

响应面法优化超声辅助提取茶渣蛋白质的工艺条件

陆晨^{1,2}, 邹雨虹¹, 张士康^{*2}, 朱科学¹, 王彬², 彭伟¹, 周惠明¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 中华全国供销合作总社 杭州茶叶研究院, 浙江 杭州 310016)

摘要: 以茶渣为原料,采用超声波技术辅助提取茶渣蛋白质,考察了超声功率、超声频率、超声温度、超声时间、碱液浓度、料液比对茶渣蛋白质提取率的影响,并以响应曲面法优化工艺条件;比较分析了超声辅助碱提和热水浴碱提茶渣蛋白质提取率的差异。结果表明,超声波辅助提取茶渣蛋白质最佳提取工艺条件为:超声功率 300 W、超声频率为 26 Hz、超声温度 54 °C、超声时间 61 min、碱液浓度 0.35 mol/L、料液质量比比 1 g : 27 mL,在此条件下,茶渣蛋白质一次提取率为 86.50%,超声碱提相对于热水浴碱提,一次提取率提高了 37.2%。

关键词: 茶渣;蛋白质;超声波辅助提取;响应曲面法

中图分类号: TS201.6 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)03-0319-07

Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Protein from Tea Residue by Response Surface Methodology

LU Chen^{1,2}, ZOU Yu-hong¹, ZHANG Shi-kang^{*2}, ZHU Ke-xue¹,
WANG Bin², PENG Wei¹, ZHOU Hui-ming¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China; 2. Hangzhou Tea Research Institute, All China Federation of Supply and Marketing Co-operatives, Hangzhou 310016, China)

Abstract: Ultrasound-assisted extraction of protein from tea residue was investigated in this manuscript. Effect of ultrasonic power, ultrasonic frequency, ultrasonic temperature, ultrasonic time, alkali concentration and material-liquid ratio on extraction yield of protein was investigated by single-factor experiment. Based on the results, the response surface methodology was used to optimize the extraction parameters and the optimum conditions listed as follows: e ultrasonic power 300 W, frequency 26 kHz, temperature 54 °C, time 61 min, alkali concentration 0.35 mol/L and material-liquid ratio 1g : 27mL. Under these conditions, the protein extraction rate achieved at 86.5 %, increased by 37.2 % when compared with that of hot water alkali extraction.

Key words: tea residue, protein, ultrasonic wave-assisted alkali extraction, response surface methodology

茶渣是茶叶经过饮用、初、深加工等利用后的
剩余残渣。据 FAO-IGG 统计,2009 年全球茶叶产

量达到 392.84 万 t。近 10 年中国茶叶产量持续增
长,2009 年已达到 131 万 t,是全球最大的产茶

收稿日期: 2011-05-17

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2010C32053)。

* 通信作者: 张士康(1965—),男,江苏南京人,工学博士,高级工程师,硕士研究生导师,主要从事食品科学方面的研究。

E-mail: zsk6510@126.com

国^[1]。在我国,随着茶叶消费量的逐年增加以及茶叶产业初、深加工技术的不断发展,产生大量废弃的茶渣。目前,大批量茶渣的主要来源有茶多酚等功能成分的工业提取残渣以及饮料工业残渣。茶渣若是被焚烧或废弃,不但是资源的巨大浪费,也是对环境的极大污染,大量茶渣的处理成了一个急需解决的问题^[2]。

茶饮料、速溶茶等深加工所提取的物质只占茶叶干重的 30 % 左右。所利用的成分主要是茶多酚、咖啡碱、糖类、氨基酸和维生素等。经加工后的茶渣中仍残留 1 %~2 % 的茶多酚,0.1 %~0.3 % 的咖啡碱,17 %~19 % 的粗蛋白,16 %~18 % 的粗纤维。目前对于茶渣的研究利用有:利用茶渣固体发酵成饲料,有机无机复合肥,开发重金属吸附剂等^[3]。合理的茶渣综合利用技术对于增加茶叶产业链经济价值以及环境保护都有良好的作用。

茶蛋白氨基酸分析表明:茶蛋白中氨基酸组成丰富,8 种必需氨基酸均含有,谷氨酸、天冬氨酸和亮氨酸含量最高,其中苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、组氨酸等含量都明显高于 FAO/WHO/UNU1985 年的推荐值^[4],是一种优质的叶蛋白质资源。因此从茶渣中提取蛋白质具有很好的现实意义。

超声波提取技术是利用超声波的机械破碎和空化作用,加速浸提物从原料向溶剂的扩散速率,具有提取率高、能耗低、时间短等优点^[5-8]。作者对超声辅助提取茶渣蛋白质的工艺条件进行优化,探讨超声辅助提取技术在茶渣蛋白质提取中的应用。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

茶渣:浙江塔塔茶叶科技有限公司提供,凯氏定氮法测定其蛋白质质量分数为 23.50%;氢氧化钠、盐酸、硫酸、硼酸、硫酸铜、硫酸钾:均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

DFY-500 摇摆式高速中草药粉碎机:温州温岭林大机械有限公司;超声波药品处理机:济宁金百特工程机械有限公司;JB90-D 型电动搅拌机:上海标本模型厂;TDL-5 低速大容量离心机:上海安亭科学仪器厂;KDN-08 消化炉:上海昕瑞仪器仪表

有限公司。

1.3 方法

1.3.1 超声波辅助提取茶渣蛋白质工艺流程 茶渣→粉碎→过筛→加碱液混合→超声处理→离心→取上清液→凯氏定氮法测定茶渣蛋白质提取率。

1.3.2 蛋白质测定法 凯氏定氮法^[9],换算系数为 6.25。

1.3.3 蛋白质提取率的计算

$$\text{提取率} = \frac{\text{提取液中蛋白质质量}}{\text{茶渣中总蛋白质质量}} \times 100$$

1.3.4 单因素实验 研究超声功率、超声频率、超声温度、超声时间、碱液浓度和料液比对茶渣蛋白质提取率的影响。

1.3.5 响应面法实验设计 依据单因素实验结果,利用 design-expert 软件进行响应面实验设计,优化超声辅助茶渣蛋白质提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声波功率对茶渣蛋白质提取率的影响

称取 5 g 茶渣,分别做空白对照、200、250、300 W 条件下进行提取实验,其他条件一定,提取液经离心后测定茶渣蛋白质提取率,结果见图 1。

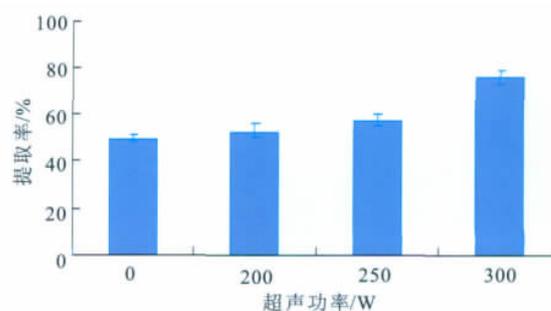


图 1 超声功率对茶渣蛋白质提取率的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic power on yield of tea residue protein

超声功率越高,越容易获得较大的声强^[10]。对于一定频率和一定发射面的超声波,功率增大,声强随之增大后,声压幅值以及液体中压力亦增大,空化泡崩溃时间变短,有利于内容物与提取剂的接触^[11]。从图 1 可以看出,超声功率增大,有利于内容物溶出,茶渣蛋白质提取率随超声功率增大而提高,从蛋白质提取率考虑,选取超声波药品处理机最大功率 300 W 为超声辅助提取茶渣蛋白质的最佳功率。

2.1.2 超声波频率对茶渣蛋白质提取率的影响

称取 5 g 茶渣,在超声功率 300 W 条件下,分别做空白对照、低频(26 Hz)、中频(47 Hz)、高频(68 Hz)条件下茶渣蛋白质提取实验,其他条件同 2.1.1,提取液经离心后,测定茶渣蛋白质提取率,结果见图 2。

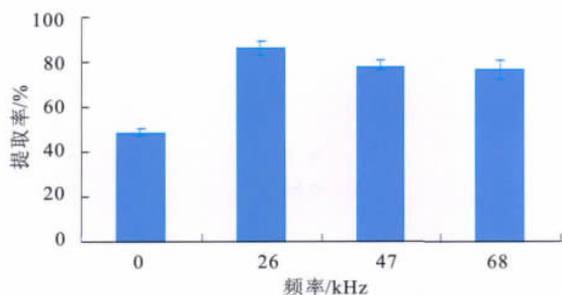


图 2 超声波频率对茶渣蛋白质提取率影响

Fig. 2 Effects of ultrasonic frequency on yield of tea residue protein

由图 2 可以看出,超声条件下茶渣蛋白质提取率均高于空白对照,超声有利于茶渣蛋白质提取,随着超声频率的提高,茶渣蛋白质提取率有所下降,26 Hz 条件下,茶渣蛋白质提取率最高。这是因为超声波频率越低,在液体中产生空化越容易,作用也越强。以提取率为目标,选取超声波频率 26 Hz 为超声辅助提取茶渣蛋白质最佳频率。

2.1.3 超声温度对茶渣蛋白质提取率的影响

称取 5 g 茶渣,在超声功率 300 W,超声频率为 26 Hz 条件下分别在 30、40、50、60、70 °C 下进行茶渣蛋白质提取实验,其他条件同 2.1.1,结果见图 3。

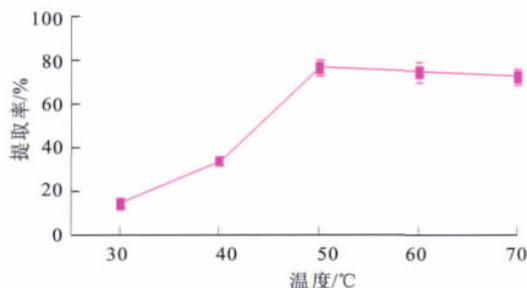


图 3 超声温度对茶渣蛋白质提取率的影响

Fig. 3 Effects of ultrasonic temperature on yield of tea residue protein

由图 3 可以看出,30~50 °C 之间,随着温度提高茶渣蛋白质提取率提高。50 °C 以后提取率稍有下降,但变化不大。综合考虑能量消耗、茶渣蛋白

质提取率以及温度对蛋白质的影响,50 °C 条件下进行提取较为适宜。

2.1.4 超声作用时间对提取率的影响

称取 5 g 茶渣,在超声功率 300 W,频率为 26 Hz 条件下分别对茶渣蛋白质进行 30、40、50、60、70 min 处理,其他条件同 2.1.1,提取结果见图 4。

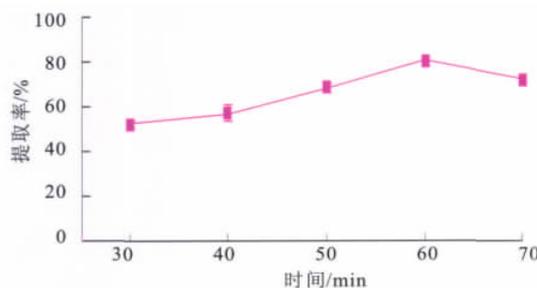


图 4 超声时间对茶渣蛋白质提取率的影响

Fig. 4 Effects of ultrasonic time on yield of tea residue protein

由图 4 可知,超声辅助提取茶渣蛋白质提取率随时间增加先提高后稍有降低,30~60 min 间随时间增加提取率不断提高,60 min 时茶渣蛋白质提取率达到最大,超过 60 min 后蛋白质提取率稍有降低,本实验采用 60 min 的超声作用时间。

2.1.5 料液比对提取率的影响

称取 5 g 茶渣,在超声功率 300 W,频率为 26 Hz 条件下分别在料液比为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 条件下进行茶渣蛋白质提取实验,其他条件同 2.1.1,结果见图 5。

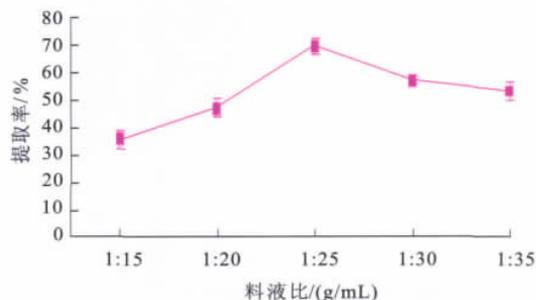


图 5 料液比对茶渣蛋白质提取率的影响

Fig. 5 Effects of material-liquid ratio on yield of tea residue protein

由图 5 可知,料液质量体积比为 1 g : 25 mL 时,茶渣蛋白质提取率最高;1 g : 15 mL~1 g : 25 mL 之间,料液比过小时,茶渣蛋白质提取率偏低,随着料液比的增大,提取率不断增加。这是因为茶

渣吸水性强, 料液比低, 在短时间内蛋白质浸提就达到平衡, 不利于蛋白质的提取; 1 g : 25 mL ~ 1 g : 35 mL 之间, 茶渣蛋白质提取率稍有下降, 且料液比过大, 不利于蛋白质提取后的浓缩沉淀。综合考虑, 料液比 1 g : 25 mL 适宜于茶渣蛋白质提取。

2.1.6 碱液浓度对茶渣蛋白质提取率的影响 称取 5 g 茶渣, 在超声功率 300 W, 频率为 26 Hz 条件下分别在碱液浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 条件下进行茶渣蛋白质提取实验, 其他条件同 2.1.1, 结果见图 6。

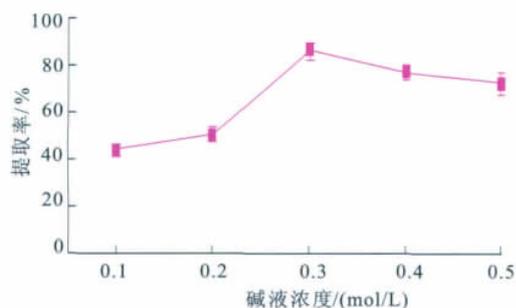


图 6 碱液浓度对茶渣蛋白质提取率的影响

Fig. 6 Effects of alkali concentration on yield of tea residue protein

由图 6 可以看出, 碱液浓度在 0.1~0.3 mol/L 之间, 茶渣蛋白质提取率不断提高。稀碱有利于蛋白质的提取, 过高碱液浓度时, 蛋白质提取率有所下降, 并且过高碱液浓度会改变蛋白质的营养学特性, 生成赖氨酰丙氨酸, 这种物质有毒, 引起营养物质的损失^[12]; 除此之外, 高碱条件下还会使蛋白质变性和水解; 加速美拉德反应, 产生黑褐色物质; 使提取物中非蛋白质含量增加, 分离效果降低^[13]。并且考虑到过高浓度的碱液会引入大量的离子, 增加产品的盐分, 后期还需消耗大量水进行洗涤^[14], 所以在茶渣蛋白质提取时碱液浓度选择 0.3 mol/L 为宜。

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面试验设计与结果分析 根据单因素实验结果, 超声功率为 300 W, 超声频率为 26 Hz 时茶渣蛋白质提取率最大, 从提取率出发, 选定超声功率 300 W, 超声频率为 26 Hz, 以下实验设计中选择超声温度、超声时间、碱液浓度、料液比 4 个因素, 以茶渣蛋白质提取率为响应值进行优化。根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 设计四因素三水平的试验方案, 试验因素和水平见表 1。

表 1 实验因素和水平

Tab. 1 Factors and levels of Box-Behnken test

因素	水平		
	-1	0	1
A 超声时间/min	50	60	70
B 料液比/(g/mL)	1 : 20	1 : 25	1 : 30
C 碱液浓度/(mol/L)	0.2	0.3	0.4
D 超声温度/°C	40	50	60

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Tab. 2 Box-Behnken design and results

试验号	A	B	C	D	茶渣蛋白质提取率/%
1	0	1	1	0	91.00
2	-1	0	-1	0	51.51
3	1	-1	0	0	56.43
4	0	0	0	0	89.57
5	-1	0	0	-1	39.45
6	0	0	1	-1	56.30
7	1	1	0	0	73.60
8	1	0	-1	0	47.07
9	0	0	0	0	89.11
10	0	-1	0	1	50.10
11	0	-1	0	-1	44.17
12	0	0	-1	-1	39.26
13	0	0	0	0	82.11
14	0	-1	1	0	51.74
15	0	0	0	0	86.90
16	0	1	-1	0	46.33
17	-1	0	1	0	76.76
18	0	0	-1	1	58.22
19	-1	0	0	1	66.50
20	0	1	0	0	68.70
21	-1	1	0	0	69.21
22	1	0	1	0	81.49
23	1	0	0	1	70.50
24	-1	-1	0	0	49.87
25	0	1	0	1	78.38

续表 2

试验号	A	B	C	D	茶渣蛋白质提取率/%
26	0	0	1	1	64.56
27	0	-1	-1	0	42.40
28	1	0	0	-1	43.08
29	0	0	0	0	81.10

利用 Design-expert 对表 2 试验数据进行回归,得到茶渣蛋白质对以上四因素的二次多项回归模型为:茶渣蛋白质提取率 = 85.76 + 1.57A + 7.94B + 11.42C + 11.21D + 8.83BC - 11.22A² - 11.66B² - 13.58C² - 17.00D²

对模型进行回归方差分析显著性检验,结果见表 3。对回归模型系数显著性检验,结果见表 4。

表 3 回归模型方差分析

Tab. 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
回归模型	7294.73	9	810.53	22.47	<0.0001, 显著
残差	685.48	19	36.08		
失拟	623.41	15	41.56	2.68	0.1760, 不显著
纯误差	62.08	4	15.52		
总和	7980.22	28			

R=0.9561 R²=0.9141 R_{adj}²=0.8734

由表 3 结果可知,模型 P<0.0001,回归模型极其显著。表 4 结果表明:模型的一次项 C,D 极其

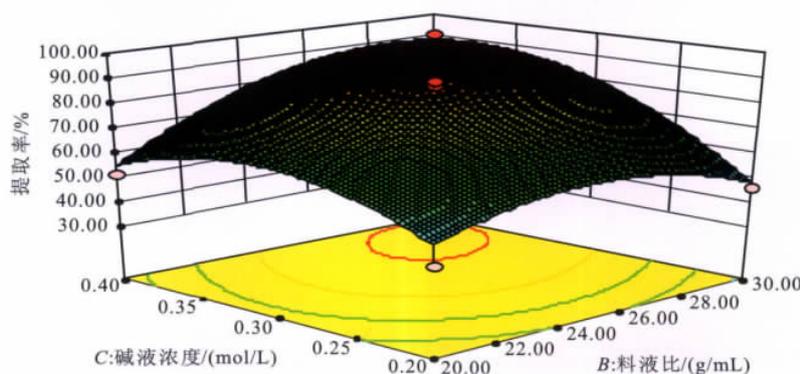
显著,B 显著;二次项 B²,C²,D² 极其显著,A² 显著;交互项 BC 显著;结果表明,各因素对茶渣蛋白质提取率的影响不是简单的线性关系。失拟项 P=0.1760,不显著,相关系数 R²=0.9141,说明模型拟合程度良好,该模型可以较好的分析和预测超声辅助提取茶渣蛋白质提取率。

表 4 回归模型系数显著性检验

Tab. 4 Significance test of regression model coefficient

系数项	回归系数	自由度	标准差	95%置信		P 值
				下限	上限	
常数项	85.76	1	2.69	80.14	91.38	
A	1.57	1	1.73	-2.06	5.20	0.3758
B	7.94	1	1.73	4.31	11.57	0.0002
C	11.42	1	1.73	7.79	15.05	<0.0001
D	11.21	1	1.73	7.58	14.84	<0.0001
A ²	-11.22	1	2.36	-16.16	-6.29	0.0001
B ²	-11.66	1	2.36	-16.60	-6.29	<0.0001
C ²	-13.58	1	2.36	-18.51	-8.64	<0.0001
D ²	-17.00	1	2.36	-21.94	-12.07	<0.0001
BC	8.83	1	3.00	2.55	15.12	0.0084

2.2.2 因素间交互作用 从回归方程可以看出,超声时间和料液比、碱液浓度以及超声温度,料液比和超声温度,碱液浓度和超声温度之间交互作用不是特别明显,料液比和碱液浓度之间的交互作用最为显著。根据回归方程,利用 Design-expert 做因子间的响应面分析图和等高线图,最为显著的料液比和碱液浓度间交互作用对茶渣蛋白质提取率的影响见图 7。



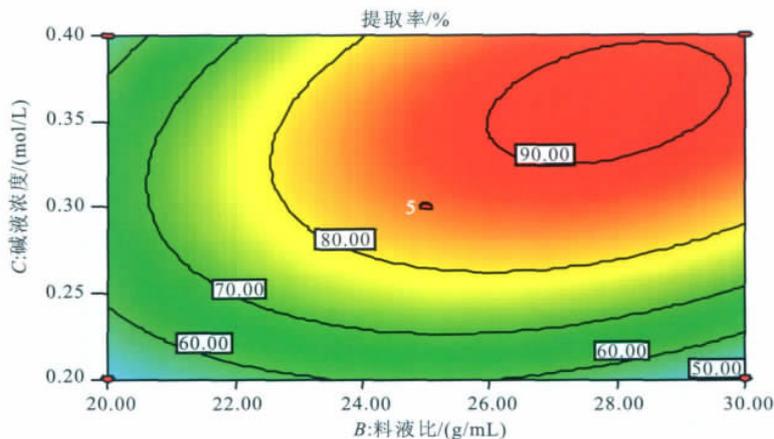


图 7 料液比和碱液浓度及其交互作用对茶渣蛋白质提取率影响的响应面图和等高线图

Fig. 7 Response surface and contour of effects of alkali concentration and material-liquid ratio on tea residue protein extraction

由图 7 可以看出,料液比和碱液浓度之间交互作用非常显著,表现在等高线图呈椭圆形;当超声功率为 300 W,超声频率为 26 Hz,超声温度 50 ℃,超声提取时间 60 min 时,料液质量体积比 1 g : 20 mL~1 g : 30 mL 之间,提取率先提高,然后随料液比继续增大,提取率降低;碱液浓度为 0.2~0.4 mol/L 时,对茶渣蛋白质提取率的影响也是如此。

由分析结果可知,超声时间 57~64 min,料液质量体积比 1 g : 25 mL~1 g : 29 mL 之间,碱液浓度 0.32~0.39 mol/L 之间,提取温度 51~56 ℃ 之间最适宜茶渣蛋白质的提取。响应面法对超声辅助提取茶渣蛋白质提取率的优化结果为:料液质量体积比 1 g : 27 mL,碱液浓度 0.35 mol/L,温度 54 ℃,提取时间 61 min。

2.2.3 实验验证 为了检验响应面模型的合适性和有效性,进行一组验证试验,超声功率 300 W,超声频率 26 Hz 条件下,料液比 1 g : 27 mL,碱液浓度 0.35 mol/L,温度 54 ℃,提取时间 61 min,蛋白质提取率分别为:83.68%,89.12%,86.70%,蛋白质提取率试验值(86.50%)与模型预测值(92.97%)的差值仅占预测值的 6.81%。

2.3 超声波辅助提取与热水浴碱提法的比较

由表 5 可以看出,超声辅助提取茶渣蛋白质比热水浴提取茶渣蛋白质提取率提高了 37.2%,碱液浓度从 0.5 mol/L 降低到 0.35 mol/L,料液质量体积比从 1 g : 40 mL 减少到 1 g : 27 mL,提取时间缩短 59 min。结果表明,超声辅助提取是一种有效的茶渣蛋白质提取方式。

表 5 超声辅助提取与热水浴提取比较

Tab. 5 Comparison between ultrasound-assisted extraction and hot water extraction

提取方式	提取率/%	碱液浓度/(mol/L)	料液比/(g/mL)	提取时间/min
超声辅助提取	86.5	0.35	1:27	61
热水浴提取*	49.3	0.50	1:40	120

注: * 实验结果为作者所在实验室茶渣蛋白质热水浴碱法提取优化数据。

3 结 语

1) 采用响应面试验设计,优化超声辅助茶渣蛋白质提取实验,利用 Design-expert 软件对实验数据进行分析拟合,得出超声辅助提取茶渣蛋白质的

提取率的数学模型,超声辅助提取茶渣蛋白质的最佳工艺条件为:超声功率 300 W、超声频率为 26 Hz、超声温度 54 ℃、超声时间 61 min、碱液浓度 0.35 mol/L、料液比 1 g : 27 mL;在此条件下,茶渣蛋白质一次提取率为 86.50%。

2) 通过比较超声辅助提取与热水浴提取茶渣

蛋白质实验,得出超声辅助提取茶渣蛋白质提取率明显高于热水浴提取,超声辅助提取是一种高效的茶渣蛋白质提取方式。

参考文献(References):

- [1] 封槐松,陈宗懋,林智,等. 全球茶叶市场现状和展望[J]. 中国茶叶,2010,32(8):4-9.
FENG HUAI-song, CHEN Zong-mao, LIN Zhi, et al. Current situation of the world tea market and its future development[J]. *China Tea*, 2010,32(8):4-9. (in Chinese)
- [2] 张楠,张凌云. 茶渣在自然发酵与添加外源微生物发酵过程中的理化动态研究[C]. 中国茶叶学会 2009 茶叶科技创新与产业发展学术研讨会论文集[A]. 重庆:中国茶叶学会,2009:419-426.
- [3] 罗红玉,黎星辉,郁军. 茶渣回收利用研究现状[J]. 福建茶叶,2010,32(7):8-12.
LUO Hong-yu, LI Xing-hui, YU Jun. Tea-leaf recycling research[J]. *Tea in Fujian*, 2010,32(7):8-12. (in Chinese)
- [4] FAO/WHO/UNU. Energy and protein requirements; Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. World Health Organization technical report series 724[R]. Geneva; WHO, 1985; 121-123.
- [5] Li Haizhou, Pordesimo Lester, Weiss Jochen. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans[J]. *Food Research International*,2004,37(7):731-738.
- [6] Chemat F, Grondin L, Costes, P et al. High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2004, 11(5):281-285.
- [7] Rostagno M A, Palma M, Barroso C G. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597(2):265-272.
- [8] 严伟,李淑芬,田松江. 超声波协助提取技术[J]. 化工进展,2002(9):649-651.
YAN Wei, LI Shu-fen, TIAN Song-jiang. Ultrasound-assisted extraction technology[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2002(9):649-651. (in Chinese)
- [9] 张水华. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007:156-160.
- [10] 薛芳,颜瑞,王承明. 超声辅助碱提取花生多糖的研究[J]. 食品科学,2008,29(8):158-163.
XUE Fang, YAN Rui, WANG Cheng-ming. Study on ultrasonic wave-assisted alkali extraction of polysaccharides from peanut meal[J]. *Food Science*, 2008,29(8):158-163. (in Chinese)
- [11] 黄国平. 玉米醇溶蛋白的超声波提取、改性与释药性能的研究[D]. 广州:华南理工大学,2004.
- [12] Ansharullah, Hourigan J A, Chesterman C F. Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,1997,74(2)141-146.
- [13] Shih F F, Daigle K. Use of enzymes for the separation of protein from rice flour[J]. *Cereal Chemistry*,1997,74(4):437-441.
- [14] 朱科学. 小麦胚蛋白质及其酶解产物的研究[D]. 无锡:江南大学,2006.