

# 超声波辅助提取甘薯叶中 SOD 的工艺研究

潘明, 王世宽, 谢仁有, 洪玉程

(四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000)

**摘要:** 本文运用超声波细胞破碎仪, 对浆液进行超声波处理, 并采用 Design-Expert 软件的中心组合设计方法设计响应面试验, 建立了数学模型, 通过进行验证实验, 得到了最优的提取工艺条件为液固比为 28:1、超声时间 6 s、次数 40 次、时间间隔 2 s。在此条件下, SOD 的活性为 359.54 U/g 鲜重, 与模型预测值的比较误差为 1.01%。

**关键词:** 甘薯叶; SOD; 超声波; 响应面

**文章编号:** 1673-9078(2012)11-1512-1515

## Ultrasonic Extraction of SOD from Sweet Potato Leaves

PAN Ming, WANG Shi-kuan, XIE Ren-you, HONG Yu-cheng

(Biology Department, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan, 643000)

**Abstract:** The slurry was treated by ultrasonic cell disrupter, and the experiment was verified. Response surface design was generated by the Design-Expert software according to the central composite design principle and a mathematical model was set up. The optimal extraction conditions were found as liquid-to-solid ratio of 28:1 and ultrasonic time of 6s and 40 times and time interval of 2s. Under these conditions, the yield of SOD was 359.54 U/g, and compared with the model prediction, the error was 1.01%.

**Key words:** sweet potato leaves; SOD; ultrasonic; Response surface methodology

超声波技术在提取天然产物过程中的几大理论依据是: 空化效应、热效应、机械作用。(1)空化效应是由于超声波在介质中传播引起的, 它可以产生极大的压力, 使生物细胞壁及其整个生物体都瞬间破裂;(2)热效应是因为超声波的强度引起组织内部的温度瞬间升高, 在不改变成分性质的条件下, 加速成分的溶出;(3)机械作用则是加强物质的释放、扩散, 被浸提的物质在被破碎的瞬间生物活性保持不变<sup>[1]</sup>。因此, 超声波破碎提取是一种理想的提取方法。

近年来, 运用超声波破碎细胞提取植物中的活性物质取得了良好的效果, 大量研究证明<sup>[2-4]</sup>, 超声波技术在植物的研究领域被广泛应用, 它具有费时少、得率高, 化学成分与其它方法相比变化很小的特点<sup>[5]</sup>。

SOD 广泛应用于食品工业中, 它可以作为食品的营养强化剂和保健食品的功效因子, 该类食品拥有很好的抗疾病、抗辐射、抗衰老、抗疲劳、防治感冒和强健身体的效果<sup>[6]</sup>。目前已有许多添加 SOD 的保健食品面市, 比如牛奶、白酒、啤酒、蛋黄酱、奶糖、饮料等。还有各种剂型的 SOD, 如片剂、胶囊、颗粒剂等<sup>[7]</sup>。SOD 可以作为食品的抗氧化剂, 从而防止食品

收稿日期: 2012-06-27

基金项目: 四川省教育厅自然科学基金项目 (10ZA139)

作者简介: 潘明 (1966-), 女, 博士, 教授, 主要从事食品生物技术方面的研究

腐败变质的现象<sup>[8]</sup>。

甘薯叶部分品种叶片干物质中蛋白质含量可高达 30% 以上, 富含多种营养物质, 在日本、美国等国家被誉为“长寿菜, 蔬菜皇后<sup>[9-10]</sup>”, 具有很高的开发利用价值。本文以甘薯叶为原料, 采用氮蓝四唑 (NBT) 光化还原法测定超氧化物歧化酶, 并对其超声波提取工艺进行研究, 以获得更多的超氧化物歧化酶, 为进一步利用甘薯叶提供理论依据。

## 1 实验

### 1.1 材料、仪器与试剂

#### 1.1.1 材料

冷冻新鲜甘薯叶。

### 1.1.2 仪器

PS-1 高速匀浆机, 金坛市水北创兴仪器厂; UNIVERSAL 32R 高速冷冻离心机, 德国 Hettich; UH-500A 超声波细胞破碎仪, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; UV2400 紫外可见分光光度计, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; pHS-3C 酸度计, 成都世纪方舟科技有限公司; AR1140 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 微量进样器; 荧光灯; 秒表。

### 1.1.3 试剂

50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8), 130 mmol/L 甲硫氨酸(Met)溶液, 750  $\mu\text{mol/L}$  NBT, 100  $\mu\text{mol/L}$  EDTA- $\text{Na}_2$  溶液, 20  $\mu\text{mol/L}$  核黄素溶液, 聚乙烯吡咯烷酮。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 SOD 的测定方法

超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法<sup>[11]</sup>, 酶活性以抑制 NBT 光还原的 50% 为一个酶活性单位。

### 1.2.2 超声波提取单因素试验

通过初步的实验探索<sup>[12]</sup>, 及其对文献查阅, 选取以下几因素做单因素试验: 液固比、超声时间(s)、超声次数、时间间隔(s)。

### 1.2.3 超声波提取响应曲面试验设计

通过单因素试验确定出液固比、超声时间(s)、超声次数及时间间隔(s), 甘薯叶 SOD 提取的较优范围, 利用 Box-Behnken 中心组合设计, 设计 4 因素 3 水平的响应曲面试验。

### 1.2.4 数据处理

单因素试验使用 Microsoft Excel 软件进行分析; 响应曲面试验使用 Design-Expert 7.1.6 软件分析<sup>[13-14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 液固比的影响

取打浆后甘薯叶溶液 4 份, 各 10 mL, 按液固比 15:1、20:1、25:1、30:1 的比例依次加入 0.05 M 的磷酸缓冲溶液(pH 8.0)。然后按超声时间 3 s、次数 20 次、时间间隔 2 s 进行超声波提取。

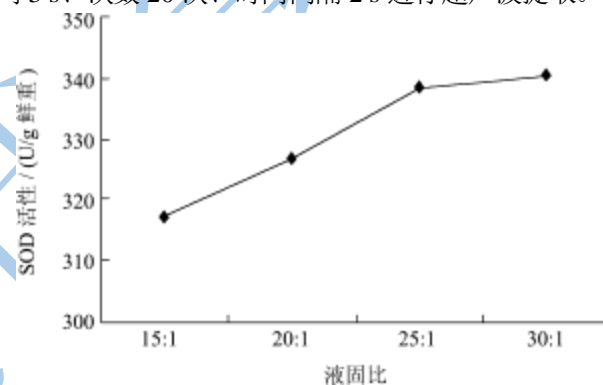


图 1 液固比对 SOD 活性的影响

Fig.1 The effect of liquid-to-solid ratio on SOD activity

由图 1 可以看出, 当液固比为 15:1 时, 缓冲溶液加入量比较少, 超声波提取时可发现溶液还较粘稠, 超声波的效果受到影响, 不利于溶出蛋白质; 当液固比达到 25:1 时, SOD 活性增加较多, 这可能是因为缓冲溶液加入量增加, 蛋白质溶出增多, 因此 SOD 活性增大; 当缓冲液继续增加时, SOD 活性的增长很小, 但对于后期处理, 花费的人力财力增加, 所以料液比为 25:1 时比较适合。

### 2.2 超声时间的影响

取打浆后甘薯叶溶液 4 份, 各 10 mL, 按液固比 25:1 的比例依次加入 0.05 M 的磷酸缓冲溶液(pH 8.0)。超声时间按 3 s、6 s、9 s、12 s, 次数 20 次、时间间隔 2 s 进行超声波提取。

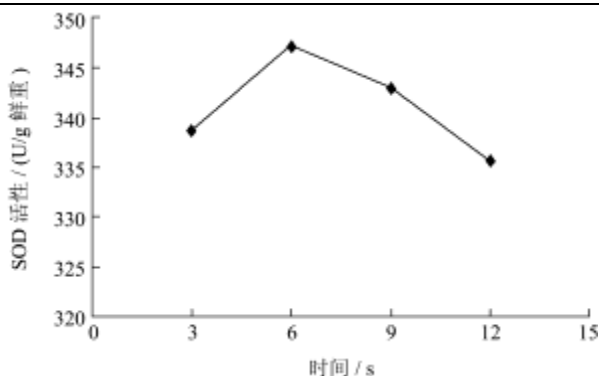


图2 超声时间对 SOD 活性的影响

Fig.2 The effect of ultrasonic time on SOD activity

由图2可以看出,在超声波破碎细胞过程中,时间是其中一个很重要的影响因素。超声提取开始的时候,随着超声波时间越长,蛋白质溶出越多,SOD量也越多。这是因为时间越长,所形成的气泡也越多,高频振荡就越剧烈,吸收的声能也就越大,破壁的效果也越好。当时间到9s的时候,效果下降,并不因为时间越长,效果越好。这可能是因为超声波是一种高能波,时间过长,虽然细胞液溶出率提高,但是有些物质容易受到破坏。SOD是酶类物质,也可能受到一些影响。所以综合考虑,超声时间取6s比较合适。

### 2.3 超声次数的影响

取打浆后甘薯叶溶液4份,各10mL,按液固比25:1的比例依次加入0.05M的磷酸缓冲溶液(pH 8.0)。超声次数按20、30、40、50次,超声时间6s、时间间隔2s进行超声波提取。

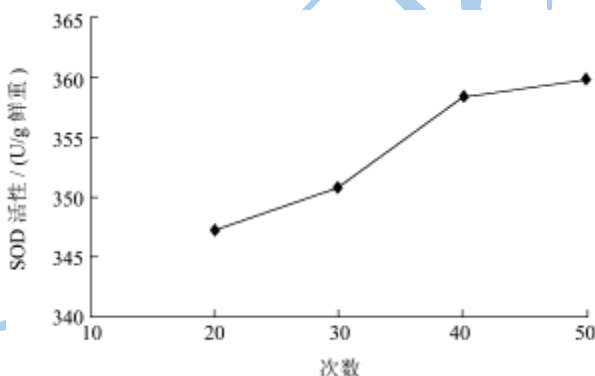


图3 超声次数对 SOD 活性的影响

Fig.3 The effect of time on SOD activity

由图3可以看出,超声次数越多,SOD活性越大。由于细胞的细胞壁有一定的韧性、弹性,对压力的剪切作用具有一定的抵抗力。当超声次数越多时,细胞壁被破坏的可能性越大,蛋白质的溶出得越多,相应的SOD活性越大。当超声次数由20次到30次时,SOD活性呈上升趋势,但上升平缓,可能是超声的累积时间还比较短,超声波破壁还没有达到最佳的效果,当超声次数达到40次时,SOD活性增加明显,到50次时,增加很小。从能耗以及活性保持方面考虑,不是超声波次数越多越好。确定超声波次数为40次为适宜。

### 2.4 时间间隔的影响

取前面甘薯叶最优条件打浆后溶液4份,各10mL,按液固比25:1的比例依次加入0.05M的磷酸缓冲溶液(pH 8.0)。超声时间间隔按2s、5s、8s、11s,超声时间6s、超声次数40次进行超声波提取。

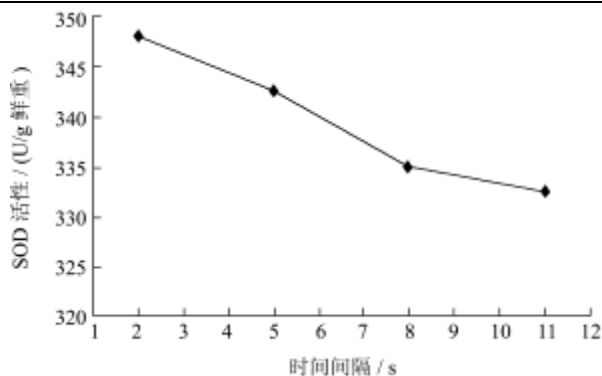


图4 时间间隔对 SOD 活性的影响

Fig.4 The effect of time interval on SOD activity

由图4可以得知,时间间隔为2s时最佳,时间间隔在其它因素确定的条件下,起到的作用比较明显。在细胞受到超声波破碎处理时,液体吸收一定声波能后,在细胞内积聚了一定的能量,最后产生空化效应。只有在间歇式的处理过程中提供能量,才能让其频率达到一定的范围,从而使细胞剧烈震荡,细胞壁破碎。从图中可以看出,随着间隔时间的越来越大,SOD的活性下降。这与前面选择的超声破碎时间比较短有关,如果间隔时间过长,细胞可能会在间隔时间内又恢复原来的韧性与弹性,致使蛋白质溶出减少,SOD活性下降。因此选择时间间隔为2s比较好。

2.5 响应曲面实验结果分析

试验固定超声功率500W,以SOD含量作为考核指标,试验因素与水平见表1。

表1 响应面因素与水平

Table1 Factors and the level of response surface methodology

水平	实验因素			
	A (液固比)	B (时间/s)	C (次数)	D (时间间隔/s)
-1	20:1	3	20	2
0	25:1	6	30	5
1	30:1	9	40	8

2.5.1 响应面因素及方差分析

根据 Box-Behnken 中心组合设计,综合单因素试验结果,对液固比、超声时间(s)、次数及时间间隔(s)进行4因素3水平的响应曲面分析试验,结果见表2。

表2 响应曲面实验结果

Table 2 Response surface experimental results

序号	A	B	C	D	SOD 活性 / (U/g 鲜重)
1	0	0	0	0	345.17
2	0	0	-1	1	336.53
3	-1	1	0	0	323.15
4	0	1	0	-1	345.32
5	1	0	0	1	338.22
6	0	0	1	-1	358.35
7	0	0	0	0	342.25
8	0	0	1	1	344.87
9	-1	0	0	-1	340.66
10	1	0	0	-1	352.88
11	0	1	1	0	346.78
12	0	0	-1	-1	347.23

13	-1	0	1	0	341.32
14	-1	0	0	1	325.12
15	0	-1	0	-1	340.84
16	1	0	1	0	355.72
17	0	0	0	0	343.12
18	1	0	-1	0	345.95
19	-1	-1	0	0	318.89
20	0	-1	0	1	328.69
21	0	0	0	0	343.77
22	0	1	-1	0	333.93
23	1	1	0	0	337.8
24	0	-1	-1	0	328.85
25	0	-1	1	0	342.98
26	-1	0	-1	0	330.48
27	0	0	0	0	344.37
28	0	1	0	1	331.57
29	1	-1	0	0	332.06

对表 2 中数据进行回归分析，获得提取液中 SOD 活性对液固比、超声时间 (s)、次数及时间间隔 (s) 的二次多项回归方程：

$$Y=159.97427+11.84533A+12.90122B-1.27637C-2.45991D+0.024667AB-0.00535AC+0.014667AD-0.010667BC-0.044444BD-0.023167CD-0.21045A^2-1.02056B^2+0.035812C^2+0.082491D^2$$

为了检验模型的有效性，对模型进行方差分析结果表明，模型的 F 值为 49.91，说明模型有意义。该回归模型的总决定系数  $R^2=0.9804$ ，调整决定系数  $R^2_{Adj}=0.9607$ ，说明该模型的拟合程度较好，实验误差小。因此该回归方程模型成立，可以用此模型对提取 SOD 进行分析及预测。

表 3 响应面法对提取的 SOD 活性的 ANOVA 分析结果

Table 3 The response surface method for ANOVA analysis results of SOD activity

因素	平方和	自由度	均方和	F值	P值	显著性
模型	2451.77	14	175.13	49.91	< 0.0001	**
A	574.22	1	574.22	163.66	< 0.0001	**
B	57.38	1	57.38	16.35	0.0012	**
C	374.64	1	374.64	106.78	< 0.0001	**
D	537.07	1	537.07	153.07	< 0.0001	**
AB	0.55	1	0.55	0.16	0.6988	
AC	0.29	1	0.29	0.082	0.7794	
AD	0.19	1	0.19	0.055	0.8177	
BC	0.41	1	0.41	0.12	0.7377	
BD	0.64	1	0.64	0.18	0.6758	
CD	1.93	1	1.93	0.55	0.4703	
A <sup>2</sup>	179.56	1	179.56	51.17	< 0.0001	**
B <sup>2</sup>	547.24	1	547.24	155.97	< 0.0001	**
C <sup>2</sup>	83.19	1	83.19	23.71	0.0002	**
D <sup>2</sup>	3.58	1	3.58	1.02	0.3299	
残差	49.12	14	3.51			
失拟	44.07	10	4.41	3.49	0.1197	
纯误差	5.05	4	1.26			



由表3可知, 超声波提取甘薯叶SOD的工艺参数中, 影响SOD活性的因素按主次顺序排列为: 液固比、次数、时间间隔 (s)、超声时间 (s), 且都达到极显著水平。考察因素间交互作用, 由表3可知, 四因素之间的两两交互作用较小, 都未达到显著水平。

### 2.5.2 响应曲面图分析及最佳工艺确定

液固比、超声时间 (s)、次数及时间间隔 (s) 四因素之间的两两交互作用的响应曲面见图5, 从图5及方差分析表3可看出, 四因素之间的两两交互作用不显著。

为了精确计算最佳工艺参数, 对甘薯叶中 SOD 的提取的回归方程式中4个自变量分别求偏导并使其等于0, 可以解方程得最佳工艺参数: 液固比为28.1:1、超声时间6.4s、次数40次、时间间隔2s, 最高SOD活性为363.17 U/g 鲜重。

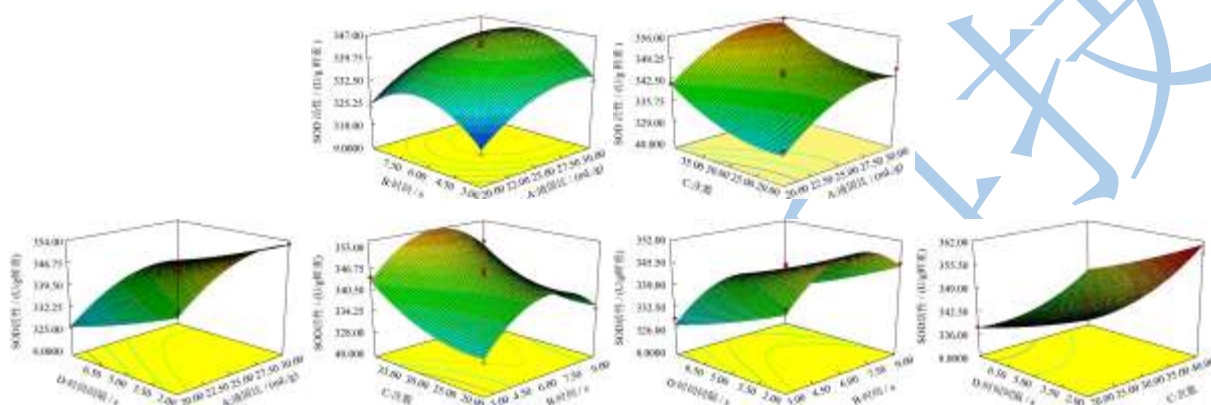


图5 液固比、超声时间、次数及时间间隔的响应曲面图

Fig.5 The response surface figure of the liquid-solid ratio, ultrasonic time, time and time interval

为检验响应面法优化对甘薯叶中 SOD 的提取的可靠性, 采用优化后提取工艺条件进行验证实验, 参考实际操作, 将优化后工艺参数调整为液固比为28:1、超声时间6s、次数40次、时间间隔2s。在此最佳条件下, SOD的活性为359.54 U/g 鲜重, 与模型预测值的比较误差为1.01%。

### 3 结论

运用超声波细胞破碎仪, 对打浆液进行超声波处理, 并采用 Design-Expert 软件的中心组合设计方法设计响应面试验, 建立了数学模型, 得到了较优的工艺条件, 影响 SOD 活性的因素按主次顺序排列为: 液固比、次数、时间间隔 (s)、超声时间 (s), 且都达到极显著水平。结合响应面分析得到的数学模型, 预测更优的工艺条件, 并进行验证实验, 最后确定最优工艺条件为液固比为28:1、超声时间6s、次数40次、时间间隔2s。在此最佳条件下, SOD的活性为359.54 U/g 鲜重, 与模型预测值的比较误差为1.01%。本实验通过超声波辅助对甘薯叶中SOD进行提取工艺的研究, 为进一步的研究SOD提供了条件, 也为甘薯叶的其它研究提供了部分理论依据。

### 参考文献

- [1] 宋国胜,胡松青,李琳.超声波技术在食品科学中的应用与研究[J].现代食品科技,2008,24(6):609-612
- [2] 王海灵.玉米超氧化物歧化酶(SOD)提取及纯化技术的研究[D].吉林农业大学优秀硕士论文,2007
- [3] 冯艳伟,于琳琳,艾勇.超声波破碎在植物SOD提取中的应用[J].大连民族学院学报,2005,7(1):94
- [4] 郑琳,张钟,陈湘,齐明.超声波辅助提取红米色素的工艺研究[J].现代食品科技,2011,27(3):296-298
- [5] 朱建华,杨晓泉,熊健.超声波技术在食品工业中的最新应用进展[J].酿酒, 2005,32(2):54-57
- [6] 文才艺,张艳红.凝胶过滤及离子交换层析法纯化玉米Cu/Zn-SOD的研究[J].襄樊学院学报,2001,9(1):88-92
- [7] 孟宇竹,雷昌贵等.SOD抗氧化作用及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2008,8,134-137
- [8] 任大明,迟乃玉,刘少霞.玉米超氧化物歧化酶同功酶(SOD)研究[J].玉米科学,2001,9(1):78-79
- [9] Hiroshi Ishida, Hiroko Suzuno, et al. Nutritive evaluation on chemical components of leaves, stalks and stems of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* *poir*) [J]. Food Chemistry, 2000, 68: 359-367

- [10] 王世宽,吴平,许艳丽,等.甘薯叶的营养成份与应用前景[J].四川理工学院学报:自然科学版,2009,6:57-59
- [11] 萧浪涛,王三根.植物生理学实验技术[M].中国农业出版社,2005
- [12] 潘明,谢仁有,洪玉程,等.响应面法优化甘薯叶 SOD 的提取工艺[J].四川理工学院学报:自然科学版,2012,25(2):5-7
- [13] 赵翊,李红良,张惠妹.响应面法优化火麻仁黄酮提取工艺[J].食品科学,2011,32(2):127-131
- [14] 郭兴凤,张娟娟,马宇翔,等.响应面法优化中性蛋白酶提取米渣中蛋白质的研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2008,29(6):13-17

现代食品科技