

阿魏菇多糖聚酰胺层析脱色工艺及其抑菌活性

张伟丰¹,王亮^{1*},陈义勇²

(1. 新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830066;2. 常熟理工学院生物与食品工程学院,江苏常熟 215500)

摘要 [目的]探讨阿魏菇多糖的聚酰胺层析脱色工艺及其抑菌活性。[方法]以新疆阿魏菇为原料,采用水浴浸提法提取阿魏菇多糖,以蛋白脱除率、多糖保留率和脱色率为指标,探讨聚酰胺用量、去离子水用量以及洗脱速度对阿魏菇多糖脱色的影响,并研究阿魏菇多糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉和酿酒酵母的抑菌活性。[结果]聚酰胺层析法为阿魏菇多糖最佳的脱蛋白方法,其脱色最佳工艺条件为:聚酰胺用量为 60 g(粗多糖的 3000 倍),聚酰胺柱用 1.5 倍柱体积的去离子水以 1.5 ml/min 的流速进行洗脱,在此工艺条件下,蛋白质脱除率达到 93.6%。阿魏菇多糖对黑曲霉和酿酒酵母没有抑菌活性,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑菌作用,最小抑菌浓度分别为 3.125、6.250 和 3.125 mg/ml,且抑菌活性与多糖质量浓度呈正相关关系。[结论]聚酰胺层析工艺可用于阿魏菇多糖的脱色。

关键词 阿魏菇多糖;聚酰胺层析;脱色;抑菌

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)14-033-03

Decolorization Technology of Polysaccharides from *Pleurotus ferulae* by Polyamide Chromatography and Its Antibacterial Activity
ZHANG Wei-feng¹, WANG Liang^{1*}, CHEN Yi-yong² (1. School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046;2. School of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500)

Abstract [Objective] To investigate decolorization technology of polysaccharides from *Pleurotus ferulae* by polyamide chromatography and its antibacterial activity. [Method] *Pleurotus ferulae* from Xinjiang was used as raw material. Polysaccharides from *Pleurotus ferulae* were extracted with water. Deprotein rate, polysaccharide retention rate and decoloration rate were used as the index. Effect of content of polyamide, deionized water and flow rate on decolorization of polysaccharides from *Pleurotus ferulae* by polyamide chromatography was investigated. Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* was also investigated. [Result] Polyamide chromatography was the best deproteinization method on polysaccharides from *Pleurotus ferulae*. The optimum decolorization technology was as follows: The content of polyamide was 60 g, and the polyamide column was eluted with 1.5 column volumes of deionized water at flow rate of 1.5 ml/min. Under this technology, the deprotein rate was 93.6%. Polysaccharides from *Pleurotus ferulae* had no antimicrobial activity of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* and had antibacterial activities against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* with minimum inhibitory concentration of 3.125, 6.250 and 3.125 mg/ml, respectively. The antibacterial activity was positively correlated with polysaccharides concentration. [Conclusion] Polyamide chromatography can be used for decolorization of polysaccharides from *Pleurotus ferulae*.

Key words Polysaccharides from *Pleurotus ferulae*; Polyamide chromatography; Decolorization; Antibacterial

阿魏菇(*Pleurotus ferulae*)又名阿魏侧耳、阿魏蘑,因其生长在新疆干旱草原上的草本植物阿魏上而得名。其子实体具有很高的营养价值和药用价值^[1]。研究发现阿魏菇多糖具有增强免疫力^[2]、抗炎^[3]等功效。目前关于阿魏菇多糖的提取大多采用水浴醇沉法^[4-5],多糖提取物中含有较多的杂质如蛋白质和色素,阿魏菇多糖的纯化是其精制过程中非常重要的一步,是研究其理化性质、生物活性和化学结构的基础。

为了获得纯度较高的阿魏菇多糖,笔者以新疆阿魏菇为原料,探讨阿魏菇多糖的聚酰胺层析脱色工艺,另外关于阿魏菇多糖的抑菌活性研究尚未见报道,所以笔者在阿魏菇多糖纯化的基础上,进一步探讨了其抑菌活性,旨在为开发阿魏菇多糖这一天然防腐剂奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 阿魏菇(购自乌鲁木齐南山),经新疆大学生命科学与技术学院微生物教研室鉴定为阿魏菇子实体。粉末活性炭(成都科龙试剂公司);树脂 S-8(天津南开大学

化工厂);聚酰胺(中国医药集团上海化学试剂公司);葡萄糖、苯酚、氯仿、正丁醇、三氯乙酸、葡萄糖、苯酚、浓硫酸、95%乙醇等均为分析纯。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)由常熟理工学院微生物实验室提供。细菌培养基、酵母培养基(YPD 培养基)和霉菌马铃薯培养基(PDA 培养基)参照文献[6]配制。

1.2 主要仪器 RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器公司);DJ-04 粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司);752 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);LD4-ZA 型离心机(北京医用离心机厂);SHB-B 循环水式真空泵(郑州长城科工贸公司);LGJ-10 冷冻干燥仪(南京百思威科技有限公司);UV2102 PCS 紫外扫描仪(上海精密仪器有限公司);DHP-90 不锈钢电热恒温培养箱(上海索普机械有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 阿魏菇粉的制备。新鲜阿魏菇在 50 ℃ 条件下真空干燥后粉碎,过 80 目筛,得到预处理的阿魏菇粉。

1.3.2 阿魏菇多糖的提取。称取阿魏菇粉 5 g,放入 250 ml 的三角瓶中,加入 200 ml 水,在 80 ℃ 条件下提取 3 h,然后冷却,将提取液离心(4 000 r/min,15 min),弃去沉淀,将上清液

基金项目 2013 年新疆维吾尔自治区科技援疆项目计划(指令性)项目(2013911071)。

作者简介 张伟丰(1988-),男,河南郑州人,硕士研究生,研究方向:食品加工。*通讯作者,副教授,硕士生导师,从事食品加工方面的研究。

收稿日期 2015-03-30

减压浓缩,按体积比 1:4 加入 95% 乙醇,4℃ 条件下过夜,弃去上层液体,将沉淀冷冻干燥得到阿魏菇多糖。

1.3.3 多糖含量测定。采用苯酚-硫酸法^[7]。

1.3.4 蛋白质含量测定。采用福林-酚法^[8]。

1.3.5 阿魏菇多糖脱蛋白方法。

1.3.5.1 三氯乙酸法。称取 20 mg 阿魏菇多糖,加入蒸馏水配制成 10% 的多糖溶液,然后向多糖溶液加入三氯醋酸(3%),直至溶液不再继续浑浊为止,4℃ 条件下放置过夜,然后离心(1 000 r/min,15 min),弃去沉淀,测定上清液中的蛋白质和多糖含量,根据下列公式计算多糖保留率和蛋白质脱除率。

$$\text{多糖保留率} = \frac{\text{脱蛋白后的多糖质量}}{\text{未脱蛋白前的多糖质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{蛋白脱除率} = \frac{\text{未脱前的蛋白质质量} - \text{脱除后的蛋白质质量}}{\text{未脱前的蛋白质质量}}$$

$$\times 100\% \quad (2)$$

1.3.5.2 Seville 法。称取 20 mg 阿魏菇多糖,加入蒸馏水配制成 10% 的多糖溶液,按照阿魏菇多糖溶液的 1/4 体积加入 Seville 试剂(氯仿:正丁醇=4:1),在 25℃ 下混合振荡 40 min,然后离心(1 000 r/min,15 min)去沉淀,将上清液再按上述比例加入 Seville 试剂,重复操作 5 次,测定上清液中的蛋白质含量和多糖含量,根据公式(1)和(2)计算多糖保留率和蛋白质脱除率。

1.3.5.3 聚酰胺层析法。称取 80 g 聚酰胺,倒入一定量的去离子水加热 20 min,然后装层析柱(4 cm×58 cm),最后用去离子水洗脱平衡。称取 20 mg 阿魏菇多糖,加入去离子水配制成 10% 的多糖溶液,将多糖溶液上柱,用去离子水洗脱,测定洗脱液中的蛋白质含量和多糖含量,根据公式(1)和(2)计算多糖保留率和蛋白质的脱除率。

1.3.6 阿魏菇多糖聚酰胺层析脱色条件的优化。

1.3.6.1 聚酰胺用量对脱色效果的影响。称取 20 mg 阿魏菇多糖,加入去离子水配制成 10% 的多糖溶液,然后分别将 20、40、60、80、100 g 的聚酰胺倒入一定量的去离子水中加热 20 min,分别装层析柱(4 cm×58 cm),去离子水洗脱平衡。分别将多糖溶液加入聚酰胺层析柱中进行吸附,1 倍柱体积的去离子水以 1.0 ml/min 的流速进行洗脱,359 nm 处测定多糖原液和洗脱液吸光值,计算脱色率,根据公式(3)计算脱色率^[9-10],苯酚-硫酸法检测多糖,根据公式(1)计算多糖保留率,探讨聚酰胺用量对脱色效果的影响。

$$\text{脱色率} = \frac{\text{脱色前 } A_{359} - \text{脱色后 } A_{359}}{\text{脱色前 } A_{359}} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.6.2 去离子水用量对脱色效果的影响。称取 20 mg 阿魏菇多糖,加入去离子水配制成 10% 的多糖溶液,然后添加到 80 g 的聚酰胺柱(40 cm×580 mm)中进行吸附,用 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 倍柱体积的去离子水以 1.0 ml/min 的流速进行洗脱,分别计算脱色率和多糖保留率,探讨去离子水用量对脱色效果的影响。

1.3.6.3 洗脱速度对脱色效果的影响。称取 20 mg 阿魏菇多糖,加入去离子水配制成 10% 的多糖溶液,然后添加到 80

g 的聚酰胺柱(40 cm×580 mm)中进行吸附,以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml/min 的流速进行洗脱,分别计算脱色率和多糖保留率,探讨洗脱速度对脱色效果的影响。

1.3.7 紫外光谱检测。称取 20 mg 阿魏菇多糖,加入去离子水配制成 10% 的多糖溶液,在聚酰胺层析脱色最佳条件下,将阿魏菇多糖溶液上聚酰胺层析柱,蒸馏水进行洗脱,紫外光谱对洗脱液进行扫描(波长范围:190~800 nm),探讨聚酰胺层析对阿魏菇多糖蛋白质的去除效果,根据公式(2)计算蛋白质脱除率。

1.3.8 阿魏菇多糖的抑菌活性。

1.3.8.1 菌种活化与菌悬液制备^[11]。将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌接种到细菌培养基中,置于 37℃ 恒温振荡培养 24 h;将黑曲霉和酿酒酵母分别接种到 PDA 培养基和 YPD 培养基中,28℃ 下培养 48 h,长出菌落后,分别挑取活化后的菌种放入 9 ml 无菌生理盐水中,振荡摇匀制备菌悬液,浓度约为 10⁷ CFU/ml 备用。

1.3.8.2 抑菌试验。用无菌水配制成质量浓度为 100 mg/ml 的阿魏菇多糖溶液。分别稀释成 50.000、25.000、12.500、6.250、3.125 mg/ml 系列质量浓度溶液。取供试菌悬液 0.1 ml (浓度约为 10⁷ CFU/ml)置于倒好培养基的培养皿中,放入牛津杯,向牛津杯中加入不同质量浓度的多糖溶液 150 μl,每个质量浓度 3 次重复,同时用无菌水作对照。细菌于 37℃ 培养 48 h,真菌于 28℃ 培养 72 h,用游标卡尺测定抑菌圈直径,出现抑菌圈所对应的阿魏菇多糖浓度即为最小抑菌圈浓度。

2 结果与分析

2.1 阿魏菇多糖脱蛋白方法选择 三氯乙酸法、Seville 法和聚酰胺吸附柱层析法对阿魏菇多糖中的蛋白脱除效果见图 1。从图 1 可以看出,三氯乙酸法蛋白脱除率和多糖保留率都较低,易引起多糖的降解。Seville 法脱除蛋白次数较多(6 次),导致多糖损失较多,聚酰胺吸附柱层析法具有较好的脱除蛋白效果,蛋白脱除率达 90.8%,且对多糖影响较小,多糖保留率较高,达到 88.6%,所以选择聚酰胺吸附柱层析法作为阿魏菇多糖脱蛋白的方法。

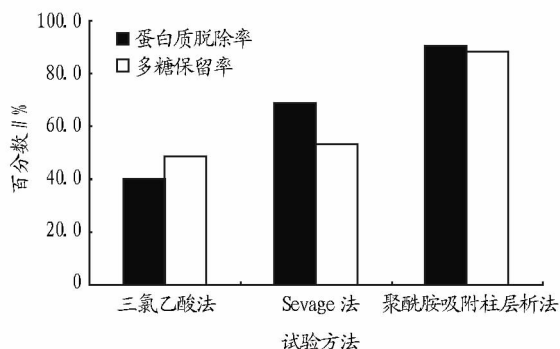


图 1 阿魏菇多糖不同脱蛋白方法的比较

2.2 阿魏菇多糖的脱色

2.2.1 聚酰胺用量对脱色效果的影响。聚酰胺用量对阿魏菇多糖脱色效果的影响见图 2。从图 2 可以看出,随着聚酰胺用量的增加,脱色率逐步增大,多糖的保留率逐渐下降,当

聚酰胺用量超过 60 g,多糖脱色率变化不大,但多糖的保留率有较大下降,为了尽可能多地保留多糖,节约处理费用,确定聚酰胺用量为 60 g(粗多糖的 3 000 倍)。

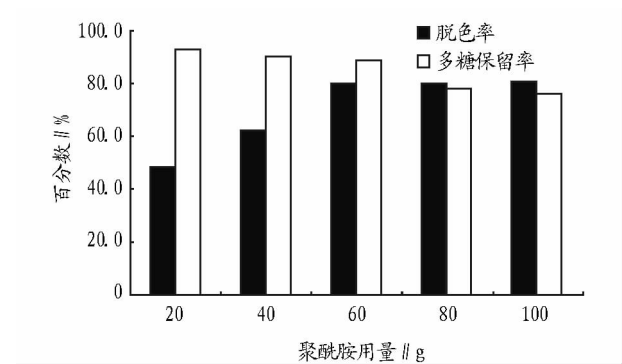


图2 聚酰胺用量对阿魏菇多糖脱色效果的影响

2.2.2 去离子水用量对脱色效果的影响。去离子水用量对脱色效果的影响见图3。从图3可以看出,随着洗脱体积的增加,阿魏菇多糖脱色率逐步下降,但多糖保留率逐渐增加,当洗脱体积达到 1.5 倍柱体积时,其脱色率达到 51.2%,多糖保留率为 88.2%,洗脱体积大于 1.5 倍柱体积时,多糖保留率变化不大,因此选用 1.5 倍柱体积的去离子水进行洗脱。

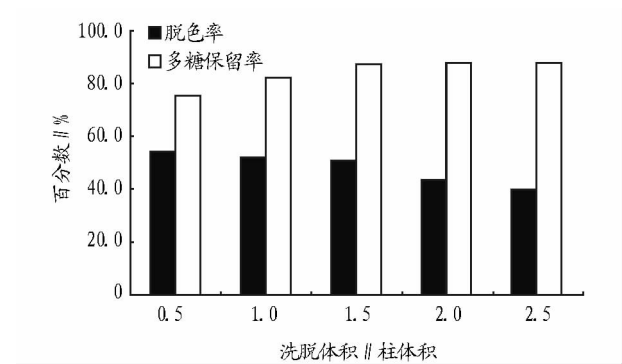


图3 洗脱体积对阿魏菇多糖脱色效果的影响

2.2.3 洗脱速度对脱色效果的影响。洗脱速度对脱色效果的影响见图4。从图4可以看出,洗脱速度对脱色率没有明显影响,但随着洗脱速度的增大,多糖的保留率逐渐减小,当洗脱速度大于 1.5 ml/min 时,多糖的保留率变化不大。由于洗脱速度越小,耗时越长,所以选择的洗脱速度为 1.5 ml/min。

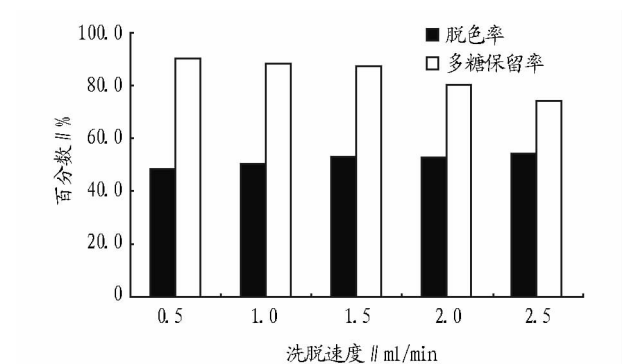


图4 洗脱速度对阿魏菇多糖脱色效果的影响

2.3 紫外光谱分析 阿魏菇多糖脱蛋白前后的紫外光谱分别见图5和图6。从图5和图6可以看出,阿魏菇粗多糖在 280 nm 处有一个较为明显的吸收峰,经过聚酰胺色谱柱处理之后,这个峰消失,经福林-酚法^[7]测定后,蛋白质脱除率达到 93.6%。

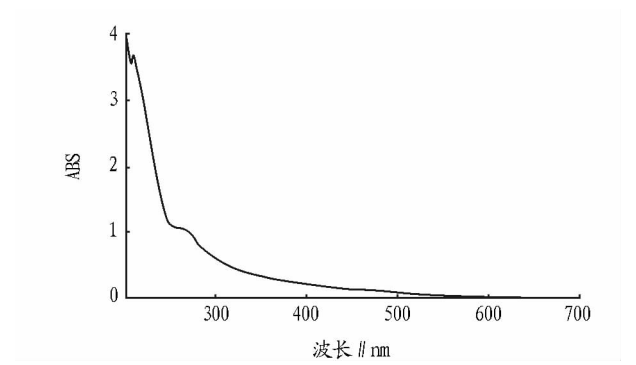


图5 阿魏菇粗多糖的紫外光谱

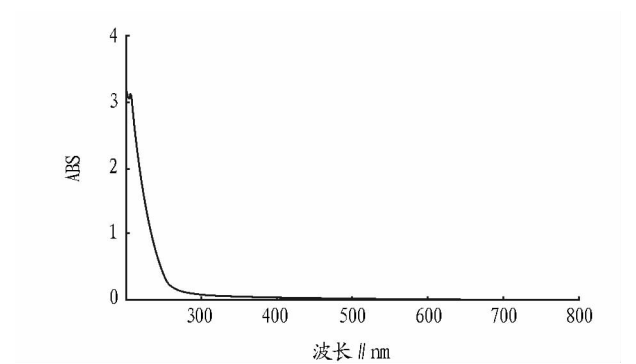


图6 经过聚酰胺色谱柱处理之后阿魏菇多糖的紫外光谱

2.4 阿魏菇多糖的抑菌活性 阿魏菇多糖的抑菌效果见表1。从表1可以看出,阿魏菇多糖对黑曲霉和酿酒酵母没有抑菌活性,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑菌作用,且抑菌活性与多糖质量浓度呈正相关关系,其中对金黄色葡萄球菌抑制作用最强,对大肠杆菌的抑制作用最弱。阿魏菇多糖对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度为 3.125 mg/ml,对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 6.250 mg/ml。

3 结论

(1)该研究确定聚酰胺吸附柱层析法作为阿魏菇多糖脱蛋白的最佳方法。

(2)聚酰胺柱层析对阿魏菇多糖脱色的最佳工艺条件:聚酰胺用量为粗多糖的 3 000 倍,聚酰胺柱用 1.5 倍柱体积的去离子水以 1.5 ml/min 的流速进行洗脱,在此工艺条件下,蛋白质脱除率达到 93.6%。

(3)阿魏菇多糖对黑曲霉和酿酒酵母没有抑菌活性,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑菌作用,且抑菌活性与多糖质量浓度呈正相关关系,其中对金黄色葡萄球菌抑制作用最强,对大肠杆菌的抑制作用最弱。阿魏菇多糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度为 3.125、6.250 和 3.125 mg/ml。

kg/hm²,有效成分为 2.5 g/m²;喷施试验药剂为 300 g/hm² 72% 农用链霉素 + 300 g/hm² 70% 甲基托布津的复配剂;喷药方式分为初花期喷 1 次、初花期与盛花期各喷 1 次的 2 种方式),结果表明在 9 个处理中以生石灰 + 喷药 2 次处理最好,五氯硝基苯 + 喷药 2 次次之,盛花期和成熟期发病植株(青枯病、枯萎病、芝麻茎点枯病)分别较土壤不处理 + 不喷药处理降低 15.6%、13.1% 和 18.9%、14.7%,产量分别提高 12.8%、10.6% 和 16.0%、12.6%;土壤消毒剂以生石灰最好,五氯硝基苯次之,盛花期发病(青枯病、枯萎病、芝麻茎点枯病)植株分别较土壤不处理降低 11.8% 和 9.6%,产量分别提高 10.8% 和 7.6%。

5 产量结构

2014 年 8 月 30 日,江西省科技厅和南昌市科技局组织有关专家对南昌市农业科学院承担的项目在进贤县高产示范方进行了现场考察与测产。该示范方种植的品种为金黄麻,播种方式为撒播,项目区面积为 1.04 hm²,平均种植密度为 28.35 万株/hm²,每株蒴果数 49.1 个,果粒数 58.39 粒,按照区试结果千粒重 2.60 g 计算,理论产量为 2 028 kg/hm²,折合实际产量为 1 521 kg/hm²。经调研,黑芝麻撒播种植的最高产量为 2 142.40 kg/hm²,平均种植密度 28.80 万株/hm²,每株蒴果数 47.5 个,果粒数 58.6 粒,千粒重 2.67 g。因此,大面积黑芝麻撒播生产,若要获得实际产量 1 500 kg/hm² 以上,其产量结构为平均株数 28.5 万 ~ 29.5 万株/hm²,每株蒴果数 48 ~ 50 个,果粒数 58 ~ 60 粒,千粒重 2.60 g 以上。

6 主要农艺措施

综上所述,深旋耙平理畦和撒播芝麻种后结合浅旋盖耕是大面积黑芝麻高产高效生产的有效途径。大面积黑芝麻撒播生产,若要获得实际产量 1 500 kg/hm² 以上,其平均种植密度应为 28.5 万 ~ 29.5 万株/hm²,每株蒴果数 48 ~ 50 个,果粒数 58 ~ 60 粒,千粒重在 2.60 g 以上。实现其产量的主要农艺措施为:应用高产抗病性好的优良新品种赣芝 6 号和赣芝 7 号等新品种或选用抗病性强、经过提纯复壮的金黄麻地方老品种,前作最好是空白或油菜,选用未种过芝麻的新地,避免使用连作 1 年以上旱地,在 6 月中旬前播种,早播有利于提高单产,播种量为 5.25 ~ 7.50 kg/hm²,墒情好、早播,播种量少,否则应适当加大播种量。结合深旋耕,施用 45% 的三元复合肥 450 kg/hm² 和硫酸锌 7.5 kg/hm² 作为底肥,撒施生石灰 1 125 kg/hm² 进行土壤消毒,增加中微量元素。苗期、初花期分别喷施浓度为 0.2% 硼肥 5 750 kg/hm²。在芝麻始花期以后,连续 2 次(间隔 7 d)喷施 300 g/hm² 农用链霉素 + 450 g/hm² 甲基托布津能较好防治黑芝麻病害的发生。

参考文献

[1] 汪瑞清,肖运萍,魏林根,等.江西红壤旱地黑芝麻新品种(系)比较试验[J].江西农业学报,2011,23(4):27-29.
[2] 张冬仙,乐美旺,饶月亮,等.我省芝麻生产现状和高产栽培关键技术[J].江西农业科技,2002(3):23-25.
[3] 范芳.江西红壤旱地黑芝麻高产栽培技术[J].江西科学,2013,31(6):768-771.
[4] 王苏影,颜廷献,徐宝庆,等.配施硼、锌肥及施用方法对芝麻生长及产量的影响[J].江西农业学报,2014,26(12):35-37.
[5] 葛洪滨,颜小文,胡金和,等.红壤旱地黑芝麻茎点枯病药剂防效研究[J].安徽农业科学,2014,42(10):2964-2965.

(上接第 35 页)

菌种	表 1 阿魏菇多糖对各菌种的抑菌效果						mm
	阿魏菇多糖质量浓度//mg/ml						
	无菌水	3.125	6.250	12.500	25.000	50.000	
金黄色葡萄球菌	-	12.55 ± 0.25	13.47 ± 0.44	15.25 ± 0.32	16.02 ± 0.29	16.23 ± 0.36	
大肠杆菌	-	-	9.54 ± 0.24	10.59 ± 0.21	11.84 ± 0.31	12.34 ± 0.35	
枯草芽孢杆菌	-	10.10 ± 0.26	10.13 ± 0.24	11.31 ± 0.45	13.11 ± 0.30	13.27 ± 0.34	
黑曲霉	-	-	-	-	-	-	
酿酒酵母	-	-	-	-	-	-	

注:数据为抑菌圈直径,数值为 3 次试验的平均值,“-”表示未显示抑菌活性。

参考文献

[1] 刘冰,许程剑,王月香,等.阿魏菇多糖的分离纯化与结构分析[J].食品研究与开发,2014,35(8):69-72,85.
[2] 巩平,杨琳,王冬慧,等.阿魏菇多糖对荷瘤小鼠机体免疫功能的影响研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(12):2482-2484.
[3] 丛媛媛,帕丽达·阿不力孜,米仁沙·牙库甫,等.阿魏菇多糖的急性毒性及抗炎实验研究[J].亚太传统医药,2013,9(2):7-8.
[4] 杨清香,潘锋,童军茂.阿魏菇子实体粗多糖提取的研究[J].食品科技,2007(12):90-93.
[5] 肖浩,郑小江.响应面法优化发酵藤茶黄酮和多糖的提取工艺[J].湖北民族学院学报:自然科学版,2013(2):132-137.
[6] 袁丽红.微生物学实验[M].北京:化学工业出版社,2010.
[7] 杨祖英.食品检验[M].北京:化学工业出版社,2001.
[8] LOWRY O H,ROSEBROUGH N J,FARR A L,et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Journal of Biology Chemistry,1951,193:265-275.
[9] 王维香,王晓君,黄潇,等.川芎多糖脱色方法比较[J].离子交换与吸附,2010,26(1):74-82.
[10] 彭友舜,韩占霞,李嘉明.芦笋多糖活性炭法脱色工艺[J].河北科技师范学院学报,2014(2):15-20.
[11] 李湘利,刘静,燕伟,等.芡实多糖的抗氧化活性及抑菌特性[J].食品与发酵工业,2014,40(11):104-108.