

超声波协同酶法提取大豆多糖工艺的研究*

陈红, 崔海月, 李玉扩, 刘秀奇, 樊红秀, 王大为**
吉林农业大学食品科学与工程学院, 长春 130118

摘要: 以豆渣为原料, 采用超声波协同酶法提取大豆多糖并对其工艺进行了优化。通过单因素试验和正交试验, 确定超声波协同酶法提取的最佳工艺条件: 超声波功率 200 W, 超声波辐射时间 30 min, 料液质量浓度为 0.04g/mL, 纤维素酶用量 1.5%, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 40 min, pH 5.0, 在此工艺条件下, 多糖的得率为 12.23%。

关键词: 豆渣; 多糖; 超声波; 纤维素酶

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20110706.1517.004

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20110706.1517.004.html>

Ultrasonic-Assisted Enzymatic Hydrolysis of Bean Dregs for Extraction of Polysaccharides

CHEN Hong, CUI Hai-yue, LI Yu-kuo, LIU Xiu-qi, FAN Hong-xiu, WANG Da-wei

College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University · Changchun 130118 · China

Abstract: The present study aimed at developing an optimal procedure for the extraction of polysaccharides from the bean dregs hydrolyzed with a commercial cellulase preparation under ultrasonic assistance. The optimal values of crucial technological parameters for improved polysaccharides yield were determined by one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods as follows: ultrasonic powder 200 W for 30 min treatment, material water concentration 0.04 g/mL, enzyme dosage 1.5%, pH 5.0 and hydrolysis temperature 50 °C for a hydrolysis duration of 40 min. Under such conditions, a maximum polysaccharides yield of up to 12.23% was obtained.

Key words: bean dregs; polysaccharides; ultrasonic; cellulase

豆渣是加工大豆食品(如豆腐、腐竹、豆乳等)过程中的副产物。我国大豆食品行业每年约生产 2000 万 t 湿豆渣, 由于其水分含量大, 运输困难, 又极易腐败变质^[1], 通常用作饲料或废弃, 不仅浪费资源, 而且污染环境。豆渣的主要成分是子叶部的细胞壁多糖类, 约含 30% 的水溶性多糖类物质。

水溶性大豆多糖(SSPS)简称大豆多糖, 它是一种酸性多糖, 主要成分是半乳糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸、鼠李糖、海藻糖等, 具有多种生物活性, 是一种天然的功能性成分。它可以改善食品的食用品质、加工特性和外观特性, 能够用于抑制脂类氧化^[2]和稳定酸性饮料中的蛋白质^[3], 还可以作为食品中的乳化成分^[4]。因此, 它在食品中具有广阔的应用前景,

从豆渣中提取大豆多糖, 就有了变废为宝的意义。大豆多糖传统的提取方法是热水浸提, 该法得率低、操作费时、能耗大^[5]。近几年来, 生物酶技术、超声技术在多糖提取工艺中已引起广泛的关注^[6]。超声波是一种弹性机械波, 利用超声波振动传递能量, 可以改变物质组织结构、状态、功能或加速这些改变过程。由于超声空化效应, 超声波能提高多糖的得率。缩短提取时间, 降低提取液黏度。酶技术是一种新型高效绿色提取技术, 具有快速、高效、反应温和、专一性强等诸多优点^[7-10]。本试验以豆渣为材料, 将超声波和酶技术相结合提取豆渣中的大豆多糖, 旨在为工业化提取大豆多糖提供新方法, 以期能提高豆渣的利用率, 降低大豆产品的生产成本。

* 基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z336)

作者简介: 陈红, 女, 在读博士, 讲师, 主要从事食品营养与功能食品的研究与开发。

收稿日期: 2011-04-17

网络出版时间: 2011-07-06 15:17

**通讯作者:

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豆渣(购自市场, 烘干), 经检测干豆渣含水分 8.45%、蛋白质 18.61%、脂肪 11.87%、纤维素 52.46%、灰分 3.52%。纤维素酶(1.5 万 U/g, 中国科学院上海生化东风生化技术公司); 浓硫酸、苯酚、无水乙醇、95%乙醇、三氯乙酸(TCA)、三氯甲烷、正丁醇、葡萄糖、丙酮等均为分析纯, 标准品均购自 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

101型电热鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂), VCX500型超声波破碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司), LJX-II型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂), 722型可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), 6K-80电热恒温水浴锅(常州市国立试验设备研究所), GB204分析天平(日本岛津公司), RE-52AA旋转蒸发仪(上海申胜生物科技有限公司), FD21冷冻干燥机(北京博医康技术公司)。

1.3 方法

1.3.1 提取工艺 干豆渣 → 索氏提取(乙醚脱脂) → 粉碎[过0.35 mm(40目)筛] → 加水浸泡 → 调pH(磷酸盐缓冲溶液) → 酶解(纤维素酶) → 超声波处理 → 离心(3 500 r/min, 30 min) → 取上清液 → 去蛋白(加三氯乙酸) → 离心(3 500 r/min, 20 min) → 取上清液 → 浓缩 → 95%乙醇沉淀 → 离心(3 000 r/min, 20 min) → 沉淀物 → 无水乙醇洗涤 → 冷冻干燥 → 粗多糖。

1.3.2 葡萄糖标准溶液的配制 精确称取干燥至质量恒定的葡萄糖 100 mg, 定容至 100 mL, 得浓度为 1 mg/mL 的葡萄糖贮备溶液。再准确移取 10 mL, 用蒸馏水定容至 100 mL, 得 0.1 mg/mL 的葡萄糖使用液。

1.3.3 苯酚溶液的制备 取苯酚 100 g, 加 0.1 g 铝片和 0.05 g 碳酸氢钠蒸馏, 收集 182 °C 馏分。称取馏出液 15 g, 加蒸馏水定容至 300 mL 溶解, 混匀并转移至棕色瓶中, 即得 5 g/100 mL 的苯酚溶液, 置 4 °C 冰箱备用。

1.3.4 标准曲线的绘制 多糖测定采用改进的苯酚—硫酸法^[11]。精确称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖标准样品 25 mg 于 250 mL 容量瓶中加水定容, 摇匀, 然后分别吸取 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mL, 以水补至 2.0 mL, 然后加入 5 g/100 mL 苯酚液 1.0 mL, 再加浓硫酸至总体积达 10 mL, 混合均匀后, 室温放置 30 min, 在波长 490 nm 处测定吸光度, 以 2.0 mL 水按同样显色操作为空白, 横坐标为葡萄糖质量浓度,

纵坐标为吸光度, 绘制标准曲线, 线性回归方程为

$$A=0.0129 C+0.029$$

式中, A 为吸光度, C 为测定液质量浓度(mg/mL), 相关系数 $r = 0.997$ 。

1.3.5 多糖得率计算 吸取样品液 1.0 mL 按上述步骤操作, 在波长 490 nm 处测定大豆多糖 A 值。重复 3 次, 取平均值。根据标准曲线方程求出样品液中大豆多糖的含量, 按下面方法计算多糖得率:

多糖得率 = 多糖的质量(g) / 豆渣样品干物质的质量(g) × 100%。

1.3.6 单因素试验设计 利用单因素试验分别考察超声波功率、超声时间、超声温度、料液质量浓度、纤维素酶用量、酶解温度、酶解时间、酶解体系 pH 值 8 个因素对大豆多糖得率的影响程度, 选择最佳的提取工艺条件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声波功率对大豆多糖得率的影响 在超声波辐射时间 30 min、超声温度 60 °C、料液质量浓度为 0.04 g/mL、纤维素酶用量 1.5%、酶解温度 50 °C、酶解时间 40 min、酶解体系 pH 5.0 条件下, 不同超声波功率对大豆多糖得率的影响结果见图 1。

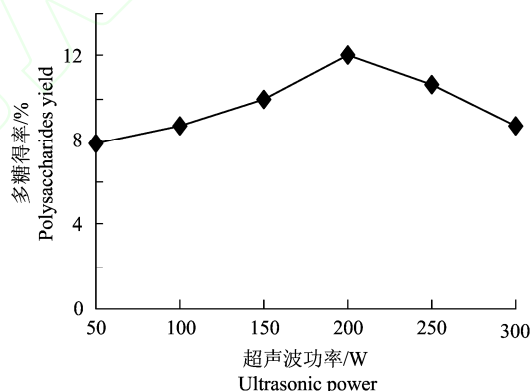


图 1 超声波功率对多糖得率的影响

Fig.1. Effect of ultrasonic power on polysaccharides yield

由图 1 可知, 超声功率设定为 50~200 W。随着超声波功率的增大, 超声波对细胞壁的破碎作用增强, 胞内多糖溶出速率增加, 得率逐渐提高。超声功率设定为 200~300 W 时, 随着超声波功率的增大, 多糖的得率逐渐下降, 主要原因在于当超声波功率过大时, 可能因为超声波的剧烈振动使多糖降解, 从而使得多糖提取量出现了下降的趋势^[13]; 另外, 因超声波功率过高导致反应器内局部温度瞬时升高, 使酶活力下降, 多糖得率降低。因此, 超声波功率以 200 W 为宜。

2.1.2 超声波辐射时间对大豆多糖得率的影响 在超声波功率 200 W、超声温度 60 °C、料液质量浓度为

0.04 g/mL、纤维素酶用量1.5%、酶解温度50℃、酶解时间40

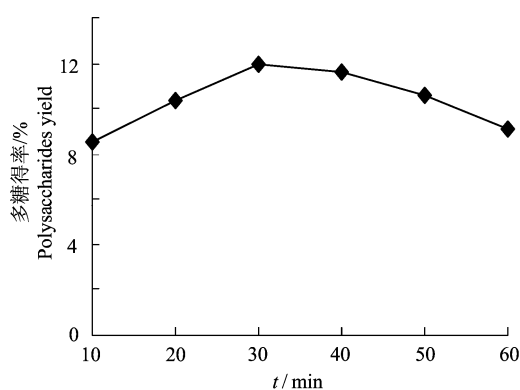


图 2 超声波辐射时间对多糖得率的影响

Fig.2. Effect of ultrasonic treatment time on polysaccharides yield.

min、酶解体系pH 5.0条件下，不同超声波辐射时间对大豆多糖得率的影响结果见图2。

由图2可知，随着超声波作用时间的延长，多糖得率随之增加。当辐射时间达到30 min时，多糖得率最大。超过30 min，多糖得率开始下降。究其原因可能是由于超声波较强的机械剪切作用，长时间处理不仅会使大分子多糖降解，同时也使蛋白质等其他杂质开始溶出，产生干扰^[13]，使得到的多糖含量下降。因此，超声波辐射时间以30 min为宜。

2.1.3 料液质量浓度对大豆多糖得率的影响 在超声波功率200 W、超声波辐射时间30 min、超声温度60℃、纤维素酶用量1.5%、酶解温度50℃、酶解时间40 min、酶解体系pH 5.0条件下，不同料液质量浓度对大豆多糖得率的影响结果见图3。

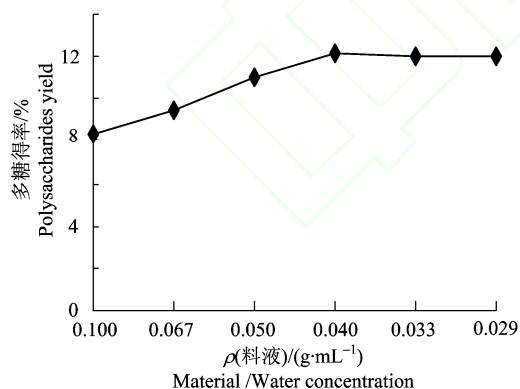


图3 料液质量浓度对多糖得率的影响

Fig.3. Effect of material water concentration on polysaccharides

由图3可知，料液质量浓度为0.04~0.10 g/mL 时，大豆多糖得率上升最为迅速。料液质量浓度高于0.04 g/mL 时，多糖的得率趋于稳定，变化幅度不大。但当料液质量浓度过大时，由于水的比例过大增加了后续浓缩处理的工作量和能耗，不利于实际操作和生产。因此料液质量浓度以0.04 g/mL 为宜。

2.1.4 纤维素酶用量对大豆多糖得率的影响 在超声波功率200 W、超声波辐射时间30 min、超声温度60℃、料液质量浓度为0.04g/mL 、酶解温度50℃、酶解时间40 min、酶解体系pH 5.0条件下，不同纤维素酶用量对大豆多糖得率的影响结果见图4。

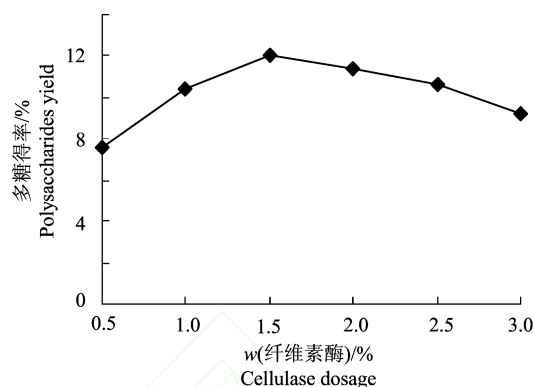


图4 纤维素酶用量对多糖得率的影响

Fig.4. Effect of cellulase dosage on polysaccharides yield

由图4可知，纤维素酶用量为0.5%~1.5%时，随着酶用量的增加，酶与底物接触机会增加，同一时间内水解的分子数不断增加，致使多糖更快地分离出来。当纤维素酶用量达1.5%时，多糖得率最大。当纤维素酶用量过大时，酶分子过于饱和，一部分酶分子没有机会与底物结合，底物被水解的速度降低，引起多糖得率下降，而且不经济^[14]。因此，纤维素酶用量以1.5%为宜。

2.1.5 酶解温度对大豆多糖得率的影响 在超声波功率为200 W，超声波辐射时间30 min，超声温度60℃，料液质量浓度为0.04 g/mL ，纤维素酶用量1.5%，酶解时间40 min，酶解体系pH 5.0条件下，不同酶解温度对大豆多糖得率的影响结果见图5。

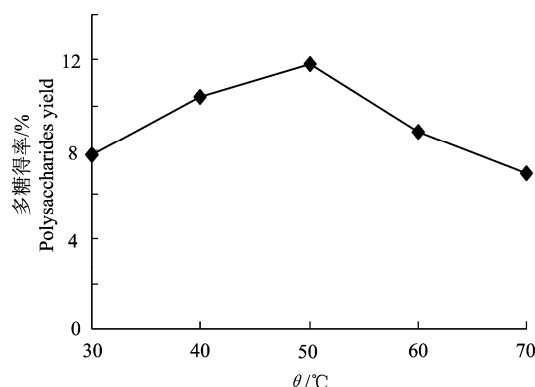


图5 酶解温度对多糖得率的影响

Fig.5. Effect of hydrolysis temperature on polysaccharides yield

由图5可知，酶解温度为30~50℃时，多糖得率随着温度升高而显著增加，在50℃时达到最大值。温度>50℃时，多糖提取量反而随温度的升高而降低。这是因为温度过高导致纤维素酶失活，从而影响了细胞壁中纤维素的降解，最终影响了多糖的得率。因此，

酶解温度以50℃为宜。

2.1.6 酶解时间对大豆多糖得率的影响 在超声波功率200 W, 超声波辐射时间30 min, 超声温度60℃, 料液质量浓度为0.04 g/mL, 纤维素酶用量1.5%, 酶解温度50℃、酶解体系pH 5.0条件下, 不同酶解时间对大豆多糖得率的影响结果见图6。

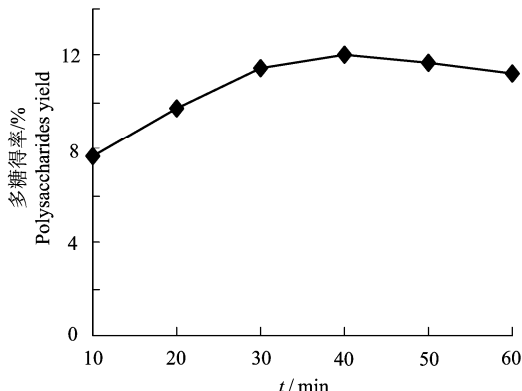


图6 酶解时间对多糖得率的影响

Fig.6. Effect of hydrolysis time on polysaccharides yield

由图6可知, 酶解时间<30 min 时, 多糖得率随温度升高显著提高, 30~40 min得率的增加不明显, 40 min之后多糖得率变化不大, 有略微下降趋势。因此, 酶解时间以30~40 min为宜。

2.1.7 酶解体系pH对大豆多糖得率的影响 在超声波功率200 W、超声波辐射时间30 min、超声温度60℃、料液质量浓度为0.04 g/mL, 纤维素酶用量1.5%, 酶解温度50℃, 酶解时间40 min条件下, 不同酶解体系pH对大豆多糖得率的影响结果见图7。

由图7可知, 当pH为5.0时, 多糖的得率达到最大, pH增大或减小, 得率均开始下降。这可能是因pH过高或过低都会影响酶的活性, 导致得率下降,

pH为5.0时酶活性达到最大。因此, 酶解体系pH以5.0为宜。

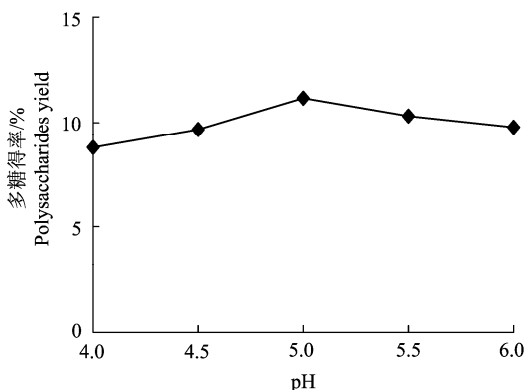


图7 酶解体系pH值对多糖得率的影响

Fig.7. Effect of pH on polysaccharides yield

2.2 正交试验设计及结果

超声波辅助提取大豆多糖时, 超声波处理温度以60℃为宜。在试验中显示>60℃易使蛋白质发生变性, 而且会使部分多糖水解为单糖或低聚糖, 多糖得率反而下降。故提取过程中超声波处理温度以60℃为宜。

在超声波处理温度为60℃, 料液质量浓度0.04 g/mL、酶解时间40 min、酶解体系pH 5.0的条件下, 以大豆多糖得率作为评价指标, 选取对得率有较大影响的超声波功率、超声波辐射时间、酶解温度、纤维素酶用量4个因素进行L₉(3⁴)正交试验, 确定最佳提取工艺条件。为了优化提取工艺条件, 本试验参照单因素试验结果设计正交试验因素及水平见表1, 结果及分析见表2。

表1 正交试验因素水平

Table 1. Factors and levels in orthogonal array design

水平 Level	超声波功率/W Ultrasonic power	超声波辐射时间/min Ultrasonic treatment time	酶解温度/℃ Hydrolysis temperature	纤维素酶用量/% Cellulase dosage
	A	B	C	D
1	150	30	40	0.5
2	200	40	50	1
3	250	50	60	1.5

表2 正交试验结果

Table 2. Orthogonal array design matrix and experimental values of polysaccharides yield

序号 No.	超声波功率/W Ultrasonic power	超声波辐射时间/min Ultrasonic treatment time	酶解温度/℃ Hydrolysis temperature	纤维素酶用量/% Cellulase dosage	多糖得率/% Polysaccharides yield
	A	B	C	D	yield
1	1 (150)	1 (30)	1 (40)	1(0.5)	9.53
2	1 (150)	2 (40)	2 (50)	2(1.0)	8.76
3	1 (150)	3 (50)	3 (60)	3(1.5)	9.28
4	2 (200)	1 (30)	2 (50)	3(1.5)	12.23
5	2 (200)	2 (40)	3 (60)	1(0.5)	9.13
6	2 (200)	3 (50)	1 (40)	2(1.0)	10.70
7	3 (250)	1 (30)	3 (60)	2(1.0)	9.57
8	3 (250)	2 (40)	1 (40)	3(1.5)	10.16

9	3 (250)	3 (50)	2 (50)	1(0.5)	10.88
K1	27.57	31.33	30.39	29.54	
K2	32.06	28.05	31.87	29.03	
K3	30.61	30.86	27.98	31.67	
k ₁	9.19	10.44	10.13	9.85	
k ₂	10.69	9.35	10.62	9.68	
k ₃	10.20	10.29	9.33	10.56	
R	1.50	1.09	1.29	0.88	

由表2正交试验结果可以看出, 超声波功率(A)、超声波辐射时间(B)、酶解温度(C)、纤维素酶用量(D)对大豆多糖得率的影响程度强弱顺序为A>C>B>D。根据正交试验结果最佳工艺条件为A₂B₁C₂D₃,

2.3 传统的热热水浸提法与超声波协同酶提取法比较

表3 2种方法比较结果

Table 3. Comparisons between hot water extraction and ultrasonic-assisted cellulase hydrolysis of bean dregs in optimal conditions and polysaccharides yield

提取方法 Extraction method	t / min Time	料液质量浓度/(g·mL ⁻¹) Water/Material ratio	多糖得率/% Polysaccharides yield
热水浸提法 Hot water for extraction	240	0.04	3.68 ± 0.02 ^A
超声波协同酶提取法 Ultrasonic-assisted enzymatic for extraction	30	0.04	12.23 ± 0.03 ^B

注: 同行数据肩注不同大写字母表示处理间差异极显著($P < 0.01$)

Note: Superscript capital letters of the same row indicate significant difference ($P < 0.01$)

由表3可知, 与传统的热热水浸提法相比, 超声波协同酶法可显著提高大豆多糖的得率。原因主要有以下两点: ①超声波处理能在物料内部产生强烈的振动和较强的空化效应, 可以破坏植物细胞, 降低植物组织中各成分之间结合的紧密程度, 使多糖更快地渗透到提取液中, 提高提取效率。②由于纤维素酶能够特异性降解植物中的纤维素, 有效地破坏细胞壁, 使细胞中的多糖最大限度地溶解出来, 提高多糖得率[15-16]。

3 结论

超声波协同酶法提取大豆多糖的最佳工艺条件: 超声波功率200 W, 超声波辐射时间30 min, 超声波提取温度60 °C, 料液质量浓度为0.04 g/mL, 纤维素酶用量1.5%, 酶解温度50 °C, 酶解时间40 min, 酶解体系 pH 5.0, 在此工艺条件下, 水溶性大豆多糖的得率为12.23%。

参考文献:

- [1] 张振山, 叶素萍, 李泉, 等. 豆渣的处理与加工利用[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 400-406.
- [2] Matsum U Y, Egem I M, Satake C, et al. Inhibitory effects of pep-tide-bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions[J]. Food Chemistry, 2003, 83: 107-119.
- [3] Nakam U A, Furuta H, Ka T M, et al. Effect of soybean soluble

polysaccharides on the stability of milk protein under acidic conditions[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17: 333-343.

- [4] Nakam U A, Takaha S T, Yoshida A R, et al. Emulsifying properties of soybean soluble polysaccharide[J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18: 795-803.
- [5] 向东, 赖凤英, 梁平. 植物性多糖的强化提取[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(5): 81-84.
- [6] 周连文, 张存兰, 刘新华. 酶辅助超声波提取何首乌多糖及其抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2008(1): 170-173.
- [7] 李慧, 金仁哲, 刘振春, 等. 超声波对双酶水解玉米蛋白的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(4): 460-464, 472.
- [8] 周泉城, 孙军凤. 超声波辅助提取桔梗多糖研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 111-116.
- [9] 王艳, 聂志勇, 贺瑛, 等. 超声波协同复合酶法提取姬松茸多糖[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 866-870.
- [10] 王立峰, 鞠兴荣, 何荣, 等. 水溶性大豆多糖的提取工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 111-114.
- [11] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(9): 550-552.
- [12] 魏明, 邵平, 姚红, 等. 超声波协同纤维素酶法提取霍山石斛多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 199-201.
- [13] 洪秀云, 吴晓英, 叶春燕. 超声波协同酶法提取绞股蓝皂苷的工艺研究[J]. 生物技术, 2010, 20(6): 75-77.
- [14] 娄在祥, 张有林, 王洪新. 超声波协同酶法提取黑木耳多糖[J]. 食品工业, 2007(1): 29-32.
- [15] Choudhari S M, Ananthanarayan L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues[J]. Food Chemistry, 2007, 102: 77-81.
- [16] 徐建国, 王向东, 胡青平, 等. 纤维素酶提取槐花芦丁的新工艺研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 315-318.