

# 茯苓菌丝体胞外多糖的脱蛋白方法研究

韩 勇, 王 仙 芝, 张 虹

(山西药科职业学院, 山西 太原 030031)

**摘 要:**以蛋白质脱除率和多糖损失率为考察指标,研究比较了 Sevag 法、三氯乙酸法、酶法、酶-Sevag 法对茯苓菌丝体胞外多糖脱蛋白效果的影响。结果表明:酶-Sevag 法是最佳的脱除茯苓菌丝体胞外多糖中蛋白质的方法,酶用量 1.5%,温度 50℃,pH 6.5,脱蛋白 2 h,Sevag 法脱蛋白 3 次,蛋白质脱除率为 87.43%,多糖损失率为 10.97%。

**关键词:**茯苓菌丝体;胞外多糖;脱蛋白;酶-Sevag 法

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0151-03

茯苓(*Wolfiporia cocos*)为多孔菌科茯苓属常见中药,具有渗湿、利尿、健脾等功效。茯苓多糖因具有调节机体免疫、抑制肿瘤生长等功能,已成为近年来研究较多的真菌多糖。目前传统的茯苓栽培法仍是茯苓生产的主要方法,但该方法受地域、气候等条件限制,存在生产周期长、产量不高等特点。而用液体深层发酵培养生产茯苓可不受地域、气候、病虫害等条件制约,易于实现工业化生产,具有广阔的开发应用前景<sup>[1-2]</sup>。目前,国内外关于茯苓菌丝体胞外多糖的研究报道较少<sup>[3]</sup>,而对其胞外多糖脱蛋白方法的比较研究在国内也尚鲜见报道。现通过液体深层发酵培养茯苓,获得茯苓发酵液,经检测,发酵液中含有大量茯苓菌丝体胞外多糖。

该试验初步研究了茯苓菌丝体胞外多糖的脱蛋白方法,旨在选出一种适合茯苓菌丝体胞外多糖脱蛋白的最佳工艺,以期为该多糖的进一步研究利用提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

通过 10 L 发酵罐发酵得到的茯苓发酵液,经 6 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。上清液用 3 倍体积无水乙醇沉淀,收集沉淀,沉淀物经无水乙醇洗涤 2 次,经真空干燥,得茯苓菌丝体胞外粗多糖。仪器及试剂:10 L 自动控制发酵罐(镇江东方生物工程设备技术公司);752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TGL20M-II 高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);日立 U-2010 紫外分光光度计;木瓜蛋白酶(南宁庞博生物工程有限公司)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 Sevag 法脱蛋白** 将茯苓菌丝体胞外粗多糖制成 1.0% 的多糖水溶液,用 Sevag 法除去多糖水溶液中的蛋白质。Sevag 液由氯仿和正丁醇以 4:1 的体积比配制而成。将多糖水溶液和 Sevag 液以 4:1 的体积比混合,充分振荡 30 min,然后 6 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,测定上清液的多糖和蛋白质含量。上清液重复以上脱蛋白步骤,直至离心无沉淀产生。

**1.2.2 三氯乙酸法脱蛋白** 将茯苓菌丝体胞外粗多糖制成 1.0% 的多糖水溶液,分成 5 份等体积溶液。将多糖溶液中加入三氯乙酸,至溶液中三氯乙酸的浓度分别为 2.5%、5.0%、10.0%、15.0%、20.0%,均匀振摇 30 min,静置过夜,然后经 6 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,测定上清液的多糖和蛋白质含量。

**1.2.3 酶法脱蛋白** 将茯苓菌丝体胞外粗多糖制成 1.0% 的多糖水溶液,分成 5 份等体积溶液。将多糖溶液中加入木瓜蛋白酶,至溶液中木瓜蛋白酶的浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%,在 50℃、pH 6.5 的反应体系中水解 2 h,沸水浴灭酶 5 min,冷却至室温,然后 6 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,测定上清液的多糖和蛋白质含量。

**1.2.4 酶-Sevag 法脱蛋白** 将茯苓菌丝体胞外粗多糖制成 1.0% 的多糖水溶液,加入木瓜蛋白酶,在 50℃、pH 6.5 的反应体系中水解 2 h,沸水浴灭酶 5 min,冷却至室温,然后 6 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,所得上清液再用 Sevag 法除蛋白。

### 1.3 项目测定

采用苯酚-硫酸法测定多糖含量<sup>[4]</sup>;采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量<sup>[5]</sup>。蛋白质脱除率=(处理前蛋白含量-处理后蛋白含量)/处理前蛋白含量×100%。多糖损失率=(处理前多糖含量-处理后多糖含量)/处理前

**第一作者简介:**韩勇(1978-),男,硕士,助教,现主要从事微生物发酵工程的教学与研究工作。E-mail:swxyhy@163.com。

**收稿日期:**2012-12-11

多糖含量 $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 Sevag 法脱蛋白效果

由图 1 可知,随着脱蛋白次数的增加,蛋白质脱除率明显上升,但多糖损失率也不断增加。经过 3 次重复,蛋白质脱除率达到 61.22%;经过 9 次重复,溶液离心无明显的沉淀产生,此时,蛋白质脱除率达到 80.61%,但多糖损失率也高达 41.59%。由此可见,Sevag 法能有效的脱除茯苓菌丝体胞外多糖中的蛋白质,但多糖损失率较高。

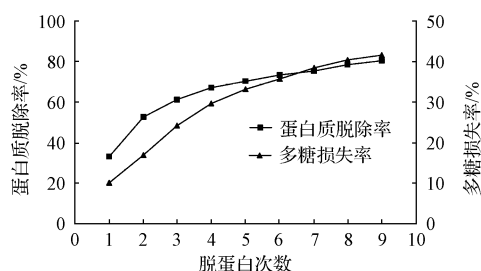


图 1 Sevag 法脱蛋白效果

Fig. 1 Deproteinization by Sevag method

### 2.2 三氯乙酸法脱蛋白效果

由图 2 可以看出,随着三氯乙酸浓度的增加,多糖溶液中的蛋白质脱除率随之提高,但多糖损失率也在显著增加。当溶液中三氯乙酸浓度为 10.0% 时,蛋白质脱除率为 55.44%,但多糖损失率高达 44.57%;继续提高溶液中的三氯乙酸浓度后,当三氯乙酸浓度为 20.0% 时,蛋白质脱除率为 61.14%,对蛋白质脱除率提高不明显,但多糖损失率显著提高,达 52.15%。

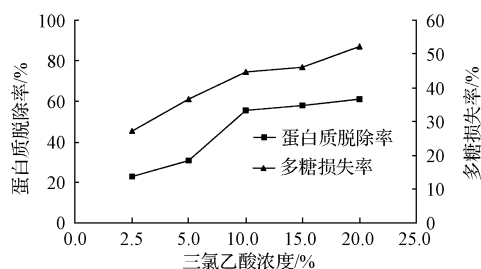


图 2 三氯乙酸法脱蛋白效果

Fig. 2 Deproteinization by trichloroacetic acid method

### 2.3 酶法脱蛋白效果

由图 3 可知,随着溶液中木瓜蛋白酶浓度的增加,蛋白质脱除率明显提高,多糖损失率缓慢增加。当酶浓度为 1.5% 时,蛋白质脱除率为 63.30%,蛋白质脱除效果提高显著,多糖损失率仅为 9.06%。由此可见,采用木瓜蛋白酶脱除茯苓菌丝体胞外多糖中的蛋白质,多糖的损失率较低。

### 2.4 酶-Sevag 法脱蛋白效果

综合考虑以上 3 种脱除茯苓菌丝体胞外多糖中蛋

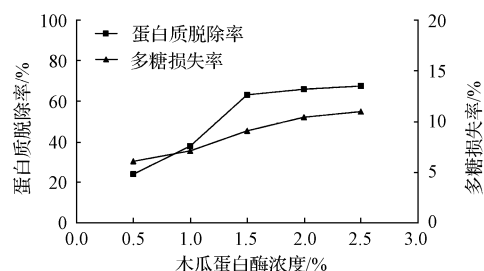


图 3 酶法脱蛋白效果

Fig. 3 Deproteinization by enzyme method

白质的方法,确定先采用浓度为 1.5% 的木瓜蛋白酶处理多糖溶液,再结合 Sevag 法脱除蛋白。Sevag 法脱除蛋白重复操作 5 次。由图 4 可以看出,经浓度为 1.5% 的木瓜蛋白酶处理的多糖溶液,再用 3 次 Sevag 法脱蛋白后,蛋白质脱除率高达 87.43%,多糖损失率仅为 10.97%,由此可见,酶-Sevag 法是较佳的脱除茯苓菌丝体胞外多糖中蛋白质的方法。

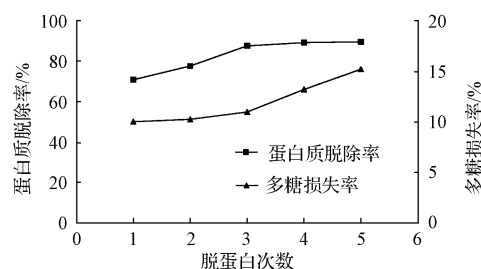


图 4 酶-Sevag 法脱蛋白

Fig. 4 Deproteinization by enzyme-Sevag method

### 2.5 紫外光谱扫描

采用酶-Sevag 法脱蛋白,取脱蛋白后的多糖在 200~400 nm 进行紫外光谱扫描。由图 5 可以看出,在 280 nm 处无蛋白质的特别明显吸收峰,表明酶-Sevag 法脱蛋白的效果较好。

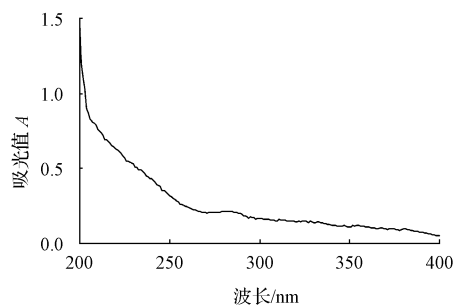


图 5 多糖的紫外光谱

Fig. 5 UV Spectrum of polysaccharide

## 3 结论与讨论

近年来,生物活性多糖以其诸多的生物和药理作用愈来愈引起人们的重视,研究和开发具有生物活性的多糖已成为国内外科学研究的热点<sup>[6-7]</sup>。随着多糖研究的

不断深入与发展,越来越多的多糖产品被开发出来,并依据其性质和功能应用于各个领域。但是在多糖的提取纯化过程中,多糖中的蛋白质常常影响多糖纯度,因此多糖脱除蛋白质是多糖纯化精制的关键。

该试验结果表明,Sevag 法能有效的脱除多糖中的蛋白质,但多糖损失率较高;三氯乙酸法脱除蛋白质,蛋白质脱除率较低,多糖损失率较高,证明该法不宜作为茯苓菌丝体胞外多糖脱除蛋白的方法;木瓜蛋白酶法条件温和,多糖损失率低。综合以上试验结果,采用酶-Sevag 法脱除蛋白,进一步提高了蛋白质脱除率,而且多糖损失率较低,既减少了有机溶剂的用量,又能达到较好的脱蛋白效果。值得注意的是,茯苓菌丝体胞外多糖采用酶-Sevag 法脱除蛋白后,仍有少量蛋白质残留。因此,还需要进一步优化酶-Sevag 法脱除蛋白的工艺条件。此外,推测可能还有部分的少量蛋白质与多糖结合形成紧密的糖蛋白复合物,这部分蛋白质可能与多糖的生物活性有关,但其生物活性还需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] 李羿,李晨,游元元,等. 茯苓发酵罐补料液体发酵的研究[J]. 化学研究与应用,2011,23(7):847-851.
- [2] 王谦,冀宏,丁万杰,等. 茯苓的发酵研究及其动物免疫学观察[J]. 中国食用菌,2002,21(2):41-42.
- [3] 曹宇,高文远,张黎明,等. 液体发酵茯苓胞外多糖的研究[J]. 现代食品科技,2009,25(12):1438-1441.
- [4] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州:浙江大学出版社,1999:11-12.
- [5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry,1976,72:248-254.
- [6] Leung M Y K, Liu C, Koon J C M, et al. Polysaccharide biological response modifiers[J]. Immunology Letters,2006,105:101-114.
- [7] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60: 258-274.

## Study on Deproteinization of Exopolysaccharide from *Poria cocos* Mycelia

HAN Yong, WANG Xian-zhi, ZHANG Hong

(Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan, Shanxi 030031)

**Abstract:** Taking the rate of removed protein and rate of lost polysaccharide as indexes, the effect of sevag method, trichloroacetic acid method, enzyme method, enzyme-Sevag method on deproteinization of exopolysaccharide from *Poria cocos* mycelia were studied. The results showed that the enzyme-Sevag method was the best method of removing protein from the exopolysaccharide of *Poria cocos* mycelia. The optimal conditions of deproteinization were as follows: 1.5% enzyme, temperature at 50°C, pH value 6.5, deproteinization time 2 h, Sevag deproteinization 3 times treatment. The rate of removed protein and the rate of lost polysaccharide were 87.43% and 10.97%, respectively.

**Key words:** *Poria cocos* mycelia; exopolysaccharide; deproteinization; enzyme-Sevag method

## 微生物肥料使用注意事项

为了确保微生物肥料的使用效果,广大微生物肥料消费者在推广运用时应留意以下几个问题。

1. 没有获得国家登记证的微生物肥料不能推广。国家规定微生物肥料必须经农业部指定单位检验和正规田间试验,充分证实其效益、无毒、无害后由农业部登记,而且先发给暂时登记证,经 3 a 实际运用检验可靠后再发给正式登记证。正式登记证有效期只有 5 a。所以没有获得国家登记证的微生物肥料,品质有可能出问题,不要大面积推广使用。

2. 有效活菌数达不到标准的微生物肥料不要使用。国家规定微生物肥料菌剂有效活菌数 $\geq 2$  亿/g,大肥有效活菌数 $\geq 2$  000 万/g,而且应该有 40%的富裕。如果达不到这一标准,说明品质达不到要求。

3. 寄存时间超过有效期的微生物肥料不宜使用。由于技术程度的制约,目前我国绝大多数微生物肥料的有效菌成活时间超过 1 a 的不多,所以必须在有效期内尽快使用,越早越好。

4. 寄存条件和使用方法须严格按照规定办。微生物肥料中很多有效活菌不耐高温和强光,不耐强酸碱,不能与某些化肥和杀菌剂混杂,所以,推广运用微生物肥料必须按产品说明书进行科学保存和使用。

(摘自农业知识网)