

桑黄菌丝体多糖的分离纯化及理化性质分析

谢丽源¹, 张勇^{2,*}, 郭勇¹, 吴翔¹, 彭卫红¹, 甘炳成¹

(1.四川省农业科学院土壤肥料研究所, 四川 成都 610066; 2.电子科技大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610054)

摘要: 研究桑黄粗多糖的分离和纯化工艺, 并对多糖组分进行理化性质分析。结果表明: 经DEAE-52纤维素离子交换层析和Sephadex G-100凝胶过滤层析得到两个组分P-47000和P-8700; 经高效液相色谱分析证明, 两组分均为纯品, 且不含蛋白质、核酸, 为非淀粉类多糖, 分子质量分别为 4.74×10^4 D和 8.71×10^3 D, 均由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖组成, P-47000中各单糖物质的量比为3.47:1.99:1:63.27:13.44, P-8700中各单糖物质的量比为10.46:1:1.03:182.75:30.94。

关键词: 桑黄; 多糖; 纯化; 理化性质

Isolation, Purification and Physico-chemical Characteristics Analysis of Mycelial Polysaccharides from *Phellinus baumii*

XIE Li-yuan¹, ZHANG Yong^{2,*}, GUO Yong¹, WU Xiang¹, PENG Wei-hong¹, GAN Bing-cheng¹

(1. Institute of Soil and Fertilizer, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China;

2. School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China)

Abstract: The isolation, purification and physico-chemical characterization of mycelial polysaccharides from *Phellinus baumii* were studied. Two polysaccharide fractions were separated from crude deproteinized polysaccharides from *Phellinus baumii* mycelia by DEAE-52 cellulose column chromatography, followed by purification on Sephadex G-100 gel filtration column. The two fractions were determined by HPLC to contain neither protein nor nuclear acid and to be pure non-starch polysaccharides, their molecular weights were 4.74×10^4 D and 8.71×10^3 D, respectively, and they were both composed of rhamnose, arabinose, xylose, galactose and glucose in a molar ratio of 3.47:1.99:1:63.27:13.44 and 10.46:1:1.03:182.75:30.94, respectively.

Key words: *Phellinus baumii*; polysaccharide; purification; physico-chemical characteristics

中图分类号: O636.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)05-0143-05

桑黄是担子菌亚门(Basidiomycota)、层菌纲(Hymenomycetes)、非褶菌目(Aphyllorphales)、锈革孔菌科(Hymenochaetaceae)、针层孔菌属(*Phellinus*)的大型真菌, 具有增强免疫、抗氧化、抗菌、消炎等药理活性^[1]。桑黄多糖是桑黄的主要功能成分, 经过分离纯化, 得到相对较纯的多糖才能更好地发挥作用, 因此, 桑黄多糖的分离纯化是一个必不可少的步骤。而有关桑黄 *P. ignarius* 和 *P. linteus* 子实体多糖组成研究见诸报道^[2-3], 但对桑黄 *P. baumii* 菌丝体多糖的分离纯化及理化性质的报道还很少。由于不同的提取条件、分离纯化手段以及不同的菌株, 所得的糖组成结果不相同, 因此通过分子质量检测、单糖组成分析、紫外光谱扫描对桑黄 *P. baumii* 菌丝体多糖组分进行理化性质研

究, 旨在为进一步研究桑黄多糖构效关系提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑黄(*Phellinus baumii*)菌丝体粗多糖脱蛋白、脱色后干燥粉末, 密封保存。

标准分子质量葡聚糖标准品(右旋糖苷: 180 ~ 200000D) 中国科学院成都分院分析测试中心; L-鼠李糖、D-阿拉伯糖、D-木糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、肌醇、三氯乙酸 美国Sigma公司; KBr(光谱纯)、乙醇、甲醇、硫酸、苯酚、硼氢化钠、氢氧化钠、氯化钠、吡啶、乙酸酐、二氯甲烷、硫酸铜、碘液、三氯化铁、酒石酸钾钠均为

收稿日期: 2010-06-19

基金项目: 四川省青年基金项目(2008ZQ026-072); 四川省科技支撑计划项目(2008FZ0157)

作者简介: 谢丽源(1977—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为农产品加工。E-mail: xieliyuan77@163.com

* 通信作者: 张勇(1977—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为微生物。E-mail: zhangyong916@uestc.edu.cn

分析纯 上海 Sangon(中国)公司。

1.2 仪器与设备

HL-2N 数显恒流泵、SBS-100 数控计滴自动部分收集 上海沪西分析仪器厂有限公司;真空冷冻干燥器 荷兰 Heto Drywinner;高效液相色谱系统(510 型高压泵, 2410 示差检测器, Ultrahydrogel linear column 色谱柱) 美国 Waters 公司;GLI66- 高速离心机 上海安亭科学仪器厂;UV1240 紫外分光光度计 日本岛津仪器公司;SC-6000 气相色谱仪 重庆川仪分析仪器有限公司;石英毛细管柱 美国 Supelco 公司。

1.3 方法

1.3.1 桑黄多糖分离与纯化

1.3.1.1 DEAE-52 纤维素柱层析

将经过脱蛋白、脱色的多糖样品溶于适量的蒸馏水,离心去除不溶物,3mL 上样至离子交换层析柱(45cm × 3cm, DEAE-52 纤维素填充),洗去不吸附组分,分别用蒸馏水、0.5、1、1.5、2mol/L NaCl 洗脱液分段梯度洗脱,恒流泵控制流速为 2mL/min,自动部分收集器收集,每管收集 5mL,苯酚-硫酸法检测,绘制曲线,合并单峰部分,浓缩。

1.3.1.2 凝胶过滤层析

选用 Sephadex G-100 的凝胶填料,洗脱液为 0.01mol/L 磷酸缓冲液,柱规格为 105cm × 1.5cm,上样量 2mL,流速为 0.5mL/min,每管收集 4mL,苯酚-硫酸法检测,绘制曲线,合并单峰部分,浓缩,干燥。

1.3.1.3 高效液相色谱(HPLC)纯度鉴定

取测试纯化多糖样品少许,用流动相溶解,10000r/min 离心 10min,取上清液 20 μL 进样。色谱条件:流动相:1g/100mL NaCl 溶液,流速 0.6mL/min,记录样品色谱曲线。

1.3.2 桑黄多糖组分溶解性及显色反应

观察各组分的颜色、气味、形状、溶解性和碘反应、斐林试剂反应、三氯化铁反应的现象。

1.3.3 桑黄多糖分子量测定^[4-5]

多糖在凝胶柱上的洗脱体积或保留时间与其分子量密切相关,在一定分子量范围内,洗脱体积或保留时间与其分子质量的对数呈线性关系。根据这一性质,可用一系列已知分子质量的标准葡聚糖在一定色谱条件下制作分子质量的数值与保留时间或洗脱体积的标准曲线,根据待测多糖的保留时间,从标准曲线上求出该多糖的分子量。标准葡聚糖(分子量分别为 2000000、133800、84400、41100、21400、10000、7100、4600、2500、180D)分别用 1g/100mL NaCl 配制溶液,10000r/min 离心 10min,上清液取 20 μL 进样,HPLC 测定。以各标准多糖已知分子质量的对数对相应

的保留时间作图,得到标准曲线(由 GPC 数据处理系统完成)。分析条件:流动相 1g/100mL NaCl;流速 0.6mL/min。

1.3.4 桑黄多糖紫外光谱分析

称取样品少许,用蒸馏水配制成一定质量浓度的溶液,在波长 200 ~ 400nm 进行紫外全扫描。

1.3.5 桑黄多糖气相色谱分析

1.3.5.1 色谱条件

气相色谱仪(GC)配备 SPB-1 石英毛细管柱(28m × 0.32mm, 1.0 μm)。FID 检测器,高纯氮作为载气,流速:30mL/min,进样量为 1 μL,分流比为 25:1;检测器温度为 280,汽化室温度为 260,进样口温度为 260;氢气速度 30mL/min,空气流速 200mL/min,尾吹(N₂)速度 30mL/min。程序升温:柱初温 180,以 2 /min 升温至 230^[6-7]。

1.3.5.2 标准单糖样品的酯化衍生制备

分别精密称取 5mg 的鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖、甘露醇,均匀混合后溶于 1mL 蒸馏水,加入 15mg 硼氢化钠和 5mg 的肌醇作为内标物,在 60 还原 1h。加乙酸分解过量的硼氢化钠,至无气泡逸出为止。减压 60 蒸干,用甲醇反复洗,直至壁上为透明物质,真空干燥 4h。将 1mL 吡啶和 1mL 乙酸酐加入到干燥的盛有还原糖样品的反应瓶中,在 100 反应 1h 后,用 1mL 二氯甲烷萃取 3 次,合并 3 次萃取液后浓缩至 1mL,待 GC 分析^[8-11]。

1.3.5.3 样品的酯化衍生制备

称取 10mg 多糖样品溶解在 2mL 的 2mol/L 三氟乙酸溶液中,密封 100 水解 5h。离心,取上清水解液,减压 60 蒸干。用甲醇反复洗,直至无酸味为止。水解糖样溶解在 1mL 0.05mol/L 氢氧化钠溶液中。以下操作同标准单糖样品的酯化衍生制备。

1.3.5.4 GC 分析及定量

用样品按照以上方法处理后用 GC 测定。根据出峰时间,计算各糖组分的出峰面积,根据等物质的量的标样组分,计算出样品的物质的量比。

2 结果与分析

2.1 桑黄粗多糖 DEAE-52 纤维素柱层析

表 1 桑黄粗多糖 DEAE-52 纤维素柱层析结果

Table 1 Summary of chromatographic separation of crude deproteinized polysaccharides from *Phellinus baumii* mycelia on DEAE-52 cellulose column

项目	组分	组分
洗脱剂	蒸馏水	1mol/L NaCl
总糖量/mg	55.3	16.4
总糖量占全部层析组分百分数/%	77.1	22.9
进样量/mg	80.4	80.4
回收率/%	68.8	20.4

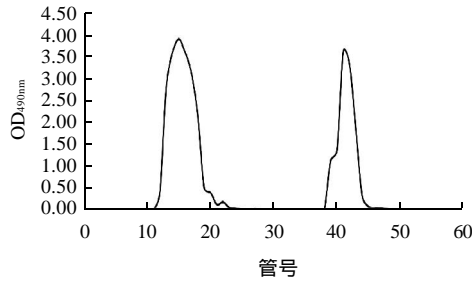


图1 菌丝体粗多糖 DEAE-52 纤维素柱层析

Fig.1 Elution profile of polysaccharides from *Phellinus baumii* mycelia from DEAE-52 cellulose column

由表 1、图 1 可知，DEAE-52 纤维素柱层析对桑黄粗多糖具有良好的分离效果，多糖的总回收率达到了 89.2%。粗多糖经 DEAE-52 纤维素柱层析分离，阶段洗脱，得到 2 个峰(组分 和组分)，证明桑黄胞内多糖至少含有 2 种多糖组分。收集各单峰部分，经苯酚-硫酸法检测，可知每个组分所占比例不同，蒸馏水洗脱组分 占绝大部分，为 77.1%，1mol/L NaCl 洗脱也获得一个组分 ，占 22.9%。

2.2 桑黄多糖 Sephadex G-100 凝胶柱层析

为了得到均一多糖组分，继续进行 Sephadex G-100 柱层析。取经 DEAE-52 纤维素柱层析纯化获得的上述多糖 2mL，上样到 Sephadex G-100 凝胶柱，用 0.01mol/L 磷酸缓冲液洗脱，进行进一步纯化。由图 2、3 可知，组分 和组分 经 Sephadex G-100 柱层析洗脱均得到一个峰 Polysaccharide-47000 (P-47000)和 Polysaccharide-8700 (P-8700)，其多糖回收率分别为 81.3% 和 77.8%。

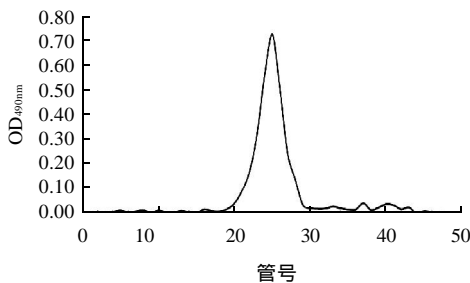


图2 组分 I Sephadex G-100 凝胶过滤层析

Fig.2 Elution profile of fraction I from Sephadex G-100 gel filtration column

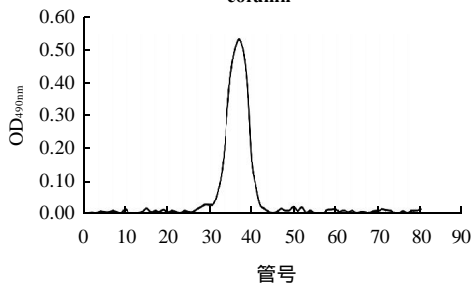


图3 组分 II Sephadex G-100 凝胶过滤层析

Fig.3 Elution profile of fraction II from Sephadex G-100 gel filtration column

2.3 桑黄多糖纯度鉴定

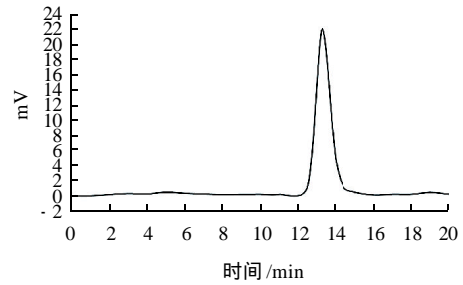


图4 P-47000 的 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC profile of fraction I

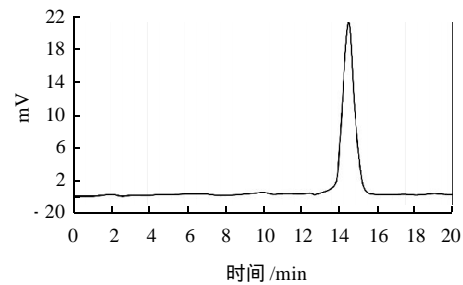


图5 P-8700 的 HPLC 图谱

Fig.5 HPLC profile of fraction II

由图 4、5 可知，两组分多糖的 HPLC 色谱图均呈现单一对称吸收峰，表明从桑黄菌丝体中得到的两个水溶性多糖组分均为单一多糖。

2.4 桑黄多糖物理性质

经冷冻干燥后的桑黄多糖 P-47000 为白色蓬松状固体，P-8700 为黄色晶体。两者都可溶于水、稀酸、稀碱、稀盐溶液，均不溶于乙醇、丙酮和乙醚等有机溶剂。两种多糖与碘化钾反应均不显蓝色，说明它们是非淀粉类多糖。两种均一组分的斐林试剂反应、三氯化铁反应均为阴性，说明它们不含单糖、多酚类物质。

2.5 桑黄多糖分子质量标准曲线及分子质量测定

以已知分子质量的标准葡聚糖(M_w)和保留时间(t)，制作标准曲线，得回归方程： $\lg M_w = 11.94 - 0.552t + 4.70 \times 10^{-3}t^2 - 3.29 \times 10^{-4}t^3$ ($R^2 = 0.999$)。根据保留时间从标准曲线回归方程中求得各纯化组分的平均分子质量，结果见表 2。

表 2 纯化组分桑黄多糖的平均分子质量
Table 2 Mean molecular weights of fractions I and II

组分	保留时间/min	平均分子质量/D
P-47000	13.252	4.74×10^4
P-8700	14.470	8.71×10^3

2.6 桑黄多糖的紫外吸收光谱

对两种均一多糖在波长 200 ~ 400nm 范围内进行紫外

全扫描,由图6、7可知,P-47000和P-8700紫外全扫描图谱非常相似,在波长280nm和260nm处均没有吸收峰,说明两种多糖组分均不含蛋白质和核酸。

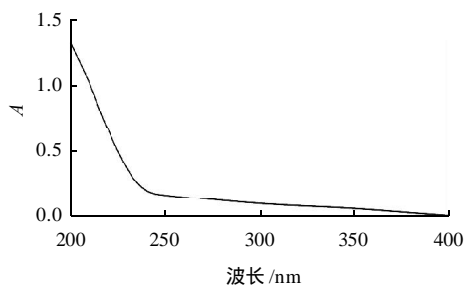


图6 P-47000紫外吸收光谱全扫描图

Fig.6 UV full scan spectrum of fraction

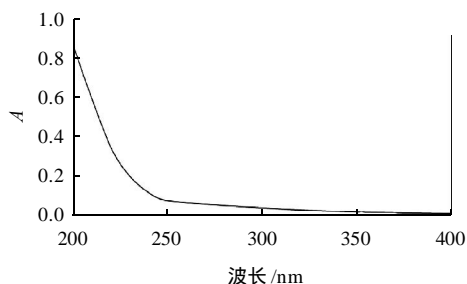


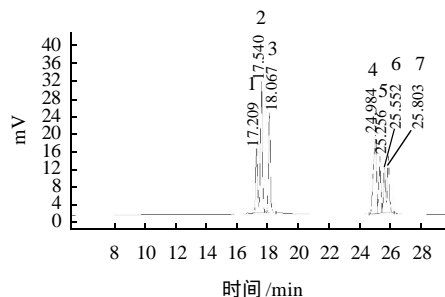
图7 P-8700紫外吸收光谱全扫描图

Fig.7 UV full scan spectrum of fraction

2.7 桑黄多糖中单糖组成及物质的量比

2.7.1 标样GC分析

根据6种单糖混标的乙酸酯化衍生物的GC分析得图8,混合标准糖样品中各单糖的出峰顺序为鼠李糖(rhamnose)、阿拉伯糖(arabinose)、木糖(xylose)、甘露糖(mannose)、葡萄糖(glucose)、半乳糖(galactose)。



1. 鼠李糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 木糖; 4. 肌醇(内标); 5. 甘露糖; 6. 葡萄糖; 7. 半乳糖。

图8 混合标准糖样中单糖的气相色谱图

Fig.8 Gas chromatograms of mixed monosaccharide standards

2.7.2 桑黄多糖中各单糖的GC分析

P-47000和P-8700水解、酯化的单糖组成气相色谱与单糖标样的气相色谱图比较可知,P-47000(图9)和P-8700(图10)中均含有5种单糖,对照混合单糖标准

品的出峰时间,可判断其含有鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖。

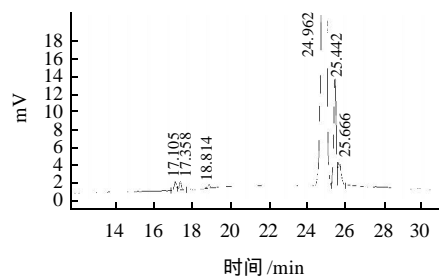


图9 P-47000气相色谱图

Fig.9 Gas chromatogram of fraction I

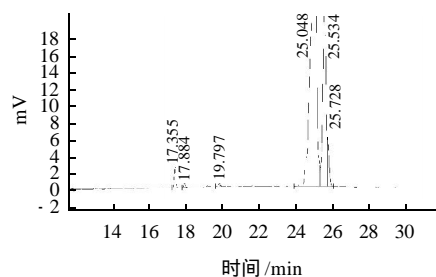


图10 P-8700气相色谱图

Fig.10 Gas chromatogram of fraction

根据出峰时间及其面积平均百分含量得出P-47000中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖物质的量比为3.47:1.99:1:63.27:13.44,P-8700中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖物质的量比为10.46:1:1.03:182.75:30.94。

3 讨论

本实验采用离子交换层析分离桑黄胞内多糖,其多糖回收率高达89.2%,得到两种多糖组分和组分,两种多糖所占层析组分百分数分别为77.1%和22.9%,两种多糖进一步经凝聚过滤层析分别得到多糖组分P-47000和P-8700,经凝聚柱层析和高效液相色谱验证,两种多糖均为均一多糖,说明DEAE-52纤维素离子交换层析和Sephadex G-100凝聚过滤层析是该种桑黄胞内多糖分级纯化的有效方式,并且为后续的活性和结构的研究奠定基础。

从菌丝体中分离纯化得到的两个多糖组分P-47000和P-8700的外观性状不同,分别为白色蓬松状固体和黄色晶体,均易溶于水、稀酸、稀碱、稀盐溶液,均不溶于乙醇、丙酮和乙醚等有机溶剂;两个多糖组分与斐林试剂反应、三氯化铁、碘液反应呈阴性,表明不含单糖和多酚类及淀粉类物质;紫外光谱表明两种均一多糖均不含核酸和蛋白质;从分子质量来看两种均一多

糖具有不同的分子质量, 分别为 4.74×10^4 、 8.71×10^3 D。

对桑黄菌丝体多糖组分进行气相色谱分析, 由于糖类本身没有足够的挥发性, 因此进行气相色谱分析时, 必须先将其转化成易挥发、对热较稳定的衍生物。采用先将糖还原为糖醇, 再衍生为乙酸酯的方法, 避免了衍生物异构体的产生, 在进行色谱分析时每种糖都可以得到单峰, 确保了测定结果的精确。由此可见利用气相色谱法分析 *P. baumii* 菌丝体多糖单糖组成完全可行。通过气相色谱分析表明, 两种均一多糖的单糖组成一致, 由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖组成, 其物质的量比不相同, P-47000 中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖物质的量比为 3.47:1.99:1:63.27:13.44, P-8700 中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖物质的量比为 10.46:1:1.03:182.75:30.94。

参考文献:

- [1] 张小青, 戴玉成. 中国真菌志: 锈革孔菌孔: 第二十九卷[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 117-119.
- [2] 秦俊哲, 刘华. 桑黄子实体多糖提取工艺及单糖组成研究[J]. 中国食用菌, 2008, 27(6): 43-45.
- [3] 葛青, 张安强, 孙培龙. 桑黄子实体多糖的分离纯化及单糖组成研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 291-294.
- [4] 段金友. 肺叶多糖的分离纯化、结构鉴定、生物活性与构效关系及碳水化合物方法学研究[D]. 北京: 中国科学院, 2003.
- [5] 雷德柱. 灰树花菌丝的深层发酵及其多糖的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2001.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994: 11-78.
- [7] 李云捷, 吴谋成, 吴季勤, 等. 玉米花粉多糖的分离纯化与结构鉴定[J]. 武汉生物工程学院学报, 2009(1): 25-27; 78.
- [8] 徐桂云, 陈汝贤, 常理文. 用毛细管气相色谱法测定多糖中单糖的组成[J]. 分析测试学报, 2000, 19(3): 71-73.
- [9] ALBERSHEIM P, NEVINS D J, ENGLISH P D, et al. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography[J]. Carbohydr Res, 1967, 5: 340-345.
- [10] GE Qing, ZHANG Anqiang, SUN Peilong. Structural investigation of a novel water-soluble heteropolysaccharide from the fruit bodies of *Phellinus baumii* Pilat[J]. Food Chemistry, 2009, 114: 391-395.
- [11] GE Qing, ZHANG Anqiang, SUN Peilong. Structural elucidation of a neutral fucoglucan from the fruiting bodies of *Phellinus baumii* Pilat[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(2): 343-348.