

美味牛肝菌胞外多糖的 分离纯化及组分分析

矫丽曼^{1,2}, 纪纯阳², 阚国仕¹, 陈红漫¹, 杨玉红^{1,*}

(1. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110161;

2. 辽宁省杨树研究所, 辽宁盖州 115200)

摘要: 主要对美味牛肝菌发酵产生的胞外多糖(BeBEP)进行了分离纯化和组分的分析。方法: 采用 DEAE-纤维素柱层析和 Sephadex G-100 凝胶柱层析对 BeBEP 进行分离纯化, 得到的主要成分 BeBEP III a, 用紫外光谱和醋酸纤维素薄膜电泳方法进行纯度鉴定, 红外光谱进行结构分析, 高效液相色谱法分析单糖组分。结果表明: BeBEP III a 为均一组分, 存在吡喃糖苷, 由 D-木糖、D-甘露糖和 D-半乳糖三种单糖组成, 摩尔比为 3.1:63.3:1.0, 其中主要以 D-甘露糖为主。

关键词: 美味牛肝菌, 胞外多糖, 分离纯化, 组分分析

Separation, purification and component analysis of extracellular polysaccharide of boletus edulis bull

JIAO Li-man^{1,2}, JI Chun-yang², KANG Guo-shi¹, CHEN Hong-man¹, YANG Yu-hong^{1,*}

(1. Biology Science and Technology Institute, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China;

2. Liaoning Provincial Institute of Poplar, Gaizhou 115200, China)

Abstract: This article focused on the separation and purification and analysis of the fermentation components of BeBEP. The BeBEP was separated and purified by DEAE - cellulose and Sephadex G - 100 column chromatography, the purity of which was verified through ultraviolet spectrum and cellulose acetate pellicle electrophoresis, the structure of which was analyzed with IR spectrum and the monosaccharide component was analysed with HPLC. The results showed that BeBEP III a was a polysaccharide, presences pyran indican, including xylose, mannose and galactose with a molar ratio of 3.1:63.3:1.0, but mannose was primary.

Key words: boletus edulis; extracellular polysaccharide; separation and purification; analysis of the components

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)05-0164-03

美味牛肝菌属于担子菌纲伞菌目、牛肝菌科、牛肝菌属, 又称大脚菇, 它含有多种氨基酸、维生素、矿物质和多糖。动物实验和临床研究结果表明^[1], 药用真菌多糖具有抗肿瘤、病毒作用, 能促进机体中枢免疫器官胸腺和脾的增长, 促进淋巴细胞增生, 提高机体的免疫功能, 同时, 对机体红细胞 SOD 活性具有促进作用, 因而具有抗衰老的功效, 是一种珍贵的药物资源。目前国内外的大多数研究都主要集中在对美味牛肝菌多糖的发酵、提取和生物活性方面, 而对它的分离纯化和组分分析研究的较少。因此本文较深入地研究了美味牛肝菌胞外多糖的分离纯化方

法, 并对纯化多糖的结构和组分进行初步研究, 为进一步研究美味牛肝菌胞外多糖的生物活性和多糖构效关系提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

美味牛肝菌 5.504 购自中国科学院微生物所菌种保藏中心; 乙醇, 三氯甲烷, 正丁醇, 活性炭, 苯酚, 硫酸, 氯化钠, 硼砂, 氢氧化钠, 甲苯胺蓝, 溴化钾, 三氟乙酸, 甲醇, DEAE-cellulose, Sephadex G-100。

721 型分光光度计, HH-6 型数显恒温水浴锅, LGJ-10 型冷冻干燥仪, SPD-10A 紫外检测仪, 红外光谱仪, SPD-10A 检测仪, LC-10AT 流动泵, 层析柱 (2.0cm × 40cm)。

1.2 实验方法

1.2.1 BeBEP 的提取与预处理 在无菌条件下, 用直径为 10mm 的打孔器, 在长满美味牛肝菌菌丝的培

收稿日期: 2009-07-17 * 通讯联系人

作者简介: 矫丽曼 (1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事酶工程及生物活性物质方面的研究。

基金项目: 沈阳农业大学青年基金项目 (2005053)。

养皿上打孔,镊子夹取两片菌丝碟接种于盛有100mL 发酵培养基的三角瓶中,28℃,150r/min 恒温振荡培养 6d,取出滤去菌丝,合并上清液浓缩,用0.5%的木瓜蛋白酶 + Seavage [V(多糖溶液):V(三氯甲烷):V(正丁醇) = 25:5:1]法^[2]脱去粗多糖溶液中游离的蛋白,3% 活性炭,50℃脱色 2h,过滤离心,浓缩,用三倍体积 95% 乙醇沉淀 48h,沉淀冷冻干燥,得到精制的 BeBEP。

1.2.2 BeBEP 的分离纯化

1.2.2.1 DEAE-纤维素柱层析^[3-5] 称取 100mg 精制的 BeBEP,充分溶于 10mL 蒸馏水中,离心除去不溶物,上清液用 DE-52 阴离子交换柱进行层析分离,分别用蒸馏水、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0mol/L 的 NaCl 溶液依次洗脱,控制洗脱速度 2mL/min,每管收集 3mL 洗脱液,苯酚-硫酸法跟踪检测收集液,合并各洗脱峰洗脱液,浓缩,透析,冷冻干燥,即得 BeBEP 的半纯品。

1.2.2.2 Sephadex G-100 凝胶柱层析^[5] 取洗脱峰含量高的组分 10mg 溶于 10mL 蒸馏水中,离心除去不溶物,上清液用 Sephadex G-100 进行凝胶柱层析,用相应浓度的 NaCl 溶液洗脱,控制洗脱速度 2mL/min,苯酚-硫酸法跟踪检测收集液。收集各洗脱峰洗脱液,浓缩,透析,冷冻干燥,得到 BeBEP 的纯品。

1.2.3 BeBEP 的纯度鉴定^[6-8]

1.2.3.1 紫外光谱分析法 将 BeBEP 纯品配成 1mg/mL 的水溶液,在紫外分光光度计上进行 200~400nm 的连续扫描。

1.2.3.2 醋酸纤维素薄膜电泳法 醋酸纤维素薄膜规格为 2cm × 8cm,缓冲液为硼砂-NaOH 缓冲液 (pH10.0),电压为 240V,电泳时间 30~40min,1% 甲苯胺蓝溶液染色,90% 乙醇漂洗至条带清晰,根据染色后斑点的形状来判断样品的纯度。

1.2.4 BeBEP 的红外光谱分析^[9-10] 称取 BeBEP 纯品 2mg 与 KBr 混合,压片,测定 BeBEP 在 4000~200cm⁻¹ 的红外吸收光谱。

1.2.5 BeBEP 的单糖组分分析^[11-13] 取 BeBEP 纯品 5mg,加 2mol/L 的三氟乙酸 4mL,真空封管,110℃ 水解 6h,40℃ 下蒸干试管中的液体,用 3mL 甲醇洗涤蒸干,重复三次,最后用无菌水复溶。进行高效液相色谱分析,并与标准单糖对照,确定单糖的组成种类,计算各单糖的摩尔比。

色谱条件为:流动相为乙腈:水(80:20),流速为 0.8mL/min,固定相为氨基柱,检测器为示差折光检测器,柱温 25℃,进样量为 5μL。

2 结果与分析

2.1 DEAE-纤维素柱层析结果

由图 1 中可以看出,美味牛肝菌胞外多糖 BeBEP 在不同的离子强度溶液中均有存在,主要出现三个峰,但含量不同,蒸馏水洗脱峰(BeBEP I)和 0.1mol/L NaCl 洗脱峰(BeBEP II)含糖量较低,而 0.3mol/L NaCl 洗脱峰(BeBEP III)含糖量较高。因此只收集 BeBEP III,并对 BeBEP III 进行进一步的纯化。

2.2 Sephadex G-100 凝胶柱层析结果

由图 2 中可以看出,经 DEAE-纤维素柱层析得

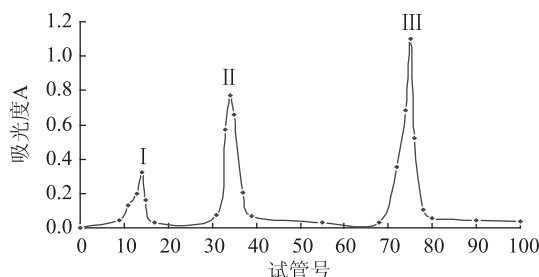


图 1 BeBEP 的 DEAE-纤维素柱层析曲线

到的 BeBEP III 并不是单一组分,通过 Sephadex G-100 凝胶柱层析得到了两个峰,即 BeBEP III a 和 BeBEP III b,BeBEP III b 含糖量较低,所以未作研究。而 BeBEP III a 含糖量较高,收集并对其进行纯度鉴定和理化性质的研究。

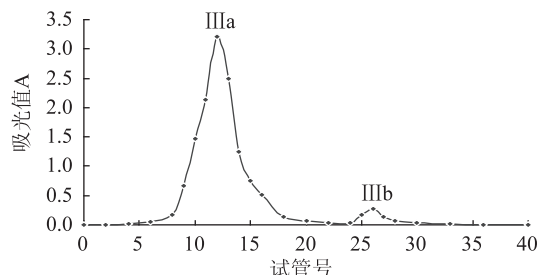


图 2 BeBEP III 的 Sephadex G-100 凝胶柱层析曲线

2.3 BeBEP 的纯度鉴定结果

2.3.1 紫外光谱分析法 从图 3 的紫外扫描图谱可以看出:牛肝菌胞外多糖 BeBEP III a 的紫外扫描曲线比较平滑,在 260、280nm 处无吸收峰,可以认为,BeBEP III a 不含有杂蛋白、多肽和核酸,证明其为单一组分的多糖纯品。

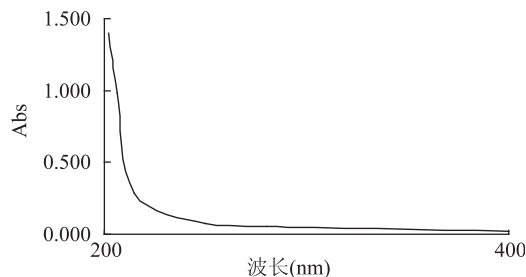


图 3 BeBEP III a 的紫外扫描图谱

2.3.2 醋酸纤维素薄膜电泳法 由图 4 的电泳图可以看出,精制的 BeBEP 电泳后斑点不唯一,说明含有多种多糖组分;BeBEP III 电泳后有两个蓝色的斑点,说明含有两种多糖。而经 Sephadex G-100 凝胶柱层析得到的多糖组分 BeBEP III a,其醋酸纤维素薄膜电泳结果为单一的蓝色斑点,说明 BeBEP III a 在组成上比较唯一,是一种多糖纯品,可以进行多糖理化性质的研究。

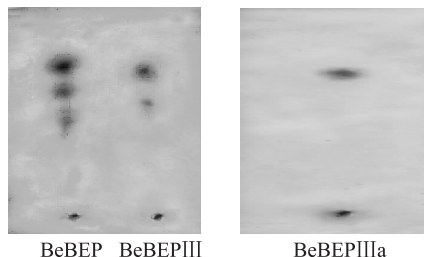


图 4 BeBEP、BeBEP III、BeBEP III a 的电泳图

2.4 BeBEP 的红外光谱分析结果

由图5可以看出, BeBEP III a 在 3416.2cm^{-1} 处有一强且宽的吸收峰, 是多糖的 O-H 键的伸缩振动, 表明多糖存在分子内和分子间的氢键; 在 2931.1cm^{-1} 处的吸收峰表明分子中有 C-H 键的伸缩振动, 为糖类的特征峰; 1637.3cm^{-1} 处的吸收峰是 C-O 的非对称伸缩振动峰, 为多糖的水合振动峰; 在 1386.3cm^{-1} 处的吸收峰为 -OH 的变形振动, 表明该组分为多聚糖; 1054.8cm^{-1} 处比较大的吸收峰是由两种 C-O 键伸缩振动所引起的; 其中一种是属于 C-O-H 的, 另一种是糖环的 C-O-C。在 813.9cm^{-1} 处出现的吸收峰为吡喃糖苷吸收峰, 说明该组分中存在吡喃糖苷; 在 579.6cm^{-1} 处的吸收峰是硫酸酯键的吸收峰, 表明多糖 BeBEP III a 含有硫酸基团, 因而可能具有抗病毒作用。

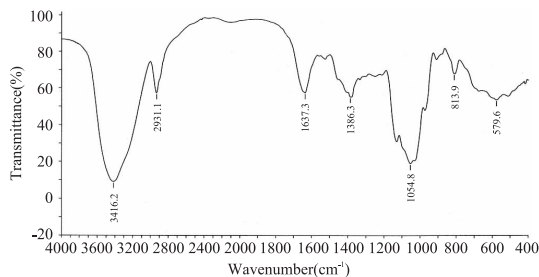


图5 BeBEP III a 红外光谱图

2.5 BeBEP 的单糖组分分析结果

BeBEP III a 用三氟乙酸完全水解进行 HPLC 分析, 并与单糖标准品的保留时间对比, 分析 BeBEP III a 的单糖组分, 根据峰面积确定各单糖在分子组成上的摩尔比。

从图6和图7可以看出, 与标准单糖的保留时间对比, BeBEP III a 完全水解液里含有三种单糖: D-木糖、D-甘露糖和 D-半乳糖, 摩尔比为: 3.1:63.3:1.0。可见美味牛肝菌胞外多糖 BeBEP III a 主要由 D-甘露糖组成。

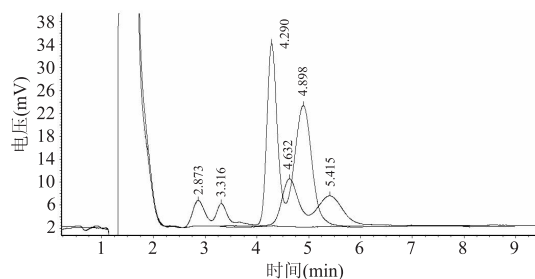


图6 标准单糖的 HPLC 色谱图

自左向右依次为: L-鼠李糖、D-木糖、D-果糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖。

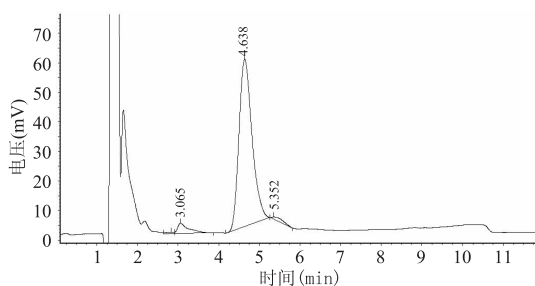


图7 BeBEP III a 水解液的 HPLC 色谱图

3 结论

3.1 脱蛋白去色素后的牛肝菌多糖 BeBEP, 经过 DEAE-纤维素柱层析和 Sephadex G-100 凝胶柱层析分离纯化得到 BeBEP III a, 用紫外光谱和醋酸纤维素薄膜电泳方法对其纯度进行鉴定, 结果表明, BeBEP III a 是单一的组分, 可以用于结构和组分的分析。

3.2 BeBEP III a 红外光谱扫描得出: 该多糖存在分子内和分子间的氢键, 分子中还存在着 C-H 键伸缩振动和 -OH 的变形振动, 存在吡喃糖苷吸收峰。说明 BeBEP III a 是典型的多糖类化合物, 而且分子中存在硫酸酯键, 具有潜在的抗病毒作用。

3.3 BeBEP III a 经过高效液相色谱分析得出: 其单糖组成为 D-木糖、D-甘露糖和 D-半乳糖, 摩尔比为 3.1:63.3:1.0, 主要以 D-甘露糖为主。

本文主要对美味牛肝菌胞外多糖进行了分离纯化、结构和组分分析, 而对其分子结构、生物学活性及其作用机制还有待进一步的研究, 以期对美味牛肝菌多糖药用价值的研制拓宽发展空间和途径。

参考文献

- [1] 唐薇, 鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及其抗 S-180 肿瘤的应用[J]. 西南师范大学学报, 1999, 24(4): 478-481.
- [2] Masashi Mizuno. Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei murill* [J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 2003, 47(4): 707-714.
- [3] 吕庆, 夏玮, 张文清, 等. 桑叶多糖的分离纯化与分析[J]. 2007, 33(7): 167-170.
- [4] 谭周进, 谢达平, 王征, 等. 蜜环菌多糖分离纯化及性质的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 49-53.
- [5] 顾林, 姜军. 山药多糖的分离纯化及组分研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 158-161.
- [6] 陈海华, 许时婴, 王璋. 亚麻籽胶中酸性多糖和中性多糖的分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(1): 96-100.
- [7] 赵玉萍, 纪丽莲, 朱晓庆. 真菌多糖提纯、组分分析及结构初步鉴定[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 127-129.
- [8] Koh J H. Antifatigue and antistress effect of the hot-water extract from Mycelia of *Lentinan* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 26(5): 691-694.
- [9] Jennifer M FWAN, Daniel K O CHAN. The quantification of (1,3)- α -glucan in edible and medicinal mushroom polysaccharides by using limulus G test [J]. *Mycosystema*, 2003, 22(2): 296-302.
- [10] 李永泉, 吴炬, 花立明, 等. 白阿魏菇菌丝体多糖分离纯化工艺的优化和结构分析[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2003, 39(4): 49-54.
- [11] 刘咏, 成战胜. 茶叶多糖的提取纯化及其单糖组分鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(6): 134-136.
- [12] 李亚清, 杨海波, 刘艳, 等. 小球藻多糖的分离纯化和组分分析[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(3): 294-296.
- [13] F Nachtmann, K W Budna. Sensitive determination of derivatized carbohydrates by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1977, 133(2): 279-287.