

茶花粉經*Aspergillus niger* 發酵之酵素活性與抗氧化活性評估

高嬿婷^{1*} 陳錦樹²

¹ 嘉南藥理大學保健營養系
² 中興大學食品暨應用生物科技學系

摘要

花粉是一種常流傳於民間的食用藥物，也廣泛被用於健康之補助食品。台灣花粉產量大宗是茶花粉，但花粉往往有厚實的外壁影響吸收，因此本研究探討 *A. niger* BCRC 32073 分泌的胞外酵素種類，再分析藉由 *A. niger* 固態發酵(SSF)或液態發酵(SmF)茶花粉後之酵素作用及抗氧化活性表現。實驗結果顯示 *A. niger* BCRC 32073 能分泌產生脂解酶(lipase)、蛋白酶(protease)及纖維酶(cellulase)和半纖維酶(hemicellulase)。纖維素酶包含 CMCCase 及 Avicelase;半纖維酶則包含 xylanase。進一步利用 *A. niger* 發酵不同濃度的花粉檢體於固態發酵及液態發酵下觀察酵素活性發現，固態發酵以加等量的水分、液體發酵則以 10 倍及 15 倍水含量發酵之各酵素活性表現最佳。抗氧化活性則以 10 倍水含量之液態花粉發酵液表現最佳。

關鍵詞：茶花粉、固態發酵、液態酵素、抗氧化活性

*通訊作者:嘉南藥理大學保健營養系
Tel:+886-6-2664911#3411
Fax:+886-6-2667327
E-mail:kaolin@mail.chna.edu.tw

壹、前言

人類必須從食物中長期不斷地補充營養來維持生命，其飲食不僅關係著生存、健康問題，也是左右疾病風險的重要影響因子〔Pihlanto 等人，2010〕。花粉在許多國家已廣泛被用於有助益身體健康之補助食品，尤其在歐洲及亞洲更將花粉當做流傳民間的藥物(folk medicine)〔Campos 等人，1997〕。中國

食用花粉的歷史悠久，前人在《神農本草經》曾記載香蒲花粉(蒲黃)和松樹花粉(松黃)入藥，氣味甘平、無毒，主治心腹寒熱邪氣、消小便、消瘀血，久服輕身、益氣力、延年，列為上品。《新修本草》亦提到松花粉可健身療病，“甘溫無毒、潤心肺、除風止血亦可釀酒……久服令人輕身”。近年更多篇科學研

究報告證實花粉含多種人體所需之營養素，並富含調節生理之機能性物質〔Paramas 等人，2006; Campos 等人，1997; Grunfeld 等人，1989; Kao 等人，2011〕。但由於花粉有厚實的內壁與外壁，影響消化吸收，若事先進行破壁步驟必將有助於內容物的釋出，增加生物體消化利用率。

花粉外壁主要成份是孢粉(sporopollenin) (John 及 John, 2006 ; Nina 及 Valentina, 2004 ; Semia 等人, 2005)、纖維素、類胡蘿蔔素、類黃酮素、類脂物質及蛋白質等 (李, 2005)。因含大量孢粉素(類胡蘿蔔素脂質衍生物)可抗酸、抗鹼、抗滲透，既無法被酸鹼、放射線破壞、亦難被生物性分解，故此雄性配子體(花粉)可在自然界保存上億年而不損壞。應用在演化、考古領域不失一項可利用的良好工具，但長期以來對花粉的食用吸收有很大的爭議性，有學者認為此特性造成生物利用率並不高。花粉內壁則較薄、較軟、且有彈性，成份大致含有纖維素、果膠質、半纖維素及蛋白質等，較易被物理及化學方法破壞。不同植物來源的萌發孔數目不同，孔徑大小和位置也不一樣，當花粉粒遇適合發育親合性佳的柱頭，花粉管就會由萌發孔伸出，該孔處之外壁輕薄易突破。一般推測花粉內容物的釋出主因是萌發孔的內壁破裂導致內容物流出。

有效萃取花粉內容物，增進花粉的生物利用率，最佳方式是尋求合宜的花粉破壁步驟以提高萃取率。最適宜且溫和的方法可藉由多種酵素配合以水解細胞壁，水解過程中，添加適量的水有助於花粉破壁，當花粉遇水，內層(intine)及原生質(protoplasm)吸水膨脹時，花粉體積也將增大，更利於酵素滲透進入暴露的內

層作用(Human 及 Nicolson, 2006)。然而不同的酵素來源常是由微生物分泌純化而來。

自然界分解以上細胞壁的商業分解酵素主要是由真菌、細菌和原生生物所製造，可將細胞壁分解，促使內容物如糖類、蛋白質、脂肪及其他機能性等營養物質釋放出來，並可降解生成易吸收的還原糖、胺基酸及脂肪酸等，提高生物攝食後的利用率。事實上，微生物發酵技術早已深入生活，用於增進多項原料的吸收利用及提升保健功效，例如酒醋、乳酸菌產品或納豆等發酵製品。

人類常應用之蜜蜂相關產品品項繁多，除了花粉之外，其他諸如蜂蜜、蜂膠、蜂毒、蜂蠟、蜂蛹等，雖有各不同領域的研究報告，但針對花粉發酵相關的報告卻很少，本研究利用微生物之酵素發酵茶花粉，進行破壁探討。無論如何花粉的破壁作用，在生物利用方面將更加強營養素的消化利用率。故研究設計以 *Aspergillus niger* BCRC32073 發酵不同水含量的固態與液態花粉基質，分別比較各酵素活性的差異，及發酵期間抗氧化活性的變化。

貳、材料與方法

一、茶花粉之發酵

茶花粉(*Camellia sinensis*)是台灣產量最多的花粉源。本茶花粉原料購自永祥養蜂場(彰化縣)之新鮮乾燥花粉(1 公斤真空包裝)，粉源產地是南投縣鹿谷鄉。實驗期間之花粉檢體以小包裝真空分裝，於-20°C 保藏，可分批取出使用。

(一)、孢子懸浮液的製備

將 *Aspergillus niger* BCRC32073 培養在 PDA 斜面培養基上，於 30°C 下培養 4-5 天至

產孢旺盛。以 6 ml 含 0.1% Tween 80 無菌水沖洗斜面培養基(振盪後放置 2 分鐘)，配合刮取斜面殘存孢子製成孢子懸浮液。隨即利用血球計數器計算孢子數，稀釋 10 倍得到約 2×10^7 spores/ml。

(二)、固態發酵(Solid-SubstrateFermentation, SSF)

花粉稱重加實驗設計之適量的水，經滅菌處理後接種 2% *Aspergillus niger* 孢子(2×10^7 spores/ml) (V/W)，30°C 培養五天，每 12 小時取樣 2 克檢體加 18 ml 無菌蒸餾水於 150 rpm 下震盪 2 小時後，離心取上清液分析。

(三)、液態發酵(Submerged Fermentation, SmF)

花粉稱重加實驗設計不同倍率的水溶液，經滅菌處理後接種 2% *A. niger* 孢子(2×10^7 spores/ml)(V/V)，30°C，150 rpm 培養，每 12 小時取樣離心後取上清液分析。

二、酵素定性分析

參考 Teather 及 Wood 的方法(1982)以膠體酵素擴散實驗(Gel-diffusing assay)觀察脂解酶(lipase)、蛋白酶(protease)、澱粉分解酶(α -amylase)、纖維酶(cellulose)及半纖維酶(hemicellulase)活性。

實驗步驟取 Nutrition agar (NA)或 Potato dextrose agar (PDA)分別加入 2% olive oil 與 1% skim milk、soluble starch、CMC，Avicel，xylan 或 locust bean gum，鋪平板後壓洞(直徑 7mm)，分別加入 SmF 酸酵後上清液或 SSF 酸酵後萃取液 100 μ l，置於 30°C 下放置 24 hr。觀察結果時，蛋白酶的生成可直接觀察。其他分別在脂解酶測定培養基中加入酚紅；soluble

starch 之平板內加入碘液；CMC，Avicel，xylan 及 locust bean gum 培養基中則加入 0.5% Cango red 蓋過平板，靜置 15-20 分鐘後倒出液體，再加入二次蒸餾水靜置 5 分鐘後倒出液體，此步驟進行兩次以清除多餘染劑。最後分別觀察個別透明環之大小。

CMC，Avicel，xylan 及 locust bean gum 當受質，可檢測表示 CMCase、Avicelase、Xylanase 及 Mannosidse 等酵素的活性表現。

三、抗氧化分析

抗氧化分析參考 Zhou 和 Yu (2006) 測定 DPPH 自由基清除能力。取 4 ml 之花粉樣品萃取物，加入 1 ml 新鮮配製 10 mM Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 之甲醇溶液，均勻混合靜置 30 分鐘後，測其 517 nm 下的吸光值，吸光值愈低表示清除(DPPH)自由基的能力越強。

$$\text{Radical scavenging activity} =$$

$$[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$$

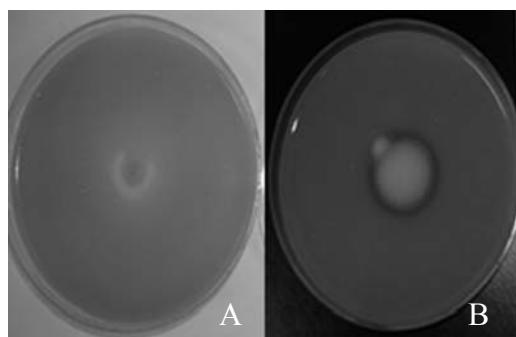
參、結果與討論

一、*Aspergillus niger BCRC32073* 生成酵素

A. niger 能分泌多種胞外酵素(Bonnin 等人，2002；Ismail 等人，1996)。首先利用膠體酵素擴散實驗(Gel-diffusing assay)觀察 *A. niger* 分泌之酵素類型。取 *A. niger* 接菌於各培養基中，發現培養基中的油脂(olive oil)因黴菌產生的脂解酶而分解為脂肪酸，滴入酚紅(Phenol-sulfonphthalein，0.02~0.05% 的醇溶液)，呈現黃色的酸性反應(圖 1(A))；圖 1(B)

培養基中的脫脂奶(skim milk)也因酪蛋白經黴菌所產蛋白酶分解而呈現透明環；圖 2 則滴入碘液觀察，因培養基中的澱粉未被分解而呈現藍紫色。圖 3 則是將纖維受質(CMC、xylan、Avicel PH 101)加入培養基中，以剛果紅染色判斷是否分泌纖維素酶及半纖維素酶，其實驗原理是先加入剛果紅於平板中染色 10-15 分鐘，因剛果紅可以跟大分子多醣類(CMC、xylan、Avicel PH 101)緊密結合形成紅色。當有纖維素酶存在下分解了平板中的纖維素或半纖維素成為小分子糖類，剛果紅因無法與小分子糖緊密結合，用蒸餾水沖洗 2-3 次後，剛果紅就會被脫色，呈現透明區域(圖 3)。

故實驗結果顯示 *A. niger* BCRC 能分泌產生脂解酶(lipase)(圖 1(A))、蛋白酶(protease)(圖 1(B)) 及 纖 維 酶 (cellulase) 和 半 纖 維 酶 (hemicellulase) (圖 3)，但缺少生成澱粉分解酶



(α -amylase) (圖 2)。

圖 1、*A. niger* BCRC 32073 分泌胞外脂解酵素(A)及蛋白質分解酵素(B)

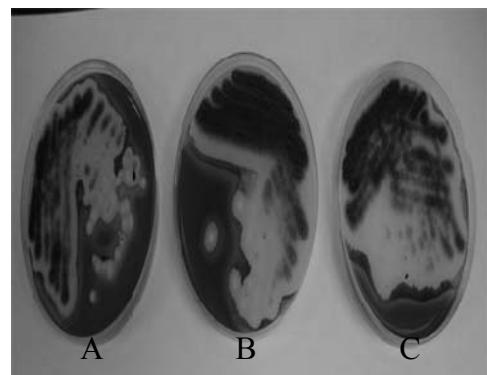


圖 3、*A. niger* BCRC 32073 分泌胞外纖維分解酵素(CMCase(A))；Avicelase(B)及半纖維分解酵素(xylanase(C))

二、*A. niger* 發酵花粉之酵素活性條件影響

保護花粉粒的厚實細胞壁含大量纖維及半纖維素，影響生物食用後的營養價值及機能性。根據以上實驗結果，本研究確定選擇以產多種酵素之 *A. niger* BCRC32073 進行茶花粉發酵探討，期待以產生複合酵素系統之生物法自然分解花粉壁，提升茶花粉營養含量及利用率。

茶花粉固態發酵(SF)水分濃度選擇從 1:1、1:2、1:3 到 1:4 (茶花粉:無菌蒸餾水, W/W) 4 個不同水含量為變因；茶花粉液態發酵(SmF)選擇則從 5 倍、10 倍、15 倍到 20 倍(茶花粉:無菌蒸餾水, W/V) 茶花粉 4 種不同的水分含量濃度為變因；初步分別以酵素膠體擴散法探討相關纖維素酶(CMCase, Avicelase, xylanase 及 mannosidase) 於 60 小時內花粉發酵檢體中的活性表現。

圖 4 是以含 1% CMC 之 PDA 培養基加入 1:1~1:5 (SF) 花粉發酵檢體萃取液，置於 30°C



圖 2、*A. niger* BCRC 32073 缺乏分泌胞外澱粉分解酶

下 24 hr 後加入剛果紅(Cango red)後呈現透明環的結果。茶花粉固態及液態發酵結果如表一。整體而言，SSF 以 1:1 (50%)、液體發酵則以 10 倍及 15 倍水含量 (茶花粉:無菌蒸餾水，W/V)發酵之各酵素活性表現最佳。

SSF 的影響變數很多，其中最重要的是濕度及選擇適合的基質與顆粒大小(Singhania 等人，2009; Couto 及 Sanromán，2006；Patil 及 Dayanand，2006)。一般對真菌(fungi)及酵母菌發酵而言，40%-60%的濕度(moisture)已足夠，僅有少部份細菌適合在此條件下發酵(Singhania 等人，2009; Couto 及 Sanromán，2006)。Kheng 和 Omar (2005) 研究 *A. niger* USM AI 1 固態發酵棕櫚仁蛋糕(palm kernel cake)時，以最初 43%溼度可產生最高量 xylanase。Couri 等 (2000)以 *A. niger* 3T5B8 接種於最終溼度調整為 60% ($Aw=0.9250$)之發酵蔬果廢棄物(香蕉皮、芒果皮、樹薯皮、麥麩)中以產生最適酵素活性。本研究 1:4 (SSF)在發酵 48 小時後，CMCase 及 Avicelase 酵素活性幾乎已經式微(表一)，此結果顯示 1:4 (SSF)濃度之水分含量明顯較高。因黴菌生長需適量的

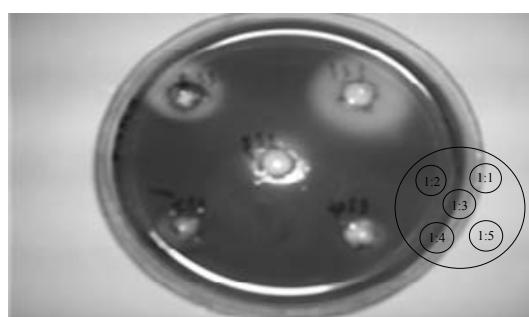


圖 4、在 1% CMC 之 PDA 中，以 *A. niger* BCRC 32073 發酵茶花粉 24h(SSF)後分泌胞外半纖維分解酵素 cellulase 的表現情形。

營養及氧氣供應，低水活性基質會使物質傳遞效率減弱；高水活性則阻礙基質的孔隙通透性(Pal 及 Khanum，2010)。液態發酵結果發現含水量 10 倍及 15 倍的花粉發酵上清液之各酵素活性最佳(表一)，是較適合液態發酵的條件。

Bisaria 和 Ghose (1981) 提到當葡萄糖及纖維雙醣產生過多，會抑制 CMCase, Avicelase 及 β -glucosidase(以上均屬於 cellulase)之酵素活性。即當纖維素於分解纖維素物質時，過多的產物堆積會抑制酵素活性。除此，固態發酵較不如液態振盪便於降低週圍產物的濃度，故結果常不如液態發酵之表現。

三、抗氧化活性變化

自由基清除能力是一般檢驗物質的抗氧化能力重要指標項目之一。自由基清除能力強的物質，可以有效預防心血管疾病。自由基清除能力影響著多形態的生理作用還包括血管擴張(vasodilatory)、抗癌(anticarcinogenic)、抗發炎(anti-inflammatory)、抗菌(antibacterial)、增進免疫(immune-stimulating)、抗過敏性 (antiallergic)、抗病

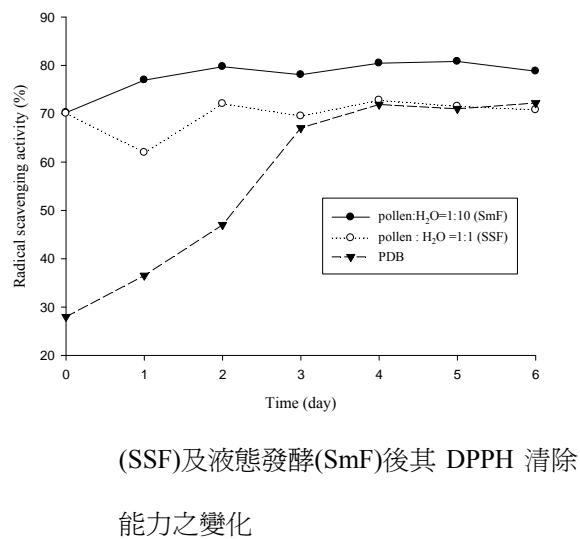
毒(antiviral)、影響雌激素(estrogenic effect)和抑制某些酵素反應(inhibitors of specific enzymes) (Kroyer 及 Hegedus, 2001)。利用DPPH自由基清除能力之實驗(圖 5)顯示 SmF (1:10)一至六天仍然維持有較高的自由基清除能力，花粉發酵一天後，自由基清除能力由未發酵花粉的 70% 增加維持在 80%左右。

表一、*A. niger* 發酵茶花粉 12 到 60 小時各檢體之纖維酶活性

	SSF (W/W)				SmF (W/V)			
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:10	1:15	1:20
CMCase								
12h	6	3	1	1	5	8	6	7
24h	9	4	3	2	8	8	7	7
36h	7	4	2	1	6	5	6	6
48h	7	8	2	0	5	3	10	7
60h	5	10	3	0	2	4	9	6
Avicelase								
12h	10	4	2	1	5	10	10	10
24h	11	7	3	1	9	10	9	9
36h	12	8	4	2	10	10	10	8
48h	10	8	2	1	7	10	10	8
60h	5	10	1	0	8	12	12	9
Xylanase								
12h	7	5	4	3	8	9	9	9
24h	8	5	4	4	8	11	10	8
36h	15	7	5	5	8	9	10	6
48h	8	10	3	5	8	9	10	7
60h	6	10	4	1	6	7	10	6
Mannosidase								
12h	12	6	5	5	8	9	8	8
24h	6	5	7	3	8	9	8	6
36h	7	5	4	5	9	8	10	8
48h	7	11	5	6	8	9	8	8
60h	7	6	6	6	9	8	7	9

SSF (1:1)除第一天下降外，清除能力亦在 70% 左右。第一天下降的原因推測是因加入水分，且因固體發酵之酵素作用傳遞較緩慢所致。比較特別的是接入 *A. niger* 的 PDB 培養基在第三天後也表現良好的自由基清除能力，此顯示固態發酵的抗氧化能力大部分可能來自菌體本身存在的抗氧化特性。

圖 5. 花粉經 *A. niger* BCRC 32073 固態發酵



肆、結論

根據酵素反應環的研究結果顯示液態發酵之各纖維酶活性優於固態發酵，尤以 10 倍及 15 倍水含量發酵之各酵素活性表現最佳；其次無論液態或固態發酵均有良好的去氫離子能力，特別是液態發酵六天內均維持 80%左右之 DPPH 清除力。

花粉在許多國家已被廣泛當做流傳民間的藥物(folk medicine)，用於緩和或治療感冒、發燒、貧血、腸胃發炎及潰瘍、過敏及老化現

象，甚至一般日常生活中用於單純滋補(tonic primarily)及養顏、防止老化等 (Campos et al., 1997)。為了增加食用效果，利用生物培養的液態發酵會是一個具有應用潛力的議題。

伍、謝辭

本研究由行政院國家科學委員會專題計畫 (No. NSC 97-2221-E-005-005) 補助，在此致謝！

陸、參考文獻

- 李幸阳, (2005), 淺談花粉破壁.中國養蜂 , 56:29
- Bisaria, V. S., Ghose, T. K. (1981), Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms enzyme and products. Enzyme and Microbial Technology, 3, 90-104.
- Bonnin, E., Saulnier, L., Brunel, M., Marot, C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Thibault, J.-F. (2002), Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. Enzyme and Microbial Technology, 31, 1000–1005.
- Campos, M., Markham, K. R., Mitchell, K. A. (1997), Cunha A. P., An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. Phytochemical analysis, 8, 181-185.
- Couri, S., Costa Terzi, S., Pinto, G. A. S., Freitas, S. P., Costa, A. C. A. (2000), Hydrolytic enzyme production in solid-state

- fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. Process Biochemistry, 36, 255-261.
6. Couto, S. R., Sanromán, M. Á. (2006), Application of solid-state fermentation to food industry-A review. Journal of food Engineering, 76, 291-302.
7. Grunfeld, E., Vincent, C., Bagnara, D. (1989), High-performance liquid chromatography analysis of nectar and pollen of strawberry flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37, 290-294.
8. Human H., Nicolson S. W. (2006), Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe grestheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). Phytochemistry, 67, 1486-1492.
9. Ismail, A.-M. S. (1996), Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. Process Biochemistry, 7, 645-650.
10. John R. R., John J. S. (2006), Pollen development in *Epilobium* (Onagraceae): Late microspore stages (a review). Review of palaeobotany and playnology , 140, 91-112.
11. Kao, Y.-T., Lu, M.-J., Chen, C., (2011), Preliminary analyses of phenolic compounds and antioxidant activities in tea pollen extracts. Journal of Food and Drug Analysis, 19, 470-477.
12. Kheng, P. P., Omar, I. C. (2005), Xylanase production by a local fungal isolate *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. Journal of Science and Technology, 27, 325-336.
13. Kroyer G., Hegedus N. (2001), Evaluation of bioactive properties of pollen extract as function dietary food supplement. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2, 171-174.
14. Nina I. G., Valentina V. G., (2004), Exine development in *Encephalartos altensteinii* (Cycadaceae): Ultrastructure, substructure and the modes of sporopollenin accumulation. Review of palaeobotany and palyontology, 132, 175-193.
15. Pal, A., Khanum, F. (2010), Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DF-5h through solid-state- fermentation. Bioresource Technology, 101, 7563-7569.
16. Paramas, A. M. G., Barez, J. A. G., Marcos, C. C., Villanova, R. J.G., Sanchez, J. S. (2006), HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). Food Chemistry, 95, 148-156.
17. Patil, S. R., Dayanand A. (2006),

- Optimization of process for the production of
fungal pectinases from deseeded sunflower
seed head in submerged and solid-state conditions.
Bioresource Technology, 97, 2340-2344.
18. Pihlanto, A., Virtanen, T., Korhonen, H.
(2010), Angiotensin I converting enzyme
(ACE) inhibitory activity and
antihypertensive effect of fermented milk.
International Dairy Journal, 20, 3-10.
19. Semia, B. S.-L., Mohamed, A. M., Joh, R. R.
(2005), Pollen wall ultrastructure and
ontogeny in *Heliotropium europaeum* L.
(Boraginaceae). Review of palaeobotany and
playnology, 133, 135-149.
20. Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, G. R.,
Pandey, A. (2009), Recent advances in
solid-state fermentation. Biochemical
Engineering Journal, 44, 13-18.
21. Teather, R. M., Wood, P. J., (1982), Use of
congo red-polysaccharide interaction in
enumeration and characterization of
cellulolytic bacteria from the bovine rumen.
Appl. Environ. Microbiol. 43, 777-780.
22. Zhou, K., Yu, L., (2006), Total phenolic
contents and antioxidant properties of
commonly consumed vegetables grown in
Colorado. LWT-Food Science and
Technology, 39, 1155-1162.

Enzymatic activity and antioxidant activity of tea pollen is fermented by *Aspergillus niger*

Yen Ting Kao^{1,2 *} Chin shuh Chen²

¹Department of Health and Nutrition,
Chia-Nan University of Pharmacy and Technology, Tainan, 71710, Taiwan, R.O.C.

²Department of Food Science and Biotechnology,
National Chung Hsing University, Taichung, 402, Taiwan, R.O.C.

Abstract

The bee pollen is usually used as a folk medicine, and is a good nutritional supplement with beneficial effect of improving health. Tea pollen is one of the main staples of bee-collected pollen grains in Taiwan. Nevertheless, it is to influence the absorption as a result of the pollen envelope. The purpose of the study was to investigate the extracellular enzymes secreted by the fungus *Aspergillus niger* BCRC32073. And it is evaluation of the enzyme activity and antioxidant properties for tea pollen was fermentation by *A. niger* BCRC32073 in solid-substrate fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). First, the fungus *A. niger* can produce multiple extracellular enzymes, such as lipase, protease, cellulose and hemicellulose. The cellulase has CMCCase and Avicelase . And hemicellulase has xylanase .The best enzymatic activity are tea pollen added equal volume of water for SSF, and 10 times or 15 times water for SmF. Furthermore, the analysis of the greatest antioxidant ability is 10 times water is added to tea pollen for SmF.

Key words: Tea pollen, Solid-Substrate Fermentation (SSF), Submerged Fermentation (SmF), Antioxidant activity

*Correspondence: Department of Health and Nutrition, Chia-Nan University of Pharmacy and Technology, Tainan, 71710, Taiwan, R.O.C.

Tel: +886-6-2664911#3411

Fax: +886-6-2667327

E-mail:kaolin@mail.chna.edu.tw