

深层培养云芝菌丝体蛋白多糖 的提取及性质

程光宇 吴国荣 邹玉珍 陈胜兰

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

摘要 采用水、3%草酸和 0.2 mol/L 氢氧化钠为溶剂分别提取深层培养的云芝 [*Polystictus versicolor* (L.) Fr.] 菌丝体蛋白多糖, 其得率分别为菌丝体干重的 2.0%、4.9% 和 1.9%。提取的粗多糖经 Sephadex G-100 柱层析进一步分离、纯化, 纯化的多糖经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后呈现一个斑点, 在 Sephadex G-100 柱层析中有一个对称峰, 紫外及红外光谱分析和蛋白质含量测定表明该多糖为蛋白多糖, 其蛋白质和多糖含量在水提多糖中分别为 13% 和 62%、在酸提多糖中分别为 5% 和 91%。在碱提多糖中分别为 3% 和 81%。组成该多糖的主要单糖是葡萄糖和木糖。

关键词 云芝; 深层培养; 蛋白多糖; 提取

Extraction and character of proteoglycan from the mycelium of *Polystictus versicolor* (L.) Fr. by submerged culture Cheng Guang-Yu, Wu Guo-Rong, Zhou Yu-Zhen, Cheng Sheng-Lan (Department of biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097), *J. Plant Resour. & Environ.* 1998, 7(4): 19~23

Proteoglycan were extracted by water, 3% oxalic acid and 0.2 mol/L NaOH from the mycelium of *Polystictus versicolor* (L.) Fr. under submerged culture respectively, and extraction yield of proteoglycan account for mycelium dry weight was of 2.0% (water-extraction), 4.9% (acid-extraction) and 1.9% (alkali-extraction). Proteoglycan was further isolated and purified by Sephadex G-100. Its homogeneity was confirmed by chromatography on Sephadex G-100 and PAGE. By means of IR, UV-spectrum and protein content analysis that the polysaccharide belongs to proteoglycan were determined. Its sugar and protein content were up 62% and 13% (water-extraction), 91% and 5% (acid-extraction), 81% and 3% (alkali-extraction) respectively. PC and TLC analysis of proteoglycan hydrolyte showed that those sugars were mainly composed of glucose and xylose.

Key words *Polystictus versicolor* (L.) Fr.; submerged culture; proteoglycan; extraction

云芝 [*Polystictus versicolor* (L.) Fr.] 是一种药用真菌, 其子实体作为一种治疗肿瘤药材, 很早就在中国、日本等国的民间使用, 云芝多糖是从云芝中提取的抗肿瘤有效成分, 国内外学者对其理化性质及药理作用进行了广泛的研究, 证明它不仅对多种肿瘤有预防及治疗作用, 对其他疾病也有良好疗效^[1-4]。云芝多糖的提取多采用固体发酵的菌丝体, 培养周期长, 杂质

多,不易提纯,作者采用深层培养的方法,取得成功,并对菌丝体及发酵液多糖性质进行了初步研究^[2,5],本文进一步报道云芝多糖提取方法及某些性质。

1 材料与 方法

1.1 材料

选用紫外线诱变云芝菌株,经液体培养 96 h^[5],收集直径 3~7 mm 的球状云芝菌丝体,经抽滤后用于实验。

1.2 方法

1.2.1 多糖的提取、分离及纯化 取菌丝 3 份,每份各 150 g,分别加入蒸馏水、3%草酸和 0.2 mol/L NaOH,在组织捣碎机上破碎匀浆,于 100℃水浴回流提取 1 h,抽滤,残渣再提取 1~2 次。合并滤液,调至中性后真空浓缩至原体积 1/5,加入 3 倍体积的无水乙醇,静置过夜。离心,收集沉淀,用丙酮、乙醚离心洗涤,将沉淀对水透析,冷冻干燥后得结晶状水提多糖、酸提多糖和碱提多糖。取上述多糖分别进行 Sephadex G-100 柱层析,用 0.1 mol/L NaCl 洗脱,分部收集,测定多糖,收集最先洗脱的多糖峰(图 1 中 A, B, C),透析冻干后,再进行一次同样条件柱层析,得到纯化的水提、酸提及碱提多糖纯品。

1.2.2 多糖含量测定 采用硫酸-苯酚法^[6],以葡萄糖(国产 AR)为标准品。

1.2.3 蛋白质含量测定 采用 Lowry 法和 Bradford 法^[7],以牛血清白蛋白(Serva 产品,含量 >99%)为标准蛋白。

1.2.4 紫外及红外光谱分析 用岛津 UV-256 型分光光度计测定多糖紫外吸收光谱;红外光谱测定在日立-285 光栅型红外分光光度计上进行(KBr 压片法)。

1.2.5 糖的层析分析 多糖纯品各 5 mg,加 1 mol/L H₂SO₄,封管,100℃水解 8 h,水解液用碳酸钡中和,离心,浓缩后进行纸层析^[8]和薄层层析^[6]。

2 结果与 分析

2.1 提取剂对多糖得率的影响

不同溶剂对多糖提取影响较大(表 1),用草酸提取多糖得率最高,占菌丝体干重的 4.9%,是水提多糖的 2.45 倍,达到从野生云芝子实体中提取的多糖最高得率^[4]。用碱提取多糖仅为水提取多糖的 95%,可见用碱提取多糖,会造成多糖结构的分解破坏,使得率下降。

表 1 不同提取剂对云芝蛋白多糖得率的影响

Tab 1 Effects of different extraction solvent on the yields of proteoglycan from *Polystictus versicolor* (L.) Fr.

| 提取剂 Extraction solvent | 多糖(%) ¹⁾ Proteoglycan (%) ¹⁾ | 占菌丝体干重(%) Account for percent of mycelial dry weight | 与蒸馏水相比(%) Comparison with water (%) |
|-------------------------------|--|--|---|
| 蒸馏水 water | 0.30 ± 0.04 | 2.0 ± 0.27 | 100 |
| 3%草酸 3% oxalic acid | 0.74 ± 0.10 | 4.9 ± 0.67 | 245 |
| 0.2 mol/L 氢氧化钠 0.2 mol/L NaOH | 0.28 ± 0.08 | 1.9 ± 0.53 | 95 |

¹⁾为 150 g 菌丝体鲜重经提取后得到的多糖百分含量 Proteoglycan yield (%) 150 g mycelial fresh weight.

2.2 不同提取条件对多糖得率的影响

从表 2 看出,以水、酸和碱为溶剂分别提取 3 次,可把菌丝体中的多糖基本提取出来。将菌丝体 90% 以上多糖提出,水提只需 1 次,酸提和碱提需 2 次。用碱提取,在没有通 N_2 保护情况下,多糖总量损失较大。用酸提取,第一和第二次提取的多糖分别是水提 3 次多糖总量的 1.7 倍和 38.8%。

表 2 不同提取条件对云芝蛋白多糖得率的影响

Tab 2 Effects of different extraction conditions on the yield of proteoglycan from *Polystictus versicolor* (L.) Fr.

| 提取剂 Extraction solvent | 提取次数 No. of time of extraction | 提取时间 Time (h) | 体积 Volume (ml) | 糖浓度 Proteoglycan conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 多糖 Proteoglycan (mg) | 得率 Yield (%) | 多糖总量 Total proteoglycan (mg) |
|---------------------------|--------------------------------------|---------------------|----------------------|--|----------------------------|--------------------|------------------------------------|
| 蒸馏水 water | 1 | 1 | 600 | 699 | 419 | 94.0 | |
| | 2 | 1 | 600 | 40 | 24 | 5.4 | |
| | 3 | 1 | 300 | 9 | 2.7 | 0.6 | 445.7 |
| 3% 草酸 3% oxalic acid | 1 | 1 | 600 | 1271 | 763 | 77.3 | |
| | 2 | 1 | 600 | 288 | 173 | 17.5 | |
| | 3 | 1 | 300 | 170 | 51 | 5.2 | 987 |
| 0.2 mol/L NaOH | 1 | 1 | 600 | 453 | 272 | 79.8 | |
| | 2 | 1 | 600 | 90 | 54 | 15.8 | |
| | 3 | 1 | 300 | 50 | 15 | 4.4 | 341 |

2.3 多糖的 Sephadex G-100 柱层析分离、纯化

水提、酸提和碱提多糖的 Sephadex G-100 柱层析图谱见图 1, 与水提多糖相比, 碱提多糖低分子组分的比例明显增加, 酸提多糖中保留了较多大分子组分, 将最先洗脱的多糖峰(A, B 和 C)合并, 再层析 1 次, 得到单一对称形的多糖峰, 蛋白含量测定表明, 蛋白峰也为单一对称

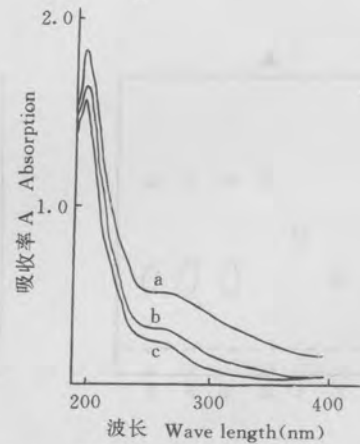
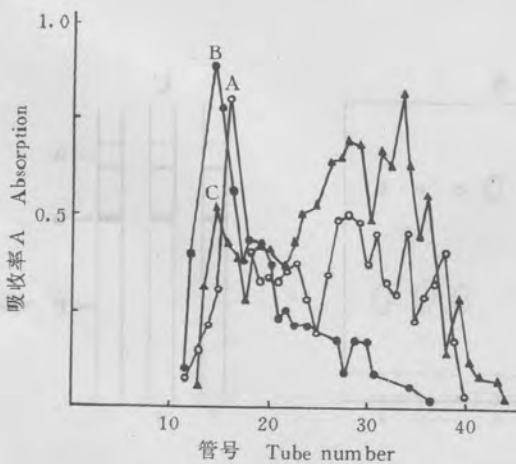


图 1 云芝蛋白多糖的 Sephadex G-100 柱层析图

Fig 1 Chromatography of proteoglycan from *Polystictus versicolor* (L.) Fr. on Sephadex G-100

○—○ 水提多糖 water-extraction; ●—● 酸提多糖 acid-extraction; ▲—▲ 碱提多糖 alkali-extraction

图 2 云芝蛋白多糖的紫外吸收光谱

Fig 2 Ultraviolet absorption spectrum of proteoglycan from *Polystictus versicolor* (L.) Fr.

a: 水提多糖 water-extraction; b: 酸提多糖 acid-extraction; c: 碱提多糖 alkali-extraction

峰,且与多糖峰的洗脱体积相同。说明水提多糖、酸提多糖和碱提多糖已被提纯,它们都含有一定量蛋白质,属蛋白多糖。

2.4 紫外及红外光谱分析

3种溶剂提纯的云芝多糖的紫外光谱基本一致,它们在260 nm处无吸收,在280 nm左右有一肩形峰(图2),这是蛋白结合多糖的特征吸收。在红外光谱中,多糖纯品均显示出3 350、2 910、1 645、1 400和1 050 cm^{-1} 等多糖特征吸收峰(图3)。

2.5 组成单糖分析

多糖纯品水解后经纸层析和薄层层析后均显示两个明显斑点,它们分别与葡萄糖和木糖的Rf值相同(图4中A,B),说明组成云芝多糖的单糖主要是葡萄糖和木糖。

2.6 多糖和蛋白含量分析

将多糖纯品配成1 mg/ml浓度,分别用硫酸-苯酚法测定多糖含量,用Lowry法测定蛋白质含量,结果表明水提、酸提和碱提多糖纯品的多糖和蛋白质含量分别为(61.6 ± 1.9)%、(90.6 ± 1.7)%、(81.0 ± 2.8)%和(12.6 ± 1.3)%、(5.3 ± 0.6)%、(2.8 ± 0.2)%。

多糖纯品经聚丙烯酰胺凝胶电泳(pH 9.1的Tris-HCl缓冲液系统)分离后,用高碘酸西夫试剂染色,得一条紫红色区带(图4中C)。在Sephadex G-100柱层析中呈形状对称的单一峰形,说明提纯的3种多糖纯品都为均质成分。

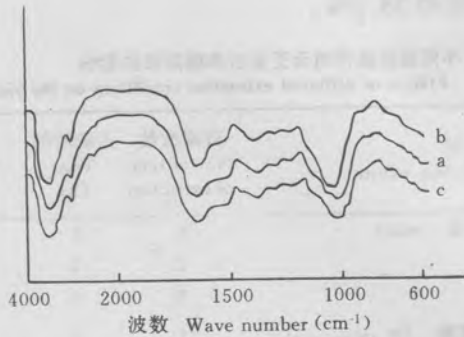


图3 云芝蛋白多糖的红外光谱
Fig The infrared spectrum of proteoglycan from *Polystictus versicolor* (L.) Fr.
a: 水提多糖 water-extraction; b: 酸提多糖 acid-extraction; c: 碱提多糖 alkali-extraction

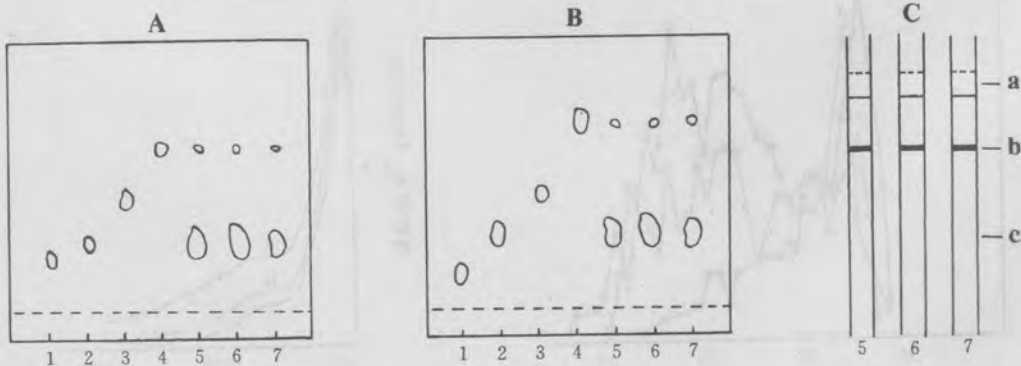


图4 云芝蛋白多糖的纸层析(A)、薄层层析(B)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(C)图谱
Fig 4 Paper chromatography (A), thin-layer chromatography (B) and polyacrylamide gel electrophoresis (C) of proteoglycan from *Polystictus versicolor* (L.) Fr.
a: 浓缩胶 spacer gel; b: 色带层(点样量 25 μg) colour tape (25 μg of proteoglycan); c: 分离胶 separation gel. 1. 半乳糖 Gal; 2. 葡萄糖 Glu; 3. 甘露糖 Man; 4. 木糖 Xyl; 5. 水提多糖 water-extraction proteoglycan; 6. 酸提多糖 acid-extraction proteoglycan; 7. 碱提多糖 alkali-extraction proteoglycan

3 讨 论

云芝多糖是抗肿瘤有效成分, 目前已从云芝中提取出子实体多糖、菌丝体多糖和胞外多糖, 它们之间的化学结构虽有区别, 但对实验性肿瘤都具有明显的抑制作用^[9], 我们以水提取菌丝体多糖, 经测定含 12% 的蛋白质, 它的紫外及红外光谱都显示了蛋白多糖特性, 说明云芝菌丝体多糖属蛋白类多糖, 与文献报道一致^[10]。水提多糖经 Sevag 法反复脱蛋白精制后, 蛋白含量明显减少, 多糖含量可达 80% (资料未列出), 说明蛋白质与多糖结合并不牢固, 采用较激烈的方法可将其洗脱, 与本文用酸和碱提取多糖, 其蛋白质含量明显低于水提多糖的结果相一致。

本文用水、酸和碱为溶剂提取多糖, 结果表明不同提取剂提取的多糖含量和纯度有一定差异, 以草酸提取多糖, 得率和纯度都高, 多糖的基本结构未发生变化, 说明用草酸提取多糖的方法是可行的。碱提多糖虽然纯度较高, 但凝胶过滤后小分子组分明增多, 揭示多糖已发生降解, 故得率较低, 通 N_2 虽可起到保护作用, 但成本高, 不适于工业化生产。

参 考 文 献

- 1 藤井喜一郎, 伊藤均, 成瀬千助等. 担子菌类的抗肿瘤作用について: 担子菌からラタチの产生する分糖体の抗肿瘤作用. 日药理志, 1974, 70: 571.
- 2 吴国荣, 程光宇, 陈胜兰等. 液体发酵云芝蛋白多糖的分离及其鉴定. 南京师大学报(自然科学版), 1995, 18(1): 88.
- 3 张翼仲, 李治平, 苗春艳等. 云芝多糖的分离与鉴定. 吉林师大学报(自然科学版), 1979, 2: 108.
- 4 吉林师大生物系抗癌药物研究室. 长白云芝多糖的毒性和活性研究及口服制剂对 200 例慢性肝炎临床试用的近期疗效观察. 吉林师大学报(自然科学版), 1979, 2: 95.
- 5 陈胜兰, 吴国荣, 程光宇等. 云芝菌丝体液体培养周期的研究. 江苏食用菌, 1993, 14(3): 12.
- 6 张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248.
- 8 刘京丽, 王淑如, 陈琼华. 九里香多糖和蛋白多糖的分离、纯化和分析. 生物化学杂志, 1989, 5(1): 33.
- 9 乐恒淳. 真菌异多糖与肿瘤的非特异性免疫. 东北师大学报(自然科学版), 1989, 2: 65.
- 10 冢越茂. がん免疫療法の現状と将来. 化学と生物, 1975, 13(9): 578.

(责任编辑: 许定发)