

超声波辅助酶法提取紫薯花青素及抗氧化性研究

张莹丽, 邓瑞瑞, 李伟民

(许昌学院 食品与药学院, 河南省食品安全生物标识快检技术重点实验室, 河南 许昌 461000)

摘要:采用超声波辅助纤维素酶和 α -淀粉酶对紫薯花青素进行提取优化。在纤维素酶与 α -淀粉酶的质量比为1:1时,得到提取紫薯花青素的最佳工艺为料液比1:30(g/mL),酶用量4 mg/g,提取时间40 min,提取温度55 $^{\circ}$ C。对紫薯花青素清除羟自由基能力进行研究,结果表明:紫薯花青素具有较强的自由基清除能力,当浓度为5 mg/mL时,自由基清除率接近100%,与抗坏血酸抗氧化能力相当。

关键词:紫薯;花青素;超声波;提取;抗氧化

Ultrasonic-assisted Enzymatic Method Extraction Technology and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Purple Potato

ZHANG Ying-li, DENG Rui-rui, LI Wei-min

(Food and Pharmacy College, Key Laboratory of Biomarker Based Rapid-detection Technology for Food Safety of Henan Province, Xuchang University, Xuchang 461000, Henan, China)

Abstract: The ultrasonic-assisted enzymatic method was used to extract the anthocyanin from purple potato in order to increase the yield of anthocyanins. Under the condition the mass ratio of cellulose and α -amylase was 1:1, the best technology for extracting anthocyanins from purple potato was as follows: solid to liquid ratio 1:30 (g/mL), enzyme quantity 4 mg/g, extraction time 40 min, extraction temperature 55 $^{\circ}$ C. The ability of scavenging hydroxyl radicals of purple potato anthocyanin was investigated. The results showed that the anthocyanin had a good performance in scavenging hydroxyl radical, when the concentration was 5 mg/mL, the free radical scavenging rate was close to 100%, which was similar to that of ascorbic acid.

Key words: purple potato; anthocyanin; ultrasonic; extraction; antioxidant

引文格式:

张莹丽, 邓瑞瑞, 李伟民. 超声波辅助酶法提取紫薯花青素及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(15): 92-96.

ZHANG Yingli, DENG Rui-rui, LI Weimin. Ultrasonic-assisted Enzymatic Method Extraction Technology and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Purple Potato[J]. Food Research and Development, 2021, 42(15): 92-96.

紫薯又称为紫甘薯、黑红薯等,富含硒元素和花青素^[1-2],紫薯花青素是一类天然食用色素,是从紫薯中提取的花色苷类物质^[3-4],紫薯中含有的花青素比茄子、樱桃等植物中所含的量要高^[5-6]。紫薯花青素色泽艳丽,可用作着色剂;安全无毒,具备营养、药理保健功效,也是一种天然的抗氧化剂^[7],在食品、医药等行业有着巨大的发展潜力^[8]。花青素的提取方法主要有溶剂

提取法^[9]、超声波辅助提取法^[10]、微波辅助提取法^[11]、酶解法^[12]、超临界流体萃取法等^[13],单一的提取方法往往会存在一些不足,实际应用中常采用两种或两种以上的方法来提取,从而来提高花青素的提取率^[14]。酶能专一性的分解大分子物质,超声波可以破坏植物细胞壁,使其有效成分更易提取^[8,13]。张慢等^[13]对超声波辅助酶法提取紫薯花青素进行了研究,结果表明提取效果比传统方法有较大提高。徐颖等^[18]研究证明超声波辅助纤维素酶法能大大提高紫薯花青素的得率。本研究是在超声波辅助的条件下,对双酶法提取紫薯花青素的最佳工艺及紫薯花青素的抗氧化性进行研究,为

基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(172102310445);许昌学院科研项目(2021YB008)

作者简介:张莹丽(1982—),女(汉),讲师,博士,研究方向:食品加工。

紫薯花青素的提取提供了依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

紫薯:市售,干燥粉碎后过60目筛。原花青素标准品、 α -淀粉酶(≥ 30 U/mg)、纤维素酶($\geq 10\ 000$ U/g):合肥博美生物科技有限公司;硫酸铁铵、柠檬酸(均为分析纯):天津市大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

FW100 高速万能粉碎机:天津市泰斯特仪器有限公司;SYU-10-200DT 超声波清洗机:郑州生元仪器有限公司;101-2 电热鼓风干燥箱:北京中兴伟业仪器有限公司;T6 新世纪紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;TDZ5-WS 台式低速自动平衡离心机:湖南湘仪实验仪器开发有限公司;RE-52A 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;JY052 真空冷冻干燥机:宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的绘制

用甲醇溶液将5 mg 花青素标准品溶解定容到10 mL,制成标准液,浓度0.5 mg/mL。再将标准液稀释定容,制成不同浓度梯度的标准系列使用液,然后将各浓度使用液分别移取1.0 mL与9.0 mL反应液[反应液为正丁醇:浓盐酸:10%硫酸铁铵=83:6:1(体积比)]在10 mL具塞试管内混匀,沸水浴40 min后冷却,恢复室温(25℃)后,以试剂空白调零,在波长520 nm处测吸光值^[3]。

1.3.2 紫薯花青素得率的计算

准确吸取1.0 mL定容后的紫薯浸提液于试管内,后续操作方法同1.3.1测定吸光值,然后根据标准曲线方程,由得率公式计算出紫薯花青素的得率^[3]。

$$\text{紫薯花青素得率}/(\text{mg/g}) = c \times v / m$$

式中: c 为紫薯花青素的浓度,mg/mL; v 为稀释后的花青素溶液总体积,mL; m 为样品的质量,g。

1.3.3 单因素试验设计

1.3.3.1 酶比对紫薯花青素得率的影响

称量5份紫薯粉,分别加入质量比为0:0、0:6、6:0、3:3、2:4、4:2的纤维素酶和 α -淀粉酶,酶总量为6 mg/g,以料液比1:20(g/mL)加入3.5%柠檬酸溶液,50℃下超声20 min,其余操作步骤同1.3.1,根据标准曲线方程,由得率公式计算出不同酶配比提取的花青素得率,以此确定最佳酶配比。

1.3.3.2 料液比对紫薯花青素得率的影响

称量5份紫薯粉,各加入6 mg/g质量比为1:1的

纤维素酶和 α -淀粉酶,再分别以不同料液比1:10、1:15、1:20、1:25、1:30(g/mL)加入3.5%柠檬酸溶液,50℃下超声提取20 min,冷却后操作方法同1.3.1,然后根据标准曲线方程,由得率公式计算出不同料液比下花青素的得率,以确定最佳料液比^[6]。

1.3.3.3 酶用量对紫薯花青素得率的影响

分别以酶用量3、4、5、6、7 mg/g加入质量比为1:1的纤维素酶与 α -淀粉酶,以料液比1:20(g/mL)加入3.5%柠檬酸溶液,50℃下超声20 min,其余操作步骤同1.3.1,根据标准曲线方程,由得率公式计算出不同酶用量提取的花青素得率,以此确定最佳酶用量。

1.3.3.4 超声提取时间对紫薯花青素得率的影响

固定加入的酶量为6 mg/g,料液比为1:20(g/mL),50℃超声温度下分别提取20、25、30、35、40 min,后续操作同1.3.1,根据标准曲线方程,由得率公式计算出不同超声时间下提取的花青素得率,从而确定最佳超声提取时间。

1.3.3.5 温度对紫薯花青素得率的影响

固定加入的酶量为6 mg/g,料液比1:20(g/mL),分别在40、45、50、55、60℃的不同超声温度下提取20 min,后续操作同1.3.1,根据标准曲线方程,由得率公式计算出不同温度下提取的花青素得率,从而确定最佳提取温度。

1.3.4 正交试验设计

在单因素试验前提下,选用料液比、酶用量、超声时间和提取温度4个因素进行四因素三水平的正交试验,从而来确定紫薯花青素提取工艺的最佳参数。

正交试验因素水平表见表1。

表1 因素水平
Table 1 Factor level

水平	A 料液比/ (g/mL)	B 酶用量/ (mg/g)	C 时间/min	D 温度/℃
1	1:20	4	30	50
2	1:25	5	35	55
3	1:30	6	40	60

1.3.5 紫薯花青素的抗氧化活性试验

紫薯花青素的 $\cdot\text{OH}$ 清除试验^[7]:先配制不同浓度梯度的紫薯花青素样液,再在试管中分别依次加入1 mL 10 mmol/L的 FeSO_4 溶液、水杨酸-乙醇溶液和各个浓度梯度下的花青素样液,最后各自加入1 mL 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液,37℃水浴下反应0.5 h,以蒸馏水为空白对照,测定不同浓度的紫薯花青素样液和抗坏血酸的吸光值,重复3次。 $\cdot\text{OH}$ 清除率计算公式如下。

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率}/\% = (A_0 - A_1) / A_1 \times 100$$

式中: A_0 为空白吸光值; A_1 为样品平均吸光值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 酶配比对紫薯花青素得率的影响

不同配比的纤维素酶与 α -淀粉酶对紫薯花青素提取得率的影响见图1。

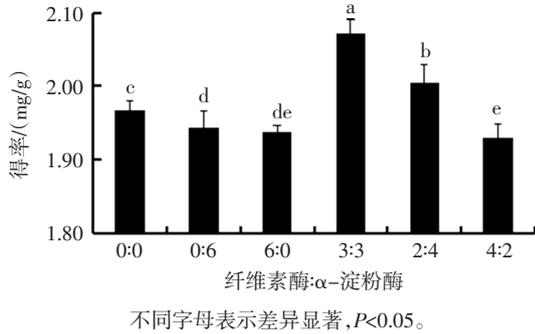


图1 不同的酶比对紫薯花青素得率的影响

Fig.1 Effect of different enzyme ratio on extraction rate of anthocyanin from purple potato

由图1可知,两种酶质量比为3:3时,紫薯花青素的得率明显高于单一加入纤维素酶或者 α -淀粉酶。说明纤维素酶与 α -淀粉酶联合作用下紫薯花青素的提取效果更显著。纤维素酶能水解破坏构成植物细胞壁的纤维素成分,释放细胞内的花青素等有效成分; α -淀粉酶能够水解紫薯中丰富的淀粉,使得被包裹住的花青素释放出来,从而达到分离提取紫薯花青素的目的。两种酶联合作用,能有效降解淀粉,破裂细胞壁,释放细胞中的目标物质,使花青素的分离提取效果显著^[18]。

2.1.2 料液比对紫薯花青素得率的影响

不同料液比与花青素得率的关系见图2。

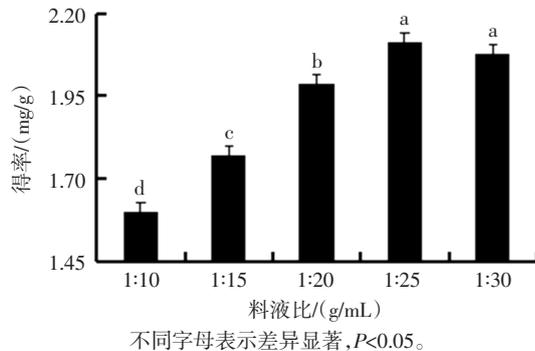


图2 料液比对紫薯花青素得率的影响

Fig.2 Effect of ratio of material to liquid on extraction rate of anthocyanin from purple potato

由图2可知,花青素的得率从料液比1:10(g/mL)~1:25(g/mL)渐渐升高,1:25(g/mL)时得率最大,高于1:25(g/mL)时得率呈下降趋势。该结果可能是由于在

1:25(g/mL)料液比下,提取剂几乎可以浸提紫薯中溶出的全部花青素;再继续增大提取剂的量,花青素含量也不会增多。所以,提取花青素的料液比以1:25(g/mL)为最佳。

2.1.3 酶用量对紫薯花青素得率的影响

酶用量对紫薯花青素得率的影响见图3。

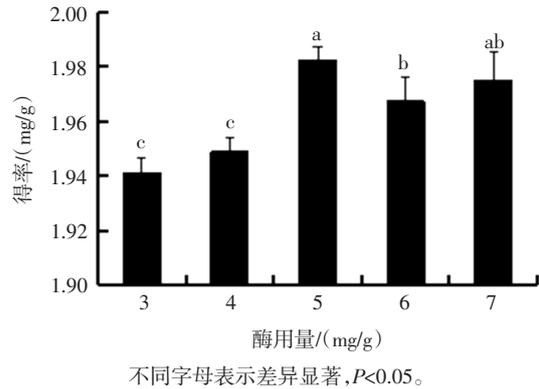


图3 酶用量对紫薯花青素得率的影响

Fig.3 Effect of enzyme quantity on extraction rate of anthocyanin from purple potato

由图3可知,酶量从4 mg/g增加到5 mg/g时,紫薯花青素的得率有明显上升趋势,酶用量5 mg/g时得率最大;酶用量大于5 mg/g,得率又有所波动。由于底物紫薯粉是定量的,所以与之对应的有最适酶用量,能将紫薯粉彻底水解,使最终得到的有效物质含量最高。因此,提取花青素的酶添加量以5 mg/g为最佳。

2.1.4 超声提取时间对紫薯花青素得率的影响

提取时间对紫薯花青素得率的影响见图4。

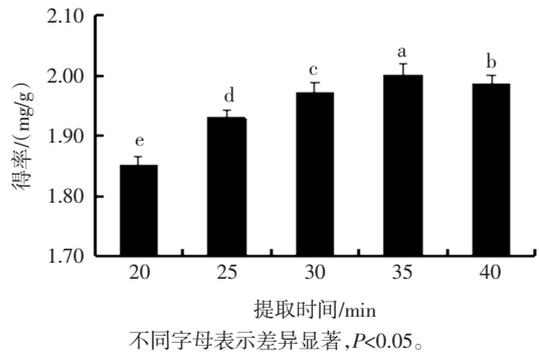


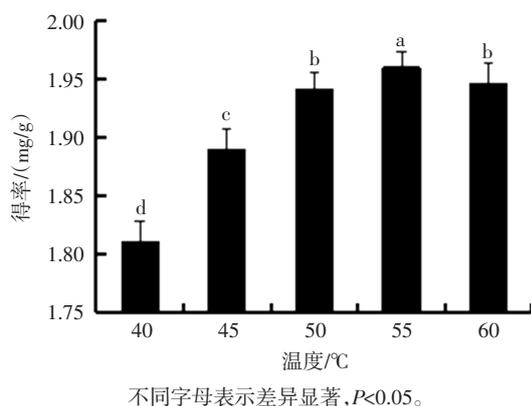
图4 提取时间对紫薯花青素得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction rate of anthocyanin from purple potato

由图4可知,提取时间增长,得率随之逐渐增大,时间为35 min时得率最高,时间超过35 min,得率开始下降。该结果的产生是因为酶作用于底物,反应需要一定的时间,35 min时酶促反应能够充分进行,时间过长则酶促反应能力有所降低,以致最终得率有所下降。因此,提取紫薯花青素的超声时间以35 min为最佳。

2.1.5 提取温度对紫薯花青素得率的影响

温度对紫薯花青素提取得率的影响见图5。



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图5 温度对紫薯花青素得率的影响

Fig.5 Effect of temperature on extraction rate of anthocyanin from purple potato

由图5可知,温度低于55℃时,得率随温度升高而增大,从40℃升高到45℃时,得率显著增大,55℃时得率最高;温度高于55℃时,得率有所下降。出现此种结果的原因是酶活随温度升高而增强,从而加快酶促反应速率,所以得率逐渐增大,直到温度升高到该酶促反应的最适温度55℃,此时花青素得率最高,温度高于55℃,酶可能会失活或变性,而使得率降低。因此,提取紫薯花青素的温度以55℃为最佳。

2.2 正交试验结果分析

正交试验结果见表2。

表2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal experiment results

试验号	A 料液比	B 酶用量	C 时间	D 温度	得率/(mg/g)
1	1	1	1	1	2.075 ^a
2	1	2	2	2	1.975 ^b
3	1	3	3	3	2.098 ^{ab}
4	2	1	2	3	2.109 ^d
5	2	2	3	1	2.008 ^e
6	2	3	1	2	2.053 ^f
7	3	1	3	2	2.199 ^a
8	3	2	1	3	2.165 ^b
9	3	3	2	1	2.154 ^c
K ₁	6.148	6.383	6.293	6.237	
K ₂	6.170	6.148	6.237	6.226	
K ₃	6.517	6.305	6.305	6.372	
k ₁	2.049	2.128	2.098	2.079	
k ₂	2.057	2.049	2.079	2.075	
k ₃	2.172	2.102	2.102	2.124	
R	0.123	0.078	0.022	0.049	
因素主次	A>B>D>C				
最优组合	A ₃ B ₁ C ₃ D ₃				

注:标以不同小写字母的值表示不同水平组合的提取率之间具有显著性差异($P < 0.05$)。

由表2可知,紫薯花青素得率最高水平组合为

A₃B₁C₃D₂,即料液比1:30(g/mL),酶用量4 mg/g,超声时间40 min,提取温度55℃;由极差R值可看出影响紫薯花青素提取的主次因素为A(料液比)>B(酶用量)>D(提取温度)>C(超声时间)。根据k值可知,A₃B₁C₃D₃为最优组合,其表示的水平条件为:料液比1:30(g/mL),酶用量4 mg/g,提取时间40 min,提取温度60℃,此组合是通过计算得到的,称为理论最佳水平组合。试验最优水平组合和理论水平组合存在提取温度上的差异。

2.3 验证试验

将试验的最优水平组合A₃B₁C₃D₂与计算得到的理论最优组合A₃B₁C₃D₃进行验证试验。通过验证试验得出,A₃B₁C₃D₂组合下3次试验得率的平均值为2.202 mg/g;A₃B₁C₃D₃组合下的3次试验得率的平均值为2.154 mg/g。由此可确定提取紫薯花青素的最优水平组合为A₃B₁C₃D₂,即料液比1:30(g/mL),酶用量4 mg/g,提取时间40 min,提取温度55℃。

2.4 抗氧化试验结果分析

紫薯花青素与抗坏血酸抗氧化能力比较见图6。

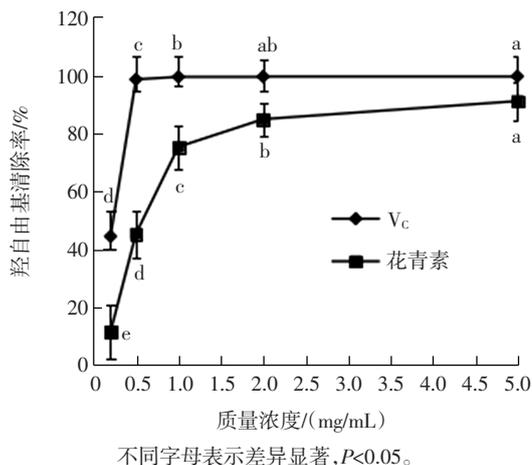


图6 紫薯花青素与抗坏血酸抗氧化能力比较

Fig.6 Comparison of antioxidant capacity between anthocyanin and ascorbic acid

由图6可知,紫薯花青素具有较好的·OH清除能力,随花青素浓度的增大清除·OH的能力逐渐增强,浓度增大到5 mg/mL时,自由基的清除率将近100%;浓度低于0.5 mg/mL时,花青素与抗坏血酸(Vc)抗氧化能力的差别逐渐增大;质量浓度增大,即大于0.5 mg/mL时,两者的羟自由基清除能力逐渐接近,逐渐接近100%。章萍萍^[14]研究结果表明,紫薯花青素对·OH的清除率在低浓度时明显低于Vc,但随着浓度的增加其清除能力随之增大,当浓度达到8 mg/mL时,对·OH的清除能力和Vc相近,达到90%以上,与本研究结果一致,说明紫薯花青素与Vc对·OH的清除能力存在一定的量效关系。

3 结论

本文通过对紫薯花青素提取工艺和紫薯花青素抗氧化能力进行研究,得到如下结论:1)纤维素酶与 α -淀粉酶联合使用且质量比为1:1时,花青素的提取得率最高。2)通过试验得到紫薯花青素提取的最优条件为料液比1:30(g/mL)、酶用量4 mg/g、提取时间40 min、提取温度55℃。此条件下,紫薯花青素的得率最高。3)由羟自由基清除试验中抗坏血酸与紫薯花青素的抗氧化能力比较可知,低于质量浓度0.5 mg/mL时,花青素与抗坏血酸的自由基清除率差异明显,当浓度大于0.5 mg/mL,两者的自由基清除率逐渐接近,差异逐渐变小,最终都达到最高值。

参考文献:

- [1] 许青莲,邢亚阁,车振明,等.超声波提取紫薯花青素工艺条件优化研究[J].食品工业,2013,34(4):97-99.
XU Qinglian, XING Yage, CHE Zhenming, et al. Optimized research on the extracted technology of anthocyanin from purple sweet potato by ultrasonic[J]. Food Industry, 2013, 34(4): 97-99.
- [2] 郭彩华,卢珍华,伍菱,等.紫薯花青素的提取及其在VC含量测定中的应用[J].食品科学,2016,37(9):134-138.
GUO Caihua, LU Zhenhua, WU Ling, et al. Anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas*) and its application in VC quantification[J]. Food Science, 2016, 37(9): 134-138.
- [3] 暴海军,袁红波,李静,等.紫甘薯色素的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(23):12386-12387,12399.
BAO Haijun, YUAN Hongbo, LI Jing, et al. Research progress on pigment in purple sweet potato[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(23): 12386-12387, 12399.
- [4] HWANG Y P, CHOI J H, CHOI J M, et al. Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against *tert*-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49 (9): 2081-2089.
- [5] 温桃勇,刘小强.紫色甘薯营养成分和药用价值研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(5):1954-1956,2035.
WEN Taoyong, LIU Xiaoqiang. Research progress on nutritive components and medicinal value of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37 (5): 1954-1956, 2035.
- [6] 田喜强,董艳萍.超声波辅助提取紫薯花青素及抗氧化性研究[J].中国酿造,2014,33(1):77-80.
TIAN Xiqiang, DONG Yanping. Ultrasonic-assisted extraction technology and antioxidant activity of anthocyanins from purple potato[J]. China Brewing, 2014, 33(1): 77-80.
- [7] 刘荣,郑旭煦,殷钟意.天然抗氧化剂在植物油中的应用研究进展[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2015,32(10):43-47.
LIU Rong, ZHENG Xuxu, YIN Zhongyi. Research advances in application of natural antioxidants in vegetable oil[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science), 2015, 32(10): 43-47.
- [8] 徐颖,樊凡,阴鹏涛,等.紫薯花青素超声波辅助酶法提取工艺优化及其抗氧化性研究[J].食品与机械,2017,33(3):150-154.
XU Ying, FAN Fan, YIN Pengtao, et al. Study on ultrasonic-enzyme combined extraction and antioxidant activity of anthocyanins from purple sweet potato by response surface methodology[J]. Food and Machinery, 2017, 33(3): 150-154.
- [9] 费旭元.紫娟茶中花青素的提取分离及抗氧化活性研究[D].北京:中国农业科学院,2012.
FEI Xuyuan. Study on extraction and separation of anthocyanins from "Zijuan" tea and their antioxidant activity[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.
- [10] 傅婧.紫山药皮中色素的提取纯化和稳定性研究及结构鉴定[D].南昌:南昌大学,2011.
FU Jing. Research on extraction and purification, stability and structure identification of the pigment from peels of purple yam [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011.
- [11] YANG Z, ZHAI W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11(3): 470-476.
- [12] SIGURDSON G T, ROBBINS R J, COLLINS T M, et al. Molar absorptivities (ϵ) and spectral and colorimetric characteristics of purple sweet potato anthocyanins [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 497-504.
- [13] 张慢,潘丽军,姜绍通,等.响应面法优化酶-超声波辅助同步提取紫薯花青素工艺[J].食品科学,2014,35(10):23-28.
ZHANG Man, PAN Lijun, JIANG Shaotong. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of anthocyanins from purple sweet potato by response surface methodology[J]. Food Science, 2014, 35(10): 23-28.
- [14] 章萍萍.紫薯花青素的提取、纯化及其抗氧化和益生元活性研究[D].合肥:合肥工业大学,2017.
ZHANG Pingping. Study on extraction, purification and activity of antioxidant and prebiotics of purple sweet potato anthocyanins[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017.
- [15] 张妹萍. EGCG、葡萄籽原花青素与二氢杨梅素协同抗氧化及对小鼠乳腺癌4T1细胞的协同抑制作用研究[D].杭州:浙江大学,2019.
ZHANG Shuping. Synergistic antioxidant effect of EGCG, grape seed proanthocyanidins and dihydromyricetin and their synergistic inhibitions on mouse mammary 4T1 cells[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [16] 白佳兴.野生黑果枸杞饮料工艺及特性研究[D].天津:天津科技大学,2018.
BAI Jiaying. Studies on processing technology and characteristics of wild *Lycium ruthenicum* Murray beverage[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.
- [17] 姚刚.从紫甘薯中提取纯化花青素、花青素的抗氧化活性以及利用剩余物制备麦芽糊精的研究[D].杭州:浙江大学,2015.
YAO Gang. Study on the extraction and purification of anthocyanins from purple sweet potato, the antioxidant activity of anthocyanins and the preparation of maltodextrin from the extraction residue[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [18] 陈东方.酶解提高燕麦粉抗氧化活性的作用机制[D].杨凌:西北农林科技大学,2016.
CHEN Dongfang. Mechanism of enhancement of antioxidant activity of oat flour after enzymatic hydrolysis[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016.