

猪苓多糖提取工艺的优化

王晶晶, 杨春文, 张莹莹, 董英伟, 杜带弟

(牡丹江师范学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

摘 要: 对猪苓多糖的提取过程进行了研究。结果表明: 猪苓多糖的最佳提取工艺为: 用乙醇含量为 70%, pH 值为 6.5 的提取液提取; 用 Sevag 法去除蛋白效果最好; 用氧化脱色法除色素效果最好; 分级沉淀时乙醇浓度为 80% 时效果最好。

关键词: 猪苓; 多糖; 提取工艺; 优化; 乙醇

中图分类号: S 646.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)20-0178-03

猪苓(*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr.) 属真菌门、担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、猪苓(地花)属^[1]。猪苓菌核在我国已有 2 000 多年的用药历史, 其性平味甘, 具有利水渗湿、祛痰解毒的功能^[2], 大量近代药理和临床实践证明, 其提取物猪苓多糖是一种非特异性细胞免疫刺激剂, 可以抑制癌细胞生长, 目前被广泛用于癌症的辅助治疗, 在治疗病毒性肝炎、肝硬化、抗辐射和白血病方面也有良好的效果^[3]。近年来, 已经成为较受欢迎的抗癌、抗肿瘤及保健食品。

牡丹江师范学院生物系开设的生物工程下游技术

实验课中“猪苓多糖的提取”是其中一项内容, 其目的是使学生掌握新兴的生物产品制备技术, 提高学生的实践能力及未来的就业机会。但在实际授课中常面临费用高、产品产率低、产品质量差、产品利用率低、后续研究匮乏等问题。因此, 优化猪苓多糖的提取工艺, 并进一步开展对猪苓多糖分离、纯化的研究, 形成具有价廉、产量高、品质优的完整的猪苓多糖制备工艺体系, 并争取在未来开设猪苓多糖的药用成分分析和以小白鼠为试验对象的猪苓多糖的抗癌、抗辐射和治疗肝损伤的试验研究, 建立完整的、有深度的、有实际应用价值的试验体系, 是该研究的最终目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪苓购自牡丹江市天利医药商厦。

1.2 试验方法

1.2.1 pH 值和乙醇含量对猪苓多糖粗品提取率的影响

第一作者简介: 王晶晶(1980-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事生物化学及生物修复研究工作。

基金项目: 牡丹江师范学院科技青年扶持资助项目(QF2009040);

牡丹江师范学院科技青年一般资助项目(QY200905)。

收稿日期: 2010-07-29

Study on Conditions of Extracting Crude CMCase and Xylanase from *Auricularia auricula-judae* Residue

MA Huai-liang, GONG Zhen-jie, CHEN Huan, MI Chun-xia, YANG Nan

(College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang Heilongjiang 157012)

Abstract: The other extraction conditions in the same situation, were selected at different times, different temperatures and different liquid ratio for crude enzyme preparation, the carboxymethyl cellulase activity was mensurated, based on single factor experiments to carboxymethyl cellulase and xylanase activity as an index, the best conditions of the extracting *Auricularia auricula-judae* residues carboxymethyl cellulase, xylanase. The results showed that the *Auricularia auricula-judae* residues were homogenized 2 minutes in waring blender (10 000 r/min), the mycelium can break, beneficial releasing of enzymes; optimal condition of extracting CMCase were temperature 30 °C, time 1.0 h and liquid-material ratio 40 : 1 and that of extracting xylanase were temperature 25 °C, time 2.0 h and liquid-material ratio 50 : 1.

Key words: CMCase; xylanase; *Auricularia auricula-judae*; residue; extraction

响 猪苓多糖的提取方法较多^[4,9], 该研究针对实验教学采用水煮醇沉法, 原因是由于其工艺成本低、设备要求简单、安全、初步纯化效果较好, 适合在实验教学中使用。将粒径为 1~2 cm 的猪苓 100 g 放入容器中, 加入大概为猪苓体积 10 倍的蒸馏水, 煮沸 1 h, 期间注意调节 pH 值、补水, 过滤, 量取提取液体积, 苯酚-硫酸法^[10]测定多糖含量。将获得的提取液用旋转蒸发仪浓缩, 合并浓缩液, 加入 95% 的乙醇, 静置 24 h, 离心, 收集沉淀, 回收乙醇, 将沉淀冷冻干燥得猪苓多糖粗品。其中加入 95% 乙醇使乙醇含量分别为 50%、60%、70%、80% 和 90%, 探讨乙醇含量对猪苓多糖提取率的影响。有研究表明酸性溶液可使多糖的提取率提高, 因此, 试验把提取液的 pH 值设为 5.5、5.6、6.5、7.8, 乙醇含量为 70%, 探讨 pH 值对猪苓多糖提取率的影响。

1.2.2 猪苓多糖粗品中除蛋白的方法 多糖中蛋白质的去除方法一般有 Sevag 法、三氯乙酸法、三氟三氯乙烷法和蛋白质水解酶法等^[11]。由于蛋白质水解酶法操作过于复杂、药品比较昂贵不适于实验教学, 因此分别采用 Sevag 法、三氯乙酸法和三氟三氯乙烷法对猪苓多糖粗品中的蛋白质进行处理, 探讨最适用于实验教学的方法。

1.2.3 猪苓多糖粗品中除色素的方法 除去色素的方法一般有活性炭法、DEAE 纤维素法和氧化脱色法等, 源于植物的色素大多呈负离子, 不能用活性炭脱色, 若多糖与色素结合则易被 DEAE 纤维素吸附, 不能用水洗脱, 因此采用 H₂O₂ 氧化脱色法除色素^[11], 并探讨提取

过程中的最适 pH 值和保温时间, pH 值分别为 7、7.5、8、8.5、9, 保温时间分别为 1、1.5、2、2.5、3 h, 保温温度为 50℃。

1.2.4 分级沉淀 将除去色素的多糖溶于热蒸馏水, 加 95% 乙醇使醇浓度达到 70%, 静置过夜, 离心收集沉淀溶于少量蒸馏水, 用去离子水透析 24 h, 将多糖溶液分别加入无水乙醇使醇含量分别为 50%、60%、70%、80% 和 90%, 静置过夜, 离心收集沉淀, 冷冻干燥, 获得除蛋白和色素后的多糖, 确定最适分级沉淀的乙醇浓度。

2 结果与分析

2.1 pH 值和乙醇含量对猪苓多糖粗品提取率的影响

随着乙醇含量的逐渐增加, 猪苓多糖粗品获得率不断增加, 但是差别不大, 考虑到实验课中用药量较大, 综合经济因素, 确定猪苓多糖粗品提取时乙醇含量为 70%, 并注意回收乙醇(图 1)。

不同 pH 值的提取液对猪苓多糖的获得量存在影响。由图 2 可知, pH 值为 6.5 时最高, 为 6.70 g。因此确定, 在猪苓多糖粗品提取时采用水煮醇沉法提取法, 其中乙醇含量为 70%, 提取液 pH 值为 6.5。

2.2 猪苓多糖粗品中除蛋白的方法

除去多糖中含有的蛋白一般采用 Sevag 法、三氯乙酸法和三氟三氯乙烷法。由图 3 可知, 其中三氟三氯乙烷法效果最好, 但是由于三氟三氯乙烷容易挥发, 不适于大量使用, Sevag 法收率较高, 防降解效果好, 因此在实验教学中采用 Sevag 法除去粗品中的蛋白。

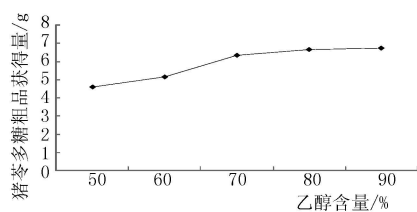


图 1 不同乙醇含量对猪苓多糖粗品获得量的影响

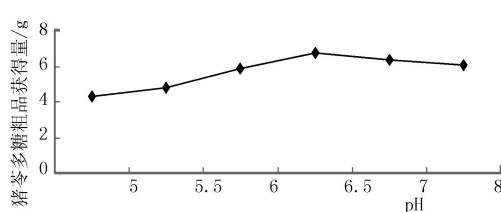


图 2 提取液的 pH 值对猪苓多糖粗品获得量的影响

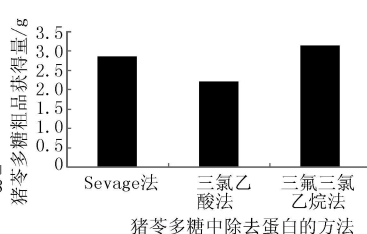


图 3 不同除蛋白方法对猪苓多糖获得量的影响

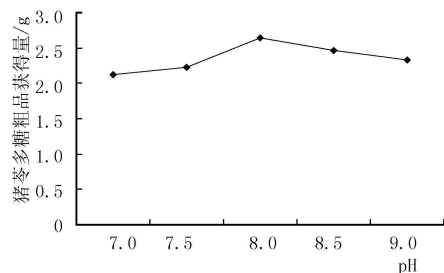


图 4 不同 pH 值对除去猪苓多糖中含有的色素影响

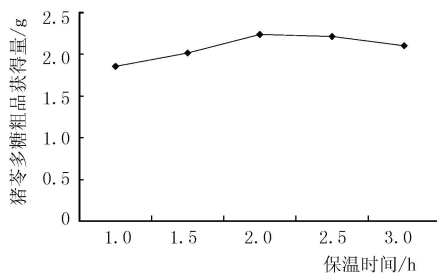


图 5 不同保温时间对除去猪苓多糖中含有的色素影响

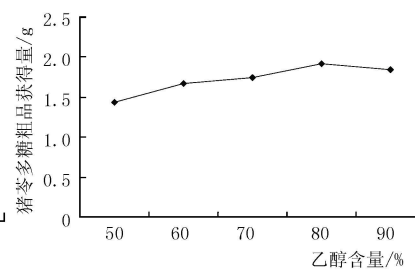


图 6 不同乙醇含量对猪苓多糖纯品分级的影响

2.3 猪苓多糖粗品中除色素的方法

不同 pH 值和保温时间对猪苓多糖中含有的色素的除去存在影响。由图 4.5 可知, pH 值为 8 时, 猪苓多糖获得量最高为 2.65 g, 保温时间为 2 h 时, 获得量最高, 为 2.24 g。

2.4 分级沉淀

随着醇浓度梯度的增加, 分别得到不同量的沉淀, 达到多糖的简单分级的目的。由图 6 可知, 在醇浓度达到 80% 时, 沉淀获得量最高, 各浓度获得产品经凝胶色谱(GPC)鉴定在结构上几乎没有差别, 均为单一成分。

3 讨论

多糖提取过程中一般都采用水提醇沉法, 由于提取液的酸碱程度对产品获得量存在影响, 因此试验对猪苓多糖粗提过程进行了优化, 采用了水煮醇沉酸提取法, 获得了更高的收率。由于在试验教学中用药量较多, 因此在粗品收率差别不大的前提下乙醇含量采用了 70%, 在实验中对离心后注意回收上清液, 用旋转蒸发仪可回收乙醇, 降低了实验成本。

多糖中蛋白的除去一般都利用蛋白在一定条件下会变性这一特点, 该试验采用 Sevag 法除蛋白, 相对于三氟三氯乙烷法虽然收率稍低一些, 但是三氟三氯乙烷法所用溶剂容易挥发, 具有低毒性, 不适合在实验教学中使用, 而三氯乙酸法较 Sevag 法收率低且会引起某些多糖的降解, 因此 Sevag 法是最适合用于实验室的提取猪苓多糖的方法。

源于植物的多糖一般颜色较深, 并大多呈负离子, 不能用活性炭脱色, 用吸附法除色素时若多糖与色素是结合的则不易被洗脱, 因此 H_2O_2 氧化脱色是最适合的

除色素的方法, 但要注意在保温过程中调节 pH 值, 控制温度不能过高, 以防止多糖降解。

多糖类物质多数为水溶性, 其醇溶性随聚合度增加而降低, 因此在水溶液中加入乙醇, 随着乙醇浓度的增加, 可获得不同乙醇梯度时析出的沉淀, 从而完成多糖的简单分级, 各浓度获得的猪苓多糖经凝胶色谱(GPC)鉴定在结构上几乎没有差别, 产品若用于进一步的应用还需进行红外光谱、气相色谱等鉴定。

参考文献

- [1] 柳玲玲, 朱国胜, 刘永翔 等. 优质猪苓菌株的初步筛选[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(1): 91-94.
- [2] 许广波, 傅伟杰, 赵旭奎 等. 我国猪苓研究的进展[J]. 菌物研究, 2003(1): 58-61.
- [3] 王林丽, 吴寒真, 赵旭奎. 猪苓的药理作用及临床应用[J]. 中国药业, 2000, 9(10): 58-59.
- [4] 苏德龙, 史洪波, 裴福成 等. 正交实验法研究猪苓多糖提取工艺[J]. 基层中药杂志, 2002, 16(1): 27-28.
- [5] 王贵发, 马力, 徐楚鸿 等. 猪苓多糖的提取与含量测定[J]. 医药导报, 2006(4): 346.
- [6] 张青. 苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技, 2004(7): 17-18.
- [7] 张鑫. 液体深层培养猪苓菌丝体及猪苓多糖的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [8] 陈文强, 邓百万, 刘开辉 等. 猪苓多糖超声提取工艺条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 7(4): 53-57.
- [9] 雷萍, 孙悦迎, 张鑫 等. 猪苓发酵菌丝多糖分离提取工艺研究[J]. 中国食用菌, 2006, 5(25): 45-47.
- [10] 田广文, 陈德育, 李学俊 等. 猪苓多糖苯酚-硫酸法测定条件的优选[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 75-78.
- [11] 徐述明. 猪苓多糖硫酸酯化及其研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2006.

Optimize and Search on Process for Extraction of *Polyporus umbellatus* Polysaccharides

WANG Jing-jing, YANG Chun-wen, ZHANG Ying-ying, DONG Ying-wei, DU Dai-di
(Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157012)

Abstract: The process of extraction of *Polyporus umbellatus* polysaccharides were studied. The results showed that the concentration of alcohol amounted in extract to 70% and the value of acidity was about 6.5; the method of Sevag and oxidation-strip were best for removing protein and pigment; the concentration of alcohol amounted to 80% had best effects in fractional precipitation.

Key words: *Polyporus umbellatus*; polysaccharide; extraction process; optimize; alcohol