

响应面优化 CTAB 辅助提取 血柚皮果胶工艺

陈健旋^{1,2}

(1. 漳州职业技术学院 食品与生物工程系, 福建 漳州 363000;
2. 农产品深加工及安全福建省高校应用技术工程中心, 福建 漳州 363000)

摘要:为优化十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)辅助提取血柚皮果胶工艺,在单因素实验基础上,选取 CTAB 浓度、pH、提取温度、提取时间为自变量,果胶提取率为响应值,采用 Box - Behnken 实验设计方法,研究各自变量及其交互作用对果胶提取率的影响,并利用 Design - Expert 8.05b 软件,建立了果胶提取率与各因素的二次多项式模型。结果表明,CTAB 辅助提取血柚皮果胶的最佳工艺条件为 CTAB 浓度 0.62%、pH 2.1、提取温度 56 ℃、提取时间 93 min,该条件下果胶提取率为 20.85%,与预测值的相对误差为 0.28%,表明该模型有效。所得的果胶黏度为 $58.2 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{S}$,甲氧基含量为 6.47%,酯化度为 38.9%,灰分为 0.82%,总半乳糖醛酸果胶含量为 85.7%,其主要理化性质完全符合 QB2484—2000 标准,该果胶是一种低甲氧基果胶,可作为一种增稠剂使用。

关键词:血柚皮;果胶;提取;十六烷基三甲基溴化铵;响应面优化

中图分类号:TS 255 **文献标识码:**A **文章编号:**1007 - 7561(2015)03 - 0053 - 06

Optimization of CTAB - assisted extraction of pectin from blood pomelo peel by response surface methodology

CHEN Jian - xuan^{1,2}

(1. Department of Food and Biology Engineering, Zhangzhou Institute of Technology,
Zhangzhou Fujian 363000; 2. Applied Technology Engineering Center of Fujian University
for Further Processing and Safety of Agricultural Products, Zhangzhou Fujian 363000)

Abstract: The process of CTAB - assisted extraction of pectin from blood pomelo peel was optimized. Based on the single - factor experiments, selecting concentration of CTAB, pH, temperature and time as independent variables and the extraction yield of pectin as response value, the effects of each independent variable and their interactions on the extraction yield were studied by Box - Behnken design. The quadratic multinomial model of each factor and the yield was set by Design - Expert 8.05b software. The results showed that the optimal extraction conditions of pectin from blood pomelo peel were: CTAB concentration 0.62%, pH 2.1, temperature 56 ℃ and time 93 min. The yield of pectin could be up to 20.85% under the optimal extraction condition, the relative error was 0.28% compared to the predictive value, which indicated the feasible model fitted well with the experimental data. The pectin showed a viscosity of $58.2 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{S}$, content of methoxy group 6.47%, degree of esterification 38.9%, ash content 0.82%, content of total galacturonic acid pectin 85.7%, which accorded with the standard of QB2484 - 2000. The pectin was a kind of low methoxy pectin and could be used as thickener.

Key words: blood pomelo peel; pectin; extraction; CTAB; response surface optimization

红肉蜜柚是漳州平和特有的一个新品种,由琯

溪蜜柚基因芽变株培育而成^[1-2],其肉呈血红色,故坊间将其称为“血柚”。近几年来,随着血柚种植量的增加,血柚皮、血柚核等废弃物量也逐年增多,其中血柚皮中除含有人体必需的多种营养素^[3-4]

收稿日期:2014 - 12 - 03

基金项目:福建省中青年教育科研项目(JB14182)

作者简介:陈健旋,1964 年出生,女,福建漳州人,副教授。

外,还含有大量的果胶。果胶是由半乳糖组成的一种天然高分子化合物,是人体七大营养元素膳食纤维的主要成分,具有良好的凝胶和乳化稳定性,广泛应用于食品、医药、化妆品等工业中^[5-6]。目前,已有文献对柚皮果胶的提取进行了报道^[7],另有文献研究表明柚皮中的有效成分会因其品种和产地的不同而不同^[8],但尚未有文献对这种特殊品种血柚皮中的果胶提取进行报道。十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)是一种具有特殊亲水亲油结构的表面活性剂,能有效地降低表面张力,促进溶剂对物料的润湿性与渗透性,从而提高有效成分的溶出^[9-10]。本文以血柚皮果胶提取率为指标,考察各因素对果胶提取率的影响,通过响应面法优化提取工艺参数,以期对血柚皮果胶的开发利用提供技术支撑和理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Q-250B 高速多功能粉碎机,上海冰都电器有限公司;BSA124S 电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;GZX-9070MBE 数显鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

血柚,购于漳州市超市;无水乙醇(分析纯),汕头西陇化工股份有限公司;十六烷基三甲基溴化铵(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;盐酸(分析纯),汕头西陇化工股份有限公司;蒸馏水,实验室自制。其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理

将超市购回的血柚剥皮,切成块状、洗净,将所得血柚皮置于 90 ℃ 水中煮 5 min,除去果胶酶,后用 50 ℃ 温水漂洗,除去色素、有机酸、可溶性糖及苦味物质,挤干水后,置于 50 ℃ 烘箱中烘干,用万能粉碎机粉碎,过 80 目筛得柚皮粉,保存备用。

1.2.2 血柚皮果胶的提取

称取 10 g 血柚皮粉,采用 CTAB 辅助热稀酸法,按实验设计设定的工艺参数,进行提取,提取完后冷却,在 3 000 r/min 下离心 5 min,得上清液,并将上清液置于旋转蒸发仪中浓缩得到果胶提取液。在 150 r/min 的搅拌速度下,加入等体积的无水乙醇,静置,使果胶析出,在 3 000 r/min 下离心 5 min,抽滤得到沉淀,将沉淀置于 50 ℃ 烘箱中烘干,得到果胶产品。血柚皮果胶提取率按以下公式计算^[11]:

$$\text{血柚皮果胶提取率}/\% = \frac{\text{血柚皮果胶质量}}{\text{血柚皮质量}} \times 100$$

1.2.3 血柚皮果胶理化性质的测定

根据 QB2484—2000《食品添加剂 果胶》对血柚

皮果胶的外观、干燥失重、灰分等理化性质进行测定;根据 GB 5009.5—2010《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》对果胶中粗蛋白进行测定;根据 GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》对果胶中粗脂肪进行测定。

1.2.4 血柚皮果胶黏度的测定

分别取三份不同量的血柚皮果胶,配成 5% 的溶液,静置过夜,在室温下测定其黏度,求其平均值。

1.3 实验设计

采用单因素实验,考察 CTAB 浓度(质量分数,以溶剂质量为基准)、pH、提取温度、提取时间对血柚皮果胶提取率的影响,并在单因素实验结果基础上,采用响应面法对血柚皮果胶的提取工艺进行优化。根据 Design-Expert 8.05b 软件,采用 Box-Behnken 中心组合原理设计 CTAB 浓度(A)、pH(B)、提取温度(C)、提取时间(D)四因素三水平响应面实验,考察各因素及因素间交互作用对血柚皮果胶提取率的影响,建立预测模型,并进行最佳工艺验证。响应面因素与水平见表 1。

表 1 响应面实验因素水平

水平	CTAB 浓度/%	pH	提取温度/℃	提取时间/min
-1	0.5	1.5	50	75
0	0.6	2	55	90
1	0.7	2.5	60	105

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 CTAB 浓度对血柚皮果胶提取率的影响

固定 pH 2.0、提取温度 55 ℃、提取时间 90 min,考察 CTAB 浓度(分别为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1%)对血柚皮果胶提取率的影响,结果如图 1 所示。

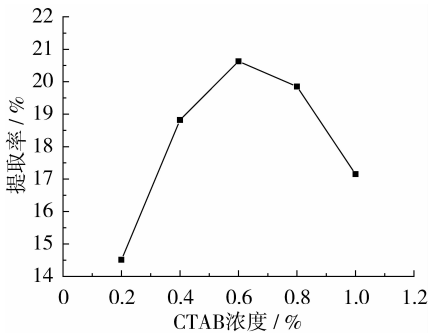


图 1 CTAB 浓度对果胶提取率的影响

从图 1 中可以看出,随着 CTAB 浓度的增大,果胶提取率先不断增加,当 CTAB 浓度达到 0.6% 时,继续增大 CTAB 的浓度,果胶提取率反而下降。这是因为随着 CTAB 的增加,降低了血柚皮颗粒与溶

剂间的界面张力,促进了果胶的溶出,而当 CTAB 浓度达到 0.6% 时,CTAB 达到了临界胶束浓度^[12],此时果胶的提取率达到最大,继续增加 CTAB 浓度,会造成 CTAB 浓度过大,容易使得提取过程产生过多的泡沫,增加了操作难度,从而使得果胶提取率下降,因此最佳 CTAB 浓度选择为 0.6%。

2.1.2 pH 值对血柚皮果胶提取率的影响

固定 CTAB 浓度 0.6%、提取温度 55℃、提取时间 90 min、考察 pH (分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0) 对血柚皮果胶提取率的影响,结果如图 2 所示。

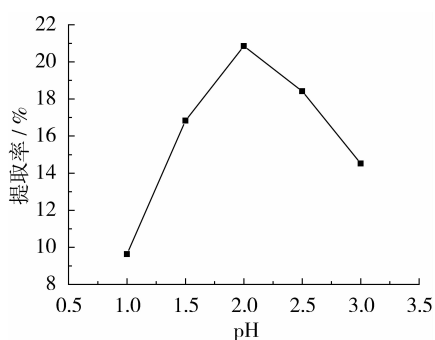


图2 pH对果胶提取率的影响

从图2中可以看出,随着 pH 值的增加,果胶提取率先不断增加,当 pH 为 2.0 时,果胶提取率达到最大,继续增大溶液的 pH,果胶提取率反而下降。这是因为当 pH 过低时,果胶过度水解,造成果胶脱酯和裂解等副反应的增多,使得果胶提取率下降;而当 pH 过高时,不能充分软化血柚皮颗粒组织,且 pH 过高果胶体系不稳定,容易水解成单糖,使得果胶提取率下降^[13]。因此最佳的 pH 选择为 2.0。

2.1.3 提取温度对血柚皮果胶提取率的影响

固定 CTAB 浓度 0.6%、pH 2.0、提取时间 90 min,考察提取温度 (分别为 45、50、55、60、65℃) 对血柚皮果胶提取率的影响,结果如图 3 所示。

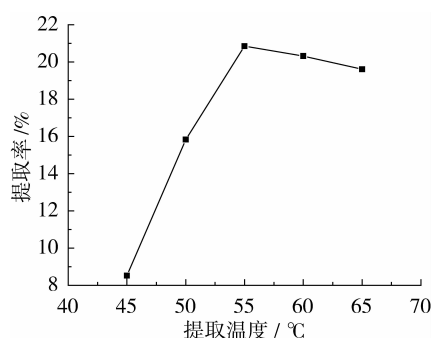


图3 提取温度对果胶提取率的影响

从图3可以看出,随着温度的升高,果胶提取率先不断升高,当提取温度达到 55℃ 时,果胶提取率达到最大,继续增大提取温度,果胶提取率反而下降。这是

因为随着温度的升高,果胶的溶解度增加,促进了果胶在溶剂中的传质,使得果胶提取率增大,但当温度过高时,溶解的色素等杂质增加,使得提取液颜色加深,且温度高,果胶容易发生降解,从而导致果胶提取率下降^[14]。因此最佳的提取温度选择为 55℃。

2.1.4 提取时间对血柚皮果胶提取率的影响

固定 CTAB 浓度 0.6%、pH 2.0、提取温度 55℃,考察提取时间 (分别为 30、60、90、120、150 min) 对血柚皮果胶提取率的影响,结果如图 4 所示。

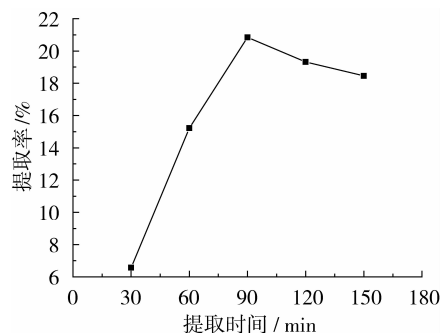


图4 提取时间对果胶提取率的影响

由图4中可以看出,随着提取时间的增加,果胶提取率先不断增加,当提取时间为 90 min 时,果胶提取率达到最大,继续增加提取时间,果胶提取率反而下降。这是因为提取时间较短时,果胶水解不完全,提取率较低,随着提取时间的增加,果胶水解程度增加,使得果胶提取率增大,但提取时间过长时,果胶分子在酸溶剂中容易过度水解,从而使得提取率下降^[15],因此最佳的提取时间选择为 90 min。

2.2 响应面实验结果

2.2.1 响应面实验结果及方差分析

根据 Box - Benhnken 中心组合原理,在单因素实验结果基础上采用四因素三水平实验设计,选取 CTAB 浓度(A)、pH(B)、提取温度(C)、提取时间(D)四个因素进行优化实验,实验因素和水平设计如表 2 所示,响应面方差分析见表 3。

表2 响应曲面实验以及响应值

序号	CTAB 浓度 /%	pH	提取温度 /℃	提取时间 /min	提取率 /%
1	0.6	2	55	90	20.83
2	0.6	1.5	55	105	20.13
3	0.7	2	55	75	20.05
4	0.7	2	60	90	20.39
5	0.6	1.5	60	90	19.77
6	0.7	2	50	90	20.08
7	0.6	2	55	90	20.78
8	0.5	2.5	55	90	19.99
9	0.6	2.5	50	90	20.01
10	0.5	1.5	55	90	19.71

续表					
序号	CTAB 浓度 /%	pH	提取温度 /℃	提取时间 /min	提取率 /%
11	0.5	2	50	90	19.69
12	0.6	2.5	60	90	20.41
13	0.6	2	55	90	20.81
14	0.6	2	55	90	20.92
15	0.7	2	55	105	20.40
16	0.5	2	55	75	19.67
17	0.6	2.5	55	105	20.38
18	0.6	2.5	55	75	19.92
19	0.6	2	50	105	20.01
20	0.6	2	55	90	20.90
21	0.6	2	50	75	19.78
22	0.6	1.5	55	75	19.80
23	0.6	1.5	50	90	19.73
24	0.5	2	60	90	20.07
25	0.6	2	60	75	20.03
26	0.7	1.5	55	90	20.12
27	0.5	2	55	105	20.11
28	0.7	2.5	55	90	20.36
29	0.6	2	60	105	20.27

表 3 响应曲面方差分析表

方差来源	均方	自由度	离差平方和	F 值	P 值	显著性
模型	4.01	14	0.29	45.74	<0.000 1	**
A - A	0.39	1	0.39	62.04	<0.000 1	**
B - B	0.27	1	0.27	43.56	<0.000 1	**
C - C	0.22	1	0.22	35.76	<0.000 1	**
D - D	0.35	1	0.35	55.88	<0.000 1	**
AB	0.000 4	1	0.000 4	0.064	0.804 2	
AC	0.001 225	1	0.001 225	0.20	0.665 2	
AD	0.002 025	1	0.002 025	0.32	0.578 7	
BC	0.032	1	0.032	5.17	0.039 3	*
BD	0.004 225	1	0.004 225	0.67	0.950 5	
CD	0.000 025	1	0.000 025	0.003 989	<0.000 1	**
A ²	0.94	1	0.94	149.98	<0.000 1	**
B ²	1.14	1	1.14	182.07	<0.000 1	**
C ²	1.20	1	1.20	191.97	<0.000 1	**
D ²	1.00	1	1.00	158.98	<0.000 1	**
残差	0.088	14	0.006 267			
失拟度	0.073	10	0.007 346	2.06	0.253 8	
绝对误差	0.014	4	0.003 57			
总离差	4.10	28				

注: * 表示显著($P < 0.05$), ** 表示极显著($P < 0.01$)。

对表 2 数据进行二次多项式回归拟合,得到回归方程为: $Y = 20.85 + 0.18A + 0.15B + 0.14C + 0.17D - 0.010AB - 0.017AC - 0.022AD + 0.090BC + 0.032BD + 0.0025CD - 0.38A^2 - 0.42B^2 - 0.43C^2 - 0.39D^2$ 。回归统计分析结果见表 3,从表 3 可以看出,实验数据所得模型的 F 值为 45.74, $P < 0.0001$,表明该回归模型达到极显著水平。其方程的 R^2 为 0.9786,表明超过 97% 的实验数据可用该模型来拟合,说明该模型的可靠性高。方程的失拟项 F 值为 2.06, $P = 0.2538 > 0.05$,表示失拟度不显著,说明模型拟合效果好,可由该回归方程描述各因素与响

应值之间的真实关系,从而确定最佳的提取工艺条件。根据 F 值和 P 值可以看出,影响因子的主效应主次顺序为:CTAB 浓度 > 提取时间 > pH > 提取温度。一次项 A、B、C、D,交互项 CD,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对实验结果影响极显著($P < 0.01$);交互项 BC 对实验结果影响显著($P < 0.05$);交互项 AB、AC、AD、BD 对实验结果影响不显著($P > 0.05$),表明各实验因素与响应值之间是一种非线性的关系。

2.2.2 果胶提取率的响应面分析

各实验因素及因素间交互作用对果胶提取率的响应面分析结果见图 5~图 10。从图中可以看出,所考察的四个工艺条件对血柚皮果胶的提取率都有显著的影响,CTAB 浓度的影响最为显著,随着 CTAB 浓度的升高,果胶提取率逐渐增大,果胶提取率在一定的 CTAB 浓度时达到最大,随后随着 CTAB 浓度的增大,果胶提取率开始下降,表现为曲面较陡;提取时间、pH 和提取温度的影响依次减弱,表现为曲面较平缓,响应值变化较小。各实验因素对响应值影响的主次顺序为 CTAB 浓度 > 提取时间 > pH > 提取温度。

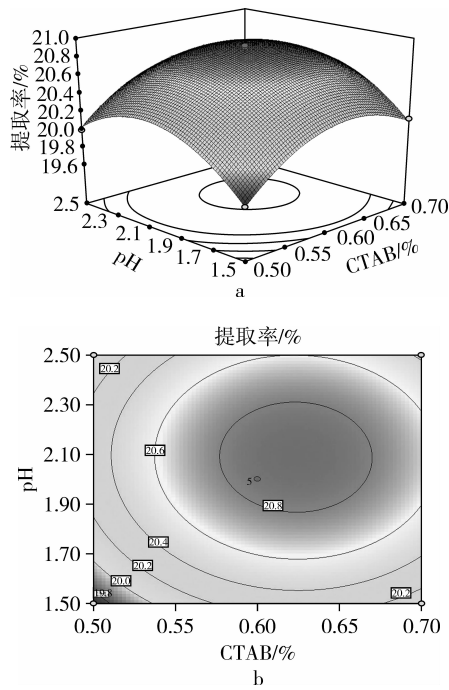
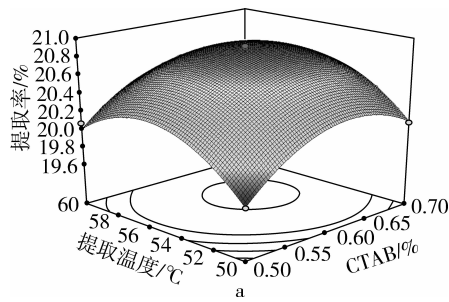


图 5 CTAB 浓度和 pH 的响应面图(a)及等高线图(b)



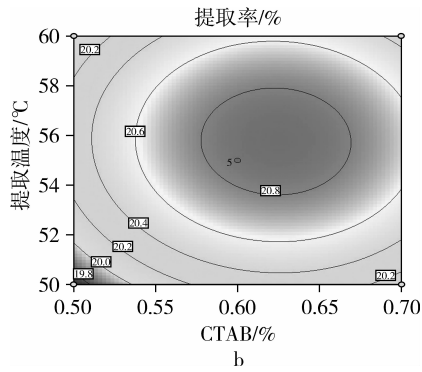


图 6 CTAB 浓度和提取温度的响应面图 (a) 及等高线图 (b)

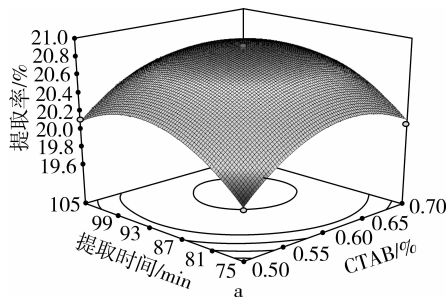


图 7 CTAB 浓度和提取时间的响应面图 (a) 及等高线图 (b)

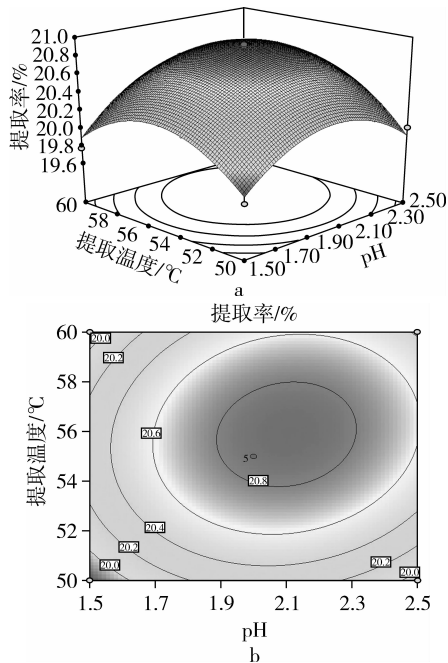


图 8 pH 和提取温度的响应面图 (a) 及等高线图 (b)

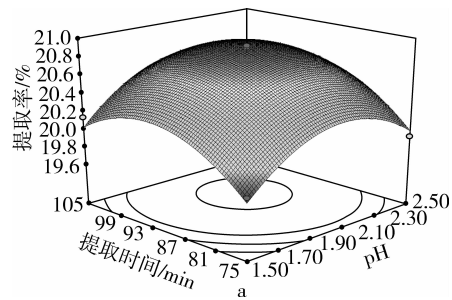


图 9 pH 和提取时间的响应面图 (a) 及等高线图 (b)

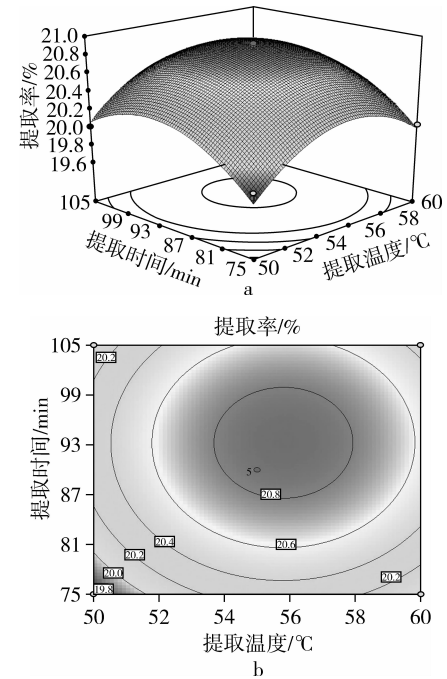


图 10 提取温度和提取时间的响应面图 (a) 及等高线图 (b)

2.2.3 最佳提取工艺的确定及其验证

在所选的实验因素考察范围内,利用 Design - Expert 8.05b 软件,得到了 CTAB 辅助提取血柚果皮胶的最佳工艺参数为 CTAB 浓度 0.62%、pH 2.1、提取温度 55.88 ℃、提取时间 93.30 min,在此条件下,提取率可达 20.91%,考虑到实际操作的可性及便利性,将最佳工艺条件修正为 CTAB 浓度 0.62%、pH 2.1、提取温度 56 ℃、提取时间 93 min。在修正条件下进行 3 次平行实验,实际提取率为 20.85%,与理论值的相对误差为 0.28%,验证了回

归模型的可靠性。因此,采用响应面法优化得到的提取条件参数可靠,得到的血柚皮果胶的提取条件具有实际应用价值。

2.3 血柚皮果胶特性分析

从表 4 中可以看出,本方法所提取的血柚皮果胶黏度为 $58.2 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{S}$,甲氧基含量为 6.47%,酯化度为 38.9%,总半乳糖醛酸果胶含量 85.7%,其主要理化性质完全符合 QB2484—2000 标准,且大部分指标优于商品柑橘果胶^[7]。另外,酯化度为 38.9%,说明血柚皮果胶是一种低甲氧基果胶,可作为一种增稠剂使用。灰分为 0.82%,与盐析法提取的沙田柚果胶相比^[16],血柚皮果胶的灰分明显要低于沙田柚。

表 4 血柚皮果胶与柑橘果胶成分对照表

成分	血柚皮果胶	柑橘果胶	QB2484—2000
干燥失重/%	6.96	7.56	≤8
灰分/%	0.82	2.63	≤5
盐酸不溶物/%	0.27	0.71	≤1
pH	4.73	2.73	4.5~5.0
总半乳糖醛酸/%	85.7	79.1	≥65
外观	淡黄色	淡黄色	淡米黄色、无异味
黏度/(Pa·S)	58.2×10^{-3}	182.2×10^{-3}	
粗蛋白/%	2.32	1.53	
粗脂肪/%	0.76	0.65	
甲氧基含量/%	6.47	10.89	
酯化度/%	38.9	66.79	

3 结论

利用 CTAB 辅助法提取血柚皮果胶,并通过响应面分析得到了回归预测模型为: $Y = 20.85 + 0.18A + 0.15B + 0.14C + 0.17D - 0.010AB - 0.017AC - 0.022AD + 0.090BC + 0.032BD + 0.0025CD - 0.38A^2 - 0.42B^2 - 0.43C^2 - 0.39D^2$ 。利用该模型对血柚皮果胶提取过程的关键因素进行分析得到了 CTAB 辅助提取血柚皮果胶的最佳工艺参数为 CTAB 浓度 0.62%、pH 2.1、提取温度 56℃、提取时间 93 min,在此条件下果胶的提取率为 20.85%,与预测值的相对误差为 0.28%,说明采用响应面法对血柚皮总果胶的提取条件进行优化合理可行。该工艺提取的血柚皮果胶黏度为 $58.2 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{S}$,甲氧基含量为 6.47%,酯化度为 38.9%,灰分为 0.82%,总半乳糖醛酸果胶含量 85.7%,其主要理化性质完全符合 QB2484—2000 标准,该果胶是一种低甲氧基果胶,可作为一种增稠剂使用,具有一定的市场前景。

参考文献:

[1] 陈文娟, 陈建福. 漳州血柚皮总黄酮超声波辅助提取工艺研究[J]. 常熟理工学院学报, 2012, 26(4): 57-63.

[2] Kulkarni S G, Vijayanand P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa* L.)[J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(7): 1026-1031.

[3] 陈文娟, 陈建福. 超声辅助提取血柚皮多糖工艺优化及其对自由基的清除作用[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2014, 37(1): 141-146.

[4] Huang R L, Gao M, Guo H, et al. Enhanced ethanol production from pomelo peel waste by integrated hydrothermal treatment, multi-enzyme formulation, and fed-batch operation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(20): 4643-4651.

[5] Tan L, Eberhard S, Pattathil S, et al. An Arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein[J]. The Plant Cell Online, 2013, 25(1): 270-287.

[6] Guo X, Zhao W, Pang X, et al. Emulsion stabilizing properties of pectins extracted by high hydrostatic pressure, high-speed shearing homogenization and traditional thermal methods: a comparative study[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35(3): 217-225.

[7] 田宝明, 彭林, 吴金松, 等. 柚皮果胶理化性质的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(8): 313-317.

[8] 赵红英, 文海涛, 林励, 等. 化州柚不同栽培品种总黄酮及柚皮苷含量的比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 183-186.

[9] Allen G C, Flores - Vergara M A, Krasynanski S, et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide[J]. Nature protocols, 2006, 1(5): 2320-2325.

[10] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. Plant molecular biology reporter, 1997, 15(1): 8-15.

[11] Qiu L, Zhao G, Wu H, et al. Investigation of combined effects of independent variables on extraction of pectin from banana peel using response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(2): 326-331.

[12] Wang L, Stegmann J P. Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide [J]. Biomaterials, 2010, 31(7): 1612-1618.

[13] Prakash Maran J, Sivakumar V, Thirugnanasambandham K, et al. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel[J]. Carbohydrate polymers, 2013, 97(2): 703-709.

[14] Minjares - Fuentes R, Femenia A, Garau M C, et al. Ultrasound - assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach [J]. Carbohydrate polymers, 2014, 106(7): 179-189.

[15] Chen H, Fu X, Luo Z. Properties and extraction of pectin - enriched materials from sugar beet pulp by ultrasonic - assisted treatment combined with subcritical water[J]. Food chemistry, 2014, 168(2): 302-310.

[16] 周尽花, 周春山. 柚皮果胶的盐析研究[J]. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 2009, 29(3): 95-99.