

doi:10.11937/bfyy.20164627

超声结合酶法提取紫山药花青素 工艺优化及其抗氧化活性

王彦平, 韩二芳, 钱志伟, 孙瑞琳, 李东, 赵世航

(河南农业职业学院 食品工程学院, 河南 郑州 451450)

摘要:以紫山药为试材,以0.5%柠檬酸水溶液为溶剂,采用超声结合酶法提取花青素,通过单因素试验和正交实验对紫山药中花青素的提取工艺进行优化,并用大孔吸附树脂纯化,对其进行体外抗氧化试验,研究了超声结合酶法提取紫山药花青素最佳工艺参数和其体外抗氧化活性,为紫山药的综合开发利用提供参考依据。结果表明:最佳工艺条件为加酶量1.5%、料液比1:20 g·mL⁻¹、提取时间25 min、超声功率200 W。在此条件下,花青素得率为5.91 mg·g⁻¹。体外抗氧化试验中,紫山药花青素表现出明显的抗氧化能力,对DPPH 自由基(DPPH·)和羟基自由基(·OH)的清除能力明显强于维生素C。

关键词:紫山药;花青素;超声结合酶法提取;抗氧化性

中图分类号: TS 202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)14-0130-06

花青素(anthocyanins)属生物类黄酮化合物,又叫花色素,是一种广泛存在于植物中的水溶性色素,使植物的果实和花瓣呈现出蓝、紫、红、橙等颜色^[1]。花青素对人体具有多种生理学功能,如清除自由基、抗氧化、延缓衰老、抗突变、抗肿瘤、保护肝脏、降血糖、保护视力、保护心血管等特殊作用^[2-6]。因此,开发利用天然色素资源已成为目前食品行业关注的热点。

紫山药(*Dioscorea alata*)属薯蓣科(Dioscoreaceae)山药属(*Dioscorea* L.)一年生或多年生

蔓生植物,又名参薯、脚板薯等,是我国重要的经济植物及药食同源的绿色蔬菜佳品。紫山药富含花青素,目前对紫山药中花青素的提取方法^[7-8]有溶剂提取法、超声波提取法、微波辅助提取法、超声-微波协同法、酶提取法,但超声结合酶法提取紫山药花青素的方法尚鲜见报道。该研究采用超声结合酶法提取紫山药花青素,对其提取工艺进行优化,并研究其体外抗氧化活性,以期为提高紫山药的附加值和综合利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试紫山药为河南温县产紫山药。

供试药剂:1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH,纯度99%)购于Sigma公司;纤维素酶(10 000 U·g⁻¹)购于索莱宝公司;乙醚、醋酸、醋酸钠、无水乙醇、硫酸、三氯乙酸、三氯化铁、铁氰化钾、双氧水、硫酸亚铁、葡萄糖等均为分析纯,购于国药集团。

供试仪器:BS224S 分析天平(德国赛多利斯公司);UV power 紫外-可见分光光度计(北京

第一作者简介:王彦平(1983-),女,硕士,讲师,研究方向为食品功能与营养因子。E-mail:14389487@qq.com.

责任作者:钱志伟(1969-),男,硕士,教授,研究方向为食品营养与安全。E-mail:1460331538@qq.com.

基金项目:郑州市普通科技攻关资助项目(153PKJGG424);2015年度河南省高等学校优秀教学团队建设项目(河南农业职业学院食品营养与检测专业);2014年度河南省高等学校“专业综合改革试点”资助项目(河南农业职业学院食品营养与检测专业)。

收稿日期:2017-03-28

莱伯泰科仪器股份有限公司);HH-2 数显恒温水浴锅(上海乔跃电子科技有限公司);202-3AB 电热恒温鼓风干燥箱(上海乔跃电子科技有限公司);PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);RE2000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);KBS-250 型数控超声波细胞粉碎机(昆山舒美超声仪器有限公司);D5-R2 离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 紫山药预处理

新鲜紫山药清洗、去皮后,切成 1~3 mm 厚度的薄片,置 1%柠檬酸溶液中护色 15 min,捞出后置于 60 ℃恒温箱烘 24 h,称恒重、粉碎,过 60 目筛后,在二氧化硅干燥器内常温保存备用。

1.2.2 紫山药花青素的提取工艺流程

紫山药预处理粉与 0.5%柠檬酸水溶液混合→一定水浴温度下酶解 1 h→超声辅助浸提→离心(4 000 r·min⁻¹,15 min)取上清液。

1.2.3 最大吸收波长的确定

取 1 g 紫山药预处理粉加入 20 mL 0.5%柠檬酸水溶液,在 50 ℃水浴条件下提取 1 h,4 000 r·min⁻¹离心 15 min 取上清液,用紫外-可见光分光光度计在 400~600 nm 内扫描测定吸光度,并绘制波长-吸光度曲线,以确定紫山药花青素最大吸收波长。

1.2.4 紫山药花青素含量的测定

采用示差法。取 5 mL 提取液 2 份,分别用 pH 1.0 和 pH 4.5 缓冲溶液^[9]稀释至 20 mL,平衡后用蒸馏水做对照,在最大吸收波长 530 nm 处测定其吸光度。然后以蒸馏水作对照,测定 700 nm 处吸光度。花青素质量浓度为: $C = [(A_{530} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{530} - A_{700})_{pH 4.5}] \times MW \times DF / \epsilon L$ 。式中: C 为花青素质量浓度,mg·mL⁻¹; A 为吸光度; MW 为分子量,449.2; DF 为稀释倍

数; ϵ 为浓度为 1 mol·L⁻¹的摩尔吸光系数; L 为光程,1 cm。花青素得率为: $D = C \times V / M$ 。式中: D 为花青素得率,mg·g⁻¹; C 为提取液花青素质量浓度,mg·mL⁻¹; V 为提取液体积,mL; M 为紫山药预处理粉质量,g。

1.2.5 紫山药花青素提取的单因素试验

加酶量对紫山药花青素得率的影响:加酶量(紫山药干质量酶量)分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%,在超声功率 100 W、料液比 1:20 g·mL⁻¹、提取温度 40 ℃条件下超声辅助 30 min,测定 530 nm 处吸光度,并计算花青素得率。料液比对紫山药花青素得率的影响:料液比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g·mL⁻¹,在超声功率 100 W、加酶量 1.0%、提取温度 40 ℃条件下超声辅助提取 30 min,测定 530 nm 处吸光度,并计算花青素得率。酶解温度对紫山药花青素得率的影响:提取温度分别为 25、30、35、40、45、50 ℃,在超声功率 100 W、加酶量 1.0%、料液比 1:20 g·mL⁻¹的条件下超声辅助提取 30 min,测定 530 nm 处吸光度,并计算花青素得率。超声时间对紫山药花青素得率的影响:超声时间分别为 5、10、15、20、25、30 min,在超声功率 100 W、加酶量 1.0%、料液比 1:20 g·mL⁻¹、提取温度 40 ℃的条件下提取,测定 530 nm 处吸光度,并计算花青素得率。超声功率对紫山药花青素得率的影响:超声功率分别为 50、100、150、200、250 W,在加酶量 1.0%、料液比 1:20 g·mL⁻¹、提取温度 40 ℃条件下提取 30 min,测定 530 nm 处吸光度,并计算花青素得率。

1.2.6 紫山药花青素提取的正交实验

在单因素试验基础上,设计 4 因素 3 水平 L₉(3⁴)的正交实验,见表 1。按照 1.2.2 的方法提取紫山药花青素,并计算花青素得率,以确定超声结合酶法提取紫山药花青素的最佳工艺条件。

表 1

正交实验因素及水平

Table 1

Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	A 加酶量 Cellulose amount/%	B 料液比 Solid-liquid ratio/(g·mL ⁻¹)	C 超声时间 Ultrasonic time/min	D 超声功率 Ultrasonic power/W
1	1.0	1:15	15	150
2	1.5	1:20	20	200
3	2.0	1:25	25	250

1.3 项目测定

按照正交实验获得的最佳工艺条件得紫山药花青素提取液后,用 XDA-7 大孔吸附树脂吸附 24 h,将吸附树脂过滤出后置于 60%乙醇中,洗脱 24 h,按照 1.2.3 的方法测定洗脱液吸光度,并计算紫山药花青素质量浓度,按照不同要求,配制不同浓度的紫山药花青素水溶液,分别测定提取液的总还原能力、DPPH·清除率、·OH 清除率,参照文献[10-11]的方法进行。

1.3.1 总还原能力的测定

取不同浓度样品各 1 mL 倒入试管,加入 2.5 mL 0.2 mol·L⁻¹ 的磷酸缓冲液(pH 6.6),再加入 2.5 mL 1%铁氰化钾,混匀,50℃水浴 20 min;冷却后加入 2.5 mL 10%的三氯乙酸,混匀,混合液 3 500 r·min⁻¹离心 10 min;取上清液 2.5 mL 倒入试管,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1%氯化铁,静置 10 min 后,于 707 nm 波长处测定其吸光度。

1.3.2 DPPH·清除率的测定

取不同浓度样品各 0.2 mL 倒入试管,加入 3.8 mL 浓度为 80 mg·L⁻¹的 DPPH·无水乙醇溶液,摇匀,室温下黑暗处放置 30 min,于 517 nm 波长处分别测定吸光度 A_i ,另取不同浓度样品各 0.1 mL 倒入试管,加入 3.9 mL 无水乙醇,于 517 nm 波长处分别测定参比吸光度 A_b ;再取 0.1 mL 无水乙醇,加入 3.9 mL 80 mg·L⁻¹的 DPPH·无水乙醇溶液,于 517 nm 波长处测定空白吸光度 A_0 。DPPH·清除率(%)=(1-($A_i - A_b$)/ A_0)×100。

1.3.3 ·OH 清除率的测定

取不同浓度样品各 2 mL 倒入试管,加入 2 mL 浓度为 6 mmol·L⁻¹的 FeSO₄ 溶液,再加入 6 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 溶液,摇匀,静置 10 min 后,加入 2 mL 6 mmol·L⁻¹水杨酸溶液,摇匀,静置 30 min。于 510 nm 波长处分别测定其吸光度 A_i ;另用蒸馏水代替水杨酸溶液重复上述试验,测得参比吸光度 A_b ;另用蒸馏水代替样品溶液重复上述试验,测得空白吸光度 A_0 。·OH 清除率(%)=(1-($A_i - A_b$)/ A_0)×100。

1.4 数据分析

用 Excel 2007 进行数据处理及作图。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定

由图 1 可知,紫山药花青素吸光度值在 400~530 nm 逐渐升高,在 530 nm 处吸光度值最大,在 530~600 nm 逐渐降低,因此确定紫山药花青素的最大吸收波长为 530 nm。

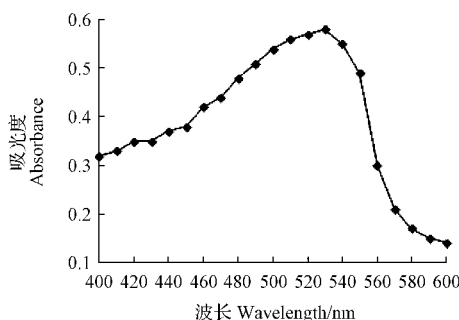


图 1 紫山药花青素吸光度曲线

Fig. 1 Absorbance curve of purple yam anthocyanins

2.2 紫山药花青素提取的单因素试验

2.2.1 加酶量对紫山药花青素得率的影响

由图 2 可知,加酶量在 0.5%~2.0%时紫山药花青素得率随着加酶量的增加而升高。当加酶量大于 1.5%时,花青素得率趋于稳定,表明紫山药细胞壁已被纤维素酶水解完全。从经济性角度考虑,选择加酶量为 1.0%~2.0%做进一步优化试验。

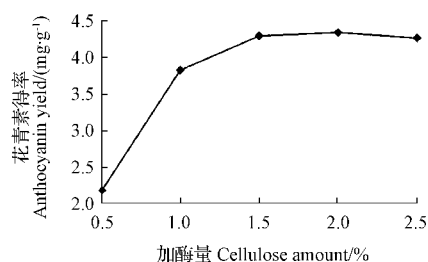


图 2 加酶量对花青素得率的影响

Fig. 2 Effect of cellulase amount on anthocyanins yield

2.2.2 料液比对紫山药花青素得率的影响

由图 3 可以看出,当料液比在 (1:5)~(1:20) g·mL⁻¹时,花青素提取率不断升高,当料液比大于 1:20 g·mL⁻¹时,花青素得率呈下

降趋势。一定范围内,提取剂剂量越大,花青素得率越高;但当提取剂过多时由于可能影响纤维素酶的催化效果和超声的空化效应与机械振动的效果,花青素得率反而下降^[11]。故选择料液比(1:15)~(1:25)g·mL⁻¹进一步优化试验。

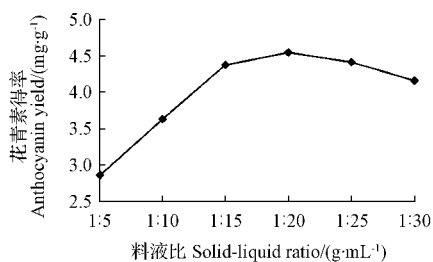


图 3 料液比对花青素得率的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on anthocyanins yield

2.2.3 酶解温度对紫山药花青素得率的影响

由图 4 可知,酶解温度在 25~45 °C 内,随着温度的升高,紫山药花青素的得率随之升高,当酶解温度高于 45 °C 时,花青素得率反而下降。这说明纤维素酶对紫山药细胞壁的最佳酶解温度为 45 °C,温度较低时酶的活性随着温度的升高而增强,而温度过高时会抑制酶的活性,影响对细胞壁的破坏,使花青素得率下降。

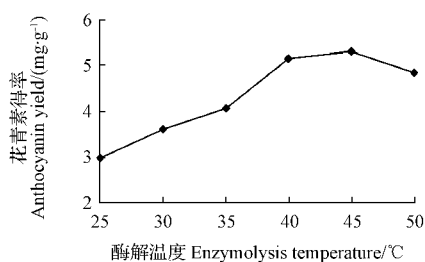


图 4 酶解温度对花青素得率的影响

Fig. 4 Effect of enzymolysis temperature on anthocyanins yield

2.2.4 超声时间对紫山药花青素得率的影响

由图 5 可知,超声时间在 5~20 min,花青素得率随着时间延长而升高,20~25 min 时趋于稳定。故选择超声时间 15~25 min 进一步优化试验。

2.2.5 超声功率对紫山药花青素得率的影响

由图 6 可知,超声功率在 50~200 W 时,紫

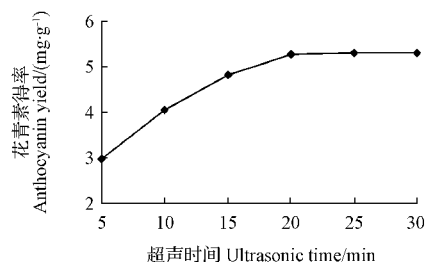


图 5 超声时间对花青素得率的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic time on anthocyanins yield

山药花青素得率随着超声功率的增大而升高,250 W 时反而下降,可能由于功率过大加速了提取液的流动,使物料作用于超声波下的时间减少,细胞壁被破坏程度减弱,花青素溶出减少;超声功率过高,热效应显著,可能影响纤维素酶活性,从而影响花青素的溶出效果。故选择超声功率 150~250 W 进一步优化试验。

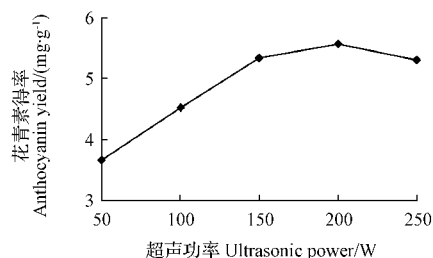


图 6 超声功率对花青素得率的影响

Fig. 6 Effect of ultrasonic power on anthocyanins yield

2.3 紫山药花青素提取的正交实验

由表 2 可知,对极差进行分析获得各因素的极差顺序为 $R_B > R_C > R_A > R_D$,即对紫山药粗花青素得率重要性排序为料液比>超声时间>加酶量>超声功率。最佳提取工艺为 $A_2B_2C_3D_2$,即加酶量 1.5%、料液比 1:20 g·mL⁻¹、提取时间 25 min、超声功率 200 W。对最佳提取工艺条件做验证试验,重复 3 次,此条件下紫山药花青素得率为 5.9 mg·g⁻¹,高于正交实验中所有试验结果。

2.4 紫山药花青素体外抗氧化活性

2.4.1 紫山药花青素的总还原能力

由图 7 可知,紫山药花青素的总还原力明显

表2 紫山药花青素提取的正交实验结果

Table 2 The orthogonal experiment results of extracting anthocyanins of purple yam

编号 No.	A	B	C	D	花青素得率 Yield of anthocyanins /(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	3.43
2	1	2	2	2	5.62
3	1	3	3	3	5.46
4	2	1	2	3	4.83
5	2	2	3	1	5.29
6	2	3	1	2	4.95
7	3	1	3	2	5.66
8	3	2	1	3	5.90
9	3	3	2	1	5.17
K ₁	4.41	4.25	4.27	4.54	A ₂ B ₂ C ₃ D ₂
K ₂	5.12	5.30	5.11	5.11	
K ₃	4.98	4.96	5.14	4.86	
R	0.71	1.05	0.87	0.57	

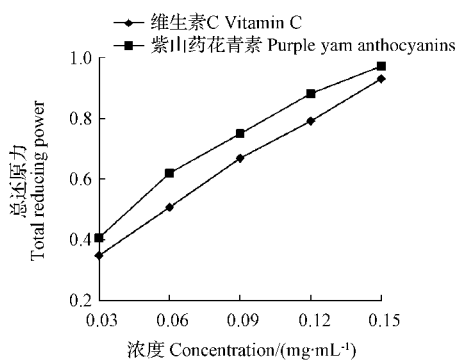


图7 紫山药花青素的总还原能力

Fig. 7 Total reducing power of purple yam anthocyanins

强于维生素C。在试验的浓度范围内,紫山药花青素的总还原能力随着浓度的增加而升高,并且样品浓度与总还原力存在量效关系。

2.4.2 紫山药花青素对 DPPH· 的清除作用

由图8可知,在0.1~0.5 mg·mL⁻¹浓度范围内,对DPPH·的清除能力随着紫山药花青素质量浓度的提高而增强,通过线性回归方程计算得到紫山药花青素的IC₅₀=0.129 mg·mL⁻¹,而维生素C的IC₅₀=0.227 mg·mL⁻¹,这说明在相同浓度下,紫山药花青素对DPPH·的清除能力明显强于维生素C。

2.4.3 紫山药花青素对·OH的清除作用

由图9可知,在·OH清除试验中,在0.1~0.5 mg·mL⁻¹内,花青素浓度与·OH清除率之间存在良好的量效关系,通过线性回归方程计算

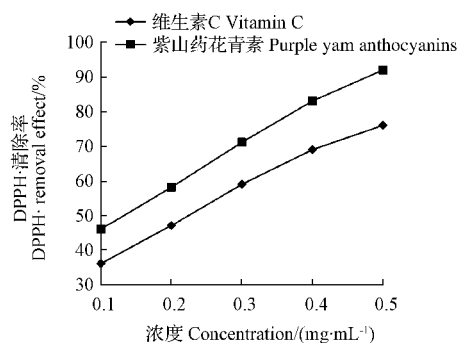


图8 紫山药花青素对 DPPH· 的清除作用

Fig. 8 DPPH· removal effect of purple yam anthocyanins

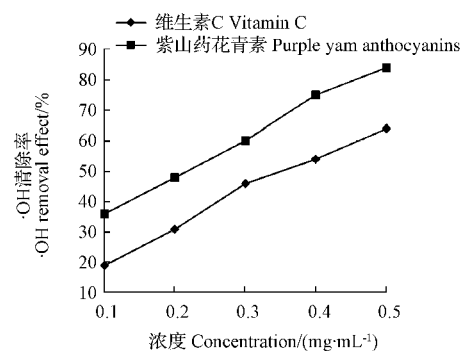


图9 紫山药花青素对·OH的清除作用

Fig. 9 ·OH removal effect of purple yam anthocyanins

得到紫山药花青素的IC₅₀=0.214 mg·mL⁻¹,而维生素C的IC₅₀=0.364 mg·mL⁻¹,这说明在相同浓度下,紫山药花青素对·OH的清除能力明显强于维生素C。

3 结论与讨论

紫山药富含花青素,由于紫山药花青素的主要成分为矢车菊素和芍药色素^[8],且多为酰化物,稳定性较高,但溶剂提取法提取时间较长,对花青素存在一定的破坏和流失,难以高效利用资源,因此新方法如超声波、微波、酶法等辅助提取方法得到了应用。该研究采用正交实验的方法获得超声结合酶法提取紫山药花青素的最佳提取工艺条件为加酶量1.5%、料液比1:20 g·mL⁻¹、提取时间25 min、超声功率200 W,此条件下,紫山药粉中花青素的得率为5.91 mg·g⁻¹。

该研究抗氧化活性测定结果表明,紫山药花青素具有较高的总还原力,有较强的清除DPPH·

和 $\cdot\text{OH}$ 的能力,抗氧化能力明显高于维生素C,且抗氧化作用与花青素含量呈正相关。从紫山药中提取的花青素具有良好的生理功能,可作为功能性食品基料添加到酸奶、饮料、果冻、饼干等食品中,既可作为色素,同时具有良好的保健功能,具有广阔的应用前景。

该研究结果表明,紫山药中花青素含量较高,且具有较强的抗氧化活性,研究结果为紫山药中花青素的研究及深度加工利用提供了参考依据。但该研究仅对紫山药花青素进行了体外抗氧化评价,今后应在此基础上进行体内抗氧化性研究,为开发天然、安全、稳定的抗氧化剂提供科学依据。紫山药作为一种药食同源的地方特种经济作物,其进一步开发利用,可变资源优势为经济优势,对与推动地方经济发展具有重要意义。

参考文献

- [1] KERIO L C, WACHIRA F N, WANYOKO J K, et al. Characterization of anthocyanins in Kenyan teas; extraction and identification[J]. Food Chemistry, 2012, 131: 31-38.
- [2] CHIEMI M, TAKAHIRO H, SAYURI A, et al. New acylated anthocyanins from purple yam and their antioxidant activity[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2015(4): 1-9.
- [3] 姜慧芳,李向荣,唐超. 紫心甘薯黄酮提取物对糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(4): 374-379.
- [4] 陈永强,刘金娟,曹成亮,等. 紫甘薯汁抗肿瘤活性及诱导人肝癌 HepG2 凋亡机制的研究[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 263-267.
- [5] 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.
- [6] 肖杰,刘曼露,刘丹芳,等. 紫山药花青素的提纯及其抗氧化性测定[J]. 食品工业, 2015, 36(3): 121-125.
- [7] KALT W, HANNEKEN A, MILBURY P, et al. Recent research on polyphenolics in vision and eye health[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(7): 4001-4007.
- [8] 王彦平,汤高奇,谢克英,等. 紫山药主要活性成分提取纯化技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(17): 356-359.
- [9] 阮思莲,贺永朝,叶翌冬,等. 超声波辅助提取紫山药花青素的工艺优化[J]. 莆田学院学报, 2015, 22(2): 356-359.
- [10] 陈月英,王彦平,孙瑞琳,等. 葡萄皮渣原花青素微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J]. 北方园艺, 2016(11): 123-126.
- [11] 姚以才,耿中华,王乃馨,等. 芦根多糖的超声辅助提取及其抗菌活性[J]. 食品科学, 2011, 32(14): 147-151.

Optimization of Ultrasonic-enzymatic Extraction of Anthocyanins From Purple Yam and Its Antioxidant Activity

WANG Yanping, HAN Erfang, QIAN Zhiwei, SUN Ruilin, LI Dong, ZHAO Shihang

(Department of Food Engineering, Henan Vocational College of Agriculture, Zhengzhou, Henan 451450)

Abstract: Purple yam was used as the experimental material, 0.5% citric acid aqueous solution as solvent, the extraction technology and antioxidant activity of polysaccharides from purple yam were studied by ultrasonic-enzymatic extraction and macroporous adsorption resin for purification, and provided reference basis for the comprehensive development and utilization of purple yam. The results showed that the optimum condition were as follows, cellulose amount 1.5%, solid-liquid ratio 1:20 g·mL⁻¹, extraction time 25 minutes, ultrasonic power 200 W. Under such conditions, the yield of polysaccharides was 5.91 mg·g⁻¹. Anthocyanins from purple yam showed significant antioxidant capacity, and the scavenging abilities of DPPH· and that of $\cdot\text{OH}$ were slightly stronger than vitamin C.

Keywords: purple yam(*Dioscorea alata*); anthocyanins; ultrasonic-enzymatic extraction; antioxidant