

深层培养裂褶菌胞外多糖的提取及结构研究

冀颐之* 杜连祥

(天津科技大学食品科学和生物工程学院 天津 300222)

摘要: 对深层培养裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 胞外多糖的提取工艺及多糖结构进行了初步研究。将等电点法与 Sevag 法相结合可高效的去除多糖中的蛋白, 其方法简单有效。纯多糖经凝胶柱层析, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 高效液相色谱分析为均一组分, 分子量 4×10^4 D。通过完全水解, 纸层析, 气相色谱分析单糖组分, 红外光谱, 酶解反应, 高碘酸氧化分析结构, 证明了裂褶菌多糖是以葡萄糖为单一组分, β - (1-3) 和 β - (1-6) 糖苷键组成的 β -D 葡聚糖。

关键词: 裂褶菌, 多糖, 提取, 结构

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0015-06

EXTRACTION AND STRUCTURAL STUDY OF SCHIZOPHYLLAN FROM *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* BY SUBMERGED CULTIVATION

Ji Yi-Zhi DU Lian-Xiang

(Food Science and Bioengineering college, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222)

Abstract: The extraction method and structure of exo-polysaccharide from *schizophyllum commune* by submerged cultivation were studied. Proteins were removed completely from the polysaccharide by the sevag method following the isoelectric point precipitation method. The purified schizophyllan was proved to be homogeneous with molecular weight 4×10^4 D by sephadex G-200 column chromatography, PAGE and HPLC. Its monomer was determined by hydrolysis, PC, GC and its structure was analyzed by IR, enzymolysis, periodate oxidation, the results showed that schizophyllan was only composed of glucose and it was the β -glucan consisting of β - (1-3) and β - (1-6) glucosidic linkages.

Key words: *Schizophyllum commune*, Schizophyllan, Extraction, Structure

裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 属担子菌纲蘑菇目裂褶菌科裂褶菌属, 是一种珍贵的药用真菌^[1]。裂褶菌胞外多糖 (Schizophyllan, 简称 SPG) 是一种水溶性的 β -D-葡聚糖, 因其具有好的水溶性和独特的活性结构, 在调节免疫功能、抗肿瘤、抗辐射等方面有着显著的功效^[2,3]。

深层培养裂褶菌提取其胞外多糖具有周期短、成本低、产量大等优点, 是一种大量获取裂褶菌多糖的有效途径, 本文就裂褶菌胞外多糖的提取工艺进行了研究, 提出了以等电点法与 Sevag 法相结合的真菌多糖去蛋白新方法。并在此基础上对裂褶菌多糖的结构进行了分析, 为进一步开发和利用裂褶菌多糖奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

裂褶菌 *Schizophyllum commune*, 由南开大学生命科学院真菌研究室提供。

* 联系人 Tel: 022-28193580, E-mail: jiyizhi@sina.com

收稿日期: 2002-10-10, 修回日期: 2002-12-20

1.2 培养基

1.2.1 斜面种子培养基: PDA 培养基(酵母浸膏粉含量 5g/L)。

1.2.2 种子液体培养基: 葡萄糖 35 g, 酵母浸膏粉 3 g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 自来水配制定容至 1L, 除酵母浸膏粉外其余均为分析纯, pH 自然。

1.2.3 发酵培养基: 葡萄糖 45 g, 酵母浸膏粉 3 g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 自来水配制定容至 1L, 除酵母浸膏粉外其余均为分析纯, pH 自然。

1.3 培养方法

斜面种子 27℃, 培养 7d。然后将一块覆有菌丝的斜面培养基接入装液量为 100mL 的 500mL 一级种子瓶中, 27℃, 160r/min, 培养 60h。以 10% 接种量转到装液量为 250mL 的 1L 二级种子瓶中 27℃, 160r/min, 培养 24h。发酵罐容积 7L, 装培养液 4L, 接种量 10%, 培养温度 27℃, pH 自然, 初始通气量 100L/h, 搅拌转速 200r/min, 培养 3d, 终止发酵。

1.4 裂褶菌胞外多糖的提取工艺流程

发酵液→离心脱细胞→上清液脱色→真空薄膜浓缩→去蛋白→沉淀→复溶→沉淀→冷冻干燥→裂褶菌纯多糖

1.4.1 脱色方法: (1) 活性炭吸附法: 发酵液中加入适量活性炭, 40℃ 水浴, 搅拌 30min, 去除活性炭, 测其白度。(2) 氧化脱色法: 用浓氨水调 pH 至 8.0, 滴加 H_2O_2 至浅黄色, 室温放置 30min, 测其白度和粘度。

1.4.2 脱蛋白方法: (1) Sevag 法: 在多糖溶液中加入 0.2 倍体积的氯仿正丁醇混合液(氯仿: 正丁醇 = 5:1), 剧烈振荡 30min, 离心, 回收上清液, 去除蛋白层及有机溶液^[4]。(2) 三氯醋酸法: 在多糖溶液中滴加 3% 三氯醋酸, 直至溶液不再浑浊为止, 5℃ ~ 10℃ 放置过夜, 离心除去胶状沉淀^[4]。(3) 等电点法: 用浓氨水调多糖溶液 pH 至 10, 离心除去沉淀。

1.5 纯度分析

1.5.1 SephadexG-200 凝胶柱层析: SephadexG-200 装填于 2.5 × 60cm 的玻璃柱中, 以 0.05mol/L NaCl 平衡, 0.5% 多糖溶液上样 2mL, 以 0.06mol/L NaCl 洗脱, 流速恒定在 8mL/h, 收集流出液, 苯酚-硫酸法显色, 490nm 测其 OD 值。

1.5.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 分离胶浓度为 7.5%, pH8.9, 浓缩胶浓度为 3.75%, pH6.7, Tris-甘氨酸电极缓冲液, pH8.3。上样量 5mg, 点样体积 20 μ L。开始将电流调为 10A, 待样品进入分离胶时, 将电流调为 30A。溴酚蓝做指示剂, 电泳 4h, Schiff 试剂染色。

1.5.3 高效液相色谱: Waters244 型高效液相色谱仪, 糖柱, Waters410 视差检测器, 流动相为水, 流速 0.9, 柱温 50℃。

1.5.4 紫外吸收光谱: 裂褶菌多糖溶液从 200nm ~ 600nm 进行全波长扫描, 分析其末端吸收。

1.6 分子量测定

采用高效液相色谱法, 条件同 1.5.3。

1.7 结构鉴定

1.7.1 单糖组分分析: (1) 完全水解: 取多糖 10mg 加 2mol/L H_2SO_4 5mL, 封管,

100℃, 水解 8h, BaCO₃ 中和, 离心, 取上清液浓缩备用。(2) 纸层析: 葡萄糖、甘露糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖做对照, 展开剂为正丁醇:冰醋酸 水 = 4:1 5, 显色剂为苯胺-邻苯二甲酸, 室温上行 7h。(3) 气相色谱分析: 将裂褶菌多糖单糖水解液与标准单糖: 葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖制备单糖衍生物^[5]。GC-7890II 气相色谱仪, 选用 15m × 0.25mmSE-54 毛细管柱, FID 检测器, 温度 240℃, 进样量 1μL。

1.7.2 红外光谱分析: 取裂褶菌多糖冻干粉用 KBr 压片, 在红外光谱仪上扫描红外光谱。

1.7.3 酶解反应: 淀粉酶 0.1mL 溶于 30mL 蒸馏水中。蜗牛酶以 pH7.4 磷酸缓冲液配制, 终浓度为 3%。两者中均加入裂褶菌多糖 30mg, 40℃, 反应 3d, 用斐林法测定水解产物。

1.7.4 高碘酸氧化: 200mg 裂褶菌多糖溶于 100mL 0.25mol/L NaIO₄ 中于暗处, 12℃, 间隔时间取样, 稀释, 在 223nm 测定高碘酸消耗量, 将溶液中加入乙二醇放置 10min, 以终止反应, 还原剩余的高碘酸, 用溴甲酚紫为指示剂, 用 0.01mol/L NaOH 滴定甲酸释放量。

2 结果与讨论

2.1 裂褶菌胞外多糖提取工艺的研究

2.1.1 脱色方法的比较: (1) 活性炭脱色法: 按方法 1.4.1 (1) 将 50mL 发酵液稀释一倍后分别加入 0.25%、0.5%、1% 的活性炭, 考察不同活性炭浓度的脱色效果。试验结果见图 1。当活性炭用量为 0.5% 时白度为 15.32, 发酵液透明无色, 脱色效果最好。活性炭用量过大, 发酵液呈灰色, 有细微活性炭颗粒剩余, 不利于后提取。

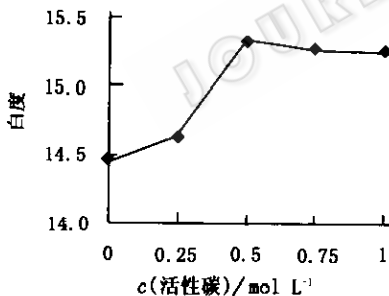


图 1 不同活性炭浓度对脱色的影响

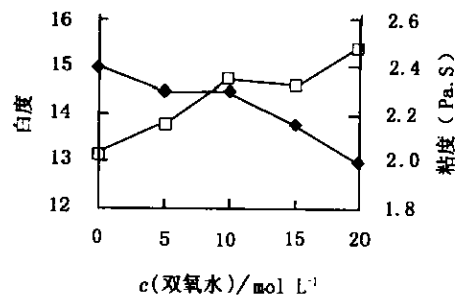


图 2 不同双氧水浓度对脱色和多糖粘度的影响

—◇— 白度, —●— 粘度

(2) 氧化脱色法: 将发酵液稀释一倍后, 按方法 1.4.1 (2) 在发酵液中分别加入 5%、10%、15%、20% 浓度的 H₂O₂, 观测不同浓度 H₂O₂ 的脱色效果及其对发酵液粘度的影响, 试验结果见图 2。由图 2 可知, 随着 H₂O₂ 浓度的增加, 发酵液白度由最初的 13.14 增加至 15.41, 脱色效果逐渐增强, 其中 H₂O₂ 浓度为 20% 脱色效果最佳。但发酵液粘度也随之降低, 这说明 H₂O₂ 对裂褶菌多糖有降解作用。

由试验结果可知活性炭吸附法和氧化脱色法均能对裂褶菌多糖溶液起到很好的脱色效果, 但考虑到氧化脱色法作用较为剧烈, 可引起多糖的降解, 因此选择 0.5% 活性炭作为最佳脱色方法。

2.1.2 脱蛋白方法的比较：发酵液脱色后，分别采用 Sevag 法、三氯醋酸法、等电点法等方法进行脱蛋白试验，微量凯氏定氮法测其含氮量，所得结果见表 1。

由表 1 可知，三氯醋酸法不能去除裂褶菌多糖中的蛋白，此法不适于真菌多糖。

Sevag 法重复 5 次可将含氮量

降至 0.25%，虽溶剂消耗较大，操作繁琐，但去蛋白效果好。等电点法去蛋白不完全，但操作简单且一次可去掉 40%左右的蛋白，故选择将等电点法与 Sevag 法结合，进行去蛋白试验，结果见表 2。

表 1 不同脱蛋白方法对裂褶菌粗多糖含氮量的影响

	粗多糖	Sevag 法 (5 次)	三氯醋酸法	等电点法
含氮量 (%)	7.9	0.25	7.9	4.82

表 2 Sevag 法去蛋白次数对裂褶菌粗多糖含氮量的影响

	等电点法 + Sevag 法 1 次	等电点法 + Sevag 法 2 次	等电点法 + Sevag 法 3 次
含氮量 (%)	2.5	0.69	0.23

从表 2 可看出，将等电点法与 Sevag 法结合，Sevag 法只需 2 次即可将含氮量降至 0.69%，去蛋白效果极好，既简化了工艺又节约了溶剂，因此确定等电点法 + Sevag 法 2 次为脱蛋白工艺。

通常真菌多糖脱蛋白选用的是酶法和 Sevag 法^[6]，酶法去蛋白不完全，它的引入又增加了 Sevag 法的负担。而本文所提出的用氨水调节等电点与 Sevag 法相结合的新方法，还未有文献报道。此方法简便有效，尤其适于含氮量较低的真菌多糖。

2.2 纯度鉴定

SephadexG-200 凝胶柱层析结果如图 3 所示为单一峰，聚丙烯酰胺凝胶电泳为单一一条带，液相色谱结果如图 4 所示为单一峰，说明裂褶菌多糖为均一组分。

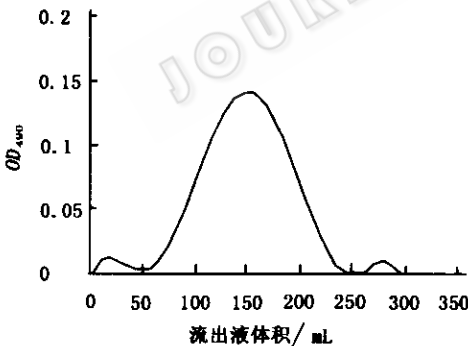


图 3 SephadexG-200 凝胶柱层析图谱

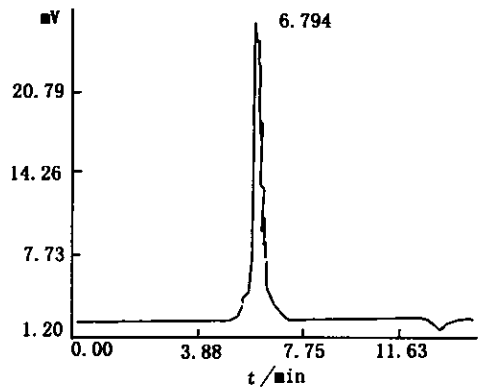


图 4 裂褶菌多糖高效液相色谱图

裂褶菌多糖紫外扫描结果如图 5 所示，未发现核酸吸收峰 (260nm ~ 290nm) 及蛋白质吸收峰 (250nm ~ 300nm)，证明裂褶菌多糖溶液中无核酸及蛋白。

2.3 分子量测定

经 Waters244 型高效液相色谱测定，Waters410 视差检测器检测，其出峰时间与分子量为 40kD 的标准蓝色葡聚糖一致，故确定裂褶菌多糖分子量为 40kD。

2.4 裂褶菌胞外多糖结构鉴定

2.4.1 单糖组分分析: 纸层析结果为裂褶菌多糖水解液为单一斑点, 其 R_f 值与葡萄糖一致, 证明裂褶菌多糖是由葡萄糖组成的。

标准单糖与裂褶菌多糖单糖组分的气相色谱如图 6、7 所示。图 6 有 5 个峰, 分别为木糖、内标物、甘露糖、葡萄糖、半乳糖。其中葡萄糖的绝对保留时间为 19.482, 相对保留时间为 1.084。而图 7 有两个峰, 其一为内标峰, 另一为裂褶菌多糖的单糖组分峰。单糖组分峰的绝对保留时间为 19.382, 相对保留时间为 1.069, 与标准单糖图谱中的葡萄糖一致, 故可证明裂褶菌多糖是由单一组分葡萄糖所聚合而成的。

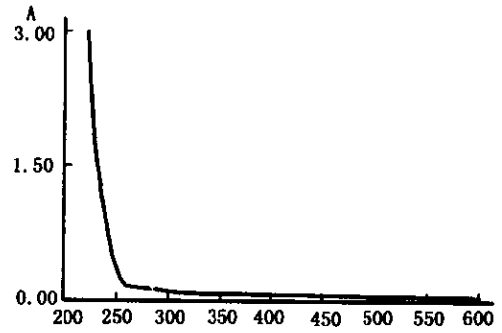


图 5 裂褶菌多糖紫外图谱

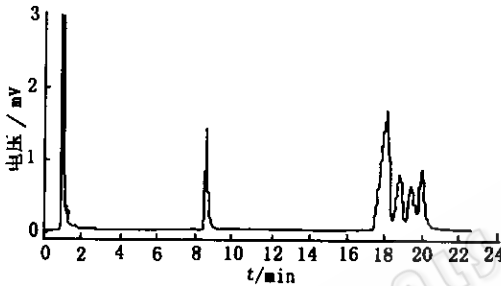


图 6 标准单糖气相色谱的测定

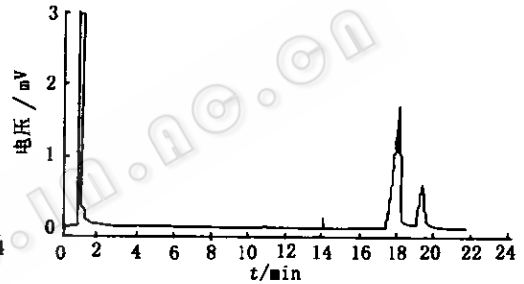


图 7 裂褶菌多糖单糖组分气相色谱的测定

2.4.2 红外光谱: 红外光谱如图 8 所示, 显示裂褶菌多糖在 $3,200 \sim 3,600 \text{ cm}^{-1}$ 的宽峰是 O-H 伸缩振动。 $2,800 \sim 3,000 \text{ cm}^{-1}$ 的峰为糖类 C-H 伸缩振动, 在这个区域的吸收峰是糖类的特征吸收峰。 $1,200 \sim 1,400 \text{ cm}^{-1}$ 的不太尖的吸收峰是 C-H 的变角振动。 $1,000 \sim 1,200 \text{ cm}^{-1}$ 的比较大的吸收峰是由两种 C-O 伸缩振动所引起的。 888.87 cm^{-1} 处的吸收峰为吡喃糖 β 型 C-H 的变角振动的特征吸收峰, 吡喃糖是不会有这种吸收峰的, 故可知糖苷键为 β 型, 糖环形态为吡喃糖环^[7,8]。

2.4.3 酶解反应: 经斐林法测定, 淀粉酶 (α -淀粉酶和糖化型淀粉酶) 酶解产物中未检测出还原糖, 证明裂褶菌多糖不含有 α (1 \rightarrow 4) 糖苷键。而多糖溶液可被蜗牛酶酶解, 表明含有 β (1 \rightarrow 3) 糖苷键。

2.4.4 高碘酸氧化: 裂褶菌多糖经高碘酸钠氧化 14d, 平均每摩尔已糖消耗高碘酸盐 0.58mol, 产生甲酸 0.28mol, 高碘酸的消耗是甲酸生成的 2 倍, 多糖中以 1 \rightarrow 6 位键合的糖基或非还原末端基经高碘酸氧化, 消耗二分子高碘酸同时释放一分子甲酸, 由此可知, 裂褶菌多糖溶液含有 β (1 \rightarrow 6) 糖苷键。

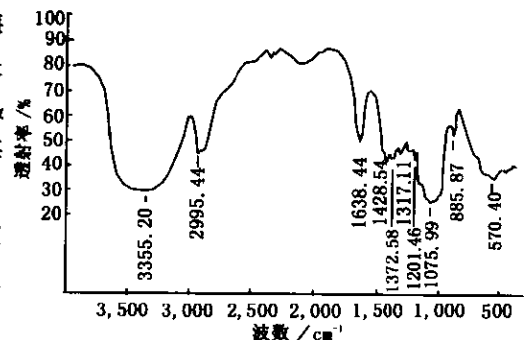


图 8 裂褶菌多糖红外图谱

2.5 性状

裂褶菌多糖醇析物为白色纤维状, 冷冻干燥海绵状, 无臭, 无味。溶于水, 水溶液粘稠。不溶于乙醇、乙醚、异丙醇、丙酮、氯仿等有机溶剂。pH 中性。苯酚-硫酸试剂反应呈红色。

综上分析, 裂褶菌多糖是由单一组分葡萄糖组成, 糖苷键为 β 型, 糖环形态为吡喃型, 并含有 β -(1-3)和 β -(1-6)糖苷键, 分子量40kD, 这与文献报道的裂褶菌多糖结构为 β -(1-6)分支的 β -(1-3)-D葡聚糖是一致的^[2], 但分子量较小。动物试验证明裂褶菌的胞外多糖对机体的免疫功能有一定促进作用, 并可恢复老年动物低下的细胞免疫及体液免疫功能, 对延缓衰老有一定的意义^[8]。

参考文献

- [1] 韦伯斯特 J 著, 张素轩译. 真菌导论. 北京: 中国林业出版社, 1982. 230.
- [2] Udo R. Methods in Biotechnology, 1999, 10 (Carbohydrate Biotechnology Protocols): 43 ~ 45.
- [3] Moo-Sung K, Kyung-Mok P, Ih-Seop C, et al. Allured's Cosmetics & Toiletries magazine, 2000, 115 (7): 79 ~ 86.
- [4] 方积年. 药学通报, 1984, 19 (10): 46 ~ 49.
- [5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术, 浙江: 浙江大学出版社, 1999. 40 ~ 41.
- [6] 李平作, 章克昌. 微生物学报, 2000, 40 (2): 217 ~ 220.
- [7] 雷德柱, 于淑娟, 曹珍年. 菌物系统, 2002, 21 (2): 280 ~ 282.
- [8] 李兆兰, 李学信. 真菌学报, 1994, 13 (4): 267 ~ 272.
- [9] 夏冬, 林志彬, 马莉, 等. 药学学报, 1990, 25 (3): 161 ~ 166.