

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101845464 A

(43) 申请公布日 2010.09.29

(21) 申请号 200910218158.5

(22) 申请日 2009.12.30

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街 2699
号

(72) 发明人 张桂荣 费瑞 程英琨 牛砚涛
宋月爽

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

C12P 7/42 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

(54) 发明名称

多功能酶水解玉米皮制备阿魏酸的方法

(57) 摘要

本发明提供一种多功能酶水解玉米皮制备阿魏酸的方法,将玉米皮加入 NaOH 避光浸泡,高压灭菌,加入同时具有肽酶及酯酶活性的多功能酶水解细胞壁上的酯键和肽键,离心取上清液经过柱层析、洗脱,洗脱液浓缩,经乙酸乙酯萃取,旋转蒸发得阿魏酸。利用粮食加工或燃料乙醇生产的副产品——玉米皮,通过同时具有肽酶及酯酶活性的多功能酶水解生产阿魏酸,工艺简单,省时节能,增加了玉米副产物的附加值。

1. 一种多功能酶水解玉米皮制备阿魏酸的方法,包括以下步骤:

1) 将粉碎玉米皮 60 ~ 80 目,加入 0.6% NaOH,固液比为 1 : (5-7) (W/V),避光浸泡 1 ~ 3 小时;

2) 将浸泡物 121°C 高压 0.105MPa 灭菌 30-60min;

3) 浸泡液降温至 50°C 后,调节 pH 至 8,按每 ml 浸泡液加入同时具有蛋白酶及酯酶活性的多功能酶 20ul,水解细胞壁上的酯键和肽键,放入摇床 50°C 条件下反应 2 ~ 3 小时; 5500r 离心 10min;

4) 取上清液经过柱层析、洗脱,洗脱液为:浓盐酸:水:乙醇为 4 : 35 : 61,将洗脱液浓缩,经乙酸乙酯萃取,旋转蒸发得阿魏酸。

2. 根据权利要求 1 所述制备阿魏酸的方法,其特征在于:

调步骤 3 的上清液 PH = 9.0,利用 HPD-600 进行柱层析,柱料与上清液的比例为 1 : 6(W/V),密封后放入 50°C,110r/min 恒温摇床中完全吸附,洗脱,洗脱液为:浓盐酸:水:乙醇为 4 : 35 : 61,将洗脱液浓缩,经乙酸乙酯萃取,旋转蒸发得阿魏酸。

多功能酶水解玉米皮制备阿魏酸的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种阿魏酸的生产方法,尤其是提供一种多功能酶水解玉米皮制备阿魏酸的方法,利用工程菌表达的多功能酶获得阿魏酸,属于玉米深加工技术领域。

背景技术

[0002] 目前,玉米皮是玉米深加工的副产物,玉米皮不仅含有较丰富的多糖、蛋白质、碳水化合物、维生素和矿物质,还含有较多的酚酸或酚类化合物。阿魏酸是酚酸的一种,在植物细胞壁上,由于阿魏酸的交联,至使胞壁多糖之间紧密结合,单一使用某种多糖水解酶,并不能很好的渗入多糖分子内部,导致水解率太低。如果能采用多功能水解酶作用于细胞壁,同时打断阿魏酸酯键和糖苷键,无疑将使低聚糖的水解产率大大提高,同时又可生产阿魏酸。另外,玉米细胞壁多糖的含量都在 50% 以上,如能采用适当方法降解,提取其中的有效成分,这些副产品都可以成为功能性食品原料的重要来源,并且,对麸皮进行深加工和综合利用,将会产生很高的经济效益和社会效益。

[0003] 有文献研究表明,阿魏酸及其衍生物药理研究已经发现其具有抗血栓形成,消炎止痛,抗氧化,清除自由基等药理活性。

发明内容

[0004] 本发明公开一种多功能酶水解玉米皮制备阿魏酸的方法,多功能酶是一种具有肽酶和酯酶活性的工程酶,利用粮食加工或乙醇生产的副产品玉米皮,通过多功能酶法生产阿魏酸。

[0005] 本发明提供提取阿魏酸的方法,包括以下步骤:

[0006] 1) 将粉碎玉米皮 60 ~ 80 目,加入 0.6% NaOH,固液比为 1 : (5-7) (W/V),避光浸泡 1 ~ 3 小时;

[0007] 2) 将浸泡物 121°C 高压 0.105PKa 灭菌 30-60min ;

[0008] 3) 浸泡液降温至 50°C 后,调节 pH 至 8,按每 ml 浸泡液加入多功能酶 20u1,水解细胞壁上的酯键和肽键,放入摇床 50°C 条件下反应 2 ~ 3 小时 ;5500r 离心 10min ;

[0009] 4) 取少量上清,乙酸乙酯萃取,气相色谱检测阿魏酸。

[0010] 5) 其它上清经过柱层析、洗脱,洗脱液为:浓盐酸:水:乙醇为 4 : 35 : 61,将洗脱液浓缩,经乙酸乙酯萃取,旋转蒸发得阿魏酸。

[0011] 上述制备阿魏酸方法的步骤 4,其特征在于:

[0012] 气相色谱检测条件:柱温 80°C -210°C,升温速度:15°C /min,,210°C 停留 3min. 进样室温度为 240°C,检测室温度为 240°C。色谱柱为:DB1701。

[0013] 上述制备阿魏酸方法的步骤 5,其特征在于:

[0014] 调步骤 3 的上清液 PH = 9.0,利用 HPD-600 进行柱层析,柱料与上清液的比例为 1 : 6(W/V),密封后放入 50°C,110r/min 恒温摇床中完全吸附。

[0015] 本发明制备方法中使用多功能酶 (APE1547) 是一种具有肽酶和酯酶活性的工

程酶,在水解玉米皮制备阿魏酸过程中,采用一种酶、单一的反应条件,具有省时,省力,节约能源的特点。

[0016] 本发明的积极效果在于:利用粮食加工或燃料乙醇生产的副产品--玉米皮,通过同时具有肽酶及酯酶活性的多功能酶水解生产阿魏酸,工艺简单,省时节能,增加了玉米副产物的附加值。

附图说明

[0017] 图 1 为实施例 1 阿魏酸的气相色谱图。

[0018] 图中出峰时间为 8.21 ~ 8.26 为阿魏酸。

[0019] 图 2 为实施例 2 阿魏酸的气相色谱图。

[0020] 图中出峰时间为 8.21 ~ 8.26 为阿魏酸。

[0021] 图 3 为实施例 3, HPD600 吸附后,流出液中阿魏酸的气相色谱图。

[0022] 图中出峰时间为 8.21 ~ 8.26 为阿魏酸,吸附率 95% -98%。

[0023] 图 4 为实施例 3 中, HPD600 利用洗脱液,洗脱后阿魏酸的气相色谱图。

[0024] 图中出峰时间为 8.21 ~ 8.26 为阿魏酸,层析后阿魏酸的纯度提高到 92%。

具体实施方式

[0025] 通过以下实施例进一步举例描述本发明,并不以任何方式限制本发明,在不背离本发明的技术解决方案的前提下,对本发明所作的本领域普通技术人员容易实现的任何改动或改变都将落入本发明的权利要求范围之内。

[0026] 实施例 1

[0027] 1) 在 100kg 的 80 目玉米皮中加入 650L 的 0.6% NaOH,避光浸泡 1.5 小时;

[0028] 2) 将浸泡物 121℃ 高压 0.105PKa 灭菌 30-60min;

[0029] 3) 浸泡液降温至 50℃ 后,调节 pH 至 8,按每 ml 浸泡液加入多功能酶(APE1547)20ul,水解细胞壁上的酯键和肽键,放入摇床 50℃ 条件下反应 2 小时;5500r 离心 10min;

[0030] 4) 取上清液,乙酸乙酯萃取,气相色谱测定,气相色谱检测条件:柱温 80℃ -210℃,升温速度:15℃ /min,,210℃ 停留 3min. 进样室温度为 240℃,检测室温度为 240℃。色谱柱为:DB1701。结果见图 1。

[0031] 实施例 2

[0032] 1) 在 10kg 的 80 目玉米皮中加入 70L 的 0.6% NaOH,避光浸泡 1.5 小时;

[0033] 2) 将浸泡物 121℃ 高压 0.105PKa 灭菌 30-60min;

[0034] 3) 浸泡液降温至 50℃ 后,调节 pH 至 8,按每 ml 浸泡液加入多功能酶(APE1547)20ul,水解细胞壁上的酯键和肽键,放入摇床 50℃ 条件下反应 2 小时;5500r 离心 10min;

[0035] 4) 取上清液,乙酸乙酯萃取,气相色谱测定,气相色谱检测条件:柱温 80℃ -210℃,升温速度:15℃ /min,,210℃ 停留 3min. 进样室温度为 240℃,检测室温度为 240℃。色谱柱为:DB1701。结果见图 2。

[0036] 实施例 3

[0037] 阿魏酸的纯化

[0038] 将实施例 1 步骤 3 的上清液, PH = 9.0, 利用 HPD-600 进行柱层析, 柱料与上清液的比例为 1 : 6 (W/V), 密封后放入 50℃, 110r/min 恒温摇床中完全吸附, 见图 3;

[0039] 洗脱, 洗脱液为: 浓盐酸: 水: 乙醇为 4 : 35 : 61, 将洗脱液浓缩, 用等体积的乙酸乙酯萃取, 气相色谱法检测, 见图 4。

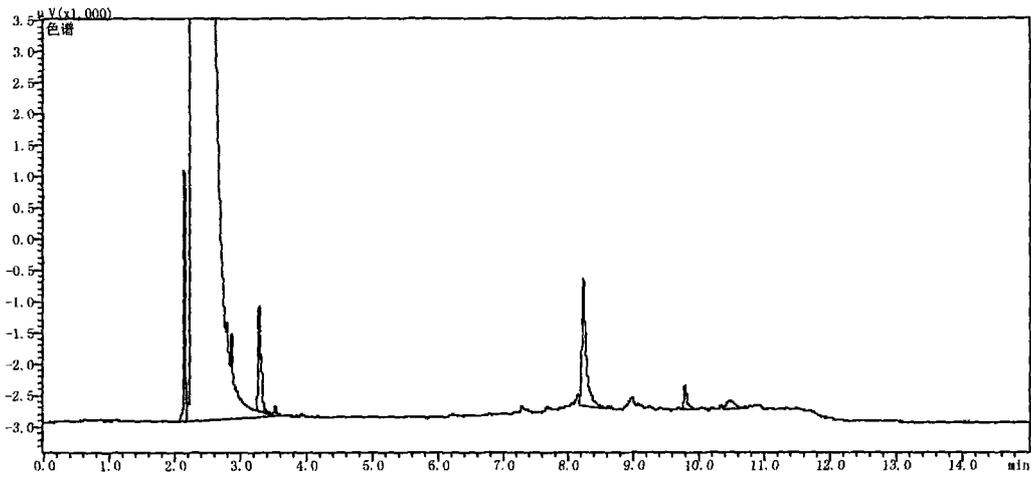


图 1

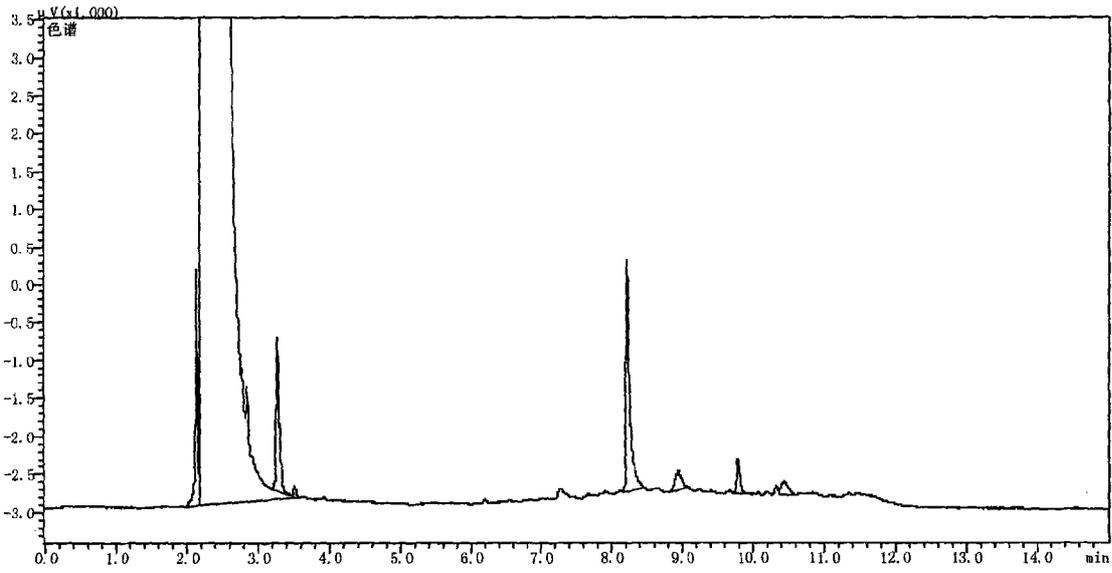


图 2

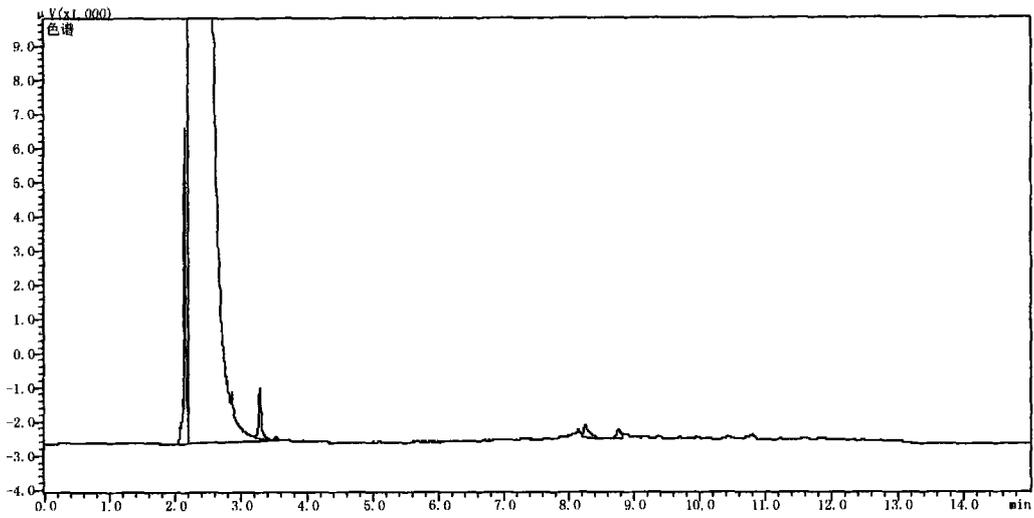


图 3

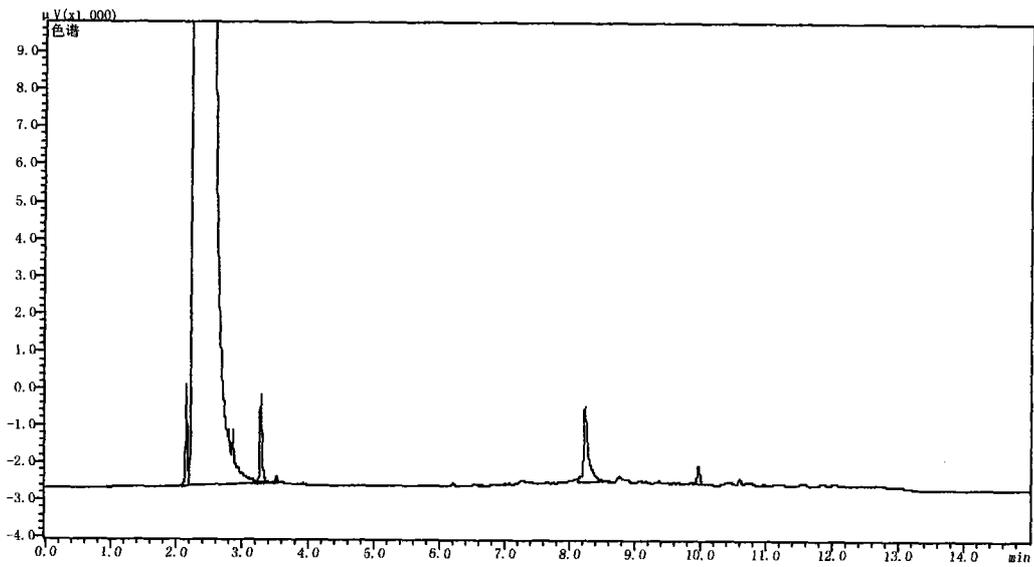


图 4