

响应面法优化麻疯树籽壳 提取总黄酮工艺

刘细祥¹, 马 博^{1,*}, 张婷婷¹, 李荣峰¹, 卢芳泉²

(1.百色学院, 化学与生命科学系, 广西百色 533000;

2.百色职业学院, 计算机工程系, 广西百色 533000)

摘 要:以麻疯树籽壳为原料提取其中总黄酮,在单因素实验的基础上,利用响应面法建立二次回归模型并对工艺条件参数进行优化。结果表明,回归模型具有高度显著性,最佳提取工艺条件为乙醇体积分数为58%、料液比为1:35(g/mL)、浸提温度为82℃、浸提时间为126min。在最佳工艺条件下,总黄酮得率预测值8.71%,验证值为8.65%,与模型预测值相对误差仅为0.69%,说明该优化工艺合理可靠。

关键词:麻疯树籽壳,总黄酮,提取,响应面法

Optimization of extraction process of total flavonoids from *Jatropha curcas* L. seed shells using response surface methodology

LIU Xi-xiang¹, MA Bo^{1,*}, ZHANG Ting-ting¹, LI Rong-feng¹, LU Fang-quan²

(1.Department of Chemistry and Life Science, Baise College, Baise 533000, China;

2.Department of Computer engineering, Baise Vocational College, Baise 533000, China)

Abstract: On the basis of single factor experiment, quadratic regression model was established and the extraction process for total flavonoids from *Jatropha curcas* L. seed shells was optimized both by response surface methodology. Results showed that the quadratic regression model had high significance, the optimal values of the variables were as follows: ethanol concentration in aqueous solution 58%, solid to solvent ratio 1:35(g/mL), extraction temperature 82℃, extraction time 126min. Under these conditions, the predicted and actual yields of total flavonoids were 8.71% and 8.65% respectively, the relative error was only 0.69%. Therefore, the optimized extraction process was reasonable and reliable.

Key words: *Jatropha curcas* L. seed shells; total flavonoids; extraction; response surface methodology

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)06-0284-05

麻疯树(*Jatropha curcas* L.)是大戟科麻疯树属植物,主要分布于热带和亚热带地区,强耐旱、耐瘠薄,在年降雨量仅为250mm地方也能生长。由于麻疯树籽油可以用来生产生物柴油^[1],在我国广西、云南和贵州地区作为能源植物广泛种植。据统计^[2-3],我国现有野生麻疯树约3.33万顷,人工种植的麻疯树约200万公顷,据国家有关部门规划,到2015年我国麻疯树栽培面积将达800万顷,每顷麻疯树按产麻疯树籽65000kg计算,麻疯籽总产量达 5.2×10^{11} kg,但是,利用麻疯树籽制备生物柴油的同时,将留下大量的麻疯树籽壳并成为废弃物。Raphael等^[4]研究发现麻疯树籽壳中含有大量的纤维素、木质素等有用成分,而麻疯树籽壳传统处理方式是焚烧,不仅浪费资源而

且在燃烧过程产生大量硫化物污染环境,因此,寻求麻疯树籽壳资源化利用途径具有重要的现实意义。目前关于麻疯树果壳和籽粕的综合利用有少量研究报道^[5-9],而麻疯树籽壳的综合利用尚未见研究报道。本文主要研究麻疯树籽壳总黄酮的提取工艺,为麻疯树籽壳总黄酮提取产业化提供基础数据,为麻疯树籽壳资源化利用寻找新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

麻疯树籽 广西南宁富民达生物科技有限公司; 芦丁、氢氧化钠、九水合硝酸铝、亚硝酸钠、无水乙醇等试剂 均为分析纯。

721型分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司; FA2004型电子分析天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; HH-S2型数显恒温水浴锅 金坛市医疗仪器厂; DHG-9146A型鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; LD-200型中药粉碎机 长沙市常宏制药机械设备厂。

1.2 实验方法

收稿日期: 2013-11-05 * 通讯联系人

作者简介: 刘细祥(1983-),男,硕士研究生,讲师,主要从事食品有效成分提取和分析方面的研究。

基金项目: 广西高等学校一般资助科研项目(201203YB171); 材料物理与化学广西高校重点学科项目。

1.2.1 原料处理 将麻疯树籽去仁后收集麻疯树籽壳,将麻疯树籽壳用水清洗去除灰尘和杂质后,于50℃干燥至恒重,粉碎过60目筛,样品于4℃密封保存。

1.2.2 总黄酮提取 取1.0g麻疯树籽壳粉末放入磨口锥形瓶中,于一定温度下用乙醇溶液水浴提取一段时间后,抽滤、收集滤液并定容。测定提取液中总黄酮含量,计算总黄酮得率。总黄酮含量测定和得率计算参考文献[10]方法进行。

$$\text{总黄酮得率 } Y(\%) = (A \times B \times V / W) \times 100$$

式中:A为提取液中黄酮浓度(mg/mL);B为提取液的稀释倍数;V为提取液体积(mL);W为麻疯树籽壳干粉质量(g)。

1.2.3 单因素实验 选择不同乙醇体积分数、料液比、浸提温度和浸提时间进行单因素实验,探索麻疯树籽壳总黄酮提取条件,每个实验组重复3次,单因素实验设计如下:乙醇体积分数30%、45%、60%、75%、90%,固定料液比1:15(g/mL)、浸提时间120min,浸提温度60℃;料液比1:15、1:25、1:35、1:45、1:55(g/mL),固定乙醇体积分数60%、浸提时间120min,浸提温度60℃;浸提温度50、60、70、80、90℃,固定乙醇体积分数60%、料液比1:35(g/mL)、浸提时间120min;浸提时间30、60、90、120、150、180min,固定乙醇体积分数60%、料液比1:35(g/mL)、浸提温度80℃。

1.2.4 响应面法实验设计 根据单因素实验结果可知,麻疯树籽壳总黄酮最佳提取单因素为:乙醇体积分数60%、料液比1:35(g/mL)、浸提温度80℃和浸提时间120min。为建立上述四因素与总黄酮得率之间的函数关系,以进一步优化麻疯树籽壳总黄酮提取最佳工艺,运用Design-Expert 8.0.6软件,采用Box-Behnken design设计实验方案^[1],进行响应面四因素三水平优化实验,每个实验组重复3次,实验数据应用Design-Expert 8.0.6软件进行分析,以麻疯树籽壳总黄酮得率为响应值进行响应面分析。实验因素水平编码见表1。

表1 响应面法实验因素水平表
Table 1 Factors and levels for response surface methodology design

编码	因素			
	A 乙醇体积分数(%)	B 料液比(g/mL)	C 浸提温度(℃)	D 浸提时间(min)
-1	45	1:25	70	90
0	60	1:35	80	120
1	75	1:45	90	150

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 乙醇体积分数对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响 固定料液比为1:15(g/mL)、浸提温度为120min、浸提温度为60℃,考察不同乙醇体积分数对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响。由图1可以看出,随着乙醇体积分数的增加,麻疯树籽壳总黄酮得率先增大,当

体积分数为60%时,总黄酮得率达到最大值为5.38%,但乙醇体积分数进一步增大时,总黄酮得率反而下降。这可能是乙醇体积分数过大,乙醇溶液沸点开始降低,导致挥发性过大,同时一些醇溶性物质和麻疯树籽壳中的黄酮类物质竞争结合乙醇分子,从而导致总黄酮得率下降。因此,本实验选择乙醇体积分数为60%。

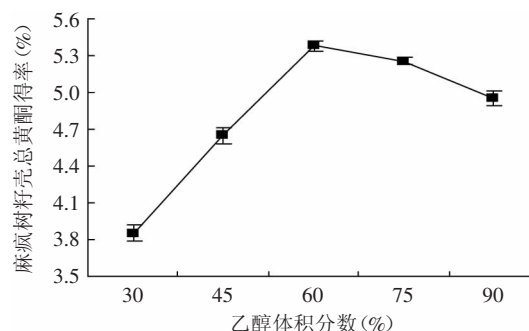


图1 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of total flavonoids

2.1.2 料液比对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响 固定乙醇体积分数为60%、浸提温度为120min、浸提温度为60℃,考察不同料液比对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响。由图2可知,随着料液比的减小,总黄酮得率达到最大并趋于稳定。这是由于增加乙醇的用量可以增加类黄酮在麻疯树籽壳细胞壁内外浓度差,有助于类黄酮的溶出,当进一步增大乙醇用量时,由于传质效率达到最大,总黄酮提取量趋于饱和。当料液比为1:35、1:45、1:55时,总黄酮得率分别为6.08%、6.17%、6.18%,虽然料液比减小,总黄酮得率略有增大,但考虑提取溶剂成本问题,确定料液比1:35(g/mL)。

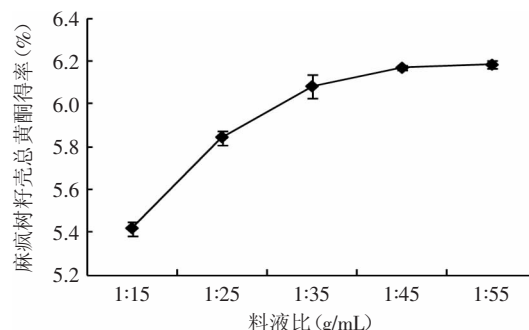


图2 料液比对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of solid-to-solvent ratio on the yield of total flavonoids

2.1.3 浸提温度对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响 固定乙醇体积分数为60%、料液比为1:35(g/mL)、浸提时间为120min,考察不同浸提温度对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响。由图3可知,总黄酮得率随着温度的升高先增后降,80℃时,总黄酮得率达到最大值7.61%。随着温度的升高,分子运动速度加快,能加大

乙醇对黄酮的溶解能力,但当温度过高(高于80℃)时,总黄酮物质结构发生变化,杂质溶出量增加,导致总黄酮得率下降^[12]。故选择80℃为浸提温度。

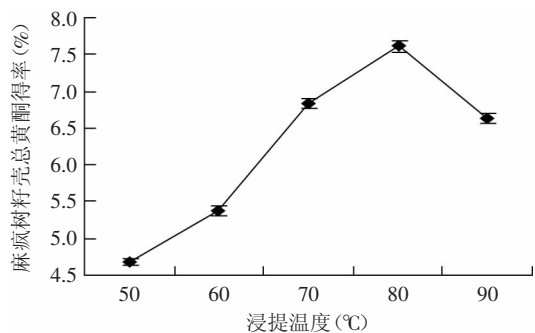


图3 浸提温度对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on extraction yield of total flavonoids

2.1.4 浸提时间对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响

固定乙醇体积分数为60%、料液比为1:35 (g/mL)、浸提温度为80℃,考察不同浸提时间对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响。由图4可以看出,浸提时间为30~120min时,总黄酮得率逐渐升高,浸提时间为120~150min时,总黄酮得率趋于稳定。这是由于黄酮类化合物全部溶出,当浸提时间超过150min时,总黄酮得率下降,这是由于提取时间延长,部分溶出的总黄酮物质结构发生破坏^[13],导致总黄酮得率下降。综合考虑,选择浸提时间为120min。

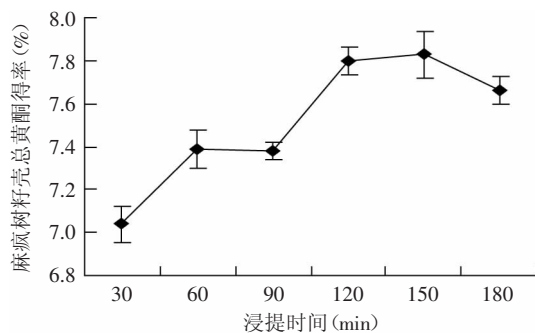


图4 浸提时间对总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction yield of total flavonoids

2.2 响应面法优化麻疯树籽壳总黄酮提取工艺

2.2.1 二次响应面回归模型的建立与分析 Box-Behnken Design方案设计和响应面法实验结果如表2所示,运用Design-Expert 8.0.6软件对数据进行多元二次拟合,求得麻疯树籽壳总黄酮得率(Y)与乙醇体积分数(A)、料液比(B)、浸提温度(C)、浸提时间(D)的回归模型为: $Y = 8.36 + 0.14A + 0.34B + 0.41C + 0.100D - 0.042AB - 0.60AC - 0.022AD + 0.26BC - 0.065BD + 0.053CD - 0.30A^2 - 0.068B^2 - 1.50C^2 - 0.11D^2$ 。

从表3回归方程分析结果可知:回归模型极显著($p < 0.0001$),失拟项不显著($p = 0.2108 > 0.05$),回归模型的决定系数 $R^2 = 0.9728$,说明可以用该模型对麻疯

树籽壳总黄酮得率进行很好的分析和预测。

从表3还可以看出,B、C极显著,A显著,由F值可知,各因素对麻疯树籽壳总黄酮得率的影响程度依次为C(浸提温度)>B(料液比)>A(乙醇体积分数)>D(浸提时间);交互项AC极显著、BC显著,即乙醇体积分数和浸提温度的交互作用、料液比和浸提温度的交互作用对麻疯树籽壳总黄酮得率有显著影响。

表2 Box-Behnken方案设计和响应面法实验结果

Table 2 Box-Behnken experimental design arrangement and experimental results

实验号	A	B	C	D	Y 总黄酮得率 (%)
1	-1	1	0	0	8.03
2	0	-1	1	0	6.55
3	-1	0	0	-1	7.56
4	0	-1	0	-1	7.71
5	0	0	0	0	8.39
6	-1	0	1	0	7.65
7	1	0	0	1	8.32
8	0	0	1	1	7.09
9	0	0	0	0	8.47
10	-1	0	0	1	7.92
11	0	1	-1	0	6.55
12	0	0	0	0	8.45
13	1	0	0	-1	8.05
14	0	0	0	0	8.11
15	0	0	-1	1	6.40
16	1	-1	0	0	8.01
17	0	-1	0	1	8.10
18	0	1	0	-1	8.40
19	1	0	-1	0	6.69
20	1	0	1	0	6.39
21	0	0	-1	-1	6.48
22	0	0	1	-1	6.96
23	-1	-1	0	0	7.49
24	-1	0	-1	0	5.56
25	0	1	1	0	8.08
26	1	1	0	0	8.39
27	0	-1	-1	0	6.05
28	0	1	0	1	8.53
29	0	0	0	0	8.38

2.2.2 两因素的交互作用分析 实验数据经过Design-Expert 8.0.6软件多元二次拟合绘制响应面图和等高线图,以研究影响因素的相互作用对总黄酮得率的影响(图5)。分析图5可知,图5a、图5b中的等高线为椭圆形,说明乙醇体积分数和浸提温度的交互作用、料液比和浸提温度的交互作用显著^[13];从响应面图可以很直观的看出各因素对总黄酮得率的显著程度,比较图5可以看出浸提温度对总黄酮的得率影响最为显著,表现为图5a、图5b、图5c的曲面较为陡峭。上述结果与表3分析结果一致。从图5可以看出,乙醇体积分数、料液比及浸提时间一定时,麻疯

表3 回归模型分析结果
Table 3 The analysis results for Regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	20.54	14	1.47	35.76	<0.0001	**
A	0.23	1	1.23	5.50	0.0343	*
B	1.38	1	1.38	33.70	<0.0001	**
C	2.06	1	2.06	50.20	<0.0001	**
D	0.12	1	0.12	2.90	0.1104	
AB	6.947×10^{-3}	1	6.947×10^{-3}	0.17	0.6870	
AC	1.43	1	1.43	34.85	<0.0001	**
AD	1.891×10^{-3}	1	1.891×10^{-3}	0.046	0.8331	
BC	0.27	1	0.27	6.54	0.0228	*
BD	0.017	1	0.017	0.41	0.5300	
CD	0.011	1	0.011	0.27	0.6120	
A ²	0.57	1	0.57	13.80	0.0023	**
B ²	0.030	1	0.030	0.73	0.4065	
C ²	14.55	1	14.55	354.58	<0.0001	**
D ²	0.082	1	0.082	2.00	0.1792	
残差	0.57	14	0.041			
失拟项	0.49	10	0.049	2.37	0.2108	不显著
纯误差	0.083	4	0.0212			
总误差	21.12	28				

注: $p < 0.01$ **表示极显著影响, $p < 0.05$ *表示有显著影响。

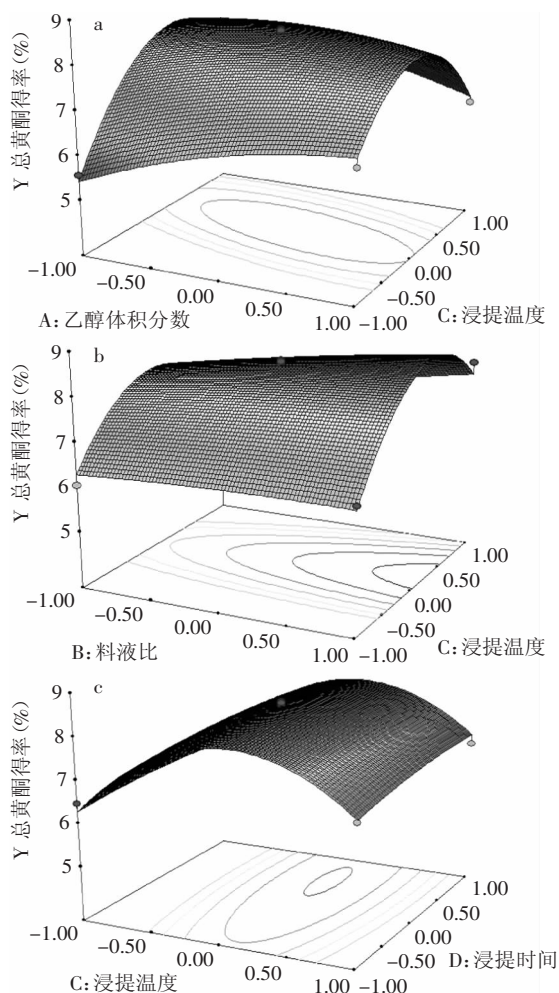


图5 各因素交互作用对总黄酮得率影响的响应面图
Fig.5 Response surface plots for interaction effects of parameters on the extraction yield of total flavonoids

树籽壳总黄酮得率随着浸提温度的升高呈先增加减小的趋势,这与单因素实验结果一致。

2.2.3 最佳工艺的预测和验证实验 用Design-Expert 8.0.6软件分析回归方程,在实验的因素水平范围内预测麻疯树籽壳总黄酮最佳提取条件为:乙醇体积分数为58.5%、料液比为1:35 (g/mL)、浸提温度为82.5℃、浸提时间为126.6min。在此条件下,麻疯树籽壳总黄酮得率为8.71%。考虑实际操作方便性,将提取条件修正为乙醇体积分数为58%、料液比为1:35 (g/mL)、浸提温度为82℃、浸提时间为126min,实际测定的总黄酮得率为8.65%,与模型预测值相对误差为0.69%,说明回归模型对麻疯树籽壳总黄酮得率预测结果准确可靠。

3 结论

麻疯树籽壳中含有丰富的黄酮类化合物,具有很好的开发利用前景。本研究以麻疯树籽壳为原料,以乙醇为浸提剂,在单因素实验基础上,用响应面法对麻疯树籽壳总黄酮提取工艺进行优化。优化最佳提取工艺为:乙醇体积分数为58%、料液比为1:35 (g/mL)、浸提温度为82℃、浸提时间为126min。该工艺条件可从麻疯树籽壳中有效提取总黄酮,为麻疯树籽壳总黄酮的产业化提供了基础数据和技术支持。

参考文献

- [1] 李志业,夏帆,张琳叶,等. 麻疯树油化学法制备生物柴油的研究进展[J]. 中国科技论文,2013,8(3):219-224.
- [2] 赵瑞方,华坚,陈放,等. 化学活化法制备麻疯树果壳活性炭的实验研究[J]. 四川环境,2007,26(6):15-18.
- [3] 万辉,夏辉,丁丹华,等. 麻疯树籽蛋白提取工艺的研究[J]. 中国油脂,2010,35(3):28-31.

(下转第291页)

菌作用。

3 结论

Nisin与WPI-NaCas复合蛋白膜相容性较好,与对照组相比,组织更加致密。抗菌蛋白膜的TS增大,E增大,WVP降低。抗菌蛋白膜的热封温度为145℃,适用温度小于150℃。

抗菌蛋白膜对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用,并且随Nisin浓度的增加而增强。

参考文献

- [1] Gennadios A, Weller C L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins[J]. Food Technology, 1990, 44(10): 63-69.
- [2] 武莹浣. 大豆分离蛋白的碱性蛋白酶酶解条件研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 141-143.
- [3] 李丽杰, 王越男, 李艳辉. 可食性复合膜的制备及其在羊肉保鲜中的应用[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 317-320.
- [4] 黄志英, 雷桥, 包建强, 等. 蛋白薄膜包装性能的研究进展[J]. 包装工程, 2013, 34(15): 146-151.
- [5] 王芳, 张兰威. 乳清蛋白可食性膜的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2007(3): 109-112.
- [6] 寻倩男, 雷桥, 包建强, 等. 明胶-酪蛋白酸钠可食性膜的包装性能研究[J]. 包装工程, 2013, 34(15): 40-45.
- [7] Rico-Pena DC, Torres JA. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid films: water activity and pH effects[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(2): 497-499.
- [8] 丛建民. Nisin在草莓保鲜中的应用研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 131-133.
- [9] Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(8): 859-865.
- [10] 张国只, 陈林海, 杨天佑, 等. 琼脂扩散法等测定乳链菌肽校价的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 175-178.
- [11] 吴琼. 乳酸菌肽测定方法的研究[J]. 食品科学, 1999(6): 56-59.
- [12] Ramos, OL, Santos, AC, Leao, MV, et al. Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents[J]. International Dairy Journal, 2012, 25(2): 132-141.
- [13] Sivarooban, T, Hettiarachchy, NS, Johnson, MG. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films[J]. Food Research International, 2008, 41(8): 781-785.
- [14] Pranoto, Y, Rakshit, SK, Salokhe, VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(8): 859-865.
- [15] 陈桂云, 雷桥. 海藻酸钠对可食性复合膜性能的影响研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 400-403.
- [16] Ghasemlou, M, Khodaiyan, F, Oromiehie, A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefir[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 477-483.
- [17] ASTM, D882-09. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting[S]. 2009.
- [18] ASTM, E398. Standard test method for water vapor transmission rate of sheet materials using dynamic relative humidity measurement[S]. 2003.
- [19] Chen, GY, Lei Q. Research on preparation and properties of edible composite protein films[J]. Applied Mechanics and Manufacturing Technology, 2011, 87: 213-222.
- [20] Mu CD, Guo LM, Li XY, et al. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27: 22-29.
- [21] 平川, 王昆, 马玲. 乳清蛋白可食用膜抑菌性、溶解性的研究[J]. 肉类工业, 2012(6): 35-37.
- [22] 吕淑霞, 白泽朴, 代义, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造, 2008(9): 87-91.
- [4] Raphael M J, Downmore M, Rutendo M. An evaluation of utility of *Jatropha curcas* L. as a source of multiple energy carriers[J]. International Journal of Engineering, Science and Technology, 2010, 2(7): 115-122.
- [5] 李育川, 郭巧生, 房海灵, 等. 小桐子果壳抑菌活性部位的分离及HPLC-MS分析[J]. 中草药, 2010, 41(9): 1445-1448.
- [6] 李育川, 耿开友, 王海燕, 等. 麻疯树果壳正丁醇相抑菌活性部位的分离和鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(3): 275-277.
- [7] 王娟, 蒋文举, 李莎璐. 微波活化制备麻疯树果壳活性炭研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(6): 69-71.
- [8] H Hidayat, E R P Keijzers. Preparation and properties of binderless boards from *Jatropha curcas* L. seed cake[J]. Industrial crops and products, 2014, 52: 245-254.
- [9] Yao L C, Han C R, Chen G Y, et al. A new asymmetric diamide from the seed cake of *Jatropha curcas* L.[J]. Fitoterapia, 2012, 83(8): 1318-1321.
- [10] 张婷婷, 马博, 李荣峰, 等. 桂西野生蕨菜黄酮提取工艺优化研究[J]. 北方园艺, 2013(16): 163-165.
- [11] 徐向宏, 何明珠. 实验设计与Design-Expert, SPSS应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 146-157.
- [12] Mihaela B, Rodica O, Dana M, et al. Thermal stability of new vanadyl complexes with flavonoid derivatives as potential insulin-mimetic agents [J]. J Therm Anal Calorim, 2010, 99(3): 823-827.
- [13] 张玉香, 屈慧鸽, 杨润亚, 等. 响应面法优化蓝莓叶黄酮的微波提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 33-37.

(上接第287页)