

响应面优化超声辅助 提取油菜花粉多糖

姚秋萍, 姬青松

(贵州民族大学 化学与环境科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要:采用 Box - Benhnken 中心组合实验和响应面分析法, 在单因素实验基础上, 以超声功率、提取时间和液料比为影响因素, 多糖提取率为响应值, 对超声波提取油菜花粉多糖的工艺进行优化。结果表明: 优化后确定的最佳工艺条件为: 超声功率为 463 W、超声时间为 20.5 min、液料比 22.7:1 (mL/g), 优化条件下多糖提取率验证值为 5.28%, 与响应面分析优化多糖提取率预测值 5.30% 接近。超声波技术可大大提高油菜花粉多糖的提取率。

关键词: 油菜花粉多糖; 超声提取; 响应面分析

中图分类号: TS 201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2015)04-0062-04

Optimization of ultrasonic - assisted extraction of rape pollen polysaccharide by response surface method

YAO Qiu - ping, JI Qing - song

(College of Chemistry and Environmental Science, Guizhou Minzu University, Guiyang Guizhou 550025)

Abstract: The ultrasonic - assisted extraction conditions of rape pollen polysaccharide were optimized by Box - Benhnken central composite design and response surface analysis based on the single factor experiment with ultrasonic power, extraction time, and the solvent/solid ratio as causal factors, and the extraction yield of polysaccharides as response value. The results showed that the optimum ultrasonic - assisted extraction conditions were as follows: ultrasonic power was 463 W, extraction time 20.5 min, and the solvent/solid ratio 22.7:1 (mL/g). Under such conditions, the verification value of yield of polysaccharides was 5.28%, which was close to the predictive maximum yield of 5.30%. Ultrasonic technology can greatly improve the extraction yield of rape pollen polysaccharide.

Key words: rape pollen polysaccharide; ultrasonic extraction; response surface analysis

花粉是植物有性繁殖的雄性配子体, 是植物繁衍后代的“精子”, 含有多种维生素、酶、微量元素、生物活性物质等人体所必需的营养成分^[1]。我国是世界养蜂大国, 产量居世界首位, 但由于花粉壁结构复杂, 组织致密, 阻碍了花粉营养物质的溶出, 导致花粉资源利用率低。油菜花粉多糖是花粉中一种重要的生物活性物质, 具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、增强机体免疫^[4]等功能。提取油菜花粉多糖的方法常用的有热水提取法^[5-6]、反复冻融法^[7]、微波法^[8]。这些方法可明显提高多糖的得率, 但研究方法局限于单因素和正交实验。为最大限度地提高油

菜花粉多糖的溶出率, 本研究将超声波技术应用到油菜花粉多糖提取中, 采用 Box - Benhnken 中心组合实验设计及响应面分析法对油菜花粉多糖的提取工艺进行优化, 为油菜花粉资源的综合开发利用提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油菜花粉: 在 40 ℃ 条件下对油菜花粉进行热风干燥, 粉碎, 过 60 目筛, 密封好后置于 4 ℃ 冰箱中保存。95% 乙醇、无水乙醇、浓硫酸、丙酮、乙醚、苯酚、葡萄糖、3,5-二硝基水杨酸、氢氧化钠、丙三醇等均为分析纯。

1.2 主要仪器

101-1 型电热鼓风干燥箱: 北京科伟永兴仪器有限公司; DTY-ZBJ-15A 型台式全自动制冰机:

收稿日期: 2015-02-05

基金项目: 贵州省科技厅自然科学资助项目(黔科合 J 字[2010]2263 号); 贵州民族大学引进人才科研项目(2010)

作者简介: 姚秋萍, 1978 年出生, 女, 陕西渭南人, 副教授。

北京天佑科技发展有限公司;SHZ-Ⅲ型循环水式真空泵:上海亚荣生化仪器厂;RE-52A型旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂;756PC型紫外分光光度计:上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 总糖和还原糖的测定

总糖测定采用苯酚—硫酸法^[9];还原糖测定采用DNS法^[10]。油菜花粉多糖含量及多糖提取率计算公式如下:

油菜花粉多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量

油菜花粉多糖提取率/% = 油菜花粉多糖含量 / 油菜花粉干粉质量 × 100

1.3.2 单因素实验

称取2 g油菜花粉粉末,按一定液料比加入一定量的去离子水,在冰水浴中超声提取一定时间,离心,取上清液待测。采用单因素实验方法考察超声波功率、提取时间、液料比3个因素对油菜花粉多糖得率的影响。

1.3.3 中心组合实验设计

在单因素实验基础上,进行三因素三水平 Box-Behnken 的中心组合实验设计,采用响应面法对实验结果进行分析,优化油菜花粉多糖超声波法的提取条件。

1.3.4 验证实验

按1.3.2节中的方法,将离心后的沉淀物加蒸馏水再超声波提取1次,离心,合并两次上清液,在旋转蒸发仪上浓缩至一定体积,加入3倍体积的95%乙醇,放入4℃冰箱中静置12 h。离心,沉淀加入适量的蒸馏水溶解,滤除不溶物,上清液加入3倍体积的95%乙醇,置4℃冰箱中静置过夜,离心,沉淀用无水乙醇、丙酮和乙醚依次洗涤,干燥,得油菜花粉多糖粗提物。

2 结果与分析

2.1 油菜花粉总糖和还原糖测定

采用苯酚—硫酸法以葡萄糖(毫克数)为横坐标,吸光度值(Y)为纵坐标制作标准曲线,得回归方程: $Y = 0.0286X + 0.0687$, $R^2 = 0.9953$ 。

采用DNS法以葡萄糖(X,毫克数)为横坐标,吸光度值(Y)为纵坐标制作标准曲线,得回归方程: $Y = 0.0161X + 0.0159$, $R^2 = 0.9903$ 。

将所测得的样品吸光度值分别代入对应回归方程,计算油菜花粉总糖和还原糖的含量。

2.2 单因素实验优化油菜花粉多糖超声波提取条件

2.2.1 超声功率对油菜花粉多糖提取率的影响

油菜花粉粉末按液料比为16:1(mL/g),功率分别为180、270、360、450、540、630 W的条件下,冰

水浴中提取20 min,离心,取上清测定总糖和还原糖的含量。由图1可知,超声功率为450 W时,油菜花粉多糖的提取率最大。功率在450~630 W之间时多糖的提取率有所下降,这可能是由于超声功率过高使多糖结构破坏,从而导致多糖得率降低,因此选择超声波功率为450 W。

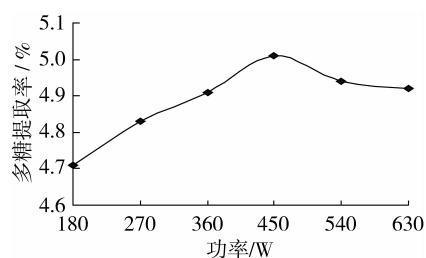


图1 超声功率对油菜花粉多糖提取率的影响

2.2.2 提取时间对油菜花粉多糖提取率的影响

油菜花粉粉末按液料比为16:1(mL/g)、功率为450 W的条件,在冰水浴中分别超声提取5、10、15、20、25、30 min,离心,取上清测定总糖和还原糖的含量。由图2可知,油菜花粉多糖提取率随着提取时间的延长,在20 min之前增加比较明显,20 min之后趋于平缓,为了节约能耗,选择20 min为提取时间。

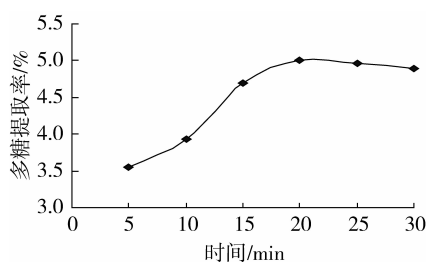


图2 提取时间对油菜花粉多糖提取率的影响

2.2.3 液料比对油菜花粉多糖提取率的影响

油菜花粉粉末按功率为450 W,液料比分别为10:1、13:1、16:1、19:1、22:1、25:1(mL/g)的条件,冰水浴中提取20 min,离心,取上清测定总糖和还原糖的含量。由图3可知,液料比从10:1到22:1(mL/g)递变时,油菜花粉多糖的提取率显著增加($P < 0.05$),液料比从22:1到25:1(mL/g)递变时变化不大,因此选择液料比为22:1(mL/g)。

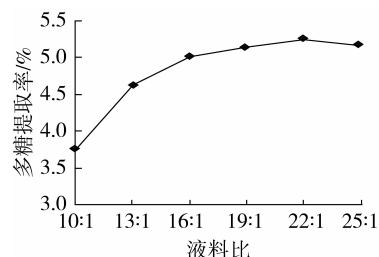


图3 液料比对油菜花粉多糖提取率的影响

2.3 中心复合实验及结果

在单因素实验基础上,以超声功率、提取时间、液料比为自变量,进行三因素三水平 Box - Benhnken 的中心组合实验设计,因素水平表如表 1 所示。以油菜花粉多糖的提取率为响应值(Y),采用多元二次回归方法对实验结果进行响应面分析,并采用偏导方法求解多元二次回归方程的极值,得到超声波法提取油菜花粉多糖的最佳条件。

表 1 响应面实验因素水平

水平	因素		
	X_1 超声功率/W	X_2 时间/min	X_3 液料比/(mL/g)
-1	360	15	19:1
0	450	20	22:1
1	540	25	25:1

在单因素实验的基础上,以 $Z_1 = (X_1 - 450)/90$ 、 $Z_2 = (X_2 - 20)/5$ 、 $Z_3 = (X_3 - 22)/3$ 为自变量,以三次实验所得多糖提取率的平均值为响应值(Y)进行响应面分析。结果见表 2,17 个实验中,1~13 是析因实验,14~17 是中心实验,用来估计实验误差。

表 2 响应面分析实验结果

实验号	X_1	X_2	X_3	多糖提取率/%
1	1	0	1	5.05
2	0	1	1	4.96
3	1	-1	0	4.81
4	0	-1	-1	4.66
5	0	1	-1	4.66
6	-1	-1	0	4.55
7	1	0	-1	4.88
8	-1	0	1	4.86
9	-1	0	-1	4.72
10	-1	1	0	4.83
11	1	1	0	4.75
12	0	-1	1	4.70
13	0	0	0	5.16
14	0	0	0	5.34
15	0	0	0	5.38
16	0	0	0	5.29
17	0	0	0	5.24

对所得数据进行回归分析,从表 3 的分析结果来看,整体模型的 $P = 0.000\ 2$,表明回归模型极显著。失拟项用来表示所用模型与实验拟合的程度,即二者差异的程度。失拟项 P 值为 $0.907\ 2 > 0.05$,无失拟因素存在,因此可用回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。由 P 值可知,在各因素水平范围内,对多糖提取率的影响顺序为:液料比 > 超声功率 > 超声时间。回归模型中一次项 X_3 ,二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y 的影响极显著。一次项 X_1 、 X_2 ,二

表 3 回归分析结果

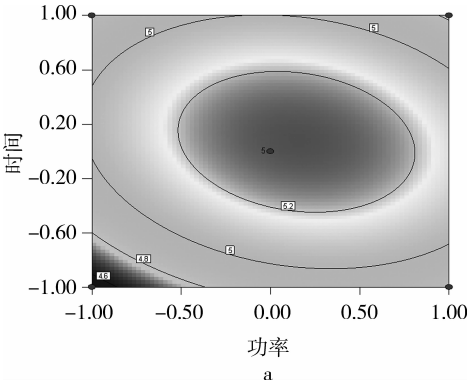
方差来源	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值	Prob > F
模型	1.08	9	0.12	25.05	0.000 2
X_1	0.035	1	0.035	7.31	0.030 4
X_2	0.029	1	0.029	6.02	0.042 7
X_3	0.053	1	0.053	11.00	0.009 8
$X_1 X_2$	0.029	1	0.13	7.89	0.026 2
$X_1 X_3$	0.000 225	1	0.000 225	0.047	0.834 8
$X_2 X_3$	0.017	1	0.017	3.52	0.102 7
X_1^2	0.18	1	0.18	37.67	0.000 5
X_2^2	0.49	1	0.49	101.24	<0.000 1
X_3^2	0.16	1	0.16	34.12	0.000 6
残差	0.034	7	0.004 801		
失拟项	0.003 925	3	0.001 308	0.18	0.907 2
纯误差	0.030	4	0.007 42		
总离差	1.12	16			

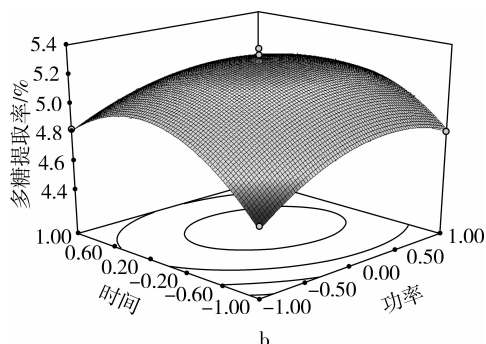
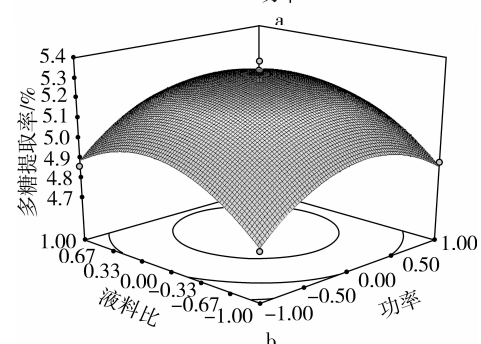
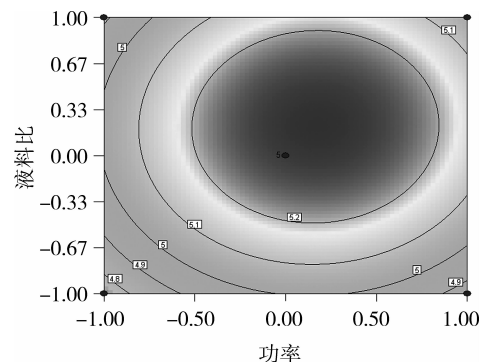
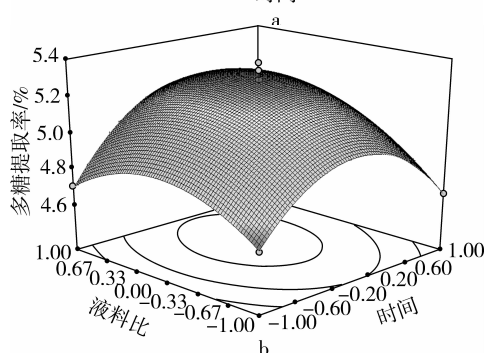
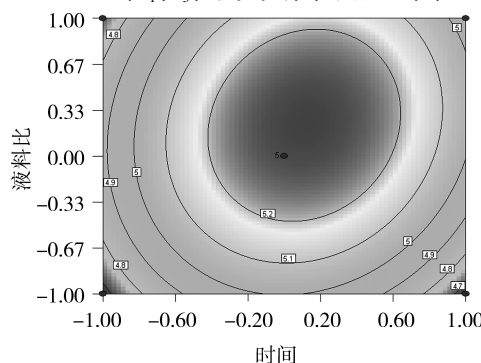
次项 $X_1 X_2$ 对 Y 的影响显著,由此可见,各具体实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系,交互项作用和二次项对响应值都有很大的影响。通过 Design - Expert 软件进行二次响应面回归分析,得到多元二次响应面回归模型:

$$Y = -16.628\ 33 + 0.026\ 931X_1 + 0.545\ 27X_2 + 0.892\ 25X_3 - 0.000\ 188\ 9X_1X_2 + 0.000\ 027\ 8\ X_1X_3 + 0.004\ 333X_2X_3 - 0.000\ 025\ 6X_1^2 - 0.013\ 590X_2^2 - 0.021\ 917X_3^2$$

对该模型进行方差分析,校正决定系数 R^2 (adj) 为 $0.931\ 2 > 0.8$,变异系数(CV)为 1.40%,说明响应值的变化有 93.12% 来自于所选变量,进一步说明模型拟合度较好,可以用来对超声提取油菜花粉多糖工艺进行初步分析和预测。

根据回归方程做出响应面分析图和等高线图,见图 4~图 6。从响应面和方差分析结果得到, X_1 、 X_2 之间的交互作用强于 X_2 、 X_3 之间的交互作用, X_2 、 X_3 之间的交互作用强于 X_1 、 X_3 之间的交互作用。由 SAS 分析得到响应值最大时 X_1 、 X_2 、 X_3 对应的编码值分别为 $Z_1 = 0.145\ 0$ 、 $Z_2 = 0.092\ 0$ 、 $Z_3 = 0.223\ 3$,对应的油菜花粉多糖最佳提取条件为:超声功率 463 W、时间为 20.5 min、液料比 22.7:1 (mL/g),预测的理论提取率为 5.30%。



图4 $Y=f(X_1, X_2)$ 的等高线(a)与响应面(b)图图5 $Y=f(X_1, X_3)$ 的等高线(a)与响应面(b)图图6 $Y=f(X_2, X_3)$ 的等高线(a)与响应面(b)图

2.4 验证实验及多糖提取率测定

为了验证模型预测的可行性,在最佳提取条件下提取油菜花粉多糖,进行3次平行验证实验,3次平行实验得到油菜花粉多糖提取率为5.28%,与理论预测值(5.30%)相比相对误差为0.38%,预测值与实验值吻合较好。因此,响应面法对油菜花粉多糖超声提取条件进行优化是可行的。

3 结论

超声提取是近年来兴起的一种新型提取技术,超声波作用于提取介质时产生的“空化现象”可产生瞬间几千个压力,使提取介质中的微小气泡压缩、爆裂,破碎被提取的原料及其细胞壁,加速天然活性成分的溶出,且具有操作方便、作用时间短等特点。本研究采用响应面分析法优化了超声提取油菜花粉多糖的提取工艺,得到的最佳提取工艺参数为:超声功率为463 W、超声时间为20.5 min、液料比22.7:1 (mL/g),多糖提取率验证值为5.28%。吴晖等^[5]根据Box-Behnken中心组合实验设计原理,确定了热水提取油菜花粉水溶性多糖的验证值为1.48%。由此可见,超声波技术运用在油菜花粉上,可大大提高油菜花粉多糖的提取率。

参考文献:

- [1] 冯慧,焦土蓉,唐远谋,等. 油菜花粉研究进展[J]. 食品工业, 2011,32(9):108-111.
- [2] 杨晓萍,罗祖友,吴谋成. 油菜花粉多糖的制备及其对荷瘤小鼠的影响[J]. 食品科学,2005, 26(12):202-204.
- [3] 王雪飞,张华,王振宇,等. 11种花粉水提物体外抗氧化能力研究[J]. 食品工业科技, 2014,35(15):139-142.
- [4] 张金明,杨晓萍. 油菜花粉多糖对小鼠机体免疫功能的影响[J]. 公共卫生与预防医学,2004,15(6):45-46.
- [5] 吴晖,赖富饶,胡筱波. 响应面分析法优化油菜花粉多糖提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2007,23(5):66-69,73.
- [6] 杨晓萍,罗祖友,吴谋成. 油菜花粉多糖提取工艺条件研究[J]. 食品科学,2004, 25(9):128-131.
- [7] 周建华,车玉芬. 微波技术提取油菜花粉多糖工艺的研究[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2007, 22(2):109-111.
- [8] 郭卫芸,刘海英,白玉敏,等. 反复冻融法辅助提取油菜花粉多糖的研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(13):26-28,40.
- [9] 涂宗财,李敏,刘光宪,等. 苯酚-硫酸法测定油菜花粉多糖含量的研究[J]. 食品工业科技,2007,28(4):219-221.
- [10] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1994:13-16.