

纤维素酶辅助提取藕节多糖工艺优化及其动力学、热力学研究

王占一¹, 赵静¹, 朱天顺¹, 胡锦涛¹, 赵春林¹, 向兰²

(1. 枣庄学院食品科学与制药工程学院, 山东 枣庄 277160; 2. 山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 优化纤维素酶辅助提取藕节多糖工艺, 并研究其动力学、热力学。方法 在单因素试验基础上, 以加酶量、介质 pH、酶解温度、酶解时间为影响因素, 多糖得率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。对提取期间的动力学、热力学进行分析。结果 最佳条件为加酶量 0.9%, 介质 pH 5.0, 酶解温度 47 °C, 酶解时间 2.5 h, 多糖得率为 5.86%。加入纤维素酶后, 多糖得率、提取速率常数 (k)、表面扩散系数 (D_s) 提高。提取过程符合一级动力学模型, 吸热熵增加, 放热熵减小, 为自发过程。结论 该方法稳定可靠, 可用于纤维素酶辅助提取藕节多糖。

关键词: 藕节; 多糖; 纤维素酶辅助提取; 动力学; 热力学; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)04-0836-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.04.003

Cellulase-assisted extraction process optimization, kinetics and thermodynamics of polysaccharides from *Nelumbinis Rhizomatis Nodus*

WANG Zhan-yi¹, ZHAO Jing¹, ZHU Tian-shun¹, HU Jin-gang¹, ZHAO Chun-lin¹, XIANG Lan²

(1. College of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China; 2. College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the cellulase-assisted extraction process for polysaccharides from *Nelumbinis Rhizomatis Nodus* and to study their kinetics and thermodynamics. **METHODS** With enzyme consumption, medium pH, enzymolysis temperature and enzymolysis time as influencing factors, polysaccharides yield as an evaluation index, the extraction process was optimized by Box-Behnken response surface method on the basis of single factor test. The kinetics and thermodynamics were analyzed during the extraction. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 0.9% for enzyme consumption, 5.0 for medium pH, 47 °C for enzymolysis temperature, and 2.5 h for enzymolysis time, the polysaccharides yield was 5.86%. After the addition of cellulase, the polysaccharides yield, extraction rate constant (k) and surface diffusion coefficient (D_s) were elevated. The spontaneous extraction process accorded with first-order kinetic model, along with increased endothermic entropy and decreased exothermic entropy. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the cellulase-assisted extraction for polysaccharides from *Nelumbinis Rhizomatis Nodus*.

KEY WORDS: *Nelumbinis Rhizomatis Nodus*; polysaccharides; cellulase-assisted extraction; kinetics; thermodynamics; Box-Behnken response surface method

莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 为睡莲科莲属水生植物, 其干燥根茎节部入药, 称为藕节, 2015 年版《中国药典》也有收载^[1], 具有收敛止血、清热凉血、通便止泻、健脾益气之功效, 用于治疗肺结核咯血、胃出血、鼻出血、吐血、便血等病症。

近年来, 国内外学者发现藕节中含有大量多酚、生物碱、多糖, 其中多糖类成分已引起广泛关注^[2-3]。

在天然活性成分的提取过程中, 水酶法提取是将生物酶作为一种生物催化剂来破坏植物细胞壁结构, 提高细胞膜、细胞壁通透性, 降低底物传质阻

收稿日期: 2019-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51809228); 中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社 [2018] 43)

作者简介: 王占一 (1980—), 男, 硕士, 副教授, 执业药师, 从事天然药物活性成分提取与分离方面的研究。Tel: (0632) 3785886, E-mail: zhyiwang@126.com

力, 加快细胞中活性物质溶出, 该方法操作安全, 易于控制, 提取效率高, 已在生产实践中得到大量应用^[4-9]。

天然活性成分从实验材料到提取介质中的溶出过程比较复杂, 会受到各种因素的影响, 但其本质都是溶质从物料的固相到溶剂的液相转运过程。一般认为, 有效成分从物料内部到物料表面扩散的过程是控制该步骤的关键^[10], 但纤维素酶法提取多糖类成分时溶质转运过程的动力学、热力学研究尚未见报道。本实验采用响应面法优化纤维素酶辅助提取藕节多糖工艺, 通过 Fick 扩散公式、Van't Hoff 方程分析该成分从材料固相到溶剂液相传递过程中的动力学、热力学, 为工业化生产提供技术参考, 也为药材资源开发利用提供理论依据。

1 材料

藕采自微山湖, 手工取其根茎节部后洗净、烘干, 经枣庄学院闫志佩教授鉴定为正品。TU-1800SPC 型紫外-可见分光光度计 (上海普析通用仪器有限公司); ALC-1104 型电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); GZX-9240MBE 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); RE-2000A 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); HH-6 型数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司)。葡萄糖对照品 (纯度 > 98%, 批号 110833-201805) 购自中国食品药品检定研究院; 纤维素酶 (酶活性 $\geq 20\ 000\ \text{U/g}$) 购自郑州宇控生物科技有限公司。3, 5-二硝基水杨酸、无水乙醇、碳酸钠、浓硫酸、苯酚、抗坏血酸、磷酸盐等试剂均为分析纯, 购自天津市天力化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[11-12]测定总糖含量。将 D-无水葡萄糖干燥至恒重后精密称取 50 mg, 小烧杯溶解, 置于容量瓶中定容至 100 mL, 作为葡萄糖贮备液, 依次稀释成 10、20、30、40、50、60、70 $\mu\text{g/mL}$, 以蒸馏水为对照, 各量取 1 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 5% 苯酚溶液 0.5 mL, 充分振荡后再滴加 5.5 mL 浓硫酸, 混合均匀, 室温下静置 30 min, 于 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标 (A), 溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $A = 0.079\ 2X - 0.005\ 5$ ($r = 0.999\ 5$), 在 1.43 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

采用 DNS 显色法^[13-14]测定还原糖含量。精密量取 0.5 mg/mL 葡萄糖溶液 0.1、0.2、0.4、

0.6、0.8、1.0 mL 于试管中, 蒸馏水补至 1.0 mL, 加入 2.0 mL 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 显色剂, 沸水浴 5 min, 冷却, 蒸馏水补至 10 mL 后于 540 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标 (A), 溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $A = 0.017\ 2X - 0.186\ 2$ ($r = 0.999\ 3$), 在 5 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

再计算总糖含量与还原糖含量的差值, 即为多糖含量。

2.2 多糖得率测定 精密称取粉碎至 40 目的藕节粉末 5.0 g, 置于三颈圆底烧瓶中, 加入纤维素酶至设定加酶量, 加入一定 pH 值磷酸盐缓冲液使料液比达到设定值, 酶解反应到设定时间, 其间温度保持恒定。提取结束后, 将提取物转移至烧杯中, 沸水浴灭酶 10 min, 抽滤, 定容至 250 mL, 作为供试品溶液, 计算多糖得率, 公式为多糖得率 = (多糖含量/药材质量) $\times 100\%$ 。

2.3 单因素试验 本实验考察了加酶量 (0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%)、料液比 (1 : 8、1 : 12、1 : 16、1 : 20、1 : 24、1 : 28)、介质 pH (2、3、4、5、6、7)、酶解温度 (20、30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$)、酶解时间 (1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h) 对多糖得率的影响, 将其中 1 个作为单因素时, 其他 4 个分别固定为加酶量 0.8%、料液比 1 : 20、介质 pH 5、酶解温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解时间 2.5 h。

2.3.1 加酶量 图 1 显示, 当加酶量为 0.2% ~ 0.8% 时, 多糖得率随着其增加而升高; 超过 0.8% 后, 逐渐趋于平缓, 表明已达到饱和状态, 考虑到生产成本, 确定加酶量在 0.8% 左右。

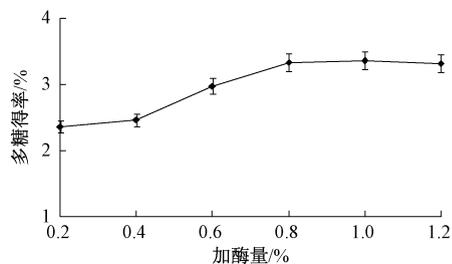


图 1 加酶量对多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of enzyme consumption on polysaccharides yield

2.3.2 料液比 图 2 显示, 随着提取溶剂用量增加, 多糖得率呈先升后降的趋势, 当料液比为 1 : 20 时达到最大值, 其原因是提取溶剂用量较大时有利于溶质从固相向溶剂相转移, 加速多糖溶出, 得率也随之提高; 超过 1 : 20 后, 由于后期处理过程中

有损耗,导致多糖得率不升反降,故确定料液比在1:20左右。

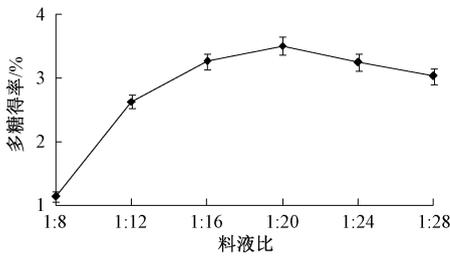


图2 料液比对多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on polysaccharides yield

2.3.3 介质 pH 图3显示,随着介质 pH 升高,多糖得率呈先升后降的趋势,在5时达到最大值,其原因是磷酸盐缓冲液 pH 值对生物酶的影响较大,大于或小于最适 pH 值都会降低后者活性,故选择介质 pH 在5左右。

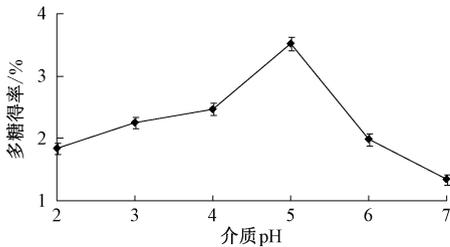


图3 介质 pH 对多糖得率的影响

Fig. 3 Effect of medium pH on polysaccharides yield

2.3.4 酶解温度 图4显示,当酶解温度为20~50℃时,多糖得率随着其增加而逐渐升高,在50℃时达到最大值;超过50℃后,多糖得率呈降低趋势,其原因是酶解温度过高时生物酶活性受到抑制,不能充分发挥作用,导致其得率降低,故确定酶解温度在50℃左右。

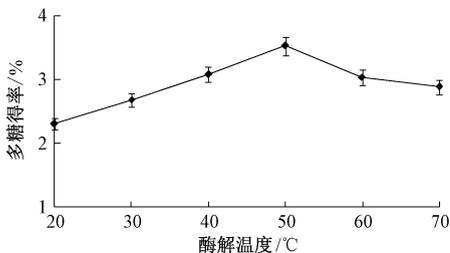


图4 酶解温度对多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of enzymolysis temperature on polysaccharides yield

2.3.5 酶解时间 图5显示,当酶解时间为1.0~2.5 h时,多糖得率随着其延长而逐渐升高,在2.5 h达到最大值;超过2.5 h后,多糖得率几乎不再提高,考虑到实际生产,确定酶解时间在2.5 h左右。

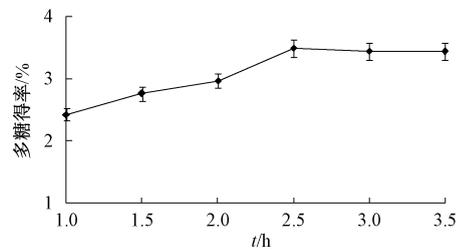


图5 酶解时间对多糖得率的影响

Fig. 5 Effect of enzymolysis time on polysaccharides yield

2.4 Box-Behnken 响应面法优化 在单因素试验基础上,采用 Design Expert 8.0.5 软件进行 Box-Behnken 响应面设计,选择加酶量 (X_1)、介质 pH (X_2)、酶解温度 (X_3)、酶解时间 (X_4) 作为影响因素,多糖得率 (Y) 作为评价指标,共设立 29 个处理组,因素水平见表1,结果见表2。

表1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 加酶量/%	0.6	0.8	1.0
X_2 介质 pH	4	5	6
X_3 酶解温度/℃	40	50	60
X_4 酶解时间/h	2.0	2.5	3.0

表2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	Y 多糖得率/%
1	0	0	1	-1	4.42
2	-1	0	-1	0	3.13
3	-1	0	1	0	4.14
4	-1	0	0	-1	2.94
5	0	0	0	0	5.47
6	0	0	1	1	3.59
7	1	-1	0	0	4.68
8	0	1	0	-1	4.02
9	1	0	0	1	5.15
10	1	0	-1	0	5.28
11	0	1	1	0	3.70
12	1	1	0	0	4.94
13	1	0	0	-1	4.69
14	0	-1	-1	0	4.62
15	0	1	-1	0	4.58
16	0	0	-1	1	4.57
17	0	0	0	0	5.62
18	0	1	0	1	4.82
19	-1	-1	0	0	3.81
20	0	0	0	0	5.86
21	0	0	0	0	5.59
22	-1	0	0	1	4.83
23	0	-1	0	1	4.47
24	0	-1	1	0	4.02
25	1	0	1	0	4.57
26	0	0	0	0	5.86
27	-1	1	0	0	3.11
28	0	-1	0	-1	4.31
29	0	0	-1	-1	3.87

通过 Design-Expert 8.0.5 软件进行拟合, 得二次回归方程为 $Y = 5.68 + 0.61X_1 - 0.062X_2 - 0.13X_3 + 0.27X_4 + 0.24X_1X_2 - 0.43X_1X_3 - 0.36X_1X_4 - 0.07X_2X_3 + 0.16X_2X_4 - 0.38X_3X_4 - 0.69X_1^2 - 0.72X_2^2 - 0.79X_3^2 - 0.64X_4^2$, 方差分析见表 3。由此可知, 模型 $P < 0.0001$, 决定系数 $R^2 = 0.9095$, 失拟项 $P > 0.05$, 表明方程拟合情况良好; X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对多糖得率有极显著影响 ($P < 0.01$), X_4 、 X_1X_3 、 X_3X_4 对其有显著影响 ($P < 0.05$); 各因素影响程度依次为加酶量 > 酶解时间 > 酶解温度 > 介质 pH。响应面分析见图 6。

由此可知, 最优提取工艺为加酶量 0.9%, 介质 pH 5.07, 酶解温度 47.4 °C, 酶解时间 2.58 h, 多糖得率为 5.87%, 考虑到实际操作, 将其修正为加酶量 0.9%, 介质 pH 5.0, 酶解温度 47 °C, 酶解时间 2.5 h。进行 3 次验证试验, 测得多糖平均得率为 5.86%, 与预测值 5.87% 接近, 表明工艺稳定可靠。

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	16.22	14	1.16	10.05	<0.0001
X_1	4.50	1	4.50	39.06	<0.0001
X_2	0.046	1	0.046	0.40	0.5394
X_3	0.22	1	0.22	1.87	0.1926
X_4	0.84	1	0.84	7.32	0.0171
X_1X_2	0.23	1	0.23	2.00	0.1793
X_1X_3	0.74	1	0.74	6.42	0.0239
X_1X_4	0.51	1	0.51	4.44	0.0537
X_2X_3	0.020	1	0.020	0.17	0.6863
X_2X_4	0.10	1	0.10	0.89	0.3619
X_3X_4	0.59	1	0.59	5.08	0.0408
X_1^2	3.11	1	3.11	26.95	0.0001
X_2^2	3.32	1	3.32	28.84	<0.0001
X_3^2	4.04	1	4.04	35.08	<0.0001
X_4^2	2.66	1	2.66	23.11	0.0003
残差	1.61	14	0.12	—	—
失拟项	1.49	10	0.15	4.95	0.0684
误差项	0.21	4	0.030	—	—
总离差	17.83	28	—	—	—

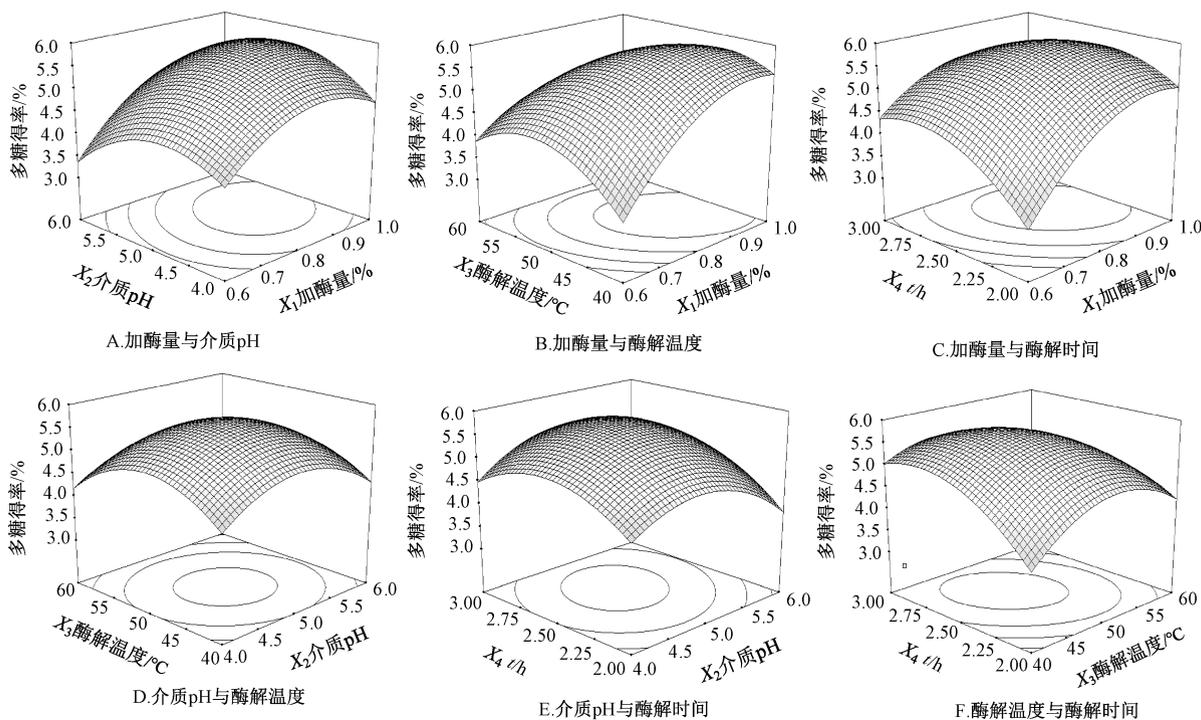


图 6 各因素响应面图

Fig. 6 Response surface plots for various factors

2.5 提取过程动力学分析 本实验假设整个提取体系温度分布一致, 搅拌良好, 忽略传质过程中的外部阻力, 将原料粉末近似看作球形构造, 表面光滑。多糖从固相向溶剂相的溶出只与径向相关, 扩散速率通常用 Fick 扩散公式描述^[15], 为了方便表达, 假

设 $Y = \ln [C_{\infty} / (C_{\infty} - C)]$, 完整表达为 $Y = kt + \ln [\pi^2 C_{\infty} / 6 (C_{\infty} - C_0)]$ 且 $k = \pi^2 D_s / r^2$ (C_{∞} 为传质达到平衡时介质中多糖含有量, 单位 mg/mL; C 为 t 时刻介质中多糖含有量, 单位 mg/mL; C_0 为介质中多糖初始含有量, 单位 mg/mL; k 为提取速率常数,

单位 min^{-1} ; D_s 为表面扩散系数, 单位 cm^2/min ; r 为近似球形的材料半径, 单位 cm 。

精密称取 40 g 藕节粉末 (r 约为 0.05 cm), 设定纤维素酶加入量 0.9%, 介质 pH 5, 料液比 1:20, 在 7 种温度 (305、310、315、320、325、330、335 K) 下水浴提取, 相同条件下另设不加纤维素酶的体系。从开始反应的 0.5 h 开始, 每隔 0.25 h 取样 0.5 mL, 直至 3.5 h 提取完全为止, 测定提取样品中多糖含量, 得到多糖得率随提取时间的变化规律, 结果见图 7。

由此可知, 无论是否加入纤维素酶, 多糖得率都随着提取时间延长而升高; 在最适酶解温度下, 加入纤维素酶后多糖得率最高, 提取过程达到平衡时间最短, 其原因是纤维素酶有其最佳酶解温度, 低于或者超过该温度时活性均会受到限制, 导致其得率下降, 达到提取平衡时间延长; 但在各提取温度下, 加入纤维素酶后多糖得率均高于未加入纤维素酶, 表明纤维素酶有助于提高其得率。提取过程动力学方程 (X 为提取时间, Y 为多糖得率) 及动力学参数见表 4。

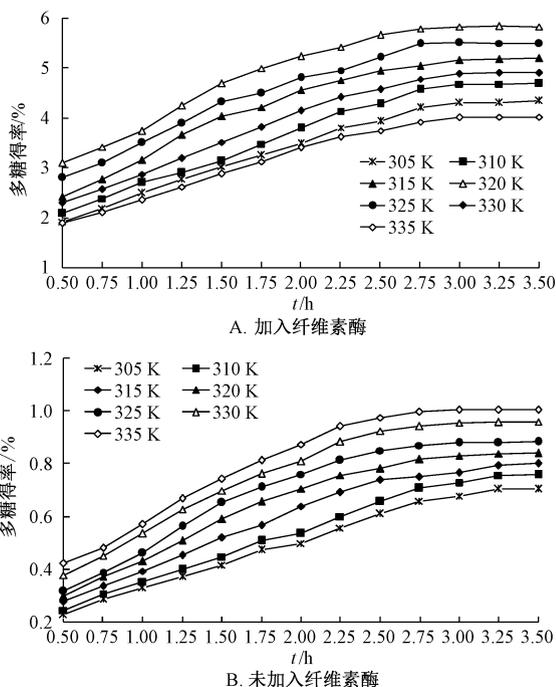


图 7 不同温度下多糖得率与提取时间的关系
Fig. 7 Relationships between polysaccharides yield and extraction time under different temperatures

表 4 提取过程动力学方程及动力学参数

Tab. 4 Kinetic equations and kinetic parameters for extraction process

是否加入纤维素酶	酶解温度/K	拟合方程	$k/(1 \cdot \text{min}^{-1})$	$D_s(\times 10^{-6})/(\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1})$	R^2
加入	305	$Y=0.014\ 3X+1.664\ 5$	0.014 3	3.625 9	0.965 5
	310	$Y=0.015\ 8X+1.760\ 4$	0.015 8	4.006 3	0.965 7
	315	$Y=0.015\ 9X+2.329\ 3$	0.015 9	4.031 6	0.918 4
	320	$Y=0.016\ 1X+2.974\ 4$	0.016 1	4.082 3	0.908 9
	325	$Y=0.015\ 8X+2.644\ 8$	0.015 8	4.006 3	0.931 3
	330	$Y=0.015\ 7X+2.026\ 7$	0.015 7	3.980 9	0.951 7
	335	$Y=0.012\ 9X+1.661\ 8$	0.012 9	3.270 9	0.952 0
未加入	305	$Y=0.002\ 8X+0.163\ 6$	0.002 8	0.710 0	0.984 1
	310	$Y=0.003\ 0X+0.185\ 7$	0.003 0	0.760 7	0.982 4
	315	$Y=0.003\ 1X+0.227\ 0$	0.003 1	0.786 0	0.957 0
	320	$Y=0.003\ 2X+0.270\ 2$	0.003 2	0.811 4	0.928 0
	325	$Y=0.003\ 3X+0.301\ 8$	0.003 3	0.836 8	0.901 3
	330	$Y=0.003\ 4X+0.354\ 8$	0.003 4	0.862 1	0.919 4
	335	$Y=0.003\ 5X+0.394\ 3$	0.003 5	0.887 5	0.904 0

由此可知, 在不同提取温度下无论是否加入纤维素酶, 决定系数 R^2 均不小于 0.901 3, 表明方程拟合情况良好, 提取过程符合一级传质动力学模型; 加入纤维素酶后, 在提取温度 305~335 K 范围内提取速率常数 (k) 先升后降, 在 320 K 达到最大值, 证实将其作为最佳酶解温度时既可保证较好的提取效果, 又能达到节约资源的目的; 相同提取温度下加入纤维素酶后的 k 值均大于未加入纤维素酶, 表面扩散系数 (D_s) 亦然。

2.6 提取过程热力学分析 当提取过程达到动态平衡时, 可通过 Van't Hoff 方程计算热力学参数 ΔH 、 ΔS 、 ΔG ^[16-17], 计算公式为 $\ln(C/C_\infty - C) = -\Delta G/RT = -\Delta H/RT + \Delta S/R$ [ΔG 为提取过程的自由能, 单位 kJ/mol ; ΔS 为提取过程的熵, 单位 $\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$; ΔH 为提取过程的焓, 单位 kJ/mol ; R 为摩尔气体常数, 数值 $8.314\ \text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$; T 为提取温度, 单位 K]。

加入纤维素酶后, 在提取温度 320 K 时多糖提

取达到平衡, 即 $C=C_{\infty}$, 将 $\ln [C/(C_{\infty}-C)]$ 对 $1/T$ 作线性拟合, 可得 2 组线性方程, 即 $\ln [C/(C_{\infty}-C)] = -7.8413X + 0.0298$ ($R^2 = 0.9881$)、 $\ln [C/(C_{\infty}-C)] = 15.4688X - 0.0423$ ($R^2 = 0.9873$), 由此计算 ΔH 、 ΔS 、 ΔG 。由于提取温度 320 K 时 $\ln [C/(C_{\infty}-C)]$ 无意义, 故只计算 305、310、315、325、330、335 K 下热力学参数, 结果见表 5。

表 5 不同提取温度下热力学参数

Tab. 5 Thermodynamic parameters under different extraction temperatures

提取温度/K	$\Delta H/$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$\Delta S/$ ($\text{J}\cdot(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$)	$\Delta G/$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
305	65.192 6	247.757 2	-10.373 4
310			-11.612 2
315			-12.850 9
325	-128.607 6	-351.682 2	-14.312 6
330			-12.554 1
335			-10.795 7

由此可知, 提取温度为 305~315 K 时, ΔH 、 ΔS 均大于 0, 表明提取过程中吸热熵增加^[17]; 为 325~335 K 时, ΔH 、 ΔS 均小于 0, 表明提取过程中放热熵减小; 不同提取温度下 ΔG 均小于 0, 表明提取过程为自发过程, 其中在 320 K 前 ΔG 值减小, 表明提取过程容易进行^[17], 而超过 320 K 后 ΔG 值反而增大, 表明提取过程不容易进行, 从而印证了最佳提取温度确定为 320 K (47 °C) 的合理性。

3 讨论

水酶法是在机械破碎的基础上, 利用酶(蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等)破坏细胞壁结构, 提高植物细胞膜、细胞壁通透性, 加快内容物溶解, 从而增加提取效率、产物得率。文献报道, 采用该方法提取油橄榄叶^[18]、菊苣根^[19]、半边莲^[20]等药材中的多糖时得率高, 安全可控。本实验通过纤维素酶法辅助提取藕节多糖, 并结合工业生产可行性和成本应用 Box-Behnken 响应面法对提取工艺进行优化, 发现所建立的模型稳定可靠。

目前, 已有关于天然产物提取过程中动力学、热力学的研究^[10,16-17], 天然活性成分从实验材料中的溶出过程比较复杂, 会受到有效成分分子量大小、药材粉末颗粒形态、药材质地、细胞破碎程度等诸多因素的影响^[10], 但有效成分向外扩散过程是关键。因此, 本实验采用 Fick 扩散公式、Van't Hoff 方程分析有效成分向外扩散过程的动力学、热

力学, 发现纤维素酶能提高藕节多糖提取过程中提取速率常数 (k)、表面扩散系数 (D_s), 从而加快溶出速率。另外, 纤维素酶法提取天然活性成分时, 应在其最适温度下进行, 这样才能充分发挥生物酶的高效性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 381.
- [2] 李正一, 连成杰, 孙 杰, 等. 莲藕不同部位多糖的理化特征与抗氧化活性研究[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(4): 18-25.
- [3] 许瑞波, 何 静, 王新新, 等. 正交实验优选藕节多糖的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2447-2449.
- [4] Goula A M, Papatheodorou A, Karasavva S, et al. Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pomegranate seeds[J]. *Waste Biomass Valori*, 2018, 9(1): 1-11.
- [5] 陈 程, 张存芳, 罗国平, 等. 超声波辅助纤维素酶提取牡丹籽饼中多糖及其清除自由基活性研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(4): 119-124.
- [6] Konopka I, Roszkowska B, Czaplicki S, et al. Optimization of pumpkin oil recovery by using aqueous enzymatic extraction and comparison of the quality of the obtained oil with the quality of cold-pressed oil[J]. *Food Technol Biotechnol*, 2016, 54(4): 413-420.
- [7] 李亚辉, 马艳弘, 黄开红, 等. 芦荟多糖的超声波辅助纤维素酶提取及抗肿瘤活性研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(11): 91-97.
- [8] 张素斌, 黄劲峥. 猴头菇多糖提取方法的比较[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(4): 233-237.
- [9] Wang H Z, Li Y, Ren Z H, et al. Optimization of the microwave-assisted enzymatic extraction of *Rosa roxburghii* Tratt. polysaccharides using response surface methodology and its antioxidant and α -D-glucosidase inhibitory activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112: 473-482.
- [10] 王占一, 王京龙, 王玉海, 等. 石榴鞣质黄酮表面活性剂-超声波协同提取工艺优化及其动力学、热力学行为[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1726-1732.
- [11] 李明华, 陆正清, 孟秀梅, 等. 金针菇多糖糖式提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(10): 216-221.
- [12] Fan Y J, Yu F F, Zhang P, et al. Separation technology of polysaccharides from *Fructus Lycii* by ultrafiltration method [J]. *Med Plant*, 2011, 2(8): 61-65.
- [13] 庄红艳, 张 冰, 刘小青, 等. 菊苣药材中菊苣多糖的含量测定研究[J]. 中成药, 2011, 33(1): 114-117.
- [14] Chen R Z, Li Y, Dong H, et al. Optimization of ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Ornithogalum caudatum* Ait and evaluation of its biological activities[J]. *Ultrason Sonochem*, 2012, 19(6): 1160-1168.
- [15] 王占一, 戴 博, 王玉海, 等. 石榴皮多糖提取过程的动力

- 学分析[J]. 中成药, 2015, 37(5): 971-977.
- [16] 刘继超, 刘晓风, Lormoua Kiatoukosin, 等. 地木耳粗多糖超声波辅助提取工艺优化及其动力学和热力学分析[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(2): 316-324.
- [17] 张艳丽, 符华林, 卢朝成, 等. 内部沸腾法提取槐米中的芦丁及其动力学和热力学研究[J]. 中成药, 2015, 37(4): 895-898.
- [18] 原姣姣, 陈锦璇, 张帆, 等. 响应面优化超声-酶辅助强化油橄榄叶多糖的提取[J]. 中国油脂, 2019, 44(4): 128-132.
- [19] 许芳, 吴雨龙, 王俏娜, 等. 超声波协同酶法提取菊苣根多糖工艺优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 168-173; 180.
- [20] 黄秀香, 赖红芳, 罗丽程. 超声波协同复合酶法提取半边莲多糖工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 44-46.

小构树总黄酮提取工艺优化及其抗氧化、美白活性

张意笠, 胡培豪, 黄真, 程汝滨, 钟晓明*
(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 优化小构树总黄酮提取工艺, 并评价其抗氧化、美白活性。方法 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、液料比、提取温度、提取时间为影响因素, 总黄酮得率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。检测总黄酮对 DPPH、ABTS 自由基的清除能力, 以及对酪氨酸酶活性的抑制作用。结果 最佳条件为乙醇体积分数 90%, 液料比 35:1, 提取温度 85 °C, 提取时间 80 min, 总黄酮得率为 55.14 mg/g。总黄酮对 DPPH、ABTS 自由基及酪氨酸酶单酚酶、二酚酶的 IC₅₀ 值分别为 151.70、242.20、24.37、15.64 μg/mL。结论 该方法稳定可靠, 可用于提取具有良好抗氧化、美白活性的小构树总黄酮。

关键词: 小构树; 总黄酮; 提取; 抗氧化活性; 美白活性; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)04-0842-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.04.004

Extraction process optimization and anti-oxidant, whitening activities of total flavonoids from *Broussonetia kazinoki*

ZHANG Yi-li, HU Pei-hao, HUANG Zhen, CHENG Ru-bin, ZHONG Xiao-ming*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the extraction process for total flavonoids from *Broussonetia kazinoki* Sieb. et Zucc. and to evaluate their anti-oxidant and whitening activities. **METHODS** With ethanol concentration, liquid-solid ratio, extraction temperature and extraction time as influencing factors, total flavonoids yield as an evaluation index, the extraction process was optimized by Box-Behnken response surface method on the basis of single factor test. The scavenging capacities of total flavonoids on DPPH and ABTS free radicals, and their inhibitory effect on tyrosinase activity were detected. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 90% for ethanol concentration, 35:1 for liquid-solid ratio, 85 °C for extraction temperature and 80 min for extraction time, the total flavonoids yield was 55.14 mg/g. The IC₅₀ values of total flavonoids on DPPH and ABTS free radicals, tyrosinase monophenolase and diphenolase were 151.70, 242.20, 24.37, 15.64 μg/mL. **CONCLUSION** This stable and

收稿日期: 2019-09-27

基金项目: 株式会社高丝研究所横向课题 (2016-HT-146)

作者简介: 张意笠 (1994—), 女, 硕士生, 从事中药品质评价及资源开发利用研究。Tel: 17826867289, E-mail: ZYL_pony@163.com

* 通信作者: 钟晓明 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药品质评价及资源开发利用研究。Tel: (0571) 61768168, E-mail: k6_zxm@sina.com