

# 酶法提取河蚬多糖的研究

王宇<sup>1,2</sup>, 高宏建<sup>1</sup>, 刘东红<sup>1,\*</sup>

(1.浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310029;

2.军事经济学院襄阳士官学校, 湖北襄樊 441118)

**摘要:**选择木瓜蛋白酶法提取河蚬多糖, 确定了不同料液比、酶解时间、酶解温度、加酶量、酶解pH等因素对河蚬多糖提取率的影响。通过正交实验, 结果表明, 河蚬多糖的最佳提取工艺条件为: 料液比1:30, 酶解温度55℃, 加酶量1.5%, 酶解pH7.5。在此条件下提取2h, 河蚬多糖的提取率为4.53%。

**关键词:**酶法, 河蚬, 多糖, 提取

## Study on enzymatic extraction polysaccharides from *Corbicula fluminea*

WANG Yu<sup>1,2</sup>, GAO Hong-jian<sup>1</sup>, LIU Dong-hong<sup>1,\*</sup>

(1.School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2.The Military Economic Academy Xiangfan College, Xiangfan 441118, China)

**Abstract:** Using *Corbicula fluminea* as raw material, polysaccharides of *Corbicula fluminea* were extracted by the method of papain. On the basis of single factors tests, the effects of the four factors including solid-liquid ratio, time, temperature, amount of enzyme and pH on the yield were studied through orthogonal experiment design. The results showed that the best extracted conditions were as follows: solid-liquid ratio 1:30, temperature 55℃, amount of enzyme 1.5% and pH7.5. The yield of polysaccharides was 4.53% under the optimum technological parameters extracting for 2h.

**Key words:** enzymatic; *Corbicula fluminea*; polysaccharides; extracted

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)14-0228-04

活性多糖是一类具有免疫调节活性等特殊生理功能的多糖, 广泛存在于动物、植物、微生物等体内, 资源极为丰富, 其中动物类多糖主要包括糖原、肝素、硫酸软骨素等。多糖及其复合物在生物体中不仅是作为能量资源和构成材料, 更重要的是, 它存在于一切细胞膜结构中, 参与生命现象中细胞的各种活动, 具有多种多样的生物学功能<sup>[1]</sup>。有学者已经从牡蛎<sup>[2]</sup>、文蛤<sup>[3]</sup>、河蚌<sup>[4]</sup>等软体中提取出具有与植物多糖相似生理活性的多糖类化合物, 该类化合物具有调节机体免疫力、抗氧化、抗肿瘤、抗凝血、抗心脑血管疾病等多种特殊抗病作用<sup>[5]</sup>, 是一类理想的药品或保健食品原料, 由此受到了人们的普遍关注, 并在医药和保健食品等行业中得到了一定的应用, 具有较广阔的发展前景。近年来, 随着分离提取技术、手段的不断进步, 酶法提取多糖技术已得到广泛的应用。汪财生等<sup>[6]</sup>采用纤维素酶法提取紫山药多糖, 优化了提取工艺条件, 并与传统热水浸提法进行了比较, 结果表明, 纤维素酶法更适用于紫山药多糖的提取; 邹伟等<sup>[7]</sup>采用水浴振荡辅助酶法提取双胞蘑菇多糖, 并对工艺条件进行了优化研究, 结果表明, 该法提取率可达2.31%。

目前, 有关河蚬多糖的研究报道甚少, 本实验主要研究了酶法提取的各单因素对河蚬粗多糖提取结果的影响, 并优化了提取工艺, 以期建立一种简便、快速、有效的提取方法, 为河蚬的综合开发及深加工提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

冷冻煮蚬肉 L号, 2010年4月生产, 湖州凡人食品公司; 木瓜蛋白酶 活力为20万U/g, 广西南宁杰沃利生物制品有限公司; 苯酚、无水乙醇、浓硫酸、乙醚等 为国产分析纯。

CTAIPH1-4LSC冷冻干燥机 德国CHRIST公司; 电动粉碎机 温岭市大德中药机械有限公司; GB204分析天平 瑞士梅特勒仪器有限公司; THA-82恒温水浴锅 江苏金坛亿通电子有限公司; RE52AAA型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; KA-1000离心机 上海安亭科学仪器厂; UV-2550紫外/可见分光光度计 日本SHIMADZU公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 精密量取105℃干燥至恒重标准葡萄糖100mg, 用蒸馏水定容100mL, 再从该溶液中吸取10mL, 用蒸馏水定容100mL, 配成浓度各为0.1mg/mL的标准糖溶液。称取5g的苯酚, 用蒸馏水定容于100mL的棕色容量瓶中, 配成质量分数为5%的苯酚溶液。精密吸取标准单糖溶液0.2、0.4、0.6、0.8、

收稿日期: 2011-11-25 \* 通讯联系人

作者简介: 王宇(1981-), 男, 在读硕士研究生, 讲师, 研究方向: 食品营养与安全。

基金项目: 国家支撑项目(2012BAD38B09)。

1.0、1.2mL, 分别置于具塞试管中, 加蒸馏水至体积2.0mL, 再加苯酚1.0mL, 迅速摇匀后滴加浓硫酸5.0mL, 摇匀后放置5min, 置于沸水浴中加热15min, 取出迅速冷却至室温; 另以蒸馏水2.0mL, 加苯酚1.0mL和浓硫酸5.0mL, 同上做2个空白对照, 于490nm处测吸光度。以吸光度为纵坐标, 葡萄糖的浓度为横坐标绘制葡萄糖标准曲线如图1所示。

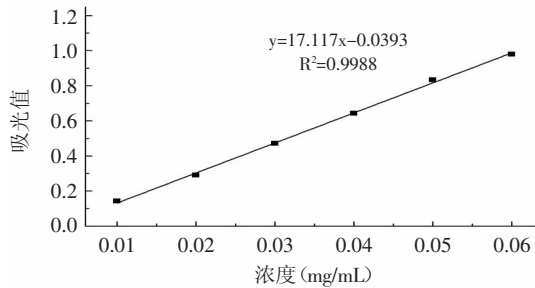


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

1.2.2 河蚬多糖提取工艺流程 原料冷冻干燥→粉碎过40目筛→称量5g→50℃条件下乙醚脱脂8h、晾干→木瓜蛋白酶水解→90℃水浴10min进行酶灭活→离心(5000r/min, 10min)去沉淀→浓缩→醇沉(加2倍无水乙醇使最终浓度60%~70%, 4℃静置10h)→离心(5000r/min, 10min)沉淀→复溶(定容10mL)→去蛋白(氯仿:正丁醇=5:1, 粗多糖溶液:氯仿=5:1, 振摇20min, 脱2~3次)→离心(5000r/min, 10min)取上清液→冷冻干燥→多糖粗品

1.2.3 多糖含量测定 多糖类物质在强酸和加热条件下能迅速水解成单糖, 单糖在强酸条件下与酚反应生成橙色衍生物, 该橙色衍生物在波长490nm处有最大吸收, 可用光度法进行定量分析。采用苯酚-硫酸法<sup>[8]</sup>对其进行含量测定, 然后计算河蚬多糖提取率。计算公式为:

$$\text{多糖提取率}(\%) = m/M \times 100$$

式中: m为提取物中总糖质量, M为所称量原料质量。

1.2.4 单因素实验 本实验主要研究不同料液比、酶解时间、酶解温度、加酶量、酶解pH等因素对河蚬多糖提取率的影响。

1.2.5 正交实验设计 通过单因素实验, 最终确定料液比、酶解温度、加酶量、酶解pH为考察因素, 采用4因素3水平实验设计, 即L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表(见表1)进行实验, 每个实验号重复3次, 实验结果取平均值。

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Table of factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 料液比	B 温度(℃)	C 加酶量(%)	D 酶解pH
1	1:20	50	0.5	6.5
2	1:30	55	1.0	7.5
3	1:40	60	1.5	8.5

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

2.1.1 料液比对河蚬多糖提取率的影响 料液比分别采用1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(w:w)处理, 其他提

取条件为: 酶解时间2h、温度50℃、加酶量1%、pH6.5时, 结果如图2所示。

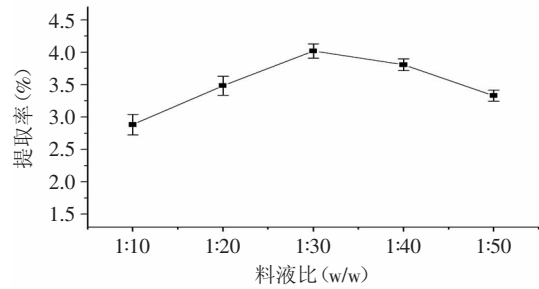


图2 料液比对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on extraction rate of polysaccharides

由图2可以看出, 料液比由1:10增至1:30时, 多糖提取率逐渐增大, 而后料液比再增大时多糖的提取率反而减小。可见, 料液比的过小或过大都不利于多糖的提取。这可能是因为当料液比过小时, 酶及底物的浓度过高, 分子运动速率受到限制, 抑制了酶促反应的进行, 随着料液比增大可以提高反应速度。当料液比过大时, 酶及底物浓度过低, 也不利于酶促反应的进行。因此, 将料液比确定为1:30。

2.1.2 酶解时间对河蚬多糖提取率的影响 当提取条件为: 料液比1:30、温度50℃、加酶量1%、pH6.5时, 分别反应1、2、3、4、5h, 结果如图3所示。

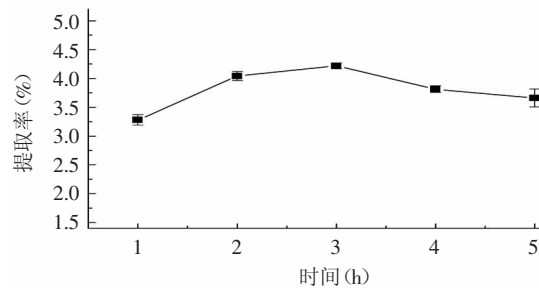


图3 时间对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of time on extraction rate of polysaccharides

由图3可知, 随着酶解反应时间的延长, 多糖的提取率呈不断增大的趋势, 到3h时达到最大提取率, 再继续延长反应时间, 提取率反而减小, 但减小趋势较缓。这可能是因为反应进行到3h时已比较充分, 使得多糖尽可能地溶出, 再继续反应, 某些多糖又和蛋白质大分子结合在一起沉到底部, 从而导致多糖提取率减小。但在2~3h范围内提取率变化并不大, 考虑经济效益, 酶解时间2h为宜。总的来看, 酶解时间对河蚬多糖提取率的影响不大, 相对于其他单因素而言, 其影响最为不明显, 因此, 在正交实验设计时不予考虑。

2.1.3 酶解温度对河蚬多糖提取率的影响 当提取条件为: 酶解时间2h、料液比1:30、加酶量1%、pH6.5时, 分别在45、50、55、60、65℃温度条件下酶解提取, 结果如图4所示。

由图4可以看出, 在45~55℃范围内, 多糖的提取率随着温度的升高而增大, 达到最高提取率后继续升高温度, 提取率减小。这是因为随着温度的升高, 酶促反应速度加快, 当高于最适反应温度后, 酶活力减

小,多糖提取率也随之减小。在50~55℃范围内,多糖提取率相差不大,综合考虑,酶解温度确定为50℃。

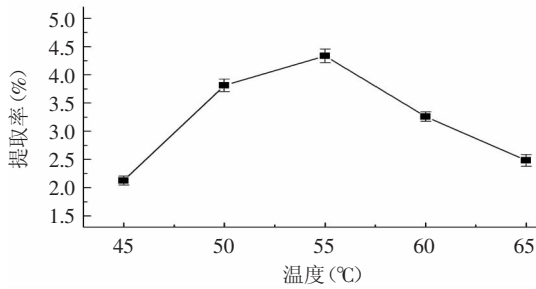


图4 温度对多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of temperature on extraction rate of polysaccharides

2.1.4 加酶量对河蚬多糖提取率的影响 当提取条件为:酶解时间2h、料液比1:30、温度50℃、pH6.5时,加酶量分别为0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%处理,结果如图5所示。

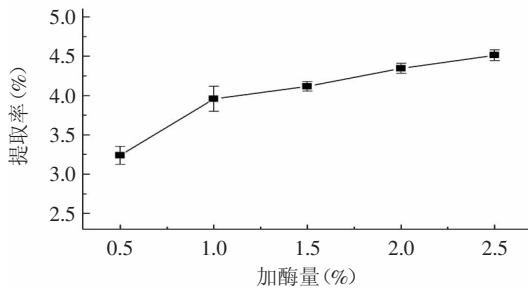


图5 加酶量对多糖提取率的影响

Fig.5 Effect of enzyme-material ratio on extraction rate of polysaccharides

由图5可以看出,当加酶量在0.5%~1.0%范围内时,多糖的提取率增加较为明显,继续增大加酶量时,多糖提取率的增加趋势则较为平缓。这是因为随着加酶量的增加,酶浓度增大,使更多的多糖能更快地与蛋白质分离,当酶浓度达到一定值后逐渐趋于饱和,酶解反应也随之趋于平缓。所以,考虑经济因素,加酶量确定为1.0%较为合适。

2.1.5 酶解pH对河蚬多糖提取率的影响 pH分别选择4.5、5.5、6.5、7.5、8.5处理,其他提取条件为:酶解时间2h、温度50℃、加酶量1%、料液比1:30时,结果如图6所示。

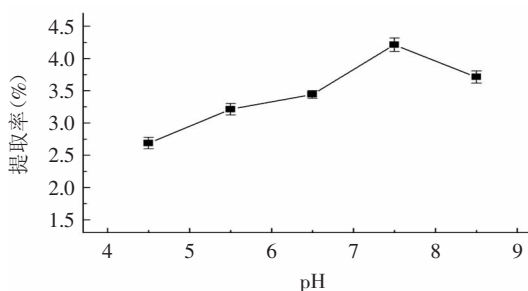


图6 pH对多糖提取率的影响

Fig.6 Effect of pH value on extraction rate of polysaccharides

由图6可以看出,在pH为4.5~7.5时,多糖的提取率随着pH的增大而增大,当继续增大pH时,多糖的

提取率开始减小。这可能是由于酶活力的适宜pH范围以及糖肽键对碱的不稳定性共同作用的原因。因此,最适pH为7.5。

## 2.2 正交实验结果与分析

在单因素实验基础上,对影响河蚬多糖提取率的主要因素(料液比、温度、加酶量、pH)进行正交实验,选出最佳数据,结果见表2。正交实验极差分析表明,由极差R得出影响因素大小顺序为:B>D>C>A,即酶解温度>酶解pH>加酶量>料液比。最佳因素组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即料液比1:30,酶解温度55℃,加酶量1.5%,酶解pH7.5。在此条件下,河蚬多糖的提取率最高,为4.53%。

表2 正交实验结果及其分析表

Table 2 Table of results and analysis of orthogonal test

实验号	A	B	C	D	多糖提取率 (%)
1	1	1	1	1	3.18
2	1	2	2	2	4.11
3	1	3	3	3	3.05
4	2	1	2	3	3.19
5	2	2	3	1	4.28
6	2	3	1	2	3.39
7	3	1	3	2	4.07
8	3	2	1	3	3.46
9	3	3	2	1	2.95
K <sub>1</sub>	10.34	10.44	10.03	10.41	
K <sub>2</sub>	10.86	11.85	10.25	11.57	
K <sub>3</sub>	10.48	9.39	11.40	9.70	
k <sub>1</sub>	3.45	3.48	3.34	3.47	
k <sub>2</sub>	3.62	3.95	3.42	3.86	
k <sub>3</sub>	3.49	3.13	3.80	3.23	
R	0.17	0.82	0.46	0.62	

## 2.3 正交实验方差分析结果

表3 正交实验方差分析表

Table 3 Table of variance analysis of orthogonal test

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	p值
A	0.0483	2	0.0241		
B	1.0158	2	0.5079	21.0747	0.0453
C	0.3609	2	0.1804	7.4855	0.1178
D	0.5941	2	0.2970	12.3237	0.0751
误差	0.0483	2	0.0241		
总和	2.0190	8			

由方差分析表3的F值可知,4种因素对实验结果的影响程度各不相同,影响程度依次为:酶解温度>酶解pH>加酶量>料液比。由p值可知,因素B即酶解温度有显著性差异( $p < 0.05$ ),这与直观分析结果一致。

## 3 结论

通过单因素和正交实验结果得出,酶法提取河蚬多糖,4个因素影响多糖提取率的大小顺序为:酶解温度>酶解pH>加酶量>料液比,其中,酶解温度对河蚬多糖提取率的影响程度达显著水平,料液比、加酶量和酶解pH对河蚬多糖提取率没有显著影响。河蚬多糖的最佳提取工艺条件为:料液比1:30,酶解温度

(下转第238页)

杆菌生长及产酸能力,发现枯草芽孢杆菌A9作为伴生菌可提高2-KGA产量并且缩短发酵时间。为发挥新菌系的发酵潜力,进而研究营养成分及培养条件对新菌系生长产酸的影响,旨在提高其2-KGA产量及发酵效率。最终确定最优发酵培养基为:L-山梨糖8%、玉米浆1.4%、尿素1.2%、MgSO<sub>4</sub> 0.02%、碳酸钙0.5%;最优培养条件为:pH7.0~7.3、100mL发酵摇瓶装液量为10mL、温度29℃、接种量15%。通过实验证明:优化后的混合菌系2-KGA产量提高2.45%,60h达到发酵终点,比优化前缩短16h,发酵效率提高0.29g/L·h。优化后的培养条件不仅降低了成本,还提高了生产效率,这对指导V<sub>c</sub>工业生产具有重大意义。

### 参考文献

- [1] 张静,刘立明,刘杰,等. 生物技术法生产维生素C的研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(5):1-7.
- [2] 尹光琳,陶增,鑫于龙,等. L-山梨糖发酵产生维生素C前体2-酮基-L-古龙酸的研究 I. 菌种的分离筛选和鉴定[J]. 微生物学报,1980,20(3):246-251.
- [3] T. Reichstein, A. Grüssner. Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure(C-Vitamin)[J]. Helvetica Chimica Acta,1934,17(1):311-328.
- [4] Zhang Jing, Liu Jie, Shi Zhong-ping. Manipulation of B. megaterium growth for efficient 2-KLG production by K. vulgare[J]. Process Biochemistry,2010,45:602-606.

(上接第230页)

55℃,加酶量1.5%,酶解pH7.5。在此条件下酶解提取2h,河蚬多糖的提取率最高为4.53%。

### 参考文献

- [1] 姚静倩,吴皓,陈蕾,等. 双壳贝类软体部位活性物质研究概况[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(10):98-100.
- [2] 王俊,姚滢,张建鹏,等. 牡蛎多糖的制备和生物学活性研究[J]. 医学研究生学报,2006,19(6):217-220.
- [3] 尹华,袁强,储云月. 文蛤多糖的提取及含量测定[J]. 中国海洋药物,2006,25(1):48-51.

(上接第234页)

- [6] Wang Lijun, MasayoshiSAITO, Eizo TATSUMI, et al. Antioxidative and angiotensin I-Converting enzyme inhibitory activities of sufu(fermented tofu) extracts[J]. JARQ,37(2):129-132.
- [7] A Fahmi,S Morinura,H C Guo,et al. Production of angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales[J]. Process Biochemistry,2004,39:1195-1200.
- [8] 郝征红,李桂凤,祁国栋,等. 大豆功能性成分的价值综述[J]. 中国食物与营养,1998(2):9-30.
- [9] 张岩春,于国萍. 酶法有机溶剂萃取大豆油的综述[J]. 粮油食品科技,2004,12(3):31-32.
- [10] 洪丰,朱向菊. 酶法提油技术应用[J]. 粮食与油脂,2009(6):1-3.
- [11] 鲁曾,董海洲,潘燕. 酶法提油技术研究进展[J]. 粮食与油脂,2006(6):37-39.

- [5] 康艳红,赵军,杨伟超,等. V<sub>c</sub>二步发酵新组合菌系B15-14的筛选及其条件优化[J]. 微生物学杂志,2008,28(4):35-38.
- [6] 仲崇斌,张忠泽,张文革,等. 以掷孢酵母作为伴生菌产生V<sub>c</sub>前体KGA的研究[J]. 生物技术,2004,14(1):45-47.
- [7] 杨伟超,汲涌,荆士华,等. 一种V<sub>c</sub>二步发酵伴生菌的初筛方法[J]. 生物技术,2009,19(6):51-53.
- [8] 盛勤,冯瑞山,陈建. 氧化葡萄糖酸杆菌及其伴生菌软化芽孢杆菌原生质体融合的研究[J]. 中国药科大学学报,1996,27(10):618-620.
- [9] Takagi Y, Sugisawa T, Hoshino T. Continuous 2-keto-L-gulonic acid fermentation from L-sorbose by Ketogulonigenium vulgare DSM 4025[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2009,82:1049-1056.
- [10] 蒋宇扬,郭振勇,张成刚. 2-酮基-L-古龙酸还原酶分离纯化及其理化、酶学性质的研究[J]. 生物工程学报,1997,13(4):400-405.
- [11] Zhang Jing, Zhou Jing-wen, Liu Jie, et al. Development of chemically defined media supporting high cell density growth of Ketogulonigenium vulgare and Bacillus megaterium[J]. Bioresource Technology,2011,102:4807-4814.
- [12] 杨丽宁,赵士豪,刘冲. 间歇流加L-山梨糖发酵生产2-酮基-L-古龙酸研究[J]. 河北化工,2008,31(6):33-35.
- [13] 李强,刁劲羽,向波涛. 山梨糖发酵产生2-酮基-L-古龙酸氮源代谢规律[J]. 微生物学报,1996,36(1):19-24.
- [14] 杨涛,朱欣杰,张志雄,等. MgSO<sub>4</sub>对2-酮基-L-古龙酸发酵影响的实验研究[J]. 上海交通大学学报,2008,42(9):1458-1465.

- [4] 沈鸿,窦昌贵. 河蚌多糖提取工艺的优化[J]. 时珍国医国药,2006,17(3):380-381.
- [5] 张延坤,张东祥. 浅谈生物活性多糖的抗病作用与临床应用[J]. 中国现代实用医学杂志,2008,7(5):35-39.
- [6] 汪财生,孙安吉,王忠华,等. 紫山药多糖酶法提取工艺优化研究[J]. 食品工业科技,2010,31(2):266-271.
- [7] 邹伟,张宝善,李冰,等. 水浴振荡辅助酶法提取双孢蘑菇多糖的工艺研究[J]. 食品工业科技,2011,32(5):223-224,334.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第二版. 杭州:浙江大学出版社,1999.

- [12] 吴祥庭. 酶法提油技术的研究进展[J]. 粮油食品科技,2006,14(6):41-42.
- [13] Dobush G R, Ankney C D, Kremetz D G. The effect of apparatus,extraction time,and solvent type on lipid extractions of snow geese[J]. Can J Zool,1985,63:1917-1920.
- [14] 尚军,李来好,吴燕燕,等. 响应面法优化超声波辅助蛋白酶水解合浦珠母贝肉的条件研究[J]. 食品科学,2009,30(18):44-49.
- [15] 张智,朱洪亮,钮宏禹,等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产蛋白酶的发酵条件[J]. 食品科学,2008,2(12):400-404.
- [16] van der VEN C, GRUPPEN H, de BONT D B A, et al. Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology[J]. International Dairy Journal,2002,12(10):813-820.