

皂化工艺对枸杞皮渣中类胡萝卜素提取效果的影响

王 星, 牛黎莉, 王晓璇, 周 美, 张盛贵*

(甘肃农业大学 食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 采用超声波辅助皂化法提取枸杞皮渣中类胡萝卜素, 以类胡萝卜素的提取量为评价指标, 在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计和响应面法分析考察了 4 个因素对类胡萝卜素提取量的影响, 并优化了皂化工艺。结果表明: 类胡萝卜素的最优皂化工艺条件参数: KOH 浓度 1.8 mol/L、皂化温度 40.7 ℃、皂化时间 1 h、超声波功率 205 W。在该条件下, 实际获取的类胡萝卜素提取量为 129.121 mg/hg, 与预测值 128.099 mg/hg 的相对误差为 0.79%, 说明该模型拟合度好, 优化后得到的皂化工艺准确、可靠。

关键词: 类胡萝卜素; 超声波; 皂化; 响应面

中图分类号: S 665 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)07—0709—06

Effects of Saponification on the Contents of Carotenoids in Wolfberry Pomace

WANG Xing, NIU Lili, WANG Xiaoxuan, ZHOU Mei, ZHANG SHenggui*

(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Ultrasonic-assisted Saponification method was used to extract carotenoids from wolfberry pomace and the contents of carotenoids were detected. Based on single factor tests of different potassium hydroxide concentration, temperature, time and ultrasonic power, the optimum extraction process was evaluated by Box-Behnken central composite experimental design and response surface methodology analysis. The results showed that the optimal saponification processing parameters of carotenoids as followed: concentration of potassium hydroxide 1.8 mol/L, saponification temperature 40 ℃, saponification time 1 h, ultrasonic power 205 W. Under these compared with the predicted value 128.099 mg/hg, which indicated the degree of fitting was good and the saponification processing was accurate and reliable.

Keywords: carotenoids, ultrasound, saponification, response surface

枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 是我国特有的茄科枸杞属植物的果实, 是西北地区重要的经济作物, 枸杞中含有丰富的类胡萝卜素, 是枸杞的功能因子

之一^[1-4]。类胡萝卜素在人体内具有多种生物学活性, 不仅能作为 VA 的来源, 而且能在人体内发挥抗氧化作用^[5-7]。因此, 越来越多的学者专家对类胡萝

收稿日期: 2013-12-25

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD52B07); 甘肃农业大学创新基金项目(GAU-CX1108)。

* 通信作者: 张盛贵(1970—), 男, 甘肃景泰人, 农学博士, 教授, 主要从事食品科学与工程研究。E-mail: zhangshenggui0931@126.com

胡萝卜素的提取及纯化进行了研究,枸杞中类胡萝卜素可分为游离胡萝卜素和类胡萝卜素脂肪酸酯,研究表明,不同品种的枸杞中类胡萝卜素的组成基本相同,其组成除含少量玉米黄素和 β -胡萝卜素外,97%以上的类胡萝卜素以酯化形式存在^[8-12]。为获得高纯度的类胡萝卜素单体,李国银^[13]等对枸杞色素提取过程中的皂化处理进行了研究,得出皂化可以有效除去枸杞果肉中的大部分脂肪酸甘油酯和游离脂肪酸,释放其中包含的枸杞色素的结论。王闯^[14]等研究了万寿菊花中反式叶黄素提取皂化工艺的优化,反式叶黄素得率可达1.494%,与传统工艺相比反式叶黄素的得率提高了10.87%。大量研究证明,皂化是类胡萝卜素前处理的一个重要环节。

目前,对枸杞的研究主要集中在枸杞多糖的提取纯化及生理功能研究等方面,而对枸杞类胡萝卜素的研究报道较少,特别是对枸杞皮渣的研究^[15-16]。而我国每年产生枸杞皮渣在几万t以上,皮渣中含多种有效成分,包括枸杞多糖、类胡萝卜素、枸杞籽油、可溶性膳食纤维等已应用到食品、医学等行业中。从枸杞中提取多糖和黄酮类化合物后产生大量的废渣,绝大部分作为废弃物丢弃,既造成环境污染,又浪费了皮渣中丰富的类胡萝卜素资源。为了提高枸杞产业的附加值,就要加大副产物的综合利用,因此,作者以提取完多糖和黄酮所剩余的枸杞皮渣为原料,对其进行超声辅助皂化处理并用有机溶剂法粗提其类胡萝卜素,并采用Box-Behnken响应面法对其皂化工艺进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 枸杞:采自甘肃省景泰县,采摘后清洗并于4℃冷藏运至实验室;玉米黄素标准品:购于美国sigma公司。

1.1.2 仪器 T6新世纪紫外可见分光光度计:中国北京普析通用仪器有限责任公司产品;FA2004B电子天平:中国上海越平科学仪器有限公司产品;JY96-II N 超声波细胞粉碎机:宁波新艺生物科技股份有限公司产品;SHB-III循环水式真空泵,HWS12型电热恒温水浴锅:上海一恒科学仪器有限公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 类胡萝卜素的提取工艺 烘干(50℃)的枸杞

皮渣→粉碎→过筛(80目)→称取0.1g样品→加入碱液5mL→超声辅助皂化→将pH调至中性→真空抽滤→加入有机溶剂25mL(v (乙酸乙酯): v (乙醇)=1:1)→恒温水浴处理1h(55℃)→提取两次→过滤→定容至50mL→测定 $A_{454\text{nm}}$ 并计算类胡萝卜素的含量。

1.2.2 类胡萝卜素含量的计算 精确称取玉米黄素标准样品5mg,用丙酮溶解定溶至100mL,得0.005mg/mL的玉米黄素溶液,准确吸取玉米黄素标准液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0mL分别用丙酮定溶至50mL的容量瓶中,所得的浓度依次为0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 $\mu\text{g/mL}$,以丙酮为空白,测定 $A_{454\text{nm}}$ 并绘制标准曲线,以玉米黄素标准品质量浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,以吸光度 Y 为纵坐标得回归方程: $y=0.2245x-0.0008(R^2=0.9995)$ 。

根据玉米黄素的标准曲线并参考徐伟^[18]等方法,得类胡萝卜素质量分数的计算公式如下:

$$X=100CV/1000m$$

式中: X 为枸杞皮渣中类胡萝卜素的质量分数,mg/hg; C 为由标准曲线所得的玉米黄素的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; V 为提取液总体积,mL; m 为枸杞皮渣的质量,g。

1.2.3 皂化单因素试验设计 选取不同KOH浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mol/L)、皂化温度(20、30、40、50、60℃)、皂化时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0h)、超声波功率(90、180、270、360、450、540W)4个因素对类胡萝卜素的皂化工艺进行优化,提取工艺如1.2.1所述。

1.2.4 响应面试验 采用Design-Expert7.0软件中的Box-Behnken Design试验设计,选取KOH浓度、皂化温度、皂化时间及超声辅助功率为自变量,类胡萝卜素含量为响应值,进行四因素三水平响应面分析试验,设计了响应面因素水平,见表1。

表1 响应面因素水平表

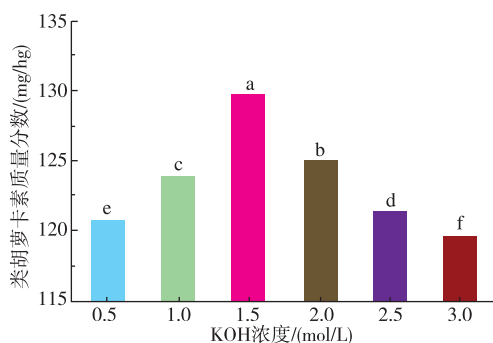
Table 1 Factors and levels in the response surface analysis

水平	因素			
	X_1 碱液浓度/ (mol/L)	X_2 皂化 温度/℃	X_3 皂化 时间/h	X_4 超声功率/ W
-1	1.0	30	0.5	90
0	1.5	40	1.0	180
1	2.0	50	1.5	270

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 KOH 浓度对类胡萝卜素含量的影响 在温度 40 ℃,皂化时间 1 h,超声辅助功率 180 W 的条件下,研究碱液浓度对类胡萝卜素含量的影响,由图 1 可看出,KOH 的用量对皂化效果有显著影响,随着 KOH 浓度的增大,越来越多的脂肪酸甘油酯及各种游离脂肪酸被除去而释放出类胡萝卜素,使类胡萝卜素的提取量显著增大($p<0.05$),当 KOH 浓度为 1.5 mol/L 时,提取量达到最大值 129.689 mg/hg,与与传统的皂化工艺(118.24 mg/hg)相比提高了 9.86%。随着 KOH 浓度的继续增大,提取量急剧下降,强碱性条件下破坏类胡萝卜素的稳定性。因此,1.5 mol/L 的 KOH 溶液皂化效果较好。



注:不同字母表示差异显著, $P<0.05$;相同字母表示观测值在 0.05 水平上差异不显著

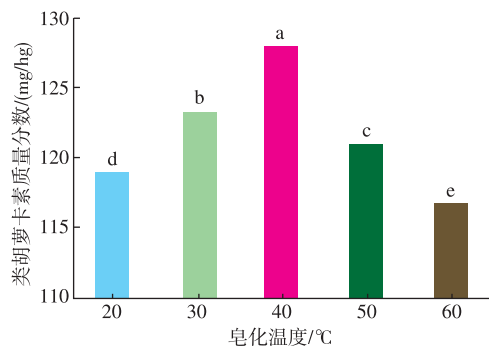
图 1 KOH 浓度对类胡萝卜素提取量的影响

Fig. 1 Effect of KOH concentration on carotenoids extraction

2.1.2 温度对类胡萝卜素含量的影响 温度是影响皂化的一个重要因素,在 KOH 浓度 1.5 mol/L,皂化时间 1 h,超声辅助功率 180 W 的条件下,温度对类胡萝卜素含量的影响如图 2 所示,随着温度的升高,类胡萝卜素的提取量呈显著上升的趋势($p<0.05$),且在 40 ℃时,达到最大 128.025 mg/hg,之后随着温度的升高而显著降低($p<0.05$)。这可能是由于温度过低时不利于类胡萝卜素酯在皂化体系中分散,易导致皂化不完全,而温度过高则会造成游离类胡萝卜素降解或异构化,此试验结果与李国银^[13]等的一致。

2.1.3 时间对类胡萝卜素含量的影响 在 KOH 浓度 1.5 mol/L,皂化温度 40 ℃,超声辅助功率 180 W

的条件下,随着皂化时间的延长,类胡萝卜素的提取量显著升高($p<0.05$),在 1 h 时达到最大值 128.247 mg/hg(图 3),随后提取量明显降低,说明时间过长会导致类胡萝卜素发生氧化。因此,皂化时间应控制在 1 h 以内。



注:不同字母表示差异显著, $P<0.05$;相同字母表示观测值在 0.05 水平上差异不显著

图 2 温度对类胡萝卜素提取量的影响

Fig. 2 Effect of temperature on carotenoids extraction

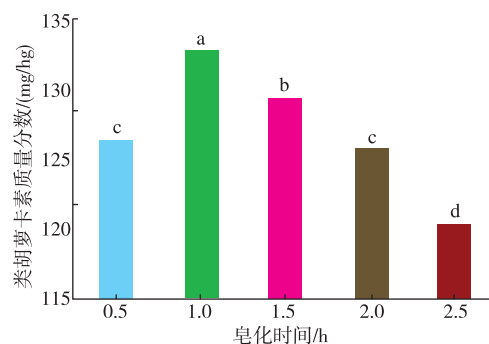


图 3 时间对类胡萝卜素提取量的影响

Fig. 3 Effect of time on carotenoids extraction

2.1.4 超声波功率对类胡萝卜素含量的影响 超声波产生高频振荡,有破壁作用,也能加快皂化速度,缩短皂化时间。在 KOH 浓度 1.5 mol/L,皂化温度 40 ℃,皂化时间 1 h,超声功率对类胡萝卜素含量的影响如图 4 所示,类胡萝卜素的提取量随超声波功率增大呈显著上升($p<0.05$),当功率达到 180 W 时,提取量达最大 126.066 mg/hg,之后随着超声功率的升高而逐渐下降,可能是由于超声功率过大会使类胡萝卜素更大程度地与氧接触而发生氧化降解或裂解反应,造成类胡萝卜素损失而影响提取率。

2.2 响应试验结果

2.2.1 回归模型的建立 运用 Design expert 8.0 软件对表 2 进行二次多项回归拟合实验和方差分析,

反映各个自变量对响应值的影响,方程中各项系数的大小直接反映了4个因素对类胡萝卜素提取量的影响程度,系数的正负反映了影响的方向。拟合所得多元二次回归方程如下:

$$Y = 130.25 - 0.74X_1 + 1.17X_2 - 0.18X_3 + 0.81X_4 - 0.10X_1X_2 + 2.12X_1X_3 - 0.17X_1X_4 + 0.73X_2X_3 - 1.71X_2X_4 + 0.96X_3X_4 - 5.42X_1^2 - 5.98X_2^2 - 2.51X_3^2 - 1.89X_4^2$$

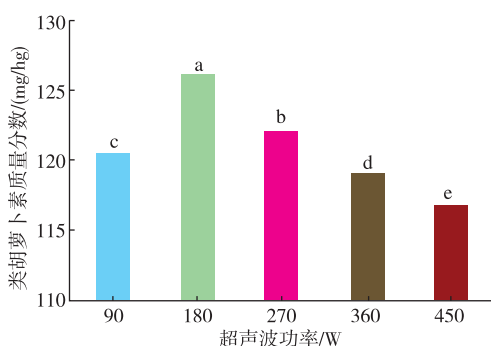


图4 超声波功率对类胡萝卜素提取量的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic power on carotenoids extraction

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and corresponding results for responses surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	类胡萝卜素质量分数(mg/hg)	
					试验值	预测值
1	-1	-1	0	0	118.715	118.31
2	1	-1	0	0	117.18	117.04
3	-1	1	0	0	121.17	120.86
4	1	1	0	0	119.22	119.18
5	0	0	-1	-1	125.989	126.19
6	0	0	1	-1	123.809	123.91
7	0	0	-1	1	126.426	125.88
8	0	0	1	1	128.1	127.45
9	-1	0	0	-1	122.914	123.05
10	1	0	0	-1	121.209	121.22
11	-1	0	0	1	124.06	124.31
12	1	0	0	1	123.053	123.19
13	0	-1	-1	0	121.99	121.50
14	0	1	1	0	122.858	122.37
15	0	-1	-1	0	118.92	119.67
16	0	1	1	0	122.727	123.49
17	-1	0	-1	0	124.623	125.36
18	1	0	1	0	119.06	119.66
19	-1	0	1	0	121.17	120.76
20	1	0	1	0	124.08	123.52

续表2

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	类胡萝卜素质量分数(mg/hg)	
					试验值	预测值
21	0	-1	0	-1	118.856	118.69
22	0	1	0	-1	124.73	124.46
23	0	-1	0	1	123.28	12.73
24	0	1	0	1	122.3	122.65
25	0	0	0	0	130.69	130.25
26	0	0	0	0	131.259	130.25
27	0	0	0	0	129.769	130.25
28	0	0	0	0	128.745	130.25
29	0	0	0	0	130.78	130.25

2.2.2 回归方程的方差分析 回归方程中各变量对类胡萝卜素提取量影响的显著性由 F 检验来判断。 P 值越小则相应变量的显著性越高。从回归方程方差分析表(表3)中可看出该模型回归极显著($p < 0.01$),可用于试验设计,同时失拟项 p 值为 0.6563,大于 0.05,无显著性影响,表明该模型与实际实验拟合较好,可以用于类胡萝卜素皂化条件的优化和预测,复相关系数为 0.9607,说明该模型能解释约 96.07%响应值的变化。

2.2.3 响应面的直观分析 根据回归方程,获得 KOH 浓度、皂化温度、皂化时间和超声辅助功率两两相互作用对类胡萝卜素提取量的影响,结果见图5。

根据回归方程预测4个因素对类胡萝卜素含量的响应曲面图5直观地反映了各因素对响应值的影响,由响应曲面和等高线图以及回归方程分析可知,响应面的坡度越陡说明单因素的交互作用对类胡萝卜素含量的影响越显著。KOH 浓度和皂化时间(图B)、皂化温度和超声辅助功率(图E)的交互作用对类胡萝卜素提取的影响极显著($p < 0.01$),皂化时间和超声辅助功率(图F)交互作用对类胡萝卜素提取的影响显著($p < 0.05$),KOH 浓度和皂化温度(图A)、KOH 浓度和超声辅助功率(图C)、皂化温度和皂化时间(图D)交互作用对类胡萝卜素提取的影响不显著($p > 0.05$)。

3 结语

采用超声辅助皂化法对枸杞皮渣中的类胡萝卜素进行粗提,并通过单因素试验和响应面试验对其皂化工艺进行优化,得到其最优工艺参数为 KOH 浓度 1.8 mol/L,皂化温度 40.7 °C(实验室调整为 40 °C),皂化时间为 1 h,超声波辅助功率为 205 W,在

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F	显著性
模型	426.12	14	30.44	49.77	<0.000 1	**
A	6.53	1	6.53	10.62	0.005 7	**
B	16.46	1	16.46	26.92	0.000 1	**
C	0.36	1	0.36	0.64	0.438 2	—
D	7.66	1	7.66	12.80	0.003 0	**
AB	0.043	1	0.043	0.070	0.795 1	—
AC	17.95	1	17.95	29.23	<0.000 1	**
AD	0.12	1	0.12	0.20	0.661 8	—
BC	2.16	1	2.16	3.55	0.080 4	—
BD	11.74	1	11.74	19.11	0.000 6	**
CD	3.71	1	3.71	6.05	0.027 5	*
A ²	190.49	1	190.49	311.25	<0.000 1	**
B ²	232.17	1	232.17	380.26	<0.000 1	**
C ²	40.77	1	40.77	66.65	<0.000 1	**
D ²	23.06	1	23.06	37.87	<0.000 1	**
残差	8.55	14	0.61			
失拟项	4.56	10	0.46	0.46	0.656 3	—
纯误差	3.99	4	1.00			
总回归	434.67	28				

$R^2=0.980\ 3$ $R_{Adj}^2=0.960\ 7$

注: $p<0.01$ 极显著(**); $p<0.05$ 显著(*); $p>0.05$ 不显著(—)

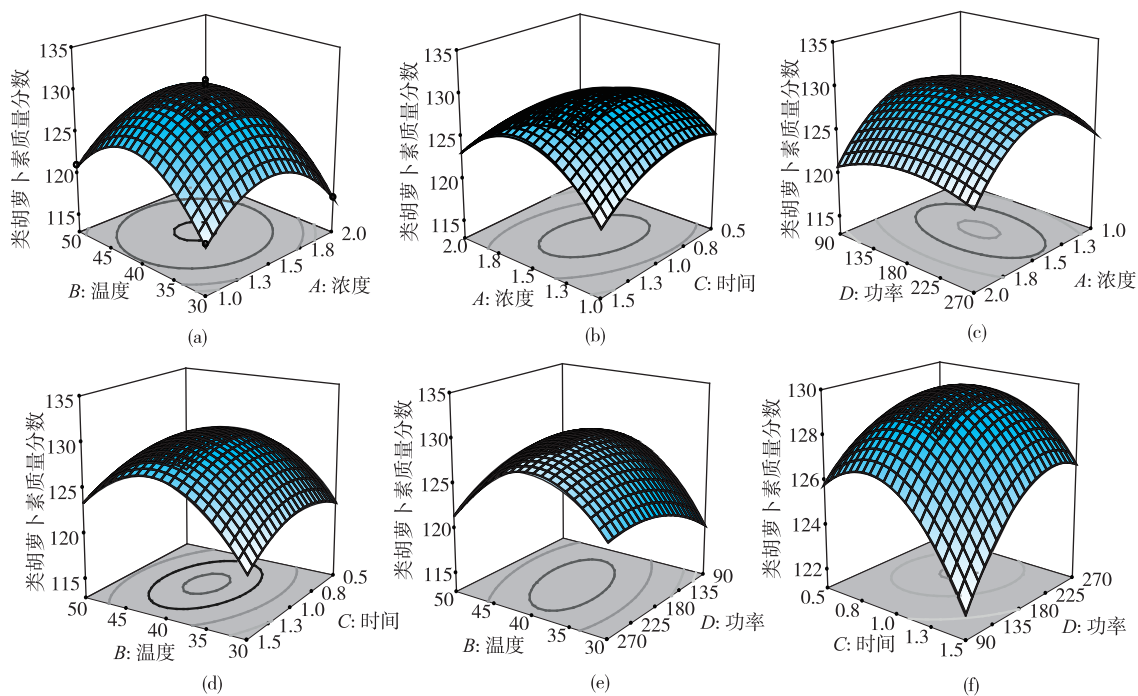


图 5 KOH 浓度、温度、时间和超声波功率对类胡萝卜素质量分数影响的响应面

Fig. 5 Effect of response surface of KOH concentration, temperature, time and Ultrasonic Power on the Carotenoids extraction

该条件下类胡萝卜素提取量为 128.099 mg/hg, 实际获取的类胡萝卜素提取量为 129.121 mg/hg, 与预测值接近, 而采用不皂化工艺所得类胡萝卜素的提取

量为 119.78 mg/hg, 所以在该试验的最有条件下, 枸杞皮渣中类胡萝卜素的提取量提高了 7.8%, 为今后的开发利用提供一定的理论参考。

参考文献:

- [1] 李赫, 陈敏, 马文平, 等. 不同成熟期枸杞中类胡萝卜素含量的变化规律[J]. 中国农业科学, 2006, 39(3): 599-605.
LI He, CHEN Min, MA Wenping, et al. Law of changes of carotenoids contents in fructus lycii of Chinese wolfberry at different Mature periods[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(3): 599-605. (in Chinese)
- [2] Chang R C C, So K F. Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2008, 28(5): 643-652.
- [3] 王心广, 曹有龙. 枸杞抗氧化功能研究进展[J]. 宁夏农林科技, 2011, 52(11): 48-52.
WANG Xinguang, CAO Youlong. Etudy of the antioxidant function Chinese wolfberry [J]. *Ningxia Agriculture and Science Technology*, 2011, 52(11): 48-52. (in Chinese)
- [4] 周晶, 李光华. 枸杞的化学成分与药理作用研究综述[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(6): 93-95.
ZHOU Jing, LI Guanghua. Study of the chemical composition pharmacological effects of Chinese wolfberry [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 11(6): 93-95. (in Chinese)
- [5] 房文汇, 里佐威, 李占龙, 等. 类胡萝卜素的分子光谱研究[J]. 物理学报, 2012, 61(15): 153301-153301.
FANG Weihui, LI Zuwei, LI Zhanlong, et al. Study of the molecular spectroscopy of Carotenoids [J]. *Journal of Physics*, 2012, 61(15): 153301-153301. (in Chinese)
- [6] 黄丽, 於洪建, 吴巍. 枸杞中类胡萝卜素的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 233-236.
HUANG Li, YU Hongjian, WU Wei. The studying progress of carotenoids in the medlar [J]. *Food Research and Development*, 2012, 33(5): 233-236. (in Chinese)
- [7] Djuikwo V N, Ejoh R A, Gouado I, et al. Determination of major carotenoids in processed tropical leafy vegetables indigenous to Africa[J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2011, 2(8): 793-802.
- [8] Aruoma O I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, 75(2): 199-212.
- [9] Willcox J K, Ash S L, Catignani G L. Antioxidants and prevention of chronic disease [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, 44(4): 275-295.
- [10] 李忠, 彭光华, 张声华. 枸杞子中类胡萝卜素的组成及含量[J]. 植物资源与环境学报, 1999, 8(4): 57-58.
LI Zhong, PENG Guanghua, ZHANG Shenghua. Composition and content of carotenoids in Fructus lycii [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 1998, 8(4): 57-58. (in Chinese)
- [11] 李玉环, 王锋, 刘群. 皂化法提取番茄红素的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 146-150.
LI Yuhuan, WANG Feng, LIU Qun. Study of extraction of lycopene by Saponification method [J]. *Food Science*, 2002, 23(8): 146-150. (in Chinese)
- [12] Kimura M, Rodriguez-Amaya D B, Godoy H T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A[J]. *Food Chemistry*, 1990, 35(3): 187-195.
- [13] 李国银, 李正英, 李成军, 等. 皂化对枸杞色素提取效果的影响[J]. 农产品加工学刊, 2009, 1(1): 28-31.
LI Guoyin, LI Zhengying, LI Chengjun, et al. Effects of saponification on the contents of carotenoids[J]. *Journal of Agricultural Products Processing*, 2009, 1(1): 28-31. (in Chinese)
- [14] 王闯, 李大婧, 宋江峰, 等. 万寿菊中反式叶黄素提取皂化工艺的优化[J]. 食品科学, 2010(24): 95-101.
WANG Chuang, LI Dajin, SONG Jiangfeng, et al. Extraction and saponification of Trans-lutein from marigold flowers [J]. *Food Science*, 2010(24): 95-101. (in Chinese)
- [15] 张惠玲. 枸杞的综合开发与利用[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(2): 223-227.
ZHANG Huilin. Comprehensive development and utilization of Chinese wolfberry [J]. *Food Research and Development*, 2012, 33(2): 223-227. (in Chinese)
- [16] 余昆, 李勇, 陈玲, 等. 响应面分析法优化枸杞皮渣中色素的超声波辅助提取工艺[J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 299-302.
YU Kun, LI Yong, CHENG Lin, et al. Optimization of ultrasonic extraction conditions of pigment from wolfberry residue by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(2): 299-302. (in Chinese)