

鸡腿菇子实体多糖分离纯化工艺及结构研究*

姚毓婧^{1,2} 杨仁智² 张劲松^{2**} 潘迎捷³

(南京农业大学生命科学院 南京 210095)(上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201106)

(上海水产大学食品科学学院 上海 200090)

摘要 :以多糖得率为指标,用正交试验对鸡腿菇子实体多糖的提取纯化工艺进行优化。用离子色谱和凝胶渗透色谱对粗多糖进行分离纯化,利用化学和光谱学方法对均一多糖 CC30w-1 进行结构分析。结果表明鸡腿菇子实体多糖最佳提取工艺为:提取次数为 3 次,提取时间为 1.5h,提取温度为 95℃,料液比为 1:12,最佳脱蛋白条件:样品-氯仿+正丁醇为 3:1(V/V),氯仿-正丁醇为 3:1(V/V),反应时间为 20min,脱蛋白次数为 7,结构分析的结果表明:CC30w-1 分子量为 1.94×10^4 Da,糖组成为 Fuc:Gal = 1:4.02,岩藻糖以端基方式连接,半乳糖主要以 1,6-和 1,2,6-两种方式连接,3 个主要的连接方式的摩尔比为 1.15:2.88:1;主要由(1,6)- α -D-Galp 糖残基构成主链,在 O-2 位被 α -Fucp 糖残基取代的 5 个单糖残基组成的结构重复单元。

关键词 鸡腿菇,正交试验,分离纯化,结构分析

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1071-06

Optimum Isolation and Structural Analysis of Polysaccharide from the Fruiting Bodies of *Coprinus comatus* *

YAO Yu-Jing^{1,2} YANG Ren-Zhi² ZHANG Jing-Song^{2**} PAN Ying-Jie³

(Department of Microbiology, Life Science College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

(Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 201106)

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

Abstract :Optimum technique of isolation and purification of *Coprinus comatus* polysaccharides was investigated by orthogonal tests. DEAE-Sepharose F. F. and gel-filtration chromatography were used to separate and purify the *Coprinus comatus* polysaccharides, and get the homogeneous polysaccharide CC30w-1. The structure of CC30w-1 was studied with chemical and spectral methods. The results showed that the optimum conditions for the isolation was as follows: times of extraction 3, time 1.5h, temperature 95℃, material to water ratio 1:12. The optimum deproteinization condition is that crude polysaccharide solute in the mixed solvent of chloroform and n-butanol (3:1) whose volume 3 times that of the former, the reaction time and times of purification were 20 minutes and 7 times, respectively. CC30w-1 molecular weight was estimated to be 1.94×10^4 by HPLC. HPAEC showed CC30w-1 was composed of fucose and galactose in molar ratios of 1:4.02. Methylation analysis and NMR data showed that it possess a pentasaccharide repeating unit have a backbone of(1→6)-linked galactose residues, and is substituted at 2-position by fucose residue.

Key words :*Coprinus comatus*, Orthogonal tests, Isolation and purification, Structural analysis

鸡腿菇(*Coprinus comatus*(Mueller. ex Fr.) S. F. Gray),学名毛头鬼伞,隶属于真菌门(Eumycota)担子菌纲(Basidiomycetes)伞菌目(Agaricales)鬼伞科(Coprinaceae)鬼伞属(*Copruinus*)^[1,2]。鸡腿菇是药食两用菌,子实体肉质细嫩,鲜美可口,性平,有益脾胃,具有清心安神、通肠利便、治疗痔疮等功效^[3]。

经常食用有助消化、增加食欲^[4]。常食用它可利于老年人的保健,幼儿的生长,孕妇体内胎儿的正常发育^[5]。现代研究表明,鸡腿菇中丰富的营养成分具有降血糖、降血脂、提高免疫活性、抗肿瘤及抑菌等一系列生物活性^[6]。而鸡腿菇多糖亦被证实具有提高免疫力、抗肿瘤等生物活性^[7-10]。与香菇、灵芝等

* 上海市农委重点攻关项目(No. 沪农科攻字 2003-3-3)

** 通讯作者 Tel 021-62208660-3211, E-mail 'syjal6@saas.sh.cn

收稿日期:2006-12-20,修回日期:2007-06-11

其它真菌相比,鸡腿菇多糖的研究还比较少。本文对鸡腿菇多糖的提取、除蛋白工艺进行优化,并借助现代分析手段对得到的均一多糖结构进行初步探讨,旨在更好地开发和利用鸡腿菇这一珍贵的真菌资源。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

鸡腿菇干燥子实体切片,购于上海农业科学院食用菌所百信食药菌科贸有限公司。

1.2 试剂

单糖标准品为 Sigma 产品;三氟乙酸(CF_3COOH , TFA)、硼氢化钠(NaBH_4)购自 Merck 公司;50% NaOH 为 Dionex 公司产品;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 设备

ICS2500 离子色谱仪(Dionex 公司),ÅKTAexplorer 层析系统(GE 公司),电热恒温水浴锅(上海益恒试验仪器有限公司),气质联用仪(Thermo Finnigan TRACEMS),色谱柱:DB-5 MS 石英毛细管柱,30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 核磁共振仪(Varian INOVA 500)。

1.4 实验方法

1.4.1 QS 鸡腿菇多糖提取、纯化工艺流程:鸡腿菇干品→沸水浴浸提→过滤→滤液醇沉→离心得粗多糖→复溶→脱蛋白→粗多糖→DEAE-Sephrose 阴离子柱层析→Sephacryl 凝胶柱层析→CC30w-1

1.4.2 粗多糖提取、除蛋白条件优化:多糖提取工艺中,影响因素很多,在本实验室常用单因素实验基础上,选定提取温度、时间、次数、料液比等因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计进行优化,因素水平设计见表 1。每一处理用鸡腿菇子实体 100 g。

表 1 热水浸提正交实验因素水平

水平	因素			
	提取次数 A	时间 B (h)	温度 C ($^{\circ}\text{C}$)	料液比 D (V/V)
1	1	1.5	60	1:8
2	2	2	80	1:10
3	3	2.5	95	1:12

粗多糖除蛋白采用 Sevag 法^[11],优化条件用 $L_9(3^4)$ 正交设计来确定,见表 2。

表 2 粗多糖除蛋白正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 样品-氯仿+ 正丁醇(V/V)	B 氯仿-正丁醇 (V/V)	C 萃取时间(h)	D 萃取次数
1	3:1	5:1	10	3
2	4:1	3:1	20	5
3	5:1	2:1	30	7

1.4.3 检测:多糖总量的测定:采用苯酚-硫酸法^[12],以葡萄糖为标准品。

蛋白含量的测定:采用 BCA 蛋白试剂盒(Merck 公司)。

1.4.4 纯度及分子量测定^[12]:3 mg CC30w-1 溶于 1.4 mL 缓冲液配成溶液,上样体积 10 μL ,TSK PWXL 4000-3000 串联柱,脱气缓冲液洗脱,流速 0.5 mL/min,Waters2414 示差检测仪自动检测。以 Dextran T 系列标准分子量,对保留时间做出标准曲线,然后根据待测多糖的保留时间,计算出样品的分子量。

1.4.5 紫外光谱测定:2mg CC30w-1 溶于 3mL 水中,在 200nm~400nm 进行全扫描。

1.4.6 单糖组成分析^[12,13]:取 2 mg CC30w-1 放入薄壁长试管中,加入 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)4 mL,在 110 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 2h,定容至 100mL,稀释 100 倍后上样测定。色谱条件:分离柱采用 Dionex 公司 CarboPacTM PA20 预处理柱、CarboPacTM PA20 检测柱;脉冲安培检测器工作参数:E1 为 100 mV 400 ms,E2 为 -2000mV,20 ms;E3 为 600 mV,10 ms;E4 为 -100 mV,70 ms。流动相:分别采用浓度为 2.5 mmol/L 的 NaOH 作淋洗液,淋洗方法采用单一浓度淋洗。流速 0.45 mL/min;上样量 25 μL ;温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4.7 红外光谱分析^[12]:取 1 mg~2 mg 多糖样品,用溴化钾压片后进行 IR 分析。完全甲基化后的多糖样品再检测甲基化是否完全时,取样 1 mg 后采用石蜡油制片进行 IR 分析。

1.4.8 甲基化分析^[14,15]:多糖 2 mg 经 P_2O_5 充分干燥,按照 Kalyan 和 Paul 的方法^[16]进行完全甲基化。甲基化样品经 IR 检测无羟基吸收后,完全甲基化后经三氟乙酸水解,硼氢化钠还原,醋酐乙酰化后,溶解于氯仿,进行 GC-MS 分析。GC-MS 的分析条件为:柱温 80 $^{\circ}\text{C}$ 初温,保持 1 min,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 200 $^{\circ}\text{C}$,再以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 215 $^{\circ}\text{C}$,最后以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 270 $^{\circ}\text{C}$ 。

氮气作载气。进样口温度 250℃,分流比 1:50。柱流速为 1mL/min。EI(70eV)倍增器电压 350V,灯丝电流 250 μA,接口温度 200℃,离子源温度 250℃,质量数扫描范围 42amu ~ 462amu,扫描速率 2.5 scan/Sec。

1.4.9 核磁共振分析:样品溶于 D₂O 于 Varian INOVA 5000 核磁仪测定, D₂O 为内标。

2 结果

2.1 鸡腿菇多糖提取条件的优化

鸡腿菇多糖提取正交试验结果见表 3。

表 3 热水浸提正交实验结果

序号	A	B	C	D	粗提物得率 (%)	多糖 (%)
1	1	1	1	1	33.69	10.17
2	1	2	2	2	36.9	11.9
3	1	3	3	3	39.64	13.51
4	2	1	2	3	39.36	13.42
5	2	2	3	1	39.76	15.26
6	2	3	1	2	42.57	12.91
7	3	1	3	2	45.14	16.25
8	3	2	1	3	44.98	14.42
9	3	3	2	1	43.09	13.18
K1	35.58	39.84	37.5	38.61		
K2	41.59	41.58	38.5	41.06		
K3	43.85	39.6	45.02	41.35		
k1	11.86	13.28	12.5	12.87		
k2	13.86	13.86	12.83	13.69		
k3	14.62	13.2	15.01	13.78		

表 3 表明:(1)从极差 R 值的大小,可得出各因素作用主次顺序是:A(提取次数)> C(温度)> D(料液比)> B(时间)。(2)最佳因素水平是 A₃B₂C₃D₃,即提取次数为 3 次,时间为 1.5h,温度为 95℃,溶剂体积为 12 倍时提取效果最为理想。

2.2 鸡腿菇粗多糖除蛋白条件的优化

鸡腿菇粗多糖除蛋白最佳工艺条件试验结果见表 4。

由表 4 得出(1)各组因素作用的主次顺序为:氯仿与正丁醇的体积比>反应时间=除蛋白次数>样品与氯仿-正丁醇的体积比。(2)最佳工艺为 A₁B₂C₂D₃,即样品-氯仿正丁醇的体积比为 3:1,氯仿

-正丁醇的体积比为 3:1,反应时间为 20 min,除蛋白次数为 7 次。

表 4 粗多糖除蛋白正交实验结果

序号	A	B	C	D	粗多糖蛋白质含量 (%)
1	1	1	1	1	0.44
2	1	2	2	2	0.25
3	1	3	3	3	0.27
4	2	1	2	3	0.32
5	2	2	3	1	0.33
6	2	3	1	2	0.39
7	3	1	3	2	0.39
8	3	2	1	3	0.29
9	3	3	2	1	0.32
K1	0.96	1.15	1.12	1.09	
K2	1.04	0.87	0.89	1.03	
K3	1.00	0.98	0.99	0.88	
k1	0.32	0.38	0.37	0.36	
k2	0.35	0.29	0.30	0.34	
k3	0.33	0.33	0.33	0.29	
R	0.03	0.09	0.07	0.07	

2.3 纯度鉴定

粗多糖经 DEAE-阴离子交换层析和凝胶层析后得到均一多糖 CC30w-1。CC30w-1 在凝胶层析和 HPLC 图谱上均呈单一对称峰,表明其为均一组分(见图 1、图 2)。其紫外图谱扫描显示 200nm ~ 400nm 无吸收峰,表明其不含蛋白质和核酸。根据在 HPLC 图谱中的保留时间,根据标准曲线计算其分子量为 1.94×10^4 D。

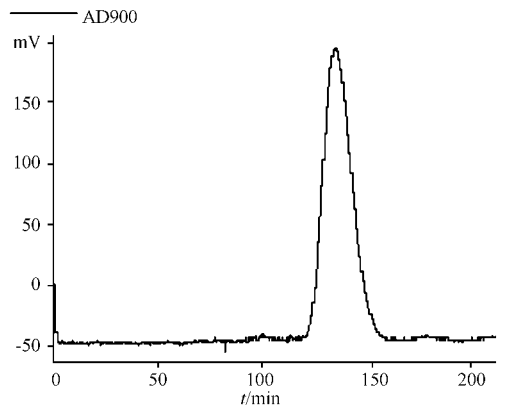


图 1 CC30w-1 的 Sephacryl S-300 层析色谱图

2.4 结构分析

2.4.1 糖组成分析:CC30w-1 完全酸水解后的样品经过 HPAEC-PAD 分析后(见图 4),与标准单糖的离子色谱(图 3)比较,可知 CC30w-1 主要由岩藻糖和

半乳糖组成,其摩尔比为 Fuc:Gal = 1:4.02。

2.4.2 红外光谱分析 红外光谱显示出 CC30w-1 在

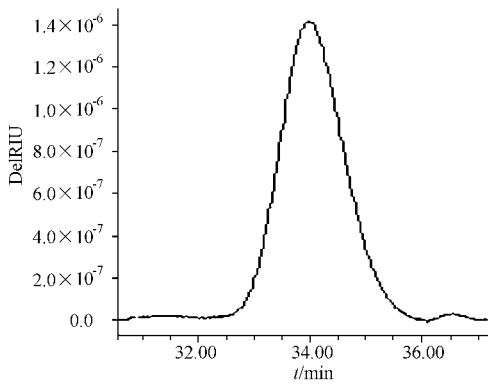


图2 CC30w-1的HPLC图谱

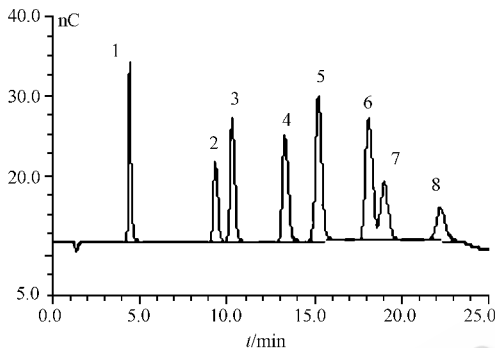


图3 标准糖样中的高效阴离子色谱图

1 岩藻糖 2 鼠李糖 3 阿拉伯糖 4 半乳糖 5 葡萄糖 6 木糖 7 甘露糖 8 果糖

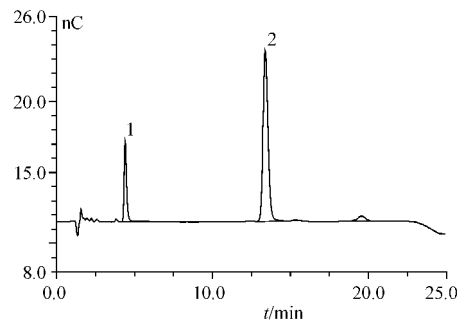


图4 CC30w-1的高效阴离子色谱图

1. 岩藻糖 2 半乳糖

4000 cm^{-1} ~ 650 cm^{-1} 区具多糖类物质的一般特征。在 1730 cm^{-1} 附近没有糖醛酸的特征吸收峰,表明 CC30w-1 很可能为一中性多糖^[17]; 843.8 cm^{-1} 的峰表明 CC30w-1 中的糖苷键为 α -型,因 α -型差向异构体的 C—H 取平伏键,在 844 \pm 8 cm^{-1} 处有 1 个吸收峰,而 β -型的 C—H 取直立键,在 891 \pm 7 cm^{-1} 处有 1 个吸收峰。759.8 cm^{-1} 为 D-吡喃环的对称环伸缩振动峰,在 1100 ~ 1010 cm^{-1} 间有 3 个强吸收峰,亦表明 CC30w-1 中的糖环构型为吡喃型(呋喃型糖环在此区间上只有 2 个强吸收峰)^[12]。以上结果说明 CC30w-1 可能是以 α -型糖苷键连接的,糖环为吡喃型。

2.4.3 甲基化分析:CC30w-1 的甲基化分析结果见表 5。

表5 CC30w-1的甲基化分析

甲基化多糖	连接方式	摩尔比	主要的离子碎片峰
2,3,4-Me ₃ -Fuc	1-linked Fucp	1	43, 72, 89, 101, 115, 117, 131, 161, 175
2,3,4-Me ₃ -Gal	1,6-linked Galp	2.94	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 173, 189, 233
3,4-Me ₂ -Gal	1,2,6-linked Galp	1.2	43, 71, 87, 99, 129, 159, 173, 189, 233

由表 5 可知 Glc 为 1,6-、1,2,6- 两种连接方式,其中 1,6-linked Galp 为主要键型,可能构成主链; CC30w-1 分枝点主要位于半乳糖上,3 个主要糖残基的摩尔比为 1:2.94:1.2,甲基化的结果与单糖组成比例基本一致,说明 CC30w-1 可能是由 5 个单糖残基构成重复单元结构。

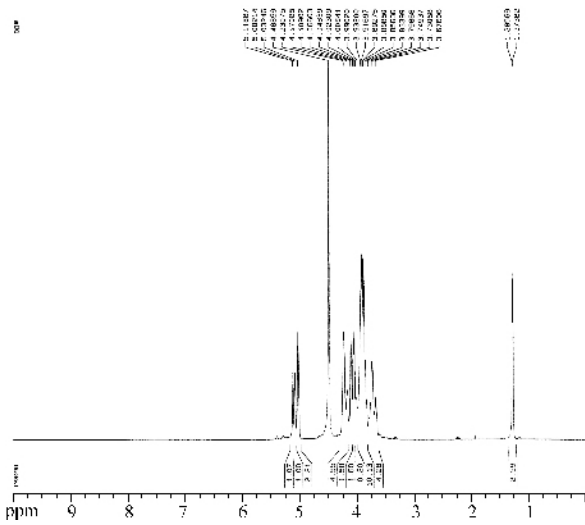
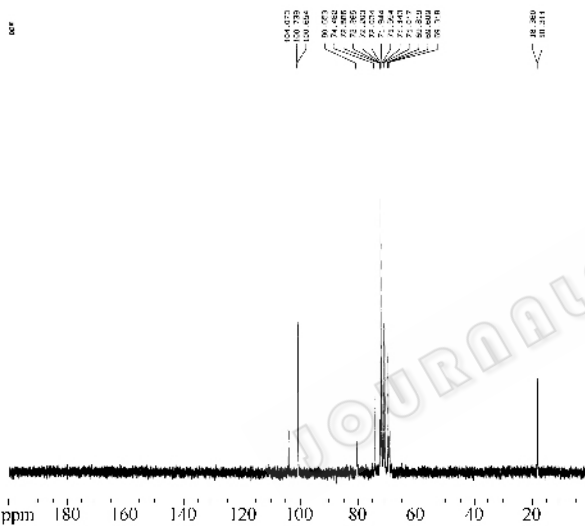
2.4.4 核磁共振分析:由 ¹H NMR 谱(图 5)可知 CC30w-1 有 5 个异头氢信号,与甲基化分析结果一致,分别在 δ 5.12、 δ 5.08、 δ 5.02(3 个 H)处出现。5 个异头氢信号出现在低场,均是半乳糖构型,且是单峰(³J_{1,2} < 3Hz)表明这些糖是 α -构型^[18]。

在 ¹³C NMR 谱中(图 6)在 δ 100.7 ~ 104.07 处也

有 5 个异头碳信号,在 δ 18.33 处为 CH₃ 的 α (Fuc 的 C-6) 的共振峰,与 ¹H NMR 上 δ 1.28 处的 6-位脱氧糖的 CH₃ 双峰(Fuc 的 H-6)是一致的; δ 57.7 ~ 64.7 处为 6 位取代的碳信号^[19]。另外,在 ¹³C NMR 谱上 δ 82 ~ 88 处没有共振信号,证明所有的糖残基为吡喃型糖苷^[20],这与 IR 谱的结果是一致的;在 δ 170 ~ 176 范围内没有无糖醛酸的羧基共振信号,进一步验证了 IR 谱中 CC30w-1 为一中性多糖的结果。

3 讨论

鸡腿菇子实体多糖提取的最佳工艺为:提取次数为 3 次,提取时间为 1.5h,提取温度为 95 $^{\circ}\text{C}$,溶剂

图5 CC30w-1的¹H NMR图谱图6 CC30w-1的¹³C NMR图谱

体积为12倍。其中各因素的影响顺序为A(提取次数) > C(温度) > D(溶剂体积) > B(时间)。

鸡腿菇子实体粗多糖脱蛋白纯化最佳条件: 样品-氯仿-正丁醇的体积比为3:1, 氯仿-正丁醇的体积比为3:1, 反应时间为20 min, 除蛋白次数为7次。4个因素对脱蛋白的影响顺序为B(氯仿与正丁醇体积比) > C(反应时间) = D(反应次数) > A(样品与氯仿-正丁醇体积比)。

鸡腿菇均一多糖CC30w-1的单糖组成为岩藻糖和半乳糖, 糖苷键的连接方式为1位连接的Fuc、1,6位连接的Gal和1,2,6位连接的Gal, 且三者摩尔比为1:2.94:1.2, 其中主链为1,6位连接的Gal, 分枝点位于半乳糖的C-2上; 5个单糖残基构成的重复单元是主要结构, 平均每4个己糖有一个分枝糖基。

通过近20年科学工作者对各类真菌多糖的组成和结构的研究, 发现真菌多糖主要包括以下几种^[21, 22] (1) 葡聚糖, 其结构是主链由 β -1,3糖苷键, 支链为 β -1,6糖苷键连接 (2) 甘露聚糖, 主要由 α -糖苷键连接的主链 (3) 杂多糖 (4) 糖蛋白和多糖肽。

据笔者所知, 除了凡军民^[23]等曾报道在鸡腿菇菌丝体中获得岩藻半乳聚糖外, 一些真菌的异半乳聚糖也有报道, 例如 *Ganoderma applanatum*^[24] 中的岩藻半乳聚糖, *Fomitopsis fraxionea*^[25]、*Flammulina velutipes*^[26]、*Polyporus pinicola*^[27]、*P. fomentarius* 和 *P. igniarius*^[28] 中的甘露岩藻半乳聚糖, 以及 *Laetiporus sulphureus*^[29] 中的岩藻甘露半乳聚糖等, 这些结构主要由(1,6)- α -D-Galp 糖残基构成主链, 在O-2位被 α -L-Fucp 或 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp 糖残基取代。

多糖的化学结构是其生物活性的基础, 王昭晶^[30]等报道小刺猴头菌子实体水溶性多糖HP I 可明显增加病体小鼠胃液中的游离酸度和胃蛋白酶活性, 降低血清中胃泌素的含量, 抑制胃体及胃窦粘膜的萎缩变薄, 使胃部粘膜炎症减轻。其中HP I 以1,6连接的Gal为主, 侧链含有Fuc和Glc残基; 马秀俐^[31]等报道西洋参多糖PPQ I -1~4均能较好的刺激小鼠脾淋巴细胞转化、协同亚剂量ConA 诱生白介素- α (IL-2)。4个均一多糖为含有糖醛酸的杂多糖, 而它们的中性糖主链是基本以1,6连接的Gal为主。CC30w-1与前面所提到的两种均一多糖主链结构类似, 然而多糖的活性受结构的影响甚多, 如高级结构、侧链的有无、长短及连接位置、分枝密度及糖苷键的结合, 即使结构相似的两种多糖也可能具有不同的生物活性, 其生理活性及详细结构还有待进一步研究证明。

参考文献

- [1] 邵立平. 真菌分类学. 北京: 中国林业出版社, 1984. pp. 272 ~ 280.
- [2] 黄年来. 自修食用菌学. 南京: 南京大学出版社, 1987. pp. 660 ~ 662.
- [3] 王灿琴, 何铁光. 食用菌, 2004, 6: 4.
- [4] 贾蕊, 刘凤兰. 食品科技, 2006, 11: 155.
- [5] 杨宁波, 张建民. 特种经济动植物, 2000, 5: 31.
- [6] 刘艳芳, 张劲松. 食用菌学报, 2003, 10(2): 60.
- [7] 李师鹏, 苏蕾. 现代商贸工业, 2000, 24(4): 44 ~ 45.

- [9] 崔 旻, 张好建, 安利国. 世界华人消化杂志, 2002, **10**(3): 287 ~ 290.
- [10] 邢国福, 王海霞, 韩春超, 等. 食品科学, 2003, **24**(6): 149 ~ 141.
- [11] Staub AM. Methods in Carbohydrate Chem, 1956, **28** 350 ~ 356.
- [12] 张惟杰. 多糖复合物生化研究技术(第二版). 杭州: 浙江大学出版社, 1999, pp. 11, 112 ~ 120, 59 ~ 64, 193 ~ 198.
- [13] 张培敏, 朱 岩, 凌艳艳. 浙江大学学报, 2004, **31**(4): 431 ~ 434.
- [14] Chrostopher JB, Gary DM. Analysis of Carbohydrate by GLC and MS. Boca Raton, Florida :CRC Press, 1989, pp. 157 ~ 211.
- [15] Chaplin MF. Carbohydrate Analysis :A practical Approach, 2nd Oxford IRL Press, Oxford, 1994, pp. 91.
- [16] Kalyan RA, Paul BT. Analytical biochemistry, 1992, **203** :101 ~ 108.
- [17] 方积年. 国外医学(药学分册), 1981, **4** :222 ~ 228.
- [18] Harding LP, Marshall VM, Hernandez Y, *et al.* Carbohydrate Research, 2005, **340** :1107 ~ 1111.
- [19] Agrawal PK. Phytochemistry, 1992, **31** 3307 ~ 3330.
- [20] Bushmarinov IS, Ovchinnikova OG, Kocharova NA, *et al.* Carbohydrate Research 2004, **339** :1557 ~ 1560.
- [21] 曾凯宏, 明 建. 食品科技, 2001, **4** :65 ~ 67.
- [22] 肖盛元, 郭顺星. 天然产物的研究与开发, 2000, **12**(2): 81 ~ 86.
- [23] Junmin Fan, Jingsong Zhang, Qingjiu Tang, *et al.* Carbohydrate Research, 2006, **341** :1130 ~ 1134.
- [24] Usui T, Iwasaki Y, Mizuno T. Carbohydrate Research, 1981, **92** :103 ~ 104.
- [25] Cho S M, Koshino H, Yu S H, *et al.* Carbohydrate Research, 1998, **37** :13 ~ 18.
- [26] Mukumoto T, Yamaguchi H. Carbohydrate Research, 1977, **59** :614 ~ 621.
- [27] Fraser R N, Karácsonyi S, Lindberg B. Acta Chemica Scandinavica, 1967, **21** :1783 ~ 1789.
- [28] Björndal H, Lindberg B. Carbohydrate Research, 1969, **10** :79 ~ 85.
- [29] Alquini G, Carbonero E R, Rosado F R, *et al.* Fems Microbiology Letters, 2004, **230** :47 ~ 52.
- [30] 王昭晶, 梁忠言, 罗巛辉. 高等学校化学学报, 2004, **25**(8): 1474 ~ 1476.
- [31] 马秀俐, 赵德超, 孙永秀. 中草药, 2000, **31**(3): 165 ~ 167.