

绿茶天然果胶的酶法提取及其组成、结构与性质

罗 钰^{2,3}, 刘咏雪¹, 付杨楠¹, 张 晨^{1,2,3*}

(¹福州大学生物科学与工程学院 福州 350108

²福州大学先进制造学院 福建泉州 362251

³福建省食品生物技术创新工程技术研究中心 福州 350108)

摘要 采用 4 种商业酶(3 种纤维素酶 S22178、FoodPro® CBL、Viscozyme® L 和半纤维素酶)提取绿茶果胶,并探究其对果胶主要结构的影响,以及纯化果胶的成分、分子质量分布、粒径分布与果胶黏性的关系,以获得结构相对完整的天然果胶的提取方法。结果表明:4 种酶均能高效提取果胶,提取率均能达到 80%。S22178 和 Viscozyme® L 对果胶的 HG 主链结构有破坏,而半纤维素酶和 FoodPro® CBL 对果胶的主链和侧链结构均没有显著影响。FoodPro® CBL 纯化样的黏度最大($\eta_i=1\,227\text{ mPa}\cdot\text{s}$),半纤维素酶纯化样的黏度较低($\eta_i=154\text{ mPa}\cdot\text{s}$),Viscozyme® L 黏度基本为 0。结论:经 FoodPro® CBL 处理获得的果胶最接近天然果胶状态,提取纯化后的果胶含量为 48%(HG 主链 43%,RG-I 侧链 5%),组分间颗粒大小相近,流变学性质较好,呈现典型的剪切稀化现象。

关键词 天然果胶; 碳水化合物酶; 化学组成; 分子质量分布; 黏度

文章编号 1009-7848(2024)01-0160-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.01.017

茶饮料是目前市场上最受欢迎的饮品之一,在我国有悠久的历史^[1]。当前茶叶品质的研究主要集中在茶风味物质的组成和氧化上^[2-3],然而这些风味物质及其氧化衍生物从叶组织溶出的过程对茶汤品质的影响却被忽略^[4]。该溶出过程受到茶叶细胞壁的阻碍,可能会因其中果胶的作用而影响各种物质的溶出速率^[5],进而影响茶汤品质。因茶汤泡制过程中,风味物质的变化无法从果胶对其溶出的影响而得出,可通过提取获得的天然果胶与纤维素膜结合,模拟茶叶细胞壁结构,以分析茶风味物质溶出过程^[6]。因此,建立新型的果胶提取方法,获得结构相对完整的天然果胶,是研究果胶对茶风味物质溶出影响的关键。

果胶是一种从高等植物细胞壁中提取获得的结构复杂的酸性杂多糖^[7]。若在提取过程中果胶结构不被破坏,且其性质仍被保留,则为天然果胶。当前,果胶的提取方法主要有水热法、酸法及碱法^[8],然而,这些方法均对果胶分子结构有影响,无法用于模拟叶细胞壁。水热法主要以高温的方式

来增加细胞间质中果胶分子在水中的溶解度^[9],其果胶提取率较低(30%~40%),且果胶分子容易发生断裂^[10]。酸法提取是利用稀酸将非水溶性的果胶转变成水溶性的果胶^[11],提取率约为 70%^[12]。酸处理过程中半乳糖醛酸主链易发生断裂,且果胶分子连接了纤维素片段,凝胶性相对较差^[13]。碱法提取是通过将果胶酸中和以提高果胶溶解率,提取率可达 90%^[14]。此法提取过程中果胶脱酯^[15],果胶与蛋白质形成的复合物提高了果胶的流变性^[13]。

理论上,天然果胶的提取可通过使用碳水化合物酶降解细胞壁成分中的纤维素和半纤维素^[16-17],以促进果胶的释放。然而,目前可行的碳水化合物酶提取方案尚未清晰。其原因:一是植物细胞壁结构复杂,酶分子不易进入且需要使用多种靶向的碳水化合物酶进行复合降解,果胶提取效率较低。二是市售纤维素酶和半纤维素酶复合酶可能会降解果胶,对果胶结构产生破坏。为了获得天然果胶,本研究以绿茶为材料,分析 4 种商业酶(S22178 酶、半纤维素酶、Viscozyme® L 和 FoodPro® CBL)对果胶提取、结构和功能的影响。测定提取液中半乳糖醛酸含量,分析提取率。采用凝胶色谱分析其分子质量分布。以标准果胶(商业柑橘果胶和阿拉伯半乳聚糖)为模型,检测 4 种酶

收稿日期: 2023-01-06

基金项目: 福建省科技计划引导性项目(2018N0013);国家自然科学基金项目(31701649)

第一作者: 罗钰,女,硕士生,助理工程师

通信作者: 张晨 E-mail: chen.zhang@fzu.edu.cn

对果胶 HG 主链结构和 RG-I 侧链结构的降解作用。采用红外吸收光谱分析果胶链中酯化羧基含量的变化。通过乙醇沉降对果胶提取物进行纯化,分析纯化样的外观,以及化学成分、分子质量分布、粒径与黏度的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

绿茶叶 (Green tea leaf, GTL) 由中国福建省工泰公司提供。Viscozyme[®] L (主要含有纤维素酶, 酶活力 120 U/mL), 美国 Sigma 公司; FoodPro[®] CBL (主要含有纤维素酶, 酶活力 1 500 U/g), 中国上海杜邦公司; S22178 酶 (主要含有纤维素酶, 酶活力 10 000 U/g), 上海玉博生物科技有限公司; 半纤维素酶 (酶活力为 20 000 U/g)、阿拉伯半乳聚糖 (RG-I 结构), 上海源叶生物科技有限公司; 商业柑橘果胶 (HG 结构), 甲氧基化度 (76.68 ± 0.35)%, 德国 CNW 试剂公司。所有化学品均为分析纯级。

1.2 主要仪器

Nicolet iS50 FT-IR 傅里叶红外光谱仪, 武汉德盟科技有限公司; Thermo Fisher Scientific 3000 高效液相色谱仪 (配有示差折光检测器), 中国赛默飞世尔科技有限公司; OMNI 粒径分析仪, 美国 Brookhaven 仪器公司; MCR302 安东帕旋转流变仪, 上海安东帕商贸有限公司。

1.3 提取方法

1.3.1 果胶酶提取方案 将绿茶叶研磨成粉末, 分别称取 200 mg 绿茶粉, 与 4 mL 含不同酶的 0.02 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 4.5) 进行充分混匀后, 于恒温振荡器中 30 ℃ 反应 3 h。酶的添加量是: 1) S22178 酶 50, 200, 250, 500, 700 U; 2) 半纤维素酶 4.5, 45, 90, 135, 300, 600 U; 3) FoodPro[®] CBL 90, 180, 713, 1 000, 1 420 U; 4) Viscozyme[®] L 0.24, 0.6, 1.8, 3, 6 U。将反应后的样品离心 (4 000×g, 20 min), 收集上清液, 测定半乳糖醛酸含量。

$$\text{果胶提取率}(\%) = \frac{A_1}{A_2} \times 100 \quad (1)$$

式中, A_1 ——上清液中半乳糖醛酸含量 (mg); A_2 ——200 mg 绿茶粉中半乳糖醛酸含量 (mg)。

1.3.2 酶对果胶 HG 主链和 RG-I 侧链的影响 以

商业柑橘果胶和阿拉伯半乳聚糖分别作为果胶 HG 主链结构和 RG-I 侧链结构的标准模型。分别将 100 mg 商业柑橘果胶和阿拉伯半乳聚糖与 2 mL 0.02 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 4.45) 混合, 在该混合液中加入不同量的酶, 充分混匀后在恒温振荡器中 30 ℃ 反应 3 h。酶的添加量是: 1) 600 U S22178 酶; 2) 1 200 U FoodPro[®] CBL; 3) 0.25 U Viscozyme[®] L; 4) 500 U 半纤维素酶。将反应后的样品离心 (4 000×g, 20 min), 收集上清液后冻干, 于干燥皿中保存, 待用。

1.3.3 乙醇沉降纯化酶果胶提取物 根据 1.3.1 节提取方案, 将 10 g 绿茶粉分别与含 10 000 U S22178 酶、4 500 U FoodPro[®] CBL、15 U Viscozyme[®] L 或 4 500 U 半纤维素酶的缓冲液混匀。在恒温振荡器中 30 ℃ 反应 3 h 后, 离心 (4 000×g, 20 min), 收集上清液。加入 2 倍体积的无水乙醇, 沉淀, 离心 (4 000×g, 15 min), 收集沉淀物。加入 1 倍体积的去离子水, 重复乙醇沉淀步骤 2 次, 使用去离子水充分溶解果胶沉淀。将果胶纯化液冻干后置于干燥皿中拍照, 记录样品的外观。

1.4 测定方法

1.4.1 半乳糖醛酸含量的测定 参考咔唑比色法测定溶液中半乳糖醛酸含量^[18]。显色反应后, 测定样品在 530 nm 波长处的吸光值, 并以 0~200 mg/L 的半乳糖醛酸为参照, 计算半乳糖醛酸含量。若待测样品为固体, 则采用酸降解法进行半乳糖醛酸含量的测定。将 25 mg 绿茶粉溶解于 0.5 mL 64% 硫酸中, 静置 30 min 后加入 5.5 mL 蒸馏水, 将混合溶液置于 80 ℃ 恒温振荡器中加热 60 min, 离心获得上清液, 测定其半乳糖醛酸含量。

1.4.2 傅里叶红外光谱分析 果胶样品的特征吸收峰采用傅里叶红外光谱仪测定^[19]。将 1 mg 果胶样品和 200 mg KBr 充分混合后, 用玛瑙研钵和研杵均化混合物并压成薄片。在 400~4 000 cm⁻¹ 波数范围对果胶样品进行扫描, 记录光谱图。采用 Sun 等^[20]和 Liu 等^[21]的方法, 建立 DE 值与 $A_{1742}/(A_{1742}+A_{1642})$ 值之间的线性回归方程: $Y=87.609X+25.768$ 来计算果胶的酯化度。式中, A_{1742} ——色谱图中 1 742 cm⁻¹ 处的峰面积; A_{1642} ——色谱图中 1 642 cm⁻¹ 处的峰面积。

1.4.3 分子质量分布的测定 果胶样品的分子质

量分布采用高效液相色谱仪测定^[22]。制备质量浓度为0.5 mg/mL的果胶溶液,经0.22 μm 滤膜过滤,备用。使用赛默飞 SEC 300 凝胶色谱柱,示差折光检测器对样品进行分析。选择流速0.25 mL/min,进样体积20 μL 和含有0.1 mol/L NaCl的乙酸钠-乙酸缓冲液(pH 4.5)为流动相,在25 $^{\circ}\text{C}$ 下检测。

1.4.4 蛋白质含量的测定 以0~100 mg/L 硝酸钾溶液制作标准曲线,用总有机碳分析仪(TOC)测定果胶样品中总氮质量浓度(g/L)^[23],采用转换因子5.4来计算蛋白质浓度^[14]。

1.4.5 中性糖含量的测定 果胶样品(20 mg)经4 mL 4 mol/L 三氟乙酸(120 $^{\circ}\text{C}$,4 h)水解后,加入0.5 mL 0.5 mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)(70 $^{\circ}\text{C}$,30 min)进行衍生化。衍生化后样品中的中性糖含量采用高效液相色谱仪测定^[13]。用于分析的柱子为 Thermo C18 柱(4.6 mm \times 250 mm,孔径5 μm),洗脱液为0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7):乙腈=82:18(V/V)。设置UV检测器波长为245 nm,流速1.0 mL/min,进样体积10 μL ,于25 $^{\circ}\text{C}$ 检测。

分别配制质量浓度为10 mg/mL *L*-(+)-鼠李糖、*L*-(+)-阿拉伯糖、*D*-(+)-木糖、*D*-(+)-甘露糖、*D*-(+)-半乳糖(97%)、*D*-(+)-葡萄糖(99.5%)溶液为标准溶液。RG-I型果胶由重复的半乳糖醛酸和鼠李糖二糖骨架和阿拉伯聚糖、半乳糖聚糖和/或阿拉伯半乳糖的侧链组成^[24]。由于阿拉伯糖和半乳糖主要存在于RG-I型果胶中,因此阿拉伯糖和半乳糖含量被用来代表RG-I果胶^[25]。RG-II型果胶具有HG型果胶的骨架,该骨架具有复杂的侧链,其包含连接至半乳糖醛酸的鼠李糖^[26]。由于RG-II型果胶中几乎不含半乳糖和阿拉伯糖,因此半乳糖和阿拉伯糖含量与鼠李糖含量的比率变化可用来表示RG-II型果胶提取率的变化。

1.4.6 多酚含量的测定 果胶样品的多酚含量参考酒石酸亚铁法测定^[27]。将250 μL 果胶溶液与315 μL 酒石酸亚铁溶液充分混合,加入1 mL pH 7.5的磷酸盐缓冲液,于室温反应5 min。测定样品在540 nm波长处的吸光值,以0~0.5 mg/mL 茶多酚绘制标准曲线,计算果胶样品中的多酚含量。

1.4.7 黏度的测定 果胶样品的黏度采用安东帕旋转流变仪测定^[28]。将果胶样品与去离子水充分混合,25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定混合溶液(50 g/L)在剪切速率1~100 rad/s范围的黏度。记 η_1 为剪切速率在1 s⁻¹时的黏度。

1.4.8 粒径的测定 基于样品的多分散性和基线指数介于0.1~0.3和5~10之间,选择配制果胶质量浓度为1 mg/mL的溶液。采用粒径分析仪(OMNI, Brookhaven, USA)测定其粒径分布^[13]。

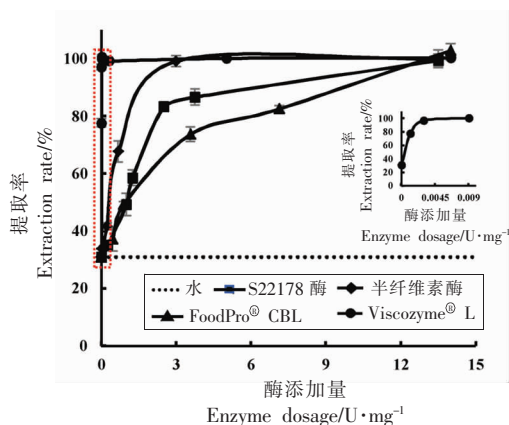
1.5 统计方法

采用 Microsoft Excel 2016 软件进行数据的统计与分析。若无特别说明,每个样品重复测定3次,其结果表示为“平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)”。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan's 法多重比较分析各组的差异显著性,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 4种酶对果胶提取率的影响

绿茶粉分别经4种酶处理后获得上清液,通过测定其半乳糖醛酸含量估算果胶提取率,结果如图1所示。采用S22178酶、FoodPro[®] CBL、Viscozyme[®] L和半纤维素酶都能高效提取果胶,提取率均可达80%。4种酶中,Viscozyme[®] L辅助果胶提取的效果最佳,每mg茶粉仅用0.003 U酶即可获得97%的果胶,而其它酶达到这一条件需要的酶添加量均超过3 U/mg。这可能是由于Vis-



注:小图为红色方框内 Viscozyme[®] L 作用下的果胶提取率。

图1 不同酶添加量下果胶的提取率

Fig.1 Extraction rate of pectin under different enzyme addition amounts

cozyme[®] L 除了含有纤维素酶活力外, 还含有阿拉伯聚糖酶和木聚糖酶等多种酶活力, 可有效提高叶细胞壁的降解效率^[14]。

2.2 4 种酶对果胶 HG 主链和 RG-I 侧链的影响

以商业柑橘果胶和阿拉伯半乳糖分别作为果胶 HG 主链和 RG-I 侧链的标准模型, 通过分子排阻色谱分析 4 种酶对果胶 HG 主链和 RG-I 侧链的影响, 如图 2 所示。图 2a 显示, 商业柑橘果胶仅有 1 个组分, 在 SEC 试验中的保留时间约 23 min。Viscozyme[®] L 处理后的商业柑橘果胶在色谱图中 23 min 处的信号峰基本消失, 可见 Viscozyme[®] L 可完全降解果胶 HG 主链。S22178 酶处理后的商业柑橘果胶在色谱图中 23 min 处的信号峰变

小, 发生拖峰现象, 表明 S22178 酶对果胶 HG 主链产生部分降解。相比之下, 经半纤维素酶和 FoodPro[®] CBL 处理的商业柑橘果胶在色谱图 23 min 处的信号峰基本没有变化, 表明这两种酶对果胶 HG 主链没有影响。图 2b 显示, 阿拉伯半乳糖只有 1 个组分, 在色谱图中的保留时间约 38 min。经 4 种酶作用后的 RG-I 侧链在 SEC 图谱中峰型相似, 表明 4 种酶对果胶的 RG-I 侧链没有影响。

可见, 半纤维酶或 FoodPro[®] CBL 处理获得的果胶结构与天然果胶结构相似, 而其它两种酶均破坏果胶结构。

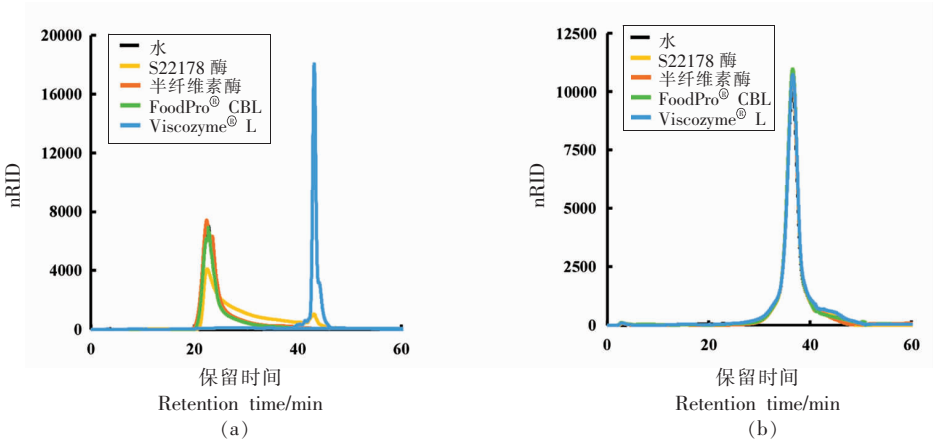


图 2 经不同酶处理前、后商业柑橘果胶(a)和阿拉伯聚糖(b)的分子质量分布
Fig.2 The molecular weight distribution of commercial citrus pectin (a) and arabinoxylan (b) before and after treatment with different enzyme concentrations

2.3 4 种酶对果胶酯化度的影响

为了进一步探究 4 种酶对绿茶果胶酯化度的影响, 测定果胶提取液的红外光谱图, 结果如图 3 所示。果胶酯化度通过 1 742 cm⁻¹ 处的峰面积与 1 742 cm⁻¹ 和 1 642 cm⁻¹ 处的峰面积之和的比值来计算。S22178 酶处理样、FoodPro[®] CBL 处理样和半纤维素酶处理样的酯化度相近, 分别为 40%, 41%和 44%, Viscozyme[®] L 的最低为 31%。可见, S22178 酶、FoodPro[®] CBL 和半纤维素酶对果胶的酯化度影响较小, Viscozyme[®] L 具有一定的脱酯作用。

2.4 4 种酶对果胶纯化样的影响

2.4.1 外观 将绿茶果胶提取物用乙醇沉降进行

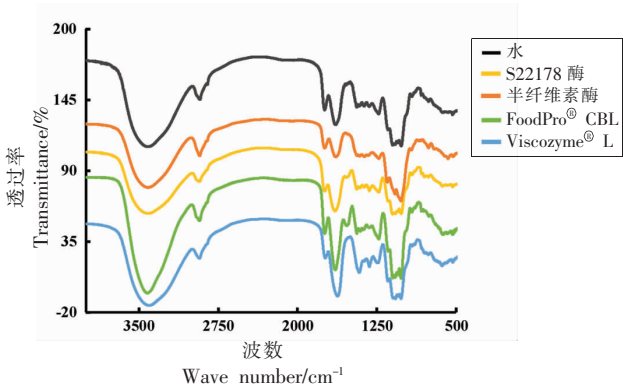
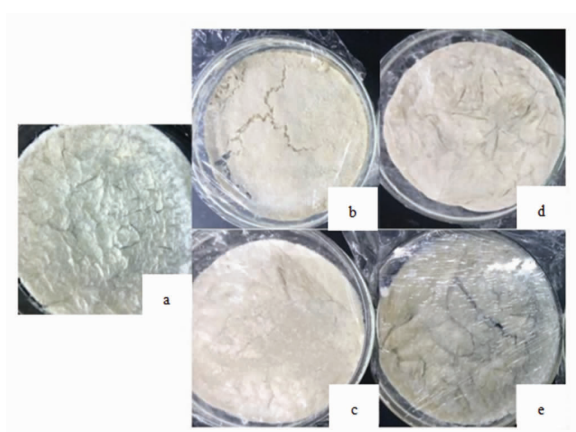


图 3 4 种酶提取的绿茶果胶的傅里叶红外光谱
Fig.3 Fourier transform infrared spectroscopy of green tea pectin extracted by four enzymes

纯化,其冻干样品的外观如图4所示。由于Viscozyme® L破坏了果胶分子结构(见图2a),因此果胶样品中小分子物质居多,冻干品呈粉末状。其它3种酶对HG果胶仅存在部分降解或无明显降解作用,使获得的果胶样品中存在更多的大分子物质呈云片状。与未经酶处理和半纤维素酶处理相比,S22178酶、FoodPro® CBL和Viscozyme® L纯化样颜色较浅,推测叶绿素与纤维素之间发生了结合^[29]。叶绿素可通过纤维素降解,溶于乙醇溶液后去除。

2.4.2 黏度 纯化后果胶样品的黏度采用安东帕旋转流变仪检测,结果如图5所示。4种酶法纯化样的黏度随角频率的增加呈现剪切稀化的现象。比较剪切速率为1时,各果胶样品的黏度(η_1)差异,FoodPro® CBL纯化样的黏度最大($\eta_1=1\,227\text{ mPa}\cdot\text{s}$),S22178酶纯化样的黏度次之($\eta_1=862\text{ mPa}\cdot\text{s}$),而半纤维素酶纯化样的黏度较低($\eta_1=154\text{ mPa}\cdot\text{s}$),Viscozyme® L黏度基本为0。4种酶处理的纯化样黏度存在较大差异,这或许与纯化样的分子质量分布、化学组成及其粒径分布相关。

2.4.3 化学组成 测定了纯化后绿茶果胶样品的化学组成(包括半乳糖醛酸、蛋白质、多酚和各种单糖含量),结果见表1。以半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖含量表示各种类型果胶的总量,Viscozyme® L纯化样中果胶含量最高,其次为S22178酶纯化样和半纤维素酶纯化样,而FoodPro® CBL纯化样和水纯化样中果胶含量相对较少。水纯化样和S22178酶纯化样中GA/Rha的值较大,约为20。可见其主要为果胶的HG结构。Viscozyme® L纯化样、半纤维素酶纯化样和FoodPro® CBL纯化样的GA/Rha和(Ara+Gal)/Rha值较小,表明其果胶提取物中含有更多其它的果胶结构。在保证HG果胶提取率的情况下,获得更多RG-I和RG-II结构的果胶,以更接近天然果胶的状态。果胶RG-II结构在细胞壁中的空间位置更靠近内侧的细胞膜,而RG-I充斥于整个细胞壁^[30],相对而言RG-II结构的提取难度较大。可见,纯化样中更多RG-II侧链的存在表明其果胶提取物结构更接近细胞壁中的天然果胶。果胶的溶出与纤维素和半纤维素的降解相关^[31],而各样品中葡萄糖和木糖的含量变化并未表明其相



注:a:水;b:Viscozyme® L;c:FoodPro® CBL;d:S22178酶;
e:半纤维素酶。

图4 乙醇沉降法纯化的各种果胶样品

Fig.4 Various pectin samples purified by ethanol precipitation method

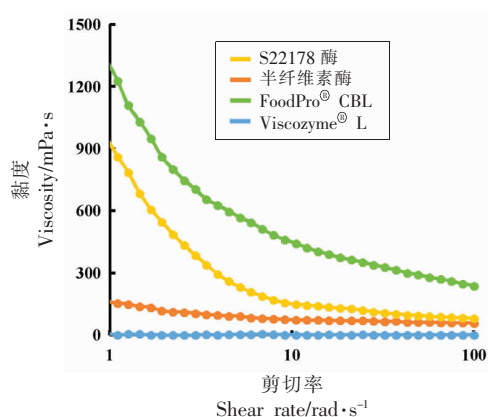


图5 不同剪切速率下4种酶提取的绿茶果胶纯化样品黏度的变化

Fig.5 The variation in viscosity of purified green tea pectin samples extracted by four enzymes under different shear rates

关性。这一现象可能是由于纤维素和半纤维素在不同酶处理条件下被降解的程度不同,从而导致它们在乙醇沉降过程中的损失不同。水纯化样、S22178酶纯化样、FoodPro® CBL纯化样和半纤维素酶纯化样中蛋白质含量相差不大,而Viscozyme® L纯化样中的蛋白质含量相对较少。这可能是Viscozyme® L酶还具有一定的蛋白酶活性,可降解蛋白质,导致它们在乙醇沉降过程中的损失较大。

理论上果胶HG主链含量与黏度呈正相关,

然而S22178 酶纯化样的黏度低于 FoodPro® CBL 纯化样的黏度，可见果胶的非 HG 型主链结构也能提供部分的黏性特质^[2,29]。

表 1 4 种酶提取的绿茶果胶纯化样品各组分和单糖含量(mg/g 果胶干质量)
Table 1 Compositions and monosaccharide content of purified green tea pectin extracted by four enzymes
(mg/g pectin dry mass)

	水	S22178 酶	半纤维素酶	FoodPro® CBL	Viscozyme® L
半乳糖醛酸 (GA)	371 ± 6 ^c	416 ± 5 ^b	408 ± 4 ^b	406 ± 16 ^b	477 ± 5 ^a
鼠李糖 (Rha)	15 ± 1 ^c	20 ± 5 ^c	36 ± 2 ^b	36 ± 1 ^b	69 ± 3 ^a
半乳糖 (Gal)	16 ± 2 ^b	40 ± 1 ^a	16 ± 1 ^b	10 ± 2 ^b	8 ± 1 ^c
阿拉伯糖 (Ara)	24 ± 1 ^c	32 ± 1 ^c	58 ± 3 ^b	55 ± 2 ^b	71 ± 4 ^a
GA/Rha	25 ± 2 ^a	22 ± 6 ^a	11 ± 1 ^b	11 ± 1 ^b	7 ± 1 ^c
(Ara+Gal)/Rha	2.9 ± 0.2 ^b	3.9 ± 1.1 ^a	2.1 ± 0.2 ^b	1.8 ± 0.2 ^c	1.2 ± 0.1 ^d
葡萄糖 (Glu)	129 ± 1 ^b	50 ± 3 ^d	101 ± 3 ^b	99 ± 9 ^c	152 ± 7 ^a
木糖 (Xly)	42 ± 1 ^c	60 ± 5 ^b	96 ± 7 ^a	90 ± 7 ^a	86 ± 6 ^a
蛋白质	221 ± 1 ^a	161 ± 1 ^b	158 ± 1 ^b	176 ± 3 ^b	47 ± 4 ^c
多酚	57 ± 2 ^b	43 ± 3 ^c	68 ± 4 ^a	61 ± 5 ^a	39 ± 1 ^d

注:同列数据肩标含有相同小写字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$),含有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下图和表同。

2.4.4 分子质量分布与粒径分布 纯化后果胶样品的分子质量分布用高效液相色谱仪测定,粒径分布用粒径分析仪检测,结果如图 6 所示。图 6a 表明,S22178 酶纯化样和 FoodPro® CBL 纯化样在 SEC 图谱中的分子质量分布与水处理的纯化样的分子质量分布相似,在 20~25 min 内出现较多的大分子物质。Viscozyme® L 纯化样和半纤维素酶纯化样中含有的大分子物质较少,小分子物质较多。由于半纤维素酶可降解非果胶和纤维素等多糖类物质,这些物质可能在乙醇沉降的过程

中没有被去除^[32],导致其在 35~44 min 内的小分子峰明显增强。Viscozyme® L 可彻底破坏 HG 果胶主链,因此其果胶样在色谱图中 20~25 min 内的大分子峰基本消失,在 35~44 min 内小分子峰的信号增强。相比之下,FoodPro® CBL 纯化样只在 20~25 min 内出现 1 个主峰,说明此果胶样品的分子质量较大,且组分间的分子质量差异较小。可见,分子质量大且分布较为集中的果胶样品具有更好的黏性^[33](见图 5)。

纯化后果胶样品的粒径用粒度仪测定,结果

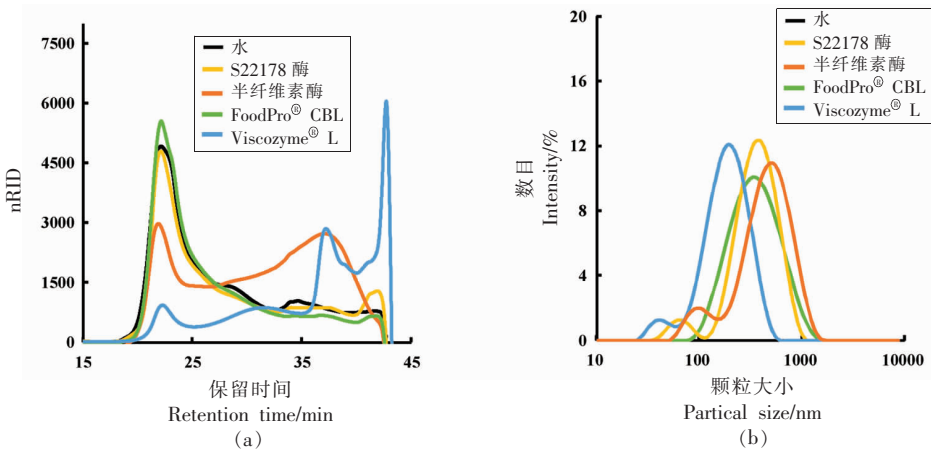


图 6 4 种酶提取的绿茶果胶纯化样品的分子质量分布(a)和粒径分布(b)
Fig.6 The molecular weight distribution (a) and particle size distribution (b) of purified green tea pectin samples extracted by four enzymes

如图 6b 所示。半纤维素酶纯化样的平均粒径最大, S22178 酶纯化样和 FoodPro® CBL 纯化样平均粒径接近, 而 Viscozyme® L 纯化样的平均粒径最小。相比于其它纯化样, FoodPro® CBL 纯化样在光散图中只有 1 个峰呈正态分布, 出现在 100~1 000 nm 范围, 表明样品的组分间颗粒大小相近。其它 3 种酶纯化样均呈现 2 个不同的信号峰, 其中主峰出现在 200~1 000 nm 范围, 次峰出现在 40~200 nm 范围。Viscozyme® L 纯化样粒径较小, 主要出现在 200 nm 附近。由于半纤维素酶纯化样中的纤维素未降解且与果胶结合形成较大的颗粒, 因此即使半纤维素酶纯化样和 FoodPro® CBL 纯化样成分接近, 其黏度仍存在较大差异 (见图 5)^[14]。

可见, 由于 FoodPro® CBL 纯化样的结构与天然果胶相似且具有较好的黏性, 因此将其浸泡于纤维素膜中, 可制作出与叶细胞壁结构相近的体外模型^[6,34]。此外, 还可将其作为增稠剂应用于食品行业。

3 结论

S22178 酶、半纤维素酶、FoodPro® CBL 和 Viscozyme® L 都能高效提取果胶, 提取率均能达到 80%。S22178 酶和 Viscozyme® L 对果胶 HG 主链有破坏, 且其几乎完全被 Viscozyme® L 降解。半纤维素酶和 FoodPro® CBL 对果胶 HG 主链和 RG-I 侧链均无显著影响。经纯化后, FoodPro® CBL 纯化样的黏度最大 ($\eta_1=1\,227\text{ mPa}\cdot\text{s}$), 半纤维素酶纯化样的黏度较低 ($\eta_1=154\text{ mPa}\cdot\text{s}$), Viscozyme® L 黏度基本为 0。FoodPro® CBL 纯化样中果胶含量为 48% (HG 主链 43%, RG-I 侧链 5%), 且相比于半纤维素酶纯化样, FoodPro® CBL 纯化样中果胶结构更丰富, 组分间颗粒大小相近, 呈现典型的剪切稀化现象, 最接近天然果胶的状态, 可用于模拟茶叶细胞壁, 研究果胶对风味物质溶出的影响。

参 考 文 献

[1] 罗龙新. 国内外茶饮料发展现状和趋势[J]. 中国茶叶, 2019, 41(1): 14-18.

LUO L X. Development status and trend of tea beverages at home and abroad[J]. China Tea, 2019, 41(1): 14-18.

[2] DING J, ZHANG H, TIAN Y J, et al. Rheological properties of prunus persica exudate: Potential effects of proteins and polyphenols [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133(15): 831-838.

[3] LI H H, LUO L Y, MA M J, et al. Characterization of volatile compounds and sensory analysis of jasmine scented black tea produced by different scenting processes [J]. Journal of Food Science, 2018, 83(10/11/12): 2718-2732.

[4] PENG B W, HUANG L, TENG J W, et al. Effect of pile fermentation on the cells of Chinese Liupao tea: The first record of cell wall of liupao tea on transmission electron microscope[J]. Food Chemistry, 2021, 361(1): 130034.

[5] CAFFALL K H, MOHNEN D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(14): 1879-1900.

[6] AGODA-TANDJAWA G, DURAND S, GAILLARD C, et al. Properties of cellulose/pectins composites: Implication for structural and mechanical properties of cell wall [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(2): 1081-1091.

[7] 苏东林, 李培骏, 李高阳, 等. 果胶提取及其银纳米粒子制备技术概述[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 331-341.

SU D L, LI P J, LI G Y, et al. An overview of the techniques for pectin extraction from plant sources and preparation of ag nanoparticles[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(10): 331-341.

[8] 孙玮璇, 田金虎, 陈健乐, 等. 提取方法对马铃薯渣果胶多糖组成及分子链构象的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 216-224.

SUN W X, TIAN J H, CHEN J L, et al. Effects of extraction methods on chemical composition and chain morphology of potato pulp pectic polysaccharide[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 216-224.

[9] CHEN J, LIANG R H, LIU W, et al. Extraction of pectin from premna microphylla turcz leaves and its physicochemical properties [J]. Carbohydr Polym,

- 2014, 102(15): 376–384.
- [10] CHEN J, LI W, LIU C M, et al. Pectin modifications: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(12/14): 1684–1698.
- [11] 谢明勇, 李精, 聂少平. 果胶研究与应用进展[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 1–14.
- XIE M Y, LI J, NIE S P. A Review about the research and applications of pectin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(8): 1–14.
- [12] WANG H F, LI H S, XIE G H, et al. Study on pectin extraction from orange peel[J]. Transactions of The Chinese Society of Agricultural Machinery, 2005, 36(3): 82–85.
- [13] ZHANG C, ZHU X X, ZHANG F P, et al. Improving viscosity and gelling properties of leaf pectin by comparing five pectin extraction methods using green tea leaf as a model material[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 105246.1–105246.8.
- [14] ZHANG C, BOZILEVA E, et al. Integration of galacturonic acid extraction with alkaline protein extraction from green tea leaf residue[J]. Industrial Crops & Products, 2016, 89(30): 95–102.
- [15] 刘新新, 刘钟栋. 低酯果胶的提取与制备技术研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(24): 278–284.
- LIU X X, LIU Z D. Research progress on extraction and manufacture technique of low methoxyl pectin[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(24): 278–284.
- [16] ZHAO Y Y, YI M, WEN J L, et al. Advances in imaging plant cell walls[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(9): 867–878.
- [17] HARRIS P J, SMITH B G. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: Structures, properties and uses in food products[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 41(s2): 129–143.
- [18] 游新侠, 仇农学. 咔唑比色法测定苹果渣提取液果胶含量的研究[J]. 食品与发酵科技, 2007, 43(1): 19–22.
- YOU X X, QIU N X. Study on pectin content in apple pomace by carbazole spectrophotometric determination method[J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 43(1): 19–22.
- [19] PARK J K, KHAN T, JUNG J Y. Structural studies of the glucuronic acid oligomers produced by gluconacetobacter hansenii strain [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 63(4): 482–486.
- [20] SUN Y L, CUI W W, GU X H, et al. Determination of degree of esterification in pectic polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(3): 682–685.
- [21] LIU L, CAO J, HUANG J, et al. Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(9): 3268–3273.
- [22] FISHMAN M L, CHAU H K, KOLPAK F, et al. Solvent effects on the molecular properties of pectins [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(9): 4494–4501.
- [23] SUGIYAMA Y, ANEGAWA A, INOKUCHI H, et al. Distribution of dissolved organic carbon and dissolved fulvic acid in mesotrophic Lake Biwa, Japan [J]. Limnology, 2005, 6(3): 161–168.
- [24] 李倩倩, 付佳璇, 赵玉梅, 等. 果胶降解与采后实质质地变化研究进展[J]. 中国食品学报, 2019, 19(9): 298–307.
- LI Q Q, FU J X, ZHAO Y M, et al. Study on pectin content in apple pomace by carbazole spectrophotometric determination method [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(9): 298–307.
- [25] RIDLEY B L, NEILL M A, MOHNEN D, et al. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling[J]. Phytochemistry, 2001, 57(6): 929–967.
- [26] 易建勇, 毕金峰, 刘璇, 等. 果胶结构域精细结构研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 292–299.
- YI J Y, BI J F, LIU X, et al. A review: Domain fine structure of pectic polysaccharides[J]. Food Science, 2020, 41(7): 292–299.
- [27] 张璇, 李秋莹, 钟克利, 等. 混合溶液中茶多酚、植酸含量的分光光度法测定及干扰消除[J]. 中国食品学报, 2020, 20(10): 262–267.
- ZHANG X, LI Q Y, ZHONG K L, et al. Concentration determination and interference elimination of the mixed solution of tea polyphenols and phytic acid[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(10): 262–267.
- [28] 白英, 杨月娇, 谢瑞鹏. 果胶-乳清蛋白混合比例和pH值对体系流变学特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 61–66.

- BAI Y, YANG Y J, XIE R P. Effects of mixture ratio and pH on the rheological properties of mixed pectin-whey protein system[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(18): 61–66.
- [29] HU W W, CHEN S G, WU D M, et al. Physicochemical and macromolecule properties of RG-I enriched pectin from citrus wastes by manosonication extraction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 176(15): 332–341.
- [30] SOMERVILLE C, BAUER S, BRININSTOOL G, et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls [J]. Science, 2004, 306 (5705): 2206–2211.
- [31] 龚玉雷. 纤维素酶和果胶酶复合体系在茶叶提取加工中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.
- GONG Y L. Study on the extraction process of tea leaves with compound enzymes including cellulase and pectinase[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013.
- [32] FISSORE E N, PONCE N M, WIDER E A, et al. Commercial cell wall hydrolytic enzymes for producing pectin-enriched products from butternut (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 93(3): 293–301.
- [33] 田玉霞, 乔书涛, 仇农学, 等. 不同分子量级苹果果胶的流变性评价[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2010, 38(1): 104–108.
- TIAN Y X, QIAO S T, QIU N X, et al. Rheological properties of apple pectins with different molecular weights[J]. Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition, 2010, 38(1): 104–108.
- [34] AGODA-TANDJAWA G, DURAND S, GAILLARD C, et al. Rheological behaviour and microstructure of microfibrillated cellulose suspensions/low-methoxyl pectin mixed systems. Effect of calcium ions[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1045–1457.

Enzymatic Extraction of Natural Pectin from Green Tea: Composition, Structure, and Properties

Luo Yu^{2,3}, Liu Yongxue¹, Fu Yangnan¹, Zhang Chen^{1,2,3*}

¹College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108

²School of Advanced Manufacturing, Fuzhou University, Quanzhou 362251, Fujian

³Fujian Food Biotechnology Innovation Engineering Technology Research Center, Fuzhou 350108)

Abstract This study employed four commercial enzymes (three cellulases: S22178, FoodPro® CBL, Viscozyme® L, and one hemicellulase) for the extraction of pectin from green tea. The investigation focused on their impact on the primary structure of pectin and explored the relationships among the composition, molecular weight distribution, particle size distribution, and pectin viscosity after purification. The goal was to develop an extraction method for obtaining structurally intact natural pectin. Results indicated that all four enzymes efficiently extracted pectin, with extraction yields reaching 80%. S22178 and Viscozyme® L disrupted the main chain structure of pectin, particularly its homogalacturonan (HG) backbone, while the hemicellulase and FoodPro® CBL did not significantly affect the main and side chain structures of pectin. The purified sample with FoodPro® CBL exhibited the highest viscosity ($\eta_1=1\,227\text{ mPa}\cdot\text{s}$), whereas the hemicellulase-purified sample had lower viscosity ($\eta_1=154\text{ mPa}\cdot\text{s}$), and Viscozyme® L showed nearly zero viscosity. In conclusion, pectin obtained through the FoodPro® CBL process closely resembled the original pectin state, with a purified pectin content of 48% (HG backbone 43%, RG-I side chain 5%). The particle sizes among components were similar, exhibiting good rheological properties and displaying typical shear-thinning behavior.

Keywords natural pectin; carbohydrase; chemical composition; molecular weight distribution; viscosity