

# 香菇菌丝体多糖 LeBD1-1 的分离纯化和分析

杨晓彤 糜可 杨庆尧 朱小颖\* 孙红珠

(上海师范大学菌物研究室 上海 200234)

**摘要** 香菇(*Lentinula edodes*)465 菌株用添加啤酒发酵醪泥的培养基发酵培养 10d 后, 菌丝体经洗涤、热水浸提、乙醇沉淀, 再经 DEAE-纤维素柱( $\text{Cl}^-$ 型)分离和 Sephadex G-100 柱层析纯化, 得到白色絮状多糖 LeBD1-1。经醋酸纤维薄膜电泳和 HPLC 检测纯度, LeBD1-1 为均一成分。HPLC 法测得分子量为 130 000Da, 红外光谱测定其糖苷键为  $\alpha$  型。经完全酸水解后用硅胶薄层层析和气相色谱法分析单糖组成, LeBD1-1 中含 D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖和 D-阿拉伯糖, 各单糖摩尔比为 2.45:1.00:0.03:0.08:0.10, 是一种以含甘露糖为主的杂多糖。

**关键词** 香菇, 多糖, 分离纯化

香菇子实体和菌丝体中存在多种抑制肿瘤、提高免疫功能、抗病毒的多糖类物质<sup>[1]</sup>, 如从香菇子实体中得到的 Lentinan<sup>[2]</sup>, 从香菇菌丝体蔗渣培养物中提取的 LEM<sup>[3]</sup>、C-1-2<sup>[4]</sup> 以及从香菇发酵菌丝体中分离的 KS-2 系列物(KS-2、KS-2-A、KS-2-B、KS-2-D)<sup>[5-8]</sup>等。

KS-2 系列物是从深层发酵菌丝体中提取的, 因此更具有大规模工业化生产的潜力。这些系列物是用 KS 系列菌株, 在添加威士忌酒厂酒糟(stillage)的培养基上培养所得的菌丝体中提取到的<sup>[5-8]</sup>。我们用啤酒厂发酵醪泥代替酒糟, 得到了与 KS-2 相似的多糖。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和方法

菌种: *Lentinula edodes* (Berk) Sing 465 菌株由上海师范大学菌物研究室提供。

啤酒厂发酵醪泥: 来自力波啤酒厂, pH6.3, 含 18.4% 固形物。

试剂: DEAE-纤维素(DE52)为 Whatman 公司产品; Sephadex G-100 和 T-系列标准分子量 Dextran (T-2000 ~ T-20) 均为 Pharmacia 公司产品。D-岩藻糖和 D-木糖为 Sigma 产品。其余为分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 发酵、提取:** 将香菇(*Lentinula edodes*)465 的斜面菌株接入发酵培养基逐级扩大到 8L, 25 °C 通气培养 10d。发酵培养基配方: 2% 蔗糖, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,

\* 上海师范大学生物系 92 级学生。

本文于 1996 年 11 月 1 日收到。

0.5% MgSO<sub>4</sub>, 10% 啤酒厂发酵醪。

发酵所得的香菇菌丝体经自来水充分洗涤, 然后加入 2 倍量蒸馏水, 95 ~ 100 °C 搅拌浸提 2h, 抽滤, 滤渣重复浸提 2 次。合并滤液, 减压浓缩后加 3 倍量乙醇低温沉淀过夜, 离心得沉淀, 用无水乙醇、丙酮、乙醚分别洗涤 3 次, 得灰白色粗多糖 LeB。

**1.2.2 分离及纯化<sup>[5]</sup>:** 将 LeB 溶于 pH6.95 的 Tris 缓冲液中, 对相同缓冲液透析 1d 后用 DEAE-纤维素 (DE52, Cl<sup>-</sup> 型, 2.5 × 49 cm) 柱分离, 相同缓冲液洗脱, 6 ml / 管收集, 用苯酚-硫酸法和 280 nm UV 吸收法逐管检测糖和蛋白质。收集主糖峰, 冷冻干燥后再经 Sephadex G-100 柱 (2.6 × 70 cm) 纯化, 0.1 mol / L NaCl-0.1 mol / L HAc 洗脱, 同法检测, 所得第一个糖峰经碳酸钠中和、透析、冷冻干燥得 LeBD1-1。

**1.2.3 纯度鉴定: 醋酸纤维素薄膜电泳:** 按文献<sup>[9]</sup>进行。HPLC 法<sup>[10]</sup>: 样品配成 2% 浓度进样。流动相为 0.02 mol / L NaAc, 流速为 0.5 ml / min, 柱为 Waters 公司的  $\mu$ -Bondgel Linear 柱。记录样品色谱曲线和保留时间 (Tr)

**1.2.4 分子量测定<sup>[10]</sup>:** 按 HPLC 测定纯度时的相同条件将 Dextran T-2000、T-110、T-80、T-40、T-20 及葡萄糖进样, 记录各自的保留时间 Tr, 以 T-2000 的 Tr 作 V<sub>0</sub>, 葡萄糖的 Tr 为 V<sub>i</sub>, 按公式  $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$  计算 K<sub>av</sub> 值, 然后与分子量对数作工作曲线, 由 LeBD1-1 的 K<sub>av</sub> 值在工作曲线上查得其分子量。

**1.2.5 红外光谱测定:** 采用 KBr 压片法。

**1.2.6 单糖组成: 硅胶薄层层析<sup>[11]</sup>:** LeBD1-1 经 2 mol / L 三氟醋酸 (TFA) 110 °C 水解 2 h 后点样, 展开, 苯胺-邻苯二甲酸显色。气相色谱法: 上述水解物经乙酰化后进行气相色谱 (GC) 分析<sup>[9]</sup>。使用 VISTA 64 (Varian, USA) 气相色谱仪, DB-1701 柱, 柱温 200 °C。

## 2 结果

### 2.1 分离纯化与纯度检测

香菇 465 菌株经发酵培养、过滤、洗涤后, 取 1000g 湿菌丝体经热水浸提、乙醇沉淀, 得到 5.6g LeB, 得率为 0.6%。

LeB 经 DEAE-纤维素及 Sephadex G-100 柱层析分离纯化, 得白色絮状的 LeBD1-1。

经醋酸纤维薄膜电泳、阿利新蓝染色后, LeBD1-1 呈现单一天蓝色染色区带; HPLC 分析亦呈现单一对称峰 (图 1)。可见 LeBD1-1 是一均一成分。

### 2.2 理化特征

HPLC 测得 LeBD1-1 得分子量为 130 000Da (图 2)。

LeBD1-1 易溶于水, 不溶于乙醇、氯仿、丙酮等有机溶剂。IR 光谱分析在 500 ~ 4 000 cm<sup>-1</sup> 范围内具有一般多糖峰的特征吸收。另外, 在 810 cm<sup>-1</sup> 处的吸收表明有甘露糖苷的存在, 844 cm<sup>-1</sup> 处的吸收表明有  $\alpha$  连接的糖苷键 (图 3)。

### 2.3 单糖组成

LeBD1-1 完全酸水解后经硅胶层析分析含有甘露糖和葡萄糖。气相色谱分析,



图1 LeBD1-1的 HPLC 图谱  
Fig.1 HPLC chromatogram of the LeBD1-1

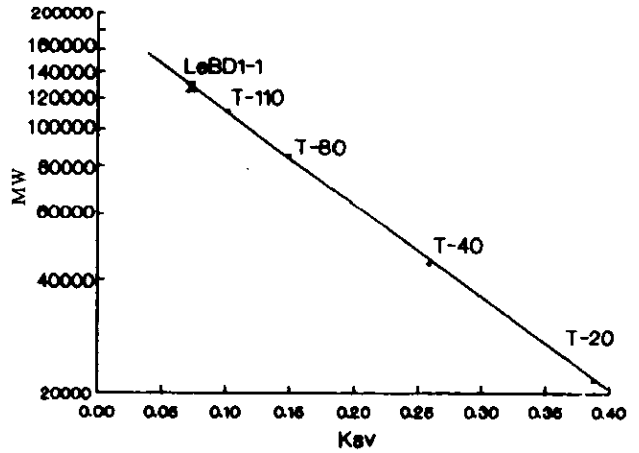


图2 LeBD1-1的分子量测定  
Fig.2 Determination of molecular weight by HPLC

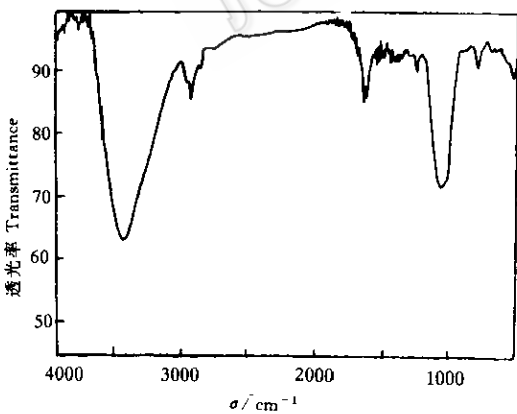


图3 LeBD1-1的红外光谱  
Fig.3 IR Spectrum of LeBD1-1

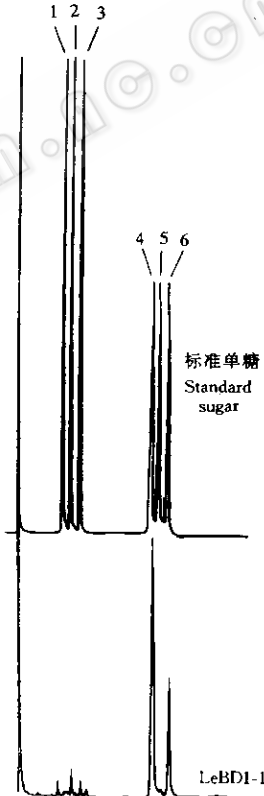


图4 标准单糖与 LeBD1-1 水解物的气相色谱图  
Fig.4 GC Chromatogram of reduced alditol acetate derivatives of standard sugars and hydrolysates of LeBD1-1  
1. 鼠李糖 Rhamnose; 2. 阿拉伯糖 Arabinose; 3. 木糖 Xylose; 4. 甘露糖 Mannose; 5. 半乳糖 Galactose; 6. 葡萄糖 Glucose.

LeBD1-1 由 D-葡萄糖、D-甘露糖、D-阿拉伯糖、D-木糖和 D-半乳糖组成(图4)。根据峰面积计算各单糖摩尔比为:甘露糖:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖=2.45:1.00:0.03:0.08:0.10, 是一种以甘露糖为主的杂多糖。

### 3 讨论

LEBD1-1 是用添加了啤酒醪泥的培养基发酵所得的香菇菌丝体多糖, 单糖组成以甘露糖为主, 糖苷键构型为 $\alpha$ 型, 和用添加威士忌酒糟的培养基发酵所得的KS-2系列物相似<sup>[5~8]</sup>。

上述香菇发酵菌丝体多糖富含甘露糖的特性似乎与培养基密切相关, 而与香菇菌株及发酵时间无关。我们曾用465菌株在不添加啤酒厂发酵醪的培养基上发酵培养3d, 结果得到2个以葡萄糖为主的多糖<sup>[9]</sup>, 即使延长发酵时间至10d或改用825菌株也得到类似结果。

已知啤酒发酵醪泥的主体为酵母菌, 酵母表面具有一层酵母甘露聚糖<sup>[10]</sup>。最近我们用面包酵母代替啤酒发酵醪并减少蔗糖含量为1%, 以迫使香菇菌丝体利用酵母提供的碳源。结果香菇菌丝生长良好, 所得多糖的甘露糖含量分别是不添加酵母所得多糖<sup>[9]</sup>的8倍和2倍。我们认为香菇在合成多糖时可能利用了培养基中酵母所提供的甘露糖。

目前已知的另几种香菇菌丝体多糖的单糖组成似乎也 and 培养基质有关。如LEM、LAP、LAP-1<sup>[3]</sup>以及C-1-2<sup>[4]</sup>都是从香菇菌丝体蔗渣培养物中提取到的多糖, 均富含木糖, 而蔗渣中含有较多的木糖成份。

这种现象似乎预示着可以利用香菇菌丝体, 通过改变培养基成分人工导向合成相应的多糖。这是一个有趣的课题, 值得进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Jong S C, Birmingham J M. *Advances in Applied Microbiology*. 1993, **39**: 153 ~ 183.
- [2] Chihara G, Hamuro J, Monura Y *et al.* 1972. Patent JP 7237002.
- [3] Sugano N, Lizuka C, Maeda H. 1984, US Patent 4461760.
- [4] Tagami T, Takeuchi I, Imaizumi F *et al.* *Chem Pharm Bull*, 1982, **30** (4): 1134 ~ 1140.
- [5] Fujii T, Maeda H, Suzuki F *et al.* *The Journal of Antibiotics*. 1978, **31** (11): 1079 ~ 1090.
- [6] Ishida N, Maeda H, Suzuki F *et al.* 1981, US patent 4247541.
- [7] Ishida N, Suzuki F, Maeda H *et al.* 1979, US patent 4163780.
- [8] Kirin Brewery Co. Ltd. 1980. Patent JP 8027101.
- [9] 杨晓彤, 张劲松, 方积年, 等. 食用菌学报, 1994, **1** (2): 25 ~ 31.
- [10] 魏远安, 方积年. 药学报, 1989, **24** (7): 532 ~ 536.
- [11] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 217 ~ 225.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE POLYSACCHARIDE LeBD1-1 FROM THE MYCELIA OF *LENTINULA EDODES*

Yang Xiaotong Mi Ke Yang Qingyao Zhu Xiaoying Sun Hongzhu

(Mushroom Research Lab of Shanghai Teachers University, Shanghai 200234)

**Abstract** After the 465 strain of *Lentinula edodes* is fermented for ten days on the medium with beer mess added to it, the mycelia are washed, extracted by hot water and precipitated by alcohol and then isolated by DEAE-cellulose column chromatography, and purification by Sephadex G-100 gel filtration. After LeBD1-1 is obtained, CAM electrophoresis and HPLC are used to determine its purity and they are proved that LeBD1-1 shows homogeneous. The HPLC method determines that its estimate molecular weights is 130 000Da. The structure of LeBD1-1 is investigated by silica TLC, GC and IR spectroscopy. The results indicate that the LeBD1-1 was composed of  $\alpha$ -linked *D*-Mannose, *D*-Glucose, *D*-Galactose, *D*-Xylose and *D*-Arabinose in the molar ratios of 2.45:1.00:0.03:0.08:0.10. It's a heteropolysaccharide with mannose as its main sugar.

**Key words** *Lentinula edodes*, Polysaccharide, Isolation