

金针菇多糖衍生物的制备及其抗菌性的测定

刘莹¹, 许琳², 赵杰¹

(1. 辽宁工程技术大学理学院, 辽宁阜新 123000;

2. 辽宁工程技术大学材料学院, 辽宁阜新 123000)

摘要:以金针菇为材料,采用微波辅助法提取金针菇多糖,采用浓硫酸法和乙酸酐-吡啶法对金针菇多糖进行化学修饰,结果表明,产物经红外光谱表征证明多糖已成功被硫酸化和乙酰化。抗菌活性实验显示硫酸化和乙酰化后的金针菇多糖衍生物抗菌活性较弱,对供试的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度MIC在25~50mg/mL之间。对同一菌株而言,抑菌效果随衍生物质量浓度的增大而增强。

关键词:金针菇,多糖,衍生物,抗菌性

Preparation and the antibacterial property test of derivatives of needle mushroom polysaccharide

LIU Ying¹, XU Lin², ZHAO Jie¹

(1.College of Science, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China;

2.College of Material, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China)

Abstract: We chose needle mushroom as the research material. Polysaccharides in needle mushroom were extracted by microwave and then modified by sulfuric acid and acetic anhydride-pyridine method. The result showed that they were successfully sulfated and acetylated by infrared spectroscopy. At the meantime, antibacterial activity test showed that the sulfated and acetylated derivatives of polysaccharides had a weaker antibacterial effect. The minimum inhibitory concentration for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was between 25mg/mL and 50mg/mL. For one strain, the antibacterial effect got stronger with the growing of mass concentration of the derivatives.

Key words: needle mushroom; polysaccharide; derivative; antibacterial property

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)06-0137-03

生物多糖广泛存在于动物、植物和微生物中,具有毒性小、安全性高的特点;在一定程度上还具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降血糖的功效^[1]。研究表明,多糖的活性与其分子结构密切相关,经过硫酸化、磷酸化、乙酰化、烷基化、磺酰化、羧甲基化等分子结构修饰后,其活性提高,毒副作用降低。金针菇(*Flammulina velutipes*)属担子菌目金钱菌属,又名冬菇。金针菇多糖提取技术及活性研究比较多。对金针菇多糖的修饰研究较少。本研究以金针菇为材料,采用微波辅助水提醇沉法提取金针菇多糖,制备出硫酸化和乙酰化金针菇多糖衍生物,并进行抗菌活性实验。为金针菇多糖的进一步应用提供理论依据,尤其为医用高分子材料的生物相容性难题增添一种新的解决方法,并为此提供理论和实践依据。

1 材料与方法

收稿日期: 2012-10-11

作者简介: 刘莹(1970-),男,硕士,副教授,主要从事生物化学方面的研究。

基金项目: 国家发改委课题(发改办工业[2006]1852号)。

1.1 材料与仪器

金针菇(*Flammulina velutipes*) 购于阜新市花园市场;试剂 乙醇、石油醚氯仿、正丁醇、DPPH·、抗坏血酸(V_C)、铁氰化钾、氯化铁、Tris、三氯乙酸、邻苯三酚、水杨酸等 均为国产分析纯,购于沈阳国药集团公司。

UV-1700型紫外分光光度计 上海欣茂仪器有限公司制造;HH-8型电热恒温水浴锅 国华电器有限公司;XI-II型离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司;RE-52A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;红外光谱仪 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 金针菇多糖的提取及纯化 采用微波辅助水提醇沉法^[2-3],从金针菇子实体中提取金针菇多糖,并通过脱脂、脱蛋白以及鼓风干燥处理后得到金针菇多糖纯品。经查阅大量文献及预实验结果确定具体工艺参数:料液比1:30、480W微波处理40s、水浴温度90℃、提取时间3h、提取次数2次、醇沉浓度为95%。并采用石油醚脱脂法(在浓缩后的滤液中加入1/5的石油醚,

振荡数次,静置10min,分液漏斗分离,弃去上层液,反复3次)及Sevage法脱蛋白(样品液:Sevage试剂(氯仿:正丁醇=5:1=4:1),置于分液漏斗中振荡15min,静置30min,去除中间层和下层取上层液,反复3次)。

在具体的实验过程中,水浴浸提液为金黄色,醇沉过后,多糖析出呈白色丝状,在恒温鼓风干燥箱中干燥至恒重,得到黄褐色块状金针菇多糖,经研磨即得白色粉状金针菇多糖。用红外光谱进行表征。

1.2.2 金针菇多糖衍生物的制备 硫酸酯化修饰和乙酰化修饰是两种常用的多糖化学修饰方法^[4-5],这两种方法反应条件温和,操作简便。采用浓硫酸法和乙酸酐-吡啶法对金针菇多糖进行化学修饰。

1.2.2.1 金针菇多糖的硫酸酯化 12mL的浓硫酸和含0.125g的硫酸铵正丁醇3mL混合,置入烧瓶中,冷却到0℃,搅拌30min,缓慢加入金针菇多糖粉末0.5g,反应1h后转速3000r/min离心,NaOH中和。然后加入3倍体积95%乙醇沉淀过夜,布氏漏斗收集沉淀,用无水氯化钙和鼓风干燥箱在30℃条件下干燥,最后得到一种白色粉末状固体,即硫酸酯化金针菇多糖(SG)。用红外光谱进行表征。

1.2.2.2 金针菇多糖的乙酰化 将0.5g金针菇多糖加入到10mL甲酰胺中,搅拌30min,再加入10mL的1:1体积的吡啶/乙酸酐,20℃下反应24h,然后进行减压浓缩,加入3倍体积95%乙醇,静置过夜后3000r/min离心。在30℃条件下干燥,得到黄褐色的乙酰化金针菇多糖(YG)固体。用红外光谱进行表征。

1.2.2.3 红红外光谱仪表征 取10mg左右的金针菇多糖、硫酸酯化金针菇多糖、乙酰化金针菇多糖,用KBr研磨压片后,在4000~400cm⁻¹范围内进行扫描。

1.3 金针菇多糖衍生物的抗菌活性

采用滤纸片法进行抗菌活性研究^[6-8]。将滤纸加工成9mm的圆片,放入平皿中,121℃干热灭菌20min,浸入到不同浓度的两种金针菇多糖衍生物供试液中,然后将已灭菌的固体培养基倒入平皿,分别移入0.4mL供试菌,涂布均匀,用无菌镊子夹取浸泡后的滤纸片贴在其中。最后37℃倒置培养,数日后测量其抑菌圈直径。

2 结果与讨论

2.1 金针菇多糖及衍生物的表征

金针菇多糖,其红外光谱如图1所示,在1250cm⁻¹和1650cm⁻¹附近显示出多糖的特征吸收。表明所得物即为金针菇多糖。

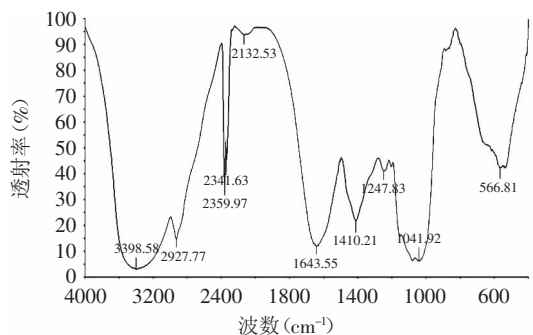


图1 金针菇多糖的红外光谱

Fig.1 The infrared spectrum of needle mushroom polysaccharide

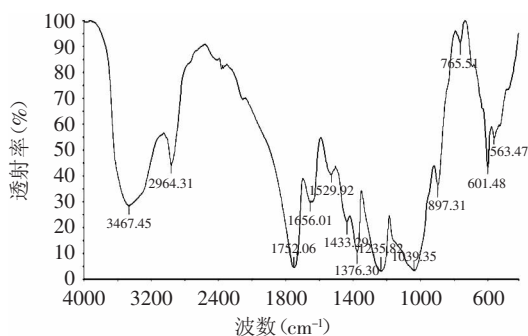


图2 硫酸酯化金针菇多糖的红外光谱

Fig.2 The infrared spectrum of sulphated needle mushroom polysaccharide

硫酸酯化产物的红外表征如图2所示,可以发现,硫酸酯化金针菇多糖在1235cm⁻¹左右处产生了吸收峰,是酯化后硫酸基团S=O伸缩振动产生,而766cm⁻¹附近的峰是酯化后-O-SO₃-的C-O-S伸缩振动的特征吸收峰。表明已经合成出硫酸酯化金针菇多糖。

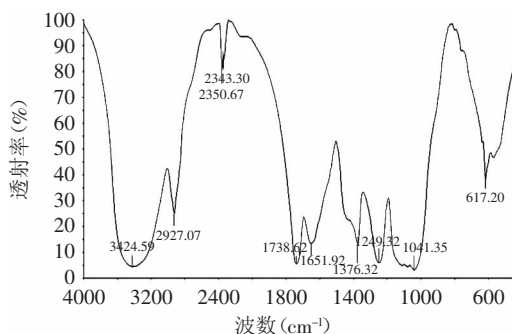


图3 乙酰化金针菇多糖的红外光谱

Fig.3 The infrared spectrum of acetylated needle mushroom polysaccharide

同样,乙酰化产物的红外表征如图3所示,不难看出,乙酰化金针菇多糖在1738.62cm⁻¹处出现了一个吸收峰,为酯基C=O双键的伸缩振动,1249.32cm⁻¹处有一个酯基C-O的伸缩振动,说明乙酰化衍生物中已成功加入了乙酰基。

2.2 硫酸酯化金针菇多糖MIC的测定

硫酸酯化金针菇多糖对各菌种的抑菌圈直径见表1。

从表1可以看出,硫酸酯化金针菇多糖对金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度为50mg/mL,对大肠杆菌的最低抑制浓度为50mg/mL。随着硫酸酯化金针菇多糖浓度的增加,两种多糖衍生物的抑菌能力也增强。

表1 硫酸酯化金针菇多糖对各菌种的抑菌圈直径(mm)

Table 1 The inhibition zone diameter of sulphated needle mushroom polysaccharide for all strains (mm)

供试菌种	硫酸酯化金针菇多糖质量浓度 (mg/mL)				无菌水
	100	50	25	12.5	
大肠杆菌	12.1	9.9	-	-	-
金黄色葡萄球菌	11.9	9.7	-	-	-

注:数据为3次重复实验的平均值;“-”表示无抑菌现象;表2同。

2.3 乙酰化金针菇多糖MIC的测定

乙酰化金针菇多糖对各菌种的抑菌圈直径见表2。

表2 乙酰化金针菇多糖对各菌种的抑菌圈直径(mm)
Table 2 The inhibition zone diameter of acetylated needle mushroom polysaccharide for all strains (mm)

供试菌种	乙酰化金针菇多糖质量浓度 (mg/mL)				无菌水
	100	50	25	12.5	
大肠杆菌	11.8	9.3	-	-	-
金黄色葡萄球菌	12.3	9.5	9.1	-	-

从表2可以看出,乙酰化金针菇多糖对金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度为25mg/mL,对大肠杆菌的最低抑制浓度为50mg/mL。随着乙酰化金针菇多糖浓度的增加,两种多糖衍生物的抑菌能力也增强。乙酰化金针菇多糖对金黄色葡萄球菌比对大肠杆菌的抑制效果要好。

3 结论

利用浓硫酸法、乙酸酐-吡啶法制取的两种金针菇多糖衍生物,分别为白色的硫酸酯化金针菇多糖和黄褐色的乙酰化金针菇多糖。用红外光谱法进行表征,结果表明白色的硫酸酯化金针菇多糖确实带上了硫酸基,黄褐色的乙酰化金针菇多糖确实带上了乙酰基。

硫酸化和乙酰化的金针菇多糖衍生物具有一定

的抗菌活性,结果显示对供试的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均产生了一定的抑制效果,但抑菌效果相对较差。对同一菌株而言,抑菌效果随衍生物质量浓度的增大而增强。最小抑制浓度MIC在25~50mg/mL之间。

多糖及其衍生物作为抗菌材料可以选择性的应用到生物医学材料中。但其分子结构及添加剂量还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王艺峰,徐伟. 生物多糖进行医用高分子材料表面修饰的研究进展[J]. 高分子通报,2007,12:56-59.
- [2] 田光辉,刘存芳. 马齿苋多糖的超声提取及多糖中单糖组成分析[J]. 食品工业科技,2007,28(6):131-134.
- [3] 程明东. 葡萄多糖的分离纯化和功能特性的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2006.
- [4] 燕航,钟耀广,王淑琴,等. 硫酸酯化香菇多糖衍生物制备的研究[J]. 化学与生物工程,2006,23(3):44-45.
- [5] 吴学谦,贺亮,程俊文,等. 香菇多糖的化学修饰及结构表征[J]. 天然产物研究与开发,2009,21(6):434-438.
- [6] 钟耀广,林楠,王淑琴,等. 香菇多糖的抗氧化性能与抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(6):902-903.
- [7] 王忠民,王跃进,周鹏. 葡萄多糖抑菌特性的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(1):77-79.
- [8] 田光辉,刘存芳,辜天琪,等. 对野生藜香中多糖的提取与测定及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2010,31(2):249-251.

(上接第136页)

葡萄糖代谢;b.对炎症因子的影响;c.抗氧化,清除自由基(ROS);d.改善脂质代谢^[7]。糖类的代谢主要是在线粒体呼吸链中进行的,在这一过程中糖被代谢产生大量的活性氧(ROS),而细胞内过量的ROS正是造成糖尿病并发症的罪魁祸首^[8-9],过量的ROS会攻击细胞内蛋白、膜脂、核酸等重要生命活动所需的分子,造成细胞功能的障碍,严重时可引起细胞的凋亡,进而造成眼病、肾病、足病等并发症。Raha教授^[10]发现线粒体复合物Ⅲ在ROS的产生中起到至关重要的作用,当用抗毒素A抑制复合物Ⅲ的表达时,细胞内产生大量的ROS,当复合物Ⅲ被刺激促进表达时,ROS的含量也受到抑制。

目前对黄连生物碱以线粒体复合物Ⅲ为靶点研究其降血糖功能的研究尚未见报道。在本实验中,首次建立以HPLC方法检测HepG2细胞对黄连生物碱的吸收,之后用Western blot测定生物碱对线粒体复合物Ⅲ表达的影响。实验结果表明,黄连中的小檗碱和黄连碱能更多地被细胞所吸收和利用,提高线粒体复合物Ⅲ的表达,从而抑制胞内产生过多的ROS,清除自由基,保护谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等清除自由基的酶类的活性,抑制糖尿病并发症的出现,从而提高糖尿病患者的生活质量。

参考文献

- [1] 陈吉生,郑聪. 中药治疗糖尿病及其并发症的应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):276-279.
- [2] Turner N Li, J Y Gosby, A To SWC, et al. Berberine and its

more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I[J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1414-1428.

[3] Yin J, Gao Z, Liu D, et al. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2008, 294(1): 148-156.

[4] Xia X, Yan J, Shen Y, et al. Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis[J]. Plos One, 2011, 6(2): 16556.

[5] Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(10): 502.

[6] Chen Hong-Ying, Ye Xiao-Li, CX-L, et al. Cytotoxicity and antihyperglycemic effect of minor constituents from *Rhizoma Coptis* in HepG2 cells[J]. Fitoterapia, 2012, 83: 67-73.

[7] 安小平,崔庆荣. 黄连治疗糖尿病的研究进展[J]. 甘肃中医, 2008, 21(1): 57-58.

[8] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature, 2001, 414: 813-820.

[9] Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, et al. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets[J]. Nature Reviews Neurology, 2011, 7(10): 573-583.

[10] Raha S, McEachern GE, Myint AT, et al. Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2000, 29(2): 170-180.