

# 木鳖果假种皮中 $\beta$ -胡萝卜素的提取工艺优化及稳定性研究

马利亭

1. 北京农学院; 2. 艾地盟食品科技(北京)有限公司 北京 100023

**摘要:**  $\beta$ -胡萝卜素作为一种较为理想的食品添加剂, 其优势在于自由基捕捉能力较强, 而且有着抗癌的药理特性。近些年业内对于 $\beta$ -胡萝卜素的研究越来越深入,  $\beta$ -胡萝卜素的开发应用也有了一定规模, 国际上 $\beta$ -胡萝卜素每年的需求量都在1000吨上下, 在食品行业和医疗领域等多个领域广泛应用。本文主要研究木鳖果假种皮中的 $\beta$ -胡萝卜素提取工艺, 侧重于研究超声波与液料比的提取工艺优化, 探究其对于 $\beta$ -胡萝卜素提取量的影响。通过稳定性实验探究光照、温度、pH值等影响因素对 $\beta$ -胡萝卜素稳定性带来的影响, 根据 $\beta$ -胡萝卜素清除DPPH、ABTS自由基探究其抗氧化能力。

**关键词:** 木鳖果;  $\beta$ -胡萝卜素; 提取工艺

## Optimization of extraction technology and stability of $\beta$ -carotene from pseudoseed bark of *Trichoderma sinensis*

Ma Liting

1. Beijing University of Agriculture, Beijing 100023

2. Aidileng Food Science and Technology (Beijing) Co., LTD., Beijing 100023, China

**Abstract:** As an ideal food additive,  $\beta$ -carotene has the advantage of strong free radical capturing ability and anti-cancer pharmacological properties. In recent years, the research on  $\beta$ -carotene in the industry is more and more in-depth, and the development and application of  $\beta$ -carotene also has a certain scale. The annual demand of  $\beta$ -carotene in the world is about 1000 tons, and it is widely used in the food industry, medical field and other fields. This paper mainly studied the extraction process of  $\beta$ -carotene from the pseudoseed bark of *Trichoderma chinensis*, focusing on the optimization of extraction process of ultrasonic and liquid-solid ratio, and explored its influence on the extraction amount of  $\beta$ -carotene. The stability experiment was conducted to explore the influence of light, temperature, pH value and other influencing factors on the stability of  $\beta$ -carotene, and to explore the antioxidant capacity of  $\beta$ -carotene according to the scavenging DPPH and ABTS free radicals.

**Keywords:** *Trichoderma sinensis* fruit;  $\beta$ -carotene; Extraction process

### 引言:

木鳖果原产于东亚、东南亚等地区, 在我国广西和云南等地也有所分布。木鳖果凭借自身丰富的营养元素和生物活性物质备受青睐, 国外针对木鳖果的研究大多集中在成分与含量、生物活性、提取干燥技术等方面。国外有关学者通过超声辅助溶剂技术提取木鳖果假种皮中的果油和 $\beta$ -胡萝卜素, 还有部分学者为了让提取过程更加环保且成本更加低廉, 选择利用酶来辅助提取 $\beta$ -胡萝卜素, 对原有的木鳖果假种皮提取工艺进行

改进, 例如通过喷雾干燥法的方法制备木鳖果油微胶囊, 从而保障生物活性成分。如今我国针对木鳖果的种子也进行了一系列的组分和活性、功能等方面研究, 但木鳖果的研究仍然不够深入, 利用木鳖果假种皮提取 $\beta$ -胡萝卜素的工艺方法也有一些需要优化的环节。国内学者对 $\beta$ -胡萝卜素的组分进行分析, 利用真空冷冻干燥技术和热泵低温干燥等工艺方法研究木鳖果干燥工艺。为进一步优化 $\beta$ -胡萝卜素提取工艺, 应当了解木鳖果的成分特性和功能, 以及提取工艺中的影响因素, 提高

$\beta$ -胡萝卜素稳定性也是研究中的重点方向,期望木鳖果能够在更多领域中得到广泛应用。

## 1 $\beta$ -胡萝卜素概述

### 1.1 $\beta$ -胡萝卜素的结构和理化性质

$\beta$ -胡萝卜素的分子式为 $C_{40}H_{56}$ ,相对分子量536.88。 $\beta$ -胡萝卜素主要由4个异戊二烯双键首尾衔接构成,分子两端都有切割 $\beta$ -紫罗酮环,拥有全反式、9-顺式、13-顺式、15-顺式等多种形式。

$\beta$ -胡萝卜素表面为深红或黑红色,具有光泽的斜方六面体或结晶粉末。 $\beta$ -胡萝卜素不溶于水但溶于二氧化碳、乙烷、苯等物质,几乎不溶于乙醇。 $\beta$ -胡萝卜素的稀释液为黄色,在浓度提高时稍偏于橙色,溶剂极性原因可能使其出现红色。在氧、光、温度的作用下可能出现氧化还原反应,弱碱条件下更加稳定。

### 1.2 $\beta$ -胡萝卜素的稳定性

$\beta$ -胡萝卜素对于储藏条件具有一定要求,若无法满足储藏要求可能会出现自氧化的现象。在应用 $\beta$ -胡萝卜素的功能性食品中,自氧化问题可能造成食品质量缺陷,例如酸败现象,也可能导致生物活性损失,VA原活性与抗氧化能力都可能由于自氧化现象而降低。 $\beta$ -胡萝卜素在油脂中时,稳定性会因为油脂的不饱和度提升而提升,如不饱和脂肪酸可以对蛋黄中的 $\beta$ -胡萝卜素产生一定的保护效果。

## 2 木鳖果假种皮中 $\beta$ -胡萝卜素提取实验

### 2.1 材料选择

在木鳖果采摘后,假种皮部分取下置于真空状态下冷冻干燥,经过干燥处理后果干部分利用组织破碎机研磨为粉末状,在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的环境下冷冻储藏。

### 2.2 设备选择

选择GX-03150型克多功能粉碎机;LQ-A30002型电子天平;KQ-100DE型超声破碎机;L3660D型低速离心机;UV-6100型紫外分光光度仪;GZX-9240MBE型电热鼓风干燥箱。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 $\beta$ -胡萝卜素提取

木鳖果假种皮提取 $\beta$ -胡萝卜素的工艺方法如下:将木鳖果去皮后留下假种皮,在 $40^{\circ}\text{C}$ 的干燥环境下放置4h并去核处理,并且保证恒温恒重。之后进行粉碎,利用60目筛过筛,通过超声辅助提取假种皮中的 $\beta$ -胡萝卜素,之后进行离心过滤,上清液便是 $\beta$ -胡萝卜素提取液。

#### 2.3.2 单因素实验

#### (1) 超声波功率对 $\beta$ -胡萝卜素提取量的影响

取5份木鳖果假种皮粉,每份取重1g,在假种皮粉中加入无水乙醇和乙酸乙酯,两种试剂的比例为1:1,处于 $55^{\circ}\text{C}$ 的温度下持续45min,液料比处于20:1上下通过超声波辅助提取,分析超声波功率在50~90W间时对提取量的影响,每10W为一区间,开展3次平行试验,目的在于寻找最符合要求的超声功率。

#### (2) 超声波温度对 $\beta$ -胡萝卜素提取量的影响

以相同的规格称取木鳖果假种皮粉和加入混合试剂,在超声波功率70W、持续45min、液料比20:1的情况下实现超声波辅助提取,分析温度处于25、35、45、55、 $65^{\circ}\text{C}$ 时对于 $\beta$ -胡萝卜素提取量带来的影响,同样开展3次平行试验,寻找最理想的超声波温度。

#### (3) 超声波时间对 $\beta$ -胡萝卜素提取量的影响

称取木鳖果假种皮粉及混合试剂规格相同的情况下,在超声波功率70W、 $55^{\circ}\text{C}$ 、液料比20:1的情况下实现超声波辅助提取,分析超声波时间为15、30、45、60、75min时对于 $\beta$ -胡萝卜素提取量带来的影响,通过3次平行试验找到最理想的超声波时间。

#### (4) 液料比对 $\beta$ -胡萝卜素提取量的影响

木鳖果假种皮粉与混合试剂规格相同,超声波功率70W、温度 $55^{\circ}\text{C}$ 、时间45min的情况下进行超声波辅助提取,待测液料比方案分别为10:1、15:1、20:1、25:1、30:1(mL/g),分析不同液料比对 $\beta$ -胡萝卜素提取量带来的影响,利用3次平行试验找到理想的液料比。

### 2.3.3 正交优化试验

选择四个考察因素,分别为上述单因素实验中的超声波功率、温度、时间以及液料比,分别代称为A、B、C、D四个因素,选取3个对提取量影响较为明显的水平开展 $L_9(3^4)$ 正交优化试验,将 $\beta$ -胡萝卜素的提取量作为主要的评价指标,探索木鳖果假种皮 $\beta$ -胡萝卜素提取工艺的优化,正交时延因素水平如表1所示<sup>[1]</sup>。

表1 正交试验因素水平

水平	因素			
	超声波功率 (W)	超声波温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	超声波时间 (min)	液料比 (mL/g)
1	60	45	30	15:1
2	70	55	45	20:1
3	80	65	60	25:1

#### 2.3.4 $\beta$ -胡萝卜素含量测定

称量0.0125g $\beta$ -胡萝卜素标准样品,在无水乙醇中溶解,定容到50mL时制备为 $\beta$ -胡萝卜素标准液。之后

将β-胡萝卜素标准液吸收0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mL标准液，利用无水乙醇定容到25mL，浓度可以达到1、2、3、4、5μg/mL，在451nm处检测吸光值，将吸光值作为纵坐标，标准β-胡萝卜素浓度为横向坐标，绘制β-胡萝卜素标准曲线如图1，结合标准曲线及样品吸光值分析提取液的浓度。

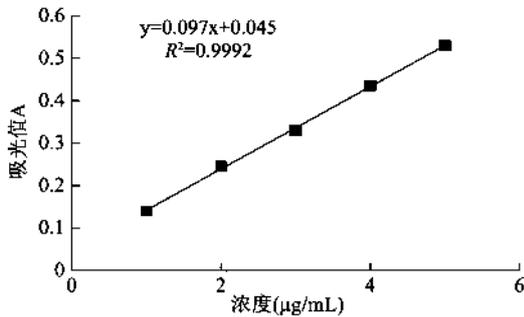


图1 β-胡萝卜素标准曲线

在测定木鳖果假种皮中β-胡萝卜素含量时，可以参照以下公式：

$$\beta\text{-胡萝卜素提取量} = \frac{C \times V \times B}{1000 \times M} \quad (1)$$

在上述式(1)中，C为β-胡萝卜素的浓度，单位(μg/mL)；V为提取液体积，单位(mL)；B为稀释倍数；M为木鳖果假种皮粉的重量，单位(g)。

### 2.3.5 β-胡萝卜素的纯化

在实验过程中，将β-胡萝卜素浸提剂设置为乙醇，在色素中难以杜绝醇溶蛋白的加入。为有效提升β-胡萝卜素纯度，对其pH值进行调整至关重要，可以达到蛋白质的等电点和沉淀，通过离心过滤的方式去除醇溶蛋白，过程如下：称取木鳖果假种皮色素醇溶液100mL，通过0.05mol/L的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液来控制溶液的pH值，在pH值处于6时溶液就开始沉淀，之后将溶液放在-15℃的冰箱之中冷冻12h，可以直观观察到絮状物在溶液中快速沉淀。之后通过离心机以4000r/min的转速持续10min，能够获得纯度更高的β-胡萝卜素澄清液。

### 2.3.6 β-胡萝卜素稳定性实验

#### (1) 光照影响

为测定光照对于β-胡萝卜素的保留率带来的作用，配0.05%木鳖果假种皮色素醇溶液，并取两份样分别放置在室外和室内阴暗处间隔24h进行一次溶液吸光值试验，按照公式(2)测算保留率。

$$\text{保留率} = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

在式(2)中，A为吸光值，A<sub>0</sub>为阴暗处作为对照组样品的吸光值。

#### (2) 温度影响

为测定温度对于β-胡萝卜素保留率带来的影响，同样配置0.05%木鳖果假种皮色素醇溶液，分别设定5、20、50、75、100℃的温度状态，间隔1h进行一次溶液吸光值测定，同样按照公式(2)计算β-胡萝卜素保留率<sup>[2]</sup>。

#### (3) pH值影响

配置0.05mol/L柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲剂，pH值为3、4、5、6、7、8，并且保证每个缓冲液的色度浓度保持在0.05%左右，温度控制在4℃，间隔1h测定溶液吸光值，按照公式(2)计算β-胡萝卜素的保留率。

### 2.3.7 抗氧化能力测定

#### (1) 清除DPPH自由基能力

配置浓度0.1mol/L的DPPH乙醇溶液，并且配置不重复的β-胡萝卜素粗提取物溶液。取样浓度不同的β-胡萝卜素溶液，每份样品2mL，加入2mL的DPPH乙醇溶液，充分混合后放置在正常室温下30min。之后制备另一种反应液，由2mL乙醇和DPHH乙醇溶液进行混合。第三种反应液取浓度不同的β-胡萝卜素溶液2mL并加入2mL的乙醇。于517nm处测定三种反应液的吸光值，假定为A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>，进行3次平行试验，根据公式(3)来计算清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_3) / A_2] \times 100\% \quad (3)$$

#### (2) 清除ABTS自由基能力

取7mmol/L的ABTS溶液以及2.45mmol/L的过硫酸钾溶液并充分混合，之后放在室温的暗处充分反应。之后利用无水乙醇将溶液在734nm的吸光值调整到0.7左右，配置浓度不重复的β-胡萝卜素溶液，取0.5mL的样本溶液加入2mL的ABTS+溶液，避光环境下反应20min，在735nm处测定吸光值，根据公式(4)测算清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = [1 - (A_c - A_s) / A_c] \times 100\% \quad (4)$$

在式(4)中A<sub>c</sub>标识未加入样品溶液的吸光值；A<sub>s</sub>为加入样品溶液的吸光值。

### 3 数据统计与分析

利用Origin8.6进行图片制作，试验过程所得数据利用Excel和SPSS22.0系统进行计算，单因素方差分析采用ANOVA。

### 4 结果分析

#### 4.1 超声波功率的影响

超声波功率对于β-胡萝卜素提取量的影响如图2，在超声波功率逐渐提高的状态下，β-胡萝卜素的提取量

呈现先增长后跌落的趋向。经分析  $\beta$ -胡萝卜素的提取量在功率为70W时约为1.54mg/g达到最大值，原因可能在于超声功率提高的条件下空化作用也得到了强化， $\beta$ -胡萝卜素更快溶出。但功率高于70W时，由于 $\beta$ -胡萝卜素已经溶出大部分，所以提取量不会再持续上升，所以超声功率在70W时 $\beta$ -胡萝卜素提取量达到最大值<sup>[3]</sup>。

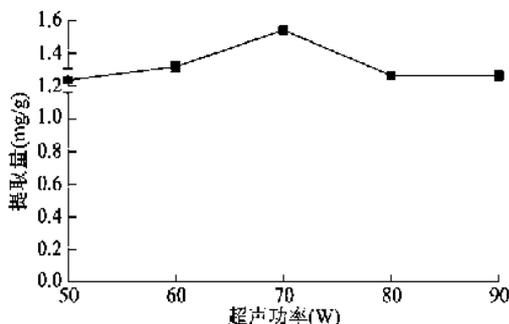


图2 超声功率对提取量的影响

#### 4.2 超声温度的影响

超声波辅助提取时温度对于 $\beta$ -胡萝卜素带来的影响如图3，从图中能够了解到，温度处于25~55℃区间时为持续上升的趋势，55℃之后则开始下降，55℃时 $\beta$ -胡萝卜素提取量达到最大值，约为1.824mg/g。温度超出55℃后开始下降的原因可能是过高的温度导致 $\beta$ -胡萝卜素稳定性不足，甚至出现了降解的情况，所以55℃为最佳温度。

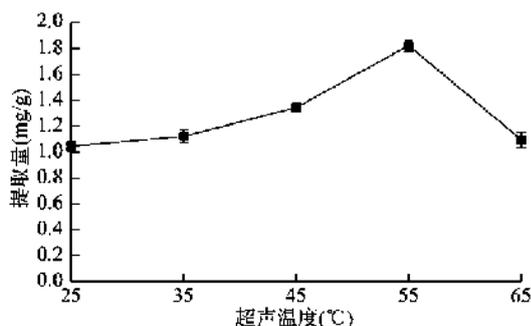


图3 超声温度对提取量的影响

#### 4.3 超声时间对提取量的影响

超声时间对于 $\beta$ -胡萝卜素提取量的影响如图4，根据图中的变化曲线能够了解到，超声时间在15~75min之间时明显出现了不太稳定的波动，15~30min时为下降趋势，30~45min则为上升趋势，超声时间处于45min时 $\beta$ -胡萝卜素提取量达到最大值，约为1.478mg/g。从图中能够看到，当时间处于45~60min时， $\beta$ -胡萝卜素的提取量总体为降低态势但变化幅度却非常小，原因可能在于前述55℃的温度下45min即可达到理想的提取效果，但55℃的温度若持续时间太长就会对 $\beta$ -胡萝卜

素产生破坏，所以为确保 $\beta$ -胡萝卜素提取量以及质量，应尽量在45min的时间进行提取<sup>[4]</sup>。

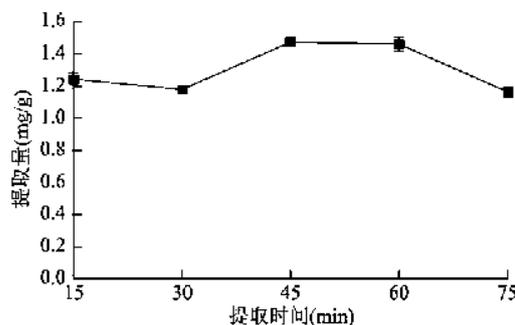


图4 提取时间对提取量的影响

#### 4.4 液料比对提取量的影响

液料比对提取量的影响能够了解到液料比在1:5~1:15g/mL之间时处于持续上涨的态势，期间随着液料比的提高 $\beta$ -胡萝卜素的提取量也会随之提升。在液料比为1:15g/mL时提取量达到了最大值，约为1.424mg/g，但液料比继续提高则会降低 $\beta$ -胡萝卜素的提取量。造成这一现象的原因在于，液料比的不断提升， $\beta$ -胡萝卜素提取量也会不断提高，但若是液料比高于1:15，那么溶出的脂溶性杂质就会和乙醇发生反应，所以 $\beta$ -胡萝卜素提取量反而会降低，因此可以确定提取 $\beta$ -胡萝卜素所适宜的液料比为1:15g/mL。

#### 4.5 正交试验结论

正交试验的结果如表2所示。

表2 正交试验结果

实验序列	A	B	C	D	提取量
1	1	1	1	1	1.223
2	1	2	2	2	1.641
3	1	3	3	3	2.201
4	2	1	1	3	1.566
5	2	2	3	4	1.298
6	2	3	2	2	1.272
7	3	1	1	2	1.918
8	3	2	3	3	1.395
9	3	3	2	1	1.293
K <sub>1</sub>	5.065	4.707	3.888	4.014	
K <sub>2</sub>	4.336	4.535	4.498	4.830	
K <sub>3</sub>	4.605	4.765	5.617	5.161	
K <sub>1</sub>	1.688	1.569	1.296	1.388	
K <sub>2</sub>	1.445	1.511	1.501	1.610	
K <sub>3</sub>	1.535	1.588	1.871	1.720	
R	0.243	0.078	0.576	0.382	

按照表2可以得出结论，若通过极差分析结果去分

析,就能够得到 $R_C > R_D > R_A > R_B$ 的结论,所以四个因素针对 $\beta$ -胡萝卜素提取量的影响从小到大排列依次为超声事件、超声功率、液料比、超声温度。超声温度对于 $\beta$ -胡萝卜素提取量的影响最为明显,液料比同样会带来显著作用,而超声功率与时间对于 $\beta$ -胡萝卜素的提取量影响并不太明显。在实验设计过程中,通过优化得到的 $\beta$ -胡萝卜素最佳条件为超声功率60W、超声时间60min、超声温度65℃、液料比1:20g/mL<sup>[5]</sup>。

#### 4.6 稳定性实验结果

##### 4.6.1 光照影响

光照影响的结论。从图中能够了解到,若处于避光环境下, $\beta$ -胡萝卜素的保留率基本上能达到100%,并且具有较高的稳定性。持续性的光照会导致 $\beta$ -胡萝卜素的降解作用,所以保留率也会随着光照时间的增加而降低。在光照持续5d的情况下, $\beta$ -胡萝卜素的保留率只有15%左右,这充分表明了 $\beta$ -胡萝卜素在光照的持续作用下其稳定性也会不断降低,经分析能够了解到,光照会提高 $\beta$ -胡萝卜素的降解速度,所以避光环境更有助于 $\beta$ -胡萝卜素的保存。

##### 4.6.2 温度影响

温度影响的试验结果可以得知,处于4℃或25℃的情况下 $\beta$ -胡萝卜素的保留率最高,最高时可以达到100%并且浮动程度非常小。在处于50℃温度下时, $\beta$ -胡萝卜素的保留率稍微提升,可能因为加热过程中其他的显色色素被溶出。在100℃的条件下 $\beta$ -胡萝卜素的保留率进一步减少,6h之后降低到了71.4%左右。所以从整体的角度来看 $\beta$ -胡萝卜素并不具备耐高温能力,所以正常室温就可以很好保存 $\beta$ -胡萝卜素<sup>[6]</sup>。

##### 4.6.3 pH值影响

pH值影响的试验结果能够了解到,若pH值为3、4、5、6为酸性的情况下,则 $\beta$ -胡萝卜素保留率相对更高,但在时间的不断推移下开始逐渐稳定下来,处于110%上下。若处于中性、碱性的pH值下, $\beta$ -胡萝卜素保留率则相对较低,经过2h的反应时间之后仅有60%的保留率,同时逐渐趋于稳定状态。在试验过程中,pH值为8的碱性环境下溶液生成了大量的黄色絮状沉淀物,经分析可能是 $\beta$ -胡萝卜素处于碱性溶液中会快速沉降,在吸光值测定过程中,显色物质仍然为 $\beta$ -胡萝卜素,所以可以判断出吸光度降低的结果。

#### 4.7 抗氧化测定结果

##### 4.7.1 清除DPPH自由基能力

$\beta$ -胡萝卜素对于DPPH自由基的清除效果会随着浓度的不断提高呈持续上升的趋势,而且整体上来看量效关系较为优秀,IC<sub>50</sub>在33.5 $\mu$ g/mL左右。有关学者在 $\beta$ -胡萝卜素清除DPPH自由基方面提取了柴达木枸杞 $\beta$ -胡萝卜素,IC<sub>50</sub>为34.08 $\mu$ g/mL左右,这也能从侧面印证 $\beta$ -胡萝卜素可以有效清除DPPH自由基。和阳性对照BHT进行对比分析,针对DPPH自由基的清除效果有所不同, $\beta$ -胡萝卜素清除DPPH的效果稍逊色于BHT,但在浓度不断提升的情况下,两者之间的距离也会不断拉近。在 $\beta$ -胡萝卜素浓度高于60 $\mu$ g/mL时,清除DPPH的效果会高于BHT。

##### 4.7.2 清除ABTS自由基水平测试结果

$\beta$ -胡萝卜素清除ABTS自由基的整体效果同样具有较为优秀的量效关系,IC<sub>50</sub>在26.14左右。在测试过程中, $\beta$ -胡萝卜素针对ABTS自由基的清除效果较低于BHT,但与清除DPPH自由基的现象相同,在 $\beta$ -胡萝卜素浓度不断提高的条件下,清除ABTS自由基的效果逐渐赶超BHT。 $\beta$ -胡萝卜素浓度处于60 $\mu$ g/mL的条件下,清除ABTS自由基的效果就已经高达70%,因此可以认定木鳖果假种皮 $\beta$ -胡萝卜素对于ABTS自由基有着十分理想的清除效果<sup>[7]</sup>。

## 5 结论与分析

根据上述的实验结果能够了解到,若选择超声波辅助乙醇提取 $\beta$ -胡萝卜素,在超声波功率60W、时间60min、温度65℃、液料比1:20g/mL的情况下效果最为理想,提取量大约在2.21mg/g左右。

稳定性实验过程中可以了解到, $\beta$ -胡萝卜素针在光照、温度、pH值等条件不同的情况下会受到不同程度影响,其中光照与温度都可能导致 $\beta$ -胡萝卜素降解,所以提取过程中应当重点控制温度与光照,应当在室温或低温环境下进行 $\beta$ -胡萝卜素的贮存。

#### 参考文献:

- [1]张冠华,刁倩楠.类胡萝卜素研究进展[J].现代农业,2021(04):46-49.
- [2]向珊珊.木鳖果假种皮类胡萝卜素的提取纯化及其纳米粒的制备[D].北京林业大学,2019.
- [3]向珊珊,张楠,潘晴,李雨浩,吴傲,孙爱东.木鳖果假种皮中 $\beta$ -胡萝卜素的提取工艺优化及稳定性研究[J].食品工业科技,2018,39(21):191-195+201.