

文章编号:1671-1513(2012)05-0032-06

纤维素酶提取漳州血柚皮总黄酮的工艺研究

陈文娟¹, 陈建福²

(1. 漳州城市职业学院 生物与环境工程系, 福建 漳州 363000;

2. 漳州职业技术学院 食品与生物工程系, 福建 漳州 363000)

摘要:以漳州血柚皮为原料,利用纤维素酶对血柚皮总黄酮进行提取,并以硝酸铝显色法测定总黄酮提取率.分别对酶用量、pH值、酶解温度、酶解时间进行单因素实验和正交试验,并通过极差、方差分析对提取过程显著影响提取率的因素进行统计分析.结果表明,纤维素酶提取血柚皮中的总黄酮的优选工艺条件为:酶用量5.5%,pH 5.2,酶解温度52℃,酶解时间为50 min,该工艺条件下血柚皮总黄酮的提取率可达1.52%.

关键词:血柚皮;总黄酮;纤维素酶

中图分类号:TS201.2;R284.2

文献标志码:A

平和红肉蜜柚是一种由漳州平和传统的琯溪蜜柚基因芽变而诞生的柚类新品种,素有“天然水果罐头”之称,因其肉色血红,坊间有人形象地称之为“血柚”,血柚所含的天然色素对人体具有一定的保健作用^[1-3].血柚皮占整个血柚果质量的40%,血柚皮中还含有经济价值高的黄酮类化合物等活性成分,具有多种生物学活性和药理作用,可作为消炎、抗病毒、抗过敏、镇痛、降低血黏度和活血解痉类药物的主要成分^[4-7].酶法辅助提取是近年来广泛应用的一种优良的提取方法,纤维素酶能催化使植物组织细胞壁疏松、破裂,提高传质系数,具有生产能耗低,提取率高,环境污染小等优点,在生物活性物质的提取方面越来越受到广泛的重视^[8-9].本文采用纤维素酶提取血柚皮中的总黄酮,并对提取工艺参数进行优化,为血柚皮的深加工提高附加值提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;SHZ-

D循环水式真空泵,郑州长城科工贸有限公司;UV-2000型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;HH-4型数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;DHG-9076A电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司.

纤维素酶,宁夏和氏璧生物技术有限公司;芦丁标准品,上海沪宇生物试剂公司;乙醇,分析纯,使用时,配制浓度(体积分数,下同)为70%或80%的乙醇溶液;亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯,使用时,配制成不同质量分数的溶液;盐酸、磷酸盐根据所需pH值配制成缓冲溶液;血柚皮,漳州市售血柚.

1.2 实验方法

1.2.1 总黄酮标准曲线的绘制

准确称取105℃下干燥至恒重的芦丁标准品10 mg,用80%的乙醇溶液溶解并定容至100 mL,摇匀得到100 mg/L标准品溶液.分别量取上述标准品溶液0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL分别置于10 mL的容量瓶中,加0.3 mL质量分数为5%的NaNO₂溶液,摇匀放置6 min,再加0.3 mL质量分数为10%的

收稿日期:2012-05-15

基金项目:福建省教育厅科技计划项目(JB11310).

作者简介:陈文娟,女,助教,硕士,主要从事食品科学与工程方面的研究;

陈建福,男,讲师,博士,主要从事食品与生物工程方面的研究.通讯作者.

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,放置 6 min,再加 4 mL 质量分数为 4% 的 NaOH 溶液,摇匀放置 20 min,加 80% 乙醇至刻度,摇匀,放置 30 min,在 510 nm 波长处测定吸光度,并绘制总黄酮质量浓度与吸光度的标准曲线。

1.2.2 血柚皮总黄酮的提取

将市场采购的血柚剥皮,将血柚皮自然晾干,于 50 °C 干燥箱中干燥至恒重,冷却,粉碎,过 100 目筛备用。准确称取备用的血柚皮粉末 5 g,置于 250 mL 的烧瓶中,加入适量的酶(质量分数,以血柚皮粉末量为基准,下同),以缓冲溶液调节 pH 值,在设置的条件下酶解,酶解结束后于 95 °C 水浴 5 min 灭酶,抽滤,收集滤渣和滤液,备用。将酶解后的滤渣加入 70% 乙醇,在料液比 1:30,提取温度 60 °C 提取 1 h,抽滤,滤液与酶解后得到的滤液合并置于旋转蒸发器减压浓缩,定容,按照 1.2.1 的方法,在 510 nm 下测定样品液的吸光度,根据标准曲线的回归方程,计算血柚皮中总黄酮的提取率,见公式(1)。

$$\text{血柚皮酮提取率}\% = \frac{C \times V}{m \times 10^3} \times 100, \quad (1)$$

式(1)中: C 为按照标准曲线计算出的总黄酮质量浓度,mg/L; V 为提取液体积,L; m 为提取血柚皮的质量,g。

2 结果与讨论

2.1 总黄酮提取率的影响因素

2.1.1 酶用量对血柚皮总黄酮提取率的影响

纤维素等多糖类物质被纤维素酶水解后,会导致细胞壁的部分破损,使得细胞膜变得疏松,增加了向主体溶剂扩散的扩散系数,有利于细胞内的总黄酮类物质的浸提。在 pH 5.5,酶解温度 55 °C,酶解时间 60 min 的条件下,考察酶用量对血柚皮中总黄酮提取率的影响,其结果见图 1。

从图 1 中可以看出,随着纤维素酶用量的增加,总黄酮提取率增大,当酶用量达到 0.6% 时,提取率达到最大值,继续增加酶的用量,提取率反而下降。这是因为随着酶用量的增加,酶浓度增大,提高了酶促进反应速率,增大了酶对细胞壁的破坏能力,使得黄酮类物质提取率增加;但当酶用量达到 0.6% 时,溶液中底物的接触点已被酶所饱和,继续增加酶用量,酶的作用受到抑制;可能因为过量的酶包裹在血柚皮粒子表面阻碍黄酮类物质透过细胞膜

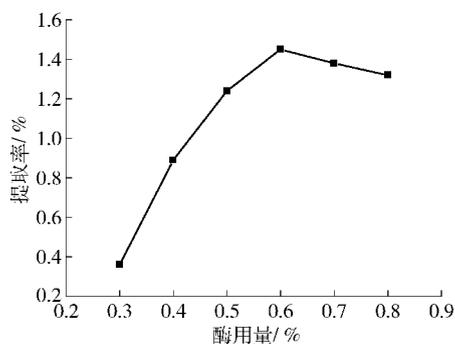


图 1 酶用量对总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of enzyme concentration on extraction efficiency of total flavonoids

进入水溶液而使其提取率下降。因此较佳的酶用量为 0.6%。

2.1.2 酶解 pH 值对血柚皮总黄酮提取率的影响

酶是具有两性电解质的一种蛋白质,酶分子依靠酸性或碱性氨基酸的侧链基团而形成活性部位,pH 值的变化将直接影响到酶的活化以及酶与底物的亲和力。

在酶用量质量分数为 0.6%,酶解温度 55 °C,酶解时间 60 min 的条件下,考察溶液 pH 值对血柚皮中总黄酮提取率的影响,其结果见图 2。

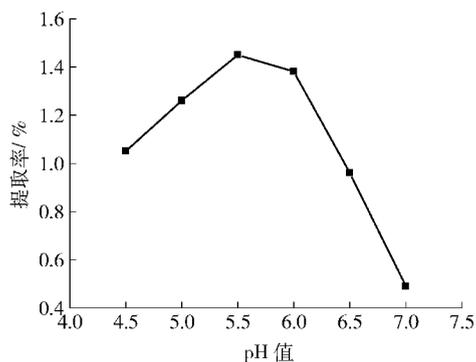


图 2 酶解 pH 值对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of pH on extraction efficiency of total flavonoids

从图 2 中可以看出,随着 pH 值的升高,总黄酮提取率增加,当 pH 值达到 5.5 时,提取率达到最大,继续增大 pH 值,总黄酮提取率却急剧下降。这是因为当 pH 值小于 5.5 时,溶液中酸性太强,纤维酶的活性较低,总黄酮提取率较小;当 pH 值处于 5.5 时,纤维素酶处于较佳 pH 值状态,能够发挥纤维素酶的最大活力,使得总黄酮提取率达到最大;当 pH 值大于 6 之后,总黄酮提取率急剧下降,这是因为酶分子在 pH 值大于 6 后,可能会引起酶空间结构的破坏,而引起酶的变性,使得底物不能与酶结

合,使酶活力下降,导致总黄酮的提取率下降.因此,较佳的pH值为5.5.

2.1.3 酶解温度对血柚皮总黄酮提取率的影响

在酶用量0.6%,pH 5.5,酶解时间60 min的条件下,考察酶解温度对血柚皮中总黄酮提取率的影响,其结果见图3.

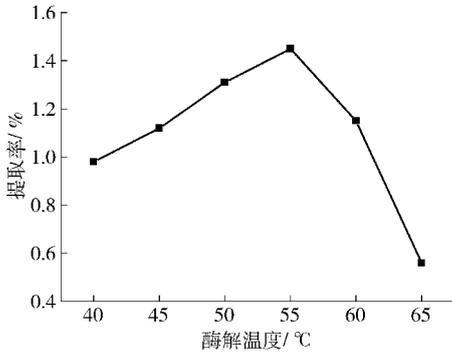


图3 酶解温度对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of hydrolysis temperature on extraction efficiency of total flavonoids

从图3中可以看出,随着温度的升高,酶的活性增大,总黄酮的提取率也增大,但当温度超过55°C时,总黄酮提取率却急剧下降,这是因为温度较低时,酶的活性随着温度的升高而增大,反应速率增大,使得总黄酮提取率增大,当温度超过55°C时,可能会使酶蛋白结构开始变化,酶活性减弱,并逐渐丧失催化能力,使得总黄酮提取率下降.因此适宜的酶解温度为55°C.

2.1.4 酶解时间对血柚皮总黄酮提取率的影响

在酶用量0.6%,pH 5.5,酶解温度55°C的条件下,考察酶解时间对血柚皮总黄酮提取率的影响,其结果见图4.

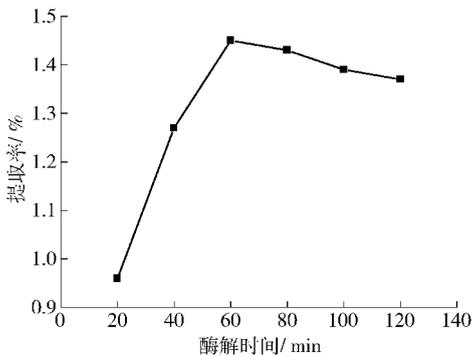


图4 酶解时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of length of hydrolysis time on extraction efficiency of total flavonoids

从图4中可以看出,随着酶解时间的延长,总黄

酮提取率增大,当酶解时间达到60 min时,总黄酮提取率达到最大,继续延长酶解时间,总黄酮提取率反而下降.这是因为酶解时间太短时,酶活力尚未充分利用,随着时间的延长,酶解反应比较完全,当酶解时间达到60 min时,血柚皮中的总黄酮几乎溶出;继续延长酶解时间,提取率不再增加,且时间过长容易导致黄酮类物质不稳定发生分解或者转化为其他物质.因此适宜的提取时间为60 min.

2.2 正交试验优选血柚皮总黄酮提取工艺

在单因素实验的基础上,选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行正交试验,以酶用量、pH值、酶解温度、酶解时间为试验因素,每个因素取4水平进行优选,以总黄酮提取率为考察指标,并进行极差分析确定酶解法提取血柚皮中总黄酮的优选工艺参数,其结果见表1~3.

表1 正交试验因素水平表 $L_{16}(4^5)$

Tab. 1 Factor levels of orthogonal experiments $L_{16}(4^5)$

水平	因素			
	A 酶用量/%	B pH值	C 酶解温度/°C	D 酶解时间/min
1	0.50	6.0	60	50
2	0.55	5.8	58	55
3	0.60	5.5	55	60
4	0.65	5.2	52	65

由表2的极差可知,影响纤维素酶水解法提取血柚皮中总黄酮的工艺中各影响因素的主次为: $B > A > C > D$,即pH值 > 酶用量 > 酶解温度 > 酶解时间,优选工艺为 $B_4A_2C_4D_2$.将正交结果进一步进行方差分析如表3,从表3中方差分析可以看出,pH值和酶解温度均有极显著差异($F_0 > F_{0.01}$),而酶用量和酶解时间差异显著($F_{0.05} \leq F_0 < F_{0.01}$).

2.3 正交试验各处理间的多重比较

2.3.1 酶用量各水平间差异显著性的SSR检验

酶用量各水平间差异显著性SSR检验参见表4.

从表4的SSR检验可以看出,酶用量水平2与水平3和水平1存在显著性差异($P < 0.05$),而与水平4之间存在极显著差异($P < 0.01$).水平3和水平1之间不存在显著性差异($P > 0.05$),但与水平4存在极显著性差异($P < 0.01$),水平1和水平4之间存在着显著性差异($P < 0.05$).所以较佳的酶用量为0.55%,其次为0.5%和0.6%,而0.65%不合适.

表2 总黄酮提取工艺正交试验结果

Tab.2 Orthogonal array design matrix and results

序号	A 酶用量/ %	B pH 值	C 酶解温度/ ℃	D 酶解时间/ min	E 空列	总黄酮 提取率 /%
1	1	1	1	1	1	0.94
2	1	2	2	2	2	1.12
3	1	3	3	3	3	1.17
4	1	4	4	4	4	1.29
5	2	1	2	3	4	0.95
6	2	2	1	4	3	1.12
7	2	3	4	1	2	1.42
8	2	4	3	2	1	1.45
9	3	1	3	4	2	0.95
10	3	2	4	3	1	1.23
11	3	3	1	2	4	1.25
12	3	4	2	1	3	1.24
13	4	1	4	2	3	1.02
14	4	2	3	1	4	1.18
15	4	3	2	4	1	0.95
16	4	4	1	3	2	1.06
K_1	4.52	3.86	4.37	4.78	4.57	
K_2	4.94	4.65	4.26	4.84	4.55	
K_3	4.67	4.79	4.75	4.41	4.55	
K_4	4.21	5.04	4.96	4.31	4.67	
\bar{K}_1	1.130 0	0.965 0	1.092 5	1.195 0	1.142 5	
\bar{K}_2	1.235 0	1.162 5	1.065 0	1.210 0	1.137 5	
\bar{K}_3	1.167 5	1.197 5	1.187 5	1.102 5	1.137 5	
\bar{K}_4	1.052 5	1.260 0	1.240 0	1.077 5	1.167 5	
R	0.182 5	0.295 0	0.175 0	0.132 5	0.030 0	

表3 正交试验结果方差分析

Tab.3 Variance analysis for orthogonal array design experimental results

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.069 5	3	0.023 2	28.090 9	*
B	0.194 7	3	0.064 9	78.676 8	**
C	0.079 9	3	0.026 6	32.292 9	**
D	0.052 3	3	0.017 4	21.141 4	*
误差	0.002 5		0.000 83		
总和	0.399 0				

$F_{0.05}(3,3) = 9.28; F_{0.01}(3,3) = 29.46; *, **$ 分别表示差异达0.05和0.01显著水平。

表4 酶用量各水平间差异显著性检验

Tab.4 Notability difference in enzyme concentration with statistic method of SSR

	A ₂	A ₃	A ₁	A ₄
平均值	1.235 0	1.167 5	1.130	1.052 5
5%显著水平	a	b	b	c
1%极显著水平	A	AB	AB	B

2.3.2 pH 值各水平间差异显著性的 SSR 检验

pH 值各水平间差异显著性 SSR 检验参见表5.

表5 pH 各水平间差异显著性检验

Tab.5 Notability difference pH with statistic method of SSR

	B ₄	B ₃	B ₂	B ₁
平均值	1.260 0	1.197 5	1.162 5	0.965 0
5%显著水平	a	ab	b	c
1%极显著水平	A	A	A	B

从表5的SSR检验可以看出,pH值水平4与水平3不存在显著性差异($P > 0.05$),而水平4和水平2存在显著性差异($P < 0.05$),与水平1存在极显著性差异($P < 0.01$).水平3和水平2不存在显著性差异($P > 0.05$),但与水平1存在极显著性差异($P < 0.01$),水平2与水平1存在极显著差异($P < 0.01$).所以较佳的pH值为5.2和5.5,其次是5.8,而pH=6.0不合适.

2.3.3 酶解温度各水平间差异显著性检验

酶解温度各水平间差异显著性的SSR检验参见表6.

表6 酶解温度各水平间差异显著性检验

Tab.6 Notability difference in hydrolysis temperature with statistic method of SSR

	C ₄	C ₃	C ₁	C ₂
平均值	1.240 0	1.187 5	1.092 5	1.065 0
5%显著水平	a	a	b	b
1%极显著水平	A	AB	BC	C

从表6的SSR检验可以看出,酶解温度水平4与水平3不存在显著性差异($P > 0.05$),而与水平1和水平2存在极显著性差异($P < 0.01$).水平3与水平1存在显著性差异($P < 0.05$),而与水平2存在极显著性差异($P < 0.01$).水平1与水平2之间不存在显著性差异($P > 0.05$).所以较佳的酶解温度为52℃和55℃,而58℃和60℃不适合.由于酶

解温度 52 ℃ 和 55 ℃ 不存在差异,从能源节约方面考虑,可将酶解温度参数修正为 52 ℃.

2.3.4 酶解时间各水平间差异显著性的 SSR 检验

酶解时间各水平间差异显著性的 SSR 检验参见表 7.

表 7 酶解时间各水平间差异显著性检验

Tab. 7 Notability difference of length of hydrolysis time with statistic method of SSR

	D ₂	D ₁	D ₃	D ₄
平均值	1.210 0	1.195 0	1.102 5	1.077 5
5% 显著水平	a	a	b	b
1% 极显著水平	A	AB	AB	B

从表 7 的 SSR 检验可以看出,酶解时间水平 2 和水平 1 不存在显著性差异 ($P > 0.05$),水平 2 与水平 3 存在显著性差异 ($P < 0.05$),而与水平 4 存在极显著性差异 ($P < 0.01$),水平 1 与水平 3 和水平 4 存在显著性差异 ($P < 0.05$). 水平 3 与水平 4 不存在显著性差异 ($P > 0.05$). 所以较佳的酶解时间为 55 min 和 50 min,60 min 和 65 min 不合适. 由于酶解时间 55 min 和 50 min 不存在差异,从生产时间成本考虑,可将酶解时间参数修正为 50 min.

2.4 验证结果

取一定量的血柚皮样品,根据正交极差法得到的较佳工艺条件和修正后的较佳工艺做 3 组平行实验,总黄酮的提取率测定如表 8.

表 8 实验结果验证

Tab. 8 Experiment of best condition

样品序号	1	2	3
总黄酮提取率(极差分析最佳工艺)/%	1.52	1.51	1.52
总黄酮提取率(修正后最佳工艺)/%	1.51	1.52	1.52

从表 8 中可以看出,最佳的酶提取条件所测得的总黄酮提取率均大于正交设计表中其他提取条件下总黄酮的提取率,且提取条件修正对提取结果不会产生影

3 结 论

采用纤维素酶处理血柚皮,并提取血柚皮中的总黄酮,考察了酶用量、酶解 pH 值、酶解温度、酶解

时间对总黄酮提取率的影响. 通过正交试验,优选出提取血柚皮总黄酮的较佳工艺条件为 B₄A₂C₄D₂,即为酶解 pH 5.2,酶用量 0.55%,酶解温度 52 ℃,酶解时间 55 min. 方差分析显示,酶解 pH 值和酶解温度均有极显著差异 ($F_0 > F_{0.01}$),而酶用量和酶解时间显著差异 ($F_{0.05} \leq F_0 < F_{0.01}$). 通过正交试验各因素间的多重比较,表明较佳工艺参数为酶解 pH 5.2,酶用量 0.55%,酶解温度 52 ℃,酶解时间 50 min. 通过验证较佳提取工艺 B₄A₂C₄D₂ 和修正后的工艺 B₄A₂C₄D₁ 的总黄酮提取率实验结果一致,且总黄酮提取率均大于正交设计表中其他提取条件下总黄酮的提取率,该工艺可用于血柚皮中总黄酮的提取.

参考文献:

- [1] 仇燕,仇彦博. 柚皮总黄酮超声波辅助提取工艺的研究[J]. 河北科技大学学报,2010,31(4):330-333.
- [2] 黄德发,卢勇武,黄国鸿,等. 红肉蜜柚特征及其栽培技术要点[J]. 果农之友,2011(3):24.
- [3] 杨淑文,马兴,汪业菊. 柚皮总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 辽宁师范大学学报:自然科学版,2011,34(2):225-227.
- [4] Lü H, Chen J, Li W L, et al. Hypoglycemic effect of the total flavonoid fraction from Folium Eriobotryae[J]. Phytomedicine,2009,16(10):967-971.
- [5] 覃海元,黄卫萍,农志荣,等. 正交法优化仙人掌中黄酮类物质提取条件的研究[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2007,25(4):12-14.
- [6] Shuai Zhanga, Lingli Zhengb, Lina Xua, et al. Sub-chronic toxicity study of the total flavonoids from Rosa laevigata Michx fruit in rats[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2012,62(2):221-230.
- [7] Seung C L, Seok M J, So Y K, et al. Effect of far-infrared radiation and heat treatment on the antioxidant activity of water extracts from peanut hulls[J]. Food Chemistry, 2006,94(4):489-493.
- [8] 窦岫,任文雅,杨春霞,等. 酶解大豆粉蛋白条件优化研究[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2011,29(2):28-32.
- [9] 喻春皓,张萍,王宏志,等. 纤维素酶提取湘西椴柑皮中总黄酮的工艺优化研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(35):17692-17694.

Extraction of Total Flavonoids from Blood Pummelo Peel by Cellulase Hydrolysis

CHEN Wen-juan¹, CHEN Jian-fu²

(1. Department of Biological and Environmental Engineering, Zhangzhou City University, Zhangzhou 363000, China;

(2. Department of Food and Biology Engineering, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: The total flavonoids from blood pummelo peel was prepared by cellulose enzyme hydrolysis, and the extraction yield was measured by coloration method with aluminum nitrate. The effects of parameters including enzyme concentration, pH, hydrolysis temperature and hydrolysis time on extraction yield were investigated by single factor test and orthogonal array design methods. And the notability difference was analyzed with the statistic method of range and variance. The results showed that the optimal conditions were as follows: the enzyme concentration was 5.5%, pH was 5.2, hydrolysis temperature was 52 °C, and the hydrolysis time was 50 min. The extraction yield of the total flavonoids from blood pummelo peel reached up to 1.52%.

Key words: blood pummelo peel; total flavanoids; cellulase

(责任编辑:檀彩莲)

(上接第31页)

Optimization of Peanut Oil Extraction with Supercritical Carbon Dioxide by Response Surface Methodology

LI Lin-jing¹, ZHANG Bao¹, LI Gao-yang^{1,2,3}

(1. Longping Branch Graduate School, Central South University, Changsha 410125, China;

2. Hunan Food Testing Analysis Center, Changsha 410125, China;

3. Hunan Agricultural Product Processing Institute, Changsha 410125, China)

Abstract: A method utilizing supercritical CO₂ fluid extraction (SFE-CO₂) technology to extract peanut oil was described. The optimum technological conditions were obtained by single-factor and response surface experiments, and the effect of parameters such as peanut granularity, extraction pressure, time, temperature and supercritical CO₂ flow on extraction rate were investigated. The highest extraction rate of 96.16% was achieved under the optimum extraction conditions of 20 mesh peanut, 20 L/h CO₂ flow, the pressure of 24 MPa, and 43 °C for 110 min. The unsaturated fatty acids content of peanut oil with the SFE-CO₂ fluid extraction (mainly linoleic acid and oleic acid) reached as high as 78%, in line with the level of first-class peanut oil standard.

Key words: supercritical CO₂; peanut oil; response surface; fatty acids

(责任编辑:叶红波)