

分类号:

密 级: 公 开

学 号: 20172007027

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



番茄皮渣中番茄红素与多糖的提取研究

学 位 申 请 人

邓龙

指 导 教 师

党艳艳 (副教授)

申请学位门类级别

医学硕士

学 科、专 业 名 称

药学

研 究 方 向

天然产物资源化利用

所 在 学 院

化学化工学院

中国·新疆·石河子

2020 年 6 月

分类号:

密 级: 公 开

学 号: 20172007027

单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



番茄皮渣中番茄红素与多糖的提取研究

学 位 申 请 人	邓龙
指 导 教 师	党艳艳 (副教授)
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	药学
研 究 方 向	天然产物资源化利用
所 在 学 院	化学化工学院

中国·新疆·石河子

2020 年 6 月

**Study on extraction of lycopene and polysaccharides
from tomato pomace**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Deng Long

(Pharmacy)

Dissertation Supervisor: A.P. Yanyan Dang

June, 2020

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 邓龙

时间：2020 年 6 月 7 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 邓龙

时间：2020 年 6 月 7 日

导师签名： 袁艳艳

时间：2020 年 6 月 7 日

摘 要

新疆是我国最大的番茄种植加工基地, 据不完全统计, 2018 年全新疆番茄耕种的总面积超越 110 万亩, 番茄酱总产量达至 101.83 万吨。番茄皮渣是番茄酱处理过程中的工业废料, 但其是番茄红素和多糖等活性物质较为丰富的来源。其中, 番茄红素是一种很有应用前景的天然抗氧化剂, 具有抗癌抗肿瘤、延缓衰老等多种功效, 已被广泛应用于制药、化妆品、保健品等领域。目前, 研究者将番茄红素视为番茄中最重要的活性成分, 主要研究其提取工艺和生物活性, 但对于番茄多糖、蛋白质及番茄籽油并未作出系统性研究。多糖是生命有机体中必不可少的成分, 具有特殊的活性。因此, 本研究以番茄皮渣为原材料, 采用盐析萃取技术对其中番茄红素和多糖的提取工艺进行了研究, 并对所获得的番茄红素和多糖粗提物进行柱层析纯化, 将番茄皮渣中多种有效成分实现了一步提取与分离。

首先, 研究了酶辅助双水相萃取法从番茄皮渣中萃取番茄红素和多糖。研究了有机溶剂及无机盐含量、粉碎目数、料液比、静提时间、酶种类以及酶解条件对番茄红素和多糖得率的影响; 并采用响应面法优化酶辅助双水相萃取番茄红素和多糖的工艺条件。结果表明, 当双水相体系组成为 31% (w/w) 乙醇/16% (w/w) 磷酸氢二钾, 粉碎目数为 160 目, 料液比为 1:40 g/mL, 静提时间为 90 min, 混合酶为果胶酶: 菠萝蛋白酶 1:1, 酶量为 2.0%, pH 6.0, 酶解温度为 50 °C, 酶解时间为 119 min, 番茄红素和多糖得率达到最大, 分别为 15.69 mg/100 g 和 77.16 mg/g。此外, DPPH 法测得酶辅助双水相提取得到的番茄红素 IC₅₀ 为 3.37 μg/mL, 抗氧化活性优于溶剂提取法。

其次, 研究了三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖。考察了正己烷、乙醇及无机盐含量等因素对萃取的影响。结果显示, 三液相萃取番茄皮渣中叶番茄红素与多糖的最佳工艺为: 9% (w/w) 正己烷/33% (w/w) 乙醇/17% (w/w) 磷酸氢二钾, 粉碎目数为 160 目, 料液比为 1: 50 g/mL, 室温静置分相 90 min; 傅里叶红外光谱显示上相提取物均为全反式番茄红素; 该方法得到番茄红素和多糖得率均高于三溶剂介导萃取、超声波辅助萃取和微波辅助萃取法。

再次, 研究了酶辅助三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖。考察了酶种类及酶解条件对提取的影响。结果表明, 2% 的果胶酶, 在 pH 6.0、酶解温度为 45 °C 条件下酶解 90 min, 番茄红素和多糖分别达到最大值为 127.0 mg/100 g 和 59.8 mg/g。傅里叶红外光谱检测结果显示果胶酶并不能破坏番茄红素的结构。该方法所得到的番茄红素和多糖的得率均高于酶辅助三溶剂介导萃取和三液相萃取, 且具有更好的抗氧化活性。

最后, 选用大孔树脂对酶辅助三液相的上下相粗提物完成提纯。通过柱层析法对上相粗提物进行纯化; 对下相粗提物进行了纯化和结构的初步分析, 考察了 AB-8 和 D101 两种树脂的脱色效果、Sevage 法除蛋白次数、分级沉降和刚果红实验。结果显示, 上相粗提物经柱层析纯化后可得到 7.8 g 番茄红素晶体; 下相粗提物经 AB-8 型大孔树脂脱色、除蛋白反复 6 次效果最好; 在分级沉降实验中 P70 组分质量最大, 且刚果红实验显示番茄多糖具有稳定的三螺旋结构。

关键词: 番茄皮渣; 盐析萃取; 酶; 番茄红素; 多糖

Abstract

Xinjiang is China's main tomato sauce processing base. According to incomplete statistics, in 2018, the tomato planting area in Xinjiang reached more than 1.1 million mu, and the total tomato sauce production reached 1.0183 million tons. Tomato pomace are leftovers in the production of ketchup, but they are rich in active substances such as lycopene and polysaccharides. Lycopene is a promising natural antioxidant with many functions such as anti-cancer, anti-tumor, anti-aging, etc. It has been widely used in pharmaceutical, cosmetics, health products and other fields. At present, there are many reports on lycopene in tomato pomace, but few reports on other active ingredients such as polysaccharides, proteins, and tomato seed oil. Among them, polysaccharides are essential components in all living organisms and have special activity. Therefore, in this study, tomato pomace was used as the raw material, and the extraction process of lycopene and polysaccharides were studied by used salting-out extraction technology, and the crude extract obtained was preliminary purified to realize the lycopene and polysaccharides one-step extraction and coarse separation.

Firstly, enzyme-assisted aqueous two-phase extraction of lycopene and polysaccharides from tomato pomace was studied. The effects of the concentration of solvent and inorganic salt, the number of crushing meshes, the rest time of the material-liquid ratio and the enzymatic hydrolysis factors on the yield of the target product were investigated, and the response surface method was used to optimize the enzyme-assisted aqueous two-phase extraction of lycopene and polysaccharides from tomato pomace. The results showed that when the aqueous two-phase system was consisted of 31% (w/w) ethanol/16% (w/w) dipotassium phosphate, extraction under the conditions of 160 mesh and material-liquid ratio of 1: 40g/mL for 90 min. After 2% mixed enzyme (pectinase: bromelain 1: 1) hydrolyzed at pH 6.0 and 50 °C for 119 min, the maximum yields of lycopene and polysaccharide were 15.69 mg/100 g and 77.16 mg/g, respectively. In addition, compared with the solvent method, the crude lycopene extract obtained by enzyme-assisted aqueous two-phase extraction has a better scavenging effect on DPPH ·, with an IC₅₀ of 3.37 µg/mL.

Secondly, the main active ingredients of the three liquid phase extraction tomato pomace were studied. The effects of factors such as the concentration of n-hexane, ethanol and inorganic salts on the extraction were investigated. The results showed that when the three liquid phase system consisted of 9% (w/w) n-hexane/33% (w/w) ethanol/17% (w/w) dipotassium phosphate, the effect was the best when the meshing number was 160 mesh and material-liquid ratio of 1: 50 g/mL for 90 min. The fourier transform infrared spectroscopy showed that the top phase extracts were all-trans-lycopene; the yields of lycopene and polysaccharides by this method were high than tri-solvent-mediated extraction, ultrasonic and microwave-assisted extraction.

Thirdly, enzyme-assisted three-liquid extraction of lycopene and polysaccharides from tomato pomace was studied. The effects of enzyme types and enzymatic conditions on extraction were investigated. The results showed that 2% pectinase was hydrolyzed at pH 6.0, enzymatic hydrolysis for 90 min at 45 °C, the maximum yield of lycopene and polysaccharides were 127.0 mg/100 g and 59.8 mg/g, respectively. The functional groups structure of lycopene obtained by EA-TLPE was not destroyed showed by Fourier transform infrared spectrum; the yields of lycopene and polysaccharides by this method are high than enzyme assisted tri-solvent-mediated extraction and the three liquid phase extraction, And better antioxidant activity.

Finally, the macroporous resin was used to purify lycopene and polysaccharides crude extracts obtained from enzyme-assisted three-liquid phase. The top phase crude extract was purified by column chromatography; the bottom phase crude extract was purified and the structure was preliminary analyzed, The decolorization effects of AB-8 and D101 resins, the number of protein removals by the Sevage method,

the graded sedimentation, and the Congo red experiment were investigated. The results show that 7.8 g of lycopene crystals can be obtained by column chromatography purification of the crude extract of the top phase; the lower phase crude extract was decolorized with AB-8 type macroporous resin, and the effect of removing protein were repeated six times. The mass of P70 component is the largest in the graded sedimentation experiment. and Congo red experiment showed that the tomato polysaccharides had a stable triple helix structure.

Key Words: Tomato pomace; Salting-out extraction; Enzyme; Lycopene; Polysaccharides

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第 1 章 文献综述.....	1
1.1 番茄概述.....	1
1.2 番茄皮渣概述.....	1
1.2.1 番茄皮渣化学成分分析.....	1
1.2.2 番茄红素萃取现况.....	2
1.2.3 多糖提取现状.....	3
1.2.4 酶辅助提取法.....	4
1.2.5 盐析萃取技术.....	5
1.3 研究内容和意义.....	6
1.3.1 研究内容.....	6
1.3.2 研究意义.....	6
第 2 章 酶辅助两相盐析萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的研究.....	7
2.1 引言.....	7
2.2 材料与仪器.....	7
2.3 分析方法.....	8
2.3.1 番茄红素的含量测定.....	8
2.3.2 多糖的含量的测定.....	8
2.3.3 抗氧化活性测定.....	8
2.3.4 统计分析.....	8
2.4 实验方法.....	8
2.4.1 两相盐析体系组成对番茄皮渣中番茄红素和多糖萃取影响.....	8
2.4.2 酶辅助两相盐析萃取单因素实验.....	9
2.4.3 响应面优化实验.....	10
2.4.4 不同萃取方法对比研究.....	10
2.5 结果讨论.....	10
2.5.1 两相盐析萃取体系的筛选.....	10
2.5.2 酶辅助双水相体系优化.....	11
2.5.3 单因素实验.....	13
2.5.4 响应面优化实验.....	19
2.5.5 不同提取方法对比及抗氧化活性对比.....	21
2.6 小结.....	21
第 3 章 三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的研究.....	22

3.1	引言	22
3.2	材料与仪器	22
3.3	分析方法	22
3.4	实验方法	22
3.4.1	三液相体系组成及筛选	22
3.4.2	三液相体系优化	23
3.4.3	三液相萃取工艺参数优化	23
3.4.4	三液相萃策略对番茄皮渣中有效成分的影响	23
3.4.5	不同提取方法对比	23
3.5	结果与讨论	24
3.5.1	三液相体系筛选结果	24
3.5.2	三液相体系优化结果	25
3.5.3	三液相萃取影响因素研究	26
3.5.4	萃取策略对番茄红素和多糖提取的影响	28
3.5.5	红外光谱分析	29
3.5.6	不同提取方法得率及抗氧化活性对比	29
3.6	小结	30
第 4 章	酶辅助三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的研究	31
4.1	引言	31
4.2	材料与仪器	31
4.3	分析方法	31
4.4	实验方法	31
4.4.1	酶辅助三液相萃取过程	31
4.4.2	酶辅助三液相萃取工艺参数优化	31
4.4.3	红外光谱分析	32
4.4.4	不同提取方法的对比	32
4.5	结果与讨论	32
4.5.1	酶辅助三液相工艺参数优化结果	32
4.5.2	红外光谱分析	36
4.5.3	不同提取方法及 DPPH·清除能力对比	37
4.6	小结	37
第 5 章	酶辅助三液相萃取番茄皮渣粗提物的初步纯化及分析	39
5.1	引言	39
5.2	材料与仪器	39
5.3	分析方法	39

5.4	实验方法	40
5.4.1	粗提物的获得	40
5.4.2	树脂的预处理	40
5.4.3	番茄红素油树脂的纯化	40
5.4.4	多糖的纯化及结构分析	40
5.5	结果与讨论	41
5.5.1	柱层析法纯化番茄红素	41
5.5.2	番茄多糖的纯化及结构分析	41
5.6	小结	44
第 6 章	结论与展望	45
6.1	结论	45
6.2	展望	45
	参考文献	47
	致 谢	52
	作者简介	53

第1章 文献综述

1.1 番茄概述

番茄，为茄科番茄属一年生或多年生草本植物，原产南美洲，现全世界广泛栽培。番茄是世界上最受欢迎的蔬菜之一，作为一种时令蔬菜，番茄还以各种加工产品的形式食用，例如汁、果泥和番茄酱等^[1]。粮农组织（FAO）的数据显示番茄的种植面积和全球产量都在增加，番茄主要产于中国。目前，中国各省份都在普遍栽植番茄，而新疆因其昼夜温差大、日照时间长、降雨量较少的特殊自然条件，为大规模栽植番茄提供了有利的自然环境，成为了中国主要番茄种植加工基地。据不完全统计，2018年新疆番茄栽植面积突破110万亩。番茄的种植之所以进行如此盛行，是因为番茄富含番茄红素，酚类，有机酸，维生素和许多其它有益成分^[2]。据研究者发现，人体必需每天食用足够的番茄才能满足人体对器官的日常需求，因此民间又称番茄味“神奇的菜中之果”。

1.2 番茄皮渣概述

番茄作为一种时令水果，仅将一小部分番茄作为新鲜商品食用，相比之下，绝大多数番茄被加工成果汁和番茄酱物等。在加工这些产品时，会产生通常称为番茄皮渣的副产品，该副产品主要由果皮和种子以及少量果肉组成。平均而言，皮渣约占所用原材料的3-5%（w/w）^[3]。尽管对番茄皮渣量的统计非常困难，但世界上番茄皮渣的总产量估计为 $5.4-9.0 \times 10^6$ 吨。因此，番茄皮渣的处置或利用是一个不可避免的问题，对食品工业极为重要。一方面，由于番茄皮渣水分含量高，营养丰富，如果处理不当，很容易变质，构成环境负担，浪费资源；另一方面，番茄皮渣的合理利用在一定程度上将废弃物转化为可利用的资源，如番茄红素，多糖和番茄籽油。

1.2.1 番茄皮渣化学成分分析

番茄皮中富含番茄红素，其浓度甚至达到 $288 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ^[4]。番茄籽中富含油脂和蛋白等活性物质^[5]。孙庆杰的研究^[11]表明在番茄皮渣中检测到膳食纤维、酚类物质和多糖等活性成分。

（1）番茄红素

番茄红素的分子式为 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ，分子量为536.85，引发番茄特征红色的原因是其化学结构拥有2个非共轭和11个共轭的碳碳双键^[6]。番茄红素是一种深红色针状晶体结构，不溶于水，微溶极性溶剂，可溶于石油醚、正己烷、丙酮等有机溶剂。番茄红素在有机溶剂中的溶解度一般可随温度的升高而增大。番茄红素是类胡萝卜素中的一种；在成熟番茄中，番茄红素是含量最高的类胡萝卜素，最高可占到80%至90%，作为一种重要的类胡萝卜素，其具有更强的抗氧化活性，单线态氧淬灭速率常数远远高于维生素E^[7]。此外，其拥有卓越的抗氧化能力已被用于通过生物活性降低心血管疾病的风险^[8]和前列腺癌^[9]，已经在制药、保健食品及化妆品领域表现出良好的应用前景^[10]。

（2）多糖

多糖是一种聚合物，是自然界中一切有生命体中不可少的重要成分，它与生命体重

的各种生理机能有着密切的关系。近年来,存在于植物、海洋生物及各种菌类的多糖已被作为具有生物活性的天然产物中的一个重要类型出现。具研究者发现,多糖具有抗肿瘤、免疫、抗凝血、降血糖和抗病毒等活性^[11],且还是造纸和建筑行业的重要原料。已有研究表明多糖的单糖组分不同,所形成的多糖活性也不相同^[12],研究者发现具有半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸的酸性杂多糖普遍具备抗补体活性,其原因是糖醛酸残基可通过经典途径激活补体系统。学者推断出对多糖进行某些特定的结构修饰能产生或提高多糖的某些生物活性^[13]。因此,多糖类逐渐成为学者关注的重点。

(3) 番茄籽油

油脂不仅是生命能源的主要来源之一,而且具有多种重要的生理功能。植物油脂中含量丰富的亚油酸、亚麻酸等成分,是人体内所无法合成的必需脂肪酸,而番茄籽油富含亚油酸和亚麻酸这两种必需脂肪酸。据研究发现,番茄籽油可以有效的降低高脂饮食仓鼠的血浆和肝胆固醇^[14]。番茄籽油除了具有很高的营养价值外,在 180 °C 下加热 50 小时也相当稳定,这有助于其固有的抗氧化剂,如生育酚和多酚^[15]。而且,番茄籽油也是一种良好的食用油和食品佐料,具有抗衰老、预防动脉硬化、改善血液循环和调节身体免疫系统等生理功能^[16]。

(4) 蛋白质

蛋白质是对人类极为重要的营养素,建议成人的每日摄入量约为 800 mg/kg^[17]。劣质和不足蛋白质的摄入会影响成年人体弱,肌肉降低和免疫力下降的风险增加,以及造成儿童生长发育缓慢,体质较差和肾上腺皮质功能退减^[18]。番茄种子富含蛋白质,约为 23.6-40.9 g/100 g,且番茄蛋白具有的营养价值可与大豆和棉籽浓缩物接近^[2]。

(5) 膳食纤维

当前,人类正面对慢性疾病(糖尿病,癌症,高脂血症,肥胖症和冠心病)的威胁,正在全球范围内快速增长。从营养学讲,这主要是因膳食纤维摄入不足所造成的^[19]。据研究发现,膳食纤维具有预防便秘^[20]和癌症^[22]、降低胆固醇^[21]等功能。

1.2.2 番茄红素萃取现况

目前为止,研究者主要以传统溶剂萃取番茄红素;近几年里,研究者将超声波和微波应用到番茄红素的提取当中,并取得了一些成就。

(1) 传统溶剂提取

有机溶剂提取通常将番茄表皮干燥后,用正己烷、丙酮或乙酸乙酯有机溶剂反复浸提,所得到的滤液经浓缩后作为粗品,经一系列精制即得番茄红素。Mahesha^[23]等运用有机混合溶剂从番茄中提取番茄红素,结果表明:当混合溶剂为丙酮:正己烷为 1:3 (V/V) 时,具有较好的提取效果,番茄红素萃取量可达到 4.03 mg/100 g。

溶剂提取法设备和操作简单,可用于工业化生产番茄红素粗产品是一种不错的选择。但由于粗提物中通常含有其它物质,得到的产品中番茄红素的含量仅为 5-6% 左右,不能得到番茄红素的晶体;且有机溶剂后期很难处理干净。

(2) 超声辅助提取

研究者将超声波辅助萃取法广泛应用到从植物中萃取天然色素。在提取过程中超声波可以有效的毁坏细胞壁,使提取溶剂更加容易的渗透到细胞体内,从而减少了提取温度的要求,降低了目标活性物质经高温破坏其结构的损失,使得提取速率升高,获得高效提取的目的。刘璐等^[24]利用超声辅助提取法从番茄皮渣中提取番茄红素,并运用响应面分析法,番茄红素的萃取量可达到 15.3 mg/100 g。Rahimpour S^[25]等采用响应面法研究超声波预处理和酶处理从番茄加工废物中提取番茄红素的适宜性。由于超声波辅助萃取相比于传统溶剂萃取法,不需要在较高温度下进行,也大大缩短了萃取时间,是一种很有应用前景的萃取方法。

(3) 微波辅助萃取

研究者将微波和传统的溶剂提取法相结合,开发了一种新型的萃取方法,其与传统的溶剂提取法相比,可以大大缩短提取时间;增加提取得率;减少有机溶剂使用量和质地纯无污染等优点。Ho^[26]等利用微波辅助提取的方法从番茄皮中提取番茄红素,以乙酸乙酯为提取剂,通过响应面法优化提取条件,最终得率可达 13.6 mg/100 g。

(4) 超临界萃取

超临界 CO₂ 萃取法是一种可持续发展的提取分离技术。Kehili M^[27]等利用超临界萃取技术从番茄皮渣中提取番茄红素,实验在 50 ~ 80 °C 的温度, 300 ~ 500 bar 的压力和 3 ~ 6 g CO₂ /min 的流速下进行 105 min 的提取时间,番茄红素的相对提取率为 32.02 % 至 60.85 %。将超临界 CO₂ 萃取技术应用到番茄红素的萃取,能有效改善传统溶剂提取法高温难题,可有效的保护番茄红素结构不遭到破坏,为番茄红素等热敏性物料的提取建立了新的研究方向;但不足的是,此方法需要昂贵的仪器,且对操作人员专业性要求高。

1.2.3 多糖提取现状

已发表的数据表明,植物多糖通常是通过常规的溶剂提取法获得。但研究者已经开发了各种方法,包括超声和微波提取,以减少提取时间,提高提取产量并提高植物多糖的质量。

(1) 溶剂法

溶剂法时利用多糖易溶于水的性质,通过高温从原料中获得多糖。符梦凡^[28]在以枸杞为原料提取枸杞多糖的实验中,最佳工艺条件为:料液比 1:15 g/mL,在提取温度为 95 °C 的水溶液中提取 180 min,浸提 1~2 次最佳,在此条件下可得到 2.54% 的枸杞多糖。

溶剂法具有成本低、操作简单等优点,但同时也具有实验时间长,温度高,效率低以及多糖可能降解提取时间长、得率低等缺点。

(2) 超声提取法

超声波法主要依靠超声波的空化现象提高了提取剂的穿透力,提高了活性成分的溶出速度和溶出次数^[29],从而提高了多糖的得率。彭川丛等^[30]采用超声辅助热水浸提香菇多糖研究中,与热回流方法相对比,在提取能耗降低了 55.51% 的情况下多糖得率提高

了 33.29%。因此，超声波提取技术可以有效减少提取时间和溶剂用量，从而节约了能源成本。

(3) 微波提取技术

微波萃取法是一个具有许多优点的场强化技术，包括提取时间更短、溶剂用量减少、提取率更高，且对目标产物结构和活性破坏较小等优点^[31]。韩秋菊^[32]通过对比传统水提法和微波辅助法所得到的枸杞多糖，得到微波辅助提取的提取效率远远高于水提法；单次微波提取时间仅为 90 s，而传统提取方法需要 4 h；且微波提取所得到的多糖得率液相对较高。但是，微波辅助提取技术在高频微波场作用下，提取过程反应剧烈，且容易造成提取物出现局部高温现象，对多糖的生物活性会造成某些不可逆的影响。

1.2.4 酶辅助提取法

酶辅助萃取技术已经广泛应用于在天然产物提取各种生物活性物质，其不仅可以节约提取时间、减少溶剂的消耗量，还可以有效提高产物的得率、产品的质量和体系的透明度^[33]。酶辅助提取法是利用酶在缓冲液中将原料细胞壁快速水解，加快活性物质的释放；且酶解反应具有极高的专一性和选择性，可在适宜的温度下完成反应^[34]。自然界中大多数高活性物质主要存在于细胞体内，因此破坏细胞壁可以有效的改善提取效率，是天然产物提取中的一大难点^[35]。酶解后的原料细胞壁松散，所以相比于传统工艺，明显缩短了提取所需时间；酶解反应具有很强的专一性，不需要在高温高压环境下操作，且反应过程操作简单；酶解反应会促使活性成分之间的转换，有可能将活性较低的物质转换为具有较高利用价值的活性物质^[36]。

酶辅助提取法是一种高效环保的提取方法，在天然产物中提取活性物质得到广泛应用，如色素、多糖及酚类物质等多种天然产物的提取。

(1) 天然色素

Strati 等^[37]结合了高压萃取技术和酶辅助提取技术，以果胶酶和纤维素酶组成的混合酶为水解酶，从番茄中提取分离类胡萝卜素和番茄红素，产率分别达到为 13 和 9 mg/100 g，相对于有机溶剂提取产率增加了将近 10 倍。果胶酶和纤维素酶已成功应用于从万寿菊中提取多酚和叶黄素^[38]，并且所获得的酚类物质的活性优于索式提取法。Lenucci 等^[39]将超临界技术和酶解提取技术相结合，利用纤维素酶水解西红柿和榛子的混合物后同时提取番茄红素和脂质物质，产率达到了 40%，比普通的超临界萃取产率提取提高了 3 倍。

(2) 多糖

Qian^[40]将纤维素酶运用于从南瓜中提取多糖，最终多糖的提取率为 17.3%。Qin^[33]等利用木瓜蛋白酶成功的从海参总提取海参蛋白多糖，提取率为 6.44%。陈曦等^[41]利用复合酶（纤维素酶、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶）酶解法萃取洋葱多糖，经过工艺优化，最终得到多糖收率为 18.75%，纯度达 62.00%。

(3) 酚类物质

Parada 等^[42]将蛋白酶、纤维素酶和果胶酶同时运用于从猴头菌中分离出酚类和多糖,结果表明:水溶性成分含量在提取物中明显增高,多酚类物质的产量达到了 32.4%。俞忠明等利用响应面法优化复合酶(纤维素酶、果胶酶和甘露聚糖酶)提取黑蒜多酚,多酚的提取得率最高可达到 8.13 mg/g。

1.2.5 盐析萃取技术

盐析萃取(Salting-out extraction, SOE)是 20 世纪 80 年代所提出的一种新的分离技术,在由分离对象和萃取剂所组成的混合溶液中加入无机盐,混合溶液即可分成液-液两相或液-液-液三相,目标物会主动进入其中某一相中,以达到分离富集的目的,这主要是因为无机盐的盐析作用导致混合液分相富集。目前,盐析萃取广泛用于食品工程,环境科学,医学和生物工程等领域,并逐渐走向工业化^[43, 44]。盐析萃取的最大优势在于可同时提取和纯化目标物。因此,与其它提取方法,大大简化了整个过程,且此方法不需要高温、高压环境,且体系含水量可达 65%~90%,减少了有机溶剂的消耗;所得产品收率和纯度较高,且对环境无污染、符合可持续发展要求,有着广泛的应用前景。

近年来,从中草药中提取活性成分已成为研究者所热门的话题。由从这些植物中提取的活性成分所制成的药物在人类健康维持中起着至关重要的作用。但是,由于天然产物的组成极为复杂,其中还包含部分有毒成分;因此,将混合在一起的天然组分有必要提取和分离为一种或多种混合成的具有生物活性的药用材料,以提高中成药的质量和临床疗效。近年来,国内外报道了大量有关盐析萃取分离和纯化活性成分的研究,为提取天然产物提供了新的研究方法。

Teng^[43]研究了超声波结合乙醇/磷酸氢二钾体系对虎杖中黄色素的提取作用。当双水相体系由 38.09%的乙醇和 14.28%的磷酸氢二钾组成并且整个系统在 500 W 下超声处理 20 分钟时,黄色素的产率为 27.11%。Zhou^[44]开发了一种使用 β -环糊精,碳酸钠和氯化钠所构建的双水相萃取系统,从姜中萃取姜油树脂。结果显示,姜油树脂的分配系数在 0.21 至 0.32 之间,提取率高达 71.6%。Huang^[45]等利用乙醇/磷酸氢二钠体系从山豆根中分离纯化多糖,并运用响应面优化萃取条件,实现了提取分离一步法。Antov^[46]等利用双水相盐析萃取法从小麦糠中分离抗氧化剂,经过一系列单因素实验,使多糖和多酚的得率达到了 16 mg/g 和 2.67 mg/g,大大高于传统方法。Fan^[47]等利用 16.3%的 UCON-50-HB-5100, 10%的 K_2HPO_4 和 1% 乙醇从辣椒油树脂中提取辣椒素,并运用大孔树脂对其进行纯化,得到了较为纯净的辣椒素。Liu 等^[48]采用由 30% (w/w)乙醇/17% (w/w)硫酸铵/40% (w/w)石油醚组成的三液相体系用于分离盾薯蓣皂苷元和甾体皂苷。在最佳萃取条件下,薯蓣皂苷元主要富集到上相石油醚中,且回收率高达 97.24%,中间乙醇相主要富集了甾体皂苷,此体系并将未转化的甾体皂苷和葡萄糖同时分离去除。付晓茜^[49]利用果胶酶辅助由 12% (w/w)正己烷/26% (w/w)乙醇/14% (w/w)硫酸铵组成的三液相体系萃取万寿菊花中的叶黄素和酚类物质。结果表明,酶辅助三液相萃取得到的叶

黄素和多酚得率远远高于索式萃取，且具有更强的抗氧化活性。Dang^[50]等利用三液相技术提取辣椒中的辣椒红素和辣椒碱，在 22% (w/w)丙酮/ 20% (w/w)磷酸氢二钾/10% (w/w)正己烷组成的体系在 25 °C 时的条件下实现了辣椒红素与辣椒碱提取分离一步完成，其中上相中主要富集了辣椒红素其，回收率可达 98.15%；中间相主要富集了辣椒碱。此方法大大减少了工艺操作过程，降低了操作难度。

全球的研究者经过几十年的研究，促使天然产物的研究成果取得了令人瞩目的成就。但是，常用的提取方法仍然是较为落后的溶剂提取法，没有取得明显的突破，这种情况严重的限制了自然医学的发展。据报道，盐析萃取拥有多种优点，有可能取代传统溶剂萃取法，其具有三个独特的优势：对靶标的高选择性，保留靶标的高活性以及易于工业扩大化。

1.3 研究内容和意义

1.3.1 研究内容

(1) 酶辅助两相盐析萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的研究。考察了由乙醇和无机盐组成的双水相系统和不同种类的酶对番茄红素和多糖提取得率的影响，并利用单因素试验和响应面实验获得最佳的提取工艺条件，并采用DPPH法测定了番茄红素粗提物的抗氧化能力。

(2) 三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的研究。分析了由不同无机盐组成的三液相盐析萃取体系对番茄红素和多糖提取得率的影响，并从原料目数、料液比、静置时间和萃取策略等方面获得了最优提取体系和工艺条件。

(3) 酶辅助三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖。研究了酶的类型和酶解条件对目标产物在三液相中提取得率的影响，并利用傅里叶红外光谱检测上相提取物结构是否遭到破坏。

(4) 利用大孔树脂对酶辅助三液相的上相和下相粗提物进行提纯，并对纯化后的多糖初步进行结构探索和抗氧化活性分析。

1.3.2 研究意义

新疆是我国主要的番茄酱加工基地，但番茄酱厂通常将富含番茄红素和多糖类的番茄皮渣作为工业废料被丢弃，由于番茄皮渣中水分和营养物质含量较高，容易滋生细菌使其腐败，成为自然环境的负担。以番茄皮渣为原料提取具有良好生物活性的番茄红素和多糖不仅可以废弃物资源化利用，还可以摆脱地理环境上的限制，增加番茄产业的附加值。

本研究选择与绿色化学要求相符的盐析萃取技术和酶辅助提取技术，以番茄皮渣为原料，实现了番茄红素和多糖的高效提取与初步分离，并初步探索了番茄多糖的结构。

第 2 章 酶辅助两相盐析萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的研究

2.1 引言

目前,对于番茄红素和多糖的提取方法大致有溶剂提取、超临界萃取、超声波和微波辅助提取等方法^[26, 51-53]。同时,各种提取方法普遍存在优缺点。例如,溶剂提取法所需要的提取时间长和溶剂使用量较大,且得率普遍较低;超声波提取法噪音较大,且工业化应用较难;微波提取法辐射强,控温较难,容易造成局部温度过高;超临界萃取法需要昂贵的设备,较难在工业化推广;因此,寻找一种简单易放大化的工艺至关重要。经研究发现,番茄皮渣中富含生物活性优越的番茄红素和多糖,且市场前景较好。然而,并没有研究报道从番茄皮渣中同时提取番茄红素和多糖。

近年来,酶辅助提取技术因其成本低、高效率、无污染、操作简单已经广泛应用于天然产物中活性物质的提取^[54, 55]。双水相萃取技术是一项新型的液-液提取分离技术,不需要提供高温高压环境,具有体系含水量高、有机溶剂消耗量较少、成本低、产品纯度和得率高等优点,该技术已广泛应用于生物化工、食品工业、环境化工等重要领域研究^[56, 57],是一种符合绿色化学和可持续发展的液-液萃取技术,有着较为广泛的应用前景。因此,本章主要研究了乙醇与不同种类的无机盐对番茄皮渣中番茄红素和多糖的萃取影响,考察了原料目数、料液比、不同种类的酶及水解条件对番茄红素和多糖在双水相体系中的提取得率影响,并考察提取物的抗氧化活性,为番茄皮渣的回收利用提供一定的理论依据。

2.2 材料与仪器

番茄皮渣于 2018 年 9 月从石河子某番茄酱厂获得,分离皮籽并在室温下阴干后粉碎过筛(40~200 目)。

表 2-1 实验药品和试剂

Table 2-1 Experimental drugs and reagents

名称	级别	产地
硫酸铵	分析纯	天津市盛奥化学试剂有限公司
磷酸氢二钾	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
柠檬酸三钠	分析纯	天津市盛奥化学试剂有限公司
柠檬酸铵	分析纯	天津市盛奥化学试剂有限公司
乙醇	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
磷酸氢二钠	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
柠檬酸	分析纯	北联试剂有限公司
DPPH	纯度≥98%	阿拉丁试剂
番茄红素	纯度≥98%	北京索莱宝科技有限公司
果胶酶	30 U/mg	麦克林生化科技有限公司
纤维素酶	50 U/mg	山西西亚化工有限公司
菠萝蛋白酶	300 U/mg	麦克林生化科技有限公司
木瓜蛋白酶	3 U/mg	麦克林生化科技有限公司

表 2-2 实验设备

Table 2-2 Experimental Instruments

仪器名称	型号	生产商
紫外可见分光光度计	UV-5100B	上海棱光技术有限公司
台式高速大容量离心机	5810R	Eppendorf 中国有限公司
电子天平	BSA223S	北京赛多利斯仪器系统有限公司
漩涡混合器	XH-C	金坛市白塔新宝仪器厂
电热恒温水槽	DK-8D	上海精宏实验设备有限公司
万能高速粉碎机	DE-100g	浙江红景天工贸有限公司
超声波清洗器	KQ5200B	昆山市超卢仪器有限公司
pH 计	PBS-3C	上海精密科学仪器有限公司

2.3 分析方法

2.3.1 番茄红素的含量测定

使用分光光度法^[58]测定番茄红素的浓度。取上相提取液在 503 nm 处测定吸光度值。以番茄红素标准溶液的浓度为横坐标，吸光度值我纵坐标得到的线性回归方程为： $y = 0.0616x + 0.0052$ ($R^2 = 0.999$)

2.3.2 多糖的含量的测定

使用苯酚-硫酸比色法^[59]测量多糖浓度。取 1 mL 稀释一定倍数的提取液于 10 mL 试管中，加入 5% 苯酚溶液 1mL 和 98% 硫酸 5 mL 后静置 10 min，混合均匀后冰浴 1 min，在 30 °C 水浴 20 min 后在 490 nm 处测定吸光度值。葡萄糖标准溶液的质量浓度与吸光度值的线性回归方程为： $y = 0.0108x - 0.0037$ ($R^2 = 0.999$)

2.3.3 抗氧化活性测定

DPPH 自由基清除能力测定^[60]，向试管中分别加入稀释为不同浓度的样品液和 2 mL 的 DPPH 溶液，使用漩涡混合器混合均匀后，在 25 °C 条件下避光静置 30 min，最后在 517 nm 处测定吸光度值。

2.3.4 统计分析

为了降低实验误差，所有实验均采用三组平行。

2.4 实验方法

2.4.1 两相盐析体系组成对番茄皮渣中番茄红素和多糖萃取影响

准确称取一定量的番茄皮粉末于带刻度的试管中，将磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液和酶添加到试管中并混合均匀，在恒温水浴锅中进行酶解；酶解反应完成后，迅速加入一定质量的无机盐使其溶解，然后迅速加入适量的无水乙醇使其与试管中的混合物混合均匀后放置黑暗环境下静置分相，待分相完成后分别读取上相和下相的体积，然后根据

公式 (1)、(2) 和 (3) 测定番茄红素和多糖的得率及回收率。提取物的得率 (Y) 和回收率 (R) 计算公式如下:

$$Y_L (mg/100 g) = \frac{C_t V_t}{M} \quad (1)$$

$$Y_P (mg/g) = \frac{C_t V_t + C_b V_b}{M} \quad (2)$$

$$R (\%) = \frac{C_b V_b}{C_t V_t + C_b V_b} \times 100 \quad (3)$$

其中 Y_L 和 Y_P 分别为番茄红素和多糖的得率, C_t 和 C_b 分别为上、下相提物的浓度 (mg/mL), V_t 和 V_b 分别为上、下相的体积 (mL), M 为番茄皮渣粉末的总质量 (g)。

2.4.2 酶辅助两相盐析萃取单因素实验

(1) 原料目数的影响

分别称取不同目数的番茄皮渣粉末, 在 pH 5.5、1.0% 的果胶酶、提取温度 45 °C、酶解时间 60 min 的条件下加入磷酸氢二钾和无水乙醇, 混合均匀后在黑暗环境中静置分相完成后进行含量测定。

(2) 料液比对提取的影响

分别称取不同质量的 160 目番茄皮粉末, 使其料液比范围在 1:50 到 1:30 (g/mL) 之间, 剩余实验操作同上。

(3) 静置时间对提取的影响

称取 0.25 g 160 目的番茄皮粉末, 使其料液比为 1:40 (g/mL), 在 pH 5.5、1.0% 的果胶酶、提取温度 45 °C、酶解时间 60 min 的条件下加入磷酸氢二钾和无水乙醇, 混合均匀后在黑暗环境中分别静置分相 30、60、90、120 和 150 min 后测定番茄红素和多糖含量。

(4) 酶种类对提取的影响

称取适量的 160 目番茄皮粉末, 分别加入纤维素酶、果胶酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶以及按照 (1:1、1:2、1:3、2:3、2:1、3:1、3:2) 组成的复合酶, 剩余实验操作如原料的目数。

(5) pH 对提取的影响

称取适量的 160 目番茄皮渣粉末和混合酶, 分别于 pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0, 45 °C 水解 60 min, 剩余实验操作如上。

(6) 酶量对提取的影响

称取适量的 160 目番茄皮粉末, pH 6.0, 分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5% 混合酶, 剩余实验操作如上。

(7) 酶解温度对提取的影响

称取适量的 160 目番茄皮粉末和 2% 混合酶, pH 6.0, 分别于 45、50、55、60、65 °C 酶解 90 min 后, 剩余实验操作如上。

(8) 酶解时间对提取的影响

称取适量的 160 目番茄皮粉末和 2% 混合酶, pH 6.0, 50 °C 分别酶解 30、60、90、120、150 min 后, 加入磷酸氢二钾和无水乙醇, 混合室温静置分相后进行分析测定。

2.4.3 响应面优化实验

通过 Design-Expert 软件(V8.0.6), 以酶的使用量、酶解温度和酶解时间为自变量, 番茄红素和多糖的得率为响应值, 利用响应面法对酶辅助双水相提取番茄皮中番茄红素和多糖的工艺参数进行优化。

表 2-3 酶辅助双水相法的实验因素水平

Table 2-3 Experiments factors for enzyme-assisted aqueous two-phase extraction method

水平	因素		
	A 酶/%	B 酶解温度/°C	C 酶解时间/min
-1	1.5	45	90
0	2.0	50	120
1	2.5	55	150

2.4.4 不同萃取方法对比研究

溶剂提取的工艺的条件: 将料液比 1 : 40 (g/mL) 的 160 目番茄皮粉末, 在 60 °C 下回流提取 15 min。

2.5 结果讨论

2.5.1 两相盐析萃取体系的筛选

选择乙醇分别与硫酸铵、磷酸氢二钾和两种柠檬酸盐构建两相盐析体系, 考察两相盐析体系组成对番茄皮中番茄红素及多糖提取的影响。结果如表 2-4 所示, 从有效成分的得率来看, 当体系为乙醇/磷酸氢二钾时, 番茄红素的提取得率最高为 7.1 mg/100 g, 此时多糖得率为 63.4 mg/g; 当体系为乙醇柠檬酸钠时, 多糖的提取得率最高为 75.1mg/g, 此时番茄红素得率为 4.9 mg/100 g。磷酸氢二钾所构建的体系与柠檬酸三钠体系相比, 番茄红素得率高出 44.9%, 而多糖得率仅仅减少了 18.4%, 且考虑番茄皮渣中价值最高、最受关注的是番茄红素。因此, 选择乙醇/磷酸氢二钾体系作进一步研究。

表 2-4 乙醇/无机盐体系对番茄红素及多糖萃取的影响

Table 2-4 Extraction of lycopene and polysaccharides in different ethanol/salt system

溶剂/盐	配比 (%, w/w)	番茄红素得率 (mg/100 g)	多糖得率 (mg/g)
乙醇/柠檬酸钠	24/21	4.6	71.2
	26/19	4.7	72.3
	28/17	5.1	73.2
	30/15	4.9	75.1
	32/13	4.7	70.8
乙醇/磷酸氢二钾	23/21	6.6	60.2
	26/19	6.8	61.1
	29/17	7.1	63.4
	32/15	7.1	62.3
	35/13	6.9	61.9
乙醇/硫酸铵	20/24	4.0	59.8
	23/22	4.0	61.3
	26/20	4.3	62.8
	29/18	3.7	62.1
	32/16	3.6	60.4
乙醇/柠檬酸铵	23/30	5.7	65.1
	26/28	6.2	66.3
	29/26	6.0	67.4
	32/24	6.0	62.1
	35/22	5.6	61.4

2.5.2 酶辅助双水相体系优化

(1) 乙醇用量对番茄红素和多糖提取的影响

固定 K_2HPO_4 用量为 17%(w/w), 考察乙醇用量对番茄红素得率及多糖得率和回收率的影响。由图 1 所示, 番茄红素和多糖的得率随着乙醇用量的增加出现先增大然后降低的整体趋势。当乙醇用量为 29%(w/w) 时多糖得率达到最大值为 60.03 mg/g; 当乙醇用量达到 31%(w/w) 时, 番茄红素得率达到最大值为 8.40 mg/100g, 且多糖的回收率也达到最大值。合理的增加乙醇用量可以提升有效成分的提取率, 但过高的乙醇浓度也会使目标产物得率和回收率下降^[61]。因此, 选择 31% (w/w) 乙醇进行下一步实验。

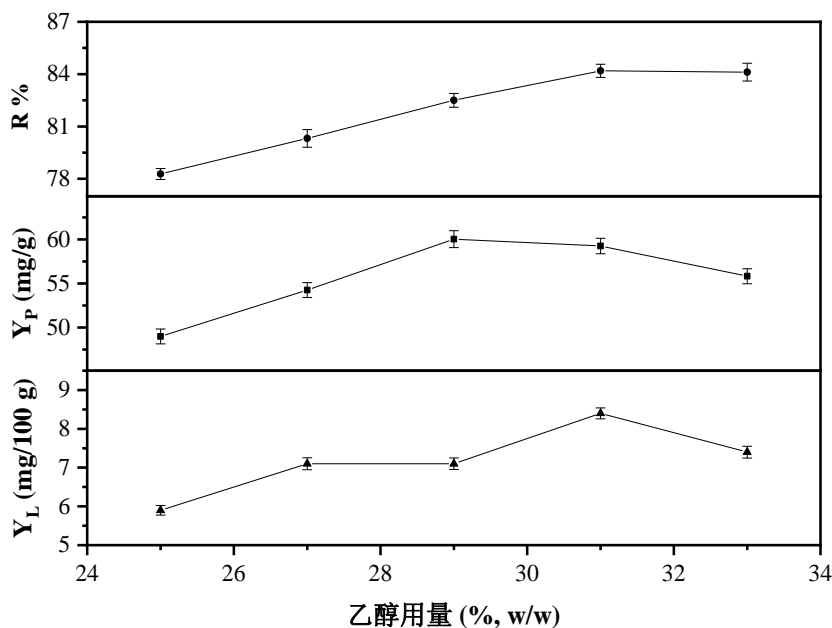


图 2-1 乙醇用量对番茄红素和多糖提取的影响

Fig. 2-1 Effects of ethanol content on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

(2) 磷酸氢二钾用量对番茄红素及多糖提取的影响

固定乙醇用量为 31%(w/w) 时, 考察了磷酸氢二钾用量对番茄红素和多糖的提取影响, 结果如图 2 所示。番茄红素和多糖的得率随着磷酸氢二钾用量的增加显示出先增大然后减少的趋势。当磷酸氢二钾用量为 16%(w/w) 时, 番茄红素和多糖的得率分别达到最大值为 8.7 mg/100 g 和 60.73 mg/g, 多糖回收率为 84.55%, 继续增加磷酸氢二钾用量时, 番茄红素和多糖的得率均开始降低, 说明过高的盐浓度不适于有效成分的提取, 这一现象与文献所报道一致^[38]。因此, 选择 16% (w/w)磷酸氢二钾进行下一步研究。

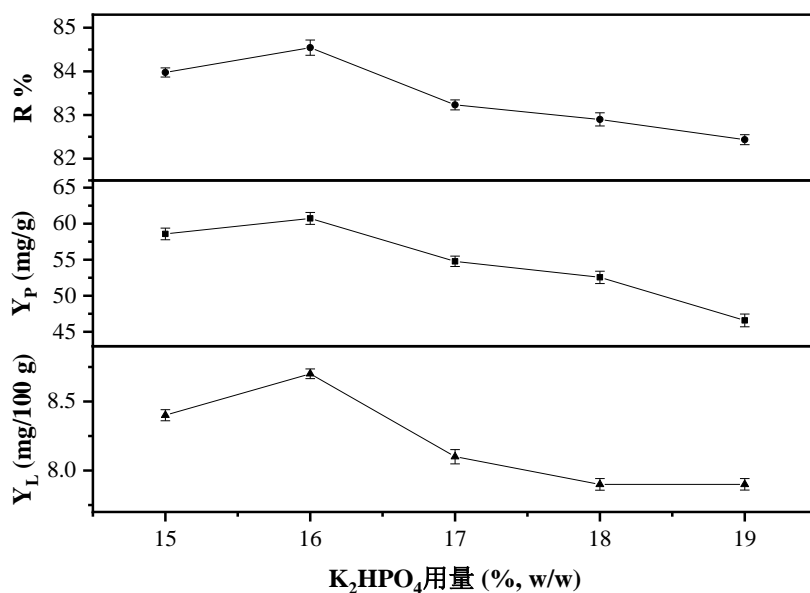


图 2-2 K₂HPO₄用量对番茄红素和多糖提取的影响

Fig. 2-2 Effects of K₂HPO₄ content on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

2.5.3 单因素实验

(1) 目数对番茄皮中番茄红素及多糖提取的影响

目数对番茄红素和多糖得率的影响如图 2-3 所示。总体来说，原料目数大小对番茄红素和多糖的提取影响较大。刚开始，番茄红素和多糖的得率随着目数的增大而增加，当在 160 目时达到最大值，分别为 8.5 mg/100 g 和 70.9 mg/g；随后，番茄红素和多糖的得率随着目数的进一步增大而降低。这主要是因为，随着目数的增大，样品粒径越小，可以有效的增加样品与溶剂接触面积，越有利于溶剂的渗透与提取物更好的溶出，使得提取率逐渐增大；但由于样品粒径过小，使得小粒径的样品在溶液中黏着抱团，导致样品与溶剂的接触面积减小，从而降低了番茄红素和多糖的提取得率^[62]。因此选择 160 目的番茄皮粉末为最佳的原料目数。

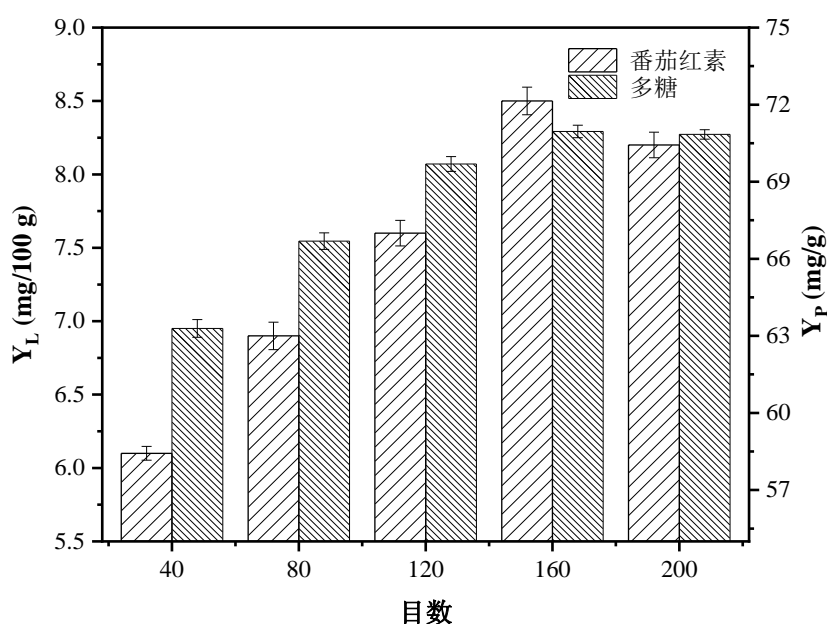


图 2-3 目数对番茄红素和多糖提取的影响

Fig.2-3 Effects of mesh on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

(2) 料液比对番茄皮中番茄红素及多糖提取的影响

如图 2-4 所示，在一定范围内增加样品与溶剂的料液比可以有效的提高提取得率。当料液比在 1:40 g/mL 时番茄红素和多糖的提取得率均达到最大值，分别为 8.9 mg/100 g 和 71.3 mg/g。这是因为多余的原料颗粒不能充分与缓冲溶液接触，导致酶解不充分；还有一种原因可能是萃取体液总体积不变，提取能力是有限的，添加过多的原料不能增加产物得率^[63]，还会影响萃取体系对某些杂质的有效处理从而使得提取效率降低。因此选择 1:40 g/mL 为最佳的料液比。

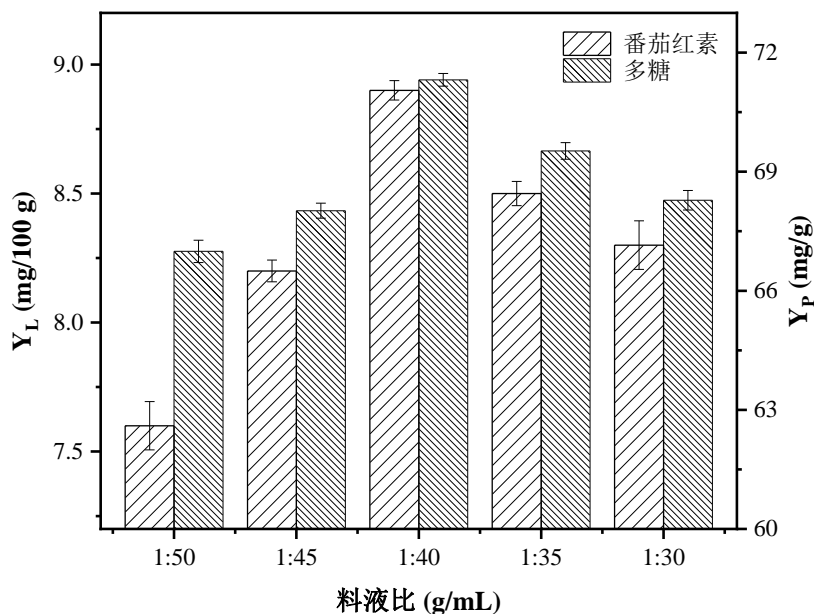


图 2-4 料液比对番茄红素和多糖提取的影响

Fig.2-4 Effects of solid-liquid ratio on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

(3) 静置时间对番茄皮中番茄红素及多糖提取的影响

如图 2-5 所示，静置分相时间对番茄红素和多糖提取得率影响较为显著。随着静置分相时间的增加，番茄红素和多糖的得率呈先增高后下降的趋势，在静置 90 min 时，番茄红素和多糖的得率均达到最大值，分别为 9.2 mg/100 g 和 73.6 mg/g。这一结果说明此时目标产物在体系中富集均达到平衡，若继续增加静置分相时间，部分有效成分开始从富集相向另一相移动^[60]，从而降低了番茄红素和多糖的提取得率。因此，选择 90 min 为最佳静置时间。

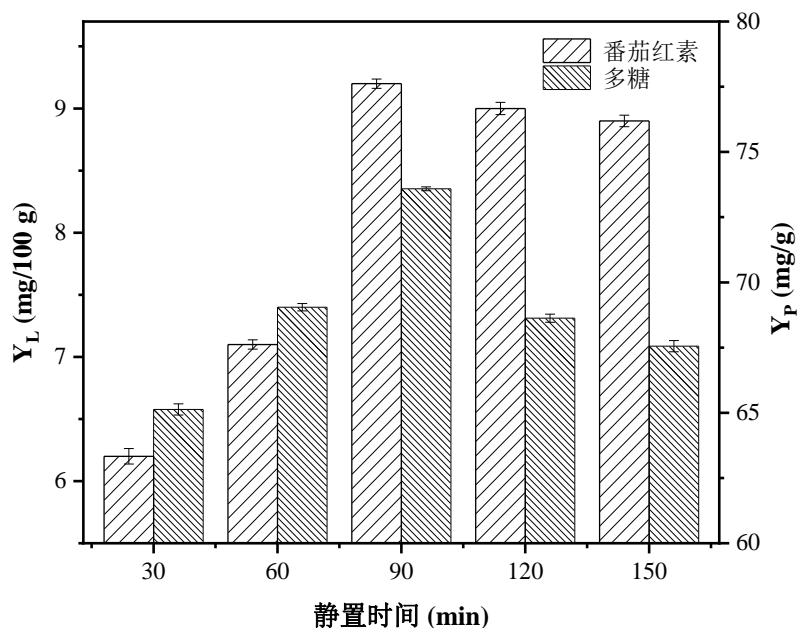


图 2-5 静置时间对番茄红素和多糖提取的影响

Table 2-5 Effects of extraction time on extraction of lycopene and polysaccharides

(4) 酶种类对提取番茄红素和多糖的影响

为了研究不同种类的酶对番茄红素和多糖提取得率的影响,选取了果胶酶、纤维素酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶等四种常用于天然产物中活性成分提取的酶进行比较,结果如图 2-6 所示,对于番茄红素而言,果胶酶效果最好,纤维素酶仅次于果胶酶,而菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶效果较差;对于多糖而言,纤维素酶效果最佳,果胶酶酶解效果优于两种蛋白酶,此结果与文献报道的一致^[64]。

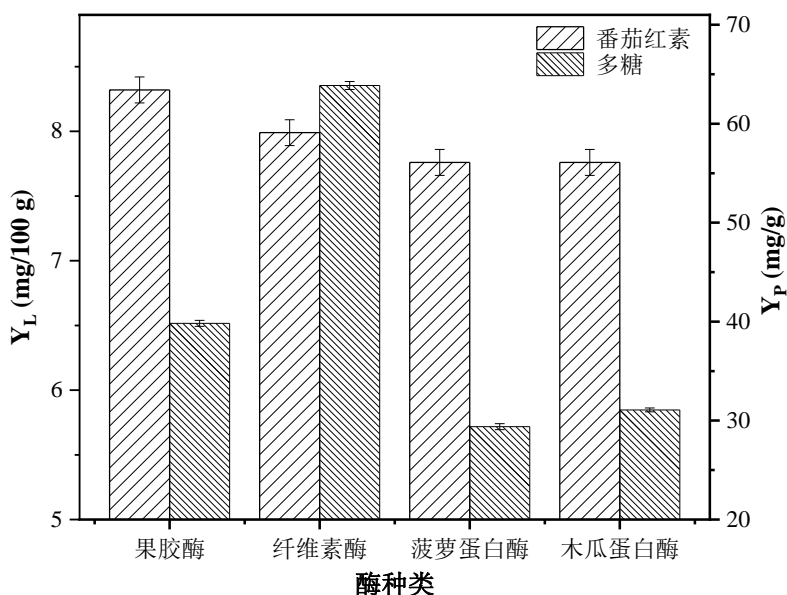


图 2-6 酶种类对番茄红素和多糖的影响

Fig.2-6 Effects of enzyme types on lycopene and polysaccharides

(5) 混合酶组成对提取番茄红素和多糖的影响

选取对于番茄红素效果较好的果胶酶与菠萝蛋白酶和纤维素酶混合使用,对比混合酶组成对番茄红素和多糖提取得率的影响,结果如图 2-7 所示。当果胶酶与菠萝蛋白酶混合后,可明显提高番茄红素的得率。当果胶酶:菠萝蛋白酶为 1:1 时,番茄红素的得率最高为 11.15 mg/100g,说明等比例混合的果胶酶与菠萝蛋白酶可以促使番茄皮细胞中果胶物质及游离的蛋白质水解,有利于番茄红素的提取。而对于多糖,始终是纤维素酶效果最佳。综合考虑,选择果胶酶:菠萝蛋白酶为 1:1 的混合酶用于酶解番茄皮渣。

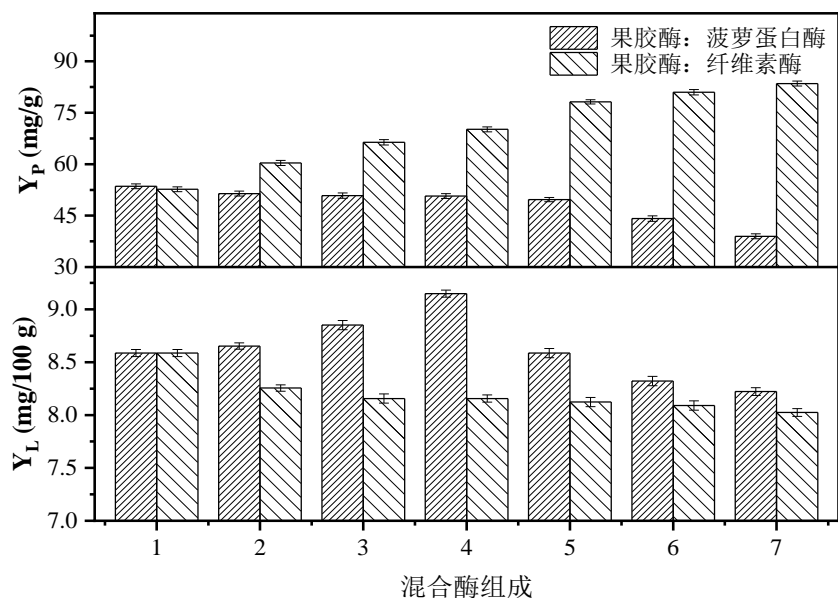


图 2-7 混合酶组成对番茄红素和多糖提取的影响。1 果胶酶；7 菠萝蛋白酶/纤维素酶；2 到 6 为果胶酶：菠萝蛋白酶的比例为 3:1，2:1，1:1，1:2，1:3。

Fig.2-7 Effect of compositions of enzyme on the extraction rate of lycopene and polysaccharides. 1 Pectinase; 7 Bromelain/Cellulase; 2 to 6 are complex enzymes of pectinase and bromelain, the ratios are: 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3.

(6) 混合酶量对提取番茄红素和多糖的影响

混合酶量对番茄红素和多糖得率的影响如图2-8所示。当酶量为2.0% 时，番茄红素和多糖有最高提取得率，分别为为13.83 mg/100g和61.6 mg/g，随着酶量的进一步增加，并没有有效的提高番茄红素和多糖的得率，反而略有下降，该现象与文献报道一致^[65]。因此，在不影响提取效果的前提下考虑节约成本，选择2.0% 作为最佳酶用量。

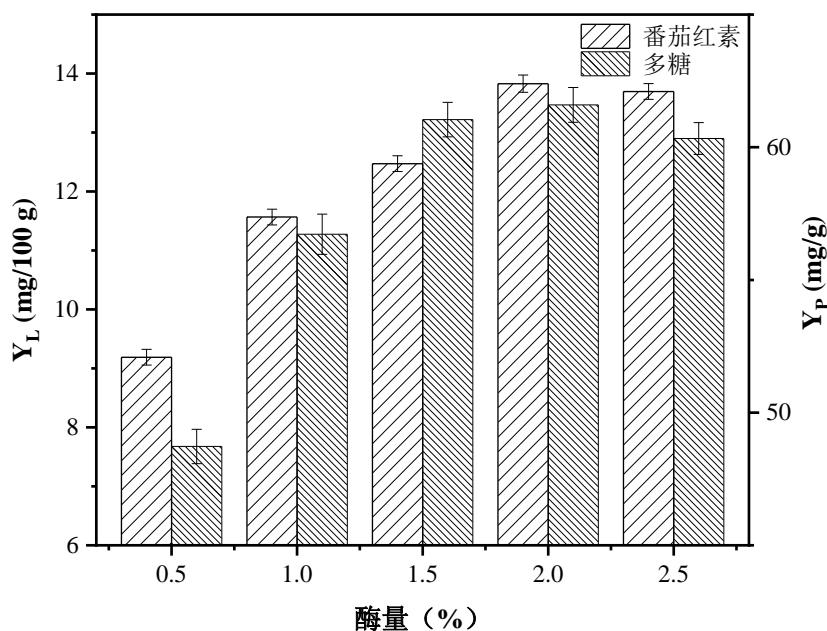


图 2-8 酶量对番茄红素和多糖提取的影响

Fig.2-8 Effects of enzyme content on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

(7) 缓冲液 pH 对提取番茄红素和多糖的影响

缓冲溶液 pH 值对酶的活性有着至关重要的影响, 造成番茄皮细胞壁的破坏程度从而影响细胞体内活性物质的释放量。本实验选择柠檬酸钠-柠檬酸缓冲溶液, 通过将其 pH 值范围调至 5.0-7.0 之间, 其对番茄红素和多糖提取得率的影响如图 2-9 所示。当 pH 值低于 6.0 时, 番茄红素和多糖的提取得率随着缓冲溶液 pH 值的增加而增加; 当 pH 为 6.0 时, 番茄红素和多糖的提取得率均达到最高值, 分别为 13.82 mg/100 g 和 62.07 mg/g。说明混合酶酶解番茄皮渣的最适 pH 为 6.0, 在此条件下混合酶活性较高, 降解番茄皮细胞壁的能力最强。当缓冲溶液 pH 值高于 6.0 后, 番茄红素和多糖的得率均快速下降, 说明在此 pH 值下, 混合酶活性降低, 无法高效的破坏番茄皮细胞壁, 造成目标物得率下降。因此, 选择 6.0 为最佳缓冲溶液 pH 值进行下一步实验。

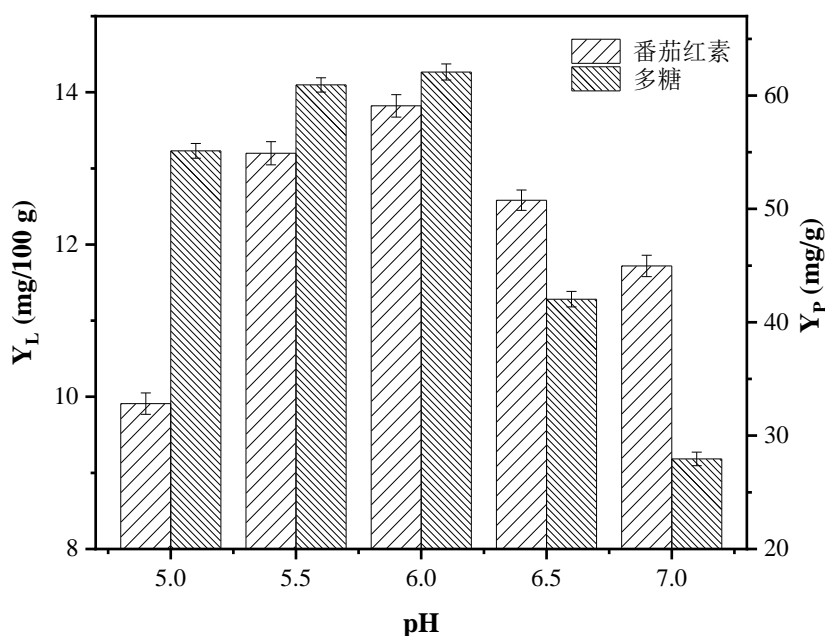


图 2-9 缓冲溶液 pH 对番茄红素和多糖提取的影响

Fig.2-9 Effects of buffer solution pH on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

(8) 酶解温度对提取番茄红素和多糖的影响

适当的酶解温度可以最大化的激发混合酶活性, 也可以在提取过程中有效的保护目标产物的结构的完整性不会遭到破坏。如图 2-10 所示, 随着酶解温度的升高番茄红素和多糖的提取得率均显现先增加后降低整体趋势; 酶解温度在 50 °C 时, 番茄红素的提取得率达到最大值为 14.39 mg/100 g; 当酶解温度的进一步升高后, 番茄红素的提取得率呈下降趋势, 而多糖的提取得率还呈上升趋势, 说明过高的温度不利于番茄红素的提取; 当酶解温度超过 60 °C 后, 混合酶部分失活^[66], 造成原料酶解不完全, 降低了番茄红素和多糖的提取得率。因此, 选择 50 °C 为最佳的酶解温度。

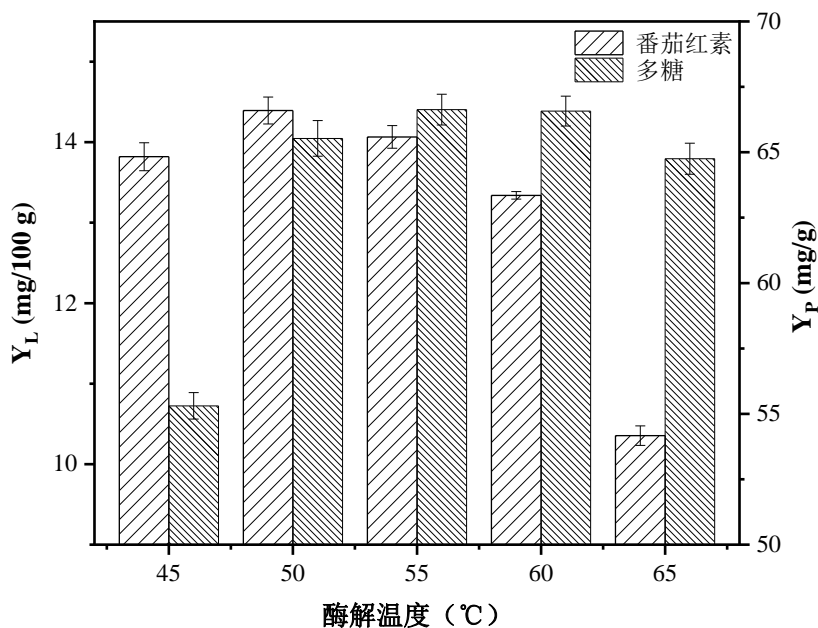


图 2-10 酶解温度对番茄红素和多糖提取得率的影响

Fig.2-10 Effects of enzymolysis temperature on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

(9) 酶解时间对提取番茄红素和多糖的影响

如图 2-11 所示，酶解时间对番茄红素和多糖提取得率存在一定的影响。随着酶解时间的延长，番茄红素和多糖的得率呈现先增大后降低的整体趋势；当酶解时间为 120 min 时，番茄红素和多糖的提取得率有最大值，分别为 15.66 mg/100 g 和 72.54 mg/g。随着酶解时间的继续增加，导致体系中杂质溶出量的增加，阻碍了番茄红素和多糖的释放通道，因而有降低了目标产物的提取得率，该现象与文献报道一致^[67]。因此，选择 120 min 为最佳酶解时间。

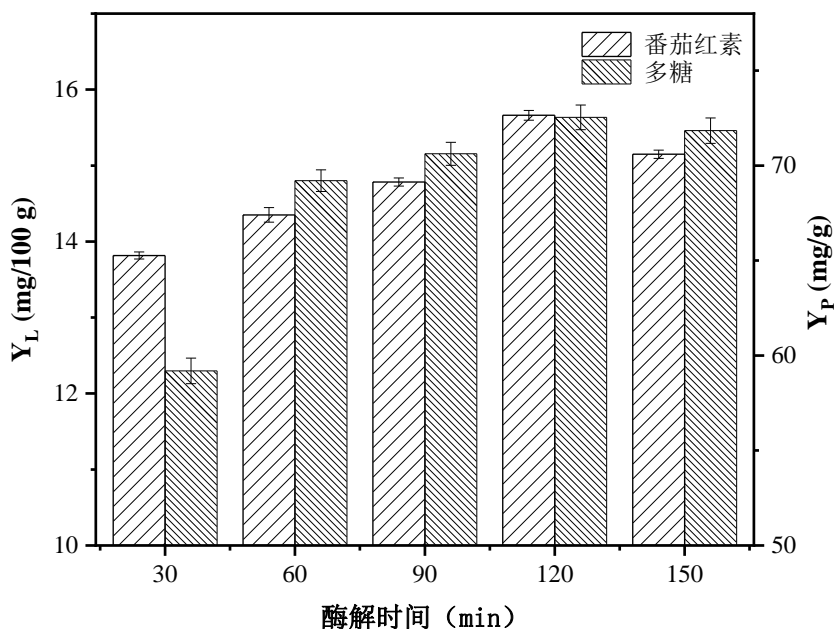


图 2-11 酶解时间对番茄红素和多糖提取的影响

Fig.2-11 Effects of enzymolysis time on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

2.5.4 响应面优化实验

通过单因素实验结果可以看出，对番茄红素和多糖的得率影响较大为酶的使用量、酶解温度和酶解时间，因此将影响较大的三个单因素通过响应面实验，进一步分析三种因素之间的相互交叉影响作用。响应面实验结果如表 2-5 所示，其中 Y_1 和 Y_2 分别为番茄红素和多糖的提取得率。

表 2-5 响应面设计与结果

Table 2-5 Experimental design and results for response surface analysis

序号	A	B	C	Y_1 (mg/100 g)	Y_2 (mg/g)
1	0.00	1.00	-1.00	13.23	73.83
2	0.00	1.00	1.00	14.53	73.64
3	1.00	1.00	0.00	13.93	75.49
4	0.00	-1.00	1.00	13.78	73.54
5	0.00	0.00	0.00	15.45	77.31
6	1.00	0.00	-1.00	13.81	74.91
7	-1.00	1.00	0.00	11.46	71.84
8	0.00	0.00	0.00	15.31	77.22
9	-1.00	0.00	-1.00	12.48	72.82
10	0.00	0.00	0.00	15.33	77.41
11	1.00	0.00	1.00	13.82	73.90
12	-1.00	0.00	1.00	13.23	71.68
13	0.00	0.00	0.00	15.36	77.87
14	1.00	-1.00	0.00	13.97	75.46
15	-1.00	-1.00	0.00	13.66	71.67
16	0.00	-1.00	-1.00	14.45	74.25
17	0.00	0.00	0.00	15.28	77.87

(1) 响应面方差分析

利用 Design Expert 8.0.6 软件对数据进行整理与分析，实验设计及结果见表 2-6。番茄红素和多糖提取得率模型均显现出极显著特性（其中 $P < 0.01$ ）。就番茄红素提取得率而言，对提取得率表现出极显著的影响因素有 A、B、AB、BC、 A^2 、 B^2 和 C^2 ，影响程度从高到低依次为： $A > B > C$ 。对于多糖提取得率影响的因素表现出极显著影响的有 A、 A^2 、 B^2 和 C^2 ，影响程度从高到低为： $A > C > B$ 。

以番茄皮渣中番茄红素 (Y_1) 和多糖 (Y_2) 的得率为响应值，酶量 (A)、酶解温度 (B)、酶解时间 (C) 为自变量，对实验数据进行多元回归分析，得到二次多项式回归方程：

$$Y_1 = 15.37 + 0.59A - 0.34B + 0.17C + 0.54 AB - 0.19 AC + 0.49 BC - 1.39A^2 - 0.73B^2 - 0.65C^2$$

$$Y_2 = 77.54 + 1.47A - 0.015B - 0.38C - 0.035AB + 0.032AC + 0.13BC - 2.20A^2 - 1.72B^2 - 2.00C^2$$

通过两个模型的 R^2 分别为 97.47%、97.57%， R_{Adj}^2 分别为 94.21%、94.45%，说明建立的模型拟合度较高且实验误差属于正常范围。

表 2-6 响应面试验方差分析

Table 2-6 Analysis of variance for the fitted regression model of response surface

来源	番茄红素		多糖	
	F 值	P 值	F 值	P 值
模型	29.91	< 0.0001**	31.24	< 0.0001**
A	38.10	0.0005**	65.52	< 0.0001**
B	12.67	0.0092**	6.834E-003	0.9364
C	3.33	0.1107	4.41	0.0737
AB	16.10	0.0051**	0.019	0.8953
AC	1.89	0.2117	0.016	0.9028
BC	13.39	0.0081**	0.26	0.6280
A ²	112.22	< 0.0001**	77.67	< 0.0001**
B ²	30.73	0.0009**	47.12	0.0002**
C ²	24.34	0.0017**	64.22	< 0.0001**

(注: P<0.01**, 极显著; P<0.05*, 显著)

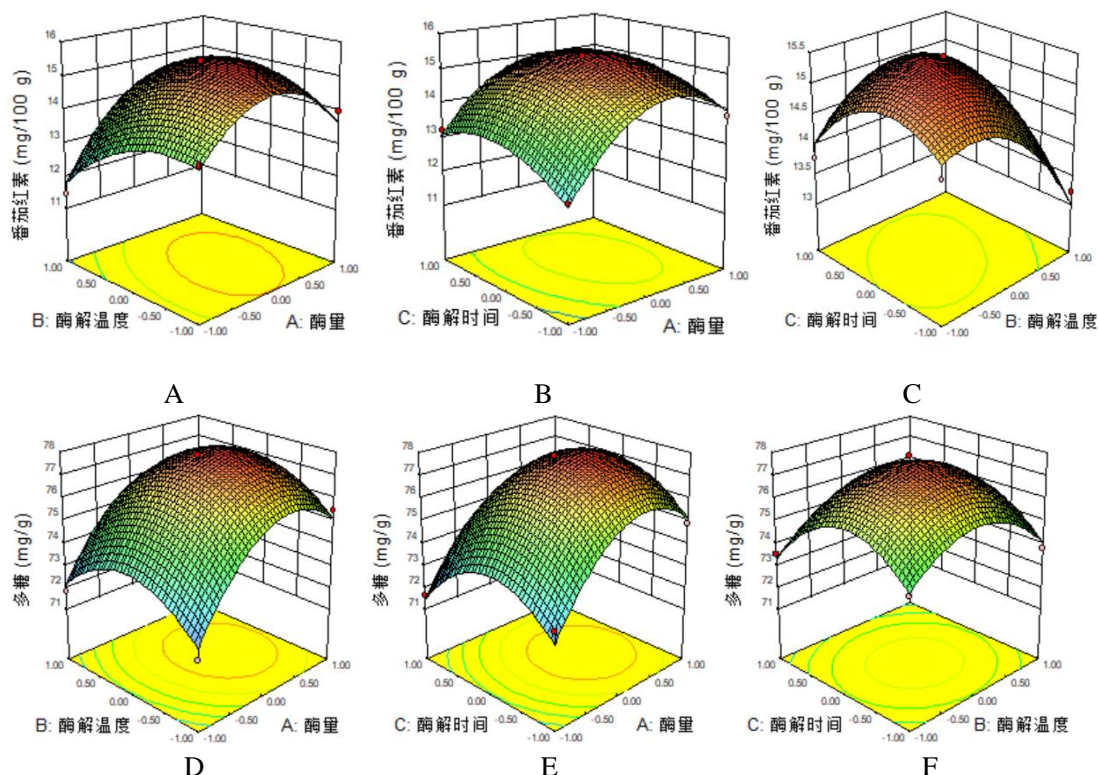


图 2-12 各因素交互作用对番茄红素和多糖得率影响的响应面图

Fig.2-12 Effects of process parameters on extraction of lycopene and polysaccharides by response surface analysis

(2) 响应面验证实验

根据建立二次回归方程模型及响应面图, 预测到酶辅助双水相提取番茄红素和多糖的最优工艺条件为: 酶量 2.0%, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 119 min, 预测番茄红素和多糖的得率分别为 15.71 mg/100 g 和 77.78 mg/g。为了验证所获得的模型方程的适用性, 将利用获得的最佳工艺条件下进行提取工艺的论证, 实验结果显示番茄红素和多糖的得

率分别为 15.69 mg/100 g、77.16 mg/g，RSD 分别为 0.13% 和 0.18%。实测值与预测值偏差率小于 0.2%，表明该方程拟合较好。

2.5.5 不同提取方法对比及抗氧化活性对比

将酶辅助双水相提取法与传统溶剂提取法进行比较，传统溶剂法溶剂为 90% 的乙醇，提取方法参照文献^[53]，结果如表 2-7 所示。酶辅助双水相提取法番茄红素和多糖得率明显高于传统溶剂提取法，并且溶剂用量少，酶辅助双水相消耗溶剂量为传统溶剂提取的 28.7%，提取温度较低，可避免高温对番茄红素结构的破坏。DPPH 法抗氧化活性测定结果表明酶辅助双水相所得到的番茄红素比溶剂提取所得到的抗氧化能力更好，说明酶辅助双水相法通过分相效应，使所得到的番茄红素粗提物杂质较少；还有一种可能是所得到的番茄红素分子结构部分发生了转换，增强了 DPPH 自由基清除能力^[68]。

表 2-7 不同提取方法对得率和抗氧化活性的比较

Table 2-7 Effect of different extraction methods on yield and antioxidant activity

提取方法	乙醇用量 (g)	温度 (°C)	时间 (min)	番茄红素 (mg/100g)	多糖 (mg/g)	DPPH (IC ₅₀) (ug/ml)
酶辅助双水相提取	3.1	50	119 ^a /90 ^b	15.69	77.16	3.37
溶剂提取	10.8	60	15	3.96	56.23	3.45

注：a 和 b 分别为酶解时间和静置时间。

2.6 小结

(1) 研究了酶辅助双水相提取番茄皮中番茄红素和多糖。结果表明当体系构成为体系组成为 31% (w/w) 乙醇/16% (w/w) 磷酸氢二钾，粉碎目数为 160 目，料液比为 1:40 g/mL，静置时间为 90 min，混合酶为果胶酶：菠萝蛋白酶 1:1，酶量为 2.0%，pH 6.0，酶解温度为 50 °C，酶解时间为 120 min。

(2) 以单因素实验结果为基础研究了各因素之间的交互作用对番茄红素和多糖提取率的影响。其结果显示，酶量对番茄红素和多糖的提取影响最为显著，番茄红素和多糖的得率分别可达 15.69 mg/100 g 和 77.16 mg/g，与预测值 15.71 mg/100 g 和 77.78 mg/g 基本一致。证明建立的模型可行性高，所获得的提取条件可用于实际操作。

(3) 对比了溶剂提取法，结果表明酶辅助双水相萃取法具有具有溶剂用量少、提取温度低，提取物活性较好等优点，可以实现番茄红素与多糖的同时提取与粗分离。

第3章 三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的研究

3.1 引言

番茄红素可以有效的清除自由基、促进细胞间的连接与传导,在防癌抗癌等方面拥有较好的表现,在制药、食品加工、化妆品领域有很高需求^[69, 70]。基于番茄红素是一种脂溶性色素,在酶辅助两相盐析萃取体系中的提取得率不是很高的问题做进一步试验。三液相体系(three-liquid-phase system, TLPS)是基于双水相体系的一种高效的提取分离技术^[48],因其高效的提取能力和选择性,已经引起了大多数学者的关注。TLPE 技术已成功用于葛根提取物中的异黄酮^[71],红辣椒中的辣椒红素和辣椒素^[72],加工海参废液中的多种有效成分^[73]。相比于双水相萃取技术,三液相萃取技术可有效的分离脂溶性成分及一些难以提取的活性物质。

本章采用三液相萃取技术从番茄皮渣中提取番茄红素和多糖等活性物质,解决脂溶性的番茄红素在两相体系中得率较低的问题。考察了三相萃取番茄红素和多糖的主要影响因素,并通过抗氧化实验评估了三液相萃取效率和可行性。

3.2 材料与仪器

正己烷,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;其它实验材料同表 2-1。

傅里叶红外光谱仪, Nicolet 6700 型, 美国;其它实验仪器同表 2-2。

3.3 分析方法

(1) 番茄红素含量测定同 2.3.1

(2) 多糖的含量测定同 2.3.2

(3) DPPH 自由基的清除能力测定同 2.3.3

3.4 实验方法

3.4.1 三液相体系组成及筛选

将适量的无机盐、蒸馏水、乙醇依次加入到试管中并混合均匀,在将正己烷加入到试管中充分震荡后形成稳定三液相体系,然后将适量的番茄皮渣粉末加入到其中并混合均匀,最好在黑暗环境下静置分相,待分静置分相一定时间后吸取上、中、下相体积,分别测定上、中、下相目标物的含量。番茄皮渣中主要有效成分的得率(Y)、回收率(R) 计算公式如下:

$$Y_L (mg/100 g) = \frac{C_t V_t}{M} \quad 3-1$$

$$Y_p (mg/g) = \frac{C_m V_m + C_b V_b}{M} \quad 3-2$$

$$R (\%) = \frac{C_b V_b}{C_m V_m + C_b V_b} \times 100 \quad 3-3$$

其中 C_t 、 C_m 和 C_b 分别为上、中、下相提物的浓度 (mg/mL), V_t 、 V_m 和 V_b 分别为上、中、下相的体积 (mL), M 为番茄皮渣粉末的总质量 (g)。

3.4.2 三液相体系优化

称取不同质量分数磷酸氢二钾（14%、15%、16%、17%、18%）及适量蒸馏水于试管中，使无机盐震荡溶解后加入不同浓度的乙醇（32%、33%、34%、35%、36%）使其混合均匀，然后向其混合溶液中加入 9% 的正己烷充分混合。待形成稳定的三液相后加入适量的番茄皮渣粉末，混合均匀后在黑暗环境下反应一定时间。

3.4.3 三液相萃取工艺参数优化

（1）目数对番茄皮渣中有效成分萃取的影响

在三液相体系中分别加入 0.4 g 的 40、80、120、160、200 目原料，混合均匀，避光静置 1.0 h 的条件下进行番茄废渣中有效成分的提取。然后，分别提取上、中、下相进行测定。

（2）料液比对番茄皮渣中有效成分萃取的影响

在三液相体系中分别加入料液比为 1:35、1:40、1:45、1:50、1:55 g/ml，160 目原料，混合均匀，避光静置 1.0 h 的条件下进行番茄废渣中有效成分的提取。然后，分别提取上、中、下相进行测定。

（3）料液比对番茄皮渣中有效成分萃取的影响

在三液相体系中加入料液比为 1:50 g/ml，160 目的原料，混合均匀，避光分别静置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 的条件下进行番茄废渣中有效成分的提取。然后，分别提取上、中、下相进行测定。

3.4.4 三液相萃取策略对番茄皮渣中有效成分的影响

选择三液相体系构成为 9% (w/w)正己烷/33% (w/w)乙醇/17% (w/w)磷酸氢二钾按，160 目番茄皮渣粉末，料液比 1: 50 g/mL 条件下考察萃取策略对番茄皮渣中番茄红素和多糖的提取影响，具体策略如下：

(A) 将磷酸氢二钾、蒸馏水、乙醇、正己烷和番茄皮渣粉末分别加入 25 mL 试管中，混合均匀，静置分相；(B) 将磷酸氢二钾水溶液和番茄皮渣粉末加入到试管中混合均匀，在加入依次正己烷和乙醇，混合均匀，静置分相。(C) 将磷酸氢二钾水溶液和乙醇加入到试管中，在依次加入番茄皮渣粉末和正己烷，混合均匀，静置分相；(D) 将磷酸氢二钾水溶液、正己烷和样品依次加入到试管中，在加入乙醇混合均匀，静置分相；(E) 将正己烷和番茄皮渣粉末加入到试管中混合，在依次加入乙醇和磷酸氢二钾水溶液混合均匀，静置分相；(F) 将乙醇和番茄皮渣粉末加入到试管中混合，在依次加入正己烷和磷酸氢二钾水溶液混合均匀，静置分相。

3.4.5 不同提取方法对比

三溶剂介导萃取^[65]：己烷/丙酮/乙醇（2/1/1），料液比为 1:50 g/mL，磁力搅拌 120 分钟后加入 3 mL 蒸馏水静置分相 5 分钟。超声辅助提取^[52]：己烷/丙酮/乙醇（2/1/1），料液比为 1:50 g/mL，在 90 W 超声 30 min；微波辅助提取^[26]：提取溶剂为乙酸乙酯，料液比为 1:50 g/mL，400 W 微波反应 1min 后静提 30min。

3.5 结果与讨论

3.5.1 三液相体系筛选结果

选择正己烷和乙醇与四种无机盐构建三液相萃取体系,考察了三液相萃取体系组成对番茄皮渣中番茄红素及多糖提取的影响。结果如表 3-1 所示,当无机盐为磷酸氢二钾时,番茄红素的提取效果最好,其提取得率可达 66.5 mg/100 g,而此时多糖的得率为 16.7 mg/g;当体系为正己烷/乙醇/柠檬酸钠时,多糖的提取效果最好,最高可达 35.8 mg/g,此时番茄红素的得率为 41.2 mg/100 g。由磷酸氢二钾构建的三液相体系中番茄红素的得率是柠檬酸钠体系的 1.6 倍,虽然多糖的萃取得率仅为柠檬酸钠体系中的 0.5 倍,但番茄红素的研究价值远远高于番茄多糖。因此选择对于番茄红素萃取效果最好的正己烷/乙醇/磷酸氢二钾体系进行后期实验。而在磷酸氢二钾体系中,当正己烷为 9% 时,提取效果最好,因此选择 9% 的正己烷进一步考察。

表 3-1 正己烷/乙醇/无机盐体系对番茄红素及多糖萃取的影响

Table 3-1 Extraction of lycopene and polysaccharides in different n-hexane/ethanol/salt system

无机盐	配比	番茄红素 (mg/100 g)	多糖 (mg/g)
磷酸氢二钾	29/17/7	65.8	16.1
	29/17/9	66.5	16.7
	29/17/11	62.2	14.7
	29/17/13	59.4	14.0
	29/17/15	56.9	12.0
柠檬酸钠	28/17/7	37.6	34.1
	28/17/9	41.2	35.8
	28/17/11	39.6	31.1
	28/17/13	38.6	25.1
	28/17/15	36.6	18.6
硫酸铵	22/20/7	49.4	24.5
	22/20/9	50.8	27.3
	22/20/11	46.8	28.2
	22/20/13	45.3	28.8
	22/20/15	41.9	28.6
柠檬酸铵	26/28/7	50.9	24.3
	26/28/9	55.1	26.3
	26/28/11	54.6	24.7
	26/28/13	54.2	24.5
	26/28/15	54.0	23.7

3.5.2 三液相体系优化结果

(1) 乙醇用量对番茄红素和多糖得率的影响

从图 3-1 可以看出,在一定范围内,番茄红素和多糖的萃取得率随着乙醇用量的增大而增加;当乙醇浓度为 33% 时,番茄红素达到最大值为 73.0 mg/100 g;当乙醇质量分数为 35% 时,多糖达到最大值为 17.2 mg/g。随着乙醇浓度的进一步增加,多糖回收率呈下降趋势,这是因为随着随着乙醇质量分数的增大,中相体积也随之增大,部分分子量较小的多糖富集到中相;当乙醇的用量过大时,会导致下相的无机盐会部分析出,造成番茄红素和多糖得率的降低。因此,选择 33% (w/w)的乙醇作进一步研究。

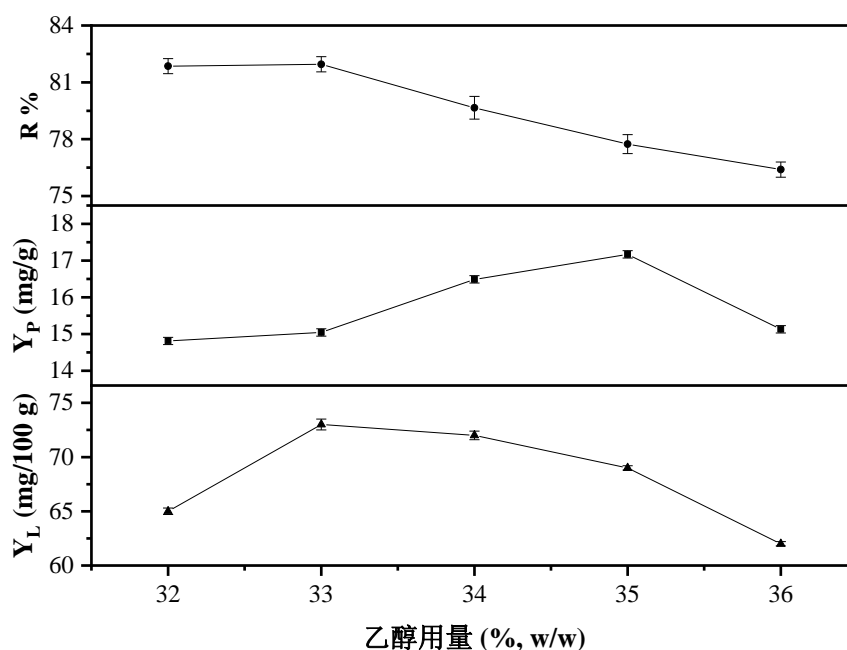


图 3-1 乙醇质量分数对番茄红素和多糖得率的影响

Fig. 3-1 Effects of ethanol concentration on the yield of lycopene and polysaccharides

(2) 无机盐用量对番茄红素和多糖萃取得率的影响如图 3-2。番茄红素和多糖的萃取得率在一定范围内随着磷酸氢二钾用量的增大而增加,当磷酸氢二钾的用量为 17% (w/w) 时,番茄红素和多糖均达到最大值,分别为 74.1 mg/100 g 和 17.5 mg/g,这是由于盐用量的持续增加,体系中的水分子主要向下相移动,从而减小了上相和中相的体积,使得体系萃取能力增强,目标产物得率增大;而过多的无机盐会破坏体系的形成,因此目标产物得率降低。因此,选用 17% (w/w) 的磷酸氢二钾作下一步的研究。

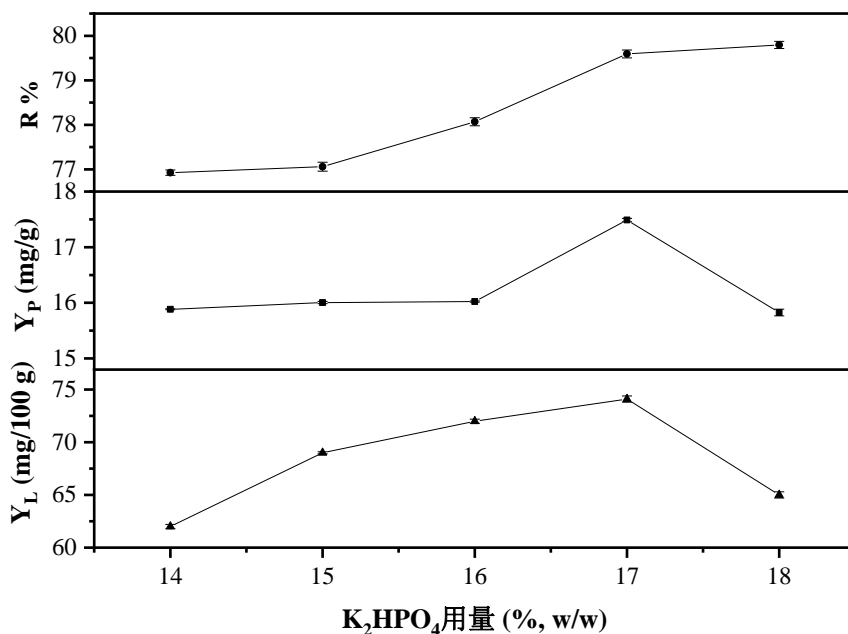


图 3-2 磷酸氢二钾用量对番茄红素和多糖得率的影响

Fig. 3-2 Effects of dipotassium phosphate concentration on the yield of lycopene and polysaccharides

3.5.3 三液相萃取影响因素研究

(1) 目数对番茄红素和多糖得率的影响

由图 3-3 可知, 番茄红素和多糖得率随目数增大而增加, 当目数为 160 目时, 分别达到最大值为 78 mg/100 g 和 31 mg/g; 当日数大于 160 时, 目标产物的得率均下降, 这是因为颗粒过细, 进入溶剂中会出现抱团现象, 降低了与溶剂的接触面积, 从而导致得率降低。因此, 选择 160 目的番茄皮渣粉末作进一步研究。

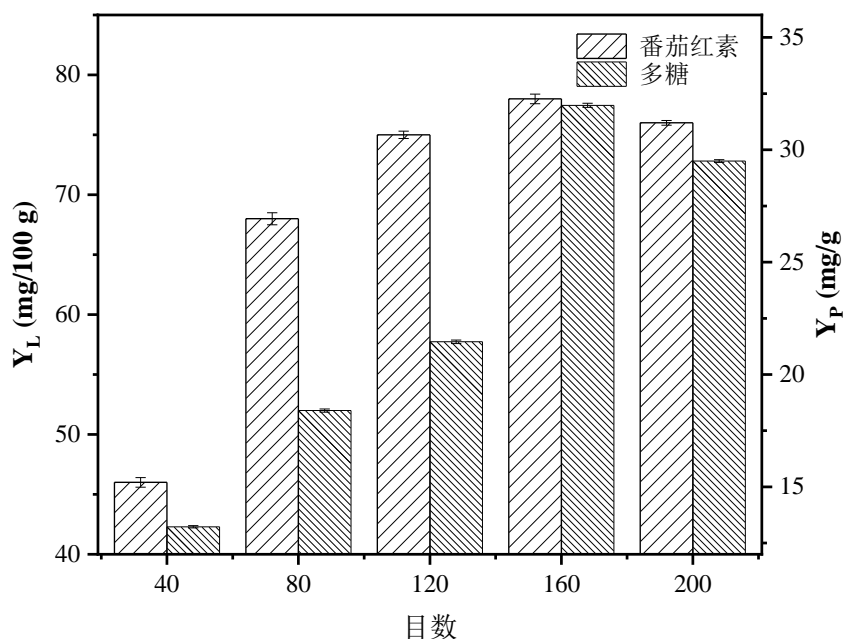


图 3-3 目数对番茄红素和多糖得率的影响

Fig. 3-3 Effects of mesh on the yield of lycopene and polysaccharides

(2) 料液比对番茄红素和多糖得率的影响

由图 3-4 可知, 料液比对番茄红素和多糖得率的影响较大, 随着料液比的增大, 多糖和番茄红素得率快速增加, 这是由于料液比在 1:50 以前, 由于所加的样品过多造成提取剂粘稠, 不利于有效成分的提取; 当料液比在 1:50 时, 这时所加的样品刚好满足提取剂的最大载样量, 番茄红素和多糖均达到最大值分别为 83.0 mg/100 g 和 38.8 mg/g。因此, 选择 1:50 的料液比进行下一步实验。

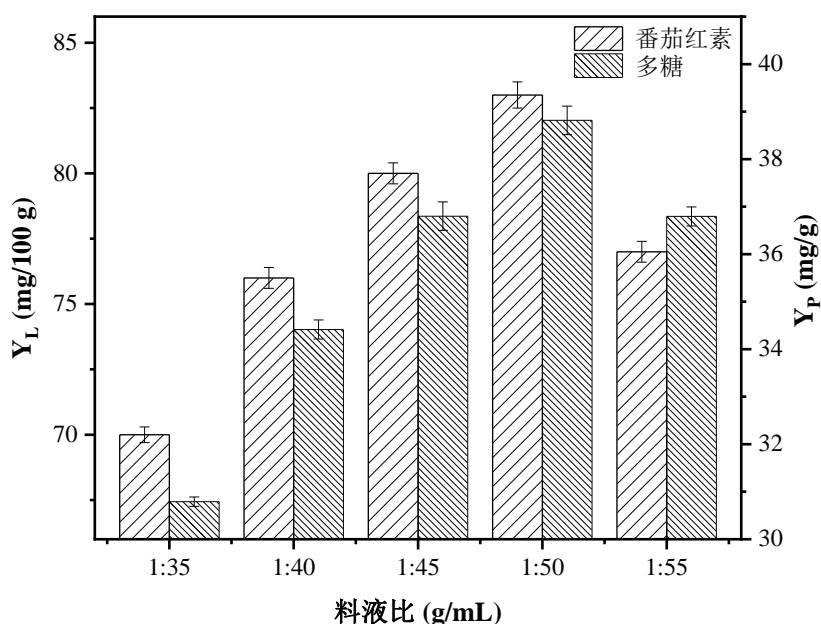


图 3-4 料液比对番茄红素和多糖得率的影响

Fig. 3-4 Effects of solid-liquid ratio on the yield of lycopene and polysaccharides

(3) 静置时间对番茄红素和多糖得率的影响

由图 3-5 可知, 在 30 min-60 min 时, 静置时间对番茄红素和多糖的提取影响最大, 这是由于在前 60 min, 体系正在快速的达到相平衡, 有效成分从原料中提取出来迅速的向富集相移动。而超过 60 min, 相逐渐达到平衡, 使得得率增加缓慢。当静置时间在 90 min 时, 番茄红素达到最大值为 84 mg/100 g; 当静置时间为 120 min 时, 多糖达到最大值为 42.8 mg/g, 此时番茄红素得率没有明显变化; 当超过 120 min 时, 两者得率均下降。这是因为当静置时间达到 120 min 后, 各相的有效成分接近饱和, 少部分有效成分跟空气接触被氧化分解, 所以造成目标产物得率和回收率下降。从时间成本考虑, 选择静置时间为 90 min 较为恰当。

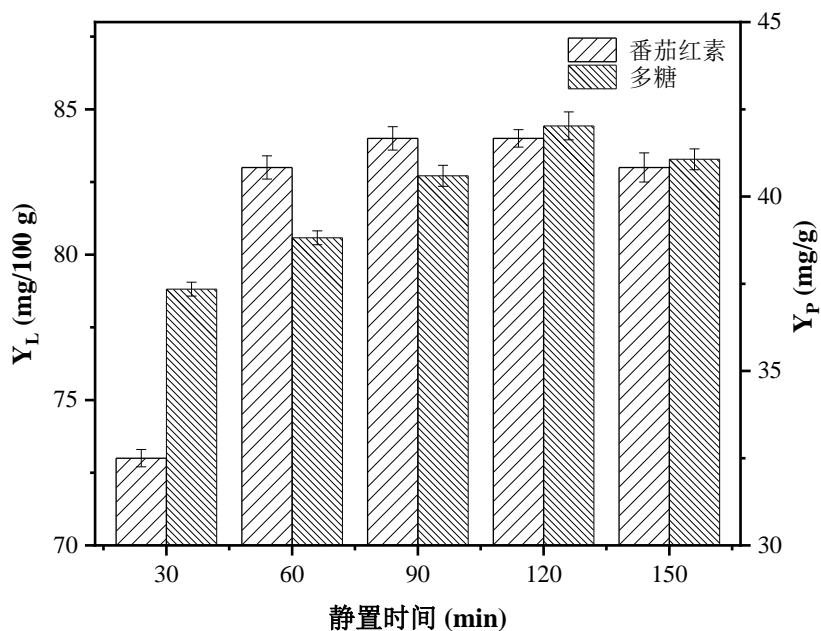


图 3-5 静置时间对番茄红素和多糖提取的影响

Fig. 3-5 Effects of extraction time on extraction of lycopene and polysaccharides

3.5.4 萃取策略对番茄红素和多糖提取的影响

如图 3-6 所示，萃取策略的不同对番茄红素和多糖提取得率有明显的影响。通过对比了 6 种萃取策略，策略 D、E 和 F 对于番茄红素提取效果最好，番茄红素可达到为 92.0、93.0 和 93.0 mg/100 g；此外，策略 A 明显高于策略 B 和 C。而对于多糖，策略 C 效果最好，可达到 41.9 mg/g；策略 E 略低于策略 C，可达到 40.8 mg/g。这是因为番茄红素易溶于正己烷，多糖易溶于水。

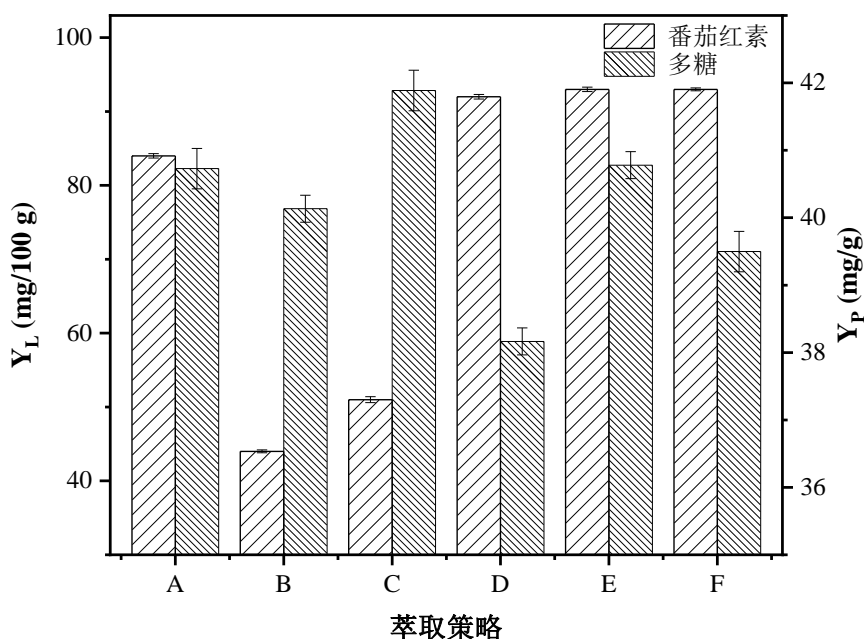


图 3-6 萃取策略对番茄红素和多糖提取的影响

Fig. 3-6 Effects of extraction strategie on extraction of lycopene and polysaccharides

3.5.5 红外光谱分析

由图 3-7 可见, 番茄红素标准品被用作检测番茄红素上层相富集的参考。FT-IR 中出现在 3009.01 、 2923.58 和 2854.24 cm^{-1} 处的特征性尖峰, 表明 C-H 基团的不对称伸。 1461.73 和 1378.76 cm^{-1} 处存在明显的峰表明 C-H₂ 弯曲, 1163.57 cm^{-1} 峰代表反式-R-HC = CH-R, 这证明提取的番茄红素是全反式的结构体。 1465.39 cm^{-1} 处的典型峰确认了番茄红素分子中 CH₂ 的 V 对称性^[25], 以 723.13 cm^{-1} 为中心的带宽可归因于 CH = CH-H 拉伸振动。FT-IR 光谱的结果与番茄红素标准品一致。因此, 可证明所得到的番茄红素均为全反式结构。

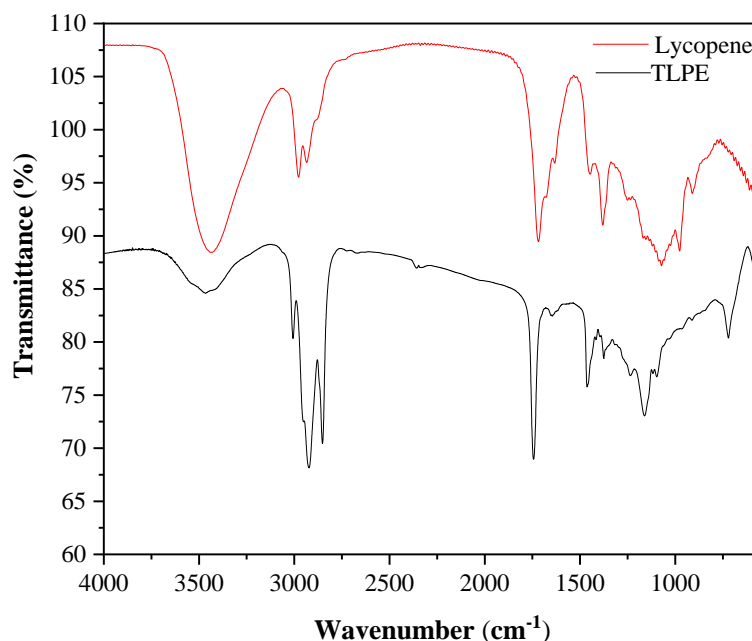


图 3-7 番茄红素红外光谱图

Fig. 3-7 Infrared spectrum of lycopene

3.5.6 不同提取方法得率及抗氧化活性对比

对比研究了三种溶剂介导萃取、超声波辅助提取、微波辅助提取及三液相萃取法提取番茄皮渣中番茄红素的得率, 并对所得到的番茄红素粗提物进行抗氧化活性分析, 结果如表 3-2 所示。四种方法中, 超声辅助提取和微波酶辅助提取所花费的时间较少, 但它们分别需要 40 和 20 mL 的有机试剂; 虽然, 三溶剂介导法所消耗的有机试剂相对比超声和微波辅助提取较少, 但其需要长时间的搅拌; 三液相萃取由于相分离行为减少了有机溶剂的消耗, 并有利于获得更高浓度的活性成分^[74], 所消耗的有机试剂的量仅为超声辅助提取的 26.5%。就番茄红素的得率而言, 三液相萃取法所得到的番茄红素远远高于其它方法。DPPH 法抗氧化活性测定结果表明四种方法所得到的番茄红素抗氧化效果基本一致, 这可能是由于四种方法所获得的番茄红素结构较为稳定, 均为天然的全反式结构。

表 3-2 不同提取方法得率及抗氧化活性对比

Table 3-2 Comparison of yield and antioxidant activity of different extraction methods

不同提取方法	有机溶剂 (mL)	提取温度 (°C)	提取时间 (min)	番茄红素得率 (mg/100 g)	DPPH (IC ₅₀) (ug/mL)
三溶剂介导萃取	12	40	125	64.1	3.42
超声辅助提取	40	30	30	74.0	3.38
微波辅助提取	20	45	31	83.2	3.36
三液相萃取	10.6	25	90	92.0	3.26

3.6 小结

(1) 研究了三液相体系组成对番茄皮渣中番茄红素和多糖萃取的影响。结果表明,无机盐种类对萃取影响较大。当无机盐为磷酸氢二钾时,番茄红素萃取效果最好;当无机盐为柠檬酸钠时,多糖提取效果最好。

(2) 考察了三液相萃取番茄红素和多糖的影响因素。结果显示,当萃取体系组成为 9% (w/w)正己烷/33% (w/w)乙醇/17% (w/w)磷酸氢二钾,使用 160 目的原料,将料液比为 1: 50 g/mL 时在黑暗环境下静提 90 min,番茄红素和多糖的得率最高,且萃取策略的不同对番茄红素和多糖的提取影响较大。

(3) 通过傅里叶红外光谱结果显示三液相上相萃取物均为全反式番茄红素。上相提取物的 DPPH 的 IC₅₀ 值为 3.26 ug/mL。三液相萃取使番茄红素富集于上相,多糖主要富集于下相,实现了番茄皮渣中番茄红素和多糖的提取与粗分离。

第 4 章 酶辅助三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的研究

4.1 引言

鉴于三液相萃取实验可以有效的改善番茄红素的萃取得率,但由于其对多糖的萃取效果并不是很好,而酶辅助两相盐析萃取中多糖的提取效果较好。因此,为进一步提高有目标产物的萃取得率,本章采用酶辅助三液相法从番茄皮渣中提取番茄红素和多糖,试图进一步提高番茄红素的得率和解决多糖在三液相萃取体系中萃取得率较低的问题。分析了酶辅助三相萃取番茄红素和多糖的主要影响因素;此外,还通过与其他方法对比评估了酶辅助三液相萃取的萃取效率及抗氧化活性。

4.2 材料与仪器

正己烷,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司

其它实验材料同表 2-1。

Nicolet 6700 型傅里叶红外光谱仪美国

其于实验仪器同表 2-2。

4.3 分析方法

- (1) 番茄红素的含量测定见 2.3.1
- (2) 多糖的含量测定见 2.3.2
- (3) DPPH 自由基的清除能力测定见 2.3.3

4.4 实验方法

4.4.1 酶辅助三液相萃取过程

首先,在 25 ml 的刻度试管中加入 160 目 0.4 g 的番茄渣粉,1% 酶和适量磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,并通过涡旋混合器混合均匀后置于 45℃ 水浴中 90 min。然后,将 9% (w/w)正己烷/33% (w/w)乙醇/17% (w/w)磷酸氢二钾和 41% (w/w)去离子水添加到酶浆中,并通过涡旋混合器振动 10 分钟以使盐完全溶解,然后在室温下静置 90 分钟以形成三相液相系统。最后,将混合物以 4000 rpm 离心 5 分钟以促进相分离,并在相分离完成后记录系统顶部和底部相的体积,然后根据等式 3-1、3-2 和 3-3 分别计算番茄红素得率及多糖的得率和回收率。

4.4.2 酶辅助三液相萃取工艺参数优化

- (1) 酶种类对番茄皮渣有效成分萃取的影响

称取适量的 160 目 0.4 g 番茄皮粉末,分别加入纤维素酶、果胶酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶以及按照 (1:1、1:3、5:3、3:5、3:1) 组成的复合酶于 45 °C

水浴中酶解 60 min 后, 加入适量的无机盐、乙醇和正己烷, 混合均匀后, 黑暗环境下静置分相, 测定番茄红素和多糖含量。

(2) pH 对番茄皮渣有效成分萃取的影响

称取 160 目 0.4 g 番茄皮渣粉末和适量的果胶酶, 分别于 pH 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5, 45 °C 酶解 60 min, 其余步骤如上。

(3) 酶量对番茄皮渣有效成分萃取的影响

称取 160 目 0.4 g 番茄皮渣粉末和适量 pH 6.0 缓冲液, 分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5% 果胶酶, 45 °C 酶解 60 min, 其余步骤如上。

(4) 酶解温度对番茄皮渣有效成分萃取的影响

称取 160 目 0.4 g 的番茄皮渣粉末和 2% 果胶酶, pH 6.0, 分别于 35、40、45、50、55 °C 酶解 60 min, 其余同上。

(5) 酶解时间对番茄皮渣有效成分萃取的影响

称取 160 目 0.4 g 番茄皮渣粉末和 2% 果胶酶, pH 6.0, 45 °C 分别酶解 30、60、90、120、150 min, 配制三液相萃取体系, 然后进行番茄红素和多糖的含量测定。

4.4.3 红外光谱分析

将一定数量的顶层萃取物和 0.01 g 溴化钾粉末充分混合, 将混合物研磨, 然后压成 1 mm 颗粒。通过使用番茄红素标准品作为检测上层相富集番茄红素的参考, 在 4000 至 450 cm^{-1} 范围内进行记录, 获得了上相提取物的红外光谱, 检测提取过程造成损坏的可能性^[75, 76]。

4.4.4 不同提取方法的对比

对比酶辅助三液相、三液相以及酶辅助三溶剂介导萃取法对番茄皮渣中番茄红素和多糖的提取研究。酶辅助三溶剂介导萃取法^[65]: 加入 0.4 g 番茄皮渣粉末和 2% 果胶酶在 45 °C 下磁力搅拌 240 min 后加入己烷/丙酮/乙醇 (2/1/1) 混合溶剂 12mL, 磁力搅拌 120 分钟后静置分相 5 分钟。

4.5 结果与讨论

4.5.1 酶辅助三液相工艺参数优化结果

(1) 酶种类对萃取番茄红素和多糖的影响

选择了四种广泛应用于天然产物活性成分提取的酶进行比较, 结果如图 4-1 所示, 不同种类的酶对番茄红素和多糖得率影响较为显著。就番茄红素而言, 果胶酶水解后提取所得到的番茄红素得率最高, 而木瓜蛋白酶的酶解作用仅次于果胶酶。Ranveer^[77]发现果胶酶在释放番茄红素方面比纤维素酶和蛋白酶更加有效, 果胶酶可以大大提高番茄红素的提取率已得到证实^[78]。就多糖而言, 纤维素酶具有最佳的酶分解作用, 在所有类型的酶中产量最高, 而两种蛋白酶最差。一个可能的原因是植物细胞壁的结构多糖主要由纤维素, 半纤维素和果胶组成^[79]。

然后，将具有较好酶解作用的果胶酶，纤维素酶和木瓜蛋白酶按比例混合，用于下一步实验。

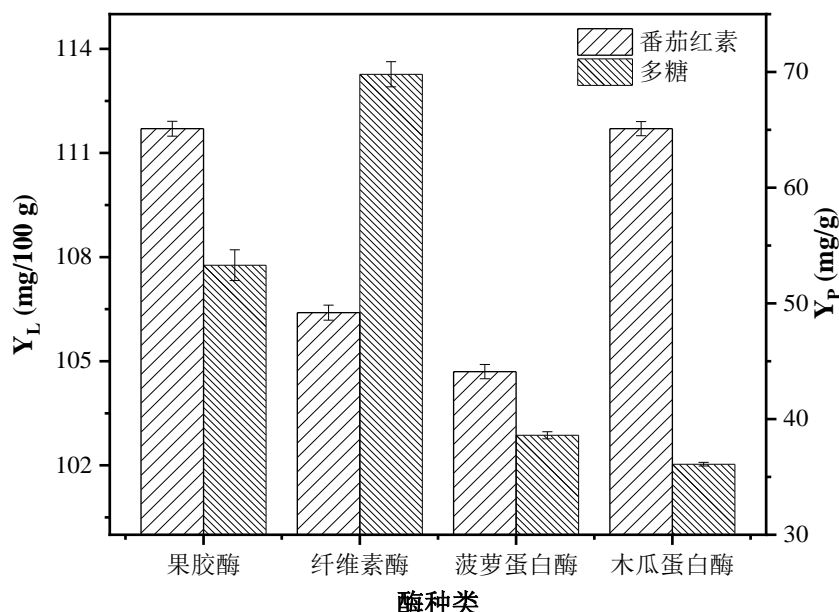


图 4-1 酶种类对番茄红素和多糖的影响

Fig.4-1 Effects of enzyme types on lycopene and polysaccharides

(2) 混合酶组成对提取番茄红素和多糖的影响

复合酶的组成对番茄红素和多糖得率的影响如图 4-2 所示。在果胶酶和纤维素酶的组合中，番茄红素的收率在果胶酶中最高，表明果胶酶在番茄红素的提取过程中起主要作用；多糖的产量随纤维素酶的增加而增加，表明纤维素酶在多糖的提取过程中起主要作用。在由果胶酶和木瓜蛋白酶组成的混合酶系统中，混合酶所提取到的番茄红素要比单一酶提取效果低；对于多糖，果胶酶显示出较高的提取率。因此，果胶酶被选为最佳水解酶。

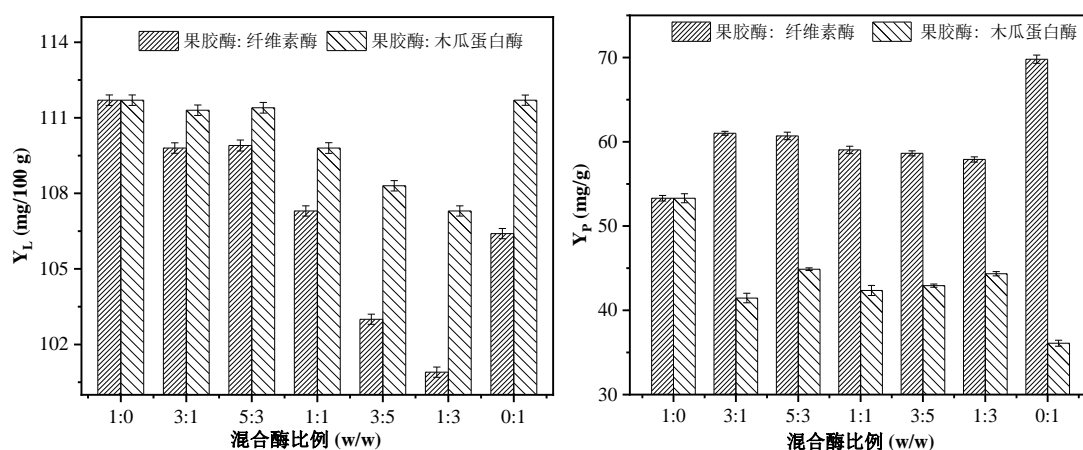


图 4-2 混合酶组成对番茄红素和多糖提取的影响。1:0 果胶酶；0:1 菠萝蛋白酶/纤维素酶；果胶酶：纤维素酶/菠萝蛋白酶的比例为 3:1，5:3，1:1，3:5，1:3。

Fig.4-2 Effect of compositions of enzyme on the extraction rate of lycopene and polysaccharides. 1 Pectinase; 7 Bromelain/Cellulase; 2 to 6 are complex enzymes of pectinase and bromelain, the ratios are: 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3.

(3) 缓冲溶液 pH 对提取番茄红素和多糖的影响

缓冲溶液 pH 对番茄红素和多糖得率的影响如图 4-3 所示。在 pH 6.0 时，番茄红素和多糖的得率分别达到最大值为 111.7 mg/100 g 和 53.3 mg/g。这可能是由于果胶酶在中等酸性环境下比在高酸性和中性条件下的稳定性更好^[80]或番茄红素和多糖在此条件下结构相对稳定。因此，选择 6.0 作为最佳酶解 pH 进行下一步实验。

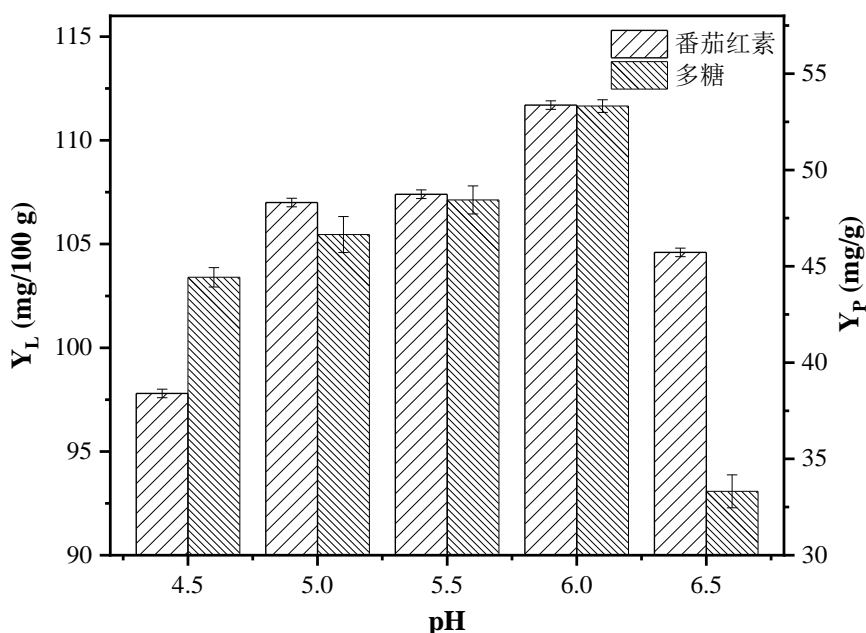


图 4-3 pH 对番茄红素和多糖的影响

Fig.4-3 Effects of pH on the yield of lycopene and polysaccharides

(4) 酶量对番茄红素和多糖得率的影响

果胶酶浓度对番茄红素和多糖得率的影响示如图 4-4 所示。结果表明，番茄红素和多糖含量随果胶酶浓度的增加而逐渐增加，最终随果胶酶浓度的进一步增加而降低。在 2% 果胶酶浓度下观察到番茄红素和多糖的释放明显最高。番茄红素和多糖的产量分别为 125.0 mg/100 g 和 56.1 mg/g。这可能是由于较低的酶浓度，果胶酶不能完全破坏番茄皮渣细胞壁，而较高的酶浓度导致快速水解导致最终产物氧化增加。Ranveer^[81]和 Munde^[80]也报道了类似的结果。因此，考虑到成本，选择 2% 作为最佳酶浓度。

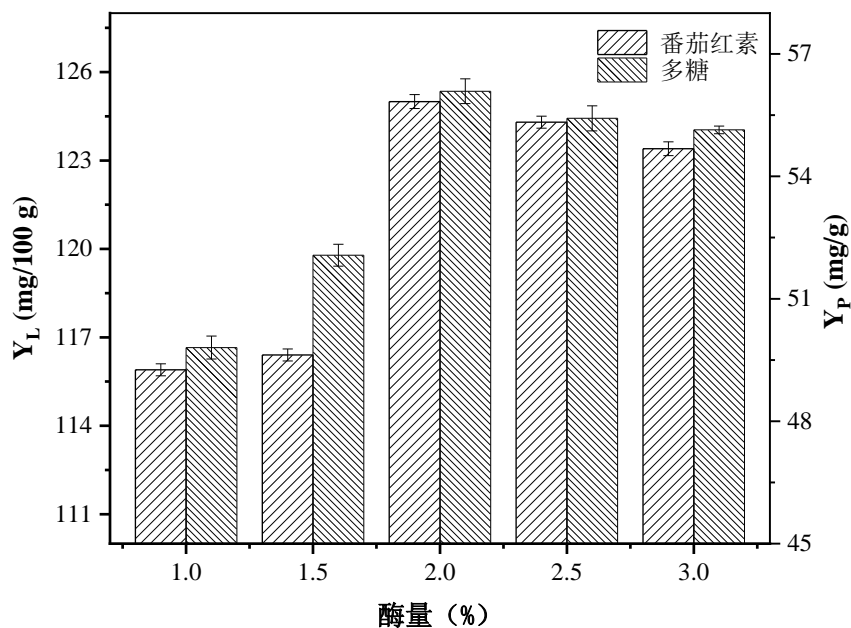


图 4-4 酶量对番茄红素和多糖得率的影响

Fig. 4-4 Effects of concentration of enzymes on the yield of lycopene and polysaccharides

(5) 酶解温度对番茄红素和多糖得率的影响

酶解温度对番茄红素和多糖得率的影响如图 4-5 所示。番茄红素和多糖的得率随温度从 35 升高到 45 °C 而增加。当酶解温度为 45 °C 时番茄红素达到最大值，产率为 125.1 mg/100 g。当温度为 50 °C 时，多糖得率达到最大值为 58.7 mg/g。然而，继续升高温度，番茄红素和多糖的得率均降低。这可能是由于高温导致产物分解^[82]或果胶酶活性降低^[38]，因此降低了番茄红素和多糖的得率。考虑到能耗，选择 45 °C 作为最佳酶解温度。

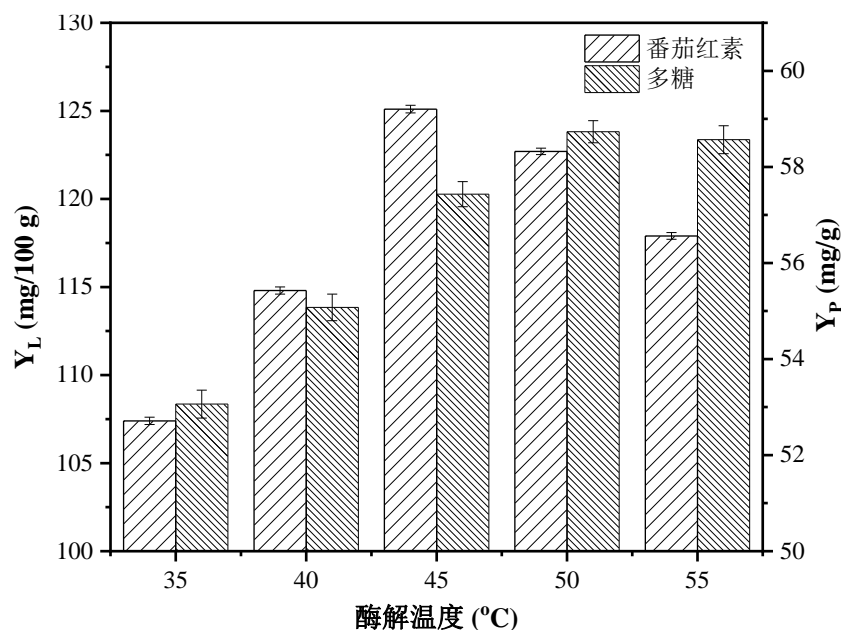


图 4-5 酶解温度对番茄红素和多糖提取的影响

Fig.4-5 Effects of enzymolysis temperature on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

(6) 酶解时间对番茄红素和多糖得率的影响

由图 4-6 可知酶解时间对番茄红素和多糖萃取得率的影响结果, 显而易见, 番茄红素和多糖的萃取得率在一定的范围内随着酶解时间的延长而增大; 当酶解时间为 90 min 时, 番茄红素和多糖的得率分别达到最大值为 127.0 mg/100 g 和 59.8 mg/g; 当酶解温度超过 90 分钟以后, 番茄红素的得率降低, 多糖的收率趋于稳定。这可能是由于番茄红素长时间暴露在外部环境中导致番茄红素氧化, 导致番茄红素在长时酶解后得率降低^[83], 而此时多糖的浓度在体系中达到了饱和。因此, 将最佳酶解时间定为 90 min。

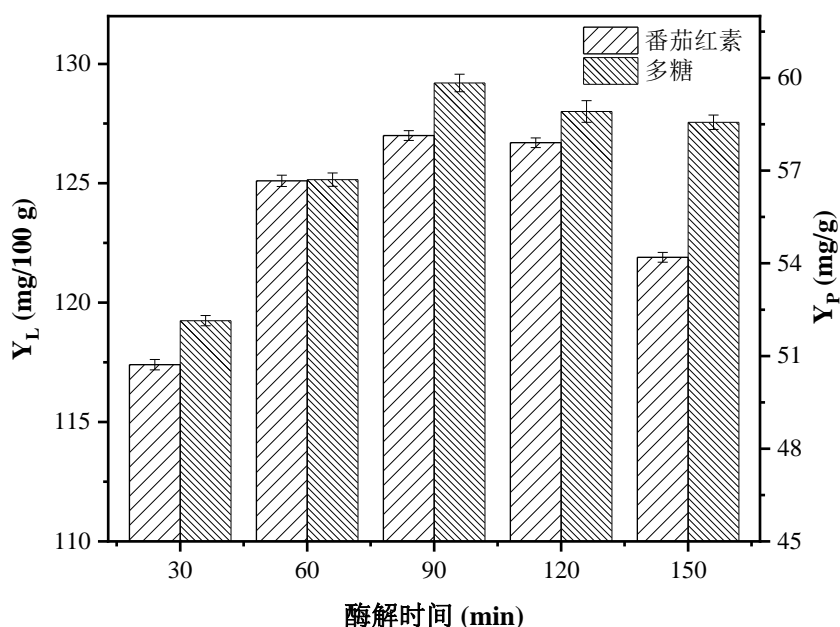


图 4-6 酶解时间对番茄红素和多糖提取的影响

Fig.4-9 Effects of enzymolysis time on the extraction rate of lycopene and polysaccharides

4.5.2 红外光谱分析

在这项研究中, 傅里叶红外光谱用于检测酶辅助三液相法提取的番茄红素的结构是否被生物酶破坏。结果如图 4-7 所示, 番茄红素标准品被用作检测上相中富集的番茄红素参考。FT-IR 中出现在 3009.01、2923.58 和 2854.24 cm^{-1} 处的特征性尖峰, 表明 C-H 基团的不对称伸展^[25]。1461.73 和 1378.76 cm^{-1} 处存在明显的峰表明 C-H₂ 弯曲, 1163.57 cm^{-1} 峰代表反式-R-HC = CH-R^[84], 这证明了提取的番茄红素是全反式的结构。1465.39 cm^{-1} 处的典型峰确认了番茄红素分子中 CH₂ 的 V 对称性, 以 723.13 cm^{-1} 为中心的带宽可归因于 CH = CH-H 拉伸振动。FT-IR 光谱的结果与从番茄产品中提取的番茄红素的光谱值相关, 如 Rahimpour 等^[25]所解释的。因此, 可以证明酶辅助三液相法上相的主要产物是全反番茄红素, 果胶酶不能破坏番茄红素的结构。

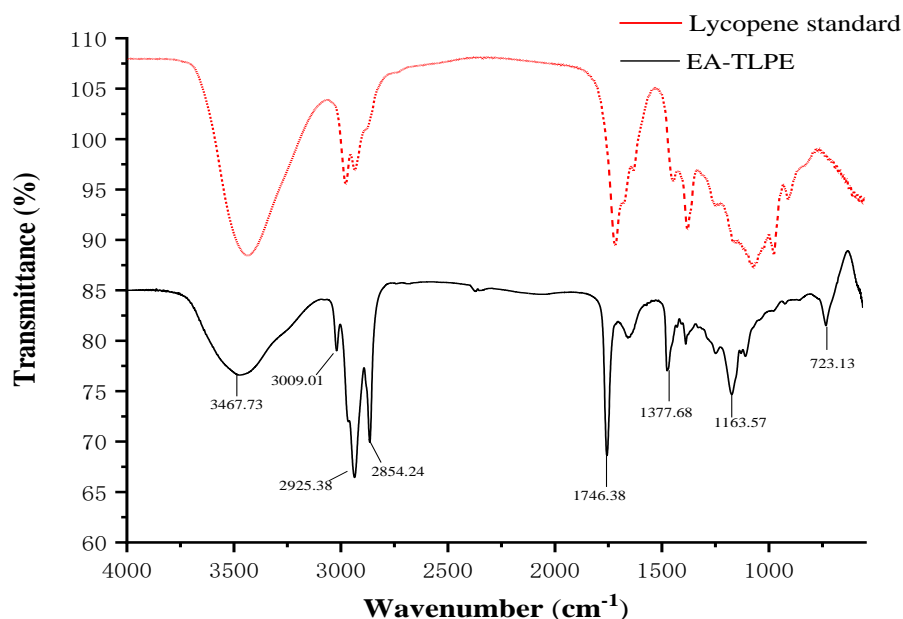


Fig. 4-7 FTIR spectrum of lycopene

图 4-7 番茄红素的 FTIR 谱图

4.5.3 不同提取方法及 DPPH · 清除能力对比

通过对比酶辅助三溶剂介导萃取、三液相萃取和酶辅助三液相萃取法提取番茄皮渣中番茄红素的得率,并对所获得的番茄红素粗提物进行了抗氧化活性分析,结果如表 4-1 所示。这三种方法中,就得率而言,酶辅助三液相萃取法结合了盐析作用和酶解的优势,番茄红素的产量为 127 mg/100 g,比酶辅助三溶剂介导法所得到的番茄红素高 38.7 mg/100 g,比三液相萃取法的得率高 35 mg/100 g。采用 DPPH 方法分别对所得到的番茄红素粗提取产物进行抗氧化分析,结果表明酶辅助三液相萃取得到的产物的 IC_{50} 为 3.18 $\mu\text{g/mL}$,低于酶辅助三溶剂介导萃取所得到的,这可能是由于部分番茄红素分子发生几何异构化,使得其 DPPH 自由基清除能力增加^[85]。

表 4-1 番茄红素得率及抗氧化活性对比

Table 4-1 Comparison of lycopene yield and antioxidant activity

不同提取方法	DPPH (IC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$)	得率 (mg/100 g)
酶辅助三溶剂介导萃取	3.33	88.3
三液相萃取	3.26	92.0
酶辅助三液相萃取	3.18	127.0

4.6 小结

(1) 研究了酶辅助三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖的工艺参数,为 2% 的果胶酶,在 pH 6.0、酶解温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下酶解 90 min,番茄红素和多糖分别达到最大值为 127.0 mg/100 g 和 59.8 mg/g。

(2) 通过红外光谱可以看出，所得到的番茄红素均为全反式结构，果胶酶并不能破坏番茄红素结构。

(3) 研究了酶辅助三液相萃取、三液相萃取及酶辅助三溶剂介导萃取三种方法提取番茄皮渣中番茄红素和多糖。结果表明酶辅助三液相萃取法获得的番茄红素得率最高，且抗氧化活性最好。

第5章 酶辅助三液相萃取番茄皮渣粗提物的初步纯化及分析

5.1 引言

目前,高纯度的番茄红素研究已经成为番茄红素研究领域的重要内容,有机溶剂提取所获得的番茄红素粗提物中脂溶性杂质含量较高;且通常提取获得的植物多糖杂质含量较高,不利于后期对其结构探索。因此要对所得粗提物进行纯化。

大孔吸附树脂是一种新型人工合成的高分子材料,因其价格便宜,吸附性能较好,可选择性的吸附粗提物中的组分,从而实现目标物与杂质的分离纯化,在粗提物的分离纯化中有着广泛的应用前景^[86]。研究者发现 AB-8 型大孔树脂对有机物选择性好,不受无机盐存在的影响,可以用于盐析萃取所获得的番茄红素和多糖的纯化研究^[87-89]。

酶辅助三液相萃取从番茄皮渣中提取番茄红素和多糖,虽然将番茄红素和多糖得到进行简单的分离,但其粗提物中含有大量的其它杂质,仍需对萃取所得到的番茄红素树脂和多糖粗提物进行系统的分离纯化。本章主要选取 A8-8 大孔树脂对所获得的粗提物进行分离纯化研究,并对番茄多糖的结构初步探索。

5.2 材料与仪器

表 5-1 实验药品及试剂

Table 5-1 Experimental drugs and reagents

名称	级别	产地
AB-8	分析纯	天津市光复精细化学研究所
D101	分析纯	天津市光复精细化学研究所
刚果红	分析纯	麦克林生化科技有限公司
正丁醇	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
氯仿	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司

表 5-2 实验设备

Table 5-2 Experimental Instruments

仪器名称	型号	生产商
氮吹仪	N-EVAP	美国 Organomation 公司
旋转蒸发仪	R-210	BUCHI Labortechnik AG
超声波清洗器	KQ5200B	昆山市超卢仪器有限公司
紫外可见分光光度计	UVmini-1240	岛津企业管理有限公司
层析柱	Φ10mm×20cm	瑞达恒辉商城

5.3 分析方法

(1) 番茄红素含量的测定如 2.3.1

- (2) 多糖的含量测定如 2.3.2
 (3) DPPH·清除能力的测定如 2.3.3

5.4 实验方法

5.4.1 粗提物的获得

采用批量法大量收集酶辅助三液相萃取的上下相产物，并将其减压浓缩至无有机试剂后使用冷冻干燥仪将样品进行干燥处理，最终得到粗产品。

5.4.2 树脂的预处理

新购的树脂中均残留惰性溶剂和一些不溶杂质，所以使用前应按以下步骤进行预处理。下面是大孔树脂的预处理过程：

(1) 乙醇浸泡：将适量大孔树脂浸泡在含有 95% 的乙醇溶液中，使乙醇液面高于树脂层 10 cm 左右，用玻璃棒搅拌均匀后室温静置 24 h；

(2) 水洗：用蒸馏水反复水洗第一步所浸泡好的树脂，直至烧杯中的水清澈透明且不含乙醇味；

(3) 酸洗：将配置好的 5% 的盐酸加入到水洗后的树脂中，浸泡 8 h 后，反复水洗使 pH 为中性；

(4) 碱洗：再用 5% 的 NaOH 浸泡酸洗后的树脂 8 h 后，用蒸馏水反复冲洗树脂至出水的 pH 呈中性。

5.4.3 番茄红素油树脂的纯化

取番茄红素油树脂 20 g，取 5 mL 的乙酸乙酯溶解上柱。将 40 g 活化好的 AB-8 为柱层析的固定相，第一步用正己烷洗脱，待洗脱液清亮无色后用正己烷：丙酮 3:2 (V/V) 的混合液洗脱，最后用丙酮洗脱。收集深红色部分，使用旋转蒸发仪减压浓缩至适量，放置冰箱过夜，第二天将番茄红素晶体过滤，测定番茄红素含量，并计算计算番茄红素的得率。

5.4.4 多糖的纯化及结构分析

(1) 番茄多糖脱色

采用大孔树脂^[90]对番茄多糖进行脱色处理。称取 20.0 g 树脂与 5 mg/mL 多糖溶液 40 mL 加入 100 mL 锥形瓶混匀，放置在 38 °C，150 r/min 条件下的摇床中静态吸附 2 h，然后减压抽滤，收集样液依照公式 5-1 和 5-2 测定脱色率和多糖损失率。

$$\text{脱色率 (\%)} = (\text{脱色前 } A_{\text{脱色前}} - A_{\text{脱色后}}) / A_{\text{脱色前}} * 100\% \quad (5-1)$$

$$\text{损失率 (\%)} = (C_{\text{脱色前}} - C_{\text{脱色后}}) / C_{\text{脱色前}} * 100\% \quad (5-2)$$

(2) 番茄多糖除蛋白

利用 Sevage 法去除蛋白^[91]。在多糖溶液中加入体积比为 4:1 的氯仿和正丁醇的混合溶液充分摇匀，其中游离的蛋白质变性后成为不溶性物质而被沉淀下

来, 经高速离心后去除变性的蛋白质。

(3) 番茄多糖的分级沉降

取 5 g 除去蛋白的出多糖配制为 10 mg/mL 的多糖溶液, 向其添加无水乙醇, 调节乙醇浓度为 30%, 4 °C 下静置 12 h, 将获得的分沉淀记为 P30, 依次类推, 分别获得 P50、P70 和 P90。

(4) 刚果红实验

取样品 2 mg 溶于 5mL 蒸馏水中, 取 1mL 溶解号的样品分别加入不同浓度(0.1-0.5 mol)的 NaOH 溶液 2mL, 再加入 80 umol/L 刚果红溶液 2 mL, 混合均匀, 反应 60 min 后进行全变成扫描, 来检测样品的最大吸收波长是否发生变化。

5.5 结果与讨论

5.5.1 柱层析法纯化番茄红素

柱层析法是利用混合物中各个组分的物理化学性质的差别, 通过反复的吸附或分配作用, 从而使各组分分离。番茄红素树脂经过柱层析纯化后的结果如表 5-3 所示。20 g 番茄红素树脂经 AB-8 型树脂纯化后可得到 7.8 g 的番茄红素晶体。番茄红素晶体极易氧化, 需真空低温避光下保存。

表 5-3 柱层析纯化番茄红素树脂

Table 5-3 Purification of lycopene oleoresin by column chromatography

树脂 (g)	番茄红素晶体 (g)
20	7.8

5.5.2 番茄多糖的纯化及结构分析

(1) 番茄多糖脱色结果

番茄多糖粗提取中含有较多的杂质, 杂质含量过高会影响下一步的分离纯化及结构测定, 因此, 先进行脱色素处理。不同型号大孔树脂的吸附性能对番茄多糖纯化过程中脱色效果影响较大, 其主要是因为树脂的极性、比表面积和空间结构等重要因素^[92]。实验选取 AB-8 和 D101 两种分子极性和颗粒理化性质不同的大孔树脂进行比较, 实验结果如表 5-4 可知, 大孔树脂 AB-8 是弱极性树脂, D101 为非极性树脂, AB-8 的脱色率为 78.28% 明显优于 D101 树脂, 且多糖的保留率液相对较高, 因此选择 AB-8 为番茄多糖脱色树脂。

表 5-4 两种树脂的性质及脱色效果

Table 5-4 Properties and decolorizing effect of resins

树脂类型	极性	脱色率 (%)	多糖损失率 (%)
AB-8	弱极性	78.28	25.33
D101	非极性	61.43	23.43

(2) 番茄多糖脱蛋白结果

由表 5-5 可知, 采取 Sevage 法脱蛋白时, 随着实验次数的增加, 脱蛋白率

和多糖折损率也随之增大。当重复 6 次实验后,蛋白质的去除率趋于稳定。因此,采用此方法脱蛋白时,实验 6 次效果最佳,此时的去除率达到 79.87%,多糖的损失率为 44.23%。当实验次数超过 6 此时,并没有有效的去除蛋白,反而造成大量的多糖损失。这主要在脱蛋白过程中,由于反复操作原因造成多糖损失的反复积累。

表 5-5 Sevage 法脱蛋白
Table5-5 Removing protein with Sevage

实验次数	3	4	5	6	7
脱蛋白率 (%)	50.78	60.12	70.08	79.87	82.13
多糖损失率 (%)	18.21	24.12	30.34	44.23	50.09

(3) 番茄多糖的分级沉降结果

番茄多糖的分级沉降结果如表 5-6 所示。结果 P30、P50、P70 和 P90 的沉淀质量分别为 0.3、0.8、2.6 和 0.6 g,其中 P70 所得沉淀最多,这是由于是以单糖聚合而成,且易溶于水,在低浓度的乙醇溶液中只能沉淀相对分子质量较大的多糖。但糖类是由多羟基的醛和酮组成,当溶液中的乙醇分子达到一定程度后会与多糖分子中的羟基形成互溶体系^[93],减少了沉淀的析出。通过苯酚-硫酸法测定多糖含量,结果 P30 沉淀中多糖含量最高,这是因为当溶液中添加乙醇后,小分子的糖和一些醇溶性杂质溶解在 30% 乙醇溶液中,而水溶性大分子的糖快速沉淀下来。

表 5-6 番茄多糖的分级沉降
Table5-6 Fractional sedimentation of tomato polysaccharides

名称	沉淀质量 (g)	含量 (%)
P30	0.3	64.8
P50	0.8	55.1
P70	2.6	63.5
P90	0.6	52.1

(4) 刚果红实验

研究者通常使用刚果红试剂检测糖类是否存在三螺旋结构,其原因是多糖分子中的三螺旋结构可与刚果红试剂发生反应,形成络合物后造成刚果红的最大吸收波长改变^[94]。由于多糖的三螺旋结构不能稳定存在于 NaOH 溶液中,因此改变多糖与刚果红的混合溶液中的 NaOH 浓度可以清楚的看到混合溶液最大吸收波长的变化。将选取 P70 进行试验,结果如图 5-1 所示,当 NaOH 浓度从 0.0 变化到 0.4 mol/L 时,混合溶液的最大吸收波长增大,则表明番茄多糖可与刚果红试剂发生反应,形成稳定的络合物,此结构可以证明番茄多糖具有稳定规则的三螺旋构象;当 NaOH 浓度超过 0.4 mol/L 时,混合物的最大吸收波长急剧减少,此现象说明在此浓度下,番茄多糖不能与刚果红形成络合物,也就是此时的多糖

的三螺旋结构遭到 NaOH 分子的解离。

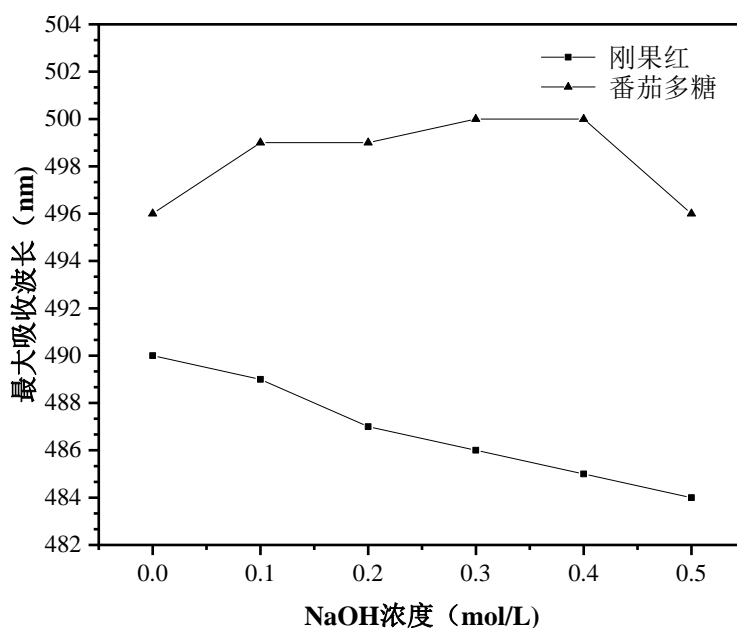


图 5-1 NaOH 浓度对最大吸收波长的影响

Fig.5-1 Effect of NaOH concentration on the maximum absorption wavelength

5.5.3 番茄多糖的纯化前后活性比较

纯化前后的番茄多糖对 DPPH 的清除作用如图 5-2 所示。其结果显示纯化前后的多糖对 DPPH· 都有清除作用，其清除率与样品浓度成正相关趋势。纯化前多糖的清除效果明显优于纯化后的，纯化前后的番茄多糖的 DPPH 自由基清除能力的 IC₅₀ 值分别为 3.43 和 4.37 mg/mL。这说在纯化过程中丢失了部分活性物质。华宵等^[95]曾报道过，番茄蛋白质为糖蛋白，具有较好的活性，且其拥有较好的起泡性和乳化性。

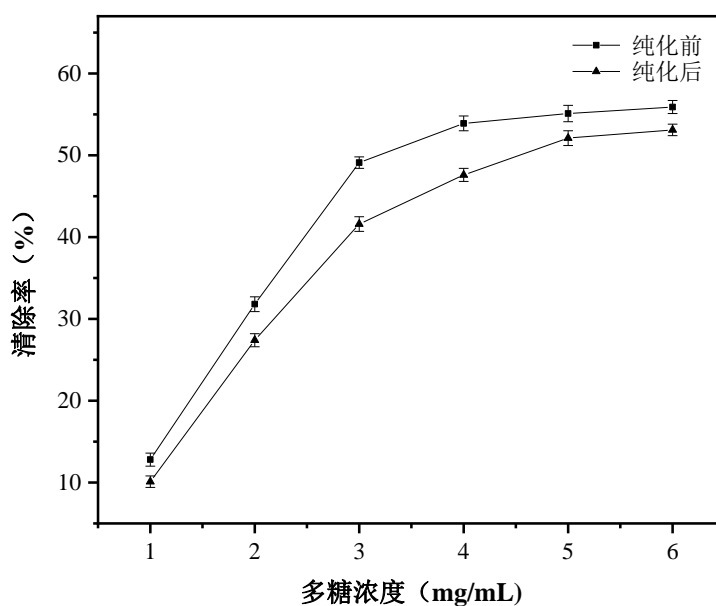


图 5-2 多糖对 DPPH· 的清除能力

Fig.5-2 Scavenging activity of polysaccharides on DPPH· radical

5.6 小结

(1) 研究了柱层析法对番茄红素油树脂进行纯化。结果表明，番茄红素粗提物经 AB-8 型树脂纯化后可得到 7.8 g 的番茄红素晶体。

(2) 对番茄多糖粗提物进行脱色、除蛋白和分级沉降等方法，获得了较为纯净的番茄多糖，并进行了刚果红实验。结果表明，AB-8 型大孔树脂脱色效果优于 D101 型大孔树脂；Sevage 法除蛋白反复 6 次结果最好；分级沉降实验中获得 4 组组分，其中 P70 组分质量最大；刚果红实验显示番茄多糖具有稳定的三螺旋结构。

(3) 通过对比纯化前后番茄多糖对 DPPH 的清除效果，发现纯化前的番茄多糖活性更高。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

(1) 研究了酶辅助双水相提取番茄皮渣中番茄红素和多糖的提取工艺。结果表明, 在 31% (w/w) 乙醇/16% (w/w) 磷酸氢二钾, 粉碎目数为 160 目, 料液比为 1:40 g/mL, 静置时间为 90 min, 混合酶为果胶酶: 菠萝蛋白酶 1:1, 酶量为 2.0%, pH 6.0, 酶解温度为 50 °C, 酶解时间为 119 min 时, 番茄红素和多糖的得率达到最大, 最大值分别为 15.69 mg/100 g 和 77.16 mg/g。通过不同类型的酶对原料的水解, 证明了果胶酶和菠萝蛋白酶组成的混合酶对番茄红素提取效果最好; 纤维素酶对多糖的萃取影响最大。与溶剂法对比, 酶辅助双水相所获得的番茄红素和多糖的得率均最高。

(2) 研究了三液相提取番茄皮渣中的番茄红素和多糖, 结果表明, 体系组成为 9% (w/w) 正己烷/33% (w/w) 乙醇/17% (w/w) 磷酸氢二钾, 粉碎目数为 160 目, 料液比为 1: 50 g/mL, 室温静置分相 90 min, 在该条件下, 番茄红素和多糖得率达到最大; 通过 6 种萃取策略相比较发现萃取策略的不同对番茄红素和多糖的影响较大; 通过傅里叶红外光谱结果显示所得到的番茄红素均为全反式结构; 对比分析了三溶剂介导萃取、超声辅助提取和微波辅助提取番茄红素, 结果表明, 三液相提取法提取得率最高。

(3) 研究了酶辅助三液相萃取番茄皮渣中番茄红素和多糖。结果表明, 在 2% 的果胶酶, pH 6.0、酶解温度为 45 °C 条件下酶解 90 min, 番茄红素和多糖分别达到最大值为 127.0 mg/100 g 和 59.8 mg/g。通过傅里叶红外光谱检测, 结果表明果胶酶并不能影响番茄红素的结构; 将酶辅助三液相萃取、三液相萃取及酶辅助三溶剂介导萃取得到的番茄红素得率和 DPPH·清除能力相比较, 结果表明, 酶辅助三液相萃取效果最佳。

(4) 首先, 将酶辅助三液相萃取获得的上相萃取物经柱层析法纯化, 获得 7.8 g 的番茄红素晶体。其次, 探究了 AB-8 型和 D101 型两种大孔吸附树脂对所得到的下相多糖进行脱色比较; Seville 法除蛋白反复次数分析; 进行多糖的分级沉降和刚果红实验。多糖纯化结果表明, AB-8 型大孔树脂对多糖脱色效果较好; Seville 法除蛋白反复 6 次效果最好; 分级沉降实验中获得 4 组组分, 其中 P70 组分质量最大; 刚果红实验显示 P70 具有稳定的三螺旋结构。

6.2 展望

本研究采用盐析萃取法和酶辅助盐析萃取法萃取番茄皮渣中的番茄红素和多糖, 分别研究了酶辅助双水相、三液相萃取和酶辅助三液相萃取番茄红素和多糖的工艺参数, 并进行了不同方法之间的对比。研究结果表明盐析萃取法可以有效的提取番茄皮渣中的活性物质; 酶可以有效的毁坏植物细胞壁且不能破坏目标物的结构。另外, 本研究采用大孔树脂对番茄红素油树脂进行纯化, 对番茄多糖

粗提物进行纯化处理和结构探索。但不足的是，得到的番茄红素晶状体较少，且只证明番茄多糖具有三螺旋结构，并没有得到番茄多糖是由哪些单糖聚合而成。因此，还需对番茄多糖进行系统的组成成分分析。

参考文献

- [1] Kaur D , Wani A A , Oberoi D P S , et al. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 711-718.
- [2] Lu, Z., et al., Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019. 86(2): 172-187.
- [3] Zuorro A , Fidaleo M , Lavecchia R . Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste[J]. enzyme microb technol, 2011, 49(6): 567-573.
- [4] Zuorro A , Lavecchia R . Optimization of Enzyme-Assisted Lycopene Extraction from Tomato Processing Waste[J]. Advanced Materials Research, 2013, 800(6): 173-176.
- [5] 白雪, 张彬, 赵强,等. 番茄籽蛋白酶解产物的功能特性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 036(4): 189-192,209.
- [6] 袁永成, 陈军, 刘成梅,等. 响应曲面法优化番茄皮渣中番茄红素提取工艺的研究[J]. 江西食品工业, 2011, (2): 23-26.
- [7] J, Shi, M, et al. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing.[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2000. 20(4): 293-334.
- [8] Song B , Liu K , Gao Y , et al. Lycopene and risk of cardiovascular diseases: A meta-analysis of observational studies[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017:161-167.
- [9] Edward G , Rimm E B , Yan L , et al. A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2002(5): p. 391-398.
- [10] 潘晓威, 叶剑芝, 苏子鹏, 等. 番茄红素生物学功能研究进展及应用前景[J]. 现代农业科技. 2018(1): 237-238.
- [11] 李珊珊, 祝贺, 祁玉丽,等. 人参果多糖的分离纯化及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 039(4): 73-76.
- [12] 韦巍, 李雪华. 多糖的研究进展[J]. 国外医学.药学分册, 2005, 32(3): 179-184.
- [13] 滕浩, 李雪影, 孙卉, 等. 天然多糖的硫酸化修饰对其生物活性影响研究进展[J]. 食品工业科技, 2019(6):121-124.
- [14] Shao D , Bartley G E , Yokoyama W , et al. Plasma and hepatic cholesterol-lowering effects of tomato pomace, tomato seed oil and defatted tomato seed in hamsters fed with high-fat diets[J]. Food Chemistry, 2013, 139(4): 589-596.
- [15] Shao, D., et al., Thermal and storage characteristics of tomato seed oil[J]. Lwt Food Science & Technology, 2015, 63(1):191-197.
- [16] 朱敏敏, 王永瑞, 刘文玉, 等. 水酶法提取番茄籽油酶法破乳工艺的研究[J]. 食品工业, 2018, 39(04): 20-23.
- [17] Wolfe R R , Cifelli A M , Kostas G , et al. Optimizing Protein Intake in Adults: Interpretation and Application of the Recommended Dietary Allowance Compared with the Acceptable Macronutrient Distribution Range[J]. Advances in Nutrition An International Review Journal[J], 2017, 8(2): 266-275.
- [18] Wu, Guoyao. Dietary protein intake and human health[J]. Food Funct, 2016.10.139-145.
- [19] Sho, H., J. Tzu-Ming, and I. Reiko, Dietary Metabolites and Chronic Kidney Disease. Nutrients[J]. 2017, 9(4): 358-364.
- [20] Frank Isken, Susanne Klaus, Martin Osterhoff, et al. Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. Journal of Nutritional Biochemistry[J]. 2010, 21(4): 278-284.

- [21] Topping, D.L., Soluble Fiber Polysaccharides: Effects on Plasma Cholesterol and Colonic Fermentation[J]. *Nutrition Reviews*, 1991, 11(7): 195-203.
- [22] Tan B L , Norhaizan Mohd Esa. Brewers rice induces apoptosis in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats via suppression of cell proliferation and the Wnt signaling pathway[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14(1): 221-229.
- [23] Poojary, M.M. and P. Passamonti. Extraction of lycopene from tomato processing waste: Kinetics and modelling. *Food Chemistry*[J]. 2015. 173(15): 943-950.
- [24] 刘璐, 李芳, 刘莉, 等. 超声波辅助番茄皮渣中番茄红素在核桃油中的富集工艺[J]. *中国食品添加剂*, 2018, 11(5):88-95.
- [25] Shamim R , Somayeh T D . Lycopene extraction from tomato processing waste using ultrasound and cell-wall degrading enzymes[J]. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 2018, 13(3): 102-109.
- [26] Ho K K H Y , Ferruzzi M G , Liceaga A M , et al. Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 62(1): 160-168.
- [27] Kehili, M., et al., Supercritical CO₂ extraction and antioxidant activity of lycopene and β -carotene-enriched oleoresin from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) peels by-product of a Tunisian industry[J]. *Food and bioproducts processing*, 2017. 102: p. 340-349.
- [28] 符梦凡, 赵一帆, 阎卫东, 等. 柱前衍生化 HPLC 法分析枸杞多糖中单糖组成[J]. *食品科学*. 2018, 4 (1): 186-191.
- [29] 王如涛, 吴绵斌, 林建平, 等. 植物多糖分离提取技术的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(7): 118-123.
- [30] 彭川丛, 孔静, 游丽君, 等. 超声波辅助热水浸提香菇多糖响应面优化工艺及其抗氧化活性的研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(4):452-456.
- [31] Guo H , Zhang W , Jiang Y , et al. Physicochemical, Structural, and Biological Properties of Polysaccharides from Dandelion[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 121-126.
- [32] 韩秋菊, 马宏飞. 两种提取枸杞多糖方法的比较研究[J]. *化学与生物工程*, 2012, 29(5): 64-66.
- [33] Yujing Q , Qingxia Y , Yuexing Z , et al. Enzyme-Assisted Extraction Optimization, Characterization and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Sea Cucumber *Phyllophorus proteus*[J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 590-597.
- [34] Gardossi L , Poulsen P B , Ballesteros A , et al. Guidelines for reporting of biocatalytic reactions[J]. *trends in biotechnology*, 2010, 28(4): 171-180.
- [35] 程贤, 毕良武, 赵振东, 等. 酶辅助提取技术在天然产物提取中的应用研究进展[J]. *生物质化学工程*, 2016, 050(003):71-76.
- [36] Chamorro, S., et al., Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment[J]. *Food Chemistry*. 2012, 133(2): 308-314.
- [37] Strati, I.F., E. Gogou, and V. Oreopoulou, Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste[J]. *Food & Bioproducts Processing*. 2015, 94(4): 668-674.
- [38] Fu, X.-Q., et al., Simultaneous extraction and enrichment of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower by an enzyme-assisted ethanol/ammonium sulfate system[J]. *Food & Function*, 2019, 10(1): 266-276.
- [39] Marcello Salvatore Lenucci., et al., Enzyme-aided extraction of lycopene from high-pigment tomato cultivars by supercritical carbon dioxide[J]. *Food Chemistry*. 2015. 170(3): 193-202.
- [40] Qian, Zhi-Gang. Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Cucurbita moschata* and their antibacterial activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101(3): 432-434.

- [41] 陈曦, 张黎, 罗建红, 等. 复合酶提取洋葱多糖的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019(4): 123-126.
- [42] Parada, María, Rodríguez-Blanco, Arturo, Fernández de Ana Magán, Francisco, et al. Sequential extraction of *Herichium erinaceus* using green solvents[J]. *Lwt Food Science & Technology*, 2015, 64(1): 397-404.
- [43] Yi T, Qiong W U, Lei-Lei H E, et al. Study on extraction of buddleia yellow from *Buddleja officinalis Maxim* with ultrasound-assisted synergism ethanol-dipotassium phosphate two-phase[J]. *science & technology of food industry*, 2012, 33(20): 273-275.
- [44] Ling-Guo Z, Lin X, Yi-Wei Z, et al. Study on extraction of ginger oleoresins by aqueous two-phase system[J]. *China condiment*, 2011, 53(4): 231-237.
- [45] Huang, Y., et al., Biphasic extraction of different polysaccharides from *Radix Sophorae Tonkinensis* by microwave-assisted aqueous two-phase extraction: Process optimization, structural characterization and mechanism exploration[J]. *Separation & Purification Technology*. 2018, 207(2): 187-198.
- [46] Tatjana, Antov M. Ultrasound assisted extraction in aqueous two-phase system for the integrated extraction and separation of antioxidants from wheat chaff[J]. *Separation and Purification Technology*, 2017, 182(3): 52-58.
- [47] Fan Y, Lu Y, Yu B, et al. Extraction and purification of capsaicin from capsicum oleoresin using an aqueous two-phase system combined with chromatography[J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2017, 1063(5): 11-17.
- [48] Lin Liu, Yue-sheng Dong, Zhi-long Xiu. Three-liquid-phase extraction of diosgenin and steroidal saponins from fermentation of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(5): 752-756.
- [49] 付晓茜. 酶辅助盐析萃取万寿菊花中的叶黄素和酚类物质[D]. 2019, 石河子大学.
- [50] Dang, Y.Y., H. Zhang, and Z.L. Xiu, Three-liquid-phase Extraction and Separation of Capsanthin and Capsaicin from *Capsicum annum L*[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2014, 32(1): 109-114.
- [51] 郎德龙, 超声波提取桔梗多糖工艺研究. *黑龙江工业学院学报(综合版)*, 2019. 19(11): 63-66.
- [52] Kumcuoglu, S., T. Yilmaz, and S. Tavman, Ultrasound assisted extraction of lycopene from tomato processing wastes[J]. *J Food Sci Technol*, 2014. 51(12): 4102-4107.
- [53] 曾笑, 王剑云, 曾磊. 食用番茄红素的乙醇提取法[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(01): 193-196.
- [54] Lenucci, M.S., et al., Enzyme-aided extraction of lycopene from high-pigment tomato cultivars by supercritical carbon dioxide[J]. *Food Chemistry*, 2015, 170(11): 193-202.
- [55] Tirgarian, B., J. Farmani, and J.M. Milani, Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein hydrolysate from sesame seed[J]. *Journal Of Food Measurement And Characterization*, 2019, 13(3): 2118-2129.
- [56] Ramakrishnan V, Goveas L C, Suralikerimath N, et al. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization[J]. *Biocatalysis & Agricultural Biotechnology*, 2016, 6(4): 19-27.
- [57] Chen B, Han J, Wang Y, et al. Separation, enrichment and determination of ciprofloxacin using thermoseparating polymer aqueous two-phase system combined with high performance liquid chromatography in milk, egg, and shrimp samples[J]. *Food Chemistry*, 2014, 148(3): 105-111.

- [58] Ranveer, R.C., S.N. Patil, and A.K. Sahoo, Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2013, 91(4): 370-375.
- [59] Huang, Y., et al., Biphasic extraction of different polysaccharides from *Radix Sophorae Tonkinensis* by microwave-assisted aqueous two-phase extraction: process optimization, structural characterization and mechanism exploration[J]. *Separation & Purification Technology*, 2018, 207(1): 187-198.
- [60] 马娜, 孙伟鹏, 等. 万寿菊花酚类物质及叶黄素的微波辅助盐析萃取[J]. *精细化工*, 2017, 34(10): 1139-1147.
- [61] Xie, X., et al., Microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of four flavonoids in *Crotalaria sessiliflora* L[J]. *Industrial Crops & Products*, 2017, 95(3): 632-642.
- [62] 孙伟鹏, 马娜, 党艳艳. 沙棘果渣中多种有效成分的提取及其抗氧化性能研究[J]. *食品工业*, 2018, 34(6): 51-55.
- [63] Xiao-Qian F , Na M , Wei-Peng S , et al. Microwave and enzyme co-assisted aqueous two-phase extraction of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower[J]. *Industrial Crops & Products*, 2018, 123(34): 296-302.
- [64] Zuorro, A., M. Fidaleo, and R. Lavecchia, Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 49(6): 567-573.
- [65] Munde, P.J., et al. Optimization of pectinase-assisted and tri-solvent-mediated extraction and recovery of lycopene from waste tomato peels[J]. *Biotech*, 2017, 7(3): p. 206-212.
- [66] 李广志, 马永强, 王鑫, 等. 番茄果汁酶解处理对果汁中番茄红素浓度的影响[J]. *中国食品添加剂*, 2018, 176(10): 53-60.
- [67] Choudhari S M , Ananthanarayan L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues[J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(1): 77-81.
- [68] 巴宁宁. 提取方法不同对番茄红素油树脂抗氧化活性的影响[J]. *粮食与油脂*, 2019, 11(8): 83-86.
- [69] Machmudah S , Zakaria, Winardi S , et al. Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide[J]. *Journal of food engineering*, 2012, 108(2): 290-296.
- [70] Sandhir, R., A. Mehrotra, and S.S. Kamboj, Lycopene prevents 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial oxidative stress and dysfunctions in nervous system[J]. *Neurochemistry international*, 2010, 57(5): 579-587.
- [71] Hu W , Shao Q , Xi X , et al. A general gas-assisted three-liquid-phase extraction method for separation and concentration of puerarin, 3'-methoxydaidzin, puerarinxyloside, daidzin and daidzein from puerariae extract[J]. *Biomedical Chromatography*, 2019, 33(1): 17-22.
- [72] Hua, et al., Three-liquid-phase Extraction and Separation of Capsanthin and Capsaicin from *Capsicum annum* L[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2014, 32(1): 109-114.
- [73] Chen, D.L., et al., Three-liquid-phase salting-out extraction of effective components from waste liquor of processing sea cucumber[J]. *Food And Bioproducts Processing*, 2015, 96(3): 99-105.
- [74] Liu, L. et al., Microwave-Assisted Three-Liquid-Phase Extraction of Diosgenin and Steroidal Saponins from Fermentation Broth of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright[J]. *Solvent Extraction Research And Development-Japan*, 2016, 23(2): p. 101-114.
- [75] Shamim R , Somayeh T D . Lycopene extraction from tomato processing waste using ultrasound and cell-wall degrading enzymes[J]. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 2018, 101(3): 1-10.

- [76] Mirheli M , Taghian Dinani S . Extraction of β -carotene pigment from carrot processing waste using ultrasonic-shaking incubation method[J]. Journal of Food Measurement & Characterization, 2018, 12(2): 1818-1828.
- [77] Ranveer, R.C., S.N. Patil, and A.K. Sahoo, Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste[J]. Food & Bioproducts Processing, 2013, 91(4): 370-375.
- [78] Nam, V.P., Improvement of lycopene extraction from tomatoes by enzyme-assisted treatment[J]. Vietnam Journal of Science and Technology, 2016, 54(4): 275-281.
- [79] Ribeiro D S , Henrique R M B , Oliveira R S , et al. Enzymes in juice processing: a review[J]. International journal of food ence & technology, 2010, 45(4): 635-641.
- [80] Munde P J, Muley A B, Ladole M R, et al. Optimization of pectinase-assisted and tri-solvent-mediated extraction and recovery of lycopene from waste tomato peels[J]. 3 Biotech, 2017, 7(3): 121-127.
- [81] Ranveer, R.C., S.N. Patil, and A.K. Sahoo, Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste[J]. Food & Bioproducts Processing, 2013. 91(4): 370-375.
- [82] Shi J , Maguer M L , Bryan M , et al. Kinetics of lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation[J]. Journal of food process engineering, 2003, 25(6): 485-498.
- [83] S, Xianquan, et al. Stability of lycopene during food processing and storage[J]. Journal of Medicinal Food, 2005, 4(8): 413-422.
- [84] López-Cervantes, J., et al., Effect of solvents and methods of stirring in extraction of lycopene, oleoresin and fatty acids from over-ripe tomato[J]. International Journal of Food Sciences & Nutrition. 2014, 65(2): 187-193.
- [85] 陈孝云, 朱俊向, 吴昊,等. 不同提取方式番茄红素的抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2015, 11(04): 109-113.
- [86] 刘世军, 李瑞, 杨旭, 等. 大枣多糖的纯化工工艺研究[J]. 西部中医药, 2017, 030(003): 36-38.
- [87] 梁智慧, 王祯丽. 番茄红素的研究生产现状及发展趋势[J]. 新疆石油教育学院学报, 2003, 7(2): 28-30.
- [88] 宫江宁, 云成悦, 杨义菊. AB-8 大孔吸附树脂纯化龙胆多糖的工艺优化[J]. 贵州师范大学学报:自然科学版, 2018, 02(2): 98-102.
- [89] 黄素华, 邱丰艳, 戴婉妹, 等. 枇杷叶多糖纯化工工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2017(5): 205-209.
- [90] Ruoying Ma, Youmei Li, Xuetian Rao, et al. Antioxidant activities and phenolic compounds analysis of extractions of carica papaya seed residue[c]// International Conference on Biotechnology & Medical Science. 2016, 21(2): 596-604.
- [91] 杜宝香, 相美容, 付业佩, 等. 北沙参多糖的分离、纯化及其体外免疫活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018. 24(11): 27-31.
- [92] 王旭苹, 杨磊, 杨小兰, 等. 大孔树脂纯化酒花多酚及其组成分析[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 15-20.
- [93] 张盟雨, 王静, 张应中, 等. 水提醇沉法提取油茶饼粕多糖的响应面优化[J]. 林业与环境科学, 2019(5): 1-6.
- [94] 邹林武, 赵谋明, 游丽君. 香菇多糖提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19):177-182.
- [95] 华霄, 徐沙楠, 陈颖, 等. 番茄皮渣蛋白质提取及其性质表征[J]. 食品与发酵工业, 043(3): 259-266.

致 谢

时光飞逝，转眼间三年紧张而又充实的研究生生活即将画上句号。在这三年的学习期间，我得到了很多老师、同学和朋友的关怀和帮助。在学位论文即将完成之际，我要向所有期间给予我支持、帮助和鼓励的人表示我最诚挚的谢意。

首先感谢导师党艳艳老师三年来对我学习上认真严格的教诲，科研上热心耐心的指导，生活上无微不至的关怀。

其次，本论文的完成也离不开其环境课题组鲁建江教授、曹鹏副教授、邓辉副教授、刘子龙老师、闫豫君老师、李珊蔓老师、童延斌老师、李敏老师、李维军老师和同学在科研过程中给我的鼓励和帮助。

最后感谢父母在我求学生涯中给予我无微不至的关怀和照顾，一如既往地支持我、鼓励我。

作者简介

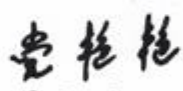
邓龙，男，出生于 1993 年 1 月，籍贯甘肃。2017 年 6 月毕业于塔里木大学应用化学专业，获理学学士学位。2017 年 9 月起在石河子大学化学化工学院药学专业学习。

硕士期间发表的学术论文

[1] 邓龙，付晓茜，贾梦真，党艳艳. 番茄皮渣中番茄红素与多糖的提取研究.食品工业（核刊：接受）

[2] Xiao-Qian Fu, Gen-Lin Zhang, **Long Deng**, Yan-Yan Dang*. Simultaneous extraction of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower by enzyme-assisted ethanol/ammonium sulfate system. *Food &Function*, 2019, 10, 266-276.

石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表

研究生姓名	邓龙	学制	3年
专业	药学	研究方向	天然产物资源化利用
<p>学术评语:</p> <p>本论文采用盐析萃取技术和酶辅助提取技术,以番茄皮渣为原料,进行了番茄红素和多糖的提取工艺及两类成分的初步分离研究,并初步的对番茄多糖的结构进行判断实验。</p> <p>论文选题具有实际应用价值,可实现番茄皮渣的废物利用。论文撰写层次分明,技术路线合理,达到了硕士学位论文水平要求。答辩报告主题明确,表述比较清楚,回答问题准确。该生具备相应的专业技术知识及科研的独立工作能力。</p> <p>综合以上,本论文达到硕士研究生学位论文水平,同意该生进行硕士研究生论文答辩和硕士学位申请。</p>			
<p>指导教师签字: </p> <p>2020年6月7日</p>			