

膜技术分离纯化茶多糖的工艺研究

张 艳, 杜先锋*

(安徽农业大学教育部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036)

摘 要: 茶多糖是一类具有生物活性且结构复杂的糖蛋白复合物。结合膜集成联用技术通过微滤和超滤分离方法对粗制茶多糖溶液进行纯化, 同时对纯化后的茶多糖进行结构和活性分析。结果表明, 以 0.05 μm 的膜孔径, 0.2 MPa 的操作压力和 1% 的料液为最佳微滤工艺条件, 再经 30 kD 的超滤膜进行二次纯化, 多糖含量从 50% 提高至 81%, 工艺简单易行, 适宜于工业化生产, 同时保存多糖的活性。

关键词: 茶多糖; 微滤; 超滤

中图分类号: TS272; Q539

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)01-0012-06

Separation and purification of tea polysaccharides with membrane technology

ZHANG Yan, DU Xianfeng

(Key Laboratory of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Tea polysaccharides are a group of glycoprotein compounds that have biological activity and complicated structure. In this study, we combined microfiltration with ultrafiltration separation methods to purify the crude tea polysaccharides. The structure and activity of the purified polysaccharides were analyzed. Results showed that the optimal processing conditions of microfiltration for tea polysaccharide purification were: using the membrane with pore size of 0.05 μm , under 0.2 MPa operating pressure with 1% feed concentration of the crude solution, followed by the second purification through a 30 kD ultrafiltration membrane. The yield of polysaccharides increased from 50% to 81% using this purification method. In conclusion, this method is simple and the purified polysaccharides remain high activity; thus this method is suitable for industrial production.

Key words: tea polysaccharide; microfiltration; ultrafiltration

茶多糖是从茶叶中提取出来具有多种生物活性且结构复杂的复合物, 是茶叶中继茶多酚之后发现的又一重要生理活性物质。研究表明, 茶多糖具有防辐射、抗凝血、抗血栓、降血糖、降血脂以及增加冠状动脉血流量等作用^[1-2]。多糖活性与其纯度和化学结构有关, 而多糖提取与纯化是研究其活性的基础, 因此高效地提纯多糖是目前核心问题。多糖提取液的纯化方法主要有季铵盐沉淀法、盐析法、分布沉淀法、离子交换分级法及凝胶柱层析法等, 而上述多糖纯化方法均存在劳动强度大、效率低、产业化难度大、多糖生物学活性难以保证等不足^[3]。

膜分离作为一种新型的分离技术, 不仅具有收率高、能耗低的特点, 还极少破坏多糖的生物活性,

不存在传统的有机溶剂法的试剂残留问题, 特别适用于热敏性生物产品的分离, 便于产业化, 已广泛应用于多糖、酶等活性物质的分离纯化^[4-6]。目前应用较多的为微滤与超滤技术。

本试验以茶多糖为原料, 采用膜集成联用技术依次利用微滤 (MF), 超滤 (UF) 对粗制茶多糖溶液进行分离纯化, 并从膜孔径、压力、浓度、pH 值等影响因素进行研究, 为其工业化生产及应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

茶多糖粗品: 含量 50%, 商品 (购置于河南万

收稿日期: 2014-03-13

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20113418110001) 资助。

作者简介: 张 艳, 硕士研究生。E-mail: zy1110ok@163.com

* 通信作者: 杜先锋, 教授, 博士生导师。E-mail: dxf@ahau.edu.cn

嘉生物科技有限公司); 葡聚糖标准品(购置于 Sigma 公司); 蒽酮, 浓硫酸, 氢氧化钠等均为分析纯。

S-JM 型无机陶瓷膜过滤设备 (膜面积 0.2 m²), (合肥世杰膜工程有限责任公司提供); SJM-OM 型多功能膜分离设备, (合肥世杰膜工程有限责任公司); SCIENTZ-12SN 真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司); UV-2102C 型紫外可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司); Waters 600 高效液相色谱仪(配 2410 示差折光检测器和 Empower 工作站)。

1.2 试验方法

1.2.1 茶多糖的纯化 (1)无机陶瓷膜纯化茶多糖。采用单管路循环的陶瓷膜进行茶多糖的纯化, 测定各自的膜通量随时间的变化情况。常温条件下测定 0.05、0.1、0.2 和 0.5 μm 孔径的膜管道初始膜通量。

料液的配制: 以纯水为溶剂, 配制料液浓度为 1% 的料液 10 L。

膜孔径的选择: 在以料液浓度为 1%, 操作压力(即出口压力)为常压的条件下, 选择最佳膜通量的孔径。

操作压力的选择: 料液浓度仍为 1%, 在选出最佳膜孔径后通过改变出口压力观察膜通量。所选择的出口压力分别为 0.1、0.15、0.2 和 0.25 MPa。

料液浓度的选择: 在已得的最佳膜孔径和操作压力的条件下, 通过改变料液浓度, 选择得出最佳的料液浓度。所选择的料液浓度分别为 1%、2%、3% 和 4%。

料液 pH 值的选择: 在已得的最佳膜孔径, 操作压力以及浓度的条件下, 采用 0.1% 的 NaOH 和 HCL 调整溶液的 pH 值, 考察溶液 pH 值对膜通量的影响。

(2) PVDF 膜(聚偏二氟乙烯膜)超滤纯化茶多糖。超滤是利用膜的筛分性质, 以压差为传质推动力, 将高分子溶质与小分子溶质依据其相对分子质量的差别进行分离的方法^[6]。从现有的文献报道来看, 茶叶中具有生理活性的多糖分子量约在 4 万~10 万之间^[7-10], 因此分别选取平均截留分子量为 30、50、80 和 100 kD 的 PVDF 膜, 膜面积为 0.248 m²、操作压力为 0.35 MPa 的条件下, 以多糖含量为主要指标进行优化选择。

(3) 计算公式。工艺优化选择是以膜通量, 多糖的含量为参考标准^[11]。

$$J = \frac{V}{T \times A}$$

式中 J 表示单位时间的膜通量(L·m²·h⁻¹); A 表示膜

面积(m²); V 表示单位时间内滤过液体积(mL)。

1.2.2 茶多糖含量的测定 采用蒽酮-硫酸法测定总糖含量, 用半乳糖作标准曲线^[12]。

采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定还原糖含量, 用葡萄糖作标准曲线^[12]。

茶多糖含量=总糖含量-还原糖含量

1.2.3 膜的清洗及再生 由于陶瓷膜材料表面的多孔结构和丰富的表面活性点, 凡大分子物质与膜表面接触都会发生程度不同的吸附作用, 在过滤时浓差极化使膜面污染物达到凝胶浓度, 从而导致膜孔径的堵塞, 使得渗透通量衰减。为减少膜污染, 恢复膜通量, 降低膜应用的成本, 对膜进行化学清洗是必不可少的, 它能在一定程度上保持膜通量和延长膜的使用寿命^[13-14]。试验采用不同的化学试剂对膜进行清洗与再生。

关闭装置透过液阀门, 先用去离子水冲洗被污染的组件 15 min 后, 分别采用 70℃ 纯水、0.5% NaOH、1% NaClO 进行清洗, 测定并计算膜通量恢复率。

1.2.4 茶多糖的结构表征及生物活性研究 许多研究表明多糖的生物活性与其结构、分子量及纯度有着密切的关系。因此, 对多糖的化学组成及结构研究已经成为多糖研究的重点和热点, 这为开发多糖类新药和保健品提供科学依据^[15-17]。

将纯化后的茶多糖溶液真空冷冻干燥, 得到干燥的多糖冻干粉末, 对其进行结构分析与生物活性研究。

(1) 红外光谱分析。KBr 压片法: 称取 2 mg 干燥的茶多糖样品, 与 200 mg KBr 粉末在研钵中研磨均匀, 并在红外干燥箱中干燥以免 KBr 吸收空气中的湿气, 再经压片机压成薄片。在 4000~400 cm⁻¹ 波长范围内扫描^[12]。

(2) 茶多糖相对分子量分布的研究。多糖类复合物等生物大分子的理化性质、生物活性与其相对分子质量有很大的关系, 因此在多糖类复合物研究中, 相对分子质量是一个重要的指标^[21-22]。

本试验采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC), 仪器: Waters 600 高效液相色谱仪(配 2410 示差折光检测器和 Empower 工作站)。色谱柱: Ultrahydrogel™ Linear 300 mm×7.8 mmid×2, 流动相: 0.1 N 硝酸钠, 流速: 0.9 mL·min⁻¹ 柱温: 45℃。

样品制备: 称取样品 100 mg 于 25 mL 容量瓶中, 用流动相溶解, 定容。

分子量校正曲线所用葡聚糖标准品(均购置于 Sigma 公司): DextranT-500(M_w480000), DextranT-

150 (M_w 133800), DextranT-50(M_w 42000), DextranT- 20 (M_w 21400), Dextran T-5 (M_w 2500)。

(3) 茶多糖抑制 α -淀粉酶活性研究。淀粉酶是消化糖类物质的一类酶, α -淀粉酶抑制剂是属于糖(苷)水解酶抑制剂中的一种, 它能有效抑制肠道内唾液及胰淀粉酶的活性, 从而延缓或者阻碍食物中碳水化合物的水解, 减少糖分的摄取, 降低血糖和血脂的水平^[18]。本试验采用体外对 α -淀粉酶的抑制作用来评价纯化后的茶多糖的降血糖活性。

吸取可溶性淀粉溶液 20.0 mL 和 pH6.0 的磷酸缓冲液 5.0 mL 于试管中, 在 70℃ 恒温水浴中预热平衡 5 min, 然后加入到在 55℃ 预热 20 min 的混合溶液中(含 1.00 mL 多糖溶液和 1.00 mL 2% α -淀粉酶液)。摇匀, 在 0、5、10、15、20、25、30、35、40 和 45 min 时, 准确吸取反应液 1.00 mL, 加到预先盛有 0.5 mL 盐酸($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 5.00 mL 稀碘液的试管中, 摇匀。空白用 1.00 mL 缓冲液代替 1.00 mL 多糖溶液。660 nm 测定其吸光度^[19]。

2 结果与分析

2.1 无机陶瓷膜纯化操作条件的确定

2.1.1 膜孔径对膜通量的影响 在陶瓷膜纯化过程当中, 膜孔径是影响膜通量与截留率等分离性能的主要因素。在相同条件下, 膜孔径越小, 截留在膜表面的溶质则越多, 浓差极化越严重, 相应的通量也就越低。然而膜孔径越大, 通过的溶质越大, 则较大的孔径易被相近尺度的物质所堵塞, 污染物在膜表面吸附沉积的机会越多, 膜通量越低。在实际膜分离操作过程中, 膜通量的降低则主要是由于膜受到污染^[22-23]。所以对于大分子物质的混合物, 选择合适孔径的陶瓷膜对于物质分离纯化至关重要。

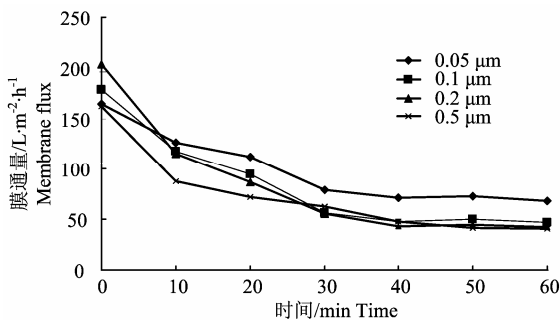


图 1 不同孔径膜的通量随时间变化趋势

Figure 1 Change trends of different aperture membrane fluxes with time

图 1 为所选的 4 个不同孔径的膜在 60 min 内膜通量随时间变化的趋势。从图 1 中可以看出: 运行

前 10 min, 膜通量迅速减小, 30 min 后膜通量趋于稳定。

表 1 是粗制多糖经过不同孔径的膜纯化后的多糖含量变化。由表 1 可以看出 4 种不同孔径的膜对茶多糖都有不同程度的截留, 结合蒽酮-硫酸法检测各孔径滤出液的纯度可知, 经过 0.05 μm 膜滤过的茶多糖含量略高, 且 0.05 μm 的膜通量均高于其他膜孔径。综合以上的结果, 考虑使用 0.05 μm 孔径的陶瓷膜。

表 1 不同膜孔径对多糖含量的影响

Table 1 Effects of different membrane pore sizes on the contents of tea polysaccharides

膜孔径/ μm Pore size of the membrane	多糖含量/% Polysaccharide content
0.05	71.59
0.1	62.74
0.2	65.98
0.5	67.33

2.1.2 不同操作压力对膜通量的影响 无机膜在操作过程中存在临界压力, 而临界压力对凝胶层的形成起着重要的作用。在临界压力之下, 膜通量与操作压力成正比关系, 而当压力超过临界压力时, 由于膜孔堵塞、浓差极化等因素的影响, 膜通量与压力则不一定存在线性关系。如图 2 所示, 当操作压力低于 0.2 MPa 时, 无机膜的膜通量随过滤出口压力的增加而增大, 当压力超过 0.2 MPa, 膜通量随压力的增加而减小。由于压力的增大伴随温度的升高, 能耗增大, 同时对膜材料有很大的磨损。因此, 本实验选用 0.2 MPa 的操作压力进行陶瓷膜过滤。

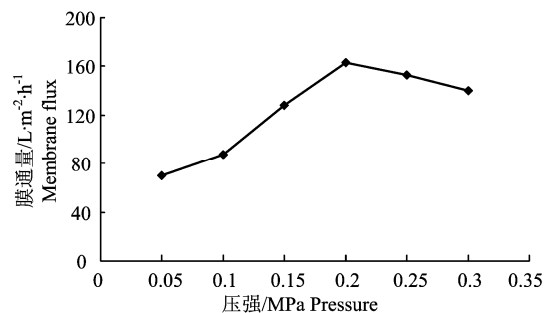


图 2 不同操作压力对膜通量的影响

Figure 2 Effects of different operating pressure on the membrane flux

2.1.3 不同料液浓度对膜通量的影响 如图 3 所示, 当料液浓度为 1% 时, 膜通量最大, 并且随着时间的推移, 膜通量相应地降低。当料液浓度超过 2% 时, 其膜通量在短时间内急剧下降。由此可知茶

多糖溶液在无机陶瓷膜过滤过程中料液的浓度不宜过大。原因在于粗制的茶多糖溶液中含有较多的大分子物质,随着浓度的增加,杂质易于在膜的表面发生一定的吸附作用,形成多层吸附,从而造成膜的污染以及膜通量的衰减。所以本实验选用 1% 浓度的茶多糖。

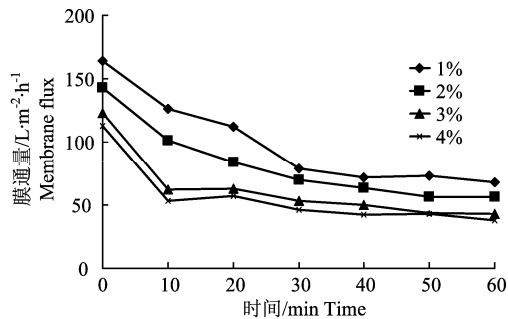


图 3 不同料液浓度对膜通量的影响

Figure 3 Effects of different feed concentrations on the membrane flux

2.1.4 不同 pH 对膜通量的影响 由图 4 可知,当 pH 值为 6.0 时,膜的通量为最低。随着 pH 的增大或减小,通量开始增大。这可能是因为茶多糖属于一种酸性蛋白糖,pH 值的改变会改变蛋白质的存在状态,蛋白质所带电荷的不同会影响蛋白凝胶层形成的快慢,在 pH 为 6.0 时,可能蛋白质所带电荷最少,此时凝胶层容易形成,膜污染严重,膜通量最低。随着 pH 的增加,膜通量逐渐加大,有更多的无机盐及小分子的色素等杂质被分离出来,多糖的纯度得到提高。因此,茶多糖的纯化时溶液的 pH 可选择为 8。

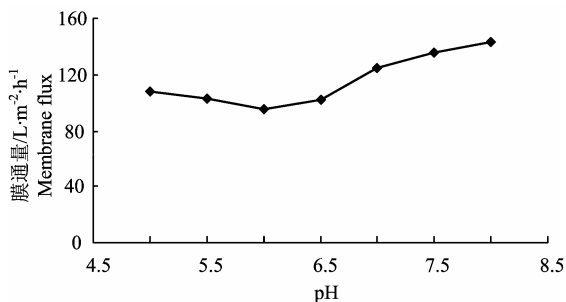


图 4 不同 pH 值对膜通量的影响

Figure 4 Effects of different pH values on the membrane flux

2.2 PVDF 膜(聚偏二氟乙烯膜)超滤纯化茶多糖

从表 2 可以看出,30 kD 的超滤膜截留液中多糖的含量最高,同时茶叶中具有生理活性的多糖分子量约在 4 万~10 万之间,综合考虑本实验选取平

均截留分子量 30 kD 的 PVDF 膜可以在有效截留多糖的同时起到去除小分子物质、除杂、浓缩的目的。

表 2 不同超滤膜(UF)孔径对多糖含量的影响

Table 2 Effect of different ultrafiltration membrane apertures on the contents of tea polysaccharides

平均截留分子量/kD Molecular weight cut-off	多糖含量/% Polysaccharide content
30	81.64
50	77.35
80	74.29
100	71.55

2.3 膜的清洗

无机陶瓷膜过滤性能的变化主要是浓差极化以及膜因受到过滤体系的污染所致,膜受到过滤体系污染是个不可逆的过程,所以必须加以清洗,从而使膜通量得到恢复。

相比有机膜,陶瓷膜因具有热稳定性,耐酸碱等特性,所以清洗更为容易,更适合化学清洗法。本实验采用化学清洗方法,对膜进行再生。清洗前后的膜通量变化是衡量化学清洗效果的一个重要指标,通常采用纯水透水率恢复系数(r)表示

$$r = \frac{J_0}{J_Q} \times 100\%$$

J_0 -清洗后膜的纯水通量; J_Q -膜的初始纯水通量。

表 3 为各化学试剂清洗陶瓷膜后膜通量的恢复情况,所有的膜通量均为纯水在室温,压力为 0.2 MPa 下测定。由表 3 可知,经过不同的清洗剂清洗后膜通量得到恢复,本实验采用 0.5% NaOH 清洗至中性,再用纯水清洗至溶液呈中性。

表 3 不同清洗剂对膜通量恢复的影响

Table 3 Effect of different cleaning agents on the membrane flux recovery

清洗剂 Cleaning agent	清洗时间/h Washing time	清洗后膜通量/ $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ Membrane flux after washing	恢复率/% Recovery rate
70℃ 纯水 Pure water	1	151.70	92.31
0.5% NaOH	1	155.80	94.80
1% NaClO	1	146.66	89.24

2.4 茶多糖结构分析

2.4.1 红外光谱 (FTIR) 法 由图 5 可知,在 3396 cm^{-1} 周围存在较宽的吸收峰,这为多糖分子间或分子内 O-H 伸缩振动的结果;在 2919 cm^{-1} 周围存在的峰为甲基 (-CH₃) 和次甲基 (-CH₂) 的 C-H 伸缩振动的信号;在 1756 cm^{-1} 左右出现较强的吸收峰,

为 C=O 的伸缩振动,表明多糖中含有—COOH,是一种酸性多糖; 1644 cm^{-1} 的吸收峰为羰基的 C=O 伸缩振动或形成了结晶水; 在 1407 cm^{-1} 处有一吸收峰,为—COOH 基团的 C-O 的伸缩振动; 1098 cm^{-1} 和 1033 cm^{-1} 的峰为吡喃糖苷的特征吸收峰,这两处的吸收为 C-O-H 或 C-O-C 结构中 C-O 键的弯曲振动; 887 cm^{-1} 是 β -D-吡喃糖苷的特征吸收峰。652 cm^{-1} 出现吸收峰,表明茶多糖结构中存在酰胺基。

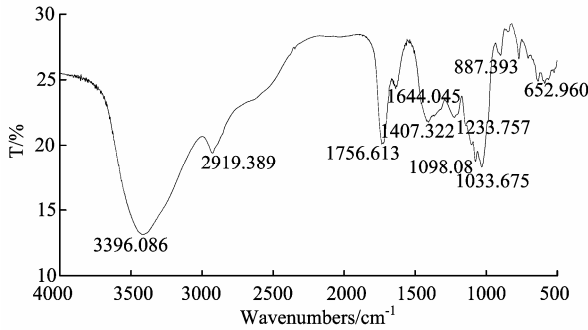


图 5 茶多糖红外光谱分析

Figure 5 Infrared spectral analysis of tea polysaccharide

2.4.2 茶多糖相对分子质量的分布 采用 HPGFC 对纯化后的茶多糖进行分子量分布检测。由图 6 可

知,经膜纯化后的茶多糖相对分子量分布主要是由 2 个主峰组成。由表 4 可知,第 1 个峰的相对分子质量值为 86994,第 2 个峰的相对分子质量值为 43173。

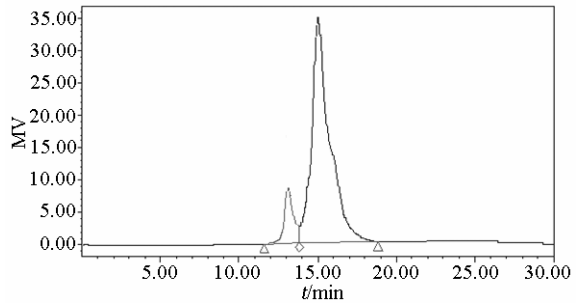


图 6 茶多糖 GFC 图谱

Figure 6 The GFC atlas of tea polysaccharides

2.5 茶多糖抑制 α -淀粉酶活性研究

由图 7 可知,纯化后的茶多糖对 α -淀粉酶具有较好的抑制作用。在 0 min 时,因样品与空白实验中的淀粉含量相同,则吸光度相同。随着时间的增加,由于 α -淀粉酶的作用,淀粉的含量减少,则吸光度逐渐降低。由于茶多糖对 α -淀粉酶的抑制作用,导致样品中淀粉减少的速度要低于空白实验。

表 4 茶多糖相对分子量分布

Table 4 The molecular weight distribution of tea polysaccharides

保留时间 Retention Time	数均分子量 Mn	重均分子量 Mw	MP	面积 Area	面积百分数/% Area percent
13.237	77302	86994	87298	567818	16.36
15.042	35163	43173	47554	2903220	83.64

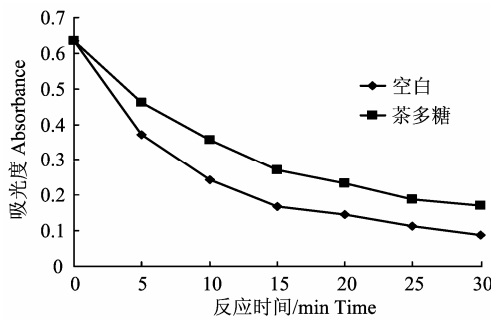


图 7 茶多糖对 α -淀粉酶抑制作用曲线

Figure 7 Curve of inhibition of α -amylase by tea polysaccharide

3 结论

试验结果表明:无机陶瓷膜微滤茶多糖的最佳工艺条件为:膜孔径 0.05 μm ,料液质量分数为 1%,操作压力为 0.2 MPa,料液 pH 值为 8。再经 30 kD 超滤膜纯化后,多糖含量有大幅度的提高,从原来的 50%提高到 81%。

膜过滤完成后采用 0.5%NaOH 溶液清洗至中

性,再用纯水清洗至溶液至中性,可使膜通量得到较好的恢复。

由红外光谱图可知,茶多糖是一种含有吡喃环和糖醛酸的蛋白多糖复合物。

高效液相凝胶过滤色谱法表征显示,经纯化后的茶多糖由 2 个主要分子量分布峰组成,峰值的相对分子量分布为 86994 与 43173。

经抑制 α -淀粉酶活性实验发现:经过膜分离纯化后的茶多糖对 α -淀粉酶仍具有一定的抑制作用。证明采用膜分离纯化方法适用于热敏性生物产品的分离,保存茶多糖的生物活性。

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, 23(4): 358-364.
 [2] Chen H X, Zhang M, Xie B J. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea [J]. Food Chemistry, 2005(90): 17-21.

- [3] 谢明勇, 聂少平. 茶叶多糖的研究进展[J]. 食品生物技术学报, 2006, 25(2): 107-119.
- [4] 崔志芳, 李春露, 韩秋霞. 茶多糖提取分离工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4): 79-81.
- [5] 张庆雷, 周宏兵. 膜分离技术及其在多糖分离纯化研究中的应用[J]. 食品与药品, 2009, 11(5): 60-62.
- [6] 孙艳娟, 朱跃进. 膜分离技术在茶叶中的应用现状及展望[J]. 茶叶科学, 2010, 30(S): 516-520.
- [7] Mulder M. 膜技术基本原理[M]. 2 版. 李琳译. 北京: 清华大学出版社, 1999.
- [8] 寇小红, 江和源, 崔宏春, 等. 膜过滤绿茶多糖的系统分级纯化及免疫活性分析[J]. 茶叶科学, 2008, 28(3): 172-180.
- [9] 王元凤. 茶多糖分离纯化结构及构效关系研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [10] 孙玉军, 陈彦. 茶叶多糖的分离纯化及其结构分析概述[J]. 中国茶叶加工, 2004(4): 38-40.
- [11] 陈海霞, 谢笔钧. 茶多糖不同提取工艺的比较研究[J]. 食品工业科技, 2001, 22 (2): 18-19.
- [12] 张惟杰. 糖复合生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 12-13.
- [13] 田岳林, 袁栋栋, 李汝琪. 陶瓷膜污染过程分析与膜清洗方法优化[J]. 环境工程学报, 2013, 7(1): 253-257.
- [14] 韩永萍, 林强, 何绪文. 无机陶瓷微滤膜处理虫草菌丝体粗多糖溶液的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 90-93.
- [15] 潘见, 陈彦, 方伟, 等. 具有抗氧化活性茶多糖 TPS-II 的分离纯化及其性质研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 25-28.
- [16] 全吉淑, 尹学哲, 吉川和志. 茶多糖降血糖作用机制[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(3): 295-296.
- [17] 丁保金, 金丽琴, 吕建新. 多糖生物活性研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2004, 3(8): 561-564.
- [18] 黄绍华, 胡晓波, 王震宙. 山药多糖对淀粉酶活力的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2009(6): 94-95.
- [19] 周燕平, 徐德平. 山药中抑制 α -淀粉酶活性成分的分离与结构解析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 52-55.
- [20] 顾亚萍, 钱和. 茶叶多糖纯度鉴定及结构分析的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(7): 166-171.
- [21] Chen H X, Qu Z H, Fu L L, et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of 3 polysaccharides from green tea, oolong tea, and black tea [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(6): 469-474.
- [22] 王湛. 膜分离技术基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [23] Chen J C, Li Q L, Elimelech M. In situ monitoring techniques for concentration polarization and fouling phenomena in membrane filtration [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2004, 107: 83.