

文章编号:1673-1689(2008)06-0103-04

酶法处理对油菜花粉萌发孔通透性的改善

董捷^{1,2}, 李春阳³, 张红城^{*1,2}, 李慧岩^{1,2}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 农业部国家蜂产品加工专业分中心, 北京 100093; 3. 江苏省农科院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:研究了经酶法处理的油菜花粉的营养物质的溶出情况和萌发孔打开情况。结果表明:用中温淀粉酶和复合纤维素酶处理花粉后,每克花粉上清液中可溶性糖含量最高可达到 (0.365 ± 0.017) g,与空白相比提高了 53%;用复合蛋白酶和复合纤维素酶处理花粉后,蛋白质溶解指数达到最高为 0.66 ± 0.05 ;通过显微镜可以观察到经过复合蛋白酶和复合纤维素酶处理后,花粉萌发孔明显变大。

关键词:油菜花粉;酶法;萌发孔

中图分类号:Q 556

文献标识码:A

Effect of Enzymatic Treatments on Permeability of Germ Pores of Rape Pollens

DONG Jie^{1,2}, LI Chun-yang³, ZHANG Hong-cheng^{*1,2}, LI Hui-yan^{1,2}

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China; 2 National Research Center of Bee Product Processing, Ministry of Agriculture, Nanjing 100093, China; 3 Institute of Agro-food Science & Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: This manuscript studied the effect of enzymatic treatments on permeability of germ pores of rape pollens. The results indicated that the content of soluble sugar of pollens treated by α -amylase of BAN[®] and cellulase of celluclast[®] from Novozymes was (0.365 ± 0.017) g, increasing by 53% compared with that of the control. The solution index of pollens treated by protease of protamex[®] and cellulose of celluclast[®] from Novozymes was achieved at 0.66 ± 0.05 . And germ pores of pollens treated by protease of protamex[®] and cellulose of celluclast[®] opened the greatest.

Key words: rape pollen; enzymatic treatment; germ pores

蜂花粉(Bee pollen)是蜜蜂从蜜源植物花蕊内采集的花粉粒,经过蜜蜂向其内部加入了花蜜和分

泌物,混合成不规则扁圆形、上面带有蜜蜂后肢嵌挟痕迹的团状物^[1]。蜂花粉的营养成分十分丰富,

收稿日期:2007-10-16.

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2006BAD14B07-5-0);农业部基本科研业务费专项课题(200703);中国农业科学院蜜蜂研究所所长基金项目(200605).

作者简介:董捷(1966-),女,北京人,副研究员,工学硕士,主要从事蜂产品开发与利用方面的研究. Email:jiedon@126.com

* 通讯作者:张红城(1967-),男,黑龙江哈尔滨人,助理研究员,工学博士,主要从事食品生物技术方面的研究. Email:zzhc@sohu.com

几乎含有全部营养素,是一种高质量的营养源,被人们誉为营养素的浓缩体^[2]。然而,由于花粉有一层坚固的花粉壁,会影响人体对其营养成分的吸收,故人们普遍认为,花粉在口服前必须先进行破壁处理。目前花粉的破壁方法均存在一些缺点,例如超声波破壁、温差破壁、机械破壁(绞碎机)等,这些方法破壁率低、生产成本低,容易使花粉中的活性物质受到损害。并且这些方法都忽视了蜂花粉自身的特点,即花粉壁上存在萌发孔,是花粉中营养物质的出口。在自然环境下不需要破壁,花粉内的营养物质是通过萌发孔流出来的,但渗出量很少。本实验的目的就是采用比较温和的酶法处理蜂花粉,改善蜂花粉萌发的环境条件,使蜂花粉中的营养成分能通过萌发孔大量渗透出来。从而最大限度地保护蜂花粉的营养成分,克服破壁工艺的缺点,为蜂花粉的应用提供可借鉴的科学方法和研究数据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验材料 油菜花粉来自中国农业科学院蜜蜂研究所;蒽酮,乙酸乙酯,蔗糖,乙酸铅,草酸钠,硼酸,氢氧化钠,浓硫酸,均为分析纯;甲基红,指示剂;溴甲酚绿,分析纯;中温淀粉酶(BAN, Bacterial Amylase Novo),复合蛋白酶(protamex),复合纤维素酶(celluclast),由诺维信生物技术有限公司提供。

1.1.2 设备 TDL-5-A 型台式离心机;上海安亭科学仪器厂制造;HZS-H 型摇床水浴;哈尔滨市东明医疗仪器厂制造;SevenEasy 型 pH 计;梅特勒—托利多仪器上海有限公司制造;HYP-1014 消化炉,上海纤检仪器有限公司制造;酸式滴定管,微量凯氏定氮仪,PL303 型精密天平,梅特勒—托利多仪器上海有限公司制造;数码照相机 NIKON BM-7;显微镜 OLYMPUS CX31。

1.2 方法

1.2.1 样品的前处理 取一定量的油菜花粉 8 份,研磨均匀后放入三角瓶中,然后向每瓶花粉中加入等量的蒸馏水。

1.2.2 酶解 将处理好的花粉液,加入一定的酶,调相应的 pH 值,在一定温度下摇床水浴水解。作为空白的样品既不加酶,也不调 pH 值。最后将水解好的水解液取一点进行显微镜观察,剩余的样品于 5 000 r/min 离心,然后分离上清液和沉淀。

用复合蛋白酶酶解时,加酶量为 8%,水解 pH 7.5,水解温度 50 ℃,水解时间 12 h。用中温淀粉

酶和复合纤维素酶酶解时,加酶量均为 0.3 mL,水解 pH 值均为 6,水解温度均为 60 ℃,水解时间均为 12 h。

加两种酶酶解时,如果有复合蛋白酶先加蛋白酶,在最适的水解条件下水解完成后,再加另一种酶。加中温淀粉酶和复合纤维素酶时,这两种酶可以同时加,因为水解条件一样。加复合蛋白酶、中温淀粉酶和复合纤维素酶这 3 种酶时,先加蛋白酶,在其最适水解条件下水解完成后,再同时加入中温淀粉酶和复合纤维素酶,最后 95 ℃灭酶 10 min。

1.2.3 可溶性糖的测定 分离的上清液稀释 50 倍后,采用蒽酮比色法^[3],对可溶性糖进行测定。

蒽酮比色法的标准曲线的回归方程为

$$y=0.006x+0.0132, R^2=0.9965$$

酶处理后 1 g 花粉上清液中可溶性糖质量(g)

$$Q=\frac{M_x \times V \times D}{V_1 \times W} \times 10^{-6}$$

式中:Q 为可溶性糖质量(g); M_x 为标准曲线查得的糖质量;V 为样品总体积(mL); V_1 为测定时取用体积(mL);D 为稀释倍数;W 为样品质量(g); 10^{-6} 为由 μg 到 g 的换算单位。

1.2.4 溶解指数的测定 将分离的沉淀物进行微量凯氏定氮,用于溶解指数的测定^[4]。

溶解指数 = 1 - 酶解沉淀物含氮量/空白沉淀物含氮量

1.2.5 光学显微镜观察 用胶头滴管取一滴花粉液在载玻片上,并加盖玻片,然后将制好的样品在 OLYMPUS 光学显微镜下观察(放大倍数为 1600 倍)、摄影。

1.2.6 统计学分析 使用 SPSS 12.0 软件,对实验结果用邓肯法进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 酶法处理对可溶性糖质量的影响

由表 1 可以看出,对于没加酶的空白样品,其上清液中的可溶性糖质量为 (0.238 ± 0.007) g;而分别用复合蛋白酶、复合蛋白酶+复合纤维素酶、复合纤维素酶处理的花粉,它们上清液中的可溶性糖质量均明显低于空白样品($P < 0.05$),说明用这些酶处理花粉并不能促进花粉中碳水化合物溶出。而分别用复合蛋白酶+中温淀粉酶、复合蛋白酶+中温淀粉酶+复合纤维素酶、中温淀粉酶、中温淀粉酶+复合纤维素酶处理的样品中,它们的可溶性糖质量均明显高于空白样品($p < 0.05$)。其中经过中温淀粉酶+复合纤维素酶处理后,样品中可

溶性糖质量最高,为(0.365±0.017) g,比空白样品提高了 53%。所以此组合对花粉中碳水化合物的溶出有很好的改善作用。

表 1 酶法处理对可溶性糖质量分数的影响

Tab.1 The influence of treatment by enzyme on content of soluble sugar

酶法处理	可溶性糖 质量分数/(g/g)
复合蛋白酶	0.135±3.881 ^a
复合蛋白酶+复合纤维素酶	0.209±0.012 ^b
复合纤维素酶	0.213±0.095 ^b
空白	0.238±0.007 ^c
复合蛋白酶+中温淀粉酶	0.262±0.002 ^d
复合蛋白酶+中温淀粉酶+复合纤维素酶	0.282±0.002 ^e
中温淀粉酶	0.305±0.008 ^f
中温淀粉酶+复合纤维素酶	0.365±0.017 ^g

注:字母不同代表彼此之间有显著性差异($p<0.05$),字母相同代表彼此之间无显著性差异。

2.2 酶法处理对溶解指数的影响

由表 2 可以看出,分别用复合纤维素酶、中温淀粉酶+复合纤维素酶、中温淀粉酶处理的花粉,其溶解指数均为负值,说明这些酶对花粉中蛋白质的溶出没有改善反而抑制了。而分别用复合蛋白酶+中温淀粉酶+复合纤维素酶、复合蛋白酶、复合蛋白酶+中温淀粉酶、复合蛋白酶+复合纤维素酶处理花粉,其溶解指数均有提高,而且彼此之间无显著性差异($p>0.05$)。经复合蛋白酶+复合纤维素酶处理的花粉,其溶解指数最大,为 0.66±0.05。

表 2 酶法处理对溶解指数的影响

Tab.2 The influence of treatment by enzyme on the solution index

酶法处理	溶解指数
复合纤维素酶	-0.3±0.01 ^a
中温淀粉酶+复合纤维素酶	-0.05±0.03 ^b
中温淀粉酶	-0.02±0.02 ^b
复合蛋白酶+中温淀粉酶+复合纤维素酶	0.61±0.06 ^c
复合蛋白酶	0.64±0.01 ^c
复合蛋白酶+中温淀粉酶	0.64±0.01 ^c
复合蛋白酶+复合纤维素酶	0.66±0.05 ^c

注:字母不同代表彼此之间有显著性差异($p<0.05$),字母相同代表彼此之间无显著性差异。

从实验结果可以看出,只要经过中温淀粉酶处理的样品,可溶性糖质量均明显高于空白样品。这是因为中温淀粉酶能够降解存在于萌发孔突出腔中的淀粉粒^[5],使萌发孔更易打开,进而才有可能促进花粉中淀粉的降解和溶出。同样只要加入复合蛋白酶将蛋白质进行水解,都能提高蛋白质的溶解指数^[6]。这是因为在花粉壁上除了含有果胶纤维素(内壁)和孢粉素(外壁)外,在内外壁上还含有

蛋白质,而内壁的蛋白质主要集中在萌发孔处^[5]。因此用复合蛋白酶降解萌发孔处的蛋白质,会更有利于萌发孔的打开和花粉壁内蛋白质的溶出。

2.3 显微镜下观察花粉萌发孔情况

图 1 为没经过任何处理的单个花粉,可以看出花粉呈圆形,看不清花粉孔。图 2 为经过复合蛋白酶+复合纤维素酶处理的单个花粉,可以清晰地看到萌发孔。一般在成熟花粉壁上都有萌发孔,这是花粉外壁形成时产生的开口,长的称沟,短的称孔。在自然的条件下,花粉中的营养物质可以通过萌发孔与外界相通^[5]。

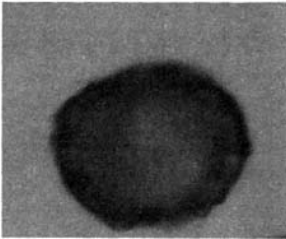


图 1 没经过任何处理的单个花粉

Fig.1 The single pollen of no treatment

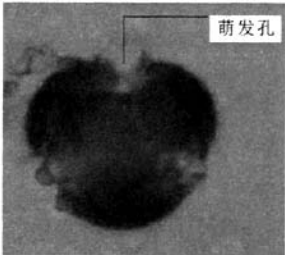


图 2 经复合蛋白酶+复合纤维素酶处理的单个花粉

Fig.2 The single pollen of treatment by protamex and cellulclast

经过复合纤维素酶和中温淀粉酶分别处理的花粉,以及用这两种酶一起处理的花粉,花粉颗粒仍然呈圆形或椭圆形,萌发孔不清晰,与没有经过酶处理的空白样品相近,见图 3。说明中温淀粉酶和复合纤维素酶对萌发孔的打开影响很小,这两种酶不适合于在花粉的酶解工艺中单独或联合使用。

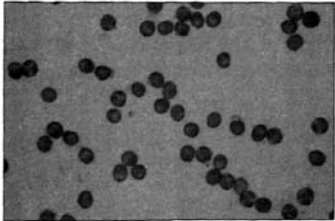


图 3 没经过任何处理的花粉

Fig.3 The pollens of no treatment

经过复合蛋白酶+中温淀粉酶+复合纤维素酶、复合蛋白酶、复合蛋白酶+中温淀粉酶、复合蛋白酶+复合纤维素酶4种方式处理的花粉,从图4~5中可以观察到,与空白样品相比,这4种花粉的萌发孔均打开,并且用不同酶处理花粉的萌发孔裂开的缝隙程度是不同的。用复合蛋白酶+复合纤维素酶处理花粉的萌发孔(图5中箭头所指)裂开最为明显,见到了花粉内容物从萌发孔外吐现象。这4种处理方式都使用了复合蛋白酶,可见复合蛋白酶在提高花粉萌发孔的通透性上具有非常大的作用。经过这4种方式处理花粉的蛋白质溶解指数分别为 0.61 ± 0.06 、 0.64 ± 0.01 、 0.64 ± 0.01 、 0.66 ± 0.05 ,都是非常高的,可见蛋白溶解指数的变化趋势与花粉萌发孔的打开情况是一致的,蛋白溶解指数越高萌发孔打开就越明显。

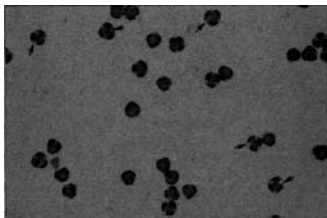


图4 经复合蛋白酶+中温淀粉酶处理的花粉

Fig. 4 The pollens of treatment by protamex and BAN

通过以上分析可以看出,复合蛋白酶对花粉萌发孔的打开影响很大,而且用复合蛋白酶+复合纤维素酶处理花粉后,萌发孔打开最明显。这是因为萌发孔是花粉外壁的不连续造成的,所以在萌发孔处只有内壁(纤维素)和内壁上的蛋白质^[6]。而纤维素酶是一个复杂酶系,根据其功能的不同可分为

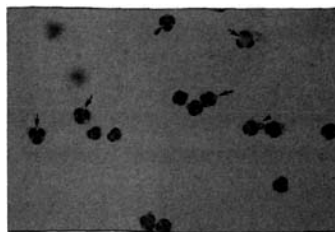


图5 经复合蛋白酶+复合纤维素酶处理的花粉

Fig. 5 The pollens of treatment by protamex and cellulase

内切葡聚糖酶,外切葡聚糖酶和葡萄糖苷酶,这3类酶的协同作用可以将结构复杂的天然纤维素降解^[7]。所以先用蛋白酶将萌发孔上的蛋白质降解后,再用复合纤维素酶降解纤维素内壁,这样更易于萌发孔的暴露和打开,有利于花粉壁内部营养物质的溶出。

3 结 语

通过对酶法处理的花粉萌发孔通透性改善情况进行分析,结果表明:用中温淀粉酶+复合纤维素酶处理花粉后,每克花粉中上清液中可溶性糖质量最高,可达到 $(0.365 \pm 0.017)g$,与空白相比提高了53%;用复合蛋白酶+复合纤维素酶处理花粉后,蛋白质的溶解指数最高为 0.66 ± 0.05 。

显微镜观察花粉通透性的改善情况结果表明:中温淀粉酶和复合纤维素酶对萌发孔的打开影响很小;而复合蛋白酶对萌发孔的打开影响比较大,而且用复合蛋白酶+复合纤维素酶处理花粉后,萌发孔打开最明显。

参考文献(References):

- [1] 徐景耀. 蜜蜂花粉研究与利用[M]. 北京:中国医药科技出版社,1991:1.
- [2] Linskens H F, Jorde W. Pollen and medicine-a review[J]. *Economic Botany*, 1997,51(1):78-87.
- [3] 熊庆娥. 植物生理学实验教程[M]. 成都:四川科技技术出版社,2003:81-82.
- [4] 董捷,李慧岩,张红城,等. 茶花花粉蛋白酶解的最佳工艺研究[J]. *食品科学*, 2007,28(7):226-231.
- [5] DONG Jie, LI Hui-yan, ZHANG Hong-cheng, et al. Research on the optimal process of enzymatic hydrolysis of protein from *Camellia* pollen[J]. *Food Science*, 2007,28(7):226-231. (in Chinese)
- [6] 胡适宜. 被子植物生殖生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2005:81-84.
- [7] 段钢,赵振锋,钱莹. 酶制剂在蛋白质加工行业的应用[J]. *食品与生物技术学报*, 2005,24(4):104-109.
- [8] DUAN Gang, ZHAO Zheng-feng, QIAN Ying. Enzyme application in the protein processing industries[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005,24(4):104-109. (in Chinese)
- [9] 罗颖,欧阳嘉,许婧,等. 耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2007,26(1):84-89.
- [10] LUO Ying, OUYANG Jia, XU Jing, et al. Screening and identification of a thermostable cellulase-secreting bacteria and its optimization for cellulase production[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007,26(1):84-89. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)