

· 有效成分 ·

## 香菇子实体蛋白多糖 Le-3 的结构性质研究

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:** 目的 研究香菇子实体蛋白多糖 Le-3 的结构性质。方法 凝胶渗透色谱法测定相对分子量, 红外扫描、气相色谱、 $\beta$ -消除反应和琼脂糖凝胶电泳等方法阐述多糖的结构, 比色法测定糖及蛋白质的含量。结果 该多糖的重均分子量和数均分子量分别为 13 700 和 12 500, 红外扫描有典型的多糖吸收峰, 糖苷键为  $\beta$  型。单糖组成为阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸, 中性糖摩尔比为 Ara: Xyl: Man: Gal: Glu = 0.31: 0.47: 1.00: 1.15: 8.92, 总糖含量为 70.6%, 蛋白质含量为 25.3%, 多糖与蛋白质为非 O-糖苷键连接。Le-3 中含有 RNA。结论 Le-3 是从香菇子实体中分离得到的一种新类型多糖。

**关键词:** 香菇; 蛋白多糖; 结构性质

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670-(2001)09-0769-03

### Studies on structural characteristics of protein-bond polysaccharide Le-3 from fruitbody of *Lentinus edodes*

YANG Juan<sup>1</sup>, WU Mou-cheng<sup>2</sup>, ZHANG Sheng-hua<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang Guizhou 550002; 2. Department of Food Science and Technology, Central China Agricultural University, Wuhan Hubei 430070, China)

**Abstract Object** To study the structural characteristics of protein-bond polysaccharide Le-3 from the fruitbody of *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler. **Methods** Relative molecular weights were determined by gel permeation chromatography. Structural characteristics were expounded by infra-red scan, gas chromatography,  $\beta$ -elimination reaction and Sepharose gel electrophoresis. The content of total polysaccharide and protein were determined by colorimetry. **Results** Mean molecular weight and molecular number of Le-3 were 13 700 and 12 500. Typical absorption peak of the polysaccharide as shown in infra-red spectrum was of  $\beta$ -type glycosidic linkage. Le-3 was composed of arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose and glucuronic acid. The molar ratio of the neutral saccharides was Ara: Xyl: Man: Gal: Glu = 0.31: 0.47: 1.00: 1.15: 8.92. The content of total saccharide and protein were 70.6% and 25.3%. The saccharides were not linked to peptides chain through O-glycosidic linkage. Le-3 contained RNA. **Conclusion** Le-3 was a kind of new type polysaccharide isolated from the fruitbody of *L. edodes*.

**Key words** *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler; protein-bond polysaccharide; structural characteristics

目前从香菇子实体中分离到的多糖主要是不与蛋白质结合的单纯多糖, 而我们在实验中得到与蛋白质结合的新类型复合多糖。关于香菇蛋白多糖中多糖、蛋白质的性质, 二者的连接方式及多糖的药理活性是否与蛋白质的协同作用有关等问题, 未见有研究报道。本文以研究化学结构为目的, 初步探讨了香菇蛋白多糖的结构性质, 为今后更深入研究香菇多糖的化学结构和生物活性等工作提供基础资料。

### 1 材料与方法

1.1 材料: 香菇子实体蛋白多糖 Le-3 的制备与纯化见文献<sup>[1]</sup>, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳、Sepharose CL-6B 柱层析及凝胶渗透色谱法, 证明为分子量分布均一级分<sup>[1]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 凝胶渗透色谱法测定分子量<sup>[2]</sup>: Waters HPLC 仪配以 TSK-5000PW 柱, 0.2 mol/L, pH 6.0

收稿日期: 2000-11-29

作者简介: 杨娟, 女, 助理研究员。1996 年于贵州大学生化营养研究所毕业, 获理学硕士学位; 同年考入华中农业大学食品科技系攻读博士学位, 并于 1999 年获工学博士学位。已发表论文 5 篇, 现研究方向主要为天然产物化学。E-mail: Yangjuan\_401@263.net

磷酸盐缓冲液为流动相,示差折射检测器检测,多糖标准为 Pullulan系列: P-800( $M_w$  870 000), P-400( $M_w$  432 000), P-200( $M_w$  186 000), P-50( $M_w$  48 000), P-20( $M_w$  23 700)。

1.2.2 紫外光谱分析: 将 Le-3配成  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  水溶液,在 200~ 500 nm之间进行扫描。

1.2.3 红外光谱分析: 在日立 260-10型红外分光光谱仪上进行,样品用溴化钾压片。

1.2.4 蛋白多糖组成成分分析: 气相色谱法测定单糖组成及摩尔比: 称取 15 mg Le-3,加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4 mL,封管后,在  $100^\circ\text{C}$  条件下水解 10 h,水解液用  $\text{BaCO}_3$  中和,过滤所得上清液冷冻干燥后按文献<sup>[3]</sup>制成糖的三甲基硅醚衍生物进行气相色谱分析,根据气相色谱分析中各峰的面积比算出摩尔比。色谱柱为 3 mm $\times$  2 m 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  $180^\circ\text{C}$ , 进样口温度  $230^\circ\text{C}$ , 空气流速 50 mL/min, 氢气流速 50 mL/min, 氮气流速 20 mL/min。

中性糖含量的测定: 根据气相色谱测出的蛋白多糖中中性单糖的组成及各单糖比例,取这几种单糖按比例混后作为中性糖标准,采用硫酸-苯酚法测定<sup>[4]</sup>。

糖醛酸含量的测定: 硫酸-吡啶法<sup>[5]</sup>。

蛋白质含量的测定: 考马斯亮蓝法<sup>[6]</sup>。

氨基酸组成分析: 准确称取 25 mg Le-3,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。

1.2.5 糖苷键连接方式的确定: Le-3用 0.2 mol/L NaOH于  $45^\circ\text{C}$ 下处理 1.5 h后,测定其在 220~ 400 nm的吸收光谱。

$\beta$  消除反应: 在  $\text{N}_2$  保护下,26 mg Le-3溶于 3 mL, 0.2 mol/L NaOH-1.0 mol/L  $\text{NaBH}_4$  溶液,于  $40^\circ\text{C}$ 反应 24 h,在冰浴中用 1 mol/L 乙酸中和至 pH7.0。在  $\text{N}_2$  气保护下,用 6 mol/L HCl水解,用氨基酸自动分析仪测定氨基酸含量。

## 2 结果与讨论

2.1 基本物性: Le-3为黄色纤维状疏松固体,溶于水,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。硫酸-苯酚、硫酸-蒽酮、硫酸-吡啶反应,考马斯亮蓝反应呈阳性;菲林试剂、碘-碘化钾反应呈阴性,表明其中含有多糖、蛋白质、糖醛酸,不含还原糖和淀粉。

2.2 相对分子量: 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  $\log M_w = 9.49 - 0.555RT$ ,  $r = 0.9996$ 。Le-3的数均分子量为 125 000,重均分子量为 13 700。多分散系数 ( $M_w/M_n$ ) 为 1.1,分子量分布比较均一。

2.3 紫外可见光谱分析: Le-3在 280 nm无吸收峰,260 nm附近有特征吸收,表明其中可能含有核酸和较少的色氨酸。由于 Le-3在 260 nm处有吸收,猜测可能有核酸存在,因此用琼脂糖凝胶水平板电泳加以验证。胶浓度为 0.7%, TAE电泳缓冲液: 0.04 mol/L Tris-乙酸, 0.001 mol/L EDTA。电压 1~ 5 V/cm,电泳结束后,用  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  的溴化乙锭水溶液染胶 20 min,在紫外光( $\lambda$  为 254 nm)下观察。结果发现 Le-3约在 1 000个碱基对处有很亮的拖尾带,估计是 RNA。加适量 RNA酶于 Le-3中,于  $37^\circ\text{C}$  温育 1 h,再与未经酶处理的样品一起电泳比较,结果发现亮带消失,证明 Le-3中确实含有 RNA。这在以往有关香菇子实体多糖的研究中未见报道。香菇中双链 RNA 有诱生干扰素产生的作用<sup>[7]</sup>,是否 Le-3也具有此功能,可做进一步探讨。

2.4 红外光谱解析: Le-3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。  $1620\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  有酰胺基的特征吸收峰,  $1420 \text{ cm}^{-1}$  处的 C-N 伸缩振动,都证明有蛋白质存在,红外分析进一步证实 Le-3为蛋白多糖。Le-3在  $890 \text{ cm}^{-1}$  ( $\beta$ -D-葡聚糖特征吸收)处有明显吸收,说明该蛋白多糖含  $\beta$ -D-葡萄糖。在  $870, 800 \text{ cm}^{-1}$  有甘露吡喃糖特征吸收峰。

## 2.5 组成分析

2.5.1 单糖组成及其摩尔比: Le-3酸水解物的气相色谱表明,其中性糖组成为阿拉伯糖(Ala)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glc),摩尔比为 0.31: 0.47: 1.00: 1.15: 8.92, Le-3中性糖、葡萄糖醛酸、总糖含量(%) 分别为 30.57, 40.05, 70.62。

2.5.2 蛋白质含量及氨基酸组成,含量(g/100g): 蛋白质含量为 25.3%, 氨基酸含量(%) 分别为天门冬氨酸 3.81; 苏氨酸 1.72; 丝氨酸 2.12; 谷氨酸 4.04; 甘氨酸 1.96; 丙氨酸 1.58; 缬氨酸 1.25; 蛋氨酸 0.53; 异亮氨酸 0.81; 亮氨酸 1.19; 酪氨酸 0.71; 苯丙氨酸 1.03; 赖氨酸 1.28; 组氨酸 0.30; 精氨酸

1. 09;脯氨酸 1. 07

2. 6  $\beta$ -消去反应确定糖肽链的连接方式: Le-3经碱处理后,在 240 nm 处未出现新的吸收峰,说明在 Le-3中可能不存在 O-糖苷键。因为如有 O-糖苷键存在,由于形成 O-糖苷键的丝氨酸和苏氨酸经碱处理后分别生成  $\alpha$ -氨基丙烯酸和  $\alpha$ -氨基丁烯酸,这两种不饱和氨基酸会导致 240 nm 处的光吸收增加<sup>[8]</sup>。

为进一步确定 O-糖苷键是否存在,对 Le-3进行  $\beta$ -消去反应。结果反应后 Le-3中丝氨酸和苏氨酸含量减少,其中丝氨酸为 1. 21,减少了 42. 9%;苏氨酸为 1. 08,减少 37. 2%,但丙氨酸未见有相应增加,这也说明了 Le-3中存在 O-糖苷键。但须指出,丝氨酸和苏氨酸经碱处理后,发生了何种反应,生成了什么物质,有关这方面的问题还需进一步研究。

Le-3中蛋白质、多糖、RNA 三者的存在,使其结构变得尤为复杂,阐明三者的连接方式比较困难,本文只是对香菇子实体蛋白多糖 Le-3的结构性质

进行了初步研究,有待进一步的深入

参考文献:

- [1] 杨娟,吴谋成,张声华. 香菇子实体多糖 Le-III 的分离纯化及性质研究 [J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(2): 16-17.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. Anal Biochem, 1962, 4: 330-334.
- [6] 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.
- [7] Takehara M, Toyomasu T, Mori K, et al. Isolation and antiviral activities of the doublestranded RNA from *Lentinus edodes* (Shiitake) [J]. Kobe J Med Sci, 1984, 30: 3-4.
- [8] Plantner J J, Carlson D M. Studies of mucin-type glycoproteins olefinic amino acids, products of the  $\beta$ -elimination reaction [J]. Anal Biochem, 1975, 65: 153-163.

## 一株产生萘醌类化合物的真菌的化学成分研究 (I)

刘为忠<sup>1</sup>,李维莉<sup>2</sup>,沈云修<sup>1</sup>,陈远腾<sup>2</sup>,谢金伦<sup>2</sup>

(1. 滨州医学院 化学教研室,山东 滨州 256603; 2. 云南大学 发酵工程重点实验室,云南 昆明 650091)

**摘要:**目的 研究菌寄生菌属真菌 (*Hypomyces* sp.) 菌丝体的化学成分。方法 用丙酮提取,硅胶柱分离纯化,化学和波谱学方法进行结构鉴定。结果 从菌丝体中分得 5 个化合物,分别鉴定为:竹红菌甲素 (I),竹红菌丙素 (II),痂囊腔菌素 C (III),1-吩嗪羧酸 (IV) 和 1,8-二羟基-9,10-蒽醌 (V)。结论 化合物 II ~ V 为首次从该菌中分得。

**关键词:** 菌寄生菌属真菌;萘醌类化合物;发酵

中图分类号: R284. 1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670-(2001)09-0771-03

### Studies on chemical constituents of fungus producing perylenequinones I

LIU Wei-zhong<sup>1</sup>, LI Wei-li<sup>2</sup>, SHEN Yun-xiu<sup>1</sup>, CHEN Yuan-teng<sup>2</sup>, XIE Jin-lun<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry, Binzhou Medical College, Binzhou Shandong 256603, China; 2. Key Laboratory of Fermentation Engineering, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China)

**Abstract Object** To study the chemical constituents in the mycelia of *Hypomyces* sp. **Methods** The mycelia were extracted with acetone and the chemical constituents of the extract were isolated and purified on silica gel column. Chemical and spectral methods were used to determine the structures of the isolated compounds. **Results** Five compounds were obtained and identified as hypocrellin A (I), hypocrellin C (II), elsinochrome C (III), 1-phenazinecarboxylic acid (IV), and 1,8-dihydroxy-9,10-anthraquinone (V). **Conclusion** Compounds II ~ V were obtained from the mycelia of *Hypomyces* sp. for the first time.

**Key words** *Hypomyces* sp.; perylenequinones; fermentation