

鸡腿蘑菌丝体水溶性多糖的提取与分离

胡 梅^{1,2}, 梁运祥²

(1 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003; 2 华中农业大学 生命科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

【摘 要】 【目的】优化鸡腿蘑菌丝体水溶性粗多糖(CMP)的提取条件,对鸡腿蘑菌丝体胞内水溶性 CMP 进行分级分离。【方法】以多糖得率为测定指标,选取提取温度、提取时间、料水比、微波处理时间 4 个影响因素,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优化鸡腿蘑菌丝体水溶性粗多糖的提取条件,并通过 DEAE-纤维素 32 柱层析和 Sephadex G-200 凝胶过滤色谱,对经过初步提纯的鸡腿蘑菌丝体胞内水溶性 CMP 进行分级分离。【结果】鸡腿蘑菌丝体水溶性 CMP 适宜的提取条件为:湿菌丝体匀浆后微波处理 3 min,然后按料水体积比 1:2 加水,在 55℃ 水浴中抽提 6 h,提取液用无水乙醇醇析,该法 CMP 的得率为 5.14%。DEAE-纤维素 32 柱层析得到了 CMP-I、CMP-II 和 CMP-III 3 个多糖组分,其中 CMP-I 为主要组分,约占 69.72%。CMP-I 含有相对分子质量十分接近的 2 个组分 CMP-I-1 和 CMP-I-2,其中 CMP-I-1 为主要组分。【结论】初步确定了腿蘑菌丝体水溶性 CMP 的提取条件和分级分离方法,为进一步进行 CMP 结构分析奠定了基础。

【关键词】 鸡腿蘑;菌丝体;水溶性多糖

【中图分类号】 O629.12;S464.1⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)04-0223-05

Extraction and Isolation of *Coprinus comatus* mycelial water-soluble polysaccharide

HU Mei^{1,2}, LIANG Yun-xiang²

(1 College of Horticulture and Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China;

2 College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to optimize the extractive conditions of *Coprinus comatus* mycelial water-soluble polysaccharide, grade and isolate *Coprinus comatus* mycelial water-soluble polysaccharide. 【Method】 Used mycelial water-soluble polysaccharide as index, by $L_9(3^4)$ orthogonal test of four factors (temperature, time, mycelia/water, microwave heating time), the extractive conditions of mycelial water-soluble polysaccharide were optimized. The partial purified polysaccharides were further graded and isolated by DEAE cellulose32 column and Sephadex G-200 column chromatography. 【Result】 The extractive conditions of mycelial water-soluble polysaccharide were determined as follows: mycelia : water = 1 : 2, microwave heating time 3 minutes, extracting temperature 55℃, extracting time 6h. The extractive efficiency of mycelial polysaccharide was 5.14%. Three factions in CMP were obtained by DEAE cellulose32 column, respectively. CMP-I was the main faction, accounting for 69.72% of total amount. Then CMP-I was further graded and isolated by Sephadex G-200 column chromatography. The result showed that the molecular weight of the two factions were similar which obtained in CMP-I, respectively. GMP-I-1 was a main faction. 【Conclusion】 The extractive conditions and isolation method of *Coprinus comatus* mycelial water-soluble polysaccharide were probed.

* [收稿日期] 2007-04-06

[作者简介] 胡 梅(1971—),女,浙江上虞人,讲师,硕士,主要从事微生物学和食用菌研究。E-mail: lyhumei-0026@163.com

Key words: *Coprinus comatus*; mycelia; water-soluble polysaccharide; extraction; isolation

鸡腿蘑(*Coprinus comatus* (Mull. ex Fr.) S. F. Gray)又名鸡腿菇、毛头鬼伞,在真菌分类上属于担子菌亚门层菌纲伞菌目鬼伞科鬼伞属^[1]。是一种味道鲜美、营养丰富、食药兼用的大型真菌^[2]。据报道,鸡腿蘑能降低血糖,并含有治疗糖尿病的有效成分,从鸡腿蘑子实体中提取出的粗多糖(CMP)具有较高的免疫活性和抗肿瘤活性^[3-4]。可见,鸡腿蘑是一种极具开发潜力和应用前景的食药真菌。

目前,食药真菌的胞内水溶性多糖大多是从子实体中提取的。有研究表明,食用菌子实体的营养成分和疗效成分与菌丝体相似^[5],因此可以直接从菌丝体中提取水溶性 CMP。这种方法可以缩短周期、提高效率,但所获提取物是各种多糖组分的混合物,而不同的多糖具有不同的生物活性^[6],因此需要对各种多糖组分进行分级分离。对多糖分级分离的方法有多种,目前分离精制真菌多糖的有效方法有离子交换色谱和凝胶过滤色谱^[7]。近 30 年来,国内科研人员已对多种食药真菌,如灵芝^[8]、平菇^[9]、灰树花^[10]、蛹虫草^[11]、姬松茸^[12]、羊肚菌^[13]等进行了水溶性多糖的提取纯化、分离鉴定研究。但对鸡腿蘑水溶性多糖提取分离的研究尚未见报道。为此,本研究对鸡腿蘑菌丝体水溶性 CMP 的提取条件进行了优化,并采用分级醇沉、除蛋白、透析、离子交换色谱、凝胶色谱等分离方法从鸡腿蘑菌丝体

水溶性 CMP 中分离出多种多糖组分,以期为鸡腿蘑菌丝体水溶性多糖化学结构分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 鸡腿蘑菌株 Co-1 由河南科技大学林学院园艺系食用菌教研室提供。

1.1.2 主要试剂 苯酚,分析纯,天津博迪化工有限公司产品;硫酸,分析纯,开封东大化工(集团)有限公司试剂厂产品; DEAE-纤维素 32,Whatman 公司产品;SephadexG-200,Pharmacia 公司产品。

1.2 鸡腿蘑菌丝体水溶性 CMP 提取条件的优化

1.2.1 提取流程 湿菌丝体 → 匀浆 → 微波(800 W)处理 → 加水调配 → 热水抽提 → 离心 → 取上清液 → 醇析(加等体积无水乙醇) → 沉淀物 → 体积分数 70%乙醇洗涤 → 离心 → 沉淀物 → 体积分数 90%乙醇洗涤 → 离心 → 沉淀物 → 体积分数 100%乙醇洗涤 → 离心 → 沉淀物(即菌丝体水溶性粗多糖) → 50 ℃烘干至恒重 → 称重。

1.2.2 提取条件的优化 选取提取温度、提取时间、料水比(体积比)、微波处理时间 4 个因素,各因素均设 3 个水平,利用 $L_9(3^4)$ 正交试验^[14] 确定菌丝体水溶性 CMP 最佳提取条件。试验因素水平见表 1。

表 1 鸡腿蘑菌丝体水溶性 CMP 提取条件的 $L_9(3^4)$ 正交试验因素及其水平

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal design on extractive conditions of *Coprinus comatus* mycelial water-soluble polysaccharide

水平 Level	因素 Factor			
	温度/℃ Temperature	时间/h Time	料 : 水 Mycelia : Water	微波处理时间/min Microwave heating time
	A	B	C	D
1	55	2	1 : 1	0.0
2	70	4	1 : 2	1.5
3	85	6	1 : 3	3.0

1.2.3 多糖得率的计算

水溶性 CMP 得率/% = $\frac{\text{水溶性 CMP 干重(g)}}{\text{菌丝体干重(g)}} \times 100\%$

1.3 鸡腿蘑菌丝体 CMP 的分级分离

1.3.1 去除蛋白 采用优化的提取条件制备鸡腿蘑菌丝体水溶性 CMP,按每克水溶性 CMP 加 100 mL 水的比例加蒸馏水,置于 85 ℃水浴锅中加热溶解 30 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。除蛋白采用 Sevag 法^[15],即在多糖提取液中加入等体积的氯仿和正丁醇混合液(V(氯仿) : V(正丁

醇)=5 : 1),剧烈振荡 30 min,弃去下层氯仿层和中间变性蛋白层,如此反复数次,直至无变性蛋白层出现为止。

1.3.2 透析脱盐 将去蛋白后的多糖提取液装入透析袋中,扎紧袋口,悬浮于蒸馏水中透析 48 h,每隔 8 h 换水一次。

1.3.3 浓 缩 将经过透析脱盐后的多糖提取液,利用旋转蒸发仪在 60 ℃下减压浓缩至原体积的 1/3。

1.3.4 DEAE-纤维素 32 柱层析^[16,7] 将按试剂说明处理的 DEAE-纤维素 32 填装于 1.6 cm×40 cm

的层析柱中,床体积约为 55 mL,用去离子水平衡过夜后进行层析。层析时,多糖上样量为 15 mg,上样体积 4.2 mL,依次用去离子水、0.1 mol/L NaHCO₃、0.1 mol/L NaOH 溶液洗脱,洗脱速度依次为 16.5,25 和 30 mL/h。收集洗脱液(3 mL/管),逐管检测多糖含量,直至无洗脱峰为止,合并含主要多糖峰(CMP-I)的 3~14 管洗脱液进行浓缩,用于 Sephadex G-200 凝胶柱层析。

1.3.5 Sephadex G-200 凝胶柱层析^[16,7] 将按试剂说明处理的 Sephadex G-200 凝胶填充于 1.6 cm×80 cm 层析柱中,床体积约为 100 mL,0.05 mol/L NaCl 溶液平衡过夜后进行层析。层析时,上样量为 4 mg,上样体积 6.7 mL,用 0.05 mol/L NaCl 溶液洗脱,洗脱速度为 15 mL/h。收集洗脱液(3 mL/管),检测多糖含量。

1.3.6 多糖含量的测定 (1)标准曲线的绘制。将无水葡萄糖在 105 ℃ 下烘干至恒重,配制成 100 μg/mL 葡萄糖标准溶液。分别取 100 μg/mL 葡萄糖标准溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 和 0.9 mL,加蒸馏水至 1 mL,另取 1 mL 蒸馏水作为空白对照,分别加质量分数 5% 的苯酚溶液 1 mL,再加入 5 mL 浓硫酸,静置 30 min 后摇匀,于 490 nm 波长处测定 OD₄₉₀ 值。以葡萄糖浓度为横座标(*x*),OD₄₉₀ 值为纵座标(*y*)绘制标准曲线(图 1)。该标准曲线的回归方程为: $y=0.007x+0.0275$, $R^2=0.9925$ 。

(2)测定方法。采用苯酚硫酸法^[17],取收集液或收

集液的稀释液 1 mL,加入 1 mL 质量分数 5% 的苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,静置 30 min 后摇匀,于 490 nm 波长处测定 OD₄₉₀ 值,将 OD₄₉₀ 值代入上述回归方程即可计算出多糖浓度。最后按下式计算出每管收集液中的多糖含量:

每管收集液中多糖含量(mg)= $A\times B\times C\times 1/1\,000$ 。式中:*A* 为根据回归方程算出的多糖浓度(μg/mL);*B* 为收集液稀释倍数;*C* 为收集液体积(mL)。

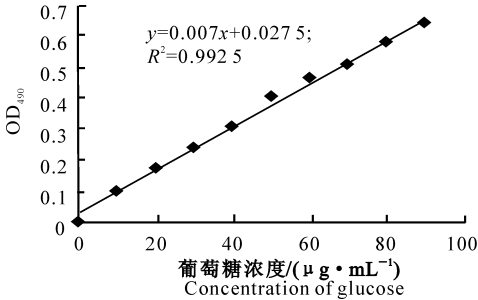


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

1.4 数据分析

利用 SPSS 软件中 ANOVA 方法对正交试验数据进行极差分析和方差分析。数据之间的差异显著性采用 Duncan’s 新复极差法进行比较。

2 结果与分析

2.1 鸡腿蘑菇丝体胞内水溶性 CMP 提取条件的优化

鸡腿蘑菇丝体胞内水溶性 CMP 提取条件的优化结果见表 2。

表 2 鸡腿蘑菇丝体胞内水溶性 CMP 提取条件正交试验结果的极差分析

试验分离号 Exper. No.	因素 Factor				胞内多糖得率/% Extractive efficiency of mycelial polysaccharide
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	3.03
2	1	2	2	2	3.03
3	1	3	3	3	5.09
4	2	1	2	3	4.24
5	2	2	3	1	3.63
6	2	3	1	2	2.42
7	3	1	3	2	2.79
8	3	2	1	3	2.66
9	3	3	2	1	4.36
K ₁	11.15	10.06	8.11	11.02	
K ₂	10.29	9.32	11.63	8.24	
K ₃	9.81	11.87	11.51	11.99	
k ₁	3.72	3.35	2.70	3.67	
k ₂	3.43	3.11	3.88	2.75	
k ₃	3.27	3.96	3.84	4.00	
R	0.45	0.85	1.18	1.25	

从表 2 可以看出,各因素对鸡腿蘑菌丝胞内水溶性 CMP 得率的影响程度依次为 $D>C>B>A$,即微波处理是主要影响因子。表 3 表明,4 个因素对菌丝胞内水溶性 CMP 得率的影响均未达到显著水平。综合考虑各方面因素,本试验确定鸡腿蘑菌

丝体胞内水溶性 CMP 最佳提取条件为 $A_1B_3C_2D_3$,即湿菌丝体匀浆后微波处理 3 min,然后按料水体积比 1 : 2 加水,在 55 ℃ 水浴中抽提 6 h,提取液用等体积无水乙醇醇析。在此条件下,胞内水溶性 CMP 得率为 5.14 %。

表 3 鸡腿蘑菌丝体胞内水溶性 CMP 提取条件正交试验结果的方差分析

Table 3 Analysis of variance of orthogonal experiment on extractive conditions of *Coprinus comatus* mycelial water-soluble polysaccharide

变异来源 Source	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	F
A	2	0.31	0.15	1.00
B	2	1.15	0.57	3.73
C	2	2.66	1.33	8.67
D	2	2.53	1.26	8.22
总和 Total	8	6.64		
$F_{0.05}(2,2)=19.00$		$F_{0.01}(2,2)=99.00$		

2.2 鸡腿蘑菌丝体胞内水溶性 CMP 的分离

2.2.1 DEAE-纤维素 32 柱层析 鸡腿蘑菌丝体胞内 CMP 经过 DEAE-纤维素 32 柱层析后,分别用去离子水、0.1 mol/L NaHCO_3 、0.1 mol/L NaOH 洗脱,得到了 CMP-I、CMP-II、CMP-III 3 个洗脱峰(图 2),说明提取物中含有 3 种多糖组分。经逐管

计算多糖含量,结果发现每个多糖组分所占比例不同,其中去离子水洗脱组分 CMP-I (中性多糖)所占比例较大,约为 69.72 %,而 NaHCO_3 洗脱组分 CMP-II 和 NaOH 洗脱组分 CMP-III 所占比例较小,分别约为 7.57 %和 22.71 %。

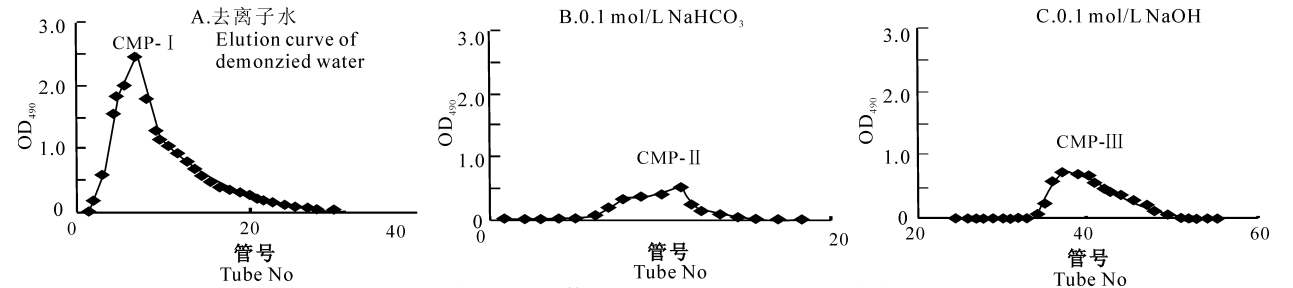


图 2 鸡腿蘑菌丝体胞内水溶性粗 CMP 的洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of *Coprinus comatus* mycelial water-soluble polysaccharide

2.2.2 Sephadex G-200 凝胶柱层析 为了得到单一均匀的多糖组分,将胞内多糖的主要组分 CMP-I 又用 Sephadex G-200 柱层析进行进一步分离^[7,18],结果见图 3。

图 3 表明,中性多糖 CMP-I 含有相对分子质量很接近的 2 个组分 CMP-I-1 和 CMP-I-2,其中 CMP-I-1 为主要组分。

3 讨论与结论

本试验结果显示,鸡腿蘑菌丝体水溶性 CMP 的提取条件为:湿菌丝体匀浆后微波处理 3 min,然后按料水体积比 1 : 2 加水,在 55 ℃ 水浴中抽提 6 h,提取液用无水乙醇醇析,在此条件下,水溶性粗多糖得率约为 5.14 %;鸡腿蘑菌丝体胞内至少含有 3 种多糖组分,其中 CMP-I (中性多糖)为主要组分;CMP-I 包含相对分子质量十分接近的 2 个组分 CMP-I-1 和 CMP-I-2,其中 CMP-I-1 为主要组分。

用 DEAE-纤维素 32 柱层析分离鸡腿蘑多糖时,分别用 3 种不同离子强度的洗脱液洗脱,均得到

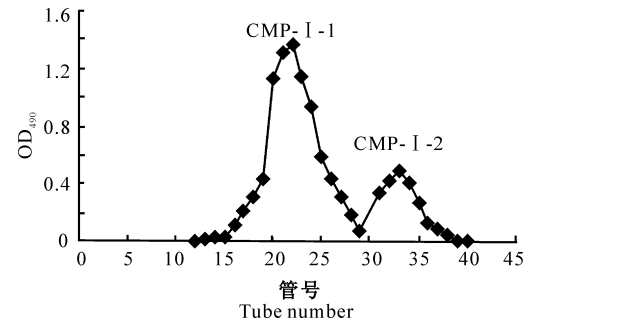


图 3 鸡腿蘑菌丝体胞内 CMP-I 在 Sephadex G-200 柱上的层析结果

Fig. 3 Results of chromatogram of CMP-I on Sephadex G-200 column of *Coprinus comatus* mycelial water-soluble polysaccharide

了单一的多糖洗脱峰,分离效果很好。再用 Sephadex G-200 凝胶色谱进行分离时,又将2个相对分子质量十分接近的多糖组分成功分离。可见,用 DE-AE-纤维素 32 柱层析和 Sephadex G-200 凝胶色谱对鸡腿蘑多糖进行分级分离是可行的。

鸡腿蘑菌丝体粗多糖提取液中含有褐色素,其会影响多糖纯品的外观品质,所以一般对含有色素的多糖提取液在进行分离纯化时,还要进行脱色素处理^[7]。本试验发现,在进行 DEAE-纤维素 32 柱层析时,鸡腿蘑粗多糖提取液中的色素沉积在柱床表面,只有用 0.1 mol/L NaOH 洗脱时方可把褐色素洗下,但 NaOH 洗脱出的多糖组分所占比例较小。因此作者认为,鸡腿蘑菌丝体水溶性多糖在进行分离纯化时可以省去脱色素环节。

[参考文献]

- [1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京:中国农业出版社,1993:139.
Huang N L. Encyclopedia of edible fungi in China [M]. Beijing:China Agriculture Press,1993:139.
- [2] 贾蕊,刘凤兰. 鸡腿菇研究现状及发展前景[J]. 食品科学,2006,27(12):890-894.
Jia R, Liu F L. Research current situation and developing prospect of *Coprinus comatus* [J]. Food Science, 2006, 27(12): 890-894. (in Chinese)
- [3] 邢福国,王海霞,韩春超,等. 鸡腿蘑多糖免疫功能的初步研究[J]. 食品科学,2003,24(6):139-141.
Xing F L, Wang H X, Han C C, et al. Preliminary study on immunological function of polysaccharide from *Coprinus comatus* [J]. Food Science, 2003, 24(6): 139-141. (in Chinese)
- [4] 刘艳芳,张劲松. 鸡腿蘑药理活性概述[J]. 食用菌学报,2003,10(2):60-63.
Liu Y F, Zhang J S. Recent advances in the studies on the medicinal functions of *Coprinus comatus* [J]. Acta Edulis Fungi, 2003, 10(2): 60-63. (in Chinese)
- [5] 杜德清,王丽霞,陈志生. 液体深层发酵技术在食用菌方面的应用[J]. 浙江林业科技,2003,23(3):83-85.
Du D Q, Wang L X, Chen Z S. Application of fermentation technique in edible mushroom cultivation [J]. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 2003, 23(3): 83-85. (in Chinese)
- [6] 孙培龙,魏红福,杨开,等. 姬松茸多糖的分离纯化与理化性质研究[J]. 中草药,2006,37(2):190-192.
Sun P L, Wei H F, Yang K, et al. Study on purification and physical-chemical properties of polysaccharide from extracting *Agaricus blazei* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(2): 190-192. (in Chinese)
- [7] 陈石良. 药用真菌灰树花深层发酵技术及其抗肿瘤多糖的研究

[D]. 江苏无锡:无锡轻工业大学,2000.

Chen S L. Studies on submerged fermentation technology of medicinal fungi *Grifola frondosa* and anti-tumor effect of its polysaccharide [D]. Wuxi, Jiangsu: Wuxi University of Light Industry, 2000. (in Chinese)

- [8] 赵桂梅,张丽霞,于挺敏,等. 灵芝孢子粉水溶性多糖的分离、纯化及结构研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(2):182-185.
Zhao G M, Zhang L X, Yu T M, et al. chemical study on the water soluble polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(2): 182-185. (in Chinese)
- [9] Yuko Y, Ryoko T, Hazime S, et al. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) quél. Isolation and structure of a β -glucan [J]. Carbohydrate Research, 1985, 148(1): 245-248. (in Chinese)
- [10] Mizuno T, Ohsawa K, Hagivara N, et al. Fraction and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa* Agric [J]. Bio Chem, 1986, 50(7): 1679-1688. (in Chinese)
- [11] Rongmin Y, Lei W, Hui Z, et al. Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris* [J]. Fitoterapia, 2004, 75(7-8): 662-666.
- [12] 魏红福,孙培龙,杨开,等. 姬松茸子实体多糖分离纯化研究[J]. 中国食用菌,2005,24(5):45-48.
Wei H F, Sun P L, Yang K, et al. Study on isolation and purification of polysaccharide from fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill [J]. Edible Fungi of China, 2005, 24(5): 45-48. (in Chinese)
- [13] 魏芸,张天佑,张姝,等. 羊肚菌多糖的分离纯化及组成结构分析[J]. 植物资源与环境学报,2000,9(2):14-17.
Wei Y, Zhang T Y, Zhang S, et al. Isolation, purification and characterization of polysaccharides from *Morchella esculenta* L [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2000, 9(2): 14-17. (in Chinese)
- [14] 侯化国,王玉民. 正交试验法[M]. 长春:吉林人民出版社,1985:241.
Hou H G, Wang Y M. Orthogonal test [M]. Changchun: Jilin People's Press, 1985: 241. (in Chinese)
- [15] 王卫国,赵永亮. 香菇多糖分离最佳工艺及最佳原料探讨[J]. 中草药,2000,31(8):584-585.
Wang W G, Zhao Y L. Studies on the choice of material and optimal conditions for the extraction of lentinan from mushroom [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31(8): 584-585. (in Chinese)
- [16] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉:武汉大学出版社,1994:78-145.
Zhao Y F. Theorem of biochemical technology and its application [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 1994: 78-194. (in Chinese)

(下转第234页)