

袁晓晴,李 磊,刘红梅. 超声波辅助提取癩葡萄总黄酮工艺的优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):340-343.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.106

超声波辅助提取癩葡萄总黄酮工艺的优化

袁晓晴,李 磊,刘红梅

(河南牧业经济学院食品系,河南郑州 450044)

摘要:为优化癩葡萄中总黄酮的超声波辅助提取工艺,通过单因素试验确定乙醇体积分数、液固比、提取时间、提取温度、超声功率 5 个提取工艺参数的最适水平范围,并通过响应面分析法(RSM)对乙醇体积分数、提取温度、提取时间进行优化。结果表明,超声波辅助提取癩葡萄总黄酮的最佳工艺条件为:乙醇体积分数 72%、提取温度 68℃、提取时间 34 min,此条件下黄酮提取率为 2.53%;验证试验表明,黄酮提取率为 2.54%,与理论值相符合。

关键词:癩葡萄;黄酮;超声波辅助提取;响应面分析

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0340-03

癩葡萄(*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser.) 别称金铃子,是葫芦科苦瓜属(*Momordica*)的栽培种之一,其果实呈纺锤状,果面呈不规则尖刺状,长约 4 cm、宽约 3 cm、单果质量 25~30 g,未成熟果实呈浅绿色,成熟后呈金黄色。目前关于癩葡萄中活性肽、皂苷的研究较多^[1-2],而对癩葡萄中黄酮的研究较少。癩葡萄的果实、叶中均富含黄酮,黄酮是一种强抗氧化剂,具有清除自由基、抗衰老、抗炎抑菌、降低胆固醇含量等多种生理功效^[3-5]。

提取植物中总黄酮的传统方法是热回流提取法。近年来,随着提取技术的不断发展,许多学者使用超声波辅助法分别从黄花菜^[6]、马齿苋^[7]、苦荞^[8]等植物中提取总黄酮。超声波提取是利用超声波破碎细胞(空化)和强化传质(机械)作用,使溶剂分子渗透到组织细胞中与溶质分子充分接触,从而使细胞中的可溶成分更快释放出来,该方法具有提取速度快、得率高、对热不稳定物质破坏少等特点^[9]。本研究通过单因素试验、响应面分析法优化超声波辅助提取癩葡萄总黄酮的工艺,以期对癩葡萄黄酮的开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

癩葡萄采自南京市郊区,于 70℃ 下烘干,冷却后粉碎过 40 目筛,置于干燥器中保存备用。芸香苷购自中国医药(集团)上海化学试剂公司;无水乙醇(AR)、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯。

XA-1 型高速万能粉碎机(江苏省姜堰市银河实验仪器厂产品),WFJ200 型可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司产品),KQ-200VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司产品),SHZ-D 型循环水式真空泵(郑州市长城科工贸有限公司产品)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制作 精确称取芸香苷标准品 0.01 g,用 70% 乙醇溶解并定容至 100 mL,得到浓度为 0.1 mg/mL 的标准溶液。分别准确吸取芸香苷标准溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,加入 0.5 mL 质量分数为 5% 的 NaNO₂ 溶液,摇匀并静置 6 min,加入 0.5 mL 质量分数为 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液,摇匀并静置 6 min,再加入 4.0 mL 质量分数为 4% 的 NaOH 溶液,最后添加 70% 乙醇至刻度,摇匀并静置 15 min,于波长 510 nm 处测定吸光度,得到芸香苷浓度 C (mg/mL) 与吸光度 D 之间的回归方程:

$$C = 0.0853D + 0.0025, r^2 = 0.9988。$$

1.2.2 癩葡萄总黄酮的提取及测定 精确称取脱脂后的癩葡萄粉 1.0 g,加入一定体积分数的乙醇溶液,按相应条件进行超声波辅助提取,减压滤渣并将滤液移至烧杯中待测。吸取 1.0 mL 待测液于 10 mL 容量瓶中,按照“1.2.1”节的方法测定黄酮质量,黄酮提取率的计算公式为:

$$\text{黄酮提取率} = \frac{C \times 10 \times V}{m} \times 100\%。$$

式中: C 为总黄酮浓度(mg/mL); m 为癩葡萄粉质量(mg); V 为癩葡萄提取液体积(mL)。

1.2.3 单因素试验 分别考察乙醇体积分数、液固比、提取温度、提取时间、超声功率对癩葡萄黄酮提取率的影响。试验中各考察因素的设定水平分别为:乙醇体积分数 50%、60%、70%、80%、90%;液固比(mL:g) 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1;提取温度 40、50、60、70、80、90℃;提取时间 10、20、30、40、50 min;超声功率 120、140、160、180、200 W。除考察因素外,其他因素的条件为:乙醇体积分数 70%、液固比 30 mL:1 g、超声功率 180 W、提取温度 70℃、提取时间 30 min。

1.2.4 响应面优化试验 在单因素试验的基础上,以乙醇体积分数、提取温度、提取时间为因素,采用 Design-Expert 软件的中心组合试验 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平(表 1)的中心旋转组合试验。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数的影响 当乙醇体积分数低于 70%

收稿日期:2015-01-08

基金项目:河南省科技攻关计划(编号:142102110177)。

作者简介:袁晓晴(1977—),女,江苏泰州人,博士,副教授,主要从事农产品深加工研究。E-mail:yxq_yrd@163.com。

表 1 癭葡萄总黄酮提取工艺响应面优化试验的因素与水平

试验 水平	因素		
	乙醇体积分数 X_1 (%)	提取温度 X_2 (°C)	提取时间 X_3 (min)
-1	60	65	20
0	70	70	30
1	80	75	40

时,癭葡萄黄酮提取率随乙醇体积分数的提高逐渐增大;当乙醇体积分数高于 70% 时,黄酮提取率反而下降(图 1)。可见,乙醇体积分数为 70% 左右时,溶剂与溶质极性最相似;乙醇体积分数过高则叶绿素等脂溶性物质的溶出量增多,不利于黄酮的提纯^[10],因此确定乙醇体积分数为 70%。

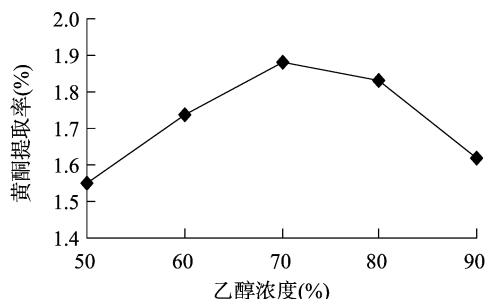


图1 乙醇浓度对黄酮提取率的影响

2.1.2 液固比的影响 当液固比小于 30 mL : 1 g 时,癭葡萄黄酮提取率随液固比的增加显著提高;当液固比大于 30 mL : 1 g 时,黄酮提取率的增幅降低(图 2)。液固比过高将增加溶剂成本,并加重后续的浓缩和干燥工作,因此确定液固比为 30 mL : 1 g。

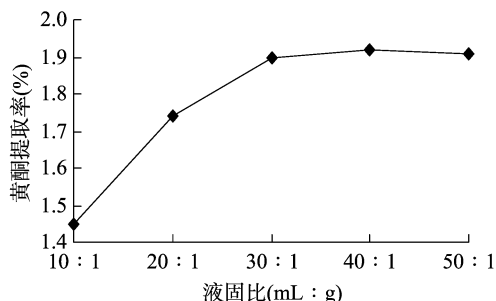


图2 液固比对癭葡萄黄酮提取率的影响

2.1.3 提取时间的影响 在提取的前 30 min 内,癭葡萄黄酮提取率随提取时间的延长显著提高;当提取时间继续延长时,黄酮提取率的增幅降低(图 3)。为提高工作效率,确定提取时间为 30 min。

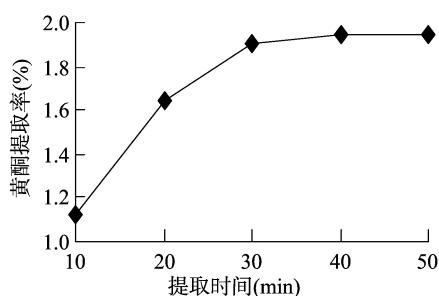


图3 提取时间对黄酮提取率的影响

2.1.4 提取温度的影响 当温度低于 70 °C 时,癭葡萄黄酮提取率随温度的升高显著增大;当温度高于 70 °C 时,黄酮提取率反而降低(图 4)。温度升高会加剧溶剂和溶质分子运动,有利于黄酮浸出;而温度过高会增加其他物质的溶出,并可能破坏黄酮活性成分,因此确定提取温度为 70 °C。

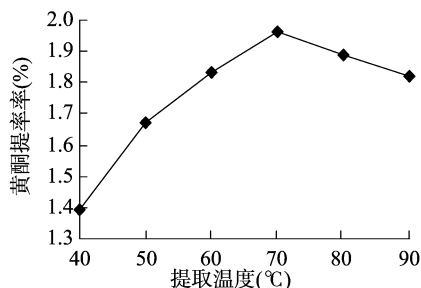


图4 提取温度对黄酮提取率的影响

2.1.5 超声功率的影响 当超声功率低于 180 W 时,癭葡萄黄酮提取率随超声功率的增加而增大;当超声功率高于 180 W 时,黄酮提取率反而下降(图 5)。超声功率增大则空化作用大,总黄酮传质速率高;超声功率过高会使分子运动加剧、溶剂温度升高,从而破坏黄酮组分并增加其他杂质的溶出^[11],使癭葡萄黄酮提取率降低,因此确定超声功率为 180 W。

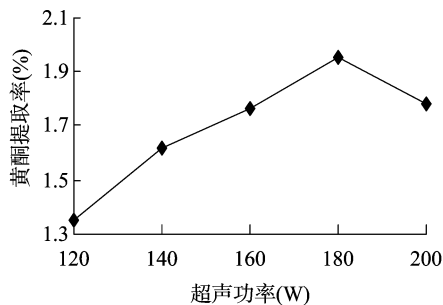


图5 超声功率对癭葡萄黄酮提取率的影响

2.2 响应面优化提取工艺条件

2.2.1 响应面试验设计与结果 确定超声功率、液固比后,以乙醇体积分数 (X_1)、提取温度 (X_2)、提取时间 (X_3) 为变量,开展 3 因素 3 水平的响应面试验。本次提取工艺优化试验采取中心旋转组合设计,试验设计和结果见表 2。

2.2.2 回归模型的建立及方差分析 以黄酮提取率为响应值,经回归拟合,各试验因子对响应值的影响可用回归方程表示:

$$Y = 2.450 + 0.024X_1 + 0.055X_2 + 0.056X_3 - 0.15X_1^2 - 0.20X_2^2 - 0.18X_3^2 + 0.095X_1X_2 - 0.083X_1X_3 - 0.005X_2X_3。$$

对该回归方程进行方差分析及显著性评价(表 3),此模型的 $P < 0.0001$,表明响应面回归模型达到极显著水平;失拟项 P 值大于 0.05,呈不显著,表明该方程拟合 3 个参数与黄酮提取率之间的关系是可行的;较高的 R^2 值(0.9986)进一步表明,试验方程式与实际数据之间具有非常好的拟合性。

回归方程系数的显著性分析表明,乙醇体积分数、提取温度、提取时间均对黄酮提取率具有显著性影响($P < 0.001$),影响效果大小依次为:提取时间 > 提取温度 > 乙醇体积分数。这 3 个因素的二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对黄酮提取率也有显著性影响($P < 0.001$)。在交互项中, X_1X_2 、 X_1X_3 项的回归系数极

表 2 癭葡萄总黄酮提取工艺 RSA 试验设计和结果

试验 编号	X_1 :乙醇 体积分数	X_2 :提取 温度	X_3 :提取 时间	Y :黄酮提取率 (%)
1	0	1	1	2.18
2	1	0	1	2.12
3	-1	1	0	2.23
4	-1	0	1	2.23
5	-1	-1	0	1.93
6	0	0	0	2.45
7	0	0	0	2.44
8	1	0	-1	2.18
9	0	-1	1	2.08
10	0	0	0	2.45
11	0	-1	-1	1.95
12	0	0	0	2.44
13	1	1	0	2.08
14	-1	0	-1	1.96
15	0	0	0	2.45
16	0	1	-1	2.07
17	1	-1	0	2.16

显著($P < 0.001$),表明乙醇体积分数与提取温度、乙醇体积分
数与提取时间的交互作用对黄酮提取率的影响极显著;
 X_2X_3 项的回归系数不显著($P = 0.1973$),表明提取温度与
提取时间的交互作用对黄酮提取率的影响不显著。

提取条件对癭葡萄黄酮提取率影响的响应面见图 6,其
作用均为上凸曲面,表明本试验所选择的区域范围合理。随
着乙醇体积分数、提取温度、提取时间的增大,黄酮提取率均
呈先升高、后下降的变化趋势,表明乙醇体积分数、提取温度、
提取时间对黄酮提取率的影响效果明显。通过分析计算得到
最佳提取条件:乙醇体积分数 72%、提取温度 68℃、提取时
间 34 min,此条件下黄酮提取率的理论值为 2.53%。

为检验响应面分析法的可靠性,采用上述优化参数进行
提取试验,实际测得癭葡萄黄酮提取率为 2.54%,与理论预
测值的相对误差为 0.4%,表明采用响应面分析法优化得到
的提取工艺参数准确可靠,具有实用价值。

3 结论

为探讨超声波辅助提取癭葡萄总黄酮的工艺条件,首先
通过单因素试验确定乙醇体积分数、液固比、提取时间、提取

表 3 回归模型方差分析及显著性检验

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
X_1	1	0.004 513	0.004 513	91.56	<0.000 1	**
X_2	1	0.024 000	0.024 000	491.01	<0.000 1	**
X_3	1	0.025 000	0.025 000	513.59	<0.000 1	**
X_1^2	1	0.091 000	0.091 000	1 839.80	<0.000 1	**
X_2^2	1	0.170 000	0.170 000	3 391.66	<0.000 1	**
X_3^2	1	0.130 000	0.130 000	2 668.91	<0.000 1	**
X_1X_2	1	0.036 000	0.036 000	732.46	<0.000 1	*
X_1X_3	1	0.027 000	0.027 000	552.39	<0.000 1	
X_2X_3	1	0.000 100	0.000 100	2.03	0.197 3	
模型	9	0.550 000	0.061 000	1 243.67	<0.000 1	**
残差	7	0.000 345	0.000 050			
失拟项	3	0.000 225	0.000 075	2.50	0.198 5	
误差	4	0.000 120	0.000 030			
R^2		0.998 600				

注: *、** 分别表示在 0.05、0.01 水平下差异显著。

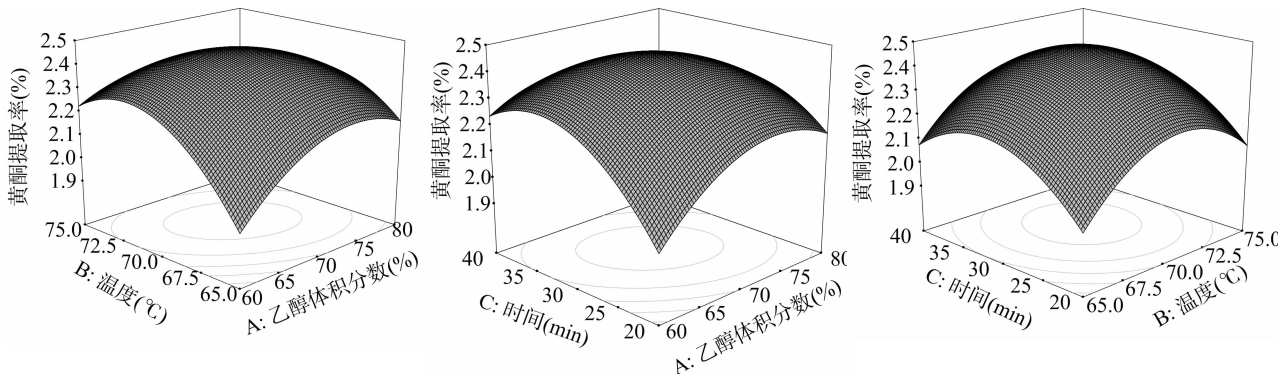


图6 提取条件对黄酮提取率影响的响应面

温度、超声功率的最适水平范围,再通过响应面分析法对乙醇
体积分数、提取温度、提取时间进行优化。结果表明,超声波
辅助提取癭葡萄总黄酮的最佳工艺条件为:乙醇体积分数

72%、提取温度 68℃、提取时间 34 min,此条件下的黄酮提取
率为 2.53%。验证试验表明,黄酮提取率为 2.54%,与理论
值相符合。

董玉兰,李书生,张丽萍,等.生物型保鲜纸对中华寿桃的保鲜效果[J].江苏农业科学,2015,43(11):343-345.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.107

生物型保鲜纸对中华寿桃的保鲜效果

董玉兰,李书生,张丽萍,尹淑丽,程辉彩,张根伟

(河北省科学院生物研究所,河北石家庄 050081)

摘要:为了找到一种新型安全的保鲜纸贮藏中华寿桃以提高品质,延长货架期,以中华寿桃为试材,采用 BSD-2 代谢产物无菌滤液浸泡的薄页纸,单果包装低温贮藏桃果,研究生物型保鲜纸对中华寿桃果实品质及生理指标的影响。结果表明,保鲜纸处理能明显降低中华寿桃失重率,延缓维生素 C、可溶性固形物和可滴定酸含量的下降,一定程度上抑制果实多酚氧化酶活性,提高桃果品质。BSD-2 生物型保鲜纸可有效提高中华寿桃贮藏品质,延长货架期。

关键词:中华寿桃;保鲜纸;BSD-2;可溶性固形物;多酚氧化酶

中图分类号: TS255.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0343-03

新鲜中华寿桃含水量高,组织脆嫩,属于呼吸跃变型,采后贮运过程中仍进行呼吸作用和酶的生化反应,易出现褐变、变味甚至腐烂,严重影响其商品质量和货架寿命。随着消费者对果蔬品质和保藏期要求的提高,功能化、环保化、简便化逐渐成为果蔬保鲜包装的主流趋势。生物技术保鲜是近年来新兴的、具有发展前景的贮藏保鲜方法。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种能产生多种抗菌素和酶、具有广谱抗菌活性 G+杆状细菌,在自然界中广泛存在,对人畜无毒害,不污染环境,备受各国研究者的青睐。保鲜纸物美价廉、制作简单、使用方便,有广泛的利用空间。目前还未见到有关生物型保鲜纸在中华寿桃保鲜贮藏上的应用和相关报道。本试验采用枯草芽孢杆菌 BSD-2 代谢产物^[1]

制成保鲜纸,其保鲜作用是由于 BSD-2 可以产生抗生素、细菌素、溶菌酶等,利用菌体次生代谢产物抑制或杀死果蔬中的有害微生物,或与有害微生物竞争果蔬中的糖类等营养物质,借助保鲜纸载体,在果实与纸之间形成一个“微环境”,起到气调的效果,从而达到防腐保鲜、延缓贮藏期间桃果维生素 C 和可溶性固形物的含量下降、提高果实质量的目的^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

采摘八成熟左右中华寿桃鲜果,裹网套装箱后运至实验室,选择大小均匀、无病虫害、无机械损伤的寿桃置于(10±0.5)℃冰箱中预冷,以去除果实的田间热。

采用液体培养基活化 BSD-2 菌株,摇床转速设为 200 r/min,30℃培养 24 h,离心去除枯草芽孢杆菌,用微孔滤膜过滤,得到含有代谢产物的无菌滤液。将薄页纸浸泡在无菌滤液中,1 min 后取出晾干,备用。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 将预冷的中华寿桃用保鲜纸单果包装,装纸箱于 1℃低温贮藏,以未处理果实为对照(CK),均设 3 个重复,每个重复 20 个果实,每隔 15 d 取样测定,于采收当天

Process Biochemistry,2009,44(7):749-756.

收稿日期:2014-11-21

基金项目:河北省科技攻关项目(编号:13227102D)。

作者简介:董玉兰(1986—),女,吉林辽源人,硕士,研究实习员,主要从事有益微生物和水果保鲜研究。Tel:(0311)83014879;E-mail:dong_yulan@126.com。

通信作者:张根伟(1976—),男,河北博野人,副研究员,主要从事农业有益微生物研究。Tel:(0311)83014879;E-mail:889io@sina.com。

参考文献:

- [1] Yuan X Q, Gu X H, Tang J. Purification and characterization of a hypoglycemic peptide from *Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser. [J]. Food Chemistry, 2008, 111: 415-420.
- [2] 赵海雯, 汤坚. 癩葡萄皂甙的降糖功效探索[J]. 食品科技, 2007(12): 224-227.
- [3] 延玺, 刘会青, 邹永青, 等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学, 2008, 28(9): 1534-1544.
- [4] Zhou P, Li L P, Luo S Q, et al. Intestinal absorption of luteolin from peanut hull extract is more efficient than that from individual pure luteolin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(1): 296-300.
- [5] Sousa F, Guebitz G M, Kokol V. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids [J].

- [6] 高中松. 超声波提取黄花菜中总黄酮的工艺研究[J]. 中国林副特产, 2006, 82(3): 15-16.
- [7] 秦学会, 阮美娟, 赵龙, 等. 响应面法优化超声波水提马齿苋黄酮的工艺[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(1): 19-21, 25.
- [8] 罗仓学, 张冬梅, 胡兵, 等. 响应曲面法优化超声波辅助提取苦荞总黄酮研究[J]. 粮食与油脂, 2011(8): 17-21.
- [9] Zhang Q A, Zhang Z Q, Yue X F, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder [J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 513-518.
- [10] 华景清, 蔡健. 苦瓜总黄酮提取工艺[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(6): 131-134.
- [11] 董发明, 白喜婷. 响应面法优化超声提取杜仲雄花中黄酮类化合物的工艺参数[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 227-231.