

正交实验法优化黄柏中黄连素的酶碱法提取工艺

王玉洁,刘 静,王碧霞,徐 洲,刘 莉,丁春邦*

四川农业大学生命科学学院,雅安 625014

摘要:为了提高黄柏中黄连素的提取得率与效率,采用传统方法碱提法与酶解辅助提取相结合来优化黄柏中黄连素的提取工艺。以黄连素浸提率为评价指标,考察纤维素酶浓度、酶解时间、料液比及浸提时间对提取效率的影响。在单因素实验的基础上,通过正交实验分析各因素的作用大小以及它们之间的交互作用。优选出黄柏中黄连素的酶碱法提取最佳工艺条件为:纤维素酶浓度 15‰、酶解时间 1 h、料液比 1:7、浸提时间 7 h,在该条件下黄连素的浸提率可达 8.99%。该提取工艺浸提率高,成本低,稳定性好,可用于生产上黄柏中黄连素的提取。

关键词:正交实验;黄柏;黄连素;纤维素酶;石灰水

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.12.016

Optimization of Enzyme-alkali Method Extraction Process of Berberine from Cortex *Phellodendri* by Orthogonal Experiments

WANG Yu-jie, LIU Jing, WANG Bi-xia, XU Zhou, LIU Li, DING Chun-bang*

College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: The objective of this study was to find out the optimal extraction conditions of berberine from Cortex *Phellodendri* by applying the enzyme-alkali technology. Based on the single factor experiments, the orthogonal test was designed to optimize the Enzyme-alkali technology to extract berberine from cortex *phellodendri* with the extraction ratio as evaluation index. The optimal extraction conditions were as follows: the concentration of cellulase with 15‰, enzymolysis time with 1 h, substrate/liquid with 1:7, and extraction time with 7 h. The process was suitable for its industrialized production with high yield, low cost and good stability.

Key words: orthogonal test; cortex *phellodendri*; berberine; cellulose; calcarea hydrica

黄柏为芸香科植物黄柏(*Phellodendron chinense* Schneid.)的树皮剥下后除去粗皮干燥后所得,习称“川黄柏”。黄连素为黄柏的主要成分,具有抗菌、抗病毒、抗心律失常、抗肿瘤、降血糖及降血脂等功效^[1-3],作为一种常用药在临床上得到广泛应用。关于黄连素的提取已有诸多报道,主要有水提法、酸提法、碱提法、醇提法和一些辅助提取技术如超声波法、微波法、酶解法等^[4-7]。酸提法会产生大量的粘液质,给操作带来不便;超声波法、微波法对仪器设备有特殊要求,不便于大规模生产;醇提法提取率虽高,但需消耗大量的乙醇,生产成本较高;碱提法工艺简单,成本低,但提取时间长,得率低^[8]。纤维素酶是一类能够将纤维素降解为葡萄糖的多组分酶

系的总称。纤维素酶处理能破坏细胞壁的致密构造,减小细胞壁、细胞间质等传质屏障对有效成分从胞内向提取介质扩散的传质阻力,从而有利于有效成分的溶出,且具有对天然活性成分破坏小、对设备要求不高、能源消耗低、提取时间短等优点,在植物天然产物提取中得到广泛应用^[8-10]。因此,从简化工艺、降低成本、提高得率出发,本实验用纤维素酶降解黄柏细胞壁,再用碱提法提取黄连素,采用单因素结合正交实验的方法,以期优选出黄柏中黄连素的酶碱法提取工艺,为制定科学、经济的生产工艺提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 供试材料

黄柏树皮采自四川雅安(经四川农业大学丁春邦教授鉴定为黄柏(*Phellodendron chinense* Schneid.)),经干燥、粉碎,过 40 目筛,备用。黄连

收稿日期:2017-09-01 接受日期:2017-10-09

基金项目:四川省科技厅科技支撑计划(2014NZ0103)

* 通信作者 E-mail:deb@sicau.edu.cn

素标准品购自北京世纪奥科生物有限公司;纤维素酶购自诺维信生物技术有限公司;其余试剂为分析纯。

1.2 实验仪器

LDP-750A 型粉碎机(浙江永康市红太阳机电有限公司),BT-124S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),紫外分光光度计 UV-1750(日本岛津制作所),DZ-2BC 型真空干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司),RM-220 实验室超纯水机(四川沃特科技发展有限公司),7D-4Z 型台式低速离心机(蜀科仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 标准曲线的绘制

本实验采用紫外分光光度法测定黄连素含量。准确称取 40、50、60、70、80 mg 黄连素标准品用无水乙醇溶解、定容至 10 mL,于 350 nm 波长下测定其吸光度^[11]。以黄连素标准品浓度为横坐标(mg/mL),吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,所得回归方程为 $y = 83.992x - 0.0216$, $R^2 = 0.9973$,在 4~8 mg/mL 浓度范围内线性关系良好。

2.2 黄柏中黄连素的提取

准确称取 2.0 g 干燥黄柏粉末,于 50 °C 15 mL 纤维素酶溶液中保温降解一段时间后加入饱和石灰水浸提,在 4000 rpm 下离心 20 min,取上清液于 350 nm 下测吸光度,根据 2.1 中回归方程求出黄连素浸提率。

2.3 单因素实验

以黄连素浸提率为指标,分别考察纤维素酶浓度(1%、5%、10%、15%、20%,固定酶解时间 1 h,料液比 1:7,浸提时间 6 h)、酶解时间(0.5、1、1.5、2、2.5 h,固定纤维素酶浓度 15%,料液比 1:7,浸提时间 6 h)、料液比(1:5、1:6、1:7、1:8、1:9,固定纤维素酶浓度 15%,酶解时间 1 h,浸提时间 6 h)、浸提时间(4、5、6、7、8 h,固定纤维素酶浓度 15%,酶解时间 1 h,料液比 1:7)4 个因素对黄柏中黄连素提取的影响。

2.4 正交实验

根据单因素实验结果确定的最适因素水平见表 1。采用 $L_9(3^4)$ 正交表,通过 SPSS 设计实验,以黄连素浸提率为评价指标,考察各个因素对黄柏中黄连素提取的影响。

表 1 正交设计实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment list

| 水平 Levels | 因素 Factors | | | |
|--------------|---|------------------------------------|--|-----------------------------------|
| | (A)纤维素酶浓度 Cellulose concentration (%) | (B)酶解时间 Enzymolysis time (h) | (C)料液比 Solid/liquid ratio (g/mL) | (D)浸提时间 Extraction time (h) |
| 1 | 15 | 1.5 | 1:6 | 6 |
| 2 | 10 | 1 | 1:7 | 7 |
| 3 | 5 | 0.5 | 1:8 | 8 |

2.5 验证和比较实验

为了进一步考察优选工艺的可靠性和稳定性,准确称取 2.0 g 干燥黄柏粉末,在上述确定的工艺条件下进行 3 次平行验证实验;再准确称取 2.0 g 干燥黄柏粉末 3 份,碱提参考郭孝武^[12] 的方法,醇提参考邢俊波^[13] 的方法,酶碱法用本实验优化得到的方法,对 3 种提取方法进行比较实验。

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果与分析

3.1.1 纤维素酶浓度对黄连素浸提率的影响

随着纤维素酶浓度增加,酶与底物接触机会增加,相同条件下黄连素浸提率也随之增加。如图 1

所示,纤维素酶浓度从 1%增加到 5%时,浸提率随纤维素酶浓度增加而明显升高,当纤维素酶浓度 >

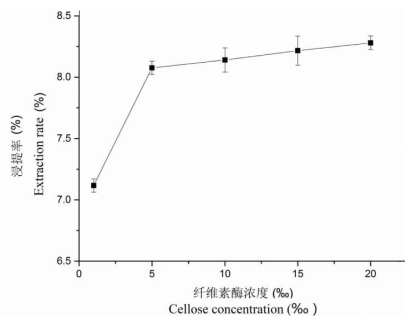


图 1 纤维素酶浓度对黄连素浸提率的影响

Fig. 1 Effect of cellulose concentration on extraction rate of berberine

5‰时,继续增大纤维素酶浓度,浸提率增量较小。考虑到提取成本,故选择5‰、10‰、15‰三个浓度为正交设计的3个水平。

3.1.2 酶解时间对黄连素浸提率的影响

酶解时间越长,在其他条件相同情况下,底物水解度越大。如图2所示,当酶解时间 ≤ 1 h,黄连素浸提率随酶解时间增加而增加;1 h后,随酶解时间增加浸提率变化不大。酶解时间的增加不仅延长了生产周期,还导致生产成本的增加。综合考虑,选择0.5、1和1.5 h三个酶解时间为正交设计的3个水平。

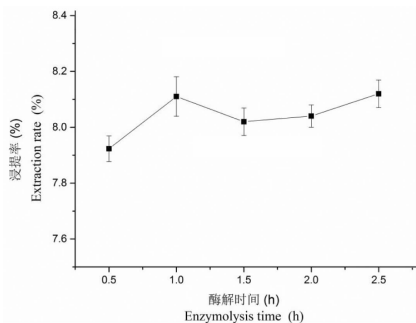


图2 酶解时间对黄连素浸提率的影响

Fig. 2 Effect of enzymolysis time on extraction rate of berberine

3.1.3 料液比对黄连素浸提率的影响

如图3所示,随着碱液的增加,物料与碱液接触增多,浸提率逐渐升高,当料液比达到1:7(g/mL)时,浸提率达到8.0%。但当碱液继续增加,浸提率降低。可能是由于继续增大液料比,造成黄连素部分分解,引起黄连素浸提率的下降。故选择1:6、1:7、1:8三个料液比为正交设计的3个水平。

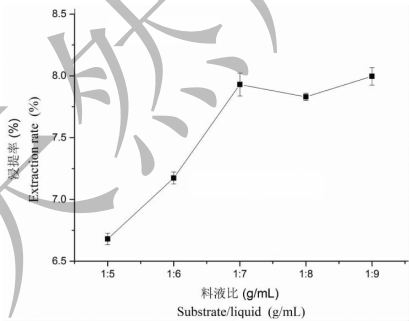


图3 料液比对黄连素浸提率的影响

Fig. 3 Effect of solid/liquid ratio on extraction rate of berberine

3.1.4 浸提时间对黄连素浸提率的影响

浸提时间越长,提取出的目标物越多,当浸提时

间过长,则可能由于降解等原因而使浸提率降低。如图4所示,在7 h以内,浸提率随浸提时间增加而增加,浸提时间达到7 h后,浸提率随浸提时间增加而略有下降。因此,选择6、7、8 h三个浸提时间为正交设计的3个水平。

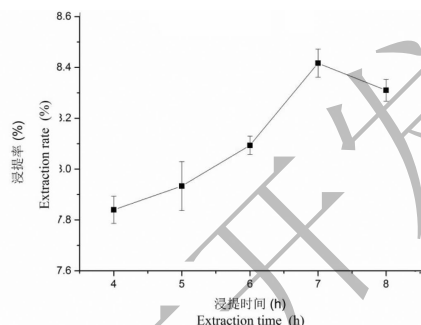


图4 浸提时间对黄连素浸提率的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on extraction rate of berberine

3.2 正交实验结果与分析

四因素三水平正交实验结果及方差分析见表2.3。由表中的R值可知,各因素对浸提率的影响大小为 $A > B > C > D$,即纤维素酶浓度的影响最大,其次是酶解时间、料液比和浸提时间,其中纤维素酶浓度对浸提率有显著性影响。通过K值可判断出最佳的提取条件是 $A_1B_2C_2D_3$ 。考虑到浸提时间对浸提率的影响较小,从节约资源角度出发,优化后的工艺为 $A_1B_2C_2D_2$,即纤维素酶浓度15‰、酶解时间1 h、料液比1:7(g/mL)、浸提时间7 h。

3.3 验证实验

为了进一步考察优选工艺的可靠性和稳定性,在上述确定的工艺条件下[纤维素酶浓度15‰、酶解时间1 h、料液比1:7(g/mL)、浸提时间7 h]进行3次平行实验,得到的黄连素浸提率分别为8.96%、8.98%、9.02%,平均值为8.99%,RSD为0.25%。实验表明,此工艺稳定性好,可靠性高。

3.4 酶碱法提取与碱提和醇提的比较

对文献报道^[12,13]的碱提法、醇提法及优化后的酶碱法进行了比较实验,实验结果为:碱提法的浸提率为7.07%,醇提法的浸提率为7.77%,酶碱法的浸提率为8.94%。酶碱法相较于碱提法,大大缩短了浸提时间,浸提率提高了1.87%;酶碱法比醇提法的浸提率提高了1.17%,且相比醇提法消耗的大量乙醇,酶碱法提取所用的石灰水价格低廉,能有效节约成本。因此,本实验优化得到的酶碱法提取工艺成本低,提取效率高。

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiments

| 编号 No. | A:纤维素酶浓度 Cellulose concentration (%) | B:酶解时间 Enzymolysis time (h) | C:料液比 Solid/liquid ratio (g/mL) | D:浸提时间 Extraction time (h) | 浸提率 Extraction rate (%) |
|-----------|--|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 | 2 | 3 | 1 | 9.2 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 8.7 |
| 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | 9.1 |
| 4 | 2 | 3 | 3 | 2 | 8.5 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 1 | 8.7 |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 3 | 8.8 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 3 | 8.2 |
| 8 | 3 | 3 | 1 | 1 | 7.9 |
| 9 | 3 | 2 | 2 | 2 | 8.5 |
| K_1 | 27 | 25.6 | 25.4 | 25.8 | - |
| K_2 | 26 | 26.5 | 26.3 | 25.7 | - |
| K_3 | 24.6 | 25.5 | 25.9 | 26.1 | - |
| R | 0.8 | 0.33 | 0.3 | 0.13 | - |

表3 浸提率方差分析

Table 3 The variance analysis of extraction rate

| 方差来源 Source | 离差平方和 Sum of squares | 自由度 df | 均方 R-square | F 值 F-value | 显著性 Significant |
|----------------|-------------------------|-----------|----------------|----------------|--------------------|
| A | 0.973333 | 2 | 0.486667 | 29.2 | ** |
| B | 0.206667 | 2 | 0.103333 | 6.2 | - |
| C | 0.14 | 2 | 0.07 | 4.2 | - |
| D(误差) | 0.033333 | 2 | 0.016667 | - | - |

$F_{0.05(2,2)} = 19.0$ 。

4 结论

在提取前用纤维素酶溶液保温处理,能降解植物的细胞壁,增加细胞的通透性,缩短提取时间,提高得率且纤维素酶对天然活性成分破坏小^[14]。黄连素一般以季铵型生物碱的状态存在,可以离子化呈强碱性,能溶于水,用饱和石灰水作为提取液,黄连素与氢氧化钙发生碱置换而促进溶出。本实验中结合黄连素的理化性质,优化后的酶碱法较单独的醇提法和碱提法得率高、工艺简单、周期短、成本低。

以黄连素浸提率为指标,通过单因素结合正交实验方法,考察纤维素酶浓度、酶解时间、料液比、浸提时间对黄柏中黄连素的浸提率的影响,优选的酶碱法提取黄柏中黄连素的最佳工艺条件为:纤维素酶浓度 15‰、酶解时间 1 h、料液比 1:7 (g/mL)、浸

提时间 7 h。在此工艺条件下,黄柏中黄连素浸提率可达到 8.99%。可用于生产上黄柏中黄连素的提取。

参考文献

- 1 Wang XY(王小逸), Shi YL(史亦丽), Zeng YJ(曾衍钧). The advance in research of berberine. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2003, 12:523-525.
- 2 Tsang CM, Cheung KCP, Cheung YC, et al. Berberine suppresses Id-1 expression and inhibits the growth and development of lung metastases in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2015, 1852: 541-551.
- 3 Tang J(唐俊), Feng YB(冯义彬), Wang N(王宁), et al. Berberine and *Coptidis rhizoma* as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investiga-

- tions. *J Ethnopharmacol* (民族药理学), 2009, 126(1): 5-17.
- 4 Huang XR(黄学仁), Li CZ(李超柱), Chen YH(陈艳辉), *et al.* Study on microwave extraction of berberine from Rhizoma Coptidis. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 395-397.
 - 5 Wang Y(王玥), Du SY(杜守颖), Dai JD(戴俊东), *et al.* Study on smashing tissue extraction technology of berberine hydrochloride from Cortex Phellodendri. *China Pharm* (中国药业), 2013, 22(6): 72-73.
 - 6 Lin YX(林叶新), Xia ZN(夏之宁), Chen H(陈华), *et al.* Extraction and purification technology of berberine from *Coptis chinensis* Franch from Sichuan Province. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2013, 35: 1204-1208.
 - 7 Zeng RH(曾荣华), Lu HQ(陆海勤), Qiu TQ(丘泰球). Intensification of extracting berberine by dual-frequency ultrasound. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 769-772.
 - 8 Cheng YM(程咏梅), Chen RH(陈仁华). Studies on the extracting technology of berberine. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 18: 1445-1447.
 - 9 Yu HB(余洪波), Zhang XY(张晓昱). Research progress of enzyme to extraction of Chinese traditional medicine. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2005, 27: 591-593.
 - 10 Lin J(林静), Gao WZ(高卫真), Li ZY(李卓燕), *et al.* Studying on enzymatic-assisted extraction of alkaloid from *Phellodendron amurense*. *J Tianjin Med Univ* (天津医科大学学报), 2012, 18: 388-391.
 - 11 Sun ZL(孙志良), Lu XY(卢向阳), Xu JP(许建平), *et al.* Determination of berberine sulphate in compound *Solanum lyratum* injection by UV. *J Hunan Agric Univ* (湖南农业大学学报), 2003, 29: 294-295.
 - 12 Guo XW(郭孝武). Effect of ultrasonic extraction on extraction rate of berberine. *Tradit Chin Med* (中国中药杂志), 1995, 20: 673-675.
 - 13 Xing JB(邢俊波), Liu Y(刘云). Study on extract technology of berberine in Cortex Phellodendri by orthogonal design. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2003, 14: 129-131.
 - 14 Gu FY(顾方媛), Chen CY(陈朝银), Shi JJ(石家骥), *et al.* Advances in cellulase and its development tendency. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2008, 28(1): 83-87.

木质素转化成化学品研究新突破

2017年8月21日,美国桑迪亚国家实验室的研究者在《科学报告》上发表论文,展示了两条木质素转化的化学-生物混合途径,该途径大大提高了木质素转化成粘康酸的产率和产量。

木质素是植物细胞壁的主要成分之一,含有可转化为尼龙、塑料和药物等产品的化合物,但其顽拗性使得难以从中提取有价值的化合物。常用的方法包括生物方法和化学方法。温和的生物方法能够生产特定的目标化合物,但耗时长达几周甚至几个月。猛烈的化学反应可以在几小时甚至几分钟内解构木质素,但需要昂贵的催化剂(有时是有毒的),且产生的化合物量极少。桑迪亚国家实验室的研究者展示了两条木质素转化的新途径,结合了化学方法的速度和生物方法的精确度,生产出了目前仅源于石油的高价值化学品:粘康酸和连苯三酚。

第一种方法首先用过氧化氢水溶液预处理木质素,产生中间体香兰素和丁香酸,再经修饰过的大肠杆菌菌株转化得到最终产物。然而,这个过程中产生的粘康酸的量不令人满意。

第二种方法跳过了分解木质素的过程,直接遗传改造烟草细胞,随着植物生长会产生大量的中间产物PCA(原儿茶酸盐),提取该化合物,再利用工程化的大肠杆菌来生产粘康酸。

终产物粘康酸可转化成尼龙、塑料、树脂或润滑剂,连苯三酚具有抗癌作用,研究者表示该方法产生的化学品的总市值可达2557亿美元,该方法对于可再生能源燃料的开发具有重大的意义。

吴晓燕编译自 <https://phys.org/news/2017-11-biofuel-chemicals.html>
原文标题: Study speeds transformation of biofuel waste into useful chemicals