

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240424003

超声波辅助低共熔溶剂提取甜樱桃色素及其功能特性分析

王兆丰¹, 杜石勇^{2*}, 代 华³, 王 萍⁴, 陶淑芸⁵, 闫永录⁴, 刘霞晖⁴

(1. 天水师范学院生物工程与技术学院, 天水 741000; 2. 秦州区农业农村局, 天水 741000;
3. 静宁县食品药品检验检测中心, 平凉 743400; 4. 秦州区林业和草原局, 天水 741000;
5. 麦积区林业和草原局, 天水 741020)

摘 要: **目的** 优化超声波辅助低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DESs)提取甜樱桃色素的工艺条件, 并研究甜樱桃色素对 α -淀粉酶和蔗糖酶的抑制特性以及体内抗氧化能力的影响。**方法** 筛选最佳 DESs, 考察 DESs 含水量、固液比、超声功率和提取时间对甜樱桃色素提取效果的影响, 测定甜樱桃色素对 α -淀粉酶、蔗糖酶的抑制率及对秀丽隐杆线虫衰老的影响。**结果** 氯化胆碱与 1,4-丁二醇的摩尔比为 1:3 时制备的 DESs 为最佳溶剂, 超声波辅助 DESs 提取甜樱桃色素的最佳工艺参数为: DESs 含水量 20%、固液比 1:40 (g/mL)、超声功率 316 W、提取时间为 41 min, 该工艺下甜樱桃色素的平均提取量为(465.10 $\pm$ 1.46) mg C3G/100 g, 显著优于 70%乙醇的提取量。甜樱桃色素在 100 μ g/mL 的条件下对 α -淀粉酶和蔗糖酶的抑制率分别为 80.20% $\pm$ 0.65%和 73.50% $\pm$ 1.26%。甜樱桃色素能显著延长秀丽隐杆线虫在过氧化氢胁迫下的存活率($P<0.05$), 平均寿命达(8.41 $\pm$ 0.31) h, 显著高于阴性对照组[(2.67 $\pm$ 0.20) h]和阳性对照组[(5.23 $\pm$ 0.17) h]。甜樱桃色素还显著提高了总超氧化物歧化酶(>60.71%)和过氧化氢酶(>43.10%)的活性, 降低了丙二醛水平($P<0.05$)。**结论** 超声波辅助 DESs 提取甜樱桃色素方法可行, 甜樱桃色素可抑制葡萄糖苷酶活性, 能够减轻体内氧化应激损伤, 具有很大的开发利用价值。

关键词: 低共熔溶剂; 甜樱桃色素; 响应面法; α -葡萄糖苷酶活性

Ultrasonic-assisted deep eutectic solvents extraction of sweet cherry pigments and its functional characteristics analysis

WANG Zhao-Feng¹, DU Shi-Yong^{2*}, DAI Hua³, WANG Ping⁴, TAO Shu-Yun⁵,

YAN Yong-Lu⁴, LIU Xia-Hui⁴

(1. College of Bioengineering and Technology, Tianshui Normal University, Tianshui 741000, China; 2. Agriculture and Rural Bureau of Qinzhou District, Tianshui 741000, China; 3. Jingning Food and Drug Inspection Testing Center, Pingliang 743400, China; 4. Qinzhou Forestry and Grassland Bureau, Tianshui 741000, China; 5. Maiji Forestry and Grassland Bureau, Tianshui 741020, China)

基金项目: 天水市秦州区科技支撑计划项目(2022-NCKJG-7435)、天水师范学院高层次人才科研资助项目(0309-20230104002)

Fund: Supported by the Science and Technology Support Plan of Qinzhou District Tianshui City (2022-NCKJG-7435), and the Research Grant for High-level Talents of Tianshui Normal University (0309-20230104002)

***通信作者:** 杜石勇, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品储藏与加工。E-mail: 475898271@qq.com

***Corresponding author:** DU Shi-Yong, Senior Agronomist, Qinzhou Agriculture and Rural Bureau, Jianjiahe Agricultural Building, Qinzhou District, Tianshui 741000, China. E-mail: 475898271@qq.com

ABSTRACT: Objective To optimize ultrasonic-assisted deep eutectic solvents (DESs) extraction process for preparing sweet cherry pigment, and investigate the inhibitory properties of sweet cherry pigments on α -amylase and sucrase, as well as their impact on antioxidant capacity *in vivo*. **Methods** Select the best DESs, investigate the effects of DESs water content, solid-liquid ratio, ultrasonic power and extraction time on the extraction effect of sweet cherry pigment, and determine the inhibition rate of sweet cherry pigment on α -amylase and sucrase, as well as the effects of aging of *Caenorhabditis elegans*. **Results** The results showed that, the DESs prepared at a molar ratio of choline chloride to 1,4-butanediol of 1:3 was the best solvent, the optimum technological parameters of ultrasonic-assisted DESs extraction of sweet cherry pigment were as follows: The water content of DESs was 20%, solid-liquid ratio 1:40 (g/mL), ultrasound power was 316 W, extraction time was 41 min, and the average amount of pigment extracted from the optimized extraction was (465.10 ± 1.46) mg C3G/100 g, significantly better than 70% ethanol extraction yield. The inhibition rate of the pigments to α -amylase and sucrase was $80.20\% \pm 0.65\%$ and $73.50\% \pm 1.26\%$, respectively, at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ sweet cherry pigment. Sweet cherry pigment could significantly prolong the survival rate of *Caenorhabditis elegans* under hydrogen peroxide stress ($P < 0.05$), and the mean lifespans of *Caenorhabditis elegans* reached (8.41 ± 0.31) h, which was significantly higher than that of the negative control $[(2.67 \pm 0.20)$ h] and the positive control group $[(5.23 \pm 0.17)$ h]. Sweet cherry pigment also significantly enhanced the activities of total superoxide dismutase ($> 60.71\%$) and catalase ($> 43.10\%$) and reduced the level of malondialdehyde ($P < 0.05$). **Conclusion** The results indicate that ultrasound-assisted DESs extraction of sweet cherry pigment is feasible, the sweet cherry pigment can inhibit the activity of glucosidase and reduce oxidative stress damage *in vivo*, which has great development and utilization value.

KEY WORDS: deep eutectic solvent; sweet cherry pigments; response surface methodology; α -glucosidase activity

0 引言

甜樱桃(*Prunus avium* L.), 又称欧洲樱桃, 果实肉软、皮薄、汁多, 属于不耐贮运的水果, 轻微碰撞容易导致果皮破裂, 严重影响商品价值, 极大地限制了甜樱桃的异地销售和产业发展, 不仅影响果农的经济收入和生产积极性, 而且残次果实的大量丢弃还会污染环境。因此, 如何提高残次果的商品附加值, 是当前亟待解决的问题。甜樱桃中的色素含量相当丰富, 甜樱桃色素作为一种花色苷类色素, 具有抗氧化、防癌、抗炎、防治糖尿病等保健功效^[1-2]。虽然残次果在外观形状上的商品价值大打折扣, 但其色素含量与商品果并无差异, 所以从甜樱桃中提取色素, 是开发甜樱桃资源、提高其产品附加值的有效途径。

近年来, 利用有机溶剂的常规提取技术已被广泛用于色素的提取^[3-4]。然而, 大多数有机溶剂有毒、易燃、易挥发且污染环境。因此, 作为有机溶剂的替代品, 低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DESs)由于其低毒性受到了越来越多的关注。DESs 是一种类离子溶剂, 它是由氢键受体(hydrogen bond acceptor, HBA)和氢键供体(hydrogen bond donor, HBD)按照一定的化学计量比组成的二元或多元混合物^[5], 具有低成本、低毒、可生物降解和易于制备的优点^[6]。季铵盐氯化胆碱(chloride choline, ChCl)是一种常用的 HBA, 氨基酸、多元醇、羧酸和糖等天然有机物是最常用的 HBD, HBA 和 HBD 溶剂组分通过氢键、静电引力和

分子间相互作用形成安全稳定的 DESs 体系。DESs 在提取生物活性化合物时表现出良好的提取能力和生物相容性, 例如, 在相同条件下, DESs 从玫瑰花中提取的花青素是酸化乙醇的 3 倍^[7]。龙碧秀等^[8]用 DESs [n(氯化胆碱):n(乙二醇)] = 1:4 配制]提取和田红葡萄皮籽渣中的多酚, 提取率分别比水、80%甲醇、80%乙醇高 448.13%、126.36%和 55.98%。鉴于 DESs 在生物提取领域的诸多优点, 本研究探索建立一种 DESs 提取甜樱桃色素的方法。

超声辅助提取是一种有效的提取方法, 具有节能、适应性强、操作简单等特点, 可在短时间内从植物材料中提取生物活性化合物。超声波的空化作用能有效破坏细胞壁, 增强细胞内容物的传质能力, 可以大幅缩短提取时间, 提高提取率^[9]。目前关于 DESs 用于甜樱桃色素提取的研究鲜有报道。因此, 本研究建立一种基于 DESs 超声辅助提取甜樱桃色素的方法, 设计和筛选对甜樱桃色素提取效率最高的 DESs, 并与常用的有机溶剂乙醇进行比较。基于 Box-Behnken 实验设计, 优化超声波辅助 DESs 提取甜樱桃色素的工艺, 并研究其在体外对酶的抑制率和体内的抗氧化作用, 为甜樱桃色素的进一步开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甜樱桃购自天水市秦州区果之道种植家庭农场, 去核后保存备用。

氯化胆碱(纯度 $\geq 98\%$)、乳酸(纯度 $\geq 90\%$)、苹果酸(纯度 $\geq 98\%$)、柠檬酸(纯度 $\geq 99.5\%$)、葡萄糖(纯度 $\geq 99\%$)、乙二醇(纯度 $\geq 99\%$)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)、可溶性淀粉、蔗糖、乙酸、乙酸钠、氯化钾、蔗糖酶(1 U/mL)、3,5-二硝基水杨酸、 α -淀粉酶(1 U/mL)(上海源叶生物技术有限公司); 1,4 丁二醇、甘油、1,2-丙二醇、维生素 C (vitamin C, VC)(天津市科密欧化学试剂有限公司); M9 缓冲液(15.12 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、3 g KH_2PO_4 、5 g NaCl、0.25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1000 mL 去离子水)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪器与设备

DF101S 智能数显恒温油水两用浴锅(郑州东晟仪器设备有限公司); Alpha-1860SPlus 紫外-可见分光光度计(上海谱元仪器有限公司); KQ-100E 超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司); CT15RE 台式离心机(Hitachi 日立公司); AS-FA2004 万分之一电子分析天平(上海艾析艾捷仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DESs 的制备

根据表 1 中的摩尔比, 将 HBA(氯化胆碱)和 HBD(羧酸、多元醇或其他化合物)在 75~85℃下恒温磁力搅拌至溶液澄清, 制备获得 8 种 DESs, 在室温下储存 1 周后使用。

1.3.2 甜樱桃色素的提取

称取去核后甜樱桃 1 g, 置于 25 mL DESs 中, 在超声波清洗器中以一定温度超声处理一定时间, 按照设计的 DESs、固液比、超声功率、提取时间进行超声提取, 将色素粗提物在 8000 r/min 离心 10 min, 收集上清液在 4℃储存备用, 并与 70%乙醇作为提取液提取的甜樱桃色素进行比较。

1.3.3 甜樱桃色素含量的测定

通过文献所述的改良 pH 差法进行测量^[10], 并基于花

青素-3-葡萄糖苷(anthocyanin-3-glucoside, C3G)进行计算。将 0.5 mL 样品溶液与 pH 1.0 的缓冲液(氯化钾, 0.1 mol/L)混合, 并将另 0.5 mL 样品与 pH 4.5 的缓冲剂(乙酸钠, 0.5 mol/L)混合。使用紫外-可见分光光度计在 510 nm 处测定吸光值。提取液中花色苷的含量按照公式(1)计算。

$$Y/(\text{mg C3G}/100 \text{ g})=(OD_{\text{pH } 1.0}-OD_{\text{pH } 4.5})\times V\times n\times M\times 100/(\varepsilon\times m) \tag{1}$$

式中: V 提取液总体积(mL); n 为稀释倍数; M 为 C3G 的分子量(449); ε 为 C3G 的消光系数, 其值为 29600; m 为原料的重量(g)。

1.3.4 单因素实验

称取去核后甜樱桃 1 g, 按照不同 DESs、固液比、超声功率、提取时间提取甜樱桃色素。DESs-6 含水量分别为 0%、10%、20%、30%、40%, 固液比分别为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 (g/mL), 超声功率分别为 100、200、300、400、500 W, 提取时间分别为 25、30、35、40、45 min。

1.3.5 响应面法实验设计

采用响应面法确定甜樱桃色素的最佳提取条件。基于单因素实验结果, 进行了 Box-Behnken 设计, 将 4 个自变量设置在 3 个水平(见表 2)。基于单因素方差分析验证回归模型的统计显著性, 并通过 P 确定每个变量的交互作用。

1.3.6 酶抑制率的测定

制备不同质量浓度(10、15、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)的甜樱桃色素, 按照表 3 方法, 在不同试管中加入相应成分, 置于 37℃水浴中保存 30 min 后, 加入 3 mL 3,5-二硝基水杨酸, 在沸水中保存 10 min。冷却后, 将 0.5 mL 反应溶液加入 4.5 mL 去离子水中, 在 520 nm 处测量吸光值。 α -淀粉酶抑制率的计算如公式(2):

$$I/\%=\frac{[A_1-(A_0-A_2)]}{A_1}\times 100\% \tag{2}$$

式中, I 为 α -淀粉酶抑制率, %; A_1 、 A_2 为对照管 1 和对照管 2 在 A_{520} 处测得的吸光值; A_0 为在 A_{520} 处测得的样品管吸光值。

表 1 DESs 制备
Table 1 Preparation of DESs

氢键受体(HBA)	氢键供体(HBD)	摩尔比	序号	简称
氯化胆碱	乳酸	1:2	DESs-1	ChCl/LA
	苹果酸	1:2	DESs-2	ChCl/MA
	柠檬酸	1:2	DESs-3	ChCl/CA
	葡萄糖	1:2	DESs-4	ChCl/Glu
	乙二醇	1:2	DESs-5	ChCl/EG
	1,4 丁二醇	1:2	DESs-6	ChCl/BD
	甘油	1:2	DESs-7	ChCl/GL
	1,2-丙二醇	1:2	DESs-8	ChCl/PD

表 2 优化方案的因素水平设计
Table 2 Factors and levels in the optimal scheme

水平	因素			
	A 含水量/%	B 固液比(g/mL)	C 超声功率/W	D 提取时间/min
-1	10	1:30	200	35
0	20	1:40	300	40
1	30	1:50	400	45

表 3 α-淀粉酶抑制率测定
Table 3 Determination of α-amylase inhibition rate

成分	样品管	对照管 1	对照管 2
可溶性淀粉(1 g/L)/mL	0.4	0.4	0.4
α-淀粉酶(1 U/mL)/mL	0.2	0.2	0
样品溶液/mL	0.2	0	0.2
柠檬酸缓冲液(0.7 mol/L)/mL	0.2	0.4	0.4

甜樱桃色素对蔗糖酶的抑制率参照文献方法进行^[11]。制备不同浓度(10、15、25、50、100 μg/mL)的甜樱桃色素,按照表 4 方法将各管试剂混合均匀后,分别加入 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸,置于沸水浴中保持 5 min,冷却后加去离子水至 25 mL。在 520 nm 处测量吸光度值,蔗糖酶抑制率的计算如公式(3):

$$I/\%=\frac{[A_1-(A_0-A_2)]}{A_1}\times100\%$$

(3)

式中, I 为蔗糖酶抑制率,%; A_1 、 A_2 为对照管 1 和对照管 2 在 A_{520} 处测得的吸收值; A_0 为在 A_{520} 处测得的样品管吸收值。

表 4 蔗糖酶抑制率测定
Table 4 Determination of sucrase inhibition rate

成分	样品管	对照管 1	对照管 2
乙酸缓冲液 (0.2 mol/L)/mL	0.5	0.8	0.7
蔗糖溶液(5%)/mL	0.5	0.5	0.5
去离子水/mL	0.5	0.5	0.5
蔗糖酶(1 U/mL)/mL	0.2	0.2	0
样品溶液/mL	0.3	0	0.3

1.3.7 体内抗氧化潜能测定

(1)秀丽隐杆线虫的培养与同步

以大肠杆菌菌株 OP₅₀ 为食物来源,在 20℃的线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM)上培养秀丽隐杆线虫并同步培养。鸡蛋用 M9 缓冲液洗涤,然后在新的 NGM 上孵化。

(2)抗 H₂O₂ 活性

选择抗 H₂O₂ L4 期同步秀丽隐杆线虫,并在寿命测定前在 20℃下培养 1 d。将不同质量浓度甜樱桃色素样品(0.075、0.150、0.300、0.600 和 0.900 mg/mL)、VC (0.6 mg/mL, 阳性对照)或 M9 缓冲液(阴性对照)加入 NGM 中,并进一步

培养秀丽隐杆线虫 48 h。接下来,将秀丽隐杆线虫转移到含有 H₂O₂ (200 μL, 3 mmol/L)的 96 孔板中,在 20℃下培养。每 40 min 记录一次线虫成活情况,直到所有线虫死亡(标准:轻轻用针触摸线虫的头部或身体,当线虫的头部和身体没有反应时,表明线虫已经死亡)。

(3)抗氧化酶活性和 MDA 含量的测定

L4 期同步秀丽隐杆线虫按照 1.5.2 的方法在 20℃的新培养皿中培养 24 h。将不同质量浓度的甜樱桃色素样品(0.075、0.150、0.300、0.600 和 0.900 mg/mL)、VC (0.6 mg/mL)或 M9 缓冲液加入 NGM 中,进一步培养 48 h。然后将秀丽隐杆线虫转移到含有 H₂O₂ (200 μL, 3 mmol/L)的 96 孔板中,在 20℃下培养 2.5 h。用 M9 缓冲溶液洗涤线虫 3 次,测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性,并按照 MDA 检测试剂盒的要求测定 MDA 含量。

1.4 数据分析

所有实验重复 3 次,采用 Excel 2010 和 SPSS 27.0 软件进行数据统计和方差分析,采用 Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 最佳 DESs 的筛选

不同种类的 DESs 是影响活性物质提取效果的重要因素之一。如图 1 所示,当氯化胆碱作为 DESs 的 HBA 时,由不同 HBD 组成的 DESs 对甜樱桃色素的提取效果是不同的,DESs 的提取量明显优于 1%柠檬酸的提取量。在 8 种 DESs 中,DESs-6 的提取量最好,DESs-2 的提取量最差。用 DESs-6 提取甜樱桃色素的提取量是用 70%乙醇提取量的 2.13 倍,这可能是由于 DESs 具有广泛的极性,允许溶剂与花色苷类化合物相互作用并形成分子间氢键以保持稳定性^[12];当氢受体为苹果酸、葡萄糖、甘油、乙二醇和 1,2-丙二醇时,产率均低于 350 mg C3G /100 g,这可能是这些

试剂的高黏度阻碍了甜樱桃色素在体系中的溶解。DESs 提取性能的可变性归因于其物理化学性质的差异, 如极性、密度、表面张力和物理化学相互作用等因素^[13-14]。因此, 后续实验选取 DESs-6 进行甜樱桃色素提取工艺的优化。

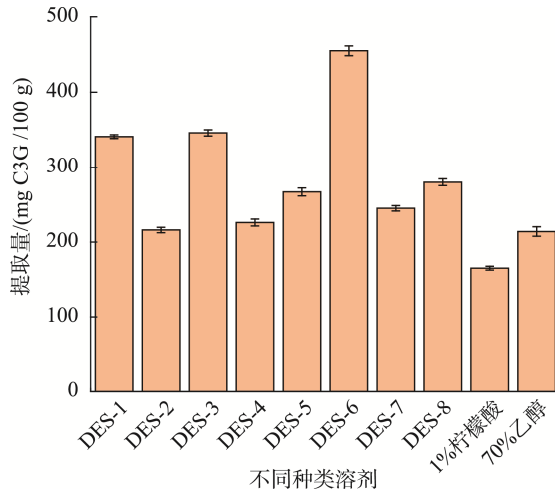


图1 不同种类DESs和常规提取溶剂对色素提取效果的影响
Fig.1 Effects of different DESs and conventional solvents on pigment extraction

2.2 影响甜樱桃色素提取效果的单因素实验

DESs-6 含水量、固液比、超声功率和超声时间对甜樱桃色素提取量的影响如图 2 所示。从图 2A 中可以看出, 当 DESs-6 中含水量增加至 20%时, 色素提取量达到最大值; 当含水量继续增加时, 色素提取量反而出现下降。说明 DESs 的黏度随着含水量的变化而变化, 含水量的增加会降低 DESs 的黏度, 并且有助于色素的溶解, 从而提高提取率^[15]。然而, 高含水量会对氢键相互作用产生不利影响, 从而限制 DESs 与目标组分的相互作用^[16]。因此, 选择 DESs-6 中 20%的含水量用于后续实验。

从图 2B 可以看出, 当固液比从 1:10 (g/mL)增加到 1:40 (g/mL)时, 色素的提取量不断增加。当体系的固液比超过 1:40 (g/mL)时, 色素提取饱和导致呈现下降趋势。因此, 选择 1:40 (g/mL)作为后续优化实验的中心点。

如图 2C 所示, 甜樱桃色素的提取量随着超声功率的增加呈现先上升后下降的趋势, 当超声功率为 300 W 时, 甜樱桃色素的提取量达到最大值。超声功率在 0~300 W 范围内, 提取率不断上升, 可能是由于随着超声功率的增加, 空化效应不断增强, 从而促进了甜樱桃果皮细胞壁的破坏

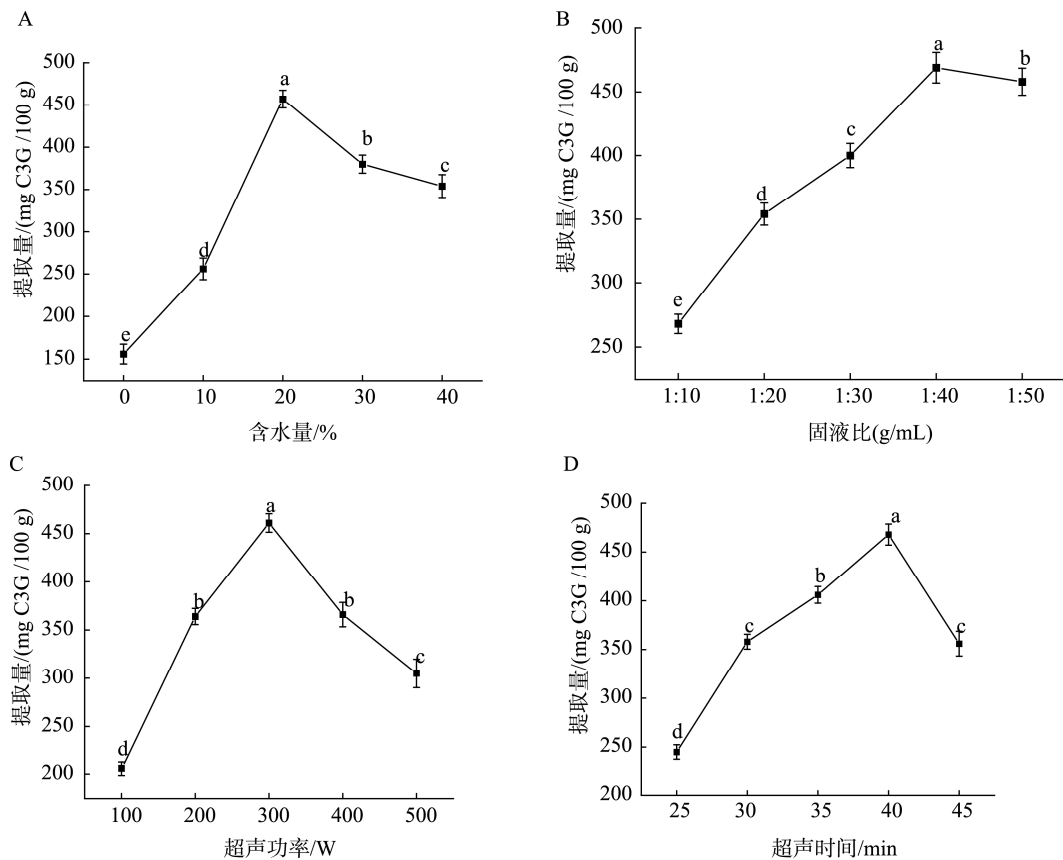


图2 DESs含水量(a)、固液比(b)、超声功率(c)、超声时间(d)对甜樱桃色素提取效果的影响($n=3$)
Fig.2 Effects of water content of DESs (a), solid-liquid ratio (b), ultrasonic power (c), and extraction time (d) on yields of pigment from sweet cherry ($n=3$)

和色素在细胞壁中的溶解^[9]。随着超声功率的继续增大,色素提取量呈现下降趋势,可能是由于机械振动能量过强,破坏了部分色素物质的结构,另外,超声功率过强使其空化作用趋于饱和,产生无用气泡,增加散射衰减,降低空化强度,使提取量下降^[17]。因此,在随后的实验中将超声功率确定为 300 W。

从 2D 图可看出,甜樱桃色素的提取量随着超声时间的增加呈现先上升后下降的趋势,超声处理 40 min 时,色素提取量最大。当提取时间超过 40 min 时,甜樱桃色素的提取量呈现下降趋势,这可能是由于随着超声时间的增加,超声提取产生了大量的热量,致使提取液的温度过高,可能使部分色素物质的结构遭到破坏^[17],导致了提取量的下降。因此,选择提取时间 40 min 进行后续实验。

2.3 响应面法优化

2.3.1 提取过程建模

为了优化超声辅助 DESs 提取甜樱桃色素的条件,建立了 Box-Behnken 响应面实验设计,并记录了各种实验条件下的提取量(表 5)。表 6 总结了所有自变量的响应面多项式模型的方差分析数据。模型的 F 为 15.1336, $P<0.0001$,表明模型具有高度显著性,接近 1 的高决定系数(R^2)为该模型提供了可信的拟合;此外,各模型的变异系数为 5.34%,表明结果是可靠和准确的。一次项 C 、 D 和交互项 BD 影响显著($P<0.05$),交互项 AB 、 AC 、 BC 以及平方项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 影响极显著($P<0.01$)。由表 6 中 F 值可知,4 种因素对甜樱桃色素提取量的影响大小顺序为:

表 5 Box-Behnken 响应面试验设计结果
Table 5 Design and results of Box-Behnken response surface experiment

序号	A 含水量/%	B 固液比(g/mL)	C 超声功率/W	D 提取时间/min	提取量/ (mg C3G/100 g)
1	-1	-1	0	0	302
2	1	-1	0	0	387
3	-1	1	0	0	398
4	1	1	0	0	296
5	0	0	-1	-1	326
6	0	0	1	-1	375
7	0	0	-1	1	335
8	0	0	1	1	365
9	-1	0	0	-1	308
10	1	0	0	-1	340
11	-1	0	0	1	367
12	1	0	0	1	326
13	0	-1	-1	0	288
14	0	1	-1	0	402
15	0	-1	1	0	376
16	0	1	1	0	348
17	-1	0	-1	0	405
18	1	0	-1	0	324
19	-1	0	1	0	368
20	1	0	1	0	405
21	0	-1	0	-1	290
22	0	1	0	-1	324
23	0	-1	0	1	400
24	0	1	0	1	329
25	0	0	0	0	455
26	0	0	0	0	440
27	0	0	0	0	475
28	0	0	0	0	470
29	0	0	0	0	468

表 6 响应面方差分析表
Table 6 Response surface analysis of variance table

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
模型	82275.59	14	5876.828	15.1336	<0.0001	**
<i>A</i> -含水量	408.3333	1	408.3333	1.051512	0.3226	
<i>B</i> -固液比	243	1	243	0.625757	0.4421	
<i>C</i> -超声功率	2054.083	1	2054.083	5.289534	0.0374	*
<i>D</i> -提取时间	2106.75	1	2106.75	5.425157	0.0353	*
<i>AB</i>	8742.25	1	8742.25	22.51244	0.0003	**
<i>AC</i>	3481	1	3481	8.964031	0.0097	**
<i>AD</i>	1332.25	1	1332.25	3.430718	0.0852	
<i>BC</i>	5041	1	5041	12.98124	0.0029	**
<i>BD</i>	2756.25	1	2756.25	7.097705	0.0185	*
<i>CD</i>	90.25	1	90.25	0.232406	0.6372	
<i>A</i> ²	17460.85	1	17460.85	44.96396	<0.0001	**
<i>B</i> ²	25446.06	1	25446.06	65.52694	<0.0001	**
<i>C</i> ²	10643.84	1	10643.84	27.40928	0.0001	**
<i>D</i> ²	31338.87	1	31338.87	80.70168	<0.0001	**
残差	5436.617	14	388.3298			
失拟项	4635.417	10	463.5417	2.314237	0.2174	
纯误差	801.2	4	200.3			
总和	87712.21	28				

注: **表示极显著性差异(*P*<0.01); *表示显著性差异(*P*<0.05)。

D(提取时间)>*C*(超声波功率)>*A*(含水量)>*B*(固液比)。综上所述表明,该模型能充分且准确反映色素提取量与自变量之间的关系。

根据实际因素得出的最终多项式方程为:
$$Y=461.60-5.83A+4.50B+13.08C+13.25D-46.75AB+29.50AC-18.25AD-35.50BC-26.25BD-4.75CD-51.88A^2-62.63B^2-40.51C^2-69.51D^2$$

2.3.2 过程变量对色素产量的影响

利用 Design-expert 13.0 软件获得响应面图,响应面图直接反映了过程变量之间对响应值的相互作用,陡峭的响应面反映了显著的相互作用效应^[18]。响应面曲线呈凸面,极值点出现在最高面,说明两因素之间作用显著^[19]。DESs-6 含水量、固液比、超声功率、提取时间对响应面提取甜樱桃色素的影响如图 3 所示,含水量和固液比(*AB*)、含水量和超声功率(*AC*)、固液比和超声功率(*BC*)、固液比和提取时间(*BD*)的交互作用对色素提取量的显著性影响一致。最后,结合方差分析及回归方程的响应面图,得出色素最佳提取条件为:DESs-6 含水量 19.83%、固液比 1:39.76 (g/mL)、超声功率 316.05 W、提取时间为 40.49 min。

2.3.3 最佳条件下的验证实验

为了验证模型的可靠性,根据响应面法(response surface method, RSM)结果进行了 3 次重复实验,并稍作修改,即含水量 20%、固液比 1:40 (g/mL)、超声功率 316 W、

提取时间为 41 min,此时色素平均提取量为(465.10±1.46) mg C3G/100 g,与 463.3 mg C3G/100 g 的预测数据吻合良好。理论值与实验数据之间的相对误差小于 2.5%,回归模型可较好地预测色素的产量。因此,响应面分析方法可靠,符合实际情况,能够验证回归方程的有效性。

采用乙醇取代 DESs,在其他条件一致情况下,其平均产量为 245.1 mg C3G/100 g,远低于 DESs-6 的提取量,可能是由于 DESs 对原料细胞壁的破坏程度更大。因此,采用超声辅助 DESs 从甜樱桃中提取色素的工艺方法是可行的。

2.4 甜樱桃色素对葡萄糖苷酶的抑制作用

α -淀粉酶与蔗糖酶同属于 α -葡萄糖苷酶, α -淀粉酶是体内淀粉、糊精等碳水化合物转化的关键酶之一,能催化 α -1,4-糖苷键的水解。 α -淀粉酶抑制剂可抑制胃肠道唾液和胰淀粉酶的活性,抑制食物中淀粉等碳水化合物的转化利用,具有降血糖作用^[20]。蔗糖酶是小肠中的一种低聚糖水解酶,能将蔗糖转化为葡萄糖和果糖,肠道吸收葡萄糖后使血糖升高。抑制 α -淀粉酶和蔗糖酶能使碳水化合物的消化和葡萄糖吸收延迟,从而起到减少餐后高血糖的作用^[21]。为探究甜樱桃色素的降血糖作用,开展了甜樱桃色素对 α -淀粉酶和蔗糖酶活性抑制的相关实验。

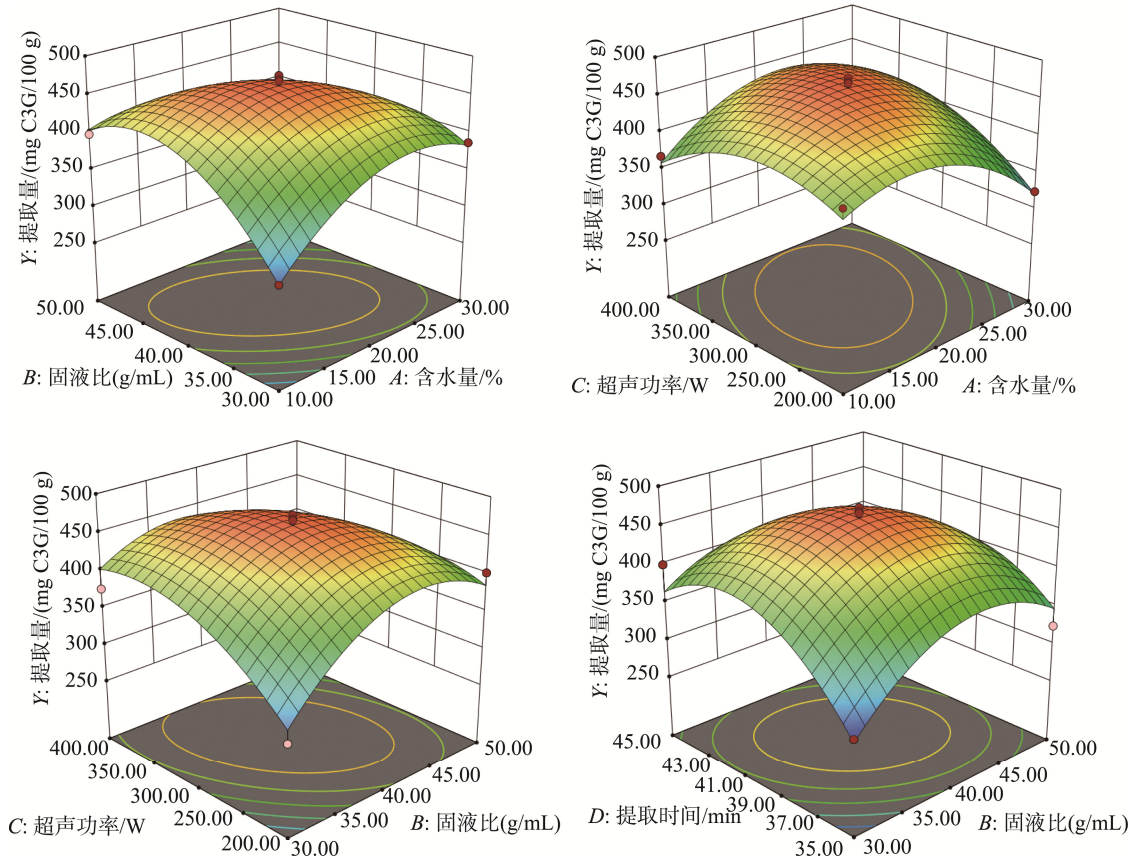


图3 4个自变量与色素提取量相互作用的响应面图

Fig.3 Response surface plots for interactions between 4 independent variables and pigment

如图 4 所示, 在实验浓度范围内, 甜樱桃色素对 α -淀粉酶和蔗糖酶的抑制率呈现出浓度依赖性, 即随着色素浓度的增加, 对这两种酶的抑制率也随之增加。当色素质量浓度增加到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 α -淀粉酶的抑制率为 $80.20\%\pm 0.65\%$, 对蔗糖酶的抑制率为 $73.50\%\pm 1.26\%$ 。通常用半抑制浓度值(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})表示色素对酶的抑制活性, IC_{50} 越低, 表明色素对酶的抑制能力越强。 α -淀粉酶的 IC_{50} 为 10.19 $\mu\text{g/mL}$, 蔗糖酶的 IC_{50} 为 1.78 $\mu\text{g/mL}$, 可见, 甜樱桃色素对蔗糖酶的抑制活性高于 α -淀粉酶。

2.5 甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫的衰老的影响

2.5.1 甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫氧化应激的影响

从表 7 可知, 阳性对照组秀丽隐杆线虫的平均存活时间显著高于阴性对照组(M9 组), 与 M9 组相比, 各种浓度的甜樱桃色素均能延长秀丽隐杆线虫的平均存活时间。其中, 低、中浓度的色素(0.075~0.300 mg/mL)可显著延长秀丽隐杆线虫在氧化应激下的存活时间($P<0.05$)。高浓度色素(0.600~0.900 mg/mL)处理 4 h 后秀丽隐杆线虫的存活时间与 M9 组相比显著增加($P<0.05$), 推测高浓度可能产生其他生理毒性, 影响秀丽隐杆线虫的正常生理活动, 也可能是

由于高渗透压引起的^[22]。当色素质量浓度为 0.300 mg/mL 时, 秀丽隐杆线虫的平均存活时间可达 (8.41 ± 0.31) h, 显著高于阴性和阳性对照组, 说明甜樱桃色素对应激条件下秀丽隐杆线虫的保护作用不存在浓度依赖性, 存在最优浓度。

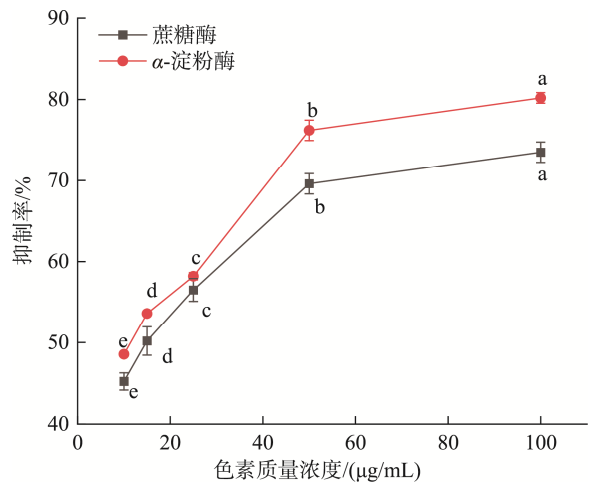


图4 不同浓度甜樱桃色素对 α -淀粉酶和蔗糖酶的抑制作用

Fig.4 Inhibitions of α -amylase and sucrase by different concentrations of sweet cherry pigments.

表 7 甜樱桃色素对线虫氧化应激的影响
Table 7 Effects of sweet cherry pigment on oxidative stress in nematodes

组别	平均存活时间/h
阴性对照组(M9 组)	2.67±0.20 ^f
阳性对照组	5.23±0.17 ^c
0.075	5.38±0.14 ^c
0.150	6.94±0.27 ^b
0.300	8.41±0.31 ^a
0.600	3.67±0.19 ^e
0.900	4.25±0.22 ^d

注: 同列不同小写字母具有显著性差异($P<0.05$)。

2.5.2 甜樱桃色素对氧化应激条件下秀丽隐杆线虫抗氧化酶活性的影响

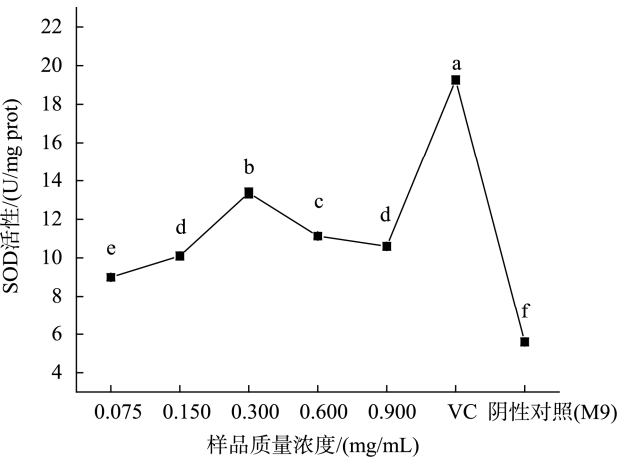
细胞内抗氧化酶系统包括 SOD、CAT 和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GRX)等, 它们通过防止单线态氧(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)、羟基自由基(hydroxyl radical, $\text{OH}\cdot$)、超氧阴离子(superoxide anion, $\text{O}_2^{\cdot-}$)和 H_2O_2 等高水平活性氧(reactive oxygen species, ROS)引起的氧化损伤而在氧化还原稳态中发挥重要作用^[23-24], SOD 被认为是催化 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的重要酶之一, 能够将高活性的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 转化为 H_2O_2 , 在细胞抗氧化损伤的第一道防线中起着重要作用^[25]。

如图 5 所示, 与阴性对照(M9)组相比, 不同浓度的甜樱桃色素和 VC 均能显著提高 H_2O_2 胁迫下秀丽隐杆线虫的 SOD 活性($P<0.05$)。在 0.075、0.150、0.300、0.600 和 0.900 mg/mL 的色素处理下, 与 M9 组相比, 线虫体内 SOD 活性分别提高了 60.71%、80.35%、138.57%、98.75%和 89.28%。与低浓度(0.075~0.150 mg/mL)和高浓度(0.600~0.900 mg/mL)处理相比, 中浓度(0.300 mg/mL)甜樱桃色素处理对秀丽隐杆线虫 SOD 活性增加较大且差异显著($P<0.05$), 说明甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫 SOD 活性的影响不存在剂量依赖关系。

CAT 主要位于过氧化物酶体中, 是一个同源四聚体, 分子量为 240 kDa, 是哺乳动物细胞中含量最多的过氧化物酶体蛋白之一, 主要作用是催化 H_2O_2 的水解, 转化为 H_2O 和 O_2 , 同时还参与多种生化途径^[26-27]。虽然 CAT 的催化反应与 GPX 相同, 但它对 H_2O_2 的亲合力更高, 是一种非常重要的保护酶, 加之其较高的米氏常数(michaelis constant, K_m), 可以有效防止 H_2O_2 浓度的增加^[28]。

如图 6 所示, 不同质量浓度(0.075~0.900 mg/mL)的甜樱桃色素均能显著增强 H_2O_2 胁迫下秀丽隐杆线虫的 CAT 活性。在 0.075、0.150、0.300、0.600 和 0.900 mg/mL 的色素处理下, 与 M9 组相比, 秀丽隐杆线虫 CAT 活性分别显著提高了 43.10%、70.68%、161.21%、106.89%和 44.83% ($P<0.05$)。0.300 mg/mL 质量浓度的甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫 CAT 活性有显著影响, 与低浓度(0.075~0.150 mg/mL)

和高浓度(0.600~0.900 mg/mL)处理相比差异显著($P<0.05$)。结果表明, 甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫 CAT 活性的影响不存在剂量依赖关系。



注: 不同小写字母组间差异显著($P<0.05$), 以下同。

图5 甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫SOD活性的影响

Fig.5 Effects of sweet cherry pigments on the activities of SOD in *Caenorhabditis elegans*

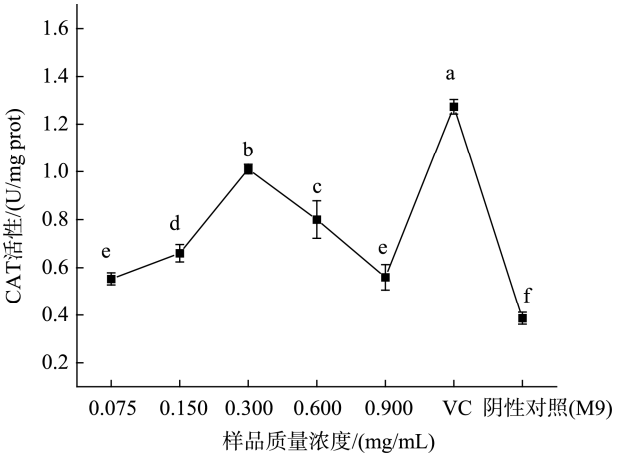


图6 甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫体内CAT活性的影响

Fig.6 Effects of sweet cherry pigments on the activities of CAT in *Caenorhabditis elegans*

2.5.3 甜樱桃色素对氧化应激条件下秀丽隐杆线虫 MDA 水平的影响

MDA 是脂质过氧化产生的一种非常活跃的毒性代谢物, 与癌症、糖尿病、心血管疾病、类风湿性关节炎、肝肾毒性以及核酸结构改变等密切相关^[29-30]。如图 7 所示, 与 M9 组相比, 不同质量浓度(0.075~0.900 mg/mL)的甜樱桃色素均能显著降低秀丽隐杆线虫体内 MDA 水平, MDA 水平分别下降了 38.71%、54.03%、63.70%、55.64%和 47.58% ($P<0.05$)。与中浓度(0.300 mg/mL)甜樱桃色素相比, 低浓度(0.075 mg/mL)和高浓度(0.900 mg/mL)处理对秀丽隐杆线虫 MDA 水平的影响差异显著($P<0.05$), 而 VC 对秀

丽隐杆线虫 MDA 水平的影响差异不显著($P>0.05$)。高浓度对秀丽隐杆线虫 MDA 水平的影响效果不如中浓度, 这可能是由于细胞外渗透压升高导致细胞功能下降和 MDA 积累所致^[31]。

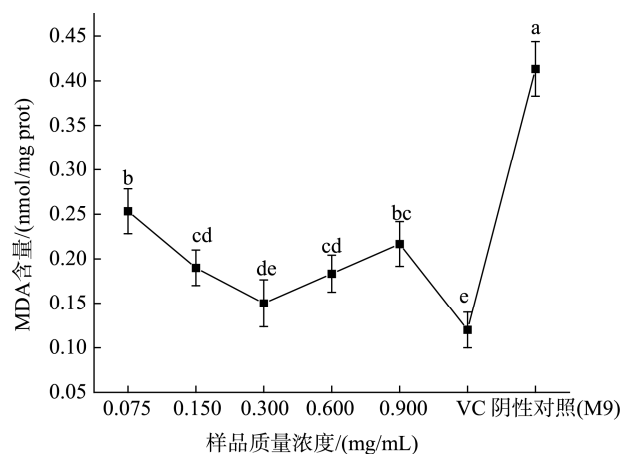


图7 甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫MDA水平的影响

Fig.7 Effects of sweet cherry pigments on the levels of MDA in *Caenorhabditis elegans*

3 结 论

本研究通过响应面优化超声辅助 DESs 提取甜樱桃色素的最佳工艺, 并从抑制 α -淀粉酶和蔗糖酶的角度, 研究了甜樱桃色素的降糖效果, 探讨了甜樱桃色素对秀丽隐杆线虫的抗氧化作用。在单因素和响应面法实验研究中, 系统地探讨了 DESs 种类、DESs 含水量、固液比、超声功率、提取时间等因素对甜樱桃色素提取效果的影响。实验结果表明, 甜樱桃色素的最佳提取工艺条件为: DESs-6 (ChCl/BD)含水量 20%、固液比 1:40 (g/mL)、超声功率 316 W、提取时间为 41 min, 采用该工艺所得甜樱桃色素的平均提取量为 (465.10 ± 1.46) mg C3G/100 g, 优于 70%乙醇的提取量。在体外降血糖实验中, 甜樱桃色素对 α -淀粉酶和蔗糖酶的抑制率呈浓度依赖性, 当色素质量浓度为 100 μ g/mL 时, 对 α -淀粉酶和蔗糖酶的抑制率分别为 $80.20\% \pm 0.65\%$ 和 $73.50\% \pm 1.26\%$, 说明其能降低碳水化合物分解为葡萄糖的速度, 可较好发挥降血糖作用。所有质量浓度(0.075~0.900 mg/mL)的甜樱桃色素均能使线虫的生长曲线向右移动, 并能显著提高 H_2O_2 胁迫下线虫体内 SOD 和 CAT 的活性($P<0.05$), 但不存在剂量依赖关系。

综上, 超声辅助 DESs 提取法不仅能提高色素提取量, 而且所得色素具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制能力和抗氧化应激能力, 可有效防止细胞受损, 为甜樱桃色素资源开发利用提供了新的思路。关于甜樱桃色素的分子结构、秀丽隐杆线虫抗氧化应激相关基因的表达, 以及在其他模型动

物中的研究尚未涉及, 有待后续进一步探索。

参考文献

- [1] 苏金歌, 孙玉刚, 吴澎. 樱桃红色素的研究进展[J]. 中国果菜, 2021, 41(10): 16–21.
SU JG, SUN YG, WU P. The research progress of cherry red pigment [J]. China Fruit Veget, 2021, 41(10): 16–21.
- [2] 郭萧. 光与激素调控不同色泽甜樱桃果实花色苷合成机理初探[D]. 北京: 中国农业大学, 2019.
GUO X. Study of the regulatory mechanism of light and phytohormone in anthocyanin biosynthesis in differently colored cherries (*Prunus avium* L.) [D]. Beijing: China Agricultural University, 2019.
- [3] 申惠如, 刘亚星, 杨丽霞, 等. 番茄色素的提取及口红的研制[J]. 天津农学院学报, 2020, 27(2): 66–71.
SHEN HR, LIU YX, YANG LX, et al. The extraction of tomato pigment and the development of lipstick [J]. J Tianjin Agric Univ, 2020, 27(2): 66–71.
- [4] 李向荣, 潘宇, 丁一鸣, 等. 毛酸浆果渣黄色素的提取, 稳定性及抗氧化性研究[J]. 食品工业, 2023, 44(8): 79–85.
LI XR, PAN Y, DING YM, et al. Study on preparation, stability and antioxidant properties of pigment from *Physalis pubescens* L. pomace [J]. Food Ind, 2023, 44(8): 79–85.
- [5] 陈玉珍, 梁志森, 李建华, 等. 基于低共熔溶剂同时清洗植物性食品中多种污染元素可行性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(9): 178–186.
CHEN YZ, LIANG ZS, LI JH, et al. Feasibility study on removal of multi-polluting elements in plant food by deep eutectic solvents [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(9): 178–186.
- [6] ALI M C, CHEN J, ZHANG H, et al. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction [J]. Talanta, 2019, 203: 16–22.
- [7] DAI Y, ROZEMA E, VERPOORTE R, et al. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents [J]. J Chromatogr A, 2016, 1434: 50–56.
- [8] 龙碧秀, 姚世豪, 岳欢欢, 等. 低共熔溶剂提取和田红葡萄皮籽渣中多酚及其组分分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(4): 304–315.
LONG BX, YAO SH, YUE HH, et al. Extraction of polyphenol from Hotan red grape by-products by deep eutectic solvents and component analysis [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(4): 304–315.
- [9] 许英瑞, 朱妍丽, 薛元泰, 等. 黑枸杞多糖的提取及其对副干酪乳杆菌 19、嗜热链球菌 G2 生长特性及抗氧化能力的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(17): 179–185.
XU YR, ZHU YL, XUE YT, et al. Optimized ultrasonic extraction of *Lycium ruthenicum* polysaccharides and its effect on the growth and antioxidant capacity of *Lactobacillus paracasei* 19 and *Streptococcus thermophilus* G2 [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(17): 179–185.
- [10] GIUSTI MM, WROLSTAD RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy [J]. Current Protoc Food Anal Chem, 2001, 1: 1–13.
- [11] ZHANG Y, SU D, ZHANG Y, et al. Optimization of chlorella polysaccharides extraction technology based on inhibition of α -amylase enzyme activity [J]. J Food Mach, 2013, 29: 128–132.

- [12] LIU ZT, SUN TT, LIU JX, *et al.* Natural deep eutectic solvent as a green extraction medium for the ultrasonic-assisted extraction of *Sinapine thiocyanate* from black mustard seeds [J]. *Microchem J*, 2024, 201: 1–9.
- [13] GUO N, KOU P, JIANG YW, *et al.* Natural deep eutectic solvents couple with integrative extraction technique as an effective approach for mulberry anthocyanin extraction [J]. *Food Chem*, 2019, 296: 78–85.
- [14] BOSILJKOV T, DUJMI CF, CVJETKO BM, *et al.* Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins [J]. *Food Bioprod Proc*, 2017, 102: 195–203.
- [15] SHANG X, DOU Y, ZHANG Y, *et al.* Tailor-made natural deep eutectic solvents for green extraction of isoflavones from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts [J]. *Ind Crop Prod*, 2019, 140: 1–8.
- [16] GARCIA A, RODRÍGUEZ-JUAN E, RODRIGUEZ-GUTIERREZ G. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents [J]. *Food Chem*, 2016, 197: 554–561.
- [17] 程涛, 李仕鲁, 陈德勇, 等. 超声辅助提取竹叶黄酮及提取机理研究[J]. *中国调味品*, 2024, 49(7): 1–8.
- CHENG T, LI SL, CHEN DY, *et al.* Study on ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from bamboo leaves and extraction mechanism [J]. *China Cond*, 2024, 49(7): 1–8.
- [18] CRAVEIRO R, AROSO I, FLAMMIA V, *et al.* Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents [J]. *J Mol Liq*, 2016, 215: 534–540.
- [19] CHEN XQ, LI ZH, LIU LL, *et al.* Green extraction using deep eutectic solvents and antioxidant activities of flavonoids from two fruits of rubia species [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2021, 148: 1–9.
- [20] ZHANG Y, SU D, ZHANG Y, *et al.* Optimization of chlorella polysaccharides extraction technology based on inhibition of α -amylase enzyme activity [J]. *J Food Mach*, 2013, 29: 128–132.
- [21] CHERBAL A, KEBIECHE M, YILMAZ EM, *et al.* Antidiabetic and hypolipidemic activities of *Algerian Pistachia lentiscus* L. leaves extract in alloxan-induced diabetic rats [J]. *S Afr J Bot*, 2017, 108: 157–162.
- [22] WANG Z, WANG X, LI X, *et al.* Antioxidant effects of the aqueous extract of turmeric against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) [J]. *J Aquac Fish*, 2022, 9(1): 71–77.
- [23] GUILHERME B, IVANA BMC, JAVIER GG. Chapter four-manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation [J]. *J Adv Clin Chem*, 2015, 68: 87–130.
- [24] BRESCIANI G, DCRUZ IBM, GONZÁLEZ-GALLEGO J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 68: 87–130.
- [25] AHN YJ, KIM H. Lutein as a modulator of oxidative stress-mediated inflammatory diseases [J]. *Antioxid*, 2021, 10(9): 2–23.
- [26] BAL A, PANDA F, PATI SG, *et al.* Modulation of physiological oxidative stress and antioxidant status by abiotic factors especially salinity in aquatic organisms [J]. *Comp Biochem Phys (Part C)*, 2021, 241: 1–22.
- [27] BOURGONJE AR, FEELISCH M, FABER KN, *et al.* Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease [J]. *Trend Mol Med*, 2020, 26(11): 1034–1046.
- [28] GUILHERME B, IVANA BMC, JAVIER GG. Chapter four-manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation [J]. *J Adv Clin Chem*, 2015, 68: 87–130.
- [29] ELWAKEELL A, SOUDAN H, ELDOKSH A, *et al.* Implementation of the Chou-Talalay method for studying the *in vitro* pharmacodynamic interactions of binary and ternary drug combinations on MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells [J]. *Synergy*, 2019, 8: 1–34.
- [30] ANZE D, PETRA K, DOMEN H, *et al.* Pharmacodynamics of malondialdehyde as indirect oxidative stress marker after arrested-heart cardiopulmonary bypass surgery [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 1–5.
- [31] 黄祎, 夏莉, 雷青松, 等. 柴胡皂苷 D 对大鼠免疫性肝纤维化的保护作用及其机制研究[J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44(14): 1410–1420.
- HUANG Y, XIA L, LEI QS, *et al.* Protective effects and mechanism of saikosaponin D on immune hepatic fibrosis in rats [J]. *J Army Med Univ*, 2022, 44(14): 1410–1420.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



王兆丰, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为植物资源开发利用与食品安全。
E-mail: 15294190664@163.com



杜石勇, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品储藏与加工。
E-mail: 475898271@qq.com