

阿魏菇多糖的相对分子质量及单糖组成的测定

刘冰, 许程剑*, 卢士玲, 牛博楠, 王学明, 陈帅

(石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: 测定了阿魏菇多糖(Pleurotus ferulae Lenzi polysaccharide, PFLP)的相对分子质量和单糖组成,在理论上为深入探究 PFLP 的结构以及构效活性奠定了基础。PFLP 利用离子交换柱层析(DEAE-52Cellulose)和凝胶柱层析(Sephadex G-100)进行初步和进一步分离纯化,紫外、冻融、电泳实验对其进行纯度鉴定。利用 Sephadex G-100 柱层析法测定相对分子质量,气相色谱分析其单糖组成。经过分离纯化、纯度鉴定后得到两种纯 PFLP 组分,分别命名为 PFLP1、PFLP2,其相对分子质量分别为 5 582、7 963。PFLP1 由鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,摩尔比为 1 : 1.66 : 19.6 : 3.98;PFLP2 由鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,摩尔比为 1 : 0.40 : 0.66 : 6.76 : 4.27。

关键词: 阿魏菇多糖;相对分子质量;单糖组成

中图分类号:TS 207.3 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2014)10—1050—06

Research of Molecular Weight and Monosaccharide Composition of Pleurotus Ferulae Polysaccharide

LIU Bing, XU Chengjian*, LU Shiling, NIU Bonan, WANG Xueming, CHEN Shuai

(School of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: The purpose of this manuscript was to study the molecular weight and monosaccharide composition of polysaccharide from the Pleurotus ferulae Lenzi(PFLP), to build a solid foundation at the further PFLP exploration in the structure, activity of structure-activity in theory. The purified PFLP was obtained after isolation and purification of the extracted crude product by chromatography Column (DEAE-52 cellulose) firstly and further purified by chromatography column (Sephadex G-100), which was determined as single polysaccharide based on ultraviolet absorption spectrometry, polysaccharide gel electrophoresis and freeze thawing. The molecular weight of PFLP was determined by sephadex G-100 Gel filtration. Monosaccharide composition and molar ratio of PFLP was identified by Gas chromatography(GC). Two different fractions, PFLP 1, PFLP 2 were found via extract purification and purity check. The molecular weight of PFLP1 and PFLP2 were 5582Da, 7963Da. PFLP1 contained Rhamnose, Mannose, Glucose, Galactose in 1 : 1.66 : 19.6 : 3.98 molar ratio and PFLP2 was composed of Rhamnose, Xylose, Mannose, Glucose, Galactose in 1 : 0.40 :

收稿日期: 2014-00-00

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101256);石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZX201021)。

* 通信作者: 许程剑(1978—),男,安徽庐江人,工学博士,副教授,主要从事天然产物制备与功能活性研究。E-mail:chengjianxu@shzu.edu.cn

0.66 : 6.76 : 4.27 molar ratio.

Keywords: Pleurotus Ferulae polysaccharide, molecular weight, monosaccharide composition

阿魏菇又名阿魏侧耳(*pleurotus ferulae* Lanzi)、阿魏蘑,是新疆特有菌类,因生长在中药阿魏上,具有多种药效作用^[1]。菇体色泽洁白、肉质细腻鲜美,富含蛋白质、脂肪、粗纤维、氨基酸等多种有益健康的物质,特别是真菌多糖,含量丰富,具有增强人体免疫力,调节人体生理平衡等多种生物活性^[2-3]。阿魏菇是食用与药用价值并存的珍贵菌类,具有良好的开发利用前景。

近年来,关于多糖的提取纯化,结构特征及免疫活性方面,前人已有一些研究^[4-5]。但作为新疆特有品种的阿魏菇,其多糖的提取纯化及结构方面的系统研究报道甚少,且多糖的生物活性与多糖的单糖组成及相对分子质量紧密相关^[6-7]。因此,通过分离纯化、纯度鉴定得到纯品阿魏菇多糖组分,分别测定其相对分子质量及单糖组成,对阿魏菇多糖一级结构和构效活性的研究有一定的基础意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

阿魏菇:产地为新疆清河;木瓜蛋白酶,天津市天新精细化工开发中心产品;蓝色葡聚糖、标准系列葡聚糖 Dextran (T500、T70、T40、T10)、DEAE-cellulose52(离子交换剂)、Sephadex G-100(葡聚糖凝胶)、D36mm 透析袋(XH419);北京鼎国生物技术有限责任公司产品;阿里新兰染色液:天津市化学试剂厂产品;肌醇、标准单糖(L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖):北京鼎国生物技术有限责任公司产品。

1.2 仪器与设备

ENK-PRO 酶标仪:美国 Bio-teck 产品;KQ-200VDE 双频数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;GRX-9073A 热空气消毒箱:上海一恒科技有限公司产品;Q/TEDUC 台式高速冷冻离心机:力康发展有限公司产品;SH21-1 恒温磁力搅拌器:上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司产品;BT-200E 恒流泵:上海琪特分析仪器有限公司产品;BSZ160-LCD 自动部分收集器:上海琪特分析仪器有限公司产品;FDU-1200 真空冷冻干燥机:

SHIMADZU;Ultrospec-5300 紫外分光光度仪:Amersham 生物科技公司产品;N-2000 系统 GC-14C 气相色谱仪:SHIMADZU 公司产品。

2 实验方法

2.1 阿魏菇粗多糖制备工艺流程

新鲜阿魏菇→打浆→超声波辅助提取→纱布过滤→旋转蒸发→醇沉→Sevage 加酶法除蛋白→透析→冷冻干燥→阿魏菇粗多糖。

2.1.1 超声辅助热水浸提 超声时间 70 min、超声功率 160 W、超声温度 60 ℃、料液质量体积比为 1 g : 30 mL^[8]。

2.1.2 醇沉 $v(\text{乙醇}) : v(\text{样液}) = 4 : 1$, 4 ℃下醇沉时间 12 h。

2.1.3 去蛋白质 加入等体积 0.15% 木瓜蛋白酶,调节 pH 5~6, 60 ℃恒温 2 h,离心得上清液,上清液用 sevage 法除蛋白 4~5 次即可^[9]。

2.1.4 透析 选用截留相对分子质量为 $8 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ 的透析袋进行透析。

2.2 阿魏菇粗多糖的分离纯化

2.2.1 DEAE-Cellulose 52 柱层析 20 mg 多糖溶解于 5 mL 蒸馏水中,离心得上清液过 DEAE-Cellulose52 柱层析,流速 1.5 mL/min,用不同浓度的 NaCl 溶液洗脱^[10],收集洗脱液,苯酚-硫酸法跟踪测定。以管数为横坐标,吸光度值为纵坐标做图。收集洗脱峰对应管数,冷冻干燥备用。

2.2.2 Sephadex G-100 柱层析 将上述获得组分,溶解于 5 mL 蒸馏水,离心得上清液过 Sephadex G-100 凝胶柱,蒸馏水洗脱,流量 1.0 mL/min,收集洗脱液,苯酚-硫酸法跟踪测定。以管数为横坐标,吸光度值为纵坐标做图。收集洗脱峰对应管数,冷冻干燥备用。

2.3 多糖的纯度鉴定

2.3.1 紫外光谱分析 将上述纯化后的阿魏菇多糖组分分别配成质量浓度为 500 mg/mL 的水溶液,用紫外光谱仪测定波长 200~400 nm 处的紫外光谱。

2.3.2 多糖凝胶电泳测定 SDS-聚丙烯酰胺凝胶法^[11];上述纯化后的阿魏菇多糖组分分别配置成 5

mg/mL 的多糖溶液备用。配制 5 g/dL 分离胶和 3 g/dL 的浓缩胶并处理样品溶液, 恒压 40 V 进行电泳, 阿里新兰染色。

2.3.3 冻融实验 将纯化的阿魏菇多糖组分分别溶解为适当体积, 溶液冷冻过夜后室温融化, 3 500 r/min 离心 25 min 后观察现象。

2.4 多糖相对分子质量的测定

2.4.1 标准曲线的制备 采用 Sephadex G-100 凝胶色谱柱法^[12]。装柱(11 cm×30 cm)后用 0.1 mol/L NaCl 溶液平衡过夜。已知相对分子质量的葡聚糖标准品(T-500, T-70, T-40, T-10)配制成 3 mg/mL 的溶液, 分别过 Sephadex G-100 凝胶柱, 上样量 1 mL, 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 流速 3 mL/min, 自动部分收集器 6 min 收集一管, 苯酚-硫酸法跟踪检测, 分别求得对应洗脱体积(V_e)。再用蓝色葡聚糖 2000 上柱求得柱外水体积(V_o), 同时测柱床体积(V_t), 以 $K[K=(V_e-V_o)/(V_t-V_o)]$ 为横坐标, $\lg c$ 为纵坐标, 绘制相对分子质量标准曲线。

2.4.2 样品相对分子质量测定 将纯化所得多糖组分分别配制成 3 mg/mL 的溶液, 同样方法上柱, 测洗脱体积 V_e , 求得 K 值, 根据标准曲线计算阿魏菇多糖各组分相对分子质量。

2.5 气相色谱法测定单糖组成

2.5.1 标准单糖衍生化 精确称取 10 mg 各标准单糖(L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖), 放入试管中, 分别加入盐酸羟胺 10 mg、内标肌醇 8 mg、吡啶 0.5 mL。震荡溶解后于 90 °C 水浴锅中反应 30 min。冷却至室温后加入醋酸酐 0.5 mL, 90 °C 水浴锅中反应 30 min 后, N_2 吹干, 加甲醇, 反复吹干 3 次。2 mL 三氯甲烷萃取, 过滤后产物直接用于 GC 分析^[13]。

2.5.2 多糖水解与衍生化 精确称取纯阿魏菇多糖组分各 10 mg, 放入 5 mL 安瓿管中。加入 3 mL 4 mol/L 三氟乙酸, 酒精喷灯封管。于 120 °C 下密闭水解反应 5 h, N_2 吹干。按照上述 2.5.1 衍生化处理, 经过滤后, 以同样气相条件进行气相色谱分析。

2.5.3 气相条件 GC-14C, 毛细管色谱柱(OV-1701, 30×0.32 mm), 膜厚 0.25 μ m。FID 检测器, 检测器温度(DET): 270 °C; 进样口温度(AUXI): 250 °C; 色谱柱温度, 程序升温(COL): 160 °C→5 min→5 °C/min→190 °C→5 min→5 °C/min→230 °C→5 min。氢气, 氮气流速为 50 mL/min, 氧气流量 500 mL/min。

进样体积 1 μ L。

2.5.4 定量分析 根据各色谱峰的峰面积可计算出各种单糖的摩尔比^[13]。

计算公式: $M_x=K(A_x \times M_i)/A_i$ 。 M_x 为样品中某单糖质量(mg); M_i 为样品中加入内标的质量(mg); A_x 为色谱图中某单糖的峰面积; A_i 为色谱图中内标的峰面积; K 为校正因子。

3 结果分析

3.1 DEAE-52 分析结果

如图 1, 阿魏菇粗多糖利用 DEAE-Cellulose 52 柱层析初步分离, 得到两个组分, 分别命名为 PFLP1、PFLP2。其中 PFLP1 由 0.2 mol/L NaCl 洗脱, PFLP2 由 0.4 mol/L NaCl 洗脱, 分别收集对应组分, 减压浓缩, 浓缩液透析 24 h, 冷冻干燥, 备用。

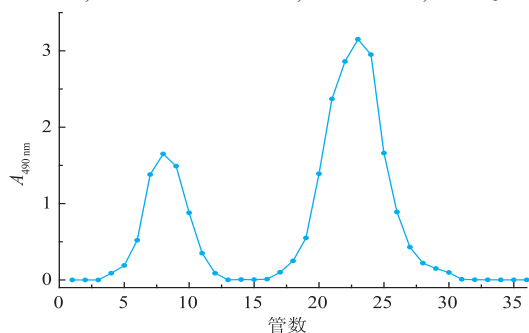


图 1 阿魏菇多糖 DEAE-52 洗脱图

Fig. 1 Pleurotus ferulae polysaccharide on DEAE-52 elution diagram

3.2 Sephadex G-100 分析结果

利用 Sephadex G-100 层析柱对上述初步分离的 2 个组分进一步分离纯化, 如图 2、3 所示, 均出现单一狭窄的对称峰, 说明 PFLP1, PFLP2 为纯单一的组分, 对应收集相应管数, 浓缩透析 24 h 后冷冻干燥, 初步判定 PFLP1, PFLP2 为纯品阿魏菇多糖。

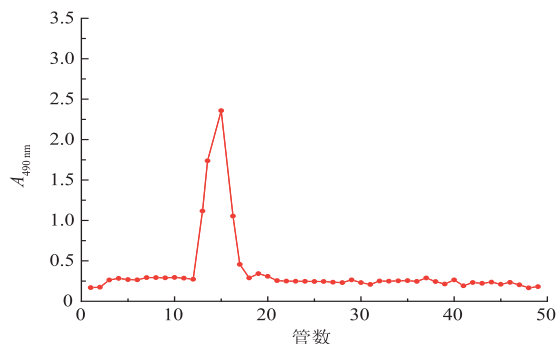


图 2 PFLP1 Sephadex G-100 洗脱图

Fig. 2 PFLP1 on Sephadex G-100 elution diagram

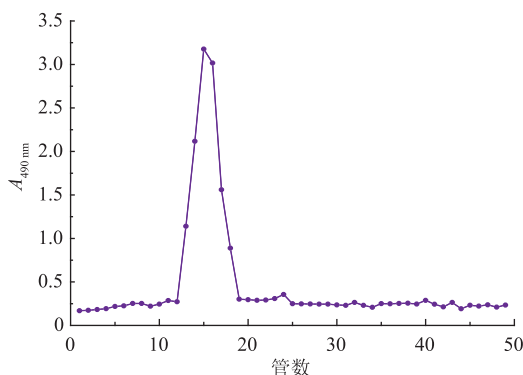


图3 PFLP2 Sephadex G-100 洗脱图

Fig. 3 PFLP2 on Sephadex G-100 elution diagram

3.3 紫外光谱分析结果

由于多糖的纯度对后续单糖的组成及相对分子质量测定具有一定的影响,因此对多糖纯度的鉴定是必要的。如图4所示,在260 nm没有峰值,说明纯化的PFLP1和PFLP2中没有核酸;在280 nm处也没有吸收峰,说明PFLP1和PFLP2中也没有蛋白质等杂质,呈现出典型的多糖光谱。

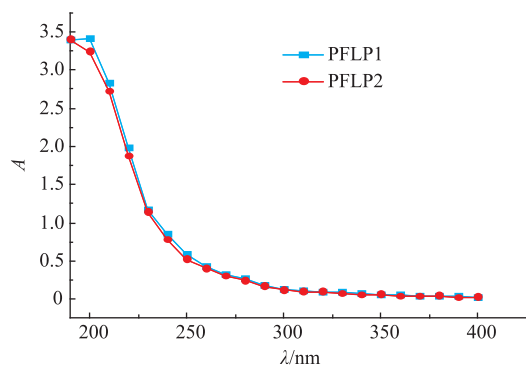


图4 阿魏菇多糖紫外光谱图

Fig. 4 UV spectrum of pleurotus ferulae polysaccharide

3.4 电泳分析结果

所谓纯品多糖实质上只是具有一定相对分子质量范围的均一组份。电泳结果显示:条带区域相对集中,呈现出较清晰的条带,具有相同的电泳迁移率。由此可知,PFLP1,PFLP2均为均一组分,达到了电泳纯级的样品。

3.5 冻融实验结果

观察发现2个组分的离心管底部都没有生成沉淀,阿魏菇多糖溶液仍与离心前溶液一样,均为淡黄色透明液体,无任何杂质,由此可以确定,PFLP1,PFLP2均为单一的多糖组分。

3.6 相对分子质量测定结果

由图5标准曲线得相对分子质量与 K 值之间的回归方程为 $y = -6.7085x + 5.8801$,分别取5 mg PFLP1和PFLP2同样方法上SephadexG-100柱子,计算其 V_e 分别为12.8 mL、12.5 mL, K 为0.32、0.29。对照标准曲线知PFLP1的相对分子质量为5582,PFLP2的相对分子质量为7963。

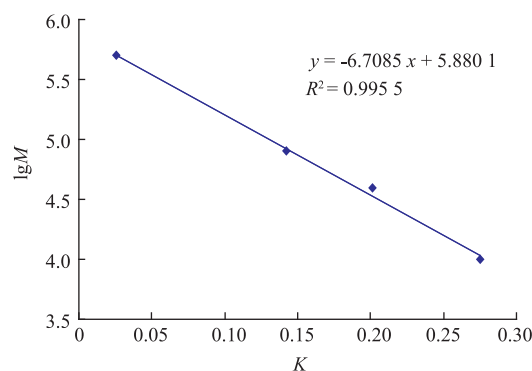


图5 多糖相对分子质量测定的标准曲线

Fig. 5 Calibration curve of standard dextrans for determining molecular weight of polysaccharide

3.7 气相色谱分析结果

由于阿魏菇多糖是大分子物质,不具有气相色谱分析必须的挥发性及热稳定性,因此,需要对阿魏菇多糖进行衍生化,这是单糖组成测定中至关重要的一步^[13]。根据气相色谱的定性分析,如图6~8,得出PFLP1由鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,PFLP2由鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,定量分析得PFLP1摩尔比为1:1.66:19.6:3.98。PFLP2摩尔比为1:0.40:0.66:6.76:4.27。

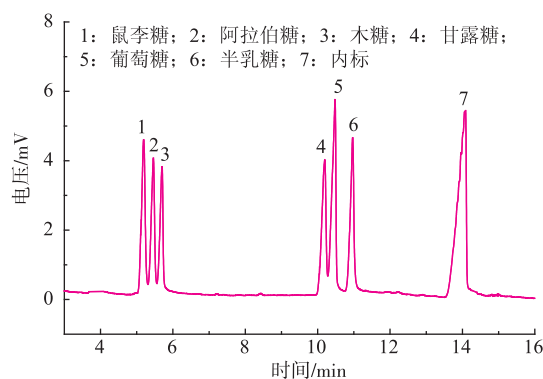


图6 标准单糖的气相色谱分析

Fig. 6 GC analysis of standard monosaccharide

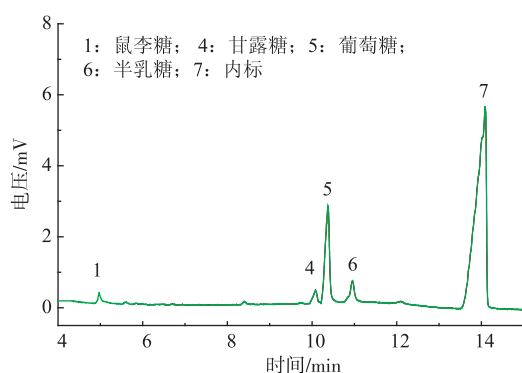


图 7 PFLP1 的气相色谱分析

Fig. 7 GC analysis of PFLP1

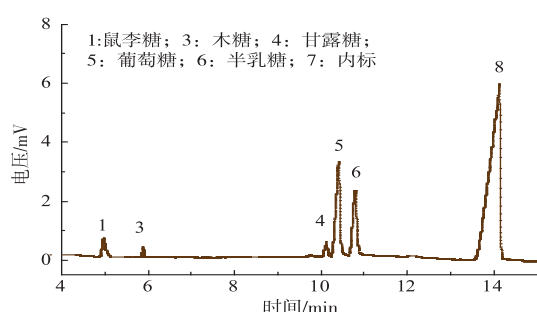


图 8 PFLP2 的气相色谱分析

Fig. 8 GC analysis of PFLP2

4 结 语

提取得到的粗多糖中，一般会混有蛋白质、无

机盐、色素和其它小分子杂质,对后续实验影响较大,作者通过去蛋白、透析可基本去除阿魏菇粗多糖中的杂质,但此时的多糖为混合多糖,通过 DEAE-52 柱层析和 SephadexG-100 凝胶柱层析实验,可将混合多糖分离纯化为一组组分,作者得到两种单一多糖组分 PFLP1 和 PFLP2。通常纯度鉴定的方法需至少两种结合分析,结论才具有准确性^[14],因此通过聚丙烯酰胺电泳、紫外、冻融试验结合表明 PFLP1 和 PFLP2 均为单一组分,为最终纯品。

目前多糖的结构研究中,主要集中于一级结构的研究,高级结构的发展由于技术的限制发展缓慢。多糖的一级结构与它的生物活性有着重要关系,既构效关系^[15]。一级结构非常复杂,对多糖单糖组成、相对分子质量大小的研究是一级结构研究的基础,同时也是高级结构研究的重要前提。

利用 SephadexG-100 柱层析法得 PFLP1 的相对分子质量为 5 582, PFLP2 的相对分子质量为 7 963。气相色谱分析单糖组成及摩尔比得 PFLP1 由鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,摩尔比为 1 : 1.66 : 19.6 : 3.98。PFLP2 由鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成,摩尔比为 1 : 0.40 : 0.66 : 6.76 : 4.27。

参考文献:

- [1] 沈观冕. 中草药丛书:阿魏[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,1986.
- [2] 马淑凤,李铁超,李书倩,等. 白灵菇多糖研究进展[J]. 安徽农业科学,2005,33(7):1264-1265.
MA Shufeng, LI Tiechao, LI Shuqian, et al. Research Advances in Polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* [J]. **Journal of Anhui Agri Sci**, 2005, 33(7): 1264-1265. (in Chinese)
- [3] ZHANG G, SUN J, WANG H, et al. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula mushroom*[J]. **Phytomedicine**, 2010(17): 775-781.
- [4] 孙锋,谷文英,丁霄霖. 山药粗多糖的提取工艺[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(3):80-82.
SUN Feng, GU Wenying, DING Xiaolin. Study on the Extraction Technology of Polysaccharide form *Dioscorea opposita* Thunb[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(3): 80-82. (in Chinese)
- [5] 闫训友,王玮,赵英. 阿魏侧耳多糖研究进展[J]. 北方园艺,2007(12):243-245.
YAN Xunyou, WANG Wei, ZHAO Ying. Advancement on Polysaccharides from *Pleurotus ferulae lenz* [J]. **Northern Horticulture**, 2007(12): 243-245. (in Chinese)
- [6] 韩春然,马永强,唐娟. 黑木耳多糖的提取及降血糖作用[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(5):111-114.
HAN Chunran, MA Yongqiang, TANG Juan. Extraction of polysaccharide from *Auricularia auricular* and its hypoglycemia activity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(5): 111-114. (in Chinese)
- [7] 张桂和,赵谋明,王伟. 方格星虫多糖分离纯化及性质鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(4):63-66.
ZHANG Guihe, ZHAO Mouming, WANG Wei. Isolation, Purification and property identification of polysaccharide contained in *sip uncul usnudus*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(4): 63-66. (in Chinese)

- [8] 许程剑,田金虎. 超声波法提取阿魏菇多糖的工艺[J]. 食品研究与开发,2012,33(4):75-77.
XU Chengjian,TIAN Jinhu,et al. Optimization on Extraction Technology of Pleurotus Ferulae Polysaccharide by Ultrasonic Assistant Method[J]. **Food Research And Development**,2012,33(4):75-77.(in Chinese)
- [9] 王珊,黄胜阳. 植物多糖提取液脱蛋白方法的研究进展[J]. 食品科技,2012(9):189-190.
WANG Shan,HUANG Shengyang. Deprotein of plant polysaccharide extract [J]. **Food Science And Technology**,2012,(9):189-190.(in Chinese)
- [10] 田晓艳,刘延吉,祝寰宇,等. 沙棘多糖 HRPIa 纯化及鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(1):23-26.
TIAN Xiaoyan,LIU Yanji,ZHU HuanYu,et al. Purification,identification of polysaccharide HRPIa of *Hippophae rhamnoides* L. [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(1):23-26.(in Chinese)
- [11] 金玉妍. 灰树花胞外多糖的分离纯化及降血糖作用研究[D]. 天津:天津科技大学,2009.
- [12] 乔德亮. 三角帆蚌多糖提取、纯化、生物活性及其结构[D]. 南京:南京农业大学,2009.
- [13] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.
- [14] 吴迷迷. 黄蜀葵胶的分析及应用研究[D]. 合肥:安徽大学,2010.
- [15] Chumkhunthod P,Rodtong S,Lambert S T. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,2006(1760):326-332.

会议信息

会议名称(中文):第六届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会

开始日期:2014-11-21

结束日期:2014-11-24

所在城市:福建省 厦门市

具体地点:白鹭宾馆

主办单位:国家微生物资源平台、中国微生物学会微生物资源专业委员会

承办单位:国家海洋局第三海洋研究所、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、厦门大学及华侨大学

议题:微生物资源与海洋经济

摘要截稿日期:2014-09-30

全文截稿日期:2014-09-30

联系人:赖其良 13459255785

E-MAIL: CMR2014MCCC@163.com

会议网站: <http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=3008>

会议背景介绍:为进一步加强微生物资源研究、保护和可持续利用,更好服务于国家生物产业发展的战略需求,促进微生物资源学科的学术交流与发展,由中国微生物学会微生物资源专业委员会主办,国家海洋局第三海洋研究所、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、厦门大学及华侨大学共同承办的第六届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会将于2014年11月21-24日在福建省厦门市召开。此次会议将为与会代表提供一个学术交流、成果展示以及项目合作的极好平台。大会将特邀中国科学院院士、中国工程院院士以及国内外著名专家学者到大会交流。热忱欢迎微生物资源领域的同行莅临大会,齐聚一堂,共享微生物资源领域的盛事。

会议名称(中文):AOCS-CCOA 功能性油脂国际研讨会

开始日期:2014-11-19

结束日期:2014-11-20

所在城市:上海市 浦东新区

具体地点:外高桥皇冠假日酒店

主办单位:美国油脂化学家协会(AOCS) 中国粮油学会(CCOA)

联系人:李芳

联系电话:010-68357511

E-MAIL:cco2012@126.com

会议网站: <http://www.ccoaonline.com/index.php>

会议背景介绍:本次会议将邀请国际上著名专家作特邀报告,同时欢迎大家提交发言或张贴论文

征集论文主题包括:1.油脂中的污染物;2.油脂品质及其改善;3.粮油中高附加值的微量元素;4.新资源油品