正交试验优化纤维素酶法提取牛蒡根皮中绿原酸工艺

林春梅，周鸣谦
(淮海工学院食品科学与工程学院，江苏 连云港 222005)

摘 要：目的：研究纤维素酶法提取牛蒡根皮中绿原酸的提取工艺。方法：通过单因素试验探讨纤维素酶用量、料液比、酶解温度、酶解时间、pH值对绿原酸提取率的影响，并通过正交试验对影响绿原酸提取率的参数进行优化。结果表明牛蒡根皮中绿原酸提取的最佳工艺条件为纤维素酶用量4mL、酶解温度60℃、酶解时间1.5h、pH6.0、料液比1:20，此条件下绿原酸提取率为1.45%。

关键词：牛蒡；绿原酸；提取

Optimization by Orthogonal Array Design of Extraction of Chlorogenic Acid from Burdock Root Peels

LIN Chun-mei，ZHOU Ming-qian
(College of Food Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract：Objective: To optimize extraction process of chlorogenic acid in burdock root peels by cellulose methods. Methods: The effects of enzyme dosage, material-liquid ratio, extraction temperature, extraction duration and extraction pH on the yield of chlorogenic acid from burdock root peels by single factor and orthogonal tests were explored. Results: The optimal extraction process included cellulose addition amount of 4 mL, extraction temperature of 60 ℃, extraction time of 1.5 h, extraction pH 6.0, and material-liquid ratio of 1:20. Under the optimal extraction conditions, the maximum yield of chlorogenic acid was 1.45%.

Key words：burdock；chlorogenic acid；extraction
中图分类号：TS255.1 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)06-0064-04

牛蒡(*Arctium Lappa* L.)，别名大力子、蒡翁菜、火山药、东洋参等，是一种常用的中药。现代药理分析表明，牛蒡根中含有丰富的B族维生素、人体必需的17种氨基酸、蛋白质、黄酮、生物碱、牛蒡苦素、碳水化合物等化学成分，具有抗菌、抗突变和防癌、抗疲劳、抗衰老、抗氧化、降血糖、降血脂、抑制癌细胞增生与扩散等作用[1-4]。从九十年代初开始，我国开始大规模人工栽培牛蒡，在山东烟台、青岛、日照、江苏连云港等东部沿海城市中有很多从事蔬菜加工的外资食品企业加工其根作为蔬菜出口日本及欧洲等国，牛蒡加工过程中产生大量的根皮副产物，这些副产物一部分被附近奶牛养殖户拉走饲喂奶牛，可提高奶牛的产奶量，说明这些根皮中不乏丰富的营养成分，大部分被丢弃，造成资源浪费。

绿原酸(chlorogenic acid)是牛蒡叶、牛蒡根中皆含有的一种多酚类物质，属于咖啡酰奎尼酸衍生物，是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类化合物。绿原酸具有抗病毒、抗氧化能力、抗致畸、抗过敏、抗肿瘤细胞株毒活性、对透明质酸酶和葡萄糖-6-磷酸酶的抑制作用等功能[5]。目前，很多学者研究从植物中提取绿原酸这一课题，经研究发现用有机溶剂法、超声波法、微波超声协同法、纤维素酶法等，从金银花[6-9]、杜仲叶[10-11]、葵粕[12]、稻壳[13]、甘薯叶[14]、蒲公英[15]、杭白菊[16]、牛蒡叶[5,17-18]等植物中可以提取绿原酸成分，这些植物都可以作为提取绿原酸的材料，但利用牛蒡加工副产物根皮中提取绿原酸的研究未见报道，本实验利用牛蒡加工副产物牛蒡根皮为原料，采用纤维素酶法提取其中的绿原酸，考察了牛蒡根皮中绿原酸含量，并与传统溶剂提取法做比较，对影响绿原酸提取率的因素进行了初步探讨，优化了绿原酸提取的工艺，为提高牛蒡的综合利用价值提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛蒡根皮由连云港富士食品有限公司提供，低温烘

收稿日期：2011-12-19
基金项目：江苏省产学研联合创新资金计划项目(BY2010127)；连云港市农业攻关计划项目(CN0905)
作者简介：林春梅(1972—)，女，副教授，博士，研究方向为天然产物。E-mail：linlin0174@sina.com

干粉碎过40目筛；纤维素酶(35ku)　北京梦怡美生物科技有限公司分装；绿原酸标准品(纯度＞98%)　北京中科三捷生物有限公司；无水甲醇、无水乙醇、盐酸均为分析纯。

1.2　仪器与设备

数显恒温水浴锅　浙江舟山市定海区海源仪器厂；电子分析天平　赛多利斯科学仪器(北京)有限公司；T6新世纪紫外-可见分光光度计　北京普析通用仪器有限公司；PHS-3C型精密酸度计　上海精密科学仪器有限公司。

1.3　方法

1.3.1　醇法提取[19]

工艺流程：选材→称量→加60%乙醇溶液→水浴保温→抽滤→取滤液挥干定容→紫外-分光光度法测绿原酸提取率。

方法：准确称取1g牛蒡根皮干粉3份，置3个50mL三角瓶中，分别加入60%乙醇溶液12mL，0.6mol/L HCl溶液调pH4，密封60℃恒温水浴保温2.5h，过滤取上清液，置100mL容量瓶中蒸馏水定容，摇匀，待测。

1.3.2　纤维素酶法提取

1.3.2.1　工艺流程

选材→称量→加蒸馏水→加酶液→水浴保温→高温灭酶→抽滤→取滤液定容→紫外-分光光度法测绿原酸提取率

1.3.2.2　单因素试验

准确称取1g牛蒡根皮干粉，置50mL三角瓶中，分别加入20mL蒸馏水浸润，然后，分别加入0.1%的纤维素酶液3.0mL，摇匀，0.6mol/L HCl溶液调pH5，密封置水浴锅中50℃水浴保温2h，取出置80℃水浴灭酶15min，取出冷却，抽滤，滤液置50mL的容量瓶中蒸馏水定容，摇匀，待测。固定其他条件，分别考察纤维素酶用量(0～4.0mL)、酶解温度(30～70℃)、酶解时间(0.5～2.5h)、pH值(2～6)、料液比(1:10～1:30)对绿原酸提取率的影响。

1.3.2.3　正交试验

表1　正交试验因素与水平

Table 1　Factors and levels of orthogonal tests

水平	*A*纤维素酶用量/mL	*B*酶解温度/℃	*C*酶解时间/h	*D* pH	*E*料液比(g/mL)
1	2.5	30	0.5	3.0	1:15
2	3.0	40	1.0	4.0	1:20
3	3.5	50	1.5	5.0	1:25
4	4.0	60	2.0	6.0	1:30

在上述根据单因素试验基础上，进行工艺优化试验。选择纤维素酶用量、酶解温度、酶解时间、pH值、料液比进行五因素四水平$L_{16}(4^5)$正交试验，以绿原酸的提取率为评价指标，评价各号试验的提取率效果。并在最佳工艺条件下进行绿原酸提取试验，重复3次，绿原酸提取率结果取均值。因素与水平见表1。

1.3.3　绿原酸提取率的计算[14]

测定波长的选择：用万分之一的天平精密称取绿原酸42.5mg，50%甲醇溶液溶解，并定容于1000mL的容量瓶中，摇匀，得到绿原酸标准液(42.5mg/L)。取适量绿原酸标准液于500～200nm范围内扫描，以50%的甲醇溶液作参比，得到绿原酸在327nm处有最大吸收峰，故选择于327nm处测量绿原酸的吸光度。

标准曲线的制定：精密吸取以上绿原酸标准液0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00mL，分别置于10mL容量瓶中，加50%甲醇溶液定容，摇匀。以327nm分别测定不同质量浓度标准溶液的吸光度，以绿原酸标准样品质量浓度(X，μg/mL)为横坐标，吸光度(Y)为纵坐标绘制标准曲线，得到绿原酸标准曲线回归方程为：Y=0.2292X+0.0285，相关系数r=0.9971。结果表明绿原酸在4.25～21.25μg范围内有良好的线性关系。

样品测定：量取醇法以及酶法中获得的样品溶液200μL于10mL容量瓶中，置干燥箱中60℃挥干，50%甲醇定容，以50%甲醇溶液作参比，327nm处测定吸光度，带入标准曲线方程，计算绿原酸提取率。

2　结果与分析

2.1　醇法提取试验

醇法提取牛蒡根皮中绿原酸提取率为1.51%。

2.2　纤维素酶法提取单因素试验

2.2.1　纤维素酶用量对绿原酸提取率的影响

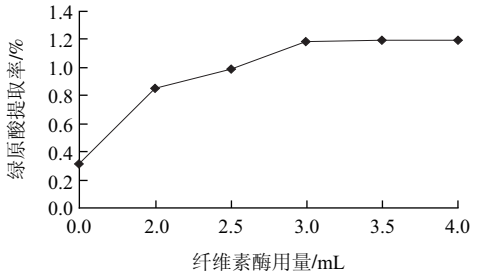

图1　纤维素酶用量对绿原酸提取率的影响

Fig.1　Effect of cellulase addition amount on extraction rate of chlorogenic acid

由图1可知，不加酶条件下，绿原酸提取率最低，随着纤维素酶用量的增加，绿原酸提取率呈上升趋势，当酶用量超过3mL，绿原酸提取率增加缓慢。原因是牛蒡根皮细胞壁主要由纤维素构成，其有效成分被包裹在细胞壁内。纤维素则是由β-D-葡萄糖以1,4-β-葡萄糖苷键连接，用纤维素酶酶解可以破坏β-D-葡萄糖苷键，使牛蒡根皮细胞壁破坏，增加绿原酸的溶出率。随着酶用量的

增加，牛蒡根皮中大部分绿原酸溶出，所以，酶用量继续增加不再显著增加绿原酸提取率。

2.2.2 酶解温度对绿原酸提取率的影响

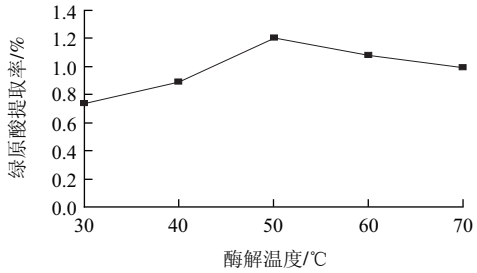

图 2 酶解温度对绿原酸提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on extraction rate of chlorogenic acid

由图2可知，绿原酸提取率在温度30～50℃之间明显上升，在50℃达到最大值，在50～70℃之间开始下降。因为酶的本质是一种蛋白质，遇高温容易变性失活，绿原酸在温度比较高的情况下也容易被氧化破坏。

2.2.3 酶解时间对绿原酸提取率的影响

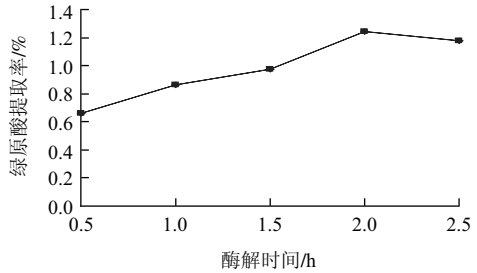

图 3 酶解时间对绿原酸提取率的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis time on extraction rate of chlorogenic acid

由图3可知，绿原酸提取率在时间为0.5～2h之间上升，2h之后开始略有下降，原因可能是长时间加热情况下，绿原酸结构中的酯键不稳定发生分解，所以，确定提取时间为2h。

2.2.4 pH值对绿原酸提取率的影响

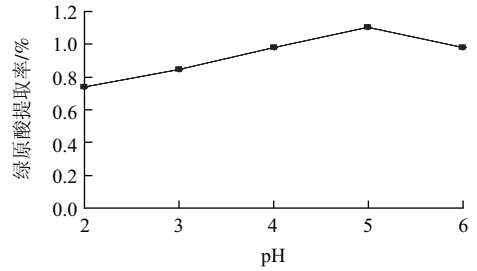

图 4 pH值对绿原酸提取率的影响

Fig.4 Effect of pH on extraction rate of chlorogenic acid

由图4可知，绿原酸提取率在pH3～5之间上升，随后开始略有下降，说明酸性pH值有利于绿原酸的提取，可能与绿原酸呈弱酸性有关，本课题所用纤维素酶的最佳pH值为4.5～6.0，在这样一个酸度范围内，酶保持较高活力，更有利于牛蒡根皮细胞壁的降解和绿原酸的溶出。

2.2.5 料液比对绿原酸提取率的影响

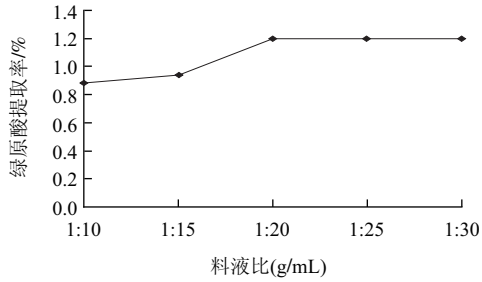

图 5 料液比对绿原酸提取率的影响

Fig.5 Effect of material-liquid ratio on extraction rate of chlorogenic acid

由图5可知，随提取液使用量的增大，绿原酸提取率呈现比较稳定的状态，从成本考虑，选用1:20作为最佳料液比。

2.2.6 正交试验结果与分析

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Results of orthogonal tests

试验号	*A*纤维素酶用量	*B*酶解温度	*C*酶解时间	*D* pH	*E*料液比	提取率/%
1	1	1	1	1	1	0.381
2	1	2	2	2	2	0.611
3	1	3	3	3	3	0.590
4	1	4	4	4	4	0.659
5	2	1	2	3	4	0.628
6	2	2	1	4	3	0.455
7	2	3	4	1	2	0.473
8	2	4	3	2	1	0.448
9	3	1	3	4	2	1.22
10	3	2	4	3	1	0.96
11	3	3	1	2	4	0.895
12	3	4	2	1	3	0.867
13	4	1	4	2	3	0.998
14	4	2	3	1	4	1.15
15	4	3	2	4	1	1.26
16	4	4	1	3	2	1.31
k_1	0.560	0.807	0.760	0.718	0.762	
k_2	0.501	0.794	0.841	0.738	0.904	
k_3	0.985	0.804	0.852	0.872	0.728	
k_4	1.179	0.821	0.772	0.899	0.833	
R	0.678	0.027	0.092	0.181	0.176	

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance for the extraction rate of chlorogenic acid

因素	偏差平方和	自由度	*F*值	*P*值	显著性
纤维素酶用量	1.301	3	1301.0000	2.41×10^{-18}	*
酶解温度	0.001	3	1.000	0.42	
酶解时间	0.026	3	26.000	3.42×10^{-6}	*
pH	0.101	3	101.000	3.58×10^{-10}	*
料液比	0.073	3	73.000	3.55×10^{-9}	*
误差	0.00	3			

注：$F_{0.05}$=9.280；$F_{0.01}$=29.500；*. 差异显著（$P<0.05$）。

由表2可看出，根据*R*值，可看出，各因素对绿原酸提取率的影响程度依次为*A*＞*D*＞*E*＞*C*＞*B*。在5个影响因素中，通过*k*值可看出，纤维素酶用量、pH值、料液比对提取率影响较大，其次是酶解时间，影响最小的是酶解温度。以绿原酸提取率为考察指标，5个因素的最优水平组合是$A_4B_4C_3D_4E_2$，即纤维素酶用量4mL、酶解温度60℃、酶解时间1.5h、pH6.0、料液比1:20。此条件下，进行3次验证实验，绿原酸提取率平均值为1.45%，高于其他组合。由表3看出，把影响程度较小的因素酶解温度归入误差列，结果表明，纤维素酶用量、酶解时间、pH值及料液比对提取率的影响达到显著差异水平($P<0.05$)，酶解温度对提取率的影响最小。

3 讨论与结论

纤维素酶是将纤维素水解成葡萄糖的一组酶的总称，它不是单种酶，主要有3个组分组成：①内切葡聚糖酶，即C_1酶；②纤维二糖水解酶，即C_X酶；③ *β*-葡萄糖苷酶。在适当的条件下，它们协同作用，将天然纤维素水解成葡萄糖。纤维素是由*β*-*D*-1,4-葡糖糖苷键组成的多糖。纤维素酶的作用方式首先由内切葡聚糖酶作用于微纤维的非结晶区，使其露出许多末端供外切型酶作用，纤维二糖水解酶从非还原性末端依次分解，产生纤维二糖，然后，部分降解的纤维素进一步由内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶协同作用，分解生成纤维二糖、三糖等低聚糖，最后由*β*-葡萄糖苷酶作用分解成葡萄糖。纤维素酶在食品工业有广泛应用，利用它处理原料，可改变细胞壁的通透性，提高细胞内含物的提取率[20]。

本实验将纤维素酶应用于牛蒡根皮中绿原酸的提取，结果表明，影响纤维素酶法提取牛蒡根皮中绿原酸的主要因素：纤维素酶用量、酶解温度、酶解时间、pH值和料液比，5个因素影响大小顺序为：纤维素酶用量、pH值、料液比、酶解时间、酶解温度。以绿原酸提取率为考察指标，五个因素的最优水平组合是$A_4B_4C_3D_4E_2$，即纤维素酶用量4mL、酶解温度60℃、酶解时间1.5h、pH6.0，料液比1:20，正交试验结果与单因素结果不完全一致，单因素试验中，绿原酸提取最适pH值为5.0，这与正交试验设计中考虑的是多因素多水平的综合影响有关，纤维素酶作为一个复合酶系，作用最适pH值有一个变化区间，本课题所购纤维素酶最适pH4.5～6.0，所以，在多因素多水平综合影响情况下，体系最适pH值可能发生改变。在正交最优条件下，3次验证实验绿原酸提取率平均值为1.45%，高于其他组合。可见，纤维素酶对牛蒡根皮细胞壁有分解作用，增加细胞内容物绿原酸的溶出效果较明显，与应用有机溶剂法提取绿原酸的效果(1.51%)相当。与有机溶剂法相比，酶法提取条件温和，活性物质不易破坏，成本低，无溶剂残留，工艺也更为简单。

牛蒡全身都是宝，其叶中含有丰富的多酚化合物，如绿原酸、黄酮等，根中提取菊糖后的牛蒡渣中还可以提取高活性膳食纤维[18]，牛蒡根皮中的绿原酸含量与金银花、杜仲叶都为5%左右[14]，牛蒡叶中3%左右的含量相比而言较低[21]，但牛蒡根皮以其量大的优势仍然可以作为一种理想的提取绿原酸的材料。

参考文献：

[1] 魏东, 王连翠. 牛蒡根的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(15): 3716-3717.

[2] 崔纯璀, 邹振祥, 李卫强. 新型创汇蔬菜: 牛蒡[J]. 山东农业科学, 1993(2): 43-44.

[3] 陈世雄, 陈靠山. 牛蒡根化学成分及活性研究进展[J]. 食品与药品, 2010, 12(7): 281-285.

[4] 郝林华, 陈靠山, 李光. 耐盐植物牛蒡的研究进展与应用[J]. 海洋科学, 2004, 28(5): 69-72.

[5] 林学政, 柳春燕, 陈靠山, 等. 不同地域牛蒡叶绿原酸的含量比较及其抑菌试验[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(4): 328-330.

[6] 郝凤霞, 杨敏丽. 金银花中绿原酸和黄酮的同时提取分离工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 211-214.

[7] 刘佳佳, 赵国玲, 章晓骅, 等. 金银花绿原酸酶法提取新工艺研究[J]. 中成药, 2002, 42(6): 416-418.

[8] 王瑞红, 侯靖宇, 王爽. 纤维素酶在金银花提取工艺中的应用[J]. 黑龙江医药, 2003, 16(4): 286-287.

[9] 何钢, 刘贤桂, 李樊, 等. 金银花叶片绿原酸提取及工艺参数优化的研究[J]. 江西农业大学学报, 2008, 3(1): 136-143.

[10] 陈晓娟, 周春山. 酶法及半仿生法提取杜仲叶中绿原酸和黄酮[J]. 精细化工, 2006, 23(3): 257-260.

[11] 罗季阳, 田呈瑞, 张晓娟. 酶法提取杜仲叶活性成分的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 164-167.

[12] 王志华, 王东洁, 赵晋府. 葵花籽绿原酸酶法提取工艺研究[J]. 食品科学, 2004, 52(1): 97-100.

[13] 于加平, 李一卓. 稻壳中绿原酸的提取及含量测定[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(2): 445-447.

[14] 李悦丰, 尹婷, 钱金萍, 等. 红薯叶中绿原酸的提取纯化工艺研究[J]. 四川食品与发酵, 2006(4): 27-29.

[15] 殷书平, 梁引库, 徐仲阳. 巨大型蒲公英绿原酸提取工艺研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 77-80.

[16] 陈文韬. 纤维素酶法提取杭白菊中绿原酸影响因素的研究[J]. 福建师范大学福清分校学报, 2009(2): 12-15.

[17] 祝明思, 陈磊, 张公亮, 等. 牛蒡叶中绿原酸超声波法提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(1): 134-136.

[18] 郝林华, 陈靠山, 李光友, 等. 利用牛蒡渣提取高活性膳食纤维的工艺[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(4): 41-44.

[19] 兰小艳, 黄敏, 张学俊. 杜仲叶中绿原酸醇提法的工艺研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(18): 84-88.

[20] 王兰芬. 纤维素酶的作用机理及开发应用[J]. 酿酒科技, 1997(6): 16-17.

[21] 刘世名, 董国霞, 陈靠山. 牛蒡叶中绿原酸的提取工艺优化[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(9): 659-661.