

响应面法优化甘薯叶 SOD 的提取工艺

潘明, 谢仁有, 洪玉程

(四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要:采用 Design-Expert 软件的中心组合设计方法设计响应面实验, 优化甘薯叶中 SOD 提取工艺条件, 建立了数学模型, 得到了最优的提取工艺条件为打浆时间 2.4 min、液固比 3.6:1、pH 8.0, 在此条件下, SOD 的活性为 332.64 U/g 鲜重, 与模型预测值 350.24 U/g 鲜重的比较, 误差为 5.03%。

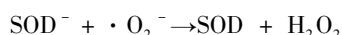
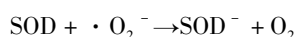
关键词:甘薯叶; SOD; 响应面法

中图分类号:TS201

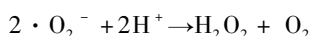
文献标识码:A

甘薯属旋花科, 一年生或多年生蔓生草本。我国甘薯的总产量和种植面积均居世界首位, 产量仅次于水稻、小麦和玉米, 在粮食作物中位居第四, 占世界甘薯产量的 80% 以上^[1]。在许多国家, 人们较重视甘薯地下部分块根的利用。我国每年大约有 480 亿公斤甘薯叶、50 亿公斤甘薯藤尖和 470 亿公斤甘薯藤, 除部分地区作为饲料外, 多数被抛弃掉^[2]。而甘薯叶部分品种叶片干物质中蛋白质含量可高达 30% 以上, 富含多种营养物质, 在日本、美国等国家被誉为“长寿菜, 蔬菜皇后”^[3-4], 具有很高的开发利用价值。

SOD(超氧化物歧化酶)是一种源于生命体的活性物质, 能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质, 具有抗衰老的特殊功能。SOD 分布广泛, 人们已从动物、植物、细菌、真菌、藻类等生物中分离得到 SOD^[5]。SOD 的等电点偏酸性, 为酸性蛋白质, 它对热、pH 和蛋白水解酶的稳定性比一般的酶要高^[6]。SOD 是生物体内脂肪氧化损伤的一种十分重要的金属酶, 它的作用底物是超氧阴离子·O₂⁻, 它催化超氧阴离子发生歧化反应, 从而清除·O₂⁻。其催化机理是^[7]:



总反应式为:



本文以甘薯叶为原料, 采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定超氧化物歧化酶, 对其提取工艺进行研究, 为甘薯叶的开发利用提供理论依据。

1 实验

1.1 材料、仪器与试剂

1.1.1 材料

冷冻新鲜甘薯叶。

1.1.2 主要仪器设备

UV2400 紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司), PS-1 高速匀浆机(金坛市白塔金昌实验仪器厂), pH S-3C 酸度计(成都世纪方舟科技有限公司), UNIVERSAL 32R 高速冷冻离心机(德国 Hettich), 微量进样器(上海逸采仪器有限公司), AR1140 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

1.1.3 主要试剂

50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.8), 130 mmol·L⁻¹甲硫氨酸(Met)溶液, 750 μmol·L⁻¹ NBT, 100 μmol·L⁻¹ EDTA-Na₂ 溶液, 20 μmol·L⁻¹核黄素溶液, 聚乙烯吡咯烷酮。

1.2 试验方法

1.2.1 SOD 的测定方法

超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法^[8], 酶活性以抑制 NBT 光还原的 50% 为一个酶活性单位。

1.2.2 响应曲面试验设计

通过对文献查阅及单因素试验确定出不同打浆时间、液固比及 pH, 甘薯叶 SOD 提取的较优范围, 利用 Box-Behnken 中心组合设计, 设计 3 因素 3 水平的响应

曲面试验。试验因素与水平见表1。

1.2.3 数据处理

使用 Design - Expert 7.1.6 软件分析。

表1 响应面因素与水平

水平	实验因素		
	打浆时间 (min)	液固比 (mL/g)	pH
-1	1	2:1	7
0	2	3:1	8
1	3	4:1	9

2 结果与分析

2.1 响应面因素及方差分析

根据 Box - Behnken 中心组合设计,综合单因素试验结果,对打浆时间、液固比、pH 进行 3 因素 3 水平的响应曲面分析试验,结果见表2。

表2 响应曲面实验结果

序号	打浆时间 (min)	液固比 (mL/g)	pH	SOD 活性 U/g 鲜重
1	3	3	7	271.61
2	2	3	8	321.93
3	1	4	8	253.46
4	3	3	9	263.15
5	2	3	8	321.93
6	2	3	8	321.93
7	2	2	9	135.13
8	2	4	9	309.42
9	2	4	7	297.99
10	2	2	7	137.62
11	3	4	8	324.11
12	1	3	7	223.14
13	1	3	9	227.45
14	2	3	8	321.93
15	3	2	8	164.78
16	2	3	8	321.93
17	1	2	8	140.22

对表2中数据进行回归分析,获得提取液中 SOD 活性对打浆时间、液固比、pH 的二次多项回归方程:

$$Y = -3016.19375 + 163.37500A + 407.77375B + 606.10375C + 11.52250AB - 3.19250AC + 3.48000BC - 37.49500A^2 - 63.79250B^2 - 38.09750C^2$$

为了检验模型的有效性,对模型进行方差分析结果表明,模型的 F 值为 124.51,说明模型非常有意义。该回归模型的总决定系数 $R^2 = 0.9938$,调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9858$,说明该模型的拟合程度较好,实验误差小。因此该回归方程模型成立,可以用此模型对提取 SOD 进行分析及预测。

由表3可知,提取甘薯叶 SOD 的工艺参数中,影响 SOD 活性的因素按主次顺序排列为:液固比 > 打浆时间 > pH。其中液固比(B)、打浆时间(A)达到极显著水

平,pH(C)没有统计显著性。考察因素间交互作用,由表3可知,液固比与打浆时间存在交互作用,达到显著水平。

表3 响应面法对提取 SOD 活性的 ANOVA 分析结果

因素	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	83014.78	9	9223.86	124.51	< 0.0001	**
A	4022.15	1	4022.15	54.30	0.0002	**
B	46091.03	1	46091.03	622.19	< 0.0001	**
C	2.87	1	2.87	0.039	0.8496	
AB	531.07	1	531.07	7.17	0.0317	*
AC	40.77	1	40.77	0.55	0.4823	
BC	48.44	1	48.44	0.65	0.4453	
A ²	5919.47	1	5919.47	79.91	< 0.0001	**
B ²	17134.67	1	17134.67	231.30	< 0.0001	**
C ²	6111.24	1	6111.24	82.50	< 0.0001	**
残差	518.55	7	74.08			
失拟	518.55	3	172.85			
纯误差	0.000	4	0.000			
总和	83533.33	16				

2.2 响应曲面图分析及最佳工艺确定

打浆时间与液固比、打浆时间与 pH、液固比与 pH 的响应曲面分别如图1~图3所示。由图1可见,液固比与打浆时间两因素的交互作用对甘薯叶 SOD 的提取有显著影响。随着打浆时间的增大,SOD 的活性呈现先增大后减少的趋势,当增加到 2.7 min 的时候,SOD 的活性达到最大,这可能的原因是随着打浆时间的增加,打浆越充分,当打浆时间过久时,破坏了少量蛋白质的结构,使 SOD 的活性也相应减少。随着液固比的升高,SOD 的活性呈增大的趋势。当液固比较低时,由于甘薯叶未与缓冲液充分接触,使 SOD 未被完全抽提,随着提取液的增加,甘薯叶与提取液接触充分,SOD 活性随之增加,当液固比达到 3.4 时,SOD 活性最大。如液固比继续增大时,SOD 活性无明显影响。说明液固比超过 3.4 时,对提取率的影响不大,反而原料消耗过多,也对后期处理不利。

从方差分析可以看出,打浆时间与 pH、液固比与 pH 两两之间交互作用不显著。

为了精确计算最佳工艺参数,对甘薯叶中 SOD 的提取的回归方程式中 3 个自变量分别求偏导并使其等于 0,可以解方程得最佳工艺参数:打浆时间 2.4 min、液固比 3.6:1、pH 8.0,最高 SOD 活性为 350.24 U/g 鲜重。

为检验响应面法优化对甘薯叶中 SOD 的提取的可靠性,采用优化后提取工艺条件进行验证实验,参考实际操作,将优化后工艺参数调整为打浆时间 2.4 min、液固比 3.6:1、pH 8.0,在此最佳条件下,SOD 的活性为 332.64 U/g 鲜重,与模型预测值的比较误差为 5.03%。

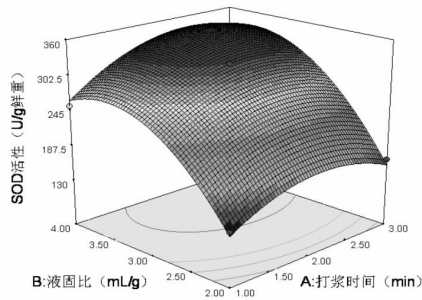


图 1 打浆时间与液固比响应曲面

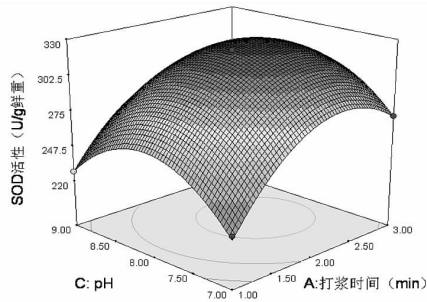


图 2 打浆时间与 pH 响应曲面

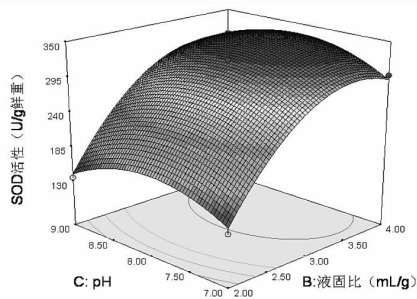


图 3 液固比与 pH 响应曲面

3 结束语

采用 Design - Expert 软件的中心组合设计方法设计响应面试验,建立了数学模型,得到了较优的提取工艺

条件,确定了影响的主次顺序为:液固比 > 打浆时间 > pH,其中液固比、打浆时间达到极显著水平。并结合响应面分析得到的数学模型,预测更优的工艺条件,并进行验证实验,最后确定最优工艺条件为打浆时间 2.4 min、液固比 3.6:1、pH 8.0,在此最佳条件下,SOD 的活性为 332.64 U/g 鲜重,与模型预测值 350.24 U/g 鲜重的比较误差为 5.03%。本实验通过部分因素对 SOD 活性影响的研究,为进一步的 SOD 的纯化提供了条件,也为甘薯叶的其它研究提供了部分理论依据。

参考文献:

- [1] 何伟忠,木泰华.我国甘薯加工业的发展现状概述[J].食品研究与开发,2006,127(11):176-180.
- [2] 王丽娟,王琴,温其标.我国甘薯产业的发展状况[J].粮食加工,2008,33(1):13-15.
- [3] Hiroshi Ishida,Hiroko Suzuno,et al.Nutritive evaluation on chemical components of leaves,stalks and stems of sweet potatoes(Ipomoea batatas poir)[J].Food Chemistry,2000,68:359-367.
- [4] 王世宽,吴平,许艳丽,等.甘薯叶的营养成份与应用前景[J].四川理工学院学报:自然科学版,2009,6:57-59.
- [5] 庞凌云.蝗虫蛋白质的分类、组成及其 SOD 的研究[D].陕西:陕西师范大学,2005.
- [6] 刘小兰,刘晓红,张欣,等.Mn-SOD 与 Fe-SOD 的结构和催化机理研究进展[J].有机化学,2003,23(1):30-36.
- [7] 王海灵.玉米超氧化物歧化酶(SOD)提取及纯化技术的研究[D].吉林:吉林农业大学,2007.
- [8] 萧浪涛,王三根.植物生理学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2005.
- [9] Salin M L,Oesterhelt D.Purification of a manganese-containing superoxide dismutase from Halobacterium halobium[J].Arch Biochem Biophys,1998,260(2):806-810.

Optimization of Extraction Technology of the Sweet Potato Leaves SOD by Response Surface Methodology

PAN Ming, XIE Ren-you, HONG Yu-cheng

(School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: On the basis of the previous results, response surface design is adopted by the Design-expert software according to the central composite design principle for studying the extracting condition of SOD in sweet potato leaves. The optimal extracting conditions are: beating time 2.4 min and liquid-to-solid ratio 3.6:1 and pH 8.0. Under these conditions, the yield of SOD is 332.64 U/g and the model prediction is 350.24 U/g,so the error is 5.03%.

Key words: sweet potato leaves; Superoxide dismutase (SOD); response surface methodology