

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

Study on Ultrasonic-enzyme Combined Extraction and Antioxidant Activity of  
Anthocyanins from Purple Sweet Potato by Response Surface Methodology

徐颖<sup>1</sup> 樊凡<sup>1</sup> 阴鹏涛<sup>1</sup> 董梅<sup>2</sup>

XU Ying<sup>1</sup> FAN Fan<sup>1</sup> YIN Peng-tao<sup>1</sup> DONG Mei<sup>2</sup>

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西 西安 710021; 2. 渭南市食品药品检验所, 陕西 渭南 714000)  
(1. School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an, Shaanxi  
710021, China; 2. Weinan Institute for Food and Drug Control, Weinan, Shaanxi 714000, China)

**摘要:**采用单因素试验和响应面试验研究超声波辅助酶法提取紫薯花青素, 确定最佳工艺条件为: 以 95% 乙醇—0.1% HCl(体积比 4:6)为提取剂, 液料比 36:1(mL/g), 60℃ 下超声提取 35 min, 纤维素酶添加量 2.50 mg/g·紫薯粉。在该条件下紫薯花青素得率达到 2.003 mg/g。紫薯花青素还原力和对·OH 清除率随浓度增大而增强。在 30.00 mg/L 时, 紫薯花青素对·OH 清除率达到 80.2%。研究初步揭示了紫薯花青素具有很高的体外抗氧化活性, 可以作为天然抗氧化剂进行开发。

**关键词:**紫薯; 花青素; 提取; 超声波; 纤维素酶; 抗氧化性

**Abstract:** The anthocyanins were extracted from purple sweet potato (PSP) tuber. Influencing factors of ultrasonic-enzyme combined extraction of anthocyanins were studied by single factor experiments. On the basis of this, the extraction process was optimized by three factors and three levels of response surface analysis method, using yield rate as response value. The optimal process parameters of the extraction process were: extraction temperature 60℃, extraction time 35 min, liquid to solid ratio 36:1(mL/g). Under these conditions, the yield of anthocyanins from purple sweet potato was 2.003 mg/g. The results showed that the determination of reducing power of purple sweet potato anthocyanins and the scavenging rate of·OH increased with the increase of concentration. The scavenging rate of·OH was 80.2% at the concentration of 30.00 mg/L. The study revealed that the anthocyanins from purple sweet potato have

high antioxidant activity in vitro and can be used as a natural antioxidant.

**Keywords:** purple sweet potato; anthocyanins; extraction; ultrasonic; cellulase; antioxidation

目前食品工业上所用的色素大多数是合成色素, 几乎都有不同程度的毒性<sup>[1]</sup>, 长期食用会危害健康。花青素是一种类黄酮类的水溶性色素, 属于天然食用色素, 安全无毒, 具有抗氧化<sup>[2]</sup>、清除自由基功能<sup>[3]</sup>、抗突变<sup>[4]</sup>、增进视力<sup>[5]</sup>、预防心脑血管疾病<sup>[5]</sup>及保护肝脏<sup>[6]</sup>等功能, 在食品、医药、化妆等行业有着巨大的应用潜力。紫薯花青素与紫葡萄、紫米和樱桃等其它来源的花青素相比, 其热稳定性与紫米相似, 但优于其它来源且光稳定性最强<sup>[7]</sup>。中国提取花青素的传统方法多采用柠檬酸水溶液或乙醇等溶剂浸提法<sup>[7]</sup>, 国外多采用盐酸化甲醇、乙酸或盐酸水溶液等低温或常温提取<sup>[8]</sup>, 这些方法耗时长, 而超声波提取法利用空化作用和强烈振动可以破坏植物细胞壁, 使溶剂易于渗透到细胞内, 溶解其中的化学成分。另外, 纤维素酶能降解植物细胞壁中的纤维素, 提高花青素的得率。目前将二者结合用于花青素提取的报道较少, 本试验结合两者的优势, 采用超声波辅助纤维素酶法提取紫薯花青素, 能大大提高其得率。利用响应面法优化获得提取紫薯花青素的最佳工艺参数, 并进行抗氧化性研究。为紫薯花青素的工业化生产提供基础理论, 以便于对紫薯资源的进一步利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

紫薯: 市售;

纤维素酶: 酶活 50 000 U/g, 天津诺奥科技发展有限公司

**基金项目:**陕西科技大学科研启动金—自然科学基金预研基金(编号: 2016BJ-21); 陕西省大学生创新创业训练计划项目(编号: 1348)

**作者简介:**徐颖(1978—), 女, 陕西科技大学讲师, 博士。

E-mail: xuying@sust.edu.cn

**收稿日期:**2016—12—02

公司；  
抗坏血酸、茶多酚： $\geq 98\%$ ，上海源叶生物科技有限公司；  
其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

高速万能粉碎机：FW80 型，天津市泰斯特仪器有限公司；  
数控超声波清洗器：KH-250DE 型，昆山禾创超声仪器有限公司；  
紫外可见分光光度计：UV-2800 型，上海尤尼克柯仪器有限公司；  
高速冷冻离心机：HC-3018R 型，安徽中科中佳科学仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 紫薯粉的制备 将紫薯洗净、切成小块，45℃烘干至恒重，粉碎过 60 目筛，干燥器中避光保存，备用。

1.2.2 花青素浓度及得率的测定 参照文献[9]，略作改进。精确称取紫薯粉 2.00 g，按液料比加入一定量的提取剂 A（95%乙醇：0.1% HCl 体积比为 40：60），按 2.5 mg/g·紫薯粉加入纤维素酶，在一定温度下超声波提取，4 500 r/min 离心 5 min，取出上清液用提取液定容至 100 mL。各取 5 mL 样液，分别用 pH 1.0 盐酸—氯化钾和 pH 4.5 盐酸—乙酸钠缓冲液定容至 100 mL，用蒸馏水作参比，分别测定  $A_{530}$  和  $A_{700}$ 。采用 pH 示差法<sup>[10]</sup>计算花青素浓度。

$$A = (A_{530} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{530} - A_{700})_{pH\ 4.5}, \tag{1}$$

$$C = \frac{A \times f \times M}{E \times L}, \tag{2}$$

式中：  
A——吸光度差值；  
 $(A_{530} - A_{700})_{pH\ 1.0}$ ——pH 1.0 的样液在两波长（530，700 nm）的吸光度差；  
 $(A_{530} - A_{700})_{pH\ 4.5}$ ——pH 4.5 的样液在两波长（530，700 nm）的吸光度差。

C——花青素浓度（以矢车菊素-3-葡萄糖苷计），mg/mL；

f——稀释倍数；  
M——矢车菊素-3-葡萄糖苷的分子量，449.2；  
E——矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔吸光常数，26 900；  
L——比色皿厚度，1 cm。

$$W = \frac{C \times V}{m}, \tag{3}$$

式中：  
W——紫薯花青素得率，mg/g；  
C——样品溶液的花青素浓度，mg/mL；  
V——样品溶液的体积，mL；  
m——样品的质量，g。

1.2.3 单因素试验设计

（1）提取温度：准确称取 2.00 g 紫薯粉，按照液料比为 20：1（mL/g）加入提取剂 A，再加入 5 mg 纤维素酶，分别于

40,45,50,55,60,65℃超声辅助提取 20 min，4 500 r/min 离心 5 min，取上清液并用提取剂定容至 100 mL，测定其吸光度，每组试验重复 3 次取平均值。

（2）提取时间：准确称取 2.00 g 紫薯粉，按照液料比为 20：1（mL/g）加入提取剂 A，再加入 5 mg 纤维素酶，进行超声辅助提取，超声波浸提温度为 50℃，提取时间分别为 10，15,20,25,30,35,40 min，4 500 r/min 离心 5 min，取上清液并用提取剂定容至 100 mL，测定其吸光度，每组试验重复 3 次取平均值。

（3）液料比：准确称取 2.00 g 紫薯粉，液料比分别为 10：1,15：1,20：1,25：1,30：1,35：1,40：1,45：1（mL/g），加入提取剂 A，再加入 5 mg 纤维素酶，50℃超声辅助提取 20 min，4 500 r/min 离心 5 min，取上清液用提取剂定容至 100 mL，测定其吸光度，每组试验重复 3 次取平均值。

（4）纤维素酶添加量：准确称取 2.00 g 紫薯粉，按照液料比为 20：1（mL/g）加入提取剂 A，再按 1.50,2.00,2.50,3.00,3.50 mg/g·紫薯粉加入纤维素酶，50℃超声辅助提取 20 min，4 500 r/min 离心 5 min，取上清液并用提取剂定容至 100 mL，测定其吸光度，每组试验重复 3 次取平均值。

1.2.4 响应面法优化超声波提取工艺 综合考虑单因素试验结果，选取提取温度、提取时间和料液比 3 个因素为自变量，采用 Design-Expert 8.0 软件回归分析试验数据，得最优提取参数。

1.2.5 花青素的抗氧化活性分析 将提取得到的紫薯花青素粗提液用旋转蒸发仪浓缩后，用冷冻干燥机干燥成粉状物，再用 95%乙醇溶解。分别制成 30.00,15.00,7.50,5.00,3.75,3.00 mg/L（以花青素计）的紫薯花青素溶液，用于抗氧化活性分析。以抗坏血酸和茶多酚作为阳性对照。还原能力测定方法参照文献[11]，羟自由基（·OH）清除能力测定方法参照文献[12]。

2 结果分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 提取温度对得率的影响 由图 1 可知，得率随温度的升高而出现先增加后减小的趋势，可能是花青素随温度的升高而不断被提取出，但随温度升高花青素稳定性降低，当温

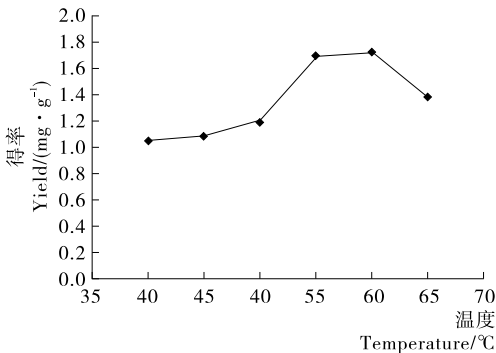


图 1 提取温度对紫薯花青素得率的影响

Figure 1 Effect of extraction temperature on the yield of anthocyanins

度高于 60 ℃时,花青素开始部分分解而导致含量降低,得率下降。因此提取温度为 55~60 ℃时效果较好。

2.1.2 提取时间对得率的影响 由图 2 可知,得率随时间的延长出现先增加后减小的趋势,可能是随超声时间延长,产生的热量促使部分花青素分解而导致含量降低,得率下降。因此提取时间为 30~35 min 时效果较好。

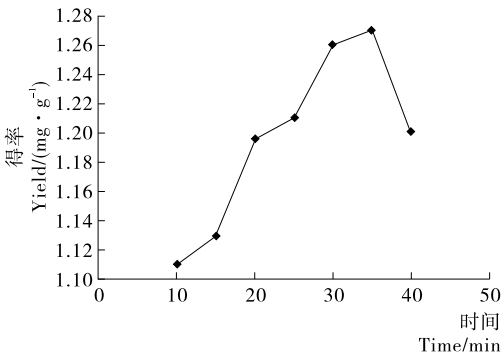


图 2 提取时间对花青素得率的影响

Figure 2 Effect of extraction time on the yield of anthocyanins

2.1.3 液料比对得率的影响 由图 3 可知,得率随液料比的增大而增大,当液料比大于 35:1(mL/g)时,随着液料比的增加得率也有增大的趋势,但增加幅度很小。随提取剂添加量的增加,花青素逐渐溶解到提取剂中,当提取剂超过一定量时,花青素溶解趋于饱和,得率趋于稳定。因此液料比为 35:1(mL/g)时得率较高。

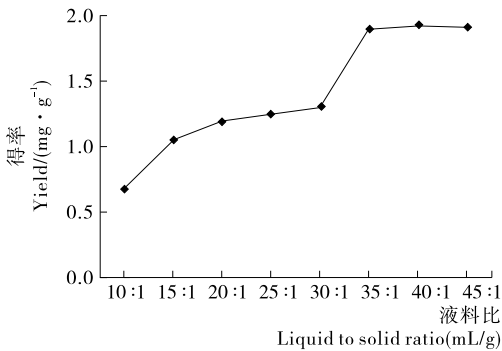


图 3 液料比对花青素得率的影响

Figure 3 Effect of liquid to solid ratio on the yield of anthocyanins

2.1.4 纤维素酶添加量对得率的影响 由图 4 可知,得率随纤维素酶添加量的增大而增大,在 2.50 mg/g · 紫薯粉时达到高峰,当大于 2.50 mg/g · 紫薯粉时,随纤维素酶添加量的增加得率基本保持不变,是由于纤维素酶对紫薯细胞壁的降解作用趋于饱和,因此,每克紫薯添加 2.50 mg 纤维素酶为宜。后续试验纤维素酶添加量固定为 2.50 mg/g · 紫薯粉。

2.2 响应面优化提取工艺结果分析

响应面试验设计因子水平见表 1。根据中心组合试验设计 Box-Behnken,对超声波辅助酶法进行优化,对提取温度、提取时间、液料比 3 个因素进行考察。试验设计方案及结果见表 2。

2.2.1 回归模型的建立及显著性检验 利用 Design-Expert 8.0 软件,对多项式回归分析,得到的二次回归方程为:

$$Y = 2.00 - 0.014A + 5.0 \times 10^{-3}B + 0.064C + 0.023AB - 0.010AC + 0.018BC - 0.19A^2 - 0.082B^2 - 0.12C^2$$
 (4)

从式(4)可看出,在试验范围内,回归方程一次项系数的绝对值  $C > A > B$ ,说明在 3 个因素中液料比对紫薯花青素得率影响最大,其次是温度,提取时间影响最小。

由表 3 可知,回归得到的二次多项式模型极显著 ( $P_{\text{Model}} < 0.0001$ ),相关系数  $R^2$  为 0.9984,失拟项不显著 ( $P =$

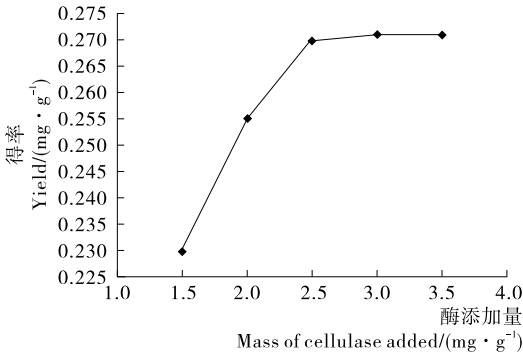


图 4 纤维素酶添加量对紫薯花青素得率的影响

Figure 4 Effect of mass of cellulase added on the yield of anthocyanins

表 1 响应面试验设计因子水平表

| 水平 | A 提取温度/℃ | B 提取时间/min | C 液料比(mL/g) |
|----|----------|------------|-------------|
| −1 | 55       | 30         | 30 : 1      |
| 0  | 60       | 35         | 35 : 1      |
| 1  | 65       | 40         | 40 : 1      |

表 2 响应面试验设计方案及结果

| 试验号 | A  | B  | C  | 得率/(mg · g <sup>−1</sup> ) |
|-----|----|----|----|----------------------------|
| 1   | 0  | −1 | −1 | 1.750                      |
| 2   | 0  | 0  | 0  | 2.000                      |
| 3   | 1  | 1  | 0  | 1.750                      |
| 4   | 0  | −1 | 1  | 1.835                      |
| 5   | 0  | 1  | 1  | 1.880                      |
| 6   | −1 | 1  | 0  | 1.730                      |
| 7   | 0  | 0  | 0  | 2.000                      |
| 8   | −1 | −1 | 0  | 1.760                      |
| 9   | 1  | −1 | 0  | 1.690                      |
| 10  | 0  | 1  | −1 | 1.715                      |
| 11  | −1 | 0  | −1 | 1.620                      |
| 12  | 0  | 0  | 0  | 2.010                      |
| 13  | −1 | 0  | 1  | 1.790                      |
| 14  | 0  | 0  | 0  | 2.005                      |
| 15  | 1  | 0  | −1 | 1.600                      |
| 16  | 1  | 0  | 1  | 1.720                      |
| 17  | 0  | 0  | 0  | 2.010                      |

0.058 1>0.05),说明该模型拟合程度较好,应用此模型可对紫薯花青素提取得率进行分析和预测。

2.2.2 交互作用对紫薯花青素得率的影响 由图 5(a)可知,提取时间的最佳水平范围为 34~36 min,提取温度的最佳水平范围为 59~60 ℃。由图 5(b)可知,提取时间的最佳水平范围为 34~36 min,液料比的最佳水平范围为 35:1~37:1 (mL/g)。由图 5(c)可知,提取温度的最佳水平范围为 58~60 ℃,液料比的最佳水平范围为 35:1~37:1 (mL/g)

2.2.3 提取工艺优化结果 通过响应面分析得到提取温度 59.70 ℃,提取时间 35.25 min,液料比 36.30:1 (mL/g),回归方程的得率最大,预期的得率为 2.013 7 mg/g。将提取工艺条件修正为:提取温度 60 ℃,提取时间 35 min,液料比 36:1 (mL/g),预期的得率为 2.01 mg/g。在此优化工艺条件下平行实验 3 次得到花青素得率为 2.003 mg/g。与理论预测值的相对误差约为 0.35%。将提取得到的紫薯花青素粗提液用旋转蒸发仪浓缩后用冷冻干燥机干燥成粉状物,检测其花青素的含量为 86.7%。紫薯花青素在酸性条件下比中

表 3 回归模型的方差分析表<sup>†</sup>

Table 3 Variance analysis of the response surface regression model for the yield

| 来源             | 平方和                   | 自由度 | 均方                    | F 值      | Prob>F   |
|----------------|-----------------------|-----|-----------------------|----------|----------|
| 模型             | 0.32                  | 9   | 0.036                 | 456.62   | <0.000 1 |
| A              | 2.45×10 <sup>-3</sup> | 1   | 2.45×10 <sup>-3</sup> | 31.18    | 0.000 8  |
| B              | 2.00×10 <sup>-4</sup> | 1   | 2.00×10 <sup>-4</sup> | 2.55     | 0.154 6  |
| C              | 0.040                 | 1   | 0.040                 | 463.91   | <0.000 1 |
| AB             | 2.02×10 <sup>-3</sup> | 1   | 2.02×10 <sup>-3</sup> | 25.77    | 0.001 4  |
| AC             | 6.25×10 <sup>-4</sup> | 1   | 6.25×10 <sup>-4</sup> | 7.95     | 0.025 8  |
| BC             | 1.60×10 <sup>-3</sup> | 1   | 1.60×10 <sup>-3</sup> | 20.36    | 0.002 8  |
| A <sup>2</sup> | 0.16                  | 1   | 0.16                  | 1 985.79 | <0.000 1 |
| B <sup>2</sup> | 0.030                 | 1   | 0.030                 | 342.97   | <0.000 1 |
| C <sup>2</sup> | 0.070                 | 1   | 0.070                 | 905.65   | <0.000 1 |
| 残差             | 5.50×10 <sup>-4</sup> | 7   | 7.86×10 <sup>-5</sup> |          |          |
| 失拟项            | 4.50×10 <sup>-4</sup> | 3   | 1.50×10 <sup>-4</sup> | 6.00     | 0.058 1  |
| 纯误差            | 1.00×10 <sup>-4</sup> | 4   | 2.50×10 <sup>-5</sup> |          |          |
| 总误差            | 0.32                  | 16  |                       |          |          |

<sup>†</sup> Prob>F 的值小于 0.05 为影响显著,Prob>F 的值小于 0.01 为影响极显著,Prob>F 的值大于 0.05 为影响不显著。

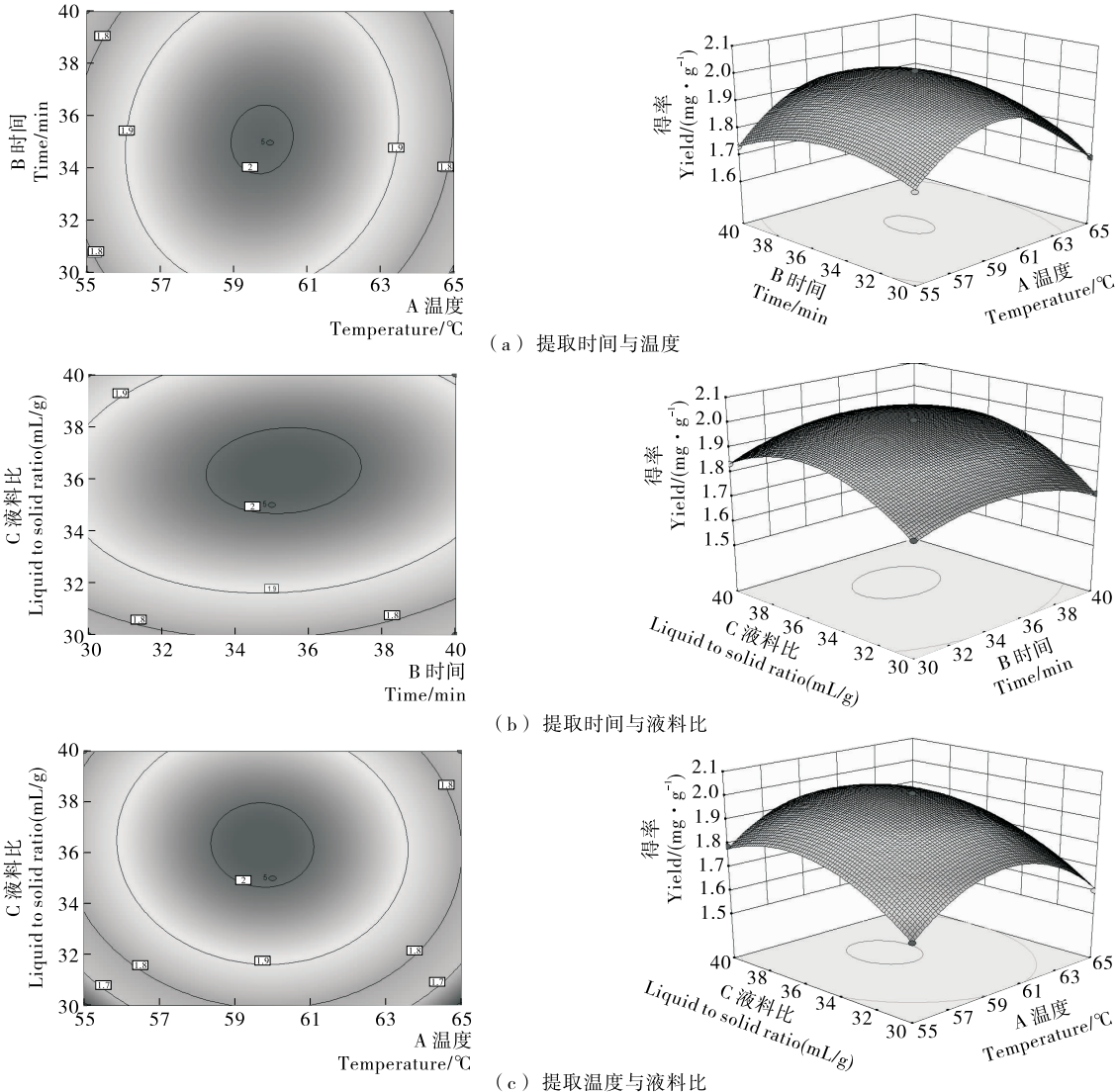


图 5 交互作用对紫薯花青素得率交互影响的等高线图和曲面图

Figure 5 Contour and Response surface plots of the interactions on the yield of anthocyanins from PSP

性和碱性条件下稳定,pH 2~3 最稳定。60 ℃加热 1 h,花青素存留率达到 96%,70 ℃加热 1 h,花青素存留率仅为 56%。

2.3 紫薯花青素抗氧化活性结果分析

2.3.1 还原力测定 由图 6 可知,在相同浓度条件下紫薯花青素还原力明显高于抗坏血酸和茶多酚。在 3.00~30.00 mg/L 时,随着浓度的增大,各物质的还原力均有所提高,但是紫薯花青素的还原力提高显著( $P<0.05$ ),而抗坏血酸的还原力提高并不显著。

2.3.2 羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )的清除能力 由图 7 可知,在 3.00~30.00 mg/L 时,随着浓度的增大,各物质对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力均有所提高,但是紫薯花青素的清除能力不如抗坏血酸和茶多酚的清除能力提高显著( $P<0.05$ ),在 3.00~3.75 mg/L 时,紫薯花青素清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力高于抗坏血酸和茶多酚的清除能力,在 5.00~30.00 mg/L 时,抗坏血酸的清除能力高于紫薯花青素和茶多酚的清除能力,紫薯花青素和茶多酚的清除能力基本相当。

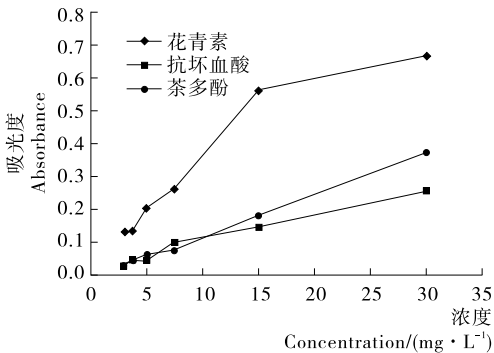


图 6 花青素还原力的测定

Figure 6 Determination of reducing power of anthocyanins

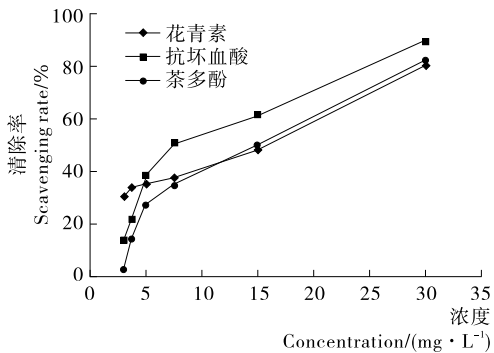


图 7 花青素对羟自由基的清除能力

Figure 7  $\cdot\text{OH}$  radical scavenging activity of anthocyanins

3 结论

本试验采用超声辅助纤维素酶对紫薯花青素的提取进行了研究,分析影响紫薯花青素得率的影响因素,对超声波辅助酶法进行响应面优化,得出其最佳工艺为:提取时间 35 min,提取温度 60 ℃,液料比 36:1(mL/g),纤维素酶添加量 2.50 mg/g · 紫薯粉,在此条件下花青素得率达到

2.003 mg/g。在超声和纤维素酶的双重作用下,紫薯花青素溶出速度很快,本工艺所需提取时间较短,有利于产业化推广。紫薯花青素在酸性条件下比较稳定,其还原力明显高于抗坏血酸和茶多酚,对羟自由基清除能力与茶多酚基本相当。紫薯花青素可以作为天然抗氧化剂进行开发。在后续研究中,可以添加果胶酶,考察双酶对紫薯花青素提取的效果。

参考文献

[1] WROLSTAD R, CULVER C. Alternatives to those artificial FD&C food colorants[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2012, 3(1): 59-77.

[2] YONG P H, CHOI J H, CHOI J M, et al. Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against tertbutyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(9): 2 081-2 089.

[3] 孙传范. 原花青素的研究进展[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 146-148, 152.

[4] 赵宇瑛, 张汉锋. 花青素的研究现状及发展趋势[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(5): 904-905, 907.

[5] 李彦青, 卢森权, 黄咏梅, 等. 紫色甘薯花青素的应用前景[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(29): 12 641-12 642, 12 646.

[6] 吕昱, 严敏. 紫薯花色苷的生理功能及分离纯化研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 250-253.

[7] 陆国权, 李秀玲. 紫甘薯红色素与其他同类色素的稳定性比较[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2001, 27(6): 635-638.

[8] BYAMUKAMA R, KIREMIRE B T, ANDERSEN O M, et al. Anthocyanins from fruits of Rubus pinnatus and Rubus rigidus [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2005, 18(6): 599-605.

[9] 阳翠, 秦廷豪, 李晓梅, 等. 紫甘薯花青素提取工艺参数优化 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 38(7): 69-72.

[10] 中华人民共和国农业部. NY/T 1320—2007 农作物种质资源鉴定技术规程 甘薯[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 23-24.

[11] 谢思芸, 钟瑞敏, 肖仔君, 等. 杨梅果醋体外抗氧化活性的研究 [J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 125-128.

[12] 罗春丽, 王林, 李杏, 等. 紫薯花青素体外抗氧化及对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 225-230.