

硫酸酯化香菇多糖的制备及光谱分析

燕 航¹, 钟耀广^{2,3}, 王淑琴³, 刘长江³

(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, H₂O₂ 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⁺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^[1,2]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^[3]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

第一作者简介: 燕航, 女, 1980 年生, 硕士, 研究方向为功能性食品研究与开发 E-mail: yanhang_@126.com.

通讯作者: 钟耀广, E-mail: zhongy aoguang @126.com.

收稿日期: 2006-10-10

参考文献:

- [1] Conver 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. Caribbean 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_2O_2 至淡黄色或无色,在 $50^\circ C$ 下保温 2 h,然后浓缩,装入透析袋中用双蒸水透析,每 8 h 换一次水,透析 3~5 d 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 0.05 mol/L NaCl 溶液洗脱,苯酚-硫酸法^[4] 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^[5] 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 400 V,至溴酚蓝染液迁移距硅胶框下缘 1 cm 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-吡啶法^[6] 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 0.5 g 多糖粉末,在 $45^\circ C$ 、 $60^\circ C$ 搅拌反应 4 h,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^[7]、苯酚-硫酸反应、DNS 反应^[8]、碘-碘化钾反应^[9]、茛三酮反应^[10]、三氯化铁反应^[11] 和硫酸-吡啶反应^[12]。

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 2 mg 多糖粉末与 200 mg KBr 压片,在红外 $4000\text{ cm}^{-1} \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 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。

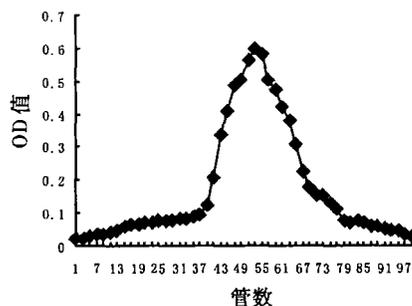


图1 多糖 B-1 的 Sephadex G-200 柱层析

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 $45^\circ C$ 、 $60^\circ C$,反应时间为 4 h 制备香菇多糖硫酸酯,用 BaCl₂-明胶比浊法^[13] 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($^\circ C$)	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

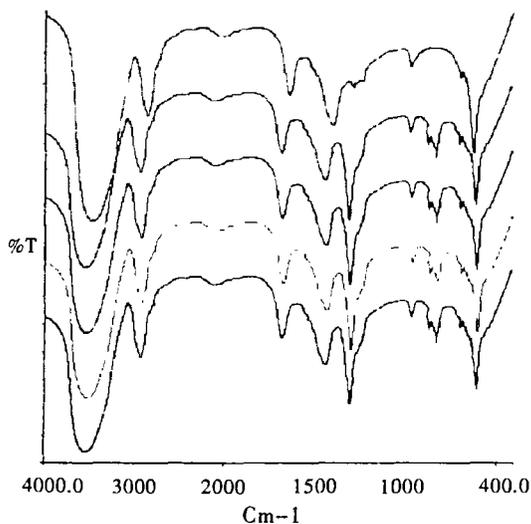
比较了香菇多糖与硫酸酯化香菇多糖的部分理化性质,结果见表 2。由表 2 可见,多糖 B-1 及硫酸酯化香菇多糖对硫酸-吡啶反应、茛三酮反应、碘-碘化钾反应、三氯化铁反应均呈阴性,说明多糖 B-1 不含糖醛酸、蛋白类物质、淀粉类物质及多酚类物质;对苯酚-硫酸反应、莫利希反应均呈阳性,说明 2 种多糖组分均有糖类的典型反应,而对于 DNS 反应多糖 B-1 的颜色很浅,含有少量还原糖,而硫酸酯化香菇多糖的颜色较深,还原糖的含量略有升高,可能在进行酯化反应时多糖有降解造成还原糖含量升高。而与香菇多糖相比,酯化多糖的颜色也由淡褐色变成白色。

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	-	-
茛三酮反应	-	-
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 $4000\text{ cm}^{-1} \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 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 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 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, Chemiak 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 alkyl acetates for monosaccharide analysis[J]. Carbohydr. Res., 1983, 113: 291-299.
- [13] Senchenkova S. N, Knirel Y. A., Likhoshervostov 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 Hang¹, ZHONG Yao guang^{2,3}, WANG Shu qin³, LIU Chang jiang³

(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 H_2O_2 . Six lentinan fractions were got by DEAE Cellulose column. Letinan B was further purified on Sephadex G 200 column, two subfractions of letinan (B 1, B 2) were obtained. Sephadex G 200 column chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis illustrated that the fraction B 1 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.