

邹东恢,郭建华.多酶法提取平菇多糖工艺及光谱研究[J].江苏农业科学,2013,41(12):293-295.

多酶法提取平菇多糖工艺及光谱研究

邹东恢,郭建华

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院/黑龙江省普通高校齐齐哈尔大学农产品加工重点实验室,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:以平菇为原料,采用复合酶法提取平菇多糖,选择粒度、料液比、提取时间、加酶量等进行单因素试验,得出在平菇粉末粒度为 >80 目、料液比为 1 g : 25 mL、时间 1.5 h、复合酶(纤维素酶:木瓜蛋白酶 = 1 : 1)对底物的浓度为 2.0% 时平菇多糖的得率最高;固定上述提取条件,通过对温度、pH 值、酶比进行 3 因素 3 水平正交试验,得出在温度为 55 ℃、pH 值为 7、纤维素酶:木瓜蛋白酶 = 2 : 1 时提取的多糖得率最高,为 13.93%。

关键词:平菇;多糖;多酶法;提取;光谱分析; β -吡喃多糖

中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0293-03

平菇又名侧耳,属担子菌亚门口蘑科,是一种目前广泛栽培的食用菌。平菇中含有丰富的营养物质,氨基酸种类齐全,矿物质含量丰富。平菇多糖是一种高分子多糖活性物质,具有抑制癌细胞增生、抗氧化、抗肿瘤、诱导干扰素合成、诱导细胞凋亡等多种功能^[1-3],通常被包裹在植物细胞壁内,往往和蛋白质结合在一起,以蛋白多糖的形式存在。

平菇多糖的提取可以采用热水、稀酸、稀碱作为浸提剂进行浸提,这是提取平菇多糖的传统方法,时间长、效率低、能耗大^[4],多糖的提取率不高;可以采用微波法、超声波法辅助提取;也可以采用酶解提取,中性蛋白酶能有效酶解与多糖结合在一起的蛋白质,从而将多糖释放出来而提高多糖的得率,同时降低了多糖中蛋白质的含量,提高了多糖的纯度^[5-6]。本研究采用木瓜蛋白酶与纤维素酶复合酶法,多酶协同作用以提高平菇多糖的提取率、减少能源消耗,这对进一步探索平菇多糖的提取具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验原料

新鲜平菇,清洗除去根部,切块干燥,粉碎,过 40、60、80、100 目筛,过筛之后把各级平菇粉分别装到清洁干燥的烧杯中,置于真空干燥箱中待用。

1.2 主要试剂与仪器

722 紫外分光光度计,北京赛多利斯仪器系统有限公司;Lambda-35 紫外可见分光光度计,美国 PE 公司;真空干燥箱,上海益恒试验仪器有限公司;离心机,上海跃进医疗器械厂;SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司。木瓜蛋白酶,北京世纪时尚科贸有限公司;纤维素酶,国药集团化学试剂有限公司;使用试剂均为分析纯。

1.3 平菇多糖的提取

称取 80 目的平菇粉 2 g,放入 250 mL 三角瓶中,加蒸馏水 35 mL,混合均匀后置于 45 ℃ 水浴锅中,水浴 30 min,调节

pH 值;称取木瓜蛋白酶和纤维素酶按一定比例混合,加入 5 mL 蒸馏水溶解;平菇溶液放在水浴中预热至酶解温度,将酶液加入到平菇溶液中,在恒温振荡器上提取;反应结束后,将三角瓶放到沸水锅中,10 min 沸水浴灭酶;然后冷却至室温,将酶提取液放入到离心管中 6 000 r/min 离心,取上清液,即得到平菇多糖提取液。

1.4 葡萄糖标准曲线的制作

以葡萄糖浓度为横坐标、吸光度为纵坐标作图。用苯酚-硫酸法测定多糖含量,得葡萄糖标准曲线的回归方程为: $y = 13.547x - 0.0048$,相关系数 $r = 0.9951$,在 5 ~ 25 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。

1.5 多糖总量的测定

采用苯酚-硫酸比色法^[7],以硫酸、苯酚作为显色剂,与平菇多糖发生显色反应,在 490 nm 波长处测定吸光度,通过已经测定的葡萄糖标准曲线计算求得平菇中的多糖含量。

1.6 蛋白质去除方法

采用 Sevag 法^[8]去除粗多糖中的蛋白质。具体方法为:在多糖上清液中加入溶液体积 1/4 的氯仿-正丁醇溶液,将其置于 250 mL 锥形瓶中,充分摇匀 30 min 后用离心机 8 000 r/min 离心 15 min,除去白色浑浊液,只取上清液。重复操作 3 ~ 4 次,即可除净蛋白质。

1.7 多糖的分离与色谱纯化

平菇多糖经初步提取之后取清液,用透析袋透析去除杂质离子,Sevag 法去除杂蛋白,2% 活性炭脱色 1 h,抽滤,10 000 r/min 离心 10 min;将离心后的上清液放入锥形瓶中,加入 95% 乙醇,使溶液中乙醇的浓度达到 75%,将其保存在 4 ℃ 冰箱中醇沉 24 h;6 000 r/min 离心 15 min,取沉淀放入表面皿中,置于真空干燥箱中干燥,即可得到平菇粗多糖^[9]。

取粗多糖 10 mL 上柱,用恒流泵控制流速为 20 mL/h,自动部分收集器收集,每管收集 2.0 mL,用苯酚-硫酸法测定各洗脱液于 490 nm 处的吸光度。收集其流出液,冷冻干燥得到纯化样品。

1.8 平菇多糖红外光谱和紫外光谱法分析

采用傅里叶红外光谱仪,在 450 ~ 4 000 cm^{-1} 范围内对平菇多糖的结构进行分析。采用 Lambda-35 紫外可见分光光度计在 190.0 ~ 500.0 nm 范围内对提取的多糖进行紫外光谱扫描。

收稿日期:2013-05-10

作者简介:邹东恢(1967—),男,黑龙江齐齐哈尔人,硕士,副教授,研究方向为农产品加工、酶技术等。E-mail: zoudongh99@163.com。

2 结果与分析

2.1 单因素试验条件确定

2.1.1 物料粒度大小对平菇多糖提取率的影响 将粉碎后的平菇粉依次通过 40、60、80、100 目筛,得到 40 目以下、40~60 目、60~80 目、80~100 目、100 目粒度以上的样品。由图 1 可见,物料粒度对提取率有较大影响,平菇粉末粒度越大平菇多糖得率越高,当平菇粉末的粒度在 80~100 目之间时增加幅度处于平稳状态,因此,平菇粉末粒度选择 80 目以上为宜。

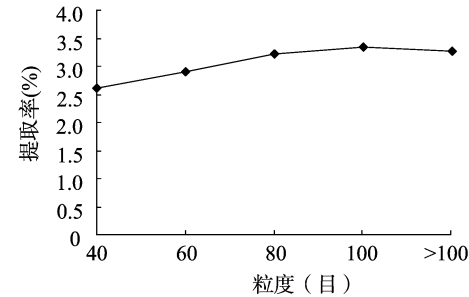


图1 粒度大小对平菇多糖提取率的影响

2.1.2 料液比对多糖提取的影响 由图 2 可见,平菇多糖的得率随提取剂用量的增加而增大,料液比在达到 1 g : 25 mL 时多糖得率最大,且增加逐渐缓慢;提取剂用量过高会降低液体中固形物的含量而不利干多糖的提取。因此,料液比 1 g : 25 mL 时为最优提取条件。

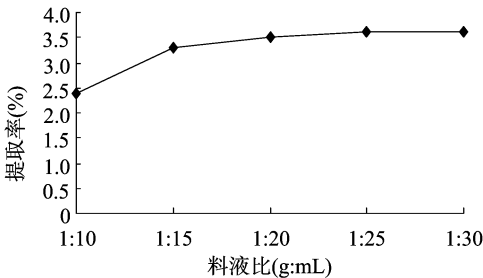


图2 料液比对平菇多糖提取率的影响

2.1.3 浸提时间对平菇多糖提取率的影响 选择料液比为 1 g : 25 mL、45℃ 水浴中浸提,浸提时间分别为 0.5、1、1.5、2.0、2.5 和 3 h。由图 3 可知,浸提时间为 1.5 h 时多糖提取率最高。

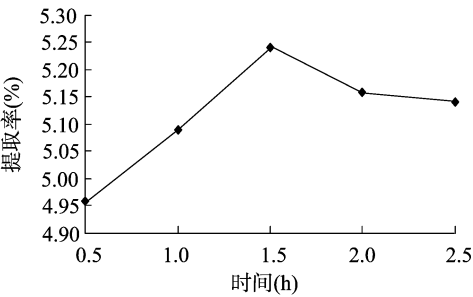


图3 不同浸提时间对平菇多糖提取率的影响

2.1.4 不同复合酶浓度对多糖提取的影响 由图 4 可见,纤维素酶与木瓜蛋白酶为 1 : 1 的复合酶,随着复合酶浓度的增大,多糖提取率也逐渐增加,在浓度为 2.0% 时多糖得率最大,酶浓度大于 2.0% 后提取率增加趋于平缓。考虑酶的成

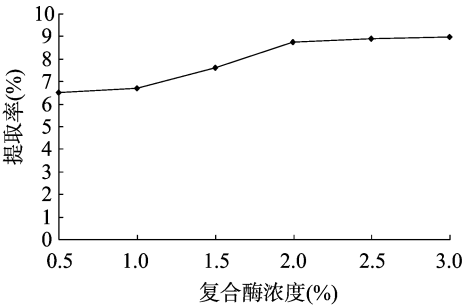


图4 复合酶浓度对平菇多糖提取率的影响

本及提取效果,将复合酶浓度 2.0% 确定为最优条件。

2.2 多酶法提取平菇多糖正交试验结果

影响平菇多糖提取率的因素有许多,本试验固定平菇粉末粒度为 80 目、料液比为 1 g : 25 mL、提取时间 1.5 h、复合酶对底物的浓度为 2.0%,选择温度、pH 值、酶比这 3 个因素进行 3 个水平正交试验(表 1),以得到提取平菇多糖得率最多的优化条件。由表 2 可见,影响平菇多糖提取率的因素主次顺序为:A > C > B;多酶法提取平菇多糖的最佳工艺条件为 A₂B₃C₃,即纤维素酶:木瓜蛋白酶=2 : 1、pH 值为 7、酶解温度 55℃,在此条件下,试验得多糖提取率为 13.93%。

表 1 平菇多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	A:酶比	B:pH 值	C:温度(℃)
1	1 : 1	5	35
2	2 : 1	6	45
3	3 : 1	7	55

表 2 平菇多糖提取工艺正交试验结果

序号	A	B	C	多糖得率(%)
1	1	1	1	9.04
2	1	2	2	10.05
3	1	3	3	12.13
4	2	1	2	12.98
5	2	2	3	11.43
6	2	3	1	12.09
7	3	1	3	11.87
8	3	2	1	13.42
9	3	3	2	10.82
K ₁	31.22	33.89	31.95	
K ₂	36.50	34.90	33.85	
K ₃	36.11	35.04	35.33	
k ₁	10.41	11.3	10.65	
k ₂	12.17	11.63	11.28	
k ₃	12.04	11.68	11.78	
R	1.76	0.38	1.13	
优化条件	A ₂	B ₃	C ₃	

2.3 平菇多糖红外光谱和紫外光谱法分析

红外吸收光谱是有机化合物结构表征的重要方法。由图 5 可见,平菇多糖具有下列结构特征:3 445 cm⁻¹处的吸收峰是由 O—H 键的伸缩振动引起的;2 927 cm⁻¹处的吸收峰是由多糖中的 C—H 键伸缩振动引起的;1 633 cm⁻¹处的吸收峰是糖—CHO 的 C=O 键伸缩振动引起的;1 458~1 414 cm⁻¹的吸收峰是 C—O—C 和 C—O—H 伸缩振动引起的;1 154~1 079 cm⁻¹的吸收峰是吡喃环的 C—O—C 键伸缩振动引起

的;879 cm^{-1} 处的吸收峰是葡聚糖特征吸收峰;571 cm^{-1} 的吸收峰是沿着 C—OH 键内部旋转而引起的。因此,可以得出平菇多糖为 β -吡喃多糖。

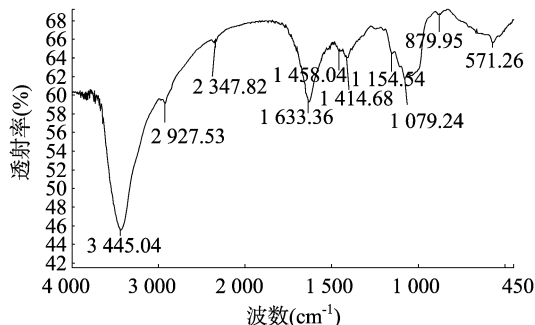


图5 平菇多糖的红外光谱分析

紫外光谱在实际应用中非常广泛,可以用来对有机化合物进行定量分析,该分析方法灵敏度较高,能够检测出浓度为 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物,蛋白质的吸收峰为 280 nm、核酸的吸收峰为 260 nm。由图 6 可见,测出的紫外吸收光谱非常平滑,光滑曲线上没有出现峰值,这说明提取的平菇多糖中,蛋白质和核酸的含量都很少。

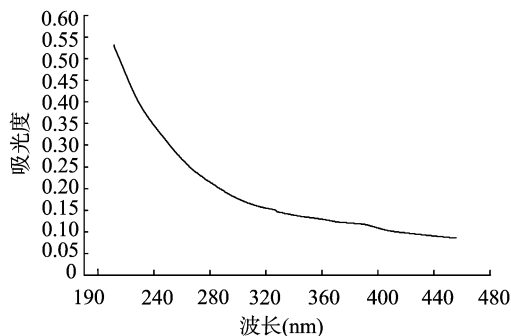


图6 平菇多糖的紫外吸收光谱

3 小结

本试验采用多酶法对平菇多糖进行优化提取,首先通过

(上接第 208 页)

骨板的前缘与 1 对勾状软骨相连;软骨板的外侧缘中间稍偏后方有关节面与甲状软骨的后角相连。勾状软骨 1 对,附于环状软骨背侧前缘,呈三角形小骨,前端附有弯曲的弹性软骨形成的小角软骨。

3 小结

一般哺乳动物的喉腔有声带,有的动物还有室褶,声带和室褶都属于喉腔的黏膜褶^[2,5]。兔喉腔除了有声带和室褶外,在喉中室两侧还有 1 对纵向的小黏膜褶(图 1 中的 V),该黏膜褶位于 2 个乳头之间。至于该黏膜褶对兔的发声有何作用,还有待进一步研究。

马等动物的会厌软骨有楔状突^[5],楔状突是从会厌软骨基底部两侧缘发出的棒状软骨突,位于喉侧壁内,参与构成室褶。兔会厌软骨的乳头突(图 1 中的 R)不是从会厌软骨基底部两侧缘发出,而是从基底部的背侧向后上方发出 1 对乳头

对粒度、料液比、时间、酶量等单因素分别进行试验,得出在平菇粉末粒度 >80 目、料液比为 1:25、时间 1.5 h、复合酶(纤维素酶:木瓜蛋白酶=1:1)对底物的浓度为 2.0% 时平菇多糖的得率最高。

然后通过对酶解温度、pH 值、加酶比(纤维素酶:木瓜蛋白酶)进行 3 因素 3 水平正交试验,得出在酶解温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7、纤维素酶:木瓜蛋白酶=2:1 的条件下,平菇多糖的得率最高为 13.93%。

通过傅里叶红外光谱仪对平菇多糖的结构进行分析,可以得出平菇多糖为 β -吡喃多糖;将提纯后的干燥平菇多糖,采用 Lambda-35 型紫外可见分光光度计进行紫外吸收光谱分析,结果表明平菇多糖中的蛋白质和核酸的含量都比较少。

参考文献:

- [1] 王立泽. 食用菌栽培[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1993: 82-97.
- [2] 程超,李伟. 平菇多糖的提取条件及其沉淀特性研究[J]. 食品工业科技,2005,26(8):92-94.
- [3] Franz G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts[J]. Planta Medica,1989,55(6):493-497.
- [4] 张扬,熊耀康. 超声波提取平菇多糖工艺研究[J]. 中国实用医药,2009,4(29):13-14.
- [5] Sham P W Y, Scaman C H, Durance T D. Texture of vacuum microwave dehydrated apple chips as affected by calcium pretreatment, vacuum level and apple variety[J]. Journal of Food Science,2001,66(9):1341-1347.
- [6] 赵国华,陈宗道,李志孝,等. 活性多糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业,2001,27(7):45-48.
- [7] 叶凯贞,黎碧娜,王奎兰,等. 多糖的提取、分离与纯化[J]. 广州食品工业科技,2004,20(3):144-145.
- [8] 叶姜瑜,谈锋. 紫芝多糖的纯化及组分分析[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2002,27(6):945-949.
- [9] 黄桂萍,肖红,张敏生,等. 微波技术提取香菇多糖的研究[J]. 食品科学,2006,27(11):267-269.

状突起,不位于喉侧壁内,不参与构成室褶,所以该乳头突是否属于楔状突,还有待于商榷。

参考文献:

- [1] 南开大学实验动物解剖学编写组. 实验动物解剖学[M]. 北京:人民教育出版社,1979.
- [2] 董常生. 家畜解剖学[M]. 4 版. 北京:中国农业出版社,2009.
- [3] 杨安峰. 兔的解剖[M]. 北京:科学出版社,1979.
- [4] Johnson-Delaney C A, Orosz S E. Rabbit respiratory system: clinical anatomy, physiology and disease[J]. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice,2011,14(2):257-266.
- [5] Sisson S. The anatomy of the domestic animals[M]. Philadelphia: W B Saunders Company,1975.
- [6] Yoon Y H, Rha K S, Koo B S, et al. The preventive effect of halofuginone on posterior glottic stenosis in a rabbit model[J]. Otolaryngology-head and Neck Surgery,2008,139(1):94-99.