

大孔树脂纯化番石榴多酚的工艺优化

曹增梅, 黄 和*

(广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

摘 要:考察大孔吸附树脂对番石榴多酚的吸附性能和纯化效果, 确立番石榴多酚纯化的较优工艺。通过吸附、解吸实验, 筛选出适合分离纯化番石榴多酚的大孔树脂, 并确立其纯化工艺参数。结果表明, NKA-9 是纯化番石榴多酚的最佳树脂, 较佳吸附条件为上样多酚浓度为 1.2mg/mL, pH2.0, 上样速率为 1mL/min, 吸附率达到 90.5%; 较佳的洗脱条件为乙醇浓度 50%, pH3.0, 洗脱速率 1mL/min, 解吸率为 89.3%。

关键词:番石榴, 多酚, 大孔吸附树脂, 纯化

Optimization of purification process of Guava polyphenols with macroporous absorbent resin

CAO Zeng-mei, HUANG He*

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract:To find a better method to separate and purify polyphenols in Guava, the absorption capability and purification effect of polyphenols of Guava on macroporous absorption resin were evaluated. Adsorption and desorption experiments were carried out to screen the suitable macroporous absorbent resin for Guava polyphenols. Results showed that NKA-9 was the best macroporous resin for purification. The optimum absorption condition of macroporous resin NKA-9 were concentration of feeding 1.2mg/mL, pH2.0, feeding rate 1mL/min. Under this condition, the absorption ratio was 90.5%, the desorption conditions were ethanol concentration 50% pH3.0, elute rate 1mL/min. Under this condition, the desorption ratio was 89.3%.

Key words: Guava; polyphenols; macroporous absorbent resin; purification

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)05-0215-04

番石榴 (*Psidium guajava* L.), 又名鸡矢果、拔子, 属于桃金娘科 (*Myrtaceae*), 番石榴属 (*Psidium*), 常绿多年生的灌木植物, 现在台湾、广东、广西、福建省等省均有栽培^[1]。植物多酚是一种具有多羟基化合物的总称, 具有抗氧化、抗病毒、抑菌消炎等功效^[2]。已有研究表明番石榴中含有没食子酸、儿茶素、槲皮素、香草酸等多种多酚类物质, 具有较强的抗氧化功能^[3], 但目前对番石榴多酚的研究较少, 尚无番石榴多酚纯化方面的研究报道, 可见对番石榴中多酚类物质的研究很有必要。大孔树脂是一类不溶于酸、碱和各种有机溶剂, 具有较好吸附性的有机高分子聚合物, 具有物理化学稳定性高、比表面积大、吸附量大、选择性好、吸附速度快等优点^[4], 近年来大孔树脂在黄酮、多酚等活性物质的分离纯化的应用越来越广泛^[5-6]。本文通过考察大孔树脂对番石榴多酚的纯化效果, 通过吸附、解吸实验, 选择适宜的树脂, 并对其分离纯化工艺进行优化。

1 材料与方 法

收稿日期: 2012-09-14 * 通讯联系人

作者简介: 曹增梅 (1987-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事农产品加工与保藏。

基金项目: 广东省科技计划项目 [2012]145 号。

1.1 材料与仪器

番石榴 购于湛江爱佳超市, 产地湛江; 大孔树脂 AB-8、S-8、D101、NKA-9 上海摩速科学器材有限公司; 大孔树脂 HP-20 日本三菱化学公司; 其他试剂 均为国产分析纯。

KQ-500DB 数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; RE-3000A 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; 722S 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; BL-620S 电子天平 日本 SHIMADZU 公司; SIGMA3-18K 高速冷冻离心机 北京博励行仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品溶液的制备 番石榴清洗、打浆, 用 40% 的乙醇溶液, 在料液比 1:30 的条件下超声提取 30min, 提取液离心, 取上清液旋转蒸发去除溶剂, 得番石榴多酚粗提液, 蒸馏水稀释至相应浓度得多酚样品液, 冷藏备用。

1.2.2 多酚含量的测定 以没食子酸为标准品, 采用 Folin-ciocalteu (FC) 法测定番石榴中多酚总含量^[7], 称取没食子酸 0.05g, 用蒸馏水溶解并定容至 1000mL, 得浓度为 0.05mg/mL 的标准液, 准确吸取 0、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8mL 置于 50mL 的棕色容量瓶中, 分别加入 FC 试剂 4.0mL, 混匀, 在 0.5~5min 内加入 4mL 10% Na₂CO₃ 溶液, 充分混合后定容, 室温下

避光放置 1h, 以不加标准液的溶液为空白对照, 在 760nm 波长下测定吸光度值, 每个样品平行测定 3 次。

1.2.3 大孔树脂的预处理 树脂分别用 95% 乙醇浸泡 24h, 充分溶胀, 用倾倒法去除上浮的树脂碎片和杂物, 更换乙醇浸泡, 直至上清液加适量水后无混浊, 再用 1mol/L HCl 溶液浸泡 8h, 蒸馏水冲洗至中性, 然后用 1mol/L NaOH 溶液浸泡 8h, 最后用蒸馏水冲洗至中性, 备用。

1.2.4 大孔树脂静态吸附与解吸

1.2.4.1 静态吸附实验 准确称取 1.0g 湿树脂于 50mL 锥形瓶中, 加入样品溶液 10mL, 置于摇床上振荡 12h, 过滤, 测定滤液中多酚的含量, 根据以下公式计算吸附量、吸附率, 考察样品溶液的 pH 对树脂吸附性能的影响。

$$Q = (C_0 - C_1) \times V / W \quad \text{式(1)}$$

$$A(\%) = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: Q 为吸附量, mg/g; A 为吸附率, %; C_0 为起始浓度, mg/mL; C_1 为平衡浓度, mg/mL; V 为吸附溶液体积, mL; W 为树脂重量, g。

1.2.4.2 静态解吸实验 将充分吸附后的树脂用蒸馏水清洗至树脂表面无提取溶液残留, 用滤纸吸干水分, 加入乙醇溶液 30mL, 置于摇床上振荡 12h, 充分解吸后过滤, 测定滤液中多酚含量, 按式(3)计算解吸率, 考察洗脱液的浓度和 pH 对树脂洗脱性能的影响。

$$B(\%) = (C_2 \times V) / (W \times Q) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: B 为解吸率, %; C_2 为解吸液中多酚浓度, mg/mL; V 为吸附溶液体积, mL; W 为树脂重量, g; Q 为吸附量, mg/g。

1.2.5 大孔树脂动态吸附与解吸 将预处理好的大孔树脂湿法装入玻璃层析柱 (1.6cm × 40cm) 中, 蒸馏水平衡后, 将样品溶液以一定的流速上柱并收集流出液, 每 4mL 为一管, 根据流出液的浓度, 计算多酚动态吸附率, 考察样品溶液流速、样品溶液浓度等因素对树脂吸附性能的影响, 确定最佳吸附工艺条件。

对已吸附饱和的树脂进行洗脱实验, 用蒸馏水洗至无还原糖, 以一定的流速用适当浓度的乙醇溶液进行洗脱, 收集洗脱液, 通过计算解吸率, 考察洗脱液体积、洗脱流速等对树脂洗脱性能的影响, 确定最佳洗脱条件。按优化后的条件上柱, 吸附、洗脱, 收集洗脱液, 绘制动态洗脱曲线, 合并含量高的洗脱液, 制成番石榴多酚粉末, 计算回收率和纯度。

$$R(\%) = C_2 V_2 / C_0 V_0 \times 100 \quad \text{式(4)}$$

$$P(\%) = C_2 V_2 / M \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: R 为回收率, %; C_0 为粗提液多酚的起始浓度, mg/mL; V_0 为上样液的体积, mL; C_2 为洗脱液中多酚浓度, mg/mL; V_2 为洗脱液体积, mL; M 为多酚样品的重量 (干重), mg; P 为样品中多酚的纯度。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

以没食子酸在反应体系中的质量浓度为横坐标

(x , $\mu\text{g/mL}$), 吸光度值为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 见图 1。得到的回归方程为: $y = 0.11x + 0.014$, $R^2 = 0.9994$, 说明该曲线具有较好的线性关系。

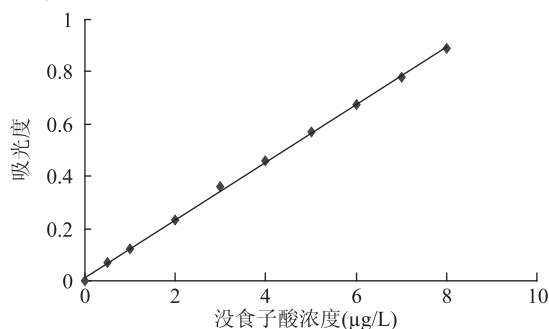


图 1 没食子酸标准曲线图

Fig.1 Standard curve of gallic acid

2.2 树脂筛选结果

大孔树脂的物理结构与化学性质不同, 对多酚的吸附和解吸效果也不同, 表 1 显示了 5 种大孔树脂对番石榴粗提液中多酚的静态吸附量、吸附率和解吸率。

表 1 5 种大孔树脂静态吸附和解吸性能的比较分析

Table 1 Static adsorption and desorption analysis of five macroporous resins

树脂型号	吸附量 (mg/g)	吸附率 (%)	解吸率 (%)
AB-8	11.0	51.8	84.6
D101	11.7	55.1	87.3
NKA-9	12.8	60.4	87.8
S-8	8.9	42.0	33.6
HP-20	9.8	46.2	93.0

由表 1 可知, 树脂 NKA-9 的吸附量明显高于其他树脂, 可能是因为 NKA-9 的极性与番石榴多酚的极性相近, 而且, NKA-9 的解吸效果较好, 故确定 NKA-9 为分离纯化番石榴多酚的最佳树脂。

2.3 静态吸附与解吸条件的优化

2.3.1 粗提液 pH 对树脂吸附效果的影响 吸附过程中吸附质以分子形态容易被吸附剂吸附, 因此吸附要达到较好的效果, 必须使吸附质保持分子状态^[8]。如图 2 所示, 当 pH 为 2 时, 树脂对多酚的吸附效果最好, 随着酸性减弱, 多酚的吸附量逐渐减少, 这是因为多酚具有酚羟基, 易于电离, 酸性条件保证多酚以分子形态存在, 故吸附效果好。

2.3.2 乙醇浓度对树脂解吸效果的影响 如图 3 所示, 随着乙醇浓度的提高, 解吸率逐渐增大, 当乙醇浓度达到 50% 后, 进一步增大乙醇浓度, 解吸率增加不明显, 这可能是由于解吸剂的极性在一定程度上影响吸附质的解吸^[9]。实验中为了减少试剂浪费, 节约成本, 选用 50% 的乙醇对番石榴多酚进行洗脱。

2.3.3 解吸液 pH 对解吸效果的影响 如图 4 所示, 随着解吸剂 pH 的增大, 解吸能力逐渐增强, pH 为 3.0 时达到最大, pH 继续升高, 解吸率反而下降。这可能是因为 pH 为 3.0 时, 树脂与多酚之间的相互作用较弱, 多酚易被洗脱。

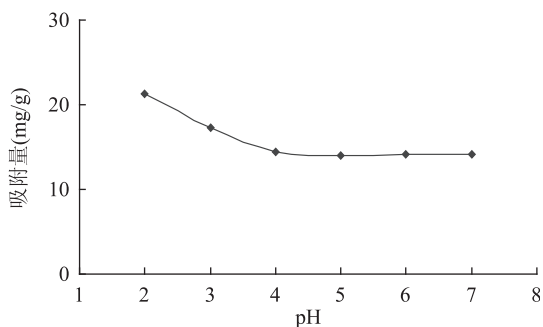


图2 pH对多酚吸附量的影响

Fig.2 Effect of pH on adsorption capacity of polyphenols

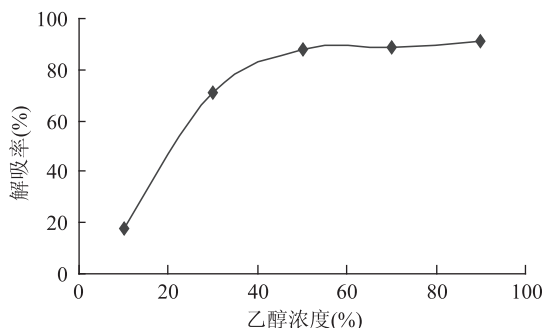


图3 乙醇浓度对多酚解吸率的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on adsorption rate of polyphenols

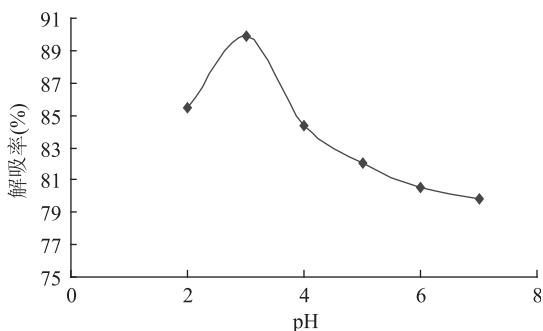


图4 pH对多酚解吸率的影响

Fig.4 Effect of pH on desorption rate of polyphenols

2.4 动态吸附与解吸条件的优化

2.4.1 上柱流速对树脂吸附效果的影响 一般来说上柱速度慢,有利于树脂对多酚的吸附,流速过快,样液中部分多酚物质会来不及扩散到树脂的内表面,就被冲出柱子,导致树脂对多酚物质吸附量降低,但流速过低,操作时间长,影响生产效率^[10]。如图5,随着流速的增加,多酚的吸附量逐渐降低,在0.5、1.0mL/min速率下,树脂的吸附率相差不大,因此选择速率为1.0mL/min。

2.4.2 上样浓度对树脂吸附效果的影响 一般来说,大孔树脂的吸附量一般与上样浓度成反比,低浓度有利于吸附^[11]。如图6所示,上样浓度较低时,吸附率变化不明显,随着上样浓度的增加,树脂的吸附率逐渐降低,所以吸附液浓度以1.2mg/mL为宜。

2.4.3 解吸剂流速对树脂解吸效果的影响 解吸流速一般要求慢,因为流速过快,解吸带宽,且拖尾严重,解吸不完全,但流速过慢,又会延长生产周期^[8],

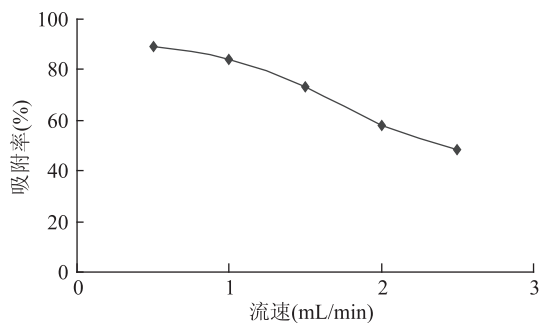


图5 流速对多酚吸附率的影响

Fig.5 Effect of flowing rate on adsorption rate of polyphenols

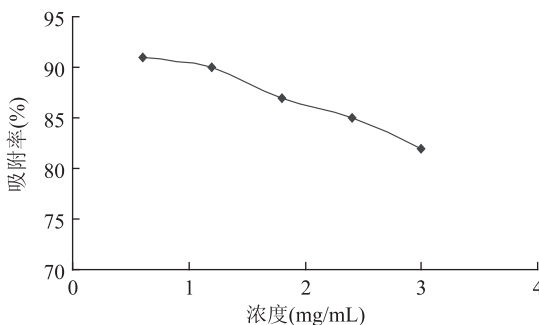


图6 多酚浓度对吸附率的影响

Fig.6 Effect of polyphenols concentration on adsorption rate

生产中应综合考虑。如图7所示,随着解吸速率的增加,解吸率逐渐下降,解吸速率为1mL/min时解吸效果较好,因此选择解吸剂流速为1mL/min。

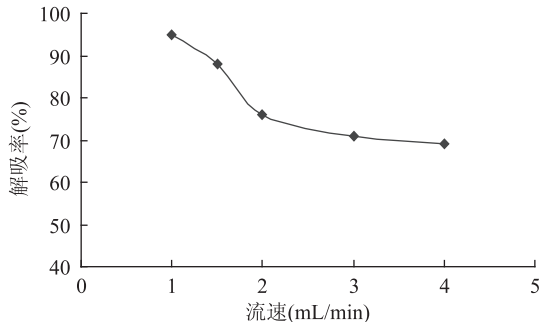


图7 流速对多酚解吸率的影响

Fig.7 Effect of flowing rate on desorption rate of polyphenols

2.4.4 动态洗脱曲线 如图8可以看出,NKA-9树脂上吸附的多酚物质极易洗脱,多酚的洗脱峰相对集中,对称,无拖尾现象。当洗脱量达到30管时,洗脱液中多酚含量已经很低,可认为已基本洗脱完全,因此,洗脱量为3BV 50%的乙醇。

2.5 验证实验

称取一定量的番石榴多酚粗提物,用蒸馏水溶解,按上述确定的优化工艺条件上柱、吸附、洗脱,收集流出液和洗脱液,经浓缩、干燥得精制番石榴多酚产品,重复3次实验,多酚的平均吸附率和解吸率分别为90.5%和89.3%,产品纯度为46.5%。

3 结论

3.1 通过静态吸附和解吸实验得出,NKA-9具有良好的吸附性能,是初步分离纯化番石榴多酚的优良材料。

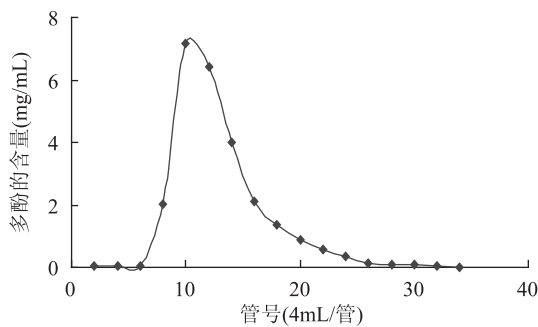


图8 NKA-9大孔树脂动态洗脱曲线

Fig.8 Dynamic elution curve of NKA-9 resin

3.2 当样液多酚浓度为 1.2mg/mL, pH 为 2 时,以 1.0mL/min 的流速上样, NKA-9 型树脂对番石榴多酚的吸附率最高, 达到 90.5%。

3.3 以 50% 的乙醇作为洗脱剂, pH 为 3, 洗脱速度为 1mL/min 时, 洗脱效果较好, 洗脱率可达 89.3%, 洗脱液经过冷冻干燥, 多酚纯度达到 46.5%。

参考文献

[1] 温靖, 徐玉娟, 肖更生, 等. 番石榴果实的营养价值和药理作用及其加工利用[J]. 农产品加工学刊, 2009(6): 11-13.

[2] 姚瑞祺. 植物多酚的分类及生物活性的研究进展[J]. 农产品加工学刊, 2011(4): 99-100.

[3] Melo PS, Bergamaschi KB, Tiveron AP, et al. Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues [J]. Ciencia Rural, 2011, 41(6): 1088-1093.

[4] 杜晓. 大孔树脂技术在中草药分离纯化中的应用[J]. 青海大学学报, 2012(1): 62-65.

[5] 熊何健, 吴国宏. 大孔树脂分离纯化葡萄多酚的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 128(11): 74-77.

[6] 周文亮, 孙蕴哲, 唐星. 大孔树脂纯化柿叶总黄酮工艺考察[J]. 中国药理学杂志, 2008, 6(5): 276-282.

[7] 姚瑞祺. 青果多酚的提取、分离及体外抗氧化活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2009.

[8] 周跃勇, 王岸娜, 吴立根. 大孔吸附树脂分离纯化猕猴桃中多酚的优选研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2007, 28(5): 32-36.

[9] 王振宇, 刘春平. 大孔树脂 AB-8 对苹果多酚的分离纯化[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(4): 21-24.

[10] 艾志录, 王育红, 王海, 等. 大孔树脂对苹果渣中多酚物质的吸附研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(8): 245-248.

[11] 刘丽香. 甘薯叶中多酚提纯工艺及抗氧化活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.

(上接第 201 页)

为培养时间 36.0h, 培养温度 31.0℃, 培养基 pH 为 5.1, 结果获得的抑菌圈直径为 (20.17 ± 0.24) mm, 与预测值的相对误差为 0.5%。原有发酵条件为培养时间 24.0h, 培养温度 30.0℃, 培养基 pH 为 6.0, 所得抑菌圈直径为 (15.86 ± 0.21) mm, 优化后发酵条件比原发酵条件提高了 27.2%。结果表明该响应面法优化得到的发酵条件稳定可靠。

3 结论

3.1 抑菌谱研究表明, 屎肠球菌 E6 发酵上清液能够抑制单增李斯特氏菌 (G^+)、大肠杆菌 (G^-)、金黄色葡萄球菌 (G^+) 和枯草芽孢杆菌 (G^-)。蛋白酶敏感性实验表明, 发酵上清液中具有抑菌活性的物质为蛋白质类化合物, 即细菌素, 且该细菌素对蛋白酶敏感, 对胰蛋白酶不敏感。该细菌素在酸性条件下有明显的抑菌活性, 经热处理 20min 后仍有抑菌活性, 但随着处理温度的升高, 抑菌活性有所降低。

3.2 响应面法优化并修正的屎肠球菌 E6 发酵条件为培养时间 36.0h, 培养温度 31.0℃, 培养基 pH 为 5.1, 该条件下发酵上清液抑菌圈直径达到 20.17mm, 比原有条件提高了 27.2%。本研究对屎肠球菌 E6 的进一步实际应用提供了科学基础。

参考文献

[1] Jacob F, Lwaff A, Siminonvich A, et al. Definition de quelques terms relatifs à la lysogenie [J]. Annales de Institut Pasteur, 1953, 84: 222-224.

[2] Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate

immunity for food [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(10): 777-788.

[3] 田晓乐, 孟庆繁, 周杰, 等. 微生物防腐剂——细菌素的研究与应用[J]. 食品工业科技, 2004, 25(1): 120-123.

[4] Jiang Jie, Shi Bo, Zhu Deqiang, et al. Characterization of a novel bacteriocin produced by Lactobacillus sakei LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish [J]. Food Control, 2012, 23(2): 338-344.

[5] Dal Bello B, Coccolin L, Zeppa G, et al. Technological characterization of bacteriocin producing Lactococcus lactis strains employed to control Listeria monocytogenes in Cottage cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(1-2): 58-65.

[6] Cheigh Chan-Ick, Choi Hak-Jong, Park Hoon, et al. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. lactis A164 isolated from kimchi [J]. Journal of Biotechnology, 2002, 95(3): 225-235.

[7] Evrim Gunes Altuntas, Serap Cosansu, Kamuran Ayhan. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain Pediococcus acidilactici 13 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141(1-2): 28-31.

[8] 罗海, 唐洁, 汪静心, 等. 响应曲面法优化乳杆菌产细菌素的条件研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 163-166.

[9] 陈琳, 孟祥晨. 响应面法优化植物乳杆菌代谢产细菌素的发酵条件[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 176-180.

[10] 李玉锋, 唐洁, 车振明. 工科微生物学实验[M]. 成都: 西南交通大学出版社, 2007: 28-36.