

灵芝孢子粉多糖的分离纯化、结构表征及免疫活性初探

冯蒙蒙¹, 王海鸣², 杨惠成², 孙震³, 孙秀兰³, 戴军^{*1}

(1. 食品与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 广州广电计量检测股份有限公司, 广东 广州 510065; 3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用水浴回流法提取灵芝孢子粉粗多糖, 再依次使用 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱和 Sepharose CL-6B 凝胶色谱柱分离纯化得到 2 种多糖组分 GLP1a 和 GLP1b, HPSEC 法测得 2 种组分均呈单一峰, 重均分子量分别为 1.12×10^6 和 1.21×10^5 。HPLC、红外光谱和核磁共振分析的结果表明, GLP1a 和 GLP1b 主要由葡萄糖组成, 主链都是以 β -(1,6) 糖苷键连接, GLP1b 在部分 1→6 连接的葡萄糖的 3 位和 4 位有分支。MTT 实验表明, 2 个多糖级分均具有一定的免疫活性, 而且都存在明显的量效关系, GLP1b 的免疫活性明显高于 GLP1a。

关键词: 灵芝孢子粉多糖; 分离纯化; 结构表征; 免疫活性

中图分类号: Q 539 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)05-0502-07

Purification, Structural Characterization and Immunological Activity of Polysaccharides from the Spores of *Ganoderma lucidum*

FENG Mengmeng¹, WANG Haiming², YANG Huicheng², SUN Zhen³, SUN Xiulan³, DAI Jun^{*1}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Guangzhou GRG Metrology & Test Co., LTD, Guangzhou 510065, China; 3. Food Academy of Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The crude polysaccharides was obtained from the hot-water extract of the spores of *Ganoderma lucidum*, and two main fractions GLP1a and GLP1b were isolated by DEAE Sepharose Fast Flow chromatography and Sepharose CL-6B gel chromatography. The HPSEC analysis indicated that the two fractions were all homogeneous polysaccharides and their relative molecular mass weight were respectively 1.12×10^6 and 1.21×10^5 . The analysis of composition, infrared spectrum and NMR spectroscopy indicated that GLP1a and GLP1b all had a backbone of β -D-(1,6)-glucan and GLP1b were partly substituted at C-3 and C-4 in the main chain. Preliminary tests in vitro showed that the two polysaccharide fractions all has stimulating effects on murine splenocyte

收稿日期: 2016-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171688)。

* 通信作者: 戴军(1958—), 男, 江苏盐城人, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事食品功能因子的分析鉴定及其构效关系研究。

E-mail: daihp1c@163.com

引用本文: 冯蒙蒙, 王海鸣, 杨惠成, 等. 灵芝孢子粉多糖的分离纯化、结构表征及免疫活性初探[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(05): 502-508.

proliferation and the effect of GLP1b was better than GLP1a. Moreover, their activities were all in a dose-dependent manner. GLP1a.

Keywords: *Ganoderma lucidum* spore polysaccharides, purification, structural characterization, immunological activity

灵芝是一种珍贵的药用真菌,属于担子菌门担子菌纲多孔菌科灵芝属,又称“灵芝草”、“仙草”、“长生草”,在我国有悠久的药用历史^[1]。传统中医视之为名贵滋补类药材,有扶正固本、延年益寿之功效,是上等保健医疗佳品。灵芝孢子是灵芝生长成熟期从菌盖弹射出来极其细小的种子,具有灵芝的全部遗传活性物质^[2]。近年来药理试验表明,灵芝孢子粉比灵芝子实体具有更强更全面的生理活性,是灵芝的精华部分,具有抑制肿瘤细胞生长,调节、提高人体免疫力,降低胆固醇,提高肌体耐缺氧能力等功能^[3-5];灵芝多糖类化合物是灵芝孢子粉或子实体及菌丝体中主要的活性成分之一^[6]。

目前,市场上对灵芝子实体多糖的研究及开发利用已经非常广泛,从灵芝子实体中分离出来的多糖已有一百五十多种,其中大部分为 β -型葡聚糖,少数为 α -型葡聚糖^[7]。另外,有文献报道在已分离的灵芝子实体中具有 β -(1 \rightarrow 3)键连接的D-葡聚糖的活性较大^[8]。然而,有关灵芝孢子粉的研究虽然已有近20年的时间,但关于从一种灵芝孢子粉中同时分离出多个多糖级分并对其进行结构表征和免疫活性研究的报道较少^[9]。本文作者针对东北吉林某企业培育的一新品种灵芝的孢子粉,采用水浴回流法提取粗多糖,并进一步分离纯化得到两个多糖级分GLP1a和GLP1b,同时对这2个组分的基本结构和免疫活性进行初步的研究。本研究对了解和评价该品种灵芝孢子粉及其多糖的质量和特点,进而深入研究其多糖构效关系及更好的开发利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

样品:赤芝破壁孢子粉由吉林某企业提供;

试剂:苯酚、浓硫酸、三氯甲烷、正丁醇、三氟乙酸(TFA),国药集团化学试剂有限公司产品;甲醇、乙腈,美国Tedia公司产品;1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP),美国Acros Organics公司产品;四甲基偶氮唑蓝(MTT),美国Biosharp公司产品;DMEM

培养液,美国Gibco公司产品;

树脂D101,河北沧州宝恩材料有限公司产品;DEAE Sepharose Fast Flow,美国GE Healthcare公司产品;Sepharose CL-6B,美国GE Healthcare公司产品;MD44-3.5透析袋,美国Viskase公司产品。

1.2 仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪,配紫外检测器,Agilent 公司产品;Waters 1525 高效液相色谱仪,配2414 示差折光检测器,Waters 公司产品;Spectra Max M2 多功能酶标仪,美谷子仪器有限公司产品;氮吹仪,杭州奥盛仪器有限公司产品;BSZ-100 自动部分收集器、玻璃层析柱,上海沪西分析仪器厂有限公司产品。

1.3 孢子粉多糖的提取

称取约20 g已破壁灵芝孢子粉样品置于500 mL的平底烧瓶中,按料液比1:20(g/mL)加入400 mL去离子水,摇匀,在100 °C下水浴回流提取6 h,真空抽滤,水提液浓缩至适量,加入三倍体积无水乙醇在4 °C下静置过夜,8 000 r/min离心20 min,沉淀依次用95%乙醇和无水乙醇洗涤,离心后去上清,40 °C真空干燥。

将粗多糖配成10 g/L的多糖溶液50 mL置于三角瓶中,加入3.0 g D101树脂,于140 r/min、50 °C下震荡脱色4 h。脱色后的多糖溶液按体积比5:1加入Sevag试剂,强烈震荡20 min,静置分层后除去白色絮状物和氯仿相,重复此过程直到白色絮状物不再出现。

1.4 多糖的分离纯化

1.4.1 将1.3中脱色脱蛋白质后的粗多糖配制成30 g/L左右的多糖溶液10 mL,经过DEAE Sepharose Fast Flow层析柱(2.6 cm \times 30 cm)进行阴离子交换色谱分离,自动部分收集器收集200管,1~100管用pH 7.8、0.02 mol/L Tris-HCl缓冲液进行洗脱,101~200管用0.01~1.0 mol/L NaCl-0.02 mol/L Tris-HCl缓冲液进行线性梯度洗脱,流速为8 mL/min,1 min/管。通过苯酚硫酸法跟踪检测每一管的多糖含量,绘制洗脱曲线,合并相同级分,分别透

析、浓缩及冻干。

1.4.2 将 1.4.1 获取的多糖级分通过 Sepharose CL-6B 柱(2 cm×100 cm)进行凝胶过滤色谱分离,洗脱液为 0.1 mol/L NaCl,流速 0.5 mL/min,10 min/管,共收集 100 管,采用苯酚硫酸法跟踪检测每一管的多糖含量,绘制洗脱曲线,合并相同级分,分别透析、浓缩及冻干。

1.5 HPSEC 分析

1.5.1 色谱条件 Shodex OHpak SB-803、SB-804、805HQ 8.0 mmID×300 mmL 三根柱串联,检测器为示差折光检测器,以 0.1 mol/L NaNO₃ 溶液为洗脱液,流速为 0.8 mL/min,柱温为 30 °C,进样体积为 20 μL。

1.5.2 多糖样品相对分子质量分析及纯度鉴定 将相对分子质量分别为 2.7×10^3 、 9.75×10^3 、 3.68×10^4 、 1.35×10^5 、 2.0×10^6 的标准葡聚糖配成约 3 g/L 的标准溶液,进样分析,由 GPC 软件自动处理数据得到相对分子质量校正曲线方程。然后,将多糖样品配制成 10 g/L 的水溶液,0.22 μm 微孔膜过滤,同样条件下进样分析。

1.6 多糖级分的完全酸水解

多糖样品的完全酸水解方法参照参考文献[10]。

1.7 混合单糖标样及多糖级分的 PMP 衍生化

混合单糖标样和多糖样品的衍生化方法参照参考文献[11]。

1.8 HPLC 分析条件

色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250 mm×4.6 mm ID, 5 μm),以 0.1 mol/L pH 6.7 磷酸盐缓冲液-乙腈(体积比为 83:17)为流动相,检测波长为 245 nm,柱温为 30 °C,流速为 1.0 mL/min,进样体积为 20 μL。

1.9 红外光谱分析

分别称取多糖级分 1 mg 置于研钵中,加入适量溴化钾充分研磨,压片,400~4 000 cm⁻¹ 的范围内扫描 32 次,分辨率为 4 cm⁻¹。

1.10 核磁共振分析

分别称取约 30 mg 多糖样品溶于 D₂O 中,配置成饱和溶液,DSS 做内标,VANCE III HD 核磁共振仪,400 MHz,40 °C 条件下测 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱。

1.11 多糖样品促进正常小鼠脾淋巴细胞的增殖实验

2 个多糖级分促进正常小鼠脾淋巴细胞增殖的实验方法参照参考文献[12]。

2 结果与讨论

2.1 孢子粉多糖的分离级分

按照 1.4.1 的方法,灵芝孢子粉粗多糖由 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析得到中性多糖 GLP1 和酸性多糖 GLP2 两个级分,如图 1 所示。2 个级分的得率分别为:GLP1,78.54%;GLP2,6.49%。GLP1 和 GLP2 经 Sepharose CL-6B 柱分离结果见图 2。由图可知,经 Sepharose CL-6B 柱分离后中性多糖 GLP1 得到 3 个组分 GLP1a、GLP1b 和 GLP1c,酸性多糖 GLP2 得到 2 个组分 GLP2a 和 GLP2b。本文着重对相对分子质量较大的中性多糖级分 GLP1a 和 GLP1b 做进一步的结构表征和免疫活性讨论(关于 GLP1c 和 GLP2a、GLP2b 的分析研究另文发表)。

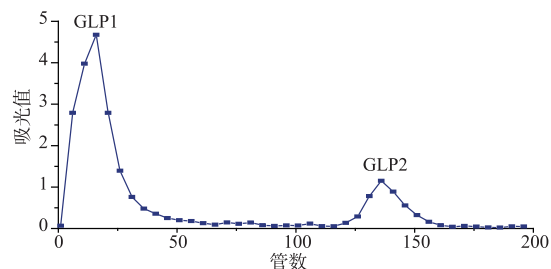


图 1 灵芝孢子粉多糖在 DEAE Sepharose Fast Flow 柱上的分离洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of *Ganoderma lucidum* polysaccharide by DEAE Sepharose Fast Flow

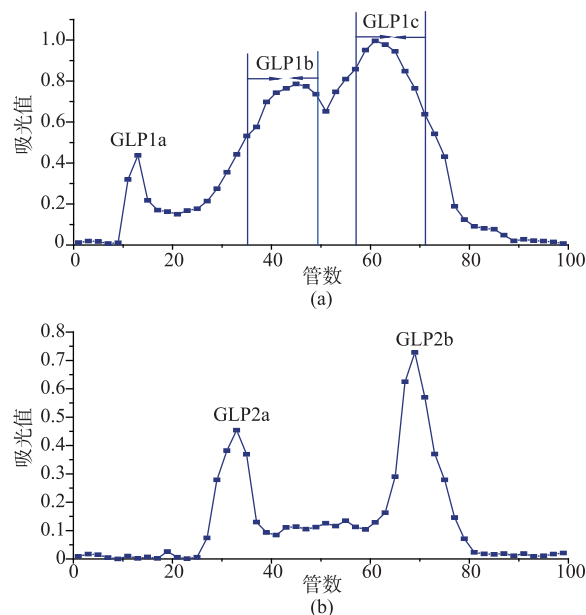


图 2 GLP1 和 GLP2 在 Sepharose CL-6B 柱上的分离洗脱曲线

Fig. 2 Respective elution profiles of GLP1 and GLP2

2.2 多糖级分的纯度测定及相对分子质量分布

HPSEC 测得 GLP1a 和 GLP1b 的相对分子质量分布色谱图于图 3,由图可见,2 级分均为单一对称峰,说明 GLP1a 和 GLP1b 皆为均一多糖组分。同时按照 1.5 方法,由 HPSEC 测得 5 个多糖级分的重均相对分子质量(M_w)、数均相对分子质量(M_n)及相对分子质量分布宽度(M_w/M_n)如表 1 所示。

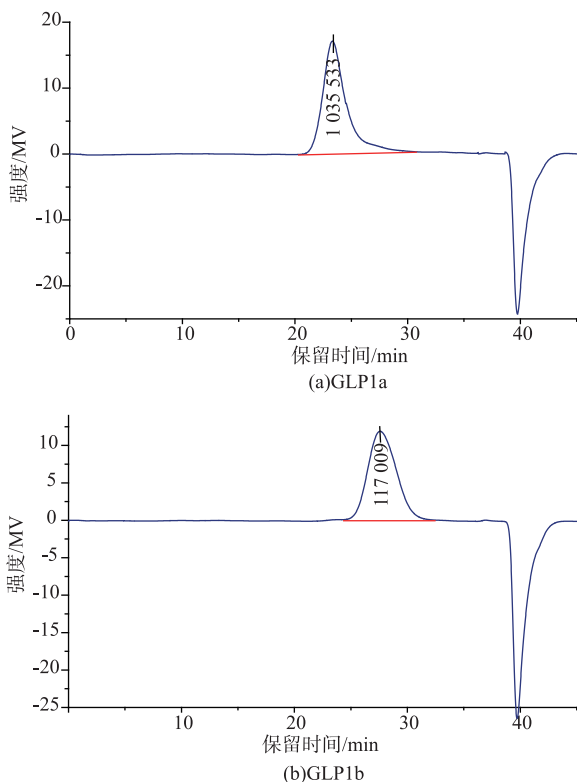


图 3 GLP1a 和 GLP1b 的 HPSEC 图

Fig. 3 HPSEC chromatogram of GLP1a and GLP1b

表 1 5 种多糖级分的相对分子质量分布

Table 1 Relative molecular mass distribution of five polysaccharide fractions

多糖级分	重均相对分子质量 M_w	数均相对分子质量 M_n	分布宽度 M_w/M_n
GLP1a	1 119 956	861 684	1.30
GLP1b	121 035	93 344	1.30
GLP1c	11 049	8 188	1.35
GLP2a	1 405 931	814 216	1.72
GLP2b	7 448	3 841	1.94

2.3 单糖组成

12 个单糖标样和 2 个多糖级分 GLP1a、GLP1b 的水解产物的 PMP 柱前衍生化反相高效液相色谱图如图 4 和图 5 所示。根据 12 个单糖标样峰的保

留时间对 GLP1a、GLP1b 进行定性,由图 5 可知, GLP1a 和 GLP1b 主要由葡萄糖组成,其摩尔百分比分别为 97.07%和 95.96%,因此, GLP1a 和 GLP1b 均为葡聚糖。

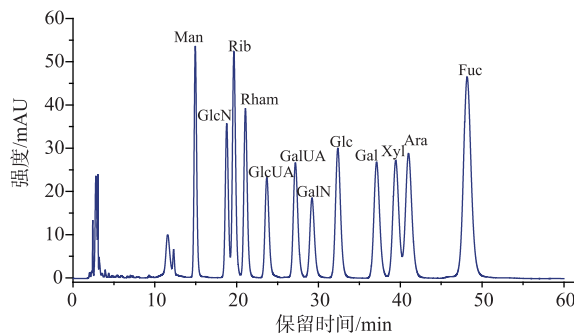


图 4 12 种标准单糖经 PMP 衍生化后 RP-HPLC 图谱

Fig. 4 Chromatography of PMP derivatives of twelve kinds of monosaccharides by HPLC

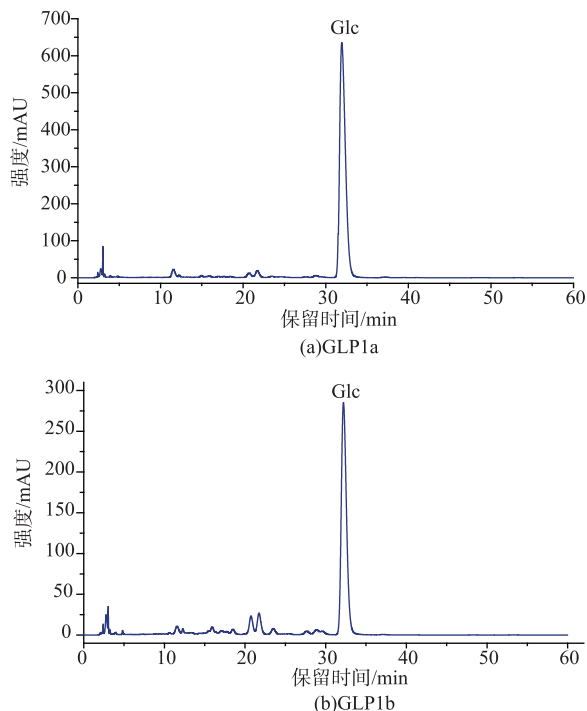


图 5 GLP1a 和 GLP1b 经 PMP 衍生化后的 RP-HPLC 图谱

Fig. 5 RP-HPLC chromatograms of GLP1a and GLP1b by PMP derivatives

2.4 红外光谱分析

红外光谱图显示, GLP1a 和 GLP1b 的特征峰主要出现在 3 400, 2 920, 1 640, 1 375 cm^{-1} 和 1 060 cm^{-1} 附近。其中 3 400 cm^{-1} 附近较强、较宽的吸收峰是糖类的 O-H 伸缩振动, 2 920 cm^{-1} 附近的弱吸收峰是糖类 C-H 的伸缩振动, 这 2 组峰是糖类的特征

吸收峰。1 640 cm^{-1} 附近的较强吸收峰是糖的 C=O 伸缩振动, 1 375 cm^{-1} 附近的峰是表示 C-H 的变角振动, 1 000~1 200 cm^{-1} 附近宽吸收峰是吡喃环 C-O-C 和 C-O 的伸缩振动吸收峰。另外, 896 cm^{-1} 附近较小吸收峰是典型的吡喃葡聚糖和 β -型糖苷键连接的特征吸收峰^[13-15]。

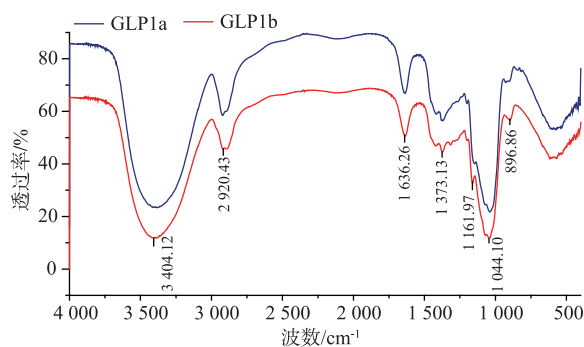


图 6 GLP1a 和 GLP1b 的红外光谱

Fig. 6 FT-IR spectrum of GLP1a and GLP1b

2.5 核磁共振分析

如图 7 和图 8 所示, GLP1a 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱的异头区域都只有一个信号峰, 说明只有一种 β 构型的糖残基组成; ^{13}C NMR 谱信号峰分布在 60~104 ppm 区域之间, 说明不含糖醛酸; 882~84 ppm 区域中无信号, 说明为吡喃糖; 异头区域只显示 103.24 ppm 一个信号, 其连接碳的化学位移为 70.19 ppm, 说明 GLP1a 的主链为 β -1, 6-吡喃葡聚糖; 其他峰信号均为未取代的碳信号^[16-18]。

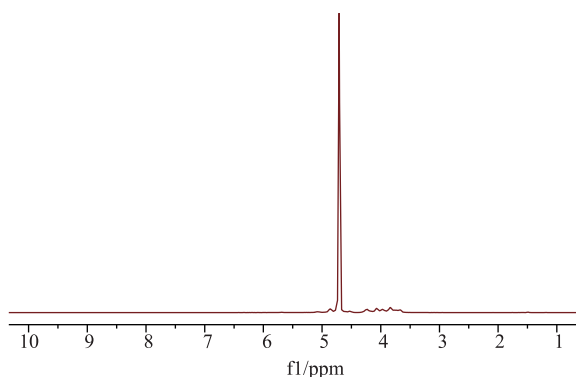


图 7 GLP1a 的 ^1H NMR 谱图

Fig. 7 ^1H NMR spectrum of GLP1a

由 GLP1b 的 ^1H 谱和 ^{13}C 谱图(图 9 和图 10)可知, GLP1b 与 GLP1a 的结构基本相似, 但是 GLP1b 在 885.41 ppm 和 879.47 ppm 处各有一弱峰, 分别为发生氧取代的 C-3 和 C-4 的信号, 说明部分 1→

6 连接的葡萄糖在 3 位和 4 位有分支。

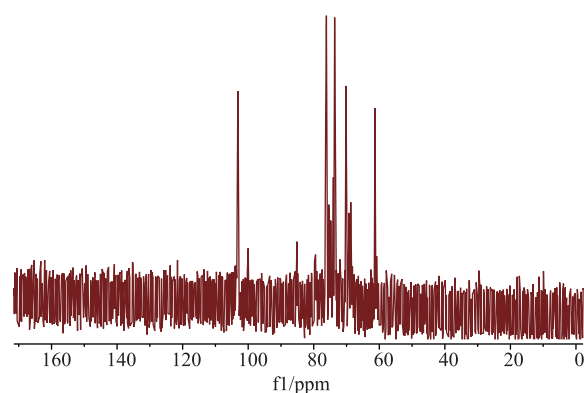


图 8 GLP1a 的 ^{13}C NMR 谱图

Fig. 8 ^{13}C NMR spectrum of GLP1a

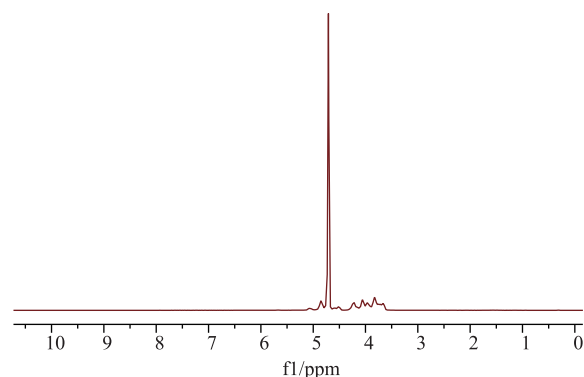


图 9 GLP1b 的 ^1H NMR 谱图

Fig. 9 ^1H NMR spectrum of GLP1b

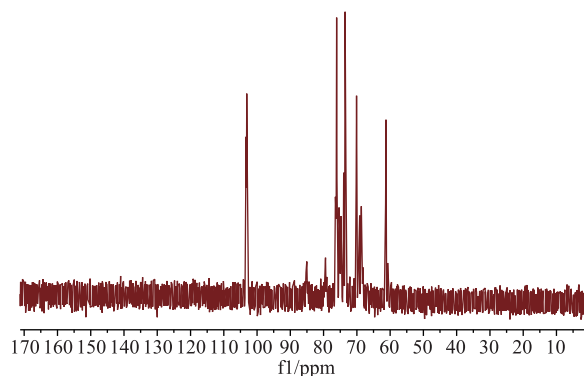


图 10 GLP1b 的 ^{13}C NMR 谱图

Fig. 10 ^{13}C NMR spectrum of GLP1b

2.6 体外对正常小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响

图 11 是上述 2 个相对分子质量较大的中性多糖级分 GLP1a 和 GLP1b 对正常小鼠淋巴细胞增殖影响的初步试验结果, 其结果显示, 多糖级分 GLP1a 和 GLP1b 对小鼠脾淋巴细胞的增殖均有一定的促进作用, 并且都有明显的量效关系。GLP1b

促进小鼠脾淋巴细胞增殖的效果明显高于 GLP1a, 这可能与其相对分子质量及结构有关。

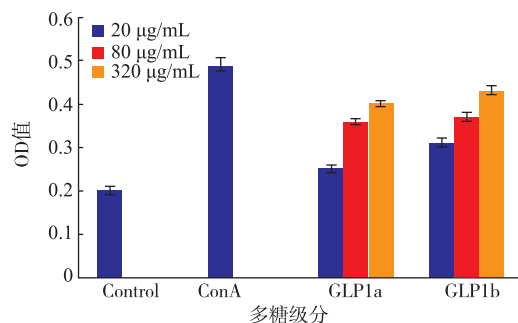


图 11 GLP1a 和 GLP1b 对正常小鼠脾淋巴细胞增殖的影响
Fig. 11 Effect of GLP1a and GLP1b on the proliferation by splenic lymphocytes of normal mice

3 结语

从吉林某企业培育的一新品种灵芝的孢子粉中提取和分离得到 5 个多糖级分,其中 2 个中性多糖 GLP1a 和 GLP1b 的重均相对分子质量分别为 1.12×10^6 、 1.21×10^5 。单糖组成、红外、核磁共振的分析结果表明:GLP1a 和 GLP1b 均为葡聚糖,主链均以 β -(1,6) 糖苷键连接,GLP1b 在部分 1 \rightarrow 6 连接的葡萄糖的 3 位和 4 位有分支。MTT 实验表明,2 个多糖级分都能够促进正常小鼠脾淋巴细胞的增殖,并且都存在明显的量效关系,但 GLP1b 的活性明显高于 GLP1a。类似 GLP1b 的孢子粉多糖的结构分析曾有报道^[9],但类似 GLP1b 的孢子粉多糖的免疫活性和具有类似 GLP1a 的分子量及其糖苷键特征的葡聚糖在有关灵芝孢子粉多糖的研究文献中尚未见报道。

参考文献:

- [1] GUO Chunyuan. A review on pharmacological studies of *Ganoderma lucidum*[J]. *Edible Fungi of China*, 1998, 17(3):34-35. (in Chinese)
- [2] WANG Weixiao, LV Yanru, YAO Miaomiao, et al. Research progress on anti-tumor activity of *Ganoderma lucidum* spores[J]. *Hebei Medical Journal*, 2015, 37(1):105-108. (in Chinese)
- [3] ZHAO Dongxu, YANG Xinlin, ZHU Hesun, et al. Studies on the spores of *Ganoderma lucidum*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1999, 30(4):305-307. (in Chinese)
- [4] BAO X F, WANG X S. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(2):175-181.
- [5] BAO X F, LIU C P, FANG J N, et al. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst[J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 332(1):67-74.
- [6] 林志斌. 灵芝的现代研究[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2001:69.
- [7] LI Mingchun, LIANG Dongsheng, XU Ziming, et al. Effects of *Ganoderma (Ganoderma lucidum)* polysaccharide on PKA activity of murine peritoneal macrophages[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2000, 31(5):353-355. (in Chinese)
- [8] 张丽霞. 灵芝孢子粉多糖的分离纯化及结构研究[D]. 长春:东北师范大学, 2005.
- [9] 赵桂梅. 灵芝孢子粉水溶性多糖 GLP2 和 GLP3 的结构研究[D]. 长春:东北师范大学, 2005.
- [10] 王海燕. 灵芝菌丝体多糖的免疫活性指纹图谱及其发酵优化[D]. 无锡:江南大学, 2015.
- [11] DAI J, WU Y, CHEN S H W et al. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82:629-635.
- [12] 王浩豪. 灵芝孢子粉多糖色谱指纹图谱及其免疫活性谱效关系的研究[D]. 无锡:江南大学, 2012.
- [13] LIANG G, XIE J H, RUAN Y Y, et al. Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum*[J]. *International Immunopharmacology*, 2009, 9:1175-1182.
- [14] HUANG Jinghan, AISIKAER Ailati, MAO Jian. Purification and structural identification of a bioactive polysaccharide fraction from *Ganoderma lucidum*[J]. *Food Science*, 2011, 32(12):301-304. (in Chinese)
- [15] LI Qingyu, YANG Ying, JIA Linfei, et al. Purification, structural analysis and antifatigue assay of polysaccharide from castanea

- mollissima blume[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 31(21):191-194. (in Chinese)
- [16] 王林强. 核磁共振在多糖结构解析中的应用[D]. 上海: 华东师范大学, 2013.
- [17] YE Libin, ZHANG Jingsong, PAN Yingjie. The NMR techniques in structural analysis of polysaccharide from edible and medical fungi[J]. *Journal of Edible Fungi*, 2007, 14(4):68-75. (in Chinese)
- [18] DU Xiuju, ZHANG Jingsong, PAN Yingjie. Application of the NMR techniques in structural analysis of polysaccharide from edible fungi[J]. *Edible Fungi of China*, 2010, 29(1):3-6, 19. (in Chinese)
- [19] BAO XF, FANG JN, LI XY. Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65(11), 2384-2391.

会 议 消 息

第四届农业和生物科学国际学术会议

【会议简介】第三届农业和生物科学国际学术会议(ABS2017)已于2017年6月26-29日在山东青岛圆满落下帷幕。会议邀请了25位国际知名的专家作主题报告和特邀报告,100多位与会者参与会议,就当前农业和生物科学方向最新的研究成果展开了相应的讨论和交流。ABS2016已推荐100多篇文章到EI会议论文集和SCI期刊发表,并成功检索,ABS2017文章正在安排出版过程中。ABS2018筹备初步完成,为促进农业和生物科学最新研究成果的交流,现特邀请农业和生物科学领域的广大高校师生同仁参会投稿。

【会议时间和地点】

会议时间:2018年6月26日-29日

会议地点:浙江省杭州市

【会议主题】:植物科学;动物科学;土壤科学;食品科学和生物科学

【会议征稿要求】:文章需要围绕跟农业和生物科学相关的植物科学,动物科学,土壤和环境科学,食品科学和生物科学方向展开,各位老师和相关领域的专家可以根据自己文章研究的方向来自拟文章题目和撰稿。

投稿请通过会议网站的在线投稿系统

<http://paper.academicconf.com/author/login.aspx?confname=ABS2018>

ABS2018再次与多本SCI期刊确认合作关系,具体信息可以参照www.absconf.org。投稿的文章,后期通过领域和质量审核,可以推荐到相应的EI论文集或SCI期刊作发表。

【主办单位】武汉博胜学术交流有限公司

【联系方式】石编辑

电话 17362961533

Email: labs@absconf.org

会议规模 100人以上

官方网址 <http://www.absconf.org/index.html>