

超声波协同酶法提取海带多糖工艺优化及海带饮料配制

任 壮, 赵基思, 郑钧源, 武文洁*

(天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457)

摘要:以山东地区海带为原料,采用超声波协同复合酶法提取海带多糖及海带饮料。确定海带多糖最优提取条件:纤维素酶质量分数为0.3%、果胶酶质量分数为0.7%、木瓜蛋白酶质量分数为1.5%、温度为55℃、pH为5.5、固液比为1:150、反应时间为4 h,迅速将反应体系升温至90℃并保温1 h;灭酶后,55℃水浴下超声反应30 min。该方法提取的海带多糖得率为19.4%,褐藻糖胶得率为6.96%。海带饮料最佳配方:白砂糖质量分数为5%、柠檬酸质量分数为0.12%、蜂蜜质量分数为3%、草莓香精质量分数为1.5%。

关键词:提取;复合酶;超声波;海带多糖;海带饮料

中图分类号:TQ91

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2018)03-0182-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2018.03.040

Process optimum for extracting polysaccharide from laminaria japonica by ultrasonic-enzyme synergistic method and preparation of laminaria japonica beverage

REN Zhuang, ZHAO Ji-si, ZHENG Jun-yuan, WU Wen-jie*

(College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The ultrasonic-enzyme synergistic method is used to extract polysaccharide from laminaria japonica produced in Shandong area and laminaria japonica polysaccharide beverage is developed. The optimal conditions for extraction of polysaccharide from laminaria japonica are determined as follows: the mass contents of cellulase, pectinase and papain are 0.3%, 0.7% and 1.5% respectively, pH = 5.5, the ratio of solid to liquid is 1:150 and extraction is firstly performed at 55℃ for 4 h, and then the reaction system is rapidly heated to 90℃ that is kept for 1 h. After de-enzyme, the system carries out ultrasonic reaction for 30 min under 55℃ of water bath. Given these conditions, the yield rates of polysaccharide and fucoidan can reach 19.4% and 6.96% respectively. The optimum formula of laminaria japonica beverage is that the mass contents of white granulated sugar, citric acid, honey and strawberry flavor are 5%, 0.12%, 3% and 1.5%, respectively.

Key words: extract; compound enzymes; ultrasonic; laminarin polysaccharide; laminaria japonica beverage

海带是一种具有食用和药用双重功能的大型褐藻^[1-2],富含多种功能性成分,如碘、甘露醇、维生素A、维生素B、维生素C、牛磺酸、海带多糖等,其中海带多糖具有多种生理功能,其食用和药用价值很早期为世人所关注^[3]。狭义上海带多糖为岩藻聚糖硫酸酯,广义上海带多糖主要包括褐藻胶、岩藻聚糖硫酸酯、海带淀粉3种,其中褐藻胶和岩藻聚糖硫酸酯主要存在于细胞壁中,海带淀粉存在于细胞质中。

目前,世界范围内海带多糖的提取方法主要有热水浸提法、酸提法、碱提法、超声波法等。热水浸提法简单经济,但多糖提取率低,同时高温会破坏多糖结构^[4];酸提、碱提容易使多糖变性失活^[5-6];超声波作为一种新型提取技术在植物活性物质提取中已经崭露头角^[7],具有提取率高、时间短等优点^[8]。

关于利用生物酶进行提取的研究实验报道很少,生物酶提取多糖是一种温和的方式,不会对多糖结构造成破坏且多糖提取率高^[9]。

笔者采用超声波协同复合酶法提取海带多糖,并对提取工艺进行优化,利用提取得到的海带多糖进行海带多糖饮料配制。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

纤维素酶(最适pH为4.5~5.5,最适温度为55~60℃)、果胶酶(最适pH为4.0~5.5,最适温度为50~60℃)(均为食品级),购于山东省隆科特公司;木瓜蛋白酶(最适pH为5.0~7.0,最适温度为50~55℃);草莓香精(食品级);浓磷酸、浓硫酸等

收稿日期:2017-08-21

作者简介:任壮(1990-),男,硕士研究生,研究方向为天然物提取、改性及应用,1124198890@qq.com;武文洁(1963-),女,硕士,教授,研究方向为天然物提取、改性及应用,通讯联系人,wwjie@tust.edu.cn。

试剂均为分析纯。

电子恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司生产;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂生产;LGJ-12 型冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 多糖质量浓度的测定

多糖含量测定采用硫酸-苯酚比色法^[10]。准确称取 105℃ 下干燥至恒重的分析纯葡萄糖标准物,490 nm 波长处测定葡萄糖质量浓度与吸光度的对应关系。标准曲线方程: $A = 9.888C + 0.0868$, $R^2 = 0.999$ (A 为吸光度值; C 为葡萄糖质量浓度,mg/mL)。

1.2.2 硫酸根质量浓度的测定

硫酸根质量浓度的测定采用硫酸钡比浊法^[11]。用 105℃ 下干燥至恒重的分析纯 K_2SO_4 为标准物,在 360 nm 波长处测定硫酸钾质量浓度与吸光度的对应关系。标准曲线方程: $A = 0.000661C - 0.01636$, $R^2 = 0.999$ (A 为吸光度值; C 为硫酸钾质量浓度,μg/mL)。

1.3 实验工艺流程

新鲜海带→浸泡除杂→烘干粉碎→酶解→灭酶水提→超声波提取→抽滤→真空悬蒸→冷冻干燥→粗多糖制品→溶解→海带多糖饮料。

1.4 计算公式

海带多糖得率 = [海带多糖质量 / 海带干粉质量] × 100%

褐藻糖胶得率 = [褐藻糖胶质量 / 海带干粉质量] × 100%

1.5 海带多糖饮料评价方法

感官评定:由 15 人组成的评定小组按标准对成品进行感官评定^[12],结果如表 1 所示。

表 1 成品质量评价标准

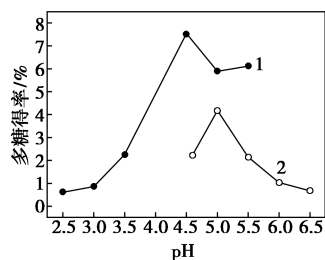
项目	标准	评分
色泽	色泽均匀,好看	15
腥味	淡腥味或无腥味	25
口感风味	酸甜适终,口感柔和	40
组织形态	均一流动性好,无沉淀	20

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 pH 对海带多糖得率影响

在酶质量分数为 0.7%, 固液比为 1:100 (g/mL), 55℃ 酶解 3 h 的反应条件下,分别考察纤维素酶、果胶酶在不同 pH 下的海带多糖得率,结果如图 1 所示。



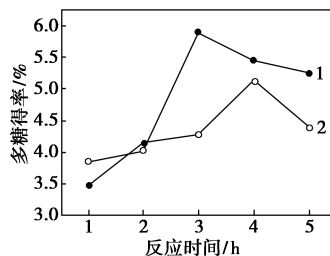
1—果胶酶;2—纤维素酶

图 1 pH 对海带多糖得率的影响

由图 1 可以看出,纤维素酶和果胶酶 pH 分别为 5.0、4.5 时,多糖得率最高。pH 增大会抑制酶的活性,过高会对酶结构造成破坏,导致多糖得率下降。因此,纤维素酶和果胶酶反应 pH 分别为 5.0、4.5 比较合适。

2.1.2 酶解时间对海带多糖得率影响

在酶质量分数为 0.7%, 固液比为 1:100 (g/mL), 纤维素酶 pH 为 5.0, 果胶酶为 pH 4.5, 55℃ 酶解 3 h 的反应条件下,考察果胶酶、纤维素酶在不同反应时间下海带多糖得率,结果如图 2 所示。



1—果胶酶;2—纤维素酶

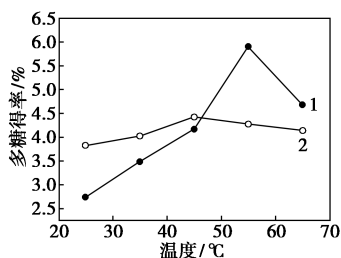
图 2 酶解时间对海带多糖得率的影响

由图 2 可以看出,随着反应时间增加,海带多糖得率不断升高,纤维素酶至 4 h 时,多糖得率达到峰值;果胶酶反应至 3 h 时,多糖得率达到峰值,再延长酶解时间多糖得率基本不变,为节约能源,确定纤维素酶和果胶酶最佳反应时间分别为 4、3 h。

2.1.3 温度对海带多糖得率影响

在酶质量分数为 0.7%, 固液比为 1:100 (g/mL), 纤维素酶酶解 4 h, pH 为 5, 果胶酶酶解时间为 3 h、pH 4.5 的反应条件下,分别考察纤维素酶、果胶酶在不同温度下海带多糖得率,结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出,反应温度升高,多糖得率增加,纤维素酶和果胶酶反应温度分别为 45、55℃ 时,多糖得率最大。温度是影响酶活性的重要因素,随着温度升高反应速率加快,但超过一定温度,酶蛋白质变性,活性降低,多糖得率降低。因此纤维素酶和果胶酶最佳反应温度为 45、55℃。

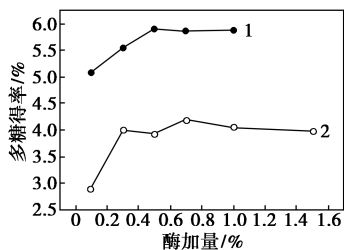


1—果胶酶;2—纤维素酶

图 3 温度对海带多糖得率的影响

2.1.4 酶质量分数对海带多糖得率影响

在纤维素酶解时间为 4 h, pH 为 5, 反应温度为 45°C, 固液比为 1:100 (g/mL); 果胶酶解时间为 3 h, pH 为 4.5, 反应温度为 55°C, 固液比为 1:100 (g/mL) 的反应条件下, 分别考察了纤维素酶、果胶酶在不同酶质量分数下反应的多糖得率如图 4 所示。



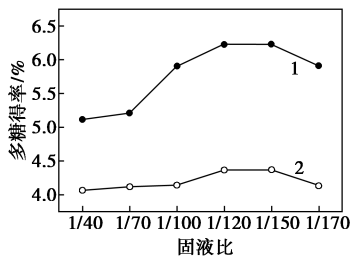
1—果胶酶;2—纤维素酶

图 4 酶加量对海带多糖得率的影响

由图 4 可以看出, 随着酶质量分数的增多, 多糖得率明显增加, 纤维素酶和果胶酶质量分数分别为 0.5%、0.7% 时多糖得率最高, 随着酶质量分数的继续增加, 反应底物多糖得率基本平稳, 又因酶的价格比较高。综合考虑, 确定纤维素酶和果胶酶质量分数分别为 0.5%、0.7%。

2.1.5 固液比对海带多糖得率影响

在纤维素酶解 4 h, pH 为 5, 反应温度为 45°C, 加酶质量分数为 0.5%; 果胶酶酶解 3 h, pH 为 4.5, 反应温度为 55°C, 加酶质量分数为 0.7% 的反应条件下, 分别考察了纤维素酶、果胶酶在不同固液比下反应的多糖得率, 如图 5 所示。



1—果胶酶;2—纤维素酶

图 5 固液比对海带多糖得率的影响

由图 5 可以看出, 随着固液比的增大, 纤维素酶和果胶酶多糖得率增加。由于增大固液的接触面积, 提高了水的扩散和传质速率^[13]。固液比增大, 溶液稀释有利于细胞内多糖向外扩散, 多糖提取率提高。因此, 确定纤维素酶和果胶酶固液比为 1:150。

2.2 正交实验

在单因素的基础上, 分别选取纤维素酶和果胶酶的 pH、温度、酶加量、反应时间、固液比 5 个因素, 设计五因素三水平的正交实验 L18(3⁵), 以确定最优提取条件。

2.2.1 纤维素酶正交实验

采用直观分析方法对正交实验数据处理, 以极差大小确定因素主次顺序, 结果如表 2 所示。由表 2 可以看出, 以海带多糖得率为指标的因素影响程度依次为 A、E、B、C、D, 最佳组合为 A3E3B2C3D1, 即最佳组合为: 纤维素酶质量分数为 0.3%, 温度为 55°C, pH 为 5.5, 时间为 4 h, 固液比为 1:150, 此时, 海带多糖得率为 12.58%, 褐藻糖胶得率为 5.58%。

表 2 纤维素酶正交实验设计和结果

水平	因素					海带多糖得率/%
	pH (A)	温度/°C (B)	时间/h (C)	酶质量分数/% (D)	固液比 (E)	
1	1(4.5)	1(45)	1(2)	1(0.3)	1(1:100)	1.64
2	1	2(55)	2(3)	2(0.7)	2(1:120)	4.21
3	1	3(65)	3(4)	3(1)	3(1:150)	9.57
4	2(5.0)	1	1	2	2	6.24
5	2	2	2	3	3	4.34
6	2	3	3	1	1	4.46
7	3(5.5)	1	2	1	3	12.68
8	3	2	3	2	1	12.54
9	3	3	1	3	2	10.79
10	1	1	3	3	2	4.59
11	1	2	1	1	3	9.57
12	1	3	2	2	1	5.12
13	2	1	2	3	1	9.06
14	2	2	3	1	2	11.42
15	2	3	1	2	3	11.54
16	3	1	3	2	3	11.32
17	3	2	1	3	1	9.18
18	3	3	2	1	2	12.58
K1	277.62	364.36	391.72	418.80	336.03	
K2	376.51	421.07	383.94	407.81	398.57	
K3	522.73	410.09	431.20	380.25	472.26	
R	275.11	56.71	47.27	38.55	136.23	

2.2.2 果胶酶正交试验结果

采用直观分析方法对正交实验数据处理进行处理, 以极差大小确定因素主次顺序, 结果如表 3 所

示。由表3可以看出,以海带多糖得率为指标的因素影响程度依次为A、E、B、C、D,最佳组合为A3E3B2C3D1,对最佳组合进行重新验证,即果胶酶质量分数为0.7%,温度为55℃,pH为5.5,时间为4h,固液比为1:150;海带多糖得率为11.54%,褐藻糖胶得率为5.67%。

表3 果胶酶正交实验设计与结果

水平	因素					海带多糖得率/%
	pH (A)	温度/℃ (B)	时间/h (C)	酶质量分数/% (D)	固液比 (E)	
1	1(4.5)	1(45)	1(2)	1(0.5)	1(1:100)	2.32
2	1	2(55)	2(3)	2(0.7)	2(1:120)	4.56
3	1	3(65)	3(4)	3(1)	3(1:150)	9.25
4	2(5.0)	1	1	2	2	9.05
5	2	2	2	3	3	5.70
6	2	3	3	1	1	9.86
7	3(5.5)	1	2	1	3	10.93
8	3	2	3	2	1	9.38
9	3	3	1	3	2	11.54
10	1	1	3	3	2	4.05
11	1	2	1	1	3	8.67
12	1	3	2	2	1	3.78
13	2	1	2	3	1	8.66
14	2	2	3	1	2	9.05
15	2	3	1	2	3	10.15
16	3	1	3	2	3	9.97
17	3	2	1	3	1	3.96
18	3	3	2	1	2	7.70
K1	260.95	359.79	365.49	388.22	303.61	
K2	419.72	418.16	330.59	375.14	367.61	
K3	427.86	330.58	412.45	345.18	437.32	
R	166.91	87.58	81.86	43.04	133.71	

2.3 果胶酶和纤维素酶复合

在纤维素酶质量分数为0.3%,果胶酶质量分数为0.7%,温度为55℃,pH为5.5,时间为4h,固液比为1:150最优条件下复合纤维素酶和果胶酶,结果海带多糖得率为15.8%,褐藻糖胶得率为6.27%。

2.4 复合酶对海带多糖得率的影响

在2.3反应条件基础上,考察木瓜蛋白酶质量分数对多糖得率影响,结果如图6所示。

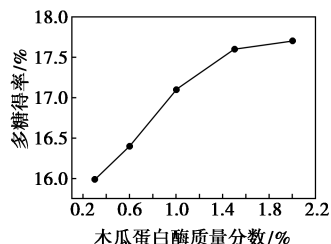


图6 木瓜蛋白酶质量分数对海带多糖得率的影响

由图6可以看出,随着木瓜蛋白酶质量分数的增多,多糖得率明显增加。海带细胞壁主要由多糖和蛋白质组成。木瓜蛋白酶加速了细胞组织的崩解,提高了纤维素酶和果胶酶的作用效果。当木瓜蛋白酶质量分数为1.5%,多糖得率最高,此时木瓜蛋白酶对多糖的流出率达到最大。在此条件下海带多糖得率为17.6%,褐藻糖胶得率为6.73%。

2.5 灭酶温度

在2.4实验反应结束后灭酶1h,考察灭酶温度对多糖得率的影响,结果如图7所示。

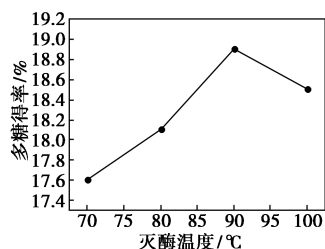


图7 灭酶温度对多糖得率影响

热水浸提工艺简单,水提的同时进行灭酶处理,既可灭酶同时提高多糖得率。由图7可以看出,随着灭酶温度的升高,多糖得率明显增加,灭酶温度为90℃时,多糖得率最高;继续提高温度,多糖得率反而下降。这是由于高温使多糖失活,破坏多糖结构,多糖糖苷键断裂形成糖单体,糖单体没有活性。因此,选择灭酶温度为90℃,此时,海带多糖得率为18.9%,褐藻糖胶得率为6.95%。

2.6 超声时间对海带多糖的影响

在2.5实验反应结束后,考察不同超声时间对多糖得率影响,结果如图8所示。

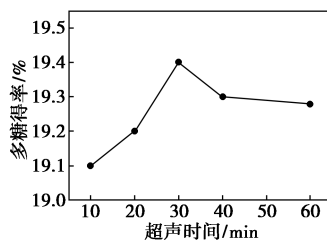


图8 超声时间对海带多糖得率的影响

由图8可以看出,随着超声时间增加,多糖得率先增加后降低,超声处理为30min时,多糖得率达到峰值。这是由于超声处理后细胞壁被破坏,细胞内多糖向外扩散,30min时达到峰值,但随着时间延长,空化效应作用力减弱,多糖被海带颗粒的表面吸附增强使多糖得率下降。因此,超声时间为30min时,多糖得率为19.4%,褐藻糖胶的得率为6.96%。该方法对提高多糖提取率影响较低,多糖提取率仅

增加了 0.5%。

2.7 海带多糖饮料配制

将最优条件下提取的海带多糖溶解为多糖质量浓度为 1 g/mL。在参考文献[14-17]以及在本课题组探究的基础上,选择影响海带多糖饮料效果的白砂糖、蜂蜜、香精、柠檬这 4 个因素(添加量为海带多糖溶液质量分数),每个因素设三个水平,正交实验设计和结果如表 4 所示。

表 4 海带饮料正交试验设计和结果

水平	因素				感官评价
	w(白砂糖)/ %(A)	w(蜂蜜)/ %(B)	w(草莓香精)/ %(C)	w(柠檬酸)/ %(D)	
1	1(5)	1(1)	1(0.5)	1(0.06)	78
2	1	2(3)	2(1)	2(0.12)	88
3	1	3(5)	3(1.5)	3(0.2)	84
4	2(7)	1	2	3	75
5	2	2	3	1	83
6	2	3	1	2	83
7	3(9)	1	3	2	80
8	3	2	1	3	75
9	3	3	2	1	77
K1	250	233	236	238	
K2	241	246	240	248	
K3	232	244	247	234	
R	18	13	7	14	

从表 4 可以看出,白砂糖质量分数对海带多糖饮料品质影响最大,然后是柠檬酸、蜂蜜,最后为草莓香精,即 $A > D > B > C$ 。正交试验结果表明,海带多糖饮料的最佳工艺组合为 $A1D2B2C3$,即白砂糖质量分数为 5%,柠檬酸质量分数为 0.12%,蜂蜜质量分数为 3%,草莓香精质量分数为 1.5%。对最佳组合进行重新验证,产品色、香、味俱佳,经感官评定小组评定感官得分平均为 89。

2.8 海带多糖饮料技术指标

2.8.1 感官指标

色泽:浅黄色,均匀;风味:酸甜适中、口感柔和,有海带特有的香味;组织状态:均已流动性好,无沉淀。

2.8.2 理化指标

可溶性固形物为 6.0%,pH 为 4.5~5.5。

2.8.3 微生物指标

细菌总数 $\leq 15/\text{mL}$;大肠菌群 $\leq 7/\text{mL}$;无致病菌。

3 结论

本实验中提取获得的海带多糖得率高,实验过

程中无有机溶剂参与,工艺简单,降低多糖的损失,同时对提取的海带多糖进行海带饮料配方研制,获得具有独特口味的海带饮料,具有很大的市场开发价值。

用超声波法协同复合酶提取,能提高海带多糖和褐藻糖胶得率。该工艺参数如下:纤维素酶质量分数为 0.3%,果胶酶质量分数为 0.7%,木瓜蛋白酶质量分数为 1.5%,温度为 55℃,pH 为 5.5,时间为 4 h,固液比为 1:150 g/mL;热水浸提温度为 90℃,时间为 1 h;55℃温水浴下超声波 30 min,此时,海带多糖得率为 19.4%,褐藻糖胶得率为 6.96%。海带多糖饮料最佳工艺组合为白砂糖质量分数为 5%,柠檬酸质量分数为 0.12%,蜂蜜质量分数为 3%,草莓香精质量分数为 1.5%。

参考文献

- [1] 钱风云,傅德贤,欧阳藩.海带多糖生物功能研究进展[J].中国海洋药物,2003,91(1):55-59.
- [2] 李德远,徐现波,熊亮,等.海带的保健功效及海带生理活性多糖研究现状[J].食品科学,2002,23(7):151-154.
- [3] 李德远.海带的保健功效及海带生理活性多糖研究现状[J].食品科学,2002(7):151-154.
- [4] 高梦祥,叶森.海带多糖的提取工艺研究[J].长江大学学报:自然科学版,2005,2(5):73-75.
- [5] 王维香,邢雪琳.复合酶解-热水浸提法提取裙带菜硫酸多糖的研究[J].辽宁师范大学学报,1998,21(4):315-318.
- [6] 周裔彬,汪东风,杜先锋,等.酸化法提取海带多糖及其纯化的研究[J].南京农业大学学报,2006,29(3):103-107.
- [7] Zhou Yibin, Wang Dongfeng, Du Xianfeng, et al. Studies on extraction and purification of lamiarin by acid solubilization[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2006, 29(3): 103-107.
- [8] Kamaljit Vilkhui, Raymond Mawson, Lloyd Simons, et al. Applications and opportunities or ultrasound assisted extraction in the food industry-A review[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008, 9(2): 161-169.
- [9] 周泉城,申德超,区颖刚.超声波辅助提取经膨化大豆粕中低聚糖工艺[J].农业工程学报,2008,24(5):245-249.
- [10] 阚国仕,崔亮亮,陈红漫.纤维素酶超声波法萃取胡萝卜多糖工艺的研究[J].食品工业科技,2009,3(7):252-256.
- [11] 余冰宾.生物化学实验指导[M].北京:清华大学出版社,2010:136-138.
- [12] 丛建波,王长振,李妍,等.褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定——硫酸钡比浊法研究[J].解放军药学学报,2003,19(3):181-183.
- [13] 徐虹,王馨仪,曹杨,等.莲子红皮蛋白微波辅助盐提工艺优化[J].食品科学,2011,32(4):87-91.
- [14] 刘殿锋,任建辉,吴春昊,等.调配型西瓜乳饮料的研制[J].食品研究与开发,2009,30(9):105-107.
- [15] 王秀娟,梁久伟,詹冬玲.海带多糖饮料的研制[J].食品研究与开发,2012,33(7):93-95.
- [16] 王颖,李晓,孙元芹,等.海带口服液加工工艺研究[J].食品开发,2009,34(1):77-80.
- [17] 郭红珍,申磊,李新.海带绿豆饮料的工艺研究[J].河南工业大学学报,2014,8(1):100-103. ■