

九州虫草菌丝体多糖 Ck₃-A 的分离纯化 及其理化性质研究

王延兵 张长铠

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南, 250100)

摘 要 以九州虫草(*Cordyceps kyushuensis*, Kobayasi) 发酵菌丝体为试验材料, 采用水提法得到九州虫草菌丝体粗多糖。粗多糖经酶法结合 Sevag 法除蛋白、H₂O₂ 法脱色、透析、分级沉淀得到 Ck₃, Ck₃ 经 DE-23 柱层析得到多糖 Ck₃-A。经紫外扫描、聚丙烯酰胺凝胶电泳、Sephacrose 4B 柱层析等方法检测确定 Ck₃-A 为均一组分。用苯酚-硫酸法测得 Ck₃-A 的含糖量为 73.1%, 硫酸-咔唑法测得 Ck₃-A 含有微量的葡萄糖醛酸。Sephacrose 4B 柱层析测得 Ck₃-A 的分子量为 92 500 u。红外光谱结果显示 Ck₃-A 含有 α -型糖苷键。

关键词 九州虫草 菌丝体多糖 纯化 理化性质

目前的研究发现真菌多糖可以作为广谱免疫促进剂, 具有免疫调节作用; 具有抗感染、抗放射、抗凝血作用; 能够降血糖、降血脂, 促进核酸与蛋白质的生物合成, 还能够控制细胞分裂和分化, 调节细胞的生长和衰老^[1]。

九州虫草(*Cordyceps kyushuensis*, Kobayasi) 是本实验室 1996 年在山东蒙山发现的一种寄主为豆天蛾(*Clanis bilineata* Walker) 幼虫的虫草。有关九州虫草菌丝体多糖的研究未见报道, 本研究首次以九州虫草菌丝体为材料, 提取纯化了九州虫草菌丝体多糖 Ck₃-A, 并对其理化性质进行了初步的研究, 为九州虫草菌丝体多糖的进一步研究和利用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌 种

九州虫草(*Cordyceps kyushuensis*, Kobayasi), 采自山东蒙山, 经中国科学院微生物研究所郭英兰研究员鉴定确认。其无性型菌种由山东大学生命科学院菌种室提供。

1.2 试 剂

DEAE-23、Sephacrose 4B、标准多糖 Dextran T-40、T-70、T-250、T-500 及蓝色葡聚糖 2000 均为 Pharmacia 公司产品, 其他为分析纯。

1.3 方 法

1.3.1 菌丝体培养物的获得

将九州虫草斜面种子接入摇瓶培养基, 24℃ 恒温 140 r/min 摇瓶培养 60 h, 10% 的接种量转接, 24℃ 恒温 140 r/min 摇瓶培养 72 h, 充分洗涤后抽滤得菌丝体, 60℃ 烘干至恒重粉碎备用。斜面培养基为 PDA 培养基^[2], 摇瓶培养基的组成为: 马铃薯 20%, 麸皮 5%, 蔗糖 2%, KH₂PO₄ 0.3%, MgSO₄ · 7H₂O 0.15%。

1.3.2 粗多糖的制备

菌丝体粉碎后加入约 3 倍体积的体积分数为 95% 乙醇脱脂 12 h, 离心除去乙醇, 残渣晾干, 加入约 20 倍体积蒸馏水, 90℃ 浸提 3 h, 重复提取 4 次, 上清液减压浓缩至小体积后加入约 3 倍体积的 95% 乙醇沉淀多糖, 过夜离心得沉淀, 以无水乙醇、丙酮、乙醚各洗涤 1 次, 真空干燥后得菌丝体粗多糖。

1.3.3 多糖的分离纯化

粗多糖溶液, 以酶法结合 Sevag 法^[3]脱

蛋白, H_2O_2 法^[4]脱色, 透析后以酸性乙醇分级沉淀出 Ck_1 和 Ck_2 2 个组分后, 将多糖溶液 pH 值调至中性, 继续加乙醇至醇浓度达 50%, 离心得 Ck_3 。 Ck_3 过 Sepharose 4B 柱层析, 苯酚-硫酸法^[5]检测糖分布。结果表明 Ck_3 峰形对称, 分子量分布范围较窄。利用 DEAE-23 柱层析进一步纯化 Ck_3 , 收集主糖峰透析、乙醇沉淀、干燥得菌丝体多糖 Ck_3 -A。

1.3.4 纯度检查

1.3.4.1 紫外扫描检测

配制 1 mg/mL 的 Ck_3 -A 溶液, 使用紫外可见记录光谱仪 UV-240 在波长 200 ~ 400 nm 范围内扫描。

1.3.4.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用连续电泳, 胶浓度为 7.5%^[6]。缓冲液为 20 mM、pH 9.3 的硼砂-NaOH 缓冲液, 样品浓度为 2 mg/mL, 加样量 20 μ L, 电压 100 V, 电泳 70 min, 以麝香草酚-硫酸法^[7]染色。

1.3.4.3 Sepharose 4B 柱层析

Ck_3 -A 10 mg 溶于 1 mL 质量分数 0.9% 的 NaCl 溶液, 上 Sepharose 4B 柱, 以质量分数 0.9% 的 NaCl 溶液洗脱, 从第 61 管开始自动部分收集, 0.21 mL/min, 用苯酚-硫酸法检测糖含量。

1.3.5 总糖含量测定

以苯酚-硫酸法测定。

1.3.6 葡萄糖醛含量测定

以硫酸-咔唑法^[8]测定。

1.3.7 分子量的测定

用 Sepharose 4B 柱, 以分子质量为 40 000、70 000、250 000 和 482 000 u 的多糖标准品 Dextran T-40、T-70、T-250、T-500 分别上柱, 0.9% 的 NaCl 溶液洗脱, 自动部分收集, 2.1 mL/10 min, 测得各自的洗脱体积 V_e , 用蓝色葡聚糖 200 (分子质量 > 200 ku) 测得柱外水体积 V_0 , 以 V_e/V_0 为纵坐标, $\lg M_w$ 为横坐标, 绘制标准曲线。样品 Ck_3 -A 在相同条件下上柱, 测量其 V_e 值, 利用标准曲线求得其分子量。

1.3.8 红外光谱

干燥的 Ck_3 -A 10 mg, 与 100 ~ 200 mg KBr 研碎后压片, Perkin-Elmer 783 型红外分光光度计在 4 000 ~ 400 cm^{-1} 段扫描。

2 结果与讨论

2.1 多糖的分离与纯化

Ck_3 过 DEAE-23 层析柱时, 糖峰主要出现在穿过峰部分 (见图 1), 收集穿过峰得到 Ck_3 -A。 Ck_3 -A 为白色粉末, 易溶于水, 不溶于乙醇、丙酮、乙醚等有机溶剂。

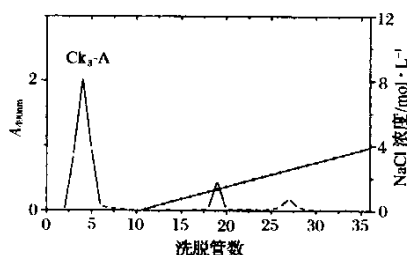


图 1 Ck_3 的 DE-23 洗脱曲线

2.2 纯度鉴定

2.2.1 紫外扫描检测

紫外扫描的结果 (见图 2) 显示, 在波长 260 nm 和 280 nm 处 Ck_3 -A 均无明显的吸收峰, 表明 Ck_3 -A 中不含核酸和蛋白质等杂质。

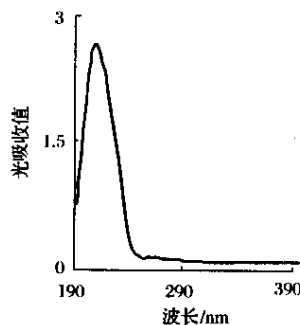


图 2 Ck_3 -A 的紫外吸收光谱

2.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Ck_3 -A 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 染色后显示为一红色窄带, 表明 Ck_3 -A 具有较高的纯度。

2.2.3 Sepharose 4B 柱层析

Ck_3 -A 的 Sepharose 4B 柱层析洗脱峰为

单峰(见图 3),并且峰形狭窄对称,证明 Ck₃-A 的分子量分布较为均一。

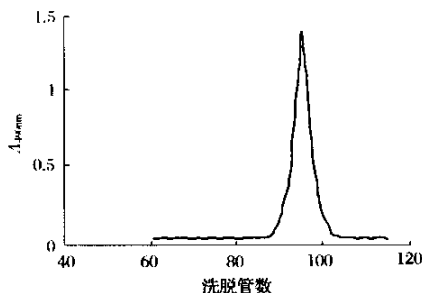


图 3 Ck₃-A 的 Sepharose 4B 洗脱曲线

以上结果可以证明, Ck₃-A 为均一的多糖,可以进一步进行结构研究。

2.3 总糖含量

采用苯酚-硫酸法测得 Ck₃-A 的含糖量为 73.1%(以葡萄糖计)。

2.4 葡萄糖醛酸含量

采用硫酸-咔唑法测得 Ck₃-A 含有微量的葡萄糖醛酸。

2.5 分子量

Sepharose 4B 柱层析测得 Ck₃-A 的洗脱体积为 122 mL。根据标准曲线 $y = 0.3524x + 3.1849$ ($R^2 = 0.9856$) 计算, Ck₃-A 平均分子量为 92 500 u。

2.6 红外光谱

Ck₃-A 的红外光谱图(见图 4),在 3 370 cm⁻¹附近均有 O—H 伸缩振动的强吸收峰,在 1 600 cm⁻¹附近和 1 200 ~ 1 010 cm⁻¹附近均有 C=O 的伸缩振动峰,以上均为多糖的特征吸收峰。在 839 cm⁻¹附近有明显的吸收峰,在 890 cm⁻¹附近无吸收峰,表明 Ck₃-A 含 α-型糖苷键。在 800 cm⁻¹及 876 cm⁻¹附近有明显的吸收峰,说明 Ck₃-A 可能含有甘露糖。

目前的研究发现真菌多糖的生物学活性与其结构有密切的关系,真菌多糖的功能活性与其三维空间的立体构型、分支程度、单糖间的苷键结合形式、取代基等均有一定的关系。对于 Ck₃-A 精细结构及其生物学活性的研究正在进行当中。

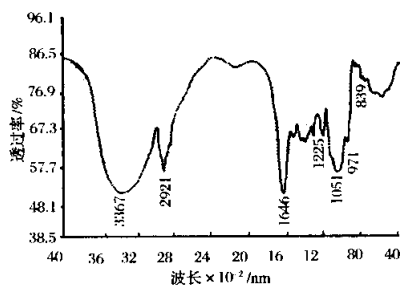


图 4 Ck₃-A 的红外光谱

3 结 果

采用摇瓶发酵制备了九州虫草菌丝体,用水提法得到九州虫草菌丝体粗多糖。粗多糖经酶法结合 Sevag 法除蛋白、H₂O₂ 法脱色、透析、分级沉淀、DE-23 柱层析得到多糖 Ck₃-A。经多种方法检测证明 Ck₃-A 为均一组分。Ck₃-A 的分子量为 92 500 u。红外光谱结果显示 Ck₃-A 含有 α-型糖苷键。

参 考 文 献

- 1 田庚元,冯宇澄.化学进展,1994,1(2):114~124
- 2 范秀容,李广武,沈萍.微生物学实验(第2版).北京:高等教育出版社,1998.262
- 3 张林维,吴东儒,赵帜平等.安徽大学学报(自然科学版),1996,20(3):95~100
- 4 张丽萍,汉丽萍,王月秋等.分子科学学报,1999,15(4):205~209
- 5 董群,郑丽伊,方积年.中国药理学杂志,1996,9:550~553
- 6 张惟杰.糖复合物生化研究技术(第3版).杭州:浙江大学出版社,1999.1~540
- 7 David Racusen. Anal. Biochem., 1979, 99:474~476
- 8 Bitter T, Muir H M. Anal. Biochem., 1962, 4:330~334

(下转第 36 页)

所产生的效果。

参 考 文 献

- 1 余伯良编. 微生物饲料生产技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 26 ~ 33
- 2 徐子伟, 汤志宏, 林纯洁等. 饲料工业, 1996, 17 (8): 13 ~ 15
- 3 刘仲敏, 何伯安, 曹友生等. 微生物学通报, 1995, 22 (6): 351 ~ 354
- 4 郭 勇. 酶工程. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 308 ~ 315
- 5 张 海, 冯成利, 房兴莉. 标准化报道, 1995, 16 (4): 37 ~ 38
- 6 中山大学生物系生化微生物学教研室. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1981. 64 ~ 65
- 7 张若寒. 中国饲料, 1997, 5: 30 ~ 32
- 8 张 军, 王爱军. 饲料工业, 1997, 18 (8): 21 ~ 22

Optimum Screening of Strains Fermenting Swine Blood Power

Chen Yu Fu Zujiao Mo Xiangtao Shi Hongjuan Xia Liquiu

(Department of Microbiology , College of Life Science , Hunan Normal University , Changsha 410081)

ABSTRACT 16 protease producing strains were screened from mouldy swine , and their multienzyme production ability was detected. Through blending some strains to culture , an optimum combination (*Aspergillus oryzae* AS100 , *Aspergillus oryzae* AS102 , *Saccharomyces cerevisiae* Y113 , *Bacillus* sp. Asp007) , which can yield numerous protease , amylase , CMCase , glucomylase , phytase , pectinase was chosen. Products of blood meal fermentation has strong soy flavor and contained 69 percent protein , abundance free amino acid and organic elements , this results strongly suggest that the strains are very fit to ferment blood meal.

Key words optimum combined strains , enzyme activity , blood meal fermentation

(上接第 27 页)

Isolation , Purification and Properties of A Polysaccharide Ck₃-A from *Cordyceps kyushuensis* Cultured Mycelium

Wang Yanbing Zhang Changkai

(The State Key Laboratory of Microbial Technology , Shandong University , Jinan , 250100)

ABSTRACT Crude polysaccharide were extracted from the cultured mycelium of *Cordyceps kyushuensis* with water. Ck₃ was obtained from crude polysaccharide after removing proteins (Sevag method) and color (H₂O₂ method.) dialysis and precipitation fractionation with alcohol. A polysaccharide Ck₃-A was isolated from Ck₃ by DEAE-23 chromatography. Its homogeneity was verified by UV scan , polyacrylamide gel electrophoresis and gel - filtration chromatography. Its carbohydrate content was 73.1% , and had little uronic acid. The average molecular weight of Ck₃-A was 92 500 Da. The results of IR showed that Ck₃-A had a α -glycoside linkage.

Key words *Cordyceps kyushuensis* , polysaccharide of cultured mycelium , purification , properties