

文章编号:1672-058X(2011)06-0614-08

二次通用旋转设计优化紫玉米芯色素提取工艺*

熊建功, 邵承斌**, 曹霞霞, 李 宁, 陈盛明

(重庆工商大学 环境与生物工程学院, 重庆 400067)

摘 要:以一种紫玉米芯为原料,在单因素试验的基础上,以得率为指标,采用四因素二次通用旋转设计方法,对影响紫玉米芯色素提取的工艺条件进行了优化;结果表明:紫玉米芯色素的优化提取工艺条件为浸提温度 40 ℃、液固比 60:1、乙醇体积分数 60%、粒径 80 目、提取时间为 3 h;在此工艺条件下紫玉米芯色素粗品得率为 6.88%,其产品色价达到 14。

关键词:二次通用旋转设计;紫玉米芯色素;提取;优化

中图分类号:0584

文献标志码:A

紫玉米(Purple corn;学名 *Zea mays* L)原产南美山区,是印加帝国居民种植的粮食作物之一^[1]。紫色玉米也是我国各地大量种植的一种谷物^[2],随着人们对天然色素需求的量的增加,近年来具有全新遗传特性的紫色玉米新品种陆续培育成功。紫色玉米日益受重视的原因在于,种植紫色玉米在收获玉米种子的同时获得大量用于提取天然色素的廉价原料,紫玉米芯和紫玉米秸秆。种植紫玉米利用紫玉米芯或紫色植株提取色素,是农民增收的一条好出路。紫玉米芯色素属花青素类色素,具有一定营养和药理作用,是替代合成色素的理想食品添加剂^[3,4]。重庆市三峡农科院培育的紫玉米,其玉米芯色泽深紫,色素含量高^[5],具有较好的市场前景。在前人研究工作的基础上,系统考察了影响紫玉米芯色素提取工艺条件,在单因素实验基础上,采用四因素二次通用旋转设计优化紫玉米芯色素的提取工艺,建立影响因素与所考察指标二次回归数学模型寻求最佳工艺参数,为紫玉米芯色素开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

紫色玉米芯,由重庆市三峡农科院提供。微型高速万能试样粉碎机,河北黄骅科学仪器厂;UV-2450 紫外分光光度计,日本岛津苏州工厂;SHB-Ⅲ循环水式真空泵,郑州长城科工贸有限公司;AL104 电子天平,梅特雷斯-托利多仪器有限公司。医用乙醇,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 工艺流程

紫玉米芯→40 ℃干燥 48 h→粉碎→过筛→溶剂提取 2 次→滤液合并溶剂定容备用。

1.3 单因素实验

分别准确称取 1 000 g 玉米芯若干份,放入 250 mL 三角瓶中并置于 120 r/min 恒温振荡器中,连续提取 2 次。滤液混合定容至相同体积,测定最大波长下的吸光度考察液固比、温度、粒径、溶剂浓度、提取时间、提取次数对提取效率的影响。

收稿日期:2011-03-10;修回日期:2011-03-25.
* 基金项目:重庆市科技攻关项目(CSTC,2009AC1065).
作者简介:熊建功(1984-),男,硕士研究生,重庆市人,从事固体废弃物资源化研究.
* 通讯作者:邵承斌(1956-),男,研究员,重庆市人,从事农业废弃物综合利用研究.

1.4 二次通用旋转回归实验

在单因素实验结果基础上,选取乙醇体积分数、粒径、液固比、提取时间 4 个因素设计了二次通用旋转回归实验,变量的因素编码及水平见表 1。

表 1 试验因素水平编码表

因子	符号	水平					
		2	1	0	-1	-2	△
乙醇体积分数	X_1	80%	70%	60%	50%	40%	10%
粒径(目)	X_2	100	80	60	40	20	20
液固比/(mL/g)	X_3	100:1	80:1	60:1	40:1	20:1	20:1
提取时间/h	X_4	5	4	3	2	1	1

1.5 考察指标

(1) 吸光度。取 1 mL 提取液于比色管中,再加入 pH3.0 的柠檬酸缓冲液并定容至 25 mL,测定 400 ~ 600 nm 处最大吸收值。

(2) 相对提取率。分别收集每次浸提色素溶液并测定其体积(V)、吸光度(A)、稀释倍数 R 。相对提取率为每次提取吸光度值比提取总吸光度值^[6],即: $\text{相对提取率}/\% = \frac{A \times V \times \text{稀释倍数}}{\sum (A \times V \times \text{稀释倍数})} \times 100$ 。

(3) 产品得率。将优化工艺浸提样品,经过:抽滤→旋转蒸发→真空干燥至恒重→色素产品→称重。由公式计算产品得率,即: $\text{产品得率}/\% = \frac{\text{色素成品质量}}{\text{玉米芯质量}(1\,000\text{ g})} \times 100$ 。

(4) 产品色价。配制 1% 浓度色素产品,调节至 pH3.0 ,在 525 nm 处测定吸光值^[7],根据以下公式计算色价,即: $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = A \times \text{稀释倍数}$ 。

2 结果与讨论

2.1 提取方式的选择

分别称取 1.000 g 玉米芯(60 目)于若干 250 mL 三角瓶中,依次加入 0.1 mol/L 的盐酸、0.1 mol/L 的柠檬酸、0.1 mol/L 的酒石酸与 95% 乙醇(1:1)混合液 100 mL,置于恒温振荡器中和超声波清洗器中,其中水浴恒温振荡器的工作条件:水温为 30 ℃,120 r/min,提取 24 h。超声波清洗器工作条件:功率输出 45 KHz,工作时间 10 min,水温 30 ℃,连续超声 7 次。处理结束,均定容至 100 mL,抽滤,取滤液 1 mL,用相应提取溶剂稀释 25 倍,测定 400 ~ 600 nm 处最大吸收值(均在 525 nm 附近),每样重复 3 次,结果如图 1。由图 1 可知,盐酸乙醇(0.1 mol/L 盐酸:95% 乙醇=1:1)提取效果最好。恒温水浴和超声提取效率比较接近,考虑到生产中,超声提取需要专用设备,投资成本高,因此选用恒温水浴。

2.2 单因素分析

2.2.1 液固比对提取效果影响

粒径为 60 目玉米芯,按液固比为 20:1、40:1、60:1、80:1、100:1 加入 95% 乙醇与 0.1 mol/L 盐酸混合液(体积比为 1:1),振荡 5 h,水温为 30 ℃。以 20:1 为基准比例,其他比例下测得的吸光度换算成和它相同总体积下的吸光度。结果见图 2。由图可知液固比 60:1 时提取效果最好。这是由于紫色玉米芯的色素能够充分溶解,也没被稀释。

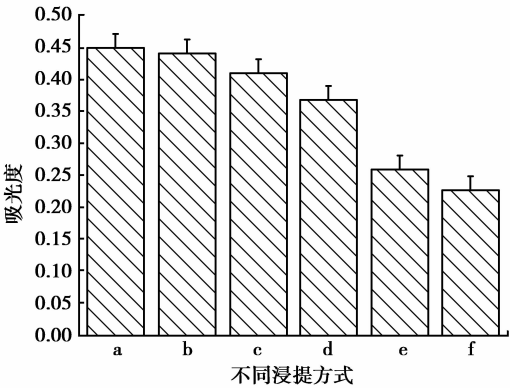


图 1 提取方式对提取效果影响

a-盐酸超声波提取;b-盐酸恒温水浴提取;
c-柠檬酸超声波提取;d-酒石酸超声波提取;
e-酒石酸水浴提取;f-柠檬酸水浴提取

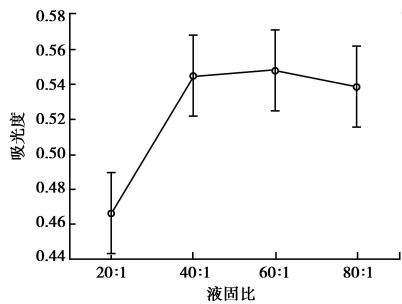


图 2 液固比对提取效果影响

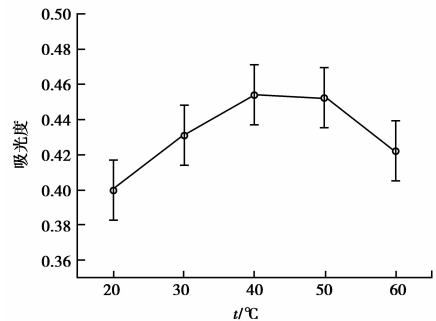


图 3 温度对提取效果影响

2.2.2 温度对提取效果影响

固定液固比 60:1,提取 3 次。提取温度在 20 ~ 60 ℃ 范围内,按 2.2 的实验方法提取。实验结果见图 3。在 40 ℃ 时,提取效果最佳,继续增加温度,提取效果下降。一般来说,提高温度是增大原料成分的溶解度、加快溶出速率的有效途径。温度升高,分子运动速度加快,渗透、扩散、溶解速度加快,但温度过高可能会影响紫玉米色素的结构稳定。

2.2.3 粒径对提取效果影响

固定液固比 60:1,提取温度 40 ℃,提取 3 次,玉米芯粒径分别为 20、40、60、80、100。按 2.2 的方法提取,结果见图 4。由图 4 可知在粒径 80 目时,提取效果最好,粒径小固液接触面积增大,紫玉米芯内部的色素向溶剂扩散的距离缩短,溶剂向紫玉米内部总的扩散速率加快,色素溶出量变大,提取效果随粒径的变小而增加。但粉碎度过细,样品粉碎表面积过大,吸附作用增强,反而影响扩散速度,并不利于有效成分的溶出。同时许多不溶性高分子如蛋白质、糖类浸出量也相应增加,导致分离提纯困难,工艺成本增加。提取过程是一个溶剂扩散和渗透进入固体细胞壁内部,将有效物质溶出的过程,颗粒减小的过程是单位体积的紫玉米粉末的反应比表面积增大的过程,有利于溶剂的渗透扩散。但是随着颗粒继续减小,比表面积增大的同时由于颗粒之间的吸附力加强导致提取效果下降^[8]。

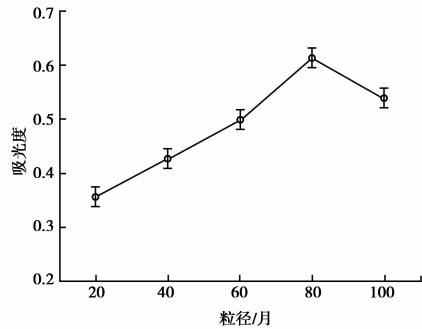


图 4 粒径对提取效果影响

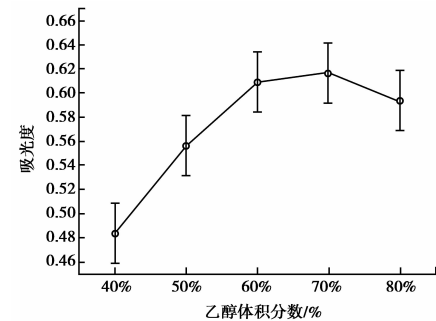


图 5 乙醇体积分数对提取效果影响

2.2.4 乙醇体积分数对提取效果影响

固定液固比 60:1,提取温度 40 ℃,玉米芯粒径 80 目,提取 3 次,用 95% 乙醇与 0.1 mol/L 盐酸按不同体积混合配制成乙醇体积分数分别为 80%、70%、60%、50%、40% 的溶剂。按 2.2 的方法实验,结果见图 5。由图 5 可知,当乙醇体积分数为 70% 时,紫玉米色素的溶解度最大,提取效果最好;而后,继续增加乙醇体积分数,提取效果反而降低。原因可能是随着乙醇体积分数的升高,一些醇溶性杂质、亲脂性强的成分溶出量也增加,干扰因素随之增大,这些成分与紫玉米色素竞争溶解于乙醇—盐酸体系中,从而导致紫玉米色素的提取效果下降。

2.2.5 提取时间对提取效果影响

固定液固比 60:1,提取温度 40 ℃,粒径 80 目,乙醇体积分数 70%,提取 2 次,分析提取时间为 1、2、3、4、5 h 对色素浓度的影响。按 2.2 的方法提取,结果见图 6。图 6 表明紫玉米色素的提取效果是随时间的增加而增加,3 h 提取效果最好,以后随时间的变化提取液的吸光度变小。这可能是由于随着提取时间的延长,

紫玉米色素被充分萃取,提取效率最高,继续延长提取时间,提取液受热的时间也增加,在酸性条件下加热会使花色苷的黄吡盐阳离子结构转变为查尔酮式无色结构,使得色素提取液的吸光度减小^[9-11]。

2.2.6 提取次数对提取效果影响

固定液固比 60:1,提取温度 40 ℃,玉米芯粒径 80 目,乙醇体积分数 70%,提取时间为 3 h。提取 3 次。按 2.2 的方法提取,结果见图 7。

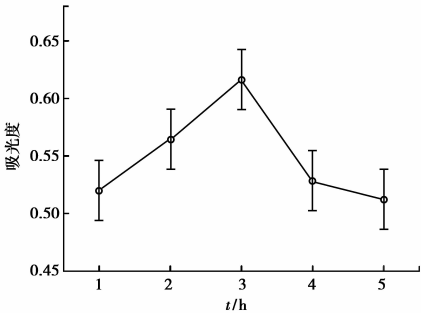


图 6 时间对提取效果影响

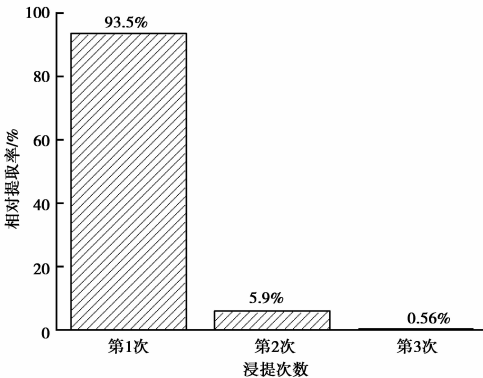


图 7 提取次数对提取效果影响

第 1、2、3 次色素相对提取率分别为 93.5%、5.9%、0.56%,第 1 次和第 2 次提取的色素占 3 次提取总量的 99.44%,考虑到溶剂成本及浓缩过程能量的消耗,色素浸提 2 次为宜。

2.3 二次通用旋转组合设计实验结果

根据单因素实验结果,控制提取温度 40 ℃、pH 为 3 条件下,选择四因素二次通用旋转组合实验设计法,对乙醇体积分数、粒径、液固比、提取时间进行优化,结果见表 2。

表 2 二次通用旋转试验方案及试验结果

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
乙醇体积分数	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
粒径/目	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1
液固比/(mL/g)	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
提取 t/h	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
色素得率/%	5.49	4.31	5.23	5.47	2.48	2.31	4.66	3.52	5.45	4.48	5.07	4.79	2.37	2.30	4.76	4.86

No.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
乙醇体积分数	-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
粒径/目	0	0	-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
液固比/(mL/g)	0	0	0	0	-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
提取 t/h	0	0	0	0	0	0	-2	2	0	0	0	0	0	0	0
色素得率/%	3.58	3.55	2.61	7.21	6.70	2.13	3.60	4.61	5.89	5.80	6.70	6.24	6.57	6.23	6.18

2.4 模型的建立及其显著性检验

利用 DPSv7.05 软件对表 2 试验数据进行了二次多项逐步回归分析,回归方程模型为:
$$Y = 6.230\ 0 + 0.926\ 2X_2 - 0.762\ 9X_3 + 0.228\ 8X_4 - 0.670\ 7X_1^2 - 0.334\ 5X_2^2 - 0.458\ 2X_3^2 - 0.535\ 7X_4^2 + 0.126\ 9X_1X_2 + 0.064\ 4X_1X_4 + 0.469\ 4X_2X_3 + 0.056\ 9X_2X_4 + 0.081\ 9X_3X_4$$

模型复相关系数 R 为 0.963 6, $P = 0.000\ 1$ 。模型的方差分析(表 3)知,试验所选用的二次多项模型具有高度的显著性,失拟项 $p = 0.013\ 6 < 0.05$,模拟失拟度显著。模型的调整确定系数 $R^2 = 0.950\ 1$,说明模型能解释 95.01% 响应值的变化,可以用此模型对紫色玉米芯色素提取进行分析和预测^[12,13]。

表 3 试验结果方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	偏相关	比值 F	p -值	显著性
X_1	0.018 7	1	0.018 7	-0.065 7	0.069 4	0.795 6	
X_2	20.590 5	1	20.590 5	0.909 3	76.375 7	0.000 1	**
X_3	13.969 0	1	13.969 0	-0.8741	51.814 7	0.000 1	**
X_4	1.255 8	1	1.255 8	0.4749	4.658 2	0.046 4	*
X_1^2	12.864 6	1	12.864 6	-0.865 4	47.718 1	0.000 1	**
X_2^2	3.199 2	1	3.199 2	-0.652 6	11.866 6	0.003 3	**
X_3^2	6.004 4	1	6.004 4	-0.762 8	22.271 8	0.000 2	**
X_4^2	8.207 1	1	8.207 1	-0.809 6	30.442 5	0.000 1	**
X_1X_2	0.257 6	1	0.257 6	0.237 4	0.955 3	0.342 9	
X_1X_3	0.021 8	1	0.021 8	0.070 8	0.080 7	0.780 0	
X_1X_4	0.066 3	1	0.066 3	0.123 0	0.245 9	0.626 7	
X_2X_3	3.525 0	1	3.525 0	0.670 6	13.075 2	0.002 3	**
X_2X_4	0.051 8	1	0.051 8	0.108 9	0.192 0	0.667 1	
X_3X_4	0.107 3	1	0.107 3	0.155 8	0.397 8	0.537 1	
回归	63.429 2	14	4.530 7		$F_2 = 16.805 40$	0.000 1	**
剩余	4.313 5	16	0.269 6				
失拟	3.673 9	10	0.367 4		$F_1 = 3.446 46$	0.0136	*
误差	0.639 6	6	0.106 6				
总和	67.742 7	30					

注: * 差异显著, $P < 0.05$; * * 差异极显著, $P < 0.01$ 。

2.5 数学模型的应用分析

2.5.1 单因素分析

根据表 3 和图 8 可知,各因素在试验取值范围内对色素提取效果作用大小依次为: X_2 (粒径) > X_3 (液固比) > X_1 (乙醇体积分数) > X_4 (提取时间)。在提取试验中随着粒径目数的不断增加,色素得率也在不断的增加,而且在粒径增加到 80 目后,色素得率开始稍微下降。随着液固比增加,色素吸光度先增加后降低的趋势,说明一定程度的增加液固比可以提高色素的得率,但是当液固比因素水平超过 1.4 时,色素得率下降。随着乙醇体积分数增加,色素得率先增加后降低的趋势,说明一定程度的增加乙醇体积分数可以提高色素得率,但是当体积分数超过 60% 时,色素得率下降,这与玉米芯色素在一定酸性体系的稳定性有关。色素吸光度在 3 h 达到最大。减少时间色素不能充分提取,增加提取时间,色素会随时间降解。

2.5.2 试验因子间互作效应分析

选取一个因素固定于零水平,求余下两个因素的交互作用,分别作图可以直观地分析各因子间的互作效应。等高线的形状可反映出交互效应的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。由图 10-14 可知粒径和液固比对玉米色素得率的交互影响显著;其他均不显著。图 9 表明乙醇体积分数 50% ~ 70% 时,粒径在 80 ~ 100 目色素得率较高。图 10 表明乙醇体积分数 50% ~ 70% 时,液固比在 40 ~ 60 色素得率较高。图 11 表明乙醇体积分数 50% ~ 70% 时,提取时间 3 h 色素得率最大。图 12 在液固比不小于 60 mL/g、粒径在比较大的范围内可以达到响应值最高点。图 13 表明粒径在 70 目以上,提取时间在 2.5 ~ 4 h 时可以达到响应

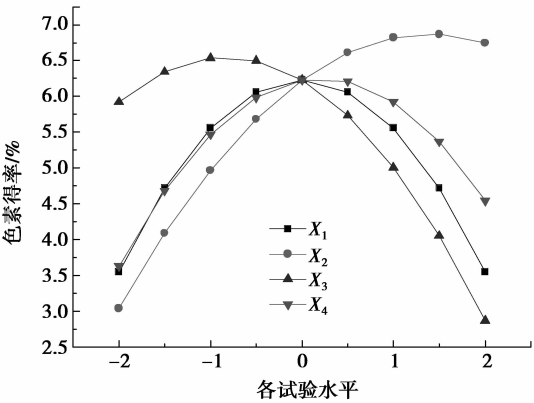


图 8 各单因子与色素提取效果关系图

值最高点。图 14 提取时间小于 3 h, 液固比在比较大的范围内可以达到响应值最高点。

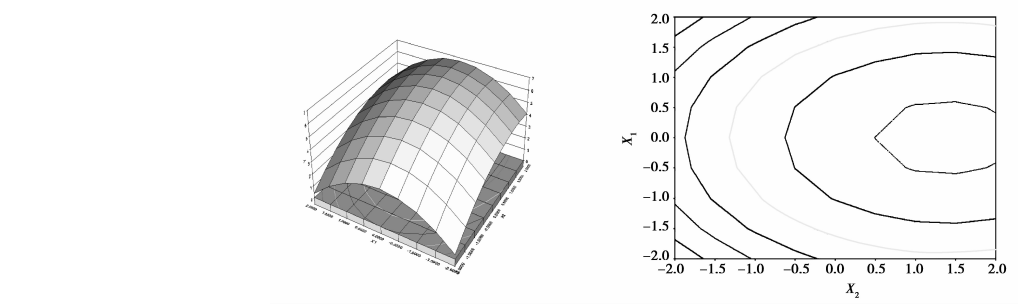


图 9 乙醇体积分数与粒径对色素提取效果影响的响应曲面与等高线

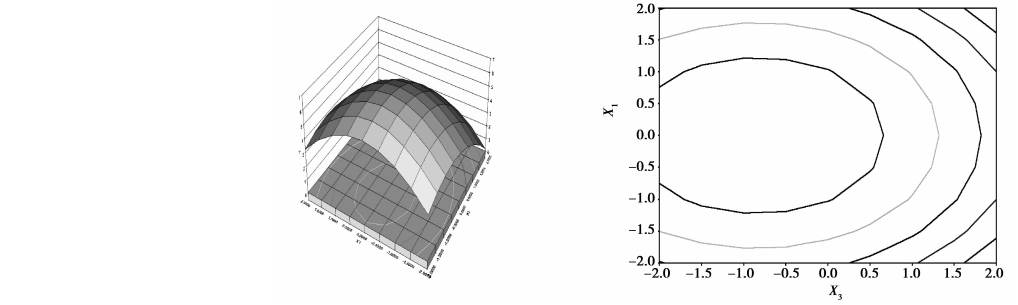


图 10 乙醇体积分数与液固比对色素提取效果的响应面与等高线

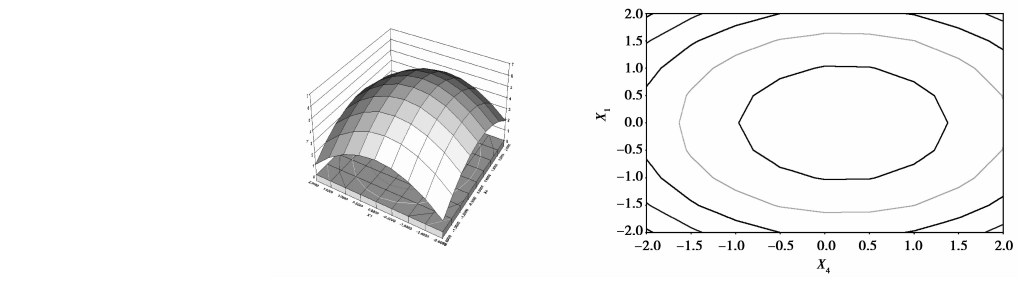


图 11 乙醇体积分数与提取时间对色素提取效果的响应面与等高线

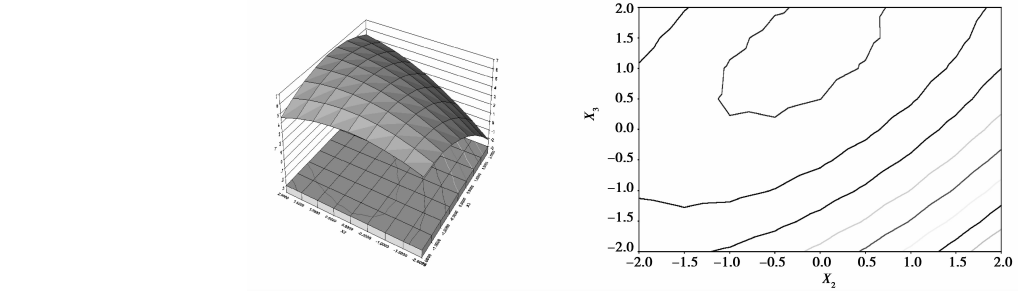


图 12 粒径与液固比对色素提取效果的响应面与等高线

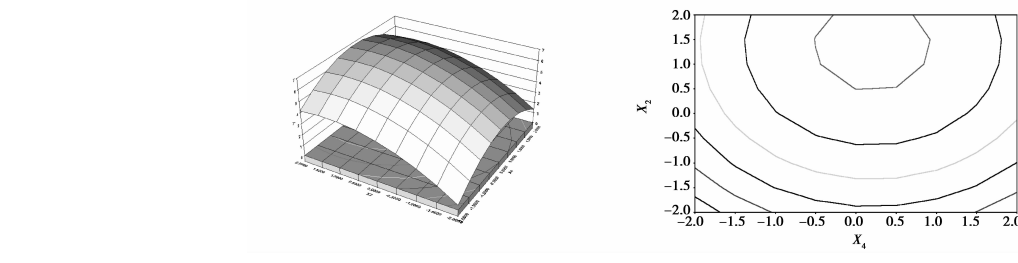


图 13 粒径与提取时间对色素提取效果影响的响应曲面与等高线

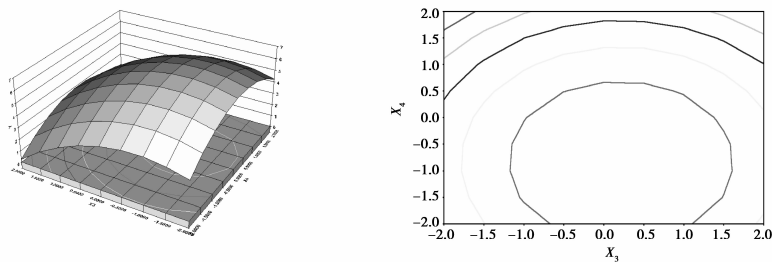


图 14 液固比与提取时间对色素提取效果影响的响应曲面与等高线

2.5.5.3 频率分析及统计寻优^[14]

表 4 优化提取方案中 X_i 取值频率分布表

因素水平	X_1		X_2		X_3		X_4	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率
-2	0	0.000 0	0	0.000 0	0	0.000 0	0	0.000 0
-1	2	0.111 1	0	0.000 0	5	0.277 8	1	0.055 6
0	14	0.777 8	3	0.166 7	10	0.555 6	12	0.666 7
1	2	0.111 1	8	0.444 4	3	0.166 7	5	0.277 8
2	0	0.000 0	7	0.388 9	0	0.000 0	0	0.000 0
加权均数	0.000 0		1.222 0		-0.111 0		0.222 0	
标准误差	0.111 0		0.168 0		0.155 0		0.126 0	
95% 的分布区间	-0.218 ~0.218		0.894 ~1.551		-0.415 ~0.193		-0.024 ~0.468	
提取条件	57.82% ~62.18%		77.88 ~91.02		51.7 ~63.86		2.98 ~3.47	

采用计算机对不同设计水平下的组合进行模拟试验,以接近零水平的均值 6.00 为临界值,获得大于临界值的方案 18 个,各变量取值的频率分布见表 4。在 95% 的置信区间吸光度大于 6.00 的优化方案为:乙醇体积分数 57.82% ~62.18%,粒径目数 77.88 ~91.02,液固比为 51.7 ~63.86 mL/g。提取时间为 2.98 ~3.47 h。为了贴近实际的工业化生产,可将优化方案定为乙醇体积分数为 60%、粒径目数 80、液固比为 60 mL/g、提取时间为 3 h。对方案进行试验验证得到色素得率为 6.88%,与优化方案的理论值 6.91% 比较接近,明显优于文献报道的单因素^[15](得率约 6%),或正交试验^[16](得率约 3.2%)优化效果。试验所得产品色价为 14,高于国家现行标准胡萝卜色素色价 8。

3 结 论

根据响应曲面对紫色玉米芯色素的提取影响因素分析,确定最佳提取工艺为:乙醇体积分数为 60%,粒径目数 80,液固比为 60:1、提取时间为 3 h,在此条件下,紫色玉米芯色素得率可达 6.88%,产品色价 14。响应曲面法对紫色玉米芯的提取工艺进行优化,不仅科学合理,准确可靠,而且快速可行,方法对工艺方面的研究具有一定的意义。

参考文献:

[1] HIROMITSU A N K, YOSHIAKI K. Foods and Food Ingredients[J]. Df Jap,2002,199:41-45

[2] 胡学安,李玉玲,张效梅. 黑玉米资源的利用与改良[J]. 作物品种资源,1999(1):8-9

[3] 郑永霞. 花色苷药理功效的研究进展[J]. 山西医药杂志,2008,37(3):254-257

[4] FAN G J, HAN Y B, GU Z X, et al. Composition and color stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture [J]. Food Science and Technology, 2008,41(8):1412-1416

[5] 徐燕, 徐茜, 余鸿燕, 等. 紫色玉米穗轴色素的提取及其稳定性研究[J]. 玉米科学 2006,14(5): 166-169

[6] 曹铭,周梅村,唐莉英,等. 紫胶色素提取方法的研究[J]. 食品科技,2005(2):45-47

[7] 凌关庭,唐述潮,陶民强. 食品添加剂手册[M]. 北京:化学工业出版社,1997:592-593

[8] 任苏玲. 荞麦壳色素提取纯化及稳定性研究[D]. 安徽:合肥工业大学,2007

- [9] MAZZA G, BROUILLARD R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products[J]. Food Chem, 1987, 25: 207-225
- [10] JACKAMAN R L, YADA R Y, et al. Anthocyanins as food colorants-a review[J]. Biochem, 1987, 11: 201-247
- [11] BROUILLARD R. Flavonoids and flower color. In The Flavonoids. Advances in Research Since 1980 [M]. London: Chapman and Hall, 1983
- [12] 周纪芄. 实用回归分析方法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 77-79
- [13] 王钦德, 杨坚. 食品实验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 405-414
- [14] 曲晓婷, 张名位, 温其标, 等. 二次通用旋转组合设计法优化米糠蛋白提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(1): 102-106
- [15] 赵正涛, 正秀菊, 安鑫, 等. 玉米紫色素提取工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2008(8): 41-43
- [16] 马跃. 紫玉米花色苷提取纯化、性质研究及中试生产[D]. 北京: 中国农业科学研究院, 2009

Optimization of the Extraction Technique of Pigment from Purple Corn Cob by Quadratic General Rotary Design

**XIONG Jian-gong, SHAO Cheng-bin,
CAO Xia-xia, LI Ning, CHEN Sheng-ming**

(College of Environment and Biological Engineering, Chongqing Technology and Business University,
Chongqing 400067, China)

Abstract: Quadratic general rotary design of tetra-factor is employed to optimize the extraction of pigment from corn cob on the basis of mono-factor tests with a purple corn cob as raw materials in order to obtain good yield. The results showed that the yield of primary product of the purple corn cob reached available 6.88% under the condition of 40 °C leaching temperature, 60:1 ratio of liquid-to-solid, 60% ethanol volume fraction, 80 mesh particle diameter, and 3 h extraction time. Furthermore, the color value reached 14.

Key words: quadratic general rotary design; purple corn cob pigment; extract; optimization

责任编辑: 田 静