

# 碱液和木瓜蛋白酶预处理对葛仙米多糖提取效果的影响

莫开菊<sup>1,2,3</sup>, 周 志<sup>2,3</sup>, 汪兴平<sup>2,3</sup>, 谢笔均<sup>1,\*</sup>

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000  
3. 湖北省生物资源保护与利用重点实验室, 湖北 恩施 445000)

**摘 要:** 多糖的保健功能日益得到学术界的重视与证实。葛仙米中含有丰富的多糖。以碱液和木瓜蛋白酶对葛仙米进行预处理, 正交试验确定最佳预处理工艺。多糖提取条件为料水比 1:300, 于 90℃ 水浴提取 2 次, 2h/次。结果说明, 以木瓜蛋白酶预处理葛仙米, 按 100mg 葛仙米加入 10ml 水充分吸胀后, 加入含 1.5mg 木瓜蛋白酶的缓冲液, 在 50℃ 的水浴条件下, 经过 10h 预处理后, 葛仙米多糖得率最高, 为 29.53%。以 NaOH 溶液预处理葛仙米, 最佳的条件是 0.4mol/L 的浓度, 于 40℃ 处理 2h, 多糖得率可高达 35.15%。将碱与酶结合使用, 则多糖的得率可以高达 47.56%, 比对照高出 25.12%。

**关键词:** 葛仙米; 木瓜蛋白酶; 氢氧化钠; 多糖; 提取

## Effects of Alkali and Papain Pretreatment on *Nostoc sphaeroids kutz* Polysaccharides Extraction

MO Kai-ju<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Zhi<sup>2,3</sup>, WANG Xing-ping<sup>2,3</sup>, XIE Bi-jun<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;  
2. School of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China;  
3. Hubei Key Laboratory of Biological Resource Conservation and Utilization, Enshi 445000, China)

**Abstract:** The health protection function of polysaccharides has been paid attention and affirmed by the sphere of leaning. Polysaccharides is rich in *Nostoc sphaeroids kutz*. *Nostoc sphaeroids kutz* was pretreated with alkali and papain, and the best pretreatment method was defined with the orthogonal test. The condition of the extracting polysaccharides are that the material hydraulic proportion 1: 300, extracted 2 times at 90℃ water baths for 2 h. The results showed: the optimal enzyme pretreatment conditions are 10 mg papain added to the 100 mg *Nostoc sphaeroids kutz* material, pretreated for 10 h at 50 ℃. The polysaccharides is 29.53%; The optimal alkali treatment conditions are the NaOH content 0.4 mol/L, pretreated for 2 h at 40 ℃. The polysaccharides yield is 35.15%. Pretreating *Nostoc sphaeroids kutz* with alkali and papain, the highest polysaccharides yield is 47.56%, higher 25.12% than the contrast.

**Key words** *Nostoc sphaeroids kutz* papain alkali polysaccharides extraction

中图分类号: Q946.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)11-0194-05

葛仙米古称天仙菜, 俗称水木耳, 又名固氮蓝藻, 其外形为墨绿色小颗粒<sup>[1]</sup>。含有丰富的蛋白质、蓝藻淀粉及人体 8 种必需氨基酸中的 7 种。其 VC 含量 550mg/100g、VB<sub>1</sub> 1.2mg/100g、VB<sub>2</sub> 11.8mg/100g、VE 7.0mg/100g、β-胡萝卜素 114.0mg/100g<sup>[2]</sup>, 同时还含有丰富的磷、钙、铁等微量元素。但是其脂肪含量低, 可用于防治心血管疾病。因此, 它是天然高级

营养佳品, 并有较好的医用价值。据《药性考》“(葛仙米) 清神解热, 痰火能疗, 且久服延年”<sup>[1]</sup>。但是对葛仙米医药保健功能的阐述均基于对其营养成分的分析和古代中医著作的记述, 对葛仙米中是否含有其它功能成分, 目前还知之不多。仅有资料报道葛仙米藻红蛋白有抗自由基活性<sup>[3]</sup>。葛仙米中含有丰富的多糖, 而多糖的保健功能日益得到学术界的重视与

收稿日期: 2007-04-01

\*通讯作者

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2003ABA068); 湖北省优秀中青年科技创新团队计划(2004Q002)

作者简介: 莫开菊(1965-), 女, 教授, 博士研究生, 研究方向为食品化学。

证实<sup>[4]</sup>。本实验进一步研究葛仙米多糖的提取工艺,以便为葛仙米多糖的结构与功能的研究以及葛仙米的深加工打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

葛仙米(过60目干粉) 湖北鹤峰。

木瓜蛋白酶 武汉亚法生物技术拓展公司; 乙二胺四乙酸(EDTA); 半胱氨酸(L-Cysteine);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 95% 乙醇、苯酚、盐酸、浓硫酸、氢氧化钠、无水葡萄糖、甲苯均为 A R 级。

### 1.2 仪器

UV755B 紫外-可见分光光度计 上海分析仪器总厂; 101-2AB 型电热鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司; 800B 离心机 上海安亭科学仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 试剂的配制

木瓜蛋白酶的配制<sup>[5]</sup>: 按 0.1mol/ml 磷酸缓冲液(pH7.4)中含 5mg 木瓜蛋白酶、0.9mg EDTA、0.4mg Cys 配制。

#### 1.3.2 木瓜蛋白酶处理的单因素试验

##### 1.3.2.1 不同酶浓度的处理方法

称取 4 份质量均为 100mg 的葛仙米干粉放入具塞试管中, 再加入 10ml 缓冲液, 使葛仙米充分吸水膨胀, 然后分别按 100mg 葛仙米加入木瓜蛋白酶 0、0.5、1.0、1.5mg, 体系中 pH 值为 7.4, 在温度为 40℃ 的条件下处理 10h。

##### 1.3.2.2 酶作用温度的研究

称取 4 份质量均为 50mg 的葛仙米干粉放入具塞试管中, 再加入 5ml 缓冲液, 使葛仙米充分吸水膨胀, 按 100mg 葛仙米加入木瓜蛋白酶 1.0mg, 体系中 pH 值为 7.4, 分别在 40、50、60、65℃ 处理 10h。

##### 1.3.2.3 酶作用时间的研究

称取 4 份质量均为 50mg 的葛仙米干粉放入具塞试管中, 再加入 5ml 缓冲液, 使葛仙米充分吸水膨胀, 按 100mg 葛仙米加入木瓜蛋白酶 1.0mg, 体系中 pH 值为 7.4, 在 40℃ 的条件下分别作用 5、10、15、20、25h 进行酶水解。

##### 1.3.2.4 酶提取葛仙米多糖工艺参数的优化

根据以上单因素试验结果, 选择酶浓度、处理温度和处理时间为考查因素, 以葛仙米多糖得率为考查指标。进行正交试验设计, 确定最佳提取工艺参数。其因素水平见表 1。

#### 1.3.3 碱提取葛仙米多糖工艺参数确定方法

表 1 酶处理正交试验因素水平  
Table 1 Factors and levels of test by enzymes

因素	水平		
	1	2	3
A 酶浓度(mg 木瓜蛋白酶/100mg 葛仙米)	0.5	1.0	1.5
B 处理温度(℃)	30	40	50
C 处理时间(h)	5	10	15

选择碱浓度、处理温度和处理时间为考查因素, 以葛仙米多糖得率为考查指标。进行正交试验设计, 确定最佳提取工艺参数。

#### 1.3.4 碱酶复合预处理提取葛仙米多糖

表 2 碱处理正交试验因素水平

Table 2 Factors and levels of test by alkali

因素	水平		
	1	2	3
A 碱浓度(mol/L)	0.3	0.4	0.5
B 处理温度(℃)	30	40	50
C 处理时间(h)	1	2	3

以 0.1~0.5mol/L 的碱液于 40℃ 处理 2h 后, 用盐酸中和至中性, 按 1.0mg/100mg 葛仙米的量加入木瓜蛋白酶液, 于 40℃ 处理 10h。然后提取葛仙米多糖。

#### 1.3.5 葛仙米多糖提取方法

酶处理结束后, 按 1:300 的质量体积比补加蒸馏水, 于 90℃ 水浴提取 2h, 重复两次。将提取液合并后加热浓缩至一定量体积, 量取部分浓缩液加入 95% 乙醇沉淀, 使乙醇最终浓度为 75%。静置 2h 后, 采用 4000r/min 离心 30min, 弃去上层清液, 将沉淀物质干燥。最后将其溶解并定容至 100ml 容量瓶中, 制成葛仙米多糖样品液, 测定并计算葛仙米多糖的得率。

#### 1.3.6 葛仙米多糖测定

采用苯酚-浓硫酸法<sup>[5]</sup>。

##### 1.3.6.1 标准葡萄糖溶液的配制

精密称取无水葡萄糖 25.2mg, 加适量水溶解。转移至 250ml 容量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 配成浓度为 100.8μg/ml 的标准葡萄糖溶液备用。

##### 1.3.6.2 标准葡萄糖曲线的制作

精确量取葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0ml 置干燥试管中, 分别加水使成 2.0ml 再分别加入 5% 苯酚溶液 1.6ml。然后加浓硫酸 7.0ml 并充分摇匀, 蒸馏水定容至 12ml, 室温放置 25min。在 490nm 处测其最大吸光度, 绘制标准曲线(见图 1), 用最小二乘法计算回归方程:

$$C=195.159A+1.263, r=0.9975.$$

##### 1.3.6.3 葛仙米多糖测定

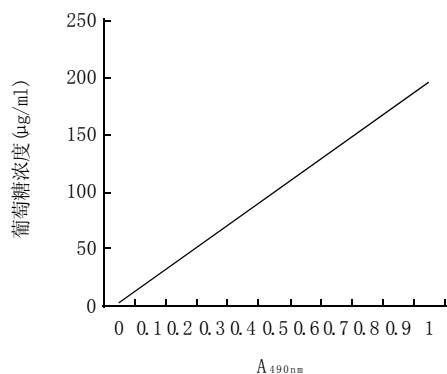


图1 葡萄糖标准曲线  
Fig.1 Standard curve graphic of glucose

精确量取 100ml 容量瓶中 1~2ml 葛仙米多糖样品液后加 5% 苯酚 1.6ml, 然后加浓硫酸 7.0ml, 充分摇匀水解后在室温冷却 25min 并定容到 12.0ml 在 490nm 处测吸光度, 根据回归方程计算体系中多糖浓度, 并计算得率。葛仙米多糖得率的计算公式:

$$d = 0.9 \times \frac{Cf}{1000M} \times 100$$

式中,  $d$  为葛仙米多糖得率, 单位: %;  $C$  为葛仙米多糖浓度, 单位:  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $f$  为稀释倍数。根据实验过程来确定;  $M$  为称取葛仙米样品的干物质质量, 单位:  $\text{mg}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素对木瓜蛋白酶提取葛仙米多糖的影响

#### 2.1.1 酶浓度对提取葛仙米多糖的影响

葛仙米在酶的作用下, 多糖得率明显比对照高。以对照为 100% 时, 得率高出 6.77%~23.65%。这说明使用酶是有效的。在酶的作用下, 随着浓度的增加, 提取率也提高。从图 2 可以看出当酶浓度为 1.0、1.5mg

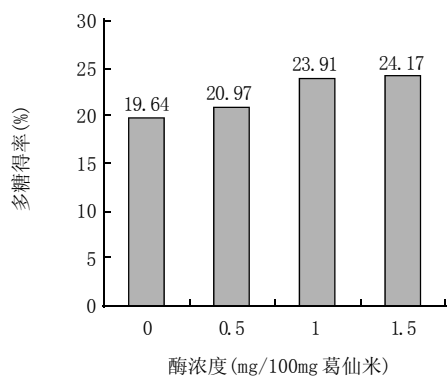


图2 不同酶浓度下多糖得率  
Fig.2 Effects of polysaccharide obtaining rate by different density of enzyme

木瓜蛋白酶 / 100mg 葛仙米样品时多糖得率增加不明显。因此可选择 1.0mg 木瓜蛋白酶 / 100mg 葛仙米为最佳浓度。

#### 2.1.2 酶处理温度对提取葛仙米多糖的影响

温度是影响酶活力的重要因子。提取温度在 40、50℃ 时, 多糖的得率相近且较高, 分别为 28.88%、28.35%。而温度达到 60℃ 以上时, 多糖得率明显下降。所以, 在使用酶制剂时, 要严格掌握好温度, 在酶的最适温度下使用, 以提高对葛仙米多糖的提取率。

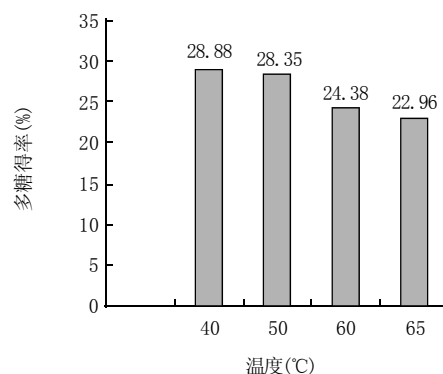


图3 不同温度下多糖得率  
Fig.3 Polysaccharide yield at different temperature

#### 2.1.3 酶处理时间对提取葛仙米多糖的影响

从图 4 可以看出: 在 5~25h 的作用时间里, 多糖的得率基本上稳定, 且随时间延长反而有所下降。这可能是在 40℃ 的温度下较长的时间, 微生物的活动使部分多糖降解。因此, 酶作用时间不宜过长。

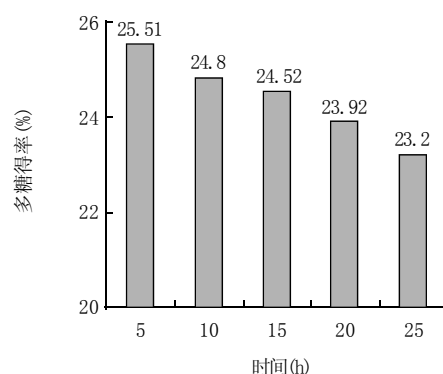


图4 不同温度下多糖得率  
Fig.4 Polysaccharide yield at different time

### 2.2 木瓜蛋白酶预处理提取葛仙米多糖工艺参数优化

从图 5 可以看出: 多糖得率随木瓜蛋白酶使用量的增加而增加, 处理温度以 50℃ 最好, 处理时间最好是 10h。因此条件的最佳组合是  $A_3B_3C_2$ , 即 1.5mg 木瓜蛋白酶 / 100mg 葛仙米、处理温度 50℃、时间 10h, 正好是处理 9, 其多糖得率为 29.53%。极差分析表明影响预

表3 酶处理正交试验结果  $L_9(3^4)$   
Table 3 Results of orthogonal test  $L_9(3^4)$

试验号	A 酶浓度 (mg/100mg 葛仙米)	B 处理温度 (℃)	C 处理时间 (h)	D 空列	得率 (%)
1	1	1	1	1	23.38
2	1	2	2	2	25.62
3	1	3	3	3	26.50
4	2	1	2	3	27.99
5	2	2	3	1	25.84
6	2	3	1	2	24.92
7	3	1	3	2	28.92
8	3	2	1	3	23.82
9	3	3	2	1	29.53
$K_1$	75.50	80.29	72.12	78.75	
$K_2$	78.75	75.28	83.14	79.46	
$K_3$	82.27	80.95	81.26	78.31	
$K_1/3$	25.17	26.77	24.04	26.25	
$K_2/3$	26.25	25.09	27.71	26.49	
$K_3/3$	27.42	26.98	27.08	26.10	
R	2.25	1.89	3.67	0.39	

注:  $f=125.0$ 。

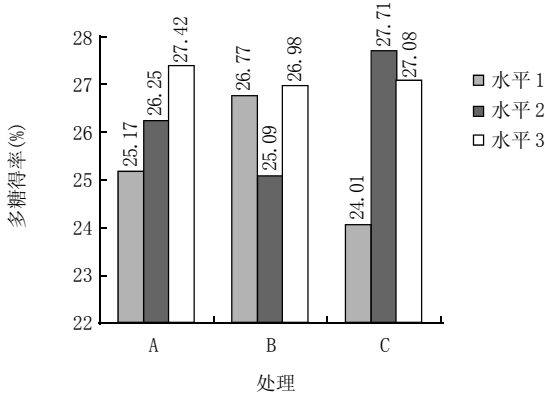


图5 正交处理的直观效果  
Fig.5 Histogram of audio-visual effect

处理效果的主次因素为: 时间>酶浓度>温度, 即  $C > A > B$ 。

2.3 碱液预处理提取葛仙米多糖工艺参数优化

按正交组合设计了 9 组碱预处理葛仙米的条件, 经提取多糖并测定得率, 结果见表 4。根据各因素的平均得率作柱形图 6。

由图 6 可知: 碱预处理后, 多糖得率以碱浓度为  $0.4\text{mol/L}$ , 处理温度以  $40^\circ\text{C}$ , 处理时间为 2h 最好, 最佳条件的组合是  $A_2B_2C_2$ , 即碱浓度为  $0.4\text{mol/L}$  处理温度  $40^\circ\text{C}$ , 时间 2h, 未包含在正交组合中。在正交组合中多糖得率最高的为处理 4 ( $A_2B_1C_2$ ) 和处理 5 ( $A_2B_2C_3$ ), 多糖得率均为 35.15%; 多糖得率较低的是处理 6 ( $A_2B_3C_1$ ) 和处理 7 ( $A_3B_1C_3$ ), 分别为 16.18%、18.49%。多糖得率相差很大, 结果说明, 碱预处理时, 各因素的合理组合很重要。否则会导致多糖得率下降。这是因为碱处理

表4 碱预处理正交试验结果  $L_9(3^4)$   
Table 4 Results of orthogonal test by alkali  $L_9(3^4)$

试验号	A(浓度)	B(温度)	C(时间)	多糖浓度(μg/ml)	得率(%)
1	1	1	1	40.10	21.65
2	1	2	2	57.47	31.03
3	1	3	3	54.74	29.56
4	2	1	2	65.08	35.15
5	2	2	3	65.08	35.15
6	2	3	1	29.25	16.18
7	3	1	3	34.25	18.49
8	3	2	1	45.95	24.82
9	3	3	2	54.54	29.45
$K_1$	82.24	75.29	62.65	$T=241.48\%$ (以得率为换算指标)	
$K_2$	86.48	91.00	95.63		
$K_3$	72.76	75.19	83.20		
$K_1/3$	27.41	25.10	20.88	$t=26.83\%$ (t为平均得率)	
$K_2/3$	28.83	30.33	31.88		
$K_3/3$	24.25	25.06	27.73		
R	4.58	5.27	11.00		

注:  $f=300.0$ 。

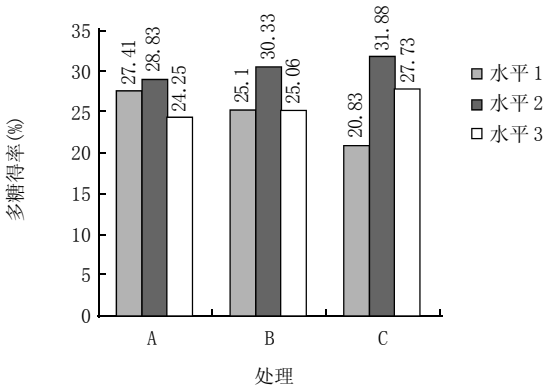


图6 碱预处理因素下的多糖得率  
Fig.6 Polysaccharide yield by alkali

条件较剧烈, 可能导致多糖的分解。

2.4 碱液-酶处理提取葛仙米多糖影响

表5 浓度对葛仙米多糖提取效果的影响  
Table 5 Effects of concentration on yield of *Nostoc sphaeroides* kutzing polysacchaccharide

条件	处理					
	1	2	3	4	5	6
加碱浓度(mol/ml)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
用酶量(mg 木瓜蛋白酶/ 100mg 葛仙米)	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
$A_{490}$	0.249	0.411	0.400	0.410	0.535	0.434
多糖浓度(μg/ml)	49.86	81.47	79.33	81.28	105.67	85.96
多糖得率(%)	22.44	36.67	35.69	36.58	47.56	33.50

注:  $f=250.0$ 。

由表 5 和图 7 可知: 将葛仙米样品经碱液-酶水解处理后, 效果非常明显, 2、3、4、5 号多糖得率均大于仅用酶或碱处理。而且最大得率比对照的高出

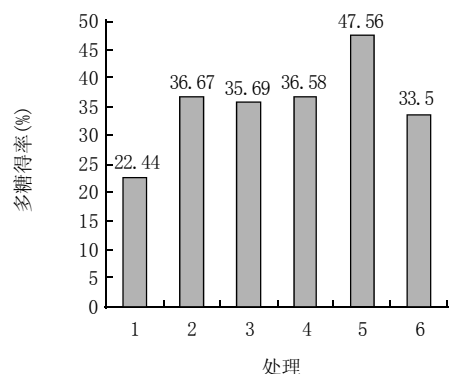


图7 不同碱浓度下多糖得率

Fig.7 Polysaccharide yield by different concentrations of alkali

112%。在碱浓度为0.1~0.3mol/ml之间没有太大的变化,当提高到0.4mol/ml时有了一个最高值。在0.5mol/ml又开始下降。这是因为多糖结构容易在高浓度碱下受到破坏<sup>[7-8]</sup>。碱酶复合处理结构同样验证了碱的最适处理条件。

### 3 结 论

3.1 采用木瓜蛋白酶预处理葛仙米,对多糖的提取效果有一定的增效作用。当将未加酶处理的对照得率视为100%时,在使用不同酶浓度的单因素试验中,酶处理者最大得率高出6.77%~23.65%。

3.2 采用木瓜蛋白酶预处理葛仙米,需要注意处理条

件的控制。单因素和正交试验均说明了这一点。此外,酶处理时间较长时,应注意防止微生物的生长繁殖,以免降解多糖。

3.3 碱处理葛仙米,对多糖的提取效果的影响是非常明显的。当碱浓度、处理时间、处理温度合理配合时,多糖的得率可高达35%以上,当处理条件不当时,会破坏多糖,得率明显下降。

3.4 当先用碱适当破坏葛仙米的结构,然后再用酶处理,多糖的得率有所增加,说明复合处理有一定的增效作用,多糖最高得率高达47.56%,比对照高出112%。

### 参考文献:

- [1] 毕永红,胡征宇.葛仙米的营养价值及其开发利用[J].中国野生植物资源,2004(1):40-42.
- [2] 汪兴平,程超,周志,等.野生葛仙米营养成分分析及评价[J].食品科学,2002,23(8):57-59.
- [3] 汪兴平,谢笔钧,潘思轶,等.葛仙米藻红蛋白抗活性氧自由基作用的初步研究[J].食品科学,2005,26(8):404-407.
- [4] 徐梓辉,周世文.植物多糖及其降血糖作用的研究进展[J].华西药杂志,2001,16(5):365-366.
- [5] 张维杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987:266-267.
- [6] 王莉,鲁建江,顾承志,等.商陆多糖的提取及含量测定[J].解放军药学报,2001,17(5):286-287.
- [7] 孙学权.林蛙多糖(TCPS)提取工艺的初步研究[J].吉林农业大学学报,2001,23(4):108-110.
- [8] 肖凯军.鲨鳍软骨多糖的提取[J].化工学报,2001(8):726-728.



## 食用煮熟花生能更好预防疾病

对于那些喜欢食用煮熟花生的人而言,以下的研究结果或许是个好消息:Huntsville研究小组最近发现煮熟的花生中能帮助预防疾病发生的化学物质的含量比生花生、干花生或烘烤花生多出4倍以上。

阿拉巴马A&M大学食物和动物科学系主任Lloyd Walker是研究成员之一,他表示这些花生中含有的植物化学物质的抗氧化特性能够防止细胞受到退行性疾病伤害,其中包括癌症、糖尿病和心脏病等等。

Walker表示:“对于花生而言,煮沸是更好的保存这些植物化学物质的方法。”研究结果发表在近日出版的美国化学学会刊物《农业与食品化学杂志》(Journal of Agricultural and Food Chemistry)上。其作者包括A&M科学家Yvonne Chukwumah和Martha Verghese,以及阿拉巴马大学Huntsville分校的Bernhard Vogler等。

Walker认为花生和其它植物利用植物化学物质来帮助自身防止疾病和害虫的侵害。他在接受Birmingham News采访时说:“这些物质并不是营养物质,但是同时它们又对人类健康有好处。为了保持这些有利于健康的作用,我们需要在食物处理过程中保持住它们。”

Walker还表示,水和热量穿透花生时会在特定点释放出有益化学物质。而对花生的过度烹煮会破坏这些有用的成分。