

纤维素酶法提取枸骨叶熊果酸的工艺研究

曾 超 珍, 郭 玉, 孙 丽 香

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院 湖南 长沙 410004)

摘 要: 研究纤维素酶法提取枸骨叶熊果酸最佳工艺条件。以枸骨叶熊果酸提取率为指标, 通过单因素和正交试验优化酶法提取枸骨叶熊果酸的工艺。结果表明: 纤维素酶酶解工艺的最佳条件为 pH 5.2 酶量 6 mg/g, 酶解温度 50℃, 酶解时间 3 h。验证试验结果表明该提取工艺稳定可行, 适用于枸骨叶熊果酸的提取。

关键词: 纤维素酶; 枸骨叶; 熊果酸; 正交试验

中图分类号: S 567.1<sup>+</sup>9 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2009)09—0216—03

枸骨叶为冬青科植物枸骨(*Ilex Cornuta Lindl*)的叶, 具有清热解毒、止渴生津的功能<sup>[1]</sup>。熊果酸(Ursolic acid)又名乌苏酸、乌索酸, 是枸骨叶主要功能成分之一, 具有镇静、消炎、抗菌、抗致癌、抗促癌、抗糖尿病、降低血糖和显著的免疫作用等<sup>[2]</sup>。目前, 纤维素酶辅助法已广泛应用在植物活性成分的提取中, 如纤维素酶法提取黄酮、多糖、色素、生物碱等<sup>[3-6]</sup>, 它具有操作简单, 高效率, 稳定等优点。选用纤维素酶进行枸骨叶熊果酸的提取, 通过正交试验研究纤维素酶的作用时间、pH、酶用量和温度对枸骨叶熊果酸提取率的影响, 得到了提取熊果酸的最佳条件。

1 材料与方法

1.1 材料

枸骨叶: 2008 年 9 月采于中南林业科技大学, 除去杂质, 晒干备用。试剂: 熊果酸标准品、高氯酸、香草醛、纤维素酶、95%乙醇。

1.2 方法

1.2.1 枸骨叶熊果酸提取工艺 枸骨叶→粉碎→过 80 目筛→酶解→高温灭酶→减压过滤→滤渣烘干→95%乙醇浸提→浓缩过滤→测定熊果酸得率。

1.2.2 标准曲线的制作 用 95%乙醇配制 100 μg/mL 的熊果酸标准品溶液, 作为储备液备用, 准确吸取上述溶液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 70℃水浴挥干乙醇, 加入 5%香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 将容量瓶放入 60℃水浴中加热 15 min, 放冷至室温, 用冰醋酸定容至刻度, 摇匀; 用紫外

分光光度计在 548 nm 处测其吸光度, 得到回归方程为:  $A=0.0071C-0.0013(R^2=0.9958)$ 。

1.2.3 熊果酸含量的测定 将提取液用 95%的乙醇定容, 取样在波长 548 nm, 按照 1.2.2 方法测定其吸光度, 代入回归方程得出样品中熊果酸的浓度, 并计算其提取率<sup>[2]</sup>。

1.2.4 单因素试验 分别选择 pH、酶量、酶解温度和时间因素, 用 95%乙醇浸提枸骨叶熊果酸(料液比为 1:20), 各因素及水平的设计如表 1。测定某一因素时, 其他条件为非测定因素。各单因素试验所选择的基本条件为: 酶解温度 50℃、pH 4.6、时间 2.0 h、酶量 4 mg/g。

表 1 枸骨叶熊果酸提取单因素试验的各因素及水平

因素	水平						
	1	2	3	4	5	6	7
pH	3.4	4.0	4.6	5.2	5.8	6.4	
酶量/mg·g <sup>-1</sup>	3	4	5	6	7	8	
温度/℃	35	40	45	50	55	60	65
时间/h	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	

1.2.5 正交试验 由于单因素并不能反映各因素之间的相互作用, 而提取过程是各因素之间的相互作用造成的提取传质过程速率的变化, 从而影响熊果酸提取率, 因此, 通过单因素的试验结果确定各因素的最佳水平范围, 以 pH A、酶量 B、酶解温度 C、酶解时间 D 为因素, 进行四因素三水平 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验(如表 2)来优化枸骨叶熊果酸提取工艺。

表 2 因素水平表

水平	因素			
	pH A	酶量 B/mg·g <sup>-1</sup>	酶解温度 C/℃	酶解时间 D/h
1	4.6	4	45	2
2	5.2	5	50	2.5
3	5.8	6	55	3

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 pH 对熊果酸提取率的影响 每种酶都有自己

第一作者简介: 曾超珍(1978-), 女, 讲师, 现主要从事药用植物的教学与科研工作。E-mail: chaozheng@sina.com。  
基金项目: 中南林业科技大学青年科学研究基金资助项目(06007 B); 中南林业科技大学林木遗传育种学科资助项目。  
收稿日期: 2009-03-20

最适 pH 值,在此 pH 下酶解反应的速率最高;高于或低于此值,都会使酶活性部位的基团离子化而降低酶的活性,酶反应速率降低。不同 pH (3.4、4.0、4.6、5.2、5.8、6.4)对枸骨叶熊果酸提取率的影响见图 1,枸骨叶熊果酸提取率随着溶液的 pH 值的增加呈现先增加后减少的趋势。当溶液的 pH 达到 5.2 时,熊果酸提取率达到最大值,大于 5.2 时,含量反而下降,因此酶发挥作用的最好 pH 5.2。

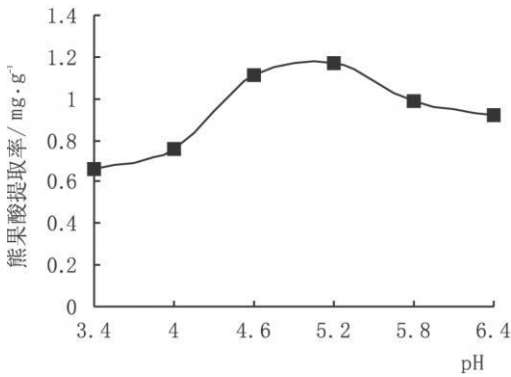


图 1 pH 对熊果酸提取率的影响

2.1.2 酶量对熊果酸提取率的影响 不同纤维素酶量 (3、4、5、6、7、8 mg/g)对枸骨叶熊果酸提取率的影响见图 2,当加酶量为 3~5 mg/g 时,熊果酸提取率迅速上升,继续增加酶量,提取率上升趋势平缓,因此,酶量是影响酶促反应的重要因素,酶量低于最佳值时,酶解未进行完全;达最佳值时,酶解进行较完全;达到最大值后,随着加酶量的增加,底物被酶分子所饱和,纤维素被水解的速度趋于稳定,致使熊果酸提取率也趋于稳定。因此,加酶量以 5 mg/g 最合适。

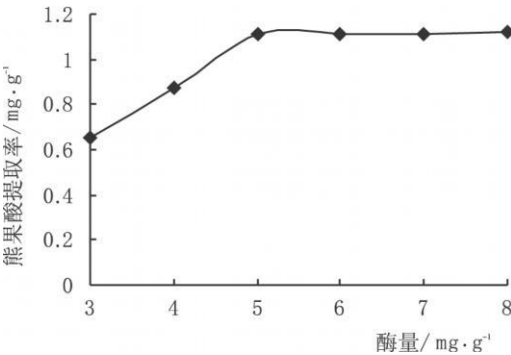


图 2 酶量对熊果酸提取率的影响

2.1.3 酶解温度对熊果酸提取率的影响 不同酶解温度 (35、40、45、50、55、60、65 ℃)对枸骨叶熊果酸提取率的影响见图 3,枸骨叶熊果酸提取率随着酶解温度的增加

呈现先增加后减少的趋势,这是由于每种酶都有自己的最适温度,在此温度下酶解反应的速率最高,达到最适酶解温度前,随着温度升高,酶分子运动速度加快,增加了酶分子与底物纤维素结合的机会,反应速度不断上升,熊果酸提取率呈上升趋势;但超过最适温度,使酶蛋白变性,失去催化能力,熊果酸提取率没有上升反而下降,酶解最适温度 50 ℃。

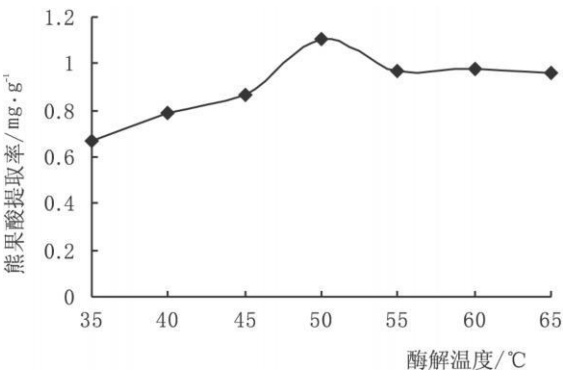


图 3 酶解温度对熊果酸提取率的影响

2.1.4 酶解时间对熊果酸提取率的影响 酶解反应时间会影响酶解效率,反应时间太短破壁效果不好,酶解不充分;时间太长,有效成分的结构可能会被破坏,不利于工业生产。不同酶解时间 (1、1.5、2、2.5、3、3.5 h)对枸骨叶熊果酸提取率的影响见图 4,随着提取时间的延长,熊果酸提取率呈上升趋势,当时间达到 2.5 h 后,提取率增长趋缓,因此,最佳的酶解时间为 2.5 h。

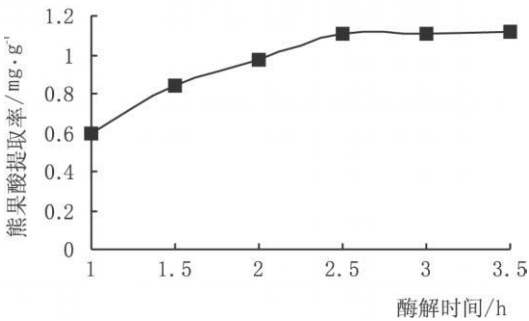


图 4 酶解时间对熊果酸提取率的影响

2.2 枸骨叶熊果酸提取条件的优化

正交试验结果及极差直观分析见表 3 和图 5,影响枸骨叶熊果酸提取因素的顺序为: pH> 酶解温度> 酶量> 酶解时间,其最佳的提取工艺条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即 pH 5.2,酶量 6 mg/g,酶解温度 50 ℃,酶解时间 3 h。

2.3 影响因素的方差分析

正交试验的方差分析 (见表 4): 在不考虑因素交互

作用的情况下, pH 和酶解温度差异显著, 对枸骨叶熊果酸提取率的影响起最主要作用, 其中 pH 最为显著; 酶量和酶解时间在试验范围内没有显著差异, 对测定结果的影响较小, 这与直观分析结果(见表 3、图 5)相吻合。

表 3 正交试验结果

水平	因素				提取率
	pH A	酶量 B/mg·g <sup>-1</sup>	酶解温度 C/℃	酶解时间 D/h	
1	1	1	1	1	0.67
2	1	2	2	2	0.88
3	1	3	3	3	0.80
4	2	1	2	3	1.10
5	2	2	3	1	0.93
6	2	3	1	2	1.08
7	3	1	3	2	0.71
8	3	2	1	3	0.80
9	3	3	2	1	0.95
k1	0.78	0.83	0.85	0.85	
k2	1.04	0.87	0.98	0.89	
k3	0.82	0.94	0.81	0.90	
R	0.26	0.11	0.17	0.05	

因素主次: A>C>B>D

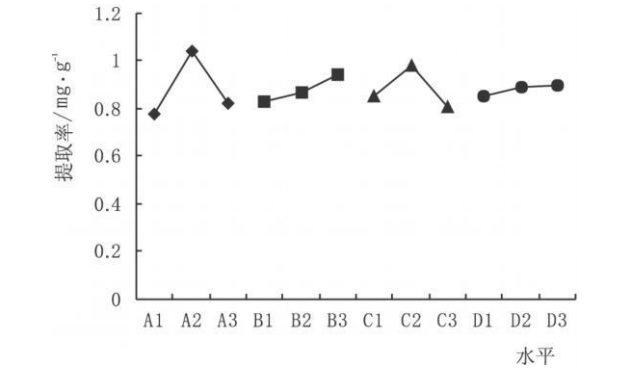


图 5 因素和指标直观分析

## Studies on the Technology of Extracting Ursolic Acid from Folium Ilicis Cornutae by Cellulase

ZENG Chao-zhen, GUO Yu, SUN Li-xiang  
(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

**Abstract:** To optimize the extraction technology for ursolic acid of Folium Ilicis Cornutae by cellulase. The extraction technology for ursolic acid of Folium Ilicis Cornutae was optimized by single factor and orthogonal experiment with the use of the extraction rate of ursolic acid as the assessment index. The optimal enzymolysis conditions were as follows: the pH of extracting media was 5.2, the amounts of cellulase was 6 mg/g, the enzymolysis temperature was 50 ℃ and the enzymolysis time was 3 h. It was shown by an approval test that the optimized technology was stable, feasible and suitable for the extraction of ursolic acid of Folium Ilicis Cornutae.

**Key words:** Cellulase; Folium Ilicis Cornutae; Ursolic acid; Orthogonal experiment

表 4 正交试验方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	0.1125	2	0.0375	26.79	<0.05
B	0.0209	2	0.01045	4.98	>0.1
C	0.0441	2	0.02205	10.50	<0.1
D	0.0042	2	0.0021	1.00	>0.1
误差	0.0042	2			

注:  $F_{0.1}(2, 2)=9$ ;  $F_{0.05}(2, 2)=19.0$ ;  $F_{0.01}(2, 2)=99.0$ .

2.4 最优工艺试验的验证  
为考察正交试验得到优选工艺条件的稳定性, 按其重复 6 次, 枸骨叶熊果酸提取率为 1.23 mg/g, RSD=0.39%(n=6), 说明该工艺稳定可行。

3 结论  
首次用纤维素酶法通过正交设计对枸骨叶熊果酸提取工艺进行了初步探讨, 表明酶法提取枸骨叶熊果酸的最佳酶解条件: pH 5.2, 酶量 6 mg/g, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 3 h。熊果酸提取率高达 1.23 mg/g。经过极差和方差分析, 影响枸骨叶熊果酸酶解因素的顺序为: pH>酶解温度>酶量>酶解时间, 且 pH 和酶解温度差异显著, 该结果可为枸骨叶熊果酸提取工业化生产提供理论参考依据。

参考文献

[1] 李颜, 吴强, 王峥涛, 等. RP-HPLC 测定枸骨叶中羽扇豆醇的含量[J]. 中国中药杂志, 2008(2): 149-152.

[2] 张静, 刘艺, 殷飞, 等. 枇杷叶中熊果酸的提取工艺研究[J]. 食品工业, 2007(3): 22-24.

[3] 土晓, 李林波, 马小来, 等. 酶法提取山楂中总黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(3): 37-39.

[4] 尹怀霞, 黎锡流, 潘兆广, 等. 纤维素酶提取仙草多糖的研究[J]. 食品科技, 2007(5): 126-128.

[5] 余清, 陈绍军. 酶法提取乌饭树叶色素的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 36-39.

[6] 钟世安, 乔蓉, 李维, 等. 采用酶法提取荷叶中的荷叶碱[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2007, 38(6): 1135-1139.