

# 纤维素酶预处理法提取辣椒素的研究

董新荣<sup>1,2</sup>, 刘仲华<sup>2,\*</sup>, 郭德音<sup>1</sup>, 李雨虹<sup>3</sup>, 谢达平<sup>3</sup>

(1. 湖南农业大学理学院, 湖南 长沙 410128 2. 湖南农业大学天然产物研究中心, 湖南 长沙 410128

3. 湖南农业大学生物科学与技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 本文研究了应用纤维素酶处理辣椒粉的酶解条件及对乙醇提取辣椒素效率的影响。考察了纤维素酶处理辣椒粉的酶解液初始 pH 值、酶解温度、酶用量和酶解时间对辣椒素提取率的影响; 确定了酶解的最优条件为: 酶解液初始 pH 值 5.3, 酶解温度为 40℃, 酶用量为 10mg/g, 酶解时间为 3h。在此条件下, 酶解后的辣椒粉用乙醇提取时, 辣椒素的提取率比乙醇直接提取时高出 7% 左右。

**关键词:** 辣椒; 辣椒素; 纤维素酶; 提取

Study on Extraction of Capsaicinoids from *Capsicum frutescens* L. with Cellulase Enzymolysis

DONG Xin-rong<sup>1,2</sup>, LIU Zhong-hua<sup>2,\*</sup>, GUO De-yin<sup>1</sup>, LI Yu-hong<sup>3</sup>, XIE Da-ping<sup>3</sup>

(1. College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Natural Product Research Center, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

3. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In this paper, a new technology, extracting capsaicinoids from *Capsicum frutescens* L. with cellulase is studied. Some affecting factors, such as enzymatic hydrolysis temperature, pH of the enzyme solution, the time of enzymatic hydrolysis and the amount of enzyme on extraction of capsaicin are optimized. The optimum parameters are: enzyme solution pH 5.3, enzymatic hydrolysis temperature 40℃, enzyme 10mg/g and time of enzymatic hydrolysis 3 hours. The extractive efficiency is 7% more than that of traditional extract with ethanol comparatively.

**Key words** *Capsicum frutescens* L.; capsaicinoids; cellulase; extraction

中图分类号 Q814.9 TQ041.8

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0100-04

辣椒素的传统提取方法一般为乙醇回流提取法、丙酮浸提法<sup>[1]</sup>等, 由于辣椒具有片状凹凸不平的纤维组织结构, 辣椒素及其他脂溶性成分存在于纤维组织内<sup>[2]</sup>, 采用传统的有机溶剂提取法需要耗费大量有机溶剂和时间, 提取效率较低。超声法、超临界流体萃取法等认为是天然产物提取的新方法, 在辣椒素提取的研究中认为是有效的, 与传统方式比较具有产率高、生产周期短、无需加热、有效成分不被破坏等优点<sup>[3-4]</sup>。但这些方法设备要求高、生产成本高等原因目前仅应用于实验研究中, 难适用于大工业生产。

酶法为天然产物提取中新兴技术, 国外从二十世纪八十年代已有利用酶法预处理提取天然产物的报道<sup>[5-6]</sup>; 国内近些年也可见一些类似研究<sup>[7-8]</sup>, 这些研究均显示比传统方法提取率高等优越性。Santamaría 等<sup>[9]</sup>对酶法预处理辣椒粉提取辣椒素的方法进行了较为系统的研究,

认为酶解可有效地破坏辣椒纤维组织, 有利于辣椒素类物质释放, 辣椒素的收率较传统有机溶剂直接抽提法要高。国内最近有酶法提取辣椒红色素<sup>[10]</sup>的报道, 同时也认为酶法处理有利于辣椒素的释放。本文系统探索了纤维素酶处理辣椒粉及用 30% 乙醇及 90% 乙醇分步提取辣椒素的方法, 旨在为我国辣椒素的提取分离探索新的工艺路线。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

海南野山尖椒 市售; 纤维素酶 湖南尤特尔生化有限公司; 辣椒素对照品 美国 Sigma 公司; 食用级乙醇 市售; 其它化学试剂均为分析纯试剂。

F-2500FL 荧光分光光度计 日本日立公司; LC-10ATVP 高效液相色谱仪 日本岛津公司。

收稿日期: 2006-07-19

\*通讯作者

基金项目: 国家科技部十五科技重点项目(2004BA542C); 湖南省发改委项目(2004714-16)

作者简介: 董新荣(1963-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为天然产物化学。

## 1.2 方法

### 1.2.1 辣椒粉的酶解方法及辣椒素的提取方法

取1g干辣椒粉,在一定条件下进行纤维素酶的酶解反应,抽滤。滤液用蒸馏水定容后备用。辣椒残渣用95%食用乙醇回流1h提取辣椒素,过滤,提取液用乙醇定容备用。水溶液及醇提液均采用荧光光度法检测辣椒素含量。

### 1.2.2 酶活的测定方法

采用DNS法测定酶活力<sup>[11]</sup>。查标准曲线的葡萄糖浓度。

酶活定义:在40℃,pH4.8的条件下,1min分解CMC-Na产生相当于1μg葡萄糖的酶量规定为一个酶活力单位,以U/g表示。

### 1.2.3 分析方法

#### 1.2.3.1 HPLC 色谱条件<sup>[12]</sup>

色谱柱为Vp-ODS柱(150mm×4.6mm id, 5μm),流动相为甲醇-水(65:35),体积流量为0.8ml/min,柱温为35℃,检测波长为280nm;进样量20μl。

对照品及样品溶液制备:准确称取对照品及待测样品,用甲醇定容于10ml容量瓶中,超声溶解。

按色谱条件进行HPLC测定,相关物质含量采用对照品面积外标法计算。

#### 1.2.3.2 荧光光度法的条件<sup>[13]</sup>

激发狭缝为10.0nm,发射狭缝为10.0nm;扫描速度为1500nm/min,扫描波长为10nm;在激发波长(Ex)278.0nm,发射波长(Em)312.0nm,测定样品荧光值。以对照品标准曲线法计算有关物质含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶活的测定

以葡萄糖标准溶液0~0.8mg/ml浓度对吸光值OD<sub>540</sub>绘制标准曲线,线性回归方程为 $y=1.398x-0.01$ , $R=0.9992$ , $SD=0.02068$ , $N=5$ , $p<0.0001$ 。实验测得酶活力OD值为0.661,计算得知纤维素酶的活力为15833U/g。

### 2.2 酶解条件的单因素试验

#### 2.2.1 酶解pH值对辣椒素提取的影响

在酶解时间、酶解温度和酶用量一定的条件下,辣椒素的提取效率与辣椒粉酶解液的pH变化有关,其变化曲线如图1。辣椒素的含量先随酶解缓冲液初始pH值的增大而增大,在pH5.3时达到最大值,当pH值大于5.3后,辣椒素的含量反而随pH值的增大而减小。说明纤维素酶的活力受环境pH值的影响。实验表明在pH值为5.3时,实验用酶处于最佳催化状态,有利于纤维素

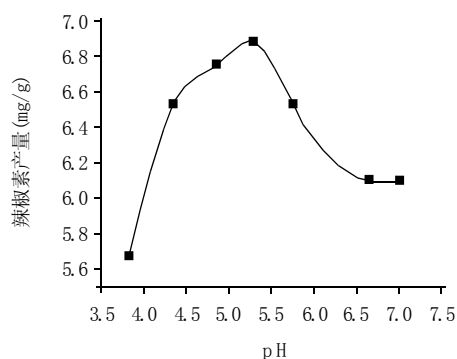


图1 酶解液pH对辣椒素产量的影响

Fig.1 Effects of pH of solution on yield of capsaicinoids

的分解和辣椒素的释放,酶解后辣椒素的提出量最高。

#### 2.2.2 酶解温度对辣椒素提取的影响

在酶解缓冲液初始pH值为5.3,酶解时间和酶量一定的条件下,辣椒粉酶解后乙醇提取辣椒素的量随酶解温度的变化情况如图2所示。实验显示酶解后辣椒素的提出量开始随酶解温度的升高而增大,在30~40℃时达到最高值;超过40℃后随温度的升高而减少。因此,酶解实验应在30~40℃进行。

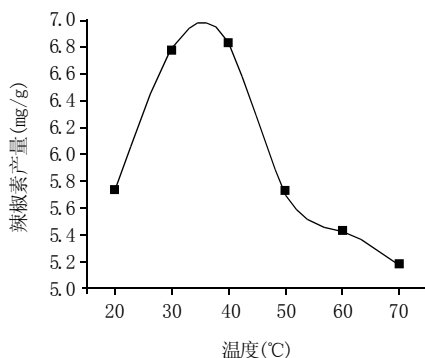


图2 温度对辣椒素产量的影响

Fig.2 Effects of temperature on yield of capsaicinoids

#### 2.2.3 酶用量对辣椒素提取的影响

在酶解缓冲液初始pH值为5.3,酶解温度为40℃,酶解时间一定的条件下,酶用量对辣椒素提取效率的影响如图3所示。实验表明,辣椒素的提取量开始随着酶用量的增加而增大;但当酶用量与辣椒粉的比例达到一定值后,再增加酶的用量,辣椒素的提取量反而降低,这可能是过量的纤维素酶使反应时酶浓度过高,不利于分子定向运动,酶活性反而降低,使辣椒素溶出下降。因此,酶用量以10mg/g辣椒粉为佳。

#### 2.2.4 酶解时间对辣椒素提取的影响

在酶解缓冲液初始pH值为5.3,酶用量为10mg/g辣椒粉,酶解温度为40℃,辣椒素提取量随酶解时间的变化情况如图4所示。实验表明,辣椒素的提取量随

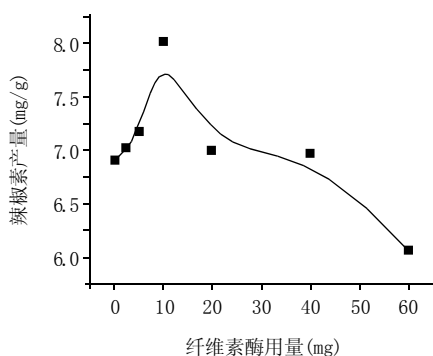


图3 酶用量对辣椒素产量的影响

Fig.3 Effects of the amount of cellulase on yield of capsaicinoids

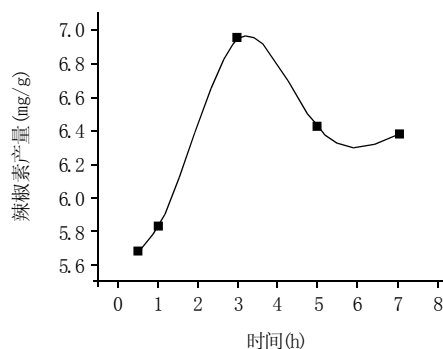


图4 时间对辣椒素产量的影响

Fig.4 Effects of time on yield of capsaicinoids

着酶解时间的增加而增大；当酶解时间大于3 h后，辣椒素的提取量反而降低，这可能是由于辣椒素水解的缘故。因此，酶解时间以3 h左右为佳。

#### 2.2.5 酶解正交试验

在以上单因素考察的基础上，以1 g辣椒粉为原料进行四因素三水平正交试验，酶解后以95%乙醇提取其

表1 因素水平与正交试验表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

试验号	因 素				试验结果 辣椒素提出量 mg/g 辣椒皮粉
	A 酶解 pH 值	B 温度 (°C)	C 酶用量 (mg/g)	D 时间 (h)	
1	1(4.3)	1(20)	1(5)	1(2)	6.615
2	1(4.3)	2(30)	2(10)	2(3)	6.775
3	1(4.3)	3(40)	3(20)	3(4)	7.060
4	2(5.3)	1(20)	2(10)	3(4)	7.060
5	2(5.3)	2(30)	3(20)	1(2)	6.745
6	2(5.3)	3(40)	1(5)	2(3)	7.065
7	3(6.8)	1(20)	3(20)	2(3)	6.995
8	3(6.8)	2(30)	1(5)	3(4)	6.615
9	3(6.8)	3(40)	2(10)	1(2)	7.220
K <sub>1j</sub>	20.45	20.67	20.30	20.58	
K <sub>2j</sub>	20.87	20.14	21.06	20.84	
K <sub>3j</sub>	20.83	21.35	20.80	20.74	
K <sub>1j/3</sub>	6.82	6.89	6.77	6.86	
K <sub>2j/3</sub>	6.96	6.71	7.02	6.95	
K <sub>3j/3</sub>	6.94	7.12	6.93	6.91	
R	0.14	0.23	0.25	0.09	

残渣中的辣椒素，以辣椒素的提出量为考察指标，因素水平安排及试验结果如表1。

正交试验的极差(R)分析表明，酶解液初始pH值、酶解温度、酶用量和酶解时间对辣椒素提取的影响程度为：酶用量>酶解温度>酶解液初始pH值>酶解时间。

结合单因素试验与正交试验结果，本文确定的辣椒粉的最佳酶解工艺条件为：酶用量10 mg/g辣椒，酶解温度40℃，酶解液初始pH5.3，酶解时间3 h。

#### 2.2.6 酶法对辣椒素提取的效果

以1 g辣椒粉为原料用甲醇30 ml超声提取30 min(A)；用90%乙醇30 ml直接水浴提取1 h(B)；在本文确定的最佳酶解条件下酶解辣椒粉后残渣用90%乙醇30 ml热水浴提取1 h(C)；与(C)相同，但不加纤维素酶的条件下处理辣椒粉，残渣用90%乙醇30 ml水浴提取1 h(D)。分别用荧光光度计检测辣椒素提出量，实验结果见表2。

表2 酶解对照实验(I)

Table 2 Control test of enzymolysis (I)

提取方法	辣椒素提出量 (mg/g 辣椒皮)	提出率 (%)
甲醇超声提取(A)	6.83	100
乙醇直接提取(B)	6.40	93.7
酶解后乙醇提取(C)	6.86	100.4
未酶解乙醇提取(D)	5.53	81.0

由表2可知，纤维素酶法处理辣椒粉后辣椒素的提取效率与超声提取相当，比乙醇直接提取的提取效率高6.7%；但仅用pH5.3酶解初始缓冲液处理辣椒粉，再用乙醇提取时辣椒素的提取率下降，可能是辣椒素为酰胺结构，在酸性水溶液中被水解所致，这一点在用pH4.8酶解初始缓冲液处理辣椒粉的实验得到证实，它的提取率仅为75.4%。

文献[9]报道，采用酶处理辣椒粉有利于辣椒素与色素的释放，采用30%的乙醇及95%乙醇的两步提取方法，不仅能使辣椒素与色素进行初步分离，而且辣椒素及色素的提取率比95%的乙醇一步法高。因此，本文在上述实验的基础上，以1 g辣椒粉为原料，进一步设计了如下实验：用30 ml甲醇分两次超声提取，每次30 min(A)；用90%乙醇30 ml直接提取1 h(B)；在酶解初始液pH5.3，酶解温度40℃，酶用量10 mg/g辣椒，酶解时间3 h的条件下酶解，抽滤后辣椒粉残渣先用30%乙醇15 ml提取1 h，再用90%乙醇15 ml提取1 h(C)；与(C)相同，但不加纤维素酶的条件下处理。抽滤后辣椒粉残渣分别用30%、90%乙醇提取1 h(D)；先用30%乙醇15 ml提取1 h，再用90%乙醇15 ml提取1 h(E)。分别用荧光光度计检测辣椒素提出量，实验结果见表3。

表3说明，酶解后辣椒素的总提取率与甲醇超声提取相当，比乙醇直接提取的提取率高7.9%，与表2的实验结果基本一致，也与文献[9]报道一致；同时酶解

表3 酶解对照实验 (II)  
Table 3 Control test of enzymolysis (II)

提取方法	辣椒素提出量 (mg/g辣椒皮)				提出率 (%)
	水相	30% 乙醇	90% 乙醇	总量	
甲醇超声提取 (A)				6.90	100
乙醇直接提取 (B)				6.40	92.8
酶解后乙醇提取 (C)	1.55	1.60	3.80	6.95	100.7
未酶解乙醇提取 (D)	1.45	1.50	2.15	5.10	73.9
乙醇二次提取 (E)		2.80	3.15	5.95	86.2

的水液中辣椒素的提取率达到 22.5%，比文献[9]报道要高；30% 乙醇可提出 23.2% 的辣椒素，两者之和达到 45.7%，这部分辣椒素中基本不含色素，而且可直接用大孔吸附树脂(方法将另文报道)方法进行辣椒素的富集。未处理的辣椒粉直接用 30% 及 90% 乙醇两次分步提取时，30% 乙醇提出的辣椒素总量与酶解处理时水液及 30% 醇提液相差不大，但从辣椒素的总提取率来看，酶解处理的辣椒粉比未加酶的酶解液处理的辣椒素提取率高 26.8%，比乙醇两次分步直接提取时亦高出许多。

### 3 结 论

天然植物的细胞壁由纤维素构成，其中的有效成分往往是包裹在细胞壁内。酶法就是利用纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等(主要是纤维素酶)破坏植物的细胞壁，以利于有效成分最大限度溶出的一种方法。酶反应可以较温和的将植物组织分解，从而大幅度提高提取效率。

本文应用纤维素酶预处理辣椒粉，研究了酶解液初始 pH 值、酶解温度、酶用量和酶解时间对乙醇提取辣椒素效率的影响；确定了辣椒粉的酶解条件为：酶解液初始 pH 值 5.3，酶解温度为 40℃，酶用量为 10mg/g，

酶解时间为 3 h。在此条件下，酶解后的辣椒粉用乙醇提取时，辣椒素的提取率与超声提取接近，比乙醇直接提取时高出 7% 左右。

### 参考文献：

- [1] 王剑平, 张建国, 王爱军. 辣椒碱及其工业生产方法[J]. 食品工业科技, 1996(6): 65-67.
- [2] 郑学明, 李玉良. 辣椒红色素的提取工艺研究[J]. 河北轻化工学院学报, 1995, 16(1): 63-65.
- [3] 李化, 吴天骄. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(6): 563-564.
- [4] 杨祖荣. 超声技术在天然药物有效成分提取中的应用[J]. 云南中医学院学报, 2003, 26(3): 29-31.
- [5] FULLBROOK P D. The use of enzymes in the processing of oilseeds[J]. J Am Oil Chem Soc, 1983, 60: 476-478.
- [6] DOMINGUEZ H, NUNEZ M J, LEMA J M. Oil extractability from enzymatically treated soybean and sunflower: range of operational variables [J]. Food Chem, 1993, 46: 277-284.
- [7] 向海燕, 周春山, 陈龙胜, 等. 酶法提取虎杖中白藜芦醇新工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(4): 77-80.
- [8] 李元波, 殷辉安, 周燕霞, 等. 纤维素酶预处理法提取郁金中姜黄素的研究[J]. 广州化学, 2004, (3): 18-23.
- [9] SANTAMARIA R I, REYES-DUARTE M D, BARZANA E, et al. Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajilo puya (*Capsicum annum* L.) using ethanol as solvent [J]. J Agric Food and Chem, 2000, 48: 3063-3067.
- [10] 马润宇. 从干红辣椒中提取辣椒红素的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2004.
- [11] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1998.
- [12] 董新荣, 石国荣, 姜晖霞, 等. 反相高效液相色谱法同时测定辣椒素及二氢辣椒素的含量[J]. 分析实验室, 2006, 25(增刊): 5-7.
- [13] 董新荣, 王锦, 刘仲华, 等. 荧光法测辣椒素的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(1): 135-137.