

doi: 10.3969/j.issn.1001-6678.2015.02.006

黄绿蜜环菌菌丝体多糖分离纯化与含量测定

史强强^{1,2}, 党军¹, 岳会兰¹, 文怀秀¹, 陶燕铎¹, 王启兰¹

1. 中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室 西宁 810008;

2. 中国科学院大学 北京 100049

摘要: 分离纯化黄绿蜜环菌菌丝体粗多糖,提高多糖含量,以进一步应用于工业化生产。采用 DEAE-52 纤维素层析柱分离纯化黄绿蜜环菌菌丝体多糖,依次用水、0.1 mol/L NaCl、0.2 mol/L NaCl、0.4 mol/L NaCl、0.8 mol/L NaCl 进行洗脱;苯酚-硫酸法测定纯化后多糖含量,测定波长 490 nm,葡萄糖浓度与吸光度的回归方程为 $A = 6.3137X + 0.2156R^2 = 0.9909$ 。黄绿蜜环菌菌丝体水体重多糖经 DEAE-52 纤维素层析柱分离纯化后,多糖含量达到 99% 以上。经过中试试验验证提取及分离纯化工艺适用于工业化生产。

关键词: 黄绿蜜环菌菌丝体; 多糖; DEAE-52; 苯酚-硫酸法

黄绿蜜环菌 (*Armillaria luteo-virens*), 又名黄蘑菇, 黄环菌, 属担子菌亚门, 层菌纲, 口蘑目, 口蘑科, 蜜环菌属。野生黄绿蜜环菌子实体中含丰富的蛋白质、氨基酸、维生素、矿物质、挥发油和多糖等营养成分^[1-2]。在黄绿蜜环菌诸多的生物活性组分中, 多糖是发挥关键作用的主要组分之一, 具有抗肿瘤作用^[3]。但是野生黄蘑菇自然产量低, 且生长环境易遭受破坏, 多糖产量与质量不稳定^[4]。已有关于黄绿蜜环菌人工驯化^[5]、深层发酵条件^[6]、胞外多糖发酵条件^[7]、子实体多糖^[8]、菌丝体多糖含量测定^[9] 方面的研究, 对于黄绿蜜环菌菌丝体多糖分离纯化方面的研究很少。本文通过对人工驯化的黄绿蜜环菌菌种进行深层发酵, 利用 DEAE-52 纤维素柱分离纯化菌丝体多糖, 以期提高多糖的纯度为黄绿蜜环菌多糖的深层开发及工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄绿蜜环菌菌种分离自青海省祁连县峨堡乡采集的野生黄绿蜜环菌子实体, 菌种经人工驯化、深层发酵培养收集菌丝体, 蒸馏水洗净, 60℃烘干既得。

95% 乙醇(分析纯)、NaOH(分析纯)、HCl(分析纯)、苯酚(分析纯)、硫酸(分析纯)、NaCl(分析纯)、葡萄糖(分析纯)、阿拉伯糖(分析纯)、鼠李糖(分析纯)、D-甘露糖(分析纯)、阿拉伯糖(分析纯)、木糖(分析纯)、半乳糖(分析纯)、DEAE-52 纤维素、实验用水为蒸馏水。

752 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、RE52-98 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、UPI-4-520T 型超纯水器(成都超纯科技有限公司)、JP 300 型超声波提取器(武汉嘉鹏电子有限公司)、YP 1002N 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司)、JDP-0.2 型真空冷冻干燥机(兰州科近真空冻干技术有限公司)、LXJ-II 离心沉淀机(涟水电讯电机厂)、10×40 cm 层析柱、3 000 MW 透析膜等。

1.2 实验方法

1.2.1 黄绿蜜环菌菌丝体多糖的提取、分离和纯化

黄绿蜜环菌菌丝体→按料液比 1:60 加水浸泡 12 h→超声 30 min→92℃水浴提取 3 次, 每次 3 h, 合并滤液, 浓缩→加入 4 倍体积的 95% 乙醇, 沉淀→抽滤, 沉淀→真空冷冻干燥 12 h→既得黄绿蜜环

基金项目: 青海省高新技术研究与发展计划(2012-G-218)。

作者简介: 史强强(1989~), 男, 硕士研究生。E-mail: shiqq89@126.com。

菌菌丝体水提物粗多糖。

称取200 g DEAE-52 填料,装于10×40 cm 层析柱中,2 mol/L NaOH 浸泡24 h,水洗至中性;1 mol/L HCl 浸泡24 h,水洗至中性,备用。取上述糖溶液,胶头滴管上样,依次用水(约10 L)、0.1 mol/L NaCl(9 L)、0.2 mol/L NaCl(9 L)、0.4 mol/L NaCl(9 L)和0.8 mol/L NaCl(9 L)洗脱,分别收集洗脱液。将各组分洗脱液分别浓缩至适当体积,透析除盐,然后对各组分进行减压冷冻干燥得 Fr1-Fr5 的菌丝体多糖。

1.2.2 对照品及供试品溶液制备

精确称取已干燥的葡萄糖100 mg,加水溶解,转移至100 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,得1 mg/mL 葡萄糖对照品溶液,备用。取1.2.1 项下分离所得5个流份(F₁~F₅)的多糖各50 mg,溶于50 mL 水中,得供试品溶液备用。

1.2.3 标准曲线测定

精密吸取葡萄糖对照品溶液0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL 和1.6 mL,加水补至2.0 mL,加饱和苯酚水溶液0.5 mL,浓硫酸7.5 mL,室温放置30 min,于490 nm 处测定吸光度值。

1.2.4 换算因子测定

精密移取5个供试品溶液各1.0 mL,按照标准曲线项下的方法测定吸光度,计算出多糖中葡萄糖的浓度,按下式计算出换算因子^[10]。

$$F = W/CD$$

W 为多糖重量(mg), C 为多糖中葡萄糖的浓度(mg/mL), D 为多糖的稀释因素。测得 $F_1 = 1.54$ 、 $F_2 = 0.85$ 、 $F_3 = 0.98$ 、 $F_4 = 0.95$ 、 $F_5 = 2(n = 3)$ 。

1.2.5 多糖含量测定

吸取供试品各1.0 mL,按照标准曲线项下的方法测定吸光度,同时做3个重复,以标准曲线和下式计算样品中多糖的百分含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = CDF/W$$

C 为供试液葡萄糖浓度, D 为供试液的稀释因素, F 为换算因素, W 为供试品的重量。

1.2.6 回收率测定

采用加样回收法。取5个组分的供试品溶液各5份,每份1 mL。每份样品分别加入标准葡萄糖溶

液0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL,用蒸馏水补至2 mL,按照标准曲线项下方法测定吸光度,计算加标回收率。

加标回收率 = (加标试样测定值 - 试样测定值) ÷ 加标量 × 100%

1.2.7 黄绿蜜环菌菌丝体多糖的组成分析

多糖完全水解液,以葡萄糖、木糖、鼠李糖、D-甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖为标准对照,标准对照单糖配制浓度为5 mg/mL。将硅胶板在105℃活化0.5 hr,用毛细管重复点样几次,吹风机吹干,在密闭层析缸中展开。展开剂为正丁醇:乙酸:水(4:1:5),在室温下展开,展层结束后,在通风橱中挥干溶剂,用苯胺-邻苯二甲酸显色剂喷雾,置105℃烘箱中显色10 min,由斑点确定样品的单糖组成^[8]。

1.2.8 黄绿蜜环菌菌丝体多糖提取中试放大试验

取发酵所得黄绿蜜环菌菌丝体5 kg,按照1.2.1 项下的提取工艺提取黄绿蜜环菌菌丝体多糖,计算粗多糖的得率并测定多糖含量。另取黄绿蜜环菌菌丝体50 kg,按照同样的工艺流程进行中试放大试验,计算出多糖的得率并测定含量。

1.2.9 黄绿蜜环菌菌丝体多糖分离纯化中试放大试验

取1.2.8 中试试验所得粗多糖5 kg,按照1.2.1 项下的分离纯化工艺对黄绿蜜环菌菌丝体粗多糖进行分离纯化,计算纯多糖的得率并测定多糖含量。另取黄绿蜜环菌菌丝体多糖50 kg,按照同样的分离纯化工艺进行中试放大试验,计算多糖的得率并测定含量。

2 结果与讨论

2.1 菌丝体多糖提取、分离纯化结果

15.3 g、12.8 g、17.6 g 干燥的黄绿蜜环菌菌丝体按菌丝体多糖提取方法分别制得的菌丝体多糖0.3680 g、0.2829 g、0.4189 g,得率2.405%、2.210%、2.380%。黄绿蜜环菌菌丝体本工艺提取多糖平均得率为2.3317%,RSD=4.55%^[9]。

黄绿蜜环菌菌丝体粗多糖65 g,经DEAE-52 分离纯化,得到5个组分的精制多糖分别为Fr1(水洗)0.0099 g,得率9.46%;Fr2(0.1 mol/L NaCl 淋洗)0.9110 g,得率1.4%;Fr3(0.2 mol/L NaCl 淋

洗) 0.2767 g, 得率 0.43%; Fr4 (0.4 mol/L NaCl 淋洗) 0.1458 g, 得率 0.23%; Fr5 (0.8 mol/L NaCl 淋洗) 0.0546 g, 得率 0.084%。纯化多糖的总得率为 11.38%

2.2 标准曲线测定结果

苯酚-硫酸法测得标准曲线的回归方程: $A = 6.3137X + 0.2156$, $R^2 = 0.9909$, A 为吸光度值, X 为葡萄糖浓度。结果表明葡萄糖在 (0.02 ~ 0.16) mg/mL 之间线性关系良好。回归方程见图 1。

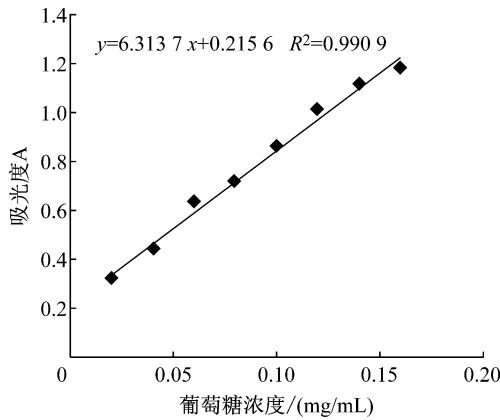


图 1 葡萄糖标准曲线

2.3 多糖含量测定结果

按照标准曲线项下多糖含量测定方法测定 5 个纯化组分 (Fr1 ~ Fr5) 供试品的多糖含量, 每个组分供试品重复测定 3 次, 吸光度平均值见下表 1。

表 1 各流份多糖吸光度表

流份	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5
吸光度	0.629	0.952	0.857	0.877	0.533

结果表明, 经分离纯化 5 个流份供试品的多糖含量分别是: 99.45%、99.45%、99.96%、99.75% 和 100%。根据相关文献^[9]可知黄绿蜜环菌菌丝体水提物多糖含量为 31.21%, 由此可见经分离纯化多糖含量明显得到提高。

2.4 回收率测定结果

按照标准曲线项下的多糖含量测定方法, 测定每个组分下加标试样多糖含量, 按照加标回收率计算公式, 计算出每个组分的加标回收率及平均值, 5 个组分供试品回收率见表 2。

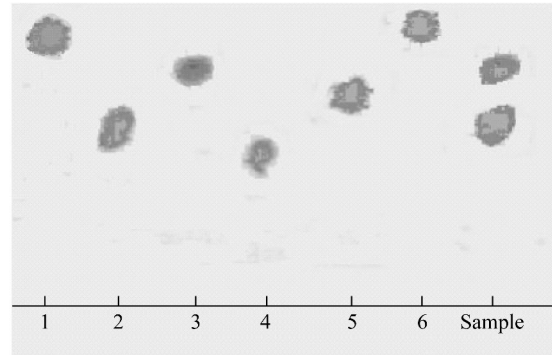
2.5 多糖组分分析结果

硅胶薄层层析结果表明, 菌丝体多糖水解产物

的组成为阿拉伯糖和木糖(图 2)^[8]。

表 2 供试品回收率

组分	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5
回收率	103.3%	102.7%	99.6%	100%	98.2%
RSD	3.1%	1.9%	2.4%	1.5%	3.6%



1. D-甘露糖 2. 阿拉伯糖 3. 木糖 4. 半乳糖 5. 葡萄糖 6. 鼠李糖

图 2 薄层层析图

2.6 黄绿蜜环菌菌丝体多糖提取小试及中试放大试验

表 3 三批小试试验结果

编号	菌丝体量/kg	粗多糖提取量	粗多糖得率/%	多糖含量/%
1	5	0.118	2.18	30.76
2	5	0.111	2.21	29.35
3	5	0.114	2.29	28.57

表 4 三批中试试验结果

编号	菌丝体量/kg	粗多糖提取量	粗多糖得率/%	多糖含量/%
1	50	1.07	2.14	28.59
2	50	1.04	2.08	27.74
3	50	0.99	1.98	28.16

三批放大试验结果与小试结果基本一致。试验方法可行, 可以用于工业大生产中。

2.7 黄绿蜜环菌分离纯化中试放大试验

表 5 三批小试试验结果

粗多 糖/kg	纯化多糖/g					总纯化 多糖/g	多糖得 率/%	多糖含 量/%
	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5			
5	467.05	67.23	18.07	9.53	3.86	565.74	11.31	96.58
5	456.13	64.65	17.66	9.24	3.94	551.62	11.03	97.42
5	461.68	68.19	14.87	8.72	3.83	557.29	11.16	98.65

黄绿蜜环菌菌丝体多糖分离纯化工艺三批中试试验与小试试验结果基本一致, 可应用于工业分离纯化黄绿蜜环菌菌丝体多糖。

表6 三批中试试验结果

粗多 糖/kg	纯化多糖/g					总纯化 多糖/g	多糖得 率/%	多糖含 量/%
	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5			
50	4476.15	637.22	128.56	79.12	32.52	5353.57	10.71	93.67
50	4503.55	649.56	136.28	68.54	35.67	5393.6	10.78	94.35
50	4489.64	658.43	133.49	73.36	31.98	5386.9	10.77	94.13

3 结论

目前,对于多糖的纯化方法主要有,纤维素层析、凝胶柱层析、亲和层析及阴离子交换柱层析^[11]。本文采用阴离子交换柱层析中的 DEAE-52 纤维素柱层析分离纯化菌丝体多糖。DEAE-52 纤维素具有较大的表面积,对大分子的吸附能力较弱,用一定浓度的盐就可以洗脱下来,洗脱速度快。实验结果表明 DEAE-52 分离纯化得到的 5 个组分多糖含量均达到 99% 以上,取得了比较满意的结果。本方法操作简便,得到的多糖纯度高。进一步实验可对发酵产生的菌丝体多糖和自然状态下的子实体多糖进行含量和种类上的比较;进一步分离纯化多糖;另外对于黄绿蜜环菌菌丝体多糖进行相关的生物活性研究。

参 考 文 献

[1] 刁治民. 青海草地黄绿蜜环菌生态学特性及营养价值的研究

[J]. 中国食用菌, 1997, 16(4): 21-22.

- [2] 周劲松,熊辉岩,杨春江等. 黄绿蜜环菌子实体挥发油的化学成分[J]. 农业科学与技术(英文版), 2008, 9(2): 90-92.
- [3] 黄年来. 大球盖菇的分类地位和特征特性[J]. 食用菌, 1995, 17(6): 11.
- [4] 谢红民,刁治民,邓君. 青藏高原黄绿蜜环菌资源现状及可持续发展的研究[J]. 邵阳师范高等专科学校学报, 2005, 25(6): 67-70.
- [5] 李渝珍. 青海野生黄绿蜜环菌人工驯化技术途径的探讨[J]. 青海师范大学学报(自然科学版), 2005(1): 74-76.
- [6] 周连玉,朱莉莉,邓旭武等. 黄蘑菇深层发酵条件研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 30(1): 110-112.
- [7] 王虹,游潇倩,余梅. 黄绿蜜环菌产胞外多糖发酵培养的研究[J]. 北方园艺, 2010(22): 174-176.
- [8] 刘葳,于源华,毛亚杰等. 黄绿蜜环菌多糖的分离纯化与组成结构分析[J]. 长春理工大学学报(自然科学版), 2007, 30(2): 102-105.
- [9] 党军,王瑛,陶燕铎等. 黄绿蜜环菌菌丝体水提物多糖含量测定[J]. 光谱实验室, 2011, 28(6): 2836-2840.
- [10] 高丽君,王汉忠,崔建华等. 苯酚-硫酸法测定白首乌中多糖含量[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2004, 35(2): 295-297.
- [11] 方积年,丁侃. 天然药物—多糖的主要生物活性及分离纯化方法[J]. 中国天然药物, 2007, 5(5): 338-347.

Isolation, purification and content determination of polysaccharide in *Armillaria luteo-rivens* mycelium

SHI Qiang-qiang^{1,2}, DANG Jun¹, YUE Hui-lan¹, WEN Huai-xiu¹, TAO Yan-duo¹, WANG Qi-lan¹

1. Northwest Institute of Plateau Biology, CAS; Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, CAS; Xining 810008, China;

2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 10049, China

Abstract In order to enhance the content of polysaccharide, isolation and purification of polysaccharide of *Armillaria luteo-rivens* mycelium were conducted for the application to industrial production. The polysaccharide in *Armillaria luteo-rivens* mycelium was separated and purified by DEAE-52, and eluted gradually by water, 0.1 mol/L NaCl, 0.2 mol/L NaCl, 0.4 mol/L NaCl and 0.8 mol/L NaCl; the content of polysaccharide was measured by the phenol-sulfuric acid method, determined with wavelength of 490 nm. The linear relationship of glucose concentration was good with regression equation $A = 6.3137X + 0.2156$ ($R^2 = 0.9909$). The content of polysaccharide exceeded 99% after isolation and purification. The results showed that the process of extraction, separation and purification was suitable for industrial production.

Key words *Armillaria luteo-rivens*; mycelium polysaccharide; DEAE-52; phenol-sulfuric acid method