

鸢尾科红葱红色素的提取及抗氧化活性评价

黄建蓉¹, 李慕紫², 陈颖蕾¹, 温杰彬¹, 王志江¹, 王庆华^{3*}

1. 广东药科大学食品科学学院(中山 528453); 2. 广东药科大学中药学院(广州 510006);
3. 广东药科大学基础学院(广州 510006)

摘要 在单因素试验的基础上, 采用二次回归正交旋转组合试验对超声辅助提取鸢尾科红葱红色素的工艺条件进行优化, 并对红葱红色素粗提物的体外抗氧化活性进行评价。结果表明, 红葱红色素最优提取工艺条件为: 乙醇体积分数31%, 料液比1:54 (g/mL), 超声时间40 min; 在此条件下, 红葱红色素粗提物得率为17.97%。红葱红色素粗提物具有一定的还原能力、DPPH自由基清除能力和羟自由基清除能力, 其清除效果与市售红曲红色素接近, 清除能力与浓度之间呈现一定的量效关系。

关键词 红葱红色素; 二次回归正交旋转; 提取; 抗氧化活性

Extraction and Antioxidant Activity of Red Pigments from *Eleutherine americana*

Huang Jian-rong¹, Li Mu-zi², Chen Ying-lei¹, Wen Jie-bin¹, Wang Zhi-jiang¹, Wang Qing-hua^{3*}

1. School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University (Zhongshan 528453);
2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University (Guangzhou 510006);
3. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University (Guangzhou 510006)

Abstract Based on single factor experiment, quadratic regression orthogonal rotation combination design method was used to optimize the ultrasound-assisted extraction conditions of red pigments from *Eleutherine americana*. The antioxidant activity of the crude extraction was evaluated. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: ethanol concentration 31%, sample/solvent ratio 1:54 (g/mL) and ultrasonic time 40 min. Under the optimal conditions, the crude extract yield of red pigments from *Eleutherine americana* was 17.97%. The crude extraction exhibited moderate reducing capacity and radical scavenging activity on against 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and hydroxyl radical. Its radical scavenging effect was similar to that of monascus red pigments commercially available and the scavenging activity was proportional to the concentration of the extract.

Keywords red pigments from *Eleutherine americana*; quadratic regression orthogonal rotary method; extraction; antioxidant activity

鸢尾科红葱 (*Eleutherine americana* Merr.) 和人们熟知的蔬菜葱科葱属植物红葱 (香葱) (*Allium ascalonicum* L.) 的鳞茎外形、颜色相近, 且名称类似, 二者容易被混淆。鸢尾科红葱原产于西印度群岛、美洲等地, 云南民间引入栽培, 是云南省各民族常用草药, 其化学成分具有多种生理活性^[1-2], 其在食品中的应用也有尝试^[3-5]。红葱红色泽纯正柔和, 作为天然红色素的来源具有一定的开发前景。试验对超声辅助提取红葱红色素的工艺条件进行优化, 并评价色素抗氧化活性, 可为新型天然红色素的开发供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

红葱, 广州白云华南生物科技有限公司; 红曲红色素, 广东天益生物科技有限公司; 所用化学试剂均为分析纯。

SB-25-12DT超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; R-1001-V/VN旋转蒸发器, 郑州长城科工贸有限公司; SHB-III型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; HH-ZK8恒温水浴箱, 巩义市予华仪器有限责任公司; DGX-9053B-2烘箱, 上海福玛实验设备有限公司; TU-1901双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 红葱红色素的提取

1.2.1 提取溶剂的选择

鲜红葱鳞茎干燥粉碎过40目筛后, 按1:10 (g/mL) 的料液比在具塞试管中分别加入蒸馏水、甲醇、50%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯和石油醚, 浸提过夜, 观察浸提液颜色, 选择红色纯正自然的作为浸提溶剂。

1.2.2 红葱红色素提取

采用超声辅助提取, 选取提取剂浓度、料液比和超声时间做单因素试验, 在一定条件下提取后, 抽滤

*通讯作者; 基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A020208134)

得到滤液, 稀释至相当于料液比为1:200 (g/mL), 测定样液在450 nm处的吸光度, 以 $A_{450\text{ nm}}$ 评价提取效果, 吸光度越大则提取效果越佳。

1.2.2.1 单因素试验

1) 乙醇体积分数对提取效果的影响。在料液比为1:40 (g/mL), 超声时间为30 min的条件下, 考察当乙醇体积分数为15%, 35%, 55%, 75%和95%时, 对红葱红色素提取效果的影响。

2) 料液比对提取效果的影响。在乙醇体积分数为35%、超声时间为30 min的条件下, 考察当料液比为1:20, 1:30, 1:40, 1:50和1:60 (g/mL)时, 对红葱红色素提取效果的影响。

3) 超声时间对提取效果的影响。在乙醇体积分数为35%、料液比为1:40 (g/mL)的条件下, 考察当超声时间为10, 20, 30, 40和50 min时, 对红葱红色素提取效果的影响。

1.2.2.2 二次回归正交旋转组合设计优化试验

在单因素试验基础上, 采用三元二次回归正交旋转组合^[6-7]设计试验, 对提取工艺进行优化, 试验因素水平表见表1。试验结果用DPS 7.05软件进行统计分析。

表1 二次回归正交旋转组合试验因素水平编码值表

水平编码值	因素		
	X_1 乙醇体积分数/ %	X_2 料液比/ (g·mL ⁻¹)	X_3 超声时间/ min
1.682	38	1:60	50
1	31	1:56	46
0	25	1:50	40
-1	19	1:44	34
-1.682	15	1:40	30

1.3 红葱红色素抗氧化活性评价

根据1.2.2.2优化的工艺条件提取红葱红色素, 滤液经真空浓缩后, 在50 °C恒温干燥24 h, 得到红葱红色素粗提物。配制一系列不同浓度的红葱红色素溶液, 评价其抗氧化活性, 并与抗坏血酸、红曲红色素的抗氧化活性进行对比。

1.3.1 还原能力

在2.5 mL pH 6.6的磷酸盐缓冲液中加入红葱红色素溶液2.5 mL和1%的铁氰化钾溶液2.5 mL, 混合均匀后在50 °C恒温20 min, 冷却, 再加入2.5 mL 10%的三氯乙酸溶液, 静置10 min, 取上层清液5 mL, 加蒸馏水5 mL和0.1%三氯化铁溶液1 mL, 在700 nm处测定吸光度^[8-10]。吸光度越高, 还原能力越强。同法测定抗坏血酸、红曲红色素的还原能力。

1.3.2 DPPH·清除能力

取红葱红色素样液0.5 mL, 加入0.1 mmol/L DPPH·无水乙醇溶液2 mL, 用无水乙醇补足反应总体积至4 mL, 混匀, 40 °C恒温避光静置30 min。无水乙醇调

零, 于517 nm测定吸光度, 按公式(1)计算DPPH·清除率^[3, 10-11]。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 ——空白对照液的吸光度, 以蒸馏水代替样品液; A_1 ——样品组吸光度; A_2 ——色素溶液吸光度本底值, 由无水乙醇代替反应试剂。

同法测定抗坏血酸、红曲红色素清除DPPH·能力。

1.3.3 羟自由基清除能力

在试管中依次加入1 mL 9 mmol/L硫酸亚铁溶液、1 mL 9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液, 再加入1 mL 8.8 mmol/L H₂O₂溶液启动反应, 最后加入2 mL红葱红色素溶液, 以蒸馏水做参比, 于510 nm波长处测定吸光度, 按公式(2)计算羟自由基清除率^[9-13]。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 ——空白对照液的吸光度, 以蒸馏水代替样品液; A_1 ——样品组吸光度; A_2 ——色素溶液吸光度本底值, 由蒸馏水代替反应试剂。

同法测定抗坏血酸、红曲红色素清除羟自由基能力。

2 结果与分析

2.1 红葱红色素在不同极性溶剂中的溶解性

红葱中红色素在不同极性溶剂中的溶解性不同, 提取液颜色也不同, 在纯水、甲醇、50%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯和石油醚中的颜色分别呈橙红色、橙红色、红色、橙黄色、橙黄色、浅黄色和接近无色。随着溶剂极性的减小, 色素溶解度大大下降, 在极性稍强的溶剂中溶解度较大, 以乙醇-水溶剂中红色最为纯正。

2.2 红葱红色素提取单因素试验结果

2.2.1 乙醇体积分数对提取效果影响

由图1可知, 乙醇体积分数较低对红色素的溶出比较有利, 乙醇体积分数在15%~35%时提取效果较好。

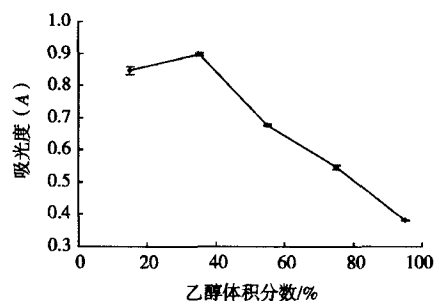


图1 乙醇体积分数对红葱红色素提取效果的影响

2.2.2 料液比对提取效果影响

由图2可知,随着液固比增加,红色素溶出增多,当料液比达到1:40(g/mL)时,提取效果较好,达到1:50(g/mL)时,红色素在提取剂中的溶解趋于平衡,色素基本上全部溶出。

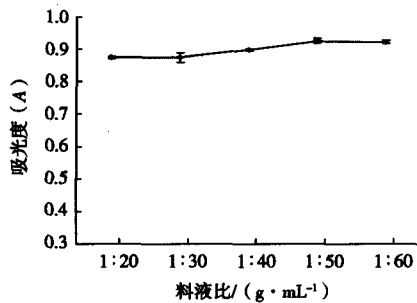


图2 料液比对红葱红色素提取效果的影响

2.2.3 超声时间对提取效果影响

由图3可知,随着超声时间延长,红色素溶出增多,40 min时达到峰值,50 min吸光度略有下降,超声提取时间过长有可能对红色素有一定破坏作用。

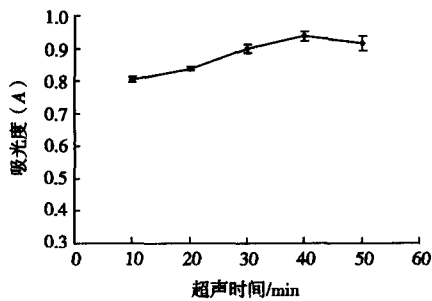


图3 超声时间对红葱红色素提取效果的影响

2.3 二次回归正交旋转组合设计优化试验

红葱红色素超声提取的二次回归正交旋转组合试验安排及试验结果见表2。

对试验结果进行三元二次回归拟合,由表3可知,对提取效果影响程度由大到小顺序为:乙醇体积分数>超声时间>料液比,其中乙醇体积分数影响极显著($p=0.0001$),料液比和超声时间的显著水平分别0.1486和0.1811。由于试验影响因素的多样性和不确定性,在回归正交试验设计的分析试验中,当某因素的显著水平达到0.25时,一般不要盲目将其淘汰^[7]。将未达到0.25以上显著水平的因素(或互作)剔除,得到回归方程: $Y=0.92328+0.02704X_1+0.00576X_2+0.00626X_3-0.01361X_1^2$ 。由表3方差分析结果可知,二次回归模型 $F=7.0903$, $p=0.003<0.05$,显著,失拟项 $F=1.3526$, $p=0.3037>0.05$,不显著,说明模型拟合结果良好,用该回归方程拟合3个因素与提取液吸光度之间的关系是可行的。且回归方程相

关系数 $R^2=0.9114$,说明该回归方程与实际数据之间拟合度良好,试验误差小。通过模型预测的最佳提取条件为:乙醇体积分数30.74%,料液比1:53.62(g/mL),超声时间40.11 min。考虑到实际可操作行,优化的工艺参数为:乙醇体积分数31%,料液比1:54(g/mL),超声时间40 min。模型预测值为0.940。在此条件下进行验证试验,提取液吸光度为0.938,与模型预测值接近。对滤液浓缩干燥后得到红葱红色素粗提物,得率为17.97 g/100 g红葱粉。

表2 二次回归正交旋转组合试验安排及试验结果

试验号	X_1 乙醇体积分数	X_2 料液比	X_3 超声时间	吸光度
1	1	1	1	0.934
2	1	1	-1	0.93
3	1	-1	1	0.921
4	1	-1	-1	0.912
5	-1	1	1	0.885
6	-1	1	-1	0.87
7	-1	-1	1	0.874
8	-1	-1	-1	0.84
9	-1.682	0	0	0.853
10	1.682	0	0	0.937
11	0	-1.682	0	0.921
12	0	1.682	0	0.925
13	0	0	-1.682	0.918
14	0	0	1.682	0.932
15	0	0	0	0.935
16	0	0	0	0.926
17	0	0	0	0.908
18	0	0	0	0.921
19	0	0	0	0.93
20	0	0	0	0.929
21	0	0	0	0.9
22	0	0	0	0.945
23	0	0	0	0.912

表3 回归方程方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	p值
X_1	0.01	1	0.01	43.937	0.0001
X_2	0.0005	1	0.0005	1.9971	0.1811
X_3	0.0005	1	0.0005	2.3579	0.1486
X_1^2	0.0029	1	0.0029	12.9436	0.0032
X_2^2	0.0002	1	0.0002	0.9605	0.3449
X_3^2	0.0001	1	0.0001	0.629	0.442
X_1X_2	0	1	0	0.055	0.8182
X_1X_3	0.0002	1	0.0002	0.7129	0.4138
X_2X_3	0.0001	1	0.0001	0.3168	0.5831
回归	0.0145	9	0.0016	7.0903	0.003
剩余	0.003	13	0.0002		
失拟	0.0014	5	0.0003	1.3526	0.3037
误差	0.0016	8	0.0002		
总和	0.0175	22			
R^2					0.9114

2.4 红葱红色素还原能力

由图4可以看出,红葱红色素的还原能力随着

浓度的增加而增强。在所研究的浓度范围内, 红葱红色素还原能力与浓度变化呈良好的线性相关关系 ($R^2=0.9955$)。总体上看, 红葱红色素还原能力与红曲红色素接近, 在较高浓度范围内, 比红曲红色素稍差, 二者还原能力远小于抗坏血酸。

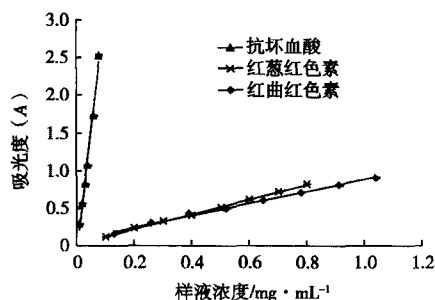


图4 红葱红色素还原能力

2.5 DPPH自由基清除能力

图5表明, 红葱红色素具备清除DPPH自由基的能力, DPPH自由基清除率随着浓度增加而增大。在一定浓度范围内, 红葱红色素、红曲红色素和抗坏血酸对DPPH自由基清除率与浓度之间的关系均服从线性分布, 以 y 表示DPPH自由基清除率, x 表示样液浓度, 线性回归方程和相关系数分别为 $y=0.7418x+0.0886$ ($R^2=0.9745$), $y=0.4869x+0.1679$ ($R^2=0.9982$) 以及 $y=19.88x+0.0475$ ($R^2=0.9798$)。据此可知, 三者的 IC_{50} 值分别为0.55, 0.68和0.02 mg/mL。可见, 在清除DPPH自由基的能力上, 红葱红色素略优于红曲红色素, 二者清除效果均弱于抗坏血酸。

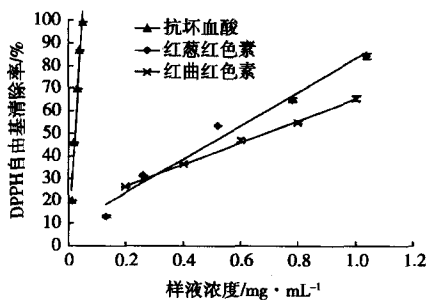


图5 红葱红色素对DPPH自由基的清除能力

2.6 羟自由基清除能力

由图6可知, 红葱红色素具备清除羟自由基的能力, 清除率随着浓度增加而增大。在较低浓度范围内, 红葱红色素羟自由基清除效果优于红曲红色素; 当质量浓度 >0.78 mg/mL时, 红曲红色素的羟自由基清除效果更优。两种天然的红色素对羟自由基清除能力均不如抗坏血酸。在一定浓度范围内, 红葱红色素、红曲红色素和抗坏血酸对羟自由基清除率与浓度之间的关系均服从线性分布, 以 y 表示羟自由基清除

率, x 表示样液浓度, 线性回归方程和相关系数分别为 $y=0.3083x+0.2132$ ($R^2=0.9989$), $y=0.5132x+0.0538$ ($R^2=0.9990$) 以及 $y=6.227x+0.0503$ ($R^2=0.9928$), 据此可知三者的 IC_{50} 值分别为0.93, 0.87和0.07 mg/mL。

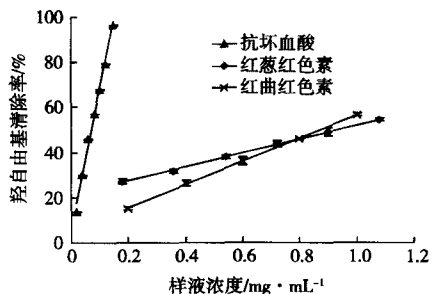


图6 红葱红色素对羟自由基的清除能力

3 结论

采用二次回归正交旋转组合试验对红葱红色素超声提取条件进行优化, 得到最优工艺条件为: 乙醇体积分数31%, 料液比1:54 (g/mL), 超声时间40 min。在此条件下提取液吸光度为0.938。对滤液浓缩干燥后得到红葱红色素粗提物, 得率为17.97%。抗氧化活性评价试验结果表明, 红葱红色素具有一定的还原能力、DPPH自由基清除能力和羟自由基清除能力, 与市售红曲红色素较为接近。作为天然红色素具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 王晓艺, 王庆华, 何云, 等. 红葱植物成分及生物活性研究现状[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(5): 39-42.
- [2] SARAGIH B, PASIAKAN M, SARAHEINI, et al. Effect of herbal drink plants Tiwai (*Eleutherine Americana* Merr) on lipid profile of hypercholesterolemia patients[J]. International Food Research Journal, 2014, 21(3): 1199-1203.
- [3] IFESAN B O T, SIRIPONGVUTIKORN S, HUTADILOK-TOWATANA N, et al. Evaluation of the ability of *Eleutherine americana* crude extract as natural food additive in cooked pork[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(7): 352-357.
- [4] ATCHARA N P, SUPAYANG P V. *Eleutherine americana* as a growth promotor for infant intestinal microbiota[J]. Anaerobe, 2013(20): 14-19.
- [5] ATCHARA N P, SUPHITCHAYA C, SUPAYANG P V. Applications of microencapsulated *Bifidobacterium Longum* with *Eleutherine Americana* in fresh milk tofu and pineapple juice[J]. Nutrients, 2015(7): 2469-2484.
- [6] 王潇, 吴佳佳, 张鹤, 等. 响应面法优化中华管鞭虾酸性电解水杀菌工艺[J]. 中国食品学报, 2015, 15(12): 107-114.
- [7] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 398-428.

鳊鱼鱼肉蛋白的酶解工艺及其产物抗氧化活性

李超

徐州工程学院食品工程学院 (徐州 221018)

摘要 在单因素试验的基础上,选择酶底物比、pH和酶解温度进行3因素3水平的Box-Behnken试验设计,采用响应曲面法分析3个因素对响应值的影响。结果表明:鳊鱼鱼肉蛋白碱性蛋白酶酶解的最佳酶解工艺参数为酶底物比4%,pH 8.4和酶解温度54.4℃,此时水解度为60.36%;鳊鱼鱼肉蛋白碱性蛋白酶酶解物在质量浓度81.7~245 μg/mL和9.8~245 μg/mL范围内,其对DPPH·和·OH的清除率分别为6.73%~71.93%和18.42%~78.32%,且都存在量效关系。

关键词 鳊鱼;蛋白;酶解;抗氧化活性

Enzymatic Hydrolysis of *Pelteobagrus fulvidraco* Protein and Antioxidant Activities of Its Hydrolysate

Li Chao

College of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology (Xuzhou 221018)

Abstract Based on single factor experiments, a three-factor and three-level Box-Behnken design coupled with response surface analysis was employed to probe the effects of enzyme concentration, pH value and enzymolysis temperature on the degree of hydrolysis. It was found that the best enzymolysis conditions of enzymatic hydrolysis of *Pelteobagrus Fulvidraco* protein were as follows: enzyme concentration 4%, pH value 8.4 and enzymolysis temperature 54.4℃, and that the degree of hydrolysis was 60.36% under such conditions. When the concentrations were 81.7~245 μg/mL and 9.8~245 μg/mL, the clearance rates of DPPH· and ·OH were 6.73%~71.93% and 18.42%~78.32% individually, and the scavenging activity was correlated with the concentrations.

Keywords *Pelteobagrus fulvidraco*; protein; enzymatic hydrolysis; antioxidant activities

生物活性肽不仅能提供人体生长发育所需的营养物质,而且具有特殊的生物学功能。目前,人们对生物活性肽的研究越来越关注,其制备主要通过酶法、发酵法等食品生物技术手段从天然动植物蛋白质中得到,具有易消化、抗氧化、无毒副作用及来源方便等优点^[1-6]。Soottawat^[7]研究了牙鳍的废弃物的利用,分别用中性蛋白酶和碱性蛋白酶水解,根据结果选出何种最佳酶和最佳水解条件下所得产物蛋白质含量高,氨基酸组成与鱼肌肉十分相近。Samaranayaka等^[8]研究了大洋鳊鱼用风味蛋白酶水解的酶解条件和水解物的抗氧化性。Yang等^[9]研究了军曹鱼皮凝胶在四种酶的水解条件下得到的水解产物的抗氧化性活性。丁利君

等^[10]优化出了枯草杆菌蛋白酶对鳊鱼肉蛋白行酶解的工艺参数。盘赛昆等^[11]筛选出了复合蛋白酶作为酶解鲤鱼肉制备具有清除羟自由基活性酶解物的水解酶。何建君^[12]以鱼的废弃物为原料,用酶水解蛋白质,恒温发酵研制了鱼露。熊光权等^[13]用胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶对鲢鱼进行水解,比较了它们对鲢鱼的水解效果,结果表明:胰蛋白酶水解效果好。游丽君等^[14]用不同酶水解泥鳅肉蛋白,优化出最佳工艺条件。周燕芳等^[15]研究木瓜蛋白酶水解罗非鱼蛋白质的工艺条件。鳊鱼鱼肉中含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素、矿物质等营养物质。为此,以鳊鱼鱼肉为原料,脱脂和碱提酸沉后首先优化碱性蛋白酶

[8] 段宙位,申铨日,李鹏,等.罗非鱼尾色素中抗氧化成分的提取及活性研究[J].食品工业科技,2012,33(10):144-146,150.

[9] 卫强,张国升,刘金旗,等.石楠叶红、绿色素成分比较及抗氧化活性研究[J].化学研究与应用,2014,26(12):1882-1886.

[10] 赵倩,王能飞,张梅,等.南极红色素与3种天然色素还原性和抗氧化性对比研究[J].食品研究与开发,2015,36(2):

117-120.

[11] 刘锴栋,袁长春,黎海利,等.圣女果果皮色素的提取及抗氧化活性研究[J].广东农业科学,2015(1):83-86.

[12] 黎海利,刘锴栋,袁长春,等.红肉火龙果果皮色素提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品与发酵工业,2014,40(12):203-209.

[13] 李斌,武晓雪,孟瑶瑶,等.信阳毛尖茶色素的超声提取及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2015,36(18):281-285.