

复合酶法提取红茶粗多糖的工艺优化研究

王 昕¹, 李新生^{1, 2, 3*}, 付 静^{1, 2, 3}, 韩 豪^{1, 2}, 赵 璇¹, 米 桂¹

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室, 汉中 723000;
3. 陕西理工学院秦巴红茶研究所, 汉中 723000)

摘 要: **目的** 提高茶叶中粗多糖的提取率。**方法** 以汉中红茶为原料, 采用复合酶(纤维素酶、果胶酶)法提取粗多糖。在单因素试验的基础上, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优化了复合酶添加量, 提取温度, pH 值和料液比等工艺参数。**结果** 影响粗多糖得率的因素依次为提取温度(B)>复合酶添加量(A)>pH 值(C)>料液比(D), 最佳提取工艺参数为复合酶(果胶酶:纤维素酶=2:1)添加量 0.8%, 提取温度 50 ℃, pH 值 4.0, 料液比 1:25。在此条件下粗多糖的平均得率为 5.97%, 是水提法的 2.61 倍。**结论** 该研究优化的工艺参数具有提取效率高、提取温度低的特点。

关键词: 红茶; 粗多糖; 复合酶法; 工艺优化

Optimal extraction of coarse polysaccharides from black tea by composite enzymes method

WANG Xin¹, LI Xin-Sheng^{1, 2, 3*}, FU Jing^{1, 2, 3}, HAN Hao^{1, 2}, ZHAO Xuan¹, MI Gui¹

(1. School of Bioscience and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China;
2. Bio-Resource Key Laboratory of Shaanxi Province, Hanzhong 723000, China;
3. Qinba Black Tea Research Institute, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

ABSTRACT: Objective To improve the extraction rate of the coarse polysaccharides. **Methods** Coarse polysaccharides were extracted from Hanzhong black tea by using composite enzymes (cellulose enzyme and pectinase). Based on the single factor experiments, the optimum conditions of the amount of composite enzymes, the extracting temperature, the pH and the solid-liquid ratio were optimized by orthogonal design $L_9(3^4)$. **Results** The impact factors were as follows: the extracting temperature(B)>the amount of composite enzymes(A)>the pH(C)>the solid-liquid ratio(D). The optimized process parameters were the amount of composite enzymes 0.8%, the extracting temperature 50 ℃, the pH 4.0, the solid-liquid ratio 1:25. Under the above conditions, the extraction rate of coarse polysaccharides reached to 5.97%, which was 2.61 times compared with the extraction by water. **Conclusion** The optimized process parameters have the characteristics of the higher efficiency and the lower extracting temperature.

KEY WORDS: black tea; polysaccharides; composite enzymes method; optimization of process

基金项目: 陕西省教育厅项目(11JS031)

Fund: Supported by the Project of Shaanxi province Department of Education (11JS031)

*通讯作者: 李新生, 教授, 主要研究方向为生物资源开发利用。E-mail: lxs9@tom.com

*Corresponding author: LI Xin-Sheng, Professor, School of Bioscience and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China. E-mail: lxs9@tom.com

1 引言

多糖是茶叶的重要活性成分之一, 是醛糖和(或)酮糖通过 α -或 β -糖苷键连接在一起的天然聚合物, 主要由葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、木糖、半乳糖及鼠李糖等组成聚合度大于 10 的多聚糖构成, 并且与蛋白质紧密结合^[1], 具有降血糖、降血脂、增强免疫力、降血压、减慢心率、增加冠脉流量、抗凝血、抗血栓和耐缺氧等功效^[2,3], 可广泛应用于医药、食品等行业。近年来, 人们对茶多糖提取方法的研究越来越深入, 除了传统的水提法外, 还有一些辅助提取法, 如超声波辅助提取法, 微波辅助提取法, 酶辅助提取法等。王超等^[4]利用水提法研究了茶多糖的提取条件, 陈仕学等^[5]利用超声波辅助法研究了石阡苔茶多糖的最佳提取工艺, 林志奎等^[6]利用微波辅助法研究了白毫银针茶毫中茶多糖的工艺优化。

汉中属古老的巴蜀茶区, 是中国茶的原生地和中国茶文化发祥地之一, 有着三千余年生产贡茶、官茶的历史^[7]。这里气候温和, 雨量丰沛, 被公认为地球上同纬度最适合茶树生长的地方。近年来, 汉中充分利用当地茶树资源, 推广“一园、三季、两茶”的生产模式, 实现了茶叶总产量和总产值的突破。为充分利用红茶加工过程中的碎末茶、粗老茶, 提高低档红茶的经济价值, 拓展茶叶应用领域, 延伸汉中茶产业链, 有必要对汉中红茶进行精深加工研究。本研究以汉中红茶为材料, 采用复合酶(纤维素酶、果胶酶)法

提取粗多糖, 用正交实验对影响红茶粗多糖提取具有显著影响的 4 个因素(复合酶添加量、温度、pH 值、料液比)进行优化, 获得了最佳提取工艺, 提高了红茶粗多糖的得率。

2 材料与方法

2.1 试验材料

红茶样品: 在汉中市南郑县汉山茶厂, 经日光萎凋、揉捻、发酵、烘干等工艺制成红茶, 装入锡箔纸袋密封常温保存。

2.2 试剂与仪器

2.2.1 试剂

纤维素酶(300 U/mg)、果胶酶(>20 U/mg)(西安热默尔生物科技有限公司); 重蒸苯酚(北京索莱宝科技有限公司); 葡萄糖、柠檬酸、柠檬酸钠、浓硫酸、活性炭(天津市科密欧化学试剂有限公司, 均为分析纯)。

2.2.2 仪器

UV-1750 型紫外-可见分光光度计(日本岛津仪器公司); DZKW-S-4 型水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂); SHZ-D(III)型循环水式真空泵(天津华鑫仪器厂); 101-OES 型电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗仪器); PHS-3C 型酸度计(天顺化玻); BSA224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

2.3 试验方法

2.3.1 提取路线

红茶 → 粉碎过 80 目筛 → 称取 4 g 茶样 → 加 80 mL 水, 40 °C 水浴回流浸提 1 h
 → 抽滤, 滤渣用热蒸馏水洗涤两次 → $\left\{ \begin{array}{l} \text{水浸提液 I} \\ \text{滤渣} \rightarrow \text{加入复合酶, 用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液浸提} \end{array} \right.$
 → 调 pH 至中性, 煮沸灭酶 → 抽滤, 滤渣用热蒸馏水洗涤
 两次 → $\left\{ \begin{array}{l} \text{酶提滤液 II} \rightarrow \text{合并滤液 I 和 II} \rightarrow \text{用活性炭脱色} \rightarrow \text{测粗多糖含量} \\ \text{滤渣} \rightarrow \text{弃去} \end{array} \right.$

2.3.2 吸收波长选择

精密吸取粗多糖提取液和葡萄糖标准溶液各 2 mL, 分别置于 25 mL 具塞试管中, 依次加入 6% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 随后快速加入 5 mL 浓硫酸, 静置 10 min 后摇匀, 30 °C 水浴 20 min 后, 在波长 400~800 nm 范围进行扫描, 测最大吸收波长。

2.3.3 标准曲线建立

精密称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 0.5000 g, 置于 500 mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 配成 1 mg/mL 母液, 然后分别移取 1、2、4、6、8 mL 标准溶液, 置于 100 mL 容量瓶中稀释至刻度, 摇匀, 配成 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 mg/mL 的系列标

准葡萄糖溶液,精密吸取各浓度梯度溶液 2 mL 分别置于 25 mL 加塞试管中,加入 6%苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,随后快速加入 5 mL 浓硫酸,静置 10 min 后摇匀,30 ℃水浴 20 min 后,在最大吸收波长处测其吸光值,建立标准曲线,求得曲线方程。

2.3.4 样品粗多糖测定

按 2.3.1 方法提取粗多糖后,精密吸取 2 mL 提取液,按 2.3.3 中的方法反应后,测其吸光值。根据标准曲线方程换算样品浓度($C_{\text{样}}$),并按下列公式计算样品中粗多糖含量。葡萄糖在粗多糖中所占比例约为 18.70%,计算粗多糖含量乘以换算因子 5.348^[8]。茶叶中水分测定按照国家标准测定^[9]。

$$\text{粗多糖含量}(\%) = \frac{C_{\text{样}} \times V_{\text{样}} \times b \times h}{M_{\text{样}} \times m} \times 100\%$$

式中: $C_{\text{样}}$ ——根据标准曲线方程换算样品测试液浓度,mg/mL;

- $V_{\text{样}}$ ——样品测试液体积, mL;
- b ——样品稀释倍数;
- h ——换算因子, 5.348;
- $M_{\text{样}}$ ——样品称量质量, mg;
- m ——样品的干物质含量, %。

2.4 单因素试验

将试验样品汉中红茶粉碎,过 80 目筛,称取 4 g,加水 80 mL,采用 2.3.1 路线,设置复合酶(果胶酶:纤维素酶)比例(3:1、2:1、1:1、1:2、1:3),复合酶添加量(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%),提取温度(30、35、40、45、50 ℃),pH 值(4.0、4.5、5.0、5.5、6.0),酶提时间(1、1.5、2、2.5、3 h),料液比(1:15、1:20、1:25、1:30)进行单因素试验,确定最佳复合酶比例、复合酶添加量、提取温度、pH 值、酶提时间、料液比。

2.5 正交试验

根据单因素实验结果,选取在复合酶(果胶酶:纤维素酶)比例 2:1,提取时间 2.5 h 的条件下,对红茶粗多糖提取影响显著的 4 个因素(复合酶添加量、提取温度、pH 值、料液比)进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,优化复合酶法提取红茶粗多糖的工艺参数。

3 结果与分析

3.1 最大吸收波长选择结果

按 2.3.2 的方法,测得的粗多糖提取液和葡萄糖标准液分别在 486、488 nm 处吸光值最大,故选择 488 nm 为最大吸收波长,见图 1。

3.2 标准曲线绘制

按 2.3.3 方法配制葡萄糖标准溶液,在 488 nm 波长下测其吸光值,绘制标准曲线,求得回归曲线方程: $Y=15.53X+0.0097$ ($r^2=0.9993$, $n=5$),见图 2。

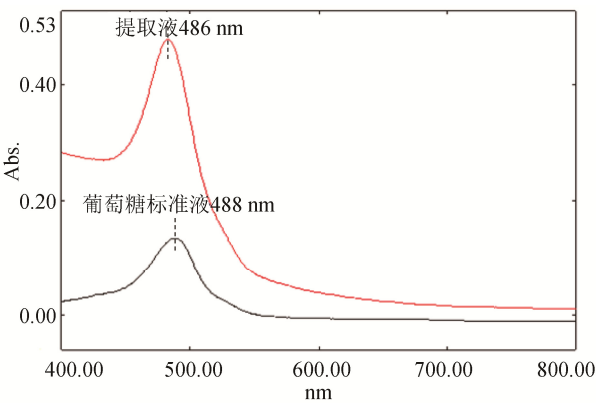


图 1 葡萄糖和粗多糖样品紫外-可见光扫描图
Fig. 1 UV absorption scan spectrum of glucose and coarse polysaccharide samples

表 1 正交试验因素及水平
Table 1 The factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 复合酶添加量(%)	B 提取温度(℃)	C pH 值	D 料液比
1	0.6	40	4	1:20
2	0.8	45	4.5	1:25
3	1.0	50	5	1:30

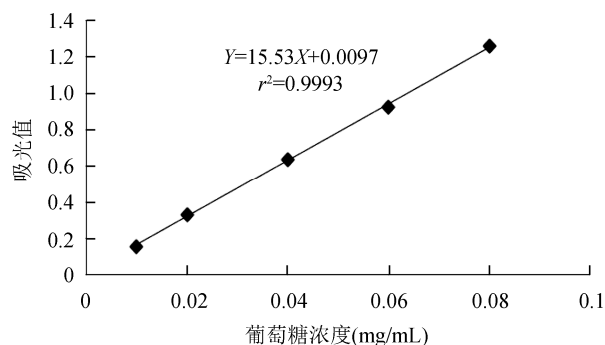


图 2 葡萄糖标准曲线及回归方程

Fig. 2 Standard curve of the glucose and regression equation

3.3 单因素试验结果

3.3.1 复合酶比例对粗多糖提取率的影响

与不加酶的对照组相比, 添加复合酶能显著提高粗多糖的提取率。但复合酶比例对粗多糖提取率的影响较小。在果胶酶:纤维素酶=2:1 时, 提取率相对较高, 因此选用果胶酶:纤维素酶=2:1 为最佳复合酶比例, 见图 3。

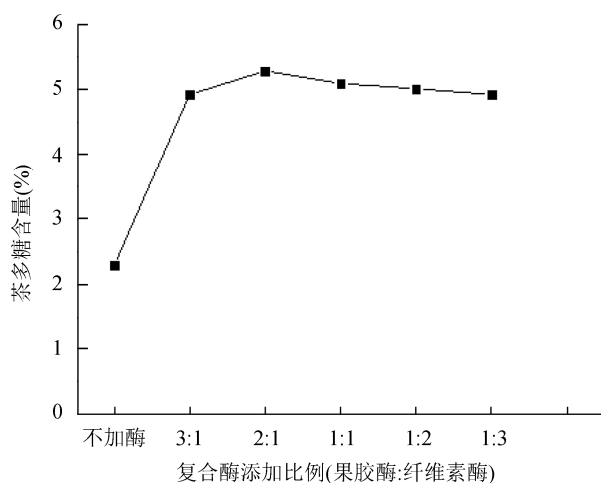


图 3 复合酶比例对粗多糖提取率的影响

Fig. 3 Effects of compound enzyme proportion on the coarse polysaccharides extraction rates

3.3.2 复合酶添加量对粗多糖提取率的影响

粗多糖的提取率随复合酶添加量增加而逐渐增加, 当添加量达到 0.8% 后, 提取率趋于平缓, 综合成本因素, 选择 0.8% 为适宜复合酶添加量, 见图 4。

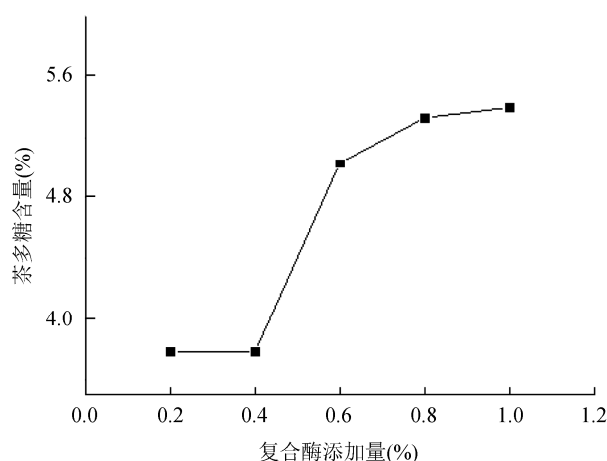


图 4 复合酶添加量对粗多糖提取率的影响

Fig. 4 Effects of compound enzyme additive amount on the coarse polysaccharides extraction rates

3.3.3 提取温度对粗多糖提取率的影响

粗多糖的提取率随温度的增加呈现先增加后下降的变化趋势, 45 °C 时达到最高, 见图 5。

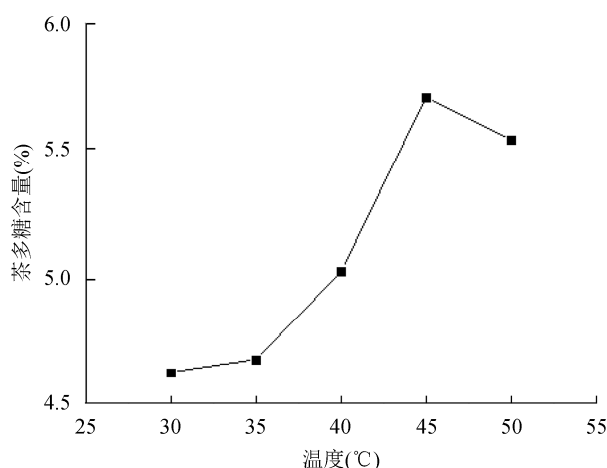


图 5 提取温度对粗多糖提取率的影响

Fig. 5 Effects of compound enzyme extracting temperature on the coarse polysaccharides extraction rates

3.3.4 pH 值对粗多糖提取率的影响

当 pH 值为 4.5 时, 提取率最高, 之后随着 pH 值的增大, 提取率逐渐下降, 见图 6。

3.3.5 酶提时间对粗多糖提取率的影响

粗多糖的提取率随酶提时间的增加而逐渐增加, 当时间达到 2.5 h 后, 提取率趋于平缓, 综合效率因素, 选择 2.5 h 为最佳酶提时间, 见图 7。

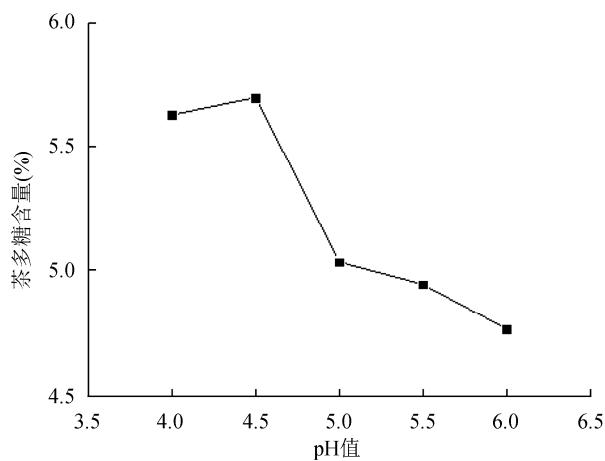


图 6 pH 值对粗多糖提取率的影响

Fig. 6 Effects of compound enzyme extracting pH on the coarse polysaccharides extraction rates

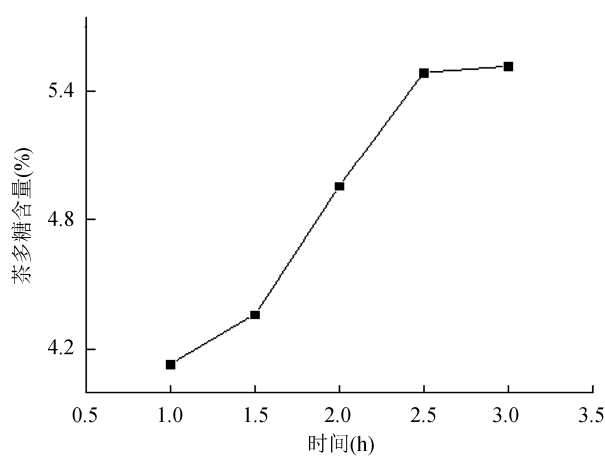


图 7 酶提时间对粗多糖提取率的影响

Fig. 7 Effects of compound enzyme extracting time on the coarse polysaccharides extraction rates

3.3.6 料液比对粗多糖提取率的影响

粗多糖的提取率随料液比的增加而逐渐增加,当料液比为 1:25 时,提取率最高,之后逐渐下降,见图 8。

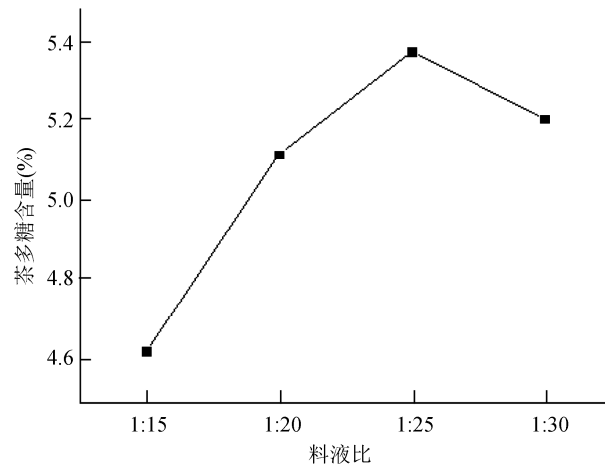


图 8 料液比对粗多糖提取率的影响

Fig. 8 Effects of solid-liquid ratio on the coarse polysaccharides extraction rates

3.4 正交试验结果

由表 2 极差数据 R 可见, 4 个因素对粗多糖得率的影响主次顺序依次为酶解温度(B) > 复合酶添加量(A) > pH 值(C) > 料液比(D)。综合分析正交试验结果, 确定最佳工艺条件为 $A_2B_3C_1D_2$ 。即: 复合酶添加量 0.8 %, 提取温度 50 ℃, pH 值 4.0, 料液比 1:25。

由表 3 方差分析得知, 酶解温度, 复合酶添加量在 5%水平上存在显著性差异, 因此影响粗多糖提取率主要因素为提取温度和复合酶添加量。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验及其结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

实验号	A 复合酶添加量(%)	B 提取温度(℃)	C pH 值	D 料液比	红茶粗多糖提取率(%)
1	0.6	40	4	1:20	4.98
2	0.6	45	4.5	1:25	5.25
3	0.6	50	5.0	1:30	5.35
4	0.8	40	4.5	1:30	5.08
5	0.8	45	5.0	1:20	5.54
6	0.8	50	4	1:25	5.95
7	1.0	40	5	1:25	5.17
8	1.0	45	4	1:30	5.69
9	1.0	50	4.5	1:20	5.86
k_1	5.193	5.077	5.540	5.460	
k_2	5.523	5.493	5.397	5.457	
k_3	5.573	5.720	5.353	5.373	
R	0.380	0.643	0.187	0.087	

表 3 方差分析结果
Table 3 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
<i>A</i>	0.256	2	7.211	6.940	*
<i>B</i>	0.639	2	18.000	6.940	*
<i>C</i>	0.057	2	1.606	6.940	
<i>D</i>	0.014	2	0.394	6.940	
误差	0.07	4			

注: *表示 $P>P_{(0.05)}$, 该因素在 5%水平上存在显著性差异。

表 4 验证性实验结果($n=5$)
Table 4 Results of replication experiment($n=5$)

样品编号	粗多糖提取率(%)	平均值(%)	变异系数(%)
1	5.87	5.97	1.15
2	6.04		
3	5.96		
4	5.95		
5	6.02		
对照组	2.29		

3.5 验证性实验

依据优化的提取工艺参数, 精确称取 5 份过 80 目筛的汉中红茶粉 4 g, 加水 80 mL, 热水回流浸提 1 h 后过滤, 滤渣加入 0.8%的复合酶(果胶酶:纤维素酶=2:1), 加入 100 mL pH 4.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 提取温度 50 ℃, 提取时间 2.5 h。如表 4 所示, 结果表明: 粗多糖的平均提取率为 5.97%, 变异系数为 1.15%, 是对照组未优化水提法的 2.61 倍。说明本优化工艺合理, 见表 4。

4 结论与讨论

采用复合酶法提取红茶粗多糖, 具有条件温和、效率高、不影响多糖结构等优点。由于提取时间短, 提取温度低, 较好地保持了其原有的生物活性。

复合酶法提取的多糖得率远高于水提法。在复合酶(果胶酶:纤维素酶)比例 2:1, 提取时间 2.5 h 的条件下, 该试验确定的复合酶法提取红茶粗多糖的最佳工艺为: 复合酶添加量 0.8%, 提取温度 50 ℃, pH 值 4.0, 料液比 1:25, 在此条件下粗多糖的平均提取率为 5.97%, 而对照组水提法的 2.61 倍, 与陈剑等^[10]利用水提法提取庐山云雾茶多糖(产率为 4.58%)的方

法相比提取率也明显提高。说明该法能有效提高粗多糖的提取率。

据文献报道, 目前提取茶叶粗多糖的主要方法是水提法^[11,12], 但由于茶叶多糖的热稳定性较差, 高温会使部分多糖降解^[13], 因此提取温度太高, 会造成提取成本高, 且提取率低。采用果胶酶和纤维素酶组成的复合酶提取粗多糖时, 提取温度低, 提取效率高, 且维持了粗多糖的活性, 减少了能耗, 有效提高茶汤中可溶性糖的含量。其主要原因在于果胶酶和纤维素酶都能破坏茶叶细胞壁, 果胶酶降解细胞壁中的果胶, 破坏了果胶和半纤维素组成的无定形区, 暴露出纤维素部分, 纤维素酶降解纤维素, 提高了茶叶细胞内粗多糖的溶出和扩散^[14]。

本研究对红茶粗多糖的含量及提取工艺进行了初步研究, 在脱色过程中使用活性炭具有原料易得、操作简单、价格低廉的优点, 但有可能造成多糖的损失, 因此如何更好的对茶多糖脱色需要进一步的研究。

茶叶中多糖的含量与茶叶的粗老程度有关^[15], 在红茶加工生产过程中, 大量的粗老茶叶和茶灰末等副产品被丢弃, 造成资源的巨大浪费。从中提取茶多糖则可变废为宝, 为粗茶和低档红茶的综合利用开辟一条新的途径。

参考文献

- [1] 汪东风, 谢晓凤, 王世林, 等. 茶多糖的组分及理化性质[J]. 茶叶科学, 1996, 16(1): 1-8.
Wang DF, Xie XF, Wang SL, *et al.* Composition and the physical and chemical characteristics of tea polysaccharide [J]. J Tea Sci, 1996, 16(1): 1-8.
- [2] 陈海霞, 谢笔钧. 茶多糖对小鼠实验性糖尿病的防治作用[J]. 营养学报, 2002, 01: 85-86.
Chen HX, Xie BY. The preventive and curative effects on diabetic mice of tea polysaccharides [J]. Acta Nutr Sin, 2002, 01: 85-86.
- [3] 严鸿德, 汪东风. 茶叶深加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
Yan HD, Wang DF. Further processing technology of tea [M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1998.
- [4] 王超, 施晓云, 祁杨. 茶多糖提取及其稳定性研究[J]. 江苏科技大学学报(自然科学版), 2011, 25(2): 187-190.
Wang C, Shi XY, Qi Y. Extraction and stability of tea polysaccharide [J]. J Jiangsu Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 2011, 25(2): 187-190.
- [5] 陈仕学, 王岚, 代鸣, 等. 超声波辅助提取石阡苔茶多糖工艺的优化[J]. 湖北农业科学, 2014, 15: 3609-3612.
Chen SX, Wang L, Dai M, *et al.* Optimizing the polysaccharide extraction process from Shiqian moss tea by ultrasonic-assisted method [J]. Hubei Agric Sci, 2014, 15: 3609-3612.
- [6] 林志奎, 王欢, 郑小珍, 等. 白毫银针茶毫中茶多糖工艺优化及其抗氧化研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 03: 665-668.
Lin ZL, Wang H, Zhen XZ, *et al.* Optimizing extraction process of polysaccharide from hairs Baihaoyinzen tea and its antioxidation [J]. Hubei Agric Sci, 2015, 03: 665-668.
- [7] 李三原. 陕西茶文化考论[J]. 西北大学学报(哲学社会科学版), 2012, 04: 82-87.
Li SY. The origin of Chinese tea culture: Shaanxi tea culture [J]. J Northwest Univ (Philos Social Sci Ed), 2012, 04: 82-87.
- [8] 招钰, 周小玲, 郭海燕, 等. 茶多糖中单糖组成比较[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 04: 547-550.
Zhao Y, Zhou XL, Guo HY, *et al.* Comparison of monosaccharides in tea polysaccharides [J]. J Anhui Agric Univ, 2007, 04: 547-550.
- [9] GB/T 8304-2013 茶 水分测定[S].
GB/T 8304-2013 Tea-Determination of moisture content [S].
- [10] 陈剑, 刘频健, 吴晓言. 庐山云雾茶多糖提取工艺研究[J]. 怀化学院学报, 2014, 11: 10-12.
Chen J, Liu PJ, Wu XY. Study on extraction technology of Lushan mist tea polysaccharide [J]. J Huaihua Univ, 2014, 11: 10-12.
- [11] 王黎明, 夏文水. 水法提取茶多糖工艺条件优化[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 171-174.
Wang LM, Xia WS. Optimization of extraction parameters for tea polysaccharides [J]. Food Sci, 2005, 26(5): 171-174.
- [12] 黄杰, 孙桂菊, 李恒, 等. 茶多糖提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 127(6): 77-79.
Huang J, Sun GJ, LI H, *et al.* Study on optimization of extraction method of tea polysaccharides [J]. Food Res Dev, 2006, 127(6): 77-79.
- [13] 宛晓春. 茶叶生物化学(第3版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
Wan XC. Biochemistry of tea (the Third Edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2008.
- [14] 龚玉雷, 魏春, 王芝彪, 等. 生物酶在茶叶提取加工技术中的应用研究[J]. 茶叶科学, 2013, 33(4): 311-321.
Gong YL, Wei C, Wang ZB, *et al.* Research progress of cellulase and pectinase in the extraction of tea leaves [J]. J Tea Sci, 2013, 33(4): 311-321.
- [15] 汪东风, 谢晓凤, 王泽农, 等. 粗老茶中的多糖含量及其保健作用[J]. 茶叶科学, 1994, 14(1): 73-74.
Wang DF, Xie XF, Wang ZN, *et al.* The content and health care function of polysaccharides in coarse tea [J]. J Tea Sci, 1994, 14(1): 73-74.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王 昕, 在读研究生, 主要研究方向为食品生物化学。
E-mail: wxsxlq@qq.com



李新生, 教授, 主要研究方向为生物资源开发利用。
E-mail: lxs9@tom.com