

复合酶法提取蓝莓皮渣中白藜芦醇的工艺及其分离提纯

张 华¹, 仇宏图¹, 高青山¹, 王福超^{1,2*}

(1. 延边大学农学院, 延吉 133002; 2. 锡林郭勒职业学院, 锡林浩特 026000)

摘 要: 为提高蓝莓皮渣这一副产品的利用率, 通过冷冻干燥技术, 制得蓝莓皮渣粉末, 通过单因素试验确定复合酶比例、酶解温度、酶解时间、pH 值 4 个因素对蓝莓皮渣中白藜芦醇的含量的影响, 采用响应面优化得出最优提取条件, 并进行了 LC-18SPE 分离提纯。结果表明: 液相色谱-质谱法 (LC-MS) 结果显示蓝莓皮渣中大多为酯类物质和醛、酮类物质; 白藜芦醇最优提取条件为料液 (乙醇) 比 1:20 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 复合酶比例 (纤维素酶:果胶酶) 1:5, 酶解温度 54.62 $^{\circ}\text{C}$, 酶解时间 1 h, pH 值 5.38, 白藜芦醇提取含量最高为 $(236\pm 0.424)\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。利用乙酸乙酯分提含量最高达到 76.61%。

关键词: 蓝莓皮渣; 复合酶法; 白藜芦醇; 分离提纯

中图分类号: S58

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2021)06-1027-08

Extraction resveratrol process and fractionation from blueberry peel residue using multiple enzymes

ZHANG Hua¹, QIU Hongtu¹, GAO Qingshan¹, WANG Fuchao^{1,2}

(1. School of Agronomy, Yanbian University, Yanji 133002; 2. Xilingol Vocational College, Xilinhaote 026000)

Abstract: Blueberry peel power (BPP) was obtained by freeze-drying technology to improve the utilization rate of blueberry peel as a by-product. The contents of resveratrol from blueberry powder were determined by single experiments on the ratio of complex enzymes, enzymolysis temperature, enzymolysis time and pH values to explore the optimal conditions, and LC-18SPE was used to separate and purify BPP, which was mainly composed of esters, aldehydes and ketones. The optimal conditions for BPP extraction were based on the ratio of solid (BBP) to liquid (ethanol) of 1:20 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the ratio of compound enzyme (cellulase: pectinase) of 1:5, enzymolysis at 54.62 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h with pH value of 5.38, and the extraction rate of resveratrol content was $(236\pm 0.424)\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The fractionation content with ethyl acetate was up to 76.61%.

Key words: blueberry pericarp; combined-enzyme method; resveratrol; fractionation

白藜芦醇存在于多种植物中, 目前, 植物提取获得白藜芦醇的主要原料为虎杖、葡萄和蓝莓等。虎杖是传统的中药材, 加之虎杖资源面临萎缩, 提取成本较大^[1]。而葡萄中的白藜芦醇在各个组织间分布均不同, 在果皮和果梗中含量较多^[2]。蓝莓 (Blueberry) 又称蓝浆果、越橘, 俗称都市果, 属杜鹃花科越橘属植物, 果实呈蓝色, 含有丰富的营养成分^[3-4], 以及含有花青素、绿原酸、槲皮素等多种黄酮类化合物^[5-6], 亦含有白藜芦醇 (芪三酚) 这一含有芪类结构非黄酮类多酚化合物, 一般以白藜

芦醇糖苷和白藜芦醇两种主要形式存在。白藜芦醇是一种天然植物抗毒素, 其具有抗肿瘤、抗氧化、降血脂、抗病毒、抗炎、抗癌、抗衰老、抗血栓、保护血管等多种生物功能^[7-8], 这一物质被列为目前最有前景的抗心血管、抗癌活性物质。常用的白藜芦醇提取方法有溶剂提取法、超临界流体萃取、大孔树脂吸附分离法、微波辅助提取法等^[9]。溶剂提取法相比与其他方法有操作简单、成本低廉等优点, 但也存在得率低, 溶剂浪费严重等问题, 复合酶辅助乙醇提取能够有效提高溶剂利用率, 同时提高产

收稿日期: 2021-02-19

基金项目: 高等学校学科创新引智计划 111 项目 (D20034) 资助。

作者简介: 张 华, 博士。E-mail: zhanghua@ybu.edu.cn

* 通信作者: 王福超, 讲师。E-mail: 8618504799768@qq.com

物的得率。

张敏等^[10]的研究表明,从虎杖酶解液中萃取白藜芦醇可使得提取率大幅度提高,李婷等^[11]在葡萄皮渣中用酶法辅助乙酸乙酯浸提法提高白藜芦醇含量。虽然对于白藜芦醇的提取已经进行了广泛的研究,但是在蓝莓皮渣中进行提取分离研究甚少。

鉴于此,本试验使用复合酶乙醇辅助提取的方法,并通过 LC-18SPE 进行纯化,以提高白藜芦醇含量为目标,确定了最佳工艺参数及纯化溶剂,旨在为蓝莓皮渣这一副产品的深加工利用提供新思路,为白藜芦醇的资源开发提供指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试材料 新鲜蓝莓,长白山野生蓝莓;白藜芦醇 R107315-25 g, 纤维素酶 40 000 U·g⁻¹, 果胶酶 30 000 U·g⁻¹, 均为上海阿拉丁科技有限公司; 95%无水乙醇,天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备 往复式恒温震荡水浴培养摇床: LC-18SPE: Tubes3 mL 柱, 美国; 冷冻干燥机: FD-1C-50, 北京博医康实验仪器有限公司; 高效液相色谱仪: LC-2010A HT, 岛津企业管理(中国)有限公司; 气相色谱-质谱联用仪: 7890A/5975C, 美国 Agilent 公司; 紫外灯: WFH-204B, 杭州齐威仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 样品制备以及白藜芦醇的定性 将新鲜蓝莓榨汁, 过滤后将皮渣置于冷冻干燥盘中均匀薄层铺开, 并封膜, 在-80 ℃冰箱内冷冻 24 h 后, 迅速转移至冷冻干燥机中冷冻 48 h 后取出, 刮粉得初制样品, 于研钵中磨碎, 过 100 目筛, 制得样品备用。以供试品和白藜芦醇标准品对比, 用薄层层析法定性白藜芦醇^[12]。

1.2.2 液相色谱和质联连用(LC-MS)进行成分分析 采用液相色谱和质联连用(LC-MS)对蓝莓皮渣提取物进行分析。其分析条件如下所示: XR-OPS 色谱柱(50 mm×3.3 mm, 2.2 μm), 柱温 50 ℃, 进样量 20 μL, 以 0.5%的甲酸水溶液为流动相 A, 甲醇为流动相 B 进行梯度洗脱。电喷雾离子源(EIS), 扫描模式为正负离子模式并触发多级质谱, 正离子质谱采集范围(m/z)为 70~700, 负离子采集范围(m/z)为 70~500。质谱检测采用 ESI 正离子模式: 雾化气 55 psi, 辅助气 55 psi, 气帘气 40 psi, 喷雾电压 5 500 V, 离子化温度 550 ℃, 通过信息依赖性采集模(IDA)激活增强离子扫描(EPI)。一级质谱

主要条件为 DP, 80 V, CE, 10 eV, 采集范围 100~1 000; 二级质谱主要条件 IDA, DP, 80 V, CE, (30±20) eV, 采集范围 50~1 000。

1.2.3 提高蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的单因素试验 精确称量 0.50 g 冻干蓝莓皮渣粉末, 在料液比 1:20 (g·mL⁻¹), 酶解温度 50 ℃、pH 5.0 的条件下, 酶解 3 h^[13], 分别按纤维素酶:果胶酶(5:1、2:1、1:1、1:2 和 1:5)的比例添加复合酶 0.3%至蓝莓皮渣粉中^[14], 以白藜芦醇的含量为评价指标进行分析。根据纤维素酶和果胶酶最优比例结果, 在其他试验条件不变情况下, 采用不同酶解温度(40、45、50、55 和 60 ℃)探究酶解温度对白藜芦醇含量的影响。接着根据前两个条件最优结果, 在其他试验条件不变情况下, 采用不同酶解时间(1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 h)进行提取, 以酶解时间为横坐标, 白藜芦醇的含量为纵坐标作图, 分析酶解时间对白藜芦醇含量的影响。最后在不同 pH(3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0)下进行提取, 分析不同 pH 对白藜芦醇含量的影响。

1.2.4 提高蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的响应面优化影响试验的关键因素 主要是复合酶添加量、反应温度、反应 pH 值, 采用 Box-Behnken 实验原理, 通过响应面分析法进行三因素三水平的试验设计, 因素与水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 The factors and levels in orthogonal experiment			
因素	水平		
A	-1	0	1
B	-1	0	1
C	-1	0	1

A. 纤维素酶:果胶酶; B. 反应温度(℃); C. pH 值。

1.2.5 高效液相色谱测定白藜芦醇含量 色谱条件为液相色谱柱 Agilent TC-C18(2), 250×4.6 mm, 5 μm。采用低压色谱洗脱: 流动相 A: 甲醇, 流动相 B: 超纯水; 进样量 10 μL; 柱温 45 ℃; 检测波长 306 nm; 具体低压梯度洗脱程序参照 NY/T2641-2014。以白藜芦醇标准品绘制标准曲线, 以峰面积值为纵坐标, 白藜芦醇浓度为横坐标绘制标准曲线, 并计算得回归方程为 $Y = 2E + 0.8X + 102.64$, $R^2 = 0.9997$ 。白藜芦醇含量测定用如下公式:

$$X = \frac{C \times V \times F}{m} \times 100$$

其中: X 为试样中白藜芦醇的含量(mg·kg⁻¹); C 为试样溶液中白藜芦醇的浓度(mg·L⁻¹); V 为试

样定容体积 (mL); m 为试样质量 (g); F 为稀释倍数。

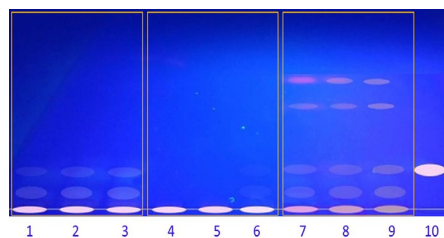
1.2.6 LC-18SPE 柱分离提纯样品中白藜芦醇 用体积 3~5 BV 纯水及乙醇 (95%) 依次冲洗 SPE 柱后, 将体积 5 BV 浓度 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提取液以流速 $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 上样通入 SPE 柱中, 依次用蒸馏水、体积分数分别为 30%、60%和 90%的乙醇及 100%的乙酸乙酯溶液依次洗脱, 测量流出液中白藜芦醇的浓度。

1.2.7 数据分析 所有数据均以独立试验的平均值 \pm 标准差来表示, 平行试验 3 次。采用 SPSS 22.0 进行试验数据分析, 当 $P < 0.05$ 时, 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 薄层层析定性

从图 1 中可以看出, 在紫外灯 (285 nm) 下观察白藜芦醇标品的 R_f 值为 0.117 6, 酸性条件提取蓝莓粉中检测出的两种物质, R_f 值分别为 0.058 9 和 0.117 6。冻干蓝莓粉中出现 4 种物质, R_f 值分别为 0.058 9、0.117 6、0.441 2 和 0.529 4。碱性条件提取蓝莓粉在此展开剂中未检测出白藜芦醇, 此结果证明白藜芦醇适应于酸性环境下提取。



1. 酸性条件纤维素酶提取物; 2. 酸性条件果胶酶提取物; 3. 酸性条件复合酶 (纤维素酶和果胶酶) 提取物; 4. 碱性条件纤维素酶提取物; 5. 碱性条件果胶酶提取物; 6. 碱性条件复合酶 (纤维素酶和果胶酶) 提取物; 7. 蓝莓皮渣冻干粉纤维素酶提取物; 8. 蓝莓皮渣冻干粉果胶酶提取物; 9. 蓝莓皮渣冻干粉复合酶 (纤维素酶和果胶酶) 提取物; 10. 白藜芦醇标准品。

图 1 购买的蓝莓粉不同条件下提取物中的白藜芦醇鉴定
Figure 1 Identification of resveratrol in blueberry extract under different extract conditions

2.2 冻干蓝莓粉提取物 LC-MS 分析

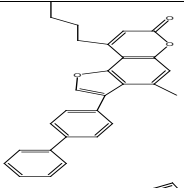
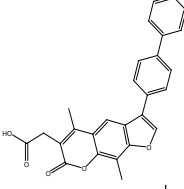
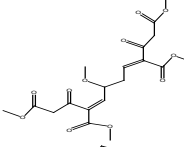
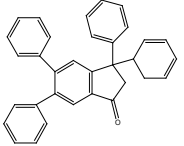
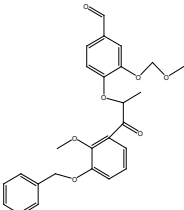
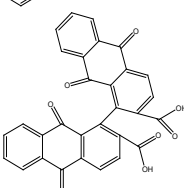
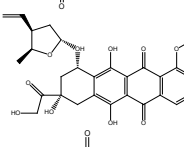
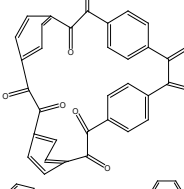
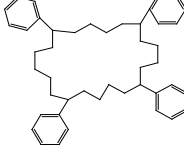
利用已经建立的 LC-MS, 结合高分辨率质谱 IT-TOF-MS 对蓝莓皮渣提取物进行分析, 结合相关文献和 chemspider 等数据库, 共分析 17 种化合物, 其中有 7 种为酯类物质、5 种酮类物质、2 种酸类物质、1 种烷烃类物质、1 种呋喃糖和 1 种醛类物质。其具体化合物鉴定见表 2。

表 2 蓝莓皮渣提取物化学成分

Table 2 Chemical constituents of blueberry extracts

序号	分子式	名称	结构式	最大荷质比 (m/z)	类别
1	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6$	Beta.-l-Rhamnofuranoside,methyl-5-O-acetyl- 1-(3,4-dihydroxy-5-methoxy)		221.100 9	糖苷类
2	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$	Methyl 9-phenylnonanoate		249.182 9	酯类
3	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$	(6R,8aS)-3,5,5-Trimethyl-8-methylene-1,2,4,5,6,7,8,8a-octahydro-6-azulenyl acetate		249.000 0	酯类
4	$\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{O}_5$	6-Oxo-6H-benzo[c]chromen-3-yl 4-methoxybenzoate		347.092 8	酯类
5	$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_6$	2-Benzofurancarboxylic acid, 3-(ethoxycarbonyl)-2-methyl-5-benzofuranylester		365.103 5	酯类
6	$\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{O}_3$	6-Benzyl-5-methyl-3-phenyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one		367.133 9	酮类
7	$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_6$	Benzyl {[[(2Z)-2-(2-furylmethylene)-3-oxo-2,3-dihydro-1-benzofuran-6-yl]oxy]acetate		377.103 8	酯类
8	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_5$	(2Z)-2-[(2E)-3-(2-Methoxyphenyl)-2-propen-1-ylidene]-3-oxo-2,3-dihydro-1-benzofuran-6-yl cyclohexanecarboxylate		405.170 5	酯类

续表 2

9	C ₂₈ H ₂₄ O ₃	3-(4-Biphenyl)-9-butyl-4-methyl-7H-furo[2,3-f]chromen-7-one		409.181 1	酮
10	C ₂₇ H ₂₀ O ₅	[3-(4-Biphenyl)-5,9-dimethyl-7-oxo-7H-furo[3,2-g]chromen-6-yl]acetic acid		425.139 5	乙酸
11	C ₁₉ H ₂₄ O ₁₁	Tetramethyl (3E,7Z)-5-methoxy-2,9-dioxo-3,7-decadiene-1,3,8,10-tetracarboxylate		429.134 5	酯类
12	C ₃₃ H ₂₄ O	3,3,5,6-Tetraphenyl-1-indanone		437.191 1	酮类
13	C ₂₆ H ₂₆ O ₇	4-(1-(4-(Benzyloxy)-3-methoxyphenyl)-1-oxopropan-2-yloxy)-3-(methoxymethoxy)benzaldehyde		451.175 5	醛类
14	C ₃₀ H ₁₄ O ₈	9,9',10,10'-Tetraoxo-9,9',10,10'-tetrahydro-1,1'-bianthracene-2,2'-dicarboxylic acid		503.076 6	酸类
15	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₁	(2S,3S,5S)-5-([(1S,3S)-3-Glycoloyl-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydro-1-tetracenyl]oxy)-2-methyltetrahydro-3-furancarbaldehyde		527.156 3	酯类
16	C ₃₂ H ₁₆ O ₈	Pentacyclo[20.2.2.24,7.210,13.216,19]dotriacont-1(24),4,6,10,12,16,18,22,25,27,29,31-dodecaene-2,3,8,9,14,15,20,21-octone		529.092 4	酮类
17	C ₄₆ H ₆₀	1,6,12,17-Tetraphenylcyclodocosane		613.476 5	烷烃类

2.3 单因素试验

2.3.1 复合酶比例的确定 由图 2 可知,随着果胶酶比例不断增加,蓝莓皮渣中白藜芦醇的含量逐渐增大,纤维素酶:果胶酶(1:5)时,蓝莓皮渣中白藜芦醇含量达到最大。说明复合酶中的果胶酶起决定作用。这是由于果胶酶促进细胞壁的网状结构被

破坏,从而使白藜芦醇不断的被溶出^[15-17]。预试验显示单独使用果胶酶蓝莓皮渣中白藜芦醇含量显著低于纤维素酶。Meini 等^[14]的研究结果表明纤维素酶和其他酶比例为 1:1 时进行提取,时效果最佳。因此,选取具有显著差异的纤维素酶:果胶酶(5:1)、(1:1)和(1:5)3个水平进行响应面设计。

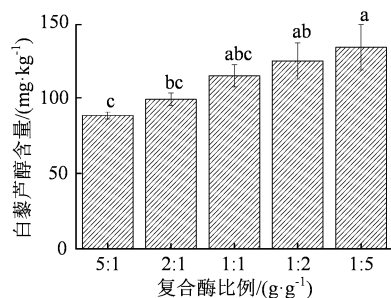


图 2 复合酶(纤维素酶:果胶酶)的比例对蓝莓皮渣白藜芦醇含量的影响

Figure 2 Effects of compound enzyme ratio (cellulose to pectinase) on resveratrol extraction rate

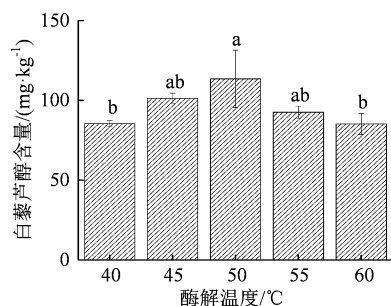


图 3 不同酶解温度对蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的影响

Figure 3 Effects of different enzymolysis temperature on resveratrol extraction rate

2.3.2 酶解温度的确定 由图 3 可知,随着反应温度的升高,蓝莓皮渣中白藜芦醇的含量呈现出先上升后下降的趋势,其中 50 °C 时得率最高。这是因为适宜的温度下,水分子运动活跃,有利于酶渗透底物而促进加快分解细胞壁。温度低于酶解最适温度效果差,而温度较高会导致提取物中的多酚类物质分解而致酶活变性,从而得率受到影响^[18-19]。又由于温度在 45、50 和 55 °C 时蓝莓皮渣中白藜芦醇含量差异不显著,综合考虑,选择 40、50 和 60 °C 3 个水平进行响应面设计。

2.3.3 酶解时间的确定 由图 4 可知,其中酶解 1 h 蓝莓皮渣中白藜芦醇含量与酶解 3 h 和 4 h 无显著性差异,并显著高于酶解 2 h 和 5 h 的含量。出现这种现象是由于反应开始时,底物浓度大,复合酶容易快速水解底物,使白藜芦醇含量增加而快速提高。亦有可能是此提取条件提取的活性物质之间发生了拮抗反应,白藜芦醇在此条件下先与复合酶结合反应析出,后续其他物质再与酶进行反应析出^[12]。酶解 3 h,可能反应完全,即此处白藜芦醇含量再次上升。为节省时间,又因为与其他单因素相比,蓝莓皮渣中白藜芦醇含量影响因素最小,故选择酶解时间为 1 h。

2.3.4 pH 值的确定 由图 5 可知,蓝莓皮渣中白藜芦醇的含量随着 pH 增大,呈现先上升后下降趋势,其中 pH 等于 6.0 时,蓝莓皮渣中白藜芦醇的含量达

到最大值,但与 pH 7 时无显著性差异。结合预实验中碱性条件下在蓝莓皮渣中未能提取白藜芦醇,且已知反式白藜芦醇含有酚羟基,在碱性条件下生成酚盐,从而改变白藜芦醇的结构^[20]。因此选择了 pH 5.0、6.0 和 7.0 共 3 个水平进行响应面设计。

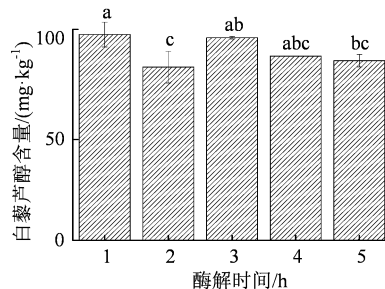


图 4 不同酶解时间对蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的影响

Figure 4 Effects of different enzymolysis time on resveratrol extraction rate

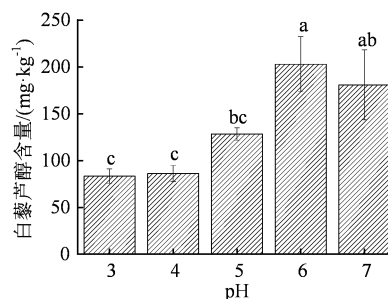


图 5 不同 pH 值对蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的影响

Figure 5 Effects of different pH values on resveratrol extraction rate

2.4 蓝莓皮渣中白藜芦醇响应面试验优化结果

各因素的相互关系以及相互作用程度可以通过响应面图来反映。对影响试验的关键因素(复合添加量、反应温度、反应 pH 值)进行研究,分别得到的结果见表 3,统计分析结果见表 4。

以含量为考核指标,通过试验结果分析各限制因素对蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的影响(表 4)。使用 Design Expert 软件进行二次响应面回归分析,得到多元二次响应回归方程:

$$Y = 156.38 + 3.97A + 23.23B + 15.76C + 34.87AB - 8.94BC$$

Y 为白藜芦醇含量预测值(mg·L⁻¹)。

表 4 显示,模型极显著($P < 0.01$),失拟项不显著($P > 0.05$),说明方程对试验拟合较好。分析各方差可得,因素 A、A²、AB 和 B²对白藜芦醇含量有极显著的影响($P < 0.01$),因素 AC 对白藜芦醇含量有显著的影响($P < 0.05$),因素 B、C、BC、C²对白藜芦醇含量影响不显著,说明 A、B、C 三个因素之间交互性作用明显。各因素对白藜芦醇含量的影响从大到小依次为 A(酶的比例) > B(反应温度) > C(酶解时间)。

表 3 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 3 Box-Behnken design and results

编号	复合酶比例 (A)	酶解温度 (B)	pH 值 (C)	白藜芦醇/(mg·kg ⁻¹)
1	-1	-1	0	147.80
2	1	-1	0	103.34
3	-1	1	0	167.00
4	1	1	0	235.00
5	-1	0	-1	134.63
6	1	0	-1	116.25
7	-1	0	1	161.00
8	1	0	1	214.58
9	0	-1	-1	128.06
10	0	1	-1	176.92
11	0	-1	1	146.63
12	0	1	1	159.73
13	0	0	0	167.80
14	0	0	0	175.21
15	0	0	0	112.62
16	0	0	0	144.74
17	0	0	0	170.21

表 4 模型分析方差结果

Table 4 Analysis of variance of quadratic polynomial regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P>F
A	14 072.55	1	14 072.55	120.69	<0.01**
B	322.58	1	322.58	2.77	0.140 2
C	3.32	1	3.32	0.028	0.870 9
A ²	3 362.88	1	3 362.88	28.84	0.001 0**
AB	3 258.70	1	3258.70	27.95	0.001 1**
AC	1 383.10	1	1 383.10	11.86	0.010 8*
B ²	2 788.92	1	2 788.92	23.92	0.001 8**
BC	7.10	1	7.10	0.061	0.812 1
C ²	455.32	1	455.32	3.90	0.088 7
模型	25 338.69	9	2 815.41	24.15	0.000 2**
失拟	662.95	3	220.98	5.77	0.061 8
纯误差	153.27	4	38.32		
残差	816.21	7	116.60		
总和	26 154.90	16			

注: *表示差异显著 (P<0.05) ; **表示差异极显著(P<0.01)。

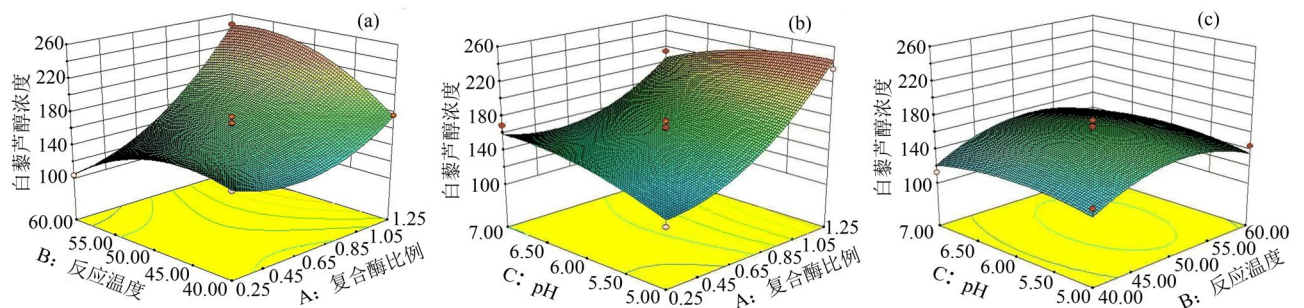
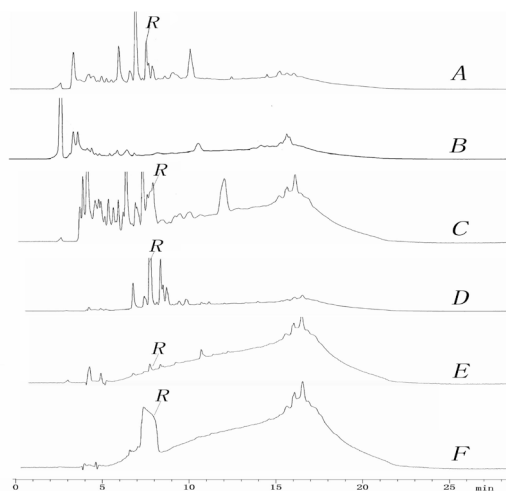


图 6 各因素交互结果对蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的综合评分影响的响应面图

Figure 6 Response surface plots showing the interactive effects of various factors on comprehensive evaluation



A. 最优条件的验证实验液相图; B. 纯水洗脱液相图; C、D和E分别为30%、60%和90%乙醇洗脱液相图; F. 乙酸乙酯洗脱液相图; R. 白藜芦醇的峰。

图 7 LC-18SPE 液相提纯图

Figure 7 LC-18SPE liquid extraction diagram

通过观察响应面的变化(图6),可以更加清晰地观察两因素之间交互作用对白藜芦醇含量的影响。当复合酶比例一定时,蓝莓皮渣中白藜芦醇的含量随着温度的升高,呈现出先增大后减小的趋势。

由图6(a)可知,酶解pH 5时,反应温度与复合酶比例对蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的交互作用。反应温度一定时,随着果胶酶比例的增大,白藜芦醇的含量逐渐增大;复合酶比例一定时,随着提取温度的升高,白藜芦醇含量逐渐升高,达到一定值后降低。

由图6(b)可知,酶解温度为50℃时,酶解pH与复合酶比例的交互作用。pH一定时,蓝莓皮渣中白藜芦醇含量随着果胶酶比例的升高呈逐渐上升的趋势;复合酶比例一定时,白藜芦醇含量随着pH增大呈先上升后降低的趋势。

由图6(c)可知,复合酶比例(纤维素酶:果胶酶1:5)时,酶解pH与反应温度对蓝莓皮渣中白藜芦醇含量的交互作用。当pH一定时,白藜芦醇含量随温度升高呈先上升后降低的趋势;提取温度一定时,随着pH的升高,白藜芦醇含量呈先升高后降低的趋势。

通过Box-Behnken得到最高的优化组合为:酶的比例(纤维素酶:果胶酶=1:5(g·g⁻¹))、反应温度54.62℃、pH 5.38。根据结论,进行验证实验,结果测得,蓝莓皮渣中白藜芦醇含量为(236±0.424)mg·kg⁻¹,与预测结果值相近。三因素之间交互性作用对蓝莓皮渣中白藜芦醇的含量影响显著,通过观察,响应面分析结果与单因素结果趋势一致。验证

实验结果与模型预测理论值无显著差异。说明该工艺准确性良好,提取工艺稳定可靠。

2.5 提取物中白藜芦醇纯化分析

白藜芦醇(白藜芦醇苷)的动态脱附试验结果如图7所示。洗脱顺序依次为蒸馏水、30%乙醇、60%乙醇、90%乙醇及乙酸乙酯溶液,LC-18SPE提纯白藜芦醇分别为C(9.54%)、D(10.48%)、E(9.08%)和F(76.61%),B无R峰是因为蒸馏水只能除去其中糖类、蛋白质和易溶性杂质。F分提率最好是因为流动相极性降低,白藜芦醇在此流动相中的分配比增大而易脱附。

3 结论

目前用于提取白藜芦醇的酶主要有纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶等。酶法提取产品安全性高,生产条件温和,但由于细胞壁成分复杂,选用单一的酶往往不能达到很高的提取效率,因此根据不同细胞壁成分选用合适的复合酶对提取率非常关键。提取白藜芦醇的溶剂提取法有水提法、碱溶酸沉和有机溶剂法。由于白藜芦醇较难溶于水,易溶于有机溶剂,一般的水提法提取效率较低。本研究以蓝莓皮渣为原料,采用复合酶辅助乙醇提取蓝莓皮渣中的白藜芦醇,在单因素试验基础上通过响应面分析法,确定了复合酶辅助乙醇提取蓝莓皮渣中的白藜芦醇的最佳工艺条件为:料液(乙醇)比1:20(g·mL⁻¹),复合酶比例(纤维素酶:果胶酶)1:5,酶解温度54.62℃,酶解时间1h,pH值5.38。在此条件下,蓝莓果皮中白藜芦醇得率为(236±0.424)mg·kg⁻¹。各因素对蓝莓果皮中白藜芦醇提取效果影响的主次顺序为:酶的比例>反应温度>酶解时间,比较了几种有机溶剂分离提纯结果,提取率由低到高依次为30%乙醇洗脱液<60%乙醇洗脱液<90%乙醇<乙酸乙酯。本研究结果为天然白藜芦醇的高效提取提供了一种有效的手段,同时为开发具有功能活性的食品添加剂提供了理论基础。总体来看,为蓝莓皮渣的开发利用以及高附加值的蓝莓副产品深加工产品,建立了有效的提取方法。

参考文献:

- [1] 安宝树,沙见浩,罗星.花生植株白藜芦醇提取工艺的优化[J].贵州农业科学,2017,45(6):114-118.
- [2] 王虹玲,吴优,于子箫,等.酿酒葡萄皮渣中白藜芦醇的提取及抗氧化、抗肿瘤活性研究[J].中国酿造,2018,37(7):112-116.
- [3] 吴万林,余元善,肖更生,等.蓝莓汁乳酸菌的发酵特性[J].现代食品科技,2020,36(3):159-166.

- [4] 周倩, 冯肖, 纪淑娟, 等. 蓝莓果实常温贮藏过程中表面病原真菌的分离与鉴定[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 271-279.
- [5] 王欢, 譙顺彬, 田辉, 等. 高效液相色谱法测定蓝莓酒中六种花青素含量[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 280-284.
- [6] CLADIS D P, LI S Y, REDDIVARI L, et al. A 90 day oral toxicity study of blueberry polyphenols in ovariectomized sprague-dawley rats[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 139: 111254.
- [7] 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, 2020, 45(2): 122-126.
- [8] 李贵文, 秦国正, 赵志刚, 等. 大孔吸附树脂纯化紫斑牡丹籽中白藜芦醇的工艺研究[J]. 甘肃中医药大学学报, 2019, 36(6): 26-30.
- [9] 马玉静, 何荣香, 杨玲, 等. 白藜芦醇的生物学功能及其在动物生产中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(11): 3234-3243.
- [10] 张敏, 焦杨. 虎杖酶解液中白藜芦醇萃取工艺初步研究[J]. 林业科技通讯, 2019(6): 16-19.
- [11] 李婷, 李胜, 张青松, 等. 酶法提取葡萄皮渣中白藜芦醇工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 194-197.
- [12] 刘新荣, 高丽萍, 夏涛, 等. 薄层层析-紫外分光光度法测定葡萄果皮中白藜芦醇及白藜芦醇苷[J]. 生物学杂志, 2008, 25(5): 63-65.
- [13] FU S, LV R, WANG L, et al. Resveratrol, an antioxidant, protects spinal cord injury in rats by suppressing MAPK pathway[J]. Saudi J Biol Sci, 2018, 25(2): 259-266.
- [14] MEINI M R, CABEZUDO I, BOSCHETTI C E, et al. Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process[J]. Food Chem, 2019, 283: 257-264.
- [15] 孔璐, 刘晓颖, 王鹏, 等. 果胶酶辅助提取蓝莓多糖的工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 保鲜与加工, 2017, 17(6): 61-65.
- [16] 孙磊磊, 康健, 邹积赞. 响应面优化酶法辅助提取葡萄叶白藜芦醇工艺[J]. 食品科技, 2015, 40(2): 276-281.
- [17] 于泽源, 滕歆, 徐雅琴, 等. 复合酶法提取树莓果实多糖工艺优化的研究[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(3): 52-58.
- [18] AUGUSTIN M A, SANGUANSRI L, LOCKETT T. Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol[J]. Ann N Y Acad Sci, 2013, 1290(1): 107-112.
- [19] 孟宪军, 朱金艳, 孙希云, 等. 酶法优化蓝莓多糖的提取工艺[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 185-187.
- [20] 李晓, 高超, 王颖, 等. 复合酶法提取海黍子中海藻酸钠的工艺研究[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(2): 98-103.