

姬松茸多糖中 β -葡聚糖含量的酶法测定

何荣军 孙培龙 高红林 赵 敏 应雪肖

(浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310014)

摘 要 探讨了酶法测定姬松茸多糖中 β -葡聚糖含量的方法,测得它的 β -葡聚糖含量在 3.7% ~ 3.9% 之间,标样的平均回收率为 86.8%。实验结果表明,此方法灵敏度高,测定结果可靠。

关键词 姬松茸,多糖, β -葡聚糖,酶

姬松茸 (*Agaricus blazei* Murill) 又叫巴西蘑菇,是一种珍贵的药食兼用真菌。它的子实体中所含的多糖是一种宿主免疫增强剂,尤其是抗肿瘤效果好于其他菌类^[1~3]。从姬松茸子实体或液体发酵产生的菌丝体及滤液中提取多糖,采用的提取方法不同, β -葡聚糖含量不同,则多糖的免疫活性不同。

β -葡聚糖的测定方法有荧光法^[7]、刚果红法^[8]和全酶法。全酶法被公认为是最为科学的,但若采用的酶和反应条件不同、处理工艺不同,都将影响测定结果。笔者从姬松茸子实体开始,用热水提取多糖,并运用 3 种酶的特异性除去多糖中的 α -型糖苷键和肽段,用还原糖法测定了 β -葡聚糖含量。

1 仪器与试剂

1.1 原材料

姬松茸子实体粉末:浙江庆元方格医药保健品有限公司。

1.2 仪器

CR20B2 高速冷冻离心机, JY-501 型超级恒温器, VIS-7220 型可见光光度计, 751-GW 分光光度计。

1.3 试剂

高温 α -淀粉酶 20 000 U/mL (宜兴), 木瓜蛋白酶 3×10^4 U/g (上海化学试剂公司), 糖化酶 10×10^4 U/mL (宜兴), TAKA-DIASTASE (α , β -复合淀粉酶, SERVA FEINBIOCHEMICA) β -葡聚糖 (G6513) Sigma 公司。

2 实验方法

2.1 姬松茸多糖的提取

称取姬松茸子实体粉末 200 g, 溶于 2 000 mL 水中, 自然 pH 下煮沸浸提 5 h, 过滤后滤液冷藏备用, 滤渣再加 1 500 mL 水复提 5 h, 过滤后合并滤液, 50℃ 下减压蒸馏, 向浓缩至 200 mL 的滤液中加入 3 倍体积体积分数为 95% 的乙醇, 4℃ 下静置 6 h 后离心, 弃去上清液, 沉淀物中加 200 mL 水复溶, 冷冻干燥得多糖。

2.2 姬松茸多糖的预处理

准确称取 3.000 g 姬松茸多糖粗粉, 溶于 12 mL 水中, 振荡使粗粉溶解, 加入 0.006 g Ca-Cl_2 , 然后依次进行以下酶解。

2.2.1 高温 α -淀粉酶水解

量取 1.2 mL 高温 α -淀粉酶液 (240 U), 与所得的多糖溶液一起放入 95℃ 水浴中预热 10 min, 然后将酶液倒入多糖溶液, 并振荡 (避免起泡), 保持 30 min 后放入 100℃ 水浴锅灭酶 10 min。冷却至室温。

2.2.2 木瓜蛋白酶水解

调节混合液 pH 值到 7.5。将 0.100 g (3 000 U) 木瓜蛋白酶溶于 5 mL 水中, 和前面反应的混合液一起放入 60℃ 水浴锅中预热 5 min, 将二者混合, 并振荡, 加热 120 min。然后放入 100℃ 水浴锅灭酶 10 min。

2.2.3 糖化酶水解

第一作者 硕士研究生。

收稿时间 2003-08-05, 改回时间 2003-11-19

将上述混合液冷却至 60°C ,并调节 pH 值到 4.3。同时将 4.5 mL 糖化酶(450 U)和混合液放入 60°C 水浴预热 5 min ,然后将酶液倒入混合液 ,并振荡 ,保持 30 min 后放入 100°C 水浴锅灭酶 10 min。

2.2.4 水解后处理

混合液冷却至室温后 ,放入高速冷冻离心机离心(4°C ,15 000 r/min ,15 min)。弃去沉淀物 ,用 120 mL 95% 乙醇沉淀 ,静置 6 h 以上。醇沉物用砂芯漏斗抽滤 ,并依次用 10 mL 78% 乙醇、10 mL 95% 乙醇、10 mL 丙酮润洗。将砂芯漏斗连同滤饼一起放入恒温干燥箱 , 100°C 干燥 30 min 后 60°C 保持 60 min 得预处理样品。

2.3 还原糖含量的测定

称取 0.200 g 预处理样品 ,溶于 30 mL 水中 ,并加入 0.01 g CaCl_2 。另外将 0.250 g α 、 β -复合淀粉酶溶于 5 mL 水中。在 80°C 水浴锅中预热 10 min 后混合反应 60 min ,然后放入 100°C 水浴锅灭酶 10 min ,冷却至室温后放入高速冷冻离心机离心(4°C ,15 000 r/min ,15 min) ,上清液用水定容至 100 mL ,用兰-埃农法^[9]测定 β -葡聚糖水解释出来的葡萄糖含量。

3 结果与讨论

3.1 高温 α -淀粉酶用量的确定

灰树花多糖经过高温 α -淀粉酶酶解之后 ,直接进行后处理。然后准确称取后处理样品各 0.02 g ,用蒸馏水定容至 500 mL ,吸取样品液 1.0 mL ,各以水补至 2.0 mL ,然后加入 6% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL ,静置 10 min ,摇匀 ,室温放置 20 min 后于 490 nm 测光密度。结果如图 1。

由图 1 可知 ,当高温 α -淀粉酶的用量达到 80 U/g(原料)后 ,再增加酶的用量 ,水解效果已经不明显。因此 ,确定高温 α -淀粉酶的用量为 80 U/g(原料)。

3.2 木瓜蛋白酶用量的确定

准确称取 3.000 g 姬松茸多糖粗粉 ,溶于 12 mL 水中 ,振荡使粗粉溶解 ,并调节 pH 值到 7.5 ,加入 0.006 g CaCl_2 ,然后按 2.2.2 和 2.2.

4 的方法进行处理。称取 0.020 g 的该后处理样品 ,溶于 5 mL 蒸馏水中 ,于 280 nm 处测定其吸收值 ,结果如图 2。

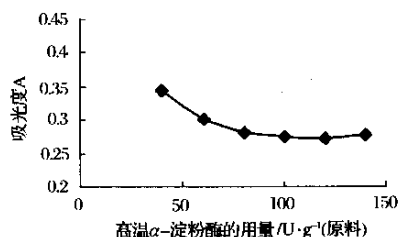


图 1 高温 α -淀粉酶对水解效果的影响

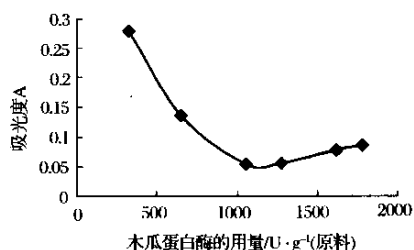


图 2 木瓜蛋白酶用量对水解效果的影响

从图 2 可以看出 ,当木瓜蛋白酶的用量为 1000 U/g(原料)时 ,水解效果较好 ,随着酶用量的增加 ,紫外吸收也随着增加。

3.3 糖化酶用量的确定

在确定了前 2 个酶的用量之后 ,依次采用 3 酶水解 ,样品的测定方法同 3.1 ,结果如图 3。

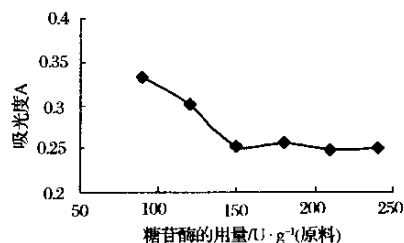


图 3 糖化酶用量对水解效果的影响

由图 3 可知 ,糖化酶用量达到 150 U/g(原料)之后 ,再增加糖化酶的用量水解效果很有限。因此 ,可以认为这时葡聚糖中的 α -糖苷键已经差不多水解完全。

3.4 样品的测定

准确称取 3.000 g 多糖,按照各酶的最佳用量的实验方法进行处理,测得还原糖含量后用下式计算 β -葡聚糖的含量:

$$\beta\text{-葡聚糖的含量}\% = (\text{预处理样品质量} \times \text{还原糖含量} \times 0.9 / \text{原料质量}) \times 100$$

式中 0.9 为校正系数。

表 1 样品测定结果

原料/g	预处理样品/g	还原糖含量/%	β -葡聚糖含量/%	β -葡聚糖/g
3.0	0.162	80.2	3.9	0.117
3.0	0.193	65.6	3.8	0.114
3.0	0.213	58.1	3.7	0.111

从表 1 可以看出,姬松茸菌丝体的水提多糖中 β -葡聚糖的含量在 3.7%~3.9%。

3.5 β -葡聚糖的回收率测定

准确称取多糖粉末 3.000 g,共计 5 份,分别加入一定量 β -葡聚糖,照样品的预处理和含量的测定方法进行分析,并测定回收率,结果见表 2。

表 2 β -葡聚糖的回收率

样品质量/mg	样品中 β -葡聚糖质量/mg	β -葡聚糖加入量/mg	β -葡聚糖检出量/mg	回收率/%	平均回收率/%
3010	114.4	1012	976	86.7	86.8
2914	110.7	1143	1152	91.9	
3115	118.4	998	945	84.6	
2876	109.3	1106	1024	84.3	
3047	115.8	1039	996	86.2	

由表 2 可知,本实验方法的回收率平均值为 86.8%。

4 结 论

(1)确定了酶法测定姬松茸 β -葡聚糖的方法,结果稳定可靠,灵敏度高。

(2)确定了几个关键酶的最佳用量,并测得姬松茸多糖中的 β -葡聚糖的含量在 3.7%~3.9%之间,为姬松茸的进一步研究提供了方便,也为一些颜色较深的食用菌和植物中的 β -葡聚糖的测定提供了参考。

(3)将该法应用于灰树花多糖和香菇多糖的测定,结果重复性很好,与工厂提供的数据基本吻合(该法测出的数据分别为 3.4% 和 4.7%,工厂为 3.8% 和 4.9%)。

参 考 文 献

1 黄年来.巴西蘑菇值得研究推广[J].中国食用菌,1994,13(1):11~92
2 黄年来.巴西蘑菇值得研究推广[J].中国食用菌,1994,13(2)8~93
3 史刚荣.姬松茸研究的现状与展望[J].江苏食用菌,1995,16(4)21~22
4 Kawagishi H,Inagaki R,Kanao T et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies[J]. Carbohydr Res, 1989,186:267~274
5 Kawagishi H,Kanao T,Inagaki R et al. Formolysis of a potent antitumor(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of resulting products[J]. Carbohydr Polymers,1990(12)393~403
6 Qun Dong Jian Yao,Xiao-tong Yang et al. Structural characterization of a water-soluble- β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Mur[J]. Carbohydrate Research,2002,331:1417~1421
7 Ullrich S E,Clancy J A,Cuti J G et al. Analysis of β -glucan in barley and malt:a comparison of four methods[J]. J ASBC,1991,49:110~115
8 李永仙,尹象胜,顾国贤等.刚果红法测定麦汁和啤酒中的 β -葡聚糖[J].无锡轻工业大学学报,1997,16(1)8~13

Enzymatic Measurement of β -Glucans in Polysaccharides of *Agaricus blazei* Murill

He Rongjun Sun Peilong Gao Honglin Zhao Min Ying Xuexiao
(College of Biological and Environmental Engineering,Zhejiang University of Technology, Hangzhou,310014)

ABSTRACT An enzyme method for analysis of soluble β -glucan in polysaccharides of *Agaricus blazei* Murill has been studied in this paper. The yield of the sample was 86.8% and 3.7%~3.9% content of β -glucans were obtained using this method.

Key words *Agaricus blazei* Murill polysaccharides β -glucan, enzyme