

# 秀珍菇多糖的硫酸化及其生物活性研究

申进文<sup>1</sup>, 王瑞瑞<sup>1</sup>, 许春平<sup>2\*</sup>

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 采用水提醇沉法从秀珍菇发酵液中提取胞外多糖, 经氯磺酸-吡啶法修饰后得到胞外多糖硫酸酯, 对多糖及其硫酸酯进行抗氧化活性和抑菌活性研究。结果表明, 制备出的秀珍菇多糖硫酸酯硫酸基含量为 15.4%, 取代度为 1.53。在相同质量浓度下, 秀珍菇多糖硫酸酯的抗氧化活性稍高于秀珍菇多糖, 而抑菌活性明显提高。

**关键词:** 秀珍菇; 胞外多糖; 硫酸化; 抗氧化活性; 抑菌活性

中图分类号: S646 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)07-0102-05

## Study on Preparation and Bioactivity of Sulfated Saccharides of *Pleurotus geesteranus*

SHEN Jin-wen<sup>1</sup>, WANG Rui-rui<sup>1</sup>, XU Chun-ping<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** After water extraction and alcohol precipitation, exopolysaccharide was extracted from the fermentation broth of *Pleurotus geesteranus*, which was modified to obtain polysaccharide sulfate by chlorosulfonic acid-pyridine method. The antioxidant activity and antibacterial activity of polysaccharides and sulfated polysaccharide were investigated. The results showed that the sulfate group content in the sulfated polysaccharide was 15.4%, and substitution degree was 1.53. The antioxidant activity of sulfated polysaccharide was a little higher than polysaccharide with the same concentration, while the antibacterial activity of sulfated polysaccharide was much higher than polysaccharide.

**Key words:** *Pleurotus geesteranus*; exopolysaccharides; sulfation; antioxidative activity; antibacterial activity

真菌胞外多糖是从真菌液体发酵液中提取的一种水溶性多糖, 硫酸酯化多糖是多糖大分子链中单糖分子上的羟基被硫酸根所取代而形成的天然及合成的酸性多糖<sup>[1]</sup>。近年来发现硫酸酯化多糖具有多种生物活性, 如抗氧化<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗病毒<sup>[4]</sup>等, 具有很好的开发利用价值。

秀珍菇(*Pleurotus geesteranus*) 在分类学上隶属于真菌门、担子菌纲、伞菌目、侧耳科、侧耳属, 又名环

柄侧耳、白环柄侧耳<sup>[5]</sup>, 是一种具有较高营养保健价值的食用菌。目前, 国内关于秀珍菇的研究报道较多, 但主要集中在秀珍菇栽培技术<sup>[6-9]</sup>方面, 而关于秀珍菇多糖及其硫酸酯生物活性的研究较少。鉴于此, 以秀珍菇胞外多糖为原料, 采用氯磺酸-吡啶法进行硫酸化修饰, 研究秀珍菇多糖及其硫酸酯的抗氧化活性和抑菌活性等生物活性, 旨在为秀珍菇多糖硫酸酯应用于生物制药方面提供一些理论依据。

收稿日期: 2014-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(21376227)

作者简介: 申进文(1964-), 男, 河南郑州人, 教授, 硕士, 主要从事食药真菌及其栽培废料利用研究。

E-mail: shenjinwen369@163.com

\* 通讯作者: 许春平(1977-), 男, 河南焦作人, 教授, 博士, 主要从事生物化工和烟草工程研究。

E-mail: c. p. xu@zzuli.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 秀珍菇来自郑州轻工业学院食品与工程学院实验室。

1.1.2 培养基 PDA 培养基(马铃薯 20%、葡萄糖 2%、琼脂 2%)、液体种子基础培养基(葡萄糖 3%、蛋白胨 0.3%)、液体发酵优化培养基(麦芽糖 60 g/L、蛋白胨 5 g/L、NaCl 1 mmol/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mmol/L, pH 值 6)。

1.1.3 试剂 葡萄糖、麦芽糖、牛肉膏、蛋白胨、琼脂、明胶、NaCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、NaOH、HCl、 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、乙醇、氯仿、正丁醇、吡啶、氯磺酸、二甲基甲酰胺(DMF)、三氯乙酸(TCA)、水杨酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)均为分析纯。

1.1.4 仪器 恒温振荡摇床、电子分析天平、超净工作台、旋转蒸发器、高速离心机、紫外分光光度计、立式灭菌器、PB-10 pH 计、真空冷冻干燥机、磁力搅拌器、傅里叶红外光谱仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 多糖及其硫酸酯的制备

1.2.1.1 多糖的发酵、提取及纯化 使用打孔器在靠近菌株生长边缘的位置取 2 块  $1\text{ cm}^2$  的菌种块,接种于液体种子基础培养基中,置于恒温振荡摇床中,28℃、160 r/min 培养 4 d。取一定量液体种子培养液接种于液体发酵优化培养基中,置于恒温振荡摇床中,28℃、160 r/min 培养 7 d。

经过液体摇瓶发酵后,抽滤除去培养物中的菌丝体,发酵液中加入 4 倍体积的无水乙醇沉淀得到粗多糖。将其溶于适量蒸馏水后,用 Sevag 法<sup>[10]</sup>除去蛋白质,乙醇沉淀出多糖,经真空冷冻干燥后得到秀珍菇发酵胞外多糖。

1.2.1.2 多糖含量的测定 精确称取 105℃烘干至恒质量的葡萄糖 1.000 0 g,定容至 100 mL,即为 10 g/L 的葡萄糖贮备液。精确量取 1 mL 葡萄糖贮备液定容至 100 mL,即为 0.1 g/L 葡萄糖标准液。分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的葡萄糖标准液于试管中,并用蒸馏水补足 1 mL,再分别加入 1 mL 5% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,振荡均匀,置于沸水浴加热 15 min 后取出,冰浴 15 min,于 490 nm 下测定吸光度,以蒸馏水代替葡萄糖溶液作为对照测定吸光度<sup>[11]</sup>。

用蒸馏水溶解多糖,定容至 250 mL。取 1 mL

多糖溶液于试管中,分别加入 1 mL 5% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,然后按上述方法测定发酵液中的多糖含量。

1.2.1.3 多糖硫酸化修饰 将附有冷凝装置和搅拌(磁力搅拌)的三颈烧瓶置于冰盐浴中,加入 24 mL 吡啶,较为剧烈地搅拌,充分冷却后,于 40 min 内边搅拌边逐滴加入 3 mL 氯磺酸,至出现大量淡黄色固体,即酯化试剂。

称取 0.400 g 多糖,混溶于 35 mL DMF 中,倒入酯化试剂中,80℃水浴 3 h。将反应液倒入 100 mL 冰水中,用 15% 的 NaOH 中和至 pH 值 7.0 左右,加入 3 倍体积的无水乙醇,静置 24 h,离心得沉淀,用热水溶解沉淀后,用蒸馏水透析 72 h,冷冻干燥,得秀珍菇发酵胞外多糖硫酸酯<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.2 多糖硫酸酯的表征

1.2.2.1 硫酸基含量的测定 分别吸取 0.6 g/L  $\text{K}_2\text{SO}_4$  溶液 0.08、0.16、0.24、0.32、0.40 mL,加入 1 mol/L HCl 溶液补充至 0.40 mL,继续依次加入 3% TCA 溶液 7.6 mL、 $\text{BaCl}_2$ -明胶溶液 2 mL 于试管中,振荡摇匀,室温下静置 15 min,于 360 nm 波长处测定吸光度,得  $A_1$  值,再以 0.5% 的明胶溶液代替  $\text{BaCl}_2$ -明胶溶液,依上述方法操作测定其 360 nm 处的吸光度,得  $A_2$  值,以硫酸基的浓度为横坐标,以  $(A_1 - A_2)$  的值为纵坐标作图,得硫酸基的标准曲线图。其中每个浓度做 3 次平行,取其平均值<sup>[13]</sup>。

称取秀珍菇发酵胞外多糖硫酸酯 50 mg 于容量瓶中,以 1 mol/L 的 HCl 溶液溶解,并定容至刻度,置于沸水浴上水解 3 h。按照标准曲线制作方法测定吸光度,由回归方程计算其硫酸基含量。

$$\text{取代度计算公式: } DS = \frac{1.62 \times S \times 100\%}{32 - 1.02 \times S \times 100\%},$$

其中,DS—取代度;S—含硫量。

1.2.2.2 红外光谱分析 分别取秀珍菇发酵胞外多糖及其硫酸酯样品各 1 mg,与 KBr 研匀压片,于 4000~500  $\text{cm}^{-1}$  的红外区进行扫描,得到其红外光谱图<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.3 多糖及其硫酸酯的抗氧化活性测定

1.2.3.1 清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )活性 采用水杨酸法测定秀珍菇发酵胞外多糖及其硫酸酯清除  $\cdot\text{OH}$  的能力,反应体系中含 2 mL 8.8 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、2 mL 9 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$ 、2 mL 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液,不同质量浓度的试验样品 2 mL。最后加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  启动反应,37℃反应 30 min,以蒸

馏水调零,在 510 nm 下测定吸光度。为了清除样品溶液本身颜色对测定的干扰,同时以蒸馏水代替  $H_2O_2$  进行测定<sup>[15]</sup>。按下式计算  $\cdot OH$  清除率:  
 $\cdot OH$ 清除率 $=[A_0-(Ax-Ax_0)/A_0]\times 100\%$ ,式中, $A_0$  为空白对照液的吸光度, $Ax$  为加入样品后的吸光度, $Ax_0$  为不加显色剂  $H_2O_2$  的样品溶液本底的吸光度。

1.2.3.2 清除  $\cdot DPPH$  活性 采用 DPPH 法测定秀珍菇发酵胞外多糖及其硫酸酯清除  $\cdot DPPH$  的能力,将 2 mL 样品溶液及 2 mL 0.1 g/L DPPH 的 50%乙醇溶液先后加入试管中,摇匀,以 50%乙醇溶液为空白在 517 nm 波长下测定其吸光度  $A_i$ ;将 2 mL 0.1 g/L DPPH 的 50%乙醇溶液及 2 mL 蒸馏水混合,摇匀,以 50%乙醇溶液为空白在 517 nm 波长下测定其吸光度  $A_0$ ;将 2 mL 样品溶液及 2 mL 50%乙醇混合,摇匀,25℃放置 1 h,以 50%乙醇溶液为空白在 517 nm 波长下测定其吸光度  $A_j$ <sup>[16]</sup>。按下式计算  $\cdot DPPH$  的清除率: $\cdot DPPH$  清除率 $=[1-(A_i-A_j)/A_0]\times 100\%$ 。

1.2.4 多糖及其硫酸酯的抑菌活性测定 分别挑取已活化好的菌种放入细菌液体培养基中,置于 37℃ 恒温振荡摇床培养 24 h。取 1 g 样品于 10 mL 细菌液体培养基中,充分摇匀,即得质量浓度为 100 g/L 的溶液。将 100 g/L 样品溶液分别稀释成 25、12.5、6.25、3.125、1.563 g/L 系列质量浓度溶液。每个质量浓度的溶液取 10 mL 于试管中,接种 100  $\mu L$  菌悬液,摇匀后置于 37℃ 恒温振荡摇床培养 24 h,每个质量浓度做 3 次平行。每个质量浓度的溶液另取 10 mL 于试管中,但不接种任何菌,作为空白对照。另取 10 mL 基础细菌液体培养基于试管中,分别接种 3 种不同的细菌,每种细菌做 3 次平行。于 560 nm 波长处测定试验组与对照组的 OD 值<sup>[17]</sup>。

根据下列公式计算抑菌率: $R=[A-(B-C)]/A\times 100\%$ ,式中: $R$ —抑菌率; $A$ —基础细菌液体培养基细菌 OD 值; $B$ —样品组 OD 值; $C$ —空白对照组 OD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖含量测定结果

以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,如图 1 所示。由葡萄糖标准曲线得到线性方程: $y=8.7843x-0.0023$ , $R^2=0.9976$ ,根据此线性方程得出秀珍菇发酵胞外多糖含量为 17.0 g/L。

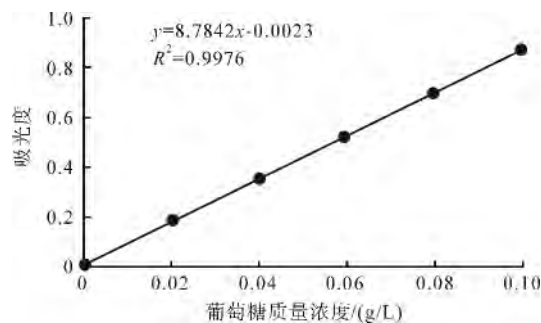


图 1 葡萄糖标准曲线

### 2.2 多糖硫酸酯硫酸基含量测定结果

硫酸基含量的标准曲线如图 2 所示,线性关系良好,线性回归方程为: $y=0.0097x+0.3772$ , $R^2=0.9978$ 。采用硫酸钡比浊法测定秀珍菇多糖硫酸酯的硫酸基含量为 15.4%,取代度为 1.53。

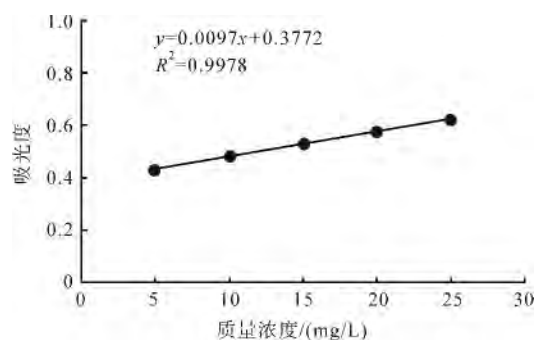


图 2 硫酸基的标准曲线

### 2.3 红外光谱结果分析

对秀珍菇发酵胞外多糖及其硫酸酯进行红外光谱检测得到红外光谱图,如图 3 所示。由图 3 可以看出,秀珍菇多糖红外图谱在  $3400\text{ cm}^{-1}$  左右出现的一组特征宽吸收峰是糖类 O—H 的伸缩振动引起的,可知羟基不是游离存在的,而是缔合在分子之间; $3000\sim 2800\text{ cm}^{-1}$  的一组峰是 C—H 的伸缩振动,这个区域的吸收峰是糖类的特征吸收峰; $1662.87\text{ cm}^{-1}$  处吸收峰是由 C=O 非对称伸缩振动

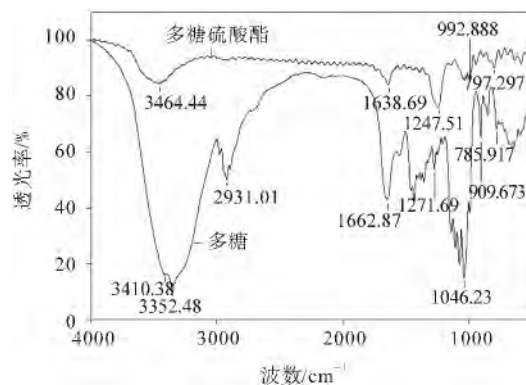


图 3 秀珍菇发酵胞外多糖及其硫酸酯红外光谱

引起,推断秀珍菇多糖含有羧基或糖醛基,可能含有一COOH;1 271.69  $\text{cm}^{-1}$ 处吸收峰是由C=O对称伸缩振动引起,表明其含有一COOH基团,该多糖是一种酸性多糖;785.917  $\text{cm}^{-1}$ 处微弱的吸收峰是吡喃糖对称环伸缩振动的结果。综上所述,秀珍菇多糖可能是一种含有吡喃糖的酸性多糖<sup>[18]</sup>。

对比未修饰的秀珍菇多糖的红外光谱图可见,硫酸化修饰后的大部分特征吸收峰都发生不同程度的移动,这说明多糖分子中有新基团引入。秀珍菇多糖硫酸酯除了保留多糖母体特征吸收峰之外,在1 247.51  $\text{cm}^{-1}$ 出现S=O特征吸收峰,表明有硫酸基存在,1 046.23  $\text{cm}^{-1}$ 附近的C—O伸缩振动吸收明显减弱,说明多糖硫酸酯的硫酸基含量增多,同时797.297  $\text{cm}^{-1}$ 左右的吸收峰为C—O—S的拉伸振动,这些都是硫酸酯键的特征吸收峰<sup>[19]</sup>,表明硫酸基

已与秀珍菇多糖结合为酯,硫酸化修饰成功。

## 2.4 多糖及其硫酸酯的抗氧化活性测定结果

图4A表明,随着秀珍菇发酵胞外多糖溶液质量浓度的增加(0~6 g/L),其清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力均匀增加,呈现一定的相关性;秀珍菇发酵胞外多糖硫酸酯比相同质量浓度下多糖清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力强,可能是多糖引入了硫酸基,取代了原多糖链上的羟基,改变了多糖的空间构象,从而使其活性改变<sup>[20]</sup>。图4B表明,随着秀珍菇发酵胞外多糖和多糖硫酸酯溶液质量浓度的增加(0~6 g/L),二者清除 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基的能力都均匀增加,呈现一定的相关性,且多糖硫酸酯的清除能力较多糖强,硫酸基的引入引起多糖构象变化,可能这是导致其生物活性差异的重要原因之一,使酯化后的多糖性质有所不同。

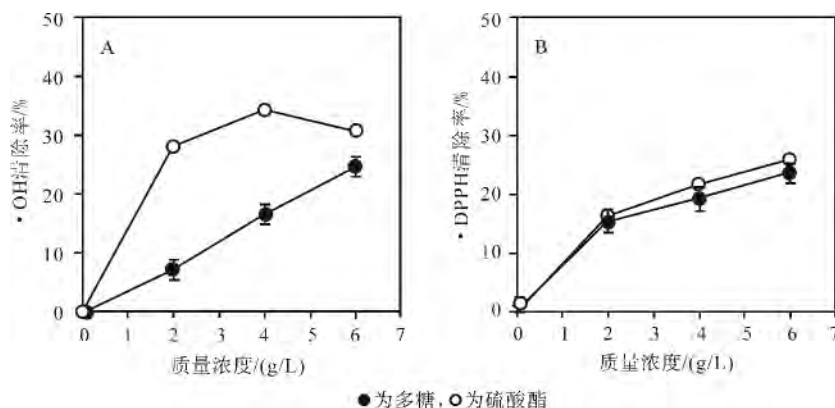


图4 秀珍菇多糖及其硫酸酯的抗氧化活性

## 2.5 多糖及其硫酸酯的抑菌活性测定结果

图5表明,秀珍菇发酵胞外多糖硫酸酯对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌均有较好的抑菌活性。在一定的质量浓度范围内,随着秀珍菇发酵胞外多糖硫酸酯质量浓度的增加(0~25 g/L),其抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌3种细菌的能

力迅速增强,其质量浓度在25 g/L时,对3种细菌的抑制率均达到95%左右。秀珍菇多糖分子链上羟基连接上硫酸基团,导致负电荷增加,通过静电作用与细菌细胞膜表面结合,可能改变了细菌细胞的电导率和介电常数,从而影响细菌细胞的信号传导,进而影响细菌的生长发育<sup>[21]</sup>。

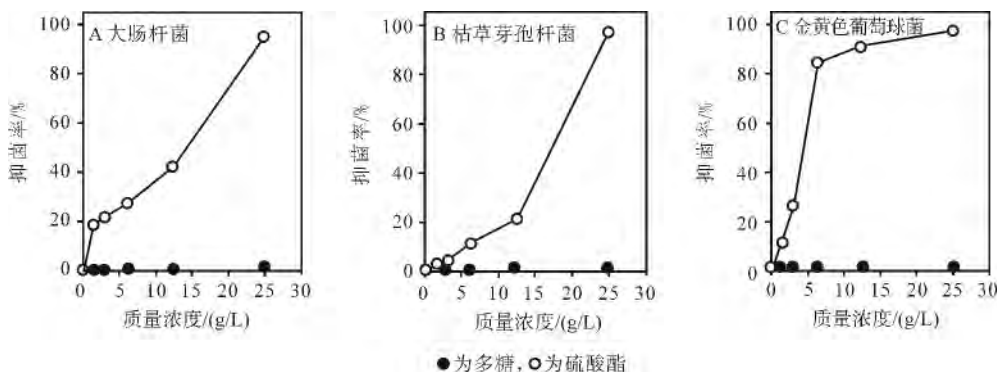


图5 秀珍菇多糖及其硫酸酯的抑菌活性

### 3 结论与讨论

用水提醇沉法从秀珍菇发酵液中提取胞外多糖,纯化后冷冻干燥得到秀珍菇多糖,采用氯磺酸-吡啶法对其进行硫酸酯化修饰,得到秀珍菇硫酸酯硫酸基含量为 15.4%,取代度为 1.53。用红外光谱技术分析秀珍菇多糖修饰前后可能含有的化学键或官能团,结果证明秀珍菇多糖硫酸酯化成功。通过比较分析秀珍菇发酵胞外多糖及其硫酸酯的抗氧化活性发现,在相同试验浓度下,秀珍菇多糖硫酸酯的抗氧化活性、抑菌活性高于多糖,试验取得了预想的结果。徐静静等<sup>[2]</sup>采用氯磺酸-吡啶法对竹荪多糖进行硫酸化修饰后发现,硫酸酯竹荪多糖的抗氧化活性高于未经修饰的竹荪多糖,与本试验结果相同。

秀珍菇胞外多糖提取方法简便,因此多糖硫酸化原料来源丰富,对秀珍菇多糖硫酸酯的大量生产有着重要意义,同时秀珍菇多糖硫酸酯所表现出的抗氧化活性和抑菌活性等生物活性有着较高的应用价值,在医疗和制药领域将会有长远的发展。但秀珍菇硫酸酯是否具有抗肿瘤、抗病毒等方面的活性,还需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 张萍,李静,吕兴萍,等. 赤灵芝多糖硫酸酯化初步研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(1):211-213.
- [2] 徐静静,付海田,邓超,等. 水不溶性竹荪多糖硫酸酯的制备及抗氧化研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(10):277-279.
- [3] Cinthia B S Telles, Diego A Sabry, Jailma Almeida-Lima, et al. Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom *Pleurotus sajorajju* alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties *in vitro* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011(85):514-521.
- [4] 邓成华,杨祥良,王雁,等. 硫酸酯化及羧甲基化虎奶多糖的抗病毒作用[J]. 中国地方病学杂志,2000,19(4):251-253.
- [5] 卯晓岚. 我国常见常用食用菌名称[J]. 中国食用菌,2002(5):24-26.
- [6] 高云超,吴娱明,廖森泰,等. 桑枝栽培秀珍菇试验[J]. 广东农业科学,2011,38(18):1-2.
- [7] 王晓丹. 秀珍菇反季节栽培技术[J]. 食药菌,2012(5):23.
- [8] 陈胜昌,李发勇,陈敬虎. 秀珍菇品种(菌株)筛选试验[J]. 食用菌,2013(2):23-24.
- [9] 刘志忠,程长标,叶菊馨. 秀珍菇不同菌株栽培比较试验[J]. 食用菌,2013(3):27-28.
- [10] 齐慧玲,魏绍云,王继伦,等. Sevag 法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工,2000(3):20-21.
- [11] 来永斌,王琦,孙月. 蛹虫草多糖含量的测定与分析[J]. 中成药,2001(7):517-518.
- [12] 刘菊秋. 蛹虫草多糖的硫酸酯化改性研究[J]. 吉林林业科技,2012,41(4):14-16.
- [13] 丛建波,王长振,李妍,等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定——硫酸钡比浊法研究[J]. 解放军药学学报,2003,19(3):181-183.
- [14] 张萍,李静,凡军民,等. 赤灵芝多糖硫酸酯化初步研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(1):211-213.
- [15] 陈留勇,孟宪军,贾薇,等. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究[J]. 食品科学,2004,25(1):167-170.
- [16] 孙存普. 自由基生物学导论[M]. 合肥:中国科技大学出版社,1999:236.
- [17] 苏玲,宋慧,薛强,等. 灵芝发酵液浸膏多糖对大肠杆菌生长抑制效果的观察[J]. 吉林农业大学学报,2008,30(3):276-278.
- [18] 沈晓云,李兆兰. 冬虫夏草与虫草菌丝有效成分分析比较[J]. 山西大学学报:自然科学版,1998,21(1):80-85.
- [19] 申进文,余海尤,戚元成,等. 硫酸化分级香菇多糖抗氧化活性研究[J]. 菌物学报,2010,29(3):449-453.
- [20] 邓成华,杨祥良,王雁,等. 取代度对硫酸酯化虎奶多糖抗氧化活性的影响[J]. 华中理工大学学报,2000,28(5):104-107.
- [21] Yeung T, Gilbert G E, Shi J, et al. Membrane phosphatidyl serine regulates surface charge and protein localization[J]. Science, 2008,319(11):210-213.