



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105483183 B

(45)授权公告日 2019.05.10

(21)申请号 201610008867.0

A61K 31/702(2006.01)

(22)申请日 2016.01.07

A61P 3/10(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105483183 A

(56)对比文件

CN 100508985 C,2009.07.08,全文.

CN 101423854 A,2009.05.06,全文.

(43)申请公布日 2016.04.13

CN 102382200 A,2012.03.21,全文.

(73)专利权人 福建农林大学

CN 104829738 A,2015.08.12,全文.

地址 350002 福建省福州市仓山区上下店路15号

周存山等.条斑紫菜多糖提取工艺的优化.《农业工程学报》.2006,第22卷(第9期),194.

(72)发明人 赵超 刘斌 杨成凤 肖正

审查员 李颖

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊

(51)Int.Cl.

C12P 19/14(2006.01)

C12P 19/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种马尾藻寡糖的制备方法及其在降血糖药物中的应用

(57)摘要

一种马尾藻寡糖的制备方法,以马尾藻脱脂和除蛋白后的精多糖为原料,利用超声波处理,依次添加褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶酶解多糖后,经乙醇沉降法去除未降解充分多糖,离心上清液过分子筛后截留物,冷冻干燥制备得到马尾藻寡糖,本发明中制备的马尾藻寡糖对 α -葡萄糖苷酶具有强抑制活性,其IC₅₀值为4.82 mg/mL,且呈现剂量依赖性,同时对胰岛素抵抗HepG2细胞的葡萄糖消耗具有明显的促进作用.该方法采用非特异性商业化酶,工艺路线简单合理,适合工业化,即提高了降血糖活性寡糖的制备量,同时又降低了酶的消耗和生产成本,是一种制备马尾藻活性寡糖的有效方法,可在降血糖药品、保健品、食品中得到应用。

1. 一种马尾藻寡糖的制备方法,其特征在于:以马尾藻脱脂和除蛋白后的精多糖为原料,利用超声波处理,依次添加褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶酶解多糖后,沸水加热以灭酶活,经乙醇沉降法去除未降解充分多糖,离心上清液过分子筛后截留物,冷冻干燥制备得到马尾藻寡糖;

具体方法如下:

(1) 将马尾藻干燥后粉碎,向马尾藻干粉中加入95%乙醇回流提取1-2小时,干粉重量与乙醇体积比为1:15-20,回流结束后除去乙醇,烘干得到干燥脱脂的马尾藻粉末;马尾藻粉末中加入蒸馏水,其中马尾藻质量与蒸馏水体积比为1:25-30,85-90℃下使用水提法提取2-3小时,提取结束后,进行过滤,将滤渣重复上述水提步骤进行2-3次提取,将获得的滤液混合后进行浓缩,加入3-4倍体积95%乙醇,4-10℃静置沉淀8-12小时后,离心收集沉淀,真空冷冻干燥后得马尾藻粗多糖粉末;

(2) 向步骤(1)所得马尾藻粗多糖粉末中加入蒸馏水,其中马尾藻粗多糖粉末质量与蒸馏水体积比为1:10-20,进行搅拌复溶,用Sevag法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸法中一种或几种除蛋白5-8次;

(3) 利用截留分子量8000-14000规格透析袋,去除有机小分子、色素;截留液在50-60℃及转速为20-40 r/min条件下旋转蒸发,浓缩至膏状,并进行真空冷冻干燥得到马尾藻精多糖粉末;

(4) 将步骤(3)中所得马尾藻精多糖粉末用蒸馏水溶解,质量浓度为4-10%,调节pH为6.5-8.0,加入褐藻胶裂解酶后进行辅助超声酶解15-20min,超声波功率为45-80kHz,然后置于25-32℃,速度为65-90r/min水浴摇床中进一步酶解1-1.5h后取出,沸水加热5-10 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

(5) 将步骤(4)离心所得上清液调节pH为5.0-7.0,加入甘露聚糖酶后进行辅助超声酶解10-15min,超声波功率为45-80kHz,然后置于50-60℃,速度为65-90r/min水浴摇床中进一步酶解30-60min后取出,沸水加热10-15 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

(6) 将步骤(5)离心所得上清液调节pH为4.5-6.5,加入木聚糖酶后进行辅助超声酶解30-60min,超声波功率为45-80 kHz,然后置于50-60℃,速度为65-90r/min水浴摇床中进一步酶解30-60min后取出,沸水加热10-15 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

(7) 将步骤(6)离心所得上清液调节pH为3.0-6.0,加入果胶酶后进行辅助超声酶解10-15min,超声波功率为45-80kHz,然后置于25-50℃,速度为65-90r/min水浴摇床中进一步酶解1-2h后取出,沸水加热5-10 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

(8) 向步骤(7)中酶解后离心所得上清液加入体积比1:3-4的95%乙醇沉降除去降解液中未降解多糖,4-10℃静置沉淀4-6小时后,离心收集上清,即为马尾藻寡糖粗品溶液;

(9) 将步骤(8)中马尾藻寡糖粗品溶液通过2000D的分子筛,滤出液再通过200D的分子筛,将截留物冷冻干燥,制备得到马尾藻寡糖。

2. 根据权利要求1所述的一种马尾藻寡糖的制备方法,其特征在于:所述褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶与步骤(4)中马尾藻多糖的质量比分别为1:60-85、1:25-45、1:40-65和1:25-35。

3. 如权利要求1所述制备方法制得马尾藻寡糖在制备降血糖药物中的应用。

一种马尾藻寡糖的制备方法及其在降血糖药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种马尾藻寡糖的制备方法及其在降血糖药物中的应用,属于功能性寡糖酶解法生产工艺。关于一种分步酶解法制备马尾藻寡糖方法及其在降血糖药品、保健品、食品中的应用中的应用,本发明的特点在于超声波辅助分步酶解马尾藻多糖制备寡糖。

背景技术

[0002] 糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病。目前降糖药或功效不足或有显著的副作用,开发既具有显著降血糖效果又无副作用的保健食品已经成为当前全球研究热点。海藻多糖及其降解产物——特异性海藻低聚糖、寡糖为原料的海洋药源和食药同用的保健食品原料的开发和功能研究近年来受到广泛关注。酶法降解多糖制备寡糖条件温和、无副反应、环境友好等优点,是理想的制备方法。

[0003] 马尾藻寡糖的单糖组分包括甘露糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、木糖、鼠李糖等,马尾藻活性寡糖具有多种生物功能,在药物、保健品、食品等方面用途广泛。与多糖相比,寡糖具有易溶于水、无抗原性,以及在宿主体内具有较弱的积累效应等优点。但在规模化应用上受到很大的限制,主要原因是对寡糖制备技术的研究尚不够深入。

[0004] 在目前所公开的海藻寡糖相关专利中,CN101891904B公开了海带寡糖在制备防治植物病害药物方面的应用;CN 102827899B公开了一种龙须菜琼胶寡糖及其制备方法与其在制备抗氧化、抗紫外线保健品和化妆品中的应用;CN103333876B公开的琼胶寡糖可与唾液淀粉酶的激活剂-氯离子协同增强唾液淀粉酶的酶活。CN100508985C公开了一种低分子量褐藻胶寡糖,虽然提到了其在糖尿病防治方面的应用,但该专利所述低分子量褐藻胶寡糖,是利用酸水解海藻酸钠所得,而本发明中所述马尾藻寡糖为利用分步酶解的绿色制备方法制得,具有不会发生副反应、条件温和、环境友好等优点。因此,本发明中通过超声辅助分步酶解所获得的马尾藻寡糖的降血糖活性均未见其它研究报道或专利。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种制备马尾藻寡糖的方法及其在降血糖药物中的应用。制备工艺路线简单合理,降低了酶的消耗和生产成本,提高了制备产量,是一种绿色高效制备马尾藻寡糖的有效方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种超声辅助分步酶解法制备马尾藻寡糖的方法,以马尾藻脱脂和除蛋白后的精多糖为原料,利用超声波处理,依次添加褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶酶解多糖后,沸水加热以灭酶活,经乙醇沉降法去除未降解充分多糖,离心上清液过分子筛后截留物,冷冻干燥制备得到马尾藻寡糖。

[0008] 具体方法为:

[0009] (1)将马尾藻干燥后粉碎,向马尾藻干粉中加入95%乙醇回流提取1-2小时,干粉重量与乙醇体积比为1:15-20,回流结束后除去乙醇,烘干得到干燥脱脂的马尾藻粉末;马尾

藻粉末中加入蒸馏水,其中马尾藻质量与蒸馏水体积比为1:25-30,85-90℃下使用水提法提取2-3小时,提取结束后,进行过滤,将滤渣重复上述步骤进行2-3次提取,将获得的滤液混合后进行浓缩,加入3-4倍体积95%乙醇,4-10℃静置沉淀8-12小时后,离心收集沉淀,真空冷冻干燥后获得马尾藻粗多糖粉末;

[0010] (2)向步骤(1)所得马尾藻粗多糖粉末中加入蒸馏水,其中马尾藻粗多糖粉末质量与蒸馏水体积比为1:10-20,进行搅拌复溶,用Sevag法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸法中一种或几种除蛋白5-8次;

[0011] (3)利用截留分子量8000-14000以上规格透析袋,去除有机小分子、色素;截留液在50-60℃及转速为20-40 r/min条件下旋转蒸发,浓缩至膏状,并进行真空冷冻干燥得到马尾藻精多糖粉末;

[0012] (4)将步骤(3)中所得马尾藻精多糖粉末用蒸馏水溶解,质量浓度为4-10%,调节pH为6.5-8.0,加入褐藻胶裂解酶后进行辅助超声酶解15-20min,超声波功率为45-80kHz,然后置于25-32℃,速度为65-90r/min水浴摇床中进一步酶解1-1.5h后取出,沸水加热5-10 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0013] (5)将步骤(4)离心所得上清液调节pH为5.0-7.0,加入甘露聚糖酶后进行辅助超声酶解10-15min,超声波功率为45-80kHz,然后置于50-60℃,速度为65-90r/min水浴摇床中进一步酶解30-60min后取出,沸水加热10-15 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0014] (6)将步骤(5)离心所得上清液调节pH为4.5-6.5,加入木聚糖酶后进行辅助超声酶解30-60min,超声波功率为45-80 kHz,然后置于50-60℃,速度为65-90r/min水浴摇床中进一步酶解30-60min后取出,沸水加热10-15 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0015] (7)将步骤(6)离心所得上清液调节pH为3.0-6.0,加入果胶酶后进行辅助超声酶解10-15min,超声波功率为45-80kHz,然后置于25-50℃,速度为65-90r/min水浴摇床中进一步酶解1-2h后取出,沸水加热5-10 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0016] (8)向步骤(7)中酶解后离心所得上清液加入体积比1:3-4的95%乙醇沉降除去降解液中未降解多糖,4-10℃静置沉淀4-6小时后,离心收集上清,即为马尾藻寡糖粗品溶液;

[0017] (9)将步骤(8)中马尾藻寡糖粗品溶液通过2000D的分子筛,滤出液再通过200D的分子筛,将截留物冷冻干燥,制备得到马尾藻寡糖。

[0018] (10)所述褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶酶与步骤(4)中马尾藻精多糖的质量比分别为1:60-85、1:25-45、1:40-65和1:25-35。

[0019] 本发明的优点在于:

[0020] (1)本发明采用超声辅助分步酶解法,依次利用褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶酶解马尾藻多糖,能充分酶切马尾藻多糖复杂键合结构,大幅提高酶解效率并降低酶用量。

[0021] (2)本发明制备的马尾藻活性寡糖对 α -葡萄糖苷酶具有较好的抑制活性,其IC₅₀值为4.82 mg/mL,且呈现剂量依赖性,同时对胰岛素抵抗HepG2细胞的葡萄糖消耗具有明显的促进作用。

附图说明

[0022] 图1为HepG2胰岛素抵抗细胞形态电镜图。

[0023] 图2为马尾藻寡糖与拜糖平对 α -葡萄糖苷酶活性抑制比较。

具体实施方式

[0024] 实施例1

[0025] (1) 将马尾藻干燥后粉碎,向马尾藻干粉中加入95%乙醇回流提取2小时,干粉重量与乙醇体积比为1:20,回流结束后除去乙醇,烘干得到干燥脱脂的马尾藻粉末;马尾藻粉末中加入蒸馏水,其中马尾藻质量与蒸馏水体积比为1:30,90℃下使用水提法提取2小时,提取结束后,进行过滤,将滤渣重复上述步骤进行2次提取,将获得的滤液混合后进行浓缩,加入3倍体积95%乙醇,4℃静置沉淀12小时后,离心收集沉淀,真空冷冻干燥后马尾藻粗多糖粉碎;

[0026] (2) 向步骤(1)所得马尾藻粗多糖中加入蒸馏水,其中马尾藻粗多糖粉末质量与蒸馏水体积比为1:20,进行搅拌复溶,用Sevag法除蛋白8次;

[0027] (3) 利用截留分子量14000以上规格透析袋,去除有机小分子、色素;截留液在60℃及转速为40 r/min条件下旋转蒸发,浓缩至膏状,并进行真空冷冻干燥得到马尾藻精多糖粉末;

[0028] (4) 将步骤(3)中所得马尾藻精多糖粉末用蒸馏水溶解,浓度为10%,调节pH为8.0,加入褐藻胶裂解酶后进行辅助超声酶解20min,超声波功率为80kHz,然后置于32℃,速度为90r/min水浴摇床中进一步酶解1.5h后取出,沸水加热10 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0029] (5) 将步骤(4)离心所得上清液调节pH为7.0,加入甘露聚糖酶后进行辅助超声酶解15min,超声波功率为45-80kHz,然后置于60℃,速度为90r/min水浴摇床中进一步酶解60min后取出,沸水加热15 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0030] (6) 将步骤(5)离心所得上清液调节pH为6.5,加入木聚糖酶后进行辅助超声酶解60min,超声波功率为80 kHz,然后置于60℃,速度为90r/min水浴摇床中进一步酶解60min后取出,沸水加热15 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0031] (7) 将步骤(6)离心所得上清液调节pH为6.0,加入果胶酶后进行辅助超声酶解15min,超声波功率为80kHz,然后置于50℃,速度为90r/min水浴摇床中进一步酶解2h后取出,沸水加热10 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0032] (8) 向步骤(7)中酶解后离心所得上清液加入体积比1:4的95%乙醇沉降除去降解液中未降解多糖,10℃静置沉淀6小时后,离心收集上清,即为马尾藻寡糖粗品溶液;

[0033] (9) 将步骤(8)中马尾藻寡糖粗品溶液通过2000D的分子筛,滤出液再通过200D的分子筛,将截留物冷冻干燥,制备得到马尾藻寡糖。

[0034] 所述褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶与步骤(4)马尾藻多糖的质量比分别为1:60、1:25、1:40和1:25。

[0035] 以下给出所得马尾藻寡糖降血糖活性的实验验证:

[0036] (1) 细胞实验:

[0037] 1. HepG2细胞培养

[0038] 将HepG2细胞置于含10% FBS的DMEM高糖培养基中,在37 °C、5% CO₂饱和湿度条件下培养。待细胞长满后,用0.25% 的胰酶消化液消化细胞,进行种板,尽量使细胞散落均匀,每天记录细胞状态,隔天换液。

[0039] 1.2 HepG2细胞产生胰岛素抵抗的最佳方法和最佳时间

[0040] 当孔板中的HepG2细胞贴壁长满后,将其分成三组:对照组、高糖胰岛素组和地塞米松组,对照组用DMEM培养基培养,高糖胰岛素组用10mg/ L胰岛素培养液,地塞米松组用含1 μ mol/ L的地塞米松养液培养,分别于0、12、24、36、48h小时后吸取少量细胞培养液进行葡萄糖浓度检测,使用葡萄糖氧化酶法检测试剂盒测定培养基中残余的葡萄糖含量。葡萄糖含量计算公式:

$$[0041] \quad \text{葡萄糖 (mM)} = \frac{\text{样品管吸光值 (A)} \times \text{标准液浓度}}{\text{标准管吸光值 (A)}}$$

[0042] 2. 海藻寡糖对胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢的影响

[0043] 使用最佳方法和最佳时间进行建模,建模后将实验分成5组:正常对照组、模型组、二甲双胍组(0.086 mg/mL)、海藻寡糖组(0.01、0.02、0.1、0.2、1 mg/ mL)。给药组加入不同浓度的不含血清的含药培养基,正常对照组及模型组则加入不含血清的培养基,各组均包括含生理胰岛素组与不含生理胰岛素组。于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育 24h 后,用葡萄糖临床试剂盒检测培养基中的葡萄糖含量。葡萄糖含量计算公式:

$$[0044] \quad \text{葡萄糖 (mM)} = \frac{\text{样品管吸光值 (A)} \times \text{标准液浓度}}{\text{标准管吸光值 (A)}}$$

[0045] 2. 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞的数目与活力

[0046] 葡萄糖消耗实验结束后,每孔加入 5g/L MTT 溶液 50 μ L,于 37 °C、5 % CO₂培养箱中继续培养,4h后终止培养小心吸弃孔中的培养基,每孔加入150 μ L 二甲亚砷(DMSO),振荡器振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶标仪 550nm 波长下测定各孔的吸光度值,以检测细胞的数目与活力。

[0047] 实验结果:

[0048] 1. HepG2 细胞形态观察(见图1)。

[0049] 2. HepG2细胞产生胰岛素抵抗的最佳方法和最佳时间

[0050] 表. 1 不同方法与时间作用各组的剩余葡萄糖浓度(mmol/ L)

[0051]

组别	0h	6h	12h	24h	36h
对照组	5.93	4.63	3.03	2.50	1.90
高糖胰岛素组	5.04	3.84	2.75	2.04	1.75
地塞米松组	5.71	4.37	4.05	3.81	2.86

[0052] 分别用10mg/ L胰岛素培养液、1 μ mol/ L的地塞米松养液培养,分别在5个不同的时间点(0h、6h、12h、24h、36h)检测其葡萄糖浓度。结果显示:与对照组相比,随着时间的

延长,地塞米松组与对照组细胞的上清中剩余葡萄糖浓度差值逐渐增大,说明地塞米松诱导胰岛素抵抗具有时间累积性,且在24h达最大值。24h以后对照组葡萄糖基本消耗完全。因此选择地塞米松诱导24h作为诱导HepG2细胞产生胰岛素抵抗的最佳条件。

[0053] 3. 马尾藻寡糖对胰岛素抵抗HepG2细胞的糖代谢的影响

[0054] 表2马尾藻寡糖对胰岛素抵抗HepG2细胞的糖代谢的影响

[0055]

组别	剂量 mg/mL	组数	葡萄糖消耗量 (mmol/L)	MTT(A ₅₅₀)	比值
空白对照组		3	2.74	0.60	4.61
模型对照组		3	1.54	0.50	3.08
马尾藻寡糖组	0.01	3	2.19	0.85	2.58
	0.02	3	2.98	0.75	3.97
	0.10	3	2.15	0.71	3.02
	0.20	3	1.79	0.70	2.56
	1.00	3	1.91	0.59	3.24
二甲双胍组	0.086	3	2.87	0.65	4.42

[0056] 与模型对照组相比,用0.086 mg/mL二甲双胍处理的HepG2胰岛素抵抗细胞,其葡萄糖消耗量增加了43.50%,用浓度0.02 mg/mL的马尾藻寡糖处理的HepG2胰岛素抵抗细胞,其葡萄糖消耗量增加了28.90%。

[0057] (2) α -葡萄糖苷酶活性抑制实验

[0058] 采用 96 孔板法。以无色的 PNPG 作反应底物,经 α -葡萄糖苷酶催化水解后, α -1,4-葡萄糖苷键断开,释放出对硝基苯酚(PNP),PNP 在碱性条件下呈黄色,通过一定时间内反应体系中 PNP 的含量变化来计算样品的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

[0059] 反应体系为:0.1U/mL α -葡萄糖苷酶 50 μ L,加入样品溶液 50 μ L,37 $^{\circ}$ C水浴恒温 20min,再加入 0.116mol/L 的 PNPG50 μ L,37 $^{\circ}$ C水浴恒温 20min,最后加入 1mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液 100 μ L,终止反应,于 405nm 波长下测定 OD 值。用 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH6.8)代替酶液作对照,0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液代替样品作空白对照,缓冲液作空白。

[0060] 表3 α -葡萄糖苷酶活性抑制体系

	酶液/ μL	抑制剂/ μL	PNPG 溶液/ μL	
	空白管	50	-	50
[0061]	空白对照管	-	-	50
	抑制管	50	100	50
	背景对照管	-	100	50

[0062] 抑制率计算公式为：抑制率 = $(1 - A_{00}/A_{01}) \times 100\%$

[0063] $A_{00} = A_3 - A_4$, $A_{01} = A_1 - A_2$

[0064] 式中 A_1, A_2, A_3, A_4 分别为 405nm 处空白管、空白对照管、抑制剂管和背景对照管的吸光值。

[0065] 实验结果：(见图 2)

[0066] 以阿卡波糖为阳性对照，马尾藻寡糖对 α -葡萄糖苷酶活性具有显著的抑制作用，其 IC₅₀ 值为 4.82 mg/mL，且呈现剂量依赖关系。

[0067] 实施例 2

[0068] (1) 将马尾藻干燥后粉碎，向马尾藻干粉中加入 95% 乙醇回流提取 1 小时，干粉重量与乙醇体积比为 1:15，回流结束后除去乙醇，烘干得到干燥脱脂的马尾藻粉末；马尾藻粉末中加入蒸馏水，其中马尾藻质量与蒸馏水体积比为 1:25，85℃ 下使用水提法提取 2 小时，提取结束后，进行过滤，将滤渣重复上述步骤进行 2 次提取，将获得的滤液混合后进行浓缩，加入 3 倍体积 95% 乙醇，4℃ 静置沉淀 8 小时后，离心收集沉淀，真空冷冻干燥后马尾藻粗多糖粉碎；

[0069] (2) 向步骤 (1) 所得马尾藻粗多糖中加入蒸馏水，其中马尾藻粗多糖粉末质量与蒸馏水体积比为 1:10，进行搅拌复溶，用三氟三氯乙烷法除蛋白 5 次；

[0070] (3) 利用截留分子量 8000 以上规格透析袋，去除有机小分子、色素；截留液在 50℃ 及转速为 20 r/min 条件下旋转蒸发，浓缩至膏状，并进行真空冷冻干燥得到马尾藻精多糖粉末；

[0071] (4) 将步骤 (3) 中所得马尾藻精多糖粉末用蒸馏水溶解，质量浓度为 4%，调节 pH 为 6.5，加入褐藻胶裂解酶后进行辅助超声酶解 15min，超声波功率为 45kHz，然后置于 25℃，速度为 65r/min 水浴摇床中进一步酶解 1h 后取出，沸水加热 5 min 以灭酶活，冷却至室温，离心取上清液备用；

[0072] (5) 将步骤 (4) 离心所得上清液调节 pH 为 5.0，加入甘露聚糖酶后进行辅助超声酶解 10min，超声波功率为 45kHz，然后置于 50℃，速度为 65r/min 水浴摇床中进一步酶解 30min 后取出，沸水加热 10 min 以灭酶活，冷却至室温，离心取上清液备用；

[0073] (6) 将步骤 (5) 离心所得上清液调节 pH 为 4.5，加入木聚糖酶后进行辅助超声酶解 30min，超声波功率为 45 kHz，然后置于 50℃，速度为 65r/min 水浴摇床中进一步酶解 30min 后取出，沸水加热 10 min 以灭酶活，冷却至室温，离心取上清液备用；

[0074] (7) 将步骤 (6) 离心所得上清液调节 pH 为 3.0，加入果胶酶后进行辅助超声酶解 10min，超声波功率为 45kHz，然后置于 25℃，速度为 65r/min 水浴摇床中进一步酶解 1h 后取

出,沸水加热5min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0075] (8) 向步骤(7)中酶解后离心所得上清液加入体积比1:3的95%乙醇沉降除去降解液中未降解多糖,4℃静置沉淀4小时后,离心收集上清,即为马尾藻寡糖粗品溶液;

[0076] (9) 将步骤(8)中马尾藻寡糖粗品溶液通过2000D的分子筛,滤出液再通过200D的分子筛,将截留物冷冻干燥,制备得到马尾藻寡糖。

[0077] 所述褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶与步骤(4)马尾藻多糖的质量比分别为1:85、1:45、1:65和1:35。

[0078] 实施例3

[0079] (1) 将马尾藻干燥后粉碎,向马尾藻干粉中加入95%乙醇回流提取2小时,干粉重量与乙醇体积比为1:17,回流结束后除去乙醇,烘干得到干燥脱脂的马尾藻粉末;马尾藻粉末中加入蒸馏水,其中马尾藻质量与蒸馏水体积比为1:27,90℃下使用水提法提取2小时,提取结束后,进行过滤,将滤渣重复上述步骤进行3次提取,将获得的滤液混合后进行浓缩,加入4倍体积95%乙醇,7℃静置沉淀10小时后,离心收集沉淀,真空冷冻干燥后马尾藻粗多糖粉碎;

[0080] (2) 向步骤(1)所得马尾藻粗多糖中加入蒸馏水,其中马尾藻粗多糖粉末质量与蒸馏水体积比为1:15,进行搅拌复溶,用三氯乙酸法除蛋白5-8次;

[0081] (3) 利用截留分子量11000以上规格透析袋,去除有机小分子、色素;截留液在55℃及转速为30 r/min条件下旋转蒸发,浓缩至膏状,并进行真空冷冻干燥得到马尾藻精多糖粉末;

[0082] (4) 将步骤(3)中所得马尾藻精多糖粉末用蒸馏水溶解,浓度为7%,调节pH为7.0,加入褐藻胶裂解酶后进行辅助超声酶解17min,超声波功率为60kHz,然后置于30℃,速度为80r/min水浴摇床中进一步酶解1.5h后取出,沸水加热7 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0083] (5) 将步骤(4)离心所得上清液调节pH为6.0,加入甘露聚糖酶后进行辅助超声酶解12min,超声波功率为60kHz,然后置于55℃,速度为80r/min水浴摇床中进一步酶解45min后取出,沸水加热13 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0084] (6) 将步骤(5)离心所得上清液调节pH为5.5,加入木聚糖酶后进行辅助超声酶解40min,超声波功率为60kHz,然后置于55℃,速度为80r/min水浴摇床中进一步酶解45min后取出,沸水加热13 min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0085] (7) 将步骤(6)离心所得上清液调节pH为5.0,加入果胶酶后进行辅助超声酶解12min,超声波功率为50kHz,然后置于35℃,速度为80r/min水浴摇床中进一步酶解2h后取出,沸水加热7min以灭酶活,冷却至室温,离心取上清液备用;

[0086] (8) 向步骤(7)中酶解后离心所得上清液加入体积比1:4的95%乙醇沉降除去降解液中未降解多糖,7℃静置沉淀5小时后,离心收集上清,即为马尾藻寡糖粗品溶液;

[0087] (9) 将步骤(8)中马尾藻寡糖粗品溶液通过2000D的分子筛,滤出液再通过200D的分子筛,将截留物冷冻干燥,制备得到马尾藻寡糖。

[0088] 所述褐藻胶裂解酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶与步骤(4)马尾藻多糖的质量比分别为1:70、1:30、1:50和1:30。

[0089] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与

修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

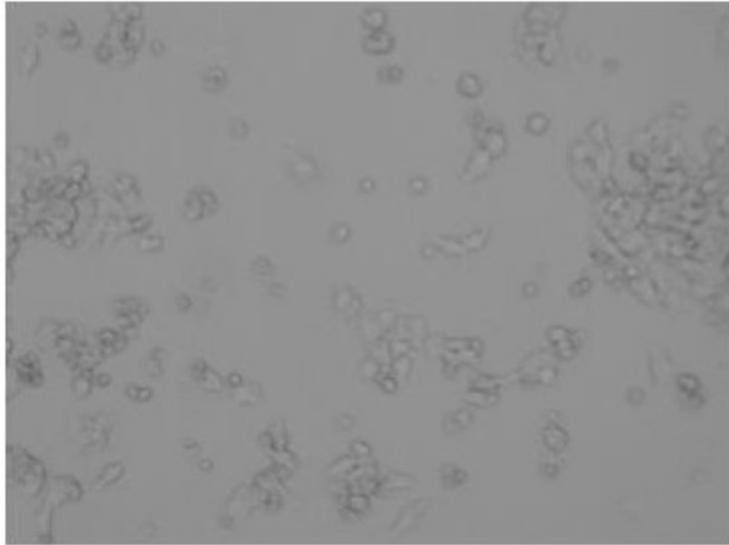


图1

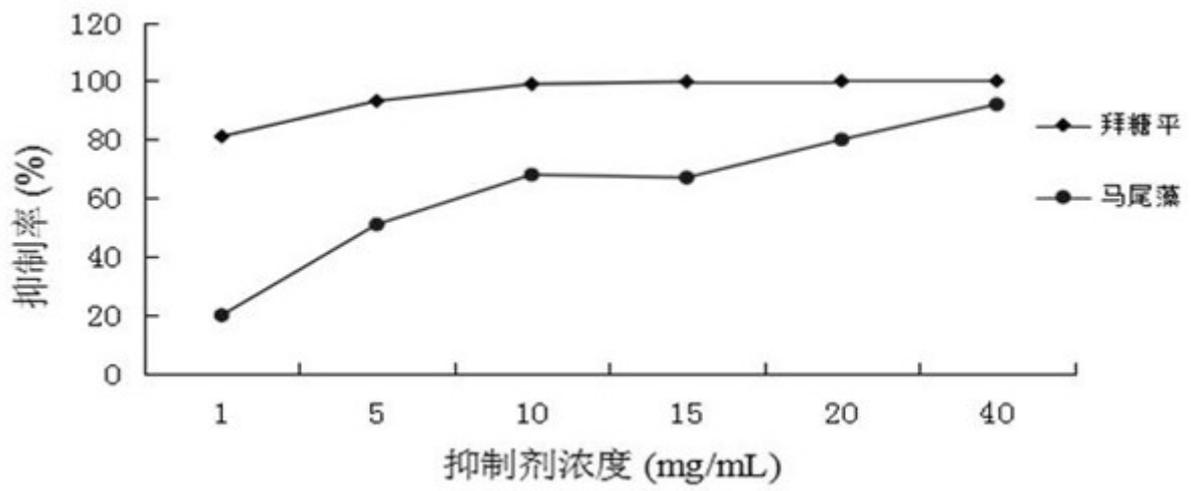


图2