

羊肚菌多糖的分离纯化及组成结构分析

魏 芸 张天佑 张 姝 刘庆辉

(北京市新技术应用研究所, 北京 100035)

摘要: 液体深层发酵所得的羊肚菌(*Morchella esculenta* L.) 营养液经超过滤法去掉小分子量组分, 脱脂, 脱色, 脱蛋白质, 减压低温浓缩, 用超速离心法分离提纯, 再用乙醇沉淀法反复多次将所要的多糖沉淀提纯, 得到羊肚菌多糖(MEP)。对其中分子量为 10 000~100 000 的多糖(MEP-SP), 采用 DEAE-纤维素离子交换柱, 以不同浓度 NaCl 为洗脱液, 进行纯化分离, 再经 Sepharose CL-6B 纯化得到 2 种水溶性多糖 MEP-SP2 和 MEP-SP3。用高效液相色谱法测得 MEP-SP2 和 MEP-SP3 的分子量分别为 23 000 和 44 000。气相色谱法对 MEP-SP2 和 MEP-SP3 组成的分析结果表明, MEP-SP2 由甘露糖、葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖残基为重复单元组成, 摩尔比为 1.75:4.13:0.71:0.68; MEP-SP3 由木糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、阿拉伯糖和半乳糖残基为重复单元组成, 摩尔比为 3.58:14.9:3.85:1.77:51.3:0.53。用核磁共振及红外光谱法等鉴定出 MEP-SP2 是具有 α -吡喃糖苷键的杂多糖。

关键词: 羊肚菌; 多糖; 分离; 纯化; 表征

中图分类号: Q949.328.5; Q539 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)02-0014-04

Isolation, purification and characterization of polysaccharides from *Morchella esculenta* L. WEI Yun, ZHANG Tian-you, ZHANG Shu, LIU Qing-hui (Beijing Institute of New Technology and Application, Beijing 100035), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(2): 14~17

Abstract: The nutrient liquid of *Morchella esculenta* L. from liquid deep layer fermentation was treated by ultrafiltration to remove low molecular weight components, then defatted, decolorized and deproteinized and followed by concentration under reduced pressure and low temperature. It was further purified by ultracentrifuge and repeated precipitation and purification with ethanol to obtain the required polysaccharide components (MEP), in which MEP-SP of molecular of 10 000~100 000 was purified and separated by DEAE-cellulose ion exchange column and Sepharose CL-6B gel chromatography, two soluble fractions (MEP-SP2 and MEP-SP3) were yielded. HPLC was used to obtain their molecular weight and gas chromatography was used to determine their monosaccharide constitution. The results showed that molecular weight of MEP-SP2 is 23 000, MEP-SP3 is 44 000, the former is composed of four kinds of monosaccharides: mannose, glucose, arabinose and galactose in the mole ratio of 1.75:4.13:0.71:0.68; the latter is composed of six kinds of monosaccharides, which contains xylose, glucose, mannose, fructose, arabinose and galactose in mole ratio of 3.58:14.9:3.85:1.77:51.3:0.53. The structure of MEP-SP2 was studied by means of elemental analysis, IR, NMR, etc. the result showed that main chains in MEP-SP2 were composed of α -pyranoglycoside linkage.

Key words: *Morchella esculenta* L.; polysaccharide; isolation; purification; characterization

自日本千原^[1]1970 年报道从香菇中分离出一种抗肿瘤多糖而轰动整个医药学界之后, 全世界掀起了一股从食用菌中寻找抗肿瘤药物的热潮。

羊肚菌(*Morchella esculenta* L.) 被誉为世界最名贵的食用菌之一, 现代医学研究表明羊肚菌具有降血脂、升高白细胞和调节免疫功能等方面的作用, 并可减轻患者放疗化疗引起的恶心、头疼、少食欲等副作用。因此对其有效成分之一多糖进行了纯化及结构研究。由于羊肚菌多糖的复杂性以及分离和分

析方法的种种限制, 羊肚菌多糖的种类至今尚未探明, 其结构也未完全确定。羊肚菌多糖的结构和药理作用关系的报道也不多。因此, 进一步探明羊肚菌多糖的化学结构, 并对其结构进行修饰以提高其

收稿日期: 1999-11-28

基金项目: 北京市科院所科技开发基金资助项目, 合同编号: 951851200

作者简介: 魏 芸, 女, 1970 年 12 月生, 河北武安县人, 助理研究员, 理学博士, 主要从事生物大分子的分离纯化研究

对人体的免疫功能和抑制肿瘤的活性是今后研究的方向之一。

对多糖的分离提纯,国内外常采用有机溶剂沉淀法和柱层析分离法。作者通过超过滤,超速离心,有机溶剂沉淀,离子交换色谱及凝胶渗透色谱相结合的方法对羊肚菌多糖进行了分离提纯,并对多糖组分及结构进行测定。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

天然羊肚菌菌种取自北京市食品研究所;已知分子量的 Dextran 及标准多糖为 Sigma 产品;Sephacrose CL-6B 为 Pharmacia 公司产品;DEAE-纤维素(DE-52)为 Whatman 产品;其他均为国产试剂。

日本岛津 UV2501PC 紫外分光光度计,高效液相色谱仪 Waters 600, Ultrahydrogel 2000 和 Ultrahydrogel 500 色谱柱串联, Waters 410 型示差折光检测器, Carlo-Erba 1106 元素分析仪, 美国 Varian 公司 INOVA-500 型核磁共振氢谱仪, 美国 Nicolet 公司的 IMPACT-400 型付立叶红外光谱仪, 岛津 GC-9A 气相色谱仪, 弹性石英毛细管柱 25m×0.33mm×0.25μm, SE-54 及凝胶渗透色谱(GPC)仪器自制。

1.2 方法

1.2.1 羊肚菌多糖的提取分离 天然羊肚菌菌种经过液体培养得到菌丝体, 菌丝体通过液体深层发酵制成营养液, 再通过超过滤法得到羊肚菌粗多糖^[2]。取分子量为 10 000~100 000 的粗多糖 MEP-SP 100 mg 溶于 1 mL 去离子水中, 通过 DEAE-纤维素柱(DE-52, OH 型)用水充分洗脱后, 依次用 0.1 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaCl 洗脱, 逐步收集, 15 mL/管。苯酚-硫酸法检测多糖峰位, 相同部位合并, 冷冻干燥后分别溶于 1 mL 蒸馏水中, 再过 Sepharose CL-6B 柱, 进一步分离纯化。

1.2.2 羊肚菌多糖的分子量测定 用高效液相色谱法测定 2 种多糖的分子量。流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 流速为 0.6 mL/min, 取 Waters 公司提供的 7 种不同分子量的标样 2 mg 分别溶于 1 mL 流动相中, 然后取 20 μL 各标样依次进样, 按 Waters 公司 GPC 软件操作以 $LgMw-t_R$ 作图得标准曲线。2

种多糖样品同标样操作依次进样, 由保留时间插入标准曲线上得分子量。

1.2.3 羊肚菌多糖的组成测定 用气相色谱法测定 2 种多糖的组成。2 种多糖各取 10 mg, 以 1 mL 1 mol/L H₂SO₄ 溶解, 封管, 80℃ 水解 10 h, 冷却, BaCO₃ 中和, 离心, 上清液冷却干燥, 置于干燥器中干燥 24 h。以 0.1 mL 吡啶溶解, 加六甲基二硅胺烷-三甲基氯硅烷(2:1)0.1 mL, 于 50℃ 放置 3 min 后由氯仿萃取进样, 弹性石英毛细管柱柱温 180℃, 流速 50 μL/min, FID 检测器温度 230℃。各种单糖及混和单糖标准品采取同样方法制成三甲基硅烷衍生物, 进样分析。由于各种糖对检测器的响应值不同, 因而测定糖基摩尔比需要先测定其定量校正因子。精密称取各标准单糖, 使各单糖与内标的重量比为 0.4~2.6 之间的 5 个不同浓度, 按前法制备成 TMS 并进行气相色谱分析, 求出各单糖的斜率 b 即定量校正因子(K)。样品的摩尔比测定条件与定量校正因子相同, 以葡萄糖为标准测定各糖基的峰面积, 乘以 K/M(M 为分子量), 所得之值即为摩尔比。

1.2.4 羊肚菌多糖的结构鉴定 取羊肚菌多糖 1 (MEP-SP2), 用 KBr 压片进行红外光谱分析, 扫描次数 32, 分辨率 4, 温度 20℃, 湿度 18%。以 TMS 为内标, D₂O 为溶剂, 室温 20℃, 射频 125 MHz 作碳谱, 射频 500 MHz 作氢谱, 进行核磁共振谱(¹³CNMR)及氢谱(¹HNMR)测定, 并结合紫外光谱及元素分析, 初步鉴定其结构。

2 结 果

2.1 羊肚菌多糖的种类

羊肚菌多糖在 DE-52 和 Sepharose CL-6B 上的洗脱曲线见图 1 和图 2。可以看出:采用 DE-52 纤维素离子交换柱用不同浓度的盐溶液洗脱和过 Sepharose CL-6B 凝胶柱进一步纯化得到 2 种多糖, 即 MEP-SP2 和 MEP-SP3, 前者 27.8 mg 占 27.8%, 后者 15.1 mg, 占 15.1%。

2.2 羊肚菌多糖的分子量

以标准葡聚糖分子量对数对 MEP-SP2 和 MEP-SP3 的保留时间作图(图 3), 从图 3 查得 MEP-SP2 和 MEP-SP3 分子量分别为 23 000 及 44 000。

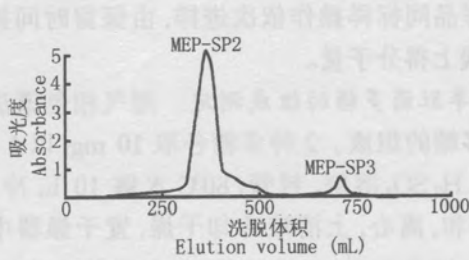


图1 羊肚菌多糖在 DE-52 上的洗脱曲线
Fig. 1 Elution profile of polysaccharides from MEP on DE-52

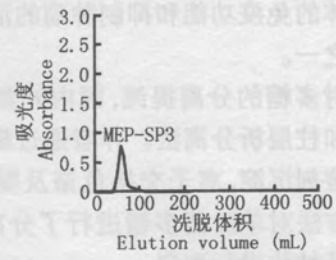
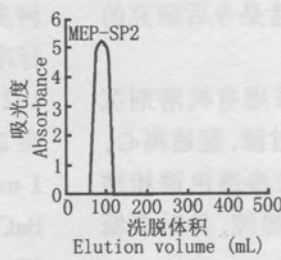


图2 羊肚菌多糖在 Sepharose CL-6B 上的洗脱曲线
Fig. 2 Elution profile of polysaccharides from MEP on Sepharose CL-6B

2.3 羊肚菌多糖的组成

MEP-SP2 和 MEP-SP3 气相色谱见图 4 和图 5。可以看出,羊肚菌多糖 MEP-SP2 是由甘露糖、葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖残基为重复单元组成的,摩尔比为 1.75:4.13:0.71:0.68; MEP-SP3 是由木糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、阿拉伯糖和半乳糖残基为重复单元组成的,摩尔比为 3.58:14.9:3.85:1.77:51.3:0.53。

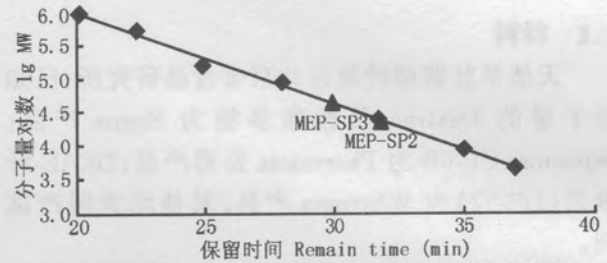
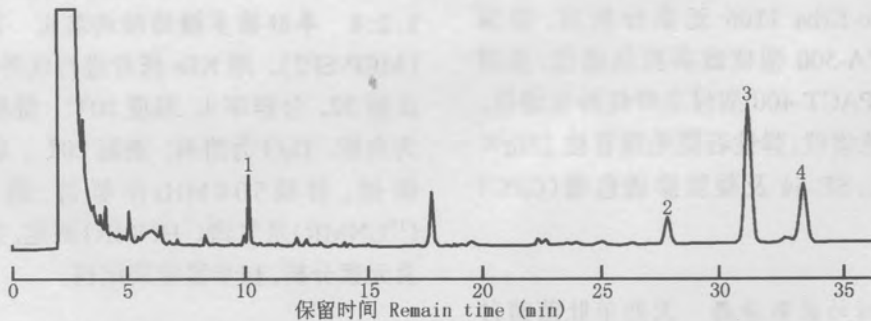
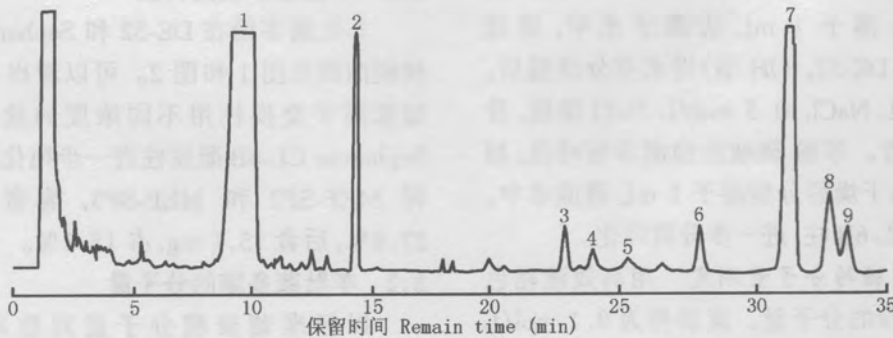


图3 高效液相色谱对 MEP-SP2 和 MEP-SP3 的分子量测定
Fig. 3 Molecular weight determination of MEP-SP2 and MEP-SP3 by HPLC



1. 阿拉伯糖 arabinose; 2. 半乳糖 galactose; 3. 葡萄糖 glucose; 4. 甘露糖 mannose

图4 MEP-SP2 气相色谱图
Fig. 4 Gas chromatogram of MEP-SP2



1. 阿拉伯糖 arabinose; 2. 木糖 xylose; 3,4,5. 果糖 fructose; 6. 半乳糖 galactose; 7. 葡萄糖 glucose; 8,9. 甘露糖 mannose

图5 MEP-SP3 气相色谱图
Fig. 5 Gas chromatogram of MEP-SP3

3.4 羊肚菌多糖的结构

羊肚菌多糖 1 (MEP-SP2) 的紫外光谱显示在 260 nm 和 280 nm 处未见蛋白质及核酸的特征吸收峰。元素分析结果为含碳 39.68%, 含氢 6.2%, 不含氮。红外光谱 $IR_{\nu_{\max}}^{KBr}$ (cm^{-1}) 显示出在 4 000~650 区内具有多糖类物质的一般特征。3 500~3 300 的吸收峰是游离 OH 的伸缩振动峰, 1 026 和 1 078 为吡喃糖环的醚键 C—O—C 振动吸收峰; 在 890 附近没有 β -糖苷键的特征吸收峰, 在 840 处有 α -糖苷键的特征吸收峰, 而在 810 处的振动吸收峰表明有甘露糖的存在。

MEP-SP2 的 ^{13}C -NMR 谱无呋喃糖基化学位移, 主要为吡喃糖基 (δ 102.97) 化学位移^[3,4]。 δ : 102.97、74.83、75.86、79.78、74.0 及 63.2, 与文献 [5] 对比应分别是 C-1、C-2、C-3、C-4、C-5 和 C-6 的信号。由于在 99~110 共振范围清楚呈现 4 个共振信号, 说明 MEP-SP2 为 4 个不同单糖残基的重复单位组成的杂多糖。在 MEP-SP2 的 1H -NMR 数据中 δ 5.47 及 5.15 的共振信号, 即 C_1 质子区的信号峰在 5.0 以上, 进一步证明糖苷键为 α 型^[6]。在 δ 3.39 和 4.24 处代表环上 2 和 5 位质子的信号^[7]。上述分析结果表明, 羊肚菌多糖 1 (MEP-SP2) 是一个具

有 α -吡喃糖苷键的杂多糖。

致谢 在研究工作中北京市食品所宋淑敏先生给予了大力支持, 在此表示衷心感谢!

参考文献

- [1] 吴锦文. 天然生理活性物质香菇多糖和灵芝多糖的国内外研究进展[J]. 江苏食用菌, 1995, 16(5): 33~34.
- [2] 邹作华, 宋淑敏, 王熊, 等. EP-11 食用蕈多糖的分离提纯与结构研究[J]. 食品科学, 1995, 16(4): 43~46.
- [3] 梁忠岩, 张翼伸. 长白山松杉灵芝子实体水溶多糖的分离鉴定与结构研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25(1): 59~63.
- [4] 方积年. ^{13}C -NMR 在多糖结构分析上的应用[J]. 国外药学 (抗生素分册), 1982, 3(2): 107.
- [5] 刘方明, 李志孝, 孟延发. 红芪多糖 RHG 的分离纯化及化学结构[J]. 药学报, 1997, 32(8): 603~606.
- [6] 张丽萍, 李森, 黄丽萍. 金顶侧耳酸提水溶性多糖的研究——PC-3 的分离、纯化与结构确定[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 158~162.
- [7] Sawads H, Furushiro M, Hiral K, *et al.* Purification and characterization of an antihypertensive compound from lactobacillus casei[J]. Biol Chem, 1990, 54(12): 3211~3219.

(责任编辑: 宗世贤)

敬告读者

《植物资源与环境》自 2000 年第 9 卷第 1 期起更名为《植物资源与环境学报》, 英文刊名 Journal of Plant Resources and Environment 已体现本刊的属性, 未予更动。卷号连续。从本期起本刊同时改为大 16 开本印刷, 定价仍为每期每册 4.00 元, 全年 16.00 元, 凡错过邮局征订时间者, 可向编辑部邮购, 每期每册另加邮寄包装费 1.50 元。

编辑部地址: 南京中山门外, 江苏省植物研究所内, 邮编: 210014, Tel. (025)4432128-3203, 中国科学院

Fax: (025)4432074, E-mail: JSSZZZZZ @ public 1. ptt. js. cn

《植物资源与环境学报》编辑部

2000-01-09