

微波辅助合成硫酸化发酵灵芝胞外多糖的研究

张珏¹, 沈洁², 隋晓辰², 刘昱均²

(1. 卫生部核医学重点实验室 / 江苏省原子医学研究所, 江苏 无锡 214063; 2. 食品科学与技术国家重点实验 / 江南大学, 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 多糖的硫酸化修饰能提高多糖的生物活性。从灵芝深层发酵液中获取灵芝胞外多糖, 以二甲基甲酰胺为反应溶剂, 采用氨基磺酸为酯化剂, 探讨了微波辅助加热合成多糖的途径。结果表明, 将尿素作为催化剂微波辅助合成硫酸酯化多糖, 反应条件温和, 取代度可高达 2.67。因此微波辅助合成法为获取高取代度硫酸化灵芝多糖开辟了一条新途径。

关键词: 灵芝; 多糖; 硫酸化; 发酵

中图分类号: O 657.3 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)01—0107—05

Microwave Assisted Synthesis of Sulfated Extracellular Polysaccharide from Submerged Fermentation of *Ganoderma Lucidum*

ZHANG Jue¹, SHEN Jie², SUI Xiaochen², LIU Yujun²

(1. Key Laboratory of Nuclear Medicine of Ministry of Health / Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China; 2 State Key Laboratory of Food Science and Technology / School of College of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Sulfation of polysaccharides can improve their biological activities. To efficiently prepare the sulfated extracellular polysaccharide from submerged fermentation of *Ganoderma Lucidum*, microwave assisted synthesis was established in this paper, using dimethylformamide as solvent and aminosulfonic acid as esterifying reagent. Results showed that the microwave assisted synthesis with urea as catalyst led to a high substitution degree of 2.67, and the reaction was mild. Thus, microwave assisted synthesis is a new approach to obtain sulfated polysaccharides with high degree of substitution.

keywords: *Ganoderma Lucidum*, polysaccharide, sulfation, submerged fermentation

灵芝多糖为灵芝中最重要的活性成分之一, 具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等药理活性^[1-3]。随着现代生物工程技术的发展, 通过液态深层发酵可规模化定向获取灵芝多糖^[4-5]。但发酵灵芝胞外多糖的抗肿瘤活性却并不理想^[6]。为解决这一问题, 通过多糖

的硫酸化修饰来提高多糖的生物活性^[7-9]。研究表明, 灵芝胞外多糖经硫酸化修饰后其抗肝癌活性明显提高, 且硫酸化取代度(DS)与其生物活性密切相关^[10-13]。目前对灵芝多糖硫酸化修饰的研究多集中于子实体多糖^[14-15], 关于发酵灵芝多糖硫酸化的报

收稿日期: 2014-08-08

基金项目: 中央高校自主科研项目(JUSRP11517); 食品科学与技术国家重点实验室自由探索基金项目(SKLF-ZZB-201504); 无锡市科技支撑计划—社会发展项目(CSE01N1239)。

作者简介: 张珏(1969—), 女, 上海人, 工学博士, 副研究员, 主要从事天然产物提取研究。E-mail: zhangjue@jsinn.org

道相对较少^[8]。在多糖硫酸化工艺上多采用氯磺酸酯化法^[12,16-17],并且以传统的常规加热方式来提供能量,这就带来了反应时间长、副反应多、取代度较小(DS=0.8-1.5)等弊端^[10,12,18-19]。对于合成高取代度的硫酸酯化多糖的报道更为少见^[20],另外以氨基磺酸作为酯化试剂的报道也相对较少^[21]。

微波辅助合成技术利用微波替代传统的加热方式,可降低反应活化能,提高反应速率,具有高转化率、高选择性、低能耗、清洁环保等特点^[22]。作者采用微波辅助合成法对灵芝胞外多糖进行硫酸化修饰,考察各因素对取代度的影响,旨在得到一条高效、可控、取代度高、反应条件温和的多糖硫酸化合成途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

发酵灵芝胞外多糖:江南大学章克昌教授实验室提供;无水硫酸钠、N,N-二甲基甲酰胺、苯酚、吡啶、浓硫酸、乙醇、氯化钡、氢氧化钠、甲酰胺、氨基磺酸:AR,国药集团化学试剂有限公司产品;明胶:Amresco 生物科技有限公司产品;氯磺酸:CP,上海金山亭化工试剂厂产品。

微波催化合成\萃取仪:XH-100A,北京祥鹤科技发展有限公司产品;紫外分光光度计:T-6,普析通用仪器有限责任公司产品;透析袋:截留相对分子质量 3 500,美国 Viskase 公司产品;冷冻干燥机:EZ585Q,美国 FTS System 公司产品;旋转蒸发仪:RE-52,上海本波仪器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 硫酸酯化灵芝胞外多糖的制备流程 将一定量的灵芝胞外多糖加入装有二甲基甲酰胺的烧瓶中,室温下搅拌 30 min 使多糖均匀分散在溶剂中。将烧瓶放入微波反应器中,选择恒温模式,一定温度下预热 30 min 后缓慢加入氨基磺酸,设置反应所需的微波功率。反应结束后迅速将烧瓶置于冰水浴中,反应液用 4 mol/L NaOH 调节 pH 至 7 后用体积分数 90%乙醇沉淀,离心取沉淀。沉淀先用 90%乙醇洗涤再用去离子水复溶,用流水透析 24 h。透析袋内液体冷冻干燥后即得灵芝胞外硫酸化多糖。

1.2.2 硫酸基含量测定:采用 BaCl₂-明胶浊度法采用 BaCl₂-明胶浊度法^[23],取代度(DS)计算公式:

$$DS = (1.62 \times S) / (32 - 1.02 \times S)$$

其中 S%为硫质

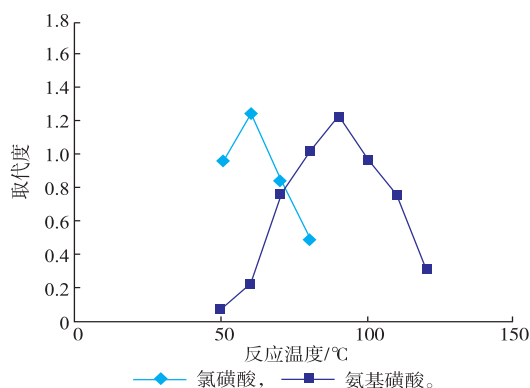
量分数。

2 结果与讨论

2.1 硫酸酯化试剂的筛选

硫酸基团的引入影响着多糖的生物活性,硫酸酯化试剂则对反应有一定的影响。作者分别考察了氯磺酸和氨基磺酸对取代度的影响。

从图 1 可看出,氯磺酸和氨基磺酸在各自最佳反应温度下的取代水平相似,但氨基磺酸对反应温度更为宽泛。相比用氯磺酸合成的硫酸酯化灵芝多糖,氨基磺酸法合成的硫酸酯化灵芝多糖色泽较浅,反应过程温和。



溶剂和多糖的体积质量比为 50 mL:1 g, n 磺化剂:n 多糖的单体残基为 3:1, 5 min

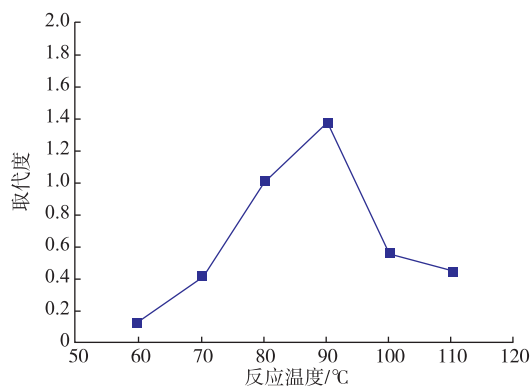
图 1 不同硫酸酯化试剂对 DS 的影响

Fig. 1 Effect of sulfuric acid esterification reagent on DS

2.2 微波辅助合成对取代度的影响

氨基磺酸是一种温和的硫酸酯化试剂。在微波合成反应中,通过极性分子的偶极旋转和离子传导两种作用将能量直接传递到反应物上。同时,分子的整体运动能够活化分子,有利于其形成过渡态,从而降低反应体系的活化能,最终使反应速率加快,选择性提高。

微波辐射对多糖硫酸酯化的影响见图 2。采用微波法合成硫酸酯化多糖具有反应时间短,转化率高优点。但这也提高了对温度的选择性。温度过低(< 80 °C)不利于反应充分进行,而温度过高(>90 °C)则导致氨基磺酸分解,同样降低了取代度。反应温度为 90 °C 时,多糖硫酸化的取代度达到最大为 1.37,并且产物颜色较浅,说明副产物较少。因此,作者选取 90 °C 为最佳的合成温度。



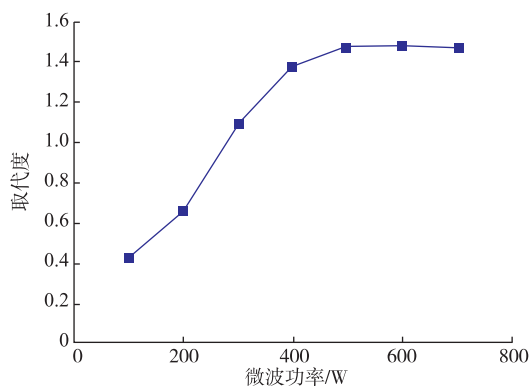
溶剂为二甲基甲酰胺,溶剂和多糖的体积质量比为 50 mL:1 g,物料摩尔比(n 氨基磺酸: n 多糖的单体残基)为 3:1,5 min)。

图 2 微波辐射温度对灵芝胞外多糖硫酸酯化取代度的影响

Fig. 2 Effect of reaction temperature on DS

2.3 微波辐射功率对取代度的影响

微波辐射功率通过影响体系的温度和反应初速度来影响反应的取代度。由图 3 可知,微波功率在 100~300 W 时,微波提供的能量较低,体系仅处于微波辐射加热状态,无法有多余的能量传递到反应分子上使其活化。当微波功率高于 400 W 时,体系能维持最适反应温度 90 °C,并有一定的能量传递到反应分子上,且在一定范围内取代度随功率增加而增大。当功率超过 500 W 时,硫酸酯化胞外多糖的取代度有所增加但并不显著。这可能是由于过大的功率导致反应温度上升,从而不利于取代度的提高。综上所述,500 W 为最佳的微波辐射功率。



溶剂和多糖的体积质量比为 50 mL:1 g, n 氨基磺酸: n 多糖的单体残基为 3:1,90 °C,5 min)。

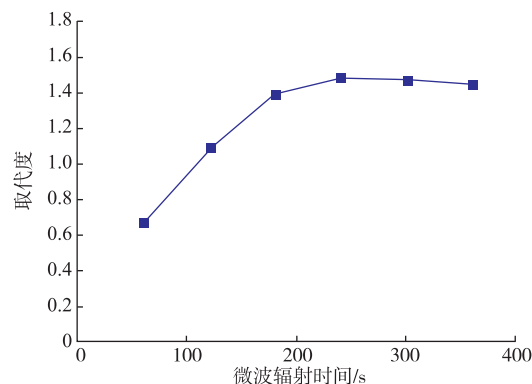
图 3 微波辐射功率对灵芝胞外多糖硫酸酯化取代度的影响

Fig. 3 Effect of microwave radiation power on DS

2.4 微波辐射时间对取代度的影响

微波辐射时间对灵芝胞外多糖硫酸酯化取代

度的影响见图 4。在微波功率为 500 W、辐射时间超过 120 s 时,灵芝胞外多糖硫酸酯化取代度明显提高。但随着反应时间的延长,取代度并未明显增大。考虑到微波辐射下各底物偶极矩的强烈变化可能对反应物和产物的稳定性带来不确定因素。并且反应时间过短不利于反应充分进行,反应时间过长则加剧氨基磺酸分解。故选取微波辐射反应时间为 240 s。



溶剂和多糖的体积质量比为 50 mL:1 g, n 氨基磺酸: n 多糖的单体残基为 3:1,90 °C,5 min,500 W)。

图 4 微波辐射时间对灵芝胞外多糖硫酸酯化取代度的影响

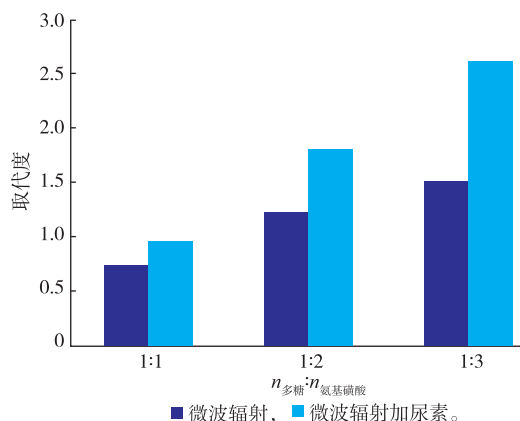
Fig. 4 Effect of microwave radiation time on DS

2.5 反应物料摩尔比及催化剂在微波辅助合成中对取代度的影响

在微波辅助合成反应物中,反应物的分子极性越大,偶极旋转越强,产生的热量也越大,从而提高了微波的效能作用,由此增大了反应体系中反应物分子的碰撞频率或有效碰撞的几率。因此,有必要探讨微波合成中多糖与氨基磺酸的摩尔比。此外,催化剂的存在也是影响酯化反应速率的重要因素。微波辐射在加速多糖的氨基磺酸酯化速率的同时也不可避免地导致氨基磺酸的分解。而尿素的加入能有效缓解这一问题。在微波辐射反应中将尿素作为催化剂不仅加快了反应速率,提高硫酸酯化多糖的取代度,还提高了氨基磺酸的利用率。

从图 5 结果可看到,在没有催化剂的情况下,多糖与氨基磺酸摩尔比的增大使得取代度略有增加。当物料摩尔比为 1:3 时,对应的取代度为 1.5。将尿素作为催化剂,物料摩尔比超过 1:2 时,取代度明显增大。这表明在微波场中,尿素的催化性能得到显著提高,有效提高了底物转化率。并且在反应时间仅为 4 min 时获得的硫酸化灵芝胞外多糖的取代

度高达 2.63, 高于目前已有文献所报道的取代度。



溶剂和多糖的体积质量比为 50 mL:1 g, $n_{\text{氨基磺酸}}:n_{\text{多糖的单糖残基}}$ 为 3:1, 尿素与氨基磺酸的摩尔比为 1:6.4, 90 °C, 5 min, 500 W。

图 5 尿素在微波辅助合成硫酸酯化灵芝胞外多糖取代度的影响

Fig. 5 Effect of urea under microwave radiation on DS

参考文献:

- [1] WANG J G, MA Z C, ZHANG L N, et al. Structure and chain conformation of water-soluble heteropolysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. **Cbohydrate Polymer**, 2011, 86(2): 844-851.
- [2] HUANG S Q, LI J W, LI Y Q, et al. Purification and structural characterization of a new water-soluble neutral polysaccharide GLP-F1-1 from *Ganoderma lucidum*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2011, 48(1): 165-169.
- [3] LIU W, WANG H Y, PANG X B, et al. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2010, 46(4): 451-457.
- [4] LIU G Q, WANG X L, HAN W J, et al. Improving the fermentation production of the individual key triterpene ganoderic acid me by the medicinal fungus *Ganoderma lucidum* in submerged culture[J]. **Molecules**, 2012, 17(11): 12575-12586.
- [5] Chien Y L, Ho C T, Chiang B H, et al. Effect of fermentation time on antioxidative activities of *Ganoderma lucidum* broth using leguminous plants as part of the liquid fermentation medium[J]. **Food Chemistry**, 2011, 126(4): 1586-1592.
- [6] ZHANG J, LIU Y J, Park H S, et al. Antitumor activity of sulfated extracellular polysaccharides of *Ganoderma lucidum* from the submerged fermentation broth[J]. **Cbohydrate Polymer**, 2012, 87(2): 1539-1544.
- [7] ZHAI Q Z, LI X L, YANG Y Z, et al. Antitumor activity of a polysaccharide fraction from *Laminaria japonica* on U14 cervical carcinoma-bearing mice[J]. **Tumor Biology**, 2014, 35(1): 117-122.
- [8] WU X D, JIANG W, LU J J, et al. Analysis of the monosaccharide composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry [J]. **Food Chemistry**, 2014, 145: 976-983.
- [9] WANG X X, CHEN Y, WANG J J, et al. Antitumor activity of a sulfated polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis* targeted against hepatoma through mitochondrial pathway[J]. **Tumor Biology**, 2014, 35(2): 1641-1647.
- [10] LIU W, WANG H Y, YAO W B, et al. Effects of sulfation on the physicochemical and functional properties of a water-insoluble polysaccharide preparation from *Ganoderma lucidum* [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010, 58(6): 3336-3341.
- [11] FENG Y L, LI W Q, WU X Q, et al. Rapid and efficient microwave-assisted sulfate modification of lentinan and its antioxidant and antiproliferative activities in vitro[J]. **Cbohydrate Polymer**, 2010, 82(3): 605-612.
- [12] CHEN T, LI B, LI Y, et al. Catalytic synthesis and antitumor activities of sulfated polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino[J]. **Cbohydrate Polymer**, 2011, 83(2): 554-560.

3 结语

以氨基磺酸为硫酸化试剂,对微波辅助合成硫酸化发酵灵芝胞外多糖的工艺条件进行了探讨。由此获得最佳工艺条件为:微波辅助反应温度为 90 °C,反应时间为 4 min,微波功率为 500 W,物料比(多糖的单糖残基与氨基磺酸摩尔比)为 1:3,催化剂尿素的用量为氨基磺酸质量的 25%。在该条件下获得的硫酸化发酵灵芝胞外多糖的取代度高达 2.67。并且该反应快速温和、易控制。由此可见,微波辅助法合成硫酸化多糖是一种易于规模化、能获取高取代度的合成方法。

- [13] Dore C, Alves M, Santos N D, et al. Antiangiogenic activity and direct antitumor effect from a sulfated polysaccharide isolated from seaweed[J]. *Microvascular Research*, 2013, 88: 12-18.
- [14] CHEN Y, XIE M Y, NIE S P, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*[J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(1): 231-241.
- [15] FAN L P, LI J W, DENG K Q, et al. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*[J]. *Carbohydrate Polymer*, 2012, 87(2): 1849-1854.
- [16] WANG Y, SHEN X K, LIAO W F, et al. A heteropolysaccharide, L-fuco-D-manno-1,6- α -D-galactan extracted from *Grifola frondosa* and antiangiogenic activity of its sulfated derivative[J]. *Carbohydrate Polymer*, 2014, 101: 631-641.
- [17] QIAN X P, ZHA X Q, XIAO J J, et al. Sulfated modification can enhance antiglycation abilities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*[J]. *Carbohydrate Polymer*, 2014, 101: 982-989.
- [18] YAN J K, WANG W Q, MA H L, et al. Sulfation and enhanced antioxidant capacity of an exopolysaccharide produced by the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*[J]. *Molecules*, 2013, 18(1): 167-177.
- [19] Jindal M, Rana V, Kumar V, et al. Sulfation of *Aegle marmelos* gum: Synthesis, physico-chemical and functional characterization [J]. *Carbohydrate Polymer*, 2013, 92(2): 1660-1668.
- [20] CHEN T, WANG J, LI Y Y, et al. Sulfated modification and cytotoxicity of *Portulaca oleracea* L. polysaccharides [J]. *Glycoconjugate Journal*, 2010, 27(6): 635-642.
- [21] 陈群. 茯苓硫酸酯化多糖的制备及其核磁共振波谱分析[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(1): 3.
- [22] Wan H-d, Sun S-y, Hu X-y, et al. Nonthermal effect of microwave irradiation in nonaqueous enzymatic esterification[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(6): 1454-1462.
- [23] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 浙江: 浙江大学出版社, 1994.

科技信息

澳新拟批准低聚异麦芽糖用于饮料、糖果等食品

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,12月23日澳新食品标准局发布通知公告33-15,拟批准低聚异麦芽糖(isomalto-oligosaccharide)作为新型食品配料用于饮料、糖果等食品。

Essence Group 向澳新食品标准局提交申请,请求将低聚异麦芽糖作为可替代(低热量)甜味剂用于碳酸饮料、运动和能量饮料、豆奶、乳基和非乳基替代饮料、果汁、早餐条、糖果等,最大使用量为15g/份。尽管申请方请求将其用于部分特殊膳食用途食品,然而并未打算将其用于婴幼儿配方食品。

低聚异麦芽糖可替代蔗糖、葡萄糖、果糖、高果糖、麦芽糖浆、低果聚糖类、菊粉、聚葡萄糖、糊精。

[信息来源] 食品伙伴网. 澳新拟批准低聚异麦芽糖用于饮料、糖果等食品 [EB/OL]. (2015-12-25). <http://news.foodmate.net/2015/12/345852.html>

欧盟批准一种内切-1,4- β -葡聚糖酶作为饲料添加剂

据欧盟网站消息,12月11日欧盟发布(EU)2015/2305法规,批准桔绿木霉(IM SD142)生产的内切-1,4- β -葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)作为肉鸡、肉禽和断奶仔猪的饲料添加剂。

根据最新法规,本酶制剂属于畜产添加剂,功能上属于消化促进剂。

当用于肉鸡、肉禽饲料时,在湿度为12%的饲料全料中的含量不应低于500CU;当用于断奶仔猪时,在湿度为12%的饲料全料中的含量不应低于350CU。

该法规自公布二十日起生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准一种内切-1,4- β -葡聚糖酶作为饲料添加剂 [EB/OL]. (2015-12-18). <http://news.foodmate.net/2015/12/344632.html>