

巴西蘑菇胞外多糖的分离及抗肿瘤活性研究

刘常金 谷文英

(无锡轻工大学食品学院, 无锡, 214036)

摘 要 从巴西蘑菇深层发酵的滤液中分离得到胞外粗多糖 Ab-FP, 用 DEAE 柱色谱经阶段洗脱得到 4 个主要组分, 其中前 2 个组分为蒸馏水洗脱部分, 后 2 个组分分别为 0.1 mol/L NaCl 和 0.3 mol/L NaCl 洗脱部分。以 KM 纯系小白鼠为实验模型, 巴西蘑菇胞外多糖具有较高的抗肿瘤活性, 并呈剂量依赖性。

关键词 巴西蘑菇 胞外多糖 抗肿瘤活性

巴西蘑菇 (*Agaricus blazei* Murill) 原产巴西、秘鲁等美洲地区, 1965 年自巴西传入日本并人工栽培成功, 日本商品名为姬松茸^[1], 是一种食药兼用的珍稀菌。日本的研究表明, 巴西蘑菇具有多方面的医疗保健功能, 具有抗肿瘤、抗病毒、降血脂、降血压、治疗糖尿病、保护肝功能及提高机体免疫力等方面均有效果, 尤其抗肿瘤效果被认为优于目前所知的其他菌^[2]。

以往的研究多以子实体为材料, 人工栽培子实体产量低, 受季节及气候影响大等限制了产品的工业化生产, 因而液态深层发酵被认为是开发巴西蘑菇活性成分的有效手段。关于巴西蘑菇深层发酵方面的研究和报道不多, 现有的资料表明巴西蘑菇深层发酵生产的菌丝体及滤液中同样含有抗肿瘤活性成分, 主要成分为抗肿瘤多糖及其蛋白复合物^[1,3,4]。作者对巴西蘑菇深层发酵进行了系统的研究, 对巴西蘑菇深层发酵产生的胞外多糖进行了分离, 并通过动物实验研究了抗肿瘤活性, 为今后开发相关的保健品提供了依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

DEAE (Whatman 产品); 乙醇、硫酸、苯

酚、CCl₄、正丁醇(国产分析纯)。

1.1.2 菌种

本实验室从巴西蘑菇子实体经组织分离优选、驯养并保存。

1.1.3 实验动物

KM 系小白鼠购自江苏原子医学研究所; SI80 腹水瘤小鼠购自中国科学院上海药物研究所。

1.2 方法

1.2.1 粗多糖 Ab-FP 的制备及分离

1.2.1.1 Ab-FP 的制备

巴西蘑菇滤液在 3 000 r/min, 离心 10 min, 上清液经真空旋转蒸发(55℃)浓缩至原体积 1/5, 加入 3 倍体积分数为 95% 的乙醇, 静置 8 h, 离心收集沉淀, 用乙醚、丙酮洗涤, 真空干燥得胞外粗多糖 Ab-FP。

1.2.1.2 Ab-FP 的分级分离

取 Ab-FP 粗多糖用蒸馏水配制溶液, 用 Savag[V(CCl₄): V(正丁醇) = 5:1] 法脱蛋白多次, 对蒸馏水透析 2 昼夜, 真空旋转蒸发(55℃)浓缩, 样液上 DEAE 柱(1.7 cm × 80 cm), 分别用蒸馏水、0.1 mol/L NaCl、0.3 mol/L NaCl 进行阶段洗脱, 洗脱速度为 0.35 mL/min, 4 mL/管, 逐管检测含糖量及蛋白质含量。

1.2.2 巴西蘑菇胞外多糖的抗肿瘤活性

抽取荷瘤鼠腹水放入无菌试管中, 用无

第一作者: 博士研究生, 讲师。

收稿时间: 2001-01-15

菌生理盐水稀释成 1×10^7 个/mL 瘤细胞悬液, 每只健康小白鼠(5~6 周龄, 体重 20 g 左右)注射 0.2 mL 悬液于右腹沟皮下, 随机分组, 每组 8 只, 接种 24 h 后, 每天腹腔注射给药 1 次, 每次 0.2 mL, 连续 10 d, 对照组给予等量生理盐水。停药 24 h 后, 颈椎脱臼处死小鼠, 剥取瘤块, 称重, 用下式计算抑瘤率:

$$\text{肿瘤抑制率}(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

式中: C 为对照组平均瘤重, mg; T 为实验组平均瘤重, mg。

1.2.3 多糖含量测定

硫酸-苯酚法。

1.2.4 蛋白质含量测定

紫外分光光度法。

2 结果与分析

2.1 巴西蘑菇胞外多糖 Ab-FP 的分离纯化

Ab-FP 粗多糖经 DEAE 柱色谱分离后可得 4 个组分(图 1), 其中水洗部分又分为 2 个组分, 分别为 Ab-FP-A-a 和 Ab-FP-A-b, 占总回收率的 73%, 用 0.1 mol/L NaCl 和 0.3 mol/L NaCl 洗脱分别得到一个组分, 即 Ab-FP-B 和 Ab-FP-C, 分别占回收总率的 16.5% 和 6.8%(表 1)。

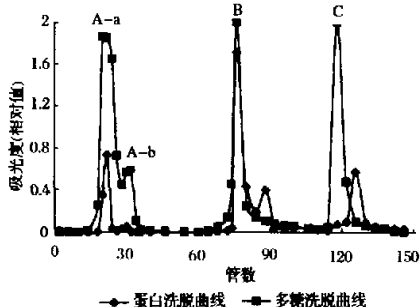


图 1 Ab-FP 在 DEAE 柱上的色谱曲线

2.2 巴西蘑菇胞外多糖的抗肿瘤效果

从表 2 可以看出, 巴西蘑菇胞外粗多糖 Ab-FP 对 S180 移植瘤具有一定的抑制作用, 并呈剂量依赖性, 其中 40 mg/kg·d 剂量的抑瘤率为 43%。巴西蘑菇胞外多糖经 DEAE

柱色谱分离的各组分具有不同的抗肿瘤效果, 其中以水洗组分 Ab-FP-A-a 和 0.1 mol/L NaCl 洗脱组分 Ab-FP-B 的抗肿瘤效果最明显, 抑瘤率高于粗多糖而接近 70%。

表 1 Ab-FP 各组分的情况

组 分	含量/mg	回收率/%
Ab-FP-A-a	46.85	65.7
Ab-FP-A-b	5.44	7.63
Ab-FP-B	11.78	16.52
Ab-FP-C	4.88	6.80
合 计	68.95	96.65

表 2 Ab-FP 对 S180 的抑制效果

剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	抑瘤率/%
10	22
20	27
40	43

3 讨 论

通过 DEAE 柱色谱对巴西蘑菇胞外多糖进行了初步的分级分离, 其中水洗部分占较大比例, 说明以中性多糖为主。从洗脱曲线可以看出, 水洗组分多糖洗脱峰与蛋白洗脱峰重叠, 因此此组分很可能是多糖的蛋白复合物, 其详细结构正在研究之中。

巴西蘑菇胞外多糖具有较高的抗肿瘤效果, 并呈现剂量依赖性。经分级分离后, 其主要组分的抗肿瘤活性可进一步得到提高。巴西蘑菇抗肿瘤成分的研究大多以子实体多糖为主要研究对象^[5,6], 其主要机理是通过刺激机体的免疫系统, 提高并调整机体内部的防御系统间接地发挥抗肿瘤效果, 即是通过宿主介导而起作用的^[3,4]。由于巴西蘑菇的研究历史较短, 关于巴西蘑菇胞外多糖及其抗肿瘤作用的机理报道较少, 其具体的抗肿瘤机理尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Mizuno T. Food Reviews International, 1995, 11(1), 167~172
- 2 近藤贤著, 刘雪卿译. 巴西蘑菇与癌症. 台湾: 正义出版社, 1998

3 Ito H et al. *Anticancer Res.*, 1997, 17, 277~284

4 Mizuno M et al. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1999, 47(4):707~714

5 Mizuno T et al. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54(11), 2889~2896

6 Mizuno T et al. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54(11), 2897~2905

Fractionation of Extracellular Polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill and Its Antitumor Activity

Liu Changjin Gu Wenying

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

ABSTRACT An extracellular polysaccharide, Ab-FP, was extracted from submerged fermentation broth of *Agaricus blazei* Murill. Four parts were obtained by DEAE column chromatography, the first two parts were water effluents, and the following two parts were 0.1 mol/L NaCl and 0.3 mol/L NaCl effluents. With KM mice as animal model, a higher antitumor effect of Ab-FP was observed. Furthermore, this effect was dose-dependent.

Key words *Agaricus blazei* Murill, extracellular polysaccharide, antitumor activity

2001 年我国饲料工业用酶需求有较大增长

饲料工业在我国是个大行业,2000 年配合饲料产量达到 6 500 万 t,较 1990 年的 3 122 万 t 增长 108%。我国最常见的配合饲料是:玉米-豆粕型。今年玉米价格一路上扬,不少饲料厂家、养殖场户探索降低饲料成本的方法,增加小麦、次粉、大麦、麸皮、米糠等非常规饲料的使用量。如用价格远低于玉米的小麦或次粉替代 50%~60% 的玉米用于配合饲料。

由于小麦、次粉等非常规饲料中含有抗营养因子——非淀粉多糖(NSP),其中包括纤维素、木聚糖、 β -葡聚糖、果胶等物质,因此,必须在饲料中添加可以降解抗营养因子 NSP 的以木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、果胶酶等组成的复合饲用酶制剂。据广东省饲料行业管理部门提供的信息,今年以来,对饲料用酶制剂的需求量一直处于上升趋势。有些酶制剂厂的产量半年之内翻了一番。很多饲料厂、养殖场户通过实践已经认识到使用饲料用酶制剂可以达到保质保量又降低饲料成本的目的。

据报道,近 10 年来饲用酶制剂最主要的进展是在小麦和大麦为基础的禽畜日粮中添加复合酶制剂。酶制剂对小麦和大麦的主要作用是减少或消除

其中 NSP 产生的负面影响,一个典型的例子,在肉鸡饲料中加入 10% 的大麦时,可使鸡粪变湿变粘,并降低生长速度。这种副作用是由于大麦籽粒细胞壁中的可溶性、高粘度的 NSP(木聚糖、 β -葡聚糖)所致。但是,加入复合酶制剂到含有大麦的饲料中,NSP 被解除,粪便外观改变,饲料的利用率和消化率获得提高。目前世界各国在 80% 的肉鸡用小麦或大麦基础日粮中均添加复合酶制剂。

加酶饲料长期以来主要应用于反刍动物,鸡饲料居第一,其次为猪。1996 年,加拿大试验于反刍动物奶牛饲料中添加木聚糖酶、 β -葡聚糖酶等组成的复合酶制剂,获得产乳量增加 16% 的明显效果,表明酶制剂对提高反刍动物饲料利用率有很好的作用。

我国 2000 年配合饲料 6 500 万 t,如果全部加酶,添加量以 0.1% 计,需 65 000 t 酶制剂,对酶制剂的需求量很大。2000 年我国用于饲料的酶制剂 11 000 t,加酶饲料占配合饲料 16.9%。2001 年用于饲料的酶制剂可望达到 15 000 以上。饲用酶制剂是一种有活性的蛋白质,为绿色饲料添加剂。酶制剂的应用推动了饲料工业的发展。