

“沪农灵芝 1 号”品种子实体多糖分析

刘艳芳^{1,2}, 唐庆九^{*1}, 张劲松¹, Steve W. Cui^{2,3}, 杨焱¹,
吴迪¹, 周帅¹, 唐传红¹, 张忠¹, 颜梦秋¹

(1. 国家食用菌工程技术研究中心/农业部应用真菌资源与利用重点开放实验室/上海市农业科学院 食用菌研究所, 上海 201403; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 加拿大农业部 圭尔夫食品研究中心, 加拿大 N1G5C9)

摘要: 以水提醇沉法获得“沪农灵芝 1 号”子实体中的灵芝多糖, 并对其结构特征和含量进行分析。高效凝胶尺寸排阻色谱-多角度激光光散射仪-示差折光检测仪联用分析结果表明, 该多糖重均相对分子质量为 2.28×10^6 , 均方根半径为 150.1 nm, 多分散系数 (M_w/M_n) 为 1.14, 在水溶液中呈棒状结构。单糖组成及甲基化分析结合酶解试验结果表明, 该多糖为 β -1,3/1,6-葡聚糖。经液相色谱法定量检测, 段木栽培所得灵芝子实体中, 该多糖质量分数为 0.52 mg/g, 显著高于袋料栽培所得子实体中相应组分的含量。

关键词: 灵芝多糖; 多角度激光光散射; 分子特征

中图分类号: S 646 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)10—1078—05

Analysis of Large Molecular Weight Polysaccharide in the Fruiting Bodies of *Ganoderma lucidum* Cultivar ‘Hunonglingzhi 1’

LIU Yanfang^{1,2}, TANG Qingjiu^{*1}, ZHANG Jingsong¹, Steve W. Cui^{2,3}, YANG Yan¹,
WU Di¹, ZHOU Shuai¹, TANG Chuanhong¹, ZHANG Zhong¹, YAN Mengqiu¹

(1. National Engineering Research Center of Edible Fungi; Key Laboratory of Applied Mycological Resources and Utilization, Ministry of Agriculture; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. School of Chemical and Materials Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Guelph Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Guelph, N1G 5C9, Canada)

Abstract: The high molecular polysaccharide fraction was purified by precipitating a hot-water extract with 20% (V/V) ethanol from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* cultivar 'Hunonglingzhi 1'. The high performance size exclusion chromatography - multiple angle laser light scattering - refractive index detector (HPSEC-MALLS-RI) was adopted to determine the molecular characteristics of this fraction. Results indicated that the polysaccharide possessed high weight average molecular weight (M_w) of 2.28×10^6 , small polydispersity of 1.14 and large gyration radius (R_g) of 150.1 nm, and existed with a rigid chain conformation in the liquid solution. Structural

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 上海市科委国际合作项目(13540721901); 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303080)。

作者简介: 刘艳芳(1980—), 女, 山东曲阜人, 化学工程博士研究生, 副研究员, 主要从事真菌多糖化学研究。E-mail: aliu-1980@163.com

* 通信作者: 唐庆九(1969—), 女, 江苏盐城人, 理学博士, 研究员, 主要从事天然产物化学和药理学研究。E-mail: tangqingjiu@saas.sh.cn

analysis showed that this polysaccharide was a β - (1,3)/ (1,6)-linked D-glucan. Its content determined by HPLC in wood cultivated fruiting bodies was about 0.52 mg/g, which was significantly higher than that in bag cultivated pattern.

Keywords: polysaccharide of *Ganoderma lucidum*, MALLS, molecular character

灵芝是我国著名的药用真菌,属担子菌门、非褶菌目、灵芝菌科、灵芝属^[1]。现代研究表明,灵芝具有多种生物活性,临床上主要用于治疗慢性支气管炎、神经衰弱、冠心病、肝炎、高血脂、高血压、白细胞减少症等疾病^[2]。中国药典^[3]规定赤芝(*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.)和紫芝(*Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang)的干燥子实体为药用正品。“沪农灵芝1号”为近年来广泛推广的赤芝品种之一,因其具有抗病性好、孢子粉产量高等优点,深受各地菇农喜爱。

多糖是灵芝的主要活性成分之一,在抗肿瘤和免疫调节方面起着重要作用^[4-6]。至今已从灵芝子实体、孢子粉、发酵菌丝体和胞外液中分离获得200多个多糖组分^[7],其中大部分为杂多糖和葡聚糖。据报道^[8-9],灵芝品种对多糖含量乃至结构都有明显影响。为了进一步分析“沪农灵芝1号”子实体中的多糖成分,作者以高效凝胶尺寸排阻色谱-多角度激光光散射仪-示差折光检测仪联用分析技术对其中的大相对分子质量多糖组分的分子特征进行了分析,并建立了高效液相色谱法测定其多糖含量,为灵芝的进一步开发利用和质量控制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

沪农灵芝1号灵芝菌株,由浙江龙泉基地栽培获得子实体。

1.2 试剂

标准单糖 D-半乳糖, D-葡萄糖, D-阿拉伯糖, L-岩藻糖, L-鼠李糖, D-甘露糖, D-木糖: 购自 Sigma 公司; 葡聚糖 Pullulan (P-50) 标准品: 购自 Shodex 公司; 专一性内切-1,3- β -D-glucanase (来源于 *Trichoderma* sp, EC:3.2.1.39): 购自 Megazyme 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

Waters2695 型高效液相色谱仪: 配有 Waters2414 示差折光检测器 (RI), Waters 公司产

品; 激光光散射仪 (MALLS): Wyatt 公司产品; 高效阴离子色谱仪: Dionex 公司产品。

1.4 试验方法

1.4.1 灵芝多糖的纯化 参考文献[10], 采用乙醇沉淀法纯化灵芝大相对分子质量多糖。称取灵芝子实体粉 100 g, 加入 1 L 蒸馏水浸泡 30 min 后, 煮沸提取 1 h, 过滤, 残渣重复提取 1 次, 合并滤液。滤液经旋转蒸发仪减压浓缩至 100 mL, 离心 (8 000 g, 15 min) 去除残渣, 上清液加无水乙醇至乙醇终体积分数为 20%, 4 ℃ 放置 12 h, 倒去上清液, 10 000 g 离心 10 min, 沉淀用体积分数 20% 乙醇反复洗涤 3 次, 离心去上清液, 沉淀部分加 20 mL 蒸馏水溶解, 80 ℃ 水浴加热挥去乙醇后, 经冷冻干燥机干燥即得灵芝大相对分子质量多糖。

1.4.2 灵芝多糖纯度鉴定及相对分子质量分析 采用苯酚-硫酸法^[11]测定灵芝多糖的糖含量, 以高效凝胶尺寸排阻色谱-多角度激光光散射仪-示差折光检测仪联用分析法 (HPSEC-MALLS-RI System) 对该灵芝多糖的纯度和相对分子质量进行分析^[12]。具体色谱条件为: 以 TSK-GEL 系列 G6000PW_{XL} 和 G4000PW_{XL} 色谱柱 (7.8 mm × 300 mm, TOSOH, 日本) 为分析柱, 以 0.15 mol/L NaNO₃ 和 0.05 mol/L NaH₂PO₄ (pH=7) 为流动相, 在 35 ℃ 条件下, 以 0.5 mL/min 流速进行洗脱分析。样品质量浓度配制成 5 mg/mL, 12 000 g 高速离心 10 min 后, 取上清液进样 100 μ L。其中 8 角度激光光散射仪的光源波长选用 623.8 nm, 多糖在溶液中的折光指数增量按照 0.146 mL/g 计算。使用 Astra (version 6.1.1, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA) 数据分析软件对光散射数据进行采集和分析, 计算相对分子质量。

1.4.3 多糖的单糖组成及连接方式分析 按照文献 [13] 方法, 采用高效阴离子交换色谱分析法 (HPAEC) 对灵芝多糖的单糖组成进行分析。灵芝多糖经甲基化处理后, 以 GC-MS 分析其产物, 确定糖残基的主要连接方式^[12]。

1.4.4 高效液相色谱法定量分析大相对分子质量

灵芝多糖含量 精密称取灵芝子实体粉 4 g, 加入蒸馏水 40 mL, 沸水浴提取 2 h, 过滤离心后取 20 mL 提取液直接冻干。加入 1 mL 流动相使样品充分溶解后, 按照 1.4.2 项的色谱条件进行分析。以上述灵芝多糖为标准品, 分别配成 0.25、0.5、1、2、4 mg/mL 的浓度进样, 以示差折光检测器所测峰面积对应多糖浓度做标准曲线, 计算多糖含量。

1.4.5 栽培方式对“沪农灵芝 1 号”子实体中大相对分子质量多糖含量的影响 将“沪农灵芝 1 号”品种进行袋料和段木栽培, 收集子实体后按上述 1.4.4 项方法进行大相对分子质量多糖含量测定, 考察栽培方式对灵芝大相对分子质量多糖含量的影响。

2 结果

2.1 灵芝大相对分子质量多糖的纯化及相对分子质量分析

“沪农灵芝 1 号”子实体热水提取物经 20% 乙醇沉淀后获得一组分, 苯酚硫酸法检测其多糖含量为 94.3%。紫外扫描结果显示该组分水溶液在 280 nm 处无紫外吸收峰, 说明该组分为多糖, 经高效凝胶尺寸排阻色谱检测, 示差检测器 (RI) 信号峰为单一峰, 证明该多糖纯度较高 (图 1)。采用 HPSEC-MALLS-RI 技术对其相对分子质量进行分析, 以普鲁兰 (P-50, 重均相对分子质量 4.88×10^4) 为标准品对各个角度的激光进行归一化处理, 计算该多糖重均相对分子质量 (M_w) 为 2.28×10^6 。该多糖的相对分子质量分布如图 2 所示, 经分析其多分散系数 (M_w/M_n) 为 1.14, 属于窄分布样品。

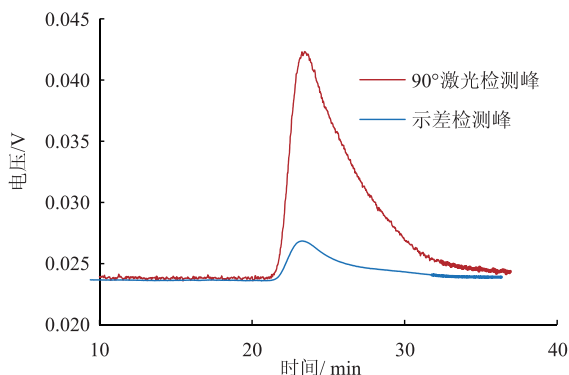


图 1 高效凝胶尺寸排阻色谱-多角度激光光散射仪-示差折光检测仪联用分析多糖组分

Fig. 1 Light scattering and refractive index profiles from HPSEC-MALLS-RI experiments on the polysaccharide fraction

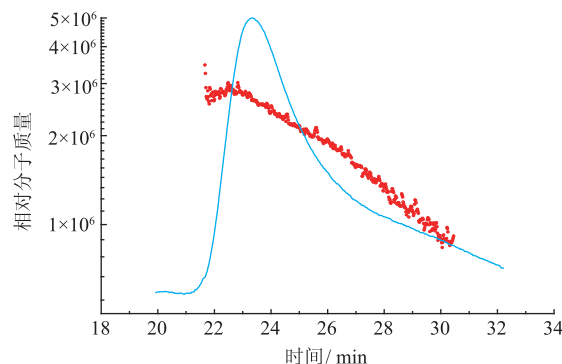


图 2 多糖组分的相对分子质量分布

Fig. 2 Molar mass distribution of the polysaccharide fraction

均方根半径 (R_g) 与重均相对分子质量 (M_w) 间的关系如图 3 所示, 拟合曲线的斜率可以用来表征多糖在溶液中的构象。当斜率大于 0.7 时表示高分子在溶液中是棒状排列, 当斜率为 0.5~0.6 时则表示高分子在溶液中呈线性无规则线团, 斜率约为 0.33 时表示高分子为球状形态^[14]。由 Astra 处理软件计算, 该多糖的 R_g 值为 (150.1 ± 6.6) nm, 拟合曲线的斜率为 0.98 ± 0.01 , 说明该多糖在流动相体系中呈现硬的棒状排列。

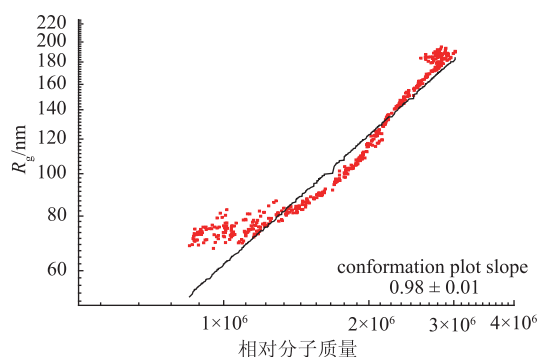


图 3 多糖组分的 R_g 与 M_w 双对数关系图及拟合曲线

Fig. 3 Double-logarithmic plot of R_g against M_w and the linear fitting curve for the polysaccharide fraction

2.2 单糖组成及连接方式分析

高效阴离子交换色谱分析 (HPAEC) 结果表明, 该灵芝多糖主要由葡萄糖组成。酶解试验结果显示, 该多糖可以被专一性内切- β -1,3-D-glucanase 水解, 判定该多糖为 β 构型。甲基化分析其连接方式结果显示, 该多糖主要包含 3 种主要连接方式的糖残基 (图 4), 分别为末端葡萄糖残基, 1,3-连接的葡萄糖残基和 1,3,6-连接的葡萄糖残基 (表 1), 其摩尔比约为 1:2.1:0.9, 说明该多糖的结构是以 β -

1,3连接为主链、1,6-连接为支链的葡聚糖。

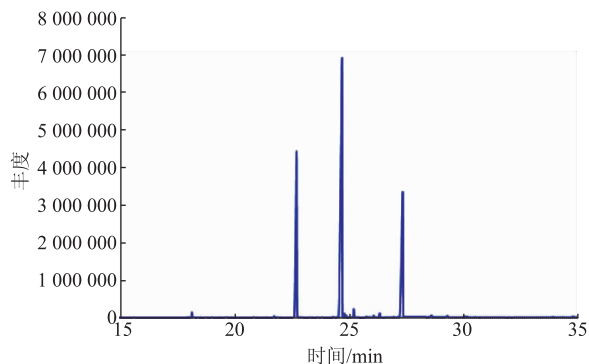


图4 多糖的总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram of the polysaccharide fraction

表1 多糖组分的甲基化分析结果

Table 1 Methylation analysis of the polysaccharide fraction

部分甲基化的糖醇乙酯	连接方式	面积分数/%
2,3,4,6-Me4-Glep	Glep(→	25.1
2,4,6-Me3-Glep	→3)-Glep-(1→	51.9
2,4-Me2-Glep	→3,6)-Glep-(1→	23.0

2.3 大相对分子质量灵芝多糖的含量测定

2.3.1 标准曲线的建立 以上述灵芝多糖为标准品,配制成不同浓度的溶液,使用示差折光检测器(RI)测定对应浓度下多糖的峰面积,以多糖质量浓度(X , mg/mL)对峰面积(Y)绘制标准曲线,得回归方程, $y=173\ 604x+3\ 862$, $r=0.999\ 6$, 线性质量浓度范围为 $0.5\sim4$ mg/mL。

2.3.2 栽培方式对“沪农灵芝1号”子实体中大相对分子质量多糖含量的影响 分别收集在四川成都基地经袋料和段木栽培获得的“沪农灵芝1号”子实体,对其大相对分子质量多糖含量进行了测定,结果见表2。段木栽培所得子实体大相对分子质量多糖含量为 0.52 mg/g,显著高于袋料栽培所得灵芝子实体中该组分的质量分数(0.14 mg/g)。

表2 不同栽培方式所得灵芝子实体中大相对分子质量多糖质量分数测定($n=3$)

Table 2 Contents of large molecular weight polysaccharide in the fruiting bodies obtained by different cultivation patterns

栽培方式	多糖质量分数/(mg/g)
段木栽培	0.52 ± 0.06^a
袋料栽培	0.14 ± 0.03^b

注:* 数值上的不同字母表示差异达到5%的显著水平

3 结 语

通过简单的乙醇沉淀法从“沪农灵芝1号”子实体中分离获得大相对分子质量 β -葡聚糖,与笔者从另一灵芝材料所得葡聚糖^[10]结构相同,均以 β -(1,3)-连接为主链、 β -(1,6)-连接为支链,其构象特征也相似,但相对分子质量大小略有不同。经检测发现,分类学上属于不同种的灵芝,其多糖相对分子质量分布有显著差别,部分灵芝中未检测到相对分子质量为上百万的水溶性多糖组分。另外,不同来源灵芝子实体所含大分子多糖的结构是否完全相同,仍需通过对这部分多糖的纯化和结构解析来进行验证。

据报道^[9],不同来源灵芝子实体多糖含量存在差异,但此种差异仅通过苯酚-硫酸法等化学方法检测其总多糖含量来进行比较,没有针对性。因为并非所有的多糖组分均具有明显的生物活性,而 β -(1,3)/(1,6)-葡聚糖在免疫调节和抗肿瘤等方面表现出较好的效果^[15-16],所以,化学方法所测总多糖含量高低不能完全反映灵芝子实体的品质和多糖特征。作者以分离获得的 β -葡聚糖为标准品,建立了HPLC定量分析的检测方法,为灵芝子实体品质评价提供了参考。研究发现,段木栽培所得的灵芝子实体中 β -葡聚糖含量显著高于袋料栽培,这为灵芝子实体的生产提供了指导。

HPSEC-MALLS联用技术是近些年兴起的分析大分子聚合物的新技术,现已应用于多糖的相对分子质量测定^[17]。与原有的GPC分析法相比,此方法不需要标准品作对照,对多糖进行相对分子质量测定时受样品结构和构型的影响小,因此可以更准确地得到多糖的相对分子质量信息。另外,此技术还可通过测定样品在溶液状态下的各项参数来分析其构象特征,为进一步研究多糖的构效关系提供有用信息。

参考文献:

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究(第二版)[M]. 北京:北京医科大学出版社,2001.
- [2] 杨晓丽,地里热巴·沙它尔,李翔,等. 灵芝超微粉理化特性研究[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(1):69-74.
YANG Xiaoli,DILIREBA Sha-taer,LI Xiang,et al. Physicochemical properties of ultrafine *Ganoderma lucidum* powder [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(1):69-74.(in Chinese)
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [4] 刘高强,王晓玲. 灵芝免疫调节和抗肿瘤作用的研究进展[J]. 菌物学报,2010,19(1):152-158.
LIU Gaoqiang,WANG Xiaoling. Advances in studies on immunomodulating and anti-tumor effects of *Ganoderma lucidum* [J]. **Mycosystema**,2010,19(1):152-158.(in Chinese)
- [5] NIE Shaoping,ZHANG Hui,LI Wenjuan,et al. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*:Isolation,structure and bioactivities[J]. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**,2013,1:10-20.
- [6] 郝瑞芳,李荣春. 灵芝多糖的药理和保健作用及应用前景[J]. 食用菌学报,2004,11(4):57-62.
HAO Ruifang,LI Rongqing. Pharmacological and health effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and its application prospect[J]. **Acta Edulis Fungi**,2004,11(4):57-62.(in Chinese)
- [7] HUIE Carmen,DI Xin. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components [J]. **Journal of Chromatography B**,2004,812(1-2):241-257.
- [8] 史俊青,张丽萍,杨春清,等. 不同品种灵芝多糖含量差异研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):104-106.
SHI Junqing,ZHANG Liping,YANG Chunqing,et al. Study on polysaccharide content in two different variety of *Ganoderma lucidum* [J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**,2010,16(13):104-106.(in Chinese)
- [9] 徐凌川,许昌盛. 18种不同来源灵芝的多糖含量测定[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2004,6(2):57-60.
XU Lingchuan,XU Changsheng. Determination of content of polysaccharides of 18 varieties of *Ganoderma lucidum* Karst with different origins[J]. **World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica**,2004,6(2):57-60.(in Chinese)
- [10] LIU Yanfang,ZHANG Jingsong,TANG Qingjiu,et al. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β -D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. **Carbohydrate Polymers**,2014,101:968-974.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第2版)[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.
- [12] LIU Yanfang,ZHAO Yuan,YANG Yan,et al. Structural characteristics and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Coprinus comatus* [J]. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**,2013,2:164-169.
- [13] 杨仁智,张劲松,唐庆九,等. 高效阴离子交换色谱法测定毛头鬼伞多糖中的单糖组成[J]. 中国食用菌,2005,24(5):42-44.
YANG Renzhi,ZHANG Jingsong,TANG Qingjiu,et al. High performance anion exchange chromatography method to determine the monosaccharide composition of polysaccharides [J]. **Edible Fungi of China**,2005,24(5):42-44.(in Chinese)
- [14] YANG Liqun,ZHANG Liming. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources [J]. **Carbohydrate Polymers**,2009,76:349-361.
- [15] Akramiene,Dalia.,Kondrotas,Aantolijus,Didziapetriene,Janina,et al. Effects of beta-glucans on the immune system [J]. **Medicina (Kaunas)**,2007,43(8):597-606.
- [16] CHEN Jiezhong,SEVIOUR Robert. Medicinal importance of fungal β - (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans [J]. **Mycological Research**,2007,111:635-652.
- [17] 陈同强,ADILBEKOV J,王娟,等. 凝胶渗透色谱-多角度激光散射联用技术研究红芪多糖中4个组分分子特征[J]. 中国中药杂志,2012,37(12):1798-1802
CHEN Tongqiang,ADILBEKOV J,WANG Juan,et al. Study on molecular characteristics of four components contained in Hedysari Radix polysaccharide by gel permeation chromatography-multi angle laser light scattering technology (GPC-MALLS) [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**,2012,37(12):1798-1802.(in Chinese)