

Monika OSIŃSKA-JAROSZUK, Anna JAROSZ-WILKOŁAZKA

e-mail: moniosi73@gmail.com

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Chromatograficzne metody oczyszczania polisacharydów grzybowych

Wstęp

Ostatnio dużo uwagi poświęca się badaniom dotyczącym specyficznych polisacharydów i ich kompleksów, zawartych w grzybach wyższych szczególnie *Basidiomycetes*. Związki te charakteryzują się różnorodnymi właściwościami biomedycznymi, między innymi wykazują zdolności przeciwnowotworowe, cytotoksyczne, immunoregulacyjne, antyoksydacyjne, stymulujące wzrost komórek czy też hipolipidemiczne [Malinkowska, 2008; Zhang i inni, 2007]. Do lepiej poznanych polisacharydów o właściwościach przeciwnowotworowych i immunomodulacyjnych należą: schizofylan pozyskiwany ze szczepu *Schizophyllum commune*, lentinian z owocników *Lentinus edodes*, grifolan z owocników *Grifola frondosa* [Wasser, 2002].

Większość dotychczasowych badań nad polisacharydami pochodzenia grzybowego dotyczy substancji pozyskiwanych z grzybni bądź z owocników przy zastosowaniu drastycznych warunków ekstrakcji (wartość *pH*, temperatura), umożliwiających zniszczenie ściany komórkowej i ekstrakcję polisacharydów [Malinkowska, 2008]. Otrzymane polisacharydy poddawane są następnie procesowi oczyszczania głównie przy pomocy technik chromatograficznych takich jak chromatografia jonowymienna, filtracja żelowa czy chromatografia powinowactwa. Dobór techniki chromatograficznej jest uzależniony od rodzaju polisacharydu grzybowego. Do rozdzielania polisacharydów kwaśnych i neutralnych używa się między innymi chromatografii kolumnowej na złożach jonowymiennych, takich jak *DEAE-Cellulose* lub *DEAE-Sephadex* [Malinkowska, 2008]. Guo i wsp. uzyskali neutralne polisacharydy z owocników *Ganoderma lucidum*, które oczyszczali przy użyciu chromatografii na złożach *DEAE-Cellulose* i *DEAE-Sepharose* [Guo i inni, 2009]. Z kolei przy użyciu chromatografii żelowej na złożu *Sepharose CL-6B* uzyskano biopolimer ze szczepu *Hericum erinaceus* [Yaung i inni 2003].

Mniej poznany substancjami bioaktywnymi są grzybowe polisacharydy zewnątrzkomórkowe, które wydają się być interesującym materiałem badań ze względu na możliwość pozyskiwania ich w sposób tani i mniej czasochłonny w porównaniu do otrzymywania polisacharydów wewnątrzkomórkowych. Celem pracy było opracowanie chromatograficznej metody oczyszczania polisacharydów zewnątrzkomórkowych pozyskiwanych ze szczepu *Ganoderma applanatum*.

Materiały i metody

Warunki hodowli grzybowych

W badaniach wykorzystano 14-dniowy homogenat szczepu *Ganoderma applanatum*, którym zaszczepiano 100 ml wyselekcjonowanej wcześniej pożywki hodowlanej umieszczonej w 250 ml kolbach Elenmayera. Hodowle wstrząsane prowadzono przez okres 14 dni w temp. 28°C przy 120 obr./min. Po tym czasie hodowle likwidowano i oddzielano grzybnię od płynu hodowlanego poprzez wirowanie (6 000 rpm, 10 min.). Uzyskany płyn hodowlany wykorzystywano do ekstrakcji polisacharydów.

Izolacja polisacharydów

Frakcję zewnątrzkomórkowych polisacharydów strącano z płynu hodowlanego podwójną objętością 96% etanolu. Uzyskany osad odwirowano (10 000 rpm, 10 min.), rozpuszczano w wodzie destylowanej z dodatkiem 1 M NaOH i liofilizowano. Następnie preparat zagęszczano i odsalano przez ultrafiltrację (membrana 10 kDa). Surowy, wstępnie

oczyszczony preparat polisacharydu poddawano procesowi chromatografii.

Chromatografia żelowa polisacharydów

Proces oczyszczania przeprowadzono przy użyciu zestawu do chromatografii *BioLogic LP* firmy *BioRad* wyposażonego w detektor UV oraz kolektor frakcji *BioRad 2110*. Zastosowano dwa różne nośniki chromatograficzne *Sepharose 6B* oraz *Sepharose CL-4B*. Na kolumnę nanoszono po 1 ml próbki o stężeniu 1,5 mg/ml; elucję prowadzono za pomocą 0,2 M NaCl (*pH* 7,0).

Metody analityczne

Całkowite stężenie cukrów oznaczono metodą kolorymetryczną [Dubois i inni, 1956] natomiast stężenie białka metodą opisaną w pracy [Bradford, 1976].

Wyniki i dyskusja

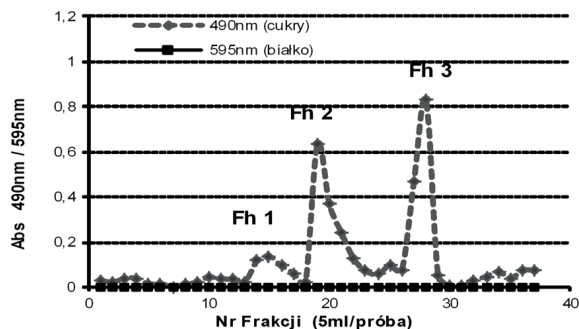
Obecnie większość polisacharydów pochodzenia grzybowego uzyskuje się w oparciu o czasochłonne oraz wieloetapowe procedury izolacji i frakcjonowania polegające między innymi na strącaniu cukrów etanolem a następnie wielokrotnej ekstrakcji preparatu wrzącą wodą oraz roztworami szczawianu amonu i NaOH. Wyekstrahowane polisacharydy są następnie oczyszczane za pomocą różnych technik chromatograficznych. W przedstawionej pracy preparat polisacharydu zewnątrzkomórkowego uzyskano z płynu hodowlanego, otrzymanego z hodowli płynnej szczepu *Ganoderma applanatum* w wyniku prostej procedury strącania cukru etanolem.

Następnie surowy preparat polisacharydu (Ho) poddano procedurze oczyszczania z zastosowaniem technik chromatograficznych. Ze względu na słabą rozpuszczalność surowego polisacharydu w wodzie do preparatu dodawano 1 M NaOH aż do osiągnięcia *pH* 11,8 przy którym uzyskano całkowitą rozpuszczalność badanego preparatu (Tab. 1). Przed naniesieniem na kolumnę preparat wstępnie oczyszczono z białek i zagęszczono uzyskując stężenie wyjściowe polisacharydu 1,53 mg/ml. Tak przygotowany preparat (H1) nanoszono na dwa rodzaje kolumn chromatograficznych *Sepharose 6B* lub *Sepharose CL-4B* w celu doboru najlepszych warunków rozdzielania. W czasie oczyszczania na kolumnie *Sepharose 6B* analizowano piki Fh1, Fh2 i Fh3; natomiast w czasie oczyszczania preparatu na kolumnie *Sepharose CL-4B* analizowano piki F1, F2, F3 (Rys. 1 i Rys. 2). Bardziej symetryczne piki (Fh1, Fh2 i Fh3) świadczące o lepszym rozdzielaniu polisacharydów otrzymano po zastosowaniu nośnika *Sepharose 6B*.

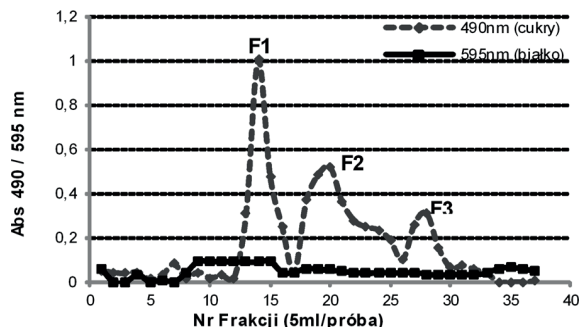
Tab. 1. Przewodnictwo i wartości *pH* uzyskane na poszczególnych etapach oczyszczania polisacharydów

Frakcja	Przewodnictwo [μS]	<i>pH</i>
Ho	450	3,8
H1	0,008	11,8
F1	18,4	6,4
F2	19,1	6,2
F3	19,1	6,2
Fh1	0	3,9
Fh2	0	4,3
Fh3	0	4,6

W zależności od rodzaju zastosowanego w procesie oczyszczania nośnika uzyskano odmienne właściwości otrzymanych frakcji. Na nośniku *Sepharose 6B* największe stężenie cukrów obserwowano dla frakcji Fh2



Rys. 1. Profil elucji polisacharydów oczyszczonych na kolumnie *Sepharose 6B*



Rys. 2. Profil elucji polisacharydów oczyszczonych w kolumnie *Sepharose Cl-4B*

i Fh3 (0,92 i 0,87 mg/ml). W przypadku frakcji Fh1 stężenie cukrów było najmniejsze i wynosiło 0,23 mg/ml. Odwrotną tendencję uzyskano na nośniku *Sepharose Cl-4B*, gdzie największe stężenie cukrów uzyskano dla frakcji F1 (0,1 mg/ml) najmniejsze zaś w przypadku frakcji F3 (0,076 mg/ml) (Tab. 2).

Tab. 2. Stężenie białek i cukrów uzyskane na poszczególnych etapach oczyszczania polisacharydów

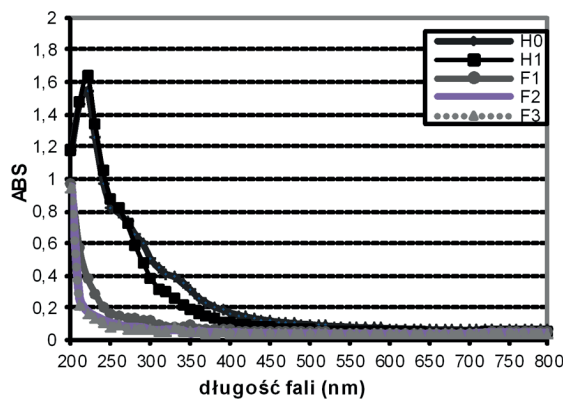
Frakcja	Stężenie białka [mg/ml]	Stężenie cukru [mg/ml]
H0	0,023	0,303
H1	0,021	1,53
F1	0	0,100
F2	0	0,084
F3	0	0,076
Fh1	0	0,23
Fh2	0	0,92
Fh3	0	0,87

Wstępnie przeprowadzone badania fizyczne otrzymanych frakcji polisacharydów wykazały, że uzyskane polisacharydy charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, jednak w wyniku procesu chromatografii tracą swoje właściwości żelujące, które obserwowano w przypadku surowego preparatu polisacharydu (H0).

Odmienne właściwości fizyczne uzyskanych substancji potwierdzają badania wartości *pH* tych preparatów. Frakcje polisacharydowe uzyskane w czasie oczyszczania z zastosowaniem nośnika *Sepharose 6B* wykazywały wartość *pH* 6,2 podczas gdy frakcje otrzymane w czasie oczyszczania na nośniku *Sepharose Cl-4B* wartość *pH* 4.

Analiza przewodnictwa uzyskanych substancji potwierdziła dobry stopień ich oczyszczenia. Stopień przewodnictwa ulegał spadkowi wraz z procesem oczyszczania z 450 μ S do wartości 19,1 μ S dla frakcji uzyskanych w czasie oczyszczania na nośniku *Sepharose Cl-4B* i 0 μ S dla frakcji oczyszczanych na nośniku *Sepharose 6B* (Tab. 1).

W otrzymanych po rozdziale frakcjach polisacharydów nie obserwowano obecności białek, co dodatkowo potwierdziły analizy spektrum UV-Vis. Nie wykazano absorbancji przy długości fali 280 i 260 nm co świadczy o braku białek i kwasów nukleinowych w badanych substancjach (Tab. 2. i Rys. 3).



Rys. 3. Spektrum UV-Vis polisacharydów uzyskanych w trakcie procesu oczyszczania

Uzyskanie 100% oczyszczenia frakcji polisacharydów z białek ma istotne znaczenie z punktu widzenia ewentualnego zastosowania tych substancji do procesów biomedycznych. Stosowane dotychczas alternatywne metody oczyszczania polisacharydów odczynnikiem *Sevag* (chloroform:butanol) nie pozwalają na uzyskanie całkowitego oczyszczenia polisacharydów z białek ze względu na tendencję białek do łatwego łączenia się z rozpuszczalnymi glukanami. Dodatkowo silne rozpuszczalniki organiczne obecne w odczynniku *Sevag* są trudne do oddzielenia od oczyszczanej substancji co wyklucza zastosowanie takich preparatów do potrzeb medycznych i dietetycznych. Zatem zastosowanie chromatografii w procesie oczyszczania cukrów pozwala na uzyskanie nowych frakcji polisacharydowych, bez potrzeby stosowania kontrowersyjnego odczynnika *Sevag* [Synytsya i inni, 2009].

Wnioski

Zaproponowana w pracy procedura oczyszczania polisacharydów z wykorzystaniem technik chromatograficznych pozwala na całkowite oczyszczenie preparatu z białek przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej ilości polisacharydu. Bardziej symetryczne piki uzyskano w przypadku rozdzielu preparatu na nośniku *Sepharose 6B*. W zależności od zastosowanego w chromatografii nośnika, otrzymuje się frakcje polisacharydowe o odmiennych właściwościach fizycznych.

LITERATURA

- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Bioch.* 72, nr 1, 248-254. DOI: doi:10.1006/abio.1976.9999
- Dubois M. Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Anal. Chem.* 28, nr 3, 350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017
- Guo L. i inni, 2009. Characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum* *Int. Immunopharmacol.* 9, nr 10, 1175-1182. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.06.005
- Malinkowska E. i inni, 2008. Pozyskiwanie, budowa i działanie biologiczne polisacharydów grzybowych na przykładzie soplówki jeżowej (*Herichium erinaceum*) *Biotech.*, 80, nr 1, 109-12.
- Synytsya A. i inni, 2009. Glucan from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity *Carbohydr. Polymers* 76, nr 4, 548-556. DOI:10.1016/j.carbpol.2008.11.021
- Wasser S.P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides *App. Microbiol. Biotechnol.* 60, nr 3, 258-274. DOI: 10.1007/s00253-002-1076-7
- Yaung B.K., Park J.B., Song C.H., 2003. Hypolipidemic effect of an Exo-biopolymer from a submerged mycelial culture of *Herichium erinaceus* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, nr 6, 1292-1298. DOI: 10.1271/bbb.67.1292
- Zhang M. Cuia S.W., Cheungb P.C.K., Wanga Q., 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity *Trends Foods Sci. Technol.* 18, nr 1, 4-19. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.07.013