

酶法结合超声波提取粉葛葛根素的研究

李甜甜¹, 傅舒^{2,3}, 刘晓风², 李东², 王舒雅¹, 郑涛^{1,*}

(1.南京工业大学, 江苏南京 211816; 2.中国科学院成都生物研究所, 四川成都 610041;
3.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:目的:以提高粉葛葛根素的得率为目的。方法:在优选出纤维素酶结合超声波的方法基础上,采用单因素实验和响应面实验法,对影响酶解反应的主要因素进行了优化。结果:最佳酶解反应条件为固液比 1:31(g/mL)、酶解时间 9.8h、酶添加量 31.84U/g,超声条件为功率 150W、频率 40kHz、时间 30min。在此条件下得率为 0.728%,比优化前提高 15.37%,比单纯超声波提取法和传统乙醇浸提法分别高出 24.7%和 28.0%。结论:初步建立了纤维素酶结合超声波技术提取粉葛葛根素的最优工艺条件。

关键词:纤维素酶,粉葛,葛根素,因素,响应面分析

Research of enzymatic hydrolysis assisted ultrasonic for extraction of puerarin from Kudzu

LI Tian-tian¹, FU Shu^{2,3}, LIU Xiao-feng², LI Dong², WANG Shu-ya¹, ZHENG Tao^{1,*}

(1.Collage of Biotechnology and Pharmaceutical, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China;
2.Chengdu Institute of Biology, Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;
3.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To increase yield of puerarin, enzymatic hydrolysis assisted ultrasonic extraction was used to extract puerarin from Kudzu. A Box-Behnken design (BBD) involving three main variables such as solid-liquid ratio, enzymatic time and enzyme dosage at three levels was employed based on single factor experiments. The optimal values of these variables were determined by response surface analysis. The optimal conditions were as follows: solid-liquid ratio of 1:31(g/mL), enzymatic time of 9.8h and enzyme dosage of 31.84U/g. Moreover, the validity of the established model was verified. The experimental yield of puerarin of 0.728% was in good agreement with the predicted one of 0.723%, which was 15.37% higher than unoptimized group and separately 24.7% and 28.0% higher than ultrasonic extraction and ethanol extraction methods.

Key words: cellulase; Kudzu; Puerarin; factors; response surface analysis

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)13-0175-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.028

葛素有“北参南葛”、“亚洲人参”之美称,是国家卫生部首批批准的药食同源药食两用植物^[1-2]。葛根为豆科多年生落叶藤本植物甘葛藤(*P.thomsoni Benth*)的干燥根,富含葛根淀粉和葛根黄酮(含量约为1%~12%)。其中葛根黄酮的主要成分为葛根素、大豆苷、大豆苷元等,具有抗癌、抗衰老、降低胆固醇、治疗心脑血管疾病、解酒等功效^[3-5],因此,对葛根有效成分的提取方法的研究对开发该植物资源具有重要意义。

目前,葛根素的提取分离方法有回流法、渗漉法、浸渍法、煎煮法等^[6-7],但存在原料消耗大、产率低、提取时间长的问题^[8]。近年来,酶技术作为新的

强化提取技术发展迅速,具有传质速率高,能耗低、有机溶剂用量少、提取物稳定等特点。纤维素酶可降解 β -1,4糖苷键从而破坏植物细胞壁,加速有效成分的溶出,提高有效成分的提取率^[9-10]。邢秀芳等^[11]将纤维素酶用于葛根异黄酮的提取工艺中,通过对比实验加酶处理得到的样品比未加酶的葛根异黄酮的收率提高了13%。超声提取法是近年来较新型的提取方法,超声空化作用有助于破坏细胞膜,促进物质释放与溶出,且超声波的不断振荡和热效应有助于溶质扩散,具有效率高、提取时间短、能耗低、节约溶剂等优点,已广泛应用于化合物及生物活性成分等物质的提取^[12-13]。

收稿日期:2014-08-21

作者简介:李甜甜(1989-),女,硕士,研究方向:天然产物提取。

*通讯作者:郑涛(1982-),男,博士,研究方向:生物质能资源化利用、生物电化学合成、天然产物绿色提取技术等。

基金项目:中国科学院环境与应用微生物重点实验室开放基金项目(KLCAS-2013-05);江苏省自然科学基金(BK20130932);江苏省高校自然科学基金(13KJB530009)资助。

酶法结合超声波技术用于天然产物活性成分的提取,已有相关报道,例如灵芝多糖、山楂总黄酮等^[14-15],但将该技术用于提取葛根中有效成分至今未见文献报道。因此,本文对酶解提取葛根素的主要影响因素进行研究,并通过响应面优化法得出了纤维素酶结合超声波技术提取粉葛葛根素的最优工艺条件,为葛根素的工业化提取和相关功能性食品或药物的开发提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

葛根 粉葛,采集于江西省上饶横峰葛源镇。将采集样品洗净,去除表面泥沙,晾干、切成片状,于60℃烘干、粉碎,过60~80目筛后于干燥器中保存备用;葛根素对照品(纯度≥98%) 国药生物制品检定所;纤维素酶 Celluclast 1.5L(反应最适温度45℃,滤纸酶活(自测)为31.84U/mL) 诺维信公司。

HITACHI L2000 高效液相色谱仪 美国安捷伦公司;KQ3200DE 型数控超声波仪 昆山市超声仪器有限公司;数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;FA2004N 电子分析天平 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 葛根素提取

1.2.1.1 乙醇浸提法 准确称取若干份粉葛样品1.000g于100mL锥形瓶中,加入70%乙醇,使固液比为1:20,提取温度70℃,浸提2h。结束后离心得上清液并量取体积。

1.2.1.2 超声提取法 准确称取若干份粉葛样品1.000g于100mL锥形瓶中,加入70%乙醇,使固液比为1:20,提取温度60℃,提取30min。用功率为150W、频率为40kHz的超声波器提取。结束离心得上清液并量取体积。

1.2.1.3 纤维素酶结合超声波提取法 准确称取若干份葛根样品1.000g于100mL锥形瓶中,45℃自然pH下酶解一定时间,酶解结束后离心收集上清液I。固体残渣按1.3.2超声提取条件进行提取,然后离心得上清液II。合并上清液II和I所得待测液并量取体积。

1.2.2 葛根素得率的测定 将以上三种方法所得待测液过0.45μm微孔滤膜过滤后,采用HPLC法测定葛根素浓度,并计算得率。HPLC条件是:流动相为甲醇:水25:75,流速1.0mL/min,柱温30℃,检测波长250nm,进样量5μL。标准曲线的制定:称取葛根素标准样品,用甲醇配制成0.5mg/mL的溶液,作为对照品溶液。按照一定梯度精密稀释成一系列标准溶液,以峰面积为Y值,葛根素(mg/mL)为X值计算标准曲线方程: $Y = 9 \times 10^{-7} X + 32183$, $R^2 = 0.9999$ 。待测液的测定:分别取所得的待测液,供HPLC测定分析。根据峰面积计算上清液中葛根素的得率。

$$\text{葛根素得率}(\%) = \frac{c \times v \times n}{m} \times 100$$

式中:浓度c(mg/mL);v为上清液体积(mL);n

为:稀释倍数;m为粉葛重量(mg)。

1.2.3 纤维素酶结合超声波提取葛根素的单因素实验

1.2.3.1 酶解时间对葛根素得率的影响 加入70%乙醇溶液15mL,酶添加量为0.2mL/g,分别酶解2、4、6、8、10、12、13h,反应结束后处理方法同1.2.1.3。

1.2.3.2 酶解固液比对葛根素得率的影响 酶添加量为0.2mL/g,加入70%乙醇溶液,使固液比分别为1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40(g/mL),酶解2h,反应结束后处理方法同1.2.1.3。

1.2.3.3 酶添加量对葛根素得率的影响 加入70%乙醇溶液20mL,酶解时间2h,酶添加量分别为0、0.5、1、1.5、2、2.5(mL/g),反应结束后处理方法同1.2.1.3。

1.2.4 纤维素酶结合超声波提取粉葛葛根素的响应面优化实验 响应面分析法(Response Surface Methodology)是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法^[16-17]。在单因素实验结果的基础上,进行3因素3水平的Box-Behnken设计,各因素的低、中、高水平分别以(-1,0,1)表示,见表1。获得实验数据后,进行二次回归拟合,得到带交互项和平方项的二次方程,分析各因素的主效应和交互效应,最后在在一定水平范围内确定最优实验条件,并进行验证。

表1 响应面分析因素及水平表

Table 1 Factors and levers of response surface Box-Behnken design

因素	水平		
	低水平 (-1)	中水平 (0)	高水平 (+1)
X ₁ 固液比(g/mL)	8	10	12
X ₂ 酶解时间(h)	1:25	1:30	1:35
X ₃ 酶添加量(mL/g)	1	1.5	2

2 结果与分析

2.1 不同处理方法的葛根素得率

不同处理方法的葛根素得率见表2,用超声波提取法所得的葛根素的得率比乙醇浸提法所得的葛根素的得率只提高了2.6%,但是提取时间大大缩短。粉葛经酶解后采用超声辅助提取法所得葛根素的得率比乙醇浸提法和超声波提取法分别提高了10.9%和8.05%。为了进一步提高粉葛中葛根素的得率,以下采用酶解与超声波辅助提取相结合的方法提取粉葛葛根素,并对酶解的主要影响因素进行研究。

表2 不同提取方法的葛根素得率

Table 2 Yield of puerarin with different approach method

提取方法	葛根素提取 得率(%)	提取时间 (h)
乙醇浸提法	0.569	2
超声波提取法	0.584	0.5
酶法结合超声提取法	0.631	2.5

2.2 纤维素酶结合超声波提取葛根素的单因素实验

2.2.1 酶解时间对葛根素得率的影响 酶解时间对葛根素得率的影响,结果见图1。随着酶解时间的增加,葛根素得率也随之增加。增加酶解时间能使原料中物质溶解的更加充分,当酶解时间为10h时葛根素得率达到最大值,继续增加酶解时间反而使葛根素得率下降,这可能是黄酮类物质本身易被氧化,过长时间的提取会破坏其结构,从而降低葛根素得率^[18],且提取时间越长能耗及其它经济成本越大,故10h为较合适的酶解时间。

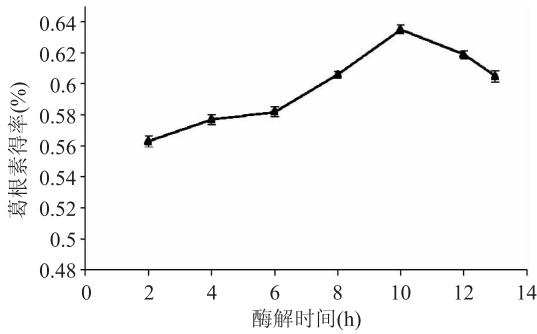


图1 酶解时间对葛根素得率的影响

Fig.1 Effect of enzymatic time on yield of puerarin

2.2.2 酶解固液比对葛根素得率的影响 根据传质速率方程^[19],溶剂的质量体积比即固液比是影响提取速率和提取得率的主要因素之一,酶解固液比对葛根素得率的影响结果见图2。随着固液比的增加,葛根素得率也随之增加,固液比为1:30(g/mL)时葛根素得率达到最高值0.662%。这是因为随着溶剂量的增大,溶剂和葛根粉末之间的接触面积变大,增加了扩散速度,有利于有效成分的溶出。当固液比大于1:30(g/mL)时,随着固液比增大葛根素得率下降,可能是随着溶剂量的继续增加,降低了酶的有效作用浓度和催化活性,从而使葛根素得率降低^[20]。从浸提效果、减少溶剂用量和降低浓缩负荷这三方面综合考虑,溶剂用量不宜过大。同时溶剂用量过大也会增加提取成本。

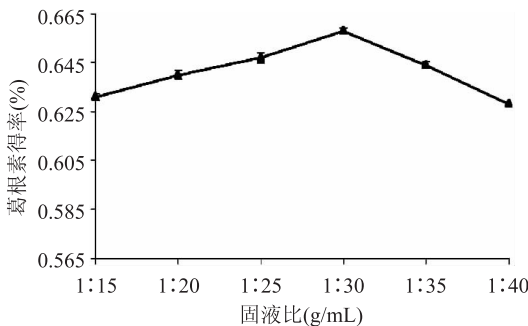


图2 酶解固液比对葛根素得率的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratios on yield of puerarin

2.2.3 酶添加量对葛根素得率的影响 酶添加量对葛根素得率的影响结果见图3。随着酶添加量的增加,葛根素得率随之增大,当酶添加量大于1.5mL/g时,葛根素得率增幅减小,可能因为葛根中纤维素成分含量一定,当其全部被纤维素酶的结合位点所结合后,即使再加酶也无多余的底物来进行酶解反应。

添加过量的酶也会增加酶解反应的不均匀性,从而影响酶解速率,所以葛根素得率增加度较小^[21-22]。从1.5mL/g酶添加量2.5mL/g比1.5mL/g时的葛根素得率只提高了1.82%,从经济成本和效率方面考虑,较佳的酶添加量为1.5mL/g。

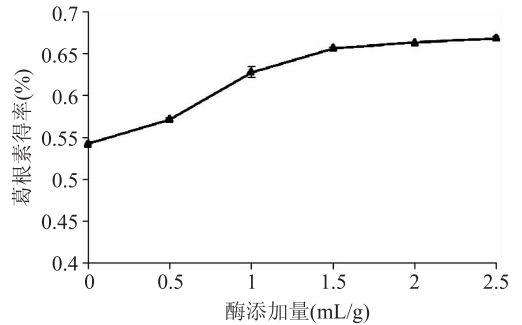


图3 酶添加量对葛根素得率的影响

Fig.3 Effect of enzyme dosage on yield of puerarin

2.3 纤维素酶结合超声波提取葛根素的响应面优化研究

在单因素实验的基础上,选择影响葛根素得率的三个主要酶解因素:固液比(X_1)、酶解时间(X_2)、酶添加量(X_3),以葛根黄酮的主要成分葛根素得率为响应值,进行响应面分析实验。实验设计与结果见表3。

表3 响应面实验设计及结果

Table 3 Design and result of response surface methodology

实验号	X_1 固液比	X_2 酶解时间	X_3 酶添加量	葛根素得率 (%)
1	0	-1	-1	0.712
2	-1	1	0	0.707
3	0	0	0	0.722
4	1	0	-1	0.705
5	0	0	0	0.721
6	0	0	0	0.722
7	-1	0	-1	0.707
8	0	1	1	0.686
9	0	-1	1	0.652
10	-1	-1	0	0.633
11	0	0	0	0.721
12	-1	0	1	0.683
13	0	1	-1	0.688
14	0	0	0	0.701
15	1	-1	0	0.650
16	1	1	0	0.627
17	1	0	1	0.678

应用统计软件 Design-Expert 8.05b 对表3 的数据进行回归分析,得到因子 X_1 (固液比)、 X_2 (酶解时间)、 X_3 (酶添加量)与响应值 Y (葛根素得率)间的关系方程为: $Y = 0.72 - 0.007793X_1 + 0.008908X_2 - 0.013X_3 - 0.028X_1X_2 - 0.005178X_1X_3 + 0.013X_2X_3 - 0.026X_1^2 - 0.038X_2^2 + 0.003787X_3^2, R^2 = 0.9250$ 。

对上述模型进行方差分析及显著性评价,由表4

表4 二次多项模型及其各项方差分析

Table 4 Variance analysis of second order polynomial equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率 p	显著性
模板	0.016	9	1.771E-003	9.60	0.0035	显著
X_1	5.019E-004	1	5.019E-004	2.72	0.1431	
X_2	5.720E-004	1	5.720E-004	3.10	0.1217	
X_3	1.252E-003	1	1.252E-003	6.78	0.0352	
X_1X_2	3.334E-003	1	3.334E-003	18.07	0.0038	
X_1X_3	1.146E-004	1	1.146E-004	0.62	0.4567	
X_2X_3	5.711E-004	1	5.711E-004	3.09	0.1220	
X_2^2	2.376E-003	1	2.376E-003	12.87	0.0089	
X_2^2	5.756E-003	1	5.756E-003	31.18	0.0008	
X_2^3	4.517E-005	1	4.517E-005	0.24	0.6360	
误差总计	1.292E-003	7	1.846E-004			
失拟误差	9.648E-004	3	3.216E-004	3.93	0.1096	不显著
纯误差	3.272E-004	4	8.180E-005			
总计	0.017	16				

可见,该模型 $p = 0.0035 < 0.01$,失拟项 $p = 0.1096$,表明该模型失拟不显著,回归极显著。一般认为,相关系数 R^2 大于 0.9,表明预测值能与实验值具有高度相关度^[23],该方程系数 $R^2 = 0.9250$,进一步说明回归模型与实验数据的拟合性较好,能够解释葛根素得率的变化,可以应用于酶解提取葛根素得率的理论预测。

依据模型参数 F 值的大小,各影响因素对响应目标值葛根素得率的影响程度依次为酶添加量 > 酶解时间 > 固液比。此外,一次项中 X_3 的回归系数显著,说明酶添加量对葛根素得率有显著影响;交互项中 X_1 与 X_2 的偏回归系数极显著,说明固液比与酶解时间的交互项对葛根素得率有显著 ($p < 0.05$) 影响,而其余的交互作用不显著。响应面图形是响应值对各因素 (X_1 、 X_2 、 X_3) 所构成的三维空间的曲面图,根据回归方程,将一个影响因子固定在其中中心水平 ($X_n = 0$),得到其它两个因素交互作用的响应曲面,可以直观的从图 5、图 6 看出。

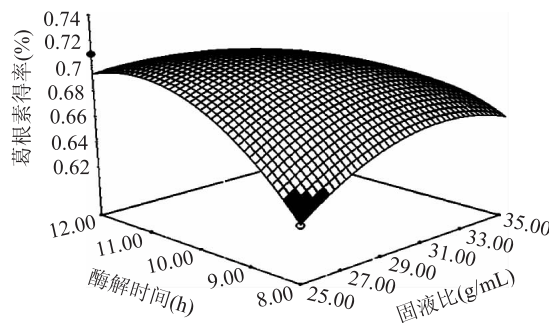


图4 固液比与酶解时间对葛根素得率的响应面曲面图

Fig.4 Response surface of the solid-liquid ratio and hydrolysis time on the yield of puerarin

通过回归模型理论预测酶粉葛提取葛根素的最佳条件为 X_1 为 1:31.35, X_2 为 9.81, X_3 为 1,即固液比 1:31.35,酶解时间 9.81h、酶添加量为 1mL/g (31.84U/g),在此条件下从粉葛提取葛根素的理论预测值可达 0.723%。考虑到实际操作的可行性,将酶法结合超

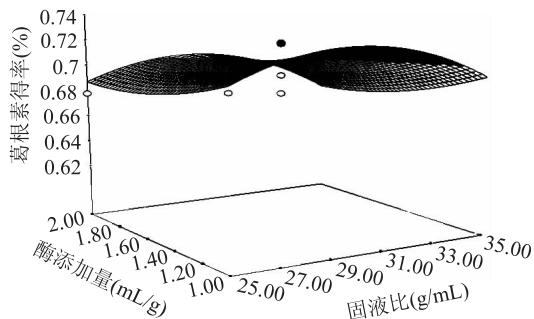


图5 固液比与酶添加量对葛根素得率的响应面曲面图

Fig.5 Response surface of the solid-liquid ratio and enzyme dosage on the yield of puerarin

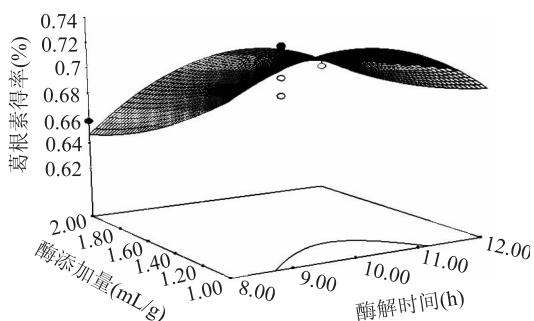


图6 酶解时间与加酶量对葛根素得率的响应面曲面图

Fig.6 Response surface of the hydrolysis time and enzyme dosage on the yield of puerarin

声波提取粉葛根素的最佳反应条件修正为:固液比 1:31,酶解时间 9.8h,加酶量 1mL/g。

2.4 纤维素酶结合超声波提取葛根素最优工艺条件的验证实验

采用固液比 1:31 (g/mL),酶解时间 9.8h、酶添加量为 1mL/g 进行验证实验,共进行 4 次实验,平均值为 0.728%,与预测值 0.723% 较为接近,相对误差为 0.69%,比优化前 (0.631%) 提高了 15.37%,比传统乙醇浸提法 (0.569%) 和单纯超声波提取法 (0.584%) 分别提高了 28.0% 和 24.7%,表明本文建

立的酶法结合超声波提取粉葛葛根素最优工艺条件,既能提高提取得率,又具有一定的可靠性和重现性。

3 结论

本论文以提高葛根素提取得率为目的,通过单因素实验和响应面优化研究,建立了纤维素酶结合超声波提取粉葛葛根素的最优工艺条件,即固液比 1:31(g/mL)、酶解时间 9.8h、酶添加量 31.84U/g,超声功率 150W、频率 40kHz、时间 30min。在该条件下,葛根素的提取得率达 0.728%,比优化前提高了 15.37%,比传统乙醇浸提法(0.569%)和单纯超声波提取法(0.584%)分别提高了 28.0%和 24.7%。

2010 年版《中国药典》规定,粉葛葛根素含量应不低于干燥品质量的 0.30%方可入药^[2]。本文所选用的葛根品种总黄酮得率达到 2.1%,葛根素得率达到 0.728%,符合药用要求。其鲜葛根淀粉含量高达 70.9%,可广泛应用于保健食品行业,具有很高的经济价值。该品种已实现大规模的种植加工,是综合开发利用葛根资源的较优选择。

目前工业中常用的醇水提取方法中有效成分提取率低、工序复杂等问题,而酶解与超声提取法两种提取技术连用可以实现优势互补,在温和可控制的条件下提取出更多的黄酮类物质,在保健食品及药物开发中具有很大的开发前景和应用潜力。

参考文献

- [1] 李悦,李艳菊.国内外葛根功能食品研究进展[J].食品研究与开发,2007(12):174-176.
 - [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2010:272
 - [3] 王靖,吉民,华维一,等.葛根素研究进展[J].药学进展,2003,02:70-73.
 - [4] 苗慧,肖文彬,秦伯益.异黄酮化合物的药理作用[J].国外医学:药学分册,1989,16(6):355-358.
 - [5] Wong KH, Li G, Li KM, et al. Kudzu root: traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular disease. J Ethnopharmacol, 2011, 134: 584-607.
 - [6] 欧阳平,张高勇,康保安.类黄酮提取的基本原理、影响因素和传统方法[J].中国食品添加剂,2003,05:54-57.
 - [7] 赵浩如,邝凤香.葛根总黄酮的提取方法研究[J].中成药,2000,22(11):756-757.
 - [8] 许明淑,罗明芳,邢新会,等.酶法强化中药提取的研究进
- (上接第 174 页)
- 17-23.
 - [22] 贡汉生,孟祥晨,刘红娟,等.一株布氏乳杆菌细菌素的初步纯化与部分特性[J].微生物学通报,2008,35(2):193-199.
 - [23] 牛爱地,韩建春.一株从酸菜中分离的产细菌素乳杆菌的鉴定及其所产抑菌物质的研究[J].东北农业大学学报,2009,40(10):104-108.
 - [24] Atrih A, Rekhif N, Moir A J G, et al. Mode of action,

展[J].中国中医药信息杂志,2005,12(12):37-39.

- [9] 李雄彪,吴奇.植物细胞壁[M].1.北京:北京大学出版社,1993:671
- [10] 王剑文,许云峰,周建芹,等.酶法辅助强化中药提取过程研究进展[J].生物加工过程,2008,06:6-11.
- [11] 刑秀芳,马云,于宏芳,等.纤维素酶在葛根总黄酮提取工艺中的应用[J].中草药,2001,32(1):37-38.
- [12] 陈雅维,周惠云,王建普.纤维素酶解-超声偶联法提取葛根中总异黄酮的工艺优化.天然产物研究与开发.2012,24:933-938
- [13] Kwun KH, Kim GJ, Shin HJ. Ultrasonication assistance increases the efficiency of isoflavones extraction from Kudzu (Pueraria lobata Ohwi) Roots Waste. Biotech and Bioprocess Engineering, 2009, 14: 345-348
- [14] 郑静,常迺滔,林英,等.超声波法和超声波酶法提取灵芝多糖的条件研究[J].食用菌学报,2006,13(1):48-57.
- [15] 高文秀,杨艳艳,赵文卓,等.复合酶解法协同超声波法提取山楂中总黄酮的工艺条件优化[J].食品工业科技,2014,02:175-178+182.
- [16] Reddy LVA, Wee YJ, Ryu HM, et al. Optimization of alkaline protease production by batch culture of Bacillus sp.RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches[J]. Biores Tech, 2008, 99: 2242-2249.
- [17] Wu YF, Wang XS, Fan EG. Optimization of ultrasound-assisted extraction of puerarin and total isoflavones from Puerariae Lobatae Radix (Pueraria lobata (Wild.) Ohwi) with response surface methodology. Phytochem Anal, 2012, Vol.23(5), pp.
- [18] 吴梅林,周春山,陈龙胜,等.酶法提取银杏黄酮类化合物研究[J].天然产物研究与开发,2004,06:557-560.
- [19] Leigh Hagenson Thompson, L K Doraiswamy. The rate enhancing effect of ultrasound by inducing supersaturation in a solid-liquid system. Chemical Engineering Science, 2000, 55: 3085-3090.
- [20] 黄雅维,张延萍,周冬菊,等.响应面法优化葛根总黄酮的超声辅助提取工艺[J].食品科学,2012,14:41-44.
- [21] 黄彤,李丽华,刘蕾,等.纤维素酶预处理对葛渣异黄酮提取的影响[J].四川农业大学学报,2013,01:42-48.
- [22] 魏金莹.纤维素酶在中药材提取中的应用研究[D].天津:天津大学,2006.
- [23] Wood JM, Bremer E, Laszlo N. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria comparative. Biochem Physiol, 2001, 130: 437-460.
- purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an antilisteria bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum C19 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 68(1/2): 93-104.
- [25] Odorov S D, Dicks L M T. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by Pediococcus pentosaceus ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(1): 365-370.