

文章编号:1009-038X(2003)02-0075-04

硫酸酯化灰树花多糖的制备与分析

史宝军, 许正宏, 敖宗华, 孙志浩, 陶文沂*

(江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要:利用碱提酸沉淀法从灰树花(*Grifola frondosa*)发酵菌丝体中获得碱提水不溶性多糖 GAP, 氯磺酸-吡啶法对 GAP 进行硫酸化修饰后, 即制得能溶于水的硫酸化灰树花多糖. 通过 DEAE-Sephrose F.F. 离子交换柱层析精制为一种相对分子量为 2.8×10^4 , 硫酸基质量分数为 16.4% 的硫酸酯化灰树花多糖(S-GAP). 琼脂糖电泳显示, S-GAP 可被甲苯胺蓝染色且着色较深. S-GAP 的紫外光谱和红外光谱分析表明, 在波长 208, 264, 268, 286 nm 以及波数 $1\,230\text{ cm}^{-1}$ 、 810 cm^{-1} 处有硫酸酯键的特征吸收峰.

关键词:灰树花; 水不溶性多糖; 多糖硫酸化

中图分类号: Q 539

文献标识码: A

Preparation and Analysis of *Grifola frondosa* Polysaccharide Sulfate

SHI Bao-jun, XU Zheng-hong, AO Zong-hua, SUN Zhi-hao, TAO Wen-yi

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Water-insoluble polysaccharide GAP was extracted with 2% NaOH from the mycelia of submerged fermentation of *grifola frondosa*. S-GAP, a kind of good water-soluble sulfated derivative, was obtained from sulfatinal modification of GAP with chlorosulfonic acid-pyridine, and purified by DEAE Sepharose F.F. ion exchange chromatography. Its sulfur content was 16.4% and average molecular weight was 2.8×10^4 . The results of agarose electrophoresis showed that S-GAP could be deeply stained by toluidine blue. The UV and IR spectrum of S-GAP showed that characteristic absorptions of sulfate ester bond were at wavelength of 218 nm, 264 nm, 268 nm, 286 nm and $1\,230\text{ cm}^{-1}$, 810 cm^{-1} respectively.

Key words: *Grifola frondosa*; water-insoluble polysaccharide; polysaccharide sulfate

灰树花(*Grifola frondosa*)属担子菌亚门, 多孔菌科, 是一种营养丰富, 生物活性物质含量高的珍贵菌. 灰树花多糖具有明显的抗肿瘤, 抗 HIV 病毒, 改善免疫系统功能; 调节血糖、血脂及胆固醇水平, 降血压等作用; 对防止癌细胞的生成和转移, 艾滋病、高血压、肥胖症、糖尿病以及免疫功能的紊乱

都有一定的疗效; 且无任何毒副作用^[1]. 一些食用菌的真菌的天然多糖通过硫酸酯化得到了用途更为广泛的多糖衍生物, 如硫酸酯化的香菇多糖具有良好的抗 HIV 活性^[2]; 硫酸酯化的虎奶菇多糖具有较强的抗氧化作用^[3].

灰树花发酵菌丝体经碱提、乙酸中和、离心, 上

收稿日期: 2002-11-07; 修回日期: 2002-12-06.

作者简介: 史宝军(1973-), 男, 青海西宁人, 发酵工程博士研究生. * 为通讯作者.

清液为碱提水溶性多糖,沉淀为水不溶性多糖,后者不溶于水,无法制成注射液,影响进一步的药理研究.作者通过硫酸酯化,将碱提水不溶性灰树花多糖制成了溶于水的硫酸化多糖.

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株 GF9801 由江南大学生物工程学院生物制药研究室提供.

1.1.2 灰树花深层发酵 按照文献[4]介绍的方法制备灰树花菌丝体.

1.2 试剂

DEAE Sepharose F. F.、Blue Dextran2000、Dextran T500、DextranT110、Dextran T70、Dextran T40、DextranT20、Dextran T10 均为 Pharmacia 产品;明胶为 Amresco 产品;其余试剂均为国产分析纯.其中,吡啶和甲酰胺用前分子筛 5A 型脱水.

1.3 仪器

U-3000 紫外可见扫描仪:日立公司产品;CS9301(PC)S 型双波长飞点扫描仪:日本岛津;752 紫外可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;DYY-III-4 型稳压稳流电泳仪:北京市六一仪器厂;美国 Necolit5D×B 傅立叶变换红外光谱仪.

1.4 硫酸酯化灰树花多糖的制备

灰树花发酵菌丝体经热水(80℃)提取,反复多次,直至苯酚-硫酸法检测无多糖.剩余残渣用质量浓度 2 g/dL NaOH,4℃,过夜提取,离心,上清液用冰醋酸中和,产生大量白色沉淀,重复 3 次,合并沉淀,经水、丙酮、乙醚洗涤,真空干燥.用 0.05 mol/L NaOH 溶解干粉,离心,上清液加入 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀多糖,过夜,离心收集白色沉淀,真空干燥,得到灰树花菌丝体碱提水不溶性多糖“GAP”.

酯化试剂的制备:按照文献[5]的方法,稍加改进.10 mL 无水吡啶置于反应瓶中,经冰盐浴冷却后,剧烈搅拌下,缓慢滴加 4 mL 氯磺酸,继续搅拌 30 min,密封后置于低温冰箱备用.

将 GAP 悬浮于 35 mL 无水甲酰胺中,然后逐渐加入酯化试剂,45℃下搅拌反应 2~4 h,反应结束后,2.5 mol/L NaOH 中和,流水透析 3 d,蒸馏水透析 1 d,浓缩,加无水乙醇沉淀多糖,得到硫酸酯化衍生物.将该衍生物加到 DEAE Sepharose F. F. 阴离子交换柱上,先用蒸馏水洗,后用 0~1.5 mol/L NaCl 梯度洗脱.苯酚-硫酸法检测多糖,仅有一个主要洗脱峰,收集,充分透析,冷冻干燥得到硫酸化衍生物:S-GAP.

1.5 理化性质测定

多糖测定:苯酚-硫酸法^[6];还原糖测定:3,5-二硝基水杨酸法^[6];硫酸基含量测定:BaCl₂-明胶浊度法^[6],取代度公式: $d.s = (1.62 \times S) / (32 - 1.02 \times S)$.

1.6 纯度鉴定及相对分子质量测定

1.6.1 高压液相色谱 将多糖配制成 20 mg/mL 的溶液进样.采用 Ultrahydrogel liner(7.8 mm×300 mm)色谱柱,双柱串联,示差折光检测器,流动相为 0.1 mol/L NaNO₃ 溶液,体积流量为 0.9 mL/min,柱温 45℃,进样量 20 μL,记录样品色谱曲线.

1.6.2 相对分子质量测定 完全按 HPLC 测定纯度时的相同条件,将相对分子质量分别为 T500(482 000),T110(110 000),T70(70 000),T40(40 000),T20(216 000),T10(10 000)的标准 Dextran 相继进样,记录各自的保留时间 RT.待测样品相同条件进样,得到多糖相对分子量.

1.7 琼脂糖电泳

用 0.06 mol/L 巴比妥缓冲液(pH 8.6)配置成 1 g/dL 琼脂糖溶液制板,电压 150 V,电泳 1.5 h,0.1 g/dL 甲苯胺蓝溶液染色.完全脱色后,进行双波长扫描^[7].

1.8 光谱学鉴定

紫外扫描的样品质量浓度为 1 g/dL 的水溶液,扫描范围 190~300 nm.红外光谱为溴化钾压片,测定范围为 4 000~400 cm⁻¹.

2 结果与讨论

2.1 S-GAP 分离纯化结果

灰树花菌丝体通过热水提取,剩余残渣碱提沉淀,所得多糖硫酸化后,经过 DEAE Sepharose F. F. 柱层析,主要分离得到了一种多糖,即 S-GAP(图 1),S-GAP 经高压液相色谱测定呈单一对称吸收峰(图 2),表明 S-GAP 是一纯多糖.经 HPLC 测得 S-GAP 的相对分子质量为 2.8×10^4 (图 3).

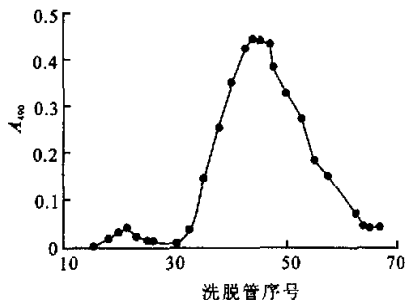


图 1 S-GAP 的 DEAE Sepharose F. F. 柱层析

Fig.1 Chromatography of S-GAP on DEAE Sepharose F. F. column

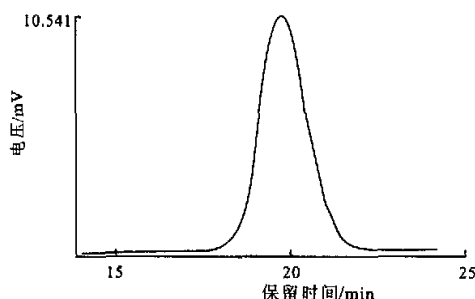


图2 S-GAP 的高压液相色谱

Fig.2 HPLC of S-GAP

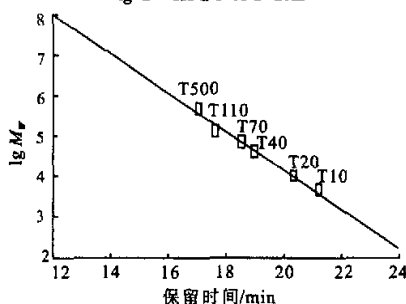


图3 S-GAP 的相对分子质量测定

Fig.3 Determination of S-GAP Molecule Weight by HPLC

2.2 琼脂糖电泳结果

从电泳图谱(图4)可以看到非常明显的深蓝紫色斑点,于广利等指出^[8],样品凝胶色泽的深浅与样品分子中含有的负电荷尤其是硫酸基含量的多少有关,硫酸基含量越高,凝胶着色越深.由于本文采用的是碱性琼脂糖电泳系统和甲苯胺蓝显色剂,只有酸性多糖才能泳动和染色,故说明 GAP 已被硫酸酯化,且硫酸根含量较高.经双波长扫描,呈单一峰,说明 S-GAP 是均多糖.

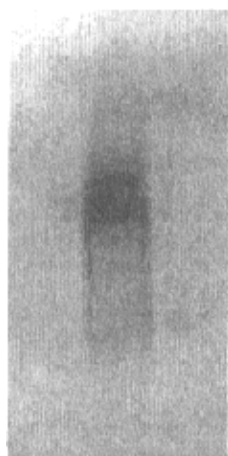


图4 S-GAP 的琼脂糖电泳

Fig.4 Agarose electrophoresis of S-GAP

2.3 GAP 的硫酸酯化条件及结果

多糖的硫酸酯化反应是在路易斯碱溶液中由 SO_3H^+ 取代多糖羟基中的 H^+ , 经中和得到硫酸酯盐(图5).

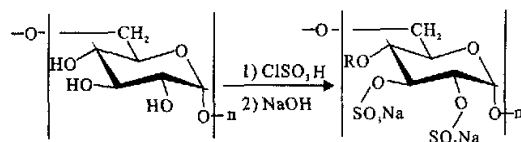


图5 多糖硫酸酯化的反应方程式

Fig.5 Polysaccharide sulfate with chlorosulfonic acid

S-GAP 为白色粉末,糖质量分数为 52.8%,硫酸质量分数为 16.4%,取代度为 1.74. 多糖硫酸化的方法有多种,氯磺酸-吡啶法试剂简单易得,反应条件相对简单,产物回收方便,是最理想的一种方法. 控制反应温度,不同反应时间以及不同比例的酯化试剂,可以得到取代度不同的硫酸酯化多糖. 一般来讲,高温、氯磺酸比例高,反应时间长,产物取代度高.但是,高温会造成多糖结构破坏,经预实验表明,高温(100℃)条件下,反应结束后,经 DNS 法测得还原糖含量较高,因此本实验将温度固定在 45℃. 提高氯磺酸的比例,氯磺酸-吡啶盐(淡黄色固体)生成增多至出现板结,搅拌困难,加入无水甲酰胺可溶解. 高比例的磺化试剂,多糖易被酯化,取代度高,但产率低,可能是由于反应液酸度过高($\text{pH} < 1$)引起多糖降解. 采用较温和的条件, $\text{pH} 4 \sim 5$, 收率和取代度较为理想. 本实验产物得率为 82.7% ($d.s = 1.74$).

2.4 S-GAP 的光谱学鉴定结果

紫外光谱在波长分别为 218, 264, 268 和 286 nm 有 $-\text{S}-\text{O}-$ 和 $-\text{SO}_3^-$ 的吸收. GAP 的红外光谱(图6)和 S-GAP 的红外光谱(图7)显著不同, S-GAP 除了多糖母体特征吸收峰得以保留外,还增加了 $1\,230\text{ cm}^{-1}$ 左右的吸收,表明为 OSO_3^- 的 $\text{S}=\text{O}$ 伸缩振动, 810 cm^{-1} 左右的吸收表明为 $\text{C}-\text{O}-\text{S}$ 的拉伸振动,这些是硫酯键的特征吸收峰;同时,还可以看出, S-GAP 在 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 附近的羟基吸收峰有所降低,表明部分羟基已被酯化,以上充分说明多糖已形成硫酸酯.

3 结论

研究表明,以灰树花发酵菌丝体为原料,经碱提酸沉淀,得到了水不溶性多糖,该多糖经硫酸酯化后水溶性得到了很好的改善,为进一步研究其生物活性带来了方便. 多糖硫酸化常用的方法有三氧

化硫-吡啶法,浓硫酸法,氯磺酸-吡啶法^[9].其中氯磺酸-吡啶法试剂简单易得,反应条件相应地简单,产物回收方便,收率和取代度均较理想,因此,该法是多糖硫酸化最理想的一种方法.所得硫酸化多糖 S-GAP,硫酸基质量分数为 16.4%,取代度为 1.74,

相对分子量为 2.8×10^4 .红外光谱显示,在波数 1230 cm^{-1} 和 810 cm^{-1} 处出现硫酸酯键的特征吸收峰,表明多糖已形成硫酸酯. S-GAP 的生物活性有待进一步研究.

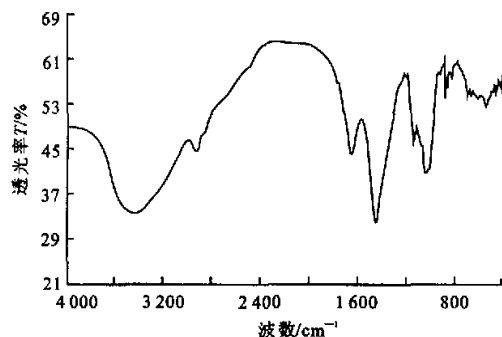


图 6 GAP 的红外光谱

Fig.6 IR spectrum of GAP

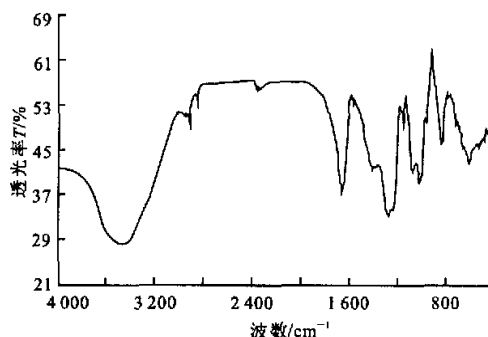


图 7 S-GAP 的红外光谱

Fig.7 IR spectrum of S-GAP

参考文献:

- [1] Mark Mayell. Maitake extracts and their therapeutic potential-A review[J]. *Altern Med Rev*, 2001, 6(1):48-60.
- [2] 王顺春, 方积年. 香菇多糖硫酸化衍生物的制备及其结构分析[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(5):594-597.
- [3] 邓成华, 杨祥良, 王雁, 等. 硫酸酯化虎奶多糖的制备及其抗氧化作用[J]. *中国生化药物杂志*, 2001, 22(1):1-4.
- [4] 孙克, 敖宗华, 许正宏, 等. 营养条件对灰树花产胞外多糖产量的影响[J]. *无锡轻工大学学报*, 2002, 21(3):273-276.
- [5] Alicia Fernandez Cirelli, Javier A. Covian. Effect of sulfation on the biological activity of β -(1 $\rightarrow$ 3)glucans from the tree fungus *Cyttaria harioiti* Fisher[J]. *Carbohydrate Research*, 1989, 190:329-337.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1994.
- [7] 阮期平, 周立, 王小明, 等. 黄附子糖复合物的初步分析[J]. *天然产物研究与开发*, 2000, 12(1):46-49.
- [8] 于广利, 迟连利, 管诗华, 等. PAGE 在海洋酸性寡糖分析的应用[J]. *中国海洋药物*, 2001, 3:7-11.
- [9] 田庚元, 李寿桐, 宋麦丽, 等. 牛膝多糖硫酸酯的合成及其抗病毒活性[J]. *药学报*, 1995, 30(2):107-111.

(责任编辑:杨 萌)