

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0244 - 05

灰树花胞外多糖的性质与结构

陈石良¹, 马青², 谷文英¹, 陶文沂¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 杭州娃哈哈集团有限公司研发中心, 浙江 杭州 310020)

摘要:对发酵法生产的灰树花胞外多糖 GLP-A-2 的理化特性与结构进行了初步研究. 经凝胶柱层析和 HPLC 检测纯度, 证明水溶性多糖 GLP-A-2 为单一均匀组分, 不含蛋白质和核酸, 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +177.50$ (H₂O, 0.1), HPLC 法测得平均相对分子质量为 6.2×10^4 . GC、IR 和 ¹³C-NMR 分析表明, GLP-A-2 是一类 β-葡聚糖, 分子的主链以 β(1→3)-糖苷键连接, 并含有 β(1→6)、α(1→2)、α(1→3) 及 β(1→2) 糖苷键相连的侧链. GLP-A-2 可与刚果红结合, 形成的络合物在 0~0.4 mol/L 的 NaOH 溶液中, 表现出最大吸收波长 (λ_{max}) 的特征变化, 同时在 CD 谱中出现明显的有序结构信息. 这提示 GLP-A-2 在溶液中存在三股螺旋构象, 维持其有序构象的力可能以氢键力为主.

关键词:灰树花 胞外多糖 结构分析

中图分类号: Q 538

文献标识码: A

The Character and Structure of Extracellular Polysaccharide from *Grifola frondosa*

CHEN Shi-liang¹, MA Qing², GU Wen-ying¹, TAO Wen-yi¹

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Research & Development Centre, Hangzhou Wahaha Group Co. LTD, Hangzhou 310020, China)

Abstract: The physical and chemical characteristics of GLP-A-2 isolated from fermentation broth of *Grifola frondosa* were primarily determined. The water-soluble polysaccharide GLP-A-2 was proved to be a homogeneous component by using the techniques of Sephadex G-200 column chromatography and HPLC. It had a optical rotation $[\alpha]_D^{25} = +177.50$ (H₂O, 0.1). The average molecular weight of GLP-A-2 was 6.2×10^4 determined by HPLC. The structure of GLP-A-2 was determined by GC, IR and ¹³C-NMR. The results showed that GLP-A-2 was β-D-glucan, which possessed a β(1→3) linked backbone and sidechains involving β(1→6), β(1→2), α(1→2), α(1→3)-glycosidic bonds. GLP-A-2 could form a complex with Congo red and exhibited the specific change in the absorption maximum of the Congo Red-glucan complex. On the other hand, CD spectra analysis showed that GLP-A-2 had an ordered molecular structure. All these indicated that GLP-A-2 probably took a triple helical conformation in water and its hydrogen bond force was probably a main force supporting that conformation.

Key words: *Grifola frondosa*; extracellular polysaccharides; structure analysis

收稿日期: 2001-11-05; 修订日期: 2001-12-29.

作者简介: 陈石良(1969-)男, 湖南邵阳人, 工学博士, 上海中企东方资产管理有限公司高级研究员.

万方数据

多糖的生物活性直接依赖于糖链的结构与构象,揭示多糖结构与功能的关系是目前真菌多糖的研究热点.虽然有关灰树花多糖结构的分析已有不少报道^[1,2],但大多数是以来自子实体的多糖为研究对象,而对发酵产物中的多糖结构研究还较少^[3].GLP-A-2是作者从灰树花 GfUV04 菌株发酵液中分离纯化出来的一种主要多糖组分,经动物实验证实,该组分具有显著的抗肿瘤和增强机体免疫功能的作用^[4].

1 材料与方法

1.1 材料

GLP-A-2按文献[4]介绍的方法制备.

1.2 试剂

Dextran 标准品和 Sephadex G-20 为 Pharmacia 公司产品,D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖、D-木糖、D-鼠李糖和 D-阿拉伯糖均为 Sigma 公司产品,其余均为国产分析纯试剂.

1.3 仪器

红外光谱仪:IR-440,日本 Shimadzu 仪器公司生产;核磁共振仪:AX300,瑞士 BRUKER 仪器公司生产;气相色谱仪:GC-14A,日本岛津公司生产.高压液相色谱仪:Waters 公司生产,配置有 2140 示差折光检测器、510 泵和 740 数据处理机;j-500C 圆二色谱仪、WZZ-2A 自动旋光仪:上海物理光学仪器厂生产.

1.4 方法

1.4.1 高压液相色谱 将糖样配成 20 mg/mL 的溶液进样.采用 Ultrahydrogel linear(7.8 mm × 300 mm)色谱柱,双柱串联,氢火焰离子化检测器(FID).流动相为 0.1 mol/L NaNO₃ 溶液,体积流量为 0.9 mL/min,柱温 45 °C,进样量 20 μL,记录样品色谱曲线.

1.4.2 相对分子质量测定 按 HPLC 测定纯度时的相同条件,将相对分子质量分别为 4 100,71 400,110 000,200 000,580 000 的标准 Dextran 相继进样,记录各自的保留时间 RT,以 RT 为横坐标,lg M 为纵坐标,绘制标准曲线.待测样品按上述条件进样,求得 RT,查标准曲线,得到多糖相对分子质量.

1.4.3 红外光谱分析 取多糖 10 mg 与 KBr 压片,用 IR-440 扫描.

1.4.4 紫外光谱分析 将多糖配成质量浓度为 0.1 g/dL 的溶液,用 UV-300 扫描.

1.4.5 核磁共振分析(¹³C-NMR) 20 mg 多糖样品溶于 0.5 mL D₂O 中,300 MHz 的 NMR 仪在 313 K 下连续 4 h 测定,参考标准为 DSS.

1.4.6 气相色谱分析 参照文献[5]所述方法制备糖乙酰化衍生物,然后直接进行气相色谱分析.采用弹性石英毛细管柱,内径 0.32 mm,长 30 m,担体为 Chromosorb WAW DMCS(80~100 目),固定液为 3%OV-1701,载气 N₂,体积流量 1.5 mL/min,氢火焰检测器(FID),气化室温度 260 °C,检测温度 250 °C,程序升温:180 °C(3 min)→240 °C(30 min).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摩尔比.

1.4.7 圆二色谱测定 将样品配成 2.0% 的多糖溶液,以 J-500C 圆二色谱仪在室温条件下进行测定,波长范围为 190~350 nm.

1.4.8 刚果红实验 按文献[8]所述方法,以 UV-754 分光光度计在 0~0.4 mol/L NaOH 溶液条件下测 λ_{max} 的变化,以 Dextran T-41 以及纯刚果红溶液为参比,手控波长扫描.

1.4.9 比旋光度测定 将样品配成一定浓度的溶液,WZZ-2A 自动旋光仪以室温条件下测定比旋光度.

2 结果与分析

2.1 纯度鉴定

2.1.1 凝胶柱层析 洗脱液经苯酚-硫酸法测多糖分布,以管号对光密度作图,为单一对称洗脱峰(见图 1).

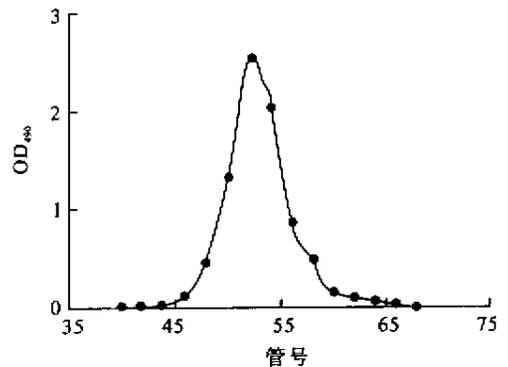


图1 GLP-A-2的Sephadex G-200柱层析

Fig.1 Chromatogram of GLP-A-2 on Sephadex G-200 Column

2.1.2 高压液相色谱 多糖经高压液相色谱测定呈单一对称吸收峰(见图 2).

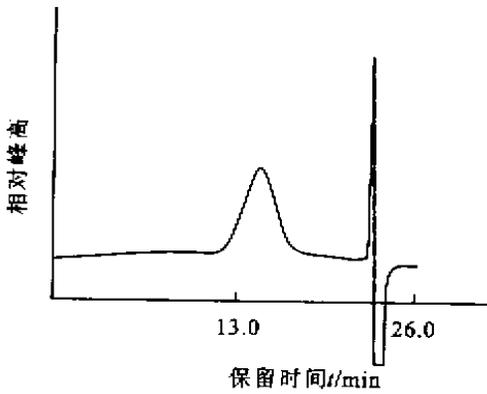


图2 GLP-A-2 的高压液相色谱

Fig.2 HPLC of GLP-A-2

以上两种纯度检测结果表明,多糖 GLP-A-2 为均一组分。

2.2 物理性状

GLP-A-2 为白色粉末状,易溶于水,不溶于乙醇、乙醚、丙酮等有机溶剂。其比旋度为 $[\alpha]_D^{25} = +177.50$ (H₂O, 0.1)。显色反应结果表明:GLP-A-2 与苯酚-硫酸试剂反应呈红色,与蒽酮试剂反应呈蓝绿色,与 α -萘酚试剂反应呈紫红色,与 KI-I₂、斐林试剂均不显色。

2.3 单糖组成

GC 分析表明, GLP-A-2 由葡萄糖组成(见图 3),为均一多糖。

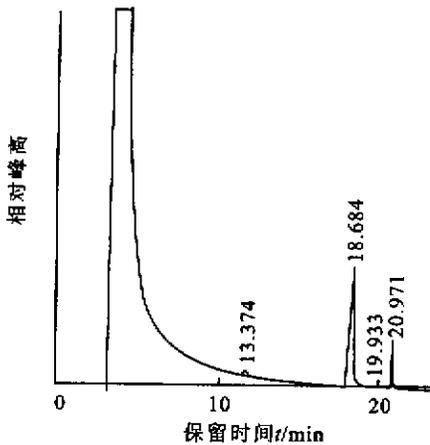


图3 GLP-A-2 水解物的气相色谱

Fig.3 GC of Hydrolysates of GLP-A-2

2.4 相对分子质量

经 HPLC 测得 GLP-A-2 的近似相对分子质量约为 62 000(见图 4)。

2.5 光谱分析

紫外吸收光谱(UV):紫外光谱分析表明, GLP-A-2 为末端吸收,未发现有核酸及蛋白质的吸收峰(图 5)。

红外吸收光谱(IR):GLP-A-2 图谱显示(见图

6)在 $3\ 200 \sim 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 出现一种宽峰,是 O—H 的伸缩振动,表明多糖存在分子内和分子间的氢键。在 $2\ 800 \sim 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰是 C—H 伸缩振动,这一区域的吸收峰是糖类的特征吸收峰。 $1\ 200 \sim 1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 所看到的不太尖的吸收峰是 C—H 的变角振动。 $1\ 000 \sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 间比较大的吸收峰是由两种 C—O 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。 $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是—CHO 的 C=O 伸缩振动造成的。 $890\ \text{cm}^{-1}$ 处有一吸收峰,是吡喃糖 β -型 C—H 变角振动的特征吸收峰,表明有 β -糖苷键^[5]。

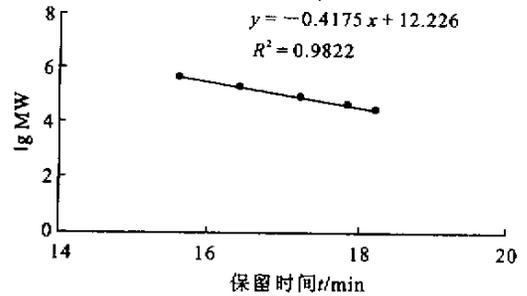


图4 GLP-A-2 的相对分子质量测定

Fig.4 Determination of GLP-A-2 Molecular Weight by HPLC

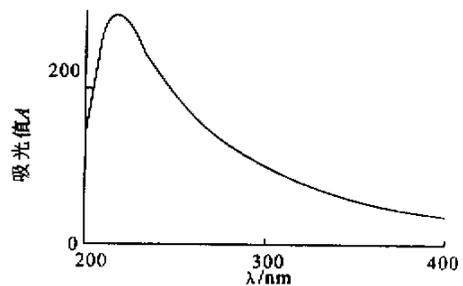


图5 GLP-A-2 的紫外光谱

Fig.5 UV Spectrum of GLP-A-2

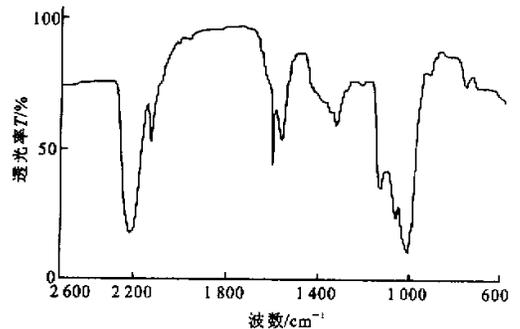


图6 GLP-A-2 的红外光谱

Fig.6 IR Spectrum of GLP-A-2

2.6 NMR 分析

由 GLP-A-2 的 ¹³C-NMR 图谱(图 7)可知,在异

头碳 $9.8 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^{-4}$ 共振范围内出现 5 个共振信号,可以肯定有 5 个残基(异头碳)组成。

1) 98.2×10^{-5} 和 78.1×10^{-5} 分别是异头碳和连接碳的化学位移,这两处的共振信号说明多糖分子中存在 α -1,2-糖苷键,由于 O 取代发生在 C_2 位上,因而连接碳的共振向低磁场位移($7.0 \times 10^{-5} \sim 7.5 \times 10^{-5} \rightarrow 7.6 \times 10^{-5} \sim 8.5 \times 10^{-5}$),这同时表明分子中有 α -1,2-糖苷键连接的侧链^[5];

2) 9.96×10^{-5} 和 8.38×10^{-5} 两处的共振信号说明多糖分子中存在 α -1,3-糖苷键连接的侧链^[5];

3) 1.04×10^{-4} 和 7.04×10^{-5} 两处的共振信号说明多糖分子中存在 β -1,3-糖苷键连接的侧链^[5];

4) 1.04×10^{-4} 和 8.69×10^{-5} 两处的共振信号说明多糖分子中存在 β (1,3)-糖苷键^[6],根据红外光谱的结果,作者认为该键构成了 GLP-A-2 的主链;

5) 1.06×10^{-4} 和 8.25×10^{-5} 两处的共振信号显示多糖分子中存在 β (1,2)-糖苷键相连的侧链^[5];

6) $7.1 \times 10^{-5} \sim 7.7 \times 10^{-5}$ 区为未取代碳 C_2 、 C_3 、 C_4 和 C_5 的化学位移,比较复杂,不易解析。

7) 6.68×10^{-5} 是 C_6 共振区^[5]。

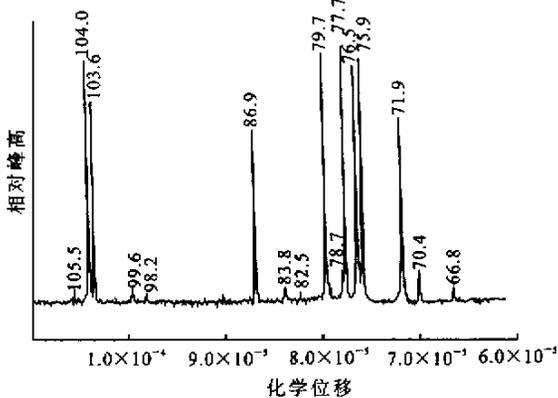


图 7 GLP-A-2 的 ¹³C-NMR
Fig.7 ¹³C-NMR of GLP-A-2

2.7 多糖的构象分析

2.7.1 多糖 GLP-A-2 可与刚果红形成稳定的络合物 如图 8 所示,GLP-A-2 与刚果红结合,形成的络合物在 0 ~ 0.4 mol/L 的 NaOH 溶液范围内,表现为最大吸收波长(λ_{max})的特征变化。当 NaOH 溶液浓度在 0.05 ~ 0.18 mol/L 范围内时, λ_{max} 有一稳定区,当 NaOH 浓度大于 0.25 mol/L 后, λ_{max} 急剧下降到与 Dextran T-41 及单纯刚果红相同。由于

Dextran 为 1→6 主干,分子整体不具刚性,不能形成螺旋,更不能形成多股螺旋^[7],因而不能出现刚果红实验中的 λ_{max} 相对稳定区域。以上结果初步表明,GLP-A-2 在中性至弱碱性范围内是一有序的多股螺旋,在中等碱性条件下(0.18 ~ 0.22 mol/L NaOH 溶液)发生构象转变,在强碱性条件下则解体为单股无规线团,不能与刚果红形成络合物。这种特征变化与 Hara C 等人对 β (1→3)葡聚糖构象的研究结果相同^[8,9]。

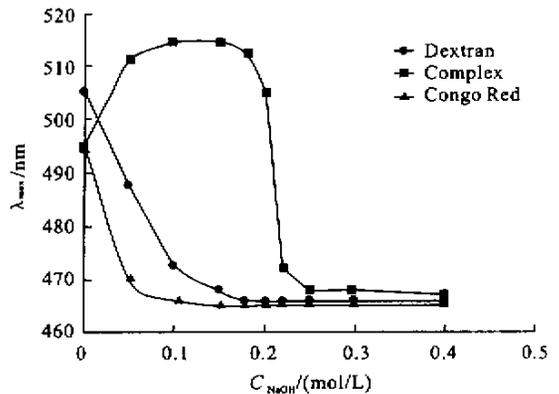


图 8 不同 NaOH 浓度下 GLP-A-2—刚果红络合物 λ_{max} 的变化

Fig.8 Changes in the absorption maximum(λ_{max}) of the Congo Red -GLP-A-2 complex, at various concentrations of sodium hydroxide

2.7.2 圆二色谱分析(CD) 用圆二色谱作 GLP-A-2 与脲试剂作用前后的分析,结果见图 9。可看出,不加变性剂脲的样品溶液,除在 195 nm 处形成极强的正科顿效应 [θ]为 $+43.5^\circ$,尚在 211 nm 处出现较强的负科顿效应 [θ]为 -11.4° ,这显示存在有序螺旋构象^[10]。加变性剂脲作用后,CD 谱发生了明显的改变,即在所用仪器测定的范围内没有明显的吸收峰,暗示分子的构象发生了相应的变化,无明显的有序结构信息^[11]。

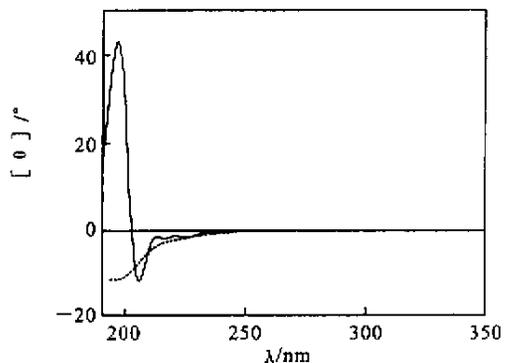


图 9 GLP-A-2 的圆二谱
Fig.9 CD Spectrum of GLP-A-2

因多糖的 CD 分析资料较少,对脲引起的 CD 变化与构象关系尚不能确切解析.但据作者推测,可能是脲破坏了氢键,糖链的有序构象转变为无规线团构象,因而使分子不富有圆二色谱结构信息.因此,结合前面的刚果红实验结果,推知 GLP-A-2 在水溶液中为多股螺旋.

3 结 论

1) 灰树花胞外多糖 GLP-A-2 为白色粉末状均一组分,不含蛋白质与核酸,易溶于水,比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +177.5^\circ (\text{H}_2\text{O}, 0.1)$, 其平均相对分子质量为 6.2×10^4 .

2) 结构分析表明 GLP-A-2 是一种由葡萄糖组

成的吡喃葡聚糖,分子主链是 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 连接的葡萄糖,支链为 $\beta(1 \rightarrow 6)$, $\alpha(1 \rightarrow 2)$, $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 及 $\beta(1 \rightarrow 2)$ 葡萄糖,分别连接在主链的 O-2、O-3 和 O-6 上.从近年来的一些文献报道看,凡具有抗肿瘤活性的真菌多糖如小核菌多糖^[12]、多孔菌多糖^[12]、裂褶菌多糖^[13]和香菇多糖^[14]均为有分支的 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 葡聚糖,而 $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 葡聚糖没有抑瘤活性^[12].由此推断,在多糖主链上占优势的 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 键是 GLP-A-2 活性的结构前提^[12,15].

3) 刚果红实验和圆二色谱分析结果初步证明 GLP-A-2 在溶液中存在螺旋构象,维持其有序构象的力可能以氢键力为主. GLP-A-2 分子的 β -螺旋构象对于抗肿瘤活性起重要作用^[15].

参考文献:

- [1] MIYAZAKI I, OHDSWA M. Conformation of grifolan in the fruitbody of *Grifola frondosa* assessed by carbon - 13 cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. **Jap J Med Mycol**, 1982, 23 : 61 - 65.
- [2] NANABA H, HAMAGUCHI A, KURODA H. The chemical structure of antitumor polysaccharide in fruitbodies of *Grifola frondosa*[J]. **Chem Pharma Bull**, 1987, 85(3): 1136 - 1168.
- [3] ZHUNG C, MIZUNO T, ITO H, *et al.* Fractionation and antitumor activity of polysaccharides from *Grifola frondosa* mycelium[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1994, 58(1): 185 - 188.
- [4] 陈石良. 药用真菌灰树花深层发酵技术及其抗肿瘤多糖的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 2000.
- [5] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [6] 方积年. ¹³C-NMR 在多糖结构分析上的应用[J]. 国外药学(抗生素分册), 1982 (2): 107 - 125.
- [7] REE D A. 多糖形态[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [8] HARA C, KIHO T, TANAKA Y, *et al.* Anti-inflammatory activity and conformational behavior of a branched (1-3)- β -D-glucan from an alkaline extract of *Dictyophora indusiata* Fisch[J]. **Carbohydrate Research**, 1982, 110 : 77 - 87.
- [9] HARA C, KIHO T, UKAI S. Branched (1-3)- β -D-glucan from a sodium carbonate extract of *Dictyophora indusiata* Fisch [J]. **Carbohydrate Research**, 1983, 117 : 201 - 203.
- [10] BLUHM T L, SARKO A. Conformational studies of polysaccharide multiple helix[J]. **Carbohydr Res**, 1977, 54 : 125 - 128.
- [11] SOUTHWICK J G. Coformation of ranthan dissolved in aqueous urea and sodium chloride solution[J]. **Carbohydr Res**, 1982, 99 : 117 - 121.
- [12] 沈萍萍, 付庭治. 真菌多糖研究进展[J]. 南京大学学报, 1991, 27(3): 524 - 519.
- [13] 李兆兰, 李学信. 裂褶菌胞内多糖的分离纯化鉴定及其性质[J]. 真菌学报, 1994, 13(4): 267 - 272.
- [14] 杜宇野. 香菇多糖的研究进展[J]. 中国食用菌, 1997, 14(4): 9 - 11.
- [15] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.

(责任编辑 杨萌 朱明)