

真菌多糖提纯、组分分析及结构初步鉴定

赵玉萍, 纪丽莲, 朱晓庆
(淮阴工学院生化系, 江苏 淮阴 223001)

摘要: 研究了采用 Sephadex G75 分离纯化真菌多糖, 获得两种胞外多糖, 采用薄层层析法, 分析这两种多糖组分均可能有木糖、甘露糖、葡萄糖和鼠李糖, 采用红外光谱对此两种多糖进行了初步的结构鉴定。

关键词: 真菌; 多糖; 组分分析; 结构鉴定

Purification, Preliminary Component Analysis and Structure Identification of Fungi Polysaccharides

ZHAO Yu-ping, JI Li-lian, ZHU Xiao-qing
(Department of Bioengineering and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology,
Huaiyin 223001, China)

Abstract: The polysaccharides of fungi were studied in this paper. The two kinds of EPS were obtained by Sephadex G75. Then the components of these EPS were considered by thin-layer chromatography, and they were xylose, mannose, glucose and rhamnose. Finally, the structures of polysaccharides were analyzed preliminarily by infra-red spectrum.

Key words: fungi; polysaccharide; component analysis; structure identification

中图分类号 TS201

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)09-0127-03

由于真菌多糖具有多方面的生物活性, 真菌多糖产品的研制已成为一个热点。目前许多食用真菌产品已投放市场, 以真菌多糖作为功能添加剂的保健食品也相继出现, 并且多种真菌多糖已被制成药品。但是, 对于未开发的真菌资源来说, 还需要进一步加强研究和开发的深度, 进一步了解真菌多糖的化学结构、组成成分、

生物活性和构效关系, 使真菌多糖在食品工业、发酵工业、医疗保健等领域得到更广泛的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 编号为 SHX03008, 本院生物工程实验室筛

收稿日期: 2005-07-01

作者简介: 赵玉萍(1977-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为生物技术、食品生物技术。

尔滨商业大学学报, 2001, (6): 36-38.

- [4] Naotoshi Matsudomi. Polymerization of deamidated peptide fragments obtained with the mild acid hydrolysis of ovalbumin [J]. Agric Food Chem, 1985, 33: 738-745.
- [5] Naotoshi Matsudomi. Conformational changes, functional properties of acid-modified soy proteins [J]. Agric Biol Chem, 1985, 49(5): 1251-1258.
- [6] Mita T, Matsumoto H. Flow properties of aqueous gluten methyl ester dispersions [J]. Cereal Chem, 1981, (58): 57-62.
- [7] Franzen K L, Kinsella J E. Functional properties of succinylated and cetylate soy protein [J]. Agric Food Chem, 1976, 24(4): 788-793.
- [8] Frank A W. Non-enzymic methods for the phosphorylation of proteins [J]. Phosphorus and Sulfur, 1978, (29): 297-302.
- [9] 宁正祥. 食品成分分析手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 119-124.
- [10] Franzen Kay L, Kinsella John E. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein [J]. J Agric Food Chem, 1976, 24(4): 788-795.
- [11] 华欲飞, 顾玉兴. 功能性大豆浓缩蛋白的性能及应用研究 [J]. 中国油脂, 1997, 22(1): 22-24.
- [12] 刘大川, 张立伟. 富硒菜籽分离蛋白的制备及功能特性的研究 [J]. 中国油脂, 1994, 19(5): 14-18.
- [13] 李新华. 粮油加工工艺学 [M]. 成都科技大学出版社, 1996. 170-179.

选获得。

1.2 主要仪器和设备

WS70-1 型红外线快速干燥器; YP-2 压片机; Nicolet 5700 FT-IR; UV-2401PC 紫外分光光度计; Spectrumlab 22PC 分光光度计; BSZ-160 自动分部收集器。

1.3 培养基及配制方法

(1) 基础培养基: PDA 培养基^[1]

(2) 曲霉 SHX03008 种子培养基: PDA 液体培养基

(3) 曲霉 SHX03008 发酵培养基: 葡萄糖 4%, 酵母膏 4%, 磷酸二氢钾 0.1%, 七水硫酸镁 0.025%

1.4 糖含量测定

多糖含量 = 总糖量 - 还原糖量

总糖量测定方法: 苯酚硫酸法^[2,3];

还原糖测定方法: 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)测还原糖。

1.5 胞外粗多糖的提取条件优化

乙醇沉淀法^[4]。

1.6 多糖去蛋白

seavage 法^[4,5]。

去蛋白后的多糖制成水溶液, 200~400nm 范围紫外扫描鉴别去蛋白效果。

1.7 粗多糖的分离纯化

凝胶柱层析法^[6~8]: 本课题所用的凝胶为葡聚糖凝胶 Sephadex G-75, 湿态粒径 92~277 μ m, 适用 pH2~10, 膨胀系数 12~15ml/g, 溶胀时间 20℃, 24h。

1.8 多糖组分分析

采用薄层层析法来分析多糖组分^[9~13]。

展层剂: 正丁醇:乙酸乙酯:异丙醇:醋酸:水:吡啶 = 35:100:60:35:30:30

显色液: 苯胺 8ml, 二苯胺 8g 和 85% 磷酸 140ml 混合, 水浴微热至溶解。

样品的处理: 多糖样品 3mg, 加 1mol/L 硫酸 6ml, 置 100℃ 水解 8h, 水解液用 BaCO₃ 中和至中性, 离心取上清液低温浓缩即为点样液。将标准单糖: 木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖和鼠李糖各自配成 0.5% 的乙醇溶液, 作为标准糖点样液。

1.9 多糖的红外光谱分析

采用压片法进行制样, 以 KBr 作为分散介质, 用红外光谱扫描, 对多糖的构型初步分析^[14]。

2 结果与讨论

2.1 胞外粗多糖提取条件优化结果

在多糖浓缩液中加入不同体积的乙醇, 沉淀出的粗多糖量不同, 见图 1。

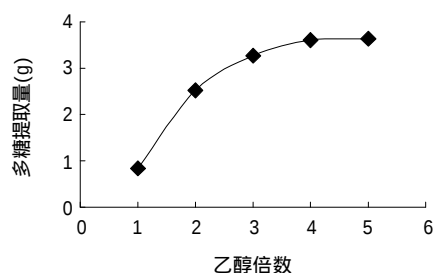


图1 乙醇量对胞外粗多糖沉淀的影响

Fig.1 The effect of quantity of alcohol on sedimentation of crude extracellular polysaccharide(EPS)

由图 1 可知, 加入 1 倍体积乙醇时, 只有少量粗多糖析出。随着乙醇量的增加, 粗多糖析出量也在增加。当乙醇量增加到 4 倍时, 粗多糖已基本沉淀完全。故在实验中选择 95% 乙醇与多糖浓缩液体积比为 4:1 时的乙醇量为最佳乙醇量。

2.2 胞外粗多糖去蛋白后的紫外扫描分析

去蛋白后的胞内外粗多糖水溶液用紫外分析仪 200~400nm 紫外扫描, 图谱如下:

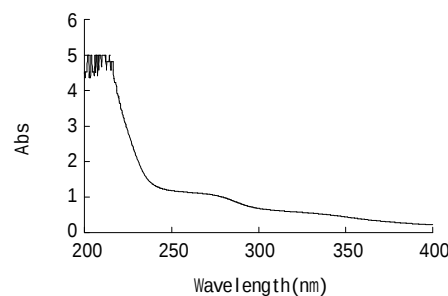


图2 胞外多糖紫外扫描图

Fig.2 UV-light scanning of EPS

由图 2 可见, 多糖液在 260nm 和 280nm 处均无特征吸收, 表明经脱蛋白后, 胞外多糖粗品中核酸(260nm)和蛋白质(280nm)已基本不存在, 用苯酚硫酸法测得胞外粗多糖总糖含量分别为 80.2%。seavage 法去蛋白可行。

2.3 多糖分离纯化结果

2.3.1 凝胶柱层析结果

胞外多糖凝胶层析洗脱曲线见图 3, 出样率为 97.2%。

凝胶层析柱能基本实现多糖的分离。由胞外多糖出峰情况可知, 胞外可能含有两种多糖。先出峰的为胞外多糖(EPS) I, 后出峰的为 EPS II。浓缩烘干后, EPS I 呈乳白色, EPS II 呈浅黄褐色, 两种多糖的总糖含量均在 90% 以上。

2.3.2 薄层层析结果

喷洒了显色剂的薄板在烘箱烘干后即可检查其展层效果, 效果较好, 如图 4 所示。从下往上样品分别为木糖、胞外多糖 I、甘露糖、胞外多糖 II、葡萄糖、

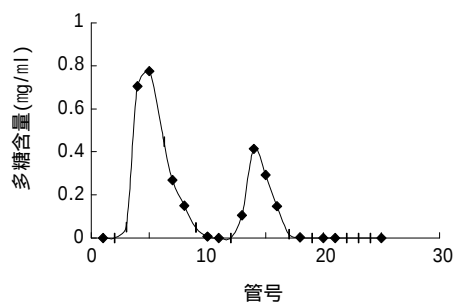


图3 胞外多糖凝胶层析洗脱曲线

Fig.3 The elution curve of EPS by Gel chromatography



图4 薄层层析图

Fig.4 The picture of thin-layer chromatography

鼠李糖和果糖。

由图4可见,各单糖的 R_f 值为鼠李糖>木糖>甘露糖>果糖>葡萄糖。两种胞外多糖组分相同,均可能有木糖、甘露糖、葡萄糖和鼠李糖。

2.4 红外光谱扫描结果

2.4.1 胞外多糖 I 红外光谱图

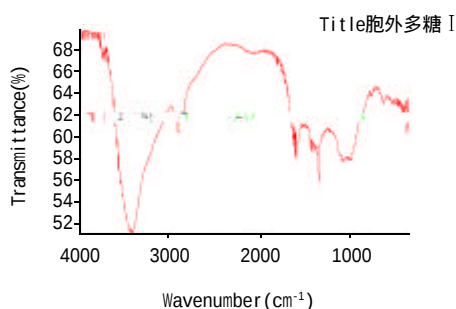


图5 胞外多糖 I 红外光谱图

Fig.5 The infra-red spectrum of EPS I

从图5中可以观察到 $4000\sim 1600\text{cm}^{-1}$ 特征谱带中, $3450\sim 3400\text{cm}^{-1}$ 处是-OH伸缩振动峰; $2900\sim 2850\text{cm}^{-1}$ 处为C-H伸缩振动; $1700\sim 1600\text{cm}^{-1}$ 处是C=O振动推知该种多糖含有羰基。多糖中可能含有-COOH,是一种酸性多糖。 $1600\sim 1000\text{cm}^{-1}$ 相关谱带区中,在 $1400\sim 1340\text{cm}^{-1}$ C-H弯曲振动;在 $1100\sim 1000\text{cm}^{-1}$ 为C-O伸缩振动。 1000cm^{-1} 以下的指纹区, 860cm^{-1} 或 810cm^{-1} 处有较弱小吸收峰,表明多糖中可能存在甘露糖残基^[19]。

2.4.2 胞外多糖 II 红外光谱图

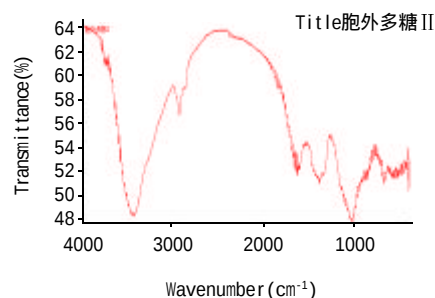


图6 胞外多糖 II 红外光谱图

Fig.6 The infra-red spectrum of EPS II

由图可知,胞外多糖 I 和 II 的组成成分虽然相同,但在结构上它们却存在着差异。

3 结 论

实验室分离筛选真菌菌株 SHX008,经 Sephadex G-75 分离后,获得两种胞外多糖纯品,采用薄层层析法分析其组分,发现两者均可能含有木糖、甘露糖、葡萄糖和鼠李糖,采用红外光谱法,初步分析多糖的结构,发现两者的结构有差异。

参考文献:

- [1] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [2] Harald J, Ruijsenaars, Francessa Stinge, et al. Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides[J]. Current Microbiology, 2000, 40: 194-199.
- [3] 张双凤,林香娟,于村.苯酚-硫酸法测定胖大海凉茶中多糖的研究[J].河南预防医学杂志,2000,(3):144-145.
- [4] 欧瑜,刘志礼.盐生隐杆藻多糖的提纯及含量分析[J].海洋湖沼通报,1996,(3):33-38.
- [5] 刘成梅,游海.天然产物有效成分的分离与应用[M].化学工业出版社,2003.
- [6] 周先碗,胡晓倩.生物化学仪器分析与实验技术[M].化学工业出版社,2003.
- [7] 李建武,余瑞元,袁明秀,等.生物化学实验原理和方法[M].北京大学出版,1994.
- [8] 郭勇.现代生化技术[M].华南理工大学出版社,1996.
- [9] 张哲,张钧.海带中的生理活性多糖[J].食品科技,1999,(3):52-53.
- [10] 黄为群,吴其威,黄瑞珊,等.灵芝发酵产物中多糖组分的分离与性质研究[J].上海交通大学学报,1994,(2):83-89.
- [11] 张欣,吕作舟.香菇菌盖多糖的提取纯化及其理化性质的研究[J].华东农业大学学报,1998,(6):537-541.
- [12] 邓岚,马耀辉,苏任,等.虫草菌多糖的部分理化性质研究[J].云南大学学报,2003,(2):35-37.
- [13] 高居易,卓建亭,黄一红,等.紫孢侧耳多糖的提取纯化及性质研究[J].福建师范大学学报,1999,(5):83-87.
- [14] 范康年.谱学导论[M].北京:高等教育出版社,2001.