

# 香菇子实体蛋白多糖的分离纯化及组成结构分析

杨娟<sup>1</sup>, 吴谋成<sup>2</sup>, 张声华<sup>2</sup>

(1. 贵州省·中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 2. 华中农业大学食品科技系, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 香菇 [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] 子实体经热水提取, 乙醇沉淀, 得多糖粗品 (Le)。Le 脱游离蛋白, 脱色, 经 DEAE-纤维素柱及纤维素凝胶柱层析分离纯化得到 Le-1、Le-2 和 Le-3 3 个级分。经聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Sepharose CL-6B 柱层析鉴定为分子量分布均一的蛋白多糖。凝胶渗透色谱法测得 Le-1、Le-2 和 Le-3 分子量分别为 954 000, 90 000 和 14 000。3 个级分均由阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸组成, 气相色谱测得 Le-1 的阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖的摩尔比为 0.39:0.46:1.00:0.93:14.13; Le-2 为 0.19:0.41:1.00:0.93:10.72; Le-3 为 0.31:0.47:1.00:1.15:8.92。Le-1、Le-2 和 Le-3 葡萄糖醛酸含量 (%) 分别为 24.10、34.77 和 40.05, 蛋白质含量 (%) 分别为 2.01、7.38 和 25.31, 红外扫描确定 Le-1 和 Le-2 的糖苷键为  $\alpha$  型, Le-3 为  $\beta$  型。

**关键词:** 香菇; 蛋白多糖; 分离; 纯化; 性质

中图分类号: S567.3<sup>+</sup>9; Q539 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2001)02-0004-03

**Isolation, purification and characterization of polysaccharides from the fruitbody of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.** YANG Juan<sup>1</sup>, WU Mou-cheng<sup>2</sup>, ZHANG Sheng-hua<sup>2</sup> (1. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and the Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(2): 4-6

**Abstract:** After being extracted with hot water and precipitated with alcohol, crude polysaccharide (Le) was obtained from fruitbody of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Le was removed free proteins and colouring matter, then isolated and purified by DEAE-cellulose and cellulose gel column chromatography, three pure polysaccharides (Le-1, Le-2, Le-3) were obtained. Results of polyacrylamide gel electrophoresis and Sepharose CL-6B column chromatography illustrate that they were protein-bond polysaccharides with homogeneous molecular weights. Molecular weights of Le-1, Le-2 and Le-3 were 954 000, 90 000 and 14 000, respectively, by gel permeation chromatography. Three fractions were composed of arabinose (Ara), xylose (Xyl), mannose (Man), galactose (Gal), glucose (Glc) and glucuronic acid. Gas chromatography illustrated that the neutral saccharides molar ratio of Le-1 was Ara:Xyl:Man:Gal:Glc = 0.39:0.46:1.00:0.93:14.13; Le-2 was Ara:Xyl:Man:Gal:Glc = 0.19:0.41:1.00:0.93:10.72 and Le-3 was Ara:Xyl:Man:Gal:Glc = 0.31:0.47:1.00:1.15:8.92. Glucuronic acid contents (%) of three fractions were 24.10, 34.77 and 40.05 and protein contents (%) were 2.01, 7.38 and 25.31, respectively. Infra-red spectrum showed that the glycosidic linkages of Le-1 and Le-2 were  $\alpha$  type, while that of Le-3 was  $\beta$  type.

**Key words:** *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.; protein-bond polysaccharides; isolation; purification; characterization

香菇 [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] 是著名的食、药兼用菌。近年来发现香菇多糖具有调节机体免疫力、抑制肿瘤生长、抗辐射、抗糖尿病等方面的作用<sup>[1-3]</sup>。作者从香菇子实体中分离得到 3 种新的蛋白多糖, 并对其理化性质进行了初步分析, 为进一步研究香菇蛋白多糖的化学结构和生物活性提供基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

香菇由湖北省远安县真菌研究所提供; 多糖标

收稿日期: 2001-01-05

作者简介: 杨娟(1971-), 女, 重庆市人, 工学博士, 助理研究员, 主要从事天然产物化学研究。

准 Pullulan 系列为日本东京化成公司产品; Sepharose CL-6B 为 Pharmacia 公司产品; 其他试剂均为国产。

瑞典 LKB 公司 2032 型自动柱层析; 日本岛津 UV-265FW 紫外分光光度计; 北京六一仪器厂 DYY-38B 型稳压稳流定时电泳仪; 高效液相色谱仪 Waters 600, TSKG-5000 PW 色谱柱, Waters 401 型示差折射检测器; 岛津 GC-9A 气相色谱仪; 岛津 260-10 红外分光光谱仪; 德国 ALPHAL-2 真空冷冻干燥机。

## 1.2 方法

**1.2.1 香菇多糖的提取、分离和纯化** 香菇烘干粉碎后用石油醚脱脂, 80% 乙醇脱单糖及低聚糖, 热水浸提多糖, 乙醇沉淀, 干燥后得香菇多糖粗品 (Le)。取 Le 经 Savag 法脱游离蛋白, 20%  $H_2O_2$  脱色, 透析脱盐, 浓缩后取样上 DEAE-纤维素柱, 依次用水、0.05 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L NaCl 洗脱, 分部收集, 分别用紫外吸收法 (280 nm) 和酚硫酸法检测。透析脱盐, 浓缩后进一步用纤维素凝胶柱 (武汉大学化学系自制) 纯化, 用水洗脱, 检测方法同上。收集糖、蛋白质高峰部分, 冷冻干燥得到 Le 的 3 个级分 Le-1、Le-2 和 Le-3。

**1.2.2 纯度鉴定** (1) 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳<sup>[4]</sup>: 胶浓度为 5%, 电泳缓冲液为 0.025 mol/L pH 9.0 硼砂-硼酸缓冲液, 电压 100 V, 电泳 10 h, 分别用阿利新蓝对多糖、考马斯亮蓝 R250 对蛋白质染色。(2) Sepharose CL-6B 凝胶柱层析: 取 Le-1、Le-2 和 Le-3 各 10 mg, 溶于 0.2 mol/L NaCl 中, 上 Sepharose CL-6B 柱。用 0.2 mol/L NaCl 洗脱, 流速 10 mL/h, 分部收集 (20 min/管), UV280 nm 和酚硫酸法检测, 以洗脱管数为横坐标, 吸光值为纵坐标作图。

**1.2.3 分子量及组成结构分析** (1) 分子量测定: 凝胶渗透色谱法<sup>[5]</sup>。流动相为 0.2 mol/L, pH 6.0 磷酸盐缓冲液, 流速为 1.0 mL/min, 多糖标准为 Pullulan 系列: P-800 (MW 870 000), P-400 (MW 432 000), P-200 (MW 186 000), P-50 (MW 48 000), P-20 (MW 23 700)。以 Log MW-RT (保留时间) 作图得标准曲线, 由保留时间求得分子量。(2) 组成分析: A. 单糖组成及摩尔比: 称取 Le-1、Le-2 和 Le-3 各 15 mg, 加入 2 mol/L  $H_2SO_4$  4 mL, 封管后, 在 100℃ 条件下水解 10 h, 水解液中和, 过滤, 冷冻干燥后制成糖的三甲基硅醚衍生物进行气相色谱分析<sup>[6]</sup>, 根据各峰的面积比算出摩尔比。色谱柱为 3mm × 2m 不锈钢柱, 担体为 Chromosorb W (60 ~ 80

目), 3% SE-30 固定液, 氢火焰离子化检测器, 记录仪; C-R6A 积分仪。分析条件为: 柱温 180℃, 进样口温度 230℃, 空气流速 500 mL/min, 氢气流速 50 mL/min, 氮气流速 20 mL/min; B. 中性糖含量测定: 根据气相色谱测定结果, 取组成蛋白多糖的单糖按比例混合后作为标准, 采用酚硫酸法测定<sup>[7]</sup>; C. 糖醛酸含量测定: 硫酸-吡啶法<sup>[8]</sup>; D. 蛋白质含量测定: 考马斯亮蓝法<sup>[9]</sup>; E. 氨基酸组成分析: 准确称取 Le-1、Le-2 和 Le-3 各 5 mg, 以 6 mol/L HCl 溶解, 封管, 水解 24 h 后定容至 50 mL, 取 1 mL 蒸干, 加 0.02 mol/L HCl 溶解后用氨基酸自动分析仪分析。(3) 构型分析: 红外光谱扫描 (KBr 压片)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基本理化性质

Le-1 和 Le-2 溶于水呈浑浊粘稠状, Le-3 水溶性很好。3 个级分都不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。硫酸-苯酚、硫酸-吡啶及考马斯亮蓝反应呈阳性; 菲林试剂和碘-碘化钾反应呈阴性, 表明 3 个组分含有多糖、蛋白质和糖醛酸, 不含还原糖和淀粉。

### 2.2 化合物纯度

Le-1、Le-2 和 Le-3 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 用阿利新蓝和考马斯亮蓝 R250 染色, 结果均表现为单一区带, 两种染色法显示的区带出现在相同的位置。Sepharose CL-6B 凝胶柱层析结果为洗脱液在 490 nm (先经酚硫酸法显色) 和 280 nm 处的吸收值变化趋势一致, 并为单一对称峰。因此可以确认 Le-1、Le-2 和 Le-3 为分子量分布均一的蛋白多糖。

### 2.3 蛋白多糖分子量

以 Pullulan 系列分子量对数对其在凝胶渗透柱上的保留时间作图, 得到分子量标准曲线, 标准方程为  $\log MW = 9.49 - 0.555 RT$ ,  $r = 0.9996$ 。从而计算出 Le-1、Le-2 和 Le-3 的分子量分别为 954 000、90 000 及 14 000。

### 2.4 蛋白多糖的组成

**2.4.1 中性单糖的组成及摩尔比** 气相色谱表明 (图 1), 各级分重复结构都为含有阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖 5 种中性单糖的杂多糖。其摩尔比 Le-1 为 0.39:0.46:1.00:0.93:14.13; Le-2 为 0.19:0.41:1.00:0.93:10.72; Le-3 为 0.31:0.47:1.00:1.15:8.92。Le-1、Le-2 和 Le-3 中性糖含量

(%)分别为67.75、49.24和30.57;葡萄糖醛酸含量(%)分别为24.10、34.77和40.05。

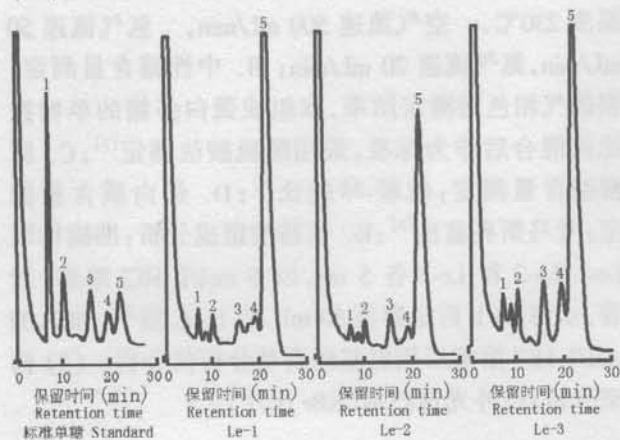


图1 标准单糖和香菇子实体纯多糖3个级分的气相色谱图  
Fig. 1 Gas chromatographies of standard monosaccharides and three fractions of polysaccharides from the fruitbody of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.

2.4.2 蛋白质含量及氨基酸组成 Le-1、Le-2和Le-3蛋白质含量(%)分别为2.01、7.38和25.31;氨基酸含量(g/100g):天门冬氨酸分别为0.14、0.85和3.81;苏氨酸0.11、0.60和1.72;丝氨酸0.12、0.70和2.12;谷氨酸0.15、1.14和4.04;甘氨酸0.07、0.35和1.96;丙氨酸0.09、0.41和1.58;半胱氨酸0.24、0.33和0;缬氨酸0.13、0.29和1.25;蛋氨酸0.11、0.20和0.53;异亮氨酸0.10、0.21和0.81;亮氨酸0.11、0.43和1.19;酪氨酸0.06、0.02和0.71;苯丙氨酸0.20、0.34和1.03;赖氨酸0.09、0.46和1.28;组氨酸0.02、0.03和0.30;精氨酸0.05、0.24和1.09;脯氨酸0.05、0.23和1.07。

## 2.5 蛋白多糖的糖苷键构型

3个级分的红外光谱显示,在 $2925\text{ cm}^{-1}$ (C—H)、 $1620\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ (C=O)、 $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ (吡喃糖环醚键C—O—C)和 $1420\text{ cm}^{-1}$ (C—O)处有多糖吸收峰; $3400\text{ cm}^{-1}$ 处有一级氨基、二级氨基吸收峰, $1620\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ 处有酰胺基的特征吸收峰, $1420\text{ cm}^{-1}$ 处的C—N伸缩振动,Le-1、Le-2在 $920\text{ cm}^{-1}$ 和 $840\text{ cm}^{-1}$ 处有 $\alpha$ -糖苷键的特征吸收峰;Le-3则在 $890\text{ cm}^{-1}$ 处有 $\beta$ -糖苷键特征吸收峰,3个级分

均在 $870\text{ cm}^{-1}$ 和 $800\text{ cm}^{-1}$ 处有甘露吡喃糖特征吸收峰。

由以上结果可以看出Le-1、Le-2和Le-3与以往报道的香菇多糖不同,如Sasaki等报道的香菇子实体多糖Lentinan,是只由葡萄糖组成的同多糖,分子量约为100万,不含蛋白质<sup>[10]</sup>;张俐娜从香菇子实体中得到4种酸性杂多糖和2种葡聚糖,也不含蛋白质,分子量大于100万<sup>[11]</sup>。因此Le-1、Le-2和Le-3是从香菇子实体中分离得到的新类型多糖。

## 参考文献:

- [1] Kanai K, Kondo E, Jacques P J. Immunopotentiating effect of fungal glucans as revealed by frequency limitation of postchemotherapy relapse in experimental mouse tuberculosis [J]. *Jpn J Med Sci Biol*, 1980, 33 (6): 283-291.
- [2] Urushiya K I. Host defense mechanisms against cancer amsterdan [J]. *Excerpta Medica*, 1986; 167-176.
- [3] Zakang J, Chihara G, Fachet J. Effect of lentinan on tumor growth in murine allogeneic and syngeneic [J]. *Int J Cancer*, 1980, 25: 371-383.
- [4] 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、纯化及单糖的鉴定[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1984, 16(4): 393-397.
- [5] 陈春英,丁玉强,Elmahadi E A,等. 蕈叶多糖的分离纯化及其理化性质的研究[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, 14 (4): 422-431.
- [6] 李铁林,吴昌贤,蒋挺大,等. 糖和糖醇的气相色谱分析, II. 单糖三甲基硅醚衍生物的气相色谱分析[J]. *分析化学*, 1981, 9 (3): 295-298.
- [7] 林颖,吴毓敏,吴雯,等. 天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 1996, 8(3): 5-9.
- [8] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. *Anal Biochem*, 1962, 4: 330-334.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [10] Sasaki T, Takasuka N. Further study of the structure of Lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes* [J]. *Carbohydr Res*, 1976, 47: 99-104.
- [11] 张俐娜,张平义,李翔,等. 香菇多糖的成分及其分子量研究[J]. *高等学校化学学报*, 1998, 19(9): 1513-1517.

(责任编辑:宗世贤)