

超声波辅助提取燕竹笋壳中多酚的工艺优化

吕萍, 李茜, 薛波, 孙潇辉, 丁之恩

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要: 以燕竹笋壳为原料, 运用超声波辅助提取技术对其中多酚类物质进行提取, 以其总多酚得率作为指标, 考察超声功率、提取时间、乙醇浓度、料液比对总多酚提取率的影响, 并利用响应面法对燕竹笋壳多酚提取工艺进行分析, 得到最佳工艺参数为: 超声功率 200 W, 提取时间 40.2 min, 乙醇浓度 42%, 料液比 1:50.5。在此条件下, 燕竹笋壳总多酚的理论提取得率为 5.50%, 实际平均提取得率为 5.57%, 理论预测值与实际值相对误差为 1.27%。

关键词: 竹笋壳; 总多酚; 超声提取; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2012)12-1734-1738

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Polyphenols from *Phyllostachys tianmuensis* Shoot Shell by Response Surface Methodology

LV Ping, LI Qian, XUE Bo, SUN Xiao-hui, DING Zhi-en

(College of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: *Phyllostachys tianmuensis* shoot shell was used as experimental materials to extraction total polyphenols under ultrasound assistance. The effects of four independents variables in terms of ultrasonic power, extract time, ethanol concentration and solid-liquid ration of total polyphenols were studied by response surface methodology. The optimum extraction conditions were as follow: the ultrasonic power 200W, extract time 40.2 min, ethanol concentration 42% and solid-liquid ration 1:50.5. Under these conditions, the predicted maximum yield and average experimental yield were 5.50% and 5.57%, respectively. The relative error between then was 1.27%.

Key words: bamboo shoot shell; total polyphenols; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

燕竹, 又名天目早竹 (*Phyllostachys tianmuensis* Z.P.Wang), 广泛分布于浙江、安徽一带。具有出笋期早, 笋肉营养丰富、口感鲜嫩可口等特点, 深受人民群众的喜爱^[1]。近年来, 随着燕竹笋消费量的增加, 竹笋加工过程中产生的笋壳废弃物也随之增加。

竹笋衣壳中多酚类化学物质的含量颇丰。而多酚类化合物具有抑菌^[2]、抗氧化、清除自由基^[3]、预防心脑血管疾病^[4]等多种生理活性功能, 日益受到人们的关注。本文在结合超声波辅助提取技术和响应面分析法的基础上, 以燕竹笋壳为原料, 对燕竹笋壳总多酚的提取工艺进行优化, 为燕竹笋壳等竹笋加工过程中产生的废弃物的综合利用提供了良好的理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

收稿日期: 2012-07-20

基金项目: 安徽省“蔬菜产业体系—蔬菜加工”项目

作者简介: 吕萍 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生

通讯作者: 丁之恩, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 经济林、产品加工、功能食品研究

燕竹笋 (2012 年 4 月采自安徽省绩溪县): 将新鲜燕竹笋壳洗净自然阴凉处沥干水分, 于 40 °C 烘箱中干燥 24 h, 将粉碎机粉碎处理后的干燥的燕竹笋壳粗粉, 过 40 目筛, 置于干燥器中备用。

没食子酸; Folin-Ciocalteu 试剂; 无水碳酸钠; 无水乙醇均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与amp;设备

UV-180 型紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; KQ-250DE 型超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司; DFT-100 多功能中药粉碎机, 温岭市大德中药机械有限公司; DL-5-B 飞鸽牌低速离心机, 上海安亭科学仪器厂; GXZ-9146 MBE 数显鼓风干燥箱, 上海博远实业有限公司; DK-S24 型电热恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 没食子酸标准曲线

配制没食子酸标准溶液 (质量浓度为 0.1 mg/mL): 精确称取没食子酸 25 mg, 用纯水溶解后定容于 250 mg 容量瓶中, 摇匀待用。精密吸取该溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 各加

入 0.5 mL Folin-Ciocalteu 试剂, 摇匀后各容量瓶中分别加入 1.5 mL 15% Na₂CO₃ 溶液, 再向各容量瓶中加入蒸馏水, 定容至 10 mL。于 30 °C 恒温条件下反应 1 h, 取出后使用分光光度计于 760 nm 波长下测定样品溶液反应显色后的吸光度值。以没食子酸浓度(mg/mL)为横坐标, 以显色后吸光度值为纵坐标, 绘制标准工作曲线^[5] (如图 1)。其线性回归方程为: Y=6.7486X+0.0121, 相似系数 R²=0.9993, 结果表明, 反应液吸光度值与没食子酸浓度呈现良好的线性关系, 符合朗伯-比尔定律, 可依据该标准曲线进行样品定量分析^[6]。

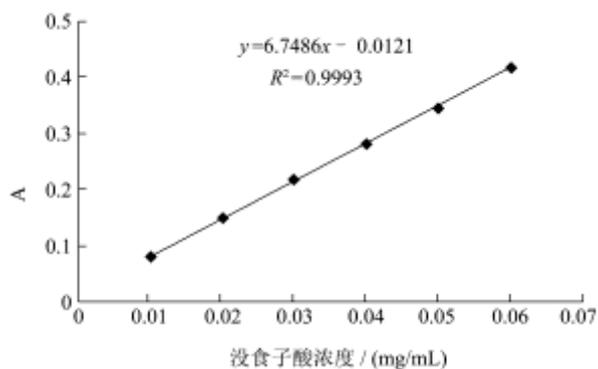


图 1 标准工作曲线

Fig.1 The standard curve of the yield of polyphenols

1.3.2 样品多酚测定方法

以燕竹笋壳粉末为原料, 精确称取 0.5 g, 加入一定量的乙醇溶液, 在一定温度下使用超声辅助提取一定时间, 后以 3 000 r/min 速度离心 10 min, 取全部澄清液定容, 得到燕竹笋壳多酚粗提液。将该粗提液稀释一定倍数后准确移取 1 mL, 采用 Folin-Ciocalteu 法^[7] 对其进行多酚含量测定, 再按照 1.3.1 的回归方程计算该样品提取液中总多酚质量浓度 (mg/mL)。

1.3.3 总多酚提取得率的计算

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{多酚质量浓度} \times \text{提取液体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{燕竹笋壳质量}} \times 100\%$$

1.3.4 单因素试验

选定超声功率、提取时间、乙醇体积分数及料液比作为考察因素, 研究各个因素对于燕竹壳总多酚提取量的影响。

1.3.5 响应面实验设计

结合单因素试验结果, 以超声功率、提取时间、乙醇体积分数、料液比为四个因素, 燕竹笋壳总多酚提取率作为考察对象, 运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 Box-Behnken 设计, 设计四因素三水平的响应面试验分析方法, 优化总多酚的提取条件。试验中因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

序号	水平			
	A (超声功率/W)	B (提取时间/min)	C (乙醇体积分数/%)	D [料液比/(g/mL)]
-1	175	30	30	1:40
0	200	40	40	1:50
1	225	50	50	1:60

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 超声波功率对多酚提取效果的影响

在固定超声波提取时间为 40 min, 提取温度为 50 °C, 乙醇体积分数为 30%, 料液比为 1:40 的条件下, 考察不同超声波功率 (125 W、150 W、175 W、200 W、225 W、250 W) 对多酚提取效果的影响 (见图 2)。

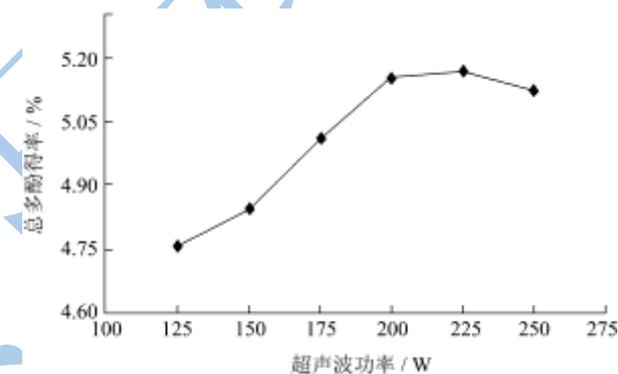


图 2 超声波功率对于总多酚得率的影响

Fig.2 Effect of ultrasound power on yield of total polyphenols

结果如图 2 所示, 随着超声波处理功率的增加, 燕竹笋壳总多酚得率呈现上升趋势, 当超声波功率达到 200 W 时燕竹笋壳总多酚得率达到最大, 超过 200 W 时总多酚得率缓慢下降^[8], 这一现象可能是由于酚类物质不稳定, 在受到外界高功率超声波处理下会发生部分破坏。因此确定 200 W 为较佳超声波功率。

2.1.2 超声波提取时间对多酚提取效果的影响

在固定超声波功率为 150 W、提取温度为 50 °C, 乙醇体积分数为 30%, 料液比为 1:40 条件下, 考察不同提取时间 (10 min~60 min) 对燕竹笋壳总多酚提取效果的影响 (见图 3)。

结果如图 3 所示, 燕竹笋壳总多酚得率的变化随着超声波提取时间的延长而呈现明显的上升趋势, 其最大值在提取时间达到 40 min 时出现, 随后总多酚得率会出现下降变化。这一现象表明多酚提取量与提取时间有关, 时间过短可能会造成多酚提取不充分,

但时间过长可能会因为改变原料特性而影响多酚类物质提取,或造成已提取的多酚发生结构上的破坏^[9],从而造成多酚含量的降低。因此可确定较佳超声波提取时间为 40 min。

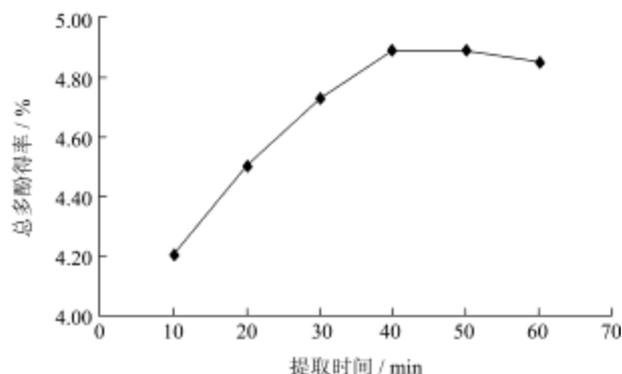


图3 提取时间对总多酚得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on yield of total polyphenols

2.1.3 乙醇体积分数对多酚提取效果的影响

在固定超声波功率为 150 W、提取温度为 50 ℃,料液比为 1:40,提取时间 40 min 的条件下,考察不同乙醇体积分数(10%~60%)对多酚提取效果的影响(见图 4)。

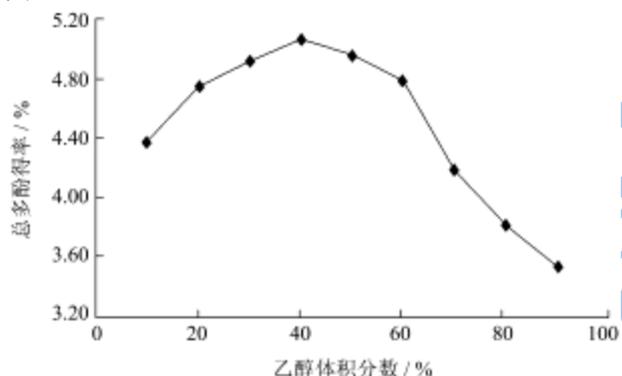


图4 乙醇体积分数对总多酚得率的影响

Fig.4 Effect of ethanol concentration on yield of total polyphenols

结果如图 4 所示,燕竹笋壳总多酚得率的变化随着乙醇体积分数的增加呈现先提高后降低的趋势,其最大值在乙醇体积分数达到 40% 时出现,当乙醇体积分数超过 40% 之后,总多酚提取率开始下降,这可能是因为原料所含的部分醇溶性杂质在乙醇体积分数超过一定量之后溶出,从而增大干扰因素,使总多酚得率相应降低^[10]。因此选用 40% 乙醇体积分数为较佳条件。

2.1.4 料液比对多酚提取效果的影响

在固定超声波功率为 150 W、提取温度为 50 ℃,乙醇体积分数为 30%,提取时间 40 min 的条件下,考察不同料液比(1:10~1:70)对总多酚提取效果的影响(见图 5)。

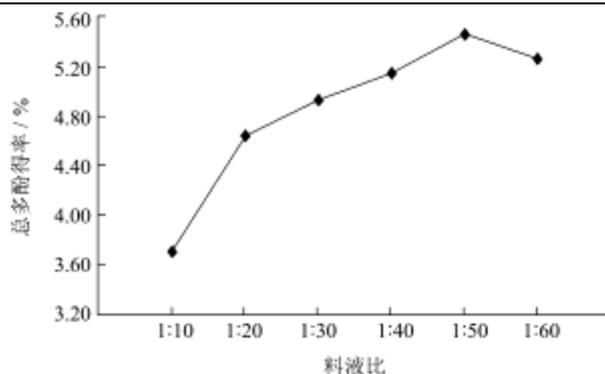


图5 料液比对总多酚得率的影响

Fig.5 Effect of material/liquid ratio on yield of total polyphenols

表 2 Box-Behnken 试验设计结果

Table 2 Results of data analysis by Box-Behnken design

实验号	A	B	C	D	总多酚得率/%
1	0	-1	1	0	5.23
2	0	0	-1	1	5.17
3	-1	0	1	0	5.11
4	0	1	0	-1	5.18
5	1	1	0	0	5.23
6	0	0	0	0	5.44
7	-1	0	0	-1	4.53
8	0	1	-1	0	5.15
9	0	-1	0	-1	4.52
10	-1	0	0	1	5.38
11	1	0	-1	0	5.15
12	0	-1	-1	0	4.84
13	1	0	1	0	5.19
14	0	0	0	0	5.42
15	0	0	1	1	5.42
16	0	0	-1	-1	4.59
17	-1	1	0	0	5.15
18	-1	-1	0	0	4.94
19	1	-1	0	0	5.19
20	0	1	0	1	5.35
21	0	1	1	0	5.14
22	1	0	0	-1	4.95
23	0	-1	0	1	5.25
24	0	0	0	0	5.49
25	1	0	0	1	5.17
26	-1	0	-1	0	4.99
27	0	0	1	-1	5.05
28	0	0	0	0	5.39
29	0	0	0	0	5.38

结果如图 5 所示,料液比对燕竹笋壳总多酚得率的影响作用较大,随着料液比的增加,总多酚得率显

著提高,当料液比达到 1:50 时,燕竹笋壳总多酚得率达到最大,料液比超过 1:50 之后,总多酚提取得率开始下降,因此选用 1:50 为较佳料液比。

2.2 提取条件优化

在单因素试验基础上,选择恰当的因素和水平,运用响应面法进行试验设计^[11],以确定最佳的燕竹笋壳总多酚提取条件。Box-Behnken 响应面分析试验设计与试验结果见表 2。

2.2.1 模型的建立

利用 Design-Expert.8.0.6 软件对表 2 中试验数据进行多元回归分析,共涉及到四因素三水平 29 个试验点,中心点重复试验次数为 5 次,得到总多酚提取得率(Y)对超声功率(A)、提取时间(B)、乙醇体积分数(C)、料液比(D)的二次回归方程为:

$$Y=5.42+0.065A+0.10B+0.10C+0.24D-0.043AB-0.020AC-0.16AD-0.10BC-0.14BD-0.053CD-0.17A^2-0.14B^2-0.16C^2-0.22D^2$$

表 3 回归分析结果

Table 3 Results of regression analysis					
项目	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.776469	14	0.126891	16.4394	<0.0001
A	0.0507	1	0.0507	6.568472	0.0225
B	0.126075	1	0.126075	16.33373	0.0012
C	0.130208	1	0.130208	16.86923	0.0011
D	0.710533	1	0.710533	92.05361	<0.0001
AB	0.007225	1	0.007225	0.93604	0.3497
AC	0.0016	1	0.0016	0.207289	0.6559
AD	0.099225	1	0.099225	12.85516	0.0030
BC	0.04	1	0.04	5.182226	0.0391
BD	0.0784	1	0.0784	10.15716	0.0066
CD	0.011025	1	0.011025	1.428351	0.2519
A ²	0.181805	1	0.181805	23.55392	0.0003
B ²	0.133882	1	0.133882	17.34514	0.0010
C ²	0.168485	1	0.168485	21.82812	0.0004
D ²	0.313708	1	0.313708	40.64267	<0.0001
残差	0.108062	14	0.007719		
失拟性	0.100342	10	0.010034	5.19905	0.0631
净误差	0.00772	4	0.00193		
总离差	1.884531	28			

另由分析结果可知:总多酚的提取率实验值与回归方程预测值的决定系数 R² 值为 94.27%,即模型响应值的变化有 94.27% 来自于所选变量,能较好地描述试验结果。并且修订系数 R²_{adj} 为 88.53%,变异系数 CV=1.71%,P<0.01。故该回归模型可判定为显著,拟合情况良好,采用响应面法针对燕竹笋壳原料进行

总多酚提取的优化试验设计的方法具有可行性^[12],并且所得回归方程模型有效、可靠。

2.2.2 各因素交互作用分析

从表 3 对回归方程系数显著性的检验可知,模型一次项 B、C、D 为极显著,A 为显著,单因素的影响顺序 D>C>B>A,即料液比>乙醇体积分数>提取时间>超声功率;交互项 AD、BC、BD 显著,AB、AC、CD 不显著;二次项 A²、B²、C²、D² 均极显著。

为更直观地考察 A、B、C、D 四个因素的交互作用,可运用 Design-Expert.8.0.6 软件绘制响应面曲面图,见图 6~11。

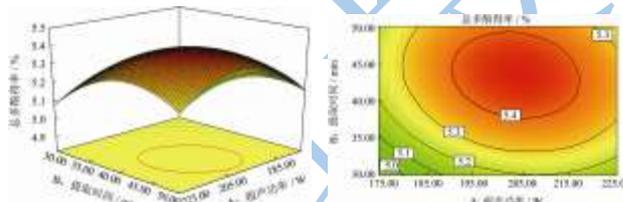


图 6 超声功率(A)和超声时间(B)对总多酚提取率影响的响应面图和等高线图

Fig.6 Response surface plots and contour plots for the effect of ultrasonic power(A) and extract time(B) on extraction rate of total polyphenols

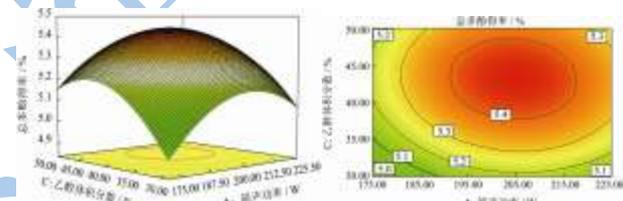


图 7 超声功率(A)和乙醇体积分数(C)对总多酚提取率影响的响应面图和等高线图

Fig.7 Response surface plots and contour plots for the effect of ultrasonic power(A) and ethanol concentration (C) on extraction rate of total polyphenols

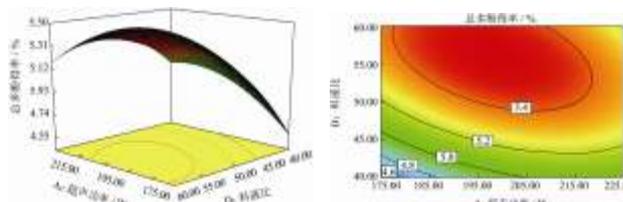


图 8 超声功率(A)和料液比(D)对总多酚提取率影响的响应面图和等高线图

Fig.8 Response surface plots and contour plots for the effect of ultrasonic power(A) and solid-liquid ration (D) on extraction rate of total polyphenols

绘制的响应面曲面图可以直观地反映两两变量之间交互作用的显著程度,并且将极值条件展现在等高线的圆心处。如图 6、7 所示,A、B 与 A、C 的等高线图较圆,说明 A 与 B, A 与 C 之间的相互作用对燕

竹笋壳总多酚的提取率的影响小; 其余如图 8~11 所示, 等高线图扁平, 并且所示曲面图陡峭, 表明各因素间相互影响大, A、D 两因素之间的影响最大^[13]。

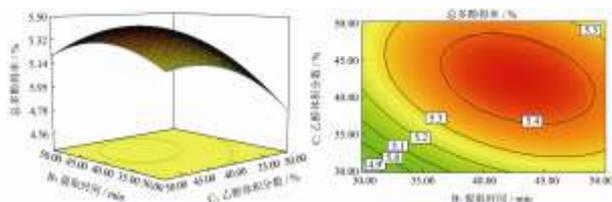


图 9 提取时间 (B) 和乙醇体积分数 (C) 对总多酚提取率影响的响应面图和等高线图

Fig.9 Response surface plots and contour plots for the effect of extract time(B) and ethanol concentration (C) on extraction rate of total polyphenols

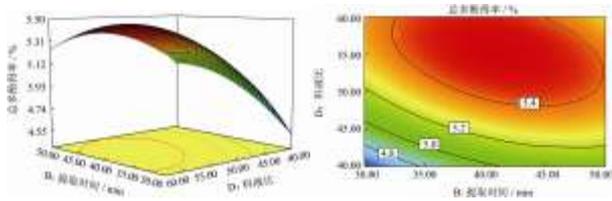


图 10 提取时间 (B) 和料液比 (D) 对总多酚提取率影响的响应面图和等高线图

Fig.10 Response surface plots and contour plots for the effect of extract time(B) and solid-liquid ration (D) on extraction rate of total polyphenols

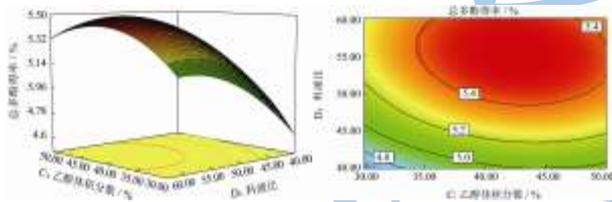


图 11 乙醇体积分数 (C) 和料液比 (D) 对总多酚提取率影响的响应面图和等高线图

Fig.11 Response surface plots and contour plots for the effect of ethanol concentration (C) and solid-liquid ration (D) on extraction rate of total polyphenols

2.2.3 最佳条件的确定及验证实验

表 4 验证试验结果 (n=3)

Table 4 Results of validation experiments (n=3)

编号	实际提取率/%	平均提取率/%	RSD/%	预测提取率/%	相对误差/%
1	5.62				
2	5.55	5.57	0.78	5.50	1.27
3	5.54				

使用 Design-Expert.8.0.6 软件对 2.2.1 所述二次回归方程进行优化计算, 得到燕竹笋壳总多酚最佳提取工艺条件: 超声波功率 197.98 W, 提取时间 40.20 min, 乙醇浓度 42.33%, 料液比 1:50.48。由此条件得到的

总多酚提取率的理论值为 5.50%。在考虑实际操作可行性的基础上对工艺参数进行修正, 故实际操作中在超声波功率 200W, 提取时间 40.2 min, 乙醇浓度 42%, 料液比 1:50.5 的条件下对燕竹笋壳中总多酚进行提取验证试验。3 次平行试验得到总多酚提取率的实际平均值为 5.57%, 与预测值之间相对标准偏差 (RSD) 为 0.78%, 相对误差为 1.27%, 由此表明实际提取率与回归方程所预测理论值相吻合^[14]。

3 结论

本文以燕竹笋壳为原料对其中的多酚类物质进行了超声波辅助条件下的提取。在单因素试验的基础上, 进行四因素三水平的 Box-Behnken 中心组合设计试验。使用 Design-Expert.8.0.6 软件建立响应面法模型, 方差分析表明其回归方程拟合性较好, 得到燕竹笋壳总多酚最佳提取工艺条件为: 超声波功率 200 W, 提取时间 40.2 min, 乙醇浓度 42%, 料液比 1:50.5。在此条件下, 3 次验证试验的实际平均提取率为 5.57%, RSD 为 0.78%, 与预测值相对误差为 1.27%。表明此工艺优化参数具有稳定性高、精确度好的特点, 为燕竹笋加工过程中废弃物的综合开发利用提供了重要的理论依据。

参考文献

- [1] 张规富, 谢深喜, 薛华. 雷竹笋保鲜技术研究[J]. 竹子研究汇刊, 2011, 30(3): 49-52
- [2] 严奉伟, 郝晶晶. 菜籽多酚抑菌作用研究[J]. 食品工业, 2011, 2: 1-2
- [3] 任亚梅, 李光辉. 石榴籽多酚的提取及其种壳种仁抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2012, 4: 31-32
- [4] 李红月, 陈超. 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 1: 117-119
- [5] 张铁英. 红豆中多酚类物质的提取及其含量测定的研究[J]. 中国食品添加剂, 2012, 24: 114-117
- [6] 熊建华, 刘胜兰, 黄占旺, 等. 响应面分析法优化金银花叶多酚的提取工艺[J]. 中国食品学报, 2011, 11(2): 115-121
- [7] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- [8] 吕春茂, 王博, 孟宪军, 等. 寒富苹果渣中多酚类物质超声波辅助提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(3): 47-51
- [9] Daniella Pingret, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Carine Le Bourvellec et al. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace [J]. Journal of Food Engineering, 2012, 111: 73-81
- [10] 胡明明, 张国文, 何力. 响应面法优化超声提取花生壳多酚

- [J].南昌大学学报理科版,2011,35(3):241-246
- [11] G Vázquez, M S Freire, J Santos, et al. Optimisation of Polyphenols Extraction from Chestnut Shell by Response Surface Methodology [J]. Waste and Biomass Valorization, 2010, 1: 219-225
- [12] 王晓阳,唐琳.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
- [13] Yi Sun, Wenqing Xu, Wenqin Zhang, et al. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology [J]. Separation and Purification Technology, 2011, 78: 311-320
- [14] 李炳辉,陈玲,李晓玺,等.超声强化响应面法优化知母多糖的提取工艺[J].现代食品科技,2011,27(4): 432-436

现代食品科技