

胺基化磁性壳聚糖微球对苹果渣多酚的吸附条件优化

袁亚宏, 蔡露阳, 岳田利, 高振鹏, 赵旭博

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 杨凌 712100)

摘要: 为分离苹果渣中的多酚物质, 研究壳聚糖磁性材料对多酚物质提取的影响。采用化学共沉淀法制得 Fe_3O_4 磁核, 反相悬浮交联法制得磁性壳聚糖微球, 并进行胺基化改性; 利用扫描电镜、激光粒度仪对微球进行表征。采用单因素试验和响应曲面法对磁性微球吸附分离苹果渣多酚的吸附条件进行了工艺优化。结果表明: 胺基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚工艺参数对多酚吸附率有显著影响, 因素影响主次顺序为微球用量 > 摇床转速 > 吸附温度; 胺基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚的工艺参数为: 微球用量 0.25 g/mL, 吸附温度 45℃, 摇床转速 127 r/min, 吸附率可达 81.58%。壳聚糖与 Fe_3O_4 磁性物质相结合, 对多酚物质具有良好的吸附性能, 可以对多酚物质进行快速分离, 解析后多酚得率可达 78.73%。研究结果为磁性材料吸附分离多酚类物质提供了理论参考。

关键词: 吸附, 优化, 分离, 苹果渣多酚, 胺基化磁性壳聚糖微球, 反相悬浮法, 改性

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2012.11.045

中图分类号: O625.31; TS255

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2012)-11-0279-08

袁亚宏, 蔡露阳, 岳田利, 等. 胺基化磁性壳聚糖微球对苹果渣多酚的吸附条件优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(11): 279-286.

Yuan Yahong, Cai Luyang, Yue Tianli, et al. Optimization of adsorption conditions for apple polyphenols by aminated magnetic chitosan microspheres[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(11): 279-286. (in Chinese with English abstract)

0 引言

中国苹果产量居世界首位^[1], 加工产品主要是浓缩苹果汁, 每年产生苹果渣达 300 万 t, 对环境已造成严重污染^[2]。苹果渣富含多种生物活性物质, 其中苹果多酚具有多种药理功能, 可防衰老、抗肿瘤、抗癌、抗动脉粥样硬化、防治冠心病与中风、防龋齿等^[3-9], 在食品、保健、日用品等领域得到广泛应用^[10]。因此将苹果渣变废为宝, 提取其中的多酚物质具有非常重要的意义。

苹果渣多酚的提取分离方法主要包括有机溶剂萃取法, 超临界 CO_2 萃取法, 超声波、微波辅助提取法, 吸附-解析法等^[11-16], 而磁性壳聚糖材料目前的研究重点集中在细胞分离^[17]、固定化酶^[18]、蛋白质提纯^[19]、核酸分离^[20]等方面, 还未见利用磁性壳聚糖材料吸附分离苹果渣多酚的研究报道, 和传统方法提取苹果多酚相比, 磁性壳聚糖材料吸附分离苹果多酚具有工艺简单、快速吸附、能耗较低、成本低、吸附后易于磁分离等优点。本试验采用反相悬浮法制得微球, 并对其进行胺基化改性, 以增加其化学活性基团, 将其应用于苹果渣多酚的吸附分离, 采用响应曲面法优化出微球吸附多酚的工艺参数, 旨

在为磁性材料分离苹果渣中多酚物质的研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

苹果渣: 陕西扶风苹果榨汁、干燥、粉碎后的干渣, 含水率为 6.5%。

壳聚糖(西安沃尔森生物技术有限公司); Folin-酚显色剂(上海荔达生物科技有限公司); 没食子酸、无水乙醇、无水 Na_2CO_3 、三氯化铁、二氯化铁、冰乙酸、氨水、体积分数 25%戊二醛、氢氧化钠、二甲亚砜、环氧氯丙烷、乙二胺等均为分析纯; 液体石蜡、司班 80 为化学纯; 去离子水(实验室自制)。

1.2 仪器与设备

JSM-6360LV 扫描电子显微镜: 日本电子公司; JFC-1600 离子溅射仪: 日本电子公司; MS-2000 激光粒径仪: 英国马尔文公司; KO-600DB 型数控超声波清洗器: 昆山市超声波仪器有限公司; UV-1700 紫外分光光度计: 日本岛津; B490 旋转蒸发器: 瑞士 BUCHI 公司; SHA-C 型恒温振荡器: 国华电器有限公司; GS2B-B 电子恒温搅拌器: 上海安亭电子仪器厂。

1.3 方 法

1.3.1 Fe_3O_4 磁核的制备

利用化学共沉淀法^[21], 将 0.1 mol/L FeCl_2 溶液与 0.1 mol/L FeCl_3 溶液以体积比 1:2 加入烧杯中, 用电子恒温搅拌器搅拌, 使溶液混合均匀, 同时加热, 待混合物温度升至 50℃时, 缓慢匀速滴加氨水, 至 pH 值为 10 左右。再置于 80℃水浴中熟化 30 min, 停止加热, 冷却。待降

收稿日期: 2011-09-27 修订日期: 2012-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071550, 31171721); 农业部“948”项目(2011-G8-3); 陕西省科技攻关(2009K01-20); 西北农林科技大学基本科研业务青年项目(QN2009073)

作者简介: 袁亚宏(1971-), 女, 副教授, 博士, 2007-2008 年在美国马里兰大学及美国农业部进行合作研究, 主要研究方向: 食品工程高新技术。杨凌 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 712100。

Email: yuan324@msn.com

至室温后,用磁铁收集,并用蒸馏水充分洗涤至中性,抽滤,备用。

1.3.2 胺基化壳聚糖磁性微球的制备

配制一定体积的质量分数为 3%壳聚糖醋酸溶液,按磁流体体积与壳聚糖醋酸液体积比为 1:20 加入磁核,制备过程详见参考文献[22]。

1.3.3 胺基含量的测定

分别称取 0.0500 g 磁性壳聚糖微球,环氧氯丙烷活化后的磁性壳聚糖微球和磁性胺基化壳聚糖微球,加入 20.0 mL 0.05 mol/L 的盐酸,搅拌 1 h 使其完全反应,取 15.00 mL 的上清液,用 0.0500 mol/L 的 NaOH 滴定,酚酞为指示剂。按式(1)计算胺基含量。

$$\text{胺基含量 (mmol/g)} = (N_1V_1 - N_2V_2 \times 20/15)/W \quad (1)$$

式中, N_1 为标准盐酸的浓度, mol/L; V_1 为标准盐酸的体积, mL; N_2 为标准 NaOH 浓度, mol/L; V_2 为标准 NaOH 的体积, mL; W 为微球的质量, g。

1.3.4 胺基化磁性壳聚糖微球大小形貌观察

将在 30 Pa 下真空冷冻干燥 12 h 后的胺基化磁性壳聚糖微球用导电胶固定后溅金,喷金条件为:40 mA, 80 s,用扫描电子显微镜观察微球的表面形态。

1.3.5 胺基化磁性壳聚糖微球的粒度分布

将在 30 Pa 下真空冷冻干燥 12 h 后的微球用蒸馏水溶解,加入数滴质量分数为 0.3%六偏磷酸钠助分散剂并在 350 W 下超声 10 min,用激光粒度仪测定微球粒度分布。

1.3.6 苹果渣多酚测定标准曲线的建立

苹果渣多酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 方法^[23],以没食子酸作为标准品测定多酚的浓度。

测定的标准曲线回归方程为: $y=0.103x+0.012$, $R^2=0.998$, x 为多酚质量浓度, mg/L; y 为吸光度。

1.3.7 苹果渣多酚的提取

本试验采用超声波辅助提取苹果渣中的多酚物质。操作步骤:准确称取果渣 5.00 g,放入 100 mL 三角瓶中,按料液比为 1:7 g/mL 加入体积分数为 60%乙醇水溶液,在 60℃、420 W 下提取 25 min,重复 2 次,将提取液合并,在 40℃下进行真空浓缩,即得多酚粗提液。

1.3.8 胺基化磁性壳聚糖微球对苹果渣多酚吸附影响因子的单因素试验

取一定量的磁性微球,加入 20 mL 0.5 mg/mL 苹果多酚粗提液,避光密封,置于摇床中,一定吸附温度、一定摇床转速下振荡一定时间,磁分离后按标准曲线法测定多酚含量,计算吸附率(%)。

$$\text{吸附率 } A = \frac{C_0 - C_r}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中, C_0 为苹果渣多酚溶液的起始质量浓度, mg/mL; C_r 为吸附后溶液中多酚的质量浓度, mg/mL。

以吸附多酚的微球用量、吸附时间、吸附温度、摇床转速、多酚粗提液 pH 值为试验因素,以多酚吸附率作为试验指标,分别做单因素试验,分析各因素对多酚吸附率的影响。

1.4 响应曲面法优化胺基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚的工艺条件

在单因素试验的基础上,固定多酚粗提液 pH 值为 5,吸附时间为 40 min,选取微球用量(X_1)、吸附温度(X_2)、摇床转速(X_3)为试验因素,以多酚吸附率(Y)为响应指标,采用统计软件 SAS9.1 中的响应曲面法建立三因素三水平的 Box-Behnken 模型,因素编码及水平见表 1,其中自变量的编码值 1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低水平。

表 1 正交试验因素水平及编码值
Table 1 Code and level of factors for orthogonal test

编码	因素		
	微球用量 X_1/g	吸附温度 $X_2/^\circ\text{C}$	摇床转速 $X_3/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$
-1	0.05	20	80
0	0.15	40	120
1	0.25	60	160

1.5 胺基化磁性壳聚糖微球对苹果渣多酚的洗脱

称取 4.98 g 胺基化磁性壳聚糖微球,加入 20 mL 0.5 mol/L 苹果渣多酚提取液,避光密封,置于摇床中,44.8℃、127 r/min 下振荡吸附 40 min,磁分离。吸附饱和后的微球置于质量分数 4%的 NaOH 溶液中振荡 1 h,磁分离,吸附液和洗脱液在 765 nm 下测定吸光度,计算多酚得率(%)。

$$D = \frac{V_s \times C_s}{V_0 \times C_0 \times A} \times 100\% \quad (3)$$

式中, V_s 为洗脱液总体积, mL; C_s 为洗脱液中多酚的质量浓度, mg/mL; V_0 为吸附时加入苹果渣多酚提取液的体积, mL。

1.6 数据处理方法

以多酚吸附率为目标函数,以微球用量、吸附温度、摇床转速为自变量,采用 SAS9.1 统计分析软件进行数据处理及结果分析。

2 结果与分析

2.1 胺基化磁性壳聚糖微球氨基含量的测定

由表 2 可知,活化后壳聚糖微球的氨基含量降低,表明在环氧氯丙烷活化磁性壳聚糖微球的过程中,环氧氯丙烷可能也与部分氨基发生反应,导致氨基含量降低;活化之后的微球经乙二胺进行胺基化后,氨基含量显著提高,达到了 4.56 mmol/g。

表 2 制备过程中微球氨基含量
Table 2 Amino-group content in microspheres during preparation

微球	磁性壳聚糖微球	环氧氯丙烷活化后磁性壳聚糖微球	胺基化磁性壳聚糖微球
氨基含量/ (mmol·g ⁻¹)	2.44	1.32	4.56

2.2 胺基化磁性壳聚糖微球大小形貌观察

由图 1 微球的扫描电镜照片可以看出,制备出的微球达到了微米级,呈规则球形,分散性较好,表面较光

滑，部分微球表面有少量凹陷。

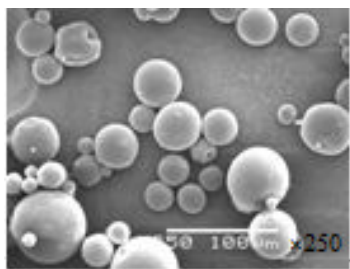


图 1 胺基化磁性壳聚糖微球的扫描电镜照片 (250 倍)
Fig.1 Scanning electron microscope photo of magnetic aminated chitosan microspheres (×250 times)

2.3 胺基化磁性壳聚糖微球的粒度分布

由图 2 可以看出，激光粒度仪得出胺基化磁性微球的 $d(0.5)$ 为 $85.884 \mu\text{m}$ ，即 50% 的微球粒径小于 $85.884 \mu\text{m}$ ， $d(0.9)$ 为 $272.170 \mu\text{m}$ ，即 90% 的微球粒径小于 $272.170 \mu\text{m}$ ，表明制备的胺基化磁性壳聚糖微球为微米级。

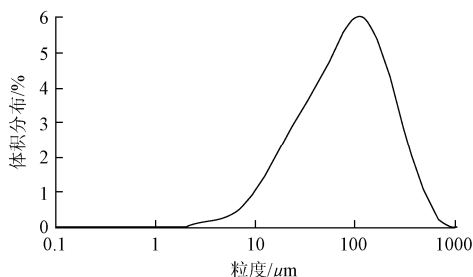


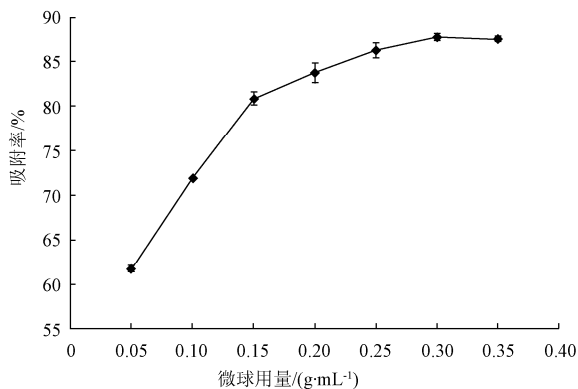
图 2 胺基化磁性微球的粒度分布图

Fig.2 Particle size distribution of magnetic aminated chitosan microspheres

2.3 胺基化磁性壳聚糖微球对苹果渣多酚吸附的单因素试验结果

2.3.1 胺基化磁性壳聚糖微球用量对吸附效果的影响

量取 20 mL 0.5 mg/mL 的苹果多酚粗提取液，固定多酚粗提液 pH 值为 3，在吸附温度 25°C ，摇床转速 150 r/min 下吸附 1 h，考察微球用量对吸附率的影响见图 3。



注：固定多酚粗提液 pH 值为 3，在吸附温度 25°C ，摇床转速 150 r/min 下吸附 1 h。

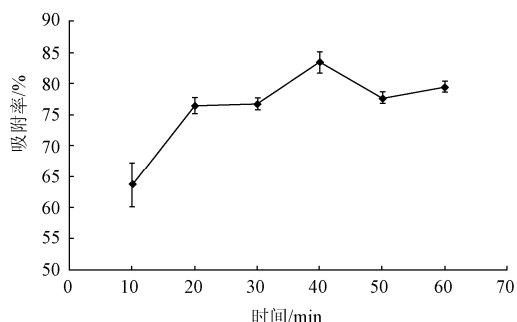
图 3 微球用量对吸附效果的影响

Fig.3 Influence of microsphere dosage on adsorption effect

由图 3 可知，随着胺基化磁性壳聚糖微球用量的增加，吸附率呈上升趋势，在达到微球用量（每毫升多酚粗提液）为 0.3 g 后，吸附达到平衡，但在达到微球用量（每毫升多酚粗提液）0.15 g 后，吸附率增加减缓，考虑到微球制备过程复杂，用量过多使试验复杂化，也不利于磁分离，在达到微球用量（每毫升多酚粗提液） $>0.25 \text{ g}$ 后，已无法良好分离，因此综合考虑，选择胺基化磁性微球的用量为 $0.05 \sim 0.25 \text{ g/mL}$ ，进行后续正交试验。

2.3.2 吸附时间对吸附效果的影响

量取 20 mL 0.5 mg/mL 苹果多酚提取液，固定多酚粗提液 pH 值为 3，微球用量 0.15 g/mL 多酚粗提液，在吸附温度 25°C ，摇床转速 150 r/min 下进行吸附，吸附时间对吸附率的影响见图 4。



注：固定多酚粗提液 pH 值为 3，微球用量 0.15 g/mL 多酚粗提液，在吸附温度 25°C ，摇床转速 150 r/min 下进行吸附。

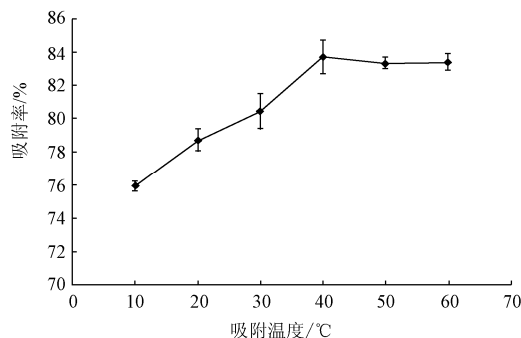
图 4 吸附时间对吸附效果的影响

Fig.4 Influence of time on adsorption effect

由图 4 可知，随着吸附时间的增加，吸附率呈现先增加后降低的趋势，时间太短 ($<40 \text{ min}$)，反应不完全，因此吸附率较低；吸附时间过长 ($>40 \text{ min}$)，已经吸附上的多酚可能又会重新溶于溶液中，导致吸附率降低。在吸附时间为 40 min 时，吸附率最高，吸附效果最优，因此吸附时间选择 40 min。

2.3.3 吸附温度对吸附效果的影响

量取 20 mL 0.5 mg/mL 的苹果多酚提取液，固定多酚粗提液 pH 值为 3，微球用量 0.15 g/mL 多酚粗提液，在摇床转速 150 r/min 下吸附 40 min，吸附温度对吸附率的影响见图 5。



注：固定多酚粗提液 pH 值为 3，微球用量 0.15 g/mL 多酚粗提液，在摇床转速 150 r/min 下吸附 40 min。

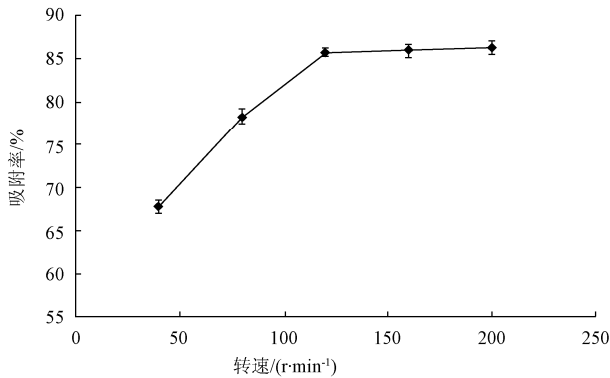
图 5 吸附温度对吸附效果的影响

Fig.5 Influence of temperature on adsorption effect

由图 5 可知,随着吸附温度的升高,吸附率先增加然后达到吸附平衡,温度过低,反应速率降低,因此在 40 min 内,微球与多酚的结合减少,当温度升高后,反应速率加快,吸附率增加,当温度为 40℃时吸附达到平衡,因此,合适的吸附温度为 40℃。

2.3.4 摇床转速对吸附效果的影响

量取 20 mL 0.5 mg/mL 的苹果多酚提取液,固定多酚粗提液 pH 值为 3,微球用量 0.15 g/mL 多酚粗提液,在吸附温度 40℃下吸附 40 min,摇床转速对吸附率的影响见图 6。



注:固定多酚粗提液 pH 值为 3,微球用量 0.15 g/mL 多酚粗提液,在吸附温度 40℃下吸附 40 min。

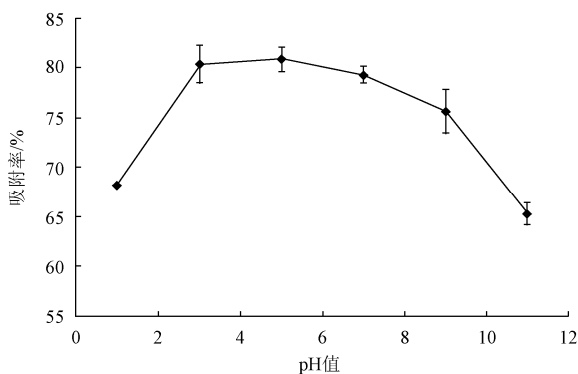
图 6 摇床转速对吸附效果的影响

Fig.6 Influence of shaker speed on adsorption effect

由图 6 可知,随着摇床转速的增加,吸附率先增加然后达到吸附平衡,转速较低时,微球聚集在一起,与多酚溶液的接触面积较少,使得吸附效果较差;当转速不断增加,微球与多酚溶液充分接触,提高了吸附率,当转速达到 120 r/min 时,吸附达到平衡,因此选择摇床转速 120 r/min。

2.3.5 溶液 pH 值对吸附效果的影响

量取 20 mL 0.5 mg/mL 的苹果多酚提取液,固定多酚粗提液 pH 值为 3,微球用量 0.15 g/mL 多酚粗提液,在吸附温度 40℃,摇床转速 120 r/min 下吸附 40 min,多酚粗提液 pH 值对吸附率的影响见图 7。



注:固定多酚粗提液 pH 值为 3,微球用量 0.15 g/mL 多酚粗提液,在吸附温度 40℃,摇床转速 120 r/min 下吸附 40 min。

图 7 溶液 pH 值对吸附效果的影响

Fig.7 Influence of solution pH value on adsorption effect

由图 7 可知,随着多酚溶液 pH 值的增加,吸附率先增加后降低,pH 值<5 时,随着 pH 值的升高,吸附率逐渐增大,pH 值=5 时吸附率达到最大;当 pH 值>5 时,吸附率随着 pH 增大而下降。这是因为苹果多酚具有较多的酚羟基,易电离出羟基上的 H 质子,而使水溶液呈弱酸性,酸性条件又抑制 H 质子电离,保证了多酚以分子形态存在,有利于吸附^[24]。随着酸性减弱,多酚离子化程度增加,吸附效果减弱。因此,多酚溶液 pH 值选择 5。

2.4 胺基化磁性壳聚糖微球吸附多酚条件的响应曲面分析及优化

2.4.1 吸附试验回归模型的建立及其显著性检验

由单因素试验结果进行多重比较,结果表明胺基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚工艺参数对多酚吸附率有显著影响,因素影响主次顺序为微球用量>摇床转速>吸附温度;并选取微球用量、吸附温度及摇床转速为试验因素,采用响应曲面法优化微球吸附苹果渣多酚的工艺条件,根据 SAS 9.1 软件的响应曲面 Box-Behnken 设计,进行了 17 个吸附试验,结果见表 3。

表 3 试验设计及结果

Table 3 Design and results of experiment

试验号	微球用量 X_1	吸附温度 X_2	摇床转速 X_3	吸附率/%
1	-1	-1	0	49.595
2	-1	1	0	63.920
3	1	-1	0	79.380
4	1	1	0	80.165
5	0	-1	-1	50.370
6	0	-1	1	76.115
7	0	1	-1	72.260
8	0	1	1	79.855
9	-1	0	-1	44.515
10	1	0	-1	78.910
11	-1	0	1	60.625
12	1	0	1	80.010
13	0	0	0	76.935
14	0	0	0	75.825
15	0	0	0	74.065
16	0	0	0	74.115
17	0	0	0	77.885

利用 SAS 9.1 软件对表 3 的试验数据进行多元回归分析,得到磁性微球吸附多酚吸附率对自变量微球用量、吸附温度、摇床转速的二次多元回归模型方程为式(3):

$$Y = 75.765 + 12.47625X_1 + 5.0925X_2 + 6.31875X_3 - 5.5675X_1^2 - 3.385X_1X_2 - 3.7525X_1X_3 - 1.9325X_2^2 - 4.5375X_2X_3 - 4.1825X_3^2$$
(3)。式中, Y 为磁性微球吸附多酚吸附率的预测值(%), $X_1 \sim X_3$ 分别为上述自变量的编码值。

对该模型进行方差分析,结果见表 4,模型系数显著性检验见表 5。

表 4 回归模型方差分析
Table 4 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2197.662	9	244.1847	26.15872	0.000141
误差	65.34313	7	9.334732		
失拟	53.86372	3	17.95457	6.256276	0.054359
纯误差	11.4794	4	2.86985		
总和	2263.005	16			

$R=0.9854, R^2=0.9711, R^2_{Adj}=0.9340$

从回归方程的方差分析表 4 可见, $P_{模型}=0.000141<0.01$, 表明试验所选用的模型是极显著的; 失拟项 $P=0.054359>0.05$, 表明模型失拟项不显著; 模型的校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9340$, 表明该模型能解释 93.40% 响应值的变化; 相关系数 $R=0.9854$, 表明该模型拟合程度良好, 该模型是合适的, 可以用此模型对磁性微球对苹果渣多酚吸附工艺进行分析和预测。

表 5 回归模型系数显著性检验
Table 5 Significance test of regression coefficient

模型项	系数估计值	自由度	标准误差	t 值	P 值	显著性
截距	75.765	1	1.37			
X_1	12.47625	1	1.080204	11.5499	0.0001	**
X_2	5.0925	1	1.080204	4.714386	0.002172	**
X_3	6.31875	1	1.080204	5.849587	0.000631	**
X_1^2	-5.5675	1	1.488959	-3.73919	0.00727	**
X_2^2	-1.9325	1	1.488959	-1.29789	0.235454	
X_3^2	-4.1825	1	1.488959	-2.80901	0.026183	*
X_1X_2	-3.385	1	1.52764	-2.21584	0.062259	
X_1X_3	-3.7525	1	1.52764	-2.4564	0.043695	*
X_2X_3	-4.5375	1	1.52764	-2.97027	0.0208	*

注: **为极显著, *为显著

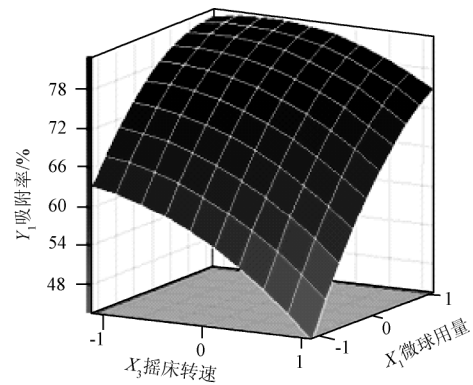
由表 5 回归模型系数显著性检验结果可知, 模型中一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 均极显著; 二次项 X_1^2 极显著, X_3^2 显著; 交互项 X_1X_3 、 X_2X_3 显著; 其余项均不显著。

2.4.2 胺基化磁性壳聚糖微球吸附多酚试验响应面分析

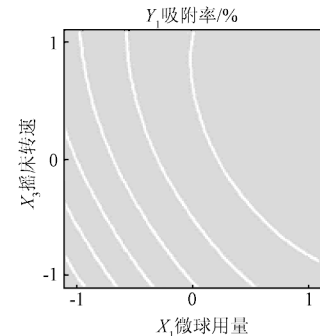
本试验中 X_1X_3 、 X_2X_3 对响应值吸附率 Y 影响显著, 而 X_1X_2 对吸附率 Y 影响不显著, 因此可不予考虑, X_1X_3 、 X_2X_3 对吸附率 Y 的影响见图 1、图 2。通过该组响应面图即可对两因素交互影响磁性微球吸附多酚的吸附率的效应进行分析与评价, 并从中确定最佳因素水平范围。

图 8 为吸附温度为 40℃ 时, 微球用量和摇床转速对吸附率的交互影响效应。从图 8 中可以看出, 微球用量和摇床转速的交互作用对吸附率有显著影响。当微球用量处于较低水平时, 吸附率随着摇床转速的增加而逐渐增大, 当微球用量处于较高水平时, 随着摇床转速的增加, 吸附率先增加后减小; 当摇床转速处于较低水平时, 吸附率随着微球用量的增加而增大, 且增幅较大, 当摇床转速处于较高水平时, 吸附率随着微球用量的增加而增大。

图 9 为微球用量为 3 g 时, 吸附温度和摇床转速对吸附率的交互影响效应。从图 9 中可以看出, 吸附温度和摇床转速的交互作用对吸附率有显著影响。当吸附温度处于较低水平时, 吸附率随着摇床转速的增加而逐渐增大, 当吸附温度处于较高水平时, 随着摇床转速的增加,



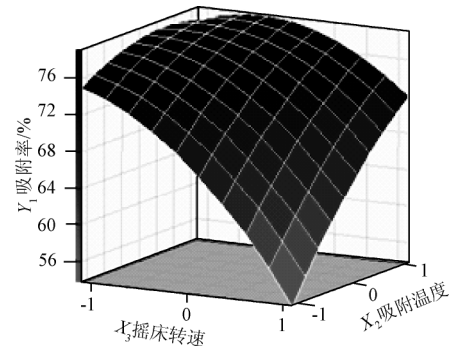
a. 微球用量、摇床转速及其交互作用对吸附率影响的响应面图



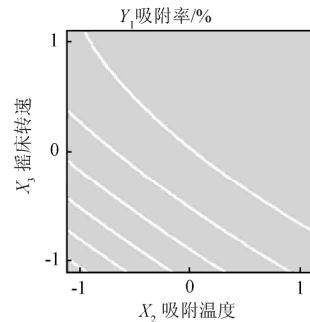
b. 微球用量、摇床转速及其交互作用对吸附率影响的等高线图

注: 吸附温度为 40℃; 图中 X 值均为编码值, Y 值为实际值。

图 8 微球用量、摇床转速对吸附率影响的响应面和等高线
Fig.8 Response surface and contour plots of interactive effects of adsorption rate with microspheres usage and shaker speed



a. 吸附温度、摇床转速及其交互作用对吸附率影响的响应面图



b. 吸附温度、摇床转速及其交互作用对吸附率影响的等高线图

注: 微球用量为 3 g; 图中 X 值均为编码值, Y 值为实际值。

图 9 吸附温度、摇床转速及其交互作用对吸附率影响的响应面和等高线

Fig.9 Response surface and contour plots of interactive effects of adsorption rate with adsorption temperature and shaker speed

吸附率先增加后减小；当摇床转速处于较低水平时，吸附率随着吸附温度的增加而增大，且增幅较大，当摇床转速处于较高水平时，随着吸附温度的增加，吸附率先增加后减小。

2.4.3 最佳工艺参数优化

利用 SAS 9.1 软件优化后得到的氨基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚的最优工艺条件为：微球用量为 0.249 g/mL 多酚粗提液，吸附温度为 44.8℃，摇床转速为 127 r/min，在此条件下，得到氨基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚的吸附率理论值可达到 83.10%。工艺条件取整后进行验证试验，即微球用量 0.25 g/mL，吸附温度 45℃，摇床转速 127 r/min，微球对多酚的吸附率的实际值达 81.58%，相对误差为 1.83%，解析后多酚得率可达 78.73%。

3 讨论

本试验利用壳聚糖及 Fe_3O_4 磁性物质相结合，为分离苹果渣中的多酚物质提供一条可行的途径。壳聚糖无毒，具有良好的生物相容性、生物可降解性、易成型加工等优点^[25-27]，胺基化磁性壳聚糖微球有望在苹果渣多酚的提取分离中获得广泛应用，且制备胺基化磁性壳聚糖微球的材料容易获得且成本低廉，其可由甲壳素经脱乙酰化反应而制得，甲壳素广泛存在于蟹、虾等低等甲壳动物以及藻类、真菌中，自然界每年生物合成的甲壳素有数十亿吨之多，是一种十分丰富的自然资源^[28-30]。目前此法处于理论研究阶段，仍需在优化磁性微球的制备条件，解吸附试验以及微球使用稳定性等方面进行后续研究，以期在苹果渣多酚的提取分离中获得广泛应用，并用于工业生产。与传统方法相比，胺基化磁性壳聚糖微球对苹果渣多酚的吸附分离效果显著，主要表现在吸附多酚速度快，易于从多酚溶液中分离，并且操作简单易行，胺基化磁性壳聚糖微球对苹果渣多酚的吸附分离技术为苹果渣多酚的吸附分离提供了一条新颖、可行的途径。

4 结论

1) 利用化学共沉淀法制备出了 Fe_3O_4 磁核，反相悬浮交联法制备出了磁性壳聚糖微球后，对其进行胺基化改性，制得的微球达微米级，粒度均匀，呈规则球形，且经胺基化后，氨基含量提高至 4.56 mmol/g。

2) 胺基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚工艺参数对多酚吸附率有显著影响，因素影响主次顺序为微球用量 > 摇床转速 > 吸附温度。以吸附率为考察指标，利用响应面法建立了胺基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚的二次多项数学模型，此模型经检验证明是合理可靠的，利用模型的响应面及其等高线对影响吸附率的关键因子及其相互作用进行探讨，优化出胺基化磁性壳聚糖微球吸附苹果渣多酚的工艺参数为微球用量为 0.25 g/mL、吸附温度为 45℃，摇床转速为 127 r/min，吸附率为 81.58%。

[参 考 文 献]

- [1] 赵锋, 杨兴华, 薛培生, 等. 世界苹果产业概论[J]. 落叶果树, 2005(3): 16-17.
- [2] Yolanda D G, Beln S V, Anna P L. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: apple pomace[J]. Food Chemistry, 2009, 117(4): 731-738.
- [3] 李建新, 王育红, 潘治利, 等. 苹果多酚的提取技术和应用研究[J]. 农产品加工, 2007(12): 62-65.
- [4] Auqustin Scalbert, Gary Williamson. Dietary intake and bioavailability of polyphenols[J]. American Society for Nutritional Science, 2000, 130(8): 2073-2085.
- [5] 牛鹏飞, 仇农学, 杜寅. 苹果渣中不同极性多酚的分离及体外抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 238-242.
- Niu Pengfei, Qiu Nongxue, Du Yin. Separation of polyphenols from apple pomace based on different polarities and their antioxidative activities in vitro[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2008, 24(3): 238-242. (in Chinese with English abstract)
- [6] Shoji T, Akazome Y, Kanda T, et al. The toxicology and safety of apple polyphenol extract[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(6): 959-967.
- [7] Tsao R, Yang R, Xie S, et al. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(12): 4989-4995.
- [8] Graziani G, D'Argenio G, Tuccillo C, et al. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells *in vitro* and to rat gastric mucosa *in vivo*[J]. Gut, 2005, 54(2): 193-200.
- [9] 徐亚民. 天然抗氧化剂: 苹果多酚的研究与应用[C]//齐庆中. 第十届中国国际食品添加剂和配料展览会学术论文集. 上海: 中国食品添加剂生产应用工业协会, 2006: 109-113.
- Xu Yamin. The natural antioxidant: the development and application of apple polyphenols[C]// Qi Qingzhong. The 10th China international food additives and ingredients exhibition research papers. Shanghai: Chinese food additive production and application industry association, 2006: 109-113. (in Chinese with English abstract)
- [10] 唐传核, 彭志英. 苹果多酚的开发及应用[J]. 中国食品添加剂, 2001(2): 41-45.
- Tang Chuanhe, Peng Zhiying. The development and application of apple polyphenol[J]. China Food Additives, 2001, (2): 41-45. (in Chinese with English abstract)
- [11] 郝少莉, 仇农学. 苹果渣中多酚物质的提取技术研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(2): 152-155.
- Hao Shaoli, Qiu Nongxue. Study on the extraction process of polyphenols from apple pomace[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2006, 15(2): 152-155. (in Chinese with English abstract)

- [12] Palenzuela B, Arce L, Mach A, et al. Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(8): 2021–2027.
- [13] 魏福祥, 曲恩超. 超临界 CO₂ 从苹果渣中萃取苹果多酚的工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(7): 60–63.
Wei Fuxiang, Qu Enchao. Research of supercritical CO₂ extraction apple polyphenol from apple pomace[J]. *Food Research and Development*, 2006, 27(7): 60–63. (in Chinese with English abstract)
- [14] 李涛, 岳田利, 袁亚宏. 苹果多酚提取的响应曲面法优化研究[J]. *食品科技*, 2007(8): 118–121.
Li Tao, Yue Tianli, Yuan Yahong. Optimization of extraction conditions of apple polyphenol using response surface methodology[J]. *Food Science and Technology*, 2007(8): 118–121. (in Chinese with English abstract)
- [15] 王丽, 李化, 张钟. 微波辅助提取苹果皮中的多酚类物质[J]. *试验报告与理论研究*, 2007, 10(6): 25–28.
Wang Li, Li Hau, Zhang Zhong. Microwave radiation extraction of polyphenols from apple peel[J]. *Experimental Reports and Theoretical Researches*, 2007, 10(6): 25–28. (in Chinese with English abstract)
- [16] Yingrong Lu, Yeap Foo L. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace[J]. *Food Chemistry*, 1997, 59(2): 187–194.
- [17] Orekhova N M, Akchurin R S, Belyaev A A, et al. Local prevention of thrombosis in animal arteries by means of magnetic targeting of aspirin-loaded red cells[J]. *Thrombosis research*, 1990, 57(4): 611–616.
- [18] Lei L, Bai Y X, Li Y F, et al. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009, 321(4): 252–258.
- [19] 徐翠香, 仓理, 高强. 复合磁性壳聚糖微球对 BSA 的吸附机理研究[J]. *云南化工*, 2008, 35(1): 12–16.
Xue Cuixiang, Cang Li, Gao Qiang. Study on the adsorption mechanism of chitosan magnetic microspheres on BSA[J]. *Yunnan Chemical Technology*, 2008, 35(1): 12–16. (in Chinese with English abstract)
- [20] Liu J W, Zhang Y, Chen D, et al. Facile synthesis of high-magnetization γ -Fe₂O₃/alginate/silica microspheres for isolation of plasma DNA[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2009, 341(1/3): 33–39.
- [21] Liao M H, Chen D H. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(20): 1723–1727.
- [22] 洪爱真. 胺基化壳聚糖微球吸附阴离子偶氮染料的研究[D]. 福建: 福建师范大学化学与材料学院, 2003.
Hong Aizhen. Research on Adsorption of Anion Azo Dyes by Aminated Chitosan Microspheres[D]. Fu Jian: Fujian Normal University, 2003. (in Chinese with English abstract)
- [23] 李春阳, 许时婴, 王璋. 从葡萄废弃物中提取分离多酚类生物活性物质[J]. *食品科技*, 2004(6): 88–93.
Li Chunyang, Xu Shiyong, Wang Zhang. Extraction the bioactive-products from the wastes of vint grape[J]. *Food Science and Technology*, 2004(6): 88–93. (in Chinese with English abstract)
- [24] 张文博, 陈盛, 夏启华, 等. 胺基化壳聚糖树脂吸附分离茶多酚的研究[J]. *广州化学*, 2010, 35(1): 22–27.
Zhang Wenbo, Chen Sheng, Xia Qihua, et al. Study on adsorption of tea polyphenols with aminated chitosan resin[J]. *Guangzhou Chemistry*, 2010, 35(1): 22–27. (in Chinese with English abstract)
- [25] 杨晋青, 叶盛权, 郭祀远. 磁性壳聚糖微球的制备及其应用[J]. *现代食品科技*, 2008, 10(24): 1079–1082.
Yang Jiqing, Ye Shengquan, Guo Siyuan. Review of Preparation and Application of Magnetic Chitosan Microspheres[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 10(24): 1079–1082. (in Chinese with English abstract)
- [26] Moo-Yeal Lee, Kyung-Jin Hong, Toshio Kajiuchi, et al. Synthesis of chitosan-based polymeric surfactants and their adsorption properties for heavy metals and fatty acids[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 36(3): 152–158.
- [27] Li Liu, Yeping Li, Yu Li. Rapid N-phthaloylation of chitosan by microwave irradiation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2004, 57(1): 97–100.
- [28] 张海真. 磁性壳聚糖微球的改性表征及吸附行为研究[D]. 湖北: 中南民族大学化学与材料科学学院, 2008.
Zhang Haizhen. Modification and Characterization of Magnetic Chitosan Microspheres and Adsorption Behaviours[D]. Hubei: College of Chemistry and materials of South-Central University for Nationalities, 2008. (in Chinese with English abstract)
- [29] Huang J H, Huang K L, Liu S Q, et al. Adsorption properties of tea polyphenols onto three polymeric adsorbents with amide group[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, 315(2): 407–414.
- [30] 罗志敏, 薛丽群, 张婷, 等. 珠状壳聚糖树脂对绿茶中茶多酚的吸附研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(1): 86–89.
Luo Zhimin, Xue Liqun, Zang Ting, et al. Study on adsorption of tea polyphenols from green tea onto beaded chitosan resin[J]. *Food science*, 2009, 30(1): 86–89. (in Chinese with English abstract)

Optimization of adsorption conditions for apple polyphenols by aminated magnetic chitosan microspheres

Yuan Yahong, Cai Luyang, Yue Tianli, Gao Zhenpeng, Zhao Xubo

(College of Food science and engineering, Northwest Agriculture and Forest University, Yang ling 712100, China)

Abstract: The aim of this study was to provide a new and feasible way for separation apple polyphenols(AP), and to study the influence of AP by chitosan magnetic materials. Fe_3O_4 particles were synthesized by coprecipitation. Magnetic chitosan microspheres were prepared by inverse suspension cross-linking, and analyzed through SEM and laser particle size analyzer after aminated. Then, apple polyphenols were adsorbed using the aminated magnetic chitosan microspheres. The single-factor experiment and response surface method were applied to optimize the adsorption factors of AP. Process parameters of AP separation by aminated magnetic chitosan microspheres had significant effect on adsorption rate of AP. The influence order of factors was: usage of microspheres>shaker speed>adsorption temperature. The optimum adsorption conditions of AP by aminated magnetic chitosan microspheres were as follows: usage of microspheres 0.25 g/mL, adsorption temperature 45°C, shaker speed 127 r/min, and under this condition, the adsorption rate could reached to 81.58%. The combination of chitosan and Fe_3O_4 magnetic material had a good adsorption performance and quick separation of AP. The results of the research can provide a theoretical reference for the adsorption of AP by magnetic materials.

Key words: adsorption, optimization, separation, apple polyphenols, aminated magnetic chitosan microspheres, inverse suspension cross-linking, modification