

一种基于水解过程的多糖快速鉴别方法

马耀宏¹, 孟庆军¹, 杨艳¹, 杨俊慧¹, 史建国¹, 张利群¹, 郑岚², 刘伟霞³

(1. 山东省科学院生物研究所, 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014;
2. 山东农业大学, 山东 泰安 271018; 3. 山东省计算中心, 山东 济南 250014)

摘要: 应用生物传感器记录树舌、灵芝和虫草多糖水解过程的还原糖(还原性末端数)和葡萄糖含量的实时变化, 研究水溶性多糖水解过程中还原糖(还原性末端数)和葡萄糖的水解过程变化规律。研究表明, 同一种多糖水解图谱稳定, 不同种多糖图谱特异性明显, 通过水解过程图谱的比对分析, 可以实现对树舌、灵芝和虫草多糖的快速鉴别。

关键词: 多糖; 水解过程; 葡萄糖; 还原糖

中图分类号: Q81; TP212.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-4026(2014)04-0012-05

A hydrolysis process based rapid identification approach for polysaccharides

MA Yao-hong¹, MENG Qing-jun¹, YANG Yan¹, YANG Jun-hui¹,
SHI Jian-guo¹, ZHANG Li-qun¹, ZHENG Lan², LIU Wei-xia³

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensors, Biology Institute, Shandong Academy of Sciences,
Jinan 250014, China; 2. Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;
3. Shandong Computer Science Center, Jinan 250014, China)

Abstract: We employed biosensors to record real-time variations of reducing sugar and glucose contents in hydrolysis process of *Ganoderma applanatum* Pat, *Ganoderma lucidum* and *Cordyceps* polysaccharide. We further investigated the variation law of the hydrolysis process of reducing sugar and glucose in hydrolysis process of water-soluble polysaccharide. Results show that hydrolysis process map is stable for the same kind of polysaccharide, but the specificity of hydrolysis process map is significant for different kinds of polysaccharide. Rapid identification of *Ganoderma applanatum* Pat, *Ganoderma lucidum*, and *Cordyceps* polysaccharide can be implemented by the comparison analysis of hydrolysis process map.

Key words: polysaccharide; hydrolysis process; glucose; reducing sugar

糖类是生物体内除蛋白质和核酸以外的又一类重要的物质, 蕴涵十分丰富的生物学信息, 是细胞识别和信息遗传等重要生物学功能的参与者, 近年来已成为生命科学研究的热点^[1-2]。

多糖, 尤其是水溶性多糖, 由于在免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化和降血糖等方面具有独特的生理活

收稿日期: 2014-02-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA021201); 山东省自主创新重大科技专项(20122501)

作者简介: 马耀宏(1970-), 男, 副研究员, 研究方向为生化分析与生物传感器。

性与功能^[5-4],相关研究进展迅速。随着该研究领域仪器分析手段的不断进步,有关多糖结构与功能关系的研究备受关注^[5-4]。目前对多糖结构功能研究常用的大型仪器分析技术有气质联用、紫外及红外光谱分析、核磁共振、高效液相、X射线晶体扫描以及原子力显微技术等^[7-8]。但是,由于多糖结构特点的复杂性,使得单一仪器分析手段具有一定的局限性。气相色谱法测定糖类所遇到的主要困难是糖类本身没有足够的挥发性,必须将其转化为挥发性衍生物才能进行测定。高效液相色谱法由于使用通用的示差折光检测器灵敏度低而受到限制;若使用紫外或荧光检测器来提高分析灵敏度,糖类化合物须先经过标记衍生,操作繁杂;并且衍生反应的发生总伴随样品的损失,这对目前分析要求的日益提高不利。传统的电泳法及20世纪80年代后期迅速发展起来的高效毛细管电泳法能进行糖的分离检测,但重复性相对较差,该技术的稳定性能达不到实际需求。核磁共振技术解决了糖苷键构型问题,但难以分辨非异头质子的位移,解析方法十分繁杂。通常要弄清楚一个多糖的结构往往需要数种大型仪器与化学分析方法结合,同时花费专业研究人员几个月甚至整年的时间与精力。这些实验方法由于测试周期长,根本无法在生产过程中使用。多糖的快速分析与鉴别是多糖研究领域的热点问题。本文研究了水溶性多糖水解过程中还原糖(还原性末端数)和葡萄糖的水解过程变化规律,通过分析水解过程图谱,实现了对树舌、灵芝和虫草多糖的快速鉴别,目前国内外未见相关研究报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

HH-S 型恒温水浴锅,上海羌强仪器设备有限公司;JPI-5 型架盘天平,苏州博泰伟业电子科技有限公司;YH-4 型电子万用炉,金坛市诺艺实验仪器厂;SBA-40D 型生物传感分析仪 山东省科学院生物研究所;SGD-IV-D型全自动还原糖测定仪,山东省科学院生物中心;81-2 型磁力恒温搅拌器,上海思乐自动化科技有限公司;DS-4 型高速组织捣碎机,上海满贤经贸有限公司;20RP-52D 型自动高速冷冻离心机,内蒙古农大动物科学与医学学院;A-2 电热鼓风干燥箱,福建省泉州宇博电子厂。

1.1.2 试剂

0.15 mol/L 盐酸的配制:用移液管取 37% 浓盐酸 6.25 mL,用蒸馏水定容至 1 000 mL。

0.10 mol/L 氢氧化钠溶液的配制:称量氢氧化钠 4.0 g,加入到盛有适量蒸馏水的烧杯中,用蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.00 g/L 葡萄糖标准溶液的配制:精密称量烘干后的无水葡萄糖 1.000 0 g,用蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2 方法^[9-10]

1.2.1 胞外粗多糖的制备

分别取培养成熟的树舌、灵芝和虫草发酵液,以发酵液中残留还原糖低于 0.01% 为基准,用 5 000 r/min 离心机离心 15 min,并用 0.2 μ m 过滤器过滤,获得上清液。上清液加入 1.5 ~ 3 倍无水乙醇沉淀多糖 30 min。醇沉液体用 10 000 r/min,离心 15 min,弃上清液。沉淀置于 60 $^{\circ}$ C 电热鼓风干燥箱中烘干 24 h,获得胞外粗多糖样品。

1.2.2 胞内多糖的制备

虫草发酵液经离心后的菌丝体沉淀,用蒸馏水冲洗 3 ~ 4 次,菌丝体中加入适量 5% 氯化钠溶液,放入组织捣碎机中,高速捣碎 30 min。捣碎的菌丝体液,用超声波进行细胞破碎。破碎菌丝体溶液 100 $^{\circ}$ C 煮沸 2 h。溶液冷却后,用高速离心机 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入 1.5 倍体积的无水乙醇,静置过夜,10 000 r/min 离心 10 min,取沉淀,于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中烘干,即得虫草胞内粗多糖样品。

1.2.3 多糖的酸水解方法

精密称取 0.300 0 g 多糖样品,于 100 mL 小三角瓶中,加入 30.0 mL 蒸馏水充分溶解,再加入 30.0 mL 0.15 mol/L 盐酸,混匀,沸水浴 5 h。水解前半个小时每隔 5 min,以后每隔 10 min 取 0.50 mL 的水解液,将水解液迅速冷却并加入 0.30 mL 浓度为 0.10 mol/L 的氢氧化钠溶液终止水解反应,后微调水解液 pH 值至 7.0,获得该样品的不同水解时间的水解液测试样品。

1.2.4 水解过程参数的测定方法

还原糖含量使用 SGD-IV-D 型全自动还原糖测定仪测定,每次取样量 0.5 mL;葡萄糖含量采用 SBA-40D 型葡萄糖酶电极法,每次取样量 20 μ L。

2 结果与分析

2.1 树舌多糖水解过程图谱

平行测定两次树舌多糖水解过程中葡萄糖、还原糖的含量变化。称取树舌粗多糖 0.299 8 g,按 1.2.3 和 1.2.4 的测定方法,测定结果见图 1;平行测定称取树舌粗多糖 0.300 3 g,按同样方法测定,结果见图 2。

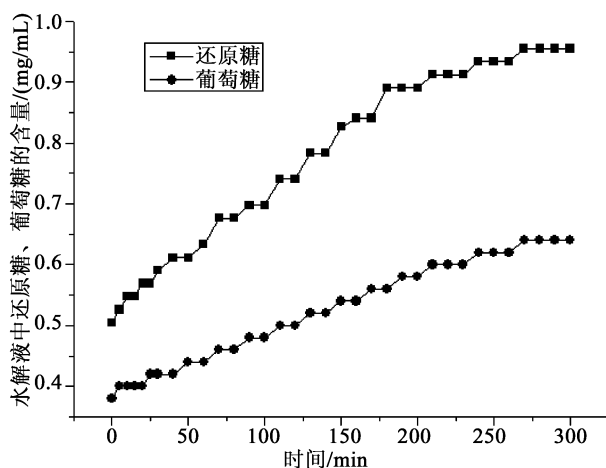


图 1 树舌多糖水解过程图谱

Fig.1 Hydrolysis process map of *Ganoderma applanatum* Pat polysaccharides

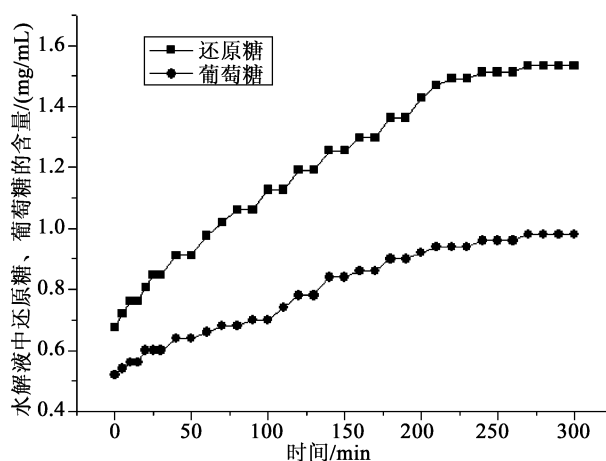


图 2 平行测定树舌多糖水解过程图谱

Fig.2 Parallel determination hydrolysis process map of *Ganoderma applanatum* Pat polysaccharides

由图 1 图谱可知,多糖水解过程中葡萄糖和还原糖含量随时间逐步增加。葡萄糖含量在糖水解过程中占还原性糖的比例由起始时的 75% 左右逐渐降低至 65% 左右;由图 2 图谱可见同样的结果。图 1~2 显示葡萄糖和还原糖在时间进程上数值稳定,葡萄糖占还原糖比值稳定。由图 1 和图 2 比对可以看出,同一种树舌多糖样品水解图谱是稳定的,图形相似。

2.2 灵芝多糖水解过程图谱

平行测定两次灵芝多糖水解过程中葡萄糖、还原糖的含量变化。称取灵芝粗多糖 0.300 3 g,按 1.2.3 和 1.2.4 的测定方法,结果见图 3;平行测定称取灵芝粗多糖 0.300 2 g,按同样的测定方法,结果见图 4。

由图 3 可知,灵芝多糖水解过程中葡萄糖和还原糖含量随时间逐步增加。葡萄糖含量在灵芝多糖水解过程中占还原性糖的比例由起始时的 70% 左右逐渐提高为 80% 左右;由图 4 可见同样的结果。图 3~4 显示葡萄糖和还原糖在时间进程上数值稳定,葡萄糖占还原糖比值稳定。

由图 3~4 可知,水解 5 h 后,该灵芝粗多糖水解液中葡萄糖占还原糖的比例分别为 80%、78%。图 3 和图 4 的比对分析显示,同一种灵芝多糖样品水解图谱是稳定的。

2.3 虫草胞内多糖水解过程图谱

称取虫草胞内粗多糖 0.300 3 g,按 1.2.3 和 1.2.4 水解过程参数的测定方法,结果见图 5,平行测定称

取虫草胞内粗多糖 0.300 5 g,按同样的方法测定,结果见图 6。

由图 5~6 可知,虫草胞内多糖在该水解条件下水解液中几乎不含葡萄糖,多糖水解过程中还原糖含量随时间逐步增加。图谱 1~2 显示葡萄糖和还原糖在时间进程上数值稳定,还原糖水解速率几乎相同。还可以看出,同一种虫草胞内多糖样品水解图谱是稳定的。

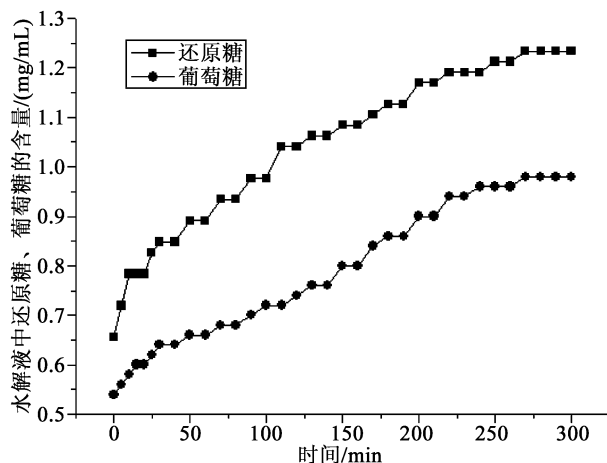


图3 灵芝多糖水解过程图谱

Fig.3 Hydrolysis process map of *Ganoderma lucidum* polysaccharides

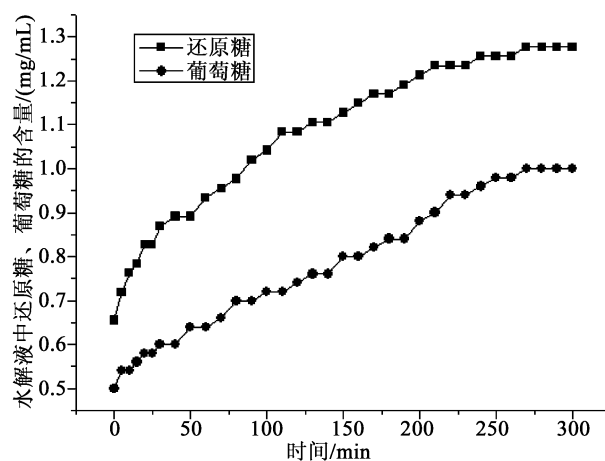


图4 平行测定灵芝多糖水解过程图谱

Fig.4 Parallel determination hydrolysis process map of *Ganoderma lucidum* polysaccharides

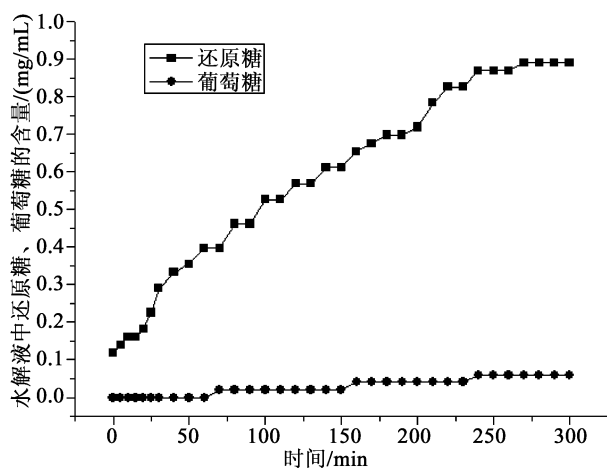


图5 虫草胞内多糖水解过程图谱

Fig.5 Hydrolysis process map of *Cordyceps* polysaccharides

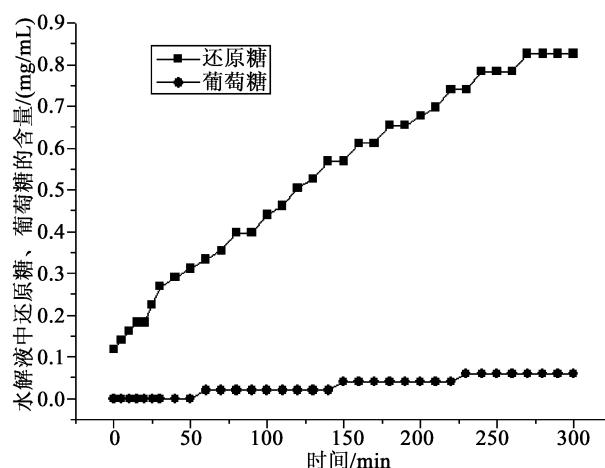


图6 平行测定虫草胞内多糖水解过程图谱

Fig.6 Parallel determination hydrolysis process map of *Cordyceps* polysaccharides

3 结论

(1) 在精密控制多糖水解的条件下,同一种树舌、灵芝和虫草胞内多糖的水解图谱是稳定且可以重复的。

(2) 通过比较树舌、灵芝和虫草胞内多糖的水解图谱,发现它们之间的区别非常明显。每一种多糖的水解图谱具有各自的特征,同种多糖水解过程参数测定数值稳定,且参数之间对应关系稳定。比对不同多糖水解过程中葡萄糖、还原糖含量的水解图谱,可以实现对不同来源的多糖的快速鉴别分析。

(3) 如果建立更多的单糖快速分析传感器,如半乳糖、木糖以及甘露糖等,用来记录标准水解条件的多糖的水解过程,建立多糖水解过程图谱库,开发比对分析软件,就能够根据水解过程图谱来实现对多糖的快速分析,同时获得该多糖的更多信息。如果能够进一步从水解过程中分辨到相对分子量、糖苷键、异构形式和单糖构型等水解信息,就有可能建立基于水解过程的多糖快速分析方法。

参考文献:

- [1] RADEMACHER T W, PAREKH R B, DWEK R A. Glycobiology [J]. Annual Review of Biochemistry, 1988, 57: 785 – 838.
- [2] PERSIN Z, STANA-KLEINSCHKE K, FOSTER T J, et al. Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 22 – 32.
- [3] CHEN R Z, MENG FL, LIU Z Q, et al. Antitumor activities of different fractions of polysaccharide purified from *Ornithogalum caudatum* Ait [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 845 – 851.
- [4] BELSKA N V, GURIEV A M, DANILETS M G, et al. Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response [J]. International Immunopharmacology, 2010, 10(8): 933 – 942.
- [5] WU J, DENG X, ZHANG Y, et al. Application of atomic force microscopy in the study of polysaccharide [J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(12): 1458 – 1465.
- [6] CHEN Y Y, DING Y, WANG W, et al. Determination of polysaccharide in *Radix pseudostellariae* extract by size-exclusion high-performance liquid chromatography [J]. Tsinghua Science & Technology, 2007, 12(4): 389 – 393.
- [7] 谢明勇, 聂少平. 天然产物活性多糖结构与功能研究进展 [J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 1 – 10.
- [8] 刘玉红, 王凤山. 真菌多糖结构研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(8): 561 – 564.
- [9] 郑岚. 液体发酵制备真菌多糖及多糖水解特性研究 [D]. 济南: 山东轻工业学院, 2011: 1 – 95.
- [10] 郑岚, 马耀宏, 杨俊慧, 等. 树舌产糖培养基的选择及树舌粗多糖的纯化 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(8): 112 – 116.

* 简讯 *

我院与烟台市人民政府签署全面合作框架协议

6月27日,“2014年烟台市与省内部分高校院所科技合作签约仪式”在烟台市举行。我院院长王英龙代表我院和烟台市人民政府签署了全面合作框架协议。双方本着“优势互补、平等协商、真诚合作、互惠互利、共同发展”的原则,采取共建机构、人员交流、联合研究、技术转移、科技咨询等多种方式,开展高起点、多层次、全方位的科技交流与合作,逐步建立起产学研联合的创新体系和良性互动的运行机制,共同在烟台构建科技创新的新高地。

科技合作洽谈会上,院属单位负责人、专家与烟台市企业进行了技术交流沟通,在海洋平台设备系统控制、海洋工程特种材料、食品加工、太阳能综合利用等多个领域达成合作意向。我院激光所、生物所、海仪所、自动化、材料所、能源所分别与烟台富润实业有限公司、山东国际生物科技园、蓬莱市海洋生物有限公司、山东蓝色海洋科技股份有限公司、莱州金声汽车电器有限公司、隆达铝业(烟台公司)、山东海德尔节能技术有限公司签署了科技合作协议。(<http://www.sdass.org/tpxw/5331.htm>)