

樟芝多糖的超滤分离及其免疫活性研究

齐善厚

(衡水学院, 河北衡水 053000)

摘要: 利用醇沉法和超滤法分离提取经发酵后的樟芝胞内胞外多糖, 通过小鼠脾淋巴细胞转化增殖实验检测分离得到的各组分多糖的免疫活性。结果显示, 经超滤分级处理后, 樟芝胞内胞外多糖的总得率达18.18%, 相对于乙醇沉淀法多糖得率提高了56.99%, 显著的提高了樟芝胞内胞外多糖的得率; 小鼠实验显示, 利用超滤法获得的分子量大于1000 kD、100~1000 kD以及小于100 kD的六个樟芝多糖胞内胞外组分均能显著的促进小鼠脾淋巴细胞的转化增殖作用, 表明, 超滤法能显著提高发酵后樟芝胞内胞外多糖提取产量, 其操作简单、易行, 不损害多糖活性。

关键词: 樟芝; 多糖; 超滤; 免疫活性

文章编号: 1673-9078(2012)12-1672-1674

Study on Ultrafiltration Separation and Immunocompetence of Polysaccharides from *Antrodia*

QI Shan-hou

(Hengshui College, Hengshui 053000, China)

Abstract: *Antrodia* polysaccharide was separated by ethanol precipitation and ultrafiltration (UF) and the effects of *Antrodia* polysaccharide were investigated on immune function of mice. The result showed that the rate of *Antrodia* polysaccharide was 18.18%, increased by 56.99% compared to that by ethanol extracting. The yields of *Antrodia* polysaccharides with molecular weights of >1000 kD (GFP100), 100~1000 kD (GFP10) and 10~100 kD (GFP1) were 3.85%, 1.81% and 4.69%, respectively. All the polysaccharide components separated by UF can significantly increase the proliferation rate of mouse spleen lymphocytes. Conclusion: The method of ultrafiltration separation of *Antrodia* polysaccharide was simple and feasible.

Key words: *Antrodia*; polysaccharide; ultrafiltration (UF); immunocompetence

樟芝 (*Antrodia*) 又名牛樟芝, 是台湾特有的珍贵药用真菌, 据报道, 樟芝含有多种生物活性物质, 如樟芝多糖、三萜类、SOD、腺苷、蛋白质 (含免疫球蛋白), 维生素 (如B族、烟酸、麦角甾醇), 微量元素 (Ca、P、K)、核酸、凝血素、氨基酸、固醇类、木质素和血压稳定物质等。具有保肝、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、解毒、抗炎等功效^[1-4], 而随近年来的研究发现, 樟芝多糖的生理活性与多糖分子量、结构、提取工艺等密切相关, 分离提取工艺会直接影响到樟芝多糖药用价值的开发和利用, 目前樟芝多糖的提取工艺多采用热水提取、醇析的工艺, 该工序繁杂, 不易获得多糖粗品, 且得糖率低, 难以工业化应用。超滤是一种新型膜分离技术, 利用不同的孔径截留不同分子量物质, 不仅具有常温操作、无相态变化, 可以

防止杂菌污染和热敏性物质失活等特点, 而且比上述方法更适于工业化生产。

本研究将醇沉法与超滤法相结合, 利用不同截留分子量的中空纤维超滤膜联用对发酵后樟芝多糖的进行分离提取并考察其促进小鼠淋巴细胞转化增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株

樟芝真菌, 本实验室保藏。

1.2 仪器

10 L 发酵罐, 中国丽 上海高机生物有限公司; 干燥箱, 郑州万博仪器有限公司 101。

1.3 培养基

发酵培养基: 葡萄糖 6%, 蛋白胨 0.4%, pH 值 8.0, 酵母膏 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, VB_1 0.005%。

1.4 方法

收稿日期: 2012-07-20

基金项目: 衡水学院资助课题 (2008031)

作者简介: 齐善厚 (1976-), 男, 主治医师, 研究方向: 保健医疗, 食品营养与卫生

1.4.1 樟芝真菌培养方法

1.4.1.1 樟芝真菌种子液的培养

由已培养好的斜面培养基上用接种铲切 1 cm² 带培养基的菌体, 装入 500 mL 三角瓶进行培养, (培养条件: 装液量 150 mL; 温度 25 °C; 转速 150 r/min; 培养时间 72 h。)

1.4.1.2 10 L 发酵罐连续培养

培养条件: 接种量 10%; 装液量 7 L; 培养温度 25 °C; 通气量 150 L/h; 转速 200 r/min; 培养时间 144 h。

1.4.2 樟芝粗多糖的提取与制备

1.4.2.1 樟芝真菌发酵胞外多糖的提取与制备

樟芝真菌经 10 L 发酵罐发酵后, 过滤除菌体后, 取滤液在 4 °C 下进行醇析、离心, 所得沉淀用无水乙醇重复洗涤两次后用蒸馏水溶解, 最后将样品提取液稀释到适当体积, 待测。

1.4.2.2 樟芝真菌胞内多糖的提取与制备

樟芝真菌经 10 L 发酵罐发酵后, 过滤取菌体, 冷冻干燥后, 准确称取菌丝体干粉放入烧杯中, 按照试验设计要求加一定量的蒸馏水, 放入恒温水浴锅中进行提取, 提取结束后, 用旋转蒸发仪将滤液浓缩, 取滤液在 4 °C 下进行醇析、离心, 所得沉淀用无水乙醇重复洗涤两次后用蒸馏水溶解, 最后将样品提取液稀释到适当体积, 待测。

1.4.3 超滤法处理樟芝多糖工艺流程

经处理后的樟芝胞内胞外多糖粗品, 经处理后, 采用 1000、100、10 kDa 的中空纤维超滤膜三组件连用截留分子量, 樟芝多糖粗提液, 在室温下、0.3 MPa 条件下进行超滤处理, 得到不同分子量的多糖体, 不同分子量的多糖体经浓缩、冷冻干燥后得到不同分子量的樟芝多糖的干制品。

1.4.4 樟芝多糖供试样品的制备

樟芝多糖样品经过透析后, 真空冷冻干燥, 精确称取樟芝多糖样品放于灭过菌的微型离心管中, 用磷酸生理盐水缓冲液配成 10 mg/mL, 溶解后以 10000 r/min 离心处理 40 min, 无菌下转移到无菌的微型离心管中, 样品稀释后成 1、2、5 mg/mL 三个浓度梯度。

1.4.5 分析测定方法

总糖含量测定: 苯酚-硫酸法; 还原糖含量测定: DNS 法; 蛋白质含量测定: BCA 蛋白质试剂盒定量测定法; 多糖含量采用总糖含量减去还原糖含量来定量。

1.4.6 小鼠淋巴细胞的制备方法^[5]

选取 27~28 g 体重, 8~10 周的小鼠, 颈椎脱臼处死后取小鼠脾脏, 用磷酸生理盐水缓冲溶液进行冲洗

干净, 组织捣碎机捣碎后, 捣碎液过 100 目筛处理, 混悬液经过筛后, 以 500 r/min 的速度进行离心处理, 离心时间 10 min, 用无菌吸管吸去上清液, 下层液添加浓度为 2 mol/L NH₄Cl 溶液 2 mL, 冲打数次, 静置 15 min 后, 添加 50 mL 磷酸生理盐水缓冲溶液, 经 500 r/min 离心处理 5 min 后, 用无菌吸管吸去上清液, 再添加磷酸生理盐水缓冲溶液反复处理 2 次, 吸净上清液, 添加已经配置好的培养基混匀后, 用细胞计数器计数并将其用磷酸生理盐水缓冲溶液稀释至 2×10⁶ cfu/mL 的细胞液备用。

1.4.7 小鼠淋巴细胞增殖率的测定方法^[5]

取经 1.3 处理的小鼠淋巴细胞悬浮液添加入 96 个孔板中, 每个孔板的添加量为 180 mL, 分别加入待测样品 20 μL, 同时以 20 mL 的磷酸生理盐水缓冲液为阴性对照品, 以 60 mg/mL 的 PHA 溶液作为阳对照, 在 37 °C 的温度条件下, 添加 5% 的 CO₂, 培养 3 d, 然后添加 Alamar Blue 试剂, 再进行培养, 添加 Alamar Blue 试剂前后分别用 ELISA 自动读板仪在 570、600 nm 下测定吸光度值, 根据 Alamar Blue 试剂计算公式计算各种样品的细胞增殖率, 计算公式如下:

$$W = \frac{A_1 \times 117216 - A_2 \times 80586}{A_3 \times 117216 - A_4 \times 80586} \times 100\%$$

注: W-小鼠淋巴细胞增殖率(%); A₁-样品在 570 nm 下的吸光度值; A₂-样品在 600 nm 下的吸光度值; A₃-对照品在 570 nm 下的吸光度值; A₄-对照品在 600 nm 下的吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 超滤分离樟芝多糖成分对比

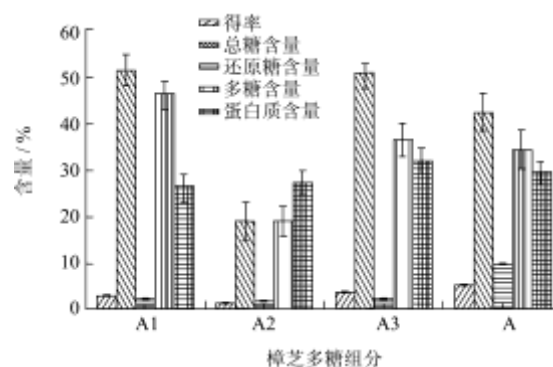


图 1 樟芝胞外多糖的超滤膜分离结果

Fig 2 Separation results of exopolysaccharides by using ultrafiltration (UF)

利用不同分子量的中空纤维超滤膜三组件联用对利用乙醇沉淀法得到的樟芝胞内胞外多糖进行分级, 共获得了六部分多糖: 胞外多糖 A₁、A₂、A₃ 和胞内多糖 B₁、B₂、B₃, 其中 A₁、B₁>1000 kDa; 1000 kDa>A₂、B₂>100 kDa; A₃、B₃<100 kDa, 测定各类多糖组分中

的还原糖、总糖、蛋白等含量结果如图 1、2 所示。

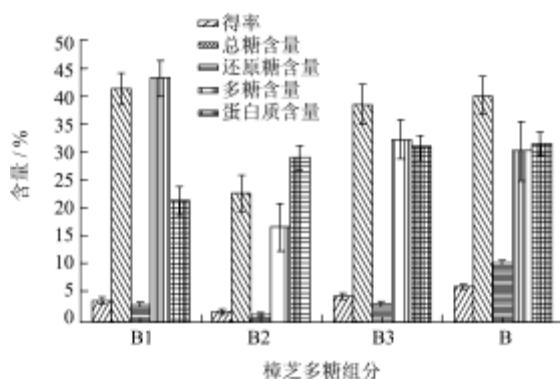


图 2 樟芝胞内多糖的超滤膜分离结果

Fig.3 Separation results of intracellular polysaccharides by using ultrafiltration (UF)

如图 1、2 所示，樟芝多糖经超滤分级处理后，樟芝胞内胞外多糖的总得率为 18.18%，相对于传统的乙醇沉淀法多糖得率提高了 56.99%，显著地提高了樟芝胞内胞外多糖的得率。对比多糖含量可知，经超滤处理后樟芝胞内胞外多糖各组分均有一定程度的提高，其中胞外多糖 A1 含量最高，达到了 46.25%，胞内多糖含量也达到了 43.25%，表明采用超滤分级处理樟芝真菌胞内胞外多糖能够显著提高多糖的分离度，切实可行。

2.2 不同分子量的樟芝胞内胞外多糖质量分布情况考察情况

采用纤维超滤膜三级超滤处理樟芝胞内胞外多糖，樟芝胞内胞外多糖分子量被分为三级，C₁: 分子量大于 1000 kDa; C₂: 分子量大于 100 kDa 而小于 1000 kDa; C₃: 分子量小于 100 kDa，结果如图 3 所示。

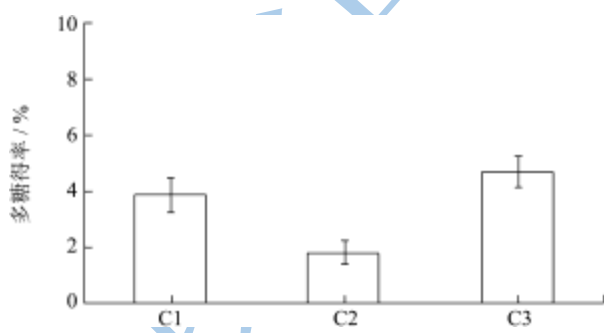


图 3 樟芝多糖的分子量分布

Fig.3 Molecular weight distribution of *Antrodia* polysaccharide

由图 3 可知，经超滤处理发酵后的樟芝真菌胞内胞外多糖，得到的三级樟芝多糖得率之比为 2.13:1:2.59，其中分子量 < 100 kDa 范围内的多糖的得率最高为 4.69%，而分子量在 100~1000 kDa 的多糖得率仅为 1.81%。

2.3 不同分子量的樟芝多糖对促进小鼠脾淋巴细胞转化增殖的影响^[6,7]

近些年来研究表明，多糖的药理活性与多糖的结构、分子量、黏度、溶解度等有着较大的联系^[6]，多糖的结构与多糖的分子量又有直接关系，为考察利用发酵法得到的樟芝胞内胞外多糖的药理活性，以樟芝多糖促进小鼠淋巴细胞的转化增殖作为考察分析的根据，考察了不同分子量范围的樟芝胞内胞外多糖对小鼠的免疫促进功能，结果如图 4 所示。

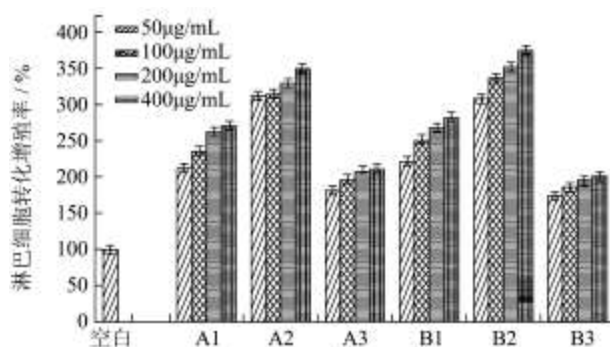


图 4 樟芝多糖促进小鼠淋巴细胞转化增殖的作用

Fig.4 Proliferation on mouse splenocytes effects of *Antrodia* polysaccharides

由图 4 可知，经超滤处理后各分子量范围内的樟芝真菌胞内胞外多糖在 4 个浓度点（50、100、200、400 µg/mL）对小鼠淋巴细胞转化增殖均有显著作用，从多糖分子量上来看，分子量在 100~1000 kDa 之间的樟芝胞内胞外多糖对小鼠淋巴细胞转化增殖作用最强，分子量大于 1000 kDa 的多糖组分作用次之，分子量小于 100 kDa 的增殖作用最次。表明樟芝真菌发酵胞内胞外多糖的活性部位主要位于分子量 100~1000 kDa 的范围之间，同时，樟芝真菌胞内胞外多糖各组分随多糖浓度的增加，增殖作用逐渐增强。增殖效果与多糖浓度成一定的正相关性。

3 讨论

3.1 超滤处理樟芝胞内胞外多糖时，因为超滤膜的微孔不对称性结构，分离过程中大分子的微粒和溶质切向流经膜表面，小分子的物质和溶剂则能够流过超滤膜，超滤膜可以长期使用并能够保持较为恒定的分离效果且能够保持较高的通过率，在多糖的分离提取过程中，具有能耗低、分离效果好、可以连续使用、无污染等优点，适宜于工业化大生产。

3.2 樟芝多糖的重要活性之一为免疫活性，如何高效的提取樟芝多糖并保持其活性是实现樟芝使用价值的重要途径。当前樟芝多糖的分离提取及药用功能研究还只限于实验研究阶段。本实验研究通过超滤法分离提取樟芝多糖，通过小鼠淋巴细胞转化增殖实验来证明樟芝多糖提取后的生理活性，表明了超滤法分离提

取樟芝多糖切实可行, 此研究为发酵法工业生产樟芝多糖提供了理论依据及参考。

参考文献

- [1] 黄大斌,杨菁,黄进华,等.樟芝的生物学特性研究[J].食用菌学报,1991,8(2):24-28
- [2] 王健,龚兴国.多糖抗肿瘤及免疫调节研究进展[J].中国生化药物杂志,2001,22(1):52-54
- [3] 林永贤,于海峰,许鹏等.发菜多糖的提取及性质研究[J].现代食品科技,2007,23(5):34-37
- [4] 奚灏镨,袁根良,杜冰,等.超高压提取香菇多糖的研究[J].现代食品科技,2010,26(9):991-994
- [5] 杨阳,刘承初,贾薇,等.灰树花多糖的超滤分离及免疫活性研究[J].食品科学,2008,29(9):277-280
- [6] 李海花.灰树花多糖的免疫作用实验研究[J].中华中医药学刊,2007,25(2):365-366
- [7] Matsul K, Kcxtama N, Nanba H. Effects of maitake (*Grifolafrondosa*) D-fraction on the carcinoma angiogenesis [J]. Cancer Leters, 2001, 172: 193-198