

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90244

间歇式超声辅助酶法提取葡萄皮渣 白藜芦醇工艺优化

Optimization on extraction process of resveratrol by intermittent ultrasonic assisted enzymatic extraction from grape skin residue

张 勤 田子明 王金柱

ZHANG Qin TIAN Zi-ming WANG Jin-zhu

(焦作职工医学院基础医学部, 河南 焦作 454000)

(Department of Basic Medicine, Jiaozuo Adult Medical College, Jiaozuo, Henan 454000, China)

摘要:目的: 高效提取白藜芦醇, 并保持其良好的抗氧化性能。方法: 以葡萄皮渣为原料, 使用间歇式超声波辅助纤维素酶提取白藜芦醇, 采用响应面法对提取工艺进行优化, 并分析其抗氧化性能。结果: 当提取液 pH 为 5.0、纤维素酶用量为 1.3%、酶解温度为 57 °C 时, 用 300 W 超声波间歇式辅助累计提取 43 min, 白藜芦醇的平均得率可达 0.293%。抗氧化性分析发现其对 DPPH·、ABTS·和·OH 等的清除作用明显, 且总抗氧化性能较好。结论: 采用间歇式超声波辅助纤维素酶提取的葡萄皮渣白藜芦醇, 与单独酶法或持续超声波法提取相比, 无论是得率还是抗氧化性能均有大幅度提高。

关键词: 葡萄皮渣; 白藜芦醇; 酶法提取; 超声波辅助; 抗氧化能力

Abstract: Objective: In order to efficiently extract resveratrol and to maintain the good antioxidant capacity. **Methods:** Resveratrol was extracted from grape skin residue using intermittent ultrasonic assisted enzymatic extraction. The response surface method (RSM) was utilized to optimize the extraction process, and the antioxidant capacity of resveratrol were analyzed. **Results:** The experiment results indicated that under the condition of buffer solution pH of 5.0, cellulase dosage of 1.3% and enzymolysis temperature of 57 °C, the resveratrol obtained better extraction effect after intermittent assisted treatment with 300 W ultrasonic waves for accumulatively 43 min, and the average yield could reach 0.293%. The antioxidant analysis found that the res-

veratrol had obvious scavenging effect on DPPH·, ·OH and ABTS·, as well the total antioxidant capacity was better. **Conclusion:** The resveratrol extracted by intermittent ultrasonic assisted cellulase method, both the yield and antioxidant capacity have been greatly improved comparing with the single enzymatic method or continuous ultrasonic extraction.

Keywords: grape pomace residue; resveratrol; enzymatic extraction; ultrasonic-assisted; antioxidant capacity

白藜芦醇属于非黄酮类多酚有机化合物, 是植物受到刺激时产生的一种抗毒素, 主要存在于葡萄、大豆、樱桃、石榴和一些坚果的果皮中^[1-2], 具有祛痰、止咳、平喘、驱风、健胃、解热、镇痛、抗菌、消炎等作用。同时, 在抗肿瘤、抗氧化、抗菌等方面具有独特的优势, 对人体健康益处明显^[3-5], 被认为是较有前景的治疗心血管疾病、抗癌、防衰老的活性物质。

许多学者对白藜芦醇的提取开展了相关研究, 在酶法、超声波辅助以及超声波辅助酶法提取方面均有涉及: 张华等^[6]使用纤维素酶和果胶酶共同酶解提取蓝莓皮渣中的白藜芦醇, 发现最优提取条件为料液比($m_{\text{蓝莓皮渣}} : V_{\text{乙醇}}$)1 : 20 (g/mL)、复合酶配比($m_{\text{纤维素酶}} : m_{\text{果胶酶}}$)1 : 5、酶解温度 54.62 °C、酶解时间 1 h、pH 5.38, 白藜芦醇最高得率为 236.424 mg/kg; 崔霖等^[7]对超声波辅助乙醇回流法提取虎杖白藜芦醇的工艺进行优化, 发现在乙醇质量分数 80%、原料与溶剂配比($m_{\text{原料}} : m_{\text{溶剂}}$)1 : 28、超声功率 120 W 的条件下浸提 60 min, 白藜芦醇得率达到 1.36%。由于超声波的空化、扰动和搅拌等多级效应可提高提取效率^[8-9]; 而酶法提取则较为温和, 可有效保持天然产物的基本结构^[10-11], 但提取时间长、易氧化。因此, 有学者开展了超声波辅助酶法提取白藜芦醇的研究: 汪开拓等^[12]对超声波辅助乙醇提取葡萄皮渣中白藜芦醇的

基金项目: 河南省科技厅科学计划研究项目(编号: 182400410283); 河南省教育厅项目(编号: 2019-ZZJH-591)

作者简介: 张勤, 女, 焦作职工医学院讲师。

通信作者: 王金柱(1969—), 男, 焦作职工医学院教授。

E-mail: wjzhu189@163.com

收稿日期: 2021-11-23 **改回日期:** 2022-05-23

工艺进行了优化,当乙醇体积分数为 50%、液料比($V_{乙醇} : m_{葡萄皮渣}$)为 12 : 1 (mL/g)、提取温度为 35.6 °C、提取时间为 34.8 min 和超声波功率为 231 W 时,白藜芦醇的得率最高为 48.72 $\mu\text{g/g} \cdot \text{FW}$ 。同时,Zhou 等^[13]使用超声波辅助虎杖苷- β -葡萄糖苷酶(PBG)在乙醇/硫酸铵体系中进行酶解来提取白藜芦醇,最大得率较单独使用酶法有大幅度提高,达到了 10.7 mg/g。此外,黄兆翔等^[14]对超声波辅助酶法提取花生红衣白藜芦醇工艺进行了优化,当乙醇体积分数为 80%、料液比($m_{花生红衣} : V_{乙醇}$)为 1 : 25 (g/mL)、超声时间为 30 min、提取温度为 50 °C 时,白藜芦醇的提取量为 (0.854 ± 0.025) mg/100 g。

由于长时间持续使用超声波会导致分子运动速度加剧、温度升高,可能破坏提取物的结构与活性^[15]。间歇式超声波可在一定程度上改善这种状况^[16],但暂未见用辅助酶法提取葡萄皮渣白藜芦醇的报道。研究以葡萄皮渣为原料,将超声波间歇处理与酶解提取相结合来提取白藜芦醇。通过响应面法优化提取工艺,并对葡萄皮渣白藜芦醇进行抗氧化性能分析,以期为实现具有良好生物活性的葡萄皮渣白藜芦醇的高效提取提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

葡萄皮渣:赤霞珠,烟台某葡萄酒有限公司;

纤维素酶:酶活 5 万 U/g,上海阿拉丁科技有限公司;

白藜芦醇标准品:纯度 $\geq 99\%$,天津尖峰天然产物有限公司;

甲醇、乙醇等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

数控超声水浴锅:CSSX-30 型,常州易晨仪器制造有限公司;

电热鼓风干燥箱:101A-2 型,上海荣计达仪器科技有限公司;

高效液相色谱仪:Agilent 1200S 型,美国安捷伦;

旋转蒸发器:RE-210 型,郑州博汇精密科技有限公司;

离心机:KH19A 型,浙江恒岳仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 白藜芦醇提取 将葡萄皮渣洗净后置于恒温箱中于 45 °C 烘干,粉碎后过 40 目筛。向粒度小于 40 目的 5 g 葡萄皮渣干粉中加入体积分数为 60% 的乙醇—水溶液 100 mL,按照试验设计加入不同质量分数的纤维素酶,调节 pH 值为 5.0 后置于数控超声水浴锅中,在设定的温度和功率下采用间歇的方式提取一定时间(每超声 2 min,停止 2 min,计算超声累计时间),离心分离(4 000 r/min)、60 °C 蒸发浓缩至无液体,再用 5 mL 甲醇

溶解,过有机滤膜后蒸发浓缩。

为了进行比较分析,分别采用单独酶法(无超声波辅助)和持续超声波法(无纤维素酶)进行提取,其他工艺条件(pH 值、时间、温度等)与间歇式超声波辅助酶法的相同。

1.2.2 试验设计 在探索性试验的基础上,以白藜芦醇得率为考察指标,分别以超声波功率、超声累计时间、酶解温度、酶液用量 4 个因子进行单因素试验,考察其对白藜芦醇得率的影响。

(1) 超声波功率和累计处理时间:在酶解温度为 55 °C,酶液用量为 1.4% 的条件下,考察超声波功率(200, 250, 300, 350, 400 W)和超声累计时间(40, 50, 60, 70, 80, 90 min)对白藜芦醇得率的影响。

(2) 酶解温度和酶液用量:在超声波功率为 300 W,超声累计时间为 60 min 的条件下,考察酶解温度(40, 45, 50, 55, 60, 65 °C)和酶液用量(0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.4%, 1.6%)对白藜芦醇得率的影响。

(3) 在单因素试验的基础上选取对得率影响较大的因素进行响应面试验。

1.2.3 得率测定与计算 称取干燥至恒重的白藜芦醇标准品 20 mg,用甲醇—水溶液($V_{甲醇} : V_{水} = 60 : 40$)溶解并定容至 10 mL,配制成 2 mg/mL 的标准液,低温保存。用标准液配制成质量浓度分别为 2.5, 5.0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$ 的白藜芦醇溶液,采用 HPLC 法测定各标准溶液的吸光度,色谱柱为 CNW Athena C₁₈-WP,流动相为乙腈—水($V_{乙腈} : V_{水} = 70 : 30$),流量 1 mL/min,柱温 28 °C,进样量 20.0 μL ,检测波长 306 nm。通过测定所提取物的吸光度,按式(1)计算白藜芦醇的得率。

$$Y = \frac{m \times V_2 \times D}{1\ 000 \times G \times V_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——白藜芦醇的得率, %;

m——标准样品液吸光度值对应的白藜芦醇的质量, μg ;

V_1 ——取样体积, mL;

V_2 ——样品液体积, mL;

G——样品称取的质量, g;

D——样品溶液的稀释倍数。

1.2.4 基本性能表征 使用扫描电镜、傅里叶红外光谱、X-射线衍射分析仪和差示扫描量热分析仪对所提取白藜芦醇的微观形貌、晶相结构、官能团以及热分解性能进行分析。

1.2.5 抗氧化能力检测 白藜芦醇的抗氧化性能通过测定吸光度来进行评价,参照文献[17]中的方法对 DPPH·、ABTS· 和总抗氧化性能进行测定。参照文献[18]中的方法对白藜芦醇的·OH 抗氧化能力进行测定。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 超声波功率与超声累计时间的影响 如图 1 所示:随着超声累计时间的增加,白藜芦醇得率不断升高,但大部分在累计时间超过 60~70 min 后增幅减缓,部分甚至出现下降的趋势,其中 300,350 W 时的得率相对较高,且 300 W 试样在累计时间为 60~70 min 时得率达到了最高(0.253%~0.256%)。这可能是因为超声波的空化作用导致葡萄皮渣细胞破碎而使有效成分溶出所致^[19],而较大功率的超声波能够加快这种作用,故在提取初期和大功率超声波的作用下胞内的白藜芦醇溶出较多。同时,超声波的长时间空化作用也易加速活性成分的氧化^[15,20],故超声波功率较大(如 400 W)和超声累计时间较长(如 90 min)时均易导致得率下降。在试验条件下,当超声波功率为 300 W、超声累计时间为 60 min 时,白藜芦醇的得率较高(0.253%)。因此,后续将以此为基础进行试验分析。

使用 SPSS 软件进行单因素方差分析,结果(表 1)表明,超声累计时间和超声波功率对白藜芦醇得率的影响非常显著; $R^2=0.936$,表明反应体系的稳定性好。

2.1.2 酶解温度和酶液用量的影响 如图 2 所示:白藜芦醇得率随着酶液用量的增加而增加。同时,随着酶解

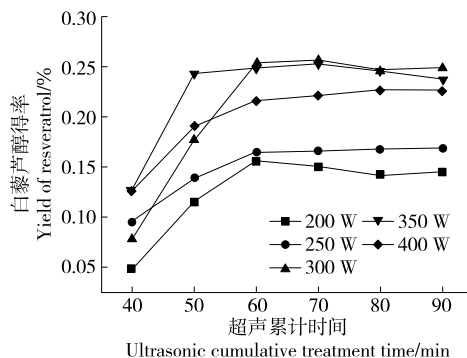


图 1 超声波功率和累计处理时间对白藜芦醇得率的影响
Figure 1 Effects of ultrasonic power and cumulative treatment time on res yield

温度的升高,得率也逐渐增加,大部分在 50~60 °C 附近达到最高,其中酶液用量为 1.4% 时的得率最高,在 55 °C 时达到了 0.258%;但当温度继续升高得率反而降低,可能是由高温导致部分纤维素酶失去活性以及在较高温度下白藜芦醇氧化分解所致^[21]。因此,合理地控制酶解温度(55 °C)、超声累计时间(60 min)与酶液用量(1.4%)有利于白藜芦醇的溶出。

使用 SPSS 软件进行单因素方差分析,结果(表 2)表明,酶解温度和酶液用量对白藜芦醇得率的影响非常显著; $R^2=0.947$,表明反应体系的稳定性好。

表 1 超声波功率与超声累计时间对白藜芦醇得率影响的方差分析[†]

Table 1 Variance analysis of effect of ultrasonic power and time on res yield

| 源 | III 类平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|--------|--------------------|-----|-------|--------|-----------|-----|
| 修正模型 | 0.094 ^a | 9 | 0.010 | 32.409 | 5.25E-010 | ** |
| 超声累计时间 | 0.051 | 5 | 0.010 | 31.488 | 7.98E-009 | ** |
| 超声波功率 | 0.043 | 4 | 0.011 | 33.560 | 1.30E-008 | ** |
| 误差 | 0.006 | 20 | 0.000 | | | |
| 总计 | 1.096 | 30 | | | | |
| 修正后总计 | 0.100 | 29 | | | | |

[†] a 为 $R^2=0.936$ (调整后 $R^2=0.907$); ** 非常显著。

2.2 响应面试验

2.2.1 试验设计及结果 由单因素的分析可知,影响得率的因素主要有超声波功率、超声累计时间、酶解温度和酶液用量等。考虑到酶解较为温和而更有利于保持白藜芦醇的生物活性,因此在超声波功率为 300 W 的条件下,分别选取超声累计时间、酶解温度和酶液用量 3 个因素,以白藜芦醇得率为响应值,设计三因素三水平的响应面试验,如表 3 所示。

按照响应面的试验设计,进行 17 组试验,结果见表 4。

2.2.2 响应面结果分析 运用 Design-Expert 8.0.6 软件对数据进行二次多元回归拟合得到多元回归方程:

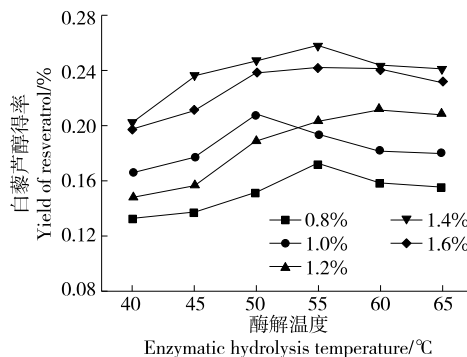


图 2 酶解温度和酶液用量对白藜芦醇得率的影响
Figure 2 Effects of enzymatic hydrolysis temperature and enzyme dosage on res yield

表 2 酶解温度和酶液用量对白藜芦醇得率影响的方差分析[†]

Table 2 Variance analysis of effect of enzymolysis temperature and enzyme dosage on res yield

| 源 | III类平方和 | 自由度 | 均方 | F值 | P值 | 显著性 |
|-------|--------------------|-----|-------|--------|-----------|-----|
| 修正模型 | 0.037 ^a | 9 | 0.004 | 39.741 | 1.20E-010 | ** |
| 酶解温度 | 0.007 | 5 | 0.001 | 14.258 | 5.02E-006 | ** |
| 酶液用量 | 0.030 | 4 | 0.007 | 71.594 | 1.21E-011 | ** |
| 误差 | 0.002 | 20 | 0.000 | | | |
| 总计 | 1.207 | 30 | | | | |
| 修正后总计 | 0.039 | 29 | | | | |

[†] a 为 $R^2=0.947$ (调整后 $R^2=0.923$); ** 非常显著。

表 3 响应面试验设计中的水平和编码

Table 3 Level and code of response surface experiment design

| 水平 | A 超声累计时间/min | B 酶解温度/°C | C 酶液用量/(U·g ⁻¹) |
|----|--------------|-----------|-----------------------------|
| -1 | 55 | 50 | 1.2 |
| 0 | 60 | 55 | 1.4 |
| 1 | 65 | 60 | 1.6 |

$$Y = -0.029A^2 - 0.014B^2 - 0.026C^2 + 0.016AB + 0.018AC + 0.0025BC + 0.036A + 0.018B - 0.038C + 0.26 \quad (2)$$

如表 5 所示:模型的 F 值为 9.60, $P=0.0035 < 0.01$, 非常显著;失拟项 $P=0.0511$, 不显著;复相关系数 $R^2=0.925$, 接近 1, 说明该方程拟合度好, 模型精度高。试验中的酶解温度、超声累计时间和酶液用量的交互作用对反应体系有显著影响。

表 4 响应面试验结果

Table 4 Results of response surface experiment

| 序号 | A | B | C | 得率/% | 序号 | A | B | C | 得率/% |
|----|----|----|----|-------|----|---|----|----|-------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 0.211 | 10 | 0 | 1 | -1 | 0.225 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 0.223 | 11 | 0 | -1 | 1 | 0.238 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 0.207 | 12 | 0 | 1 | 1 | 0.278 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 0.284 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0.272 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 0.221 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0.281 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 0.212 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0.265 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 0.191 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0.269 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 0.253 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0.282 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 0.195 | | | | | |

表 5 模型与方差[†]

Table 5 Model and variance

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F值 | P值 | 显著性 |
|----------------|-----------|-----|-----------|-------|--------|-----|
| 模型 | 0.16E-002 | 9 | 1.80E-003 | 9.60 | 0.0035 | ** |
| A | 3.36E-003 | 1 | 3.36E-003 | 17.97 | 0.0038 | ** |
| B | 9.00E-004 | 1 | 9.00E-004 | 4.81 | 0.0643 | |
| C | 1.37E-003 | 1 | 1.37E-003 | 7.34 | 0.0302 | * |
| AB | 1.06E-003 | 1 | 1.06E-003 | 5.65 | 0.0491 | * |
| AC | 1.26E-003 | 1 | 1.26E-003 | 6.74 | 0.0356 | * |
| BC | 2.50E-005 | 1 | 2.50E-005 | 0.13 | 0.7254 | |
| A ² | 3.46E-003 | 1 | 3.46E-003 | 18.48 | 0.0036 | ** |
| B ² | 8.14E-004 | 1 | 8.14E-004 | 4.35 | 0.0754 | |
| C ² | 2.82E-003 | 1 | 2.82E-003 | 15.10 | 0.0060 | ** |
| 残差 | 1.31E-003 | 7 | 1.87E-004 | | | |
| 失拟项 | 1.09E-003 | 3 | 3.62E-004 | 6.50 | 0.0511 | 不显著 |
| 纯误差 | 2.23E-004 | 4 | 5.57E-005 | | | |

[†] * 表示影响显著 ($P < 0.05$), ** 表示影响非常显著 ($P < 0.01$); 复相关系数 $R^2=0.925$ 。

根据回归方程(2)和表 5 可知,AB 和 AC 的 P 值 < 0.05,即超声累计时间分别与酶解温度和酶液用量具有交互作用,且二次项 A^2 和 C^2 的系数为负值,表明回归方程可求解最大值,即有最高得率。

由图 3(a)可知,在合适的酶解温度和超声累计时间下,得率可达到峰值,但随着酶解温度的提高和超声累计时间的延长得率反而降低。这是因为较高的温度和较长的时间会使部分酶液失活,且易导致提取物氧化与分解。由图 3(b)可知,在一定的酶解温度条件下,得率随着酶液用量的增加而提高,但达到峰值后降低。这可以解释为:当酶液用量不足时,酶解不彻底;而酶液用量较多时,一方面过剩的酶液不参与反应;另一方面,反应体系中过多的酶液所产生的抑制作用也将影响白藜芦醇的析出^[11]。因此,合理地控制酶解温度、超声累计时间与酶液用量有

利于反应体系中白藜芦醇的溶出。与图 3(a)和图 3(b)相比,图 3(c)中由酶解温度和酶液用量构成的 3D 曲面的变化较小,表明其对得率的影响不明显。同时,从表 5 可知,交互项 BC 的 $P > 0.05$,不显著。由此可见,酶液用量和酶解温度对白藜芦醇得率的影响相对较小。

通过对提取工艺进行优化,得到最佳的工艺参数为:超声累计时间 43.46 min、酶解温度 57.27 °C、酶液用量 1.28%,白藜芦醇的预测得率为 0.284%。为了验证该优化工艺的稳定性,在超声波功率为 300 W、缓冲液 pH 值为 5.0 的条件下,分别选取超声累计时间 43 min、酶解温度 57 °C 和酶液用量 1.3% 进行 3 次验证实验,白藜芦醇平均得率为 0.293%,高于表 4 中的最高得率,与模型预测值接近,说明所建立的回归模型对试验具有较好的指导作用。

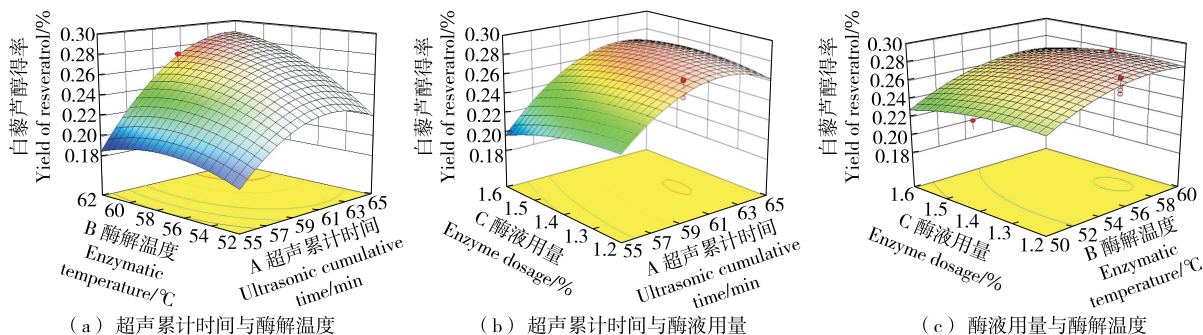


图 3 响应面 3D 图

Figure 3 Response surface 3D diagram

2.3 不同提取工艺得率对比分析

基于优化后的工艺条件,按照 1.2.1 中的提取方法进行试验,对单独酶法(酶液用量 1.3%,酶解温度 57 °C、酶解时间 86 min)、持续超声波法(功率 300 W、超声累计时间 86 min,无酶液)及间歇式超声辅助纤维素酶法的提取得率进行比较,结果见表 6。由表 6 可知,单独酶法、持续超声波法所提取白藜芦醇的得率均小于间歇式超声辅助纤维素酶法。这是因为在试验条件下,超声波进行间歇式处理,可以降低因单次长时间处理所引起的温度升高而导致白藜芦醇的氧化;而多次短时间超声脉冲处理,加上纤维素酶的作用,更容易充分发挥两者各自的优势,形成协同效应。

表 6 不同提取方式白藜芦醇的得率

Table 6 Resveratrol yield of different extraction methods

| 提取方式 | 得率/% | 备注 |
|--------------|-------|--------------------------|
| 单独酶法 | 0.124 | 无超声波,酶解时间 86 min |
| 持续超声波法 | 0.153 | 无纤维素酶,提取时间 86 min |
| 间歇式超声辅助纤维素酶法 | 0.293 | 超声时间 43 min,总提取时间 86 min |

2.4 基本性能表征

由图 4(a)可知,在试验条件下提取的白藜芦醇粉末呈片状与四面体结晶状,粒径在 50 μm 左右。同时,图 4(b)中的 FTIR 光谱显示:在 833,680,615,513 cm^{-1} 处有表征 C-H 反式双振动吸收峰;在 965 cm^{-1} 处出现了表征反式 C=C 的振动吸收峰;而表征苯环骨架振动吸收峰则出现在 1 583,1 521,1 451 cm^{-1} 处;同时,在 3 360 cm^{-1} 附近有表征 -OH 伸缩振动吸收峰的宽带峰出现,这些均表明所提取的白藜芦醇含有丰富的活性基团。图 4(c)中的 XRD 图谱显示,在 6.4°,13.3°,16.2°,19.3° 等处有尖锐峰出现,说明存在有序的晶体结构,与文献[22]的结论吻合。此外,图 4(d)中的 DSC 图谱显示,在 270.2 °C 附近呈现出尖锐的吸热峰,与白藜芦醇本身的热分解温度相吻合^[23],进一步证实了所提取的物质为白藜芦醇。

2.5 抗氧化性分析

将试验条件下所得到的白藜芦醇与单独酶法提取和持续超声波法提取的试样对部分自由基清除能力和总抗氧化能力进行对比分析。

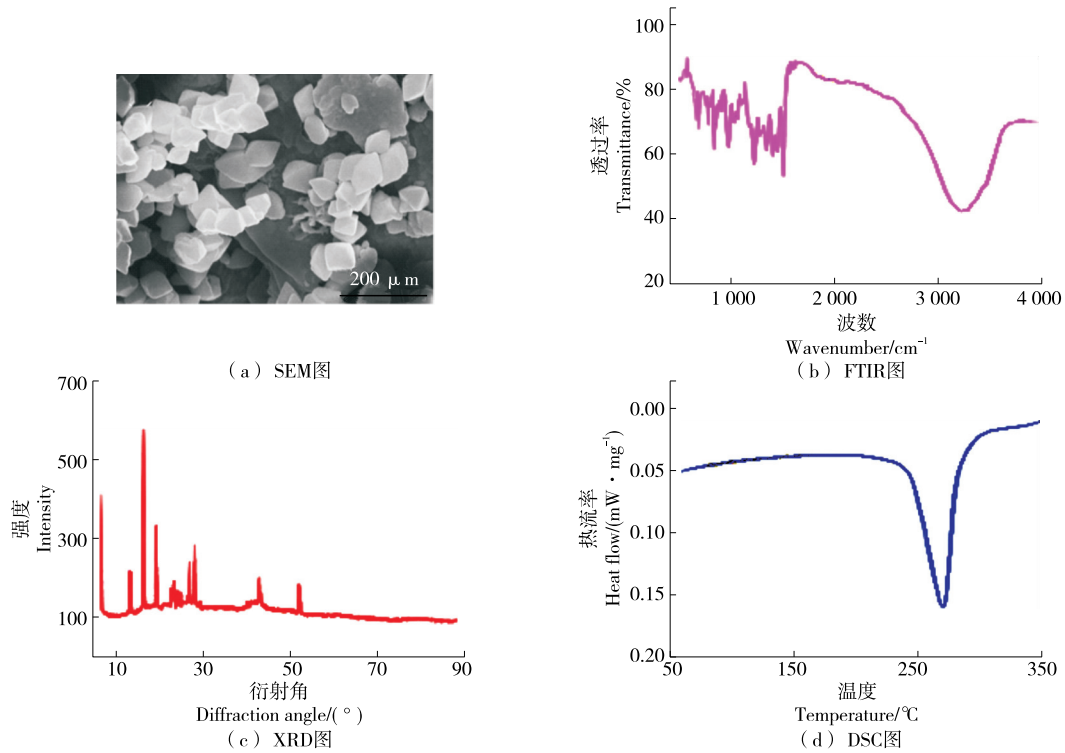


图 4 白藜芦醇粉末的 SEM、FTIR、XRD 和 DSC 图

Figure 4 SEM image and FTIR, XRD, DSC curves of res

2.5.1 对 DPPH· 的清除能力 如图 5 所示:3 种方法提取的白藜芦醇对 DPPH· 的清除率均随着质量浓度的增加而逐渐增加,其中采用间歇式超声波辅助酶法提取的白藜芦醇的效果最好,当质量浓度达到 4.5 mg/mL 时,对 DPPH· 的清除率达到 98.7%,而单独酶法与持续超声波提取的白藜芦醇对 DPPH· 虽然有一定的清除作用,但相比之下清除率要低很多,两者中最高也只有 78.5%,相差近 20%。

2.5.2 对 ABTS· 的清除能力 如图 6 所示:超声波辅助酶法获取的白藜芦醇在质量浓度较低(1.5 mg/mL)时对 ABTS· 的清除率为 94.7%,随着质量浓度的增加清除率

减缓。而单独酶法提取的在 1.5 mg/mL 时的清除率为 78.1%,即使在 4.5 mg/mL 时也只有 82.6%;持续超声波法的在 1.5 mg/mL 时的清除率则更低,仅有 58.2%,说明间歇式超声波辅助酶法提取的白藜芦醇具有较好的活性,在低浓度时对 ABTS· 有较好的清除效果。

2.5.3 对 ·OH 的清除能力 如图 7 所示:在试验范围内,对 ·OH 的清除能力随着质量浓度的增加逐渐增强。其中超声波辅助酶法提取的白藜芦醇对 ·OH 的清除率在质量浓度为 2.0 mg/mL 时达到了 73.7%,且在 18.0 mg/mL 时高达 97.3%,但单独酶法与持续超声波法的分别只有 71.3%和 51.7%,效果差异较大。

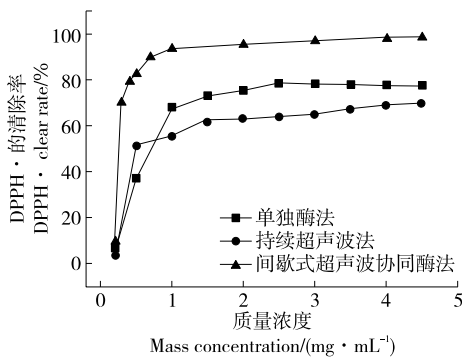


图 5 不同工艺提取的白藜芦醇对 DPPH· 的清除效果
Figure 5 The scavenging effect of resveratrol extracted by different processes on DPPH·

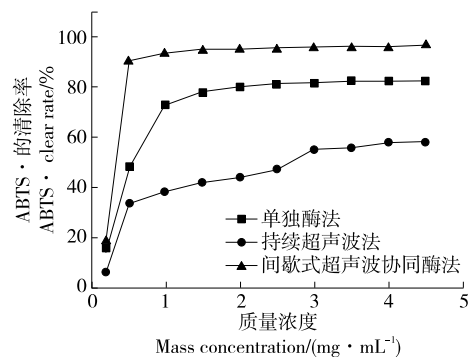


图 6 不同工艺提取的白藜芦醇对 ABTS· 的清除效果
Figure 6 The scavenging effect of resveratrol extracted by different processes on ABTS·

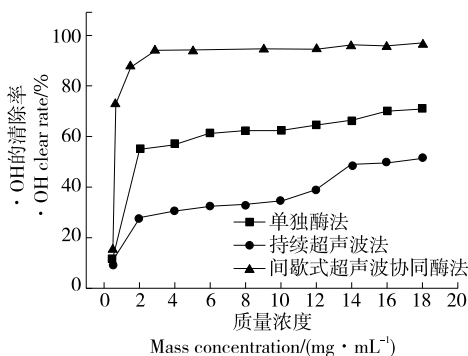


图 7 不同工艺提取的白藜芦醇对 ·OH 的清除效果

Figure 7 The scavenging effect of resveratrol extracted by different processes on ·OH

2.5.4 总抗氧化能力评价 如图 8 所示:总体上随着白藜芦醇质量浓度的增加吸光度不断增加,表明总抗氧化能力逐渐增强。但使用间歇式超声波辅助酶法提取白藜芦醇的吸光度最高,当质量浓度为 9.0 mg/mL 时达到了 2.23,均高于单独酶法与持续超声波法提取的样品。可见采用间歇式超声波辅助酶法提取的白藜芦醇具有较好的生物活性。

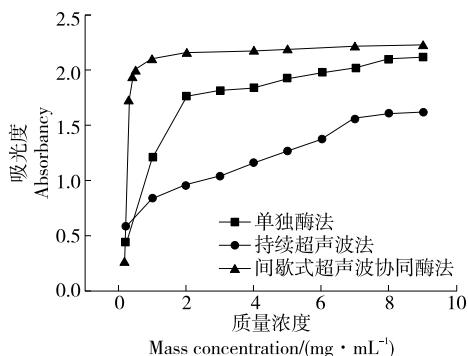


图 8 不同工艺提取的白藜芦醇的总抗氧化能力

Figure 8 Comparison of total antioxidant properties of resveratrol extracted by different processes

上述结果表明,采用间歇式超声波辅助酶法提取的白藜芦醇的抗氧化性能比单独使用一种方法提取的要高。这可以解释为:单独酶法提取时,由于酶解速度较慢,较长的提取时间易导致白藜芦醇的氧化与分解;使用持续超声波提取时,长时间连续超声波处理会使提取液的温度升高,同样易导致提取物氧化;而间歇式超声波处理则可以降低因单次长时间超声所引起的高温氧化。因此,在试验条件下多次短时间超声脉冲处理,加上纤维素酶的作用,更容易充分发挥超声波与纤维素酶各自的优势,形成协同效应。

3 结论

试验表明,酶解温度、酶液用量、超声累计时间和超

声波功率等工艺参数对白藜芦醇得率有较大影响。通过响应面试验对提取工艺进行优化后得率有明显提高,达到了 0.293%。所提取的白藜芦醇对 DPPH ·、ABTS ·和 ·OH 的清除能力均优于采用单独一种方法提取的试样。当白藜芦醇质量浓度为 9.0 mg/mL 时其吸光度达到了 2.23,显示出优异的抗氧化性能。综上,采用间歇式超声波辅助纤维素酶提取白藜芦醇,可在提高得率的同时改善抗氧化活性,后续将在间歇式超声波辅助双酶法的提取工艺等方面开展深入研究,以获取更高得率与活性。

参考文献

- [1] WANG J D, FU L N, WANG L T, et al. Simultaneous transformation and extraction of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* using acidic natural deep eutectic solvent[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 173: 114 140-114 148.
- [2] SARIYARACH T, SAKCHAI H, AMPORN S, et al. Resveratrol oligomers from roots of *Ampelocissus martini* Planch[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2022, 101: 104 393-104 401.
- [3] NIKITA K, RAMESH D, SUNIL B, et al. Enhancement of blood-brain barrier penetration and the neuroprotective effect of resveratrol[J]. *Journal of Controlled Release*, 2022, 346: 1-19.
- [4] 郭智东, 吴锦鸿, 赵雪, 等. 白藜芦醇对脓毒症血管内皮屏障功能的保护作用及其机制研究[J]. *中华危重症医学杂志*, 2021, 14(4): 281-289.
- [5] GUO Z D, WU J H, ZHAO X, et al. Protective effect and related mechanism of resveratrol on vascular endothelial barrier dysfunction in sepsis[J]. *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, 2021, 14(4): 281-289.
- [6] DANIEL R, ALEJANDRO M, SEBASTIÁN S M, et al. Resveratrol decreases the invasion potential of gastric cancer cells [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3 047-3 058.
- [7] 张华, 仇宏图, 高青山, 等. 复合酶法提取蓝莓皮渣中白藜芦醇的工艺及其分离提纯[J]. *安徽农业大学学报*, 2021, 48(6): 1 027-1 034.
- [8] ZHANG H, QIU H T, GAO Q S, et al. Extraction resveratrol process and fractionation from blueberry peel residue using multiple enzymes[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2021, 2021, 48(6): 1 027-1 034.
- [9] 崔霖, 朱建星, 张万忠, 等. 虎杖中白藜芦醇的提取工艺[J]. *沈阳师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 38(4): 365-371.
- [10] CUI L, ZHU J X, ZHANG W Z, et al. Extraction process of resveratrol from *polygonum Cuspidatum* Sieb et Zucc[J]. *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2020, 38(4): 365-371.
- [11] 王晓慧, 姚茂君, 陈怡君, 等. 超声辅助复合酶法提取莓茶多糖的工艺优化[J]. *食品与机械*, 2021, 37(11): 166-172.
- [12] WANG X H, YAO M J, CHENG Y J, et al. Research on extraction technology of *Ampelopsis grossdentata* polysaccharide by ultrasound-assisted enzymatic method[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(11): 166-172.

- [9] 取得蓉, 刘松奇, 熊坤艳, 等. 雪莲果叶总黄酮超声辅助酶法提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2011, 37(2): 179-185.
- JI D R, LIU S Q, XIONG K Y, et al. Ultrasonic enzymatic extraction of total flavonoids from *Saussurea involucre* leaves and its antioxidant capacity analysis[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(2): 179-185.
- [10] QU Y, YANG Z G, LI H, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction method for multi-element analysis of rice r[J]. *Food Analytical Methods*, 2021, 3: 1 549-1 555.
- [11] MARWAN M A, ADBULJALIL D S, LI J P. Enhancement of mass transfer intensification for essential oil release from *lavandula pubescence* using integrated ultrasonic-microwave technique and enzymatic pretreatment [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(2): 1 639-1 649.
- [12] 汪开拓, 马莉, 卢霞. 超声波辅助提取葡萄皮渣中白藜芦醇工艺的优化研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(3): 1 201-1 206.
- WANG K T, MA L, LU X. Study on process optimization of ultrasonic-assisted extraction of resveratrol from grape skin dreg[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 26(3): 1 201-1 206.
- [13] ZHOU L F, JIANG B, ZHANG T, et al. Ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction of resveratrol from the enzymatic hydrolysates of *Polygonum cuspidatum*[J]. *Food Bioscience*, 2019, 31(11): 100 442-100 451.
- [14] 黄兆翔, 庞道睿, 王卫飞, 等. 超声波辅助酶法提取花生红衣中白藜芦醇的工艺优化[J]. 中国油脂, 2022, 45(2): 122-126.
- HUANG Z X, PANG D R, WANG W F, et al. Optimization of extracting resveratrol from peanut skin by ultrasound-assisted enzymolysis[J]. *China Oils and Fats*, 2022, 45(2): 122-126.
- [15] 李晓静, 韩宗元, 穆雪姣, 等. 超声波法提取香蕉皮单宁及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(24): 120-123.
- LI X J, HAN Z Y, MU X J, et al. Ultrasonic extraction of tannin from banana peel and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(24): 120-123.
- [16] O'SULLIVAN J, MURRAY B, FLYNN C, et al. Comparison of batch and continuous ultrasonic emulsification processes [J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 167: 114-121.
- [17] 李嘉欣, 孟斌斌, 朱凯. 樟树叶精油组成分析及抗氧化活性研究[J]. 林产化学与工业, 2020, 40(1): 84-90.
- LI J X, MENG B B, ZHU K. Components and antioxidant activity of camphor leaves essential oil [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2020, 40(1): 84-90.
- [18] 贺银菊, 张旋俊, 杨再波, 等. 响应面优化艾叶多酚提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2020, 45(6): 278-284.
- HE Y J, ZHANG X J, YANG Z B, et al. Antioxidant activity and optimization of extraction of polyphenols in the *artemisia argyi* by response surface methodology [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(6): 278-284.
- [19] 王慧娟, 吴正奇, 黄梦萍, 等. 乙醇预处理水酶法提取牡丹籽油的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(12): 135-137.
- WANG H J, WU Z Q, HUANG M P, et al. Optimization of ethanol pretreatment of aqueous enzymatic extraction of peony seed oil[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(12): 135-137.
- [20] LIN J A, KUO C H, CHEN B Y, et al. A novel enzyme-assisted ultrasonic approach for highly efficient extraction of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 32: 258-264.
- [21] CARLOS S, NIEVES C, AGUSTÍN O, et al. Enzymatic extraction of pectin from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products using Celluclast® 1.5L[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 190: 43-49.
- [22] 邓姣, 刘鑫, 郑敏, 等. 静电纺丝制备白藜芦醇固体分散体及其性能[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 80-86.
- DENG J, LIU X, ZHENG M, et al. Preparation of resveratrol solid dispersion by electrospinning and its properties[J]. *Food Science*, 2021, 42(21): 80-86.
- [23] 肖卓峰, 赵艺楠, 刘建兰, 等. 非等温热分析法研究白藜芦醇及其苷的熔点、热稳定性及分解动力学[J]. 分析测试学报, 2015, 34(10): 1 119-1 125.
- XIAO Z B, ZHAO Y N, LIU J L, et al. Study on melting point, thermal stability and decomposition kinetics of resveratrol and piceid by the non-isothermal analysis[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2015, 34(10): 1 119-1 125.

(上接第 135 页)

- [10] 郝勇, 温钦华, 饶敏, 等. 基于便携式近红外光谱仪的食品接触性塑料鉴别[J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 124-127.
- HAO Y, WEN Q H, RAO M. Research on plastic material identification based on portable near infrared spectrometer [J]. *Food & Machinery*, 2018, 34(4): 124-127.
- [11] 祝诗平, 王一鸣, 张小超, 等. 近红外光谱建模异常样品剔除准则与方法[J]. 农业机械学报, 2004(4): 115-119.
- ZHU S P, WANG Y M, ZHANG X C, et al. Outlier sample eliminating criteria and methods for building calibration model of near infrared spectroscopy analysis[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2004(4): 115-119.
- [12] 刘翠玲, 胡玉君, 吴胜男, 等. 近红外光谱奇异样本剔除方法研究[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(5): 74-79.
- LIU C L, HU Y J, WU S N, et al. Outlier sample eliminating methods for building calibration of near infrared spectroscopy analysis[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 32(5): 74-79.
- [13] 卢涌泉, 邓振华. 实用红外光谱解析[M]. 北京: 电子工业出版社, 1989: 18-19.
- LU Y Q, DENG Z H. Practical infrared spectroscopy analysis[M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 1989: 18-19.
- [14] 许昆, 王菊琳, 何秋菊. 胶矾水中明矾对宣纸中纤维素、碳酸钙和明胶的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(6): 1 829-1 833.
- XU K, WANG J L, HE Q J. The influence of alum in alum gelatin solution on cellulose, calcium carbonate and gelatin in XUAN paper[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2018, 38(6): 1 829-1 833.