

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.

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

鲜香菇购自新乡市七里营香菇生产基地,经干燥、粉碎后备用。

纤维素酶(酶活性15U/mg) 上海耕奔生物技术有限公司;木瓜蛋白酶(酶活性80万U/g) 广西庞博生物工程有限公司;其余均为国产分析纯试剂。

7200可见分光光度计 上海尤尼科公司;PHS-3TC精密数显酸度计 上海天达仪器仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 香菇多糖提取

取2g香菇粉,加适量水,在50℃水中浸泡1h。升温至90℃,提取0.5h。冷却至适宜温度,加入适量酶溶液使提取液总体积为100ml,酶解提取1h。然后升温至90℃提取1h。提取液抽滤,滤液稀释20倍后进行测定。同时按相同步骤做香菇空白(2g香菇粉,不经酶处理)和酶空白(只加酶,不加香菇粉)实验。

1.2.2 多糖含量测定

提取液中的多糖含量测定采用苯酚硫酸法^[3],在490nm波长下测定吸光度值,并以提取液的 A_{490nm} 减去酶空白的 A_{490nm} 表示多糖的提取率。

2 结果与分析

2.1 香菇多糖提取中若干问题的研究

2.1.1 香菇粉的溶解方式对提取的影响

我们比较了将香菇粉先在50℃浸泡1h、再升温至90℃进行溶解与直接将香菇粉在90℃进行溶解两种方式,二者经相同步骤提取后,前者的 A_{490nm} 为0.407,后者为0.371。结果显示,香菇粉先在50℃温水中进行溶胀后再于高温下进行溶解效果较好,这可能是因为这种温和的溶解方式更有利于香菇粉中多糖的溶出。

2.1.2 香菇粉粒度对提取的影响

根据提取理论,样品粒度的大小对提取有一定的影响。将香菇粉粉碎后,分别过40、80、120、160、200目筛,比较了不同粉碎粒度对香菇多糖的提取效果,结果见表1。

表1显示,香菇粉粒度在80~120目和大于200目时,多糖提取率较高。香菇粉粒度在120~200目之间时,提取率反而较低。这可能是由于粒度较小后,由

于多糖对样品颗粒的吸附效应增加,导致溶解于溶液中的多糖量减少。当粒度大于200目后,可能由于一部分的样品细胞结构被破坏,使细胞内多糖的溶出量增加,这一效应大于吸附效应,因此多糖提取率又增加。由此可见,如果采用超微粉碎技术对香菇进行处理,则有可能使多糖提取率大大增加。考虑实际情况,我们在进行提取时,选择的是80~120目的香菇粉。

2.1.3 酶法提取中多糖提取效果的评价方法

经分析测定,酶中也含有少量的糖类成分,它们的存在将会对香菇多糖提取效果的评价产生影响。例如,0.01g纤维素的酶空白测定结果为 $A_{490nm}=0.021$,0.01g木瓜蛋白酶的酶空白测定结果为 $A_{490nm}=0.026$ 。如果酶用量增加, A_{490nm} 也相应的增加。因此在评价酶法提取多糖的效果时,一定要减去酶本身所引入的糖,尤其在确定最佳酶浓度时更要考虑这一点。

2.2 木瓜蛋白酶单因素试验

香菇细胞壁、膜由多糖和蛋白质组成,采用木瓜蛋白酶和纤维素酶能够水解蛋白和纤维素,破坏细胞壁、膜结构,使多糖易于从细胞内释放出来。

2.2.1 木瓜蛋白酶反应温度的影响

90℃热水提取0.5h后,加入适量木瓜蛋白酶溶液,使酶浓度为香菇粉重量的0.5%,分别于40、45、50、55、60℃下酶解提取1h,结果见图1。

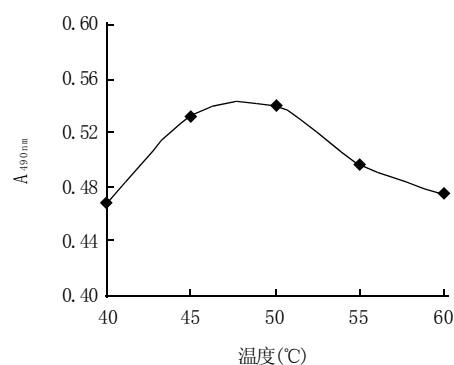


图1 酶解温度对多糖提取的影响

Fig.1 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on extraction of lentinan

图1显示,酶解温度对香菇多糖的提取有显著影响。在50℃时,多糖提取率最高,与不加酶的香菇空白相比,多糖提取率增加7.74%。

2.2.2 木瓜蛋白酶浓度的影响

表1 香菇粉粒度对提取的影响
Table 1 Effects of powder size of *Lentinus edodes* on extraction

样品粒度	未筛分	< 40 目	40~80 目	80~120 目	120~160 目	160~200 目	> 200 目
A_{490nm}	0.425	0.411	0.424	0.457	0.432	0.434	0.469

控制木瓜蛋白酶浓度分别为香菇粉重量的0.1%、0.2%、0.5%、1%、2%，酶解温度为50℃，结果见图2。

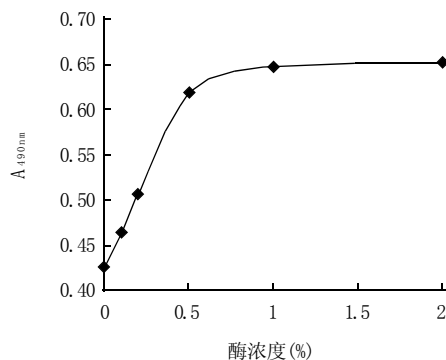


图2 木瓜蛋白酶浓度对多糖提取的影响

Fig.2 Effects of papain concentration on extraction of lentinan

图2显示，随着蛋白酶浓度的增加，多糖提取率也逐渐增加，酶浓度大于0.5%后提取增加率趋于平缓。考虑酶的成本及提取效果，宜将蛋白酶浓度确定为0.5%。

2.2.3 木瓜蛋白酶反应pH值的影响

木瓜蛋白酶浓度为0.5%，将酶解反应的pH值分别控制在4、5、6、7、8，在50℃下酶解反应1h，结果见图3。

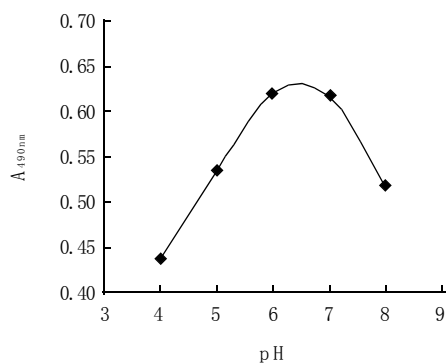


图3 木瓜蛋白酶反应pH值对多糖提取的影响

Fig.3 Effects of hydrolysis pH of papain on extraction of lentinan

图3显示，酶反应的pH值对香菇多糖的提取有很大影响，pH值在6~7之间时多糖的提取率最高。考虑生产实际，可选用自然条件下的pH值。

2.2.4 木瓜蛋白酶反应时间的影响

控制木瓜蛋白酶浓度为0.5%，自然pH值(约6.5)，在50℃下分别反应0.5、1、2、3、4h，结果见图4。

图4显示，随着酶解时间的延长，多糖的提取率也随之增加，当酶解时间超过1h后，提取率的增幅趋于平缓。考虑实际生产情况，酶解作用1h较为适宜。

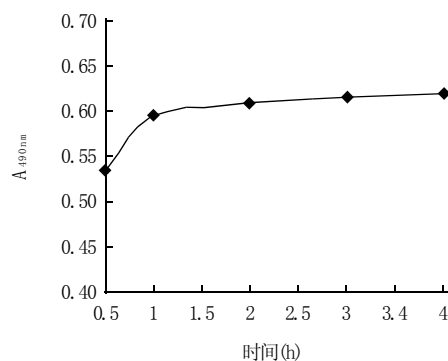


图4 木瓜蛋白酶反应时间对多糖提取的影响

Fig.4 Effects of hydrolysis time of papain on extraction of lentinan

2.3 纤维素酶单因素试验

2.3.1 纤维素酶反应温度的影响

90℃热水提取0.5h后，加入适量纤维素酶溶液，使酶浓度为香菇粉重量的0.5%，分别于30、35、40、45、50℃下酶解提取1h，结果见图5。

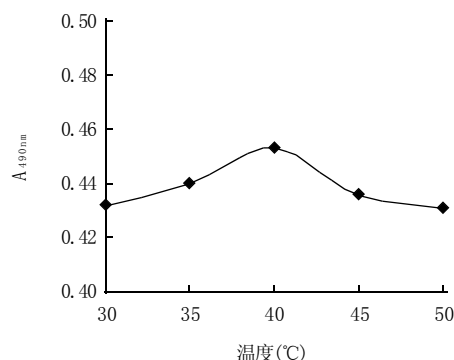


图5 纤维素酶反应温度对多糖提取的影响

Fig.5 Effects of hydrolysis temperature of cellulase on extraction of lentinan

图5显示，酶反应温度在40℃时多糖提取率最高。但在30~50℃范围内，提取结果无显著差异，因此实际生产中也可根据需要进行选择温度。

2.3.2 纤维素酶浓度的影响

控制纤维素酶浓度分别为香菇粉重量的0.05%、0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%，酶解温度为40℃，结果见图6。

图6显示，随着纤维素酶浓度的增加，香菇多糖提取率也随之增加，酶浓度超过0.25%后提取率的增幅很小。因此，纤维素酶浓度确定为0.25%比较适宜。

2.3.3 纤维素酶反应pH值的影响

纤维素酶浓度为0.25%，将酶解反应的pH值分别控制在3.4、4、4.5、5、5.5、6，在40℃下酶解反

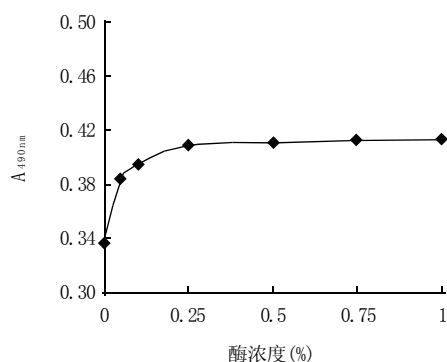


图6 纤维素酶浓度对多糖提取的影响
Fig.6 Effects of cellulase concentration on extraction of lentinan

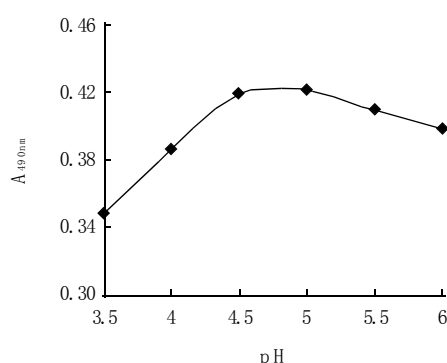


图7 纤维素酶反应 pH 值对多糖提取的影响
Fig.7 Effects of hydrolysis pH of cellulase on extraction of lentinan

应 1 h, 结果见图 7。

图 7 显示, pH 值对酶解提取效果有很大影响, pH 值在 4.5~5.0 之间时, 多糖提取率最高。

2.3.4 纤维素酶反应时间的影响

控制纤维素酶浓度为 0.25%, pH 值为 5.0, 在 40℃

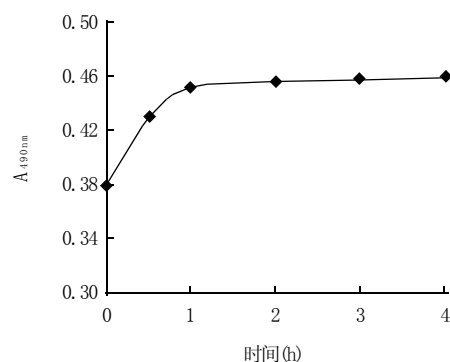


图8 纤维素酶反应时间对多糖提取的影响
Fig.8 Effects of hydrolysis time of cellulase on extraction of lentinan

下分别反应 0.5、1、2、3、4 h, 结果见图 8。

图 8 显示, 随着酶解时间的延长, 多糖提取率逐渐增加。当酶解时间超过 1 h 时, 多糖提取率变化很小, 因此酶解时间可确定为 1 h。

3 结 论

在香菇多糖提取中加入木瓜蛋白酶和纤维素酶进行辅助提取, 能够显著提高多糖的提取率。木瓜蛋白酶的最佳酶解条件是: 酶浓度是香菇粉重量的 0.5%, 酶解温度 50℃, pH 值 6~7, 酶解反应 1 h。纤维素酶的最佳酶解条件是: 酶浓度是香菇粉重量的 0.25%, 酶解温度 40℃, pH 值 4.5~5.0, 酶解反应 1 h。

参考文献:

- [1] 杜宇野. 香菇多糖的研究进展[J]. 中国食用菌, 1995(4): 9-10.
- [2] 张润光. 香菇的营养保健功能及其产品开发[J]. 食品研究与开发, 2004(4): 125-128.
- [3] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社. 1999: 11-12.

信 息

日本培育出第四代克隆猪

日本明治大学教授长岛比吕志率领的研究小组日前依靠体细胞克隆技术进行反复“拷贝”, 现已成功培育出第四代克隆猪。

研究人员说, 猪与人类身体构造相似, 因此克隆猪可作为研究人类疾病的实验动物, 而反复“拷贝”克隆猪使科学家能在超过猪平均寿命的长时间里, 使用遗传性质完全相同的猪做实验。

这一研究小组培育的第一代克隆猪于 2004 年 4 月诞生, 此后, 他们从长大的克隆猪唾液腺中提取细胞, 将细胞核植入未受精的卵子, 依次培育出第二代和第三代克隆猪。今年 7 月 23 日, 采用同样技术克隆出的三头第四代克隆猪问世。其中一头在出生两天后死亡, 另两头目前发育良好。

如同文件反复复印后清晰度会下降一样, 多次使用体细胞克隆技术也会给动物基因造成损伤。科学家已经培养出第二代克隆牛和第六代克隆鼠, 它们的基因都被发现有损伤, 而第四代克隆猪的基因尚未发现异常, 还有可能继续“拷贝”下去。