

超声波辅助酶法提取红枣多糖的研究



SUN Xiao-ru

孙晓瑞, 王娜, 谢新华, 雷丹, 张寒瑞, 常俊晓, 艾志录*

(河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 研究了超声波酶法联合提取红枣多糖的工艺条件。通过正交试验优化出最佳超声波提取条件;在最佳超声波提取条件下,以多糖纯度及提取率为指标,从木瓜蛋白酶、胰蛋白酶及中性蛋白酶中筛选出木瓜蛋白酶;对木瓜蛋白酶处理条件进行研究,最后得出超声波辅助酶法提取红枣多糖的最佳工艺条件为:10 g 红枣,料液比 1:8 (g:mL),温度 70 ℃,超声波时间 25 min,超声波功率 70 W,经超声波处理后,添加 0.15% 木瓜蛋白酶、pH 值 6.0、时间 120 min、温度 60 ℃。此条件下,提取 2 次,多糖的得率为 21.95%,纯度达到 13.05%。

关键词: 超声波;木瓜蛋白酶;红枣;多糖

中图分类号:TQ351;TS201.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2011)04-0058-05

Extraction Technology of Polysaccharide from *Zizyphus jujuba* by Ultrasound-assisted Enzymatic Method

SUN Xiao-ru, WANG Na, XIE Xin-hua, LEI Dan,
ZHANG Han-rui, CHANG Jun-xiao, AI Zhi-lu

(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The polysaccharide from *Zizyphus jujuba* was extracted by ultrasound-assisted enzymatic method. Its optimum conditions were investigated by the orthogonal design. According to the purity and extraction rate, the extraction effect of papain which was selected among papain, trypsin and neutral protease was better. The extraction conditions of polysaccharide by papain were studied. Finally, the optimum technological conditions of polysaccharide from *Z. jujuba* are as follows: material 10 g, the ratio of solid to liquid 1:8, temperature 60 ℃, ultrasonic time 25min, ultrasonic power 70 W, after the ultrasound treatment, papain amount 0.15%, pH value 6.0, enzymolysis time 120 min and temperature 60 ℃. Under these conditions, extraction two times, the yield of the polysaccharide was 21.95%, the purity was 13.05%.

Key words: ultrasonic wave; papain; *Zizyphus jujuba*; polysaccharide

大枣是鼠李科植物枣(*Zizyphus jujuba* Mill.)的成熟果实。枣树原产于我国,主要分布在黄河流域,栽培历史悠久。其富含糖类、粗纤维、维生素、氨基酸、矿物质等多种成分,还含有生物碱、三萜、皂苷、黄酮类等化学成分,另含十多种人体必需的氨基酸和包括硒在内的 36 种微量元素,因此,大枣具有较高的营养价值和药用价值^[1]。现在,随着新型分离检测手段的出现和生命科学的发展,多糖成为天然药物研究的一个新热点,多糖的生理活性和生物学功能也越来越受到人们的关注。红枣多糖是重要的生物活性物质,能控制细胞分裂和分化,调节细胞生长和衰老。经检测红枣多糖具有明显的抗补体活性和促进淋巴细胞增殖作用,对提高机体免疫力有重要作用^[2],其作为绿色生物医药产品具有广阔的市场前景。目前,国内外研究较多的多糖提取方法主要有超声波提取、微波浸提和水浴法等。超声波辅助提取是一种有效的新型提取方法^[3-5],利用其产生的强烈的空化效应、机械粉碎作用以及热效应等,可以加

收稿日期:2010-12-17

基金项目:郑州市科技局重大科技攻关项目(072SGZN12030)

作者简介:孙晓瑞(1986-),女,河南孟津人,硕士,研究方向为食品科学;E-mail: yiyu1688@126.com

* 通讯作者:艾志录(1965-),男,教授,博士,研究领域为传统食品的产业化研究与农产品加工。

速有效成分的溶出,从而提高浸出率,缩短提取时间,同时可以避免高温对有效成分的影响^[6]。一般植物中糖类物质多以蛋白质及核酸相互结合方式存在,酶法提取红枣多糖主要是利用酶解使大枣结构变得松散,降低了它们与原料的结合力,有利于多糖的浸出^[7]。作者以新郑灰枣为原料,提取具有较高药用价值的多糖,对超声波辅助蛋白酶提取的工艺进行研究和优化,旨在为工业生产做参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

红枣品种为新郑灰枣,河南新郑奥星实业有限公司提供;木瓜蛋白酶和胰蛋白酶,由北京索来宝科技有限公司生产;中性蛋白酶,由丹麦诺维信公司生产;葡萄糖、浓硫酸、3,5-二硝基水杨酸、苯酚、无水乙醇、氢氧化钠均为分析纯;实验用水为蒸馏水。

1.2 主要仪器与设备

KQ-300VDB 双频数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;TDL-5-A 离心机,河南中粮科学仪器有限公司;FA25 高剪切分散乳化机,上海费鲁克流体机械制造公司;T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;PHS-3C pH 计,上海理达仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 红枣中多糖的提取 准确称取打碎的红枣 10.0 g,先用组织捣碎机粉碎后,加入一定量 pH 值 7.0^[8]的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液,然后转入 FA25 高剪切分散乳化机匀浆,将乳化后的样液在适当的超声波条件下进行提取,得提取液 I,调节 pH 值,加入一定量的蛋白酶于合适的温度下反应一定的时间,然后于沸水浴中灭酶 10 min,离心(4200 r/min、15 min),得到粗多糖提取液 II;加入溶液体积的 1% 的硅藻土脱色,再加入一定量的无水乙醇静置一段时间沉淀多糖,将得到的沉淀再用无水乙醇洗涤,得到的沉淀进行真空干燥,得到粗多糖。

1.3.2 酶类的筛选 取 3 份待处理多糖溶液,每份 50 mL,分别加入不同蛋白酶使样液中酶质量分数为 0.15%,包括木瓜蛋白酶(pH 值 5.7、55℃)、胰蛋白酶(pH 值 8.1、40℃)、中性蛋白酶(pH 值 7.0、45℃),分别在各自最适酶解条件^[9-11]下酶解 120 min,沸水浴 10 min 灭酶,冷却至室温后,4 200 r/min 离心 15 min,除去变性酶沉淀,上清液醇沉,沉淀真空干燥,得到的粗多糖溶解定容,对相应的指标进行测定。

1.4 测定及计算方法

1.4.1 多糖含量的测定 以葡萄糖为标准品,还原糖的测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[12],总糖的测定采用苯酚-硫酸法^[13]。

1.4.2 多糖得率和纯度的计算 多糖得率按公式(1)计算。测得总糖和还原糖的含量,再根据公式(2)计算多糖纯度。

$$y = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

$$p = \frac{m_a - m_b}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中: y —多糖得率,%; m_1 —大枣原料质量,g; m_2 —粗多糖质量,g; p —多糖纯度,%; m_a —粗多糖中总糖质量,g; m_b —粗多糖中还原糖质量,g。

1.4.3 蛋白质含量的测定 利用紫外吸收法^[14]检测蛋白质,取多糖提取液 1 mL 定容于 50 mL 容量瓶,以蒸馏水为空白溶液,检测 280 和 260 nm 处的吸光值,实验重复两次,取平均值。根据经验公式(3)计算蛋白质含量(C),从而确定最适作用酶,然后确定最适作用酶的最适作用条件。

$$C = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260} \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 超声波提取条件的选择

在单因素试验基础上,以不同料液比、温度、超声波时间、超声波功率为因素设计正交试验,确定超声波提取的最佳工艺条件,结果见表1。

表1 正交试验结果

Table 1 Orthogonal test

试验号 experiment No.	A 料液比(g:mL) ratio of solid to liquid	B 温度/°C temperature	C 超声波时间/min ultrasonic time	D 超声波功率/W ultrasonic power	多糖得率/% polysaccharide yield
1	1:4	50	15	50	20.67
2	1:4	60	20	60	25.94
3	1:4	70	25	70	33.05
4	1:8	50	20	70	30.81
5	1:8	60	25	50	28.34
6	1:8	70	15	60	30.68
7	1:12	50	25	60	16.13
8	1:12	60	15	70	19.61
9	1:12	70	20	50	11.30
k_1	26.553	22.537	23.653	20.103	
k_2	29.943	24.630	22.683	24.250	
k_3	15.680	25.010	25.840	27.823	
R	14.263	2.473	3.157	7.720	

由表1可知,通过方差分析,正交表中推定 $A_2B_3C_3D_3$ 为最佳超声波提取条件,即料液比 1:8 (g:mL,下同),温度 70 °C,超声波时间 25 min,超声波功率 70 W。由此工艺提取红枣多糖的得率为 34.24%,纯度为 5.86%。

2.2 酶的筛选

将 2.1 节最佳条件下提取得到的多糖提取液 I 利用紫外吸收法检测 3 种蛋白酶提取后的蛋白质浓度以及多糖含量,结果见表 2。

表2 酶的筛选

Table 2 Selection of enzyme

酶的种类 type of enzyme	脱蛋白率/% deproteinized rate	多糖纯度/% polysaccharide purity	得率/% yield
木瓜蛋白酶 papain	83.44	12.78	11.10
胰蛋白酶 trypsin	77.00	8.43	9.79
中性蛋白酶 neutral protease	68.80	6.47	7.86

由表2可知,木瓜蛋白酶的脱蛋白作用效果最好,且在其作用下多糖纯度和得率也较高。不同酶提取出的多糖溶液在醇沉后形态不同:木瓜蛋白酶提出的多糖沉于溶液下面;胰蛋白酶提取的多糖较为松散;而用中性蛋白酶提出的多糖沉淀颜色较深。与未添加酶提取出的粗多糖在形态上有所不同,可能是酶在对蛋白降解的同时,对多糖的化学结构也产生了影响^[15]。

2.3 木瓜蛋白酶处理对多糖提取效果的研究

通过单因素试验,确定酶添加量(A)、pH值(B)、时间(C)和温度(D)的水平,采用4因素3水平正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,以多糖纯度为主要指标,得率为参考指标,探索酶处理最佳的工艺条件,正交试验结果及方差分析见表3~表4。

由表3、表4可见,对多糖纯度而言,由极差(R)表明影响因素作用大小顺序依次为 $B > D > A > C$,即蛋白酶添加量对纯化过程影响最大,温度次之,然后是pH值,时间的影响最小;酶法纯化新郑灰枣多糖的最佳工艺条件为 $A_2B_2C_1D_2$,即提取时pH值6.0,酶添加量0.15%,时间120 min,温度60 °C。由此得出的条件不在正交表中,做验证试验,木瓜蛋白酶提取新郑灰枣中红枣多糖的最佳工艺条件为酶

0.15%, pH值6.0, 时间120 min, 温度60℃, 在此条件下, 测得提取得到的多糖纯度为12.26%。

表3 酶法提取大枣多糖正交试验及结果

Table 3 Results of orthogonal test

试验号 No.	A pH 值 pH value	B 酶添加量/% enzyme amount	C 作用时间/min enzymolysis time	D 作用温度/℃ enzymolysis temperature	多糖纯度/% purity	得率/% yield
1	5.5	0.10	120	50	9.31	12.90
2	5.5	0.15	150	60	11.57	14.56
3	5.5	0.20	180	70	9.39	12.92
4	6.0	0.10	150	70	9.92	14.52
5	6.0	0.15	180	50	10.28	14.25
6	6.0	0.20	120	60	11.22	15.91
7	6.5	0.10	180	60	8.88	15.60
8	6.5	0.15	120	70	8.63	17.63
9	6.5	0.20	150	50	6.69	18.16
k_1	9.370	10.090	9.720	8.760		
k_2	10.160	10.473	9.393	10.557		
k_3	9.100	8.067	9.517	9.313		
R	1.060	2.406	0.327	1.797		

表4 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis for orthogonal test

方差来源 sources	偏差平方和 deviation	自由度 degree of freedom	F 值 F value	F 临界值 F critical value	显著性 significance
A pH 值 pH value	1.821	2	11.172	19.000	
B 酶添加量 enzyme amount	10.033	2	61.552	19.000	*
C 作用时间 enzymolysis time	0.163	2	1.000	19.000	
D 温度 enzymolysis temperature	5.080	2	31.166	19.000	*

2.4 提取次数的选择

在确定最佳提取条件后, 在最佳的提取条件, 将酶解后的滤液进行醇沉干燥, 得到一级多糖样品, 枣渣按料液比1:8加水配成样液经过上述相同处理后, 离心过滤后滤液进行醇沉干燥得到二级多糖样品, 相同的试验方法进行3次提取, 以3次提取所得多糖总量为基准, 测定每级多糖样品的得率, 实验结果如表5所示。

从表5看出, 在多糖提取3次中, 前两次的得率达到21.95%, 占3次多糖总提取量的89%, 第三次得率相对前两级较少, 提取次数越多合并提取液中多糖浓度越低, 乙醇沉淀时需要浓缩, 耗时长, 增加成本, 考虑在第三次提取量相对较少, 因此选择2次提取。对所得多糖进行测定, 纯度达到13.05%。

3 结论

3.1 对木瓜蛋白酶、胰蛋白酶及中性蛋白酶提取纯化红枣多糖进行筛选, 实验得出, 木瓜蛋白酶的脱蛋白作用效果最好, 且在其作用下多糖纯度和得率也较高。

3.2 通过对超声波辅助木瓜蛋白酶的提取条件进行研究, 选出提取的最佳工艺条件: 10 g 红枣(品种为新郑灰枣), 料液比1:8 (g:mL), 温度70℃的提取液中, 超声波时间25 min, 超声波功率70 W, 经超声波处理后, 添加木瓜蛋白酶0.15%, pH值6.0, 时间120 min, 温度60℃, 提取2次, 新郑灰枣中红枣多糖得率21.95%, 纯度达到13.05%。

表5 灰枣多糖提取次数实验

Table 5 The experiment of extraction times

提取次数 extracting times	多糖得率/% polysaccharide yield
1	14.05
2	21.95
3	24.66

参考文献:

- [1] 尚红伟. 大枣多糖提取分离过程研究[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2002.
- [2] 郑东宝, 郑金贵, 曾绍校. 果蔬多糖的研究状态及应用前景[J]. 食品科学, 2003, 24(18): 152-153.
- [3] LI H, PORDESIMO L, WEISS J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans[J]. Food Res Int, 2004, 37: 731-738.
- [4] ROSTAGNO M A, PALMA M, BARROSO C G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones[J]. J Chromatogr A, 2003, 1012: 119-128.
- [5] CHEMAT F, GRONDIN I, COSTES P, et al. High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil[J]. Ultrason Sonochem, 2004, 11: 281-285.
- [6] 王振宇, 赵鑫. 超声波提取大花葵色素的工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(2): 65-67.
- [7] 杨云, 谢新年, 孟江, 等. 酶法提取大枣多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24: 93-95.
- [8] 占建波, 郁建平, 蔡立. 金针菇水溶性多糖提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 265-268.
- [9] 邱承军, 姚文华. 酶法脱蛋白提取大枣多糖工艺的研究[J]. 生物技术通报, 2009(7): 94-97.
- [10] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 327-332.
- [11] 钟振声, 陈钰, 文锡莲. 木瓜蛋白酶与中性蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(9): 1039-1042.
- [12] 吕淑霞. 基础生物化学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [13] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 120-126.
- [14] 刘佳, 姜曦, 王少华, 等. N-V 蛋白酶含量检测方法的准确度评价[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2009, 35(4): 762-764.
- [15] 葛玉, 段玉峰, 刘俊花, 等. 酸浆果水溶性多糖提取工艺的比较[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(5): 73-75.

计量标准器具 竭诚欢迎使用检定

松香色度标准块

本产品具有国内行业中质量检验的权威性
长期、周到的售后服务让客户无后顾之忧

松香色度标准装置(又名《松香颜色分级标准》玻璃比色块),是符合我国松香光学特性具有完整体系的松香颜色分级标准。1982年荣获林业部科技成果二等奖。1987年至今,被《脂松香》、《松香试验方法》国家标准所采用,并多次经国家质量监督检验检疫局复查考核合格。

用有色光学玻璃制成的最高标准一套称为“中国松香色度标准装置”,计六个级别,每级一块,编号为S20,保存在中国林业科学研究院林产化学工业研究所。本标准块为最高标准的复制品,分为壹等品和贰等品两种。壹等品适用于商检、质检、内外贸、工厂中心化验室和教学、科研等单位;贰等品适用于工厂车间化验室。根据检定规程,壹等品与最高标准的色差 $\Delta E_{ab}^* \leq 1.5$,贰等品与最高标准的色差 $\Delta E_{ab}^* \leq 2.0$ 。林产化学工业研究所为本标准块全国唯一的制造单位和归口检定单位。制造计量器具许可证证书编号为(苏)制00000095号。产品出厂两年内免检,以后按检定规程要求每两年采用双光束分光光度计复检一次。林产化学工业研究所将竭诚为您服务,欢迎来电来函订购,欢迎将标准块寄我所检定。

联系地址:210042 南京市锁金五村16号
中国林科院林产化学工业研究所

电 话:(025)85482450,85482533

联系人:郭长泰

传 真:(025)85413445