

雅致小克银汉霉的复合酶破壁工艺研究

万红贵^{1,2},王亚东^{1,2},黄志旭^{1,2},薛彩丽^{1,2},彭银成¹

(1.南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京 210009;

2.南京工业大学国家生化中心,江苏南京 211816)

摘要:利用复合酶对雅致小克银汉霉进行破壁工艺研究,通过研究复合酶添加量、酶解 pH、酶解温度、酶解时间等因素对破壁效果的影响,确定较优的工艺条件为:复合酶添加量为 0.3%、酶解 pH 为 9、酶解温度为 50℃、酶解时间为 4h,最终提取率为 87.3%,可为相应的工业化作参考。

关键词:复合酶,细胞破壁, γ -亚麻酸

Study on cell disruption of complex enzyme of *Cunninghamella elegans*

WAN Hong-gui^{1,2}, WANG Ya-dong^{1,2}, HUANG Zhi-xu^{1,2}, XUE Cai-li^{1,2}, PENG Yin-cheng¹

(1.College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

2.National Biochemical Center of Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, China)

Abstract: Using the complex enzyme to break the cell of *Cunninghamella elegant*, the optimum process conditions were determined by studying the addition of enzyme, pH, temperature, reaction time. The optimum process conditions were as followed: enzyme dosage 0.3%, hydrolysis pH9, hydrolysis temperature 50℃, reaction time 4h, the final extraction rate reached 87.3%. The final process can serve as a reference for the corresponding industrialization.

Key words: complex enzyme; cell broken; γ -linolenic

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)03-0258-04

γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA) 分子式为 $C_{18}H_{30}O_2$, 分子量为 278, 它是无色油状液体, 不溶于水, 易溶于石油醚、正己烷等非极性溶剂中, 在高温条件下极易氧化。GLA 是一种 ω -6 多不饱和脂肪酸^[1-2], 具有广泛的生理活性和明显的药理作用。GLA 可以降低血脂, 抗糖尿病, 抗肿瘤, 抗血栓性心脑血管疾病, 预防和治疗高血压、动脉粥样硬化等^[3]。GLA 还可增强人体的免疫功能, 它是婴儿不可缺少的营养素之一^[4]。人和哺乳动物自身却不能合成 GLA, 一般从天然植物中获得, 但远不能满足人们的需求。在某些藻类和真菌中含有丰富的 GLA, 真菌发酵产 GLA 具有生产周期短、不受自然条件限制、占地面积小、产量稳定和含油量稳定等优点, 因而现在利用真菌发酵生产亚麻酸已成为国际趋势。1986 年日本和英国就能用微生物提取亚麻酸进行工业化生产, 目前我国还处于研究阶段, 加大力度研究微生物工业化提取亚麻酸的方法是当前研究亚麻酸的一个重要方面^[5]。

GLA 为胞内产物, 因而必须对细胞进行破壁处理, 选择合适的破壁方法可最大限度的将 GLA 提取出来。目前, 研究者常采用的油脂提取方法主要有索氏抽提法、机械法、有机溶剂浸提法、酸热法、超临

界 CO_2 萃取法等^[6-7]。索氏法的油脂得率最高, 但耗时较长, 用量大; 超临界 CO_2 萃取法油脂得率较索氏法略低, 油脂的脂肪酸组成及含量相近, 且样品需要量小, 样品处理能力较索氏法大为提高, 但需相应设备; 有机溶剂法提取效果最差; 酸热法效果较好, 操作简便, 但更多用于菌株筛选。目前工业中仍以经球磨机或高压匀浆处理菌体后再用有机溶剂提取的方法为主, 但该方法耗能高、噪声大、并且破壁过程中容易积聚大量的热量, 易对 GLA 造成损失。因而, 寻找一种高效、节能的 GLA 提取工艺显得尤为重要。酶法破壁相对于传统破壁手段具有反应条件温和、能耗低、环保等优点, 近年来已有许多相关文献的报道。万红贵^[8]等用纤维素酶和蛋白酶复合处理三孢布拉霉优化番茄红素提取率。根据雅致小克银汉霉的细胞壁结构特征, 本文研究采用碱性木聚糖酶和碱性蛋白酶复合处理雅致小克银汉霉的实用效果, 旨在为工业化生产提供相应的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雅致小克银汉霉(*Cunninghamella elegans*) 本实验室保藏菌株; 碱性蛋白酶(酶活为 50000u/g)、碱性木聚糖酶(酶活为 35944u/mL) 诺维信中国生物技术有限公司; 氢氧化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、石油醚、正己烷、乙醇 国药集团化学试剂公司, 分析纯; 去离子水 同凯兆业; GLA 标准品 南京奥青生物

收稿日期: 2013-06-28

作者简介: 万红贵(1955-), 男, 硕士, 研究员, 主要从事发酵工程及代谢工程方面的研究工作。

有限公司,色谱纯。

JJ-1 电动搅拌机 常州国华电器有限公司;
LG10-2.4A 高速离心机 北京医用离心机厂;
KH2200B 超声波清洗器 昆山禾创超声仪器有限公司;
RE-85C 旋转蒸发器 上海青浦沪西仪器厂;
GZX-9140 MBE 电热鼓风干燥箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;
SHB-S 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;
HH-2 恒温水浴锅 金坛市恒丰仪器厂;
BS124S 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;
GC112A-1 气相色谱仪 上海舜宇恒平设备有限公司;
SPB-3 空气泵 北京中惠普分析技术研究所;
SPH-300 氢气泵 北京中惠普分析技术研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 分析方法

1.2.1.1 GLA 含量测定 分别选取浓度为 1、2、3、4、5mg/mL GLA 标准品作为横坐标,峰面积为纵坐标,得到标准曲线。利用外标法,将样品的峰面积代入,即可得到样品 GLA 的含量。

1.2.1.2 菌体含水量测定 称取一定量 GLA 湿菌丝体置入 80℃烘箱中烘至恒重,计算菌体含水量。菌体含水量计算公式如下

$$\eta = 1 - \frac{m}{M}$$
 式(1)

式中,η 为含水量,M 为湿菌体质量,m 为烘干后菌体质量。

1.2.1.3 GLA 提取率的计算 称取一定量 GLA 湿菌丝体置入 80℃烘箱中烘至恒重,机械破碎后以石油醚作为提取剂进行索氏提取,索提时间为 8h,索提结束后用旋转蒸发器将提取溶剂蒸发掉,得到的油脂甲酯化后,经气相色谱检测,得到 GLA 的含量。

称取一定量小克银汉霉湿菌丝体,按照不同方法对其进行处理后,加入适量的正己烷和乙醇提取 GLA,之后用旋转蒸发器将提取溶剂蒸发掉,得到的油脂甲酯化后,经气相色谱检测,即可得到 GLA 的含量。由此可得到提取率的计算公式为:

提取率(%) = 一定量的湿菌体经不同方法处理后得到的 GLA 的量/相同量的湿菌体经索提后得到的 GLA 的量 × 100 式(2)

1.2.2 实验设计 称取一定量的雅致小克银汉霉菌丝体,在一定条件下加入一定的复合酶酶进行酶解反应,反应结束后加入一定量的正己烷和乙醇提取 GLA,采用气相检测 GLA 并按式(2)计算提取率,考察实验过程中复合酶的添加量、酶解温度、酶解时间、酶解 pH 等因素,获得最佳的破壁工艺。

1.2.3 复合酶各因素实验方法

1.2.3.1 酶添加量对 GLA 提取的影响 称取 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05g 复合酶(碱性蛋白酶与碱性木聚糖酶质量比为 1:1),溶于 30mL 去离子水中,加入到 10g 雅致小克银汉霉湿菌丝体(含水量为 η)中。对照实验用 30mL 去离子水代替。自然 pH 条件下,在 50℃恒温水中反应 4h 后用正己烷-乙醇混合溶剂提取(V_{正己烷}:V_{乙醇} = 4:1)。收集提取液,测定 GLA 含量,计算提取率。

1.2.3.2 酶解 pH 对 GLA 提取的影响 称取 0.03g 复合酶,溶于 30mL 去离子水中,加入到 10g 小克银汉霉湿菌丝体中,分别调节菌丝体 pH,为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0。在 50℃恒温水中反应 4h 后用正己烷-乙醇混合溶剂提取。收集提取液,测定 GLA 含量,计算提取率。

1.2.3.3 酶解温度对 GLA 提取的影响 称取 0.03g 复合酶,溶于 30mL 去离子水中,加入到 10g 雅致小克银汉霉湿菌丝体中,均调节 pH 为 9.0。分别在 35、40、45、50、55、60℃恒温水中反应 4h 后用正己烷-乙醇混合溶剂提取。收集提取液,测定 GLA 含量,计算提取率。

1.2.3.4 酶解时间对 GLA 提取的影响 称取 0.03g 复合酶,溶于 30mL 去离子水中,加入到 10g 雅致小克银汉霉湿菌丝体中,均调节 pH 为 9.0。在 50℃恒温水中反应 1、2、3、4、5、6h 后用正己烷-乙醇混合溶剂提取。收集提取液,测定 GLA 含量,计算提取率。

表 1 正交实验表

Table 1 The orthogonal experimental design

水平	因素			
	A 酶解温度 (℃)	B 酶解 pH	C 酶添加量 (%)	D 酶解时间 (h)
1	45	8	0.2	3
2	50	9	0.3	4
2	55	10	0.4	5

2 结果与讨论

2.1 GLA 标准曲线测定

由实验得 GLA 标准曲线的回归方程为 Y = 2112.806X-155.4546,相关系数 R² = 0.99726。

2.2 复合酶破壁单因素实验

2.2.1 酶添加量对 GLA 提取的影响 由图 1 可知,随着复合酶的添加,GLA 的提取率与对照相比有了明显提高,但随着复合酶的量增加,提取率提高的幅度越来越不明显,出于考虑经济等因素,酶的添加量选择 0.03g,即相对于湿菌体来说,酶的添加量为 0.3% 为宜。

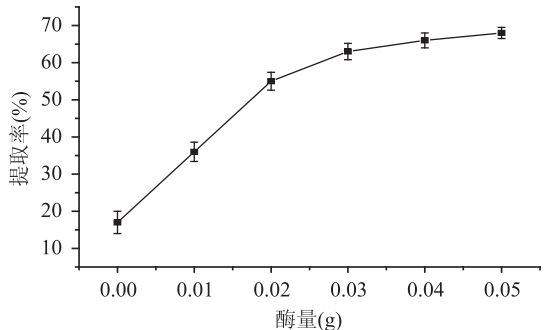


图 1 酶添加量对 GLA 提取的影响

Fig.1 Effect of addition of enzyme on GLA extraction

2.2.2 酶解 pH 对 GLA 提取的影响 由图 2 可知,当 pH 为 9 时,复合酶的破壁效果最好,GLA 提取率为 86.2%。这是由于 pH 为 9 时复合酶的综合活性最佳,能最大程度上破坏雅致小克银汉霉的细胞壁,这

使得萃取剂能够很好地和胞内的 GLA 接触,将其提取出来。在其他 pH 范围内,复合酶的活性受到不同程度的抑制,使得提取率有着不同幅度地下降。

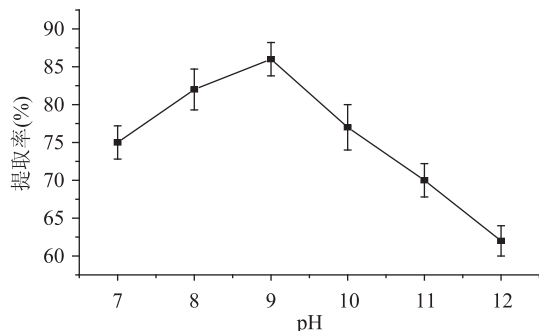


图2 酶解 pH 对 GLA 提取的影响

Fig.2 Effect of different pH on GLA extraction

2.2.3 酶解温度对 GLA 提取的影响 如图 3 所示,在较低温度时,提取率随着温度升高而升高,当温度超过 50℃ 时,提取率则随着温度升高而有所降低。这是因为在较低温度时难以发挥出复合酶的全部活力,而温度太高又容易使复合酶变性,抑制其活性,故酶解最佳温度选择 50℃。

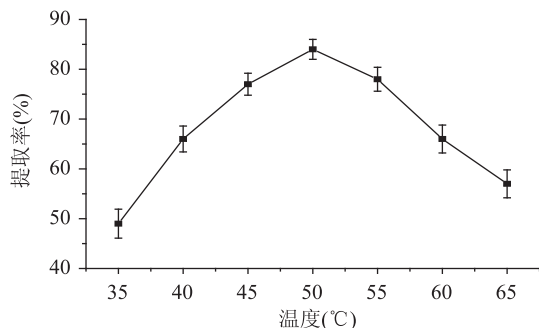


图3 酶解温度对 GLA 提取的影响

Fig.3 Effect of different temperature on GLA extraction

2.2.4 酶解时间对 GLA 提取的影响 由图 4 可知,随着时间增加, GLA 提取率有明显地提高,但是当酶解 4h 过后,随着时间的增加, GLA 的提取率则无明显增加,综合考虑经济等因素,酶解时间为 4h,此时提取率达到 87.3%。

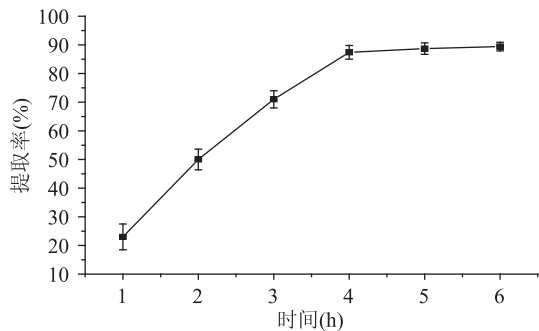


图4 酶解时间对 GLA 提取的影响

Fig.4 Effect of enzymolysis time on GLA extraction

2.2 复合酶破壁正交实验

由单因素实验可知,酶解 pH、酶解温度、酶解时间可能会产生相互影响,有必要对提取工艺进行正交优化。在固定酶添加量的前提下,综合考察酶解

pH、酶解温度、酶解时间等单因素,通过正交实验优化出最佳提取工艺。

由正交实验数据表可知,各因素对结果影响都不显著,但正交实验数据仍有意义。复合酶对雅致小克银汉霉破壁的极差大小顺序为 $C > B > D > A$,即影响破壁效果的 4 个因素的主次顺序为酶添加量、酶解 pH、酶解时间、酶解温度。表中最佳的组合为 $A_1B_2C_2D_2$,而根据 k 值分析,最优组合为 $A_2B_2C_2D_2$ 。将这两个组合实验进行验证实验, GLA 提取率分别为 77.8% 和 87.3%,故组合 $A_2B_2C_2D_2$ 为最佳组合,即复合酶添加量为 0.3%、酶解 pH 为 9、酶解温度为 50℃、酶解时间为 4h 为本文最佳条件。

表2 正交实验数据表

Table 2 The orthogonal experimental result

实验号	A	B	C	D	提取率 (%)
1	1	1	1	1	66.3
2	1	2	2	2	77.8
3	1	3	3	3	74.7
4	2	1	2	3	75.5
5	2	2	3	1	76.4
6	2	3	1	2	74.2
7	3	1	3	2	73.5
8	3	2	1	3	72.6
9	3	3	2	1	73.1
k_1	72.93	71.77	71.03	71.93	
k_2	75.37	75.6	75.47	75.17	
k_3	73.07	74.0	74.87	74.27	
r	2.44	3.83	4.44	3.24	

表3 方差分析

Table 3 The analysis of variance

实验号	A	B	C	D
偏差平方和	11.55	21.84	35.05	16.80
F 比	0.54	1.03	1.65	0.79
F 临界值	4.46	4.46	4.46	4.46

3 结论

酶破壁法具有反应条件温和,能耗低,环保等特点,更适于工业化生产,与传统工艺相比,节约了成本,降低能耗,符合国家倡导的“低碳经济”等主题,具有积极的意义。

本文通过单因素和正交实验,得到最佳的复合酶破壁工艺条件为:复合酶添加量为 0.3%、酶解 pH 为 9、酶解温度为 50℃、酶解时间为 4h,在此条件下 GLA 提取率达到 87.3%。上述实验数据可为 GLA 工业化生产起一定的参考作用。

参考文献

- [1] 徐焰,肖藏.功能性 γ -亚麻酸代谢研究的进展[J].食品科学,2005,26(8):508-512.
- [2] 梁松,张晓昱,王宏勋.刺孢小克银汉霉产 γ -亚麻酸代谢规律的研究[J].生物技术,2004,14(5):48-50.
- [3] Elena Conti, Miroslav Stredansky, Silvia Stredanska, et al. γ -Linolenic acid production by solid - state fermentation of

响应面法优化鱿鱼缠卵腺糖蛋白提取工艺研究

王 倩¹, 刘淑集^{1,2}, 林彩平², 吴成业^{2,*}

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002;

2. 福建省水产研究所, 福建厦门 361013)

摘 要:以鱿鱼缠卵腺为原料,在单因素实验的基础上,通过响应面实验设计优化了鱿鱼缠卵腺糖蛋白提取的工艺条件。结果表明,从鱿鱼缠卵腺中提取糖蛋白的最佳工艺条件为:提取时间 3.5h,提取温度 25℃,NaOH 浓度 0.37mol/L,在该条件下,提取率为 12.79%,获得的糖蛋白中糖含量为 72.5%,蛋白含量 22.7%,硫酸根含量 3.0%,是一种硫酸化的粘蛋白。

关键词:鱿鱼,糖蛋白,提取,响应面,优化

Optimization of the extraction technology of glycoprotein in nidamental gland from squid by response surface methodology

WANG Qian¹, LIU Shu-ji^{1,2}, LIN Cai-ping², WU Cheng-ye^{2,*}

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China)

Abstract: Using the nidamental gland of squid as raw material, extraction of glycoprotein from nidamental gland of squid was optimized by response surface methodology based on single factor experiment. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: extraction time 3.5h, extraction temperature 25℃, NaOH concentration 0.37mol/L. Under these conditions, the yield of glycoprotein could reach 12.79%, which contained 72.5% of sugar, 22.7% of protein, and 3.0% of sulfate radical. The extracted glycoprotein from nidamental gland of squid is a kind of sulfating mucin.

Key words: squid; glycoprotein; extraction; response surface; optimization

中图分类号: TS254.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)03-0261-05

鱿鱼营养丰富,富含多种人体必需氨基酸,是一种高蛋白、低脂肪、低热量,深受人们喜爱的水产品。其含有多种人体必需的氨基酸,且必需氨基酸组成接近全蛋白^[1],具有缓解疲劳、滋补、抗衰老、抗氧化、养颜等作用。近年来,鱿鱼加工产量日益扩大,但在加工过程中一般仅对其胴体进行加工,产生 50% 左右的内脏等副产物,其中生殖腺(缠卵腺、精巢、卵巢等)占了鱿鱼内脏的 20%~30%。鱿鱼加工副产物中

含有大量具有高价值、含量大的功能活性成分,现已逐渐被开发和高值化利用,如林彩平等^[2]以鱿鱼内脏为原料,研究了酶法提取鱿鱼肝油的生产工艺;宋茹等^[3]采用酶解法提取了鱿鱼墨囊中的墨黑色素;章建设等^[4]从鱿鱼内脏中提取了糖蛋白,具有一定的免疫活性。缠卵腺在头足类中普遍存在,位于直肠两侧内脏囊壁上,墨囊的两侧,呈白色卵状,与头足类的生殖活动密切相关^[5]。国内外对于头足类缠卵腺的研究很少。Yu 等^[6]在柔鱼 *Ommastrephid squid* 的缠卵腺中发现一种特殊的海洋粘蛋白,用制成高保湿和皮肤保护的化妆品。糖蛋白是一类由寡糖链与肽链中的一定氨基酸残基以糖苷键共价连接而成的蛋

收稿日期: 2013-07-23 * 通讯联系人

作者简介: 王倩(1987-),女,硕士研究生,研究方向:水产品加工与贮藏工程。

基金项目: 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2011R1003-8)。

Mucorales strains on cereals[J]. Bioresource Technology, 2001, 76: 283-286.

[4] 张永刚, 印遇龙, 黄瑞林, 等. 多不饱和脂肪酸的营养作用及其基因表达调控[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 273-277.

[5] 万红贵, 张建, 袁建锋, 等. 生物制备 γ 亚麻酸研究进展[J]. 中国酿造, 2012, 31(2): 12-16.

[6] 张玲, 沈晓京, 赖炳森, 等. 四种真菌油脂提取方法的比较研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 72-74.

[7] 赵祥颖, 田延军, 国天庆, 等. 酸热法提取酵母油脂条件的研究[J]. 中国酿造, 2010(5): 143-146.

[8] 万红贵, 汪文进, 张波, 等. 三孢布拉霉的复合酶破壁工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 276-278.