

响应曲面法优化微波柑橘皮渣发酵液中总黄酮的提取工艺研究

任廷远^{1,2}, 安玉红¹, 王 华², 谢 娇^{1,2}, 李远虎^{1,2}

(1.西南大学食品学院, 重庆 400716; 2.中国农科院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘 要: 研究以乙醇为溶剂微波辅助提取柑橘皮渣发酵液总黄酮的工艺。在单因素试验的基础上, 采用四元二次通用旋转组合试验优化柑橘皮渣发酵液总黄酮的提取工艺, 用曲面响应法对影响总黄酮得率的料液比, 提取时间, 乙醇浓度, 微波功率的最佳水平范围进行研究。通过对二次多项回归方程求解得到最优工艺参数为: 微波提取时间 50s, 料液比 1:40, 乙醇浓度 70%, 微波功率 500w, 可获得最大总黄酮得率 2.3700%。

关键词: 柑橘皮渣发酵液; 总黄酮; 微波; 旋转设计; 响应面分析

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1674-506X(2010)01-0077-0005

Research on Process of Microwave Extraction of Total Flavone from Fermentation Fluid of Citrus Hide Trimmings through Optimization of Response Surface Methodology

REN Ting-yuan^{1,2}, AN Yu-hong¹, WANG Hua², XIE Jiao^{1,2}, LI Yuan-hu^{1,2}

(1. Food College, Southwest University, Chongqing 400716; 2. Citrus Research Institute, CAAS, Chongqing 400712)

Abstract: This paper mainly researched on the extraction of total flavanone from fermentation fluid of citrus hide trimmings with the method of microwave cooperated which took alcohol as resolver. On the basis of the single-factor experiment, the quaternionic quadratic rotational combination was used to optimize the extraction process of total relative flavone that came from fermentation fluid of citrus, and we had used the response surface methodology to study the best horizontal extent of solid-to-liquid ratio, extraction time, alcohol density, the microwave power which affected the rate of total flavone relative extraction. The optimum extraction conditions were obtained by solving the quadratic regression equation, the results as followed: microwave time: 4min, solid-to-liquid ratio 1:40, ethanol 70%, microwave power 70%. Under these conditions, the biggest quality of total flavonee relative extraction rate would be up to 2.3700%.

Keywords: fermentation fluid of citrus hidetrimmings; total flavone; microwave; whirly design; response surface methodology
doi: 10.3969/j.issn.1674-506X.2010.01-020

黄酮类化合物是一类在自然界广泛分布的多酚类物质。黄酮类化合物具有清除自由基、抗氧化、抗突变、抗肿瘤、抗菌、抗病毒和调节免疫等功能。柑橘是世界第一大宗水果,栽培面积、产量均居世界各类水果之首。中国是柑橘生产大国,其产量居世界第二^[1]。柑橘中含有大量的营养物质,除含丰富的芳香油、果

胶^[2]、色素外,还有经济价值较高的柚皮苷等黄酮类化合物。中国农科院柑橘研究所研究并具有自主知识产权的一种新型饲料添加剂——柑橘皮渣发酵饲料,该技术已于 2005 年 7 月通过重庆市科委成果鉴定,现已在万州汇源集团投产。通过微生物发酵后,柑橘皮渣中大量黄酮类化合物溶解于发酵液中,干

收稿日期: 2009-12-11

基金项目: 三峡库区柑桔皮渣综合利用关键技术及成套设备的研制(CSTC2008A1007)

作者简介: 任廷远(1983-),男,贵州凤冈人,硕士研究生,主要从事食品安全与质量分析研究。

燥前进行挤压脱水,不少柑橘皮以小颗粒的形式混杂于发酵液中,其中含有大量黄酮类化合物。微波技术作为一种新兴的应用技术,近年在提取天然植物的有效成分中得到广泛应用^[3]。由于它是一种瞬时穿透式加热方式,在微波场的作用下植物细胞破碎,从而加快了萃取速率并有效提高了产品得率^[4]。本试验选用微波辅助提取柑橘皮渣发酵液中的总黄酮,并用曲面响应法对影响柑橘皮渣发酵液总黄酮得率的主要因素进行分析^[5]。为柑橘皮渣发酵液的充分利用和工业化生产提取作参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

柑橘皮渣发酵液,万州汇源果业集团;橙皮苷标准, Sigma 公司提供;无水乙醇,一缩二乙二醇,柠檬酸,酸洗石棉,试验所用药品及试剂均为分析纯。

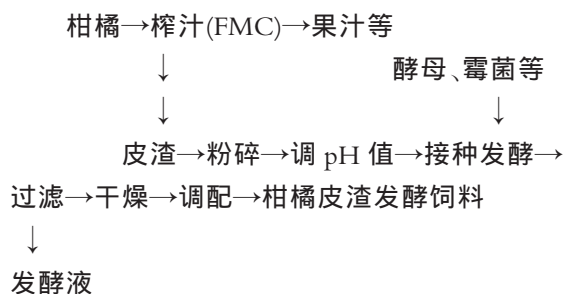
1.2 主要仪器与设备

双光束紫外可见分光光度计(TU-190);微波炉(WD900);电子恒温水浴锅(DZKW-4);酸度计(PHS-3CT);旋转蒸发仪(152/R-RE(1L));统计软件DPS(Digital Signal Processing) v7.5。

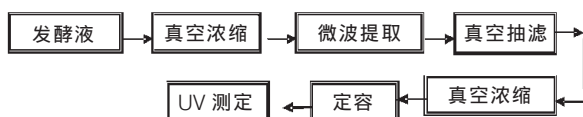
1.3 实验方法

1.3.1 柑橘皮渣发酵液总黄酮的提取工艺流程

1.3.1.1 柑橘皮渣发酵液生产过程



1.3.1.2 发酵液总黄酮提取工艺流程



准确称取浓缩后的发酵液 1.00g 置于 250mL 烧杯中,加入适量一定体积一定浓度提取剂,烧杯口用塞密封好,微波提取一段时间,取出,真空抽滤,于 65℃ 旋转蒸发仪中浓缩去除乙醇后定容至 100mL,于 4℃ 冰箱中冷冻保存待测。

1.3.2 柑橘皮渣发酵液总黄酮含量的测定方法及得率的计算

橙皮甙标准曲线的绘制:称取 0.0250g 橙皮甙,

置 50mL 烧杯中,加 20mL 0.1mol/L 氢氧化钠溶解,用 200g/L 的柠檬酸溶液调至 pH=6, 转移到 100mL 容量瓶中,用蒸馏水定溶至刻度,摇匀。分别称取 0.00mL, 1.00mL, 2.00mL, 3.00mL, 4.00mL, 5.00mL 此标准溶液于具塞试管中, 分别依次加 5.00mL, 4.00mL, 3.00mL, 2.00mL, 1.00mL, 0.00mL 试剂空白溶液(20mL 0.1mol/L NaOH, 用 200g/L 的柠檬酸溶液调至 pH=6, 转移到 100mL 容量瓶中,用蒸馏水定溶至刻度), 摇匀。再各加 5.0mL 90% 的二甘醇, 0.1mL 4.0mol/L 的氢氧化钠, 配制成 0.0mL, 20.0mL, 40.0mL, 60.0mL, 80.0mL, 100.0mg/L 总黄酮标准溶液。将上述试管置于 40℃ 恒温水浴中保温 30min, 取出, 在冷水浴中冷却 5min。用 1cm 比色皿, 以 0.0mg/L 标准溶液调零, 在波长 420nm 处测定各溶液的吸光度。经吸光度为纵坐标, 相应的总黄酮浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 并计算回归方程。

微波提取后发酵液总黄酮含量的测定: 取样液 5.0mL, 不用加试剂空白, 其它步骤同标准溶液测定方法, 根据标准曲线求得其浓度, 并计算出总黄酮含量 X。总黄酮含量计算公式如下:

$$X = C / (M / 100 \times V / 10) = C \times 1000 / MV$$

式中:

X: 样品中总黄酮含量, mg/kg;

C: 从标准曲线上查出(或用回归方程计算出)试液中黄酮的含量 $\mu\text{g/mL}$ 。

V: 测定时吸取试样的体积, mL;

M: 样品的质量。

总黄酮得率的计算公式:

$$\text{发酵液总黄酮得率} \% = \frac{\text{微波提取后总黄酮含量 } X}{\text{提取所用发酵液质量 } m} \times 100\%$$

1.3.3 单因素试验

分别选取不同料液比、提取时间、乙醇浓度、微波功率进行单因素试验, 最后比较试验结果, 确定进行旋转试验的因素水平。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

标准曲线按照 GB/T16771-1997 中附录 E 制得, 以橙皮甙标准系列溶液浓度 y 为纵坐标, 紫外分光光度计测得的吸光度 x 为横坐标绘制标准曲线如图, 得到回归方程 $y = 94.543x - 0.4857$, 相关系数 $R^2 = 0.9995$, 有较好的线性关系。

2.2 料液比对发酵液总黄酮得率的影响

在提取时间 50s, 微波功率 300w, 乙醇浓度 70%

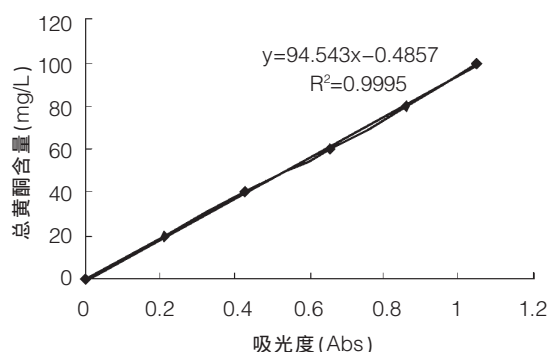


图 1 橙皮甙标准曲线

Fig.1 The standard curve of hesperidin

的条件下,分别以料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 进行微波提取,最后试验结果如图 2。从图可知,当料液比小于 1:40 后,总黄酮得率随着料液比的增加而升高,这是因为溶剂量大,溶剂中的有效成分浓度低,与物料及溶剂边界层的有效成分浓度差大,扩散推动力大。当料液比大于 1:40 后,总黄酮得率随料液比的增加而降低,考虑到浸提液的用量过多,会给浓缩、过滤、干燥等后续工作带来困难,使成本增加,因此最佳料液比为 1:40。

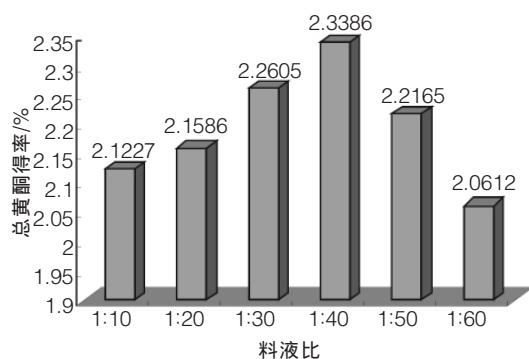


图 2 料液比对总黄酮得率的影响

Fig.2 The effect of solid-to-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoid

2.3 微波提取时间对发酵液总黄酮得率的影响

在微波功率 300w,乙醇浓度 70%的,料液比为 1:40 条件下,提取时间分别为 0s、10s、30s、50s、70s、90s、120s 进行微波提取,最后比较试验结果如图 3。由图可得,随着时间的加长,其总黄酮得率先升高后降低。考虑到成本和效益问题,微波提取的最佳提取时间在 50s 左右。

2.4 乙醇浓度对发酵液总黄酮得率的影响

在微波功率为 300w,料液比为 1:40,提取时间为 50s 条件下,分别以乙醇浓度为 10%、30%、50%、70%、90%、无水乙醇条件下,进行微波提取,最后比较试验结果如图 4。由图可知,随着乙醇浓度的升

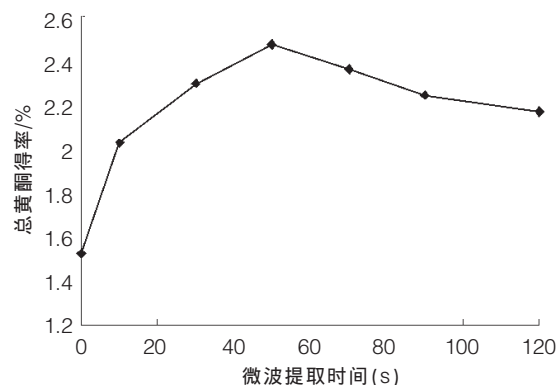


图 3 微波提取时间对总黄酮得率的影响

Fig.3 The effect of microwave extraction time on the yield of total flavonoid

高,其总黄酮得率随着升高,当乙醇浓度达到 70% 时,总黄酮得率达到最大值。随着浓度进一步提高,总黄酮含量逐渐降低,说明乙醇浓度过高时,一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分等溶出增多,这些成分与总黄酮竞争地与乙醇-水分子结合,使组织的通透性下降,干扰因素随之增大。

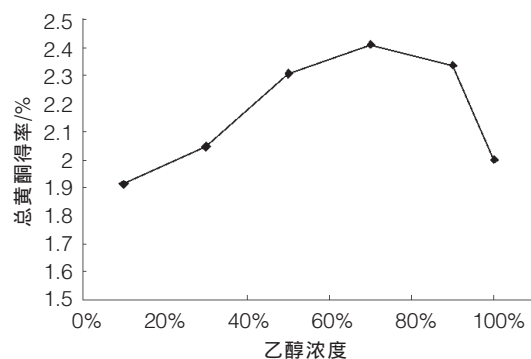


图 4 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

Fig.4 The effect of alcohol density on the yield of total flavonoid

2.5 微波功率对发酵液总黄酮得率的影响

在料液比为 1:40,乙醇浓度 70%,提取时间 50s,微波功率分别为 100w、300w、500w、700w、900w 条件下,进行提取,最后比较试验结果如图 5。由图

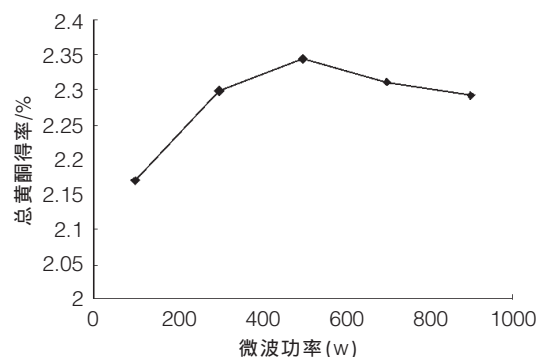


图 5 微波功率对总黄酮得率的影响

Fig.5 The effect of microwave power on the yield of total flavonoid

可看出,当微波功率达到 500W 左右时,总黄酮相对提取率含量达到最大值,随后下降。

2.6 柑橘皮渣发酵液总黄酮微波提取条件的四元二次通用旋转组合设计及结果分析

2.6.1 四元二次通用旋转组合试验设计因素水平、方案及结果

采用二次通用旋转组合设计,实验辅助软件为 DPS(Digital Signal Processing)v7.5 版,在单因素的基础上,确定各因素上水平和下水平,以及变化间距 $\Delta_j^{[4]}$ 。并编制出因素水平表的编码值表 1。

表 1 实验因素水平表及编码

Tab.1 Code and level of factors chosen for the trials

编码	料液比 x_1	提取时间(s) x_2	乙醇浓度% x_3	微波功率(W) x_4
2	1:50	70	90	700
1	1:45	60	80	600
0	1:40	50	70	500
-1	1:35	40	60	400
-2	1:30	30	50	300

利用统计软件 DPS (Digital Signal Processing) v7.5 进行实验设计,其结果如表 2。

表 2 试验设计及结果

Tab.2 Experimental designs and results

处理号	x_1	x_2	x_3	x_4	总黄酮得率%
1	1	1	1	1	1.8438
2	1	1	1	-1	2.0256
3	1	1	-1	1	2.0001
4	1	1	-1	-1	2.2101
5	1	-1	1	1	2.2891
6	1	-1	1	-1	2.212
7	1	-1	-1	1	2.1461
8	1	-1	-1	-1	2.2013
9	-1	1	1	1	2.0963
10	-1	1	1	-1	2.1338
11	-1	1	-1	1	2.1653
12	-1	1	-1	-1	2.2774
13	-1	-1	1	1	2.1874
14	-1	-1	1	-1	2.1039
15	-1	-1	-1	1	2.0795
16	-1	-1	-1	-1	2.1496
17	-2	0	0	0	2.1079
18	2	0	0	0	2.1057
19	0	-2	0	0	2.1583
20	0	2	0	0	2.1845
21	0	0	-2	0	2.0699
22	0	0	2	0	2.0424
23	0	0	0	-2	2.1892
24	0	0	0	2	2.1005
25	0	0	0	0	2.338
26	0	0	0	0	2.4007
27	0	0	0	0	2.3452
28	0	0	0	0	2.3371
29	0	0	0	0	2.4025
30	0	0	0	0	2.3877
31	0	0	0	0	2.4002

利用统计软件为 DPS (Digital Signal Processing) v7.5v,对表 2 实验数据进行四元二次通用旋转组合分析,得到微波提取柑橘皮渣发酵液总黄酮的四元二次回归方程模型为: $Y=2.37306-0.01123X_1-0.02350X_2-0.01635X_3-0.02848X_4-0.06443X_{12}-0.04828X_{22}-0.07710X_{32}-0.05492X_{42}-0.05758X_1X_2-0.00229X_1X_3-0.01461X_1X_4-0.04808X_2X_3-0.03604X_2X_4+0.02429X_3X_4$

2.6.2 模型及回归方程系数的显著性检验

微波提取柑橘皮渣发酵液总黄酮数据模型方差分析见表 3。

表 3 回归模型方差分析

Tab.3 ANOVA for response surface quadratic model

变异来源	平方和	自由度	均方	偏相关	F 值	P 值
x_1	0.0030	1	0.0030	-0.3033	1.6205	0.2212
x_2	0.0133	1	0.0133	-0.5544	7.0997	0.0170
x_3	0.0064	1	0.0064	-0.4205	3.4372	0.0823
x_4	0.0195	1	0.0195	-0.6281	10.4232	0.0053
x_1^2	0.1187	1	0.1187	-0.8938	63.5725	0.0001
x_2^2	0.0667	1	0.0667	-0.8310	35.6982	0.0001
x_3^2	0.1700	1	0.1700	-0.9222	91.0140	0.0001
x_4^2	0.0863	1	0.0863	-0.8618	46.1875	0.0001
x_1x_2	0.0530	1	0.0530	-0.7998	28.4066	0.0001
x_1x_3	0.0001	1	0.0001	-0.0530	0.0451	0.8345
x_1x_4	0.0034	1	0.0034	-0.3202	1.8278	0.1952
x_2x_3	0.0370	1	0.0370	-0.7437	19.8065	0.0004
x_2x_4	0.0208	1	0.0208	-0.6405	11.1306	0.0042
x_3x_4	0.0094	1	0.0094	0.4900	5.0565	0.0390
回归	0.5056	14	0.0361	$F_2=19.33638$		0.0001
剩余	0.0299	16	0.0019			
失拟	0.0240	10	0.0024	$F_1=2.44895$		0.0533
误差	0.0059	6	0.0010			
总和	0.5354	30				

上述方程的回归系数显著性检验表明:模型一次项 x_2 、 x_3 各处理间差异显著, x_4 ($P<0.01$) 极显著, x_1 不显著。二次项 x_1^2 、 x_2^2 、 x_3^2 、 x_4^2 ($p<0.01$) 极显著,交互项 x_1x_2 、 x_2x_3 ($P<0.01$) 极显著, x_2x_4 、 x_3x_4 ($0.001<P<0.05$), 差异显著。失拟性检验, $FLF=1.56406<F_{0.05}$, 表示差异不显著,可直接对回归方程进行显著性检验。回归方程显著性检验为: $FR=19.33638>F_{0.01}$, 极显著,表明所建方程拟合性较好。

以下是 $\alpha=0.10$ 显著水平剔除不显著项后,简化后的回归方程: $Y=2.37306-0.02350X_2-0.01635X_3-0.02848X_4-0.06443X_1^2-0.04828X_2^2-0.07710X_3^2-$

$$0.05492X_4^2 - 0.05758X_1X_2 - 0.04808X_2X_3 - 0.03604X_2X_4 + 0.02429X_3X_4$$

2.6.3 微波提取柑橘皮渣发酵液总黄酮响应面分析

从图 1 中可看出,在乙醇浓度和微波功率处在最佳值时,随着微波作用时间增加,总黄酮得率先增加后减小。随着料液比的增加,总黄酮得率也是先增加后减小。由图 a 可确定最佳的提取时间最佳范围 45s~55s,料液比 1:37.5~1:42.5。

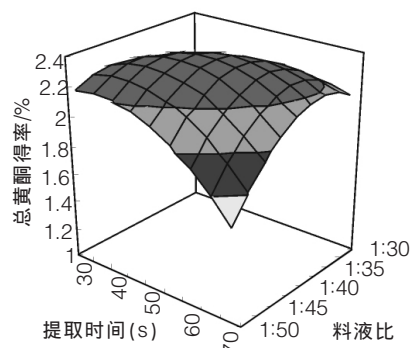


图 1 料液比和微波时间对总黄酮得率的响应面图

Fig.1 Response surface of solid-to-liquid ratio and microwave time on the yield of total flavone

从图 2 中可看出,微波提取时间和微波功率处在最佳值时,总黄酮得率随着料液比的增加先增加后减小。随乙醇浓度的增加先增加后减小。由图可确定最佳的料液比 1:37.5~1:42.5,乙醇浓度:67.5%~72.5%。

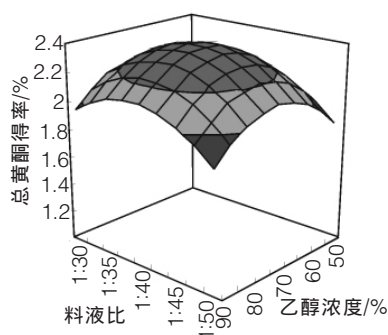


图 2 料液比和乙醇浓度对总黄酮得率的响应面图

Fig.2 Response surface of supersonic power, alcohol density on the yield of total flavone

从图 3 中可看出,微波提取时间和乙醇浓度处在最佳值时,总黄酮得率随着料液比的增加先增加后减小。总黄酮得率,随着微波功率的增加先增加后减小。由图可确定最佳的料液比 1:37.5~1:42.5,超声功率 450w~550w。

从图 4 中可看出,料液比和微波声功率处在最佳值时,总黄酮得率随着提取时间的增加先增加后

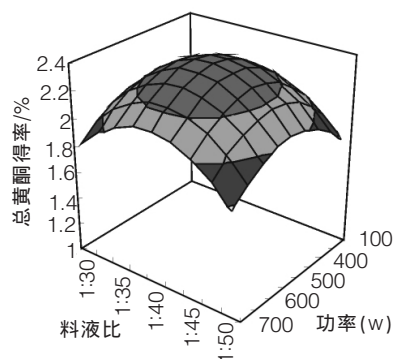


图 3 料液比与微波功率对总黄酮得率的响应面

Fig.3 Response surface of solid-to-liquid ratio, microwave power on the yield of total flavone

减小。随着乙醇浓度的增加先增加后减小。由图可确定最佳的提取时 3.5min~4.5min,乙醇浓度 67.5%~72.5%。

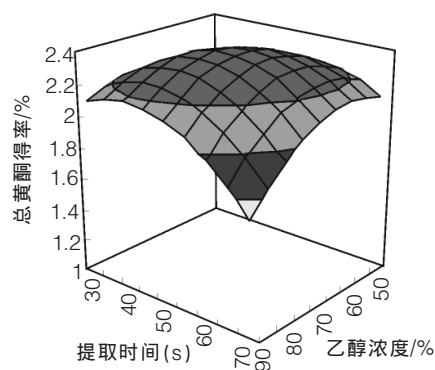


图 4 超声时间和乙醇浓度对总黄酮得率的响应面图

Fig.4 Response surface of supersonic time, alcohol density on the yield of total flavone

从图 e 可看出,料液比和乙醇浓度处在最佳值时,总黄酮得率随着提取时间的增加先增加后减小。总黄酮得率随着微波功率增加先增加后减小。可确定最佳的提取时间 45s~55s,微波功率 450w~550w。

从图 f 可看出,当料液比和提取时间处在最佳

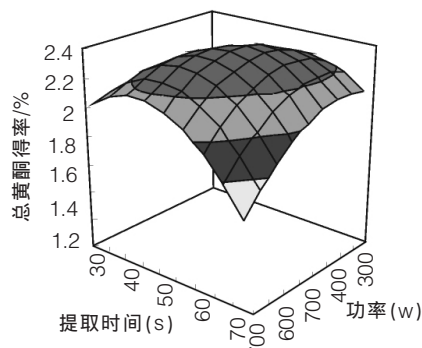


图 5 提取时间和微波功率对总黄酮得率的响应面图

Fig.5 Response surface of time, microwave power on the yield of total flavone

(下转第 99 页)

饮业主和从业人员《食品卫生法》、《餐饮业和集体用餐配送单位卫生规范》等卫生法律法规培训,树立依法从业的观念,增强卫生安全意识;深化食品卫生量化分级管理制度,改善经营环境,重点改造好食品加工场所的面积、布局、消毒保洁设施等;设置规模与接待能力应相匹配,禁止超负荷接待,以确保就餐群众的饮食卫生。

参考文献:

- [1] GB14938. 食物中毒诊断标准及技术处理总则:2-3
- [2] 王理兴等. 连云港市场预测 28 起食物中毒的病因分析. 中国食品卫生杂志,2005 13(6):40-43
- [3] 谷政,巴川江,主编.食物中毒预防诊断及处置.四川科学技术出版社,2002,358.
- [4] 吴俊,等.重庆市 1998-2002 年食物中毒情况分析.现代预防医学,2004,31(1),114.
- [5] 吴俊,等.2000 年重庆市食品污染状况调查.现代预防医学,2003,30(6),854.

(上接第 81 页)值时,总黄酮得率随着乙醇浓度的增加先增加后减小。随着微波功率的增加先增加减小。由图 6 可确定最佳的乙醇浓度 67.5%~72.5%,微波功率 450w~550w。

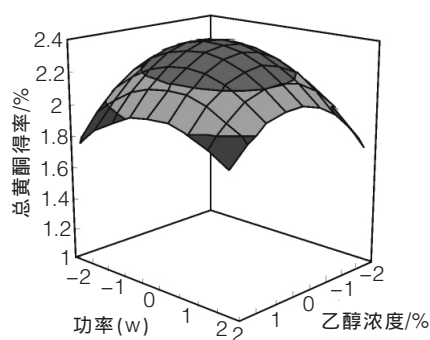


图 6 乙醇浓度和微波功率对总黄酮得率的响应面图
Fig.6 Response surface of alcohol density,microwave power on the yield of total flavone

3 结论

本试验利用试验设计软件 DPS (Digital Signal Processing),通过通用旋转试验建立了微波提取柑橘皮渣发酵液总黄酮的二次多项式数学模型,通过对该模型的方差分析,得到本试验所选用的二次多项式模型极显著性,通过对该方程中回归系数显著性

检验表明:一次项中乙醇浓度极显著,提取时间、微波功率显著,料液比不显著;料液比、提取时间、乙醇浓度、微波功率的二次项对总黄酮相对提取率影响线性效应极显著;交互项中,料液比和提取时间、提取时间和微波功率对总黄酮得率影响极显著,提取时间和微波功率、微波功率和乙醇浓度对总黄酮得率影响显著,其它不显著。通过响应面分析,得到了各因素的最佳范围。由方程求解可得最佳的提取工艺参数为:提取时间 50s,料液比 1:40,乙醇浓度 70%,微波功率 500w,可获得最大的总黄酮得率2.3700%。

参考文献:

- [1] 叶兴乾.柑橘加工与综合利用[M].北京:中国轻工业出版社.2005,1-50.
- [2] 王健、黄国林,柑橘皮中果胶的萃取方法研究进展[J].四川食品与发酵. 2007(4):12-15
- [3] 张代佳,刘传斌,修志龙,等.微波技术在植物胞内有效成分提取中的应用[J].中草药,2000,31(9):86-87.
- [4] 段胜林.微波辐射技术在食品萃取工业和化学工业上的应用[J].食品工业科技,1999,20(2):70-71
- [5] 王钦德,杨坚主编,食品试验设计与统计分析[M].中国农业大学出版社 2007.1.北京.330-416.

(上接第 84 页)

通过本试验利用微波辅助提取红橘种子中蛋白质,可得出微波处理能提高红橘种子蛋白质提取率,并通过正交试验得出影响红橘种子提取率的顺序为:pH 值>料液比>提取时间>微波功率,由单因素及正交试验,确定了微波辅助提取红橘种子最佳提取工艺条件:即提取时间为 50s、微波功率为 400w、pH 值为 12、料液比为 1:20。

参考文献:

- [1] 单杨主编.柑橘加工概论 [M]. 北京:中国农业出版社,

2004.

- [2] T.A.El-Adawy,A.A.El-BI-Bedawy,E.H.Raham,etc.Properties of Some Citrus Seed. Part 3.Evaluation as a New Source of Protein and Oil[J].Nahrung.1999,43(6): 385-391.
- [3] 王志祥,李红娟,万水昌,等.微波萃取技术及其在中药有效成分提取中的应用[J].时珍国医国药,2007,18(5):1245-1247.
- [4] 无锡轻工业学院,天津轻工业学院.食品分析.北京:中国轻工业出版社,1998:216-219.
- [5] 朱峰.红橘种子资源化利用的研究 [J]. 西南大学硕士论文,2009:37-40.