

响应面法优化芒果核多酚提取工艺

陈昱洁^{1,2,3}, 盛占武¹, 施瑞城³, 马蔚红^{1,2,*}, 武红霞², 詹儒林²

(1.中国热带农业科学院海口实验站, 海南 海口 570102;

2.中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091; 3.海南大学食品学院, 海南 海口 570228)

摘要:以芒果核为原料, 利用响应面法优化果核多酚提取的工艺条件。通过单因素试验结果确定影响芒果核多酚提取的主要因素为提取温度、时间和料液比, 利用响应面回归分析方法对提取条件进行优化得出最佳工艺条件为95%乙醇作为提取溶剂、提取温度56℃、时间2h、料液比1:6.8, 通过验证实验得出数值(9.38%)与模型预测数值(9.21%)没有明显差异, 可信度较高, 较先前报道的数值(6.86%)高。

关键词:芒果核; 总酚; 提取; 响应面法

Optimization of Polyphenol Extraction from Mango Kernel by Response Surface Methodology

CHEN Yu-jie^{1,2,3}, SHENG Zhan-wu¹, SHI Rui-cheng³, MA Wei-hong^{1,2,*}, WU Hong-xia², ZHAN Ru-lin²

(1. Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102, China;

2. South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091, China;

3. College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Response surface methodology was applied for the optimization of process conditions for the extraction of polyphenols from mango kernel. Temperature, extraction time and solid-to-liquid ratio were identified as main factors that affect polyphenol extraction by means of one-factor-at-a-time experiments. Based on a 20-run, three-level Box-Behnken experimental design and multiple regression analysis, a mathematical model equation was fitted that describes the extraction rate of polyphenols as a function of temperature, extraction time and solid-to-liquid ratio, and the relationship between the function and the three variables was analyzed using response surface analysis. As a result, the optimal extraction conditions were extraction temperature of 56 °C, extraction time of 2 h, 95% ethanol as extraction solvent with a solid-to-liquid ratio of 1:6.8. Under these conditions, the experimental extraction rate of polyphenols was 9.38%, which was close to the predicted value of 9.21% and obviously higher than the previously reported value of 6.86%. Therefore, the established extraction method has high reliability.

Key words: mango kernel; polyphenol; extraction condition; response surface methodology

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0078-05

芒果作为五大热带水果之一, 素有“热带果王”之美誉。我国是芒果主要生产国之一, 分布于台湾、广东、广西、海南、福建、云南、以及四川等省区。2007年我国芒果收获面积44.3万公顷, 产量约为83.9万吨^[1]。近年来随着我国芒果产业的不断发展壮大, 芒果产量也大大提高, 在芒果鲜果消费的同时, 相继涌现出了如芒果浓缩汁、果脯、芒果干、芒果粉等加工产品。目前, 国内产区如海南、广东、广西、云南等产区都在大力发展芒果加工业, 果汁、果肉的需求量大增。然而, 芒果果核作为在加工过程中的下脚料,

目前为止还未得到进一步的开发利用。

据中国药典理论记载, 芒果核是蒙医习用药之一, 具有补肾、祛肾寒的功能, 用于肾虚、肾寒、腰腿痛, 多配方用。莫武桂等^[2]对芒果核提取物在动物体内外抑菌效果及其急性毒性进行了研究, 结果表明芒果核提取物对常见肠道感染致病菌如: 志贺痢疾杆菌、福氏痢疾杆菌和大肠埃希氏菌等具有较明显的体内体外抑菌作用, 通过小鼠急性毒性实验表明, 芒果核提取物具有良好的安全性。高云涛等^[3]采用超声与双水相体系耦合体系对芒果果核多酚的提取进行了研究, 提取率达

收稿日期: 2010-08-30

基金项目: 国家林业科技支撑计划项目(2006BAD01A1705); 国家公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-032-3)

作者简介: 陈昱洁(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与保藏。E-mail: chen_yujie2001@163.com

*通信作者: 马蔚红(1968—), 女, 副研究员, 本科, 研究方向为果实品质生理。E-mail: zjwhma@163.com

6.86%。国外针对芒果核研究的报道较多,主要集中在果核营养价值评价^[4],果核提取物的抗氧化和抑菌活性研究^[5],芒果果核淀粉^[6]、精油的提取^[7]以及利用芒果果核饲料的研究^[8]。由此可以看出,芒果果核具有较高的药用价值,特别是其含有的多酚类物质。然而,如何高效、低成本的对其进行提取,国内外鲜有报道,为此本研究以常规提取方法为切入点,在单因素的基础上,采用响应面法对芒果多酚的提取工艺进行优化,以期为芒果核的综合利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

台农1号芒果:采自海南省乐东县芒果基地,剥皮取核、切片、烘干、粉碎置于冰箱中备用。

无水乙醇、95%乙醇、甲醇、氯仿、乙酸乙酯、石油醚、丙酮、无水碳酸钠、没食子酸、福林酚试剂等均为国产分析纯。

722型可见分光光度计 上海欣茂仪器有限公司; PL303电子天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; DC-160C高速粉碎机 浙江省瑞安市春海药材器械厂; 电热鼓风干燥箱 上海恒科仪器有限公司; 旋转蒸发器 上海申顺生物科技有限公司; CU-420电热恒温水槽 上海齐欣科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 没食子酸标准曲线的绘制^[9-10]

精确称取没食子酸10mg,用水溶解定容于100mL容量瓶中。精确吸取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL没食子酸标准溶液于25mL比色管中,加入2mL 2%碳酸钠溶液,放置2min,然后加入100μL 50%福林酚试剂,加蒸馏水定容至10mL,摇匀后于室温下放置30min,在720nm波长处测定标准溶液的吸光度,每组3个重复。以标准溶液的质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2 芒果核中多酚的提取和测定方法

精确称取10g预先干燥、粉碎的芒果核粗粉,用一定体积的有机溶剂加热回流提取,真空抽滤,收集滤液置旋转蒸发器中浓缩后干燥。多酚含量采用Folin-Ciocalteu^[9]法测定,取1g干样定容至100mL容量瓶中,用移液枪精密移取100μL各样液于25mL比色管中,加入100μL 50%福林酚试剂和2mL 2%碳酸钠溶液,用蒸馏水定容至10.0mL,混合均匀后置于暗处反应30min,用可见分光光度计在波长720nm处测定吸光度,计算样品中多酚提取率。

$$\text{提取率}/\% = \frac{M}{m} \times 100$$

式中: M 为提取液中多酚的含量; m 为芒果核粗粉的质量。

1.3 单因素试验^[11]

1.3.1 有机溶剂的选择

确定温度60℃、时间2h、料液比1:10和果核粗粉质量一定的条件下,比较无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、60%乙醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚、三氯甲烷、甲醇、水等不同的溶剂提取对芒果核总酚提取率的影响(为防止爆沸,添加少量玻璃珠)。

1.3.2 提取温度的选择

在确定的有机溶剂下,以2h提取时间、1:10的料液比和果核粗粉质量的条件下,分别在40、50、60、70、80、90℃条件进行提取,测定总酚提取率,选择最佳提取温度。

1.3.3 提取时间的选择

在确定的有机溶剂和提取温度下,以1:10的料液比和果核粗粉质量的条件下,分别在1、1.5、2、2.5、3、3.5h条件下进行提取,测定总酚提取率,选择最佳提取时间。

1.3.4 料液比的选择

在确定的有机溶剂、提取温度和提取时间下和果核粗粉质量的条件下,分别在1:10、1:15、1:20、1:25、1:30条件下进行提取,测定总酚提取率,选择最佳料液比。

1.3.5 响应面法试验设计^[12-13]

以提取时间、提取温度和料液比3个因素为考察对象,采用响应面分析并设计试验,以获取最佳工艺参数。响应面设计见表1。

表1 芒果核总酚提取响应面分析因素水平表

Table 1 Factors and their coded levels in the response surface analysis for optimizing polyphenol extraction from mango kernel

因素	编码	水平				
		1.68	1	0	-1	-1.68
提取温度/℃	X_1	76.8	70	60	50	43.2
提取时间/h	X_2	2.8	2.5	2	1.5	1.2
料液比(mL/g)	X_3	18.4	15	10	5	1.6

2 结果与分析

2.1 没食子酸标准曲线

由图1可知,求得没食子酸的线性回归方程为 $Y=10.4X+0.021(R^2=0.9994)$,表明本方法在没食子酸质量浓度为0.002~0.01mg/mL时具有良好的线性关系。

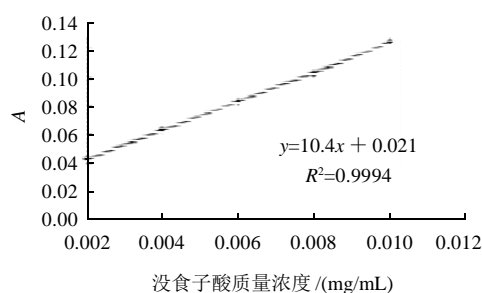


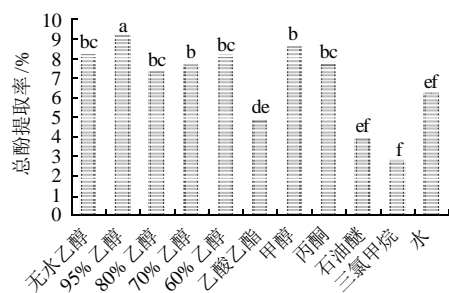
图1 没食子酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of gallic acid

2.2 单因素试验

2.2.1 有机溶剂的选择

分别用无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、60%乙醇、乙酸乙酯、甲醇、丙酮、石油醚、三氯甲烷、水等溶剂对芒果核粉进行提取,测定芒果核提取物中总酚提取率,确定其提取效果,其结果见图2。



小写字母不同表示差异显著, $P < 0.05$ 。下同。

图2 不同溶剂的芒果核提取物的提取效果

Fig.2 Effect of solvent type on extraction rate of polyphenol from mango kernel

从图2可以看出,95%乙醇提取的总酚提取率最高,其次为甲醇、无水乙醇,而三氯甲烷提取的总酚提取率最低,这与芒果核的组分以及酚类物质的物理性质有极大关系^[11]。乙醇相较其他有机溶剂安全性高且价格便宜,因此,本实验选用95%乙醇作为最佳提取溶剂。

2.2.2 提取温度的选择

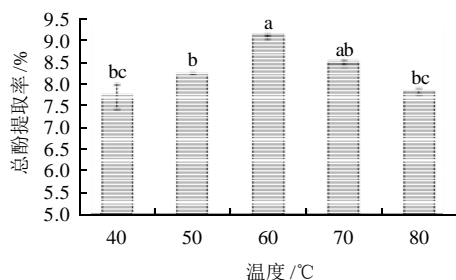


图3 温度对芒果核总酚提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on extraction rate of polyphenols from mango kernel

由图3可知,温度对总酚提取率的影响呈现先上升后下降的趋势,提取温度在40~60℃时,芒果核中总酚的提取率随温度升高而增加,这是由于温度升高,分子运动加速,氢键更容易断裂,酚类物质的渗透、溶解、扩散速度加快,因而酚类物质更易于从原料中溶出^[14-15]。在70℃时明显下降,由于酚类物质在高温下易于发生氧化或降解。因此,本实验确定60℃为最佳提取温度。

2.2.3 提取时间的选择

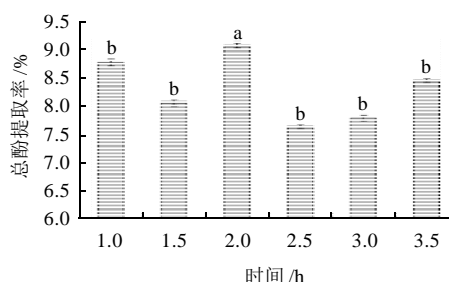


图4 提取时间对芒果核总酚提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction rate of polyphenols from mango kernel

由图4可知,随着提取时间的延长提取液中总酚提取率在逐渐增大。但提取时间超过2h以后,总酚提取率呈现显著下降趋势。这可能由于酚类物质不稳定,随时间延长,易发生分解,也有可能是芒果核中氧化物氧化聚合而生成沉淀。因此,本实验确定2h为最佳提取时间。

2.2.4 料液比的选择

料液比是影响酚类物质提取率的重要因素之一,适当的液料比不仅能使原料中的酚类物质得到充分提取,而且可减少溶剂的浪费和节省提取成本。由图5可知,在果核粗粉质量相同的情况下,随着料液比的增加,总酚提取率逐渐下降。其原因是由于在温度确定的条件下,物质的溶解度是恒定的,因此总酚溶出量随着提取溶剂体积的增加而增加,但当溶剂体积达到一定值时,总酚已基本溶出,此时增加溶剂量对总酚的提取率影响不大^[16]。因此,本实验确定1:10为最佳料液比。

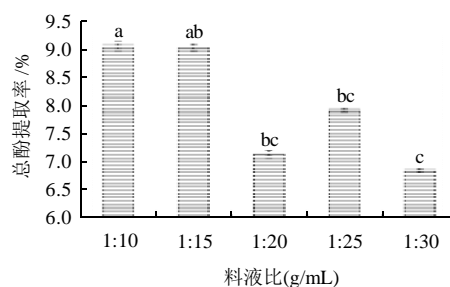


图5 料液比对芒果核总酚提取率的影响

Fig.5 Effect of solid-to-liquid ratio on extraction rate of polyphenols from mango kernel

2.2.5 响应面试验设计

2.2.5.1 数学模型建立^[16-22]

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 在单因素试验基础上, 确定响应面设计中每个因素的适宜范围。而通过单因素试验结果的方差分析选取提取温度 X_1 、提取时间 X_2 、料液比 X_3 3 个因素为自变量, 总酚提取率为因变量 Y , 按照 Design Expert 软件中的中心组合试验模型, 对试验获得的总酚提取率响应值(表 2)进行回归分析, 建立二次回归模型。

表 2 芒果核总酚提取响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and corresponding results for the response surface analysis for optimizing polyphenol extraction from mango kernel

试验号	提取温度(x_1)	提取时间(x_2)	料液比(x_3)	总酚提取率/%
1	-1	-1	-1	9.085
2	-1	-1	1	8.368
3	-1	1	-1	8.907
4	-1	1	1	8.063
5	1	-1	-1	8.285
6	1	-1	1	8.185
7	1	1	-1	8.065
8	1	1	1	8.010
9	-1.68179	0	0	8.240
10	1.681793	0	0	8.165
11	0	-1.68179	0	8.835
12	0	1.681793	0	8.698
13	0	0	-1.68179	8.890
14	0	0	1.681793	8.133
15	0	0	0	9.260
16	0	0	0	9.027
17	0	0	0	9.060
18	0	0	0	9.095
19	0	0	0	9.086
20	0	0	0	9.063

表 3 回归方程模型系数的显著性检验

Table 3 Significance test of the regression coefficients in the fitted regression model

参数	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
X_1	1	0.293957	0.293957	12.95156	0.004857
X_2	1	0.089888	0.089888	3.960417	0.074611
X_3	1	0.653824	0.653824	28.80703	0.000316
X_1^2	1	1.616363	1.616363	71.21589	0.0001
X_1X_2	1	0.000979	0.000979	0.043135	0.839639
X_2^2	1	0.264726	0.264726	11.66364	0.0066
X_1X_3	1	0.24728	0.24728	10.89501	0.008003
X_2X_3	1	0.000838	0.000838	0.036942	0.851431
X_3^2	1	0.734396	0.734396	32.357	0.000202
回归检验	3	2.261405	0.753802	33.212	0.0001
失拟检验	5	0.192856	0.038571	5.653858	0.040137
误差	5	0.034111	0.006822		
总计	19	3.775143			

初步回归方程为:

$$Y = -2.09102 + 0.347624X_1 + 1.914481X_2 - 0.065951X_3 - 0.003349X_1^2 + 0.002212X_1X_2 + 0.003516X_1X_3 - 0.542135X_2^2 -$$

$$0.004095X_2X_3 - 0.00903X_3^2 \quad (1)$$

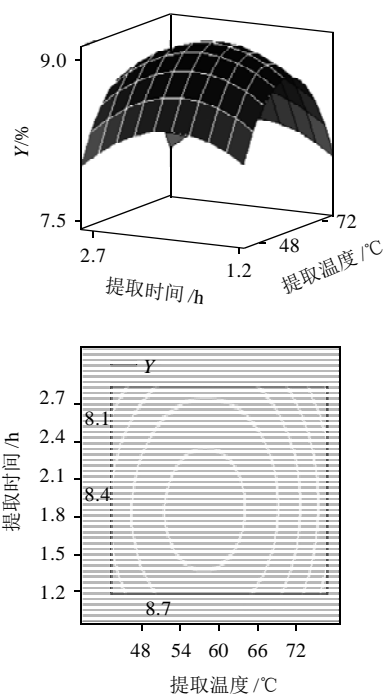
对回归方程进行检验, 相关系数 $R^2=0.9399$, $P < 0.01$, 表明回归模型显著, 拟合程度好, 有实际应用意义。对回归方程系数进行显著性检验(表 3), 表明: 对结果的影响排序为: 料液比 $>$ 提取温度 $>$ 提取时间。其中, X_3 、 X_1^2 和 X_3^2 对 Y 的影响差异极显著, X_1 、 X_2^2 和 X_1X_3 对 Y 的影响高度显著, 而 X_2 、 X_1X_2 和 X_2X_3 对 Y 的影响不显著。可见, 试验各因素对芒果核中总酚提取的影响不是简单的线性关系。在 $\alpha=0.05$ 显著水平下剔除不显著项后, 对模型(1)进行优化可得:

$$Y = -2.09102 + 0.347624X_1 - 0.065951X_3 - 0.003349X_1^2 + 0.003516X_1X_3 - 0.542135X_2^2 - 0.00903X_3^2 \quad (2)$$

2.2.5.2 反应条件的优化和模型验证

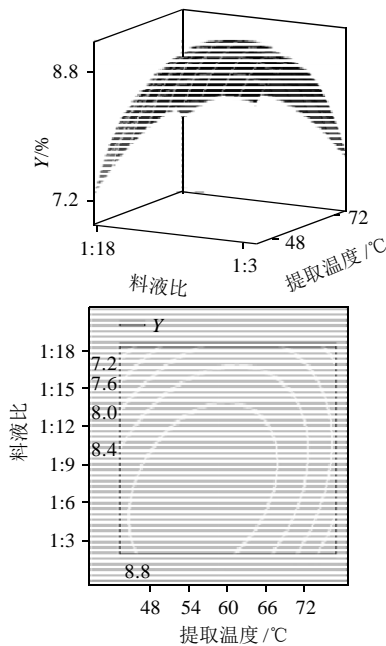
各因素之间的响应面图和等高线图如图 6~8 所示, 由 SAS 分析得到响应面值最大时, 温度(X_1)、时间(X_2)、液料比(X_3)对应的编码值分别为 $X_1 = -0.38909$ 、 $X_2 = -0.2914$ 、 $X_3 = -0.62954$, 对应的芒果核中总酚提取的最佳条件为: 提取温度 56.11°C , 提取时间 1.8h , 料液比 $1:6.8$, 总酚提取率的理论值为 9.21% 。

为了验证响应面法的可行性, 选择温度为 56°C 、时间为 2h 、料液比为 $1:6.8$, 对芒果核中总酚进行提取验证实验。3 次平行实验得到实际平均总酚提取率为 9.38% , 较理论值高 0.17% 。因此, 响应面法对芒果核中总酚提取条件的优化是可行的, 具有实际应用价值。



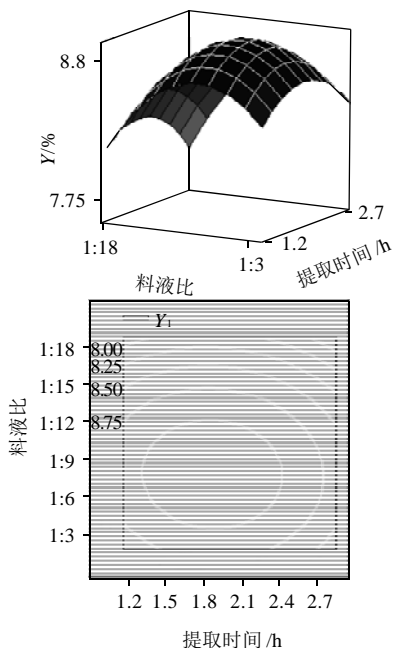
固定水平: 料液比 $=1/110.0000075$ 。

图 6 提取温度与提取时间对总酚提取率影响的响应面与等高线图
Fig.6 Response surface and contour plots for the effect of extraction temperature and time on extraction rate of polyphenols from mango kernel



固定水平: 提取时间=2.00000075h。

图7 提取温度与料液比对总酚提取率影响的响应面与等高线图
Fig.7 Response surface and contour plots for the effect of extraction temperature and solid-to-liquid ratio on extraction rate of polyphenols from mango kernel



固定水平: 提取温度=60.000015℃。

图8 提取时间与料液比对总酚提取率影响的响应面与等高线图
Fig.8 Response surface and contour plots for the effect of extraction time and solid-to-liquid ratio on extraction rate of polyphenols from mango kernel

3 结论

3.1 单因素试验表明: 95% 乙醇提取的总酚提取率最高, 其次为甲醇、无水乙醇, 而三氯甲烷提取的总酚

提取率最低, 芒果核多酚的提取温度应控制在 50~70℃, 提取时间应控制在 1.5~2.5h, 料液比在 1:5~1:15 之间提取率最高, 根据单因素的结果分析选定提取温度、时间和料液比为主要因素进行工艺优化。

3.2 通过响应面分析得出: 各因素中以提取温度对多酚提取率的影响最为显著, 各因素间的交互作用较小, 通过软件优化得出芒果核总酚提取的最佳条件为温度 56℃、时间 2h、料液比 1:6.8; 通过验证实验得出数值(9.38%)与模型预测数值(9.21%)没有明显的差异, 可信度较高, 同时比先前报道的高(6.86%)^[3]。

参考文献:

- [1] 马蔚红, 武红霞, 王松标, 等. 我国芒果优势区域布局发展规划[C]//热带作物产业带建设规划研讨会: 热带果树产业发展论文集, 海口: 中国热带作物学会, 2006: 62-70.
- [2] 莫武桂, 刘华钢, 郑陈光, 等. 芒果核提取物体外抑菌及急性毒性实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1932-1933.
- [3] 高云涛, 付艳丽, 李正全, 等. 超声与双水相体系耦合提取芒果核多酚及活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 164-167.
- [4] ABDALLA A E, DARWISH S M, AYAD E H, et al. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel[J]. Food Chemistry, 2007a, 103(4): 1141-1152.
- [5] ABDALLA A E, DARWISH S M, AYAD E H, et al. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel[J]. Food Chemistry, 2007b, 103(4): 1134-1140.
- [6] SANDHU K S, LIM S T. Structural characteristics and *in vitro* digestibility of Mango kernel starches (*Mangifera indica* L.)[J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 92-97.
- [7] RUKMINI C, VIJAYARAGHAVAN M. Nutritional and toxicological evaluation of Mango kernel oil[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1984, 61(4): 789-792.
- [8] JOSEPH J K, ABOLAJI J. Effects of replacing maize with graded levels of cooked Nigerian mango-seed kernels (*Mangifera indica*) on the performance, carcass yield and meat quality of broiler chickens[J]. Bioresource Technology, 1997, 61(1): 99-102.
- [9] SILVA E M, ROGEEZ H, LARONDELLE Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 55(3): 381-387.
- [10] AMIN I, NORAZAIDAH Y, HAINIDA K I E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched Amaranthus species [J]. Food Chemistry, 2006, 94(1): 47-52.
- [11] 贾冬英, 李尧, 姚开, 等. 香蕉皮中多酚的提取工艺条件研究: 工程科学版[J]. 四川大学学报, 2005, 37(6): 52-55.
- [12] 刘丽丽, 张建新, 王娜, 等. 响应面分析法优化光皮木瓜总酚醇提工艺的研究[J]. 中国酿造, 2009(2): 76-79.
- [13] 王明艳, 杨凡, 李燕, 等. 响应面法优化百部多糖提取条件研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 82-83.
- [14] 高园, 房玉林, 张昂, 等. 葡萄枝条中多酚类物质的超声波辅助提取[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(9): 78-82.
- [15] 张艳萍, 傅晓航, 俞远志. 板栗中多酚物质的提取工艺优化[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 187-191.
- [16] 张喜梅, 李琳. 葛根总黄酮提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(1): 44.
- [17] 杨红玲, 吴鸣建, 张宏韬, 等. 射干黄酮提取工艺的响应面设计优化[J]. 食品科技, 2009, 34(3): 188-191.
- [18] 郑辉杰, 李志强, 刘伟, 等. 响应面法优化番茄红素提取工艺研究[J]. 北方园艺, 2009(2): 5-8.
- [19] 郭树琴, 吴胜举, 李岱. 响应面法优化超声提取绿茶茶多酚工艺[J]. 生物加工过程, 2009, 7(1): 42-43.
- [20] 张初署, 禹山林, 潘丽娟, 等. 响应面法优化花生根中白藜芦醇提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 36-37.
- [21] WANG Jing, SUN Baoguo, CAO Yanping, et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 804-810.
- [22] RODRIGUES S, PINTO G A S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(3): 869-872.