

菊芋粕菊粉的酶法提取、组成及抗氧化活性研究

王晓喜^{1,2}, 李雁^{1,2}, 李国强¹, 陈琦^{1,2}, 乔亚俊^{1,2}, 杜玉枝¹, 李天才^{1*}, 毕宏涛^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所 青海省藏药药理学与安全性评价研究重点实验室, 西宁 810000;

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:本研究拟应用酶法提取技术解决菊芋菊粉工业化生产中的废弃物——菊芋粕再利用程度低的问题, 并评价菊芋粕菊粉的抗氧化活性功效。对菊芋粕菊粉的果胶酶法提取的最佳条件通过响应面法进行了优化, 并对菊芋初次水提菊粉(primary water-extracted inulin, PWI)和二次酶提菊粉(secondary enzymatic-extracted inulin, SEI)的组成成分和抗氧化活性进行了比较分析。响应面法优化确定的菊芋粕菊粉最佳酶法提取条件为:pH4.5、提取温度50℃、酶底比7.5 U/g、提取时间2 h, 该提取方法所得菊芋粕菊粉的得率为35.30% ± 0.85%, 与传统热水浸提法相比菊粉得率提高38.16%。组成分析结果显示, SEI的总糖和菊粉含量均显著高于PWI($P < 0.05$)。在菊粉聚合度方面, PWI中蔗果三糖和蔗果四糖含量较高, 而SEI中蔗果五糖、蔗果六糖及其以上聚合度菊粉的含量较高。此外, SEI的抗氧化活性优于PWI。因此, 果胶酶辅助提取方法有望为菊芋粕菊粉的再利用难题提供新的解决思路。

关键词: 菊芋粕; 菊粉; 酶法提取; 响应面法; 抗氧化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)8-1408-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.8.016

Enzymatic extraction of inulin from *Jerusalem artichoke* pulp and its composition and antioxidant activity analysis

WANG Xiao-xi^{1,2}, LI Yan^{1,2}, LI Guo-qiang¹, CHEN Qi^{1,2}, QIAO Ya-jun^{1,2}, DU Yu-zhi¹, LI Tian-cai^{1*}, BI Hong-tao^{1*}

¹Qinghai Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Evaluation, Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810000, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In this study, we applied enzymatic extraction technology to solve the problem of low recycling of Jerusalem artichoke pulp, which comes from waste in the industrial production of Jerusalem artichoke inulin, and then evaluated the antioxidant activity of inulin from Jerusalem artichoke pulp. The enzymatic extraction process was optimized by using response surface methodology, and the optimum parameters were as follows: pH4.5, extraction temperature 50 °C, pectinase-substrate ratio 7.5 U/g, extracting time 2 h. The yield inulin from Jerusalem artichoke pulp was 35.30% ± 0.85% by using optimized enzymatic extraction process, which is 38.16% higher than that by traditional hot water extraction. Subsequently, we comparatively analyzed the chemical composition and antioxidant activity of primary water-extracted inulin (PWI) and secondary enzymatic-extracted inulin (SEI). The results showed that the total sugar and inulin contents of SEI were significantly higher than those of PWI ($P < 0.05$). Compared with PWI, SEI contained more inulin with six and higher polymerization, but less sugarcane trisaccharide and sugarcane tetrasaccharide. Furthermore, the antioxidant activity of SEI was superior to PWI, according to the total antioxidant capacity, DPPH, hydroxyl and superoxide anionradicals scavenging activity, Fe²⁺-chelating ability and reducing power assays. Therefore, pectinase-enzymatic extraction method has the potential to be a new solution for the problem on reutilization of inulin of Jerusalem artichoke pulp in the inulin industry.

Key words: *Jerusalem artichoke* pulp; enzymatic extraction; response surface methodology; chemical composition; antioxidant activity.

收稿日期: 2019-01-28 接受日期: 2019-06-04

基金项目: 青海省重点实验室专项(2017-ZJ-Y08); 青海省自然科学基金(2018-ZJ-902)

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)系菊科向日葵属植物, 菊粉是其主要的干物质组成成分, 含量占比超

* 通信作者 E-mail: tcli@nwipb.cas.cn, bihongtao@hotmail.com

过干物质重量的 60%^[1]。菊芋是我国菊粉工业化生产的主要原料,目前其工业化提取技术以连续热水浸提法为主^[2]。菊芋菊粉生产过程产生大量的废弃物——菊芋粕,其湿重约占原料重量的 65%,大多作为饲料直接出售^[3]。由于菊芋粕中含有大量的糖类物质^[4],主要包括果胶和未提取完全的菊粉^[5],所以为了充分利用菊芋资源,提高菊芋产品的附加值,菊芋粕的再次利用越来越受到业界的关注。目前,菊芋粕再利用研究主要集中于果胶、果糖和蛋白质等成分的提取技术^[6]。由于菊芋粕中含有大量的果胶,而难溶性原果胶所形成的细胞骨架,严重妨碍了菊芋粕中菊粉的提取,所以尚缺少菊芋粕菊粉的高效提取技术,造成菊芋菊粉的整体产率无法有效提升。本研究针对菊芋粕菊粉提取效率低的难题,采用果胶酶辅助提取方法对菊芋粕菊粉的高效提取技术进行研究,并对菊芋粕菊粉的抗氧化能力进行评价,以期对菊芋粕的再利用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜菊芋块茎,甘肃白银熙瑞生物工程有限公司提供;果胶标准品,购自北京索来宝科技有限公司;D-半乳糖醛酸,水溶性维生素 E (Trolox)、二苯基苦基苯肼 (DPPH),购自美国 Sigma-Aldrich 公司;蔗糖三糖、蔗糖四糖、蔗糖五糖标准品,购自西宝生物科技(上海)股份有限公司;果胶酶 (CAS 号:9032-75-1),自南宁东恒华道生物科技有限公司;2,2-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 (ABTS 二胺盐),购自生工生物工程(上海)股份有限公司;辣根过氧化物酶 (HRP),购自上海源叶生物科技有限公司;菲啰啉,购自上海玉博生物科技有限公司;二乙氨基纤维素 (DEAE 纤维素),上海恒信化学试剂有限公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

SJZX 多功能酶标仪,珀金埃尔仪器有限公司;FDU-1100 型冷冻干燥机,EYELA 东京理化器械株式会社;Mettler Toledo AL104 分析天平,瑞士 Mettler-Toledo 公司;Sigma 3-18KS 离心机,德国 Sigma 公司;Milli-Q Academic A10 超纯水系统,美国 Millipore 公司;IS50 傅里叶变换红外近红外-拉曼光谱连用仪,美国 thermo 公司;LC-10CT 液相色谱仪,岛津日本公司。

1.3 菊粉的提取及含量测定

新鲜菊芋块茎切成薄片,按照 1:5 (w/w) 料液

比,沸水中提取 1 h,纱布过滤后,分别收集滤液和菊芋粕。滤液浓缩后冷冻干燥,得到初提粗菊粉样品,-20 ℃ 保存备用。新鲜菊芋粕冷冻干燥后,粉碎、过筛,按照料液比 1:20 (w/w),加入含有果胶酶的 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,在一定温度范围加热提取。提取液离心后,收集上清液,测定总糖含量和还原糖含量,计算非还原糖得率。

果胶酶酶活按照 Zhang 等^[7]方法进行测定,以果胶酶每分钟分解果胶产生 1 μmol 半乳糖醛酸定义为 1 个酶活。总糖含量的测定以果糖为标准品采用苯酚-硫酸法,还原糖含量的测定以葡萄糖为标准品采用二硝基水杨酸 (DNS) 法,菊粉得率计算公式如下:

$$\text{非还原糖得率}(\%) = (\text{总糖含量} - \text{还原糖含量}) / \text{菊芋粕重量} \times 100\%$$

1.4 菊芋粕中菊粉的酶法提取工艺优化

以酶加量 (U/g)、提取 pH、提取温度、提取时间 4 个因素作为指标,先后进行单因素试验,确定各因素的适宜提取范围,然后以各因素的适宜提取范围作为响应曲面设计试验的不同水平进行响应曲面设计,从而确定最佳提取条件。

1.4.1 pH 值对菊粉得率的影响

固定提取条件为提取温度 50 ℃、酶底比 6.5 U/g、提取时间 1.5 h,考察不同 pH (3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0) 对菊粉得率的影响。

1.4.2 提取温度对菊粉得率的影响

固定提取条件为 pH4.5、酶底比 6.5 U/g、提取时间 1.5 h,考察不同提取温度 (40、45、50、55、60 ℃) 对菊粉得率的影响。

1.4.3 酶底比对菊粉得率的影响

固定提取条件为 pH4.5、温度 50 ℃、提取时间 1.5 h,考察不同酶底比条件 (0.315、0.625、1.25、2.5、5、10、15、20、40 U/g) 对菊粉得率的影响。

1.4.4 提取时间对菊粉得率的影响

固定条件为 pH4.5、温度 50 ℃、酶底比 10 U/g,考察不同提取时间 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h) 对菊粉提取率的影响。

1.4.5 菊芋粕中菊粉的酶法提取工艺的响应曲面设计实验

在单因素实验基础上,进行 4 因素 3 水平的响应曲面设计 (Box-Behnken 中心组合法) 实验,以菊粉得率为响应值,各因素的 3 个水平采用 -1、0、1 进行编码 (见表 1)。

表 1 响应面设计试验因素水平和编码

Table 1 The factors and levels used in response surface methodology

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A:pH 值 pH value	4.0	4.5	5.0
B:提取温度 Extraction temperature(℃)	45	50	55
C:酶底比 Enzyme-substrate ratio(U/g)	5	10	15
D:提取时间 Extraction time(h)	1.0	1.5	2.0

1.5 菊芋菊粉的纯化及含量测定

菊芋粕酶法提取的粗菊粉提取液,沸水浴灭活果胶酶后离心去除沉淀,上清液经蒸馏水透析(截留分子量 500 Da)除盐后冷冻干燥,得到菊芋粕酶法提取粗菊粉。随后,初提粗菊粉和菊芋粕酶法提取粗菊粉,分别采用 DEAE-纤维素阴离子交换色谱柱(55 cm × 10.5 cm i. d.)进行纯化,收集蒸馏水洗脱部分,凝缩后冷冻干燥,得到纯化菊粉样品,分别命名为初次水提菊粉(primary water-extracted inulin, PWI)和二次酶提菊粉(secondary enzymatic-extracted inulin, SEI)。

纯化后菊粉样品的蛋白质含量采用考马斯亮蓝法测定(牛血清白蛋白为标准品),糖醛酸含量采用间羟基联苯法测定(半乳糖醛酸为标准品),菊粉含量测定方法同 1.3 所述。

1.6 菊粉聚合度的测定

菊粉样品的聚合度采用疏水相互作用液相色谱法(HILIC)^[8]进行测定,应用分析型麦芽糖基键合色谱柱(analytical 'click' maltose column, 5 μm, 100 Å, 100 × 4.6 mmid, 浙江华谱新创科技有限公司),蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖为标准品,流动相为 65% 乙腈水溶液,流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 ℃。

1.7 体外抗氧化活性的测定

总抗氧化能力采用 ABTS 法测定,样品总抗氧化能力以 Trolox 当量(TEAC,即每克样品相当于 x 毫克 Trolox, mgTE/g)及 ABTS 自由基清除率表示^[9];有机自由基 DPPH 清除能力,按照 Arise 等(2016)方法^[10]测定;羟基自由基(·OH)清除能力,按照 Halliwell 等^[11]的方法测定;超氧负离子清除能力,采用 NADH-NBT-PMS 体系^[12]测定;还原力采用 FRAP 方法^[13]测定;二价铁离子螯合能力,采用 Denis 等^[14]的方法测定,EDTA 作为阳性对照物。

1.8 数据处理

每项实验均重复 6 次,取平均值,数据以平均值 ± 标准差的形式表述。采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面优化实验的作图及分析。采用 Graph-Pad Prism 5.0 软件作图及分析数据,one-way ANOVA 进行显著性检验, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果分析

2.1 pH 值对菊粉得率的影响

从图 1A 可以看出,pH 值对菊粉得率影响显著,菊粉得率随着 pH 值升高呈先增加后降低的趋势,在 pH4.5 时,菊粉得率达到最大值 33.16%。这可能是由于在 pH4.5 时果胶酶的酶活最高,其造成的细胞壁中果胶类多糖的破坏促进了菊粉成分溶出。

2.2 温度对菊粉得率的影响

如图 1B 所示,在 40 ~ 60 ℃ 范围,菊粉得率随着温度的升高呈现先上升后下降的趋势,在 50 ℃ 时得率最高,菊粉得率为 31.76%。可见,该温度下果胶酶酶活作用与菊粉溶解性共同促进了菊芋粕菊粉的溶出。

2.3 酶底比对菊粉得率的影响

如图 1C 所示,菊粉得率随着酶底比的增加呈现先增加后下降的趋势。在酶底比 0.315 ~ 2.5 U/g 时,菊粉得率随酶底比增加而显著上升;2.5 ~ 20 U/g 范围内,菊粉得率变化较小,10 U/g 时菊粉得率最高,达到 35.08%;酶底比大于 20 U/g 时,菊粉得率随酶底比增加而显著下降。上述结果可能由于酶底比较低时,果胶酶未能充分破坏细胞壁,而在较高酶底比时,提取液粘度增大造成菊粉不易溶出。

2.4 提取时间对菊粉得率的影响

如图 1D 所示,当提取时间不足 1.5 h 时,延长提取时间可以显著增加菊粉得率。提取 1.5 h 时,菊粉得率为 33.1%,继续延长提取时间对菊粉得率的影响较小。

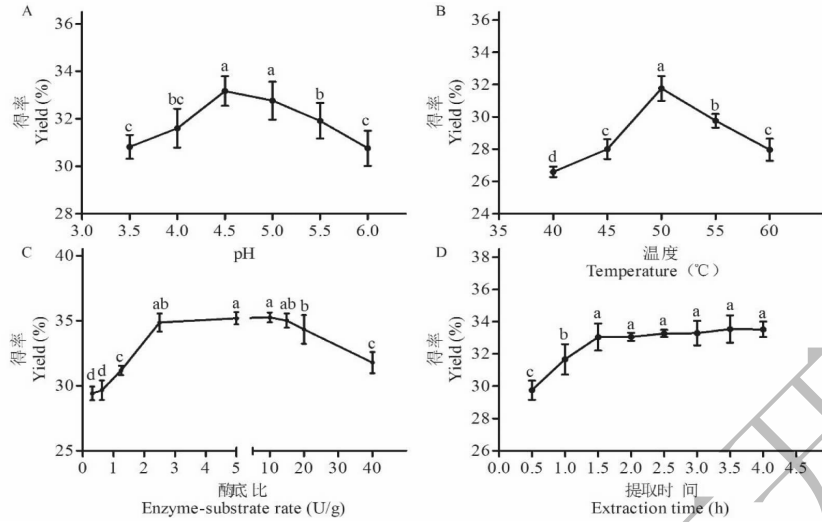


图1 pH值(A)、提取温度(B)、酶底比(C)、提取时间(D)对菊芋粕菊粉得率的影响

Fig. 1 Effects of pH, extraction temperature, enzyme-substrate ratio and extraction duration on the yield

注:图中小写字母表示单因素实验中具有显著差异的不同处理组($P < 0.05$)。Note: Lowercase letters mean a significant difference among the different treatments at $P < 0.05$ level in single factor experiment.

2.5 响应曲面设计实验结果

在单因素实验基础上,根据 Box-Benhnken 中心组合实验设计原理,以菊粉提取率为响应值,以 pH 值(A)、温度(B)、酶底比(C)、提取时间(D)为

自变量,建立四因素三水平中心组合实验设计,共包括 29 个实验方案,24 个分析试验点,5 个中心试验点,用来计算试验误差。菊芋粕菊粉提取的响应面实验设计及结果见表 2。

表 2 响应面实验设计及结果($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Box-Benhnken design and results($n = 6, \bar{x} \pm s$)

实验号 No.	A: pH 值 pH value	B: 温度 Extraction temperature (°C)	C: 酶底比 Enzyme-substrate ratio (U/g)	D: 提取时间 Extraction time (h)	Y: 菊粉得率 Yield of inulin (%)
1	0	1	0	-1	33.37 ± 0.91
2	-1	-1	0	0	34.73 ± 0.35
3	1	0	0	-1	31.89 ± 1.25
4	0	-1	0	-1	32.64 ± 1.43
5	0	-1	0	1	35.35 ± 0.56
6	1	1	0	0	31.28 ± 0.61
7	-1	0	0	-1	34.42 ± 0.80
8	1	0	0	1	33.69 ± 0.49
9	0	0	0	0	36.22 ± 0.98
10	-1	0	-1	0	34.12 ± 0.48
11	0	0	1	-1	32.96 ± 0.37
12	0	0	0	0	35.88 ± 0.77
13	1	0	1	0	29.98 ± 0.56
14	-1	0	0	1	33.05 ± 0.33
15	-1	1	0	0	31.47 ± 0.98
16	0	0	1	1	34.66 ± 1.41

续表 2(Continued Tab. 2)

实验号 No.	A:pH 值 pH value	B:温度 Extraction temperature ($^{\circ}\text{C}$)	C:酶底比 Enzyme-substrate ratio (U/g)	D:提取时间 Extraction time (h)	Y:菊粉得率 Yield of inulin (%)
17	-1	0	1	0	32.96 ± 0.42
18	1	-1	0	0	31.37 ± 1.14
19	0	0	0	0	35.38 ± 0.48
20	0	0	-1	1	36.91 ± 0.87
21	0	1	0	1	33.06 ± 0.32
22	0	0	0	0	36.75 ± 0.65
23	0	0	-1	-1	34.36 ± 0.54
24	0	1	-1	0	33.46 ± 1.33
25	0	1	1	0	31.52 ± 0.61
26	0	0	0	0	35.24 ± 0.54
27	0	-1	1	0	32.75 ± 0.78
28	0	-1	-1	0	33.55 ± 1.11
29	1	0	-1	0	33.35 ± 0.33

2.5.1 回归模型的建立

采用 Design-Expert 8.0.6 对所得数据进行回归分析,对各因素回归拟合后,得到回归方程如下:

$$Y = 35.66 - 0.077A - 0.52B - 0.91C + 0.59D + 0.79BC + 0.79AD - 0.76BD - 2.05A^2 - 1.76B^2 - 1.01C^2$$

2.5.2 回归模型的方差分析

为了确定响应面实验设计中 4 个因素对菊粉提取效果的影响,以及各个因素的交互作用和显著性,

进行回归方差分析(表 3)。结果表明,失拟项不显著($P > 0.05$),而模型极显著($P < 0.0001$),其中 $R^2 = 0.9011$,说明预测值和实际值具有高度的相关性。通过模拟系数显著性检验,得到提取因素的主效应关系: $A > D > C > B$,即酶底比 > pH 值 > 提取温度 > 提取时间,因素 BD 、 AB 、 AD 和 C^2 对提取效果显著,而因素 A 、 B 、 C 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对提取效果具有极显著的影响。

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源 Source	平方和 Quadratic sum	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
Model	78.36616	14	5.597583	13.57995	< 0.0001	**
A	7.041072	1	7.041072	17.08191	0.0010	**
B	3.253125	1	3.253125	7.892207	0.0139	**
C	9.944481	1	9.944481	24.12569	0.0002	**
D	4.153633	1	4.153633	10.07687	0.0068	*
AB	2.521744	1	2.521744	6.117848	0.0268	*
AC	1.227664	1	1.227664	2.97836	0.1064	
AD	2.4964	1	2.4964	6.056363	0.0275	*
BC	0.322624	1	0.322624	0.782698	0.3913	
BD	2.286144	1	2.286144	5.546273	0.0336	*
CD	0.181476	1	0.181476	0.440268	0.5178	
A ²	28.96158	1	28.96158	70.2619	< 0.0001	**

续表 3 (Continued Tab. 3)

方差来源 Source	平方和 Quadratic sum	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
B ²	21.747 13	1	21.747 13	52.759 38	< 0.000 1	**
C ²	7.559 301	1	7.559 301	18.339 16	0.000 8	**
D ²	0.819 918	1	0.819 918	1.989 151	0.180 3	
残差	5.770 725	14	0.412 195			
失拟	4.229 425	10	0.422 943	1.097 626	0.506 1	Not significant
误差	1.541 299	4	0.385 325			
总和	84.136 89	28				

注: ** $P < 0.01$ 为极显著; * $P < 0.05$ 为显著。

Note: ** $P < 0.01$ was considered to be extremely significant; * $P < 0.05$ was considered to be significant.

2.5.3 响应面分析

根据软件 Design-Expert 获得响应值的 3D 曲面,分析各因素对菊粉得率的影响及各因素之间的交互作用。图 2~7 中所示为 pH、提取温度、酶底比、提取时间中任意两个因素为零水平时,其余两个因素间的交互作用对菊粉得率的影响。菊粉的得率随其中任意两个变量的增加均呈上升趋势,达到某一定值时,曲面稍下降或趋于平缓。图 2、4 和 6 曲

面陡峭,说明 pH 和温度、pH 和时间、温度和时间之间交互作用明显,与方差分析结果一致。

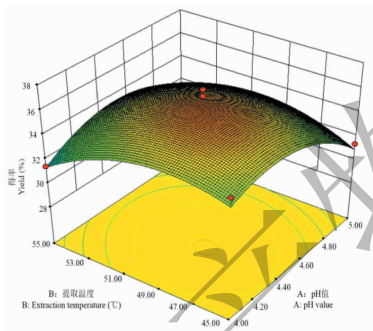


图 2 pH 值和提取温度对菊粉得率影响的响应面图

Fig. 2 Response surface plot for pH value and extraction temperature effect on the yield of inulin

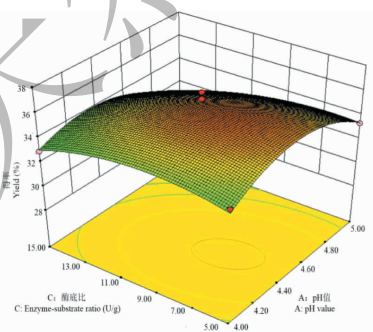


图 3 pH 值和酶底比对菊粉得率影响的响应面图

Fig. 3 Response surface plot for pH value and enzyme-substrate ratio effect on the yield of inulin

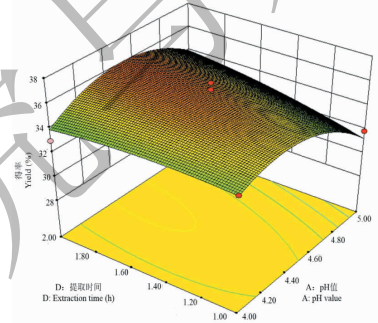


图 4 pH 值和提取时间对菊粉得率影响的响应面图

Fig. 4 Response surface plot for pH value and extraction time effect on the yield of inulin

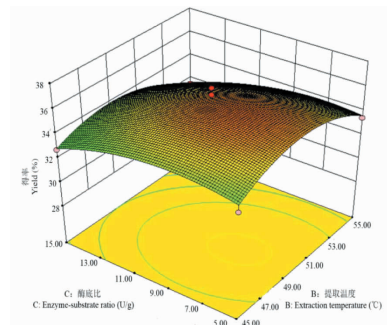


图 5 提取温度和酶底比对菊粉得率影响的响应面图

Fig. 5 Response surface plot for extraction temperature and enzyme-substrate ratio effect on the yield of inulin

2.5.4 参数优化及最优条件的验证

在选取的因素范围内,根据上述回归模型分析得出,SEI 的最佳酶法提取条件为:pH 值 4.51、提取温度 48.46 °C、酶底比 7.59 U/g、提取时间 2 h。根据最佳条件和实际提取条件可操控性,调整提取条件为:pH4.5、提取温度 50 °C、酶底比 7.5 U/g、提取

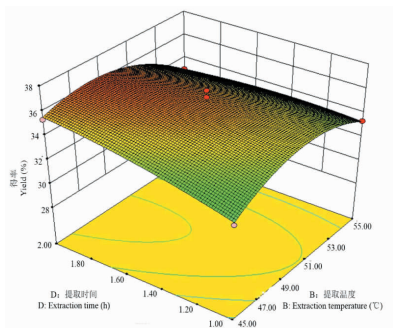


图6 提取温度和提取时间对菊粉得率影响的响应面图

Fig. 6 Response surface plot for extraction temperature and extraction time effect on the yield of inulin

时间 2 h。经 3 次重复实验,测得的 SEI 得率为 $35.30\% \pm 0.85\%$,与预测值 36.6% 无显著差别,说明上述模型与实际情况拟合较好。与传统热水浸提法相比(提取条件:料液比 1:20 w/w,提取时间 2 h,提取温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$,菊粉得率: $25.26\% \pm 0.50\%$),SEI 得率提高 38.16% 。

2.6 初次水提菊粉(PWI)和二次酶提菊粉(SEI)组成成分比较

由于提取顺序和提取方式的不同可能会对菊粉

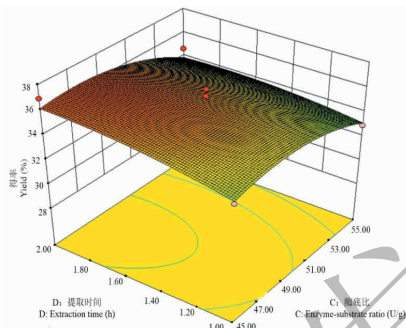


图7 酶底比和提取时间对菊粉得率影响的响应面图

Fig. 7 Response surface plot for enzyme-substrate ratio and extraction time effect on the yield of inulin

的组成产生影响,我们对 PWI 和 SEI 的组成成分进行了测定。结果如表 4、表 5 所示,SEI 的总糖和菊粉含量均显著高于 PWI ($P < 0.05$)。在菊粉聚合度方面,PWI 中蔗糖三糖和蔗糖四糖含量较高,而 SEI 中蔗糖五糖、蔗糖六糖及其以上聚合度菊粉的含量较高。该结果可能是由于低聚合度菊粉溶解度较大而最先被提取,而聚合度较高的菊粉溶解度较小或受限于果胶等细胞壁成分束缚而较难被提取。当采用果胶酶辅助提取时,细胞壁成分被破坏,聚合度较高的菊粉被提取出来。

表4 纯化菊粉组分的总糖、菊粉、半乳糖醛酸和蛋白质含量

Table 4 Total sugar, inulin, galacturonic acid and protein content of purified inulin fractions

多糖组分 Polysaccharide component	总糖含量 Total sugar content (%)	菊粉含量 Inulin content (%)	糖醛酸含量 Uronic acid content (%)	蛋白含量 Protein content (%)
PWI	82.67 ± 0.2^b	77.74 ± 0.30^b	0.08 ± 0.01^b	0.22 ± 0.03^b
SEI	90.06 ± 0.5^a	89.21 ± 0.52^a	0.23 ± 0.02^a	0.36 ± 0.03^a

注:不同小写字母表示 PWI 和 SEI 之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate a significant difference between PWI and SEI ($P < 0.05$).

表5 纯化菊粉组分的聚合度组成分析结果

Table 5 Polymerization analysis result of purified inulin fractions

组分 Component	蔗糖三糖 Kestose (%)	蔗糖四糖 Nystose (%)	蔗糖五糖 Fructo-pentasaccharide (%)	蔗糖六糖及其以上聚合度菊粉 Inulin with six and higher polymerization (%)
PWI	24.25 ± 0.44^a	29.28 ± 0.62^a	15.48 ± 0.87^b	30.99 ± 0.19^b
SEI	16.99 ± 0.26^b	8.09 ± 0.16^b	20.72 ± 0.26^a	54.19 ± 0.37^a

注:不同小写字母表示 PWI 和 SEI 之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate a significant difference between PWI and SEI ($P < 0.05$).

2.7 抗氧化活性测定结果

2.7.1 总抗氧化能力

采用总抗氧化能力法测定 ABTS 自由基清除能力, Trolox 为标准品,标准曲线绘制以 Trolox 含量 X ($\text{ng}/\mu\text{L}$) 为横坐标, ABTS 自由基清除率 Y (%) 为纵

坐标,回归方程为 $Y = 0.0075X$ ($R^2 = 0.9971$)。结果如图 8 所示, PWI 和 SEI 的 ABTS 自由基清除能力均随着样品浓度增加而上升。当样品浓度为 5 mg/mL 时, SEI 的 ABTS 自由基清除能力显著优于 PWI ($P < 0.05$), 二者 TEAC 值分别为 3.93 ± 1.02

和 2.95 ± 0.47 mg TE/g。

2.7.2 DPPH 自由基清除能力

如图 9 所示,两种菊粉样品的 DPPH 清除能力均随着剂量浓度的增加而呈上升趋势。在 $0 \sim 0.4$ mg/mL 浓度范围内,SEI 的 DPPH 清除能力优于 PWI,但是在 $0.4 \sim 0.6$ mg/mL 浓度范围时二者差异发生反转, $0.6 \sim 1.0$ mg/mL 时 PWI 的 DPPH 清除能力显著优于 SEI。 1.0 mg/mL 浓度时,PWI 和 SEI 的 DPPH 清除率分别为 $15.1\% \pm 0.139\%$ 和 $10.6\% \pm 0.76\%$ 。

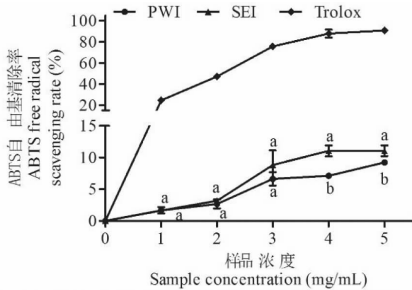


图 8 初次水提菊粉 (PWI) 和二次酶提菊粉 (SEI) 的总抗氧化能力

Fig. 8 Total antioxidant capacities of primary water-extracted inulin (PWI) and secondary enzymatic-extracted inulin (SEI).

注:不同小写字母表示 PWI 和 SEI 之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate a significant difference between PWI and SEI ($P < 0.05$).

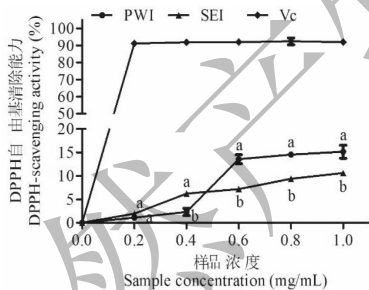


图 9 初次水提菊粉 (PWI) 和二次酶提菊粉 (SEI) 的 DPPH 自由基清除率测定结果

Fig. 9 DPPH-scavenging activities of primary water-extracted inulin (PWI) and secondary enzymatic-extracted inulin (SEI).

注:不同小写字母表示 PWI 和 SEI 之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate a significant difference between PWI and SEI ($P < 0.05$).

2.7.3 羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除能力

如图 10 所示,两种菊粉样品的 $\cdot\text{OH}$ 清除率均随着浓度的增加而上升。在 $1 \sim 5$ mg/mL 浓度范围

内,PWI 的 $\cdot\text{OH}$ 清除率为 $1.58\% \sim 18.01\%$,SEI 的 $\cdot\text{OH}$ 清除率为 $1.15\% \sim 19.32\%$ 。在 1 和 4 mg/mL 浓度时,PWI 清除能力显著高于 SEI ($P < 0.05$); 5 mg/mL 时,SEI 清除能力显著高于 PWI ($P < 0.05$)。

2.7.4 超氧负离子清除能力

如图 11 所示,两种菊粉样品的超氧负离子清除能力均随着剂量浓度的增加而增强,但是 SEI 比 PWI 的超氧负离子清除能力增强幅度更加显著。在 1 mg/mL 浓度时,PWI 的超氧负离子清除能力显著优于 SEI,而 $3 \sim 5$ mg/mL 浓度时,SEI 的超氧负离子清除能力显著优于 PWI。 5 mg/mL 浓度时,SEI 和 PWI 的超氧负离子清除率分别为 $16.47\% \pm 0.25\%$ 和 $20.15\% \pm 0.68\%$ ($P < 0.05$)。

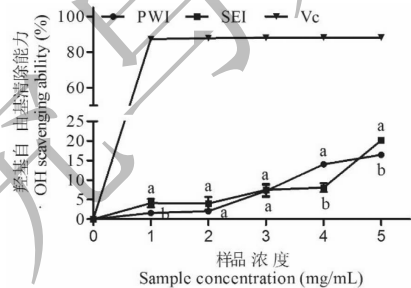


图 10 初次水提菊粉 (PWI) 和二次酶提菊粉 (SEI) 的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力

Fig. 10 Hydroxyl radical-scavenging activities of primary water-extracted inulin (PWI) and secondary enzymatic-extracted inulin (SEI).

注:不同小写字母表示 PWI 和 SEI 之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate a significant difference between PWI and SEI ($P < 0.05$).

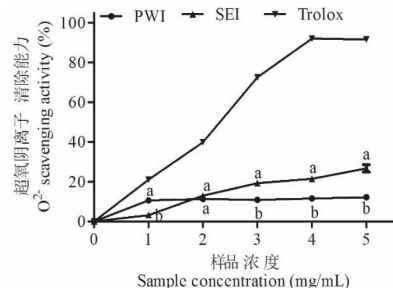


图 11 初次水提菊粉 (PWI) 和二次酶提菊粉 (SEI) 的超氧负离子清除能力

Fig. 11 Superoxide anion scavenging activities of primary water-extracted inulin (PWI) and secondary enzymatic-extracted inulin (SEI).

注:不同小写字母表示 PWI 和 SEI 之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate a significant difference between PWI and SEI ($P < 0.05$).

2.7.5 Fe²⁺ 螯合能力

如图 12 所示,SEI 的 Fe²⁺ 螯合能力呈浓度剂量依赖关系,随着浓度的增加而上升。在 5 mg/mL 时,其 Fe²⁺ 螯合率达到 15.02 ± 0.50%。然而,PWI 未表现出 Fe²⁺ 螯合能力。

2.7.6 还原力

如图 13 所示,两种菊粉样品的还原力随浓度增加而增强。在样品浓度为 5 mg/mL 时,二者的还原力达到了最大值,其中 PWI 的还原力显著优于 SEI,700 nm 时二者的吸光度分别为 0.129 ± 0.006 和 0.083 ± 0.006 ($P < 0.05$)。

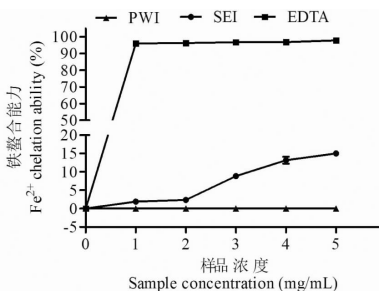


图 12 初次水提菊粉(PWI)和二次酶提菊粉(SEI)的 Fe²⁺ 螯合能力

Fig. 12 Fe²⁺ chelation abilities of primary water-extracted inulin (PWI) and secondary enzymatic-extracted inulin (SEI)

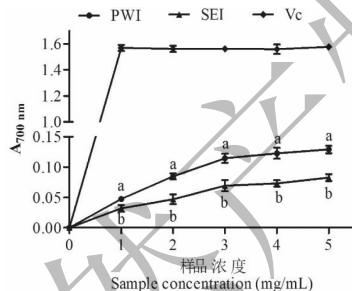


图 13 初次水提菊粉(PWI)和二次酶提菊粉(SEI)的还原力

Fig. 13 Reducing power of primary water-extracted inulin and secondary enzymatic-extracted inulin.
注:不同小写字母表示 PWI 和 SEI 之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate a significant difference between PWI and SEI ($P < 0.05$).

3 结论

菊粉是由 D-果糖经 β -1,2 糖苷键连接而成的线性直链状多糖,末端常含一个葡萄糖残基。欧洲的菊粉工业化生产以菊苣为原料,在我国则以菊芋为原料。我国开展菊芋菊粉研究的起步较晚,且无法

应用欧洲的菊苣工业化生产技术,因此导致了菊芋菊粉生产工艺相对落后。目前,我国菊芋菊粉的工业生产大多采用甜菜制糖的提取设备和生产工艺。魏凌云等采用响应面法对菊芋菊粉的热热水浸提工艺进行了优化,在自然 pH 值、温度为 76.7 °C、液固比为 10.56:1 (v/w)、提取时间 20 min 的最佳工艺条件下,菊粉提取率达到 83.6%^[15]。胡建锋等采用超声波辅助提取技术对菊粉热水提取工艺进行改进,菊粉得率达到 63.37%^[16]。上述热水浸提生产菊芋菊粉的过程中,产生了大量的工业废弃物-菊芋粕。菊芋粕中仍含有果胶、菊粉、纤维素/半纤维素等大量糖类化合物,其中菊粉含量最多可达到 6%。因此,从菊芋粕中深层提取菊粉,有望在不改变原有菊粉生产工艺的条件下,以较低成本解决国内企业菊芋菊粉提取效率低的产业化瓶颈问题。目前,研究人员已经开始关注菊芋粕的高效利用,已有关于菊芋粕中果胶和单糖的二次利用研究的报道^[1,8],但是还没有关于菊芋粕中菊粉提取技术的报道。

本研究以菊芋粕为研究材料,采用酶法提取技术对其中残留菊粉进行深层提取,提高残余菊粉的提取效率,并对 PWI 和 SEI 的组成和抗氧化活性进行比较研究,初步探讨提取方式和顺序对菊粉组成和活性的影响。结果表明,采用响应面法优化的果胶酶辅助提取菊粉的最佳工艺 (pH 值 4.5、提取温度 50 °C、酶底比 7.5 U/g、提取时间 2 h),菊芋粕菊粉的得率比传统热水浸提法提高 38.16%。已有研究发现,提取方法能够影响多糖的抗氧化活性,特别是酶法提取多糖较传统热水水提多糖具有更强的抗氧化能力^[19,20]。同样,本研究结果表明,SEI 的抗氧化活性优于 PWI。体外抗氧化活性评价方法涉及到自由基链反应的引发、传递与终止每个环节,并且测得不同体外抗氧化活性评价方法之间的抗氧化活性基本趋势一致。二者产生抗氧化能力差异的原因推测可能有 2 个方面:(1)SEI 羟基等活性基团暴露量较多,易与自由基充分作用,进而能将更多的自由基转变成稳定的物质,终止自由基的链反应;(2)SEI 中高聚合度菊粉含量较高,粘度较大,易于结合那些能与 H₂O₂ 反应的金属离子,形成螯合物,从而遏抑羟基自由基的产生^[21]。综上所述,本研究发现果胶酶法提取技术能够显著增加菊芋粕菊粉的得率,且酶法提取菊芋粕菊粉 (SEI) 与热水初次提取菊芋菊粉 (PWI) 相比抗氧化能力更强。因此,果胶酶辅

助提取方法有望为菊芋粕菊粉的高效利用问题提供新的解决思路。

参考文献

- Zhang W, Li XY, Zhang XL, et al. Production technology of sugar extraction from Jerusalem artichoke residue [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2011, 37:206-209.
- Long XH, Tian J, Zhong QW, et al. Study the cultivars comparison of *Helianthus Tuberosus* L. and planting technology of low cost and high quality in non-infield of Qinghai and Xinjiang provinces [J]. Chin Agric Bull(中国农学通报), 2010, 26:354-358.
- Deng YB, Sun ZL, Ge B, et al. A new feed additive-inulin [J]. Hunan J Anim Sci Vet Med(湖南畜牧兽医), 2005, 6:29-30.
- Li Z, Yuan PC, Wang YTC, et al. The biological activity of *Jerusalem artichoke* polysaccharides with different molecular weights[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:1226-1230.
- Liu SY, Shi XJ, Xu LL, et al. Optimization of pectin extraction from *Jerusalem artichoke* Pulp and analysis of product properties[J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(24):29-34.
- Zhang W, Li XY, Zhang XL, et al. Optimization of extraction conditions of protein from *Jerusalem artichoke* residue by response surface methodology[J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2012, 33:305-307.
- Zhang F, Tian M, Du M, et al. Enhancing the activity of pectinase using pulsed electric field(PEF) treatment[J]. J Food Engin, 2017, 205:56-63.
- Fu Q, Liang T, Zhang X, et al. Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column[J]. Carbohydr Res, 2010, 345:2690-2697.
- Labrinea EP, Georgiou CA. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay[J]. Anal Chim Acta, 2004, 526(1):63-68.
- Arise AK, Alashi AM, Nwachukwu ID, et al. Antioxidant activities of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions [J]. Food Funct, 2016, 7:2431-2437.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method—a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals [J]. Anal Biochem, 1987, 165:215-219.
- Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts [J]. Life Sci, 1997, 60:763-771.
- Huang JH, Xu WW, Lin SL, et al. Phytochemical profiles of marine phytoplanktons: an evaluation of their *in vitro* antioxidant and anti-proliferative activities [J]. Food Funct, 2016, 7:5002-5017.
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers [J]. Arch Biochem Biophys, 1994, 315:161-169.
- Wei LY, Wang JH, Zheng XD. Optimization of inulin extraction process from *Jerusalem artichoke* tubers by response surface methodology [J]. Food Sci(食品科学), 2008, 10:191-194.
- Hu JF, Qiu SY, Zhou JL, et al. The study of ultrasonic-assisted extraction of inulin from *Jerusalem artichoke* [J]. Guangxi J Light Ind(广西轻工业), 2009, 125(4):6-8.
- Huang YL, Gao QY, Quan T, et al. Effects of different extraction methods on the composition and antioxidant activity of the polysaccharides in *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb. [J]. Modern Food Sci Tech(现代食品科技), 2018, 34:126-131.
- Jing YS, Zhang DS, Zhang RJ, et al. Effect of different extraction methods on the properties and biological activity of polysaccharides from *Radix Glehniae* [J]. Food Mach(食品与机械), 2017, 33:149-153.
- Wu YY, Tian SY, Lu SF, et al. Effects of different extraction techniques on physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* [J]. J Food Safety Qual(食品安全质量检测学报), 2018, 9:5164-5170.
- Wang Q, Li DD, Pan YY, et al. Effect of different extraction methods on the extraction ratio and antioxidant activity of polysaccharides from *Gastrodia elata* Bl. [J]. Food Mach(食品与机械), 2017, 33:146-150.
- Wang Q, Li DD, Pan YY, et al. Effect of different extraction methods on the extraction ratio and antioxidant activity of polysaccharides from *Gastrodia elata* Bl. [J]. Food Mach(食品与机械), 2017, 33:146-150.