

表3 正交实验的结果与分析

实验号	A	B	C	D	吸光度	黄酮得率(%)
1	1	1	1	1	0.093	1.94
2	1	2	2	2	0.135	2.75
3	1	3	3	3	0.268	5.31
4	2	1	2	3	0.189	3.79
5	2	2	3	1	0.165	3.33
6	2	3	1	2	0.196	3.92
7	3	1	3	2	0.301	5.95
8	3	2	1	3	0.193	3.86
9	3	3	2	1	0.112	2.31
K <sub>1</sub>	10.00	11.68	9.72	7.58		
K <sub>2</sub>	11.04	9.94	8.85	12.62		
K <sub>3</sub>	12.12	11.54	14.59	12.96		
R <sub>1</sub>	3.33	3.95	3.24	2.52	因素主次顺序 CDAB	
R <sub>2</sub>	3.68	3.31	2.95	4.21		
R <sub>3</sub>	4.04	3.85	4.86	4.32		
R	0.71	0.64	1.91	1.80		

清除率 =  $(A_0 - A_x) / A_0 \times 100\%$

A<sub>0</sub> 空白溶液的吸光值;

A<sub>x</sub> 加入清除剂溶液的吸光值。

## 2 结果与分析

### 2.1 正交实验结果分析

由表3分析可知,影响黄酮得率的所选因素主次顺序为CDAB,提取黄花菜中黄酮类化合物的最佳工艺条件为A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即水浴温度为75℃,提取时间为2h,乙醇浓度为95%,料液比1:20。此提取条件下测的其总黄酮含量为6.98%。

### 2.2 黄花菜提取物对羟自由基的清除效果

在10ml比色管中分别加入1.0ml 2.0mmol/L FeSO<sub>4</sub>, 1.0ml 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.0ml的溴邻苯三酚红, 3.0ml pH=9 NH<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O-NH<sub>4</sub>Cl缓冲溶液,摇匀,再分别加入0.0、0.2、0.4、

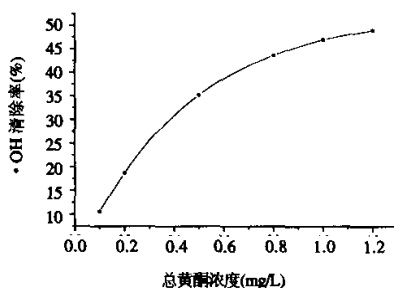


图1 黄花菜提取物对羟自由基的清除效果

0.8、1.0、1.2mg/ml提取物,测出吸光度A<sub>x</sub>。由图1可得知,提取物粗品在0.05~2.0mg/ml范围内清除率与浓度剂量呈比例。

## 3 结论

3.1 本文用正交实验法得出了黄花菜中提取黄酮化合物的最优方法,即在水浴温度为75℃,提取时间为2h,乙醇浓度为95%,料液比为1:20。

3.2 提取的黄酮化合物对·OH有很强的清除效果,这为黄花菜保健食品的开发提供了良好的参考依据。

### 参考文献:

- [1] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1986.
- [2] 陈运中.苦荞麦黄酮含量的测定[J].食品科学,1998,19(3): 54-55.
- [3] 李兆龙.从银杏叶提取黄酮类化合物的方法[J].中成药, 1992,14(6):5-8.
- [4] 肖崇厚.中药化学[M].上海:上海科学技术出版社,1996.
- [5] 赵保路.自由基和天然抗氧化剂[M].北京:科学出版社, 1999.

# 木耳多糖提取工艺研究

王金凤

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘要:**本文讨论了黑木耳多糖的提取方法,实验结果表明,采用酶法可显著提高多糖提取率,其最佳提取条件为:料水比1:60,浸提温度80℃,浸提时间2.5h,中性蛋白酶用量650IU/g,作用温度43℃,作用时间1.5h,最适pH值7.4;纤维素酶用量375IU/g,作用温度43℃,作用时间1.5h,最适pH值5.3。木耳多糖提取率为4.38%。

收稿日期:2003-09-29

作者简介:王金凤(1963-),女,工程师,研究方向为食品微生物技术。

关键词: 木耳; 多糖; 蛋白酶; 纤维素酶; 提取

## Studies on the Extracting Technology of Polysaccharide from *Auricularia*

WANG Jin-feng

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

**Abstract:** The research on the extracting technology of *Auricularia* polysaccharide was studied in this paper. The results showed that the extracting rate of polysaccharide was 4.38%. The extracting rate could be increased by enzymatic technology. The best technological conditions for the extraction were as follows: the ratio of material and water was 1:60 with a temperature of 80℃ and extracting time 2.5h and the amount of Proteinase and cellulase used was 650 IU/g and 375 IU/g respectively with a reacting time of 1.5h at the temperature of 43℃. The optimum pH of the two respected enzymes was 7.4 and 5.3.

**Key words:** *Auricularia*; polysaccharide; proteinase; cellulase; extraction

中图分类号: TS201.23

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)06-0143-04

木耳(*Auricularia auricula*), 又名黑木耳、光木耳, 其性味甘平, 是我国传统的保健佳品。近年来, 随着人们营养保健意识的增强, 对黑木耳的研究也越来越深入, 结果表明, 黑木耳的重要生理功能都是与其多糖组分密切相关的<sup>[1]</sup>。因此, 建立高效、经济的黑木耳多糖的提取方法具有重要的现实意义。本文采用不同的提取方法, 通过对比确定了酶法提取黑木耳多糖的最佳条件, 为建立高效、经济的多糖提取途径提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 黑木耳(*Auricularia auricula*), 市售。

1.1.2 试剂 纤维素酶(Cellulase)和中性蛋白酶(Proteinase)为无锡生物制剂厂产品; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器 722型分光光度计 上海精密仪器有限公司分析仪器厂; LXJ-64-01型离心机 北京医疗仪器修配厂; XT220A型电子分析天平 瑞士普列塞斯。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 水、碱、复合酶解及分别酶解提糖方法的比较

###### 1.2.1.1 热水浸提法

黑木耳子实体干粉按体积比 1:60 加水, 80℃水浴中恒温浸提 4h, 过滤, 滤渣用相同方法水提 2 次, 合并水提液。浓缩, 加三氯乙酸除蛋白。离心, 取上清液, 定容。

###### 1.2.1.2 碱提取法

黑木耳子实体干粉按体积比 1:100 加入 1mol/L 氢氧

化钠溶液, 80℃水浴中浸提 4h, 过滤, 稀碱提取液经中和、浓缩后, 加三氯乙酸除蛋白, 浓缩、定容<sup>[2]</sup>。

###### 1.2.1.3 复合酶解提取法

黑木耳子实体干粉按体积比 1:80 加水, 调至 pH6.6, 加入 2% 复合酶(纤维素酶/蛋白酶), 40℃水浴中恒温酶促反应 4h, 迅速升温至 80℃灭酶, 恒温浸提 1h, 过滤, 滤液浓缩后加入三倍体积 95% 乙醇静置过夜。离心, 弃上清液, 沉淀加水溶解, 三氯乙酸除蛋白, 定容<sup>[3]</sup>。

###### 1.2.1.4 分别酶解提取法

黑木耳子实体干粉按体积比 1:60 加水, 调至 pH5.0, 加入 375IU/g 纤维素酶, 40℃水浴中恒温酶促反应 1.5h。调 pH 至 7.5, 加入 650IU/g 中性蛋白酶, 40℃恒温酶解 1.5h。升温至 80℃灭酶浸提 2.5h, 加入三倍体积 95% 乙醇沉降, 静置过夜。离心, 弃去上清液, 取沉淀加水溶解, 加三氯乙酸除蛋白, 定容。

##### 1.2.2 分别酶解法提取木耳多糖工艺条件的研究

###### 1.2.2.1 中性蛋白酶作用条件单因素试验

选择中性蛋白酶用量分别为 390、650、910、1170、1430、1690IU/g, 酶解作用 pH 值分别为 6.6、7.0、7.4、7.7、8.0、8.3, 作用时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0h, 作用温度分别为 37、39、41、43、45、47℃, 进行单因素实验, 分别测定木耳多糖提取率。

###### 1.2.2.2 纤维素酶作用条件单因素试验

选择纤维素酶用量分别为 75、150、225、300、

375、450IU/g, 酶解作用 pH 值分别选择 4.9、5.3、5.9、6.3、6.6、6.8, 作用时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0h, 作用温度分别为 40、44、48、52、58、60℃ 进行单因素实验, 分别测定木耳多糖提取率。

1.2.2.3 中性蛋白酶解最佳工艺条件的确定

采用四因素三水平的正交实验方法, 实验因素水平见表 1。

表 1 因素水平表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

水平	因素			
	酶用量(IU/g)	料水比	浸提时间(h)	pH 值
1	390	1:45	1.5	7.1
2	650	1:60	2.0	7.4
3	910	1:75	2.5	7.7

1.2.2.4 纤维素酶解最佳工艺条件的确定

采用四因素三水平的正交实验方法, 实验因素水平见表 2。

表 2 因素水平表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

水平	因素			
	酶用量(IU/g)	料水比	浸提时间(h)	pH 值
1	300	1:45	1.5	5.3
2	375	1:60	2.0	5.9
3	450	1:75	2.5	6.3

1.2.3 成品木耳多糖的分析

总糖测定采用蒽酮比色法, 蛋白质测定采用凯氏定氮法, 灰份测定采用灰化法, 水份测定采用干燥法(GB 5009.3)<sup>[4]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 水、碱、复合酶解及分别酶解法提取比较

不同浸提方法中粗多糖含量的差别较大, 结果见图 1。

图 1 表明, 分别酶提法能显著提高粗多糖的提取

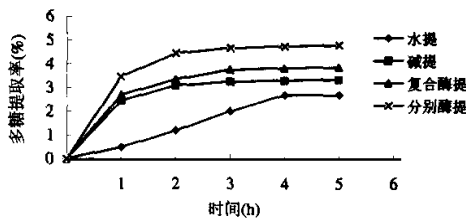


图 1 热水、碱、复合酶及分别酶法浸提木耳多糖曲线

率, 相同条件下, 分别酶解法提取木耳多糖的量达到 48.02mg/g, 因而四种提取方法中, 选择分别酶解法提取木耳多糖。

2.2 分别酶解法提取木耳多糖工艺条件的确定

2.2.1 中性蛋白酶作用条件的确定

由于组成细胞壁的蛋白质在蛋白酶作用下被水解, 细胞壁破裂, 多糖易于从细胞内释放出来, 温度和 pH 值影响蛋白酶的活性和底物的构象, 试验结果表明, 蛋白酶各作用因素分别为: 酶用量 650IU/g, pH 值 7.4, 作用时间为 1.5h, 作用温度 43℃ 时, 多糖提取率较高。而通过试验可看出作用温度和作用时间对提取率的影响不大, 因此统一选用 43℃, 酶解 1.5h 进行以后的正交实验。

2.2.2 纤维素酶作用条件的确定

结果显示, 纤维素酶各作用因素分别为: 酶用量 375IU/g, pH 值 5.3, 作用时间 1.5h, 作用温度 43℃ 时, 多糖提取率较高, 并且酶的作用温度及作用时间对多糖提取率影响不大, 因此选用 43℃ 下酶解 1.5h 进行以后的正交实验。

2.2.3 木耳多糖提取工艺最佳条件的确定

为了得到较高的木耳多糖提取率, 我们考察了影响粗多糖提取率比较大的蛋白酶用量、纤维素酶用量、pH 值、料水比、提取时间等五个因素对结果的影响, 采用两组四因素三水平的正交实验设计确定最佳提取条件。

表 3 中性蛋白酶酶解正交实验结果及分析

实验号	因素				实测 A 值
	A 酶用量 (IU/g)	B 料水比	C 浸提时间 (h)	D pH 值	
1	1(390)	1(1:45)	1(1.5)	1(7.1)	0.144
2	1	2(1:60)	2(2.0)	2(7.4)	0.288
3	1	3(1:75)	3(2.5)	3(7.7)	0.274
4	2(650)	1	2	3	0.385
5	2	2	3	1	0.363
6	2	3	1	2	0.239
7	3(910)	1	3	2	0.373
8	3	2	1	3	0.314
9	3	3	2	1	0.226
K <sub>1</sub>	0.706	0.902	0.609	0.821	T=2.606
K <sub>2</sub>	0.987	0.877	0.987	0.900	
K <sub>3</sub>	0.913	0.827	1.010	0.885	
k <sub>1</sub>	0.235	0.301	0.203	0.274	
k <sub>2</sub>	0.329	0.292	0.329	0.300	$\bar{x}$ =0.290
k <sub>3</sub>	0.304	0.276	0.337	0.295	
R	0.094	0.025	0.134	0.026	
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>2</sub>	

(1) 中性蛋白酶最佳作用条件的确定

通过正交试验确定中性蛋白酶酶解最佳作用条件, 正交实验结果见表 3。

表 3 极差分析表明, 酶用量、料水比、浸提时间和 pH 值对木耳粗多糖的提取率均有不同程度的影响, 其中浸提时间和酶用量对多糖提取率的影响较为显著, 各种因素对木耳粗多糖的提取率影响的大小顺序为: C > A > D > B, 中性蛋白酶提糖的最优水平组合为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>。各因素对 K 值作用示意图见图 2。

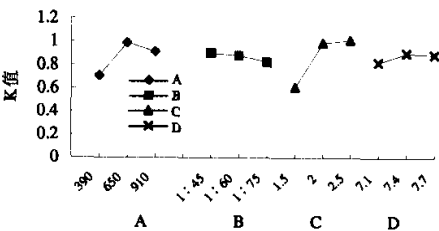


图 2 四种因素对中性蛋白酶提糖的影响

(2) 纤维素酶最佳作用条件的确定

通过正交试验确定纤维素酶酶解最佳工艺条件, 正交试验结果见表 4。

表 4 极差分析表明, 酶用量、料水比、浸提时间和 pH 值对木耳粗多糖的提取率均有不同程度的影响, 其中浸提时间和酶用量对多糖提取率的影响比较显著, 各种因素对木耳粗多糖的提取率影响的大小顺序为: C > A > B > D。纤维素酶提糖的最优条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>, 各因素对 K 值作用示意图见图 3。由两个直观图可以看出, 料水比对纤维素酶作用的影响比其对蛋白酶作用的影响更为明显, 因此多糖提取的最佳料水比应为 1:60。

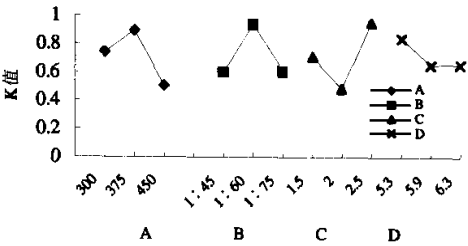


图 3 四种因素对纤维素酶提糖的影响

3 结 论

3.1 木耳多糖的提取 使用酶法提取黑木耳多糖提取

表 4 纤维素酶酶解正交实验结果及分析

实验号	因素				实测 A 值
	A 酶用量 (IU/g)	B 料水比	C 浸提时间 (h)	D pH 值	
1	1(300)	1(1:45)	1(1.5)	1(5.3)	0.250
2	1	2(1:60)	2(2.0)	2(5.9)	0.223
3	1	3(1:75)	3(2.5)	3(6.3)	0.271
4	2(375)	1	2	3	0.163
5	2	2	3	1	0.494
6	2	3	1	2	0.239
7	3(400)	1	3	2	0.187
8	3	2	1	3	0.220
9	3	3	2	1	0.095
K <sub>1</sub>	0.744	0.600	0.709	0.839	T=2.142
K <sub>2</sub>	0.896	0.937	0.481	0.649	
K <sub>3</sub>	0.502	0.605	0.952	0.654	
k <sub>1</sub>	0.248	0.200	0.236	0.280	x̄=0.714
k <sub>2</sub>	0.299	0.312	0.160	0.216	
k <sub>3</sub>	0.167	0.202	0.317	0.218	
R	0.132	0.112	0.157	0.064	
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	

表 5 成品木耳多糖的分析表

成分	总糖	水分	灰分	蛋白质
含量(%)	62.83	10.16	4.87	0

率可达 4.38%。

3.2 酶法提取黑木耳多糖的最佳工艺条件为: 料水比 1:60; 浸提时间 2.5h; 浸提温度 80℃; 中性蛋白酶用量 650IU/g; 中性蛋白酶最适作用温度 43℃, 最适作用时间 2.5h, 最适 pH 值 7.4; 纤维素酶用量 375IU/g, 最适作用温度 43℃, 最适作用时间 1.5h, 最适 pH 值 5.3。

3.3 成品木耳多糖分析 由表 5 可以看出所提多糖纯度较高, 脱蛋白效果接近 100%。

参考文献:

[1] 张倩. 多糖功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 1998, 19 (3): 11-13.

[2] 欧阳天赞, 谢九阜. 碱性黑木耳多糖的分离、纯化和表征[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(1): 46-48.

[3] 涂国云. 酶法提取竹荪深层发酵菌丝体多糖的研究[J]. 中国食用菌, 1997, 17(1): 36-38.

[4] 黄伟坤, 等. 食品检验与分析[M]. 轻工业出版社, 1989.