

- electrophoresis[J]. Journal of Chromatography, 1993, 646: 391-396.
- [6] Ler-Xisscn J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London: Elsevier Applied Science, 1986.
- [7] Ilen G. Sequencing of proteins and peptides. In laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, vol. 9, 2<sup>nd</sup> edn, p. 73 (Eds. R. H. Burdon and P. H. van Knippenberg). Amsterdam: Elsevier, 1989.
- [8] Biochemistry Geoffrey Znbay addision\_ Wesley Publishing Company 1984. Repyinteeel with Lorrectius.
- [9] Brantl V. H. et al. Novel opioid peptides derived from casein ( $\beta$ -casomorphins)[J]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1979, 360: 1211-1216.
- [10] Bullen J J, H J, Rogers, L Leight. Iron binding proteins in milk and resistance to *E. coli* infections in infants[J]. Br Med J, 1972, (1): 69-75.
- [11] Brantl V. Novel opioid peptide derived from human beta-casein: human beta-casomorphins[J]. Eur J Pharmacol, 1984, 106: 213-214.
- [12] Daniel H. M Vohwinkel, G. Rehner. Effect of casein and beta-casomorphins on gastrointestinal motility in rats[J]. J Nutr, 1990, (3): 41-46.
- [13] Chiba H, F Tain, M Yoshikawa. Opioid antagonist peptide derived from  $\kappa$ -casein[J]. J Dairy Res, 1989, 56: 363-366.

## 红托竹荪多糖的提取分离及组成研究

连 宾<sup>1, 2</sup>, 郁建平<sup>3</sup>

(1. 贵州工业大学化学与生物工程学院, 贵州 贵阳 550003; 2. 重庆大学西南资源开发及环境灾害控制工程教育部重点实验室, 重庆 400044; 3. 贵州大学生化营养研究所, 贵州 贵阳 550025)

**摘 要:** 本文对红托竹荪 (*Dictyophora rubrovalvata*) 多糖的提取、纯化和单糖的组成成分进行了研究。红托竹荪子实体经热水提取、乙醇沉淀得多糖(Dr)粗品, 多糖粗品经脱蛋白, 乙醇分级沉淀、Sephadex G-15 葡聚糖凝胶柱层析纯化得 Dr-1, Dr-2, Dr-3 三个级分, 应用薄层层析技术, 确定该三个级分均由半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖组成。

**关键词:** 红托竹荪; 多糖; 分离; 纯化

### Study on the Polysaccharides Extraction from Mushroom *Dictyophora rubrovalvata* by TLC

Lian Bin<sup>1, 2</sup>, Yu Jian-Ping<sup>3</sup>

(1. Chemistry and Bio-engineering College, Guizhou University of Technology, Guiyang 550003, China; 2. Key Lab for the Exploitation of Southwestern Resources & the Environmental Disaster Control Engineering Ministry of Education, Chongqing 400044, China; 3. Institute of Biochemistry and Nutrition, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** In this paper, the crude polysaccharides from the fruitbody of mushroom *Dictyophora rubrovalvata* were obtained by extracting with hot water and precipitating with alcohol. The free proteins were removed from crude polysaccharides, and then the polysaccharides were isolated and purified by Sephadex G-15 gel column chromatography. Three pure polysaccharides (Dr-1, Dr-2 and Dr-3) were obtained by precipitating with different concentration alcohol. By using the TLC method, we proved that the three fractions were all composed of galactose (Gal), glucose (Glu), mannose (Man) and xylose (Xyl).

**Key words:** *Dictyophora rubrovalvata*; polysaccharides; isolation; purification; TLC (Thin-layer-chromatography)

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630 (2004) 03-0043-03

收稿日期: 2003-08-20

基金项目: 贵州省优秀科教人才基金[黔科教办(2001)3号]

作者简介: 连宾(1964-), 男, 教授, 博士, 主要从事土壤和食品微生物方面的研究。

红托竹荪 (*Dictyophora rubrovalvata*) 是一种担子菌, 隶属真菌门 (*Fumycota*)、担子菌亚门 (*Basidiomycotina*)、腹菌纲 (*Gasteromycetes*)、鬼笔目 (*Phallales*)、鬼笔科 (*Phallaceae*)、竹荪属 (*Dictyophora*)。野生红托竹荪主要分布于中国贵州中(西)部、云南、四川和浙江等省区竹林下的腐殖土上<sup>[1-2]</sup>。红托竹荪目前已经可以大规模人工种植, 产量较为集中的贵州省织金县2000年还被中国食用菌协会授予“中国竹荪之乡”称号。红托竹荪不仅外形美丽, 营养丰富, 而且味道鲜美, 深受消费者欢迎, 是市场上商品价格较高的一类食用真菌。近年来的研究发现, 红托竹荪含有多种氨基酸、维生素、多糖和多种无机盐等<sup>[3]</sup>。除其营养价值外, 同时还具有一定的防病保健作用。多糖是红托竹荪子实体中重要组成成分之一, 多糖生理活性和功能已有许多报道<sup>[4-7]</sup>, 竹荪所具有的多种生物活性是否与其所含有多糖有关尚未见报道。作者曾对红托竹荪人工栽培过程中病虫害的防治和食品安全问题进行分析<sup>[8]</sup>, 本文主要报道红托竹荪多糖的提取分离及组成研究。作者采用热水萃取、有机溶剂沉淀和凝胶层析等方法, 从红托竹荪子实体中分离得到竹荪多糖, 并利用薄层层析方法, 确定了该多糖的单糖组成, 为进一步研究竹荪多糖的化学结构和生物活性提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 材料

实验材料选用贵州省织金县人工栽培的红托竹荪子实体(干品)为多糖提取材料。

#### 1.1.2 试剂

95%食用酒精, 各种单糖标样为上海东风生化试剂厂产品, 其余试剂均为分析纯、化学纯或生化试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 红托竹荪多糖的提取、分离和纯化

红托竹荪子实体烘干切碎后称量, 采用热水浸提法, 子实体和水之比为1:5, 浸提温度为70~80℃, 浸提时间3~5h, 共提取3次, 合并3次浸提液。真空减压浓缩, 浓缩一倍体积。在浓缩液中加入3倍体积的乙醇(95%)搅拌, 沉淀为多糖和蛋白质的混合物, 此为粗多糖。

上述粗多糖经Sevage法(氯仿:异戊醇=3:1混合摇匀)脱游离蛋白, 进行粗多糖纯化。粗多糖溶液加入Sevage试剂后, 置恒温振荡器中振荡过夜, 使蛋白质充分沉淀, 离心(3000r/min)分离, 去除蛋白质。脱游离蛋白后, 上葡聚糖凝胶柱分离纯化。选用Sephadex G-15葡聚糖凝胶, 将已充分膨胀的葡聚糖凝胶湿法装柱, 用氯化钠水溶液进行平衡。样品上柱后, 用蒸馏水洗脱, 分部收集。洗脱液经乙醇沉淀, 离心, 干燥沉淀即得较为纯化的竹荪多糖Dr-1, Dr-2, Dr-3三个组分。

红托竹荪多糖的提取流程如下:

竹荪子实体→切碎→热水浸提→提取液过滤→合并3次浸提液→浓缩→乙醇沉淀多糖→Sevage法脱游离蛋白→多糖液过柱→分部收集洗脱液→乙醇沉淀→离心分离→干燥沉淀(竹荪多糖Dr-1, Dr-2, Dr-3)

#### 1.2.3 红托竹荪多糖组成单糖组分分析

薄层板的制备、展开剂的配制、多糖样品水解、点样、展开、显色和分析等步骤按文献<sup>[9]</sup>进行。其中的多糖水解方法: 称取少许的多糖(0.1g)于小型离心管中, 加入1mmol/L的硫酸1ml, 沸水浴水解2h, 然后加氢氧化钡中和至中性, 过滤除去硫酸钡沉淀, 得多糖水解脱清液, 以此进行点样; 薄层层析法一般只展开一次, 为达到较好分离效果, 本实验选用二次展开法, 即: 在第一种展开剂中展开后, 晾干, 再放入第二种展开剂中进行层析展开。红托竹荪多糖组成单糖组分分析流程如下所示:

多糖→酸解→制板点样→二次展开→显色  
→分析多糖组成

## 2 结果与讨论

### 2.1 红托竹荪与其它食用菌粗多糖含量的比较

所谓多糖提取, 就是将存在于食用菌中的多糖分离或解离出来的过程。从成本和工艺上考虑, 目前多数食用菌多糖提取均采用热水浸提和酒精沉淀法进行。本文用水提醇沉法开展了红托竹荪、平菇、香菇、金针菇、茯苓等真菌子实体的粗多糖提取, 实验结果见表1:

表1 食用菌粗多糖含量

食用菌种类	原料来源	粗多糖含量(%)
红托竹荪样品1	市售(织金县)	8.846
红托竹荪样品2	直销(织金县)	7.152
平菇	市售(贵阳)	0.6
金针菇	市售(贵阳)	5.2
香菇	市售(贵阳)	0.6
茯苓	市售(锦屏县)	2.663

备注: 含量=粗多糖重/原料重。

由表1可见, 2个红托竹荪样品粗多糖含量均远远高于其它食用菌, 这说明进行红托竹荪多糖开发具有一定的优势。

影响多糖提取率的因素很多, 浸提温度、时间、加水量以及脱除杂质的方法等都会影响食用菌多糖的得率, 对不同种类的食用菌而言, 多糖的提取条件应该有所改变, 因此本项结果只是在本实验条件下的相对结果, 但用于初步比较不同食用菌粗多糖的含量还是可行的。此外, 在不明显影响多糖浸出率的情况下, 浸出液体积越少越好, 因为长时间的高温浓缩会影响多糖的活性, 故子实体和水之比为5:1。试验

表2 红托竹荪子实体样品多糖分级提取

	乙醇浓度 (%)	过柱液多糖 质量(g)	过柱液多糖 含量(%)	洗柱液多糖 质量(g)	洗柱液多糖 含量(%)	总含量 (%)
第一级沉淀	65	0.0830	0.05608	0.0097	0.00655	0.06263
第二级沉淀	75	0.0748	0.05054	—	—	0.05054
第三级沉淀	85	0.1742	0.11770	0.0655	0.04426	0.16196

备注: 多糖含量 = 多糖质量 / 样品质量; 总含量 = 过柱液多糖百分含量 + 洗柱液多糖百分含量。

发现,当浸提液体积一定时,分多次浸提比一次浸提的多糖浸提率高。

多糖的纯化,就是将存在于粗多糖中的杂质去除而获得单一的多糖组分。一般是先脱除非多糖组分,再对多糖组分进行分级。

本项实验采用Sevage法(氯仿:异戊醇=3:1混合摇匀)进行脱蛋白,用Sephadex G-15的葡聚糖凝胶柱进行进一步的纯化,红托竹荪样品多糖组分分级情况见表2。

## 2.2 红托竹荪多糖单糖组成成分分析结果

采用薄层层析法分析单糖组分。薄层层析显色后,根据不同单糖标样参考斑点的颜色和相对位置及 $R_f$ 值或 $R_{\text{比}}$ 值,同红托竹荪多糖水解所得单糖斑点的颜色和相对位置及 $R_f$ 值或 $R_{\text{比}}$ 值,确定样品中有哪几种糖。红托竹荪多糖纯化得Dr-1, Dr-2, Dr-3三个级分的单糖组分相同,均为半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖。

## 3 结 语

食用菌多糖是一种能够增强人体免疫功能的生物活性物质,国际学术界称之为生物应答效应物(Biological Response Modifier),目前已经成为分子生物学、食品科学、药学等领域的热点研究内容之一<sup>[6]</sup>。随着分子生物学的发展,人们逐级认识到糖及其复合分子具有极其重要的生物学功能,多糖与免疫功能的调节、细胞与细胞的识别、细胞间物质的运输、癌症的诊断与治疗等都有着密切的关系。开展多糖资源的开发、多糖结构的分析、多糖药理作用等的研究

具有十分重要的意义<sup>[4, 6, 7]</sup>。近年来,有关食用菌多糖的研究、报道的频率相当高,人们一直在努力寻找提取多糖的最佳方法以及不断获得新的功能性多糖资源。红托竹荪作为我国的特色食品,具有极高的开发价值。随着红托竹荪人工栽培规模的不断扩大,红托竹荪多糖的研究和开发必将会产生明显的效益。

## 参 考 文 献:

- [1] 姜守忠,等.竹荪栽培与制种技术[M].贵阳:贵州科技出版,1991.
- [2] 吴勇,姜守忠,林朝忠.竹荪栽培与加工技术[M].贵阳:贵州科技出版社,1997.
- [3] 张甫安,蒋筱仙.中国竹荪驯化栽培大观[M].上海:上海科学普及出版社,1992.
- [4] 董群,方积年.多糖在医药领域中的应用[J].中国药学杂志,2001,36(10):649-652.
- [5] 谭周进,谢达平.多糖的研究进展[J].食品科技,2002,(3):10-12.
- [6] 杜巍,李元瑞,袁静.食药用菌多糖生物活性与结构的关系[J].食用菌,2001,(2):3-5.
- [7] 赵国华,等.活性多糖的研究进展[J].食品与发酵工业,2001,27(7):45-48.
- [8] 连宾.红托竹荪的食品安全分析[J].食品科学,2003,24(8).
- [9] 张惟杰.糖复合物生化研究技术(第二版)[J].杭州:浙江大学出版社,1999,73-75.

# 香蕉酶促褐变的研究

张 勇<sup>1</sup>, 池建伟<sup>2,\*</sup>, 温其标<sup>1</sup>, 张名位<sup>2</sup>, 徐志宏<sup>2</sup>

(1.华南理工大学食品与生物工程学院,广东 广州 510640; 2.广东省农科院生物所,广东 广州 510640)

摘 要: 本文以邻苯二酚为底物采用分光光度计测定氧化产物的方法对香蕉果肉多酚氧化酶(PPO)的催化特性、

收稿日期: 2003-05-28

\* 通讯联系人

基金项目: 广东省农业攻关项目(攻关号B202)

作者简介: 张勇(1977-),男,硕士研究生,研究方向为粮食油脂及植物蛋白质工程。