

丁醇沉淀法分离粗直链淀粉的研究

高炜丽, 赵 燕, 李建科*

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 以普通玉米淀粉为原料, 根据直链淀粉和支链淀粉的结构特性不同, 采用丁醇沉降法分离直链淀粉粗产品, 讨论了分离过程中离心温度, 离心力大小等对分离效果的影响, 得出在 8000r/min, 2℃时离心 15min 分离效果最佳, 而且通过对淀粉黏度、蓝值、分子量分布的测定及与标准品的比较, 证实该法分离的直链淀粉纯度较高。

关键词: 丁醇沉淀; 分离; 直链淀粉; 影响因素

Study on Separating Coarse Amylose by Butanol Precipitation

GAO Wei-li, ZHAO Yan, LI Jian-ke*

(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this paper, according to the structural property and physicochemical property of amylose and amylopectin, we use butanol precipitation separating amylose and amylopectin from common corn starch. Discussed the effect of centrifugal time, centrifugal force on separating efficiency of amylose and amylopectin. The results showed that at 2℃, 8000 r/min, centrifuge 15 mins, we could get the best separate efficiency, and at last we compared the viscosity, blue value, gel permeation chromatography of the amylose sample with the standard amylose, confirmed the coarse amylose had a high purity.

Key words butanol precipitation separating amylose effect factors

中图分类号: 0636.12

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)09-0271-04

淀粉既可供食用又可做工业原料, 1940 年 Meyer K H^[1] 等人首先指出淀粉不是单一的物质, 而是直链淀粉和支链淀粉的混合物, 其中直链淀粉是线性直链状分子的多糖, 支链淀粉是高度分支的多糖。

直链淀粉的悬浮乳液在加热时分子螺旋结构散开, 易与水形成氢键, 均匀分布于水中, 形成黏度较低的溶胶溶液^[2-3], 易冻结成凝胶, 成膜性能好, 作为重要工业原料, 用途涉及 30 多个领域, 如食品、医疗、纺织、造纸、包装、石油、环保、光纤、高精度印刷线路板、电子芯片等行业, 特别是作为可生物降解塑料的原材料, 由于其具有较高的剪切力, 强度, 韧性和低廉的价格等等, 是解决目前日益严重得“白色污染”问题的首选材料和有效途径^[4]。但是目前我国尚少有直链淀粉的纯品出售, 所以从混合淀粉中分离直链淀粉的研究迫在眉睫。

本研究根据直链淀粉和支链淀粉的理化特性及结构的不同, 采用丁醇沉降法多次结晶分离直链淀粉粗产品, 讨论了分离过程中抽提温度, 离心温度, 离心速度以及离心力大小对分离效果的影响, 并通过对淀粉黏

度、蓝值、凝胶色谱的分析及与标准品的比较, 鉴定直链淀粉纯度。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

玉米淀粉 鲁州生物科技有限公司; 标准直链淀粉 美国 Sigma 公司; 721-分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; 离心机 德国 SIGMA-3K15 冷冻离心机; 电热鼓风干燥箱 (DHG-9035(A)) 上海赛欧试验设备有限公司; 黏度计 (brookfield DV-2+pro) 美国 brookfield; 氢氧化钠、氢氧化钾、无水乙醇、正丁醇、碘、苯酚、氯化钠、异戊醇等都为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 直链淀粉粗分离^[5]

称取适量玉米淀粉, 经充分脱脂后, 添加到热水中配制成 3% 糊液, 120℃加热搅拌 1h, 使溶液清澈透明, 无结团状, 冷却后调 pH 值 5.9~6.3 后, 在一定温度下高速离心, 除去不溶性杂质后, 添加丁醇-异戊醇的混合液, 在沸水浴中加热搅拌 10min 后, 冷却至

收稿日期: 2007-06-20

*通讯作者

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT0540)

作者简介: 高炜丽 (1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为直链淀粉分离及其应用。

室温, 于2~4℃的冰箱中静置24h, 取出, 冷冻, 高速离心10min, 得到的沉淀物为粗直链淀粉, 离心液为粗支链淀粉。

1.2.2 直链淀粉的纯化^[5-7]

将粗直链淀粉沉淀全部移入10% 丁醇饱和水溶液中, 加热溶解至溶液透明, 冷却至室温后放入冰箱中静置24h, 取出, 冷冻, 在一定温度下高速离心20min, 得沉淀物, 加入丁醇饱和液中搅拌1h、静置、离心, 重复四次后, 将沉淀物在砂芯漏斗中过滤, 用无水乙醇洗涤数次, 样品在50℃干燥8h, 即得纯直链淀粉。离心液在经过重结晶后, 所得残留母液加1% NaCl 搅拌, 静置离心, 后沉淀物无水乙醇洗涤数次, 50℃干燥所得为支链淀粉。

1.2.3 淀粉蓝值的测定^[8-9, 12]

取直链淀粉和支链淀粉各制备成浓度为1mg/ml 的溶液, 直链淀粉取1ml、支链淀粉取5ml 溶液, 加35ml 蒸馏水, 用0.05mol/l 的HCl 调节pH至3.0, 加2% I₂-KI 0.5ml, 定容至50ml, 充分混匀, 20min后采用UV-1100 紫外可见分光光度计于500~700nm 对样品进行扫描, 扫描最高峰的光谱波长为最大吸收波长, 在最大波长处测吸光度记做A_{λmax}。

$$\text{蓝值} = \frac{A_{\text{max}} \times 4}{\text{样品的浓度}(\text{mg}/100\text{ml})}$$

1.2.4 凝胶色谱分析^[7, 12, 16]

凝胶过滤层析准确称取50mg 样品, 加1ml 无水乙醇和3ml 水, 再加0.3ml, 2mol/L 的NaOH, 充分振荡, 再渐渐加入2ml 水, 继续振荡至样品完全溶解, 用1mol/L 的HCl 中和至pH6.8~7.2, 定容到50ml 容量瓶, 摇匀, sepharose 层析柱, 取1ml 上柱50mmol NaCl, 9ml/h 速率洗脱, 收集洗脱液, 每管收集3ml, 取1.5ml 苯酚-硫酸法比色, 测吸光度。

1.2.5 淀粉黏度的测定

称取5g 经200目过筛的样品, 加入100ml, 30~40℃蒸馏水摇匀, 放入80℃左右的水浴中糊化15min, 然后加热至水浴沸腾, 不断摇动, 至到淀粉糊呈透明、无结块、均匀的黏稠流动的胶体糊。采用brookfield DV-2+pro 黏度仪, 4# 转子, 100 转速, 常温测定黏度。

2 结果与分析

2.1 离心温度对分离效果的影响

重复1.2.2 的步骤分离和纯化直链淀粉, 取1g 淀粉, 离心速度为8000r/min, 保持其他条件不变, 改变离心温度, 分别在0、2、4、6、8℃离心, 收集直链淀粉和支链淀粉。

表1 离心温度对直链淀粉与支链淀粉分离纯化的影响
Table 1 Effects of centrifuge temperature on the separate efficiency of amylose and amyloptin

淀粉	温度(℃)				
	0	2	4	6	8
直链淀粉(g)	0.1706	0.1874	0.1543	0.1643	0.1517
支链淀粉(g)	0.8109	0.8036	0.8300	0.8132	0.8330
总淀粉(g)	0.9815	0.9910	0.9843	0.9775	0.9847

2.2 离心速度的影响

称取2g 淀粉, 在离心温度为2℃, 改变离心速度, 使离心速度分别在4000、6000、8000、10000、12000r/min 时离心, 分别收集直链淀粉和支链淀粉, 所得数据如表2。

表2 离心速度对直链淀粉与支链淀粉分离纯化的影响
Table 2 Effects of centrifugal force on the separate efficiency of amylose and amyloptin

转速(r/min)	4000	6000	8000	10000	12000
直链淀粉(g)	0.1810	0.2343	0.3114	0.3412	0.3423
支链淀粉(g)	1.0354	1.5934	1.6680	1.6565	1.6217
总淀粉(g)	1.2164	1.8277	1.9794	1.9977	1.9640

由表1、2 我们可以看到, 在离心力较小的情况下和离心温度较高时, 会导致离心液较混浊, 直链淀粉与支链淀粉无法完全分离开, 最后制得的支链淀粉中含有较多无法完全沉淀的直链淀粉。这主要是因为直链淀粉的线性长链间, 每个链因分子内氢键作用卷曲成螺旋状, 分子链与分子链间缔合程度大, 形成的微晶束结构紧密, 结晶区域大, 分子排列较规整, 分子容易相互靠拢重新排列, 具有很强的凝聚沉淀性能, 而支链淀粉是具有多分支的多聚糖, 以分支端的葡萄糖链平行排列, 彼此以氢键缔合成束状, 形成微晶束结构; 结晶区域小, 晶体结构不太紧密, 淀粉颗粒大分子量大, 各支链的空间阻碍作用使分子间的作用力减小, 而且由于支链的作用, 使水分子容易进入支链淀粉的微晶束内, 阻碍了支链淀粉的凝聚^[13-14], 如果转速较小的话温度较高的话支链淀粉分离离心液浑浊, 效果差, 所以综合直链淀粉和支链淀粉的分离影响因素, 我们选择在2℃, 8000r/min 离心10min, 可以达到最好的离心效果。

2.3 淀粉蓝值比较

淀粉的最大吸收波长和蓝值反应了支链淀粉与碘(I₃⁻)

表3 不同淀粉蓝值比较
Table 3 Compared blue value of different starch

多糖	吸光度	最大吸收波长(nm)	蓝值
原玉米淀粉	0.127	590	0.347
自制玉米支链淀粉	0.087	548	0.087
标准玉米直链淀粉	0.235	630	1.023
自制玉米直链淀粉	0.196	628	0.913

结合的能力, 蓝值和最大吸收波长越长, 说明直链淀粉的线性聚合度越高, 支链淀粉中含有较长的分支链越多^[11, 15]由表 3 可知, 不同淀粉间的蓝值和最大吸收波长差异显著, 其中自制直链淀粉和标准直链淀粉的最大吸收波长的相近, 所测得的蓝值相差不大, 这表明自制直链淀粉的纯度较高, 而支链淀粉的最大吸收波长是 548nm, 蓝值是 0.087, 与直链淀粉相比的分别小了 14.96% 和 4.47 倍, 这主要是因为直链淀粉由于其线性聚合度很高, 故蓝值很大, 一般为 0.8~1.2 之间, 支链淀粉的侧链链长只有 18~30 葡萄糖残基, 则蓝值很低在 0.08~0.22 之间。

2.4 凝胶色谱分析

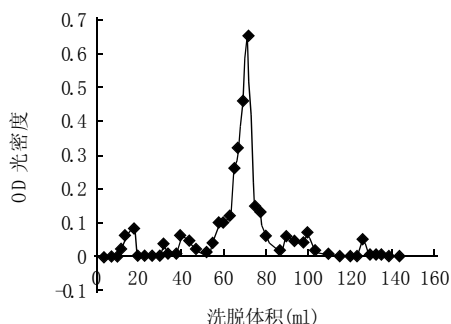


图1 标准直链淀粉凝胶色谱图

Fig.1 Gel permeation chromatogram chart of standard amylose

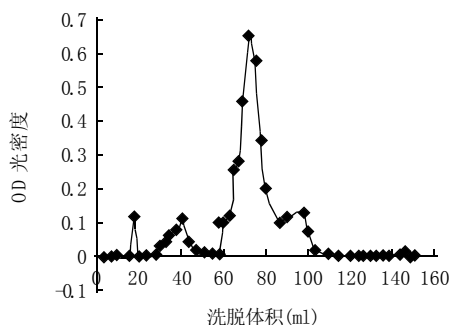


图2 自制直链淀粉凝胶色谱图

Fig.2 Gel permeation chromatogram chart of self-made amylose

从图 1、2 我们可以看到经过正丁醇多次重结晶后得到的直链淀粉, 经凝胶色谱分析, 自制的直链淀粉出峰时间和标准直链淀粉出峰时间相近, 在洗脱体积为 72ml 左右出现一个单一高峰, 与标准直链淀粉峰高相近, 洗脱体积为 40ml 左右时自制直链淀粉有一个小的吸收峰, 估计为淀粉支链淀粉或其他杂质, 但是此峰面积小, 在整个峰面积中所占比例低, 故可认为此直链淀粉已经具有很高的纯度了。

2.5 黏度变化

从表 4 我们可以明显看到在相同得浓度下, 支链淀

表 4 不同淀粉的黏度的测定
Table 4 Viscosity of different starch

多糖	淀粉浓度 (W/V)	淀粉黏度 (cp)
玉米淀粉	3 %	1015
自制直链玉米淀粉	3 %	246
自制支链玉米淀粉	3 %	1560
标准直链淀粉	3 %	129

粉得黏度最高为 1560cp, 而直链淀粉的粘度甚至不到 400cp, 这主要是因为直链淀粉颗粒中, 大分子链排列有序, 淀粉晶体结构紧密, 分子中氢链缔合程度大, 使水分子不容易渗透到颗粒内部, 直链分子中的极性基团仍使相互作用在一起, 没有和水分子形成作用力, 故而其黏度很底, 而支链淀粉颗粒大, 晶体结构不太紧密, 水分子很容易渗透到支链淀粉颗粒内, 使颗粒润湿胀大, 在 100℃ 时水的渗透加快, 形成非常黏滞的胶体溶液^[9-10]。

3 结 论

3.1 由于直链淀粉在溶液状态下分子伸展时, 易与一些极性有机化合物, 如正丁醇、异戊醇等, 通过氢键缔合形成结晶性化合物而沉淀; 支链淀粉在溶液中呈分枝状, 存在较大的空间位阻, 不易与极性有机物结合形成沉淀。所以可以利用丁醇沉淀法可以将直链淀粉与支链淀粉分开。

3.2 通过单因素试验研究了离心温度, 离心速度等对直链淀粉和支链淀粉分离效果的影响, 可以知道在 2℃, 8000r/min 离心 10min 时, 分离效果最好。

3.3 通过测定自制直链淀粉和 Sigma 公司的标准直链淀粉的黏度、蓝值、和凝胶色谱图, 得到直链淀粉蓝值 0.913、黏度 246cp、凝胶色谱图在 72ml 洗脱体积时有最大吸收, 均与直链淀粉标准品相近, 表明本分离方法所得纯品纯度较高, 效果较好。

参考文献:

- [1] MEYER K H, BERNFELD P. *Helv. Chim. Acta*[J]. 1940, 23: 890.
- [2] 孙成斌. 直链淀粉与支链淀粉的差异[J]. 黔南民族师范学院学报, 2000(2): 36-38.
- [3] BARSBY T L, DONALD A M, FRAZIER P J. *Starch advances in structure and function*[J]. 2001.
- [4] BERTUZZI M A, ARMADA M, GOTTIFREDI J C. *Journal of Food Engineering*[J]. 2007, 82: 17-25.
- [5] WHISTLER R L. *Methods in carbohydrate chemistry IV starch*[M]. New York and London: Academic Press, 1964: 168-169.
- [6] TAKEDA Y, HIZUKURI S, JULIANO B O. Purification and structure of amylose from rice starch carbohydrate[J]. *Res*, 1986, 148: 299-308.
- [7] 洪雁, 顾郑彪, 刘晓欣. 直链淀粉和支链淀粉纯品的提取及其鉴定[J]. *食品工业与科技*, 2004, 25(4): 86-88.
- [8] HIZUKURI S. Polymodal distribution of the chain lengths of

酶法提取香菇多糖工艺研究

李 波, 宋江良, 赵 森, 周 崇, 刘倩倩

(河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003)

摘 要: 本实验将木瓜蛋白酶和纤维素酶应用于香菇多糖的提取, 研究了酶法提取的工艺条件。结果显示, 木瓜蛋白酶的最佳酶解条件是: 酶浓度 0.5%, 酶解温度 50℃, pH6~7, 酶解反应 1h; 纤维素酶的最佳酶解条件是: 酶浓度 0.25%, 酶解温度 40℃, pH4.5~5.0, 酶解反应 1h。采用酶水解后, 香菇多糖的提取率显著提高。
关键词: 香菇多糖; 提取; 木瓜蛋白酶; 纤维素酶

Extraction of Polysaccharide in *Lentinus edodes* by Enzymatic Method

LI Bo, SONG Jiang-liang, ZHAO Sen, ZHOU Chong, LIU Qian-qian

(School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Papain and cellulase were applied on the extraction of lentinan, and the extraction conditions of enzymatic method were studied in this research. The results showed that the optimal conditions of papain were enzymatic concentration 0.5%, temperature 50℃, pH6~7 and reaction time 1h. The optimal conditions of cellulase were enzymatic concentration 0.25%, temperature 40℃, pH4.5~5.0 and reaction time 1h. By enzymatic hydrolysis, the extraction yield of lentinan was improved distinctly.

Key words lentinan; extraction; papain; cellulase

中图分类号: Q946.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)09-0274-04

香菇(*Lentinus edodes*)是侧耳科(*Pleurotaceae*)的担子菌, 味道鲜美, 营养丰富。香菇含有多钟有效药用成分^[1], 其中香菇多糖(lentinan)是一种非特异免疫刺激剂, 具有抗肿瘤, 抗病毒等生理功能^[2]。香菇多糖的提取方法有水提法、碱提法和酶提法等, 其中酶提法

是利用酶对细胞结构的破坏作用, 使存在于细胞内部的多糖释放出来, 从而提高了多糖的得率。本实验采用纤维素酶和木瓜蛋白酶对香菇进行水解, 研究香菇多糖的最佳提取工艺, 并探讨香菇粒度、香菇溶解方法以及酶法提取中多糖提取效果的评价方法。

收稿日期: 2007-08-09

基金项目: 河南省高校新世纪优秀人才支持计划(2006HANCET-17); 河南科技学院重点科研项目

作者简介: 李波(1973-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品科学。

- amylopectins, and its significance[J]. Carbohydrate Research, 1986, 147 (2): 342-347.
- [9] KRISHNASWAMY K G, SREENIVASAN A. Separation and determination of the amylose and amylopectin fractions of starch[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1948, 14: 1253-1261.
- [10] 刘洁, 刘亚伟. 直链淀粉与支链淀粉的分离方法[J]. 粮食与饲料工业, 2005(2): 15-17.
- [11] LIN Jheng-hua, WANG Shu-wen, CHANG Yung-ho. Effect of molecular size on gelatinization thermal properties before and after annealing of rice starch with different amylose contents[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22: 156-163.
- [12] 谢涛, 陈建华, 谢碧霞. 橡胶直链淀粉与支链淀粉的分离纯化[J]. 中南林业学院学报, 2002, 22(2): 30-35.
- [13] CHEETHAM N W H, TAO L. The effects of amylose content on the molecular size of amylose, and on the distribution of amylopectin chain length in maize starches[J]. Carbohydrate Polymers, 1997, 33: 251-261.
- [14] CHEN Ming-hsuan, CHRISTINE J. Bergman Method for determining the amylose content, molecular weights, and weight and molar-based distributions of degree of polymerization of amylose and fine-structure of amylopectin[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69: 562-578.
- [15] 吉宏武, 丁霄霖. 马铃薯直链淀粉与支链淀粉的分离方法[J]. 食品科技, 2000(6): 6-7.
- [16] HIZUKURI S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance[J]. Carbohydrate Research, 1986, 147 (2): 342-347.