

# 响应面法优化梨小豆粗多糖超声波提取工艺研究

李良玉\*, 李朝阳, 宋大巍, 贾鹏禹

黑龙江八一农垦大学国家杂粮工程技术研究中心, 大庆 163319

**摘要:** 本文以梨小豆为原料, 在单因素试验的基础上, 采用响应面法优化超声波辅助提取梨小豆粗多糖的工艺技术参数, 研究超声波功率、液料比、超声温度、超声时间等单因素对梨小豆粗多糖提取效果的影响, 通过 SAS8.2 统计分析系统对响应面实验结果进行分析, 结果显示: 超声功率 254 W, 液料比 25.5:1 mL/g, 超声温度 78.4 °C, 超声时间 26.2 min, 梨小豆粗多糖的得率达到  $0.34 \pm 0.015\%$ , 与模型预测值接近。

**关键词:** 梨小豆; 粗多糖; 响应面法; 超声提取

中图分类号: TS214.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.10.017

## Optimization of Ultrasonic Extraction of Crude Polysaccharide from Pear Adzuki Beans

LI Liang-yu\*, LI Chao-yang, SONG Da-wei, JIA Peng-yu

Heilongjiang Bayi Agricultural University, National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China

**Abstract:** The ultrasonic extraction conditions for crude polysaccharide from pear adzuki beans were optimized with response surface method in this study. Influences of factors such as ultrasonic power, solid to liquid ratio, ultrasonic temperature and ultrasonic time on the extraction yield of crude polysaccharide from pear adzuki beans was optimized with single factor experiment and response surface analysis. The optimized conditions for pear adzuki beans crude polysaccharide extraction were: ultrasonic power of 254 W, solid to liquid of 25.5:1 mL/g, ultrasonic time of 26.2 min and ultrasonic temperature of 78.4 °C. The experimental yield of pear adzuki beans crude polysaccharide was  $0.34 \pm 0.015\%$ . The deviation between the predicted and experimental extraction yield of pear adzuki beans crude polysaccharide was very small.

**Key words:** Pear adzuki beans; crude polysaccharide; response surface methodology; ultrasonic extraction

小豆又名赤豆、红豆等, 学名 *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi 是豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科 (Papilionaceae) 菜豆族 (Phaseoleae) 豇豆属 (*Vigna*) 的一个栽培种<sup>[1]</sup>, 是我国栽培历史最为悠久的小杂豆之一。小豆富含蛋白质、维生素、矿物质等营养物质外, 还具有活血、利水等药用价值, 是药食同源的作物<sup>[2,3]</sup>。小豆起源于亚洲东南部, 在我国中部和西部山区山脉分布有小豆野生种和半野生种<sup>[4-6]</sup>。梨小豆是最近十几年在黑龙江省嫩江流域发现的一个小豆野生种, 具有丰富的蛋白质, 矿物质等营养物质, 同时发现梨小豆中富含多糖类物质, 具有一定的药理活性, 从梨小豆中提取多糖类化合物作为保健食品或药品的原料具有较好的前景。

响应面法 (Response Surface Methodology, RSM) 是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, 解决多变量问题的一种用于开发、改进、优化的统计和数学方法。与正交试验设计相比, 能研究几种因素之间的球面交互作用, 而正交试验只能解决几种因素之间的平面交互作用, 目前已经被广泛地应用于解决多变量的复杂试验中, 以寻求以最少的试验次数达到最佳的试验设计效果<sup>[7-9]</sup>。

本文采用超声波辅助提取梨小豆粗多糖, 并用响应面法优化相关工艺参数, 以期小豆的开发利用和我国现代农业种植结构调整提供理论参考, 为我国欠发达地区脱贫致富提供经济来源。

## 1 材料与仪器

### 1.1 原料与试剂

梨小豆(市购); 石油醚、无水乙醇、氯仿、正丁

收稿日期: 2015-05-07 接受日期: 2015-09-02

基金项目: 国家科技计划 (2011FU125X07)

\* 通讯作者 Tel: 86-459-8979675; E-mail: liliangyu6@163.com

醇、蒽酮、浓硫酸均为分析纯,市购。

## 1.2 仪器与设备

恒温水浴箱,上海森信实验仪器有限公司; MD100-2 型电子分析天平,沈阳华腾电子有限公司; 烘干箱,天津市泰斯特仪器有限公司;Pharo300 紫外可见分光光度计,默克密理博;JBT/C 超声波药品处理机,济宁金百特电子有限责任公司。R-200 旋转蒸发仪,Bü CHI;TGL16M 高速台式离心机,长沙英泰仪器有限公司;55&110-4L 冷冻干燥机,丹麦 Labogene。

## 2 实验方法

### 2.1 梨小豆粗多糖的提取工艺流程

梨小豆置于烘箱中 50 ℃ 条件下烘干 48 h,粉碎并过 100 目筛,得到梨小豆粉。取适量梨小豆粉于烧瓶中,加入石油醚回流脱脂 2 次,1 h/次,过滤烘干后进行超声波提取,离心得到粗多糖上清液并进行真空浓缩。采用 Sevage 法脱蛋白,采用酶法去除淀粉,活性炭脱色,膜透析去除小分子糖,乙醇沉淀多糖,最后冷冻干燥得到梨小豆粗多糖<sup>[10-15]</sup>。

### 2.2 检测方法

苯酚硫酸法测定多糖的含量<sup>[16]</sup>

粗多糖的得率% = (梨小豆粗多糖质量/梨小豆样品质量) × 100 %

### 2.3 试验数据分析处理方法

试验重复 3 次,采用 SAS8.2 软件进行数据统计分析。

### 2.4 单因素试验方法<sup>[17]</sup>

#### 2.4.1 超声功率对梨小豆粗多糖得率的影响

取脱脂后的梨小豆 10 g,蒸馏水为提取剂,超声频率 24 kHz,超声时间为 25 min、超声温度 70 ℃、液料比为 25:1 (mL/g) 的条件下,研究超声功率分别

为 100、200、300、400、500 W 五个水平时对梨小豆粗多糖提取效果的影响。

#### 2.4.2 液料比对梨小豆粗多糖得率的影响

取脱脂后的梨小豆 10 g,蒸馏水为提取剂,超声频率 24 kHz,超声功率 300 W、超声时间为 25 min、超声温度 70 ℃、研究液料比分别为 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1 (mL/g) 七个水平时对梨小豆粗多糖提取效果的影响。

#### 2.4.3 超声温度对梨小豆粗多糖得率的影响

取脱脂后的梨小豆 10 g,蒸馏水为提取剂,超声频率 24 kHz,超声功率 300 W、超声时间为 25 min、液料比为 25:1 (mL/g) 的条件下,研究超声温度分别为 55、60、65、70、75、80、85 ℃ 七个水平时对梨小豆粗多糖提取效果的影响。

#### 2.4.4 超声时间对梨小豆粗多糖得率的影响

取脱脂后的梨小豆 10 g,蒸馏水为提取剂,超声频率 24 kHz,超声功率 300 W、超声温度为 70 ℃、液料比为 25:1 (mL/g) 的条件下,研究超声时间分别为 10、15、20、25、30、35、40 min 七个水平时对梨小豆粗多糖提取效果的影响。

### 2.5 响应面优化试验方法

在单因素试验基础上,根据二次回归组合试验设计原理,以梨小豆粗多糖得率为响应值,设计超声功率、液料比、超声温度、超声时间四个因素进行响应面试验,试验设计见表 1。

## 3 结果与分析

### 3.1 单因素试验结果

#### 3.1.1 超声波功率对梨小豆粗多糖得率的影响

试验采用 SAS 8.2 统计软件对实验结果进行 One-way ANOVA 分析以及 Duncan 分析,在研究超声功率对梨小豆提取影响的五点三次重复的因素分

表 1 因素水平编码表

Table 1 Factors and levels for response surface analysis

编码值 Coding value	X <sub>1</sub> 超声功率 Ultrasonic power (W)	X <sub>2</sub> 液料比 Liquid to solid ratio (mL/g)	X <sub>3</sub> 超声温度 Ultrasonic temperature (°C)	X <sub>4</sub> 超声时间 Ultrasonic time (min)
-2	100	20:01	70	25
-1	150	22.5:1	72.5	27.5
0	200	25:01:00	75	30
1	250	27.5:1	77.5	32.5
2	300	30:01:00	80	35

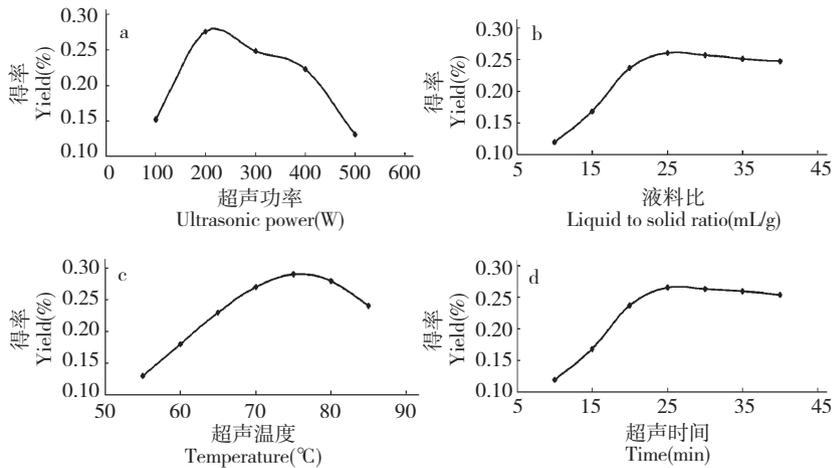


图1 超声功率(a)、液料比(b)、超声温度(c)及超声时间(d)对梨小豆粗多糖提取的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic power (a), liquid to solid ratio (b), extraction temperature (c) and extraction time (d) on the yield of polysaccharides

析中,  $P < 0.01$ , 相关系数 = 0.892, 说明不同超声功率对梨小豆粗多糖的得率有显著影响。由图 1a 可以看出, 随着超声功率的不断增大, 梨小豆粗多糖的得率呈现上升的趋势; 在超声功率为 200 W 时得率最大, 超过 200 W 后得率有下降的趋势。由于超声波具有强烈的热效应, 随着超声波功率的增加, 可能会导致部分梨小豆多糖一定程度的破坏, 从而导致多糖得率的下降<sup>[18]</sup>。因此, 本试验选择响应面优化处理超声功率范围为在以 200 W 为中心 100 W 到 300 W 之间。

### 3.1.2 超声液料比对梨小豆粗多糖得率的影响

试验采用 SAS 8.2 统计软件对实验结果进行 One-way ANOVA 分析以及 Duncan 分析, 在研究超声液料比对梨小豆提取影响的七点三次重复的因素分析中,  $P < 0.01$ , 相关系数 = 0.913, 说明不同超声液料比对梨小豆粗多糖的得率有显著影响。由图 1b 可以看出, 随着超声液料比的不断增大, 梨小豆粗多糖的得率呈现上升的趋势, 这是由于少量溶剂很快溶解粗多糖达到饱和, 扩散推动力减小, 当溶剂足量足够大时, 对超声波的提取基本无阻碍, 得率逐渐增加; 当超声液料比达到 25:1 mL/g 后, 得率趋于平稳, 并伴有下降趋势, 分析原因可能是随着液料比的升高, 其他成分的溶出也相对增多, 从而抑制了梨小豆多糖的溶出, 还会使浓缩过程中梨小豆多糖损失增大, 从而导致梨小豆粗多糖得率有所降低<sup>[19]</sup>。因此, 本试验选择响应面优化处理超声液料比范围为在以 25:1 mL/g 为中心 20:1 mL/g 到 30:1 mL/g 之间。

### 3.1.3 超声温度对梨小豆粗多糖得率的影响

试验采用 SAS 8.2 统计软件对实验结果进行 One-way ANOVA 分析以及 Duncan 分析, 在研究超声温度对梨小豆提取影响的七点三次重复的因素分析中,  $P < 0.01$ , 相关系数 = 0.907, 说明不同超声温度对梨小豆粗多糖的得率有显著影响。由图 1c 可以看出, 在 75 °C 时, 得率达到最大值, 之后得率趋于平稳, 并伴有下降趋势。随着超声波温度的升高, 溶剂的溶解能力和溶解速度也随之提高, 梨小豆中的粗多糖分子运动速度也随之提高, 在曲线中表现出来的是溶剂和粗多糖分子在寻求互相融合的速度及能力的平衡过程, 最终到达 75 °C 时两者到达最佳平衡状态<sup>[20]</sup>。上升到 80 °C 时温度过高可能对多糖结构造成一定的破坏导致多糖部分水解, 使其得率有所下降, 影响其药理活性, 综合考虑后选择 75 °C 为中心点 70 °C 到 80 °C 之间进行响应面试验。

### 3.1.4 超声时间对梨小豆粗多糖得率的影响

试验采用 SAS 8.2 统计软件对实验结果进行 One-way ANOVA 分析以及 Duncan 分析, 在研究超声时间对梨小豆提取影响的七点三次重复的因素分析中,  $P < 0.01$ , 相关系数 = 0.883, 说明不同超声时间对梨小豆粗多糖的得率有显著影响。由图 1d 可知在 10 ~ 30 min 时, 梨小豆多糖得率呈现上升的趋势, 在 30 min 时, 得率达到最大值。这是由于超声波对细胞的破坏作用较大, 多糖溶出较多, 所以得率高; 在 30 ~ 40 min 时, 得率趋于平稳并有下降趋势。这可能是随着提取时间的延长, 超声波的空化作用

使梨小豆组织细胞达到足够破裂,其它成分也同时被提取出,也会引起部分粗多糖结构的变化,这些均会影响到梨小豆多糖的得率<sup>[21]</sup>。因此,本试验选择响应面优化处理超声时间范围为在以 30 min 为中心 25 min 到 35 min 之间。

### 3.2 响应面试验结果

基于单因素试验结果确定的最佳条件,以超声功率(W)、液料比(mL/g),超声温度(°C),超声时间(min),这四个因素为自变量(以  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  表示),以梨小豆粗多糖得率为响应值设计 4 因素共 31 个试验点的四元二次回归正交旋转组合实验<sup>[22]</sup>,实验结果见表 2。

表 2 响应面实验设计及结果  
Table 2 Scheme and results of response surface experiments

实验号 No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	得率 Yield of polysaccharides (%)
1	1	1	1	1	0.262
2	1	1	1	-1	0.312
3	1	1	-1	1	0.283
4	1	1	-1	-1	0.232
5	1	-1	1	1	0.231
6	1	-1	1	-1	0.308
7	1	-1	-1	1	0.265
8	1	-1	-1	-1	0.224
9	-1	1	1	1	0.205
10	-1	1	1	-1	0.262
11	-1	1	-1	1	0.251
12	-1	1	-1	-1	0.215
13	-1	-1	1	1	0.202
14	-1	-1	1	-1	0.249
15	-1	-1	-1	1	0.238
16	-1	-1	-1	-1	0.168
17	2	0	0	0	0.325
18	-2	0	0	0	0.221
19	0	2	0	0	0.286
20	0	-2	0	0	0.231
21	0	0	2	0	0.287
22	0	0	-2	0	0.206
23	0	0	0	2	0.309
24	0	0	0	-2	0.256
25	0	0	0	0	0.302
26	0	0	0	0	0.312
27	0	0	0	0	0.330
28	0	0	0	0	0.304
29	0	0	0	0	0.309
30	0	0	0	0	0.330
31	0	0	0	0	0.329

采用 SAS 8.2 统计软件对响应面法优化梨小豆粗多糖分离实验进行分析 (RSREG)<sup>[23]</sup>, 二次回归方程以及回归方程各项的方差分析结果见表 3, 二次回归参数模型数据如表 4 所示。

表 3 回归方程各项的方差分析表

Table 3 The ANOVA of regression equations

回归方差来源 Regression Source	自由度 DF	平方和 Sum of Squares	均方和 Mean Squares	F 值 F Value	P 值 P value
回归模型 Model	14	0.0555	0.9002	10.31	<.0001
一次项 Linearity	4	0.0189	0.3062	12.27	<.0001
二次项 Quadratic item	4	0.0247	0.4005	16.05	<.0001
交互项 Interaction item	6	0.0119	0.1935	5.17	0.0039
失拟项 Lack of Fit	10	0.0052	0.00052	3.23	0.0821
误差/Error	16	0.0062	0.00039		
纯误差 Pure Error	6	0.0062	0.00016		
总/Corrected Total	30	0.0617			

由表 3 可以看出: 二次回归模型的 F 值为 10.31,  $P < 0.01$ , 大于在 0.01 水平上的 F 值, 而失拟项的  $P$  为 0.0821, 小于 0.05, 说明该模型拟和结果好。一次项、二次项和交互项的 F 值均大于 0.01 水平上的 F 值, 说明它们对梨小豆多糖得率有极其显著的影响。

表 4 二次回归模型参数表

Table 4 The parameters of quadratic regression

模型 Model	非标准化系数 non-standard	T 值 T value	P 值 P value
截距 Intercept	-33.012	-7.76	<.0001
$X_1$	0.00113	0.33	0.742
$X_2$	0.178	2.53	0.0222
$X_3$	0.641	6.85	<.0001
$X_4$	0.444	6.18	<.0001
$X_1^2$	-0.0000575	-3.92	0.0012
$X_1 X_2$	-0.0000075	-0.19	0.851
$X_1 X_3$	0.0000315	0.8	0.434
$X_1 X_4$	-0.0000185	-0.47	0.644
$X_2^2$	-0.00288	-4.91	0.0002
$X_2 X_3$	-0.00035	-0.45	0.662
$X_2 X_4$	-0.00007	-0.09	0.93
$X_3^2$	-0.00336	-5.73	<.0001
$X_3 X_4$	-0.00429	-5.47	<.0001
$X_4^2$	-0.00192	-3.27	0.0048

以梨小豆粗多糖的得率为 Y 值, 得出超声功率 (W), 液料比 (mL/g), 超声温度 (°C), 超声时间 (min) 的编码值为自变量的四元二次回归方程为:

$$Y = -33.012 + 0.00113X_1 + 0.178X_2 + 0.641X_3$$

$$+ 0.444X_4 - 0.0000575X_1^2 - 0.0000075X_1X_2 + 0.0000315X_1X_3 - 0.0000185X_1X_4 - 0.00288X_2^2 - 0.00035X_2X_3 - 0.00007X_2X_4 - 0.00336X_3^2 - 0.00429X_3X_4 - 0.00192X_4^2。$$

### 3.3 交互作用分析

采用降维分析法研究其它两因素条件固定在零水平时,有交互作用的两因素对梨小豆粗多糖得率

的影响。图2、图3和图4是SAS8.2软件绘出三维曲面及其等高线图,对这些因素中交互项之间的交互效应进行分析。

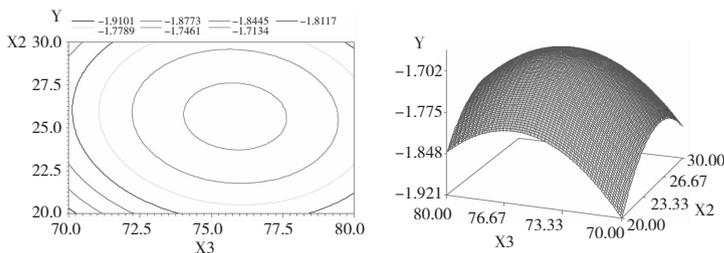


图2  $Y=f(X_2, X_3)$  的响应曲面图及其等高线图

Fig. 2 Response surface plot and its contour map of  $Y=f(X_2, X_3)$

由图2可以看出,响应曲面坡度相对较大,等高线呈椭圆形,表明液料比和超声温度两者交互作用显著。由等高线可知,沿超声液料比方向等高线密集,而超声温度方向等高线相对稀疏,说明超声液料

比比超声温度对响应值峰值的影响大。当超声液料比在25:1~30:1 mL/g,超声温度在75~80℃范围内,两者存在显著的增效作用,响应值随着二者的增加而增大,并达到极值。

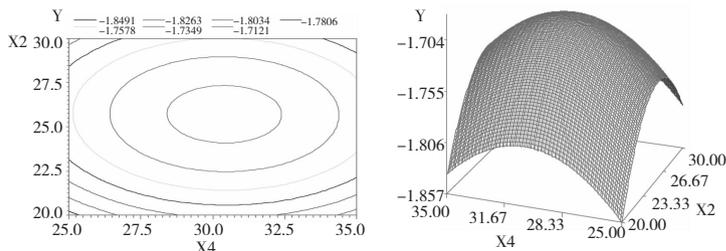


图3  $Y=f(X_2, X_4)$  的响应曲面图及其等高线图

Fig. 3 Response surface plot and its contour map of  $Y=f(X_2, X_4)$

由图3可以看出,响应曲面坡度相对较大,等高线呈椭圆形,表明液料比和超声时间两者交互作用显著。由等高线可知,沿超声时间方向等高线密集,而超声液料比方向等高线相对稀疏,说明超声时间

比超声液料比对响应值峰值的影响大。当超声液料比在25:1~30:1 mL/g,超声时间在30~35 min范围内,两者存在显著的增效作用,响应值随着二者的增加而增大,并达到极值。

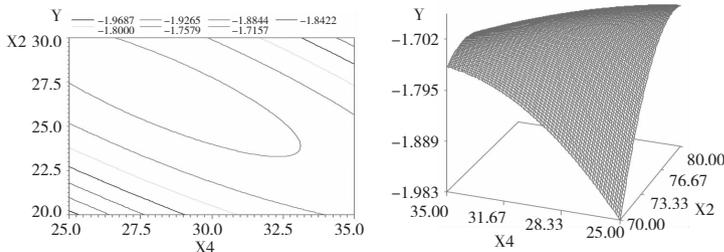


图4  $Y=f(X_3, X_4)$  的响应曲面图及其等高线图

Fig. 4 Response surface plot and its contour map of  $Y=f(X_3, X_4)$

由图4可以看出,响应曲面坡度相对较大,等高线呈椭圆形,表明超声温度和超声时间两者交互作用显著。由等高线可知,沿超声时间方向等高线密

集,而超声温度方向等高线相对稀疏,说明超声时间比超声温度对响应值峰值的影响大。当超声温度在75~80℃,超声时间在30~35 min范围内,两者存

在显著的增效作用,响应值随着二者的增加而增大,并达到极值。

### 3.4 最优条件分析

为了进一步确证最佳点的值,采用 SAS8.2 软

件的 Rsreg 语句对实验模型进行响应面典型分析,以获得最大的得率时的提取条件。经典型性分析得最优提取条件和得率见表 5。

表 5 最优提取条件及得率

Table 5 The optimized extraction condition and extraction yield

因素 Factors	标准化 Standard	非标准化 Non-standard	最大得率 Yield of polysaccharides (%)
X <sub>1</sub>	0.538	253.84	
X <sub>2</sub>	0.0965	25.48	0.336
X <sub>3</sub>	0.683	78.42	
X <sub>4</sub>	-0.753	26.23	

得率最高时的超声功率、液料比、超声温度、超声时间的具体值分别为:254 W,25.5:1 mL/g,78.4 °C,26.2 min,该条件下得到的最大理论得率为 0.336%。

### 3.5 回归模型的验证实验

按照最优提取条件进行实验,重复三次。结果梨小豆粗多糖的得率为 0.34 ± 0.015%,实验值与模型的理论值非常接近,且重复实验相对偏差不超过 5%,说明试验条件重现性良好。结果表明,该模型可以较好的反映出超声波辅助提取梨小豆粗多糖的条件。

## 4 结论

本研究超声波技术辅助提取梨小豆粗多糖技术,在单因素试验的基础上采用响应面法优化提取工艺参数,建立了二次回归模型,该模型与数据拟合程度较高,具有较好的实用性。经优化后的工艺参数为:超声功率 254 W,液料比 25.5:1 mL/g,超声温度 78.4 °C,超声时间 26.2 min,梨小豆粗多糖的得率达到 0.34 ± 0.015%,大大提高了梨小豆粗多糖的得率,降低生产成本提高提取效率,本研究可以增加小豆生产加工的附加值,促进我国杂粮产业的发展。

### 参考文献

- 1 Wang LX(王丽侠),Cheng XZ(程须珍),Wang SH(王素华). Review on genetic study and application of adzuki bean (*Vigna angularis*) germplasm. *J Plant Genetic Resour*(植物遗传资源学报),2013,14:440-447.
- 2 Xiao JZ(肖君泽),Li YF(李益锋),Zeng XJ(曾宪军). Planting experiments of adzuki bean (*Vigna angularis* (willd.) ohwi andohashi) introduced from south Korea. *Crop Res*(作物研究),2004,1:27-28.

- 3 Zheng ZJ(郑卓杰). *China Edible Bean*. Beijing:China Agriculture Press,1997.141-166.
- 4 Fomooka N, Vaughan DA, Moss H, *et al*. *The Asian vigna: the genus vigna subgenus ceratotropis genetic resources*. London:Kluwer Academic Publishers,2003.
- 5 Yang RJ(杨人俊). The geographical distribution of *Vigna angularis* var *nipponensis* in China. *Acta Agronm Sin*(作物学报),2001,27:905-907.
- 6 Lin RF(林汝法),Cai Y(柴岩),Liao Q(廖琴). *Minor Grain Crops in China*. Beijing:China Agriculture Press,2002.210-227.
- 7 Cai LL(蔡亮亮),Yu FR(余方荣),Li XH(李西海),*et al*. Optimization of extraction conditions of *Bauhinia championii* benth polysaccharide based on response surface methodology. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2012,24:1837-1843.
- 8 He YF(何彦峰),Yang RM(杨仁明),Hu N(胡娜). Optimization of extraction process of polysaccharides from Fenugreek by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2012,24:1463-1467.
- 9 Xing YL(邢雅丽),Bi LW(毕良武),Zhao ZD(赵振东),*et al*. Optimization of ultrasonic extraction of ursolic acid from paulownia elongata leaves by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2015,27:301-305.
- 10 Li FL(李粉玲),Cai HQ(蔡汉权),Lin ZP(林泽平). Red bean polysaccharides ability of resistance to oxidation and reduction research. *Food Ind*(食品工业),2014,35:190-194.
- 11 Chen H(陈红),Zhang B(张波),Liu XQ(刘秀奇). Ultrasonic-assisted extraction and purification of water-soluble polysaccharides from soybean dregs. *Food Sci*(食品科学),2011,6:139-142.