

核桃青皮中多酚的超高压提取工艺优化

Extra-high pressure extraction of polyphenols from walnut green peels by response surface methodology

宋丽军^{1,2} 侯旭杰^{1,2} 李雅雯³ 张 丽^{1,2}

SONG Li-jun^{1,2} HOU Xu-jie^{1,2} LI Ya-wen³ ZHANG Li^{1,2}

(1. 塔里木大学生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300; 3. 新疆食品检验所, 新疆 阿拉尔 843300)

(1. College of Life Sciences, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China; 2. Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory to Process of Agricultural Livestock Products in Southern Xinjiang, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China; 3. The Food Inspection of Southern Xinjiang, Alar, Xinjiang 843300, China)

摘要:为优化核桃青皮中多酚类物质的超高压提取工艺,以温度、压力、时间、液料比为自变量,多酚得率为响应值,进行响应面试验设计和优化,并建立预测数学模型。结果表明,超高压提取核桃青皮多酚最佳工艺为:采用超高压二次提取法,以 50% 乙醇—水为提取液,粉碎粒度 80 目,温度 42 ℃,压力 310 MPa,时间 6 min,液料比 40:1(V:m),该条件下多酚得率为 7.417 mg/g,获得的数学模型能够用于预测超高压提取核桃青皮多酚的过程。

关键词:超高压;核桃;青皮;多酚

Abstract: Studied the extra-high pressure extraction of polyphenols from Walnut green peels. The effect of operation conditions such as extraction temperature, pressure, time and ratio of material were analyzed. On the basis of single-factor test, the optimum extraction technology of walnut green peels polyphenols and mathematical regression model were established by response surface methodology. The results showed that the optimal extraction conditions were as followed: alcohol concentration of 50%, processing temperature of 42 ℃, extraction pressure of 310 MPa, extraction time of 6 min, ratio of liquid to material of 40:1(V:m). Under these conditions, the maximum predictive yield of polyphenols from walnut green husks was 7.417 mg/g, The standardized regression equation can be used to predict the extraction yield of polyphenols from walnut green

peels.

Keywords: extra-high pressure; walnut; green peels; polyphenols

核桃青皮,又称青龙衣,是核桃加工过程中的副产物,据统计^[1],截止 2010 年底,新疆核桃青皮产量已达到 13.41 万 t。核桃青皮中含有丰富的多酚类化合物,如绿原酸、香草酸、槲皮素、没食子酸、核桃酮等^[2-4],具有较强的抗氧化活性,有抗衰老、治疗心脑血管疾病、降血脂、抗癌、抗辐射等生理功能^[1,5]。但长期以来,核桃青皮均作为废渣抛弃,造成了极大的环境污染和资源浪费。

赵国建等^[6]分别比较了溶剂提取法、微波辅助提取法、超声波辅助提取法、六偏磷酸钠(SHMP)辅助提取法对核桃青皮多酚的提取效果,其中 SHMP 辅助提取法效果最佳,多酚得率为 4.01 mg/g,且需在 70 ℃继续提取 120 min;房祥军等^[7]采用 50% 丙酮—水溶液提取多酚得率为 4.71%,但需连续提取 3 次,总提取时间达到 4.5 h。传统的提取方法普遍存在提取时间长、温度高、提取效率低等缺点。

超高压处理可以破坏物料的细胞壁、细胞膜等结构,促使细胞内容物和提取溶剂充分接触,加快提取速度,具有提取率高、提取温度低,以及可避免热效应引起的有效成分损失和生理活性降低等优点^[8]。近年来,超高压提取技术已广泛应用于皂苷^[8]、多糖^[9]、茶多酚^[10]、齐墩果酸^[11]、茶树花精油^[12]等生物活性成分的提取研究中,并取得了良好的效果,但有关核桃青皮多酚的超高压提取研究却未见报道。本研究拟采用超高压技术提取核桃青皮中的多酚类物质,采用响应面法优化多酚提取工艺,为核桃青皮多酚类物质提取提供新方法。

基金项目:新疆兵团工业科技计划项目(编号:2012BA011);国家级大学生创新创业项目(编号:201310757009,TDGCX201246)

作者简介:宋丽军(1982—),男,塔里木大学讲师,硕士。
E-mail: slj176@163.com.

通讯作者:张丽

收稿日期:2015-03-27

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

核桃青皮:新疆薄皮核桃温 185 核桃青皮,树龄 21~23 年,2012 年 10 月 2 日购于新疆阿拉尔市。由于不同品种、生长期的核桃中多酚含量差异较大,本试验原料一次性采集。

福林—酚试剂、没食子酸:美国 Sigma 公司。

乙醇、无水碳酸钠等均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

减压干燥箱:DHG-9101-1S 型,上海鸿都电子科技有限公司;

恒温水浴锅:HH-S6 型,上海博讯事业有限公司医疗设备厂;

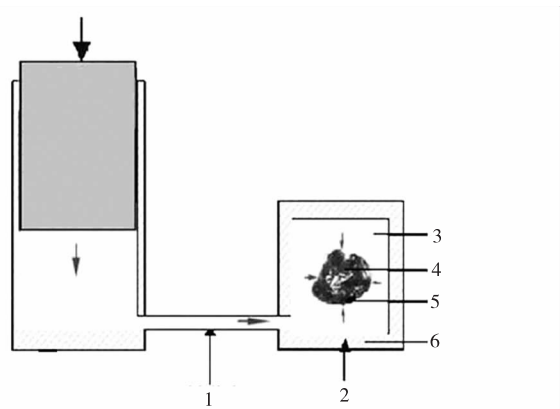
粉碎机:FZ102 型,北京市永光明医疗仪器厂;

台式高速冷冻离心机:Neofuge 15R 型,北京阳光思特生物技术有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-Mini1240 型,日本岛津公司;

电子天平:MA110 型,上海台衡仪器仪表有限公司;

超高压处理装置(图 1):HPP, L. 2-600/0.6 型,工作压力 0~600 MPa,工作温度-10~60 ℃,传压介质为水,天津市华泰森森生物工程技术有限公司。



1. 压力管路 2. 压力釜 3. 压力介质 4. 混合液
5. 真空包装 6. 循环水控温

图 1 超高压提取多酚示意图

Figure 1 The schematic diagram of extra-high pressure extraction

1.2 方法

1.2.1 提取工艺

核桃青皮→预处理→减压干燥→粉碎、过筛→样品、溶剂混合→真空包装→预热、超高压处理(间歇加压提取两次)→离心→上清液→测定总多酚

操作要点:核桃青皮切分后于 50 ℃减压干燥,粉碎,过 80 目筛,置于棕色瓶中密封,-18 ℃冷冻保藏备用。取 5 g 粉末与 50%乙醇—水混合,避光、真空包装,预热 3 min 后采用超高压提取 2 次,两次加压间隔时间 3 min(包含升降压时间),离心后取上清液,测定总多酚含量。

1.2.2 多酚类定性试验 参照文献[5]。

1.2.3 总多酚测定 采用福林—酚法^[6]。没食子酸标准溶液标准曲线为: $y = 0.1028x - 0.0084 (R^2 = 0.9986)$ 。样品中的多酚以没食子酸的含量表示,单位为 mg/g。多酚得率按式(1)计算:

$$R = \frac{m_2}{m_1} \tag{1}$$

式中:

R ——多酚得率,mg/g;

m_1 ——核桃青皮质量,g(干基);

m_2 ——核桃青皮提取液中多酚含量,mg(干基)。

1.2.4 单因素试验设计

(1) 压力对多酚提取效果的影响:以 50%的乙醇—水为提取溶剂,在保压时间 5 min、液料比 30:1 ($V:m$)、提取温度 40 ℃条件下,分别设置提取压力 100~600 MPa,研究提取压力对多酚提取效果的影响。

(2) 温度对多酚提取效果的影响:以 50%的乙醇—水为提取溶剂,在提取压力 300 MPa、保压时间 5 min、液料比 30:1 ($V:m$)条件下,分别设置提取温度 20~60 ℃,研究提取温度对多酚提取效果的影响。

(3) 时间对多酚提取效果的影响:以 50%的乙醇—水为提取溶剂,在提取压力 300 MPa、液料比 30:1 ($V:m$)、提取温度 40 ℃条件下,分别设置提取时间 2~7 min,研究提取时间对多酚提取效果的影响。

(4) 液料比对多酚提取效果的影响:以 50%的乙醇—水为提取溶剂,在提取压力 300 MPa、提取温度 40 ℃、提取时间 5 min 条件下,分别设置液料比 10:1~60:1 ($V:m$),研究液料比对多酚提取效果的影响。

以上试验均做 3 个平行,取平均值。

1.2.5 响应面优化试验 在单因素试验基础上,选取对核桃青皮多酚影响显著的因素,运用 Design Expert 8.05 软件,根据 Box-Behnken 试验设计原理,以多酚得率为响应值,进行响应面试验并对试验数据进行回归分析,优化核桃青皮多酚提取条件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 核桃青皮多酚提取液定性试验 由表 1 可知:定性试验均显示阳性结果,说明核桃青皮提取物中含有多酚类物质。

表 1 核桃青皮提取液多酚类定性试验

Table 1 Qualitative test of polyphenols extracted from walnut green peel

试验方法	现象	结果
加入 0.1%的 FeCl ₃	呈蓝色、墨绿色或蓝黑色	阳性
明胶沉淀法	出现沉淀	阳性
加入醋酸铅	红棕色或红褐色沉淀	阳性
加入盐酸和镁粉	粉红色泡沫	阳性

2.1.2 提取温度对多酚得率的影响 由于高温极易造成多酚类物质的损失,故本试验设定提取温度低于 60 ℃。由图 2 可知,在超高压条件下,温度对多酚得率有显著影响。20 ℃ 时多酚得率为 6.454 mg/g,40 ℃ 时多酚得率为 6.875 mg/g,增幅为 0.420 mg/g。当温度大于 40 ℃ 时,多酚得率增幅不显著。因此,后续试验提取温度选择 40 ℃。

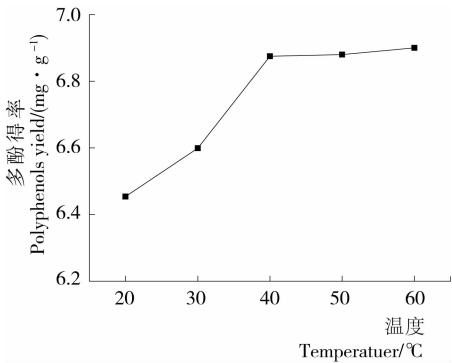


图 2 提取温度对核桃青皮多酚得率的影响
Figure 2 Effect of temperature on the extraction efficiency of polyphenols

2.1.3 提取压力对核桃青皮多酚得率的影响 由图 3 可知,当压力小于 300 MPa 时,随着压力的增大,多酚得率迅速增加,增幅达到 1.895 mg/g;当压力大于 300 MPa 时,随着压力的增加,多酚得率小幅度增加,增幅为 0.210 mg/g。本试验采用二次加压提取法,在升压和卸压过程中,对物料细胞造成极大的压力差,使细胞壁和细胞膜通透性发生变化,细胞内容物紊乱、外泄,增大了提取溶剂与有效成分的接触面积,降低了传质阻力,从而使其传质速率加快^[8],提高得率。考虑设备成本及效率,确定后续试验提取压力为 300 MPa。

2.1.4 提取时间对多酚得率的影响 由图 4 可知,提取时间对核桃青皮多酚得率有显著影响。当保压时间小于 5 min 时,随着时间的延长,多酚得率显著增加,增幅达到 1.883 mg/g;当时间为 5~8 min 时,多酚得率缓慢增加,增幅

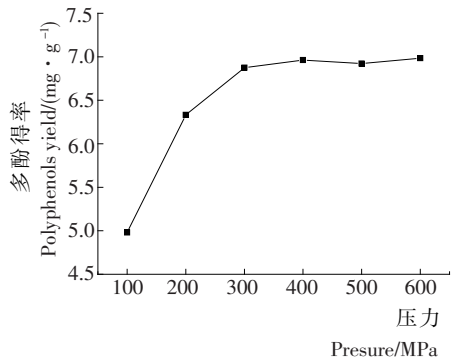


图 3 提取压力对核桃青皮多酚得率的影响
Figure 3 Effect of pressure on the extraction efficiency of polyphenols

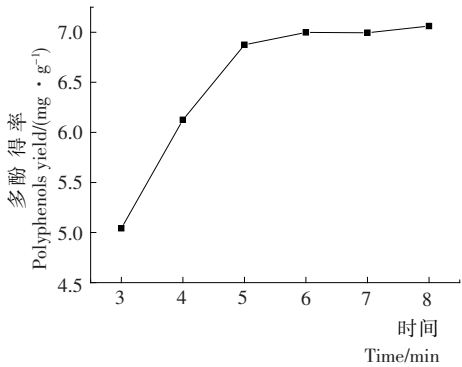


图 4 提取时间对核桃青皮多酚得率的影响
Figure 4 Effect of time on the extraction efficiency of polyphenols

只有 0.286 mg/g。可能是在高压条件下,物料细胞内产生剧烈的涡流扩散,有效成分传质速率快,因此在较短时间内(5 min)便可使细胞内部和外部的多酚浓度达到平衡;之后再延长保压时间,多酚也无法由细胞内部向提取溶液中扩散^[8]。因此,后续试验选择保压时间为 5 min。

2.1.5 液料比对多酚得率的影响 多酚类化合物的提取过程由渗透、溶解、扩散几个步骤组成,其中扩散为最主要的作用。提取过程中,溶剂与原料的比值越大,则浓度梯度越大,多酚的扩散速率越大^[13]。由图 5 可知:在液料比 10 : 1~30 : 1($V : m$) 范围内,随着溶剂量的增加,多酚得率由 3.942 mg/g 增加到 6.873 mg/g,增幅达到 2.991 mg/g;当液料比大于 30 : 1($V : m$) 时,增幅变缓,尤其是液料比大于 40 : 1($V : m$) 时,多酚得率基本趋于稳定。考虑到液料比过大,不仅会消耗大量的溶剂,而且会降低提取液中有效成分的浓度,给后续分离纯化过程带来困难^[10]。因此,后续试验选择液料比 1 : 30($m : V$)。

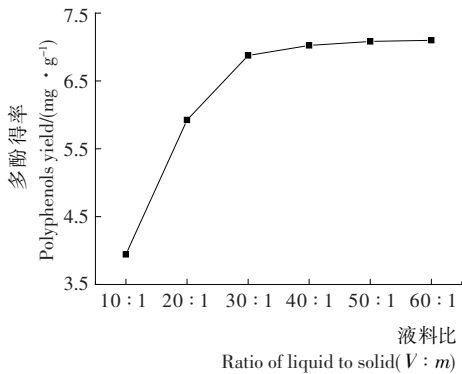


图 5 液料比对核桃青皮多酚提取率的影响
Figure 5 Effect of liquid ratio on the extraction efficiency of polyphenols

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计与结果 在单因素试验基础上,选取温度、压力、时间、液料比 4 个因素,运用 Design Expert 8.05 软件的 Box-Behnken 原理进行试验设计。各因素及水平见表 2,试验设计及结果见表 3。

表 2 响应面设计因素水平表

Table 2 Levels and codes of variables chosen for design					
编码	X ₁ 温度/℃	X ₂ 压力/MPa	X ₃ 时间/min	X ₄ 液料比(V : m)	
−1	30	200	4	20 : 1	
0	40	300	5	30 : 1	
+1	50	400	6	40 : 1	

表 3 响应面设计与试验结果

Table 3 The experimental and predicted values of polyphenols extraction						
序号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	实测值/ (mg · g ^{−1})	预测值/ (mg · g ^{−1})
1	−1	−1	0	0	6.228	6.290
2	+1	−1	0	0	6.330	6.372
3	−1	+1	0	0	6.904	6.868
4	+1	+1	0	0	7.040	6.984
5	0	0	−1	−1	5.905	5.752
6	0	0	+1	−1	6.352	6.317
7	0	0	−1	+1	6.751	6.791
8	0	0	+1	+1	7.183	7.342
9	−1	0	0	−1	6.021	6.012
10	+1	0	0	−1	5.938	5.976
11	−1	0	0	+1	6.958	6.910
12	+1	0	0	+1	7.143	7.142
13	0	−1	−1	0	6.015	5.988
14	0	+1	−1	0	6.784	6.792
15	0	−1	+1	0	6.773	6.755
16	0	+1	+1	0	7.124	7.141
17	−1	0	−1	0	6.204	6.283
18	+1	0	−1	0	6.423	6.475
19	−1	0	+1	0	6.982	6.934
20	+1	0	+1	0	7.015	6.940
21	0	−1	0	−1	5.486	5.533
22	0	+1	0	−1	6.365	6.476
23	0	−1	0	+1	7.020	6.913
24	0	+1	0	+1	7.203	7.160
25	0	0	0	+1	6.875	6.931
26	0	0	0	0	6.931	6.931
27	0	0	0	0	6.892	6.931
28	0	0	0	0	6.982	6.931
29	0	0	0	0	6.975	6.931

以多酚得率为响应值(Y),利用 Design Expert 8.05 软件对表 3 数据进行二次多元回归拟合,得到响应值对自变量的多元回归方程(2):

$$Y=6.93+0.049X_1+0.30X_2+0.28X_3+0.52X_4+8.50\times10^{-3}X_1X_2-0.047X_1X_3+0.067X_1X_4-0.10X_2X_3-0.17X_2X_4-3.75\times10^{-3}X_3X_4-0.16X_1^2-0.15X_2^2-0.12X_3^2-0.26X_4^2$$

(2)

由表 4 可知: $F_{\text{model}}=49.61$, $P<0.0001$,表明模型(2)极显著, $R^2=0.9802$,Adj $R^2=0.9605$,Adeq Precision = 27.068,说明该模型拟合程度良好,试验误差小,该模型可以用来分析和预测超高压提取核桃青皮多酚的效果。

表 4 试验结果方差分析表[†]

Table 4 Analysis of variance for quadratic regression equation						
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr>F	显著性
模型	5.992 6	14	0.428	49.61	< 0.000 1	* *
X ₁	0.029 2	1	0.029 2	3.385	0.087 1	
X ₂	1.060 9	1	1.060 9	123.0	<0.000 1	* *
X ₃	0.933 5	1	0.933 5	108.2	< 0.000 1	* *
X ₄	3.194 0	1	3.194	370.2	<0.000 1	* *
X ₁ X ₂	0.000 3	1	0.000 3	0.033	0.857 4	
X ₁ X ₃	0.008 6	1	0.008 6	1.002	0.333 7	
X ₁ X ₄	0.018 0	1	0.018	2.081	0.171 1	
X ₂ X ₃	0.043 7	1	0.043 7	5.063	0.041 0	*
X ₂ X ₄	0.121 1	1	0.121 1	14.04	0.002 2	*
X ₃ X ₄	6E−05	1	6E−05	0.007	0.936 8	
X ₁ ²	0.159 3	1	0.159 3	18.46	0.000 7	*
X ₂ ²	0.138 2	1	0.138 2	16.02	0.001 3	*
X ₃ ²	0.087 4	1	0.087 4	10.13	0.006 6	*
X ₄ ²	0.453 2	1	0.453 2	52.53	< 0.000 1	* *
残差	0.120 8	14	0.008 6			
失拟	0.111 6	10	0.011 2	4.855	0.070 7	
误差	0.009 2	4	0.002 3			
总和	6.113 3	28				

† * 表示 0.05 水平显著;* * 表示 0.01 水平显著。

模型(2)中一次项 X₂、X₃ 和 X₄ 极显著,交互项 X₂X₃ 和 X₂X₄ 显著,X₁²、X₂² 和 X₃² 显著,X₄² 极显著,其它不显著。对表 2 的数据进行回归分析,剔除不显著交互项,得到核桃青皮多酚得率(mg/g)对各自变量的标准回归方程(3):

$$Y=6.93+0.049X_1+0.30X_2+0.28X_3+0.52X_4-0.10X_2X_3-0.17X_2X_4-0.16X_1^2-0.15X_2^2-0.12X_3^2-0.26X_4^2$$

(3)

根据一次项自变量系数可知,各自变量对响应值的影响大小顺序为:X₄(液料比)>X₂(压力)>X₃(时间)>X₁(温度)。

图 6、7 为压力和时间、压力和液料比对核桃青皮多酚提取效果的影响,通过等高线及响应面图可直观地反映出不同变量间交互作用的显著程度,等高线越扁平说明因素之间交互作用越显著,对多酚得率的影响越大。由图 6、7 可知:压力和时间交互作用、压力和液料比交互作用的等高线均呈现椭圆、扁平状,表示上述因素之间的相互作用显著。

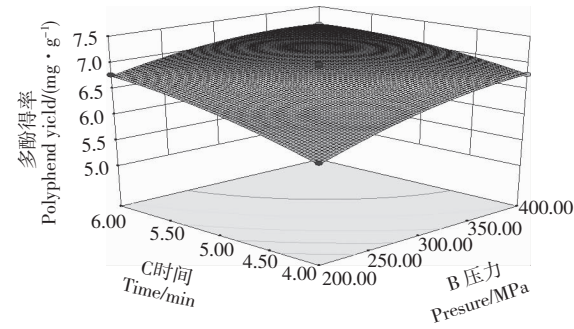


图 6 $Y=f(X_2,X_3)$ 的响应面和等高线图
Figure 6 Response surface and contours of $Y=f(X_2,X_3)$

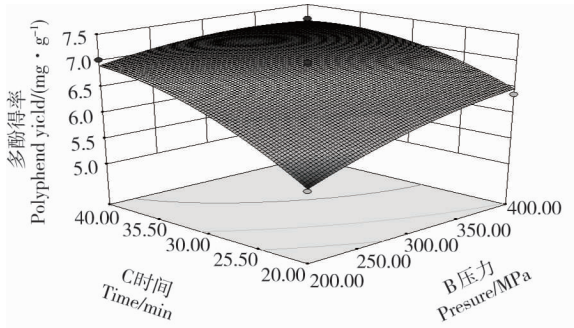


图 7 $Y=f(X_2,X_4)$ 的响应面和等高线图
Figure 7 Response surface and contours of $Y=f(X_2,X_4)$

2.2.2 验证实验结果 根据软件和模型进行参数优化分析,得到核桃青皮多酚超高压提取的最佳工艺条件为:温度 42.19 ℃,压力 309.09 MPa,时间 6.00 min,液料比 39.69 : 1 (V : m),在此条件下预测得率为 7.35 mg/g。结合实际操作情况,将上述最优工艺调整为:温度 42 ℃,压力 310 MPa,时间 6 min,液料比 40 : 1(V : m)。在此优化工艺条件下,3 次验证实验的多酚得率分别为 7.31,7.45,7.49 mg/g,平均值为 7.417 mg/g,验证值与预测值相对误差相差较小,说明了模型的有效性。

3 结论

本试验在单因素基础上,通过响应面法优化了超高压提取核桃青皮多酚的最佳工艺为:采用超高压二次提取法,以 50%乙醇—水为提取液,粉碎粒度 80 目,温度 42 ℃,压力 310 MPa,时间 6 min,液料比 40 : 1(V : m),此条件下多酚得率为 7.417 mg/g。本研究的不足之处在于未对超高压条件下多酚类物质的传质机理及其动力学进行深入研究,下一步需针对上述问题进行深入探讨。

参考文献

1 徐佳. 核桃外果皮多酚提取纯化及抗氧化活性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2012.
2 Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire M S, et al. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts[J]. Industrial Crops and

Products, 2013(42): 126~132.
3 Toshiyuki F, Hideyuki I, Takashi Y. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.) [J]. Phytochemistry, 2003 (63):795~801.
4 Ivo O, Anabela S, Isabel CFR, et al. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(7): 2 326~2 331.
5 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 50~63.
6 赵国建, 王向东, 王焕. 提取方法对核桃青皮多酚提取效果的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(1): 351~355.
7 房祥军, 邵海燕, 陈杭君. 正交试验法优化山核桃仁中总多酚的提取工艺参数研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 153~157.
8 陈瑞战. 超高压提取人参皂苷工艺及机理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2005.
9 凌庆枝, 李晓, 魏兆军, 等. 桑叶多糖超高压提取工艺研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 50~52.
10 张格, 张玲玲, 吴华, 等. 采用超高压技术从茶叶中提取茶多酚[J]. 茶叶科学, 2006, 26(4): 291~294.
11 董海丽, 陈怡平. 超高压提取木瓜中齐墩果酸的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(11): 125~127.
12 王娟, 央金卓嘎, 黄惠华. 茶树花精油超高压、超声波与微波辅助萃取工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 146~148.
13 江东文, 黄佳佳, 杨公明, 等. 响应面法优化超高压辅助提取茶多酚的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1 316~1 320.