

文章编号: 1674-7054(2011)04-0355-05

酶法提取红毛丹果皮花色苷的研究

何 艾^{1,2} 张容鹄¹ 陈秀琼² 冯建成²

(1. 海南省农业科学院 农产品加工设计研究所, 海南 海口 570110; 2. 海南大学 材料与化工学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 以红毛丹果皮为材料, 研究酶法提取花色苷的工艺条件, 结果表明, 红毛丹果皮花色苷在可见光范围内的最大吸收波长为 535 nm; 纤维素酶适用于花色苷的提取; 最佳提取条件: 料液比为 1 g: 15 mL, 采用 pH5.2 的磷酸氢二钠-柠檬酸作为缓冲溶液, 加酶量为混合液 5% 等体积的量, 酶解温度 55 °C, 酶解时间 150 min。在此工艺条件下, 每克红毛丹果皮可提取 1.14 mg 花色苷。

关键词: 红毛丹; 果皮; 酶法提取; 花色苷

中图分类号: TS 201.2+5

文献标志码: A

花色苷是一类天然的可食用的水溶性色素, 广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实等器官的细胞液中, 使器官呈现出红色、蓝或紫色等颜色。因花色苷种类繁多、资源丰富且安全无毒, 并具有一定的营养和保健功效, 从而引起国内外的广泛关注。花色苷具有十分广阔的应用前景和很高的商业价值^[1-2]。红毛丹(*Nephelium lappaceum* L.) 为原产东南亚的无患子科热带果树, 又名毛荔枝。红毛丹果实成熟时, 果皮外观呈紫红色, 色素含量丰富, 但红毛丹在食用时, 果皮常常作为废弃物而遗弃, 造成天然色素资源的浪费^[3-4]。目前, 有关红毛丹果皮色素的提取, 多采用溶剂浸提法、微波辅助提取等方法, 而采用酶法提取红毛丹果皮花色苷的鲜有报道^[4-6]。笔者采用单因素法和多因素正交试验法, 对酶法提取红毛丹果皮花色苷的工艺条件进行研究, 为红毛丹的综合开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 新鲜红毛丹(市售, 产地: 海南省), 洗净后剥取果皮, 低温烘干, 粉碎备用。纤维素酶(标准活力 700 EGU · g⁻¹)、果胶酶(标准活力 26 000 PG · mL⁻¹) 购于丹麦诺维信(中国)投资有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备 岛津 UV-2450 紫外可见分光光度计; NBS U410 超低温冰箱; 赛多利斯 BSA124-S 电子天平; 梅特勒 FG2 pH 计; PALL PURELAB Prima 纯水系统; 日立 CF16RX 高速冷冻离心机。

1.2 方法

1.2.1 红毛丹果皮花色苷提取流程 红毛丹果皮花色苷提取流程: 红毛丹果皮→洗净→低温烘干→粉碎→酶解→离心→过滤→花色苷提取液。

1.2.2 花色苷含量的检测方法

1) 最大吸收波长的测定。取 1 mL 花色苷提取液, 用 pH3.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液稀释至 10 mL, 以缓冲液作为参比, 在 400~700 nm 范围内进行扫描, 确定红毛丹果皮中花色苷的最大吸收波长。

2) 总花色苷含量的测定方法。总花色苷含量的测定采用单 pH 测定法^[7]。取 1 mL 提取液, 用 pH3.0

收稿日期: 2011-09-18

基金项目: 海南省科学事业费项目(11-21401-0006); 海南省自然科学基金资助项目(509003)

作者简介: 何艾(1965-), 女, 海南文昌人, 海南省农业科学院农产品加工设计研究所助理园艺师。

通信作者: 冯建成(1972-), 男, 湖北麻城人, 海南大学材料与化工学院副研究员, E-mail: fjc197228@126.com

的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液稀释至 10 mL,以缓冲溶液为参比液,测定其在 535 nm 下的最大吸光度值 $A_{535\text{nm}}$,以此作为总花色苷含量的检测指标。

3) 不同酶对花色苷提取的影响。称取 10 g 红毛丹果皮碎末 4 份,按料液比 1 g: 10 mL 与 pH5.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液混合,分别加入与混合液 10% 等体积的蒸馏水(作为对照组 CK)、果胶酶、纤维素酶和混合酶(与混合液 4% 等体积的果胶酶+与混合液 6% 等体积的纤维素酶)进行处理;对照组与处理组均在 50 ℃ 水浴下暗酶解 1 h 后,经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,均采用单 pH 测定法测定 535 nm 处吸光度,实验平行进行 3 次。

1.2.4 纤维素酶提取花色苷单因素试验

1) 料液比的选择。取红毛丹果皮碎末 10 g,分别按不同的料液比 1 g: 5 mL,1 g: 10 mL,1 g: 15 mL,1 g: 20 mL,1 g: 25 mL 与 pH5.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液混合,加入与混合液 10% 等体积的纤维素酶,50 ℃ 水浴下酶解 1 h 后,经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,均采用单 pH 测定法测定 535 nm 处吸光度,实验平行进行 3 次。

2) 酶量的影响。取红毛丹果皮碎末 10 g,按料液比 1 g: 15 mL 与 pH5.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液混合,分别加入与混合液 1%、5%、10%、15% 等体积的纤维素酶,50 ℃ 水浴下酶解 1 h 后,经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,均采用单 pH 测定法测定 535 nm 处吸光度,实验平行进行 3 次。

3) pH 值的影响。取红毛丹果皮碎末 10 g,按料液比 1 g: 15 mL 分别与 pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液混合,加入与混合液 5% 等体积的纤维素酶,50 ℃ 水浴下酶解 1 h 后,经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,均采用单 pH 测定法测定 535 nm 处吸光度,实验平行进行 3 次。

4) 酶解温度的选择。取红毛丹果皮碎末 10 g,按料液比 1 g: 15 mL 与 pH5.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液混合,加入与混合液 5% 等体积的纤维素酶,分别在 30、40、50、60、70、80 ℃ 下酶解 1 h 后,经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,均采用单 pH 测定法测定 535 nm 处吸光度,实验平行进行 3 次。

5) 酶解时间的选择。取红毛丹果皮碎末 10 g,按料液比 1 g: 15 mL 与 pH5.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液混合,加入与混合液 5% 等体积的纤维素酶,60 ℃ 水浴,分别酶解 40、80、120、160、200 min 后,经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,均采用单 pH 测定法测定 535 nm 处吸光度,实验平行进行 3 次。

1.2.5 纤维素酶提取花色苷多因素正交试验 根据单因素试验结果,在纤维素酶用量为混合液 5% 等体积的量的条件下,选取料液比、pH、酶解温度、酶解时间作为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表对酶解法提取花色苷的工艺条件进行优化,确定花色苷酶法提取的适宜工艺条件。

表 1 因素水平表 $L_9(3^4)$

水平	因 素			
	A	B	C	D
1	4.8	1:12	55	90
2	5.0	1:15	60	120
3	5.2	1:18	65	150

注: A 为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 pH 值; B 为料液比($W_{\text{料}}:V_{\text{液}}=\text{g}:\text{mL}$); C 为酶解温度/℃; D 为酶解时间/min。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定 从图 1 可见,红毛丹果皮花色苷提取液在可见光范围内扫描的最大吸收波长为 535 nm,这表明该色素为花色苷类色素^[8]。因此,可在此波长下进行红毛丹果皮花色苷含量测定。

2.2 不同酶对花色苷提取的影响 用于花色苷提取的酶主要有纤维素酶和果胶酶。通过酶解使植物细胞壁软化、膨胀及崩溃,从而促进花色苷的溶出^[2]。从表 2 可以看出,红毛丹果皮碎末加酶提取,花色苷提取量明显高于

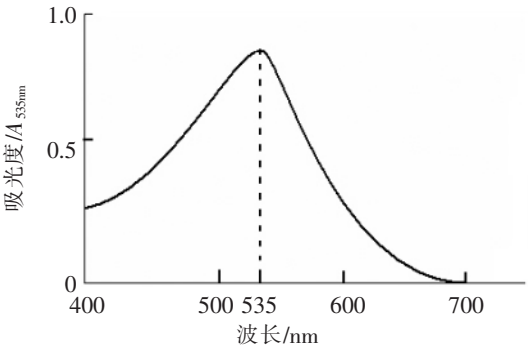


图 1 红毛丹果皮花色苷扫描图谱

对照组(CK),说明酶法提取花色苷是可行的;对于红毛丹果皮花色苷而言,单一的纤维素酶比单一的果胶酶提取量更高,这可能是因为纤维素酶破坏了植物的细胞壁,而更利于胞内物质的释放;采用复合酶提取的花色苷提取量低于相同用量的纤维素酶提取的,这说明两种酶并无明显的协同作用^[9]。因此,可以确定以纤维素酶进行后续的单因素和多因素正交试验。

表 2 不同酶对花色苷提取的影响

处理	水平			
	1	2	3	平均值
蒸馏水(CK)	0.152	0.146	0.142	0.147
纤维素酶	0.642	0.651	0.612	0.635
果胶酶	0.472	0.468	0.443	0.461
复合酶	0.511	0.498	0.502	0.504

2.3 料液比对花色苷提取的影响 由表 3 可知,纤维素酶法提取红毛丹果皮花色苷时,在料液比为1 g: 5 mL~1 g: 15 mL 时,其花色苷提取量随料液比的增大而增加,在料液比 1 g: 15 mL 时达到最大;当料液比继续增加后,花色苷提取量逐渐降低。这是因为在一定的酶解条件下,随着料液比的增加,酶液与果皮细胞充分接触,可加速细胞壁降解,有助于花色苷的释放;但随着料液比的增大超过一定限度,单位体积中的酶浓度随之降低,影响细胞壁的降解,不利于花色苷的释放。

表 3 料液比对花色苷提取的影响

料液比/(g: mL)	水平			
	1	2	3	平均值
1: 5	0.421	0.45	0.417	0.429
1: 10	0.572	0.591	0.602	0.588
1: 15	0.712	0.718	0.702	0.711
1: 20	0.567	0.573	0.58	0.573
1: 25	0.411	0.398	0.402	0.403

2.4 加酶量对花色苷提取的影响 由图 2 可以看出,纤维素酶法提取红毛丹果皮花色苷时,花色苷提取量随酶用量的增加而增大,当纤维素酶加入量为与混合液 5% 等体积时,花色苷的提取量达到最大,继续增加纤维素酶的用量,花色苷提取量变化不明显。这是因为当酶量低于与混合液 5% 等体积时,酶量不能满足酶解的需要,影响花色苷的释放,造成提取量低;而当酶量为与混合液 5% 等体积时,酶解反应充分,继续增加酶用量,就超出了酶解反应需求量,对花色苷提取量的影响有限,且还增加酶解成本。因而后续实验,确定将纤维素酶用量控制在与混合液 5% 等体积的量。

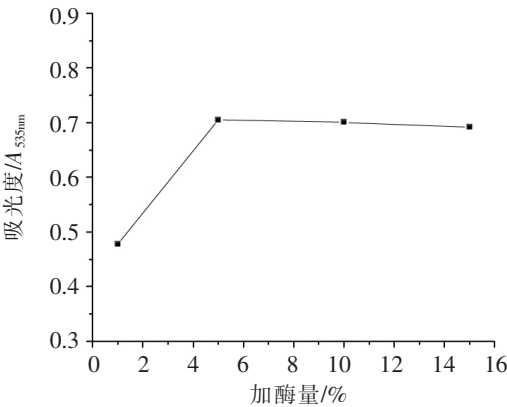


图 2 酶量对花色苷提取的影响

2.5 pH 对花色苷提取的影响 由图 3 可知,随着缓冲液 pH 的升高,红毛丹果皮花色苷提取量出现先升后降的现象,在 pH5.0 时,提取量最高。这是因为该纤维素酶为酸性酶,作用的最适 pH 在 4.8~5.4,在 pH5.0 下酶解,酶活力较强,有利于红毛丹果皮花色苷提取。

2.6 酶解温度对花色苷提取的影响 由图 4 可知,酶解温度对红毛丹果皮花色苷的提取量有明显影响,60℃ 时其提取量达到最大。推测其原因,可能是升温有助于提高细胞膜的通透性,从而有助于提取量的提高。但花色苷对热敏感,当温度超过某一临界温度时会加速花色苷的降解^[7],因而当提取温度超过 60℃ 时反而使提取量下降。

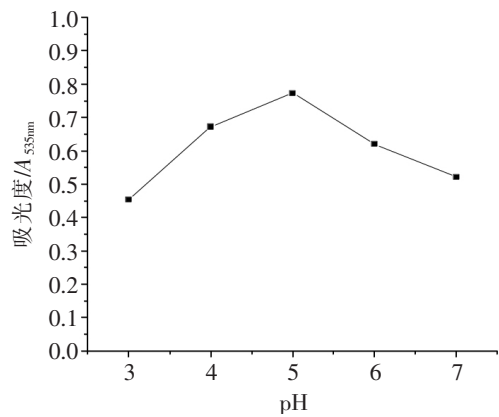


图3 pH对花色苷提取的影响

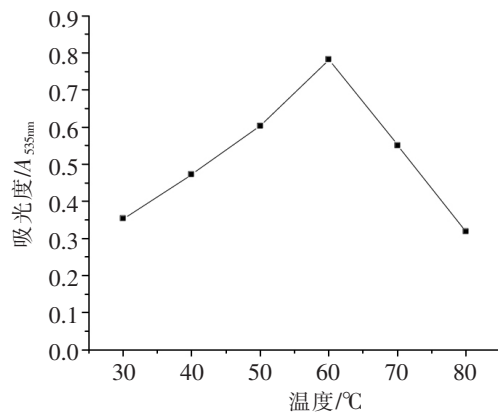


图4 提取温度对花色苷提取的影响

2.7 酶解时间对花色苷提取的影响 由表4可知,随着酶解时间的延长,花色苷提取量呈现先增后减,在120 min时出现1个最大值;随着提取时间进一步延长,提取量反而下降。推测其原因,可能是延长提取时间导致花色苷发生氧化降解,从而损失提取量,因此,适宜的酶解时间为120 min。

表4 提取时间对花色苷提取的影响

酶解时间/min	水平			平均值
	1	2	3	
40	0.53	0.571	0.545	0.549
80	0.712	0.751	0.702	0.722
120	0.832	0.838	0.832	0.834
160	0.817	0.823	0.805	0.815
200	0.731	0.758	0.742	0.744

2.8 多因素正交实验分析 由表5的极差分析可知,极差大小排序为: A > C > D > B,说明在影响酶活性的关键因素中,缓冲液的pH值、酶解温度对花色苷的提取量影响最大。正交试验得出最佳配比为A₃B₂C₁D₃,即红毛丹果皮花色苷酶法提取的工艺条件是:纤维素酶加入量为混合液5%等体积的量,料液比为1 g: 15 mL, pH5.2 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,在55℃水浴下酶解150 min。在此工艺条件下,每克红毛丹果皮可提取1.14 mg 花色苷。

表5 正交试验结果

处理组合	A	B	C	D	总花色苷/A _{535nm}
1	1	1	1	1	0.793
2	1	2	2	2	0.750
3	1	3	3	3	0.703
4	2	1	2	3	0.965
5	2	2	3	1	0.871
6	2	3	1	2	0.987
7	3	1	3	2	1.071
8	3	2	1	3	1.320
9	3	3	2	1	1.124
K1	0.749	0.943	1.033	0.929	
K2	0.941	0.980	0.946	0.936	
K3	1.172	0.938	0.882	0.996	
R	0.423	0.042	0.151	0.067	

3 结 论

红毛丹果皮花色苷在可见光范围内的最大吸收波长为 535 nm; 纤维素酶适宜红毛丹果皮花色苷的提取。纤维素酶法提取红毛丹果皮花色苷的优化工艺条件组合为: 料液比 1g: 15mL ,pH5.2 磷酸氢二钠-柠檬酸作缓冲溶液,加入酶量为混合液 5% 等体积的量,酶解温度 55 ℃,酶解时间 150 min。

参考文献:

- [1] KONG J M , CHIA L S , GOH N K , et al. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. *Phytochemistry* ,2003 ,64 (5) : 923 - 933.
- [2] 于东,陈桂星,方忠祥,等. 花色苷提取、分离纯化及鉴定的研究进展[J]. *食品与发酵工业* ,2009 ,35(3) : 127 - 133.
- [3] O'HARE T J. Postharvest physiology and storage of rambutan [J]. *Postharvest Biology and Technology* ,1995 ,6(3/4) : 189 - 199.
- [4] 孙健,蒋跃明,彭宏祥,等. 红毛丹果皮色素的提取及其稳定性的研究[J]. *食品科学* ,2009 ,30(11) : 71 - 75.
- [5] 张瑜,张换换,李志洲. 红毛丹果皮中原花青素提取及其抗氧化性[J]. *食品研究与开发* ,2011 ,32(1) : 188 - 192.
- [6] 梁文娟,马青云,蒋合众,等. 红毛丹果壳的化学成分研究[J]. *中草药* ,2011 ,42(7) : 1271 - 1275.
- [7] 黄昉,徐志宏,李沛生,等. 黑豆种皮色素的测定和提取[J]. *食品工业科技* ,2004 ,25(4) : 117 - 119.
- [8] 王秀菊,杜金华,马磊,等. 蓝莓酒渣中花色苷提取工艺的优化及其稳定性的研究[J]. *食品与发酵工业* ,2009 ,35(9) : 151 - 156.
- [9] 李颖畅,孟宪军. 酶法提取蓝莓果中花色苷的研究[J]. *食品工业科技* ,2008 ,29(4) : 215 - 217.

Enzymatic Extraction of Anthocyanins from Rambutan Fruit Pericarp Tissues

HE Ai^{1,2} , ZHANG Rong-hu¹ , CHEN Xiu-qiong² , FENG Jian-cheng²

(1. Farm Produce Processing and Design Research Institute , Hainan Academy of Agricultural Sciences , Haikou 570110 , China;

2. College of Materials and Chemical Engineering , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: The crude anthocyanins from Rambutan fruit pericarp tissues were natural food additives. In our report , the extraction conditions by enzyme solution were optimized. The results showed that the maximum absorption wave length of the anthocyanins was 535 nm , the optimal enzyme was cellulase , and the optimum conditions of enzymatic extraction were as follows: the ratio of dry pericarp to extracting solution was 1: 15(g: mL) , pH value of enzyme solution was 5.2 , the amount of enzyme was 5% , the digest temperature was 55 ℃ , the digest time was 150 min. It was under the condition that the content of anthocyanins reached 1.14 mg · g⁻¹ fruit pericarp.

Key words: rambutan; fruit pericarp; enzymatic extraction; anthocyanins