

山药粘液质多糖的酶法脱蛋白工艺及其性能研究

宁奇¹, 孙培冬^{*1}, 曹光群¹, 张晨², 邬凤娟²

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 无限极(中国)有限公司, 广东 江门 529156)

摘要: 采用响应面法优化酶法山药粘液质多糖的脱蛋白工艺条件, 确定最佳条件为: pH 8.0, 时间 2.0 h, 液料体积质量比 80 mL/g, 酶底质量比 30%, 温度 37 °C; 此条件下的蛋白脱除率为 83.4%, 多糖保留率为 92.7%。通过测定山药粘液质多糖对自由基的清除率, 发现它对 DPPH 自由基和过氧化氢的清除率均可达到 80% 以上, 对 OH 自由基的清除能力较弱; 通过测定山药粘液质多糖在相对湿度 43% 和 81% 时的吸湿率、保湿率, 表明其综合保湿性能略优于透明质酸钠。

关键词: 山药粘液质多糖; 响应面法; 脱蛋白; 清除自由基; 保湿性能

中图分类号: TQ 281/TQ 464.1 文章编号: 1673-1689(2019)09-0118-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.09.017

Deproteinization Technology by Enzymic Method of Polysaccharide from Yam Mucilage and Its Performance Study

NING Qi¹, SUN Peidong^{*1}, CAO Guangqun¹, ZHANG Chen², WU Fenjuan²

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Infinitus (China) Company Ltd., Jiangmen 528156, China)

Abstract: The response surface methodology was used to optimize the deproteinization technology of yam mucilage polysaccharide. The results indicated that the optimal conditions were pH 8.0, time 2 h, liquid-solid ratio 80 mL/g, enzyme-substrate ratio 30% and temperature 37 °C. Under these conditions, the protein removal rate and polysaccharide retention rate were 83.4% and 92.7%, respectively. Through testing the free-radical scavenging rates of yam mucilage polysaccharide, the results showed that yam mucilage polysaccharide's abilities of scavenging DPPH free radicals and hydrogen peroxide were very strong, and the clearing rates could achieve 80% above; but its ability of scavenging OH free radical was weak. In 43% and 81% relative humidity, by testing the moisture absorption rate and moisture rate, the results showed that the comprehensive moisturizing property of yam mucilage polysaccharide was slightly better than that of sodium hyaluronate.

Keywords: yam mucilage polysaccharides, response surface methodology, deproteinization methods, radical scavenging, moisturizing performance

山药具有很高的药用价值和食用价值, 现代药理研究表明山药具有多种生物活性, 山药的开发利

用具有巨大潜力^[1-10]。

粗提的植物多糖中蛋白质为主要杂质, 蛋白质

收稿日期: 2016-12-07

* 通信作者: 孙培冬(1967—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事生物化学研究。E-mail: sunpeidong2004@126.com

引用本文: 宁奇, 孙培冬, 曹光群, 等. 山药粘液质多糖的酶法脱蛋白工艺及其性能研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(09): 118-124.

的存在不仅会导致多糖纯度的下降,而且会干扰多糖性能的测定。酶法脱蛋白质优于Sevage法、三氯乙酸(TCA)法等常用脱蛋白质方法,其反应条件温和,同时具有较高的蛋白质脱除率和多糖保留率。作者以单因素试验为基础,以蛋白脱除率和多糖保留率为响应值,采用响应面法优化山药粘液质多糖的脱蛋白质工艺条件,并对纯化后的山药粘液质多糖的抗氧化活性和保湿性进行测定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山药:市售;牛血清白蛋白、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶:均为生物试剂。

1.2 主要仪器设备

TU-1900 双光束紫外-可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司产品;LyoQuest-85 冷冻干燥机:西班牙泰事达公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 山药粘液质多糖的提取 将新鲜山药洗净去皮后切片,称重,加入组织捣碎机中,按 0.5 mL/g 的比例加入去离子水,粉碎 10 min,得山药匀浆;将山药匀浆称重后用高速离心机离心,速度为 8 000 r/min,时间为 40 min;离心后取上层清液,得山药粘液质原液。

取适量山药粘液质原液于烧杯中,向烧杯中加入 4 倍体积的无水乙醇,边缓慢加入、边搅拌,将搅匀后的混合溶液置于 4 ℃ 的冰箱中,沉降过夜,离心取下层沉淀,沉淀用无水乙醇洗两次,丙酮洗 1 次,将洗后的沉淀放入真空干燥箱中于 45 ℃ 干燥 4 h,得山药粘液质粗多糖。

1.3.2 脱蛋白质工艺评价方法 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质质量浓度,以牛血清蛋白的质量浓度 c (mg/mL) 为横坐标,595 nm 处所测得的吸光度为纵坐标,得到牛血清蛋白标准曲线方程;采用苯酚-浓硫酸法测定样品中多糖质量浓度,以葡萄糖的质量浓度 c (mg/mL) 为横坐标,490 nm 处所测得的吸光度为纵坐标,得到葡萄糖标准曲线方程^[11]。

评价脱蛋白质方法的两个主要指标为蛋白质脱除率和多糖保留率,其计算方法如公式(1)和(2)所示;综合评分的计算方法如公式(3)所示。

$$W_1 = (1 - \frac{m_1}{m_2}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: W_1 为蛋白质脱除率(%), m_1 为脱蛋白质后多糖质量, m_2 为脱蛋白前多糖质量。

$$W_2 = \frac{m_3}{m_4} \times 100\% \quad (2)$$

式中: W_2 为多糖保留率(%), m_3 为脱蛋白质后多糖质量, m_4 为脱蛋白前多糖质量。

$$A = \frac{1}{2} \times \left(\frac{W_1}{W_{1,\max}} + \frac{W_2}{W_{2,\max}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

式中: A 为综合评分, $W_{1,\max}$ 为蛋白脱除率中最大值, $W_{2,\max}$ 为多糖保留率中最大值。

1.3.3 酶解条件单因素实验 比较 4 种蛋白酶脱蛋白效果,确定较优蛋白酶;在该蛋白酶的最适温度下分别考察 pH、酶底质量比、时间和液料体积质量比对蛋白脱除率和多糖保留率的综合影响,以此来确定响应的因素水平。

1.3.4 响应面优化试验设计 在单因素试验的基础上,选取对蛋白脱除率和多糖保留率的综合评价结果影响差异性最显著的 3 个因素为变量,以综合评分为响应值,按试验设计进一步进行响应面优化分析^[11-12];固定其余酶解的条件。

采用 Design-Expert 系统 Box-Behnken 试验设计 3 因素 3 水平的响应面试验,建立综合评分与各因素关系的数学模型,并通过对模型的分析来获得较优的酶解工艺条件。

1.3.5 抗氧化活性的测定 参考文献[13-15]测定山药粘液质多糖对 DPPH 自由基、OH 自由基和过氧化氢的清除效果,分析山药粘液质的抗氧化活性^[16]。

1.3.6 保湿性研究

1) 吸湿率 准确称取山药粘液质和透明质酸钠各 0.100 g,每种样品需做 3 份平行,将样品放入相对湿度为 43% 的密闭容器内吸湿,放入后开始计时,每 6 h 称重 1 次,分别计算各个时间下的吸湿率。使用同样的方法测定相对湿度为 81% 的环境下的吸湿率与时间的关系。

$$W_3 = \left(\frac{D_1 - D_0}{D_0} \right) \times 100\% \quad (4)$$

式中: W_3 为吸湿率(%), D_0 为吸湿前样品的质量; D_1 为吸湿后样品的质量。

2) 保湿率 分别配制质量分数为 1% 的山药粘液质多糖和透明质酸钠溶液;准确称取配制好的溶液各 0.300 g,每种样品需做 3 份平行,将样品放入相对湿度为 43% 的密闭容器内保湿,放入后开始计

时,每6 h 称重1次,分别计算各个时间下的吸湿率;使用同样的方法测定相对湿度为81%的环境下的保湿率与时间的关系。

$$W_4 = \frac{H_1}{H_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中: W_4 为保湿率(%), H_0 为保湿剂中水分初始质量; H_1 为保湿剂中水分最终质量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

牛血清白蛋白标准品在实验质量浓度范围内呈线性相关,如图1(a)所示,其标准曲线方程为: $y = 5.255x + 0.0673$ ($R^2 = 0.9998$);葡萄糖标准品在实验浓度下呈线性相关,如图1(b)所示,其标准曲线方程为: $y = 11.38x + 0.0638$ ($R^2 = 0.9995$)。

2.2 蛋白酶种类筛选

分别在4种不同蛋白酶的最佳酶解条件下进行酶解反应,如图2所示,胰蛋白酶是这4种蛋白酶中的最优蛋白酶。

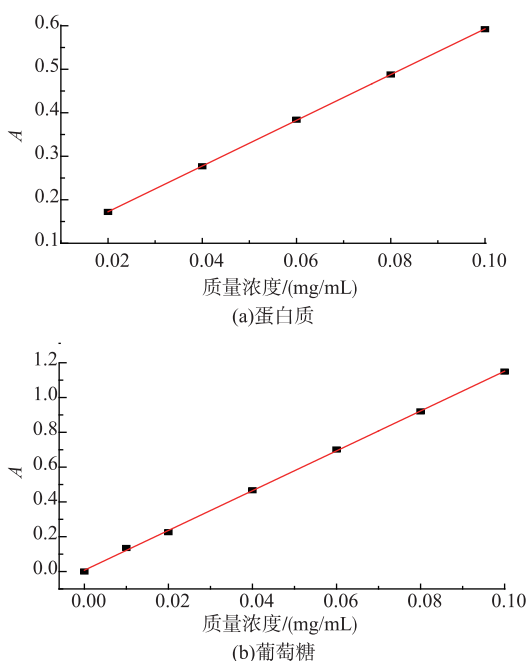


图1 蛋白质和葡萄糖的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of protein and glucose

2.3 酶解条件的单因素实验

如图3所示,蛋白质脱除率和多糖保留率均随酶底质量比的增大而增加,酶底质量比为30%时效果最佳;pH、时间和液料体积质量比对蛋白质脱除率和多糖保留率的综合影响较为显著。因此固定酶

底质量比为30%,选定pH、时间和液料体积质量比为变量,按试验设计进一步进行响应面优化分析。变量pH(A)、时间(B)和液料体积质量比(C)的因素水平见表1。

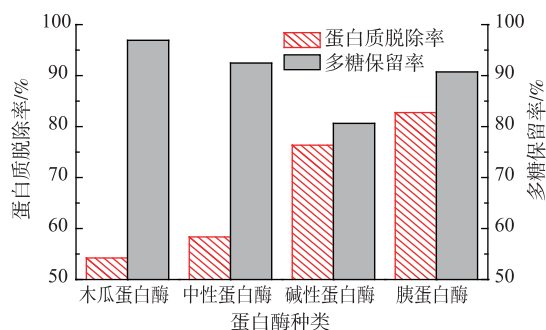


图2 酶法脱蛋白质结果

Fig. 2 Deproteinization effect by enzyme method

2.4 响应面法优化酶解条件

2.4.1 响应面优化的试验结果 响应面试验设计与结果见表2。

采用 Design Expert 8.0.6 软件对试验结果进行多项拟合回归,得到二次多项回归模型方程,综合评价用 Y 表示,则回归模型的方程式为:

$$Y = 97.75 + 3.27A + 0.52B + 1.65C - 0.53A^2 - 2.42A^2C + 1.10B^2C - 4.33A^2 - 2.92B^2 - 3.56C^2$$

2.4.2 交互作用对综合评分的影响 图4~6为pH、时间和液料质量体积比之间的交互影响的等高图和响应面。

2.4.3 响应面回归模型的方差分析 为了检验回归方程的有效性,进一步确定各因素对山药粘液质多糖酶解脱蛋白质的影响,对回归模型进行了方差分析,结果见表3,由表可知,模型的 $F = 132.88$,模型显著; $P(<0.0001) < 0.01$,差异极显著;失拟项的 $P = 0.0122$,显著;决定系数 $R^2 = 0.9867$,说明响应值的变化有98%以上来源于所选因素,模型拟合度好,回归方程能很好的描述各因素与响应值之间的关系,该试验方法可靠。

在以上的回归模型中,一次项的有 A 、 C ,二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 的 P 值均小于0.01,说明pH、液料比以及3个因素的二次项都具有显著影响。二次项 AC 、 BC 的 P 值小于0.01,说明pH与液料体积质量比的相互影响、时间与液料体积质量比的相互影响都极为显著。 B 的 P 值小于0.05,大于0.01,说明时间的影响显著。 AB 的 P 值大于0.05,说明pH与时间的相互影响较小。一次项中各因素对山药粘液质

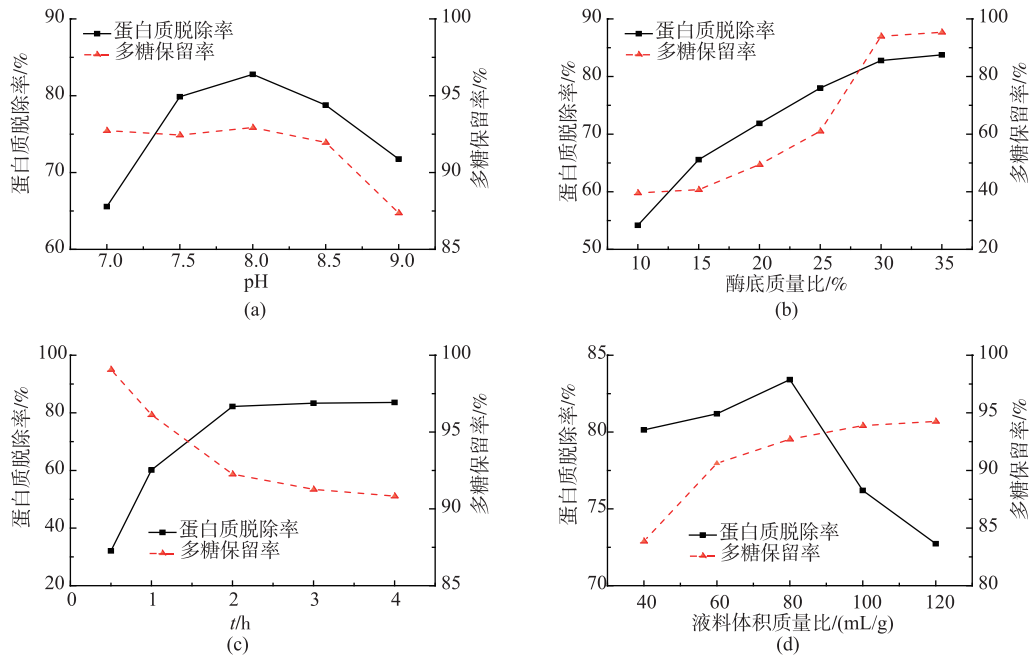


图 3 pH、酶底质量比、时间和液料体积质量比对蛋白质脱除率和多糖保留率的影响

Fig. 3 Effects of pH, E/S ratio, time and liquid-to-solid ratio on protein removal rate and the polysaccharide retention time

表 1 因素水平表

Table 1 Factor level table

水平编码	因素		
	A	B/h	C/(mL/g)
-1	7.5	45	60
0	8.0	50	80
1	8.5	55	100

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface experimental design and the result

标准号	试验号	pH	时间/h	料液质量体积比/(mL/g)	蛋白质脱除率/%	多糖保留率/%	综合评分(Y)
8	1	8.5	2.0	100	69.9	95.2	91.9
14	2	8.0	2.0	80	81.5	92.7	97.5
12	3	8.0	3.0	100	77.0	93.1	95.1
3	4	7.5	3.0	80	68.0	90.4	88.2
1	5	7.5	1.0	80	62.9	92.4	86.2
13	6	8.0	2.0	80	82.3	92.1	97.7
17	7	8.0	2.0	80	81.6	92.7	97.6
11	8	8.0	1.0	100	69.7	95.1	91.7
15	9	8.0	2.0	80	82.3	92.6	97.9
9	10	8.0	1.0	60	66.3	95.1	89.7
5	11	7.5	2.0	60	56.1	94.1	83.0
7	12	7.5	2.0	100	68.0	94.3	90.2
16	13	8.0	2.0	80	82.3	92.6	98.0
4	14	8.5	3.0	80	76.5	91.2	93.8
6	15	8.5	2.0	60	74.8	94.3	94.3
2	16	8.5	1.0	80	73.1	95.4	93.9
10	17	8.0	3.0	60	66.3	93.1	88.6

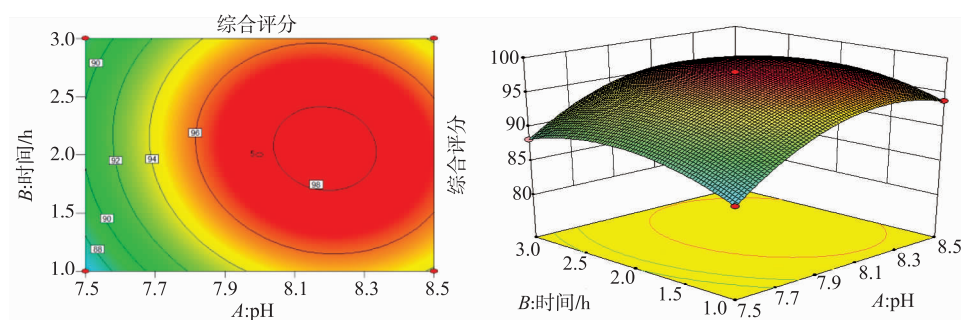


图4 pH 和时间对综合评分交互作用的等高图和响应面图

Fig. 4 Contour plots and response surface showing the effect of pH and time on the comprehensive score

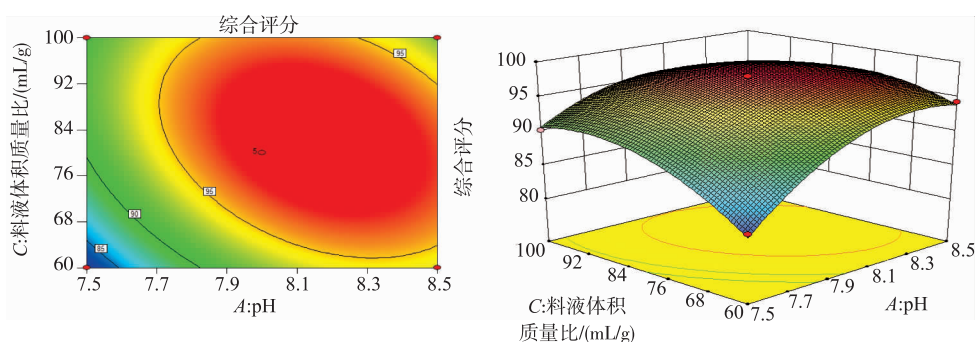


图5 pH 和液料体积质量比对综合评分交互作用的等高图和响应面图

Fig. 5 Contour plots and response surface showing the effect of pH and liquid-to-solid ratio on the comprehensive score

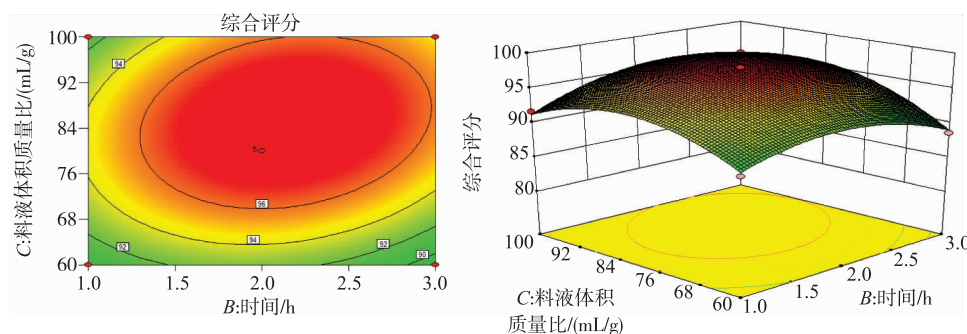


图6 时间和液料体积质量比对综合评分交互作用的等高图和响应面图

Fig. 6 Contour plots and response surface showing the effect of time and liquid-to-solid ratio on the comprehensive score

酶解影响显著性大小顺序是:pH>液料体积质量比>时间。通过响应面优化得出最佳酶解条件为 pH=8.0, 时间 2.0 h, 液料体积质量比 80 mL/g, 酶底质量比 30%, 温度 37℃; 该条件下的蛋白质脱除率为 83.4%, 多糖保留率为 92.7%。

2.5 抗氧化活性的测定

由图 7 可知, 山药粘液质多糖对 DPPH 自由基清除能力较强, 其 IC_{50} 值为 1.10 mg/mL, 当质量浓度达到 2.5 mg/mL 时, 清除率达到 80.9%; 山药粘液质多糖清除过氧化氢的能力较强, 其 IC_{50} 值为 0.24 mg/mL, 当质量浓度达到 1.0 mg/mL 时, 清除率达到

87.0%; 山药粘液质多糖清除 OH 自由基的能力较弱, 当其质量浓度达到 8.0 mg/mL 时, 其 OH 自由基的清除率曲线逐渐趋于平缓, 此时的 OH 自由基清除率只有 32.5%。

2.6 保湿性研究

2.6.1 吸湿率 如图 8 (a) 所示, 当相对湿度为 43%, 开始时透明质酸钠的吸湿率略高于山药粘液质多糖, 当时间大于 48 h, 山药粘液质多糖的吸湿率略高于透明质酸钠; 如图 8(b) 所示, 当相对湿度为 81% 时, 山药粘液质多糖的吸湿率略高于透明质酸钠的吸湿率。

表 3 响应面设计回归方程的方差分析

Table 3 ANOVA analysis of the fitted quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
模型	326.04	9	36.23	132.88	< 0.000 1	**
<i>A</i> -pH	85.56	1	85.56	313.83	< 0.000 1	**
<i>B</i> -时间	2.18	1	2.18	8.00	0.025 4	*
<i>C</i> -液料体积质量比	21.76	1	21.76	79.80	< 0.000 1	**
<i>AB</i>	1.13	1	1.13	4.13	0.081 7	
<i>AC</i>	23.44	1	23.44	85.97	< 0.000 1	**
<i>BC</i>	4.80	1	4.80	17.62	0.004 0	**
<i>A</i> ²	78.92	1	78.92	289.47	< 0.000 1	**
<i>B</i> ²	35.78	1	35.78	131.26	< 0.000 1	**
<i>C</i> ²	53.41	1	53.41	195.92	< 0.000 1	**
残差	1.91	7	0.27			
失拟项	1.75	3	0.58	14.97	0.012 2	*
纯误差	0.16	4	0.039			
总和	327.95	16				

注:“*”为显著($p<0.05$),“**”为极为显著($p<0.01$)

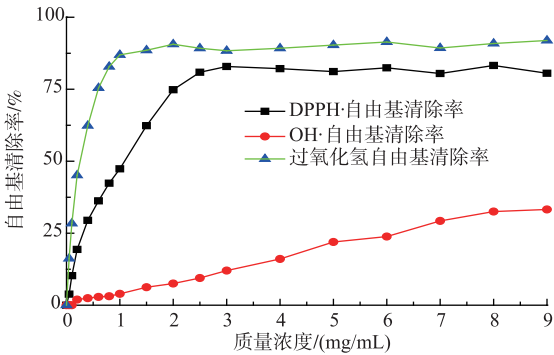


图 7 山药粘液质多糖 DPPH 自由基、OH 自由基和 H₂O₂ 清除能力

Fig. 7 DPPH radical, OH radical and H₂O₂ radical scavenging capacities of yam mucilage polysaccharide

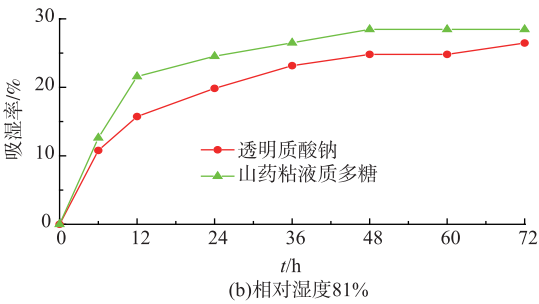
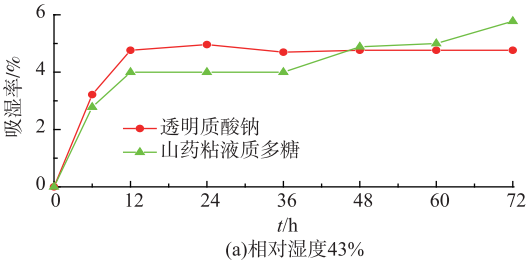


图 8 相对湿度为 43% 和 81% 时吸湿率与时间的关系

Fig. 8 Moisture absorption rate with time at 43% and 81% relative humidity

2.6.2 保湿率 当相对湿度为 43% 时, 山药粘液质多糖和透明质酸钠的保湿率相近; 当相对湿度为 81% 时, 山药粘液质多糖的保湿率略高于透明质酸钠。

3 结 语

响应面法优化山药粘液质多糖脱蛋白工艺结果表明, 最佳脱蛋白工艺为 pH 8.0, 时间 2.0 h, 液料体积质量比 80 mL/g, 酶底质量比 30%, 温度 37 ℃;

该条件下的蛋白质脱除率为 83.4%，多糖保留率为 92.7%。研究表明，山药粘液质多糖具有抗氧化活性，其对 DPPH 自由基和过氧化氢的清除率均可达到 80%以上，对 OH 自由基的清除能力较弱。当相对湿度为 43%时，透明质酸钠和山药粘液质多糖的吸

湿率和保湿率接近，当相对湿度为 81%时，山药粘液质多糖的吸湿率和保湿率均略高于透明质酸钠，山药粘液质多糖的综合保湿性能略优于透明质酸钠。因此，将山药粘液质多糖应用于化妆品中，可以得到比透明质酸钠保湿性更好的产品。

参考文献：

- [1] LIU Hangda,MA Qiansu,WANG Jie,et al. Optimization of extraction conditions and investigation of antioxidant activity of polysaccharides from purple yam[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2015,36(23):208-213.(in Chinese)
- [2] TAKESHI N,NOBUTAKA S,NORIHISA K,et al. Functional properties of autolysate and enzymatic hydrolysates from yam tsukuneimo tuber mucilage tororo;antioxidative activity and antihypertensive activity [J]. **Journal of Food Science and Technology**,2014,51(12):3838-3845.
- [3] YANG Liu. Research progress of bioactive of Chinese yam polysaccharides [J]. **Agricultural Science & Technology and Equipment**,2015(11):43-44.(in Chinese)
- [4] FU Ziqin,CAI Baochang,BIAN Changxia,et al. Comparison of the effect of polysaccharides from crude and processed rhizoma dioscoreae on gastro in testinal function in mice of splenic a stheni [J]. **Pharmaceutical and Clinical Research**,2008,16(3):181-183.(in Chinese)
- [5] SHANG H F,ZHENG H C,LIANG H R,et al. Immunostimulatory activities of yam tuber mucilages [J]. **Botanical Studies**,2007,48(1):63-70.
- [6] CHEN Yan. Pharmacological effects and product development of Yam [J]. **Food and Fermentation Technology**,2015,51(1):60-62,69.(in Chinese)
- [7] WANG Hongxin,WANG Yuanhui. Investigative progress of Chinese yam (Rhizoma dioscorea) polysaccharide [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(3):321-327.(in Chinese)
- [8] JIN Rui,CHENG Yinxiang,HAN Fengmei,et al. The effects of rhizoma dioscoreae polysaccharide on hyperglycemia, hyperlipemia and oxidative stress in type I diabetic rats [J]. **Journal of Hubei University (Natural Science)**,2016,38(4):298-302.(in Chinese)
- [9] SHI Yixin,YU Lian,ZHAI Meifang,et al. Effect of nano Chinese yam polysaccharide on 4 kinds of tumor cells [J]. **Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy**,2016,33(8):967-971.(in Chinese)
- [10] LI Pei. Study on inhibition kinetics of polysaccharide from yam on α -glucosidase[J]. **Food & Machinery**,2016,32(7):14-17.(in Chinese)
- [11] YANG Bin,YANG Ying,WANG Xuefei,et al. Optimization of deproteinized process from echinops latifolius tausch polysaccharide by response surface methodology [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2016,35 (10):287-291.(in Chinese)
- [12] WAN Ping,ZHANG Yu,YANG Lan,et al. Optimization of main fermentation technology for buckwheat dry rice wine by response surface method[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(11):1185-1191.(in Chinese)
- [13] CONCEPCION SM,JOSE AL,FULGENCIO SC. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols [J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,1998,76(2):270-276.
- [14] LU F C,WEI L P,ALI A,et al. Rapid syntheses of dehydridiferulates via biomimetic radical coupling reactions of ethyl ferulate [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2013,60(34):8272-8277.
- [15] CHENG Y K,LI L,MENG Z K,et al. Component analysis and free radicals scavenging activity of *Physalis alkekengi* L. polysaccharide[J]. **Chemical Research in Chinese Universities**,2008,24(2):167-170.
- [16] WANG Xiaoyu,DU Guorong,LI Hua,et al. Progress of analytical methods for antioxidant capacity in vitro [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(3):247-252.(in Chinese)