

酶法提取鲍鱼多糖的研究*

殷红玲 杨静峰 李冬梅 董秀萍 姜丹 李 韬 朱蓓薇

(大连轻工业学院生物与食品工程学院,大连,116034)

摘 要 选用木瓜蛋白酶酶解鲍鱼肉,提取多糖,确定了温度、时间、pH 值、料液比、加酶量对鲍鱼多糖得率的影响。结果表明,木瓜蛋白酶的适宜反应条件为温度 55℃,时间 2h,pH8.0,料液比 1:40,加酶量 2.0%,在此条件下,鲍鱼多糖的得率为 19.60%。

关键词 鲍鱼,木瓜蛋白酶,酶解

多糖和糖复合物以其在生物体内重要的生物功能和很好的生物活性,在生命科学和医药上具有巨大的应用价值^[1],可增强机体免疫力、降低血糖^[2],抗凝血^[3],抗肿瘤^[4],抗炎症^[5],抗癌及抗艾滋病毒等视^[6]。鲍鱼,属软体动物门腹足纲原始腹足目鲍科,被列为八珍之首,是海洋中氨基酸含量最全面,脂肪、胆固醇含量最低的生物之一,具有丰富的营养价值和药用价值。鲍鱼多糖是重要的生理活性物质之一,对其研究主要集中在功能和组成方面。沈鸣^[7]等人研究发现,鲍鱼多糖具有增强免疫力、抗癌功能;余志刚^[8]等人从有机化学的角度研究了多糖组成,但是国内外有关鲍鱼多糖提取的报道甚少。文中系统地研究了酶法提取鲍鱼多糖,工艺简便,条件温和,提取率高,为鲍鱼的综合开发及深加工提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

皱纹盘鲍,大连獐子岛渔业集团有限公司;木瓜蛋白酶,广州市天河区远天酶制剂厂;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器与设备

FW100 高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;UV-2100 型紫外可见分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;LD4-2A 低速离心机,北京医用离心机厂;HH-4 数显恒温水浴锅,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;LG-1.0 型真空冷冻干燥机,沈阳航天新阳速冻设备制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理

第一作者:硕士研究生(朱蓓薇教授为通讯作者)。

* 辽宁省教育厅科技攻关项目(No. 05L069)

收稿日期:2006-07-19, 改回日期:2006-10-23

将新鲜鲍鱼剔除鲍壳、内脏,冷冻干燥到水分含量低于 9%,然后将鲍鱼肉粉碎,粒度控制在 20 目以下,备用。

1.3.2 鲍鱼中多糖的提取方法

称取一定量经过预处理的鲍鱼肉,溶于 pH 缓冲液中,以温度、时间、pH 值、料液比、加酶量为可变因素,在不同条件下酶解,然后迅速升温至 90℃灭酶 10 min,离心(4000 r/min)10 min,用 3 倍 95%乙醇沉淀,4℃静置 10 h 以上,离心分离得到多糖,待测。

1.4 鲍鱼多糖的测定

1.4.1 总糖测定

采用苯酚-硫酸法^[9]。

1.4.2 还原糖测定

采用 DNS 法^[9]。

1.4.3 多糖含量测定

多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量。

1.4.4 多糖得率的计算方法

$$\text{多糖得率}/\% = \frac{\text{提取物中所含多糖质量}}{\text{原料干品质量}} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 不同提取条件对多糖得率的影响

2.1.1 温度对多糖得率的影响

采用 1.3.2 的方法,酶解条件为:pH 7.0,料液比 1:30,加酶量 2.5%,于 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃下分别酶解 2h,结果见图 1。

从图 1 可以看出,温度升高,多糖提取率升高,达到最大值后继续升高温度,提取率下降。随着温度的升高,反应物的能量增加,使反应速度加快。超过其最适温度后,酶发生变性,使酶活力减弱,直至完全丧失活力,从而影响酶对鲍鱼肉的水解效果,不利于多糖的提取,从而使其得率随着温度的升高迅速下降。因此,木瓜蛋白酶酶解的最适温度为 50℃。

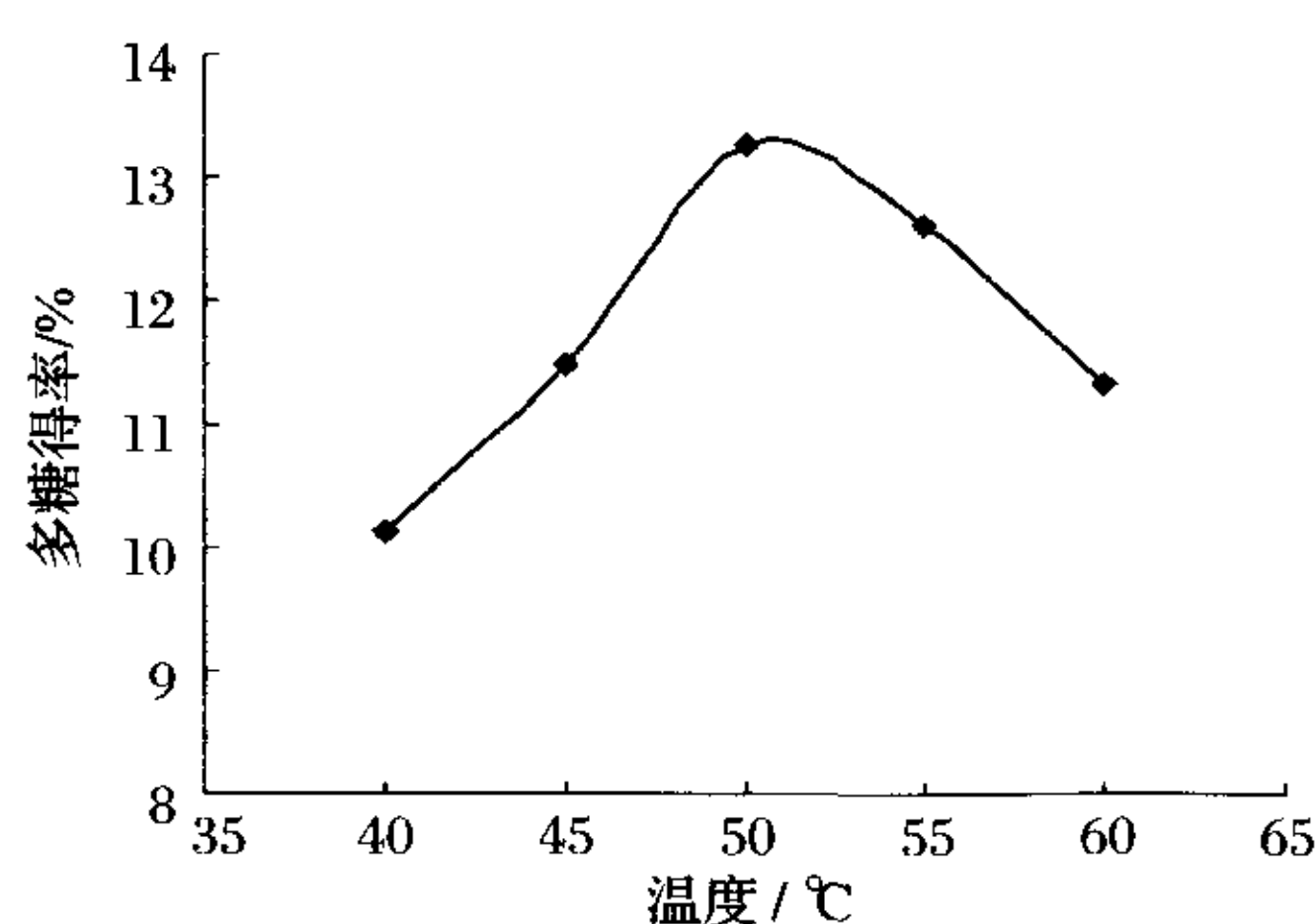


图1 温度对多糖得率的影响

2.1.2 提取反应时间对多糖得率的影响

采用 1.3.2 的方法, 温度 50℃, pH7.0, 料液比 1:30, 加酶量 2.5%, 分别反应 1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h, 结果见图 2。

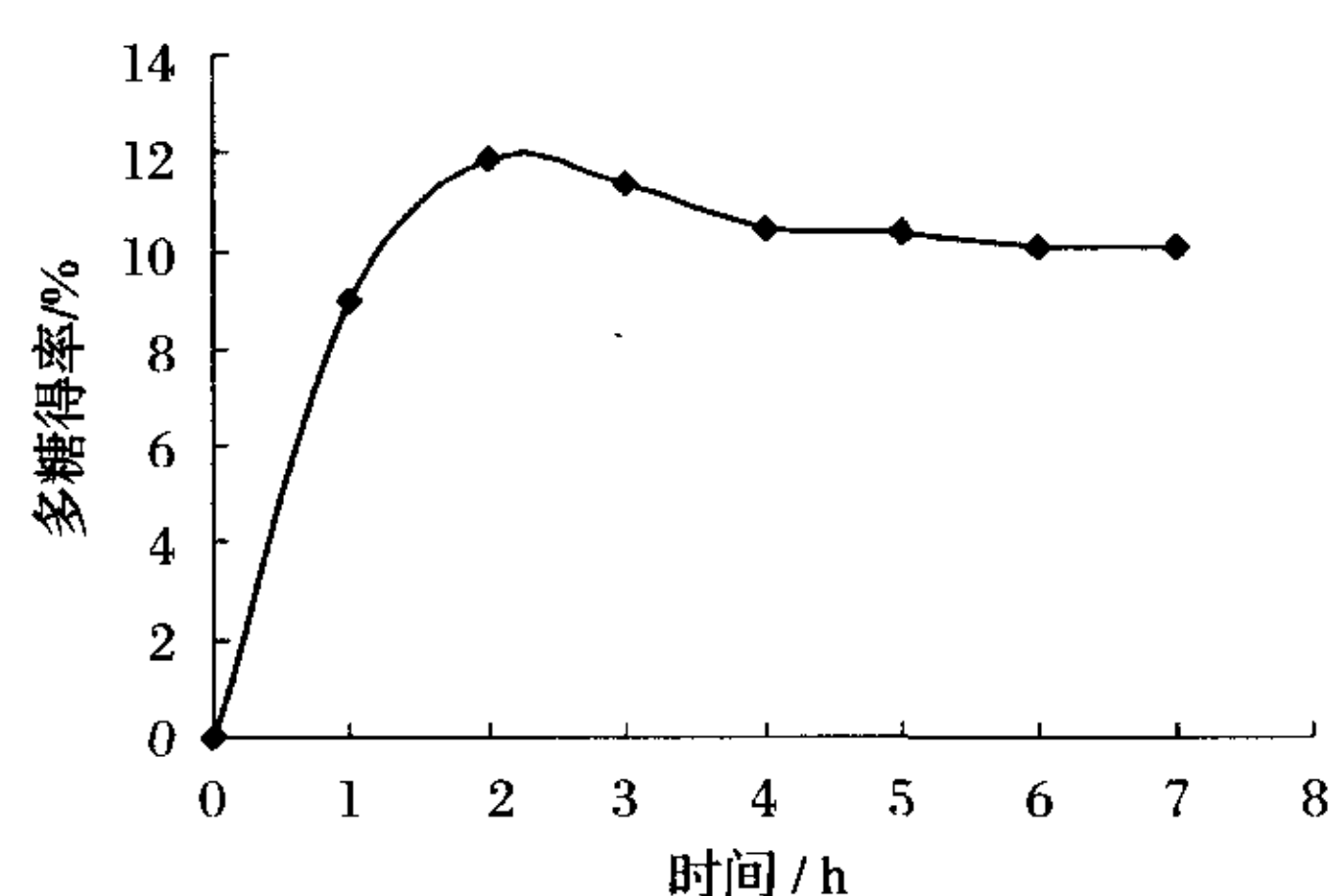


图2 时间对多糖得率的影响

由图 2 可知, 随着时间的延长, 多糖的提取率呈不断上升的趋势, 到 2 h 时达到最大提取率, 再延长反应时间, 多糖的提取反而下降。原因可能是由于反应到 2h 的时候, 蛋白酶作用已经比较充分, 使多糖最大限度的溶出, 随着时间的延长, 某些多糖又附着在大分子蛋白上, 沉降到底部, 反而导致多糖含量降低。另外, 酶解时间过长, 也会使酶液腐败, 当反应进行一段时间后, 随着底物的减少, 酶活力的下降, 水解的程度也趋于平缓。因此 2h 为最佳提取时间。

2.1.3 pH 对多糖得率的影响

采用 1.3.2 的方法, 料液比 1:30, 加酶量 2.5%, pH 选择 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 于 50℃ 水浴中酶解 2h, 结果见图 3。

如图 3 所示, pH7.5 时, 酶解体系中的多糖得率最高。pH 影响酶活力, 适当的 pH 值, 通过静电作用, 维持了酶活性中心的最佳三维构象, 促进酶与底物结合; pH 还会影响酶催化速度, pH 不同, 酶及作用底物所带电荷不同, 酶的立体构象以及酶与底物的亲和力不同, 催化速度也就不同。所以木瓜蛋白酶的最适 pH 为 7.5。

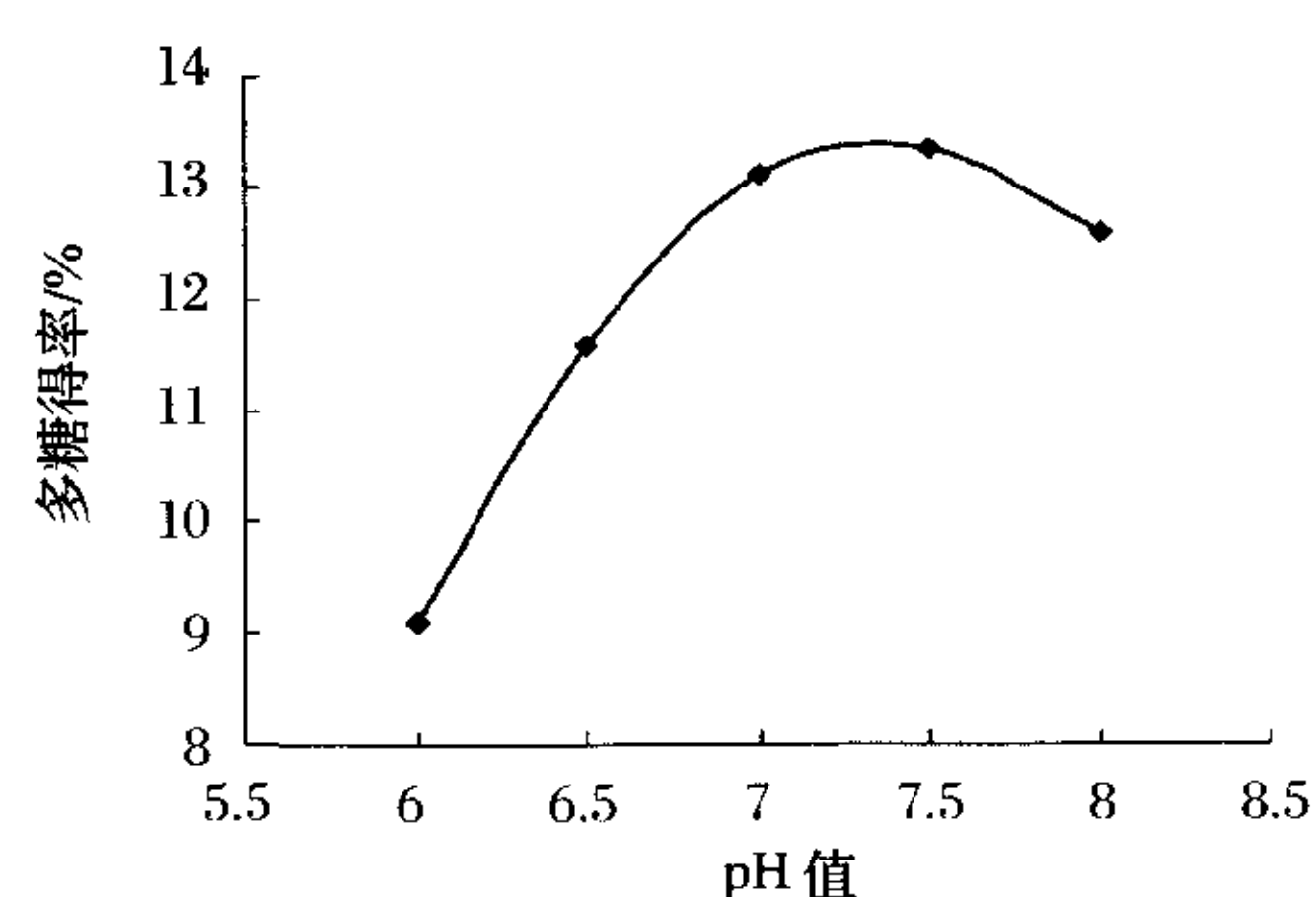


图3 pH 值对多糖得率的影响

2.1.4 料液比对多糖得率的影响

采用 1.3.2 的方法, pH7.5, 加酶量 2.5%, 分别选取料液比 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 在 50℃ 的水浴中酶解 2h, 结果见图 4。

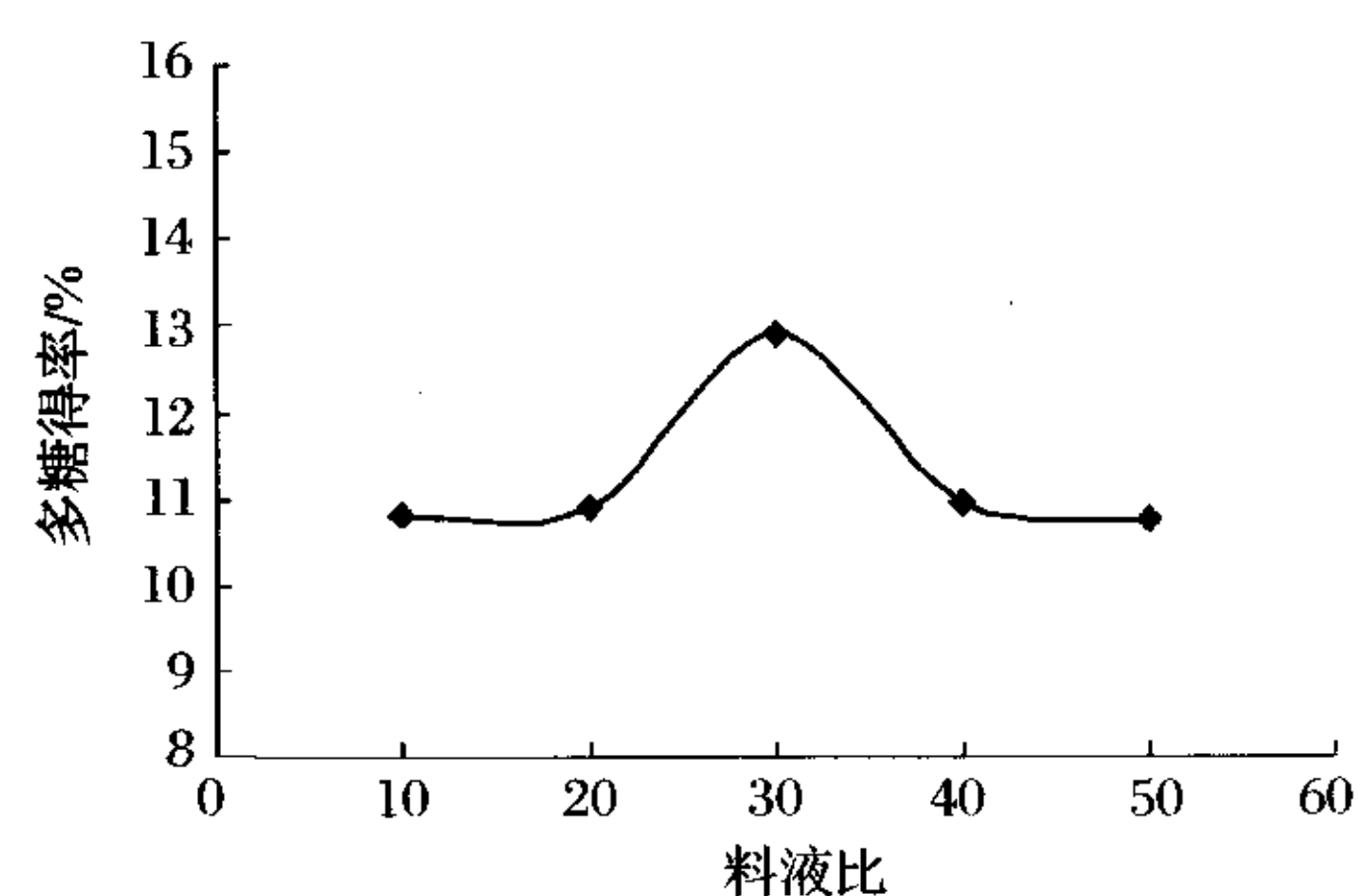


图4 料液比对多糖得率的影响

如图 4 所示, 料液比从 1:10 升至 1:20 时, 多糖得率增幅较小, 1:20 升至 1:30 时得率增加较快, 当料液比达到 1:30 时, 多糖的提取率最高, 随着加水量的增加, 多糖的提取率反而下降。料液比会直接影响到多糖的提取率, 过小或过大都会造成负面影响, 过小时底物和产物对酶促反应有一定的抑制作用, 随着料液比增加可以提高酶促反应速度, 当料液比过大时, 对酶浓度造成了一定的稀释, 不利于多糖的提取。因此综合考虑, 料液比为 1:30 较为理想。

2.1.5 加酶量对多糖得率的影响

采用 1.3.2 的方法, 在温度 50℃, 料液比 1:30, pH7.5, 加酶量分别为 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5% 的条件下反应 2 h, 结果见图 5。

如图 5 所示, 当加酶量在 0.5~2.0% 时, 多糖提取率迅速增加, 继续增大加酶量至 2.5% 时, 多糖提取率的上升趋势平缓。

由此可见, 酶的添加量直接影响着多糖的提取率, 原因在于, 在保持体系中其他成分不变的条件下, 随着酶浓度的上升, 蛋白酶与蛋白质分子肽链的接触机会增加, 在同一时间内水解的肽链数不断增加, 蛋白质水解速度提高, 致使多糖更快地分离出来。达到

最大值后,随着酶浓度的升高,底物完全被酶分子所饱和,蛋白被水解的速度趋于稳定。因此,加酶量 2.0% 较合适。

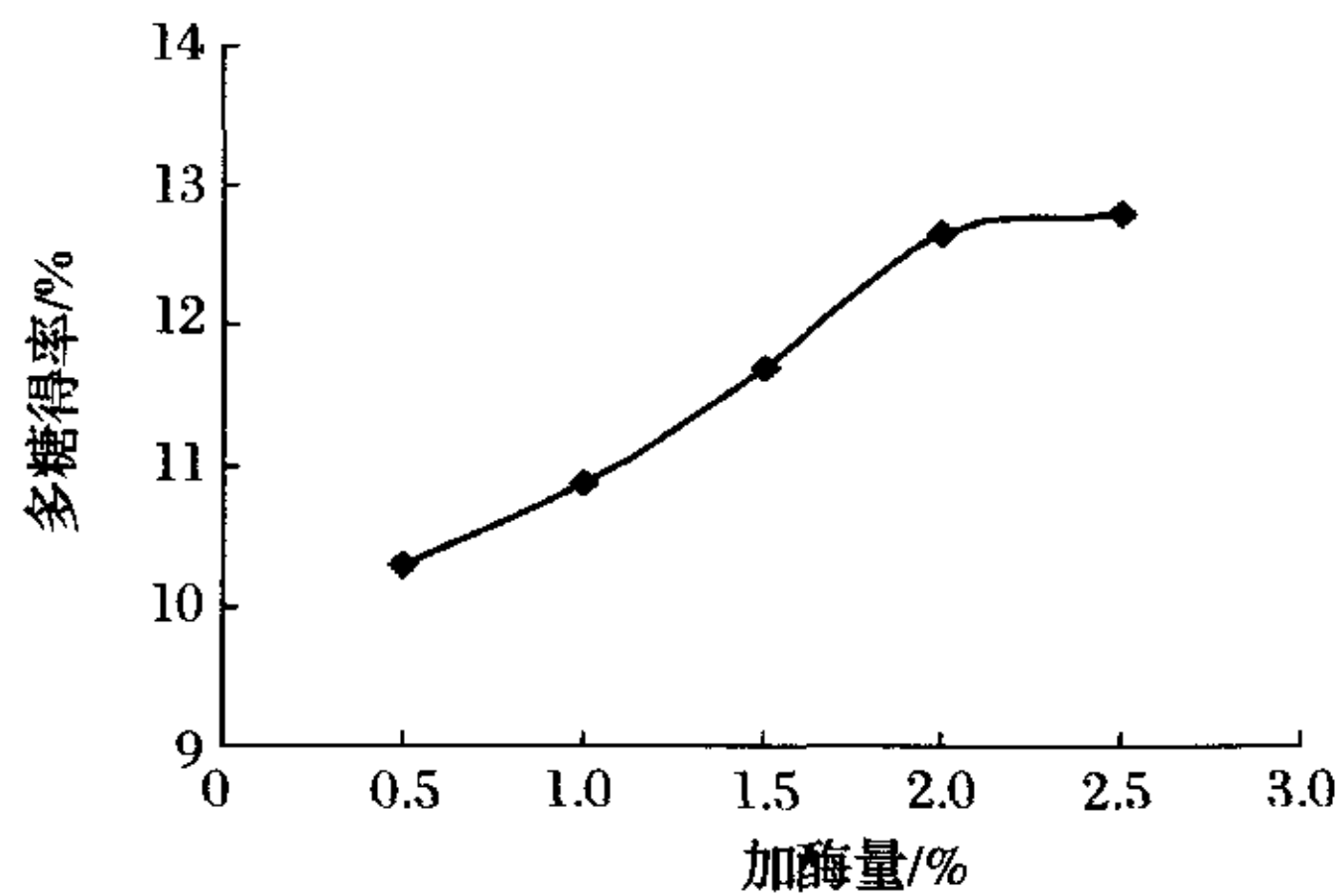


图 5 加酶量对多糖得率的影响

2.2 多糖提取工艺条件的优化

在上述实验基础上,对影响鲍鱼多糖提取率的主要因素(温度、pH、料液比、加酶量)进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,结果见表 1:

表 1 正交实验结果及其分析

试验号	温度/℃ (A)	pH (B)	料液比 (C)	加酶量 /% (D)	OD _(490nm) 值
1	1(45℃)	1(7.0)	1(1:20)	1(1.5%)	0.675
2	1	2(7.5)	2(1:30)	2(2.0%)	0.824
3	1	3(8.0)	3(1:40)	3(2.5%)	0.888
4	2(50℃)	1	2	3	0.903
5	2	2	3	1	1.038
6	2	3	1	2	1.027
7	3(55℃)	1	3	2	1.026
8	3	2	1	3	1.017
9	3	3	2	1	1.009
K ₁	2.387	2.604	2.721	2.722	
K ₂	2.968	2.881	2.736	2.877	
K ₃	3.054	2.924	2.952	2.810	
k ₁	0.796	0.868	0.907	0.907	Σ = 8.409
k ₂	0.989	0.960	0.912	0.959	
k ₃	1.018	0.975	0.984	0.937	
R _j	0.222	0.107	0.077	0.052	
最优水平	A ₃	B ₃	C ₃	D ₂	

极差分析表明,R 值越大对多糖得率影响越大。第 1 列 R=0.222,大于其他各极差之值,所以各因素的主要次序依次为 A>B>C>D。由表中看出最佳的因素组合为 A₂B₂C₃D₁,即温度为 50℃,pH7.5,料液比 1:40,加酶量 1.5%。而根据因素指标趋势图(图 6)最佳因素组合为 A₃B₃C₃D₂,即温度为 55℃,pH8.0,料液比 1:40,加酶量 2.0%。需要对这 2 个组合进一步验证。

验证实验结果表明,A₂B₂C₃D₁ 组合提取鲍鱼多糖得率为 14.99%,A₃B₃C₃D₂ 组合提取鲍鱼多糖得率为 19.60%。因此,确定鲍鱼多糖提取的最佳工艺

条件为 A₃B₃C₃D₂ 组合,即温度为 55℃,pH8.0,料液比 1:40,加酶量 2.0%。在此条件下,鲍鱼多糖得率为 19.60%。

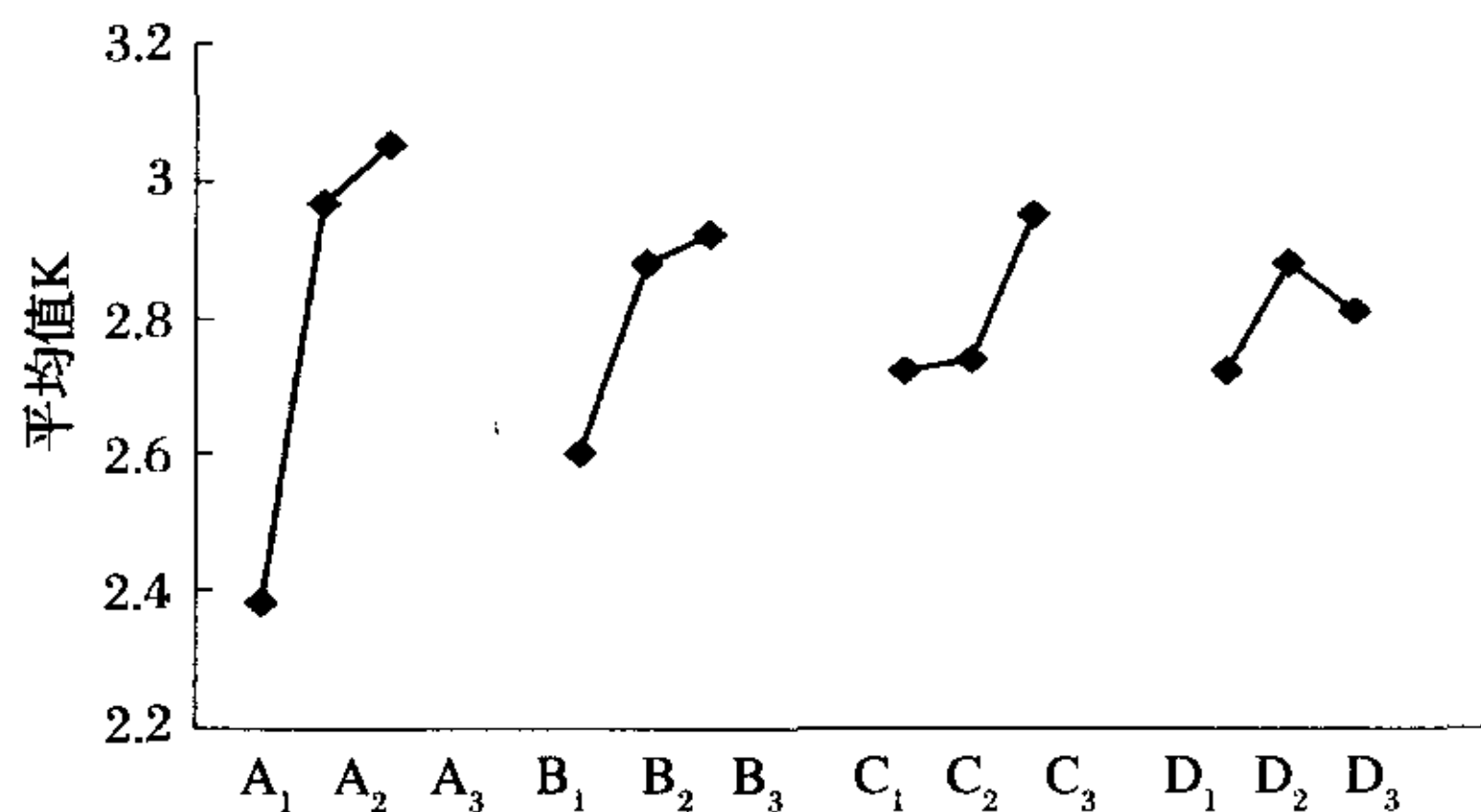


图 6 因素指标趋势图

3 结 论

木瓜蛋白酶酶解鲍鱼肉的最佳工艺条件:温度 55℃,时间 2 h,pH8.0,料液比 1:40,加酶量 2.0%,在此条件下,鲍鱼多糖得率为 19.60%。

参 考 文 献

- Hurtley S, Service R, Szuromi P. Cinderella,s coach is ready [J]. Science,2001,291:2337~2378
- Hiroshi Takii. Takashi Kometani. Antidiabetic effect of glycyrrhizin in genetically diabetic KK - Ay mice[J]. Biol Pharm Bull,2001,24(5):484~487
- Cui J, Chisti Y. Polysaccharopeptides of Coriolus versicolor: physiological activity, uses, and production [J]. Biotechnol Adv,2003,21(2):109
- Mizuno M. Anti-tumor polysaccharides from mushrooms during storage [J]. Biofactors,2000,12:275
- Ukai S, Kiho T, Hara C, et al. Tanak Y Polysaccharides in fungi. XIV. Anti - inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi [J]. J Pharmacobiodyn, 1983,6(12):983~990
- 王 兵. 鲍鱼多糖对荷人鼻咽癌裸鼠抗癌作用的研究[J]. 中草药,2000,31(8):597~599
- 沈 鸣,陈建伟. 氨基多糖的药理研究进展[J]. 上海医药, 2001,22(6):268~270
- 吴耀文,余志刚,胡谷平,等. 鲍鱼多糖 Hal-B 的组成研究[J]. 中山大学学报,2002,2:119~120
- 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,1999.11

(下转第 170 页)

高。在货架期期间,超低氧处理后果实的风味保持较好,病变发生率较低。试验结果表明对富士苹果进行超低氧处理是可行的,可以较好的保持果实的品质。

参 考 文 献

- 1 石建新,赵迎丽,赵 猛,等. 红富士苹果采后生理研究[J]. 山西农业科学,1999,27(2):61~64
- 2 王春生,赵 猛,李建华,等. 红富士苹果的特性及贮藏[J]. 中国果品研究,1997(2):4~6
- 3 Mitchell F G, Kader A A, Crisosto G, et al. Stone fruit tolerance to high carbon dioxide and low oxygen atmospheres[J]. Hort Sci, 1984,19:573~580
- 4 Tian S P, Folch E, Pratella G C, et al. The correlation of some physiological properties during ultra low oxygen storage in nectarine[J]. Acta Horticult, 1996,374:131~140
- 5 Ke D, Kader A A. External and internal factors influence fruit tolerance to low - oxygen atmospheres[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1992,117:913~918
- 6 Blazek J, Hlusickoval I, Varga A. Changes in the quality characteristics of Golden Delicious apples under different storage conditions and correlations between them[J]. Zahradnictvi (Horticultural Science). 2003,30(3):81~89
- 7 Lavilla T, Recasens I. Relationships between volatile production, fruit quality, and sensory evaluation in Granny Smith apples stored in different controlled - atmosphere treatments by means of multivariate analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999,47(9):3 791~3 803
- 8 田世平. 冷藏条件下超低氧处理对樱桃果实中乙醇、乙醛和甲醇含量的影响[J]. 植物生理学通讯, 2000,36(3):201~204
- 9 Patterson M E, Workman M. The influence of oxygen and carbon dioxide on the development of apples scald[J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1962,80:130~136

Effects of Ultra Low - oxygen Treatment on Storage Quality of Fuji Apple during Storage

Xu Kang Wang Qingguo

(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

ABSTRACT The effect of ultra low - oxygen treatment on storage quality of Fuji apple were investigated. Fuji apples were stored in ultra low - oxygen condition ($1.6\% \pm 0.1\% O_2$). The results indicated that after ultra low - oxygen treatment, the firmness and total soluble content of Fuji apple were well maintained, the respiration rate was reduced, the Vc content, titration acid content and sugar content were largely maintained. All the physiological indexes of the fruits stored in ultra low - oxygen condition ($1.6\% \pm 0.1\% O_2$) were better than other conditions, the rate of superficial scald was the lowest, but the effect of inhibiting the bitter pit was not significant. The overall quality of Fuji apple after ultra low - oxygen treatment was better than other storage conditions.

Key words Fuji apple, ultra low-oxygen, storage

(上接 160 页)

Optimum Condition for Extraction of Polysaccharide from Abalone

Yin Hongling Yang Jingfeng Li Dongmei Dong Xiuping
Jiang Dan Li Tao Zhu Beiwei

(College of Biotechnology & Food Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034, China)

ABSTRACT Papain was used to extract the polysaccharide from abalone to analyze the factors influencing the extraction rate. The result of orthogonal experiment indicates that optimal conditions were: 55°C , 2h, pH 8.0, 1:40 (w/v) of abalone powder to balanced solution, and 2.0% of papain. Under these conditions, the yield of polysaccharide could reach to 19.60%.

Key words abalone, papain, enzyme method