

不同取代度硫酸酯化裂褶多糖的制备及其降血糖和保湿活性

刘蔓菽¹, 肖媛², 伍磊¹, 郭朝万^{2*}, 郑必胜^{1*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 广东丸美生物技术股份有限公司, 广东广州 510530)

摘要: 该研究探讨了以裂褶多糖为原料, 采用三氧化硫-吡啶法制备硫酸酯化裂褶多糖以及取代度大小与其体外降血糖、体外保湿之间的关系。实验表明, 随着三氧化硫-吡啶质量分数的增加, 依次可获得取代度在 0.66~1.81 的 4 种硫酸酯化裂褶多糖。硫酸酯化裂褶多糖的重均分子量随着取代度的增加而逐渐降低, 从 1.67×10^7 u 下降到 8.04×10^5 u。取代度为 1.19 的硫酸酯化裂褶多糖 PDI 低至 7.84, 过度硫酸酯化将导致裂褶多糖内部发生无序降解。刚果红实验结果表明, 硫酸酯化裂褶多糖不存在三螺旋结构。取代度为 1.81 的硫酸酯化裂褶多糖在质量浓度为 2 mg/mL 时, 对 α -葡萄糖苷酶抑制率可达 73.8%, 4 种硫酸酯化裂褶多糖均为可逆混合 I 型抑制剂。硫酸酯化后裂褶多糖的吸湿与保湿活性均优于改性前, 取代度为 1.81 的硫酸酯化裂褶多糖的吸湿能力可达 77.93% (湿度 43%)、52.54% (湿度 81%), 吸湿性仅次于甘油, 但优于透明质酸。硫酸酯化裂褶多糖在干燥环境下的保湿性比透明质酸钠稍差。因此, 硫酸酯化裂褶多糖具有的较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性与吸湿保湿活性, 两种活性均随着取代度的升高而增强。

关键词: 硫酸酯化裂褶多糖; 降糖作用; 保湿

文章编号: 1673-9078(2025)02-244-252

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.1520

Preparation of Sulfated Schizophyllan Polysaccharides with Different Degrees of Substitution and Their Hypoglycemic and Moisturizing Activities

LIU Manqiu¹, XIAO Yuan², WU Lei¹, GUO Chaowan^{2*}, ZHENG Bisheng^{1*}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Marubi Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510530, China)

Abstract: In this study, Schizophyllan Polysaccharides (SPG) was used as the as raw material, sulfated Schizophyllan polysaccharides (S-SPGs) was prepared by the sulfur trioxide-pyridine method, and the relationship between the degree of substitution (DS) of S-SPGs and their *in vitro* hypoglycemic and moisturizing activities was examined. The experimental results showed that four S-SPGs with a DS of 0.66~1.81 could be obtained sequentially with the increase of the mass fraction

引文格式:

刘蔓菽, 肖媛, 伍磊, 等. 不同取代度硫酸酯化裂褶多糖的制备及其降血糖和保湿活性 [J]. 现代食品科技, 2025, 41(2): 244-252.

LIU Manqiu, XIAO Yuan, WU Lei, et al. Preparation of sulfated Schizophyllan polysaccharides with different degrees of substitution and their hypoglycemic and moisturizing activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 244-252.

收稿日期: 2023-12-20

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2022B1111080003)

作者简介: 刘蔓菽 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 裂褶多糖的改性及应用, E-mail: m18384824390@163.com; 共同第一作者: 肖媛 (1992-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 化妆品科学, E-mail: xiao.yuan@marubi.cn

通讯作者: 郭朝万 (1983-) 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 生物技术与化妆品科学, E-mail: guo.chaowan@marubi.cn; 共同通讯作者: 郑必胜 (1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物活性多糖及功能应用, E-mail: febzhen@scut.edu.cn

of sulfur trioxide-pyridine. The weight-average molecular weight M_w of S-SPGs decreased gradually from 1.67×10^7 u to 8.04×10^5 u with the increase of DS. The PDI of S-SPG with a DS of 1.19 was as low as 7.84. Excessive sulfation would lead to disordered degradation of S-SPGs. The results of Congo red experiment showed that there was no triple helix structure in S-SPGs. The inhibitory rate of the S-SPG with a DS of 1.81 and concentration of 2mg/mL against α -glucosidase could reach 73.8%. All the four S-SPGs were reversible mixed type I inhibitors. The moisture-absorbing and moisture-holding capacities of the SPG after sulfation were superior to those before modification, and the moisture-absorbing capacities of the S-SPG with DS1.81 were 77.93% (RH 43%) and 52.54% (RH 81%), respectively, which were second only to glycerol but better than hyaluronic acid. In dry environments, S-SPGs had slightly worse moisture-holding capacities than sodium hyaluronate. Therefore, S-SPGs had better α -glucosidase-inhibitory activity and moisture-absorbing and moisture-holding capacities, and both of the latter capacities increased with the increase of substitution degree.

Key words: sulfated schizophyllan polysaccharides; hypoglycemic effect; moisturizing activity

裂褶多糖 (SPG) 是药食两用真菌裂褶菌通过深层发酵而得到的一种胞外多糖, 它是以 β -(1,3)-D-吡喃葡萄糖为主链, 每三个葡萄糖分子连接一个 β -(1,6)-D-吡喃葡萄糖支链的一种中性多糖^[1]。裂褶多糖具有抗肿瘤活性与体外保湿活性。由于裂褶多糖分子量大、粘度高, 在水中的溶解度小; 经过醇沉或冻干后, 裂褶多糖的复溶性极差。这一特点严重影响了其在工业上的应用, 有必要对其进行改性。

酸水解^[2]、超声物理场降解^[3]和酶法降解^[4]是裂褶多糖降解改性的三种主要方法。通过适度降低裂褶多糖的分子量, 可提高其水溶性及生物活性, 同时不改变基本结构和功能。除了降解改性, 通过化学修饰的方法对裂褶多糖进行衍生化改性也是有一种重要的改性手段, 通过引入新的基团, 一般情况下都能显著改善多糖的溶解性, 同时可能赋予多糖一些新的功能。胡康^[5]采用氢氧化钠与氯乙酸混合制备出羧甲基化裂褶多糖, 并发现羧甲基基团的引入, 可以同时增强裂褶多糖的溶解性和保湿活性。Xiao 等^[6]制备出三种不同取代度的硫酸酯化海蒿子多糖, 发现在体外和细胞水平上的降血糖活性均高于天然多糖。王玉芬等^[7]通过对粒毛盘菌多糖进行羧甲基化、硫酸酯化改性, 发现改性后的多糖可提高对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性。

本研究采用三氧化硫-吡啶法对裂褶多糖进行硫酸酯化改性, 制备硫酸酯化裂褶多糖 (S-SPG), 探讨不同取代度下该多糖的水溶性及分子量变化, 对其体外降血糖活性、体外吸湿及保湿活性进行系

统性研究, 为裂褶多糖的广泛应用及功效拓展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三氧化硫-吡啶复合物、凝胶多糖、变色硅胶, 上海麦克林生化科技有限公司生产; N-N 二甲基甲酰胺 (DMF), 安耐吉化学有限公司生产; 吡啶、二甲基亚砷 (DMSO), 上海阿拉丁科技股份有限公司生产; 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷、 α -葡萄糖苷酶, 美国 sigma-Aldrich 公司生产; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

ZNCL-DL-GX4 型智能磁力搅拌器, 河南爱博特科技; Alpha 1-2 LD plus 型冷冻干燥机, 德国 Chris 公司; 1525 高效液相色谱泵、717plus 自动进样器、2414 示差检测器, 美国 Waters 公司; Spectra Max M2 型酶标仪, 美国 Molecular 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 硫酸酯化裂褶多糖的制备

硫酸酯化裂褶多糖的制备参考三氧化硫-吡啶法^[8]。精确称取干燥裂褶多糖 100 mg, 装入 50 mL 玻璃三角瓶中, 将 15 mL N-N 二甲基甲酰胺 (DMF) 按 1:15 的质量比加入, 在干燥环境下浸润 12 h。具体制备过程如表 1。反应结束后, 预先冷却加入 60 mL 无菌水, 将 pH 值调整到 7.5, 经过醇沉、

透析、冷冻干燥处理。所得的硫酸酯化裂褶多糖按照三氧化硫-吡啶的质量分数从低到高依次标记为S-SPG1、S-SPG2、S-SPG3、S-SPG4。

表 1 硫酸酯化裂褶多糖的制备条件

Table 1 Preparation method of schizophyllan

序号	SPG: 三氧化硫-吡啶复合物	反应时间/min	反应温度/℃	产物
1	1:2	180	70	S-SPG1
2	1:2.5			S-SPG2
3	1:3			S-SPG3
4	1:4			S-SPG4

1.3.2 取代度测定

根据参考文献方法^[9]对标准曲线的制备稍作修改。称取硫酸酯化裂褶多糖 10 mg，加入 10 mL 浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液溶解，于 105 ℃ 的烘箱中高温水解 8 h，待水解反应结束后将溶液补足冷却。将 1 mg/mL 的多糖储备液于 0.45 μm 膜过滤，4 ℃ 储存。取 200 μL 多糖溶液，360 nm 波长测定吸光值。硫酸酯化裂褶多糖的取代度根据式 (1) 计算即可：

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

式中：

B——硫酸酯化裂褶多糖的取代度 (DS)；

S%——硫酸酯化裂褶多糖的含硫量。

1.3.3 样品溶解性观察

参考药典方法进行多糖溶解性观察。取粉末状样品 5 mg 放于玻璃管内，加入预热的 5 mL (25 ± 2 ℃) 蒸馏水浸浴 30 min，观察试管中多糖的溶解度变化。

1.3.4 分子量测定

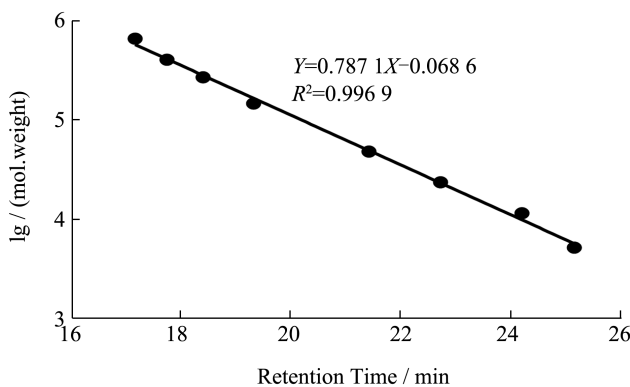


图 1 葡聚糖分子量标准曲线

Fig.1 Standard curve of dextran molecular weight

多糖分子量分布测定采用高效凝胶渗析色谱法，葡聚糖分子量标准曲线如图 1 所示。色谱条件：采用 Ultrahydrogel 1 000 (7.8 mm×300 mm) 和 Ultrahydrogel 500 (7.8 mm×300 mm) 凝胶柱串联使用；流动相选择 0.02 mol/L，流速 0.8 mL/min，柱温 35 ℃。样品采用流动相溶解配制成 2 mg/mL 溶液，采用 0.45 μm 水相膜过滤，取样 20 μL 测定，运行时间 35 min。

1.3.5 刚果红实验

刚果红实验参考方法^[10]，稍加修改。将 80 μmol/L 刚果红溶液加入裂褶多糖和硫酸酯化裂褶多糖中，混合制成 2 mg/mL 的多糖-刚果红溶液，加入 4 mol/L NaOH (0.05~0.5 mol/L)，混合均匀后静置 1 h，形成 NaOH-多糖-刚果红溶液。测量溶液在 400~600 nm 范围内的最大吸收波长 (λ_{max})。凝胶多糖为阳性对照。

1.3.6 α-葡萄糖苷酶抑制活性

1.3.6.1 多糖对 α-葡萄糖苷酶抑制率的测定

在 50 μL 的试样中加入 100 μL 的酶溶液，在 37 ℃ 的酶标板中混合，孵化 10 min。加入 50 μL pNPG，孵化 20 min，测 405 nm 吸光值。同浓度阿卡波糖作为阳性组。按下式计算抑制率：

$$A = \frac{1 - (As - Ab)}{Ac} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

As——样品组，由样品、酶、pNPG 组成；

Ab——背景对照，由 150 μL 缓冲液、pNPG 组成；

Ac——空白对照，由 50 μL 缓冲液、酶、pNPG 组成。

1.3.6.2 多糖对 α-葡萄糖苷酶抑制类型的测定

将 pNPG 的固定为 5 mmol/L，于不同质量浓度条件下 (0.5、1、2 mg/mL) 分别添加多糖或不添加多糖，以观察酶在不同质量浓度下的初始反应速度，从而判断其是否为可逆性抑制作用。

1.3.6.3 多糖对 α-葡萄糖苷酶抑制动力学的测定

将 α-葡萄糖苷酶固定在 0.1 U/mL，于不同质量浓度条件下 (0.5、1、2 mg/mL) 分别添加多糖或不添加多糖，测定 pNPG 在不同质量浓度条件下的反应初率，绘制 lineweaver-burk 曲线，判断其可逆性抑制类型。

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

式中:

V —反应速率, $\Delta\text{OD}/\text{min}$;

$[S]$ —底物浓度, mmol/L ;

V_{max} —酶促反应最大速率, $\Delta\text{OD}/\text{min}$;

K_m —米氏常数, mmol/L 。

1.3.7 体外保湿活性

1.3.7.1 体外吸湿实验

精确称取干燥样品 100 mg, 放置于密封干燥器皿中, 分别在 0、12、24、36、48、60、72 h 的环境中 (RH 43%、RH 81%) 称量多糖质量。甘油 (GL)、低分子量透明质酸钠 (L-HA)、高分子量透明质酸钠 (H-HA) 均作为阳性对照组。吸湿率 R_a 计算公式为:

$$R_a = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

W_0 —0 h 时多糖的质量, mg;

W_t —时间 t 时多糖的质量, mg。

1.3.7.2 体外保湿实验

精确称取干燥样品 100 mg, 加入等量 50% 蒸馏水, 混合均匀后放入密封干燥器中。分别在 0、12、24、36、48、60、72 h 的环境中 (43%、干燥硅胶) 称量多糖质量。以甘油 (GL)、低分子量透明质酸钠 (L-HA)、高分子量透明质酸钠 (H-HA) 均作为阳性对照组。吸湿率 R_r 计算公式为:

$$R_r = \frac{W_t - W_0}{H_0} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

W_0 —0 h 时多糖的质量, mg;

W_t —时间 t 时多糖的质量, mg;

H_0 —加水的质量, mg。

1.3.8 数据分析

采用 Origin 2023b 软件对数据进行处理。

2 结果与讨论

2.1 硫酸酯化裂褶多糖的制备

硫酸酯化裂褶多糖经三氧化硫-吡啶法成功制备, 按反应中所加三氧化硫-吡啶的比例由低到高依次命名相应产品为 S-SPG1、S-SPG2、S-SPG3、S-SPG4。其冻干状态如图 2 所示。测定其取代度, 分别为 0.66、0.95、1.19 和 1.81。

2.2 硫酸酯化裂褶多糖的溶解性测定

图 3 为 SPG 和 S-SPG 在不同时间下的溶解情况。

SPG 经蒸馏水预热后在水中的溶解性较低, 通过多次震荡摇匀、加热, 仍有少量 SPG 在水溶液中呈絮凝状。但 4 种 S-SPG 均呈现无色透明, 极易溶解于水, 30 min 后未出现沉淀现象, 说明硫酸基团的引入能够改善 SPG 的溶解性^[11,12]。经硫酸酯化处理后, 水溶性灰树花多糖及水溶性灵芝多糖均具有良好的溶解性。且取代度越高, 溶解度越好。多糖的溶解性与改性前相比均有所加强。

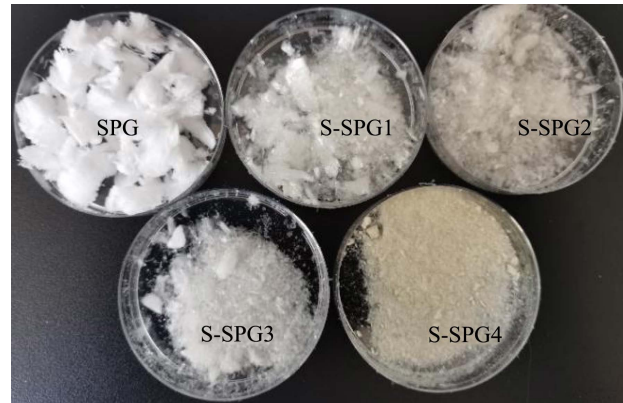


图 2 裂褶多糖和硫酸酯化裂褶多糖

Fig.2 Schizophyllum and sulfated schizophyllum

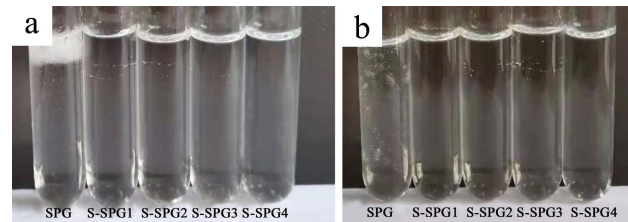


图 3 裂褶多糖、硫酸酯化裂褶多糖在 0 min (a) 和 30 min (b) 时的溶解性

Fig.3 Solubility of schizophyllum and sulfated schizophyllum at 0 min (a) and 30 min (b)

2.3 硫酸酯化裂褶多糖的分子量测定

如表 2 所示, SPG 的分子量为 3.79×10^7 u, 而 S-SPG 的分子量主要分布在 $8.04 \times 10^5 \sim 1.67 \times 10^7$ u 之间。在 S-SPG2、S-SPG3 中也含有少量如 3.68×10^4 u、 1.86×10^4 u 的低分子量多糖组分。与 SPG 相比, S-SPG 的相对分子质量均有所下降, 这可能是因为长时间高温条件下的硫酸酯化导致裂褶多糖发生降解反应。裂褶多糖的 PDI 为 12.26, 表明 M_w 有较广的分布范围。SPG 在酯化过程中, S-SPG1、S-SPG2、S-SPG3 的 PDI 均有所降低, 说明 M_w 分布变窄。但 S-SPG4 的 PDI 为 41.44, 这可能是因为剧烈反应造成多糖无序降解, 从而导致分子分布变宽。

表 2 裂褶多糖、硫酸酯化裂褶多糖的 M_w 、 M_n 、 M_z 、PDI
Table 2 M_w , M_n , M_z and PDI of schizophyllan and sulfated schizophyllan

分子量/u	SPG	S-SPG1	S-SPG2		S-SPG3		S-SPG4
			峰 1	峰 2	峰 1	峰 2	
M_w	3.79×10^7	1.67×10^7	9.32×10^6	3.68×10^4	3.04×10^6	1.86×10^4	8.04×10^5
M_n	3.10×10^6	1.59×10^6	8.42×10^5	2.58×10^4	3.88×10^5	1.09×10^4	1.94×10^4
M_z	9.70×10^7	6.25×10^7	3.06×10^7	4.86×10^4	9.14×10^7	2.83×10^4	1.76×10^7
PDI (M_w/M_n)	12.26	10.50	11.07	1.04	7.84	1.71	41.44

2.4 刚果红实验

如图 4 所示，弱碱条件下的 (0.05~0.1 mol/L NaOH) SPG 与凝胶多糖的最大吸收波长 λ_{max} 均向长波方向移动，提高 NaOH 浓度，两者的 λ_{max} 降低，说明裂褶多糖具有三螺旋结构。S-SPG 向短波方向移动，表明 S-SPG 可能不具备三螺旋结构。这可能是由于带负电荷的硫酸基团与 SPG 中的其他负电荷基团产生排斥现象，从而导致了 S-SPG 规则的三螺旋结构趋向于解聚和展开，进而转变为线团结构^[13]，最后呈现出水溶液中的紊乱线团状态。

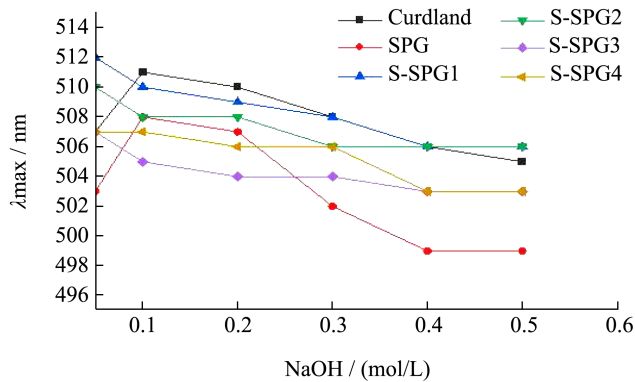


图 4 不同 NaOH 浓度下裂褶多糖、硫酸酯化裂褶多糖 - 刚果红复合物的 λ_{max}

Fig.4 λ_{max} of schizophyllan and sulfated schizophyllan-Congo complex at different NaOH concentrations

2.5 体外降血糖活性研究

2.5.1 多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制率的测定

寡糖可在 α -葡萄糖苷酶的作用下降解成单糖，从而引起机体血糖水平的升高。根据图 5 可知，SPG 在 0.062 5~2.0 mg/mL 的质量浓度范围内对 α -葡萄糖苷酶的活性无抑制作用。但 S-SPG 还是表现出一定的抑制作用，且抑制率和取代度之间存在某些关联。在质量浓度为 0.062 5~2.0 mg/mL 的范围内，S-SPG 均呈剂量依赖形式抑制 α -葡萄糖苷酶

活性。质量浓度为 2.0 mg/mL 时，阿卡波糖的抑制率为 73.80%，S-SPG1、S-SPG2、S-SPG3、S-SPG4 的抑制率为 38%、56.48%、78.81%、84.66%。但取代度过高对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用不大，S-SPG4 比 S-SPG3 的取代度略高，两者的抑制活性却相似，在低质量浓度 (0.25~0.5 mg/mL) 时其活性反而大于 S-SPG4。Xiao 等^[6]研究得出，通过引入硫酸基团，可提高海蒿子多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性，同时取代度与最高抑制率呈正相关，在多糖质量浓度为 1.0 mg/mL (取代度最高) 的情况下，其抑制率可达到 97.6%。靳文娟等^[13]研究发现，硫酸化可提高鸡油菌多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率，与改性前相比抑制率提高了 1.47 倍。王玉芬^[7]研究发现，通过引入羧甲基或硫酸基团，均能提高粒毛盘菌多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用，其中羧甲基的改性较硫酸酯化的作用更好。

根据表 3 可知，各样品 IC_{50} 随着取代度的提高，出现了逐渐降低的情况。S-SPG1 的 IC_{50} 最高，阿卡波糖的 IC_{50} 最低，为 0.58 mg/mL，其次为 S-SPG4，为 0.8 mg/mL。同时可说明具有最大抑制能力的是阿卡波糖，抑制能力最小的是 S-SPG1。

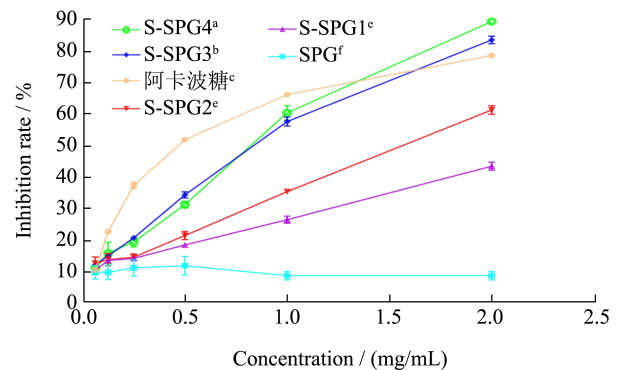


图 5 裂褶多糖、硫酸酯化裂褶多糖裂褶多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率

Fig.5 Inhibition rate of schizophyllan and sulfated schizophyllan on α -glucosidase

表 3 裂褶多糖、硫酸酯化裂褶多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制 IC_{50}

Table 3 Substitution degree, IC_{50} rate of schizophyllan and sulfated schizophyllan

样品	阿卡波糖	SPG	S-SPG1	S-SPG2	S-SPG3	S-SPG4
DS	—	—	0.66	0.95	1.19	1.81
IC_{50} / (mg/mL)	0.58	—	>2	1.74	0.85	0.80

2.5.2 多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制类型及动力学参数

抑制剂在酶促反应中可分为两种：可逆性和不可逆性。如图 6 所示，所有样品曲线相交于原点，样品浓度与对应斜率呈反比，表明对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用具有可逆性^[14,15]。

通过判断 Lineweaver-Burk 的曲线双倒数情况，可逆性抑制剂的类型可以得到进一步确定。竞争性抑制剂会在图中与 Y 轴相交；混合抑制剂于第二象限互交^[15]。从图 7 可以看出，阿卡波糖的双倒数曲线交于 Y 轴。根据表 4 可知， K_m （米氏常数）逐渐增大， V_{max} （最大反应速率）无明显改变，说明阿卡波糖具有竞争性抑制作用^[16]。四种 S-SPG 的双倒数曲线都相交于第二象限，同时随着浓度的升高， K_m （米氏常数）逐渐增大， V_{max} （最大反应速率）逐渐变小，可以推测此四种硫酸酯化裂褶多糖均为可逆混合 I 型抑制剂^[14,17]。

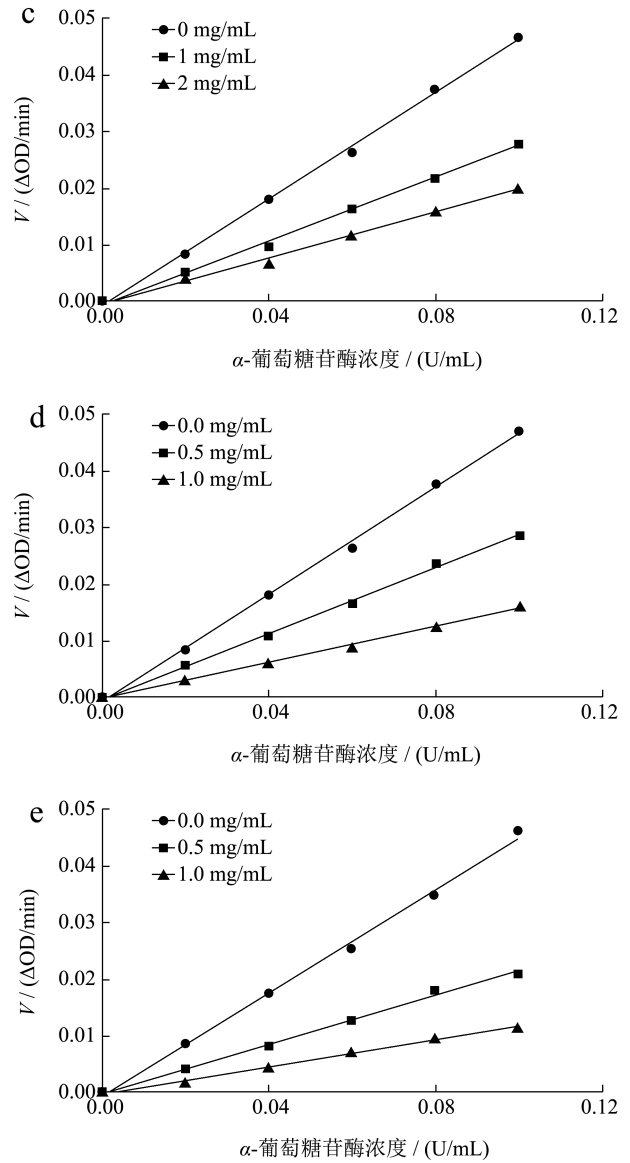
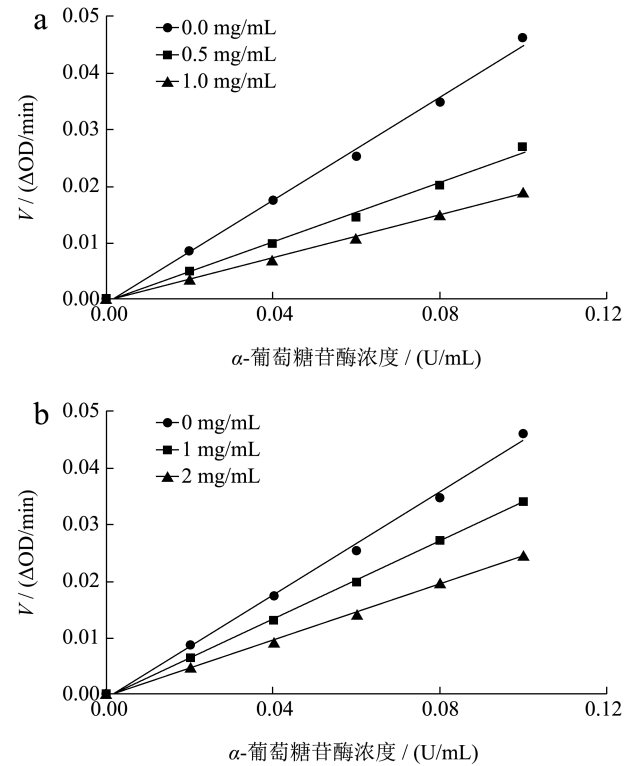


图 6 阿卡波糖、硫酸酯化裂褶多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型

Fig.6 Inhibition type of acarbose and sulfated schizophyllan on α -glucosidase

注：a~e 分别代表阿卡波糖、S-SPG1、S-SPG2、S-SPG3、S-SPG4。图 7 同。

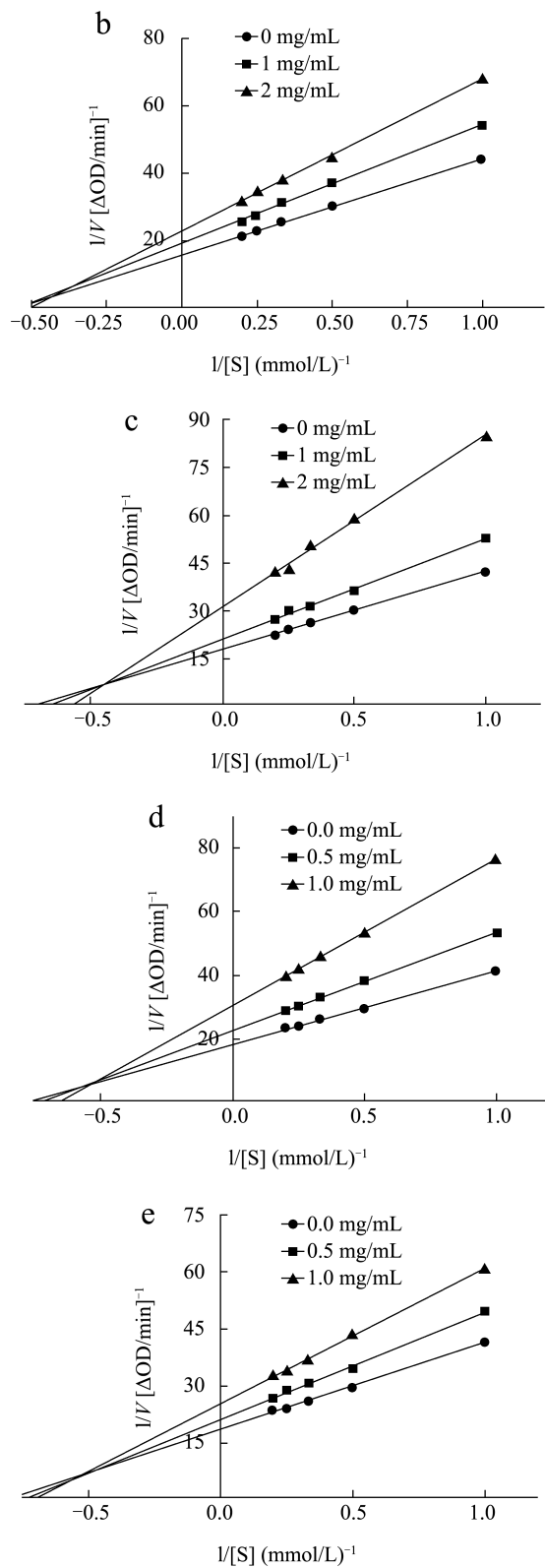


图7 阿卡波糖、硫酸酯化裂褶多糖对 α -葡萄糖苷酶的Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.7 Lineweaver-Burk double reciprocal curve of acarbose and sulfated schizophyllan on α -glucosidase

2.6 体外吸湿与保湿实验

2.6.1 体外吸湿实验

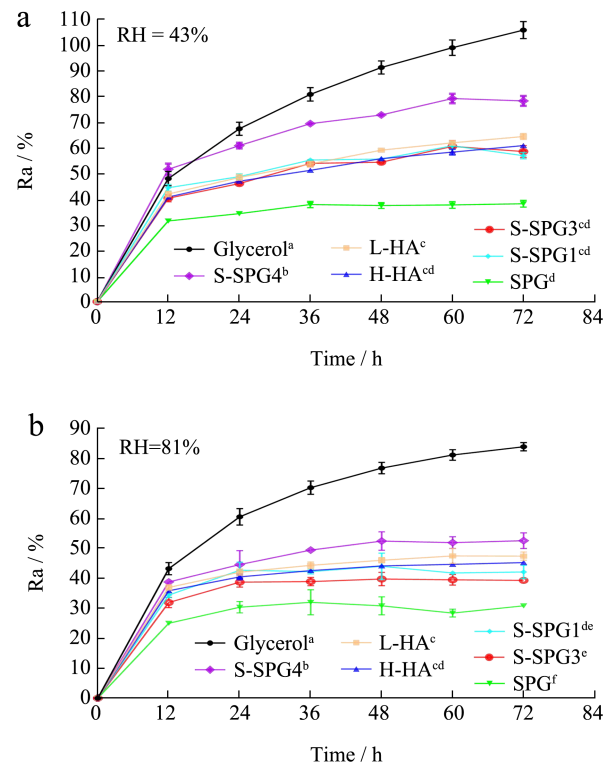


图8 相对湿度RH为43%和81%条件下裂褶多糖、硫酸酯化裂褶多糖的吸湿性

Fig.8 Moisture absorption rate of schizophyllan and sulfated schizophyllan in RH 43% and 81%

注: (a) RH为43%条件下的吸湿性; (b) RH为81%条件下的吸湿性。

在体外吸湿与保湿的研究中, 可通过称重法测量样品的表观质量, 由图8a观察得出, 各样品吸湿性的大小为: GI>S-SPG4>L-HA>H-HA>S-SPG3>S-SPG1>SPG。4种S-SPG的吸湿能力在过去48h中逐渐平衡。按照取代度从低到高, 其吸湿性依次为56.66%、58.25%、60.56%、64.08%。裂褶多糖的保湿能力在引入硫酸基团后有了明显的提升, 保湿性能较改性前提升了0.49~1.04倍。从图8b中可观察得出, 相对湿度为81%时, 各样品的吸湿性的大小为: GI>S-SPG4>L-HA>H-HA>S-SPG1>S-SPG3>SPG。S-SPG的吸湿能力类似于透明质酸钠, 是SPG的1.3~1.7倍。经过72h的吸湿能力测试, S-SPG4的吸湿性达到52.55%, 是SPG的1.73倍, 透明质酸钠的1.10倍左右。

表 4 阿卡波糖、硫酸酯化裂褶多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学参数
Table 4 Kinetic parameters of α -glucosidase inhibited by acarbose and sulfated schizophyllan

样品	质量分数/(mg/mL)	米氏方程	R^2	$V_{max}/(\Delta OD/min)$	$K_m/(mmol/L)$
空白	0	$1/V=22.82 \times 1/[S]+18.42$	0.997 5	0.054 28	1.238 9
阿卡波糖	0.5	$1/V=89.33 \times 1/[S]+19.58$	0.997 6	0.051 07	4.562 3
	1	$1/V=143.80 \times 1/[S]+20.25$	0.994 2	0.049 38	7.101 2
S-SPG1	1	$1/V=35.52 \times 1/[S]+18.97$	0.997 7	0.052 71	1.872 4
	2	$1/V=44.85 \times 1/[S]+22.97$	0.998 3	0.043 54	1.952 5
S-SPG2	1	$1/V=31.32 \times 1/[S]+21.29$	0.995 3	0.046 97	1.471 1
	2	$1/V=54.03 \times 1/[S]+31.46$	0.996 4	0.031 79	1.717 4
S-SPG3	0.5	$1/V=30.82 \times 1/[S]+22.52$	0.999 8	0.044 40	1.368 5
	1	$1/V=46.09 \times 1/[S]+30.50$	0.999 9	0.032 79	2.189 5
S-SPG4	0.5	$1/V=28.27 \times 1/[S]+21.05$	0.997	0.047 51	1.343 0
	1	$1/V=35.98 \times 1/[S]+25.09$	0.995 1	0.039 86	1.434 0

SPG 在相对湿度为 43%、81% 的环境中，吸湿能力较弱。但其体外吸湿能力可通过硫酸酯化改性得到明显改善，吸湿能力与 S-SPG 的取代度呈正相关。其中，取代度最高的 S-SPG4 吸湿性最强，强于透明质酸钠，弱于甘油。这可能是由于硫酸基是亲水基团，引入了可利于多糖和水分子的强相互作用形成，这种作用能更紧密地吸吸附水分子。

2.6.2 体外保湿实验

在干燥条件下各样品保湿能力的大小依次为： $GI > L-HA > H-HA > S-SPG1 > SPG > S-SPG4 > S-SPG3$ 。极度干燥的环境会加速样品的水分流失，各样品在 7 h 后均比蒸馏水具有更高的保湿能力，其中 S-SPG1、S-SPG4 和 SPG 的保湿率约为 35%，与透明质酸钠相差无几。根据图 9 可知，在相对湿度 43% 的情况下，各样品的保湿性的大小为： $GI > S-SPG4 > SPG > L-HA > S-SPG3 > S-SPG1 > H-HA$ 。S-SPG4 在 72 h 后保湿率为 74.94%，仅低于甘油；SPG、L-HA 的保湿率可达 74.01%、72.71%。改性前后的 SPG 在干燥和相对湿度为 43% 的环境下，均具有良好的保湿效果，且在 SPG 中引入硫酸基团对保湿活性无显著影响，取代度大小与 S-SPG 的保湿效果无明显相关性。在干燥条件下，S-SPG1 的取代度最低，但具有最好的保湿活性；但在相对湿度 43% 的情况下，取代度最高的 S-SPG4 的保湿活性最强。

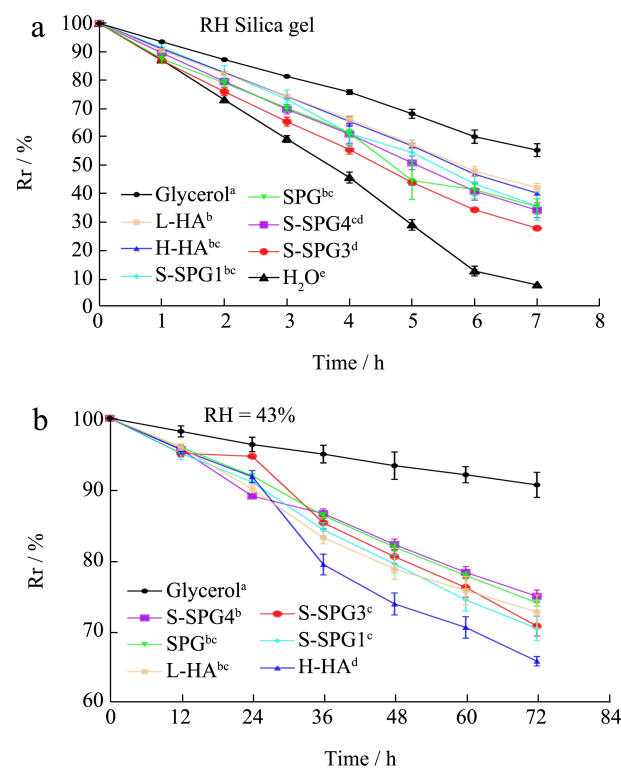


图 9 相对湿度 RH 为干燥环境和 41% 条件下裂褶多糖、硫酸酯化裂褶多糖的保湿性

Fig.9 Moisture retention rate of schizophyllan and sulfated schizophyllan in dry and RH 43%

注：(a) RH 为干燥条件下的保湿性；(b) RH 为 43% 条件下的保湿性。

3 结论

采用三氧化硫-吡啶法制备了4种不同取代度(0.66~1.81)的硫酸酯化裂褶多糖。其分子量较降解前明显下降,取代度越大,降解效果越显著。四种S-SPG的分子量分别为 1.67×10^7 、 9.32×10^6 、 3.04×10^6 、 8.04×10^5 u, S-SPG1~S-SPG3分子量分布均变窄, S-SPG3的PDI为7.84,但S-SPG4的PDI为41.44,说明过度硫酸酯化反而会加强多糖的无序降解。硫酸酯化裂褶多糖的溶解性较改性前明显提高。刚果红实验表明, S-SPG在水溶液中呈现出不规则的线性结构,表明其失去了三螺旋结构。裂褶多糖经硫酸酯化后对 α -葡萄糖苷酶具有显著抑制作用,且抑制活性与浓度和取代度呈正相关。SPG、SPG1~3在质量浓度为2 mg/mL时的抑制率分别为38.68%、56.48%、78.81%、84.66%。动力学实验结果表明硫酸酯化裂褶多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制属于可逆混合I型抑制。当环境相对湿度为43%和81%时,硫酸酯化裂褶多糖的吸湿性是改性前的1.3~2倍,其中取代度为1.81的硫酸酯化裂褶多糖在72 h时的吸湿性分别为77.93% (RH=43%)、52.54% (RH=81%),仅次于甘油。在干燥环境中,硫酸酯化裂褶多糖的保湿性略弱于透明质酸钠。当相对湿度为43%时,取代度为1.81的硫酸酯化裂褶多糖的保湿性仅次于甘油,略强与裂褶多糖。因此,硫酸酯化裂褶多糖具有良好的体外降血糖活性,同时可作为一种潜在的、很有前景的保湿剂。

参考文献

- [1] 李兆兰,李学信.裂褶菌胞内多糖的分离纯化鉴定及其性质[J].真菌学报,1994,4:267-272.
- [2] MUNZBERG J, RAU U, WANGER F. Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched β -1,3-glucan [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 27(4): 271-276.
- [3] ZHONG K, TONG L, LIU L, et al. Immunoregulatory and antitumor activity of schizophyllan under ultrasonic treatment [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 80: 302-308.
- [4] LEATHERS T D, SUTIVISEDSAK N, NUNNALLY M S, et al. Enzymatic modification of schizophyllan [J]. Biotechnology Letters, 2015 37(3): 673-678.
- [5] 胡康.羧甲基裂褶多糖的制备及其抗氧化、保湿活性研究[D].广州:华南理工大学,2017.
- [6] XIAO H, FU X, CAO C L, et al. Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 407-414.
- [7] 王玉芬.基于分子修饰的粒毛盘菌多糖结构与生物活性研究[D].合肥:合肥工业大学,2017.
- [8] SUN Y J, SUN W, GUO J T, et al. Sulphation pattern analysis of chemically sulphated polysaccharide LbGp1 from *Lycium barbarum* by GC-MS [J]. Food Chemistry, 2015, 170: 22-29.
- [9] 伍磊.硫酸酯化裂褶多糖的制备、结构表征及其体外活性研究[D].广州:华南理工大学,2021
- [10] WANG C F, HE Y X, TANG X Z, et al. Sulfation, structural analysis, and anticoagulant bioactivity of ginger polysaccharides [J]. Journal of Food Science, 2020, 85(8): 2427-2434.
- [11] ZHANG H, WANG J Q, NIE S P, et al. Sulfated modification, characterization and property of a water-insoluble polysaccharide from *Ganoderma atrum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 248-255.
- [12] 陈媛媛.灰树花多糖结构表征及其硫酸酯化多糖免疫活性研究[D].天津:天津科技大学,2015.
- [13] 靳文娟,鲁晓翔.硫酸化鸡油菌多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J].食品科技,2012,37(8):168-172.
- [14] 何勇林.三种黄酮类化合物抑制 α -葡萄糖苷酶活性和晚期糖基化终末产物生成作用研究[D].沈阳:辽宁大学,2019.
- [15] 费群勤.乌龙茶多酚及其儿茶素单体抑制消化相关酶的活性及其机制的研究[D].南京:南京农业大学,2015.
- [16] 舒婷,肖畅,何慧,等.青砖茶粗多糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J].食品科技,2019,44(3):194-199.
- [17] 冯学珍,覃慧逢,冯书珍.网地藻多糖对 α -葡萄糖苷酶体外抑制作用的研究[J].食品研究与开发,2020,41(3):35-40.