

[文章编号] 1007-7405(2017)01-0021-08

生物酶法制备海带多酚的工艺研究

刘萌¹, 刘光明^{1,2,3,4}, 刘翼翔^{1,2,3,4}, 陈庆绸¹, 邱绪建¹, 孙乐常¹, 杨燊¹, 郝更新¹

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021; 2. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建厦门 361021;
3. 福建省海洋功能食品工程技术中心, 福建厦门 361021;
4. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建厦门 361021)

[摘要] 以海带为原料, 采用酶法破壁技术和固相萃取技术, 研究纤维素酶、果胶酶及其组成的复合酶对海带多酚溶出效果的影响, 并确定最佳工艺条件。结果表明, 选用果胶酶进行酶解破壁, 最佳工艺条件为: 加酶量 20 000 U·kg⁻¹, 酶解 pH 值 5.0, 酶解温度 60 ℃, 酶解时间 90 min, 海带多酚提取率达 1.68 g/kg; 经固相萃取纯化后, 海带多酚的高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 信号值提高了 9.24 倍, 杂质峰明显减少, 实现了海带多酚的高效纯化。

[关键词] 海带; 多酚; 生物酶; 固相萃取

[中图分类号] TS 201.2

Extracting Polyphenols from *Laminaria japonica* Based on Bio-enzymes Extraction Method

LIU Meng¹, LIU Guangming^{1,2,3,4}, LIU Yixiang^{1,2,3,4}, CHEN Qingchou¹,
QIU Xujian¹, SUN Lechang¹, YANG Shen¹, HAO Gengxin¹

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China;
3. Marine Functional Food Engineering Technology Center of Fujian Province, Xiamen 361021, China;
4. National Joint Engineering Research Center for Deep Processing of Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

Abstract: Bio-enzymes and solid phase extraction were used for the extraction of polyphenols from kelp. The extraction efficiency for polyphenol extracts from *Laminaria japonica* by using cellulase, pectinase and their compounds were evaluated and then the optimal technological conditions were determined. The results showed that the extraction efficiency of polyphenols was 1.68 g/kg after pectinase enzyme hydrolyzing the cell walls of *Laminaria japonica*; and the optimum parameters of enzyme hydrolyzing were as follows: enzyme hydrolyzing for 90 min, 2000 U·kg⁻¹, pH 5.0, 60 ℃, the signal value of high performance liquid chromatography (HPLC) was improved to 9.24 times and the impurity peaks were significantly reduced after solid phase extraction being employed.

Keywords: *Laminaria japonica*; polyphenols; bio-enzymes; solid phase extraction

[收稿日期] 2016-08-30 [修回日期] 2016-11-03

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(J2015J01139); 福建省省属高校科研专项基金资助项目(JK2016021);
福建省中青年教师教育科研项目(JAT160249); 福建省高校自然基金重点项目(JZ160448)

[作者简介] 刘萌(1992—), 女, 硕士生, 从事功能性食品开发研究。通信作者: 刘翼翔(1982—), 男, 讲师, 博士, 从事海洋生物活性物质利用与开发研究, E-mail: lyxjmu@jmu.edu.cn。

0 引言

研究表明^[1]，海带含有丰富的生物活性成分，例如，海带多糖具有抗病毒活性，海带多酚具有突出的抗氧化能力，岩藻黄质具有保护视力作用。2013 年世界粮农组织（FAO）数据统计，中国大陆地区海带年产量占全球产量的一半以上^[2-3]。但是，目前我国海带产品仍以传统的盐渍风干为主，只有 30% 的海带用于甘露醇及褐藻胶等产品的深加工，少量用于海带高附加值活性物质的提取，海带的综合利用程度仍停留在较低水平^[4]。而日本、韩国等海带加工产品多达上百种，为其带来优厚的贸易顺差^[2-3]。因此提高海带附加值，研究适用于工业化提取海带中高附加值活性物质的技术迫在眉睫。

海带多酚为 1, 3, 5-间苯三酚的多聚体，其独特的结构赋予了海带多酚多种生物活性，如抑菌^[5]、抗病毒^[6]、抗衰老^[7]等。但酚类物质存在易氧化、不稳定、提取组分复杂等问题，制约了其工业化制备生产。海带多酚主要存在于细胞内细胞核附近，细胞壁的通透性直接影响其提取率。水解酶类（包括纤维素酶和果胶酶）可以水解细胞壁中的纤维素和果胶，提高胞内成分的溶出，可显著提高活性成分得率，且具有操作简便、绿色环保的优势^[8]。文献报道，经生物酶破壁后，天竺葵多酚化合物中的鞣云实素和牛儿鞣素的提取率分别提高了 1.64 倍和 1.73 倍^[9]；台湾五针松中多酚提取率提高了 1.41 倍^[10]。固相萃取技术能够利用固相吸附剂与目标产物的快速结合与富集，从而提高分离效率。然而，目前尚未见有关生物酶-固相萃取联用技术在制备海藻多酚中的应用。

本文选用新鲜海带为原料，研究纤维素酶、果胶酶及其组成的复合酶对海带多酚溶出效果的影响，并确定最佳工艺条件；此外，将多酚粗提液直接采用静态固相萃取技术进行纯化，以提高海带多酚的纯度。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

鲜海带，购于厦门新阳洲水产品工贸有限公司。

纤维素酶（100 000 U·g⁻¹），Imperial Jade Biotechnology Company；果胶酶（30 000 U·g⁻¹），上海晶纯生化科技股份有限公司；XAD-7 大孔树脂，Sigma 公司；XDA-7 大孔树脂，西安蓝晓科技新材料股份有限公司；200~300 目硅胶，青岛鼎康硅胶有限公司；甲醇，色谱纯，Sigma 公司；实验所用其他试剂均为国药分析纯。

紫外-可见分光光度计（UV-755B，上海元析仪器有限公司）；台式高速冷冻离心机（IEC-31R，美国 Thermo 公司）；冷冻干燥机（MODULYOD-230，美国 Savant）；循环水真空泵（SHZ-IIID，上海亚荣生化仪器厂）；旋转蒸发仪（RE-52AA，上海亚荣生化仪器厂）。

1.2 试验方法

1.2.1 生物酶法提取海带多酚

1.2.1.1 生物酶法提取海带多酚的工艺流程

海带多酚提取工艺：海带磨粉→生物酶酶解→有机溶剂浸提→离心→合并提取液→减压浓缩粗提液→海带多酚粗提物。

1.2.1.2 最佳加酶量、pH 值、温度、时间的确定

准确称取一定的海带加工副产物（以下简称原料），分别加入不同量的纤维素酶、果胶酶及少量热水，调节 pH 值为 6.0，置于 60 ℃ 的恒温水浴锅中，酶解 2 h 后取出；加入一定量体积分数 95% 乙醇搅拌均匀后于 60 ℃ 水浴 1 h，离心，取上清液测定吸光度值，计算海带多酚提取率，确定最佳加酶量；然后按最佳加酶量分别加入 2 种酶，60 ℃ 水浴条件下调节不同 pH 值，确定最佳 pH 值；在优化的加酶量和 pH 值条件下，设定不同酶解温度，确定最佳提取温度；在最佳加酶量、pH 值、温度条

件下, 最后确定最佳的酶解时间。

1.2.1.3 酶对海带多酚提取效果的影响

精确称取一定原料, 根据优化出的各单因素条件, 研究对比不加酶、纤维素酶、果胶酶以及复合酶对海带多酚提取率的影响。

1.2.1.4 最佳提取工艺参数优化

通过单因素试验及不同酶解法提取试验结果, 综合考虑各影响因素后, 选取果胶酶法酶解 pH 值 (A)、酶解温度 (B)、酶解时间 (C) 3 个因素, 进行正交试验, 确定酶法提取海带多酚的最佳工艺条件, 结果如表 1 所示。

表 1 海带多酚正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平		因素 Factor		
Level		A(酶解 pH Enzymatic hydrolysis pH)	B(温度 Temperature)/℃	C(酶解时间 Enzymatic hydrolysis time)/min
1		4.0	50	60
2		5.0	60	90
3		6.0	70	120

1.2.2 静态固相萃取法纯化海带多酚

固相萃取常见于环境分析检测中, 具有回收率高、重现性好等优点, 但其前处理过程较为复杂^[11]。本试验采用静态固相萃取法, 在提高样品处理通量的同时, 也减少了吸附剂的预处理过程。

用于静态固相萃取法的海带多酚纯化流程: 海带多酚粗提液→大孔树脂静态吸附→静态解吸→硅胶静态吸附→减压浓缩→冻干→海带多酚纯化物。

1.2.3 海带多酚含量的测定

1.2.3.1 总酚含量及提取率测定

总酚含量采用 Folin – Denis 法。取制备的海带多酚提取液, 计算出样品中多酚的质量浓度 ρ ($\mu\text{g}/\text{mL}$), 按下述公式计算海带多酚的提取率: 多酚提取率 (g/kg) = $\rho \times V \times n / (m \times 10^6)$, 式中: ρ 为海带多酚的质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); V 为提取液的体积 (mL); n 为稀释倍数; m 为海带粉的质量 (kg)。

1.2.3.2 海带多酚纯度的 HPLC 分析

色谱条件: Merck Purospher STAR RP – 18 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm} \times 5 \text{ } \mu\text{m}$), 检测波长 280 nm , 柱温 $30 \text{ } ^\circ\text{C}$, 流速 $0.80 \text{ mL}/\text{min}$, 洗脱剂为色谱纯甲醇。

1.3 数据分析

试验数据为 3 个平行试验样品的平均值, Origin 8.0 软件作图, 采用 SPSS V17.0 统计软件对数据进行方差分析 (One – Way ANOVA)。* 表示 $P < 0.05$, 有显著性差异; ** 表示 $P < 0.01$, 有极显著性差异。

2 试验结果

2.1 加酶量、酶解 pH 值、温度、时间对海带多酚提取率的影响

加酶量、酶解 pH 值、温度、时间对海带多酚提取率的影响如图 1 所示。从图 1a 可以看出, 随着加酶量的增加, 海带多酚的提取率逐步增加至平缓, 说明在生物酶破壁的作用下, 提高了多酚的溶出率。同时, 果胶酶作用效果明显优于纤维素酶。纤维素酶加酶量达到 $16\,000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 海带多酚提取率达到最大, 提取率为 $0.99 \text{ g}/\text{kg}$, 是未加酶提取率的 1.83 倍; 果胶酶加酶量达到 $20\,000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 海带多酚提取率达到 $1.76 \text{ g}/\text{kg}$, 是未加酶的 3.26 倍。从 pH 值来看, pH 值变化对纤维素酶提取

海带多酚没有明显影响,但对于果胶酶,当 pH 值小于 6.0 时,提取率随 pH 值的增大而增加,当 pH 值达到 5.0 时,海带多酚的提取率达到最大值 1.84 g/kg,如图 1b 所示。从温度来看,随着温度升高,海带多酚提取率随之增加,当酶解温度达到 60 ℃ 时,提取率达到最大,其中纤维素酶处理组海带多酚提取率为 0.84 g/kg,果胶酶处理组提取率为 1.88 g/kg,如图 1c 所示。从时间来看,随着酶解时间的延长,多酚提取率增加,且在 90 min 时达到最高:纤维素酶组提取率为 0.75 g/kg,果胶酶组提取率为 1.66 g/kg,如图 1d 所示。

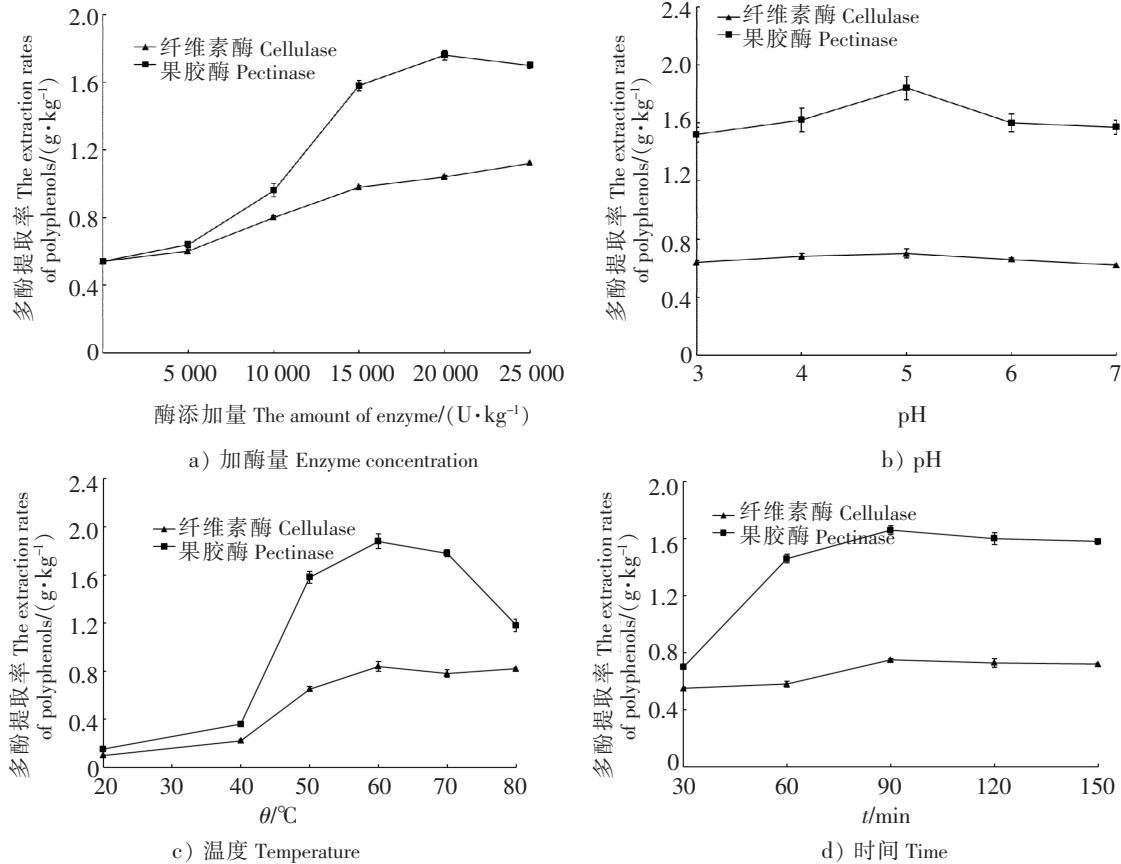


图 1 加酶量、酶解 pH 值、温度、时间对海带多酚提取率的影响

Fig. 1 Effects of enzyme concentration, pH value, temperature and time of hydrolysis conditions on the extraction rates of polyphenols from *Laminaria japonica*

2.2 不同酶解方法对海带多酚提取效果的比较

由图 2 可知,酶法破壁技术极显著提高了海带多酚的提取率($P < 0.01$),并且果胶酶的效果明显好于纤维素酶($P < 0.01$),但复合酶的效果与果胶酶相比没有显著性差异。结果显示,纤维素酶处理组中,海带多酚提取率是不加酶的 1.69 倍,果胶酶处理组达到了 3.4 倍,复合酶处理组提高到了 3.66 倍。虽然复合酶处理组提取率较单独使用果胶酶的效果略好,但综合考虑生产成本问题,选定果胶酶法为海带多酚提取的最佳方法。

2.3 最佳工艺条件的确定

结合以上试验结果,以海带多酚提取率为

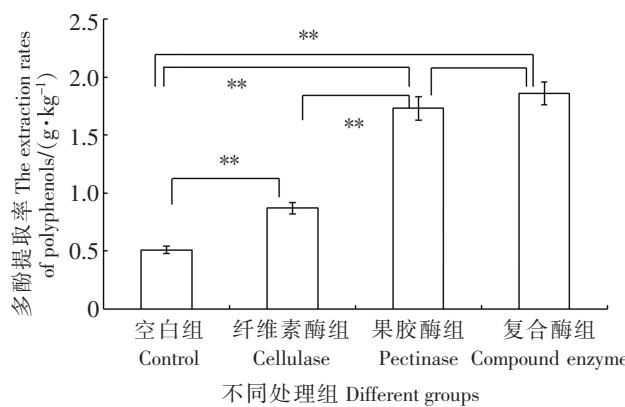


图 2 不同酶解法提取效果的比较

Fig. 2 The effects of enzymic hydrolysis on *Laminaria japonica* by different enzymes

指标, 选取果胶酶酶解 pH 值 (A)、温度 (B)、时间 (C) 3 个因素 3 水平进行 $L_9(3^3)$ 正交试验, 各组合实验重复 3 次, 结果见表 2。

由表 2 正交试验结果和极差分析表明, 在果胶酶法提取工艺中, 影响海带多酚提取率的因素主次顺序为: 酶解温度 > 酶解时间 > 酶解 pH 值, 最佳提取工艺条件的组合为 $A_2B_2C_2$ 。

根据表 3 的方差分析结果可知: 以海带多酚提取率为指标时, 酶解温度、酶解时间、酶解 pH 值对提取率影响不显著。故可以按照最佳组合 $A_2B_2C_2$ 进行验证。即用果胶酶法从原料中提取海带多酚, 酶解 pH 值为 5.0, 酶解温度 60 °C, 酶解时间 90 min, 其他步骤同样品的制备, 做 3 次平行验证试验, 得到海带多酚提取率为 1.68 g/kg。

表 2 正交试验设计与结果

Tab. 2 Orthogonal experiment design and the corresponding results

试验号 Experiment number	A	B	C	海带多酚提取率 Polyphenol extraction rate of kelp/(g · kg ⁻¹)
1	1	1	1	0.997
2	1	2	2	1.799
3	1	3	3	1.498
4	2	1	2	1.678
5	2	2	3	1.690
6	2	3	1	1.648
7	3	1	3	1.477
8	3	2	1	1.622
9	3	3	2	1.623
K_1	4.294	4.152	4.267	
K_2	5.016	5.111	5.100	
K_3	4.722	4.769	4.665	
k_1	1.431	1.384	1.422	
k_2	1.672	1.704	1.700	
k_3	1.574	1.590	1.555	
R	0.241	0.320	0.278	

表 3 海带多酚试验结果的方差分析及显著性检测

Tab. 3 Variance analysis of orthogonal experiments

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Free degree	F	F_a	显著性 Significance
A	0.088	2	1.257		不显著 No significance
B	0.157	2	2.243	$F_{0.05}(2,2) = 19$	不显著 No significance
C	0.116	2	1.657		不显著 No significance
误差 Error	0.070	2			

2.4 海带多酚的纯化

为进一步获得较高纯度的海带多酚, 选用大孔树脂和硅胶静态吸附作为下一步实验操作。结合文献报道^[4,12], 最终选取 XAD - 7 和 XDA - 7 大孔树脂, XAD - 7 树脂是中极性大孔树脂, 吸附之后可以溶于乙醇中; XDA - 7 树脂是弱极性树脂, 可以在有机溶剂中萃取亲水性较强的物质。硅胶可在一定程度上除去色素。

2.4.1 海带多酚提取物的全波长扫描分析

据报道^[13], 多酚的特征吸收峰在 280 nm, 300~500 nm 是类胡萝卜素等色素的特征吸收, 而 680 nm 附近是叶绿素 A 的吸收峰。从图 3 中可以看出, 粗提物中含有较多的色素杂质, 经 XAD-7 树脂纯化后的多酚, 280 nm 处的吸收值有明显提高, 但仍含有较多色素杂质; 而经 XDA-7 树脂纯化后的多酚, 不仅在 280 nm 处吸收值提高了, 杂质也有明显减少。因此, 选用 XAD-7 树脂作为纯化所需大孔树脂。进一步研究硅胶树脂的除杂效果, 结果发现, 经硅胶吸附后, 多酚的纯度得到提高。

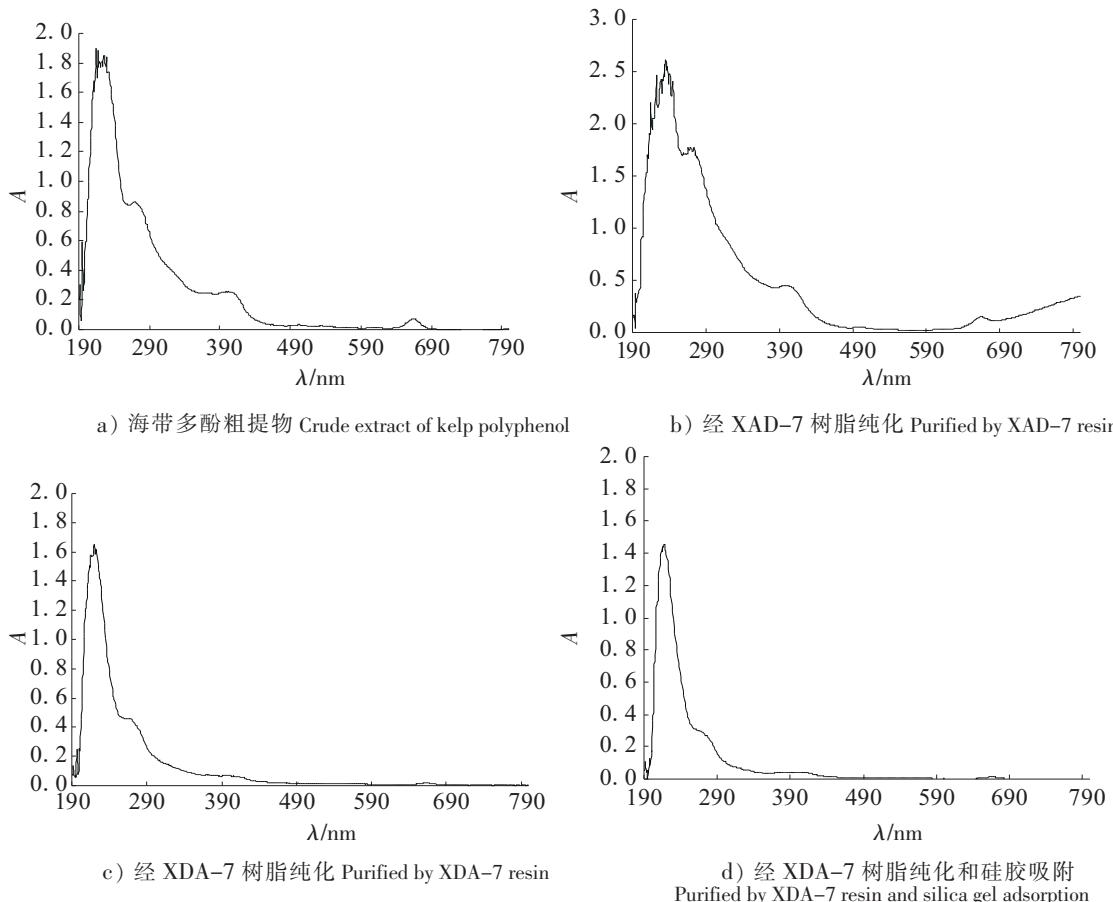


图 3 各种方法提取物的紫外-可见扫描光谱

Fig.3 The ultraviolet-visible spectral scan maps of the extraction by different extraction methods

2.4.2 HPLC 验证固相萃取的纯化效果

以甲醇溶解样品, 色谱纯甲醇为流动相, 经 HPLC 测定后图谱如图 4。海带多酚粗提物在 280 nm 下信号值较低, 且有驼峰出现, 说明杂质较多。同样浓度下, 经 XAD-7 树脂纯化后的多酚信号值达到了纯化前的 1.92 倍, 而 XDA-7 树脂可使信号值提高到 8.44 倍; 如果进一步经硅胶吸附除杂, 信号值提高了 9.24 倍, 且杂质峰明显减小。因此, XDA-7 树脂-硅胶联用固相萃取技术具有良好的纯化效果。

3 讨论

生物酶法破壁技术是高效提高植物多酚提取率的有效手段。例如, ZHANG 等人^[14]采用微波辅助纤维素酶法提取花生壳中的多酚, 提取率达到 1.75%, 高于超声提取和热水浸提等常规方法的提取率。KONG 等^[8]的研究结果表明, 利用纤维素酶水解金银花, 提取其中的植物多酚, 提取率高达 3.03%。在海藻中提取多酚, ROH 等人^[15]采用超临界二氧化碳技术, 多酚的提取率为 770 μg/g, 仅

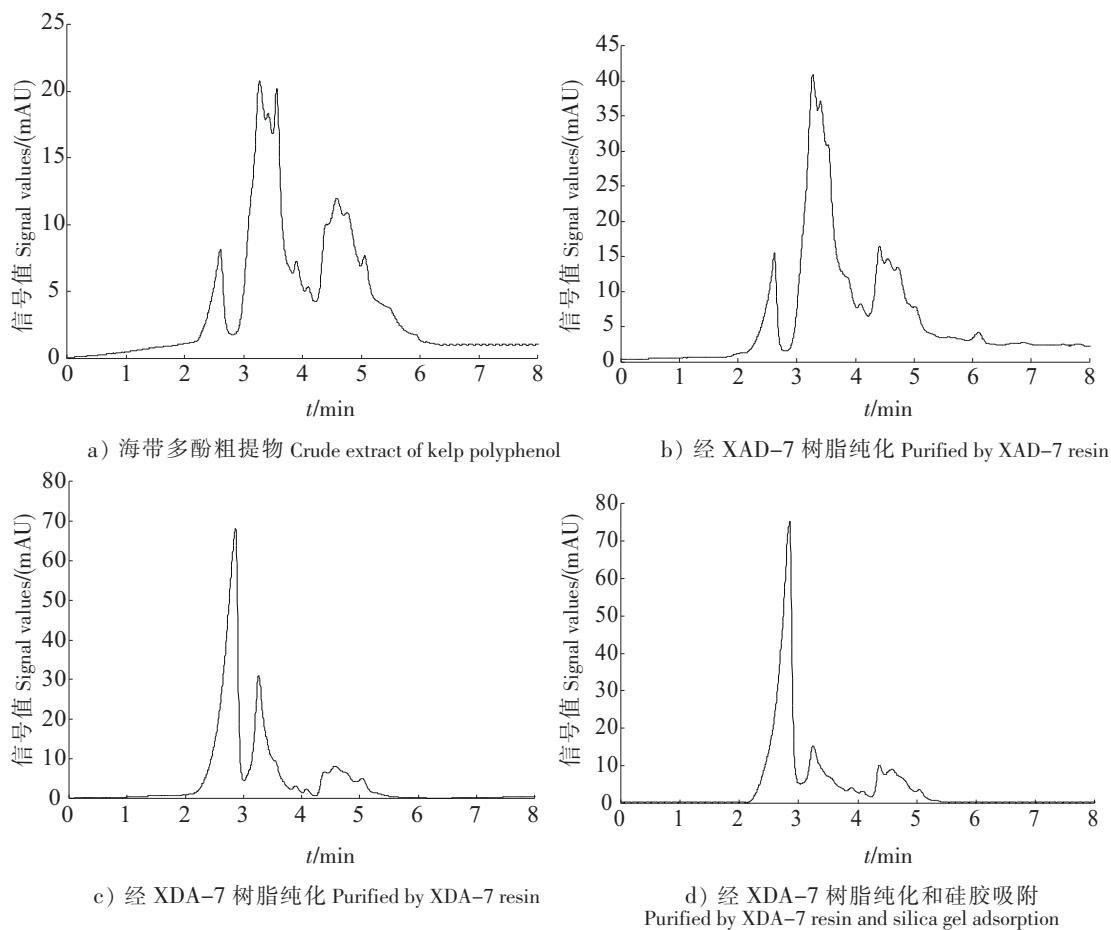


图 4 各种方法提取物的 HPLC 图谱

Fig.4 The HPLC spectrum of the extraction by different extraction methods

为本试验酶法提取率的 45.83%。劳敏君等^[16]用微波辅助提取法研究了海带多酚的提取工艺, 海带多酚提取率为 1.2 g/kg, 也低于本实验的 1.68 g/kg。在纯化方面, 相比传统的柱层析技术, 本研究采用的固相萃取技术省去了装柱及洗脱过程, 具有处理量大、操作方便、成本低的优势, 适于工业化生产。比如, 黄秋森等^[17]采用 AB-8 树脂为吸附剂, 以食用酒精为提取剂, 进行树脂静态吸附操作, 绿茶多酚得率为 10.5%; 付湘晋等^[18]采用 AB-8 树脂静态吸附樟树叶多酚, 多酚得率为 75.78%, 纯度达到 63.56%。乔小瑞^[12]采用 XDA-7 树脂静态吸附荔枝多酚, 纯度为 70.65%。然而, 相关技术在海藻多酚中的应用尚未见报道。硅胶具有吸附色素的能力, 因此, 本研究采用硅胶进一步去除海带多酚中的色素类杂质。陈文梅等^[19]研究发现, 硅胶具有良好的吸附红花黄色素的作用。将此原理运用于本试验中发现, 经硅胶吸附后, 海带多酚溶液颜色变浅, 经全波长扫描, 其色素峰显著下降, 经 HPLC 分析, 色谱中的杂质峰显著减少, 主峰响应值大幅提高, 表明硅胶能有效去除海带多酚中的色素, 提高其纯度。

4 结论

- 1) 本实验酶法破壁提取最终选用果胶酶法, 最佳工艺条件为: 加酶量 $20\,000\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$, 酶解 pH 值 5.0, 酶解温度 60 °C, 酶解时间 90 min, 提取率达到 1.68 g/kg。
- 2) 采用固相萃取纯化技术后, 经大孔树脂及硅胶静态吸附, 海带多酚的 HPLC 信号值提高了 9.24 倍, 杂质峰明显减少, 实现了海带多酚的高效纯化。

[参考文献]

- [1] WU X, WANG G G, FU X T. Variations in the chemical composition of *Costaria costata* during harvest [J]. Journal of Applied Phycol, 2014, 26(6): 2389-2396.
- [2] 岳昊, 孙英泽, 胡娟, 等. 中国海带产业及国际贸易情况分析 [J]. 农业展望, 2013, 9: 65-69, 74.
- [3] 江晓宁, 陈钏杰, 沈宇丹, 等. 海带的加工技术与研究现状 [J]. 北京农业, 2015(12): 22.
- [4] 李斌. 海带岩藻黄素和褐藻多酚提取制备工艺的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2015.
- [5] 党法斌, 王伟, 陈赓超, 等. 几种海藻多酚对鱼类致病菌的抑菌性研究 [J]. 水产科学, 2012, 31(8): 499-501.
- [6] ARANZAZU B, SARA B, JUANA B, et al. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds [J]. Journal of Medicinal Food, 2009, 12(2): 236-258. DOI:10.1089/jmf.2008.0151.
- [7] 庄英斌, 刘军海, 郭景学, 等. 天然活性多酚提取、纯化及功能性研究进展 [J]. 粮食与油脂, 2012(8): 44-48.
- [8] KONG F S, YU S J, BI Y G, et al. Optimization of process parameters and kinetic model of enzymatic extraction of polyphenols from *Lonicerae Flos* [J]. Pharmacognosy Magazine, 2016, 12(45): 70-74. DOI:10.4103/0973-1296.176055.
- [9] YANG Y C, LI J, ZU Y G, et al. Optimisation of microwave-assisted enzymatic extraction of corilagin and geraniin from *Geranium sibiricum* Linne and evaluation of antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 373-380. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.02.061.
- [10] LIN S C, CHANG C M, DENG T S. Enzymatic hot pressurized fluids extraction of polyphenolic from *Pinus taiwanensis* and *Pinus morrisonicola* [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2009, 40(2): 136-142. DOI:10.1016/j.jtice.2008.09.005.
- [11] 林星辰, 余彬彬, 叶丹霞. 固相萃取技术新发展及其在环境分析中的应用 [J]. 化工时刊, 2014, 9: 28-34.
- [12] 乔小瑞. 荔枝多酚的提取制备和抗氧化活性研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2010.
- [13] 杨立群. 海带中总色素和褐藻黄素的提取分离及其生物活性研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2008.
- [14] ZHANG G W, HU M M, HE L, et al. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities *in vitro* [J]. Food and Bioproducts Processing, 2013, 91(2): 158-168. DOI:10.1016/j.fbp.2012.09.003.
- [15] ROH M K, UDDIN M S, CHUN B S. Extraction of fucoxanthin and polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with co-solvent [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2008, 13(6): 724-729. DOI:10.1007/s12257-008-0104-6.
- [16] 劳敏军, 王阳光. 海带多酚提取工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2012, 31(9): 93-96.
- [17] 黄秋森, 胡娟, 沙玫, 等. 树脂静态吸附法生产茶多酚初步试验 [J]. 福建林业科技, 2009, 36(1): 35-37, 86.
- [18] 付湘晋, 冉晓敏, 张慧, 等. AB-8 大孔树脂对樟树叶多酚的静态吸附与解吸附特性 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2013, 42(2): 162-165.
- [19] 陈文梅, 金鸣, 吴伟, 等. 红花黄色素抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用的研究 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(11): 21-24.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)