

灵芝菌丝体多糖的分离纯化及其单糖组成 分析与分子量测定

Separation, monosaccharide composition and molecular weight analysis of
polysaccharide from *G. lucidum* mycelium

王海燕¹ 戴军¹ 陈尚卫²

WANG Hai-yan¹ DAI Jun¹ CHEN Shang-wei²

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214022; 2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214022)

(1. Food Academy of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214022, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology in Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214022, China)

摘要:前期杂交优化后赤芝菌种经液体深层发酵后,提取灵芝菌丝体多糖,并过 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱分离纯化,利用高效体积排阻色谱(HPSEC)检测多糖级分的纯度,采用完全酸水解 PMP 柱前衍生化 RP-HPLC 测定多糖级分的单糖组成,多角度光散射仪联用装置(SEC-MALLS)测定其绝对重均分子量(M_w),并且根据分子旋转半径与分子摩尔数的关系曲线斜率初步推断其空间构象。结果显示:分离纯化得到 3 个多糖级分 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3, HPSEC 检测其峰面积百分比分别为 93.58%, 97.64%, 99.19%, 单糖组成分析结果表明 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 均含有甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖,但单糖摩尔比各异。SEC-MALLS 测试 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 的 M_w 分别为 4.526×10^5 , 4.603×10^4 , 3.760×10^3 g/mol, 3 个多糖级分构象可能均为高度紧缩且具有分支结构的聚合物。

关键词:灵芝;菌丝体;多糖;级分;分离纯化;分子量

Abstract: The polysaccharide was extracted from *G. lucidum* mycelium by submerged fermentation after previous hybrid optimization. The polysaccharide of *G. lucidum* mycelium was separated by DEAE Sepharose fast flow column. Then we used high volume exclusion chromatography (HPSEC) to explore purity of three polysaccharide fractions and complete acid hydrolysis and PMP pre column derivatization RP-HPLC to measure the monosaccharide composition of them. At last, multi angle light scattering instrument combined with

device (SEC-MALLS) was used to measure the M_w of polysaccharide fractions, while the slope of curves between the molecular rotation radius and molecular molar of moles inferred the space conformation of them. HPSEC results showed that the purified of GLMP1, GLMP2 and GLMP3 were 93.58%, 97.64% and 99.19%. Monosaccharide composition analysis showed that mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose, xylose, arabinose and fucose were contained in GLMP1, GLMP2 and GLMP3, however they had different molar ratios of monosaccharide. SEC-MALLS tested the absolute weight-average molecular weights (M_w) of GLMP1, GLMP2 and GLMP3 respectively were 4.526×10^5 , 4.603×10^4 and 3.760×10^3 g/mol and it suggested that the conformations of the three polysaccharide fractions maybe were polymers which were high tightening and having branched structures.

Keywords: *G. lucidum*; mycelium; polysaccharide; fraction; purification; molecular weight

灵芝(*G. lucidum*)属担子菌纲、多孔菌目、灵芝科、灵芝属^[1],按其生长过程可分为菌丝体、子实体和孢子粉 3 个阶段。中国灵芝属真菌有 75 种,常见的有赤芝、紫芝、黑芝、松杉灵芝等。近年来,研究发现灵芝具有降血糖^[2,3]、降血脂^[4]、免疫调节^[5]、抗肿瘤^[6]、抗氧化^[7]等保健功能,其主要功效成分为多糖和三萜^[8]。

作为灵芝的主要活性物质之一,灵芝多糖类产品受到人们青睐。野生灵芝极为有限,传统的固体培养基培植法受到生产周期长、生产效率低等制约,无法实现大规模工业化生产;液体深层发酵灵芝菌丝体多糖具有含量高、培养周期短、可大规模生产和易于标准化等优点^[9],因此其成为研究热点。

基金项目:国家自然科学基金(编号:31171688)

作者简介:王海燕(1990—),女,江南大学在读硕士研究生。

E-mail: yichenwhy@163.com

通讯作者:戴军

收稿日期:2015-07-30

目前,关于灵芝菌丝体多糖的研究主要包括发酵优化、结构分析和活性检测等方面^[10-12]。本试验为考察前期优化的赤芝菌种在最佳发酵条件下得到的赤芝菌丝体粗多糖的组成特性,对该粗多糖分离纯化后分别利用高效体积排阻色谱(HPSEC)、PMP柱前衍生化反相高效液相色谱(RP—HPLC)和多角度光散射(SEC—MALLS)等技术分别研究了各级分多糖的单糖组成、分子量分布以及链构象特性,为进一步对该赤芝多糖进行构效关系研究和产品研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

赤芝菌丝体多糖样品:本实验室自制;

阴离子交换凝胶:DEAE-Sephacrose CL-6B型,美国 GE Healthcare 公司;

葡聚糖标准品:Dextran 系列,美国 Sigma 公司;

甘露糖、鼠李糖等 12 种单糖标准品: >97%, 美国 Sigma-Aldrich 公司;

乙腈:色谱纯,美国 Tedia 公司;

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

三氟乙酸:化学纯,国药集团化学试剂有限公司;

盐酸、苯酚、硫酸、三氯甲烷、无水乙醇、硝酸钠、甲醇和氢氧化钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪:Waters 1525 型,美国 Waters 公司;

液相色谱系统:Agilent 1200 型,安捷伦科技有限公司;

多角度激光光散射仪:DAWN8 型,美国 Wyatt 公司;

可见光分光光度计:722N 型,上海精密科学仪器有限公司;

自动收集器及玻璃层析柱(3.2 cm×25 cm):BSZ-100 型,上海沪西分析仪器厂;

旋转蒸发仪:RE52-2 型,上海亚荣生化仪器公司;

恒温水浴锅:HH-2 型,江苏省金坛市新航仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 灵芝菌丝体粗多糖的分离纯化 脱蛋白、脱色后,将灵芝菌丝体多糖配制为浓度 50 mg/mL 的水溶液。样品上 DEAE-Sephacrose Fast Flow 柱(3.2 cm×25 cm),用自动收集器前后分 2 次各收集洗脱液 100 管,第 1 次以 pH 7.8 的 0.02 mol/L Tris—HCl 溶液为洗脱液,第 2 次以 0.01~1.00 mol/L NaCl 溶液和 0.02 mol/L Tris—HCl 溶液梯度洗脱,流速为 8 mL/min,每分钟收集 1 管,每 5 管(每管取 0.2 mL,共 1.0 mL)用苯酚硫酸法^[13]于 490 nm 处测多糖的吸光值。收集主要峰组分,用截留分子量为 3.5×10^3 Da 的透析袋透析 48 h 除盐后冷冻干燥得 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3。

1.2.2 级分多糖的高效体积排阻色谱法(HPSEC)分析 色谱条件参考文献^[14],GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 分别配成

浓度约为 10 mg/mL 的水溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜后进样分析。

1.2.3 级分多糖的单糖组成分析

(1) 样品的完全酸水解:将多糖级分别溶于水配成浓度约为 5 mg/mL 的溶液,吸取 500 μL 溶液于具塞试管中,加入 2 mol/L TFA 溶液 500 μL,充分混匀后充入 N₂ 封管,置于 110 °C 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 次后以 1 mL 超纯水溶解。

(2) 混合单糖标样 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 mol/L 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 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液 50 μL,旋涡混匀;70 °C 下反应 100 min 中,取出冷却至室温,加入 0.3 mol/L 的 HCl 溶液 60 μL 中和 pH,加水定容至 1 mL,再加入的 1 mL 氯仿,振荡使两相充分接触,静置后弃去有机相,重复 3 次以除去多余的 PMP 试剂,将衍生化后的溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,进样分析。级分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。

(3) RP—HPLC 色谱条件:检测器:二极管阵列检测器(DAD);色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm);流动相:0.1 mol/L pH 6.7 磷酸盐缓冲液—乙腈(V/V=83/17);检测波长:245 nm;柱温:30 °C;流速:1 mL/min;进样体积:20 μL。

1.2.4 SEC—MALLS 分析

(1) SEC—MALLS—RI 体系:采用尺寸排除色谱和多角度光散射仪联用装置(SEC—MALLS)测试试样的重均分子量(M_w)、多分散系数(M_w/M_n)及均方根旋转半径(RMS)。多角度激光光散射仪(MALLS)波长为 633 nm,用茁霉多糖($M_w=1.18 \times 10^4$, $M_w/M_n=1.10$)做为标样进行归一化。尺寸排除色谱装置分别使用水体系的 Shodex OHpak SB-805HQ 和 Shodex OHpak SB-804 HQ 两根色谱柱串联和示差折光检测器(RI-150, Thermo Finnigan, USA)。

(2) 测试条件:流动相:0.2 mol/L 的 NaCl 水溶液;流速:0.5 mL/min;测试温度:25 °C;进样量:200 μL。

(3) 样液制备:多糖级分分别溶于 0.2 mol/L 的 NaCl 水溶液中,样品浓度为 1 mg/mL。进样前样品及流动相经过 0.2 μm 滤膜过滤。

2 结果与分析

2.1 灵芝菌丝体多糖的分离纯化

通过 DEAE-Sephacrose Fast Flow 柱的洗脱液以管数为横坐标,吸光值为纵坐标绘制洗脱曲线(图 1),按照出峰顺序先后收集得到 3 个多糖级分分别命名为 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3,级分组分透析除盐后冻干供后续分析。

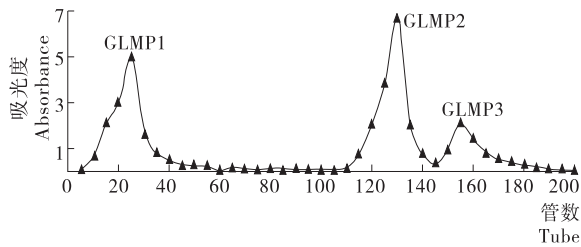


图 1 灵芝菌丝体多糖通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱洗脱曲线

Figure 1 Elution curve of *Ganoderma lucidum* mycelium polysaccharide on DEAE-Sepharose

2.2 级分多糖的高效体积排阻色谱法 (HPSEC) 分析

纯度的概念是随着分离分析手段的进展而不断发展的,多糖是结构复杂的生物大分子,它的纯度只代表多糖在某一链长的平均分布,因此通常意义上的多糖纯度是指多糖在一定分子量范围的均一分布^[15]。高效体积排阻色谱(HPSEC)具有快速、高分辨率和重现性好的优点,是目前最常见的鉴定多糖纯度的方法。由图 2 可知,除少量杂峰外 3 个级分均为单一对称的峰型,可以视为均一的多糖。

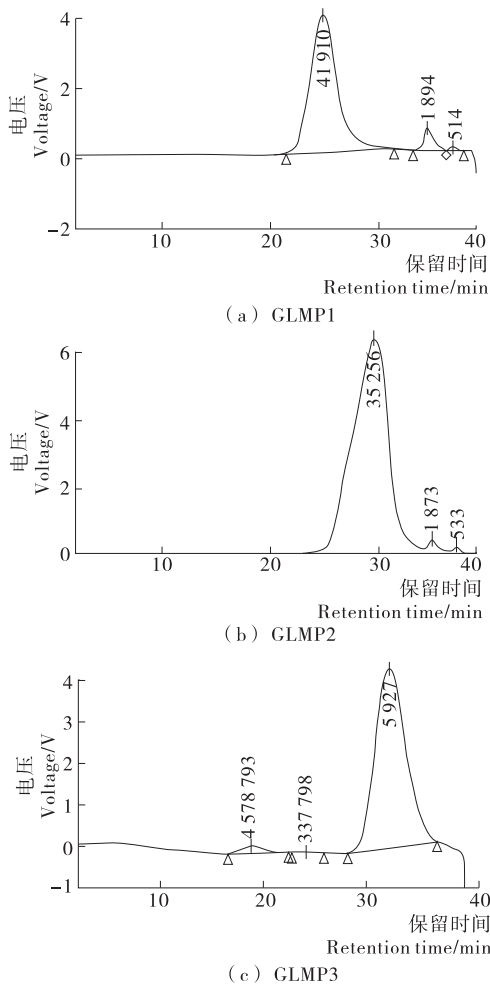


图 2 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 的 HPSEC 图谱
Figure 2 HPSEC elution profile of GLMP1, GLMP2 and GLMP3

根据 HPSEC 图中峰面积的百分比可知,3 个级分多糖的纯度分别为 93.58%, 97.64%, 99.19%, 少量杂峰为分子量 0.5×10^3 Da 左右的多糖小分子。同时,以不同分子量的葡聚糖标准品为标样,根据标样的保留时间和对应分子量做出分子量校正曲线,再由软件计算出级分多糖样品的相对重均分子量(M_w)见表 1。

表 1 3 个级分多糖的相对重均分子量及纯度结果

Table 1 The relative M_w and purity results of three polysaccharide fractions

样品名称	相对重均分子量/Da	纯度/%
GLMP1	46 2363	93.58
GLMP2	65 222	97.64
GLMP3	6 387	99.19

2.3 单糖组成分析结果

12 种单糖标样的 PMP 衍生化 RP-HPLC 色谱图见图 3,在该色谱条件下 12 个单糖峰的分离效果较好。

GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 的单糖组成见图 4~6,与图 3 中标准品的保留时间对照可知,GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 均含有甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara)和岩藻糖(Fuc)。Ferreira 等^[16]研究发现液体深层发酵灵芝多糖的单糖组成中 Ara 来自于发酵液多糖而非菌丝体多糖。

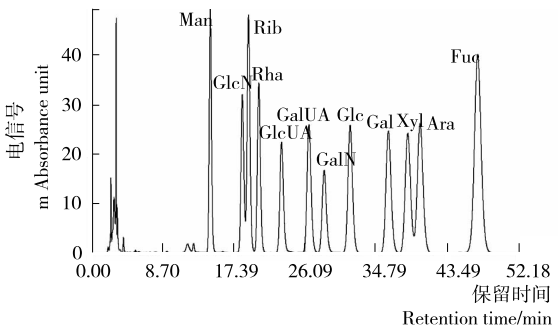


图 3 12 种单糖 PMP 衍生物的 RP-HPLC 图谱
Figure 3 Chromatograms of PMP derivatives of twelve kinds of monosaccharides by RP-HPLC

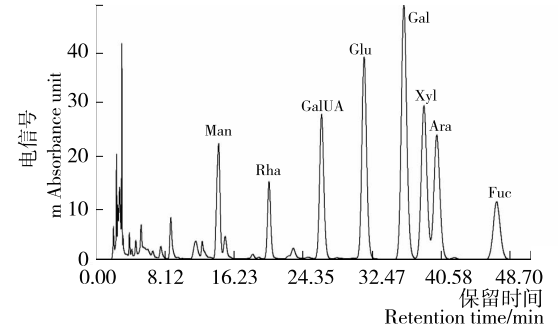


图 4 GLMP1 PMP 柱前衍生化的 RP-HPLC 图谱
Figure 4 RP-HPLC chromatograms of GLMP1 by PMP derivatives

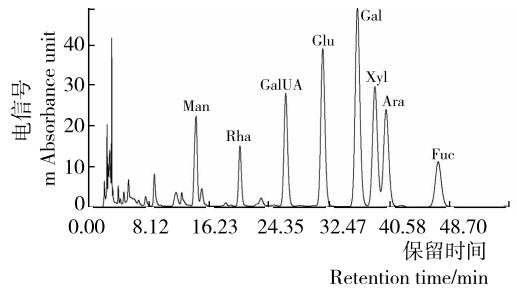


图 5 GLMP2 PMP 柱前衍生化的 RP—HPLC 图谱
Figure 5 RP—HPLC chromatograms of GLMP2 by PMP derivatives

由表 2 可知,3 个多糖级分均含有 Man、Rha、GalUA、Glu、Gal、Xyl、Ara 和 Fuc,但它们的单糖摩尔比差异较大。分子量最大的 GLMP1 中 Xyl 最多,其次是 Gal、Ara 和 Fuc,前期研究^[17]表明 Xyl 有助于提高多糖的抗氧化活性。GLMP2 含 Gal 最多,其次是 Xyl、Glc 和 Ara 且这 3 种单糖

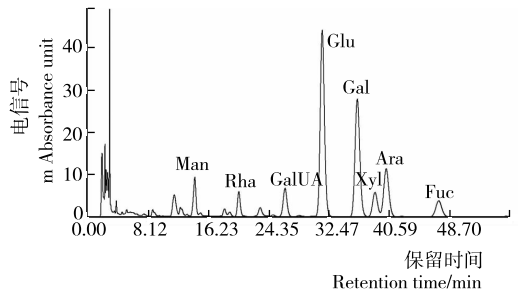


图 6 GLMP3 PMP 柱前衍生化的 RP—HPLC 图谱
Figure 6 RP—HPLC chromatograms of GLMP3 by PMP derivatives

含量接近,单糖组成分析中 Gal 含量较多的多糖可以显著地增强免疫活性^[18]。分子量最小的 GLMP3 中 Glc 含量最多,其次是 Gal,而其他 6 种单糖含量较少。分子量大的 GLMP1 和 GLMP2 中单糖组成种类更丰富,并且表征高生物活性的单糖含量更高。

表 2 3 个级分多糖的单糖组成(摩尔比)

Table 2 Monosaccharide composition of three polysaccharide fractions

多糖级分	甘露糖(Man)	鼠李糖(Rha)	半乳糖醛酸(GalUA)	葡萄糖(Glc)	半乳糖(Gal)	木糖(Xyl)	阿拉伯糖(Ara)	岩藻糖(Fuc)
GLMP1	2.21	2.46	5.36	1.00	7.67	12.85	6.44	5.07
GLMP2	0.40	0.28	0.59	1.00	1.45	1.09	0.93	0.47
GLMP3	0.13	0.10	0.13	1.00	0.73	0.19	0.39	0.15

2.4 多糖级分的液相色谱—多角度激光散射联用(SEC—MALLS)分析

通过示差折光(RI)检测器信号和光散射(90°)获得 3 个多糖级分的色谱图,见图 7。SEC—MALLS 经普适校正测定 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 的绝对重均分子量(M_w)分别为 4.526×10^5 , 4.603×10^4 , 3.760×10^3 g/mol,这与 2.2 中所测得的相对重均分子量有一定差异。HPSEC 方法中,葡聚糖和多糖样品结构有一定的差异性,以葡聚糖为标样测得的相对重均分子量误差更大,不能准确表示级分多糖的分子量。SEC—MALLS 直接测出多糖样品图谱中每个点的绝对分子量,无需进行任何色谱柱标定和标准品参考,测定结果更精确。

此外,分子量分布情况可由 M_w/M_n 的比值显示,当该

值越大时,分子量分布就越宽即分散度就越大。对于窄的分子量分布,其 M_w/M_n 比值接近 1^[19]。由表 3 可知,3 个多糖级分的 M_w/M_n 比值分别为 1.559,1.360,1.125,表明 GLMP1 和 GLMP2 中度分散,而 GLMP3 分子量分布区间较窄。另外,ASTRA 软件分析可获得样品的构象,即由分子旋转半径 RMS 与分子摩尔数之间的关系曲线可得,该关系曲线用 α 表示。Wyatt^[19]认为当 α 值小于或等于 0.33 时大分子是一个紧密均匀的球形构象;而 α 值在 0.2~0.4 可以说明大分子为高支化的紧缩链构象;直线斜率在 0.5~0.6,表明大分子是一个无规则线团构象。3 个级分多糖的 α 值皆在 0.3~0.4,表明 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 均为紧密且具有高度分枝结构的大分子聚合物,其中 GLMP2 可能是球形构象。

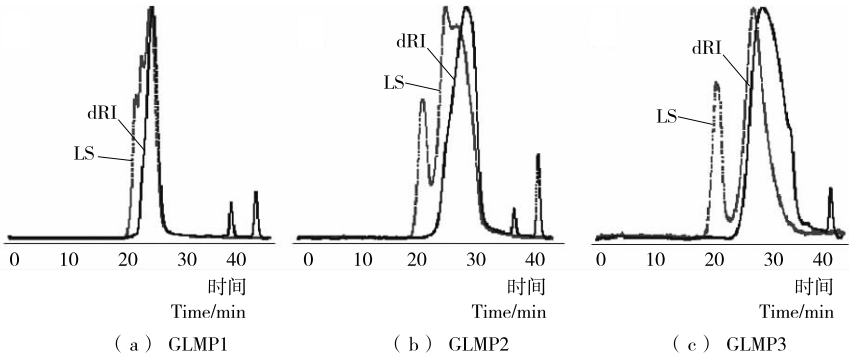


图 7 级分多糖的光散射(LS)和 RI 检测器的色谱图
Figure 7 Chromatograms obtained by SEC with LS and RI of three polysaccharide fractions

表 3 SEC—MALLS—RI 测定多糖级分的分子特性

Table 3 Molecular characteristics of three polysaccharide fractions by SEC—MALLS—RI

样品	折光指数 增量 dn/dc	$Mw/$ ($g \cdot mol^{-1}$)	RMS/nm	Mw/Mn	α
GLMP1	0.145	4.526×10^5	86.3	1.559	0.38
GLMP2	0.142	4.603×10^4	61.2	1.360	0.31
GLMP3	0.141	3.760×10^3	20.6	1.125	0.34

3 结论

前期优化后的赤芝菌种经液体深层发酵,获得的灵芝菌丝体粗多糖经 DEAE-Sepharose CL-6B 分离纯化得到 3 个多糖级分 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3,HPSEC 检测 3 个级分多糖纯度都较高,可视为均一的多糖级分。PMP 衍生化 RP—HPLC 结果显示 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 均含有 Man、Rha、GalUA、Glu、Gal、Xyl、Ara 和 Fuc,与之前报道的灵芝菌丝体多糖的单糖组成略有差异^[20],这可能跟灵芝菌种、培养条件等因素有关。采用 SEC—MALLS—RI 测试 GLMP1、GLMP2 和 GLMP3 的绝对重均分子量(Mw)分别为 4.526×10^5 , 4.603×10^4 , 3.760×10^3 g/mol,并且根据分子旋转半径与分子摩尔数的关系曲线斜率 α 可知,3 个多糖级分构象可能均为高度紧缩且具有分支结构的聚合物。本研究为赤芝菌丝体多糖的构效关系研究提供结构基础,有利于该多糖的产品开发。

参考文献

- 毛健,马海乐. 灵芝多糖的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 295~299.
- Shi Min, Zhang Zhen-ya, Yang Ying-nan. Antioxidant and immunoregulatory activity of Ganoderma lucidum polysaccharide (GLP)[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(1): 200~206.
- Jia Jie, Zhang Xi, Hu Yong-shan, et al. Evaluation of in vivo antioxidant activities of Ganoderma lucidum polysaccharides in STZ-diabetic rats[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 32~36.
- Yang Qian, Wang Si-wang, Xie Yan-hua, et al. HPLC analysis of Ganoderma lucidum polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(2): 167~172.
- Seto S W, Lam T Y, Tam H L, et al. Novel hypoglycemic effects of Ganoderma lucidum water-extract in obese/diabetic (+ db/+ db) mice [J]. Phytomedicine, 2009, 16(5): 426~436.
- 衣艳君,徐承水. 灵芝降血脂作用的实验研究[J]. 安徽师范大学报, 2001, 24(1): 52~53.
- Peng Yan-fei, Zhang Li-na, Zeng Fan-bo, et al. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from Ganoderma tsugae mycelium[J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 59(3): 385~392.
- Boh B, Berovic M, Zhang Jing-song, et al. Ganoderma lucidum

and its pharmaceutically active compounds[J]. Biotechnology Annual Review, 2007(13): 265~301.

- 李云,曾东方. 食用菌液体深层发酵的研究热点[J]. 食品工业科技, 2006, 27(7): 198~201.
- 贺红. 灵芝液体深层发酵技术研究进展及展望[J]. 基层中药杂志, 2000, 14(2): 48~49.
- 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.
- 毛健,马海乐. 灵芝多糖的研究进展[J]. 食品科学, 2010(1): 295~299.
- 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 浙江: 浙江大学出版社, 1994: 32,89,256.
- 孙小梅,戴军,陈尚卫,等. 灵芝子实体多糖提取方法优化及不同来源赤芝子实体的多糖分子质量比较[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(7): 212~217.
- 方积年. 多糖的分离纯化及其纯度鉴别与分子量测定[J]. 药学通报, 1984, 19(10): 46~49.
- Ferreira I C F R, Heleno S A, Reis F S, et al. Chemical features of Ganoderma polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities[J]. Phytochemistry, 2014, 10(11): 3~17.
- Wang Jun-long, Guo Hong-yun, Zhang Ji, et al. Sulfated modification, characterization and structure antioxidant relationships of Artemisia sphaerocephala polysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 897~905.
- Li Yan-qun, Fang Lu, Zhang Ke-chang. Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured Ganoderma lucidum[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(2): 323~328.
- Wyatt P J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules[J]. Analytica chimica acta, 1993, 272(1): 1~40.
- 罗立新,周少奇,姚汝华. 灵芝多糖的结构分析[J]. 分析实验室, 1998, 17(4): 17~21.

敬告

《食品与机械》网站(<http://www.ifoodmm.com/>)将于 2016 年 1 月正式开通。开通后,我刊唯一的投稿方式为: <http://www.ifoodmm.com/>投稿通道(原来的投稿邮箱:foodmm@vip.sina.com 不再接受投稿)。

从 2016 年 1 月起,《食品与机械》由双月刊改为月刊,欢迎广大作者踊跃投稿。

本刊从未对外设立其他编辑部或采编部,本刊联系电话:0731-85258200,85258201。

《食品与机械》编辑部