

纤维素酶-微波辅助提取银杏叶 总黄酮及抗氧化性能研究

李保同,徐永霞,李娟,刘泽学,韩春蕊*

(北京林业大学材料科学与技术学院,林业生物质材料与能源教育部工程研究中心,
林木生物质化学北京市重点实验室,北京 100083)

摘要:研究了纤维素酶-微波辅助提取银杏叶总黄酮的工艺,并对乙醇提取法、纤维素酶辅助提取法、微波辅助提取法和纤维素酶-微波辅助提取法4种工艺进行了对比,结果表明,采用纤维素酶-微波辅助提取法工艺效果最佳,最佳条件为:纤维素酶质量分数为5%(与银杏叶的质量比),酶解时间为1h,酶解温度为50℃,累计微波时间为2min,乙醇质量分数为70%,液料比为30:1,此时,银杏叶总黄酮的提取率达到3.96%,是乙醇提取法提取率的2.6倍。

关键词:银杏叶;总黄酮;纤维素酶;微波;抗氧化

中图分类号:R284.2

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)03-0067-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2016.03.016

Cellulase-microwave assisted extraction of flavonoids from ginkgo biloba leaves and its antioxidant activity

LI Bao-tong, XU Yong-xia, LI Juan, LIU Ze-xue, HAN Chun-rui*

(College of materials Science and Technology, Beijing Forestry University; MOE Engineering Research Center of Forestry Biomass Materials and Bioenergy, Beijing Forestry University; Beijing Key Laboratory of Lignocellulosic Chemistry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The cellulase-microwave assisted method is used to extract total flavonoids from ginkgo biloba leaves. Ethanol extraction, cellulase-assisted extraction, microwave extraction and microwave-assisted extraction are compared. The results show that the extraction yield of total flavonoids is significantly enhanced by cellulase-microwave assisted method. The yield can reach as high as 3.96%, which is 2.6 times than that extracted by using conventional extraction method. The optimal conditions are shown as follows: 3% of the cellulase, 1 hour of hydrolysis time, 50℃ of hydrolysis temperature, 2 minutes of total microwave time, 70% of ethanol concentration and 30:1 of the ratio of liquid to solid. Antioxidant performance of extracts from ginkgo biloba leaves and vitamin C are also investigated in hydroxyl free radical system and superoxide anion free radical system. The scavenging rates of the present extract on hydroxyl radical and radical superoxide are 85% and 86.18%, respectively, with the concentration of 4 mg/ml. The anti-oxidation from extracts is better than that from vitamin C.

Key words: ginkgo biloba leaves; total flavonoids; cellulase; microwave; antioxidations

银杏叶提取物广泛用于心脑血管疾病的治疗^[1],其中银杏黄酮具有清除自由基、抗氧化、改善心脑血管循环等多种功能^[2],广泛应用于医药、食品技术等各个行业。目前,国内生产厂家多采用有机溶剂乙醇提取法提取银杏叶黄酮,而银杏叶中黄酮类化合物主要包裹在以纤维素为主构成的细胞壁内,造成乙醇提取法提取时间长、提取率低等特点^[3-4]。而银杏黄酮的功能基团酚羟基也会因为提取时间过长发生不同程度的氧化,降低其使用效果。因此,近几年出现了可大幅度降低提取时间的酶辅助提取法^[5]、超声波辅助提取法^[6]、微波辅助提取法^[7]以及超临界辅助提取法^[8]等提取工艺,但具有生产工艺复杂、设备成本高等缺点。笔者采用工艺

简便、提取时间短的纤维素酶-微波辅助提取银杏叶总黄酮,并结合 SEM 观察其微观结构,探讨了其提取机理,最后研究了提取物体外抗氧化性能—对羟基和超氧自由基的清除能力。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

银杏叶,市售,产自江苏徐州,干银杏叶于60℃烘箱内烘24h,粉碎,过60目分样筛;纤维素酶(活性1:5000),北京奥博星生物科技有限公司生产;VC(抗坏血酸),天津博迪化工有限公司生产。

仪器:T6系列紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司生产;微电脑微波化学反应

收稿日期:2015-08-29

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助(TD2011-10, YX2011-4);国家自然科学基金项目(30901139)

作者简介:李保同(1988-),男,硕士生,研究方向为天然产物的提取分离,libaotong2008@126.com;韩春蕊(1980-),工学博士,副教授,研究方向为天然资源化学加工利用和松香高值化利用,通讯联系人,hanrc1@sohu.com。

器, WBFY-205 型, 巩义科瑞仪器有限公司生产; S-4800 扫描电子显微镜, 日本日立公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的制作

以芦丁为标准品, 采用硝酸铝显色法测定银杏叶总黄酮的提取率^[9]:

$$\text{提取率} =$$

$$[\text{提取液中的黄酮质量}(\text{g}) / \text{银杏叶质量}(\text{g})] \times 100\%$$

1.2.2 乙醇提取法

准确称取 10 g 银杏叶干粉与 70% 乙醇水溶液 200 mL, 于 70℃ 回流提取 3 h, 提取 2 次合并滤液抽滤, 滤液用石油醚萃取 2 次去叶绿素和脂质, 取水层浓缩得产品。

1.2.3 纤维素酶辅助提取法

称取 10 g 银杏叶干粉, 加入 5% (酶质量与银杏叶粉末质量比) 的纤维素酶于 60 mL pH 为 4.8 的乙酸钠-乙酸缓冲溶液中酶解, 50℃ 水浴中酶解 1 h 后, 加入 140 mL 无水乙醇, 使提取体系为 70% 乙醇溶液。

1.2.4 微波辅助提取法

准确称取 10 g 银杏叶干粉与 70% 乙醇水溶液 200 mL, 微波提取 2 min 得产品备用。

1.2.5 纤维素酶-微波辅助提取法

称取 10 g 银杏叶干粉, 加入纤维素酶于 pH = 4.8 的水体系中进行酶水解反应, 然后进行微波乙醇水溶液体系提取制得产品。

1.2.6 银杏叶提取物的抗氧化性能测试

按照文献[10]所述的方法测定 VC 和银杏叶提取物对羟基自由基和超氧自由基的清除率。

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线

吸光度 A 与芦丁质量浓度 C (mg/mL) 的工作曲线如图 1 所示。由图 1 可知, 回归方程式为 $A = 8.4495C$, $R^2 = 0.9885$, 吸光度与芦丁质量浓度呈直线关系, 线性关系良好。

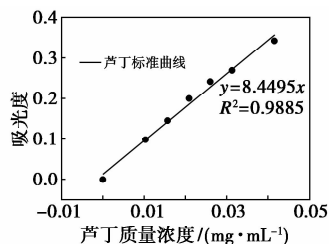


图 1 芦丁标准曲线

2.2 提取方法对提取率的影响

4 种不同提取方法下提取时间和所对应的提取率如表 1 所示。

表 1 不同提取方法对比表

提取方法	乙醇提取法	微波辅助提取法	纤维素酶辅助提取法	纤维素酶-微波辅助提取法
所用时间	6 h	2 min	7 h	2 min
提取率/%	1.51	2.12	2.35	3.96

由表 1 可知, 与乙醇提取法和微波辅助提取法相比, 微波辅助提取法可将提取时间由 6 h 降低到 2 min, 而提取效率却由 1.51% 升高到 2.12%, 表明微波辅助不仅可大幅度降低提取时间, 还可提高提取效率。对比纤维素酶辅助提取法和乙醇提取法, 在相近的提取时间内, 纤维素酶辅助提取法可将提取率提高 56%, 表明纤维素酶辅助法可大幅度提高提取率。而纤维素酶-微波辅助提取法便是结合了微波辅助和纤维素酶辅助提取的优点, 降低了提取时间, 提取率是常规提取方法—乙醇提取法的 2.6 倍。

2.3 纤维素酶-微波辅助提取法工艺研究

影响纤维素酶-微波辅助提取法的因主要有纤维素酶质量分数 (纤维素酶质量/银杏叶粉末质量)、酶解时间、酶解温度、累计微波时间、乙醇质量分数和料液比, 为探索最佳提取工艺, 进行单因素试验。

2.3.1 酶质量分数对提取率的影响

纤维素酶质量分数 (占银杏叶粉末质量) 对银杏叶总黄酮提取率的影响如图 2 所示。

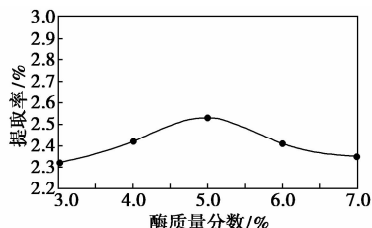


图 2 酶质量分数对提取率的影响图

由图 2 可知, 随着酶质量分数的增加, 提取率先增加后降低, 这是由于随着原料粉末与酶接触几率的增加, 促进有效成分的溶出, 银杏黄酮的提取率明显增加, 当酶质量分数为 5% 时提取率最高, 此时酶解基本完全, 再增加酶的量, 过高的酶质量分数反而会抑制酶解, 导致提取率降低。综合分析, 纤维素酶最佳质量分数为 5%。

2.3.2 酶解时间对提取率的影响

酶解时间对银杏叶总黄酮提取率的影响如图 3

所示。由图3可知,当酶解1 h时,酶解已经反应完全,有效成分已经溶解于溶剂中,而酶解时间过长会加大提取液中黄酮与空气接触时间而被氧化,而且导致细胞内更多其他成分的溶出,因此,最佳酶解时间为1 h。

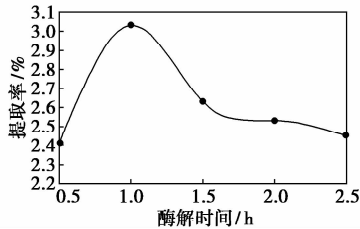


图3 酶解时间对提取率的影响

2.3.3 酶解温度对提取率的影响

酶解温度对提取率的影响如图4所示。

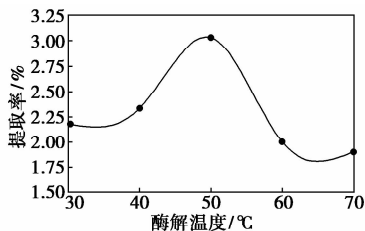


图4 酶解温度对提取率的影响

由图4可知,随着温度从30℃到50℃不断增加,提取率不断增加,说明温度较低时,达不到纤维素酶的最佳催化温度;而当温度为50℃时,达到酶最适活性温度;而超过50℃之后,纤维素酶受热反而使得活性降低,故最佳酶解温度50℃。

2.3.4 累计微波时间对提取率的影响

累计微波时间对提取率的影响如图5所示。

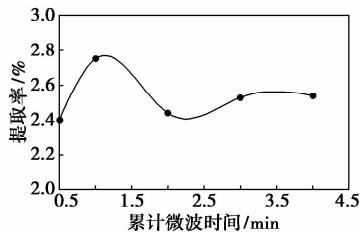


图5 累计微波时间对提取率的影响

由图5可以看出,随着微波时间的增加,提取率逐渐降低,说明微波时间为2 min已经足够,再增加微波时间反而会提取出较多其他杂质,而且温度不宜控制,对银杏黄酮的成分会造成破坏,导致提取率降低^[11]。综合分析,最佳微波时间为2 min。

2.3.5 乙醇质量分数对黄酮类化合物提取的影响

乙醇质量分数对提取率的影响如图6所示。由图6可以看出,银杏叶中黄酮化合物在乙醇质量分数为70%时的溶解度最高,在乙醇质量分数较低时,不能使银杏叶黄酮的成分全部溶解出来,微波只

对有极性的溶剂有吸收作用,增加乙醇质量分数反而会降低溶液对微波的吸收能力,反不利于银杏叶中极性较大的黄酮苷的溶出,使得提取率降低。

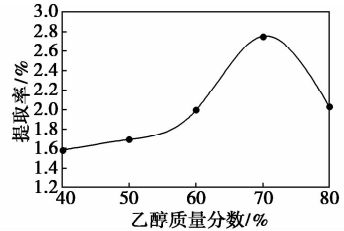


图6 乙醇质量分数对提取率的影响

2.3.6 料液比对提取率的影响

料液比对提取率的影响如图7所示。

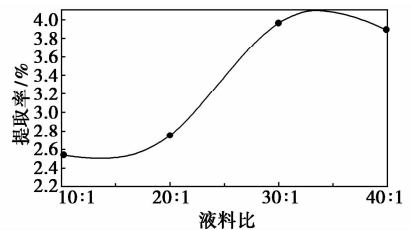


图7 料液比对提取率的影响

由图7可以看出,当液料比从10:1增加到30:1时,提取率逐渐增加,在溶液较少时,银杏叶细胞组织中的溶液与外周溶液浓度过早达到平衡,细胞中的黄酮成分不能充分扩散到溶液。当液料比大于30:1时,银杏叶黄酮成分已经提取充分,提取率基本不变,为节省原料,最佳料液比为30:1。

3 提取机理研究

银杏叶及其残渣扫描电镜照片如图8所示。从图8中可以看出,银杏叶粉末微观结构比较紧密,乙醇主要是利用溶剂的扩散渗透作用,根据细胞内外的浓度差,将有效成分溶解出来,溶剂对原料的细胞壁成分破坏有限;由图8(c)可以看出,微波能快速加热细胞内的水等极性分子,使得银杏叶细胞内压力迅速上升,冲破细胞壁使有效成分流出;纤维素酶将细胞壁水解,破坏细胞壁的组织结构,使其有效成分暴露出来。由图8(d)可以看出,银杏叶微观形态变得更加疏松,部分区域瓦解至絮状,银杏叶细胞微观结构遭到破坏,更多有效成分溶出。此外,纤维素酶处理的样品明显更为疏松,对银杏叶细胞壁的破坏程度要大于微波辐射的作用;由图8(e)可以看出,在纤维素酶和微波辅助的作用下,银杏叶细胞壁的破裂更为完全,更多的有效成分容易被溶剂吸收、溶解,减少了溶质由固体向主体溶剂扩散的传质阻力,从而提高提取率。

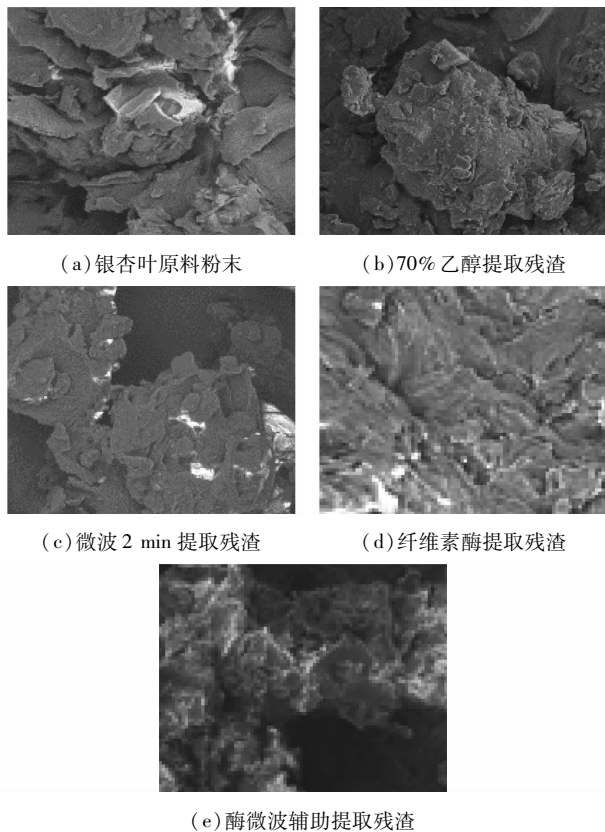
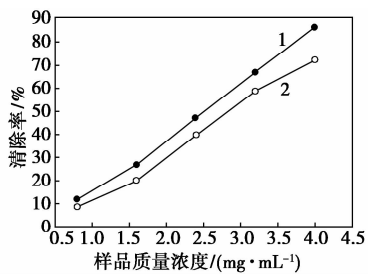


图8 银杏叶及其残渣扫描电镜照片

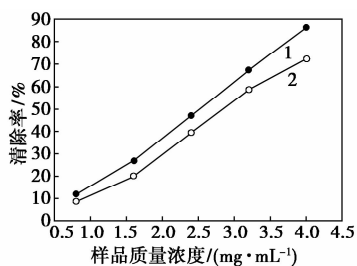
4 抗氧化性能研究

取纤维素酶-微波辅助干燥后提取物的抗氧化实验结果如图9和图10所示。



1—提取物对·OH的清除率;2—VC对·OH的清除率

图9 提取物对羟基自由基清除能力



1—提取物对O₂·⁻的清除率;2—VC对O₂·⁻的清除率

图10 提取物对超氧自由基清除能力

由图9、图10可以看出,样品对羟基自由基和

超氧自由基具有较强的清除能力,且清除能力强于VC。随着样品质量浓度的增加,清除率随之提高,呈现出良好的量效关系。当质量浓度为4 mg/mL时,其对羟基自由基和超氧自由基的清除率分别达到85.00%和86.16%,说明银杏叶提取物中有优异的清除自由基效果。

5 结论

(1)对比醇提取法、纤维素酶辅助提取法、微波辅助提取法和纤维素酶-微波辅助提取法4种不同提取方法,得到纤维素酶-微波辅助提取银杏叶总黄酮的最佳工艺为:纤维素酶质量分数为5%,酶解时间为1 h,酶解温度为50℃,累计微波时间为2 min,乙醇质量分数为70%,液料比为30:1,此条件下银杏叶黄酮的提取率达到3.96%。经扫描电镜观察微观结构发现,微波和纤维素酶对银杏黄酮的辅助提取均能够不同程度地破坏银杏叶细胞的微观结构,提高提取率。

(2)经抗氧化试验发现,银杏叶黄酮提取液对羟基自由基、超氧阴离子自由基有较强的清除作用,且其清除能力大于VC,银杏黄酮提取液对自由基清除率都随其浓度的增大而增大,呈现出良好的量效关系。

参考文献

- [1] Kiefer M. Review about Ginkgo biloba special extract EGB 761 (Ginkgo)[J]. Current Pharmaceutical Design, 2004, 10(3): 261-264.
- [2] Mahadevan S, Park Y. Multifaceted therapeutic benefits of ginkgo biloba L.: Chemistry, efficacy, safety, and uses[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(1): R14-R19.
- [3] 王敏, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 响应曲面法优化酶法提取银杏叶总黄酮[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 117-121.
- [4] 张莹, 祖元刚, 陈小强, 等. 中国植物提取业的形成与发展策略[J]. 现代化工, 2010, (3): 9-16.
- [5] Chen shuo, Xing Xin-hui, Huang Jian-jun, et al. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from Ginkgo biloba leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by Penicillium decumbens cellulase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(1): 100-105.
- [6] 豁银强, 尹杰, 陈雪. 银杏叶黄酮的超声波提取及抗菌活研究[J]. 食品工业, 2012, 33(5): 47-49.
- [7] 王新雯, 海洪, 金文英, 等. 微波-超声波联合提取银杏叶黄酮工艺的响应面法分析[J]. 食品科技, 2010, (3): 189-193.
- [8] 缪世锋. 基于超临界流体技术的银杏黄酮提取和微粒化过程研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [9] 薛志彬, 承伟. 银杏叶黄酮提取工艺的优化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5751-5752.
- [10] 牛付阁. 大高良姜黄酮的提取、分离纯化及抗氧化作用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.
- [11] 徐春明, 王英英, 李婷, 等. 银杏叶总黄酮的微波提取及生物利用度研究[J]. 林产化学与工业, 2014, 34(4): 131-136. ■