

双酶法提取豆豉多糖的工艺研究

吉义平, 费 珊, 丁彩梅

(武汉设计工程学院食品与生物科技学院, 湖北武汉 430205)

摘要:在单因素实验基础上应用正交实验设计法对双酶法提取豆豉多糖的工艺进行了优化。优化后的最佳提取工艺为:首先在料液比 1:20 (g:mL)、pH7.0 和温度 50 °C 的条件下,添加 2.0% 的木瓜蛋白酶进行水解 150 min。然后在料液比 1:20 (g:mL)、pH7.0 和 55 °C 的条件下继续添加 2.5% 的风味蛋白酶水解 150 min,两次分步酶解后测得多糖得率为 15.90%。此优化后的豆豉多糖提取工艺合理、可行且得率较高。

关键词:豆豉, 多糖, 双酶法

Research on dual-enzymatic extraction of polysaccharides from Douchi

Ji Yi-ping, FEI Shan, DING Cai-mei

(College of Food and Biology Science and Technology, Wuhan Institute of Design and Sciences, Wuhan 430205, China)

Abstract: Based on the single factor experiments, the orthogonal experimental design was employed to optimize the extraction conditions of polysaccharide from douchi via dual-enzymatic. The results showed that the optimum dual-enzymatic extracting conditions were as follows: firstly, the ratio of water to raw material 1:20 (g:mL), pH7.0 and extraction temperature 50 °C, enzyme dosage of papain 2% and hydrolysis time 150 min. Secondly, pH7.0 and extraction temperature 55 °C, with flavourzyme 2.5%, hydrolysis time 150 min. Under these step by step enzymatic hydrolysis conditions, the extraction yield was 15.90%. The optimization of extraction process technology of polysaccharides from douchi was reasonable and feasible and yield was higher.

Key words: douchi; polysaccharides; dual-enzymatic

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)21-0260-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.21.041

豆豉是我国传统的四大发酵豆制品之一,不仅营养价值高,而且具有许多独特的生理调节作用^[1-3],主要的有效生物活性成分如豆豉多肽^[4-6]、异黄酮^[7]和豆豉多糖^[2]等。研究报道称,其中的豆豉多糖除了具有清除自由基作用之外^[8],还具有修复糖尿病小鼠肾脏和胰腺的作用^[9]以及抑制 α -葡萄糖苷酶的作用^[10-11]。但是,国内外有关豆豉多糖提取方法的研究却不多。已见报道的方法主要有热水浸提法^[12]、回流提取法^[13]和超声辅助提取法^[14],其中热水浸提法和回流提取法的提取时间长且效率低,超声辅助法虽然具有操作较为简单,提取率相对较高、操作时间相对较短等诸多优点,但是有报道称超声可使大分子量的多糖降解为较小分子量的多糖从而改变其生物活性^[15]。诸些方法的提取率普遍较低,如超声提取法仅为 0.91%^[14],且提取产品中往往含有大量的蛋白质和色素^[15]。这是因为植物多糖通常被包裹在植物细胞壁内,并与蛋白质结合以蛋白多糖的形式存在。研究表明酶解法能有效地酶解与多糖结合在一起的蛋白质,从而提高多糖的提取率的同

时还能保持多糖的构象与生物活性^[16]。酶解法^[17]尤其是双酶法^[18-20]在多糖的提取中发挥了重要的作用,但是尚未见应用于豆豉多糖的提取。因此,本实验在单因素的基础上,采用正交设计实验法对豆豉多糖的双酶法提取工艺进行优化,旨在为豆豉多糖的提取及其实际应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

豆豉 市售;纤维素酶(>2.5 万 U/g)、风味蛋白酶(>2.0 万 U/g)、胰蛋白酶(25 万 U/g)、酸性蛋白酶(5 万 U/g)、木瓜蛋白酶(>10 万 U/g) 均购自上海金穗生物科技有限公司;石油醚、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、柠檬酸 均购自国药集团;其他试剂均为国产分析纯。

XFB-200 高速中药粉碎机 湖南吉首忠诚制药机械厂;TDL-5-A 离心机 上海安亭科学仪器厂;UV-2000 紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司;SHZD 抽滤机 巩义市亭华有限责任公司;

收稿日期:2016-04-01

作者简介:吉义平(1984-),女,硕士,讲师,研究方向:食品功能性成分的提取纯化、检测及其应用,E-mail:343677874@qq.com。

基金项目:武汉设计工程学院校科研项目(201302)。

HH-2 水浴锅 金坛市医疗仪器厂; DHG-9240 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; FA1004B MA * 100 g 分析天平 上海越平科学仪器有限公司; DZ-1A 台式真空干燥箱及真空泵 深圳市鑫科化实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 豆豉多糖的提取工艺流程 取一定量的豆豉于 60 ℃ 下烘干至恒重, 用高速组织粉碎机粉碎, 过 40 目筛。粉末置于索氏提取器中, 加入 30~60 ℃ 的石油醚溶液, 在 50 ℃ 下回流提取 6 h, 低温干燥至恒重, 即得到脱脂后的粉末备用。按照 1:20 (g:mL) 的料液比添加特定 pH 的缓冲溶液于干燥后的豆豉粉末中, 置于一定温度下的水浴锅中, 添加一定量的酶溶液恒温水解一定时间后升温至 90 ℃ 灭酶 10 min, 冷却后调整 pH 和水浴温度, 继续添加第二种酶溶液进行第二酶解。酶解结束后升温至 90 ℃ 灭酶 10 min, 冷却、减压抽滤, 取滤液采用 sewage 试剂法除蛋白后, 滤液进行 60 ℃ 真空浓缩后, 添加一定量的无水乙醇使其乙醇浓度达到 95% 后静置 24 h 后于低速离心机中 4500 r/min 下离心 10 min。所得沉淀用 95% 乙醇重复洗涤两次后, 置于真空干燥箱中 60 ℃ 下干燥至恒重即得豆豉多糖粉末。

1.2.2 酶种类的考察实验 按照 1.2.1 的方法提取豆豉多糖, 提取条件分别为: 固定反应条件为料液比 1:20 (g:mL), 酶添加量 0.1%, 酶解时间 120 min, 酶解 pH 和酶解温度分别选择对应酶的最适 pH 和温度, 考察酶的种类 (纤维素酶、酸性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶) 对多糖得率的影响。固定取样量 2.0 g, 料液比 1:20 (g:mL) 进行实验。

1.2.3 木瓜蛋白酶的单一因素实验 固定 pH7, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 120 min, 比较 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5% 的木瓜蛋白酶添加量对多糖得率的影响; 固定 pH7, 酶解温度 50 ℃, 酶添加量 2.5% 的条件下, 比较 30、60、90、120、150、180 min 的酶解时间对多糖得率的影响; 固定 pH7, 酶添加量 2.5%, 酶解时间 120 min, 比较 45、50、55、60、65、70 ℃ 的酶解温度对多糖得率的影响; 固定酶解温度 50 ℃, 酶添加量 2.5%, 酶解时间 120 min, 比较 3、4、5、6、7、8 的 pH 对多糖得率的影响。

1.2.4 风味蛋白酶的单一因素实验 固定 pH7, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 120 min, 比较 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5% 的风味蛋白酶的添加量对多糖得率的影响; 固定 pH7, 酶解温度 50 ℃, 酶添加量 3.0%, 比较 30、60、90、120、150、180 min 的酶解时间对多糖得率的影响; 固定 pH7, 酶添加量 3.0%, 酶解时间 120 min 的条件下, 比较 45、50、55、60、65、70 ℃ 的酶解温度对多糖得率的影响; 固定酶解温度 55 ℃, 酶添加量 3.0%, 酶解时间 120 min 的条件下, 比较 3、4、5、6、7、8 的 pH 对多糖得率的影响。在这两个单一因素实验的基础上, 以两种酶的酶添加量和酶解时间两个因素的 3 个较优水平进行正交实验, 确定豆豉多糖的最优双酶提取条件。

1.2.5 正交实验 根据单一因素实验结果, 分别选取

较佳两种酶的酶添加量和酶解时间为因素, 每个因素选取三个对多糖得率影响较大的水平进行正交实验, 因素水平表见表 1。

表 1 正交因素水平

Table 1 Level of orthogonal factors

水平	因素			
	A 酶量-木瓜 (%)	B 酶量-风味 (%)	C 酶解时间-木瓜 (min)	D 酶解时间-风味 (min)
1	2.0	2.0	90	90
2	2.5	2.5	120	120
3	3.0	3.0	150	150

1.2.6 豆豉多糖得率的计算 按照 1.2.1 提取的豆豉多糖沉淀用蒸馏水溶解定容, 最后取一定体积稀释到适当浓度后进行测定。采用苯酚-硫酸法^[21]测定豆豉多糖的含量, 葡萄糖的标准曲线方程为 $y = 6.4918x + 0.0534$, $R^2 = 0.9918$ 。多糖得率计算如式 (1):

$$\text{多糖得率 (g/100 g)} = \frac{x \times \frac{V_2}{V_1} \times V_3}{m \times 1000} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: x —相当于葡萄糖的浓度, mg/mL; V_1 —测定时的取样体积, mL; V_2 —测定样品时的定容体积, mL; V_3 —提取液的定容体积, mL; m —取样样品的质量, g。

2 结果与分析

2.1 不同酶对豆豉多糖得率的影响

由表 2 分析可知, 五种类型酶中, 木瓜蛋白酶和风味蛋白酶对豆豉多糖的得率较高, 分别为 7.23% 和 5.90%, 这间接地表明豆豉中含有的纤维素、果胶、蛋白质等非多糖类大分子物质, 形成了较为致密的结构, 甚至一部分与多糖结合了起来, 大大阻碍了多糖的浸提过程中的释放。所以酶法提取可以降低非多糖类物质, 使细胞内外的豆豉多糖更有效地被提取出来。本实验选择木瓜蛋白酶和风味蛋白酶作为双酶提取的优选酶制剂, 首先分别优化两种酶的较佳酶解单一因素条件, 然后利用正交实验确定出双酶法的较优酶解工艺条件。

表 2 不同类型酶对多糖提取率的影响

Table 2 Effect of enzyme types on extraction yield of douchi polysaccharides

酶的类型	pH	酶解温度 (°C)	酶添加量 (%)	多糖得率 (g/100 g)
纤维素酶	5.0	50	0.1	5.53
酸性蛋白酶	3.0	50	0.1	4.89
胰蛋白酶	7.3	50	0.1	5.68
木瓜蛋白酶	7.0	60	0.1	7.23
风味蛋白酶	7.0	50	0.1	5.90

2.2 木瓜蛋白酶酶解条件的筛选结果

由图 1a 可知, 在 1.0%~2.5% 范围内, 随着木瓜蛋白酶酶添加量的增加, 多糖的得率不断增加, 但是

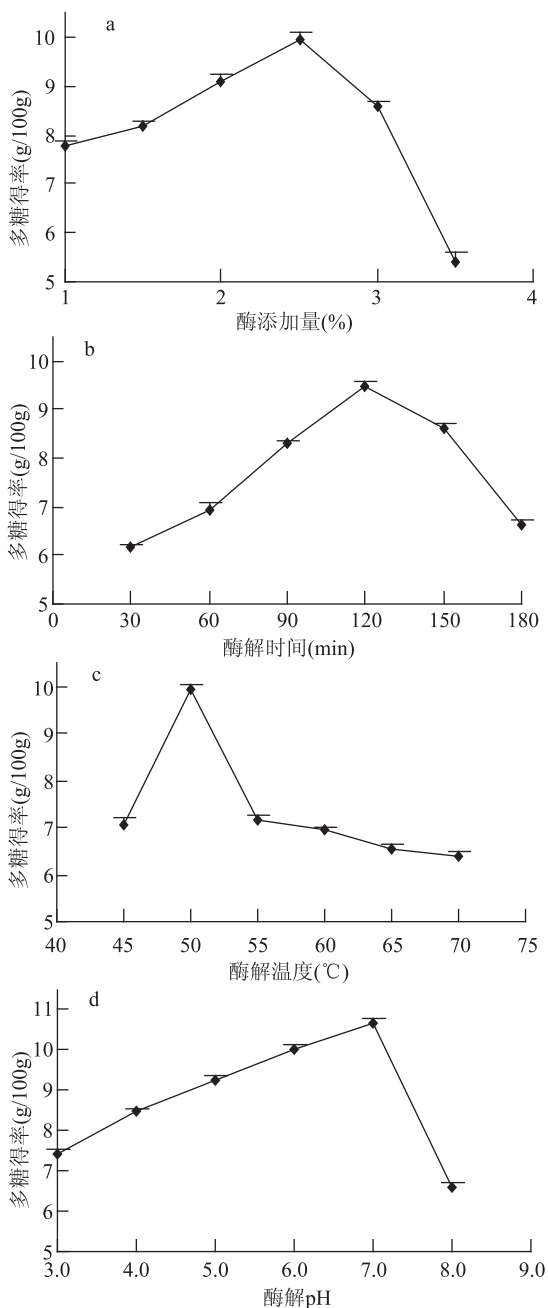


图1 木瓜蛋白酶不同单因素对豆豉多糖得率的影响

Fig.1 Effect of single-factor of papain on extraction yield of douchi polysaccharides

当酶用量继续增加时,多糖的得率反而下降。这是因为在一定的酶量范围内,随着酶量的增加,酶与底物接触的机会增加,水解速率加快,同一时间内获得更多的多糖。但是当酶用量达到一定程度后,过高的酶用量已经处于饱和状态,反而会抑制了酶促反应的进行,降低水解的速率,所以木瓜蛋白酶的较佳添加量为2.5%。

木瓜蛋白酶酶解时间对多糖得率的影响结果如图1b所示。随着酶解时间的延长,多糖的得率也随之增加,在120 min时达到最大值。随着时间的继续延长,得率出现了下降趋势。这是因为随着酶解速率一定的条件下,酶解时间的增加会促进更多多糖的解离而溶出,提高多糖的得率。随着酶解时间的

进一步增加,多糖的得率随之减小,原因可能是因为酶反应时间过长,导致酶的失活甚至导致部分多糖分解或者结构发生变化,从而导致多糖得率下降。所以木瓜蛋白酶较佳酶解时间为120 min。

从图1c可以看出,随着温度的升高,多糖得率也随之增加。在木瓜蛋白酶中50℃后,随着温度的升高,多糖得率逐渐降低。主要原因是随着温度的上升,酶的活性逐渐降低,且较高的温度会影响多糖的稳定性,从而导致多糖得率降低。故木瓜蛋白酶的较佳酶解温度为50℃。

从图1d可以看出过低的pH不利于木瓜蛋白酶活性的充分发挥,从而影响多糖的提取,当pH7.0时,木瓜蛋白酶的多糖得率最大,由此表明该实验中木瓜蛋白酶的较佳pH为7.0,过酸或者过碱都会导致酶的结构发生改变,影响酶与底物的亲和力,从而导致多糖得率减小。所以木瓜蛋白酶的较佳酶解pH7.0。综合可知,木瓜蛋白酶的较佳酶解条件为:酶添加量2.5%、pH7.0、温度50℃、酶解时间120 min。

2.3 风味蛋白酶酶解条件的筛选结果

从图2a可以看出,随着风味酶添加量的增加,多糖的得率也随之增加。表明该豆豉多糖的提取过程中,风味蛋白酶对蛋白质或蛋白质-多糖结合物的酶解,有利于多糖的分离与溶出。而过高的酶用量不但增加经济成本,反而抑制了酶解反应的进行,从而导致得率的下降。所以风味蛋白酶的较佳添加量为3.0%。

从图2b可以看出,随着风味蛋白酶酶解时间的增加,多糖的得率先增加后下降。分析原因是酶解时间较短,酶解不完全充分,而多长的时间不能显著地增加豆豉多糖的得率,反而使多糖的稳定性下降。综合考虑,风味蛋白酶较佳酶解时间为120 min。

由图2c可以看出,从45℃开始,在所优化的温度范围内,随着温度的升高,多糖得率也随之增加。在风味蛋白酶中55℃时,达到最大值。随着温度的进一步继续升高,多糖得率开始不断下降。主要原因55℃以内的温度升高有利于酶催化反应能量的增加,加快反应速率,但当超过风味蛋白酶的最适温度55℃后,酶的活性逐渐降低,从而导致多糖得率降低。在酶解温度单因素实验中,所以本实验中,风味蛋白酶的较佳酶解温度为55℃。

由图2d可知,当pH为3.0时,豆豉多糖的得率最低,表明较强的酸性环境大大抑制了风味蛋白酶的活性;当pH升高至7时,多糖得率达到最大值11.65 g/100 g,之后升高的pH8反而使多糖得率减小。表明该实验中的风味蛋白酶的较合适酶解pH为7。综合可知,风味蛋白酶的较佳酶解条件为:酶添加量3.0%、pH7.0、温度55℃、酶解时间120 min。

2.4 双酶法提取豆豉多糖的工艺研究

2.4.1 双酶法酶解方式的确定 在上述筛选出的结果基础上,分别称取一定量的豆豉粉末,固液比1:20(g:mL),分别按照表3中的五种方式进行酶解,分析表3各方式下多糖的得率可知,5种不同的酶解

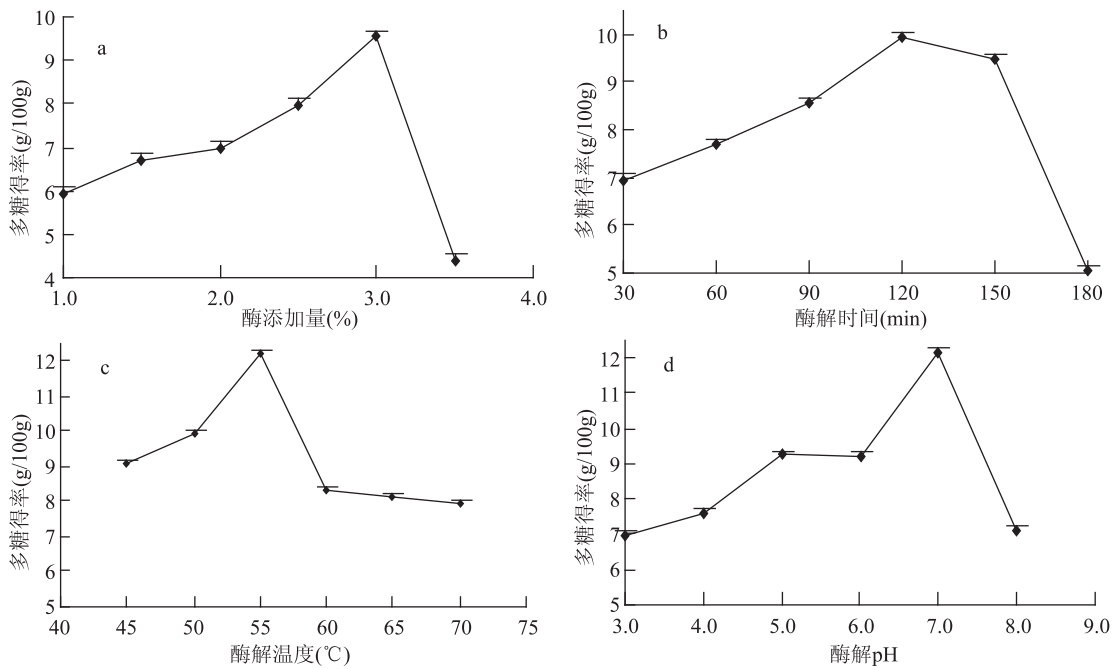


图2 风味蛋白酶不同单因素对豆豉多糖得率的影响

Fig.2 Effect of single-factor of papain on extraction yield of douchi polysaccharides

表3 不同酶解方式对豆豉多糖得率的影响

Table 3 Effect of enzymatic method on extraction yield of douchi polysaccharides

酶解方式	pH	酶解温度(°C)	酶解时间(h)	多糖得率(g/100 g)
2.5% 木瓜蛋白酶	7.0	50	2	10.15
3.0% 风味蛋白酶	7.0	50	2	11.65
2.5% 木瓜蛋白酶—3.0% 风味蛋白酶	7.0	50	2 + 2	15.6
3.0% 风味蛋白酶—2.5% 木瓜蛋白酶	7.0	50	2 + 2	14.32
2.5% 木瓜蛋白酶 + 3.0% 风味蛋白酶	7.0	50	2	12.45

注:木瓜蛋白酶-风味蛋白酶指分步酶解,即先木瓜蛋白酶酶解后再进行风味蛋白酶水解;木瓜蛋白酶 + 风味蛋白酶指添加混合酶后一起酶解。

方式获得的多糖得率存在一定的差异。其中,相较于直接双酶混合酶解而言,分步酶解的多糖得率更高。且分步酶解中,先木瓜蛋白酶水解后再进行风味蛋白酶的水解方式得率较高。这是因为两种不同的蛋白酶,水解的物质和部位各不相同,两者结合一起的模式更有利于水解的充分性,从而提高了豆豉多糖的释放与溶出,且分步的水解模式,使每一种酶均能在各自的最适环境条件下进行最高程度的酶解,且具有一定的相继互补性,能逐步地将豆豉中的蛋白质及蛋白-多糖结合物水解,从而提高了多糖的得率。所以,本实验选择木瓜蛋白酶和风味蛋白酶的双酶分步酶解方式来提取豆豉中的多糖,并对其工艺条件进行进一步的优化。

2.4.2 双酶法的工艺优化 根据单因素实验结果,设计出的正交实验方案和实验结果如表4所示。由表4可知,故极差分析可得各因素的最佳搭配为A₁B₂C₃D₃,此组合并未在正交中出现,所以经过验证实验后得出多糖得率为15.90 g/100 g,大于9组正交实验中的最大组15.59 g/100 g。所以最佳的提取工艺条件为A₁B₂C₃D₃:即在pH7.0,温度50 °C条件下,木瓜蛋白酶添加量为2.0%,水解150 min后,灭酶冷却;升温至55 °C,风味蛋白酶添加量为2.5%,水浴

150 min后90 °C灭酶冷却后测定,多糖得率最大为15.90 g/100 g。

3 结论

本实验采用酶解法对豆豉多糖的提取条件进行了优化。实验结果表明不同的酶对豆豉多糖的得率影响表现出一定的差异性,其中木瓜蛋白酶和风味蛋白酶效果较好。进一步研究对比发现,该两种酶的分步酶解较混合酶的一步酶解对多糖的提取效果更好。最后采用正交实验对分步酶解的提取工艺进行了优化,最佳条件为:在pH7.0,温度50 °C条件下,木瓜蛋白酶添加量为2.0%,进行第一步酶解150 min后,90 °C灭酶冷却,待升温至55 °C后,添加2.5%风味蛋白酶,恒温酶解150 min后,所得的多糖得率高达15.90 g/100 g(干基),且通过实验测得该多糖中的蛋白质含量很低,可以忽略不计。该结果远高于目前文献报道^[12]中的豆豉多糖得率(2.81%,干基),也高于大豆^[19]中的多糖含量(9.28%,干基)。前者结果差异较大的原因有待后续进一步实验研究,初步分析可能为豆豉中的多糖多为与蛋白结合的多糖,故本论文中两种蛋白酶的使用破坏了蛋白多糖的结合作用,从而大大提高了多糖的溶出。后者的

表4 正交数据表

Table 4 Data of orthogonal experiment

实验号	A 酶量-木瓜(%)	B 酶量-风味(%)	C 酶解时间-木瓜 (min)	D 酶解时间-风味 (min)	得率(g/100 g)
1	1	1	1	1	13.22
2	1	2	2	2	15.59
3	1	3	3	3	15.22
4	2	1	2	3	14.16
5	2	2	3	1	15.11
6	2	3	1	2	12.72
7	3	1	3	2	13.95
8	3	2	1	3	13.76
9	3	3	2	1	14.23
k ₁	14.677	13.777	13.233	14.187	-
k ₂	13.997	14.820	14.660	14.087	-
k ₃	13.980	14.057	14.760	14.380	-
R	0.697	1.043	1.527	0.293	-

差异表明大豆发酵生产豆豉的过程中,多糖的含量有一定程度的升高,这与文献中报道的结果^[22]相吻合。综合分析可知,该提取工艺可为豆豉多糖的提取及其下一步深入应用提供一定的参考作用。

参考文献

- [1] 蔡允林,杜冰,余飞,等.豆豉营养成分及研究进展[J].中国调味品,2015,40(6):119-123.
- [2] 牛广财,贾亭亭,魏文毅,等.淡豆豉的研究进展[J].中国酿造,2013,32(9):1-4.
- [3] Fan J, Zhang Y, Chang X, Saito M, et al. Changes in the radical scavenging activity of bacterial-type douchi, a traditional fermented soybean product, during the primary fermentation process [J]. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2009, 73: 2749-2753.
- [4] Sanjukta S, Rai A K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 50:1-10.
- [5] Sanjukta S, Rai A K, Muhammed A, et al. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14:650-658.
- [6] Zhang J H, Tatsumi E, Ding C H, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product [J]. *Food Chemistry*, 2006, 98:551-557.
- [7] 索化夷, 蹇宇, 卢露, 等. 永川豆豉传统发酵过程中的大豆异黄酮变化[J]. *食品科学*, 2012, 33(8):270-273.
- [8] Wang D, Wang L J, Zhu F X, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107:1421-1428.
- [9] 刘正猛, 翟丽, 郭瑞华, 等. 豆豉多糖修复糖尿病小鼠肾脏和胰腺作用的研究[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2005, 8(12):1345-1346.
- [10] Chen J, Cheng Y Q, Yamali K, et al. Anti- α -glucosidase activity of Chinese traditionally fermented soybean (douchi) [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103:1091-1096.
- [11] 郭瑞华, 翟丽, 刘正猛, 等. 豆豉及其多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究及豆豉中姜汤有效成分的初步分析[J]. *中药材*, 2005, 28(1):38-40.
- [12] 劳凤云, 李小娜, 王洪波. 淡豆豉多糖的提取工艺研究[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(9):1691-1692.
- [13] 郭瑞华, 翟丽, 刘正猛, 等. 豆豉多糖的提纯及成分分析[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(4):512-514.
- [14] 张静, 葛喜珍, 田平芳, 等. 淡豆豉中豆豉多糖、大豆异黄酮的超声提取及含量检测[J]. *中药材*, 2007, 30(12):1532-1534.
- [15] 王小梅. 超声对麦冬多糖结构/溶液行为及生物活性影响的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2013.
- [16] 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, (5):223-224, 334.
- [17] 张军瑞, 陈健. 木瓜蛋白酶酶解白底辐肛参提取多糖的研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(5):542-545.
- [18] 陈瑞平, 陈瑞战, 张敏, 等. 复合酶法提取大蒜多糖及其抗氧化活性研究[J]. *分子科学学报*, 2012, 28(1):48-52.
- [19] 宋慧, 苗敬芝, 董玉玮. 双酶法提取大豆多糖及其抗氧化性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2011(5):89-93.
- [20] 贾丽艳, 任盛财. 复合酶法提取零余子多糖工艺的优化[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(2):130-135.
- [21] 高明侠, 苗敬芝, 曹泽虹, 等. 双酶法提取牛蒡多糖的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(9):260-262.
- [22] 叶德军, 黄占旺. 豆豉多糖生产工艺优化研究[J]. *中国调味品*, 2014, 39(1):47-49.