

响应面分析法优化超声提取茶多糖工艺的研究

张彬, 谢明勇*, 殷军艺, 聂少平, 张媛媛

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要: 为优化超声提取茶多糖工艺, 在单因素试验基础上, 选择料液比, 提取温度, 提取时间为自变量, 茶多糖提取率为响应值, 利用 Box-Behnken 中心组合试验和响应面分析法, 研究各自变量交互作用及其对茶多糖提取率的影响, 模拟得到二次多项式回归方程的预测模型, 并确定超声提取茶多糖工艺最佳条件为: 料液比为 1:28, 提取温度为 60℃, 提取时间为 70 min, 在此条件下, 茶多糖提取率达到 10.46%。

关键词: 超声波; 茶多糖; 响应面分析法

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Conditions of Tea Polysaccharides by Using Response Surface Methodology

ZHANG Bin, XIE Ming-yong*, YIN Jun-yi, NIE Shao-ping, ZHANG Yuan-yuan

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this study, optimum condition of ultrasonic-assisted extraction of tea polysaccharide(TPS) is optimized by response-surface test. On the basis of single-factor test, the mathematical regression model is established about the dependent variable (extraction yield of tea polysaccharide) and independent variables (ratio of material to water, extraction temperature and extraction time) through Box-Behnken center composite design and response surface methodology. The optimum extraction conditions as follows: material to water ratio 1:28, extraction temperature 60 °C, time 70 min. Under these conditions, the yield of tea polysaccharide is 10.46%.

Key words: ultrasonic wave; tea polysaccharide(TPS); response surface methodology

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-6630(2008)09-0234-05

茶叶起源于中国, 是在中国古代文献中最早被提及的天然药物之一。我国茶叶资源丰富, 饮茶历史悠久, 但是大量的粗老茶叶及制茶副产品未得到有效利用。茶多糖(tea polysaccharide)是茶叶中继茶多酚之后发现的又一重要的生物活性物质。在中国民间早有用粗老茶叶治疗糖尿病的习俗。茶叶的保健功能与其所含的功能成分密切相关, 茶多酚、茶色素、咖啡碱等生物活性成分已研究较多, 而茶多糖的研究则相对较少^[1-2]。20 世纪 80 年代起, 随着国际上掀起的多糖生物学和生物技术研究热潮, 国内外学者对茶叶所含的多糖类复合物进行了大量研究。发现茶多糖具有增加机体免疫能力、降血糖、降血脂、减少动脉粥样硬化、抗凝血、抗氧化、抗辐射等作用, 具有很好的研究价值和经济价值^[3-5]。

植物多糖的传统提取方法有热水浸提、稀酸浸提、稀碱浸提等, 近年来在提取工艺方面引入了一些新方法如酶法提取、微波提取、超声提取^[6]。超声提取作为一种先进的提取方法, 具有提取时间短、能耗低、效率高等特点^[7]。目前采用响应面设计优化茶多糖提取工艺的报道较少。本研究主要在传统水提法基础上, 施加超声波处理, 利用超声波的空化作用、热效应、机械作用加速细胞壁的破碎, 促进胞内多糖的溶出, 缩短提取时间^[8], 本实验以茶多糖提取率为评价指标, 在原料颗粒度、提取时间、提取温度、料液比等单因素试验基础上, 利用响应面分析法优化超声波提取茶多糖的工艺条件, 希望为开发利用茶多糖资源及工业化生产提供理论依据。

收稿日期: 2008-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(20462005); 国家农业产业化转化基金项目;

教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0540)

作者简介: 张彬(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生。E-mail: zhangbin_2039@163.com

* 通讯作者: 谢明勇(1957-), 男, 教授, 研究方向为食品化学、食品营养与安全。E-mail: myxie@ncu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

分宜绿茶 江西分宜茶厂; 蒸馏水、无水乙醇、浓硫酸、蒽酮、葡萄糖均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2000 紫外分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司; FA1104 电子天平 上海精天电子仪器厂; HH-4 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; 旋转蒸发器 上海荣生有限公司; DGG-9140B 型电热恒温鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司; KQ2200E 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; SHZ-III 型循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂; ALPHA 1-2 冷冻干燥机 德国 Martin Christ 公司。

1.3 方法

1.3.1 茶多糖提取工艺流程

原料处理→干燥称重→超声提取→过滤→离心→上清液→蒸发浓缩至原体积的 1/4 →醇析→冷冻离心→粗提物→洗涤干燥→多糖粗品

1.3.2 茶多糖提取率计算

茶多糖采用蒽酮-硫酸法对其进行含量测定^[9], 然后按下式计算茶多糖提取率^[10]:

$$\text{茶多糖含量}(\%) = \frac{C \times D \times f}{W} \times 100$$

式中, C 为供试液中葡萄糖浓度(mg/ml); D 为多糖的稀释因素(ml); f 为换算因子, W 为供试茶叶的重量(mg)。

1.3.3 实验设计

根据响应面分析软件提供的模型, 设料液比(X₁)、温度(X₂)、时间(X₃)三因素为自变量, 茶多糖的提取率为响应值, 设计三因素三水平的试验, 并根据单因素试验结果选定三因素的零水平和波动区。试验因素与水平的取值见表 1。

表 1 响应面因素水平编码表
Table 1 Factors and levers of response surface test

因素	代码	编码水平		
		-1	0	1
料液比(g/ml)	X ₁	1:25	1:30	1:35
温度(°C)	X ₂	55	60	65
时间(min)	X ₃	65	70	75

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线的绘制

准确称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖标准品 0.2003 g, 置于 200 ml 容量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 配

成 1.0mg/ml 的标准溶液, 然后分别移取 2.5、5、10、15、20ml 标准溶液, 置于 100ml 容量瓶中稀释至刻度, 摇匀, 配成系列葡萄糖标准溶液。

称取 0.33g 蒽酮, 加 100ml 浓硫酸, 置于棕色瓶中, 混合摇匀置于冰箱中(现配现用)。

分别准确移取 1ml 系列标准溶液于具塞试管中, 补 1ml 蒸馏水, 以蒸馏水作空白, 每管再加入 5ml 蒽酮-硫酸试液, 立即摇匀, 置于冰水浴中, 然后置于沸水浴中加热 7min 之后, 用自来水迅速冷至室温, 放置 10min 后, 于 620nm 处测定吸光度, 做标准曲线, 并计算其标准曲线回归方程, 见图 1。

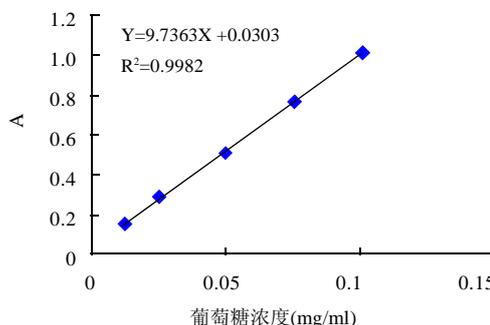


图 1 葡萄糖标准曲线
Fig.1 Standard curve of glucose

由图 1 可见, 标准曲线的回归方程为 Y=9.7363X + 0.0303, R²=0.9982, 葡萄糖标准品在 0~0.2mg/ml 范围内呈良好线性关系。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 原料颗粒度对茶多糖提取率的影响

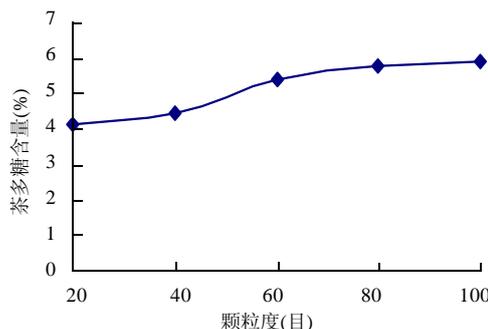


图 2 颗粒度对茶多糖提取率的影响
Fig.2 Effects of particale size of material on extraction rate of TPS

如图 2 所示, 茶叶原料颗粒度对茶多糖提取率有显著影响, 目数越高, 原料越细小, 浸提越充分, 提取率越高, 但原料过于细小, 会延长过滤时间, 从生产成本、周期和实验操作的复杂程度等方面考虑, 颗粒度选取 60 目较好。以下实验中均选用颗粒度为 60 目的茶原料。

2.2.2 料液比对茶多糖提取率的影响

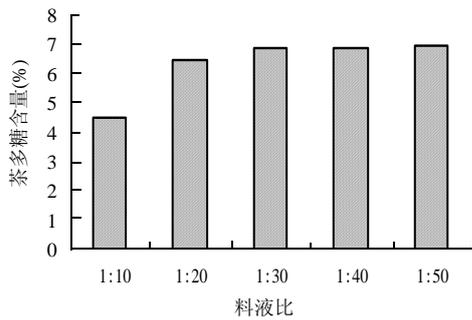


图3 料液比对茶多糖提取率的影响

Fig.3 Effects of ratio of material to water on extraction rate of TPS

从图3中看出,随着料液比的增大,提取率逐渐提高。但从1:30开始增长逐渐趋于平缓。从实际生产操作条件和成本考虑,加水量不宜过大,所以料液比1:30左右为宜,即选取1:30为自变量料液比(X_1)的零水平。

2.2.3 提取温度对茶多糖提取率的影响

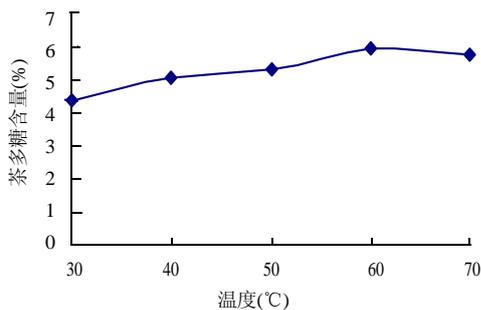


图4 提取温度对茶多糖提取率的影响

Fig.4 Effects of extraction temperature on extraction rate of TPS

从图4中可以看出,当提取温度低于60°C时,随温度升高茶多糖提取效率呈上升趋势,在60°C时,茶多糖提取率达到最大值。再升高温度,茶多糖提取率开始下降。这是由于在升温 and 机械波作用下,茶多糖结构遭到破坏,造成提取率下降。因此,最佳提取温度应在60°C附近,选取60°C为自变量温度(X_2)的零水平。

2.2.4 提取时间对茶多糖提取率的影响

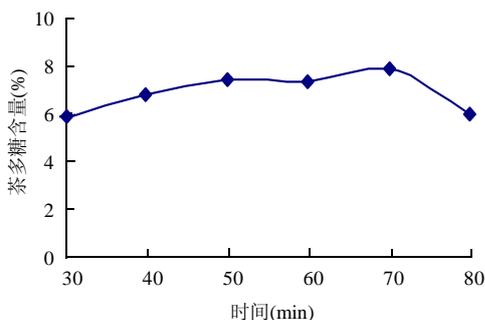


图5 提取时间对茶多糖提取率的影响

Fig.5 Effects of extraction time on of extraction rate of TPS

从图5可以看出,提取时间在前30~70min内,茶多糖提取率随时间延长而提高;在70min提取率达到最大值。这表明茶多糖的提取过程与时间密切相关,提取时间较短时,产物溶解不充分;时间过长,大分子多糖在超声波的强剪切作用下发生断裂,在后处理过程中出现损失现象,影响茶多糖提取率。所以,茶多糖的最佳提取时间应在70min左右,选取70min为自变量时间(X_3)的零水平。

2.3 响应面分析试验安排及试验结果

15个试验点可分为两类:其一析因点,自变量取值在 X_1 , X_2 , X_3 所构成的三维顶点,共有12个析因点;其二零点,为区域的中心点,零点试验重复3次,用以估计试验误差,每次试验得到的茶多糖含量见表2,试验安排及结果见表2。根据Box-Behnken的中心组合设计原理^[11],试验中对三因素各取三水平,设计了三因素三水平共15个试验点的响应面分析试验,并用国际上最常用的统计软件SAS v8.1对试验数据进行回归分析。

表2 响应面分析试验结果

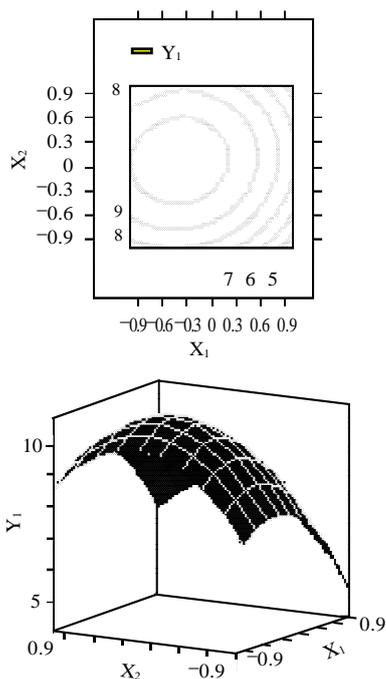
Table 2 Test design and results of response surface analysis

试验号	编码水平			茶多糖提取率(%)
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	7.690
2	-1	1	0	7.990
3	1	-1	0	3.930
4	1	1	0	5.185
5	0	-1	-1	5.645
6	0	-1	1	6.175
7	0	1	-1	6.810
8	0	1	1	7.015
9	-1	0	-1	9.320
10	1	0	-1	5.550
11	-1	0	1	6.940
12	1	0	1	5.765
13	0	0	0	10.350
14	0	0	0	10.320
15	0	0	0	10.345

2.3.1 数据分析

以茶多糖提取率为响应值,根据表2的实验结果,用SAS统计分析软件进行多元回归分析^[12],所得的主要分析结果见表3、4。从方差分析表中可以看出,方程一次项、二次项的影响都是显著的,交互项作用影响不显著,故交互项可以省略,也可以看出各具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。经回归拟合后,试验因子对响应值的影响可用回归方程表示为: $Y_1 = 10.33833 - 1.43875X_1 + 0.445X_2 - 0.17875X_3 - 1.828542X_1^2 + 0.23875X_1X_2 + 0.64875X_1X_3 - 2.311042X_2^2 - 0.08125X_2X_3 - 1.616042X_3^2$

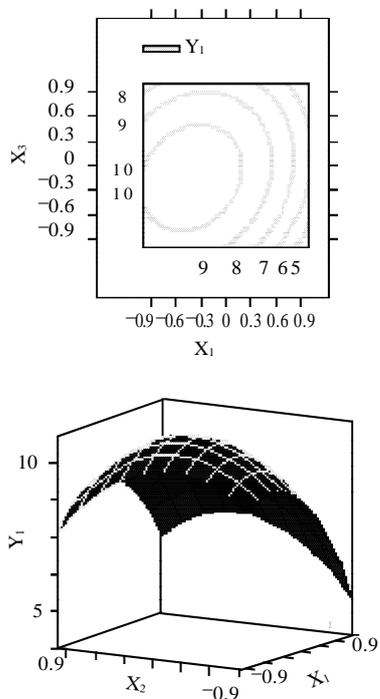
根据上述回归方程作出响应面分析图及等值线图,见图6~8, Y_1 为茶多糖含量(%)。



固定水平: $X_3=0$

图6 响应面法(料液比、温度)立体分析图和相应等高线图

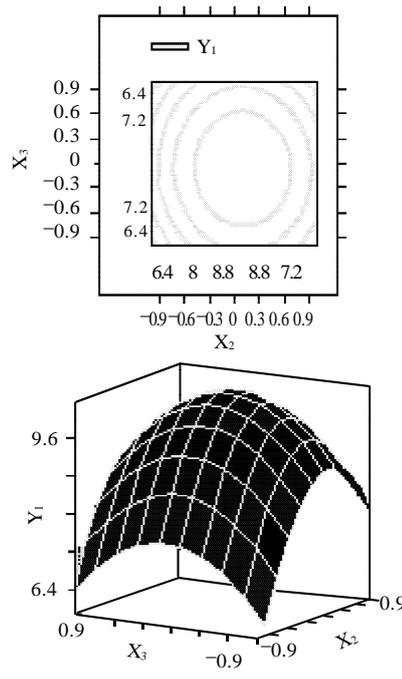
Fig.6 Response surface and contour plot for effects of the ratio of solvent to material and extraction temperature on extraction rate of TPS



固定水平: $X_2=0$

图7 响应面法(料液比、时间)立体分析图和相应等高线图

Fig.7 Response surface and contour plot for effects of ratio of solvent to material and extraction time on extraction rate of TPS



固定水平: $X_1=0$

图8 响应面法(温度、时间)立体分析图和相应等高线图

Fig.8 Response surface and contour plot for effects of extraction temperature and extraction time on extraction rate of TPS

从表3中可以看出,用上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,其因变量和自变量之间的线性关系是显著的,决定系数为97.07%,说明回归方程的拟合程度很好。

表3 回归方程偏回归系数的估计值

Table 3 Estimate value of partial regression coefficient of regress equation

参数	自由度	参数估计	大于 t 的概率
X_1	1	-1.43875	0.0024**
X_2	1	0.445	0.1009
X_3	1	-0.17875	0.4417
X_1^2	1	-1.826875	0.0053**
X_1X_2	1	0.23875	0.4656
X_1X_3	1	-2.309375	0.0022**
X_2^2	1	0.64875	0.0938
X_2X_3	1	-0.08125	0.7975
X_3^2	1	-1.614375	0.0082**
离回归偏差		0.592677	
决定系数		97.07%	

注: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ 。

表4 回归方程方差分析表

Table 4 Variance analysis of regression equation

回归项	自由度	平方和	F值	大于F的概率
一次项	3	0.3837	17.46	0.0092**
平方项	3	0.5466	24.87	0.0048**
交互项	3	0.0404	1.84	0.2804
总回归	9	0.9707	14.72	0.0099**

注: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

2.3.2 寻取最优值

为确定各因素的最佳取值,可以利用 SAS 软件进行岭脊分析^[13],通过岭脊分析后,得出回归模型存在最大值点, Y_1 的最大估计值为 10.66%, 稳定点 (X_1, X_2, X_3) 的代码值为 (-0.413647, 0.077435, -0.140424)。与之对应的实际值为料液比(X_1)= 1:27.931, 温度(X_2)= 60.387℃, 时间(X_3)= 69.297 min, 此时茶多糖含量最大估计值 $Y=10.66\%$ 。为实际操作方便,选取料液比(X_1)= 1:28, 温度(X_2)= 60℃, 时间(X_3)= 70 min, 在此优化条件下共进行 3 次平行验证实验,结果见表 5。实验结果茶多糖含量为 10.46% 与预测值 10.66% 是非常接近的。

表 5 茶多糖验证实验结果
Table 5 Verification results of TPS extraction

试验号	1	2	3	平均提取率(%)
提取率(%)	10.31	10.47	10.59	10.46

3 结论

本研究将响应曲面法运用到优化茶多糖的提取工艺上。经实验优化后的超声提取茶多糖的最佳工艺条件为:茶原料颗粒度为 60 目,料液比为 1:28,提取温度为 60℃,提取时间为 70min,在此条件下,茶多糖提取率达到 10.46%。

参考文献:

- [1] 高林瑞,周斌星.茶多糖的研究与开发[J].世界农业,2005,315(7):46-48.
- [2] NIE S P, XIE M Y, FU Z H, et al. Study on the purification and chemical compositions of tea glycoprotein[J].Carbohydrate Polymers, 2008, 71(4): 626-633.
- [3] RUSAK G, KOMES D, LIKIC S, et al. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used [J]. Food Chemistry 2008, 110: 852-858.
- [4] 傅博强,谢明勇,周鹏.茶叶多糖的提取纯化、组成及药理作用研究进展[J].南昌大学学报:理科版,2001,25(4):358-363.
- [5] 聂少平,谢明勇,罗珍.茶叶多糖的抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2005,17:549-552.
- [6] 陈浩,贺小敏.超声提取菜籽饼粕多糖的方法研究[J].食品科学,2005,26(9):359-361.
- [7] 赵茜,李秉滔,刘欣,等.超声强化甘草酸的提取研究[J].食品科技,2000(5):38.
- [8] 李金钟,马海乐,吴沿友.超声波提取山药多糖的研究[J].粮油食品科技,2005,13(5):14-16.
- [9] 傅博强,谢明勇,聂少平,等.茶叶中多糖含量的测定[J].食品科学,2001,22(11):69-73.
- [10] 谢建华,谢明勇,聂少平,等.青钱柳多糖提取工艺的研究[J].食品科学,2007,28(10):188-191.
- [11] BOX G P, BBHNKEN D W. Some vew three level design for the study of quantitative variables[J]. Technometrics, 1960 (2): 456-475.
- [12] THOMPOSN D R. Response surface experimentation [J]. J Food Proc Pres, 1982(6): 155.
- [13] PAN S C, BONANNO S, WAGMAN G H. Efficient utilization of fatty oils as energy ource in penicillin fermentation [J]. Appl Microbiol,1959 (7): 176-180.