

贺兰山紫蘑菇多糖的分离与纯化

杨振华, 张靠稳, 马爱瑛

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:以贺兰山紫蘑菇为材料,采用纤维素酶法提取多糖,并经离子交换纤维素柱层析和葡聚糖凝胶柱层析对其组分进行分离和纯化,以明确贺兰山紫蘑菇的多糖组份和纯化方法。结果表明:贺兰山紫蘑菇多糖含有I和II 2个组分,纯化后二组分均不含有核酸和蛋白质,此方法适宜该蘑菇多糖的分离纯化。

关键词:紫红丝膜菌;多糖;层析;纯化

中图分类号:S 646.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)04-0187-03

贺兰山紫蘑菇(*Cortinarius rufo-olivaceus*)为外生菌根菌,与青海云杉树的根系有着密切的共生关系^[1]。它是生长在贺兰山自然保护区森林中的一种肉厚味美、口感纯正、营养丰富的野生食用菌。食用菌中所含的营养成分—食用菌多糖,长期食用能够提高人体免疫力,起到防癌抗癌^[2]、抗衰老^[3]、抗炎^[4-5]等作用,是一种纯天然的营养保健品,受到越来越多现代人的青睐。然而有关贺兰山紫蘑菇多糖方面的研究并不多,现以贺兰山紫蘑菇为材料,采用纤维素酶法提取多糖,并经离子交换纤维素柱层析和葡聚糖凝胶柱层析对其组分进行分离和纯化,目的在于明确该菌的多糖组分和纯化方法,为进一步开发利用当地特色资源—贺兰山紫蘑菇奠定基础。

第一作者简介:杨振华(1983-),女,在读硕士,研究方向为种群与植物生理生态学研究。

通讯作者:张靠稳(1962-),男,教授,硕士生导师,现主要从事微生物资源开发利用的教学与研究工作。E-mail:zkw620821@yahoo.com.cn。

基金项目:北方民族大学科研资助项目(2009Y040)。

收稿日期:2010-12-21

1 材料与方法

1.1 试验材料及仪器

贺兰山紫蘑菇子实体,经形态鉴定后,60℃烘干、粉碎,过60目筛备用。

葡萄糖、98%浓硫酸、NaOH、HCl、苯酚、甘油、无水乙醇、30%过氧化氢、氯化钠、氯仿、正丁醇均为国产分析纯;纤维素酶(和氏璧生物技术有限公司),DEAE-52 填料(英国沃特曼公司),Sephadex G-100(上海化学试剂厂),D36 透析袋(截流范围8 000~14 400)。

JA2003N 电子精密天平(常熟双杰分析仪器厂),DELTA 320 酸度计(梅特勒-托利多(上海)有限公司),HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),SIGMA 3K-30 高速离心机(德国 SIGMA 公司),UV754N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),H2Q-C 空气浴振荡器(哈尔滨市东明医疗仪器厂),磁力加热搅拌器(常州国华电器有限公司),SBS-100 数控记滴部分收集器、HL-1 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂),DU-800 核酸蛋白检测仪(BECKMAN COULTER),RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 粗多糖的提取 采用纤维素酶法提取贺兰山紫蘑菇粗多糖。称取贺兰山紫蘑菇子实体烘干后取粉末2.0 g,在纤维素酶浓度0.75%,固液比1:50,pH 5.0,

Overview of Morphological Development about *Auricularia auricula*

ZHANG Peng, YAO Fang-jie, WANG Li-jun, ZHANG You-min

(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: This article summarized the research of morphology on process what is on the ontogeny of *Auricularia auricula*. Some existed problems were proposed. Taking a long view for the morphological development.

Key words: *Auricularia auricula*; morphological development; life cycle

温度 50℃ 的条件下酶解 100 min, 90℃ 灭活 1 h。然后离心、浓缩混合物, 加乙醇沉淀粗多糖, 烘干后得到粗多糖粉末。

1.2.2 粗多糖的分离纯化 脱蛋白: 将粗多糖水溶, 采用 Sevage 法^[6], 按多糖水溶液的 1/4 体积加入氯仿/正丁醇(4:1)混合液, 摇床摇动 30 min, 静置, 取上清, 除去中间变性蛋白及下层氯仿, 多次重复上述操作, 直至中间层无变性蛋白。脱色透析: 采用 H₂O₂ 法^[7], 用氨水调节多糖溶液 pH 至 8.0, 40℃ 滴加 5% H₂O₂, 保温 3 h, 以 D36 透析袋(分子量 8 000~14 400)于室温下透析, 得贺兰山紫蘑菇多糖。多糖的分级: (1) DEAE-52 纤维素柱层析: DEAE-52 填料用蒸馏水浸泡, 除去细小颗粒。抽干改用 0.5 mol/L NaOH、0.5 mol/L HCl 溶液处理(每次 30 min), 期间用蒸馏水分别洗至中性, 装柱。装柱后用蒸馏水平衡, 贺兰山紫蘑菇多糖上样, 过柱。分别用水、0.1 mol/L NaCl、0.5 mol/L NaCl 洗脱, 流速 0.5 mL/min, 用收集器收集, 各管以苯酚-硫酸法检测多糖含量。依据测定结果, 分段收集、合并各多糖峰部分, 然后透析。(2) Sephadex G-100 凝胶柱层析: 将 Sephadex G-100 填料加蒸馏水浸泡过夜, 100℃ 煮沸 4 h, 脱气后装柱, 用 0.05 mol/L NaCl 平衡。将透析后的各多糖组分分别进一步纯化, 用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 流速 0.3 mL/min, 各管以苯酚-硫酸法检测多糖含量。收集合并多糖峰部分, 然后透析。

1.2.3 多糖的纯度鉴定 由于蛋白质及核酸分别在波长 280 nm 和 260 nm 处有最大吸收峰, 因此将透析浓缩后的多糖组分分别于波长 210~400 nm 处进行紫外扫描, 记录紫外光谱, 检测样品中是否含有蛋白质及核酸。

2 结果与分析

2.1 贺兰山紫蘑菇粗多糖的分离纯化

2.1.1 DEAE-52 纤维素柱层析分离 多糖分子一般为中性或酸性带负电荷, 因此采用阴离子交换柱层析(DEAE-52)作为分离介质, 对贺兰山紫蘑菇多糖进行层析, 结果见图 1。由图 1 可看出, 经 DEAE-52 纤维素柱层析后, 得到 2 个相对明显的组分 I 和 II, 组分 I 为蒸馏水洗脱组分, 组分 II 为 0.1 mol/L NaCl 洗脱组分, 说明 DEAE-52 纤维素柱层析能达到较好的分离效果。

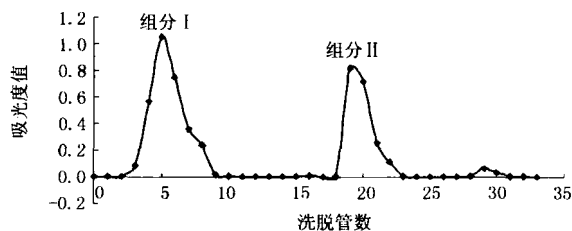


图 1 贺兰山紫蘑菇多糖的 DEAE-52 柱层析图

2.1.2 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化 经 DEAE-52 纤维素柱层析分离得到的贺兰山紫蘑菇多糖组分 I 和 II, 再以 Sephadex G-100 凝胶柱层析进行纯化, 结果见图 2~3。由组分 I 和组分 II 的洗脱曲线(图 2、3)可知, 二组分的洗脱峰均为单一峰, 说明二组分均为单一组分。因此 Sephadex G-100 凝胶柱层析能够达到较好的纯化效果。

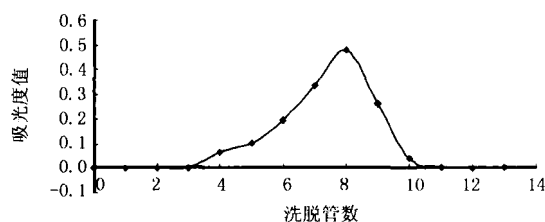


图 2 组分 I 的 Sephadex G-100 柱层析图

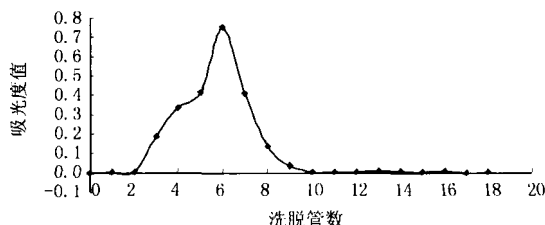


图 3 组分 II 的 Sephadex G-100 柱层析图

2.2 贺兰山紫蘑菇多糖的纯度鉴定

多糖组分于波长 210~400 nm 处进行紫外扫描, 结果见图 4~5。

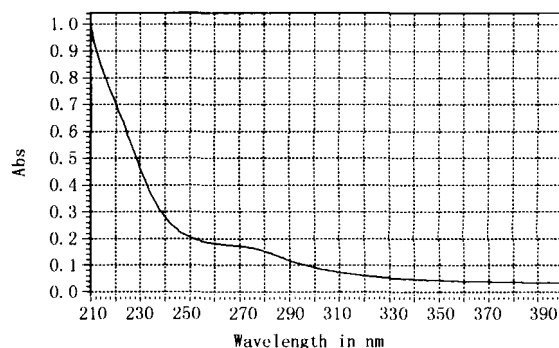


图 4 组分 I 的紫外吸收光谱

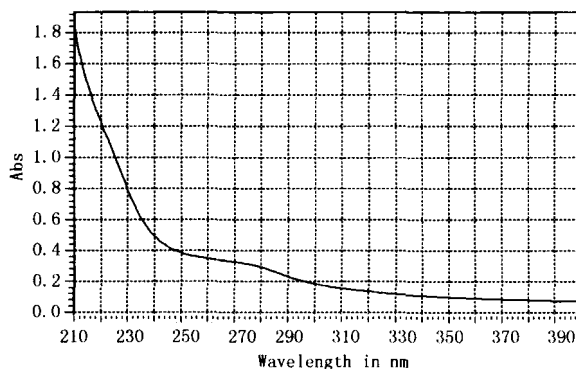


图 5 组分 II 的紫外吸收光谱

由组分I和组分II紫外吸收光谱(图 4、5)可知,在波长 260 nm 和 280 nm 处,组分I和组分II均无明显吸收峰,说明贺兰山紫蘑菇多糖经分离纯化所得的 2 个组分不含有核酸和蛋白质。

3 结论与讨论

用纤维素酶法提取的贺兰山紫蘑菇(*C. rufo-olivaceus*)多糖,经 Sevage 法脱蛋白, H_2O_2 脱色,然后采用 DEAE-52 纤维素柱层析和 Sephadex G-100 凝胶柱层析对多糖进行分离纯化,得出贺兰山紫蘑菇(*C. rufo-olivaceus*)多糖主要含有 2 个组分I和II,经纯化后的这二组分均不含核酸和蛋白质。说明采用 DEAE-52 纤维素柱层析和 Sephadex G-100 凝胶柱层析分离纯化该蘑菇多糖效果良好。

多糖纯化过程中蛋白质的脱除是目前分离纯化多糖的难点。常用脱蛋白方法有 TCA 法和 Sevage 法,但由于 TCA 法不适宜含糖量较少、蛋白多的真菌多糖的提取,且该法酸性较高,处理的时间长会使糖发生降解,为了避免因酸、时间造成糖的降解,因此该试验采用 Sevage 法脱蛋白。

脱色也是多糖纯化过程中面临的一个难题。该试验提取出来的粗多糖呈橙黄色,颜色较深,含色素较多,这类色素大多呈负性离子,如采用活性炭脱色,活性炭会吸附多糖而造成多糖的损失。而 H_2O_2 在水溶液中可

电离出过氧化氢根离子 HO_2^- 攻击色素,在碱性介质中电离度增大,脱色作用增强,对于负性离子有很好的脱色作用^[8]。因此该试验采用 H_2O_2 脱色,但要注意脱色时温度不应过高,否则会破坏多糖结构。脱色处理后再经透析,多糖溶液的颜色变浅,呈浅黄色。

从总多糖中分离单一多糖组分时,由于各种色谱介质价格昂贵,而且样品制备量极小,因此仅限于实验室研究,规模化提取纯化该蘑菇多糖的方法还需继续探索;对于单一多糖组分生理活性的研究也需加强。

参考文献

- [1] 巴图. 紫色丝膜菌种分离与栽培研究[J]. 中国食用菌, 1999, 18(5): 8-9.
- [2] 陈爱葵, 易广, 李爱群. 食用菌在提高人体免疫力方面的功效[J]. 中国食用菌, 2003, 23(3): 7-9.
- [3] 侯安继, 陈腾云, 彭施萍, 等. 茯苓多糖抗衰老作用研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(3): 10-11.
- [4] 赵容杰, 赵正林, 王丹, 等. 姬松茸多糖的抗炎作用[J]. 延边大学医学学报, 2004, 27(1): 19-22.
- [5] 欧阳学农, 余宗阳, 王文武, 等. 香菇多糖抗炎作用[J]. 福州总医院学报, 2006(3): 172-173.
- [6] 齐慧玲, 魏绍云, 王继伦, 等. Sevage 法去除多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工, 2000(3): 20-21.
- [7] 韩春然, 唐娟, 马永强. 黑木耳多糖的酶法提取、纯化及性质研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 53-55.
- [8] 付学鹏, 杨晓杰. 植物多糖脱色技术的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 166-169.

Isolation and Purification of Polysaccharides from *Cortinarius rufo-olivaceus*

YANG Zhen-hua, ZHANG Kao-wen, MA Ai-ying

(School of Life Sciences and Technology, North University for Ethnicity, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking *Cortinarius rufo-olivaceus* as the test material, using method of cellulase enzyme extracted polysaccharides, and cellulose by ion exchange chromatography and sephadex column chromatography separation and purification of its components, in order to determine the *Cortinarius rufo-olivaceus* polysaccharide components and purification methods. The results showed that there were two main components in polysaccharide, and the two components do not contain nuclear acid and protein after purification, the method was suitable for separation and purification of polysaccharides from *Cortinarius rufo-olivaceus*.

Key words: *Cortinarius rufo-olivaceus*; polysaccharide; chromatography; purification