

响应面优化提取美藤果油及其对高强度运动大鼠腓肠肌功能恢复和ATP酶的影响

齐婷¹, 房磊²

(1.吉林化工学院, 吉林 吉林 132022; 2.吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:采用响应面优化超临界CO₂萃取美藤果油工艺,并研究其对高强度运动下大鼠腓肠肌功能恢复和ATP酶的影响。结果表明:萃取美藤果油的最优工艺条件为萃取压力21 MPa、萃取温度55℃、萃取时间109 min,此条件下美藤果油的得率为50.15%。大鼠实验表明,灌胃美藤果油后,由于其具有较强的抗氧化能力,可以提高过氧化物酶(peroxidase, POD)活性和琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)水平,减少乳酸的产生,提高三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)酶合成能力,清除机体内产生的自由基,避免脂质过氧化,缓解运动性疲劳,进而使得大鼠腓肠肌功能恢复。

关键词:美藤果油;超临界萃取;高强度运动;腓肠肌;ATP酶

Response Surface Methodology for Optimization of Rattan Oil Extraction and Effects of the Oil on the Functional Recovery of the Gastrocnemius and ATPase in Rats After High Intensity Exercise

QI Ting¹, FANG Lei²

(1. Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, Jilin, China; 2. Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132101, Jilin, China)

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the supercritical CO₂ extraction process of Rattan oil, and the effects of the oil on recovery of gastrocnemius muscle function and ATPase after high-intensity exercise were studied. The optimum extraction conditions were determined as extraction pressure of 21 MPa, extraction temperature of 55℃ and extraction time of 109 min. Under these conditions, the yield of Rattan oil was 50.15%. The results showed that after intragastric administration of the oil, the activity of peroxidase and the level of succinate dehydrogenase increased, the production of lactic acid reduced, and the activity of adenosine triphosphate (ATP) increased. This was facilitated by strong antioxidant capacity and ATP synthesis ability, elimination of free radicals produced in the body, avoidance of lipid peroxidation, alleviation of exercise-induced fatigue, and recovery of gastrocnemius function.

Key words: Rattan oil; supercritical fluid extraction; high intensity exercise; gastrocnemius muscle; ATPase

引文格式:

齐婷,房磊. 响应面优化提取美藤果油及其对高强度运动大鼠腓肠肌功能恢复和ATP酶的影响[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 53-58.

QI Ting, FANG Lei. Response Surface Methodology for Optimization of Rattan Oil Extraction and Effects of the Oil on the Functional Recovery of the Gastrocnemius and ATPase in Rats After High Intensity Exercise[J]. Food Research and Development, 2021, 42(19): 53-58.

美藤果(*Plukenetia volubilis* Linneo), 别名印加果、印奇果, 是一种大戟科木本植物, 原生长在南美

洲, 其种植周期短、营养价值高, 是一种高油脂、高蛋白的新型木本油料作物^[1-2]。2006年, 美藤果由中国科

基金项目: 吉林省教育厅科学技术研究规划项目(JJKH20190977KJ)

作者简介: 齐婷(1985—), 女(汉), 讲师, 硕士, 主要从事运动营养保健。

学院西双版纳热带植物园引种成功,2013年美藤果油获批为新资源食品。美藤果的主要成分有油脂、蛋白质、糖类、多酚类、维生素E以及Ca、P、K等矿物质元素^[3-4]。

美藤果油的脂肪酸组成丰富,主要以不饱和脂肪酸为主,包括亚麻酸、亚油酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸等,且均为人体所需要的不饱和脂肪酸,其中亚麻酸含量高于40%,明显高于除亚麻籽油之外的植物油^[5]。美藤果油中的活性成分还包括多酚、生育酚、甾醇、胡萝卜素等,其中生育酚含量约为1.6 g/kg^[6]、多酚含量约为62 mg/kg^[7]。研究表明,美藤果油具有降低血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、降低收缩血压和舒张血压、提高高密度脂蛋白水平的作用。其含有的多不饱和脂肪酸、维生素、多酚类物质具有较强的抗氧化作用,并且抗氧化效果优于橄榄油、茶油、亚麻籽油和紫苏油^[8]。同时美藤果油中的亚油酸和亚麻酸还具有调节免疫机能的作用^[9]。本文采用响应面优化萃取美藤果油,利用大鼠高强度运动,研究其对大鼠腓肠肌功能恢复和ATP酶的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

美藤果:昆明彩云之南生物科技有限公司;正己烷(分析纯):天津科密欧化学试剂有限公司;过氧化物酶(peroxidase, POD)试剂盒、乳酸(lactic acid, LA)试剂盒、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)试剂盒:南京建成生物科技公司;三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)试剂盒:上海索宝生物科技有限公司。

SPF级雄性SD大鼠50只,体重(120±5)g,广州市白云区龙归兴科动物养殖场,许可证号SCXK(粤)2017-0042。

1.2 仪器与设备

ZW-CIJ-5型超临界萃取仪:泽望自动化设备(上海)有限公司;RV-211M型旋转蒸发仪:上海一恒科学仪器有限公司;YJ-GS-300型电子天平:上海亚津电子科技有限公司;CK-CWYCJ型粉碎机:永康市圣象电器有限公司;TG-16W型高速离心机:济南欧莱博科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 美藤果油的制备

首先将美藤果去皮,挑选饱满的美藤果仁,并将其粉碎过60目筛,放在40℃真空干燥箱干燥4h,称取适量的美藤果仁粉,将美藤果仁粉装入萃取釜中,

在不同萃取压力、萃取温度、萃取时间等条件下进行超临界萃取。萃取结束,收集美藤果油^[10-11]。

$$Y/\% = m/M \times 100$$

式中:Y为美藤果油得率,%;m为美藤果油质量,g;M为美藤果仁粉末质量,g。

1.3.2 单因素试验

在萃取温度55℃、萃取时间100min条件下,设定不同萃取压力为10、15、20、25、30MPa,考察萃取压力对美藤果油得率的影响;在萃取压力为20MPa、萃取时间100min条件下,设定不同萃取温度为40、45、50、55、60℃,考察萃取温度对美藤果油得率的影响;在萃取压力20MPa、萃取温度55℃条件下,设定不同萃取时间为60、80、100、120、140min,考察萃取时间对美藤果油得率的影响。

1.3.3 响应面法优化美藤果油提取工艺

在单因素试验的基础上,以美藤果油得率(Y)为指标,选取对美藤果油得率影响较大的3个因素进行试验,以萃取压力(X_1)、萃取温度(X_2)和萃取时间(X_3)为考察因素,进行三因素三水平响应面试验设计,试验因素与水平见表1。

表1 Box-Behnken 试验设计因素水平
Table 1 Box-Behnken design factor level

水平	X_1 萃取压力/MPa	X_2 萃取温度/℃	X_3 萃取时间/min
-1	15	50	80
0	20	55	100
1	25	60	120

1.3.4 分组及运动方案

选取SPF级雄性SD大鼠50只,体重(120±5)g,自由饮食,饲养环境(23±2)℃。分成5组,每个小组10只大鼠,分成对照组、运动组 and 低、中、高剂量美藤果油组。低、中、高剂量美藤果油组每天灌胃10、15、20 mg/g美藤果油,运动组灌胃15 mg/g生理盐水。其中对照组不进行任何运动,其它4组进行游泳训练,实验时间6周。将大鼠放入游泳池内,大鼠的尾部负重其体重8%的铅丝,从大鼠进入到游泳池开始,到大鼠力竭的这段周期,沉入水中8s不能浮到水面停止实验。大鼠在6周实验结束之后,所有大鼠进行腹腔麻醉(10%的水合氯醛),处死后取腓肠肌,放入液氮以备指标测定,并对相关指标POD、SDH、ATP酶、乳酸等指标根据酶学试剂盒的说明书检测分析^[12]。

1.4 统计学分析

使用SPSS 20.0软件进行数据分析,数据均使用平均值±标准差来表示,采取组间进行对比, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 萃取压力对美藤果油得率的影响

萃取压力对美藤果油得率的影响见图1。

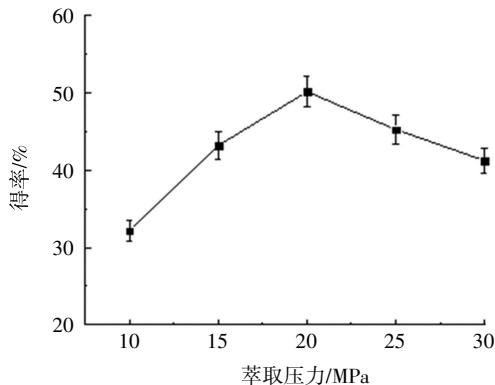


图1 萃取压力对美藤果油得率的影响

Fig.1 Effect of extraction pressure on the yield of Rattan oil

由图1可知,随着萃取压力的逐渐增加,美藤果油得率逐渐提高,当萃取压力达到20 MPa时,美藤果油得率达到最高,继续增加萃取压力,美藤果油得率呈下降趋势。这是因为过高的萃取压力可以使流体的扩散性和对流性有所下降,传质速率降低,使得美藤果油得率降低,并且增加萃取压力会使实际操作增加危险性。综上,选择萃取压力为20 MPa。

2.1.2 萃取温度对美藤果油得率的影响

萃取温度对美藤果油得率的影响见图2。

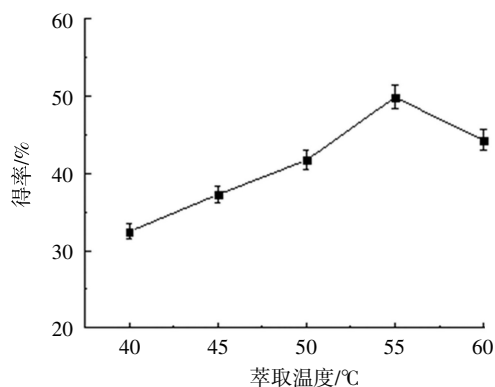


图2 萃取温度对美藤果油得率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on the yield of Rattan oil

由图2可知,随着萃取温度的逐渐增加,美藤果油得率逐渐提高,当萃取温度达到55 °C时,美藤果油得率达到最高;继续增加萃取温度,美藤果油得率呈下降趋势。这是因为温度升高可以增加油脂分子的扩散运动,使得美藤果油更容易萃取出来,得率提高。但是萃取温度过高,会发生氧化反应破坏美藤果油的结构。综上,选择萃取温度为55 °C。

2.1.3 萃取时间对美藤果油得率的影响

萃取时间对美藤果油得率的影响见图3。

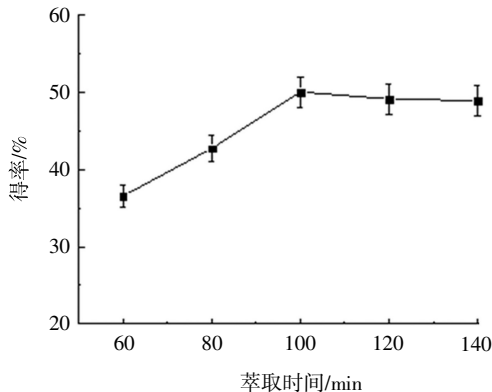


图3 萃取时间对美藤果油得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the yield of Rattan oil

由图3可知,随着萃取时间的延长,美藤果油得率逐渐提高,当萃取时间达到100 min时,美藤果油得率达到最高,继续延长萃取时间,美藤果油得率几乎不变,说明此时美藤果油已经几乎完全被萃取。综上,选择萃取时间为100 min。

2.2 响应面法试验结果与分析

在单因素试验的基础上,确定各因素最佳水平范围,以美藤果油得率(Y)为指标,设计Box-Behnken试验中心组合试验。响应面分析方案与结果见表2。

表2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

序号	X_1	X_2	X_3	Y 得率/%
1	0	0	0	49.96
2	0	1	-1	45.11
3	0	0	0	50.12
4	-1	-1	0	44.82
5	1	-1	0	45.71
6	0	0	0	50.06
7	-1	0	-1	45.41
8	1	0	1	48.55
9	1	0	-1	45.92
10	0	0	0	49.92
11	-1	0	1	47.36
12	0	0	0	50.15
13	1	1	0	46.11
14	0	1	1	47.83
15	0	-1	1	46.97
16	-1	1	0	45.81
17	0	-1	-1	44.78

采用Design-Expert 8.0软件对表2试验数据进行多元回归拟合,得到多元回归方程: $Y=50.04+0.36X_1+0.32X_2+1.19X_3-0.15X_1X_2+0.17X_1X_3+0.13X_2X_3-1.90X_1^2-2.53X_2^2-1.34X_3^2$ 。

该模型回归分析见表 3。

表 3 响应面回归模型 ANOVA 分析结果

Table 3 ANOVA analysis results of response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	68.42	9	7.60	586.05	< 0.000 1	**
X_1	1.04	1	1.04	80.48	< 0.000 1	**
X_2	0.83	1	0.83	64.14	< 0.000 1	**
X_3	11.26	1	11.26	867.82	< 0.000 1	**
X_1X_2	0.087	1	0.087	6.71	0.035 9	*
X_1X_3	0.12	1	0.12	8.91	0.020 4	*
X_2X_3	0.070	1	0.070	5.41	0.052 9	
X_1^2	15.14	1	15.14	1 166.81	< 0.000 1	**
X_2^2	27.03	1	27.03	2 083.37	< 0.000 1	**
X_3^2	7.52	1	7.52	579.35	< 0.000 1	**
残差	0.091	7	0.013			
失拟项	0.051	3	0.017	1.72	0.300 6	
纯误差	0.040	4	0.009 92			
总和	68.51	16				

注: * 表示有显著差异($P<0.05$); ** 表示有极显著差异($P<0.01$)。

模型 $P=0.000 1<0.01$ 极显著, 失拟项 $P=0.300 6>0.05$ 不显著, 证明失拟处理不显著, 实验误差较小。相关系数 $R^2=0.998 7$, 调整系数 $R_{Adj}^2=0.997 0$ 也表明上述模型拟合程度较好, 该模型可用于萃取美藤果油。对美藤果油得率影响顺序依次为萃取时间>萃取压力>萃取温度。并且萃取时间、萃取压力和萃取温度影响都达到了极显著水平 ($P<0.01$); X_1X_2 达到显著水平 ($P<0.05$), X_1X_3 达到显著水平 ($P<0.05$); 上述各因素的二次项均对得率影响极显著 ($P<0.01$)。萃取压力与萃取温度的响应面分析、萃取压力与萃取时间的响应面分析见图 4 和图 5。

从图 4 分析得出, 萃取压力与萃取温度对得率的影响较为明显。由于 3D 曲面较为陡峭, 同时两者之间交互作用较为明显, 等高线为椭圆形; 从图 5 分析得出, 萃取压力与萃取时间对得率的影响较为明显。由于 3D 曲面较为陡峭, 同时两者之间交互作用较为明显, 等高线为椭圆形。

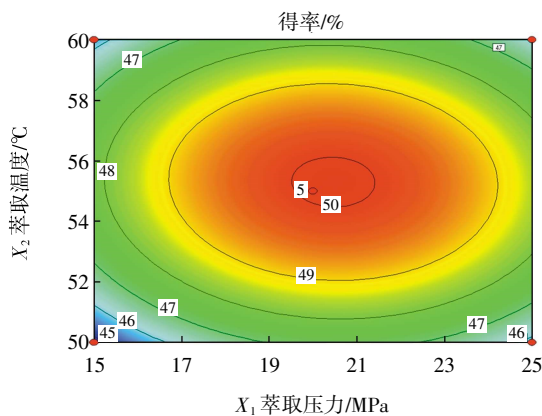


图 4 萃取压力与萃取温度的响应面分析

Fig.4 Response surface analysis of extraction pressure and temperature

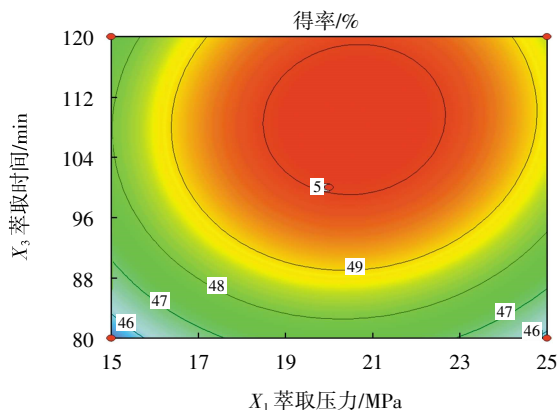


图 5 萃取压力与萃取时间的响应面分析

Fig.5 Response surface analysis of extraction pressure and extraction time

通过上述分析得美藤果油最佳萃取条件为萃取压力 20.56 MPa、萃取温度 55.36 °C、萃取时间 109.08 min

时, 此时美藤果油得率为 50.34%。考虑到实际操作情况, 修正成萃取压力为 21 MPa、萃取温度为 55 °C、萃

取时间为109 min,选取该组合做3次平行试验,得出美藤果油的平均得率为50.15%。与预测值相近,证明该工艺可以用来萃取美藤果油。

2.3 美藤果油对高强度大鼠腓肠肌功能恢复和 ATP 酶的影响

美藤果油对高强度大鼠腓肠肌功能恢复和 ATP 酶的影响见表4。

表4 美藤果油对高强度大鼠腓肠肌功能恢复和 ATP 酶的影响
Table 4 Effect of Rattan oil on functional recovery and ATPase of gastrocnemius muscle in high-intensity rats

组别	POD/(U/mg)	SDH/(U/mL)	乳酸/(mmol/g)	ATP 酶/(mg/mL)
对照组	1.51±0.31	10.76±1.29	1.91±0.14	1.62±0.22
运动组	0.62±0.15 [#]	6.35±0.92 [#]	3.45±0.74 [#]	0.79±0.13 [#]
低剂量组	0.81±0.19	8.52±1.11	2.94±0.62	1.08±0.15
中剂量组	1.24±0.20	9.25±1.15	2.43±0.47	1.33±0.17
高剂量组	1.40±0.25 [*]	10.46±1.25 [*]	1.88±0.32 [*]	1.51±0.19 [*]

注:各组与对照组相比,[#]表示有显著差异($P<0.05$);与运动组相比,^{*}表示有显著差异($P<0.05$)。

从表4可知,运动组与对照组相比 POD 活性显著降低($P<0.05$),低、中、高剂量美藤果油组 POD 活性呈上升趋势,高剂量组的 POD 活性与运动组相比显著提高($P<0.05$);运动组与对照组相比 SDH 水平显著降低($P<0.05$),低、中、高剂量美藤果油组 SDH 水平呈上升趋势,高剂量组的 SDH 水平与运动组相比显著提高($P<0.05$);运动组与对照组相比乳酸含量显著提高($P<0.05$),低、中、高剂量美藤果油组乳酸含量呈下降趋势,高剂量组的乳酸含量与运动组相比显著降低($P<0.05$);运动组与对照组相比 ATP 酶水平显著降低($P<0.05$),低、中、高剂量美藤果油组 ATP 酶水平呈上升趋势,高剂量组的 ATP 酶水平与运动组相比显著提高($P<0.05$)。POD 是机体内抗氧化酶之一,担负着体内氧自由基的清除作用,使超氧离子维持在正常水平,实验结果显示高强度运动后,运动组大鼠腓肠肌 POD 活性明显降低,说明高强度运动后机体相对缺氧,腓肠肌内的细胞质中的钙离子浓度增加,机体耗氧量水平增加,产生大量自由基,机体抗氧化能力降低,进而影响健康^[13]。而 SDH 是糖在有氧化过程中的关键酶,是腓肠肌内线粒体的一种标志酶^[14]。乳酸是高强度运动中产生的产物,在缺氧条件下,糖酵解能量代谢产生大量乳酸,乳酸会导致腓肠肌的收缩能力下降,使糖酵解供能速率下降,减少了 ATP 酶合成,最终导致运动能力下降^[15]。大鼠灌胃美藤果油后,由于其具有较强的抗氧化能力,可以提高 POD 活性和 SDH 水平,减少乳酸的产生,提高 ATP 酶合成能力,清除机体内产生

的自由基,避免了脂质过氧化,缓解运动性疲劳,进而使得大鼠腓肠肌功能恢复。

3 结论

通过超临界 CO₂ 得美藤果油最佳萃取条件为萃取压力 20.56 MPa、萃取温度 55.36 ℃、萃取时间 109.08 min 时,美藤果油得率 50.34%。考虑到实际操作情况,修正成萃取压力为 21 MPa、萃取温度为 55 ℃、萃取时间为 109 min,选取该组合做 3 次平行试验,得出美藤果油的平均得率为 50.15%。与预测值相近,证明该工艺可以用来萃取美藤果油。大鼠实验表明,灌胃美藤果油后,由于其具有较强的抗氧化能力,可以提高 POD 活性和 SDH 水平,减少乳酸的产生,提高 ATP 酶合成能力,清除机体内产生的自由基,避免脂质过氧化,缓解运动性疲劳,进而使得大鼠腓肠肌功能恢复,为以后美藤果油的研究提供了宝贵经验。

参考文献:

- [1] 蔡志全,杨清,唐寿贤,等. 木本油料作物星油藤种子营养价值的评价[J]. 营养学报, 2011, 33(2): 193-195.
CAI Zhiquan, YANG Qing, TANG Shouxian, et al. Nutritional evaluation in seeds of a woody oil crop *Plukenetia volubilis* linneo[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2011, 33(2): 193-195.
- [2] 蔡志全. 特种木本油料作物星油藤的研究进展[J]. 中国油脂, 2011, 36(10): 1-6.
CAI Zhiquan. Advance in research on a special woody oilseed crop of *Plukenetia volubilis* L[J]. China Oils and Fats, 2011, 36(10): 1-6.
- [3] 张嘉怡,杜冰,谢蓝华,等. 绿色新资源食品——美藤果油[J]. 中国油脂, 2013, 38(7): 1-4.
ZHANG Jiayi, DU Bing, XIE Lanhua, et al. A new resource green food—*Sacha inchi* oil[J]. China Oils and Fats, 2013, 38(7): 1-4.
- [4] 薛莉,杨瑞楠,汪雪芳,等. 美藤果油的营养组成分析与评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2010-2015.
XUE Li, YANG Ruinan, WANG Xuefang, et al. Analysis and quality evaluation of nutritional components in *Sacha inchi* oil[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(9): 2010-2015.
- [5] CAI Z Q. Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of *Sacha inchi* (*Plukenetia volubilis*) plants[J]. Industrial Crops and Products, 2011, 34(1): 1235-1237.
- [6] FANALI C, DUGO L, CACCIOLA F, et al. Chemical characterization of *Sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(24): 13043-13049.
- [7] 韩本勇,周志梅,赵鹏,等. 美藤果油的组成、性质及功能特性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(3): 59-64.
HAN Benyong, ZHOU Zhimei, ZHAO Peng, et al. Review on the composition, characteristics and functional properties of *Sacha inchi* oil[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2019, 38(3): 59-64.
- [8] 吴俏瑾,张嘉怡,杜冰,等. 适宜提取方法提高美藤果油提取率

- 及油品质[J]. 农业工程学报, 2015, 31(21): 277-284.
- WU Qiaojin, ZHANG Jiayi, DU Bing, et al. Suitable extraction method improving extraction efficiency and oil quality of *Sacha inchi* oil[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(21): 277-284.
- [9] 李慧, 金红, 王晔, 等. 美藤果油增强免疫力的试验研究[J]. 现代食品, 2016(16): 98-100.
- LI Hui, JIN Hong, WANG Ye, et al. Experimental study on enhancing immunity of mido fruit oil[J]. Modern Food, 2016(16): 98-100.
- [10] 吴定, 黄卉卉, 孙嘉文, 等. 瓜蒌籽油超临界 CO₂ 萃取工艺条件优化研究[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(9): 61-65.
- WU Ding, HUANG Huihui, SUN Jiawen, et al. Optimization research of supercritical extraction technology of *Trichosanthes kirilowii* maxim seed oil[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(9): 61-65.
- [11] 李倩, 蒲彪. 超临界流体萃取技术在天然产物活性成分提取中的应用[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(3): 11-14, 27.
- LI Qian, PU Biao. Application of supercritical fluid extraction methods in the extraction and isolation of natural products[J]. Food and Fermentation Technology, 2011, 47(3): 11-14, 27.
- [12] 王金霞, 王羽, 张颖珺, 等. 黄酮对运动大鼠腓肠肌抗氧化能力的影响[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2013, 37(5): 504-508.
- WANG Jinxia, WANG Yu, ZHANG Yingjun, et al. Effects of flavonoids on antioxidation capacity of rats gastrocnemius[J]. Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition), 2013, 37(5): 504-508.
- [13] 曾明, 李守汉, 郭层城, 等. 松针提取液对小鼠骨骼肌自由基代谢和运动能力的影响[J]. 北京体育大学学报, 2006, 29(4): 484-485, 488.
- ZENG Ming, LI Shouhan, GUO Cengcheng, et al. Research on the effects of the extract of pine needles on free radicals' metabolism of the skeletal muscle of rats[J]. Journal of Beijing Sport University, 2006, 29(4): 484-485, 488.
- [14] 袁克星, 王海涛, 常丽新, 等. 月季花色素对运动小鼠抗氧化酶系统及乳酸含量的影响[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2011, 35(5): 515-518, 531.
- YUAN Kexing, WANG Haitao, CHANG Lixin, et al. Effects of rose anthocyanin on inoxidizability and lactic acid of mice[J]. Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition), 2011, 35(5): 515-518, 531.
- [15] 张敏, 陈立军, 周蔚. 大鼠骨骼肌细胞异柠檬酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶活性在不同训练负荷时的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2): 290-293.
- ZHANG Min, CHEN Lijun, ZHOU Wei. Effects of exercise training modes at different work intensities on activity of isocitrate dehydrogenase and succinic dehydrogenase in rat skeletal muscles[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(2): 290-293.

加工编辑:冯娜
收稿日期:2020-09-28