

响应面法优化柿子多糖脱蛋白质工艺研究

王 辉, 句荣辉, 王 丽, 朱建晨

(北京农业职业学院, 北京 102442)

【摘 要】以柿子为原料,经超声波辅助提取多糖后醇沉,采用木瓜蛋白酶提取柿子多糖并除去多糖中的蛋白质,通过对酶解温度、时间、加酶量进行单因素试验,以蛋白质脱除率和多糖保留率为指标,依据 Box-Behnken 试验设计原理,进行提取条件的响应面优化。结果表明,柿子多糖脱蛋白质的最优工艺参数为:酶解温度 45℃、酶解时间 3 h、酶添加量 2%,在此工艺条件下,多糖保留率为 89.73%,蛋白质脱除率为 30.33%。

【关键词】脱蛋白质;多糖;柿子;木瓜蛋白酶法;响应面

【中图分类号】TS255.36

【文献标识码】A

【文章编号】1671-7252(2021)05-0077-07

0 前言

柿子隶属柿科(Ebenaceae),是我国五大水果(柿子、葡萄、柑桔、香蕉、苹果)之一,具有较为广泛的产地,在我国山东、江苏、河北等地均有产出,功效有润肺、解毒等。其柿皮中含类胡萝卜素、维生素 C 等多种微量元素以及大量的多糖。在最近的研究当中,人们开始发掘柿子的保健价值,充分发挥其药用功效。

在植物界当中,多糖属于一种天然成分,有良好的抗氧化功效,能够有效提高人体的免疫力,进而起到抗肿瘤的效果。在实际研究中,我们发现柿子具有较高含量的多糖,通过传统的水提法对其进行多糖提炼有较大缺陷,得到的粗多糖纯度不够理想,不利于多糖的功效发

挥。如何去除蛋白质,是对多糖提纯的重要步骤,也是制备多糖相关纯品的关键环节^[1]。

经过反复的试验验证发现,木瓜蛋白酶能够起到良好纯化效果,同时能更好地将柿子中的多糖保存下来^[2]。在本文的试验中,采用了响应面对上述除杂方法进行优化,不仅有效提高了蛋白质脱除率,还可以对多糖相关的食品进行开发,提高柿子的利用率,并打下良好的试验基础^[3-4]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 原材料

柿子果实购买于北京市房山区青龙镇地区。

【基金项目】特色高水平院校建设项目—打造技术创新平台—食品营养与安全应用技术协同创新中心(PXM2021-157102-000005)

【收稿日期】2021-08-05

【作者简介】王辉(1982—),男,山东曹县人,北京农业职业学院食品与生物工程系副教授,硕士。研究方向:食品加工与营养检测。

1.1.2 试验试剂

本次试验使用到的试剂均是纯化学试剂, 包括浓硫酸、乙醇等在内; 水则采用了二级蒸

馏水。

1.2 仪器与设备

具体情况见表 1。

表 1 实验主要仪器与设备

仪器与设备名称	型 号	出 产 厂 家
智能超声波清洗仪	DL-360B	上海之信仪器有限公司
数显恒温水浴锅	HH-4	江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司
紫外分光光度计	T6 新世纪	北京普析通用仪器有限责任公司
涡旋振荡仪	QL-866	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
高速离心机	HC-3018	安徽中科中佳科学仪器有限公司
分析天平	FA-1104N	上海菁海仪器有限公司

1.3 试验方法

1.3.1 柿子多糖提取工艺

柿子洗净、去皮、去籽→烘干 (65℃, 48 h) →粉碎、过筛 (65 目 =0.25 mg) →称重→固液比 (1:10) →无水乙醇 (20 mL) →振荡、混匀→超声辅助热水浸提 (80℃, 1 h) →离心 (4 000 r/min, 10 min) →取除液体→醇沉 (80% 乙醇 10 mL, 24 h) →离心→水溶液、定容 (100 mL) →粗多糖溶液→酶解 (单因素及多因素) →灭酶→离心 (4 000 r/min, 10 min) →对多糖及蛋白质进行测定。

1.3.2 多糖含量的测定

根据所得数据对曲线进行绘制, 挑选充分干燥后的柿子 0.01 g, 放置到容器中, 定容到 100 mL, 从而制备出试验所需的葡萄糖溶液, 溶液的浓度为 0.1 mg/mL。吸取 5 组不同剂量的葡萄糖标准溶液放入试管当中, 分别为 0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL, 通过加入蒸馏水进行补充, 让各组溶液补充至 1.0 mL, 然后加入 1 mL 的 5% 苯酚, 之后快速将 5 mL 的浓硫酸加入到各组溶液当中, 随后放置 10 min, 再进行 1 min 的搅拌操作, 均匀后置入水浴锅 20 min, 水浴锅温度控制在 30℃, 然后在 490 nm 处进行吸光度的测量^[5]。得到回归方程为:

$$Y=17.013X-0.0811 \quad (R^2=0.99) \quad (1)$$

1.3.3 蛋白质含量的测定

绘制标准曲线: 吸取牛血清白蛋白标准溶液, 溶液浓度为 0.1 mg/mL, 吸取的溶液量分别是 0、0.03 mL、0.06 mL、0.12 mL、0.24 mL、0.48 mL、

0.72 mL、0.84 mL、0.96 mL, 依次置于 9 组比色管中, 然后向各组管中补充去离子水到 1 mL, 并进行摇匀操作。然后准备考马斯亮蓝溶液, 向每组试管倒入 5 mL, 摇匀后放置 2 min, 在 595 nm 波长处进行吸光度的测定^[6]。得到回归方程为:

$$Y=4.8133X+0.004 \quad (R^2=0.9912) \quad (2)$$

1.3.4 计算方法

1.3.4.1 多糖含量的测定

按苯酚—硫酸法测定多糖含量。

$$X_1 = \frac{A_t}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

在式 (3) 中, X_1 为糖的保留率; A_0 与 A_t 分别是脱蛋白质前后的多糖含量, 两者单位均为 g/100 g。

1.3.4.2 蛋白质含量的测定

按考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

$$X_2 = \frac{A_t - A_0}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

在式 (4) 中, A_0 与 A_t 分别是脱蛋白质前后的多糖含量, 两者单位均为 g/100 g; X_2 为蛋白质脱除率。

1.3.5 脱蛋白质单因素试验

木瓜蛋白酶法脱蛋白质单因素试验为: 酶解温度分成 4 个, 分别是 40℃、50℃、55℃和 60℃, 酶用量分成 6 组, 分别是 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 和 3%, 酶解时间为 6 组, 分别是 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h 和 3 h, 同时以多糖保留率作为指标, 探究各因素对柿子粉多糖

保留率蛋白质和蛋脱除率的影响。

1.3.6 响应面优化试验

在完成单因素试验之后, 将各个因素设定为自变量, 按照 Box-Behnken 设计原理, 利用 Design-Expert V 8.0 对试验进行设计。其中, 响应值设定为蛋白脱除率与多糖保留率, 然后对其进行全面的试验和分析, 得出的试验因素和水平如表 2 所示。

表 2 木瓜蛋白酶脱蛋白质试验因素与水平

水平	因素		
	X ₁ (加酶量 /%)	X ₂ (温度 /℃)	X ₃ (时间 /h)
-1	1.5	45	2.0
0	2.0	50	2.5
1	2.5	55	3.0

2 结果与分析

2.1 酶解单因素对蛋白质脱除率的影响

2.1.1 酶用量对蛋白质脱除率的影响

将温度控制在 45℃, 试验的时长为 2 h, 根据用量的不同, 将木瓜蛋白酶共分为 6 组, 分别是 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 和 3%, 在这个条件下对酶用量的造成影响进行分析, 结果如图 1 所示。

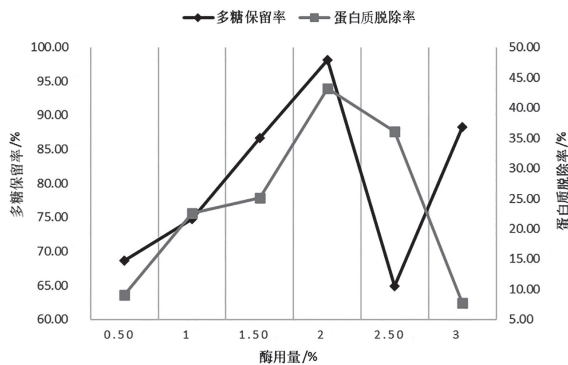


图 1 木瓜蛋白酶用量对多糖保留率和蛋白质脱除率的影响

由图 1 可见, 酶的添加量越多, 多糖保留率在一定范围内会逐渐上升, 并在 2% 呈现出最大值, 但酶用量超过 2% 后, 则出现下降趋势。这是由于酶浓度超过一定值后, 底物与酶产生更多的接触机会, 使蛋白质脱除的效率得到增强。部分多糖会产生水解作用, 蛋白质的

脱除率慢慢提高之后, 多糖也会出现部分的损失, 损失量有限^[7]。当酶添加量达到 2% 时, 蛋白质脱除率比较高, 达到了 98.11%, 而在 2.5% 时多糖保留率会降到最低。这是由于该用量条件下, 导致多糖产生大量水解而致。在用量达到 3% 时, 蛋白质脱除率则最小, 而多糖保留率不断提高, 这是由于酶已将蛋白质脱除完成, 留存的酶进一步发挥催化作用, 并将柿子粉中的多糖继续溶出, 造成多糖保留率增高。因此, 选取 2% 为最佳的酶用量。

2.1.2 酶解温度对蛋白质脱除率的影响

保持酶用量为 2% 不变, 处理时间为 2 h, 酶解温度分为 5 组, 分别是 40℃、45℃、50℃、55℃和 60℃, 对不同温度条件下多糖的保留率进行分析, 结果如图 2 所示。40℃~50℃, 温度越高, 多糖保留率也越高, 在 50℃时, 多糖保留率最为理想, 达到了 89.81%, 同时蛋白质脱除率提高。在该温度区间内, 酶的活性得到激活, 温度越高, 其活性越强, 反应速度得到提高。但酶解温度超过 50℃之后, 温度越高, 多糖保留率越低, 蛋白质脱除率下降。这是由于超过酶的最适温度后, 酶出现失活的现象, 使得多糖保留率和蛋白质脱除率均下降, 不符合试验目的, 所以本试验中 50℃是最合适的温度。

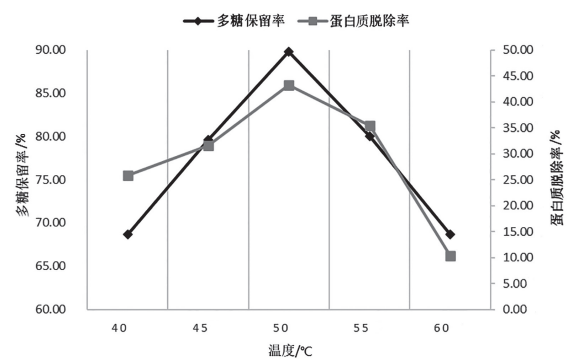


图 2 酶解温度对多糖保留率和蛋白质脱除率的影响

2.1.3 酶解时间对蛋白质脱除率的影响

控制酶解温度为 50℃, 用量固定为 2%, 将酶解时间设为变量, 共分为 6 组, 分别是 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h 和 3 h, 通过试验分析时间对多糖保留率的影响, 见图 3。

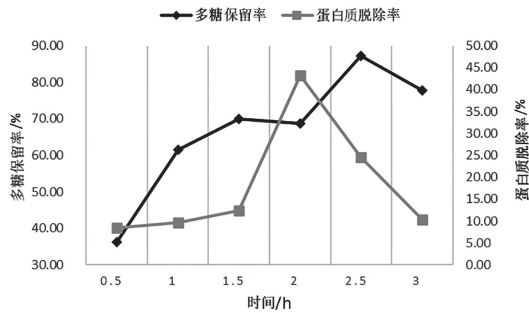


图 3 酶解时间对多糖保留率和蛋白质脱除率的影响

由图 3 可见, 0.5 h ~ 1.5 h, 随时间延长, 多糖保留率呈现提升的状态, 蛋白质脱除率也增多。这是由于底物和酶的接触机会得到增多, 而脱除率在下降。同时, 部分多糖产生水解。在时间达到 2 h 的时候, 蛋白质脱除率达到 43.22%。这是因为酶充分活化使蛋白质除去, 同时使多糖发生水解, 造成多糖的损失^[8]。当时间为 2.5 h 时, 多糖保留率达到最大值 (87.17%), 蛋白质脱除率下降。这是因为柿子粉中蛋白质脱除干净, 酶与底物反应将多糖提取出来, 因此选取 2.5 h 为最佳的酶解时间。

2.2 响应面优化酶法提取条件

2.2.1 模型建立与显著性检验

根据各个单因素对试验进行分析, 本试验共有 3 个因素, 分别是加酶量、温度与时间, 定义为 X_1 、 X_2 、与 X_3 。并设定两个指标, 分别是多糖保留率与蛋白质脱除率, 定义为 Y_1 、 Y_2 。通过三因素三水平的试验, 得出的方案和结果如表 3 所示。

表 3 Box-Behnken 设计方案及结果

试验号	X_1	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	0	0	0	58.48	37.07
2	-1	0	-1	55.37	53.93
3	1	1	0	53.12	52.25
4	0	0	0	65.85	38.76
5	0	0	0	81.47	28.65
6	0	1	-1	58.93	38.22
7	0	0	0	57.81	34.27
8	1	0	-1	52.45	50.56
9	0	-1	-1	88.62	53.37
10	0	-1	1	89.73	30.33
11	-1	-1	0	60.27	46.63
12	-1	0	1	50.45	39.89
13	0	0	0	54.36	47.75
14	-1	1	0	54.02	49.43
15	0	1	1	93.33	34.27
16	1	0	1	62.95	30.34
17	1	-1	0	56.47	43.82

通过 Design-Expert V 8.0 对数据进行处理, 完成模型的建立, 并得到各个单因素的回归方程:

多糖保留率:

$$Y_1 = 63.59 + 0.61X_1 - 4.46X_2 + 5.14X_3 + 0.72X_1X_2 + 3.86X_1X_3 + 8.32X_2X_3 - 17.49X_1^2 + 9.86X_2^2 + 9.20X_3^2 \quad (5)$$

蛋白质脱除率:

$$Y_2 = 37.30 - 1.61X_1 + 2.500E-003X_2 - 7.66X_3 + 1.41X_1X_2 - 1.55X_1X_3 + 4.77X_2X_3 + 7.68X_1^2 + 3.05X_2^2 - 1.30X_3^2 \quad (6)$$

通过多糖保留率回归方程模型进行方差分析, 见表 4。

表 4 多糖保留率回归方程模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2662.78	9	295.86	3.23	0.0681	
X_1	2.98	1	2.98	0.033	0.8620	
X_2	159.22	1	159.22	1.74	0.2288	
X_3	211.05	1	211.05	2.30	0.1728	
X_1X_2	2.10	1	2.10	0.023	0.8838	
X_1X_3	59.44	1	59.44	0.65	0.4469	
X_2X_3	277.06	1	277.06	3.03	0.1255	
X_1^2	1287.37	1	1287.37	14.06	0.0072	差异性显著
X_2^2	409.49	1	409.49	4.47	0.0723	
X_3^2	356.13	1	356.13	3.89	0.0892	
残差	640.97	7	91.57			
失拟项	171.46	3	57.15	0.49	0.7096	不显著
纯误差	469.52	4	117.38			
总离项	3303.75	16				
R^2	0.8060					

注: 差异显著 ($p < 0.05$); 差异极显著 ($p < 0.01$)。

由表 4 可见, 失拟项 P 为 0.7096, 超过了 0.05, 说明该模型的拟合度较好, 差异不显著, 出现的残差可能是小概率的时间。由方差分析可知, 校正决定系数 $R^2=0.8060$, 这表明模型具有较高的解释力度, 能对 80.06% 响应值产生的变化做出解释^[9]。在所选取的各因素水平

范围内, 通过对 F 值的观察, 对因素的影响主次进行排序, 得出结果为 $X_3 > X_2 > X_1$ 。在交互作用的比较上, 主次顺序为: $X_2X_3 > X_1X_2 > X_1X_3$ 。

通过蛋白质脱除率回归方程模型进行方差分析, 见表 5。

表 5 蛋白质脱除率回归方程模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	899.36	9	99.93	2.45	0.1256	
X_1	20.83	1	20.83	0.51	0.4982	
X_2	5.000E-005	1	5.000E-005	1.224E-0006	0.9991	
X_3	468.95	1	468.95	11.48	0.0116	
X_1X_2	7.92	1	7.92	0.19	0.6728	
X_1X_3	9.55	1	9.55	0.23	0.6435	
X_2X_3	91.11	1	91.11	2.23	0.1789	
X_1^2	248.51	1	248.51	6.09	0.0430	差异显著
X_2^2	39.17	1	39.17	0.96	0.3600	
X_3^2	7.14	1	7.14	0.17	0.3883	
残差	285.84	7	40.83			
失拟项	90.45	3	30.15	0.62	0.6395	不显著
纯误差	195.39	4	48.85			
总离项	1185.20	16				
R^2	0.7588					

注: 差异显著 ($p < 0.05$); 差异极显著 ($p < 0.01$)。

由表 5 可见, $P > 0.05$, 表明该模型具有较好的拟合度, 出现的残差属于随机误差^[10]。通过对其进行方差分析可得 $R^2=0.7588$, 这表明 75.88% 响应值的变化都可以得到很好的解释。通过对 F 值的对比, 可以了解各因素的影响次序, 分别是 $X_2 > X_1 > X_3$ 。对各个因素交互作用的主次顺序进行分析, 得出结果为: $X_2X_3 > X_1X_3 > X_1X_2$ 。

2.2.2 响应面分析

依据回归方程对响应曲面图进行绘制, 对其形状进行检验考察, 对各个因素的影响及交互效应进行分析, 见图 4—图 9。

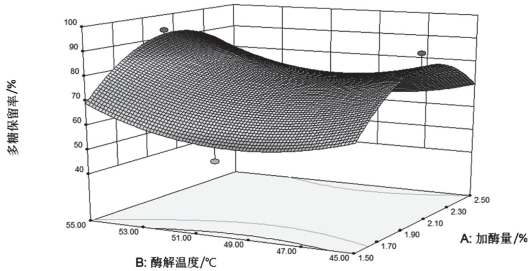


图 4 加酶量与酶解温度交互作用对多糖保留率影响的响应面

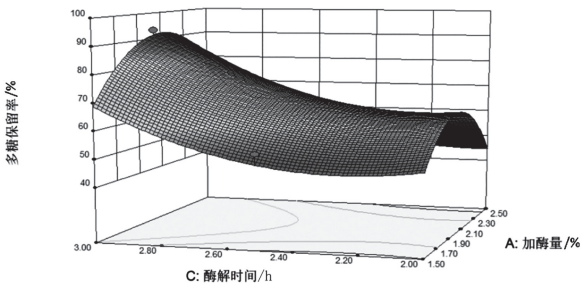


图 5 加酶量与酶解时间交互作用对多糖保留率影响的响应面

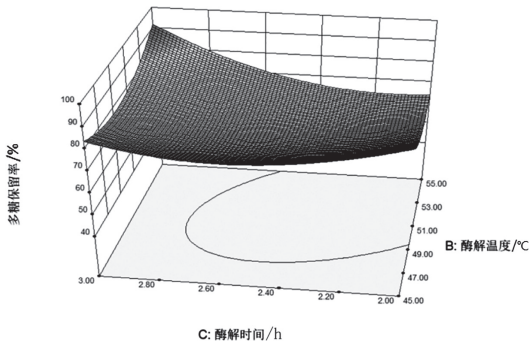


图 6 酶解温度与酶解时间交互作用对多糖保留率影响的响应面

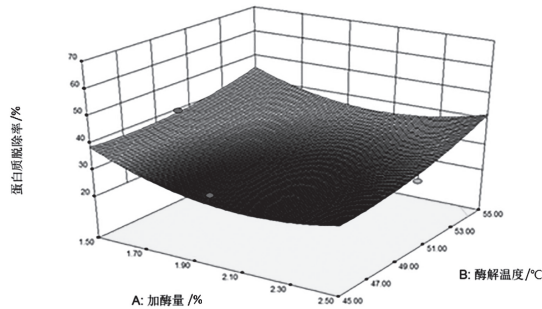


图 7 加酶量与酶解温度交互作用对蛋白质脱除率影响的响应面

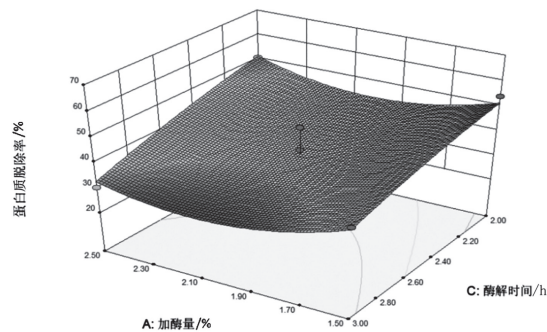


图 8 加酶量与酶解时间交互作用对蛋白质脱除率影响的响应面

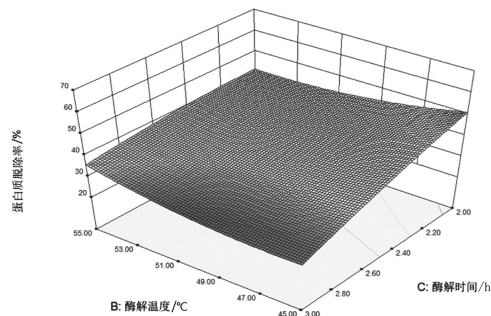


图 9 酶解时间与酶解温度交互作用对蛋白质脱除率影响的响应面

从图 4—图 9 可以了解到任意两个因素的编码处于零水平状态时其他变量对多糖保留率及蛋白质脱除率的影响。其中, 图 5 具有最为陡峭的曲面, 对保留率而言, 时间与加酶量有最强的交互性, 而图 7、图 9 的坡度比较缓慢, 说明对多糖保留率和蛋白质脱除率而言, 温度与加酶量有不错的交互性, 对于蛋白质脱除率来说, 时间与加酶量有较强的交互性, 所得的分析结果与方差分析吻合^[11]。

经过上述分析, 并结合软件处理所得的数

据, 其中可获得最佳工艺参数为: 加酶量 2.0%, 酶解温度 50℃, 酶解时间 2.5 h, 与实际测量值有所偏差。实际测量得到最佳解温度 45℃, 酶解时间为 3 h, 加酶量 2.0%, 此时多糖保留率最佳, 为 89.73%, 而蛋白质脱除率也较为理想, 达到了 30.33%, 脱蛋白质工艺条件重复性好。本次试验蛋白质脱除率较低, 多糖保留率较高, 可能与酶法脱蛋白质数较少有关, 可以通过正交试验或其他方法继续探究对综合指数的影响。

3 结论

柿子具有较高的多糖含量, 其中 1% ~ 10% 成分为蔗糖等, 其余则是果糖与葡萄糖。以葡萄糖含量为最高, 果糖次之。糖的甜度, 如以蔗糖为 100, 则果糖为 148, 葡萄糖为 70。本试验以柿子多糖保留率作为主要分析指标, 并将蛋白质脱除率定位为次要分析指标进行了多糖脱蛋白工艺研究。

本试验采用了单因素的试验方法, 在此基础上结合软件进行方案设计和数据处理, 通过二次回归分析, 得到本次试验的最佳条件^[12]。试验对加酶量、温度与时间进行综合分析, 建立相互之间的回归模型, 通过分析得出, 该模型可靠性较高, 能够将蛋白质脱除率较为准确地预测出来。最优的试验条件为: 时间 3 h, 温度 45℃, 加酶量 2.0%。该方法具有很好的操作性和可行性, 处理后的多糖溶液仍然残留部分蛋白质, 无法完全去除, 这可能是由于一些蛋白质和多糖形成了糖复合物, 完成脱蛋白质处理后, 多糖结构还有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] 李雪梅. 海湾扇贝多糖的纯化、分离及抗肿瘤活性研究 [J]. 中国食品学报, 2016 (7):121-127.
- [2] 王雪飞. 响应面法优化黄柏花粉多糖的脱蛋白工艺及其抗氧化活性 [J]. 食品工业, 2018 (4):7-11.
- [3] 谢玲, 郑林希, 夏志兰, 等. 木瓜蛋白酶法与超滤膜法提取柿子多糖最佳条件的筛选 [J]. 果树学报, 2017, 34(01):106-114.
- [4] 林翔凯. 紫薯多糖脱蛋白工艺的研究 [J]. 热带作

物学报, 2014 (2):381–386.

[5] SN/T 4620–2015, 出口植物源食品中组多糖的测定苯酚—硫酸法 [S].

[6] SN/T 3926–2014, 出口乳、蛋、豆类食品中蛋白质含量的测定—卡马斯亮蓝法 [S].

[7] Yang R, Meng D, Song Y, et al. Simultaneous decoloration and deproteinization of crude polysaccharide from pumpkin residues by cross-linked polystyrene macroporous resin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012 (60):8450–8456.

[8] 彭友舜. 芦笋粗多糖蛋白质脱除工艺研究 [J]. 食

品工业科技, 2013(20):312–314.

[9] 徐丹鸿. 酶-Sevag 法除酸浆果实多糖蛋白工艺的研究 [J]. 安徽农业科学, 2016 (4):113–115.

[10] 秦国正. 响应面法优化黑根霉胞外多糖脱蛋白工艺研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2017(10):1773–1778.

[11] 臧玉红. 响应面法优化三氯乙酸脱除滑子菇粗多糖蛋白质的工艺 [J]. 食品工业科技, 2014(16):243–247.

[12] 方婷. 猪肚菇粗多糖脱蛋白脱色工艺优化研究 [J]. 热带作物学报, 2015(6):1166–1172.

(责任编辑 宋晓华)

Optimization of Deproteinization of Persimmon Polysaccharides by Response Surface Methodology

WANG Hui, JU Rong-hui, WANG Li, ZHU Jian-chen

(Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China)

Abstract: Using persimmon as raw material, the polysaccharide was extracted with the aid of hypergrowth and alcohol precipitation was achieved. The persimmon polysaccharide was extracted by papain and the protein in the polysaccharide was removed. The response surface optimization of the extraction conditions was carried out by single factor experiment of enzymic hydrolysis temperature, time and amount of enzyme. The protein exfoliation rate and polysaccharide retention rate were used as indexes, according to the Box-Behnken experimental design principle. The results showed that the optimum process parameters of papain were: hydrolysis temperature 45°C, hydrolysis time 3 h, adding enzyme amount 2%. Under these conditions, the polysaccharide retention rate was 89.73%, and the protein removal rate was 30.33%.

Keywords: deproteinization; polysaccharides; persimmon; papaya; response surface