

# 灵芝胞外多糖的分离纯化及生物活性

李平作 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

关键词:灵芝,胞外多糖,分离和纯化,生物活性

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2000)02-0217-20

目前,灵芝多糖的抗肿瘤及免疫活性已得到人们的广泛关注<sup>[1]</sup>。灵芝子实体多糖和发酵过程中产生的胞内和胞外多糖已被国内外的研究者证实都是有效多糖<sup>[2]</sup>。因此利用深层发酵来大规模地生产生物活性多糖是目前灵芝开发利用技术的热点。国内对灵芝培养基的组成、培养方法等已有较系统的研究<sup>[3]</sup>。对灵芝多糖的研究多集中于子实体或菌丝体多糖,而对发酵胞外多糖研究较少,尤其是下游分离纯化技术尚鲜见报道。为此我们对发酵法生产灵芝胞外多糖进行了较系统地研究。本文报道灵芝胞外多糖(Exo-polysaccharides of *Ganoderma lucidum*,简称 GLEP)的分离纯化,抗肿瘤及免疫活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

灵芝为本实验室分离保存的赤芝菌。

### 1.2 灵芝胞外粗多糖(GLEP)

灵芝发酵上清液经 60% 乙醇提取,沉淀经乙醇、乙醚洗涤,真空干燥,即为粗多糖。

### 1.3 主要试剂

氯仿、丁醇、苯酚等均为国产分析纯试剂。DEAE-纤维素为上海第二化学试剂厂产品。Sephacrose-CL-6B 购自 Sigma 公司。

### 1.4 多糖测定

硫酸-苯酚法<sup>[4]</sup>。

### 1.5 多糖分离及纯化策略

粗多糖溶解于蒸馏水后对水透析 1d;由 20% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 脱色,Sevage 法和蛋白酶法结合除去杂蛋白<sup>[5]</sup>。然后经 DEAE-纤维素柱层析和 Sepharose CL-6B 凝胶过滤色谱,收集组份,真空浓缩后,以乙醇沉淀,沉淀经冷冻干燥后即为纯化精制多糖。

DEAE-纤维素柱层析:柱规格 2.6cm×50cm, V<sub>t</sub> = 240mL, 流速 50mL/(cm<sup>2</sup>/h), 上柱量 10mL, 用蒸馏水、0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>、0.3mol/L NaHCO<sub>3</sub>、0.5mol/L NaHCO<sub>3</sub> 和 0.1mol/L NaOH 分段洗脱。

Sephacrose CL-6B 凝胶过滤:柱规格 1.6cm×100cm, V<sub>t</sub> = 191mL, 蒸馏水洗脱,样品浓度 7mg/mL, 3mL/管,苯酚硫酸法测定多糖。

### 1.6 纯度鉴定

聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[6]</sup>。以 Tris-HCl(pH=9.1)为缓冲液,以 0.2% 麝香草酚为染色液,呈现单

作者简介:李平作,男,无锡轻工大学生物工程学院,博士,现已毕业。导师为章克昌教授,主要研究方向为再生资源工程、发酵工程和酶工程

收稿日期:1998-10-13,修回日期:1999-03-08

一红色窄带。

### 1.7 分子量测定

膜渗透压法<sup>[7]</sup>:将纯化多糖配成5个不同浓度的溶液,测量记录后以多糖浓度对 $(\pi/C)$ 作图求得 $(\pi/C)_{c \rightarrow 0}$ 数据,然后代入下式计算分子量:

$$M = RT/(\pi/C)_{c \rightarrow 0}, (1) \quad M \text{ 是样品分子量, } C \text{ 是样品浓度, } T \text{ 是测量温度, } R, \pi \text{ 是常数。}$$

### 1.8 灵芝多糖生物活性检测<sup>[8]</sup>

抗肿瘤活性:以小鼠肉瘤 S180 为肿瘤模型,胞外多糖样品按高、中、低剂量于腋下注射给药,连续给药 10d,于第 11d 处死小鼠取瘤块,称瘤重,计算抑制率。

免疫活性:以小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响进行评价。

## 2 结果

### 2.1 DEAE-纤维素柱层析分离 GLEP(组别分离)

由表 1 可以看出,逐渐增加洗脱液的碱性,可以将 GLEP 分成 5 个组份,每一个组份所占的比例不同。而以蒸馏水为洗脱剂时(组份 I)所占的比例最大,达到 75.6%,非目标组份占 24.2%。由图 1 可以看出,在组份 I 中有两个洗脱峰之间存在明显的重叠,因此至少含有两种不同分子量的多糖,这为后续的分级分离提供了依据。

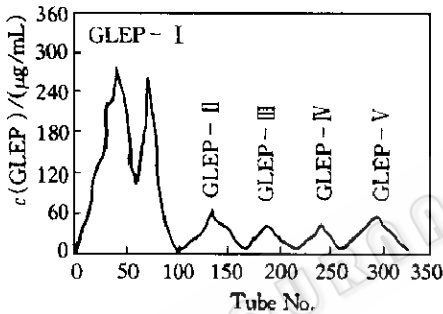


图 1 GLEP 的 DEAE-纤维素柱层析图

表 1 GLEP 的 DEAE-Cellulose 柱层析结果

	GLEP-I	GLEP-II	GLEP-III	GLEP-IV	GLEP-V	总计
总糖量/mg	110.6	15.6	7.2	1.2	11.6	146.2
所占百分率/%	75.6	10.6	4.9	0.8	7.9	
样品量/mg						163.6
回收率/%						89.3

组份 GLEP-I、II、III、IV、V 分别是指以蒸馏水、0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>、0.3mol/L NaHCO<sub>3</sub>、0.5mol/L NaHCO<sub>3</sub>、0.1mol/L NaOH 为洗脱剂时的洗脱组份。

### 2.2 Sepharose CL-6B 分离 GLEP-I (分级分离)

考察了不同的样品粘度,样品量和洗脱流速对 GLEP-I 分级分离的影响,结果表明最适分离条件是样品相对粘度 1.5,上柱量 6mL,流速 30mL/(cm<sup>2</sup>·h),见图 2 及表 2。可以看出,从 DEAE-纤维素分离得到的组份 I 中经分级分离得到二种分子量不同的多糖, GLEP-IFr1 和 GLEP-IFr2,二者质量之比 3.8;多糖回收率达到 78.2%。

表 2 Sepharose CL-6B 凝胶过滤色谱分离结果

	IFr1	IFr2	总计
总糖量/mg	25.3	6.6	31.9
所占百分率/%	79.3	20.7	
样品量/mg			40.8
回收率/%			78.2

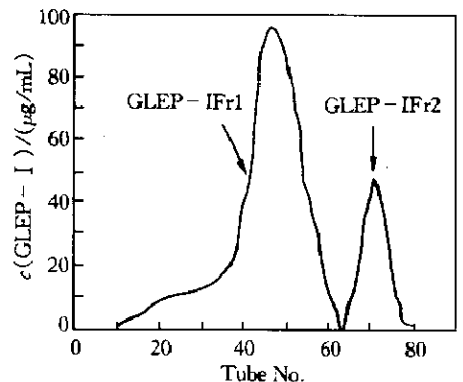


图 2 GLEP 的 Sepharose-CL-6 凝胶过滤色谱图

### 2.3 分子量测定

通过回归分析求得 GLEP-IFr1 和 GLEP-IFr2 的 $(\pi/C)_{c \rightarrow 0}$ 数据分别为 6.68 和 11.5, 代入公式(1), GLEP-IFr1 和 GLEP-IFr2 的数均分子量分别是  $3.8 \times 10^4$  和  $2.2 \times 10^4$ 。

### 2.4 灵芝胞外多糖(GLEP-IFr1)抑制肿瘤及免疫活性检测

#### 2.4.1 对小鼠 S180 的抑瘤作用:由表 3

可以看出,胞外多糖样品具有较明显的抑瘤效果( $P < 0.01, 0.05$ ),其抑瘤率达 57.4%。而且剂量与抑瘤率之间呈直线关系。

2.4.2 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用:由表 4 可以看出,环磷酰胺能明显抑制小鼠腹腔 MΦ 的吞噬杀菌功能,其抑制率分别达到 51.1%, 55.8% ( $P < 0.01$ )。而灵芝胞外多糖样品能明显提高小鼠腹腔 MΦ 的吞噬杀菌功能,除样品 a 外,其余都与对照组有统计学意义,且剂量与吞噬率、杀菌率呈线性关系。

2.4.3 样品对小鼠白细胞数及免疫器官重量的影响:白细胞能分泌单核因子,增强机体的抗肿瘤活性。在以化疗和放疗法对肿瘤病人进行治疗时,通常引起机体的胸腺和脾脏等免疫器官萎缩,降低补体的抗肿瘤作用结果见表 5。可以看出环磷酰胺使小鼠白细胞数减少 67.7% ( $P < 0.01$ ),使胸腺和脾脏萎缩分别达到 36.3%、48.4%,尤其是以脾脏萎缩更明显( $P < 0.01$ )。样品对小鼠白细胞数、胸腺、脾脏重量均有明显增加。

表 3 GLEP-IFr1 对小鼠 S180 的抑制活性(n=6)

	剂量/(mg/kg)	瘤重/g( $X_{\bar{y}} \pm SD$ )	抑瘤率/%	显著性 P
对照组		3.38 ± 0.57		
环磷酰胺组	25	1.18 ± 0.27	65.1	<0.01
样品 a	1	2.31 ± 0.42	31.7	<0.05
样品 b	5	2.00 ± 0.46	40.8	<0.01
样品 c	10	1.44 ± 0.32	57.4	<0.01

a, b, c 分别表示不同剂量的 GLEP-IFr1, 下同。

表 4 GLEP-IFr1 对小鼠腹腔 MΦ 吞噬杀菌功能的影响(n=6)( $X_{\bar{y}} \pm SD$ )

	剂量/(mg/kg)	吞噬率/%	显著性 P	杀菌率/%	显著性 P
对照组		42.5 ± 5.6		17.2 ± 2.8	
环磷酰胺组	25	20.8 ± 3.9	<0.01	7.6 ± 0.8	<0.01
样品 a	1	50.7 ± 8.3	>0.05	21.4 ± 2.3	<0.05
样品 b	5	57.8 ± 7.8	<0.05	27.8 ± 2.1	<0.01
样品 c	10	63.1 ± 7.3	<0.01	33.2 ± 4.2	<0.01

表 5 样品对小鼠白细胞数及免疫器官重量的影响(n=6)( $X_{\bar{y}} \pm SD$ )

组别	白细胞数 $10^9/L$	显著性 P	胸腺重量 (mg/10g)	显著性 P	脾脏重量 (mg/10g)	显著性 P
对照组	9.9 ± 3.7		38.8 ± 8.6		37.2 ± 4.3	
环磷酰胺组	3.2 ± 0.7	<0.01	24.7 ± 7.0	<0.05	19.2 ± 5.1	<0.01
样品 1a	11.3 ± 3.2	>0.05	41.2 ± 5.8	>0.05	43.3 ± 5.3	>0.05
样品 1b	16.6 ± 3.5	<0.05	48.7 ± 6.8	>0.05	51.5 ± 7.2	<0.01
样品 1c	21.5 ± 5.3	<0.01	57.9 ± 7.3	<0.01	62.7 ± 7.3	<0.01

## 3 讨论

本实验测得的 GLEP-IFr1 是数均分

子量,与凝胶法测得的重均分子量相比,数值偏低。多糖的抗肿瘤活性与其结构密切相关, GLEP-IFr1 的分子量大小是适中的,对其结构分析(将另文报道)表明: GLEP-IFr1 是以  $\beta$ -1,3-糖苷键连接成主链,含有  $\beta$ -1,6 糖苷键的侧链的杂多糖。因此从结构上说 GLEP-IFr1 也已经具备了抗肿瘤的活性结构<sup>[9]</sup>。动物实验结果从实践上证明了这一点。GLEP-IFr1 的 3 个剂量组的抑瘤率均在 30% 以上,根据新药审批方法规定,说明灵芝发酵胞外多糖对小鼠 S180 实体瘤有较好的抗肿瘤作用,符合抗癌药物筛选标准。灵芝发酵胞外多糖能明显地增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬和杀菌能力,与化疗药物相比,显示了其抗肿瘤的优越性。分子量为  $3.8 \times 10^4$  左右的灵芝发酵胞外多糖尚未见文献报道。另外,我们还对粗多糖及一混合样品(含多糖和灵芝四环三萜酸)进行了抗肿瘤实验,结果表明粗多糖的平均抑瘤率达到 51.2%;混合样品的平均抑瘤率达到 68.0%,这表明灵芝酸和多糖混合能提高抑瘤效果。今后将对组份 GLEP II ~ V 的抑瘤活性进行检测,以便对灵芝多糖的抑瘤活性作出更全面的评价。

致谢 本校生化研究室全文海教授对本实验给予了热情指导;苏州医学院附属第一人民医院的夏云月老师在动物实验方面给予了大力的支持与指导,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Jong S C, Birmingham J M. *Advances in Applied Microbiology*, 1992, **37**:101~134.
- [ 2 ] 陈国良,陈晓清.中国食用菌,1995,14(4):7~8.
- [ 3 ] 赵继鼎,张小青.真菌学报,1992,11(1):55~62.
- [ 4 ] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* *Analyt Chem*, 1996, **28**:350~356.
- [ 5 ] 梁忠岩,张翼伸.高等化学学报,1983,4(3):464~470.
- [ 6 ] Racusen D. *Anal Biochem*, 1979, **99**:474~476.
- [ 7 ] 张惟杰.复合多糖生化研究技术.上海:上海科学技术出版社,1987.81~86.
- [ 8 ] 徐叔云.药理实验方法学.北京:人民卫生出版社,1982.1423~1442.
- [ 9 ] John A B, James N B. *Carbohydrate Polymers*, 1995, **28**:3~14.

## ISOLATION, PURIFICATION AND BIOACTIVITIES OF EXOPOLY SACCHARIDES FROM FERMENTED BROTH OF *GANODERMA LUCIDUM*

Li Pingzuo Zhang Kechang

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract:** The exopolysaccharides of *Ganoderma lucidum* (GLEP) extracted from the fermentation broth after removing protein by Sevage and protease digestion procedures, were applied to a column of DEAE-cellulose(OH<sup>-</sup> form), and eluted stepwise with distilled water, sodium hydrogen carbonate (0.1 mol/L, 0.3mol/L,0.5mol/L successively) and 0.1mol/L sodium hydroxide. Five fractions were obtained, and the main fraction was known as GLEP- I., furthermore subjected to chromatography on a column of SepharoseC1-6B, eluted at a flow rate of 30mL/(cm<sup>2</sup>·h), the relative viscosity of sample solution of 1.5. Two fractions, GLEP-IFr1 and GLEP-IFr2 with a ratio of 3.8 :1, were obtained,. Molecular weight of GLEP-IFr1 and GLEP-IFr2 was estimated to be 38 000 and 22 000 Dalton respectively by Membrane Osmometer. The animal test showed that GLEP-IFr1 could inhibited the growth of Sarcoma 180 tumor in mice. The average inhibition ratio was 57.4% (i. p. 10mg/kg for 10 days). The result of immunological activity showed that GLEP-IFr1 could significantly improve macrophage cytophagy.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*, Exopolysaccharides, Isolation and purification, Bioactivity