

## 酵母蛋白多糖的分离纯化及鉴定

王义华<sup>1,2</sup> 徐梅珍<sup>2</sup> 江 萍<sup>3</sup> 何照范<sup>3</sup> 熊绿芸<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 清华大学生物科学与技术系 北京 100084) (<sup>2</sup> 江西农业大学食品科学系 南昌 330045) (<sup>3</sup> 贵州大学生物技术学院 贵阳 550025)

**摘 要** :以热带假丝酵母和八孢裂殖酵母为材料,通过化学抽提法得到多糖粗取物,经 DEAE-纤维素阴离子交换柱分离纯化得到组分 Ma 和 Mb,经 Sephadex G-200 柱层析鉴定,它们为均一成分,分子量分别为 438kD 和 667kD;蛋白分析表明 Ma 和 Mb 为蛋白多糖,经薄层层析和高压液相分析, Ma 主要含甘露糖, Mb 则由甘露糖和半乳糖组成,其摩尔比为 1.3:1;氨基酸组成分析表明 Ma 和 Mb 含有 4 种极性氨基酸和 12 种非极性氨基酸;经邻苯三酚自氧化法检测 Ma 与 Mb 均能抑制邻苯三酚自氧化,具有体外抗氧化能力。动物实验表明 Ma 和 Mb 具有抑制小白鼠肝癌 H<sub>22</sub> 实体瘤的作用。

**关键词** 酵母 蛋白多糖, DEAE-纤维素, Sephadex G-200

**中图分类号** Q936 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)04-0515-04

酵母多糖是酵母细胞壁的重要组成部分<sup>[1]</sup>,这些大分子中含有 100~300 甘露糖分子,酵母多糖占酵母细胞壁干重的 40%<sup>[2,3]</sup>。近年来,多糖及多糖复合物在生物体的功能越来越受到生物学家们的重视,成为生物学研究热点之一<sup>[4,5]</sup>。现已发现某些酵母多糖主要成分为大分子的甘露聚糖<sup>[6,7]</sup>,并具有免疫和抗肿瘤的作用<sup>[8,9]</sup>。周义发等<sup>[10]</sup>研究表明啤酒酵母多糖主要由  $\alpha$ -D-甘露糖组成,分子量为 220kD,但未见多糖的功能报道。江 萍等<sup>[11]</sup>在其研究工作中发现从啤酒酵母、热带假丝酵母和八孢裂殖酵母提取的多糖具有相应的免疫学效应,但他们未对多糖成分作进一步分离纯化。为此本研究以热带假丝酵母和八孢裂殖酵母为材料,分别提取多糖并初步分析多糖的化学组成和理化性质,从而为进一步研究酵母多糖的功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株** 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)和八孢裂殖酵母(*Schizosaccharomyces octosporus*)菌株购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

**1.1.2 试剂** :DEAE-纤维素为 Whatman 产品;Sephadex-葡聚糖凝胶为 Pharmacia 公司产品;蓝色葡聚糖(分子量为 2000kD)购自 Sigma 公司;葡聚糖标准品为 Dextran 系列,平均分子量分别为 10kD、40kD、

70kD、110kD、500kD;单糖标准样品为生化试剂;其它化学试剂均为分析纯。

**1.1.3 主要仪器** :日本岛津 UV-260 型紫外可见分光光度计;美国 Beckman 公司高压液相色谱仪;美国 FREEZOFF-6L 型真空冷冻干燥;日本岛津 CS-930 型薄层扫描仪;层析柱为 1.5cm $\times$ 28.5cm 砂芯玻璃柱。

### 1.2 多糖含量的测定方法

苯酚硫酸法,参照文献<sup>[12]</sup>进行。

### 1.3 酵母蛋白多糖的 DEAE-纤维素柱层析分离

提取粗多糖<sup>[13]</sup>,经 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>型 DEAE-纤维素色谱柱初步分离后,再用 B<sub>4</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>型 DEAE-纤维素色谱柱作进一步纯化,具体步骤如下:(1)用 0.1 mol/L pH 9.16 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液平衡 DEAE-纤维素色谱柱(柱高 20cm),加入多糖粗提物溶液 2mL,蒸馏水为洗脱液进行洗脱,控制流速为 0.6mL/min,洗脱液以每管 5 mL 进行收集,苯酚硫酸法测定各管多糖的含量,检测多糖洗脱峰。(2)再用 0.2mol/L pH8.80 的 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 缓冲液平衡 DEAE-纤维素色谱柱(柱高 20cm),加入上述初步分级的多糖溶液 2mL,以蒸馏水作为洗脱液进行洗脱,控制流速为 0.4mL/min,洗脱液以每管 5mL 进行收集,苯酚硫酸法测定各管多糖的含量,检测多糖洗脱峰。

### 1.4 蛋白多糖的纯度鉴定及其分子量测定

Sephadex G-200 凝胶预处理后,装柱至 22.5cm,加多糖溶液 0.6mL(含多糖 10mg),以 0.9% NaCl 作

基金项目 江西省自然科学基金资助(0330061)

作者简介 王义华(1969-),男,江西九江人,清华大学生物科学与技术系在站博士后,江西农业大学副教授,主要从事糖生物化学及相关的分子生物学研究。E-mail:wyh6909@sina.com

收稿日期 2003-10-27,修回日期 2003-11-28

为洗脱液进行洗脱,控制流速为 0.5mL/min,以每管 3mL 收集流出液,以苯酚硫酸法测定各管多糖的含量,以检测多糖洗脱峰。同时以蓝色葡聚糖检测色谱柱的空体积  $V_0$ ,再检测 5 种标准葡聚糖洗脱体积  $V_e$ ,以  $V_e/V_0$  为纵坐标、各标准多糖分子量的对数为横坐标,得到多糖的分子量标准曲线,根据样品的洗脱体积得出多糖的分子量。

### 1.5 蛋白多糖单糖成分的分析

3mg 蛋白多糖样品加入 5mmol/L 硫酸 2.5mL,于 100℃ 水解 5h,用  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  中和硫酸。水解液分别进行薄层层析和高压液相色谱分析单糖组成。薄层层析和高压液相色谱分析分别参照文献 [14, 15]。

### 1.6 蛋白含量的测定

参照文献 [16] 方法进行。

### 1.7 氨基酸成分的分析<sup>[15]</sup>

准确称取样品 5mg,加入 6mol/L HCl 500 $\mu\text{L}$  (含有 1% 草酸和 0.05% 巯基乙醇),封管,于 100℃ 水解 24h,过滤,收集滤液。用 Backman 6300 型氨基酸自动分析仪分析滤液中各氨基酸浓度。

### 1.8 多糖体外抗氧化能力的鉴定

采用邻苯三酚自氧化法<sup>[17]</sup>进行。

### 1.9 Ma 和 Mb 抗肿瘤活性的鉴定

实验用昆明小白鼠雌雄各半,用皮下转移方法转接小白鼠肝癌  $\text{H}_{22}$  瘤株,24h 后开始腹腔注射 Ma 与 Mb,连续注射 10d,剂量为 25mg/(kg·d)。对照组注射等量生理盐水,第 11 天检测小鼠实体瘤重。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组瘤重} - \text{试验组瘤重}}{\text{对照组瘤重}} \times 100\%$$

## 2 结果和分析

### 2.1 酵母蛋白多糖的分离纯化

**2.1.1 热带假丝酵母蛋白多糖的分离提纯** :化学法提取热带假丝酵母粗多糖,粗多糖经  $\text{HCO}_3^-$  型 DEAE-纤维素色谱柱层析在 30mL 处出现最大洗脱峰(图 1-A);将其真空冰冻浓缩至 15mg/mL,再进一步

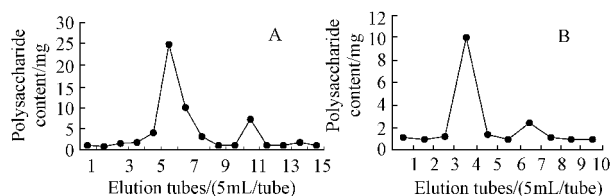


图 1 Ma 的  $\text{HCO}_3^-$  型 (A) 和  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  型 (B) DEAE-纤维素柱层析图

Fig.1 Chromatography of Ma on  $\text{HCO}_3^-$  (A) and  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  -type (B) DEAE-cellulose columns

步用  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  型 DEAE-纤维素色谱柱进行纯化,发现在 20mL 处出现大的洗脱峰(图 1-B),收集该洗脱峰,样品命名 Ma, 4℃ 保存备用。

**2.1.2 八孢裂殖酵母蛋白多糖的分离提纯** :提取八孢裂殖酵母粗多糖,粗多糖经  $\text{HCO}_3^-$  型 DEAE-纤维素色谱柱层析在 25mL 处出现最大洗脱峰(图 2-A);将其真空冰冻浓缩至 15mg/mL,再进一步用  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  型 DEAE-纤维素色谱柱进行纯化,发现在 20 mL 处出现大的洗脱峰(图 2-B),收集该洗脱峰,样品命名为 Mb, 4℃ 保存备用。

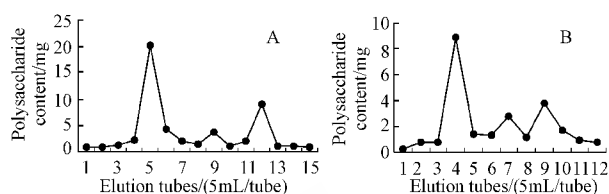


图 2 Mb 的  $\text{HCO}_3^-$  (A) 和  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  型 (B) DEAE-纤维素柱层析图

Fig.2 Chromatography of Mb on  $\text{HCO}_3^-$  (A) and  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  -type (B) DEAE-cellulose columns

### 2.2 Ma 和 Mb 的 Sephadex-G200 凝胶色谱鉴定

采用 Sephadex G-200 凝胶柱色谱鉴定 Ma 与 Mb 纯度。结果表明, Ma 和 Mb 分别在色谱柱的 27mL (图 3-A) 和 21mL (图 3-B) 处有一个洗脱峰,因此 Ma 与 Mb 为均一成分。

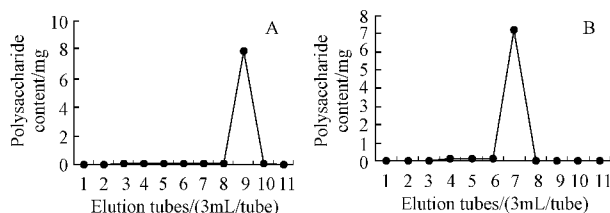


图 3 Ma 和 Mb 的 Sephadex G-200 凝胶色谱柱层析图

Fig.3 Chromatography of Ma (A) and Mb (B) on Sephadex G-200 columns

测定色谱柱的空体积  $V_0$  及各标准葡聚糖洗脱体积  $V_e$ ,并绘制多糖的分子量标准曲线(图 4)。根据 Ma 与 Mb 的洗脱体积推算得出它们的分子量分

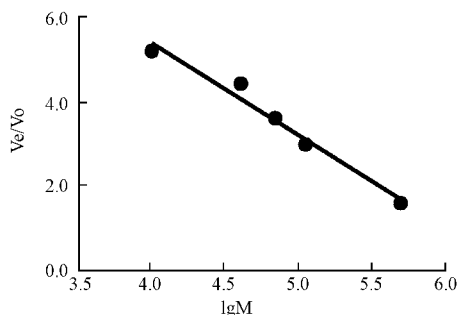


图 4 标准多糖的分子量曲线图

Fig.4 Curve of molecular weights of standard polysaccharides

别为 438 kD 和 667 kD。

2.3 Ma 和 Mb 的化学组成分析

紫外光谱分析的结果表明 Ma 与 Mb 在 200nm 及 280nm 处有吸收峰,苯酚硫酸法检测含有糖类物质,Bradford 法检测含有蛋白成分,因此 Ma 与 Mb 为蛋白多糖。

薄层层析法检测 Ma 中只含有甘露糖,Mb 中含有甘露糖和半乳糖。经高压液相色谱法的进一步分

析发现,Ma 含有甘露糖,含量为 76.4%;Mb 含有甘露糖和半乳糖,含量分别为 41.2% 和 35.9%,它们之间的摩尔比约为 1.3:1。

Ma 与 Mb 的蛋白含量测定结果表明,Ma 与 Mb 的蛋白含量分别为 22.7% 和 20.3%。氨基酸自动分析仪测定结果表明 Ma 与 Mb 均含 16 种氨基酸,其中包括 4 种极性氨基酸和 12 种非极性氨基酸,总含量分别为 20.4% 和 20.3%(表 1)。

表 1 Ma 和 Mb 的氨基酸组成/%

Table 1 Analysis of amino acids of Ma and Mb/%

Samples	S	E	Y	D	T	V	I	L	F	A	P	K	R	H	G	M	Total
Ma	1.19	2.21	0.73	1.34	2.24	1.37	1.27	1.02	0.53	1.08	1.06	2.35	0.98	1.24	1.18	0.61	20.4
Mb	1.22	1.71	1.33	1.24	1.43	1.04	1.23	1.42	1.93	0.88	0.89	1.92	1.08	1.32	0.79	0.87	20.3

Ma and Mb indicated polysaccharides purified from *Candida tropicalis* and *Schizosacchromyces octosporus* respectively.

2.4 Ma 和 Mb 体外抗氧化能力的鉴定

采用邻苯三酚自氧化检测 Ma 与 Mb 抗氧化能力,结果表明在测定体系中加入 Ma 与 Mb 时, $OD_{425}$  吸收值明显下降,表明 Ma 与 Mb 均能明显抑制邻苯三酚的自氧化作用,具有体外抗氧化能力,且 Ma 抗氧化能力略比 Mb 强(图 5)。

3 讨论

3.1 Ma 和 Mb 的 DEAE-柱层析的分离纯化

不同离子型的 DEAE-纤维素对多糖的分离十分关键。对于杂多糖的初步分离,采用  $HCO_3^-$  型 DEAE-纤维素色谱柱进行分离。色谱柱转型缓冲液的选择主要考虑缓冲液的 pH 值和离子浓度<sup>[18]</sup>。一方面,其 pH 值要小于离子交换剂的 pK 值(DEAE-纤维素 pK 值 9.20),同时 pH 必须尽量接近 pK 值;另一方面,离子强度能够增强 DEAE-纤维素的吸附能力,同时也增加色谱柱的有效交换量<sup>[18]</sup>。本实验根据多次预备实验的筛选,最终确定选用 0.1 mol/L pH 值 9.16 的  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  缓冲液作为 DEAE-纤维素转型试剂。

对于多糖进一步分离纯化,采用  $B_4O_7^{2-}$  型 DEAE-纤维素阴离子交换柱,主要是利用多糖在碱性条件下能与硼酸盐形成离子复合物的特性,从而分离不同分子量的多糖<sup>[12]</sup>。本实验中,选用 0.2 mol/L pH 值 8.8  $H_3BO_3$ - $Na_2B_4O_7$  缓冲液进行转型时,色谱柱具有很好的分离效果。

3.2 Ma 和 Mb 的性质分析

前文报道了啤酒酵母多糖的理化特性<sup>[13]</sup>,文中介绍了一般化学提取法提取酵母胞壁多糖。本研究表明 Ma 和 Mb 与啤酒酵母多糖具有相似的化学组成和抗氧化性质。实验证明,Ma 和 Mb 均为蛋白多糖,Ma 含有甘露糖,Mb 含有甘露糖和半乳糖。而大多数酵母多糖多为杂多糖<sup>[19,20]</sup>,这可能是不同的培养条件、不同的分离提纯方法而导致的<sup>[12,21]</sup>。Sephadex G-200 色谱柱测定 Ma 和 Mb 的分子量分别为

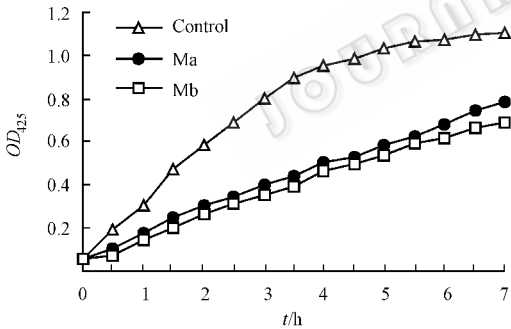


图 5 Ma 和 Mb 对邻苯三酚自氧化的抑制效应  
Fig.5 Inhibitory effects on auto-oxidation of pyrogallol by Ma and Mb

2.5 Ma 和 Mb 抗肿瘤活性的鉴定

动物实验表明 Ma 和 Mb 对小白鼠  $H_{22}$  肝癌转移性实体瘤有一定抑制作用,注射量为 25mg/(kg·d) 时,抑瘤率分别为 31.2% 和 30.3%(表 2)。

表 2 Ma 和 Mb 对小白鼠 H22 实体瘤的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects on the mice  $H_{22}$  tumor

Groups	Dosage [mg/(kg·d)]	Injection times	Animals Beginning/End	Tumor weight/g X ± SD	Inhibitory rate/%
Ma	20	10	16/16	0.298 ± 0.046	31.2
Mb	20	10	16/16	0.302 ± 0.048	30.3
Control	20	10	16/16	0.433 ± 0.068	

438 kD 和 667 kD, 这可能是糖链上连有较多的肽链、形成较大的蛋白多糖分子的缘故<sup>[22]</sup>。动物实验表明 Ma 与 Mb 具有一定的抑制小白鼠肝癌 H<sub>22</sub> 实体瘤的作用。Domer 也曾报道甘露聚糖具有抑制肿瘤功能, 并具有抗原决定簇及免疫调节功能<sup>[23]</sup>。国内也有报道证明真菌多糖具有抑制肿瘤的功能<sup>[24]</sup>。目前 Ma 和 Mb 结构特征、免疫学特性及生理功能正在研究之中, 本研究通过对多糖的提取纯化和一些理化特性的研究, 为以后的深入研究积累资料, 奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] Lipke P N, Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol*, 1998, **180**(15): 3735–3740.
- [2] Nakanishishindo Y, Nakayama K, Tanaka A, et al. Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1, 6-polymannose outer chain from och1, och1 mnn1, and och1 mnn1 alg3 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 26338–26345.
- [3] Ballou L, Cohen R E, Ballou C E. *Saccharomyces cerevisiae* mutants that make mannoproteins with a truncated carbohydrate outer chain. *J Biol Chem*, 1980, **255**: 5986–5991.
- [4] Whistler R L, Bushway A A, Singh P P. Nontoxic, antitumor polysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 1976, **32**: 235–275.
- [5] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**(3): 258–274.
- [6] Dean N. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochem Biophys Acta*, 1999, **1426**: 309–322.
- [7] Munro S. What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett*, 2001, **498**: 223–227.
- [8] Presta M, Leali D, Stabile H, et al. Heparin derivatives as angiogenesis inhibitors. *Curr Pharm Des*, 2003, **9**(7): 553–566.
- [9] 王方凌. 啤酒酵母与健康. 长春: 长春出版社, 1995.
- [10] 周义发, 张翼伸, 梁忠岩, 等. 酵母甘露聚糖的结构确定与核磁共振谱的解析. *生物化学杂志*, 1991, **7**: 74–78.
- [11] 江 萍, 王义华, 周碧君, 等. 三种酵母胞壁多糖的化学组成及血清学试验. *食品科学*, 1999, **9**: 48–51.
- [12] 张惟杰编著. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [13] 王义华, 徐梅珍, 江 萍, 等. 啤酒酵母多糖的分离纯化、化学组成及抗氧化性质鉴定. *微生物通报*, 2003, **30**(4): 51–54.
- [14] 陆冰真, 翟永信. 薄层层析法在食品分析中的应用. 北京: 北京大学出版社, 1991, 6–80.
- [15] 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [16] Bradford M H. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [17] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法-邻苯三酚自氧化法的改进. *生物化学与生物物理进展*, 1986, **4**: 71–73.
- [18] 苏拔贤. 生物化学制备技术. 北京: 科学出版社, 1994.
- [19] Osumi M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, 1998, **29**: 207–233.
- [20] 杨 娟, 吴谋成, 张声华. 香菇子实体蛋白多糖 Le III 的分离、纯化及其性质研究. *华中农业大学学报*, 1999, **18**: 188–190.
- [21] 李平作, 章克昌. 灵芝胞外多糖的分离纯化及生物活性. *微生物学报*, 2000, **2**: 71–73.
- [22] Aguado C, Ruí-Herrera J, Iranzo M, et al. Reaggregation and binding of cell wall proteins from *Candida albicans* to structural polysaccharides. *Res Microbiol*, 1998, **149**: 327–338.
- [23] Domer J E. *Candida* cell wall mannan: a polysaccharide with diverse immunologic properties. *Crit Rev Microbiol*, 1989, **17**(1): 33–51.
- [24] 张之中, 郭锡勇, 李向东, 等. 锌酵母中酵母多糖的分离纯化与分析等. *微量元素与健康研究*, 1995, **12**: 48–49.

## Purification and Analysis of Yeast Polysaccharides

WANG Yi-Hua<sup>1,2\*</sup> XU Mei-Zhen<sup>2</sup> JIANG Ping<sup>3</sup> HE Zhao-Fan<sup>3</sup> XIONG Lu-Yun<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(<sup>2</sup> Department of Food Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

(<sup>3</sup> College of Biotechnology, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** Two soluble fractions of Ma and Mb were purified from *Candida tropicalis* and *Schizosaccharomyces octosporus* by ion-exchanging chromatography on DEAE-cellulose columns, and were proved to be homogenous with approximate molecular weights of 438kD and 667kD respectively by chromatography on Sephadex G-200 column. Protein determination and amino acid analysis showed that Ma and Mb consisted of saccharide and peptide with 4 varieties of polar and 12 of apolar amino acids; And detections by HPLC and TLC indicated that Ma was mainly composed of mannase and Mb was mainly composed of mannase and galactose in a molar ratio of 1.3:1; Ma and Mb showed anti-oxidative properties by the pyrogallol auto-oxidation analysis and had inhibitory effects on the mice H22 tumor.

**Key words:** Yeast, Polysaccharide, DEAE-cellulose, Sephadex G-200

Foundation item: Jiangxi Natural Science Foundation for Young Researchers (0330061)

\* Corresponding author. E-mail: wyh6909@sina.com

Received date: 10-27-2003