

# 硫酸酯化香菇多糖的制备及光谱分析

燕 航<sup>1</sup>, 钟耀广<sup>2,3</sup>, 王淑琴<sup>3</sup>, 刘长江<sup>3</sup>

(1. 大连轻工业学院生物与食品工程学院, 116034 2. 上海大学食品学院 200090 3. 沈阳农业大学食品学院, 110161)

**摘 要:**香菇多糖粗品经 Sevage 法去除游离蛋白, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 脱色, DEAE-纤维素柱层析, 及 Sephadex G-200 柱进行纯化得到香菇多糖组分, 采用 Sephadex G-200 柱层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 证实该多糖组分为均一多糖。然后用吡啶-氯磺酸磺化试剂制备了 4 种不同取代度的硫酸酯化香菇多糖, 与未酯化之前的香菇多糖进行了理化性质和红外光谱分析的比较。结果表明硫酸酯化香菇多糖有明显的硫酸酯的特征。

**关键词:**香菇多糖; 硫酸酯化; 光谱分析

中图分类号: S 646.1<sup>+</sup>2 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)03-0046-03

近年来发现的硫酸酯多糖具有抗艾滋病病毒(HIV)的活性, 使多糖硫酸酯化的研究成为热点。日本学者<sup>[1,2]</sup>报道, 从香菇子实体中获得的一种具有良好抗肿瘤作用的葡聚糖的硫酸化衍生物具有较好的抑制 HIV 的活性。我国学者王顺春、方积年<sup>[3]</sup>对该类衍生物的结构进行了研究, 制备了一系列的不同硫酸取代度的硫酸

酯化香菇多糖, 制备的硫酸酯化香菇多糖经验证具有良好的抗 HIV 活性。但相对于多糖的研究来说有关多糖硫酸酯化研究报道仍然较少, 且缺乏后续的一系列相关试验研究。该试验进行了香菇多糖硫酸酯化衍生物的制备、理化性质及结构方面的初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

香菇粗多糖由香菇子实体中提取而得。

浓硫酸, 正丁醇, 乙醇, 吡啶, 氯磺酸等化学试剂均为分析纯。

### 1.2 试验方法

## 参考文献:

- [1] Conner R A, Litz R E. Progress in breeding papaya with tolerance to papaya ringspot virus[J]. Pro. Fla. Hort. Sci., 1997, 91(1): 182-184.
- [2] Conover R A, Litz R E, Malo R E. Caniflora a papaya Ringspot virus tolerant papaya for south Florida and the Caribbean[J]. Hortscience, 1986, 21(4): 1072.
- [3] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 78-82.

- [4] Maglalita P M, Villegas V N, Pimentel P B. Reaction of papaya (*Carica papaya* L.) and related carica species to ringpot virus. Philipp [J]. Crop Sci., 1988, 13(3): 129-132.
- [5] 肖火根, 真冈哲夫, 骆学海. 华南地区番木瓜环斑病毒和畸形花叶病毒调查鉴定研究[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(4): 52-53.
- [6] 蔡建和, 范怀忠. 华南番木瓜病毒种类调查鉴定[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(4): 13-17.

## Resistance to PRSV of a Natural Mutant in Papaya

HUANG Jian chang, XIAO Yan

(Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225)

**Abstract:** A papaya natural mutant (temporarily named Lingkangyihao, LK 1) resistant to PRSV was used to analysis the resistance stability by artificial inoculating with PRSV Ys, Vb and Sm strains. The results showed that the papaya mutant with resistance to PRSV had the resistance to Ys and Vb strains of PRSV and could hold the resistance through self hybrid, however, it was not resistant to Sm strain. The results implied that LK 1 had the stable resistance to PRSV Ys and Vb strains.

**Key words:** Papaya; PRSV; Resistance

1.2.1 香菇多糖的分离纯化 用蒸馏水将粗多糖溶解,将Sevage试剂按一定比例加入多糖液中,振荡,离心,按以上方法重复几次至有机层没有絮状沉淀,清液蛋白含量不再变化。将上清液在pH8.0下滴加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>至淡黄色或无色,在50℃下保温2h,然后浓缩,装入透析袋中用双蒸水透析,每8h换一次水,透析3~5d至离子强度不变为止。用DEAE-纤维素柱层析,经梯度洗脱,收集占较大部分的多糖组分,然后用Sephadex G-200柱进一步纯化香菇多糖,增大上样量,收集其中占较大部分的组分。

1.2.2 纯度鉴定 SephadexG-200柱层析:上样于事先平衡好的柱上,以0.05mol/L NaCl溶液洗脱,苯酚-硫酸法<sup>[4]</sup>检测糖峰的存在;聚丙烯酰胺凝胶电泳:用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法<sup>[5]</sup>进行香菇多糖的纯度鉴定,配制10%浓度的分离胶,3%浓度的浓缩胶,电极缓冲液为pH8.3的Tris-甘氨酸缓冲液,溴酚蓝作指示剂,电泳电压400V,至溴酚蓝染液迁移距硅胶框下缘1cm时停止电泳。阿利新蓝对多糖染色。

1.2.3 香菇多糖硫酸酯的制备 用氯磺酸-吡啶<sup>[6]</sup>进行多糖的硫酸酯化衍生物的制备。将一定量无水吡啶置于附有冷凝管和搅拌装置的三颈烧瓶中,经冰盐浴冷却后,剧烈搅拌下,按氯磺酸:吡啶比例分别为1:2、1:4缓慢滴加氯磺酸。用无水甲酰胺溶解,然后加入0.5g多糖粉末,在45℃、60℃搅拌反应4h,反应液经中和、离心后,用蒸馏水透析,减压浓缩,加入乙醇,静置过夜后离心,收集沉淀物,干燥后得到硫酸酯化产物。

1.2.4 硫酸酯化香菇多糖的理化性质 包括溶解性测定、莫利希实验<sup>[7]</sup>、苯酚-硫酸反应、DNS反应<sup>[8]</sup>、碘-碘化钾反应<sup>[9]</sup>、茚三酮反应<sup>[10]</sup>、三氯化铁反应<sup>[11]</sup>和硫酸-吡啶反应<sup>[12]</sup>。

1.2.5 硫酸酯化香菇多糖的红外光谱分析 用红外光谱对香菇多糖及硫酸酯化香菇多糖进行构象分析,将2mg多糖粉末与200mg KBr压片,在红外4000cm<sup>-1</sup>~400cm<sup>-1</sup>下扫描。

2 结果与分析

2.1 香菇多糖的纯化及其纯度鉴定

多糖粗品脱蛋白、脱色、透析后,经DEAE-纤维素柱层析,得到A~F 6个组分,收集占较大部分的多糖组分B,然后用Sephadex G-200柱进一步纯化香菇多糖,得到B-1和B-2,增大上样量,收集其中占较大部分的B-1组分。经Sephadex G-200柱层析法进行多糖纯度鉴定,得到的洗脱液经苯酚-硫酸法测定糖分布为单一对称洗脱峰,如图1。聚丙烯酰胺凝胶电泳后,用阿利新蓝对多糖染色,结果呈现一个单一蓝色谱带,证明B-1为纯多糖。

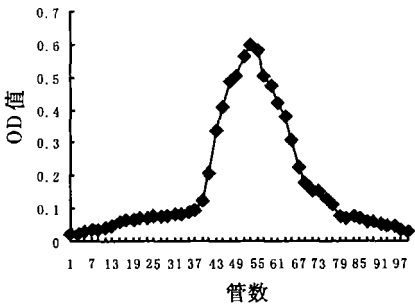


图1 多糖B-1的Sephades G-200柱层析

2.2 香菇多糖硫酸酯化及其鉴定

选择氯磺酸:吡啶比例为1:2、1:4,反应温度为45℃、60℃,反应时间为4h制备香菇多糖硫酸酯,用BaCl<sub>2</sub>-明胶比浊法<sup>[13]</sup>测得硫含量,用苯酚-硫酸法测得多糖含量,结果见表1。

表1 硫酸酯化多糖的制备结果

试验号	氯磺酸:吡啶	酯化温度(℃)	酯化时间(h)	硫酸基含量(%)	多糖含量(%)	收率(%)
1	1:2	45	4	25.3	80.2	65.1
2	1:2	60	4	27.8	79.5	66.2
3	1:4	45	4	23.7	81.3	63.4
4	1:4	60	4	25.7	78.9	62.9

2.3 硫酸酯化香菇多糖的理化性质

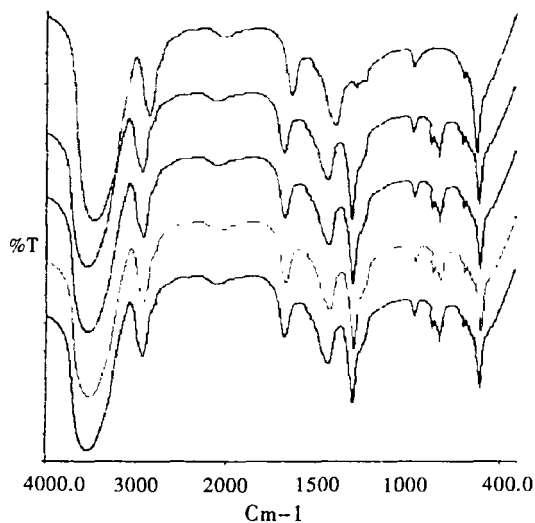
比较了香菇多糖与硫酸酯化香菇多糖的部分理化性质,结果见表2。由表2可见,多糖B-1及硫酸酯化香菇多糖对硫酸-吡啶反应、茚三酮反应、碘-碘化钾反应、三氯化铁反应均呈阴性,说明多糖B-1不含糖醛酸、蛋白类物质、淀粉类物质及多酚类物质;对苯酚-硫酸反应、莫希利反应均呈阳性,说明2种多糖组分均有糖类的典型反应,而对于DNS反应多糖B-1的颜色很浅,含有少量还原糖,而硫酸酯化香菇多糖的颜色较深,还原糖的含量略有升高,可能在酯化反应时多糖有降解造成还原糖含量升高。而与香菇多糖相比,酯化多糖的颜色也由淡褐色变成白色。

表2 香菇多糖和硫酸酯化香菇多糖部分性质

	香菇多糖	硫酸酯化香菇多糖
物理性状	淡褐色疏松状粉末	白色疏松状粉末
水溶性	易溶于水	易溶于水
莫利希反应	+	+
苯酚-硫酸反应	+	+
DNS反应	+	+
碘-碘化钾反应	-	-
茚三酮反应	-	-
三氯化铁反应	-	-
硫酸-吡啶反应	-	-

2.4 硫酸酯化香菇多糖的红外光谱分析

将未酯化香菇多糖与4种酯化香菇多糖采用KBr压片,在4000cm<sup>-1</sup>~400cm<sup>-1</sup>扫描,结果见图2。



注: 从上至下谱图分别代表 B-1、1、2、3、4

图2 硫酸酯化香菇多糖的红外光谱

从图2可以看出香菇多糖的红外光谱和硫酸酯化香菇多糖的红外光谱有所不同, 硫酸酯化香菇多糖除了有多糖特征吸收峰外, 还增加了  $1\,230\text{ cm}^{-1}$  左右的吸收, 表明为  $\text{OSO}_3^-$  的  $\text{S}=\text{O}$  伸缩振动,  $810\text{ cm}^{-1}$  左右的吸收表明为  $\text{C}-\text{O}-\text{S}$  的拉伸振动, 这些是硫酸酯键的特征吸收峰, 同时可以看出, 硫酸酯化香菇多糖在  $3\,400\text{ cm}^{-1}$  附近的羟基吸收峰有所降低, 表明部分羟基已被酯化, 以上充分说明多糖已经形成硫酸酯。

### 3 小结

该试验中制备的香菇多糖硫酸酯具有糖的典型反应, 含有还原糖, 不含糖醛酸、淀粉类及多酚类物质。与未酯化香菇多糖相比, 酯化多糖的颜色由淡褐色变成白色, 还原糖的含量也较未酯化时略有升高。香菇多糖的红外光谱和硫酸酯化香菇多糖的红外光谱显著不同, 硫酸酯化香菇多糖除了多糖特征吸收峰得以保留外, 还增

加了  $1\,230\text{ cm}^{-1}$  左右的吸收峰, 表明为  $\text{OSO}_3^-$  的  $\text{S}=\text{O}$  伸缩振动; 在  $810\text{ cm}^{-1}$  左右有吸收峰, 表明为  $\text{C}-\text{O}-\text{S}$  的拉伸振动, 这些是硫酸酯键的特征吸收峰; 同时, 硫酸酯化香菇多糖在  $3\,400\text{ cm}^{-1}$  附近的羟基吸收峰有所降低, 部分羟基已被酯化, 多糖已经形成硫酸酯。

### 参考文献:

- [1] Dixon J S, Lipkin D. Spectrophotometric Determination of Vicinal Glycols[J]. Anal. Chem. 1954, 26: 1092-1093.
- [2] Vaishnav V V, Bacon B E, O'Neill M, Chermiak R. Structural characterization of the galactoxylomanan of *Cryptococcus neoformans* Cap 67[J]. Carbohydr. Res. 1998; 306.
- [3] 王顺春, 方积年. 香菇多糖硫酸酯化衍生物的制备及其结构分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(5): 594-597.
- [4] 于村, 丁钢强, 俞莎, 等. 香菇多糖测定的方法学研究[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(3): 245-246.
- [5] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003, 3: 80.
- [6] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999, 91-92, 290-292.
- [7] Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates[J]. Carbohydr. Res. 1984, 131: 209-217.
- [8] Reese E T, Mandel M. Methods in carbohydrate chemistry[M]. Whistler R L, ed. New York: Academic Press, 1993: 139.
- [9] 刘翠平. 石见穿多糖的分离纯化、结构分析、生物活性以及碳水化合物方法学的研究[D]. 中国科学院上海药物研究所博士学位研究生学位论文, 2001.
- [10] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol. Chem. 1951, 193: 265-275.
- [11] 王展. 菟丝子多糖的分离纯化、结构分析和生物活性研究及一些多糖方法学的研究[D]. 中国科学院上海药物研究所博士学位研究生学位论文, 2000.
- [12] Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis[J]. Carbohydr. Res., 1983, 113: 291-299.
- [13] Senchenkova S. N, Knirel Y. A., Likhoshershtov L. M., et al. Structure of simusan, a new acidic exopolysaccharide from *Arthrobacter* sp[J]. Carbohydr. Res. 1995, 266(1): 103-110.

## Studies on the Purification of Lentinan and the Preparation of Its Sulfated Polysaccharides

YAN Hang<sup>1</sup>, ZHONG Yao guang<sup>2,3</sup>, WANG Shu qin<sup>3</sup>, LIU Chang jiang<sup>3</sup>

(1. College of Biology and Food Technology, Dalian Institute of Light Industry, 116034; 2. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, 200090; 3. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, 110161)

**Abstract:** Free proteins and pigment were removed by Sevage method and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Six lentinan fractions were got by DEAE Cellulose column. Lentinan B was further purified on Sephadex G 200 column, two subfractions of lentinan (B1, B2) were obtained. Sephadex G 200 column chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis illustrated that the fraction B1 was homogenous polysaccharide. A series of sulfated derivatives of lentinan were prepared by the chlorosulfonic acid pyridine method, and the products were determined by IR spectra. Result indicated that sulfated lentinan had the typical characters of sulfation.

**Key words:** Lentinan; Sulfation; IR spectra.