

响应面试验优化超声法提取橄榄果实游离氨基酸工艺

彭真汾, 谢倩, 池毓斌, 陈清西*
(福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002)

摘要: 为获得橄榄果实游离氨基酸的最佳提取工艺, 以橄榄果实为实验材料, 通过单因素试验、Plackett-Burman试验、最陡爬坡试验和响应面试验优化超声法提取橄榄果实游离氨基酸的最佳工艺。结果表明: 各因素对游离氨基酸提取量的影响力由高到低为料液比>提取次数>超声时间>超声功率>乙醇体积分数>超声温度; 响应面法得出的最佳提取工艺为超声时间20 min、料液比1:41 (g/mL)、提取次数3、超声温度50 ℃、超声功率270 W、乙醇体积分数60%, 游离氨基酸的提取量实际值为79.88 mg/g, 与预测值相对误差为2.62%, 表明此优化工艺具有实际应用价值。

关键词: 橄榄; 游离氨基酸; 超声法; 响应面法; Plackett-Burman设计; Box-Behnken设计

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Free Amino Acids from the Flesh of *Canarium album* Fruits by Response Surface Methodology

PENG Zhenfen, XIE Qian, CHI Yubin, CHEN Qingxi*
(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: This study aimed to obtain the optimum conditions for the extraction of free amino acids from the flesh of *Canarium album* fruits by the combined use of one-factor-at-a-time method, Plackett-Burman design, steepest ascent design and response surface methodology. The results showed that the effects of factors on the extraction yield of free amino acids were in the descending order of solid-to-liquid ratio > number of extraction cycles > ultrasonication time > ultrasonic power > ethanol concentration > temperature, and the optimum levels of these variables were determined to be 20 min, 1:41 (g/mL), 3, 50 ℃, 270 W and 60%, respectively. Under these conditions, the predicted extraction yield of free amino acids was 77.84 mg/g while the actual value was 79.88 mg/g. The relative error was 2.62%, indicating that the optimized extraction method was reliable.

Key words: *Canarium album*; free amino acids; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology; Plackett-Burman design; Box-Behnken design

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720021

中图分类号: S667.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 20-0146-08

引文格式:

彭真汾, 谢倩, 池毓斌, 等. 响应面试验优化超声法提取橄榄果实游离氨基酸工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 146-153.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720021. <http://www.spkx.net.cn>

PENG Zhenfen, XIE Qian, CHI Yubin, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of free amino acids from the flesh of *Canarium album* fruits by response surface methodology[J]. Food Science, 2017, 38(20): 146-153. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720021. <http://www.spkx.net.cn>

氨基酸是构成蛋白质的基本单位, 是人体正常代谢和生理活动的重要成分, 具有抗菌^[1]、保肝保肾^[2]、降血

脂^[3]等作用。氨基酸可分为水解氨基酸和游离氨基酸, 其中水解氨基酸以结合态形式存在于肽和蛋白质中, 主要

收稿日期: 2016-12-29

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD07B01); 福建省自然科学基金项目(2012D085);

福州市科技计划项目(2009-N-55); 福建省重大科技专项(2013NZ0002-4)

作者简介: 彭真汾(1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事果树生理与生态研究。E-mail: 390689340@qq.com

*通信作者: 陈清西(1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事园艺植物栽培与生理研究。E-mail: cqx0246@fafu.edu.cn

体现物质的营养状况^[4-5]；游离氨基酸以游离态存在，不仅可通过呈味氨基酸反映食物口感和风味，以药用氨基酸反映药用价值^[4,6-7]，并通过参与美拉德反应、使酚类物质发生褐变等直接影响食物的感官品质^[8-9]；且提取游离氨基酸获得的天然氨基酸可作为某些食品呈味添加剂，丰富食物口感^[10]。

橄榄 (*Canarium album* (Lour.) Raeusch.)，为橄榄科 (Burseraceae) 橄榄属 (*Canarium*) 植物，又名青果、青榄、白榄，属热带、亚热带果树^[11]，是福建省的名特优水果，果实营养价值高，富含VC和钙^[12-13]，具有生津止渴^[11]、解酒保肝^[14]等药用功效。橄榄氨基酸种类丰富，含量较高^[15]，接近世界粮农组织和卫生组织建议的理性参考模式值 (40%和60%)^[16]，表明橄榄氨基酸具有较高的营养价值。且氨基酸含量、种类和比例是评价橄榄营养价值优劣的主要指标之一，对橄榄营养品质和风味均有重要贡献^[17]。目前，在橄榄氨基酸上的研究多集中于水解氨基酸^[12,18-20]，对游离氨基酸研究仍鲜见报道。

目前，国内外提取植物游离氨基酸主要采用加热回流法^[21]、超临界流体萃取法^[22]、超声波提取法^[23]、微波提取法^[24]等。超声波提取是一种物理方法，通过超声过程中产生的空化作用和热效应，使植物细胞壁破裂，有效成分溶出，达到在较短的提取时间内，提高提取效率的作用^[25-26]，较其他方法有时间短、无需加热、操作简便等优点^[27]。因此，本实验利用超声法对橄榄果实游离氨基酸进行提取，并通过单因素试验、Plackett-Burman试验及最陡爬坡试验与响应面法相结合，寻找超声法提取橄榄果实游离氨基酸的最佳工艺，为进一步研究橄榄果实游离氨基酸提供理论依据和实际指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

‘长营’橄榄果实于2015年11月17日采自福建省闽侯县城关农场；亮氨酸标准品、十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、茚三酮 (苯骈戊三酮)、无水乙醇均为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

LGJ-25C型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司；FW177型中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司；KQ-300DE型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司；Allegra 64R型台式高速冷冻离心机 贝克曼库尔特 (美国) 有限公司；DK-S22型电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司；WinLab V6型紫外-可见分光光度计 铂金埃尔默仪器 (上海) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 橄榄果实粉末的制备

将新鲜采下的橄榄置于4℃保温箱中带回实验室，立即用双蒸水洗净、晾干、取果肉，冻干并粉碎至过40目筛后保存于-40℃冰箱中备用。

1.3.2 橄榄果实游离氨基酸溶液的制备

参照朱玉婷^[28]的方法稍作改进进行实验设计。

准确称取橄榄果实粉末0.5 g于50 mL离心管中，按料液比 (1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 (g/mL)) 加入一定体积分数 (30%、40%、50%、60%、70%) 乙醇溶液，在一定超声功率 (180、210、240、270、300 W)、超声温度 (30、40、50、60、70℃)、超声时间 (10、15、20、25、30 min) 提取 (1、2、3、4次)，之后常温10 000 r/min离心10 min，吸取一定量上清液 (视具体情况而定) 于20 mL具塞试管中，用蒸馏水稀释至刻度，作为橄榄果实游离氨基酸溶液。

1.3.3 亮氨酸标准曲线的绘制

根据前期预实验结果进行标准曲线的制作。配制0.2 mg/mL亮氨酸标准品溶液，分别吸取0.2 mg/mL亮氨酸标准品1.0、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25、2.5、2.75、3.0、3.25 mL和3.5 mL，并用蒸馏水分别补足至4.0 mL。吸取上述各溶液2.0 mL于20 mL具塞试管中，加入pH 6.6磷酸缓冲液0.5 mL和2 g/mL茚三酮溶液0.5 mL，摇匀，于100℃恒温水浴锅中加热25 min，冷却，蒸馏水定容至刻度，在568 nm波长下测定吸光度。以亮氨酸标准品溶液质量浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，所得回归方程为： $y=10.482x-0.4947$ ， $R^2=0.9996$ 。表明亮氨酸标准品溶液在0.05~0.175 mg/mL质量浓度范围内线性关系良好。

1.3.4 橄榄果实游离氨基酸提取量的测定

吸取1.3.2节制备的橄榄果实游离氨基酸溶液2.0 mL代替1.3.3节中亮氨酸标准品溶液，并以2.0 mL蒸馏水作为空白对照，按1.3.3节的方法进行实验，测定吸光度。游离氨基酸提取量的计算公式如下：

$$\text{游离氨基酸提取量}/(\text{mg/g}) = \frac{c \times V \times n}{m}$$

式中： c 为游离氨基酸质量浓度/(mg/mL)； V 为提取液总体积/mL； n 为稀释倍数； m 为橄榄粉末质量/g。

1.3.5 超声法提取橄榄果实游离氨基酸单因素试验

按1.3.2节制备橄榄果实游离氨基酸溶液，后按1.3.4节进行实验。每次只改变一个因素，且考察完一个因素，将其最佳条件作为下一个因素的固定条件，直至完成全部单因素试验，试验均重复3次。

1.3.6 Plackett-Burman (PB) 试验设计

PB试验能在较少的试验次数下，从多因素试验中筛选出显著的影响因素^[29-32]。在单因素试验的基础上，采用6个因素和5个虚拟因素进行 n 为12的PB设计，以游离氨

氨酸提取量为响应值, 每个因素取高低2个水平, 高水平倍数不超过低水平2倍, 且因素之间间隔分布, 试验设计如表1所示。

表1 PB试验因素与水平
Table 1 Factors and levels used in Plackett-Burman design

因素	水平	
	+1	-1
A超声温度/℃	60	40
B超声功率/W	300	240
C超声时间/min	25	15
D料液比 (g/mL)	1:40	1:20
E乙醇体积分数/%	70	50
F提取次数	4	2

1.3.7 最陡爬坡试验

最陡爬坡试验是在PB试验的基础上, 对筛选得出的显著因子进行合理设计, 从而获得最佳工艺区域的方法, 并将此结果作为响应面试验的中心点展开试验^[33]。主要凭借PB试验中显著因素的正负效应进行设计合理步长和爬坡方向来达到试验目的, 其他因素的取值结合单因素试验和PB试验各因素的正负效应来确定。

1.3.8 响应面试验设计

根据Box-Behnken试验设计原理, 在PB试验和最陡爬坡试验的基础上, 选择超声时间(C)、料液比(D)、提取次数(F)3个因素作为响应面试验的因素, 其余因素条件固定为乙醇体积分数60%、超声温度50℃、超声功率270W。响应面试验设计如表2所示。

表2 Box-Behnken设计试验因素与水平
Table 2 Levels and codes of independent variables used for Box-Behnken design

水平	因素		
	C超声时间/min	D料液比 (g/mL)	F提取次数
-1	15	1:35	2
0	20	1:40	3
1	25	1:45	4

1.4 数据处理

单因素试验图表的绘制采用Excel 2003完成, 显著性分析采用SPSS 17.0完成; PB试验和响应面试验设计和分析采用Design-Expert 8.05b完成。

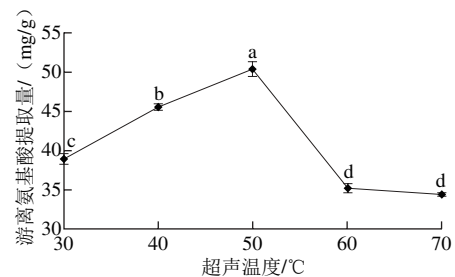
2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声温度对游离氨基酸提取量的影响

按料液比1:30 (g/mL) 加入体积分数50%乙醇溶液, 在超声功率180W时超声20min, 提取1次, 由图1可知, 随着超声温度的升高, 游离氨基酸提取量先上升后下降, 50℃时到达提取量最大值50.25 mg/g, 且50℃与

60℃之间达到显著性差异 ($P<0.05$), 60、70℃时已降低到低值且基本稳定。这可能是由于随着超声温度的增加, 原本小分子游离氨基酸的溶出量会增加, 但同时也会增加非游离氨基酸物质的溶出如水溶性色素, 使提取液的颜色加深^[34], 另外超声温度对超声提取的空化效应具有一定影响, 当温度过高时会减少空化效应产生的高压反而会弱化空化效应^[35], 进而影响提取量。因此, 超声温度应选择50℃。



不同小写字母表示具有显著性差异 ($P<0.05$), 下同。

图1 超声温度对游离氨基酸提取量的影响

Fig. 1 Effect of temperatures on the extraction yield of free amino acids

2.1.2 超声功率对游离氨基酸提取量的影响

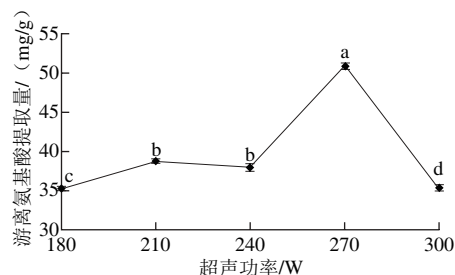


图2 超声功率对游离氨基酸提取量的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic power on the extraction yield of free amino acids

按料液比1:30 (g/mL) 加入体积分数50%乙醇溶液, 在超声温度50℃时超声20min提取1次, 由图2可知, 随着超声功率的增加, 游离氨基酸提取量不断增加, 在270W时达到最大值50.84 mg/g, 继续加大超声功率至300W, 提取量下降且与270W时达到显著差异 ($P<0.05$), 这可能是由于随着超声功率的增加, 使超声处理的热效应和空化作用增强, 有利于粉末中游离氨基酸溶出, 但继续增大超声功率至300W, 有利于提高提取液的流速, 造成粉末在超声场中停留时间减少, 导致破壁作用的减弱^[36], 另外超声功率增大至空化效应饱和后, 继续增大只会加强超声波的散射和衰减, 不利空化^[35], 造成提取量下降, 因此, 选择超声功率为270W。

2.1.3 超声时间对游离氨基酸提取量的影响

按料液比1:30 (g/mL) 加入体积分数50%乙醇溶液, 固定超声温度50℃、超声功率270W、超声提取

1次,由图3可知,随着超声时间的延长,游离氨基酸的提取量先升高后稍微下降,在20 min时达到最大值,且20 min与15 min之间达到显著差异($P<0.05$),而20 min与25 min差异不显著($P>0.05$),表明超声时间20 min时,橄榄粉末中的游离氨基酸已基本被提取出来,再继续效果不明显,且20 min与30 min时达到显著差异($P<0.05$),表明继续超声,游离氨基酸的提取量反而显著下降,可能是由于超声时间的延长,原本被提取出来的游离氨基酸,特别是芳香族氨基酸,被空化效应产生的自由基所氧化^[37],从而影响提取效果,因此,超声时间应选择20 min为宜。

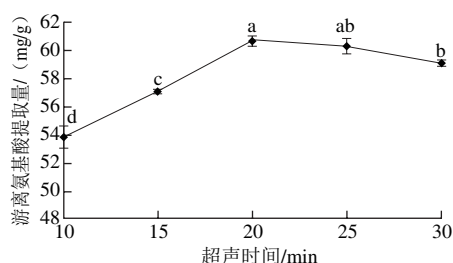


图3 超声时间对游离氨基酸提取量的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic irradiation time on the extraction yield of free amino acids

2.1.4 料液比对游离氨基酸提取量的影响

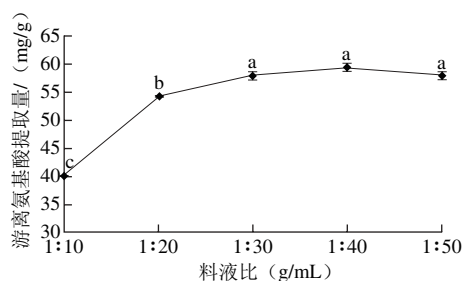


图4 料液比对游离氨基酸提取量的影响

Fig. 4 Effect of liquid/solid ratio on the extraction yield of free amino acids

用体积分数50%乙醇溶液提取橄榄粉末,固定超声温度50℃、超声功率270 W、超声20 min、提取1次,由图4可知,游离氨基酸提取量随着溶剂用量的增加而增大,在1:40 (g/mL)时达到最大值,但料液比1:30、1:40和1:50之间提取量没有显著差异($P>0.05$)。这可能是由于溶剂用量小时,溶液不足以完全提取粉末中的游离氨基酸,导致提取率低下,继续增加溶剂用量,有利于游离氨基酸的充分提取,增大提取量,但当游离氨基酸已被基本提取完全时,再增加溶剂用量,对提取量的影响小,且易造成成本的增加,结合经济角度的考虑,选择料液比1:30 (g/mL)。

2.1.5 乙醇体积分数对游离氨基酸提取量的影响

固定料液比1:30 (g/mL)、超声温度50℃、超声功

率270 W、超声20 min、提取1次,由图5可知,随着乙醇体积分数的增大,提取量逐渐增大,到60%时达到最大值62.24 mg/g,随后降低,且与70%之间达到显著差异($P<0.05$)。一方面可能是由于溶剂与物质的相似相溶原理,乙醇体积分数与游离氨基酸的极性越接近,越有利于其溶出^[38];另一方面可能是改变乙醇体积分数的同时,其他醇溶性的物质也被随即溶出,从而导致了提取量降低,综合考虑,选择体积分数60%乙醇溶液。

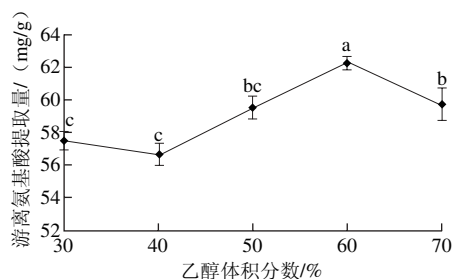


图5 乙醇体积分数对游离氨基酸提取量的影响

Fig. 5 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of free amino acids

2.1.6 提取次数对游离氨基酸提取量的影响

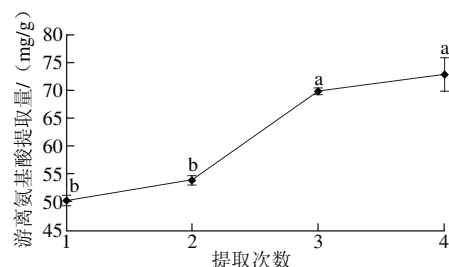


图6 提取次数对游离氨基酸提取量的影响

Fig. 6 Effect of number of extraction cycles on the extraction yield of free amino acids

按料液比1:30 (g/mL)加入体积分数60%乙醇溶液,超声温度50℃、超声功率270 W、超声20 min,由图6可知,随着提取次数的增加,游离氨基酸的提取量不断增大,在提取3次时基本达到稳定,提取3次与4次无显著性差异($P>0.05$)。这是由于提取1、2次时,还未将粉末中的游离氨基酸提取完全,提取3次已基本将粉末中的游离氨基酸提取完全,再增加提取次数对增加游离氨基酸含量影响小,且造成成本的提高和工时的拖长,因此,选择提取3次最佳。

2.2 PB试验设计及结果

利用Design-Expert 8.05b进行PB试验的设计以及结果的分析,PB试验设计与结果如表3所示。从表4可知,PB试验的模型P值为0.003 4,小于0.01,达到极显著水平,表明模型具有统计学意义。从各个因素的P值可知,各因素对游离氨基酸提取量的影响水平为料液

比>提取次数>超声时间>超声功率>乙醇体积分数>超声温度, 其中料液比和提取次数达到极显著水平 ($P<0.01$), 且从参数估计值可知此2个因素对提取量呈正效应影响, 其他因素均不显著 ($P>0.05$) 并均为负效应影响, 但考虑若选择中心组合试验设计, 则需对提取次数进行1.414倍水平处理^[39], 不符合实际操作的可行性; 选择Box-Behnken试验设计时至少需要3个因素^[29], 因此, 结合各因素影响水平的排名情况选择料液比、提取次数和超声时间3个因素进行最陡爬坡试验。

表3 PB试验设计与结果

Table 3 Plackett-Burman design with experimental results

试验号	A超声温度	B超声功率	C超声时间	D料液比	E乙醇体积分数	F提取次数	游离氨基酸提取量/(mg/g)
1	1	-1	1	1	-1	1	65.51
2	1	1	1	-1	1	1	55.39
3	1	-1	1	-1	-1	-1	49.71
4	1	-1	-1	-1	1	1	57.52
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	50.69
6	1	1	-1	1	1	-1	61.43
7	-1	1	1	-1	1	-1	43.33
8	-1	1	-1	-1	-1	1	56.93
9	1	1	-1	1	-1	-1	58.27
10	-1	-1	-1	1	1	1	69.35
11	-1	-1	1	1	1	-1	59.39
12	-1	1	1	1	-1	1	69.07

表4 PB试验设计效应分析

Table 4 Statistical analysis of Plackett-Burman design

来源	平方和	自由度	均方	参数估计	F值	P值
模型	636.76	6	106.13		17.18	0.003 4**
A超声温度	0.069	1	0.069	-0.076	0.011	0.919 8
B超声功率	4.98	1	4.98	-0.64	0.81	0.410 5
C超声时间	11.50	1	11.50	-0.98	1.86	0.230 6
D料液比	402.44	1	402.44	5.79	65.14	0.000 5**
E乙醇体积分数	1.17	1	1.17	-0.31	0.19	0.681 3
F提取次数	216.59	1	216.59	4.25	35.06	0.002 0**
残差	30.89	5	6.18			
总离差	667.65	11				
$R^2=0.953\ 7$						

注: **,差异极显著 ($P<0.01$)。

2.3 最陡爬坡试验结果

表5 最陡爬坡试验设计与结果

Table 5 Experimental design and results of steepest ascent path

试验号	C超声时间/min	D料液比(g/mL)	F提取次数	游离氨基酸提取量/(mg/g)
1	25	1:35	1	56.72
2	20	1:40	1	59.48
3	15	1:45	1	54.90
4	10	1:50	1	53.24
5	5	1:55	1	58.56

由PB试验可知, 料液比和提取次数为正效应, 超声时间为负效应, 则适当的提高料液比和提取次数, 减小超声时间有利于提高提取率, 但考虑到随着提取次数的

增加, 游离氨基酸提取量也将增加, 其提取量的显著增加易掩盖其他因素对提取量造成的影响, 因此固定提取次数为1次, 另外2个因素由其正负效应, 确定爬坡方向和合理的步长, 同时改变因素水平, 达到快速逼近最佳区域的目的。由表5可知最佳的组合为试验组2, 因此以试验组2条件为Box-Behnken试验设计的中心值。

2.4 响应面试验结果

2.4.1 Box-Behnken试验设计结果及方差分析

表6 Box-Behnken试验设计及结果

Table 6 Box-Behnken design with experimental results

试验号	C超声时间/min	D料液比(g/mL)	F提取次数	游离氨基酸提取量/(mg/g)	
				实际值	预测值
1	0 (20)	0 (1:40)	0 (3)	77.28	77.02
2	1 (25)	-1 (1:35)	0	62.71	61.56
3	-1 (15)	-1	0	60.89	60.75
4	0	1 (1:45)	1 (4)	71.61	70.96
5	1	0	-1 (2)	57.79	58.28
6	1	1	0	63.63	63.76
7	0	0	0	79.03	77.02
8	-1	0	-1	61.75	61.23
9	-1	1	0	65.79	66.94
10	0	0	0	77.85	77.02
11	0	1	-1	63.77	63.15
12	0	-1	-1	58.41	59.07
13	0	0	0	76.67	77.02
14	-1	0	1	67.65	67.16
15	1	0	1	67.22	67.74
16	0	0	0	74.26	74.02
17	0	-1	1	66.03	66.65

表7 响应面试验方差分析

Table 7 Analysis of variance of response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方值	F值	P值
模型	774.06	9	86.01	33.72	<0.000 1**
C超声时间	2.81	1	2.81	1.10	0.329 1
D料液比	35.12	1	35.12	13.77	0.007 5**
F提取次数	118.46	1	118.46	46.44	0.000 2**
CD	3.98	1	3.98	1.56	0.252 0
CF	3.11	1	3.11	1.22	0.306 3
DF	0.013	1	0.013	0.005 138	0.944 9
C ²	240.66	1	240.66	94.35	<0.000 1**
D ²	162.12	1	162.12	63.56	<0.000 1**
F ²	144.56	1	144.56	56.68	0.000 1**
残差	17.85	7	2.55		
失拟项	5.32	3	1.77	0.57	0.666 0
净误差	12.53	4	3.13		
总和	791.91	16			
$R^2=0.977\ 5$				$R_{Adj}^2=0.948\ 5$	

注: **,差异极显著 ($P<0.01$)。

在PB试验与最陡爬坡试验的基础上, 利用Design-Expert 8.05b软件进行Box-Behnken试验设计, 并得到结果如表6所示, 同时进行方差分析如表7所示。对试验结果进行多元回归拟合, 得到回归方程: 游离氨基酸提取量/(mg/g) = $77.02 - 0.59C + 2.10D + 3.85F - 1.00CD + 0.88CF + 0.057DF - 7.56C^2 - 6.21D^2 - 5.86F^2$ 。从表7可知, 模型P值小于0.000 1, 达到极显著 ($P<0.01$) 水

平, 失拟项 P 为0.666 0, 大于0.05, 不显著, 表明模型对本试验的拟合度良好, $R^2=0.977\ 5$, 表明模型拟合度良好, $R^2_{Adj}=0.948\ 5$, 表明该模型能解释94.85%响应值的变化, 则用该模型能代替真实试验点对超声法提取橄榄果实游离氨基酸提取量的分析和预测。从表7中各因素的 P 值可知, 回归模型中 D 、 F 、 C^2 、 D^2 和 F^2 极显著 ($P<0.01$), 而一次项 C 、交互项 CD 、 CF 、 DF 均不显著 ($P>0.05$), 表明各因素对游离氨基酸提取量的影响不同, 调整不同因素将达到不同提取效果。

2.4.2 响应面分析

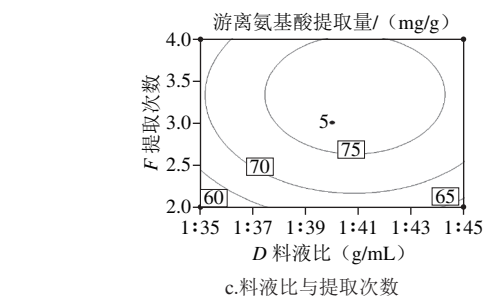
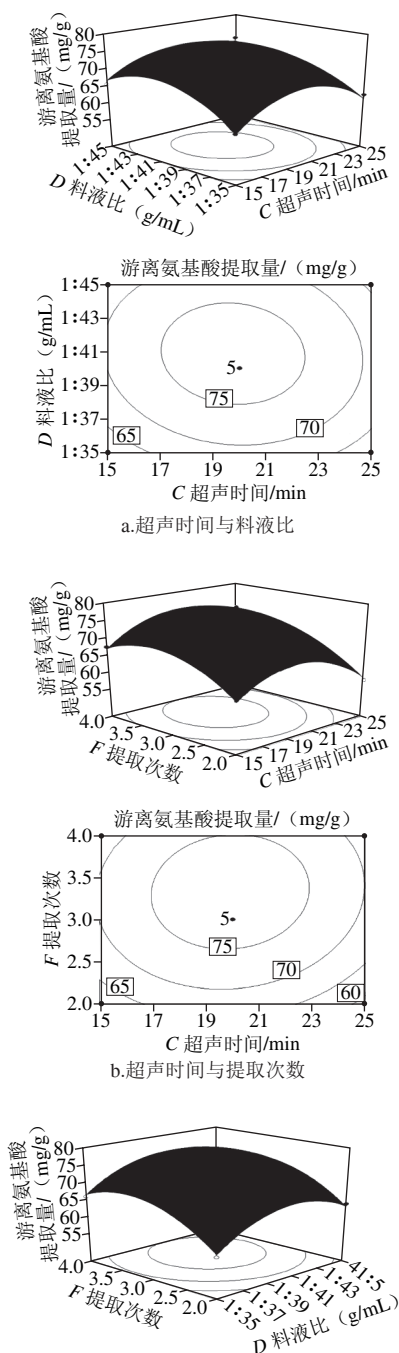


图7 各因素交互作用对游离氨基酸提取量影响的响应面与等高线图
Fig. 7 Contour plots and response surface showing the interactive effects of various factors on the extraction yield of free amino acids

通过Design-Expert 8.05b软件对响应面试验结果进行分析, 得到了各因素交互作用对游离氨基酸提取量影响的等高线图和响应面图, 可以更加直观看出各因素之间交互作用的影响。从图7可以看出, 两两因素交互作用的响应面图都较平缓, 等高线图的椭圆形状都较明显, 表明各因素之间交互作用不显著^[40-42], 与上述显著性结果一致; 图7显示随着超声时间、料液比和提取次数水平的增加, 游离氨基酸提取量表现出先增加后下降的趋势, 均能找到其最佳值。

2.4.3 最佳工艺的确定与验证实验

通过Design-Expert 8.05b软件分析得出超声法提取橄榄果实游离氨基酸的最佳工艺条件: 超声时间19.84 min、料液比1:40.87 (g/mL)、提取次数3.33、超声温度50 ℃、超声功率270 W、乙醇体积分数60%。在此条件下, 预测的游离氨基酸提取量为77.84 mg/g。考虑到实际操作的可能性, 将条件定为超声时间20 min、料液比1:41 (g/mL)、提取次数3、超声温度50 ℃、超声功率270 W、乙醇体积分数60%, 平行实验3次, 得到的游离氨基酸提取量为79.88 mg/g, 与预测值的相对误差为2.62%, 与中心点存在显著性差异 ($P=0.037<0.05$), 表明通过响应面试验优化超声法提取橄榄果实游离氨基酸的提取工艺是可行的, 具有实际意义。

3 讨论与结论

保存植物组织的方法有许多种, 如超低温保存^[43]、低温保存^[44]、干燥保存^[45]等。不同保存方法对植物体内各物质的含量和变化趋势有一定的影响。王子飞等^[46]通过比较不同保存方法对植物叶片色素降解的影响, 发现短期保存中以液氮保存最佳, 硅胶干燥法次之。何嘉琦等^[47]探讨不同保存方法对秋石斛叶片抗寒生理指标的影响, 发现不同指标影响不同, 其中脯氨酸在-20 ℃保存2 d时与鲜叶最为接近。杨琴等^[48]通过4种保存方法保存牡丹花瓣, 发现通过干燥箱后密封避光保存对花瓣中的色素影响最小。本实验橄榄粉末的保存方法为干燥低温

保存, 所测得的橄榄果实游离氨基酸含量可能与鲜样或其他保存方法测定的含量存在一定差异。

采用超声法提取植物中游离氨基酸, 提取剂不同, 提取量也存在一定的差异。Arnáiz等^[22]采用超声法比较水和体积分数70%甲醇溶液2种提取剂对花椰菜叶片中游离氨基酸提取效果的影响, 表现出在个别氨基酸和氨基酸总量上存在差异。吴月娜^[49]通过超声法比较水、体积分数75%乙醇溶液和体积分数50%乙醇溶液作为提取剂对青天葵药材游离氨基酸提取效果的影响, 发现水作为提取剂, 其游离氨基酸的浸出量大, 但其纯度相对低于75%乙醇溶液和50%乙醇溶液。马戎等^[50]等采用超声法提取烟草中游离氨基酸后用液相色谱串联质谱法测定出20种游离氨基酸, 通过比较体积分数0.1%盐酸和体积分数80%乙醇溶液提取剂的提取效果, 发现除个别氨基酸外, 盐酸超声提取的氨基酸含量高于乙醇、变异系数小于乙醇。综上可知不同的提取剂对超声法提取游离氨基酸含量的方法具有不同的效果, 本实验以乙醇溶液作为提取剂, 比较了体积分数30%、40%、50%、60%和70%乙醇溶液的提取效果, 发现60%乙醇溶液提取效果最佳, 对橄榄果实游离氨基酸的提取进行初步的探索, 为后续研究橄榄果实游离氨基酸的提取提供一定的理论参考。

本实验采用超声法提取橄榄果实中的游离氨基酸, 考察各因素之间的相互作用对游离氨基酸提取量的影响, 并凭借响应面方法得到最佳组合。首先通过单因素试验得出各因素的适宜范围, 在单因素试验基础上确定PB试验因素范围, 筛选出显著($P<0.05$)影响因素为料液比和提取次数, 得出各因素之间对游离氨基酸提取量影响主次顺序为料液比>提取次数>超声时间>超声功率>乙醇体积分数>超声温度, 结合单因素试验和PB试验结果设计最陡爬坡试验来确定中心组, 进而进行响应面试验, 得出超声法提取橄榄果实游离氨基酸的最优组合为超声时间20 min、料液比1:41 (g/mL)、提取次数3、超声温度50℃、超声功率270 W、乙醇体积分数60%, 游离氨基酸提取量实际值为79.88 mg/g, 与预测值相对误差为2.62%, 表明此模型能为今后橄榄果实游离氨基酸的提取提供一定的理论支持。

参考文献:

- [1] 陈月开, 徐军, 曲运波, 等. 氨基酸的抑菌作用研究[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(1): 29-30.
- [2] 陆丽虹, 缪长虹, 张荃, 等. 老年胃肠道肿瘤患者术中输注氨基酸对术后肝肾功能的影响[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(8): 614-618. DOI:10.3969/j.issn.1007-3969.2015.08.009.
- [3] 李俊明, 贺强, 袁超, 等. 苏氨酸的营养生理功能及其在畜禽日粮中的应用[J]. 中国饲料, 2014(11): 35-38. DOI:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.2014.11.009.
- [4] 王齐, 朱伟伟, 苏丹, 等. 蒲桃中氨基酸组成与含量对其营养与风味的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(16): 204-207.
- [5] 鲁敏, 安华明, 赵小红. 无籽刺梨与刺梨果实中氨基酸分析[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 118-121. DOI:10.7506/spkx1002-6630-2015140023.
- [6] PRIPIS-NICOLAU L, DE R G, BERTRAND A, et al. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(9): 3761-3766. DOI:10.1021/jf991024w.
- [7] CHEN G, LI J, SUN Z, et al. Rapid and sensitive ultrasonic-assisted derivatisation microextraction (UDME) technique for bitter taste-free amino acids (FAA) study by HPLC-FLD[J]. Food Chemistry, 2014, 143: 97-105. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.07.099.
- [8] 黄翠芳. 影响鸡肉中游离氨基酸和肽类因素的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006: 1-2.
- [9] SILVA B M, CASAL S, ANDRADE P B, et al. Free amino acid composition of quince (cydonia oblonga miller) fruit (pulp and peel) and jam[J]. Agricultural and Food Science, 2004, 52(5): 1201-1206. DOI:10.1021/jf030564x.
- [10] LEE M, SMITH G M, EITEMAN M A, et al. Aerobic production of alanine by *Escherichia coli* aceF ldhA mutants expressing the *Bacillus sphaericus* alad gene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(1): 56-60. DOI:10.1007/s00253-004-1560-3.
- [11] 林聪. 闽江流域橄榄(*Canarium album* Raeusch.)生产与产业化对策研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011: 1-5.
- [12] 林玉芳. 福建橄榄(*Canarium album* (Lour.) Raeusch.)若干功能成分和品质相关指标的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012: 1-4.
- [13] 谢倩. 橄榄(*Canarium album* (Lour.) Raeusch.)果实发育成熟过程多酚及相关酶活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014: 1-7.
- [14] 彭勃, 苗明三, 王颖芳, 等. 橄榄解酒饮对大鼠急性酒精性肝损伤肝组织病理形态的影响[J]. 中国医药学报, 2004, 19(8): 468-470.
- [15] 杨月欣, 王光亚, 潘兴昌. 中国食物成分表2002[Z]. 北京: 北京大学医学出版社, 2002: 82-97.
- [16] WHO, FAO. Report of FAO Nutritional Meeting Series No 52: Energy and protein requirements[J]. Rome, 1973: 40-73.
- [17] 叶发荣, 韩秀梅, 肖钧, 等. '红阳'猕猴桃果实氨基酸含量及组成分析[J]. 中国园艺文摘, 2015, 28(5): 1-3.
- [18] 万继锋, 吴如健, 韦晓霞, 等. 橄榄果实中糖和氨基酸组成与含量分析[J]. 福建农业学报, 2013, 28(5): 472-477.
- [19] 谢晓琼. 橄榄(*Canarium album* (Lour.) Raeusch.)果实若干生理生化指标的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2007: 25-28.
- [20] 何志勇. 橄榄酚类化合物的分离纯化和结构研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007: 22.
- [21] 王加党, 李艳玲, 贺永梅, 等. 影响美洲大蠊药材中游离氨基酸测定的因素研究[J]. 大理学院学报, 2011, 10(12): 12-15.
- [22] ARNÁIZ E, BERNAL J, MARTÍN M T, et al. Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1250: 49-53. DOI:10.1016/j.chroma.2012.04.066.
- [23] 郭俊国, 解孝锋, 毕宏生. PITC柱前衍生HPLC法测定茺蔚子中游离和水解氨基酸的含量[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 91-94.
- [24] 王雅玲, 代玲玲, 马堃, 等. HPLC-ELSD法测定蛹虫草中6种游离氨基酸的含量[J]. 分析测试学报, 2010, 29(10): 1091-1094. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2010.10.020.
- [25] PRAKASH M J, MANIKANDAN S, THIRUGNANASAMBANDHAM K, et al. Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(1): 604-611. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.09.020.
- [26] WANG J M, GENG Y, HU F, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction procedure to determine total isoflavones in Chinese soybean cheese by Box-Behnken design[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(1): 221-226. DOI:10.1007/s12161-012-9434-2.

- [27] ADAMI R, OSSEO L S, REVERCHON E. Micronization of lysozyme by supercritical assisted atomization[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(6): 1162-1170. DOI:10.1002/bit.22470.
- [28] 朱玉婷. 鹿药游离氨基酸的提取及在化妆品中的应用[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014: 15-23.
- [29] 黄新仁. 响应面法在生物过程优化中的应用[D]. 长沙: 湖南大学, 2011: 1-6.
- [30] EL-SHEEKH M M, KHAIRY H M, GHEDA S F, et al. Application of Plackett-Burman design for the high production of some valuable metabolites in marine alga *Nannochloropsis oculata*[J]. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2016, 42(1): 57-64. DOI:10.1016/j.ejar.2015.10.001.
- [31] JABEEN H, IQBAL S, ANWAR S, et al. Optimization of profenofos degradation by a novel bacterial consortium PBAC using response surface methodology[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 100: 89-97. DOI:10.1016/j.ibiod.2015.02.022.
- [32] LAKSHMIKANDAN M, SIVARAMAN K, ELAIYA R S, et al. Biodegradation of acrylamide by acrylamidase from *Stenotrophomonas acidaminiphila* MSU12 and analysis of degradation products by MALDI-TOF and HPLC[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 94: 214-221. DOI:10.1016/j.ibiod.2014.07.014.
- [33] JOYCE A P, LEUNG S S. Use of response surface methods and path of steepest ascent to optimize ligand-binding assay sensitivity[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2013, 392(1/2): 12-23. DOI:10.1016/j.jim.2013.02.019.
- [34] 赵蓓, 王承明, 张沙沙. 菜籽粕中清蛋白的超声辅助提取及氨基酸组成研究[J]. *中国粮油学报*, 2015, 30(10): 32-36.
- [35] 王涓, 潘忠礼, 马海乐, 等. 超声波的空化作用及其对多酚稳定性的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(19): 388-391. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.19.076.
- [36] 范三红, 原超, 刘艳荣, 等. 超声波辅助提取南瓜籽油及其脂肪酸组成研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 107-110. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201024022.
- [37] 郭志峰, 马瑞欣, 李国俊, 等. 气质联用测定超声波降解废水中的苯酚含量及机理研究[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2005, 25(3): 290-294.
- [38] CHEVAUX K A, JACKSON L, ELENA V M, et al. Proximate, mineral and procyanidin content of certain foods and beverages consumed by the Kuna Amerinds of Panama[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001, 14(6): 553-563. DOI:10.1006/jfca.2001.1027.
- [39] 张桢, 杨贤庆, 马海霞. Plackett-Burman法和中心组合法优化罗非鱼下脚料酶解工艺[J]. *食品科学*, 2011, 32(18): 1-5.
- [40] 李佳桥, 余修亮, 曾林晖, 等. 响应面试验优化超声波辅助提取莲房原花青素工艺[J]. *食品科学*, 2016, 37(12): 40-45. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612007.
- [41] 张爽, 任亚梅, 刘春利, 等. 响应面试验优化苹果渣总三萜超声提取工艺[J]. *食品科学*, 2015, 36(16): 44-50. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201516008.
- [42] 曲昊杨, 朱文学, 刘琛, 等. 苹果渣果胶提取工艺优化及碱法降酯效果评价[J]. *食品科学*, 2014, 35(14): 87-92. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201414017.
- [43] 常维霞, 姚小华, 龙伟. 山茶属3种植物花药超低温保存研究[J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(1): 52-57.
- [44] 段乃彬, 李群, 田茜, 等. 低温保存对4种作物种子ATP含量与种子活力的影响[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(2): 112-114.
- [45] WANG L, SHIRAISHI A, HASHIMOTO F, et al. Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon island (Japanese) tree peony cultivars[J]. *Journal of Plant Research*, 2001, 114(1): 33-43.
- [46] 王子飞, 熊源新, 罗睿. 不同植物叶片保存方法对色素降解的影响[J]. *贵州科学*, 2013, 31(2): 65-68.
- [47] 何嘉琦, 张东雪, 尹俊梅, 等. 不同保存方法对秋石斛叶片抗寒生理指标的影响[J]. *黑龙江农业科学*, 2016(9): 72-75. DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.09.0072.
- [48] 杨琴, 袁涛, 孙湘滨. 不同保存方法对牡丹花瓣中花青素和黄酮含量的影响[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(17): 90-95. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.17.010.
- [49] 吴月娜. 青天葵中总氨基酸的提取纯化工艺及指纹图谱研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011: 30-31.
- [50] 马戎, 鲍峰伟, 冯文宁, 等. 液相色谱串联质谱法测定烟草中的游离氨基酸[J]. *中国测试*, 2013, 39(2): 34-37.