

木蹄层孔菌多糖分离纯化及其结构初步鉴定

刘菊香¹, 贾建波²

(1. 江苏食品职业技术学院生物工程系, 江苏 淮安 223003; 2. 淮阴工学院生物工程系, 江苏 淮安 223003)

摘 要: 采用乙醇沉淀法, 对木蹄层孔菌的发酵液进行多糖提取, 用离子交换和凝胶层析对木蹄菌多糖进行纯化, 并对多糖的结构、组成进行分析。结果表明, 木蹄菌多糖只含一种多糖, 采用薄层色谱法分析, 结果显示木蹄菌多糖由半乳糖聚合而成, 对木蹄菌多糖的红外光谱分析, 显示该多糖是吡喃糖, 由 α -糖苷键连接, 含酯胺等基团。

关键词: 木蹄层孔菌; 多糖; 分离; 纯化; 结构鉴定

Isolation, Purification and Identification of Polysaccharides from *Fomes fomentarius*

LIU Ju-xiang¹, JIA Jian-bo²

(1. Department of Biological Engineering, Jiangsu Food Science College, Huai'an 223003, China;

2. Department of Biological Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China)

Abstract: The crude polysaccharides were prepared by ethanol precipitation method from the ferment liquid of *fomes fomentarius*. The polysaccharides were further purified with ion exchange chromatography and gel chromatography. Apart from this, the structure of polysaccharide was analyzed as well as its composition. The result showed that *Fomes fomentarius* polysaccharide displayed high homogeneity and was comprised of single polysaccharide, which was formed through the polymerization of galactose. The structure was analyzed by IR suggesting that the polysaccharide was in the form of pyranose containing α -glycosidic bond and C=O group.

Key words: *Fomes fomentarius*; polysaccharide; separation; purification; structural identification

中图分类号: TS201.23

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)24-0080-04

木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)又名火绒层孔菌, 其药用部位为子实体。木蹄层孔菌多糖具有抗氧化性、利尿性、退烧、消积化、止痛、消炎和抗肿瘤等作用^[1]。木蹄层孔菌多糖作为一种生物活性产品, 必须经过分离纯化, 得到相对较纯的多糖才能更好地发挥作用, 尤其是要将其开发成药品时, 需尽量脱去其中的游离的非多糖结合蛋白质等杂质, 粗多糖的分离纯化更是一个必不可少的步骤, 而不同的多糖组分其生物活性是不同的。本实验主要研究从经发酵后的菌丝体中提取出多糖, 并对其进行分离纯化, 然后对该多糖进行初步结构分析, 为下一步对不同组分进行药效实验提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

木蹄层孔菌粗多糖液由本院生物工程系实验室液体发酵菌丝体中制备。

弱酸、碱阴阳离子交换树脂、标准单糖、1,3-二羟基萘等试剂 上海久亿化学试剂有限公司。

SHODEX SB804 色谱柱、检测器示差、凝胶柱($\Phi \times L=8.0 \times 300.00\text{mm}$)、保护柱SB-G($\Phi \times L=6.0 \times 50\text{mm}$)、平板膜机 赛普膜科技发展有限公司; LNG-T98 冷冻浓缩离心干燥机 太仓市华美生化仪器厂; DHL-A 电脑衡流泵、DBS-100 自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂; 122PC 分光光度计 上海棱光技术有限公司; JY92-2D 超声波细胞破碎机 宁波新芝科器研究所; DGG-9420A 电热鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司; YP-2 压片机 上海山岳科学仪器有限公司; NICOLET 5700 型红外光谱仪 郑州中谱仪器设备有限公司; Sephadex G-75 柱 上海久亿化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

多糖含量测定: 苯酚-硫酸法^[2]; 多糖组分分析: 薄层层析法(TLC法)^[3]; 多糖结构分析: 红外光谱法(IR

收稿日期: 2009-06-13

作者简介: 刘菊香(1965—), 女, 实验师, 学士, 主要从事粮食加工研究。E-mail: liujx0308@163.com

法)^[4]。

1.2.2 实验工艺流程

经发酵所得菌丝体→细胞破碎→纱布过滤→浓缩→醇析→冷冻离心干燥→称质量→脱蛋白→二次离心→乙醇脱色→烘干得多糖→多糖含量测定→纯化→烘干得精多糖→多糖组分分析→多糖结构初步鉴定

1.2.3 操作要点

1.2.3.1 粗多糖提取

发酵液细胞破碎：将发酵4d的发酵液用超声波细胞破碎机进行细胞破碎。设定条件：间隙时间1.5s；超声波时间1s；工作时间120min；温度保护30℃。

粗糖液浓缩：粗糖溶液100℃水浴加热浓缩至适当体积。

多糖醇析^[5]：浓缩后所得粗糖溶液加入4倍体积的乙醇，静置24h进行多糖沉淀。

粗多糖冷冻离心干燥及称质量：将醇析所得的多糖水转移至小塑料离心试管，放入冷冻浓缩离心干燥机进行冷冻离心干燥。所得干燥多糖称质量。

1.2.3.2 Sevag法去蛋白^[6]

用氯仿与正丁醇或正戊醇按5:1(V/V)混合后，加到样品水溶液中振荡，采用离心取上清液，除去凝胶状蛋白质，在280nm波长处紫外分光光度计测定吸光度，若无吸收则表示蛋白质已除尽。

1.2.3.3 乙醇脱色

用75%乙醇洗涤沉淀数次，直至沉淀颜色不再发生变化。于烘箱中烘干(不高于60℃)，即得到粗多糖。

1.2.3.4 多糖含量测定^[2]

总糖量测定：苯酚-硫酸法^[2]；还原糖测定：3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)^[2]。

多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量

1.2.3.5 粗多糖的纯化

离子交换层析^[7]：先用2~3倍柱体积4%的NaOH溶液平衡离子交换柱24h。取60mg的粗多糖溶于10ml水中，溶解后吸取5ml经离子交换柱，以90s/管的流速(即1.8ml/min)进行分离。以硼酸-硼砂为缓冲溶液，硼砂为洗脱液。收集液用苯酚-硫酸法进行测定，绘出洗脱曲线。合并多糖含量较多的管子中的溶液，浓缩体积。

葡聚糖凝胶柱层析^[8]：用2~3倍柱体积的水平衡凝胶柱24h。将上述浓缩后的液体取0.5ml加样。用水以0.27ml/min的流速进行洗脱。收集液用苯酚-硫酸法进行测定，绘出洗脱曲线，合并多糖含量较多的管子中的溶液，烘干，即得到精多糖。

1.2.3.6 多糖的薄层层析分析^[3]

称取0.020g多糖，加入6ml 1mol/L的硫酸，置

100℃沸水浴中水解8h，水解液用CaCO₃中和至中性，离心取上清液低温浓缩即为点样液，以此可对多糖组分进行分析。

1.2.3.7 多糖的红外光谱法分析^[4]

红外操作：取2mg的纯化后的多糖用KBr压片，进行红外光谱扫描，多糖在红外光谱上有特征吸收峰，以此可对多糖结构进行初步分析。

2 结果与分析

2.1 多糖含量测定结果

2.1.1 还原糖 DNS 标准曲线^[2]

表1 DNS标准曲线绘制数据表
Table 1 Standard curve for DNS

处理	0	1	2	3	4	5
标准糖体积(ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
蒸馏水(ml)	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2
DNS(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
加热	沸水浴5min					
冷却	流水冷却					
蒸馏水(ml)	4	4	4	4	4	4
A _{540nm}	0.000	0.203	0.422	0.839	1.268	1.570

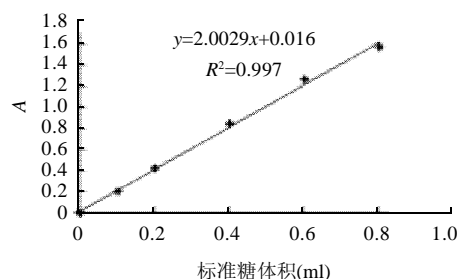


图1 DNS标准曲线

Fig.1 Standard curve of reducing sugar standards for DNS

经计算，样品总还原糖的含量为70.9%，粗多糖质量为0.181g，则还原糖质量0.128g。

2.1.2 总糖标准曲线^[2]

表2 苯酚-硫酸法标准曲线绘制数据表
Table 2 Data sheet for standard curve (phenol-sulfuric acid method)

处理	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖(ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
苯酚(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
蒸馏水(ml)	2.0	1.9	0.8	1.6	1.4	1.2	1.0
浓硫酸(ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
水浴条件	40~50℃, 30min						
A _{490nm}	0.000	0.130	0.278	0.518	0.820	1.031	1.345

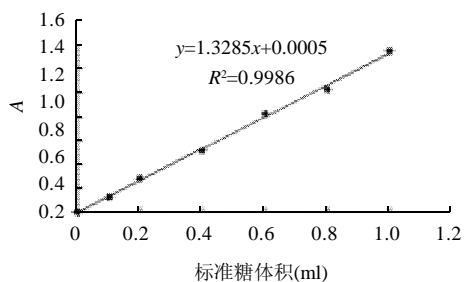


图2 苯酚-硫酸法标准曲线

Fig.2 Standard curve of total sugar for phenol-sulfuric acid method

经计算, 总糖含量 86.2%, 总糖质量 0.156mg, 则多糖质量 0.028g。

2.2 离子交换层析结果^[7]

木蹄菌多糖经离子交换柱层析, 收集液经苯酚-硫酸法检测, 绘出洗脱曲线见图 3, 3~24 管呈多糖反应, 高峰管在 12~13 管, 合并 10~17 管, 总收集液体积为 20ml, 浓缩至 2ml。

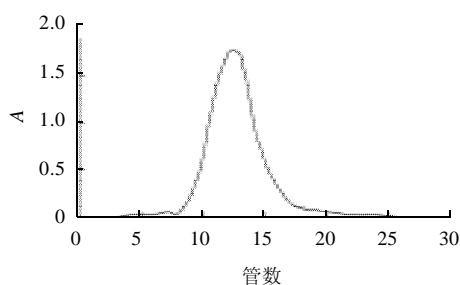


图3 多糖的离子交换柱层析

Fig.3 Ion-exchange chromatogram of polysaccharide

2.3 葡聚糖凝胶层析结果^[8]

浓缩液经 Sephadex G-75 柱层析, 收集液经苯酚-硫酸法检测, 绘出洗脱曲线见图 4, 3~22 管呈多糖反应, 高峰管在 11~12 管, 合并 10~15 管, 汇总收集液, 浓缩烘干, 得到淡黄色粉末, 即为精多糖的纯品。纯化后精多糖为 0.124g。

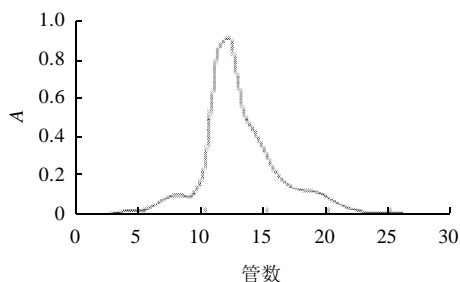
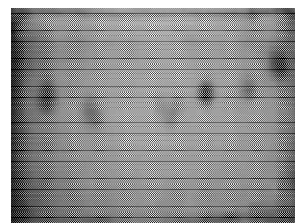


图4 多糖的凝胶柱层析

Fig.4 Gel chromatography of polysaccharide

2.4 多糖组分鉴定结果^[3]

多糖水解液经薄层层析后, 其显色图见图 5。由图 5 可知, 木蹄菌孔菌多糖是由半乳糖聚合而成。



1. 葡萄糖; 2. 半乳糖; 3. 鼠李糖; 4. 多糖样品; 5. 果糖; 6. 甘露糖; 7. 木糖。

图5 多糖的薄层色谱层析

Fig.5 TLC chromatogram of polysaccharide

2.5 多糖的红外光谱分析^[9-13]

在 $4000\sim 2500\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 X—H 伸缩振动, X 可以是 O、N、C、S 原子, 但它们有各自的范围, 图谱中在 3457.4cm^{-1} 处有一强吸收峰, 因此该基团为 O—H; 在 2926.3cm^{-1} 处有一吸收峰, 该基团为 C—H。

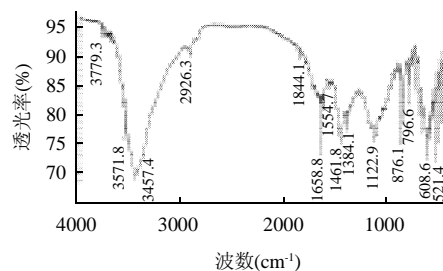


图6 木蹄菌多糖 WV003 红外光谱图

Fig.6 IR spectra of polysaccharide

$2000\sim 1500\text{cm}^{-1}$ 处为双键伸缩振动, 主要包括 $\text{C}=\text{C}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{N}$ 、 $-\text{NO}_2$ 等的伸缩振动, 以及 $-\text{NH}_2$ 的剪切振动。图谱中在 1658.8 、 1554.7cm^{-1} 处有吸收峰, 含基团 $\text{C}=\text{O}$, 糖中应含酯胺。此外 $2000\sim 1500\text{cm}^{-1}$ 处还有其他吸收峰, 说明还含有其他双键基团。

$1500\sim 600\text{cm}^{-1}$ 是单键振动及指纹区, 主要包括 C—H、O—H 的变角振动 C—O、C—N、C—X(卤素)、N—O 等的伸缩振动, 及 C—C、C—O 有关的骨架振动等。图谱中该区吸收峰较多较复杂。

吡喃糖苷在 $1100\sim 1010\text{cm}^{-1}$ 处有 3 个吸收峰, 由图 6 可知, 多糖含吡喃糖苷。840 cm^{-1} 附近表明为 α -糖苷键。

3 结 论

Sevag 法进行多糖的去蛋白, 然后用标准曲线法, 分别用 DNS 法和苯酚-硫酸法测定标准葡萄糖 $A_{540\text{nm}}$ 和

$A_{490\text{nm}}$ 的值, 作标准曲线, 再分别测定样品糖的还原糖和总糖的量, 从而计算所得多糖含量为 0.028g。多糖经离子交换层析和凝胶层析纯化, 由浅褐色变成了淡黄色的晶体, 且凝胶层析图显示, 木蹄层多孔菌多糖由一种多糖组成。木蹄层孔菌多糖水解液, 用薄层色谱法进行层析显色, 木蹄层孔菌多糖是由半乳糖聚合而成。红外光谱图分析得出, 木蹄层孔菌多糖是一种吡喃糖, 由 α -糖苷键连接, 含酯胺等基团。该实验为多糖组分活性研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陆勇芹, 周文明, 王琦, 等. 木蹄层孔菌化学成分及不同提取物体外抗肿瘤活性研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(4): 131-134.
- [2] 俞建瑛, 蒋宇, 王善利. 生物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 138-139.
- [3] 赵玉萍, 纪丽莲, 朱晓庆. 真菌多糖提取、组分分析及结构初步鉴定[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 127-129.
- [4] 陈辉, 李永辉, 姚曲响, 等. 离子交换技术在多糖分离纯化中的应用[J]. 河北农业科学, 2008, 12(7): 168-169.
- [5] 刘量, 周守标, 郑维发, 等. 木蹄层孔菌乙醇提取物体内抗肿瘤活性及其对荷瘤鼠免疫功能的影响[J]. 徐州医学院学报, 2007, 27(8): 497-499.
- [6] 徐增龙, 张如松. 冬虫夏草菌丝体发酵液中多糖的分离纯化与含量测定[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(3): 376-377.
- [7] 武金霞. 生物化学实验原理与技术[M]. 保定: 河北大学出版社, 2005: 22-29.
- [8] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 36-46; 207-216.
- [9] 范卫强, 尹鸿萍, 周长林, 等. 虫草多糖的分离、纯化和初步药效活性研究[J]. 生物加工过程, 2008, 6(1): 69-73.
- [10] 铁梅, 李闯, 费金岩, 等. 富硒金针菇子实体中晒多糖的分离纯化技术及红外光谱研究[J]. 分析测试报, 2008, 27(2): 158-161.
- [11] 刘威, 于源华, 毛亚杰, 等. 黄绿蜜环菌多糖的分离纯化与组成结构分析[J]. 长春理工大学学报, 2007, 30(2): 102-105.
- [12] KHODZHAIEVA M A, KHUSHBAKTOVA Z A. NS Irismetova carbohydrates of *Allium X. glucofructans of Allium suvorovii* and their biological activity[J]. Chemistry of Natural Compounds, 1998, 34(6): 656-658.
- [13] MIRZAEVA M R, RAKHAMANBERDYEVA R K, KRISTALLOVICH E L, et al. Water-soluble polysaccharides of seeds of the genus *Gleditsia* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 1998, 34(6): 653-656.