

香菇多糖磷酸化修饰工艺条件的研究*

张 难^{1,2}, 吴远根^{1,3}, 莫莉萍⁴, 邱树毅^{1,3}, 王文平^{1,3}

1(贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州贵阳, 550003) 2(贵州大学生命科学学院, 贵州贵阳, 550025)

3(贵州大学化学工程学院, 贵州贵阳, 550003) 4(贵阳市生产力促进中心, 贵州贵阳, 550002)

摘 要 研究了制备磷酸化香菇多糖的工艺条件。通过单因素实验, 考察磷酸化试剂、温度、时间、pH 值对修饰后香菇多糖磷酸根接枝量、粘度的影响, 确定最佳磷酸化工艺条件为: 质量分数分别为 5% 三聚磷酸钠(STPP)和 2% 三偏磷酸钠(STMP)混合液作为磷酸化试剂, 温度 90℃, 时间 5 h, pH 9.0, 所得磷酸化香菇多糖衍生物的磷酸根接枝量为 6.826%。红外光谱分析结果证实, 修饰后的香菇多糖含有磷酸酯基团。粘度测定表明, 香菇多糖经磷酸化修饰后的粘度基本没有变化。

关键词 磷酸化, 香菇多糖, 工艺优化

微生物多糖主要由细菌、酵母菌、霉菌产生, 故可分为细菌多糖和真菌多糖^[1]。真菌多糖作为药物研究始于 1950 年代, 在 1960 年代以后成为免疫促进剂而引起人们兴趣^[2]。香菇多糖(Lentinan, LNT)就是研究得较透彻的多糖之一, 香菇(*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) 是侧耳科(*Pleurotaceae*)的担子菌, 世界名贵食用兼药用菌之一, 其化学结构属于吡喃葡聚糖。现代研究证明, 香菇多糖具有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能和刺激干扰素形成等功能^[3]。

已完成的研究证实, 多糖的活性直接或间接地受其分子结构的影响, 采取一定的方法对多糖分子结构进行修饰, 可以提高或赋予多糖活性、降低其毒副作用^[4]。目前对多糖进行修饰的常见方法有硫酸化、磷酸化、乙酰化、烷基化、磺酰化、羧甲基化等^[4,5], 其中硫酸化修饰香菇多糖是研究得较为成熟的一种方法^[6]。香菇多糖经硫酸化修饰后, 其抗肿瘤、抗凝血和免疫调节作用得到很大提高^[7], 而且具有了较明显的抗艾滋病毒的效果^[8], 可抑制 HIV-1 产生的病变^[8]。多糖的磷酸化分子修饰是一种共价修饰, 是支链上的羟基被磷酸根取代的过程^[9]。目前关于香菇多糖磷酸化修饰方面的报道很少, 文中采用混合磷酸盐试剂对香菇多糖进行磷酸化修饰, 并对其工艺条件进行了初步的研究, 旨在获得磷酸化香菇多糖的最大接枝量, 从而为香菇多糖资源的开发利用, 以及开发新的保健因子、功能性食品或药品等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

香菇多糖(纯度 40%), 由上海康舟真菌多糖有限公司提供。

三聚磷酸钠(STPP)和三偏磷酸钠(STMP), 购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易公司; D-101 大孔树脂, KH_2PO_4 (优级纯), 三羟甲基氨基甲烷, MgCl_2 , HCl , NaOH , Vc , H_2SO_4 , 钼酸铵, 均为市售分析纯试剂。

1.2 实验仪器

TDL-40B 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; DZKY-4 电子恒温水浴锅, 上海科析仪器厂; CH-250 型超声波清洗机, 北京创新德超声波研究所; pH-S-25 型酸度计, 上海伟业仪器厂; 81-2 型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; NDJ-1 型旋转式粘度计, 上海天平仪器厂; DZF-0 型真空干燥箱, 上海跃进医疗器械厂; SHZ-III D 型循环水真空泵, 上海亚荣生化仪器厂; DDS-11A 电导率仪, 上海虹益仪器仪表有限公司; UV-2550 紫外分光光度计, 日本岛津公司; OSB-1000 恒温水浴槽、N-1000 真空旋转蒸发仪, YOKYO RIKAKIAI 有限公司; ALPHA1-4 冷冻干燥机, 德国博励行仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 反应样液的制备

称取一定量的香菇多糖[料水比 1 : 15 (g : mL)]于 50℃ 水浴放置 10 min, 超声充分溶解, 离心 2 次除杂, 每次离心时间 10 min, 转速 3 000 r/min。再用大孔树脂搅拌脱色 2 次, 每次搅拌 1 h, 对脱色后的样液进行 2 次离心, 抽滤, 滤液备用。

1.3.2 磷酸化反应

第一作者: 硕士研究生(邱树毅教授为通讯作者)。

* 贵州省优秀人才省长基金, 贵州省自然科学基金(No. 19993105)

收稿日期: 2007-07-17, 改回日期: 2007-11-13

向反应样液中加入磷酸化试剂和质量分数为5%的 Na_2SO_4 (减少反应时的起泡现象),调pH值后,在一定温度下反应。反应后样液用3倍体积的体积分数为95%乙醇沉淀24 h,将醇沉多糖在30℃下真空干燥,除去残留的乙醇,再于50℃水浴中复溶,然后将复溶后的溶液放入透析袋(截流分子质量为14 000 u)中透析,并测定透析前后电导率的变化。当电导率从最初的 $>1 \times 10^4$ us/cm减少到160 us/cm左右时,停止透析。最后将反应液置于真空条件下浓缩至适量体积后,冷冻干燥12 h,得到香菇多糖磷酸化衍生物。

1.3.3 磷酸酯的定性

红外光谱法,常规溴化钾混合压片法。

1.3.4 样品磷酸根的定量测定

参考文献[10],并根据该实验的具体情况做了少量修改。

1.3.4.1 磷酸根标准曲线的绘制

(1) tris缓冲溶液的配制:称取3.6 g三羟甲基氨基甲烷(又名tris试剂)和120 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于水中,并用水稀释至300 mL,用1 mol/L HCl调节溶液pH值为7.0。

(2) 定磷试剂的配制:分别取相同体积的质量分数为20%的Vc水溶液、3 mol/L H_2SO_4 溶液和3%钼酸铵溶液,混合均匀,得到定磷试剂。

(3) 磷酸盐标准溶液的配制:准确称取0.716 5 g KH_2SO_4 溶于水中,将其移入1 000 mL容量瓶中,加去离子水至刻度,摇匀。吸取10.0 mL上述溶液,用水稀释至500 mL,摇匀后备用。此溶液相当于每毫升10 μg 的磷酸盐(PO_4^{3-})。

(4) 标准曲线的绘制:准确吸取磷酸根标准溶液0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5和5.0 mL,分别移入25 mL比色管中,各管加去离子水至总体积5 mL,加入tris缓冲液3 mL,摇匀后加入3 mL定磷试剂,然后在45℃恒温水浴中加热30 min,取出后在580 nm处测定光密度,以磷酸根浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,如图1所示。

1.3.4.2 磷酸根含量的测定

(1) 样品处理:称取样品0.50 g,先用小火加热除去残留水分,再于600℃高温下进行灰化。用0.5 mL V(蒸馏水):V(HCl)=1:1的HCl液对灰化残渣进行溶解,再用水将其移入10 mL容量瓶中,测定时吸取此溶液0.5 mL,移入10 mL容量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,为测定样品中磷酸根含量用。

(2) 磷酸根的测定:分别吸取灰化溶液1 mL置于25 mL比色管中,然后按标准曲线绘制的操作方法测得光密度,并从下列公式中求出磷酸根含量。

$$\text{磷酸根含量}/\% = \frac{0.2175 \times A - 0.0075}{S} \times 100$$

式中:A为样品在580 nm处测得的吸光度;S为样品的质量(g)。

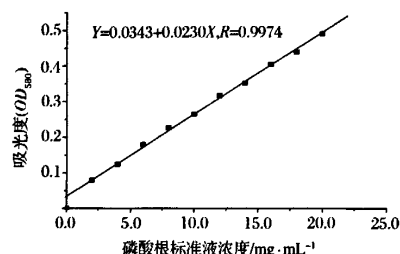
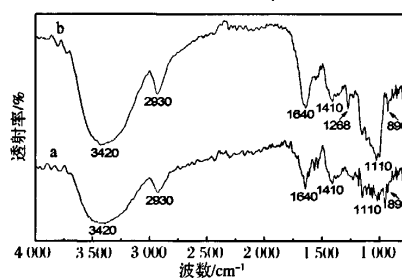


图1 磷酸根标准曲线

2 结果与讨论

2.1 磷酸化修饰前后的红外光谱图分析

磷酸化修饰前后的香菇多糖,在吸收波形、波数、吸收峰强度、峰宽等指标上十分接近。在1 110、890 cm^{-1} 处的C=O, C-H的伸缩振动表明,被修饰的香菇多糖属于吡喃葡聚糖。在2 930 cm^{-1} 处的一 CH_2 的伸缩振动,1 640 cm^{-1} 处的C=O的伸缩振动,1 410 cm^{-1} 处的C-O的伸缩振动,在修饰前后均没有发生明显变化,说明修饰产物本身的结构没有被破坏,保持了香菇多糖原有的性质。



a—未磷酸化的香菇多糖,b—磷酸化的香菇多糖

图2 香菇多糖和磷酸化香菇多糖的红外图谱

磷酸化香菇多糖的红外光谱显示了2个特征吸收带,一个在1 268 cm^{-1} 的是由于P=O伸缩振动引起的,另一个在1 110~980 cm^{-1} 的是由于P-O-C伸缩振动引起,出现了1个较宽的峰。此外,在3 420 cm^{-1} 处磷酸化香菇多糖较修饰前有明显的增强,这是因为接枝的磷酸根带有2个羟基,增加了羟基的数量,而进一步增加了其水溶性,提高了活性物质的吸

收。以上数据证明了磷酸根已被接枝到香菇多糖上。

表 1 香菇多糖和磷酸化香菇多糖的红外表征数据

吸收峰/cm ⁻¹	归属
3 420	—OH
2 930	—CH ₂
1 640, 1 110	C=O
1 410	C—O
890	C—H
1 268	P=O
1 110~980	P—O—C

2.2 单因素实验工艺优化

香菇多糖本身含有较多的矿物元素,为了提供香菇多糖磷酸化修饰后磷酸根接枝量的对照依据,本研究在考察单因素实验前,首先测定了未经磷酸化修饰的香菇多糖的磷酸根含量和粘度,其值分别为:1.494%,4.83 mPa·s。

2.2.1 磷酸化试剂对磷酸化修饰的影响

在 pH 值 6.0、常温反应 1.5 h,加入等量质量分数为 5%Na₂SO₄ 的条件下,选用不同的磷酸化试剂,对香菇多糖进行磷酸化修饰,得到修饰后的不同磷酸根含量,结果如表 2 所示。

表 2 磷酸化试剂对磷酸根接枝量的影响

序号	磷酸化试剂	试剂反应量/%	磷酸根含量/%
1	STPP	7	2.013
2	STMP	7	1.867
3	STPP+ STMP	1+6	1.946
4	STPP + STMP	2+5	2.182
5	STPP + STMP	3+4	2.073
6	STPP + STMP	4+3	2.186
7	STPP + STMP	5+2	2.199
8	STPP + STMP	6+1	2.014

由表 2 可知,混合使用三偏磷酸钠和三聚磷酸钠的接枝效果优于单独使用这 2 种试剂的效果。这可能是 2 种试剂共同作用,可以在接枝反应中起到相互催化、互补的作用。然后选取 6 种不同比例的磷酸化试剂进行反应,考察对磷酸根含量的影响。从表 2 得知,不同比例混合的磷酸化试剂对接枝量的影响不显著。其中,选择质量分数分别为 5%三聚磷酸钠和 2%三偏磷酸钠的混合试剂作用香菇多糖,可达到较佳的接枝效果,磷酸根含量为 2.199%。因此,选取质量分数分别为 5%STPP 和 2%STMP 混合试剂,作为修饰香菇多糖的磷酸化试剂。

2.2.2 反应温度对磷酸化修饰的影响

反应温度是影响磷酸根含量的重要因素。使用质量分数分别为 5%三聚磷酸钠和 2%三偏磷酸钠的

混合试剂,加入等量质量分数为 5%Na₂SO₄,保持反应 pH 值 6.0,反应时间 2 h 不变,考察反应温度对香菇多糖磷酸根接枝量和反应后粘度的影响,结果如图 3 所示。

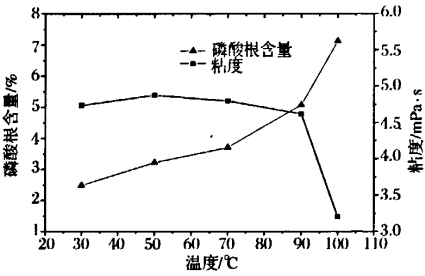


图 3 反应温度对磷酸根接枝量及粘度的影响

磷酸根含量随温度的增加而逐渐增多,磷酸根含量从 30℃ 的 2.480% 增加到 100℃ 的 7.188%,且接枝量跟随温度变化较为显著。反应温度越高,接枝量越大,这可能是因为能量升高,使高分子键的活性增强,磷酸化试剂的利用率也会随之增加。这与文献[11]的结论相一致。

另一方面,随着磷酸化反应温度的升高,香菇多糖的粘度出现了明显的变化。在低温反应阶段,由于香菇多糖长期浸渍于水中,致使多糖部分分子开始膨胀,从而使粘度增加,所以粘度从 30℃ 的 4.74 mPa·s 上升到 50℃ 的 4.88 mPa·s。在高温反应阶段,由于反应温度逐渐升高,导致多糖的部分糖苷键开始断裂,分子质量减小,所以粘度逐渐降低。但当温度升到 90℃ 时,粘度下降出现一个较明显的拐点,粘度从 90℃ 的 4.62 mPa·s 急剧下降到 100℃ 的 3.20 mPa·s,比反应的最初粘度降低了 47.98%,这说明当温度升至 90℃ 时,多糖分子结构开始了较快的分解。考虑到磷酸根接枝量和多糖分子分解的综合因素,故选取反应温度 90℃ 作为磷酸化修饰的最佳反应温度,此时香菇多糖中磷酸根含量为 5.067%,粘度为 4.62 mPa·s。

2.2.3 反应时间对磷酸化修饰的影响

反应时间也是一个重要因素。使用质量分数分别为 5%三聚磷酸钠和 2%三偏磷酸钠的混合试剂,加入等量质量分数为 5% Na₂SO₄,保持反应 pH 值 6.0,反应温度 90℃ 不变,考察反应时间对香菇多糖磷酸根接枝量和反应后粘度的影响,结果如图 4 所示。

当反应时间为 5 h 时,磷酸根含量最高,达到 7.018%。磷酸根含量随着反应时间的延长而逐渐增

加,这可能是延长反应时间,使接枝更充分的缘故。但当反应时间超过 5 h 后,接枝量出现了缓慢的下降趋势,其原因可能是因为香菇多糖在较高的温度下长时间反应,致使多糖产生了焦化作用,从而使磷酸根接枝率下降,这一结论与罗儒显等人^[12,13]在淀粉磷酸化时的结论相似。

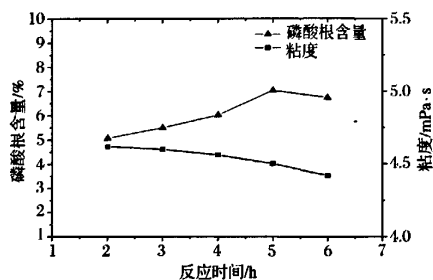


图4 反应时间对磷酸根接枝量及粘度的影响

另外,从图4可知,香菇多糖在 90℃ 条件下接枝反应,反应时间越长,粘度越趋于降低。但在 90℃ 反应条件下,时间对粘度的影响并不明显,反应 2 h 后的粘度为 4.62 mPa·s,只比 5 h 多了 2.6%。所以,在此反应条件下,主要考虑磷酸根的接枝量,选择最佳反应时间为 5 h,此条件下磷酸根含量为 7.018%,粘度为 4.50 mPa·s。

2.2.4 反应 pH 值对磷酸化修饰的影响

使用质量分数分别为 5% 三聚磷酸钠和 2% 三偏磷酸钠的混合试剂,加入等量质量分数为 5% Na_2SO_4 ,保持反应温度 90℃,反应时间 5 h 不变,考察反应 pH 值对香菇多糖磷酸根接枝量和反应后粘度的影响,结果由图 5 所示。

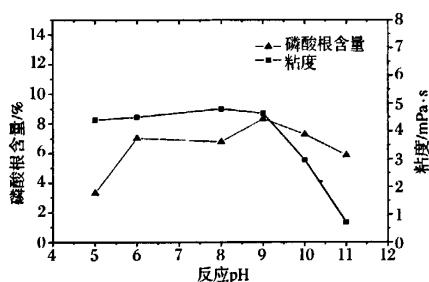


图5 反应 pH 值对磷酸根接枝量及粘度的影响

反应 pH 值对香菇多糖磷酸根接枝量有较显著的影响。在 pH 值为 9.0 时,表现出了最大的磷酸根含量,达到 8.320%,这可能是由于在该条件下,pH 值 9.0 对磷酸化接枝反应的进行起到了催化作用,使磷酸盐更充分取代了多糖枝链上的羟基。多糖应避免在强酸或强碱的条件下反应,在 pH 值为 5.0 和

11.0 时,磷酸根含量最低,分别为 3.315% 和 5.858%,这可能是因为三聚磷酸钠和三偏磷酸钠在较低的 pH 值下不稳定,会分解成活性较低的焦磷酸钠和正磷酸钠,而 pH 值过高会对磷酸化试剂与多糖的酯化反应产生不良的影响。磷酸盐本身就是良好的缓冲液体系,所以当 pH 值变化时,接枝量才会有高低起伏的出现。

从图 5 可以看出,反应后香菇多糖的粘度在 pH 值 5.0~9.0 期间有轻微波动,其中 pH 值为 8.0 时最高,达到 4.80 mPa·s。从 pH 值 9.0 开始,粘度呈直线下降,最低点的粘度只有最高点的 15.0%。由实验结果可以得出,反应 pH 值对香菇多糖分子的降解有一定影响,在酸性条件下起伏较轻微,但是在碱性条件下对香菇多糖影响尤为明显。综合磷酸根接枝量和粘度的变化,确定反应 pH 值 9.0 为宜,此时磷酸根含量为 8.320%,粘度为 4.64 mPa·s。

3 结论

通过单因素实验,初步得出香菇多糖磷酸化修饰的最佳工艺条件,即磷酸化试剂采用质量分数分别为 5% 三聚磷酸钠和 2% 三偏磷酸钠的混合试剂,反应温度 90℃,反应时间 5 h,反应 pH 值 9.0。在该工艺条件下,除去空白对照的磷酸根含量 1.494% 和粘度 4.83 mPa·s,香菇多糖经磷酸化分子修饰后,磷酸根接枝量达到了 6.826%,此时粘度仅降低了 3.93%。说明在该条件下,香菇多糖不仅提高了磷酸根含量,而且多糖分子几乎没有被降解。实验的初步研究结果为今后香菇多糖磷酸化衍生物在保健因子、功能性食品或药品领域中的应用提供了依据,其理化性质及生物活性将另文报道。

参考文献

- 赵振刚,陈山,卢家炯. 凝胶多糖的研究及其应用[J]. 食品与发酵工业,2005,26(4):63~672
- 罗伟,李东. 香菇多糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业,2005,26(4):63~67
- 黄桂萍,肖红,张敏生,等. 微波技术提取香菇多糖的研究[J]. 食品科学,2006,27(11):267~269
- 王兆梅,李琳,郭祀远,等. 多糖结构修饰研究进展[J]. 中国医药工业杂志,2002,33(12):616~620
- 赖萍,林跃鑫. 天然多糖分子修饰研究进展[J]. 生命的化学,2003,23(3):183~187
- Kaneko Y, Yoshida O, Nagasawa R, et al. Inhibition of HIV-1 infectivity with curdlan sulfate *in vitro* [J]. Biochem Pharmacol, 1990, 39:793~797

- 7 范曼芳,陈琼华. 褐藻淀粉和褐藻淀粉硫酸酯的制取,分析及生物活性比较[J]. 中国药科大学学报,1998,19(1): 30~34
- 8 Yoshida O, Nakashima H, Yoshida T, et al. Sulfation of the immune o modulating polysa — ccharide lentinan: A noval strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV) [J]. Biochem Pharm, 1998, 37 (7):2 887~ 2 889
- 9 Andreas Blennow, Spren B. Engelsen, Tom H. Nielsen, et al. Starch phosphorylation: a new front line in starch research[J]. TRENDS in Plant Science,2002,7(10),445~ 450
- 10 黄伟坤. 食品检验与分析(第5版)[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000. 185~187
- 11 伍焜贤,张歧荣,甘伟民. 双变性淀粉磷酸酯的合成与性能研究[J]. 广东化工,1995,(1):27~29
- 12 罗儒显. PS— I 型阴离子淀粉的研制[J]. 五邑大学学报,1997,11(1):24~28
- 13 周家春,张达力,曾瀚权. 淀粉磷酸化及其抗冷冻脱水的研究[J]. 广州食品工业科技,1999,16(1):43~45

Study on the Optimal Phosphorylation of Lentinan

Zhang Nan^{1,2}, Wu Yuangen^{1,3}, Mo Liping⁴,
Qiu Shuyi^{1,3}, Wang Wenping^{1,3}

1(Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, Guizhou University, Guiyang, 550003, China)

2(College of Life Science, Guizhou University, Guizhou 550025, China)

3(College of Chemical Engineering, Guizhou University, Guizhou 550003, China)

4(Guiyang Productivity Promotion Center, Guizhou 550002, China)

ABSTRACT According to the graft quantity of phosphate and viscosity in the modified lentinan, the effect of phosphorylated reagents, temperature, time and pH value on the phosphorylation of lentinan were analyzed in this paper. The result indicates when reagent are 2% sodium trimetaphosphate (STMP) and 5% sodium tripolyphosphate (STTP), temperature is 90℃, time is 5 h, pH value is 9, the graft quantity of phosphate in the modified lentinan is the highest, arriving at 6.826%, and the viscosity of phosphorylated lentinan does not decline significantly compared to control. The IR analysis testified that the phosphorylated lentinan were grafted with phosphate groups.

Key words phosphorylation, lentinan, optimization

(上接第 62 页)

Study on the Function of the Saponin from *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb

Cheng Chao¹, Qin Enhua¹, Zhu Yuchang², Mo Kaiju^{1,2}

1(School of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

2(Hubei Key Laboratory of Biological Resource Conservation and Utilization,
Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

ABSTRACT The antioxidation effect and the antiseptic activity of the saponin from *Alaternanthera philoxeroids* (Mart.) were studied. The ABTS hydroxyl and ultra oxygen free radical were produced by the ABTS, Fe²⁺—H₂O₂ and antioxidation of pyrogallol. The antiseptic was probed by the filter paper. The antioxidation capability on ABTS free radical were improved with the increasing of saponin concentration. At low concentration, saponin accelerated the rate of hydroxyl free radical while high concentration inhibited the rate in a fair relationship. As far as the ultra oxygen free radical, saponoin inhibition ability was increased and then decreased with the concentration increase. Saponins also showed the ability to inhibit antibacterial such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus*.

Key words *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb, saponin, antioxidation, antiseptic