

钟宜辰,彭颖,张珮珮,等. 响应面优化‘不知火’柑橘果肉渣中结合酚的碱法提取工艺[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 133-140.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.02.017

响应面优化‘不知火’柑橘果肉渣中结合酚的碱法提取工艺

钟宜辰, 彭颖, 张珮珮, 潘思轶

华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为提高‘不知火’柑橘果肉渣中酚类物质的利用价值, 采用已去除游离酚的‘不知火’柑橘果肉渣作为原料, 首先比较了不同溶剂提取对结合酚含量的影响, 其次通过单因素试验和响应面分析法优化结合酚的碱法提取工艺, 最后利用 HPLC 法分别检测结合酚与游离酚中单体酚的种类和含量。结果发现: NaOH 溶液作为提取溶剂对结合酚的提取效果相对最好; 液料比 22 : 1 (mL/g)、NaOH 浓度 4.1 mol/L、碱解时间 3.2 h 时, 结合酚含量达 356.51 mg/100 g; 游离酚提取液中检测出 10 种单体酚, 其中橙皮苷的含量最高(284.44 $\mu\text{g/g}$), 阿魏酸则未被检测到; 结合酚提取液中检测出 8 种单体酚, 柚皮苷二氢查尔酮的含量最高(297.29 $\mu\text{g/g}$), 阿魏酸含量高达 128.07 $\mu\text{g/g}$, 而绿原酸、原儿茶酸未被检测到。综上表明, 结合酚的酚酸组成丰富, 酚酸含量明显高于游离酚, 尤其是阿魏酸含量。

关键词 柑橘; 果肉渣; 结合酚; 游离酚; 响应面法; 碱法提取

中图分类号 TS 255.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)02-0133-08

‘不知火’(*Citrus reticulata* cv), 又称为丑橘、丑柑, 属于芸香科柑橘属植物, 在我国四川、云南、湖南、湖北等地均有种植^[1]。因其外形奇特、营养丰富而广受消费者喜爱。为追求口感, ‘不知火’被榨成柑橘汁后, 果肉渣常常被过滤后丢弃, 浪费了果肉中的营养物质。

酚类物质是‘不知火’柑橘果肉中的一种功能性成分, 能够在人体中发挥抗氧化、抗炎、抗菌^[2-3]作用, 具有预防心血管疾病、糖尿病、肥胖、癌症^[4-5]的作用, 可应用于食品、医药等行业^[6-7]。

酚类物质可分为游离酚和结合酚, 前者主要以游离态存在于植物液泡中; 后者主要与细胞壁结构中的多糖、果胶、纤维素等大分子物质结合^[8-9], 导致其提取过程较复杂, 在酚类物质的相关研究中常被忽略。Arranz 等^[10]研究桃、苹果时发现, 新鲜水果中结合酚含量(112~126 mg/100 g)显著高于游离酚含量(18.8~28.0 mg/100 g)。Chandrasekara 等^[11]和 Das 等^[12]在研究谷粒、玉米中酚类物质的抗氧化性时均发现, 结合酚的抗氧化能力强于游离酚。由此可见, 结合酚具有重要的研究价值, 有必要探究不同的方法提取柑橘果肉中的结合酚物质。

化学法是最常见的结合酚提取方法, 又分为碱法和酸法^[13]。碱法可以破坏酚类物质与植物细胞壁间的醚键与酯键^[14], 而酸法则主要作用于糖苷键^[15]。目前已有不少研究涉及到柑橘皮渣的回收利用, 却鲜少有利用柑橘果肉渣提取结合酚物质的相关研究。

本研究将已去除游离酚的‘不知火’果肉渣作为原料, 首先比较了不同酸、碱溶剂对柑橘果肉渣中结合酚的提取效果, 其次通过单因素试验和响应面试验优化了结合酚的提取工艺, 最后利用 HPLC 法分别检测结合酚与游离酚中单体酚的种类和含量, 从而为柑橘果肉渣结合酚的回收利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜‘不知火’柑橘, 购自武汉中百超市, 榨汁机榨汁后过滤, 收集残渣, 真空冷冻干燥后粉碎过孔径 0.425 mm 筛, 收集至自封袋中, 放置于干燥皿中避光保存备用。

甲醇、氢氧化钠、盐酸、乙酸乙酯、碳酸钠、福林-酚试剂、没食子酸标准品均为国产分析纯; 橙皮苷、

收稿日期: 2019-05-31

基金项目: 湖北省技术创新专项(109-409116012)

钟宜辰, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工. E-mail: Expectopatronumzyc@163.com

通信作者: 潘思轶, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工. E-mail: pansiyi@mail.hzau.edu.cn

新橙皮苷、地奥司明、柚皮苷二氢查尔酮、槲皮素、山奈酚、芦丁、没食子酸、咖啡酸、阿魏酸、绿原酸、原儿茶酸,均为色谱纯,购自上海源叶生物科技有限公司;色谱级甲醇、乙腈、甲酸,均购自美国 fisher 公司。

1.2 仪器与设备

高速万能粉碎机,浙江屹立工贸有限公司;冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;电子天平,奥豪斯仪器有限公司;水浴恒温振荡器,天津市欧诺仪器仪表有限公司;低温高速离心机,日本日立公司;旋转蒸发仪,上海贤德生化仪器厂;酶标仪,奥地利 TECAN 公司;Waters2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;超声波清洗仪,上海安亭科学仪器厂;榨汁机,浙江苏泊尔股份有限公司。

1.3 试验方法

1)游离酚的提取。称取 1.0 g ‘不知火’柑橘果肉渣粉末与 40 mL 的 80% 甲醇溶液(4℃预冷),超声提取 15 min(25℃、70 W),冷冻离心 20 min(4℃、8 000 r/min),弃去上清液。同样的方法反复提取 3 次,将提取液用旋转蒸发仪 45℃真空浓缩至干,用经预冷的甲醇复溶,定容至 10 mL 备用^[16-17]。最终沉淀物经真空冷冻干燥后,粉碎过孔径 0.425 mm 筛,置于一80℃冰箱避光保存备用。

2)结合酚的提取。称取 1.0 g 已去除游离酚的‘不知火’柑橘果肉渣粉末,加入一定体积、一定浓度的 NaOH 溶液,在 40℃下避光振荡消化一定时间,消化结束后,加入 6 mol/L 盐酸溶液调节 pH=2.0±0.2,离心 15 min(8 000 r/min、4℃),取酸性上清液,沉淀用 10 mL 超纯水洗涤,离心取上清液,与酸性上清液混合,加入等体积的乙酸乙酯重复萃取 5 次,合并有机相,旋转蒸发仪 45℃真空浓缩至干,用经预冷的甲醇复溶,定容至 10 mL 备用^[18-19]。

3)不同试剂对‘不知火’柑橘果肉渣结合酚提取量的影响。根据本文“1.3 2)”所述工艺,将各参数固定为:液料比 40:1(mL/g),提取时间 4 h。分别使用质量分数为 10% NaOH 溶液、10% 硫酸溶液、10% 盐酸溶液,以及体积比为 1:9 的硫酸-甲醇溶液、盐酸-甲醇溶液 5 种溶剂提取结合酚,考察不同溶剂对提取液中结合酚含量的影响。

1.4 结合酚提取量的测定

参考 Singleton 等^[20]的方法并稍有改动。以没食子酸为标准品,配制成 10、20、30、40、50、60 μg/mL 标准溶液。取 400 μL 的标准液于试管,加入

1.0 mL 福林酚试剂,漩涡振荡,避光放置 5 min 后加入 2 mL 5% 碳酸钠溶液,加入 6.6 mL 蒸馏水。漩涡振荡混匀后,室温避光放置 90 min,750 nm 下测定吸光值,制成标准曲线。所得标准曲线回归方程: $y=2.946x-0.0023$, $R^2=0.9979$ 。式中: x 代表待测样品中结合酚的质量浓度,mg/mL; y 代表样品在 750 nm 处的吸光度。

取 400 μL 的样品液,参照上述标准曲线制作方法进行测定,通过标准曲线计算样品中结合酚的质量浓度,并按下式计算样品的结合酚提取量(mg/100 g):

$$\text{结合酚提取量} = \frac{\text{样品中结合酚质量浓度} \times \text{样液体积}}{\text{原料质量}}$$

1.5 单因素试验

单因素试验中各因素水平固定为:液料比 40:1(mL/g),NaOH 溶液浓度 2 mol/L,提取时间 4 h。根据本文“1.3 2)”所述工艺,改变其中 1 个因素,分别考察其他因素对提取液中结合酚含量的影响。各因素试验范围为液料比 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1(mL/g),NaOH 溶液浓度 1、2、3、4、5 mol/L,提取时间 1、2、3、4、5、6 h。每组试验重复 3 次,以确定各因素的适当范围。

1.6 响应面优化试验

在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 试验设计,以液料比(A)、提取溶剂浓度(B)、提取时间(C)为自变量,结合酚提取量(Y)为响应值进行 3 因素 3 水平的中心组合试验,具体因素与水平见表 1,每组试验重复 3 次。

表 1 中心组合试验因素与水平

Table 1 Factor and level of independent variables used in central composite experiments

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
液料比(A)/(mL/g) Liquid to material ratio	10:1	20:1	30:1
NaOH(B)溶液浓度/(mol/L) NaOH concentration	3	4	5
碱解时间(C)/h Alkaline hydrolysis time	2	3	4

1.7 HPLC 法测定单体酚的种类和含量

准确称取 12 种单体酚标准品,各 1.0 mg,用甲醇溶解并定容至 10 mL,配置成酚类物质混标储备液,置于一20℃冰箱备用。将混标储备液稀释成不同浓度梯度,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐

标,绘制每种单体酚的标准曲线。

另将12种单体酚分别配成标准溶液,确定每种单体酚的保留时间。

采用 Waters2695 高效液相色谱仪测定,ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱。参考 Liu 等^[21]及苏东晓^[22]的色谱条件并稍有改动:柱温 30℃,流速 1.0 mL/min,进样量 20 μ L,二极管阵列检测器,波长分别为 260、283、320、367 nm。流动相组成:乙腈(A)和 0.1%甲酸超纯水(B)。有机相洗脱梯度:0~40 min,5%~25% A;40~45 min,25%~35% A,45~50 min,35%~50% A;50~60 min,50%~25% A;60~65 min,25%~5% A。平衡时间 5 min。通过与标准品保留时间比较,确定色谱峰所属化合物种类,根据峰面积计算化合物含量, μ g/g。

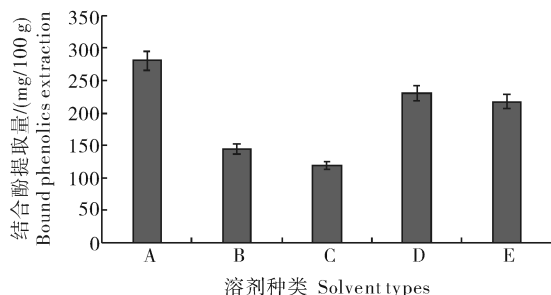
1.8 数据处理

运用 Excel 和 Design-Expert8.0 软件对数据进行分析 and 处理。

2 结果与分析

2.1 不同溶剂对‘不知火’果肉渣中结合酚提取效果的比较

分别对比了不同的酸、碱溶剂对‘不知火’果肉渣中结合酚的提取效果。由图 1 可知,10% NaOH 溶液提取的结合酚显著高于其他酸性溶剂。原因可能是碱性溶剂对醚键和酯键的破坏力很强,而酸性溶剂虽可破坏糖苷键,但对醚键、酯键的破坏力极弱。根据试验结果,选择 10% NaOH 溶液作为单因素试验的提取溶剂。



A:10% NaOH 溶液; B:10% 硫酸溶液; C:10% 盐酸溶液; D: 硫酸-甲醇溶液(体积比 1:9); E: 盐酸-甲醇溶液(体积比 1:9)
A:10% NaOH solution; B:10% sulfuric acid solution; C:10% hydrochloric acid solution; D:Sulfuric acid-methanol solution(V/V = 1:9); E:Hydrochloric acid-methanol solution(V/V = 1:9)

图 1 溶剂种类对结合酚提取量的比较

Fig.1 Comparison of solvent types for bound polyphenols extraction

2.2 单因素试验

1) 液料比对结合酚提取量的影响。由图 2 可知,在液料比 10:1~20:1 (mL/g)内,随着液料比的增加,结合酚的提取量呈上升趋势。在液料比为 20:1 (mL/g)时,结合酚提取量达到最高点。之后,随着液料比的增加,结合酚提取量逐渐减少。分析原因可能是,当液料比较低时,溶剂无法将样品充分浸透,样品未被提取完全,随着液料比的增加,样品中的结合酚逐渐被释放,提取量上升,但液料比过大时,被释放出的结合酚又随即被溶剂降解,故其提取量反而降低。故根据结果,选择液料比 10:1、20:1、30:1 (mL/g)这 3 个水平进行响应面试验。

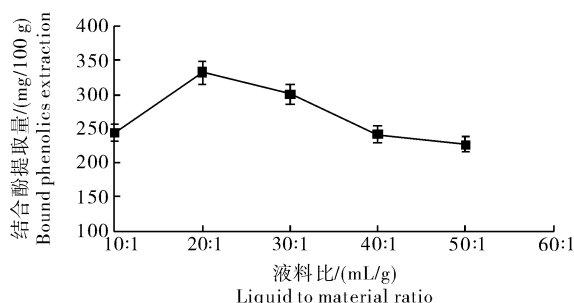


图 2 液料比对结合酚提取量的影响

Fig.2 Effect of solvent-to-solid ratio on bound polyphenols extraction

2) NaOH 溶液浓度对结合酚提取量的影响。由图 3 可知,NaOH 溶液浓度在 1~4 mol/L,随着 NaOH 溶液浓度的增加,NaOH 溶液对于结合酚与纤维素、多糖等大分子物质之间的结合键的破坏力加强,结合酚的提取量呈增加趋势。在 NaOH 溶液浓度为 4 mol/L 时,结合酚提取量达到最高点。随着 NaOH 溶液浓度继续增加,不仅不利于酚类物质的释放,而且释放出的酚类物质在强碱的环境下无法稳定存在,导致结合酚提取量减少^[23]。故选择 NaOH 溶液浓度 3、4、5 mol/L 这 3 个水平进行响应面试验。

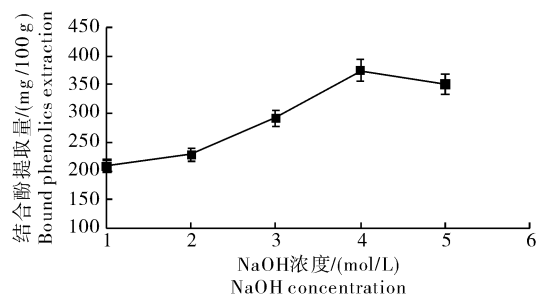


图 3 NaOH 溶液浓度对结合酚提取量的影响

Fig.3 Effect of NaOH solution concentration on bound polyphenols extraction

3)碱解时间对结合酚提取量的影响。由图 4 可知,在碱解时间 1~3 h 内,根据浸提动力学,随着碱解时间的延长,结合酚的提取量呈增加趋势。在碱

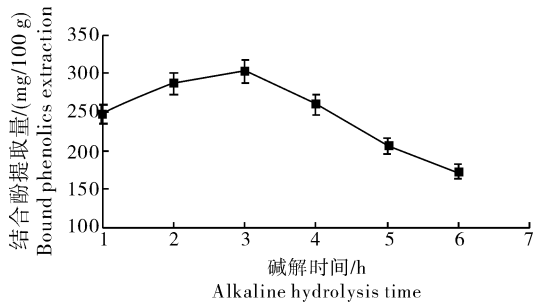


图 4 碱解时间对结合酚提取量的影响
Fig.4 Effect of alkaline hydrolysis time on bound polyphenols extraction

解时间为 3 h 时,碱解基本完成,结合酚提取量达到最高点。随后已被释放出的结合酚被氧化^[24],同时溶剂中的水分蒸发导致液料比及溶剂浓度均发生变化,导致结合酚提取量随着碱解时间的延长逐渐减少。故选择碱解时间 2、3、4 h 这 3 个水平进行响应面试验。

2.3 响应面优化试验

综合单因素试验结果,选择 NaOH 溶液作为单因素试验的提取溶剂,根据 Box-Behnken 设计原理,确定了液料比、NaOH 溶液浓度、碱解时间 3 个因素 3 个水平进行响应面试验,结果见表 2。并对试验数据进行响应面分析,得出回归模型方差分析及最优碱解提取工艺,分别见表 3 及图 5。

表 2 响应面试验结果

Table 2 Test results of response surface methodology

序号 Number	A 液料比 Liquid to material ratio	B NaOH 溶液浓度 NaOH solution concentration	C 碱解时间 Alkaline hydrolysis time	结合酚提取量/ (mg/100 g) Bound phenolics extraction
1	-1	-1	0	249.33
2	1	-1	0	308.79
3	-1	1	0	296.11
4	1	1	0	293.69
5	-1	0	-1	261.55
6	1	0	-1	285.54
7	-1	0	1	278.75
8	1	0	1	311.34
9	0	-1	-1	264.27
10	0	1	-1	282.82
11	0	-1	1	300.20
12	0	1	1	309.53
13	0	0	0	370.54
14	0	0	0	346.23
15	0	0	0	353.34
16	0	0	0	356.47
17	0	0	0	360.61

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of square	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
回归模型 Regression model	22 094.98	9	2 455	45.81	<0.000 1	***
A	1 613.69	1	1 613.69	30.11	0.000 9	**
B	443.42	1	443.42	8.27	0.023 8	*
C	1 394.98	1	1 394.98	26.03	0.001 4	*
AB	957.28	1	957.28	17.86	0.003 9	*
AC	18.49	1	18.49	0.35	0.575 4	
BC	21.25	1	21.25	0.4	0.548 9	
A ²	5 979.3	1	5 979.3	111.58	<0.000 1	***
B ²	4 522.67	1	4 522.67	84.4	<0.000 1	***
C ²	5 294.07	1	5 294.07	98.79	<0.000 1	***
残差 Residual	375.12	7	53.59			
失拟项 Missing item	50.05	3	16.68	0.21	0.887 9	
纯误差 Pure error	325.07	4	81.27			
总误差 Total error	22 470.1	16				

注: * $P<0.05$,影响显著; ** $P<0.01$,影响极显著; *** $P<0.001$,影响高度显著。Note: * $P<0.05$,significant impact; ** $P<0.01$,extremely significant impact; *** $P<0.001$,highly significant impact.

响应面分析得出的回归方程为： $Y = 357.44 + 14.2X_1 + 7.45X_2 + 13.2X_3 - 15.47X_1X_2 + 2.15X_1X_3 - 2.31X_2X_3 - 37.68X_1^2 - 32.77X_2^2 - 35.46X_3^2$ ($R^2 = 0.9833$)。方程式中, X_1 、 X_2 、 X_3 、 Y 分别表示液料比、NaOH 溶液浓度、碱解时间、碱解结合酚提取量。

由表3可以看出,碱解结合酚提取量的回归模型 P 值 < 0.0001 , 高度显著, 失拟项 0.8879, 结合回归方程 $R^2 = 0.9833$, 可说明回归方程与模型的拟合程度良好, 回归方程能较好地预测结合酚提取量与各参数之间的关系, 同时反映液料比、NaOH 溶液浓度、碱解时间这三者的交互关系。

A 的 P 值小于 0.01, 表明液料比对碱解结合酚提取量的影响极显著; B、C 的 P 值小于 0.05, 表明

NaOH 溶液浓度、碱解时间对碱解结合酚提取量的影响显著。在各因素水平范围内, 根据 F 值可以判断各工艺条件对结合酚提取量的影响强弱, 其中 F 值越大, 说明作用影响越强。根据 A、B、C 及 A^2 、 B^2 、 C^2 的 F 值大小可知, 各因素对结合酚提取量的影响力从强到弱依次为: 液料比(A)、碱解时间(C)、NaOH 溶液浓度(B)。

响应面图是响应值与各因素所构成的三维空间的曲面图, 在 1 个因素条件固定不变的情况下, 考察其他 2 个因素交互作用下响应值的变化情况。利用 Design-Expert.8.0 软件分析试验所得数据, 得到的响应面及等高线图见图 5。

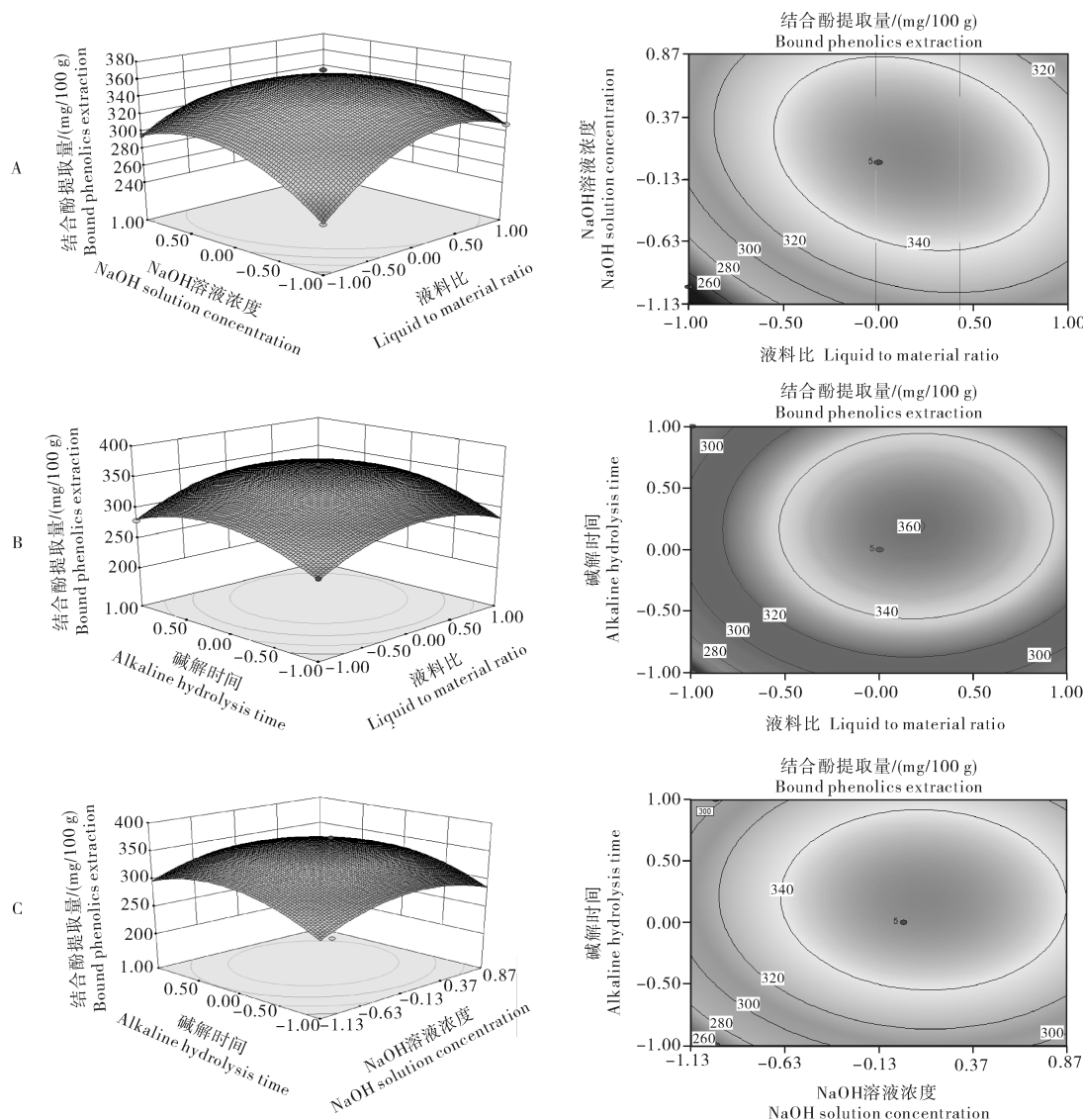


图5 液料比(A)、碱解时间(B)、NaOH 溶液浓度(C)的交互作用对碱解结合酚提取量的影响
Fig.5 Bound polyphenols extraction affected by the interaction of liquid to material ratio(A), alkaline hydrolysis time(B) and NaOH concentration(C)

由表 3 可知, AB 的 P 值小于 0.05。同样从图 5A 中可以直观看出, 液料比(A)与 NaOH 溶液浓度(B)之间存在显著的交互作用。随着液料比及 NaOH 溶液浓度的增加, 响应值(结合酚提取量)曲面呈现先上升后下降的趋势。液料比、NaOH 溶液浓度较小时, 等高线较密, 说明较低水平的液料比及 NaOH 溶液浓度对结合酚提取量的影响较大; 液料比、NaOH 溶液浓度较大时, 等高线较稀疏, 说明较高水平的液料比及 NaOH 溶液浓度对结合酚提取量的影响较小。

AC、BC 的 P 值均大于 0.05, 说明液料比(A)与碱解时间(C)、NaOH 溶液浓度(B)与碱解时间(C)之间的交互作用不显著。由图 5B、C 均可看出, 响应值(结合酚提取量)随着单因素值的上升而呈现先上升后下降的趋势, 但总体来说曲面较为平缓, 两两单因素之间均无明显交互作用。

3) 最佳工艺验证结果。响应面分析得出的最佳工艺参数为: 液料比为 21.8 : 1 (mL/g), NaOH 溶液浓度为 4.06 mol/L, 碱解时间为 3.19 h, 预测结合酚提取量为 360.21 mg/100 g。根据实际操作的情况将工艺参数调节为: 液料比为 22 : 1 (mL/g), NaOH 溶液浓度为 4.1 mol/L, 碱解时间为 3.2 h。在此工艺参数的基础上进行验证试验, 实际提取并测定 5 次, 最终测得的碱解结合酚提取量为 (356.51 ± 5.02) mg/100 g, 达到预测值的 98.97%, 说明优化后的工艺参数具有较强可行性。

2.4 ‘不知火’果肉渣中单体酚的种类和含量

由表 4 可知, 游离酚提取液中检测出 10 种单体酚, 结合酚提取液中检测出 8 种单体酚, 但种类和含量均有差异。游离酚提取液中主要含有橙皮苷、柚皮苷二氢查尔酮、山奈酚, 其中橙皮苷的含量最高, 达到 284.44 μ g/g; 结合酚提取液中主要含有橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷二氢查尔酮、芦丁、阿魏酸, 其中柚皮苷二氢查尔酮的含量最高(297.29 μ g/g), 但橙皮苷含量仅 14.93 μ g/g。游离酚提取液中的酚酸含量较少, 阿魏酸未被检测到。而结合酚中阿魏酸含量高达 128.07 μ g/g, 绿原酸、原儿茶酸未被检测到。原因可能是碱性条件下, 醚键与酯键均遭到破坏。通过醚键或酯键与细胞壁结构中蛋白质、多糖等大分子物质结合的羟基苯甲酸衍生物(没食子酸)、肉桂酸衍生物(阿魏酸、咖啡酸)被释放出来^[25-26]。而绿原酸、原儿茶酸未被检测到可能是因为原料的特性, 或已释放出的绿原酸、原儿茶酸在该

条件下被降解。总体来说, 游离酚中的黄酮总量较高, 结合酚中的酚酸总量较高。

表 4 ‘不知火’果肉渣中单体酚的种类和含量

种类 Types	游离酚 Free phenolics	结合酚 Bound phenolics
橙皮苷 Hesperidin	284.44 $\pm$ 9.77	147.93 $\pm$ 4.38
新橙皮苷 Neohesperidin	—	50.98 $\pm$ 0.84
柚皮苷二氢查尔酮 Naringin dihydrochalcone	171.15 $\pm$ 1.08	297.29 $\pm$ 1.07
地奥司明 Diosmin	52.23 $\pm$ 0.92	—
芦丁 Rutin	40.86 $\pm$ 0.28	103.37 $\pm$ 2.51
槲皮素 Quercetin	35.08 $\pm$ 0.46	49.08 $\pm$ 0.32
山奈酚 Kaempferol	181.65 $\pm$ 1.67	—
没食子酸 Gallic acid	33.68 $\pm$ 0.56	29.06 $\pm$ 0.37
咖啡酸 Caffeic acid	3.98 $\pm$ 0.07	19.24 $\pm$ 0.91
阿魏酸 Ferulic acid	—	128.07 $\pm$ 1.46
绿原酸 Chlorogenic acid	51.89 $\pm$ 0.33	—
原儿茶酸 Protocatechuic acid	19.91 $\pm$ 0.79	—

注: “—”表示未检测到。Note: “—” indicates none detected.

3 讨 论

提取结合酚时, 应根据原料的特性(例如细胞壁结构特性)及所需产物来选择提取溶剂^[27]。徐菲等^[28]研究不同溶剂对青稞结合酚的提取效果, 结果表明酸性溶剂水解得到的多酚质量分数在 5% 水平上显著高于碱性溶剂。张金宏等^[18](以苹果为提取原料)、Kim 等^[29](以麦麸为提取原料)均发现碱性溶剂对结合酚的提取效果优于酸性溶剂。本研究结果表明, 10% NaOH 溶液提取的结合酚提取量显著高于其他酸性溶剂。

结合单因素试验和响应面优化试验结果, 碱法提取‘不知火’柑橘果肉渣中结合酚的最佳工艺参数为: 液料比为 22 mL/g, NaOH 溶液浓度为 4.1 mol/L, 碱解时间为 3.2 h, 最终实际提取的碱解结合酚提取量达 (356.51 ± 5.02) mg/100 g, 达到预测值的 98.97%, 说明优化后的工艺参数具有较强可行性。

HPLC 检测结果显示, ‘不知火’柑橘果肉渣中的游离酚与结合酚的种类及含量均有较大差异, ‘不知火’柑橘果肉渣中的阿魏酸、咖啡酸、柚皮苷二氢查尔酮、芦丁多以结合态存在, 而山奈酚、橙皮苷、地奥司明、绿原酸多以游离态存在。综合表明, 游离酚主要由黄酮类组成, 酚酸含量极少。而结合酚的酚酸含量, 尤其是阿魏酸含量, 明显高于游离酚, 这与 Holtekjolen 等^[30]的研究结果相符。

本研究结果为‘不知火’柑橘果肉渣中酚类物质的深度利用提供了科学依据,优化后的工艺操作简单且高效。‘不知火’柑橘果肉渣的结合酚物质中,不仅酚酸类含量较游离酚高,而且组成丰富。未来需要进一步挖掘结合酚在预防人体糖尿病、癌症等方面的生物活性,及其对人体的代谢过程发挥的作用。

参考文献 References

- [1] 刘春荣, 吴雪珍, 郑雪良, 等. ‘不知火’品种的主要特性与栽培技术要点[J]. 浙江柑橘, 2016, 33(2):27-29. LIU C H, WU X Z, ZHENG X L, et al. Main characteristics and cultivation techniques of ‘dekopon’[J]. Zhejiang citrus, 2016, 33(2):27-29(in Chinese).
- [2] 张金宏. 苹果渣中游离酚和结合酚的提取及其功能特性的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016. ZHANG J H. Extraction of free and bound phenols in apple pomace and functional properties[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [3] FU L, XU B T, XU X R, et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits[J]. Food chemistry, 2011, 129(2):345-350.
- [4] SIAH S D, IZABELA K, SAMSON A, et al. *In vitro* investigations of the potential health benefits of Australian-grown faba beans (*Vicia faba* L.): chemopreventative capacity and inhibitory effects on the angiotensin-converting enzyme, α -glucosidase and lipase[J]. British journal of nutrition, 2012, 108(1):123-134.
- [5] YU L, ZHAO M, WANG J S, et al. Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana* Lamb) bark[J]. Innovative food science and emerging technologies, 2008, 9(1):122-128.
- [6] ARRANZ S, JOSE M S, SAURA-CALIXTO F. Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet[J]. Molecular nutrition & food research, 2010, 54(11):1646-1658.
- [7] FERREIRA C F R, CRISTINA C, ANDREIA R, et al. Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients[J]. Current pharmaceutical design, 2017, 23(19):2787-2806.
- [8] DE CAMARGO A C, REGITANO-D"ARCE M A B, GALLO C R, et al. Gamma-irradiation induced changes in microbiological status, phenolic profile and antioxidant activity of peanut skin[J]. Journal of functional foods, 2015, 12:129-143.
- [9] 王振宇, 孔子浩, 郑舒婷, 等. 天然结合酚的研究进展[J]. 中国调味品, 2017(11):147-152. WANG Z Y, KONG Z H, ZHENG S T, et al. Research progress of natural combined phenols[J]. China condiment, 2017(11):147-152(in Chinese with English abstract).
- [10] ARRANZ S, SAURA-CALIXTO F, SHALA S, et al. High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2009, 57(16):7298-7303.
- [11] CHANDRASEKARA A, SHAHIDI F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2010, 58(11):6706-6714.
- [12] DAS A K, SINGH V. Antioxidative free and bound phenolic constituents in botanical fractions of Indian specialty maize (*Zea mays* L.) genotypes[J]. Food chemistry, 2016, 201:298-306.
- [13] JARA P J, JOSEP L T. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 59(24):12713-12724.
- [14] ZHOU S, LIU X, GUO Y, et al. Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction[J]. Carbohydrate polymers, 2010, 81(4):784-789.
- [15] BENTO-SILVA A, PATTO M C V, DO R B, et al. Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls[J]. Food chemistry, 2017, 246:360-378.
- [16] 徐贵华, 胡玉霞, 叶兴乾, 等. 椪柑、温州蜜桔果皮中酚类物质组成及抗氧化能力研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11):171-175. XU G H, HU Y X, YE X Q, et al. Compositions of phenolic compound and antioxidant capacity in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort, ex Tanaka) and satsuma mandarin (*Citrus unshiu marc*) peels[J]. Food science, 2007, 28(11):171-175(in Chinese with English abstract).
- [17] DYNKOWSKA W M, CYRAN M R, CEGLIŃSKA, et al. Soluble and cell wall-bound phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in rye flour and five bread model systems: insight into mechanisms of improved availability[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2015, 95(5):1103-1115.
- [18] 张金宏, 李俊娥, 魏新元, 等. 苹果渣中结合酚不同提取方法的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(20):160-165. ZHANG J H, LI J E, WEI X Y, et al. Study on different extraction methods of bound phenol in apple pomace[J]. Science and technology of food industry, 2016, 37(20):160-165(in Chinese with English abstract).
- [19] FINOCCHIARO F, FERRARI B, GIANINETTI A, et al. Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing[J]. Molecular nutrition & food research, 2010, 51(8):1006-1019.
- [20] SINGLETON V L, ORTHOFER R, ROSA M L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. Methods in enzymology, 1999, 299:152-178.
- [21] LIU L, WEN W, ZHANG R, et al. Complex enzyme hydrolysis releases antioxidative phenolics from rice bran[J]. Food chemistry, 2017, 214:1-8.

- [22] 苏东晓. 荔枝果肉多酚的分离鉴定及其调节脂质代谢作用机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014. SU D X. Preparation and structure identification of litchi pulp polyphenols and research on the mechanism of their hypolipidemic effect[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014(in Chinese with English abstract).
- [23] ZHANG Z, SMITH C, LI W. Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: a critical review[J]. Food research international, 2014, 65:423-436.
- [24] 刘天行, 郭佳, 王伟, 等. 小米中结合型酚类化合物的分离与鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(1):138-142. LIU T X, GUO J, WANG W, et al. Isolation and identification of bound phenolic compounds in millet[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(1):138-142(in Chinese with English abstract).
- [25] 范金波, 蔡茜彤, 冯叙桥, 等. 咖啡酸体外抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(3):71-79. FAN J B, CAI X T, FENG X Q, et al. Study on antioxidant activity of caffeic acid *in vitro*[J]. Journal of Chinese institute of science technology, 2015, 15(3):71-79(in Chinese with English abstract).
- [26] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2):253-255. HU Y Y, XU X Y. Progress in chemical and pharmacological studies of ferulic acid[J]. Chinese traditional patent medicine, 2006, 28(2):253-255(in Chinese).
- [27] LI M, HECKWOLF M, CROWE J D, et al. Cell-wall properties contributing to improved deconstruction by alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis in diverse maize (*Zea mays* L.) lines[J]. Journal of experimental botany, 2015, 66(14):4305-4315.
- [28] 徐菲, 杨希娟, 党斌, 等. 酸法提取青稞麸皮结合酚工艺优化[J]. 农业工程学报, 2016, 32(17):301-308. XU F, YANG X J, DANG B, et al. Optimization of extraction process of barley bran combined with phenol by acid method[J]. Transactions of the Chinese society of agricultural engineering, 2016, 32(17):301-308(in Chinese with English abstract).
- [29] KIM K H, TSTO R, YANG R, et al. Pheonic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extract and the effect of hydrolysis conditions[J]. Food chemistry, 2006, 95(3):466-473.
- [30] HOLTEKJOLEN A K, KINITZ C, KNUTSEN S H. Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, 54(6):2253-2260.

Optimization of alkaline extraction process for bound phenolics from ‘dekopon’ citrus pulp residue

ZHONG Yichen, PENG Ying, ZHANG Peipei, PAN Siyi

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to improve the utilization value of bound phenolics from ‘dekopon’ citrus pulp residue, the ‘dekopon’ citrus pulp residue without free phenolics was used as raw materials. The effects of different solvent extractions on the content of bound phenolics were compared. Subsequently, the single-factor test and response surface analysis method were used to optimize the alkaline extraction process. And the type and content of monomeric phenol in bound phenolics and free phenolics were detected by HPLC method. The results showed that NaOH solution was the best extraction solvent for the extraction of bound phenolics. At a liquid-to-material ratio of 22 mL/g, NaOH concentration of 4.1 mol/L, and alkaline hydrolysis time of 3.2 h, the content of bound phenol reached 356.51 mg/100 g. Ten monomeric phenols were detected in the free phenolics extract, among which hesperidin was the highest (284.44 $\mu\text{g/g}$), and ferulic acid was undetectable. Eight monomeric phenols were detected in the combined phenol extract. The content of naringin dihydrochalcone was the highest (297.29 $\mu\text{g/g}$) and the content of ferulic acid reached as high as 128.07 $\mu\text{g/g}$. Chlorogenic acid, protocatechuic acid were undetectable. In summary, the phenolic acid composition of bound phenolics is rich, and the content of phenolic acid is significantly higher than that of free phenolics, especially the ferulic acid content.

Keywords citrus; pulp residue; bound phenolics; free phenolics; response surface; alkaline extraction

(责任编辑:赵琳琳)