

## 酶法提取荷叶多酚工艺研究

李长春,姚国新,李国元,戴余军\*

(湖北工程学院 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室,湖北 孝感 432000)

**摘要:** 为提高莲资源的综合利用水平,采用纤维素酶法提取荷叶多酚,以多酚得率为考察指标,通过单因素和正交试验,探讨纤维素酶含量、料液比、pH值、提取温度、提取时间、提取次数对荷叶多酚得率的影响。结果表明,纤维素酶法提取荷叶多酚的最佳条件为:纤维素酶含量0.5%、料液比1:30、pH值4.8、提取温度50℃、提取时间45 min、提取次数3次,在此条件下荷叶多酚得率最高,为2.699%。

**关键词:** 荷叶;多酚;纤维素酶;提取

**中图分类号:** R248.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2014)09-0177-04

## Research on Enzyme Extraction Technology of Polyphenols from Lotus Leaf

LI Chang-chun, YAO Guo-xin, LI Guo-yuan, DAI Yu-jun\*

(Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables,  
Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, China)

**Abstract:** In order to improve the comprehensive utilization level of lotus resource, lotus leaf was used to extract polyphenols with cellulase, and the effects of cellulase concentration, solid-liquid ratio, pH value, extraction temperature, extraction time and times on the extraction yield of polyphenols were studied, and the optimum extraction parameters were confirmed through the single factor and orthogonal experiments. The results showed that the optimum cellulase concentration was 0.5%, solid-liquid ratio was 1:30 (m/V), pH value was 4.8, extraction temperature was 50℃, extraction time was 45 min, extraction times was three. Under this optimum condition, the extraction yield of polyphenols was 2.699%.

**Key words:** lotus leaf; polyphenols; cellulase; extraction

莲(*Nelumbo nucifera*)属睡莲科莲属,是一种重要的经济植物,栽培历史悠久,在我国南方广泛种植<sup>[1]</sup>。荷叶为莲的叶片,既是食品又是药品。荷叶的生物活性和生理功能主要与其含有的生物碱、黄酮类等功能性成分有关,其所含的多酚类物质,具有生物抗氧化、抗衰老、治疗心脑血管疾病、降血脂、清暑利湿、凉血止血等生物学功能,可广泛用于食品、化工、医学等领域<sup>[2-5]</sup>。目前,用溶剂法、超声波辅助提取和微波辅助提取等方法提取荷叶多酚的报道较

多<sup>[6-8]</sup>,鲜见酶法提取荷叶多酚的报道。酶法提取具有操作简单、条件温和、安全环保、得率高等特点,可有效降低提取温度、提取时间,提高产物得率和品质<sup>[9-11]</sup>。特别是酶的专一性可避免对底物外物质的破坏,在提取热稳定性差或含量少的物质时优势更为明显<sup>[12]</sup>。为此,本研究通过单因素和正交试验对酶法提取荷叶多酚的工艺进行了研究,以期获得较优的工艺条件,为更好地促进荷叶资源的开发利用提供理论依据。

收稿日期:2014-04-15

基金项目:湖北省科技计划项目(2012DCB04001);特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室开放项目(2013K06);湖北工程学院科研项目(z2013002)

作者简介:李长春(1976-),男,湖北广水人,讲师,硕士,主要从事农业生物技术方面的研究。E-mail:609976790@qq.com

\*通讯作者:戴余军(1972-),女,湖北天门人,副教授,硕士,主要从事生物化学及天然产物的提取工艺研究。

E-mail:dyl5925@sina.com

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料与仪器

1.1.1 原料与试剂 荷叶采自湖北省孝感市。纤维素酶(BR, 15 000 U/g, 上海华蓝化学科技有限公司), 福林-酚、没食子酸、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  等试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备 101A-3 型干燥箱购自上海市实验仪器总厂, FW135 型中草药粉碎机购自天津市泰斯仪器有限公司, HHS21-6 电热恒温水浴锅购自北京长安科学仪器厂, DL-5-B 型离心机购自上海安亭科技仪器厂, HSZ-II D 型循环水真空泵、RE-52CS 旋转蒸发器购自上海亚荣生化仪器厂, 722S 可见分光光度计购自上海仪电分析仪器有限公司。

### 1.2 多酚检测波长的确定

精确吸取 100 mg/L 的标准没食子酸溶液 0.2 mL 加入 1 mL 的福林-酚试剂, 摇匀, 静置 5 min, 加入 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 然后用蒸馏水定容至 10 mL, 在室温下避光放置 2 h, 在分光光度计下进行 500~900 nm 的全波长扫描, 绘制不同波长下的吸光度曲线, 确定最大吸收峰。

### 1.3 多酚标准曲线的绘制

精确吸取没食子酸标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 10 mL 试管中, 分别加入 1 mL 的福林-酚试剂, 摇匀, 静置 5 min, 加入 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 然后用蒸馏水定容至 10 mL, 在室温下避光放置 2 h, 以空白为对照在最大波长处测定吸光度( $y$ ), 没食子酸含量( $x$ )与  $y$  的关系为:  $y = 11.543x + 0.0884 (R^2 = 0.9984)$ 。

### 1.4 纤维素酶法提取荷叶多酚的工艺流程

新鲜荷叶洗净沥干→60℃烘干→过 0.25 mm 筛→准确称取荷叶干粉 1 g, 加入纤维素酶溶液, 调节 pH 值→恒温水浴, 重复提取→离心(5 000 r/min, 20 min)→收集上清液→浓缩。

#### 1.4.1 纤维素酶法提取荷叶多酚的单因素试验

1.4.1.1 纤维素酶含量 在料液比 1:30、pH 值 4.8、提取温度 50℃、提取时间 45 min、提取次数 2 次的条件下, 研究纤维素酶含量(0、0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%)对多酚得率的影响。

1.4.1.2 料液比 在最佳纤维素酶含量、pH 值 4.8、提取温度 50℃、提取时间 45 min、提取次数 2 次的条件下, 研究料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)对多酚得率的影响。

1.4.1.3 pH 值 在最佳纤维素酶含量、最佳料液比、提取温度 50℃、提取时间 45 min、提取次数 2 次

的条件下, 研究 pH 值(4.0、4.4、4.8、5.2、5.6)对多酚得率的影响。

1.4.1.4 提取温度 在最佳纤维素酶含量、最佳料液比、最佳 pH 值、提取时间 45 min、提取次数 2 次的条件下, 研究提取温度(30、40、50、60、70℃)对多酚得率的影响。

1.4.1.5 提取时间 在最佳纤维素酶含量、最佳料液比、最佳 pH 值、最佳提取温度、提取次数 2 次的条件下, 研究提取时间(15、30、45、60、75 min)对多酚得率的影响。

1.4.1.6 提取次数 在最佳纤维素酶含量、料液比、pH 值、提取温度、提取时间条件下, 研究提取次数(1、2、3、4 次)对多酚得率的影响。

1.4.2 纤维素酶法提取荷叶多酚的正交试验 在单因素试验结果的基础上, 对纤维素酶法提取荷叶多酚工艺的纤维素酶含量、料液比、提取时间和次数进行四因素三水平的  $L_9(3^4)$  正交试验(试验设计见表 1), 确定最佳提取条件组合。

表 1 纤维素酶法提取荷叶多酚的正交试验设计

水平	因素			
	纤维素酶含量(A)/%	料液比(B)	提取时间(C)/min	提取次数(D)/次
1	0.3	1:30	30	2
2	0.5	1:40	45	3
3	0.7	1:50	60	4

### 1.5 数据处理

所有数据均用 DPS 7.05 版软件进行处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 多酚最大吸收峰的确定

在 500~900 nm 波长范围内扫描同一浓度的标准没食子酸溶液, 发现没食子酸溶液在 768.5 nm 处有最大吸收峰。

### 2.2 纤维素酶法提取荷叶多酚的单因素试验结果

2.2.1 纤维素酶含量 由图 1 可知, 随着纤维素酶含量的增加, 荷叶多酚得率先增加后降低, 当纤维素酶含量为 0.5% 时多酚得率最高, 为 2.551%; 当纤维素酶含量超过 0.5% 时, 多酚得率开始下降。这是因为前期纤维素酶的加入加速了细胞壁的破裂, 促进了细胞内多酚类物质的释放, 但酶量达到一定数值后, 底物饱和, 且酶分子积聚在细胞周围, 影响固液相间的物质扩散, 导致多酚得率降低。因此, 纤维素酶的最佳含量为 0.5%。

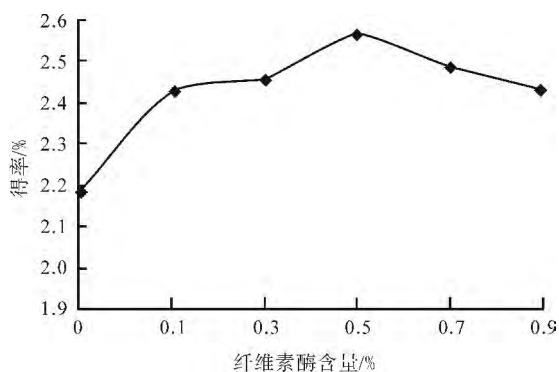


图1 纤维素酶含量对荷叶多酚得率的影响

2.2.2 料液比 由图2可知,随着料液比增加,荷叶多酚得率先增加后降低,当料液比为1:30时,多酚得率最高,为2.534%;当料液比超过1:30时,多酚得率反而下降。说明多酚的饱和浓度在1:30左右。因此,料液比以1:30为宜。

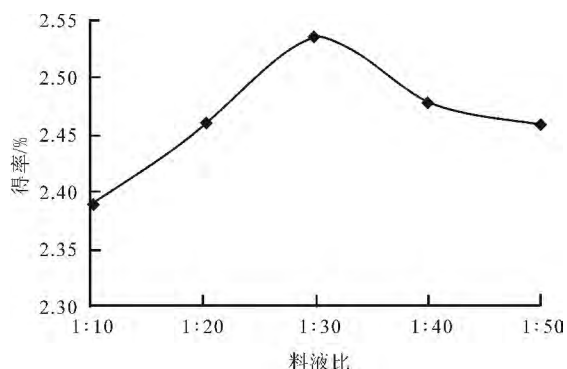


图2 料液比对荷叶多酚得率的影响

2.2.3 pH值 由图3可知,随pH值增加,荷叶多酚得率先增加后下降,当pH值为4.8时,多酚得率最高,为2.533%;当pH值超过4.8时,多酚得率开始下降。其原因可能是纤维素酶在pH值为4.8时表现出较高的活性,过高或过低的pH值不利于纤维素酶对细胞壁的降解,影响多酚的提取。因此,pH值以4.8为宜。

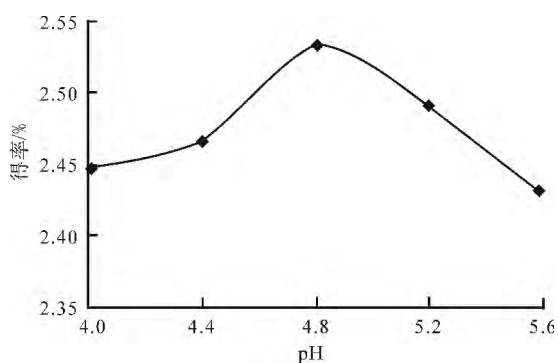


图3 pH值对荷叶多酚得率的影响

2.2.4 提取温度 由图4可知,随提取温度增加,荷叶多酚得率先增加后下降,当温度为50℃时,多酚得率最高,为2.534%;当温度超过50℃时,多酚得率开始下降。这说明温度的增加提高了多酚类物质的溶解度,且有利于酶活性的发挥,但温度过高多酚得率反而降低,可能是因为过高的温度影响了酶活性,同时造成了多酚类物质的降解。因此,最佳提取温度为50℃。

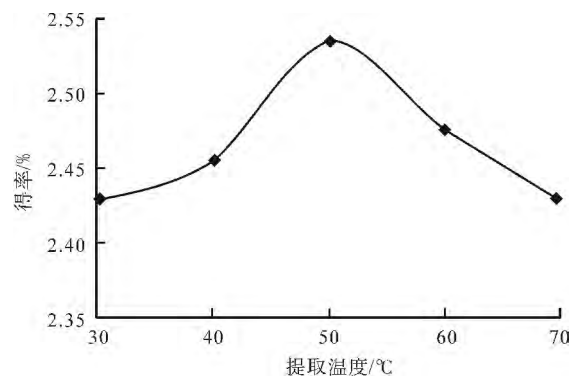


图4 提取温度对荷叶多酚得率的影响

2.2.5 提取时间 由图5可知,随提取时间增加,荷叶多酚得率先增加后逐渐降低,提取时间为45 min时,多酚得率最高,为2.538%;当时间超过45 min时,多酚得率开始下降。主要原因是在一定提取时间范围内,提取时间越长,越有利于多酚类物质的释放,但若提取时间过长,浸出的多酚类物质在溶液中被氧化,容易导致得率降低。因此,最佳提取时间以45 min为宜。

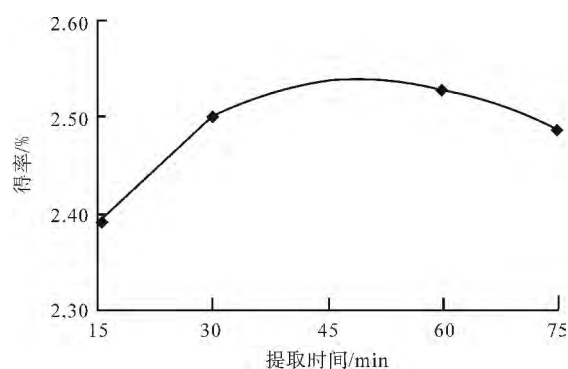


图5 提取时间对荷叶多酚得率的影响

2.2.6 提取次数 由图6可知,随提取次数的增加,荷叶多酚得率先逐渐增加后趋于稳定,提取3次时,多酚得率达到最高值,为2.606%。以上结果说明提取次数低于3次时反应并未进行完全,提取次数超过3次后,多酚得率增加不明显。综合考虑,提取次数以3次较佳。

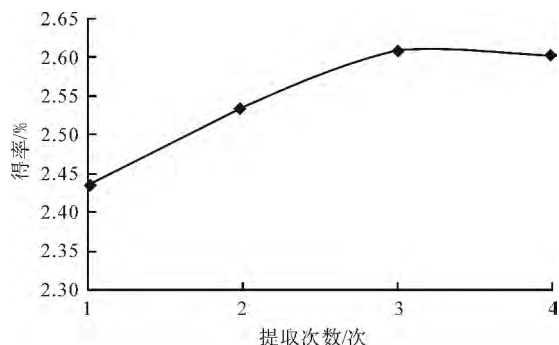


图 6 提取次数对荷叶多酚得率的影响

### 2.3 纤维素酶法提取荷叶多酚的正交试验结果

对上述单因素试验结果进行极差分析发现,纤维素酶含量、料液比、提取时间、提取次数对荷叶多酚提取的影响相对较大,因此,在温度 50 ℃、pH 值 4.8 的条件下,选用纤维素酶含量、料液比、提取时间、提取次数 4 个因素设计  $L_9(3^4)$  正交试验,优化荷叶多酚的提取工艺。由表 2 可知,各因素对荷叶多酚得率的影响程度为纤维素酶含量>提取次数>料液比>提取时间,最佳提取条件为:纤维素酶含量 0.5%、料液比 1:30、提取时间 45 min、提取次数 3 次。对正交试验结果进行方差分析,发现上述 4 个因素对荷叶多酚得率均有极显著影响(表 3)。

表 2 纤维素酶法提取荷叶多酚的正交试验结果

试验编号	因素				得率/%
	A	B	C	D	
1	0.3	1:30	30	2	2.397
2	0.3	1:40	45	3	2.452
3	0.3	1:50	60	4	2.402
4	0.5	1:30	45	4	2.561
5	0.5	1:40	60	2	2.515
6	0.5	1:50	30	3	2.551
7	0.7	1:30	60	3	2.473
8	0.7	1:40	30	4	2.462
9	0.7	1:50	45	2	2.413
$k_1$	2.416 9	2.477 0	2.469 8	2.441 6	
$k_2$	2.542 2	2.476 1	2.475 1	2.491 8	
$k_3$	2.449 1	2.455 1	2.463 3	2.474 9	
R	0.125 3	0.021 9	0.011 8	0.050 2	
最优组合	$A_2B_1C_2D_2$				

表 3 纤维素酶法提取荷叶多酚正交试验结果的方差分析

因素	平方和	自由度	均方	F	P
A	0.101 6	2	0.050 8	5 596.976 0	0.000 1
B	0.003 7	2	0.001 9	205.865 3	0.000 1
C	0.000 8	2	0.000 4	46.363 3	0.000 1
D	0.015 7	2	0.007 8	864.322 4	0.000 1
误差	0.000 2	18	0		

### 2.4 纤维素酶法提取荷叶多酚最佳工艺的验证

准确称取处理好的荷叶干粉 1 g,在最佳提取条件下进行 3 次平行试验,以考察最佳提取条件的合理性和可靠性。3 次试验测得荷叶多酚得率分别为 2.697%、2.701%、2.700%,平均得率为 2.699%,明显高于表 2 中结果,且相对标准偏差为 0.000 8,说明优化后的工艺条件重复性好,数据可靠。

## 3 结论

本研究通过单因素试验考察了纤维素酶含量、料液比、pH 值、提取温度、提取时间、提取次数对荷叶多酚得率的影响,结果显示,纤维素酶含量、料液比、提取时间、提取次数 4 个因素对荷叶多酚得率影响程度较大;通过正交试验对上述 4 个因素进行进一步的优化发现,纤维素酶含量对荷叶多酚得率的影响最大,其次是提取次数和料液比,提取时间影响最小,最终获得纤维素酶提取荷叶多酚的最佳工艺条件为:纤维素酶含量 0.5%、料液比 1:30、pH 值 4.8、提取温度 50 ℃、提取时间 45 min、提取次数 3 次,在此条件下,荷叶多酚得率可达到 2.699%,虽比有机溶剂法低<sup>[8]</sup>,但更加安全环保。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院武汉植物研究所. 中国莲[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [2] 邓国栋, 庄大海. 荷叶黄酮类化合物提取工艺研究[J]. 山地农业生物学报, 2010, 29(5): 428-431.
- [3] 唐裕芳, 张妙玲, 刘忠义, 等. 荷叶研究现状与展望[J]. 食品研究与开发, 2004(4): 14-16.
- [4] 周兰香, 黄阿根, 谢凯舟, 等. 分光光度法与 HPLC 法测定荷叶总黄酮的研究[J]. 中草药, 2002(1): 35-37.
- [5] 陈海光, 余以刚, 曾庆孝. 荷叶功能成分的提取研究[J]. 食品与机械, 2001(5): 16-17.
- [6] 靳素荣, 姚礼峰, 卢威, 等. 超声波法提取荷叶多酚工艺研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 20-22.
- [7] 赵博, 赵晓云, 李志洲. 回归正交法优化荷叶多酚的提取工艺[J]. 粮油加工, 2010(4): 116-119.
- [8] 赵晓云, 赵博, 邢媛媛, 等. 荷叶多酚的微波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国酿造, 2010(3): 79-83.
- [9] 戴余军, 石会军, 李长春, 等. 菠萝皮可溶性膳食纤维提取工艺的研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(9): 1798-1802.
- [10] 王晓. 酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 23(3): 37-39.
- [11] 项雷文, 陈文韬. 纤维素酶法提取杭白菊中总黄酮工艺优化[J]. 化学工程与装备, 2009(5): 26-29.
- [12] 韩伟, 马婉婉, 骆开荣. 酶法提取技术及其应用进展[J]. 机电信息, 2010(17): 15-18.