

裂盖马鞍菌粗多糖脱蛋白质工艺研究

滕立平^{1,2}, 曾 红¹, 汪河滨¹, 孟庆艳¹, 周忠波^{1*}

(1. 新疆生产建设兵团 塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300;

2. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要: 脱除蛋白质是真菌多糖纯化过程中较为重要的环节之一, 为了优化裂盖马鞍菌多糖脱蛋白质工艺, 采用 Sevag 法和三氯乙酸法对其多糖进行蛋白质脱除, 通过比较 2 种方法处理后的蛋白质脱除率和多糖损失率来确定最佳的脱蛋白质方法。结果表明, 三氯乙酸法脱除蛋白质效果最佳, 其最佳工艺为三氯乙酸质量浓度 50 g/L、三氯乙酸与粗多糖体积比 1 : 1、振荡时间 40 min、静置时间 40 min, 在此条件下蛋白质脱除率为 92.37%, 多糖损失率为 16.91%。

关键词: 裂盖马鞍菌; 多糖; 脱蛋白质

中图分类号: S646 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)09-0138-05

Study on the Deproteinization Technology of Crude Polysaccharide from *Helvella leucopus* Pers.

TENG Li-ping^{1,2}, ZENG Hong¹, WANG He-bin¹, MENG Qing-yan¹, ZHOU Zhong-bo^{1*}

(1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin,

Xinjiang Production and Construction Corps, Alar 843300, China;

2. College of Plant Sciences, Tarim University, Alar 843300, China)

Abstract: Deproteinization is one of the most important steps in the purification process of fungi polysaccharide. In order to improve purification efficiency of polysaccharide, the optimization of deproteinization process of crude polysaccharide from *Helvella leucopus* Pers. was carried out using Sevag reagent and trichloroacetic acid with protein removal rate and sugar loss rate as indexes. The results showed that trichloroacetic acid was more suitable to remove the protein from the crude polysaccharide, and the optimum trichloroacetic acid concentration was 50 g/L, the volume ratio of trichloroacetic acid to crude polysaccharide was 1 : 1, vibrating time and standing time were both 40 min. Under this condition, the protein removal rate was 92.37%, and sugar loss rate was 16.91%.

Key words: *Helvella leucopus* Pers.; polysaccharide; deproteinization

裂盖马鞍菌 (*Helvella leucopus* Pers.) 是一种珍稀名贵的美味野生食用菌, 分布于河北、甘肃、新疆等地^[1]。裂盖马鞍菌子实体中的蛋白质、多糖及多种人体必需氨基酸含量高于平菇、香菇及黑木耳等食用菌, 具有较好的开发前景^[2]。多糖不仅是细胞的结构物质和能源物质, 而且具有多种生理功能,

广泛参与细胞识别, 细胞生长、分化、代谢, 胚胎发育, 抗细胞癌变, 抗病毒感染及免疫应答等各项生命活动^[3]。近年来, 关于裂盖马鞍菌的研究主要集中于其营养成分及生物学特性方面, 而关于其多糖的研究鲜有报道^[4-6]。真菌中的多糖往往与蛋白质共存, 且常结合形成糖蛋白复合物, 致使从粗多糖中脱

收稿日期: 2013-04-01

基金项目: 新疆生产建设兵团青年科技创新资金专项 (2011CB001)

作者简介: 滕立平 (1977-), 女, 吉林扶余人, 讲师, 硕士, 主要从事生物农药方面的研究。E-mail: tengliping2005@126.com

* 通讯作者: 周忠波 (1978-), 男, 山东高唐人, 副教授, 在读博士研究生, 研究方向: 天然产物活性成分分析。

E-mail: zzb7855@sohu.com

除蛋白质较为困难,因此,对多糖脱蛋白质工艺进行研究具有重要意义。目前,多糖脱蛋白质的方法主要有 Sevag 法、三氯乙酸法、酶解法、鞣酸法、盐酸法等^[7-8],其中 Sevag 法和三氯乙酸法比较常用。鉴于此,本研究采用 Sevag 法和三氯乙酸法对裂盖马鞍菌子实体水溶性多糖脱蛋白质工艺进行初步研究,以期对裂盖马鞍菌多糖的开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

裂盖马鞍菌粗多糖由本实验室制备。牛血清白蛋白、苯酚、考马斯亮蓝 G-250、三氯乙酸、氯仿、正丁醇等均为国产分析纯。

仪器:HJ-2 磁力加热搅拌器产自江苏省金坛市医疗仪器厂,LXJ-IIB Anke 离心机产自上海安亭科学仪器厂,T6 新世纪紫外分光光度计购自北京普析通用仪器有限责任公司,恒温振荡器产自金坛市医疗仪器厂。

1.2 Sevag 法脱除裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质

称取 0.500 0 g 粗多糖置于 500 mL 容量瓶中,配制成 1 g/L 的粗多糖溶液,量取该溶液 80 mL 置于 100 mL 烧杯中,再加入 20 mL 的 Sevag 试剂[氯仿:正丁醇=4:1],于磁力加热搅拌器上常温搅拌 30 min,将溶液倒入 150 mL 的分液漏斗中,静置(时间越久越好),弃下层有机溶剂和中间层变性蛋白,再次加入 Sevag 试剂,重复操作 5 次,计算每次处理后的蛋白质脱除率和多糖损失率。

1.3 三氯乙酸法脱除裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质

称取 0.500 0 g 粗多糖置于 500 mL 容量瓶中,配制成 1 g/L 的粗多糖溶液,各取 20 mL,加入一定量 2 mol/L 三氯乙酸,使粗多糖溶液中三氯乙酸达到一定质量浓度,振荡一段时间,然后于 4 ℃ 静置一段时间,取上清液,于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测定并计算蛋白质脱除率和多糖损失率。

1.3.1 单因素试验

1.3.1.1 三氯乙酸质量浓度 各取 1 g/L 的粗多糖溶液 20 mL,分别加入一定量 2 mol/L 三氯乙酸,使粗多糖溶液中三氯乙酸质量浓度分别达到 20、40、50、60、80 g/L,混匀,振荡 30 min,随后于 4 ℃ 静置 30 min,然后按照 1.3 中方法进行。

1.3.1.2 振荡时间 各取 1 g/L 的粗多糖溶液 20 mL,加入 2 mol/L 三氯乙酸,使粗多糖溶液中三氯乙酸质量浓度达到 50 g/L,分别振荡 10、20、30、

40、50 min,随后于 4 ℃ 静置 30 min,然后按照 1.3 中方法进行。

1.3.1.3 静置时间 各取 1 g/L 的粗多糖溶液 20 mL,加入 2 mol/L 三氯乙酸,使粗多糖溶液中三氯乙酸质量浓度达到 50 g/L,振荡 30 min,随后于 4 ℃ 分别静置 10、20、30、40、50 min,然后按照 1.3 中方法进行。

1.3.2 正交试验 在单因素试验的基础上,对三氯乙酸法脱蛋白质工艺中的三氯乙酸质量浓度、振荡时间、静置时间进行三因素三水平正交试验,因素与水平见表 1。

表 1 三氯乙酸法脱除裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质的正交试验设计

水平	因素		
	三氯乙酸质量浓度(A)/(g/L)	振荡时间(B)/min	静置时间(C)/min
1	40	20	20
2	50	30	30
3	60	40	40

1.4 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法^[9]测定蛋白质含量,以牛血清蛋白作标准曲线,得牛血清蛋白质量浓度 C_1 与吸光度 A_1 之间的回归方程为: $A_1 = 0.447 3 C_1 + 0.007 3$, $R^2 = 0.996 4$ 。蛋白质脱除率=(处理前蛋白质含量-处理后蛋白质含量)/处理前蛋白质含量 $\times 100\%$ 。

1.5 多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法^[10-11]测定多糖含量,以葡萄糖为对照品绘制标准曲线,得葡萄糖质量浓度 C_2 与吸光度 A_2 之间的回归方程为: $A_2 = 0.203 0 C_2 + 0.003 4$, $R^2 = 0.999 4$ 。糖损失率=(处理前多糖含量-处理后多糖含量)/处理前多糖含量 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 Sevag 法对裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质的脱除效果

由图 1 可以看出,随着蛋白质脱除次数的增加,裂盖马鞍菌粗多糖中的蛋白质脱除率和多糖损失率均不断增加。当蛋白质脱除次数为 3 时,蛋白质脱除率较大,达到 64.2%,但是多糖损失率也较大,达到 25.21%;当蛋白质脱除次数大于 3 时,蛋白质脱除率增加缓慢,但多糖损失率仍不断增加,脱除次数达到 5 时,蛋白质脱除率达到 65.81%,多糖损失率也高达 34.17%。这可能是部分蛋白质与多糖牢固

结合形成了糖复合物,脱蛋白质的同时造成了多糖的损失。综合考虑,Sevag 法脱除蛋白质以 3 次为宜。

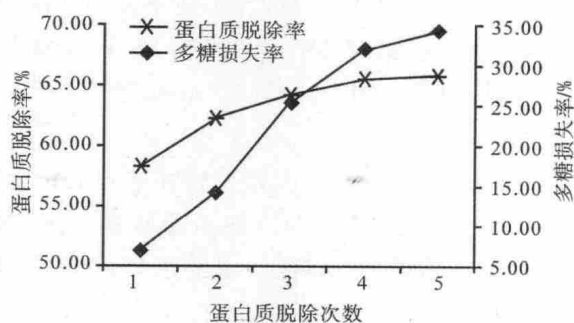


图 1 Sevag 法对裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质的脱除效果

2.2 三氯乙酸法对裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质的脱除效果

2.2.1 单因素试验结果

2.2.1.1 三氯乙酸质量浓度 由图 2 可以看出,随着三氯乙酸质量浓度的增加,蛋白质脱除率呈先降低后增加再降低的趋势,多糖损失率呈先小幅降低后增加的趋势。当三氯乙酸质量浓度小于 50 g/L 时,随着三氯乙酸质量浓度的增加,蛋白质脱除率和多糖损失率均表现为先小幅降低后升高;当粗多糖溶液中三氯乙酸质量浓度达到 50 g/L 时,蛋白质脱除率达到最大,为 94.44%,多糖损失率为 17.40%;当三氯乙酸质量浓度超过 50 g/L 时,随着三氯乙酸质量浓度的增加,蛋白质脱除率降低,多糖损失率升高。这可能是因为三氯乙酸超过一定质量浓度后,造成糖苷键的裂解,从而使多糖损失率增加,因此,三氯乙酸用量的选择对提高蛋白质脱除率和降低多糖损失率至关重要。综合考虑,粗多糖溶液中三氯乙酸质量浓度以 50 g/L 时效果最佳。

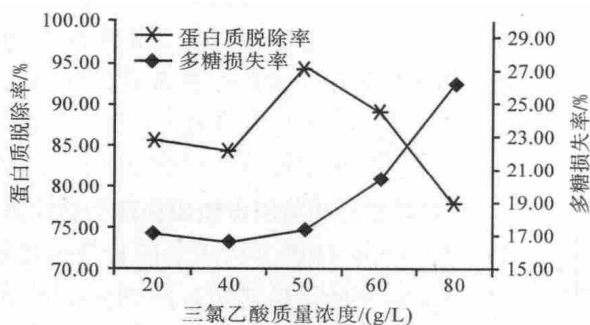


图 2 不同质量浓度三氯乙酸对裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质脱除效果的影响

2.2.1.2 振荡时间 由图 3 可以看出,随着振荡时间的增加,蛋白质脱除率和多糖损失率均表现为先增加后降低,但多糖损失率变化不明显。当振荡时间为 30 min 时,蛋白质脱除率最大,为 93.10%,多

糖损失率为 20.18%。因此,振荡时间以 30 min 为佳,此时蛋白质脱除效果较好。

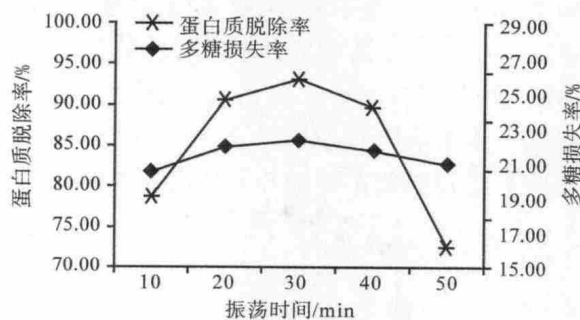


图 3 振荡时间对裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质脱除效果的影响

2.2.1.3 静置时间 由图 4 可以看出,随着静置时间的增加,蛋白质脱除率先增加后降低,多糖损失率先降低后增加。当静置时间为 30 min 时,蛋白质脱除率最高,为 91.34%;多糖损失率最低,为 17.16%。由此可知,静置时间以 30 min 为佳,此时蛋白质脱除效果较好,多糖损失率较低。

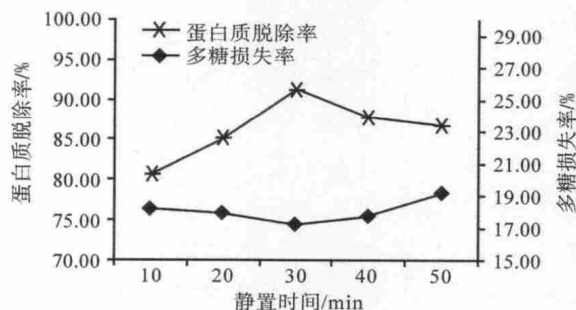


图 4 静置时间对裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质脱除效果的影响

2.2.2 正交试验结果 由表 2 可以看出,三氯乙酸法脱除蛋白质工艺过程中的各因素对蛋白质脱除率的影响主次顺序为三氯乙酸质量浓度>振荡时间>静置时间,最佳组合为 $A_2B_3C_3$,即三氯乙酸质量浓度 50 g/L、振荡时间 40 min、静置时间 40 min;各因素对多糖损失率的影响主次顺序为:三氯乙酸质量浓度>静置时间>振荡时间,最佳组合为三氯乙酸质量浓度 50 g/L、振荡时间 30 min、静置时间 30 min。由表 3 可知,三氯乙酸质量浓度对蛋白质脱除率影响显著,而振荡时间和静置时间对蛋白质脱除率和多糖损失率影响不大,由于本研究探讨的是裂盖马鞍菌粗多糖脱蛋白质工艺,因此以蛋白质脱除率为首要考察指标,综合考虑多糖损失率方面因素,故得出三氯乙酸法脱除裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质的最佳工艺为:三氯乙酸质量浓度 50 g/L、振荡时间 40 min、静置时间 40 min。

表 2 三氯乙酸法脱除裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质的正交试验结果

试验号	因素			蛋白质脱除率/%	多糖损失率/%
	A	B	C		
1	1	1	1	79.66	17.13
2	1	2	2	82.20	16.81
3	1	3	3	83.05	17.56
4	2	1	2	91.53	16.84
5	2	2	3	92.37	18.24
6	2	3	1	93.22	17.62
7	3	1	3	88.14	17.72
8	3	2	1	87.29	17.69
9	3	3	2	88.98	17.57
<i>k</i> 蛋白质脱除率 ₁	81.493	86.237	86.460		
<i>k</i> 蛋白质脱除率 ₂	92.203	87.130	87.350		
<i>k</i> 蛋白质脱除率 ₃	87.910	88.240	87.797		
<i>R</i> 蛋白质脱除率	10.710	2.003	1.337		
<i>k</i> 糖损失率 ₁	16.797	16.670	16.980		
<i>k</i> 糖损失率 ₂	16.083	16.557	16.097		
<i>k</i> 糖损失率 ₃	17.123	16.777	16.927		
<i>R</i> 糖损失率	1.040	0.220	0.883		

表 3 三氯乙酸法脱除裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质的正交试验方差分析结果

变异来源	偏差平方和		自由度		<i>F</i> 值	
	蛋白质脱除率	多糖损失率	蛋白质脱除率	多糖损失率	蛋白质脱除率	多糖损失率
A	175.475	0.412	2	2	156.395*	2.747
B	5.882	0.247	2	2	5.242	1.647
C	2.074	0.883	2	2	1.848	5.887
误差	1.12	0.15				

注：*表示在 0.05 水平上差异显著。

2.2.3 最佳工艺的验证结果 在三氯乙酸法脱除裂盖马鞍菌粗多糖中蛋白质最佳工艺条件下进行 3 次平行验证试验,以考察最佳条件的合理性和可靠性。3 次测得多糖损失率分别为 16.51%、17.32%和 16.91%,平均值为 16.91%,相对标准偏差为 2.39%;3 次测得蛋白质脱除率分别为 92.37%、93.22%和 91.53%,平均值为 92.37%,相对标准偏差为 0.91%,分别与表 2 中多糖最小损失率、蛋白质最大脱除率接近,说明三氯乙酸脱除蛋白质最佳工艺条件重现性良好,数据可靠。

3 结论与讨论

本研究结果表明,三氯乙酸法在蛋白质脱除率、多糖损失率、处理次数、有机溶剂用量等方面均优于 Sevag 法。Sevag 法虽是经典的脱蛋白质方法,但对裂盖马鞍菌粗多糖脱蛋白质效果不理想,处理 5 次后,仍未能有效脱除蛋白质,且多糖损失率较高。三氯乙酸法作用温和,脱蛋白质效果较好,且多糖损失率较低,适合作为裂盖马鞍菌粗多糖的蛋白质脱除剂。

Sevag 法主要用于去除游离蛋白质,蛋白聚糖和糖蛋白很难去除,并且随着脱蛋白质次数的增加,多糖损失率急剧上升。另外,此法用到的三氯甲烷是一种强毒性溶剂,容易导致多糖活性下降和溶剂残留。三氯乙酸是一种有机酸,可以使样品中的蛋白质变性而沉淀,从而达到去除蛋白质的目的;但是酸性物质易造成糖苷键的裂解,从而使多糖得率降低,因此在去除粗多糖中蛋白质以及与多糖结合的多肽时,三氯乙酸用量、静置时间及作用时间的选择对提高蛋白质脱除率和降低多糖损失率至关重要。

在进行单因素试验时,虽然所用的材料、试剂为同一批,所用的粗多糖提取液也是同一批,但由于试验进行有先后顺序,所以造成不同单因素试验的粗多糖提取液及其他试剂放置时间的长短不同,从而可能造成相同试验条件下不同单因素之间的试验结果略微有差异,但是差异不明显。

本研究表明,当三氯乙酸用量为 50 g/L、静置时间 40 min、处理时间 40 min 时,裂盖马鞍菌粗多糖蛋白质脱除效果较好,且多糖损失较少。 (下转第 160 页)

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 63 卷)[M]. 北京:科学技术出版社,1977:463.
- [2] 邢旺兴,陈斌,宓鹤,等. 通光藤中两个新 C21 甾体苷类成分[J]. 药学学报,2004,39(4):272-275.
- [3] 蒋毅,罗思齐. 通光藤新 C21 甾体的化学结构研究[J]. 中国医药工业杂志,1996,27(9):391.
- [4] 陈纪军,张壮鑫,周俊. 通光藤 F、G、H 和 I 结构[J]. 云南植物研究,1999,21(3):369.
- [5] 方奕奇,孙雪梅. 通光藤化学成分及抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(2):165-166.
- [6] 古利伟. 食用天然抗氧化剂研究进展[J]. 中国油脂,1997,22(3):37-39.
- [7] 张洪雨. 黄酮类抗氧化结构-活性关系的理论解释[J]. 中国科学:B 辑,1999,29(1):91-96.
- [8] 白凤梅,蔡同一. 类黄酮的生物活性及其机理的研究进展[J]. 食品科学,1999(8):11-13.

- [9] 刘玉芬,夏海涛,杨树平. 紫外分光光度法测定剑麻花中总黄酮含量[J]. 食品科学,2005,26(9):418-419.
- [10] 尉芹,马希汉. 杜仲叶黄酮含量测定方法研究[J]. 西北农林科技大学:自然科学版,2001,29(5):119-122.
- [11] 张睿,徐雅琴,时阳. 黄酮类化合物提取工艺研究[J]. 食品与机械,2003(1):21-23.
- [12] 冯朋,张丽萍,白利涛. 银杏中黄酮类化合物提取分离方法研究进展[J]. 天津农业科学,2012,16(2):42-45.
- [13] 刘玲玲,孔涛,王海英,等. 菊芋总黄酮提取工艺研究[J]. 山西农业科学,2008,36(9):62-65.
- [14] 晏丽,高中松. 超声波辅助提取枫香叶总黄酮工艺研究[J]. 山西农业科学,2010,38(8):69-70.
- [15] 袁玲,姜益泉. 超声水提紫荆花总黄酮的工艺研究[J]. 河南农业科学,2013(3):154-156.
- [16] 刘娜,胡洪利,陈惠. 响应面法优化金龙胆草总黄酮的超声波提取工艺研究[J]. 河南农业科学,2013(1):148-151.

(上接第 141 页)

参考文献:

- [1] 卯晓岚. 中国经济真菌[M]. 北京:科学出版社,1998:670.
- [2] 朱铭莪,薛泉宏,和文祥,等. 巴楚蘑菇研究(I)营养成分[J]. 西北农业学报,1999,8(3):77-80.
- [3] Franz G. Polysaccharides in pharmacy:Current applications and future concepts[J]. Plant Medica,1989,55(6):493-497.
- [4] Hou X J, Chen W. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers,2008,72(1):67-74.
- [5] Hou X J, Zhang N, Xiong S Y, et al. Extraction of Ba-Chu mushroom polysaccharides and preparation of a compound beverage[J]. Carbohydrate Polymers,2008,

73(2):289-294.

- [6] 周忠波,曾红,付金鹏,等. 裂盖马鞍菌粗多糖清除自由基活性研究[J]. 食用菌学报,2009,16(4):43-46.
- [7] 曾庆帅,李小定. 吴茱萸粗多糖碱法提取及脱蛋白方法研究[J]. 食品科学,2009,30(8):111-114.
- [8] 李瑞,赵浩如,陈乃林. 白花蛇舌草多糖除蛋白的方法研究[J]. 江苏中医药,2003,24(10):56-57.
- [9] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem,1976,72(1):248-254.
- [10] Michel D, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances[J]. Anal Chem,1956,28(3):350-355.
- [11] 董群,郑丽伊,方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志,1996,31(9):550-553.