

超声波—表面活性剂协同辅助提取 江永香柚籽多糖工艺的优化

Optimization on extraction of polysaccharides from seeds of *Citrus Grandis*
using surfactant assisted ultrasonic extraction

陈铁壁^{1,2} 赵昌会^{1,2} 何福林^{1,2} 邓胜国^{1,2} 邓欣蓓¹

CHEN Tie-bi^{1,2} ZHAO Chang-hui^{1,2} HE Fu-lin^{1,2} DENG Sheng-guo^{1,2} DENG Xin-bei¹

(1. 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199;

2. 湖南科技学院湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室, 湖南 永州 425199)

(1. Department of Biochemistry, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425199, China;

2. Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South,
Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425199, China)

摘要:以江永香柚籽为原料,通过单因素试验研究超声时间、表面活性剂、提取温度、提取时间、料液比和搅拌转速对江永香柚籽多糖提取率的影响,在该基础上对提取温度、提取时间和料液比进行响应面优化。结果表明,江永香柚籽多糖的最适提取工艺为:超声时间 4 min, SLS 表面活性剂用量 1.5%, 提取温度 71 °C, 提取时间 50 min, 料液比 1:20 (g/mL), 搅拌转速 150 r/min, 该条件下江永香柚籽多糖平均提取率为 4.69%。

关键词:江永香柚; 多糖; 超声波; 表面活性剂; 提取

Abstract: Polysaccharide was extracted from seeds of *Citrus Grandis* in Jiangyong using ultrasonic-assisted surfactant extraction. Based on the results of single-factor designs, three important factors including extraction temperature, extraction time and solid/liquid ratio were considered in the extraction process by the response Surface Method (RSM) with the Box-Behnken Design method. The results showed that the optimum extraction condition was as follows: ultrasound pretreated time of 4 min, extracting time of 50 min, extracting temperature of 71 °C, SLS addition of 1.5%, and a ratio of solid/liquid of 1:20 g/mL. The extraction yield of the polysaccharide could reach 4.69%.

基金项目:湖南省普通高等学校“十二五”重点建设学科(编号:2011-76);湖南省普通高等学校科技创新团队(编号:2012-318);永州市科技局科技计划项目(编号:永科发[2009]20号);湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心开放课题(编号:2016GCZX02)

作者简介:陈铁壁,男,湖南科技学院实验师,硕士。

通讯作者:邓胜国(1970-),男,湖南科技学院讲师,博士。

E-mail: dengsg-009@163.com

收稿日期:2016-04-25

Keywords: *Citrus grandis*; polysaccharides; ultrasound; surfactant; extraction

江永香柚(*Citrus grandis*)属于芸香科柚属,为湖南省永州市的著名特产,与香芋、香菇、香姜和香米并列“江永五香”,仅在永州市江永县有较大种植规模。目前江永香柚种植面积约 1 万 hm², 年产鲜柚 6~10 万 t, 深加工企业 3 家, 产值超过 2 亿元^[1]。香柚柚果鲜食或加工成罐头等食品后, 约产生 35%~55% 皮渣和果核, 多被废弃处理, 既污染环境又浪费资源^[2]。当前, 对香柚加工副产物柚皮开发利用的研究较多, 谭斌等^[3] 对江永香柚柚皮中挥发性成分进行了研究, 为江永香柚柚皮的深加工利用提供了理论依据; 刘小文等^[4] 采用响应面法优化了江永香柚皮多糖的提取工艺; 但对江永香柚籽的研究尚少。柚籽中含有大量脂类、多糖等成分, 张怡等^[5] 优化了超临界 CO₂ 萃取柚籽精油工艺条件, 可大大提高柚子精油的产率。经萃取出油后, 柚籽中仍含有大量柠檬苦素、多糖等活性成分; 邵金华等^[6] 分离纯化了江永香柚籽中的柠檬苦素, 但对江永柚籽多糖的研究尚无报道。

植物多糖作为一种重要的天然活性成分, 一直受到科研工作者的广泛关注^[7-9], 其具有抗氧化、抗衰老、抗癌、降血脂和抑菌等功效^[10]。至今为止, 柚子皮多糖已得到了较为有效的开发^[4, 11-12], 而对柚籽多糖的关注甚少。因此, 本试验拟优化超声波—表面活性剂协同辅助水提醇沉法提取江永香柚籽多糖的工艺, 旨在为提高江永香柚副产物的综合利用水平及提升其加工附加值提供试验依据, 对拓展和整合江永香柚产业链均具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

香柚籽:香柚籽取自新鲜江永香柚,参照文献[5]的工艺参数经超临界 CO₂ 萃取出油后,将剩余残渣用乙醚和超纯水分别充分洗涤,于 60 ℃ 下烘干粉碎过 60 目筛后备用;

葡萄糖标样:中国药品生物制品检定所;

其它试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

紫外可见分光光度计:UV-1750 型,日本岛津公司;

循环水式多用真空泵:SHB-Ⅲ型,郑州长城科工贸有限公司;

电子天平:TE124S 型,北京赛多利斯仪器系统有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-923A 型,宁波江南仪器厂;

集热式磁力搅拌器:HWCL-3 型,郑州长城科工贸有限公司;

旋转蒸发器:YRE-2000B 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

组织捣碎机:JJ-2 型,常州华普教学仪器有限公司;

超声波清洗器:SK8210HP 型,上海沪粤明科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 参照刘小文等^[4]的方法稍加改进。准确称取 1.25 g 葡萄糖,用超纯水溶解,定容至 250 mL。移取 1 mL 定容至 50 mL,即得 100 μg/mL 葡萄糖标准溶液。分别移取 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9 mL 葡萄糖标准溶液于 10 mL 具塞试管中,加超纯水至 1 mL,滴加 6% 苯酚 1 mL,加浓 H₂SO₄ 5 mL,操作过程中保持振荡。充分混匀后静止 15 min,以 1 mL 试剂空白为对照,于 490 nm 波长条件下测定吸光度值。分析得葡萄糖浓度(Y)与吸光度(X)的回归方程为:Y = 0.017 8X + 0.030 2(R² = 0.999 3)。

1.2.2 多糖的提取 参考朱开梅等^[13]的方法稍作修改。准确称取 2.0 g 柚籽粉末,置于 500 mL 烧杯中,按一定料液比加入超纯水,超声预处理后于磁力搅拌状态下加热浸提。提取完成后进行抽滤,并用超纯水洗涤滤渣多次,合并滤液。将所得滤液旋蒸至原体积的 1/4 后加入 3 倍体积的无水乙醇,醇沉过夜。次日将样品在 4 ℃ 下 5 000 r/min 离心 10 min,取沉淀溶解于 20 mL 蒸馏水中,充分溶解后分别加入 0.8 mL 正丁醇、3.2 mL 氯仿,充分振荡后静置分液,去上清液,重复上述醇沉步骤。将所得沉淀于 60 ℃ 干燥 4 h 备用。

1.2.3 多糖的测定 采用苯酚—硫酸法^[14]。将提取所得多糖溶于 500 mL 水中,取 2.0 mL 加入 50 mL 烧杯中,再依次缓慢加入 6% 苯酚 1.0 mL,浓 H₂SO₄ 5.0 mL,摇匀,静置至室温后于 490 nm 测其吸光度值。试验重复 3 次,取平均值。根据标准曲线回归方程计算多糖浓度,多糖提取率按式(1)计算:

$$\text{多糖提取率} = \frac{\text{多糖浓度} \times \text{稀释倍数}}{\text{干粉质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 单因素试验

(1) 超声时间对柚籽多糖提取率的影响:以提取率为考察指标,固定提取温度 70 ℃、提取时间 50 min、料液比 1:12 (mL/g)、搅拌速度 150 r/min、SLS 用量 1.0%,分别考察超声时间 2,4,6,8,10 min 时柚籽多糖提取率的变化。

(2) 不同表面活性剂不同用量对柚籽多糖提取率的影响:以提取率为考察指标,固定提取温度 70 ℃、提取时间 50 min、料液比 1:12 (mL/g)、搅拌速度 150 r/min,超声时间 6 min,分别考察 PEE-300、SLS 和 Tween-80 3 种表面活性剂在用量为 0.5%,1.0%,1.5%,2.0%,2.5% (相对柚籽的百分比)时柚籽多糖提取率的变化。

(3) 提取时间对柚籽多糖提取率的影响:以提取率为考察指标,固定提取温度 70 ℃、料液比 1:12 (mL/g)、搅拌速度 150 r/min,超声时间 6 min,SLS 用量 1.0%,考察提取时间为 40,50,60,70,80 min 时柚籽多糖提取率的变化。

(4) 提取温度对柚籽多糖提取率的影响:以提取率为考察指标,固定提取时间 50 min、料液比 1:12 (mL/g)、搅拌速度 150 r/min,超声时间 6 min,SLS 用量 1.0%,考察提取温度为 60,70,80,90,100 ℃ 时柚籽多糖提取率的变化。

(5) 料液比对柚籽多糖提取率的影响:以提取率为考察指标,固定提取温度 70 ℃、提取时间 50 min、搅拌速度 150 r/min,超声时间 6 min,SLS 用量 1.0%,考察料液比为 1:8,1:12,1:16,1:20,1:24 柚籽多糖提取率的变化。

(6) 转速对柚籽多糖提取率的影响:以提取率为考察指标,固定提取温度 70 ℃、提取时间 50 min、料液比 1:12 (mL/g)、搅拌速度 150 r/min,超声时间 6 min,SLS 用量 1.0%,考察转速为 125,150,175,200,225 r/min 时柚籽多糖提取率的变化。

1.2.5 响应面试验 在单因素试验基础上,固定超声时间 4 min、SLS 表面活性剂 1.5%、搅拌转速 150 r/min,以提取率为响应值,选取对香柚籽多糖提取率影响显著的 3 个因素:提取温度、提取时间和料液比,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计 3 因素 3 水平响应面试验,并对方程拟合的最适提取条件进行验证。

1.2.6 数据分析 采用 Origin 8.0、Design Expert 8.0.6 和 Office 2010 软件对数据进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 超声时间和表面活性剂对提取率的影响 由图 1(a) 可知,在超声功率为 360 W 的条件下,超声时间对柚籽多糖的提取影响显著(P < 0.05)。随着超声时间的延长,多糖提取率升高,当超声预处理时间超过 4 min,提取率变化不明显,甚至略有回落,可能是初始阶段超声波空化作用随超声时间的延长而增强,细胞壁破碎程度加大,多糖提取率不断升高;然而,随超声时间的进一步延长,在超声波的剪切作用下,液体温度过高,多糖大分子链遭到破坏,分解成小分子

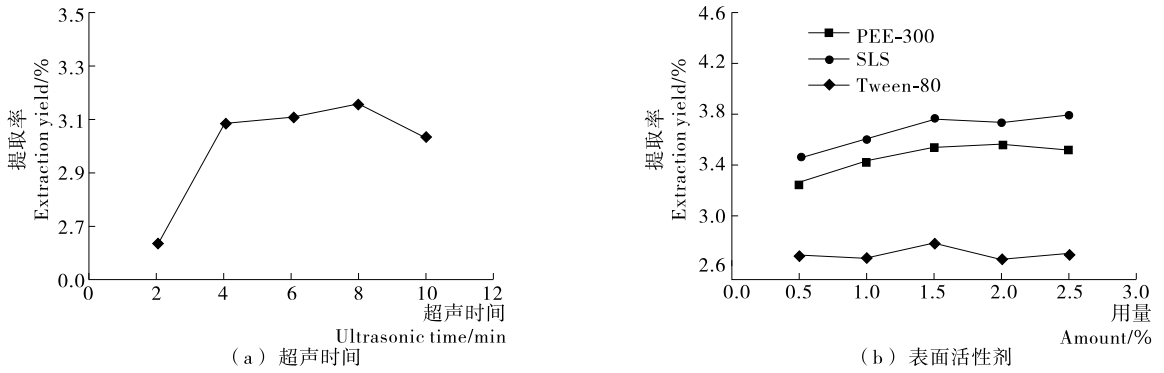


图 1 超声时间和表面活性剂对提取率的影响

Figure 1 Effects of different ultrasonic time and surfactant on the extraction efficiency

糖,在醇沉过程中发生损失,从而使多糖得率降低^[15-16]。因此,最佳超声时间为 4 min。由图 1(b)可知,PEE-300、SLS 和 Tween-80 对柚籽多糖提取率的影响差异显著($P < 0.05$),SLS 对柚籽多糖的提取更为有效,其最适用量为柚籽用量的 1.5%。

2.1.2 提取因素对提取率的影响 由图 2(a)可知,随提取温度的升高,柚籽多糖提取率呈先上升后下降的趋势,在 70 °C 时提取率达到最大,可能是高于 70 °C 后,多糖化学结构被破坏。故确定其优化范围在 70 °C 附近为宜。由图 2(b)可知,随提取时间的延长,柚籽多糖提取率逐渐增加,超过 50 min 后,其变化趋于稳定,故确定其最适提取时间为 50 min 左右。由图 2(c)可知,多糖提取率随着溶剂用量的增大而升高,其原因是溶剂用量增大,溶液黏度降低,多糖扩散阻力降低,有利于多糖的溶出,从而使多糖得率逐渐提高,但当溶剂

用量大于 20 mL 时,多糖提取率反而有所下降,因此选定液料比约 1 : 20(g/mL)提取柚籽多糖较为有利。由图 2(d)可知,搅拌速度对柚籽多糖提取率的影响不显著($P > 0.05$),以 150 r/min 为宜。因此最终固定磁力搅拌转速为 150 r/min,选取提取温度、提取时间和和料液比进行响应面试验。

2.2 响应面试验

根据单因素试验结果,选择提取温度、提取时间和料液比为自变量并确定其相应水平(见表 1),以多糖提取率为响应值,进行响应面分析,方案及结果见表 2。

采用 Design expert 8.0.6 软件对表 2 中的试验结果进行多项拟合回归,得到柚籽提取率 Y 对 A、B、C 的二次多项回归模型方程:

$$Y = 4.63 + 0.11A + 0.13B + 0.094C + 0.03AB + 0.1AC - 0.075BC - 0.78A^2 + 0.029B^2 - 0.37C^2 \quad (2)$$

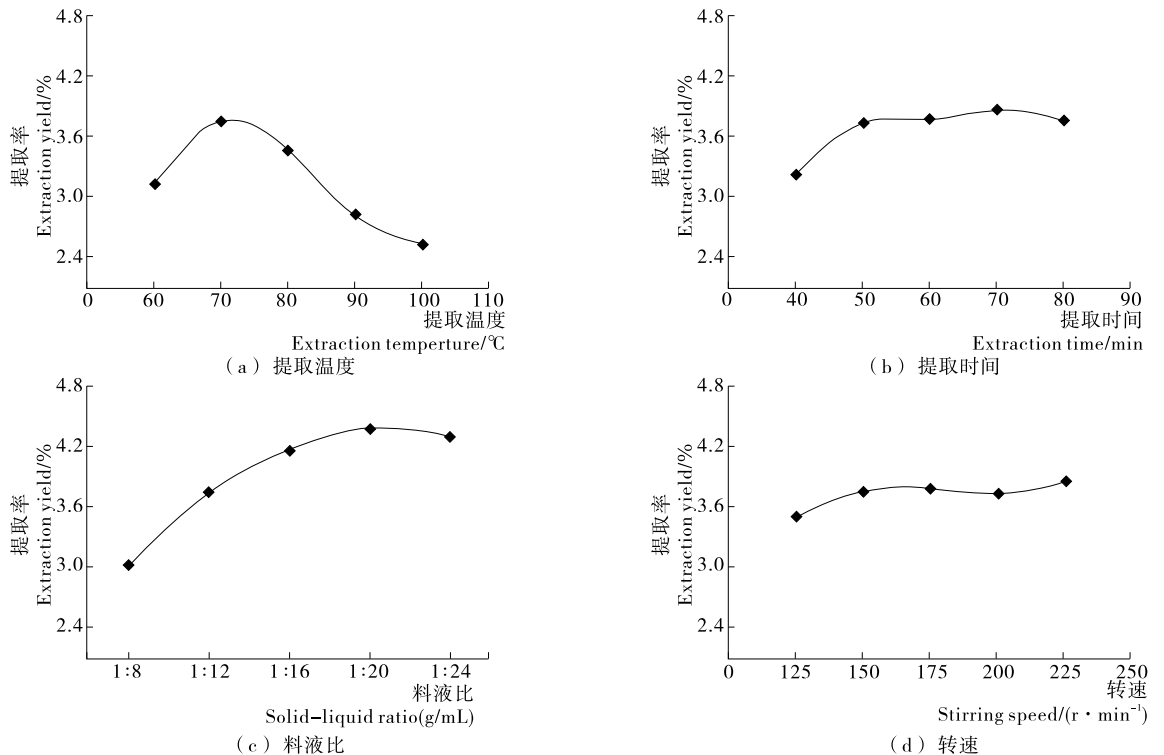


图 2 提取温度、提取时间、料液比和转速对提取率的影响

Figure 2 Effects of extracting temperature, extracting time, solid/liquid ratio and rotating speed on the extraction efficiency

表1 响应面法分析因素及水平

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

编码	A 提取温度/°C	B 提取时间/min	C 料液比(g/mL)
-1	60	40	1:16
0	70	50	1:20
1	80	60	1:24

表2 响应面试验方案与试验结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	Y 多糖提取率/%
1	-1	-1	0	3.64
2	1	-1	0	3.79
3	-1	1	0	3.92
4	1	1	0	4.19
5	-1	0	-1	3.31
6	1	0	-1	3.52
7	-1	0	1	3.44
8	1	0	1	3.69
9	0	-1	-1	4.08
10	0	1	-1	4.29
11	0	-1	1	4.32
12	0	1	1	4.50
13	0	0	0	4.63
14	0	0	0	4.54
15	0	0	0	4.67
16	0	0	0	4.74
17	0	0	0	4.59

2.3 方差分析

为了检验模型的有效性,区分各因素对柚籽多糖提取率影响的差异,对回归模型进行方差分析,结果见表3。

由表3可知,模型的F值75.32、 $P < 0.0001$,差异极显著;失拟项 $P = 0.5665$,差异不显著,说明试验误差较小;相关系数 $R^2 = 0.9898$,校正系数 $R_{adj}^2 = 0.9766$,说明响应值的变化97.66%源于所选因素提取温度、提取时间和料液比,模型拟合度良好;变异系数(CV)仅为1.77%,说明模型重现性好。一次项A、B、C及其二次项 A^2 和 C^2 的P值均小于0.01,达到极显著水平。各因素的效应关系为: $B > A > C$ 。根据回归方程所得不同因子的3D响应面图见图3,响应曲面坡度的陡峭程度反映操作条件改变时响应值敏感性的大小^[10],结合回归模型分析可知,AB的交互作用相对明显。

2.4 验证实验

用Design-expert 8.0.6软件分析拟合得到最适提取条件为提取温度70.91℃,提取时间60.00min,料液比1:20.48(g/mL),预测提取率4.81%。考虑到实际操作的可行性,并

表3 回归模型各项方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	3.5700	9	0.4000	75.32	<0.0001	**
A	0.0970	1	0.0970	18.39	0.0036	**
B	0.1400	1	0.1400	27.19	0.0012	**
C	0.0700	1	0.0700	13.36	0.0081	**
AB	0.0036	1	0.0036	0.68	0.4355	
AC	0.0004	1	0.0004	0.08	0.7908	
BC	0.0002	1	0.0002	0.04	0.8421	
A^2	2.5500	1	2.5500	484.50	<0.0001	**
B^2	0.0036	1	0.0036	0.68	0.4354	
C^2	0.5600	1	0.5600	107.01	<0.0001	**
残差	0.037	7	0.0053			
失拟项	0.014	3	0.0045	0.77	0.5665	
纯误差	0.023	4	0.0058			
总和	3.600	16				

[†] ** $P < 0.01$ 为极显著; * $P < 0.05$ 为显著; $R^2 = 0.9898$, $R_{adj}^2 = 0.9766$, $CV\% = 1.77\%$ 。

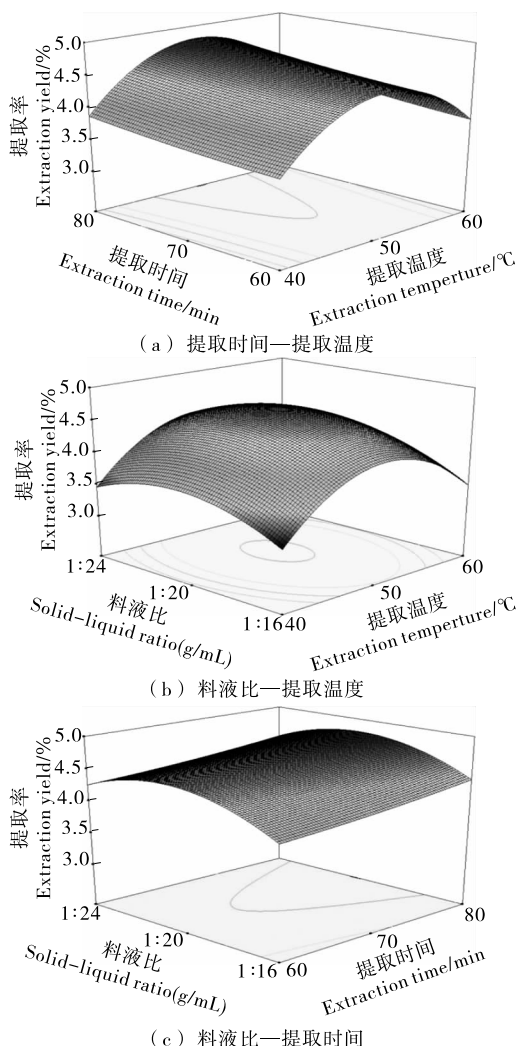


图3 各提取因素之间的交互作用

Figure 3 The mutual effects among the three factors

结合单因素试验结果,提取时间对提取率影响不大,从节约时间角度考虑,提取工艺可修正为:提取温度 71℃、提取时间 50 min、料液比 1:20(g/mL),在此条件下进行验证实验 3 次,测得柚籽多糖平均提取率为 4.69%,该值与预测值的相对误差仅为 2.37%,表明此工艺稳定可行。取消 SLS 添加和超声预处理,进行 3 次验证实验所测得柚籽多糖平均提取率仅为 2.98%,SLS 与超声预处理协同可使提取率提高 57.62%,具有明显的优势。

3 结论

表面活性剂与超声波协同辅助可大幅提高江永香柚籽多糖的提取率,其最佳提取条件为:超声预处理 4 min、SLS 用量 1.5%、提取温度 71℃、提取时间 50 min、料液比 1:20(g/mL)、搅拌转速 150 r/min,在此条件下提取率比常规方法(无超声预处理和 SLS 添加)提高 57.62%,提取率达 4.69%。由于本试验尚未考察江永香柚籽多糖的活性,下一步将对其结构与活性进行研究。

参考文献

- [1] 卢胜进. 新中国成立 60 年江永香柚产业发展回顾与展望[J]. 中国果业信息, 2010, 27(1): 10-12.
- [2] 卢胜进, 何爱光, 欧阳辉平. 江永香柚存在的问题与对策[J]. 中国果业信息, 2012, 29(12): 9-12.
- [3] 谭斌, 周玄德, 张友胜. 江永香柚柚皮中挥发性化学成分的 GC-MS 联用分析研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(5): 490-492.
- [4] 刘小文, 敖艳, 全沁果, 等. 响应面法优化江永香柚皮多糖的提

取工艺[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(4): 732-736.

- [5] 张怡, 陈鑫, 林旭, 等. 超临界 CO₂ 萃取柚籽精油工艺条件的优化[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2009, 38(2): 203-206.
- [6] 邵金华, 董加宝, 陈丽. 香柚籽中柠檬苦素的提取及纯化[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(11): 189-192.
- [7] 郭丹钊, 郑威, 马海乐, 等. 超声波辅助提取樟芝菌丝体活性物质的工艺研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 158-161, 178.
- [8] 赵玉红, 林洋, 张立刚, 等. 黑木耳多糖高剪切分散乳化法与酶法提取的比较研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 181-186.
- [9] 李敏杰, 熊亚, 韩何波. 白灵菇多糖提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 225-228.
- [10] YANG Bao, ZHAO Mou-ming, SHI John, et al. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 685-690.
- [11] 张锐, 孙美榕. 十二烷基伯胺乙酸盐盐析法提取柚子果皮胶多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(5): 120-122.
- [12] 张楠楠, 宗希明, 田丽华. 柚子皮中水溶性多糖的提取及含量测定[J]. 黑龙江医药科学, 2009, 4(32): 22-23.
- [13] 朱开梅, 顾生玖, 唐世锭, 等. 超声波法提取香蕉皮多糖的条件优化及其生物活性[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(25): 15 779-15 782.
- [14] 陈雅蕙, 陈来同. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2005: 235-237.
- [15] 陈红, 张波, 刘秀奇, 等. 超声波辅助提取水溶性大豆多糖及纯化工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 139-142.
- [16] 吴金松, 郑炯, 阙建全. 酶法辅助提取麻竹笋多糖[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(8): 258-262.

(上接第 102 页)

学方法模拟分析了 6 种不同 VIPs 覆盖率的厢体内部温度场分布情况,并对厢体的内部温度分布进行试验验证,得出以下结论:

(1) 增加嵌入 VIPs 的覆盖率可以改善厢体内部温度场均匀性。在相同制冷量的情况下,试验厢体内部的最大温差随 VIPs 的覆盖率增加而下降,87% VIPs 覆盖率厢体内部的最大温差相比全聚氨酯保温材料厢体下降了 40%。

(2) 不同壁板保温材料的厢体内部的降温幅度各不相同。相比全聚氨酯保温材料厢体,87% VIPs 覆盖率厢体的内部平均温降增加了 43%。随着 VIPs 覆盖率的增加,厢体内平均温降的变化趋势放缓。

参考文献

- [1] 温永刚, 王先荣, 董亮, 等. 真空绝热板(VIP)应用技术研究[J]. 低温工程, 2010(6): 29-32, 45.
- [2] ALAM M, SINGH H, LIMBACHIYA M C. Vacuum Insulation Panels (VIPs) for building construction industry - A review of the contemporary developments and future directions [J]. Applied Energy, 2011, 88: 3 592-3 602.
- [3] 娄宗瑞, 曹丹, 阚安康, 等. 冷藏集装箱内部温度场的特性研究[J]. 制冷, 2013, 32(1): 23-25.
- [4] 吕正光, 张贤中, 陈士发. 真空隔热板在冰箱上的应用研究[J]. 电器, 2013(S1): 670-673.

- [5] 韩佳伟, 赵春江, 杨信廷, 等. 基于 CFD 数值模拟的冷藏车节能组合方式比较[J]. 农业工程学报, 2013(19): 55-62.
- [6] 孙永才. 冷藏车热工性能分析及其真空隔热材料研制[D]. 广州: 广州大学, 2011: 3-6.
- [7] 刘杰坤, 陆华忠, 李君, 等. 冷藏运输车真空隔热厢体的温度场特性仿真研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 137-141.
- [8] 刘杰坤, 李君, 陆华忠, 等. 冷藏运输隔热车厢研究进展[J]. 食品工业, 2014(12): 203-207.
- [9] 赵春江, 韩佳伟, 杨信廷, 等. 基于 CFD 的冷藏车车厢内部温度场空间分布数值模拟[J]. 农业机械学报, 2013, 44(11): 168-173.
- [10] MOUREH J, DERENS E. Numerical modelling of the temperature increase in frozen food packaged in pallets in the distribution chain[J]. International Journal of Refrigeration, 2000, 23(7): 540-552.
- [11] LAGUERRE O, HOANG M H, FLICK D. Heat transfer modelling in a refrigerated display cabinet: the influence of operating conditions[J]. J. Food Eng., 2012, 108(2): 353-364.
- [12] 汤毅, 谢晶, 王金锋, 等. CFD 预测风机摆设形式对冷库的影响[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 124-128.
- [13] 杜子峥, 谢晶, 朱进林. 低温恒温箱的非稳态数值模拟及验证[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 126-132, 172.
- [14] 王文文. 冷藏车保温材料对内部环境影响的模拟研究[D]. 北京: 北京建筑工程学院, 2012: 12-14, 44.
- [15] 郭嘉明, 吕恩利, 陆华忠, 等. 冷藏运输厢体结构对流场影响的数值模拟[J]. 农业工程学报, 2012, 28(S1): 74-80.