

复合酶和超声辅助两步法提取甘草酸的工艺

Study on the two-stage extraction of glycyrrhizic acid by combined enzymes and ultrasonic method

梁霞 吕晓玲

LIANG Xia LU Xiao-ling

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

(School of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

摘要:以甘草酸提取率为指标,优化了复合酶和超声辅助两步法提取甘草中甘草酸的最佳工艺条件。结果表明,甘草原料为1 g时,复合酶法提取阶段的最佳工艺条件为:复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)1:3 (U/U),复合酶用量175 U/g·底物,pH 5.5,时间1 h,温度50 ℃,原料粒度40目,料液比1:25 (g/mL);超声辅助提取阶段的最佳工艺条件为:提取溶剂20%乙醇,料液比1:35 (g/mL),超声功率350 W,时间15 min,温度40 ℃。在最佳工艺条件下,甘草酸提取率可达(90.44±0.14)%。

关键词:复合酶;超声;提取;甘草酸;果胶酶;纤维素酶

Abstract: Taking glycyrrhizic acid extraction rate was used as an index, the technological conditions of extraction of glycyrrhizic acid from Licorice was optimized by two-stage method of combined enzymes and ultrasonic. When the mass of glycyrrhizic acid was 1 g, the optimum technological conditions for the enzymatic stage were as follows: the optimal ratio of combined enzymes (pectinase: cellulase) was 1:3 (U/U); the dosage of combined enzymes was 175 U/g·Substrate, reacted at pH 5.5 for 1 h at 50 ℃; and the particle size of raw material was 40 mesh with the ratio of material to liquid 1:25 (g/mL). The optimum technological conditions for the ultrasonic stage were as follows: the ultrasonic extraction solvent is 20% ethanol, and the ratio of material to liquid is 1:35 (g/mL), ultrasonic treating for 15 min at 40 ℃ with 350 W. Under these optimum conditions, the extraction rate of glycyrrhizic acid could reach (90.44±0.14)%.

Keywords: combined enzymes; ultrasonic; extraction; glycyrrhizic acid; pectinase; cellulase

甘草属于豆科植物,主要生长在欧洲和亚洲南部。甘草中含有甘草酸、多糖、类黄酮等许多活性成分,其中,最重要的活性成分之一是甘草酸(Glycyrrhizic Acid, GL)。甘草酸的甜度大约是蔗糖的200倍,且热量低,安全无毒,其甜味可在口腔中保持较长时间,是理想的天然甜味剂,已被广泛应用于食品工业。此外,由于甘草酸具有抗病毒、抗氧化、抗癌等特性,已被广泛应用于医药等行业^[1-2]。

从甘草中提取甘草酸是分离得到甘草酸的先导步骤。目前已报道^[3-6]的甘草酸提取方法主要有传统提取法和现代提取法。传统提取法主要包括水提法、有机溶剂提取法和索氏提取法等,这些方法存在操作时间长、甘草酸提取率低、有机溶剂回收困难进而污染环境等缺点。现代提取法主要包括酶提取法、超声波提取法、微波提取法等,这些方法相比传统提取方法提取率有所提高,但仅使用其中一种方法耗费的时间仍较长,能耗较大。近年来,采用两种方法两步提取植物中有效成分的研究逐渐成为热门课题。龙佳朋等^[7]研究了复合酶法、氨性乙醇浸提法两步提取甘草酸的工艺,结果显示,复合酶法、氨性乙醇浸提法两步提取甘草酸的总操作时间为3.5 h,最终得到甘草酸的提取率仅85.02%。为改善现有甘草酸提取方法的操作时间长、提取率低等不足,本研究拟结合复合酶法的条件温和、环保优势与超声法的高效优势,采用复合酶和超声辅助两步法提取甘草中的甘草酸,探求其最佳工艺条件。旨在为甘草酸的提取研究提供新方法、新思路,为甘草酸的实际提取应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

甘草酸对照品:纯度≥98%,上海源叶生物科技有限公司;

乌拉尔甘草:广东天诚中药饮片有限公司;

纤维素酶:活力≥1×10⁴ U/g,北京鼎国生物技术有限

基金项目:国家重点研发计划资助项目(编号:2016YFD0400803)

作者简介:梁霞,女,天津科技大学在读硕士研究生。

通信作者:吕晓玲(1960—),女,天津科技大学教授,硕士。

E-mail: lxling@tust.cn

收稿日期:2018-04-06

公司;

果胶酶:活力 1×10^4 U/g, 南宁东恒华道生物技术有限责任公司。

1.1.2 主要仪器设备

数控超声波清洗器:KQ-500DE 型, 昆山市超声仪器有限公司;

高效液相色谱仪(UV 检测器):LC-20A 型, 日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 甘草酸的测定方法 采用高效液相色谱法。参考文献[8]修改如下, 色谱条件:ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A:0.1% 磷酸—水, 流动相 B:乙腈; 检测波长:254 nm; 流速:1 mL/min; 柱温:25 ℃; 进样量:20 μL; 梯度洗脱参数如表 1 所示。

表 1 高效液相色谱梯度洗脱参数

Table 1 Gradient elution parameters of high performance liquid chromatography

时间/min	流动相 B/%	流动相 A/%
0~3	38→50	62→50
3~10	50→52	50→48
10~11	52→38	48→62
11~16	38	62

1.2.2 标准曲线的绘制 分别精密称取甘草酸对照品 1, 2, 3, 4, 5, 6 mg 于 100 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇溶解, 定容, 摇匀, 取适量过 0.45 μm 有机滤膜, 按 1.2.1 方法测其峰面积。以各甘草酸对照品溶液的浓度 C 为横坐标, 对应的峰面积值 S 为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $S = 1E + 07C + 14\ 947$, 相关系数 $R^2 = 1.000\ 0$, 表明该标准曲线在浓度为 0.01~0.06 mg/mL 时呈线性关系。

1.2.3 甘草原料中甘草酸总含量的测定 参考文献[9]修改如下:将甘草原料粉碎, 过三号筛(50 目), 干燥至恒重, 精密称取 0.2 g 于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入 70% 乙醇 100 mL, 密塞, 称定重量, 在功率为 250 W, 频率为 40 kHz 的条件下超声处理 30 min, 冷却, 再称定重量, 用 70% 乙醇补足减少的重量, 摇匀, 4 700 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 沉淀再按上述药典方法重复提取 4 次后, 弃沉淀, 合并 5 次提取所得上清液, 并按 1.2.1 方法测其峰面积值, 按式(1)计算甘草原料中总甘草酸含量。

$$P = \frac{CV}{1\ 000m} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

P——原料中甘草酸含量, %;

C——甘草酸浓度, mg/mL;

V——甘草酸提取液体积, mL;

m——原料质量, g。

1.2.4 复合酶法提取阶段的工艺流程及操作要点

工艺流程:甘草→粉碎→过筛→干燥→复合酶法提取→灭酶→离心→甘草酸提取液

操作要点:

(1) 过筛:将粉碎后的甘草粉末分别过 20, 40, 60, 80 目筛。

(2) 干燥:需将过筛后的甘草粉末干燥至恒重。

(3) 复合酶法提取:用 pH 为 4.5 的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液分别配制酶活均为 100 U/mL 果胶酶溶液和纤维素酶溶液;精密称取 1 g 甘草粉末于 250 mL 具塞锥形瓶中, 按设定量加入提取液(磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液)和纤维素酶、果胶酶溶液, 于设定温度的恒温水浴锅中提取甘草酸。

(4) 灭酶:酶解完成后, 沸水灭酶 10 min。

(5) 离心:冷却, 摇匀后, 4 700 r/min 离心 10 min。

1.2.5 甘草酸提取率的计算 取适量甘草酸提取液, 测定甘草酸浓度, 按式(2)计算甘草酸提取率。

$$R = \frac{nCV}{1\ 000mP} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:

R——甘草酸提取率, %;

n——稀释倍数;

C——甘草酸浓度, mg/mL;

V——甘草酸提取液体积, mL;

m——原料质量, g;

P——原料中甘草酸总含量, %。

1.2.6 复合酶法提取阶段的单因素试验设计

(1) 复合酶比例:固定加酶量 70 U/g·底物、pH 4.5、酶解时间 1.5 h、酶解温度 45 ℃、甘草粒度 40 目、料液比 1:25 (g/mL), 研究复合酶比例[果胶酶:纤维素酶为 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 (U/U)]对甘草酸提取率的影响。

(2) 加酶量:固定复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)1:3 (U/U)、pH 4.5、时间 1.5 h、温度 45 ℃、甘草粒度 40 目、料液比 1:25 (g/mL), 研究加酶量(35, 70, 105, 140, 175, 210, 245 U/g·底物)对甘草酸提取率的影响。

(3) pH:固定复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)1:3 (U/U)、加酶量 70 U/g·底物、时间 1.5 h、温度 45 ℃、甘草粒度 40 目、料液比 1:25 (g/mL), 研究 pH(3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0)对甘草酸提取率的影响。

(4) 酶解时间:固定复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)1:3 (U/U)、加酶量 70 U/g·底物、pH 4.5、温度 45 ℃、甘草粒度 40 目、料液比 1:25 (g/mL), 研究酶解时间(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h)对甘草酸提取率的影响。

(5) 温度:固定复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)1:3 (U/U)、加酶量 70 U/g·底物、pH 4.5、时间 1.5 h、甘草粒度 40 目、料液比 1:25 (g/mL), 研究温度(35, 40, 45, 50, 55, 60 ℃)对甘草酸提取率的影响。

(6) 原料粒度:固定复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)1:3 (U/U)、加酶量 70 U/g·底物、pH 4.5、时间 1.5 h、温度 45 ℃、料液比 1:25 (g/mL), 研究原料粒度(20, 40, 60, 80 目)对甘草酸提取率的影响。

(7) 料液比:固定复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)1:3

(U/U)、加酶量 $70 \text{ U/g} \cdot \text{底物}$ 、pH 4.5、时间 1.5 h、温度 45°C 、甘草粒度 40 目,研究料液比[1:15,1:20,1:25,1:30,1:35 (g/mL)]对甘草酸提取率的影响。

1.2.7 复合酶法提取阶段的工艺优化 以单因素研究为参考,在最优复合酶比例、pH 和料液比的条件下,根据响应面法(Response Surface Method, RSM)优化设计原理,选择 Box-Behnken 设计方法,以加酶量、酶解时间、酶解温度、原料粒度为自变量,甘草酸提取率为响应值,建立四因素三水平 RSM 分析试验。

1.2.8 超声辅助提取阶段的工艺流程及操作要点

工艺流程:复合酶法提取→灭酶→冷却→加入 70% 乙醇→超声法提取→离心→甘草酸提取液

操作要点:

(1) 复合酶法提取:按 1.2.7 最佳条件进行甘草酸的提取。

(2) 加入 70% 乙醇:通过浓缩或补加相同缓冲液使灭酶冷却后的提取液至一定体积,再加入一定量 70% 乙醇,使最终提取体系中的料液比及乙醇浓度至设定值。

1.2.9 超声辅助提取阶段的单因素试验设计

(1) 乙醇浓度:固定料液比 1:35 (g/mL)、超声功率 300 W、超声时间 15 min、超声温度 40°C ,研究乙醇浓度(11%, 14%, 17%, 20%, 23%, 26%)对甘草酸提取率的影响。

(2) 料液比:固定提取溶剂为 20% 乙醇、超声功率 300 W、超声时间 15 min、超声温度 40°C ,研究料液比[1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 (g/mL)]对甘草酸提取率的影响。

(3) 超声功率:固定提取溶剂为 20% 乙醇、料液比 1:35 (g/mL)、超声时间 15 min、超声温度 40°C ,研究超声功率(200, 250, 300, 350, 400 W)对甘草酸提取率的影响。

(4) 超声时间:固定提取溶剂为 20% 乙醇、料液比 1:35 (g/mL)、超声功率 300 W、超声温度 40°C ,研究超声时间(5, 10, 15, 20, 25, 30 min)对甘草酸提取率的影响。

(5) 超声温度:固定提取溶剂为 20% 乙醇、料液比 1:35 (g/mL)、超声功率 300 W、超声时间 15 min,研究超声温度(30, 35, 40, 45, 50°C)对甘草酸提取率的影响。

2 结果与分析

2.1 甘草原料中总甘草酸的含量

参照《药典 2010》从原料中提取甘草酸 5 次,可基本将甘草酸完全提出。计算得原料中总甘草酸含量为 3.72%。

2.2 复合酶法提取阶段的单因素试验

2.2.1 复合酶比例对甘草酸提取率的影响 在复合酶总量一定时,随着复合酶比例变化,纤维素酶量增加,果胶酶量减少,甘草酸提取率呈先增加后减小趋势,见图 1。这是由于甘草细胞壁中纤维素多于果胶,破壁时所需纤维素酶量大于果胶酶量,故随着纤维素酶的增加甘草酸提取率增大,而果胶酶量过少时,会导致复合酶破壁能力减弱,使甘草酸溶出量减少,提取率下降^[10]。在复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)

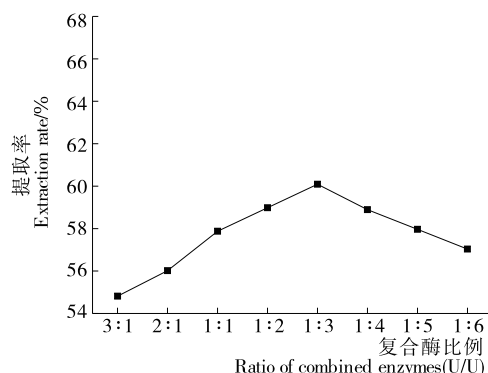


图 1 复合酶比例对甘草酸提取率的影响

Figure 1 Effect of the ratio of combined enzymes on the extraction rate of glycyrrhizic acid

为 1:3 (U/U) 时,甘草酸提取率达到最大。所以最佳复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)为 1:3 (U/U)。

2.2.2 加酶量对甘草酸提取率的影响 如图 2 所示,当加酶量 $< 175 \text{ U/g} \cdot \text{底物}$ 时,随复合酶量的增加,提取率逐渐升高;当加酶量 $> 175 \text{ U/g} \cdot \text{底物}$ 时,复合酶过量,进而导致复合酶相互附着^[11],酶与底物传质效率降低,甘草酸提取率下降;当加酶量为 $175 \text{ U/g} \cdot \text{底物}$ 时,甘草酸提取率达到最大。因此,最佳复合酶量为 $175 \text{ U/g} \cdot \text{底物}$ 。

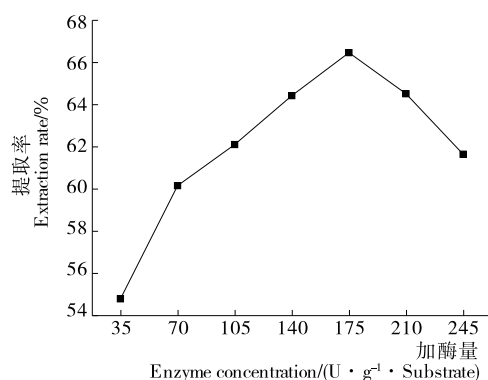


图 2 加酶量对甘草酸提取率的影响

Figure 2 Effect of enzyme concentration on the extraction rate of glycyrrhizic acid

2.2.3 酶解 pH 对甘草酸提取率的影响 当 $\text{pH} < 5.5$ 时,随着 pH 的增大,复合酶活性升高,破壁能力加强,甘草酸提取率增加;当 $\text{pH} > 5.5$ 时,复合酶活性下降,甘草酸提取率下降^[12];当 pH 为 5.5 时,甘草酸提取率达到最大,见图 3。因此,最佳 pH 为 5.5。

2.2.4 酶解时间对甘草酸提取率的影响 当酶解时间 $< 1 \text{ h}$ 时,酶解反应不完全,甘草酸提取率随时间的延长呈上升趋势;当反应时间 $> 1 \text{ h}$ 时,随着酶解时间延长,甘草酸溶出量逐步减少,甘草酸提取率增加不明显^[12];当酶解时间为 1 h 时,甘草酸提取率达到最大,见图 4。综合考虑,选择 1 h 为最佳酶解时间。

2.2.5 酶解温度对甘草酸提取率的影响 当温度 $< 50^\circ\text{C}$ 时,随温度的上升,复合酶活性增加,破壁能力加强,甘草酸提取率升高;当温度 $> 50^\circ\text{C}$ 时,较高温度使复合酶活性降

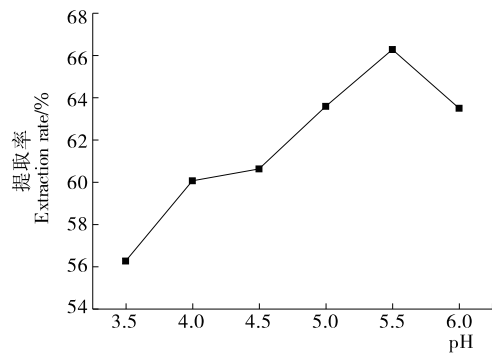


图 3 酶解 pH 对甘草酸提取率的影响
Figure 3 Effect of pH on the extraction rate of glycyrrhizic acid

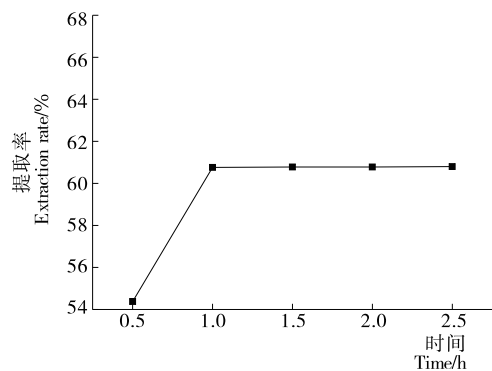


图 4 酶解时间对甘草酸提取率的影响
Figure 4 Effect of enzymatic hydrolysis time on the extraction rate of glycyrrhizic acid

低,破壁能力减弱,进而甘草酸提取率下降^[13],当温度为 50 ℃ 时,甘草酸提取率达到最大,见图 5。因此,最佳酶解温度为 50 ℃。

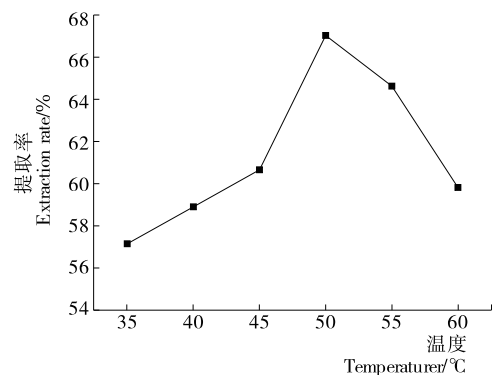


图 5 酶解温度对甘草酸提取率的影响
Figure 5 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on the extraction rate of glycyrrhizic acid

2.2.6 原料粒度对甘草酸提取率的影响 当原料粒度<40 目时,随原料粒度的减小,甘草细胞与复合酶接触面积增大,破壁能力加强,甘草酸的溶出量增加,甘草酸提取率呈上升趋势;当原料粒度>40 目时,随原料粒度的减小,杂质溶出量增加,大量杂质处于酶解体系中影响甘草酸的溶出,甘草酸提取率下降;当原料粒度为 40 目时,甘草酸提取率达到最大,见图 6。因此,最佳甘草原料粒度为 40 目。

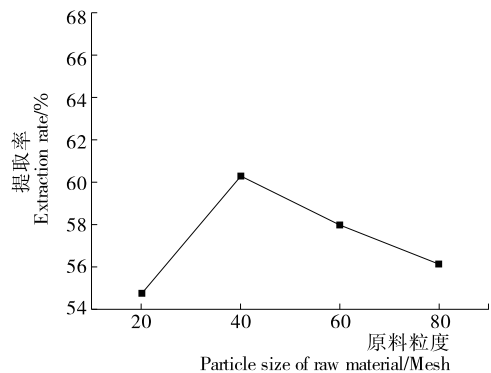


图 6 原料粒度对甘草酸提取率的影响
Figure 6 Effect of particle size of raw material on the extraction rate of glycyrrhizic acid

2.2.7 料液比对甘草酸提取率的影响 当料液比>1:25 (g/mL)时,随溶剂量增加,更多的甘草酸溶于提取液中,甘草酸提取率逐渐升高;当料液比<1:25 (g/mL)时,由于过多的提取液使复合酶浓度与底物浓度均下降,进而酶与底物的接触机会减少,甘草酸提取率降低^[13],当料液比为 1:25 (g/mL)时,甘草酸提取率达到最大,见图 7。因此,最佳料液比为 1:25 (g/mL)。

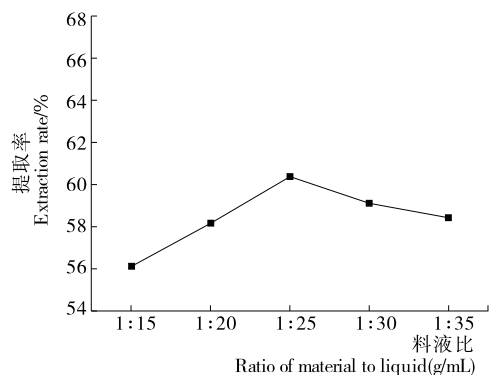


图 7 料液比对甘草酸提取率的影响
Figure 7 Effect of the ratio of material to liquid on the extraction rate of glycyrrhizic acid

2.3 RSM 优化复合酶法提取阶段的工艺条件

2.3.1 响应面试验设计因素、水平及编码 响应面试验设计因素、水平及编码见表 2。

2.3.2 Box-Benhnken 试验设计及结果 Box-Benhnken 试验设计方案及结果见表 3。

2.3.3 回归模型及方差分析 运用 Design-Expert 8.0.6 数据统计分析软件对表 3 结果进行多元线性回归,得甘草酸提

表 2 响应面试验设计因素、水平及编码

Table 2 Response surface design factors, levels and coding				
水平	A 加酶量/ U	B 酶解 时间/h	C 酶解 温度/℃	D 原料粒 度/目
-1	105	0.5	40	20
0	175	1.0	50	40
1	245	1.5	60	60

表 3 Box-Benhnken 试验设计方案及结果
Table 3 Box-Benhnken design and results

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	-1	-1	0	0	61.37±0.21
2	1	-1	0	0	61.94±0.15
3	-1	1	0	0	60.05±0.23
4	1	1	0	0	61.01±0.14
5	0	0	-1	-1	64.46±0.17
6	0	0	1	-1	64.99±0.23
7	0	0	-1	1	66.59±0.25
8	0	0	1	1	64.08±0.18
9	-1	0	0	-1	61.01±0.17
10	1	0	0	-1	62.54±0.22
11	-1	0	0	1	62.20±0.30
12	1	0	0	1	62.06±0.29
13	0	-1	-1	0	64.34±0.19
14	0	1	-1	0	64.14±0.28
15	0	-1	1	0	64.71±0.20
16	0	1	1	0	62.96±0.22
17	-1	0	-1	0	61.81±0.17
18	1	0	-1	0	62.00±0.19
19	-1	0	1	0	60.86±0.14
20	1	0	1	0	61.31±0.25
21	0	-1	0	-1	64.41±0.16
22	0	1	0	-1	64.32±0.21
23	0	-1	0	1	65.50±0.19
24	0	1	0	1	63.59±0.15
25	0	0	0	0	68.16±0.24
26	0	0	0	0	67.50±0.18
27	0	0	0	0	67.87±0.23
28	0	0	0	0	67.07±0.19
29	0	0	0	0	67.91±0.22

取率关于加酶量、酶解时间、酶解温度、原料粒度的二次多项式数学模型:

$$Y=67.70+0.30A-0.52B-0.37C+0.19D+0.098AB+0.065AC-0.42AD-0.39BC-0.45BD-0.76CD-4.59A^2-2.07B^2-1.58C^2-1.14D^2。$$
 (3)

由表 4 可知,该模型极显著($P<0.000\ 1$),失拟项不显著($0.969\ 1>0.05$),且相关系数 $R^2=0.992\ 8$,可调整确定系数 $R^2_{adj}=0.985\ 6$,说明该模型拟合程度较好,可以较准确地考察各因素对甘草酸提取率的影响。

结果显示,A 及 D 对甘草酸提取率影响显著,B 及 C 对甘草酸提取率影响极显著;交互项 AD、BC 对甘草酸提取率影响显著,交互项 BD、CD 对甘草酸提取率影响极显著,其他交互项不显著;各二次项对甘草酸提取率影响均为极显著。各因素对甘草酸提取率影响由小到大排列顺序为:原料粒度<加酶量<酶解温度<酶解时间。

表 4 模型方差分析

Table 4 Model variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	159.13	14.00	11.37	137.64	<0.000 1	* *
A	1.06	1.00	1.06	12.79	0.003 0	*
B	3.20	1.00	3.20	38.79	<0.000 1	* *
C	1.64	1.00	1.64	19.80	0.000 5	* *
D	0.44	1.00	0.44	5.29	0.037 3	*
AB	0.04	1.00	0.04	0.46	0.508 5	
AC	0.02	1.00	0.02	0.20	0.657 9	
AD	0.70	1.00	0.70	8.44	0.011 5	*
BC	0.60	1.00	0.60	7.27	0.017 4	*
BD	0.83	1.00	0.83	10.03	0.006 9	* *
CD	2.31	1.00	2.31	27.98	0.000 1	* *
A ²	136.74	1.00	136.74	1 655.83	<0.000 1	* *
B ²	27.76	1.00	27.76	336.21	<0.000 1	* *
C ²	16.20	1.00	16.20	196.12	<0.000 1	* *
D ²	8.47	1.00	8.47	102.56	<0.000 1	* *
残差	1.16	14.00	0.08			
失拟	0.43	10.00	0.04	0.24	0.969 1	
误差	0.72	4.00	0.18			
总离差	160.28	28.00				

2.3.4 响应面分析及优化结果 运用 Design-Expert 8.0.6 数据统计分析软件绘制甘草酸提取率与各因素交互项的响应曲面关系图(见图 8)。

如图 8 所示,甘草酸提取率与各因素交互项的响应曲面关系图均为开口向下的光滑曲面,甘草酸提取率均有最大值,且甘草酸提取率达到最大值时所对应的各因素水平与单因素试验研究结果基本相符,进一步说明 Box-Benhnken 试验设计所选取的因素水平适宜^[13]。

同时,运用 Design-Expert 8.0.6 数据统计分析软件预测出复合酶法提取甘草酸的最佳工艺条件为:复合酶量 176.64 U/g·底物,时间 0.94 h,温度 48.62 ℃,原料粒度 43 目,且在此最佳工艺条件下甘草酸提取率预测值为 67.78%。为方便实际操作,将参数修正为:复合酶量 176.6 U/g·底物,时间 0.94 h,温度 48 ℃,原料粒度 40 目,进行 3 次验证性实验,得甘草酸平均提取率为 67.22%,标准偏差为 0.12%,相对标准偏差为 0.18%,与预测值的相对误差为 0.83%,实际值与预测值基本相符,表明运用响应面法优化复合酶法提取甘草酸的工艺条件切实可行,但该实际值低于中心试验点所得甘草酸提取率,因此选择中心试验点为复合酶法提取甘草酸的最佳工艺条件,即最佳复合酶量 175 U/g·底物,时间 1 h,温度 50 ℃,原料粒度 40 目。

按 1.2.4 方法及 2.3 所得最佳工艺条件对甘草酸进行连续提取,结果显示,连续提取 2 次后甘草酸提取率为(68.81±0.21)%,连续提取 3 次后甘草酸提取率仅为(69.10±0.18)%,表明增加复合酶法提取甘草酸的次数已无法大幅提高甘草酸提取率,所以需要辅以其他方法来进一步使甘草酸从细胞中溶出,进而提高甘草酸提取率,避免甘草资源浪费。

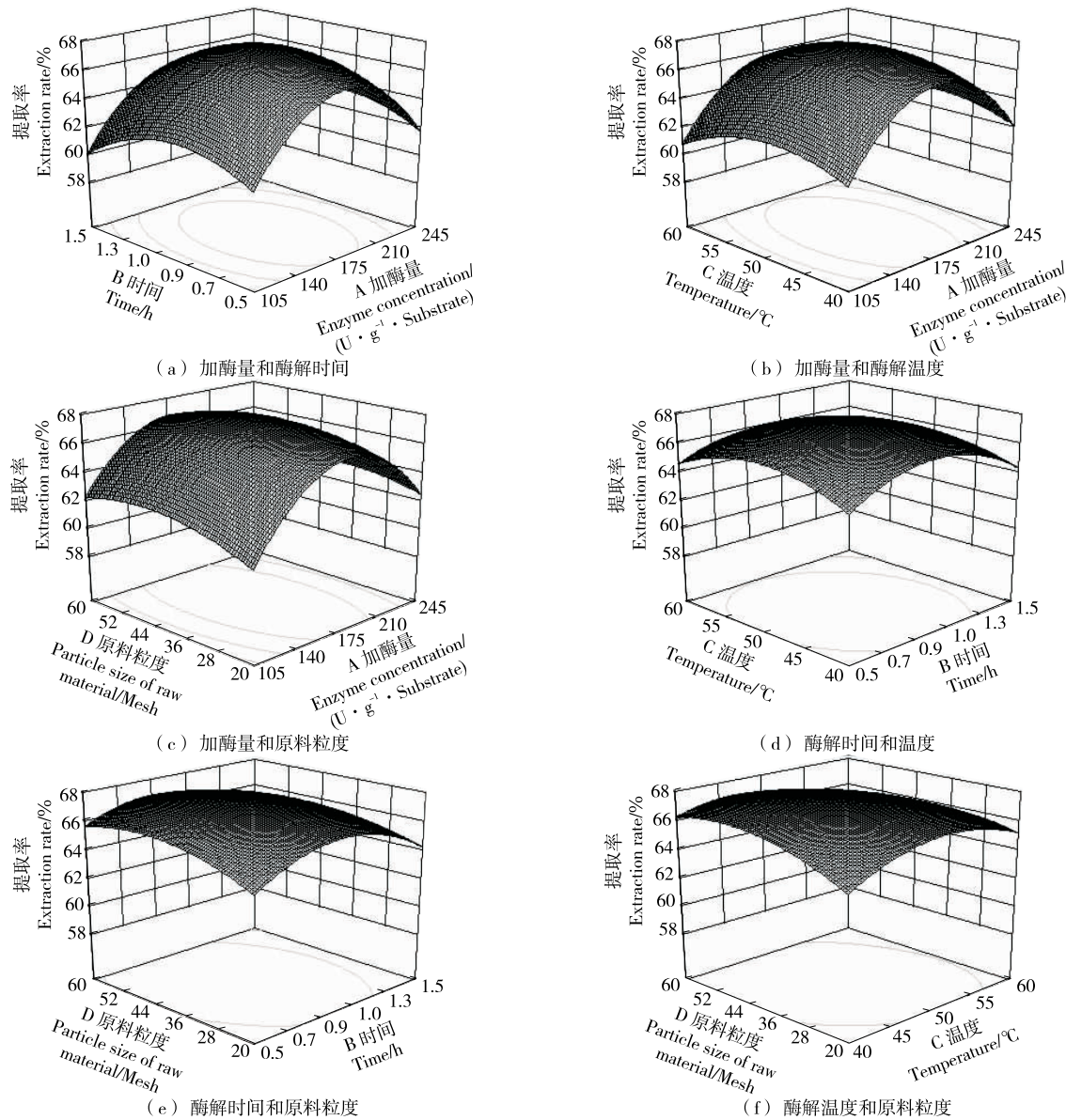


图 8 各因素交互作用对甘草酸提取率的影响

Figure 8 Effect of interaction of various factors on the extraction rate of glycyrrhizic acid

2.4 超声辅助提取阶段的单因素试验

2.4.1 乙醇浓度对甘草酸提取率的影响 当乙醇浓度 < 20% 时,甘草酸提取率急剧增大,说明在超声和提取溶剂乙醇的存在下,更多甘草酸由细胞溶出;当乙醇浓度 > 20% 时,乙醇浓度对甘草酸提取率影响不大,甘草酸提取率增加极缓慢,见图 9。为节约成本,选择乙醇浓度 20% 为最佳。

2.4.2 料液比对甘草酸提取率的影响 当料液比 > 1 : 35 (g/mL) 时,随溶剂量的增加,甘草酸与提取溶剂的浓度差增大,甘草酸更易溶出,甘草酸提取率呈上升趋势;当料液比 < 1 : 35 (g/mL) 时,由于溶剂量太大,使单位体积提取液所受超声的机械、空化等作用降低^[14],甘草酸提取率下降。当料液比为 1 : 35 (g/mL) 时,甘草酸提取率达到最大,见图 10。因此,最佳提取料液比为 1 : 35 (g/mL)。

2.4.3 超声功率对甘草酸提取率的影响 当超声功率为 200~400 W 时,随超声功率的增大,超声产生的机械和空化

等作用增强,进而甘草酸的溶出量增大,甘草酸提取率增加^[14]。当超声功率 > 350 W 时,超声功率对甘草酸溶出量

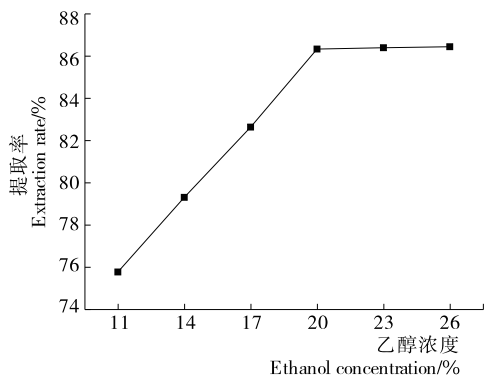


图 9 乙醇浓度对甘草酸提取率的影响

Figure 9 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of glycyrrhizic acid

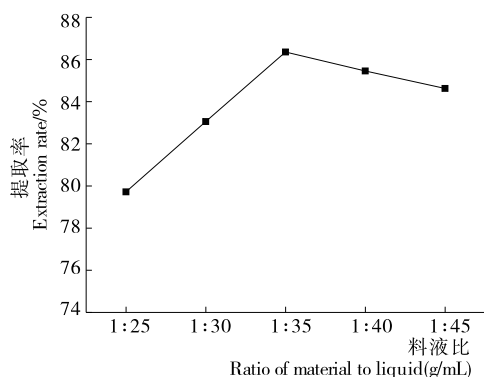


图 10 料液比对甘草酸提取率的影响

Figure 10 Effect of ratio of material to liquid on the extraction rate of glycyrrhizic acid

的影响减小,甘草酸提取率随超声功率的增加而缓慢平稳增加,见图 11。为节约能源,减小噪音,选择超声功率 350 W 为最佳。

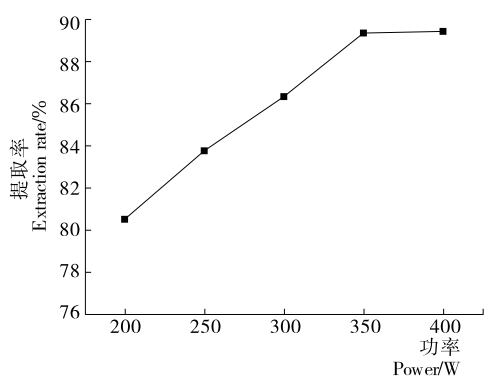


图 11 超声功率对甘草酸提取率的影响

Figure 11 Effect of ultrasonic power on the extraction rate of glycyrrhizic acid

2.4.4 超声时间对甘草酸提取率的影响 当超声时间 < 15 min 时,随超声时间的延长,甘草酸的溶出量增加,甘草酸提取率逐渐上升;当超声时间 > 15 min 时,超声时间对甘草酸的溶出量影响不大,甘草酸提取率几乎不增加,见图 12。为节约能源与时间,选择超声时间 15 min 为最佳。

2.4.5 超声温度对甘草酸提取率的影响 如图 13 所示,当温度 < 40 °C 时,随温度的上升,甘草酸在提取溶剂中的扩散

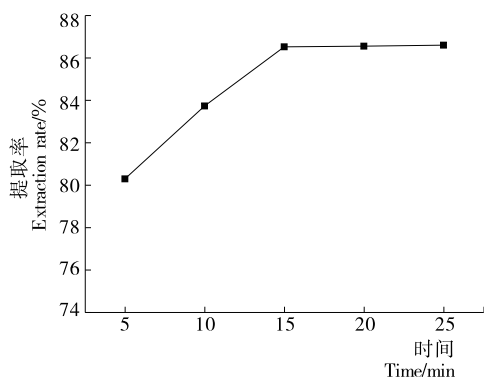


图 12 超声时间对甘草酸提取率的影响

Figure 12 Effect of ultrasonic time on the extraction rate of glycyrrhizic acid

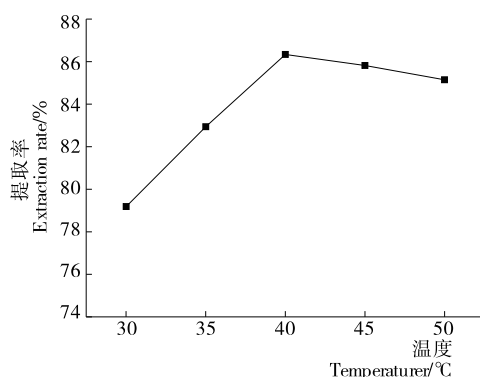


图 13 超声温度对甘草酸提取率的影响

Figure 13 Effect of ultrasonic temperature on the extraction rate of glycyrrhizic acid

速率增加,甘草酸更易从原料中溶出,甘草酸提取率升高^[15];当温度 > 40 °C 时,随温度的升高,提取体系中液体表面张力降低,且由超声产生的空化泡内的压力增大,进而超声波的阻尼增大,甘草酸提取率下降^[16];当温度为 40 °C 时,甘草酸提取率达到最大。因此,最佳超声温度为 40 °C。

在上述最佳条件下,按照 1.2.8 方法,进行复合酶和超声辅助两步法提取甘草酸,试验为 3 个平行试验,得甘草酸平均提取率为 90.44%,标准偏差为 0.14%,相对标准偏差为 0.09%,说明本研究复合酶和超声辅助两步法提取甘草酸的工艺条件真实可靠,稳定性较好,在实际生产中具有参考价值。谢果等^[17]以乙醇为提取溶剂,研究了超声波法提取甘草酸的工艺,结果显示,超声波法提取甘草酸的总操作时间长达 2.5 h,且甘草酸提取率仅为 87.4%。

3 结论

通过对复合酶和超声辅助两步法提取甘草中甘草酸的工艺进行研究,最终得到复合酶和超声辅助两步法提取甘草酸的最佳工艺条件,且在最佳工艺条件下甘草酸的提取率可达 $(90.44 \pm 0.14)\%$ 。因此,复合酶和超声辅助两步法适用于甘草酸的提取,与传统提取法、超声波提取法及复合酶法、氨性乙醇浸提法两步提取相比,具有提取率高、总操作时间短 (1.25 h)、条件温和、高效等优点。

甘草中含有许多活性成分,在采用复合酶和超声辅助两步法提高甘草酸提取率的同时,是否会导致其他杂质增多,进而增加甘草酸纯化难度,本试验未作验证,今后将加以深入研究。

参考文献

- [1] MOHAMMAD A S, MOHAMMAD H E, ZEINOLABEDIN B S, et al. Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root[J]. Food Chemistry, 2016(210): 396-401.
- [2] FAN Rui, LI Nan, XU Hong-gao, et al. The mechanism of hydrothermal hydrolysis for glycyrrhizic acid into glycyrrhetinic acid and glycyrrhetinic acid 3-O-mono- β -D-glucuronide in subcritical water[J]. Food Chemistry, 2016(190): 912-921.
- [3] 方芳,邢文倩,王沙沙,等. 甘草药用价值及其提取分离方法的研究进展[J]. 现代制造, 2017(5): 34-42.

(下转第 157 页)

抗炎、抗癌等功效^[20-21], Δ -7 植物甾醇可抑制由二氢睾酮过多引起的前列腺增生^[22];角鲨烯为天然的抗癌、抗氧化剂,被广泛应用到食品、化妆品和医药行业^[23]。因此可将裸仁南瓜籽油开发为具有降胆固醇、抗癌、抗氧化的保健油脂或进一步研究其功能成分,应用到化妆品、药品等行业。

对裸仁南瓜籽油进行体外抗氧化活性评价发现,裸仁南瓜籽油对 DPPH、ABTS 自由基具有良好的清除能力,抗氧化活性较强,可能与其高含量的不饱和脂肪酸、植物甾醇,尤其是角鲨烯相关,但具体机制还需进一步研究。下一步将对裸仁南瓜籽油的活性部位进一步分离纯化,以明确其抗氧化作用的主要组分及裸仁南瓜籽油抗氧化机制。

参考文献

- [1] 邓桂兰. 南瓜的综合利用与产品开发[J]. 粮食与食品工业, 2016, 23(3): 35-39.
- [2] 王晓, 程传格. 南瓜籽油脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 115-116.
- [3] 孙欣, 徐雅琴, 崔崇士. 南瓜籽油的化学组成及开发利用[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(2): 124-126.
- [4] 董国玲, 田密霞, 姜爱丽, 等. 南瓜籽油的开发利用价值[J]. 粮食科技与经济, 2010, 35(4): 33-35.
- [5] MAKNI M, SEFI M, FETOUI H, et al. Flax and Pumpkin seeds mixture ameliorates diabetic nephropathy in rats[J]. Food & Chemical Toxicology, 2010, 48(8/9): 2 407-2 412.
- [6] CHO Y H, LEE S Y, JEONG D W, et al. Effect of pumpkin seed oil on hair growth in men with androgenetic alopecia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2 014(1): 549 721.
- [7] MACIEJ G, WIRGINIA K K, ANETA S, et al. Evaluation of anthelmintic activity and composition of pumpkin (Cucurbita pepoL.) seed extracts: in vitro and in vivo studies[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(9): 1 456.
- [8] GOSSELL-WILLIAMS M, DAVIS A, O'CONNOR N. Inhibition of testosterone-induced hyperplasia of the prostate of sprague-dawley rats by pumpkin seed oil [J]. Journal of Medicinal Food, 2006, 9(2): 284-286.
- [9] SCHOENIGER G. Genetische Untersuchungen an Cucurbita pepoL[J]. Der Züchter, 1950, 20(11/12): 321-336.
- [10] 邹伶威, 李柱刚, 韩俊岩, 等. 裸仁南瓜研究进展概述[J]. 中国瓜菜, 2012, 25(6): 42-44.
- [11] 李全宏, 闫红, 蔡同一. 影响南瓜籽油萃取质量研究[J]. 中国食品学报, 2002, 2(3): 26-30.
- [12] 刘玉梅, 高智明, 王健, 等. 裸仁南瓜籽及南瓜籽油的营养成分研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 313-316.
- [13] 李桂华, 刘若瑜, 李珺. 葡萄籽油理化特性及组成分析的研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2009, 30(6): 37-40.
- [14] 邓乾春, 禹晓, 黄庆德, 等. 亚麻籽油的营养特性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(4): 715-721.
- [15] 刘东波, 赖锡湖. 从南瓜种子中提取南瓜子油的方法: 中国, ZL201110066333.0[P]. 2012-8-17.
- [16] 黄健花, 宋志华, 刘慧敏, 等. 植物油的不同组分 DPPH 自由基清除能力及其与微量有益成分含量的相关性[J]. 中国油脂, 2017, 42(2): 67-70.
- [17] 张思, 王蕾, 张志旭, 等. 16 种市售酵素食品功能分析与评价[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 196-200.
- [18] 梁红敏, 任继波, 李彦奎, 等. 改良的 DPPH 与 ABTS 自由基法评价不同葡萄籽油抗氧化能力[J]. 中国粮油学报, 2018(1): 85-91.
- [19] 石金娥, 于海玲, 王岩, 等. 气相色谱-质谱联用测定南瓜籽油中角鲨烯的含量[J]. 中国油脂, 2014, 39(11): 88-91.
- [20] 任建敏. 食物中植物甾醇生理活性及药理作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 389-393.
- [21] 张志旭, 昌超, 刘东波. 天然植物甾醇的来源、功效及提取研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 288-293.
- [22] RADHIKA P, CABEZA M, BRATOEFF E, et al. 5 α -reductase inhibition activity of steroids isolated from marine soft corals[J]. Steroids, 2004, 69: 439-444.
- [23] 刘纯友, 马美湖, 靳国锋, 等. 角鲨烯及其生物活性研究进展[J]. 中国食品学报, 2015, 15(5): 147-156.
- [4] 王珊, 黄怡, 曹蕾, 等. 甘草中甘草酸的提取及测定方法简述[J]. 化工科技, 2010, 18(1): 76-80.
- [5] 赵茜, 李秉滔, 刘欣, 等. 超声强化甘草酸提取的研究[J]. 食品科技, 2000(5): 38-39.
- [6] 国蓉, 李剑君, 国亮, 等. 采用响应曲面法优化甘草饮片中甘草酸的超声提取工艺[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(9): 187-192.
- [7] 龙佳朋, 陈振斌, 刘晓娇, 等. 正交试验优选甘草酸的复合酶法提取工艺[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 626-629.
- [8] 王卓, 裴建军, 李华钟, 等. 极耐热性 β -葡萄糖醛酸酶的高效表达和酶学性质及其应用[J]. 生物工程学报, 2008, 24(8): 1 407-1 412.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 80-81.
- [10] 李亚辉, 马艳弘, 黄开红, 等. 响应面法优化复合酶提取芦荟多糖工艺及其抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 63-68.
- [11] 陈超, 岳崇慧, 王艳菲, 等. 超声波辅助酶法提取榛蘑多糖[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 222-226.
- [12] 余先纯, 李湘苏, 韩大良, 等. 超声波联合果胶酸酶提取柚皮果胶的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 164-167.
- [13] 范三红, 李静, 王亚云, 等. 超声波辅助复合酶提取菊糖工艺优化[J]. 食品科学, 2015, 36(4): 23-28.
- [14] 程海涛, 申献双. 响应面优化超声-微波协同提取紫米原花青素工艺[J]. 食品工业科技, 2018(7): 186-191.
- [15] 蒋孟君, 王艺, 任建青, 等. 超声提取食用玫瑰花总酚及其大孔树脂纯化前后抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017(23): 164-169.
- [16] 宋思圆, 苏平, 王丽娟, 等. 响应面试验优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 283-289.
- [17] 谢果, 侯长军. 超声波法从甘草中提取甘草酸的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002(4): 42-44.

(上接第 151 页)