

金耳胞外多糖的结构分析

邓云霞,瞿伟菁*,曹群华,牛伟,泮一峰,顾媛,李娟

(华东师范大学 生命科学学院,上海 200062)

金耳 *Tremella aurantialba* 系银耳科中名贵药食真菌,具有止咳化痰、补气养心、平肝益胃等功效^[1,2]。金耳子实体多糖和菌丝体多糖的结构和药效均有报道^[3~10],本实验对从发酵液中提取的胞外多糖进行了分离纯化并对其结构作了初步研究。

1 实验部分

1.1 仪器与药品:Biof-2050 发酵罐(上海高机实业总公司生产);SYNDER-UF402 型超滤装置(SYNDER 美国);KA-1000 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);玻璃色谱柱(1 cm×50 cm、1.5 cm×60 cm);HL-2 恒流泵(上海精科实业有限公司制造);TH-1000 梯度混合仪(上海沪西仪器厂);BSA-100 自动分部收集器(上海长宁科技发展有限公司);MD200-3 电子分析天平;UV-VIS 8500 紫外分光光度计;Nicolet 710 FI-IR 分光光度计。

菌种:金耳 *Tremella aurantialba* 菌株由中华全国供销总社昆明食用菌研究所刘正南提供。

DEAE-Sephadex A-25、Sephadex G-200 均为 Pharmacia 公司产品,单糖标准品、高碘酸钠、 NaBH_4 、 α -淀粉酶、纤维素酶等均为国产分析纯。

1.2 金耳胞外多糖的制备:金耳在 50 L 通气搅拌反应器中发酵培养。发酵液滤过、离心除去菌丝体,滤液加 3% NaOH 40℃水解 4 h。用 2 mol/L H_2SO_4 调节 pH 10~11 过夜。取水解液用 0.1 μm 膜微滤。滤液用相对分子质量 5 000 膜截留,截留液用蒸馏水洗数次至 pH 中性。浓缩加入 4 倍酒精沉淀,相继以无水乙醇、乙醚洗涤数次,真空干燥得褐色粉末状金耳胞外多糖粗品。

取适量金耳胞外粗多糖,进行 DEAE-Sephadex A-25 凝胶柱柱色谱,0~2 mol/L NaCl(梯度洗脱,0.8 mL/min,硫酸-萘酚法检测,收集两个主要洗脱峰,透析、冷冻干燥得纯化多糖。

1.3 纯度鉴定:紫外图谱:取分离纯化后的多糖纯品组分 a、b 适量分别配制成 1 mg/mL 的溶液,在

200~400 nm 扫描。凝胶过滤法:分别取 0.2 mol/L(组分 a)和 0.4 mol/L(组分 b)NaCl 洗脱部分得到的纯化多糖进行 Sephadex G-200 柱色谱,0.05 mol/L NaCl 洗脱,0.2 mL/min,硫酸-萘酚法检测。

1.4 金耳胞外多糖组成分析:取金耳胞外纯化多糖 a 组分、b 组分各 20 mg,加入 1 mol/L H_2SO_4 2 mL 置安瓿中封管,90℃水解 12 h。用 BaCO_3 中和硫酸,抽滤,收集滤液,备用。硅胶板薄层色谱:展开剂为正丁醇-醋酸乙酯-异丙醇-醋酸-水-吡啶(35:100:60:35:30:30)。展层结束后,于通风橱中挥干溶剂。苯胺-二苯胺显色剂喷雾,80℃放置 10 min 显色。

1.5 高碘酸氧化和 Smith 降解^[11]:分别称取多糖样品 20 mg,加一定量 0.015 mol/L 高碘酸钠溶液,于 4℃下暗处放置,间或振摇。于 4、24、48 h……间隔时间取样稀释 250 倍后,使用紫外分光光度仪在 223 nm 处测定吸光度值,直至达一稳定值,计算高碘酸钠的消耗量。另取 5 mL 反应液,加乙二醇 1 mL,10 min 后以 0.01 mol/L 氢氧化钠滴定甲酸的释放量。取经高碘酸钠氧化完全的多糖溶液 10 mL,加 2 mL 乙二醇,流水透析 48 h 后,蒸馏水透析过夜。加 8 mg NaBH_4 于暗处还原 18~24 h;用 0.1 mol/L CH_3COOH 调节 pH 至 5.0,蒸馏水透析 24 h 后冷冻干燥,得多糖醇。取多糖醇 10 mg,加 2 mol/L H_2SO_4 封管水解 6 h,用 BaCO_3 中和硫酸,抽滤,收集滤液。薄层色谱鉴定水解产物,展开系统为正丁醇-醋酸-水(4:1:5,上层),硝酸银显色剂显色。

1.6 酶法分析

1.6.1 α -淀粉酶酶解:取 0.5 mL 0.5%多糖溶液,37℃预热 20 min 后加入适当稀释的 α -淀粉酶液(用 0.2 mol/L pH 6.9 的磷酸盐缓冲液配制),37℃保温 1.5 h,加入 3,5-二硝基水杨酸试剂 1 mL,放入沸水中煮沸 5 min,冷却。稀释 5 倍后于 540 nm 测定吸光度值。

1.6.2 纤维素酶酶解:方法同1.6.1,纤维素酶用0.1 mol/L pH 4.8的柠檬酸缓冲液溶解。

1.7 红外光谱分析:取金耳胞外多糖纯品,用溴化钾压片法制样,4 000~400 cm^{-1} 扫描。

2 结果

2.1 金耳胞外多糖分离结果:金耳胞外粗多糖,经DEAE-Sephadex A-25柱色谱分离得a、b两组分。

2.2 纯度鉴定:多糖纯品组分a、b在200~400 nm区域扫描,在260和280 nm无紫外吸收,表明组分a、b不含蛋白质、多肽和核酸。经Sephadex G-200鉴定二者均为单一峰。

2.3 TLC分析:经薄层色谱可得a、b两个组分均由半乳糖、鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、岩藻糖组成,但根据在相同点样量情况下其显色斑点大小不同分析二者各单糖比例是不同的。

2.4 糖苷键分析:多糖组分经高碘酸钠氧化,7 d可反应完全,高碘酸钠消耗达到稳定。计算平均每摩尔己糖残基消耗高碘酸量及释放甲酸量,数据见表1。根据高碘酸氧化原则^[12],以1→2或1→4位键合的糖基经高碘酸氧化,平均每个糖基仅消耗一分子高碘酸,并且无甲酸释放。以1→3位键合的糖基不被高碘酸氧化,以1→6位键合的糖基或非还原末端基经高碘酸氧化,消耗二分子高碘酸,同时释放一分子甲酸。因而推知a、b两组分多糖可能含有1→6、1→2或1→4糖苷键。

表1 高碘酸氧化结果

Table 1 Result of periodate oxidation

组 分	高碘酸钠消耗/mol	甲酸生成/mol
a	1.07	0.489
b	0.94	0.416

Smith降解结果表明,降解产物为赤藓醇、甘油、葡萄糖、鼠李糖。由此证明分子中存在1→3、1→4及1→6糖苷键或分枝末端基。

2.5 酶解实验结果: α -淀粉酶不能水解两组分,纤维素酶水解有还原糖的生成,则进一步证明了两组分子中存在 β -(1→4)糖苷键。

2.6 红外光谱分析:IR图谱显示:3 200~3 800 cm^{-1} 尖圆的峰是O-H和N-H的伸缩振动,3 200~2 800 cm^{-1} 的一组峰是糖类C-H的伸缩振动,1 400~1 200 cm^{-1} 的一些峰是C-H的变角振动,由此可初步判断二者均为多糖类化合物,950~1 250 cm^{-1} 之间的一组强峰是吡喃糖环的醚键和羟基的吸收峰。836~853 cm^{-1} 及875~900 cm^{-1} 特征吸收

峰为 α -端基和 β -端基差向异构的C-H变角振动;表明二组分中 α -糖苷键和 β -糖苷键并存。

3 讨论

综合上述分析结果,金耳胞外多糖组分a、均有半乳糖、鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、岩藻糖组成,且分子中均在1→3、1→4及1→6糖苷键或分枝末端基, α -糖苷键和 β -糖苷键并存,两组分结构基本相似。与李晓明等^[13]报道的(TaA由甘露糖和木糖组成)完全不同,可能因提取方法不同所致。

References:

- [1] Yang X M. *Cultures of Edible Fungi in China* (中国食用菌栽培学) [M]. Beijing: Beijing Agricultural Press, 1988.
- [2] Liu B. *Edible and Medicinal Fungi in China* (中国食用药用真菌) [M]. Taiyuan: Shanxi People's Press, 1978.
- [3] Qu W J, Zhang X F, Tang S X. The pharmacology experiments of *Tremella aurantialba* on reduction of phlegm, cough and the serum glucose level [J]. *Acta Agric Shanghai* (上海农业学报), 1998, 14(1): 58-62.
- [4] Mao S Y, Lu Q M, Qu W J. The studies of reduction the serum glucose levels by *Tremella aurantialba* polysaccharides [J]. *J East China Norm Univ-Nat Sci, Spec Issue Zoology* (华东师范大学学报·自然科学版·动物学专辑), 1997: 74-77.
- [5] Zhang W, Qu W J. Studies for polysaccharides compound of *Tremella aurantialba* on hypoglycemic effects in SD rats. [J]. *J East China Norm Univ-Nat Sci, Spec Issue Zoology* (华东师范大学学报·自然科学版·动物学专辑), 1999: 86-90.
- [6] Zhu X H, Qu W J, Wang Y F. The analysis for anti-hyperglycemic mechanism of *Tremella aurantialba* mycelium polysaccharides on SD rats induced by alloxan [J]. *J East China Norm Univ-Nat Sci, Spec Issue Zoology* (华东师范大学学报·自然科学版·动物学专辑), 1999: 102-105.
- [7] Liu C H, Rong F X, Lu G L, et al. The primary studies report of *Tremella aurantialba* polysaccharides [J]. *Edib Fungi* (食用菌), 1996, 18(3): 4-5.
- [8] Wang Y T, Rong F X, Li S Y, et al. The primary observations of effects on immune function in mice by *Tremella aurantialba* and Zhenqi Fuzheng Chongji [J]. *J Lanzhou Med Coll* (兰州医学院学报), 1989, 15(2): 59-65.
- [9] Kiho T, Morimoto H, Kobayashi T, et al. Effect of a polysaccharide (TAP) from the bodies of *Tremella aurantia* on glucose metabolism in mouse liver [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2000, 64(2): 417-419.
- [10] Liu C H, Xie H. Isolation purification and structural comparison investigation of polysaccharides of artificial cultivated fruit body and fermented mycelia of *Tremella aurantialba* [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 1998, 17(3): 246-250.
- [11] Aspinall G O, Ferrier R J. A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates [J]. *Chem Ind*, 1957, 37(7): 1216.
- [12] Zhang W J. *Biochemical Research Method of Glycoconjugates* (复合多糖生化研究技术) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987.
- [13] Li X M. The primary studies on polysaccharide A from filtrate of fermentation of *Tremella aurantialba* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(12): 745-746.