

周红宇,杨 德.茶皂素水酶法提取工艺及纯化方法[J].江苏农业科学,2016,44(5):362-364.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.106

茶皂素水酶法提取工艺及纯化方法

周红宇¹,杨 德²

(1.湖北工业大学,湖北武汉 430064;2.湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所,湖北武汉 430064)

摘要:利用水酶法,以油茶籽粕为原料,采用正交试验法优化了纤维素酶酶解提取茶皂素工艺,并对壳聚糖-蛋白酶联用纯化茶皂素进行了研究。结果表明,蛋白酶处理可显著降低提取液中蛋白质含量和壳聚糖絮凝时茶皂素损失率;各因素对油茶皂素提取率影响顺序为酶添加量>料液比>提取温度>提取时间,最佳提取工艺为酶添加量 6 mg/g,料液比 1 g:25 mL,提取温度 50 ℃,提取时间 120 min。

关键词:水酶法;茶皂素;提取纯化

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0362-03

茶皂素别称茶皂苷,是存在于山茶科(茶、油茶、山茶)植物中的一类五环三萜皂苷类物质,是一种性能优良的天然非离子型表面活性剂,在工业、医药、农业等领域有广泛用途^[1-2]。目前,提取茶皂素的方法主要有水浸提法、有机溶剂提取法、吸附法、超声波提取法、微波辅助提取法等,其中有机溶剂提取法应用广泛,但存在工艺复杂、条件要求高、能耗高、环境不友好等问题,限制了其产业化规模。因此寻找简单、经济、高效且适合工业化生产的茶皂素提取纯化方法非常必要。本研究以油茶籽粕为原料,以水代替有机试剂进行油茶皂素提取,探索酶解工艺、壳聚糖絮凝工艺在茶皂素提取上的应用,旨在为茶皂素工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

油茶籽粕由湖北省广水市涂氏农业开发有限公司提供,70 ℃烘干后粉碎,过40目筛,置于干燥器中备用。15 000 μ/g 纤维素酶(国药控股有限公司)、10 000 μ/g 木瓜蛋白酶(上海沃凯生物技术有限公司)、茶皂素标准品(纯度98%、上海紫一试剂厂);试剂均为分析纯。HW-SY21-K 电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司)、FA1004B 分析天平(上海越平科学仪器有限公司)、GL-25MS 高速冷冻离心机(上海卢湘离心机仪器有限公司)、TU-1810 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 试验设计

1.2.1 单因素试验 研究酶添加量、料液比、酶解温度、酶解时间等4个因子对茶皂素溶出率的影响。

1.2.1.1 酶添加量对茶皂素溶出率的影响 在料液比为1 g:10 mL,酶解温度为55 ℃,酶解时间2.5 h条件下,考察

酶添加量对油茶皂素提取率的影响。

1.2.1.2 料液比对茶皂素溶出率的影响 在酶用量4 mg/g,酶解温度55 ℃,酶解时间2.5 h条件下,考察料液比对油茶皂素提取率的影响。

1.2.1.3 酶解温度对茶皂素溶出率的影响 在酶用量4 mg/g,料液比为1 g:20 mL,酶解时间2.5 h条件下,考察酶解温度对油茶皂素提取率的影响。

1.2.1.4 酶解时间对茶皂素溶出率的影响 在酶用量4 mg/g,料液比为1 g:20 mL,酶解温度为55 ℃条件下,考察酶解时间对油茶皂素提取率的影响。

1.2.2 多因素正交试验 通过以上单因素试验,得出每个单因素的最佳值,设定不同酶的添加量、提取时间、提取温度、料液比进行L₉(3⁴)正交试验。

1.3 测定方法

1.3.1 油茶籽粕成分分析 测定油茶籽粕中水分、总糖、蛋白质、脂肪、粗纤维、茶皂素含量。

1.3.2 茶皂素提取方法 称取处理后的油茶籽粕50 g置于1 000 mL烧杯中,按试验设计的料液比加入蒸馏水、纤维素酶,设定提取温度与提取时间,提取完成后离心,取上清液备用。

$$\text{茶皂素提取率} = \frac{\text{提取液中茶皂素浓度} \times \text{提取液体积}}{\text{原料质量}} \times 100\%; \quad (1)$$

1.3.3 蛋白酶酶解方法 取提取液离心后得到的上清液500 mL,调节pH值为6.5,加入木瓜蛋白酶以除去提取液中的蛋白质,酶解条件为:酶添加量1%,酶解温度50 ℃,酶解时间2 h,计算酶解前后提取液中蛋白质含量和蛋白质去除率。

$$\text{蛋白质去除率} = \frac{\text{酶解前提取液中蛋白质浓度} - \text{酶解后提取液中蛋白质浓度}}{\text{絮凝前提取液中茶皂素浓度}} \times 100\%; \quad (2)$$

1.3.4 壳聚糖絮凝 取蛋白酶酶解前后的提取液100 mL,考察1%壳聚糖溶液添加量及絮凝时间对皂素纯化效果影响。

$$\text{茶皂素损失率} = \frac{\text{絮凝前提取液中茶皂素浓度} - \text{絮凝后提取液中茶皂素浓度}}{\text{絮凝前提取液中茶皂素浓度}} \times 100\%; \quad (3)$$

收稿日期:2016-03-20

基金项目:湖北省教育科学规划课题(编号:2015GB053)。

作者简介:周红宇(1984—),男,四川广安人,硕士,讲师,主要从事设备设计研究。E-mail:engzhy@126.com。

通信作者:杨德,助理研究员,主要从事农产品加工技术研究。

E-mail:yde0537@126.com。

$$\text{蛋白质去除率} = \frac{\text{絮凝前提取液中蛋白质浓度} - \text{絮凝后提取液中蛋白质浓度}}{\text{絮凝前提取液中茶皂素浓度}} \times 100\%。$$

(4)

1.3.5 其他指标 参照 GB 5009.3—2010《食品安全国家标准 食品中水分的测定》规定的方法测定水分含量;采用索式提取法测定脂肪含量;采用浓硫酸-香草醛法^[3]测定茶皂素含量。采用双缩脲法^[4]测定蛋白质含量。采用 GB/T 6434—2006《饲料中粗纤维测定方法》规定的方法测定粗纤维含量。采用苯酚硫酸法测定总糖含量。

2 结果与分析

2.1 油茶籽粕主要成分

由表 1 可知,油茶籽粕总糖含量为 31.07%,粗纤维含量 17.69%,蛋白质含量 13.60%,总糖、蛋白质含量较高会对茶皂素提取、纯化产生影响。粗纤维主要由细胞壁成分组成,其存在会影响皂素溶出,因此,通过添加纤维素酶使粗纤维酶解从而促进茶皂素溶出。

表 1 油茶籽粕主要成分含量

指标	含量(%)
水分	8.32
总糖	31.07
蛋白质	13.60
脂肪	6.50
粗纤维	17.69
茶皂素	13.09

2.2 单因素试验结果

2.2.1 酶添加量对油茶皂素提取率的影响 不同酶的添加量对油茶皂素提取率的影响如图 1 所示,油茶皂素提取率随纤维素酶添加量的增加先升高后降低,酶添加量为 4 mg/g 时提取率最高,达到 12.79%。纤维素酶可破坏植物的细胞壁,从而促使茶皂素等成分溶出;另一方面,茶皂素具有亲脂性,酶添加量增加时茶皂素提取率降低可能和脂肪浸出率增加有关。

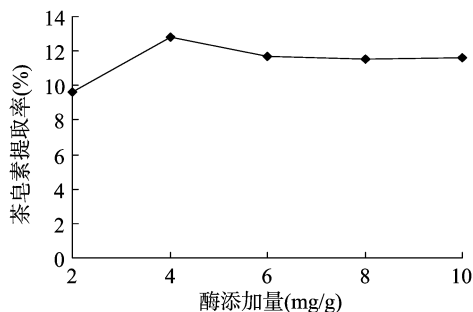


图1 酶添加量对油茶皂素提取率的影响

2.2.2 料液比油茶皂素提取率的影响 从图 2 可以看出,随着料液比的增加,茶皂素提取率随之增加,考虑到后续浓缩成本,选择 1 g : 20 mL 作为最佳料液比。

2.2.3 提取温度对油茶皂素提取率的影响 由图 3 可知,随着提取温度的增加,茶皂素提取率先升高后降低,提取温度达到 55 ℃ 时,提取率最高,因此茶皂素提取工艺的提取温度确定为 55 ℃。在一定范围内,温度升高时酶活性增大,水活度增加也更有利于成分溶出;温度达到一定高度会抑制酶活性,导致提取率降低。

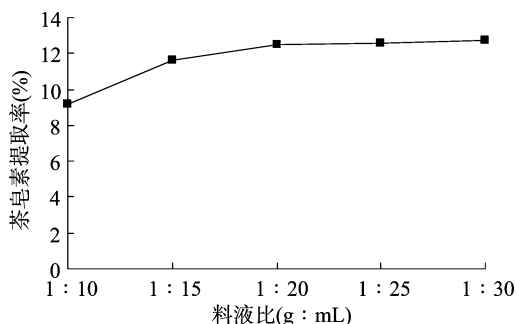


图2 不同料液比对茶皂素提取率的影响

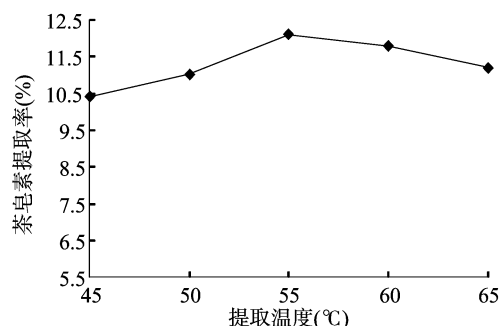


图3 不同温度对茶皂素提取率的影响

2.2.4 提取时间对油茶皂素提取率的影响 由图 4 可知,茶皂素提取率与提取时间呈正相关,即提取时间越长油茶皂素提取率越高,但 90 min 后油茶皂素提取率增加趋势趋缓,提取时间延长会增加能耗,因此选择 120 min 作为正交试验提取温度。

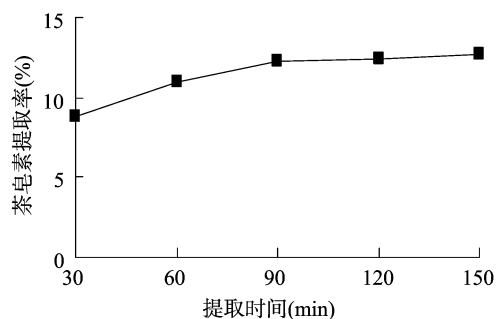


图4 不同提取时间对茶皂素提取率的影响

2.3 正交试验结果

在单因素试验基础上,对选定的酶添加量、料液比、提取时间、提取温度等 4 个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,考察酶添加量、料液比、提取时间、提取温度的综合作用。试验因素水平见表 2,试验结果见表 3。从表 2、表 3 可看出,各因素对油茶皂素提取率影响由大到小为 $A > B > C > D$,试验最优条件为 $A_3B_3C_1D_2$,即酶添加量 6 mg/g,料液比 1 g : 25 mL,提取温度 50 ℃,提取时间 120 min。

2.4 壳聚糖絮凝纯化茶皂素工艺

壳聚糖在烯酸溶液中分子链中带有大量的正电荷,是天然絮凝剂,可以对蛋白质、核酸、多糖等大分子絮凝回收。由图 5、图 6、图 7 可知,酶解前,随着壳聚糖添加量增大,茶皂素损失率增加,添加 3 mL 1% 壳聚糖溶液时茶皂素提取率为 9.57%,蛋白质含量下降至 140 μg/mL,茶皂素损失率在 25%

表 2 茶皂素水酶法提取工艺正交试验因素水平

水平	因素			
	A:酶添加量 (mg/g)	B:料液比 (g : mL)	C:提取温度 (℃)	D:提取时间 (min)
1	2	1 : 15	50	90
2	4	1 : 20	55	120
3	6	1 : 25	60	150

表 3 茶皂素水酶法提取工艺正交试验结果与极差分析

编号	A:酶添加量	B:料液比	C:提取温度	D:提取时间	提取率 (%)
1	1	1	1	1	11.19
2	1	2	2	2	11.64
3	1	3	3	3	11.93
4	2	1	2	3	11.75
5	2	2	3	1	12.35
6	2	3	1	2	12.98
7	3	1	3	2	12.16
8	3	2	1	3	12.71
9	3	3	2	1	13.10
k_1	11.587	11.700	12.293	12.213	
k_2	12.360	12.233	12.163	12.260	
k_3	12.657	12.670	12.147	12.130	
R	1.070	0.970	0.146	0.130	

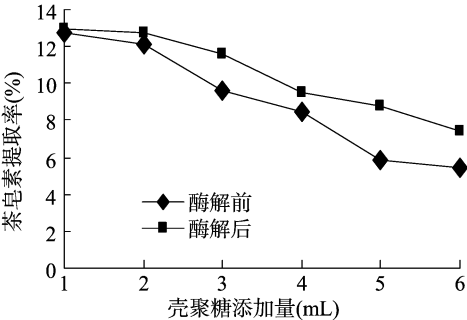


图 5 壳聚糖添加量对茶皂素提取率的影响

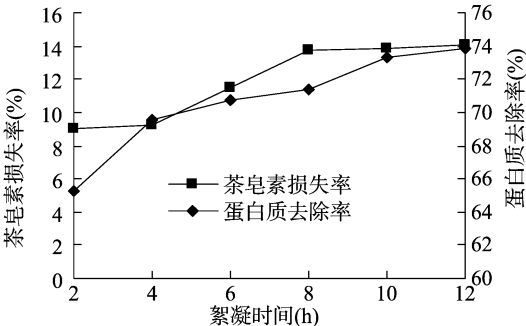


图 6 絮凝时间对茶皂素损失率和蛋白质去除率的影响

左右,酶解后壳聚糖絮凝时茶皂素损失率显著降低,添加 3 mL 1% 壳聚糖时蛋白酶对蛋白质酶解效率较高,酶解后提取液中蛋白含量下降至 63 $\mu\text{g/mL}$ 左右,茶皂素损失率约为 10%,相比酶解前蛋白含量下降更显著,同时茶皂素损失率较

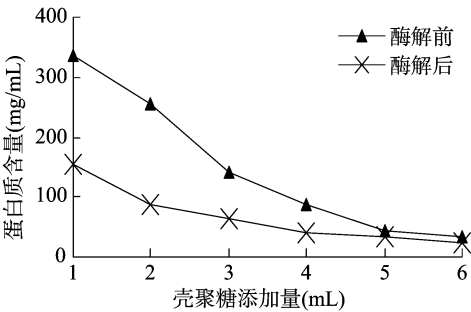


图 7 壳聚糖添加量对蛋白质含量的影响

低。絮凝时间延长,茶皂素损失率增大,同时蛋白质等杂质的去除率也增大,由试验可知,添加 3 mL 壳聚糖溶液,絮凝 4 h 即可取得较好的效果。

3 结论

纤维素酶是酶的一种,在分解纤维素时起生物催化作用,可以将纤维素分解成寡糖或单糖,在食品行业和环境行业均有广泛应用^[5-9]。提取茶皂素时,纤维素酶的加入可增大茶皂素分子向溶剂溶出的通道,从而提高茶皂素提取率。本研究结果表明,纤维素酶的加入可提高茶皂素水提取的得率,最佳提取工艺为酶添加量 6 mg/g,料液比 1 g : 25 mL,提取温度 50 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 120 min。壳聚糖的加入可有效去除提取体系中的蛋白质等杂质,在未经蛋白酶酶解的提取体系中,壳聚糖絮凝蛋白质等大分子易导致茶皂素损失率较大,这可能与茶皂素与糖类大分子、蛋白质的结合有关^[10]。蛋白酶酶解后,添加壳聚糖絮凝时茶皂素损失率下降,表明蛋白酶处理可作为壳聚糖絮凝除杂前的必要步骤。

参考文献:

[1]李俊,张爱玉,齐永杰,等. 茶树油粕中茶皂素研究进展[J]. 食品科学,2012(1):276-279.
[2]廖书娟,童华荣,吉当玲. 茶籽饼茶皂素提取及应用研究[J]. 粮食与油脂,2005(1):13-15.
[3]傅春玲,洪奇华,阮辉,等. 茶皂素定量测定方法的研究[J]. 杭州大学学报:自然科学版,1997,24(3):239-242.
[4]张立娟,姜瞻梅,姚雪琳,等. 双缩脲法检测大豆分离蛋白中蛋白质的研究[J]. 食品工业科技,2008(7):241-242.
[5]顾方媛,陈朝银,石家骥,等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志,2008,28(1):83-87.
[6]武秀琴. 纤维素酶及其应用[J]. 养殖与饲料,2003(7):15-16.
[7]彭静静. 经密码子优化的耐热纤维素酶在大肠杆菌中的表达[J]. 江苏农业学报,2014,30(3):497-502.
[8]彭静静. 利用 pHsh 载体克隆与表达多功能半纤维素酶[J]. 江苏农业学报,2014,30(4):875-879.
[9]郭彦,杨洪双,张翠,等. 大豆根瘤突变体连作土壤中纤维素酶和蔗糖酶活性的变化[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):83-84.
[10]袁红江. 茶皂素超声水提物的纯化工艺及其机理研究[D]. 重庆:重庆理工大学,2012.