

响应面法优化桑葚多糖的超声波辅助提取工艺条件

景荣琴^{1*}, 熊清平², 景 怡²

¹甘肃省白银市第二人民医院, 白银 730900; ²淮阴工学院, 淮安 223003

摘要:本研究利用响应面法优化桑葚多糖的超声波辅助提取工艺条件; 选定提取温度、时间及水料比作为影响因素, 以桑葚多糖提取率为评价指标, 在单因素实验的基础上, 通过 3 因素 3 水平 Box-Behnken 中心组合试验建立多糖提取率的二次多项式回归方程, 研究超声提取时间、温度、水料比对桑葚多糖提取率的影响; 结果显示最佳提取工艺条件为提取温度 72 °C、超声时间 23.5 min、水料比 27:1 (v: m, mL/g), 在该条件下多糖提取率预测值为 17.80%, 验证值为 $17.78 \pm 0.85\%$ ($n=3$); 此方法与传统水提取法相比具有省时、高效的优点, 为桑葚多糖的后续研发提供实验基础。

关键词: 桑葚; 多糖; 超声辅助提取; 响应面分析法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Polysaccharides from Fructus Mori by Response Surface Methodology

JING Rong-qin^{1*}, XIONG Qing-ping², JING Yi²

¹The Second People's Hospital of Baiyin City Gansu Province, Baiyin 730900, China;

²Huaiyin Institute of Technology, Jiangsu Huai'an 223003, China

Abstract: In the present study, the conditions for ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from Fructus Mori were optimized by response surface analysis. On the basis of single-factor experiments, the relationship between main extraction conditions including extraction time, the ratio of water to raw material and extraction temperature were modeled using a 3-factor, 3-level Box-Behnken experimental design. The established model was analyzed by response surface methodology to obtain the optimum extraction conditions. The results showed that the optimum extraction conditions were obtained as follows: extraction time was 23.5 min, the ratio of water to raw material was 27:1 (v: m, mL/g) and extraction temperature was 72 °C. Under these conditions, the estimated and observed values of maximal extraction yield of polysaccharides were 17.80% and $17.78 \pm 0.85\%$ ($n=3$), respectively. The method had the advantage of time-saving and efficient compared with the traditional water extraction. The results reported in this study provided the experimental basis for the follow-up research and development of Fructus Mori polysaccharides.

Key words: Fructus Mori; polysaccharides; ultrasonic-assisted extraction technology; response surface methodology

桑葚 (Fructus Mori) 为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的干燥果穗。具有滋阴补血, 生津润燥等功效。用于肝肾阴虚, 眩晕耳鸣, 心悸失眠, 须发早白, 津伤口渴, 内热消渴, 肠燥便秘等^[1]。其不仅含有维生素 C 硒及人体必需氨基酸^[2], 而且富含多糖; 现代药理学研究证明, 桑椹具有增强免疫功能、促进造血细胞生长、防癌抗突变、抗诱变、抗衰老、降血糖、降血脂、护肝等作用, 以上功效的重要物质基础之一便

是桑葚多糖^[3] (Fructus Mori Polysaccharides, 以下简称 FMP)。然而目前针对 FMP 的提取方法仅见传统水提取法^[4]及酶法辅助提取法^[5], 耗时长、效率较低, 且仅采用正交设计法优化提取工艺, 难以对提取工艺参数进行有效模拟优化。

超声波辅助提取主要是利用超声波的空化效应增大介质分子的运动速度, 使可溶性活性成分迅速溶出^[6-8]; 响应面法 (Response Surface Methodology, RSM) 采用多元二次回归方程来拟合影响因素与响应值之间的函数关系, 对回归方程进行分析得到优化的工艺参数, 与正交试验设计相比, 能研究几种因素之间的交互作用, 现被越来越广泛地应用于解决

收稿日期: 2013-03-21 接受日期: 2013-06-30

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (SBK200930185); 淮安市工业基金项目 (HAG2011013)

* 通讯作者 Tel: 86-517-83591165; E-mail: xqp686@163.com

多变量问题^[9,10]。为此,本实验采用超声辅助提取 FMP,并用响应面法优化相关参数条件,以期 FMP 的开发利用提供理论参考。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

桑葚鲜果购自淮安市洪福果品水产批发市场,经淮阴工学院生化学院食品工程系蒋长兴博士鉴定为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的成熟果穗。乙醇、苯酚、硫酸(AR,上海久亿试剂公司);正丁醇(AR,南京试剂公司);氯仿(AR,南京试剂公司);无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110833-200904);其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

KQ-400KDH 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FA2004 电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);501-A 型超级恒温器(上海实验仪器厂有限公司);DL-6000B 离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-360 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。

2 方法与结果

2.1 FMP 的提取工艺

将桑葚洗净,在 60 °C 烘箱中烘干,用石油醚索氏抽提脱脂后,去除有机溶剂,再加入 95% 乙醇过夜浸泡去黄酮、单糖及小分子低聚糖,然后真空抽滤,回收桑椹渣,60 °C 烘干备用。精密称量 5.0 g 桑葚渣于 250 mL 锥形瓶中,加入一定量的去离子水,于选定温度下,超声提取一定时间后,于离心机中(4000 rpm)离心 30 min,回收上清液,将下层残渣按上述方法进行二次提取。合并两次离心上清液,抽滤,将滤液转至 1000 mL 容量瓶中,用去离子水稀释至刻度,摇匀,得 FMP 样品溶液。

2.2 FMP 提取率的测定

2.2.1 FMP 样品溶液中多糖含量的测定

取 FMP 样品溶液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用去离子水稀释至刻度,摇匀,得 FMP 供试品溶液。吸取供试品溶液 2.0 mL,按照文献方法^[4]测定多糖含量 C_{FMP} (g/mL)。

2.2.2 FMP 提取率的计算

根据 2.2.1 项下 FMP 供试品溶液中多糖含量计算结果,按公式 1 计算 FMP 样品溶液中 FMP 的量 M_{E-FMP} (g),然后按公式 2 计算 FMP 提取率。

$$M_{E-FMP} = C_{FMP} \times V_1 \times V_2 \quad (1)$$

$$FMP \text{ 提取率} = \frac{M_{E-FMP}}{M} \quad (2)$$

式中: M 桑葚粉末质量(5.0 g); V_1 为供试品溶液体积(mL); V_2 为样品溶液体积(mL);

2.3 单因素试验

2.3.1 提取温度对多糖提取率的影响

在“水料比为 25:1 (v: m, mL/g), 超声提取时间为 30 min, 提取功率为 320 W”的条件下,分别于温度为 40、50、60、70、80、90 °C 下超声提取两次,按照 2.2 项下的实验方法,测定并计算多糖提取率。研究不同提取温度对 FMP 提取率的影响。其结果见图 1a。由图 1a 可知,FMP 提取率随着提取温度的增加,呈先上升再下降的趋势,在 80 °C 附近出现最大值。说明在 80 °C 之前,提取温度对 FMP 提取率呈正相关,但是超过 80 °C 之后,提取率反而降低,其可能与温度过高导致可溶性多糖的分子结构受到破坏及超声空化效应减弱有关。因此,提取温度宜选在 80 °C 左右。

2.3.2 超声时间对多糖提取率的影响

在“水料比为 25:1 (v: m, mL/g), 超声提取温度 80 °C, 提取功率 320 W”的条件下,分别提取 5、10、15、20、25、30 min, 重复提取两次,其它同“3.1.1”。研究不同提取时间对 FMP 提取率的影响,实验结果见图 1b。由图 1b 可知,FMP 提取率在 25 min 附近出现最大值。随着超声时间的增加,提取率呈先上升再下降的趋势。可能是由于多糖超声提取时间过长,超声波会引起产物结构变化降低提取率。因此,超声时间选在 25 min 左右。

2.3.3 水料比对多糖提取率的影响

在“超声提取时间 25 min、提取温度 80 °C, 提取功率 320 W”的条件下,分别设定水料比为 5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 (m: v, mL/g) 进行提取,实验重复两次,其它同“3.1.1”。研究不同的水料比对 FMP 提取率的影响,实验结果见图 1c。由图 1c 可知,随着水料比的增大,多糖的提取率逐渐的上升。当水料比超过 25:1 时,多糖提取率增幅不明显 ($P > 0.05$)。因此,从节约成本角度考虑,水料比取 25:1 左右。

2.4 响应面实验设计及优化

以单因素试验的结果为基础,根据 Box-Behnken 设计原则,选取超声时间、提取温度、水料比 3 个对 FMP 提取率影响显著的因素,采用 3 因素 3 水平的响应面分析方法对工艺参数进行优化。试验因素与

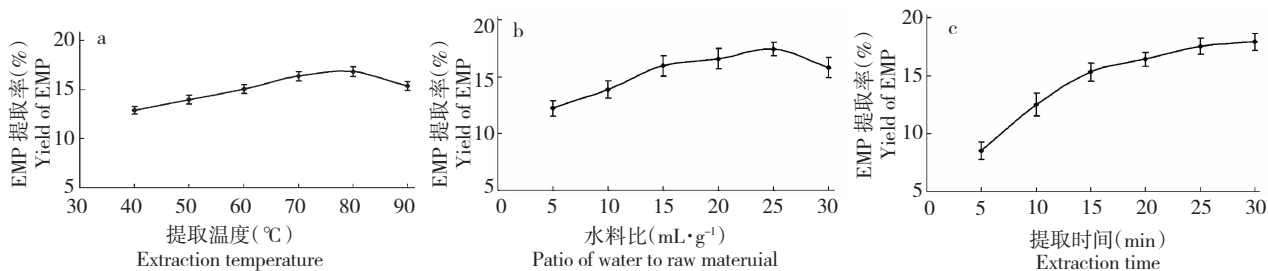


图1 单因素考察结果

Fig. 1 Results of single-factor experiments

a: 提取温度对提取率的影响; b: 提取时间对提取率的影响; c: 水料比对提取率的影响

a: Effect of extraction temperature on the yield of polysaccharides; b: Effect of extraction time on the yield of polysaccharides; c: Effect of the ratio of water to raw material on the yield of polysaccharides

水平设计见表1。响应面方案的实验结果见表2。对表2数据采用 Design Expert 7.0 软件进行处理和分析, 获得 FMP 提取率 (Y) 对超声提取温度、料液比、提取时间的二次多元回归方程:

$$Y = -106.75073 + 1.66829X_1 + 2.03283X_2 + 2.79500X_3 - 0.010750X_1X_2 - 0.020425X_1X_3 + 0.03655X_2X_3 - 0.00574050X_1^2 - 0.047042X_2^2 - 0.038872^2X_3$$

对二次回归方程进行方差分析见表3, 模型 $P < 0.01$, 此时回归方差模型极其显著, 表明该试验方法可靠。方程失拟项不显著, 表明该回归模型与实测值能较好的拟合。回归系数 $R^2 = 0.9908 > 0.9$, 表明该模型相关度好。回归方程各项的方差分析表明: X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均达到极显著水平。响应面 Y 对于因素 X_1 、 X_2 、 X_3 值构成的三维空间在二维平面上的等高图, 可直观地反映各因素之间的相互作用。Design-Expert 7.0.0 软件处理得到响应面分析结果见图2~4。

根据所得到的模型, 预测最优工艺条件: 提取温度 71.79 °C、超声时间 23.39 min、水料比 27.07 (v:m, mL/g), 在此条件下多糖的提取率理论上可达到 17.8%。但考虑到实际情况将最佳工艺修正为提取温度 72 °C、超声时间 23.5 min、水料比 27 (v:m, mL/g)。在修正条件下, 实际的提取率为 17.78

表1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平 Levels	提取温度 (X_1) Extraction temperature (°C)	提取时间 (X_2) Extraction time (min)	水料比 (X_3) Ratio of water to raw material (mL/g)
-1	70	80	90
0	20	25	30
1	20	25	30

表2 FMP 超声提取的响应面实验结果

Table 2 The experimental design and results of response surface analysis

试验号 No.	X_1	X_2	X_3	PGP 提取率 Yield of PGP (%)
1	-1	-1	0	16.81
2	1	-1	0	17.29
3	-1	1	0	15.22
4	1	1	0	13.55
5	-1	0	-1	14.53
6	1	0	-1	16.00
7	-1	0	1	17.89
8	1	0	1	15.27
9	0	-1	-1	16.90
10	0	1	-1	12.43
11	0	-1	1	16.38
12	0	1	1	15.57
13	0	0	0	17.11
14	0	0	0	17.29
15	0	0	0	17.80
16	0	0	0	17.37
17	0	0	0	17.76

$\pm 0.85\%$ ($n = 3$), 与理论值较为接近, 因此, 采用 RSM 法优化得到的 FMP 提取条件参数可靠。

3 结论

本实验使用超声法从桑葚中提取分离多糖物质, 对提升桑葚相关功能饮料及药物的进一步研究开发具有较大的现实意义。通过响应面分析对其提

表 3 回归系数及显著性检验

Table 3 The regression coefficient and significance of each term in the fitted regression model

方差来源 Sources	平方和 SS	自由度 Df	均方差 Mean Square	F 值 F value	P 值 P Value
回归模型 Mode	39.27843	9	4.36427	83.8487	< 0.0001
X_1	0.699153	1	0.699153	13.4325	< 0.01
X_2	14.10071	1	14.10071	270.9103	< 0.01
X_3	3.440065	1	3.440065	66.09236	< 0.01
$X_1 X_2$	1.155625	1	1.155625	22.20249	< 0.01
$X_1 X_3$	4.171806	1	4.171806	80.15098	< 0.01
$X_2 X_3$	3.339756	1	3.339756	64.16519	< 0.01
X_1^2	1.387509	1	1.387509	26.65757	< 0.01
X_2^2	5.823552	1	5.823552	111.8852	< 0.01
X_3^2	3.976401	1	3.976401	76.39675	< 0.01
残差 Residual error	0.364345	7	0.052049		
失拟项 Lack of fit	0.000462	3	0.000154	0.001694	0.9999
纯误差 Pure error	0.363883	4	0.090971		
总离差 Total error	39.64278	16			

注: $R^2 = 0.9908, R^2_{Adj} = 0.9790$ 。 $P < 0.05$ 表示差异显著; $P < 0.01$ 表示差异极显著。

Note: $R^2 = 0.9908, R^2_{Adj} = 0.9790$. $P < 0.05$ means significant difference; $P < 0.01$ means extremely significant difference.

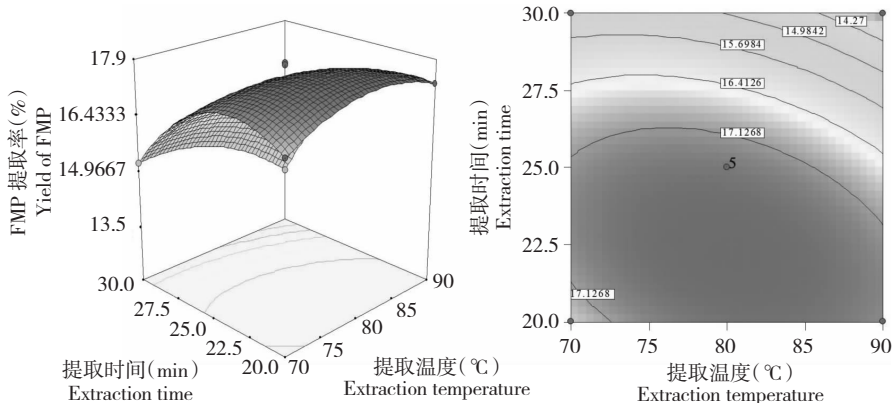


图 2 超声提取时间与提取温度对多糖提取率影响的响应面和等高线图

Fig. 2 Response surface plot and contour plot of the interactive effects of extraction time and temperature on yield of polysaccharides

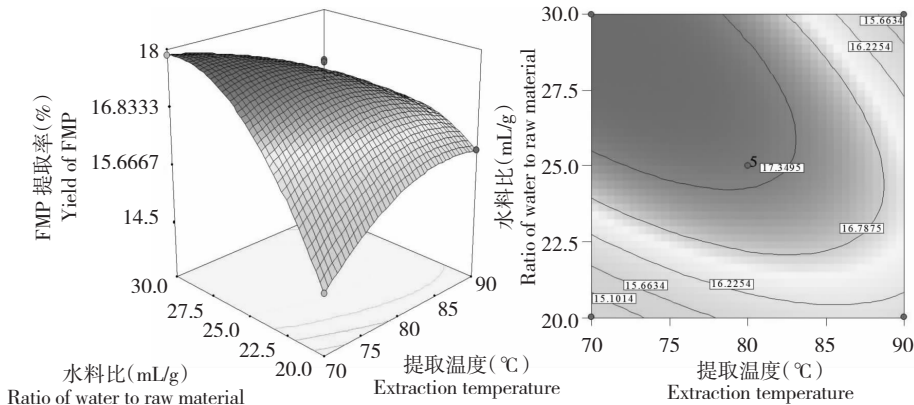


图 3 水料比与提取温度对多糖提取率影响的响应面和等高线图

Fig. 3 Response surface plot and contour plot of the interactive effects of the ratio of water to raw material and temperature on yield of polysaccharides

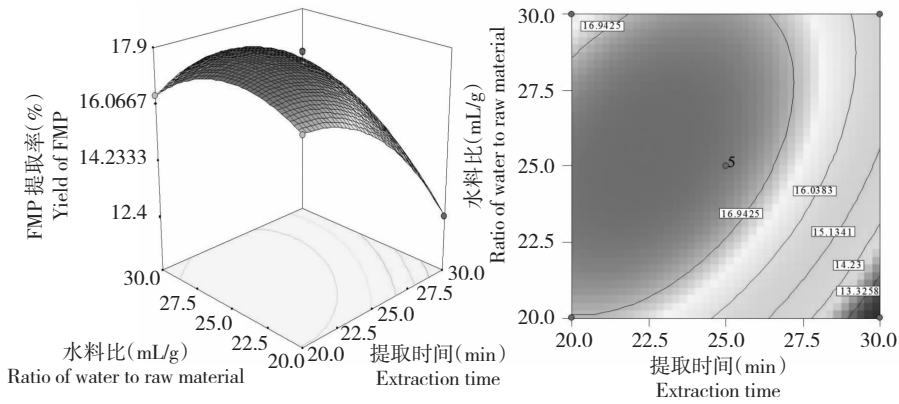


图4 提取时间与水料比对多糖提取率影响的响应面和等高线图

Fig. 4 Response surface plot and contour plot of the interactive effects of extraction time and the ratio of water to raw material on yield of polysaccharides

取工艺进行优化,超声提取的最佳工艺条件:提取温度 72 °C、超声时间 23.5 min、水料比 27 (v: m, mL/g)。在此条件下,多糖的实际提取率为 $17.78 \pm 0.85\%$ ($n=3$)。相比于传统水提取方法^[4],具有提取时间短、提取温度低、提取率高的优势;相比于酶法辅助提取^[5],超声辅助水提取法耗时为其 1/6,主要是因为超声辅助提取利用超声波的空化效应增大介质分子的运动速度,使可溶性活性成分迅速溶出,而酶法辅助提取通过纤维素酶水解植物细胞壁使细胞内物质浸出,水解所需时间较长且不完全,因此超声辅助提取可以节约提取时间且多糖提取率增加。本实验为 PGP 的提取工艺提供了参考依据,有利于桑葚的进一步开发利用。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 281.
- 2 Wu ZF(吴祖芳), Weng PF(翁佩芳). The nutrient compositions of mulberry and its functionality. *J Chin Inst Food*(中国食品学报), 2006, 3:102-107.
- 3 Liang MZ(梁明芝), Sun RY(孙日彦), Du JX(杜建勋), et al. The mulberry chemical constituents and pharmacological activities. *Guangxi Sericulture*(广西蚕业), 2004, 4:39-41.
- 4 Wei ZJ(魏兆军), Hu HM(胡海梅), Bo XH(柏晓辉), et

- al. Optimization of extraction of polysaccharide from mulberry fruit. *Food Sci*(食品科学), 2007, 11:261-264.
- 5 Liu XL(刘晓露), Liu SL(刘胜利), Guo LQ(郭立强), et al. Study on the extraction of mulberry polysaccharide by enzymatic method. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源), 2012, 1:30-32.
- 6 Chemat S, Lagha A, AitAmar, H, et al. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour Frag J*, 2004, 3:188-195.
- 7 Huang XX(黄秀香), Lai HF(赖红芳), Luo LC(罗丽程). Optimization of extraction technology for polysaccharide from *Lobelia chinensis* by ultrasonic-composite enzyme synergistic method. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*(中国实验方剂学杂志), 2012, 5:44-46.
- 8 Ni FC(倪帆呈), Liu ZH(刘增辉), Yu NN(于楠楠), et al. Ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from fructus sophorae. *Chin J Exper Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 17:23-25.
- 9 Mu YD(慕运动). Response surface methodology and its application in food industry. *J Zhengzhou Grain Colle*(郑州工程学院学报), 2001, 3:91-94.
- 10 Jiang CX, Wang MC, Liu J, et al. Extraction, preliminary characterization, antioxidant and anticancer activities in vitro of polysaccharides from *Cyclina sinensis*. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 3:851-857.