

响应面法优化葛根多糖提取工艺的研究

张永军¹, 刘晓宇², 黄惠华¹

(1.华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640) (2.华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 本试验以野葛葛根提取类黄酮后的残渣为材料, 研究了葛根多糖的提取工艺。在单因素实验的基础上, 选定温度、时间和料液比三个因素的三个水平进行中心组合实验, 建立多糖得率的二次回归方程, 通过响应面分析及岭脊分析得到优化组合条件。研究表明: 当提取工艺条件为提取温度 98 ℃, 提取时间 2.4 h, 料液比 33:1 时, 多糖得率达到极大值。该条件下多糖得率预测值为 12.59%, 验证值为 12.63%。

关键词: 野葛; 多糖; 提取工艺; 响应面法; 优化

中图分类号: O629.13; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0678-05

Optimization of the Extraction Technology of Polysaccharides from Pueraria by Response Surface Analysis

ZHANG Yong-jun¹, LIU Xiao-yu², HUANG Hui-hua¹

(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The extraction of polysaccharides from the residue of pueraria after extraction of Flavonoids was studied in this paper. According to the single-factor experiments, three levels of the factors (extraction temperature, time and the ratio of water to pueraria residue) were selected for the central composite design to establish a quadric regression equation for describing the yield of polysaccharides. By response surface analysis, the optimum extraction conditions were obtained as follows: extraction temperature of 98℃, time of 2.4 h and water-pueraria residue ratio of 33:1, under which the highest yield of polysaccharides reached with estimated value and verified value being of 12.59% and 12.63%, respectively.

Key words: pueraria; polysaccharides; extraction technology; response surface analysis; optimization

葛根(Pueraria)为豆科葛属葛的块根, 始载于《神农本草经》, 具有解肌退热, 升阳透疹, 生津止渴等功效。我国卫生部 2000 年和 2002 年正式公布葛根为“药食同源植物”, 可用于功能性食品及新药的研发^[1]。我国葛根资源极为丰富, 除新疆、西藏、青海外, 各省均有分布^[2]。葛根的主要组成是: 淀粉、纤维素、蛋白质和总黄酮, 另外还含有少量的脂肪、果胶、鞣质和生物碱等。大量药理及临床研究证实, 多糖有抗癌、抗肥胖、控制血糖、降胆固醇、降血脂等生理功能^[3]。但在现实工业化生产中, 开发利用葛根资源时其总异黄酮和多糖提取相互分离, 顾此失彼, 而野生葛根的采挖必将造成大量的植被破坏和水土流失, 不利于生态环境的保护。因此, 探索葛根黄酮与多糖等综合开发的道路, 提高葛根资源的综合利用率和利用价值具

收稿日期: 2008-03-08

作者简介: 张永军(1984-), 男, 硕士研究生。研究方向: 食品工程

通讯作者: 黄惠华, 教授

有较大的现实意义。

本试验主要是利用野葛根提取葛根类黄酮后的残渣提取葛根多糖, 用苯酚-硫酸法绘制标准曲线, 以粗多糖得率为依据, 在预试验的基础上进行单因素和中心组合实验, 然后结合数理统计方法, 用 SAS 软件绘制响应面曲线, 并拟合出多元线性回归方程, 以探寻葛根多糖提取的最佳方案, 旨在为开辟野葛根综合提取工艺路线提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

野葛葛根, 产地为河北邯郸, 购自河南洛阳市场。

1.2 仪器与试剂

微型植物粉碎机、电热恒温干燥箱、紫外扫描仪、恒温水浴锅、离心机、循环水多用真空泵、旋转蒸发器、722 型可见分光光度计、真空干燥箱等。

无水乙醇、石油醚、硫酸、苯酚、葡萄糖、正丁

醇、乙醚、无水甲醇、卤仿、丙酮等，所有试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 工艺流程

野葛葛根提取黄酮后的滤渣→烘干至恒重→准确称量→热水浸提→离心分离→上清液浓缩→Sevage 法脱蛋白→醇沉过夜→离心去上清→冷冻干燥→粗多糖成品。

1.3.2 提取方法

取过 40 目筛的野葛粉末 100 g 置圆底烧瓶中，加石油醚（沸程 60~90 °C）500 mL，回流提取 1 h 以脱脂。过滤，滤渣挥干溶剂后用 80%乙醇 500 mL 回流 1 h，过滤。异黄酮等成分溶于滤液中。取滤渣烘干至恒重，准确称量 0.5 g，置圆底烧瓶中，加蒸馏水至预定体积，回流提取预设时间，趁热过滤，减压浓缩至原体积的 1/4~1/5。采用 Sevage 法脱蛋白 2~3 次后，加入 95%乙醇使溶液含醇至预设浓度，静置过夜，以 5000 r/min 离心分离 20 min，沉淀物冷冻干燥，得到总多糖组分。

1.3.3 粗多糖含量的计算

以葡萄糖为标准，采用改良苯酚—硫酸法^[4]。

1.3.4 粗多糖得率的计算

$$\text{粗多糖得率}/\% = (\text{粗多糖}/\text{g}) / (\text{样品}/\text{g}) \times 100\%$$

1.3.5 单因素实验

分别以不同的提取温度、提取时间、料液比以及醇沉浓度为单因素进行试验，考察各单因素对粗多糖得率的影响。

1.3.6 中心组合实验

在单因素试验基础上，确定中心组合试验的因素与水平。以粗多糖得率为响应值，通过响应面分析及岭脊分析对提取条件进行优化。中心组合试验因素与水平设计如表 1 所示。

表 1 中心组合设计的因素与水平表

Table 1 Process variables and their levels used in central composite design

因素	水平		
	-1	0	1
温度/°C	80	90	100
时间/h	1	2	3
料液比值(V/m)	20:1	30:1	40:1

2 结果与分析

2.1 提取温度对粗多糖得率的影响

称取 0.5 g 野葛虑渣，保持提取时间 2 h、料液比 1:20 和醇沉浓度 80%不变，研究温度对葛根粗多糖得

率的影响，结果如图 1 所示。

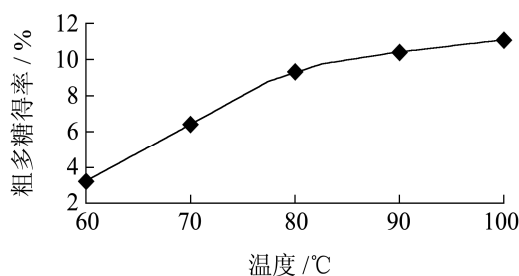


图 1 提取温度对粗多糖得率的影响

Fig.1 Effect of the extraction temperature on the yield of polysaccharide

由图 1 可见，随着温度的升高，多糖的得率逐渐增加，且增幅明显。当高于 80 °C 时，增幅有所减少，但仍然缓慢上升。这可能是伴随温度的升高，原料溶胀度增大，传质强化，从而使得多糖的溶出率增加的缘故。为了提高响应面分析的科学性，在中心组合实验中分别选取 80 °C、90 °C 和 100 °C 作为提取温度的三个水平。

2.2 提取时间对粗多糖得率的影响

称取 0.5 g 野葛虑渣，保持提取温度 80 °C、料液比 1:20 和醇沉浓度 80%不变，研究提取时间对葛根粗多糖得率的影响，结果如图 2 所示。

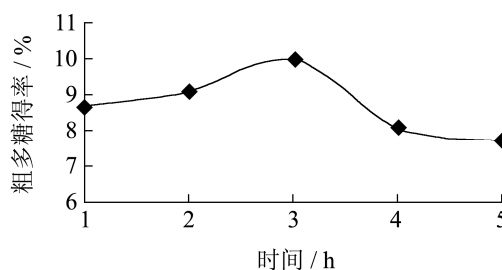


图 2 浸提时间对粗多糖得率的影响

Fig.2 Effect of the extraction time on the yield of polysaccharide

由图 2 可知，多糖提取得率随着提取时间的增长，呈现先上升再下降的总体趋势，在 3 h 附近出现最大值。为了缩短工时减少能耗，选择 1 h、2 h 和 3 h 作为中心组合实验的三个水平。

2.3 料液比对粗多糖得率的影响

称取 0.5 g 野葛虑渣，保持提取温度 80 °C、时间 2 h 和醇沉浓度 80%不变，研究料液比对葛根粗多糖得率的影响，滤渣不再进行浸提，结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出，多糖得率随料液比的增大而呈上升趋势，但到一定程度后保持水平，1:20~1:40 为较好的料液比。在粗多糖的提取过程中，溶剂用量与多糖的溶出有一个对应的平衡关系，即有一个饱和溶出度的问题^[5]。溶剂用量的最低限度是保证物料刚被

全部浸没,随着溶剂用量的增加,物料的溶出量逐渐增加,到达饱和溶出度后,多糖得率不再改变。因此,选取 1:20、1:30 和 1:40 作为中心组合实验设计料液比的三个水平。

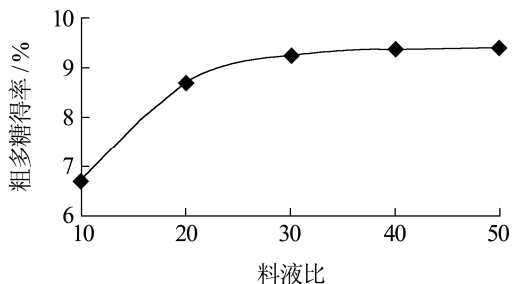


图3 料液比对多糖得率的影响

Fig.3 Effect of the solid-liquid ratio on the yield of polysaccharide

2.4 醇沉浓度对粗多糖得率的影响

称取 0.5 g 野葛虑渣,保持多糖提取温度 80 ℃、时间 2 h 和料液比 1:20 不变,研究醇沉浓度对葛根粗多糖得率的影响,结果如图 4 所示。

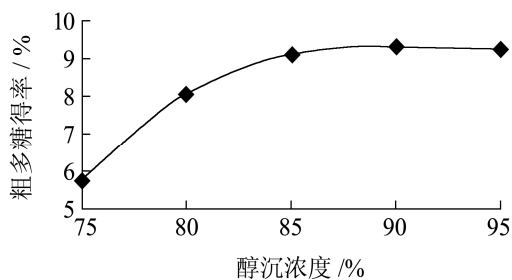


图4 醇沉浓度对粗多糖得率的影响

Fig.4 Effect of the ethanol concentration on the yield of polysaccharide

由图 4 可看出,粗多糖得率随着醇沉浓度的增加呈上升趋势,在 75%~85%浓度范围内,增幅明显,之后趋于平稳,达 95%时,稍有降低。而造成 95%粗多糖沉淀降低的原因可能是有些多糖分子与醇溶蛋白相结合,随着乙醇浓度的增加,这些醇溶蛋白分子溶于乙醇中从而使多糖也随之溶于乙醇溶液中,不被沉淀,同时一些醇溶性杂质、亲脂性强的成分溶出量增加,共同导致了粗多糖得率的降低^[6]。所以,并非是醇沉浓度越高,粗多糖得率越高。此外,考虑到不同乙醇浓度的价格问题,为了节约成本,采用 85%的醇沉浓度较为合理。

2.5 响应面设计方案及结果分析

根据 Box-Benhnken 的中心组合实验设计原理^[7],综合单因子影响实验结果,选取提取温度、浸提时间、料液比作为响应面设计的 3 个因素,在单因子试验的基础上,采用 3 因素 3 水平的响应面分析方法,

并对表 1 所列的提取温度 Z_1 、浸提时间 Z_2 和料液比 Z_3 作如下变换: $X_1=(Z_1-90)/10$, $X_2=(Z_2-2)/1$, $X_3=(Z_3-30)/10$ 。以 X_1 , X_2 , X_3 为自变量,以粗多糖得率 (Y) 为响应值,实验方案及实验结果见表 2。

表 2 响应面分析方案及实验结果

Table 2 Experimental design and results of response surface design

试验号	X_1	X_2	X_3	Y (多糖得率/%)
1	-1	-1	0	8.2229
2	-1	0	-1	9.2132
3	-1	0	1	9.9998
4	-1	1	0	10.3383
5	0	-1	-1	8.2266
6	0	-1	1	9.3764
7	0	1	-1	10.4634
8	0	1	1	11.8104
9	1	-1	0	10.2787
10	1	0	-1	11.3492
11	1	0	1	12.6137
12	1	1	0	13.1292
13	0	0	0	10.6239
14	0	0	0	10.5947
15	0	0	0	10.6458

注: X_1 , X_2 , X_3 分别表示提取温度,提取时间和料液比。

采用 SAS RSREG 程序对表 2 所得数据进行回归分析,并做出响应面图和等值线图。各因素经回归拟合后,解得回归方程:

$$Y=27.2259-0.5787X_1+1.3106X_2+0.0446X_3+0.0035X_1^2+0.0184X_1X_2-0.4770X_2^2+0.0012X_1X_3+0.0049X_2X_3-0.0018X_3^2$$

回归模型方差分析结果如表 3 所示。

表 3 多糖得率二次多项回归模型方程方差分析

Table 3 Varian analysis of quadratic regression equation

回归方 差来源	自由度	平方和	F 值	P 值 Pr> t	显著 性
一次项	3	25.7055	1121.46	<.0001	**
二次项	3	1.4921	65.09	0.0002	**
交互项	3	0.2019	8.81	0.0194	*
模型	9	27.3995	398.46	<.0001	**
失拟项	3	0.0369	18.71	0.0512	
纯误差	2	0.0013			
总误差	5	0.0382			

注: **表示极显著水平 ($p<0.01$); *表示显著水平 ($p<0.05$)。

由表 3 方差分析结果可知, 回归模型 ($p < 0.0001$) 高度显著, 一次项 ($p < 0.0001$) 也高度显著, 二次项 ($p = 0.0002 < 0.01$) 和交互项 ($p = 0.0194 < 0.05$) 都是显著的, 从另一种意义上讲, 这种实验方法是可靠的。而且方程的失拟项很小 ($F = 18.71, p = 0.0512 > 0.05$), 表明该方程对实验拟合情况好, 实验误差小。因此, 可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析, 各具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。

2.5.1 响应面图解析

回归模型的响应面图见图 5、图 6 和图 7。各图表示 X_1 、 X_2 和 X_3 中任意一个变量取零时, 其余两个变量对粗多糖得率的影响。

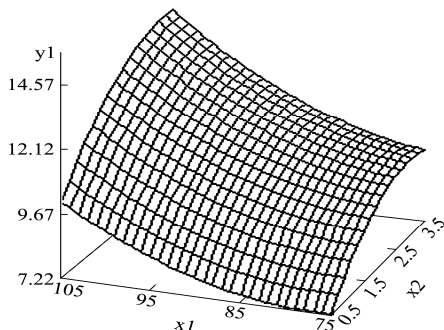


图 5 温度和时间及其交互作用对粗多糖得率影响的响应面
Fig.5 Three-dimensional response surface graphs showing combined effects of extraction temperature and time on the yield of polysaccharide

注: x_1 表示温度, x_2 表示时间, 料液比固定为 1:30。

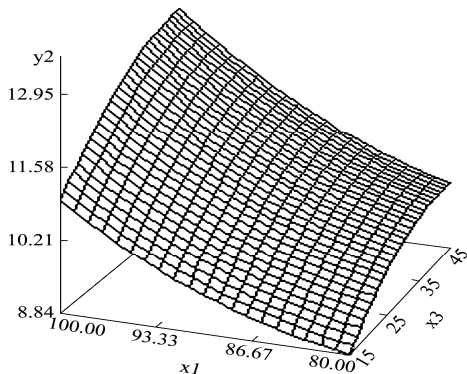


图 6 温度和料液比及交互作用对粗多糖得率影响的响应面
Fig.6 Three-dimensional response surface graphs showing combined effects of extraction temperature and the solid-liquid ratio on the yield of polysaccharide

注: x_1 表示温度, x_3 表示料液比, 提取时间固定为 2 h。

图 5 中当 $X_3 = 30$ (料液比为 1:30) 时, 时间不变, 随着温度的升高, 粗多糖得率增加, 且在低温中要比在高温中升高的速度快; 温度不变, 随提取时间的延长, 多糖得率缓慢上升。由此可以推断出, 在料液比

一定的条件下, 高温、延时有助于提高多糖的得率。

由图 6 可以看出, 当 $X_2 = 2$ (提取时间为 2 h) 时, 温度不变, 随料液比的增加, 多糖得率增加, 且在低料液比时比高料液比增加的速度更快; 料液比不变, 多糖得率随温度升高而缓慢上升。由此可以推断出与图 5 相类似的结果, 在提取时间不变的条件下, 多糖得率随温度和料液比的增加而增加。

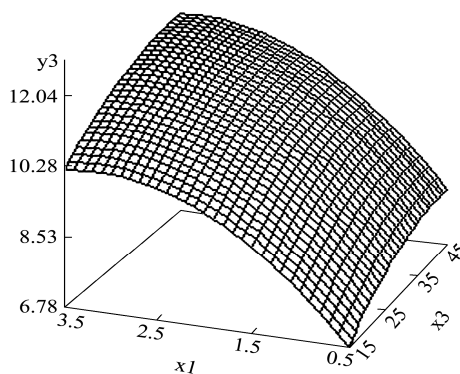


图 7 时间和料液比及交互作用对粗多糖得率影响的响应面
Fig.7 Three-dimensional response surface graphs showing combined effects of extraction time and the solid-liquid ratio on the yield of polysaccharide

注: x_2 表示时间, x_3 表示料液比, 温度固定为 80 °C。

由图 7 可知, 当 $X_1 = 80$ (提取温度为 80 °C) 时, 无论保持时间不变而增加料液比值, 还是保持料液比值不变而延长浸提时间, 两种路线显示出极为相似的变化趋势, 即在高值区增加的速率大于在低值区。

2.5.2 岭脊分析

从典型分析表 4 可以看出, 3 个因素的特征值有正有负, 表明此二次响应面是鞍面, 无极值存在; 同时, 这与以上响应面图的直观显示结果是一致的。因此不能直接从此二次响应面上找出最佳工艺参数, 需要进一步作岭脊分析^[8]。

表 4 典型值分析表

Table 4 Representative values of the response surface experiment

特征值	特征向量		
	X_1	X_2	X_3
0.3650	0.9872	0.1111	0.1142
-0.1814	-0.1199	0.0454	0.9918
-0.4881	-0.1050	0.9928	-0.0582

岭脊分析的原理是以原始设计中心点 $X_i = 0 (i=1, 2, 3, \dots)$ 为球心, R 为半径的超球面与响应面的交点 (即脊点) 形成的轨迹范围内找出最佳响应值, 即最佳工艺条件。岭脊分析的结果是对每个坐标从编码零值点开始不断扩大, 半径 R 可以由试验者自行规定, 但

不能超出试验范围^[9]。

为了便于分析,本文选取 R 在 0.0, 0.1, 0.2,……, 1.0 上计算峰点。然后调用岭脊分析程序,首先对自变量温度、时间和料液比进行 Sort 由小到大的排序,并运用选项 Lackfit 要求对回归模型进行不适合度检定,岭脊分析结果见表 5 所示。

表 5 岭脊分析结果

Table 5 Ridge analysis of the response surface experiment

编码 半径	预估响 应值	标准 误差	未编码因数		
			X ₁	X ₂	X ₃
0.0	10.6215	0.0505	90.0000	2.0000	30.0000
0.1	10.8013	0.0503	90.6998	2.0641	30.3150
0.2	10.9830	0.0499	91.4551	2.1222	30.6233
0.3	11.1674	0.0492	92.2572	2.1748	30.9220
0.4	11.3553	0.0483	93.0975	2.2223	31.2093
0.5	11.5473	0.0474	93.9685	2.2655	31.4847
0.6	11.7440	0.0467	94.8637	2.3048	31.7480
0.7	11.9459	0.0464	95.7782	2.3408	31.9998
0.8	12.1531	0.0469	96.7077	2.3740	32.2408
0.9	12.3662	0.0484	97.6491	2.4047	32.4719
1.0	12.5852	0.0513	98.3998	2.4334	32.6938

注: X₁, X₂, X₃ 分别表示提取温度, 提取时间和料液比。

表 5 中编码半径 R (Coded Radius) = 0 对应未编码稳定点 (X₁, X₂, X₃) = (90, 2, 30), 随着 R 的增加给出了一系列进一步的参考试验点。从此表中可以看出, 随着编码半径 r 的增加, 响应值 Y 也逐渐增大。

由此可见, 多糖得率随着提取温度、料液比、提取时间的增加而增大。当 R>1.0 时, X_i 超出了试验的水平范围, 不予考虑。在本试验的水平范围内, 最大响应值时 R 为 1.0, 此时的提取温度为 98.40 °C, 料液比为 32.69:1, 提取时间为 2.43 h, 理论上一次提取葛根多糖得率为 12.59%, 略低于中心组合试验的第 11、12 组试验, 这是由于模型的误差所致。为了方便实际操作, 取提取温度为 98 °C, 料液比为 33:1, 提取时间为 2.4 h, 多糖的实际得率为 12.63%, 与预测值基本一致。所以, 此回归模型可较好地预测葛根多糖的得率。

3 结论

3.1 在试验中, 分别采用了 80% 的石油醚和乙醇进行

脱脂和脱酮及除单糖、寡糖等小分子物质, 尤其在醇沉工序中采用 85% 浓度的乙醇沉淀多糖, 所以对石油醚和乙醇应进行回收, 以降低生产成本, 减少资源浪费。

3.2 将响应面分析法 (RSA) 应用于葛根粗多糖提取工艺的研究, 采用合理的试验设计对提取工艺进行全面分析和评测, 并依据回归分析确定各工艺条件的影响因子。分析结果显示, 葛根多糖提取率与提取温度、提取时间、料液比的二次回归曲面为鞍面, 需要通过岭脊分析找出最佳提取工艺条件。进一步调用岭脊分析程序, 以实验中心点 (提取温度 90 °C、浸提时间 2 h、料液比为 1:30) 为圆点, 随着编码半径 (R) 的增加给出了一系列进一步的参考试验点。岭脊分析的结果表明水法提取葛根多糖的最佳工艺条件为: 提取温度为 98.60 °C, 料液比为 32.69:1, 提取时间为 2.43 h, 理论上一次提取葛根多糖得率为 12.59%。为了方便实际操作, 取提取温度为 98 °C, 料液比为 33:1, 提取时间为 2.4 h, 多糖的实际得率为 12.63%, 与预测值基本一致。

参考文献

- [1] 黄彤, 金邦荃. 葛根及葛根异黄酮的应用. 中国食物与营养 [J], 2004, 1: 23-24
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴: 第二册 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 502
- [3] Xu, H.X., Spencer, H.S.L., Song, F.L., Robert, L.W., & Jonathan, B. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharides from *Prunella vulgaris*. Antiviral Research [J], 1999, 44: 43-54
- [4] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究 [J]. 中国药学杂志, 1996 (9): 550-553
- [5] 李桂银, 李晓如, 丁萍. 补阳还五汤多糖的微波辅助提取研究. 广东化工 [J], 2007, 34(3): 37-40
- [6] 活泼, 蒋家新, 黄光荣. 香菇多糖提取工艺的研究. 粮油食品科技 [J], 2003, 11(3): 5-17
- [7] Box G E P, Hunter W G. Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building [M]. New York: Wiley, 1990
- [8] 王黎明, 夏文水. 水法提取茶多糖工艺条件优化. 食品科学 [J], 2005, 26(5): 171-174
- [9] 黄燕, 吴平. SAS 统计分析及应用 [M]. 机械工业出版社, 2006: