

响应面法优化提取黑豆苗叶绿素工艺研究

魏海香, 梁宝东, 张爱民, 王元军, 魏小叶

(济宁学院 生命科学与工程系, 山东 曲阜 273155)

摘要:以黑豆芽苗为试材,在单因素试验基础上,根据 BOX 中心组合设计原理采用 3 因素 5 水平响应面分析法,对黑豆苗叶绿素的提取工艺进行了优化研究,并对各因素的显著性和交互作用进行了分析。结果表明:豆苗叶绿素的最佳提取工艺条件为:提取溶剂 95% 乙醇溶液,料液比 1 g : 4 mL,浸提温度 40℃,浸提时间 9 h;该条件下提取的叶绿素浓度可达到 3.03 mg/L。

关键词:豆苗叶绿素;提取;响应面法;工艺

中图分类号:TS 264.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)18-0011-04

黑豆芽(Black bean spout)俗称豆苗,营养丰富,富含钙、磷、铁、钾等矿物质及多种维生素,更为重要的是富含叶绿素。叶绿素分子结构与人体内的血液分子相似,易溶于红细胞,能抑制细菌、排出毒素,有“绿色血液”之称。研究表明,豆芽中的叶绿素能分解人体内的亚硝酸胺,起到预防直肠癌等多种消化道恶性肿瘤的作用^[1]。同时,叶绿素作为一种天然色素广泛应用于医药、食品、化妆品等行业^[2-3],随着人们生活水平的提高和食品工业的发展,对叶绿素的需求也日益增长。该研究对豆苗叶绿素的提取工艺进行了优化,以期对豆苗叶绿素深开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材为市售黑豆苗;试剂:NaOH、盐酸(分析纯),乙酸锌(分析纯),无水氯化钙(分析纯),硫酸镁,葡萄糖,乙醇(95%),丙酮(分析纯),抗坏血酸,草酸钾。仪器设备:722 紫外分光光度计(上海菁华科技有限公司),数显恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂),FA2004N 电子天平(上海精密科技仪器有限公司),微波炉(格兰仕集团),电冰箱(海尔集团),蔬菜保鲜柜(广东省韶关市鑫腾科普仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 原料制备及提取工艺流程 豆苗→挑选→清洗→取出→去除受损的→剪碎(小于 2 mm 的碎条)→冷冻→浸提→叶绿素提取液→测定。

1.2.2 操作方法 挑选新鲜的黑豆豆苗清洗后,用纱布

吸干其表面的水分,将豆苗剪成小碎条,放入密封袋,在 -18℃ 的冰箱中冷冻 6 h^[1],取出后进行单因素试验和响应面法优化黑豆苗的提取工艺研究。

1.2.3 叶绿素的测定^[4-5] 叶绿素 a 浓度(mg/L): $C_a = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$; 叶绿素 b 浓度(mg/L): $C_b = 22.9A_{645} - 4.68A_{663}$; 叶绿素总浓度(mg/L): $C_{(a+b)} = C_a + C_b$ 。

1.2.4 提取叶绿素的单因素试验 准确称取 1.0 g 经过冷冻处理的豆苗,分别以浸提溶剂、温度、时间、料液比进行单因素试验,叶绿素浓度为测定指标。为提高试验的可靠性,该试验中每组数据都做 3 次重复。

1.2.5 响应面设计 在单因素试验的基础上,以 95% 的乙醇做为提取剂,取浸提温度、时间、料液比为 3 个因素。由于在单因素试验中浸提温度、时间、料液比对叶绿素 a 和叶绿素 b 影响效果一致。所以,在响应面设计中,以叶绿素总浓度($C_{(a+b)} = C_a + C_b$)为响应值。利用 Design Exper 7.0 软件,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,设计了 3 因素 5 水平的响应面试验,因素水平见表 1。

表 1 响应面试验设计因素水平编码

Table 1 Coding of factors and levels of response surface

水平 Level	因素 Factor		
	A 温度 Temperature/℃	B 浸提时间 Time/h	C 料液比 Material-liquid ratio/g : mL
-1.67189	26.59	6.32	1 : 1.3
-1	30	7	1 : 2
0	35	8	1 : 3
1	40	9	1 : 4
1.67189	43.40	9.68	1 : 4.7

2 结果与分析

2.1 浸提工艺的单因素试验

2.1.1 浸提溶剂种类的影响 称取 1 g、15 份经冷冻处理过的豆苗,在避光条件下,选用 5 种常用提取溶剂(图

第一作者简介:魏海香(1976-),女,山西忻州人,硕士,讲师,研究方向为功能性食品。

基金项目:济宁市重大科技专项资助项目(2008GG201)。

收稿日期:2012-05-17

1),以料液比 1:3,在室温下分别浸提 8 h,于波长 663 和 645 nm 处测吸光度。由于叶绿素稳定性差,遇光、热、酸和碱等作用瞬间变色,且不溶于水^[6-7],所以选用有机溶剂进行提取。由图 1 可知,在相同条件下,丙酮提取液的吸光度大于 95%乙醇提取液的吸光度,常见溶剂对豆苗叶绿素的提取效果由大到小的顺序是:丙酮>95%乙醇>丙酮:乙醇(2:1)>乙醇>丙酮:乙醇(1:1),由此可见,丙酮对豆苗叶绿素的提取效果最好。这可能是由于叶绿素是卟啉类化合物,对丙酮这种弱极性溶剂有较大的溶解度。但 95%乙醇的安全性优于丙酮^[8],且提取的叶绿素主要是应用于食品行业,故该试验选 95%乙醇为浸提溶剂。

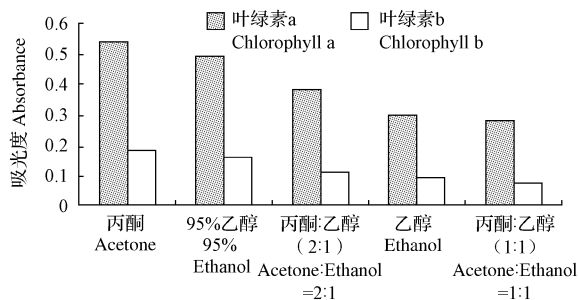


图 1 浸提叶绿素溶剂种类对吸光度的影响

Fig. 1 Effects of solvent on extraction of chlorophyll from black bean sprout

2.1.2 浸提温度的选择 称取 1 g、18 份豆苗,以 1:3 的料液比和 95%乙醇为浸提溶剂,避光,在不同温度(30~80℃)下浸提 8 h。由于 95%乙醇的沸点 78.13℃,故在 70℃时需安上回流装置,在波长 663 和 645 nm 处测吸光度并计算叶绿素浓度,结果见图 2。由图 2 可知,豆苗叶绿素的浸提效果是随浸提温度的升高而增大。因为提取温度升高,分子的运动加剧,促进叶绿素分子的扩散,提高提取效果。同时植物组织软化,促进膨胀,可加速溶剂对豆苗的渗透及对叶绿素的溶解。但温度过高可能使植物组织中一些不耐热或挥发性成分分解,增加提取液中杂质含量,叶绿素分子也会遭到破坏^[9]。因此提取温度应控制在 60℃以下为宜。

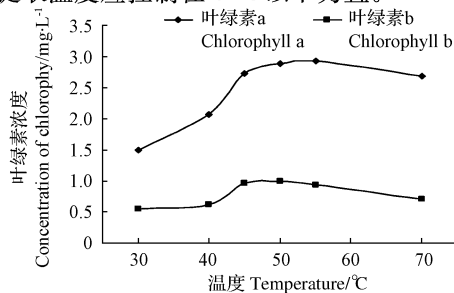


图 2 提取温度对叶绿素浓度的影响

Fig. 2 Effects of temperature on extraction of chlorophyll from black bean sprout

2.1.3 浸提时间的选择 称取 1 g、18 份豆苗,以 1:3 的料液比和 35℃、避光下浸提不同时间(4~10 h)。于波长 663 和 645 nm 处测吸光度并计算叶绿素浓度,结果见图 3。由图 3 可知,随提取时间的延长,提取效果先增大后减小;提取时间为 9 h 时,提取液的吸光值最大,表明提取时间为 9 h 时,达到溶解扩散平衡。延长时间将导致豆苗叶绿素分解,从而使其吸光度降低。

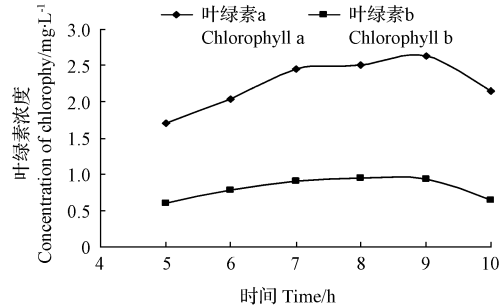


图 3 提取时间对叶绿素浓度的影响

Fig. 3 Effects of time on extraction of chlorophyll from black bean sprout

2.1.4 料液比选择 称取 1 g、18 份豆苗,以选定的溶剂、温度和时间,避光下在不同的料液比(1:2~1:20)进行浸提。于波长 663 和 645 nm 处测吸光度,选择最佳料液比,结果见图 4。由图 4 可知,随提取溶剂所占比例的增大,提取液的吸光度减小;为提高豆苗叶绿素的提取效率,应尽量减少溶剂的用量;但用的溶剂过少时,提取液太少,液体容易混浊,所测吸光度值大于 1,结果误差比较大。所以最大的料液比取到 1:2。

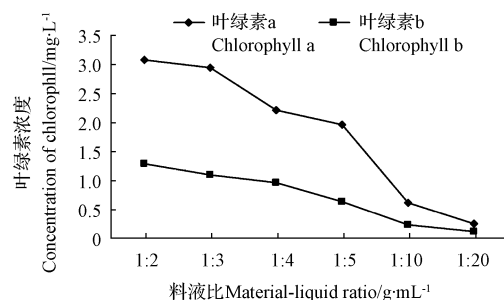


图 4 不同料液比的叶绿素浸提结果

Fig. 4 Effects of material-liquid ratio on extraction of chlorophyll from black bean sprout

2.2 响应面分析结果

利用 Design Exper 7.0 软件对表 2 进行多元回归拟合分析,得到了提取温度、时间、料液比 3 个因素的二次多项式回归模型为: $Y = 2.89 + 0.170A + 0.14B - 0.13C + 0.038AB + 0.170AC + 0.050BC - 0.14A^2 + 1.144 - 0.04B^2 - 0.099C^2$ 。

由表 3 可知, P 模型 < 0.0001 ,该模型回归达到极显著水平。同时失拟项为 0.9983,不显著,并且该模型的 $R^2 = 0.9685$, $R_{adj}^2 = 0.9402$ 。说明该模型能解释

94.02%响应值的变化,因此该模型与实际拟合的较好,可以用此模型对豆苗提取叶绿素的工艺进行分析和预测。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Results of response surface test design				
试验号	A 温度	B 时间	因素 Factor	叶绿素总浓度
No.	Temperature /℃	Time /h	C 料液比 Material-liquid ratio/g : mL	Concentration of chlorophyll (叶绿素 a+叶绿素 b) Chlorophyll a+Chlorophyll b/mg · L ⁻¹
1	1	1	1	3.09
2	1	1	-1	2.92
3	1	-1	1	2.63
4	1	-1	-1	2.68
5	-1	1	1	2.34
6	-1	1	-1	2.85
7	-1	-1	1	2.05
8	-1	-1	-1	2.74
9	1.67189	0	0	2.79
10	-1.67189	0	0	2.19
11	0	1.67189	0	3.12
12	0	-1.67189	0	2.64
13	0	0	1.67189	2.38
14	0	0	-1.67189	2.82
15	0	0	0	2.98
16	0	0	0	2.87
17	0	0	0	2.75
18	0	0	0	3.01
19	0	0	0	2.92
20	0	0	0	2.82

表 3 响应面方差分析结果

Table 3 Variance analysis of results response surface						
方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
Source	Sum squares	Df	Mean square	F value	P-value	Significant
模型	1.547983	9	0.171998	34.18605	< 0.0001	**
A	0.404058	1	0.404058	80.30983	< 0.0001	**
B	0.26636	1	0.26636	52.94131	< 0.0001	**
C	0.242542	1	0.242542	48.20722	< 0.0001	**
AB	0.01125	1	0.01125	2.236031	0.1657	
AC	0.2178	1	0.2178	43.28956	< 0.0001	**
BC	0.02	1	0.02	3.975167	0.0742	
A ²	0.27354	1	0.27354	54.36842	< 0.0001	**
B ²	1.88E-07	1	1.88E-07	3.75E-05	0.9952	
C ²	0.140905	1	0.140905	28.00595	0.0004	*
残差	0.050312	10	0.005031			
失拟项	0.002029	5	0.000406	0.042023	0.9983	
纯误差	0.048283	5	0.009657			
总和	1.598295	19				

注:“**”差异极显著(P<0.0001);“*”差异显著(P<0.05)。

表 3 回归方程系数检验表明,该试验设计与所选因素之间存在极限显著的回归关系。模型一次项 A、B、C,交互项中 AC 项和二次项中 A 呈极显著,C 呈显著,AB 和 BC 2 项不显著。对回归方程中一次项系数的绝对值进行比较,由表 3 可知,各试验因素对叶绿素提取浓度的影响顺序为:温度> 时间> 料液比。

2.3 响应面曲面分析

由图 5 可知,随着时间的增加,叶绿素浓度不断上升;随着温度的提高,叶绿素浓度上升,但温度过高时,

叶绿素提取浓度反而下降,这是有由于叶绿素不耐高温。图 5 的响应面形状说明 A(温度)和 B(时间)交互作用不显著,其中温度对叶绿素的提取浓度影响较时间大。

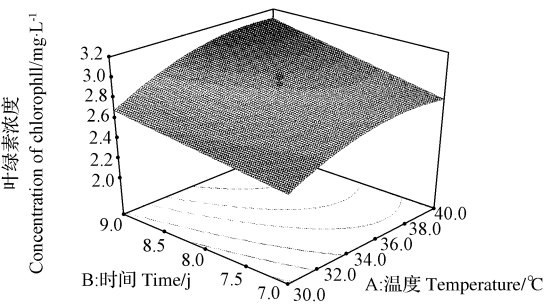


图 5 温度和时间及其交互作用对叶绿素浓度的影响

Fig. 5 Response surface plot for the effect of temperature and time on the extraction of chlorophyll

由图 6 可知,叶绿素提取浓度随着料液比的增加而降低,随着温度的增加而增加。图 6 响应面的形状说明 A(温度)和 C(料液比)交互作用明显,说明温度和料液比交互作用对叶绿素的提取浓度影响较大,其中温度较料液比对提取叶绿素浓度影响大,这与表 3 的分析结果一致。

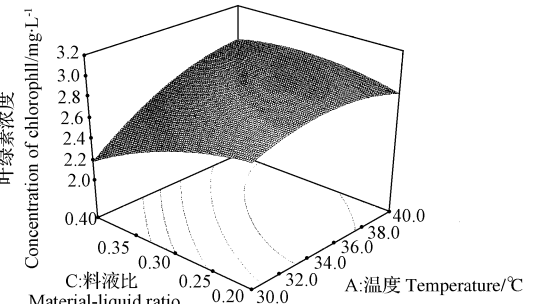


图 6 温度和料液比及其交互作用对叶绿素浓度影响

Fig. 6 Response surface plot for the effect of temperature and material-liquid ratio on the extraction of chlorophyll

由图 7 可知,叶绿素提取浓度随着料液比的增加而降低,随着时间的增加而增加,但时间对叶绿素提取浓

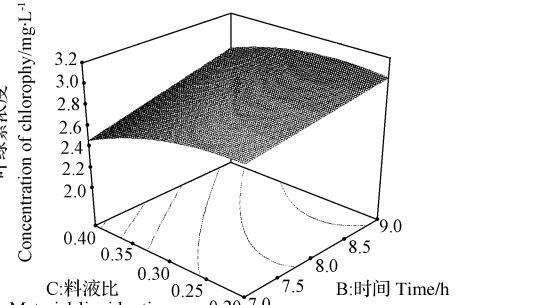


图 7 时间和料液比及其交互作用对叶绿素浓度影响

Fig. 7 Response surface plot for the effect of time and material-liquid ratio on the extraction of chlorophyll

度的影响较料液比大。响应面形状说明料液比和时间的交互作用不显著,这与表3的分析结果一致。

2.4 最优提取工艺验证试验

通过软件 Design-Expert 分析得出提取豆苗叶绿素的最佳条件为:料液比为 1 g : 4 mL,提取温度为 40℃,提取时间为 9 h,提取液的浓度的预测值为 2.89 mg/L。在优化条件下进行验证试验,进行 3 次重复试验,结果分别为 3.06、3.01、3.03 mg/L,平均值为 3.03 mg/L,提取浓度与理论预测值的相对误差 < 5%^[10]。证明了采用响应面法优化得到的提取条件参数比较准确,具有使用价值。

3 结论

单因素试验结果表明,提取剂、料液比、温度、时间 4 个因素不同水平对叶绿素提取均有不同程度的影响,在试验范围内,各水平对叶绿素提取有显著影响,确定了豆苗叶绿素的最佳提取溶剂为 95% 的乙醇。响应面分析法得到豆苗叶绿素最优提取工艺:料液比为 1 g : 4 mL,提取温度为 40℃,提取时间为 9 h,实际提取的叶绿素浓度达到 3.03 mg/L,影响豆苗叶绿素提取因素依次为温度 > 时间 > 料液比。

参考文献

- [1] 王元军. 黑豆芽苗菜叶绿素的提取方法[J]. 食品研究及开发, 2010(2): 27-29.
- [2] 黄寿吾. 叶绿素的药理和临床应用[J]. 食品与药品, 2006(4): 5-8.
- [3] 黄之杰, 费逸伟, 黄之宁. 叶绿素在绿色伪装涂料中的应用研究[J]. 现代涂料与涂装, 2006, 9(4): 13-17.
- [4] 黄持都, 胡小松. 叶绿素研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2007(3): 114-117.
- [5] 刘绚霞, 董振生. 油菜叶绿素提取方法的研究[J]. 有机农业与食品科学, 2004, 20(4): 62-63.
- [6] 张志强, 杨清香. 三叶草中叶绿素提取方法的研究[J]. 中国食品添加剂, 2008(5): 102-105.
- [7] Van Duyn M A, Pivonka E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption dietetics professional; selected literature [J]. Am Diet Assoc, 2000, 100: 1511-1521.
- [8] 贾长英, 唐丽华, 张晓娟, 等. 青草叶绿素提取工艺的研究[J]. 杭州化工, 2008, 38(2): 161-168.
- [9] 陈新香, 蔡碧琼, 蔡珠玉, 等. 芦荟皮叶绿素的提取及稳定性研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(1): 175-180.
- [10] 马荣山, 王艳萍. 响应面法优化树莓汁酶解工艺[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 125-128.

Study on Optimization Extraction Conditions of Chlorophyll from Black Bean Spout by Response Surface Methodology

WEI Hai-xiang, LIANG Bao-dong, ZHANG Ai-min, WANG Yuan-jun, WEI Xiao-ye
(Institute of Life Science and Engineering, Jining University, Qufu, Shandong 273155)

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the extraction processing of chlorophyll from black bean sprout. On the basis of single factor experiments, three factors and five levers response surface methodology were designed by BOX centre modular design principle. The results showed that the optimal extraction conditions of chlorophyll were as follows: extraction solvent 95% alcohol, material-liquid ratio 1 g : 4 mL, extraction temperature 40℃ and extraction time 9 h. Under the optimal extraction conditions, the chlorophyll extraction concentration was up to 3.03 mg/L.

Key words: chlorophyll of black bean sprout; extraction; response surface methodology; technology