

蜜环菌多糖 Am - I 的部分理化性质及结构研究

孔小卫, 沈业寿, 王满朝, 洪登华
(安徽大学生命科学学院, 合肥 230039)

摘 要 液体培养的蜜环菌水溶性胞外粗多糖经纯化得Am-I, 再经Sephadex G-200柱层析和醋酸纤维薄膜电泳鉴定Am-I 为均一性组分。采用凝胶色谱法得Am-I 相对分子量约为 6.65×10^5 Dal, 旋光法得 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+100^\circ$, 苯酚-硫酸法、Folin-酚法、Dische反应法测其糖含量、蛋白质含量和糖醛酸含量分别为91.51%、4.78%和2.81%。气相色谱分析表明: Am-I 的单糖组成为D-葡萄糖、D-岩藻糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-鼠李糖、D-半乳糖、摩尔比为: 17.05:0.33:0.36:1:0.42:13.67。红外光谱、纸色谱、Smith降解分析表明: Am-I 是一种含半乳糖醛酸的酸性多糖, 其结构主要由吡喃型单糖通过 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 键和 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 键连接而成。 β -消除反应表明这种糖蛋白是非O-型糖肽键。

关键词: 蜜环菌; 水溶性胞外多糖; 理化性质; 结构

Abstract: Am-I was isolated from the *Armillaria mellea* and purified by DEAE-cellulose and Sephadex G-200 column chromatography. The following results were obtained: Am-I was an acid polysaccharide with galacturonic acid. The molecular weight of Am-I was 6.65×10^5 Dal. The specific spin power of the polysaccharides was $Am-I +100^\circ$. Its carbohydrate content was 91.51%. The uronic acid and protein content of Am-I were respectively 2.81% and 4.78%. The gas chromatography (GC) indicated that Am-I was composed of D-glucose, D-fucose, D-arabinose, D-mannose, D-rhamnose, D-galactose respectively in the molar ratio of 17.05:0.33:0.36:1:0.42:13.67. The IR spectrum of Am-I showed a character of β -glycosidic bond in $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$. Smith degradation showed that the main strand of Am-I consisted of monosaccharides which were linked by $\beta(1, 4)$ and $\beta(1, 6)$ glycosidic bond. The glycopeptidic bond of Am-I was non-O-type one.

Key words: *Armillaria mellea*; exopolysaccharide; physical and chemical properties; structure

中图分类号: Q539; Q502

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)06-0023-04

蜜环菌(*Armillaria mellea*)是与著名中药天麻(*Gastrodia elata*)共生的食药兼用的美味食用菌, 其培养物营养丰富, 具有与天麻相似的药理作用和临床疗效^[1]。蜜环菌的发酵物和固体培养的蜜环菌提取液均具有显著的抗炎作用, 可增加胶体碳粒在小鼠血流中廓清速率和小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能^[2,3], 还具有抗辐射^[10]及保护造血组织, 调节免疫功能^[12]等作用。近年来国内外对蜜环菌菌丝体、菌索及发酵液中的底物及其结构等已有一定的研究^{[4][6]}, 也有对菌索多糖的研究^[11], 但对蜜环菌分泌的胞外多糖的研究, 目前鲜见报道。为了进一步了解蜜环菌的结构与功能的关系, 为其药理作用和临床应用等方面提供理论依据。我们对液体培养的蜜环菌胞外水溶性多糖粗品进行分离和纯化, 并对纯化的组分Am-I 进行部分理化性质及结构的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

蜜环菌胞外粗多糖由安徽大学食用菌技术开发部提供。

1.2 仪器和药品

DY-1601D 电泳仪 南京; Shimadzu Gc-16A 气相色谱仪 日本; Perkin-Elmer 1730 红外光谱仪 美国; Shimadzu uv-265 紫外可见分光光度计 日本; Nihon F-20s 冷却干燥机 瑞典; DEAE-cellulose 52 为 Whatman 美国; Sephadex G-200, Sepharose 4B, Dextran T10, T40, T70, T100, T500, Blue Eextran, T2000 均为 Pharmacia 瑞典; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 多糖的分离、纯化 将蜜环菌胞外多糖组分 I 通过分子筛 Sephadex G-200 柱, 用蒸馏水洗脱, 流速 12 ml/h, 4 ml/管收集, 苯酚-硫酸法检测, 收集第一峰, 浓缩、冷冻干燥, 得多糖 Am-I。

1.3.2 纯度鉴定

收稿日期: 2002-11-15

基金项目: 安徽省教委重点项目(98JL029Z)

作者简介: 孔小卫(1965-), 女, 讲师, 主要从事生物化学教学和多糖的研究。

1.3.2.1 柱层析 取Am-I 2mg, 经Sephacrose 4B柱层析(1.2×96cm), 用蒸馏水洗脱, 流速10ml/h, 3ml/管收集, 苯酚-硫酸法检测。

1.3.2.2 醋酸纤维薄膜电泳 取醋酸纤维薄膜(2×8cm)放在pH8.6的硼酸缓冲液中浸泡20min后, 取出吸去多余水分后点样, 点样端放在阴极, 电压200V, 电泳25min, 取出用5%甲苯胺蓝溶液染色10min, 4%钼酸铵固定。

1.3.3 理化性质

1.3.3.1 比旋度测定 旋光法^[8]。WZZ-1型自动旋光仪(Na光源), 1dm管25℃测定。

1.3.3.2 糖含量测定 苯酚-硫酸法^[7]。

1.3.3.3 蛋白质含量测定 Folin-酚法^[7]。

1.3.3.4 糖醛酸含量测定 Dische反应法^[7]。

1.3.3.5 相对分子量测定 采用凝胶色谱法^[7]。用葡聚糖(2000)测外水体积 V_0 , 再用各种已知分子量的葡聚糖标准品Dextran T10, T40, T70, T100, T500各5mg混合液和样品液分别上Sephacrose 4B柱(1.2×96cm), 蒸馏水洗脱, 流速9ml/h, 3ml/管进行收集, 苯酚-硫酸法测定各管糖含量, 分别求出洗脱体积 V_e ; V_e/V_0 与其分子量对数作图得标准曲线, 根据LogMW与 V_e/V_0 的关系得回归方程: $\log MW = -0.4066V_e/V_0 + 2.41$ ($r = -0.9941, n = 5$)。

1.3.4 结构分析

1.3.4.1 高碘酸氧化 称取Am-I 50mg, 溶于100ml 0.015mol/L的高碘酸钠水溶液中, 在4℃暗处搅拌。于4、8、12……, 24、48……h间隔时间分别吸取反应液1.0ml, 稀释250倍后, 以蒸馏水为对照在223nm处测其光密度值, 直至高碘酸的消耗量达到稳定。用0.015mol/L的高碘酸钠和0.015mol/L碘酸钠稀释250倍后的光密度值作标准。反应结束后, 取出反应液5ml于锥形瓶中加入1ml乙二醇搅拌30min以终止反应, 加入几滴酚酞, 用0.01N的NaOH滴定释放的甲酸量。

1.3.4.2 Smith降解 将高碘酸氧化后的溶液加入5ml乙二醇以终止反应, 流水透析12h, 蒸馏水透析6h, 40℃以下减压浓缩至小体积。加入硼氢化钾以还原二元醛。于室温、暗处搅拌18~24h后。用0.1mol/L乙酸调pH至5.5, 用流水透析24h, 蒸馏水透析过夜, 真空冷冻干燥获得多糖醇。多糖醇用1mol/L H_2SO_4 封管(105℃)水解10h以上, $BaCO_3$ 中和, 过滤, 浓缩, 冷冻干燥的多糖醇水解产物。产物用标准品为对照进行纸层析(正丁醇:乙酸:水=4:1:5), 过碘酸-联苯胺显色。

1.3.4.3 单糖组成分析

取50mg Am-I溶于20ml 2N H_2SO_4 中, 105℃封管水解10h, $BaCO_3$ 中和, 离心, 上清液浓缩后冷却干燥, 得水解产物, 进行气相色谱和纸层析分析。

(1)纸层析 新华1号中速滤纸(20×30cm)上行法。展层剂: 正丁醇:冰醋酸:水(4:1:5), 染色剂: 过碘酸-联苯胺; 以标准葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸为对照。

(2)按文献^[7]方法制成糖酐乙酸酯衍生物, 进行气相色谱分析。气相条件如下:

色谱柱: 3%OV-225玻璃柱(3mm×2m), 担体: Chromosorb WHP(80~100mesh), 载气流速: N_2 40ml/min、 H_2 45ml/min、Air 500ml/min, 柱温: 200℃, FID检测器和气化室温度为: 240℃。

1.3.4.4 红外光谱 取Am-I 2mg, 加入10mg KBr, 在红外灯下放入玛瑙研钵中轻轻研匀压片后, 有红外光谱仪在400 cm^{-1} ~4000 cm^{-1} 之间扫描。

1.3.4.5 β -消去反应 将Am-I配成0.3mg/ml的样品液, 加等体积0.4mol/L NaOH于45℃水浴中保温4h, 以未加碱液的Am-I作为对照, 每隔30min在200~300nm区间进行扫描。

2 结果与分析

2.1 多糖的分离、纯化

蜜环菌胞外多糖组分I的洗脱曲线见图1。

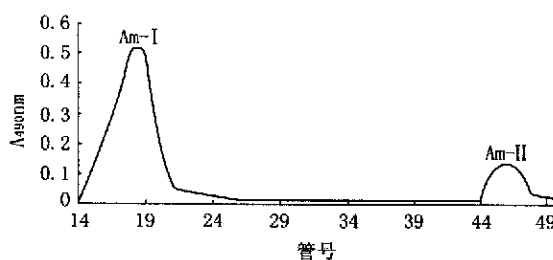


图1 胞外粗多糖Saphadex G-200洗脱曲线

2.2 纯度鉴定

2.2.1 柱层析 Am-I经Sephacrose 4B柱层析, 其结果见图2。

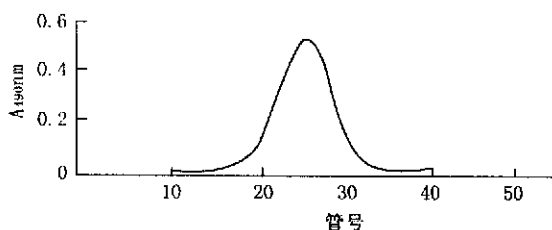


图2 Am-I的Sephacrose 4B柱层析曲线

2.2.2 醋酸纤维素薄膜电泳

Am-I 电泳结果得一条带, 图谱如图3。

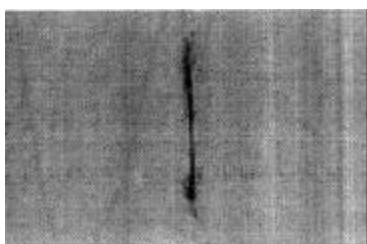


图3 Am-I 的醋酸纤维薄膜电泳照片

2.3 理化性质

2.3.1 相对分子量 Am-I $V_e=89.96\text{ml}$, 查标准曲线得 Am-I 的分子量 $6.65 \times 10^5\text{Da}$ 。

2.3.2 比旋度 用蒸馏水配制 1mg/ml 的样品溶液 25ml 。以蒸馏水为对照, 测得 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+100^\circ$ 。

2.3.3 Am-I 的组成成分 糖含量测定用标准葡萄糖作对照; 蛋白质含量测定用标准牛血清白蛋白作对照; 糖醛酸含量测定用标准半乳糖醛酸作对照。结果见表1。

表1 Am-I 的组成成分(%)

样品	总糖	蛋白质	糖醛酸(以半乳糖醛酸计)
Am-I	91.51	2.81	4.78

2.4 结构分析

2.4.1 高碘酸氧化和Smith降解 高碘酸的总消耗量为 0.76mmol , 甲酸的总释放量为 0.21mmol 。Smith降解无葡萄糖(或其它单糖)产生, 说明糖苷链中无 $1 \rightarrow 3$ 键, 产物有赤藓醇、乙二醇, 表明含 $1 \rightarrow 4$ 键, 产物有甲酸、甘油、乙二醇, 表明存在 $1 \rightarrow 6$ 键。结果见表2。

表2 高碘酸氧化和Smith降解结果

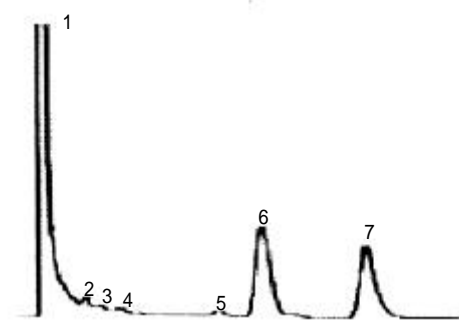
样品	Smith降解产物	结构分析
Am-I	赤藓醇、甘油、乙二醇	$1 \rightarrow 4$ 键和 $1 \rightarrow 6$ 键

2.4.2 气相色谱和纸色谱

由图4可知Am-I 的主要单糖组成为D-葡萄糖、D-岩藻糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-鼠李糖、D-半乳糖, 摩尔比为: $17.05:0.33:0.36:1:0.42:13.67$ 。纸色谱表明Am-I 含半乳糖醛酸。

2.4.3 红外光谱

由图5可知, Am-I 主要吸收峰有 3420 、 2927 、 1631 、 1425 、 1362 、 1272 、 1155 、 1018 、 950 、 891cm^{-1} 等, 其中 $3600 \sim 3200\text{cm}^{-1}$ 与 $3000 \sim 2800\text{cm}^{-1}$ 这两组峰说明是糖类化合物, 是糖类 C-H 伸缩振动, 891cm^{-1} 有 β -型连接的吸收峰, $950 \sim 1250\text{cm}^{-1}$ 之间有



1. 氯仿(0.68min) 2. 鼠李糖 Rha(1.68min)、
3. 岩藻糖 Fuc(2.04min)、4. 阿拉伯糖 Ara(2.47min)、
5. 甘露糖 Man(4.72min)、6. 葡萄糖 Glu(5.75min)、
7. 半乳糖 Gal(6.40min)

图4 Am-I 的气相色谱图

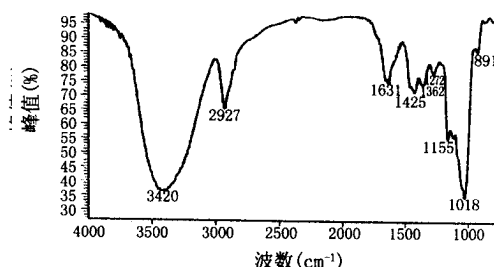


图5 Am-I 的红外光谱图

强吸收峰, 说明组成单糖为吡喃型且含羧基, 证明该糖为酸性多糖; 1250cm^{-1} , 1730cm^{-1} 无吸收峰, 说明该糖不含乙酰基。

2.4.4 糖肽连接键特征分析 在稀碱溶液中O-型糖肽键易于发生 β -消去反应, 生成不饱和氨基酸, 在 240nm 处产生明显的紫外吸收。Am-I 水溶液经碱处理后, 在 240nm 处未产生吸收峰, 表明这种糖蛋白是由非O-型糖肽键连接而成。

3 讨论

从单糖组成上看: Am-I 是一种含有半乳糖醛酸的酸性杂多糖, 根据单糖组成的摩尔比得出Am-I 主要以葡萄糖为主, 此外还有半乳糖、岩藻糖、甘露糖、鼠李糖等; 从IR光谱分析, Am-I 有多糖特征吸收峰和 891cm^{-1} 处有 β -糖苷键吸收峰, 这两点与谭周进报道^[13]有差异; 说明不同实验室由于原料来源不同及提取方法不同, 得到的多糖的分子量和组成并不一致, 甚至差别很大, 因而结构也不同, 这与杨焱报道^[5]结论一致。

Am-I 含有糖醛酸, 有报道^[9]认为糖醛酸的存在, 是许多酸性多糖具有特征生理活性的重要原因之一, 这为Am-I 进一步进行生理和药理活性研究提供理论依据。

Smith 降解说明该糖有 1 → 4 键和 1 → 6 键, 但结果中 1 → 2 键无法确定, 因 1 → 6 键和 1 → 2 键氧化都产生甘油, 故论文中提到的 1 → 6 键可能包含 1 → 2 键, 关于这一点还有待于进一步研究。

在研究过程中, 发现 Am-I 的溶解度较低。电泳后脱色时易扩散, 用 95% 乙醇固定不够理想, 改用 4% 的钼酸铵固定效果较好。

参考文献:

- [1] 蔡义荣. 浅谈天麻和蜜环菌及其共生关系[J]. 生物学通报, 1987, 22(1): 11-12.
- [2] 戴玲, 王华, 沈业寿. 蜜环菌多小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 生物学杂志, 2000, 17(5): 20-21.
- [3] 林志彬, 章达敏, 夏冬. 蜜环菌多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报, 1988, 4(2): 93-96.
- [4] 郭顺星, 徐锦堂, 肖培根. 蜜环菌的化学成分及应用研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(4): 239-240.
- [5] 杨焱, 周昌艳, 白韵琴等. 猴头菌子实体和菌丝体多糖的分离纯化与理化特征比较[J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 397-402.
- [6] Ota Y et al. Biological species of *Armillaria mellea*. Japan Plant Dis, 1998, 82: 537-543.
- [7] 张惟杰. 多糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.
- [8] 复旦大学. 物理化学实验(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社.
- [9] 林启等. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977. 113-140.
- [10] 张颖, 沈业寿, 葛继志等. 蜜环菌多糖对低能离子束诱变作用的恢复效应[J]. 激光生物学报, 2002, (4): 272-275.
- [11] 洪毅, 沈业寿, 樊叶杨. 蜜环菌菌索多糖的分离纯化及部分理化性质[J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(9): 526-528.
- [12] 于敏, 沈业寿, 梅一德等. 蜜环菌菌索多糖的免疫增强作用研究[J]. 生物学杂志, 2001, 18(4): 16-18.
- [13] 谭周进, 谢达平, 王征等. 蜜环菌多糖分离纯化及性质的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 49-52.

微生物转谷氨酰胺酶的蛋白质底物催化特性及其催化机理研究

(III) MTGase 催化多底物蛋白的聚合特性

唐传核, 杨晓泉, 陈 中, 彭志英

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640)

摘 要 采用 SDS-PAGE 研究并探讨了微生物转谷氨酰胺酶(Microbial Transglutaminase, MTGase)催化二种异源蛋白质的聚合情形, 包括 β -乳球蛋白(β -LG)/酪蛋白酸钠(SC)、牛血清白蛋白(BSA)/ β -LG、BSA/SC、大豆球蛋白(glycinin)/ β -LG、glycinin/SC 以及 glycinin/BSA。指出: ①只有那些表面疏水性相仿的蛋白质才有可能聚合交联 ②蛋白空间结构位阻也是不同蛋白交联的限制因素之一 ③蛋白质的表面疏水性质或空间结构的改变, 会影响 MTGase 的催化异源蛋白质交联的可能性。

关键词: 微生物转谷氨酰胺酶; 食物蛋白质; 聚合

Abstract: The catalytic characteristics of MTGase (Microbial Transglutaminase) against two-substrate proteins, including β -lactoglobulin (β -LG)/sodium caseinate (SC), bovine serum albumin (BSA)/ β -LG, BSA/SC, glycinin/ β -LG, glycinin/SC and glycinin/BSA systems were studied by SDS-PAGE. It showed: (a) it was possible for those proteins with similar hydrophobicity to be cross-linked, (b) the spatial structural hindrance of proteins was also one of the factors which affected the cross-linking of different proteins, (c) the changes of surface properties and spatial structures could affect the possibility of cross-linking between different proteins.

收稿日期: 2002-10-20

基金项目: 广东省“十五”攻关农产品加工重大专项资助(A20301)

作者简介: 唐传核(1973-), 男, 讲师, 博士, 研究方向: 食品生物技术。