

甘露聚糖酶低限度水解改善银耳多糖水提液粘度

樊琳娜¹, 贾焱¹, 宋丽雅¹, 王领², 何聪芬^{1*}

¹北京工商大学理学院 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048;

²北京华夏众芳生物科技有限公司, 北京 100036

摘要: 利用甘露聚糖酶对银耳多糖进行低限度水解, 降低银耳多糖水提液的粘度及提取物平均分子量, 以改善银耳多糖提取液因为粘度过大在工业生产中不易操作的缺陷。确定酶解的最适条件为: 料液比 1: 100, 温度 60 °C, pH 5.0 ~ 6.0, 加酶量 0.08%, 酶解时间 1 h。该条件下得到提取液的粘度约为 26 mPa · s, 平均分子量由 26480 降至 16530, 在 10⁴ 以下分布由 10% 提高至 20%, 10⁶ 以下分布由 35% 提高至 50%, 此水解为低限度水解。

关键词: 银耳多糖; 甘露聚糖酶; 低限度水解; 粘度; 分子量

中图分类号: TS241

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.030

Reduce the Viscosity of Tremella Polysaccharide Extract with β -Mannase

FAN Lin-na¹, JIA Yan¹, SONG Li-ya¹, WANG Ling², HE Cong-fen¹

¹Beijing Key Laboratory of plant resources research and development; School of Science, Beijing Technology and Business University; 100048, Beijing, China; ²Beijing Huaxiazhongfang Biotechnology Co. Ltd. 100036, Beijing, China

Abstract: It has been hard to filter or purify tremella polysaccharide extract in industrial operations because of the high viscosity of the extract. β -Mannase was used for reduce the average molecular weight and then reduce the viscosity of tremella polysaccharide extract in its extraction process. Reacting under the enzyme concentration of 0.08% for 1 h, the hydrolysis got its best result. The average molecular weight was reduced from 26480 to 16530 and the proportion of small molecules increased. With a final viscosity of 26 mPa · s, the hydrolysis did improve the filtration and purification of tremella polysaccharide extract in industrial operations.

Key words: tremella polysaccharide; Mannase; hydrolysis; viscosity; molecular weight

银耳具有润肺滋阴养胃、益气安神等作用, 经常食用能使皮肤弹性增强, 并有清除自由基^[1]、抗氧化^[2]、保湿抗皱^[3]、辐射防护^[4]的功效。现代药理实验表明, 银耳中含有多糖、酚类、黄酮和膳食纤维等^[5]活性成分, 主要成份是银耳多糖(约占银耳干重的 60% ~ 70%), 为近年来研究的热点^[6,7]。由于银耳中多糖含量高, 相对分子量大, 导致提取液粘度较大, 难以过滤, 成为银耳多糖提取过程中相对耗时且繁琐的步骤, 为其分离纯化带来了很大困难, 而且也不利于大量生产, 影响了银耳多糖在工业生产和日常应用的充分利用。通过对银耳多糖提取液粘度的影响因素进行调研, 得知银耳多糖提取液粘度与其浓度、温度、酸碱性、搅拌剪切力、添加物等因素都有关系^[8]。相对于已经相对完善的银耳多糖的提取工艺的研究和优化^[9,10], 目前对于改善银耳多糖

粘度及过滤情况的研究尚没有明确的进展, 有待进一步研究。

β -1, 4-D-甘露聚糖水解酶 (β -1, 4-D-mannan mannohydrolase) 是一类从甘露聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖的主链内部随机切割 β -1, 4 - D - 甘露糖苷键的水解酶^[11], 简称 β -甘露聚糖酶 (β -mannanase), 分布于多种植物细胞壁和某些植物种子中^[12]。 β -甘露聚糖酶近年来用于低限度水解魔芋葡甘聚糖以改善其粘度的研究中, 取得了较理想的结果^[13-15]。

关于银耳多糖中多糖的分子结构, 目前尚未有明确的研究结果, 但根据目前对银耳多糖单糖组成的研究, 银耳多糖完全水解后的产物主要有葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、木糖、岩藻糖^[16-18], 因而可以推断银耳多糖中也含有相当质量的葡甘聚糖, 对银耳多糖的粘度起到重大的影响。本研究尝试用 β -甘露聚糖酶, 通过实验选择出适当的添加量和操作条件, 对银耳多糖的粘度进行调节。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

银耳(购自北京新发地农产品批发市场), β -甘露聚糖酶(购自北京凯诺春天生物科技有限公司)。

高速万能粉碎机,恒温水浴锅,电动搅拌器,低速大容量多管离心机(瑞江,RJ-LD-IIIB),真空冷冻干燥机(VirTis, benchtop K),酶标仪(Thermo, MULTISKAN GO),旋转式黏度计(上海尼润,NDJ-8S),凝胶渗透色谱设备(Waters e2685 Separations Module, Swatt DAWN HELLEOS -II, Waters 2414 视差折光检测器)。

1.2 实验方法

1.2.1 银耳多糖的提取

称取干银耳,用去离子水先冲洗,再浸泡1~2 h至银耳完全吸水膨胀展开后,剪碎至每片彻底散开;或将干银耳粉碎,得到40目以上细粉。

向银耳加入去离子水(干银耳或银耳粉,料液比1:100),开始加热搅拌。到60℃时,用1.25 mol/L NaOH调节pH到8.5~9.0之间,继续搅拌升温至90℃,开始反应。每0.5 h用NaOH调节pH,使之保持在8.5~9.0。保温搅拌反应2 h。停止反应,冷却至室温后,离心,取上清液。

1.2.2 甘露聚糖酶对提取物的酶解工艺

在甘露聚糖酶作用最适温度和pH条件下(60℃,pH 5.0~6.0),取150 mL提取液上清液六份,分别添加甘露聚糖酶0.10%作用1、2、3、4、5、6 h以对比不同酶作用时间的影响;加酶0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12%分别作用1 h以对比不同加酶量的影响。然后将料液煮沸灭酶,存放于4℃冰箱。

1.2.3 粘度的测定

取150 mL/份银耳多糖水提液(不同作用条件),25℃恒温水浴15 min后摇匀,用粘度计多次测量取平均值(转速60 rpm)。

1.2.4 含糖量测定

采用DNS比色法进行银耳多糖水提液中还原糖和总糖含量的测定。用浓度为1 mg/mL的葡萄糖标准液配成不同浓度的葡萄糖反应液,与DNS指示剂反应后测量吸光度,制作标准曲线。将提取液直接与DNS指示剂反应测量吸光度,对比标准曲线求得还原糖含量;将提取液用0.5 M H₂SO₄100℃水

浴下水解1 h,再用1 M NaOH中和后与DNS指示剂反应测量吸光度,对比标准曲线求得总糖含量。

1.2.5 分子量的测定

使用凝胶渗透色谱法(GPC)测定银耳多糖提取物及酶作用产物分子质量及其分布。

色谱条件:色谱柱 Shodex Sugar KS -803 和 Shodex Sugar KS-805,流动相 0.3 mol/L NaNO₃,进样浓度 1 mg/mL,进样量 100 μ L/份,进样时间 40 min/份,流速 0.8 mL/min,柱温 60℃。

样品制备:称取冻干的提取物溶解于流动相中,得到浓度为1 mg/mL的溶液,用微孔过滤膜过滤后供进样。对照品:银耳子实体多糖30%(A),银耳多糖1-0.05%(B),森弗银耳多糖(C)。

2 实验结果

2.1 不同条件酶处理前后提取液的粘度测定

银耳多糖采用两种提取方法(干银耳或银耳粉),每种提取液的酶处理以酶作用时间或加酶量为参变量。用粘度计分别测定25℃下料液的粘度,计算平行操作的平均值后,得到干银耳和银耳粉多糖提取液在不同酶作用时间和加酶量条件下的粘度(图1~3)。

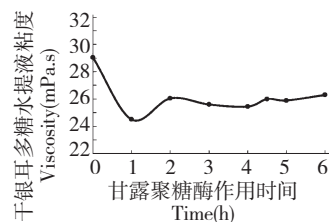


图1 加酶量0.1%时,干银耳多糖水提液粘度随酶作用时间的变化

Fig. 1 The effect of enzyme action time on the viscosity of Tremella (dried) polysaccharide

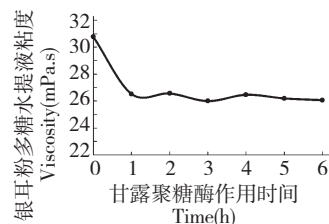


图2 加酶量0.1%时,银耳粉多糖水提液粘度随酶作用时间的变化

Fig. 2 The effect of enzyme action time on the viscosity of Tremella (milled) polysaccharide extract

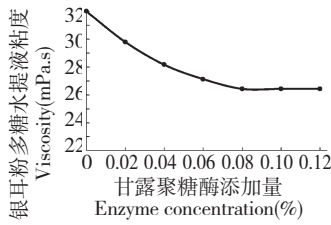


图3 酶作用时间 1h 时,银耳粉多糖水提液粘度随酶添加量的变化

Fig. 3 The effects of enzyme concentration on the viscosity of Tremella (milled) polysaccharide extract

由图 1、2 可以看出,加酶作用后提取液粘度有较明显下降,说明酶处理可以降低提取液粘度;酶作用 1 h 后随时间的增加,粘度再无明显变化,说明酶处理 1 h 已经可以较为充分作用。此外,银耳粉多糖提取液酶作用前后的粘度比相同酶处理条件的干银耳多糖提取液的粘度大,推测与不同原料状态银耳的提取液中多糖的含量有关。

根据图 3 可知,在加酶量 0 ~ 0.08% 范围内,随着酶添加量增大,提取液粘度逐渐降低;在 0.08% 处降至可调的最低粘度值,此后随加酶量继续提高提取液粘度再无明显改善。可以根据粘度测定结果得到:加酶量 0.08%,酶作用时间 1 h 即可充分发挥降低银耳多糖提取液粘度的作用。

由粘度测定得到酶处理改善银耳多糖提取液粘度的最佳处理条件为:60 °C , pH 5.0 ~ 6.0 ,加酶量 0.08% ,酶作用时间 1 h。

2.2 不同条件酶处理前后银耳多糖提取液的含糖量测定

采用 DNS 比色法测定不同酶处理条件下银耳多糖提取液的还原糖和总糖含量,首先得到标准曲线(图 4)。带入吸光值测定结果计算,则可知不同提取和酶处理条件下料液还原糖和总糖含量的情况(图 5 ~ 8)。

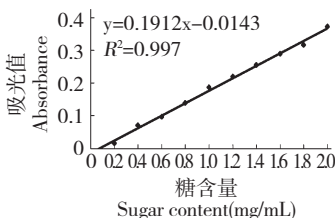


图4 DNS 比色法测定含糖量标准曲线

Fig. 4 Standard curve of sugar content by DNS colorimetric method

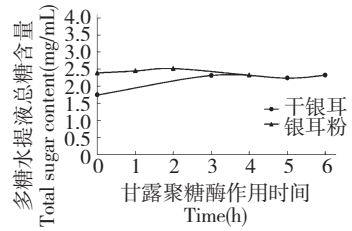


图5 银耳多糖水提液总糖含量随酶作用时间的变化

Fig. 5 The total sugar content of Tremella polysaccharide extract changes with time

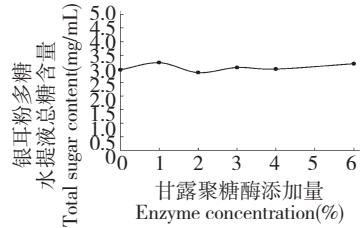


图6 银耳粉多糖水提液总糖含量随酶添加量的变化

Fig. 6 The total sugar content of Tremella (milled) polysaccharide extract changes with enzyme concentration

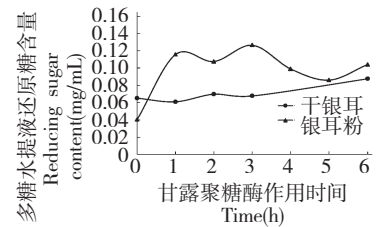


图7 银耳多糖水提液还原糖含量随酶作用时间的变化

Fig. 7 The reducing sugar content of Tremella polysaccharide extract changes with time

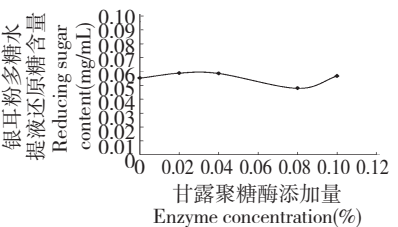


图8 银耳粉多糖水提液还原糖含量随酶添加量的变化

Fig. 8 The reducing sugar content of Tremella(milled) polysaccharide extract changes with enzyme concentration

通过总糖含量测定结果可知,酶处理前后提取液总糖含量没有明显变化,说明加酶不影响总糖含量;此外,银耳粉提取比干银耳直接提取得到总糖含量略大。

根据还原糖含量测定结果,酶作用后银耳多糖提取液中的还原糖含量略有增加,但变化很小。可见酶处理并未直接将大量多糖水解成还原糖,只是水解成了较小分子量的多糖;此外,银耳粉提取液比干银耳提取液还原糖含量增加得多,推测与提取液中原本得到的多糖分子量有关。

2.3 不同条件酶处理前后银耳多糖水提取液冻干粉平均分子量测定

银耳多糖为混合物,没有确定的标准品,采用

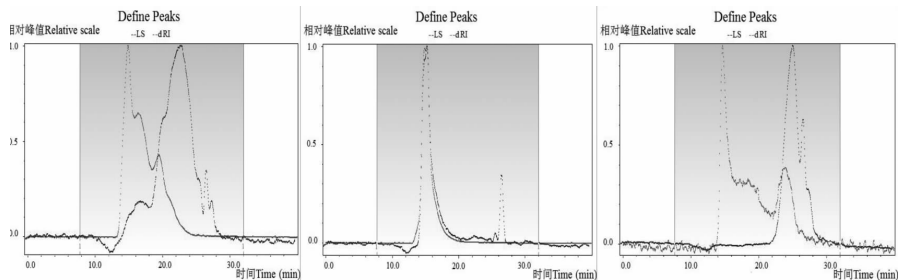


图9 参考样品色谱峰(依次为样品 A、B、C)

Fig. 9 The chromatographic peak of reference sample A, B and C

注:A—银耳孢子实体多糖30%;B—银耳多糖1-0.05%;C—森弗银耳多糖

Note: A-Tremella sporophore polysaccharide 30%; B-Tremella polysaccharide 1-0.05%; C-Sciphar Tremella polysaccharide

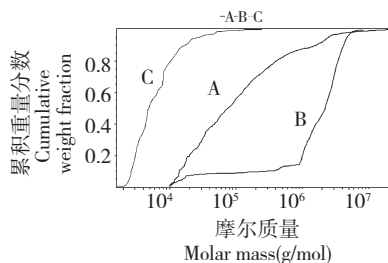


图10 三种银耳粉参考样品分子量分布

Fig. 10 The molecular weight distribution of reference sample A, B and C

同理,整理不同提取和酶处理条件下得到的银耳水提取液冻干粉分子量分布情况(图11~13),可

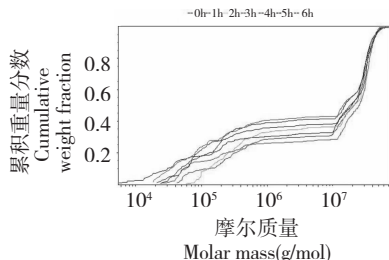


图11 干银耳多糖水提液在0.1%酶作用不同时间后冻干粉中不同分子量所占比例

Fig. 11 The molecular weight distribution of Tremella (dried) polysaccharide extract changes with time

GPC测定银耳多糖分子量时,测定A、B、C样品(见材料与方法的平均分子量作为参考。

观察三个参考样品的GPC色谱峰(图9),三个样品出峰时间近似但是峰型差别较大,说明不同来源的银耳多糖分子量分布有显著差异。根据不同分子量所占百分比的对比(图10)也可以看出,样品A分子量在 $10^4 \sim 10^7$ 范围内较为均匀分布;样品B分子量大, 10^6 以上占80%;样品C分子量小,集中在 10^5 以下, 10^4 以下占80%。这一结论与色谱峰情况对应。

以较为清楚地看出,经过酶处理的银耳水提取液冻干粉的分子量整体降低(即分子量小于等于某个分子量的部分比例变大),且分子量降低与酶作用时间和加酶量有一定关系,随作用时间延长或加酶量增加,分子量降低更明显。

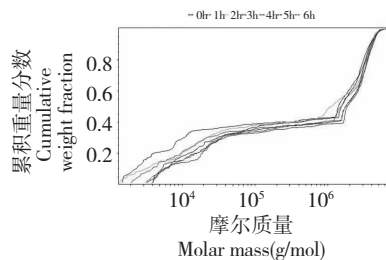


图12 银耳粉多糖水提液在0.1%酶作用不同时间后冻干粉中不同分子量所占比例

Fig. 12 The molecular weight distribution of Tremella (milled) polysaccharide extract changes with time

统计分析A、B、C三个参考样品和不同提取与酶处理条件下银耳水提取物冻干粉的平均分子量数据,结果如图14~16所示。

三种参考样品之间分子量差别大。B样品分子量远大于另外两种。

银耳多糖水提取液经过酶处理后,冻干粉平均分子量减小(最大减小量达到 50%);提取方法和加

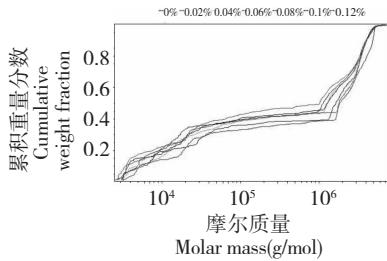


图 13 银耳粉多糖水提液在不同加酶量作用 1 h 后冻干粉中不同分子量所占比例

Fig. 13 The molecular weight distribution of Tremella (milled) polysaccharide extract changes with enzyme concentration

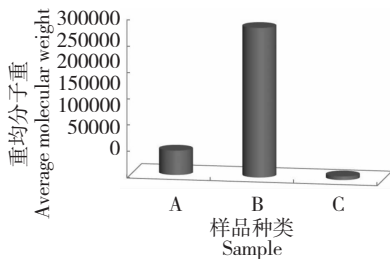


图 14 参考样品重均分子量

Fig. 14 The average molecular weight of reference sample A, B and C

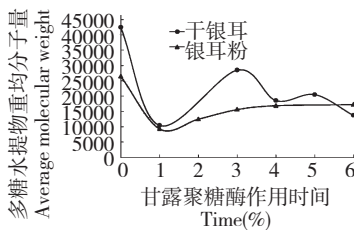


图 15 酶处理不同时间后银耳多糖水提取物冻干粉重均分子量

Fig. 15 The average molecular weight of lyophilized powder of Tremella polysaccharide extract with enzyme concentration

酶量相同的条件下,酶作用时间在 1 ~ 6 h 变化时,银耳多糖水提取物冻干粉的分子量减小量没有显著差异;提取方法和酶作用时间相同的条件下,加酶量不同时,分子量减小量有显著差异,随着加酶量增加,获得银耳多糖水提液冻干粉的平均分子量逐渐减小,在加酶量 0.08% 时达到最小。

根据 GPC 的分子量测定结果,得到酶处理降低

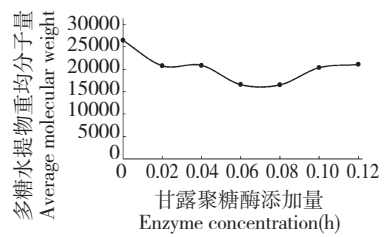


图 16 银耳粉多糖水提取物冻干粉不同加酶量处理后重均分子量

Fig. 16 The average molecular weight of lyophilized powder of Tremella (milled) polysaccharide extract with time

银耳多糖水提液冻干粉平均分子量的最佳条件为: 60 °C, pH 5.0 ~ 6.0, 加酶量 0.08%, 酶作用时间 1 h。

3 分析与讨论

本实验用干银耳与银耳粉两种不同形式的底物。实验操作上,银耳粉需要粉碎并过筛,而干银耳需要浸泡并剪碎,相比之下,银耳粉的处理较为方便省时,工作量小,且后续的搅拌、离心等处理与干银耳相同;粘度与含糖量的测定结果表明,银耳粉多糖提取液比干银耳多糖提取液的多糖含量更高,提取更充分;平均分子量测定结果也表明,银耳粉多糖提取物的平均分子量比干银耳多糖提取物更小。综上所述,选用银耳粉进行银耳多糖的提取,比干银耳更合适。

根据实验中料液粘度和含糖量以及提取物平均分子量的测定,可以总结出甘露聚糖酶的添加可以有效降低银耳多糖提取物的分子量,使提取液粘度明显减小。加酶量 0.08%, 酶处理时间 1 h 即可达到可以实现的最佳效果,继续增加酶量或者延长处理时间都不会再有明显作用。此外酶处理前后料液总糖含量未发生变化,还原糖含量也没有明显增加,说明酶处理并未能直接将多糖直接水解成还原糖,只是发生了低限度水解。

实验中银耳提取物与 A 样品分子量较相近,加酶处理后分子量仍比 C 样品大。而 B 样品分子量则高出了一个数量级。就用于化妆品中活性成分而言,不同分子量的银耳多糖提取物情况可能从不同角度发挥作用,如 B 样品的银耳多糖分子量和粘度较大,其功效重在良好的成膜性和保护作用;而本实验中降低分子量和粘度的银耳多糖,能更好地透皮

吸收,发挥营养和保湿等功效。

实验中粘度与分子量测定结果具有一致性,实验方案较为理想。但是银耳多糖提取物为混合物,成分复杂,分子量跨度大,且本身粘度大,不易溶解和过膜,导致 GPC 测量分子量操作困难,而且响应值偏低,结果缺乏精确性。

4 结论

用甘露聚糖酶处理改善银耳多糖提取物粘度和分子量的最佳工艺条件为:料液比 1:100,温度 60 °C, pH 5.0~6.0,加酶量 0.08%,酶解时间 1 h。酶解后的多糖提取物分子量明显降低,但仍为大分子多糖,是一种低限度酶解,没有生物学特性的改变,可以用于工业化生产中以改善银耳多糖粘度及过滤情况,并有利于其在化妆品中的添加应用。

参考文献

- 1 Yan J(颜军),Guo XQ(郭晓强),Wu XY(邬晓勇),*et al.* Research on the ability to scavenge free radical of Tremella polysaccharide. *J Chengdu Univ, Nat Sci* (成都大学学报, 自科版),2006,25:35-38.
- 2 Huang XJ(黄秀锦). Comparison study on enzymatic and alkaline extractions, isolation, purification and fucination properties of Tremella polysaccharides. *Food Sci* (食品科学), 2008,29:134-136.
- 3 Lai JX(来吉祥),He CF(何聪芬),Zhao J(赵进),*et al.* Optimization of extraction technology of polysaccharide from Tremella Fuciformis on commercialized basis and its function in skin care cosmetics. *China Surfact Deterge Cos* (日用化学工业),2010,40:259-262.
- 4 Han Y(韩英),Shen X(沈秀),Xu WQ(徐文清),*et al.* Radioprotective effect of polysaccharides isolated from Tremella Fuciformis in mice. *Chin J Radiol Health* (中国辐射卫生),2012,21:132-133.
- 5 Ma SY(马素云),Yao LF(姚丽芬),Ye CY(叶长云),*et al.* Isolation, purification and structural characteristics of a single polysaccharide from Tremella Fuciformis Berk. *J Chin Instit Food Sci Technol* (中国食品学报),2013,13:172-177.
- 6 Gou XJ(苟小军),Guo XQ(郭晓强),Yan J(颜军). Chinese Tremella Fuciformis. Beijing: China Agriculture Press, 2009,255-299.
- 7 Ma SY(马素云),He L(贺亮),Yao LF(姚丽芬). Research advances on structural characteristics and bioactivity of Tremella fuciformis polysaccharides. *Food Sci* (食品科学),2010,31:411-416.
- 8 Zheng L(郑良). Study on extraction conditions of Tremella fuciformis polysaccharide and viscosity characteristics of its extract. Chengdu: Sichuan University, MSc, 2003.
- 9 Wu Q(吴琼),Zheng C(郑成),Ning ZX(宁正祥),*et al.* Study on extracting tremella fuciformis polysaccharides with microwave-assisted extraction. *Food Sci Technol* (食品科技),2006,9:109-111.
- 10 He WZ(何伟珍),Wu LX(吴丽仙). 银耳多糖的提取分离与纯化. *Strait Pharm J*(海峡药学),2008,20(7):33-35.
- 11 Mou HJ,Zhou F,Jiang XL,*et al.* Production, purification and properties of β -mannanase from soil bacterium *Bacillus circulans* M-21. *J Food Biochem*,2011,35:1451-1460.
- 12 Wu MC,Tang CD,Li JF,*et al.* Bimutation breeding of *Aspergillus niger* strain for enhancing β -mannanase. *J Food Biochem*,2011,346:2149-2155.
- 13 Li JF(李剑芳),Wu MC(邬敏辰),Cheng K(程科),*et al.* Study on the preparation of Oligo-glucomannan using konjak gum by β -mannanase. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业),2007,33:21-24.
- 14 He XJ(贺雪姣),Wang HX(王洪新),Ma CY(马朝阳),*et al.* Limited enzymatic hydrolysis to produce konjac glucomannan with moderate viscosity by β -mannanase. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业),2011,37:102-105.
- 15 Zhang SS(张帅帅). Enzymatic preparation of gluco-mannooligosaccharide and galactosidase. Tianjin: Tianjin University, MSc, 2012.
- 16 Han W(韩威),Jiang RZ(姜瑞芝),Chen YH(陈英红),*et al.* Comparison of three kinds of chromatographic methods for monosaccharide composition analysis of Tremella polysaccharide. *Nat Prod Dev Res* (天然产物研究与开发),2012,24:359-361.
- 17 Chen YH(陈英红),Jiang RZ(姜瑞芝),Luo HM(罗浩铭),*et al.* Studies on establishing specific chromatogram of Tremella polysaccharides by HPLC. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志),2012,32:136-139.
- 18 Chen YH(陈英红),Jiang XZ(姜翔之),Luo HM(罗浩铭),*et al.* Analysis of monosaccharide composition in Tremella polysaccharides by precolumn derivation HPLC. *Spec Wild Econom Animal Plant Res* (特产研究),2012,3:37-39.