

胡福田,周红军,徐 华,等. 微波预处理法制备茶粕基有机药肥工艺研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(19):295-298.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.19.066

微波预处理法制备茶粕基有机药肥工艺研究

胡福田¹,周红军¹,徐 华¹,周新华¹,戴修纯²

(1. 仲恺农业工程学院化学化工学院,广东广州 510225; 2. 广州市农业科学研究院,广东广州 510308)

摘要:以油茶饼粕为原材料,采用微波预处理法,以水作提取溶剂,通过单因素试验研究液固比、温度、时间和 pH 值对油茶饼粕中茶皂素、蛋白质提取率的影响,并采用正交试验确定最佳提取工艺条件。结果表明,在液固比为 7 mL : 1 g,浸提时间为 2.5 h、pH 值为 10、浸提温度为 65 ℃时,茶皂素的提取率可达 13.93%,蛋白质提取率可达 6.92%。

关键词:油茶饼粕;茶皂素;蛋白质;微波;浸提工艺

中图分类号:S141.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)19-0295-04

为了减轻化学农药和化肥造成的污染,实现 2020 年农药化肥零增长的目标,植物源有机药肥的研究与开发成为当前热点^[1-4]。茶粕中含有 12%~18% 茶皂素、7%~12% 蛋白质以及氨基酸、多糖等物质,是一种非常有市场与应用前景的植物源有机药肥^[5-7]。在实际生产中,茶粕基本上是直接使用,有效成分利用率低,药效、肥效差。因此,亟需将茶粕有效成分提取出来使用,以提高其利用率,增强其药效和肥效。但一般用热水浸提茶粕时,茶皂素浸提率低^[8],且水性茶粕提取液性能不稳定,茶粕中的水解酶可导致茶皂素水解沉淀^[9],茶粕中的霉菌易引发浸提液霉变腐败变质,这是限制其作为药肥使用的技术难题。

微波具有热效应和非热效应等多种特性。微波热效应可

导致细胞内的极性物质尤其是水分子吸收微波能,使胞内温度迅速上升,水汽化后将细胞膜和细胞壁冲破,形成微小的孔洞,使表面出现裂纹,此时胞外溶剂容易进入细胞内,溶解并释放出胞内物质^[10-11];微波非热效应则可杀菌除酶。本研究先用微波预处理茶粕粉末来破壁杀菌除酶,再通过热水浸提制备茶粕基植物源有机药肥,以期对茶粕综合利用提供新的途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

油茶饼粕由广东省梅州市梅江区富强客家特产经营部提供,茶皂素标准样品购于上海博蕴生物科技有限公司。生化试剂牛血清蛋白为标准样品;酒石酸钾钠、五水硫酸铜、碘化钾、氢氧化钾、盐酸、无水乙醇、硫酸、香草醛均为分析纯。

所用仪器为 PHS-3C 型数显精密酸度计、RE-85Z 型旋转蒸发器、HH-1 型电热恒温水浴锅、DGG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱、DZG-6020 型真空干燥箱、VIS-7200 型紫外可见分光光度计、G8023CSL-K 3 型微波炉(格兰仕)、

收稿日期:2018-07-03

基金项目:广东省科技计划(编号:2014A020208127、2017A04045053);广东省农业厅科技计划(编号:2017LM4177)。

作者简介:胡福田(1968—),男,博士,副教授,主要从事精细化工类和农副产品综合利用研究。E-mail:hftian2002@163.com。

[11]刘绍辉,方精云. 土壤呼吸的影响因素及全球尺度下温度的影响[J]. 生态学报,1997,17(5):19-26.

[12]Wildung R E, Garland T R, Buschbom R L. The interdependent effects of soil temperature and water content on soil respiration rate and plant root decomposition in arid grassland soils[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1975, 7(6):373-378.

[13]Almagro M, López J, Querejeta J I, et al. Temperature dependence of soil CO₂ efflux is strongly modulated by seasonal patterns of moisture availability in a Mediterranean ecosystem[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(3):594-605.

[14]Zhang Q, Lei H M, Yang D W. Seasonal variations in soil respiration, heterotrophic respiration and autotrophic respiration of a wheat and maize rotation cropland in the North China Plain[J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2013, 180:34-43.

[15]Gaumont-Guay D, Black A T, Griffis T, et al. Influence of temperature and drought on seasonal and interannual variations of soil, bole and ecosystem respiration in a boreal aspen stand[J].

Agricultural and Forest Meteorology, 2006, 140(1/2/3/4):203-219.

[16]Khomik M, Arain A M, McCaughey J H. Temporal and spatial variability of soil respiration in a boreal mixedwood forest[J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2006, 140(1/2/3/4):244-256.

[17]Oechel W C, Vourlitis G L, Hastings S J, et al. Acclimation of ecosystem CO₂ exchange in the Alaskan Arctic in response to decadal climate warming[J]. Nature, 2000, 406(6799):978-978.

[18]Frank A B, Liebig M A, Hanson J D. Soil carbon dioxide fluxes in northern semiarid grasslands[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2002, 34(9):1235-1241.

[19]李凌浩,王其兵,白永飞,等. 锡林河流域羊草草原群落土壤呼吸及其影响因子的研究[J]. 植物生态学报, 2000, 24(6):680-686.

[20]陈全胜,李凌浩,韩兴国,等. 水热条件对锡林河流域典型草原退化群落土壤呼吸的影响[J]. 植物生态学报, 2003, 27(2):202-209.

HJ-3 型数码恒温磁力搅拌器。

1.2 试验方法

1.2.1 原料微波预处理 油茶粕干燥后,粉碎,过 300 目筛,取筛过物进一步干燥至含水量为 4%。精确称量 20 g 粉末,以 800 W 功率微波处理 150 s。

1.2.2 热水浸提制药肥 对微波处理过的粉末按某一液固比、温度、时间、pH 值浸提,浸提后过滤,滤液加盐酸调 pH 值为 5.2,在真空(真空度 0.09)、温度为 70 ℃ 条件下浓缩得到提取液,备用。

1.2.3 茶皂素的测定

1.2.3.1 标准曲线的绘制 精确称取茶皂素标准样品 0.1 g,用 80% 乙醇溶液溶解并定容至 100.00 mL,摇匀,配制成为 1.0 mg/mL 溶液。分别取标准溶液 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 置于 10 mL 容量瓶中,并加 80% 乙醇分别将体积补充至 1.0 mL,再分别加入 8% 香草醛乙醇溶液 1.0 mL,将容量瓶移至冰水中,用 77% 硫酸水溶液定容,摇匀,于 60 ℃ 下加热 30 min,进行显色反应;然后置于冰水中冷却 10 min,取出置于室温下,以第 1 支容量瓶作空白对照,于 550 nm 下测吸光度。

1.2.3.2 样品的测定 将“1.2.2”节中待测滤液稀释为含茶皂素量在 0.7 mg/mL 左右的样品溶液,精密吸取 1.0 mL,置于 10 mL 具塞磨口试管中,根据标准曲线的测定方法,测定吸光度,根据标准曲线计算样品中茶皂素的含量,进而计算茶皂素提取率,其公式如下:

$$\text{茶皂素提取率} = \frac{\text{浸提液中茶皂素质量}}{\text{原料质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 蛋白质的测定

1.2.4.1 标准曲线的绘制 双缩脲试剂的配制:准确称取 4.00 g 五水硫酸铜、2.49 g 碘化钾、28.00 g 氢氧化钾、10.00 g 酒石酸钠,分别溶解于蒸馏水中,定容到 1 000 mL。按照牛血清蛋白试剂标签中给出的蛋白质含量,计算称样量后,准确称取牛血清蛋白,以 28 g/L 氢氧化钾水溶液配制成为含量约为 4 mg/mL 的蛋白质标准溶液。分别取蛋白质标准溶液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 置于 10 mL 具塞比色试管中,用蒸馏水补齐至 1.0 mL,然后向各比色管中加入 4.0 mL 双缩脲试剂,混匀,室温(25 ℃)下反应 30 min。以第 1 支试管作空白对照,在 540 nm 波长测定吸光度。

1.2.4.2 样品的测定 将“1.2.2”节中待测滤液稀释为含蛋白质质量在 1.5 mg/mL 左右的样品溶液,精确吸取 1.0 mL,置于 10 mL 具塞磨口试管中,根据标准曲线的测定方法,测定

吸光度,根据标准曲线计算样品中蛋白质的含量,进而计算蛋白质提取率,其公式如下:

$$\text{蛋白质提取率} = \frac{\text{浸提液中蛋白质质量}}{\text{原料质量}} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

以茶皂素浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线(图 1),得到的曲线回归方程为 $y = 0.9697x + 0.0053$,其相关系数为 $r^2 = 0.9998$ 。以蛋白质浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标作标准曲线(图 2),得到的曲线回归方程为 $y = 0.2811x + 0.0035$,其相关系数为 $r^2 = 0.9999$ 。

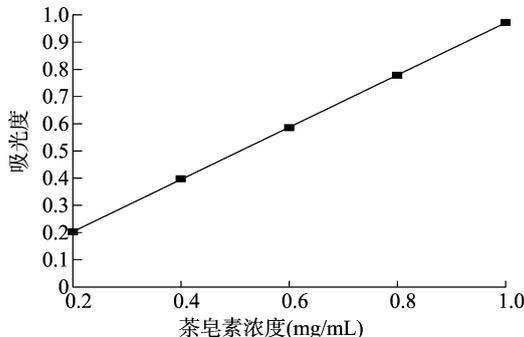


图1 茶皂素标准曲线

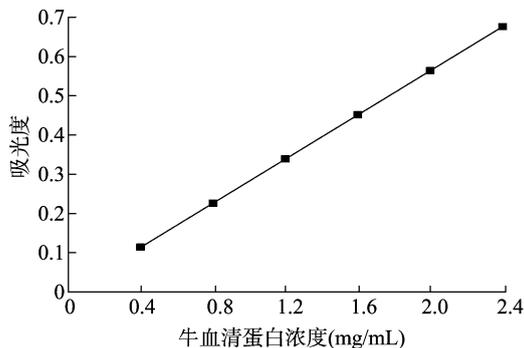


图2 牛血清蛋白标准曲线

2.2 微波预处理对工艺特性的影响

取“1.2.1”节微波处理粉末 10 g,同时取未处理粉末 10 g 为空白对照,分别在相同条件下(温度 60 ℃、液固比 7 mL:1 g、pH 值 10、2.5 h)浸提,其浸提液过滤特性、霉变特性、稳定性以及茶皂素、蛋白质的提取率如表 1 所示。

表 1 微波处理粉末和未处理粉末工艺特性对比

| 处理 | 茶皂素提取率 (%) | 蛋白质提取率 (%) | 过滤特性 | 霉变特性 | 稳定性 |
|--------|------------|------------|------|------|------|
| 微波处理粉末 | 13.95 | 6.25 | 易过滤 | 没有霉变 | 没有沉淀 |
| 未处理粉末 | 10.23 | 7.86 | 很难过滤 | 有霉变 | 有沉淀 |

由表 1 可知,微波处理粉末的茶皂素提取率高于未处理粉末,其原因主要是微波热效应导致细胞内的水汽化,将细胞膜和细胞壁冲破,形成微小的孔洞,使细胞表面出现裂纹,浸提时热水容易进入细胞内溶解胞内物质。同时,微波热效应和非热效应都有可能使某些蛋白质变性,改变蛋白质结构,使

水溶性蛋白质减少,蛋白质提取率降低;但微波处理避免了水溶性蛋白质形成胶体溶液,使浸提后液固分离的处理(过滤)变得简单。同时微波处理杀死了茶粕中的霉菌,并使茶皂素水解酶失活,达到了较理想的处理效果。

2.3 浸提时间对提取率的影响

在浸提液固比为 6 mL : 1 g、pH 值为 10、浸提温度为 60 °C 的条件下,考虑不同浸提时间对茶皂素和蛋白质提取率的影响,结果如图 3 所示,在浸提 1 h 时,提取率较低,随着时间的增加,提取率首先明显提升,这是由于浸提时间少时,浸提溶剂与茶粕粉末接触的时间短,浸提溶剂还没完全将茶皂素和蛋白质充分溶出。浸提在 2 h 以后,蛋白质的提取率基本保持不变,水溶性蛋白质接近溶解平衡,茶皂素的提取率还有少量的提升。由于茶粕粉末内部溶质的溶解及扩散都需要一定的时间,所以延长提取时间有利于茶皂素提取完全,提取率会相应有所提高。但是,随着时间的继续增加,液相主体溶质的浓度增加,传质推动力减小,提取的速度下降,使得生产能力降低。所以选择 2~3 h 作为后续试验的提取时间。

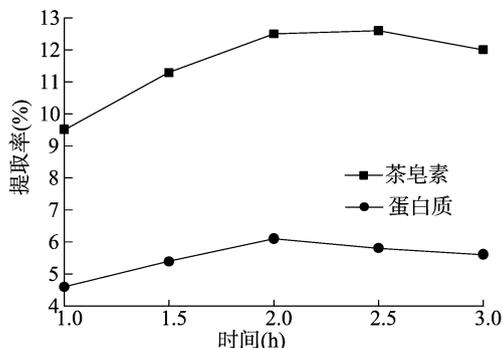


图3 浸提时间对提取率的影响

2.4 浸提温度对提取率的影响

在浸提液固比为 6 mL : 1 g、pH 值为 10、浸提时间为 2 h 的条件下,考虑不同浸提温度对茶皂素和蛋白质提取率的影响,结果如图 4 所示,随着温度的升高,茶皂素和蛋白质的提取率首先有明显提升。至 60 °C 以后,茶皂素提取率稍有降低,由于温度升高,茶皂素的溶解度增加,浸提液中的茶皂素浓度有所增加,同时温度的升高会使溶液的黏度下降,扩散系数增大,这有利于茶皂素的浸出。但是,当浸提温度超过 60 °C 时,蛋白质的提取率明显下降,可能是由于蛋白变性析出导致的。所以选择 55~65 °C 作为后续试验的温度范围。

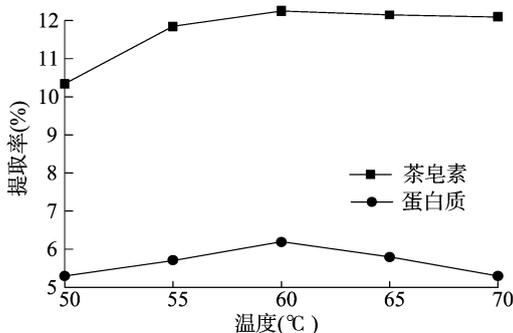


图4 浸提温度对提取率的影响

2.5 浸提液固比对提取率的影响

在浸提时间为 2 h、pH 值为 10、浸提温度为 60 °C 的条件下,考虑不同浸提液固比对茶皂素和蛋白质提取率的影响,结果如图 5 所示,在液固比较小的情况下,茶皂素和蛋白质的浸取率较低,随着液固比的增加,提取率逐渐增加,这是因为随

着液固比的增大,浸提溶剂的量增多,达到溶解平衡时会有更多的蛋白质和茶皂素被提取出来。在液固比较大的情况下,因为蛋白质和茶皂素已基本溶出,且随着液固比的增加,提取率增长很少,而后续浓缩的工作量和能耗增加很多。所以选择(6~8) mL : 1 g 作为液固比参数范围。

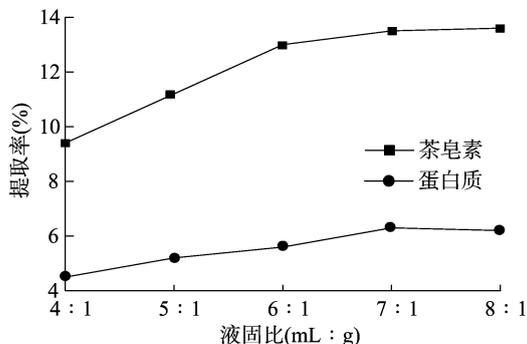


图5 浸提液固比对提取率的影响

2.6 浸提液 pH 值对提取率的影响

在浸提液固比为 6 mL : 1 g、浸提时间为 2 h、浸提温度为 60 °C 的条件下,考虑不同浸提液 pH 值对茶皂素和蛋白质提取率的影响,结果如图 6 所示,茶皂素的提取率首先随着提取液 pH 值的逐渐增大而增大,在 pH 值为 10.0 时,提取率达到最大,随后呈下降趋势。其原因在于茶皂素溶液的 pH 值为 5.5~6.5,偏酸性;当提取液偏碱性时,更容易使茶皂素从茶粕粉末中释放到提取液中,但是当 pH 值过大时,茶皂素在碱性条件下会发生水解,反而使提取液中茶皂素含量降低。随着 pH 值的增大,蛋白质的提取率首先增高,当 pH 值大于 10.0 时,提取率趋于平缓,或有所降低。理论上讲,在碱性范围内,pH 值越高,蛋白质溶出率越高,但是碱性过强会引起蛋白质极端变性,团聚沉降,使水溶性蛋白质含量降低;同时部分蛋白质会发生水解。因此,选择 pH 值为 9~11 作为后续试验的 pH 范围。

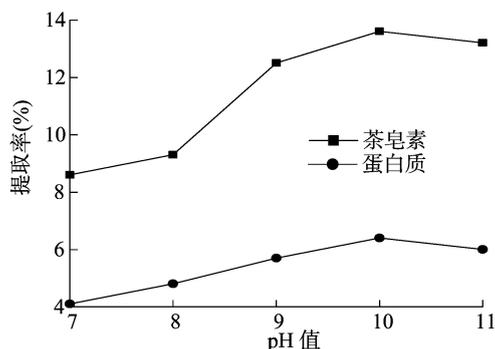


图6 浸提液 pH 值对提取率的影响

2.7 正交试验优化结果与分析

通过对各单因素试验结果的分析,得到正交试验的各因素取值范围。综合考虑,选择浸提时间、液固比、温度、pH 值 4 个因素进行正交试验,设计 3 个水平,因素水平见表 2,正交试验结果见表 3。

根据正交试验结果可知,影响茶皂素、蛋白质提取率因素的主次是不相同的,各因素对茶皂素提取率的影响程度按照 R 值从大到小依次是 pH 值 > 液固比 > 温度 > 时间,各因素对蛋白质提取率的影响程度按照 r 值从大到小依次是 pH

表2 正交设计因素水平

| 水平 | 因素 | | | |
|----|-------------|---------|-------|---------|
| | A:液固比(mL/g) | B:时间(h) | C:pH值 | D:温度(℃) |
| 1 | 6:1 | 2.0 | 9 | 55 |
| 2 | 7:1 | 2.5 | 10 | 60 |
| 3 | 8:1 | 3.0 | 11 | 65 |

值>液固比>时间>温度,其中pH值和液固比对茶皂素、蛋白质的提取率影响较大,温度和时间的影响较小;茶皂素与蛋白质提取的最佳组合条件均为A₂B₂C₂D₃,即液固比为7 mL:1 g、浸提时间为2.5 h、pH值为10、温度为65℃。对提取率最佳组合进行验证发现,茶皂素提取率为13.93%,蛋白质提取率为6.92%。

表3 正交试验及结果

| 成分 | 试验号 | A | B | C | D | 茶皂素提取率(%) | 蛋白质提取率(%) |
|-----|----------------|-------|-------|-------|-------|-----------|-----------|
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10.15 | 4.31 |
| | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 11.89 | 5.68 |
| | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 11.46 | 5.18 |
| | 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 13.49 | 6.41 |
| | 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 13.54 | 6.53 |
| | 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 10.56 | 4.95 |
| | 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 11.32 | 4.85 |
| | 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 12.57 | 5.68 |
| | 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 12.43 | 5.95 |
| 茶皂素 | K ₁ | 33.50 | 34.96 | 33.28 | 36.12 | | |
| | K ₂ | 37.59 | 38.00 | 37.81 | 33.81 | | |
| | K ₃ | 36.32 | 34.45 | 36.33 | 37.68 | | |
| | k ₁ | 11.17 | 11.65 | 11.09 | 12.04 | | |
| | k ₂ | 12.53 | 12.67 | 12.60 | 11.27 | | |
| | k ₃ | 12.11 | 11.48 | 12.11 | 12.56 | | |
| | R | 1.36 | 1.19 | 1.51 | 1.24 | | |
| 蛋白质 | K ₁ | 15.17 | 15.57 | 14.94 | 16.79 | | |
| | K ₂ | 17.89 | 17.89 | 18.04 | 15.48 | | |
| | K ₃ | 16.48 | 16.08 | 16.56 | 17.27 | | |
| | k ₁ | 5.06 | 5.19 | 4.98 | 5.60 | | |
| | k ₂ | 5.96 | 5.96 | 6.01 | 5.16 | | |
| | k ₃ | 5.62 | 5.36 | 5.52 | 5.77 | | |
| | R | 0.90 | 0.77 | 1.03 | 0.61 | | |

3 结论

本研究采用微波预处理法制备茶粕基植物源有机药肥。通过对比试验得出,茶粕粉经过微波预处理后,热水浸提时茶皂素提取率增加,蛋白质提取率略微减少,但改善了过滤操作,产品不会霉变、稳定性好。通过4个因素的单因素试验和正交试验得出,茶皂素与蛋白质提取的最佳组合条件均为液固比7 mL:1 g、浸提时间2.5 h、pH值10、温度65℃。通过验证表明,在最佳条件下,茶皂素提取率为13.93%,蛋白质提取率为6.92%。该工艺为茶粕综合利用提供了新的途径。

参考文献:

[1]陈晓明,王程龙,薄瑞. 中国农药使用现状及对策建议[J]. 农药科学与管理,2016,37(2):4-8.
 [2]王晓飞,王怀利,邹朋,等. 我国药肥发展概况及前景分析[J]. 安徽农业科学,2016,44(25):141-144.
 [3]邱德文. 生物农药的发展现状与趋势分析[J]. 中国生物防治学报,2015,31(5):679-684.

[4]曹涤环. 植物源农药的优点及研究发展趋势[J]. 科学种养,2016,26(4):57-59.
 [5]李梦丹,杨伊磊,陈力力,等. 油茶籽粕的综合利用[J]. 粮食与油脂,2016,29(1):11-14.
 [6]Shen S, Cheng H R, Li X, et al. Effects of extraction methods on antioxidant activities of polysaccharides from camellia seed cake[J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(6):1015-1021.
 [7]郝卫宁,曾勇,胡美英,等. 茶皂素在农药领域的应用研究进展[J]. 农药,2010,49(2):90-93.
 [8]朱俊明,罗凡,王超,等. 水提-醇萃法提取油茶饼粕中茶皂素[J]. 食品工业,2016,37(1):107-109.
 [9]蔡朝容. 水浸法提取油茶饼中茶皂素的水解抑制实验研究[J]. 中国油脂,2012,37(7):75-78.
 [10]张卫国. 茶皂素微波辅助提取新工艺条件研究[J]. 韶关学院学报(自然科学),2011,32(4):45-48.
 [11]彭游,郎少杰,邓泽元,等. 茶皂素微波干法提取与产品开发[J]. 天然产物研究与开发,2009,21(3):1023-1027.