

超声协同酶法 对油茶饼粕多糖提取工艺的研究

石 浩^{1,2}, 何小娥¹, 樊绍刚¹, 王文龙^{1,*}

(1.湖南应用技术学院农林科技学院, 湖南常德 415000;

2.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128)

摘要:目的:优化油茶饼粕多糖提取工艺,为大规模工业化生产提供参考。方法:以湖南常德地方油茶品种(饼粕)为试材,进行了影响多糖提取率的10个单因素实验,采用主成分分析选取影响多糖提取率的4个主要单因素,进行4因素3水平正交实验。结果:得出油茶饼粕多糖提取的最佳工艺参数为:3.0 h 酶反应时间、1:30 (g/mL)料液比、2.0 h 超声提取时间、85 ℃提取温度;结合其余六个较优单因素实验条件(6个月贮藏期、90目油茶饼粕粉末、3.0%酶浓度、1000 W 超声功率、提取3次、75%乙醇沉淀)进行5次平行验证实验,得到油茶饼粕多糖的实际提取得率为7.12% ± 0.20%。结论:该工艺操作简单、便捷快速、效率和提取得率高,为今后工业化生产提供了有效的参考标准,为广泛开发油茶饼粕中多糖资源提供了良好的参考价值。

关键词:油茶饼粕, 多糖, 蛋白酶, 超声

Study on extraction technology of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake by ultrasonic cooperated with protease

SHI Hao^{1,2}, HE Xiao-e¹, FAN Shao-gang¹, WANG Wen-long^{1,*}

(1.College of Agriculture and Forestry, Hunan Applied Technology University, Changde 415000, China;

2.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction process of polysaccharide from *Camellia oleifera* cake, it provides reference for large-scale industrial production. Method: 10 single factors experiment were carried out on the polysaccharide extraction of oil tea cake from Hunan Changde local *Camellia oleifera* (Cake) varieties. Principal component analysis was used to select the 4 main single factors of affecting the extraction yield of polysaccharides, and 4 factors and 3 levels orthogonal tests were carried out. Result: The optimum extraction process of polysaccharide from *Camellia oleifera* cake was obtained: 3.0 h enzyme reaction time, 1:30 (g/mL) material to liquid ratio, 2.0 h ultrasonic extraction time, 85 ℃ extraction temperature. Combined with the other six optimal single factor experimental conditions (6 month storage period, 90 mesh camellia cake powder, 3% enzyme concentration, 1000 W ultrasonic power, 3 times of extraction, 75% ethanol precipitation), 5 parallel validation experiments were performed. The extraction yield of camellia cake polysaccharide was 7.12% ± 0.20% under this condition. Conclusion: The process is simple to operate, convenient and fast, efficiency and yields are high. It provides an effective reference standard for industrial production in the future, It provides a good reference value for the development of polysaccharide resources in *Camellia oleifera* cake.

Key words: oil tea cake; polysaccharide; protease; ultrasonic

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2017)20-0197-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.20.035

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)又名:茶子树、茶油树,油茶属茶科,常绿小乔木^[1-2]。茶油是油茶果的主要经济产物,在获得茶油的同时每年油茶饼粕的产量也十分巨大,目前年产量已高达40万吨以上,多年来它作为一种废弃物,而常常被人忽视^[3-4]。多

糖作为油茶饼粕中的主要物质之一,它具有一定的保健作用,如提高免疫力、抗氧化^[5]、抗衰老、降血糖^[6]、抗肿瘤^[4,7]等特点。

目前油茶饼粕多糖的提取多采用传统的热水浸提法,此方法具有浸提效率慢,提取得率较低的缺

收稿日期: 2017-03-20

作者简介: 石浩(1988-),男,硕士,助教,研究方向:植物资源高值化利用技术, E-mail: 411863216@qq.com。

* 通讯作者: 王文龙(1956-),男,大学本科,教授,研究方向:植物生理生化, E-mail: 1137293462@qq.com。

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(16B188);湖南省科技厅重点研发计划(2015CK3005)。

点,完全不能适应现代化高效高产的生产模式。而提取得率是功能成分资源利用最大化的主要因素之一。超声波助提技术与传统简单溶剂提取法有一定的差别,超声波助提可以大大的提高物质提取的效率,同时操作简单,操作环境要求低,具有较高的实用性,且安全环保^[8-9]。酶-水浸提法相对于一般水提法,它同样具有高效性、环保性。由于油茶饼粕中粗纤维含量高,外壳非常坚硬,对多糖快速提取造成了一定的难度,通过酶液的添加处理可提前破坏细胞壁外围纤维,从而有效的加快提取速率,提高提取得率^[10-11]。本文采用油茶饼粕多糖提取研究中未见报道的超声协同酶法技术,利用主成分分析和正交实验对油茶饼粕多糖的提取工艺进行优化,进一步推动油茶饼粕多糖的工业化生产和深加工,为加大油茶饼粕中多糖资源的开发与利用提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

油茶饼粕 湖南省常德市丁家港镇 12 年生油茶果经榨取茶油后所得副产物;木瓜蛋白酶 ≥ 60 万 U/g, Sigma 公司;无水葡萄糖对照品、无水乙醇、丙酮、正丁醇、氯仿、石油醚、98% 浓硫酸、苯酚 分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

THZ-92B 可调速控温摇床 上海浦东物理仪器厂;ZW1105051705 紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;SB-3200D 超声波仪 宁波新芝生物科技股份有限公司;DR-1001 旋转蒸发仪 郑州长城科工贸有限公司;TG16 台式高速离心机 长沙英泰仪器有限责任公司;DK-98-IIA 电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;DHG-9246A 电热恒温干燥箱 上海精宏实验设备有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 油茶饼粕多糖的制备与测定 油茶饼粕贮藏 1 个月;准确称取经 60 °C 烘干至恒重且过 40 目的油茶饼粕粉末 1.0 g 于三角瓶中,加蒸馏水 15 mL,即料液比为 1:15 的条件下,用最终浓度为 1% 木瓜蛋白酶反应 1.0 h 后于 50 °C 下超声(300 W)提取 1 次,提取时间 0.5 h。提取后抽滤,合并滤液,滤液浓缩至 10 mL,用 50% 乙醇沉淀,10 mL 蒸馏水溶解,以多糖水溶液 1/3 体积加入 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇 = 4:1, v: v)混合振荡 20 min 后静置 15 min,除去水层与溶剂交界处的变性蛋白质,重复多次直至除尽,定容至 10 mL 容量瓶中,取 1.0 mL 再定容至 100 mL 容量瓶中,取 1.0 mL 用硫酸-苯酚法测定多糖得率,根据如下公式计算多糖提取得率。

$$\text{多糖提取得率}(\%) = (C_i \times N/M) \times 100$$

其中, C_i 为样品测定吸光度在标准曲线中对应浓度($\mu\text{g/mL}$); N 为样品稀释倍数(1000); M 为油茶饼粕粉末质量(1.0 g)。

葡萄糖标准曲线的绘制:精密移取浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的葡萄糖对照品溶液 0.15、0.30、0.45、0.60、0.75、1.00 mL 于 6 支 20 mL 玻璃试管中,加入 5.0% 苯酚溶液 1 mL,并迅速加入浓硫酸 5.0 mL,摇

匀,常温静置 20 min 后沸水浴 3 min,取出后迅速冷却至室温,各试管中加蒸馏水补至 10 mL,在 490 nm 处测定吸光值。精密量取蒸馏水 1.0 mL 同上述操作,作为空白对照,得回归方程: $y = 0.0097x + 0.0005$ ($R^2 = 0.9993$)。

1.2.2 单因素实验 准确称取相同质量的油茶饼粕粉末,改变其中的某一个单因素条件,其它条件同 1.2.1,进行超声提取,以多糖的提取得率为考察指标,评价各因素对油茶饼粕多糖提取得率的影响。

1.2.2.1 贮藏时间的影响 在阴暗处、20~30 °C、30%~80% RH 条件下贮藏 1、3、6、12、18 个月的油茶饼粕作为实验材料进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.2 不同粉粹度的影响 油茶饼粕经打粉机打粉后所得粉末分别过 40、50、70、90、120 目的筛子,得到不同直径大小的油茶饼粕粉末,进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.3 料液比的影响 在料液比为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 的条件下进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.4 酶浓度的影响 在木瓜蛋白酶最终浓度为 1%、2%、3%、4%、5% 的条件下进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.5 酶反应时间的影响 在酶反应时间为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 的条件下进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.6 提取温度的影响 在提取温度为 50、60、70、85、100 °C 的条件下进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.7 超声功率的影响 在超声功率为 300、500、700、1000、1200 W 的条件下进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.8 提取时间的影响 在提取时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 的条件下进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.9 提取次数的影响 在提取次数为 1、2、3、4、5 次的条件下进行提取实验,测定多糖提取得率。

1.2.2.10 乙醇浓度的影响 在乙醇最终浓度为 50%、65%、75%、80%、90% 的条件下沉淀多糖,测定多糖提取得率。

1.2.3 单因素实验结果主成分分析 采用 SPSS 19.0 软件对 10 个单因素实验结果进行主成分分析,通过分析确定影响油茶饼粕多糖提取得率的主要单因素和实验水平。

1.2.4 正交实验 在单因素实验中发现各因素对多糖提取得率均有一定影响。在单因素实验主成分分析的基础上,选择超声时间、提取温度、料液比、酶反应时间作为优化条件的实验因素,利用正交设计实验,进一步研究油茶饼粕多糖提取工艺的最佳条件,实验因素与水平见表 1。

1.2.5 数据处理 数据采用 Origin 制图,单因素实验数据采用 SAS 9.0 统计软件进行显著性分析。满足正态性分布且方差齐的两组之间差异的比较用两组独立样本的 t 检验,多组之间差异的比较用单因素的

表1 正交实验设计因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experimental design				
水平	因素			
	A 超声时间 (h)	B 酶反应 时间(h)	C 提取温度 (℃)	D 料液比 (g/mL)
1	1.5	2.0	70	1:25
2	2.0	2.5	85	1:30
3	2.5	3.0	100	1:35

方差分析。不同大写字母表示 $\alpha = 0.05$ 显著性水平, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 贮藏时间的影响 如图1所示,随着油茶饼粕贮藏期的延长,多糖提取得率增加,在第6个月时多糖提取得率达到最大值(4.13%),相对于贮藏1个月增加了8.40%;但继续延长贮藏时间,多糖提取得率有下降趋势,可能是因为饼粕自身的呼吸消耗和微生物的消耗导致多糖减少^[12]。因此,选择贮藏6个月的油茶饼粕进行多糖的浸提效果较好。

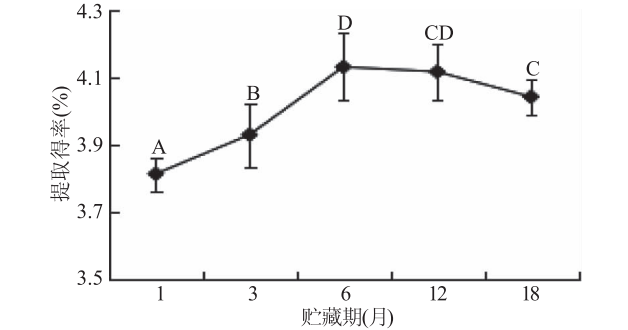


图1 贮藏时间对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.1 Effect of storage time on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

注:图中不同字母表明差异性显著($p < 0.05$),图2~图10同。

2.1.2 粉碎度的影响 如图2所示,多糖提取得率随着粉碎度的增加而增加,90目时油茶饼粕多糖的提取得率达到最大值(4.12%),相对于40目油茶饼粕多糖提取得率增加了8.14%。随后有缓慢降低的趋势,可能是因为过小的颗粒导致其它成分的大量浸出从而阻碍多糖的提取^[13]。因此,选取90目颗粒大小的油茶饼粕进行多糖的提取较为适宜。

2.1.3 料液比的影响 如图3所示,多糖提取得率随着料液比的升高呈增加的趋势。采用1:15提取时,提取得率较低,仅为3.81%。料液比在1:15~1:30时,多糖提取得率较快速增加;当料液比为1:30时,多糖提取得率几乎达到了最大值,相对于1:15增加了12.33%。这是由于在一定范围内增加浸提液体积可以增大溶剂与浸提物的接触面积,使水溶性的多糖能够较多的溶出,但浸提液体积继续增大会使多糖的溶出达到饱和,提取得率趋于平稳^[14]。因此,选择料液比在1:30较为合适。

2.1.4 酶浓度的影响 如图4所示,多糖提取得率随着酶液浓度的增加亦有增加的趋势。酶浓度低时提

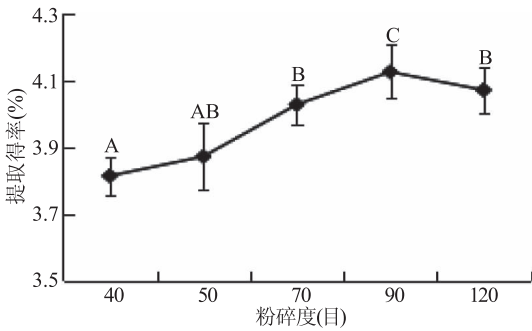


图2 粉碎度对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.2 Effect of powder degree on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

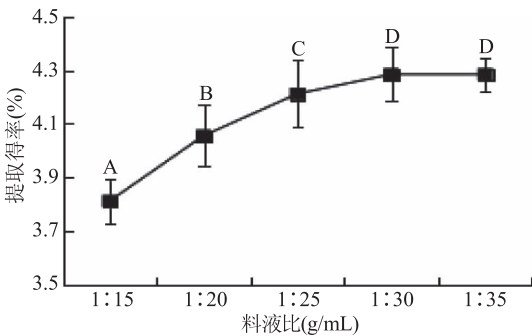


图3 料液比对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.3 Effect of material liquid ratio on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

取得率低,随着酶浓度的增加,加大了与底物的结合面积,多糖浸提率明显提高,当酶浓度由1%增加到3%时,多糖提取得率(4.57%)具有较大程度的提高,相对于1%酶浓度增加了19.95%;但由于酶量的饱和,后期随酶浓度的增加,多糖提取得率增加趋于平稳^[15]。考虑到实际生产的科学性,选择3%浓度的酶较为合理。

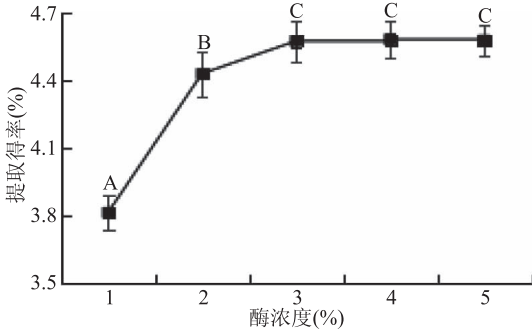


图4 酶浓度对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.4 Effect of enzyme concentration on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

2.1.5 酶反应时间的影响 如图5所示,多糖提取得率随着酶反应时间的增加亦有增加的趋势。在2.0 h酶反应时间内,随着时间的增加多糖提取得率显著提高,在这段时间内,底物与酶反应较为激烈,反应强度大。当酶反应时间达到2.5 h时,多糖提取得率(4.56%),相对于酶反应1.0 h增加了19.69%,但随酶反应时间的继续延长,多糖提取得率增加量趋于平稳,这可能是因为底物已完全反应^[16],多糖的溶出

量已达到饱和所致。考虑生产效率等因素,选择 2.5~3.0 h 的酶反应时间较为合理。

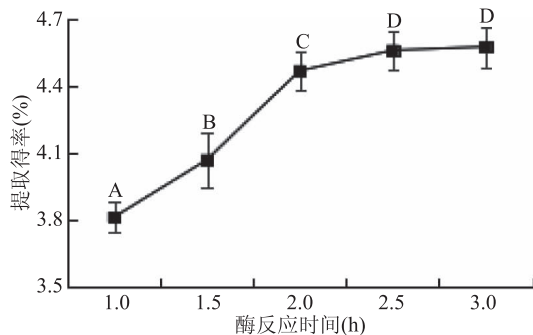


图5 酶反应时间对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.5 Effect of enzyme reaction time

on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

2.1.6 提取温度的影响 如图6所示,多糖提取得率随着温度的升高有逐渐增加的趋势。采用 50℃提取时,提取得率较低,仅为 3.81%。在提取温度为 60~85℃时,提取得率急剧升高,85℃的提取得率相比于 50℃增加了 35.43%,这是由于温度的升高加大了多糖在水中的溶解度;当温度超过 85℃时,多糖提取得率的增加量逐渐放缓,这可能是由于高温导致多糖结构破坏,并且温度过高不利于工业化生产^[17]。因此,选择提取温度为 85℃较为合理。

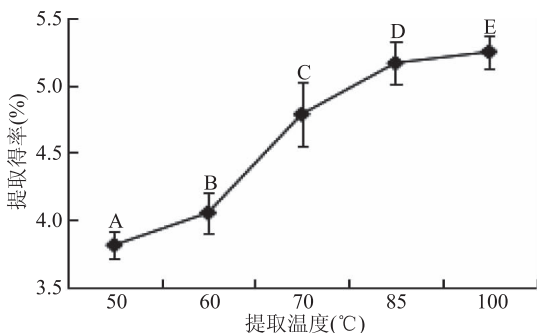


图6 提取温度对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.6 Effect of extraction temperature

on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

2.1.7 超声功率的影响 如图7所示,随着超声功率的增加多糖提取得率亦有增加的趋势,但后期有所降低。在超声功率为 300 W 时多糖提取得率仅为 3.81%;当功率增加到 1000 W 时多糖提取得率达到峰值(4.36%),说明超声提取能极大地提高天然植物功效成分的提取得率;但当超声功率达到 1200 W 时多糖提取得率有所下降,这可能是由于过高的功率破坏了多糖的结构,从而导致提取得率下降^[18-19]。因此,出于减少能量消耗及提高多糖提取得率方面的考虑,选择超声功率为 1000 W 较为适宜。

2.1.8 提取时间的影响 如图8所示,多糖提取得率随着提取时间的延长而逐渐增加。当提取时间较短(0.5 h)时,多糖提取得率较低。提取时间为 1.0~2.0 h 时,多糖提取得率显著增加,这可能是由于较短的提取时间导致多糖溶出不完全^[20]。提取时间为 2.0 h 时多糖提取得率几乎达到了峰值,为 4.95%。但后期继续延长提取时间,多糖提取得率保持相对

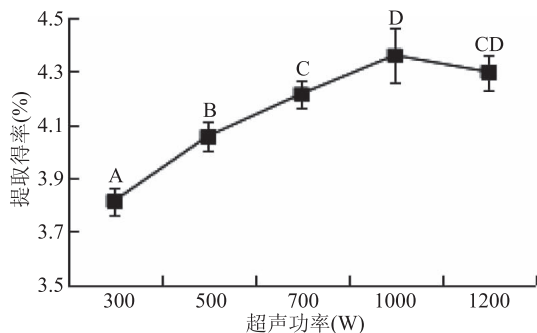


图7 超声功率对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic power on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

平稳,因此,出于节约时间的考虑,选择 2.0 h 超声提取时间较为适宜。

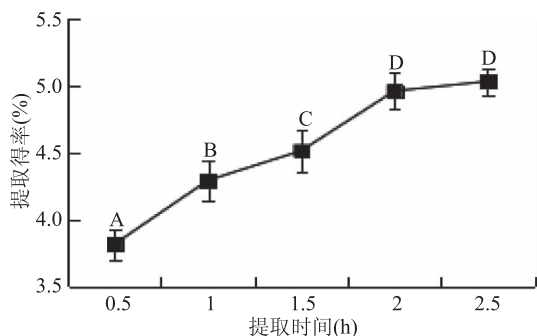


图8 提取时间对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.8 Effect of extraction time on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

2.1.9 提取次数的影响 如图9所示,多糖提取得率随着提取次数的增加而增加。采用 1 次提取时,提取得率较低,仅为 3.81%。当提取次数增加到 3 次时,相对于提取 1 次,多糖提取得率有较大幅度的增加(10% 以上),这是由于提取次数过少导致提取不完全,适当增加提取次数有利于多糖的完全浸出;但随着提取次数进一步增加,提取得率增加缓慢,这可能是由于多糖的提取量已达到最大值,继续提取不会增加提取得率,反而增加时间和原料的消耗^[21]。因此,超声提取 3 次较为适宜。

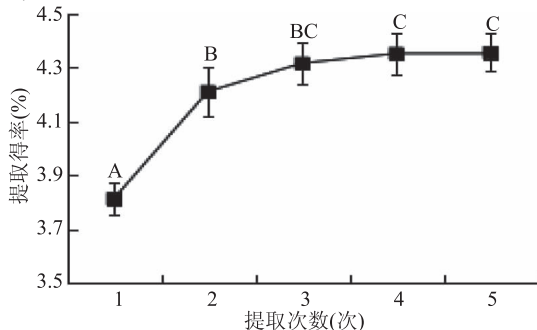


图9 提取次数对油茶饼粕多糖提取得率的影响

Fig.9 Effect of extraction times on extraction yield of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

2.1.10 乙醇浓度的影响 采用水提醇沉法提取多糖。如图10所示,多糖沉淀量与乙醇浓度无特定关系,由于不同浓度乙醇的极性大小不一样,从而油茶

表2 不同条件下油茶饼粕多糖的提取得率的标准化值

Tabel 2 The standard value of extraction yield of oil tea cake polysaccharide in different conditions

水平	X ₁ 贮藏期	X ₂ 粉粹度	X ₃ 料液比	X ₄ 酶浓度	X ₅ 酶反应时间	X ₆ 提取温度	X ₇ 超声功率	X ₈ 超声时间	X ₉ 提取次数	X ₁₀ 乙醇浓度
1	-1.34	-1.16	-1.61	-1.76	-1.40	-1.23	-1.33	-1.48	-1.73	-0.79
2	-0.54	-0.79	-0.32	0.19	-0.69	-0.85	-0.41	-0.38	0.04	-0.40
3	1.31	0.18	0.82	0.63	0.44	0.30	0.18	0.12	0.53	1.73
4	0.38	1.34	0.51	0.41	0.93	1.06	1.42	1.12	0.44	-0.07
5	0.19	0.43	0.61	0.54	0.71	0.73	0.14	0.62	0.71	-0.47

饼粕多糖在不同浓度乙醇中的溶解度也不一样^[22],在乙醇浓度≤75%时,多糖在提取液(水)中溶解度随沉淀剂(乙醇)浓度增加而减少,当乙醇浓度>75%以后,多糖溶解度则逐渐增加。如图10所示,5种乙醇浓度中以75%浓度乙醇对多糖的沉淀效果最好,达到4.33%,相对于50%乙醇浓度增加了13.64%。

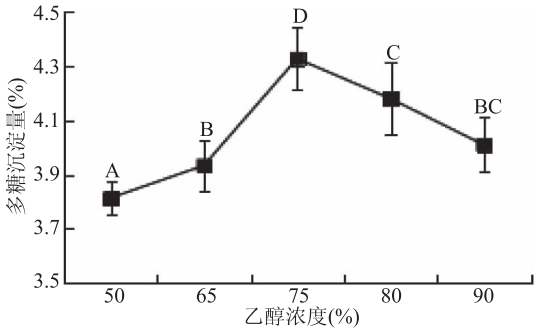


图10 乙醇浓度对油茶饼粕多糖沉淀量的影响
Fig.10 Effect of ethanol concentration on precipitate content of polysaccharide in *Camellia oleifera* cake

2.2 单因素主成分分析结果

2.2.1 主要成分个数确定 利用 SPSS 19.0 对原始数据进行数据标准化分析(Z-标准化)得多糖提取得率数据的标准化值(表2),继而进行主成分个数的确定。由表3可知,前两个主要成分的特征值均大于1,第一个主成分的贡献率为81.98%,第二个主成分的贡献率为12.07%,第三个主成分的贡献率为4.68%,其中第一个主成分的贡献率已大于80.00%,基本包含了原来变量的主要信息。

表3 不同条件下多糖提取得率主成分分析的特征值

Table 3 The component matrix of polysaccharide extraction yield in different extraction conditions

成份	特征值	贡献率(%)	累计贡献率(%)
1	8.198	81.98	81.98
2	1.207	12.06	94.04
3	0.467	4.68	98.72
4	0.128	1.28	100.00

从表4可以看出,第一主成分中相关性从大到小依次为:酶反应时间、料液比、超声时间、提取温度、提取次数、酶浓度、超声功率、粉粹度、贮藏期、乙醇浓度,总体上主要体现在实验处理的强度上,实验强度越大,多糖提取得率相对较高。在第二主成分中相关性从大到小依次为:乙醇浓度、提取次数、贮

藏期、粉粹度、超声时间、超声功率、提取温度、料液比、酶浓度,影响多糖提取得率的主要实验强度在2、3、4阶段,且并不是实验强度越高越好。由于第一主成分因素达到了80%以上,它几乎包含了影响多糖提取得率的主要因素,数值的绝对值越大对第一主成分的贡献率也就越大,其对多糖提取得率的影响也就越大;因此选取第一主成分中相关性排在前4的单因素进一步做正交实验。

表4 多糖提取得率载荷矩阵

Table 4 The load matrix with polysaccharide extraction yield

因素	成分矩阵	
	1	2
贮藏期	0.893	0.431
粉粹度	0.913	-0.321
料液比	0.975	0.163
酶浓度	0.916	0.152
酶反应时间	0.980	-0.138
提取温度	0.944	-0.243
超声功率	0.913	-0.279
超声时间	0.956	-0.286
提取次数	0.935	0.720
乙醇浓度	0.549	0.791

2.2.2 主成分综合模型构建 根据多糖提取得率的特征值和贡献率(表3)可知,第一个主成分的贡献率为81.98%,第二个主成分的累计贡献率为94.04%,这两个主成分基本包含了原来指标的绝大部分信息,因此可以用这两个变量来代替原来的所有指标,根据多糖提取得率规格化特征向量(表5),构建主成分与原来指标之间的表达式为:

$$f_1 = 0.33X_1 + 0.192X_2 + 0.334X_3 + 0.327X_4 + 0.319X_5 + 0.319X_6 + 0.312X_7 + 0.320X_8 + 0.342X_9 + 0.341X_{10}$$
$$f_2 = -0.221X_1 + 0.720X_2 - 0.260X_3 - 0.655X_4 - 0.254X_5 - 0.292X_6 + 0.392X_7 + 0.138X_8 - 0.126X_9 + 0.148X_{10}$$
$$F = 0.259X_1 + 0.260X_2 + 0.258X_3 + 0.369X_4 + 0.245X_5 + 0.241X_6 + 0.322X_7 + 0.297X_8 + 0.282X_9 + 0.316X_{10}$$

其中X₁~X₁₀为各单因素条件下多糖提取得率的标准化值(表2)。

以所选取的第一、第二主成分的方差贡献率a₁、a₂作为权数,构建综合评价模型:F=a₁f₁+a₂f₂,其

中,F 为综合评价指标,计算得出 5 个综合评价值 F,如表 6 所示。

表 5 多糖提取得率规格化特征向量

Table 5 The standardized eigenvector with polysaccharide extraction yield

因素	特征向量	
	因子 1	因子 2
贮藏期	0.312	0.392
粉碎度	0.319	-0.292
料液比	0.341	0.148
酶浓度	0.320	0.138
酶反应时间	0.342	-0.126
提取温度	0.330	-0.221
超声功率	0.319	-0.254
超声时间	0.334	-0.260
提取次数	0.327	0.655
乙醇浓度	0.192	0.720

表 6 多糖提取得率综合评价变量及 F 值

Table 6 The variables of comprehensive evaluation and F with polysaccharide extraction yield

编号	f ₁	f ₂	F
1	-4.43	-1.20	-4.01
2	-1.31	0.22	-1.11
3	1.80	2.07	1.83
4	2.48	-0.88	2.05
5	1.45	-0.20	1.24

由表 6 可知,影响多糖提取得率的第一指标 f₁ (贡献率为 81.98%),总体上呈上升趋势,表明多糖提取得率随各因素实验强度的增加而增加,提取得率逐渐提高,但各因素增强到第 5 个级别时,多糖提取得率有所下降,结合单因素实验图可以看出这可能是受超声功率、粉碎度、贮藏期、乙醇浓度的影响; f₂ (贡献率为 12.07%) 呈“升-降-升”的变化趋势,在第 3 水平时多糖提取得率最高,结合表 4 多糖提取得率载荷矩阵可以看出乙醇浓度、提取次数、贮藏期的正相关值较高达到 0.791、0.720、0.431,这与它们对多糖提取得率变化趋势大相吻合。综合评价变量 F 值呈上升趋势,说明多糖提取得率随各因素实验强度的增加而升高,当各因素的实验强度达到第 5 个级别时,F 值呈下降趋势,这说明实验强度并不是越大越好;综合各单因素的 5 个级别,当达到第 4 个级别时多糖提取得率的理论综合值较高;结合上文所确定的 4 个主要因素,在第 3、4、5 个级别的实验强度下进一步进行正交实验。

2.3 正交实验结果

2.3.1 JP2 正交实验 根据正交实验设计表,结合单因素主成分分析结果,分别以料液比、超声提取时间、酶反应时间和提取温度这四个较大影响多糖提取得率的因素进行 L₉(3⁴) 正交实验。其正交实验结果见表 7。

通过上述正交实验结果及其极差分析可知,影响多糖提取得率的主次因素由极差大小确定: B > D

> A > C,即酶反应时间 > 料液比 > 超声时间 > 提取温度,通过其 k 值比较可以得出,提取多糖的最佳组合为 A₂B₃C₂D₂。

表 7 正交实验结果及分析

Table 7 The experiment result and analysis of orthogonal

实验序号	A	B	C	D	提取得率 (%)
1	1	1	1	1	5.99
2	1	2	2	2	6.53
3	1	3	3	3	6.47
4	2	1	2	3	6.23
5	2	2	3	1	6.24
6	2	3	1	2	6.65
7	3	1	3	2	6.23
8	3	2	1	3	6.16
9	3	3	2	1	6.35
k ₁	6.330	6.150	6.267	6.193	
k ₂	6.373	6.310	6.370	6.470	
k ₃	6.247	6.490	6.313	6.287	
R	0.126	0.340	0.103	0.277	
最佳条件	A ₂	B ₃	C ₂	D ₂	

2.3.2 最佳提取工艺验证 通过上述所得最佳提取工艺,结合其余六个较优单因素实验条件(6 个月贮藏期、90 目油茶饼粕粉末、3.0% 酶浓度、1000 W 超声功率、提取 3 次、75% 乙醇沉淀)进行 5 次平行实验,其测定结果依次为 7.38%、7.15%、6.86%、6.99%、7.21%,多糖平均提取得率为 7.12% ± 0.20%。

3 结论

本文在 10 个单因素实验结果的基础上,通过主成分分析得出,提取温度、超声时间、酶反应时间、料液比相对于其它单因素对油茶饼粕多糖提取得率具有较大的相关性,这说明各单因素对油茶饼粕多糖提取得率的影响具有一定的差异性;同时得到多糖提取得率综合评价变量及 F 值,以此判定得出 3、4、5 阶段的实验强度对油茶饼粕多糖的提取具有较大的影响,从而在很大程度上明确了各单因素的不同实验强度对多糖提取得率的影响。主成分分析,相对以前纯粹单因素正交实验来说,一方面了解各单因素对油茶饼粕多糖提取得率的影响,另一方面避免了正交实验对单因素选择不科学性。选取上述单因素及实验水平进行正交实验,得出油茶饼粕多糖最佳提取工艺 A₂B₃C₂D₂,即酶反应 3.0 h 后在料液比为 1:30 的条件下,于 85 ℃ 下超声提取提取 2.0 h;同时结合其余六个较优单因素实验条件进行 5 次平行验证实验,此时多糖提取得率最高,为 7.12% ± 0.20%。利用超声协同酶法提取技术以及主成分分析和正交实验相结合,具有一定的实用性、科学性,同时工艺较简单、便捷、多糖提取得率高,又很好地兼顾了油茶饼粕多糖提取的时间和较高的提取得率,实验结论在一定程度上为后期油茶饼粕多糖大规模工业化生产提供了依据。10 个单因素实验,初步了解影响油茶饼粕多糖提取得率的因素,在后续的研究中可加大单

因素数量,加大对更多有关影响油茶饼粕多糖提取得率因素的了解,还可进一步深化探索。

参考文献

[1] 王斌,王开良,童杰洁,等.我国油茶产业现状及发展对策[J].林业科技开发,2011,25(2):11-15.

[2] 吕永来.我国油茶产业发展现状分析[J].中国林业产业,2008(10):18-19.

[3] 范东斌,莫弦丰,陈玉竹,等.响应曲面法优化油茶饼粕蛋白的超声辅助提取工艺研究[J].食品工业科技,2014,35(3):199-202.

[4] Wang J. Research progress in *Camellia oleifera* polysaccharides[J]. Science & Technology of Food Industry, 2016,37(17):372-380.

[5] Jin X. Bioactivities of water-soluble polysaccharides from fruit shell of *Camellia oleifera* Abel: Antitumor and antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2012,87(3):2198-2201.

[6] 张宽朝,马皖燕,文汉.油茶籽多糖降血糖作用的初步研究[J].食品工业科技,2014,35(2):337-339.

[7] Jin X, Ning Y. Antioxidant and antitumor activities of the polysaccharide from seed cake of *Camellia oleifera* Abel[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012,51(4):364-368.

[8] Chen Y Y, Dou X L, Huang Y R, et al. Optimization of Ultrasonic/Microwave - Assisted Extraction of Polysaccharides from Green Tea by Response Surface Methodology[J]. Food Science, 2012,33(4):100-103.

[9] 吴雪辉,黄永芳,向汝莎,等.微波提取油茶饼粕中多糖的工艺研究[J].食品工业科技,2008(9):197-199.

[10] 郑剑,仲山民.响应面法优化水酶法提取油茶饼粕多糖

[J].粮食与油脂,2016,29(12):14-17.

[11] 尹艳,高文宏,于淑娟.多糖提取技术的研究进展[J].食品工业科技,2007(2):248-250.

[12] 胡平平,李加兴,李忠海,等.油茶饼粕茶皂素与多糖综合提取工艺[J].食品科技,2012(2):196-200.

[13] 王艾平,周丽明,张勇,等.水溶性茶籽多糖提取条件研究[J].上饶师范学院学报,2012,32(6):70-73.

[14] 黎国庆,李盛宣,覃江克,等.油茶枯中皂素和多糖的综合提取工艺研究[J].中国油脂,2014,39(3):70-73.

[15] 田瑞红,江连洲,胡少新,等.超声波酶法提取豆渣中水溶性多糖条件的优化[J].食品工业科技,2011(11):305-308.

[16] LUO Kai, HUANG Xiufang, ZHOU Yifeng, et al. Optimization of Multi-Enzymatic Extraction of Polysaccharides from Cardamine hupingshanensis and Their Antioxidant Activity[J]. Food Science, 2017,38(4):237-242.

[17] 王志坤,李妃,林新春,等.超声波法提取苦竹叶多糖的工艺研究[J].食品工业科技,2011(8):236-237.

[18] 黄威,胡建华.油茶籽浸出粕提取茶籽多糖的工艺研究[J].中国食品工业,2011(2):45-46.

[19] Zhong K, Qiang W. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2010,80(1):19-25.

[20] 张丽美,杨婷婷,胡蒋宁,等.超声波辅助提取茶粕多糖及其抗氧化活性[J].食品科学,2013,34(18):36-40.

[21] Bai Q Y, Wen Y J. Study on Extraction and Antioxidant Activity of *Camellia oleifera* Seed Cake Polysaccharides[J]. Food Industry, 2014(1):136-139.

[22] 白庆云,闻永举.油茶籽饼粕多糖的提取及抗氧化活性研究[J].食品工业,2014(1):136-139.

(上接第196页)

[12] Pérez - Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results[J]. Food Research International, 2008,41(3):274-285.

[13] Clifford M N. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000,80(7):1063-1072.

[14] 宋会歌,刘美艳,董楠,等.食品中花色苷降解机制研究进展[J].食品科学,2011,32(13):355-359.

[15] Furtado P, Figueiredo P, das Neves H C, et al. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1993,75(2):113-118.

[16] Cares M G, Vargas Y, Gaete L, et al. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina[J]. Physics Procedia, 2010,3(1):169-178.

[17] Huie C W. A review of modern sample - preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002,373(1):23-30.

[18] Sun J, Mei Z, Tang Y, et al. Stability, Antioxidant Capacity and Degradation Kinetics of Pelargonidin-3-glucoside Exposed to Ultrasound Power at Low Temperature[J]. Molecules, 2016,21(9):1109.

[19] Esclapez M D, García-Pérez J V, Mulet A, et al. Ultrasound

- assisted extraction of natural products[J]. Food Engineering Reviews, 2011,3(2):108.

[20] Yu Y, Xu Y, Wu J, et al. Effect of ultra - high pressure homogenisation processing on phenolic compounds, antioxidant capacity and anti - glucosidase of mulberry juice[J]. Food Chemistry, 2014,153(3):114-120.

[21] Anese M, Mirolo G, Beraldo P, et al. Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene *in vitro* bioaccessibility[J]. Food Chemistry, 2013,136(2):458-463.

[22] Tsuda T, Shiga K, Ohshima K, et al. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L[J]. Biochemical Pharmacology, 1996,52(7):1033-1039.

[23] Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants[J]. Food Chemistry, 2011,125(2):288-306.

[24] Osorio C, Hurtado N, Dawid C, et al. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits[J]. Food Chemistry, 2012,132(4):1915-1921.

[25] Mane S, Bremner D H, Tziboula - Clarke A, et al. Effect of ultrasound on the extraction of total anthocyanins from Purple Majesty potato[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015,27(6):509-514.