

响应面法优化兰州百合多糖的提取工艺

高丹丹,安文强,陈 红

(西北民族大学生命科学与工程学院,甘肃兰州 730030)

摘 要:采用水提醇沉法对兰州百合多糖进行提取,选取提取温度、提取时间、料液比三个因素作为研究对象,以兰州百合多糖的得率为评价指标,在单因素实验的基础上,通过 Box-Behnken 响应面分析法优化兰州百合多糖的提取工艺条件。最终确定最佳的提取条件为:提取温度为 64.7℃、提取时间为 6.12h、料液比为 1:30,在此提取条件下,兰州百合多糖的理论提取率可达到 12.37%。

关键词:百合多糖,提取,响应面,优化

Response surface optimization of extraction of polysaccharides from Lanzhou Lily

GAO Dan-dan, AN Wen-qiang, CHEN Hong

(College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China)

Abstract: Polysaccharide was extracted from Lanzhou lily by water method. The influences of temperature, time and the ratio of Lily flour to solution (W/V) on the extraction rate were investigated. On the basis of single factor test, the best possible extraction parameters were obtained with the response surface methodology (RSM), at a three-variable, three-level experiment Box-Behnken design (BBD). The optimum extraction parameters were as follows: the temperature was 64.7℃, the time was 6.12h, the materials-liquid ratio was 1:30. The extraction rate of polysaccharide was 12.37%.

Key words: lily polysaccharides; extraction; response surface; optimization

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)05-0226-04

百合为百合科百合属植物,是世界著名的药食两用的植物,始载于我国现存最早的药理学专著《神农本草经》,主要研究表明,百合中含有的甘油酯、甙类、生物碱及多糖等成分都具有重要的药用价值,现代药理学表明,百合具有养阴清肺、清心安神、止咳化痰、美容养颜的功效。百合中含有多种活性多糖,属于植物性多糖,是由单糖之间脱水形成糖苷键^[1],具有非常重要的生理活性,具有明显的补益作用和增强免疫的作用,同时具有降血糖、降血脂、抗疲劳、抗衰老等生物学功能^[2]。百合多来源于栽培,也有少数为野生百合,兰州是百合在西北的一个重要产地,其资源丰富,品质优越,俨然已成为兰州的一大标志性特产。兰州百合在食用和药用两方面都具有非常大的价值。随着社会的进步,人们已经开始致力于对百合保健功能的研究,百合多糖的提取已经引起了人们的注意。响应面分析法是一种寻找多因素系统中最佳条件并且能研究几种因素间交互作用的数学统计方法,该方法实验次数少、周期短,求得的回归方程精度高^[3-5]。目前,有关兰州百合多糖的提取

工艺报道大多数都是利用正交实验对提取因素进行优化^[6-7],极少有人采用响应面分析法提取兰州百合多糖。本研究在单因素的基础上利用 Box-Behnken 中心组合实验设计原理对兰州百合多糖提取工艺的参数进行优化,以多糖的得率为响应值,获得最佳的提取工艺条件,为进一步开发、利用兰州百合资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

兰州百合干 兰州市国芳综超;葡萄糖、苯酚、浓硫酸、无水乙醇、氯仿、正丁醇、无水乙醚 均为分析纯。

电热恒温水浴锅 北京长安科学仪器厂; TGL-16M 高速台式冷冻离心机 湘仪离心机仪器有限公司; 723P 分光光度计 上海光谱仪器有限公司; N-1001 旋转蒸发器 上海爱朗仪器有限公司; A-1000S 抽滤机 上海爱朗仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 兰州百合多糖的提取工艺 将百合干放入微型植物粉碎机中磨成粉末后,过 70 目筛,筛下物放 4℃ 冰箱保存备用。取 5g 百合干粉按一定料液比(浸提液用超纯水)放入恒温水浴锅中浸提,浸提一定时间后取出,冷却,装入离心管中,于 4000r/min 离心 10min,弃去杂质,留其上清液,在上清液中加入 3

收稿日期: 2012-10-09

作者简介: 高丹丹(1983-),女,博士,副教授,研究方向:食品生物技术。

基金项目: 西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金 (zyz2011072); 甘肃省青年科技基金计划(1107RJYA018)。

倍量的乙醇,置于4℃冰箱中静置过夜^[7]。抽滤并取沉淀,用一定量的蒸馏水冲洗滤纸,向溶液中加入配制好的 Sevag 试剂(氯仿/正丁醇体积比为5:1)除蛋白直至无絮状沉淀^[8],弃掉氯仿混合液层,重复操作3次,收集液体,加入3倍量的乙醇沉淀,再次放入4℃的冰箱中静置过夜,抽滤得沉淀,所得沉淀依次用无水乙醇、无水乙醚淋洗,收集洗净的沉淀,于冷冻干燥机中干燥,即可得粗百合多糖。

1.2.2 百合多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法测定兰州百合多糖的含量^[9]。计算公式如下:

多糖的提取率(%) = 多糖的浓度(μg/mL) × 溶液体积(mL) × 稀释倍数/原料质量(g) × 10⁻⁶ × 100

1.2.3 兰州百合多糖提取工艺的单因素实验 选取提取温度(40、50、60、70、80℃)、提取时间(1、2、4、6、8h)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)3个参数进行单因素实验。

1.2.4 响应面法优化兰州百合多糖提取工艺 在单因素实验的基础上,选取提取温度、提取时间、料液比作为自变量进行三因素三水平的 Box-Behnken 的中心组合实验设计,水平分别以-1、0、1 编码,以百合多糖的得率为响应值,实验因素水平见表1。

表1 Box-Behnken 实验设计因素与水平

Table 1 Experimental design and variables levels for Box-Behnken

水平	因素		
	A 温度(℃)	B 时间(h)	C 料液比(g/mL)
1	70	7	1:35
0	60	6	1:25
-1	50	5	1:15

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 不同提取温度对百合多糖提取率的影响 在固定提取时间为4h、料液比为1:10的条件下,比较提取温度分别为40、50、60、70、80℃时对百合多糖提取率的影响。实验结果如图1所示,可知从40℃起至60℃之间,百合多糖的提取率随着温度的升高而升高,且升高速度较快;在60℃后,百合多糖的提取率趋于平缓,由于考虑到温度过高可能使多糖的活性发生变化,而且百合中的蛋白也易变性^[10],所以将最佳提取温度定为60℃。

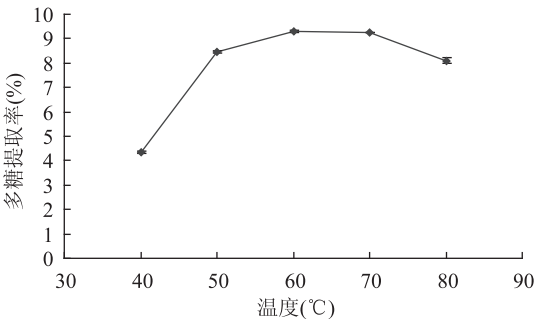


图1 温度对兰州百合多糖提取率的影响
Fig.1 Effect of temperature on the extraction rate of polysaccharide

2.1.2 不同的提取时间对百合多糖提取率的影响 在固定提取温度为60℃、料液比为1:10的条件下,比较提取时间分别为1、2、4、6、8h时对百合多糖提取率的影响。结果如图2所示。6h内百合多糖的提取率随着提取时间的延长而增大;当提取时间超过6h,多糖的提取率略有下降,这是由于大部分多糖都已经溶出并达到平衡,而且多糖逐渐被降解为单糖,所以多糖提取率不再提高而是略微下降^[11]。多糖的提取时间过低时,由于细胞壁的破坏程度不够,多糖不能够完全溶出,提取率较低^[12]。考虑到节约资源,选取提取时间为6h。

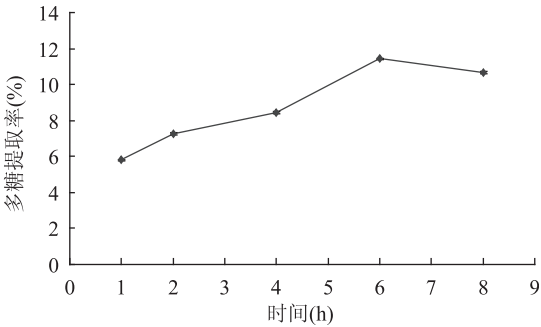


图2 提取时间对兰州百合多糖提取率的影响

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

2.1.3 不同的料液比对百合多糖提取率的影响 固定提取温度为60℃、提取时间为6h,比较料液比1:10、1:15、1:20、1:25、1:30对百合多糖提取率的影响。结果见图3,百合多糖的提取率随着料液比的升高而升高,可是在1:25以后料液比对百合多糖提取率的影响趋于缓慢,多糖提取率有所下降,这是因为若加水过多,则提取液过多,降低了浸提效率,同时增大了醇沉时乙醇的使用量,造成了资源的浪费。所以选取1:25的料液比为最佳料液比。

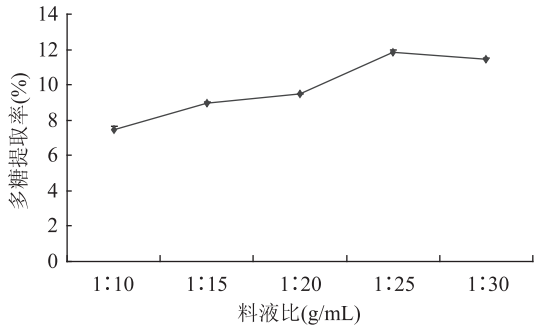


图3 料液比对兰州百合多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of ratio of Lily flour to solution(W/V) on the extraction rate of polysaccharide

2.2 响应面法优化兰州百合多糖提取工艺

2.2.1 Box-Behnken 的中心组合设计实验结果及分析 兰州百合多糖提取工艺的响应面分析实验依据 Box-Behnken 中心法设计了17组实验,其中包括5组中心点重复实验,实验的数据结果如表2所示。

利用 Design Expert 6.0 软件对表2中的实验数据进行多元回归拟合,得到回归方程为: Y = 12.09 + 0.58A + 0.26B + 0.60C - 1.07A² - 2.96B² - 1.30C² + 0.49AB + 0.87AC + 0.53BC

表2 响应面实验设计及实验结果
Table 2 Box-Behnken design matrix
and the experimental results

实验号	A	B	C	得率(%)
1	-1	-1	0	7.56 ± 0.15
2	1	-1	0	8.09 ± 0.32
3	-1	1	0	7.05 ± 0.09
4	1	1	0	9.54 ± 0.33
5	-1	0	-1	9.40 ± 0.40
6	1	0	-1	8.47 ± 0.26
7	-1	0	1	9.23 ± 0.26
8	1	0	1	11.79 ± 0.24
9	0	-1	-1	7.67 ± 0.30
10	0	1	-1	7.17 ± 0.26
11	0	-1	1	7.44 ± 0.34
12	0	1	1	9.05 ± 0.12
13	0	0	0	12.03 ± 0.12
14	0	0	0	12.47 ± 0.14
15	0	0	0	11.75 ± 0.24
16	0	0	0	12.39 ± 0.05
17	0	0	0	11.83 ± 0.17

对该模型进行方差分析,结果如表3所示。从模型的方差分析表可知,本实验所选取的二次多项式模型具有高度的显著性($p < 0.0001$)。失拟项为 $0.3099 > 0.05$,故失拟项不显著。决定系数 0.9855 ,校正决定系数为 0.9668 ,此数值说明本实验模型可以解释 96.68% 响应值的变化,只有总变异的 3.32% 不可以用此模型解释,表明该模型的拟合度良好,可以使用此模型对兰州百合多糖的提取工艺进行优化。

表3 回归模型方差分析表
Table 3 Variance analysis for the
fitted quadratic Polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
总模型	64.37	9	7.15	52.84	<0.0001
失拟项	0.53	3	0.18	1.67	0.3099
误差项	0.42	4	0.11		
总和	63.31	16			
$R^2 = 0.9855$		$R^2_{Adj} = 0.9668$			

从回归系数显著性检验(表4)可知,A、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 、AB、AC 和 BC 八个因素对提取率的影响显著,表明在百合多糖提取的过程中,温度和料液比对提取率有显著的影响;AB、AC 和 BC 显著,说明在提取的过程中,温度和提取时间、温度和料液比以及提取时间和料液比的交互作用也会对多糖提取率造成显著影响。

2.2.2 响应面与等高线分析 图5~图7是根据多元回归方程所得到的不同因素对兰州百合多糖得率影响的响应面图。通过该组图可以对任意两个因素及其交互作用进行分析和评价,并从中确定出最佳的因素水平的范围。研究表明,等高线的形状可以反映出交互作用的强弱,越趋向于椭圆表示交互作用越强,越趋向于圆形表示交互作用越弱^[13-14]。

图5表明了提取温度和提取时间对百合多糖得

率的交互作用,由图可知,等高线的形状呈椭圆,说明了提取温度和提取时间之间的交互作用显著。当提取温度不变时,提取率随着提取时间的增大而呈现先上升后下降的趋势;当提取时间不变时,提取率随着提取温度的增大而呈现上升的趋势,温度上升到一定值,百合多糖的提取率变化趋于平缓。

表4 回归方程系数显著性检验
Table 4 Regression coefficients and
their significance of the quadratic model

系数来源	回归系数	标准差	F 值	p > F
总模型	12.09	0.16	52.84	<0.0001 **
A	0.58	0.13	19.97	0.0029 **
B	0.26	0.13	3.88	0.0895
C	0.60	0.13	21.28	0.0024 **
A^2	-1.07	0.18	35.75	0.0006 **
B^2	-2.96	0.18	272.92	<0.0001 **
C^2	-1.30	0.18	52.53	0.0002 **
AB	0.49	0.18	7.10	0.0323 *
AC	0.87	0.18	22.50	0.0021 **
BC	0.53	0.18	8.22	0.0241 *

注:*表示在5%的水平内显著,**表示在1%的水平内显著。

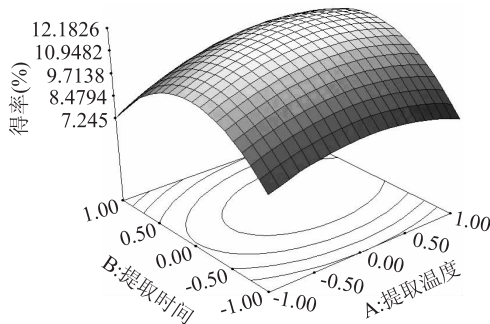


图5 温度和时间交互作用对百合多糖得率影响的响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface plot for the effects of variables on extraction rate of polysaccharide versus temperature and time

图6表明了提取温度和料液比对百合多糖得率的交互作用,由图可知,等高线呈椭圆形,说明了提取温度和料液比之间的交互作用显著。当提取温度较低时,百合多糖的提取率随料液比的增加呈现先上升后降低的趋势;当提取温度较高时,百合多糖的提取率随着料液比的增加而呈现上升趋势,而后多糖提取率的增加趋于平缓。当料液比较低时,百合多糖的提取率随着温度的升高呈现先上升后下降的趋势;当料液比较高时,百合多糖的提取率随着温度的升高而呈现上升的趋势,达到一定的温度后,上升的趋势趋于平缓。

图7表明了提取时间和料液比对百合多糖得率的交互作用,由图可知,因为其等高线呈椭圆形,说明了提取时间和料液比的交互作用比较显著。当提取时间不变时,百合多糖的提取率随着料液比的增大而呈现先上升后下降的趋势;当料液比不变时,百合多糖的提取率随着提取时间的增加而呈现先增大

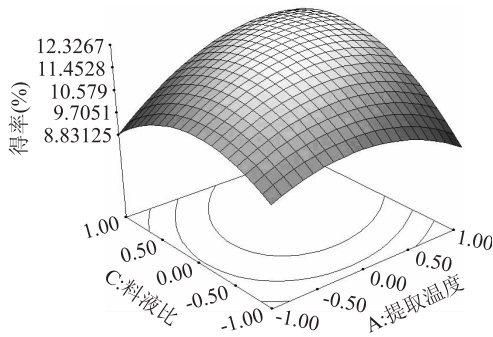


图6 温度和料液比交互作用对百合多糖得率影响的响应面图和等高线图

Fig.6 Response surface plot for the effects of variables on extraction rate of polysaccharide versus temperature and Lily flour to solution (W/V)

后减小的趋势;由响应面图可知,后者增大或减小的趋势要比前者略微明显。

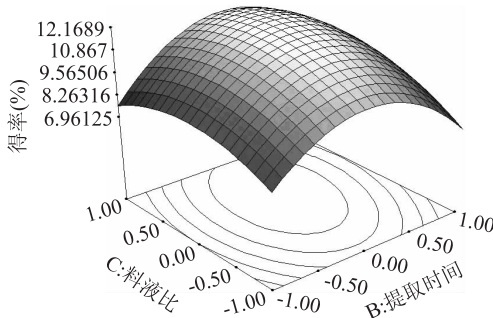


图7 时间和料液比交互作用对百合多糖得率影响的响应面图和等高线图

Fig.7 Response surface plot for the effects of variables on extraction rate of polysaccharide versus time and Lily flour to solution (W/V)

2.3 验证实验

根据 Box-Behnken 实验所得到的数据结果和回归方程,利用 Design Expert6.0 软件处理所得数据,从中可以获得一组最佳的兰州百合多糖的提取条件:温度为 64.7℃、时间为 6.12h、料液比为 1:30,在此条件下得到的兰州百合多糖的得率为 12.37%。为了验证响应面法的可行性,用实验得出的最佳条件进行兰州百合多糖提取的验证性实验,通过 3 组平行实验得到的百合多糖提取率为 12.28%、11.73%、12.05%,平均提取率为 12.02%,与理论计算值的误差在 ±1% 以内,可见该模型可以较好地预测实际多糖提取率的情况。

3 结论

本研究在单因素实验的基础上,确定了提取温

度为 60℃、提取时间为 6h、料液比为 1:25。用 Box-Behnken 设计三因素三水平的实验,利用 Design-Expert6.0 进行多元回归拟合,得到兰州百合多糖得率和各影响因素的多元二次回归方程为: $Y = 12.09 + 0.58A + 0.26B + 0.60C - 1.07A^2 - 2.96B^2 - 1.30C^2 + 0.49AB + 0.87AC + 0.53BC$ 。方差分析表明,该模型可以较好的反映出提取温度、提取时间、料液比与百合多糖得率的关系。并对兰州百合多糖的提取工艺进行了优化,得到最佳提取条件为:温度 64.7℃、时间为 6.12h、料液比为 1:30,在此提取条件下,百合多糖的得率可达到 12.37%,而经验证实验所得到的实际值为 12.02%,此实验的理论值与实际值相差不大。实验证明,响应面分析法可以有效地对兰州百合多糖的提取工艺进行优化,这对进行生产实践具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Murray H G, Scheur P J. Bioorganic marine chemistry I [M]. Berlin Heidelberg: Springer-verlag, 1987: 107-121.
- [2] 任利君, 刘俊田, 弥曼, 等. 百合多糖的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2005, 20(6): 284-285.
- [3] 孙萍萍, 孙剑锋, 牟建楼. 响应面法对缬螫粗多糖提取工艺的优化 [J]. 水产科学, 2010, 29(4): 203-207.
- [4] 游庆红, 尹秀莲. 响应面法优化桑黄多糖的提取工艺研究 [J]. 中国酿造, 2010, 218(5): 67-69.
- [5] 魏桢元, 钟耀广, 刘长江. 响应面优化法对香菇多糖提取的工艺研究 [J]. 辽宁农业科学, 2010(2): 11-14.
- [6] 彭程, 张晓东. 兰州百合多糖的提取工艺及稳定性研究 [J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2006, 27(4): 19-20.
- [7] 周静华, 李芬, 汪祖芳. 大理百合中多糖的提取与总糖含量的测定 [J]. 临床和实验医学杂志, 2006(3): 735-736.
- [8] 杨林莎, 李玉贤, 李秋杰, 等. 百合多糖提取、纯化工艺优选 [J]. 中医研究, 2005, 18(1): 25-26.
- [9] 杨林莎, 李玉贤, 李明丽. 苯酚-硫酸比色法测定百合多糖的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004(8): 704-705.
- [10] 储俊, 许娜, 凤先哲, 等. 药百合多糖的提取工艺研究 [J]. 中国林福特产, 2009(1): 15-16.
- [11] 刘成梅, 付桂明, 涂宗财. 百合多糖提取的影响因素研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(2): 87-88.
- [12] 腾利荣, 孟庆繁, 刘培源, 等. 酶法提取百合多糖及其体外抗氧化活性 [J]. 吉林大学学报: 理学版, 2003, 41(4): 538-542.
- [13] 钟葵, 王强. 响应面法优化龙眼多糖热水浸提的工艺 [J]. 化工进展, 2010, 29(4): 742-743.
- [14] 张秀红, 孙静超, 李琪. 响应面法优化茉莉花茶茶多糖提取工艺 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 603-608.

全国中文核心期刊
轻工行业优秀期刊