

碱水解及超滤提取金耳菌丝多糖的初步研究

张志才^{1,2}, 刘高强^{1,2}, 章克昌^{1,2}, 瞿伟菁³, 张雯³, 邓云霞³

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学生物工程学院生物资源实验室, 江苏 无锡 214036; 3. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 本文报道了用 NaOH 水解金耳菌丝体, 用超滤法浓缩水解液提取金耳菌丝体多糖。采用正交试验筛选出碱法水解金耳菌丝体的最适宜条件: 碱量及浓度为 25 倍菌丝体重量的 0.75mol/L NaOH, 水解温度为 40℃, 水解时间为 4h。水解液经超滤浓缩、乙醇沉淀、干燥得多糖制品。其多糖含量高于 54.69%, 蛋白质含量低于 2.5%。总提取率为 4.5%, 高于水提法的多糖得率。

关键词: 金耳; 多糖; 碱法提取; 超滤

Study on Extraction of the Polysaccharides from Mycelium of *Tremella aurantialba* by NaOH Hydrolysis and Ultrafiltration

ZHANG Zhi-cai^{1,2}, LIU Gao-qiang^{1,2}, ZHANG Ke-chang^{1,2},
QU Wei-jing³, ZHANG Wen³, DENG Yun-xia³

(1. Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Lab of Biomass Resources, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. Life Science School, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: NaOH hydrolysis and ultrafiltration were applied to extract of polysaccharides from the mycelium of *Tremella aurantialba*. The orthogonal test showed that the optimal conditions were: NaOH concentration 0.75mol/L, volume of NaOH solvent 30 times as the weight of mycelia, hydrolysis temperature 40℃, and hydrolysis time 4 hours. The extract rate of polysaccharides by NaOH hydrolysis and ultrafilter was 57.7% and total product yield 4.5%, which were both higher than those aqueous extract method.

Key words: *Tremella aurantialba* polysaccharides; alkali extract; ultrafilter

中图分类号: TS201.23

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)11-0145-04

金耳(*Tremella aurantialba*)是担子菌纲、银耳科的名贵食用兼药用真菌。金耳子实体多糖有止咳化痰, 降低血糖, 治疗心脑血管疾病和保护肝脏, 提高造血机能, 增强机体免疫力的作用^[1~3]。金耳菌丝体多糖降低血糖, 治疗糖尿病及其并发症、高血脂、高血压等功能亦有所报道^[4,5], 因此金耳菌丝体多糖的开发也具有极高的应用价值。

为了更好的开发利用这一珍贵资源, 我们采用液体深层发酵技术生产金耳菌丝体, 提取多糖。金耳菌丝体多糖属于中性多糖。经典的中性多糖提取主要采用乙醇脱脂, 水抽提, 浓缩, *sewage* 法脱蛋白, 酒精沉淀。但该工艺提取操作繁琐、污染严重(尤其 *sewage* 中

的氯仿和正丁醇均为有害有机溶剂)、周期长, 显然不适用于工业化大生产。本文旨在用 NaOH 水解破坏细胞的膜结构, 同时使蛋白质初步降解为小肽, 提高浸提率; 并降低浸提所需温度和压力, 把现代膜技术应用于浓缩多糖, 同时滤除小分子多肽, 纯化多糖。尽管分别用碱水解、超滤提取多糖已有文献报道, 但把两者结合提取中性多糖, 使提取液的浓缩和多糖的分离纯化同步进行还未见报道。本文对此进行了初步研究。

1 材料与amp;方法

1.1 金耳菌种

本室保藏, 经中国科学院微生物研究所文华安研究

收稿日期: 2004-12-22

作者简介: 张志才(1966-), 男, 博士, 高级工程师, 主要从事药用真菌资源与药用植物化学的研究工作。

员鉴定。

1.2 仪器

回转式振荡器 上海跃进机械厂; BS210S 电子分析天平 sartorius 生产; SYNDER-UF402 型超滤装置 SYNDER USA; KA-1000型台式离心机 上海安亭科学仪器厂; 721 型分光光度计 上海第三分析仪器厂; XSP-ZXC 显微镜 上海尚光显微镜公司; Biof-2050发酵罐(50L) 上海高机实业总公司生产。

1.3 方法

1.3.1 金耳菌丝体的获得^[5]及含量测定

金耳在 50L 通气搅拌反应器中发酵培养。发酵液经抽滤、水洗, 和烘干得菌丝体;

多糖含量测定 总糖含量—还原糖含量;

总糖含量测定 硫酸蒽酮法^[7];

还原糖含量测定 3,5-二硝基水杨酸^[7]。

1.3.2 金耳菌丝体多糖的水提取

参照文献[6]进行。

1.3.3 金耳菌丝体多糖碱提取法工艺流程

金耳菌丝体加 25 倍体积的 0.75mol/L NaOH, 在 40℃水解 4 h。减压抽滤去除菌丝体碎片。用 2mol/L H₂SO₄ 调节 pH 为 10~11, 沉淀过夜。取上清液用 0.1 μm 膜微滤。滤液用 MW5000 膜截留。截留液用超纯水洗涤数次至 pH 中性。浓缩加入 4 倍酒精沉淀, 抽滤, 滤渣用医用酒精回流 4 h, 趁热抽滤。得多糖制品。

1.3.4 碱水解工艺条件的正交试验

试验设计见表 1。

表 1 碱提法正交试验各因子及其试验水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal test for alkaline hydrolysis

水平	因子			
	A	B	C	D
	碱液体积与菌丝体重量比	碱浓度 (mol/L)	水解温度 (°C)	水解时间 (h)
1	20	0.25	40	2
2	25	0.5	60	4
3	30	0.75	80	6

1.3.5 膜过滤工艺条件

1.3.5.1 超滤工艺流程

超滤工艺流程如图所示, 超滤器为内压式, 聚砜膜截留分子量 5000, 操作压力通过阀 1、阀 2、阀 3 控制。

1.3.5.2 通量测定 由秒表和量筒测量。

1.3.5.3 截留率的测定

$$\text{截留率} = \frac{\text{浓缩液体积} \times \text{多糖含量}}{\text{原液体积} \times \text{多糖含量}} \times 100\%$$

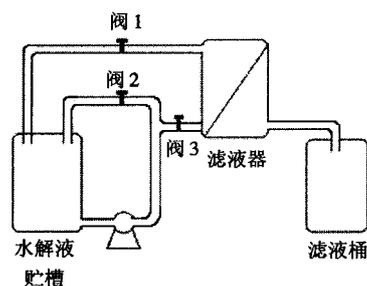


图 1 超滤工艺流程图

Fig.1 Flow chart of ultrafiltration process

1.3.6 相关测定

1.3.6.1 总糖含量测定 硫酸蒽酮法^[7]。

1.3.6.2 还原糖含量测定 3,5-二硝基水杨酸^[8]。

1.3.6.3 总蛋白测定 双缩脲法^[9]。

1.3.6.4 多糖HPLC色谱分析^[9] 由江南大学分析测试中心完成。

2 结果与分析

2.1 菌丝体多糖含量

菌丝体总糖含量为 7.8%。

2.2 碱提取多糖的条件

影响碱提取金耳多糖得率最重要的因素为水解液 NaOH 浓度、NaOH 液体与菌丝体重量比、水解温度、水解时间。为此进行了四因子三水平正交试验, 结果见表 2。

表 2 碱水解影响因子正交试验结果
Table 2 Orthogonal test results of factors influencing alkaline hydrolysis

序号	A	B	C	D	提取率(%)
1	20(1)	0.25(1)	40(1)	2(1)	2.25
2	20(1)	0.50(2)	60(2)	4(2)	3.9
3	20(1)	0.75(3)	80(3)	6(3)	5.7
4	25(2)	0.25(1)	80(3)	4(2)	3.5
5	25(2)	0.50(2)	40(1)	6(3)	4.5
6	25(2)	0.75(3)	60(2)	2(1)	7.8
7	30(3)	0.25(1)	60(2)	6(3)	2.95
8	30(3)	0.50(2)	80(3)	2(1)	4.8
9	30(3)	0.75(3)	40(1)	4(2)	7.5
K ₁	11.85	8.7	14.25	14.85	
K ₂	15.8	13.2	14.65	14.90	
K ₃	15.25	21	14	13.15	
K ₁ '	3.95	2.9	4.75	4.95	
K ₂ '	5.27	4.4	4.88	4.97	
K ₃ '	5.08	7.0	4.67	4.38	
R*	1.32	4.1	0.21	0.51	

注: 1. R 表示极差, 即平均值最高与最低之差, 反映因子的重要性, 极性越大越重要; 2. 括号内的数字表示因子水平; 3. K₁~K₃: 指因子水平 1~3 的三组实验结果平均值, 反映同一因子各水平作用大小。

由表 2 可知,对金耳菌丝体多糖提取影响大小依次为 $B > A > D > C$ 。即顺序为碱浓度、碱液体积与菌丝体重量比、水解时间、水解温度。最佳组合为 $B_3A_2D_2C_2$,即碱浓度为 0.75mol/L ,碱液体积与菌丝体重量比为 $25:1$,水解温度为 40°C ,水解时间为 4h 最为合适,此时多糖的提取率为 7.8% 。

2.3 膜过滤工艺条件的研究

2.3.1 滤膜的选择

根据报道,金耳菌丝体多糖分子量在 $30000 \sim 40000\text{D}$ 。为防止多糖渗漏,本文采用 $0.1\mu\text{m}$ 膜微滤和截留分子量 5000 的膜超滤。

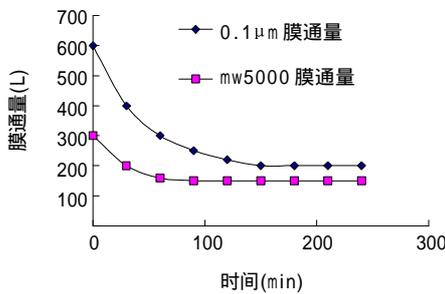


图 2 超滤膜通量随时间变化

Fig.2 Throughput change of ultrafiltration with time

由图 2 可知, $0.1\mu\text{m}$ 膜初始通量比 $\text{MW}5000$ 膜大一倍,但超滤 1h 内膜通量急剧下降,而 90min 后趋于稳定,流速为 200L/h 。 $\text{MW}5000$ 开始 60min 降低缓慢, 90min 后趋于稳定。

2.3.2 碱提液中和后 pH 对流速的影响

由于聚砜膜的 pH 使用范围为 $3.5 \leq \text{pH} \leq 12$,不能耐 Cl^- ,因此碱水解液用 H_2SO_4 调节 pH 沉淀过夜。我们试验了 $\text{pH}11$, $\text{pH}9.0$ 和 $\text{pH}7.0$,结果见表 3。

表 3 不同 pH 值对 $0.1\mu\text{m}$ 微膜流速的影响

Table 3 Influence of various pH values on flow velocity of $0.1\mu\text{m}$ micromembrane

pH	时间(min)							
	30	60	90	120	150	180	210	240
11	601	412	297	210	200	200	200	200
9	600	250	200	180	180	179	179	178
7	600	210	182	180	180	179	180	180

由表 3 可见,起始流速都为 600L/h ,但不同 pH 下降趋势明显不同, $\text{pH}7$ 下降最快, $\text{pH}9$ 次之, $\text{pH}11$ 下降最慢,这是因为不同 pH 游离出脂肪酸含量不等。脂肪酸在水溶液中形成油包水结构而堵塞膜孔,流过的料液不能将其冲掉,使膜通量下降。

2.3.3 碱液中和后不同 pH 值对多糖提取的影响

从表 4 看出, $\text{pH}11$ 时金耳多糖的提取率最高,为

表 4 不同 pH 值对超滤多糖提取水平的影响

Table 4 Influence of various pH values on polysaccharide extraction

pH 值	11	9	7
提取率(%)	57.7	38.4	25.3

57.7% 。 $\text{pH}7.0$ 时含量最低,这可能是由于不同 pH 游离出脂肪酸的含量不同,形成油包水结构堵塞 $0.1\mu\text{m}$ 膜的程度不同。尽管微孔滤膜孔径开始为 $0.1\mu\text{m}$,但不同 pH 最后孔径变小程度不同,截留了糖多少不同,因而提取率不同。分析 $0.1\mu\text{m}$ 膜截留液显示含有糖。因此,微滤时选择中和至 $\text{pH}10 \sim 11$ 。

2.3.4 碱提取多糖与水提取多糖的比较

2.3.4.1 粗品中总糖、还原糖及蛋白质含量的比较

分析了碱法提取和水法提取多糖制品中的总糖、还原糖及蛋白质的含量,结果见表 5。

表 5 碱提法水提法所得多糖制品的成分比较

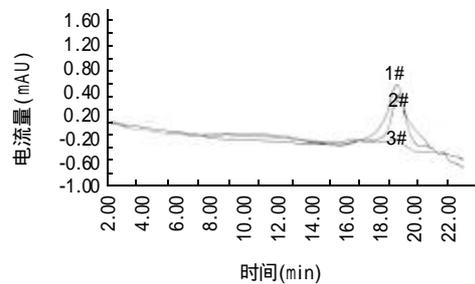
Table 5 A comparison of the content of polysaccharide extracts obtained with alkaline and aqueous methods list of figures

项目	提取方法	
	碱提取(%)	水提取(%)
总糖	54.69	47.14
还原糖	0	0
蛋白质	2.48%	0

表 5 显示碱提取多糖粗品中的总糖含量明显高于水提取的含量,但是碱提取多糖含有少量蛋白质,而水提取多糖没有蛋白质,可能含有较多的其他杂质。

2.3.4.2 碱提取与水提取多糖的 HPLC 色谱比较

碱提取与水提取多糖的 HPLC 色谱比较见图 3。该色谱图显示,碱提取多糖与水提取多糖具有相同的 Rf 值,说明它们是同一种物质,碱提取过程中未发生结构改变。



1#: 碱提法所得多糖; 2#: 水提法所得多糖

图 3 碱提取与水提取 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatography of alkaline and aqueous

2.3.4.3 多糖的总提取率

多糖的总提取率 = 粗品多糖含量 \times 碱提取率,即 $7.8\% \times 57.7\% = 4.5\%$ 。

3 结论与讨论

本文采用碱水解并结合超滤法对金耳菌丝体中的多糖进行了提取研究。正交试验表明, 碱法水解金耳菌丝体的最适宜条件为: 采用25倍菌丝体重量的0.75mol/L NaOH, 在40℃水解4h。碱提取后用稀硫酸调pH10~11, 沉淀过夜, 上清液经0.1μm膜超滤浓缩、乙醇沉淀、干燥得多糖制品。此法的提取率为57.7%。多糖含量高于54.69%, 蛋白质含量低于2.5%。总提取率为4.5%, 高于水提法的多糖得率。

本文采用碱水解破坏细胞膜结构提取中性多糖。由于碱不能水解糖苷键, 但能水解细胞膜结构, 促进多糖释放, 突破了常规的理论影响多糖提取的主要因素是细胞壁。同时把多糖提取与蛋白水解一步完成, 结合现代膜超滤提取技术, 使多糖的分离提取可工业化生产, 减少了污染。但本法所得多糖制品中尚有少量蛋白质, 如何去除残余的蛋白, 以及碱水解提取多糖的工艺条件和超滤条件的进一步优化尚需要以后深入研究。

参考文献:

- [1] 瞿伟菁, 等. 金耳止咳化痰降血糖的药理试验[J]. 上海农业科学学报, 1998, 14(1): 58-62.
- [2] 刘春卉, 荣福雄. 金耳多糖的研究初报[J]. 食用菌, 1996, 18(3): 4-5.
- [3] 王金华, 薛宝云, 等. 金耳发酵液多糖免疫调节作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1997, 4(5): 282-293.
- [4] 朱欣华, 瞿伟菁, 等. 金耳多糖菌丝体多糖对SD大鼠降血糖作用机制的研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学), 1999, 11(6): 102-105.
- [5] 毛述永. 金耳菌丝体多糖初步化学及降血糖作用的比较研究[D]. 华东师范大学1999年硕士学位论文, 1999.
- [6] 连宾, 郁建平. 树舌、茯苓多糖的分离及组成[J]. 重庆大学学报, 2004, 27(1): 120-122.
- [7] 张惟杰. 糖复合生化研究技术(第二版)[M]. 浙江大学出版社, 1999. 11-13.
- [8] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 180-181.
- [9] 中华人民共和国国家标准GB/T5473.5-1997 婴儿配方食品和乳粉乳糖, 蔗糖和总糖的测定—高压液相色谱法[S].

冷饮与速冻食品工业

首届“中国学术期刊检索与评价数据规范”执行优秀期刊
全国高校优秀科技期刊“优秀编辑出版质量奖”获奖期刊

- ※ 国家科技部“中文科技期刊数据库源期刊”
- ※ 中国学术期刊综合评价数据库源期刊
- ※ 中国期刊全文数据库源期刊
- ※ 中国核心期刊(遴选)数据库源期刊

主办单位: 江南大学(原无锡轻工大学)
常熟市莱城食品机械有限公司
中国轻工业信息中心

本刊简介: 《冷饮与速冻食品工业》杂志是经国家新闻出版总署批准出版, 国家教育部主管的面向国内外公开发行的技术指导类刊物, 旨在及时报道国内外冷饮与速冻食品领域的科研成果、生产技术及市场动态, 是冷饮与速冻食品行业广大基层决策者、科研人员、经营者研发新品、寻求商机、开拓市场的良师益友。

欢迎踊跃投稿 欢迎惠登广告

订阅方式: 全国各地邮局

邮发代号: 28-190

邮政编码: 214122

通讯地址: 江苏省无锡市太湖大道1800号

江南大学太湖校区32信箱

电子邮件: csbfj@sytu.edu.cn

联系电话: 0510-5913521; 5913529



F&M

食品与机械

创刊26周年

中国食品科学技术学会会刊
THE JOURNAL OF CHINESE INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

食品企业投资、研发及技术指南

更专业 权威论坛、科研开发、机械与设计

更实用 生产应用、国外科技、市场分析、
食品安全与检测、食品包装与设计

更多信息量 全新改版、更多页码

双月刊 邮发代号: 42-83 每期 10元