

---

## 细脚拟青霉菌丝体多糖纯化及组成分析

刘桂君<sup>1,2</sup> 文华安<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所真菌地衣系统学重点实验室 北京 100101

<sup>2</sup>北京顺鑫农业股份有限公司牛栏山酒厂 北京 101301

---

**摘要:** 通过 DE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱, 对细脚拟青霉 *Paecilomyces tenuipes* 菌丝体粗多糖进行纯化, 得到 PtPs1 和 PtPs2, 应用离子色谱 HPAEC-PAD 对纯多糖 PtPs1 和 PtPs2 的单糖组成进行分析, 证实均由葡萄糖、半乳糖和甘露糖三种单糖组成, 经红外扫描确定 PtPs1 和 PtPs2 均为  $\alpha$  型吡喃糖。

**关键词:** 纤维素柱, 葡聚糖凝胶柱, 红外光谱

## Purification and component analysis of polysaccharides from mycelia of *Paecilomyces tenuipes*

LIU Gui-Jun<sup>1,2</sup> WEN Hua-An<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Systematic Mycology and Lichenology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup>Niulanshan Distillery, Beijing Shunxin Agriculture Limited Company, Beijing 101301, China

**Abstract:** The polysaccharides of *Paecilomyces tenuipes* mycelia were purified by using DEAE cellulose DE-52 and Sephadex G-100, and pure polysaccharides PtPs1 and PtPs2 were obtained. The structural unit (monosaccharide) of PtPs1 and PtPs2 was analyzed by HPAEC-PAD. The results indicated that both PtPs1 and PtPs2 consisted of glucose, galactose and mannose. The infrared spectral analysis showed that PtPs1 and PtPs2 were all pyranose of  $\alpha$ -configuration.

**Key words:** DEAE-cellulose chromatogram, sephadex chromatogram, infrared spectrum

---

\*Corresponding author. E-mail: wenha@im.ac.cn

收稿日期: 2007-12-28, 接受日期: 2008-03-24

细脚拟青霉 *Paecilomyces tenuipes* 俗称大孢虫花，是高雄山虫草 *Cordyceps takaomontana* 的无性阶段，是虫草的一种。近年来研究发现，细脚拟青霉生物活性成分种类和含量与冬虫夏草接近而且有其突出的优点——抗肿瘤活性强（刘桂君和文华安 2007），如菌丝体含有的 acetoxyscirpenediol 的抗肿瘤活性是临床抗癌药物顺铂的 4.0-6.6 倍（Nam *et al.* 2001）；4-acetoxyscirpenediol 具有降低循环系统中血糖水平的作用（Yoo *et al.* 2005）；其多糖对大鼠具有免疫调节活性（金丽琴等 2001）。在细脚拟青霉多糖测定方法方面，本文作者通过精密度、样品回收率、稳定性实验，优选得出最佳测定菌丝体多糖方法为蒽酮-硫酸法（刘桂君和文华安 2006）。在细脚拟青霉多糖组成及结构研究方面，丁保金（2004）应用薄层层析和气相色谱方法分析得出多糖由半乳糖、甘露糖和葡萄糖三种单糖组成。作者将提取得到的细脚拟青霉菌丝体多糖通过 DEAE 纤维素柱和葡聚糖凝胶柱进行纯化，得到两个多糖纯组分，通过 HPAEC-PAD 离子色谱对多糖组成进行分析，并应用红外对多糖进行结构扫描，为细脚拟青霉多糖的深入研究提供了基础研究资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料：细脚拟青霉菌丝体粗多糖为本文作者提取所得。提取方法：加入菌丝体质量 20 倍体积的蒸馏水，100℃沸水浴 2h，重复提取 4 次，合并提取水溶液，真空浓缩至小体积，加入 3 倍体积的 95%乙醇沉淀多糖，离心，将沉淀的多糖反复用乙醚、丙酮、无水乙醇洗涤，真空冷冻干燥即得粗多糖。

试剂：碳酸氢钠、乙二胺四乙酸（EDTA）、溴化钾、蒽酮、硫酸、三羟甲基氨基甲烷（Tris）、浓盐酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯仿、正丁醇和三氟乙酸，均为分析纯及色谱级试剂。

透析袋：MD-25，MW3500（Sino-American Biotechnology，进口分装）；DE-52 纤维素（Whatman 4057-100 进口）；Sephadex G-100 葡聚糖凝胶（Pharmacia 进口分装）。

仪器：层析柱：2.6×30cm 及 1.6×100cm（上海华美实验仪器厂）；电热恒温水浴锅（北京西城区医疗器械厂）；梯度洗脱仪：TH-500（上海沪西分析仪器厂）；恒流泵：HL-2D（上海沪西分析仪器厂）；馏分收集器：DBS-100（上海沪西分析仪器厂）；紫外可见分光光度计：4050 型（LKB，瑞典）；分析天平（梅特勒-托利多仪器公司，瑞士）；高速冷冻离心机：J2-HS 型（Bechman 公司，美国）；真空旋转蒸发仪：461 型（BUCHI 公司，瑞士）；真空冷冻干燥仪：6201-1343-OH（VIRTIS 公司，美国）；离子色谱仪：HPAEC-PAD（Dionex DX600，美国）；离子色谱柱：Carbopac<sup>TM</sup> PA1（离子柱，日本）；红外光谱：Tensor 27（BRUKER 公司，德国）。

### 1.2 细脚拟青霉菌丝体多糖样品溶液制备

取细脚拟青霉菌丝体多糖溶于蒸馏水，40-50℃水浴 10min，多糖充分溶解，4000r/min 离心 15min，取上清液，0.22μm 滤膜过滤，冰箱 4℃保存，备用。

### 1.3 细脚拟青霉菌丝体多糖纯化

**1.3.1** DE-52 纤维素柱层析纯化多糖：选取 4 种缓冲液洗脱多糖，磷酸钠缓冲液（0.05mol/L，pH 7.8），Tris-HCl 缓冲液（0.05mol/L，pH 8.0），磷酸钠缓冲液和 1mol/L NaCl 溶液以及

Tris-HCl 缓冲液和 1mol/L NaCl 溶液, 采用普通洗脱和梯度洗脱两种洗脱方法, 选取最佳洗脱条件。纯化多糖, 接收洗脱峰, 合并组分, 真空浓缩, 透析除盐, 真空冷冻干燥, 得到初步纯化的多糖。

**1.3.2 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析纯化多糖:** 将经过 DE-52 纤维素柱纯化的多糖取适量, 用蒸馏水充分溶解, 制成溶液, 经过 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析纯化, 平衡液和洗脱液均为蒸馏水, 收集洗脱峰, 合并组分, 真空浓缩, 冷冻干燥, 得到纯化的多糖。

#### 1.4 多糖样品纯度检测

**1.4.1 紫外检测:** 取经过 DEAE 纤维素柱和葡聚糖凝胶柱分离纯化的多糖样品溶于水, 制成 1mg/mL 多糖溶液, 从 240-400nm 测定多糖样品紫外吸收值, 检测是否含有核酸或蛋白质 (栾洋和文华安 2004)。

**1.4.2 葡聚糖凝胶柱检测:** 取经过 DEAE 纤维素柱和葡聚糖凝胶柱分离纯化的多糖样品溶于水, 制成 1mg/mL 多糖溶液, 过葡聚糖凝胶柱, 洗脱峰要单一, 对称性要好, 说明多糖样品纯度比较高。

#### 1.5 多糖中单糖组成成分分析

取 5mg 多糖纯品 PtPs1 和 PtPs2, 加入 1.5mL 5mol/L 三氟乙酸溶液, 封管, 100°C 水解 6h, 离心除去残渣, 减压浓缩至干, 用去离子水洗涤, 减压浓缩至干, 重复 5 次, 除去残留的三氟乙酸, 定容 1mL, 置于冰箱中 4°C 保存, 备用。将三氟乙酸水解多糖样品溶液用 0.22 $\mu$ m 无菌滤膜过滤, 取 0.1mL, 定容到 10mL, 稀释 100 倍。用 HPAEC-PAD (高效阴离子交换色谱脉冲安培检测法) 分析测定, 离子柱为 CarboPac<sup>TM</sup> PA1。每次进样 200 $\mu$ L, 柱温 30°C, 洗脱液 16mmol/L NaOH 溶液, 流速 1mL/min, 用 0.2mol/L NaOH 溶液冲洗柱子除去残留杂质, 冲洗 10-15min, 离子柱平衡液为 16mmol/L NaOH 溶液, 平衡 15-20min。单糖混合标样有鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖五种, 浓度为 20 $\mu$ g/mL 五种标样等体积混合, 其中每种样品浓度为 4 $\mu$ g/mL, 待测。

#### 1.6 多糖红外扫描测定

取 1mg 干燥的纯多糖样品, 与 100-200mg 干燥的溴化钾粉末在玛瑙研钵中轻轻研磨均匀, 在红外灯下操作, 以免溴化钾吸收空气中潮气。样品或溴化钾粉末吸湿后, 将在 O-H 和 N-H 的高波数区域出现水峰, 影响 O-H 和 N-H 的判断。经压片机压成薄片, 上机测定, 在 400-4000 $\text{cm}^{-1}$  测定 (张惟杰 1994)。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖纤维素柱 DEAE-52 层析结果

对细脚拟青霉菌丝体多糖采用磷酸钠缓冲液、Tris-HCl 缓冲液进行普通洗脱, 采用磷酸钠缓冲液+氯化钠溶液以及 Tris-HCl 缓冲液+氯化钠溶液进行梯度洗脱, 分离多糖组分, 结果表明磷酸钠缓冲液不能很好地将 PtPs1 和 PtPs2 分离, 中间有 3-4 管重叠部分; 磷酸钠缓冲液和氯化钠溶液梯度洗脱, PtPs1 和 PtPs2 两个组分洗脱后又出现两个小峰, 多糖含量较低, 无法收集分析; Tris-HCl 缓冲液可以把 PtPs1 和 PtPs2 很好的分离, 比用磷酸钠缓冲液洗脱峰高, 峰型对称性好; 加入氯化钠梯度洗脱, PtPs1 和 PtPs2 浓度低。综合对比四种洗脱溶液及两种洗脱方法, 从节约能源角度考虑, 采用 Tris-HCl 缓冲液洗脱多糖组分

的方法较好。各种缓冲液洗脱多糖曲线见图 1，图 2，图 3 和图 4。

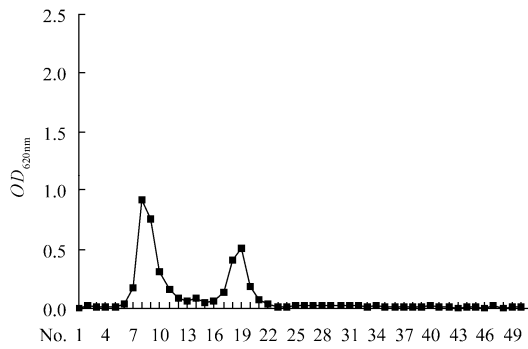


图 1 磷酸钠缓冲液洗脱曲线

Fig. 1 Sodium phosphate buffer elution curve of *Paecilomyces tenuipes* mycelial polysaccharides.

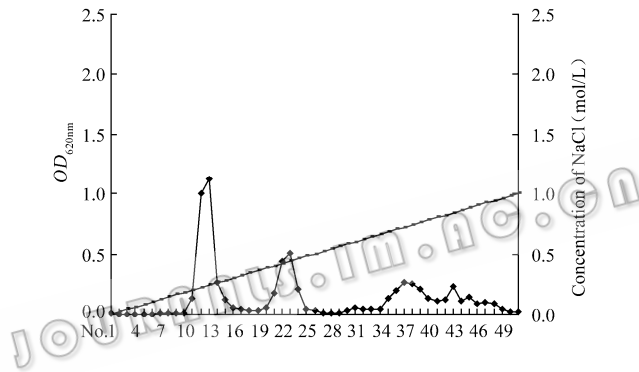


图 2 磷酸钠缓冲液+氯化钠溶液梯度洗脱曲线

Fig. 2 Sodium phosphate buffer + sodium chloride solution grade elution curve of *Paecilomyces tenuipes* mycelial polysaccharides.

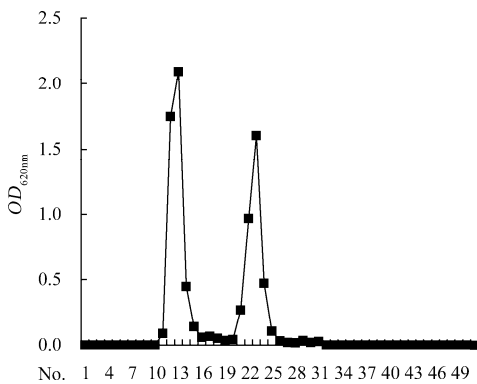


图 3 Tris-HCl 缓冲液洗脱曲线

Fig. 3 Tris-HCl buffer elution curve of *Paecilomyces tenuipes* mycelial polysaccharides.

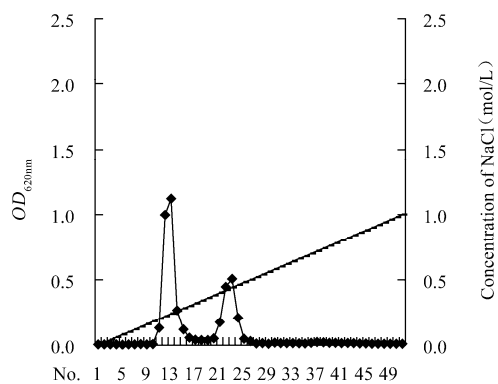


图 4 Tris-HCl 缓冲液+氯化钠溶液梯度洗脱曲线

Fig. 4 Tris-HCl buffer + sodium chloride solution grade elution curve of *Paecilomyces tenuipes* mycelial polysaccharides.

## 2.2 多糖 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析结果

细脚拟青霉菌丝体多糖经 DE-52 纤维素柱分离, 得到初步纯化的多糖 PtPs1 和 PtPs2, 用 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱继续纯化, 平衡液和洗脱液均为蒸馏水。PtPs1 洗脱峰后出现 2 个小峰, 说明经过纤维素柱层析的多糖组分不纯。PtPs2 经过凝胶柱层析洗脱的主峰后面出现拖尾现象, 分析是加样时样品没有充分渗入凝胶层就用蒸馏水洗涤, 导致样品浓度稀释, 所以洗脱峰出现拖尾现象, 收集主峰为 PtPs2, 拖尾部分弃去。洗脱曲线见图 5 和图 6。

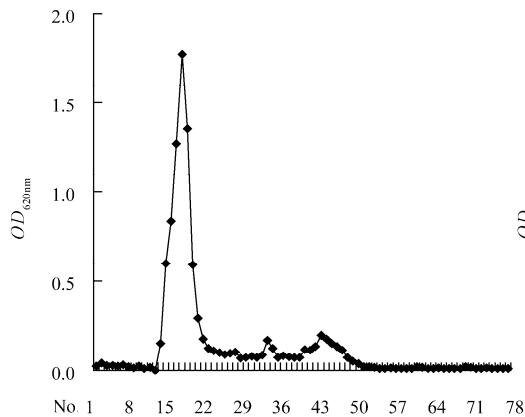


图 5 葡聚糖凝胶 PtPs1 洗脱曲线

Fig. 5 Sephadex G-100 elution curve of pure polysaccharide PtPs1 from *Paecilomyces tenuipes* mycelia.

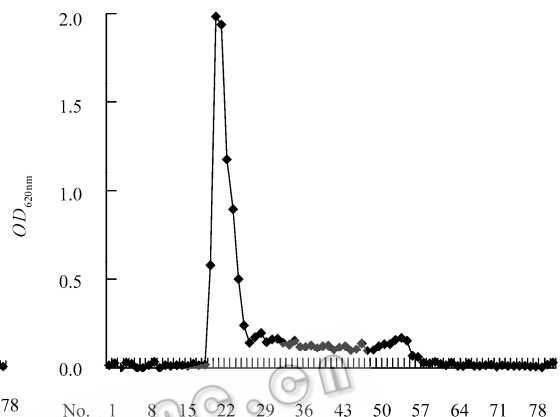


图 6 葡聚糖凝胶 PtPs2 洗脱曲线

Fig. 6 Sephadex G-100 elution curve of pure polysaccharide PtPs2 from *Paecilomyces tenuipes* mycelia.

## 2.3 多糖样品纯度检测

取经过 DEAE 纤维素柱和葡聚糖凝胶柱分离纯化的多糖样品溶于水, 制成 1mg/mL 多糖溶液, 从 240-400nm 测定多糖样品紫外吸收值, 在 260nm 和 280nm 处没有吸光度值变化, 证明多糖中不含有核酸或蛋白质。

取经过 DEAE 纤维素柱和葡聚糖凝胶柱分离纯化的多糖样品溶于水, 制成 1mg/mL 多糖溶液, 经葡聚糖凝胶柱层析, 洗脱峰单一, 对称性好, 说明多糖样品纯度高。

## 2.4 多糖单糖组成分析

用 HPAEC-PAD 高效阴离子交换色谱脉冲安培检测法测定, 标样鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖保留时间依次为 8.967min, 13.200min, 14.217min, 15.417min, 18.767min。此洗脱条件能将五种单糖峰分开, 适合测定样品中单糖的组成及含量。数据结果如图 7, 图 8, 图 9。

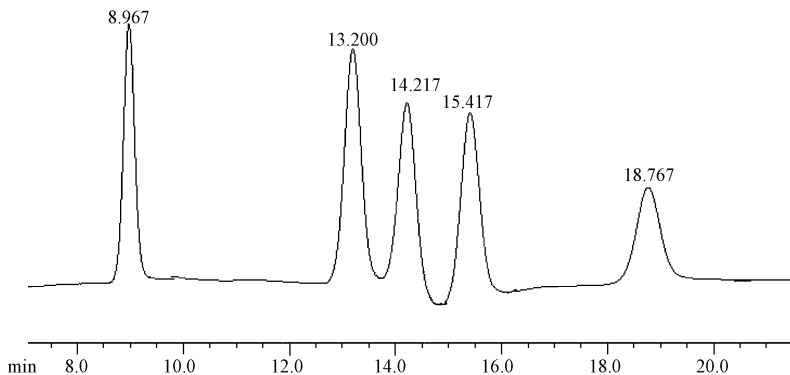


图 7 五种单糖混合标样保留时间

Fig. 7 Reserve time of five mixed monosaccharides' standard sample.

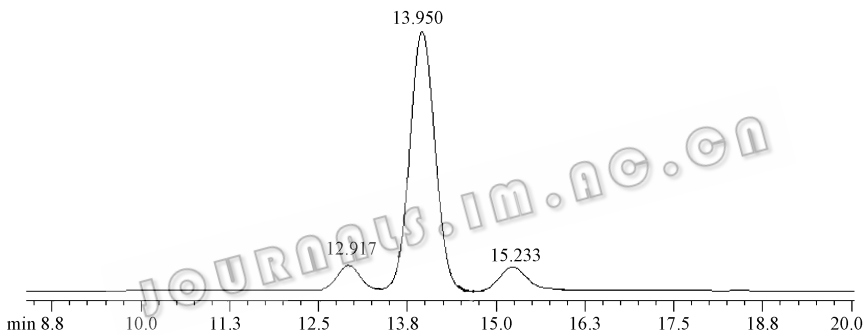


图 8 PtPs1 水解单糖组成

Fig. 8 Monosaccharides of PtPs1 hydrolysate.

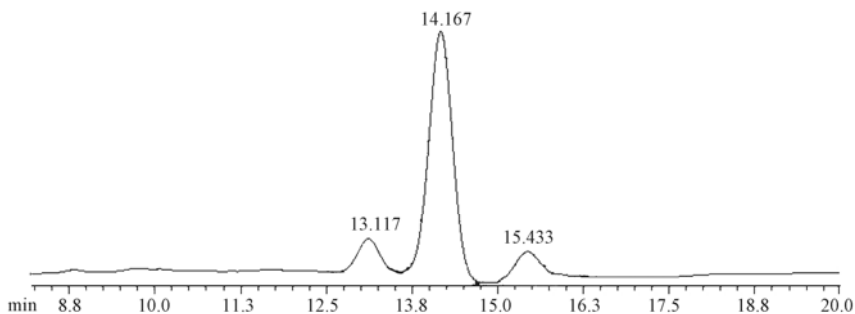


图 9 PtPs2 水解单糖组成

Fig. 9 Monosaccharides of PtPs2 hydrolysate.

根据图 8 得出，多糖 PtPs1 组成单糖有三种，与标准单糖保留时间对比，按照保留时

间顺序为半乳糖、葡萄糖和甘露糖，葡萄糖含量大于另外两种单糖，半乳糖、葡萄糖和甘露糖的含量分别为：80mg/g、1090mg/g、83mg/g，三种单糖摩尔比为：1:13.6:1。

根据图 9 得到，多糖 PtPs2 组成单糖有三种，与标准单糖保留时间对比，按照保留时间顺序为半乳糖、葡萄糖和甘露糖，葡萄糖含量大于另外两种单糖，半乳糖、葡萄糖和甘露糖的含量分别为：80mg/g、946mg/g、93mg/g，三种单糖摩尔比为：1:11.8:1.2。

对比 PtPs1 和 PtPs2 单糖的组成，单糖种类相同，分别为半乳糖、葡萄糖和甘露糖，三种单糖的含量不同，PtPs1 中半乳糖和甘露糖的含量基本相同，摩尔比接近 1:1，而 PtPs2 中半乳糖和甘露糖的含量相差 13mg/g，摩尔比则为 1:1.2。

## 2.5 多糖红外扫描结果分析

由红外扫描图谱(图 10)可以看出：细脚拟青霉菌丝体多糖 PtPs1 在红外 400-4000 $\text{cm}^{-1}$  处扫描，3600-3200 $\text{cm}^{-1}$ 、3000-2800 $\text{cm}^{-1}$ 、1400-1200 $\text{cm}^{-1}$  三组吸收峰是糖类化合物的特征吸收峰，3407.06 $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰是糖类 O-H 的伸缩振动；2929.23 $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰是糖类 C-H 伸缩振动；1200-1400 $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C-H 的变角振动；1200-1000 $\text{cm}^{-1}$  中较大的吸收峰是由两种 C-O 伸缩振动所引起的，其中一种是属于 C-O-H 的，另一种是糖环的 C-O-C，其中 930.26 $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰代表吡喃环的特征吸收；852.26 $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰代表吡喃糖  $\alpha$  型差向异构体的 C-H 键。根据红外扫描图谱数据分析，得出多糖 PtPs1 为  $\alpha$  型吡喃糖。

由红外扫描图谱(图 11)可以看出：细脚拟青霉菌丝体多糖 PtPs2 在红外 400-4000 $\text{cm}^{-1}$  处扫描，3600-3200 $\text{cm}^{-1}$ 、3000-2800 $\text{cm}^{-1}$ 、1400-1200 $\text{cm}^{-1}$  三组吸收峰是糖类化合物的特征吸收峰，3418.42 $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰是糖类 O-H 的伸缩振动；2925.42 $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰是糖类 C-H 伸缩振动；1200-1400 $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C-H 的变角振动；1200-1000 $\text{cm}^{-1}$  中较大的吸收峰是由两种 C-O 伸缩振动所引起的，其中一种是属于 C-O-H 的，另一种是糖环的 C-O-C，其中 927.70 $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰代表吡喃环的特征吸收；846.90 $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰代表吡喃糖  $\alpha$  型差向异构体的 C-H 键。根据红外扫描图谱数据分析，得出多糖 PtPs2 为  $\alpha$  型吡喃糖。

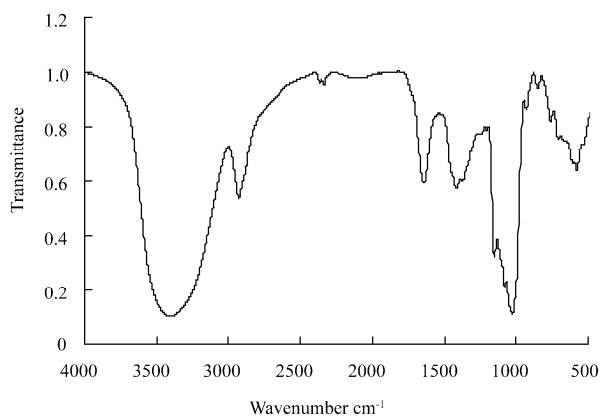


图 10 PtPs1 红外扫描图谱

Fig. 10 Infrared spectrum of PtPs1.

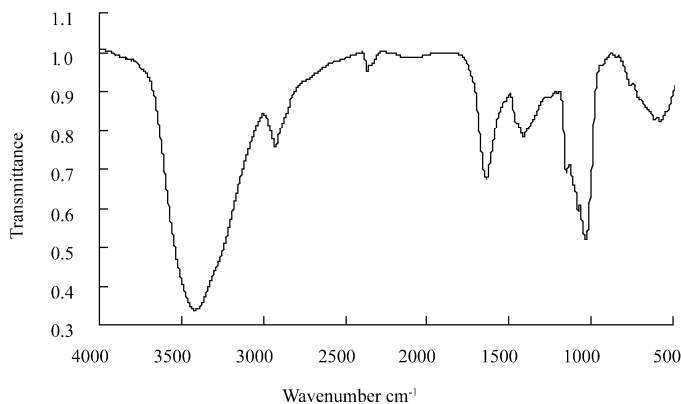


图 11 PtPs2 红外扫描图谱

Fig. 11 Infrared spectrum of PtPs2.

### 3 讨论

**3.1** 选择多糖洗脱条件, 要充分保证其他条件一致, 可以更好的比较, 梯度洗脱虽然可以将样品充分洗脱, 但是会出现小的杂峰, 而且样品还要脱盐, 多一个处理步骤, 普通洗脱方法可以将组分分离得很好, 选择 Tris-HCl 缓冲液普通洗脱为最佳分离条件。

**3.2** 多糖经 DEAE 纤维素柱纯化, 样品上样浓度不宜过高, 浓度高粘度大, 过柱流速慢, 组分不能很好分离, 经过上样浓度的筛选, 确定最佳上样浓度。多糖经葡聚糖凝胶柱纯化, 样品浓度也不能过高, 上样之前用微孔滤膜将样品过滤, 可以除去杂质, 不会损伤凝胶柱 (凝胶比较脆弱, 不能用强酸洗涤, 否则会引起结构变化而损坏), 尽量避免将杂质引入凝胶中, 可以延长凝胶的使用寿命。

**3.3** 多糖用三氟乙酸水解, 保证样品充分水解, 否则影响测定结果。不选择硫酸水解多糖, 因为硫酸浓度大的时候会使多糖样品碳化, 而且硫酸不是挥发性酸, 还要用碳酸钡中和剩余的硫酸, 去除硫酸钡沉淀, 步骤繁琐, 多次操作容易导致误差, 影响测定结果, 因此选择三氟乙酸作水解溶剂。

**3.4** 红外扫描图谱只能粗略描述多糖的构型特征吸收峰, 在一定的波段范围代表一定的结构, 所以吸收峰的准确标出是解析多糖构型的关键。多糖是大分子量复合物, 结构复杂, 尽管有红外扫描图谱等, 但是具体结构还是很难解析, 具体的糖链结构还要借助核磁共振等其他方法分析。

#### [REFERENCES]

Ding BJ, 2004. Isolation, purification, physicochemical properties and immune activity of polysaccharides from *Paecilomyces tenuipes*. Master's Thesis. Wenzhou Medical College, Wenzhou (in Chinese)



- Jin LQ, Lu JX, Li D, Li AL, Wu BM, 2001. Effects on *Paecilomyces tenuipes* on immune state in immunosuppressed rats and mice. *Zhejiang Medical Journal*, **23**(4): 216-217 (in Chinese)
- Liu GJ, Wen HA, 2006. Optimization of extraction and determination of polysaccharide in mycelium of *Paecilomyces tenuipes*. *Mycosystema*, **25**(4): 625-632 (in Chinese)
- Liu GJ, Wen HA, 2007. Review on research advances of polysaccharides from *Paecilomyces tenuipes*. *Mycosystema*, **26**(supplement): 312-316 (in Chinese)
- Luan Y, Wen HA, 2004. Cultivation and polysaccharide extraction of *Xylaria polymorpha*. *Mycosystema*, **23**(4): 536-547 (in Chinese)
- Nam KS, Jo YS, Kim YH, Hyun JW, Kim HW, 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sciences*, **69**: 229-237
- Yoo O, Son JH, Lee DH, 2005. 4-acetoxyscirpenediol of *Paecilomyces tenuipes* inhibits Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**(2): 211-217
- Zhang WJ, 1994. Studies on biochemistry technology of complex carbohydrates. Zhejiang University Press, Zhejiang. 279 (in Chinese)

#### [附中文参考文献]

- 丁保金, 2004. 细脚拟青霉多糖的分离纯化物理化学性质及免疫活性研究. 温州: 温州医学院硕士学位论文
- 金丽琴, 吕建新, 李东, 李安乐, 吴步猛, 2001. 细脚拟青霉减轻环磷酰胺所致免疫抑制效应的实验研究. *浙江医学*, **23**(4): 216-217
- 刘桂君, 文华安, 2006. 细脚拟青霉菌丝体多糖提取工艺优化及其测定方法优选. *菌物学报*, **25**(4): 625-632
- 刘桂君, 文华安, 2007. 细脚拟青霉多糖研究进展. *菌物学报*, **26**(增刊): 312-316
- 栾洋, 文华安, 2004. 多型炭角菌的培养及多糖提取. *菌物学报*, **23**(4): 536-547
- 张惟杰, 1994. 糖复合物生化技术研究. 浙江: 浙江大学出版社. 279