

香菇多糖的分离纯化方法研究进展

李 珺¹, 钟耀广^{1,2}, 刘长江²

(1. 上海水产大学 食品学院 上海 200090 2. 沈阳农业大学 食品学院 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 香菇多糖因具有很高的生物学功能已得到广泛的研究。现对香菇多糖的分离和纯化方法进行综述,以期对今后香菇多糖的应用有所借鉴。

关键词: 香菇多糖; 分离; 纯化

中图分类号: S 646.1⁺2; Q 539 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0084-02

香菇(*Lentinus edodes*)是侧耳科的担子菌,含有多钟有效药用组分。近年来的研究发现,香菇中的多糖对癌症患者有治疗作用。香菇多糖为白色粉末状固体,对光和热稳定,在水中最大的溶解度为 3 mg/mL,溶于甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂。香菇多糖具吸湿性,室温放置 15 d,吸水量可达 40%。相对分子量为 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$,这是采用凝胶过滤法(HPLC)和激光拉曼散射法测得的数据^[1]。

多糖的分离纯化是指多糖研究中获取研究对象的过程。一般这一过程包括分离、纯化和纯度鉴定。其中分离纯化是多糖研究的关键,其成功与否、效果的好坏都会直接影响后续研究的可行性与可信度。所谓分离就是将存在于生物体中的多糖分离出来。而多糖的纯化就是指将粗多糖中的杂质去除而获得的单一的多糖组分。在获得单一多糖组分后,必须对其纯度进行鉴定。需要说明的是,多糖的纯度不能用通常化合物的纯度标准来衡量,目前常用于多糖纯度鉴定的方法有凝胶过滤法、高压电泳法、超离心法、旋光测定法、毛细管电泳法等。其中应用最多的是凝胶层析法,该法的准确度高^[2]。

由于香菇多糖具有的特殊生物活性作用,因此,建立高效、经济的香菇多糖提取方法具有重要的现实意义。

1 香菇多糖的分离

常用的是“水溶醇沉法”,即将香菇子实体或菌丝体破碎,放于 100℃的热水中,4 h 后进行过滤,滤渣再反复提取 2~3 次。取滤液加入 3 倍体积的 95%乙醇处理 4 h,经离心、过滤、去除沉淀物,将滤液浓缩、烘干,即成为粗多糖。

有人采用复合酶与热水浸提相结合的方法提取香菇多糖,复合酶由果胶酶、纤维素酶及中性蛋白酶组成,此法条件温和、杂质易除、得率高。谢红旗等人采用中性蛋白酶辅助水提取香菇多糖,在降低杂质蛋白质含量

的同时能有效提高多糖提取率^[3]。陈哲超等采用复合酶解法提取香菇多糖蛋白,采用复合酶解和热水浸提法分离纯化香菇中多糖蛋白。与单纯热水浸提法相比,香菇多糖含量提高了 4 倍,且酶解后大大改善了糖类的分布,具有抗肿瘤、抗病毒活性的较高相对分子质量的葡聚糖含量也明显提高^[4]。

此外,超滤法提取香菇多糖也取得较好效果。念保义等利用超滤分离技术,得糖率高,工艺流程简单,工序少,提取时间短,料液比和提取液的粘度降低,降低了成本。该法与传统工艺相比,提取率提高了 40%以上,多糖中杂蛋白的含量降低了 50%,在提高产率的同时增加了多糖的纯度^[5]。李志洲等采用膜分离技术,利用其分离、浓缩作用,大大提高了产品得率,操作简单,能耗少,工序简捷,提取率高,产品多糖含量高^[6]。

卢成英等人采用超声波辅助热水浸提粗多糖,得率较高,但受水溶色素等杂质影响而致纯化中脱色困难,并使多糖的纯度不高;热水浸提所得粗多糖得率、多糖含量均较高,经纯化处理多糖损失较多,纯化处理后多糖含量最高达 93.12%,但纯化后多糖得率较低^[7]。

综上所述,传统的热水浸提法虽然是提取多糖的常用方法,操作简单,但时间长、效率低、能耗大,而利用复合酶解法、微波辅助法、超声波辅助法等可以提高提取率、减少能源消耗、缩短提取时间,但对香菇多糖的结构及生物活性是否有破坏,仍有待进一步的探讨。因此,探索更为高效、经济、可靠的提取方法对香菇多糖的研究开发具有现实意义。

2 香菇多糖的纯化

多糖的纯化有以下方法:①分级沉淀法:用不同浓度的沉淀剂如甲醇、乙醇、丙酮等来分部沉淀纯化多糖;②季铵盐沉淀法:常用的季铵盐是十六烷基三甲基胺溴化物(CTAB)及其碱(CTA-OH)和十六烷基吡啶;③盐析法:常用的盐析剂有硫酸铵、氯化钠、氯化钾、醋酸钾等;④金属络合物法:常用的络合剂有费林溶液、氯化铜、氢氧化钡和醋酸铅等;⑤层析法:有纤维素柱层析、

第一作者简介:李珺(1984),女,硕士,现从事功能性食品研究工作。

通讯作者:钟耀广。E-mail: zhongyao Guang@126.com。

收稿日期:2008-07-21

纤维素阴离子交换树脂柱层析(如 DEAE-纤维素)、凝胶柱层析(Sephadex G-250、Sephacrose、DEAE - Sephadex)、高压液相柱层析;⑥超滤法;⑦制备性区域电泳法等^[8]。

柱层析在多糖的纯化较为常用,常分为两类:一是只有分子筛作用的凝胶柱层析,它根据多糖分子的大小和形状不同而达到分离目的,常用的凝胶有葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶以及性能更佳的 Sephacryl 等。洗脱剂为各种浓度的盐溶液及缓冲液,其离子强度不应低于 0.02 mol/L。二是离子交换层析,它不仅根据分子量的不同,同时也具有分子筛的作用,常用的交换剂有 DEAE-纤维素、DEAE-葡聚糖和 DEAE-琼脂糖等,此法适合于分离各种酸性多糖、中性多糖和粘多糖。多糖的纯化还可采用其他方法,如高效液相层析、亲和层析等,这些方法适用于制备少量纯品,供分析用^[9]。

范云鹏等采用超滤-渗滤法改善产品纯度,并引入冷冻干燥技术,改进香菇多糖的提取纯化工艺,提高产品收率。超滤-渗滤是有效的纯化香菇多糖的方法,其最佳超滤操作条件为 30℃、0.13 MPa,经超滤后的透过液,不必增加除蛋白与醇析这两道工序,使工艺流程变短^[10]。

3 香菇多糖的纯度鉴定

对纯化后的香菇多糖进行纯度鉴定可以采用:①凝胶柱层析法:根据多糖分子量范围,选择所用凝胶型,通过检测洗脱液是否存在单一对称峰来判断;②聚丙烯酰胺电泳法:多糖纯度鉴定较为直观,纯多糖为单一带,则为纯多糖;③高效液相色谱法;④超离心法;⑤比旋度法;⑥醋酸纤维薄膜电泳^[8]。

缪建等人用比旋度法和 Sepharose 4B 柱层析进行纯度鉴定,将分离得到的 2 种多糖分别用水溶解,加乙醇至醇体积分数为 40%析出沉淀,继续加乙醇至醇体积分数为 70%时析出沉淀,将 2 次沉淀干燥后测定其相同条件下水溶液的比旋度,如比旋度相同,证明该多糖为均一组分。结果显示:多糖组分 Len1-A、Len2-A 溶于水后分别在乙醇体积分数为 30%、60%的溶液中沉淀,将两次沉淀干燥后测定其相同条件下水溶液的比旋度分别为+5.6°、+11.2°,证明该多糖为均一组分。Len1-A、Len2-A 的 Sepharose 4B 柱层析洗脱峰为单峰,且峰形较为狭窄对称,证明 Len1-A、Len2-A 的相对分子质量分布较为均一^[11]。

杨娟等人用聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Sepharose CL-6B 凝胶柱层析进行纯度鉴定,结果表明阿利新蓝和考马斯亮蓝 R 250 染色方法均只出现一条电泳带,而且多糖区带与蛋白质区带出现位置一致,而单纯的牛血清蛋白不能被阿利新蓝染色,表明香菇多糖组分 Le-II 既含有多糖又含有蛋白质,二者以结合态存在。Sephacrose CL-6B 凝胶柱层析,香菇多糖组分 Le-II 出现单一对称峰,洗脱液在 490 nm 处(先经硫酸-苯酚显色)的吸光值变化趋势与 280 nm 处的一致,表明 Le-II 含有结合蛋白。以上两种纯度鉴定结果表明,香菇多糖组分 Le-II 为多糖-蛋白复合的分子量分布均一组分^[12]。

4 结束语

香菇多糖是功能性多糖一种新来源,随着对香菇多糖认识的不断加深,寻找一种有效的提取方法是迫切需要解决的问题。目前提取香菇多糖的方法很多,每种都有其优缺点。要根据提取物的性质、提取成本、工艺设备等选择适合的提取方法,提高多糖类的提取率,减少原材料的消耗。

参考文献

[1] 方积年,王顺春.香菇多糖的研究进展[J].中国药学杂志,1997,32(6):332-334.
[2] 赵国华,陈宗道,李志孝,等.活性多糖的研究进展[J].食品与发酵工业,2001,27(7):45-48.
[3] 谢红旗,周春山,杜邵龙,等.酶法提取超滤分离香菇多糖新工艺研究[J].食品科学,2007,28(4):217-219.
[4] 陈哲超,林宇野,谢必峰,等.复合酶解法提取香菇多糖蛋白的研究[J].生物工程进展,1995,15(1):47-50.
[5] 念保义,陈铭,王铮敏.超滤膜分离香菇多糖的研究[J].化学工业与工程技术,2003,24(4):27-28.
[6] 李志洲.香菇多糖的膜分离技术[J].汉中师范学院学报,2001,19(2):67-70.
[7] 卢成荣,李国章,黄早成,等.香菇多糖提取纯化研究[J].中国林副特产,2006,83(4):5-7.
[8] 盛家荣,曾令辉.多糖的提取、分离与结构分析[J].广西师范学院学报,1999,16(4):49-54.
[9] 田庚元.植物多糖的研究进展[J].中国中药杂志,1995,20(7):441.
[10] 范云鹏,李十中,刘冬梅,等.超滤法分离与纯化香菇多糖[J].中草药,2004,35(12):1357-1358.
[11] 缪建,杨文董,周彬,等.香菇多糖提取分离的研究[J].生物加工过程,2007,5(3):74-77.
[12] 杨娟,吴谋成,张声华.香菇子实体多糖 Le-II 的提取、分离及纯度鉴定[J].食品工业科技,1999(3):16-17.

Advances on Methods for Extraction and Purification of Lentinan

LI Jun¹, ZHONG Yao-guang^{1,2}, LIU Chang-jiang²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: Lentinan is widely studied for their biological function. This paper summarized the development of studies on the lentinan, including methods of extraction and purification. It is hoped that the paper will good for the application of the lentinan in the future.

Key words: Lentinan; Extraction; Purification