



复合酶全酶解提取工艺提取荷花花粉多糖的工艺研究

王大红

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430074)

摘要:采用复合酶全酶解提取法对荷花花粉多糖的提取工艺进行研究,探讨果胶酶用量、纤维素酶用量、提取时间、提取温度等因素对多糖提取率的影响。在单因素试验的基础上,通过正交试验确定最佳提取工艺条件。研究表明,果胶酶用量对多糖提取率的影响最显著。荷花花粉多糖提取的最佳工艺条件为:果胶酶用量 0.30%、纤维素酶用量 0.15%、提取时间 6h、提取温度 60℃。

关键词:复合酶;荷花花粉;多糖

中图分类号: S682.32

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2023) 05-0116-05

DOI: 10.19899/j.cnki.42-1669/Z.2023.05.019

蜂花粉是蜜蜂从鲜花植物花蕊内采集的花粉粒,并加入了特殊的花蜜和唾液混合后形成的一种不规则扁圆形状物。不同来源的蜂花粉风味不同,有的味稍甜,有的略苦涩。荷花花粉属蜂花粉中的名贵产品,色泽呈乳黄色,呈荷花特有的清新香气,口感好。蜂花粉含有蛋白质、碳水化合物、矿物质、维生素和多种活性物质。花粉被称为是高蛋白低脂肪的“全能营养食品”^[1]。花粉多糖是花粉中一类具有重要生物功能的生物大分子,具有增强免疫、降脂降压、延缓衰老、保肝护肝、预防贫血及美容养颜等多种生理功能^[2]。花粉多糖可作为功能性成分用于食品、保健食品、医药和化妆品行业中。国内许多学者对蜂花粉多糖的组成成分、提取方法以及生物学活性进行了广泛而深入的研究。多糖一般为水溶性

化合物,易溶于水而不溶于乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂。因此,溶剂提取法是研究最多也是提取率比较高的一种提取方法。由于花粉外面有一层坚硬的细胞壁,因此,要充分提取花粉中的多糖等营养成分,就必须破坏花粉壁。花粉壁由纤维素、半纤维素、果胶质和蛋白质等组成。酶解法能够利用果胶酶、纤维素酶等酶制剂作用于蜂花粉壁,使花粉壁中的果胶、纤维素降解,促进多糖溶出^[3]。

本研究是将纤维素酶和果胶酶两种酶组成的复合酶破壁工艺与水提法提取多糖工艺相结合,首先采用单因素试验研究果胶酶用量、纤维素酶用量、提取时间、提取温度等因素对多糖提取率的影响。然后,在单因素试验的基础上,通过正交试验和方差分析确定花粉多糖的最佳提取工艺条件。

收稿日期:2022-07-27

作者简介:王大红(1969—),男,湖北武汉人,武汉职业技术学院生物工程学院副教授,研究方向:食品科学与技术。

一、材料与方法

(一) 实验材料

荷花花粉: 由武汉名盛生物科技有限公司提供。

(二) 试剂与仪器

1. 试剂

葡萄糖标准溶液($40\mu\text{g/ml}$): 精确称取干燥(105°C 干燥 4h)至恒重的葡萄糖 20mg, 加水溶解, 转移至 500ml 容量瓶中, 加蒸馏水定容, 得到浓度为 $40\mu\text{g/ml}$ 的葡萄糖标准溶液。

苯酚溶液(50g/L): 量取 80g 重蒸馏苯酚于 100mL 烧杯中, 加水溶解, 定容至 100mL, 得到浓度为 800g/L 的苯酚溶液, 于棕色磨口瓶中 4°C 冰箱中(可贮存 2 个月)。使用时, 取 5mL 800g/L 苯酚溶液, 加水稀释至 80mL, 即可得到浓度为 50g/L 苯酚溶液(现用现配)。

浓硫酸(分析纯, $\rho = 1.84\text{g/mL}$); 果胶酶(50000U/g , 湖北兴银河化工有限公司); 纤维素酶(300000U/g , 潍坊奥迪尔进出口贸易有限公司)。

2. 仪器和设备

紫外可见分光光度计(日本岛津 UV1800)、离心机、恒温水浴锅等

3. 实验方法

(1) 工艺流程

荷花花粉→研碎→加入果胶酶、纤维素酶→加入蒸馏水→酶解提取→离心→多糖提取液

(2) 荷花花粉多糖提取工艺

称取荷花花粉 1g, 研碎, 加入 $0.09\% \sim 0.18\%$ 的纤维素酶和 $0.20\% \sim 0.40\%$ 的果胶酶, 加入 10ml 蒸馏水, 置于 $40 \sim 70^\circ\text{C}$ 左右的水浴锅中酶解提取 4~10h。提取完毕后在转数 3000r/min 条件下离心 5min, 取上清液, 得到荷花花粉多糖提取液。

4. 荷花花粉多糖含量测定方法

(1) 原理

本实验采用苯酚-硫酸法测定多糖含量^[4]。多糖在浓硫酸作用下, 先水解成单糖, 并脱水生成糖醛衍生物, 与苯酚生成橙黄色物质, 在波长 490nm 处有最大吸收, 吸光度值与多糖含量呈正比。

(2) 葡萄糖标准曲线的制作

分别吸取浓度为 $40\mu\text{g/ml}$ 的葡萄糖标准溶液 0.0mL、0.4mL、0.8mL、1.2mL、1.6mL 至 25mL 试管中, 各加蒸馏水 2.0mL、1.6mL、1.2mL、0.8mL、0.4mL 至 2.0mL, 此时各试管中葡萄糖浓度分别为 $0\mu\text{g/ml}$ 、

$8\mu\text{g/ml}$ 、 $16\mu\text{g/ml}$ 、 $24\mu\text{g/ml}$ 、 $32\mu\text{g/ml}$ 。向试管中加入 1.0mL 50g/L 苯酚溶液, 迅速摇匀, 沿试管壁加入 5.0mL 浓硫酸, 迅速摇匀后盖塞, 静置 10min, 30°C 水浴反应 20min, 迅速冷却, 转移至 1cm 比色皿中, 在 490nm 处测定吸光度值。以葡萄糖的质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 如图 1 所示。标准曲线方程: $y = 0.0153x + 0.006$, 相关系数 $R = 0.9992$ 。从标准曲线上看出, 葡萄糖溶液浓度在 $8 \sim 32\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好线性关系。

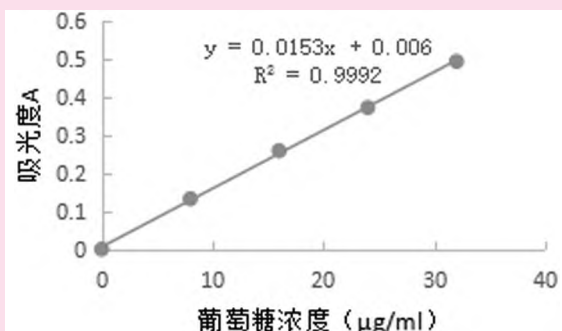


图 1 葡萄糖标准曲线

(3) 荷花花粉提取液中多糖含量的测定与计算

将荷花花粉多糖提取工艺中得到多糖提取液用蒸馏水定容至 100ml, 取 1ml, 加蒸馏水定容至 100ml (第二次稀释定容)。取第二次稀释定容后的溶液 1.0ml, 加入 5% 苯酚溶液 1.0ml 及浓硫酸 5.0ml, 摇匀, 室温放置 20 分钟后于 490nm 处测吸光度。由标准曲线方程计算第二次稀释定容后溶液中葡萄糖的浓度, 再按照下述公式计算荷花花粉多糖提取率。

$$\text{荷花花粉多糖提取率} = \frac{C \times V \times 100}{m \times 100000} \times 100\%$$

式中: C——第二次稀释定容后的溶液中葡萄糖的浓度($\mu\text{g/ml}$)

V——第二次稀释定容后的溶液的体积(ml)

m——花粉质量(g)

二、结果与讨论

(一) 不同提取条件对荷花多糖提取率的影响

首先采用单因素实验考察果胶酶用量、纤维素酶用量、提取时间和提取温度对多糖提取率的影响; 其次, 在单因素实验的基础上设计 4 因素 3 水平正交试验, 以多糖提取率为主要指标, 确定多糖的最佳提取工艺参数。

1. 果胶酶用量对花粉多糖提取率的影响

称取4份荷花花粉各1g,均加入0.12%的纤维素酶,再分别加入0.20%、0.25%、0.30%、0.40%的果胶酶,加入10ml蒸馏水,置于60℃左右的水浴锅中提取6h。离心,取上清液,定容至100ml,并测定花粉多糖提取率。果胶酶用量对多糖提取率的影响如图2所示。

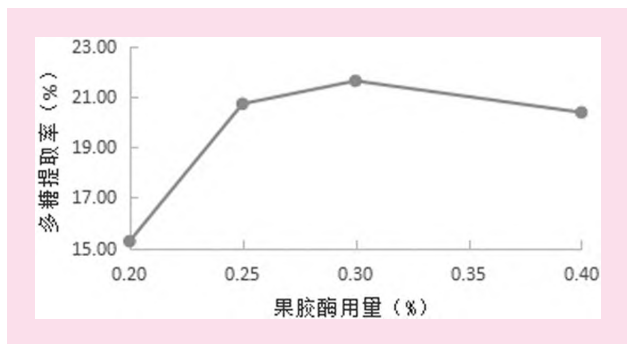


图2 果胶酶用量对多糖提取率的影响

从图2中可以看出,当果胶酶用量从0.20%增加到0.30%时,花粉多糖提取率逐渐上升,至0.30%时提取率达到最大值21.30%;当酶用量增加至0.40%时,提取率反而略有下降。说明当酶用量增大到一定程度后很可能会导致酶与酶之间相互附着,降低酶与底物的传质效率,反而降低反应效率。因此,果胶酶用量选用花粉量的0.30%为宜。

2. 纤维素酶用量对多糖提取率的影响

称取4份荷花花粉各1g,均加入0.30%的果胶酶,再分别加入0.09%、0.12%、0.15%、0.18%的纤维素酶,加入10ml蒸馏水,置于60℃左右的水浴锅中提取6h。离心,取上清液,定容至100ml,并计算多糖提取率。纤维素酶用量对多糖提取率的影响如图3所示。

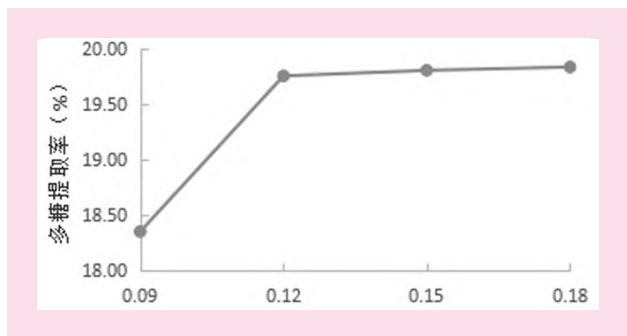


图3 纤维素酶用量对多糖提取率的影响

从图3中可以看出,随着纤维素酶用量从0.09%

增加至0.12%时,花粉多糖提取率上升较大。然后在当纤维素酶再继续增加至0.18%时,多糖提取率几乎没有再增加,其原因与果胶酶用量对多糖提取率的影响相似。因此,纤维素酶用量选用花粉量的0.12%为宜。

3. 提取时间对花粉提取率的影响

称取4份荷花花粉各1g,加0.30%的果胶酶和0.12%的纤维素酶,加入10ml蒸馏水,置于60℃的水浴中分别提取4、6、8、10小时。离心,取上清液,定容至100ml,并计算多糖提取率。提取时间对多糖提取率的影响如图4所示。

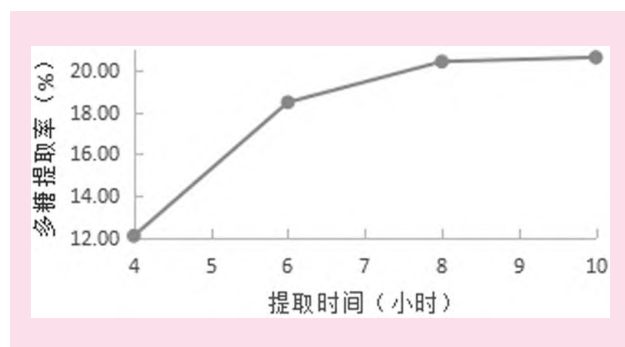


图4 提取时间对多糖提取率的影响

从图4中可以看出,随着提取时间的增加,在4~8小时内,花粉多糖提取率呈明显上升趋势;8小时后,上升趋势平缓。因此,提取时间选用8小时为宜。

4. 提取温度对多糖提取率的影响

分别称取4份荷花花粉各1g,加0.30%的果胶酶和0.12%的纤维素酶,加入10ml蒸馏水,然后分别在40℃、50℃、60℃、70℃下水浴浸提6h,离心,取上清液,定容至100ml,并计算多糖提取率,考察提取温度对多糖提取率的影响,如图5所示。

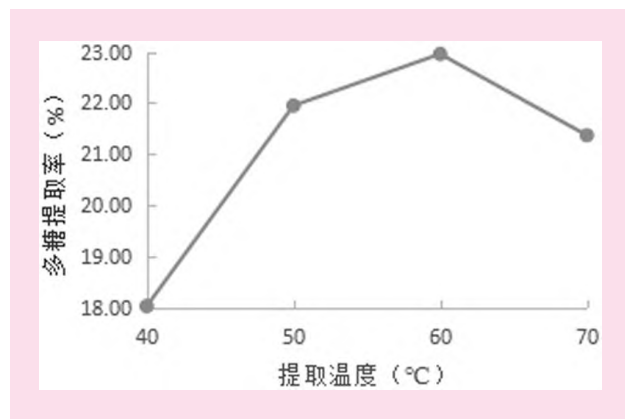


图5 提取温度对多糖提取率的影响

从图5中可以看出,当提取温度从40℃增加至60℃时,花粉多糖提取率逐渐上升,而且上升幅度较快,到60℃时提取率最大。当温度超过60℃后,随着温度逐渐增加,提取率反而下降。这是因为果胶酶用量和纤维素酶在本质上是蛋白质,随着温度逐渐升高,酶蛋白就会逐渐变性,酶活力会逐渐下降,导致多糖提取率降低。因此提取温度选择60℃为宜。

(二)荷花花粉多糖提取条件的优化

在单因素实验的基础上设计 $L_9(3^4)$ 水平正交试验,以荷花花粉的多糖提取率为指标,得出最佳提取工艺。正交实验因素水平、正交试验结果及方差分析分别如表1、表2和表3所示。

表1 正交实验因素水平

水平	A 果胶酶用量(%)	B 纤维素酶用量(%)	C 提取时间(h)	D 提取温度(℃)
1	0.25	0.09	4	40
2	0.30	0.12	6	50
3	0.40	0.15	8	60

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

编号	A 果胶酶用量(%)	B 纤维素酶用量(%)	C 提取时间(h)	D 提取温度(℃)	多糖提取率(%)
1	1	1	1	1	18.24
2	1	2	2	2	21.38
3	1	3	3	3	22.25
4	2	1	2	3	20.72
5	2	2	3	1	19.51
6	2	3	1	2	22.12
7	3	1	3	2	14.60
8	3	2	1	3	16.38
9	3	3	2	1	15.17
K1	20.62	17.85	18.91	17.64	
K2	20.78	19.09	19.09	19.37	
K3	15.38	19.85	18.79	19.78	
R	5.24	1.24	0.30	2.14	

表3 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A 果胶酶用量(%)	68.643	2	5.245	*
B 纤维素酶用量(%)	6.075	2	0.344	
C 提取时间(h)	0.139	2	0.008	
D 提取温度(℃)	7.749	2	0.439	
误差	70.61	8		

由正交实验的结果可以看出,四个因素对荷花花粉多糖提取率的影响大小中,果胶酶用量的影响最大,其次是提取温度和纤维素酶用量,提取时间的影响最小。由F分布表查得 $F_{0.95}(2, 8) = 4.46$, $F_{0.99}(2, 8) = 8.56$ 。比较各F值与 $F_{0.95}(2, 8)$, $F_{0.99}(2, 8)$ 的大小可得出: $F_A > F_{0.95}(2, 8)$, 故A因子(果胶酶用量)对多糖提取率的影响显著,而其他三个因素对多糖浓度的影响不显著。根据正交实验K值可以得到荷花花粉多糖提取的最佳工艺条件为:果胶酶用量0.30%、纤维素酶用量0.15%、提取时间6h、提取温度60℃。在此最佳条件下,荷花花粉多糖的提取率最高,为22.47%。

三、结论

蜂花粉含有蛋白质、碳水化合物、矿物质、维生素和多种活性物质。蜂花粉既是极好的天然营养食品,同时也是一种理想的滋补品,并具有一定的医疗作用,是具有营养价值和药效价值双重作用的天然营养食品的物质所组成的浓缩物。据《神农本草经》记载:“花粉气味甘平,利小便,消瘀血,久服轻身,益寿延年”。蜂花粉虽然营养丰富,但是它的外层有一层比较坚硬的细胞壁,会影响蜂花粉营养成分的提取和吸收。因此,需要采用物理方法、酶解方法和微生物方法等方法对天然蜂花粉进行破壁处理,以利于多糖等营养成分的提取和吸收。

本文采用纤维素酶和果胶酶复合酶酶解破壁工艺与水提工艺相结合的方式提取荷花花粉中的多糖。首先用单因素试验研究了果胶酶用量、纤维素酶用量、提取时间和提取温度等因素对花粉多糖提取率的影响。然后,在单因素试验基础上设计4因素3水平正交试验,确定了荷花蜂花粉多糖最佳提取工艺参数。正交实验和方差分析的结果表明:四个因素中,果胶酶用量对荷花蜂花粉多糖提取率的影响最大,其次依次是提取温度、纤维素酶用量和提

取时间。荷花蜂花粉多糖提取的最优工艺参数为果胶酶用量 0.30%、纤维素酶用量 0.15%、提取时间 6h、提取温度 60℃。在此工艺条件下,荷花花粉多糖的提取率为 22.47%。

参考文献:

[1] 周彦钢,贾建萍,孙丽华.荷花蜂花粉的营养成分分析[J].蜜蜂

杂志,2007(5):6-7.

[2] 乔子桐,尹丽,周漪璇,等.蜂花粉多糖成分研究进展[J].食品工业科技,2021(14):401-407.

[3] 张国锋,刁其玉,屠焰.荷花蜂花粉多糖提取条件的研究[J].饲料工业,2009(20):4-7.

[4] 涂宗财,李敏,刘光宪,等.苯酚-硫酸法测定油菜花粉多糖含量的研究[J].食品工业科技,2007(4):219-221.

[责任编辑:鞠守勇]

Research on the Process of Composite Enzyme Enzymatic Hydrolysis Method of Lotus Pollen Polysaccharides

WANG Dahong

(School of Biological Engineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract: A composite enzyme enzymatic hydrolysis method was used to study the extraction process of lotus pollen polysaccharides, and the effects of polysaccharide extraction rates influenced by pectinase dosage, cellulase amount, extraction time, extraction temperature and other factors was discussed. On the basis of the single factor test, the best extraction process conditions are determined through the orthogonal test. The results of the study show that the impact of the amount of pectinase on polysaccharides is the most significant. The best process conditions for the extraction of lotus pollen polysaccharides are: 0.30% of pectinase, 0.15% of cellulose enzymes, 6h extraction time, and 60° C for extraction.

Key words: Complex enzyme; Lotus pollen; Polysaccharide