

正交法优选亮菌多糖脱色工艺研究

黄纯, 王小平, 程海涛, 姜晟 (中国药科大学, 江苏南京 211196)

摘要 [目的]建立亮菌多糖脱色的最佳方法。[方法]以色素脱除率作为主要考察指标,通过单因素考察和正交法优化亮菌多糖脱色工艺。[结果]D152树脂,45℃、pH 5.0为最佳脱色条件。[结论]D152作用后色素脱除率高,糖保留率高,有益于下一步分离纯化。

关键词 脱色素;亮菌多糖;工艺优化;正交法

中图分类号 S567.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)21-0133-02

Study on Decoloration Technique of *Armillariella* Polysaccharide by Orthogonal Experiments

HUANG Chun, WANG Xiao-ping, CHENG Hai-tao et al (China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 211196)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the optimum method of decoloration about *Armillariella* polysaccharide. [Method] Taking the decoloring ratio as main index, the optimum decoloring technique were established through single factorial test and orthogonal experiments. [Result] The best method of decoloration were obtained as follows: D152 resins working in pH 5.0 and 45℃. [Conclusion] The decoloring ratio of D152 and the retention rate of polysaccharide are high, which is beneficial to the next step.

Key words Decoloration; *Armillariella* polysaccharide; Technology optimization; Orthogonal method

亮菌学名白蘑科假密环菌[*Armillariella tabescens*(Scop. EX. Fr)Sing],是我国在20世纪60年代首次发现并拥有自主知识产权的一种真菌^[1]。笔者前期从亮菌发酵菌粉中经热水提取、Sevag法去蛋白、乙醇沉淀等步骤得到亮菌多糖(*Armillariella* polysaccharide, ALP)粗品^[2],再经DEAE-纤维素色谱柱纯化后得2种多糖ALP1和ALP2,初步的药效试验已表明ALP2具有较好的抗肿瘤活性^[3]。但在研究中也发现,亮菌多糖粗品中的色素在柱层析中不易脱除,是阻碍其纯品分离纯化、结构确定、作用机理、构效关系研究的瓶颈之一。因此,对亮菌多糖粗品进行脱色,一方面可以改善多糖的外观、提高亮菌多糖的纯度,另一方面也可为后续的各项研究打下基础。基于离子交换树脂和吸附树脂已有用于糖浆脱色的报道^[4-5],该试验尝试将其应用于亮菌多糖粗品脱色,通过对不同类型树脂的脱色效果和脱色条件的考察,找出能够有效脱除粗品中色素的工艺,为亮菌多糖的生产和研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 亮菌多糖粗品(自制);大孔阳离子树脂D151、D152,大孔阴离子交换树脂D280、D201GF,大孔吸附树脂D4006、D3520、AB-8,天津波鸿树脂科技有限公司;硫酸、苯酚、葡萄糖、乙醇、盐酸、氢氧化钠,中国医药集团上海化学试剂公司;其余试剂皆为国产分析纯。722分光光度计,上海圣科仪器设备有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 树脂预处理。去离子水反复洗涤树脂至无泡沫。阳离子交换树脂用5%盐酸、5%NaOH、5%盐酸,阴离子交换树脂用5%NaOH、5%盐酸、5%NaOH,各依次浸泡4h,每次浸泡后以去离子水清洗至中性。吸附树脂以5%盐酸、5%NaOH依次浸泡4h,每次浸泡后皆以去离子水清洗至中性,再用95%乙醇浸泡12h,用去离子水洗至无醇味。

1.2.2 树脂的筛选。分别向圆底烧瓶中加入一定量预处理的D151、D152、D280、D201GF、D4006、D3520、AB-8树脂和浓度为1mg/mL的ALP粗品溶液,调pH至中性,55℃水浴恒温振荡2h,过滤,测定滤液的脱色率、糖保留率。

1.2.3 测定方法及计算。

1.2.3.1 脱色率的测定。调节pH至(7.0±0.1),5000r/min离心20min后过滤,在420nm处测定光密度值。脱色率= $(OD_{\text{脱色前}} - OD_{\text{脱色后}}) / OD_{\text{脱色前}} \times 100\%$ 。

1.2.3.2 糖含量测定及多糖保留率的计算。采用硫酸-苯酚法^[6]测定糖含量。多糖保留率= $M_{\text{前}} / M_{\text{后}} \times 100\%$,式中, $M_{\text{前}}$ 、 $M_{\text{后}}$ 分别为脱色前后多糖的质量浓度。

1.2.4 温度对树脂脱色效果的影响。分别向圆底烧瓶中加入预处理的D151、D152、D4006和pH为5.5的ALP粗品溶液,在35、45、55、65、75℃水浴恒温振荡2h,过滤,测定滤液的脱色率、糖保留率。

1.2.5 pH对树脂脱色效果的影响。分别向圆底烧瓶中加入预处理的D151、D152、D4006和pH分别为3.0、4.5、6.0、7.5、9.0的ALP粗品溶液,55℃水浴恒温振荡2h,过滤,测定滤液的脱色率、糖保留率。

1.2.6 正交设计优选脱色的工艺条件。在单因素试验基础上,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,通过正交试验确定最佳脱色条件。

2 结果与分析

2.1 树脂的初筛选 从表1可以看出,D151、D152、D280、D201GF、D4006的脱色率均达到50%以上;D151、D152、D4006糖保留率较高,其余树脂在脱色的同时多糖的损失很大。据此选出D151、D152、D4006这3种树脂做进一步研究。

2.2 不同温度对脱色效果的影响 从表2可以看出,D151和D152脱色率在35~55℃随温度升高而增加,温度高于55℃后脱色率下降;D4006的脱色率在35~65℃随温度升高而增加,温度高于65℃脱色率下降。综合考虑,正交试验温度定为45、55、65℃。

2.3 pH对树脂脱色效果的影响 从表3可以看出,D151在pH3.0~4.5脱色率随pH的增加而增加,pH大于4.5后

脱色率下降;D152 在 pH 3.0~6.0 脱色率随 pH 的增加而增加,pH 大于 7.5 后脱色率下降;D4006 随着 pH 的增加脱色率下降。综合考虑,将正交试验的 pH 定为 3.5、5.0、6.5。

表 1 7 种树脂对亮菌多糖的脱色作用比较

Table 1 Comparison of the decolorization of *Armillariella polysaccharides* from seven kinds of resin

树脂名称 Resin name	脱色率 Decoloring ratio//%	多糖保留率 Retention rate of polysaccharides//%
D151	77	81
D152	81	86
D280	77	—
D201GF	54	11
D4006	75	41
D3520	32	6
AB-8	38	28

表 2 温度对 3 种树脂脱色效果的影响

Table 2 Decolorization effect of temperature on the three kinds of resin

脱色率 Decoloring ratio//%	温度 Temperature//℃		
	D151	D152	D4006
35	72	79	70
45	78	82	73
55	80	82	76
65	75	78	79
75	70	67	69

表 3 pH 对 3 种树脂脱色效果的影响

Table 3 Decolorization effect of pH on the three kinds of resin

pH	脱色率 Decoloring ratio//%		
	D151	D152	D4006
3.0	75	77	85
4.5	80	81	80
6.0	74	82	73
7.5	69	80	71
9.0	62	69	57

2.4 正交试验 通过单因素试验,得出正交试验因素水平表(表 4)。正交试验结果见表 5。极差分析表明,各因素对树脂脱色率的影响程度从大到小依次为 A、C、B,即树脂种类对脱色率的影响最大,pH 次之,温度的影响最小;方差分析表明,树脂种类、pH 对脱色率的影响均达到显著水平,温度对脱色率的影响不显著。

表 4 正交试验因素水平

Table 4 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	A(树脂 Resin)	B(温度 Temperature//℃)	C (pH)	D(误差项 Error term)
1	D151	45	3.5	1
2	D152	55	5.0	2
3	D4006	65	6.5	3

2.5 验证试验 以脱色率作为考察指标,理论上最佳组合是 A₂B₂C₂,而正交试验的最佳组合是 A₂B₁C₂,故需进行验证试验。验证试验结果表明,A₂B₂C₂ 和 A₂B₁C₂ 的脱色率分别为 88.1%、88.6%,2 种组合的脱色率和糖保留率基本接近。考

虑到 A₂B₁C₂ 组合能耗更低,故选择 A₂B₁C₂。并且要求树脂在脱色素的同时应尽可能多地保留糖,A₂B₁C₂ 具有较高的糖保留率,符合要求。

表 5 正交试验结果

Table 5 Orthogonal test results

序号 No.	A	B	C	D	脱色率 Decoloring ratio//%	多糖保留率 Retention rate of polysaccharides %
1	1	1	1	1	78.2	89.8
2	1	2	2	2	80.6	93.0
3	1	3	3	3	72.6	76.8
4	2	1	2	3	86.6	90.4
5	2	2	3	1	83.0	82.3
6	2	3	1	2	81.9	84.9
7	3	1	3	2	73.5	41.0
8	3	2	1	3	81.7	32.6
9	3	3	2	1	77.8	34.8
K ₁	231.4	238.3	241.8			
K ₂	251.5	245.3	245.0			
K ₃	233.0	232.3	229.1			
R	20.1	13.0	15.9			

注:K₁、K₂、K₃、R 均是指脱色率

Note: K₁, K₂, K₃, R are the decolorization rate

3 小结与讨论

亮菌多糖粗品是亮菌发酵菌粉经水提醇沉得到的棕色粉末,其中色素的种类、性质、结构目前鲜见报道。从树脂初筛的试验结果来看,属于阳离子交换树脂的 D151、D152 和阴离子交换树脂 D280 均有较好的脱色效果,推测亮菌多糖粗品中的色素既有阳离子型也有阴离子型,成分比较复杂。离子交换树脂在发挥作用时,除了离子交换过程外,还存在吸附作用,而 D280 树脂作用后,溶液中的多糖几乎检测不到,此现象有深入研究的必要。从正交试验结果来看,树脂种类对脱色率的影响最大,pH 次之,二者对脱色率的影响都达到显著水平,而温度对脱色率的影响则较小。究其原因,可能与色素分子的分子结构、带电情况、基团极性、是否容易与吸附树脂的表面基团形成氢键等因素有关,尚需要继续研究。多糖的进一步分离纯化往往采用离子交换色谱法,色素的残留会对离子交换树脂产生毒害。经过 D152 作用后色素的脱除率达到 85%,而此条件下多糖的保留率近 90%,所以正交试验确定的工艺条件对进一步分离得到高纯度、高产率的亮菌多糖非常有益。

参考文献

- [1] 江苏省“亮菌”科研协作组化学小组. 假蜜环菌的研究Ⅱ. 假蜜环菌素的分离及化学结构的测定[J]. 微生物学报,1974,14(1):9-16.
- [2] 黄纯,宋慧智,马驰,等. 亮菌多糖提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(19):5027-5028.
- [3] 黄纯,周凤娟. 亮菌多糖的纯化工艺及抗肿瘤活性研究[J]. 江西中医学院学报,2007,19(6):65-66.
- [4] ROTHCHILD R D. Decolorizing by adsorption with a non functional resin [J]. International sugar journal,1994,96(1144):145-146,149-152.
- [5] 黄祥斌,于淑娟,高大维. 几种离子交换树脂用于糖浆脱色的比较研究[J]. 食品科学,2001,22(4):11-13.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.