

黑木耳多糖的酶法提取、纯化及性质研究

韩春然, 唐娟, 马永强

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 本文以双酶法提取黑木耳粗多糖, 利用 DEAE-Cellulose 52 和 Sepharose CL-4B 柱层析对其进行纯化, 以 Sephadex G-100 凝胶柱层析测定了多糖的分子量。结果表明黑木耳多糖含有两个主要组分 APE I 和 APE II, 分子量分别为 31.7×10^4 和 18.3×10^4 , 均为非淀粉类多糖, 不含单糖、蛋白质、核酸及多酚类物质。

关键词: 黑木耳; 多糖; 层析; 纯化; 分子量

Study on Isolation, Purification and Characteristics of Polysaccharides from *Auricularia auricula*

HAN Chun-ran, TANG Juan, MA Yong-qiang

(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: The *Auricularia auricular* polysaccharides were extracted by proteinase and cellulase, purified by DEAE-Cellulose 52 and Sepharose CL-4B chromatography. The molecular weight was determined by Sephadex G-100 chromatograph. The results showed that there are two main fractions in *Auricularia auricular* polysaccharides with the molecular weight of 31.7×10^4 and 18.3×10^4 , respectively, which are non-starch polysaccharides, free of simple sugar, protein, nuclear acid and phenols.

Key words: *Auricularia auricular*; polysaccharides; chromatography; purify; molecular weight

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)02-0053-04

木耳 (*Auricularia auricula* (L.ex Hook) Underwood), 又名黑木耳, 在我国已有 1000 多年的栽培史, 是我国传统的保健佳品^[1]。现代医学研究证实, 黑木耳所含的多糖体具有抗溃疡^[2]、延缓衰老^[3]、降低血脂^[4]、抗肝炎、抗突变^[5]、抗肿瘤^[6]、增强蛋白质和核酸代谢及促进机体免疫等功能, 作为“黑色食品”家族中的重要成员, 黑木耳越来越受到追求营养与健康的现代人重视。本文以黑木耳为原料, 首次采用复合酶法分离提取黑木耳多糖, 并经离子交换纤维素和葡聚糖凝胶对其进行组分拆分和纯化, 为黑木耳多糖的进一步开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黑木耳: DEAE-Cellulose 52 Waterman 公司; DEAE-Sephadex A50、蓝色葡聚糖、标准葡聚糖 (Dextran T-10, T-40, T-70, T-110, T-500) Pharmacia 公司; Sepharose CL-4B 北京鼎国生物技术有限公司 透析袋 (DM36, 透析分子量 8000~14000) Sigma 公司。

1.2 仪器

722 光栅分光光度计 上海精密科学仪器有限公司
UV-120-02 紫外/可见光分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 黑木耳多糖的提取

采用复合酶水解法提取黑木耳多糖。黑木耳经除杂、干燥、粉碎、过筛等预处理后, 得到黑木耳子实体干粉。以中性蛋白酶 (120 IU/g 木耳) 在 45℃, pH 7.0, 酶解 2.5 h; 再以纤维素酶 (90 IU/g 木耳), 于 50℃, pH 5.0 酶解 3.5 h。然后迅速升温至 80℃, 灭酶浸提 2 h, 离心, 过滤。

1.3.2 黑木耳多糖的纯化

1.3.2.1 脱蛋白

采用 Sevag 法^[7], 按照黑木耳多糖水溶液 1/4 体积加入氯仿/正丁醇 (4:1) 试剂, 剧烈振荡 30 min, 离心, 倾出上清液, 除去中间变性蛋白及下层氯仿, 重复操作直至中间层无变性蛋白。

1.3.2.2 脱色

采用 H₂O₂ 法, 将多糖水溶液用氨水调 pH 值至 8.0,

收稿日期: 2005-11-16

基金项目: 黑龙江省教育厅重大项目 (105112006)

作者简介: 韩春然 (1970-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为食品基础原料开发。

40℃滴加 5% H_2O_2 , 保温(40℃)3h, 以 DM36, 透析分子量 8000~14000 的透析袋于室温下透析 4h, 得黑木耳多糖(APE)。

1.3.2.3 黑木耳多糖的分级

(1) DEAE-纤维素柱层析

采用 DEAE-Cellulose 52(Cl^-)柱层析, 湿法装柱($\phi 1cm \times 30cm$), 取脱蛋白、脱色后的木耳多糖上样以 pH7.5 Tris-HCl 缓冲液平衡好的层析柱, 分别用 pH7.5 Tris-HCl、Tris-HCl+0.2mol/L NaCl、Tris-HCl+0.5mol/L NaCl 阶段洗脱, 流速 10ml/h, 分部收集洗脱液(5ml/tube), 各管以蒽酮-硫酸法检测多糖含量。

(2) Sepharose CL-4B柱层析

经阴离子交换柱层析分离得到的多糖级分再以 Sepharose CL-4B ($\phi 1cm \times 40cm$) 柱层析进行纯化, 以 0.1mol/L 的 NaCl 溶液进行洗脱, 流速 20ml/h, 流出液分管收集(5ml/tube), 以蒽酮比色法检测每管多糖含量。

依据测定结果, 分段合并各多糖峰部分, 冷冻干燥。

1.3.3 黑木耳多糖的纯度鉴定

取黑木耳多糖组分各 5mg, 以蒸馏水溶解, 于波长 200~400nm 处进行紫外扫描, 记录紫外光谱, 以蒸馏水为对照, 检测样品中是否含有蛋白质及核酸。

1.3.4 黑木耳多糖分子量的测定

采用凝胶柱层析法。Sephadex G-100($\phi 1cm \times 40cm$) 湿法装柱, 将 T 系列葡聚糖标准品(Dextran)及样品分别上样于 0.1mol/L 的 NaCl 溶液充分平衡的层析柱, 以 0.1mol/L 的 NaCl 溶液进行洗脱, 蒽酮-硫酸法检测, 以标准葡聚糖分子量的对数 $\lg MW$ 对分配系数 K_{av} 作标准曲线, 通过标准曲线计算样品的分子量。

1.3.5 黑木耳多糖的理化性质

对分离纯化所得的黑木耳多糖组分分别进行以下性质测定:

溶解性测定; 斐林试剂反应; 碘-碘化钾反应; 双缩脲反应; 三氯化铁反应。

2 结果与分析

2.1 黑木耳多糖的纯化

2.1.1 脱蛋白

多糖提取液经浓缩得到的粗多糖中, 多糖含量很低, 蛋白质是粗多糖中最主要的杂质, 它的存在增加了多糖的吸湿性, 而且它所带电荷可吸附大量其它杂质, 在除去其它杂质的过程中又会吸附多糖, 导致多糖损失, 使多糖的分级纯化变得困难。所以, 多糖纯化的第一步就是脱蛋白。Sevag 法是去除游离蛋白的有效方法。在多糖溶液中加入氯仿-正丁醇混合溶液进行充分振摇, 将游离蛋白变性为不溶性物质, 经离心分

离, 可达到去除蛋白质的目的。

2.1.2 脱色

黑木耳多糖是真菌来源的多糖, 由于含有酚类化合物, 所以提取出来的粗多糖呈棕色, 且溶液的碱性越强, 颜色越深, 黑木耳多糖中的色素大多是负性离子, 不能用活性炭等吸附剂脱色。但这类物质多含有不饱和双键、羟基、芳香环等, 在碱性条件下能与氧化剂反应, 从而达到脱色的目的。本试验采用了 H_2O_2 方法脱色, 过氧化氢是一种无色无臭的液体, 可与水以任何比例混合, 它氧化性较强, 酸性较弱, 通常认为, 过氧化氢的脱色原理是它在水溶液中电离出的过氧氢根离子 HO_2^- 能够与色素结合, 使之脱色。为避免多糖降解, 脱色温度不应过高, 脱色处理后再经透析除去氧化后的小分子色素, 即可使黑木耳多糖颜色变浅。经脱色处理后的黑木耳多糖呈浅黄色。

2.1.3 黑木耳多糖的分级

2.1.3.1 DEAE-纤维素柱层析

多糖分子一般为中性或酸性带负电荷的糖分子, 因此采用阴离子交换柱层析, 采用 DEAE-Cellulose 52 作为分离介质对黑木耳多糖进行层析, 获得了较为满意的结果(图1)。可以看出, 黑木耳多糖经阶段洗脱可以得到三种组分, 其中以 pH7.5 Tris-HCl 洗脱所得组分和以 Tris-HCl+0.2mol/L NaCl 洗脱所得组分为主, 分别命名为 APE I 和 APE II, 收集这两个组分, 透析, 冻干, 得到 APE I 和 APE II。

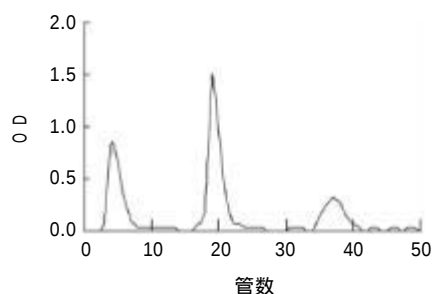


图1 黑木耳多糖的DEAE-Cellulose 52柱层析图

Fig.1 Elution profile of *Auricularia auricula* polysaccharides on DEAE-Cellulose 52 ion exchange column

2.1.3.2 Sepharose CL-4B柱层析

由 APE I 和 APE II 的洗脱曲线(图2、3)可知, 二组分的洗脱峰均为单一对称峰, 均为单一组分, 收集主峰部分, 经透析、冻干得黑木耳多糖 APE I 和 APE II。

2.2 黑木耳多糖的纯度鉴定(紫外光谱)

由图4、5可见, APE I 和 APE II 在紫外 280 和 260nm 处均无明显吸收峰, 说明黑木耳多糖经分离纯化所得的两个主要组分不含蛋白质和核酸。

2.3 黑木耳多糖分子量的测定

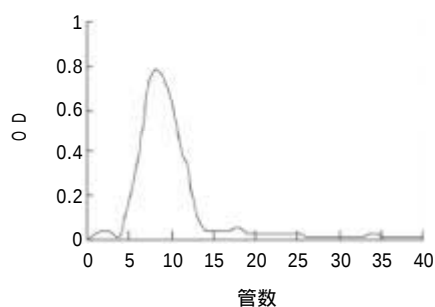


图2 APE I的Sephadex CL-4B柱层析图
Fig.2 Elution profile of APE I on Sepharose CL-4B column

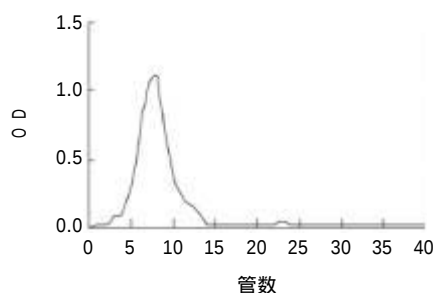


图3 APE II的Sephadex CL-4B柱层析图
Fig.3 Elution profile of APE II on Sepharose CL-4B column

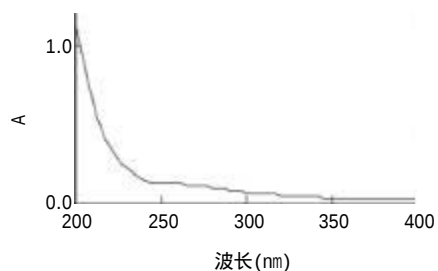


图4 APE I的紫外吸收光谱
Fig.4 Ultraviolet spectra of APE I at 200 to 400 nm

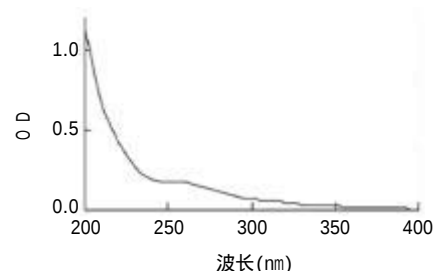


图5 APE II的紫外吸收光谱
Fig.5 Ultraviolet spectra of APE II at 200 to 400 nm

以蓝色葡聚糖测得凝胶柱的外水体积 V_0 为11ml, 标准葡聚糖分子量的对数lgMW对分配系数 K_{av} (lgMW- K_{av}) 所作标准曲线如图6。测得APE I的洗脱体积为13ml, 根据标准曲线, 其分子量为 31.7×10^4 ; APE II的洗脱体积为15ml, 其分子量为 18.3×10^4 。

2.4 黑木耳多糖的理化性质

APE I为白色粉末, APE II为灰白色粉末, 二者

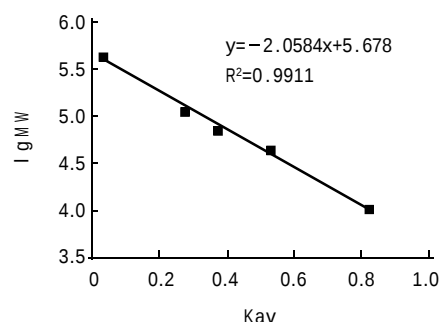


图6 Sephadex G-100柱层析测定葡聚糖分子量标准曲线
Fig.6 Standard curve of molecular weights of dextran by Sephadex G-100 column chromatography

都溶于水, 不溶于无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂; APE I和APE II斐林试剂反应、碘-碘化钾反应、双缩脲反应、三氯化铁反应均为阴性(表1), 说明APE I和APE II均为非淀粉类多糖, 且不含单糖、蛋白质及多酚类物质。

表1 黑木耳多糖的部分理化性质

Table 1 Part of the physicochemical properties of Auricularia auricula polysaccharides

	斐林试剂反应	碘-碘化钾反应	双缩脲反应	三氯化铁反应
APE I	—	—	—	—
APE II	—	—	—	—

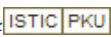
3 结 论

以中性蛋白酶和纤维素复合提取黑木耳中的多糖, 得到的黑木耳粗多糖经Sevag法脱蛋白、 H_2O_2 法脱色、DEAE-Cellulose 52柱层析和Sephadex CL-4B柱层析, 可得到两个多糖组分APE I和APE II, 这两个主要组分均不含蛋白质和核酸, 均为非淀粉类多糖, 且不含单糖、蛋白质及多酚类物质。采用Sephadex G-100凝胶柱层析法测得APE I分子量为 31.7×10^4 , APE II分子量为 18.3×10^4 。

参考文献:

- [1] 杨庆尧. 食用菌生物学基础[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 1-7.
- [2] 薛惟建, 王淑如, 陈琼华. 银耳多糖、银耳孢子多糖及黑木耳多糖的抗溃疡作用[J]. 中国药科大学学报, 1987, 18(1): 45-47.
- [3] 陈依军, 夏尔宁, 王淑如, 等. 黑木耳、银耳及银耳孢子多糖延缓衰老作用[J]. 现代应用药学, 1989, 6(2): 9-10.
- [4] 申建和, 陈琼华. 木耳多糖、银耳多糖和银耳孢子多糖的降血脂作用[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(6): 344-347.
- [5] 周慧萍, 殷霞, 高红霞, 等. 银耳多糖和黑木耳多糖的抗肝炎和抗突变作用[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(1): 51-53.
- [6] 齐德生, 于炎湖. 黑木耳多糖抗肿瘤作用的实验研究[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(2): 160-163.
- [7] 齐慧玲, 魏绍云, 王继伦, 等. Sevage法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工, 2000, (3): 20-21.

黑木耳多糖的酶法提取、纯化及性质研究

作者: 韩春然, 唐娟, 马永强, HAN Chun-ran, TANG Juan, MA Yong-qiang
作者单位: 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨, 150076
刊名: 食品科学 
英文刊名: FOOD SCIENCE
年, 卷(期): 2007, 28 (2)
被引用次数: 6次

参考文献(7条)

1. 周慧萍;殷霞;高红霞 银耳多糖和黑木耳多糖的抗肝炎和抗突变作用[期刊论文]-[中国药科大学学报](#) 1989 (01)
2. 申建和;陈琼华 木耳多糖、银耳多糖和银耳孢子多糖的降血脂作用[期刊论文]-[中国药科大学学报](#) 1989 (06)
3. 陈依军;夏尔宁;王淑如 黑木耳、银耳及银耳孢子多糖延缓衰老作用[期刊论文]-[现代应用药学](#) 1989 (02)
4. 薛惟建;王淑如;陈琼华 银耳多糖、银耳孢子多糖及黑木耳多糖的抗溃疡作用[期刊论文]-[中国药科大学学报](#) 1987 (01)
5. 杨庆尧 食用菌生物学基础 1982
6. 齐慧玲;魏绍云;王继伦 [Sevage法去除白及多糖中蛋白的研究](#) 2000 (03)
7. 齐德生;于炎湖 黑木耳多糖抗肿瘤作用的实验研究 1994 (02)

引证文献(7条)

1. 冯慎, 陈爽, 李妍, 李晓光 植物多糖的纯化工艺研究进展[期刊论文]-[天津化工](#) 2010 (6)
2. 鲜乔, 张拥军 几丁质酶产生菌黑木耳破壁的筛选及鉴定[期刊论文]-[食品与机械](#) 2009 (5)
3. 张容鹄, 冯建成, 窦志浩 黑木耳多糖抗凝活性及提取方法的研究进展[期刊论文]-[农业工程技术·农产品加工业](#) 2009 (12)
4. 徐翠莲, 杜林迦, 樊素芳, 苏惠, 万郑凯 多糖的提取、分离纯化及分析鉴定方法研究[期刊论文]-[河南科学](#) 2009 (12)
5. 李凤玲, 何金环 植物多糖的结构与分离纯化技术研究进展[期刊论文]-[中国农学通报](#) 2008 (10)
6. 宋扬, 周顺新 猴头多糖分离纯化的初步研究[期刊论文]-[生物技术](#) 2007 (5)
7. 冯慎, 陈爽, 李妍, 李晓光 植物多糖的纯化工艺研究进展[期刊论文]-[天津化工](#) 2010 (6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_spkx200702010.aspx