

# 响应面优化酶法提取芹菜黄酮工艺研究

易建华, 朱振宝

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021)

**摘 要:** 本实验采用酶法提取芹菜中的黄酮物质, 单因素试验结果表明: 酶的种类、酶浓度、酶解温度及酶解时间对芹菜黄酮得率影响较大, 且料液比影响较小; 通过响应面回归分析, 得到酶法提取芹菜黄酮的优化工艺条件为: 纤维素酶浓度 2.3 U/ml, 酶解温度 51.5 °C, pH 4.7, 酶解时间为 2.2 h。在最优条件下, 芹菜黄酮得率为 0.88%。

**关键词:** 芹菜; 黄酮; 酶解; 响应面

## Optimization of Enzymatic Extraction Technology of Total Flavonoids from Celery by Response Surface Methodology

YI Jian-hua, ZHU Zhen-bao

(College of Life Science and Engineering, Shannxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** Total flavonoids were extracted from celery (*Apium graveolens* L.) with enzymatic method. Based on single-factor test, response surface analysis was conducted to optimize the enzymatic extraction technology of total flavonoids. The single-factor test showed that enzyme variety, enzyme concentration, treatment temperature and time markedly affected the extraction rate of total flavonoids, but material to liquid ratio presented little effect. The optimum extraction conditions were confirmed by response surface method as follows: cellulase concentration 2.3 U/ml, solid to liquid ratio 1:60, pH 4.7, enzymatic hydrolysis temperature 51.5 °C, and time 2.2 h. Under these conditions, the extraction rate was 0.88%.

**Key words:** celery; total flavonoids; enzymatic hydrolysis; response surface methodology

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-092-05

芹菜(*Apium graveolens* L.)又名旱菜、药芹、香芹, 为伞形科草本植物旱芹的茎叶, 一年或两年生草本, 我国各地均有栽培, 为人们生活中常用蔬菜之一<sup>[1]</sup>。现代医学研究发现, 芹菜的茎叶中含有芹菜黄酮成分, 具有抗氧化、抗菌抗病毒、抗癌症、抗衰老、抑制高血压、高血脂及预防心血管疾病等多种药理作用, 因此芹菜黄酮具有较高的开发价值<sup>[2-4]</sup>。

目前, 芹菜黄酮类物质主要用乙醇等溶剂法提取<sup>[5-6]</sup>, 粗提物普遍存在黄酮物质含量较低, 有机溶剂残留, 得率低等缺陷, 而酶法提取芹菜黄酮, 具有绿色环保, 高效安全等优点, 因此, 本实验采用酶法提取芹菜黄酮, 以期对芹菜黄酮的开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

芹菜购于西安超市, 洗净, 切碎, 烘干, 粉碎, 备用。

90% 乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、石

油醚等(均为化学纯) 天津市红岩化学试剂厂; 标准品芦丁 上海生化试剂二厂; 果胶酶 丹麦 Novo Nordisk 公司; 纤维素酶 润德生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

粉碎机 北京中兴伟业仪器有限公司; 722 型光栅分光光度计、HS.2 型电热恒温水浴锅 上海精密科学仪器有限公司; RE-52A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; DZF-6020 型真空干燥箱 上海益恒实验仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 总黄酮含量测定

芹菜总黄酮含量测定采用  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2$  方法<sup>[7]</sup>。

#### 1.3.1.1 标准溶液的制备

精确称取 120 °C 干燥至恒重的芦丁标准品 20mg 左右, 置于 100ml 容量瓶中, 加 60% 乙醇溶解, 稀释至刻度, 精确量取 25ml, 置于 50ml 容量瓶中, 蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.10mg/ml 芦丁标准溶液。

收稿日期: 2008-07-29

作者简介: 易建华(1971-), 女, 副教授, 硕士, 主要从事天然活性物质分离、纯化研究。E-mail: yijianhua@sust.edu.cn

### 1.3.1.2 标准曲线的绘制

精密吸取芦丁标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml 分别置于 6 支 10ml 具塞试管中, 各加 30% 乙醇溶液至 5ml, 精确加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 0.3ml, 摇匀, 放置 6min 后, 加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 0.3ml, 摇匀, 放置 6min 后加入 1mol/L  $\text{NaOH}$  溶液 4ml, 加水 0.4ml, 摇匀, 放置 15min, 以第一管为空白于 510nm 波长下测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。得回归方程为  $y = 9.1257x + 0.0049$ ,  $R^2 = 0.9991$ 。

### 1.3.1.3 样品处理

取新鲜芹菜, 切碎, 烘干, 称取 1.5g, 以料液比 1:10(W/W) 加入 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次提取 2h。提取液减压回收溶剂后, 以热水充分溶解。经石油醚萃取, 取水相, 转入 100ml 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 待测。

### 1.3.1.4 样液测定

精密吸取 2ml 样液, 加入 10ml 具塞刻度试管中, 加 30% 乙醇溶液至 5ml, 精确加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 0.3ml, 摇匀, 放置 6min 后, 加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 0.3ml, 摇匀, 放置 6min 后加入 1mol/L  $\text{NaOH}$  溶液 4ml, 加水 0.4ml, 摇匀, 放置 15min, 于 510nm 波长下测定吸光度。同时吸取样液 2ml 加入 10ml 具塞刻度试管中, 加入 30% 乙醇至刻度, 作为对照溶液。根据测得吸光度, 利用标准曲线计算样品总黄酮得率。

$$\text{芹菜黄酮得率(\%)} = \frac{\text{提取物中芹菜黄酮质量}}{\text{芹菜干粉重}} \times 100$$

## 1.3.2 酶提取工艺流程

准确称取芹菜干粉(60 目)1.50g, 放入三角瓶中, 加蒸馏水混匀, 设定酶解条件(不同酶类、加酶量、pH 值、温度、时间、料液比), 进行酶解提取, 抽滤, 得提取液, 按照上述操作, 测量黄酮得率。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶法提取芹菜黄酮工艺条件的单因素试验

#### 2.1.1 酶的种类对芹菜黄酮得率的影响

表 1 酶的种类对芹菜黄酮得率的影响

Table 1 Effects of different enzymes on extraction rate of total flavonoids from celery

酶的种类	纤维素酶	果胶酶	复合酶	空白对照(醇提)
芹菜黄酮得率(%)	0.58	0.49	0.58	0.45

称取 1.5g 芹菜干粉, 采用表 1 中酶以及空白对照, 在加酶量 2.0U/ml、pH4.0、温度 50℃、酶解时间 2.0h、料液比 1:60 条件下进行进行试验, 分别考察提取体系中

酶的种类对黄酮得率的影响, 结果如表 1 所示。

表 1 结果表明, 与传统醇提相比, 加入纤维素酶后芹菜黄酮得率显著提高( $p < 0.01$ ), 这可能是由于纤维素酶破坏了细胞壁, 使细胞内芹菜黄酮得以释放的缘故。由表 1 可以看出, 加入果胶酶对芹菜黄酮的得率没有明显的提高( $p > 0.05$ ), 说明芹菜中果胶物质较少, 加入果胶酶对细胞壁的通透性影响较小; 加入纤维素与果胶复合酶, 与加入纤维素复合酶相比, 芹菜黄酮得率没有显著的提高作用( $p > 0.05$ ), 说明此两种酶无明显协同作用。因此, 实验选择纤维素酶作为酶法提取芹菜黄酮的合适用酶。

#### 2.1.2 加酶量对芹菜黄酮得率的影响

分别以 1、2、3、4U/ml 的加酶量, 调节料液比 1:60、pH4.0, 在温度 50℃ 的水浴中保温浸提 2.0h。结果如图 1 所示。

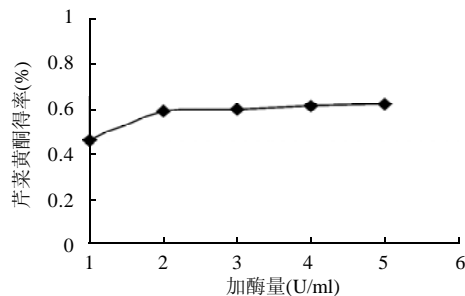


图 1 加酶量对芹菜黄酮得率的影响

Fig.1 Effects of cellulase concentration on extraction rate of total flavonoids

由图 1 可知, 随着酶用量的增加, 芹菜黄酮的得率增大, 当加酶量为 4U/ml 时, 黄酮得率最高; 由图 1 同时可以看出, 当加酶量大于 2U/ml, 随着加酶量的增加, 芹菜黄酮得率没有明显提高, 这说明酶浓度已接近饱和, 继续提高加酶量, 对芹菜得率影响不明显。

#### 2.1.3 pH 值对芹菜黄酮得率的影响

调节提取液 pH 值分别为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5, 以加酶量 2.0U/ml、1:60 料液比在 50℃ 水浴中酶解 2.0h。结果如图 2 所示。

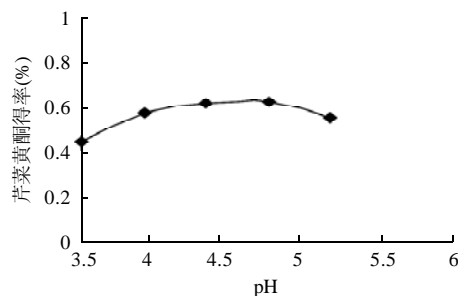


图 2 pH 值对芹菜黄酮得率的影响

Fig.2 Effects of pH value on extraction rate of total flavonoids

由图2可以看出, pH值对得率有明显影响, 在pH3.5上升到pH4.5过程中黄酮得率迅速增加, pH4.5时达到最大值, 在pH4.5~5.0之间黄酮得率增加缓慢, pH值超过5.0后, 黄酮得率下降, 说明微酸性环境有利于纤维素酶的作用。

#### 2.1.4 酶解温度对芹菜黄酮得率的影响

将提取液分别置于不同酶解温度下, 并在pH5.0、加酶量2U/ml。料液比1:60下保温2.0h进行酶解浸提, 结果见图3。

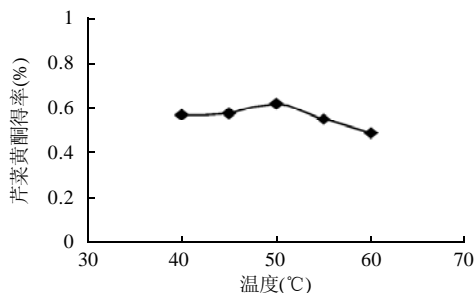


图3 酶解温度对芹菜黄酮得率的影响

Fig.3 Effects of hydrolysis temperature on extraction rate of total flavonoids

由图3可知, 随着酶解温度的提高, 芹菜黄酮的得率增大, 50℃时黄酮得率最高, 但温度进一步提高时, 黄酮得率呈下降趋势, 这是因为高温使蛋白质变性, 从而影响酶的活性。

#### 2.1.5 酶解时间对黄酮得率的影响

在加酶量2U/ml、pH5.0、50℃、料液比1:60条件下, 采用不同酶解时间进行保温浸提。实验结果见图4。

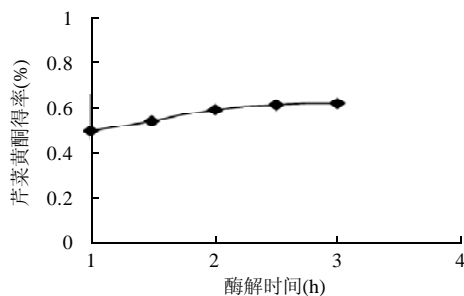


图4 酶解时间对芹菜黄酮得率的影响

Fig.4 Effects of hydrolysis time on extraction rate of total flavonoids

由图4可知, 随酶解时间的延长黄酮得率显著增大, 但酶解2.0h后, 时间进一步延长, 黄酮得率没有明显的提高, 说明适当地延长酶解时间, 酶的活性逐渐增大, 芹菜黄酮的得率获得较大程度的提高, 但酶解时间过长, 酶的活性降低, 从而对黄酮得率影响不大。

#### 2.1.6 料液比对黄酮得率的影响

分别以1:20、1:40、1:60、1:80料液比(W/W), 在pH4.5、加酶量2U/ml、温度50℃的水浴中浸提2.0h。结果如图5所示。

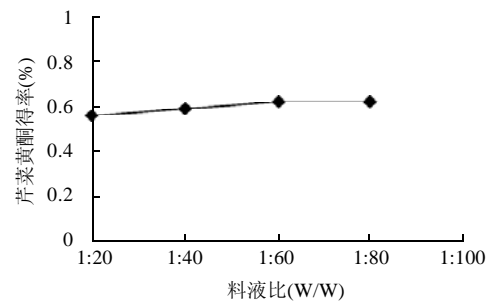


图5 料液比对黄酮得率的影响

Fig.5 Effects of material to liquid ratio on extraction rate of total flavonoids

由图5表明, 在所选择料液比范围内, 料液比越大, 芹菜黄酮得率越高, 但增量并不明显( $p > 0.05$ ), 可见, 增大料液比, 虽然一定程度增大了底物浓度, 但酶的活性有限, 因此对黄酮得率影响较小, 且增大料液比, 提取芹菜黄酮的能耗增加, 因此从经济角度考虑料液比1:60较合适。

## 2.2 响应面优化试验

### 2.2.1 响应面试验设计

表2 响应面试验的因素和水平编码值

Table 2 Coded factors and levels of response surface design

水平	X <sub>1</sub> 加酶量(U/ml)	X <sub>2</sub> 酶解温度(°C)	X <sub>3</sub> pH	X <sub>4</sub> 酶解时间(h)
-1	1	45	4.0	1.5
0	2	50	4.5	2.0
1	3	55	5.0	2.5

表3 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3 Design and results of Box-Behnken test

试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y 得率(%)
1	-1	-1	0	0	0.41
2	1	-1	0	0	0.78
3	-1	1	0	0	0.77
4	1	1	0	0	0.76
5	0	0	-1	-1	0.49
6	0	0	1	-1	0.70
7	0	0	-1	1	0.69
8	0	0	1	1	0.73
9	-1	0	0	-1	0.46
10	1	0	0	-1	0.70
11	-1	0	0	1	0.63
12	1	0	0	1	0.78
13	0	-1	-1	0	0.41
14	0	1	-1	0	0.71
15	0	-1	1	0	0.78
16	0	1	1	0	0.78
17	-1	0	-1	0	0.43
18	1	0	-1	0	0.54
19	-1	0	1	0	0.65
20	1	0	1	0	0.68
21	0	-1	0	-1	0.45
22	0	1	0	-1	0.66
23	0	-1	0	1	0.69
24	0	1	0	1	0.62
25	0	0	0	0	0.82
26	0	0	0	0	0.87
27	0	0	0	0	0.85
28	0	0	0	0	0.84
29	0	0	0	0	0.88

由单因素试验可以看出, 采用酶法提取芹菜黄酮, 酶浓度、酶解温度、pH 值及酶解时间对得率影响较大, 而料液比对得率影响较小, 选择可能形成曲面且对得率影响较大的 4 个因素(酶浓度、酶解温度、pH 值、酶解时间), 采用 Box-Behnken 设计法进行试验设计, 因素水平编码值见表 2, 其结果见表 3。

## 2.2.2 模型方差分析

表 3 是 29 个试验点给出的试验结果, 29 个试验点分为两类: 其一是析因点, 自变量取值在  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  所构成的三维顶点, 共有 24 个析因点; 其二是零点, 为区域中心点, 零点试验重复 5 次, 用来估计试验误差, 以得率为响应值(Y), 利用 DesignExpert6.0 软件进行二次多元回归拟合, 分别得到表 4 回归方程模型方差分析及表 5 回归方程系数估计值。

表 4 回归方程模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance for regression equation model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p > F
模型	0.536059	14	0.03829	10.6179	< 0.0001
残差	0.050486	14	0.003606		
失拟	0.041473	10	0.004847	1.84079	0.96
纯误差	0.009013	4	0.002253		
总和	0.586545	28			

由表 4 方差分析结果可看出, 模型  $p < 0.0001$ , 方程模型达到极显著, 失拟  $p = 0.96 > 0.05$ , 不显著, 因此二次模型成立, 应用此方程可以预测芹菜黄酮的得率及优化水酶法提取芹菜黄酮工艺。

根据表 5, 去掉不显著因素, 获得二次多项回归方程:

$$Y = 0.8546 - 0.07375X_1 + 0.064167X_2 + 0.08675X_3 + 0.056833X_4 - 0.11709X_1^2 - 0.08672X_2^2 - 0.11734X_3^2 - 0.11522X_4^2 - 0.0965X_1X_2 - 0.07525X_2X_3 - 0.06925X_2X_4 \quad (\text{校正 } R^2 = 0.9382)$$

表 5 回归方程中回归系数估计值

Table 5 Coefficient estimates in regression equation

因素	估计值	自由度	标准误	t 值	p >  t
$X_1$	0.07375	1	1.50521	-3.4677	0.0029
$X_2$	0.064167	1	11.8234	-3.92341	0.0011
$X_3$	0.08675	1	0.758591	-3.11882	0.0062
$X_4$	0.056833	1	0.752606	-2.56876	0.0199
$X_1^2$	-0.11709	1	0.023592	-4.96315	0.0001
$X_2^2$	-0.08672	1	0.589805	-3.67565	0.0019
$X_3^2$	-0.11734	1	0.005898	-4.97375	0.0001
$X_4^2$	-0.11522	1	0.005898	-4.88367	0.0001
$X_1X_2$	-0.0965	1	0.150215	-3.21206	0.0051
$X_2X_3$	-0.07525	1	0.075108	-2.50474	0.0227
$X_2X_4$	-0.06925	1	0.075108	-2.30503	0.0340

由表 5 可知, 影响芹菜黄酮得率的因素主次为:  $X_2 > X_1 > X_3 > X_4$ 。其中温度、加酶量及 pH 值达到极显著程度, 酶解时间为显著, 且加酶量与温度、温度与 pH 值以及温度与时间有交互作用。

## 2.2.3 芹菜黄酮得率响应面分析与最优工艺条件的确定

通过得率回归方程所作的响应面图和等高线图见图 6~8。由图 6 可知, 随着加酶量和酶解温度的增大, 芹菜黄酮的得率先快速提高后缓慢降低, 由此可见, 适当的增大酶浓度及酶解温度, 可以一定程度提高黄酮得率。从图 7 可以看出, 随着酶解温度和 pH 值提高, 黄酮得率也表现为先增大后降低, 在图 8 中, 酶解温度及酶解时间对芹菜黄酮得率的影响与图 7 相似, 因此, 在实际生产中, 应慎重控制酶解温度、酶解时间及 pH 值, 以获得较高的得率。

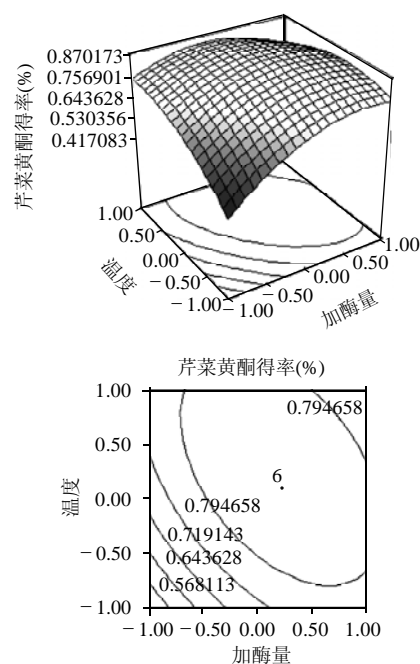
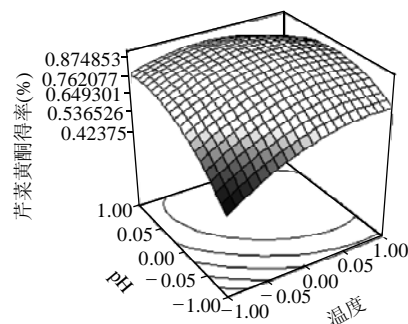


图 6 加酶量和酶解温度交互影响芹菜黄酮得率的响应面图及等高线图 ( $X_3 = 0$ ,  $X_4 = 0$ )

Fig.6 Response surface and contour plots for interaction effects of cellulase concentration and hydrolysis temperature ( $X_3 = 0$ ,  $X_4 = 0$ )



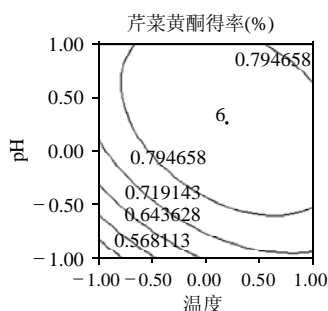


图7 酶解温度和pH值交互影响芹菜黄酮得率的响应面及等高线图  
( $X_1 = 0$ ,  $X_4 = 0$ )

Fig.7 Response surface and contour plots for interaction effects of hydrolysis temperature and pH value on extraction rate of total flavonoids

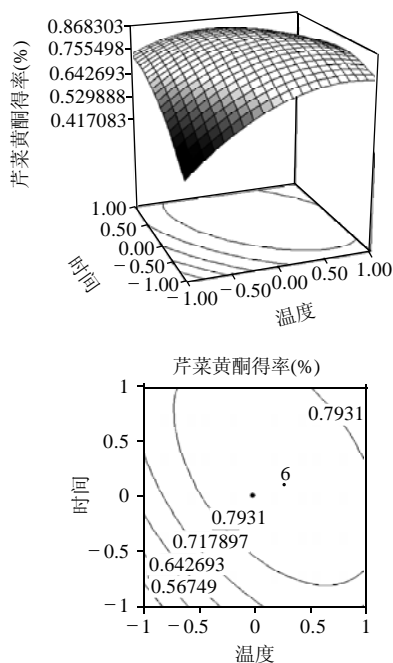


图8 酶解温度与时间交互影响芹菜黄酮得率的响应面及等高线图  
( $X_1 = 0$ ,  $X_3 = 0$ )

Fig.8 Response surface and contour plots for interaction effects of hydrolysis temperature and time on extraction rate of total flavonoids ( $X_1 = 0$ ,  $X_3 = 0$ )

酶法提取芹菜黄酮的响应面趋势呈抛物线形, 因此回归方程有极大值, 结合方程与响应面图可得到酶解的最

优条件为: 加酶量 2.3U/ml、酶解温度 51.5℃、pH4.7、酶解时间 2.2h, 最佳条件下, 得率预测值为 0.89%。

根据最佳工艺条件, 做三组验证性实验, 结果如表 6 所示。

表6 最佳工艺条件验证结果

Table 6 Validation results of optimal extraction conditions

实验号	1	2	3	平均值
得率(%)	0.89	0.88	0.88	0.88

由表 6 可以看出, 在最佳工艺条件下, 芹菜黄酮的得率与预测值接近, 因此进一步验证了实验结果。

### 3 结 论

3.1 酶的种类、加酶量、酶解温度及酶解时间对芹菜黄酮得率的影响较大, 而料液比对黄酮得率影响较小; 采用果胶酶, 果胶酶与纤维素酶复合酶进行酶法浸提, 芹菜黄酮的得率没有明显的提高, 而采用单一的纤维素酶, 芹菜总黄酮得率较高; 且果胶酶与纤维素复合酶未表现出协同作用。

3.2 采用响应面试验设计获得芹菜黄酮最优提取条件为: 纤维素酶浓度 2.3U/ml、温度 51.5℃, pH 值为 4.7, 酶解时间 2.2 h。在最优条件下, 芹菜黄酮得率为 0.88%。

### 参考文献:

- [1] 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 中国蔬菜品种[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] 杨立红. 芹菜叶柄与叶片中总黄酮含量的研究[J]. 山东师范大学学报: 自然科学版, 1998, 13(4): 434-436.
- [3] MONIN R A, NAIR M G. Antioxidant, cyclooxygenase and topoisomerase inhibitory compounds from *Apium graveolens* Linn. seeds[J]. Phytomedicine, 2002, 9(4): 312-318.
- [4] 严建刚, 张名位, 杨公明, 等. 芹菜黄酮的提取条件及其抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(1): 131-135.
- [5] 毕丽君, 李慧. 水芹中黄酮类化合物最佳提取工艺的研究[J]. 食品科学, 1999, 20(12): 35-37.
- [6] 郑瑞昌, 黄阿根, 钱建亚. 水芹黄酮提取工艺的研究[J]. 扬州大学学报, 2001, 4(4): 50-51.
- [7] 董钰明, 封士兰, 段生玉, 等. 不同品种芹菜及其不同部位中总黄酮含量的测定[J]. 兰州医学院学报, 2002, 28(3): 32-33.