猴头菇子实体中的主要多糖成分

贾联盟, 刘 柳, 董 群*, 方积年*
(中国科学院上海生命科学研究院上海药物研究所, 上海 201203)

摘 要: **目的** 对猴头菇子实体中的多糖进行分离、纯化和组成分析。**方法** 猴头菇依次经过水提取和碱提取, 所得粗多糖以 DEAE-celluose 色谱、Sephadex 凝胶滤过色谱和 Fehling 试剂沉淀等方法进一步分离纯化, 高效凝胶滤过法(HPGPC)鉴定纯度及相对分子质量, 气相色谱和 IR 光谱分析多糖的比旋光度和化学组成。**结果** 从猴头菇子实体中提取得 3 部分粗多糖 CPW、CPB1 和 CPB2, 经分离纯化得到 5 种多糖 HEP-1～HEP-5, 其中 HEP-1 和 HEP-4 为杂多糖, HEP-3 和 HEP-5 为葡聚糖, HEP-2 为酸性多糖。**结论** 猴头菇子实体分到的 5 种多糖主要含以 *D*-葡萄糖为主的中性糖, 以葡聚糖含量最多, 其中 HEP-1、HEP-2 为新类型的真菌多糖。

关键词: 猴头菇; 多糖; 子实体
中图分类号: R284.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2670(2005)01-0010-03

Main polysaccharide fractions isolated from fruiting bodies of *Hericium erinaceus*

JIA Lian-meng, LIU Liu, DONG Qun, FANG Ji-nian
(Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institute for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: **Objective** The polysaccharides from fruiting bodies of *Hericium erinaceus* were isolated, purified, and characterized. **Methods** The fruiting bodies of *H. erinaceus* were extracted by water and alkaline successively. The crude polysaccharides were isolated and purified by DEAE-celluose, Sephadex gel filtration chromatography, and the precipitation with Fehling agent. The purity and molecular weight were identified by HPGPC. Their specific rotations were also determined and the sugar compositions of polysaccharides were analyzed by GC and IR. **Results** Three crude polysaccharide fractions (CPW, CPB1, and CPB2) were extracted from fruiting bodies of *H. erinaceus*, from which five polysacchrides, designated HEP-1 - HEP-5, were obtained. Among them HEP-1 and HEP-4 were neutral heteropolysaccharides, HEP-3 and HEP-5 were glucans, and HEP-2 was an acidic polysaccharide. **Conclusion** The five polysaccharides are mainly composed of neutrual sugars, particularly of *D*-glucose. HEP-1 and HEP-2 are two new types of fungal polysaccharides.

Key words: *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers; polysaccharides; fruiting body

猴头菇为齿菌科真菌猴头菌 *H. erinaceus* (Bull.) Pers. 的子实体, 为名贵的食用真菌。入药利五脏、助消化, 可治疗神经衰弱、胃炎及胃溃疡等。猴头菇子实体中含有猴头菌酮、猴头菌碱、植物凝集素、蛋白质、脂质及多糖等多种化学成分[1]。本实验报道猴头菇子实体中主要多糖成分的分离纯化、化学特征和性质。

1 仪器和材料

实验中单糖对照品: 葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、阿拉伯糖及木糖均为 Fluka 公司出品。测定多糖相对分子质量的标准品 Dextran T-2000、T-700、T-580、T-500、T-80、T-70、T-40、T-11 和 T-9.3 为 Pharmacia 公司生产。硼氢化钠($NaBH_4$)、三氟乙酸(TFA)和 DC-Alufolien 型纤维素板购自 Merck-Schuchardt 公司, DEAE-纤维素购自 Whatman 公司, 其他试剂均为国产 AR 级, 用前未作处理。

Waters 高效液相色谱系统; 岛津 GC-14BPF 型气相色谱仪(GC), 色谱柱为 3% OV-225/AW-DMCS-Chromosorb W (80～100 目)玻璃填充柱(2.5 m × 3 mm), 糖组成分析柱温 210 ℃; Perkin-Elmer 591B 型红外(IR)分析仪; WZZ-1 型数字式自动旋光仪; Büchi 461 型旋转蒸发仪(工作水浴温

* 收稿日期: 2004-03-18
作者简介: 贾联盟(1975-), 男, 硕士研究生。
* 通讯作者 Tel: (021)50806600-3203 E-mail: dongqun@hotmail.com

度为 40 ℃)。

猴头菇子实体 *H. erinaceus* (Bull.) Pers. 产自浙江丽水,由浙江省庆元方格医药保健品有限公司提供,为干燥的药材。

2 方法

2.1 提取:取干燥的猴头菇子实体 1.5 kg,95% 乙醇索氏提取 6 h 脱脂,按图 1 所示的流程进行提取。

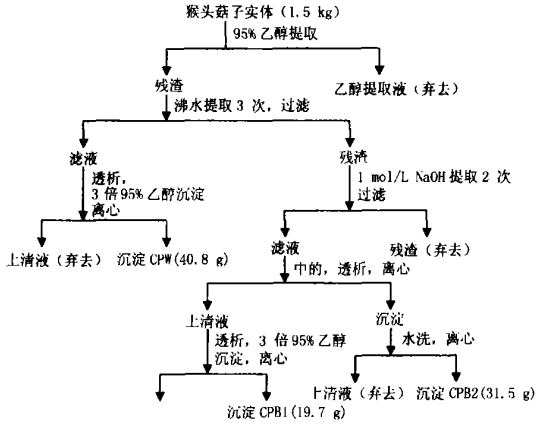

图 1 猴头菇子实体粗多糖提取流程图

Fig. 1 Extraction processing chart of crude polysaccharides from fruiting bodies of H. erinaceus

2.2 分离纯化:取粗多糖 CPW 20 g,以 Sevag 法(氯仿-正丁醇= 4∶1)脱蛋白 5 次,直到 Lowry 反应呈阴性,得完全脱蛋白后的粗多糖 14.7 g。装 DEAE-纤维素(80 cm×6 cm,Cl^- 型)柱分多次上样进行色谱分离,先后以蒸馏水及 0.1、0.2、0.4 和 0.8 mol/L NaCl 溶液洗脱,以苯酚-硫酸法检测糖含量,收集合并主峰位。其中蒸馏水洗脱和 0.2 mol/L NaCl 洗脱部分经浓缩、透析和冷冻干燥分别用 HEPA 1(4.7 g)和 HEPA 3(1.4 g)。HEPA 1(1 g)上 Sephadex G-200 柱纯化,0.2 mol/L NaCl 洗脱,得 HEP-1(230 mg)。HEPA 3(1 g)以 Sephadex G-75 柱纯化得 HEP-2(115 mg)。

取 CPB1 样品 10 g,分多次上 DEAE-纤维素柱(80 cm×6 cm,Cl^- 型),分别以蒸馏水及 0.1、0.2 和 0.4 mol/L NaCl 洗脱,收集水洗部分,浓缩、透析、冷冻干燥得 HEPB1,然后再用 DEAE-纤维素柱(OH-型)色谱,依次以蒸馏水及 0.01、0.02 和 0.04 mol/L NaOH 溶液洗脱,收集 0.04 mol/L NaOH 溶液洗脱含糖部分,以 1 mol/L HCl 中和,透析、浓缩、冷冻干燥,得多糖 HEP-3(1.4 g)。

CPB2 样品 5 g,溶于 500 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液中,搅拌使充分溶解,离心除去不溶物。上清液在搅拌下缓缓滴加 Fehling 试剂[2],至不再产生沉淀,离心(6 000 r/min)。沉淀部分在 0 ℃以含 5% HCl 的乙醇分解铜复合物,再依次以乙醇和无水丙酮洗涤,产物以 Fehling 试剂按照上述方法反复沉淀 3 次,得到浅黄色粉末 HEP-4(670 mg)。上清液以 25% 冰醋酸中和,透析后用 3 倍体积乙醇沉淀,得白色粉末 HEP-5(3.3 g)。

2.3 糖含量和蛋白含量的测定:以 *D*-葡萄糖和牛血清白蛋白(BSA)为对照品,分别按照苯酚-硫酸法[3]和 Lowry 法[4],测定粗多糖 CPW、CPB1 和 CPB2 的中性糖含量和蛋白质含量。

2.4 纯度的鉴定和相对分子质量的测定:相对分子质量用高效凝胶滤过法(HPGPC)测定[5],色谱柱为 Ultrahydrogel™ 2000 和 500 二柱串联,示差法检测。溶液和流动相均为 0.003 moL/L NaOH,体积流量 0.5 mL/min。标准曲线根据标准葡萄糖 Dextran T-700、T-580、T-500、T-80、T-70、T-40、T-11 和 T-9.3 的相对分子质量和保留时间制作。

2.5 比旋光度 $[\alpha]_{20}^{D}$ 的测定:精确称取一定量的多糖样品,以蒸馏水配成一定浓度的溶液,在 20 ℃室温于 WZZ-1S 数字式自动旋光仪上测得其旋光度,然后计算比旋光度。HEP-4 和 HEP-5 由于不溶于水,故而采用 0.5 moL/L NaOH 作为溶剂。

2.6 糖组份分析:取 3 mg 多糖样品,加入 2 moL/L 三氟乙酸(TFA)4 mL,封管,110 ℃下水解 3 h。水解产物减压蒸干,再反复加甲醇蒸干 3 次以除尽 TFA。蒸干的样品用 0.2 mL 蒸馏水溶解,取少量在纤维素板上薄层色谱,检验水解是否完全和是否含糖醛酸[6],并初步鉴定单糖组成。展开剂为醋酸乙酯-吡啶-水-醋酸(5∶5∶3∶1),苯胺-邻苯二甲酸喷洒后于 100 ℃加热烘烤 10 min 显色。其余水解产物以 $NaBH_4$ 还原、醋酸酐乙酰化制备阿尔迪醇乙酸酯衍生物后进行 GC 分析[7]。

2.7 糖醛酸的还原及含量测定:以葡萄糖醛酸为对照品,用间苯基苯酚法测定 HEP-2 的糖醛酸含量[8]。取 HEP-2 样品 20 mg,按照 Conrad 方法还原糖醛酸[9]。

3 结果和讨论

3.1 粗多糖提取:猴头菇子实体依次经沸水和碱溶液提取后,得到 3 个部分粗多糖:水提部分 CPW(40.8 g),碱提水溶部分 CPB1(19.7 g)和碱提水不溶部分 CPB2(35.7 g),总的粗多糖产率为 6.4%,碱提液中得到的多糖多于水提液,说明猴头菇子实体中的多糖多数难溶于水。按照文献方法测定 3 种粗多糖中的糖含量和蛋白含量,结果见表1。其中

表 1 3 种粗多糖的产率及其中性糖和蛋白质含量的测定

Table 1 Yield of three crude polysaccharides and their contents of neutural sugar and protein

粗多糖	产率/%	中性糖/%	蛋白质/%
CPW	2.7	82.8	17.0
CPB1	1.3	89.5	1.6
CPB2	2.4	84.5	0

CPW 蛋白质含量较高, 纯化前需要脱蛋白处理。

3.2 纯度及相对分子质量的测定: HEP-1、HEP-2 和 HEP-3 以 HPGPC 法检测, 均出现对称的单峰, 可以鉴定为均一的多糖。其中 HEP-1 和 HEP-2 的相对分子质量分别为 1.8×10^4 和 1.2×10^5, HEP-3 的相对分子质量则超过 100 万。HEP-4 和 HEP-5 在水中不溶解, 在测定条件无法进行 HPGPC 分析, 故而首先将它们分别溶解于 0.5 moL/L NaOH, 再上 Sephadex S-300 柱, 以 0.5 moL/L NaOH 洗脱, 分部收集。以苯酚-硫酸法检测, 得到的洗脱曲线呈单一对称峰。HEP-4 以 Fehling 试剂反复纯化 3 次, 最后 1 次纯化过程中以不同体积 Fehling 试剂所沉淀下来的多糖各取少量作组成分析, 糖组成基本不变, 可以判断为均一的多糖。

3.3 比旋光度 $[\alpha]_{20}^{D}$: 各种多糖的比旋光度如表 2 所示, 不同组份的比旋光度有显著差异, 说明它们可能具有不同的化学结构。

表 2 猴头菇多糖 HEP-1～HEP-5 的比旋光度

Table 2 Specific rotations of polysaccharides HEP-1- HEP-5

多糖	旋光度 α/(°)	质量浓度/(g·100 mL^{-1})	比旋光度 $[\alpha]_{20}^{D}$/(°)
HEP-1	+ 0.382	0.295	+ 129.4
HEP-2	- 0.061	0.160	- 38.1
HEP-3	+ 0.043	0.294	+ 14.6
HEP-4	+ 0.031	0.100	+ 31.0
HEP-5	+ 0.252	0.108	+ 233.3

3.4 糖组成分析结果: HEP-1 由鼠李糖、半乳糖和葡萄糖组成, 摩尔比为 1.00∶3.20∶0.84; HEP-2 由葡萄糖组成, IR 和 TLC 分析显示还含有糖醛酸, 经测定糖醛酸质量分数为 22.3%, 羧基还原后再进行组成分析, 结果未出现其他中性糖, 这说明 HEP-2 是由葡萄糖和葡萄糖醛酸组成的多糖, 两者的摩尔比约为 4∶1; HEP-3 和 HEP-5 均为单一葡萄糖组成的葡聚糖, 但 IR 的特征吸收显示前者主要为 β-葡聚糖, 而后者则为 α-葡聚糖; HEP-4 由鼠李糖、木糖和甘露糖组成, 摩尔比为 1.00∶2.40∶4.60。

3.5 IR 光谱分析: 由于多糖结构单元中糖环及官能团的相似性以及多糖整体结构的复杂性, 多糖的 IR 谱大都十分相似, 但从一些特殊的吸收峰, 也可以得到多糖结构的某些信息。HEP-2 的 IR 谱在 1 728 cm^{-1} 出现吸收峰, 说明含有糖醛酸; HEP-3 在 893 cm^{-1} 处产生 β-葡聚糖的特征吸收峰, 而 HEP-5 则出现 840 cm^{-1} 处出现 α-葡聚糖吸收峰; HEP-4 有 810 和 870 cm^{-1} 处的吸收峰, 证明含有甘露糖[10]。

国内外对猴头菇子实体中的多糖组分均进行过研究, 有些报道针对未经纯化的粗多糖进行分析, 无法确定其中多糖的类型及相对含量, 其他对纯化后的多糖的研究报道过 β-D-葡萄糖[11, 12]和一种主要由半乳糖和葡萄糖构成的杂多糖[13]。本实验分离到的两种杂多糖 (HEP-1 和 HEP-4), α-葡聚糖 (HEP-5) 和一种含糖醛酸的葡聚糖 (HEP-2) 均是首次从猴头菇子实体中分离到, 其中 HEP-1 和 HEP-2 的糖基构成在以前报道的真菌多糖中未见类似报道, 它们的化学结构和生物活性尚需进一步研究。上述结果还表明, 猴头菇中的多糖主要为中性多糖, 且大多以葡萄糖为主要构成单元。

References:

[1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.

[2] Whistler R L. *Methods in Carbohydrate Chemistry* [M]. New York: Academic Press Inc, 1965.

[3] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K. Colorimetric method for determination of sugar and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350.

[4] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al*. Protein measurement with the folinphenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.

[5] Wei Y A, Fang J N. Determination of homogeneity and molecular weight of polysaccharides by HPGPC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1989, 24(7): 532-536.

[6] Liu C P, Dong Q, Fang J N. A new simple method to detect uronic acid in polysaccharides [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(5): 404-407.

[7] Dong Q, Ding S W, Yang X, *et al*. Structural features of a heteroxylan from *Sophora subprostrata* roots [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(1): 81-84.

[8] Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. *Anal Biochem*, 1973, 54(2): 484.

[9] Taylor R, Conrad H E. Stoichiomeric depolymerization of polyuronides and glycosamino-glycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups [J]. *Biochemistry*, 1972, 11(8): 1383-1388.

[10] Zhang W J. *Biochemical Techniques in Complex Carbohydrates* (糖复合物生化研究技术) [M]. 2nd ed. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999.

[11] Mizuno T, Wass T, Ito H, *et al*. Antitumor active polysaccharides isolated from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(2): 347-348.

[12] Wang M X, Guan G, Jing M D. Studies on the nutrition composition analysis of *Hericium erinaceus* and its utilization [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 1992, 19(2): 68-72.

[13] Yang Y, Zhou C Y, Bai Y Q. Isolation and purification of the polysaccharides from the fruiting bodies and mycelium of *Hericium erinaceus* and comparison between their physicochemical properties [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2001, 20(3): 397-402.