

响应面法优化超高压辅助提取茶多酚的工艺研究

江东文^{1,2}, 黄佳佳³, 杨公明², 杜冰²

(1. 广东省生产许可证审查服务中心, 广东广州 510220)

(2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (3. 广东产品质量监督检验研究院, 广东顺德 528300)

摘要: 为优化茶多酚的超高压提取工艺, 在单因素试验基础上, 选择乙醇浓度 (X_1) 保压时间 (X_2) 及作用压力 (X_3) 为自变量, 茶多酚提取得率 (Y_1) 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酚提取得率的影响, 模拟得到二次多项式回归方程的预测模型, 并确定最佳提取工艺条件为乙醇浓度 60%、保压时间 1.5 min 和作用压力 300 MPa。在该条件下茶多酚提取得率的预测值为 31.07%, 验证值为 30.87%, 误差为 2.59%。预测模型的标准回归方程为 $Y_1=776.3561-1.3356X_1+123.093X_2+163.7406X_3-274.2023X_1X_1-145.2251X_2X_2$ 。

关键词: 超高压; 茶多酚; 提取; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2013)6-1316-1320

Optimization of Ultra High Pressure -assisted Extraction of Tea-polyphenols by Response Surface Methodology

JIANG Dong-wen^{1,2}, HUANG Jia-jia³, YANG Gong-ming², DU Bing²

(1. Guangdong Inspection Service Center of Production Licence, Guangzhou, 510220, China)

(2. South China Agricultural University, Guangzhou, 528231, China)

(3. Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Shunde, 528300, China)

Abstract: To obtain the optimum ultra high pressure-assisted extraction technology of tea-polyphenols from low value tea. On the basis of single-factor test, the mathematical regression model is established about the dependent variable(extraction yield of tea-polyphenols) and independent variables (alcohol concentration, time of maintain pressure and extraction pressure) through Box-Behnken center composite design and response surface methodology. The results indicated that the optimal extraction conditions were alcohol concentration of 60%, processing time of 1.5 min, extraction pressure of 300 MPa. Under these conditions, the predictive maximum yield of tea-polyphenols from low value tea was 31.07%, the validation value was 30.87%. The relative error between them was 2.59% .The standardized regression equation was $Y_1=776.3561-1.3356X_1+123.093X_2+163.7406X_3-274.2023X_1X_1-145.2251X_2X_2$.

Key words: ultra high pressure; tea-polyphenols; extraction; response surface methodology

超高压提取技术是一种全新的技术, 在超高压作用下, 可以观察到提取后药材细胞的细胞壁、细胞膜以及细胞内液泡等结构变化, 促使细胞内容和提取溶剂充分接触, 具有快速、高效的特点^[1-2]。且与传统的浸渍法^[3-6]、渗漉法、煎煮法、热回流提取法、索氏提取法等常规提取方法, 以及近年来研究和开发的超声提取法^[7]、微波提取法^[8]、超临界流体萃取法^[9]等方法相比, 超高压提取技术具有提取时间短、能耗低、大分子物质溶出少、有效成分提取率高以及可避免热

效应引起的有效成分结构改变、损失和生理活性降低等优点, 同时由于超高压提取是在密闭环境中进行, 没有溶剂挥发, 不会造成环境污染。本研究拟采用超高压技术对经复合水解酶预处理后低值茶叶进行茶多酚提取, 力求开辟茶多酚提取新途径, 并提高低值茶叶的附加值。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

单枞茶, 兴宁市南华现代农业有限公司; 复合植物水解酶, 活力: 1000 U/mL; 福林酚, 广州市齐云试剂公司; 无水乙醇磷酸氢二钠、磷酸二氢钾均为分析醇; 实验用水为蒸馏水。

1.2 主要仪器和设备

收稿日期: 2013-02-19

基金项目: 广东省教育部产学研项目 (2009B090300138、2011B090400071)

作者简介: 江东文 (1984-), 硕士研究生, 研究方向: 食品生产许可审查及食品标准

通讯作者: 杜冰, 博士后, 副教授, 主要从事食品加工新技术方面研究

超高压处理机, 中国兵器科学研究所和东南农业大学食品学院联合研制; 752N 型紫外线可见光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; HH-4 型数显恒温水浴锅, 金坛市富华仪器有限公司; PL203 电子分析天平, 梅特勒-托利多; SHZ-III型循环水真空抽滤机, 上海亚荣生化仪器厂; 玻璃仪器等。

1.3 提取方法

1.3.1 工艺流程

单枞茶→粉碎→过筛→酶解预处理→超高压提取→抽滤→滤液→茶多酚含量测定

酶解预处理条件: 酶解温度 60 °C, pH 值 4.8, 酶添加量 3.0 μL/g, 作用时间 120 min^[10]。

1.3.2 单因素分析

1.3.2.1 乙醇浓度对茶多酚提取效果的影响

称取适量的茶沫 5 份, 经酶解预处理后, 按料液比为 1:50, 溶剂分别是浓度 20%、40%、60%、80%、100% 的乙醇水溶液, 压力为 200 MPa, 保压时间为 3 min 的提取条件进行超高压处理, 分别测定各处理对茶多酚提取效果的影响。

1.3.2.2 保压时间对茶多酚提取效果的影响

称取适量的茶沫 5 份, 经酶解预处理后, 以 50% 的乙醇水溶液为提取溶剂, 控制料液比为 1:50, 在压力为 200 MPa, 保压时间依次为 1 min、2 min、3 min、4 min、5 min 的条件下进行超高压处理, 分别测定各处理对茶多酚提取效果的影响。

1.3.2.3 料液比对茶多酚提取效果的影响

称取适量的茶沫 5 份, 经酶解预处理后, 以 50% 的乙醇水溶液为提取溶剂, 控制料液比分别为 1:10、1:30、1:50、1:70、1:90, 在压力为 200 MPa, 保压时间为 3 min 的提取条件进行超高压处理, 分别测定各处理对茶多酚提取效果的影响。

1.3.2.4 压力对茶多酚提取效果的影响

称取适量的茶沫 5 份, 经酶解预处理后, 以 50% 的乙醇水溶液为提取溶剂, 控制料液比为 1:50, 保压时间为 3 min, 在压力依次为 100 MPa、200 MPa、300 MPa、400 MPa、500 MPa 的条件下进行超高压处理, 分别测定各处理对茶多酚提取效果的影响。

1.3.3 响应面分析

在单因素分析的基础上, 选取对茶多酚得率有显著影响的因素, 根据 Box-Behnken 的试验设计原理, 进行响应面试验, 并采用 SAS 软件对实验数据进行回归分析, 以获取最适工艺参数, 并做出响应面图。

1.4 测定方法

茶多酚含量测定: GBT 8313-2008 茶多酚和儿茶素类含量的检测方法。

水分含量测定: GB/T 8304-2002 茶水水分测定。

1.5 统计分析

采用 Excel 和 SAS 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 乙醇浓度对茶多酚提取效果的影响

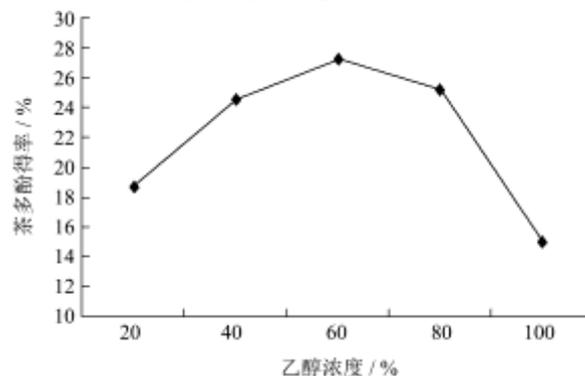


图1 乙醇浓度对茶多酚提取效果的影响

Fig.1 Effect of alcohol concentration on the extraction yield of tea-polyphenols

注: 压力为 300 MPa, 时间为 3 min, 料液比为 1:50。

由于不同的溶剂浓度其极性大小不同, 对目标成分的溶解能力不同, 对组织细胞结构的影响程度也不同^[9], 因此得率不同。由图 1 可知, 随着乙醇浓度的增大, 茶多酚的得率先增大后降低, 在浓度为 60% 时, 其茶多酚得率达到最大。说明 60% 浓度的乙醇较为适合茶酚的溶出。

2.1.2 不同保压时间对茶多酚提取效果的影响

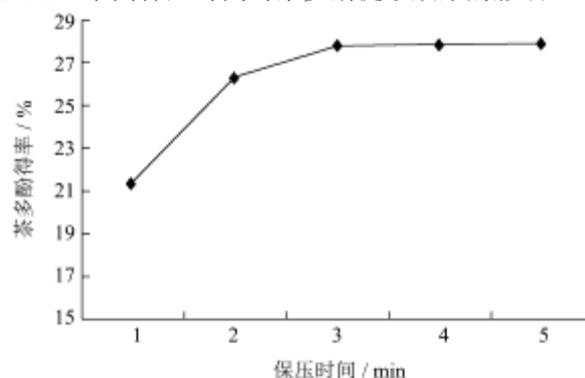


图 2 不同保压时间对茶多酚提取效果的影响

Fig.2 Effect of time of maintain pressure on the extraction yield of tea-polyphenols

注: 压力为 300 MPa, 料液比为 1:50, 乙醇浓度为 50%。

由于高压会导致细胞内产生剧烈的涡流扩散, 增大细胞内外有效成分的浓度差, 从而加快溶质的传质速率^[11-12]。因此在很短时间内便可使细胞内部和外部的功效成分浓度达到平衡, 当再延长保压时间, 有效成分便无法由细胞内部向周围溶液扩散。由图 2 分析

可知, 在 300 MPa 的压力下作用 3 min, 茶多酚的得率便达到最大。说明此时茶叶细胞内外茶多酚浓度接近平衡。因此, 建议保压时间选择 3 min。

2.1.3 不同料液比对茶多酚提取效果的影响

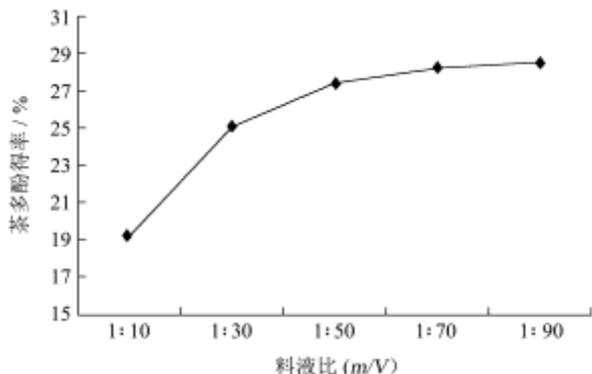


图 3 不同料液比对茶多酚提取效果的影响

Fig.3 Effect of ratio of material on the extraction yield of tea-polyphenols

注: 压力为 300 MPa, 时间为 3 min, 乙醇浓度为 50%。

天然产物功效成分的提取是由渗透、溶解、扩散几个过程组成, 其中扩散占着最主要的作用^[3]。提取过程中, 天然产物中溶质浓度逐渐降低, 溶液中溶质浓度则逐渐增高。溶剂与原料的比值越大, 则浓度梯度越大, 有效成分的扩散速率越大。从图 3 中可以看出当溶剂与茶叶比在 10:1~50:1 范围内, 随着溶剂与茶叶比的增加, 茶多酚的得率逐渐增加。但在溶剂与茶叶比超过 50:1 后, 提取得率增加并不显著, 而溶剂的消耗量以及后处理工作量却明显增大。因此, 综合考虑确定溶剂与茶叶比为 50:1 比较适宜。

2.1.4 不同作用压力对茶多酚提取效果的影响

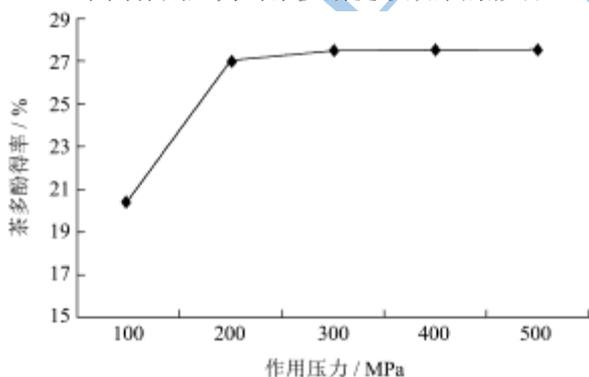


图 4 不同作用压力对茶多酚提取效果的影响

Fig.4 Effect of extraction pressure on the extraction yield of tea-polyphenols

注: 保压时间为 2 min, 乙醇浓度为 50%, 料液比为 1:50。

超高压提取的过程是先对物料加压, 保持一定时间后, 然后突然卸压, 造成细胞内外的压差在急剧上升, 以使细胞中的内含物释放出来。在一定压力范围内, 随着压力的升高, 有效成分的传质速率加快, 细

胞壁和细胞膜被坏的数量增加, 有效成分的得率增大; 当压力过大时, 细胞的细胞壁和细胞膜已充分被破坏, 再提高压力, 不仅不能使有效成分的得率提高, 还造成其它杂质的溶出。由图 4 分析知, 当压力升高至 300 MPa 时, 茶多酚的得率增加不明显, 基本维持稳定。因此, 从经济和提取效果角度考虑, 建议茶多酚提取的压力采用 200~300 MPa 为宜。

2.2 响应面分析方案及结果

表 1 响应面因素和水平

试验因素	因素水平与编码		
	-1	0	1
X ₁ (乙醇浓度/%)	40	60	80
X ₂ (作用时间/min)	1	2	3
X ₃ (作用压力/MPa)	100	200	300

在前面研究的基础上, 选取对茶多酚得率有显著影响的乙醇浓度(X₁)、保压时间(X₂)和作用压力(X₃)三个因素, 根据 Box-Behnken 的试验设计原理, 设计三因素三水平的响应面试验(见表 1)。试验中共设计 15 个试验点, 1~12 号是析因试验, 13~15 号是中心试验。15 个试验点分为析因点和零点, 其中析因点为自变量取值在 X₁、X₂、X₃ 所构成的三维顶点; 零点为区域的中心点, 零点试验重复三次, 用以估计试验误差, 试验分析方案及结果见表 2。

表 2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Experiment design and result of response surface method analysis

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	茶多酚得率/%
1	-1	-1	0	15.84
2	1	-1	0	24.72
3	-1	1	0	16.08
4	1	1	0	19.8
5	-1	0	-1	15.24
6	1	0	-1	27.24
7	-1	0	1	25.08
8	1	0	1	28.92
9	0	-1	-1	14.64
10	0	1	-1	21.24
11	0	-1	1	25.44
12	0	1	1	24.72
13	0	0	0	27.72
14	0	0	0	28.2
15	0	0	0	29.16

2.2.1 方差分析及拟合数学模型的建立

以茶多酚得率为响应值, 经回归拟合后, 各试验因子对响应值的影响可用下面函数表示:

$$Y_1 = 804.648 - 1.3356X_1 + 123.093X_2 + 163.7406X_3 - 27$$

$$7.7388X_1X_1-56.6748X_1X_2-68.2308X_1X_3-148.7616X_2X_2-75.6X_2X_3-45.9744X_3X_3 \quad (1)$$

由表 3 可以看出: $F_{model}=15.34684$, $P=0.00389 < 0.01$, 表明式 (1) 模型回归效果极显著, 不同处理间的差异极显著: $R^2=0.9651$ 说明该模型拟合程度良好, 试验误差小, 预测值与实测值之间具有高度相关性, 该模型是合适的, 可以用来分析和预测超高压提取茶多酚的效果。

分析可知, 模型 (1) 中一次项 X_2 和 X_3 显著, 二次项 X_1X_1 极显著, 二次项 X_2X_2 显著, 其他不显著。对表 2 的数据进行回归分析, 剔除不显著交互作用, 得到茶多酚得率 (%) 对乙醇浓度(X_1)、保压时间(X_2)和作用压力(X_3)的标准回归方程

$$Y_1=776.3561-1.3356X_1+123.093X_2+163.7406X_3-274.2023X_1X_1-145.2251X_2X_2 \quad (2)$$

在试验范围内, 超高压处理对茶多酚的得率, 一次项的偏回归方程系数的绝对值 $X_3 > X_2 > X_1$, 说明作用压力对茶多酚的得率影响最大, 其次是保压时间, 最小是乙醇浓度。

表 3 回归分析结果

Table 3 Variance analysis of regression equation

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	Pr>F
X_1	1	14.27062	14.27062	0.002678	0.960733
X_2	1	121215.1	121215.1	22.7463	0.005018
X_3	1	214487.9	214487.9	40.24917	0.001436
X_1^2	1	284820.3	284820.3	53.44722	0.00075
X_1X_2	1	12848.13	12848.13	2.410983	0.181193
X_1X_3	1	18621.77	18621.77	3.49442	0.120516
X_2^2	1	81710.82	81710.82	15.33323	0.01123
X_2X_3	1	22861.44	22861.44	4.290004	0.093094
X_3^2	1	7804.229	7804.229	1.464482	0.280302
模型	9	736049.9	81783.33	15.34684	0.00389
误差	5	26645.01	5329.002		
总和	14	762694.9			

$R^2=96.51\%$

2.2.2 响应面分析

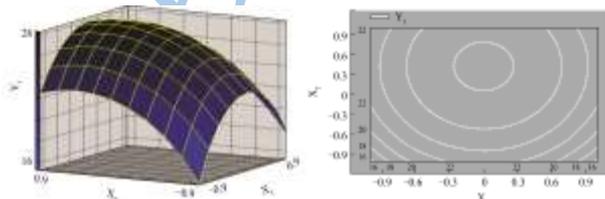


图 5 乙醇浓度和保压时间对茶多酚得率的影响

Fig.5 The effect of alcohol concentration and time of maintain pressure on the extraction yield of tea-polyphenols

由图 5 可知: 随着保压时间的延长, 茶多酚的得

率先有较大幅度的增加, 后稍趋于平缓, 保压时间的长短在一定范围内依赖乙醇浓度的大小, 增加乙醇浓度可使茶多酚的溶出能力相应提高, 从而有利于提取, 缩短萃取时间。但随着乙醇浓度的增大, 提取介质极性降低, 茶多酚的溶出能力下所, 因此会降低提取效果。

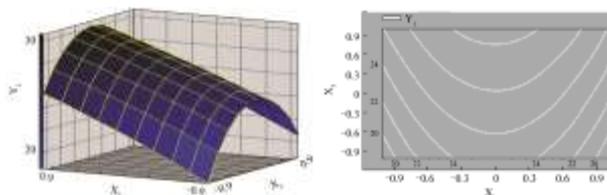


图 6 乙醇浓度和作用压力对茶多酚得率的影响

Fig.6 The effect of alcohol concentration and extraction pressure on the extraction yield of tea-polyphenols

从图 6 中可以看出: 随着作用压力的提高, 提取物中茶多酚含量一直增加, 曲线陡度大; 随着乙醇浓度的升高, 提取物中茶多酚含量有较大程度的增加, 但乙醇浓度的升高到一定程度后, 提取物中茶多酚含量反而急剧下降。

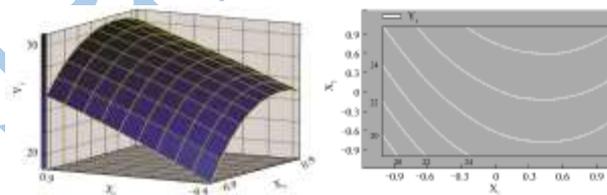


图 7 作用压力和保压时间对茶多酚得率的影响

Fig.7 The effect of extraction pressure and time of maintain pressure on the extraction yield of tea-polyphenols

由图 7 可知: 保压时间增加时, 茶多酚得率大幅度上升后趋于平缓; 而随着作用压力的增加, 提取物中茶多酚含量一直增加, 曲线陡度大。

2.3 提取条件的优化

由所建立的数学模型进行参数最优化分析, 得出茶多酚提取得率最高的参数条件为: 乙醇浓度 60%、保压时间 1.5 min 和作用压力 300 MPa。此优化工艺下茶多酚提取得率的预测值为 31.07%, 验证实验中实际测得茶多酚提取得率为 30.87%, 与模型得出的最大茶多酚得率相差较小, 再次验证了模型的有效性。

3 讨论

目前, 从茶叶中提取茶多酚主要采取加热回流提取法, 该方法操作费时费力、溶剂消耗量大、成本高, 提取物收率低, 在高温下提取, 茶多酚易氧化变质等。也有研究报道采用超声波和微波提取法, 这些方法虽然缩短了时间, 但受热不均匀, 提取液比较浑浊, 不易过滤。酶预处理法作用条件温和, 能够很好地保持

有效成分的活性;超高压提取工艺不需要加热,时间短,且机械化程度高。结合这两种工艺进行茶多酚的提取,不同提取效果可观,且粗提液质量也得以保障。同时,在实验过程中发现利用酶预处理超高压提取方法制备的粗提液,容易过滤去除固体杂质,且过滤后的溶液不会出现沉淀。

此外,虽然生产能力相同的超高压提取设备比常规提取设备的投资高出3~8倍,与超临界CO₂萃取设备投资大致相同,但超高压提取地运行成本远低于常规提取方法(一般为常规提取方法的5~10%)和超临界CO₂萃取技术。超高压提取设备的安全性和操作方便性与常规提取设备相当,远高于超临界CO₂萃取设备的安全性和操作方便性。

4 结论

本研究采用响应面分析法优化低值茶叶中茶多酚的提取工艺,以乙醇浓度、保压时间和作用压力为主要因素进行中心组合试验,建立了茶多酚得率预测的回归方程: $Y_1=776.3561-1.3356X_1+123.093X_2+163.7406X_3-274.2023X_1X_1-145.2251X_2X_2$ 。试验结果表明保压时间和作用对茶多酚得率都有显著影响,当提取工艺条件中料液比为1:50、乙醇浓度为60%、保压时间为1.5 min和作用压力为300 MPa时,茶多酚得率达到极大值30.17%,与模型预测值误差为2.59%。

参考文献

[1] 励建荣,韩晓祥.超高压提取桑叶芦丁[J].分析化学,2008,36(3):365-368

- [2] 陈瑞战,张守勤,王长征,等.超高压提取西洋参皂苷的工艺研究[J].农业工程学报,2005,21(5):150
- [3] 董文宾,胡英,周玲.有机溶剂法制备茶多酚的工艺研究[J].工艺技术,2002,23(9):44-47
- [4] 李思睿,董慧茹.溶剂浮选法分离富集茶叶中茶多酚的研究[J].分析科学学报,2007,23(5):571-574
- [5] 杨爱萍,王清吉,锁守丽,等.茶多酚提取、分离工艺研究[J].莱阳农学院学报,2002,19(2):106-107
- [6] 戴群晶.用茶末及废茶枝叶提取高纯茶多酚的研究[J].现代食品科技,2009,23(1):45-47,53
- [7] Tao Xia, Siqun Shi, Xiaochun Wan. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 74: 557-560
- [8] PAN Xue-jun, NIU Guo-guang, LIU Hui-zhou. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves [J]. Chemical Engineering and Processing,2003, 2: 129-133
- [9] 黄明,张松波.茶多酚的提取方法[P].中国专利:03135467.X,2004,3,7
- [10] 江东文,江绮晴,黄佳佳,等.低值单枞茶中茶多酚提取的比较研究[J].现代食品科技,2012,28(9):1161-1165
- [11] 陈瑞战,张守勤,张永宏,等.超高压提取丹参素的研究[J].农业工程学报,2008,24(1):291-295
- [12] 高峰,张守勤,刘静波,等.超高压技术提取北虫草多糖的工艺研究[J].食品科学,2009,30(16):41-43
- [13] 储茂泉,古宏晨,刘国杰.中草药浸提过程的动力学模型[J].中草药,2000,31(7):504-506