

PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取杏鲍菇多糖

苏艳玲

(晋中学院生物科学与技术学院, 山西晋中 030600)

摘要: 采用 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取杏鲍菇多糖, 研究了 PEG 的分子量、硫酸铵的浓度及 PEG 的浓度三个因素对杏鲍菇多糖在双水相系统中的分配系数和收率的影响, 结果表明: 当 PEG4000 浓度为 21.33%, 硫酸铵浓度为 14% 时, 多糖的分配系数可达 1.9529~2.0152, 收率可达 60.58~62.82, 从而得出一种萃取杏鲍菇多糖的方法。

关键词: 杏鲍菇; 多糖; 双水相; 萃取; 苯酚-硫酸分光光度法

文章编号: 1673-9078(2013)6-1333-1336

Extraction of *Pleurotus eryngii* Polysaccharides with PEG/(NH₄)₂SO₄ Two-Phase Aqueous System

SU Yan-ling

(School of Biological Science and Technology Jinzhong University, Jinzhong 030600, China)

Abstract: The extraction of *Pleurotus eryngii* polysaccharides in two-phase aqueous system was investigated. The effects of PEG molecular weight, and concentrations of (NH₄)₂SO₄ and PEG on the yield of *Pleurotus eryngii* polysaccharides were studied. The results showed that the optimum conditions were as follows: concentration of PEG4000 21.33% and concentration of (NH₄)₂SO₄ 14%, under which partition coefficient of polysaccharide could reach 1.9529~2.0152 and the yield coefficient could reach 60.58~62.82%.

Key words: *Pleurotus eryngii*; Polysaccharide; two-phase aqueous System; extraction; Phenol-Sulfuric acid spectrophotometric method

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii* (Dc.ex Fr.) Quel.)又名刺芹侧耳,是集食用、药用、食疗于一体的珍稀食用菌新品种。杏鲍菇的营养十分丰富,植物蛋白质质量高达25%,且含18种氨基酸和多种丰富的多糖,可显著提高人体免疫功能,并有降血脂、润肠胃、美容的功效^[1]。目前,有关食用菌多糖提取工艺的报道较多,但多数采用水浸提法,或者以超声波、微波等辅助水浸提法提取食用菌多糖,针对影响多糖提取的因素(时间、温度、料液比、功率等)开展研究,以多糖得率为指标衡量提取技术^[2-4]。除了水浸提法外还有学者采用酶法提取食用菌多糖,以酶解后的多糖提取率为指标,考查了酶的组分、浓度、时间、温度、pH值等因素对多糖提取率的影响^[5-6]。

双水相萃取是20世纪60年代发展起来的由两种不同水溶性聚合物的水溶液组成的双水相体系,其组成中大部分为水,可用于亲水性活性物质的萃取分离,是一种高效而温和的分离技术^[7]。双水相体系萃取具有如下特点:(1)含水量高(70~90%),是在接近生理

环境的温度和体系中进行萃取,不会引起生物活性物质是失活或变性;(2)分相时间短,自然分相时间一般为5 min~15 min;(3)界面张力小(10⁻⁷ mN/m~10⁻⁴ mN/m),有助于强化两相之间的质量传递;(4)不存在有机物残留问题;(5)大量杂质能与所有固体物质一同除去,使分离过程更加经济;(6)易于工程放大和连续操作。由于双水相萃取有上述特点,因此,被广泛用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域的产品的分离和提取^[8]。大多数学者采用双水相萃取技术分离提取蛋白质、色素、酶、黄酮等活性成分^[9-11]。有关多糖的提取,也已有一些报道:刘宝亮^[12]采用丙醇-硫酸铵双水相体系与超声耦合对海带多糖进行提取,苯酚-硫酸法测定多糖含量,通过单因素试验优化海带多糖的提取工艺,在浸提时间为2 h、超声提取时间为30 min、提取温度为60℃、料液比为0.019、提取液pH值为5的条件下海带多糖的提取率为11.45%;邢健敏等^[13]采用聚乙二醇/硫酸铵双水相体系提取分离芦荟多糖,确定聚乙二醇6000的分相能力最好,提取得到的芦荟多糖含量为75.63%高于传统的醇沉法(68.39%)所得的芦荟多糖,而且PEG/(NH₄)₂SO₄双水相体系大大的减少了有机溶剂的用量,PEG 6000/(NH₄)₂SO₄双水相体系是一种很好

收稿日期: 2013-01-28

基金项目: 山西省教育厅高校科技研究项目(20121115)

作者简介: 苏艳玲(1979-),女,硕士,讲师,研究方向: 果蔬加工及贮藏工程

的分离提取芦荟多糖的方法。但是采用双水相萃取技术提取食用菌多糖的报道却很少。

本试验拟开展 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取杏鲍菇多糖的初步研究,考察 PEG 的分子量、硫酸铵的浓度及 PEG 的浓度三个因素对杏鲍菇多糖在双水相系统中的分配系数和收率的影响,以期对杏鲍菇多糖提取技术的研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

杏鲍菇: 采自晋中学院生物学院食用菌试验室;

聚乙二醇(分析纯)天津市科密欧化学试剂有限公司; PEG 2000, PEG 4000, PEG 6000; 硫酸铵(分析纯), 天津基准化学试剂有限公司; 苯酚(分析纯)天津市医药工业技术研究所, 取苯酚 6 g 溶于 100 mL 容量瓶中, 定容, 配成 6% 苯酚溶液; 浓硫酸(分析纯); 蒸馏水。

1.2 试验仪器

722S 型可见分光光度计, 上海棱镜有限公司; FA1004 型电子分析天平, 上海精科电子仪器有限公司; DHX-9143B 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海福玛试验设备有限公司; TDL-40B 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 杏鲍菇多糖提取液的制备

将新鲜杏鲍菇切片于 60 °C 下烘干(含水量<8%), 粉碎过 80 目筛得干杏鲍菇粉。称取干杏鲍菇粉 5 g 放入烧杯中, 加 200 mL 水, 在电炉上加热煮沸 30 min, 不停地搅拌。过滤取滤液定容至 500 mL 待用。加入一定量的聚乙二醇和硫酸铵于 50 mL 离心管中制备双水相体系, 取滤液定容至 20 mL。制备好的多糖提取液需低温保存, 当有沉淀出现时应立即停止使用, 需要重新配制。

1.3.2 双水相体系的配制

双水相体系按体积配制, 系统总量为 20 mL, 称取一定质量的聚乙二醇置于 50 mL 离心试管中, 然后加入一定量的硫酸铵, 最后加入杏鲍菇提取液至 20 mL。振荡 2 min, 静置待溶液分相完全, 在离心机中以 4000 r/min 的转速离心 5 min, 分相后测定上、下相的体积, 分别取样分析上下相中杏鲍菇多糖的含量。有关的计算公式如下。

$$K=C_t/C_b$$

$$R=V_t/V_b$$

$$Y=1/(1+1/R \times K)$$

注: K 为多糖在双水相体系分配系数; R 为双水相体系上

下相的体积比; Y 为多糖在上相中的收率; V_t 为双水相体系上相体积, 单位 mL; V_b 为双水相体系下相积, 单位 mL; C_t 为双水相体系上相多糖的质量浓度, 单位 mg/mL; C_b 为双水相体系下相多糖的质量浓度单位, mg/mL。

1.3.3 多糖含量的测定方法

利用苯酚-硫酸法测多糖。苯酚-硫酸法是利用多糖在硫酸的作用下先水解成单糖, 并迅速脱水生成糖醛衍生物, 然后与苯酚生成橙黄色化合物, 再用分光光度计比色测定。以葡萄糖为标准样品, 采用可见分光光度计在 490 nm 下测吸光度值做标准曲线。

制作葡萄糖标准曲线: 准确称取葡萄糖 0.0200 g 用蒸馏水溶解, 然后定容至 500 mL。首先取 10 支试管, 分别编号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 取定容好的葡萄糖溶液 0.1 mL 放入 1 号试管, 取 0.2 mL 于 2 号管, 以此类推, 取 0.9 mL 放入 9 号管, 10 号为对照组(蒸馏水)。其次在每支试管中分别加蒸馏水至 1 mL, 摇匀, 再在每支试管中加入事先配制好的 6% 苯酚 0.5 mL, 然后立即加入 2.5 mL 浓硫酸, 摇匀。静置 30 min 后, 在 490 nm 处测其吸光值^[4]。

1.3.4 单因素试验

设计不同分子量的聚乙二醇(PEG2000、PEG4000、PEG6000)、不同浓度的硫酸铵(12%、14%、16%、18%、20%)、不同浓度的聚乙二醇(13.33%、16%、18.67%、21.33%、24%)三个单因素, 分别研究每一个单因素对多糖分配系数和收率的影响。

1.3.5 利用 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取杏鲍菇多糖

先称取一定量的聚乙二醇和硫酸铵置于 50 mL 离心管中, 再加入杏鲍菇多糖提取液定容 20 mL, 每次称取聚乙二醇和硫酸铵的量由试验设计要求而定。搅拌使其溶解。充分摇匀后, 静置待其分相完全, 以 4000 r/min 的转速离心 5 min。溶液形成两相, 用分液漏斗分相并测定上、下相的体积后。从上、下相中各取 1 mL 到试管中, 再加 9 mL 水稀释。再从稀释液中取 1 mL 加 0.5 mL 6% 苯酚和 2.5 mL 浓硫酸, 充分摇匀, 静置 30 min 后用 722S 可见分光光度计在 490 nm 下测吸光度值。对照组是用蒸馏水代替杏鲍菇提取液。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

按葡萄糖标准曲线的制作方法制得葡萄糖溶液标准曲线见图 1。

回归方程为: $y=0.0512x-0.0548$, $R^2=0.998$ 。

注: y 为在 490 nm 下的吸光值; x 为葡萄糖的质量浓度(μg/mL)。

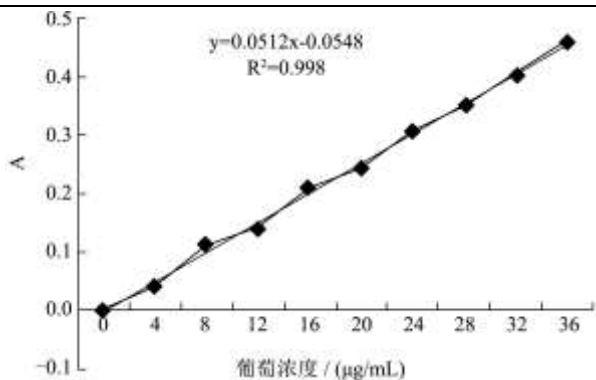


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Glucose standard curve

2.2 单因素对多糖分配系数和收率的影响

2.2.1 聚合物(PEG)分子量对多糖分配系数和收率的影响

分别取6支离心管,3支试验组,3支对照组,按表1加入糖提取液和药品,对照组用蒸馏水代替糖提取液,其余都相同。待其溶解后静置10 min,在4000 r/min下离心5 min,分相并测定各相体积后上、下相各取0.5 mL置于不同试管中,加9.5 mL蒸馏水稀释20倍,再取稀释液1 mL加0.5 mL 6%苯酚和2.5 mL浓硫酸,混匀后静置30 min,在490 nm下测吸光值。

表1 不同分子量PEG的加入量

管号	提取液 /mL	硫酸铵 /g	PEG2000 /g	PEG4000 /g	PEG6000 /g
1	20	5	5	-	-
2	20	5	-	5	-
3	20	5	-	-	5

注: -代表不添加。

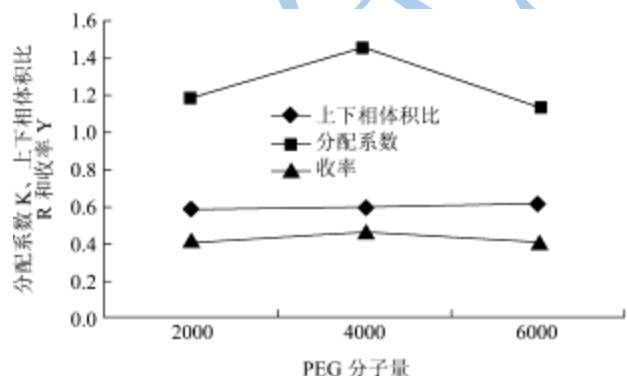


图2 分配系数K、上下相体积比R、收率Y与PEG分子量的关系

Fig.2 Effect of PEG molecular weight on the partition coefficient, volume ratio and extraction yield

聚合物分子量的改变会改变体系的成相行为,进而影响多糖在两相中的分配。分配系数K,上、下相体积比R和收率Y与PEG分子量的变化结果如图2

所示。

由图2可以看出,当初始硫酸铵质量分数不变时,上、下相体积比随PEG分子量的增大而增大,因为上相体积增加,下相体积降低。分配系数变化较大,随着PEG分子量的增大先增加后减小,在PEG分子量4000时达到最大,高于4000时分配系数随着分子量的增加而降低。收率的变化与分子量的变化相一致,但收率的变化较缓慢,没有分配系数变化明显,这表明PEG分子量在4000时有利于上相富集多糖且有较好的收率,故最佳聚合物分子量选为PEG4000。

2.2.2 硫酸铵浓度对多糖分配系数和收率的影响

固定PEG分子量为4000,研究不同浓度的硫酸铵对双水相体系的成相行为的影响。取10支离心管,5支试验组,5支对照组,按表2加入糖提取液和药品,对照组用蒸馏水代替糖提取液,其余都相同,待其溶解后静置10 min,在4000 r/min下离心5 min,分相后测定上、下相体积,再从上、下相各取1 mL置于不同试管加9 mL水稀释10倍,再取1 mL稀释液加入0.5 mL 6%苯酚和2.5 mL浓硫酸,混匀后静置30 min,在490 nm下测吸光值。

表2 硫酸铵加入量

Table 2 The amounts of ammonium sulfate

管号	稀释/mL	硫酸铵/g	PEG/g
1	20	2.4	2
2	20	2.8	2
3	20	3.2	2
4	20	3.6	2
5	20	4	2

在固定PEG分子量4000,一定的PEG浓度条件下,分配系数K、上、下相体积比R和多糖在上相中的收率Y随硫酸铵浓度的变化关系如图3所示。

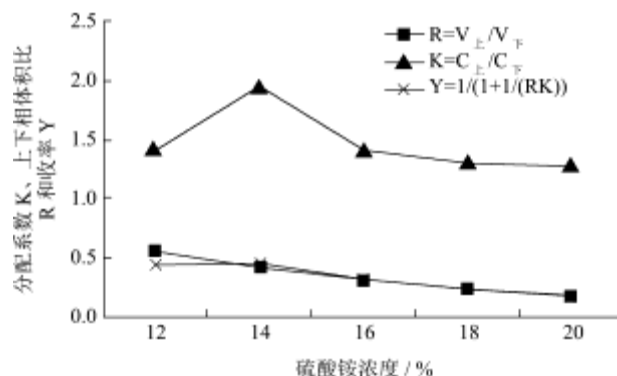


图3 分配系数K、上下相体积比R、收率Y与硫酸铵浓度的关系

Fig.3 Effects of concentration of ammonium sulfate on the partition coefficient, volume ratio and yield coefficient

由图3可以看出对于同一初始质量的聚乙二醇,

分配系数 K 和收率 Y 随硫酸铵质量分数的增加而逐渐增大, 当硫酸铵浓度大于 14% 时, 吸光值开始下降。这是因为硫酸铵质量分数增大, 分相能力也增大, 上相中 PEG 的质量分数也就随之增大, 故分配系数 K 增大。但随着硫酸铵质量分数的再增大, 上相体积减小, 下相体积增大, 所以上、下相体积之比 R 逐渐减小, 导致收率 Y 增加不明显。故可选择硫酸铵浓度为 14%。

2.2.3 PEG4000 浓度对多糖分配系数和收率的影响

固定聚乙二醇的分子量为 4000 (PEG4000)、硫酸铵浓度为 14%, 研究 PEG4000 浓度对双水相体系成相行为的影响。取 10 支离心管, 5 支试验组, 5 支对照组, 按表 3 加入溶液, 对照组用蒸馏水代替糖提取液, 其余都相同。待其溶解静置 10 min 后, 4000 r/min 离心 5 min, 分相并测定上、下相体积, 再从上、下相各取 1 mL 置于不同试管中, 加 9 mL 水稀释 10 倍, 再取 1 mL 加 0.5 mL 6% 苯酚和 2.5 mL 浓硫酸, 混匀后静置 30 min, 在 490 nm 下测吸光值。

表 3 PEG4000 加入量

管号	稀释/mL	硫酸铵/g	PEG/g
1	20	2.4	2
2	20	2.8	2
3	20	3.2	2
4	20	3.6	2
5	20	4	2

在 PEG4000, 硫酸铵 2.8 g 下, 分配系数 K 、上、下相体积比和多糖在上相中的收率 Y 随 PEG 浓度的变化关系如图 4 所示。

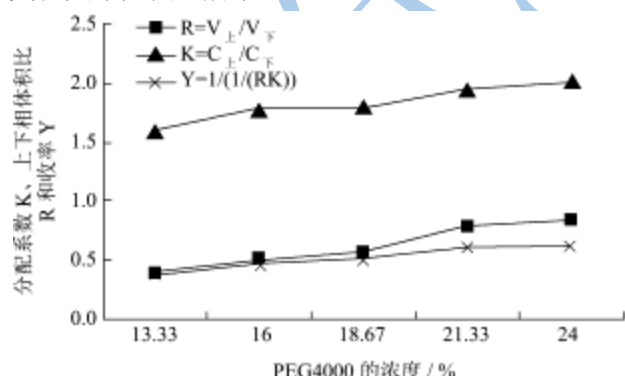


图 4 分配系数 K 、上下相体积比 R 、收率 Y 与硫酸铵浓度的关系

Fig.4 Effect of PEG4000 concentration on the partition coefficient, volume ratio and yield coefficient

由图 4 可知, 在试验设定的浓度范围内, 随着 PEG 浓度的增加, 分配系数 K 、体积比及收率都不断增加。但当 PEG 浓度增加到 24% 时, 由于上相的 PEG 含量

太多导致溶液的黏度很大, 影响两相的相比, 而相比和提取率有关, 所以对提取率也有一定的影响, 会损失一部分多糖。因此试验结果表明 PEG4000 的萃取浓度应选择 21.33%。

3 结论

本文考察了杏孢菇多糖在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系中的分配规律, 结果表明: 当 PEG4000 浓度为 21.33~24% 之间, (NH₄)₂SO₄ 浓度为 14%, 分配系数 K 可达 1.9529~2.0152, 收率 Y 可达 60.58~62.82%。同时试验中发现当 PEG4000 大于 24% 时, 多糖提取结果受影响, 准确性降低。这与吴疆等^[4]应用双水相萃取技术提取双孢菇多糖的研究结果相一致。利用 PEG/(NH₄)₂SO₄ 形成的双水相体系中, 杏孢菇多糖更易于分配在上相, 与传统工艺相比, 操作简单, 条件温和, 可以用作杏孢菇多糖的提取。在本试验中仅仅只是对影响多糖分配系数和收率的三个因素展开研究, 还有一些因素的影响及提取技术的优化还有待于进一步解决, 以期很好地为工业生产服务。

参考文献

- [1] 姚自奇, 兰进. 杏孢菇研究进展[J]. 食用菌学报, 2004, 11(1): 52-58
- [2] 黄桂萍, 肖红, 张敏生, 等. 微波技术提取香菇多糖的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 267-269
- [3] 陈君琛, 赖谱富, 周学划, 等. 响应面法优化大球盖菇粗多糖提取工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 139-142
- [4] 彭川丛, 孔静, 游丽君, 等. 超声波辅助热水浸提香菇多糖响应面优化工艺及其抗氧化活性的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(4): 452-456
- [5] 李波, 宋江良, 赵森, 等. 酶法提取香菇多糖工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 274-278
- [6] 吴佳慧, 王林, 高菲, 等. 香菇多糖的酶法提取[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(7): 201-206
- [7] 王志华, 马会民, 马泉莉, 等. 双水相萃取体系研究[J]. 应用化学, 2001, 18(3): 173-175
- [8] 董军芳, 陈钦. 双水相萃取技术在分离提纯生物物质中的应用[J]. 江西化工, 2002, 1(2): 3-6
- [9] 王红艳, 高杰, 王聪, 等. 双水相体系中几种食用色素的萃取分离研究[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2528-2531
- [10] 张娟, 王博. 聚乙二醇/硫酸铵双水相体系萃取果胶酶的研究[J]. 陕西农业科学, 2010, 5: 95-97
- [11] 高云涛, 李干鹏, 李正全, 等. 超声集成丙醇-硫酸铵双水相体系从苦荞麦苗中提取总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 110-113

- [12] 刘宝亮,曹桂萍,张金涛,等.超声波-双水相协同提取海带多糖工艺的研究[J].安徽农业科学,2010,38(31):17445-17447
- [13] 邢健敏,李芬芳,梁逸曾,等.聚乙二醇/硫酸铵双水相体系提取分离芦荟多糖及含量的测定[J].中国药学杂志,2007, 42(4):541-544
- [14] 吴疆,班立桐.应用双水相萃取技术提取双孢菇多糖的研究[J].食品研究与开发,2011,32(7):4-7

现代食品科技