

灵芝子实体多糖的分离纯化、组成及其免疫活性研究

Study on isolation, purification, composition and immunological characteristics of *Ganoderma Lucidum* body polysaccharides

杨慧¹ 戴军¹ 陈尚卫² 朱松²

YANG Hui¹ DAI Jun¹ CHEN Shang-wei² ZHU Song²

(江南大学食品与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:从一种新菌株培育的赤芝子实体中提取分离得到两个分子量均为 500 万以上的水溶性灵芝多糖组分 GLPD1 与 GLPD2; SEC—LLS 分析结果显示两者均为高支化的紧缩结构。PMP 柱前衍生化反相色谱分析结果表明 GLPD1 与 GLPD2 的单糖组成有显著差异, 即 GLPD1 的单糖组成摩尔百分比为 Man : GlcN : Rib : Rham : GalUA : GalN : Glc : Gal : Xyl : Fuc = 3.7 : 0.8 : 0.16 : 6.8 : 0.7 : 0.29 : 77 : 9.27 : 0.16 : 1.1; 而 GLPD2 的摩尔比 Man : GlcN : Rib : Rham : GalUA : GalN : Glc : Gal = 10.6 : 2.0 : 0.97 : 10.72 : 0.65 : 0.99 : 64.51 : 9.52。傅立叶红外光谱分析发现两者异头碳连接方式均为 β -构型。体外促进正常小鼠脾淋巴细胞增殖活性试验结果表明, 这 2 个多糖级分均具有一定的免疫活性, 且在 50, 200, 500 mg/mL 3 个浓度下 GLPD2 的免疫活性均比 GLPD1 要高, 且 GLPD2 促进正常小鼠脾淋巴细胞增殖活性有量效相关性。

关键词:灵芝多糖; GPC; SEC—LLS; 单糖组成; 免疫活性

Abstract: Two water-soluble polysaccharide fractions named as GLPD1 and GLPD2 were isolated and purified from the same *Ganoderma Lucidum* body which was collected from Jiangxi province. The GPC and SEC—LLS results indicated that GLPD1 and GLPD2 were high purity, moreover, their molecule weights could both reach above 5×10^6 . Their primary structural features and conformational properties were characterized by infrared spectrometry and SEC—LLS. The data obtained indicated that GLPD1 and GLPD2 may both be β -glucan configuration with pyran glucan groups. What's more, conformational analysis detected by SEC—LLS showed that GLPD1 and GLPD2 had rather tight structure with high degree of branch. However, PMP—HPLC analysis found out that GLPD1 and GLPD2 were quite different from each other. To clarify this, the Monosaccharide composition mole percentage ratios were listed. GLPD1 :

Man : GlcN : Rib : Rham : GalUA : GalN : Glc : Gal : Xyl : Fuc = 3.7 : 0.8 : 0.16 : 6.8 : 0.7 : 0.29 : 77 : 9.27 : 0.16 : 1.1; GLPD2 : Man : GlcN : Rib : Rham : GalUA : GalN : Glc : Gal = 10.6 : 2.0 : 0.97 : 10.72 : 0.65 : 0.99 : 64.51 : 9.52. In the end, compared the immunological activity with normal mice spleen lymphocyte proliferation promotion activity which were significant difference. It provide reliable basis for the culture of this kind of *Ganoderma Lucidum*.

Keywords: *Ganoderma Lucidum* polysaccharides; GPC; SEC—LLS; monosaccharide composition; immunological activity

国内外的研究^[1]表明, 灵芝的药理活性归因于其中含有的多糖、三萜、腺苷、生物碱、甾醇和有机锗等, 而灵芝多糖 (*Ganoderma Lucidum* polysaccharides, GLP) 是其重要功能成分之一, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老等重要的药理活性^[2-7]。其活性与多糖的组成和结构密切相关^[8]。

目前, 越来越多的学者^[9-11]将灵芝多糖进行分离纯化后, 进一步研究它们的结构、组成及活性特征, 从而对灵芝多糖的活性作用机制或具体的结构组成对活性的影响获得更深入的了解, 但很少有学者从一种灵芝子实体多糖中分离出两种分子量在 400 万以上的灵芝多糖组分并对其进行比较。本试验为考察和探明江西某企业自主研发的新菌株培育的赤芝子实体的多糖组成特性及其免疫活性, 对其多糖进行分离纯化后, 分别利用高效液相色谱 (HPSEC)、PMP 柱前衍生化反相高效液相色谱 (RP—HPLC) 及红外光谱 (FT—IR) 和光散射 (SEC—LLS) 等技术分析研究了该多糖不同纯化级分的单糖组成、分子量分布、异头碳连接方式、链构象特性及其免疫活性, 为该灵芝品种的进一步优化及其产品研发提供了基础性科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

高效液相色谱仪: Waters 1525 型, 安捷伦科技有限公

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31171688)

作者简介: 杨慧 (1987—), 女, 江南大学在读硕士研究生。

E-mail: chgtheyanghui@163.com

通讯作者: 戴军

收稿日期: 2014—10—21

司;

示差折光检测器:2414型,美国 Waters Corporation 公司;

高速冷冻离心机:Beckman J-26xp型,美国 Beckman Coulter Inc 公司;

冷冻干燥机:SCIENTZ-10N型,宁波新芝生物股份有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9053A型,上海沪西分析仪器厂。

1.1.2 试剂及样品

1-苯基-3-甲基-5-吡唑琳酮(PMP):99%,美国 Acros Organics 公司;

乙腈:HPLC级,美国 Tedia 公司;

三氟乙酸(TFA):>99%,国药集团化学试剂有限公司;

胎牛血清:杭州四季青生物工程材料有限公司;

DMEM 培养液:美国 GIBCO 生命技术公司;

MTT:美国 Biosharp 公司;

二甲亚砜(DMSO):分析纯,无锡市展望化工试剂有限公司;

C57 雄性小鼠:体重为(25±3)g,苏州爱尔麦科技有限公司;

灵芝子实体:由江西某企业提供。

1.2 试验方法

1.2.1 灵芝多糖的提取与分离纯化

(1) 灵芝多糖的提取:将两种不同的灵芝子实体样品置于 35℃真空干燥箱中烘干,切片粉碎。准确称量一定量的灵芝子实体,按料液比 1:20(*m*:*V*)加入纯水于 100℃下水浴回流提取 6 h,水提液浓缩后加入 3 倍体积的 95%的乙醇醇沉,4℃下静置过夜,离心(4 000 r/min,20 min)得到的沉淀再分别用 95%乙醇、无水乙醇洗涤过滤后于 40℃真空干燥后即得灵芝粗多糖备用。

(2) 灵芝多糖脱色及脱蛋白:将上述灵芝粗多糖配成约 5 mg/mL 的多糖水溶液 50 mL,加入 AB-8 树脂 2.5 g,在 pH 为 3.0,温度为 50℃的水浴振荡条件下脱色 6 h^[12],脱色之后的多糖溶液置于离心管中按 5:1(*V*:*V*)加入 Sevag 试剂($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$ 的混合液),置于离心管中,振荡 30 min后,静置分层将白色絮状物和氯仿相去除,重复此过程直到白色絮状物不再出现为止。

(3) 灵芝多糖的分离纯化:将 1.2.1(2)处理后的灵芝多糖通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱(3.2 cm×25 cm)进行分离。用自动收集器分别收集洗脱液 200 管,前 100 管以 pH 7.8 0.02 N Tris—HCl 溶液为洗脱液,后 100 管以 0.01~1.00 M NaCl+0.02 M Tris—HCl 溶液梯度洗脱,流速为 8 mL/min,每分钟收集 1 管。以苯酚硫酸法^[13]跟踪检测各个管的多糖含量,每 5 管取 1 mL 绘制多糖洗脱曲线并分步收集各多糖组分,获得的级分用截留分子量为 30 万的

透析袋蒸馏水中透析 48 h 去除 30 万以下的组分以及盐离子,减压旋蒸浓缩(-0.1 MPa)后冻干备用。

1.2.2 HPSEC 分析

(1) 色谱条件:色谱柱:Shodex OHpak SB-803 和 805HQ 8.0mmID×300mmL 两根根柱串联;检测器:示差折光检测器;流动相:0.1 M NaNO₃;流速:0.8 mL/min;柱温:30℃;进样体积:20 μL。

(2) 样品相对分子量分布:将不同分子量的葡聚糖标准品配成约为 3 mg/mL 的溶液进样分析。根据每个标样的保留时间和对应分子量由 GPC 软件做出分子量校正曲线,同样条件下将多糖样品进样分析,根据样品峰数据由 GPC 软件计算出多糖样品相对分子量及其分布。

1.2.3 多糖样品完全酸水解 将得到的多糖各个级分别配成浓度约为 5 mg/mL 的水溶液。吸取 500 μL 溶液于具塞试管中,加入 500 μL 2 M TFA 溶液,充分混匀后充入 N₂封管,置于 110℃烘箱中水解 120 min,取出冷却至室温,加入同体积的甲醇,氮气吹干,重复 3~4 后以 1 mL 超纯水溶解^[14]。

1.2.4 混合单糖标样及灵芝多糖样品的 PMP 衍生化 取 100 μL 的混合单糖标准液(各单糖质量浓度均为 3 mg/mL 左右)与等体积 0.6 M NaOH 溶液混合均匀,取 50 μL 上述混合液于 5 mL 具塞试管中,加入 50 μL 0.5 M 的 PMP 甲醇溶液,旋涡混匀;70℃下反应 100 min 中,取出冷却至室温,加 60 μL 0.3 M 的 HCl 溶液中和,再加水补至 1 mL 后混匀,然后加入等体积的氯仿,剧烈振摇,待静置分层后,弃去下层有机相,如此重复 3 次,得到的上层水相过 0.45 μm 微孔滤膜,进样分析^[14]。

灵芝多糖样品水解产物的 PMP 衍生化方法与混标衍生化方法相同。取 1.2.3 所得的多糖水溶液 100 μL,按 1.2.4 方法同样进行 PMP 衍生化处理,过微孔滤膜后供进样分析。

1.2.5 傅立叶红外(FT—IR)光谱分析 取各组分冻干样品 3 mg 左右放入研钵中,加适量溴化钾充分研磨后压片,4 000~400 cm⁻¹ 区间扫描,扫描 32 次,分辨率为 4 cm⁻¹。

1.2.6 体积排阻色谱和光散射仪联用 采用体积排阻色谱和光散射仪联用装置(SEC—LLS)测试试样的重均分子量(*M_w*)、均方根旋转半径($S^2 > Z^{1/2}$ 或者称为 RMS)及多分散系数(*M_w*/*M_n*)。激光光散射仪为美国 Wyatt 技术公司 DAWN DSP 多角度激光光散射仪(MALLS, DAWN DSP, Wyatt Technology Co., Santa Barbara, CA, USA),波长为 633 nm。体积排阻色谱装置分别使用水体系的 Shodex OHpak SB-805HQ 和 Shodex OHpak SB-804 HQ 色谱柱串联和泵(Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA)及示差折光检测器(RI-150, Thermo Finnigan, USA)。试验过程中以 0.2 M 的 NaCl 水溶液及 2×10⁻⁵ M 的叠氮化钠作为流动相。多糖分别溶于 0.2 M 的 NaCl 水溶液中,配制浓度为 1 mg/mL。进样前样品及流动相需经过 0.2 μm 滤膜过滤。测试温度 25℃,进样量 200 μL,流速 0.5 mL/min。

1.2.7 灵芝多糖促进正常小鼠脾淋巴细胞增殖试验 参照

文献[15]进行。

2 结果与讨论

2.1 灵芝多糖的分离分级及其纯化产品的组成

以 DEAE-Sepharose Fast Flow 对脱色脱蛋白之后的灵芝多糖进行分离,用自动收集器收集洗脱液,控制流速 8 mL/min,苯酚—硫酸法跟踪检测洗脱液的浓度,并以管数为横坐标,吸光值 A_{490} 为纵坐标绘制洗脱曲线,得到的洗脱曲线见图 1。将洗脱曲线中不同的多糖级分分别收集、浓缩、透析后冻干即得到 2 个多糖级分,分别为 GLPD1, GLPD2。GLPD1 和 GLPD2 的化学组成见表 1。

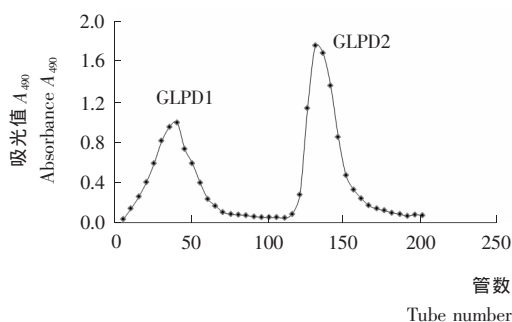


图 1 灵芝多糖过 DEAE Sepharose Fast Flow 洗脱曲线

Figure 1 Elution profile of the crude polysaccharide sample by ion exchange chromatography on DEAE Sepharose Fast Flow

表 1 GLPD1、GLPD2 的化学组成

样品名称	总糖	蛋白质	灰分	水分
GLPD1	88.74	3.11	1.38	6.77
GLPD2	87.18	2.74	2.96	7.12

2.2 HPSEC 测定的相对分子量

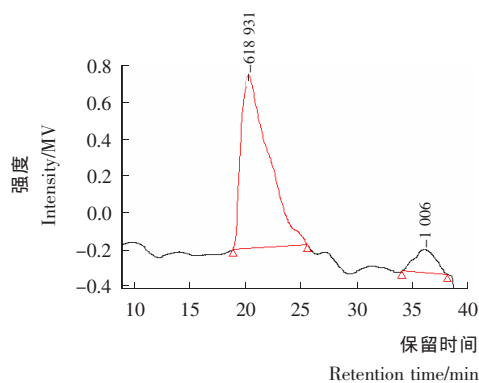
将 GLPD1 与 GLPD2 配制成浓度约为 3~5 mg/mL 的多糖溶液,进行 HPSEC 分析。其结果(图 2)表明两种多糖级分的纯度较高,均可以达到 85%以上,且重均分子量分别为 440,427 万左右(图中所示为质均分子量)。

2.3 灵芝多糖的单糖组成分析

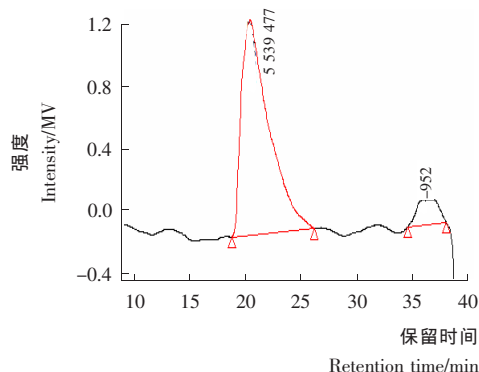
按 1.2.3 和 1.2.4 方法测得灵芝子实体多糖 GLPD1 与 GLPD2 的单糖组成见表 2,图 3 为 12 种单糖混标的 PMP 衍生物的 HPLC 图谱。由表 2 可知,两种灵芝多糖级分的单糖的种类及各单糖的比例有较大差异。

2.4 灵芝多糖级分红外光谱分析

为了分析纯化的灵芝多糖级分的功能基团,使用傅立叶红外光谱仪检测了灵芝多糖级分在 4 000~400 cm^{-1} 的红外吸收,结果见图 4。红外光谱图显示,2 种灵芝多糖组分的特征峰主要出现在 3 380,2 924,1 650,1 378,1 060,894 cm^{-1} 处,这些都明显是多糖的特征吸收峰。其中 3 380 cm^{-1} 左右



(a) GLPD1



(b) GLPD2

图 2 GLPD1 与 GLPD2 的 GPC 分析图谱

Figure 2 GPC elution profile of GLPD1 and GLPD2

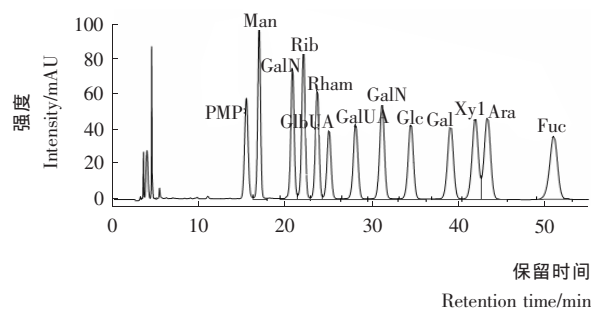


图 3 12 种单糖 PMP 衍生物的 HPLC 图谱

Figure 3 Chromatograms of PMP derivatives of twelve kinds of monosaccharides by HPLC

出现的宽峰是由 O—H 的伸缩振动所引起,2 924 cm^{-1} 左右出现的较弱的峰是由于 C—H 的伸缩振动,而 1 650 cm^{-1} 处出现的较强的峰由 C—O 伸缩振动引起,1 375 cm^{-1} 附近出现的峰是由于 C—H 的变角振动,1 058~1 072 cm^{-1} 附近出现的较宽的峰是常见的 C—O—C 和—OH 特征共振吸收峰。在 894 cm^{-1} 左右较小的吸收峰是典型的吡喃葡聚糖和 β -型糖苷键连接特征吸收峰。该结果表明两个灵芝多糖级分的异头碳均为 β 构型^[16]。

2.5 SEC—LLS 测定灵芝多糖组分子量及链构象

体积排除色谱和光散射仪联用技术(SEC—LLS)是一种

表 2 灵芝子实体多糖的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of GLPD1 and GLPD2 /mol%

多糖级分	Man	GlcN	Rib	Rham	GalUA	GalN	Glc	Gal	Xyl	Fuc
GLPD1	3.70	0.80	0.16	6.80	0.70	0.29	77.00	9.27	0.16	1.10
GLPD2	10.60	2.00	0.97	10.72	0.65	0.99	64.51	9.52	0.00	0.00

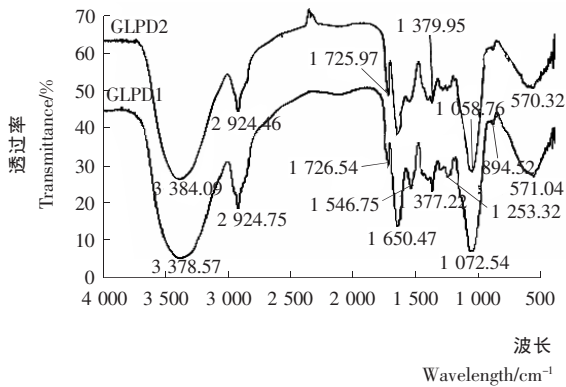


图 4 GLPD1 与 GLPD2 的红外光谱图

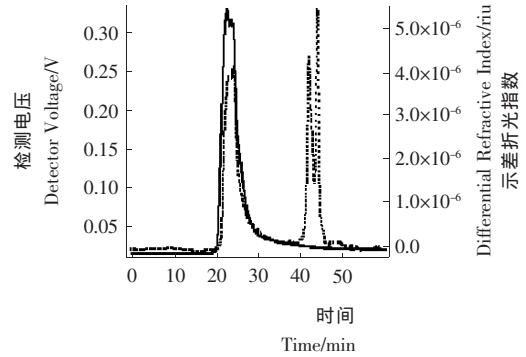
Figure 4 FT-IR spectrum of the polysaccharide fraction GLPD1 and GLPD2

测试高聚物绝对分子量 M_w 、 $\langle S^2 \rangle > Z^{1/2}$ 以及 M_w/M_n 的有力工具^[17]。通过 SEC—LLS 联用技术检测到的 SEC 谱图是由无数个试验点组成的,可以看成是由无数个单分散的级分组成。因此,可以利用这些级分点建立 M_w 和 $\langle S^2 \rangle > Z^{1/2}$ 二者之间的关系式,即 $\langle S^2 \rangle > Z^{1/2} = f(M_w)$ ^[18]。由 SEC—LLS 测得的 GLPD1 和 GLPD2 分子量及激光光散射信息见图 5。GLPD1 及 GLPD2 的分子量及其链构象参数见表 3。

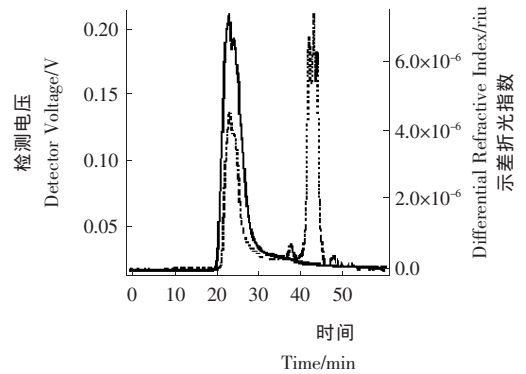
由图 5 可知,两种多糖级分纯度均较高;GLPD1 与 GLPD2 由 SEC—LLS 测得的结果均比 2.2 中测得的结果要高,这主要归因于 HPSEC(示差折光检测)测定的结果一般为相对分子质量,而非绝对分子量(由于该法制作分子量校正曲线所用标准品的多糖组成结构与实际样品有一定差异,且本试验标准品最大分子量为 200 万,大于 200 万的分子量结果是由分子量校正曲线外推所得)。表 3 中的 α 值与高分子的构象有直接联系,通常情况下, α 值为 0.2~0.4 时,高分子为高支化的紧缩链构象, α 值等于 0.3 时其接近球形链构象;0.5~0.6 时,高分子为柔性链;0.6~1.0 时,高分子为半刚性链^[18]。而 α 的计算是由 M_w 和 $\langle S^2 \rangle > Z^{1/2}$ 的依赖关系获得,通过 SEC—LLS 的谱图上的大量数据点可以得到高聚物在稀溶液中的函数方程 $\langle S^2 \rangle > Z^{1/2} = kM_w^\alpha$,根据图 6 中的截距与斜率可以求出 α 值。

由表 3 可知,GLPD1 与 GLPD2 的 α 值分别为 0.15, 0.19, 接近 0.2,此外,图 6 表现出明显的 U 型^[17],这说明灵芝多糖级分在 0.2 M NaCl 中为高支化的紧缩结构。

2.6 灵芝多糖体外对正常小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响
灵芝多糖对正常小鼠脾淋巴细胞增殖作用体外试验结



(a) GLPD1



(b) GLPD2

图中虚线为激光光散射信号,实线为示差折光信号

图 5 GLPD1 和 GLPD2 的 SEC—LLS 检测图谱

Figure 5 The SEC—LLS spectra of GLPD1 and GLPD2

表 3 GLPD1 及 GLPD2 分子量及构象参数

Table 3 Molecular weight and conformation parameter of GLPD1 and GLPD2

样品名称	M_w	M_w/M_n	α
GLPD1	1.218×10^7	1.157	0.15
GLPD2	7.087×10^6	1.136	0.19

果(见图 7)表明,GLPD1 与 GLPD2 两个多糖级分均对小鼠脾淋巴细胞增殖有一定的促进作用,且 GLPD2 对促脾淋巴细胞增殖具有明显的量效关系,在浓度达到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时促进作用最强。而 GLPD1 促进脾淋巴细胞增殖活性明显低于 GLPD2,且其活性与浓度之间无明显的量效关系。

3 结论

从一种新菌株培育的赤灵芝实体中提取分离灵芝多糖,

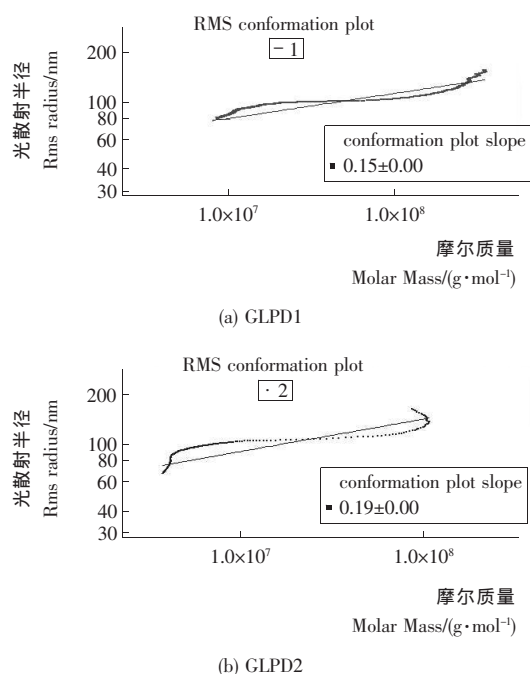


图 6 GLPD1 和 GLPD2 的 RMS 构象图
Figure 6 Dependence of RMS on Mw for
GLPD1 and GLPD2

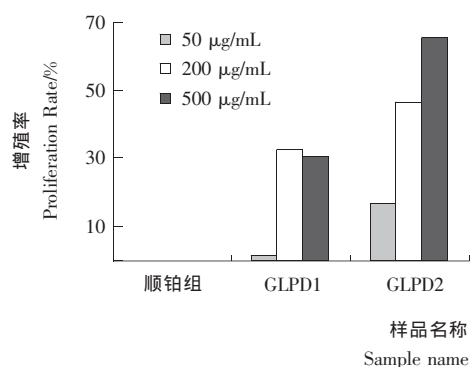


图 7 GLPD1 与 GLPD2 促进脾淋巴细胞增殖率
Figure 7 Effect of GLPD1 and GLPD2 on the
proliferation of splenocytes

最终得到两种分子量较大(相对分子量均可达 400 万 Da 以上)且单糖组成不同的水溶性灵芝多糖组分 GLPD1 与 GLPD2;SEC—LLS、PMP 柱前衍生化反相色谱和傅立叶红外光谱分析结果显示两者均为高支化的 β -杂多糖。体外促进正常小鼠脾淋巴细胞增殖活性试验结果表明,两个多糖组分均具有一定的免疫活性,GLPD2 的免疫活性均比 GLPD1 高,且 GLPD2 促进正常小鼠脾淋巴细胞增殖活性具有量效相关性。

参考文献

1 谭伟,郑林用,郭勇,等. 灵芝生物学及生产新技术[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2007:1.

2 张晓云,杨春清. 灵芝的化学成分和药理作用[J]. 国外医药·植物药分册,2006,21(4):152~155.

3 杨占涛,刘超,李月,等. 灵芝多糖的研究现状[J]. 安徽农业科学,2008,36(20):8 651~8 652,8 739.

4 向俊宇,许安,夏悉,等. 灵芝多糖的研究进展[J]. 药学实践杂志,2010,28(4):241~244.

5 钼晓艳,张日俊,张功,等. 灵芝多糖的结构及功能研究[J]. 饲料研究,2004(12):37~39.

6 Bao Xing-feng, Liu Cui-ping, Fang Ji-nian, et al. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma Lucidum* (Fr.) Karst [J]. Carbohydrate Research, 2001(332):67~74.

7 Chen Yi, Xie Ming-Yong, Nie Shao-ping, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. Food Chemistry, 2008(107): 231~241.

8 Nie Shao-ping, Zhang Hui, Li Wen-juan, et al. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(1):10~20.

9 Huang Sheng-quan, Li Jin-wei, Li Yu-qiang, et al. Purification and structural characterization of a new water-soluble neutral polysaccharide GLP-F1-1 from *Ganoderma lucidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecular, 2011(48):165~169.

10 Dong Qun, Wang Ying, Shi Lei, et al. A novel water-soluble β -D-glucan isolated from the spores of *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Research, 2012(353):100~105.

11 Zhao Li-yan, Dong Yan-hong, Chen Gui-ting, et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010(80): 783~789.

12 曹鹏伟,彭奇均,戴军,等. D392 树脂对灵芝多糖色素吸附行为研究[J]. 化工技术与开发, 2009,38(7):14~17.

13 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1994:32,46,89,256.

14 Dai Jun, Wu Yan, Chen Shang-wei, et al. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Duneliella salina* by modified RP—HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3):629~635.

15 王浩豪. 灵芝孢子粉多糖色谱指纹图谱及其免疫活性谱效关系的研究[D]. 无锡:江南大学,2012.

16 王建国. 灵芝多糖的结构及生物活性研究[D]. 武汉:武汉大学,2010.

17 李盛. 香菇三螺旋葡聚糖氢键键合作用及其功能化研究[D]. 武汉:武汉大学,2013.

18 张俐娜,薛奇,莫志深,等. 高分子物理近代研究方法[M]. 武汉:武汉大学出版社,2003.