

响应曲面法优化万寿菊叶黄素的提取工艺

汪殿蓓, 张胜红, 李建华

(湖北工程学院 生命科学技术学院, 湖北 孝感 432000)

摘要:以乙酸乙酯为提取溶剂,以提取时间、提取温度以及液料比为自变量,采用 Box-Behnken 中心组合设计原理和响应曲面分析法,研究了各因素及其交互作用对万寿菊叶黄素提取的影响。结果表明:叶黄素提取工艺最佳条件为:提取时间 54.32 min,提取温度 32.09℃,液料比 (mL:g) 为 16.15:1,吸光度的预测值为 2.357,当选取提取时间 55 min,提取温度 32℃,液料比 (mL:g) 为 16.15:1 的实际条件时,吸光度实际值为 2.356。该试验所得工艺参数准确,可用于万寿菊叶黄素的提取生产。

关键词:万寿菊;叶黄素;响应曲面;提取工艺

中图分类号:TS 264.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)22-0111-04

万寿菊 (*Tagetes erecta* L.) 属菊科万寿菊属多年生草本花卉,原产于墨西哥及热带美洲,在我国多作 1 a 生栽培。花色有黄色、橙色等,花瓣中富含叶黄素^[1]。叶黄素在预防视黄斑退化、肿瘤、心血管疾病、增加机体免疫力等方面具有重要的生理功能,现已被广泛用于药品、饮料、糕点、油脂食品等领域,被认为是一种优良的天然色素添加剂^[2]。目前对万寿菊中叶黄素的提取工艺和条件已有相关报道,如采用单因素和正交实验方法探讨不同提取剂、提取温度、提取时间以及料液比等因素对万寿菊叶黄素提取率的影响^[3-4];以及采用柱层析

法^[5]、超声波法^[6-7]和超临界二氧化碳萃取法^[8]对万寿菊叶黄素提取工艺的研究;且吴兴壮等^[9]对制备万寿菊叶黄素技术的研究作了综合阐述。但到目前为止,采用响应曲面法研究万寿菊叶黄素提取工艺的报道较少。该试验在查阅大量文献的基础上,兼顾食品安全及减少环境污染的原则^[7],选用乙酸乙酯作为提取剂,采用 Box-Behnken 中心组合设计原理和响应曲面分析法,对影响万寿菊叶黄素的提取时间、提取温度以及液料比等因素进行研究,以期获得最佳工艺条件,为工业生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

万寿菊花朵于 2011 年 9 月采自浙江工程院校园内,取万寿菊花瓣在自然条件下充分阴干,然后放入粉

第一作者简介:汪殿蓓(1968-),女,湖北洪湖人,博士,教授,研究方向为植物资源利用及观赏园艺。

基金项目:湖北省教育厅重大科研资助项目(Z20092601)。

收稿日期:2012-07-17

Detection of Indigenous Endophytic Bacteria in Jujube Seedlings Germinated From Seeds

HOU Xiao-jie

(Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000)

Abstract: The indigenous endophytic bacteria in the tissue culture seedlings germinated from seeds of *Ziziphus jujuba* var. fupingdazao were studied using observation with optical microscope and scanning electronic microscope (SEM), and detection of specific 16S rDNA fragment. The results showed that a large quantity of endophytic bacteria in jujube seedlings were detected under optical microscope with a magnification of 1 000 times, and round, short rod or rod bacterial cells with the size of 1.5~1.8 μm , (2.2~2.9) $\mu\text{m} \times$ (1.1~1.9) μm and (3.7~4.4) $\mu\text{m} \times$ (1.6~1.9) μm , respectively, were observed. Rod bacteria were found by SEM as well. The 16S rDNA fragment of 1.5 kb was amplified from the total DNA of seedlings of jujube with the bacterial primer pair pf27/1525.

Key words: *Ziziphus jujuba*; endophytic bacteria; detection; optical microscope; scanning electronic microscope; 16S rDNA

粉碎机中粉碎,过 60 目标准筛,备用。乙酸乙酯为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。试验仪器:盛博多功能药材粉碎机(浙江省永康市金盛博机械厂);HH-4 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);PL203 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂);721 可见分光光度计(上海分析仪器有限公司)。

1.2 试验方法

根据参考文献[3]~[8]可知,提取时间、提取温度、液料比 3 个因素对万寿菊叶黄素提取效果影响较显著,且提取温度范围为 25~60℃,提取时间范围为 30~150 min,液料比为 15:1~60:1(mL:g),根据这 3 个因素的取值范围,利用设计软件 Design Expert version 7.0 中的 Box-Behnken 中心组合设计原理和响应曲面法设计 3 因素 5 水平共 22 组试验,试验方案见表 1。

表 1 响应曲面设计试验方案及试验结果

Table 1 Experiment design and results of response surface for the extraction of xanthophyll from *T. erecta* L.

| 序号 | 温度/℃ | 时间/min | 液料比 | 吸光度 | 序号 | 温度/℃ | 时间/min | 液料比 | 吸光度 |
|----|-------|--------|-------|-------|----|-------|--------|-------|-------|
| 1 | 52.91 | 125.68 | 8.08 | 2.299 | 12 | 42.50 | 90.00 | 16.25 | 2.338 |
| 2 | 42.50 | 30.00 | 16.25 | 2.305 | 13 | 42.50 | 90.00 | 16.25 | 2.328 |
| 3 | 42.50 | 90.00 | 16.25 | 2.345 | 14 | 52.91 | 54.32 | 24.43 | 2.295 |
| 4 | 42.50 | 90.00 | 2.50 | 2.310 | 15 | 52.91 | 54.32 | 8.08 | 2.305 |
| 5 | 42.50 | 90.00 | 16.25 | 2.327 | 16 | 42.50 | 90.00 | 16.25 | 2.328 |
| 6 | 42.50 | 90.00 | 16.25 | 2.329 | 17 | 60.00 | 90.00 | 16.25 | 2.460 |
| 7 | 32.09 | 54.32 | 24.43 | 2.339 | 18 | 32.09 | 125.68 | 8.08 | 2.348 |
| 8 | 42.50 | 150.00 | 16.25 | 2.334 | 19 | 42.50 | 90.00 | 30.00 | 2.322 |
| 9 | 42.50 | 90.00 | 16.25 | 2.340 | 20 | 52.91 | 125.68 | 24.43 | 2.259 |
| 10 | 32.09 | 125.68 | 24.43 | 2.293 | 21 | 32.09 | 54.32 | 8.08 | 2.356 |
| 11 | 42.50 | 90.00 | 16.25 | 2.311 | 22 | 25.00 | 90.00 | 16.25 | 2.365 |

首先称取 0.500 g 粉碎过筛的万寿菊(黄色品种)粉末,装入烧杯;按表 1 方案设计,在烧杯中加入乙酸乙酯,对万寿菊粉末进行溶解;溶解后按表 1 设计的提取时间和提取温度,将加入溶剂的烧杯放入水浴锅中进行水浴;然后将水浴后的烧杯从锅中取出,运用循环水真空泵进行超滤,得提取液;最后将超滤得到的提取液用乙酸乙酯定容至 100 mL;再用 1 cm 比色皿以乙酸乙酯作空白对照在波长 400~580 nm 下,每隔 10 nm 测定吸光度值,以确定最大吸收峰,在最大吸收峰的波长下,测定提取液的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 叶黄素最大吸收峰及响应曲面试验结果

由于叶黄素含量与其提取液吸光度呈线性正相关^[10],故以溶液吸光度表示叶黄素提取量的大小。按表 1 中 12、13、17 方案提取万寿菊的叶黄素,确定叶黄素的吸收峰,3 个方案试验结果非常一致,叶黄素的吸收峰为 440 nm(图 1),因而选取吸收波长 440 nm 作为测定波长。

以吸光度为响应值,按响应曲面设计方案的试验结果见表 1。

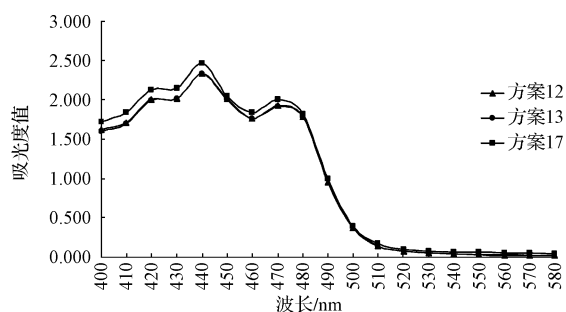


图 1 叶黄素在乙酸乙酯中的吸收图谱

Fig. 1 Visible spectrum of xanthophyll in ethyl acetate

2.2 模型的建立及显著性检验

应用 Design Expert 软件对表 2 中的数据进行多元回归拟合,得到万寿菊叶黄素提取液吸光度对提取温度(A)、提取时间(B)和液料比(C)的 4 次多项回归方程:

$$Y = 2.330 + 0.028A + 0.008523B + 0.003568C + 0.001667AB + 0.002833AC - 0.008667BC - 0.037A^2 - 0.002876B^2 - 0.021A^2B - 0.019A^2C - 0.050AB^2 + 0.024A^4.$$

对所得模型进行显著性检验,结果见表 2。回归方程系数及其显著性检验结果见表 3。由表 3 可知,该回归模型 $P < 0.01$,表明回归方程模型极显著;失拟项 $P = 0.2528 > 0.05$,表明失拟不显著。方程的复相关系数 R^2 为 0.9637, R_{Adj}^2 为 0.9154,表明模型回归方程的拟合程度良好,可用来分析和预测万寿菊叶黄素的提取工艺。

表 2 回归模型的方差分析

Table 2 Variance analysis of fitted quartic polynomial model

| 变异来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|----------------------|-----------|-----|----------|-------|----------|
| 模型 | 0.0290000 | 12 | 0.002427 | 19.93 | < 0.0001 |
| 失拟项 | 0.0003561 | 2 | 1.781 | 1.68 | 0.2528 |
| 残差 | 0.0010960 | 9 | 1.218 | | |
| 纯误差 | 0.0007399 | 7 | 1.057 | | |
| 总误差 | 0.030 | 21 | | | |
| $R^2 = 0.9637$ | | | | | |
| $R_{Adj}^2 = 0.9154$ | | | | | |
| C. V. = 47% | | | | | |

由表 4 可知,回归模型的一次项 A(温度)极显著,二次项中 A^2 极显著,三次项中 A^2B 和 AB^2 极显著、 A^2C 显著,四次项中 A^4 极显著,其它项均不显著,表明不同的提取工艺与万寿菊叶黄素提取量不是简单的线性关系。

2.3 响应曲面分析与工艺优化

根据回归方程绘出响应曲面图及等高线图,以确定提取温度、提取时间和液料比 3 个因素对万寿菊叶黄素提取效果的影响及这 3 个因素间的相互作用,响应曲面图及等高线图见图 2~4。

表 3 回归方程系数及其显著性检验

Table 3 Variance analysis of quadratic response surface regression model

| 模型项 | 系数 | 标准误 | 95%置信下限 | 95%置信上限 | F 值 | P 值 |
|------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------|-------------|
| 常量 | 2.330 | 3.490E-003 | 2.32 | 2.34 | | |
| A | 0.028 | 4.640E-003 | 0.018 | 0.039 | 36.79 | 0.0002 ** |
| B | 8.523E-003 | 4.640E-003 | -1.973E-003 | 0.019 | 3.37 | 0.0994 |
| C | 3.568E-003 | 4.640E-003 | -6.928E-003 | 0.014 | 0.59 | 0.4616 |
| AB | 1.667E-003 | 3.902E-003 | -7.159E-003 | 0.010 | 0.18 | 0.6793 |
| AC | 2.833E-003 | 3.902E-003 | -5.993E-003 | 0.012 | 0.53 | 0.4862 |
| BC | -8.667E-003 | 3.902E-003 | -0.017 | 1.595E-004 | 4.93 | 0.0535 |
| A ² | -0.037 | 8.052E-003 | -0.055 | -0.018 | 20.73 | 0.0014 ** |
| B ² | -2.876E-003 | 3.022E-003 | -9.712E-003 | 3.961E-003 | 0.91 | 0.3662 |
| A ² B | -0.021 | 6.062E-003 | -0.034 | -6.809E-003 | 11.46 | 0.0081 ** |
| A ² C | -0.019 | 6.062E-003 | -0.032 | -5.020E-003 | 9.55 | 0.0129 * |
| AB ² | -0.050 | 6.062E-003 | -0.064 | -0.037 | 68.87 | < 0.0001 ** |
| A ⁴ | 0.024 | 3.069E-003 | 0.017 | 0.031 | 58.98 | < 0.0001 ** |

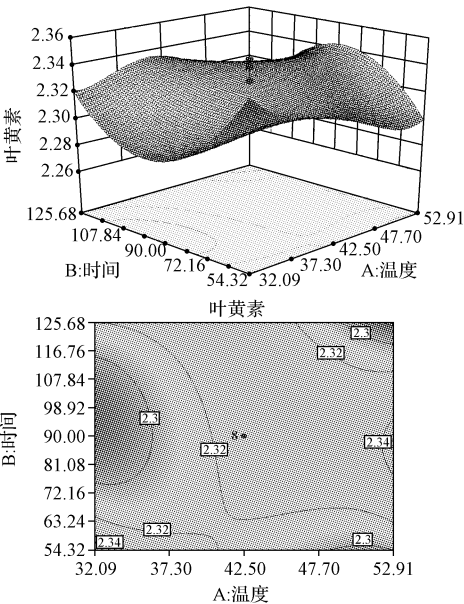


图 2 提取温度和提取时间的响应曲面和等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plots for the effect of cross-interaction between extraction temperature and extraction time on extraction rate of xanthophyll from *Tagetes erecta* L.

响应面可以直接反应出各因子对响应值影响的大小,由等高线图可以看出最优条件下各因子的取值。响应曲面法的图形是响应值 Y 对应自变量 A、B、C 构成的一个三维空间图及在二维平面上的等高线图,从试验所得响应面分析图上可以看出其在反应过程中的相互作用而确定合适的工艺条件^[11]。如果响应面坡度相对平缓,表明其可以忍受处理条件的变异,而不影响到响应值的大小。相反,如果坡度非常陡峭,那么表明响应值对于处理条件改变非常敏感^[12]。由图 2~4 可以看出,叶黄素提取率对提取温度的变化较敏感,当提取温度为 42.5℃,随着提取时间的延长,叶黄素提取率越高。结合模型系数的显著性检验结果可知,提取温度与提取时间、提取温度与液料比、提取时间与液料比的两两交互

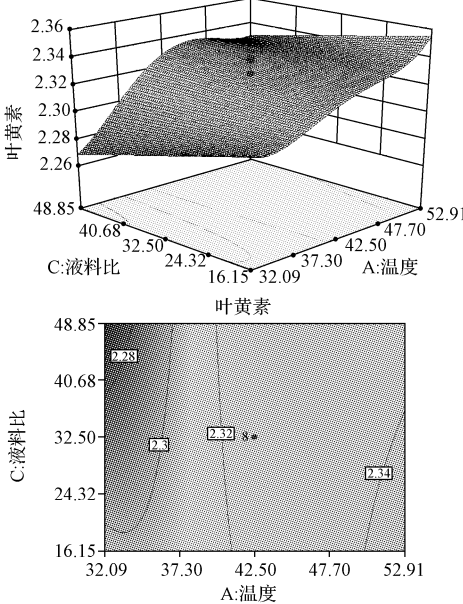


图 3 提取温度和液料比的响应曲面和等高线图

Fig. 3 Response surface and contour plots for the effect of cross-interaction between extraction temperature and liquid-material ratio on extraction rate of xanthophyll from *Tagetes erecta* L. 用都不显著,而三次项之间存在着显著的交互作用。

2.4 模型的验证性试验

利用 Design Expert 软件对万寿菊叶黄素提取条件进行响应曲面优化设计,得到万寿菊叶黄素提取的最佳条件为:提取时间 54.32 min,提取温度 32.09℃,液料比 (mL : g) 为 16.15 : 1,预测万寿菊叶黄素提取液的吸光度值为 2.357。

考虑到实际操作可行性,对模型预测条件略作修改,选择提取条件为:提取时间 55 min,提取温度 32℃,液料比 16.15 : 1,实际测得万寿菊叶黄素提取液的吸光度值为 2.356,与预测值 2.357 非常接近,因此利用响应曲面法优化万寿菊叶黄素提取工艺是有效和可行的,具有实际应用价值。

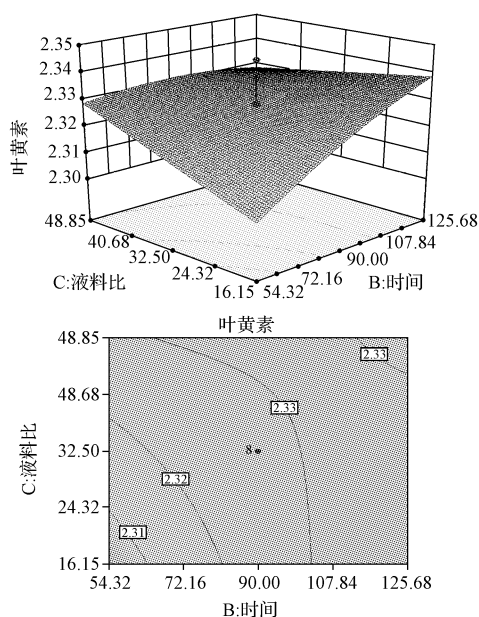


图4 提取时间和液料比的响应曲面和等高线图

Fig. 4 Response surface and contour plots for the effect of cross-interaction between extraction time and liquid-material ratio on extraction rate of xanthophyll from *Tagetes erecta* L.

3 结论

以乙酸乙酯为提取溶剂,应用响应曲面设计得到了万寿菊叶黄素提取效果与提取温度、提取时间和液料比的回归模型,经验证试验证明,该方程是准确可靠的,能有效预测叶黄素提取液的吸光度。模型方程为: $Y = 2.330 + 0.028A + 0.008523B + 0.003568C + 0.001667AB + 0.002833AC - 0.008667BC - 0.037A^2 - 0.002876B^2 - 0.021A^2B - 0.019A^2C - 0.050AB^2 + 0.024A^4$ 。

在对各主要影响因素及其相互作用进行探讨后,得到叶黄素提取的优化工艺参数为:提取时间 54.32 min,

提取温度 32.09℃,液料比 (mL : g) 为 16.15 : 1,此条件下万寿菊叶黄素提取液的吸光度理论值为 2.357。考虑到实际操作的可行性,最后优选的提取工艺条件为:提取时间 55 min,提取温度 32℃,液料比 16.15 : 1,此条件下叶黄素提取液的吸光度值为 2.356。因此,应用响应曲面法对万寿菊叶黄素的提取工艺进行优化,可获得最佳工艺参数,省时省力,准确可靠,能够为进一步试验研究提供理论依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 75 卷. 北京: 科学出版社, 1979: 389.
- [2] 李浩明. 万寿菊叶黄素及其生理功能研究概况[J]. 中国食品添加剂, 2001(4): 31-33.
- [3] 张多婷, 韩静, 张玥, 等. 万寿菊中叶黄素的提取及分离工艺[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 167-173.
- [4] 鲁明, 吴兴壮, 王小鹤, 等. 万寿菊叶黄素提取工艺参数优化研究[J]. 园艺与种苗, 2011(1): 42-45.
- [5] 张志强, 何正华, 代冬梅, 等. 柱层分析法分离万寿菊中叶黄素[J]. 中国食品添加剂, 2010(3): 51-53.
- [6] 孔阳, 马养民, 李彦军, 等. 超声波法提取万寿菊中叶黄素的工艺优化[J]. 中国酿造, 2009, 121(10): 72-74.
- [7] 聂旭元, 余少华, 任华, 等. 超声波提取万寿菊中叶黄素的工艺研究[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 147-149.
- [8] 宋大魏, 贾建, 张丽萍. 超临界萃取万寿菊叶黄素工艺参数的优化[J]. 农产品加工, 2010(8): 36-44.
- [9] 吴兴壮, 张华, 王小鹤, 等. 制备万寿菊叶黄素技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 456-459, 464.
- [10] 崔震海, 孙海蛟, 高翠玲, 等. 万寿菊叶黄素提取工艺的研究[J]. 辽宁化工, 2008, 37(4): 234-235, 238.
- [11] 石太渊, 毛红燕, 马涛, 等. 响应面法优化提取五味子黄酮工艺参数研究[J]. 中国酿造, 2011, 227(2): 96-99.
- [12] 陈莉, 屠康, 王涛, 等. 采用响应曲面法对采后红富士苹果热处理条件的优化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(2): 159-163.

Optimization of Extraction Conditions of Xanthophyll from *Tagetes erecta* L. by Response Surface Methodology

WANG Dian-pei, ZHANG Sheng-hong, LI Jian-hua

(School of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan, Hubei 432000)

Abstract: With Ethyl acetate as extraction solvent, Box-Behnken central composite design and response surface methodology were used to explore the effects of extraction time, extraction temperature and liquid-material ratio as well as their cross-interactions on extraction rate of xanthophyll from *Tagetes erecta* L. The results showed that the optimal extraction processing parameters were extraction time of 54.32 minutes, extraction temperature of 32.09℃ and liquid-material ratio of 16.15 : 1, in which the forecast value was 2.357. Under the actual extraction conditions such as extraction time of 55 minutes, extraction temperature of 32℃ and liquid-material ratio of 16.15 : 1, the absorbance value of xanthophyll was 2.356. The processing parameters achieved from these experiments were accurate and could be applied to the extraction and production of xanthophyll from *T. erecta* L.

Key words: *Tagetes erecta* L.; xanthophyll; response surface methodology; extraction technology