

D315 树脂分离茶多糖工艺的研究

王元凤, 金征宇

(江南大学食品学院, 无锡 214036)

摘要: 对 D315 树脂分离纯化茶多糖的工艺进行了研究, 试验结果表明, D315 树脂适用于茶多糖的初步分离和纯化。在上样液 pH 值 6.0~7.0, 温度 30℃, 糖醛酸质量浓度 2.5 mg/mL 时, 先收集上柱吸附的流出液和去离子水洗脱液, 得到以中性糖为主的茶多糖 NTPS, 该多糖总糖质量分数为 82.7%, 糖醛酸质量分数为 7.9%; 而后采用 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱, 得到糖醛酸含量高的酸性糖 ATPS, 该多糖总糖质量分数为 85.5%, 糖醛酸质量分数为 35.2%。

关键词: 茶叶; 多糖; 阴离子交换树脂; 分离

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2005)10-0147-04

王元凤, 金征宇 D315 树脂分离茶多糖工艺的研究[J] 农业工程学报, 2005, 21(10): 147-150

Wang Yuanfeng, Jin Zhengyu Isolation of tea polysaccharides by D315 resin[J] Transactions of the CSAE, 2005, 21(10): 147-150 (in Chinese with English abstract)

0 引言

茶多糖是茶叶中一种重要生物活性成分, 大量研究表明, 茶多糖具有降血糖、防辐射、抗凝血及抗血栓、降血压、降血脂等作用, 不同提取分离方法对茶多糖的得率、纯度和生物活性有很大影响^[1]。目前茶多糖的纯化方法主要有金属络合物法^[2]、膜过滤法^[3]、纤维素阴离子交换柱层析法^[4,5]、凝胶柱层析法^[6,7]等, 其中, 纤维素阴离子交换柱层析法和凝胶柱层析法是最常采用的两种方法, 然而纤维素树脂和凝胶柱价格昂贵, 样品制备量极小, 仅限于实验室研究, 尚不能规模化生产。

糖类化合物分子中含有许多醇羟基具有弱酸性, 在中性水溶液中可与强碱性阴离子交换树脂(OH⁻型)发生离子交换作用而被吸附, 并易被 10% 的 NaCl 水溶液解吸, 然而许多糖类物质在强碱性条件下会发生异构化和分解反应, 因而限制了 OH⁻型强碱性阴离子交换树脂在糖类物质分离纯化中的应用^[8]。应国清等^[9]探讨了 D315 树脂在分离玻璃酸(一种链状高分子粘多糖)中的应用。D315 树脂还用于柠檬酸精制^[10]。王元凤等采用静态吸附法探讨了七种树脂对茶多糖的脱色效果, 结果发现大孔弱碱性阴离子交换树脂 D315 可以有效地对茶多糖进行脱色和脱蛋白^[11]。茶多糖除含有中性糖之外, 还含有相当量由糖醛酸组成的酸性糖, 在弱碱性条件下带负电荷, D315 树脂为大孔弱碱性阴离子交换树脂, 用其进行脱色的同时, 还可以吸附带负电荷的酸性多糖, 因此根据多糖和色素分子溶解性、极性和电负性的差异, 采用适宜的吸附解吸条件, 选择性地吸附或解吸茶多糖和茶色素, 提高茶多糖的回收率和纯度。本文

考察了大孔阴离子交换树脂 D315 对茶多糖吸附和洗脱的影响, 拟找出提高茶多糖纯度和得率的较佳工艺, 为茶多糖的生产和开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

粗老绿茶经粉碎后过 60 目筛备用(湖北宜昌雾渡河茶叶公司 2004 年 5 月生产); D315 大孔阴离子交换树脂(上海华震科技有限公司); NaCl、NaOH、盐酸等均为分析纯。

水浴震荡器(HZS-H 型, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 酸度计(PHS-3TC 型, 上海天达仪器有限公司); 旋转蒸发器(RE-52A 型, 上海亚荣生化仪器厂); 循环水真空泵(SHB-III 型, 巩义市站街光亚仪器厂); 可见分光光度计(722 型, 北京光学仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 茶多糖提取工艺

称取粗老绿茶 800 g, 用 80% 乙醇 70℃ 回流提取 1.5 h, 提取后的茶渣先用自来水 65℃ 提取 2.0 h, 再用复合纤维素酶在茶叶与水的质量体积比 1:10, 温度 40℃, pH 值 5.5, 加酶量质量分数为 0.5% 条件下提取 3.0 h, 合并两次滤液, 55℃ 减压浓缩, 3 倍体积乙醇沉淀, 沉淀物冻干, 得多糖样品 ETPS。将 ETPS 稀释至糖醛酸质量浓度为 2.5 mg/mL, 以 2.0 BV/h (1 BV 相当于一个柱床体积) 速度流过 D315 大孔阴离子交换树脂, 先用去离子水洗脱, 收集上柱吸附的流出液和去离子水洗脱液, 醇沉后溶于水, 透析脱盐, 冻干后得多糖样品 NTPS, 再用 0.5 mol/L NaCl 以 0.8 BV/h 流速洗脱, 洗脱液再醇沉, 透析脱盐, 冻干后得多糖样品 ATPS。

1.2.2 树脂预处理方法

取新购的 D315 树脂, 用 40℃ 热水反复漂洗至无泡沫, 再用 5% 盐酸浸泡 4 h, 去离子水冲洗至中性, 再用 5% NaOH 浸泡 4 h, 去离子水冲洗至 pH 8.0 左右, 备

收稿日期: 2005-02-01 修订日期: 2005-08-29

作者简介: 王元凤(1974-), 女, 湖北宜昌人, 博士, 研究方向为碳水化合物。无锡 江南大学食品学院, 214036

通讯作者: 金征宇(1962-), 男, 江苏扬州人, 教授, 博士生导师, 研究方向为碳水化合物、农副产品的综合利用。无锡 江南大学食品学院, 214036

用。

1.2.3 静态吸附实验

取处理好的D315树脂,加入一定糖醛酸质量浓度的100 mL 茶多糖溶液于250 mL 三角瓶中,设定不同的温度和pH值,恒温水浴振荡器振摇12 h(振荡频率120 r/min)。振荡结束后,过滤,收集滤液,将滤液pH值调至6.0,测定12 h后溶液中糖醛酸的质量浓度和脱色率。

1) 温度对D315树脂交换容量的影响

分别取预处理的树脂加入糖醛酸质量浓度为2.5 mg/mL的茶多糖溶液,控制温度分别为10、20、30、40、50,恒温水浴振荡,静态吸附12 h。

2) pH值对D315树脂交换容量的影响

分别取预处理的树脂加入预先调节好pH值为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0的糖醛酸质量浓度为2.5 mg/mL的茶多糖溶液于35℃的恒温水浴振荡,静态吸附12 h。

3) 上样液浓度对D315树脂交换容量的影响

选择0.5、1.0、2.5、4.0、6.5 mg/mL五个糖醛酸质量浓度,于35℃的恒温水浴振荡,静态吸附12 h。

1.2.4 D315树脂动态吸附和洗脱实验

用湿法将处理好的树脂装入Φ2.6×30 mm的玻璃交换柱,每间隔1 h取流出液2 mL测糖醛酸质量浓度。

1) D315树脂动态吸附茶多糖的流出曲线

配制一定体积的浓度为2.5 mg/mL的多糖溶液于预先处理好的D315大孔阴离子吸附树脂上柱,流速为2.0 BV/h。

2) 不同NaCl浓度对茶多糖解吸的影响

采用0.0、1.0、3.0、5.0、6.0 mol/L的NaCl溶液对吸附茶色素和茶多糖的树脂洗脱,洗脱速度控制在0.8 BV/h。

1.2.5 D315树脂再生

将已吸附茶多糖的D315树脂用NaCl洗脱后,采用1.0 mol/L NaCl和1.0 mol/L的NaOH处理,最后用去离子水冲洗至pH值8.0~8.5,再生10次,测定树脂对糖醛酸的交换容量和脱色率。

1.2.6 分析及计算方法

中性糖质量分数: 苯酚—硫酸比色法^[12]

糖醛酸质量分数: 间羟基联苯法^[12]

蛋白质质量分数: 考马斯亮兰法^[13]

茶多酚质量分数: 酒石酸亚铁比色法^[14]

糖醛酸的交换容量: 指单位体积活化的湿树脂所能交换的糖醛酸的质量。

$$\text{交换容量} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = (C_0 - C_i) \times V_{\text{溶液}} / V_{\text{树脂}}$$

式中 C_0, C_i ——吸附前、后溶液中糖醛酸的质量分数, mg/mL; $V_{\text{溶液}}, V_{\text{树脂}}$ ——茶多糖溶液和活化的湿树脂的体积, mL。

脱色率测定及计算方法: 将待测茶多糖溶液调节至pH值7.0±0.1,经5000 r/min离心20 min后过滤,收集滤液,然后在420 nm处测其光密度值^[15]。

$$\text{脱色率} (\%) = (OD_{\text{脱色前}} - OD_{\text{脱色后}}) \times 100 / OD_{\text{脱色前}}$$

式中 $OD_{\text{脱色前}}, OD_{\text{脱色后}}$ ——脱色前、后溶液的光密度值。

2 结果与分析

2.1 粗茶多糖ETPS的成分分析

研究表明,按本试验确定的提取工艺提取粗茶多糖ETPS,得率为5.44%,经分析,ETPS中含有32.68%的总糖,11.24%的糖醛酸,18.96%的多酚,15.00%的灰分,7.23%的蛋白质及一定质量分数的色素。

2.2 温度对D315树脂交换容量的影响

从图1可以看出:温度对茶多糖溶液的脱色影响较明显,温度30~50左右时,D315树脂对茶多糖溶液的脱色效果较佳。温度升高,树脂功能基团活性增强,色素分子的扩散速度加快,多糖溶液的粘度下降,有利于色素的吸附。D315树脂对茶多糖溶液中的糖醛酸交换容量随温度的升高先增加后减少。可能的原因在于:一方面茶多糖中的糖醛酸是一种一元弱有机酸,不能完全电离,温度升高增加了糖醛酸在水中的电离度,使得溶液的酸性增强;另一方面弱碱性树脂交换吸附酸根离子,发生酸碱中和反应,此反应为放热反应,温度升高不利于此反应的进行。D315树脂由于对热效应比较敏感,当温度升至30左右,它对糖醛酸的交换容量下降较明显。综合考虑,宜在30左右使用D315树脂。

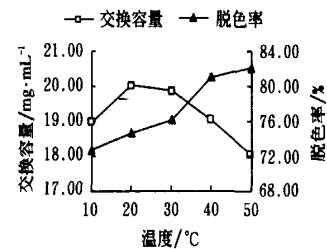


图1 温度对脱色率和糖醛酸交换容量的影响

Fig. 1 Effect of temperature on absorption of colorants and uronic acids by D315 resin

2.3 pH值对D315树脂交换容量的影响

从图2可以看出:pH值5.0~7.0时,D315树脂对茶多糖溶液的脱色效果较佳,对多糖的吸附也较大。在pH值7.0以下,D315树脂对茶多糖溶液的脱色效果和对多糖的交换容量随着pH值的增加而增加,当pH值大于7.0以后,反而下降,原因在于茶叶多糖是酸性多

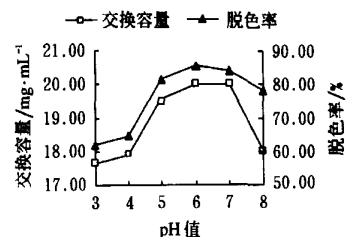


图2 pH值对脱色率和糖醛酸交换容量的影响

Fig. 2 Effect of pH value on absorption of colorants and uronic acids by D315 resin

糖,在偏碱性条件下带负电荷,树脂上的阴离子以离子键的形式与茶多糖的糖醛酸阴离子发生交换,但当 pH 值大于 7.0 以后,茶多糖在碱性条件下容易水解,脱色效果和对多糖的交换容量下降,因此,提取的多糖溶液不需调节 pH 值即可上 D315 树脂分离。

2.4 上样液浓度对 D315 树脂交换容量的影响

从图 3 可以看出:脱色率随着糖醛酸浓度升高而降低,当多糖溶液中糖醛酸质量浓度大于 2.5 mg/mL 时,脱色率迅速下降。交换容量随着多糖溶液中糖醛酸浓度升高而增加。当多糖溶液中糖醛酸质量浓度为 2.5 mg/mL 时,其糖醛酸交换容量为 19.94 mg/mL,当多糖溶液中糖醛酸质量浓度为 0.5 mg/mL 时,其交换容量仅为 4.90 mg/mL,两者相比较,后者仅为前者的 24.6%。因此,应在多糖溶液中糖醛酸质量浓度为 2.5 mg/mL 进行吸附。

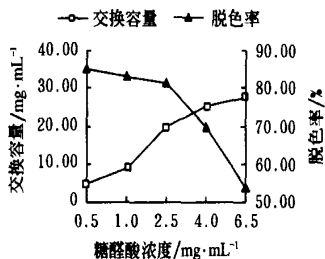


图 3 上样液浓度对脱色率和糖醛酸交换容量的影响

Fig. 3 Effect of sample solution concentration on absorption of colorants and uronic acids by D315 resin

2.5 D315 树脂动态吸附茶多糖的流出曲线

从图 4 可以看出:当多糖溶液的上样量为 20 BV 时,D315 树脂对茶多糖的吸附已经达到饱和,可以停止吸附,该点即为多糖上柱吸附的渗漏点。

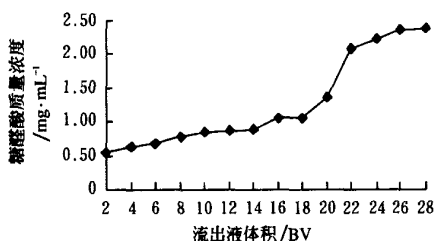


图 4 D315 树脂动态吸附茶多糖的流出曲线

Fig. 4 Flowing curve of tea polysaccharides by D315 resin adsorption

2.6 NaCl 溶液浓度对茶多糖解吸的影响

预实验发现,采用浓度大于 0.6 mol/L 的 NaCl 洗脱时,相当一部分色素洗脱下来,多糖纯度很低,不可取。从图 5 可以看出:采用 0.5, 0.6 mol/L NaCl 溶液洗脱,糖醛酸质量浓度远远高于采用 0.3, 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱,采用 0.6 mol/L NaCl 与采用 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱效果差别不大,NaCl 溶液浓度在 0.1 mol/L 时,很大一部分酸性茶多糖解吸不下来,产品得率低,故洗脱液采用 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱。

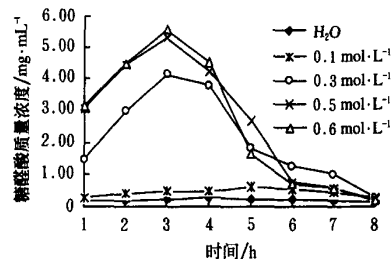


图 5 NaCl 溶液浓度对茶多糖解吸的影响
Fig. 5 Effect of NaCl concentration on elution of tea polysaccharides

2.7 D315 树脂的重复使用性能

从表 1 可以看出:D315 树脂再生 10 次后,树脂的脱色率下降 8.6%,树脂对糖醛酸的交换容量下降 5.5%,表明 D315 树脂对茶多糖的分离纯化是稳定的。

表 1 再生次数对 D315 树脂吸附性能的影响

Table 1 Effect of regeneration time on absorption performance of D315

再生次数	1	3	5	7	9	10
交换容量/mg·mL ⁻¹	20.07	19.62	19.28	19.16	19.03	18.97
脱色率/%	85.03	83.27	81.45	80.09	79.25	77.72

2.8 D315 树脂分离得到的茶多糖的基本组成

ETPS 经 D315 吸附分离后,可得到 NTPS 和 ATPS 两种茶多糖。NTPS 为不被树脂吸附的多糖,浅绿色,得率 1.16%,总糖质量分数 82.7%,糖醛酸含量 12.9%;ATPS 为酸性多糖,灰白色,得率为 0.77%,总糖质量分数 85.5%,糖醛酸质量分数 39.8%。

3 结论

1) D315 树脂纯化茶多糖的较佳条件为:上样液 pH 值 6.0~7.0,温度 30℃,多糖溶液中的糖醛酸质量浓度 2.5 mg/mL,上柱流速 2.0 BV/h。

2) ETPS 经 D315 树脂吸附分离后,可得到两种茶多糖,一种是收集的上柱吸附的流出液和去离子水洗脱液而得到的以中性糖为主的多糖 NTPS,另一种是采用 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱而得到的己糖醛酸含量高的酸性糖 ATPS。NTPS 相对于 ETPS 的得率为 21.3%,总糖含量为 82.7%,糖醛酸含量为 7.9%;ATPS 相对于 ETPS 的得率为 14.3%,总糖含量为 85.5%,糖醛酸含量为 35.2%。

3) 弱碱性的大孔阴离子交换树脂 D315 不仅可以对茶多糖溶液起到一定的脱色效果,提高茶多糖纯度,而且还可以按照茶多糖的电荷性质,对茶叶多糖进行初步分离和纯化。

[参 考 文 献]

[1] 傅博强,谢明勇,周 鹏. 茶叶多糖的提取纯化、组成及药理作用研究进展[J]. 南昌大学学报(理科版), 2001, 25(4): 358- 364

- [2] 李布青, 张慧玲. 中低档绿茶中茶多糖的提取及降血糖作用[J]. 茶叶科学, 1996, 16(1): 67- 72
- [3] 惠永正, 王 巍. 纯化茶多糖及提成方法[P]. 中国: 1379044A, 2002
- [4] 许新德, 高荫榆, 等. 茶叶多糖的纯化及组分研究[J]. 食品科学, 2000, 21(8): 13- 15
- [5] Shimizu M, Wada S, Hayashi T, et al. Study on hypoglycemic constituents of Japanese tea [J]. Yakugake Zasshi, 1988, 108(10): 964- 971.
- [6] 王丁刚, 王淑如. 茶叶多糖的分离、纯化、分析及降血脂作用[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(4): 225- 228
- [7] Takeo T, Unno T, Kinugasa H, et al. The chemical properties and functional effects of polysaccharides dissolved in green tea infusion [J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 1998, 45(4): 270- 272
- [8] 江邦和, 胡晓忠, 邬行彦. 离子交换与吸附树脂在中药有效成分提取中的应用[J]. 离子交换与吸附, 2001, 17(4): 379 - 384
- [9] 应国清, 孟优娣, 游文淑. 大孔离子交换树脂分离纯化玻璃酸的研究[J]. 离子交换与吸附, 1999, 15(4): 349- 353
- [10] 汗邦和, 徐建刚, 张纪红, 等. 弱碱性阴离子交换树脂在柠檬酸提炼中的应用[J]. 离子交换与吸附, 1996, 12(3): 254 - 258
- [11] 王元凤, 金征宇. 茶多糖脱色的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(12): 61- 66
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1998
- [13] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [14] 浙江大学茶叶研究所. 茶叶品质理化分析[M]. 上海科学出版社, 1989
- [15] 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

Isolation of tea polysaccharides by D315 resin

Wang Yuanfeng, Jin Zhengyu

(Food School, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract The technology for isolation and purification of tea polysaccharides with D315 resin was studied. It was indicated that D315 resin was suitable for the preliminary isolation and purification of tea polysaccharides. Under the conditions of sample solution with pH 6.0~7.0, temperature 30 and 2.5 mg/mL of uronic acids, one polysaccharide NTPS which was mainly neutral sugar was obtained by collecting the solution flowing out and the fraction with water elution. The total sugar content of NTPS was 82.7% and its uronic acid content was 7.9%. Another polysaccharide ATPS which was mainly acid polysaccharides was obtained by collecting the fraction with 0.5 mol/L NaCl elution. The total sugar content of ATPS was 85.5% and its uronic acid content was 35.2%.

Key words: tea polysaccharides; anion exchange resin; isolation