

啤特果粗多糖提取工艺优化*

杨明俊¹, 吴婧², 王永刚¹, 李志忠¹

1(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州, 730050)

2(兰州金川新材料股份有限公司, 甘肃 金昌, 730000)

摘要 优化啤特果粗多糖的提取工艺。在单因素试验基础上根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 采用三因素三水平响应面分析法, 依据回归分析确定各工艺条件的影响因素。结果表明: 啤特果粗多糖提取的最佳工艺条件为乙醇体积分数为 72%, 液料比为 15:1 (mL:g), 提取温度 83℃, 多糖最大提取率为 7.49%。响应面优化法能够提高啤特果的粗多糖提取率。

关键词 啤特果 粗多糖 提取 响应面分析法

啤特果原名皮囊果, 又名“酸巴梨”, 属蔷薇科苹果亚科新疆梨系统 (*Pyrus sinkiangensis*), 生长在甘肃省和政县海拔约为 2 100 ~ 2 400 m 的千年古老树种, 品味酸甜、性温, 含有多种氨基酸、糖类、维生素和钾、钙、铁等微量元素, 是一种营养价值极其丰富的绿色水果^[1]。

多糖是水果中一类重要的功能因子, 具有抗肿瘤^[2]、抗疲劳^[3]、抗损伤^[4]、抗氧化^[5-6], 增强人体免疫力和抗癌的作用。

鉴于目前对啤特果多糖研究甚少, 本实验研究了乙醇浓度、液料比、提取时间和浸提温度对啤特果多糖提取率的影响, 利用响应面分析法对其提取工艺参数进行优化, 以获得啤特果多糖提取的最佳工艺条件, 为啤特果多糖的应用研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

啤特果, 于 2010 年 10 月采自甘肃省和政县; 无水乙醇、三氯乙酸等药品均为分析纯。

1.2 实验仪器

ALC-110.4 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), TGL-16C 高速台式离心机(上海安亨科学仪器厂), RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣仪器有限公司), FD-1 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器)。

1.3 实验方法

1.3.1 工艺路线

称取定量新鲜啤特果清洗去皮→破碎打浆→热水浸提→去除蛋白→离心分离上清液→真空浓缩→醇沉→真空冷冻干燥得啤特果粗多糖→溶解定容→苯酚硫酸法测定多糖含量

1.3.2 蛋白去除方法

参照 Sevag 法^[8]。

1.3.3 多糖含量与提取率的计算

1.3.3.1 标准曲线绘制

参照苯酚-硫酸法^[9], 以葡萄糖浓度 X 为横坐标 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), 吸光度 Y 为纵坐标, 在 485 nm 处测定吸光度, 绘制标准曲线。得回归方程为 $Y = 0.0607x - 0.0569$, $R^2 = 0.9977$, 说明葡萄糖 0 ~ 100 μg 内呈良好的线性关系。

1.3.3.2 样品多糖含量的测定

将冻干的多糖样品溶解, 定容至 100 mL, 精密吸取 1 mL 样品溶液, 采用苯酚-硫酸法^[9], 在 480 nm 处测定吸光值, 从而利用标准曲线方程计算样品中多糖的含量。多糖提取率用下式计算:

$$\text{多糖提取率}/\% = \frac{\text{粗多糖质量} \times \text{多糖含量}}{\text{样品质量}}$$

1.3.4 单因素及响应面分析

取一定量的啤特果, 破碎匀浆, 取样 4 份, 每份约 80 g, 按一定的液固比量取一定量的蒸馏水于 250 mL 回流锥形瓶中, 在一定温度下进行回流提取, 浓缩提取液, 采用不同浓度乙醇进行醇沉, 离心分离, 冷冻干燥, 称重, 溶解定容至 100 mL, 测定多糖含量, 计算多糖提取率。分别确定最佳提取时间、液料比、温度及乙醇浓度。在单因素基础上, 采用响应面法优化最佳提取工艺。

第一作者: 博士, 副教授。

* 甘肃省自然科学基金资助项目(0908ZTB090), 兰州理工大学博士基金项目(0908ZXC129)

收稿日期: 2011-07-13 改回日期: 2011-10-23

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 不同浓度乙醇对多糖提取率的影响

啤特果中含单糖、双糖、低聚糖、氨基酸及醇溶性蛋白质等物质,由于多糖溶于水而不溶于高浓度乙醇,根据此原理先用体积分数 95% 乙醇 80℃ 回流 1 h,提取 1 次,除去单糖、低聚糖等对多糖提取率有影响的物质,然后在浸取温度为 80℃,料水比 15:1,提取 2h,采用不同浓度乙醇进行沉淀,结果见图 1。从图 1 中可知,随着乙醇浓度的增加,醇析程度亦有所提高,但是当乙醇浓度从 67% 增加到 75% 时,多糖提取率变化趋缓,而且当乙醇浓度增加到 80% 时,析出效果不好,究其原因可能是高浓度醇对多糖构象有影响,因此选用 67% (即浓缩液与乙醇体积比为 1.0:2.0) 的乙醇醇析啤特果多糖。

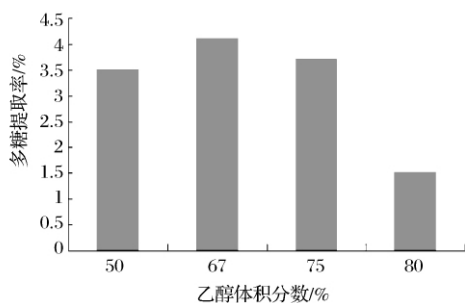


图 1 乙醇浓度对多糖提取率的影响

2.1.2 不同液料比对多糖提取率的影响

液料比对提取率具有重要影响,水量多有利于多糖的扩散传质,但水量过多增加蒸发处理的困难。在浸提温度 80℃、浸提时间 2 h、醇析浓度为 67% 条件下,改变液料比进行多糖提取,结果见图 2。

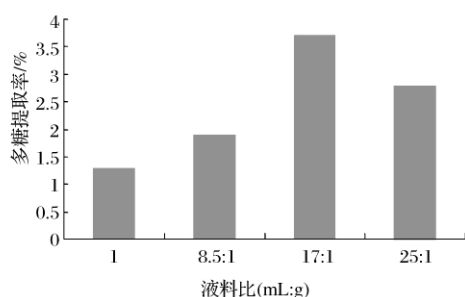


图 2 液料比对多糖提取率的影响

由图 2 可知,随着液料比的增加多糖的提取率有所提高,但是当液料比达到 17:1 时,随着液料比的增加提取率反而降低,没有明显的增高,因此选用 17:1

的液料比较为合适。

2.1.3 不同温度对多糖提取率的影响

提取温度是影响啤特果多糖提取率的重要因素。温度的升高有助于多糖的有效提取,在液料比 15:1,浸提时间 2h,醇析浓度为 67% 条件下,改变浸提温度比进行多糖提取,温度对多糖提取率影响曲线见图 3。由图 3 可知,随着温度的升高,多糖的提取率有所提高,但是达到 80℃ 以后提取率的增加程度不是很明显,考虑到设备及能耗的情况,因而选用 80℃ 较为合适。

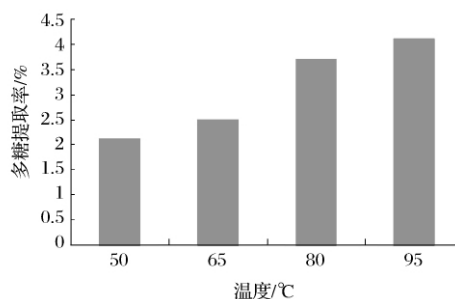


图 3 温度对多糖提取率的影响

2.1.4 不同提取时间对多糖提取率的影响

为了保证多糖的充分提取,在液料比 15:1,浸提温度为 80℃,醇析浓度为 67% 条件下,改变提取时间进行多糖提取,由图 4 可知,随着时间的延长,啤特果多糖的提取率有所提高,但是提取率增加的程度变化不是很明显,因此提取时间对啤特果多糖的影响不大,出于经济考虑一般选用 1 h 的时间较为合适。

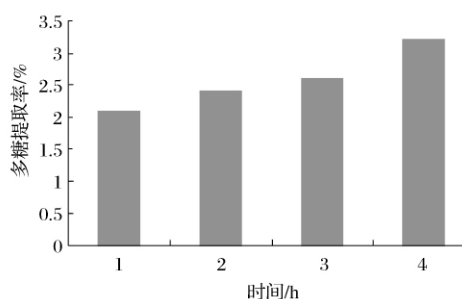


图 4 提取时间对多糖提取率的影响

2.2 响应面法提取条件的优化

2.2.1 响应面试验设计及结果

根据 Box-Behnken^[10] 中心组合实验设计原理,综合单因素试验结果,选取提取时间为 1h,对啤特果多糖提取影响显著的 3 个因素 (乙醇浓度、液料比、浸提温度),设计了 3 因素 3 水平的响应面分析实验,水平及编码表见表 1。

表1 响应面试验因素水平编码表

| 因素 | 水平 | | |
|-------------------------------|-----|--------|------|
| | -1 | 0 | 1 |
| (A) 乙醇体积分数/% | 50 | 65 | 75 |
| (B) 液料比/(g·mL ⁻¹) | 1:1 | 12.5:1 | 25:1 |
| (C) 温度/℃ | 65 | 80 | 95 |

表2 Box-Behnken 试验设计及结果

| 试验号 | A | B | C | (R) 多糖提取率/% |
|-----|----|----|----|-------------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 2.53 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 1.71 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 2.80 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 4.51 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 2.80 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 3.57 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 5.68 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 5.49 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 1.52 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 3.30 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 3.15 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 4.56 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 8.19 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 8.24 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 8.31 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 8.26 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 8.34 |

使用 Design Expert7.0 软件,以乙醇浓度、液料比、提取温度为响应变量,以啤特果多糖提取率为响应值对表3 的数据进行处理,得到表3 回归方程方差分析表,利用软件进行非线性回归的二次多项式拟合,得到预测模型如下:

$$R = -109.36625 + 1.71348A + 0.44159B + 1.44427C + 0.00421667AB - 0.00128AC - 0.000513889BC - 0.013210A^2 - 0.023031B^2 - 0.00808444C^2$$

表3 回归方程方差分析表

| 项 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|--------|-----|---------|--------|----------|-----|
| 模型 | 100.89 | 9 | 11.21 | 162.23 | < 0.0001 | ** |
| A | 0.27 | 1 | 0.27 | 3.91 | 0.0886 | |
| B | 4.9 | 1 | 4.9 | 70.89 | < 0.0001 | ** |
| C | 7.39 | 1 | 7.39 | 106.97 | < 0.0001 | ** |
| AB | 1.6 | 1 | 1.6 | 23.16 | 0.0019 | ** |
| AC | 0.23 | 1 | 0.23 | 3.33 | 0.1106 | |
| BC | 0.034 | 1 | 0.034 | 0.50 | 0.5043 | |
| A ² | 17.94 | 1 | 17.94 | 259.58 | < 0.0001 | ** |
| B ² | 46.31 | 1 | 46.31 | 670.21 | < 0.0001 | ** |
| C ² | 13.93 | 1 | 13.93 | 201.61 | < 0.0001 | ** |
| 残差 | 0.48 | 7 | 0.069 | | | |
| 失拟项 | 0.47 | 3 | 0.16 | 45.13 | 0.0015 | ** |
| 净误差 | 0.014 | 4 | 0.00347 | | | |
| 总离差 | 101.38 | 16 | | | | |

$$R^2 = 0.9952 \quad R_{Adj}^2 = 0.9891$$

注 “**”表示极显著($P < 0.01$), “*”表示显著($0.01 < P < 0.05$)。

由表3 回归方差分析显著性检验表明,该模型回归显著($P < 0.0001$),失拟项显著,模型 $R^2 = 0.9952$, $R_{Adj}^2 = 0.9891$,说明该模型与实际实验拟合较好,自变量与响应值之间线性关系显著,可以用于啤特果多糖提取工艺实验的预测。

2.2.2 各因素之间的交互作用

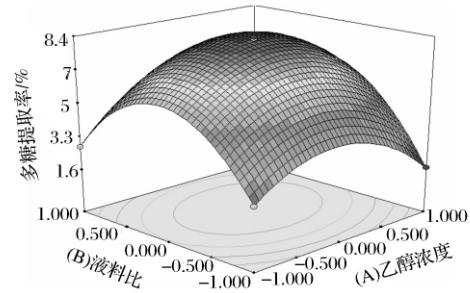


图5 液料比和乙醇浓度对多糖提取率影响的响应面图

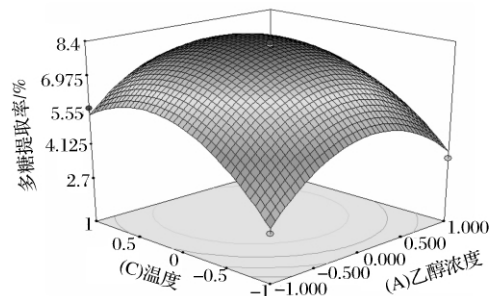


图6 温度和乙醇浓度对多糖提取率影响的响应面图

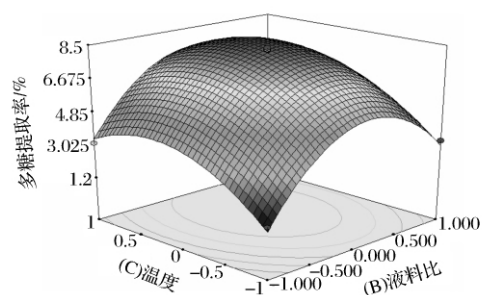


图7 温度和液料比对多糖提取率影响的响应面图

根据回归方程,做出响应面分析图,如图5~7 结合方差分析结果表明: $F_A = 3.91$, $F_B = 70.89$, $F_C = 106.97$,各因素的 F 值越大,表明对试验指标的影响越大,即重要性越大。由此,各因素对啤特果多糖提取率的影响程度大小顺序为: C(提取温度) > B(液料比) > A(乙醇体积分数)。

2.2.3 最佳工艺条件及其验证实验

为进一步确定最佳点,在模型浓度范围内选择出发点,使用快速上升法进行优化得到的啤特果多糖提取的最佳方案为:乙醇体积分数为72.77%,液料比为15.33:1(mL:g),提取温度83.06℃。啤特果多糖提取率7.229 34%。考虑到实际操作的便利,将提取工艺参数修正为乙醇体积分数为72%,液料比为15:1,提取温度为83℃。以上述条件进行试验结果的验证,重复3次实际测得的多糖提取率分别为7.15%、7.01%、8.31%,平均多糖提取率为7.49%。与理论预测值相比,其相对误差约为3.61%。说明通过响应面优化后得出的回归方程具有一定的实践意义。

4 结论

通过单因素试验设计,及在此基础上的三因素三水平响应面分析法试验,确定了啤特果多糖提取的最佳工艺参数为:提取温度83℃、乙醇体积分数72%、液料比15:1(mL:g),在此条件下多糖提取率为7.49%。

参 考 文 献

- [1] 安树康. 皮胎果梨营养成分定量分析[J]. 中国食物与营养, 2005(6): 43-46.
- [2] 陈群. 植物多糖免疫调节作用和抗肿瘤活性[J]. 安庆师范学院学报: 自然科学版, 2001, 7(1): 43-46.
- [3] 郑素玲, 郭立英, 范永山. 杏鲍菇多糖对老龄小鼠抗疲劳能力的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 269-271.
- [4] 史亚丽, 杨立红, 蔡德华, 等. 杏鲍菇多糖对力竭小鼠抗氧化、抗损伤的作用[J]. 体育学刊, 2005, 12(1): 56-58.
- [5] 李平, 王艳辉. 碱提山茱萸多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2003(11): 11-13.
- [6] 刘培勋, 高小荣. 银耳碱提多糖抗氧化活性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2005(3): 169.
- [7] 夏泉, 刘钢, 葛朝亮, 等. Sevag法去除黄芪粗多糖中蛋白质成分的研究[J]. 安徽医药, 2007, 11(12): 1069-1070.
- [8] 张青, 张天民. 苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技, 2004, 13(7): 17-18.
- [9] 刘军海, 黄宝旭, 蒋德超. 响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 114-118.

Optimization of Extraction Processing of Polysaccharide from Piteguo by Response Surface Methodology

Yang Ming-jun¹, Wu Jing², Wang Yong-gang¹, Li Zhi-zhong¹

1(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

2(Lanzhou Jinchuan New Materials Co., Ltd., Jinchang 730000, China)

ABSTRACT To optimize the extraction processing of polysaccharide from Piteguo. Based on single-factor experiments and the principles of Box-Behnken central composite experimental design, response surface methodology (RSM) with 3 factors and 3 levels was used to explore the effect of each factor on extraction rate of polysaccharide. The optimal extraction processing conditions of polysaccharide were Ethanol concentration of 72%, water-material ratio of 15:1 (mL/g) and extraction temperature of 83℃. Under the optimal extraction conditions, the extraction rate of polysaccharide was up to 7.49%. Conclusion: RSM can improve extraction rate of polysaccharide from Piteguo.

Key words Piteguo polysaccharide, extraction response surface methodology (RSM)