

- [9] 文雨欣, 李冰, 郑青松, 等. 莲蓬多酚的提取工艺优化、鉴定及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(11): 179-187; 194.
- [10] 王琪, 唐惠儒. 黑果枸杞和宁夏枸杞果实中多酚类物质组成的差异研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2019, 39(1): 39-46.
- [11] 黄丽, 於洪建, 吴巍, 等. 枸杞多酚提取物中总多酚的测定[J]. 药物评价研究, 2012, 35(4): 273-275.
- [12] 李珍, 哈益明, 李安, 等. 响应面优化苹果皮渣多酚超声提取工艺研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(21): 4569-4577.
- [13] 王妍惠. 红树莓叶多酚提取纯化及其抗氧化活性研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2021.
- [14] Chen J C, Zhang X, Huo D, *et al.* Preliminary characterization, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from *Mallotus furetianus*[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 215(12): 307-315.
- [15] 田富林, 黄文晶, 张驰, 等. HPD600型大孔树脂纯化麦麸多酚及其抗氧化活性和定性分析[J]. 食品与机械, 2022, 38(5): 173-178; 242.
- [16] 梁寒峭, 赵宇焱, 朱子冬, 等. 大孔树脂纯化脱油油樟叶渣中总黄酮工艺研究[J]. 离子交换与吸附, 2021, 37(3): 272-280.
- [17] 马景蕃, 谢晓倩, 杨吴坤, 等. 大孔树脂纯化白背天葵多酚及其体外抗氧化研究[J]. 热带作物学报, 2021, 42(2): 575-582.
- [18] 马升, 高青莹, 李莉, 等. 发酵金针菇多酚的提取、纯化及抗油脂氧化能力研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(2): 121-126.
- [19] 张洋洋, 张作法, 宋婷婷, 等. 杨树桑黄多酚类化合物纯化及抗氧化活性[J/OL]. 菌物学报: 1-13 [2023-4-19]. <https://doi.org/10.13346/j.mycosystema.220467>.
- [20] Guo Y Z, Wang J J, Lu L L, *et al.* Application of mid-infrared spectroscopy in analyzing different segmented production of *Angelica* by AB-8 macroporous resin[J]. *J Mol Struct*, 2016, 1103: 61-69.
- [21] 林宝妹, 邱珊莲, 张帅, 等. 大孔树脂纯化嘉宝果叶片多酚及其生物活性和组成分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(5): 563-572.
- [22] 李晓洁, 刘金鑫, 李建华, 等. 大孔吸附树脂纯化茶多酚的工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 214-223.

生姜总黄酮提取工艺优化及其抗氧化性研究

马波, 乔友志, 朱建国*

(连云港师范高等专科学校医药与生物材料研究所, 江苏连云港 222006)

摘要: 目的 优化生姜总黄酮的酶辅助碱法提取工艺, 并评价其抗氧化性。方法 在单因素试验基础上, 以酶解温度、料液比、pH值、酶解时间为影响因素, 总黄酮得率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。·OH、DPPH·法检测所得生姜总黄酮的抗氧化性。结果 最佳条件为酶解温度 40℃、料液比 1:35、pH 9.0、酶解时间 60 min, 总黄酮得率为 2.713%。总黄酮对·OH、DPPH·清除率的 IC₅₀值分别为 0.024、0.039 mg/mL。结论 该方法切实可行, 可用于酶辅助碱法提取具有较强抗氧化活性的生姜总黄酮。

关键词: 生姜; 总黄酮; 提取工艺; 酶辅助碱法; Box-Behnken 响应面法; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3083-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.039

生姜味辛, 性微温, 在全国各地广为种植^[1]。作为药食同源的植物, 生姜既可作调味品用于改善食物风味, 又可用作中药, 具有散寒祛风、抑菌解毒、化痰止咳等功效。生姜富含多酚、黄酮、氨基酸、可溶性多糖等活性成分, 其中黄酮类为生姜主要活性成分, 具有抗氧化、抗衰老、促进血液循环、降低心肌耗氧量、改善心肌收缩等作用^[2-4]。近年来, 生姜的综合开发利用已成为国内外的研究

热点。

目前, 生姜总黄酮的提取大多为有机溶剂提取^[5-7]。碱法是利用黄酮中含有的酚羟基具有酸性, 易溶于碱水的性质进行提取^[8]。果胶酶能够催化植物细胞壁中果胶类物质的分解, 加速活性物质的释放, 已用于山楂^[9]、白术^[10]等药材中黄酮的提取, 并取得较好的效果。本研究将发酵多粘类芽孢杆菌产生的碱性果胶粗酶液用于酶解生姜, 碱法

收稿日期: 2023-12-06

基金项目: 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202011585019Y)

作者简介: 马波(1975—), 男, 博士, 副教授, 从事生物学及天然产物研究。E-mail: mabo7512@163.com

*通信作者: 朱建国(1971—), 男, 硕士, 副教授, 从事植物活性物质的研究。E-mail: zjgz117@sohu.com

提取总黄酮。该方法以水为溶剂，廉价易得、安全无毒，同时不需要复杂的酶分离和纯化工艺，有利于降低成本，为生姜中黄酮的开发利用提供依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 生姜购自当地市场（产地山东临沂），经连云港师范高等专科学校邵世光教授鉴定为正品，清洗后切为薄片，烘干后粉碎，过40目筛。多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 20185 由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。维生素 C 购自国药集团化学试剂有限公司。芦丁对照品购自北京化学试剂研究所有限责任公司，纯度 $\geq 98\%$ ；其余试剂为国产分析纯。

1.2 仪器 DHG-L9240A 精密型烘箱（上海笃特科学仪器有限公司）；GFSJ-18 高效粉碎机（常州市乐星干燥设备有限公司）；XD-52AA 旋转蒸发仪（上海贤德实验仪器有限公司）；LS-35HD 高压蒸汽灭菌锅（江阴滨江医疗设备有限公司）；BS-2E 恒温振荡器（常州华邦仪器制造有限公司）；UV2550 分光光度计（日本岛津公司）。

2 方法与结果

2.1 果胶粗酶法提取工艺 将多粘类芽孢杆菌保存于斜面培养基（牛肉膏 0.3%、蛋白胨 0.5%、氯化钠 0.5%、琼脂 2.0%，pH 7.0）中，用无菌水洗下多粘类芽孢杆菌，制成浓度为 1×10^7 CFU/mL 的新鲜菌悬液，35℃下接种至种子培养基（玉米浆 3.0%、蛋白胨 1.0%、蔗糖 2.0%、硫酸镁 0.1%、磷酸氢二钾 1.8%、磷酸二氢钾 0.6%，pH 7.0），接种量 10%，装液量 50 mL/250 mL，150 r/min 振荡培养 24 h。35℃下将种子培养液接种至发酵培养基（果胶 1.0%、蛋白胨 2.0%、磷酸氢二钾 0.6%、硫酸镁 0.02%、氯化钠 1.0%、十二烷基硫酸钠 1.0%、磷酸二氢钾 0.3%，pH 9.0），接种量 9%，装液量 50 mL/250 mL，180 r/min 振荡培养 36 h。发酵液 3 000 r/min 离心 8 min，取上清液，即得果胶粗酶液^[11]。采用 DNS 分光光度计测定法^[12]，测定发酵粗酶液酶活力为 313 U/mL。将生姜粉末按一定的料液比加入果胶粗酶液中酶解一定时间，过滤，滤液即为生姜总黄酮样品液。

2.2 生姜总黄酮得率的测定 精密称取芦丁对照品适量，30%乙醇溶解，制成 0.15 mg/mL 的溶液。分别取 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 溶液置于 10 mL 量瓶中，加入 0.3 mL 5%亚硝酸钠溶液，摇匀，静置 5 min，加入 0.3 mL 硝酸铝溶液，摇匀静置 6 min，加入 2 mL 4%氢氧化钠溶液，30%乙醇定容，摇匀，静置 10 min。以对照品质量浓度为横坐标（X），510 nm 波长处吸光度为纵坐标（A）进行回归^[12]，得到方程为 $A = 1.0804X + 0.0057$ ($R^2 = 0.9992$)。准确移取 1.0 mL 生姜总黄酮样品液于量瓶，计算总黄酮质量浓度和得率，公式为生姜总黄酮得率 = 总黄酮质量浓度 × 稀释倍数 × 样品体积 / 生姜粉末质量 × 100%。

2.3 单因素试验 参考文献 [11, 13] 报道。

2.3.1 酶解温度 按料液比 1 : 25 将适量生姜粉末加入 pH 9.0 的粗酶液中，分别在 30、35、40、45、50℃下酶解

60 min，按“2.2”项下方法测定生姜总黄酮得率，结果见图 1。由此可知，随着酶解温度的升高生姜总黄酮得率先增大后减小，在 45℃时达到最大值，过低或过高的温度会影响果胶酶活性^[14]。

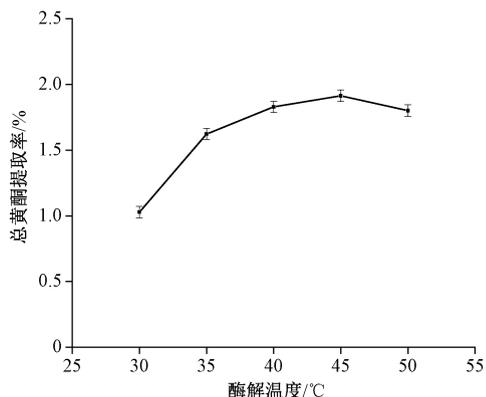


图 1 酶解温度对总黄酮得率的影响 (n=3)

2.3.2 料液比 分别按料液比 1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40 将适量生姜粉末加入粗酶液中，在 50℃、pH 9.0 下酶解 60 min，按“2.2”项下方法测定生姜总黄酮得率，结果见图 2。由此可知，料液比为 1 : 30 时，生姜总黄酮得率最大。当粗酶液量增加后，能够促进酶解反应的进行，也有利于总黄酮的释放。然而当酶量过大后，底物果胶类物质浓度未能对果胶酶达到饱和，导致酶的作用受到抑制，生姜总黄酮得率减小。

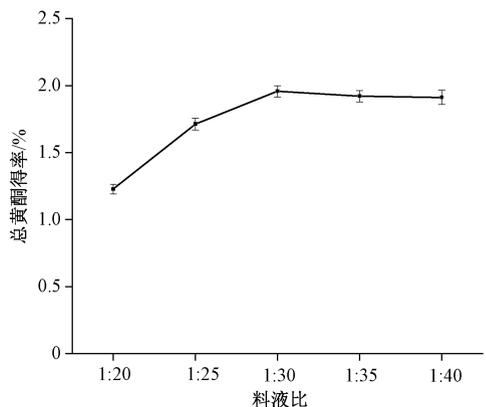


图 2 料液比对总黄酮得率的影响 (n=3)

2.3.3 pH 值 分别调节粗酶液的 pH 为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0，按料液比 1 : 25 将适量生姜粉末加入粗酶液中，50℃下酶解 60 min，按“2.2”项下方法测定生姜总黄酮得率，结果见图 3。由此可知，随着 pH 值的增加生姜总黄酮得率先增大后减小，在 pH 8.5 时达到最大值。pH 值会影响果胶酶的活性，进而会影响其降解底物果胶类物质的效果。多粘类芽孢杆菌产生的碱性果胶粗酶，其最适 pH 一般为 8.0 ~ 10.0^[11]，但 pH 值过高会降低黄酮的稳定性^[13]，导致得率下降。

2.3.4 酶解时间 按料液比 1 : 25 将适量生姜粉末加入 pH 9.0 的粗酶液中，50℃下分别酶解 40、50、60、70、80

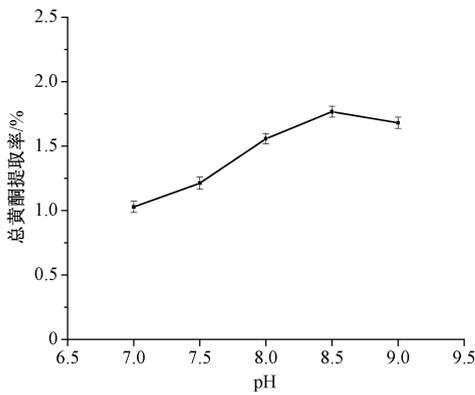


图3 pH对总黄酮得率的影响 (n=3)

min,按“2.2”项下方法测定生姜总黄酮得率,结果见图4。由此可知,随着酶解时间的延长生姜总黄酮得率先增大后减小,在70 min时达到最大值。因为较长的酶解时间能够使酶充分作用于底物果胶类物质,使其降解完全,总黄酮类成分持续释放到溶液中。而时间过长,总黄酮在高温下易氧化流失^[15]。

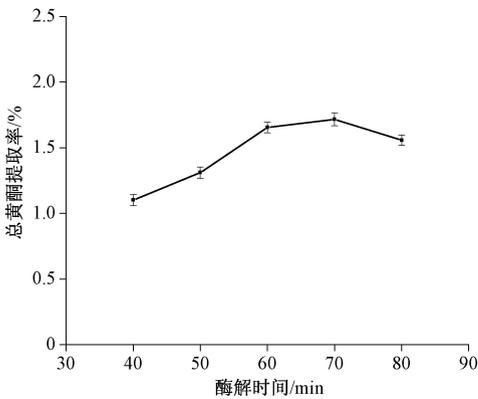


图4 酶解时间对总黄酮得率的影响 (n=3)

2.4 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上,以酶解温度(A)、料液比(B)、pH值(C)、酶解时间(D)为影响因素,总黄酮得率(Y)为评价指标,设计29组试验,每组3份,采用Design Expert 8.0.6软件进行分析,因素水平见表1,结果见表2。

表1 Box-Behnken 响应面法因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 酶解温度/℃	40	45	50
B 料液比	1:25	1:30	1:35
C pH	8.0	8.5	9.0
D 酶解时间/min	60	70	80

通过 Design-Expert 8.0.6 软件对表2数据进行多元回归拟合,得方程为 $Y=2.30-0.11A-0.11B+0.31C+0.084D+0.012AB+0.023AC+0.49AD+0.19BC-0.39BD-0.16CD-0.20A^2-0.26B^2-0.24C^2-0.29D^2$,方差分析见表3。由此可知,模型 $P<0.01$,具有高度显著性;失拟项 $P>0.05$,表明未知因素对实验结果干扰很小;相关系数 $R^2=0.9255$,

表2 Box-Behnken 响应面法设计与结果

试验号	因素				Y 总黄酮得率/%
	A	B	C	D	
1	-1	-1	0	0	2.106
2	1	-1	0	0	1.827
3	-1	1	0	0	1.835
4	1	1	0	0	1.603
5	0	0	-1	-1	1.235
6	0	0	1	-1	2.159
7	0	0	-1	1	1.687
8	0	0	1	1	1.968
9	-1	0	0	-1	2.305
10	1	0	0	-1	1.231
11	-1	0	0	1	1.425
12	1	0	0	1	2.305
13	0	-1	-1	0	1.805
14	0	1	-1	0	1.206
15	0	-1	1	0	2.031
16	0	1	1	0	2.181
17	-1	0	-1	0	1.701
18	1	0	-1	0	1.357
19	-1	0	1	0	2.305
20	1	0	1	0	2.053
21	0	-1	0	-1	1.305
22	0	1	0	-1	1.905
23	0	-1	0	1	2.361
24	0	1	0	1	1.401
25	0	0	0	0	2.413
26	0	0	0	0	2.451
27	0	0	0	0	1.806
28	0	0	0	0	2.419
29	0	0	0	0	2.418

表3 方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	4.38	14	0.31	12.41	<0.000 1
A	0.14	1	0.14	5.59	0.030 0
B	0.14	1	0.14	5.62	0.032 7
C	1.14	1	1.14	45.38	<0.000 1
D	0.085	1	0.085	3.35	0.088 5
AB	5.523×10^{-4}	1	5.523×10^{-4}	0.022	0.884 5
AC	2.116×10^{-3}	1	2.116×10^{-3}	0.084	0.776 3
AD	0.95	1	0.95	37.85	<0.000 1
BC	0.14	1	0.14	5.56	0.033 4
BD	0.61	1	0.61	24.13	0.000 2
CD	0.10	1	0.10	4.10	0.062 4
A ²	0.25	1	0.25	10.11	0.006 7
B ²	0.44	1	0.44	17.27	0.001 0
C ²	0.39	1	0.39	15.29	0.001 6
D ²	0.56	1	0.56	22.23	0.000 3
残差	0.35	14	0.025	—	—
失拟项	0.045	10	4.515×10^{-3}	0.059	0.999 8
纯误差	0.31	4	0.077	—	—
总变异	4.74	28	—	—	—

表明模型具有较好的可行性;一次项 A、B、C,交互项 BC、BD、AD,二次项 A²、B²、C²、D² 均有显著影响 (P<

0.05), 其余因素影响均不显著 ($P>0.05$); 各因素影响程度依次为 pH 值>料液比>酶解温度>酶解时间。

响应面分析见图 5。由此可知, 响应面坡面陡峭顺序

依次为 $AD>BD>BC>CD>AC>AB$, 说明酶解温度和酶解时间的交互作用对总黄酮得率影响最大, 而酶解温度和料液比的交互作用对总黄酮得率影响最小^[16]。

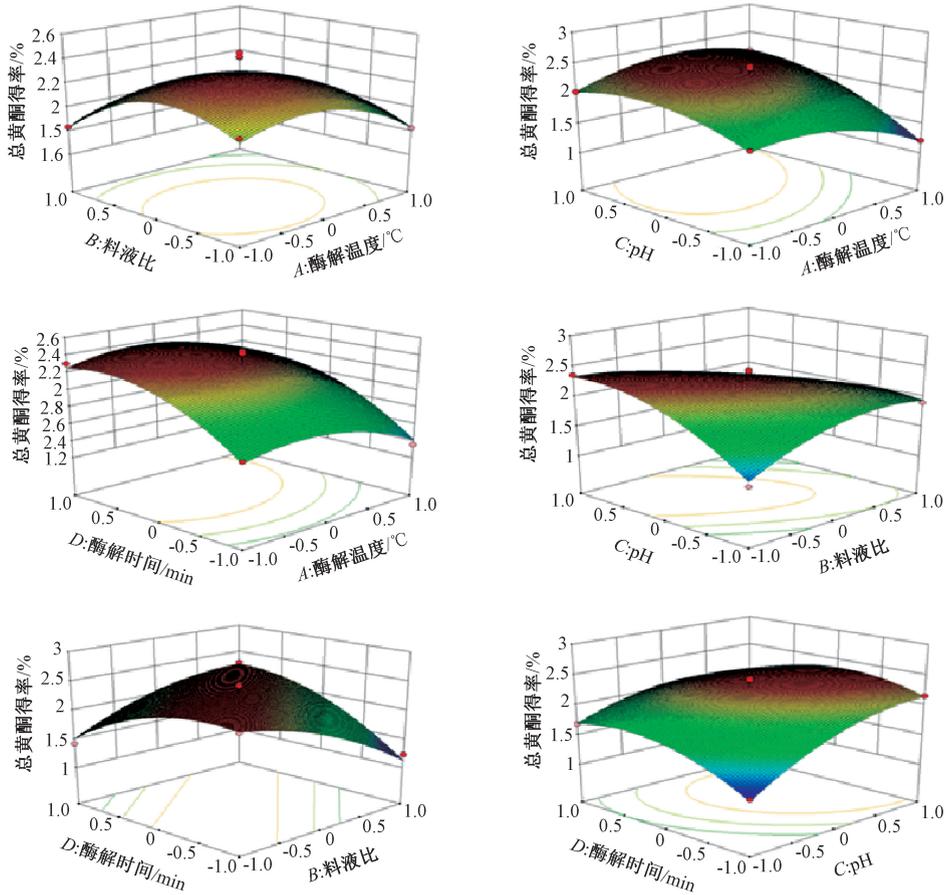


图 5 各因素响应面图

2.5 验证试验 通过 Design-Expert 8.0.6 软件, 得到最优提取工艺为酶解温度 40 ℃、料液比 1 : 34.4、pH 9.0、酶解时间 60 min, 生姜总黄酮得率为 2.726%, 高于其他提取工艺获得的生姜总黄酮得率 0.49%^[17]、0.79%^[12]、2.39%^[15]。考虑到实际操作可行性, 将其修正为酶解温度 40 ℃、料液比 1 : 35、pH 9.0、酶解时间 60 min。按照上述优化工艺进行 3 批验证试验, 测得总黄酮平均得率为 2.713%, 与预测值接近 (相对误差为 0.47%)。

2.6 抗氧化活性研究

2.6.1 ·OH 清除能力 参考文献^[18] 报道, 在 10 mL 具塞刻度试管中依次加入 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 待测溶液 2 mL、6 mmol/L FeSO₄ 溶液 2 mL、6 mmol/L H₂O₂ 溶液 2 mL, 摇匀, 静置 10 min, 加入 6 mmol/L 水杨酸溶液 2 mL, 摇匀后静置 30 min, 在 510 nm 波长处测定吸光度 A₁。空白组用等体积蒸馏水代替待测溶液, 测定吸光度 A₀, 对照组用等体积蒸馏水代替 H₂O₂ 溶液, 测定吸光度 A₂, 以维生素 C 作阳性对照, 计算 ·OH 清除率, 公式为 ·OH 清除率 = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。结果见图 6。由此可知, ·OH 清除率随着生姜总黄酮和维生素 C 质量浓度增加而升高。生姜总黄酮去除 ·OH 能力 (IC₅₀ 值为

0.024 mg/mL) 弱于维生素 C (IC₅₀ 值为 0.022 mg/mL), 表明生姜总黄酮具有较强的抗氧化性。

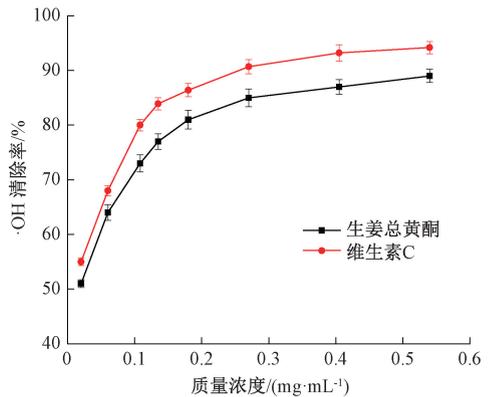


图 6 生姜总黄酮的 ·OH 清除能力

2.6.2 DPPH·清除能力 参考文献^[19] 报道, 在 10 mL 具塞刻度试管中依次加入 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 待测溶液 2 mL、0.5 mmol/L DPPH·乙醇溶液 2 mL、乙醇 2 mL, 摇匀, 避光静置 30 min, 在 517 nm 波长处测定吸光度 A₁。空白组用等体积蒸馏水代替待测溶液, 测定吸光度 A₀, 对照组用等体积蒸馏水代替 DPPH·乙醇

溶液,测定吸光度 A_2 ,以维生素 C 作阳性对照,计算 DPPH·清除率,公式为 $\text{DPPH}\cdot\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$,结果见图 7。由此可知,DPPH·清除率随着生姜总黄酮和维生素 C 质量浓度增加而增大。生姜总黄酮清除 DPPH·能力 (IC_{50} 值为 0.039 mg/mL) 弱于维生素 C (IC_{50} 值为 0.031 mg/mL,高于花椒黄酮^[19]),表明生姜总黄酮具有较强的抗氧化效果。

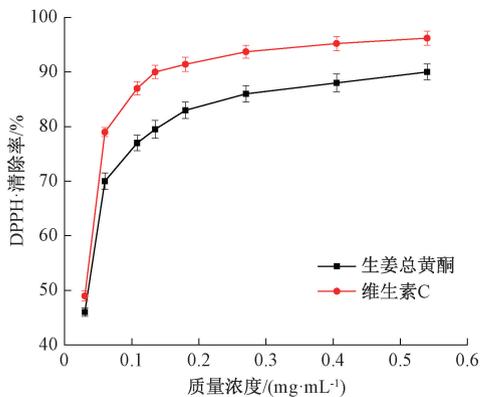


图 7 生姜总黄酮的 DPPH·清除能力

3 结论

果胶酶可破坏植物细胞壁,增强细胞壁通透性,促进黄酮的溶出,具有提取条件温和、得率高、生物活性强等特点^[9]。含有酚羟基的黄酮易溶于碱性水溶液中,用碱水提取黄酮安全方便、价格低廉^[20]。

本研究采用酶辅助碱法提取生姜总黄酮,最佳提取工艺为酶解温度 40 °C、料液比 1 : 35、pH 9.0、酶解时间 60 min,生姜总黄酮得率为 2.713%,与预测值 (2.726%) 误差仅为 0.47%,表明模型拟合度良好。抗氧化活性结果显示,生姜总黄酮对·OH 和 DPPH·自由基的抑制作用呈剂量依赖性, IC_{50} 值分别为 0.024、0.039 mg/mL,表明生姜总黄酮具有较强的抗氧化能力,在药品、化妆品、功能性食品等领域具有潜在的应用价值。本实验中生姜总黄酮为粗提物,后续应对生姜总黄酮的成分及含量进行分析研究,确定单体并评价其生物活性。

参考文献:

[1] 张腾腾,张小倩,胡云飞,等. 生姜皮质量控制方法研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3104-3108.
[2] 吕亭亭,杨志华,陶 娟,等. 泡桐花总黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性[J]. 中国酿造, 2021, 40(1): 197-202.
[3] Mushtaq Z, Nadeem M, Arshad M, et al. Exploring the biochemical and antioxidant potential of ginger (Adric) and turmeric (Haldi) [J]. *Int J Food Prop*, 2019, 22 (1) :

1642-1651.
[4] Idris N A, Yasin H M, Usman A. Voltammetric and spectroscopic determination of polyphenols and antioxidants in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) [J]. *Heliyon*, 2019, 5 (5) : e01717.
[5] 李少华,高愿军,李翠翠,等. 微波辅助酶法提取葛根黄酮的工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(1): 217-222.
[6] Li H D, Yu J Z. Study on extract methodology of total flavonoids from ginger and hydroxyl radicals scavenging effect [J]. *Am J Chem Biochem Engineer*, 2017, 1(1): 7-16.
[7] 杨 辉,王治宝. 乙醇-硫酸铵双水相体系提取牛膝菊中总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(13): 88-92.
[8] 谷政伟,李 丹,樊苏萍,等. 微波辅助碱液提取花生壳黄酮工艺[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(12): 125-129.
[9] 刘 慧,张春岭,刘杰超,等. 超声—果胶酶协同提取山楂类黄酮的工艺优化 [J]. 食品与机械, 2016, 32 (1) : 154-157.
[10] 孟永海,孟祥瑛,佟 颖,等. 超声波辅助果胶酶法提取白术总黄酮工艺优化[J]. 化学工程师, 2019, 33(7): 7-10; 21.
[11] 蒋红菊,多粘类芽孢杆菌液态发酵产碱性果胶酶的研究 [D]. 南京:南京理工大学, 2011.
[12] 孙晓玲. 纤维素酶-乙醇结合法提取生姜总黄酮的工艺研究 [J]. 中国调味品, 2018, 43(11): 113-117; 125.
[13] 杨 洁,柳 娜,胡晓晓,等. 黑枸杞总黄酮稳定性的研究 [J]. 粮食与油脂, 2018, 31(6): 89-91.
[14] 于 平,王欣馨,任 倩,等. 产碱性果胶酶菌株的筛选和鉴定及其酶学性质 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 288-296.
[15] 吴存兵,邵伯进,吴君艳,等. 生姜黄酮乙醇浸提工艺优化及其稳定性研究 [J]. 南方农业学报, 2020, 51 (11) : 2798-2807.
[16] 金慧鸣,谭兴和,蔡 文,等. 响应面法优化藤茶总黄酮的提取工艺 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1575-1582.
[17] 李会端,江 岸,余建中. 生姜总黄酮甲醇浸提工艺的响应面优化及提取液对羟自由基清除活性 [J]. 北方园艺, 2017 (23) : 155-164.
[18] 李 杰,普玲玲,王李雪,等. 花椒黄酮提取工艺及体外抗氧化活性研究 [J]. 中国调味品, 2019, 44(9): 94-100.
[19] 秦嫚嫚,冯育林,邵崇钰,等. DPPH 法测定芒果叶中总黄酮提取物的抗氧化活性 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(2): 185-188.
[20] 翟喆文,陈 文,王湘君,等. 碱法提取仙人掌花黄酮抗肿瘤研究综述 [J]. 内江科技, 2020, 41(2): 103; 100.