

纤维素酶法提取茶多糖

傅博强, 谢明勇*, 周鹏, 聂少平, 王远兴

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西南昌 330047)

摘要:为了保持茶多糖的活性,采用低温水提、酶提二次结合法提取茶多糖。第一次在 50 ℃、茶叶与水的质量比为 1:15、水提取 30 min,多糖的提取率为 2.33%,粗多糖(干重)的提取率为 6.82%。过滤后,滤渣用 pH 4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液加纤维素酶提取,经正交试验确定酶提最佳工艺参数为 55 ℃、茶叶与水的质量比为 1:14、酶用量 2.2 μL/g(以茶叶质量计),反应时间为 120 min,其多糖的提取率为 0.64%,粗多糖(干重)的提取率为 1.11%,分别占二次总提取量的 21.5%和 14.0%。而在相同条件下无酶提取,提取率仅为 0.39%和 0.56%。相对水提法,酶法的多糖提取率分别增加 63.3%和 98.9%,多糖总提取率达 2.97%,粗多糖(干重)的总提取率为 7.93%。采用酶法提取的茶多糖具有较强抑制 α-淀粉酶活力的能力。

关键词:茶多糖;纤维素酶;提取

中图分类号:Q 539

文献标识码:A

The Extraction of Tea Polysaccharide by Cellulase Degradation

FU Bo-qiang, XIE Ming-yong, ZHOU Peng, NIE Shao-ping, WANG Yuan-xing

(The Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Tea was abstracted for two times by using cellulase under a suitable temperature in order to get tea polysaccharide (TP) without destroying its activity. The extraction of tea polysaccharide was carried out firstly in water under the condition of 50 ℃, 1:15 of ratio of [S][L], 30 min. The percent of extraction was 2.33% for TP, and 6.82% (dry mass) for coarse tea polysaccharide (CTP). After a filtration, the residue was extracted in a citric acid-sodium citrate buffer of pH 4.6 by using cellulase to degrade the cell wall to accelerate the releasing of tea polysaccharide. Through a perpendicular experiment, the optimum technical parameters were obtained: 55 ℃, 1:14 of ratio of [S][L], 2.2 μL/g tea of cellulase, 120 min. The percent of extraction of TP and CTP were 0.64% and 1.11%, reached to 21.5% and 14.0% of the total extraction, respectively. As to those of the same conditions without cellulase, they only were 0.39% and 0.56%. The percent of extraction of TP and CTP in the second abstraction increased by 63.3% and 98.9%, respectively. The results showed that the total extraction percent of TP and CTP were 2.97% and 7.93%. The tea polysaccharide extracted by cellulase strongly inhibited the α-amylase activity, and might also have an activity in reducing blood sugar.

Key words: tea polysaccharide; cellulase; extraction

收稿日期 2002-01-17; 修订日期 2002-04-21.

基金项目 教育部高等学校骨干教师资助计划项目;江西省跨世纪学术和技术带头人培养计划项目资助课题.

作者简介 傅博强(1975-),男,河北石家庄人,工学硕士; * 谢明勇教授为联系人.

茶多糖是茶叶中极具开发价值的一种生理活性物质. 现代药理研究发现, 茶多糖具有降血糖、降血脂、降血压及减慢心率、耐缺氧等作用, 在抗凝血、防血栓形成、保护血相和增强人体非特异性免疫功能等方面也有明显的效果^[1].

传统的茶多糖提取方法包括煎煮、有机溶剂浸出等, 但提取温度高、提取率低、成本高, 而酶工程技术是近几年来用于天然植物有效成分提取的一项生物工程技术. 选用恰当的酶, 可较温和地将植物组织分解, 加速有效成分的释放, 从而提高其提取率. Fleurence J 等^[2]将卡拉胶酶和纤维素酶同时作用于红藻 *Chondrus crispus*, 蛋白质提取率增加了 10 倍. 王志民等^[3]用 0.15% 的纤维素酶(以滤纸为底物测得的酶活为 2 200 U/g)在 45 °C、pH 4.4 的条件下处理香菇 4 h, 可溶性固形物和多糖的提取率分别为水煮法的 3.61 倍和 2.37 倍. Lehmberg 等^[4,5]将红茶浸泡液调至适当的 pH 值后, 加入单宁酶和细胞壁水解酶如纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶或丹麦 NOVO 公司的 Viscozyme[®]L 酶, 经巴氏灭菌和离心, 制得有良好色泽和澄清度、酸性条件下稳定的天然即食茶饮料. 但将酶用于茶多糖的提取还未见报道. 作者将纤维素酶用于茶多糖的提取, 以期达到提高提取率、缩短提取时间、减少能耗和有效保存茶多糖生物活性的目的.

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂和仪器

绿茶 江西省婺源绿色企业集团提供; 纤维素酶 CellubrixTMI(含纤维素酶 1 500 NCU/mL、纤维二糖酶 25 CbU/mL)、耐高温 α -淀粉酶 Termamyl[®]; 丹麦诺维信公司(原诺和诺德公司)提供; 可溶性淀粉 浙江菱湖食品化工联合公司产品. 蒽酮、浓硫酸、无水乙醇、丙酮、乙醚、柠檬酸、柠檬酸钠、氢氧化钠、碘化钾、碘、磷酸氢二钠、盐酸, 均为分析纯. 721 分光光度计: 上海第三分析仪器厂生产; FA1104 电子天平: 上海精天电子仪器厂生产; 电子恒温水浴锅: 上海宏兴机械仪器实业制造公司生产; 旋转蒸发器: 上海申生科技有限公司生产; ZK-82A 型真空干燥箱: 上海实验仪器总厂生产; LJX-II 型离心沉淀机: 上海医用分析仪器厂生产.

1.2 测定方法

1.2.1 茶多糖含量测定 蒽酮-硫酸比色法^[6]. 将醇沉洗涤后的茶叶粗多糖沉淀加蒸馏水复溶、定容至设定体积, 用蒽酮-硫酸显色后测定吸光度(A), 由葡萄糖标准曲线得出的回归方程

$C = -0.002\ 53 + 0.317A$ 计算供试液中葡萄糖质量浓度(C), 由精制茶多糖测得茶多糖相对葡萄糖的换算因子^[7] $f = 4.268$.

1.2.2 茶多糖提取率计算

$$\text{多糖提取率} = C \times D \times f \times W \quad (1)$$

式(1)中, C 为供试液中葡萄糖质量浓度(mg/mL), D 为多糖的稀释倍数, f 为换算因子, W 为供试茶样的质量(g).

$$\text{粗多糖(干重)提取率} = M \times W \quad (2)$$

式(2)中, M 为粗多糖干重质量(g), W 为供试茶样的质量(g).

1.2.3 α -淀粉酶酶活力测定 分光光度计法吸取可溶性淀粉溶液 20.0 mL 和 pH 6.0 的磷酸缓冲液 5.0 mL 于试管中, 在 70 °C 恒温水浴中预热平衡 5 min, 然后加入到在 55 °C 预温 20 min 的混合溶液中(含 1 mL 经初步纯化的多糖提取液和 1.00 mL 待测酶液, 酶液已稀释至合适浓度), 摇匀, 准确反应 5 min. 立即吸取反应液 1.00 mL, 加到预先盛有 0.5 mL 盐酸(0.1 mol/L)和 5.00 mL 稀碘液的试管中, 摇匀. 以蒸馏水代替淀粉溶液作空白对照, 在 660 nm 处用 10 mm 比色皿迅速测定其吸光度(A).

1.2.4 茶多糖对 α -淀粉酶酶活抑制效果的计算

其计算公式:

$$PE = (c_0 - c_1) / C \times V \quad (3)$$

式(3)中: PE 为茶多糖对 α -淀粉酶酶活的抑制效果, 即每毫克多糖对酶活单位 U 的降低值; c_0 为未加茶多糖的酶液中 α -淀粉酶的原始浓度(U/mL), c_1 为经茶多糖抑制后的酶液中 α -淀粉酶的活力单位(U/mL), c 由测得的反应液的吸光度 A 据“吸光度 A —酶活力单位 c ”附表查得; C 为经初步纯化的多糖提取液中茶多糖的质量浓度(mg/mL); V 为加入酶液的多糖提取液的体积(mL).

$$PER = PE / c_0 \quad (4)$$

式(4)中, PER 为每毫克茶多糖对 α -淀粉酶酶活的抑制率(%), 其余同上式.

1.3 试验方法

1.3.1 茶多糖的纤维素酶法提取工艺流程

称取 40 目茶粉 5 g, 加入 75 mL 蒸馏水, 50 °C 水浴加热浸提 30 min, 双层滤布过滤, 滤渣用热蒸馏水洗涤—
 合并滤液与洗涤液→提取液 I
 滤渣加 pH 4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 加一定量酶, 水浴加热水解→调 pH 值至中性灭酶, 双层滤布过滤→滤渣用热蒸馏水洗涤, 合并滤液与洗涤液, 得提取液 II.

将提取液 I 和 II 分别离心分离, 真空浓缩至一

定体积,加入无水乙醇,低温静置过夜;将醇沉液离心分离,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤2次,得茶叶粗多糖I(水提)和II(酶提),真空干燥至恒重,计算粗多糖(干重)得率。

1.3.2 纤维素酶水解条件的正交设计及试验 根据试验,第一次水提时茶叶与水的质量比选1:15,纤维素酶 Cellubrix™ L作用的最适pH值为4.6,最适温度为55℃,此时多糖提取率最高(见图1和图2)。在此条件下,选择酶水解时间、酶用量、茶叶与水的质量比为考察因素,以多糖提取率为考察指标,根据酶水解单因素试验结果(图3~5),确定各正交设计因子的水平,见表1。按 $L_9(3^4)$ 正交表对酶法提取工艺进行研究,确定茶多糖纤维素酶法提取的最佳工艺参数。

表1 正交设计因子和水平表

Tab.1 The factors and levels of perpendicular experiment

水平	水解时间 A/ min	酶用量 B/ ($\mu\text{L}/\text{g}$)	茶叶与水的质量比 C
1	80	2.2	1:14
2	100	3.0	1:16
3	120	3.8	1:18

1.3.3 不同茶多糖提取物对 α -淀粉酶酶活抑制效果的对比试验 α -淀粉酶能参与人体的糖代谢过程,茶多糖对 α -淀粉酶水解淀粉的活力进行抑制,延缓葡萄糖的释放,可能是其降血糖的机理之一。通过测定不同茶多糖提取物对 α -淀粉酶酶活的抑制效果,可从一个侧面反映提取工艺的可行性。将不同提取方法得到的茶多糖提取物,经Sevag法除蛋白,自来水透析48h,蒸馏水透析24h初步纯化后,取一定体积加入酶液中,按1.2.3中的方法测定经茶多糖抑制后的 α -淀粉酶的酶活,其对 α -淀粉酶酶活抑制效果根据1.2.4中的公式计算。

1.3.4 与超声波酶法的对比实验 于淑娟等^[8]用超声波酶法提取灵芝多糖,在酶解的同时协同超声波振荡提取30min,然后恒温酶解3~4h,研究发现,通过超声振荡可破坏灵芝纤维的细胞壁,扩大可溶性物质穿过多孔透析膜的通过率,并除去一部分影响酶接触纤维的妨碍物,从而提高纤维素酶水解纤维素的效率,尽快释放灵芝多糖。作者在纤维素酶法提取茶多糖最佳工艺的基础上研究了超声振荡对多糖提取率的影响,另外还与相同条件下无酶水提法的提取率进行了比较。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

单因素试验结果见图1~5。

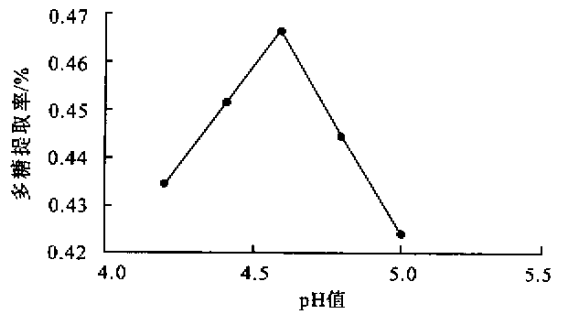


图1 多糖提取率与酶解pH值的关系

Fig.1 The relation between the percent of extraction of TP and the value of pH of enzyme digestion

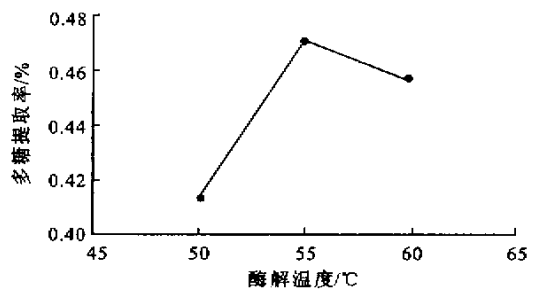


图2 多糖提取率与酶解温度的关系

Fig.2 The relation between the percent of extraction of TP and the temperature of enzyme digestion

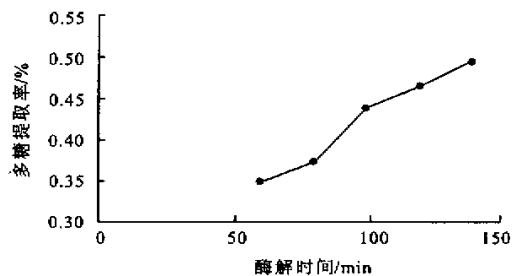


图3 多糖提取率与酶解时间的关系

Fig.3 The relation between the percent of extraction of TP and the time of enzyme digestion

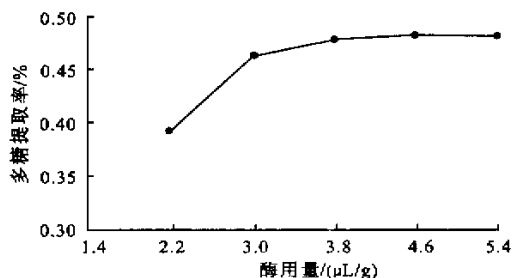


图4 多糖提取率与酶用量的关系

Fig.4 The relation between the percent of extraction of TP and the amount of cellulase

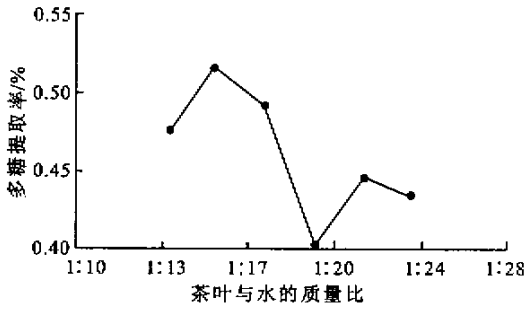


图 5 多糖提取率与茶叶与水的的关系

Fig.5 The relation between the percent of extraction of TP and the ratio of [S][L]

2.2 纤维素酶水解条件的正交试验

纤维素酶水解正交实验结果及极差、方差分析见表 2、表 3。

表 2 正交实验数据及极差分析表

Tab.2 The data of perpendicular experiment and the analysis of difference

试验号	水解时间 A/min	酶用量 B($\mu\text{L/g}$)	固液比 C	D (空白)	AR/%
1	1(80)	1(2.2)	3(1:18)	1	0.422
2	1(80)	2(3.0)	1(1:14)	2	0.482
3	1(80)	3(3.8)	2(1:16)	3	0.502
4	2(100)	1(2.2)	2(1:16)	2	0.582
5	2(100)	2(3.0)	3(1:18)	3	0.598
6	2(100)	3(3.8)	1(1:14)	1	0.594
7	3(120)	1(2.2)	1(1:14)	3	0.624
8	3(120)	2(3.0)	2(1:16)	1	0.638
9	3(120)	3(3.8)	3(1:18)	2	0.644
I	1.411	1.628	1.705	1.654	$T = 5.091$
II	1.774	1.723	1.722	1.713	
III	1.906	1.740	1.664	1.724	$\overline{ER} = 0.566$
R	0.495	0.112	0.058	0.070	
因素 主次	A > B > C				

表 3 方差分析表

Tab.3 The analysis of variance

方差来源	平方和 S_j	自由度 f_j	均方 $\overline{S_j}$	F_j^Δ	表值 F	显著性
水解时间 A	4.38×10^{-2}	2	2.19×10^{-2}	46.30	$F_{0.99}(2, 2) = 99.0$	显著
酶用量 B	2.43×10^{-3}	2	1.22×10^{-3}	2.58	$F_{0.95}(2, 2) = 19.0$	
固液比 C	5.92×10^{-4}	2	2.96×10^{-4}	0.63	$F_{0.9}(2, 2) = 9.0$	
误差	9.45×10^{-4}	2	4.73×10^{-4}			
总和	4.78×10^{-2}	10	平方数据			

由极差及方差分析可知,影响多糖提取率各因素的主次关系为:水解时间 > 酶用量 > 固液比.由方差分析得知,水解时间在 5% 水平上存在显著性差异,酶用量、固液比在 1% 水平上无差异.故酶解提取茶多糖的最佳工艺条件为: $A_3 B_1 C_1$,即水解时间 120 min,酶用量 2.2 $\mu\text{L/g}$ (以茶叶质量计),固液比 1:14.

2.3 与超声波酶法的对比实验

水提法:40 目茶粉 5 g,水提(茶叶与水的质量比 1:15,50 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min)→过滤→滤渣水提(茶叶与水的质量比 1:14,55 $^\circ\text{C}$ 水浴 120 min).

超声波-酶提法:40 目茶粉 5 g,水提(茶叶与水的质量比 1:15,50 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min)→过滤→滤渣超声酶提(加固液比 1:14,pH 值 4.6 缓冲液,酶用量 2.2 $\mu\text{L/g}$ (以茶叶质量计),超声酶提(33 kHz,100 W 超声波振荡 20 min,保持 55 $^\circ\text{C}$)→酶提(55 $^\circ\text{C}$ 水浴 100 min).

酶提-超声波法:40 目茶粉 5 g,水提(固液比 1:15,50 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min)→过滤→滤渣酶提(与 pH 值 4.6 缓冲液的固液比 1:14,酶用量 2.2 $\mu\text{L/g}$ (以茶叶质量计),55 $^\circ\text{C}$ 水浴 80 min)→超声酶提(33 kHz,100 W 超声波振荡 20 min,保持 55 $^\circ\text{C}$)→酶提(55 $^\circ\text{C}$ 水浴 20 min).

第一次水提取多糖的提取率为 2.33%,粗多糖(干重)的提取率为 6.82%.在酶提最佳工艺的基础上进行改进的对比实验及无酶水提法的第二次提取多糖提取率结果见表 4.

表 4 不同提取方法第二次提取的多糖提取率对比

Tab.4 The percent of extraction of TP using different extraction methods in the second extraction

提取方法	多糖提取率/%	相对无酶法的增幅/%	占总提取量的比例/%
酶解法	0.640	63.3	21.5
超声-酶解法	0.603	53.8	20.6
酶解-超声法	0.666	70.0	22.2
无酶水提法	0.392	0	14.4

由实验结果可知,加入纤维素酶,降解茶叶细胞壁,可加速茶多糖的释放,提高茶多糖的提取率.采用超声波辅助酶法时,超声波-酶提法的多糖提取率比酶解-超声法低 10.4%,比单独酶解法低 6.1%.这可能是由于加入酶后超声会使一部分酶变性失活,从而降低提取率;而酶解-超声法先酶提后超声波辅助提取则可避免此问题,超声振荡可进一步破坏已被酶解的细胞壁,使通过细胞多孔透析膜的可溶性物质增加,多糖提取率较高,比单独酶

解法高 4.1%。酶解法的多糖总提取率为 2.97%。

此外,在第二次提取时,测得酶解法的粗多糖(干重)提取率为 1.11%,而在相同条件下无酶提取,提取率仅为 0.56%,酶解法使粗多糖(干重)提取率增加 98.9%。酶解法的粗多糖(干重)总提取率为 7.93%。

2.4 初步纯化的不同茶多糖提取物对 α -淀粉酶酶活抑制效果

表 5 表明,第二次用纤维素酶提取的茶多糖的抑制率比第一次水提取的多糖低 21.2%,这可能是由于多糖的相对分子质量或结构发生了一定程度的变化,或者此混合多糖的相对分子质量分布发生了改变,掺杂进了一些其它相对分子质量的多糖,但主要种类未变,具有较强的抑制 α -淀粉酶的活性。第二次水提取茶多糖的抑制率比第一次水提取得到的多糖低 76.2%,这可能是由于在低温条件下第二次水提取得到的茶多糖的组成与第一次水提取的相差很大,其中相对分子质量更大的可溶性纤维素等有较大增加。

表 5 不同茶多糖提取物对 α -淀粉酶酶活抑制效果比较

Tab. 5 The inhibition effects of several different TP to α -amylase

茶多糖 提取物	多糖提取液 质量浓度/ (mg/mL)	α -淀粉酶 活力单位 c_1 (U/mL)	抑制效果 (以多糖计) (U/mg)	抑制 率/%
第一次 水提多糖	1.062	3.604	0.970	20.9
第二次 酶提多糖	1.129	3.771	0.764	16.5
第二次 水提多糖	1.343	4.324	0.231	4.98

3 结 论

1) 采用纤维素酶 Cellubrix™ L 提取茶多糖可以在较低的温度下提高多糖的提取率。由于酶作用的专一性,不会破坏茶多糖的结构,而且细胞壁降解产生的高葡萄糖聚合物会被纤维二糖酶进一步降解为葡萄糖。经实验,确定提取工艺为第一次在 50℃、茶叶与水的质量比 1:15、水提取时间 30 min 过滤后,将滤渣用 pH 4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液加纤维素酶提取,酶提最佳工艺参数为 55℃、固液比 1:14、酶用量 2.2 μ L/g(以茶叶质量计)提取时间为 120 min。

2) 第一次水提的多糖提取率为 2.33%,粗多糖(干重)的提取率为 6.82%。第二次酶提的多糖提取率为 0.64%,粗多糖(干重)的提取率为 1.11%,分别占二次总提取量的 21.5%和 14%。而在相同条件下无酶提取,提取率仅为 0.39%和 0.56%。酶法相对无酶水提法提取率分别增加 63.3%和 98.9%。研究表明,此方法的多糖总提取率达 2.97%,粗多糖(干重)的总提取率为 7.93%。

3) 采用超声波辅助酶法提取茶多糖时,第二次提取的多糖提取率为 0.67%,比单独酶解法高 4.1%,但考虑到设备投资成本,工业化生产不宜采用。

4) 用酶法提取得到的茶多糖仍具有较强的抑制 α -淀粉酶酶活的活性。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] FLEURENCE J. Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verucosa* and *Palmaria palmata*[J]. *J Appl Phycol*, 1995 (7): 393-397.
- [3] 王志民,陈祥贵. 香菇营养成分的酶法提取及利用[J]. 四川工业学院学报, 1998, 17(1): 46-49.
- [4] LEHMBERG. Enzyme extraction process for tea[P]. United States Patent 5952023, 1995-06-30.
- [5] LEHMBERG. Tea concentrate prepared by enzymatic extraction and containing xanthan gum which is stable at ambient temperature[P]. United States Patent: 6024991, 1998-03-30.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1998.
- [7] 傅博强,谢明勇,袁少平. 茶叶中多糖的含量测定[J]. 食品科学, 2001(11): 69-72.
- [8] 于淑娟,高大维. 超声波酶法提取灵芝多糖的机理研究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 1998, 26(2): 123-127.

(责任编辑 朱明)