

香菇多糖的纯化和结构分析

郭亚贞 王 愷

曲鹏鹏

(上海水产大学食品学院, 200090)

(上海市食品研究所食品工艺与包装研究室, 200233)

摘 要 香菇中提取到的水溶性粗多糖,用 Sevag 法结合酶法去蛋白,透析,甲醇分级得到 2 个多糖级分,分别命名为 Len 1 和 Len 2。去蛋白后多糖经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析纯化得精品多糖 Len 3,经纸层析及凝胶过滤层析表现单一区带或单一峰。经酸水解后纸层析和气相色谱分析表明 Len 2 含甘露糖、葡萄糖,摩尔比为甘露糖:葡萄糖 = 10.50:1.00, Len 3 含木糖、甘露糖、葡萄糖,摩尔比为木糖:甘露糖:葡萄糖 = 0.67:2.45:1.00。200~400nm 紫外扫描,无核酸和蛋白吸收峰。4000~650 cm^{-1} 红外光谱扫描,呈多糖类特征吸收峰。

关键词 香菇,多糖,纯化

中图分类号 TS201.2

Purification and identification of polysaccharide from *Lentinus edodes*

Guo Yazhen, Wang Zao

(College of Food Science, SFU, 200090)

Qu Pengpeng

(Laboratory of Food Package and Technology, Shanghai Food Research Institute, 200233)

ABSTRACT Water soluble polysaccharide (lentinan) was crudely extracted from *Lentinus edodes*, then purified by the methanol fractionation with polysaccharide solution: methanol (v/v) 1:0.5 and 1:1 respectively named Len 1 and Len 2. Subsequently, the deproteinized polysaccharide was refined by gel filtration with Sephadex G-100 named Len 3. The finished products were identified by paper chromatography and gel filtration with Sephadex G-100. The compositions of Len 2 and Len 3 were separated by paper- and gas-chromatography. The results show that Len 2 is composed of mannose and glucose with a molar ratio of 10.50:1.00, but Len 3 is composed of xylose, mannose and glucose with a molar ratio of 0.67:2.45:1.00.

KEYWORDS *Lentinus edodes*, polysaccharide, lentinan, purification

食用菌营养丰富,含有蛋白质、糖、维生素及矿物质,是深受人们喜爱的营养食品。近代生物技术的应用研究表明,食用菌中的活性多糖物质具有增强人体免疫能力和抗肿瘤的功能^[1,2],因此对多糖物质的提取和研究成了这一领域的热门课题。多糖(Lentinan)是香菇(*Lentinus edodes*)中的重要药用成分。国外发现香菇中提取的多糖物质具有明显的抗肿瘤作用,并对得到的四种组分进行了初步的结构分析。国内从 80 年代开始对食用菌多糖的分离、纯化、性质鉴定与药理作用进行了研究^[1]。但多糖的提取多以初级的发酵法、热浸提及盐析法为主,这些方法的得率低、能耗大,存在一定的技术缺陷。上海食品研

第一作者简介:郭亚贞,女,1973 年 5 月生,硕士学位,研究实习员,现在上海水产大学科研处从事科研管理工作。

收稿日期:1999-05-04

研究所采用酶解步骤对香菇多糖的提取工艺进行了改进,提高了产率。本文对该法提取的香菇多糖进行纯化,并对其组成和结构做了初步分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

香菇多糖粗品由上海市食品研究所食品工艺与包装研究室提供。Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品,D-岩藻糖为 Sigma 产品,D-木糖为北京化学试剂公司生化试剂,D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖均为上海化学试剂二厂分析纯产品。

1.2 方 法

1.2.1 提 纯

(1)去蛋白。按 Sevag 法^[3]进行蛋白沉淀。重复 3 次后再移至透析袋中,对自来水透析 1d,再对蒸馏水透析 2d,适当浓缩,然后加入 3 倍体积的 95%乙醇,静置过夜,离心收集沉淀,以无水乙醇、丙酮各漂洗两遍,抽滤瓶抽干,放入干燥器(P₂O₅)干燥,所得去蛋白多糖(Len)为浅褐色粉末。

(2)甲醇分级。将 Len 溶于水后用甲醇进行分级。1%多糖溶液用 1:0.5(多糖溶液:甲醇 v/v)醇析,在磁力搅拌棒搅拌下缓慢加入甲醇,然后静置过夜,次日离心收集沉淀,用甲醇、乙醚分别洗两次,干燥得 Len 1,将上清液继续滴加甲醇至 1:1,得 Len 2。

(3)凝胶层析。Len 经 Sephadex G-100 柱(1.0cm×70cm)纯化分离,洗脱液 0.1N NaCl 溶液,流速 10mL/hr,每 5mL 收集一管,用酚-硫酸法监测^[3],结果如图 1 所示。合并单一峰部分(17 至 25 管),浓缩,透析,用乙醇沉淀,丙酮干燥,得到白色粉末(Len 3)。

1.2.2 多糖的纯度鉴定

用醋酸纤维薄膜电泳和凝胶过滤法进行纯度检查。

1.2.3 多糖的含量分析

苯酚-硫酸法测定多糖的总糖含量,以葡萄糖为标准^[4]。

1.2.4 多糖的光谱分析

(1)紫外光谱测定。将 Len 3 多糖配成 500 μ g/mL 的溶液,UVIKOW 810 紫外扫描,在 260nm 和 280nm 处未见蛋白质和核酸的特征吸收。

(2)红外光谱分析^[3]。将 1mg 左右经干燥的糖样,与 100~200mg 经干燥的 KBr 粉末在玛瑙研钵中研细后压片,用 PERKIN ELMER MODEL 1600 红外扫描。

1.2.5 酸水解产物的纸层析^[5,6]

采用新华中速滤纸(20cm×29cm),上行层析,溶剂系统为正丁醇:冰醋酸:水(4:1.5:5)或醋酸乙酯:吡啶:水(10:4:3)。样品 100℃水解 6h,用碳酸钡中和至中性,过滤后浓缩、点样、展开、显色。显色剂为苯胺-邻苯二甲酸。并用木糖、岩藻糖、半乳糖、葡萄糖等标准单糖作对照。

1.2.6 单糖组成及其摩尔比测定

样品加入三氟醋酸 100℃水解 10h,过滤去除杂质,减压挥发三氟醋酸至干,再加入蒸馏水重复几次,直至最后去除三氟醋酸^[7]。然后进行乙酰化处理,反应产物直接进行气相色谱分析^[3]。标准单糖如上处理。根据标准单糖与样品的保留时间的比较,确定组成单糖的种类,并根据各峰面积计算出其摩尔比。色谱条件是用 5%OV-225 固定液,担体 Chromosorb WAW-DMCS(80-100 目),柱温 210℃,N₂ 流速 30mL/min,以氢焰离子化检测器测定。气相色谱仪是岛津 GC9A 型。

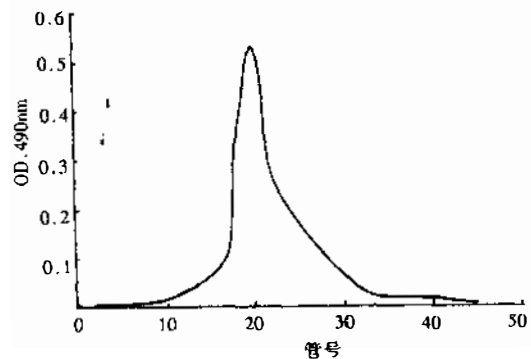


图 1 Len 的 Sephadex G-100 层析图谱

Fig. 1 Chromatogram of Len by Sephadex G-100

2 结果与讨论

2.1 多糖纯化有关问题

2.1.1 脱色处理

真菌多糖可能因含有酚类化合物,在空气中提取或干燥时颜色加深,可用双氧水或活性炭脱色^[8,9]。在用 H_2O_2 脱色处理后,一定要透析至无 H_2O_2 检出,否则在柱层析操作中残余的 H_2O_2 对葡聚糖凝胶有破坏作用。 H_2O_2 检出用高锰酸钾法^[10]。另外,醇洗及醚洗过程中,减压抽干时用薄膜覆盖样品,减少空气接触,也能防止颜色加深。

2.1.2 去蛋白方法的比较

香菇粗多糖中除了含有多糖物质以外,还含有蛋白质,胶质等。如将蛋白质物质先用蛋白水解酶水解(如胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、链酶蛋白酶等),使样品中蛋白质部分水解后,再用 Sevag 法效果更好。从去蛋白的效果来看,完全用 Sevag 法去蛋白处理,起码要重复进行 8 次,才能基本去除蛋白。2 次去蛋白后含糖 78.4%,8 次去蛋白后含糖 97.3%。如果用 Sevag 法结合酶法,酶处理后再经 3 次 Sevag 法处理,在氯仿和水的界面就未见沉淀,可见用 Sevag 结合酶法去蛋白效率可提高 68%,且节省了大量的试剂和时间;从最后得到的产物中含糖量来看,两种处理后含糖都可达到 90% 以上。所以本实验采用 Sevag 结合酶法去蛋白。

2.1.3 酒精度对多糖得率的影响

多糖配成 1% ~ 2% 的水溶液,然后进行不同酒精度的沉淀得率试验。结果见表 1。

在进行酒精沉淀时配成的多糖溶液不宜超过 2%,以免将杂质分子夹带沉淀下来,同时过稀(低于 1%)也会不利于酒精沉淀。从上面得到的结果来看,75% 的酒精度已能将多糖基本沉淀出来,再增加酒精度对多糖的得率影响并不显著。

2.1.4 多糖中糖含量的测定

多糖粗品用酚-硫酸法测得多糖中总糖含量为 61.1% (其中包括用硫酸唑啉法测得已糖醛酸含量 21.2%)^[11],凯氏定氮法测得含蛋白质 16.0%;甲醇分级得到的 1:0.5 级分(Len 3)呈褐色,含糖 60.2%;1:1 级分(Len 2)呈灰白色,含糖 94.5%;柱层析得到的多糖(Len 3)呈灰白色,含糖 99.1%。

2.1.5 凝胶层析鉴定纯度

Len 3 经 Sephadex G-100 柱(1.0cm × 70cm)再纯化分离,洗脱液 0.1N NaCl 溶液,流速 10mL/h,每 5mL 收集一管,用酚-硫酸法监测,结果如图 2 所示。

2.2 多糖组成和结构分析

2.2.1 纸色谱

结果见图 3。木糖显红色,甘露糖、葡萄糖、半乳糖均显棕色,标准单糖的 R_f 比为葡萄糖:木糖:甘露糖 = 0.84:1.16:1.00。Len 1、Len 2、Len 3 在纸上都只检出甘露糖和葡萄糖的斑点,可能因为木糖在多糖中的含量较少,而纸层析的灵敏度不够之故^[12]。

2.2.2 红外光谱分析

分析结果见图 4 所示。比较 Len 1、Len 2、Len 3 的红外光谱图,可见三者基本是一致的。在 4000 ~

表 1 不同酒精浓度对回收多糖的影响
Tab.1 The effect of different alcohol concentration on recycling polysaccharides

编号	醇析酒精度(%)	多糖得率(%)
1	65	80.5
2	70	81.9
3	75	86.7
4	80	87.0

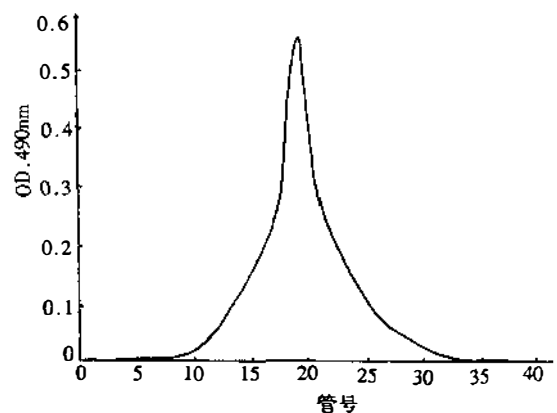


图 2 Len 3 的 Sephadex G-100 层析图谱
Fig.2 Chromatogram of Len 3 by Sephadex G-100

650 cm^{-1} 呈多糖类物质的特征吸收峰。3500~3200 cm^{-1} 的特征峰是由O-H的伸缩振动引起的;3000~2800 cm^{-1} 之间的尖峰是由糖类C-H的伸缩振动引起的,1400~1200 cm^{-1} 的一些峰是C-H的变角振动,这两组峰是糖类的特征吸收峰;1665~1625 cm^{-1} 是糖的水化物的吸收峰;1250~950 cm^{-1} 之间的一组峰是两种C-O的伸缩振动引起的,一种是吡喃糖环的醚键C-O-C,另一种是羟基的吸收峰;897 cm^{-1} 附近的吸收峰是吡喃糖 β -型C-H变角振动的吸收峰;1049 cm^{-1} 及1075 cm^{-1} 两个吸收峰表征 β -吡喃糖基。因此可推断该香菇多糖为一种 β -吡喃多糖^[3]。方积年^[2]关于多糖的综述中提到对香菇多糖结构报道较多的是 β -(1 \rightarrow 3)为主链的葡聚糖,但也有 α -甘露聚糖的报道。但从图4的光谱图中未显示 α -糖苷键的特征峰。

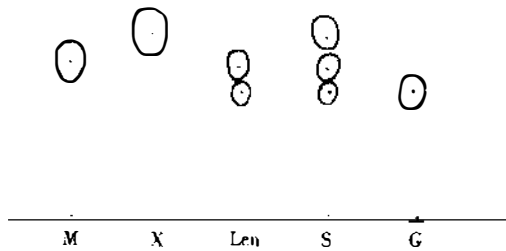


图3 香菇多糖水解物的纸色谱

Fig.3 Paper chromatogram of Len hydrolysates

M.甘露糖; X.木糖; Len. Len水解物; S.三种已知单糖混合物; G.葡萄糖; 温度. 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

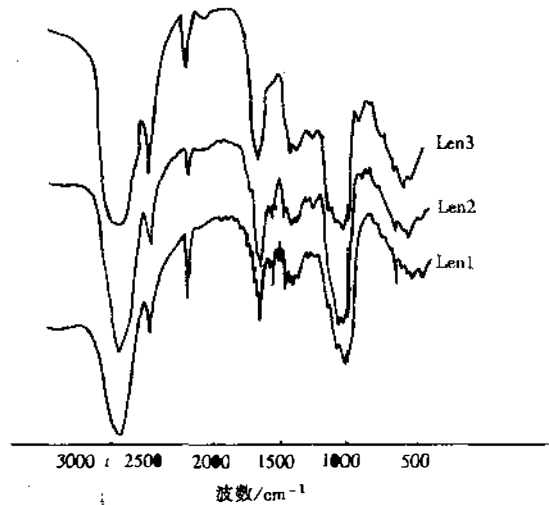


图4 香菇多糖 Len 1、Len 2 和 Len 3 的红外光谱图

Fig.4 IR chromatogram of Len 1, Len 2 and Len 3

2.2.3 气相色谱分析

样品经酸水解乙酰化后进行气相色谱分析,得到图5、图6,分别对应Len 2、Len 3的气相色谱图。

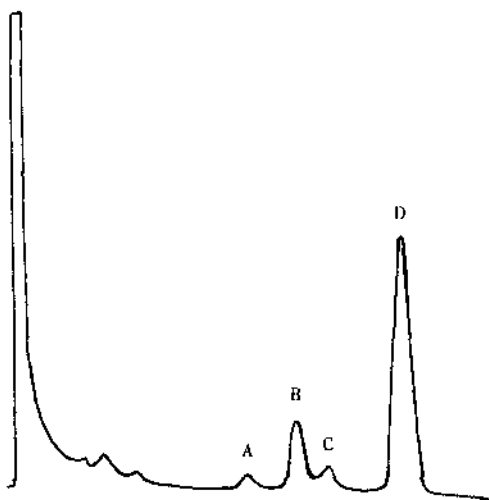


图5 香菇多糖 Len 2 的 GC 图

Fig.5 GC of Len 2

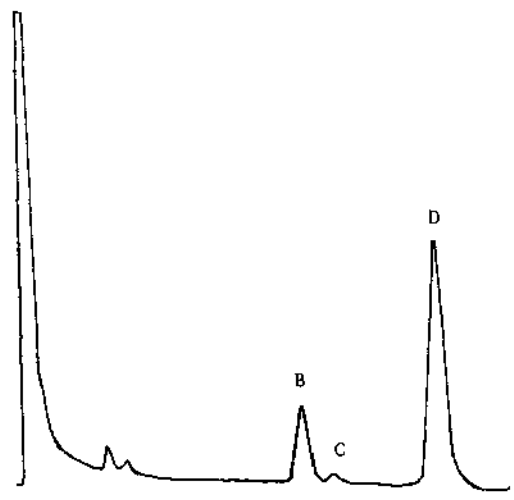


图6 香菇多糖 Len 3 的 GC 图

Fig.6 GC of Len 3

A.木糖; B.甘露糖; C.葡萄糖; D.内标物。

然后根据标准单糖与样品的保留时间的比较,确定组成单糖的种类,并根据各峰面积计算出其摩尔比。结果如表 2 所示。

表 2 Len 1、Len 2 和 Len 3 水解物的气相色谱分析
Tab.2 GC of hydrolysates of Len 1, Len 2 and Len 3

单 糖	标 准 $t_R(\text{min})$	Len 1		Len 2		Len 3	
		$t_R(\text{min})$	A_i	$t_R(\text{min})$	A_i	$t_R(\text{min})$	A_i
岩藻糖	12.435	-	-	-	-	-	-
木糖	22.858	-	-	-	-	22.642	19344
甘露糖	27.978	-	-	27.672	102433	27.608	85345
葡萄糖	30.138	-	-	29.898	9785	29.908	34882
半乳糖	31.917	-	-	-	-	-	-

注: t_R , 滞留时间; A_i , 峰面积; -, 未检出。

由上分析结果可得: Len2 含甘露糖、葡萄糖, 摩尔比为 10.50:1.00, Len 3 除了纸色谱检出的甘露糖、葡萄糖外, 还含有木糖, 摩尔比木糖:甘露糖:葡萄糖为 0.67:2.45:1.00。Len 1 在实验中只显示一个微弱的信号, 未见糖峰的出现, 可能该乙酰化法对 Len 1 不理想。但纸色谱显示有甘露糖、葡萄糖的存在, 并根据其红外图谱与 Len 2、Len 3 的基本相似, 可推断 Len 1 也含有相似的单糖组成。葡萄糖醛酸按还原乙酰化方法处理, 未能获得适合气相色谱分析的衍生物, 所以也没有出峰^[5]。

对香菇多糖的结构进行进一步深入研究, 将有利于阐明其活性功能与结构的关系。

参 考 文 献

- 1 Goro C. Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by Polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. Nature, 1969, 222:667 ~ 688
- 2 方积年. 多糖研究的现状. 药学报, 1986, 21(12):944 ~ 950
- 3 张惟杰. 复合多糖生化技术. 上海:上海科学技术出版社, 1987. 43 ~ 47, 105 ~ 108
- 4 向曙光, 刘思俭, 朱万洲等. 应用苯酚法测定植物组织中的碳水化合物. 植物生理通讯, 1984, (2):24 ~ 27
- 5 吴梧桐, 余品华, 夏尔宁等. 银耳孢子多糖 TF-A、TF-B、TF-C 的分离、纯化及组成单糖的鉴定. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(4):393 ~ 396
- 6 夏尔宁, 陈琼华. 黑木耳多糖的分离、纯化和鉴定. 生物化学与生物物理学报, 1988, 20(6):614 ~ 618
- 7 曹培让, 吴祖道, 王汝聪等. 金针菇子实体多糖 PA3DE 的分离、纯化和分析. 生物化学与生物物理学报, 1989, 21(3):152 ~ 156
- 8 樊绘曾, 陈菊娣, 林克忠. 刺参酸性粘多糖的分离及其理化性质. 药学报, 1980, 15(5):263 ~ 269
- 9 纪明候, 徐祖洪, 郭玉彩. 海带褐藻糖胶的研究. 水产学报, 1980, 4(1):9 ~ 18
- 10 武汉大学, 吉林大学, 中山大学. 分析化学实验. 北京:人民教育出版社, 1977. 94 ~ 96
- 11 Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction. Ana Biochemistry, 1962, 4:330 ~ 334
- 12 石 钺, 李休远, 马冰如. 软枣猕猴桃多糖 AAPS I、AAPS II、AAPS III 的分离纯化及组成单糖鉴定. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(4):327 ~ 331