

# 桑金钱菌的液体培养及多糖提纯鉴定

殷培峰<sup>1</sup>, 浦冠勤<sup>2</sup>

(1. 滁州学院 化学与生命科学系, 安徽 滁州 239012 2. 苏州大学 城市科学学院, 江苏 苏州 215006)

**摘要:** 收集液体振荡培养的桑金钱菌菌丝体, 在 80℃ 下干燥至恒重, 研成粉末, 多糖微波提取显示, 桑金钱菌中粗多糖含量为 6% 左右; 硫酸-苯酚法分析, 桑金钱菌菌丝体中的多糖在粗多糖中含量为 17% 左右; 即桑金钱菌的多糖含量在 1.02% 左右, 经层析鉴定, 多糖的主要组成成分为葡萄糖。

**关键词:** 桑金钱菌; 液体培养; 多糖; 含量测定

**中图分类号:** S 646.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0186-03

桑树上的寄生性真菌很多, 现从桑树上采集, 分离到一株大型真菌, 经鉴定该真菌为具有一定食用和药用价值的菇类, 属担子菌亚门层菌纲伞菌目口蘑科冬菇属<sup>[1]</sup>, 暂命名为桑金钱菌(*Flammulina sp.*) 对其所含多糖进行了研究, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

全温振荡培养箱(HZQ-F)、真空冷冻干燥器(日本 YAMATO)、台式冷冻离心机(德国 HERMLE Z383K)、

第一作者简介: 殷培峰(1979), 男, 山东临沂人, 硕士, 实验员, 研究方向为药用真菌多糖提取及纯化。E-mail: ypf197912@126.com。

通讯作者: 浦冠勤。

收稿日期: 2008-05-13

紫外分光光度计(日本 HITACHI U-3000)、低温冰箱(NIDF-290)、微波炉(LG)、电热鼓风干燥箱、恒温水浴锅、旋转蒸发器、电热吹风机、层析缸、喷雾器、微量进样器和新华滤纸等。

### 1.2 试剂配制

Sevag 试剂: 取正丁醇 1 份, 氯仿 5 份, 以 1:5 的比例混合均匀, 随配随用。8% 苯酚溶液: 苯酚 8 g, 溶于 100 mL 水, 随配随用<sup>[2]</sup>。葡萄糖标准液: 精密称取在 105℃ 下干燥至恒重的葡萄糖 100 mg, 加水溶解并定容至 100 mL 容量瓶中, 即得葡萄糖贮备液。精密吸取葡萄糖贮备液 1、2、3、4、5、6、7、8 mL, 分别置于 100 mL 容量瓶中定容, 最后浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 mg/mL<sup>[3]</sup>。桑金钱菌多糖水解液: 准确称取 2 mg 桑金钱菌多糖置于具塞试管中, 加 1 mol/L 的硫酸溶液 3 mL, 于 100℃ 水浴锅中水解 6 h, 用无水碳

将多糖醇析出来, 在多糖的醇析过程中, 乙醇浓度、乙醇用量等因素是影响多糖得率的关键因素。通过正交试验, 影响多糖得率的因素主次顺序为提取液浓缩倍数、乙醇浓度和乙醇用量。通过极差分析, 最佳醇析条件是 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>, 即将多糖提取液浓缩 5 倍后添加浓缩液重 4.5 倍浓度为 95% 的乙醇进行醇析时, 多糖的得率最高(表 6)。

### 2.4 茶树菇多糖对氧自由基的抑制率和对羟自由基的清除能力分析

按试验方法对茶树菇多糖的氧自由基抑制率 and 羟自由基的清除能力进行测定, 测定结果表明: 茶树菇多糖对氧自由基和羟自由基均有较强的抑制和清除能力, 且随着样品浓度的增高而加强, 呈现出较好的剂量-效应关系(表 7)。由于所采用的自由基模型体系所产生的氧自由基和羟自由基浓度远大于体内该自由基的浓度, 可见, 茶树菇多糖是一种良好的自由基清除剂, 具有提

高人体免疫力、增强人体防病治病能力等预防保健功能, 常食茶树菇可起到抗衰老、美容等作用。

表 7 茶树菇多糖对氧自由基的抑制率和对羟自由基的清除能力试验结果

样品浓度/ mg · mL <sup>-1</sup>	氧自由基抑制率/ %	羟自由基清除率/ %
1.2	49.3	43.6
0.8	25.4	22.8
0.4	13.6	11.9

## 参考文献

- [1] 齐香君. 现代生物制药工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 221-222.
- [2] 田光辉, 周选国, 林娟等. 松茸多糖提取方法的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 33-35.
- [3] 李知敏, 王伯初, 周菁. 植物多糖提取液的几种脱蛋白方法的比较分析[J]. 重庆大学学报, 2004(27)8: 57-59.

酸钙 0.3 g 中和, 离心取上清, 得桑金钱菌多糖水解液<sup>[4]</sup>。标准糖溶液: 分别准确称取乳糖、D-半乳糖、D-无水葡萄糖、L-鼠李糖、阿拉伯糖、L-甘露糖 5 mg, 分别溶于 0.5 mL 蒸馏水中<sup>[5]</sup>。展开剂: 异丙醇 : 水 = 4 : 1 (V/V)。显色剂: 0.5 g 二苯胺 苯胺 1 mL, 85%磷酸 5 mL, 丙酮加到 50 mL, 随配随用。层析多糖溶液: 将 0.2 g 粗多糖溶于 20 mL 的双蒸水<sup>[6]</sup>。

1.3 试验方法

1.3.1 菌丝获取 将桑金钱菌接种于马铃薯培养液(PDA 培养基中不加琼脂, 每 1 000 mL 培养液中另加 3 g 牛肉膏和 3 g 蛋白胨)中, 在 22℃下、130 r/min 振荡培养 16 d<sup>[7]</sup>。将振荡培养的菌丝体和培养液分离, 菌丝在 80℃电热鼓风干燥箱中干燥 10 h 后研细, 用于试验多糖的提取和多糖组成成分的测定。

1.3.2 菌丝体粗多糖提取 准确称取 1.3.1 法所得的桑金钱菌菌丝体干粉 1 g, 加入 200 mL 纯净水, 采用微波法提取。在微波高温条件下抽提 15~20 min, 将浸提液经 4 层纱布过滤, 重复 2 次, 合并提取液, 去掉残渣, 取滤液; 滤液于旋转蒸发器浓缩, 冷却后移入大试管, 在 5 000 r/min 下离心, 去沉淀, 在液体中边搅拌边加入无水乙醇使乙醇浓度达到 80%, 静置过夜, 8 000 r/min 离

心 8 min 得沉淀物; 沉淀物用少量水溶解, 加入等体积的 Sevag 试剂, 离心, 然后将上清液吸出, 加入无水乙醇, 使乙醇浓度达到 80%, 离心, 将沉淀用乙醚、丙酮洗涤 3 次, 真空干燥得粗多糖<sup>[8]</sup>。

1.3.3 菌丝体多糖测定 定性试验: 苯酚-硫酸呈色反应。测定条件的选择: 称取粗多糖 8 mg, 加水溶解并定容至 100 mL 容量瓶中, 成多糖稀释液。精密吸取多糖稀释液 1.0 mL 于具塞试管中, 加 8%苯酚 1.0 mL 混匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 于 40~50℃水浴 30 min, 对照液取 1.0 mL 蒸馏水于具塞试管中, 处理方法同前。从 430 nm 开始, 每隔 10 nm 测定 1 次至 530 nm, 进行最大吸光度测定。标准曲线的制备: 分别吸取各个浓度的葡萄糖标准液 1 mL 于试管中, 加入 8%苯酚溶液 1 mL, 混匀后迅速加入浓硫酸 5 mL, 混匀后 40~50℃水浴 30 min; 另以蒸馏水为对照, 处理方法相同。处理后的样品在波长 490 nm 处测定, 得标准回归方程。多糖含量的测定: 取粗多糖 8 mg, 加水 100 mL 配成粗多糖溶液, 按标准曲线的制备方法加入苯酚溶液和浓硫酸后依相同方法操作, 进行多糖含量测定, 测得吸光度, 计算多糖含量。多糖成分的鉴定: 纸层析法。

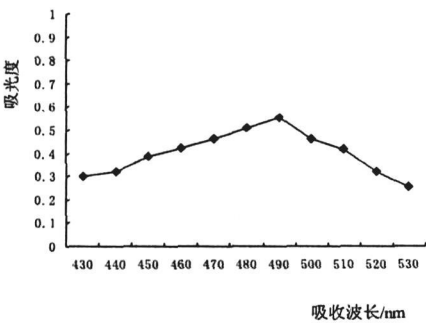


图 1 桑金钱菌多糖的吸光度测定

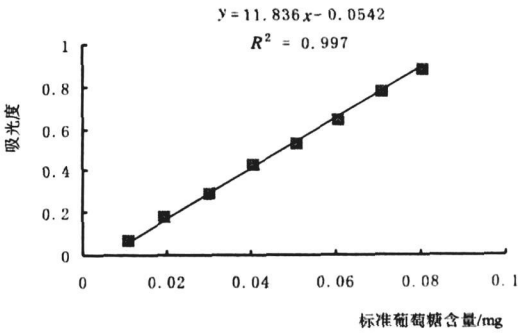


图 2 葡萄糖的标准曲线

2 结果与分析

2.1 浸提液体积和总糖含量随时间变化

在不同加热时间情况下, 浸提液体积和总糖含量随时间变化而有不同, 从表 1 可以看出, 经微波浸提的桑金钱菌多糖随着时间的推移, 出现先增多后减少的趋向, 结果表明在一定量的物料和相同溶剂体积条件下, 呈现一个最佳的浸提时间, 从而使粗多糖总量最高。在试验条件下, 20 min 下的粗多糖提取效果最好。

表 1 浸提液体积和总糖含量随时间变化

时间/min	5	10	15	20	25
浸提液体积/mL	190	180	165	140	120
1 g 菌丝体粗多糖/g	0.0094	0.0265	0.0483	0.0536	0.0412

2.2 定性试验

吸取微波提取法提取的多糖提取物稀释液 1 mL 加入 8%苯酚溶液 1 mL, 再加入浓硫酸 5 mL, 充分摇匀, 40~50℃水浴 30 min 后, 溶液变成橙色, 证明提取物中含有多糖类。

2.3 测定波长的选择

根据试验设计, 从 430 nm 开始, 每隔 10 nm 测定 1 次至 530 nm, 进行最大吸光度测定。结果表明 桑金钱菌多糖的最大吸光波长约为 490 nm(见图 1)。

2.4 标准曲线的制备

处理后的样品在波长 490 nm 处测定, 得标准回归方程:  $y = 11.836x - 0.0542$ ,  $R = 0.998$  ( $R^2 = 0.997$ ), 见图 2。

2.5 多糖含量的测定

利用回归方程和吸光度,称取粗多糖 30 mg,加水溶解并定容至 100 mL 容量瓶中,成多糖稀释液。精密吸取多糖稀释液 1.0 mL 于具塞试管中,加 8%苯酚 1.0 mL 混匀,迅速加入浓硫酸 5.0 mL,摇匀,于 40~50℃水浴 30 min,对照液取 1.0 mL 蒸馏水于具塞试管中,处理方法同前,490 nm 处进行吸光度测定。测得吸光度为 0.5494,经回归方程计算得多糖含量为 0.051 mg。30 mg 粗多糖中含有的多糖量为 5.1 mg,占粗多糖的

17%。所以多糖占菌丝体的 1.02%。  
2.6 多糖成分测定  
凝胶过滤获得的桑金钱菌多糖采用纸层析法测定单糖的种类,结果表明,桑金钱菌多糖中单糖的 Rf 值为 0.47,呈色反应为蓝绿色,这与 D-无水葡萄糖的 Rf 值及显色反应完全一致,因此初步推定桑金钱菌多糖主要是葡萄糖为单位以不同的糖苷键连接组成的,结果见表 2。

表 2 不同标准糖和待测样品的 Rf 值和颜色

标准样品	乳糖	D-甘露糖	桑金钱菌多糖	D-无水葡萄糖	D-半乳糖	L-鼠李糖	阿拉伯糖
编号	1	2	3	4	5	6	7
Rf 值	0.18	0.55	0.46	0.46	0.41	0.74	0.51
显色	绿色	蓝绿色	蓝绿色	蓝绿色	深黄绿色	黄色	黄色

3 小结与讨论

利用微波抽提法从桑金钱菌菌丝体中提取多糖,桑金钱菌菌丝体通过微波浸提、乙醇沉淀、Sevag 法去蛋白、真空抽滤干燥得粗多糖,其含量为 6%左右;用硫酸苯酚法进行定性、定量分析,测得其菌丝体中的多糖在粗多糖中含量为 17%左右;所以桑金钱菌的多糖含量在 1.02%左右。该多糖通过纸层析可以清楚地看到,其多糖水解液内含有葡萄糖,纸层析待测多糖样品与 D-无水葡萄糖标准糖的 Rf 值相同,并且用显色剂显色后呈明显的蓝绿色。由此推断桑金钱菌多糖主要是以葡萄糖单糖为单位通过不同的糖苷键连接而成的。该多糖的生理活性有待作进一步研究。

参考文献

[1] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:356

385.  
[2] 李志洲,杨海涛,邓百万.红汁乳菇多糖提取最佳工艺研究[J].中国食用菌,2003,22(5):40-43.  
[3] 欧阳天贽,谢九皋.碱性黑木耳多糖的分离、纯化和表征[J].华中农业大学学报,1999,18(2):46-48.  
[4] 张欣,吕作舟.香菇多糖的提取纯化及其理化性质的研究[J].中国食用菌,1999,18(6):34-35.  
[5] 张丽萍,李森,黄丽萍.金顶侧耳酸提水溶性多糖的研究—PC-3 的分离、纯化与结构确定[J].真菌学报,1993,12(2):158-162.  
[6] 张欣,吕作舟.香菇多糖的提取纯化及其理化性质的研究[J].中国食用菌,1999,18(6):34-35.  
[7] 周国英,刘君昂,李倩茹.松乳菇菌种分离及菌丝生长特性的研究[J].浙江林学院学报,2003(2):158-161.  
[8] 张虎,李凯.微波辅助浸提香菇多糖[J].大连民族学院学报,2000(7):21-24.

Vibrant Liquid Culture and Polysaccharide Extraction and Content Measuring of *Flammulina* sp.

YIN Pei-feng<sup>1</sup>, PU Guan-qin<sup>2</sup>

(1. Chemistry and Life Scientific Department, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239012, China; 2. School of Urban Science, Soochow University, Soochow, Jiangsu 215006, China)

**Abstract:** *Flammulina* sp. mycelium was got through the vibrant liquid culture medium, then dry to invariable weight, crumbled to powder. The amount of amylose through microwave method was 6%. The quality and quantity of the pure amylose was mensurated by the vitriol-phenol method and the content took up 17% of coarse amylose, so the content of pure amylose in *Flammulina* sp. was 1.02%. The main component of the amylose was glucose through paper chromatograph.  
**Key words:** *Flammulina* sp.; Liquid culture; Amylase; Content measure