

李 容, 吕佳窈, 李振中, 等. 酶-超声波辅助提取川木瓜总三萜工艺[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 258-261.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.084

酶-超声波辅助提取川木瓜总三萜工艺

李 容, 吕佳窈, 李振中, 钱 力, 黄祖良

(右江民族医学院药学院, 广西百色 533000)

摘要:以总三萜得率为指标, 通过单因素试验和正交试验, 研究酶-超声波辅助提取川木瓜总三萜的提取工艺。结果表明, 川木瓜总三萜的最佳工艺为: 采用纤维素酶、木瓜蛋白酶酶解, 酶用量为 1.2%, 酶解 pH 值 6.5, 酶解温度 40 ℃, 酶解时间 2.0 h; 再以 70% 乙醇作为溶剂, 在超声功率 150 W 条件下提取 1 次, 提取时间 40 min。在此工艺条件下, 总三萜得率可达 3.57%, 与单一使用超声波法或酶法相比均有较大提高。

关键词: 川木瓜; 总三萜; 酶-超声波辅助; 提取工艺

中图分类号: TQ353.6; R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)06-0258-04

皱皮木瓜为药用正品木瓜, 来源于蔷薇科植物贴梗海棠 [*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai] 的干燥近成熟果实^[1]。皱皮木瓜根据产地主要形成了川木瓜、宣木瓜、资丘木瓜 3 个主要品种, 产地不同, 品质各有差异。川木瓜为皱皮木瓜中产量最大的品种, 主产于重庆綦江、江津等地, 在广西凌云县也有大量分布; 川木瓜既可药用又可食用, 但是由于其味酸、涩, 主要用作中药药材。利用木瓜开发生产纯天然、无毒副作用及具有多功能保健和医疗作用的食物、饮料、药品, 具有广阔的前景^[2], 它含有机酸、三萜、黄酮、皂苷、氨基酸等多种活性成分, 其中三萜类衍生物含量较高, 是保肝的主要有效成分, 能显著降低血清谷丙转氨酶水平^[3]。目前关于川木瓜三萜的提取研究很少, 尚无酶-超声波联用提取川木瓜总三萜的相关报道, 本试验采用酶-超声波 2 种方法辅助提取川木瓜总三萜, 以香草醛-冰乙酸-高氯酸比色法测定川木瓜总三萜含量, 通过单因素试验和正交试验优化三萜提取的工艺, 以期对川木瓜的进一步开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

川木瓜采自广西凌云县, 将鲜果切片、去籽、晾干、粉碎过筛备用。

试验试剂主要有: 齐墩果酸标准品(上海原叶生物科技有限公司); 香草醛、高氯酸、冰乙酸、乙醇、石油醚、乙酸钠、磷酸氢钠、磷酸二氢钠、三羟甲基氨基甲烷、盐酸, 均为分析纯; 纤维素酶(40 000 U/g)、果胶酶(60 000 U/g)、木瓜蛋白酶(30 000 U/g), 均为天津利华酶制剂有限公司生产。

收稿日期: 2014-07-22

基金项目: 广西高校科学技术研究项目(编号: KY2015YB226); 广西壮族自治区教育厅科研重点项目(编号: 2013ZD053); 广西壮族自治区百色市科学研究与技术开发计划(编号: 20121402)。

作者简介: 李 容(1981—), 女, 重庆垫江人, 硕士, 讲师, 从事天然产物有效成分提取分离及活性研究。E-mail: lr1218tt@163.com。

通信作者: 黄祖良, 教授, 从事中草药有效成分及活性研究。E-mail: ymh0413@163.com。

主要仪器有: RE-52AA 型旋转蒸发仪; TU-1800 紫外-可见分光光度计; FZ102 植物粉碎机; CPA64 型电子天平; HHS-21-4 电热式恒温水浴锅; pH5-3C 型 pH 计; XH-300A 微波超声波组合合成萃取仪。

1.2 试验方法

1.2.1 川木瓜总三萜提取工艺 取川木瓜粉末, 加入 1.5 倍体积石油醚回流 4 h, 过滤、自然挥干石油醚, 除去部分色素和脂溶性物质。称取石油醚处理后的川木瓜粉末, 加入一定体积缓冲液、酶, 在一定温度、时间下酶解; 酶解后在 90 ℃ 水浴中高温灭酶, 加入一定体积的乙醇, 在一定功率、时间下超声提取总三萜, 抽滤、浓缩、定容, 得总三萜提取液。

1.2.2 总三萜测定方法

1.2.2.1 标准曲线的绘制 精确称取齐墩果酸标准品 20 mg, 用无水乙醇溶解, 配制成浓度为 200 μg/mL 的对照品溶液。精确吸取对照品溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 沸水浴蒸干乙醇后, 加入 0.3 mL 新配制的 5% 香草醛-冰乙酸溶液、1.0 mL 高氯酸, 在 60 ℃ 水浴中恒温 15 min, 冰水中快速冷却, 加入 5 mL 冰乙酸摇匀放置 15 min, 测定在 548 nm 处的吸光度 $D_{548\text{ nm}}$ ^[4]。以对照品浓度为横坐标、吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 所得标准曲线的线性回归方程为 $y = 0.054x - 0.0398$, $r^2 = 0.9981$, 对照品浓度在 4~20 μg/mL 的范围内线性关系良好。

1.2.2.2 样品总三萜含量的测定 精确吸取一定体积待测样品于具塞试管中, 按“1.2.2.1”节的方法显色, 测定吸光度, 将吸光度代入标准曲线回归方程中计算样品中总三萜提取率:

总三萜提取率 = 总三萜质量/川木瓜粉末质量 × 100%。

1.2.3 酶解工艺优化

1.2.3.1 单因素试验 (1) 酶种类对总三萜提取的影响。称取 5 份处理后的川木瓜粉末, 每份 3 g, 分别加入 40 mL pH 值为 4.5 的缓冲液及 36 mg 纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶的不同组合, 酶按川木瓜质量的 1.2% 进行添加, 在 40 ℃ 下酶解 1.5 h; 90 ℃ 水浴中灭酶, 加入乙醇配制成含量为 60% 的乙醇溶液, 在功率为 150 W 下超声提取 30 min, 抽滤、浓缩、定容, 测定总三萜含量。(2) 酶用量对总三萜提取的影响。称

取 5 份川木瓜粉末,每份 3 g,加入 40 mL pH 值为 4.5 的缓冲液,再加入 0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0% 复合酶,在 40 ℃ 下酶解 1.5 h;90 ℃ 水浴中灭酶,加入乙醇配制成含量为 60% 的乙醇溶液,在功率为 150 W 下超声提取 30 min,抽滤、浓缩、定容,测定总三萜含量。(3)酶解 pH 值对总三萜提取的影响。称取 5 份川木瓜粉末,每份 3 g,加入 40 mL pH 值分别为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5 的缓冲液,再加入 36 mg 复合酶,在 40 ℃ 下酶解 1.5 h;90 ℃ 水浴中灭酶,加入乙醇配制成含量为 60% 的乙醇溶液,在功率为 150 W 下超声提取 30 min,抽滤、浓缩、定容,测定总三萜含量。(4)酶解温度对总三萜提取的影响。称取 5 份川木瓜粉末,每份 3 g,加入 40 mL pH 值为 5.5 的缓冲液,加入 36 mg 酶,分别在 35、40、45、50、55 ℃ 下酶解 1.5 h;90 ℃ 水浴中灭酶,加入乙醇配制成含量为 60% 的乙醇溶液,在功率为 150 W 下超声提取 30 min,抽滤、浓缩、定容,测定总三萜含量。(5)酶解时间对总三萜提取的影响。称取 5 份川木瓜粉末,每份 3 g,加入 40 mL pH 值为 5.5 的缓冲液,再加入 36 mg 酶,在 45 ℃ 下分别酶解 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h;90 ℃ 水浴中灭酶,加入乙醇配制成含量为 60% 的乙醇溶液,在功率为 150 W 下超声提取 30 min,抽滤、浓缩、定容,测定总三萜含量。

1.2.3.2 正交试验 根据单因素试验结果,选取酶用量、酶解 pH 值、酶解时间、酶解温度的较优水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,对所得试验结果进行直观分析,正交试验因素水平设置见表 1。

表 1 酶解工艺优化的因素水平设计

水平	因素			
	A:酶用量 (%)	B:pH 值	C:酶解温度 (℃)	D:酶解时间 (h)
1	0.8	4.5	40	1.0
2	1.2	5.5	45	1.5
3	1.6	6.5	50	2.0

1.2.4 超声波提取工艺优化

1.2.4.1 单因素试验 (1)乙醇浓度对总三萜提取的影响。称取 5 份川木瓜粉末,每份 3 g,按最佳酶解工艺进行酶解,分别加入不同体积乙醇配制成含量为 40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇溶液,在功率为 150 W 下超声提取 30 min,抽滤、浓缩、定容,测定总三萜含量。(2)超声功率对总三萜提取的影响。称取 5 份川木瓜粉末,每份 3 g,按最佳酶解工艺进行酶解,加入乙醇配制成含量为 70% 的乙醇溶液,分别在功率为 50、100、150、200、250 W 下超声提取 20 min,抽滤、浓缩、定容,测定总三萜含量。(3)超声时间对总三萜提取的影响。称取 5 份川木瓜粉末,每份 3 g,按最佳酶解工艺进行酶解,加入乙醇配制成含量为 70% 的乙醇溶液,在功率为 200 W 下分别超声提取 20、30、40、50、60 min,抽滤、浓缩、定容,测定总三萜含量。

1.2.4.2 正交试验 根据单因素试验结果,选取乙醇浓度、超声功率、超声时间的较优水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,对所得试验结果进行直观分析,正交试验因素水平设置见表 2。

1.2.4.3 超声提取次数 在最佳工艺条件确定后,对酶解后的川木瓜进行超声提取,过滤浓缩得到 1 次提取液;在料渣中

表 2 超声波提取工艺优化的因素水平设计

水平	因素		
	A:乙醇浓度 (%)	B:超声功率 (W)	C:超声时间 (min)
1	60	150	40
2	70	200	50
3	80	250	60

再次加入乙醇进行 2 次提取,过滤浓缩得到第 2 次提取液;同理进行 3 次提取,得第 3 次提取液,分别测定总三萜含量。

1.2.5 验证试验与提取方法的对比 综合酶法、超声波辅助提取法得出的最优组合进行验证试验,研究试验结果的可重复性。再分别采用酶-超声波法、超声波法、酶法提取木瓜中的总三萜,对 3 种方法进行综合比较。

2 结果与分析

2.1 酶解工艺优化结果

2.1.1 酶种类对总三萜提取率的影响 由表 3 可知,纤维素酶+木瓜蛋白酶提取效果较好,说明纤维素酶和木瓜蛋白酶有协同作用,能更好地酶解细胞表面结构及胞间连接物,使三萜类物质浸出率增加,因此在后续试验中均采用纤维素酶复合木瓜蛋白酶进行酶解。

表 3 酶种类对总三萜提取的影响

酶种类	酶用量 (%)	总三萜提取率 (%)
纤维素酶	1.2	2.84
果胶酶	1.2	2.01
木瓜蛋白酶	1.2	2.65
纤维素酶+果胶酶	0.6+0.6	2.73
纤维素酶+木瓜蛋白酶	0.6+0.6	3.14
果胶酶+木瓜蛋白酶	0.6+0.6	1.86
纤维素酶+果胶酶+木瓜蛋白酶	0.4+0.4+0.4	2.65

2.1.2 酶用量对总三萜提取率的影响 由表 4 可以看出,纤维素酶+木瓜蛋白酶总用量分别为 0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0% 时,总三萜得率分别为 1.54%、2.57%、3.17%、3.10%、2.99%。可以看出,随着酶用量的增加,总三萜提取率增大,当酶用量为 1.2% 时提取率最高;酶用量达饱和后,底物被水解的速度不再增加。

表 4 酶用量对总三萜提取率的影响

纤维素酶+木瓜蛋白酶总用量 (%)	总三萜提取率 (%)
0.4	1.54
0.8	2.57
1.2	3.17
1.6	3.10
2.0	2.99

2.1.3 酶解 pH 值对总三萜提取率的影响 由表 5 可见,酶解 pH 值分别为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5 时,总三萜得率分别为 3.09%、3.28%、2.93%、2.52%、2.17%。由结果可知,pH 值对总三萜提取的影响较大,pH 值为 5.5 时提取率达最大。由于酶的最适合 pH 值不是一个特征物理常数,同一种酶的最适 pH 值会随底物的不同和体系不同而有所差异^[5-7]。

表 5 酶解 pH 值对总三萜提取率的影响

酶解 pH 值	总三萜提取率(%)
4.5	3.09
5.5	3.28
6.5	2.93
7.5	2.52
8.5	2.17

2.1.4 酶解温度对总三萜提取率的影响 由表 6 可以看出,当酶解温度分别为 35、40、45、50、55 ℃时,总三萜得率分别为 2.77%、3.23%、3.35%、2.92%、2.15%。由结果可知,最佳的酶解温度为 45 ℃;可见提高温度会提高酶解反应速度,但温度太高时酶会部分失活。

表 6 酶解温度对总三萜提取率的影响

酶解温度(℃)	总三萜提取率(%)
35	2.77
40	3.23
45	3.35
50	2.92
55	2.15

2.1.5 酶解时间对总三萜提取率的影响 由表 7 可以看出,当酶解时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 时,总三萜得率分别为 2.54%、3.32%、3.40%、3.35%、3.43%。由结果可知,酶解时间超过 1.5 h 后,总三萜提取率趋于平稳,可见延长提取时间,提取率没有明显提高,因此酶解时间以 1.5 h 为宜。

表 7 酶解时间对总三萜提取率的影响

酶解时间 (h)	总三萜提取率 (%)
0.5	2.54
1.0	3.32
1.5	3.40
2.0	3.35
2.5	3.43

2.2 酶解正交试验

由表 8 可知,各因素对总三萜提取率的影响顺序为 C > A > B > D,即酶解温度 > 酶用量 > pH 值 > 酶解时间;最优水平是 A₂B₃C₁D₃,即酶用量 1.2%,pH 值 6.5,酶解温度 40 ℃,酶解时间 2.0 h。

2.3 超声波提取工艺优化结果

2.3.1 乙醇浓度对总三萜提取率的影响 由表 9 可见,乙醇浓度为 40%、50%、60%、70%、80% 时,总三萜提取率分别为 2.63%、2.84%、3.27%、3.41%、3.25%,可见乙醇浓度为 70% 时提取率最高。三萜类物质易溶于乙醇,在一定范围内,随乙醇浓度提高提取率增大;但当乙醇浓度超过最佳值,其他醇溶性杂质可能会与三萜类物质竞争溶剂^[4],导致总三萜提取率降低。

2.3.2 超声功率对总三萜提取率的影响 由表 10 可以看出,当超声功率分别为 50、100、150、200、250 W 时,总三萜提取率分别为 2.47%、2.78%、3.19%、3.34%、3.38%。可以看出,提取率与超声功率呈正相关,综合考虑提取率与超声能耗,选择超声功率为 200 W。

表 8 酶解工艺正交试验结果

编号	A:酶用量	B:pH 值	C:酶解温度	D:酶解时间	提取率 (%)
1	1	1	1	1	3.04
2	1	2	2	2	2.70
3	1	3	3	3	3.16
4	2	1	2	3	2.93
5	2	2	3	1	3.21
6	2	3	1	2	3.46
7	3	1	3	2	3.13
8	3	2	1	3	3.25
9	3	3	2	1	2.88
k ₁	2.97	3.03	3.25	3.04	
k ₂	3.20	3.05	2.84	3.10	
k ₃	3.09	3.17	3.17	3.11	
R	0.23	0.14	0.41	0.07	

表 9 乙醇浓度对总三萜提取率的影响

乙醇浓度(%)	总三萜提取率(%)
40	2.63
50	2.84
60	3.27
70	3.41
80	3.25

表 10 超声功率对总三萜提取率的影响

超声功率 (W)	总三萜提取率 (%)
50	2.47
100	2.78
150	3.19
200	3.34
250	3.38

2.3.3 超声时间对总三萜提取率的影响 由表 11 可以看出,当超声时间分别为 20、30、40、50、60 min 时,总三萜提取率分别为 2.68%、3.05%、3.45%、3.39%、3.22%。由结果可知,超声时间为 40 min 时的总三萜提取率最大,超声时间过长会产生热效应,可能会破坏三萜分子结构^[8]。

表 11 超声时间对总三萜提取率的影响

超声时间 (min)	总三萜提取率 (%)
20	2.68
30	3.05
40	3.45
50	3.39
60	3.22

2.4 超声波提取的正交试验结果

由表 12 可知,超声提取各因素对总三萜提取率的影响顺序为 A > C > B,即乙醇浓度 > 超声时间 > 超声功率;最优水平是 A₂B₁C₁,即超声提取的最佳工艺为:乙醇浓度 70%,超声功率 150 W,超声时间 40 min。

2.5 超声提取次数试验结果

超声提取次数的试验结果见表 13。可以看出,提取 1、2、

表 12 超声波提取工艺正交试验结果

编号	A:乙醇浓度	B:超声功率	C:超声时间	提取率 (%)
1	1	1	1	3.27
2	1	2	2	2.91
3	1	3	3	3.05
4	2	1	2	3.19
5	2	2	3	3.42
6	2	3	1	3.51
7	3	1	3	3.28
8	3	2	1	3.05
9	3	3	2	2.97
k_1	3.08	3.25	3.28	
k_2	3.37	3.13	3.02	
k_3	3.10	3.18	3.25	
R	0.29	0.12	0.26	

表 13 提取次数对总三萜提取率的影响

提取次数(次)	总三萜提取率 (%)
1	3.67
2	0.14
3	0.08

3 次的总三萜提取率分别为 3.67%、0.14%、0.08%。结果表明,总三萜在提取 1 次后基本已经溶出,因此从能耗和环保角度考虑只超声提取 1 次。

2.6 验证试验

综合上述试验结果,得到酶法-超声波辅助提取川木瓜总三萜的最佳工艺为:用纤维素酶+木瓜蛋白酶进行酶解,酶用量为 1.2%,酶解 pH 值 6.5,酶解温度 40℃,酶解时间 2.0 h;再以 70%乙醇为提取溶剂,在超声功率 150 W、提取时间 40 min 的条件下提取 1 次。精确称取 5 份质量为 3.0 g 的川木瓜粉末,在最佳工艺条件下进行验证试验,得率分别为 3.57%、3.50%、3.62%、3.55%、3.60%,平均为 3.57%,说明最佳工艺条件具有良好的重现性。

2.7 提取方法对比

分别采用酶-超声波法、超声波法、酶法提法提取川木瓜中总三萜。酶-超声波法按本研究的最优条件进行提取,先酶解再进行超声提取;超声波法按本研究的最佳超声波工艺进行提取,不进行酶处理;酶法即只进行酶解,不超声提取。分别测定 3 种方法总三萜的得率,由表 14 可知,酶-超声波得率明显高于单一超声波法、单一酶法,可见通过辅助手段联用可以明显提高得率。

表 14 不同提取方法的总三萜提取率

提取方法	总三萜提取率 (%)
酶-超声波法	3.57
超声波法	2.15
酶法	1.82

3 结论与讨论

提取方法对天然产物活性成分的提取有很大的影响,采用超声波、微波、酶解或者几种辅助方法联用均可以明显提高提取率。本试验采用酶解、超声波 2 种方法辅助提取川木瓜总三萜,先用纤维素酶、木瓜蛋白酶进行酶解,利用纤维素酶水解川木瓜纤维素、用木瓜蛋白酶分解细胞中游离的蛋白质^[9],再利用超声波产生的强烈的空化效应、机械粉碎作用以及热效应等,加速有效成分的溶出^[10]。试验结果表明,这 2 种方法联用能明显提高总三萜的提取率。

酶-超声波联用技术提取天然产物活性成分的相关研究已有较多报道,但提取过程各有差异。吴昊等采用酶解、超声波法同时提取黄酮^[11-12],阚国仕等先采用超声波法后用酶法提取多糖^[13]。本试验考虑到提取目标物质为三萜类化合物,通常要用乙醇作为溶剂来提取,但乙醇溶剂会对生物酶活性产生较大的影响^[14],若协同进行,超声波产生的热效应也会影响酶活性,所以先进行酶解后进行超声提取,在后续研究中可以深入探讨不同的提取过程对三萜提取率的影响。

参考文献:

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 人民卫生出版社,1957:41.

[2] 俞佳. 不同道地产区木瓜指标成份分析及川木瓜总黄酮提取纯化工艺研究[D]. 成都:成都中医药大学,2007.

[3] 王有为,何敬胜,范建伟. 木瓜道地起源于道地区形成研究[C]. 贵阳:2009 年全国中药学术研讨会论文集,2009:11-15.

[4] 田娜,陈颖韬,吴文杰,等. 猕猴桃根中三萜类化合物的提取工艺研究[J]. 中国农学通报,2013,29(25):184-189.

[5] Passos C P, Yilmaz S, Silva C M, et al. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1):48-53.

[6] 李朝阳,刘魁,韩忠霄,等. 大蒜多糖的酶法提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学,2008,29(1):117-120.

[7] Hua Y L, Gao Q, Wen L R, et al. Structural characterisation of acid- and alkali-soluble polysaccharides in the fruiting body of *Dictyophora indusiata* and their immunomodulatory activities[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2):739-743.

[8] 陈莉华,吴玲,李林芝,等. 玄参总三萜提取物制备及其抗氧化生物活性研究[J]. 林产化学与工业,2013,33(6):85-90.

[9] 于泽源,滕歆,徐雅琴,等. 复合酶法提取树莓果实多糖工艺优化的研究[J]. 东北农业大学学报,2014,45(3):52-58.

[10] 孙晓瑞,王娜,谢新华,等. 超声波辅助酶法提取红枣多糖的研究[J]. 林产化学与工业,2011,31(4):58-62.

[11] 吴昊,宗志敏,石金龙. 超声波协同酶法提取银杏黄酮的工艺研究[J]. 中国资源综合利用,2012,30(11):26-29.

[12] 杨美莲,聂小伟,康银. 超声波协同酶法提取陕北滩枣总黄酮的研究[J]. 陕西科技大学学报:自然科学版,2011,29(1):58-61,76.

[13] 阚国仕,崔亮亮,陈红漫. 纤维素酶超声波法萃取胡萝卜多糖工艺的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(7):252-253,256.

[14] 曹渊,徐彦芹,夏之宁. 酶法及其联用技术在中草药提取中的应用[J]. 中药材,2008,31(12):1924-1928.