

酶协同微波辅助提取红枣多糖的工艺优化

Procedure optimization on extraction of jujube polysaccharide with enzyme-microwave

张丽芝 冯 娜

ZHANG Li-zhi FENG Na

(银川能源学院, 宁夏 银川 750105)

(The College of Energy Resources of YinChuan, Yinchuan, Ningxia 750105, China)

摘要:以灵武红枣为试验材料,采用胰蛋白酶协同微波辅助提取红枣中的多糖,研究酶浓度、酶解时间、料水比、微波功率、微波时间等因素对多糖提取得率的影响,并通过正交试验确定较优提取工艺条件。结果表明:酶协同微波辅助提取红枣多糖的最优工艺条件为:胰蛋白酶 1.5%, pH 8.0, 料水质量比 1:20, 酶解 2.0 h, 灭酶后用中火微波提取 5 min。

关键词:红枣;多糖;提取;胰蛋白酶;微波

Abstract: The polysaccharide from Lingwu Jujube was extracted using enzyme-microwave method. Moreover, the influence factors of polysaccharide extraction were studied, i. e. the enzyme concentration, the hydrolysis time, the material ratio, the microwave power, and the treatment time, and then the optimum extraction condition were finally determined through orthogonal test. The results showed that the jujube polysaccharide could be extracted with high efficiency by combining the utilization of 1.5% trypsin (pH 8.0, hydrolyzing for 2.0 h) with the microwave (under the medium fire for 5 min), controlling the material ratio at 1:20 (mass ratio).

Keywords: red date; polysaccharide; extraction; trypsin; microwave

目前关于多糖特性与功能的研究和开发已成为食品研发机构、医药行业研究的焦点。一些免疫试验^[1]证明,多糖不仅能激活 T、B 淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞,还能活化补体,诱导免疫细胞产生多种细胞因子,具有协助抗体蛋白扼杀病原微生物的特性或具备配合吞噬细胞杀灭病原菌的功能。此外,有研究^[2]表明,多糖还具有降血糖、降血脂、抗氧化的功效。

红枣多糖作为红枣中含量较高的天然活性成分,具有显著的促进淋巴细胞增殖的功能和很好的抗补体活性,对抗氧化、抗衰老、提高机体免疫力具有重要的促进作用^[3]。

目前提取多糖的方法主要有热水浸提法、碱式提取法、

超声波提取法、酶提取法、微波提取法等^[4-5],未见酶协同微波辅助提取红枣多糖的报道。酶—微波结合提取红枣多糖的工艺一方面降低了多糖提取工艺中多种化学试剂的污染,保证了提取工艺的安全性,另一方面也在多糖提取的实际应用中提高了多糖得率^[6],从而进一步提高了生产效益。

本试验拟对提取红枣多糖的影响因素进行研究,并优化红枣多糖的提取工艺,以期对红枣多糖的深加工提供新的思路,同时也为提高红枣产品附加值提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红枣:灵武红枣,宁夏灵武果业公司;

胰蛋白酶:酶活 ≥ 250 U/mg,上海户实医药科技有限公司;

乙醇、浓硫酸、苯酚、双氧水:分析纯。

1.2 仪器

粉碎机:AMR128 型,中山市东风镇爱蜜尔电器厂;

电热鼓风干燥箱:101-2 型,江苏电器冷作金厂;

电热恒温水浴锅:H.H.S II-6 型,上海医疗器械五厂;

电子天平:AL204 型,梅特勒—托利多仪器有限公司;

离心机:LXJ-II 型,上海医疗器械三厂;

紫外可见分光光度计:752P 型,上海光谱仪器有限公司;

微波炉:LG WD700(MG-5021T1)型,乐金电子电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 红枣多糖的提取工艺

红枣→烘干→粉碎→酶解→微波提取→过滤→醇沉→离心→复溶→脱色→醇沉→离心→干燥→红枣粗多糖^[7]

1.3.2 操作要点

(1) 预处理:红枣在 50℃ 烘箱中烘干,粉碎,过 60 目筛,备用。

(2) 酶解:准确称取一定量枣粉,按料水质量比 1:20 加入含 2.0% 的胰蛋白酶的水溶液(pH 8.0),于 37℃ 下酶解 2 h。

作者简介:张丽芝(1983—),女,银川能源学院讲师,在职硕士。

E-mail:zll201@163.com

收稿日期:2016—08—30

(3) 微波提取: 100 ℃ 水浴灭酶 10 min 后, 于微波炉中进行中火微波提取 4 min, 过滤。

(4) 醇沉: 过滤、浓缩后, 加入一定比例的无水乙醇, 于冰箱中静置过夜, 以 4 000 r/min 离心 15 min。

(5) 脱色: 离心后加水复溶, 加入 0.4 倍的 30% 双氧水, 40 ℃ 水浴 4 h, 再重复进行上一步骤的醇沉和离心。

(6) 干燥: 于 60 ℃ 烘箱中干燥至恒重, 即得粗多糖。

1.3.3 单因素试验

(1) 酶浓度: 料水质量比 1:20, 酶解 2 h, 微波中火提取 3 min, 考察酶浓度 (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%) 对多糖得率的影响。

(2) 料水比: 胰蛋白酶 2%, 酶解 2 h, 微波中火提取 3 min, 考察料水质量比 (1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30) 对多糖得率的影响。

(3) 酶解时间: 料水质量比 1:20, 胰蛋白酶 2%, 微波中火提取 3 min, 考察酶解时间 (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h) 对多糖得率的影响。

(4) 微波功率: 料水质量比 1:20, 胰蛋白酶 2%, 酶解 2 h, 微波提取 3 min, 考察微波功率 (温火、解冻、底火、中火、高火) 对多糖得率的影响。

(5) 微波时间: 料水质量比 1:20, 胰蛋白酶 2%, 酶解 2 h, 微波中火提取, 考察微波时间 (2, 3, 4, 5, 6 min) 对多糖得率的影响。

1.3.4 正交试验 根据单因素试验结果, 选择酶浓度、酶解时间、料水比、微波时间为试验因素, 每个因素设 3 个水平, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以确定红枣多糖的最佳提取条件。

1.3.5 多糖含量的测定 采用苯酚—硫酸法^[8]。

1.3.6 标准曲线的绘制 吸取浓度为 0.120 mg/mL 的标准溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL 于 10 mL 比色管中, 分别加入蒸馏水 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4 mL, 5% 的苯酚溶液 1.0 mL 后, 再加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀避光放置 30 min, 另取 10 mL 比色管, 加水 1.0 mL, 5% 的苯酚溶液 1.0 mL, 然后加入浓硫酸 5.0 mL, 按上述方法操作制得空白溶液, 于 490 nm 波长下测定吸光度。以葡萄糖质量浓度 x (mg/mL) 为横坐标, 吸光值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线^[8]。

1.3.7 红枣粗多糖的测定 取试验提取的干粗多糖 0.010 0 g 用蒸馏水定容至 100 mL, 从中吸取 1.0 mL 至比色管中, 加入 1.0 mL 5% 苯酚溶液, 再缓慢加入 5.0 mL 浓硫酸溶液, 摇匀避光放置 30 min, 在 490 nm 处测定吸光值。

1.3.8 多糖得率 按式(1)计算:

$$\text{多糖得率} = \frac{\text{粗多糖量(g)}}{\text{枣粉量(g)}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.9 数据处理 采用加权平均法, 即将各项指标除以该列最大值乘以 100 为该项得分。权衡红枣多糖得率 (x) 和含量 (y) 两项指标, 确定二者的权重系数均为 0.5, 对两项指标进行加权求和, 通过公式 $z = 0.5x + 0.5y$, 得到综合评分 (z)^[9]。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

按照 1.3.6 的方法绘制的葡萄糖标准曲线见图 1, 所得

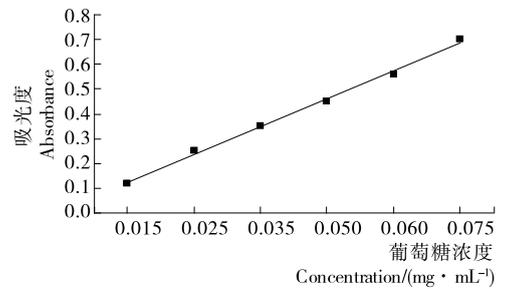


图 1 葡萄糖的标准曲线

Figure 1 The A-c standard curve of glucose

到回归方程为 $Y = 9.5625x - 0.02525$, 相关系数 $R = 0.9922$ 。

2.2 酶浓度对红枣多糖提取的影响

由图 2 可知, 胰蛋白酶浓度较低时, 红枣多糖的得率和含量随着酶浓度的升高而快速升高; 当酶浓度达到 2% 时, 得率和含量达到最大; 当酶浓度超过 2% 时, 其得率和含量基本保持不变。因为酶浓度较低时, 酶对红枣游离蛋白质的水解作用较弱, 不利于多糖的浸出, 使红枣多糖的得率和含量较低。酶浓度较高时, 酶与游离蛋白质的水解反应达到平衡, 红枣细胞液中和溶液中的多糖也达到平衡, 使多糖的得率和含量基本保持不变^[10]。因此红枣多糖以 2% 胰蛋白酶提取较适宜。

2.3 料水比对红枣多糖提取的影响

由图 3 可知, 随着料水质量比的增大, 多糖的得率和含量逐渐上升; 当达到 1:20 时, 红枣多糖的得率和含量达到最大值; 继续增加料水比, 多糖得率和含量均下降, 但其得率下降不明显。造成多糖得率和含量这种变化的原因主要是

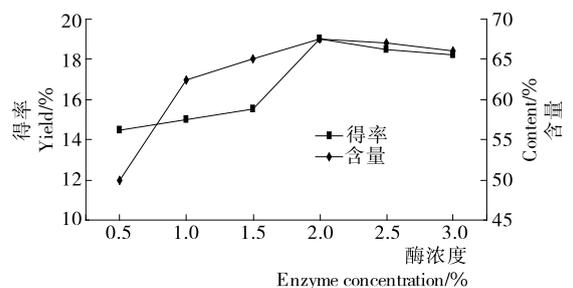


图 2 酶浓度对多糖提取的影响

Figure 2 The influence of Enzyme concentration on polysaccharide extracting

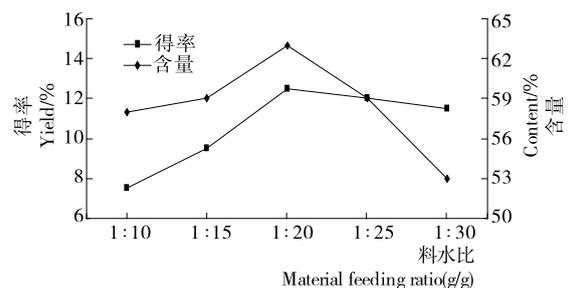


图 3 料水比对多糖提取的影响

Figure 3 The influence of material ratio on polysaccharide extracting

由于酶解反应需要最佳的底物浓度即料水比。因此,综合考虑选用料水质量比为 1:20。

2.4 酶解时间对红枣多糖提取的影响

由图 4 可知,红枣多糖的得率和含量随酶解时间的增加而提高;当酶解时间为 2 h 时,多糖的得率和含量达到最大;随后继续增加酶解时间,其得率和含量下降。这是因为酶解时间较短时,酶与底物的接触不充分,反应机会减少,因而多糖的得率和含量较低;若酶解时间较长时,胰蛋白酶的水解能力达到饱和,红枣细胞液中的其他物质就会与酶作用生成杂质,多糖结构也会发生变化或降解,并且有些非多糖物质会溶于溶剂中^[10-11],影响多糖的得率和含量。因此,酶解时间并非越长越好,选用酶解时间为 2 h 最好。

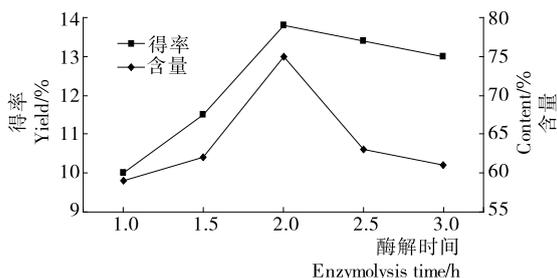


图 4 酶解时间对多糖提取的影响

Figure 4 The influence of enzymatic hydrolysis time on polysaccharide extracting

2.5 微波功率对红枣多糖提取的影响

由图 5 可知,红枣多糖的得率随微波功率的增加呈直线上升趋势;多糖的含量随微波功率的增加上升,到中火时达到最大,但微波功率为高火时却下降。这表明微波功率对多糖得率和含量的影响不如其他因素明显。考虑到微波功率过高容易造成容器内液体剧烈沸腾,沸腾的液体会产生大量泡沫,快速喷出提取容器,造成有效成分损失^[12]。综合考虑,选用微波中火提取多糖能保证得率高含量也高。

2.6 微波时间对红枣多糖提取的影响

由图 6 可知,微波提取时间的长短变化可明显改变多糖的得率和含量。起初随着微波时间的增加,得率和含量增加;当微波时间达到 4 min 时,其得率和含量达到最大值;随着微波时间的继续延长,得率和含量呈现下降趋势。因为微波时间过短时,微波不能充分提高枣粉内部的温度和压力。微波时间过长,会降低某些反应的活化能,从而促使多糖分

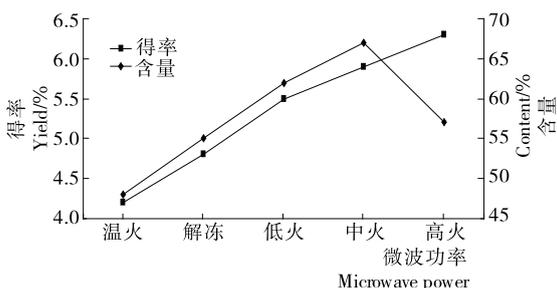


图 5 微波功率对多糖提取的影响

Figure 5 The influence of microwave power on polysaccharide extracting

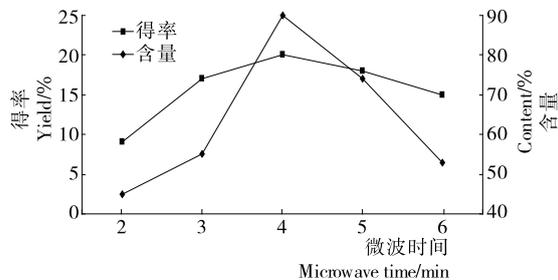


图 6 微波时间对多糖提取的影响

Figure 6 The influence of microwave time on polysaccharide extracting

子与其它分子之间形成新的化学键,增加分子之间的作用力,阻止多糖分子浸入溶液^[13]。因此,确定提取红枣多糖的最佳微波时间为 4 min。

2.7 提取红枣多糖的正交试验

由于单因素试验表明微波功率对红枣多糖的得率和含量影响不大,因此进行正交试验时只选取酶浓度、酶解时间、料水比、微波时间为试验因素,每个因素设 3 个水平,以红枣多糖的得率和含量为考核指标,并用加权平均法进行综合评分,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,以确定最佳的提取条件。其因素水平、试验结果见表 1、2。

由表 2 可知,各因素对红枣多糖提取的影响次序为: B>C>D>A,即酶解时间对红枣中多糖提取的影响最大,料水比次之,微波时间和酶浓度对其影响程度不明显。最佳提取

表 1 因素水平表

Table 1 Factors level table

水平	A 酶浓度/%	B 酶解时间/h	C 料水比 (g/g)	D 微波时间/min
1	1.5	1.5	1:15	3
2	2.0	2.0	1:20	4
3	2.5	2.5	1:25	5

表 2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	得率/%	含量/%	综合得分
1	1	1	1	1	7.27	49.45	72.35
2	1	2	2	2	10.94	61.62	100.00
3	1	3	3	3	10.62	51.16	87.03
4	2	1	2	3	9.01	51.69	83.12
5	2	2	3	1	10.52	52.21	87.94
6	2	3	1	2	7.37	53.38	74.00
7	3	1	3	2	8.75	50.01	80.57
8	3	2	1	3	9.27	54.41	86.52
9	3	3	2	1	8.55	49.91	79.57
k_1	86.46	78.68	77.62	79.95			
k_2	81.85	91.49	87.56	84.86			
k_3	82.22	80.53	85.18	85.56			
R	4.61	12.81	9.94	5.61			

(下转第 201 页)

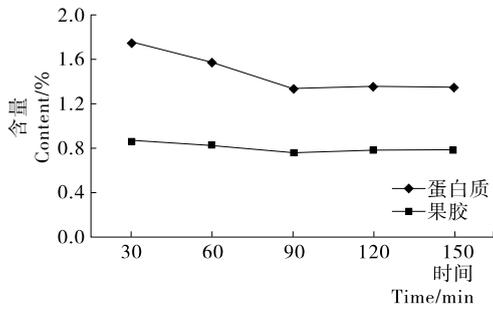


图1 不同醇沉处理时间下浓缩液蛋白质和果胶含量的变化
Figure 1 The change of protein and pectin of under different alcohol precipitation processing time in tobacco concentrated solution

的用量少,同时回收乙醇的能耗也相应减少,可有效降低经济成本。

(2) 通过试验筛选,再造烟叶提取液的醇沉净化处理最佳工艺为,将烟草提取液预浓缩至固形物含量为20%,加入占预浓缩液体积浓度40%的95%乙醇,处理90 min后,在4 000 r/min转速下离心处理5 min,去除沉淀后浓缩至40%固形物含量的烟草浓缩液。

(3) 醇沉技术,可有效应用于再造烟叶生产过程中,通过添加乙醇醇沉净化处理再造烟叶提取液,果胶和蛋白质的去除率在50%左右,香气和烟气浓度显著提高,杂气和刺激性明显降低,相比未处理样品感官品质有显著提升。

(4) 本研究进行的是影响再造烟叶浓缩液醇沉效果的因素筛选试验,将在下一步进行正交试验的研究,以考察

各因素之间的相互作用,优化出最佳的再造烟叶浓缩液醇沉处理的最佳工艺条件。

参考文献

[1] 张鹏,于静洋,龙章德,等.美拉德反应改善烟草薄片质量的应用研究[J].食品与机械,2016,32(3):39-44.
 [2] 黎新钦,张静,田兆福,等.液相美拉德反应优化烟梗烟末提取液的应用研究[J].食品与机械,2015,31(5):21-27.
 [3] 王亮,胡惠仁,唐向兵,等.微粒助留助滤体系对烟草薄片浆料助留助滤性能的影响[J].中华纸业,2011,32(18):48-52.
 [4] 黄明,王凤兰,姚元军,等.超声波辅助鉴别造纸法再造烟叶碳酸钙的含量[J].纸和造纸,2012,31(9):71-74.
 [5] 刘志昌,王学文,唐向兵,等.仿酶体系处理烟草薄片的研究[J].中国造纸,2012,30(5):26-29.
 [6] 黄明,王亮,姚元军,等.壳聚糖在造纸法再造烟叶涂布中的应用研究[J].食品工业,2013,34(12):121-123.
 [7] 汪建红,袁伟,韩平东.茅芋皮中多糖的提取、纯化及抗氧化性研究[J].食品与机械,2016,32(7):156-160.
 [8] 汪名春,聂陈志鹏,朱培蕾,等.莴苣茎水溶性多糖的单糖组成及免疫调节活性研究[J].食品与机械,2016,32(5):148-151.
 [9] 张乔会,王建中,逢锦慧,等.杜香多糖的抗氧化活性及物理性质研究[J].食品与机械,2015,31(5):206-209.
 [10] 袁益来,薛冬,张合川,等.一种改善造纸法再造烟叶色泽的方法:中国,ZL201410271283.3[P].2016-08-10.
 [11] 黄明.壳聚糖净化处理造纸法再造烟叶提取液的研究[J].食品工业,2014,35(11):1-4.
 [12] 郝辉,王高杰,许春平,等.再造烟叶中果胶降解条件优化及其应用研究[J].食品与机械,2016,32(4):201-206.

(上接第147页)

条件为 B₂C₂D₃A₁,即酶解时间为2.0 h,料水质量比为1:20,微波时间为5 min,胰蛋白酶浓度为1.5%。

由于该条件组合不在正交试验中,故需做验证实验。验证结果为:在该组合条件下红枣多糖得率和含量为10.97%,63.48%,综合得分102,平行实验的重现性好。因此,红枣多糖最佳提取条件为胰蛋白酶浓度1.5%,酶解时间2 h,料水质量比1:20,微波时间5 min。

3 结论

本研究采用胰蛋白酶协同微波辅助提取红枣中的多糖,确定了红枣多糖提取的最优条件,用1.5%的胰蛋白酶(pH 8.0),以料水质量比1:20于37℃酶解2.0 h,中火微波提取5 min,红枣多糖得率为10.97%。但提取的粗多糖中多糖含量为63.48%,仍含有较多杂质,可以通过层析法等方式对其进行纯化,以提高红枣多糖纯度。

参考文献

[1] 吕磊.大枣多糖的提取分离与脱色研究[D].西安:西北大学,2003:1-12.
 [2] 石奇,樊君,石异,等.中性蛋白复合酶法提取大枣多糖的研究

[J].时珍国医国药,2009,20(1):7-8.
 [3] 林勤保,高大维,于淑娟,等.大枣多糖的分离和纯化[J].食品工业科技,1998(4):20-21.
 [4] 李环宇,王敏,李五霞,等.超声波辅助酸性缓冲液浸提大枣多糖的工艺优化[J].食品与机械,2015,31(3):179-182.
 [5] 方元,许铭强,汪欣蓓,等.超声波辅助提取哈密大枣多糖的工艺优化[J].食品与机械,2014,30(2):175-180.
 [6] 元树艳,王荔,莫晓燕.大枣多糖的提取工艺及抗氧化作用研究[J].食品与机械,2012,28(4):117-120.
 [7] 林勤保.大枣多糖的分离和纯化[J].食品工业科技,1998(4):20-21.
 [8] 李雪华,龙盛京.大枣多糖的提取与抗活性氧研究[J].广西科学,2000,7(1):54-56.
 [9] 杨云,冯卫生,孟江,等.正交试验法优选大枣渣多糖水煎煮提取工艺[J].中药新药与临床药理,2003,14(3):200-202.
 [10] 杨云.酶法提取大枣多糖的研究[J].食品工业科技,2003,24(10):93-94.
 [11] 林勤保.大枣多糖的单糖组成的高效液相色谱法研究[J].郑州粮食学院学报,1998,19(3):57-60.
 [12] 杨世平,孙润广.陕北红枣中多糖的酶加水法提取工艺研究[J].武汉植物学研究,2005,23(4):373-375.
 [13] 刘依,韩鲁佳.微波技术在板蓝根多糖提取中的应用[J].中国农业大学学报,2002,7(2):27-30.