

# 硫酸化杏鲍菇多糖的理化特性及体外生物活性研究

伯继芳, 马琦, 刘东茹, 刘昱迪, 佺逸凡, 李梅, 徐怀德

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 本文采用氯磺酸-吡啶法修饰杏鲍菇多糖(*Pleurotus eryngii* polysaccharide, PEP), 根据加入氯磺酸与吡啶的体积比(1:2, 1:5 和 1:8) 不同得到三种硫酸化杏鲍菇多糖(sulfated *Pleurotus eryngii* polysaccharide, SPEP), 分别记为 SPEP-60<sub>1.2</sub>, SPEP-60<sub>1.5</sub> 和 SPEP-60<sub>1.8</sub>, 并通过化学分析法、气相色谱、凝胶渗透色谱对 PEP 修饰前后的理化性质进行了比较研究, 同时对 PEP 和 SPEP 的抗氧化性(DPPH·清除能力、O<sub>2</sub><sup>-·</sup>清除力)以及对碳水化合物消化与吸收的关键酶( $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶)抑制作用进行了研究。结果表明, SPEP-60<sub>1.2</sub>, SPEP-60<sub>1.5</sub> 与 SPEP-60<sub>1.8</sub> 的取代度依次为 0.26±0.00、0.21±0.00 与 0.19±0.00; 三种 SPEP 均比 PEP 的总糖、糖醛酸含量少、分子量低, 单糖组成的种类相同但单糖的摩尔比不同; 在所有的 SPEP 中, SPEP-60<sub>1.8</sub> 对 DPPH·清除能力最佳; SPEP-60<sub>1.2</sub> 对 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>清除力最强。SPEP 对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制活性均有明显增强, 对两种酶的抑制活性分别至少提高了 834.33% 和 97.66%。除 DPPH·清除能力外, 在相同剂量下, SPEP 比 PEP 表现出更强的生物活性, 表明硫酸化修饰是提高多糖抗氧化及对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用的有效途径。

**关键词:** 杏鲍菇多糖; 硫酸化修饰; 理化特性; 抗氧化; 酶抑制作用

文章编号: 1673-9078(2019)06-102-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.014

## Physicochemical Properties and *in Vitro* Bioactivity of Sulfated *Pleurotus eryngii* Polysaccharide

BO Ji-fang, MA Qi, LIU Dong-ru, LIU Yu-di, NAI Yi-fan, LI Mei, XU Huai-de

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** In this work, *Pleurotuseryngii* polysaccharide (PEP) was chemically modified by chlorosulfonic acid-pyridine method, and three kinds of sulfated *Pleurotuseryngii* polysaccharides (SPEP) were obtained. According to the volume ratio of chlorosulfonic acid to pyridine (1:2, 1:5 and 1:8), the three kinds of SPEP were recorded as SPEP-60<sub>1.2</sub>, SPEP-60<sub>1.5</sub> and SPEP-60<sub>1.8</sub>, respectively. The physicochemical properties of PEP and SPEP were detected by chemical methods, gas chromatography and gel permeation chromatography. In addition, the antioxidant activities (DPPH· scavenging ability and O<sub>2</sub><sup>-·</sup> scavenging power) and the inhibitory effect on key enzymes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) for carbohydrate digestion and absorption of PEP and SPEP were also determined. The results showed that the degree of substitution of SPEP-60<sub>1.2</sub>, SPEP-60<sub>1.5</sub> and SPEP-60<sub>1.8</sub> were 0.26±0.00, 0.21±0.00 and 0.19±0.00, respectively. All the SPEP had less total sugar, uronic acid and lower molecular weight than the PEP. They had the same monosaccharide composition with different molar ratio. Moreover, SPEP-60<sub>1.8</sub> possessed the best scavenging capacity for DPPH compared with other SPEP. SPEP-60<sub>1.2</sub> showed the strongest scavenging effect on O<sub>2</sub><sup>-·</sup>. All the SPEP had higher  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity than the PEP, increasing at least by 834.33% and 97.66%, respectively. In addition to DPPH radical scavenging capacity, SPEP exhibited stronger biological activity than PEP at the same dose. These results suggested that sulfation modification might be an effective way to enhance antioxidant and hypoglycemic activities of the polysaccharide.

**Key words:** *Pleurotuseryngii* polysaccharide; sulfation; physicochemical properties; antioxidant; inhibition of enzyme activity

多糖是存在于植物、动物和微生物中的天然聚合物。在过去的几十年中, 人们发现多糖在生物体的生长发育过程中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。多糖的生物活性取

收稿日期: 2019-02-22

基金项目: 杨凌示范区产学研用协同创新重大项目(2016CXY-14)

作者简介: 伯继芳(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工与贮藏

通讯作者: 徐怀德(1964-), 男, 教授, 研究方向: 饮料加工、果品蔬菜贮藏与加工、天然产物提取

决于其理化性质和分子结构特征, 包括取代度(degree of substitution, DS)、分子量、组成成分、单糖组成、支化度、糖苷键和空间构象等<sup>[2-4]</sup>。

有研究表明, 对多糖进行化学修饰是引入官能团、提高多糖生物活性的有效手段<sup>[5]</sup>, 而硫酸化结构修饰是常见的结构修饰方法<sup>[6]</sup>。多糖中引入的硫酸基团使多糖端基碳的氢原子活泼, 因此, 硫酸化多糖具有更大提供氢的能力, 这有助于增强硫酸化多糖的抗氧化

能力和生物活性。近年来关于硫酸化多糖的抗氧化<sup>[2,7]</sup>、降血脂<sup>[8]</sup>、抗炎<sup>[9]</sup>和抗凝血性<sup>[10]</sup>等活性研究均有报导。

杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*) 又名刺芹侧耳, 隶属伞菌目侧耳科, 是一种药食两用的珍稀食用菌, 口味鲜美, 营养成分丰富, 含有多糖、多肽、酚类和海藻糖等多种活性成分, 被誉为“菇中之王”。因此, 近年来, 人们一直在尝试开发杏鲍菇作为功能性食品或传统中药的配料。多糖作为杏鲍菇的主要有效活性成分之一, 具有抗氧化活性<sup>[11]</sup>、抗高血糖<sup>[12]</sup>、抗肿瘤<sup>[13]</sup>和保肝等活性。关于杏鲍菇多糖 (*Pleurotus eryngii* polysaccharide, PEP) 的研究中, 多糖的获取方式大多是提取之后经过一次醇沉获得, 而乙醇的浓度与产物的分子大小、结构特征和生物活性有关, 分级醇沉后获得的片段多糖的结构与活性不一样<sup>[14-17]</sup>。有试验得出在乙醇浓度为 60% (V/V) 时获得三七分级醇沉片段多糖的活性最低<sup>[16]</sup>。同时已有的关于对褐藻多糖<sup>[18]</sup>、双胞菇多糖<sup>[10]</sup>、灵芝多糖<sup>[7,19]</sup>等食用菌多糖以及青钱柳多糖<sup>[6,20]</sup>、酸枣多糖<sup>[21]</sup>及黑加仑多糖<sup>[22]</sup>等植物多糖进行硫酸化结构修饰的研究甚多, 而关于对分级醇沉杏鲍菇多糖进行硫酸化结构修饰的研究很少。

因此, 本文采用两步分级醇沉得一种新型的杏鲍菇多糖 PEP-60, 研究其经硫酸化修饰前后结构的变化及体外抗氧化能力和降血糖活性, 旨在探究结构修饰对 PEP 的结构与生物活性的影响, 以及其内在联系, 从而为杏鲍菇的精深加工利用提供更多的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

材料: 大小均匀的棍棒状杏鲍菇 (杨陵区果蔬批发市场)。

试剂: 牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G-250、半乳糖醛酸、对硝基苯- $\alpha$ -D 葡萄糖苷酶 (PNPG)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶阿拉丁、 $\alpha$ -淀粉酶, 上海蓝季生物科技有限公司; 单糖标准品 (鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖等), Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂均为国内分析纯。

### 1.2 仪器与设备

HH-2A 电热恒温水浴锅, 北京科伟永兴仪器有限公司; GL-10 MD 大容量高速冷冻离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; R-100 旋转蒸发器, 布奇实验室设备贸易 (上海) 有限公司; Brucker Tensor 27 型红外光谱仪, 德国布鲁克公司; 2014 C 型气相色谱仪, 日

本岛津公司; UV-1780 紫外可见分光光度计, 岛津企业管理 (中国) 有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 PEP 提取与硫酸化结构修饰

PEP 的提取: 新鲜的杏鲍菇切条, 55 °C 烘干。粉碎过筛, 得杏鲍菇粉末, 料液比 (g/mL) 为 1:20, 90 °C 提取 3 h, 提取两次并合并上清液, 55 °C 减压浓缩。加无水乙醇使乙醇体积浓度 (V/V) 达 40%, 4 °C 下静置 24 h, 离心分离, 收集上清液, 并加无水乙醇使醇体积达 60%, 放置过夜得沉淀, 透析冻干得杏鲍菇多糖 PEP-60。

PEP 的硫酸化结构修饰: 本文采用氯磺酸-吡啶法 (chlorosulfonic acid-pyridine method, CSA-Pyr) 对 PEP 进行硫酸化修饰<sup>[7]</sup>。以 1:2, 1:5 和 1:8 (V/V) 的比例将 CSA 加入到 Pyr 中, 剧烈搅拌, 在冰浴中制备酯化试剂。反应结束后, 撤去冰盐浴, 酯化试剂于 -20 °C 封存, 备用。将 300 mg PEP-60 在室温下悬浮于 30 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 搅拌 15 min 后逐滴加入到酯化试剂中。在搅拌下于 70 °C 继续反应 2 h。反应完成后, 将混合物在冰浴中冷却至室温, 用 4 M NaOH 将溶液 pH 调节至 7。将溶液用 95% (V/V) 乙醇在 4 °C 下沉淀 12 h, 然后将沉淀物重新悬浮在蒸馏水中。将溶液透析并冻干得硫酸化多糖 (sulfated *Pleurotus eryngii* polysaccharide, SPEP), 依次命名为 SPEP-60<sub>1:2</sub>、SPEP-60<sub>1:5</sub>、SPEP-60<sub>1:8</sub>。

#### 1.3.2 DS 测定

SPEP-60 中硫酸根的含量采用 BaCl<sub>2</sub>-明胶比浊法<sup>[8]</sup>测定。称取样品 10 mg, 放入带盖可密封的小瓶, 加 2 mL 2.0 mol/L HCl, 100 °C 水解 6 h。取水解液 0.2 mL 加蒸馏水补到 1.0 mL, 加 8% 三氯乙酸溶液 0.7 mL, 0.5% BaCl<sub>2</sub>-明胶溶液 0.5 mL, 混合, 静置 20 min。同时做 3 组平行组。360 nm 波长条件下测定吸光度值 A<sub>1</sub>。用 0.5 mL 的明胶溶液代替 BaCl<sub>2</sub>-明胶溶液做对照组, 操作同上, 得吸光度值 A<sub>2</sub>。A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub> 即为所需吸光度 A<sub>0</sub>。以硫酸钾为标准获得硫酸根质量含量 X (mg/mL) 得标准曲线 (Y=3.5305X+0.0649, R<sup>2</sup>=0.9978), 由 A<sub>0</sub> 根据硫酸根标准曲线可计算出硫酸钾的质量。DS 计算公式如下:

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

式中: S 表示样品中硫的质量分数, %。

#### 1.3.3 PEP 修饰前后总糖和糖醛酸含量测定

以葡萄糖为标准, 采用苯酚-硫酸法在 490 nm 处测定杏鲍菇粗分级醇沉多糖总糖含量<sup>[23]</sup>; 以半乳糖

醛酸为标准, 采用咪唑-硫酸法确定杏鲍菇粗多糖糖醛酸含量<sup>[24]</sup>。

### 1.3.4 分子量测定

分子量测定依据 Wang 等<sup>[25]</sup>的方法略有修改。通过凝胶渗透色谱法 (GPC) 测定多糖样品的分子量 (Mw)。使用 Waters HPLC 装置, 其配备有 Ultrahydrogel 线性色谱柱 (7.8×300 mm) 和 2414 型折射率检测器, 通过各种标准葡聚糖获得标准曲线 ( $\text{LgMw} = -0.1316x + 10.94$ ,  $x$  表示保留时间,  $R^2 = 0.9938$ ), 根据标准曲线计算样品 Mw。

### 1.3.5 单糖组成测定

单糖组成的测定依据 Wang 等<sup>[26]</sup>的方法略有修改。样品处理: 取杏鲍菇多糖样品 5~10 mg, 经三氟乙酸水解、硼氢化钠还原、乙酰化生成相应的糖醇乙酰酯衍生物, 乙酰化产物经二氯甲烷溶解后, 过 0.25  $\mu\text{m}$  膜。单糖标品的处理方式除不需经三氟乙酸水解外, 其余步骤同样品处理方式。

气相色谱工作条件: 色谱柱为毛细管柱 DB-17 (30 m×0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ); 载气流速:  $\text{N}_2$ -1.5 mL/min,  $\text{H}_2$ -60 mL/min, 空气-450 mL/min; 检测器 (FID) 温度 280  $^\circ\text{C}$ ; 进样口温度 250  $^\circ\text{C}$ ; 进样量 1  $\mu\text{L}$  (自动进样); 分析时间共计 60 min。

### 1.3.6 抗氧化活性

#### 1.3.6.1 DPPH·清除能力

DPPH·清除能力的测定根据的 Wang 等<sup>[25]</sup>方法稍作修改。吸取不同质量浓度的待测液各 2.0 mL, 移入试管中, 加 0.1 mM DPPH·-乙醇溶液 2.0 mL, 置暗处 30 min, 在 517 nm 波长处测定吸光度。同时设置空白组和样品对照组。每组三个平行。以下式计算清除率。

$$\text{清除率 (\%)} = \frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{A_1} * 100\% \quad (2)$$

式中:  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  分别为 517 nm 处空白对照、抑制剂管和背景对照的吸光值。

#### 1.3.6.2 超氧阴离子自由基清除能力

超氧阴离子自由基清除能力的测定根据的 Sun 等<sup>[27]</sup>方法稍作修改。吸取 180  $\mu\text{L}$  25  $^\circ\text{C}$  温育的 Tris-HCl 溶液 (50 mmol/L, pH 8.2) 于 96 孔板中, 之后依次加入 20  $\mu\text{L}$  同样预热条件下预热的邻苯三酚溶液 (25 mmol/L) 和 40  $\mu\text{L}$  配制好的待测样品, 精确反应 3 min 后, 加入 8.0 M 的盐酸溶液 20  $\mu\text{L}$  结束反应于 425 nm 处测定吸光度。同时设置空白组和样品对照组。每组 3 个平行。清除率计算公式同式 (2)。

### 1.3.7 酶活性抑制能力

#### 1.3.7.1 $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性

$\alpha$ -淀粉酶的抑制活性根据的 Udupa 等<sup>[28]</sup>方法稍作修改。100  $\mu\text{L}$  各个浓度 (0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL) 的杏鲍菇粗多糖溶液与 100  $\mu\text{L}$  淀粉酶溶液 (0.1 U/mL) 在室温下预混合 15 min 后, 加入 200  $\mu\text{L}$  0.5% 可溶性淀粉溶液于 37  $^\circ\text{C}$  反应 10 min, 加入 1.0 mL DNS 试剂终止反应。反应液置沸水浴中 5 min 后于冰水浴中迅速冷却, 加 3.0 mL 蒸馏水稀释后测定 540 nm 处吸收值, 同时做样品对照。每组 3 个平行。多糖对  $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制率计算同式 (2)。

#### 1.3.7.2 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性

$\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性根据的 Chapdelaine 等<sup>[29]</sup>的方法稍作修改。以 PNPG 为底物测定杏鲍菇粗多糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用。2.0 mL 的 PBS (67 mmol/L pH = 6.8)、100  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (0.3 U/mL) 与 1.0 mL 不同浓度的杏鲍菇粗多糖溶液混合后 37  $^\circ\text{C}$  保温 10 min, 之后加入 200  $\mu\text{L}$  10 mmol/L PNPG 起始反应, 于 37  $^\circ\text{C}$  反应 20 min 后, 加入 3.0 mL 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 用分光光度计测定 400 nm 处的吸收值, 同时作样品对照。每组 3 个平行。计算方法同式 (2)。

## 1.4 数据分析

运用 Excel 2010 和 SPSS 16.0 软件进行作图与数学统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DS 和多糖组成成分分析

多糖的生物活性取决于它们的理化性质和分子结构特征。多糖中的硫酸基团能够使 O-H 键的解离能较弱<sup>[30]</sup>, 因此硫酸化多糖具有更大的提供氢的能力, 这增强了硫酸化多糖的抗氧化能力和生物活性。本研究采用 CSA-Pyr 法对 PEP 进行结构修饰, 制备了三种 SPEP-60 样品分别命名为 SPEP-60<sub>1.2</sub>, SPEP-60<sub>1.5</sub> 和 SPEP-60<sub>1.8</sub>。由表 1 可知, 随着酯化试剂中 CSA 的比例增加, 硫酸化衍生物的硫含量从 4.40%±0.05% 降到 3.32±0.02%, 其 DS 的范围是 0.19±0.00~0.26±0.00, 此外, 硫酸化多糖的硫酸盐含量按照 SPEP-60<sub>1.2</sub>>SPEP-60<sub>1.5</sub>>SPEP-60<sub>1.8</sub> 的顺序依次降低。此结果表明, 本试验成功制备了具有不同 DS 的硫酸化多糖。

为进一步表征样品成分, 本论文对 SPEP-60<sub>1.2</sub>, SPEP-60<sub>1.5</sub> 和 SPEP-60<sub>1.8</sub> 中糖醛酸和总糖含量进行了测定。如表 1 所示, PEP 中的总糖 (69.27%±0.23%) 和糖醛酸 (9.23%±0.64%) 的含量明显高于 SPEP-60。在 SPEP-60<sub>1.2</sub> 中发现, 总糖 (30.01%±0.66%) 和糖醛

酸(5.21%±0.28%)的含量最低。在所有 SPEP 中,发现 SPEP-60<sub>1.8</sub> 总糖含量最高(43.36%±2.35%),SPEP-60<sub>1.2</sub>(30.01%±0.66%)最低。随酯化试剂中 Pyr 含量的增加,PEP 的总糖和糖醛酸含量按 SPEP-60<sub>1.2</sub><SPEP-60<sub>1.5</sub><SPEP-60<sub>1.8</sub> 的顺序依次增加,但均低于天然多糖 PEP-60,这与 Xie 等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。

GC 用于分析多糖样品的单糖组成,结果如表 1 所示。通过与相同条件下标准品的保留时间比较鉴定峰。结果表明,所有硫酸化衍生物均为典型的杂多糖,由鼠李糖,岩藻糖,阿拉伯糖,木糖,甘露糖,

葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比不同(SPEP-60<sub>1.2</sub>, 4.42:2.38:1.11:11.03:20.81:22.27:37.99, SPEP-60<sub>1.5</sub>, 2.77:1.60:2.67:6.56:27.25:39.74:19.41, SPEP-60<sub>1.8</sub>, 7.12:9.45:8.42:33.35:16.90:12.88:11.87, 表 1)。发现甘露糖,葡萄糖,半乳糖是所有样品糖骨架的主要单糖,这与从杏鲍菇中分离的水溶性多糖的单糖组成一致<sup>[11]</sup>。虽然硫酸化导致 Mw 的减少和硫酸化衍生物的单糖组成的微小变化,但在所有多糖样品中检测到了七种中性糖。这些结果表明,在我们的研究中,结构修饰不会导致硫酸化多糖主链的破坏。

表 1 硫酸化杏鲍菇多糖的 DS 以及理化性质分析

Table 1 DS and physicochemical properties analysis of sulfated *Pleurotus eryngii* polysaccharide

成分	SPEP-60 <sub>1.2</sub>	SPEP-60 <sub>1.5</sub>	SPEP-60 <sub>1.8</sub>	PEP-60
总糖(w%)	30.01±0.66 <sup>d</sup>	36.60±1.84 <sup>c</sup>	43.36±2.35 <sup>b</sup>	69.27±0.23 <sup>a</sup>
糖醛酸(w%)	5.21±0.28 <sup>c</sup>	5.30±0.14 <sup>c</sup>	6.51±0.18 <sup>b</sup>	9.23±0.64 <sup>a</sup>
S(%)	4.40±0.05 <sup>a</sup>	3.67±0.05 <sup>b</sup>	3.32±0.02 <sup>c</sup>	/
DS	0.26±0.00 <sup>a</sup>	0.21±0.00 <sup>b</sup>	0.19±0.00 <sup>c</sup>	/
多糖样品中的单糖组成(mol%)				
鼠李糖	4.42	2.77	7.12	1.95
岩藻糖	2.38	1.60	9.45	3.60
阿拉伯糖	1.11	2.67	8.42	0.60
木糖	11.03	6.56	33.35	0.92
甘露糖	20.81	27.25	16.90	58.35
葡萄糖	22.27	39.74	12.88	15.34
半乳糖	37.99	19.41	11.87	19.26

注:“/”表示未检测;同一行中的不同字母表示存在差异显著( $p<0.05$ )。

图 2 硫酸化杏鲍菇多糖的分子量

Table 2 Mw analysis of sulfated *Pleurotus eryngii* polysaccharide

名称	SPEP-60 <sub>1.2</sub> -1	SPEP-60 <sub>1.2</sub> -2	SPEP-60 <sub>1.5</sub> -1	SPEP-60 <sub>1.5</sub> -2	SPEP-60 <sub>1.8</sub> -1	SPEP-60 <sub>1.8</sub> -2	PEP-60-1	PEP-60-2
Mw/ku	51.03	4.44	48.57	4.46	46.33	4.89	53.63	4.91
所占比例/%	89.85	10.15	77.69	22.31	91.04	8.96	85.49	14.51

注: -1 是相应样品先出的峰, -2 是相应样品后出来的峰。

## 2.2 分子量 (Mw)

硫酸多糖的 Mw 是影响其生物活性的另一个重要参数<sup>[6]</sup>。多糖衍生物的 Mw 是影响其生物活性的重要因素<sup>[6,31]</sup>,据推测具有低分子量的多糖将具有更多的还原性羟基末端<sup>[32]</sup>。本文中 PEP 及 PEP 的 Mw 测量结果如表 2 所示,可知 PEP-60 在硫酸化修饰前后分子量不均一,主要组成成分的 Mw 分别为 53.63、51.03、48.57、46.33 ku。在所有 PEP 中,随着结构修饰过程中吡啶含量的增加,多糖主要成分的 Mw 增大,次要成分的 Mw 的几乎未变。三种 PEP 具有比天然多糖 PEP-60 小的 Mw,这是因为在多糖硫酸化反应过程中,CSA 的酸水解会使多糖的降解<sup>[33]</sup>。以上结果表明本试

验成功制备了三种不同 Mw 的 PEP。

## 2.3 抗氧化活性

### 2.3.1 DPPH·清除能力

DPPH·的减少会使溶液颜色发生改变,从而能快速简便的检测抗氧化活性<sup>[34]</sup>。因此,用 DPPH·清除活性测定了硫酸化的杏鲍菇多糖的抗自由基作用,并与天然多糖进行了比较。天然多糖 PEP-60 及 SPEP-60<sub>1.2</sub>,SPEP-60<sub>1.5</sub> 和 SPEP-60<sub>1.8</sub> 对 DPPH·清除能力如图 1 所示,所有样品对 DPPH·的清除活性均显示出浓度依赖性,且结构修饰后 DPPH·清除能力较弱。相同浓度下四种杏鲍菇多糖的清除率依次为: PEP-60>SPEP-60<sub>1.8</sub>>SPEP-60<sub>1.2</sub>>SPEP-60<sub>1.5</sub>。在浓度为 2.0 mg/mL 时,

SPEP-60<sub>1.2</sub>、SPEP-60<sub>1.5</sub>和SPEP-60<sub>1.8</sub>对DPPH·的清除作用分别为24.32%±0.20%、21.51%±0.86%和26.81%±0.91%。结果表明,所有SPEP均能清除DPPH·,特别是在高浓度时,但清除活性均低于PEP,这与贾红倩<sup>[35]</sup>的研究结果一致,可能是由于-O-SO<sub>3</sub>H基团未能激活异头碳上的氢原子,因为激活程度越低,供氢能力越弱,抗氧化能力越低<sup>[36]</sup>。

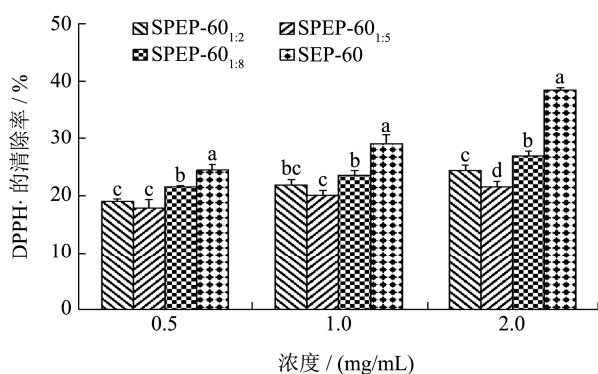


图1 硫酸化杏鲍菇多糖对DPPH·的清除能力

Fig.1 Scavenging effects of sulfated *Pleurotus eryngii* polysaccharide towards DPPH· radicals

注:同一浓度的不同字母表示存在显著差异( $p < 0.05$ ),相同字母表示无显著性差异/差异不显著。

### 2.3.2 O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力

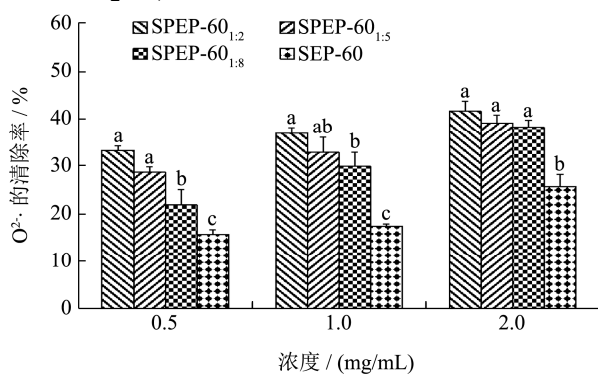


图2 硫酸化杏鲍菇多糖对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除能力

Fig.2 Scavenging effects of sulfated *Pleurotus eryngii* polysaccharide towards superoxide anion radicals

注:同一浓度的不同字母表示存在显著差异( $p < 0.05$ ),相同字母表示无显著性差异/差异不显著。

分子氧(O<sub>2</sub>)是人类生活所必需的,它不是非常活泼的,然而在生理条件下,它很容易转化为不同的活性氧,其中之一是超氧阴离子自由基,这可能导致人体损伤。天然多糖PEP-60及其三种硫酸化多糖SPEP-60<sub>1.2</sub>、SPEP-60<sub>1.5</sub>和SPEP-60<sub>1.8</sub>对O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力如图2所示,所有样品对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除活性均显示出浓度依赖性。相同浓度下四种杏鲍菇多糖的清除率依次为:SPEP-60<sub>1.2</sub>>SPEP-60<sub>1.5</sub>>SPEP-60<sub>1.8</sub>>PEP-60。PEP对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除作用随酯化试剂中氯磺酸量的增加而增

强。相比PEP-60,三种浓度下SPEP的活性分别至少提高了39.77%、72.05%和48.54%。SPEP-60<sub>1.2</sub>、SPEP-60<sub>1.5</sub>和SPEP-60<sub>1.8</sub>对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除率最高依次为41.68%±2.03%,39.09%±1.78%,38.27%±1.40%。这些结果表明,硫酸化结构修饰虽能够有效提高PEP-60对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除活性,但在试验范围SPEP对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除活性不高,这也许是因为硫酸基团(吸电子基团)的存在,O-H的解离能大,从而为O<sub>2</sub><sup>-</sup>供氢能力弱,表现出较弱的清除能力<sup>[37]</sup>。

## 2.4 酶活性抑制作用

### 2.4.1 α-淀粉酶活性抑制作用

α-淀粉酶抑制剂能够有效抑制肠道内唾液及胰淀粉酶的活性。α-淀粉酶与α-葡萄糖苷酶这两种酶抑制剂通过调控碳水化合物的降解,延缓葡萄糖在肠道内的吸收,进而降低餐后血糖,是目前进行糖尿病防治比较有效的方法<sup>[38]</sup>。天然多糖PEP-60及其三种硫酸化多糖SPEP-60<sub>1.2</sub>、SPEP-60<sub>1.5</sub>和SPEP-60<sub>1.8</sub>对α-淀粉酶活性的抑制情况如图3所示。除PEP-60外,SPEP对α-淀粉酶活性的抑制均显示出浓度依赖性,且其酶抑制活性最少提高了8.38倍,最多高达44.09倍,说明硫酸化结构修饰能够有效提高PEP-60对α-淀粉酶活性的抑制。即使当SPEP在浓度较低(0.5 mg/mL)时,SPEP-60<sub>1.2</sub>、SPEP-60<sub>1.5</sub>和SPEP-60<sub>1.8</sub>对酶活性的抑制作用分别高达49.70%、51.26%和54.05%,酶活性抑制作用至少提高了9.34倍,说明SPEP即使在较低浓度时也能有效抑制α-淀粉酶的活性,其有可能作为降血糖的酶抑制剂药物而应用于临床实践。

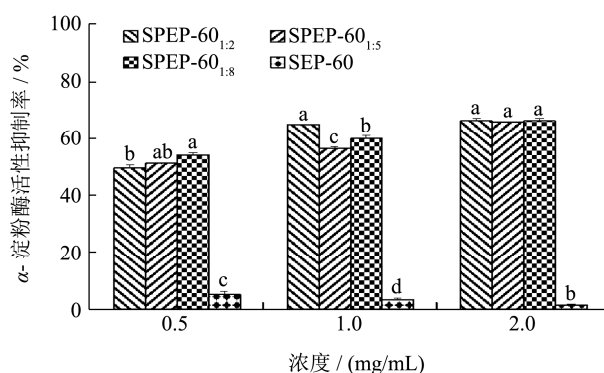


图3 硫酸化杏鲍菇多糖对α-淀粉酶活性抑制作用测定

Fig.3 Inhibitory effect of sulfated *Pleurotus eryngii* polysaccharide on the activity of α-amylase

注:同一浓度的不同字母表示存在显著差异( $p < 0.05$ ),相同字母表示无显著性差异/差异不显著。

### 2.4.2 α-葡萄糖苷酶活性抑制作用

α-葡萄糖苷酶抑制作为治疗II型糖尿病的有效药物,越来越受到人们的青睐。α-葡萄糖苷酶存在于人

体的小肠刷状缘上,能催化含有 $\alpha$ -糖苷键的底物水解产生葡萄糖,从而促进这些碳水化合物的吸收和利用<sup>[39]</sup>。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂能够和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性中心结合,从而降低 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,延缓或抑制葡萄糖在消化道内的消化、吸收,进而控制餐后血糖浓度。

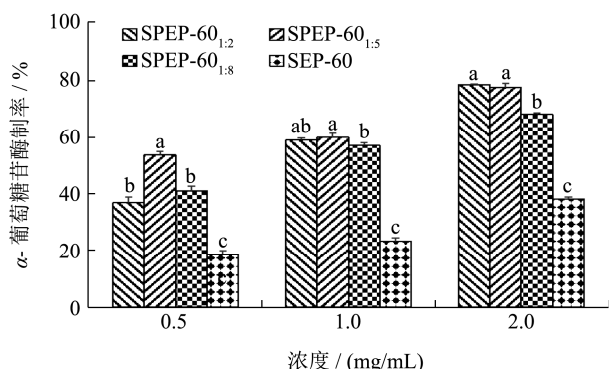


图4 硫酸化杏鲍菇多糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定

Fig.4 Inhibitory effect of sulfated *Pleurotus eryngii*

#### Polysaccharide on the activity of $\alpha$ -glucosidase

注:同一浓度的不同字母表示存在显著差异( $p < 0.05$ ),相同字母表示无显著性差异/差异不显著。

天然多糖 PEP-60 及其三种硫酸化多糖 SPEP-60<sub>1.2</sub>, SPEP-60<sub>1.5</sub> 和 SPEP-60<sub>1.8</sub> 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制情况如图4所示。所有样品对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制均显示出浓度依赖性,且相比 PEP,三种浓度下 SPEP 的酶抑制活性依次至少提高了 0.98 倍、1.42 倍和 0.89 倍。即使在低浓度 0.5 mg/mL 时, SPEP-60<sub>1.5</sub> 的酶抑制率(53.56%±0.54%)也大于 50%。当样品的浓度 $\geq 1.0$  mg/mL 时, SPEP-60<sub>1.2</sub>、SPEP-60<sub>1.5</sub> 和 SPEP-60<sub>1.8</sub> 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制率最低为 56.05%±0.20%,最高高达 78.13%±0.79%。此结果说明硫酸化结构修饰能够有效地提高多糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用,有可能用于控制和治疗糖尿病。

### 3 结论

本研究从杏鲍菇中提取了杏鲍菇多糖(PEP-60),并成功地对其进行了硫酸化修饰进而得到 SPEP-60<sub>1.2</sub>、SPEP-60<sub>1.5</sub> 和 SPEP-60<sub>1.8</sub> 三种结构修饰多糖。它们的取代度(DS)依次为 0.26±0.00、0.21±0.00 与 0.19±0.00,主要成分 Mw 依次为 51.03、48.57 和 46.33 ku。抗氧化活性和降血糖活性表明,在所有的 SPEP 中, SPEP-60<sub>1.8</sub> 的 DS (0.19±0.00) 和 Mw (46.33 ku) 最低、总糖(43.36%±2.35%)与糖醛酸含量(6.51%±0.18%)最高,对 DPPH·清除能力最佳; SPEP-60<sub>1.2</sub> 的 DS (0.26±0.00) 和 Mw (51.03 ku) 最高、总糖(30.01%±0.66%)与糖醛酸(5.21%±0.28%)

含量最低,对 O<sub>2</sub>·清除力最强。SPEP-60<sub>1.2</sub>、SPEP-60<sub>1.5</sub> 和 SPEP-60<sub>1.8</sub> 对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制活性分别至少提高了 834.33%和 97.66%。除 DPPH·清除能力外,在相同剂量下 SPEP 比 PEP 表现出更强的生物活性,这主要是由于官能团的引入,它们的 DS 和 Mw 的变化导致生物活性的变化,此结果表明硫酸化修饰是提高多糖抗氧化降糖活性的有效途径。本文研究结果表明,硫酸化结构修饰后的 PEP 具有更强的生物活性,拓宽了它的生物学应用。对 SPEP 的结构和生物活性的作用机制研究尚需进行深入研究,从而为制备具有特定功能的多糖提供更多理论依据。

### 参考文献

- [1] 秦建鲜,黄锁义.广西壮药鸡骨草总多糖和分级多糖相对分子质量的测定[J].化学世界,2016,57(10):617-622  
QIN Jian-xian, HUANG Suo-yi. Determination of relative molecular mass of total polysaccharide and classified polysaccharide from Guangxi Zhuang medicine *Abrus cantoniensis* Hance [J]. Chemical World, 2016, 57(10): 617-622
- [2] 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  
SHEN Jin-wen, WANG Rui-rui, XU Chun-pin. Study on preparation and bioactivity of sulfated saccharides of *Pleurotus geesteranus* [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2014, 43(7): 102-106
- [3] Asker M S, Shawky B T. Structural characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide isolated from *Brevibacterium otitidis* BTS 44 [J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 315-320
- [4] WANG Z, XIE J, SHEN M, et al. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities [J]. Trends in Food Science and Technology, 2018, 74: 147-157
- [5] 孟思彤,徐艳芝,王振月.多糖的化学修饰对其生物活性影响研究进展[J].天然产物研究与开发,2014,11:1901-1905  
MENG Si-tong, XU Yan-zhi, WANG Zhen-yue. Research progress on chemical modification of polysaccharide and their biological activities [J]. Natural Product Research and Development, 2014, 11: 1901-1905
- [6] XIE J, WANG Z, SHEN M, et al. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocaryapaliurus* [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53(53): 7-15
- [7] CHEN Y, ZHANG H, WANG Y, et al. Sulfated modification

- of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities [J]. Food Chemistry, 2015, 186: 231-238
- [8] 王凯,王中红,李芳萍,等.孔石莼多糖及其硫酸酯化衍生物降血脂机制的体外研究[J].中国海洋药物,2018,37(2):81-87  
WANG Kai, WANG Zhong-hong, LI Fang-ping, et al. The mechanism of *Ulva pertusa* and its derivative on decreasing blood-lipid *in vitro* [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2018, 37(2): 81-87
- [9] HOANG M H, KIM J Y, LEE J H, et al. Antioxidative, hypolipidemic, and anti-inflammatory activities of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* [J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(1): 199-205
- [10] Roman Y, Iacomini M, Sasaki G L, et al. Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of *Agaricus bisporus fucogalactan* [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 146: 345-352
- [11] 罗懿洋,任道远,陈丽芳,等.杏鲍菇多糖的单糖组成分析及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2015,36(8):158-161  
LUO Yi-yang, REN Dao-yuan, CHEN Li-fang, et al. Study on analysis and antioxidant activity *in vitro* of the monosaccharide composition of *Pleurotus eryngii* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 158-161
- [12] ZHANG C, LI J, WANG J, et al. Antihyperlipidaemic and hepatoprotective activities of acidic and enzymatic hydrolysis exopolysaccharides from *Pleurotus eryngii* SI-04 [J]. Bmc Complementary & Alternative Medicine, 2017, 17(1): 403
- [13] Alfred Mugambi Mariga, Wen-Jian Yang, Dorothy Kemuma Mugambi, et al. Antiproliferative and immunostimulatory activity of a protein from *Pleurotus eryngii* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014, 94(15): 3152-3162
- [14] 蒋俊,罗珍,刘艳芳,等.醇沉条件对猴头菌多糖得率和品质的影响[J].食用菌学报,2011,18(2):57-61  
JIANG Jun, LUO Zhen, LIU Yan-fang, et al. Effect of precipitation conditions on the yield and quality of *Hericium erinaceus* polysaccharides [J]. Acta Edulis Fungi, 2011, 18(2): 57-61
- [15] 杨军国,陈键,王丽丽,等.醇沉分级粗茶多糖的抗氧化活性比较及变化机制[J].食品工业科技,2016,37(17):96-100  
YANG Jun-guo, CHEN Jian, WANG Li-li, et al. Comparison of the antioxidant activity of tea polysaccharide samples by precipitation fractionation with ethanol and the related mechanism analysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(17): 96-100
- [16] LI J E, WANG W J, ZHENG G D, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Gynura procumbens* leaves by fractional precipitation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 719-724
- [17] GUO X, MENG H, ZHU S, et al. Stepwise ethanolic precipitation of sugar beet pectins from the acidic extract [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136(2): 316-321
- [18] ZHANG H, WANG J, NIE S, 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
- [19] WANG J, ZHANG L, YU Y, et al. Enhancement of antitumor activities in sulfated and carboxymethylated polysaccharides of *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(22): 10565-10572
- [20] WANG Y, SHEN X, LIAO W, et al. A heteropolysaccharide, L-fuco-D-manno-1,6- $\alpha$ -D-galactan extracted from *Grifolafrondosa* and antiangiogenic activity of its sulfated derivative [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101(1): 631-641
- [21] Yuqing CAI, Peng CHEN, Cuiyun WU, et al. Sulfated modification and biological activities of polysaccharides derived from *Zizyphusjuzuba* cv. Jinchangzao [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1149-1155
- [22] XU Y, GAO Y, LIU F, et al. Sulfated modification of the polysaccharides from blackcurrant and their antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 1344-1354
- [23] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356
- [24] Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 484-489
- [25] WANG X, CHEN Q, LU X, et al. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38(3): 129-137
- [26] WANG X, ZHANG L H, WU J L, et al. Improvement of simultaneous determination of neutral monosaccharides and uronic acids by gas chromatography [J]. Food Chemistry, 2017, 220(1): 198-207
- [27] SUN Y, HU X, LI W, et al. Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from

- Pleurotus eryngii* mycelium [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 97: 323-330
- [28] Udupa S L, Prabhakar A R, Tandon S.  $\alpha$ -amylase inhibitors in foodstuffs [J]. Food Chemistry, 1989, 34(2): 95-101
- [29] Chapdelaine P, Tremblay R R, Dube J Y. P-Nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen [J]. Clinical Chemistry, 1978, 24(2): 208-211
- [30] 张海平,郑明明,黄凤洪,等.多糖酯的制备与活性研究进展[J].中国油脂,2017,42(11):116-120  
ZHANG Hai-ping, ZHENG Ming-ming, HUANG Feng-hong, et al. Advance in preparation and bioactivity of polysaccharose ester [J]. China Oils and Fats, 2017, 42(11): 116-120
- [31] 卢可可,张月巧,袁娅,等.硫酸化修饰多糖抗肿瘤活性构效关系及分子机制研究进展[J].食品科学,2014,35(23):297-302  
LU Ke-ke, ZHANG Yue-qiao, YUAN Ya, et al. Progress in the studies of the structure-antitumor activity relationship of sulfated polysaccharides and its molecular mechanisms [J]. Food Science, 2014, 35(23): 297-302
- [32] WANG J, HU S, NIE S, et al. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 64: 1-13
- [33] 杜湛湛,张婧,徐平,等.粒毛盘菌多糖纯化、硫酸酯化修饰及抗氧化活性评价[J].合肥工业大学学报(自然科学版),2016, 39(1):134-139  
DU Zhan-zhan, ZHANG Qiang, XU Ping, et al. Purification and sulfated modification of a *Lachnum* polysaccharides and evaluation of its antioxidant activity [J]. Journal of Hefei University of Technology (Natural Science), 2016, 39(1): 134-139
- [34] JUNG H Y, BAE I Y, LEE S, et al. Effect of the degree of sulfation on the physicochemical and biological properties of *Pleurotus eryngii* polysaccharides [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1291-1295
- [35] 贾红倩,刘嵬,颜军,等.杏鲍菇多糖的分离纯化、乙酰化修饰及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2018,3:39-44  
JIA Hong-qian, LIU Wei, YAN Jun, et al. Isolation and purification, acetylation modification and antioxidant activity of polysaccharides of *Pleurotus eryngii* Quel [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 3: 39-44
- [36] WANG J, GUO H, ZHANG J, et al. Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 897-905
- [37] ZHU X Y, JIAN MIN W U. Superoxide anion radical scavenging ability of quaternary ammonium salt of chitosan [J]. Chinese Chemical Letters, 2004, 15(7): 808-810
- [38] 李东文,苏明声,龙凯,等.桦褐孔菌菌质提取物对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用研究[J].食用菌,2017,39(2): 14-16  
LI Dong-wen, SU Ming-sheng, LONG Kai, et al. Inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by the extract of *Inonotus obliquus* [J]. Edible Fungi, 2017, 39(2): 14-16
- [39] 季芳,肖国春,董莉,等.药用植物来源的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂研究进展[J].中国中药杂志,2010,35(12):1633-1640  
JI Fang, XIAO Guo-chun, DONG Li, et al. Development of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from medicinal herbs [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(12): 1633-1640

(上接第 29 页)

- [26] 王晓红,孔登,李万忠.青钱柳水提物对糖尿病肾病大鼠血脂、血凝和脂质过氧化的影响[J].现代食品科技,2016,32(6): 1-6,187  
WANG Xiao-hong, KONG Deng, LI Wan-zhong. Effects of aqueous extracts from *Cyclocarya paliurus* leaves on blood lipids, hemagglutination, and lipid peroxidation in rats with diabetic nephropathy [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 1-6, 187
- [27] 龚频,张梦璇,李晓凡,等.原花青素对糖尿病大鼠肾的保护作用[J].现代食品科技,2018,34(9):1-5,11  
GONG Pin, ZHANG Meng-xuan, LI Xiao-fan, et al. Protection of proanthocyanidins on kidney in diabetic rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(9): 1-5, 11
- [28] Guo C, Dong Y, Zhu H, et al. Ameliorative effects of protodioscin on experimental diabetic nephropathy [J]. Phytomedicine, 2018, 51: 77-83
- [29] 程敏,胡选生,程楠,等.墨旱莲石油醚提取物对 STZ 糖尿病大鼠生化指标及肾组织病理学的影响[J].中国药理学通报,2018,34(3):407-411  
CHENG Min, HU Xuan-sheng, CHENG Nan, et al. Effect of petroleum ether extract of *eclipta prostrate* on biochemical parameters and histopathology of kidney in STZ-induced diabetic rats [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(3): 407-411