

彭 玲. 响应面法优化超声提取油茶壳总黄酮及抑菌性研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 227–230.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.060

响应面法优化超声提取油茶壳总黄酮及抑菌性研究

彭 玲

(宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000)

摘要:利用响应面法对油茶壳中总黄酮超声提取工艺进行研究。油茶壳经过酶解预处理之后,在单因素试验的基础上,选定乙醇浓度、超声功率、提取时间为自变量,总黄酮提取量为响应值,通过响应面分析法研究各自变量交互作用及其对总黄酮提取量的影响,模拟得到二次回归方程,从而得到油茶壳总黄酮提取的最佳工艺条件。结果表明,最佳提取工艺条件如下:超声功率为 255 W,乙醇浓度为 41%,提取时间为 58 min;验证试验得到油茶壳总黄酮溶出率为 2.652 3%,与预期值吻合良好。油茶壳总黄酮提取物有抑菌活性,对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑制作用明显。

关键词:油茶壳;总黄酮;提取;响应面;抑菌

中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0227-04

黄酮类化合物是指由 2 个具有酚羟基的苯环通过中央三碳原子相连接构成的一系列化合物^[1],用 $C_6-C_3-C_6$ 表示。有研究表明,黄酮类化合物大多与糖结合成苷,少部分以游离形式存在^[2-3]。大多数植物体内都含有黄酮类化合物,它对植物的生长、发育、开花、结果等方面有很重要的作用。直到 20 世纪 60 年代末,人们发现黄酮类化合物具有利胆、强心、镇痛、抗氧化、抗菌、抗癌、抗心脑血管疾病、抗病毒、免疫调节等多种生理功能及药理作用^[4],因此其提取物已被广泛应用于食品、药品、化妆品等产品中。

有关报道显示,油茶总皂苷分子极性较强,具有抗氧化、清除自由基的能力,但从油茶壳中提取总黄酮及其抑菌活性的研究至今较少。油茶是我国南方重要的木本油料作物,广泛分布于江西、湖南、福建、广东、广西等省(自治区),资源十分丰富。据统计全国有油茶 367 万 hm^2 ,每年产油 15 亿 kg,同时将产生 100 亿 kg 的油茶果壳^[5]。本着变废为宝的原则,

如果能将数量如此庞大的油茶壳加以有效利用,将带来巨大的经济效益,因此充分利用油茶壳中的黄酮类化合物具有十分重要的现实意义。

本试验针对油茶壳中总黄酮酶解-超声提取工艺进行研究,利用纤维素酶、蛋白酶、果胶酶预处理原料油茶壳^[6],然后采用单因素试验,确定超声功率、乙醇浓度、提取时间为显著因素,采用响应面法摸索出对油茶壳总黄酮化合物提取的最佳条件,并研究其抑菌活性,旨在为油茶壳总黄酮化合物的深度开发和工业化生产天然抑菌剂提供理论依据和方法指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油茶壳,购自江西省宜春市油茶园,除杂清洗后自然风干,粉碎过 80 目筛。

无水乙醇,购自广州双船化学试剂厂;芸香苷标准品,购自中国药品生物制品检定所;纤维素酶、蛋白酶、果胶酶,购自诺维信生物技术有限公司;牛肉膏、蛋白胨、琼脂,购自广州味研生物科技有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FW135 中草药粉碎机,购自上海隆拓仪器设备有限公司;HH-4 型数显恒温水浴锅,购自国华电器有限公司;DL-1000A 超声波清洗器,购自上海之信仪器有限公司;UV-5100 紫外可见分光光度计,购自上海元析仪器有限公司;CJ

收稿日期:2017-05-20

基金项目:国家留学基金(编号:留金法[2016]5113 号);江西省科学技术厅科技计划(编号:20132BBF60063);江西省教育厅青年基金(编号:GJJ14709);江西省宜春市 2016 年科技创新“六个一”工程(编号:JXYC2016KJCX013)。

作者简介:彭 玲(1981—),女,江西宜春人,硕士,副教授,研究方向为天然产物检测分析和食品生物技术。Tel: (0795) 3201985; E-mail: pling1981@126.com。

而在香气成分测定中,检测出的成分有 80 多种,峰面积设定为 0.2% 才得到本试验中的数据,不同的色谱条件测定出的香气成分数量也会有所不同。

参考文献:

- [1] 宋兴兴. 猕猴桃白兰地的发酵工艺研究[D]. 重庆:重庆大学,2014.
- [2] 姜忠军. 白兰地酿造工艺及质量评价指标研究[D]. 无锡:江南大学,2006.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准

化管理委员会,白兰地:GB/T 11856—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

- [4] 刘晓艳,白卫东,黄玩娜. 柿子果酒香气成分的 GC-MS 分析[J]. 酿酒,2011,38(1):52-56.
- [5] 史静霞. 配制酒总酯的测定[J]. 酿酒,2001,28(4):95-96.
- [6] 黄晓钰,刘邻渭. 食品化学与分析综合实验[M]. 北京:中国农业大学出版社,2009:251-252.
- [7] Caldeira I, Santos R, Ricardo-da-Silva J M, et al. Kinetics of odorant compounds in wine brandies aged in different systems[J]. Food Chemistry, 2016, 211:937-946.

系列垂直、水平单向流净化工作台,购自苏州华宏净化技术有限公司;YHR-250 生化培养箱,购自上海姚氏仪器设备厂。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程 纤维素酶、蛋白酶、果胶酶+原料→预处理→超声提取→抽滤→滤液定容→测总黄酮含量。

1.3.2 酶解预处理^[7] 通过对油茶壳组成成分分析,可知油茶壳中含有大量的纤维素、蛋白质、果胶等成分,因此采用一定量的纤维素酶、蛋白酶、果胶酶按照一定比例互配,对原料油茶壳进行预处理,以提高油茶壳中总黄酮的提取率。

1.3.3 标准曲线的绘制^[8] 在波长为 400~800 nm 范围内做波长扫描,结果表明芸香苷在 508 nm 处有最大吸光度,且空白对照干扰最小。因此,在芸香苷的最大吸收波长 508 nm 处测定吸光度。通过标准曲线的制作,得到回归方程 $y = 123.82x - 0.0181 (r^2 = 0.9990)$ 计算总黄酮的含量。

1.3.4 单因素试验条件

1.3.4.1 超声功率的影响^[9] 称取 1 g 油茶壳粉末,经纤维素酶、蛋白酶、果胶酶预处理,采用 50% 乙醇为提取溶剂,液料比为 30 mL:1 g,提取时间为 30 min,超声功率为 200、250、300、350、400 W 等 5 个水平进行研究,以探讨超声功率对油茶壳总黄酮提取效果的影响。

1.3.4.2 乙醇浓度的影响^[10] 称取 1 g 油茶壳粉末,经纤维素酶、蛋白酶、果胶酶预处理,采用超声功率为 200 W,液料比为 30 mL:1 g,提取时间为 30 min,乙醇浓度为 30%、40%、50%、60%、70% 等 5 个水平进行研究,以探索乙醇浓度对油茶壳总黄酮提取效果的影响。

1.3.4.3 提取时间的影响^[11] 称取 1 g 油茶壳粉末,经纤维素酶、蛋白酶、果胶酶预处理,采用 50% 乙醇为提取溶剂,液料比为 30 mL:1 g,超声功率为 200 W,提取时间为 30、40、50、60、70 min 等 5 个水平进行研究,以探索提取时间对油茶壳总黄酮提取效果的影响。

1.3.4.4 液料比的影响^[12-13] 称取 1 g 油茶壳粉末,经纤维素酶、蛋白酶、果胶酶预处理,采用 50% 乙醇为提取溶剂,超声功率 200 W,提取时间为 30 min,液料比为 20 mL:1 g、30 mL:1 g、40 mL:1 g、50 mL:1 g、60 mL:1 g 等 5 个水平进行研究,以探索液料比对油茶壳总黄酮提取效果的影响。

1.3.5 响应面试验设计^[14-15] 根据单因素试验结果,确定超声功率、乙醇浓度、提取时间为主要影响因素,以油茶壳总黄酮溶出率作为评价指标,进行 3 因素 3 水平响应面分析。试验设计的水平及编码见表 1。

表 1 响应面试验因素水平编码

编码水平	因素		
	A:超声功率 (W)	B:乙醇浓度 (%)	C:提取时间 (min)
-1	200	30%	50
0	250	40%	60
1	300	50%	70

1.4 总黄酮溶出率^[16-17]

总黄酮溶出率 = $\frac{\text{样品液中总黄酮含量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$ 。

1.5 油茶壳总黄酮的抑菌活性^[18]

分别将枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进行接

种活化,用无菌水制成一定浓度的细菌悬浮液,稀释备用。

2 结果与分析

2.1 单因素对黄酮超声提取率的影响

2.1.1 超声功率的影响 在其他提取工艺条件一定时,考察超声功率对黄酮超声提取效果的影响。由图 1 可知,当超声功率为 250 W 时,总黄酮提取效果最好,但当功率再增大时提取效果反而下降,这可能是由于当功率增大到一定程度时,生成的黄酮类化合物会被再水解成其他的物质或是功率过大会对黄酮分子产生破坏作用。说明超声功率对总黄酮溶出率的影响是双向性的,既有正效应又有负效应,试验中应避免超声功率过大而引起提取率下降。综合考虑后,选择功率为 200、250、300 W 继续对油茶壳总黄酮超声提取作响应面分析,以确定最佳的超声功率。

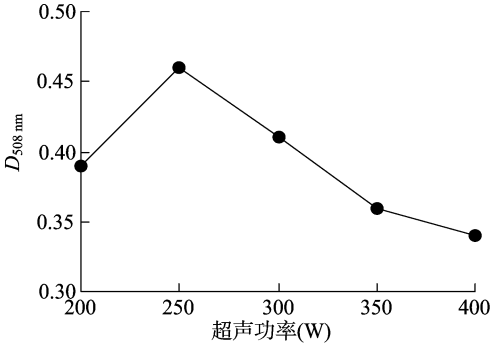


图1 超声功率对总黄酮溶出率的影响

2.1.2 乙醇浓度的影响 在其他提取工艺条件一定时,考察乙醇浓度对黄酮超声提取效果的影响。由图 2 可知,总黄酮的提取效果随着乙醇浓度的升高而增大,而后又变小。当乙醇浓度为 40% 时,总黄酮的提取效果最好。根据相似相溶原理,极性相似可达到最大溶出度,即油茶壳总黄酮与 40% 乙醇极性相似。综合考虑后,选择乙醇浓度为 30%、40%、50% 继续对油茶壳总黄酮超声提取作响应面分析,以确定最佳的乙醇浓度。

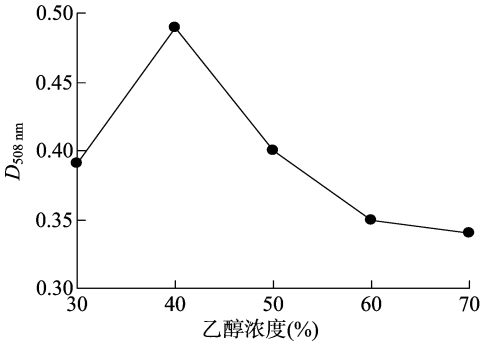


图2 乙醇浓度对总黄酮溶出率的影响

2.1.3 提取时间的影响 在其他提取工艺条件一定时,考察提取时间对黄酮超声提取效果的影响。由图 3 可知,开始时总黄酮提取效果随着提取时间的延长而增大,提取时间达到 60 min 时,总黄酮提取效果最佳,之后总黄酮提取效果有所下降。分析其原因可能是由于时间过短产物溶出不充分,而提取时间过长,超声波对总黄酮的提取结果有所破坏,引起产物结构的分解而使提取效果下降。综合考虑后,选择提取时间

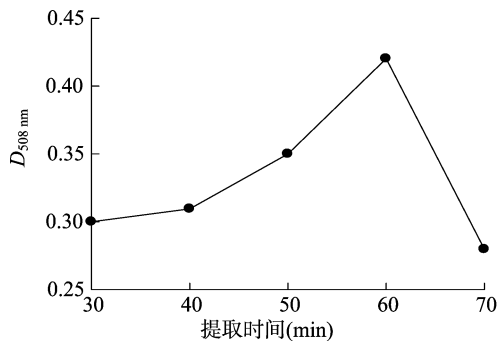


图3 提取时间对总黄酮溶出率的影响

为 50、60、70 min 继续对油茶壳总黄酮超声提取作响应面分析,以确定最佳的提取时间。

2.1.4 液料比的影响 在其他提取工艺条件一定时,考察液料比对黄酮超声提取效果的影响。由图 4 可知,总黄酮提取效果随着液料比的增大而增大,当液料比到达 40 mL : 1 g 时,吸光度达到最高值,随后呈下降趋势。从整体提取率上看,不同液料比的溶出率差别并不多。综合考虑后,液料比不作为响应面法的主要影响因素。

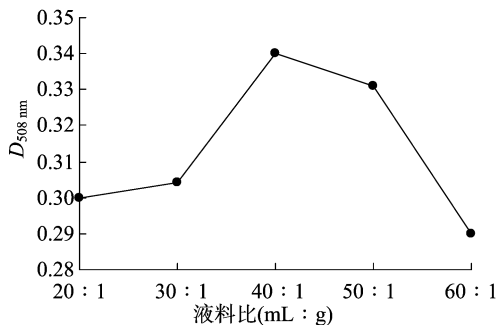


图4 液料比对总黄酮溶出率的影响

2.2 响应面法优化油茶壳黄酮提取工艺条件

2.2.1 响应面试验设计与结果 根据 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,同时综合考虑单因素试验分析结果,确定超声功率、乙醇浓度、提取时间 3 个因素为总黄酮溶出率的显著影响因素,以油茶壳总黄酮溶出率为响应值(Y),设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验,其响应面分析方案及结果见表 2。

采用 Design - Expert 8.0.6 软件对表 2 中的各组数据进行响应面回归后拟合方程,得 $Y = 2.28 + 0.049A + 0.075B - 0.029C + 7.5 \times 10^{-3}AB - 0.019AC + 8.175 \times 10^{-3}BC - 0.34A^2 - 0.53B^2 - 0.078C^2$,并进行显著性检验,结果见表 3。其中,Y 为油茶壳总黄酮含量的预测值;A、B、C 分别为上述超声功率、乙醇浓度、提取时间的编码值。

由表 3 可知,由于 $P < 0.0001$,故该模型极显著,具有统计学意义。由于失拟误差中 $P = 0.6174 > 0.05$,故该模型与实际试验拟合良好。该模型的 $R^2 = 0.9800$, $R^2_{\text{Adj}} = 0.9542$,说明响应值的变化有 98% 来源于所选自变量,因变量与自变量之间具有显著线性关系,进一步说明该回归方程可以替代试验真实点对试验结果进行分析。

回归方程各项的方差分析结果还表明,超声功率的二次项、乙醇浓度的二次项达到极显著水平。此外,方程的方差分析也达到极显著水平,且 R^2 和 R^2_{Adj} 分别为 0.9800、0.9542,

表2 响应面分析方案及结果

试验编号	A:超声功率 (W)	B:乙醇浓度 (%)	C:提取时间 (min)	总黄酮溶出率 (%)
1	0	0	0	2.2611
2	1	-1	0	1.3202
3	-1	0	-1	1.8071
4	1	1	0	1.5516
5	0	0	0	2.3634
6	1	0	-1	1.9836
7	0	-1	-1	1.6548
8	0	0	0	2.1948
9	0	-1	1	1.6012
10	-1	1	0	1.4783
11	0	0	0	2.3547
12	0	1	1	1.7025
13	0	0	0	2.2042
14	0	1	-1	1.7234
15	-1	0	1	1.7652
16	-1	-1	0	1.2769
17	1	0	1	1.8675

表3 回归方程方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.890000	9	0.210000	38.050	<0.0001
A	0.020000	1	0.020000	3.550	0.1017
B	0.045000	1	0.045000	8.240	0.0240
C	0.006757	1	0.006757	1.230	0.3048
AB	0.000225	1	0.000225	0.0410	0.8456
AC	0.001376	1	0.001376	0.250	0.6326
BC	0.000267	1	0.000267	0.0480	0.8320
A ²	0.490000	1	0.490000	89.220	<0.0001
B ²	1.170000	1	1.170000	212.260	<0.0001
C ²	0.026000	1	0.026000	4.650	0.0679
残差	0.039000	7	0.005512		
失拟误差	0.013000	3	0.004267	0.660	0.6174
纯误差	0.026000	4	0.006447		
总和	1.930000	16			

注:模型的 $R^2 = 0.9800$, $R^2_{\text{Adj}} = 0.9542$ 。

表明各因素对油茶壳总黄酮提取的影响不是简单的线性关系。此外,还可以看出各因子对于总黄酮提取的影响排序为乙醇浓度(B) > 超声功率(A) > 提取时间(C)。

2.2.2 各因素之间的交互作用 用 Design - Expert 8.0.6 软件处理的响应面分析结果见图 5 至图 7。

通过 Design - Expert 8.0.6 软件分析,将 3 因素互相进行分析比较,作出响应面曲线图。等高线即为响应面图在底面的投影,其形状反映了交互影响的强弱。等高线趋于圆形时,2 因素的交互作用相对较弱;等高线呈椭圆形时,2 因素的交互作用相对较强。由图 5 至图 7 可知,超声功率和乙醇浓度的等高线、超声功率和提取时间的等高线、乙醇浓度和提取时间的等高线均为圆形,说明它们之间的交互作用不明显。

利用 Design - Expert 8.0.6 软件分析所得回归模型方程,得到最佳提取工艺:超声功率为 253.94 W,乙醇浓度为 40.7%,提取时间为 58.07 min。但考虑到实际情况,将最佳提取工艺条件参数修正为超声功率为 255 W,乙醇浓度为 41%,提取时间为 58 min。为检验响应面法优化结果的可靠性,采用修正的最佳提取条件,经过 3 次平行验证试验,得到

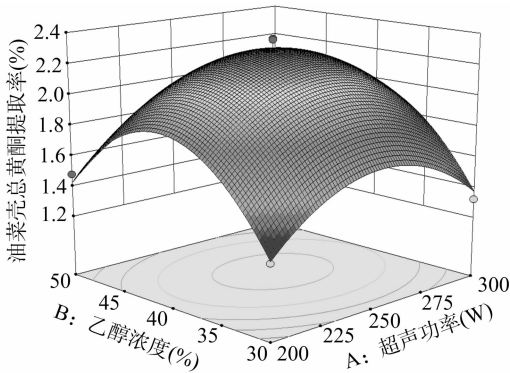


图5 超声功率和乙醇浓度对总黄酮溶出率影响的响应面

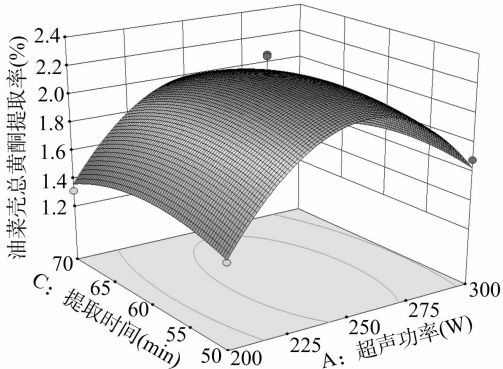


图6 超声功率和提取时间对总黄酮溶出率影响的响应面

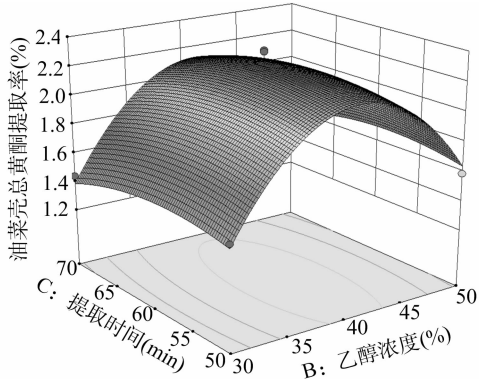


图7 乙醇浓度和提取时间对总黄酮溶出率影响的响应面

油茶壳总黄酮溶出率为 2.652 3%，为试验中最大值，同时该试验值与预期值吻合良好。

2.3 油茶壳总黄酮的抑菌活性

由表 4 可知，油茶壳总黄酮提取物对试验菌种枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有明显抑制作用，并且抑菌效果为金黄色葡萄球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 大肠杆菌。

3 结论

本试验利用酶解—超声波法提取油茶壳总黄酮，通过单因素试验发现，超声功率、乙醇浓度、超声时间、液料比等 4 个因素均对总黄酮溶出率有一定程度的影响。通过筛选确定超声功率、乙醇浓度、超声时间为主要影响因素。通过 Box - Behnken 试验设计建立提取油茶壳总黄酮的优化回归方程模型，经过方差分析该模型与实际试验拟合良好。因变量与自变量之间具有显著线性关系，可以替代试验真实点对试验结

表 4 油茶壳总黄酮的抑菌圈直径

试验重复	抑菌圈直径 (cm)		
	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
1	1.245	1.036	1.523
2	1.198	1.054	1.516
3	1.215	0.976	1.504
平均	1.219	1.022	1.514

果进行分析。最佳提取工艺条件：超声功率为 255 W，乙醇浓度为 41%，提取时间为 58 min。验证试验得到油茶壳总黄酮溶出率为 2.652 3%，为试验中的最大值，同时该试验值与预期值吻合良好。油茶壳总黄酮提取物有抑菌活性，对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑制作用明显。

参考文献：

[1] 陈永忠, 罗 健, 王 瑞, 等. 中国油茶产业发展的现状与前景 [J]. 粮食科技与经济, 2013, 5(1): 10 - 12.

[2] 李凤林, 李青旺, 高大威, 等. 天然黄酮类化合物分离纯化研究进展 [J]. 江苏调味副食品, 2008, 25(5): 20 - 24.

[3] Khalafallah A K, Suleiman S A, Yousef A H, et al. Prenylated flavonoids from *Tephrosia apollinea* [J]. Chinese Chemical Letters, 2009, 20(12): 1465 - 1468.

[4] Geleijnse J M, Hollman P C. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms? [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 88(1): 12 - 13.

[5] 彭 玲, 熊筱娟. 里氏木霉与黑曲霉糖化油茶粕的研究 [J]. 食品研究与开发, 2011, 32(12): 147 - 149.

[6] 熊筱娟, 彭 玲. 糖化后油茶粕生物发酵乙醇研究 [J]. 食品工业, 2010(6): 55 - 57.

[7] Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(7): 427 - 442.

[8] Buer C S, Imin N, Djordjevic M. Flavonoids; new roles for old molecules [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(1): 98.

[9] 马永强, 荆丽荣, 刘晓飞, 等. 双水相超声波法辅助提取甜玉米芯多酚及抑菌性研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(24): 61 - 64.

[10] 彭 玲. 油茶壳总黄酮对食用油脂抗氧化性研究 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33(12): 201 - 204.

[11] 欧阳辉, 田启建, 余 估, 等. 酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮工艺优化 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 886 - 889.

[12] 廖伟玲, 徐晓飞, 冯金源, 等. 纤维素酶协同超声波法提取香菇多糖的研究 [J]. 湖南中医杂志, 2008, 24(6): 87 - 89.

[13] Aoki T, Akashi T, Ayabe S. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis [J]. Journal of Plant Research, 2000, 113(1112): 475 - 488.

[14] 吴冬青, 徐新建, 张 丽, 等. 响应面分析法优化竹节草黄酮提取工艺 [J]. 食品科学, 2011, 32(8): 125 - 128.

[15] 彭 玲, 赵 云, 布尼洪泽, 等. 响应面法优化绿茶雪梨果味茶饮料工艺 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 70 - 75.

[16] 王梅英, 陈慧斌, 陈绍军. 响应面法优化超声波辅助提取岩茶总黄酮工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 327 - 330.

[17] 宋 倩, 赵声兰, 刘彬球, 等. 响应面法优化核桃壳总黄酮提取工艺的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 214 - 217.

[18] 蔡 鹏, 黄敏桃, 黄云峰, 等. 苦丁茶多糖活性成分动态累积及其抑菌活性 [J]. 食品科学, 2014, 35(9): 43 - 47.