

Study on the Extracting Conditions of Liupao Tea Polysaccharides Based on Response Surface Methodology

Jiashi Xie¹, Junwei Zhang¹, Ting Zhou², Xinmei Wei², Huiyi Cao³, Shouji Gong^{3*}

¹China Tea (Wuzhou) CO., Ltd., Wuzhou Guangxi

²Guilin Medical University, Guilin Guangxi

³Beibu Gulf University, Qinzhou Guangxi

Email: *gong5895801@163.com

Received: Jan. 30th, 2019; accepted: Feb. 13th, 2019; published: Feb. 20th, 2019

Abstract

Objective: To optimize the Liupao tea's polysaccharide extraction process, reduce the blindness of extraction operation, and provide reference for further experimental study. **Methods:** Response surface methodology is used to study extraction of Liupao Tea's polysaccharide. On the basis of single-factor test, the mathematical regression model is established on the independent variables (ratio of water to material, extraction time and extraction temperature) and response value (extraction yield of tea polysaccharides) through Box-Behnken Center combination test and Response Surface Methodology. The various independent variables' interaction and its influence on tea's polysaccharide extraction yield, simulation for quadratic polynomial regression equation prediction model are studied, and the best conditions of tea's polysaccharide extraction process are concluded. **Results:** The best conditions of tea's polysaccharide extraction process are: material to water ratio 1:17, time 83 min, extraction temperature 93°C. Under these conditions, the yield of tea polysaccharide is 8.0%. **Conclusions:** Response surface methodology is feasible to optimize the extraction conditions of Liupao Tea polysaccharides, and can provide reference for further experimental study.

Keywords

Liupao Tea, Tea Polysaccharide, Response Surface Methodology

响应面分析法优化六堡茶茶多糖提取工艺的研究

谢加仕¹, 张均伟¹, 周婷², 韦新美², 曹惠怡³, 龚受基^{3*}

*通讯作者。

¹梧州中茶茶业有限公司, 广西 梧州

²桂林医学院, 广西 桂林

³北部湾大学食品工程学院, 广西 钦州

Email: gong5895801@163.com

收稿日期: 2019年1月30日; 录用日期: 2019年2月13日; 发布日期: 2019年2月20日

摘要

目的: 优化六堡茶茶多糖的提取工艺, 寻找最优方案, 减少提取操作的盲目性, 为进一步的试验研究提供参考。方法: 以响应面分析法考察热水浸提提取茶多糖试验, 在单因素试验的前提下, 选择液料比、提取时间、提取温度为自变量, 以茶多糖的提取率为响应值, 根据Box-Behnken中心组合试验与响应面分析法, 研究各个自变量的交互作用与其对茶多糖提取率的影响, 模拟得出二次多项式回归方程预测模型, 从而确定茶多糖提取工艺的最佳条件。结果: 六堡茶茶多糖提取工艺的最佳条件为料液比1:17, 提取时间83 min, 提取温度93℃。在此条件下, 六堡茶茶多糖的提取率达到8.0%。结论: 采用响应面分析法对六堡茶茶多糖提取条件的优化是可行的。

关键词

六堡茶, 茶多糖, 响应面分析法

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

区别于其他茶叶品种, 黑茶经过独有的后发酵工艺, 风味独特, 保健功效卓越。六堡茶属于黑茶家族重要成员, 得名于产区广西梧州市苍梧县六堡乡, 其茶外形光润黑褐, 汤色浓红, 味醇甘爽, 以“红、浓、陈、醇”著称。历史上民间以六堡茶防治多种病疾, 调理身体, 解渴除腻, 消积养胃, 其功能渐渐为消费者熟知, 神秘面纱慢慢揭开。

黑茶中茶多糖(TPS)具有一定生理活性, 如降低血脂血糖、增强免疫力、抗肿瘤、抗凝血、抗动脉粥样硬化、抗血栓、增加冠脉流量、减慢心率等, 是黑茶主要活性物质之一[1][2][3]。

茶多糖易溶于热水, 可以利用热水对茶多糖进行提取, 通过对提取条件的优化, 促进茶多糖从茶叶溶出。不同研究者对水浸提茶多糖的料液比、提取温度、浸提时间进行了研究, 研究结果因茶叶品种和研究者不同而存在差异[4][5][6][7]。利用正交试验法研究优化提取茶多糖条件存在实验次数过多, 数值不能超过所选取范围水平等优点, 难免美中不足。本研究采用单因素试验研究六堡茶茶多糖的提取工艺, 并通过二次响应面分析法优化, 确定六堡茶茶多糖的提取工艺条件, 克服了上述缺点。

2. 材料

六堡茶为梧州中茶茶业有限公司三年陈窖藏产品。

紫外分光光度计, 日本岛津公司 250IPC; 电子分析天平, 瑞士 METTLER 公司 METTLER-XS205;

80-2B 台式离心机, 上海精密仪器仪表有限公司产品。

所用试剂均为分析纯。

3. 方法

3.1. 茶多糖的制备

参考绿茶、普洱茶茶多糖提取方法[5] [7]略加修改, 确定六堡茶茶多糖提取影响因子, 利用热水浸提, 过滤收集滤液, 经旋转蒸发浓缩至初始体积 1/5, 添加 3 倍量无水乙醇, 混合均匀静置过夜, 离心(5000 r/min, 10 min)收集沉淀, 用无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯先后各洗涤 3 次, 得精制茶多糖。

茶多糖采用蒽酮 - 硫酸法进行含量测定[8], 按下式计算茶多糖提取率:

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

式中 C 供试液中的葡萄糖浓度(mg/mL); D 多糖的稀释因素; f 换算因子; W 供试茶叶的重量(mg)。

3.2. 单因素试验

单因素试验设定三因素分别为料液比、提取温度、浸提时间。考察三因素对茶多糖提取率的影响。先固定提取温度为 80℃, 浸提时间 90 min, 提取 1 次, 料液比分别为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50; 然后固定料液比 1:20, 浸提温度 80℃, 提取 1 次, 浸提时间分别为 30 min、60 min、80 min、90 min、120 min、140 min; 最后固定液料比 1:20, 浸提时间 90 min, 提取 1 次, 浸提温度分别为 40℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃。

3.3. 试验设计

根据 Box-Behnken Design 试验的设计原理, 综合了单因素试验的结果分析, 选取料液比(X1)、浸提温度(X2)、浸提时间(X3)三因素作为试验的自变量, 茶多糖提取率作为响应值, 并根据单因素试验的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如下表 1。

Table 1. Factors and levers of response surface test

表 1. 响应面因素水平编码表

因素	代码	-1	0	1
料液比(g/mL)	X1	1:10	1:20	1:30
温度(℃)	X2	70	80	90
时间(min)	X3	80	90	100

3.4. 数据分析方法

每个实验进行 3 次重复, 以茶多糖提取率为响应值进行统计。单因素结果采用 EXCEL 进行统计分析, 响应面实验结果采用 Design-Expert 软件自带系统进行分析。

4. 结果与分析

4.1. 换算因子的测定

精密称取 45℃真空干燥至恒重的精制茶多糖 0.022 g, 置于 50 mL 容量瓶中, 加入蒸馏水并稀释至刻度, 90℃水浴加热, 超声波功率 420 W 条件下作用 10 min 助溶, 摇匀, 得茶多糖贮备液, 采用蒽酮 - 硫

酸比色法测定其吸光度(A)。使用回归方程求出此精制茶多糖贮备液中相对葡萄糖的含量,按下式计算其换算因子。取等量的 10 mL 浓缩液 2 份,经过醇沉洗涤后,一份直接加入蒸馏水,然后定容,比色,测定其多糖含量;另一份经过真空干燥至恒重,称得精制茶多糖的干重,由二者计算出的换算因子求平均值。

$$\text{换算因子} f = W / (C * D)$$

式中: W 为称取茶多糖的重量(mg), C 为精制茶多糖贮备液中葡萄糖浓度(mg/mL), D 为多糖的稀释因素,换算因子见表 2。

Table 2. Conversion factor

表 2. 换算因子

	吸光度	换算因子	平均值
直接加蒸馏水	0.572	259.55	259.54
干燥至恒重	0.422	259.53	

4.2. 单因素试验结果

4.2.1. 料液比对茶多糖提取率的影响

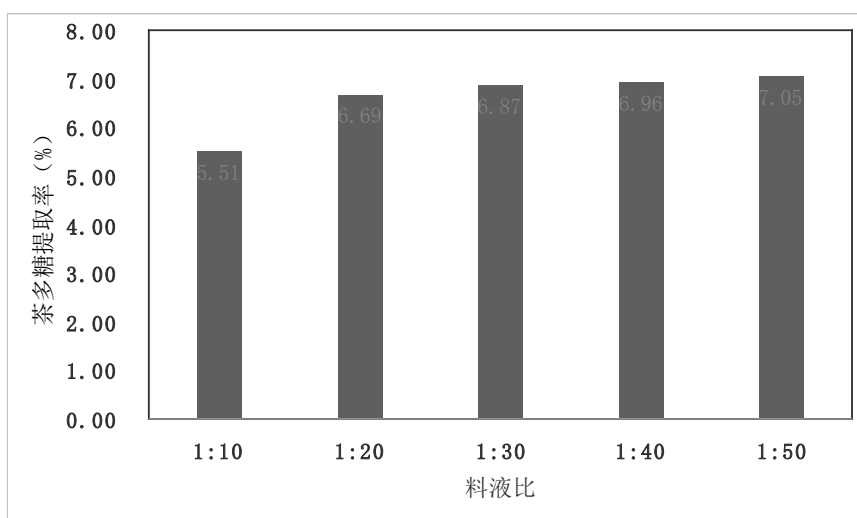


Figure 1. Effects of ratio of material to water on extraction rate of Liupao Tea's polysaccharide

图 1. 料液比对茶多糖提取率的影响

从图 1 可知,在 1:10~1:50 范围内,随着料液比的增大,茶多糖的得率缓慢上升,但从 1:20 开始茶多糖得率增长趋于平缓。料液比增大会增加能耗和操作成本,从实际生产效益考虑,料液比 1:20 左右较为适宜,故选取 1:20 为响应面分析法中自变量液料比(X1)为零水平。

4.2.2. 提取温度对茶多糖提取率的影响

提取温度对茶多糖提取率具有较大的影响,见图 2,提取温度低于 80℃时,随着温度的升高茶多糖的提取率逐渐升高,大于 80℃后,茶多糖的提取率渐趋平衡。故选取 80℃作为响应面分析法中自变量温度(X2)的零水平。

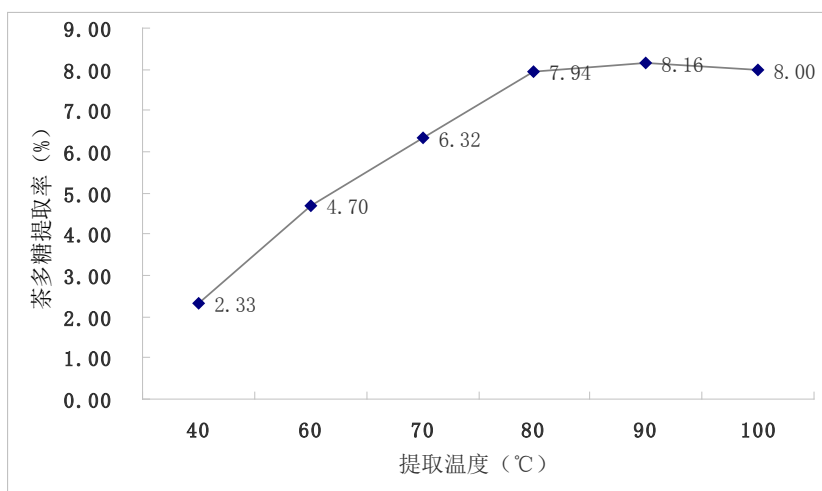


Figure 2. Effects of extraction temperature on extraction rate of Liupao Tea's polysaccharide

图 2. 提取温度对茶多糖提取率的影响

4.2.3. 提取时间对茶多糖提取率的影响

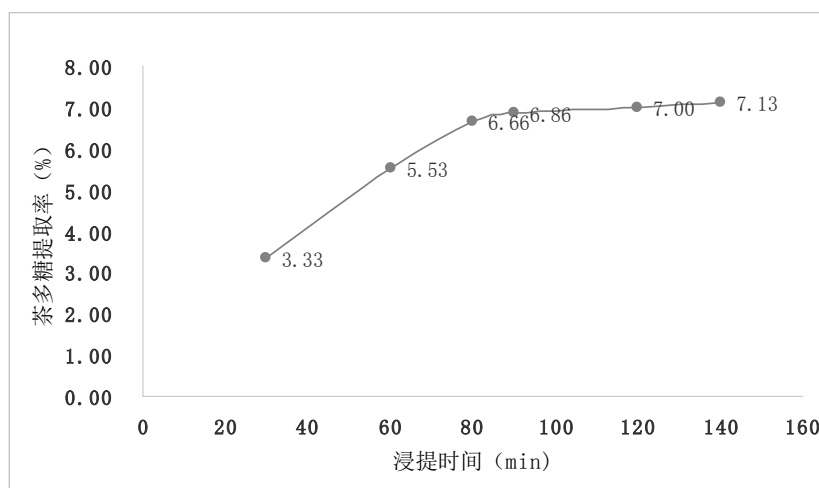


Figure 3. Effects of extraction time on of extraction rate of Liupao Tea's polysaccharide

图 3. 提取时间对茶多糖提取率的影响

提取时间对茶多糖提取率的影响见图 3, 提取时间在 30~90 min 内, 茶多糖的提取率随时间增加而升高, 在 90~140 min 内, 提取率提高速率减小, 渐趋平衡。说明茶多糖的提取率跟时间有着密切关系, 提取时间较短茶多糖溶出不充分; 提取时间过长, 茶多糖溶出充分, 但其他水溶性杂质也容易游离出来, 同时能源耗费也越多, 多糖的最佳提取时间应在 90 min 左右, 选取 90 min 作为自变量时间(X3)的零水平。

4.3. 响应面试验安排及试验结果

把试验点分为零点和析因点, 零点为区域中心点, 重复试验 3 次, 供评估分析试验误差用; 析因点包括自变量取值为 X1、X2、X3 所构成的三维顶点, 为实验中所选取的试验点; 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 设计三因素三水平总共 15 个试验点的响应面分析试验。

Table 3. Test design and results of response surface analysis**表 3.** Box-Behnken 设计方案及试验结果

试验号	编码水平			茶多糖提取率(%)
	X1	X2	X3	
1	1	1	0	7.13
2	0	0	0	7.77
3	0	-1	-1	4.98
4	0	-1	1	6.17
5	1	0	-1	7.02
6	-1	-1	0	5.18
7	-1	1	1	6.66
8	1	0	1	7.10
9	1	1	0	7.13
10	-1	0	-1	5.33
11	0	1	1	7.26
12	1	-1	0	5.71
13	0	0	0	7.98
14	0	1	-1	6.27
15	0	0	0	7.65

Box-Behnken Design 试验结果见表 3 所示, 各个因素经过回归拟合后, 试验因子对响应值的影响可以用回归方程表示,

$$Y = 7.80 + 0.39A + 0.66B + 0.45C - 0.020AB - 0.31AC - 0.050BC - 0.63A^2 - 0.99B^2 - 0.64C^2,$$

其中 Y 为茶多糖提取率, A 是液料比, B 是提取温度, C 是浸提时间。

Table 4. Estimate value of partial regression coefficient of regress equation**表 4.** 回归模型系数及显著性检验结果

项目	系数	系数标准误差	P 值
常量	7.8	0.15	0.0019
X1	0.39	0.091	0.0079
X2	0.66	0.091	0.0008
X3	0.45	0.091	0.0044
X1 ²	-0.63	0.13	0.0052
X2 ²	-0.99	0.13	0.0007
X3 ²	-0.64	0.13	0.0050
X1X2	-0.020	0.13	0.8827
X1X3	-0.31	0.13	0.0596
X2X3	-0.050	0.13	0.7138

依据 P 值判断模型的显著性(P < 0.05 显著, P < 0.001 非常显著), 显著性代表模型对各因素与茶多糖提取率相互关系可靠性的评价。由表 4 中可以看出, 各因素中一次项 X2 与二次项 X2² 为非常显著, 对茶多糖提取率影响很大, X、X3、X1²、X3² 的 P 值为显著, 说明对茶多糖提取率的影响也较大, 具有统计学意义。

Table 5. Variance analysis of regression equation
表 5. 回归方程方差分析表

来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
回归	9	12.55	139	21.00	0.0019
残差误差	5	0.33	0.066		
失拟	3	0.28	0.092	3.30	
纯误差	2	0.056	0.028		
合计	14	12.87			
S = 0.26	$R^2 = 0.9742$	$R^2_{(Adj)} = 0.9278$			

从表 5 方差分析表可知, 校正系数 $R^2_{(adj)}$ ($0.9278 > 0.80$), 该模型只有 7.22% 的变异, 说明模型拟合度较好, 可以用来对实验研究进行分析和预测。

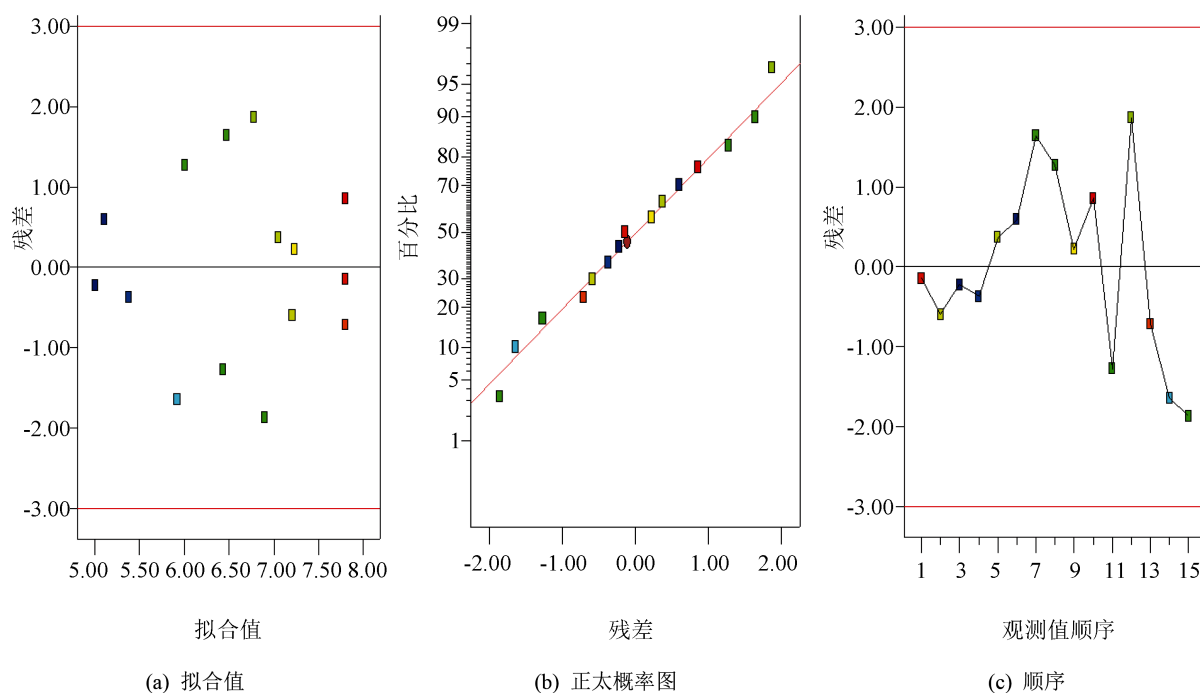


Figure 4. Analysis of lack of fit on extraction rate of Liupao Tea's polysaccharide
图 4. 茶多糖提取率残差分析图

对响应数据茶多糖提取率进行残差分析, 残差值分析结果见图 4, 表明模型能在很大程度上解释观测数据中的变化。

根据回归方程作出响应面分析图和等高线图, 见图 5~7。

模型等高线和立体分析图非常直观地展现各个因子相互作用的影响, 从图 5~7 可以看出, 在所选的范围内回归模型存在最大值。浸提温度和液料比交互作用立体图曲线最陡峭, 等高线的椭圆弧度最大, 这说明了两者的交互作用效应最为显著。浸提时间和液料比交互作用立体图曲线较平滑, 等高线趋于圆形, 说明了交互最不明显。浸提温度和时间交互作用立体图曲线平滑, 等高线趋于圆形, 说明两者的交互不显著。运用 Design-Expert 软件的分析, 得出最佳提取工艺为: 液料比为 1:17, 浸提温度为 83°C , 浸提时间为 93 min, 理论预测茶多糖得率为 7.77%。

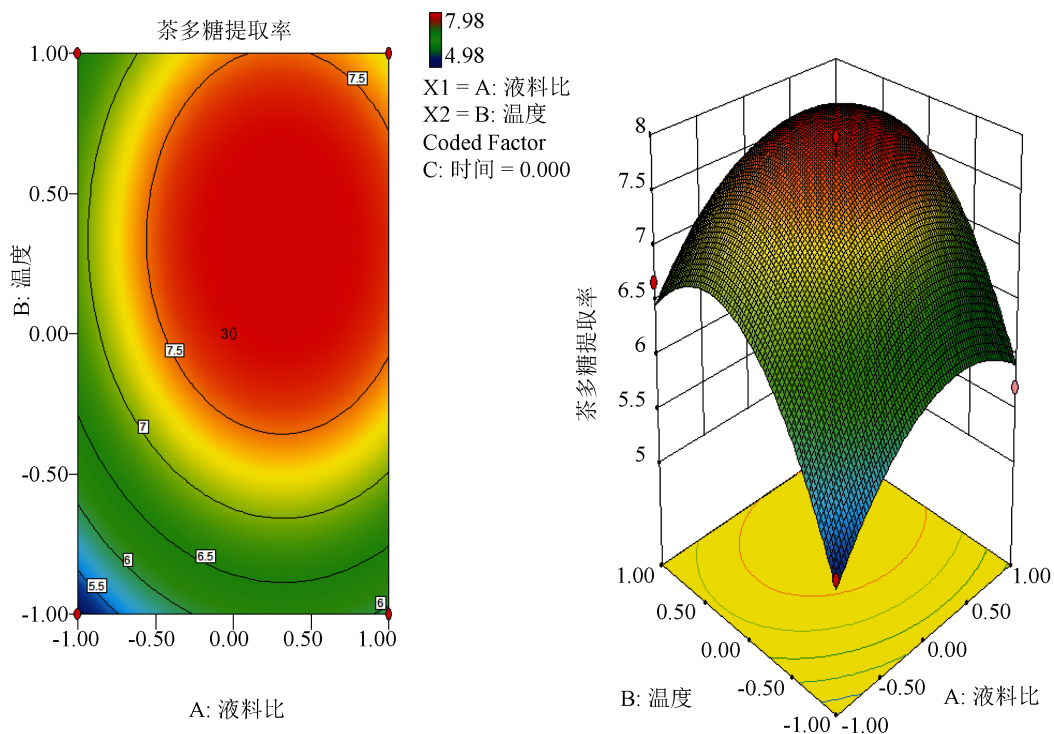


Figure 5. Response surface and contour plot for effects of the ratio of solvent to material and extraction temperature on extraction rate of Liupao Tea's polysaccharide
图 5. 响应面法(液料比、温度)等高线图及立体分析图

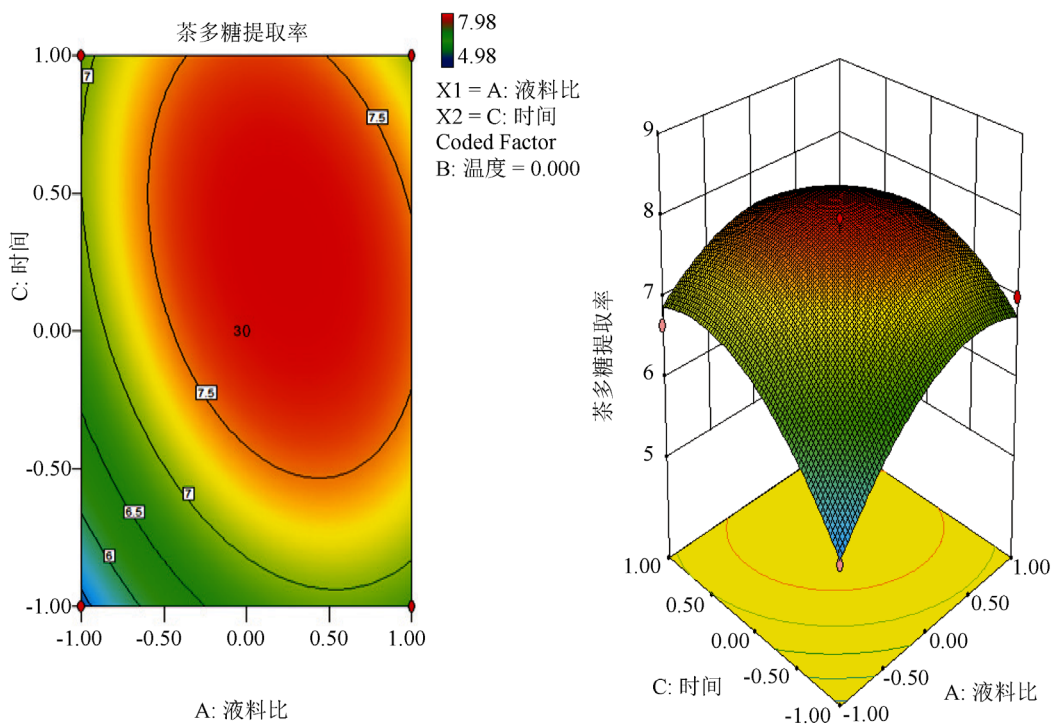


Figure 6. Response surface and contour plot for effects of the ratio of solvent to material and extraction time on extraction rate of Liupao Tea's polysaccharide
图 6. 响应面分析法(液料比、时间)等高线图及立体分析图

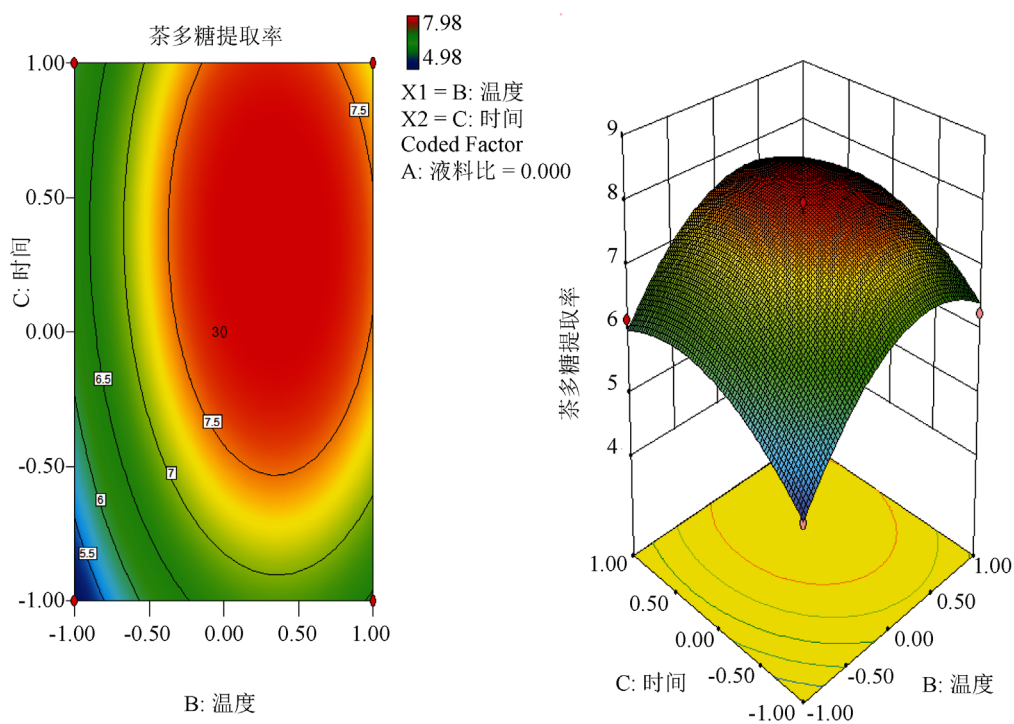


Figure 7. Response surface and contour plot for effects of extraction temperature and extraction time on extraction rate of Liupao Tea's polysaccharide

图 7. 响应面分析法(温度、时间)等高线及立体分析图

4.4. 验证试验

为验证模型在优化六堡茶茶多糖提取工艺的符合程度, 回归方程优化提取条件下重复 3 次实验, 比较了实验值和预测值的吻合程度, 平均茶多糖的得率为 7.8%, 与理论值吻合程度比较好, 说明回归方程和实际情况拟合较好, 能够在实验中使用该模型。

5. 结论

依据单因素试验的结果, 液料比在 1:10~1:20, 浸提温度在 40℃~80℃, 浸提时间为 30~90 min 时, 六堡茶茶多糖提取率与工艺参数成正相关。基于试验设计软件采用响应面分析法优化提取参数, 最佳的六堡茶茶多糖提取工艺参数料液比为 1:17, 浸提时间为 93 min, 浸提温度为 83℃, 理论预测值的茶多糖提取率为 8.0%, 实际试验值是 7.8%。工艺条件与文献比较, 略有差异[7] [9], 说明不同茶叶品种, 最佳提取条件、提取率都会存在差异。利用响应面分析法对六堡茶茶多糖提取工艺进行优化, 可以获得最佳工艺参数, 进而能有效减少提取操作的盲目性, 能为进一步的试验研究提供参考。

基金项目

《中茶窖藏六堡茶对高血糖血症的研究》/广西高校科学技术研究项目(KY2015ZD086)/钦州学院校级科研项目(2017KYQD223)。

参考文献

- [1] Xu, R., Ye, H., Sun, Y., *et al.* (2012) Preparation, Preliminary Characterization, Antioxidant, Hepatoprotective and Antitumor Activities of Polysaccharides from the Flower of Tea Plant (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 2473-2480. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.047>

- [2] 张黎, 杨艳. 茶多糖药理活性研究进展[J]. 中国实用医药, 2013, 8(16): 255-257.
- [3] 栗志文, 王媛媛, 等. 普洱茶提取物与绿茶提取物降糖功效的研究[J]. 茶叶科学, 2014(5): 428-434.
- [4] Chen, H.X., Qu, Z.S., Fu, L.L., *et al.* (2009) Physicochemical Properties and Antioxidant Capacity of 3 Polysaccharides from Green Tea, Oolong Tea, and Black Tea. *Journal of Food Science*, **74**, 469-472.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01231.x>
- [5] 罗玲, 周斌星, 郭威, 等. 普洱茶茶多糖的提取工艺的响应面分析研究(英文) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(30): 263-266.
- [6] 杨新河, 黄建安, 刘仲华, 等. 树脂对普洱茶多糖的纯化与分离[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 19-24.
- [7] 张彬, 谢明勇, 殷军艺, 等. 响应面分析法优化超声提取茶多糖工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 234-238.
- [8] Laurentin, A. and Edwards, C.A. (2003) A Microtiter Modification of the Anthrone-Sulfuric Acid Colorimetric Assay for Glucose-Based Carbohydrate. *Analytical Biochemistry*, **315**, 143-145.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00704-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00704-2)
- [9] 武晓英, 侯冬岩, 回瑞华. 黑茶中茶多糖含量的测定[J]. 鞍山师范学院学报, 2011, 13(2): 36-38.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-613X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjfs@hanspub.org