

doi: 10.3969/j.issn.1672-3678.2010.01.011

利用傅立叶红外光谱和原子力显微镜研究超声提取对鸡腿菇多糖结构的影响

刘娜女¹, 张静², 李岱¹, 徐平平¹, 王博¹, 孙润广¹

(1. 陕西师范大学 物理学与信息技术学院 生物物理与生物医学工程实验室, 西安 710062;
2. 陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 西安 710062)

摘要:利用沸水浴法和超声辅助提取法提取鸡腿菇粗多糖, 分别得到对应的多糖水浴提取的多糖(WCP)和超声提取的多糖(UCP)。采用苯酚-硫酸法测得 WCP 和 UCP 中的总糖质量分数分别为 87.997% 和 72.937%。用季铵盐沉淀法和 Sephadex G-200 凝胶层析法对 WCP 和 UCP 进行分离纯化, 得 WCP3-1、UCP3-1 2 个主要组分, 用傅立叶红外光谱 (FTIR) 和原子力显微镜 (AFM) 对提取多糖的结构进行表征。结果显示: WCP3-1 和 UCP3-1 均具有一般多糖类物质的特征吸收峰, WCP3-1 和 UCP3-1 的单糖残基均以 β -吡喃环存在, 但超声波可导致部分 C=O 双键断裂形成 C—O 链接; WCP3-1 呈现大量的近似螺旋聚集体和少量球状聚集体, 但是 UCP3-1 是较小的分散球状聚集体, 说明超声波可断裂多糖的分子链间或链内氢键, 导致近似螺旋聚集体的降解。

关键词:鸡腿菇; 超声提取; 多糖

中图分类号: Q336

文献标志码: A

文章编号: 1672-3678(2010)01-0056-05

Effect of ultrasonic-assisted extraction on polysaccharide structure from *Coprinus comatus* characterized by FTIR and AFM

LU Na-n¹, ZHANG Jing², LI Dai¹, XU Ping-ping¹, WANG Bo¹, SUN Run-guang¹

(1. Laboratory of Biophysics and Biomedical Technology, College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. College of Food Engineering and Nutrition Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Polysaccharides were extracted from *Coprinus comatus* by boiling water process and ultrasonic-assisted process, the obtained polysaccharides were designated as WCP and UCP, respectively. The total sugars of WCP and UCP were 89.997% and 72.937% determined by phenol-sulfuric acid method. The crude polysaccharides were purified by CTAB and Sephadex G-200 in sequence, and the obtained ones were designated as WCP3-1 and UCP3-1. FTIR showed that there existed β -pyranoside in the polysaccharides and AFM showed that WCP3-1 on mica existed in spiral and spherical form, but UCP3-1 existed in spherical form. The ultrasonic collapse of cavitation bubbles generated intense shock waves that damaged the intrachain or interchain hydrogen bonds.

Key words: *Coprinus comatus*; ultrasonic extraction; polysaccharide

收稿日期: 2009-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10874108); 陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目 (SJ08A16)

作者简介: 刘娜女 (1985—), 女, 陕西渭南人, 硕士研究生, 研究方向: 食品及天然药物化学; 孙润广 (联系人), 教授, 博士生导师, E-mail: sunrun-guang@snnu.edu.cn

鸡腿菇 (*Coprinus comatus*) 学名毛头鬼伞, 又名鸡腿蘑, 属真菌门、担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、鬼伞科、鬼伞属。鸡腿菇中丰富的营养成分具有降血糖、降血脂、提高免疫活性、抗肿瘤及抑菌等一系列生物活性^[1-2], 被世界卫生组织及联合国粮农组织确定为集“天然、营养、保健”3种功能于一体的16种珍稀食用菌之一, 并被推荐进行大力推广^[3]。目前, 与香菇、灵芝等其他真菌相比, 鸡腿菇多糖的研究还比较少^[4]。涉及鸡腿菇多糖结构方面的报道很少, 亟待进一步深入研究。

对于多糖提取主要采用热水回流或浸提方法, 此方法耗时、耗能、并且提取率也不高。超声波萃取作为一种新型的提取方法, 具有提取率高、提取时间短等优点, 在多糖提取的应用中越来越广泛, 但是超声萃取是否影响多糖的结构及生物活性是一个值得研究的问题。

本试验采用傅立叶红外光谱 (FTIR) 和原子力显微镜 (AFM) 2种手段表征鸡腿菇多糖的结构, 并对比沸水浴提取法和超声辅助提取法 2种提取方法对鸡腿菇多糖结构的影响, 为进一步研究鸡腿菇多糖的理化性质、立体结构、构效关系以及工业化利用超声提取多糖研究提供必要的试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡腿菇购自西安朱雀农产品贸易中心; 苯酚、浓 H_2SO_4 、葡萄糖、硼酸、NaOH、乙酸、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、NaCl、盐酸羟胺、肌醇六乙酯、醋酸酐、葡萄糖等均为国产分析纯, 实验室用水为蒸馏水。

1.2 仪器

KQ3200型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), JY92⁻ 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技有限公司), HPX⁻ 9162MBE 数显电热培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), CF16RX 高速离心机 (日本日立公司), TU⁻ 1810 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司), EQU NX55 傅立叶变换红外光谱仪 (德国 Bruker 公司), Alpha⁻ 4 真空冷冻干燥机 (德国 Christ 公司), SEM⁻ 9500J3 原子力显微镜 (日本岛津)。

1.3 鸡腿菇粗多糖的提取方法

1.3.1 超声辅助提取法

超声辅助提取流程: 鲜鸡腿菇 烘干 粉碎

称质量 4倍体积 80% (体积分数, 下同) 乙醇脱脂 (20 min, 3次) 抽滤 烘干 称质量 10倍体积水溶 超声波提取 15 min (每次 10 s, 90次, 间隔 15 s, 功率 300 W), 重复提取 3次 离心 (转速 4 000 r/min, 10 min, 室温) 上清液 真空浓缩 醇沉 沉淀 透析 3 d 冷冻干燥 超声辅助法提取鸡腿菇粗多糖 (UCP)^[5]。

1.3.2 沸水浴提取法

沸水浴提取流程: 鲜鸡腿菇 烘干 粉碎 称质量 4倍体积 80%乙醇脱脂 (20 min, 3次) 抽滤 烘干 称质量 10倍体积水溶 沸水浴 2.5 h, 重复 3次 离心 (转速 4 000 r/min, 10 min, 室温) 上清液 真空浓缩 醇沉 沉淀 透析 3 d 冷冻干燥 沸水浴法提取鸡腿菇多糖 (WCP)^[6]。

2 结果与讨论

2.1 鸡腿菇粗多糖的总糖含量测定

对鸡腿菇粗多糖 WCP 和 UCP 应用紫外分光光度计进行光谱扫描, 结果表明 WCP 吸收峰波长: 199.00 nm, $A_{199} = 1.747$; UCP 吸收峰波长: 205.00 nm, $A_{205} = 1.922$; 2种多糖均呈现单一吸收波长, 且在 260 nm、280 nm 均未出现吸收峰, 根据文献 [5], 说明鸡腿菇多糖 WCP 和 UCP 均无蛋白质、多肽及核酸的存在。按照文献 [7] 采用苯酚-硫酸法测定试样中的总糖含量。

2.1.1 葡萄糖标准曲线的绘制

1) 精密称取 105 干燥至恒质量的葡萄糖 20 mg, 加水溶解定容于 100 mL 容量瓶中, 摇匀, 即得到 0.2 mg/mL 葡萄糖标准溶液。

2) 称取 5 苯酚, 加蒸馏水溶解, 定容于 100 mL 棕色容量瓶中, 备用。

3) 精密吸取 7.5、15.0、22.5、30.0 和 37.5 mL 的上述葡萄糖标准溶液, 分别在 6 个 50 mL 容量瓶中加水定容 (第 1 个容量瓶中葡萄糖标准溶液为 0 mL, 作为空白对照), 此时各容量瓶中的溶液质量浓度为 0、0.03、0.06、0.09、0.12 和 0.15 mg/mL。在 6 只试管中分别吸取上述溶液各 0.2 mL 并加苯酚溶液 0.4 mL, 边摇拌边迅速滴加浓 H_2SO_4 2 mL, 室温放置 30 min, 用紫外分光光度计于 488 nm 处测定吸光度 (A_{488})。以葡萄糖质量浓度 () 为横坐标, 各质量浓度的吸光值 (A_{488}) 为纵坐标绘标准曲线, 得回归方程

$$A_{488} = 0.0054 + 0.0002 R^2 = 0.9998$$

2.1.2 试样中总糖含量的测定

分别精确称取已干燥的鸡腿菇粗多糖 WCP 和 UCP 各 0.050 g, 加水溶解并定容至 50 mL, 得 1 mg/mL 试样母液。吸取试样母液 1 mL 于容量瓶中并定容至 25 mL 得 0.04 mg/mL 试样溶液。吸取上述试样溶液 0.2 mL 如 2.1.1 步骤操作, 测定吸光度。以蒸馏水代替试样溶液作为参照, 由回归方程计算试样中多糖含量。

据回归方程计算得沸水浴法提取鸡腿菇粗多糖 WCP、超声辅助法提取鸡腿菇粗多糖 UCP 的多糖质量分数分别为 87.997% 和 72.937%。试验表明, 超声辅助法提取鸡腿菇粗多糖 UCP 的多糖含量小于沸水浴法提取鸡腿菇粗多糖 WCP, 可能由于超声处理断裂了多糖链末端或支链的寡聚糖, 使其在透析处理的过程中随小分子物质流出透析袋。

2.2 鸡腿菇多糖的分离纯化

2.2.1 季铵盐沉淀法纯化 WCP 和 UCP

根据长链季铵盐能与酸性多糖形成不溶性多糖化合物的特性, 可分离酸性和中性多糖。本试验采用季铵盐沉淀法分离纯化鸡腿菇多糖。

1) 多糖酸性亚组分的提取 分别取 5 g 冻干后的 WCP 和 UCP 粉末溶于 40 mL 蒸馏水, 加入质量分数 5% 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 50 mL, 产生沉淀, 静置 12 h 后 4 000 r/min, 4 离心 20 min 收集沉淀。沉淀用质量分数 10% NaCl 溶解后, 加入 3 倍体积 95% 乙醇, 产生沉淀, 4 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。加入蒸馏水溶解透析 3 d (截留相对分子质量为 8 000 的透析袋), 冷冻干燥, 分别得鸡腿菇多糖亚组分 WCP1 (0.986 g)、UCP1 (0.597 g)。

2) 多糖中性亚组分的提取 CTAB 处理后的上清液用质量分数为 1% 的 H_3BO_3 调节至 pH 为 6.0, 然后用浓度为 2 mol/L 的 NaOH 调节 pH 为 11.0, 产生沉淀, 4 000 r/min, 4 离心 20 min, 收集沉淀。用质量分数为 10% 的 NaCl 溶解, 然后用质量分数为 2% 的乙酸调节 pH 为 7.0, 再加入 3 倍体积 95% 的乙醇沉淀并离心收集沉淀, 沉淀用蒸馏水溶解, 透析 3 d, 冷冻干燥得少量鸡腿菇中性亚组分多糖 UCP2 (0.335 g)。WCP 中未发现中性亚组分多糖。

3) 多糖碱性亚组分的提取 提取中性亚组分多糖后的上清液, 用乙酸调至 pH 为 4.4, 加入 3 倍体积的 95% 乙醇, 4 静置 24 h, 4 000 r/min, 4

离心 20 min 收集沉淀, 沉淀用蒸馏水溶解, 透析 3 d, 冷冻干燥得到相对大量的碱性亚组分多糖 WCP3 (2.029 g)、UCP3 (2.007 g)。

2.2.2 WCP3 和 UCP3 的进一步纯化

选择相对含量较大的 WCP3 和 UCP3 进行进一步纯化和研究。利用 Sephadex G⁻ 200 柱层析对多糖 WCP3 和 UCP3 进一步纯化, 结果如图 1 所示。收集组分得 WCP3⁻ 1 和 UCP3⁻ 1, 凝胶柱层析纯化结果为单一峰, 表明 WCP3 和 UCP3 为分子量较均一的多糖。

2.3 WCP3⁻ 1 和 UCP3⁻ 1 的傅立叶变换红外光谱分析

取已干燥的鸡腿菇多糖 WCP3⁻ 1 和 UCP3⁻ 1 少量, 与适量干燥 KBr 粉末混合后置于玛瑙研钵中, 研磨至极细, 压片后测定红外光谱, 扫描范围 4 000 ~ 400 cm^{-1} 。

WCP3⁻ 1 和 UCP3⁻ 1 的红外光谱均表现出一类多糖类物质的特征吸收峰: 3 406 cm^{-1} 、3 409 cm^{-1} 附近的宽峰为分子间 O—H 键的伸缩振动, 信号强; 2 929 cm^{-1} 附近肩峰为饱和 C—H 键的伸缩振动, 强度弱; 根据文献 [8] 对红外光谱吸收峰的归属, 1 634、1 631 cm^{-1} 处的吸收峰为 N—H 键的变角振动峰, 是 CH_3CONH- 的酰胺 I 谱带, 表明是 α -多晶型; 1 385 cm^{-1} 、1 388 cm^{-1} 为 C—H 的变角振动, 为糖类化合物的特征峰; 根据文献 [9] 对红外光谱吸收峰的归属, 表明 1 250 ~ 950 cm^{-1} 之间出现的宽峰是吡喃糖环醚键和羟基的伸缩振动; 根据文献 [10 - 11] 对红外光谱吸收峰的归属, 表明 930 cm^{-1} 为吡喃环的非对称环伸缩振动, 840 cm^{-1} 处无吸收峰说明多糖含 α -糖苷键, 不含 β -糖苷键。由此表明, WCP3⁻ 1 和 UCP3⁻ 1 的单糖残基均以 α -吡喃环存在。

在 UCP3⁻ 1 的红外光谱图中 1 420 cm^{-1} 处为分子中 C—O 伸缩振动, 而在 WCP3⁻ 1 的红外光谱图中没有这一吸收峰, 说明超声辅助提取法得 UCP3⁻ 1 分子中存在 C—O 链接, 而沸水浴提取法所得 WCP3⁻ 1 中没有 C—O 链接。由此推测: 超声波可能导致部分 C=O 双键断裂形成 C—O 链接。这是一个十分有趣的问题, 值得进一步研究和证实。

2.4 WCP3⁻ 1 和 UCP3⁻ 1 的原子力显微镜观察

将 WCP3⁻ 1 和 UCP3⁻ 1 分别用蒸馏水溶解至 10 $\mu g/mL$, 用移液枪吸取 0.5 μL , 均匀滴于玻璃载片上, 室温风干 20 min 左右。用 SPM-9500J3 原子

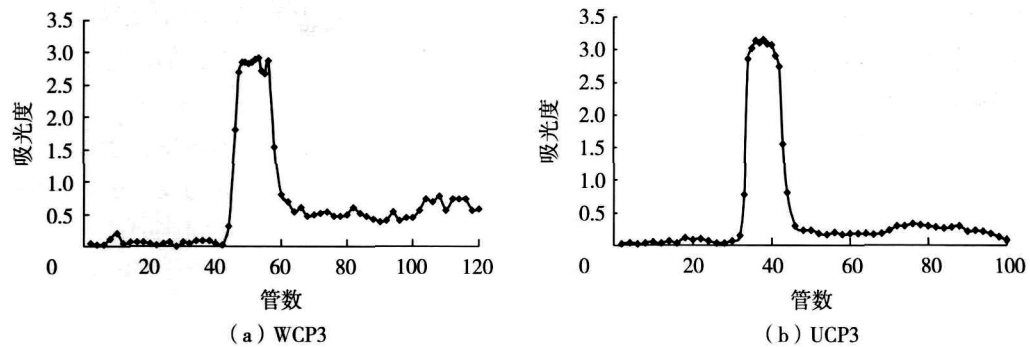


图 1 经 Sephadex G-200 层析后的 WCP3 和 UCP3 色谱图

Fig 1 Sephadex G-200 column chromatography of WCP3 and UCP3

力显微镜常温常压下观察^[12-13],结果见图 2。

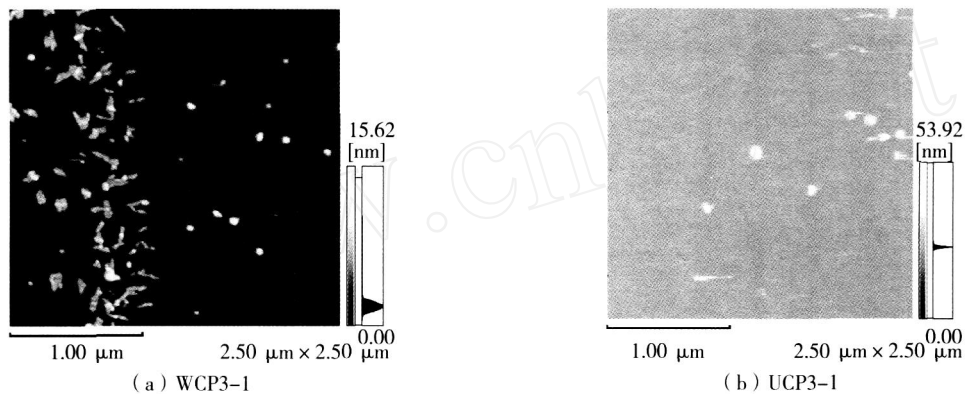


图 2 WCP3-1 和 UCP3-1 的原子力显微镜图 (平面图)

Fig 2 AFM images of WCP3-1 and UCP3-1

由图 2 可知:相同质量浓度的鸡腿菇多糖组分 WCP3-1 和 UCP3-1,在相同的视场范围 ($2.50 \mu\text{m} \times 2.50 \mu\text{m}$) 内观察所得图像差异很大:沸水浴法提取 WCP3-1 大部分在云母片上呈现近似棒状螺旋结构,只有少部分呈单个分散状;而超声辅助提取法提取 UCP3-1 在云母片上呈稀疏的分散聚集状。图 2(a) 为 WCP3-1,其分子排列紧密,且大小形状不一,有大量的近似棒状螺旋状聚集体和少量球状聚集体;图 2(b) 为 UCP3-1,其分子排列疏散,且大小均一,均为较小的球状聚集体。

3 结 论

1) 超声辅助提取法会破坏糖链,尤其是糖链中较易断裂的末端结构。研究显示超声波可能会断裂链上的 $\text{C}=\text{O}$ 为 $\text{C}-\text{O}$,破坏糖链上的 $-\text{COOH}$ 基团,导致暴露多糖链外的酸性糖转化为中性糖。

2) 超声辅助提取可破坏多糖的近似棒状螺旋

结构。由于多糖分子链间或链内氢键的作用可使多糖分子发生自缔合,形成不同形状的聚集体。超声空化气泡的瞬间崩塌产生强烈的冲击波,破坏了支撑多糖结构的分子链间或链内氢键,导致了多糖近似棒状螺旋聚集体的降解。

超声辅助法提取多糖对生物活性的影响也是一个值得研究的问题,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴巧凤,刘敬娟,陈京,等. 鸡腿菇营养成分的分析[J]. 食品营养, 2005, 26(8): 161-163.
Wu Qiaofeng, Liu Jingjuan, Chen Jing, et al Nutrient analysis of *Coprinus comatus*[J]. Food Nutrition, 2005, 26(8): 161-163.
- [2] 余杰,崔仕超,宋彩霞,等. 鸡腿菇子实体多糖分离纯化和光谱分析[J]. 汕头大学学报:自然科学版, 2009, 24(1): 45-49.
Yu Jie, Cui Shichao, Song Caixia, et al Purification and spectra analysis of polysaccharide from the sporophore of *Coprinus comatus* [J]. J. Shantou Univ: Natural Science, 2009, 24(1): 45-49.

- [3] 余杰, 崔鹏举, 陈美珍, 等. 鸡腿菇多糖的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13 (20): 84-86.
Yu Jie, Cui Pengju, Chen Meizhen, et al Progress of researches on polysaccharide [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2007, 13 (20): 84-86.
- [4] 邓功成, 陈江涛, 高礼安. 鸡腿菇多糖发酵条件优化研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (13): 3838-3839; 3855.
Deng Gongcheng, Chen Jiangtao, Gao Lian. Optimization of fermentation conditions of *Coprinus comatus* [J]. Anhui Agric Sci, 2007, 35 (13): 3838-3839; 3855.
- [5] Zhang Mei, Zhang Lina, Keung Cheung Chi Peter, et al Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hotwater and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium* [J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 56 (2): 123-128.
- [6] 姚毓婧, 杨仁智, 张劲松, 等. 鸡腿菇子实体多糖分离纯化工艺及结构研究 [J]. 微生物学通报, 2007, 34 (6): 1071-1076.
Yao Yujing, Yang Renzhi, Zhang Jingsong, et al Optimum isolation and structural analysis of polysaccharide from the fruiting bodies of *Coprinus comatus* [J]. Microbiology, 2007, 34 (6): 1071-1076.
- [7] 宋学伟, 任磊, 韩泳平, 等. 大花红景天多糖 RCPS 分离纯化及单糖组成分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28 (3): 642-644.
Song Xuewei, Ren Lei, Han Yongping, et al Purification and composition analysis of polysaccharide RCPS from *Rhodiola crenulata* [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28 (3): 642-644.
- [8] 张惟杰. 多糖复合物生化研究技术 [M]. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 11; 112-120; 59-64; 193-198.
- [9] 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.
Liu Wei, Yu Yuanhua, Mao Yajie, et al Analysis on isolation, purification, component and structure of *Amillaria luteo-virens* [J]. Changchun Univ Sci Tech, 2007, 30 (2): 102-105.
- [10] 李伟欣, 陈倩, 李平兰, 等. 双歧杆菌 22-5 胞外多糖结构分析 [J]. 食品科学, 2008, 29 (4): 267-271.
Li Wei Xin, Chen Qian, Li Pinglan, et al Structural study on exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium* 22-5 [J]. Food Science, 2008, 29 (4): 267-271.
- [11] 王悦, 陈阿梅, 李秉超. 长白木根、茎、叶水溶性多糖的纯化及组成分析 [J]. 氨基酸和生物资源, 2007, 29 (2): 15-17; 35.
Wang Yue, Chen A mei, Li Bingchao. Purification and analysis of water soluble polysaccharides from root, stem and leaf of *Aralia continentalis* [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2007, 29 (2): 15-17; 35.
- [12] 孙润广, 张静. 甘草多糖螺旋结构的原子力显微镜研究 [J]. 化学学报, 2006, 64 (24): 2467-2472.
Sun Runguang, Zhang Jing. A study of helical structure of glycyrrhiza polysaccharides by atomic force microscope [J]. Acta Chimica Sinica, 2006, 64 (24): 2467-2472.
- [13] 戴玲, 廖洪梅, 沈业寿, 等. 原子力显微镜观察丹皮多糖分子的形貌结构及自组装行为 [J]. 激光生物学报, 2007, 16 (6): 749-753.
Dai Ling, Liao Hongmei, Shen Yeshou, et al Observation of structure morphology and self-assembly of polysaccharide PSM2b-A by atomic force microscopy [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2007, 16 (6): 749-753.

国外动态

法首次用人类干细胞制造出表皮

法国科学家首次成功地利用人类干细胞制造出了一块完整的表皮, 该成果可缩短重度烧伤患者等待皮肤移植手术的时间, 减小感染的几率, 从而挽救病人生命。科学家希望这种干细胞疗法未来可成为重度烧伤患者和遗传性皮肤病患者的替代疗法。相关研究成果发表于 2009 年 11 月份的英国《柳叶刀》杂志上。

研究人员首先从人类皮肤干细胞中提取出了角质生成细胞, 它可以使皮肤不断更新; 然后, 研究人员分别在体外和生物体上对分离出来的角质生成细胞重组形成功能性表皮细胞的能力进行了测试; 接下来, 在细胞生物学和药理学方法的支持下, 研究人员在体外成功地利用角质生成细胞重建出了一块表皮, 并将获得的表皮移植到实验小鼠背部的伤口上。移植后 12 周, 小鼠移植表皮的局部皮肤区域完全恢复正常。在传统的手术中, 皮肤移植一般取用病人自己的皮肤组织, 而且完成移植需要 3 周时间, 对于很多严重烧伤的人来说, 这个过程太漫长。新的干细胞疗法可让医院接收病人后, 直接定制表皮, 缩短治疗时间, 从而让病人免于感染, 挽救其生命。

(文伟河)