

文章编号:1673-1689(2005)05-0060-04

# 不同云芝菌株获得云芝胞内多糖比较

胡卫珍<sup>1,2</sup>, 余晓斌<sup>\*1,2</sup>, 缪静<sup>3</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036; 3. 烟台师范学院 生命科学学院,山东 烟台 264025)

**摘要:** 将不同产地的6个云芝菌株进行液体培养,通过多糖产量、多糖质量和蛋白质质量等指标,从中选出了3个优良菌株.采用高效液相凝胶过滤色谱法(HPGFC)测定这3个菌株提取物云芝胞内多糖的相对分子质量,并加以比较.根据实验的结果,确认菌株LS为液体发酵的首选菌株.

**关键词:** 云芝;胞内多糖;高效液相凝胶过滤色谱法

中图分类号:

文献标识码: A

## A Primary Study on Comparison of Intracellular Polysaccharides from Different Strains of *Coriolus versicolor*

HU Wei-zhen<sup>1,2</sup>, YU Xiao-bin<sup>\*1,2</sup>, MIAO Jing<sup>3</sup>

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. School of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

**Abstract:** Three *Coriolus versicolor* strains with higher polysaccharide yield in liquid culture were selected from six *Coriolus versicolor* strains from different regions. Protein and polysaccharide contents in their mycelium were then compared. Their molecular weights were also determined and compared with high performance gel filter chromatography. From the experimental results, *Coriolus versicolor* strain LS was considered to be the optimum strain for liquid culture.

**Key words:** *Coriolus versicolor*; intracellular polysaccharide; HPGFC

云芝胞内多糖(*Coriolus versicolor* intracellular polysaccharides)系从担子菌纲多孔菌科云芝属真菌云芝或培养的菌丝中提取纯化的结合蛋白多糖,是良好的生物效应调节剂,具有抑制肿瘤、调节免疫、降低放、化疗毒副作用等多种药理作用,并有抗艾滋病活性<sup>[1]</sup>.

采用固体发酵培养菌丝体提取多糖成本高、周期长、产品质量不稳定、产量低,而且最近我国药品

监督管理局要求由固体培养变更为液体培养云芝菌丝体提取胞内多糖.所以为了克服这些不足,适应大规模集约化生产,作者采用液体发酵法培养不同云芝菌株菌丝体提取胞内多糖.同时多糖的理化性质、生理活性与相对分子质量有很大关系<sup>[2]</sup>.过去测量多糖相对分子质量常用超速离心、电泳等方法,既繁琐,误差又大.而高效液相凝胶过滤色谱法测定多糖相对分子质量,具有快速、分辨率高和重

收稿日期:2004-10-28; 修回日期:2004-11-23.

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BJ200026)资助课题.

作者简介:胡卫珍(1979-),女,浙江绍兴人,发酵工程硕士研究生.\*通讯作者.

现性好的优点,在国内外已得到广泛应用<sup>[2,3]</sup>。实验采用此法对不同云芝菌株的胞内多糖相对分子质量和其对照品相对分子质量进行分析与比较,并比较它们的多糖得率、多糖质量和蛋白质质量,以选出优良菌株,提高产量,降低成本。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 不同产地的云芝菌株 6 株(作者所在实验室提供)

#### 1.1.2 培养基和培养条件

1) 斜面培养 成分(g/L):马铃薯 200、葡萄糖 10、蔗糖 10、磷酸二氢钾 1、酵母粉 1、琼脂 25。

2) 种子培养基 成分(g/L):葡萄糖 20、玉米粉 10、麸皮 5、蛋白胨 3、磷酸二氢钾 1.5、硫酸镁 0.2。

3) 发酵培养基 成分(g/L):葡萄糖 20、玉米粉 10、豆饼粉 20、蛋白胨 1、麸皮 7.5、磷酸二氢钾 3、硫酸镁 0.2。

4) 培养条件:转速 150 r/min,温度 28 ℃,装液量 250 mL 的三角瓶 100 mL 培养 96 h。

### 1.2 方法

1.2.1 多糖质量测定 总糖质量减去还原糖质量即得胞内多糖的多糖质量。其中总糖质量用苯酚-硫酸法<sup>[4]</sup>测定,以葡萄糖为标准品;还原糖质量用 DNS 法<sup>[5]</sup>测定。

1.2.2 蛋白质质量测定 Folin-酚试剂法<sup>[6]</sup>,以牛血清白蛋白为标准品。

1.2.3 相对分子质量测定 采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)测定多糖相对分子质量。先将标准分子质量 580 000,188 000,70 000,10 000 的 Dextran 和 828 的 Maltopentaose 分别用 0.1 mol/L 硝酸钠溶液配成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液,经 0.45 μm 微孔过滤膜过滤,取滤液 100 μL 进样,作 HPGFC 分析。色谱条件:色谱柱为 Ultrahydrogel Linear 300 mm × 7.8 mmid × 2,流动相为 0.1 mol/L 硝酸钠溶液,体积流量为 0.9 mL/min,柱温 45 ℃,示差折光检测器检测。根据测出的保留时间( $t_R$ ),用 GPC 软件绘制保留时间-相对分子质量( $M_w$ )对数的标准曲线。不同菌株的提取物胞内多糖和其对照品(中国药品生物制品检定所)也按上述方法溶解、过滤、测定,根据测得的保留时间由 GPC 软件计算相对分子质量<sup>[7]</sup>。

1.2.4 菌丝体胞内多糖的提取 各菌株经液体培养的发酵液先过滤,所得的湿菌丝体洗涤后再过

滤,接着把得到的菌丝体加水充分破碎,破碎后在热水中抽提 2 h,抽完后过滤,并把滤渣再热水抽提 1 h,再次过滤,然后合并这两次滤液,减压浓缩至原体积的 1/4,加 3 倍体积的 95% 工业酒精沉淀,静置几个小时后过滤,沉淀物烘干得到结合蛋白多糖提取物即胞内粗多糖。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同云芝菌株液体培养的比较

将进行液体培养的 H, JN, DA, Y, SY, LS 这 6 株菌株分别接入发酵培养基中,在转速 150 r/min,温度 28 ℃,装液量为 100 mL,培养 96 h 条件下进行培养。这 6 株菌株的液体培养结果见表 1。

表 1 不同云芝菌株的液体培养结果比较

Tab.1 Comparison of liquid culture from different *coriolus versicolor* strains

样 品	多糖质量率/ (g/L)	每 100 g 多糖质量/g	每 100 g 蛋白质质量/g
H 提取物	0.704	44.67	31.82
JN 提取物	0.647	37.30	29.80
DA 提取物	0.654	41.32	24.37
Y 提取物	0.747	48.40	29.75
SY 提取物	0.640	30.70	31.10
LS 提取物	0.715	44.93	34.90

从实验结果可以看出,在相同的发酵条件下,这 6 株菌株所得云芝胞内多糖质量有差异,由高到低的顺序为 Y, LS, H, DA, JN, SY。其中 Y, LS 和 H 这 3 个菌株的多糖产量在 0.7 g/L 以上,而 DA, JN 和 SY 这 3 个菌株的多糖质量则在 0.7 g/L 以下。从多糖质量来看,以 Y 最高,LS 其次,SY 最低;蛋白质质量以 LS 最高,H 次之,DA 最低。从上可知,H, Y, LS 这三株菌株活力高,胞内多糖产量、多糖质量和蛋白质质量都较高。此外,还进行了多次重复液体培养实验,发现这 3 个菌种发酵结果稳定。因此,我们选择 H, Y, LS 这三个菌株作为下一步研究的出发菌株。

### 2.2 相对分子质量测定结果比较

2.2.1 保留时间-相对分子质量( $M_w$ )对数的标准曲线 分子筛原理是 HPGFC 测定多糖或结合蛋白多糖的根据,多糖相对分子质量的对数与保留时间呈一定线性关系。所以根据上述方法测定的结果,作保留时间对相对分子质量的对数的线性回归,得回归方程: $\lg M_w = 13.2 - 0.471 t_R$ ,  $M_w$  为

相对分子量,  $t_R$  为保留时间, 曲线相关系数  $\gamma = 0.9965$ .

**2.2.2 云芝多糖的相对分子量测定结果** 采用高效凝胶过滤色谱法测定了从不同菌株提取到的云芝胞内多糖, 根据 GPC 软件绘制的标准曲线及它们各自的保留时间, 用 GPC 软件计算出相对分子量 ( $M_w$ ), 其结果见表 2, 色谱图见图 1.

表 2 不同云芝菌株提取物的相对分子量比较

Tab. 2 Comparison of molecular weights of extracts from different *coriolus versicolor* strains

样品	峰 I		峰 II	
	保留时间/ (min)	相对分子 质量	保留时间/ (min)	相对分子 质量
对照品	15.583	725 115	18.683	25 136
H 提取物	15.567	737 807	18.683	25 136
Y 提取物	15.461	827 692	19.800	7 485
LS 提取物	15.517	778 920	18.597	27 593

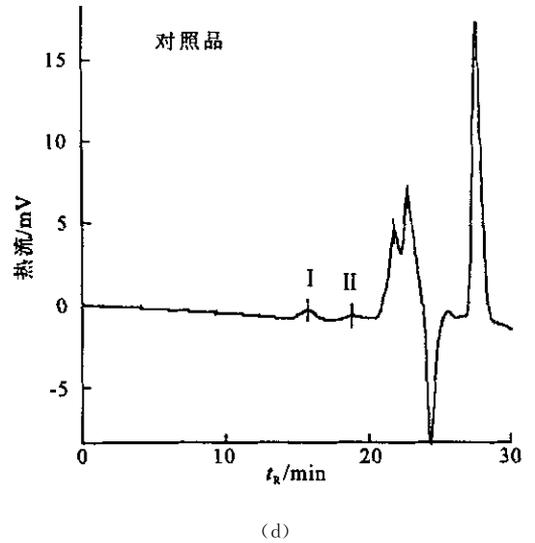
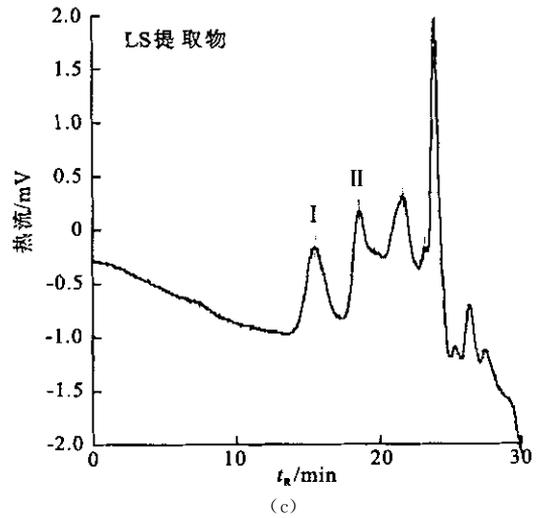
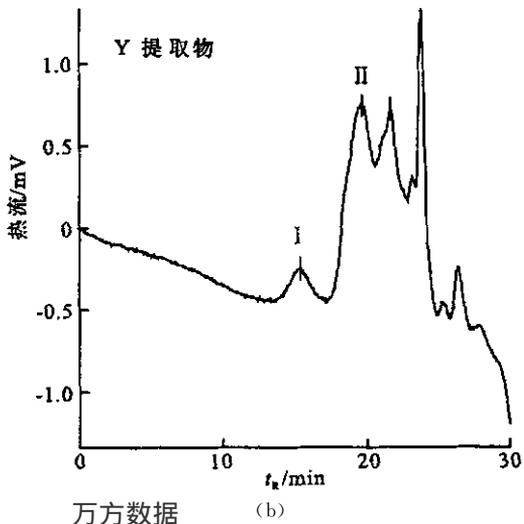
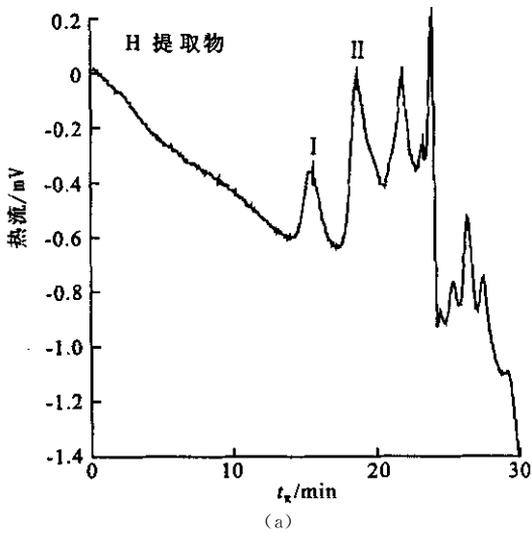


图 1 不同云芝菌株所提取的胞内多糖凝胶过滤色谱图  
Fig. 1 Chromatograms of intracellular polysaccharides from different *Coriolus versicolor* strains

由表 2 和图 1 可知, 虽然从不同云芝菌株所得云芝胞内多糖其凝胶过滤色谱峰形相似, 但其相对分子量及其分布有差异, 控制其相对分子量显得必要. 从峰 I 来看, Y 最大, 相对分子质量为 827 692, LS 其次, H 最小, 相对分子质量为 737 807; 而峰 II 的相对分子量就差别很大, 由大到小的顺序和相对分子质量分别为 LS, H, Y; 27 593, 25 136, 7 485. 与对照品相比, 可看出 Y 没有相对分子质量为二万多的这个峰, 而 H 和 LS 这两个菌株提取物的峰 I 和峰 II 分子量都分别在七十几万和二万多, 最为符合要求.

### 3 结论

1) 在实践中已经证明, 只有获得较高活力、生产性能优良的菌株, 才有可能实现成功发酵和生产, 降低生产成本. 通过自然选育淘汰活力差、发酵能力弱的菌株, 为进一步菌株改良和发酵生产打下

一个坚实的起点和基础. 本文通过液体培养淘汰了生长较弱的 JN, SY, DA 这 3 个菌株, 得到生长较快、产量较高的 H, Y, LS 这 3 个菌株.

2) 虽然 HPGFC 测定的多糖肽的相对分子质量只是一个相对值, 不是一个真正的相对分子质量, 但在一定流动相浓度下作为云芝胞内多糖的质量控制还是可取的. 据 Matsunaga K 等报道<sup>[8]</sup>, 云芝多糖抑瘤活性与相对分子质量大小有关, 一般活性较强的成分, 相对分子质量在 5 000 ~ 300 000<sup>[8,9]</sup>. 故根据对照品的相对分子质量, 认为峰 II 应

为有效活性成分峰. 本实验的 H 和 LS 这两个菌株所得云芝胞内多糖的峰 II 相对分子质量均在此范围内, 均与对照品符合, 但至于它们产生的多糖相对分子质量的差别是否会造成抑瘤活性的差异有待实验证明.

从液体培养和 HPGFC 测定的结果来看, H 和 LS 这两个菌株都不错, 但考虑到云芝菌株发酵的目的是收获菌丝体, 提取得到云芝胞内多糖, 这就要求提高产量, 降低成本, 所以确定菌株 LS 为下一步的液体发酵实验菌株.

## 参考文献:

- [1] 杨晓彤, 糜可, 冯慧琴, 等. 不同云芝菌株及提取工艺所得结合蛋白多糖的分析比较[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(12): 545—548.
- [2] 方积年. 多糖研究的现状[J]. 药学学报, 1986, 21(12): 944—949.
- [3] 张志花, 杨晓彤, 方积年. 云芝糖肽在高效液相凝胶柱上色谱行为的研究[J]. 色谱, 1997, 15(2): 150—152.
- [4] 张惟杰. 复合多糖生化研究概述[M]. 上海: 上海科技出版社, 1987. 6—7.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981. 6—9.
- [6] 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京: 科技出版社, 1982. 93—96.
- [7] 李静, 左雄军. 水溶性凝胶渗透色谱法测定芸芝多糖组分的分子量及其相对含量[J]. 分析化学, 1999, 27(8): 942—944.
- [8] Matsunaga K, Oguchi Y, Ohara M. A glycoprotein ligand for platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta$  from *Coriolus*[P]. 欧洲专利: EP: 702028, 1996—03—20.
- [9] Yang MP, Chen G. RNase-CV(*Coriolus versicolor*) [P]. 美国专利: US: 5824648, 1998—10—20.

(责任编辑: 杨 萌)

(上接第 59 页)

## 参考文献:

- [1] 何铁林. 水处理化学手册[M]. 北京: 化学工业出版社. 2000. 268—270.
- [2] 刘国军, 曾汉民. 纳米  $\text{CaCO}_3/\text{SiO}_2$  核-壳结构复合粒子的制备[J]. 宇航材料工艺, 2003, (3): 57—61.
- [3] 宇海银, 杜俊等. 纳米  $\text{ZnO}$  的表面化学修饰及其分析表征[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(2): 177—179.
- [4] Enzo A Palombo, Susan J Semple. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, 77: 151—157.
- [5] Soo-jin Park, Yu-Sin Jang. Preparation and characterization of activated carbon fibers supported with silver metal for antibacterial behavior[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 261: 238—243.
- [6] 扬杭生, 张培志. 次溴酸氧化葡萄糖反应动力学研究[J]. 杭州大学学报, 自然科学版 1996, 23(2): 168—171.
- [7] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [8] 樊能廷, 王文艺. 3-溴-1-氯-5,5-二甲基海因及相关化合物的合成[J]. 化学世界, 1998, (6): 28—31.

(责任编辑: 朱 明)