

孙健,岳瑞雪,钮福祥,等.紫甘薯花青素的大孔树脂动态吸附工艺优化[J].江苏农业科学,2013,41(6):227-229.

# 紫甘薯花青素的大孔树脂动态吸附工艺优化

孙健,岳瑞雪,钮福祥,徐飞,朱红

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/中国农业科学院甘薯研究所,江苏徐州 221121)

**摘要:**选取4种大孔树脂,研究它们对紫甘薯花青素的动态吸附工艺并优化工艺参数。结果表明:AB-8大孔树脂吸附性能最好,X-5次之;最优工艺参数为花青素含量1.000( $D_{540\text{nm}}$ 表示)、pH值3.0、恒流泵流速1 mL/min,在此条件下花青素吸附率高达99.35%。

**关键词:**紫甘薯;花青素;大孔树脂;动态吸附

**中图分类号:** S531.099 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0227-02

紫甘薯含有丰富的花青素类色素,其主要以花色素苷和酰基化花色素苷形式存在<sup>[1]</sup>,具有抗氧化、清除自由基、改善肝功能、抗高血糖、抗突变和抗肿瘤等功效<sup>[2-4]</sup>,引起国内外的广泛关注,开发前景十分广阔。

紫甘薯色素粗提液或浓缩液一般含有较多还原糖、淀粉等杂质,极大地影响了花青素的品质特性,常采用树脂法、醋酸铅沉淀法、分级醇沉法和膜分离法等方法进行分离纯化<sup>[5-6]</sup>。大孔树脂吸附法是目前纯化天然色素的主要方法,具有工艺简单、成本低、可再生、不吸潮等特点<sup>[7]</sup>。利用大孔树脂纯化紫甘薯花青素研究已有相关报道<sup>[8]</sup>,但大多集中于大孔树脂静态吸附,而动态吸附的研究较少。本研究分析了大孔树脂动态吸附紫甘薯花青素的工艺条件,并进行了试验优化,旨在为紫甘薯花青素的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

紫甘薯品种为济黑1号,江苏徐州甘薯研究中心提供;大孔吸附树脂AB-8、X-5、NKA-9、D4020,南开大学化工厂提供;磷酸氢二钠、柠檬酸、乙醇、氢氧化钠、盐酸等试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器设备

循环水真空泵(上海嘉鹏科技有限公司),旋转蒸发器(上海嘉鹏科技有限公司),730pH计(德国WTW公司),2450紫外分光光度计(日本岛津公司),玻璃层析柱(35 mm × 500 mm,上海生工生物工程有限公司)。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 紫甘薯花青素溶液制备** 鲜紫甘薯经酸化乙醇溶液[V(95%乙醇):V(0.5%柠檬酸) = 40:60]提取,于10 000 r/min离心10 min,取上清,真空浓缩,用pH值3.0磷

酸氢二钠-柠檬酸缓冲液稀释至一定浓度,备用。

**1.3.2 大孔树脂预处理** 大孔树脂经无水乙醇浸泡后,先用1 mol/L NaOH浸泡24 h,再经1 mol/L HCl浸泡24 h,最后用蒸馏水洗至中性,备用。

**1.3.3 大孔树脂动态吸附** 称取一定量经预处理的大孔树脂,以湿法缓慢装入35 mm × 500 mm的吸附柱中。室温下采用恒流泵控制流速为1 mL/min,将500 mL pH值3.0紫甘薯花青素溶液( $D_{540\text{nm}} = 3.000$ )加入树脂柱,用部分收集器收集流出液,测定吸光度D。

**1.3.3 单因素试验** 称取一定量经预处理的大孔树脂,以湿法缓慢装入35 mm × 500 mm的吸附柱中。室温下控制恒流泵流速1、2、3、4、5 mL/min,将pH值分别为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0的500 mL紫甘薯花青素溶液( $D_{540\text{nm}}$ 分别为0.500、1.000、1.500、2.000、2.500、3.000)加入树脂柱,用部分收集器收集流出液,测定吸光度D。

**1.3.4 正交试验优化** 根据单因素试验结果,选择花青素含量、pH值和流速对大孔树脂吸附率有较大影响的条件进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,试验因素及水平见表1。

表1 大孔树脂动态吸附正交试验因素和水平

水平	因素		
	A:花青素含量 $D_{540\text{nm}}$	B:pH值	C:流速(mL/min)
1	0.500	2.0	1.0
2	1.000	2.5	2.0
3	1.500	3.0	3.0

## 2 结果与分析

### 2.1 大孔树脂的选择

从图1可以看出,AB-8、X-5、NKA-9、D4020 4种大孔树脂吸附能力差异较大,AB-8吸附能力最强,其对紫甘薯花青素吸附率为95.67%;X-5次之,为94.10%;NKA-9最低,为84.04%。AB-8大孔树脂吸附量大缘于AB-8是弱极性的树脂,在吸附过程中易和色素形成氢键,结合比较牢固的原因。

### 2.2 pH值对大孔树脂动态吸附的影响

在花青素浓度为1.000( $D_{540\text{nm}}$ )、恒流泵流速为1 mL/min条件下,考察pH值在1.0~3.0之间变化对AB-8大孔树脂

收稿日期:2012-12-12

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-11-B-20)。

作者简介:孙健(1979—),男,江苏睢宁人,硕士,助理研究员,研究方向为甘薯功能食品。E-mail:sjsg9902@126.com。

通信作者:钮福祥,硕士,研究员,从事甘薯深加工研究。Tel:(0516)82028151;E-mail:niufuxiang@sina.com。

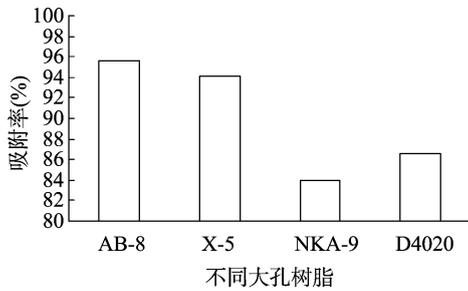


图1 不同大孔树脂吸附性能比较

对紫甘薯花青素动态吸附的影响。从图2可以看出,随着pH值的升高,AB-8对花青素吸附率不断波动,pH值3.0时最大,总体上对花青素吸附率影响不大。

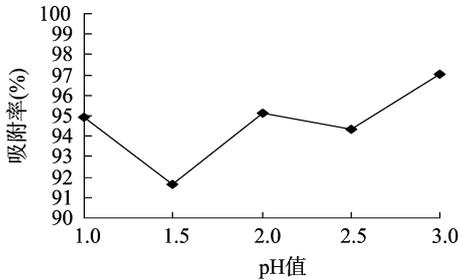


图2 pH值对AB-8大孔树脂动态吸附影响

### 2.3 花青素含量对大孔树脂动态吸附的影响

在pH值为3.0、恒流泵流速为1 mL/min条件下,考察花青素浓度为在0.500~3.000 ( $D_{540nm}$ )之间变化对AB-8大孔树脂对紫甘薯花青素动态吸附的影响。从图3可以看出,随着花青素含量的升高,AB-8对花青素吸附率呈下降趋势,花青素含量为0.500时,花青素全部被吸附,花青素含量为大于2.000后,吸附率变化不大。

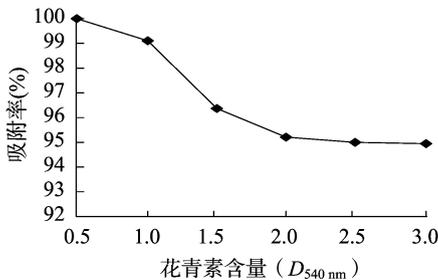


图3 花青素含量对AB-8大孔树脂动态吸附影响

### 2.4 恒流泵流速对大孔树脂动态吸附的影响

在花青素浓度为1.000 ( $D_{540nm}$ )、pH值为3.0条件下,考察恒流泵流速在1.0~3.0 mL/min之间变化对AB-8大孔树脂对紫甘薯花青素动态吸附的影响。从图4可以看出,随着恒流泵流速的加快,AB-8对花青素吸附率下降明显,流速为1.0 mL/min时,吸附率最大,为99.23%;流速为5.0 mL/min时,吸附率最小,仅为90.75%。

### 2.5 大孔树脂动态吸附紫甘薯花青素正交试验优化

根据单因素试验结果,选择花青素含量、pH值和流速等条件作为正交试验因素。从表2可知,诸因素对AB-8大孔树脂吸附率影响的主次顺序为C>A>B,最优组合为 $A_2B_3C_1$ ,

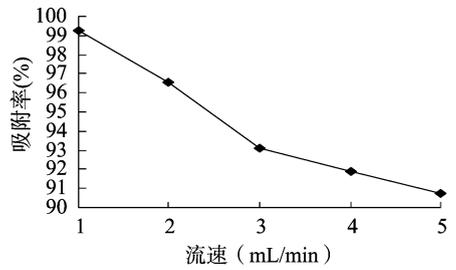


图4 流速对AB-8大孔树脂动态吸附影响

即色素含量1.000、pH值3.0和流速1 mL/min。方差分析结果(表3)表明,流速对吸附有显著影响( $P < 0.05$ ),而色素含量和pH值的影响不显著。

表2 大孔树脂动态吸附紫甘薯花青素正交试验结果

序号	因素			吸附率 (%)
	A	B	C	
1	1	1	1	93.76
2	1	2	2	92.08
3	1	3	3	90.73
4	2	1	2	94.41
5	2	2	3	90.12
6	2	3	1	99.35
7	3	1	3	91.87
8	3	2	1	97.65
9	3	3	2	93.34
$k_1$	92.19	93.35	96.92	
$k_2$	94.63	93.28	93.27	
$k_3$	94.29	94.47	90.91	
R	2.44	1.19	6.01	

表3 正交试验结果的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
花青素含量	10.449	2	5.224	3.886	
pH值	2.689	2	1.345	1.000	
流速	55.051	2	27.525	20.473	*
误差	2.690	2	1.345		
总和	70.879	8			

注: \*表明在0.05水平显著。

## 3 结论

供试的AB-8、X-5、NKA-9、D4020 4种大孔树脂中,AB-8吸附能力最强,X-5次之;AB-8大孔树脂动态吸附紫甘薯花青素最优工艺条件为花青素含量1.000 ( $D_{540nm}$ 表示)、pH值3.0、恒流泵流速1 mL/min,此条件花青素吸附率高达99.35%。

## 参考文献:

- [1] 杨朝霞,王亦军,高磊. 紫甘薯花色苷色素研究进展[J]. 青岛大学学报:工程技术版,2004,19(2):32-35.
- [2] Furuta S, Suda I, Nishiba Y, et al. High ter-butylperoxyl radical scavenging activity of sweet potato cultivars with purple flesh[J]. Food Sci Technol Int,1998,4(1):33-35.

傅冰,季秀玲,俞汇颖,等. 盐析法快速分离鸡蛋清卵白蛋白[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):229-230.

# 盐析法快速分离鸡蛋清卵白蛋白

傅冰<sup>1</sup>,季秀玲<sup>2</sup>,俞汇颖<sup>2</sup>,魏云林<sup>2</sup>

(1. 丽水职业技术学院环境工程学院,浙江丽水 323000; 2. 昆明理工大学生命科学与技术学院,云南昆明 650500)

**摘要:**鸡蛋清原液用 pH 值 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释 5 倍,4 ℃ 下静置至少 6 h,采用 30%~80% 不同饱和度的硫酸铵分离卵白蛋白,采用 Bradford 法测定盐析后蛋白含量,SDS-PAGE 检测其纯度,结果表明,60% 饱和度的硫酸铵分离鸡蛋清卵白蛋白效果较好。

**关键词:**盐析法;鸡蛋清;卵白蛋白;硫酸铵

**中图分类号:** TS253.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0229-02

鸡蛋中含有丰富的生命必需元素,营养价值较高。随着对鸡蛋生理生化活性研究的不断深入,对鸡蛋的利用逐渐超越简单的初加工阶段,趋向于开发具有较高附加值的生理活性物质<sup>[1-2]</sup>。蛋清是一种以水为分散介质、以蛋白质为分散相的典型胶体物质,鸡蛋清中的蛋白质含量约为总量的 11%,除不溶性的卵黏蛋白外,均为可溶性蛋白质。卵白蛋白、卵铁传递蛋白和溶菌酶是其中 3 种主要的生物活性蛋白质。

卵白蛋白是蛋清中主要的活性蛋白,约占蛋清蛋白质含量的 54%。卵白蛋白具有许多功能特性<sup>[3]</sup>,例如,卵白蛋白对胰蛋白酶有强烈抑制作用,能部分抑制枯草杆菌蛋白酶活性<sup>[4]</sup>;Fujita 等用胃蛋白酶水解卵白蛋白,并用 RP-HPLC 分离出具有血管舒张活性的物质 OA358-365<sup>[5]</sup>;Davalos 等研究发现,卵白蛋白酶降解物是具有强抗氧化活性的多肽<sup>[6-7]</sup>。卵白蛋白是生物化学中一种重要的参考蛋白质,包含所有的必需氨基酸,而且比例合理。高度纯化和结晶的卵白蛋白可以作为载体、稳定剂、封阻剂或标准物等,也可作为营养添加剂应用于食品工业。虽然许多学者对卵白蛋白进行了大量研究,但对其生物学特性和功能的了解仍不够全面。本研究采用硫酸铵盐析的方法,对鸡蛋清中的卵白蛋白进行了快速初步分离,为其进一步开发利用提供理论依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

新鲜鸡蛋,购自超市;卵白蛋白标准品,Sigma 公司;硫酸铵(分析纯),购自天津市风船化学试剂科技有限公司;透析袋,Amersham Biosciences(SF) Corp。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 鸡蛋清原液的制备** 取新鲜鸡蛋,用双层灭菌纱布过滤得到水样成分,充分搅拌 30 min(搅拌剧烈程度以不起泡沫为准)。为了降低鸡蛋清黏度以利于后续试验,取 5 mL 鸡蛋清用 pH 值 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液(50 mL 0.1 mol/L Tris-base 溶液与 5.7 mL 0.1 mol/L HCl 溶液混匀后,冷却到室温,加水定容到 100 mL)进行 5 倍稀释,4 ℃ 下静置至少 6 h。

**1.2.2 鸡蛋清卵白蛋白盐析法分离** 将静置蛋清 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,缓慢多次加入烘干研磨成粉末的硫酸铵,磁力搅拌,使加入粉末溶解,并参考硫酸铵溶液饱和度计算表,使其饱和度分别达到 30%、40%、50%、60%、70% 和 80%。4 ℃ 静置过夜,于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,不同饱和度离心所得沉淀均用 pH 值 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液溶解,并在 4 ℃、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中进行透析。其间更换透析液 2~4 次,透析过夜。

**1.2.3 蛋白质检测** 蛋清盐析蛋白质含量采用 Bradford 法测定<sup>[8-9]</sup>;考马斯亮蓝 G-250 在游离状态下呈红色,与蛋白质结合则呈现蓝色,蛋白与考马斯亮蓝反应后,溶液在分光光度计波长 595 nm 处吸光度与蛋白质含量成正比。用 BSA 蛋白标准液在波长 595 nm 处测得的吸光值绘制标准曲线(表 1),不同饱和度盐析得到的蛋白样品在 595 nm 波长测得的吸光度,通过标准曲线得到蛋白含量。采用 SDS-PAGE 检测盐析后卵白蛋白的纯度。

收稿日期:2010-10-29

基金项目:浙江省丽水市科技局校企合作项目(编号:20080410)。

作者简介:傅冰(1982—),男,浙江松阳人,硕士,讲师,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:41891514@qq.com。

[3] Suda I, Furuta S, Nishiba Y, et al. Reduction of liver induced by carbon tetrachloride in rats administered purple-colored sweetpotato juice[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 1997, 44(4): 315-318.

[4] Yoshimoto M, Okun O, Yoshinaga M, et al. Antimutagenicity of sweetpotato roots[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(3): 537-541.

[5] 李浩明,高蓝. 紫甘薯色素的提取工艺与性质研究[J]. 中国食品添加剂, 2003(4): 22-23.

[6] 李金林. 紫甘薯花色苷提取、膜分离及加工稳定性研究[D]. 南昌:南昌大学, 2007.

[7] Ou S Y, Luo Y L, Xue F, et al. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 78(4): 1298-1304.

[8] 陈勇,张晴. AB-8 大孔吸附树脂吸附和分离紫甘薯色素的研究[J]. 中国食品添加剂, 2001(1): 6-9.