

# 超微粉碎和普通粉碎对柳松菇多糖的提取 及凝胶柱层析分离的研究

王晓炜<sup>1</sup>, 程光宇<sup>2,3</sup>, 吴京燕<sup>2,3</sup>, 江海涛<sup>2</sup>

(1. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

(3. 江苏吴中大自然生物工程有限责任公司, 江苏 南京 210097)

**[摘要]** 对超微粉体及三种不同大小粉体提取的柳松菇多糖及多糖的凝胶柱层析分离进行研究, 结果表明, 超微粉碎和普通粉碎对总糖、还原糖的提取基本没有影响, 对多糖的提取影响较大. 由 300 目超微粉提取的多糖含量和得率分别为 50% 和 13%, 未粉碎的块状、40 目粗粉和 100 目细粉提取的多糖含量和得率分别为 300 目超微粉的 42.8%、65.7%、72.1% 和 28.2%、45.7%、71.2%. 采用 Sephadex G-200 凝胶柱层析分离柳松菇多糖, 得到纯化的多糖 I 和 II 两个多糖组分. 在超微粉碎提取的柳松菇多糖中, 主要是相对分子质量高的多糖 I, 在未粉碎的块状提取的柳松菇多糖中, 以相对分子质量低的多糖 II 为主, 超微粉碎有利于相对分子质量高的多糖 I 的提取. 多糖 I 为胞内多糖, 其含糖量为 78%, 相对分子质量约为 424 137, 在 260 nm、280 nm 均无吸收; 多糖 II 的含糖量为 42.9%, 相对分子质量为 12 944, 在 280 nm 无吸收, 但在 260 nm 有一个吸收峰.

**[关键词]** 柳松菇多糖, 超微粉碎, 提取, 柱层析

**[中图分类号]** Q539 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0066-05

## Study on Extraction and Isolation of Polysaccharide from *Agrocybe Aegerita* by Using the Ultramicro-Pulverization and the Grinding Method

Wang Xiaowei<sup>1</sup>, Cheng Guangyu<sup>2,3</sup>, Wu Jingyan<sup>2,3</sup>, Jiang Haitao<sup>2</sup>

(1. Jinling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(3. Jiangsu Wuzhong Nature Biotech Co Ltd, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** The effects are studied of extracting polysaccharide from *Agrocybe Aegerita* by using ultramicro-powder and three different size powders and isolation of polysaccharide on Sephadex G-200 column chromatography. The results show that the extraction of total sugar and reducing sugar has little influence, but has a great influence on the extracting polysaccharide between the ultramicro-powder and other three powders. The content and yield of polysaccharide are 50% and 13% by using extraction of ultramicro-powder respectively. The polysaccharide content and yield which are extracted by unsmashed fruiting body, coarse powder and fine powder are 42.8%, 65.7%, 72.1% and 28.2%, 45.7%, 71.2% of ultramicro-powder's content and yield, respectively. Two components of polysaccharide I and II are isolated and purified by using the method of column chromatographic Sephadex G-200. The polysaccharide I and II are the main components in extracted polysaccharide by using ultramicro-powder and unsmashed fruiting body, respectively. The polysaccharide I belong to the incellular polysaccharide, whose polysaccharide content is 78% and whose molecular weight is 424 137. This polysaccharide does not exhibit obvious absorption at 280 and 260 nm. The sugar content of polysaccharide II is 42.9%, whose molecular weight is 12 944, and it is not absorbed at 280 nm, but it exhibits a peak at 260 nm.

**Key words:** *Agrocybe aegerita* polysaccharide, ultramicro-pulverization, extraction, column chromatography

收稿日期: 2005-03-08.

作者简介: 王晓炜, 女, 1982—, 硕士研究生, 主要从事营养与保健功能因子的学习和研究. E-mail: vivid82@21cn.com

通讯联系人: 程光宇, 1954—, 高级实验师, 从事生物活性物质及保健功能因子的开发与研究. E-mail: mxwcgy@yahoo.com.cn

## 0 引言

柳松菇(*Agrocybe aegerita* (Brig.) sing.)又名柱状田头菇、柱状环锈伞、柳菇、柳环菌,隶属于担子菌纲,粪锈伞科,田蘑属,是一种很有发展前途的药食两用大型食用菌。该菌味道鲜美,脆嫩爽口,不仅营养价值高,而且含有多糖、麦角固醇、黄酮类等多种生物活性物质<sup>[1,2]</sup>,入药治水肿、小便不利、肾炎等,其子实体热水提取物对小白鼠肉瘤 s-180 和艾氏腹水瘤的抑制率分别为 90% 和 80%,子实体多糖可以改善肌肉疲劳状态,有明显的降血糖活性<sup>[3-5]</sup>,但目前国内外对柳松菇的研究主要集中在栽培育种等方面,对其功效成分的研究尚未见详细报道。多糖是柳松菇的主要药用功效成分之一,对于多糖的提取通常都是利用常规的粉碎方法进行,本文将超微粉碎应用于多糖的提取,并对不同粉碎程度提取的多糖及多糖的凝胶柱层析分离进行了比较研究,旨在为柳松菇多糖及其功能性保健因子的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及试剂

柳松菇子实体,来源于苏州市华昌食用菌有限公司。经低温烘干后加工粉碎成 3~5 mm<sup>3</sup> 块状、40 目粗粉、100 目细粉及 300 目超微粉四种规格用于实验。块状和 40 目细粉在本公司加工,100 目细粉和 300 目超微粉在东台市菇神食用菌研究所加工。粉碎后的样品均通过 OLYMPUS(CH 型)显微镜检查其粉体粒径的大小。

Sephadex G-200、葡聚糖(Dextran) T500、T70、T40、T10 为 Pharmacia 产品,考马斯亮蓝 G250(Fluka 产品),牛血清白蛋白(Sigma 产品),其他试剂为国产分析纯或生化试剂。

蛋白沉淀剂为 220 g/L 乙酸锌溶液和 106 g/L 亚铁氰化钾溶液。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 多糖的提取

取 4 种不同粉碎程度的样品按 1:40(W/V)的比例加入蒸馏水于 500 mL 三角烧瓶内,搅拌均匀,100℃ 恒温水浴中回流提取 1 h,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,沉淀再按 1:20(W/V)的比例加入蒸馏水,混合均匀后,按上述条件再提取两次。分别各取 3 次提取液 2.0 mL,加 4 倍 95% 乙醇沉淀粗多糖,粗多糖经 80% 乙醇洗涤离心后,用于多糖测定。将三次提取液合并,测定其总糖和还原糖,把提取液浓缩至一定体积后按 50:1:1(提取液:乙酸锌溶液:亚铁氰化钾溶液)的体积比例加入蛋白沉淀剂,混匀,静置 30 min 后,离心去除蛋白质,取上清液浓缩至一定体积,加入 4 倍体积的 95% 乙醇,于冰箱内静置过夜,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀用 80% 乙醇洗涤离心 3 次,将所得沉淀冻干后分别得到 4 种不同粉碎程度提取的柳松菇多糖,用于实验分析。

#### 1.2.2 还原糖、总糖及多糖含量测定

还原糖采用 DNS 法测定,总糖和多糖采用硫酸-蒽酮法测定。其中多糖测定改进如下:取多糖样品溶液和不同浓度葡聚糖溶液各 0.4 mL 于试管中,用 1 mL 的移液器吸 1.00 mL 蒽酮试剂后直接打入到试管中的溶液内,立即混匀后于 100℃ 保温 10 min,用 0.5 cm 光径的比色皿在 722 型光栅分光光度计上读取 620 nm 的吸光度值,以吸光度值对葡聚糖质量(μg)进行线性回归,求出回归方程及相关系数,将样品吸光度值代入回归方程后即得样品的多糖质量。

#### 1.2.3 多糖纯度分析

取冻干多糖样品 10.0 mg,加蒸馏水溶解定容至 10 mL,配成浓度为 1.0 mg/mL 的柳松菇多糖溶液,按硫酸-蒽酮法测定多糖含量,按 Bredford 法<sup>[6]</sup>或 folin-酚法测蛋白质含量。同时在 TU-1800 型紫外可见分光光度计上进行波长扫描检测 280 nm 和 260 nm 的吸收值。

#### 1.2.4 多糖的凝胶柱层析分离纯化

多糖采用 Sephadex G-200 凝胶柱层析(40×1.5 cm)分离。取柳松菇多糖加 0.4 mL 生理盐水充分溶解,加到用生理盐水充分平衡过的 Sephadex G-200 凝胶柱上,用生理盐水进行洗脱,用 BS-160A 型自动部

分收集器进行分部收集(4 管/h,0.75 mL/管),用硫酸-蒽酮试剂检测收集管糖含量,以葡萄糖含量为纵坐标,收集管号为横坐标绘制层析曲线图。

根据层析曲线图将多糖峰部分分别合并,浓缩后加 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀,离心收集沉淀后得到每个峰的多糖,将多糖溶解后再进行一次 Sephadex G-200 柱层析分离,得到单一对称的多糖峰,将多糖峰合并加 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀,即得到层析后纯多糖 I 和 II 两个多糖组分。

1.2.5 多糖的相对分子质量的测定

分别称取相对分子质量为 50 万、7 万、4 万、1 万的葡聚糖各 2 mg 左右,用少量生理盐水溶解,进行 Sephadex G-200 柱层析,检测收集管糖含量,计算出不同分子量葡聚糖的洗脱体积,以洗脱体积对葡聚糖相对分子质量对数进行线性回归求出回归方程。将纯多糖 I 和 II 分别溶解后,在相同条件下进行凝胶柱层析,求出其洗脱体积,代入回归方程得到柳松菇多糖的相对分子质量。

2 结果与分析

2.1 超微粉碎与普通粉碎粉体粒径的显微观察

在 OLYMPUS 显微镜(目镜×10,物镜×40)下观察超微粉,整个视野遍布淡黄色细小的颗粒,未见完整的细胞和组织碎片,用显微测微尺测量粉体的粒径,其中 90% 以上的粒径分布范围在 5.2~10.4 μm 间。粗粉和细粉在显微镜下观察均可见到完整的细胞、菌丝体片段和较大组织碎块,绝大多数粉体粒径都在 100 μm 以上。

2.2 提取时间及提取次数对不同粉碎程度多糖、总糖和还原糖提取的影响

从表 1 看出,不同粉碎程度的样品经 2 次提取后的得率都在 90% 以上,但第一次提取的得率与粉碎程度呈正相关,而第二次提取的得率与粉碎程度呈负相关,同时,多糖总量也与粉碎程度呈正相关,提示加大粉碎程度后,有利于多糖的溶出和提取。

从表中还可看出,不同粉碎程度对总糖和还原糖的提取影响不大,对多糖提取影响较大,随着粉碎程度的增大,提取的多糖总量明显增加,以 300 目超微粉提取的多糖总量最高,块状、40 目粗粉和 100 目细粉提取的多糖总量只有 300 目提取多糖总量的 14.7%、43.3% 和 64.7%。

表 1 提取时间及提取次数对不同粉碎程度多糖、总糖和还原糖提取的影响

粉碎程度	提取次数	时间/h	糖浓度/(μg/mL)	多糖/mg	得率/%	多糖总量		总糖/mg	还原糖/mg
						mg	%		
块状	1	1	215.4±9.8	9.7±0.4	71.15				
	2	1	69.7±14.3	3.1±0.4	23.03	13.62	14.7	309.7±22.4	53.3±1.6
	3	1	31.7±15.7	0.8±0.1	5.82				
40 目	1	1	667.5±4.2	30.0±0.3	74.98				
	2	1	157.8±3.5	7.1±0.3	17.72	40.06	43.3	323.6±65.6	52.0±0.8
	3	1	117.0±4.4	2.9±0.1	7.30				
100 目	1	1	1007.3±31.0	45.8±1.3	76.50				
	2	1	233.9±4.9	10.5±0.2	17.57	59.92	64.7	253.4±18.6	39.9±2.2
	3	1	142.2±1.8	3.6±0.1	5.93				
300 目	1	1	1606.5±68.8	72.3±2.3	78.10				
	2	1	345.7±8.4	15.6±0.4	16.81	92.56	100.0	297.2±50.4	40.1±1.3
	3	1	188.4±2.4	4.7±0.1	5.09				

2.3 不同粉碎程度对提取柳松菇多糖含量及得率的影响

将不同粉碎程度的样品重复提取多糖三次,经真空干燥后,用万分之一天平称量,得到多糖得率,同时测定该多糖的糖和蛋白质含量及紫外吸收光谱(见表 2)。结果表明不同粉碎程度提取的多糖的蛋白质含量均低于 2.3% (以 Folin-酚法测定),在 280 nm 处无明显的吸收峰存在。

表 2 不同粉碎程度提取多糖含量及得率比较

粉碎程度	多糖含量		得率		蛋白质含量	紫外吸收光谱
	(g/100 g)	相对百分数/%	(g/100 g)	相对百分数/%	(g/100 g)	280 nm
块状	21.47 ± 1.63	42.8	3.70 ± 0.06	28.2	0.15	无吸收
40 目	32.98 ± 1.65	65.7	6.01 ± 0.48	45.7	1.16	无吸收
100 目	36.20 ± 2.07	72.1	9.35 ± 0.21	71.2	1.22	无吸收
300 目	50.18 ± 0.14	100.0	13.14 ± 0.10	100.0	2.27	无吸收

经 300 目粉碎后提取的多糖含量和得率分别为 50% 和 13%, 而块状、40 目和 100 目的提取的多糖含量和得率仅为 300 目的 42.8%、65.7%、72.1% 和 28.2%、45.7%、71.2%。说明经粉碎后的物料比未粉碎的物料更有利于多糖的溶出和提取, 且超微粉碎在这三种粉碎程度中, 其多糖含量和得率都是最高的。

2.4 超微粉碎对多糖凝胶柱层析分离的影响

柳松菇多糖有两个组分, 经 Sephadex G-200 柱层析后能够将这两个组分分离开 (见图 1-A), 其中最先洗脱出来的是相对分子质量较大的多糖 I 组分, 后洗脱出来的是相对分子质量较小的多糖 II 组分。块状和 300 目超微粉提取的多糖, 以相同的量进行凝胶柱层析分离, 在小分子多糖 II 组分上, 两者层析后得到很相似几乎重合的多糖峰, 但在大分子多糖 I 组分上相差很大, 超微粉碎后大分子多糖经层析后的总量为 5.54mg, 是块状提取 (层析后总量为 0.54mg) 的 10 倍, 可见超微粉碎有利于大分子多糖的提取。

为进一步研究这两个多糖分子特性, 将 300 目层析后的最先洗脱出来的峰 I 和块状后洗脱出来的峰 II 分别合并, 进行 Sephadex G-200 柱层析, 得到单一基本对称的峰 (见图 1-B 和 1-C), 将其合并后, 得到纯化的多糖 I 和多糖 II。

经检测, 多糖 I 的糖含量为 76.7%, 与考马斯亮蓝 G250 和 Folin-酚试剂均呈阴性反应, 在 280 nm 和 260 nm 处都无明显吸收; 多糖 II 的糖含量为 42.9%, 在 280 nm 处无吸收, 但在 260 nm 处有一明显吸收, 用定磷法测得其含磷量为 3.0%, 表明多糖 II 可能为含有部分核酸类物质的多糖。

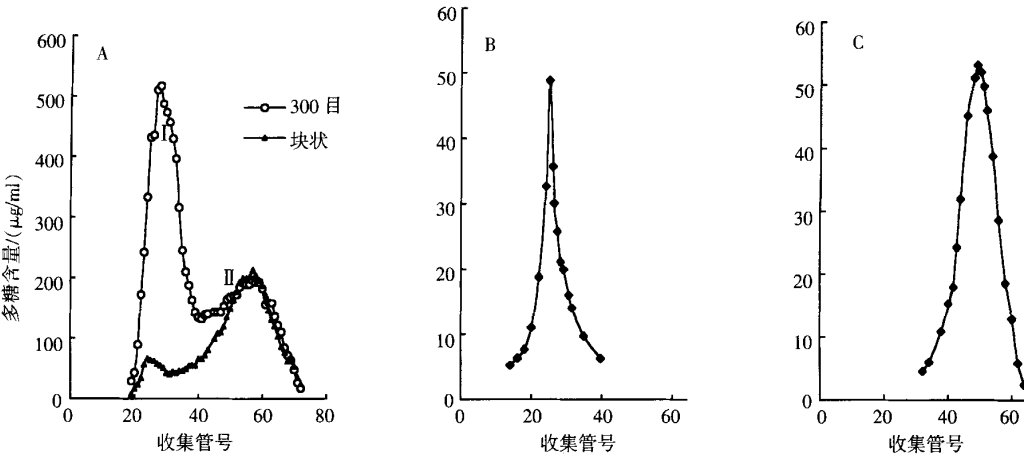


图 1 柳松菇多糖(A)、纯化多糖 I (B)和纯化多糖 II (C)的 SephadexG-200 柱层析图谱

2.5 多糖的相对分子质量测定

将标准葡聚糖系列进行柱层析得到其洗脱体积, 以 LogMW 对洗脱体积 (x) 进行线性回归, 得回归方程为  $\text{LogMW} = -0.0667x + 6.9495 (r^2 = 0.9939)$ , 将纯化的多糖 I 和 II 的洗脱体积代入, 得到大分子多糖 I 的相对分子质量为  $424\,136.8 \pm 17\,433.2$ , 小分子多糖 II 的相对分子质量为  $12\,944.4 \pm 1\,980.4$ 。

3 讨论

超微粉碎是近年来迅速发展的一项旨在进行细胞级粉碎新技术, 已在中草药的深加工中得到较快的应用, 经超微粉碎后可使细胞内成分充分暴露出来, 药物有效成分的溶解和释放加快, 药物的药效学活性

提高,更有利于在体内的吸收<sup>[7,8]</sup>.对于真菌超微粉碎则集中在灵芝孢子粉的破壁和子实体的粉碎等方面,对于其它食用菌的报道不多.柳松菇是近年来很有发展前景的一种药食大型食用菌,对其有效药用成分,特别是多糖类报道不多.我们将超微粉碎应用于多糖的提取和分离,并与不同粉碎程度提取的多糖进行比较研究,结果表明,柳松菇多糖提取的总量、得率和含量均随着粉碎程度的加大有明显的增加,以超微粉碎为最高,超微粉碎的多糖含量达50%,块状、40目粗粉和100目细粉提取的多糖含量分别为它的42.8%、65.7%和72.1%,其多糖得率为13%,高于其他几种不同粉碎程度提取的多糖和已报道的几种食用菌多糖得率<sup>[9,10]</sup>.说明超微粉碎比其他几种粉碎更有利于柳松菇子实体多糖的提取、多糖含量和得率的提高.

真菌多糖一般分为胞外多糖和胞内多糖,高等真菌多糖主要是胞内多糖,它主要存在于菌丝体的细胞壁或细胞间质中,采用适当方法可将其提取出来.本文用未粉碎和超微粉碎两种方法提取的柳松菇多糖进行凝胶柱层析分离,在同样上样量的情况下得到多糖Ⅱ的峰几乎重合,提示它的含量相同,不因粉碎程度加大而有所提高,推测它为胞外多糖,但粉碎与不粉碎对多糖Ⅰ的影响很大,经超微粉碎后多糖Ⅰ层析后的多糖量是未粉碎的10倍,说明多糖Ⅰ主要来自细胞壁或细胞内,属胞内多糖,只有当细胞完全破碎后,它们才能完全释放,被提取出来.对于柳松菇胞内大分子多糖Ⅰ的提取,本实验采用超微粉碎的方法进行,比其他几种粉碎方法更有效,得率更高.

本文从柳松菇中分离出一个大分子多糖组分和一个低分子多糖组分与文献报道结果很一致<sup>[5]</sup>.大分子多糖组分的相对分子质量为40多万,不含蛋白质和核酸,推测为葡聚糖;小分子多糖组分的相对分子质量为1万多,不含蛋白质但在260 nm处有吸收,含有3.0%的磷,明显低于核酸中磷的含量,可能含有部分核酸类物质,因其相对分子质量与小分子量多糖相近而未能分离,其分离方法还有待进一步改进.这两个多糖的理化性质及生物活性正在研究和证实之中.

有报道证实柳松菇的两种多糖成分均有降低糖尿病小鼠血糖的作用,但大分子多糖的降血糖功效更为明显,因而利用超微粉碎提取柳松菇多糖有较高的实用价值和应用前景.

多糖的脱蛋白多采用Sevag的方法,该法不仅要消耗较多的有机溶剂,而且手续烦琐,需反复多次,甚至十几次才能脱去多糖中的杂蛋白,我们将测定食品中还原型抗坏血酸方法中所用的蛋白沉淀剂应用于多糖的脱蛋白,所得多糖与考马斯亮蓝G250呈阴性反应,在280 nm无明显吸收,说明该法可靠,简便易行,有其应用价值.

### [参考文献]

- [1] 江枝和,翁伯琦.柱状田头菇(白柳松菇)中蛋白质的营养评价[J].菌物系统,2002,21(3):444—447.
- [2] 李惠珍,许旭萍,谢华玲.柱状田头菇固体栽培条件及多糖麦角固醇提取方法[J].食用菌,1999,4(1):3—5.
- [3] 黄年来.中国大型食用真菌原色图鉴[M].北京:中国农业出版社,1998:173.
- [4] 李宁宁,辛晓林,孙洪兆.茶薪菇多糖延缓离体骨骼肌疲劳的研究[J].滨州医学院学报,2004,27(1):7—9.
- [5] Tadashi Kiho, Satoshi Sobue, Shigoe Ukai. Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of *agroclybe cylindracea*[J]. Carbohydrate Research, 1994, 251(3): 81—87.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(2): 248—254.
- [7] 朱莉,隆泉,郑保忠.超微粉碎技术及其在中药加工中的应用[J].云南大学学报:自然科学版,2004,26(增刊):128—131.
- [8] 何煜,郭琪,杜晓敏.中药细胞级微粉碎对体内吸收的影响[J].中成药,1999,21(11):601—602.
- [9] 王红梅,鲍大鹏,杨立民.柱状田头菇胞内外多糖的提取和测定[J].安徽农业技术师范学院学报,2004,14(3):18—20.
- [10] 马纪,李铁杰,王龙,等.阿魏菇多糖的提取、纯化及其组成研究[J].新疆大学学报:自然科学版,2002,19(2):219—221.

[责任编辑:孙德泉]