

邹东恢,郭宏文.多酶法提取榛蘑多糖及光谱研究[J].江苏农业科学,2015,43(8):276-278.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.091

多酶法提取榛蘑多糖及光谱研究

邹东恢,郭宏文

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院/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:研究了多酶法提取榛蘑多糖的最佳条件并进行光谱研究,通过单因素和正交试验确定了酶法提取榛蘑多糖的最佳工艺,即:粒度 80 目,料水比 1:20,酶作用温度 40℃,加酶(加酶总量为底物的 1%)质量比(木瓜蛋白酶:纤维素酶)3:1,pH 值 6.5,酶作用时间 2.0 h;在此条件下多糖的提取率可达 16.85%。红外光谱分析表明榛蘑多糖为含有葡萄糖醛酸的 β -吡喃多糖。

关键词:榛蘑多糖;多酶法提取;正交试验;光谱分析

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0276-03

榛蘑多糖(AMP)是从榛蘑菌丝体、子实体和发酵产物中分离而来的,是一种能够控制细胞的分裂分化和调节细胞生长衰老的活性多糖,同时它还具有抗辐射、促进造血、抑制肿瘤生长、调节免疫等药理作用^[1-2]。此外,榛蘑多糖也具有一定的抗氧化能力,可以用于制备具有抗氧化活性的天然活性物质。榛蘑多糖提取可以采用热水、稀酸、稀碱作为浸提剂,也可采用微波法、超声波法辅助提取,浸提法是提取榛蘑多糖的传统方法,但时间长、效率低、能耗大^[3],多糖的提取率普遍不高。酶法提取多糖简单快捷、省时低耗,对榛蘑多糖的工业化提取及生产具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 原料处理

将市场上购买的榛蘑根部去除后,用清水清洗干净,用剪刀将菌伞剪成适当的小块,放入真空干燥箱中干燥,用粉碎机粉碎,将粉碎后的榛蘑干粉依次通过 20、40、60、80 目的筛子,之后将各级的榛蘑粉放入洁净干燥的烧杯中,并将其置于干燥箱中待用。

1.2 试剂与仪器

SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵:河南省巩义市予华仪器有限责任公司;离心机:上海跃进医疗器械厂;RH-Q 型全温振荡器:江苏省全坛市荣华仪器制造有限公司;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;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;所使用的试剂均为分析纯。

1.3 葡萄糖标准曲线的制作

以测定的吸光度 D 作为纵坐标,葡萄糖的质量浓度 C 作为横坐标,用苯酚-硫酸法测定多糖含量,绘制出葡萄糖标准曲线为 $y = 12.313 0x - 0.029 1$,相关系数为 $r = 0.999 1$ 。

收稿日期:2014-09-05

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: zoudong1000@163.com。

1.4 酶法提取榛蘑多糖的方法

精确称取 80 目的榛蘑粉 2 g 于锥形瓶中,按照一定的料水质量比加入蒸馏水,用 pH 计调节 pH 值,按照一定加酶比加入木瓜蛋白酶和纤维素酶(加酶总量为底物的 1%),在恒温振荡器上振荡一定时间,用 100℃沸水锅水浴 10 min,灭酶,在冷却至室温之后,用 8 000 r/min 离心机离心 10 min,取上清液,即得到酶提取多糖清液。

1.5 多糖总量的测定

采用苯酚-硫酸比色法^[4]。硫酸-苯酚法是以硫酸、苯酚作为显色剂,与榛蘑多糖发生显色反应,在 490 nm 波长处测定吸光度,再通过已经测定的葡萄糖标准曲线计算求得榛蘑中的多糖含量。

1.6 蛋白质去除方法

本试验采用 Seavage 法^[5]来去除榛蘑多糖溶液中的杂蛋白。配制氯仿-正丁醇溶液,两者的体积比为 4:1,在榛蘑多糖溶液中加入其 1/4 体积的氯仿-正丁醇溶液,将其置于大锥形瓶中,充分摇匀 30 min 之后,静置,去除溶液下面的白色混浊物;取上清液于另一锥形瓶中,重复操作 3~4 次后,即可除去榛蘑多糖溶液中的蛋白质。

2 结果与分析

2.1 单因素试验条件确定

2.1.1 物料粒度对榛蘑多糖提取的影响 从图 1 可知,20、40、60、80 目的榛蘑粉提取的多糖分别为 10.26%、10.48%、10.65% 和 12.08%,由此可知 80 目的榛蘑粉提取的多糖最高,因此试验选定物料粒度为 80 目。

2.1.2 料水质量比对榛蘑多糖提取的影响 从图 2 可知,料水质量比为 1:5、1:10、1:15、1:20 的条件下榛蘑粉提取的多糖分别为 7.02%、10.24%、11.97% 和 12.37%,因此试验确定料水质量比为 1:20。

2.1.3 pH 值对榛蘑多糖提取的影响 从图 3 可知,pH 值为 4.5、5.5、6.5、7.5 的条件下榛蘑粉提取的多糖为 10.81%、10.47%、12.93% 和 10.04%,由此可知 pH 值为 6.5 时的榛蘑粉提取的多糖最高(图 3),因此试验选定 pH 值为 6.5。

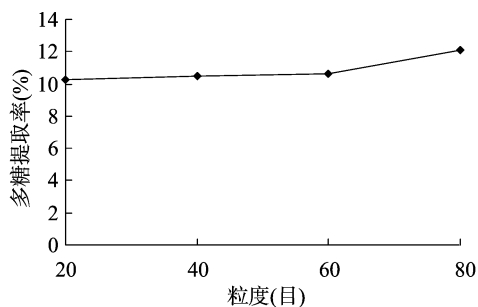


图1 物料粒度对榛蘑中多糖提取的影响

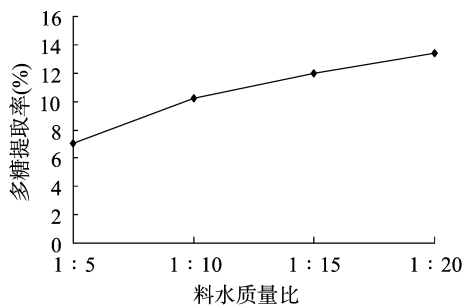


图2 料水质量比对榛蘑中多糖提取的影响

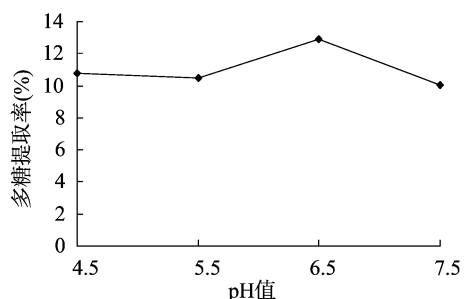


图3 pH 值对榛蘑中多糖提取的影响

2.1.4 温度对榛蘑多糖提取的影响 从图4可知,温度为30、40、50、60℃的条件下榛蘑提取的多糖分别为11.63%、12.88%、13.69%和12.59%,当温度在30~50℃之间时,随着温度的升高,多糖提取率较快地增长,继续升高温度提取的多糖便有了下降的趋势,因此试验确定温度为50℃。

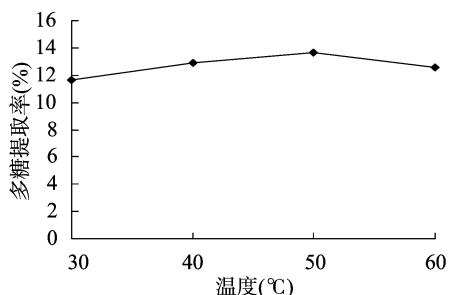


图4 温度对榛蘑中多糖提取的影响

2.1.5 时间对榛蘑多糖提取的影响 从图5可知,时间为0.5、1.0、1.5、2.0 h的条件下测定榛蘑粉的多糖提取率,以2.0 h的条件下最高,因此试验选定时间为2.0 h。

2.1.6 加酶质量比对榛蘑多糖提取的影响 从图6可以看出,当加酶总量为底物的1%时,随着加酶质量比(木瓜蛋白酶:纤维素酶)的增大提取的多糖也逐渐增加,当酶比为3:1

时,提取率开始下降,考虑到酶的成本及效果,加酶质量比应为2:1。

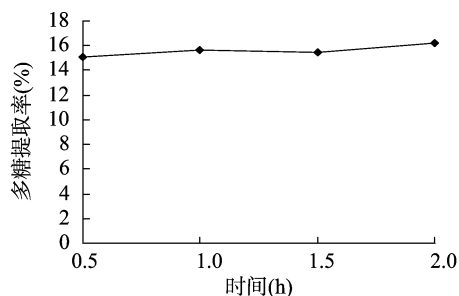


图5 时间对榛蘑中多糖提取的影响

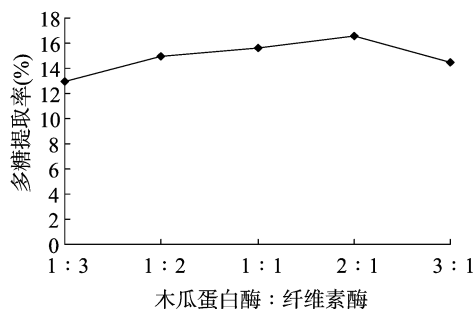


图6 加酶质量比对榛蘑中多糖提取的影响

2.2 榛蘑多糖提取的正交试验结果分析

2.2.1 因素与水平 在单因素试验的基础上,选择影响榛蘑多糖提取的主要因素加酶(加酶总量为底物的1%)质量比(木瓜蛋白酶:纤维素酶)、酶解温度、pH值、酶解时间进行四因素三水平正交试验(表1),确定提取榛蘑多糖的最佳条件。

表1 榛蘑多糖提取工艺正交试验因素与水平

水平	因素			
	A:加酶质量比(木瓜蛋白酶:纤维素酶)	B:酶解温度(℃)	C:pH值	D:酶解时间(h)
1	1:1	40	5.5	1.0
2	2:1	50	6.5	1.5
3	3:1	60	7.5	2.0

2.2.2 正交试验结果 由表2中4个因素的极差值可知,影响榛蘑多糖提取率的4个因素的主次顺序是A>B>D>C。通过正交试验可知复合酶法提取榛蘑多糖的最佳工艺条件为A₃B₁C₂D₃,即加酶质量比(木瓜蛋白酶:纤维素酶)为3:1,酶解温度为40℃,pH值6.5,酶解时间2.0 h,此时榛蘑多糖的提取率为16.85%。

2.3 榛蘑粗多糖的脱色与醇沉提取

将除净蛋白质的多糖溶液用20 g/L的活性炭脱色1 h,抽滤后再10 000 r/min离心10 min。将离心后的上清液放入锥形瓶中,加入大于溶液体积75%的乙醇,然后置于4℃冰箱中醇沉24 h。取出后用离心机8 000 r/min离心15 min,取出沉淀物放入表面皿中,在真空干燥箱中干燥,得到榛蘑粗多糖。

2.4 色谱分离纯化

取粗多糖10 mL上柱。用恒流泵控制流速(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

表 2 榛蘑多糖提取工艺正交试验结果

试管号	A	B	C	D	多糖提取率(%)
1	1	1	1	1	12.92
2	1	2	2	2	12.28
3	1	3	3	3	12.84
4	2	1	2	3	15.36
5	2	2	3	1	11.35
6	2	3	1	2	11.45
7	3	1	3	2	16.33
8	3	2	1	3	14.63
9	3	3	2	1	13.94
T ₁	38.04	44.61	39.00	38.21	
T ₂	38.16	38.36	41.58	40.06	
T ₃	44.90	37.96	40.52	42.83	
k ₁	12.68	14.87	13.00	12.73	
k ₂	12.72	12.78	13.86	13.35	
k ₃	14.98	12.65	13.50	14.27	
R	2.30	2.22	0.86	1.54	

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。

2.5 榛蘑多糖结构红外吸收光谱分析结果

红外光谱和分子结构有着极其密切的关系,已成为测定分子结构的一种重要方法。由于红外光谱仪的广泛应用,现在已成为一种常规的分析测试手段。由图 7 可知,由多糖中 O—H、N—H 伸缩振动引起 3 418.17 cm⁻¹ 处的峰值;在 2 929.88 cm⁻¹ 处吸收峰是由多糖中 C—H 的伸缩振动引起的,是糖类的特征吸收;在 1 641.61 cm⁻¹ 处吸收峰是—CHO 的 C=O 的非对称伸缩振动引起的,为肽链上酰胺碳基的吸收峰;在 1 402.05 cm⁻¹ 处吸收峰是由多糖中 C—O—C 和 C—O—H 的伸缩振动引起的;在 1 247.92 cm⁻¹ 处的吸收峰是由多糖中 C=O 的对称性伸缩振动引起的,说明有羧酸的存在;在 1 137.32 cm⁻¹ 处吸收峰是由多糖中 D-吡喃葡萄糖伸缩振动引起的;在 1 073.57 cm⁻¹ 处吸收峰是由多糖中 β-D-吡喃葡萄糖苷伸缩振动引起的;在 871.88 cm⁻¹ 为 β-吡喃环中 C₁—H 的变角振动吸收峰;在 805.52 cm⁻¹ 处是由吡喃环中 C₁—H 的变角振动引起的。由此可知,榛蘑多糖为含有葡萄糖醛酸的 β-吡喃多糖。

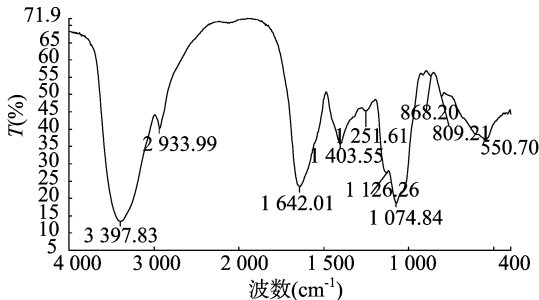


图7 榛蘑多糖的红外光谱分析

2.6 榛蘑多糖结构紫外吸收光谱分析结果

紫外吸收光谱应用广泛,可用于有机化合物的结构表征和有机化合物的定量分析^[6]。由图 8 可知,得到的紫外吸收光谱显示核酸和蛋白质的含量较小,因为在核酸(吸收峰 260 nm)和蛋白质(吸收峰 280 nm)吸收波长处未出现峰值。

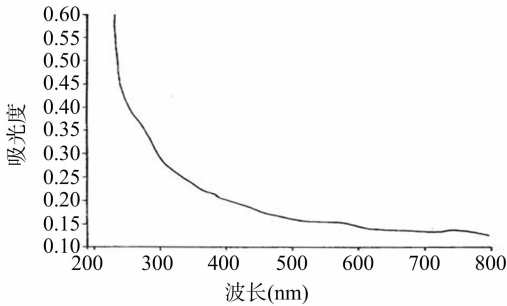


图8 榛蘑多糖的紫外吸收光谱

3 结果与讨论

本试验中,首先采用单因素试验确定优化条件,即:物料粒度为 80 目,料液质量比为 1 : 20,然后采用正交试验的方法来进一步优化榛蘑多糖的提取条件,得到提取榛蘑多糖的最佳优化条件,即为提取温度 40 ℃,pH 值 6.5,酶解时间 2.0 h,加酶(加酶总量为底物的 1%)质量比(木瓜蛋白酶:纤维素酶) 3 : 1,最佳优化条件的榛蘑多糖提取率达到 16.85%。

采用 Spectrum one 傅里叶变换红外光谱仪对干燥后的榛蘑多糖进行结构分析,由多糖中 O—H、N—H 伸缩振动引起 3 418.17 cm⁻¹ 处的峰值;在 2 929.88 cm⁻¹ 处吸收峰是由多糖中 C—H 的伸缩振动引起的,是糖类的特征吸收;在 1 641.61 cm⁻¹ 处吸收峰是—CHO 的 C=O 的非对称伸缩振动引起的,为肽链上酰胺碳基的吸收峰;在 1 402.05 cm⁻¹ 处吸收峰是由多糖中 C—O—C 和 C—O—H 的伸缩振动引起的;在 1 247.92 cm⁻¹ 处的吸收峰是由多糖中 C=O 的对称性伸缩振动引起的,说明有羧酸的存在;在 1 137.32 cm⁻¹ 处吸收峰是由多糖中 D-吡喃葡萄糖伸缩振动引起的;在 1 073.57 cm⁻¹ 处吸收峰是由多糖中 β-D-吡喃葡萄糖苷伸缩振动引起的;在 871.88 cm⁻¹ 为 β-吡喃环中 C₁—H 的变角振动吸收峰;在 805.52 cm⁻¹ 处是由吡喃环中 C₁—H 的变角振动引起的。由此可知,榛蘑多糖为含有葡萄糖醛酸的 β-吡喃多糖。

采用 Lambda-35 型紫外可见分光光度计对榛蘑多糖进行紫外光谱扫描,得到一条较为光滑的曲线,在 260 nm 和 280 nm 处都没有出现峰值,由此可知榛蘑多糖中核酸和蛋白质的含量较少。

参考文献:

[1] 秦俊哲,吕嘉彬. 食用菌栽培学[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社,2002:213.
[2] Franz G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts[J]. Planta Medica, 1989, 55(6): 493-497.
[3] 邵信儒,孙海涛,赵晓春. 山榛蘑多糖提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 224-225, 228.
[4] 王小东,慧玲,王顺启. 真菌多糖的研究进展[J]. 江西科学, 2005, 23(3): 43-46.
[5] Sham P 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] 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.