

灰树花菌丝体多糖 G F -1 理化性质 及生物活性的研究^{*}

杜 巍¹, 袁 静², 李元瑞^{2*}, 程江峰³

(1 上海理工大学 动力工程学院, 上海 200093; 2 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨陵 712100;

3 青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266042)

[摘 要] 对灰树花菌丝体多糖 G F -1 的理化性质及生物活性进行了研究。结果表明, G F -1 是一种均一性好、相对分子质量为 1.23×10^6 的多糖, 其单糖组成的物质的量之比为 $n(\text{Xyl}) : n(\text{Man}) : n(\text{Glc}) = 0.9 : 1.4 : 4.7$; 其一级结构是由主链以 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 、 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键为主, 分枝点大部分发生在主链糖基 C6 位的 βD -葡聚糖所构成; 同时, 该多糖具有清除 O_2^- 自由基、显著促进小鼠淋巴细胞增殖、增强机体免疫力的生物活性功能。

[关键词] 菌丝体多糖; 结构组成; 生物活性

[中图分类号] Q 939.93; S567.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0024-05

在国际上, 食(药)用真菌多糖被称为“生物反应调节剂”(Biological Response Modifier, BRM), 是能够增强人体免疫功能的生物活性物质。近年来, 随着生物工程和生物高分子研究新技术、新方法在科学试验中的应用, 使得国内外对食(药)用真菌多糖的研究迅速发展。目前, 食(药)用真菌多糖已成为分子生物学、医学、食品科学等领域的研究热点之一^[1]。

灰树花 (*Grifola frondosa*), 又名贝叶多孔菌、栗子蘑, 俗称云蕈、舞茸, 隶属于担子菌亚门、层菌纲、多孔菌科、树花菌属, 是一种名贵的食(药)用真菌^[2]。灰树花不仅营养丰富, 而且其子实体中约含有 8% 的生物活性多糖。经化学和药理分析发现^[3, 4], 灰树花多糖有明显高于其他食(药)用真菌多糖的医疗效果, 具有显著的抗肿瘤、抗 HIV 病毒、改善免疫系统功能, 同时具有调节血糖、血脂及胆固醇水平和降血压等作用; 另外, 对防止癌细胞的生成和转移、艾滋病、高血压、糖尿病及免疫系统功能紊乱均有一定的疗效, 且无任何毒副作用。1999 年, 美国食品和药物管理局 (FDA) 证实了灰树花提取物治疗晚期乳腺癌和前列腺癌的研究结果, 并允许灰树花提取物作为癌症的有效抑制剂, 直接进行 II 期临床试验^[5~7]。人工栽培灰树花子实体, 生产周期相对较

长, 产量较低, 从子实体中提取多糖成本较高, 且很难满足规模化研发的要求。一些研究表明^[8~10], 深层培养的灰树花菌丝体具有与其子实体相似的营养成分、药理作用和保健效果, 加之深层培养具有周期短、易于控制、便于工业化生产等特点, 这为灰树花多糖产品的研制和开发提供了一条新思路。

本研究以深层培养得到的灰树花菌丝体为原料, 进行多糖的提取、分离、纯化, 并对得到的菌丝体纯多糖进行系统的理化特性及生物活性分析, 旨在为研究和开发资源、发掘具有保健和药用价值的灰树花多糖产品奠定理论基础, 同时为进一步深入研究灰树花菌丝体多糖结构和功能的关系, 以及从分子水平阐明灰树花菌丝体多糖的药理作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

深层培养的灰树花菌丝体^[11], 经碱提和减压浓缩, 将加 2 倍体积无水乙醇沉淀后得到的产物用 Sevage 法去蛋白, 透析, 冷冻干燥, 得粗多糖 G F -A; 将 G F -A 脱色后, 进行 Sepharose 4B 柱层析分离, 通过紫外及苯酚-硫酸法检测, 收集含糖部分, 透析, 冷冻干燥, 得多糖 G F -A I; G F -A I 再次进

* [收稿日期] 2002-11-27

[基金项目] 陕西省科技攻关项目 (99K02-G8)

[作者简介] 杜 巍 (1973-), 男, 甘肃天水人, 博士, 上海理工大学动力工程学院博士后, 主要从事食品工程技术研究。

* 通讯作者: 李元瑞 (1942-), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品工程及技术研究, (029) 7092757。

行 CM-Sepharose CL-6B 柱层析分离(方法同上), 得到纯化的多糖 G.F.-1, 作为分析样品待用。

1.2 试剂

乙酸、甲苯胺蓝、硼酸、氯仿、丙酮、苯胺、二苯胺、熏蒸酚、正丁醇、吡啶、醋酸酐、盐酸羟胺、二甲基亚砜(DMSO)等均为分析纯。

L-Rha(L-鼠李糖)、L-Ara(L-阿拉伯糖)、D-Xyl(D-木糖)、D-Man(D-甘露糖)、D-Gal(D-半乳糖)、D-Glc(D-葡萄糖)等为 Sigma 进口分装产品。

另有 ConA(1 种 T 细胞致丝裂原)、[甲基- ^3H]胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)、RPMI1640 培养液、台盼蓝、体积分数 10% 小牛血清、LACA 小鼠等。

1.3 仪器

DUAL-WAVELENGTH TLC SCANNER CS-930(Shimadzu)、Backman P/A System 5000 型毛细管电泳仪(Gemany)、DL S-700 型激光散射仪(日本大冢电子株式会社)、UV-2201 UV-VIS RECORDING SPECTROPHOTOMETER(Shimadzu)、GC-14B GAS CHROMATOGRAPH(Shimadzu)、Bruker VECTOR 22 红外光谱仪(Gemany)、Bruker ARX400 超导核磁共振仪(Gemany)、细胞收集器、CO₂ 培养箱、液闪仪等。

1.4 试验方法

多糖含量的测定 用苯酚-硫酸法^[12]。

完全酸水解 多糖 10.0 mg, 加入 1 mol/L H₂SO₄ 2.0 mL, 安瓿封管, 100 °C 水解 4 h, 冷却, 用 BaCO₃ 中和, 过滤得上清液待用。

纯度分析 醋酸纤维薄膜电泳法^[13]和毛细管电泳法。毛细管电泳法的电泳缓冲液为 100 mmol/L HBO₃-KOH(pH=10.0); 紫外检测波长为 254 nm; 操作电压 20 kV, 进样时间为 8 s。

紫外扫描 将多糖配制成 1.0 mg/L 的水溶液, 用 UV-2201 UV-VIS RECORDING SPECTROPHOTOMETER(Shimadzu)在波长 200~350 nm 处扫描。

分子质量测定 分子质量测定用光散射法, ASTM 标准。

单糖组成分析 气相色谱法^[13]。

红外光谱分析 干燥的 G.F.-1 样品 5 mg, 与 200 mg 干燥过的 KBr 在玛瑙研钵中研磨均匀; 压力机在 3 923 N/cm² 压力条件下, 将含有样品的混合粉末压成薄片; 400~4 000 cm⁻¹ 波长扫描。

¹³C NMR 分析 Bruker ARX400 超导核磁共振仪; SOLVENT D₂O, NUCLEUS ¹³C, PROBHD

5 mm Multinu; 累计扫描 18 000 次, 每次扫描时间 2.7 s。

生物活性分析 a 抗氧化活性——清除 O₂⁻ 自由基^[14,15], 电子自旋共振法(Electron Spin Resonance, 简称 ESR)。b 免疫活性——小鼠淋巴细胞增殖反应^[15,16], 淋巴细胞转化试验, [甲基-³H]胸腺嘧啶核苷掺入法检测。

2 结果与分析

2.1 纯度鉴定

1 mol/L 的 H₂SO₄, 100 °C, 4 h, 可以使样品完全水解。薄层层析显示, G.F.-1 不含糖醛酸。G.F.-1 经醋酸纤维薄膜电泳得到 1 条单一的蓝色带, 利用 DUAL-WAVELENGTH TLC SCANNER CS-930, 在 590 nm 可见光下, 对这条单一蓝色带进行扫描, 扫描图谱见图 1, 从图 1 中可以看出, 扫描结果呈现单一的对称峰。G.F.-1 经毛细管电泳(CE)分析, 也得到单一的对称峰(图 2)。G.F.-1 经紫外扫描, 在 260 和 280 nm 没有明显的特征吸收峰, 说明该多糖不含核酸和蛋白质。从以上分析可知, 菌丝体多糖 G.F.-1 是一种纯化的、均一性较好的纯多糖。

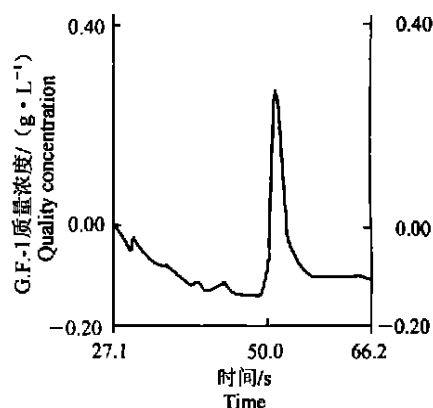


图1 G.F.-1 醋酸薄膜电泳扫描图谱

Fig 1 Scanning spectrum of vinegar film electrophoresis on G.F.-1

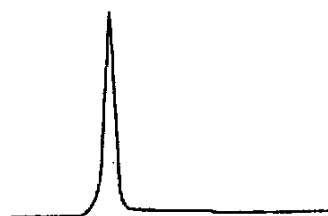


图2 G.F.-1 的 CE 图谱

Fig 2 CE spectrum of G.F.-1

2.2 分子质量及单糖组成分析

利用光散射法,采用 ASTM 标准,测定 G.F.-1 的分子质量表明, G.F.-1 是 1 个相对分子质量为 1.23×10^6 的大分子多糖。

以 DB-1701 毛细管柱 (25 m $\times$ 0.35 mm) 为分析柱,程序升温,柱温 220 ,汽化室温度 250 ,检测器温度 230 ,进行气相色谱分析,得到标准图谱和 G.F.-1 单糖组成图谱(图 3)。

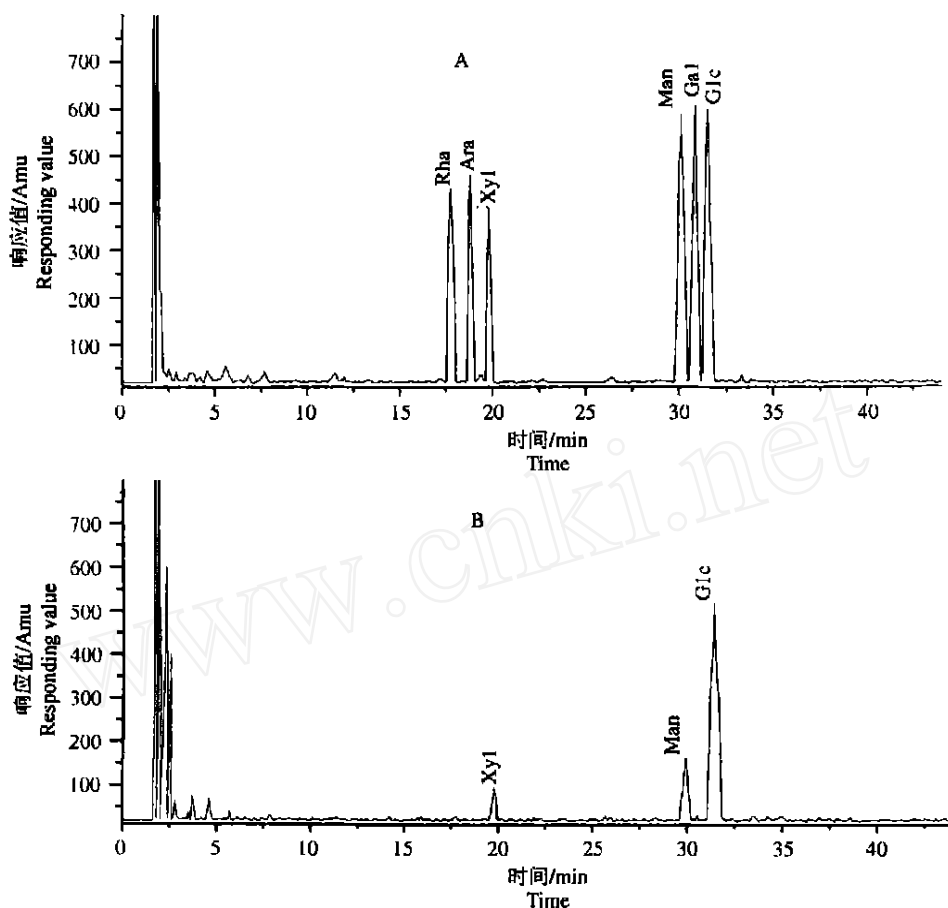


图 3 GC 法分析 G.F.-1 的单糖组成

A. 标准图谱; B. G.F.-1 单糖衍生物图谱

Fig 3 Sugar composition analysis of GC on G.F.-1

A. standard spectrum; B. glycogen ramification spectrum of G.F.-1

从图 3 可知, G.F.-1 由木糖(Xyl)、甘露糖(Man)和葡萄糖(Glc)组成,从标准样品计算得到各单糖的响应因子,由此可得到 G.F.-1 中单糖组成的物质的量之比为 $n(\text{Xyl}) : n(\text{Man}) : n(\text{Glc}) = 0.9 : 1.4 : 4.7$ 。

2.3 结构分析

2.3.1 红外光谱分析 G.F.-1 的红外图谱(图 4)及谱峰归属分析表明, $3420.79, 2927.51 \text{ cm}^{-1}$ 是多糖的特征吸收峰, $864.52 \sim 919.25 \text{ cm}^{-1}$ 是吡喃糖环的特征吸收峰,在 $1635.76 \sim 2361.22 \text{ cm}^{-1}$ 处吸收较弱,在 1635.76 cm^{-1} 处有 β 糖苷键的特征吸收峰,故该多糖以 β 多晶型为主。

2.3.2 ^{13}C NMR 分析 以 ^{13}C NMR 谱进行多糖结构的分析,一个十分有用的原则是,糖环上不同位置的碳原子发生取代后,不管其二糖、寡糖或多糖,只要取代基的结构相同,其向低磁场的位移值也基本相同。可以借助各种不同结构的二糖、寡糖的化学位移表及分析规律去分析多糖结构。这一分析规律是:糖环上那个位置的碳发生取代,那个碳的化学位移就有较大的变化,未发生取代的 C-2, C-3, C-4 的化学位移通常在 70~77 ppm,如在 78 ppm 以上有信号,则可以肯定 C-2, C-3, C-4 中某一个碳上有取代;未发生取代的 C-6 通常位于 60~64 ppm,发生取代后则位移至 67~70 ppm^[13]。

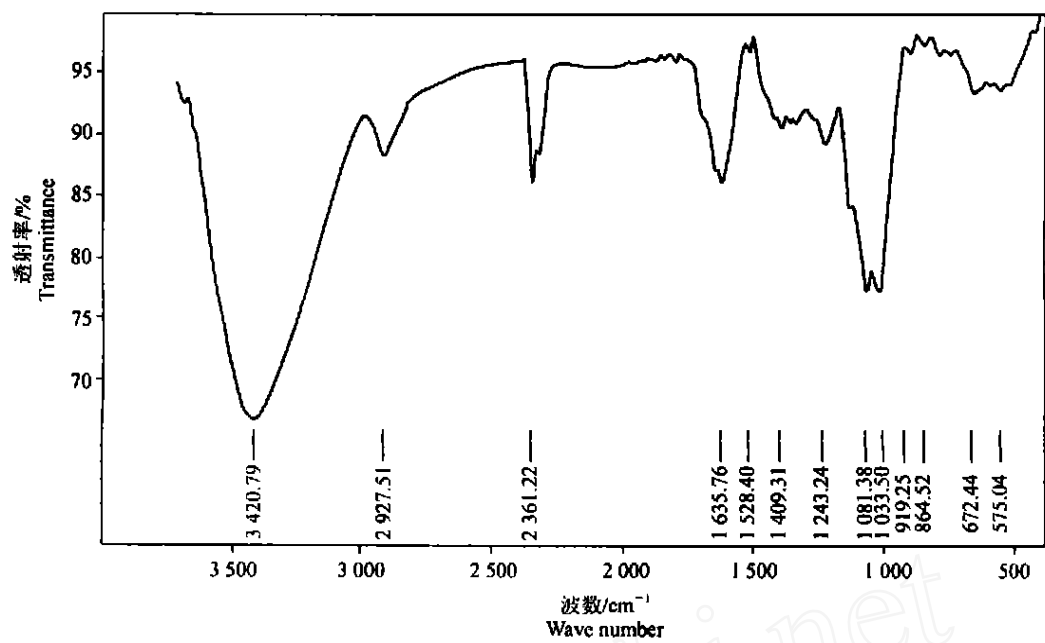


图 4 G. F. -1 的红外光谱

Fig 4 IR spectrum of G. F. -1

利用Bruker ARX400 超导核磁共振仪对 G. F. -1 进行¹³C NMR 分析,可得到 G. F. -1 的¹³C NMR 图谱(略)。根据上述的分析原则,可以确定 G. F. -1 的¹³C NMR 图谱中谱峰的指派情况(表 1)。

表 1 G. F. -1 的¹³C NMR 谱峰的指派情况

碳原子 Carbon atom	化学位移/ppm Chemical shift	取代情况 Substitution
C- 1	101.331	取代 Substituted
C- 2, C- 3, C- 4	74~ 78	未取代 Unsubstituted
C- 2, C- 3, C- 4	97.903, 99.847	取代 Substituted
C- 6	67.183~ 69.506	取代 Substituted
C- 6	60.726, 61.101	未取代 Unsubstituted

结合¹³C NMR 谱,根据二糖、寡糖的化学位移表及文献[6, 7, 10, 13]分析认为,构成 G. F. -1 糖残基的信号区中,化学位移 69~506 ppm 是葡聚糖[β-Glc(1→6)-]_n的信号峰,70~373 ppm 是葡聚糖[β-Glc(1→6)-]_n的信号峰,74~882 ppm 是葡聚糖[β-Glc(1→3)-]_n的信号峰,75~569 ppm 是葡聚糖[β-Glc(1→6)-]_n的信号峰,化学位移 99~847, 97.903 ppm 是 Man, Xyl 的 1→3 糖苷键信号峰,102~754 ppm 峰为 β-Glc-(1→6)-的信号峰,因此, G. F. -1 的多糖一级结构组成中以 β(1→3)、β(1→6) 糖苷键为主,结合¹³C NMR 谱峰的指派情况(表 1)分析认为,1→3 糖苷键是由于主链的取代发生在 C1 和 C3 之间所致,而 1→6 糖苷键则因分枝发生在

C1 和 C6 之间所形成,并且这些分枝点大部分发生在主链糖基的 C6 上。另由红外光谱图可知, G. F. -1 的糖苷键主要以 β 型为主,结合气相色谱结果可以认为,多糖 G. F. -1 中的单糖旋光性为 D 型。

综上所述,本研究认为灰树花菌丝体多糖 G. F. -1 的一级结构是由主链以 β(1→3)、β(1→6) 糖苷键为主,分枝点大部分发生在主链糖基 C6 位的 βD-葡聚糖所构成。这与文献[17~ 19]报道的具有生物活性的灰树花子实体多糖的结构基本一致。

2.4 生物活性分析

2.4.1 抗氧化活性 由表 2 可以看出,多糖 G. F. -1 对 O₂^{·-} 具有较强的清除作用,且随着加入剂量的增加,清除 O₂^{·-} 自由基的能力加强。

表 2 G. F. -1 清除 O₂^{·-} 活性

Table 2 Detemination of scavenging O ₂ ^{·-} radicals activity of G. F. -1	
G. F. -1 质量浓度/(mg · L ⁻¹) Quality concentration	清除率/% Scavenging rate
0.18	8.2
0.90	39.1
1.80	72.6

2.4.2 免疫活性 从表 3 可以看出, G. F. -1 单独使用能显著增加淋巴细胞转化,且随剂量增加效果显著,但在 T 细胞致丝裂原 ConA 的诱导下,不仅无协同作用,反而对多糖 G. F. -1 刺激小鼠淋巴细胞的增殖反应具有抑制作用。

表 3 G. F. -1 对小鼠淋巴细胞增殖反应的影响

Table 3 Effects of G. F. -1 on mouse lymphocyte proliferation

组别 Group	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Dose	[^3H] TdR 掺入值($\bar{X} \pm \text{SD}$) Penetrating value of [^3H] TdR	
		ConA (-)	ConA (+)
CK	0	729.5 $\pm$ 156.0	45 989.5 $\pm$ 3 672.6
	10	1 448.0 $\pm$ 430.3 *	47 608.5 $\pm$ 4 011.5
G. F. -1	50	2 748.5 $\pm$ 750.3 **	47 811.0 $\pm$ 2 856.6
	100	4 909.5 $\pm$ 1 699.3 ***	53 786.3 $\pm$ 3 089.4 *

注: * 表示 $r < 0.05$, ** 表示 $r < 0.01$, *** 表示 $r < 0.001$, $n = 4$

Note: * means $r < 0.05$, ** means $r < 0.01$, *** means $r < 0.001$,

$n = 4$

3 小 结

(1) G. F. -1 是一种均一性较好的菌丝体纯多糖。

(2) G. F. -1 的分子质量为 1.23×10^6 , 由木糖(Xyl)、甘露糖(Man)和葡萄糖(Glc)组成, 其单糖组成的物质的量之比为 $n(\text{Xyl}) : n(\text{Man}) : n(\text{Glc}) = 0.9 : 1.4 : 4.7$ 。

(3) 结构分析表明, 灰树花菌丝体多糖 G. F. -1 的一级结构是由主链以 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 、 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键为主, 分枝点大部分发生在主链糖基 C6 位的 βD -葡聚糖所构成。这与文献[17~19]报道的结果基本一致。

(4) 生物活性研究结果表明, 灰树花菌丝体多糖 G. F. -1 不仅具有清除 O_2^- 自由基的活性, 亦能显著促进小鼠淋巴细胞增殖, 起到增强机体免疫力的作用。

致谢: 衷心感谢中科院微生物研究所“分子微生物学研究中心”、中国计量学院国家标准物质研究中心、北京大学测试中心及中国科学院化学研究所测试中心在试验及分析中给予的支持和帮助。

[参考文献]

- [1] 杜巍, 李元瑞, 袁静. 食用菌多糖生物活性与结构的关系[J]. 中国食用菌, 2002, (2): 28-30
- [2] 张光亚. 中国常见食用菌图谱[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1999
- [3] 王增池, 孔德平, 田晓亮. 灰树花的生态条件与药用价值[J]. 中国食用菌, 1998, 17(11): 39-40
- [4] 郑建仙. 功能性食品[M]. 第2卷. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [5] 邢增涛, 周昌艳, 潘迎捷, 等. 灰树花多糖研究进展[J]. 食用菌学报, 1999, 6(3): 54-58
- [6] Nanba H, Hamaguchi A, Kuroda H. The chemical structure of antitumor polysaccharide in fruit bodies of *Grifola frondosa*[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1987, 35(3): 1162-1168
- [7] Ohno N, Hayashi M. Effect of glucans on the antitumor activity of grifolan[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, 34(5): 2149-2151
- [8] 袁娟萍, 孙培龙, 朱家荣, 等. 灰树花深层发酵培养基的研究[J]. 微生物学通报, 2000, 27(4): 275-278
- [9] Stasinopoulos S J, Seviour R J. Stimulation of exopolysaccharide production in the *Fungus acromonium persicinum* with fatty acids[J]. Biotech and Bioengi, 1990, 52(4): 778-782
- [10] Cui Y Q, Okkerse W J. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentation[J]. Biotech and Bioengi, 1998, 60(2): 216-229
- [11] 杜巍, 李元瑞, 袁静, 等. 灰树花液体深层培养条件的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(1): 110-114
- [12] 杨新美. 食用菌研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [13] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999
- [14] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [15] 龙振洲. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999
- [16] 张均田. 现代药理实验方法(上, 下)[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998
- [17] Ohno N, Iino K. Fractionation of acidic antitumor β -glucan of *Grifola frondosa* by anion-exchange chromatography using urea solutions of low and high ionic strengths[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, 34(8): 3328-3332
- [18] Zhang C, Mizuno T, Ito H, et al. Chemical modification and antitumor activity of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*[J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 1994, 41(10): 733-740
- [19] Ohno N, Ohsawa M. Conformation of grifolan in the fruitbody of *Grifola frondosa* assessed by carbon-13 cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1987, 35(6): 2585-2588

(下转第 33 页)

196

- [6] 中国科学院南京土壤研究所微生物室主编 土壤微生物研究法[M] 北京: 科学出版社, 1985 260- 268
- [7] 史 奕, 黄国宏 土壤中反硝化酶活性与 N_2O 排放的关系[J] 应用生态学报, 1999, 10(3): 329- 331
- [8] 周礼恺 土壤的脲酶活性与尿素肥料在土壤中的转化[J] 土壤学进展, 1984, (1): 1- 7
- [9] 任天志, Stefano Grego 持续农业中的土壤生物指标研究[J] 中国农业科学, 2000, 33(3): 68- 75
- [10] 李世清, 卜彤英, 李生秀 石灰性土壤中 $NH_4^+ - N$ 的粘土矿物固定[J] 干旱地区农业研究, 1993, 11(2): 99- 107
- [11] 党廷辉, 蔡贵信, 郭胜利, 等 黄土高原黑垆土冬小麦系统中尿素氮去向及增产效果[J] 土壤学报, 2002, 39(3): 199- 204
- [12] 袁丽云 反硝化作用在土壤氮素平衡中的作用[J] 土壤学进展, 1985, (5): 8- 14

Study on N_2O emission and urease activity in dryland soil

BAI Hong-ying, LI Chun-yue, ZHANG Yi-ping

(College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Experiments were carried out to study the influence of different cultivation methods and plastic film mulching on the N_2O emission and urease activity in field soil. The results showed that wheat cultivation would activate N_2O emission and urease activity in the soil layer with a depth of 10- 20 cm and 0- 20 cm. The plastic film mulching would increase the N_2O emission and urease activity in different soil layers. The N_2O emission is positively related to the urease activity in tillable soil layers ($y = 4.560x + 6.686$, $r = 0.694^{**}$), that is the urease activity can be used as the bio-indicator for N_2O emission to reflect the comprehensive influence of other factors.

Key words: N_2O emission; urease activity; cultivation methods

(上接第 28 页)

Studies on physical and chemical characters and biological activities of polysaccharide G. F. -1 from *Grifola frondosa* Mycelia

DU Wei¹, YUAN Jing², Li Yuan-ru^{2*}, CHENG Jia-feng³

(1 College of Dynamical Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

2 College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042, China)

Abstract: Physicochemical characters and biological activities of polysaccharide G. F. -1 from *Grifola frondosa* Mycelia were studied. The results showed G. F. -1 had better consistency, its relative molecular weight was 1.23×10^6 and mol ratio of sugar composition was Xyl:Man:Glc = 0.9:1.4:4.7. First order structure was made up of β D-Glc in which the main chain contained mainly $\beta(1 \rightarrow 3)$ and $\beta(1 \rightarrow 6)$ with the branched point mostly at C6. Otherwise, it could eliminate $O_2^{\cdot -}$ radical, significantly increase the mouse splenocyte proliferation and could adjust the body immunologic function.

Key words: mycelia polysaccharide; structure constitutes; biologic activities