

# 一种pH值与高压均质协同最优化的银耳多糖提取新方法

李学兵

多维医药集团国际控股有限公司 宁夏 750101

**摘要:** 银耳, 又被称为雪耳, 被称为菌中之冠。银耳中复合的银耳多糖成分其具有高保湿性、抗氧化性、抗凝血等作用, 广泛应用于各种保健品、食品以及高档化妆品中。银耳多糖主要通过银耳提取得到, 提取收率较低是制约行业规模化和产品价格的关键因素, 造成成本高、浪费大。因此, 本论文探索研究最优化的提取工艺, 提升银耳多糖的提取收率。本研究优化了一种利用高压均质法高效提取银耳多糖的方法。本论文以干木耳粉为原料, 通过单因素实验确定了较佳的提取温度、pH值、料液比以及酶添加量条件, 然后通过正交实验进行优化, 确定了银耳多糖的最佳提取工艺为: 料液比1: 80, pH值11, 复合酶添加量1%, 处理温度60℃。在此工艺条件下, 进一步结合高压均质处理, 能够高效破坏银耳的细胞壁结构, 让更多的多糖充分溶解到水相中, 用浓度为80%的乙醇进行醇沉, 可实现了银耳多糖提取率达到44.17%。本研究通过多方法组合设计, 极大地提升了银耳多糖由干银耳粉的提取收率, 为工业生产过程应用提供了技术支持。

**关键词:** 银耳多糖; 高压均质; 提取工艺; 纯化

## 引言

银耳, 是一种营养丰富、历史悠久的食用型真菌, 不仅可以用于烹饪, 在医学上也是一种常用的药方<sup>[1]</sup>。古籍中记载道, 银耳对人体具有诸多益处, 可以养肺生津、滋阴润胃, 长期在饮食中摄入银耳, 有助于提高人体免疫力, 预防心脑血管疾病等。

## 一、材料与方法

### 1. 还原糖含量的测定

银耳中还原糖含量的测定采用DNS法。DNS法测糖的原理是: DNS试剂与还原糖可以发生化学反应生成氨基化合物, 该化合物在碱性条件下会呈现出橙色, 在550nm波长下可以得到最强的吸收。并且还原糖的含量与吸光度值呈线性关系。

### 2. 总糖含量的测定

总糖含量的测定采用苯酚硫酸法。

苯酚硫酸法的实验原理为: 在较高的温度下, 多糖会被浓硫酸水解成单糖分子, 并生成一些糠醛及其衍生物, 这种衍生物可以与苯酚在强酸性条件下显色, 生成呈橙色的化合物, 在490nm时可达最高吸收。因此, 通过对样品在该波长下吸光度进行测量, 可以计算出多糖含量。总糖的标准曲线总糖标准曲线的回归线性方程为:  $y=0.8488x+0.0078$ ,  $R^2=0.9978$ 。

## 3. 银耳多糖提取收率

将酶标仪测出的不同组别银耳多糖的吸光度值代入到总糖标准曲线中, 利用该曲线的回归方程计算出不同组别银耳多糖的多糖浓度。将粗多糖质量与称取的银耳干粉质量相除, 即为粗多糖提取率, 同时将平行组的结果与实验组进行对比, 并计算平行组和实验组的标准偏差。

## 二、结果与讨论

### 1. pH值对银耳多糖提取率的影响

为了探究pH值对于提取结果的影响, 本实验选取pH值8、9、10、11、12作为变量。具体的实验方法为: 分别称取5份0.1g过60目筛的银耳干粉至10ml离心管中, 并按照按料液比1: 60 (g/ml) 向每支离心管中加入去离子水6ml, 加热并震荡至银耳溶于水, 摇床振荡两小时。然后通过添加不同体积的6mol/L NaOH溶液使得溶液的pH值分别达到8、9、10、11、12。调节pH值后放入80℃的恒温电热水浴锅中加热两小时。加热结束后, 放入离心机中离心10min, 调节转速为4000r/min。离心结束后, 取1ml上清液, 加入4ml的无水乙醇进行醇沉, 将溶液中的多糖组分沉淀下来。醇沉时长为20min, 之后放入离心机离心处理25min, 转速为4000r/min。离心结束后倒出乙醇, 沉淀烘干后, 配置成一定浓度的溶液进行多糖的含量测定。实验重复3次, 取其平均值进

行统计分析。

在料液比为1:60、提取温度为80℃的固定条件下，pH值对银耳多糖提取率的影响结果如图1所示。

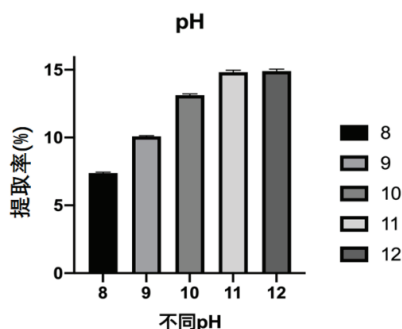


图1 不同pH值对银耳多糖提取率的影响

当pH值从8上升到11时，多糖的提取量随着溶液碱性的增强而明显增加，提取率从7.35%上升到14.59%，提高了98%；当pH值达到12时，提取率达到最大值14.66%，提取率趋向平稳，不再有明显上升。在碱性条件下，多糖的羟基与溶液的氢氧根离子充分接触，多糖的结构舒展开来，过高的pH值对结果的影响将不再明显。

在关于碱溶性银耳粗多糖的提取研究中，通过因素交互作用建立数学模型，对提取率进行拟合，确定了碱提取法的最适氢氧化钠浓度为0.76mol/L，约为pH值13.9，符合本实验中碱浓度与提取率呈正相关的趋势，考虑到实验过程中添加过多的碱液会对实验中的料液比造成一定影响，且碱提取法的缺陷也比较明显，当碱浓度过高时，提取的多糖溶液颜色发黄，对于成品的品质、颜色等有着不好的影响。因此，综合以上因素，确定进一步进行正交试验设计中，该因素的三水平值分别为10、11、12。

## 2. 料液比对银耳多糖提取率的影响

为了探究料液比对于多糖提取率的影响，控制pH值为11，提取温度80℃为固定条件，通过添加不同体积的去离子水使料液比分别达到1:50、1:60、1:70、1:80、1:90(g/ml)。具体的实验方法为：分别称取5份0.1g过60目筛的银耳干粉至10ml离心管中，并向每支离心管中分别加入去离子水5、6、7、8、9ml，加热并震荡至银耳溶于水中，摇床振荡两小时。然后添加一定体积的6mol/L NaOH溶液使得溶液的pH值达到11。其余实验步骤与前者实验内容相同。实验结果重复3次取其平均值进行统计分析，料液比对银耳多糖提取率的影响结果如图2所示。

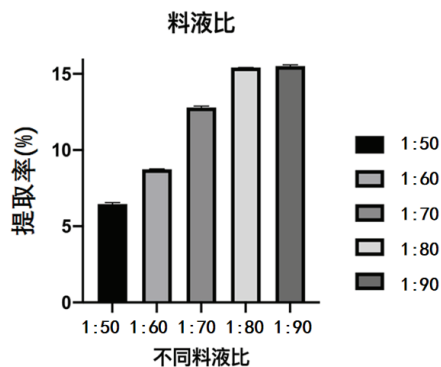


图2 不同料液比对银耳多糖提取率的影响

由结果可知，料液比的增加与多糖提取率的升高成正比，当料液比为1:50时，多糖提取率为6.82%，而当料液比升高到1:90时，提取达到最大值15.73%，提取率相较1:50时提高了130.6%，由此可见，料液比的增加使得多糖能够更多地溶解在溶剂里，在实际提取操作时，料液比的选取不能太小也不能过大，过低的料液比会使溶液黏度过大，质地过于黏稠，并且多糖不能很好地溶解，对于后续的提取分离都有不利的影响；过大的料液比会使得多糖溶液的浓度过低，从而在醇沉阶段时不容易被乙醇沉淀出来，使得多糖提取率降低，因此要选择适中的料液比。依据该实验结果，确定进一步进行正交试验设计中选取的三水平值分别为1:70、1:80、1:90。

## 3. 加热温度对银耳多糖提取率的影响

为了探究温度对多糖提取率的影响，保持其他实验条件不变，分别控制各个组别的加热温度为50、60、70、80、90℃。具体实验内容为：分别称取5份0.1g过60目筛的银耳干粉至10ml离心管中，向每支离心管中加入去离子水6ml，加热并震荡至银耳溶于水中，摇床振荡两小时。然后添加一定体积的6mol/L NaOH溶液使得溶液的pH值达到11。调节pH值后分别放入温度为50、60、70、80、90℃的恒温电热水浴锅中加热两小时。其余步骤与前者实验内容相同。

不同温度对提取收率影响结果可以看出，在温度从50℃升到70℃时，多糖的提取率随温度升高而显著增加，从11.04%提高到18.33%，上升了66.0%，这是由于温度的升高使得分子运动的速度加快，多糖在水中的溶解度增加；当温度大于70℃时，提取率逐渐下降，温度上升到90℃时，提取率降低到16.27%，距离最大值下降了11.2%，原因可能是过高的温度破坏了多糖的链式结构，使多糖发生降解，从而使后续的提取变得困难。

#### 4. 复合酶添加量对银耳多糖提取率的影响

为了探究复合酶的添加量对于多糖提取率的影响,将配置好的复合酶分别按照0.5、1、1.5、2.0、2.5 (g/100g)定量添加,控制其他因素不变,具体实验方法为:称取5份0.1g过60目筛的银耳干粉至10ml离心管中,分别加入质量分数为0.5、1、1.5、2.0、2.5%的复合酶(纤维素酶:果胶酶:中性蛋白酶1:1:1),并按照按料液比1:60 (g/ml)向每支离心管中加入去离子水6ml,加热并震荡至银耳溶于水中,摇床振荡两小时。然后添加一定体积的6mol/L NaOH溶液使得溶液的pH值达到11,其余实验步骤保持不变。在料液比为1:60、提取温度为80℃、pH值为11的固定条件下,pH值对银耳多糖提取率的影响结果。

酶添加量的变化总体来看对银耳多糖的提取率没有显著的影响,当酶的添加量从0.5%升高到2%时,银耳多糖的提取率从17.84%增加到20.39%,上升了14.3%,由此可见多糖提取率与酶添加量成正相关;当复合酶的量达到3%时,提取率有轻微下降至19.93%。整体看来,酶法提取的优势比较突出,多糖的提取率均高于15%,优于前几个条件下的最优值。其原因是复合酶对细胞壁有破壁、分解作用,使得银耳多糖可以从细胞中释放出来,从而提高多糖的提取率。综合考虑酶的用量和银耳多糖提取率,确定进一步进行正交试验设计中酶添加量的三个水平定为1%、2%、3%。

#### 5. 正交设计优化实验

根据单因素实验的分析结果,对提取率影响较大的因素进行可正交试验设计,以考虑交互作用对银耳多糖提取率的影响,实验结果如下:将实验结果在正交实验软件中进行分析,在料液比1:80,pH值12,温度60℃,酶添加量为1%的条件下,银耳多糖的提取率最高。

#### 6. 正交试验结果验证

在正交试验结果得出的最适条件下,进行银耳多糖的验证实验:称取1g过60目筛的银耳干粉至150ml摇瓶中,并分别加入0.01g的中性蛋白酶、纤维素酶和果胶酶(质量比1:1:1),按照按料液比1:80 (g/ml)向摇瓶中加入去离子水80ml,振荡使银耳和酶溶解于水中,然后摇床振荡两小时。之后添加一定体积的6mol/L NaOH溶液使得溶液的pH值达到11,调节pH值后放入

60℃的恒温电热水浴锅中加热两小时。加热结束,放入离心机中以4000r/min的转速离心10min,去除沉淀,取上清液放入旋转蒸发仪中蒸发至溶液粘稠,然后加入4倍体积的无水乙醇进行醇沉。醇沉放置20min后放入离心机,以4000r/min的转速离心25min,沉淀即为得到的银耳多糖。

#### 7. 高压均质提升银耳多糖提取率

实验组:正交实验结果与高压均质结合提升多糖提取率。称取12.5g过60目筛的银耳干粉,加入1000ml的去离子水和1%的复合酶,摇床混匀两小时后调节pH,在pH为12、提取温度为60℃的条件下,提取两小时,然后加入高压均质机中进行均质处理,分别在压力为500Pa、750Pa、1000Pa、1400Pa处取样,对其进行多糖含量的测定。研究不同压力对于银耳多糖提取率的影响。

空白对照组:称取12.5g过60目筛的银耳干粉,并加入1000ml的去离子水,然后加入高压均质机中进行均质处理,分别在压力为500Pa、750Pa、1000Pa、1400Pa处取样,对其进行多糖含量的测定。研究不同压力对于银耳多糖提取率的影响。

#### 结论

本研究采用了联合提取的方法对银耳中的多糖组分进行提取。首先通过单因素试验确定每种影响因素的合适范围,然后通过正交试验确定不同条件的影响效果以及最佳水平,对实验设计进行优化,从而确定出银耳多糖提取的最适条件:料液比1:80、温度60℃、pH值12、复合酶添加量1%。正交试验的结果表明,影响银耳多糖提取率的因素的主次顺序依次为:pH值>酶添加量>料液比>温度,采取最适条件对银耳多糖进行提取,多糖得率可以达到29.15%。

#### 参考文献

- [1]杨嘉丹,刘婷婷,张闪闪,等.微波辅助提取银耳多糖工艺优化及其流变、凝胶特性[J].食品科学,2019,40(14):289-295.
- [2]刘光荣,马诗经,韩萍,等.银耳多糖提取工艺优化及其对SDS诱导HaCaT细胞损伤的保护作用[J].中国食用菌,2021,40(1):97-102.