

# 人工培养冬虫夏草胞外多糖的分离纯化研究

闫景坤<sup>1,2</sup>, 李琳<sup>1</sup>, 吴建勇<sup>2,3</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2. 香港理工大学深圳研究院分子药理重点实验室, 广东深圳 518064)

(3. 香港理工大学应用生物与化学科技学系, 香港)

**摘要:** 本文以乙醇沉淀法提取得到的人工培养冬虫夏草(Cs-HK1)粗胞外多糖为研究对象, 采用DEAE-52纤维素(Cl<sup>-</sup>)离子交换柱层析和Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱层析进行分离、纯化得到一水溶性胞外多糖分EPS-1A。紫外光谱、比旋光度和凝胶渗透色谱法研究表明该多糖为相对均一组分, 中性糖含量为99.0%, 重均相对分子质量为 $4.0 \times 10^4$ 。多糖特征反应表明该多糖为非淀粉类, 不含单糖、糖醛酸、蛋白质、核酸和多酚类物质的中性多糖。

**关键词:** 冬虫夏草(Cs-HK1); 胞外多糖; 柱层析; DEAE-52纤维素; Sephadex G-100

文章编号: 1673-9078(2010)4-366-369

## Isolation and Purification of Exopolysaccharides from Cultured *Cordyceps sinensis* (Cs-HK1)

YAN Jing-kun<sup>1,2</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, WU Jian-yong<sup>2,3</sup>

(1. College of Light Industry and Food sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2. State Key Laboratory of Chinese Medicine and Molecular Pharmacology, Hong Kong Polytechnic University of Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518064, China)

(3. Department of Applied and Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong)

**Abstract:** In this paper, the crude exopolysaccharides was extracted from cultured *Cordyceps sinensis* (Cs-HK1) by ethanol precipitation. The water-soluble exopolysaccharide EPS-1A was obtained by isolation and purification using DEAE-52-Cellulose (Cl<sup>-</sup>) ion-exchange column chromatography and Sephadex G-100 gel column chromatography and identified with UV spectrum, optical rotation and gel permeation chromatography (GPC). Results suggested that EPS-1A was a relatively homogeneous component, containing 99.0% neutral sugar and its weight average molecular weight was of  $4.0 \times 10^4$ . Characteristic reactions of polysaccharides identified that EPS-1A was a non-starch neutral exopolysaccharides, which did not contain monosaccharides, uronic acids, protein, nucleic acids and polyphenols.

**Key words:** *Cordyceps sinensis* (Cs-HK1); exopolysaccharides; column chromatography; DEAE-52-Cellulose; Sephadex G-100

水提醇沉法是真菌中多糖提取分离的一般方法,用此法可除去真菌中的小分子杂质、蛋白质和色素等物质,从而得到多糖混合物。当然,要获取均一多糖还需对多糖混合物进行分级、纯化。现阶段多糖的分离、纯化大多采用纤维素离子交换柱层析和各种不同类型的凝胶柱层析等方法<sup>[1]</sup>,也可利用多糖在乙醇、异丙醇等溶剂中溶解度的不同对多糖进行分级和分离<sup>[2]</sup>。

多糖作为冬虫夏草中一种重要的活性化合物,具

收稿日期: 2009-12-03

作者简介: 闫景坤(1980-

),男,在读博士,主要从事活性真菌多糖的分离纯化、修饰和分子结构方面的研究

通讯作者: 李琳教授

有良好的药理作用<sup>[3]</sup>。一般来说,从子实体或菌丝体中得到的多糖称为胞内多糖,从发酵液中提取得到的多糖称为胞外多糖。受自然环境所限制,目前冬虫夏草多糖主要通过人工发酵培养获取。香港理工大学吴建勇等<sup>[4]</sup>从我国青藏高原野生虫草中分离纯化得到一株虫草菌Cs-

HK1,现已成功放大到2~10吨级工业化发酵罐,得到了大量菌丝体和发酵液,并对其多糖进行了化学特性、酸降解和体外抗氧化活性等的基础研究<sup>[5-</sup>

6],本实验以此菌的发酵液为原料,对冬虫夏草胞外多糖的分离、纯化以及纯度鉴定进行研究,为进一步探究胞外多糖的分子结构、构象表征以及构效关系的建立提供基础和保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 冬虫夏草粗胞外多糖

将培养得到的冬虫夏草(Cs-HK1)发酵液离心去除杂质和菌丝体后,浓缩,用4倍体积95%乙醇沉淀多糖,离心、冷冻干燥即得粗胞外多糖,保存于干燥器中,备用。

### 1.2 试剂

DEAE-52纤维素(Cl)为Whatman产品, Sephadex G-100为Pharmacia产品, T-

系列葡聚糖为Sigma产品。其他试剂均为国产分析纯,由香港理工大学深圳研究院提供。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 分离纯化技术路线

人工培养冬虫夏草胞外多糖的分离、纯化技术路线如图1所示。

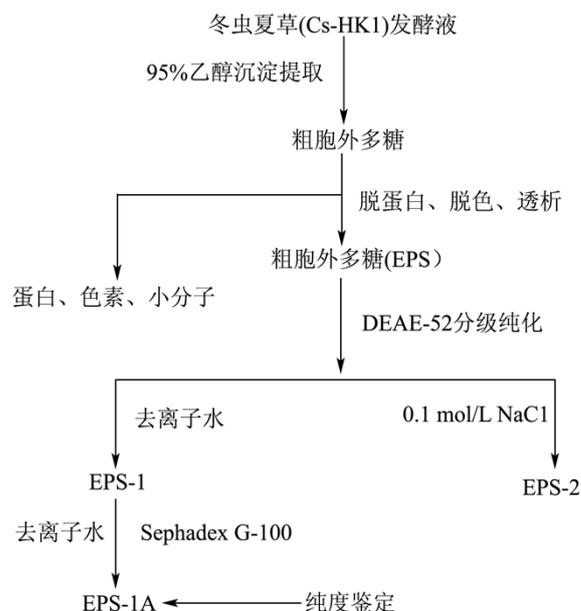


图1 冬虫夏草胞外多糖的分离纯化路线

Fig.1 Isolation and purification of EPS from cultured *Cordyceps sinensis* (Cs-HK1)

### 1.3.2 理化性质

多糖含量测定采用苯酚-硫酸法<sup>[7]</sup>,以葡萄糖为标准;糖醛酸含量测定采用硫酸-咔唑法<sup>[8]</sup>,以葡萄糖醛酸为标准;蛋白含量测定采用考马斯亮蓝染色法<sup>[9]</sup>;淀粉含量测定采用碘反应<sup>[10]</sup>;多酚类物质含量采用三氯化铁法<sup>[11]</sup>;还原糖含量采用菲林试剂法<sup>[12]</sup>;多糖的紫外光谱使用PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS 紫外分光光度计于190-400 nm下进行;比

旋光度使用PerkinElmer 341型自动数显旋光仪于20 °C, 589 nm钠光下测定。

### 1.3.3 脱蛋白和脱色

冬虫夏草胞外多糖脱蛋白和脱色处理参照文献<sup>[6]</sup>的方法进行。

### 1.3.4 DEAE-52-纤维素初级纯化

取处理的胞外多糖20 mg 溶于2.0 mL去离子水中，离心(10,000 r/min, 5 min)。将样品缓缓加入DEAE-52纤维素( $\text{Cl}^-$ )离子交换柱(2.6 cm×60 cm)上，依次用去离子水、0.1 mol/L、0.2 mol/L和0.3 mol/L NaCl溶液进行梯度洗脱，平均流速为1.0 mL/min，每10 min收集1管。苯酚-硫酸法跟踪检测各管多糖含量，收集洗脱组分，浓缩，透析，冷冻干燥。

### 1.3.5 Sephadex G-100分离纯化

取胞外多糖分EPS-1 10 mg，溶于1.0 mL去离子水中，离心(10000 r/min, 5 min)，上平衡好的Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱(2.6 cm×40 cm)，去离子水洗脱，平均流速1.0 mL/min，每10 min 收集1管。苯酚-硫酸法跟踪监测各管多糖含量，收集洗脱组分，浓缩，透析，冷冻干燥。

### 1.3.6 相对分子质量测定

胞外多糖分EPS-1A的相对分子质量测定采用凝胶渗透色谱法(GPC)。实验方法和色谱条件参照文献<sup>[6]</sup>的方法，以T-系列葡聚糖[Mw=(5.2-1482)×10<sup>3</sup>]为标准。

### 1.3.7 纯度鉴定

依次采用紫外光谱、比旋光度<sup>[13]</sup>和凝胶渗透色谱法进行胞外多糖分EPS-1A的纯度鉴定，实验方法如上所述。

## 2 结果与讨论

### 2.1 离子交换柱层析初级纯化

根据DEAE-52纤维素( $\text{Cl}^-$ )离子交换柱的物理吸附和离子交换作用，对已处理(脱蛋白、脱色、透析)的冬虫夏草胞外多糖进行初步的分级、纯化，洗脱曲线如图2所示。

如图2，经0~0.3 mol/L的NaCl溶液分步梯度洗脱后，得到2个组分EPS-1和EPS-2，其中EPS-1为去离子水洗脱得到的主要组分，该多糖在阴离子交换纤维素柱上不吸附，化学分析不含硫酸基和糖醛酸，初步判断为水溶性中性多糖。而EPS-2为0.1 mol/L

NaCl洗脱所得到的组分，得率低，且水溶性较EPS-1差，不作为进一步研究对象。

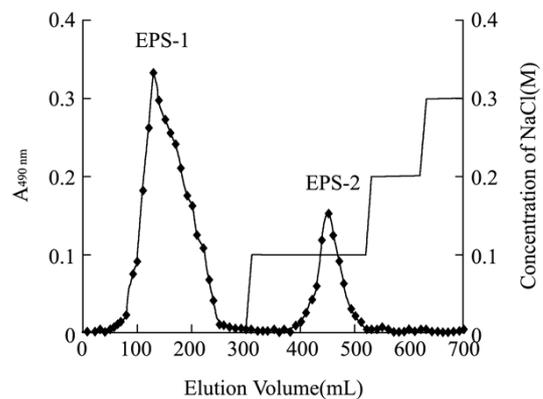


图2胞外多糖的洗脱曲线(DEAE-52纤维素)

Fig.2 The elution profile of exopolysaccharides on a DEAE-52-cellulose column

### 2.2 Sephadex G-100凝胶柱层析纯化

组分EPS-1经Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱层析进一步分级纯化，洗脱曲线如图3所示。从图可以看出：由去离子水洗脱仅得到一个组分，峰形比较对称，且得率为60.7%。合并主峰部分，减压浓缩，透析，冻干，得胞外多糖分EPS-1A，经苯酚-硫酸法检测中性糖含量为99.0%。

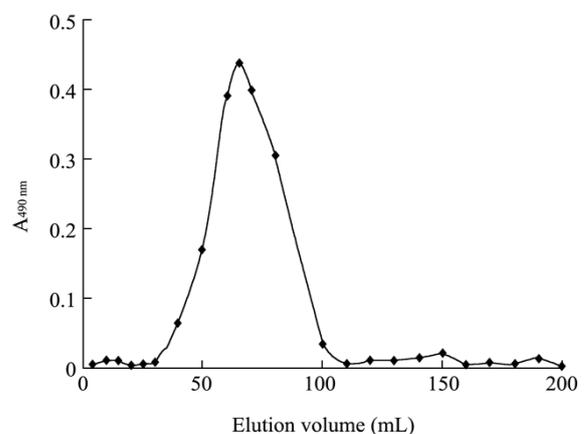


图3葡聚糖凝胶柱层析分离纯化胞外多糖

Fig.3 Purification of exopolysaccharide on Sephadex G-100 column

### 2.3 纯度鉴定

我们通常所说的多糖纯品实质上是一定相对分子质量范围的均一组分。鉴定多糖纯度的方法通常有功能团分析、比旋光度、水解后糖组分分析、纸色谱、高效液相色谱和高压电泳分析法等。随着现代生化技术的不断

发展，多糖样品的纯度一般采用两种或两种以上的方法来验证。

### 2.3.1 紫外光谱法

胞外多糖分EPS-1A的紫外光谱如图4所示。图4可以看出：EPS-1A仅在195 nm左右有一吸收峰，这是多糖的特征紫外吸收峰。在260 nm和280 nm处无明显吸收，表明该多糖中很可能不含有核酸、蛋白质和多肽类物质。

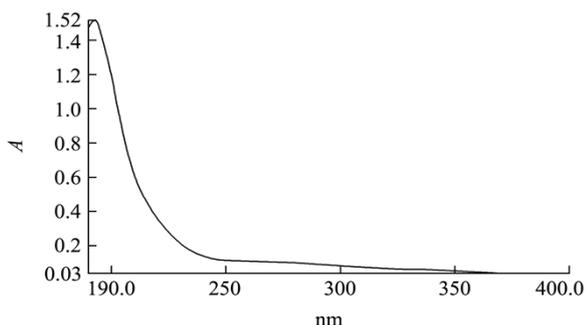


图4 胞外多糖分EPS-1A的紫外光谱

Fig.4 the UV spectrum of EPS-1A

### 2.3.2 比旋光度法

根据某一特定体积乙醇只析出一定范围相对分子质量的均一多糖，若以比旋度作为均一多糖的特征指数，其值也一定是唯一的。从表1中我们可以发现：胞外多糖分EPS-1A在三种乙醇浓度下的比旋光度基本相同，表明该多糖为相对均一组分，且比旋光度为+6.5°。

表1不同体积乙醇沉淀EPS-1A的比旋光度

Table 1 Optical rotations of EPS-1A precipitated with various volume of ethanol

	乙醇体积分数(%)			[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup> 平均值
	25	50	80	
ESP-1A	+6.3	+6.6	+6.6	+6.5

### 2.3.3 凝胶渗透色谱法

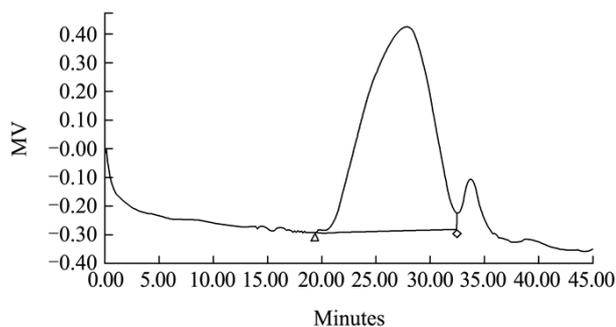


图5 胞外多糖分EPS-1A的凝胶渗透色谱图

Fig.5 GPC chromatography of EPS-1A

图5为胞外多糖分EPS-1A的凝胶渗透色谱图(GPC)，可以看出：EPS-1A为相对单一对称峰，揭示该多糖为相对均一组分。根据保留时间，从标准曲线上求得EPS-1A的数均相对分子质量为 $1.2 \times 10^4$ ，重均相对分子质量为 $4.0 \times 10^4$ ，重均相对分子质量与数均相对分子质量的比值为3.3，表明该多糖相对分子质量分布较宽。

综上所述，经紫外光谱、比旋光度和凝胶渗透色谱等方法分析表明胞外多糖分EPS-1A为相对均一多糖。

### 2.4 理化特性

实验表明：胞外多糖分EPS-1A为白色絮状固体，无异味，可溶于水，不溶于乙醇、乙醚和丙酮等有机溶剂，热稳定性良好；碘反应不显蓝色，说明此多糖为非淀粉类；与斐林试剂和三氯化铁反应均为阴性，说明不含有单糖和多酚类物质；考马斯亮蓝反应和260 nm吸收反应均为阴性，表明很可能不含有糖醛酸、蛋白质和核酸类物质。

## 3 结论

采用DEAE-52纤维素(Cl<sup>-</sup>)离子交换和Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱层析对乙醇沉淀得到的冬虫夏草胞外多糖进行分离、纯化，得到EPS-1A级分。经紫外光谱、比旋光度和凝胶渗透色谱分析表明胞外多糖分EPS-1A为相对均一组分，中性糖含量为99.0%，重均相对分子质量为 $4.0 \times 10^4$ ，为非淀粉类，不含单糖、蛋白质、核酸和多酚类物质的水溶性多糖。

### 参考文献

- [1] 范卫强,尹鸿萍,周长林.虫草多糖的分离、纯化和初步药效活性研究[J].生物加工过程, 2008, 6(1):69-73
- [2] 张俐娜,陈和生.黑木耳酸性杂多糖溶液性质研究[J].高等学校化学学报,1993, 14(9):1320-1325
- [3] 程维荣,段丽红,郑必胜.冬虫夏草及其多糖的研究与应用进展[J].现代食品科技,2006,22(4):284-286

- [4] Leung P H, Zhang Q X, Wu J Y. Mycelium cultivation, chemical composition and antitumor activity of a Tolypocladium sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*[J].Journal of Applied Microbiology, 2006, 101: 275- 283
- [5] Leung P H, Zhao S N, Wu J Y, et al. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 [J]. Food Chemistry, 2009, 114: 1251-1256
- [6] Yan J K, Li L, Wu J Y, et al. Acidic degradation and enhanced antioxidant activities of exopolysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelial culture[J].Food Chemistry, 2009, 117: 641- 646
- [7] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28:350-356
- [8] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J].Analytical Biochemistry, 1962, 4:330-334
- [9] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [10] 周科衍.有机化学实验[M].北京: 高等教育出版社,1978: 272
- [11] 李建武.生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社,1994:151-278
- [12] Schneider F. Sugar analysis: Official and tentative methods recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis [C]. Peterborough: ICUMSA, 1979:41-73
- [13] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].浙江:浙江大学出版社,1994



(上接第365页)

## 参考文献

- [1] 寇文国,高洪庆.核桃产品的开发利用[J].中国油脂,2005,25(6):112-113
- [2] 徐晓飞,蒋丽,唐健,等.植物多糖的保健功能及开发前景[J].中国食物与营养,2007,(1):61-63
- [3] 张惟杰.糖复合物生化研究技术(第二版)[M].浙江:浙江大学出版社,1999:196,245
- [4] 刘安军,钟玥如,朱振元,等.古尼虫草多糖体躯分离及初步分析[J].现代食品科技,2008,24(1):28-31
- [5] 莫开菊,秦恩华,王俊亮.杨梅叶提取物抑菌作用研究[J].湖北民族学院学报,2008,26(9):272
- [6] 苏伟,赵利,刘建涛等.黄精多糖抑菌及抗氧化性能研究[J].食品科学,2007,28(8):55-57
- [7] 钟耀广,林楠,王淑琴,等.香菇多糖的抗氧化性能与抑菌作用研究[J].食品科技,2007,(7):141-144
- [8] 张伟,崔同,檀建新等.蜂胶对食品致病菌抑菌作用研究[J].食品科学,1998,19(3):40-42

