

正交试验优化银条多糖超滤浓缩工艺

郎昌野¹, 马丽苹², 赵 琨¹, 曾晓雄^{1,*}

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2.河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要: 以膜通量为指标, 首先探讨操作压力、超滤温度和料液pH值3个工艺参数对超滤浓缩银条多糖的影响, 在此基础上通过正交试验确定超滤浓缩的最佳工艺参数, 最后通过测定清洗前后膜的水通量变化确定最佳的超滤膜清洗方法。结果表明超滤浓缩效果优于常规浓缩的效果, 超滤浓缩银条多糖的最佳工艺参数为操作压力0.35MPa、操作温度30℃、料液pH6.5; 最佳膜清洗方法为用40℃、pH8.5的NaOH溶液清洗0.5h, 此时清洗前后纯水的膜通量相差9.00L/(m²·h)。

关键词: 银条; 多糖; 超滤; 膜通量

Orthogonal Array Optimization of Ultrafiltration Concentration of Polysaccharides from Rhizomes of *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth

LANG Chang-ye¹, MA Li-ping², ZHAO Kun¹, ZENG Xiao-xiong^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: In this study, ultrafiltration conditions for the concentration of polysaccharide extracts from rhizomes of *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth were optimized by orthogonal array design based on membrane flux. Ultrafiltration allowed more effective concentration of polysaccharides from rhizomes of *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth than vacuum distillation, and the optimized ultrafiltration conditions were found to be 0.35 MPa, 30 °C and 6.5 for pressure, temperature and sample pH, respectively. Cleaning with pH 8.5 NaOH solution at 40 °C for 0.5 h was the best method for membrane cleaning, and the membrane flux was increased by 9.00 L/(m²·h) after cleaning.

Key words: *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth; polysaccharides; ultrafiltration; membrane flux

中图分类号: TS244

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)04-0051-04

植物多糖普遍存在于自然界中的植物体中, 具有调节机体免疫、抑制肿瘤、抗疲劳、降血糖血脂、抗病毒、抗氧化等生物活性^[1], 且具有毒副作用小、安全性高、疗效好等优点^[2]。银条是唇形科水苏属多年生蓄根草本植物*Stachys floridana* Schuttl. ex Benth的根状茎, 因其圆状细长, 肉质洁白, 酷似白银, 故名银条, 主产于华北、华南和新疆等地, 处于半野生状态, 而其地下根茎(银条)具有很高的食用和药用价值^[3]。作为蔬菜, 人工栽培主要集中在河南偃师, 占全国栽培总量的95%以上。据偃师县志记载, 自唐代以来, 银条就已作为历代宫廷贡品。近年, 银条还被添加到果冻和酸奶中以改善食品风味和提高食品营养价值^[4-5]。另外, 据报道^[6], 银条富含碳水化合物、多酚、VC、蛋白质和有机酸, 具有降血脂、软化血管和改善血液循环的作用。

鉴于银条多糖的文章报道较少, 而且大多都没考虑到银条中低聚糖(如水苏糖)对多糖测定的干扰, 故本实

验首先采用乙醇处理样品以去除脂类、单糖和部分低聚糖, 再采用热水浸提法提取银条多糖。热水浸提的溶液为了便于后续乙醇沉淀多糖, 需要进一步浓缩, 目前国内普遍都采用减压热浓缩的方法。但是减压热浓缩法耗能高, 且易引起活性物质的变性失活, 而超滤浓缩则不同, 不仅可以常温操作, 还可以进一步除去多糖溶液中的色素、单糖、低聚糖和多酚等小分子物质^[7-10]。因此, 本研究采用超滤方法浓缩银条多糖, 旨在确定银条多糖最佳的超滤工艺条件和最佳的超滤膜清洗条件, 为银条多糖的深入研究与应用开发提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

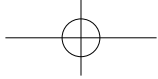
银条, 2009年12月购于偃师, 用去离子水清洗干净, 50℃烘干后, 粉碎过60目筛, 然后保存、备用; 苯酚、

收稿日期: 2012-03-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(KYZ201218); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 郎昌野(1988—), 男, 硕士, 研究方向食品工程。E-mail: 2011808095@njau.edu.cn

*通信作者: 曾晓雄(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向食品生物技术。E-mail: zengxx@njau.edu.cn



间羟联苯、盐酸等试剂均为分析纯；葡萄糖、葡萄糖醛酸标准品 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

Mini Pellicon超滤设备 密理博(中国)有限公司；HH-4型数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司；TDL-5型台式离心机 上海安亭科学仪器厂；Laborota-400型旋转蒸发器 德国Heidolph公司；SHB-III型循环水式真空泵 郑州长城科工贸有限公司；DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司；722S型可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

银条多糖的提取参照Ma Liping等^[11]等优化的银条多糖提取条件进行。先将银条干粉按液料比15:1用85%乙醇溶液在90℃条件下处理2次，每次1h，然后合并乙醇处理液，5000r/min离心10min，离心沉淀物50℃条件下烘干。烘干样品按液料比19:1用去离子水在94℃条件下提取4h，离心，并重复提取3次，合并离心收集得到的提取液，用于超滤浓缩。

1.3.2 银条多糖提取液的超滤

采用Mini Pellicon超滤设备将银条多糖提取液装入料液罐中，启动进料泵，料液进入超滤器，到达超滤膜超滤，截留液回到料液罐中，滤过液流入滤液罐中。通过调节流速和回流阀来控制操作压力。从而分离浓缩银条多糖。膜通量通常用单位时间内通过单位膜面积的透过物量 J_w 表示：

$$J_w/(L/(m^2 \cdot h)) = V/St$$

式中： V 为透过液的体积/L； S 为膜的面积/ m^2 ； t 为运转时间/h。

1.3.3 超滤条件的确定

1.3.3.1 超滤膜的选择

在室温下，依次采用各超滤膜(规格分别为0.1 μm 、100、50、10、3kD)对1200mL提取液进行超滤，对各超滤膜超滤所得200mL截留液用3500D透析袋透析至透析外液无糖为止，以去除各截留液中残余小分子糖的干扰；各部分透析液参考Dubois等^[12]的硫酸苯酚法测定糖含量，以葡萄糖为标准品作总糖含量标准曲线，得到线性回归方程 $Y=0.0087x-0.0209(R^2=0.9964)$ 。参考Blumenkrantz等^[13]的间羟联苯法测定糖醛酸含量，以葡萄糖醛酸为标准品作糖醛酸标准曲线，得到线性回归方程 $Y=0.0422x+0.0178(R^2=0.9966)$ ，以糖和糖醛酸含量确定最佳超滤膜。以各个膜分级后的糖(或糖醛酸)含量占未超滤前糖(或糖醛酸)含量的百分比表示。

1.3.3.2 超滤工艺参数的优化

设置用50kD的超滤膜、操作温度25℃、料液

pH7.0、操作压力0.3MPa，参考王旭清等^[14]、唐仕荣等^[15]的实验方法，分别固定其他条件，考察不同操作压力(0.1~0.35MPa)、操作温度(15~45℃)、料液pH值(5.5~8.0)对膜通量的影响。

在单因素试验的基础上，采用操作压力、操作温度和料液pH值3个因素和单因素试验中3个较好的水平，设计正交试验，以研究超滤工艺参数对膜通量的综合影响。

1.3.4 超滤膜的清洗

参考谢红旗^[16]、樊海燕^[17]等对超滤膜的清洗方法，将使用后的超滤膜，分别用蒸馏水室温清洗0.5h、pH8.5的NaOH溶液室温清洗0.5h、pH3.5的HCl溶液室温清洗0.5h、40℃温水清洗0.5h清洗，然后测定清洗前后蒸馏水的膜通量，膜通量相差越大，证明清洗效果越好。再将清洗效果较好的清洗方法合理组合进行复合清洗，测定复合清洗前后蒸馏水的膜通量，确定最佳的清洗方法。

1.3.5 银条多糖提取液的浓缩方法

取1000mL银条多糖提取液，用旋转蒸发器于55℃减压蒸馏至100mL；另取1000mL银条多糖提取液用优化后的超滤工艺浓缩到100mL，从浓缩时间及浓缩产物的性状两方面对比两种不同浓缩方法。

2 结果与分析

2.1 最佳超滤条件的确立

2.1.1 超滤膜的选择

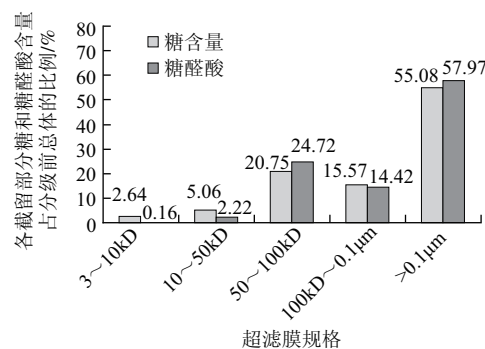


图1 各部分糖和糖醛酸含量占总体的比例

Fig.1 Effect of ultrafiltration molecular weight cut-off on the recoveries of polysaccharide and uronic acid from crude extracts

由图1可以看出，银条的大部分多糖集中在分子质量50kD以上，用50kD的超滤膜超滤浓缩银条多糖，可以保留银条的91.4%的多糖，且50kD以上的多糖的糖醛酸含量较高，能有效保留多糖的生物活性。因此，在以后的研究中均采用50kD的超滤膜浓缩银条多糖。

2.1.2 超滤最佳工艺参数的确定

2.1.2.1 操作压力对膜通量的影响

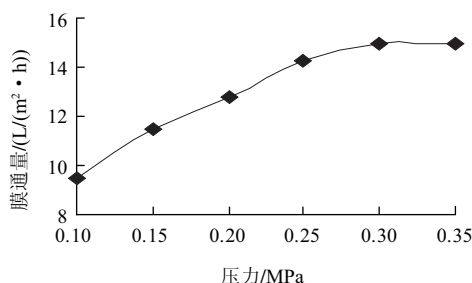


图2 操作压力对膜通量的影响

Fig.2 Effect of operation pressure on membrane flux

如图2所示,随着压力的提高,膜通量呈增加趋势。当压力达到0.3MPa左右时,压力再增加,膜通量变化不大,其原因可能是膜表面形成凝胶层,随着压力增加,凝胶层的厚度增加,传质阻力加大,从而使膜通量不再增加。为了使超滤系统能在较高的通量下运行,提高膜分离效率,且尽量减少超滤系统的损耗,故选择超滤操作压力为0.3MPa左右。

2.1.2.2 操作温度对膜通量的影响

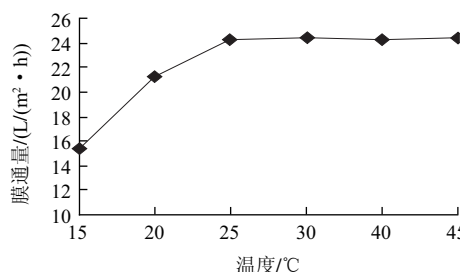


图3 操作温度对膜通量的影响

Fig.3 Effect of temperature on membrane flux

如图3所示,膜通量随温度的升高而升高,原因可能是由于随着温度的升高,物料的流变性加大,黏性降低,膜通量增加。但是当温度高于25℃后膜通量没有明显的变化,且温度太高容易加速膜老化,缩短膜的使用寿命。因此,选择操作温度为25℃左右。

2.1.2.3 料液pH值对膜通量的影响

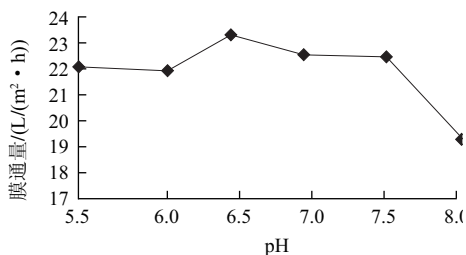


图4 料液pH值对膜通量的影响

Fig.4 Effect of sample pH on membrane flux

如图4所示,膜通量在pH值偏高或偏低时候都比较低,在pH值为8.0时,膜通量衰减速率较快,这可能是因

为料液中含有蛋白质,而蛋白质是两性物质,pH值的改变会改变蛋白质的存在状态,在pH值为8.0时,蛋白质可能带电荷最少,此时凝胶层容易形成,膜污染严重,膜通量下降最快。而在pH值在6.5~7.5之间膜通量较高且变化不大,说明料液为中性时膜通量最高,故选择中性的料液进行超滤。

2.1.2.4 正交试验确定最佳工艺参数

在单因素试验的基础上进行了多因素正交试验,结果如表1所示。从表1可以看出,以 $A_2B_3C_3$ 组合的超滤效果最好,即最佳超滤工艺条件为操作温度30℃、操作压力0.35MPa、料液pH6.5。按极差大小顺序排出因素的主次顺序,从主到次分别是操作压力、超滤温度、料液pH值。

表1 正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal array design matrix and results

试验号	A料液pH	B操作压力/MPa	C超滤温度/℃	膜通量/(L/(m²·h))
1	1(6.0)	1(0.25)	1(20)	12.6
2	1	2(0.30)	2(25)	17.28
3	1	3(0.35)	3(30)	17.4
4	2(6.5)	1	2	14.16
5	2	2	3	17.52
6	2	3	1	17.04
7	3(7.0)	1	3	15.48
8	3	2	1	16.08
9	3	3	2	17.04
K_1	47.28	42.24	45.72	
K_2	48.72	50.88	48.48	
K_3	48.6	51.48	50.4	
R	1.44	9.24	4.68	

2.2 超滤膜的清洗

2.2.1 超滤膜通量随超滤时间的变化

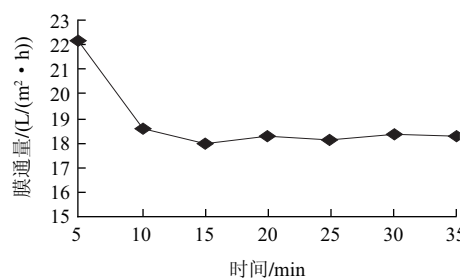


图5 膜通量随超滤时间的变化

Fig.5 Change in membrane flux during ultrafiltration

如图5所示,随着超滤时间的延长,超滤膜通量逐渐降低,其减缓速率随时间的延续而变得缓慢。

2.2.2 超滤膜的污染

由图5可知,超滤膜在使用过程中,尽管各项操作参数保持不变,其膜通量仍会逐渐下降,引起膜通量下降的原因是由膜的污染所引起的。膜的污染一般分为两种情况,一是浓差极化造成的污染。

这种污染形成的原因主要是因为膜面局部溶质质

量分数增加，引起边界层流体阻力增加，导致传质动力下降；二是吸附在膜表面和膜孔内的微粒、胶体或溶质大分子形成凝胶层和孔堵塞所造成的污染。前者可以通过改善膜面附近溶液的流体力学条件来预防，如提高流速。后者可以采用物理清洗或化学清洗方法对超滤膜进行清洗。物理方法一般是指用高速水冲洗、海绵球机械擦洗和反洗等，它们的特点是简单易行，但不适于深层清洗。化学法主要是添加化学清洗剂，如稀碱、稀酸、酶和表面活性剂等，适用性广^[18-19]。

2.2.3 膜清洗方法的确定

采用4种方法清洗污染的超滤膜，由表2可见，不同清洗方法对超滤膜的清洗效果不同，室温下pH8.5的NaOH溶液清洗效果最好，40℃温水清洗效果次之，蒸馏水室温清洗的效果最差。综合第2个和第4个方法，即用40℃、pH8.5的NaOH溶液对膜清洗0.5h，此时清洗前后纯水膜通量相差9.00L/(m²·h)，表明复合清洗方法的清洗效果较单一方法的清洗效果更好，因此对超滤膜的清洗方法可采用40℃、pH8.5的NaOH溶液清洗0.5h。

表2 不同清洗方法对超滤膜的清洗效果			
Table 2 Effect of different cleaning methods on membrane flux			
不同清洗方法	清洗前超滤膜的水通量/ (L/(m ² ·h))	清洗后超滤膜的水通量/ (L/(m ² ·h))	超滤膜水通量 清洗前后的差/ (L/(m ² ·h))
蒸馏水室温清洗0.5h	29.28	32.40	3.12
pH8.5的NaOH溶液室温清洗0.5h	28.20	36.60	8.40
pH3.5的HCl溶液室温清洗0.5h	28.68	34.80	6.21
40℃温水清洗0.5h	26.88	34.68	7.80
40℃、pH8.5的NaOH溶液清洗0.5h	26.52	35.52	9.00

2.3 超滤法与常规浓缩方法的比较

表3 超滤浓缩与常规浓缩方法的比较		
Table 3 Comparison of ultrafiltration and vacuum distillation used for polysaccharide concentration		
浓缩方法	浓缩所需时间/min	浓缩产物性状
减压蒸馏浓缩	160	褐色
超滤浓缩	40	黄色

由表3可以看出，超滤浓缩方法浓缩料液到相同体积时较常规浓缩方法节约120min的浓缩时间，效率更高；而且超滤浓缩所得浓缩液的颜色浅，可能是超滤过程分离去除了某些小分子的色素物质^[20]，因此超滤浓缩的浓缩效果比常规方法好。

3 结 论

超滤浓缩与常规浓缩比较，具有较高的浓缩效率，较常规浓缩有较明显优点。选用50kD的超滤膜，可以

有效地分离浓缩银条多糖并保留多糖生物活性；超滤浓缩银条多糖最佳工艺条件是超滤温度30℃、操作压力0.35MPa、料液pH6.5；超滤膜的最佳清洗方法为使用40℃、pH8.5的NaOH溶液清洗0.5h，此时清洗前后纯水膜通量相差9.00L/(m²·h)。

参考文献：

[1] 史霖, 宫长荣, 毋丽丽, 等. 植物多糖的提取分离及应用研究进展[J]. 中国农业通报, 2007, 23(9): 192-195.

[2] 杨宇博, 夏红梅, 袁恒翼. 植物多糖及其提取方法[J]. 中国甜菜糖业, 2008, 6999(2): 34-37.

[3] 程智慧, 孟焕文, 周文安, 等. 地灵高产栽培[J]. 西北园艺, 2003(1): 30-32.

[4] 易军鹏, 李市场, 唐浩国, 等. 一种内含银条颗粒保健果冻的制备方法: 中国, 200610048472[P]. 2007.

[5] 侯玉泽, 易军鹏, 唐浩国, 等. 一种银条酸牛奶制备方法: 中国, 200610048474[P]. 2007.

[6] 李素云, 梁中丽, 董铁有. 调压法冻干银条工艺研究[J]. 粮食流通技术, 2010(2): 35-37.

[7] 宋刚, 张宁, 彭志英. 超滤浓缩微生物胞外多糖PS-9415发酵液的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 42-44.

[8] 段穗芳, 郑宗坤. 超滤提纯香菇子实体中的香菇多糖[J]. 深圳大学学报: 理工版, 1999, 16(4): 66-69.

[9] BERGMAIER D, LACROIX C, MACEDO M G, et al. New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57(3): 401-406.

[10] STAAF M, YANG Z, HUTTUNEN E, et al. Structural elucidation of the viscous esopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb616[J]. Carbohydrate Research, 2000, 326(2): 113-119.

[11] MA Liping, GAN Dan, WANG Mingchun, et al. Optimization of extraction, preliminary characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1390-1398.

[12] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.

[13] BLUMENKRANTZ N, ASBOE-HANSEN G. New method for quantitative determination of uronic acids[J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 484-489.

[14] 王清旭. 鸭胚蛋多肽的超滤分离、纯化及其功能性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.

[15] 唐仕荣, 刘全德, 宋慧, 等. 银杏渣多糖的提取及超滤工艺研究[J]. 粮油加工, 2009(12): 163-166.

[16] 谢红旗. 香菇多糖提取、纯化、结构表征及生物活性的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.

[17] 樊海燕. 地黄中梓醇和水苏糖的提取、分离和纯化[D]. 厦门: 厦门大学, 2008.

[18] 郭宏, 王熊, 刘宗林. 超滤技术在大豆分离蛋白生产中的应用研究[J]. 食品科学, 2000, 21(12): 56-58.

[19] 王基. 膜分离技术基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 240-248.

[20] 闫荟, 杨锋, 钟蕾, 等. 膜分离技术富集六味地黄糖类成分工艺研究[J]. 中国药房, 2009, 20(3): 185-187.