

复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱

谢蓝华,肖南,焦艳丽,杨公明,杜冰*
(华南农业大学食品学院,广东广州 510642)

摘要:以干槟榔壳为实验材料,研究复合酶解辅助乙醇提取槟榔碱的工艺条件。考察酶解温度、酶添加量、酶解pH、酶解时间4个单因素对槟榔壳中槟榔碱提取率的影响,在单因素实验的基础上,选择三因素三水平进行正交实验优化工艺参数。结果表明:酶解pH对槟榔碱提取率影响较大,其次是酶解温度,酶解时间影响较小。在酶添加量为2.5%,温度为60℃,pH3.6的条件下酶解4h后,75%乙醇浸提1h时,槟榔壳中槟榔碱的提取率达到0.8391%。

关键词:槟榔碱,复合酶解,乙醇浸提

Composite-enzymolysis assisted ethanol extraction of arecaline

XIE Lan-hua, XIAO Nan, JIAO Yan-li, YANG Gong-ming, DU Bing*

(College of Food, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Composite-enzymolysis assisted ethanol extraction of arecaline from drying betel nut shell was optimized in the paper. To observe and study this, the effect of factors including enzymolysis temperature, enzymatic content, enzymolysis pH, enzymolysis time on the extraction rates of arecaline were explored by single-factor and orthogonal test. The results showed that enzymolysis pH was the most critical factor affecting the extraction rate of arecaline, followed by enzymolysis temperature, and enzymolysis time exhibited less effect on extraction rate of arecaline. The optimal extraction conditions were enzymatic content of 2.5%, enzymolysis temperature of 60℃, pH3.6 enzymolysis for 4h, 75% ethanol to extract for 1h, and arecaline extraction in betel nut shell was up to 0.8391%.

Key words: arecaline; composite-enzymolysis; ethanol extraction

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)14-0221-04

槟榔属棕榈科,又名榔玉、槟榔子,主要分布在印度和东南亚等热带地区,我国以海南、台湾两省栽培较多,是一种重要的药食两用植物资源,富含多糖、生物碱、酚类化合物、粗纤维等多种营养活性物质^[1]。槟榔碱(arecoline)是槟榔中一种主要的生物碱,化学名为N-甲基-1,2,5,6-四氢烟酸甲酯,又称N-甲基-2,5,6-三氢-3-吡啶甲酸甲酯,为吡啶衍生物类,其分子式为C₈H₁₃NO₂^[2]。现代药理学及文献表明,槟榔碱在心血管系统^[3]、中枢神经系统^[4]、抗病毒^[5]、抗菌^[6]、保肝、抗癌等多方面具有药理活性^[7-8],因此在食品保健与医药领域具有广阔应用前景。目前,槟榔碱的提取方法有水浸提法、酸浸提法、有机溶剂提取法、超声波提取法、微波提取法等^[9-11],生物酶法提取植物中的槟榔碱是在传统的溶剂提取方法的基础上,根据植物细胞壁的结构组成,利用酶反应的所具有的高度专一性等特点,选择相应的酶,将细胞壁的组成成分水解或是降解,破坏细胞壁的结构,使有效成分充分暴露出来,溶解、混悬于溶剂中,从而达到提高槟榔碱的提取率的目的^[12]。在国内外有关复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱的研究未见报道,因此本实验采

用复合酶解技术辅助乙醇浸提槟榔碱,以槟榔碱的提取率为参考指标,探求酶法辅助乙醇提取槟榔碱的最佳工艺条件,为槟榔碱的提取提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

干槟榔果 广州美益香料有限公司;氢溴酸槟榔碱标准品 纯度95%,美国Sigma Chemical公司;复合植物水解酶 诺维信(中国)生物技术有限公司;乙醇、冰乙酸、醋酸钠、溴甲酚绿、无水硫酸钠、氢氧化钠、氯仿、柠檬酸钠、柠檬酸、盐酸 均为分析纯。

FuheHH-6数显恒温水浴锅 常州澳华仪器有限公司;SHZ-88台式水浴恒温振荡器 江苏太仓市实验设备厂;SHZ-III循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂;752N紫外可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;PL203电子精密天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PHS-25酸度计 上海雷磁仪器厂;101-3电热鼓风干燥箱 上海锦屏仪器仪表有限公司通州分公司;KD23B-AH微波炉 广东美的微波炉制作有限公司;NP-NL-250三频组合超声波旋转聚焦仪 广州市新栋力超声电子设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱的工艺流程

干槟榔→敲开(壳、芯分离)→取壳粉碎→复合酶解→加溶剂、

收稿日期:2011-10-09 * 通讯联系人

作者简介:谢蓝华(1987-),男,在读硕士研究生,研究方向:食品生物技术与微生物。

调pH→50℃水浴浸提1h→抽滤→稀释→含量测定

1.2.2 槟榔碱标准曲线的绘制及测定 采用紫外分光光度法测定槟榔碱的含量。具体操作如下:精密吸取供测样品溶液1mL,用缓冲液稀释至40mL于100mL分液漏斗中,然后精密加入pH5.0的醋酸-醋酸钠缓冲液4mL和1mg/mL的溴甲酚绿溶液2mL,轻轻摇匀,精密加入氯仿5、2、3mL分3次萃取,每次振摇2min,静置30min,分离氯仿层,放置预先称量好的0.2g无水硫酸钠的干燥容量瓶中,振摇,静置,精密吸取上清液5ml,精密加入0.01mol/L的氢氧化钾无水乙醇液1mL,摇匀,于618nm处测定吸光值^[3],代入标准曲线中计算含量。

1.2.3 槟榔壳中槟榔碱含量测定 将干槟榔敲开,槟榔壳、芯分离后,取壳粉碎,过60目筛,粉末于105℃烘箱中干燥2h。精确称取2.00g槟榔粉末,加少量水浸没样品,添加固定酶量,在不同的温度、pH下酶解一定时间后,添加75%的乙醇溶剂,控制料液比为1:10,用氨水调pH至9,于50℃水浴浸提1h后,趁热抽滤,残渣用75%的乙醇20mL分2次洗涤抽滤,再将滤液全部移入锥形瓶中,得到槟榔碱待测成品。计算槟榔碱提取率的公式如下:

$$\text{提取率}(\%) = \frac{m \times 40 \times 0.001}{2 \times (1-w)} \times 100$$

式中:m-槟榔碱的质量浓度(mg/mL);w-槟榔壳的水分含量(%)。

1.2.4 槟榔壳中水分含量的测定^[4] 采用GB/T5009.3-2003《食品中水分的测定:直接干燥法》。

1.2.5 槟榔碱提取的单因素实验 对酶解温度、酶添加量、酶解时间和酶解pH进行单因素因素,分别考察这4个因素对槟榔碱提取率的影响。

酶解温度的选择:精密称取2.00g槟榔粉末5份,加少量水浸没样品,酶添加量0.5%,在温度依次为30、40、50、60、70℃的条件下酶解1h后,水浴乙醇浸提,测定不同处理下槟榔碱的含量,通过比较槟榔碱提取率确定酶解温度的适宜范围。

其他条件不变,酶解时间分别在1、2、3、4、5h于60℃的条件下进行酶解实验;酶解pH依次为2.8、3.6、4.4、5.2、6.0;酶添加量依次为1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%的条件下于60℃酶解3h,通过比较槟榔碱提取率分别确定酶解时间、酶解pH、酶添加量的适宜范围。

1.2.6 槟榔碱提取的正交实验 在单因素实验的基础上,选择3个较为合适的实验水平进行L₃(3⁴)正交实验(表1),确定槟榔碱提取的最佳工艺参数。

表1 复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱正交实验设计因素与水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment design in composite-enzymolysis assisted ethanol extraction of arecaline

水平	因素		
	A 温度(℃)	B 时间(h)	C pH
1	50	2	3.6
2	60	3	4.4
3	70	4	5.2

1.2.7 不同提取方法对槟榔碱提取率影响的对比实验 精确称取2.00g槟榔粉末4份,分别在微波辅助、

超声波辅助、乙醇溶剂提取的方法下,按照1.2.1操作,测定槟榔碱的提取率,实验重复3次,实验结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 槟榔壳中水分含量

槟榔壳中水分含量见表2。

表2 槟榔壳中水分含量(%)

实验次数	1	2	3	水分平均含量
水分含量	7.238	7.265	7.147	7.217

2.2 标准曲线的回归方程

以槟榔碱质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,其线性回归方程为 $y=4.3398x-0.0487$, $R^2=0.9979$,槟榔碱质量浓度在20~120μg/mL范围内线性关系良好。

2.3 复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱的单因素实验

2.3.1 酶解温度对槟榔碱提取率的影响 如图1所示,在30~60℃时,槟榔碱的提取率随着温度的升高而增加,当酶解温度大于60℃后,槟榔碱的提取率呈下降趋势。复合酶解温度在60℃左右表现出最大的酶活力,超过60℃时,槟榔碱的提取率明显降低,为使酶解反应充分又不导致酶失活,因此实验选择酶解温度的范围为50~70℃。

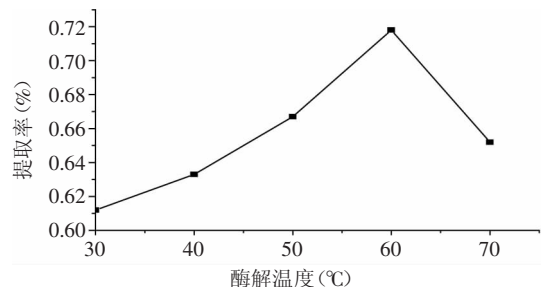


图1 酶解温度对槟榔碱提取率的影响

Fig.1 Effect of enzymolysis temperature on extraction rate of arecaline

2.3.2 酶解时间对槟榔碱提取率的影响 从图2可知,槟榔碱的提取率随着酶解时间的延长而呈现增加的趋势,当酶解时间小于3h时,槟榔碱提取率增加趋势较陡,表明酶解速率和槟榔碱的溶出速率较快。当酶解时间大于3h时,槟榔碱的提取率的增加缓慢,趋于平缓,这主要是由于酶解反应完全,槟榔碱充分提取出来,延长时间,对提取率的影响不大。因此实验选择酶解时间的范围为2~4h。

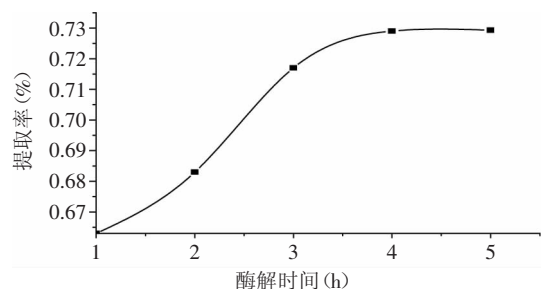


图2 酶解时间对槟榔碱提取率的影响

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

2.3.3 酶解pH对槟榔碱提取率的影响 如图3所示, 槟榔碱的提取率与酶解pH呈抛物线模型, 在pH2.8~4.4时, 槟榔碱的提取率随着pH的升高而增加, 当pH超过4.4后, 槟榔碱的提取率不再增加反而下降。酶解pH大于5.2时, 酶解反应速率下降, 槟榔碱的提取率呈现明显下降趋势。因此实验选择酶解pH的范围为3.6~5.2。

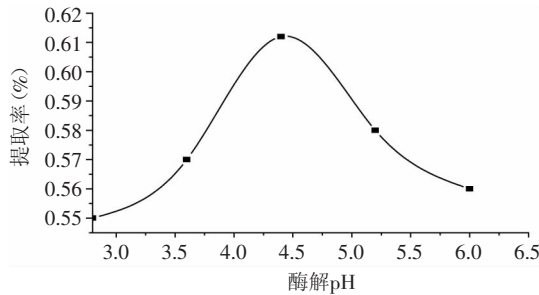


图3 酶解pH对槟榔碱提取率的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis pH on extraction rate of arecaline

2.3.4 酶添加量对槟榔碱提取率的影响 由图4可知, 随着酶添加量的增加, 槟榔碱的提取率也随之增加, 当酶添加量小于2.5%时, 槟榔碱提取率的斜率较大, 当酶添加量大于2.5%时, 槟榔碱提取率的斜率较小, 增加趋势平缓。因为随着酶添加量的增多, 使底物有更多机会与酶活性中心结合, 致使反应速度加快, 槟榔碱的溶出速率增大; 当酶添加量在2.5%~3.0%之间时, 底物转化率已经达到95%以上, 酶解反应基本完成, 再添加酶量对提高槟榔碱的得率没有促进作用。为降低实验成本又满足工业化生产的经济要求, 因此本实验选择酶添加量的为2.5%。

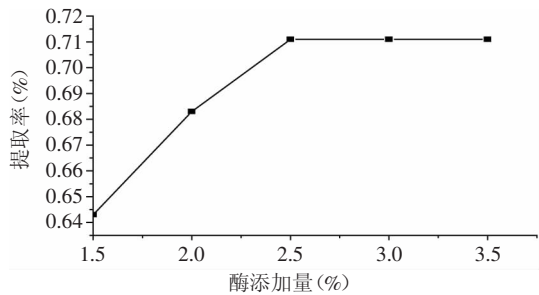


图4 酶添加量对槟榔碱提取率的影响

Fig.4 Effect of enzymatic content on extraction rate of arecaline

2.3.5 复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱的正交优化实验 由表3和表4可知, 复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱中各因素对提取率的影响主次顺序是C>A>B, 即对槟榔碱提取率影响最大的因素是酶解pH, 影响最小的因素是酶解时间。为了降低成本, 提高提取率, 确定复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱最佳酶解工艺条件为A₂B₃C₁, 即酶解温度为60℃, 酶解时间为4h, 酶解pH3.6。

2.4 最佳酶解工艺条件的验证

根据正交实验中复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱最佳酶解工艺条件进行验证实验: 精确称取2.00g槟榔粉末, 加少量水浸没样品, 在温度为60℃, 时间为4h, pH3.6的条件下进行酶解后, 添加75%的乙醇溶

表3 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	提取率 (%)
1	1	1	1	1	0.7794
2	1	2	2	2	0.8152
3	1	3	3	3	0.7034
4	2	1	2	3	0.6818
5	2	2	3	1	0.8361
6	2	3	1	2	0.6909
7	3	1	3	2	0.7844
8	3	2	1	3	0.7216
9	3	3	2	1	0.7392
k ₁	0.749	0.730	0.785		
k ₂	0.791	0.745	0.763		
k ₃	0.710	0.775	0.702		
R	0.081	0.045	0.083		

表4 方差分析表

变异来源	离差平方和	自由度	均方和	F值
酶解温度	0.0095	2	0.0047	7.13
酶解时间	0.0030	2	0.0015	2.24
酶解pH	0.0110	2	0.0055	8.23
误差	0.0013	2	0.0007	
总变异	0.0248	8		

剂, 控制料液比为1:10, 用氨水调pH至9, 于50℃水浴浸提1h后, 趁热抽滤, 残渣用20mL 75%的乙醇分2次洗涤抽滤, 再将滤液全部移入锥形瓶中, 测定槟榔碱的提取率, 平行3次, 提取率分别为0.8385%、0.8412%、0.8375%, 平均值为0.8391%。

2.5 提取方法对槟榔碱提取率的影响比较

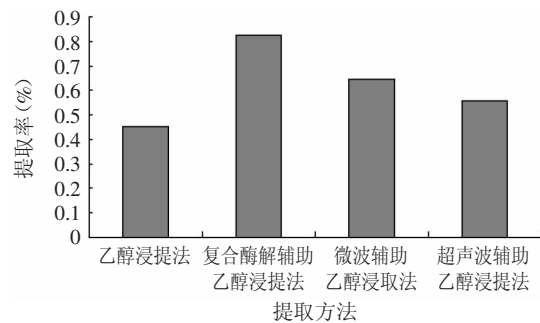


图5 提取方法对槟榔碱提取率的影响比较

Fig.5 Comparison of different methods on extraction rate of arecaline

如图5所示, 复合酶解辅助乙醇浸提槟榔壳中槟榔碱的提取率最高, 其次为微波辅助提取、超声波辅助提取, 乙醇溶剂提取所得提取率最低。复合酶解辅助乙醇浸提槟榔碱的提取率比乙醇溶剂浸提法高0.499%, 比微波辅助法高0.306%, 比超声波辅助法高0.396%。相比较而言, 复合酶解辅助浸提法提取槟榔碱具有提取率高、溶剂损耗少等优点, 可较充分地将槟榔壳中的槟榔碱提取出来。

3 结论

通过单因素实验和L₉(3⁴)正交实验研究了酶解 (下转第227页)

9.62mg/mL和16.42AU/mL;不同的氨水补加时间表明,从发酵第2d开始每隔24h调节pH为6.0时效果最好,生物量和代谢物的抑菌活性分别达到9.55mg/mL和16.47AU/mL,其中抑菌活性在第5d就达到了最大值,且极显著高于对照组和其他实验组的最大值(其他组第6d达到最大值, $p < 0.01$)。

由此可见,发酵第2d每隔24h补加10%氨水调节pH为6.0的发酵方式最好,不仅可以缩短发酵时间,还可以极显著地提高抑菌活性。

目前进行的丙酸杆菌发酵均是分批发酵,所以每次发酵在目标产物开始出现并积累时,培养基中已经积累了大量的生长限制因子和产物合成限制因子,如发酵产物乙酸、丙酸等有机酸,从而抑制了发酵液中菌体的生长和具有抑菌效价的丙酸杆菌代谢物的合成,为了增加发酵所得丙酸杆菌代谢物的抑菌效价,需要有效调节发酵液的pH,本实验首次用氨水对发酵液的pH进行了调节,显著提高了丙酸杆菌代谢物的抑菌活性,使其向工业化生产又迈进了一步。

参考文献

- [1] Hannuksela M, Haahtela T. Hypersensitivity reactions to food additives[J]. *Allergy*, 1987, 42(8): 561-575.
- [2] Juhlin L. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients[J]. *British Journal of Dermatology*, 1981, 104(3): 369-381.
- [3] 孙帅, 常忠义, 唐学明, 等. 丙酸杆菌代谢物摇瓶补料分批发酵条件研究[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2011, 39(7): 135-140.
- [4] 陈乐乐, 刘宁, 常忠义, 等. 丙酸杆菌代谢物益生因子的研

究[J]. *营养健康*, 2005, 26(5): 156-159.

- [5] 田文利, 吴琼, 吕红线, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)的研究进展[J]. *食品工业*, 2000, 21(3): 28-30.
- [6] Stevens K A, Sheldon B W, Klapes N A, et al. Nisin treatment for inactivation of salmonella species and other gram-negative bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(12): 3613-3615.
- [7] Grinstead D A, Barefoot S F, Jensenin G. A heat-stable bacteriocin produced by propionibacterium jensenii P127[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(1): 215-220.
- [8] Stiles M E. Biopreservation by lactic acid bacterin[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, 70: 331-345.
- [9] Marie J L, Julie C. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat mode[J]. *International Journal of Microbiology*, 2002, 78: 217-226.
- [10] Salih M A, Sandine W E, Ayres T A. Inhibitory effect of micogard on yoghurt and cottage cheese spoilage organism[J]. *Journal of Dairy Science*, 1990, 73: 887-889.
- [11] 冯晗, 荣邵丰, 贾彩凤, 等. 丙酸杆菌代谢物对恶臭假单胞菌抑制活性[J]. *兰州大学学报: 自然科学版*, 2008, 44(2): 58-62.
- [12] 陈玉梅, 高红亮, 常忠义, 等. 乳酸钠和葡萄糖对薛氏丙酸杆菌生长及代谢物抑菌活性的影响[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 35(2): 178-183.
- [13] 马悦培, 高红亮, 常忠义, 等. 不同初始pH对丙酸杆菌细菌素发酵的影响[J]. *食品工业科技*, 2010(5): 215-217.
- [14] Helge H, Therese F, Dag A B, et al. Bacteriocins of propionic acid bacteria[J]. *Lait*, 2002, 82(2): 59-68.
- [15] 刘坚真, 陈国寿, 李海波, 等. 国家标准测定食品细菌总数培养基的改进研究[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(2): 63-67.

(上接第223页)

时间、酶解温度、酶解pH、酶添加量对槟榔碱提取率的影响,结果表明:在酶添加量为2.5%,温度为60℃,pH3.6的条件下酶解4h后,75%乙醇浸提1h时,槟榔壳中槟榔碱的平均提取率达到0.8391%,比乙醇溶剂浸提法、微波辅助法、超声波辅助法分别高出0.499%、0.306%、0.396%。

参考文献

- [1] 王光, 张弼. 槟榔碱的研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2010, 30(4): 170-174.
- [2] 周文化, 李忠海, 张海德, 等. 不同槟榔果常规营养成分和槟榔碱含量分析[J]. *食品机械*, 2009, 25(3): 27-30.
- [3] 冯莉萍, 尚建华. 中草药生物碱类的心血管药理作用研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2009, 30(2): 58-59.
- [4] 唐敏敏, 陈卫军, 黄玉林, 等. 槟榔碱和铜离子络合物抗溶血作用研究[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(9): 1524-1527.
- [5] Weijun Chen, Xiaoling Liu, Junling Shi, et al. Mechanism of DNA damage induced by betel quid arecoline: the role of Cu(II) and alkaline conditions[J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(2): 433-436.

[6] 罗士荣, 张海德, 刘小玲, 等. 槟榔中槟榔碱体外抑菌活性的研究[J]. *农产品加工: 创新版*, 2010(9): 47-50.

- [7] 倪依东, 王建华, 王汝俊. 槟榔的药理研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2004, 15(3): 225-226.
- [8] SUN YP, LIU Q, LUO J, et al. Systemic administration of arecoline reduces ethanol-induced sleeping through activation of central muscarinic receptor in mice[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2009, 34(1): 150-157.
- [9] 胡四琴, 徐仿周, 高文平, 等. 槟榔生物碱提取分离及检测方法的研究进展[J]. *中药材*, 2009, 32(2): 308-309.
- [10] 方馥蕊, 李灼全, 梁华伦. 微波提取法对槟榔中槟榔碱的提取率的影响[J]. *中外健康文摘*, 2007, 6(4): 19-21.
- [11] 王海灿, 吉建邦, 康效宁, 等. 鲜槟榔中槟榔碱的提取工艺研究[J]. *食品机械*, 2009, 25(3): 55-58.
- [12] 任伟, 吕高辉, 王广. 酶解技术在食品和制药工业中的应用[J]. *山西化工*, 2007, 27(4): 55-56.
- [13] 高敏, 高淑芹. 光度法测定槟榔中槟榔碱的含量[J]. *化学分析计量*, 2003, 12(1): 28-30.
- [14] GB/T5009.3-2003食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.