

文章编号:1673-1689(2006)06-0083-04

海参多肽、多糖综合提取工艺条件的优化

王洪涛¹, 付学军¹, 申京宇¹, 金海珠^{*1}, 河锺明²

(1. 烟台大学 食品科学与工程研究所, 山东 烟台 264005; 2. 韩国新罗大学 生命工学科, 韩国 釜山 617736)

摘 要:从综合利用海参各种营养成分的角度,研究了利用酶解法制备海参多肽的同时分离纯化海参多糖的工艺。通过正交实验得出利用 A. S1398 精制中性蛋白酶综合提取海参多肽和多糖的最优酶解条件:加水量为鲜海参质量的 6 倍,加酶量为鲜海参质量的 1.0%,温度 30 ℃,水解时间 6 h。在该条件下多肽得率为 12.0%,多糖得率为 2.68%,水解度为 30.35%。

关键词:海参;多肽;多糖

中图分类号:Q 959.269

文献标识码:A

Optimization of Technology for Synthetic Extraction of Polypeptide and Polysaccharide of Sea Cucumber

WANG Hong-tao¹, FU Xue-jun¹, SHEN Jing-yu¹, JIN Hai-zhu^{*1}, HA Jongmyung²

(1. Institute of Food Science and Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617736, Korea)

Abstract: In order to multiply utilize the nutritional ingredients of sea cucumber, the enzymolysis technology for preparation of polypeptide and purification of polysaccharide was studied. Through orthogonal experiment, the optimum hydrolytic condition utilizing neutral protease A. S1398 was determined: 6 times water, protease 1.0%, temperature 30 ℃ and hydrolysis time 6 h. Under this condition, the yield of polypeptide and polysaccharide were 12.0% and 2.68%, respectively. The DH was 30.35%.

Key words: sea cucumber; polypeptide; polysaccharide

海参(sea cucumber, *Ludwigothurea grisea*)属棘皮动物门、海参纲、盾手目动物,其生存已有 5 000 万年之久。全世界约有 1 100 种海参,我国有 100 多种,全世界可食用海参 40 多种,我国有 20 多种^[1],其中我国黄、渤海区的刺参营养价值最高,是名贵的上等海参,被称为“参中之冠”。海参干燥体壁的有机成分中蛋白质质量分数高达 90%,脂质约占为

4%,多糖在 6%左右,另含有少量核酸。无机成分中含钙、镁盐及铁、锰、锌、铜、钼、硒等微量元素^[2]。自古以来,海参就是保健食品和营养食品。《本草纲目拾遗》中药典籍记载“海参性温补,足敌人参,故名海参;味甘咸,补肾经,益精髓,消痰涎,摄小便,壮阳疗痿,杀疮虫”^[3]。近年来先后有中医提出以海参单用或组方治疗肿瘤、再生障碍性贫血和糖

收稿日期:2006-03-23; 修回日期:2006-05-21.

基金项目:中韩国际合作项目(HY04HZ-2).

作者简介:王洪涛(1982-),男,山东聊城人,生物化工硕士研究生;*为通讯作者.

尿病,取得了良好效果,同时在辅佐如癫痫、胃及十二指肠溃疡、慢性乙型肝炎、慢性肾炎、高血压、肺结核、神经衰弱、静脉血栓、痔疮、脱肛和便秘等常见病治疗的各种药膳或食疗组方中,海参均得到了广泛的应用^[2]。

近年来,随着对海参的生理与生化,海参生物活性物质的分离、鉴定及其生物医学作用等研究的不断深入,人们发现海参含有许多具有重要生物学活性的物质,如多肽、海参多糖、海参皂苷、海参毒素等。现代营养研究表明,低分子肽可不经胃消化直接被肠粘膜吸收。此外,海参肽还具有抗肿瘤、降血压、抗疲劳、延缓衰老、提高免疫力等功效。海参多糖具有提高免疫力、抑制肿瘤、抗凝血、保护神经组织等多种生理功能。从海参各类生物活性物质中寻找和开发新药,以及加工功能性食品已经成为海参深度开发利用的重要方向。作者从综合利用海参各种营养成分的角度考虑就海参多糖、多肽的综合提取工艺进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲜刺参,产于烟台芝罘岛;精制中性蛋白酶 A. S1398; 1.3×10^5 U/g,无锡酶制剂厂产品。

1.2 实验仪器及试剂

全自动水解反应器(BIOTECH—10BGZ):上海保兴生物设备工程有限公司产品;精密 pH 计(CyberScan pH/lon 510):新加坡 EUTECH 公司产品;紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司产品;凯氏定氮仪:KDY—9820 型,北京通润源机电技术有限公司产品;旋转蒸发器:RE—5298A,上海亚荣生化仪器厂产品;微量高速离心机:TG16-W 型,湖南湘仪离心机厂产品;分析天平:AR2140,梅特勒托利多仪器公司产品;其它检验试剂均为 AR 级。

1.3 实验方法

1.3.1 工艺流程 鲜海参→-70℃速冻→剪切机切片→胶体磨研磨胶体化→加入蛋白酶水解→煮沸灭酶→加入体积分数 95%的乙醇至体系乙醇体积分数为 60%→静置 12 h→离心→沉淀(海参粗多糖)→上清液(海参多肽混合物)

粗多糖→质量分数 5%的水溶液→离心取上清液→双氧水氧化脱色→乙酸钾法除蛋白→冷藏过夜→离心收集沉淀→洗涤→精多糖

海参多肽的混合物→超滤法纯化→脱苦脱色→冷冻干燥→海参多肽粉末

1.3.2 总蛋白质质量分数的测定 微量凯氏定氮法^[4]。

1.3.3 可溶性蛋白质质量分数的测定 福林—酚法:配制福林酚甲、乙液和一系列不同浓度梯度的牛血清白蛋白(BSA)标准溶液,以水作参比,640 nm 下测吸光度,绘制标准曲线。将海参蛋白的水解液稀释适当的倍数,移取 1 mL 按制作标准曲线的步骤操作,640 nm 下测吸光度,由回归方程得到对应的 BSA 质量分数,从而求得可溶性蛋白质的质量分数^[5]。

1.3.4 多肽质量分数的测定 磷钼酸沉淀法:利用磷钼酸可以沉淀相对分子质量 10 000 以上的含氮物质。取灭酶后的酶解液 20 mL 置于 50 mL 容量瓶中,加入 15 mL 水及 2 mL 钼酸钠溶液,摇匀,立即用滤纸重复过滤至滤清,将滤液稀释适当倍数后取 1 mL 用福林酚法测定低肽的含量。上述根据是硫酸和钼酸钠作用生成钼酸,然后和试样中存在的磷酸盐作用生成磷钼酸^[6]。

低肽质量分数(%) = 低肽质量/总蛋白质质量分数 × 稀释倍数 × 100

1.3.5 多糖质量分数的测定 蒽酮比色法:多糖在硫酸的作用下水解成单糖分子并迅速脱水形成糖醛衍生物,再将其与蒽酮缩合形成有色化合物,在适当波长下和一定浓度范围内,吸收值与糖浓度成一定的线性关系,从而比色测定其含量。配制一系列不同浓度梯度的标准葡萄糖溶液,分别取 1 mL 置于试管中浸于冰水浴中冷却,然后在冰浴条件下加入蒽酮试剂,同时将各管置于沸水浴中准确加热 7 min,立即取出置冰浴中冷却至室温,640 nm 下测吸光度绘制标准曲线。取粗多糖加水溶解稀释适当的倍数,按上述步骤操作,由回归方程得到对应的多糖的含量^[4]。

1.3.6 水解度的测定 采用 TCA 法^[7]。TCA 是一种蛋白质沉淀剂,它可以沉淀蛋白质和肽段。随着反应的进行,蛋白质肽链被切成大小不等的片段,TCA 溶解指数提高。可以被 TCA 沉淀的肽段所含的最少氨基酸残基数与底物的种类有关,就特定的底物而言,TCA 溶解指数可以定性反应蛋白质的分解情况,溶解指数越高,表明较短肽断的含量越高。

取 5 mL 酶解液加入 5 mL 质量分数 10%的 TCA,混合振荡,4 000 r/min 离心 20 min。取上清液做适当稀释,总蛋白质质量分数和上清液可溶性蛋白质的质量分数分别用微量凯氏定氮法和福林—酚法测定。

$$DH\%=(N_2-N_1)/(N_0-N_1)$$

N_0 为海参蛋白中的总蛋白质, N_1 为酶解反应前海参蛋白质中的 TCA 可溶性蛋白质, N_2 为酶解液中的 TCA 可溶性蛋白质。

2 结果与讨论

2.1 水解用酶的确定

选用具有内切功能的中性蛋白酶。酸性蛋白酶的最适 pH 值为 2.0~2.5, 碱性蛋白酶的最适 pH 值为 11, 反应条件剧烈, 对设备的要求较高且水解度不容易控制, 在生产中不具有实际意义。而中性蛋白酶主要从蛋白质内部将肽键打开, 专一性突出, 反应条件温和($pH=7$), 水解效力适中, 操作易于控制, 并且不会破坏氨基酸结构和其它营养成分, 在有效成分的保留上有着不可比拟的优势, 而且价格低廉, 适用于大规模的工业化生产。

2.2 综合提取工艺条件的确定

根据海参原料及 A. S1398 精制中性蛋白酶的性质^[8], 确定加水量、加酶量、水解温度、水解时间 4 个因素, 分别设置 3 个水平, 进行正交实验, 结果见表 1。

表 1 综合提取工艺因素水平表

Tab. 1 The design of factors and levels of extraction technology

因素水平	加水量 A/倍	酶用量 B/%	温度 C/℃	时间 D/h
1	3	0.5	30	3
2	6	1.0	40	6
3	8	1.5	50	9

注:加水量和加酶量均以去除内脏后鲜品海参的质量为标准。

2.3 正交实验结果及极差分析

正交实验结果及极差分析见表 2, 3 和图 1, 2。

表 2 最佳水解条件的正交实验结果

Tab. 2 The results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	多肽得率/%
1	1	1	1	1	8.57
2	1	2	2	2	8.59
3	1	3	3	3	10.50
4	2	1	2	3	10.53
5	2	2	3	1	11.90
6	2	3	1	2	11.90
7	3	1	3	2	11.35
8	3	2	1	3	11.42
9	3	3	2	1	10.60

续表 2

试验号	A	B	C	D	
T_1	27.66	30.45	31.89	32.07	
T_2	34.33	31.91	30.72	31.84	$T=95.36$
T_3	33.37	33.00	33.75	31.45	
$\bar{x}_1$	9.22	10.15	10.63	10.69	
$\bar{x}_2$	11.44	10.64	10.24	10.61	$x=10.60$
$\bar{x}_3$	11.12	11.00	11.25	10.48	
R	2.22	0.85	1.01	0.21	

因素主→次 A→C→B→D

优方案 $A_2 C_3 B_3 D_1$

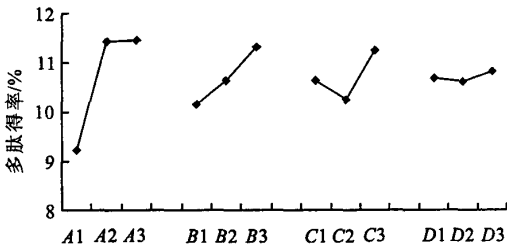


图 1 试验因素与指标趋势图

Fig. 1 Factors and index trendgraph

表 3 最佳水解条件的正交实验结果

Tab. 3 The results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	多糖得率/%
1	1	1	1	1	1.48
2	1	2	2	2	1.21
3	1	3	3	3	0.82
4	2	1	2	3	2.66
5	2	2	3	1	2.56
6	2	3	1	2	2.67
7	3	1	3	2	2.10
8	3	2	1	3	2.70
9	3	3	2	1	1.74

T_1	3.51	6.24	6.85	5.78	
T_2	7.89	6.47	5.61	5.98	$T=19.94$
T_3	6.54	5.23	5.48	6.18	
$\bar{x}_1$	1.17	2.08	2.28	1.93	
$\bar{x}_2$	2.63	2.16	1.87	1.99	$x=6.65$
$\bar{x}_3$	2.18	1.74	1.83	2.06	
R	1.46	0.42	0.45	0.13	

因素主→次 A→C→B→D

优方案 $A_2 C_1 B_2 D_3$

注:多糖得率以海参干重为标准

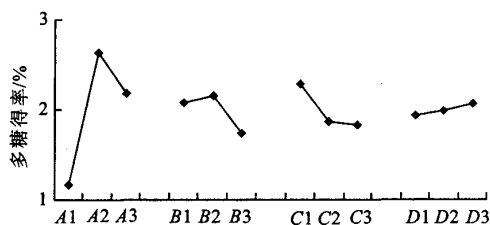


图2 试验因素与指标趋势图

Fig. 2 Factors and index trendgraph

因素A对两个指标的影响具有相同的顺序,而且在各因素中排第一位,因此选择 A_2 为最佳条件;因素C在对两个指标的影响因素中都排第二位,由于 C_1 和 C_3 的条件下多肽得率相差不大,从综合提取的角度考虑选择 C_1 为最佳条件; B_2 和 B_3 两种条

件对多糖得率的影响比多肽得率稍大,因此选择 B_2 为理想条件;因素D对二者影响的最佳条件一致,均为 D_3 ,但D对两个指标的影响很小,从规模化生产的角度考虑,选取 D_2 为最佳条件。综合确定最优条件为 $A_2B_2C_1D_2$ 。

3 结论

通过正交实验寻找得出的优化组合为 $A_2B_2C_1D_2$,从而最终确定了用A.S1398中性蛋白酶综合提取海参多肽和多糖的工艺条件为:加水量为鲜海参质量的6倍,加酶量为海参质量1.0%,温度30℃,水解时间为6h。在该条件下多肽得率为12.0%,多糖得率为2.68%,水解度为30.35%。

参考文献:

- [1] 马天舒,葛迎春. 海参活性物质的药理研究进展[J]. 特产研究,2003,(1):57.
- [2] 樊绘曾. 海参:海中人参—关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物杂志,2001,(4):38.
- [3] 姜健,杨宝灵,邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究[J]. 生物技术通讯,2004,15(5):537.
- [4] 张水华. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,2004.
- [5] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2004.
- [6] 张或,农绍庄,徐龙权. 海参蛋白酶解工艺条件的优化[J]. 大连轻工业学院学报,2001,20(6):106.
- [7] 檀志芬,生庆海. 蛋白质水解度的测定方法[J]. 分析检测,2005,(7):175.
- [8] 李春喜,王志和,王文林. 生物统计学[M]. 北京:科学出版社,2000.

(责任编辑:朱明)

简讯:

化学工业出版社举办读者俱乐部金卡会员抢注活动

化学工业出版社是国内生物、医药出版领域的重要机构,为庆祝化工社生物·医药出版分社成立及乔迁新址,特举办读者俱乐部金卡会员抢注活动,活动期间一经注册立即成为金卡会员,永久享受化工版图书85折购书优惠及多项特别服务。

活动时间:2006年12月1日至2007年2月28日

注册页面:<http://www.cip.com.cn/member/register.jsp>

新社地址:北京市东城区青年湖南街13号(邮编:100011)

联系电话:010-64519348,64519296,64519352