

超声波辅助乙醇提取黄秋葵果渣多酚的工艺优化

Optimization on polyphenols ethanol extraction from okra marc by ultrasonic-assisted

程旺开

汤 强

许月明

童传旺

CHENG Wang-kai TAGN Qiang XU Yue-ming TONG Chuan-wang

(芜湖职业技术学院, 安徽 芜湖 241000)

(Anhui Institute of Technology, Wuhu, Anhui 241000, China)

摘要:以黄秋葵果渣为原料,研究超声波辅助乙醇提取多酚的工艺条件。在超声波功率 250 W 条件下,通过单因素试验探讨料液比、乙醇浓度、温度和时间对多酚提取率的影响;采用 Design Expert 8.0.6 软件中的 Box-Behnken 模块设计 3 因素组合试验,建立多项式回归方程,经响应面回归分析优化组合条件。结果表明,超声波辅助乙醇提取黄秋葵果渣多酚的最佳提取条件为液料比 25:1 (V:m),乙醇浓度 58%,温度 51℃,时间 89 min,黄秋葵果渣多酚提取率达 11.72 mg/g。

关键词:黄秋葵;果渣;多酚;超声波

Abstract: The process of polyphenols ultrasonic-assisted extraction from okra marc by ethanol was studied. Under the condition of ultrasonic power was set at 250 W, four groups of single factor tests were designed to investigate the effects of ratio of material to liquid, ethanol concentration, temperature and duration time on the ultrasonic extraction results of polyphenol from Okra marc. Box-Behnken experimental module in Design-Expert 8.0.6 software was used to design for the combination test of 3 factors, establishment of polynomial regression, response surface analysis and optimization by combination of conditions. Results: Under the conditions of ultrasonic power was 250 W, and the ratio of material to liquid was 25 mL:1 g, the optimized technological parameters for ultrasonic-assisted ethanol to extract polyphenol from Okra marc were: ethanol concentration 57.58%, temperature 51.16℃, and duration time 88.40 min, and the yields of extraction rate was 11.72 mg/g, which was the same as the prediction value in the model.

基金项目:安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2015A432);安徽省高校领军人才引进与培育计划项目(编号:gxfxZD2016361);芜湖职业技术学院 2014 年度科学研究项目(编号:Wzyzr201405)

作者简介:程旺开(1972—),男,芜湖职业技术学院副教授,硕士。

E-mail: ahwhcw@163.com

收稿日期:2015-11-21

Keywords: okra; pomace; polyphenol; ultrasonic

黄秋葵(*Abelmoschus esculentu*)别名秋葵、羊角豆,为锦葵科秋葵属的一年生草本植物^[1]。黄秋葵果实具有较高营养价值和显著保健功能,其富含黄酮、多酚、多糖等生物活性物质。有研究^[2-4]表明衰老小鼠适量摄入黄秋葵果实粉能显著提高免疫功能和抗疲劳能力。在美国和日本黄秋葵分别被冠以“植物伟哥”和“绿色人参”的美称^[5]。

黄秋葵的嫩果营养价值最高,但极不易保存,采摘后数小时就会发生品质劣化,2~3 d 就完全萎蔫或腐烂^[6]。因此黄秋葵除用作新鲜蔬菜食用外,还制备成黄秋葵果汁,用来加工酸奶、复合饮料等保健型饮品^[7-8]。而在黄秋葵果汁的制备过程中会产生大量的果渣,回收利用残渣内残存的活性物质可变废为宝,提高黄秋葵加工的经济效益,但目前还没有黄秋葵果渣多酚等活性物质提取利用的相关研究报道。

多酚的提取方法有很多,国内外主要有水提法、酶提法、有机溶剂法、微波提取法、超声波提取法等^[9-12]。超声波提取法是利用超声波所具有的机械、空化及热学效应,对物料的细胞壁造成破坏,促进细胞内物质释放、扩散及溶解,与常规提取法相比具有明显的优势^[13-14]。目前黄秋葵多酚提取主要采用酶法和超声波法。汪殿蓓等^[15]采用复合酶法提取黄秋葵嫩果多酚,多酚提取率达 29.156 mg/g,但提取时间将近 4 h;而刘怡彤等^[16]采用超声波法提取黄秋葵多酚和多糖,大大缩短了提取时间,但其多酚得率仅为 4.207 mg/g。超声波结合有机溶剂提取法是一种既能缩短提取时间又能提高提取效率的有效方法,被广泛应用于植物功能性物质的提取^[17-19]。但利用该方法提取黄秋葵多酚的研究尚未见诸于报道。因此,本试验拟采用超声波辅助乙醇提取黄秋葵果渣多酚,研究提取工艺条件中液料比、乙醇浓度、提取温度和提取时间等因素对黄秋葵果渣多酚提取的影响,并通过响应面试验优化提取工艺条件,以期黄秋葵资源的高效利用提

供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄秋葵果渣:本实验室黄秋葵嫩果榨汁后的残渣,经 60 ℃干燥至恒重,粉碎机中粉碎后过 40 目筛备用;

没食子酸:分析纯,阿拉丁试剂公司;

福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂:分析纯,上海荔达生物公司;

C₂H₅OH、Na₂CO₃:分析纯,天津博迪化工股份有限公司。

电热恒温鼓风干燥箱:JXL-011 型,金坛市金祥龙电子有限公司;

中草药粉碎机:DG120 型,浙江省瑞安市春海药材器械厂;

标准检验筛:φ100×40 型,浙江上虞华美仪器纱筛厂;

电子天平:PTX-JA510 型,广州市晶博电子有限公司;

电热恒温水浴锅:DZKW-D-6 型,上海科恒实业发展有限公司;

分光光度计:Tu-1800pc 型,北京普析仪器公司;

离心机:TDL-4 型,上海安亭科学仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的测定 参照文献[20]的方法,以没食子酸为标准品,采用 Folin-Ciocalteu 比色法,测定并绘制没食子酸标准曲线(见图 1),得标准曲线回归方程为: $y=0.1062x-0.0215$,其中 x 为没食子酸标准溶液浓度($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光度,相关系数为 $R^2=0.9936$ 。

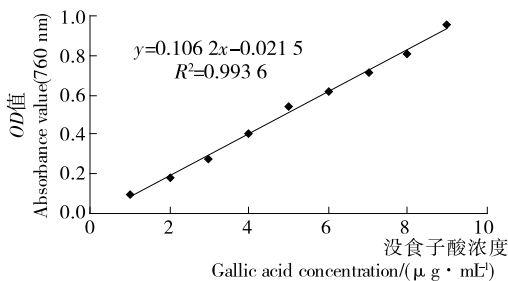


图 1 没食子酸标准曲线

Figure 1 Standard curve of gallic acid

1.2.2 样品中多酚的测定 吸取提取液 0.5 mL,然后加入 10%福林酚试剂 2.5 mL,充分摇匀。反应 5 min 后加入 7.5%的 Na₂CO₃溶液 5 mL,用水定容到 50 mL,50 ℃水浴锅中反应 5 min。室温避光保存 1 h,于波长 760 nm 处测定吸光度,以标准曲线回归方程和料液比计算多酚提取率。黄秋葵果渣多酚提取率按式(1)计算:

$$R = \frac{c_1}{c_2} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

R ——黄秋葵多酚提取率,mg/g;

c_1 ——提取液中多酚量,mg;

c_2 ——黄秋葵果渣量,g。

1.2.3 黄秋葵果渣多酚提取单因素试验

(1) 液料比对黄秋葵果渣多酚提取的影响:称取黄秋葵果渣粉末 1 g,加入 60%乙醇溶液,分别配成不同的液料比(10:1,15:1,20:1,25:1,30:1,35:1, $V:m$),在超声波功率 250 W、温度 50 ℃条件下作用 60 min,提取结束后在 3 500 r/min 下离心 15 min,测定上清液中多酚含量并计算多酚提取率,确定较好的料液比。

(2) 乙醇浓度对黄秋葵果渣多酚提取的影响:称取黄秋葵果渣粉末 1 g,加入液料比为 25:1($V:m$)的不同浓度(30%,40%,50%,60%,70%,80%)乙醇溶液,在超声波功率 250 W、温度 50 ℃条件下作用 60 min,提取结束后离心,测定上清液中多酚含量并计算多酚提取率,确定较好的乙醇浓度。

(3) 温度对黄秋葵果渣多酚提取的影响:称取黄秋葵果渣粉末 1 g,加入液料比为 25:1($V:m$)的 60%乙醇溶液,在超声波功率 250 W 条件下、在不同温度(30,40,50,60,70,80 ℃)条件下作用 60 min,提取结束后离心,测定上清液中多酚含量并计算多酚提取率,确定较好的提取温度。

(4) 时间对黄秋葵果渣多酚提取的影响:称取黄秋葵果渣粉末 1 g,加入液料比为 25:1($V:m$)的 60%乙醇溶液,在超声波功率 250 W、温度 50 ℃条件下提取不同时间(20,40,60,80,100,120 min),提取结束后离心,测定上清液中多酚含量并计算多酚提取率,确定较好的提取时间。

1.2.4 响应面法优化黄秋葵果渣多酚提取工艺试验 依据黄秋葵果渣多酚提取单因素试验结果,运用 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平的优化试验,即选乙醇浓度、温度、时间 3 个因素为自变量,每个因素取 3 个水平,以多酚提取率为响应值,通过响应面分析法优化超声波辅助乙醇提取黄秋葵果渣多酚的工艺条件。

2 结果与分析

2.1 黄秋葵果渣多酚提取单因素试验

2.1.1 液料比对黄秋葵果渣多酚提取的影响 由图 2 可知,黄秋葵果渣多酚提取率随液料比的增大而逐步提高,当液料比增大到 25:1($V:m$)以后,多酚提取率的提高将变缓慢,并随着液料比的进一步增大而有所降低。这是由于随着液料比的增加,固相和液相的接触面积增大,溶质与溶剂之间的浓度差增大,均有利于多酚物质的溶出,导致多酚提取率不断提高;随着液料比的继续增加,溶剂用量太大,会使热负荷增大,提取完全所需要的时间增加,导致在有限的时间

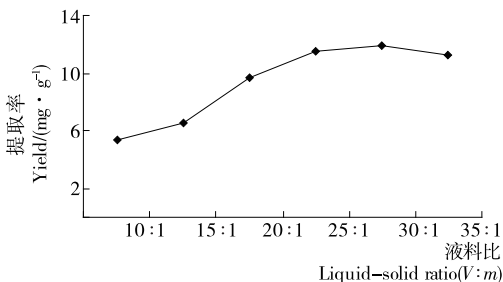


图 2 液料比对多酚提取的影响

Figure 2 Effect of different liquid-solid ratio on polyphenol yield

内提取不完全^[21]。综合考虑提取率及后续多酚分离纯化的成本,在后续的单因素试验及响应面优化试验中液料比均选择 25∶1(*V∶m*)。

2.1.2 乙醇浓度对黄秋葵果渣多酚提取的影响 由图 3 可知,随着乙醇浓度的加大,多酚提取率呈上升趋势,当乙醇浓度达到 60%时,多酚提取率达最大值,而后随着乙醇浓度的加大,多酚提取率反而逐渐降低,其原因可能是随着乙醇浓度的提高,溶剂与多酚极性差异增大,多酚类物质得不到充分的溶解,多酚提取量减少^[22]。因此,黄秋葵多酚提取溶剂乙醇的合适浓度为 60%。

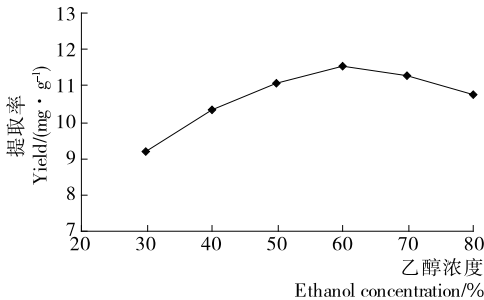


图 3 乙醇浓度对多酚提取的影响

Figure 3 Effect of different ethanol concentration on polyphenol yield

2.1.3 温度对黄秋葵果渣多酚提取的影响 由图 4 可知,温度会影响果渣多酚的提取,随着温度的升高,分子运动加快,多酚物质的渗出增多,在 50 ℃时多酚提取率达最高值,再随着温度的进一步升高,多酚物质的结构会受到损害,使其含量有所降低^[23]。因此,黄秋葵果渣多酚的合适提取温度为 50 ℃。

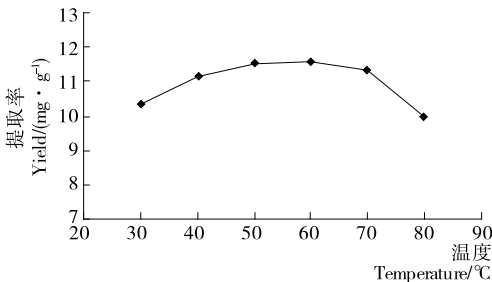


图 4 温度对多酚提取的影响

Figure 4 Effect of different temperature on polyphenol yield

2.1.4 时间对黄秋葵果渣多酚提取的影响 由图 5 可知,随着超声时间的延长,多酚在乙醇溶液中的溶出增多,在 80 min 时多酚提取率达最高,随着超声时间的延长,多酚提取率有所降低。这是由于在一定的温度下,随着时间的延长,也会对多酚的分子结构造成破坏^[24]。因此,合适的超声时间为 80 min。

2.2 响应面优化提取条件

2.2.1 响应面试验设计 根据单因素试验结果,选择乙醇浓度、温度和时间作为自变量并确定相应的水平(见表 1),以多酚提取率为响应值,进行响应面分析,其试验设计及结果见表 2。

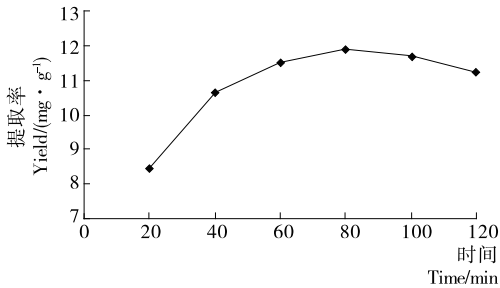


图 5 时间对多酚提取的影响

Figure 5 Effect of different time on polyphenol yield

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Levels of response surface experiments

编码	A 乙醇浓度/%	B 温度/℃	C 时间/min
—1	50	40	60
0	60	50	80
1	70	60	100

表 2 Box-Benhknen 设计及试验结果表

Table 2 Box-Benhknen experiment design and the results

试验号	A	B	C	Y 多酚提取率/(mg·g ⁻¹)
1	0	—1	1	11.47
2	0	0	0	11.85
3	0	0	0	11.79
4	1	—1	0	11.06
5	1	1	0	10.46
6	—1	0	—1	11.07
7	0	0	0	11.83
8	—1	1	0	11.46
9	0	1	1	11.47
10	1	0	—1	11.18
11	—1	—1	0	10.88
12	0	—1	—1	11.17
13	0	0	0	11.90
14	—1	0	1	11.55
15	0	0	0	11.91
16	1	0	1	10.96
17	0	1	—1	11.56

利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 中的数据进行分 析,得到黄秋葵果渣多酚提取率与乙醇浓度、温度及时间的 三次多项回归方程:

$$Y = 11.86 - 0.16A + 0.046B + 0.059C - 0.29AB - 0.17AC - 0.098BC - 0.56A^2 - 0.33B^2 - 0.11C^2. \quad (2)$$

由表 3 可知,回归方程的决定系数 $R^2 = 0.9836$,表明 98.36%的数据可以用本方程解释,该模型拟合度较好,可以 真实地描述乙醇浓度、温度及时间与多酚提取率之间的关 系。同时,失拟项 $P = 0.0817$ 不显著,说明试验误差小,回 归方程与实际情况吻合得较好,因此可用该回归方程来分析

和预测黄秋葵果渣多酚的提取。

由表 3 还可知,该模型的 $P<0.0001$,表明该试验所选模型高度显著,模型的一次项 A 极显著,二次项 A^2 、 B^2 极显著, C^2 显著,交互项 AB、AC 极显著,BC 显著,各因素对多酚提取率大小的影响依次是乙醇浓度>提取时间>提取温度。2.2.2 响应面图分析 根据回归方程,绘制 AB、AC、BC 响应面分析图和等高线图,确定各因素之间的交互作用及对多酚提取率的影响。图 6 表明,当 A(乙醇浓度)一定时,Y(多酚提取率)随着 B(温度)的提高,呈先升高后降低的趋势,当

B 一定时,Y 随 A 的提高也呈先升高后降低的趋势,且 A 在 55%~65%、B 在 45~55℃时,Y 值达最大。图 7 表明,当 A 一定时,Y 随着 C(时间)的延长,呈先升高后降低的趋势,当 C 一定时,Y 随 A 呈先升高后降低的趋势,A 在 55%~65%、C 在 76~100 min 时,Y 值达最大。图 8 表明,当 B 一定时,Y 随着 C 的延长,呈先升高后降低的趋势,当 C 一定时,Y 随 B 提高呈先升高后降低的趋势,B 在 45~55℃、C 在 76~100 min 时,Y 值达最大。在图 6~8 中的等线图都呈椭圆形,这表明乙醇浓度、温度和时间之间都存在较强的交互作用。

表 3 回归方程方差分析表[†]
Table 3 Variance analysis for the fitted regression model

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9	2.740	0.300	46.56	< 0.000 1	* *
A	1	0.210	0.210	32.36	0.000 7	* *
B	1	0.017	0.017	2.62	0.149 5	
C	1	0.028	0.028	4.23	0.078 7	
AB	1	0.350	0.350	53.33	0.000 2	* *
AC	1	0.120	0.120	18.77	0.003 4	* *
BC	1	0.038	0.038	5.83	0.046 5	*
A ²	1	1.320	1.320	201.73	< 0.000 1	* *
B ²	1	0.460	0.460	70.99	< 0.000 1	* *
C ²	1	0.048	0.048	7.35	0.030 1	*
残差	7	0.046	6.528E-003			
失拟项	3	0.036	0.012	4.81	0.081 7	
净误差	4	9.920E-003	2.480E-003			
总离差	16	2.780				

[†] * * 表示差异极显著, $P<0.01$; * 表示差异显著, $P<0.05$; $R^2=0.9836$, $R^2_{adj}=0.9624$ 。

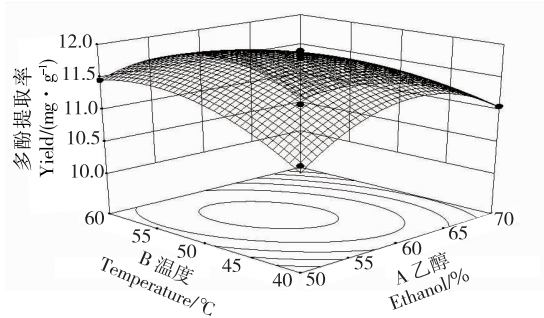


图 6 乙醇浓度和温度对多酚提取的影响

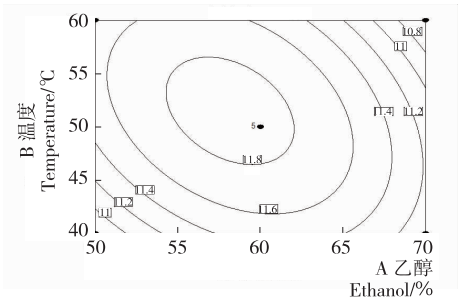


Figure 6 Response surface plot and contour plot effect of ethanol concentration and temperature on polyphenol yield

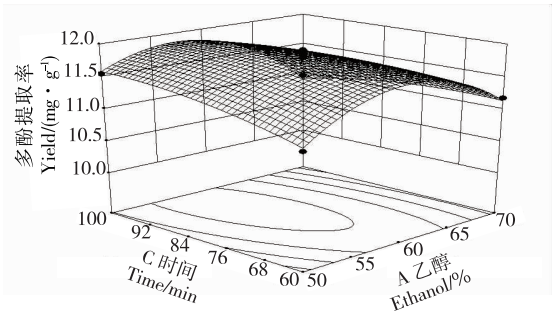


图 7 乙醇浓度和时间对多酚提取的影响

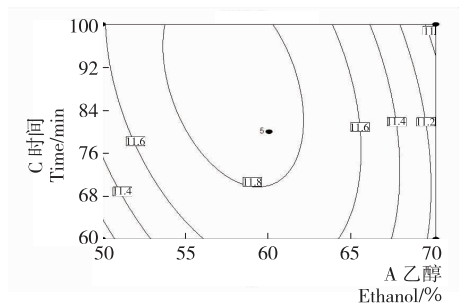


Figure 7 Response surface plot and contour plot effect of ethanol concentration and time on polyphenol yield

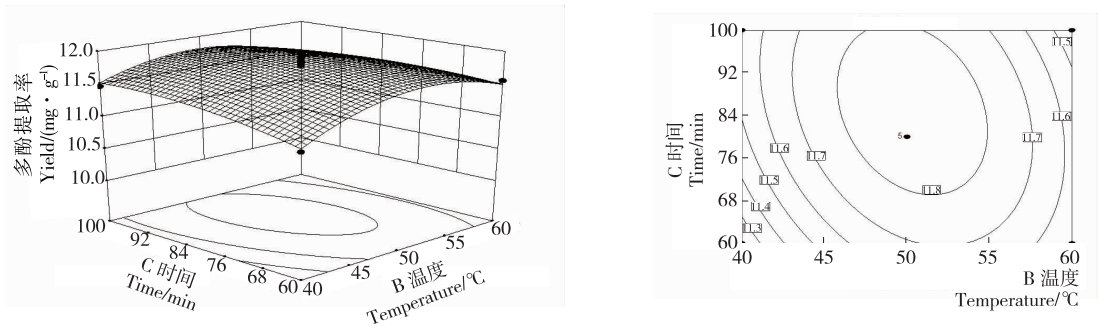


图 8 温度和时间对多酚提取的影响

Figure 8 Response surface plot and contour plot effect of temperature and time on polyphenol yield

2.2.3 最佳工艺验证实验 通过 Design Expert 8.0.6 软件分析,响应面模型中黄秋葵果渣多酚的最佳提取条件是:乙醇浓度 57.58%,温度 51.16 °C,时间 88.40 min,预测多酚的提取率为 11.89 mg/g。根据实际操作条件,在超声波功率 250 W,液料比 25:1(V:m)的条件下,选择乙醇浓度 58%,温度 51 °C,时间 89 min 进行 3 次验证实验,实验测得多酚平均提取率为 11.72 mg/g,该值与预测值非常接近,表明所优化的工艺稳定可行,可用于黄秋葵果渣多酚的提取。

3 结论

采用超声波辅助乙醇提取黄秋葵果渣多酚,响应面法优化提取工艺结果表明,乙醇浓度对多酚的提取率有极显著的影响,且与温度、时间有显著的交互作用,各提取条件与多酚提取率不是简单的线性关系。超声波辅助乙醇提取黄秋葵果渣多酚的最佳提取条件为:超声波功率 250 W,液料比 25:1(V:m),乙醇浓度 58%,温度 51 °C,时间 89 min,在此条件下黄秋葵多酚平均提取率达 11.72 mg/g。与单一提取方法相比,超声波辅助乙醇提取法可明显缩短时间,提高提取效率。由于本试验尚未考察黄秋葵果渣多酚的活性,下一步将开展多酚结构与活性方面的研究,为黄秋葵资源的高效利用提供理论依据。

参考文献

[1] 英杰. 黄秋葵的栽培技术[J]. 农村新技术, 2008, 5(3): 10-11.
[2] 刘娜. 黄秋葵的综合利用及前景[J]. 中国食物与营养, 2007 (6): 27-30.
[3] 李加兴, 陈选, 邓佳琴, 等. 黄秋葵黄酮的提取工艺和体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 121-125.
[4] 刘怡彤, 段振华, 马华林, 等. 超声波辅助提取黄秋葵多酚和多糖的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 247-149.
[5] 单承莺, 马世宏, 张卫民. 保健蔬菜黄秋葵的应用价值与前景[J]. 中国野生植物资源, 2012, 31(2): 68-71.
[6] 薛志忠, 刘思雨, 杨雅华. 黄秋葵的应用价值与开发利用研究进展[J]. 保鲜与加工, 2013, 13(2): 58-60.
[7] 李益恩, 何林富, 游敬刚, 等. 黄秋葵酸奶的研制[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(2): 82-85.
[8] 王仁哲. 黄秋葵复合果蔬汁饮料开发研究[D]. 成都: 西华大

学, 2014: 23-30.
[9] 伍鹤, 王远亮, 赵霖. 蓝莓多酚提取方法及功能活性研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 257-266.
[10] Haslam E. Vegetable tannins-lessons of a phytochemical life-time[J]. Phytochemistry, 2007, 68(22/24): 2 713-2 721.
[11] Duan Zhen-hua, Li Yan-lan, Wang Ju-lan. Study on the technology in extraction protein of fish swim bladder with ultrasonic treatment[J]. Advanced Materials Research, 2012, 396-398: 1 413-1 416.
[12] 金寒冰, 方丽, 赖蓓蕾, 等. 苦苣多酚超声辅助提取及抗氧化研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 211-215.
[13] 崔福顺, 李官浩, 金清. 超声波提取北五味子果实及茎叶总三萜的研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(7): 53-56.
[14] 刘鹏飞, 魏跃伟, 魏鹏程, 等. 不同方法提取辛夷挥发油化学成分与热失重分析的比较[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 170-176.
[15] 刘怡彤, 段振华, 马华林, 等. 超声波辅助提取黄秋葵多酚和多糖的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 247-249, 253.
[16] 汪殿蓓, 李建华. 复合酶法提取黄秋葵嫩果多酚的工艺优化[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(6): 909-914.
[17] 杨上莺, 贾冬英, 迟原龙, 等. 超声波辅助乙醇提取桑叶多酚的工艺条件优化[J]. 蚕业科学, 2013, 39(6): 1 155-1 159.
[18] 张俊生, 陈莉华, 侯孝璇, 等. 超声波辅助乙醇提取垂盆草中总黄酮及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 18-23.
[19] 张广文, 李爱梅, 葛婧, 等. 正交试验优化超声波辅助乙醇法提取米团花黄色素工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 27-30.
[20] 徐辉艳, 孙晓东, 张佩君, 等. 红枣汁中总酚含量的福林法测定[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(3): 126-128
[21] 阮征, 胡筱波, 赖富饶, 等. 油菜花粉中黄酮类物质提取工艺的优化研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 133-137.
[22] 陈纯, 王延圣, 罗自生, 等. 响应面法优化超声波提取甘蔗皮多酚的工艺条件[J]. 中国食品学报, 2013, 13(7): 95-100.
[23] 王晓阳, 唐琳, 赵奎. 响应面法优化刺槐花多酚的超声提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 66-70.
[24] Li Hua, Shen Jie. Research on the extraction of polyphenols from grape seed by ultrasonic[J]. Liquor-making, Science & Technology, 2005(5): 89-91.