

平菇多糖硫酸酯制备工艺优化及抗氧化活性研究

Optimization of preparation technology and antioxidant activity of polysaccharide sulfate from *Pleurotus ostreatus*

梁 英^{1,2} 毕红梅¹ 郑文凤¹ 毕洪梅¹ 李志江^{2,3}

LIANG Ying^{1,2} BI Hong-mei¹ ZHENG Wen-feng¹ BI Hong-mei¹ LI Zhi-jiang^{2,3}

(1. 黑龙江八一农垦大学理学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江八一农垦大学食品院, 黑龙江 大庆 163319;

3. 黑龙江省杂粮加工及质量安全工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

(1. College of Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

2. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319,

China; 3. Engineering Technology Research Centre of Coarse Cereals Processing and Quality Safety of

Heilongjiang Province, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

摘要:以取代度为考察指标,研究了浓硫酸加入量、反应温度和反应时间等因素对平菇多糖硫酸化的影响;在单因素的基础上,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优化平菇多糖硫酸酯的制备工艺条件;采用 FT-IR 光谱仪对平菇多糖和平菇多糖硫酸酯进行结构鉴定,并通过测定还原力、DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和羟自由基清除率探索了平菇多糖硫酸酯的抗氧化活性。结果表明:平菇多糖硫酸酯制备优化工艺条件为平菇多糖 1.00 g,浓硫酸加入量 10 mL,反应温度 60 °C,反应时间 90 min,该条件下平菇多糖硫酸酯的取代度为 0.48。FT-IR 光谱分析证明硫酸基与平菇多糖形成了平菇多糖硫酸酯。平菇多糖硫酸酯对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和羟基自由基的 IC_{50} (半数清除率)分别是 0.816, 1.882, 1.611 mg/mL;平菇多糖硫酸酯的还原力和对 3 种自由基的清除力均优于平菇多糖。说明平菇多糖经硫酸酯化后抗氧化能力增强。

关键词:平菇;多糖;硫酸酯化;制备工艺;光谱分析;抗氧化

Abstract: Taking substitution rate as an index, the effects of concentration of sulfuric acid, reaction temperature and reaction time on sulfation of *Pleurotus ostreatus* polysaccharides were studied

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(编号:LH2019B012);黑龙江优势特色学科资助项目(编号:黑教联[2018]4号);黑龙江省农垦总局资助项目(编号:HNK13KF-101-04)

作者简介:梁英,女,黑龙江八一农垦大学教授,博士。

通信作者:毕洪梅(1977—),女,黑龙江八一农垦大学副教授,博士。E-mail: hongmei_bi@126.com

收稿日期:2020-08-17

by concentrated sulfuric acid method. On the basis of single-factor results, the optimum preparation process of *P. ostreatus* polysaccharide sulfate was obtained by $L_9(3^4)$ orthogonal test. Secondly, the polysaccharide and sulfates of *P. ostreatus* polysaccharide were characterized by FT-IR spectrometer. Finally, the reductive power of V_C and the scavenging rates of DPPH radical, superoxide anion radical and hydroxyl radical were determined to explore the antioxidant activity of *P. ostreatus* polysaccharide sulfate. The optimum preparation process of polysaccharide sulfate of *P. ostreatus* was as follows: the mass of *P. ostreatus* polysaccharide was 1.00 g; the volume of sulfuric acid was 10 mL, reacting at 60 °C for 90 min, and the degree of substitution was 0.48. FT-IR spectrum results showed that sulfate group and *P. ostreatus* polysaccharide formed polysaccharide sulfate. The IC_{50} (scavenging rate) of polysaccharide sulfate from *P. ostreatus* were 0.816, 1.882 and 1.611 mg/mL for DPPH radical, superoxide anion radical and hydroxyl radical, respectively. The reductive power and scavenging ability to three free radicals of *P. ostreatus* polysaccharide sulfate were higher than those of polysaccharides, which suggested that *P. ostreatus* polysaccharide sulfate had a better antioxidant activity than that of polysaccharides.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; polysaccharide; polysaccharide sulfate; preparation process; spectral analysis; antioxidant activity

平菇又称白蘑,学名侧耳,属担子菌门下伞菌目侧耳科,是药食两用菌。平菇易于栽培,营养丰富且富含多糖^[1],是获取多糖物质的极好原料。据报道^[2-4],平菇多糖(*Pleurotus ostreatus* polysaccharides, POP)具有抗氧

化、抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、降血糖、降血脂和免疫调节等多种生物活性。但因水溶性较差,其生物活性的发挥受到了一定的限制。对多糖进行化学修饰,可有效地改变多糖的化学结构,从而改变多糖的理化性质,提高其生物活性^[5]。天然多糖硫酸酯和化学修饰后的多糖硫酸酯是目前研究较多的一大类多糖,硫酸酯化是多糖改性的最常用方法,已成为近年来研究的热点,受到很多学者们的极大关注^[6-8]。研究表明,多种食用菌多糖经硫酸化修饰后,不但提高了原多糖的水溶性,其抗氧化^[9-11]、抗肿瘤^[12-13]、抗病毒^[14]、抗凝血^[15]、降血脂^[16]、保护神经细胞^[17]等作用也明显增强。近年来,对多糖硫酸酯的合成、表征和生物活性的研究促进了多糖硫酸酯在食品工业和医药领域的应用^[18]。但对平菇多糖硫酸酯的制备及生物活性研究中国未见报道。

研究拟以从平菇子实体中提取的平菇多糖为原料,采用浓硫酸法对平菇多糖硫酸酯的制备工艺进行优化,鉴定平菇多糖硫酸酯的结构并考察其抗氧化活性。旨在为平菇多糖硫酸酯在药物和抗氧化保健功能性食品的开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

平菇多糖:纯度为 87.56%,实验室自制;

无水乙醇、浓硫酸、正丁醇、硫酸钾、三氯化铁、抗坏血酸、邻苯三酚、抗坏血酸、水杨酸、过氧化氢:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

三羟甲基氨基甲烷:生化试剂,美国 Sigma 公司;

DPPH:分析纯,美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

电子分析天平:ALC-310.3 型,上海精密科学仪器有限公司;

旋转蒸发器:RE-5299 型,巩义市黄山谷予华仪器厂;

紫外分光光度计:T6 新世纪型,北京普析通用仪器有限责任公司;

傅立叶变换红外光谱仪:Nexus 670FT-IR 型,美国 Thermo Nicolet 公司;

离心机:LXJ-IIB 型,上海安亭科学仪器厂;

恒温水浴锅:HWS24 型,上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 平菇多糖硫酸酯的制备 取一定体积的浓硫酸与 5 mL 含有 0.063 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的正丁醇溶液混合,置于三颈圆底烧瓶中,装上干燥管和搅拌器,冰浴冷却到 0℃,磁力搅拌 30 min,缓慢加入 1.00 g 平菇多糖,在一定温度下进行反应。反应结束后,离心(3 000 r/min, 10 min)分离,残留物用 5% NaAc 溶液中和,产物用重蒸水透析

24 h,然后加入 5 倍体积的无水乙醇沉淀,减压抽滤,用无水 CaCl_2 干燥,得到的白色晶体即为平菇多糖硫酸酯。

1.3.2 平菇多糖硫酸酯制备的单因素试验设计

(1) 浓硫酸加入量对平菇多糖硫酸酯取代度的影响:固定平菇多糖质量 1.00 g、反应时间 90 min、反应温度 20℃,浓硫酸加入量分别为 6, 8, 10, 12, 14 mL,按 1.3.1 进行操作并计算取代度值。

(2) 反应温度对平菇多糖硫酸酯取代度的影响:固定平菇多糖质量 1.00 g、浓硫酸加入量 10 mL、反应时间 90 min,反应温度分别为 20, 40, 60, 80, 100℃,按 1.3.1 进行操作并计算取代度值。

(3) 反应时间对平菇多糖硫酸酯取代度的影响:固定平菇多糖质量 1.00 g、浓硫酸加入量 10 mL、反应温度 20℃,反应时间分别为 30, 60, 90, 120, 150 min,按 1.3.1 进行操作并计算取代度值。

1.3.3 平菇多糖硫酸酯制备的正交试验设计 在单因素试验的基础上确定正交试验的因素水平,采用 $L_9(3^1)$ 表进行正交试验,对平菇多糖硫酸酯的制备工艺进行优化。

1.3.4 考察指标测定

(1) 硫酸基含量的测定及取代度计算:采用 BaCl_2 凝胶法^[19]测定硫酸基含量,以 K_2SO_4 溶液绘制标准曲线,在 360 nm 波长下测定吸光度,由回归方程计算硫酸基含量,再根据式(1)计算取代度。

$$D_s = \frac{1.62 \times S}{32 - 1.02 \times S}, \quad (1)$$

式中:

D_s ——取代度;

S ——硫含量, %。

(2) 红外光谱分析:称取 5 mg 的平菇多糖或平菇多糖硫酸酯与适量的 KBr 压片,用 FT-Iris5 型傅立叶变换红外光谱仪在 4 000~400 cm^{-1} 波数范围扫描,得到红外吸收光谱图进行分析,确定平菇多糖硫酸酯的合成情况。

(3) 相对还原力:参照文献^[20],以抗坏血酸作阳性对照,在 700 nm 处测定吸光度,每个样品重复 3 次,取平均值。吸光度越大,还原能力越强。

(4) 超氧阴离子自由基清除能力:采用邻苯三酚自氧化法^[20],以抗坏血酸作阳性对照,在 325 nm 处测定吸光度值,重复 3 次,取平均值。

(5) DPPH 自由基清除能力:参照文献^[20],以抗坏血酸作对照,在 517 nm 处测定吸光度值,重复测定 3 次,取平均值。

(6) 羟自由基的清除能力:采用 Fenton 反应体系^[20],以抗坏血酸作阳性对照,重复测定 3 次,取平均值。

1.4 数据处理

试验数据处理采用 SAS 9.1 软件,结果用(平均数

值±标准偏差)表示, $P<0.05$ 为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 平菇多糖硫酸酯制备工艺优化

2.1.1 单因素试验 由图 1(a)可知,随浓硫酸加入量的增大,取代度先增加,当硫酸加入量为 10 mL 时取代度最大(为 0.40),之后开始降低。可能是浓硫酸加入过多,放热过快造成多糖碳化,同时还会导致多糖部分降解的缘故。因此,浓硫酸最佳加入量为 10 mL。

由图 1(b)可知,反应温度在 20~60 ℃时,随温度升

高,取代度缓慢增加;当温度为 60 ℃时,取代度达到最高,为 0.47;当温度超过 60 ℃时取代度明显降低。说明温度过高也可造成平菇多糖碳化,不利酯化反应。因此,最佳反应温度为 60 ℃。

由图 1(c)可知,反应初期,随反应时间的延长,平菇多糖的取代度明显提高,1.5 h 时达最高(为 0.42),之后取代度有所降低。可能是因为浓硫酸的强氧化性及长时间作用引起多糖分子链发生断链和脱水焦化等副反应,致使取代度下降^[21]。因此,最佳反应时间为 1.5 h。

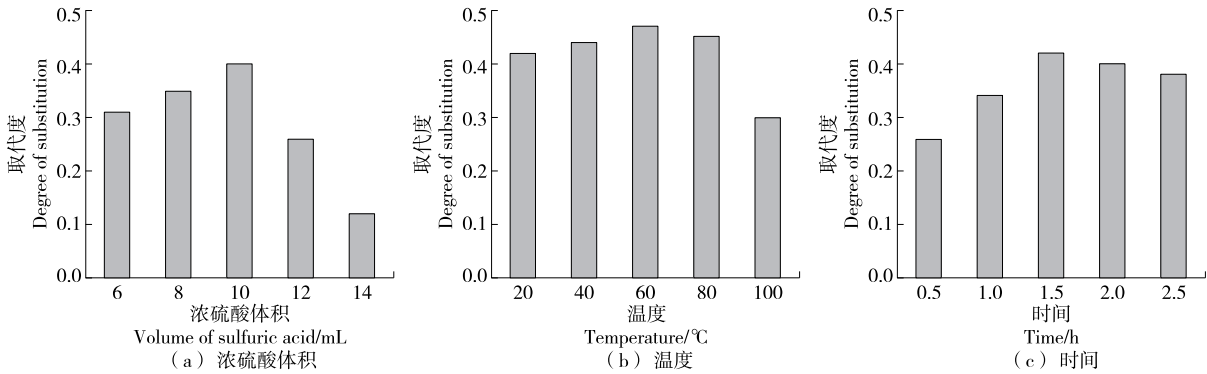


图 1 浓硫酸体积、反应温度和反应时间对平菇多糖硫酸酯取代度的影响

Figure 1 The effects of sulphuric acid volume, temperature and time on the degree of substitution of polysaccharide of *Pleurotus ostreatus*

2.1.2 正交试验 在单因素试验结果的基础上确定正交试验的因素水平,见表 1。

由表 2 可知,浓硫酸加入量影响最大,反应温度次之,影响最小的是反应时间;空列的 R 值与反应时间的 R 值相等,可能是因素间存在一定的交互作用所致。优化参数为 $A_2C_2D_2$,即平菇多糖质量 1.00 g,浓硫酸加入量 10 mL,反应温度 60 ℃,反应时间 90 min。按此组参数重复 3 次验证实验,平菇多糖取代度为 0.48,高于其他组合,因此优化工艺为平菇多糖质量 1.00 g,浓硫酸加入量 10 mL,反应温度 60 ℃,反应时间 90 min。

2.2 红外光谱分析

平菇多糖和平菇多糖硫酸酯的 FT-IR 谱图见图 2。从图 2 可以看出,平菇多糖硫酸酯除了有与平菇多糖共同的特征吸收峰:3 200~3 600 cm^{-1} 处 O—H 的伸缩振动峰,2 800~3 000 cm^{-1} 处 C—H(次甲基)的伸缩振动峰,1 650 cm^{-1} 附近 C=O 的伸缩振动峰,1 414~1 458 cm^{-1}

处 C—O—C 和 C—O—H 的伸缩振动峰,1 000~1 200 cm^{-1} 处吡喃环的 C—O—C 的伸缩振动峰及 580 cm^{-1} 处附近 C—O—H 键内部旋转引起的吸收峰,证明平菇多糖为吡喃型多糖。平菇多糖硫酸酯在 1 230 cm^{-1} 和 850 cm^{-1} 附近增加了两个新的吸收峰,1 230 cm^{-1} 的峰是—OSO₃⁻ 的 S=O 非对称伸缩振动峰,

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results

试验号	A	B(空列)	C	D	取代度
1	1	1	1	1	0.37
2	1	2	2	2	0.45
3	1	3	3	3	0.43
4	2	1	2	3	0.46
5	2	2	3	1	0.42
6	2	3	1	2	0.44
7	3	1	3	2	0.30
8	3	2	1	3	0.32
9	3	3	2	1	0.34
k_1	0.42	0.38	0.38	0.38	
k_2	0.44	0.40	0.42	0.40	
k_3	0.32	0.40	0.38	0.40	
R	0.12	0.02	0.04	0.02	

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 The factors and levels of orthogonal experiment

水平	A 浓硫酸加入量/mL	B 反应温度/°C	C 反应时间/min
1	8	40	60
2	10	60	90
3	12	80	120

850 cm^{-1} 附近的吸收峰为 C—O—S 的拉伸振动,均为硫酸酯键的特征吸收峰。同时还可以看出,平菇多糖硫酸酯在 3 400 cm^{-1} 附近的羟基吸收峰有所降低,说明平菇多糖硫酸酯已成功合成^[9,12]。

2.3 体外抗氧化活性

平菇多糖和平菇多糖硫酸酯的抗氧化活性试验结果见图 3。

由图 3(a)可知,在试验浓度范围内,平菇多糖和平菇多糖硫酸酯的还原能力与样品浓度呈正相关,浓度越大,还原能力越强,二者还原能力相当,低于对照组维生素 C ($P<0.01$)。

由图 3(b)可知,质量浓度为 0.5~3.0 mg/mL 时,平菇多糖和平菇多糖硫酸酯对超氧阴离子自由基的清除能力随着质量浓度的增加,一直明显增加。当质量浓度达到 3.0 mg/mL 时,平菇多糖硫酸酯对超氧阴离子自由基的清除率达到了 70.12%;但低于质量浓度为 1.5 mg/mL 的维生素 C 的清除率,与维生素 C 对照组比较差异显著 ($P<0.01$)。维生素 C、平菇多糖和平菇多糖硫酸酯对超氧阴离子自由基的 IC_{50} (半数清除率) 分别是 0.668, 2.321, 1.882 mg/mL,平菇多糖硫酸酯对超氧阴离子自由基的清除能力好于平菇多糖。

由图 3(c)可知,质量浓度为 0.5~1.5 mg/mL 时,平菇多糖和平菇多糖硫酸酯对 DPPH 自由基的清除能力随浓度的增加极显著增加 ($P<0.01$),质量浓度为 1.5~

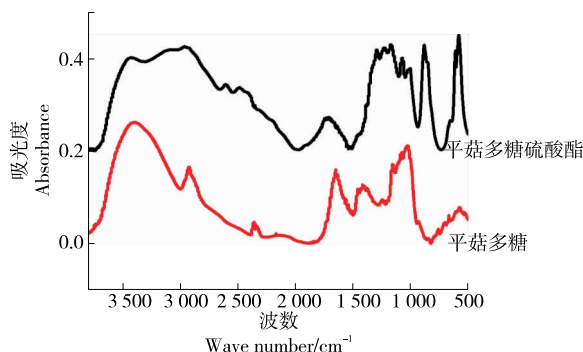


图 2 平菇多糖和平菇多糖硫酸酯 FT-IR 光谱

Figure 2 FT-IR absorbance spectra of POP and POPS

3.0 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除能力增强缓慢,差异不显著;平菇多糖硫酸酯对 DPPH 自由基的清除能力与对照组维生素 C 差异不显著,平菇多糖对 DPPH 自由基的清除能力与对照组维生素 C 差异显著 ($P<0.05$);当质量浓度为 3.0 mg/mL 时,平菇多糖硫酸酯、平菇多糖、维生素 C 对 DPPH 自由基的清除率分别为 85.78%, 77.45%, 90.23%。维生素 C、平菇多糖和平菇多糖硫酸酯对 DPPH 自由基的 IC_{50} (半数清除率) 分别是 0.523, 0.999, 0.816 mg/mL,平菇多糖硫酸酯对 DPPH 自由基的清除能力好于平菇多糖。

由图 3(d)可知,质量浓度为 0.5~3.0 mg/mL 时,平

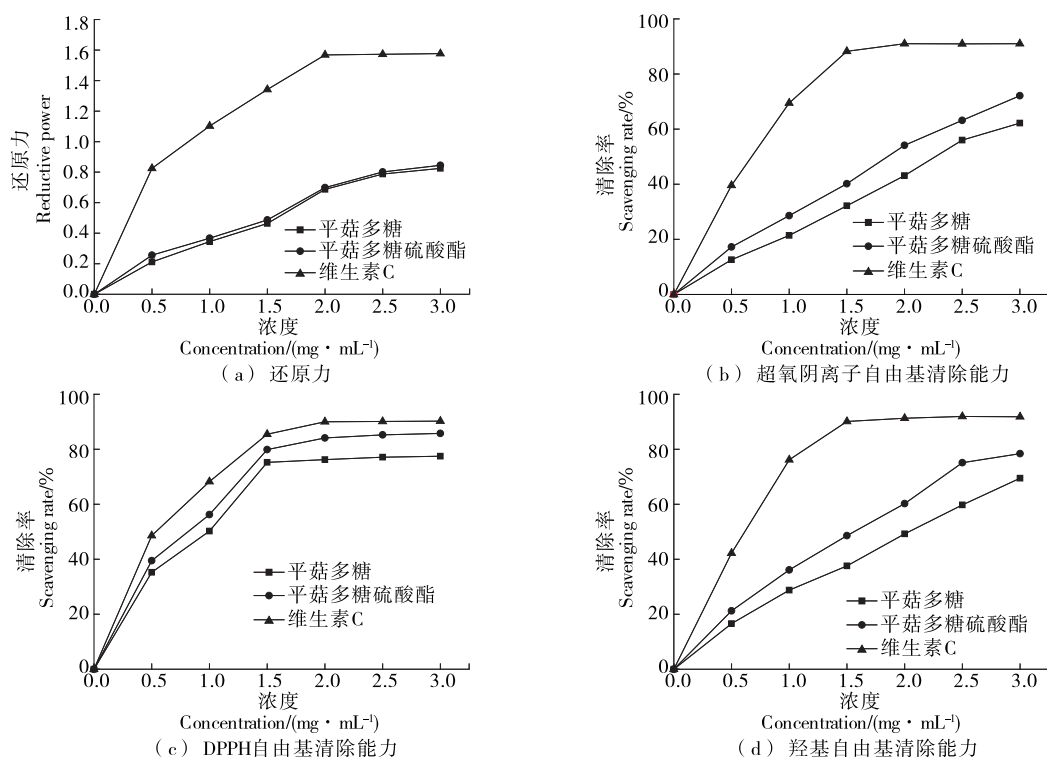


图 3 平菇多糖和平菇多糖硫酸酯的还原力和自由基清除能力

Figure 3 Reductive power and scavenging ability to free radicals of POP and POPS

菇多糖和平菇多糖硫酸酯对羟基自由基的清除能力随质量浓度的增加而增大。维生素 C 对羟基自由基的清除能力在质量浓度为 1.5 mg/mL 时基本达到最高,随着质量浓度的增加,维生素 C 的清除率趋于稳定。当质量浓度为 3.0 mg/mL 时,平菇多糖硫酸酯的清除率达到了 78.42%。当质量浓度为 1.5 mg/mL 时,维生素 C 的清除率达到了 91.28%,与对照组比较差异显著($P < 0.01$)。维生素 C、平菇多糖和平菇多糖硫酸酯对羟基自由基的 IC_{50} (半数清除率) 分别是 0.635、2.083、1.611 mg/mL,平菇多糖硫酸酯对羟基自由基的清除能力好于平菇多糖。

综上,平菇多糖硫酸酯对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除能力均好于平菇多糖,与前人^[9-10,22-24] 研究结果一致。可能是多糖引入硫酸基后,改变了多糖的水溶性、光学活性和空间构象,从而使其性质有所不同,引起生物活性发生改变^[16,22,25]。

3 结论

试验采用浓硫酸法成功制备了平菇多糖硫酸酯,通过正交试验获得了制备优化工艺,即平菇多糖质量 1.00 g,浓硫酸加入量 10 mL,反应温度 60 °C,反应时间 90 min,取代度为 0.48。红外吸收光谱分析证明平菇多糖是吡喃型多糖。平菇多糖和平菇多糖硫酸酯都具有较好的抗氧化性,但平菇多糖硫酸酯的抗氧化性强于平菇多糖,说明食用菌多糖经硫酸修饰后抗氧化能力增强。综上,制备平菇多糖硫酸酯的原料来源丰富,工艺简单,对平菇多糖硫酸酯的批量生产有重要的现实意义,同时平菇多糖硫酸酯的抗氧化性有着较好的应用价值,在药物和抗氧化保健功能性食品领域会有长远的发展。平菇多糖硫酸酯的其他生物活性及取代度不同对其生物活性的影响还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张叶,刘瑞娟,帖卫芳. 食用菌粗多糖降血糖的药理作用研究[J]. 中国食用菌, 2019, 38(10): 33-35.
- [2] 崔成伟,王翠翠,龙瑞,等. 平菇化学成分及药理活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 304-309.
- [3] 樊艺勇. 平菇多糖对运动员免疫功能的影响[J]. 中国食用菌, 2020, 39(5): 219-221.
- [4] 杨雪纯,于美丽,高文卿. 多糖硫酸酯抗凝血涂层应用于高分子医用管路[J]. 天津医科大学学报, 2019, 25(2): 110-114.
- [5] 张珏,沈洁,刘昱均,等. 硫酸化发酵灵芝胞外多糖的组成与结构[J]. 食品生物与技术学报, 2015, 38(5): 547-553.
- [6] JIA Xue-jing, MA Li-shuai, LI Peng, et al. Prospects of *Poria cocos* polysaccharides: Isolation process, structural features and bioactivities[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 54: 52-62.
- [7] 熊芳琪,刘欣,杨岚,等. 羧甲基茯苓多糖体外抗氧化活性研究[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(7): 39-41.
- [8] 刘波,袁利鹏,熊波,等. 多糖的硫酸酯化及其对结构和功能活性的影响研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 372-375.
- [9] 张忠,刘艳芳,周帅,等. 金耳子实体多糖硫酸化修饰研究[J]. 食用菌学报, 2018, 25(1): 67-73.
- [10] 汤凯,周际松,叶帆宇,等. 硫酸化碱溶性茯苓多糖的抗氧化性分析[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(7): 21-26.
- [11] 伯继芳,马琦,刘东茹,等. 硫酸化杏鲍菇多糖的理化特性及体外生物活性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(6): 102-109.
- [12] 孟欣,刘金峰. 羊肚菌多糖硫酸化衍生物的制备、结构分析及体外抗肿瘤活性[J]. 曲阜师范大学学报(自然科学版), 2020, 46(7): 992-995, 1 008.
- [13] 李梦圆,徐金龙,刘咏. 黄山花菇多糖硫酸化修饰的优化及修饰产物抗肿瘤活性研究[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2020, 43(7): 21-26.
- [14] WANG Zhi-jun, XIE Jian-hua, SHEN Ming-yue, et al. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 74: 147-157.
- [15] 杨天笑,王小莺,万根,等. 多糖的修饰及其抗凝血性研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(5): 1 108-1 113.
- [16] 唐瑜婉,张月巧,李瑶,等. 硫酸化羊肚菌多糖调控胆固醇代谢作用[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 136-142.
- [17] 李亚巍,韩丽琴,金瑛,等. 灵芝多糖硫酸酯对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(4): 679-684.
- [18] 张春军,董凯,董琦,等. 金福菇多糖及其衍生物的生物活性研究进展[J]. 中国药物经济学, 2018, 13(5): 125-128.
- [19] LU Yu, WANG De-yun, HU Yuan-liang. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(2): 180-186.
- [20] 金迪,梁英,郑文凤,等. 黄芩多糖体外抗氧化活性研究[J]. 中兽医医药杂志, 2012, 31(3): 33-37.
- [21] 李公斌,王振宇. 黑木耳多糖硫酸酯化制备工艺及红外光谱分析[J]. 东北林业大学学报, 2008, 36(12): 66-68.
- [22] 申进文,王瑞瑞,许春平. 秀珍菇多糖的硫酸化及其生物活性研究[J]. 河南农业科学, 2014, 43(7): 102-106.
- [23] LI Si-qian, SHAH Nagendra P. Sulphonated modification of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275 and antioxidant activities investigation using CCD and Caco-2 cell line models[J]. Food Chemistry, 2017, 225(15): 246-257.
- [24] 胡俊飞,张华,曲航,等. 硫酸化黑木耳多糖的辐射防护作用研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 6-10.
- [25] 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.