

零余子粗多糖超声波辅助提取工艺优化

Optimization on ultrasound-assisted extraction process of crude polysaccharide from bulbil

任佳丽^{1,2} 黄仁贵¹ 李忠海^{1,2}

REN Jia-li^{1,2} HUANG Ren-gui¹ LI Zhong-hai^{1,2}

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004;

2. 稻谷及副产物深加工国家工程实验室, 湖南 长沙 410004)

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. National Engineering Laboratory for Rice and By-product Deep Processing, Changsha 410004, China)

摘要:利用响应面法优化零余子粗多糖的超声波辅助提取工艺。通过单因素试验考察液料比、超声功率与提取时间对粗多糖得率的影响。在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 中心组合方法设计试验,以粗多糖得率为响应值进行响应面分析,获得最优提取工艺为料液比 18:1 (mL/g)、超声功率 760 W、提取时间 23 min,粗多糖得率可达 60.68%,与预测值相对误差为 2.03%,结果表明预测值与试验值之间具有良好的拟合度,采用响应面法对零余子多糖超声波提取条件进行优化合理可行。

关键词:粗多糖;零余子;超声波

Abstract: Response surface analysis was proposed to optimize the ultrasound-assisted extraction process of crude polysaccharides from bulbils. The effects of solid-liquid ratio, ultrasonic power and extraction time on crude polysaccharide yield were investigated by single factor experiments. Response surface analysis was carried out by using the crude polysaccharide yield as response value and the box Behnken method to design the experiments. The optimum extraction conditions were obtained as follows: solid-liquid ratio, 18:1 (mL/g), ultrasonic power, 760 W; extraction time, 23 min and the crude polysaccharides yield could be up to 60.68%, which agreed with the predicted value (the relative error is 2.03%). The results demonstrated that it is reasonable and practicable to optimize the ultrasonic extraction process using response surface methodology.

Keywords: crude polysaccharide; bulbil; ultrasonic

基金项目:国家自然科学基金(编号:31340059);粮油深加工与品质控制湖南省 2011 协同创新项目(编号:湘教通[2013]448 号)

作者简介:任佳丽(1977—),女,中南林业科技大学副教授,博士。

E-mail: rjl_cl@163.com

收稿日期:2016-06-06

零余子,俗称“山药蛋”,有地方亦称“山药豆”,是薯蓣叶腋间的珠芽,呈卵圆形或椭圆形,直径约 0.4~2.0 cm,外表皮淡黄色,有细皱纹,气味淡而不苦,口嚼粘腻。山药零余子味甘温、无毒、主补虚、强腰脚、食之不饥,功能比山药还要强,自古就是营养价值很高的滋补食品和药用价值很高的药材,可提高人体免疫功能和抗病能力^[1]。研究发现,零余子主要含淀粉、多糖(包括黏液质及糖蛋白)、蛋白质,并含多种游离氨基酸、尿囊素、胆碱、淀粉酶、止杈素(又称脱落酸 d-absicisin)、多巴胺(dopamine)和山药素 I (batatasin I)等^[2];零余子多糖具有较好的抗氧化性与降血糖作用^[3-4]。

粗多糖是指复合型杂多糖,含有黏多糖、脂多糖、结合多糖(糖蛋白及黏蛋白)等杂质。研究显示,粗多糖具有降血脂^[5]、抗凝血^[6]、抗氧化^[7]等多种生物活性。其提取方法有热水浸提取^[8]、超声波辅助提取^[9]、微波辅助提取^[10]、酶法提取^[11]、超临界提取^[12]以及复合提取^[13]等。其中热水浸提法的时间长,得率低^[14-15];酶法提取成本高^[16],对反应条件温度、pH、底物浓度等较为敏感。超声波法辅助提取粗多糖,操作简单,而且由于超声波巨大的空化作用和强烈振动,可加速粗多糖进入溶剂,利于提取^[17]。

崔玮等^[18]利用响应面法优化了锁阳原花青素果胶酶辅助提取的工艺,其得率高于前人的研究结果。余洋定等^[19]及 Chen 等^[20]分别利用响应面分析优化果胶酶辅助提取裙带菜孢子叶多糖工艺和葡萄糖氧化酶辅助提取黄芪多糖的工艺;贾丽艳等^[21]利用复合酶法对零余子多糖进行了提取,但是利用响应面法优化零余子多糖的超声波辅助水提工艺尚未见报道。本研究拟采用响应面法对超声波辅助水提零余子粗多糖进行研究,旨在优化零余子粗多糖提取工艺,为进一步提高零余子综合利用价值提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

零余子:铁棍山药零余子,购于河南省焦作温县;
氢氧化钠、无水乙醇:分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司;
丙酮:分析纯,湖南汇虹试剂有限公司;
配制用水均为二次蒸馏水。

1.1.2 主要仪器设备

电热恒温水浴锅:DK-98-II 型,天津市泰斯特仪器有限公司;
电热鼓风干燥箱:101-2AB 型,天津市泰斯特仪器有限公司;
真空冷冻干燥机:LJG-10 型,北京松源华兴科技发展有限公司;
高速万能粉碎机:FW200 型,北京科伟永兴仪器有限公司;
超声波细胞粉碎机:JY 92-II 型,宁波新枝生物科技股份有限公司;
离心机:TD4K-Z 型,长沙市东旺实验仪器有限公司;
旋转蒸发器:Hei-VAP Precision 型,德国 Heidolph 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 零余子粗多糖提取工艺流程

零余子→去皮→切片→冷冻干燥→粉碎→过 60 目筛→超声波辅助水提取→离心取上清液(4 000 r/min 离心 20 min)→浓缩(60 ℃下旋转蒸发至原体积的 1/5)→醇沉(将 4 倍体积的 95%乙醇水溶液缓缓倒入浓缩液中,边倒边搅拌,静置过夜)→离心取沉淀(4 000 r/min 离心 20 min;沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤)→干燥(60 ℃鼓风干燥箱中烘干至恒重)→粗多糖

1.2.2 粗多糖得率计算 按式(1)进行。

$$P = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

P ——粗多糖得率,%;

m_1 ——粗多糖的质量,g;

m_2 ——零余子粉的质量,g。

1.2.3 单因素试验设计 准确称取零余子粉 3 g,置于小烧杯中,考察液料比、超声功率与超声时间对粗多糖得率的影响。

(1) 超声功率对粗多糖得率的影响:在超声时间 20 min,液料比为 25:1(mL/g),超声功率分别为 440,560,680,800,920 W 的条件下,考察超声功率对零余子粗多糖得率的影响。

(2) 液料比对粗多糖得率的影响:在超声时间 20 min,超声功率 920 W,液料比分别为 10:1,15:1,20:1,25:1,30:1(mL/g)的条件下,考察液料比对零余子粗多糖得率的

影响。

(3) 提取时间对粗多糖得率的影响:在超声功率 920 W,液料比为 15:1(mL/g),超声时间分别为 5,15,25,35,45 min 的条件下,考察超声时间对零余子粗多糖得率的影响。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 试验设计,以超声功率、液料比、提取时间为影响因素,零余子粗多糖得率为响应值,进行响应面法优化零余子粗多糖的超声波提取工艺。

1.2.5 数据处理 每个试验进行 3 次重复,单因素试验中利用 origin 8.5 作图,优化试验中利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行数据分析、统计及作图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 超声功率对粗多糖得率的影响 由图 1 可知:在所选超声功率范围内,零余子粗多糖得率呈现出随着超声功率的增大而增加的趋势。其中,当超声功率在 440~800 W 变动,粗多糖得率的增幅较为微小,变化缓慢;当超声功率超过 800 W,零余子粗多糖得率增幅显著。考虑到所使用仪器最大功率只有 1 000 W,因此将超声功率 920 W 设置为+1 水平,将 800 W 设置为 0 水平。

2.1.2 液料比对粗多糖得率的影响 由图 2 可知:在所选液料比的范围内,零余子粗多糖得率随着液料比的增加,呈现出先增加后降低的大致趋势,其中在 15:1(mL/g)左右达到最大值。可能是溶剂不断增多,利于零余子多糖的溶出;随

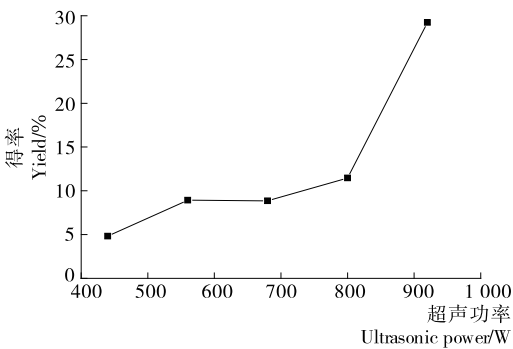


图 1 超声功率对得率的影响
Figure 1 Effect of ultrasonic power on yield

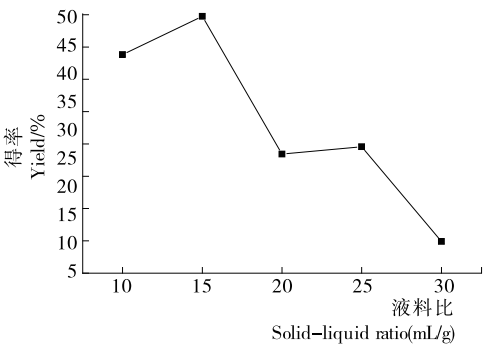


图 2 液料比对得率的影响
Figure 2 Effect of solid-liquid ratio on yield

着溶剂继续增加,零余子多糖在巨大的空化作用下开始水解,导致其含量降低。因此,将液料比拟定在 15:1(mL/g)左右,这个结果与官波等^[22]对山药多糖提取工艺的优化结果相似。

2.1.3 提取时间对粗多糖得率的影响 由图 3 可知:在所选提取时间的范围内,零余子粗多糖得率呈现出先增加后降低的趋势。其中,提取时间在 5 min 到 10 min,粗多糖得率急剧上升;在时间为 15 min 左右达到最大值。可能是随着提取时间的延长,零余子多糖的溶出逐渐增多;当超声时间继续延长,零余子多糖反而被降解,导致粗多糖得率降低。因此,将提取时间拟定在 15 min 左右。

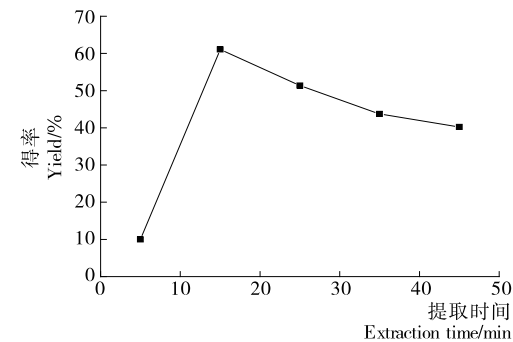


图 3 提取时间对得率的影响

Figure 3 Effect of extraction time on yield

2.2 超声波辅助提取零余子粗多糖工艺的优化

2.2.1 响应面分析因素水平的选取 在单因素试验结果的基础上,根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,综合考虑单因素影响试验的结果,选取液料比、超声功率与提取时间为影响因子,采用三因素三水平的响应面分析方法,各因素的水平及编码见表 1。

表 1 零余子粗多糖提取响应面分析因素水平表

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design test on extraction conditions of crude Polysaccharide from bulbils

编码水平	X ₁ 液料比 (mL/g)	X ₂ 超声功率/ W	X ₃ 提取时间/ min
−1	10	680	5
0	15	800	15
1	20	920	25

2.2.2 响应面分析方案及结果 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,试验方案及结果见表 2。

利用软件 Design expert 8.0.6,以零余子粗多糖得率为响应值进行分析,经回归拟合后得出,各影响因子对响应值的影响可用式(2)函数表示,回归分析见表 3。

$$Y=51.27+11.76X_1+0.90X_2+19.50X_3+1.50X_1X_2+9.41X_1X_3+1.32X_2X_3-8.90X_1^2-4.46X_2^2-17.98X_3^2$$
 (2)

由表 3 可知,回归模型具有较高的 F 值(F=18.59)和极低的 P 值(P=0.000 4),模型显著性良好。其中,X₁(液料

表 2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Program and experimental results of RSA

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y 得率/%
1	−1	−1	0	22.81
2	1	−1	0	52.50
3	−1	1	0	20.32
4	1	1	0	56.02
5	−1	0	−1	9.36
6	1	0	−1	4.90
7	−1	0	1	25.07
8	1	0	1	58.24
9	0	−1	−1	6.89
10	0	1	−1	7.33
11	0	−1	1	47.72
12	0	1	1	53.42
13	0	0	0	48.57
14	0	0	0	49.15
15	0	0	0	57.90
16	0	0	0	51.03
17	0	0	0	49.72

表 3 回归分析结果[†]

Table 3 Analysis results of regression

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值	P 值	显著性
模型	6 444.45	9	716.05	18.59	0.000 4	* *
X ₁	1 106.85	1	1 106.85	28.74	0.001 1	* *
X ₂	6.43	1	6.43	0.17	0.695 1	
X ₃	3 040.83	1	3 040.83	78.96	<0.000 1	* *
X ₁ X ₂	9.03	1	9.03	0.23	0.643 0	
X ₁ X ₃	354.00	1	354.00	9.19	0.019 1	*
X ₂ X ₃	6.92	1	6.92	0.18	0.684 4	
X ₁ ²	333.85	1	333.85	8.67	0.021 6	*
X ₂ ²	83.64	1	83.64	2.17	0.184 0	
X ₃ ²	1 360.73	1	1 360.73	35.34	0.000 6	*
残差	269.56	7	38.51			
失拟项	211.36	3	70.45	4.84	0.080 8	
纯误差	58.20	4	14.55			

[†] 决定系数 R²=0.959 9,调整决定系数 adj-R²=0.908 2;* * 表示 P<0.01 极显著,* 表示 P<0.05 显著。

比)、X₃(提取时间)对响应值影响极显著,X₂(超声功率)在所选范围内对响应值无显著影响;对于 3 个影响因子的交互作用,只有 X₁、X₃交互作用明显,显著影响零余子粗多糖得率。本试验结果中,决定系数(R²)为 0.959 9,表明此模型下零余子粗多糖得率的实验值与预测值具有较好的一致性^[23],调整决定系数(adj-R²)为 0.908 2 说明零余子粗多糖得率总变异中大约 90.82%是由独立变量决定的;另外,失拟项的 F 值为 4.84,P 值为 0.080 8,相对于纯误差不显著,因此,回归模型具有更高的适合度^[24]。

2.2.3 响应面图与等值线图分析 根据回归模型绘制相应

响应曲面图与等值线图,分析各参数对零余子粗多糖得率的影响,结果见图 4~6。其中,由图 4 可知,超声功率对零余子粗多糖得率的影响不明显,而得率随着相应的液料比从-1 水平到+1 水平变化,呈现出增加的趋势,可能是溶剂含量的增大,加速了多糖的溶出,致使得率提高。但液料比不宜过大,当液料比接近+1 水平,零余子粗多糖得率下降,可能是水分含量增加,部分多糖开始降解。由图 5 可知,液料比与提取时间两个因子在所取水平内,粗多糖得率呈现出先增加后降低的整体趋势,对零余子多糖得率影响显著,二者交互作用明显。可能是随着时间的延长,零余子多糖的溶出逐渐增多;当时间超过 15 min,多糖逐渐降解,致使粗多糖得率下降。图 6 与图 4 相似,表明超声功率对零余子粗多糖得率

影响不显著,而超声时间的延长,导致粗多糖得率先增加后降低。

利用 Design expert 软件,结合回归模型与响应面与等值线图分析得出零余子粗多糖超声波提取的最佳工艺条件为:料液比 17.8 : 1 (mL/g)、超声功率 760.4 W、超声时间 22.9 min。该条件下,预测零余子粗多糖得率可达 61.94%。

2.3 验证实验结果

考虑到实际操作的方便性,将最佳提取工艺调整为:料液比 18 : 1 (mL/g)、超声功率 760 W、提取时间 23 min。在修正后的优化工艺条件下,平行实验 3 次,得出零余子粗多糖得率为 60.68%,与预测值相对误差为 2.03%,表明预测值与实验值存在较好的一致性,说明本回归模型准确且较为可

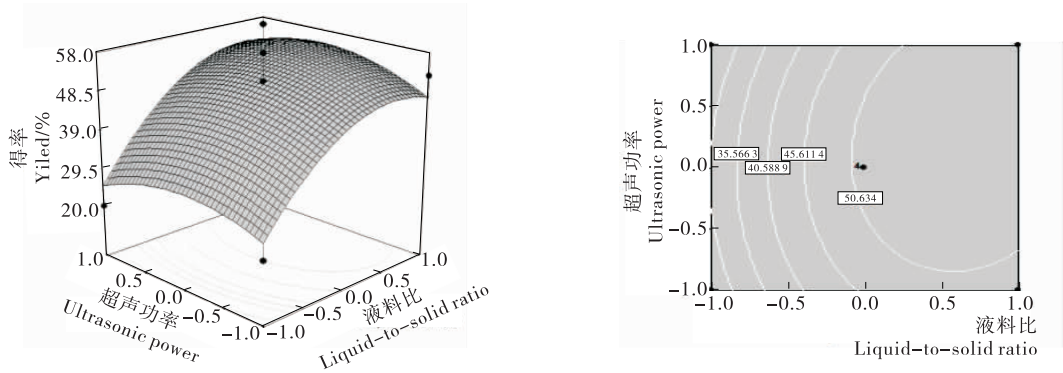


图 4 液料比与超声功率交互作用对零余子粗多糖得率的影响

Figure 4 Effect of liquid-to solid ratio and ultrasonic power on the yield of bulbil crude polysaccharide

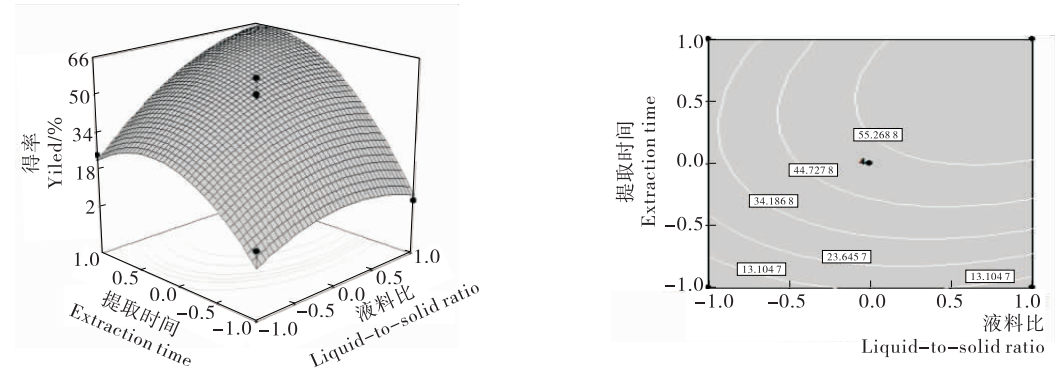


图 5 液料比与提取时间交互作用对零余子粗多糖得率的影响

Figure 5 Effect of liquid-to solid ratio and extraction time on the yield of bulbil crude polysaccharide

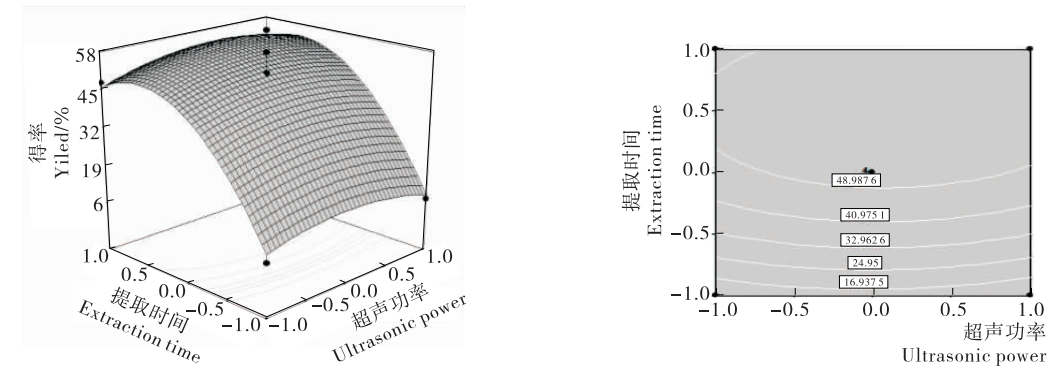


图 6 超声功率与提取时间交互作用对零余子粗多糖得率的影响

Figure 6 Effect of ultrasonic power and extraction time on the yield of bulbil crude polysaccharide

靠,具有一定的应用价值。

3 结论

在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 设计试验,以液料比、超声功率与提取时间为影响因子,零余子粗多糖得率为响应值,进行响应面法优化零余子粗多糖的超声波提取工艺,得出最佳提取工艺条件为:料液比 18:1(mL/g)、超声功率 760 W、提取时间 23 min。在此优化条件下,预测得率达到 61.94%。验证实验表明,预测值与实验值存在较好的一致性,此回归模型重复性较好,对于优化零余子多糖的超声波法提取工艺是合理的,在零余子综合利用方面具有一定的应用价值。

研究结果显示,超声波辅助水提取可以提高零余子粗多糖得率,具有较大应用前景。然而,该法得出的多糖为粗多糖,含有蛋白质、核酸及无机盐等杂质,零余子粗多糖的纯化、结构鉴定以及纯化后多糖的抗氧化、降血脂、抗疲劳等生物活性有待待深入研究。另外,多糖结构复杂,不同的提取方式可能在一定程度上影响活性功能,因此,研究提取方式对零余子多糖的生物活性影响亦具有重要意义。

参考文献

[1] 都恒青. 常用中药材品种整理和质量研究(北方篇): 第二册 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995: 1 089.

[2] 盛玮, 薛建平, 谢笔钧. 怀山药零余子化学成分及其营养评价 [J]. 食品科技, 2009, 34(8): 76-79.

[3] 薛建平, 祝红蕾, 尧俊英. 铁棍山药及其零余子营养成分的比较研究[J]. 食品工业科技, 2008(8): 268-269.

[4] LIANG Xiao, HUANG Yue-qin, CHEN Jian-ping, et al. Antioxidant of polysaccharides in yam bulbils and their hypoglycemic effect in diabetic mice[J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(7): 1 332-1 335.

[5] 李孟婕, 范秀萍, 吴红棉, 等. 翡翠贻贝粗多糖降血脂作用的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 257-261.

[6] 王娜, 冯艳凤, 范会平, 等. 大枣粗多糖体外抗凝血活性的差异化研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 34-39.

[7] 邱松山, 周天, 姜翠翠. 无花果粗多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 40-42.

[8] 傅冬和, 张影, 曾婷玉, 等. 洋葱水溶性多糖的提取工艺研究

[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 125-127.

[9] 李宏睿, 陶浚, 董兵兵, 等. 超声波辅助提取香菇多糖工艺优化 [J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 138-140.

[10] 侯秀娟, 沈勇根, 徐明生, 等. 响应曲面法优化微波萃取化橘红多糖[J]. 中国食品学报, 2013, 13(3): 101-109.

[11] 付宏媛, 张坤生, 任云霞. 酶解法提取甘薯多糖技术研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(2): 128-132.

[12] 盛桂华, 周泉城. 超临界 CO₂萃取瓜蒌多糖工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 208-210.

[13] 李倩, 田春芳, 刘雯霞, 等. 超声波复合酶法提取软紫草多糖的工艺优化[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(6): 498-503.

[14] YUAN Qing-xia, XIE Yu-feng, WANG Wei, et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from mulberry (Morus alba L.) leaves[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 128(5): 52-62.

[15] 秦培鹏, 刘涛. 猴头菌多糖热水浸提工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(15): 4 784-4 786.

[16] 金迪, 梁英, 孙工兵, 等. 植物多糖提取技术的研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2011, 23(5): 76-79.

[17] 覃海元, 潘嫣丽, 覃梅珍. 热水与超声波提取鹿角灵芝多糖工艺比较研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(3): 91-95.

[18] 崔玮, 张勇, 高海宁, 等. 响应面法优化果胶酶辅助提取锁阳原花青素的工艺[J]. 食品科学, 2016, 37(14): 1-9.

[19] 余洋定, 启航, 李冬梅, 等. 果胶酶辅助提取裙带菜孢子叶多糖的工艺条件优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 175-177.

[20] CHEN Hua-guo, ZHOU Xin, ZHANG Jun-zeng. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from Astragalus membranaceus[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111(13): 567-575.

[21] 贾丽艳, 任盛财. 复合酶法提取零余子多糖工艺的优化[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2013, 33(2): 130-135.

[22] 官波, 郑文诚. 山药多糖提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 98-101.

[23] BANIK R M, PANDEY K S. Selection of metal salts for alkaline phosphatase production using response surface methodology [J]. Food Research International, 2009, 42(4): 470-475.

[24] FAN Jie-ping, CAO Jing, ZHANG Xue-hong et al. Optimization of ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of puerarin from Radix Puerariae Lobatae by response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2 299-2 306.

(上接第 48 页)

[9] 李沂光, 单杨, 李高阳, 等. 地沟油检测方法研究现状与其应用分析[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 262-265.

[10] 许艳霞, 倪小英, 杨进. 地沟油检测指标及方法研究现状与展望[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 283-287.

[11] LU Rong-sheng, ZHOU Xin-long, WU Wei-ping, et al. Development of the miniature NMR apparatus for edible oil quality control[J]. Applied Magnetic Resonance, 2014, 45(5): 29-34.

[12] 胡雪瑶, 吴次南. 基于电导率的地沟油快速鉴别方法的改进 [J]. 应用物理, 2013, 3(8): 162-165.

[13] 王飞艳, 于修烛, 吕曼曼, 等. 基于电导率的地沟油快速定性定量分析[J]. 食品科学, 2011(18): 304-307.

[14] 朱锐, 王督, 杨小京, 等. 电导率测定在鉴别食用植物油掺伪应

用研究[J]. 粮食与油脂, 2008(11): 42-43.

[15] 刘志金, 郑雪玉, 潘红芝, 等. 滴水油与合格食用油鉴别方法的研究[J]. 武汉工业学院学报, 2006, 25(4): 9-11.

[16] 黄伟, 郑建军, 徐建华. 地沟油的安全快速检测研究[J]. 山东科技大学学报: 自然科学版, 2010, 29(3): 51-53.

[17] CHANDRAKASAN A P, SHENG S, BRODERSEN R W. Low-power CMOS digital design [J]. IEEE Journal of Solid-State Circuits, 2010, 27(4): 473-484.

[18] STERN E, KLEMIC J F, ROUTENBERG D A, et al. Label-free immunodetection with CMOS-compatible semiconducting nanowires[J]. Nature, 2007, 445(7 127): 519-522.

[19] BAKER R J. CMOS: circuit design, layout, and simulation [M]. [S.l.]: IEEE Press, 1998: 1 231-1 232.