

超声辅助提取血柚皮多糖工艺优化 及其对自由基的清除作用

陈文娟¹, 陈建福²

(1. 漳州城市职业学院食品工程系, 福建 漳州 363000)

(2. 福州大学化学化工学院, 福建 福州 350108)

[摘要] 以漳州血柚皮为原料, 采用超声波辅助热浸提法对血柚皮多糖进行提取, 并以苯酚—硫酸法测定多糖提取率. 分别对超声功率、超声温度、料液比、超声时间进行单因素和正交试验, 并通过极差、方差分析对提取过程显著影响提取率的因素进行统计分析. 结果表明, 超声波辅助热浸提取血柚皮中多糖的最佳工艺条件为: 超声功率 80 W、超声温度 65 ℃、料液比 1:30、超声时间 70 min. 该工艺条件下血柚皮多糖的提取率为 18.51%, 该方法的提取率比无超声波辅助的热浸提法提高了 2.24%. 以抗坏血酸为对照, 考察了其羟自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力以及超氧阴离子自由基清除能力, 结果显示, 多糖对自由基的清除能力很强, 但其对各自由基的清除能力均小于抗坏血酸. 表明血柚皮多糖作为天然的抗氧化剂有一定的应用前景.

[关键词] 血柚皮, 多糖, 超声波辅助, 自由基清除

[中图分类号] R284.2; O636.1; TS201 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)01-0141-06

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extracting and Free Radicals Scavenging of Polysaccharides from Blood Pummelo Peel

Chen Wenjuan¹, Chen Jianfu²

(1. Department of Food Engineering, Zhangzhou City University, Zhangzhou 363000, China)

(2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: The polysaccharides from blood pummelo peel was abstracted by ultrasonic-assisted heat extraction, and the extraction yield was measured by coloration method with phenol-sulfuric acid. The effects of extraction yield on the parameters including ultrasonic power, ultrasonic temperature, material-to-liquid ratio, ultrasonic time were investigated by single factor test and orthogonal array design methods. And the notability difference was analyzed with the statistic method of range and variance. Results showed that the optimal conditions were as follows: ultrasonic power was 80 W, ultrasonic temperature was 65 ℃, material-to-liquid ratio was 1:30, ultrasonic time was 70 min. The extraction yield of the polysaccharides from blood pummelo peel was reached up to 18.51% and it increased 2.24% compared to the heat extraction without ultrasonic-assisted. Hydroxyl radical scavenging ability, DPPH scavenging ability and reducing capacity of polysaccharide were studied by taking ascorbic acid as a referential substance. The result showed that it had good free radicals scavenging activity, however, weaker antioxidant activity than ascorbic acid. These results clearly established the possibility that polysaccharide from blood pummelo peel should be effectively employed as the type of natural antioxidant.

Key words: blood pummelo peel, polysaccharides, ultrasonic-assisted, free radicals scavenging

红肉蜜柚是由漳州平和琯溪蜜柚品种芽变株系选育而成的, 其肉色血红, 故坊间将其形象地称之为“血柚”. 随着血柚年产量的增加, 占整个血柚 40% 的血柚皮等废弃物量也逐年增多, 血柚皮中除含有多种人体必需的营养素外, 还含有多糖、黄酮等多种可抗病毒、抗过敏、抗氧化、抗衰老的非营养性、生理活性物质^[1]. 植物多糖具有多种生理功能, 且种类繁多, 来源广泛, 已成为食品领域研究的热点^[2-4]. 提取多糖的

收稿日期: 2013-09-03.

基金项目: 漳州市自然科学基金(ZZ2012J12).

通讯联系人: 陈文娟, 助教, 硕士, 研究方向: 食品科学与工程. E-mail: chenwenjuan8491@126.com

方法有多种,传统的热水浸提法操作简单,但提取时间长、能耗高,且提取率低^[5]. 超声波具有空化作用,能产生强烈的搅拌、振动,加速细胞结构的破坏,促进细胞与溶剂间的渗透和毛细血管效应^[6,7],有效地提高了生物活性物质溶出的效率. 本文以血柚皮为原料,采用超声波辅助热浸提法对血柚皮多糖进行提取,并对提取工艺参数进行优化,优选出超声波辅助热浸提取血柚皮多糖的最佳提取工艺,并对多糖体外抗自由基作用进行了评价,以期对血柚皮深加工及资源化利用提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

UV-2000 型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;DSA100-GL2 型超声波清洗仪,德森精工有限公司;FD-1C-80 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;Q-250B3 型万能粉碎机,永康哈瑞工贸有限公司;SHZ-D 循环水式真空泵,郑州长城科工贸有限公司;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司.

羟自由基测定试剂盒,抗超氧阴离子自由基与产生超氧阴离子自由基试剂盒,南京建成生物工程研究所;1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH·),美国 Sigma 公司;浓硫酸、苯酚、石油醚、无水乙醇、乙醚、葡萄糖、正丁醇、氯仿等均为分析纯.

血柚皮:漳州市售平和琯溪血柚.

1.2 试验方法

1.2.1 血柚皮多糖的提取工艺

将市场采购的血柚剥皮,自然晾干,于 50 ℃ 干燥箱中干燥至恒重,冷却,粉碎,过 100 目筛备用. 准确称取一定量的血柚皮置于装有冷凝管的 250 mL 三角烧瓶中并加入一定量的水,将其置于可恒温的超声波仪器中,按工艺条件进行恒温提取,之后加入 Seavage 试剂(正丁醇:氯仿=1:4)混合震荡 30 min,离心除去蛋白及有机溶剂,后抽滤,滤液于旋转蒸发仪中浓缩,冷冻干燥得血柚皮多糖.

1.2.2 多糖含量的测定

采用苯酚—硫酸法^[5]测定血柚皮中多糖的含量,以葡萄糖为标准样品.

1.2.3 血柚皮多糖的清除自由基能力

1.2.3.1 DPPH 自由基清除能力^[8]

用无水乙醇将 DPPH· 配制成 1.3×10^{-3} mol/L 的母液,使用时用无水乙醇稀释 20 倍,浓度为 65 μmol/L. 取 2 mL 样品溶液,加入 65 μmol/L DPPH· 乙醇溶液 2 mL,室温下避光静置 30 min 后,于 517 nm 处测吸光度.

DPPH 自由基清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%.$$

式中, A_0 : 2.0 mL DPPH· 溶液 + 2.0 mL 无水乙醇的吸光值;

A_i : 2.0 mL DPPH· 溶液 + 2.0 mL 样品液的吸光值;

A_j : 2.0 mL 无水乙醇 + 2.0 mL 样品液的吸光值.

1.2.3.2 超氧阴离子自由基清除能力

按照试剂盒说明书依次加入试剂和一定浓度的多糖(抗坏血酸)乙醇液、混匀,37 ℃ 恒温 40 min,加入显色剂和三氯甲烷,混匀,3 500 r/min 离心 10 min,吸取上清液于 550 nm 处测定吸光度,以蒸馏水代替样品为空白,试验重复 3 次,取平均值.

超氧阴离子自由基清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率} = \frac{\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}}{\text{对照管 OD}} \times 100\%.$$

1.2.3.3 羟自由基清除能力

按照试剂盒说明书加入试剂,37 ℃ 预热 3 min,加入一定浓度的多糖(抗坏血酸)乙醇液、应用液,混匀,37 ℃ 反应 1 min 后立即加入显色剂,混匀,室温放置 20 min,用分光光度计在波长 550 nm 处测定吸光度,以蒸馏水代替样品为空白,试验重复 3 次,取平均值.

羟自由基清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率} = \frac{\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}}{\text{对照管 OD}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 影响血柚皮多糖提取率的单因素试验

2.1.1 超声功率对多糖提取率的影响

超声波具有空化效应,能产生强烈的振动,使组织中细胞膜的结构受到破坏,减少了溶剂和组织细胞之间的传质阻力,加速细胞中多糖分子的溶出.固定超声温度 70 ℃,料液比 1:30,超声时间 80 min,考察超声功率对血柚皮中多糖提取率的影响,如图 1 所示,随着超声波功率的提高,血柚皮中多糖提取率逐渐增大,当超声波功率达到 80 W 时,多糖提取率达到最大,超过 80 W 以后,多糖提取率又开始下降.这是因为超声功率较小时,空化作用小,提取率较小,随着超声功率的增大,超声波的空化作用增强,植物组织细胞膜更容易破裂,加速了血柚皮颗粒与溶剂之间的扩散,使得多糖更容易溶出,但当超声波功率大于 80 W 后,过高的超声波功率引起局部溶液瞬时升温过热,造成了部分多糖分子结构的断裂^[9],反而使其提取率降低.因此最佳的超声功率选择为 80 W.

2.1.2 超声温度对多糖提取率的影响

超声温度对多糖的提取率有着重要的影响,温度的升高能降低反应体系中溶剂的表面张力和黏度,能促进溶剂的蒸气压升高,使得超声波更容易产生空化效应,从而使血柚皮颗粒内部的多糖物质更容易溶出.

固定超声功率 80 W,料液比 1:30,超声时间 80 min,考察超声温度对血柚皮中多糖提取率的影响,如图 2 所示,随着超声温度的增加,多糖提取率增大,当超声温度超过 70 ℃时,多糖提取率反而降低.这是因为随着温度的升高,血柚皮颗粒逐渐发生变形和软化,溶剂分子的热效应加速,使得溶剂进入血柚皮颗粒内部与多糖物质接触的机会和次数增加,提高了多糖的渗透力和溶解力,使多糖更容易充分地释放^[10].但是当温度超过 70 ℃时,温度过高,在温度和超声波的共同作用下,多糖的热不稳定及降解性更加地明显,从而导致了血柚皮中多糖提取率的减少.因此最佳的超声温度选择为 70 ℃.

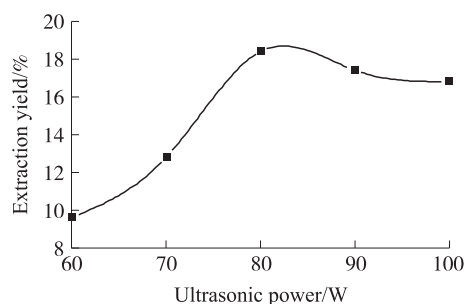


图 1 超声功率对多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power on extraction yield of polysaccharides

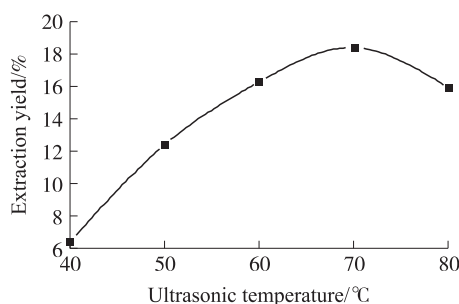


图 2 超声温度对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic temperature on extraction yield of polysaccharides

2.1.3 料液比对多糖提取率的影响

固定超声功率 80 W,超声温度 70 ℃,超声时间 80 min,考察料液比对血柚皮中多糖提取率的影响,如图 3 所示,随着料液比的增加,多糖提取率增大,当料液比超过 1:30 后,多糖提取率反而降低,这是因为料液比较小时,溶剂量较少,溶剂中多糖溶解量较大,柚皮颗粒两相界面浓度差小,扩散阻力大,多糖溶出率较小;随着料液比的增大,血柚皮与溶剂边界层接触面浓度差增大,增加了溶出传质推动力,有利于多糖分子的传质扩散.而当料液比超过 1:30 后,多糖提取率反而降低,是因为溶剂用量过大,溶剂对超声波有一定的吸收损耗,导致血柚皮颗粒对超声波的能量吸收减少,破壁不完全,多糖难以溶出,且溶液体积过大不利于后续的浓缩和醇沉,使得提取成本增加^[6].因此最佳的料液比选择为 1:30.

2.1.4 超声时间对多糖提取率的影响

固定超声功率 80 W,超声温度 70 ℃,料液比 1:30,考察超声时间对血柚皮中多糖提取率的影响,如图 4 所示,随着超声时间的增加,多糖提取率增大,当超声时间超过 80 min 时,多糖的提取率反而降低.这

是因为反应开始时,随着超声时间的延长,血柚皮颗粒破碎程度增强,颗粒内部的多糖更加充分地溶出,当超声时间达到 80 min 时,多糖提取率达到最大,此后,多糖提取率又开始下降,这是因为过长时间的超声与加热,颗粒内大量粘性物质溶出,使溶剂中杂质增多,黏度增大,影响了多糖类物质的溶出,且长时间的超声会使部分多糖分子链断裂成小分子^[11,12],加大醇沉过程的损失,从而造成多糖提取率的下降. 因此最佳的超声时间选择为 80 min.

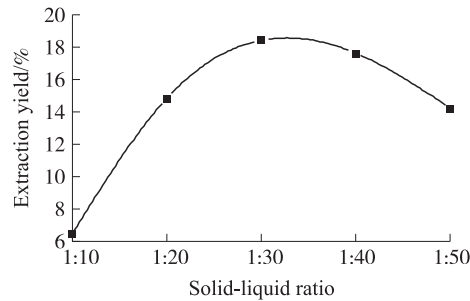


图 3 料液比对多糖提取率的影响
Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on extraction yield of polysaccharides

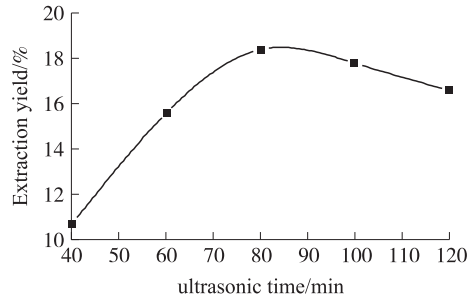


图 4 超声时间对多糖提取率的影响
Fig. 4 Effect of ultrasonic time on extraction yield of polysaccharides

2.2 正交试验优选血柚皮多糖提取工艺

在单因素实验的基础上,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行正交试验,以超声功率、超声温度、料液比、超声时间为试验因素,每个因素取 4 个水平进行优选,以多糖提取率为考察指标,并进行极差和方差分析确定超声波提取血柚皮多糖的最佳工艺参数,其结果见表 1~3.

表 1 正交实验因素水平表 $L_{16}(4^5)$

水平	因素			
	A	B	C	D
	超声功率/W	超声温度/℃	料液比	超声时间/min
1	100	75	1:20	60
2	90	70	1:25	70
3	80	65	1:30	80
4	70	60	1:35	90

Table 1 Factor levels of orthogonal experiments $L_{16}(4^5)$

表 2 多糖提取工艺正交试验结果

Table 2 Orthogonal array design matrix and results

序号	A 超声功率/W	B 超声温度/℃	C 料液比	D 超声时间/min	E 空列	多糖提取率/%
1	1	1	1	1	1	12.94
2	1	2	2	2	2	17.06
3	1	3	3	3	3	18.20
4	1	4	4	4	4	16.13
5	2	1	2	3	4	13.95
6	2	2	1	4	3	14.81
7	2	3	4	1	2	18.15
8	2	4	3	2	1	17.44
9	3	1	3	4	2	16.29
10	3	2	4	3	1	17.29
11	3	3	1	2	4	18.40
12	3	4	2	1	3	17.47
13	4	1	4	2	3	14.19
14	4	2	3	1	4	17.01
15	4	3	2	4	1	17.99
16	4	4	1	3	2	14.44
K_1	64.33	57.37	60.59	65.57	65.66	
K_2	64.35	66.17	66.47	67.09	65.94	
K_3	69.45	72.74	68.94	63.88	94.67	
K_4	63.63	65.48	65.76	65.22	65.49	
\bar{K}_1	16.08	14.34	15.15	16.39	16.41	
\bar{K}_2	16.09	16.54	16.62	16.77	16.48	
\bar{K}_3	17.36	18.18	17.23	15.97	16.17	
\bar{K}_4	15.91	16.37	16.44	16.30	16.37	
R	1.45	3.84	2.09	0.80	0.32	

由表 2 的极差分析结果可知,影响血柚皮中多糖提取工艺各影响因素的主次关系为: B>C>A>D, 即超声温度>料液比>超声功率>超声时间, 最佳工艺为 $B_3C_3A_3D_2$, 即超声温度 65℃、料液比 1:30、超声功率 80 W、超声时间 70 min. 将结果进一步进行方差分析, 其结果如表 3 所示, 超声温度和料液比均有极显著

差异 ($F_0 \geq F_{0.01}$), 而超声功率和超声时间差异显著 ($F_{0.05} \leq F_0 < F_{0.01}$), 从表中的 F 值大小可以看出影响血柚皮多糖提取的 4 个因素主次排序为 $B > C > A > D$; 这与极差分析结果相一致。

表 3 正交试验结果方差分析

Table 3 Variance analysis for the orthogonal array design experimental results

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	5.4441	3	1.8147	24.3638	*
B	29.7374	3	9.9125	133.0828	**
C	9.2340	3	3.0780	41.3245	**
D	1.3054	3	0.4351	5.8418	*
误差	0.2235	3	0.0745		
总和	45.9442				

$F_{0.05}(3,3) = 9.28$; $F_{0.01}(3,3) = 29.46$; *, ** 分别表示差异达 0.05、0.01 显著水平。

2.3 最佳工艺验证

取一定量的血柚皮样品, 根据正交极差法得到的最佳工艺条件做 5 组平行实验, 并计算相对标准偏差, 其结果如表 4 所示, 血柚皮多糖的平均提取率为 18.51%, RSD 为 0.03%, 表明所确定的最佳工艺条件稳定可靠, 且所测得的多糖提取率均大于正交设计表中其他提取条件下多糖的提取率, 与无超声波辅助的热浸提法^[5] (提取率 16.27%) 相比提高了 2.24%。

2.4 血柚皮多糖的自由基清除能力

2.4.1 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基是一种比较稳定的自由基, 能快速反映样品的抗氧化活性^[13]。血柚皮多糖和抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除能力的结果如图 5 所示, 血柚皮多糖对 DPPH 自由基有一定的清除能力, 且清除率与多糖含量存在一定的量效关系, 随着浓度的增加, 清除率逐渐增大, 当血柚皮多糖浓度为 1 mg/mL 时, 它对 DPPH 自由基的清除率为 44.5%。在相同浓度下, 血柚皮多糖对 DPPH 自由基的清除能力要弱于抗坏血酸。

2.4.2 超氧阴离子自由基清除能力

超氧阴离子自由基是生命代谢过程中产生的一种重要的自由基, 在氧化反应中扮演着非常重要的角色。血柚皮多糖和抗坏血酸对超氧阴离子自由基的清除能力如图 6 所示, 随着血柚皮多糖和抗坏血酸浓度的增加, 超氧阴离子自由基的清除能力均增强, 血柚皮多糖和抗坏血酸对超氧阴离子自由基的 IC_{50} 分别为 0.41 mg/mL 和 0.24 mg/mL, 表明血柚皮多糖对邻苯三酚自氧化产生的超氧阴离子具有较好的清除作用。但在浓度相同的情况下, 血柚皮多糖对超氧阴离子的清除能力弱于抗坏血酸。

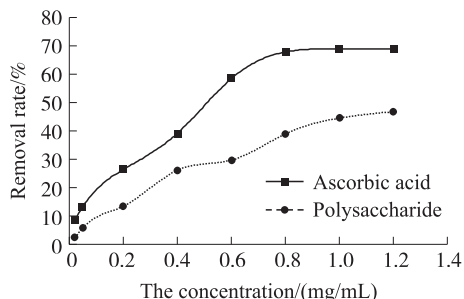


图 5 多糖和抗坏血酸对 DPPH· 的清除能力

Fig. 5 The DPPH· scavenging of polysaccharide and ascorbic acid

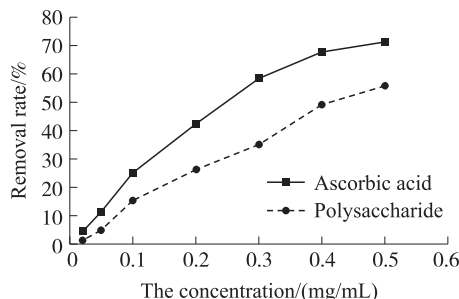


图 6 多糖和抗坏血酸对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力

Fig. 6 The $O_2^{\cdot-}$ scavenging of polysaccharide and ascorbic acid

2.4.3 羟基自由基清除能力

羟基自由基是一种强活性的自由基^[14], 它可以破坏细胞内的核酸、蛋白质、脂类化合物, 使得细胞的结构与功能受到损害, 导致各种疾病的发生, 因此羟基自由基的清除率是抗氧化的重要指标。血柚皮多糖

对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力如图7所示,血柚皮多糖和抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 均有较强的清除作用,并与其浓度呈正相关.在一定范围内,随着血柚皮多糖和抗坏血酸的增加,羟自由基的清除能力显著增强,血柚皮多糖和抗坏血酸对羟自由基的 IC_{50} 分别为0.21 mg/mL和0.11 mg/mL.但是到一定浓度时,其清除率的增加缓慢;在相同浓度时,血柚皮多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率小于抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力.

3 结论

采用超声波辅助热浸提法处理血柚皮,并提取血柚皮中的多糖,考察了超声功率、超声温度、料液比、超声时间对多糖提取率的影响,通过单因素和正交试验,优选出提取血柚皮多糖的最佳工艺条件为: $B_3C_3A_3D_2$,即超声功率80 W、超声温度65℃、料液比1:30、超声时间70 min.方差分析结果显示,超声温度和料液比均有极显著差异($F_0 \geq F_{0.01}$),而超声功率和超声时间差异显著($F_{0.05} \leq F_0 < F_{0.01}$).最佳工艺条件验证发现,血柚皮多糖的平均提取率为18.51%,RSD为0.03%,与无超声波辅助的热浸提法相比提高了2.24%.以抗坏血酸作为对比考察了血柚皮多糖的抗氧化性能,结果表明,血柚皮多糖具有清除DPPH自由基、羟基自由基以及超氧阴离子自由基的能力,且清除能力与多糖的浓度呈正相关,但均弱于抗坏血酸,表明血柚皮多糖具有较强的抗氧化能力.

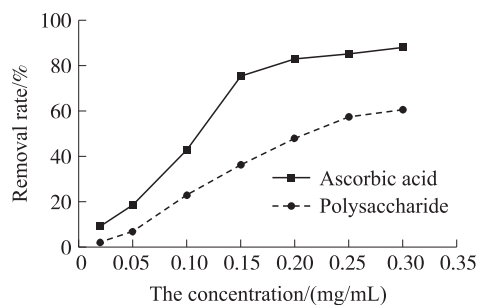


图7 多糖和抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力

Fig.7 The $\cdot\text{OH}$ scavenging of polysaccharide and ascorbic acid

[参考文献]

- [1] 陈文娟,陈建福.漳州血柚皮总黄酮的提取工艺研究[J].北京联合大学学报:自然科学版,2012,26(4):40-45.
- [2] Sui Z Q, Gizaw Y, BeMiller J N. Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella*[J]. Carbohydr Polym, 2012, 90(1):1-7.
- [3] Na Y S, Kim W J, Kim S M, et al. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(3):364-370.
- [4] Sun Y X, Liu J C. Structural characterization of water-soluble polysaccharides from the roots of *codonopsis pilosula* and its immunity activity[J]. Int J Boil Macromol, 2008, 43(3):279-282.
- [5] 陈文娟,曾稍稍,陈建福.漳州血柚皮水溶性多糖的水提工艺[J].河南科技学院学报:自然科学版,2013,41(2):31-35.
- [6] Zhao Q, Kennedy J F, Wang X, et al. Optimization of ultrasonic circulating extraction of polysaccharides from *Asparagus officinalis* using response surface methodology[J]. Int J Biol Macromol, 2011, 49(2):181-187.
- [7] 王建安,苑光辉,李艳芝,等.超声法提取金叶女贞果实中多糖工艺的研究[J].南京师大学报:自然科学版,2012,35(4):73-77.
- [8] Tian Y T, Zeng H L, Xu Z B, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. Carbohydr Polym, 2012, 88(2):522-529.
- [9] Peng Y F, Zhang L N, Zeng F B, et al. Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from *mecelium* [J]. Carbohydr Polym, 2003, 54(3):297-303.
- [10] Zhong Z S, Wang F, Wang X M, et al. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro[J]. Carbohydr Polym, 2010, 82(1):118-121.
- [11] Yang W J, Fang Y, Liang J, et al. Optimization of ultrasonic extraction of *Flammulina velutipes* polysaccharides and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity[J]. Food Res Int, 2011, 44(5):1 269-1 275.
- [12] Zhao Z Y, Xu X J, Ye Q W, et al. Ultrasound extraction optimization of *Acanthopanax senticosus* polysaccharides and its antioxidant activity[J]. Int J Boil Macromol, 2013, 59(1):290-294.
- [13] Zhang Z F, Lü G Y, He W Q, et al. Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*[J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(2):1524-1531.
- [14] Cheung Y C, Siu K C, Liu Y S, et al. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide-protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction[J]. Process Biochem, 2012, 47(5):892-895.

[责任编辑:黄 敏]