

## 灰树花的液体发酵及其胞内多糖的分离纯化

袁德云 章克昌

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214036)

(江南大学生物资源研究室, 无锡, 214036)

**摘 要** 液体发酵培养获得灰树花发酵液 GFL, 提取发酵液胞内粗多糖, 再应用快速分离纯化开拓系统 Akta Explorer 将胞内粗多糖进行分离纯化, 经 DEAE 柱层析得到一种蛋白多糖复合物 GFP I, GFP I 经 Supdex200 凝胶过滤和高压液相色谱鉴定为单峰, 初步证明其为纯净物。

**关键词** 灰树花, 液体发酵, 多糖, 分离纯化

在分类学上灰树花隶属于担子菌亚门, 层菌纲, 非褶菌目, 多孔菌科, 树花菌属, 是一种天然的珍稀食药两用真菌<sup>[1]</sup>。其所含的生物活性物质——灰树花多糖, 被认为是所有真菌生物活性物质中抗肿瘤活性最强的<sup>[2]</sup>。近年来我国对于灰树花的研究愈来愈多, 但主要集中于固体栽培方面, 液体发酵培养的研究较少, 分离纯化方面的研究亦鲜有报道, 为此笔者对灰树花进行了液体培养和胞内多糖的分离纯化, 这种珍贵的食药兼用真菌做了较深入的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株: 灰树花 (*Grifola frondosa*) GF03 菌株, 本实验室筛选。

斜面培养基(%) : 葡萄糖 2, 马铃薯汁 20, 麸皮汁 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1, 琼脂 2。

液体发酵培养基(%) : 葡萄糖 1, 玉米粉 0.5, 麸皮 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2$  0.1。液体摇瓶菌种培养条件: 培养箱及摇床温度均为 25℃, 摇床转速为 160 r/min, 培养 6 d, 得发酵液 GFL。

### 1.2 主要设备

SP-250A 型生化培养箱, 南京实验仪器厂; HYG-II 型回转式摇床, 上海欣芯自动化设备有限公司。快速分离纯化开拓系统 Akta Explorer、HiPrep<sup>TM</sup>16/10DEAE 层析柱、Supdex200 HR 10/30 凝胶过滤层析柱, 安法玛西亚公司生产。高压液相色谱仪, 惠普公司生产。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 发酵液的制备

发酵液还原糖的测定: 3, 5-二硝基水杨酸法<sup>[3]</sup>。

发酵液固形物含量的测定: 取 40 mL 发酵液, 3

000 r/min 离心 20 min, 菌体经多次冲洗后, 于 105℃ 烘至恒重。

发酵液胞外多糖含量的测定: 3 000 r/min 离心所得上清液, 取 30 mL, 加 3 倍体积的体积分数为 95% 的乙醇, 于 4℃ 冰箱中醇析 18 h, 离心, 取沉淀于 105℃ 烘至恒重。

#### 1.3.2 胞内粗多糖的提取及初步纯化

发酵液经离心、菌体经超声波破碎、热水浸提, 再于 4℃ 醇析过夜, 再经 Sevag 法脱蛋白<sup>[4]</sup>,  $\text{H}_2\text{O}_2$  脱色<sup>[6,7]</sup>, 透析, 浓缩, 冷冻干燥得胞内粗多糖。

#### 1.3.3 胞内粗多糖的纯化

采用快速分离纯化开拓系统 Akta Explorer, 将 35 mg 经 1.3.2 制备的胞内粗多糖, 上 DEAE 柱, 以 pH 6.8 磷酸盐缓冲液、NaCl 溶液梯度洗脱, 215 nm、280 nm 波长下在线检测, 5 mL/管部分收集, 结果见图 1。再经苯酚-硫酸法测定所收集各管的多糖含量, 结果见图 2。取第 1 个洗脱峰, 即第二只收集管中的溶液经透析、冷冻干燥得胞内多糖纯化物 GIP。取 6 mg GIP 上 Supdex200 柱, 超纯水洗脱, 以 0.25 mL/min 流速洗脱, 1 mL/管部分收集, 215 nm、280 nm 波长下在线检测, 结果见图 3。苯酚-硫酸法检测经凝胶过滤的多糖含量所得结果如图 4, GFP I 的高压液相检测图谱见图 5。

## 2 结果与讨论

### 2.1 液体摇瓶培养发酵动态情况

发酵液的相关发酵动态见图 1 和图 2。由图 1 和图 2 可以看出, 随着发酵的进行, pH 开始下降, 于第 4~7 天维持在 3.4 左右, 第 8 天 pH 有所上升, 可能是发酵后期部分菌体分解所致, 同时胞外多糖不断积累, 于第 6 天达到高峰, 为 2 150 mg/L。还原糖

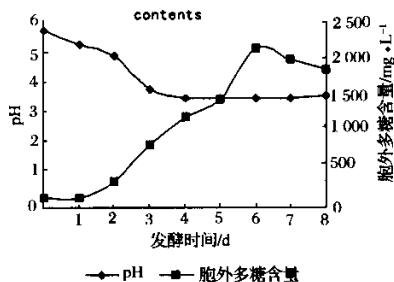


图 1 pH、胞外多糖含量变化曲线

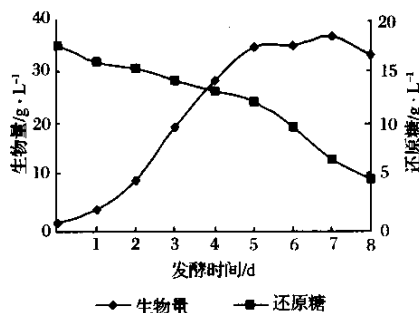


图 2 生物量、还原糖变化曲线

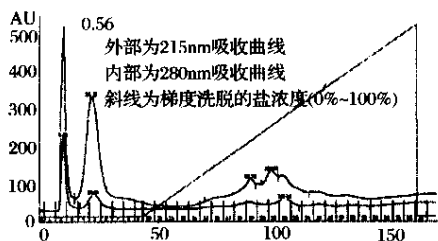


图 3 AKTA Explorer 完成的胞内多糖的 DEAE 层析图谱

含量呈下降趋势。

## 2.2 胞内多糖的分离纯化

### 2.2.1 胞内多糖的 DEAE 层析

应用快速分离纯化开拓系统 Akta Explorer, Hiprep<sup>TM</sup>16/10 DEAE 层析柱进行胞内多糖的分离纯化,结果如图 3 所示。横坐标为保留体积(mL)和管号。于 215 nm、280 nm 波长下在线检测,在结合洗脱过程,于第 2 管、第 4、5 管出现吸收高峰,而梯度洗脱过程的吸收情况相对较弱。由于本纯化设备未配置示差折光检测器,所以不能进行多糖的在线检测,故采用化学方法(苯酚-硫酸法)逐管检测多糖含量。结果如图 4 所示。

图 4 表明,经苯酚-硫酸法测定,亦是第 2 管达到多糖含量高峰,占胞内多糖组成的绝大部分。由于梯度洗脱过程与结合洗脱过程比较,各管多糖含量相对较低,使得在图 4 中不能得以表达,故于图 5

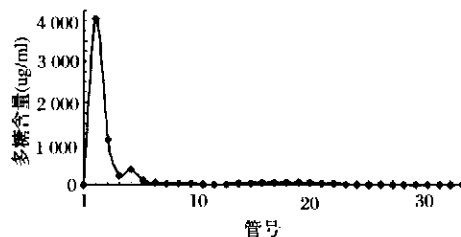


图 4 胞内多糖 DEAE 层析的多糖检测图谱

改变纵坐标后,绘出 10~30 管的 DEAE 层析图谱,图 5 所示的多糖分布情况与图 4 中第 1 个多糖洗脱峰比较含量甚微。且分离效果不佳。DEAE 层析结果说明,于 215 nm 有强吸收,且 215 nm、280 nm 吸收峰重叠,保留体积为 8.6 mL 的第 2 管之洗脱溶液为胞内多糖的主要组成部分,命名为 GIP。由于 GFP I 具有 280 nm 的吸收,推测其可能是一种蛋白聚糖复合物。有关 GFP I 的结构分析将另文报道。

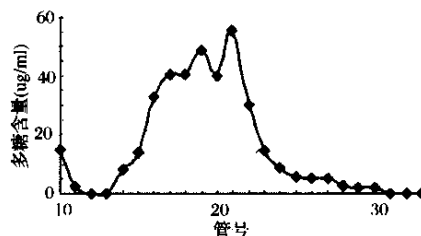


图 5 胞内多糖 DEAE 层析的多糖检测图谱 (第 10 管—第 33 管)

### 2.2.2 GFP I 的纯度鉴定

#### 2.2.2.1 GFP I 的 Supdex200 HR 10/30 凝胶过滤层析

由图 6 可见,GIP 经 Supdex200 HR 10/30 凝胶过滤层析,于 215 nm、280 nm 波长下在线检测,得到重叠单峰。

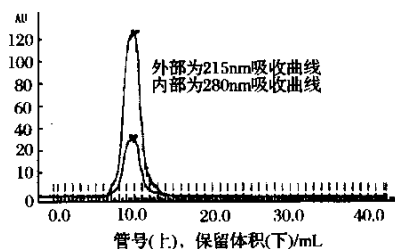


图 6 AKTA Explorer 完成的 GIP 的 Supdex200 凝胶过滤图谱

由图 7 可见,经苯酚-硫酸法测定,与图 6 在相同的洗脱位置得到一多糖单峰。

#### 2.2.2.2 GFP I 的高压液相色谱分析

图 8 表明,GFP I 经 HPLC 层析,视差折光检测亦为一单峰。图 5 表明,GFP I 经 Supdex200 凝胶

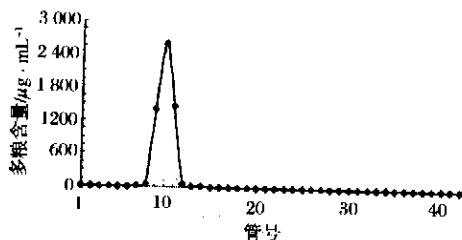


图7 GIPSupdex200 凝胶过滤的多糖检测图谱  
过滤的各管洗脱液经苯酚-硫酸法检测亦得到单峰,图6也表明 GFP I 经 Supdex200 凝胶过滤,于 215 nm、280 nm 波长下检测为单峰,故基本说明 GFP I 为一纯净物。



图8 GIP 的高压液相图谱

多糖一般在 215 nm 有较强的吸收,蛋白多糖一般在 215 nm、280 nm 会有较强的吸收,故洗脱液在此波长下的吸收情况与多糖的分布有一定的对应关

系。研究表明,灰树花胞内粗多糖各组分于 215 nm、280 nm 波长的检测情况与多糖复合物的分布情况有直接的定位关系,因此,在没有视差折光检测器在线检测多糖洗脱的情况下,可用此法进行某些多糖组分的制备,如本研究中可见灰树花胞内粗多糖经 DEAE 一次纯化即可获得高纯度的 GFP I 组分。GFP I 含量高、纯度高、保留时间短,使得制备迅速,另外洗脱剂盐浓度低,使得透析除盐较为方便,这给所收集组分的后处理工作带来极大的方便。笔者已经通过动物试验证明 GFP I 对饮食性高血脂症具有显著的治疗作用。有关生物活性的研究将另文报道。

### 3 结 论

对灰树花进行了液体培养和胞内多糖的分离纯化,以较经济的原料经液体发酵培养 6 d 即获得了较高的多糖产量。采用快速分离纯化开拓系统 Akta Explorer,于 215 nm、280 nm 波长下在线检测,经 DEAE 柱一次纯化即可获得 GFP I 组分,GFP I 经 Supdex200 凝胶过滤、HPLC 检测均为一单峰,初步证明 GFP I 为一纯净物。

### 参 考 文 献

- 1 刑增涛等. 食用菌学报,1999,1(3):54
- 2 Hiroaki Nanba. Explore,1995(6):1
- 3 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京:人民教育出版社,1981,9~11
- 4 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 杭州:浙江大学出版社,1994
- 5 U.S. Patent,3516983,1970
- 6 梁忠岩,张翼伸. 高等学校化学学报,1983,4(3):364~370

## 2003 年 1~6 月我国啤酒产量 万 t

省市区分	1~6 月产量	累计增长/%	省市区分	1~6 月产量	累计增长/%	省市区分	1~6 月产量	累计增长/%
北 京	58.33	-11.38	天 津	8.35	22.79	河 北	57.07	-15.34
山 西	8.73	8.04	内 蒙 古	21.81	1.21	辽 宁	71.04	-2.12
吉 林	41.46	-1.40	黑 龙 江	94.26	9.45	上 海	19.00	6.09
江 苏	52.81	11.13	浙 江	79.06	5.53	安 徽	66.81	-5.17
福 建	61.35	10.82	江 西	19.77	2.12	山 东	163.47	0.36
河 南	58.32	-1.14	湖 北	52.07	2.80	湖 南	18.10	1.34
广 东	85.51	5.96	广 西	19.23	3.00	海 南	2.44	9.42
重 庆	19.85	10.59	四 川	43.21	9.09	贵 州	5.19	2.37
云 南	9.29	-2.62	西 藏	1.50	4.17	陕 西	31.84	5.47
甘 肃	11.81	8.85	青 海	0.11	-38.89	宁 夏	3.12	-25.89
新 疆	11.24	4.17				全国总计	1 196.15	1.56