

文章编号:2095-7386(2016)03-0039-06

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.03.007

响应面优化超声辅助提取芦笋黄酮工艺研究

李 琴,赵雪燕,杨江科

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院,武汉 430023)

摘 要:采用 Two-Lever 与响应面法对超声辅助芦笋废弃物提取黄酮类化合物的工艺参数进行设计优化。通过 SAS 9.0 软件分析,先后确定主效因子与最佳工艺参数:在超声功率 774.3 kW,液料比为 80.5:1 和萃取温度 84.7 °C 的情况下,对芦笋废弃物中黄酮进行乙醇萃取,黄酮提取量为 8.662 ± 0.15 mg/g,与预测值(8.737 mg/g)非常相近, R^2 (=96.61%)显示该回归模型可准确地预测超声波辅助芦笋废弃物中黄酮的乙醇提取量。

关键词:响应面法;超声;黄酮;芦笋皮

中图分类号: TQ 460.62

文献标识码: A

Response surface optimization of extraction technology of flavonoids from asparagus waste assisted with ultrasonic

LI Qin, ZHAO Xue-yan YANG Jiang-ke

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430074, China)

Abstract: Experiments were carried out to optimize the ethanol extraction parameters of flavonoids from asparagus peel which was pretreated by ultrasonic using response surface methodology in the study. All the data were analyzed by SAS 9.0 software and the optimized conditions were obtained. Under the optimum conditions (liquid-solid ratio 80.5:1, 774.3 kW, 84.7 °C), the quantity of flavonoids extracted was up to 8.662 ± 0.15 mg/g, which was close to the predicted value (8.737 mg/g). The model had a satisfactory coefficient of R^2 (=96.61%) and verified experimentally. The results showed that response surface methodology was a useful method to optimize the ethanol extraction parameters of flavonoids from asparagus peel which was pretreated by ultrasonic.

Key words: response surface methodology; ultrasonic; flavonoids; asparagus peel

1 引言

近几年,我国芦笋种植与加工产量巨大,占世界芦笋贸易总量的 70%。而在芦笋加工过程中,15%—25%的老茎和芦笋皮被作为废弃物处理,其

中的大量具有优良药用性能^[1-3]黄酮类物质也随之浪费。

目前黄酮类化合物提取方法主要有醇提、水提工艺^[4-8],现有研究结果显示采用单纯醇提工艺从芦笋废弃物中提取到的黄酮类化合物含量约为 400—

收稿日期:2016-07-04.

作者简介:李琴(1978-),女,讲师,博士,E-mail:qinyun_2013@163.com.

700 mg/g^[2,3, 9-11]。本实验利用超声波产生的高速强烈的空化效应和搅拌作用,促使植物细胞组织破壁或变形,破坏植物药材的细胞,使溶剂渗透到细胞中^[12-15],结合响应面优化技术^[16-19],提高黄酮提取效率。

2 材料和方法

2.1 材料与设备

将新鲜芦笋皮晒干用粉碎机粉碎过 100 目。无水乙醇、NaOH、NaNO₂、Al(NO₃)₃·9H₂O 等试剂均为市售分析纯,购自国药集团。超声破碎仪, JY92-2D, 购自宁波新芝科器研究所。

2.2 实验方法

2.2.1 超声破碎

分别准确称量 1.0 g 芦笋皮粉于 100 mL 锥形瓶中(具塞),加入乙醇 60 mL。然后在冰浴的条件下进行超声破碎后定容至 100 mL,再采用循环式多用真空泵抽滤得滤液。

2.2.2 芦丁标准曲线^[20-21]

采用亚硝酸钠—硝酸铝比色法:配制 50 mg/L 的芦丁乙醇溶液,分别取 0 mL、1.5 mL、3.0 mL、6.0 mL、9.0 mL、12.0 mL 移入 25 mL 比色管中,加入 5 mL 的 30% 乙醇溶液和 0.3 mL 的 5% 亚硝酸钠,混匀后放置 5 min,加入 0.3 mL 的 10% 硝酸铝,摇匀后放置 6 min,加入 2 mL 的 4% 氢氧化钠,用 30% 乙醇定容至 25 mL 摇匀,放置 10 min 后在 510 nm 处测出吸光度值,以芦丁浓度为横坐标,OD₅₁₀为纵坐标模拟回归方程,制备标准曲线。

2.2.3 黄酮化合物的提取及测定

将 2.2.1 步中处理所得滤液按 2.2.2 处理,测定 OD₅₁₀值。将 OD₅₁₀值代入 2.2.2 上述标准曲线计算提取到的总黄酮含量^[20]。

$$\text{总黄酮含量(mg/g)} = \frac{nCV}{m \times 1000} \quad (1)$$

式中:C 为从回归方程中求得的芦丁浓度(mg/L), n 为提取液稀释的倍数;V 为提取液的体积(mL), m 为称取的芦笋皮的质量(g)。

2.2.4 试验设计

(1) Plackett-Burman 法设计 Two-level 实验。在前期单因素实验的基础上,利用 Plackett-Burman 法设计两级水平(Two-level)实验分析影响超声波辅助醇提芦笋废弃物黄酮过程中的主效因子。实验设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 法两级水平实验设计

因素	Two-level	
	-1	1
x_1 (功率/kW)	600	1 000
x_2 (超声时间/min)	15	45
x_3 (乙醇浓度/%)	50	70
x_4 (空白项)	0	0
x_5 (液料比/(mL/g))	70	90
x_6 (空白项)	0	0
x_7 (温度/℃)	70	90
x_8 (提取时间/min)	45	75

(2) Box-Behnken 法设计响应面(RSM)实验。在 Two-level 实验的基础上,针对确定的主效因子采用 Box-Behnken 法设计响应面,进一步优化主效因子。实验设计见表 2。

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

式中:Y₁—黄酮含量(mg/g), β—各项式系数,X—因子(自变量)。

表 2 Box-Behnken 实验设计

因子	水平		
	-1	0	1
X_1 (功率/kW)	600	800	1 000
X_2 (液料比/(mL/g))	70:1	80:1	90:1
X_3 (温度/℃)	70	80	90

3 结果与讨论

3.1 主效因子分析

按照表 1 的实验设计进行了 12 轮实验,实验结果见表 3。

利用软件 SAS 9.0 对以上数据进行主效应分析和 t 检验(表 4)可知,超声功率、液料比和萃取温度三个因素对黄酮化合物的提取量影响显著(置信度 > 90%),为超声波辅助醇提过程中诸多单因素中的主效因子,超声时间、乙醇浓度和萃取时间对黄酮提取量的影响均不大。上个述 6 因子对黄酮提取量影响的重要性次序排列如下:超声功率 > 液料比 > 萃取温度 > 超声时间 > 乙醇浓度 > 萃取时间。因此将超声功率、液料比和萃取温度这三个因素作为主效因子进行下一步响应面优化设计。

表 3 Two-Lever 实验结果

No.	x_1/kW	x_2/min	$x_3/(\text{mL/g})$	x_4	$x_5/\%$	x_6	$x_7/^\circ\text{C}$	x_8/min	$Y/(\text{mg/g})$
1	600	15	70	-1	70	-1	90	75	5.11
2	600	45	70	1	50	-1	70	75	5.19
3	1 000	45	90	-1	70	-1	70	45	5.26
4	600	15	70	1	70	1	70	45	5.73
5	600	45	90	1	50	-1	90	45	5.07
6	600	45	90	-1	70	1	70	75	5.91
7	1 000	45	70	1	70	1	90	45	4.81
8	1 000	15	90	1	70	-1	90	75	4.63
9	1 000	15	90	1	50	1	70	75	5.21
10	600	15	90	-1	50	1	90	45	5.36
11	1 000	45	70	-1	50	1	90	75	4.75
12	1 000	15	70	-1	50	-1	70	45	4.38

反应条件:芦笋废弃物 1.0 g,冰浴破碎。

表 4 各因素的主效应分析

因素	t 检验	$Pr > t $	重要性排列
x_1 (功率/kW)	6.828 8	0.006 4	1
x_2 (超声时间/min)	1.878 8	0.156 9	4
x_3 (液料比/(mL/g))	3.504 8	0.039 3	2
x_4 (空白项)	-1.083 9	0.357 7	
x_5 (乙醇浓度/%)	1.842 7	0.162 6	5
x_6 (空白项)	2.998 9	0.057 7	
x_7 (温度/°C)	-2.673 7	0.075 5	3
x_8 (提取时间/min)	-0.469 7	0.670 6	6

3.2 响应面优化

根据表 2 设计,利用响应面方法,对显著影响超声波辅助芦笋废弃物中黄酮乙醇提取效率的 3 个主效因子进行优化,结果见表 5。

利用 SAS 9.0 软件对实验数据进行多项式回归分析,拟合得多项式回归方程模型(3):

$$\begin{aligned} Y_1 = & -50.68 + 0.026175 \times X_1 + 0.59425 \times X_2 \\ & + 0.59725 \times X_3 - 0.000016 \times X_1^2 \\ & + 1.25E-6 \times X_1 \times X_2 - 0.000026 \times X_1 \times X_3 \\ & - 0.003263 \times X_2^2 - 0.000825 \times X_2 \times X_3 \\ & - 0.003013 \times X_3^2 \end{aligned} \quad (3)$$

模型方程(3)的可靠性可通过方差分析来考察(表 6),从方差分析结果可知,在 $\alpha = 0.05$ 的水平上,该模型回归高度显著($R^2 = 96.64\%$),表明该模型与实验结果拟合较好,96.64% 的黄酮提取量可以通过该模型进行预测。因此可用上述模型预测超声波辅助醇提芦笋废弃物中黄酮的提取量。

通过对 Y 的回归系数的检验可知(表 7),各因子对黄酮乙醇提取效率影响的大小顺序为 $X_1 > X_2 > X_3$ 。通过回归数据典型分析(图 1 A、B、C),可以看出 3 个因子的特征值均为负,表明该模型稳定点为一马鞍形顶点,是极大值,可以直接从此二次响应

面上确定最佳工艺参数:超声功率 774.3 W、液料比为 80.5:1 和萃取温度 84.7 °C。在此条件下,黄酮乙醇理论提取效率为 8.677 mg/g。

表 5 Box-Behnken 试验结果

No.	X_1/kW	$X_2/(\text{mL/g})$	$X_3/^\circ\text{C}$	$Y_1/(\text{mg/g})$		
				试验值	预测值	偏差
1	600	70	80	7.79	7.56	0.23
2	600	90	80	7.76	7.69	0.07
3	1 000	70	80	7.54	6.99	0.55
4	1 000	90	80	7.52	7.14	0.38
5	800	70	70	7.51	7.24	0.27
6	800	70	90	8.12	7.98	0.14
7	800	90	70	7.99	7.55	0.44
8	800	90	90	8.27	7.95	0.32
9	600	80	70	7.43	7.31	0.12
10	1 000	80	70	7.24	6.86	0.38
11	600	80	90	8.22	7.99	0.24
12	1 000	80	90	7.82	7.32	0.50
13	800	80	80	8.60	8.31	0.29
14	800	80	80	8.60	8.31	0.29
15	800	80	80	8.60	8.31	0.29

条件:芦笋废弃物 1.0 g,超声时间 60 min,乙醇浓度 60%,萃取时间 60 min。

表 6 回归模型的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方差	F 值	$Pr > F$
回归	9	2.7813	0.3090	17.5887	0.0028
(线性项)	3	0.8623	0.2754	15.6763	0.0056
(二元项)	3	1.9167	0.6389	36.3637	0.0008
(交互项)	3	0.0383	0.0128	0.7264	0.5787
残差	5	0.0879	0.0176		
(失拟项)	3	0.0879	0.0293	1.343E-11	0.0001
(纯误差)	2	4.36E-13	2.18E-3		
总离差	14	2.8691			
$R^2 = 96.64\%$					

表 7 回归方程的回归系数分析

term	Estimate	Std Err	t Ratio	P > t
X_1	-0.135 0	0.046 9	-2.880 7	0.034 6
X_2	0.072 5	0.046 9	1.547 0	0.182 5
X_3	0.282 5	0.046 9	6.028 1	0.001 8 *
$X_1 \times X_1$	-0.621 2	0.068 9	-9.006 0	0.000 3 *
$X_1 \times X_2$	0.002 5	0.066 3	0.037 7	0.971 4
$X_1 \times X_3$	-0.052 5	0.066 3	-0.792 1	0.464 2
$X_2 \times X_2$	-0.326 2	0.068 9	-4.729 0	0.005 2 *
$X_2 \times X_3$	-0.082 5	0.066 3	-1.244 0	0.268 4
$X_3 \times X_3$	-0.301 3	0.068 9	-4.367 0	0.007 2

* :Significant at 1% level.

3.3 响应面交互因子分析

图 1 显示超声功率、液料比和温度三因素对醇提过程中黄酮得率的交互影响。(A)表明萃取温度保持恒定的前提下,当萃取体系中的液料比增大至 80.5:1 时,黄酮提取量也随之增加,但当液料比大于 80.5:1 时,黄酮提取量开始逐渐下降。分析该现象的产生原因可能是因为在一定范围内,液料比的增加有利于萃取体系的均相形成与黄酮的析出;而

随着醇使用量的不断增加并超过一定值后(80.5:1 (mL/g)),黄酮析出速率下降。同时由于醇量增加导致萃取体系扩大,从而降低了单位萃取体系中黄酮的量,进而体现出黄酮提取量呈现下降的趋势。(A、B)功率变化对黄酮提取效率的影响。随着超声功率的增强,细胞破碎的效果会加强,有利于细胞内黄酮类化合物的析出,而随着超声功率的进一步增加,细胞破碎效果并不会一直加强,在与液料比和萃取温度的交互作用影响下,黄酮提取效率在一定范围内呈现下降趋势。(B、C)分别显示温度的变化对黄酮提取量的影响。在一定温度范围内($\leq 84.7^{\circ}\text{C}$),温度的上升有利于黄酮析出,温度超过这一定值后,黄酮提取量随温度升高而降低,其原因可能是过高的温度使醇逸出,降低实际参与萃取的乙醇量,进而影响黄酮的析出速率。

此外,实验过程中超声破碎液表现比较黏稠,这个现象应该是原料组织破碎后析出的果胶导致,黏稠的组织破碎液增大了萃取体系中的传质阻力,对黄酮的析出有一定的影响。

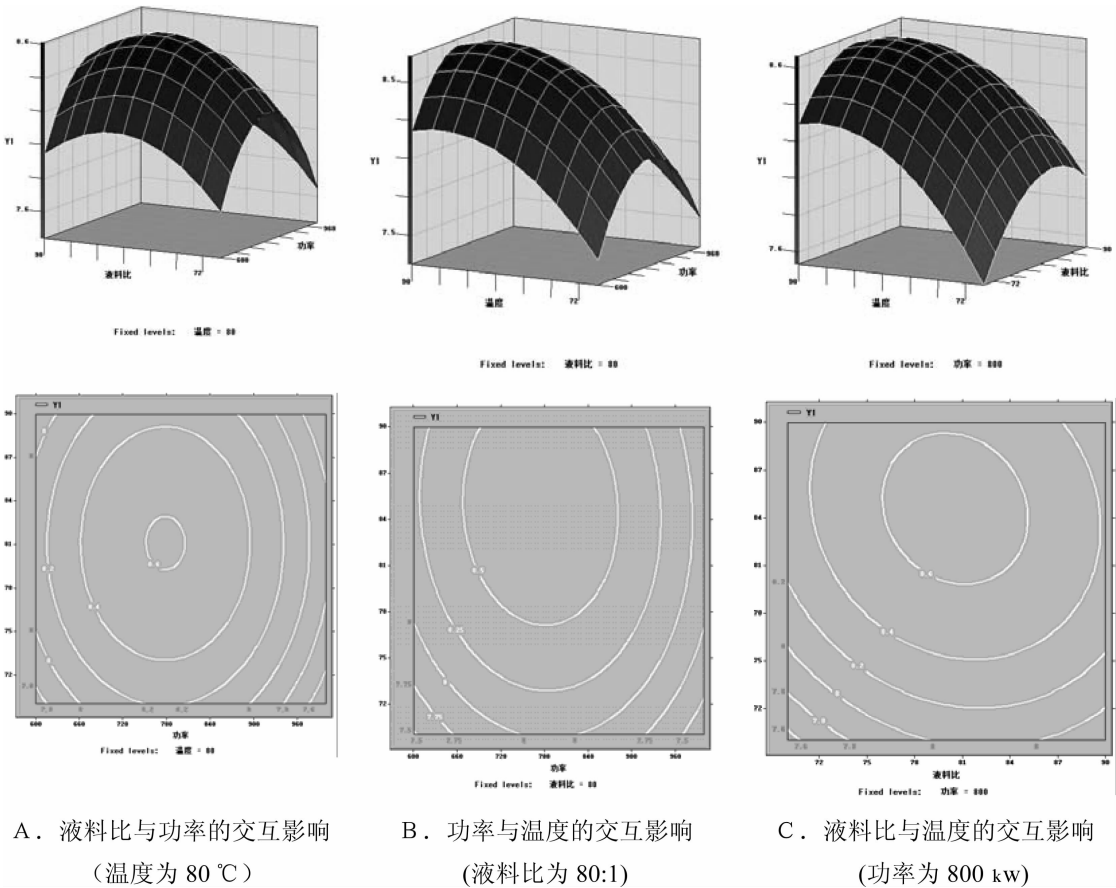


图 1 黄酮提取量的因素交互影响

3.4 模型验证

从回归模型分析得到超声波辅助芦笋黄酮的醇提工艺的最优反应条件为:超声功率 774.3 kW ($X_1 = -0.13$),液料比为 80.5:1 ($X_2 = 0.05$)和萃取温度 84.7 °C ($X_3 = 0.47$)。在上述反应条件(取整)下进行萃取实验,3 次平行验证实验所测得黄酮提取平均量为 8.662 ± 0.15 mg/g,与回归模型预测值 8.677 mg/g 十分接近,证明了响应面模型的有效性。

4 结论

本实验通过软件 SAS 9.0 对超声波预处理之后的芦笋废弃物中黄酮的乙醇提取工艺参数进行优化,通过对实验数据进行分析,该工艺的最佳参数条件为以 774 kW 超声功率进行细胞破碎以后,在 84.7 °C 的条件下,以液料比 80.5:1 进行醇提 80 min(其他条件不变),验证实验显示其结果约为 8.662 ± 0.15 mg/g,与模型的预测值非常相近。同时回归系数 R^2 为 96.64%,表明获得的模型能够较好地预测超声波辅助乙醇萃取芦笋黄酮的乙醇提取量,为今后芦笋废弃物的加工再利用工业化和高附加值产业化提供技术基础。

参考文献

- [1] Jian-Hua Xie, Cai-jun Dong, Shao-Ping Nie, et al. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves [J]. Food Chemistry, 2015, 186(1): 97-105.
- [2] 杨楠,贾晓斌,张振海,等. 黄酮类化合物抗肿瘤活性及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 373-381.
- [3] 王春燕,王卫东,李超,等. 芦笋的生物活性成分及其生理功能. 食品与药品, 2010, 12(9): 369-371.
- [4] 段雅庆,莫耽,刘冰,等. 芦笋中黄酮和多糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 120-124.
- [5] 赵子铭,付刚,李诚. 响应面法微波辅助乙醇提取红景天苷工艺优化[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 147-151.
- [6] 刘倩,齐计英,韩静,等. 响应面法优化回流提取紫薯花青素工艺[J]. 生物技术通报, 2014, 1297-1304.
- [7] 郭娇娇,宫智勇. 西芹中总黄酮的提取工艺及抑菌作用研究[J]. 武汉工业学院学报, 2011, 30(3): 1-5.
- [8] 郭娇娇,罗佳,宫智勇. 桂花中总黄酮提取工艺及其抗氧化活性的研究[J]. 武汉工业学院学报, 2011, 30(1): 5-8.
- [9] J. M. Fuentes-Alventosa, S. Jaramillo-Carmona, G. Rodríguez-Gutiérrez, et al. Preparation of bioactive extracts from asparagus by-product [J]. Food and Bioproducts Processing, 2013, 91(2): 74-82.
- [10] Werner B. Herppich, Susanne Huyskens-Keil, Karin Hassenberg, et al. Impact of ethanol treatment on physiological and microbiological properties of fresh white asparagus (*Asparagus officinalis* L.) spears [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 57(1): 156-164.
- [11] 蒋丹,陶风云,李亚秋,等. 芦笋中黄酮类化合物的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 357-361.
- [12] 李聪,朱晓吉. 超声破碎酵母细胞提取蔗糖酶条件优化[J]. 江苏农业科技, 2014, 42(4): 237-239.
- [13] 王洪彬,杨泓喆,杨霁菡. 枯草芽孢杆菌代谢组样品前处理方法的比较研究[J]. 分析化学, 2015, 43(8): 1169-1174.
- [14] 董书君,申晶晶,常耀光. 岩藻聚糖硫酸酯酶提取方法比较研究及响应面优化[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 249-259.
- [15] 赵小龙,杨涛,汤进. 水溶性茯苓多糖 PWP-Y 提取工艺优化及其分子量测定的研究[J]. 武汉轻工大学学报, 2016, 35(1): 34-38.
- [16] Xing-Yi Zhu, Yi-Li Mang, Jie Xie, et al. Response surface optimization of mechanochemical-assisted extraction of flavonoids and terpene trilactones from Ginkgo leaves [J]. Industrial Crops and Products, 2011, 34(1): 1041-1052.
- [17] N. Ilaiyaraja, K. R. Likhith, G. R. Sharath Babu, et al. Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM) [J]. Food Chemistry, 2015, 173(15): 348-354.
- [18] 索南卓玛,包显云,包锦渊. 正交设计与响应

- 面优化玄参黄酮提取工艺研究[J]. 分子科学学报, 2016, 32(1): 45-51.
- [19] 郭淑, 田硕, 王维婷, 等. 响应曲面法优化黄秋葵花总黄酮的提取工艺[J]. 中国食品添加剂, 2016, 2: 87-95.
- [20] 张琪, 刘慧灵, 朱瑞, 等. 苦荞麦中总黄酮和芦丁的含量测定方法的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(7): 25-27.
- [21] 任雪琴, 陈新, 吴兵, 等. 葛根黄酮的提取工艺及三波长一分光光度法测定其含量[J]. 武汉工业学院学报, 2011, 30(4): 32-36.

(上接第 38 页)

经回归拟合分析得 $k = 0.021$, 由此得固定化酶半衰期为 33 d。可见复合固定化酶半衰期明显延长。半衰期对固定化酶用于实际生产具有特别重要意义。

4 结论

将微孔陶瓷填充柱室温饱和和吸附游离酶后, 在戊二醛浓度 2.0 %, 温度 25 ℃, 时间 1.5 h 条件下交联制备得到的固定化酶比活力为 146 U/g, 酶活总回收率 60.8 %; 固定化酶 $k_m = 5.6$ mmol/L, 最适温度为 50 ℃, 半衰期为 33d。本研究结果酶活回收高, 半衰期长, 且酶最适温度提高, 另外微孔陶瓷机械强度高, 为工业化固定化乳糖酶连续生产低乳糖牛奶提供了技术依据。

参考文献:

- [1] 赵志华. 浅析乳业现状、潜在发展瓶颈及对策[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(1): 55-58.
- [2] Vassilis G, Migulel L L. Hydrolysis of lactosea literarure review [J]. Process Biochem, 1985, 20(1): 2-12.
- [3] 潘道东, 骆承痒. 乳糖酶的固定化及其特性的研究[J]. 中国乳品工业, 1991, 19(6): 242-247.
- [4] 骆承痒. 应用透性化细胞乳糖酶生产低乳糖乳制品的特点和技术要求[J]. 中国乳业, 2001(3): 9-11.
- [5] Papayannaks N, Matkas. Studies on modeling and simulate on of lactose hydrolysis free and immobilized beta-galactosidase from Asperillusniger [J]. Chemical Engineering Journal, 1993, 51(1): 575-586.
- [6] Pererson R S, Hill C G. Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase in capillary bed reactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1989(34): 438-446.
- [7] Miller J. Enzymiclactosehydrolysis [J]. Food Technology, 1980, 32: 144-151.
- [8] 魏群. 生物工程技术实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社. 2002.
- [9] Sufang You. Immobilizationand characterization of bera-galactosidase from the plant gram chichen bean. Evolution of its enzymatic actions in the hydrolysis of lactose [J]. Journal of agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(3): 819-823.
- [10] 戚依政, 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 北京: 化学工业出版社. 1999.