

银耳多糖的提取、分离、纯化及其 功能性研究

黄秀锦

(江苏食品职业技术学院, 江苏 淮安 223001)

摘要: 本实验研究了银耳多糖的提取、分离、纯化及其功能性。结果表明, 酶法浸提效果优于碱浸提法, 酶法提取银耳多糖溶液的最适条件为: 料水比 1:60, 加入 0.7% 的果胶酶, 酶解 50min, 浸提时间 60min; 银耳多糖通过 DEAE-Sephadex Fast Flow 和 SephadexG-200 柱层析后可得到纯度较高的 TPP2 多糖。TPP2 具有极强的清除 DPPH· 的活性, DPPH· 清除一半时的 TPP2 浓度为 55 μg/m (IC₅₀)。

关键词: 银耳多糖; 提取; 酶; 纯化

Comparison Study on Enzymatic and Alkaline Extractions, Isolation, Purification and
Functional Properties of *Tremella* Polysaccharides

HUANG Xiu-jin

(Jiangsu Food College, Huaian 223001, China)

Abstract: Extraction, isolation, purification and functional properties of *Tremella* polysaccharides were studied in the paper. The results showed that the enzymatic extraction method was better than the alkali extraction. The optimal conditions for enzymatic extraction are 1:60 of the sample to water ratio, 0.7% of Citrozyme Cloudy, 50 min of enzymatic hydrolysis and 60 min of extraction. A pure polysaccharides TPP2 can be obtained by DEAE-Sephadex Fast Flow and SephadexG-200 purification of *Tremella* polysaccharides. TPP2 shows the active capability in scavenging DPPH·. The sample thickness is 55 μg/ml in 50% scavenging rate (IC₅₀).

Key words *Tremella* polysaccharides extraction enzyme purification

中图分类号: TQ929.2

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0134-03

银耳中含有丰富的银耳多糖(约占银耳干重的 60%~70%), 银耳所含有的酸性多糖具有广泛的生理活性, 能提高机体免疫力, 抗肿瘤, 可清除自由基, 诱导人体产生抗体及干扰素, 可治疗高血压、高血脂、糖尿病等多种医学中疑难病症^[1-3]。

本实验就银耳多糖的提取、分离、纯化和功能性进行了研究, 以期对银耳资源的深度开发提供参考。

1 材料与设备

1.1 材料与设备

银耳 市售; 果胶酶 Citrozyme Cloudy NOVO 公司; 二苯代苦味基自由基 (DPPH·) 日本东京化成工业株式会社。

IFM-100 高速粉碎机; R-201 真空旋转蒸发器;

UV2100 型紫外可见分光光度计; NDZ-79 旋转式黏度计; BSZ100 自动部分收集器; XWT-S 小型台式记录仪; HL-2 型恒流泵。

1.2 银耳多糖提取工艺

银耳→粉碎→浸提→过滤→上清液浓缩→乙醇沉淀→静置、离心、烘干→粗多糖→加 Sevag 试剂→上清液→浓缩→乙醇沉淀→离心、烘干→除蛋白质后多糖

1.3 分离纯化

1.3.1 DEAE-Sephadex Fast Flow 柱层析分离

将银耳多糖配制成 10mg/ml 溶液, 微孔过滤后上样, 上样体积为 20ml, 分布收集, 将有活性多糖的峰收集后浓缩、冷冻干燥。洗脱条件为: 300ml 蒸馏水与 3N 的 NaCl 混合梯度洗脱, 流速 90ml/h, 柱大小为 2.6cm × 30cm。

收稿日期: 2006-10-26

作者简介: 黄秀锦(1967-), 女, 副教授, 研究方向为食品分析。E-mail: ningmen3749574@tom.com

1.3.2 SephadexG-200 凝胶过滤柱层析分离

将1.3.1中的冻干样品复溶后配制成1mg/ml溶液,微孔过滤后上样,上样体积为10ml,分布收集,合并糖峰洗脱液,浓缩后冻干,将该组份命名为TPP2。洗脱条件为:蒸馏水洗脱,流速30ml/h,柱大小为2cm×80cm。

1.4 TPP2 清除 DPPH 自由基活性测定

配制反应S₀溶液、S_i溶液和S_j溶液,30min后,用分光光度计在520nm测定各吸光度(A),清除率按下式计算:

$$\text{清除率 } I(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100$$

式中, S₀为5.5ml 6.5×10⁻⁵DPPH·无水乙醇溶液+0.2ml 试样的溶剂,作空白,吸光度为A₀; S_i为5.5ml 6.5×10⁻⁵DPPH·无水乙醇溶液+0.2ml 试样。吸光度为A_i; S_j为5.5ml DPPH·溶液的溶剂+0.2ml 试样,吸光度为A_j。

1.5 黏度测定

NDZ-79 旋转式黏度计测定。

1.6 总糖含量测定

苯酚-硫酸法。

1.7 还原糖含量测定

采用DNS法。

多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量

2 结果与分析

2.1 浸提方法的选择

2.1.1 碱提法

碱提法是多糖的常用提取方法之一,影响碱提法的因素主要有碱提时间、温度、碱液浓度,一般情况下,提取液的黏度越高,多糖的含量越高,因此,本实验

表1 碱提法正交试验结果分析

Table 1 Analysis of orthogonal design for alkali extraction

试验号	A温度(°C)	B碱提时间(h)	C碱液浓度(mol/L)	黏度(m ² /s)
1	A1 (50)	B1 (1.5)	C1	85
2	A1	B2(2)	C2	1525
3	A1	B3(2.5)	C3	2025
4	A2(60)	B1	C2	740
5	A2	B2	C3	330
6	A2	B3	C1	755
7	A3(70)	B1	3	715
8	A3	B2	C1	120
9	A3	B3	C2	900
k ₁	1211.7	513.3	320	
k ₂	608.3	658.3	1055	
k ₃	578.3	1226.7	1023.3	
R	633.4	713.4	735	

以提取液的黏度为指标,采用三因素三水平正交试验,结果如表1所示。

从表1可以看出,影响碱提的各个因素的优先顺序为C(碱液浓度)>B(碱提时间)>A(温度),最佳条件应为C₂B₃A₁,按照此最佳条件所得提取液的黏度为2045 m²/s,略高于3号试验结果。

2.1.2 酶解浸提法

酶解浸提法液是多糖的常用提取方法之一,本试验的果胶酶的最佳作用温度为50℃,最佳酶解pH值为5.0,在此条件下,影响的酶解浸提法因素主要有加酶量、酶解时间,浸提时间和料水比,以提取液黏度为指标,采用三因素四水平正交试验,结果如表2所示。

从表2可以看出,影响酶解浸提法的各个因素的优先顺序为A>B>C>D,最佳条件应为A₁B₃C₃D₃,即加酶量为0.7%,酶解时间为50min,浸提时间为60min,料水比为1:60,为3号实验结果,即黏度为2865m²/s。比较表1和表2的试验结果,酶解浸提法所得提取液黏度(2865m²/s)远远高于碱提法所得提取液黏度(2045m²/s),说明酶解浸提法优于碱提法。另外用碱提法所得提取液颜色呈黄色,有浓重的碱味,严重影响了成品的色泽和风味,因此本试验采用酶解浸提法提取银耳多糖。另外,需要指出的是,料水比不能太低,否则料液黏度太大,过滤困难,会导致后续操作中多糖的损失。

表2 酶解浸提法正交试验结果分析

Table 2 Analysis of orthogonal test for extraction by enzymatic hydrolysis

试验号	A 加酶量 (%)	B 浸提时间 (min)	C 酶解时间 (min)	D 料水比	黏度 (m ² /s)
1	A1 (0.7)	B1 (40)	C1 (30)	D1 (1:40)	450
2	A1	B2 (50)	C2 (40)	D2 (1:50)	2245
3	A1	B3 (60)	C3 (50)	D3 (1:60)	2865
4	A2 (0.9)	B1	C2	D3	1040
5	A2	B2	C3	D1	630
6	A2	B3	C1	D2	1065
7	A3 (1.1)	B1	C3	D2	1005
8	A3	B2	C1	D3	420
9	A3	B3	C2	D1	1200
k ₁	1853.3	831.7	645	760	
k ₂	911.7	1098.3	1495	1438.3	
k ₃	875	1710	1500	1441.7	
R	978.3	878.3	855	681.7	

2.2 银耳多糖的分离纯化

2.2.1 DEAE-Sepharose Fast Flow柱层析分离

将银耳多糖配制成10mg/ml溶液,微孔过滤后上DEAE-Sepharose Fast Flow柱,上样体积为20ml,洗脱曲线如图1所示。

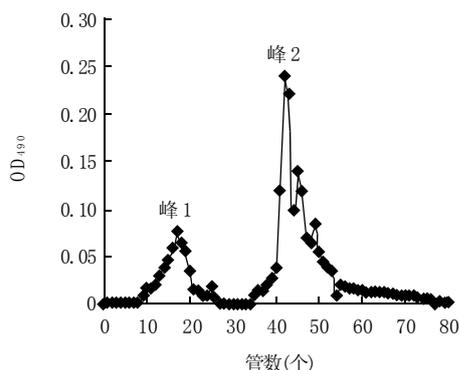


图1 银耳粗多糖 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析洗脱曲线
Fig.1 Diluting curve of *Tremella* crude polysaccharides in DEAE-Sepharose Fast Flow column

从图1可以看出,银耳粗多糖经 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析洗脱可以得到两个峰,峰1由于洗脱液为蒸馏水,因此可初步判断为中性多糖,而峰2为经 NaCl 溶液-蒸馏水梯度洗脱所得,可判断为酸性多糖。将峰2收集、浓缩并冷冻干燥。

2.2.2 SephadexG-200 凝胶过滤柱层析分离

峰2复溶后配制成 1 mg/ml 溶液,微孔过滤后上 SephadexG-200 凝胶过滤柱, SephadexG-200 凝胶过滤柱层析分离结果如图2所示。

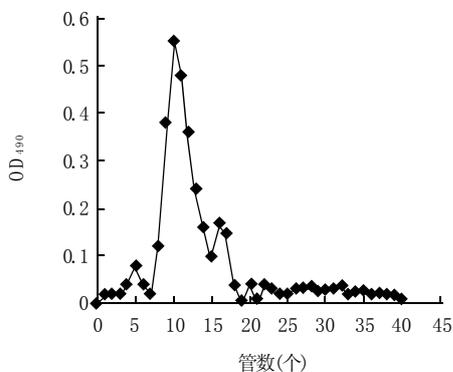


图2 峰2经 SephadexG-200 凝胶过滤柱层析洗脱曲线
Fig.2 Diluting curve of peak 2 in SephadexG-200 column

从图2可以看出,峰2经 SephadexG-200 凝胶过滤柱层析后可以得到一个主峰。将此峰收集后经浓缩、冻干,得到 TPP2。

2.3 产品纯度的鉴定

2.3.1 产品紫外区域吸收测定

将 TPP2 复溶后,配制成 1 mg/ml 溶液,微孔过滤后上 SephadexG-200 凝胶过滤柱,选择紫外检测器,用记录仪记录下溶液在波长分别为 220、260 和 280nm 下的吸光度,结果发现,TPP2 在此三个波长下均无吸收,

因此,可以判断 TPP2 中不含蛋白质和核酸等紫外条件下有吸收峰的物质。

2.3.2 产品成分分析

TPP2 产品成分测定结果如表3所示。

表3 TPP2 产品成分分析
Table 3 Analysis of components in TPP2

成分	总糖(%)	水分(%)	灰分(%)
含量	80.85	8.5	9.3

2.4 TPP2 清除 DPPH· 自由基活性的结果与分析

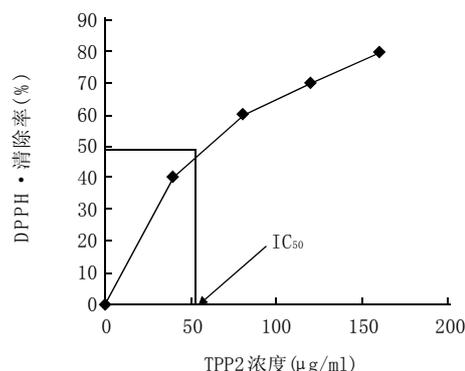


图3 DPPH· 自由基清除率随 TPP2 浓度变化曲线
Fig.3 Variation of cleaning rate of DPPH· to concentration of TPP2

从图3可以看出,TPP2 对 DPPH· 自由基有极强的清除效果,TPP2 的 IC_{50} (DPPH· 清除率为 50% 时 TPP2 的浓度) 为 $55\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

3 结论

3.1 选择果胶酶解浸提法提取银耳多糖。加酶量为 0.7%, 酶解时间为 50min, 浸提时间为 60min, 料水比为 1:60。提取液黏度达到 $2865\text{ m}^2/\text{s}$ 。

3.2 先后用 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析和 SephadexG-200 凝胶过滤柱层析分离纯化银耳多糖,得到纯度较高的 TPP2, 产品中不含核酸和蛋白质。

3.3 TPP2 对 DPPH· 自由基有极强的清除效果。 IC_{50} 为 $55\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

参考文献:

- [1] 崔蕊静, 李凤英, 李春华. 银耳多糖的提取及其在饮料中的应用[J]. 中国食用菌, 2003, 23(2): 39-41.
- [2] SMIRONFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1051-1560.
- [3] GAO Q P, ROLFSELJELID, CHEN H Q, et al. Characterization of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk with cytokine stimulating activity[J]. Carbohydrate Research, 1996, 288: 135-142.