

酶辅助提取莲房原花青素工艺及其抗氧化活性研究

禹华娟, 孙智达*, 谢笔钧

华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070

摘要: 主要用纤维素酶和果胶酶对莲房组织进行酶解, 以提高莲房原花青素提取率。采用四因素三水平正交实验对酶解时间、加酶量和酶解温度等提取工艺参数进行优化, 获得了最佳工艺参数为纤维素酶添加量为 0.7%, 果胶酶添加量 0.1%, 酶解温度 55℃, 酶解时间 2.5 h, 优化后的提取工艺与直接醇提法相比, 能将莲房原花青素的提取率提高约 48%。在此基础上采用 DPPH 法进行了抗氧化性的对比, 结果表明酶辅助提取和醇提法提取的原花青素有着相同的抗氧化性。

关键词: 纤维素酶; 果胶酶; 正交实验; 高效液相色谱; DPPH; 原花青素

中图分类号: Q946.91; R285; TS201.1

文献标识码: A

Enzyme Assistant Extraction of Procyanidins from Seedpod of Lotus and the Comparison of antioxidant Activity

YU Hua-juan, SUN Zhi-da*, XIE Bi-jun

Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: To increase the extraction ratio of procyanidins from Seedpod of the lotus (LSPC), the cellulase and pectase have been used in the extraction process. An orthogonal experiment is carried out to optimize the parameters of enzyme time, temperature and so on. The best technic parameters are like this: the amount of cellulase is 0.7%, the amount of pectase is 0.1%, enzyme temperature is 55℃, enzyme time is 2.5 h. Compare with the method of ethanol extraction, the technic after optimize can increase the extraction ratio greatly. The inoxidability of samples has been compared by DPPH, the result indicate that all samples have same inoxidability.

Key words: cellulase; pectase; orthogonal experiment; HPLC; DPPH; procyanidins

原花青素 (Procyanidins, 简称 PC) 是一类多酚化合物的总称, 由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成, 广泛存在于植物类食品中, 尤其是水果蔬菜中含量丰富。各国学者对上百种植物原花青素尤其对葡萄籽原花青素进行了广泛而深入的研究, 发现具有抗氧化、抗衰老、增强心血管活性等多种生物活性和药理作用^[1]。

莲房是莲科植物莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 的成熟花托 (又名莲蓬壳, Seedpod of the lotus, 简称 LS), 莲房作为传统中药材, 功效已为人所熟知。本实验室分离并证明了原花青素是莲房的主要活性成分之一, 并且鉴定其有抗氧化^[2], 免疫调节^[3]等多种生理功能。莲原花青素的提取主要有水浸提

法^[4]和有机溶剂提取法^[5], 但由于原花青素与莲房的纤维组织结合较紧密, 不容易溶出, 所以提取率较低, 只有 10%~15%。植物细胞壁主要成分是纤维素 (cellulose), 还有半纤维素和果胶质 (pectin)。选用纤维素酶和果胶酶的复合酶作用于莲房, 可以使细胞壁及细胞间质中的纤维素、半纤维素、果胶等物质降解, 引起细胞壁及细胞间质结构产生局部疏松、膨胀、崩溃等变化, 从而增大有效成分的扩散面积, 促进有效成分提取率提高^[6]。因此, 本实验采用纤维素酶和果胶酶对莲房原花青素的提取工艺进行优化, 对其结构进行了鉴定, 且对其抗氧化活性进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜莲房 (武植 2 号), 2008 年 7 月采自武汉汤逊湖。

葡萄籽原花青素标准品 (天津市尖峰天然产物

收稿日期: 2009-06-17 接受日期: 2009-09-15

基金项目: 国家 863 计划 (2007AA100401)

*通讯作者 Tel: 86-532-88963253; E-mail: sunzhida@mail.hzau.edu.cn

研究开发有限公司); AB-8大孔吸附树脂(南开大学化工厂); DPPH·(Sigma公司产品); 儿茶素, 表儿茶素(Sigma公司产品); 维生素C(中国医药集团上海化学试剂有限公司); 甲醇、乙醇、盐酸、铁氰化钾均为分析纯。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅(江苏省医疗器械厂); 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI公司 RE-111型); 755B紫外可见分光光度计(上海菁华); 电子天平(德国 Sartorius); Waters高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司)

1.3 实验方法

1.3.1 莲房原花青素的酶辅助提取

称取 50 g新鲜莲房, 手工撕碎, 加入 500 mL蒸馏水, 加入酶作用一段时间, 过滤, 滤液用旋转蒸发仪蒸干大部分水分, 余下的滤液配成 500 mL 60%的乙醇溶液在 60 °C条件下浸提 2 h, 在 50 °C条件下用旋转蒸发仪将乙醇蒸出, 所剩体积约为原体积的五分之一, 过滤后定容, 即得提取液。将提取液稀释一定的倍数, 测定原花青素的含量。

1.3.2 莲房原花青素酶辅助提取工艺优化

其他条件一致时, 分别研究酶解时间, 酶解温度, 纤维素酶添加量, 果胶酶添加量对原花青素提取含量的影响。在单因素实验结果的基础上, 用正交实验设计方法对主要因素进行优化分析, 以确定最佳的酶辅助提取的工艺。

1.3.3 莲房原花青素的纯化

在最优工艺的条件下提取莲房原花青素, 提取液上 AB-8大孔吸附树脂, 采用 10倍量蒸馏水和 50%的乙醇分步洗脱, 将洗脱液真空浓缩, 冷冻干燥并测定原花青素的含量。

1.4 测定方法

1.4.1 铁盐催化法测定原花青素含量

以葡萄籽原花青素为标准品, 分别配置浓度为 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 mg/mL的标准甲醇溶液, 将样品配成 0.1 mg/mL的甲醇溶液, 采用铁盐催化比色法^[7]在 546 nm处比色, 测定样品中原花青素含量。做标准曲线并得回归方程为 $y = 5.1435x + 0.0067$, $r^2 = 0.9992$ 计算出得率和纯度。

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{样品中原花青素质量}}{\text{莲房质量}} \times 100\%$$

$$\text{纯度}(\%) = \frac{\text{样品中原花青素质量}}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

1.4.2 液相色谱分析

标准溶液的配制: 标准溶液为 25×10^6 mg/L的儿茶素(C)和 35×10^6 mg/L的表儿茶素(EC)甲醇溶液, 样品溶液为 1 mg/mL的甲醇溶液。

样品处理: 称取一定质量的样品, 逐滴加入蒸馏水至刚好溶解, 用三倍体积的乙酸乙酯萃取三次, 合并萃取液, 用旋转蒸发仪蒸干乙酸乙酯, 定容至 10 mL。稀释一定的倍数做液相色谱分析。

色谱条件: 色谱柱: 岛津 C18液相色谱柱(4.6 × 150 mm, 5 μm)。流动相: (A)液: 0.2%乙酸去离子水溶液, (B)液: 0.2%乙酸-乙腈溶液。梯度洗脱条件为 0~15 min, A: 95%~85%, B: 5%~15%; 15~45 min, A: 85%~50%, B: 15%~50%。流速: 1 mL/min。进样量: 20 μL。检测波长: 284 nm。

1.4.3 抗氧化性——清除 DPPH·自由基的 IC₅₀值及清除率的计算

DPPH·法是简单有效的测定天然产物抗氧化活性的方法之一。通过比较两种提取方法的莲房原花青素对 DPPH·自由基的清除效果, 计算其抗氧化能力, 并计算出自由基清除率为 50%时的自由基清除剂的浓度, 即 IC₅₀—半数抑制率浓度。

取不同稀释度的提取液 2 mL和 2×10^{-4} mol/L的 DPPH·甲醇溶液 2 mL, 加入同一具塞试管中, 摇匀, 在室温避光反应 30 min后于 515 nm处测其吸光度, 并用维生素 C溶液作为阳性对照, 计算原花青素对 DPPH·的清除率^[8], 公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$$

式中, A_0 为对照组吸光值; A_i 为样品组吸光值; A_j 为空白组吸光值。(对照组为 DPPH·分解溶液 + 2 mL水; 空白组为 2 mL分解 + 2 mL样品。)

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

在其他条件一致的情况下, 研究纤维素酶添加量, 果胶酶添加量, 酶解时间和酶解温度对原花青素提取含量的影响。其结果见下图:

由图 1~4可知, 随着酶解时间, 酶解温度和酶的添加量的增加, 原花青素的得率也是相应增加的, 但当纤维素酶添加量超过 0.5%, 果胶酶添加量超过 0.3%, 酶解时间超过 1.5 h, 酶解温度超过 55 °C的时候, 原花青素的得率反而开始下降。所以取酶解时间为 0.5~2.5 h, 酶解温度为 45~65 °C, 纤维

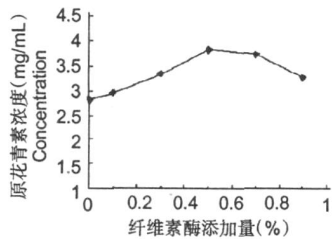


图1 纤维素酶添加量对原花青素提取率的影响

Fig. 1 Effect of cellulase on the extraction of PC

注:酶解时间:2 h;酶解温度:55 ℃;果胶酶添加量 0.3% Note: time:2 h;temperature:55 ℃;pectase:0.3%

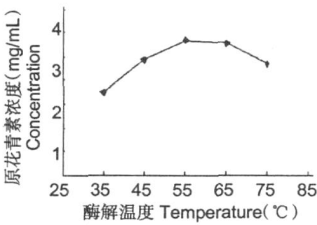


图4 酶解温度对原花青素提取率的影响

Fig. 4 Effect of enzyme temperature on the extraction of PC

注:酶解时间 2 h;纤维素酶添加量 0.5%;果胶酶添加量 0.3% Note: time 2 h; cellulase 0.5%; pectase 0.3%

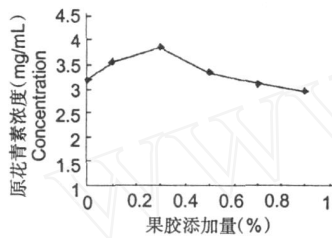


图2 果胶酶添加量对原花青素提取率的影响

Fig. 2 Effect of pectase on the extraction of PC

注:酶解时间:2 h;酶解温度:55 ℃;纤维素酶添加量 0.5% Note: time:2 h;temperature:55 ℃;cellulase:0.5%

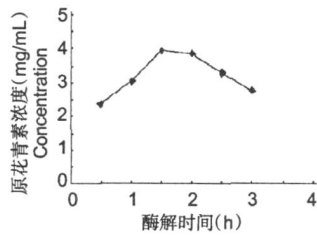


图3 酶解时间对原花青素提取率的影响

Fig. 3 Effect of enzyme time on the extraction of PC

注:酶解温度:55 ℃;纤维素酶添加量:0.5%;果胶酶添加量 0.3% Note:temperature:55 ℃;cellulase:0.5%;pectase:0.3%

素酶添加量为 0.3% ~ 0.7%,果胶酶的添加量为 0.1% ~ 0.5%进行正交实验。

2.2 正交实验结果

酶辅助提取原花青素的正交实验在单因素实验的基础上,选择 4个因素酶解时间 (A)、酶解温度 (B)、纤维素酶添加量 (C)和果胶酶添加量 (D)为研究对象,采用 4因素 3水平的正交实验来研究莲房原花青素酶辅助提取的效果,并且每个条件下做三个平行实验。以原花青素浓度为指标,4因素 3水平表如表 1所示:

根据正交实验和分析结果可知,酶解温度,酶解时间,纤维素酶添加量和果胶酶添加量对实验结果的影响按大小依次为:酶解时间 >果胶酶的添加量

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test				
因素 Factor	A 酶解温度 Temperature ()	B 酶解时间 Time (h)	C 纤维素酶量 Quantity (%)	D 果胶酶量 Quantity (%)
水平	(1) 45	(1) 0.5	(1) 0.3	(1) 0.1
Level	(2) 55	(2) 1.5	(2) 0.5	(2) 0.3
	(3) 65	(3) 2.5	(3) 0.7	(3) 0.5

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal test

实验序号 Na	A	B	C	D	实验结果 Result		
1	(1)	(1)	(1)	(1)	3.031	3.088	3.047
2	(1)	(2)	(2)	(2)	3.366	3.654	3.435
3	(1)	(3)	(3)	(3)	3.952	4.014	3.948
4	(2)	(1)	(2)	(3)	3.513	3.677	3.716
5	(2)	(2)	(3)	(1)	4.231	4.32	4.151
6	(2)	(3)	(1)	(2)	3.409	3.405	3.564
7	(3)	(1)	(3)	(2)	3.378	3.253	3.127
8	(3)	(2)	(1)	(3)	3.577	3.674	3.735

9	(3)	(3)	(2)	(1)	4.329	4.052	4.293
K1	3.504	3.314	3.392	3.860			
K2	3.776	3.794	3.804	3.399			
K3	3.735	3.907	3.819	3.756			
R	0.272	0.593	0.427	0.461			

表 3 方差分析结果
Table 3 Analysis of variance

方差来源 Origin	自由度 v	平方和 SS	离差平方和 Anova SS	均方 mean square	F值 F value	Pr > F	显著性 Significant
模型	8	4.280	-	0.535	36.81	<0.0001	**
A	2	-	0.388	0.194	13.36	0.0003	*
B	2	-	1.782	0.891	61.32	<0.0001	**
C	2	-	1.056	0.528	36.34	<0.0001	**
D	2	-	1.053	0.527	36.24	<0.0001	**

注: * 显著, ** 极显著。
>纤维素酶添加量 >酶解温度。根据 K 值分析的结果,酶辅助提取莲房原花青素的最佳条件为 A₂B₃C₃D₁,即酶解温度为 55℃,酶解时间 2.5 h,纤维素酶添加量为 0.7%,果胶酶的添加量为 0.1%,在此条件下,提取液中原花青素的平均浓度为 4.334 mg/mL。

方差分析结果如表 3 所示,通过 F 值和显著性的分析可知,本实验数据稳定可靠,具有统计学意义,并且各因素对实验结果均有显著性影响。

2.3 验证实验结果

根据正交分析的结论,采用最佳条件对分析结果进行验证。在最佳条件下,酶辅助提取原花青素的平均浓度为 4.334 mg/mL,优于正交实验中的任意一组,因此正交分析结果可信。

并且,采用普通醇提法提取的原花青素平均浓度为 2.93 mg/mL,酶辅助提取法与之相比,将提取率提高了约 48%。

2.4 莲房原花青素的纯化

采用大孔吸附树脂对提取液进行纯化,其结果

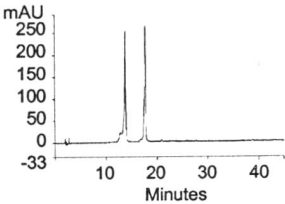


图 5 标准品 C + EC 色谱图

Fig.5 Chromatogram map of standard substance C and EC

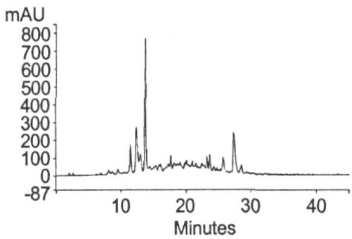


图 6 酶辅助提取的原花青素色谱图

Fig.6 Chromatogram map of PC which extract by enzyme assisted method

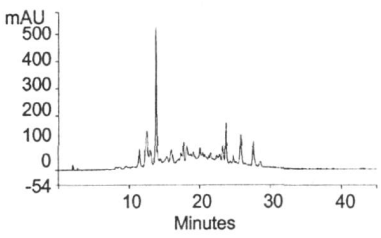


图 7 直接醇提法提取的原花青素色谱图

Fig.7 Chromatogram map of PC which extract by ethanol

表明 AB-8对莲房原花青素有很好的富集作用。在最佳的酶辅助提取条件下,纯化后的原花青素纯度可达 98%,得率为 3.86%。

2.5 液相色谱分析

由图 5 可知,儿茶素的保留时间为 13.66 min,表儿茶素的保留时间为 17.63 min。由图 6 和图 7 可知,莲房提取物原花青素的主要成分为儿茶素,此外还含有原花青素的低聚体和高聚体^[9]。并且两

种提取方法所得样品在主要组成成分上没有差异。

2.6 抗氧化性比较

分别对酶辅助醇提取的样品和普通醇提法提取的样品进行了抗氧化性的比较,并以 V_C 作为阳性对照。结果如图 8 所示。

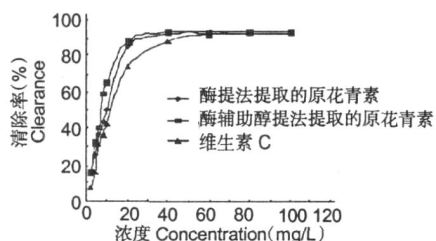


图 8 莲房原花青素清除 DPPH 的能力

Fig. 8 Inhibitory effect of LSPC on DPPH

由图 5 可以看出,酶辅助提取的莲房原花青素与直接醇提法提取的原花青素在对 DPPH·自由基的清除上有着相同的效果,酶辅助提取的原花青素清除 DPPH·的 IC_{50} 值为 6.59 mg/L,普通方法提取的原花青素 IC_{50} 值为 7.83 mg/L, V_C 的 IC_{50} 值为 11.169 mg/L。说明不同提取方法提取的原花青素有着相同的抗氧化性,且都强于 V_C 。

3 结论

由单因素实验和正交实验可知,酶辅助提取原花青素的最佳工艺条件为:酶解温度为 55℃,酶解时间 2.5 h,纤维素酶添加量为 0.7%,果胶酶的添加量为 0.1%,在此条件下,提取液中原花青素的含量为 4.334 mg/mL。高效液相色谱分析结果可知,提取物的主要成分为儿茶素及其低聚体。经 DPPH 实验证实,不同提取方法提取的原花青素有着相同的抗氧化性,且比 V_C 的抗氧化性强。

致谢:非常感谢我的导师华中农业大学食品科技学院孙智达教授和谢笔钧教授对本论文的有关实验进行的悉心指导。从试验设计到论文完成,他们都给予了极大的帮助和支持。同时也感谢华中农业

大学理学院的杨尔宁老师对我在使用仪器时给予的帮助和指导。还有实验室的各位同学对我的试验提供的帮助和支持。

参考文献

- 1 Laparra J, Michaud J, Masquelier J. Etude pharma-cocinet-ique des oligomeres flavanoliques Plantes, edicinales et Phy-toterapie, 1977, 11: 133-142
- 2 Ling ZQ, Xie BJ. Antioxidation action of procyanidins extract from the lotus seedpod on liver lipid Food Science, 2002, 23: 98-100
- 3 Zhang HH, Duan YQ, Deng QC, et al Effect of LSPC on S (180) sarcoma and immune function in mice Food Science, 2005, 26: 220-223
- 4 Du XF (杜晓芬), Xie BJ (谢笔钧), Yang EN (杨尔宁), et al The chemoprophylactic effects of procyanidins from lotus seedpod on DMBA-induced buccal-pouch carcinomas in golden hamsters Acta Nutrimenta Sinica (营养学报), 2005, 27: 241-244
- 5 Ling ZQ (凌智群), Xie BJ (谢笔钧). Study on procyanidins and its biological, pharmacological activities from the seedpod of Nelumbo nucifera Gaertn. Wahan: Huazhong Agriculture University (华中农业大学), PhD. 2001
- 6 Wang HZ (王宏志), Zhao GR (赵广荣). Enzymatic extraction of active components from radix scutellariae Tianjin: Tianjin University (天津大学), PhD. 2007
- 7 Li H (李华), Xiao FC (肖付才), Yuan CL (袁春龙), et al Determination of the proanthocyanidin in the ultrafine powder of grape seeds by catalytic colorimetry with ferric ions Food Res Dev (食品研究与开发), 2007, 28: 114-117
- 8 Mylarappa B, Ningappa, Dinesha R, et al Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (Murraya koenigii L.) extracts Food Chemistry, 2008, 106: 720-728
- 9 Xiao JS, Xie BJ, et al Rapid preparation of procyanidins B2 and C1 from granny smith apples by using low pressure column chromatography and identification of their oligomeric procyanidins J Agriculture and Food Chemistry, 2008, 56