

果是由于构象发生改变造成的, 则该溶液的旋光度必然发生改变。通过测定 Pull 溶液在不同浓度的金属离子存在下的旋光度(图 7), 发现其旋光度变化很小, 而且所有金属离子对 Pull 粘度的影响趋势大体于图 7 相同。说明 Pull 溶液粘度的改变不是由于构象的改变造成的。

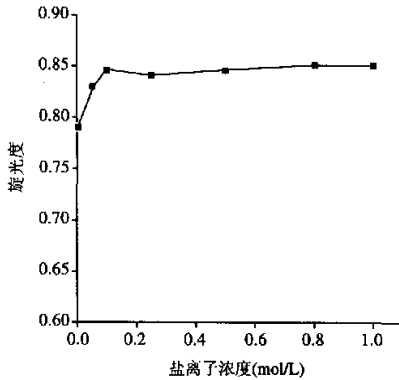


图 7 盐浓度对 Pull 溶液的旋光度的影响

利用凝胶渗透色谱法(GPC)测定 Pull 溶液在各种金属离子存在下的数均分子量, 结果如表 1 所示。由表 1 可以看出所有的金属离子都会导致 Pull 的数均分子量加大, 但不同金属离子对 Pull 分子量增加的影响程度有所差异, 其中 Mg^{2+} 的影响最大, 依次是 Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , 影响最小的是 Na^+ 。各种金属离子对普鲁兰分子量增加的影响程度(表 1)与对溶液比浓粘度增加的影响(图 6)完全相同。即 $Mg^{2+} > Cu^{2+} > Fe^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+} > Na^+$, 说明溶液粘度的增加是由于金属离子导致 Pull 分子量的加大造成的。由于多糖分子中存在大量的羟基, 因此可与某些金属离子发生络合作用(协同结合 cooperation binding), 使多糖链间

表 1 金属离子对 Pull 数均分子量的影响

离子种类	Mg^{2+}	Cu^{2+}	Fe^{2+}	Ca^{2+}	Mn^{2+}	Na^+	无离子
数均分子量	108100	87500	82700	81400	79500	72500	68400

结合若干个金属离子, 形成蛋-箱结构^[9], 而导致 Pull 分子量加大, 溶液粘度增加。

上述结果可以看出, 当用 Pull 作食品添加剂或作喷雾涂层时, 不必考虑食盐对其粘度的影响, 而其他的金属离子对 Pull 溶液粘度的影响是很大的, 应尽量避免。

参考文献:

- [1] 丘宏伟.短梗霉多糖发酵过程特征的研究[J].生物工程学报.1990,6(4):332-337.
- [2] Finkelman et al.Enhancement of pullulan elaboration by fluoroacetate[J].Biotechnol lett,1982,4(6):393-396.
- [3] Mcnecl B et al.Influence of impeller speed upon the pullulan fermentation[J].Biotechnol Lett,1987,9(2):101-104.
- [4] Catley B J.Pullulans elaboration and inducible system of A. Pullulans[J].FEBS Lett,1972,20(2):174-176.
- [5] Nogusa H et al.Synthesis of Carboxy-methylpullulan-peptide-doxorubicin conjugates and their properties[J].Chem Pharm Bull,1995,43(11):1931-1936.
- [6] Yamaya S et al.Preparation of a diphtheria toxin-pullulan conjugate that elicits good IgG antibody production with poor IGE synthesis[J].Vaccine,1990,8(1):65-69.
- [7] 梁伯润.高分子物理学[M].北京:中国纺织出版社,2000.201-209.
- [8] Southwick J G.Dynamical studies of xanthan polysaccharide in water by photon correlation spectroscopy[J].Polym Prepr, 1981,22(1):143-145.
- [9] 吴东儒.糖类的生物化学[M].北京:高等教育出版社,1988. 582-586.

超声波对螺旋藻蛋白质酶解促进作用的试验研究

马海乐, 杨巧绒, 邝利兵
(江苏大学生物与环境工程学院, 镇江 212013)

摘要: 通过螺旋藻蛋白质的酶解技术, 可以改善螺旋藻的水溶性。为了提高螺旋藻蛋白质酶解的效率, 研究了超

收稿日期: 2003-01-12

基金项目: 本项目的其它内容已通过江苏省科技厅技术鉴定, 2001 年获江苏科技进步三等奖

作者简介: 马海乐, 男, 40 岁, 江苏大学(原江苏理工大学)教授, 博士, 从事食品科学与工程的研究工作。

声波技术对酶解过程的促进作用。在同样的试验因素与水平下,进行了对比正交优化试验,结果表明,未经超声波预处理,水解率为52.25%;在超声波处理时间为20min、底物浓度为3%、温度为40℃、pH值为10、恒温酶解为7h的条件下,经过超声波预处理,水解率可达67.05%,水解率提高近15个百分点。

关键词:螺旋藻;酶解;超声波

Abstract: The water solubility of spirulina platensis was improved by Spirulina platensis proteom enzymatic hydrolysis. For raising efficiency of Spirulina platensis protein enzymatic hdrolysis, promotion effect of ultrasonic on enzymatic hydrolysis was studied. Under same factors and levels the contrast orthogonal experiments were studied. Experimental results indicated that hydrolysis rate was 52.25% without ultrasonic pretreatment. Under the conditions as ultrasonic treatment time 20min, substrate consistence 3%, temperature 40℃, pH10 and enzymatic hydrolysis time 7h, hydrolysis rate was 67.05%. With ultrasonic pretreatment, the hydrolysis rate increased 15%.

Key words: Spirulina platensis; enzymatic hydrolysis; ultrasonic treatment

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)10-0035-03

螺旋藻具有极高的营养价值和良好的生理特性,是一种优秀的蛋白质资源,已经被广泛地应用于开发保健食品、食品添加剂^[1]。尽管与其它食品原料相比,螺旋藻较易被人体吸收,但其细胞壁的特殊结构仍然对人体的充分消化有一事实上的影响。另外螺旋藻的水溶性差,严重影响着其在饮料开发、螺旋藻啤酒制备中的应用。针对以上现象,我们曾通过酶解技术成功地解决了螺旋藻的水溶性差等问题,同时脱除了其腥味、提高了吸收效果^[2]。为了进一步探讨提高酶解率的途径,本文引入了超声波技术,目的通过超声波对螺旋藻液的预处理,击破螺旋藻的细胞壁和细胞质膜,让酶液与蛋白质充分接触,增大有效的作用面积,提高酶解率。

1 材料及仪器

1.1 材料

螺旋藻粉 购自镇江华生物工程有限公司;复合蛋白酶 购自无锡酶制剂厂,酶活力为10万单位/g; 0.05mol/L NaOH 标准溶液 化学纯; 20%的中性甲醇 化学纯。

1.2 仪器

恒温箱;离心机; pH S-2 型精密酸度计;磁力搅拌器; 碱式滴定管(25ml); H66005 型超声波发生器(功率为500W)。

2 实验方法

2.1 工艺流程

称取螺旋藻干粉→加水配液→超声波处理→酶解→离心分离(3000r/min, 3min)→取上清液→分析滴定
首先将螺旋藻干粉配成一定的水溶液,经超声波

预处理后,再加入适量的酶,并调整pH,然后放入恒温箱中进行恒温酶解。经过设定的酶解时间后,取出样品冷却,随后进行离心分离。取上清液并稀释,用电位滴定法测定氨基酸氮的含量,最后求得水解液中氨基酸的含量。

本次试验在其它条件不变的情况下做了纯酶液与2%酶液水解螺旋藻的对比试验,结果表明:纯酶液的效果优于2%酶液。这可能由于酶液在稀释的过程中,pH值导致酶的活性降低或丧失,影响了酶促水解的效果。故在本试验中水解酶液统一采用纯酶液,经换算每次使用0.5ml纯酶液。

原料的蛋白质总量用微量凯氏定氮法测定,原料和水解产物的氨基酸总量用电位滴定法测定。水解率用下式计算:

蛋白质的水解率=(水解液中氨基酸的含量-原料液中游离氨基酸的含量/原料液中蛋白质的含量)×100。

2.2 设计

本试验设计目的是为了找出经超声波预处理后螺旋藻酶促水解率最高的工艺参数。为了简化试验,本文以无超声波预处理时的最佳酶解参数为基础,研究超声处理时间对螺旋藻酶促水解率的影响。无超声波预处理时的最佳酶解参数为底物浓度为2%、酶解温度为50℃、pH值为11、酶解时间为5h,该条件下的酶解率为52.25%,这部分实验研究见文献[2]。其次,在优选出的最佳超声波处理时间条件下,采用四因素三水平的正交实验 $L_4(2^3)$,进一步对试验参数进行优化。四因素分别为底物浓度、酶解温度、pH值和酶解时间,其水平设计如表1所示,实验方案如表2所示。

3 结果与分析

表1 螺旋藻酶解试验的因素水平

水平	A 温度(°C)	B 底物浓度(%)	C pH 值	D 时间(h)
1	40	3	11	6
2	50	4	9	5
3	60	5	10	7

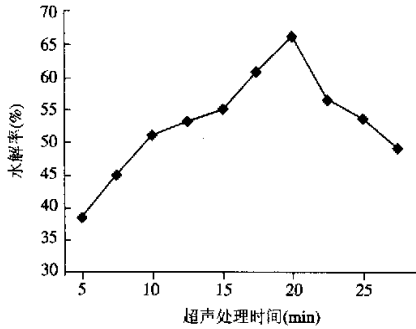


图1 超声波处理时间对水解率的影响

3.1 超声波处理时间的单因素实验

图1为超声波处理时间对水解率影响的影响曲线。图1表明,随着超声波处理时间的延长,曲线开始逐渐上升,在20min时达到最大值,此时的水解率为66.04%,随后逐渐降低。这是因为螺旋藻溶液在超声波处理过程中发生了一系列的变化:在5~10min时螺旋藻细胞壁被超声波击破,扩大了蛋白质与酶接触的面积,故在此阶段水解率逐渐增大的速率较快,在10~15min有所减缓;随着处理时间的延长,蛋白质的空间结构发生变化,埋藏在蛋白质内部的活性部位暴露出来,与酶发生作用,进一步扩大了与酶接触的机会,在15~20min时水解率进一步提高,到20min时达到最大;此后,随着处理时间的继续延长,蛋白质的活性部位被超声波逐渐破坏,因此水解率出现逐渐下降的现象。由此可见超声波处理时间的长短对螺旋藻酶促水解有较大的影响。

另外本项目的其它研究数据表明,超声波处理时间受酶解条件影响不大,因此在进一步的优化试验中固定超声波处理时间、

3.2 酶解参数优化实验

超声波处理时间20min,进行酶解参数优化实验,实验结果列于表2。经极差分析法到 $R_A > R_C > R_D > R_B$, 所以各因素的主次顺序为温度 > pH 值 > 时间 > 底物浓度。选出每个因素中 $R_i(i=1\sim3)$ 的最大值

表2 超声波处理20min后螺旋藻酶促水解的正交实验

组号	温度(°C)	底物浓度(%)	pH 值	时间(h)	水解率(%)
1	40	3	11	6	52.04
2	40	4	9	5	38.08
3	40	5	10	7	64.37
4	50	3	9	7	39.45
5	50	4	10	6	42.95
6	50	5	11	5	28.23
7	60	3	10	5	50.63
8	60	4	11	7	42.41
9	60	5	9	6	45.03
K_1	154.49	142.12	122.68	140.02	
K_2	110.63	123.44	122.56	116.94	
K_3	138.07	137.63	157.95	146.23	
R_1	51.50	47.37	40.89	46.67	
R_2	36.88	41.15	40.85	38.98	
R_3	46.02	45.88	52.65	48.74	
R	14.62	6.22	11.8	9.76	

对应的水平值,就组成了螺旋藻酶解反应操作的较优组合。在本实验中 $R_{A1} > R_{A3} > R_{A2}$, $R_{B1} > R_{B3} > R_{B2}$, $R_{C3} > R_{C1} > R_{C2}$, $R_{D3} > R_{D1} > R_{D2}$, 所以最优组合为 $A_1B_1C_3D_3$, 即底物浓度为3%、温度为40°C、pH值为10、时间为7h。但这组参数没有出现在9次正交实验之中,故要对这组参数进行验证,经验证得其水解率为67.05%,这个数值大于9次正交试验中的最大值64.37%,所以认为较优组合 $A_1B_1C_3D_3$ 。与无超声波处理时的酶解率52.25%相比较,本文的实验结果提高了近15个百分点。

4 结论

4.1 超声处理对螺旋藻蛋白的酶解有显著的促进作用,同时减弱了螺旋藻溶液的腥味并且使其颜色得到了很好的保护,这对螺旋藻产业的发展提供了新的方向。

4.2 由单因素实验可知,螺旋藻酶促水解的最佳超声波处理时间为20min。

4.3 由超声波辅助螺旋藻酶促水解的正交试验得出最佳参数为:底物浓度3%、温度为40°C、pH值为10、恒温酶解7h,水解率为67.05%。

参考文献:

[1] 张忠义.螺旋藻的生物学评价.食品科技[J].1999,(5):12-14.
 [2] 陈庶来,杨巧绒.螺旋藻营养饮料开发的试验研究.陕西农业科学[J].1999,(6):15-16.