

甜橙皮渣中柠檬苦素类似物 提取工艺研究

陈飞平¹, 曾凡坤^{1,2,*}, 吴 剑³

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715;
2.重庆市特色食品工程技术中心, 重庆 400715;
3.嘉兴市农业科学研究院, 浙江嘉兴 314024)

摘 要:以硫酸调节的酸性水为提取剂, 采用单因素实验和正交实验探讨了料液比、提取温度、时间和提取剂 pH 对甜橙皮渣中柠檬苦素类似物提取的影响, 并确定了最佳的工艺参数为温度 65℃、时间 1.5h、提取剂 pH 为 4、料液比 1:12, 在该工艺路线下提取柠檬苦素类似物的得率为 1.19mg/g(鲜重)。

关键词:甜橙, 柠檬苦素类似物, 酸性水提取

Study on extraction of limonoids from sweet orange peel

CHEN Fei-ping¹, ZENG Fan-kun^{1,2,*}, WU Jian³

(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2.Chongqing Special Food Engineering Technology Research Center, Chongqing 400715, China;
3.Jiaxing Agricultural Science Research Institute, Jiaxing 314024, China)

Abstract: The solid-liquid ratio, extraction temperature, time and pH on extraction limonoids from orange peel, were researched by acidic water as extracting solvent by using single-factor experiments and orthogonal test. The optimal parameters of extraction limonoids were acidic water (pH 4.0) as solvent and solid-liquid ratio 1:12 at 65℃ for 1.5h, and the yield of limonoids was 1.19mg/g (fresh weight).

Key words: sweet orange; limonoids; acidic water extraction

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)06-0276-04

柠檬苦素类似物是一类三萜类植物次生代谢物, 广泛存在于柑橘属果实中, 而且含量丰富。研究发现, 柠檬苦素类似物具有抗癌^[1-5]、抗氧化^[6-7]、抑菌^[8-10]、镇痛抗炎^[11]等作用, 开发添加柠檬苦素类似物的新型食品, 具有重要的意义。甜橙是加工橙汁的主要品种, 加工后约产生 40% 皮渣, 对这些皮渣进行柠檬苦素类似物、类黄酮、果胶等物质的提取, 可以提高甜橙的附加值。国内外对柠檬苦素类似物的提取主要有: 有机溶剂提取法^[12-14]、超临界 CO₂ 萃取法^[15-16]、水溶助剂提取法^[17-18]等。本文基于成熟果实中大部分柠檬苦素类似物以可溶于水、呈酸性配糖体形式存在的条件^[19] 采取酸性水浸提法提取, 以其为柠檬苦素类似物的提取提供一种成本较低的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2011-06-09 * 通讯联系人

作者简介: 陈飞平 (1985-), 女, 研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程。

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD47B06-4)。

甜橙皮渣 中国农业科学院柑桔研究所; 柠檬苦素标准品 (纯度 > 98%) Sigma 公司; 邻苯二甲酸氢钾 基准试剂; 浓硫酸、浓盐酸、冰醋酸、柠檬酸、对-二甲基苯甲醛、无水乙醇、三氯化铁 分析纯。

AE200 电子天平 Tokyo Japan; 722S 可见分光光度计 上海棱光技术有限公司; HH 恒温水浴锅 江苏金坛中大仪器厂; JQS200DE 数控超声波清洗仪 昆山市超声仪器有限公司; pH S-3C 酸度计 成都方舟科技开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理 甜橙皮渣 → 挑选 → 粗粉碎 → 沥干水分 → 捣碎 → 备用

1.2.2 柠檬苦素类似物含量的测定

1.2.2.1 标准曲线的绘制 精密称取 6mg 柠檬苦素标准品, 用无水乙醇溶解并定容到 50mL 的容量瓶中, 作为母液备用。参考徐玉娟等人的方法^[20], 精密吸取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0mL 标准溶液 (100mg/L) 置于 6 支 10mL 比色管中, 分别准确加入无水乙醇至 2mL, 再分别快速加入显色剂 5mL, 摇匀, 室温静置 30min 后, 以空白溶液为参比对照, 在 494nm 波长下测定吸光度。以标准品的浓度为横坐标, 吸光度为

纵坐标绘制标准曲线,求得回归方程为 $y = 0.0104x - 0.0076$ ($R^2 = 0.9994$)。

1.2.2.2 甜橙皮渣中柠檬苦素类似物含量的测定
精密吸取各种不同实验条件下所得的样液 1mL 置于 10mL 比色管中,准确加入该实验条件下的提取剂至 2mL,然后快速加入显色剂 5mL,摇匀,室温静置 30min 后,以空白溶液作为参比对照,494nm 波长下测定吸光度。按照下述公式计算甜橙皮渣中柠檬苦素类似物的得率。

得率(mg/g 鲜重) = $\frac{2CV}{1000M}$

式中:C-测得含量,mg/L;V-提取剂体积,mL;M-样品质量,g。

1.2.3 单因素实验 以提取剂、料液比、温度、时间和提取剂 pH 进行单因素实验。

1.2.4 正交实验设计 根据单因素实验结果,设计料液比、温度、提取剂 pH 和时间 4 因素 3 水平的正交实验,确定最佳工艺条件。为了保证实验结果的科学性,更好地估计实验误差,增加差异显著性判断和提高实验效率,本实验进行三次重复实验。正交实验设计见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 The factors and levels for the orthogonal design				
水平	因素			
	A 料液比	B 温度(℃)	C 时间(h)	D 提取剂 pH
1	1:10	55	0.5	3.5
2	1:12	60	1.0	4.0
3	1:14	65	1.5	4.5

1.2.5 最佳工艺条件验证 通过正交实验分析得到甜橙皮渣酸性水浸提法提取柠檬苦素类似物的最佳工艺条件,精密称取样品三份,各约 5g,在最佳条件下进行提取实验,计算得率。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 甜橙皮渣柠檬苦素类似物最佳提取剂的确定

精密称取样品约 2g、4 份,分别加入 pH 7 的纯水以及分别用硫酸、盐酸、冰醋酸和柠檬酸调节 pH 至 4 的纯水 20mL,50℃ 浸提 2h,过滤。得率如图 1 所示。

由图 1 可知,纯水能够把皮渣中的柠檬苦素类似物提取出来,添加有机酸或无机酸调节纯水至酸性可以增加目标物质的溶出,提高提取率。在相同条件下,用硫酸调节成酸性的纯水提取剂的提取效果最好,因此以下实验均选用以硫酸调节的酸性纯水作为提取剂。

2.1.2 最佳料液比的确定 精密称取样品约 5g、5 份,分别加入用 H₂SO₄ 调节 pH 至 4 的纯水 40、60、80、90、100mL,50℃ 浸提 2h,过滤,得率如图 2 所示。

从料液比对柠檬苦素类似物提取的影响结果(图 2)可知,料液比为 1:12 时,柠檬苦素类似物的得率最大。随着料液比的增加,得率呈下降趋势,可能是由于水的极性太强,提取物较容易被氧化,因此,选取 1:12 作为最佳的提取料液比。

2.1.3 最佳温度的确定 精密称取样品约 5g、6 份,

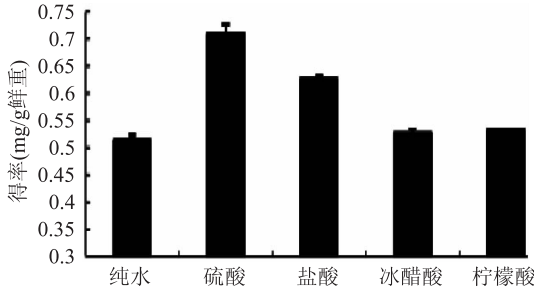


图 1 提取溶剂对柠檬苦素类似物提取的影响
Fig.1 Effect of extraction solvent on limonoids extraction rate

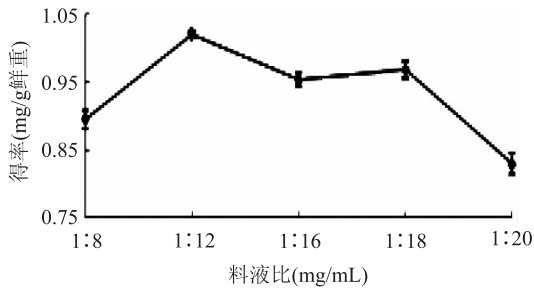


图 2 料液比对柠檬苦素类似物提取的影响
Fig.2 Effect of material-solvent ratio on limonoids extraction rate

分别加入 60mL 用 H₂SO₄ 调节 pH 至 4 的纯水,在 40、50、60、70、80、90℃ 的水浴中浸提 2h,过滤,得率如图 3 所示。

一般情况下,物质在溶剂中的溶解度会随着温度的升高而增加,但柠檬苦素类似物作为一类天然抗氧化物质,过高的温度会影响其生物活性。如图 3 所示,随着温度的升高,柠檬苦素类似物的提取得率也相应增大,当温度达到 60℃ 时,得率基本趋于平稳,60~90℃ 四个温度处理的提取效率无显著差异,考虑到生产成本和保持提取物质活性等因素,选取 60℃ 作为最佳的提取温度。

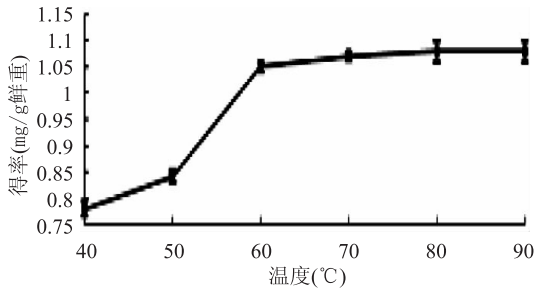


图 3 提取温度对柠檬苦素类似物提取的影响
Fig.3 Effect of extraction temperature on limonoids extraction rate

2.1.4 最佳时间确定 精密称取样品约 5g、5 份,加入 60mL 用 H₂SO₄ 调节 pH 至 4 的纯水,60℃ 浸提 0.5、1、2、3、4h,过滤,得率如图 4 所示。

由图 4 可知,随着提取时间从 0.5h 增加到 1h,得率呈直线增加,之后随着时间的增加,出现下降的趋势,可能是由于甜橙皮渣在冷冻储藏过程中,细胞内结冰导致细胞壁被破坏而加快柠檬苦素类似物的溶出。随着提取时间的延长,提取率反而降低,这可能

与柠檬苦素类似物复杂的结构和容易被氧化的特性有关,长时间暴露在空气中的柠檬苦素类似物可被氧化而使结构发生变化,所以提取时间过长,提取率可能会降低,因此选择 1h 作为最佳的提取时间。

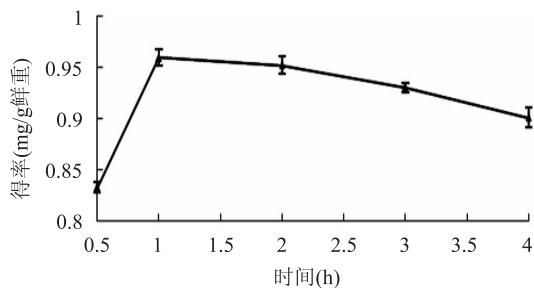


图4 提取时间对柠檬苦素类似物提取的影响

Fig.4 Effect of extraction time on limonoids extraction rate

2.1.5 最佳提取剂 pH 的确定 精密称取样品约 5g、5 份,分别加入用 H_2SO_4 调节 pH 至 2、3、4、5、6 的纯水 60mL,60℃ 浸提 1h,过滤,得率如图 5 所示。

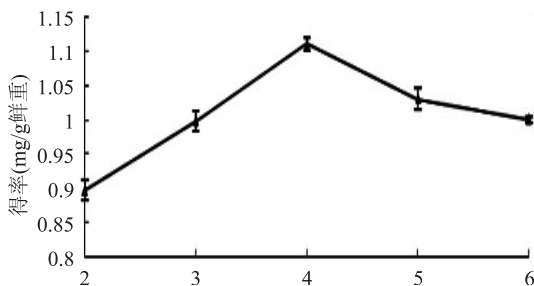


图5 提取溶剂 pH 对柠檬苦素类似物提取的影响

Fig.5 Effect of extraction solvent pH on limonoids extraction rate

一般来说,水溶液的酸碱度对物质在水中的溶解度有很大的影响。含弱酸根的有机物随溶液的 pH 升高,溶解度增大,但柠檬苦素类似物在碱性条件下易发生结构变化,影响其生物活性。由图 5 可知,在 pH 较低的情况下,提取效果随 pH 的增加而增强,当 pH 为 4 时,提取效果最佳,随后提取效果随 pH 升高反而下降,因此选择 pH 4 作为最佳的提取剂 pH。

2.2 正交实验结果与分析

$L_9(3^4)$ 正交实验结果如表 2 所示,方差分析结果见表 3。从正交实验结果(表 2)可知,酸性水浸提法提取甜橙皮渣中柠檬苦素类似物的影响因素主次顺序为 $B > C > D > A$,即温度 > 时间 > 提取剂 pH > 料液比;方差分析(见表 3)得出温度对甜橙皮渣中柠檬苦素类似物提取的影响高度显著,时间对甜橙皮渣中柠檬苦素类似物提取的影响显著,因此优化工艺为 $B_3C_3D_2A_2$,即温度为 65℃、时间为 1.5h、提取剂 pH 为 4、料液比为 1:12,一次提取得率可达到最大。

2.3 最佳工艺的验证结果

将理论最佳工艺条件与实验所得柠檬苦素类似物得率最高的工艺条件进行比较实验,结果见表 4。从实验结果可看出,两者的柠檬苦素类似物得率相差较大,且料液比的增大会增加成本和后续工艺的处理,因此,在综合效能和能源等因素后,得出提取

温度 65℃,提取时间 1.5h,提取溶剂 pH 4 和料液比 1:12 的提取工艺条件具有较高的可行性,为提取甜橙皮渣中柠檬苦素类似物的最佳工艺条件。

表 2 水浴浸提提取甜橙皮渣中柠檬苦素类似物的正交实验表

Table 2 Orthogonal test for limonoids extraction from sweet orange peel by water bath extraction

实验号	A	B	C	D	得率 (mg/g 鲜重)
1	1	1	1	1	0.942
2	1	2	2	2	0.964
3	1	3	3	3	1.060
4	2	1	2	3	1.015
5	2	2	3	1	0.997
6	2	3	1	2	1.037
7	3	1	3	2	1.072
8	3	2	1	3	0.817
9	3	3	2	1	1.052
K_1	2.966	3.029	2.796	2.991	
K_2	3.049	2.778	3.032	3.073	
K_3	2.942	3.149	3.129	2.893	
k_1	0.988	1.010	0.932	0.997	
k_2	1.016	0.926	1.011	1.024	
k_3	0.981	1.050	1.043	0.964	
R	0.035	0.124	0.111	0.060	

表 3 水浴浸提提取甜橙皮渣中柠檬苦素类似物正交实验方差分析结果

Table 3 Result of variance analysis of orthogonal experiment for extracting limonoids from sweet orange peel by water bath extraction

方差分析	偏差平方和 SS	自由度 f	平均偏差平方和 S/f	F 值	显著性
A	0.0043	2	0.0022	0.361	
B	0.0818	2	0.0409	6.705	**
C	0.0653	2	0.0327	5.361	*
D	0.0216	2	0.0108	1.770	
残差	0.1100	18	0.0061		
总和	0.3230				

注: $F_{0.05}(2,18) = 3.55$, $F_{0.01}(2,18) = 6.01$ 。

表 4 对比实验结果

Table 4 Result of contrast experiment

工艺	得率 (mg/g, 鲜重)
提取温度 65℃, 提取时间 1.5h, 提取溶剂 pH 4 和料液比 1:12	1.194
提取温度 55℃, 提取时间 1.5h, 提取溶剂 pH 4 和料液比 1:14	1.072

3 结论

本实验采用新鲜甜橙皮渣(含有果皮、种子、囊衣等)作为原料,优化了酸性水提取柠檬苦素类似物的提取工艺,得到了最佳的提取工艺参数为:料液比为 1:12、温度为 65℃、时间为 1.5h、提取剂 pH 为 4,在此条件下柠檬苦素类似物的得率为 1.19(mg/g, 鲜重),与前人用丙酮提取干燥柑橘种子中柠檬苦素类似物结果相符^[18]。采用硫酸调节纯水作为提取剂,

成本较有机溶剂低,提取效果较好,提取工艺简单,而且提取剂中酸浓度极低,后期除污简单,对环境污染小,容易实现工业化生产。

参考文献

- [1] Kelly C, Jewell C, O'Brien NM. The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat [J]. Nutrition Research, 2003(23): 681-690.
- [2] Tanaka, Maeda M, Kohno H, et al. Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by the citrus limonoids obacunone and limonin [J]. Carcinogenesis, 2001(22): 193-198.
- [3] Miller E G, Porter J L, Binnie W H, et al. Further studies on the anticancer activity of citrus limonoids [J]. Agricultural Food Chemistry, 2004, 52: 4908-4912.
- [4] 罗水忠, 潘莉华, 姜绍通. 柑橘类果汁中柠檬苦素的含量及其性质研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 4-7.
- [5] 邹连生. 柑桔类柠檬苦素的提取、纯化和体外抗肿瘤的研究[D]. 西南大学, 2001.
- [6] Poulouse S M, Harris E D, Patil B S. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity [J]. Nutrition and Cancer, 2005, 135: 870-877.
- [7] 施英, 徐玉娟, 陈卫东, 等. 桔核中柠檬苦素类物质最佳提取条件的探讨及清除 DPPH 活性的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 74-76.
- [8] 罗水忠, 潘莉华, 何建军, 等. 柑橘籽中柠檬苦素的提取与抑菌性研究[J]. 农产品加工·学刊, 2006(10): 105-107.

- [9] 孙崇德. 柑桔柠檬苦素、诺米林、吡啶酮的检测及相关含量与生物活性研究[D]. 浙江大学, 2006.
- [10] 李赤翎, 俞建, 蒋雪薇, 等. 柠檬苦素类似物糖苷的抗菌与抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2008(5): 154-156.
- [11] 温靖, 施英, 徐玉娟, 等. 柑桔果实中柠檬苦素抗炎镇痛作用的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 515-518.
- [12] 孙崇德, 陈昆松, 戚行江, 等. 柑桔果实中天然柠檬苦素和诺米林的提取、鉴别与检测[J]. 中国食品学报, 2004, 4(1): 6-11.
- [13] 刘亮, 戚向阳, 董绪燕. 枳实副产物中柠檬苦素最佳提取条件的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(7): 226-229.
- [14] 张朝晖, 朱中品, 李辉. 柑橘中柠檬苦素超声波提取工艺及含量分析[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 56-59.
- [15] Yu J, Dandekar D V, Tolebo R T, et al. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (Citrus paradise Macf.) seeds [J]. Food Chemistry, 2007, 107: 1026-1031.
- [16] 杨军, 余顺德, 范菊娣, 等. 超临界二氧化碳萃取桔核中柠檬苦素的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 934-935.
- [17] Dandekar D V, Jayaprakasha G K, Patil B S. Hydrotropic extraction of bioactive limonin from sour orange (Citrus aurantium L.) Seeds [J]. Food Chemistry, 2007(12): 71-73.
- [18] 刘君. 柑桔种子中类柠檬苦素提取纯化工艺研究[D]. 西南大学, 2008.
- [19] Fong C H, Hasegawa S, Herman Z, et al. Biosynthesis of limonoid glucosides in lemon (citrus lemon) [J]. Science Agriculture, 1999, 54: 393-398.
- [20] 徐玉娟, 施英, 肖更生, 等. 一种快速检测桔核中柠檬苦素类物质含量的方法[J]. 食品科技, 2007(2): 216-218.

(上接第 275 页)

底物, 料液比为 1:8, STP 添加量为 4%, 酶解时间为 3.37h, 改性时间为 35.68min, 进行验证实验, 测得总蛋白提取率为 94.05%。这与理论预测值误差在 1% 以内, 说明采用响应面法优化得到的工艺条件参数准确可靠, 按照建立的模型进行预测在实践中是可行的。采用大豆粉直接酶解, 即加酶量 $5000\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物, 料液比为 1:8, STP 添加量为 4%, 酶解时间为 4h, 此条件下的总蛋白提取率为 78.82%。

3 结论

3.1 各因素对总蛋白提取率的影响顺序为: 料液比 > STP 添加量 > 酶解时间 > 改性时间 > 加酶量。

3.2 利用响应面优化出的工艺参数为: $5000\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 底物, 料液比为 1:8, STP 添加量为 4%, 酶解时间为 3.37h, 改性时间为 35.68min。在该条件下的总蛋白提取率为 94.05%, 与理论预测值误差在 1% 以内。这说明利用本实验建立的模型优化出的结果与实际情况吻合。

3.3 响应面法优化水酶法结合磷酸化提取大豆蛋白的生产工艺与大豆粉直接酶解的工艺相比, 总蛋白提取率提高了 15%。

参考文献

- [1] HSIEN-YI Sung, HAIENI-JER CHEN, TIN-YIN LIU, et al. Improvement of the Functionalities of Soy Protein Isolate through

Chemical Phosphorylation [J]. Food Science, 1983, 48(3): 716-721.

- [2] Frank A W. Synthesis and properties of N-, O-, and S-phospho derivatives of amino acids, peptides and proteins [J]. CRC Crit Rev Biochem, 1984, 16(1): 51-101.
- [3] Frank A W. Non-enzymic methods for the phosphorylation of proteins [J]. Phosphorus and Sulfur, 1987, 29: 297-315.
- [4] Guenter Matheis, John R Whitaker. Chemical phosphorylation of food proteins: an overview and a prospectus [J]. Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32(4): 699-705.
- [5] 卢寅泉, 陈彤华, 陈连就. 磷酸化大豆蛋白功能特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 1993(1): 17-24.
- [6] 潘秋琴, 沈蓓英, 程霜. 花生蛋白质的磷酸化改性[J]. 中国油脂, 1997, 22(1): 25-27.
- [7] 吴向明, 雕鸿荪, 沈蓓英. 大豆蛋白去酰胺改性的研究[J]. 食品与发酵工业, 1996(5): 7-14.
- [8] 田庆. SPI 磷酸化改性程度与其酶解关系研究[J]. 粮食加工, 2008, 33(2): 43-44.
- [9] 申世强, 傅亮, 徐康, 等. 大豆分离蛋白磷酸化改性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 141-144.
- [10] 李如亮. 生化实验方法[M]. 武汉大学出版社, 1998.
- [11] 李杨. 水酶法制取大豆油和蛋白关键技术[D]. 东北农业大学, 2010.