

霍山石斛多酚超声波辅助提取工艺优化 及其抗氧化活性研究

Optimization on ultrasonic-assisted extraction of polyphenols from *Dendrobium huoshanense* and its antioxidant activity

魏 明 刘艳艳 蔡为荣 钱森和 张 珂

WEI Ming LIU Yan-yan CAI Wei-rong QIAN Sen-he ZHANG Ke

(安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽 芜湖 241000)

(College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

摘要:为确定超声波辅助纤维素酶法提取霍山石斛多酚的最佳工艺,采用响应曲面设计方法对多酚提取工艺进行优化,同时分析霍山石斛多酚的抗氧化活性。结果表明:多酚提取的最佳工艺条件为超声功率 180 W,超声时间 20 min,酶质量浓度 2.1 mg/mL,酶解温度 57 °C,酶解时间 71 min,酶解 pH 5,在该条件下,多酚平均得率为 13.74 mg/g。体外抗氧化活性试验表明,霍山石斛多酚具有较强的抗氧化活性,其 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力与多酚浓度呈现明显的量效关系。多酚对 DPPH 和 ABTS 自由基的半抑制浓度分别为 0.057 mg/mL 和 0.027 mg/mL。

关键词:霍山石斛;多酚;超声波;提取;抗氧化

Abstract: In order to determine the optimal conditions for the extraction of polyphenols from *Dendrobium huoshanense* by ultrasonic-assisted cellulase, response surface methodology was used to optimize the extraction process. Antioxidant activity of *Dendrobium huoshanense* polyphenols was evaluated. The results showed that the optimal conditions for the extraction of polyphenols were as follows: ultrasonic power 180 W, ultrasonic time 20 min, cellulase concentration 2.1 mg/mL, enzymolysis temperature 57 °C, enzymolysis time 71 min, and enzymolysis pH 5. Under these conditions, the average yield of polyphenols was 13.74 mg/g. Antioxidant assays revealed that *Dendrobium huoshanense* polyphenols had significant antioxidant activity. DPPH and ABTS radical scavenging activities had a stronger relationship with the content of polyphenols, and their hemi-inhibitory concentrations (IC_{50}) were 0.057 and 0.027 mg/mL, respectively.

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MC65);安徽省科技攻关项目(编号:1301032136)

作者简介:魏明(1969—),男,安徽工程大学教授,博士。
E-mail: wmrainbow69@126.com

收稿日期:2015-11-29

Keywords: *Dendrobium huoshanense*; polyphenols; ultrasound; extraction; antioxidant activity

霍山石斛为兰科石斛属植物,主要分布在安徽省霍山县及其附近地区,自古享有“中华九大仙草之首”的美誉^[1],是中国传统的名贵中药材。现代药理学和植物化学成分研究表明,石斛含有多糖、生物碱、多酚等有效成分^[2-3],具有预防和治疗白内障、调节免疫力,抗肿瘤、抗氧化、抗糖尿病等功效^[4-6]。近年来研究^[7]表明,植物多酚具有抑菌、抗癌、抗衰老、降血糖和抗心血管疾病等生理功能,这些发现使多酚的研究和应用越来越受到重视。

多酚的提取方法有水提、乙醇提取、微波辅助提取、超声辅助提取和酶法提取等^[8]。纤维素酶可以降解细胞壁,结合超声波处理能有效破坏细胞壁,使细胞内的物质更容易溶出。与其它提取方法相比,超声波辅助酶法提取可以大大缩短提取时间、降低能耗,提高有效成分的收率,具有一定的优势^[9]。目前,对于霍山石斛有效成分的研究主要集中在多糖和生物碱等方面,关于霍山石斛多酚的提取及相关生物活性的研究还未见报道。

本研究拟采用响应面法优化霍山石斛多酚提取的工艺条件,同时对霍山石斛多酚体外抗氧化活性进行初步研究,旨在为霍山石斛多酚的开发和利用提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 材料与试剂

霍山石斛:芜湖东源新农村开发有限公司;
二苯基苦味酰基苯(DPPH)和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS):分析纯,美国 sigma 公司;
没食子酸标品:分析纯,阿拉丁试剂上海有限公司;

纤维素酶(酶活力 3 000 U/g):分析纯,北京索莱宝科技有限公司;

其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器与设备

紫外—可见分光光度计:UV-2600型,岛津企业管理(中国)有限公司;

数控超声波清洗器:KQ5200DV型,昆山超声仪器有限公司;

旋转蒸发器:RE52-AA型,上海亚荣生化仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 多酚的测定 参照文献[10]。以没食子酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,建立没食子酸浓度与吸光度的标准曲线,得回归方程为: $y=0.008x+0.0017(R^2=0.995)$ 。多酚得率按式(1)计算:

$$q = \frac{c}{m}, \quad (1)$$

式中:

q ——多酚得率,mg/g;

c ——多酚质量,mg;

m ——石斛干重,g。

1.2.2 DPPH 自由基清除活性测定 参照文献[11]。

DPPH 自由基清除率按式(2)计算:

$$D = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

D ——DPPH 自由基清除率,%;

A_0 ——2 mL 蒸馏水与 2 mL DPPH—乙醇混合液的吸光值;

A_1 ——2 mL 样品与 2 mL DPPH—乙醇混合液的吸光值;

A_2 ——2 mL 样品与 2 mL 无水乙醇混合液的吸光值。

1.2.3 ABTS 自由基清除能力的测定 参照文献[12]。

ABTS 自由基清除率按式(3)计算:

$$AB = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

AB ——ABTS 自由基清除率,%;

A_0 ——0.5 mL 蒸馏水与 4.5 mL ABTS 混合液的吸光值;

A_1 ——0.5 mL 样品与 4.5 mL ABTS 混合液的吸光值;

A_2 ——0.5 mL 样品与 4.5 mL 无水乙醇混合液的吸光值。

1.2.4 单因素试验

(1) 超声功率的选择:精确称取 5 g 石斛样品,研磨后加入 50 mL 蒸馏水,在不同超声功率(150,180,210,240,270,300 W)条件下超声 15 min,在 50 °C 水浴 1 h,然后测定多酚的量。

(2) 超声时间的选择:精确称取 5 g 石斛样品,研磨后添加 50 mL 蒸馏水,在超声功率 180 W 下超声不同时间(5,10,

15,20,25,30 min),在 50 °C 水浴 1 h,然后测定多酚的量。

(3) 酶浓度的选择:精确称取 5 g 石斛样品,研磨后添加 50 mL 蒸馏水,添加不同量的纤维素酶(0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mg/mL),酶解时间 60 min,酶解温度 50 °C,然后测定多酚的量。

(4) 酶解时间的选择:精确称取 5 g 石斛样品,研磨后添加 50 mL 蒸馏水,酶解温度 50 °C,酶浓度 2.0 mg/mL,酶解不同时间(10,30,60,90,120,150 min),然后测定多酚的量。

(5) 酶解温度的选择:精确称取 5 g 石斛样品,研磨后添加 50 mL 蒸馏水,酶解时间 60 min,酶浓度 2.0 mg/mL,在不同温度(30,40,50,60,70 °C)下酶解,然后测定多酚的量。

(6) 酶解 pH 的选择:精确称取 5 g 石斛样品,研磨后添加 50 mL 蒸馏水,酶解时间 60 min,酶解温度 50 °C,酶浓度 2.0 mg/mL,在不同 pH(3,4,5,6,7)下酶解,然后测定多酚的量。

1.2.5 响应面优化设计 根据 Box-Behnken 模型的中心组合试验设计原理,在单因素试验的基础上,通过显著性差异分析,选取对多酚得率影响比较显著的因素进行响应面试验。

2 结果与讨论

2.1 超声功率对多酚提取的影响

由图 1 可知,超声处理对多酚提取有显著影响,当超声功率为 180 W 时,多酚得率达到最大值,继续增加功率,多酚得率逐渐降低。这是因为超声波产生的机械粉碎和空化效应能有效地破坏细胞壁,有利于多酚类物质的溶出,因此,适当功率的超声波处理可以促进多酚的提取。当超声功率过大时,超声波的机械作用增强,使更多的多酚在高速振动和剪切力作用下降解^[13-14],多酚得率反而降低。因此,选择超声功率为 180 W 较为适宜。

2.2 超声时间对多酚提取的影响

由图 2 可知,超声时间在 5~30 min 时,多酚得率呈现先上升后下降的趋势。当超声时间达到 20 min 时,多酚得率最高,而后逐渐下降。这是由于超声时间过长导致纤维网络结构松散使多酚进入纤维素结构中而不易溶出^[15]。因此,超声时间选择 20 min 较为适宜。

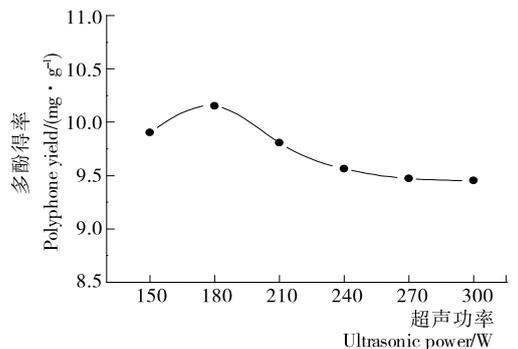


图 1 不同超声功率处理下多酚得率变化

Figure 1 The changes of polyphenol yield with different ultrasonic power

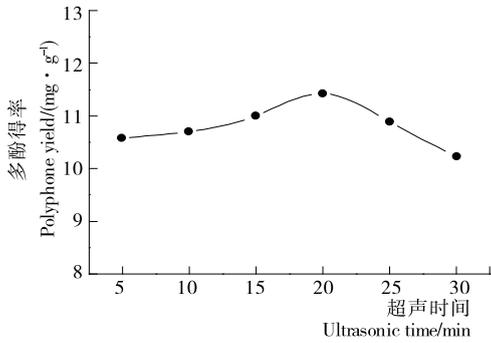


图 2 不同超声时间处理下多酚得率变化

Figure 2 The changes of polyphenol yield with different ultrasonic time

2.3 纤维素酶浓度对多酚提取的影响

由图 3 可知,纤维素酶浓度在 0.5~2.0 mg/mL 时,随着纤维素酶浓度的增加,多酚得率逐渐增大。根据米氏学说,底物浓度一定时,酶浓度越大,酶越易与底物结合^[16]。酶浓度的增加,促进了纤维素酶催化细胞壁的降解,有利于细胞内多酚类物质的溶出。当纤维素酶浓度超过 2.0 mg/mL 后,多酚得率增加不明显。因此,选取纤维素酶浓度为 2.0 mg/mL 较为适宜。

2.4 酶处理时间对多酚提取的影响

由图 4 可知,酶处理时间在 10~60 min 时,随着酶处理时间的延长,多酚得率明显提高,当酶处理时间为 60 min

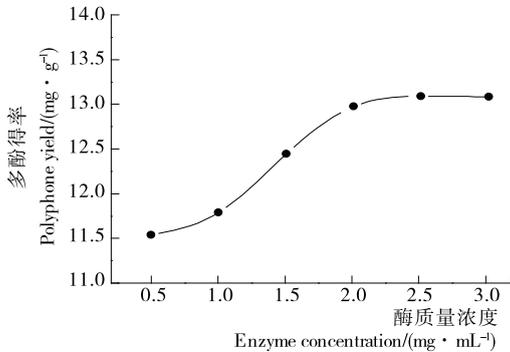


图 3 不同酶浓度处理下多酚得率变化

Figure 3 The changes of polyphenol yield with different enzyme concentrations

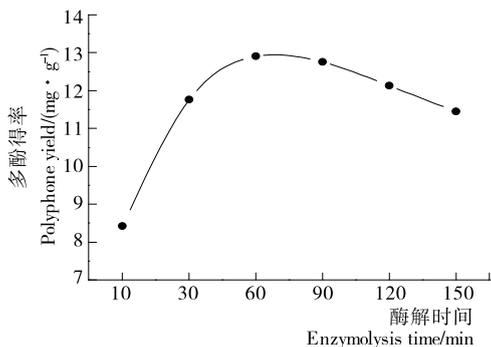


图 4 不同酶处理时间下多酚得率变化

Figure 4 The changes of polyphenol yield with different enzyme treatment time

时,多酚得率达到最大值,随后多酚得率逐渐降低,这可能与酶处理时间过长使部分多酚被氧化有关。因此,选取酶处理时间为 60 min 较为适宜。

2.5 酶处理温度对多酚提取的影响

由图 5 可知,酶处理温度在 30~50 °C 时,随着温度的升高,多酚得率逐渐提高,当酶处理温度为 50 °C 时,多酚得率达到最大,随后又下降。在一定温度范围内,纤维素酶活性随着温度的升高而增强,在 50 °C 时,酶活性最高,继续升高温度,酶蛋白发生热变性,造成酶活力减弱,多酚得率下降。因此,选择酶解温度为 50 °C 较为适宜。

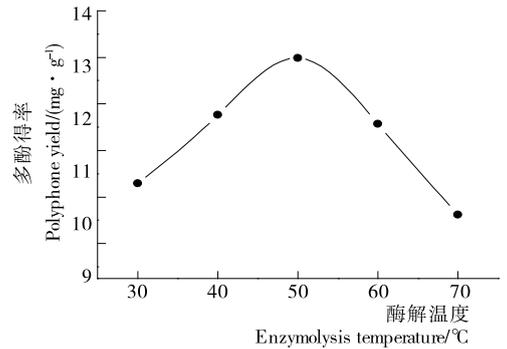


图 5 不同酶处理温度下多酚得率变化

Figure 5 The changes of polyphenol yield with different enzyme treatment temperature

2.6 酶处理 pH 对多酚提取的影响

由图 6 可知,酶处理 pH 在 3~5 时,随着 pH 的升高,多酚得率逐渐提高,在 pH 为 5 时,多酚得率达到最大。纤维素酶活性随着 pH 的升高而增强,在 pH 为 5 时,酶活性最高,继续升高 pH,造成酶活力减弱。因此,选择酶解 pH 为 5 较为适宜。

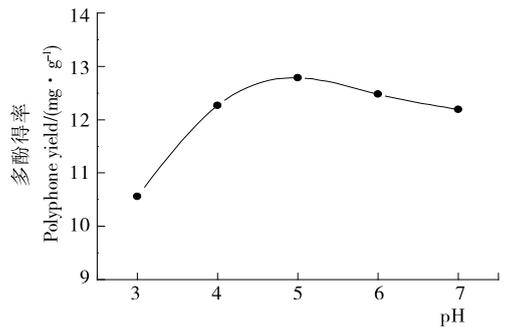


图 6 不同 pH 下多酚得率变化

Figure 6 The changes of polyphenol yield with different enzyme treatment pH

2.7 响应面优化提取条件

2.7.1 响应面设计 根据单因素试验结果,选择酶质量浓度,酶解温度和酶解时间为自变量并确定水平(见表 1),在固定超声功率 180 W,超声时间 20 min 的条件下,以多酚得率为响应值,进行响应面分析,其试验设计及结果见表 2。

利用 Design-expert 8.0.6 软件对试验数据进行多元回归拟合,得到响应值对自变量的二次多项回归方程:

$$Y = 13.07 + 0.75A + 0.56B + 0.094C - 0.05AB - 0.57AC + 0.7BC - 1.23A^2 - 0.52B^2 - 0.67C^2 \quad (4)$$

对回归模型进行方差分析(表3),所得回归模型差异极

表1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	A 酶浓度/ (mg · mL ⁻¹)	B 酶解温 度/°C	C 酶解时 间/min
-1	1.5	40	30
0	2.0	50	60
1	2.5	60	90

表2 响应面试验结果

Table 2 Results of response surface test

试验号	A	B	C	多酚得率/ (mg · g ⁻¹)
1	-1	-1	0	9.91
2	0	0	0	13.69
3	-1	1	0	11.02
4	1	-1	0	11.71
5	1	1	0	12.62
6	0	0	0	12.95
7	1	0	1	11.33
8	0	1	1	13.28
9	-1	0	1	11.17
10	0	1	-1	11.68
11	0	-1	1	10.67
12	1	0	-1	12.29
13	0	-1	-1	11.86
14	-1	0	-1	9.86
15	0	0	0	13.45
16	0	0	0	12.69
17	0	0	0	12.58

表3 回归模型方差分析[†]

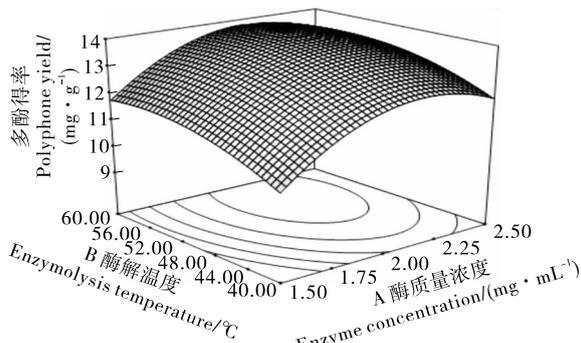
Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	20.68	9	2.30	15.72	0.000 7	**
A	4.47	1	4.47	30.59	0.000 9	**
B	2.48	1	2.48	16.99	0.004 4	**
C	0.07	1	0.07	0.49	0.508 4	
AB	0.01	1	0.01	0.07	0.801 0	
AC	1.28	1	1.28	8.78	0.021 0	*
BC	1.96	1	1.96	13.39	0.008 1	**
A ²	6.42	1	6.42	43.91	0.000 3	**
B ²	1.16	1	1.16	7.91	0.026 1	*
C ²	1.91	1	1.91	13.10	0.008 5	**
残差	1.02	7	0.15			
失拟	0.10	3	0.03	0.15	0.923 9	
误差	0.92	4	0.23			
总和	21.70	16				

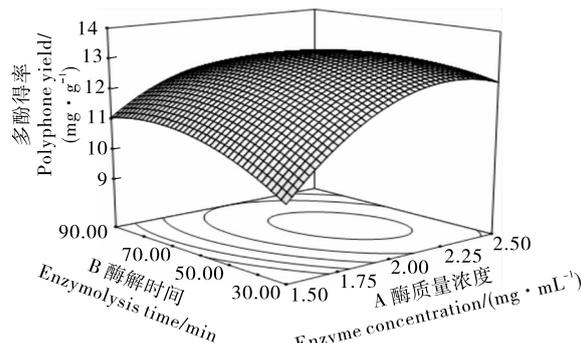
[†] * 表示差异显著, P < 0.05; ** 表示差异极显著, P < 0.01。

显著(P<0.01),失拟项不显著,R²=0.952 9,R_{Adj}²=0.892 3。模型中一次项 A、B,交互项 BC 以及二次项 A²、C²对多酚得率影响极其显著(P<0.01);AC 和 B²对多酚得率影响显著(P<0.05),其余项不显著。

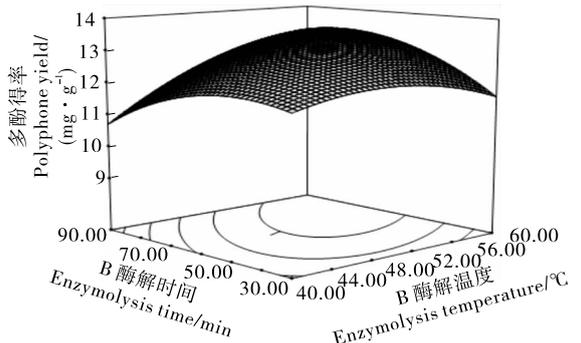
根据回归模型绘制各个因素交互作用的响应面图。由图7可知,酶浓度和酶解温度对多酚得率影响显著;而酶解时间影响不显著,酶解时间和酶解温度之间以及酶解时间和酶浓度之间具有显著的交互作用;酶解温度和酶浓度间交互作用不明显,这与表3中回归模型方差分析结果一致。



(a) 酶解温度和酶浓度响应面图



(b) 酶解时间和酶浓度响应面图



(c) 酶解时间和酶解温度响应面图

图7 两因素交互作用对多酚提取影响的响应面图

Figure 7 Surface layer of the mutual-affection of two factors on polyphenols yield

2.7.2 最佳工艺验证实验 根据所得多元二次方程,预测稳定状态下多酚提取的最优工艺条件:超声功率 180 W,超声时间 20 min,酶质量浓度 2.1 mg/mL,酶解温度 57 °C,酶解时间 71 min,酶解 pH 5,在此条件下进行 3 次平行实验,多酚平均得率为 13.74 mg/g,与理论预测值(13.38 mg/g)非常接近,相对误差为 2.69%。

2.8 霍山石斛多酚体外抗氧化分析

2.8.1 对 DPPH 自由基清除能力 霍山石斛多酚对 DPPH 自由基有明显的清除作用(图 8),且清除活性随着多酚浓度的增加而增强。在试验浓度范围内,霍山石斛多酚对 DPPH 自由基的最大清除率为 87.7%,低于对照(V_c)的清除率(95.2%)。霍山石斛多酚对 DPPH 自由基的半抑制浓度(IC_{50})为 0.057 mg/mL,由此可知,霍山石斛多酚对 DPPH 自由基具有较好的清除作用。

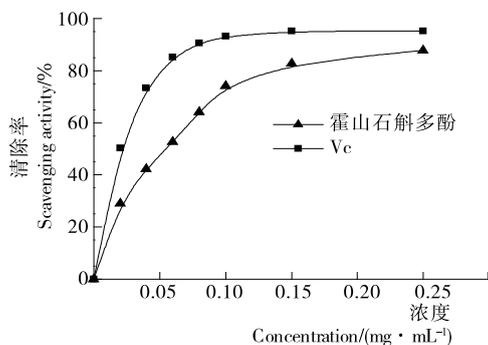


图 8 多酚对 DPPH 自由基清除能力

Figure 8 Scavenging ability of polyphenols on DPPH

2.8.2 对 ABTS 自由基清除能力 霍山石斛多酚对 ABTS 自由基有明显的清除效果(图 9),且清除能力随着多酚浓度的增加而增强。在 0.01~0.12 mg/mL 时,霍山石斛多酚对 ABTS 自由基清除力增加趋势明显,当达到 0.12 mg/mL 时,其自由基清除率接近于对照(V_c)。霍山石斛多酚对 ABTS 自由基的半抑制浓度(IC_{50})为 0.027 mg/mL。

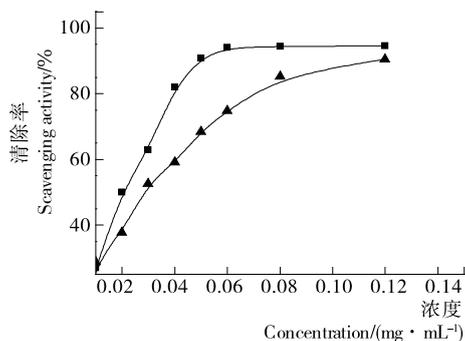


图 9 多酚对 ABTS 自由基清除能力

Figure 9 Scavenging ability of polyphenols on ABTS

3 结论

超声波辅助纤维素酶法能促进霍山石斛多酚的提取,最佳工艺条件为:超声功率 180 W,超声时间 20 min,酶质量浓度 2.1 mg/mL,酶解温度 57 °C,酶解时间 71 min,酶解 pH 5,此条件下多酚平均得率为 13.74 mg/g。霍山石斛多酚具有较强的抗氧化活性,对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力较强, IC_{50} 分别为 0.057 mg/mL 和 0.027 mg/mL,达到一定试验浓度后,其自由基清除率与 V_c 接近。然而霍山石斛多酚组分有待进一步分离纯化,相关性还需进一步研究。

参考文献

- [1] 包雪声, 顺庆生, 张申洪. 中国药用石斛图志[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2005: 32.
- [2] WU Chin-tung, HUANG Keng-shiang, YANG Chih-hui, et al. Inhibitory effects of cultured *Dendrobium tosaense* on atopic dermatitis murine model [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 463(2): 193-200.
- [3] 黄琴, 沈杨霞, 张成静, 等. 铁皮石斛多酚和黄酮含量及与抗氧化活性的相关性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(3): 438-442.
- [4] LUO Jian-ping, DENG Yuan-yuan, ZHA Xue-qiang. Mechanism of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* on streptozotocin-induced diabetic cataract[J]. Pharmaceutical Biology, 2008, 46(4): 24-249.
- [5] XING Xiao-hui, STEVE W C, NIE Shao-ping, et al. A review of isolation process, structural characteristics, and bioactivities of water-soluble polysaccharides from *Dendrobium* plants[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(2): 131-147.
- [6] ZHA Xue-qiang, LI Xiao-long, ZHANG Hai-lin, et al. Pectinase hydrolysis of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide and its effect on protein nonenzymatic glycation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 61(10): 439-447.
- [7] 尹志娜. 植物多酚分离提取方法和生物功能研究进展[J]. 生命科学仪器, 2010, 8(7): 43-49.
- [8] 王海燕, 崔春, 赵谋明, 等. 烟草多酚提取工艺优化及成分定性分析[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2008, 36(3): 64-68.
- [9] 李徽, 沈佩仪, 吴华星, 等. 超声波提取菠萝皮渣中多酚类物质的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 55-58.
- [10] LUENGO E, ÁLVAREZ I, RASO J. Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 17: 79-84.
- [11] WANG Ru-feng, CHEN Ping, JIA Fang, et al. Optimization of polysaccharides from *Panax japonicus* C. A. Meyer by RSM and its anti-oxidant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(2): 331-336.
- [12] WANG Zan-yong, WANG Chen-yu, QUAN Yue. Extraction of polysaccharides from *Phellinus nigricans mycelia* and their antioxidant activities in vitro[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99(1): 110-115.
- [13] 陈晨, 胡文忠, 田沛源, 等. 超声辅助提取香蕉皮多酚工艺优化及抗氧化分析[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 12-17.
- [14] 杜若源, 谢晶, 王婷, 等. 超声波辅助提取银杏叶总黄酮的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 167-170.
- [15] 李徽, 沈佩仪, 吴华星, 等. 超声波提取菠萝皮渣中多酚类物质的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 55-58.
- [16] 包怡红, 王硕, 王文琼, 等. 超声波酶法提取红松树皮中多酚类化合物的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 232-236.