

多糖的硫酸酯化及其对结构和功能活性的影响研究进展

刘波¹,袁利鹏^{1*},熊波²,彭述辉³,刘旭光¹

(1.广东农工商职业技术学院热作系,广东广州 510507

2.广东产品质量监督检验研究院,广东顺德 528300

3.广州城市职业学院食品系,广东广州 510405)

摘要:硫酸酯化是近年来常见的多糖分子修饰方法,通过对多糖进行硫酸酯化修饰可以极大的改善多糖的功能特性。因此,本文首先综述了近年来常见的多糖硫酸酯化方法,然后从结构和功能两个方面,深入阐述了硫酸酯化对多糖分子结构和功能活性的影响,旨在为多糖硫酸酯的进一步研究提供参考。

关键词:多糖硫酸酯,结构,功能

Research advance in polysaccharides sulfated and its effect on the structure and function activity of polysaccharides

LIU Bo¹, YUAN Li-peng^{1*}, XIONG Bo², PENG Shu-hui³, LIU Xu-guang¹

(1.Tropical Crops Department, Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510507, China;

2.Guangdong Provincial Product Quality Supervision and Inspection Institute, Shunde 528300, China;

3.Department of Food, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Sulfated is a common method for polysaccharides molecular modification. Through sulfated, the function of polysaccharides can greatly be improved. To provide reference for further research of sulfated polysaccharides, the common methods for polysaccharides sulfated are overviewed in this article, and the influence of sulfated on the molecular structure and function of activity is also expounded.

Key words: sulfated polysaccharides; structure; function

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)22-0372-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.22.068

多糖是生物体内除蛋白质和核酸外,又一类重要的生物大分子,与机体的免疫调节、细胞间物质的运输、癌症治疗等^[1-3]都有密切的关系,对维持机体正常的生命活动起着重要的作用。然而研究表明,天然多糖的生物活性相对较低,而且由于天然多糖的溶解性较差,导致其功能活性得不到充分的利用。研究发现利用分子修饰的方法制备多糖衍生物,可以改善天然多糖的生物活性。硫酸酯化是目前较为常用的多糖衍生化方法,已成为近年来研究热点,研究结果表明经硫酸酯化修饰后,多糖的生物活性可以得到明显增强或增加,水溶性也可得到改善^[4-7]。

本文首先介绍了近年来常见的多糖硫酸酯的制备方法,然后从结构和功能两个方面,分析了硫酸酯化对多糖分子结构和功能特性的影响,以期能为多糖

硫酸酯的进一步研究提供参考。

1 多糖硫酸酯的制备方法

由于硫酸酯的功能活性与硫酸基的取代度具有一定的正相关性,因此为了获得具有较高活性的多糖硫酸酯,研究人员开发了多种多糖硫酸酯的制备工艺,其中常用的方法主要有:浓硫酸法、氯磺酸-吡啶法和三氧化硫-吡啶法。

1.1 浓硫酸法

浓硫酸法^[8-9]是以正丁醇为溶剂,用浓硫酸与多糖的醇羟基发生取代反应,从而获得多糖硫酸酯的制备方法。其步骤如下:向带干燥管和搅拌装置的三颈烧瓶中加入适量体积的浓硫酸和正丁醇,其体积比为3:1,然后加入一定量的硫酸铵,搅拌,冰浴冷却至0℃,然后缓慢加入多糖样品约0.5~1g,于0℃反

收稿日期:2015-03-01

作者简介:刘波(1980-),女,硕士研究生,讲师,研究方向:食品营养与安全,E-mail:rainbow719518@126.com。

*通讯作者:袁利鹏(1979-),男,硕士研究生,副教授,研究方向:食品加工与检测,E-mail:lipengwillboy@126.com。

基金项目:国家自然科学基金(31071518);国家科技支撑计划课题(2012BAD31B03);广东省科技计划项目(2010B080701079);羊城学者计划项目(10B005D);广东省教育厅高等学校优秀青年教师培养计划项目(2014145)。

应30 min左右。反应液用2 mol/L的NaOH中和、离心后,用蒸馏水透析24 h,减压浓缩至20 mL左右,然后用乙醇进行沉淀,静置后离心,收集沉淀物,将沉淀物溶解于水,再透析24 h,透析液经冷冻干燥后即得硫酸酯化产物。熊波等^[10]利用该方法制备了魔芋葡甘聚糖硫酸酯,经硫酸钡比浊法分析,结果显示经硫酸酯化取代的魔芋葡甘聚糖硫酸酯的取代度约为0.8左右。胡爱军等^[11]也利用该方法制备了取代度约为0.5左右的香豆胶硫酸酯。浓硫酸法制备多糖硫酸酯产物杂质少,易分离,但是该方法取代度较低、产率较差。

1.2 氯磺酸-吡啶法

氯磺酸-吡啶法^[12-13]是利用氯磺酸中的氯与多糖的醇羟基发生取代反应,从而制备多糖硫酸酯的方法。其主要步骤如下:将适量氯磺酸缓慢加入预冷的吡啶中,氯磺酸与吡啶的体积比控制在1:4~1:6之间(可根据多糖的种类进行适当调整),氯磺酸的加入速度为10 mL/(30~40) min,以制备酯化试剂;同时,将多糖溶解于适量的N,N-二甲基甲酰胺中,制得多糖悬浮液;然后将多糖悬浮液加入酯化试剂中,水浴反应2~3 h,反应结束后冷却至室温,将反应液倒入100~200 mL预冷的蒸馏水中,用2 mol/L的NaOH调pH7.0;最后,加入4倍体积的无水乙醇沉淀,静置12 h后离心,收集沉淀,将沉淀溶于水,对蒸馏水透析48 h后,冷冻干燥,即得到多糖硫酸酯。Zhao XY等^[14]采用此方法制备了银耳多糖硫酸酯,产物的取代度可达到1.45。该方法产物收率较好,取代度高,然而由于氯磺酸具有极强的腐蚀性,对人体危害较大。

1.3 三氧化硫-吡啶法

三氧化硫-吡啶法^[15-16]是利用三氧化硫与有机碱的复合物与醇类发生反应制备多糖硫酸酯,适用于酚羟基或具有较强酸性羟基的硫酸酯化。其步骤如下:量取30 mL吡啶加入附有冷凝管和搅拌装置的100 mL的三颈瓶中,边搅拌边加入三氧化硫-吡啶2.5~3.0 g,然后于热水浴中加热至90 ℃,再加入0.5 g多糖,恒温搅拌2~3 h,冷却至室温,反应液用4 mol/L的NaOH溶液调pH至中性,加入4倍体积的无水乙醇,析出沉淀,离心,收集沉淀,将沉淀溶于水,透析72 h,冷冻干燥即得多糖硫酸酯化产物。刘国庆等^[17]采用此方法制备了酵母多糖硫酸酯,硫酸基含量可达15.1%,取代度达1.47。该方法不仅制备工艺简单,反应条件温和,而且制备的硫酸酯取代度也较高,是近年来较为常见的多糖硫酸酯的制备方法。

2 硫酸酯化对多糖分子结构的影响

硫酸酯化对多糖分子结构的影响主要包括两方面:一是硫酸酯化过程中多糖分子链发生降解,形成具有较高活性的中聚糖;另一方面是硫酸基的修饰引起糖链分子构象发生变化,从而导致多糖生物活性发生改变^[18]。

2.1 硫酸酯化对多糖分子量的影响

结构是功能的基础,构效关系的研究为筛选具有特定活性的多糖及进行分子修饰提供理论指导。

研究表明,硫酸酯化对多糖分子量的影响较为显著。韩亮等^[19-21]利用高效凝胶色谱对酸酯化玉米芯木聚糖的分子量进行测定,发现经过硫酸酯化后玉米芯木聚糖的平均分子量从30000 u下降至13396 u,而且经硫酸酯化后,木聚糖能够直接抑制纤维蛋白的转化和凝血酶活性,具有良好的抗凝血活性,其抗凝血活性与木聚糖的取代度成正比。由此可以推测,硫酸酯化可通过降低多糖的分子量,从而形成具有较高活性的多糖分子片段。

2.2 硫酸酯化对多糖分子构象的影响

沃尔默特^[22]认为,多糖的羟基被硫酸基取代后,硫酸基之间的排斥作用使糖链伸长,部分硫酸基与羟基形成氢键,导致螺旋结构产生,呈有活性的高级构象。因此,硫酸基的数目和链接的位置对多糖高级活性构象的形成具有重要的作用。Alban等^[23]研究了支链淀粉硫酸酯的抗凝血活性,结果显示直链淀粉的抗凝血活性与2,3,4位的葡萄糖单体上是否有硫酸基取代密切相关。Chaidedgumjorn等^[24]也认为多糖硫酸酯的抗凝血活性不仅取决于硫酸多糖的构型和所含的单糖种类,也取决于硫酸基所在的糖苷键位置,若硫酸基团连接在(1→3)键,则多糖硫酸酯具有抗凝血活性,若连接在(1→4)键,则多糖硫酸酯无抗凝血活性。在对鱿鱼墨多糖硫酸酯和壳聚糖硫酸酯的研究中^[25-30],也都发现硫酸基的位置对多糖硫酸酯的功能活性具有显著的影响。

3 硫酸酯化对多糖功能活性的影响

多糖经硫酸基修饰后,其分子结构发生了明显的变化,而分子结构的改变往往导致天然产物的生物活性发生改变。同样,硫酸酯化后的多糖也表现出与天然多糖不同的生物活性。

3.1 抗氧化

多糖的抗氧化活性,主要体现在其对自由基和活性氧的清除作用,一般认为这是由于自由基可以夺取多糖碳氢链上的氢,而多糖的羰基部分经氧化形成过氧自由基而进一步分解^[31]。张雅丽等^[32]报道,经硫酸酯化后的柿子多糖的还原力和对DPPH自由基、超氧自由基、羟基自由基的清除能力明显增强。谢佳等^[33]研究也发现,硫酸酯化南瓜多糖能有效的清除超氧阴离子自由基,而未经硫酸酯化的南瓜多糖对自由基的清除作用不明显。

3.2 抗病毒

多糖的抗病毒活性主要依赖于多糖分子的空间构象^[34-35],而经硫酸酯化后,多糖的空间构象改变恰好能够使多糖的抗病毒活性增强。多糖硫酸酯的抗病毒特性,主要体现在其对HIV的抑制作用,这可能是由于以下两方面的原因造成的:一是硫酸化多糖与HIV包膜蛋白gp-120相互作用,干扰HIV-1对宿主细胞的吸附,抑制病毒进入细胞内转录复制;二是硫酸酯化多糖抑制了HIV-1抗原的表达。我国学者王顺春、方积年等^[36]制备的香菇多糖硫酸酯,经美国国家癌症研究中心实验鉴定表明具有良好的抗HIV活性。此外,Yu Lu等^[37]还研究了淫羊藿多糖硫酸酯对法氏囊病毒的抑制作用,结果显示:与天然淫羊藿

多糖相比,经硫酸化后淫羊藿多糖能够显著增强鸡胚胎纤维原细胞对法氏囊病病毒的抑制作用。

3.3 抗凝血

多糖硫酸酯的抗凝血活性的主要机理是多糖硫酸酯结合抗凝血酶,诱导其改变构型而激活抗凝血作用。肝素即为一种非常有效的抗凝血剂。研究发现,壳聚糖硫酸酯的结构与肝素极为相似,具有血液相容性,能够与抗凝血酶物质相结合,抑制凝血酶和Xa因子活性,具有良好的抗凝血活性。Shelma等^[38]对壳聚糖硫酸酯的血液相容性进行研究,发现经过硫酸酯化后壳聚糖的红血球聚合体和溶血现象都明显减弱。此外,Costa等^[39]研究发现,经硫酸酯化的海藻多糖也具有抗凝血活性。

3.4 抗肿瘤

多糖的分子构型对其抗肿瘤活性起着至关重要的作用,其活性成分的结构前提是在多糖骨架链上占优势交替的 β -(1-3)糖苷键^[40],而且研究结果表明硫酸酯化能够使多糖的抗肿瘤活性得到进一步增强。平菇多糖的分子主链即为 β -(1-3)糖苷键,Ho Young Jung等^[41]对其进行硫酸酯化后,发现经过硫酸酯化的平菇多糖对A549癌细胞的抑制作用明显增强,在1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制率最高可达到70%,而未经修饰的平菇多糖其抑制率仅为30%左右。汲晨锋等^[42]也对昆布多糖进行硫酸酯化,发现经硫酸酯化的昆布多糖对人结肠癌细胞LOVO的抑制率可达到65%以上,而未经硫酸酯化的昆布多糖对LOVO细胞的抑制率低于40%。

4 展望

近年来,研究人员针对多糖硫酸酯制备开发了多种硫酸酯化方法,并对多糖的功能进行了全面的研究,然而由于多糖分子结构的复杂多样性,因此想要清晰地阐明硫酸酯化对多糖结构和功能特性的影响,仍然存在一定的困难。但是红外光谱、超高效液相、核磁共振等最新分析技术,以及分子模拟技术的发展,为进一步深入研究多糖硫酸酯的结构及其与功能相关性提供了有力的技术支持。相信随着对多糖硫酸酯研究的深入,将对其的作用机制有更加深入的了解。

参考文献

[1] Yongbing Zhang, Shifa Yang, Xue Zhao, et al. Immune enhancement of Taishan Robinia pseudoacacia polysaccharide on recombinant Proteus mirabilis OmpA in chickens[J]. International Immunopharmacology, 2014, 22(1):236-241.
 [2] Yang LQ, Zhang LM. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3):349-361.
 [3] Shuang Yang, Lu Jin, Xiaodong Ren, et al. Optimization of fermentation process of Cordyceps militaris and antitumor activities of polysaccharides in vitro[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2014, 22(4):468-476.
 [4] CBS Telles, DA Sabry, J Almeida-Lima, et al. Sulfation of the

extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom Pleurotus sajor-caju alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties in vitro[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(3):514-521.

[5] Xia Ma, Zhenhuan Guo, Deyun Wang, et al. Effects of sulfated polysaccharides and their prescriptions on immune response of ND vaccine in chicken[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(1):9-13.

[6] Ryogo Abua, Zedong Jiangb, Mikinori Ueno, et al. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from Ascophyllum nodosum on B16 melanoma [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 458(4):727-732.

[7] Shiguo Chen, Jingfeng Wang, Changhu Xue, et al. Sulfation of a squid ink polysaccharide and its inhibitory effect on tumor cell Metastasis[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(3):560-566.

[8] 王新宇,迟祥,石亮,等. 2种方法制备硫酸化小刺猴头菌多糖[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(6):704-707.

[9] 靳文娟,鲁晓翔. 硫酸化鸡油菌多糖的体外抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2012, 37(10):177-181.

[10] 熊波,彭述辉,王志江,等. 浓硫酸法制备魔芋葡甘聚糖硫酸酯(KGMS)[J]. 食品工业科技, 2013(2):222-225.

[11] 胡爱军,肖建. 硫酸酯化香豆胶的制备、表征及其特征[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(5):59-62.

[12] Wolfrom ML, Shen Han TM. The sulfonation of chitosan[J]. Journal of the American Chemical Society, 1959, 81:1764-1765.

[13] The Luong Nguyen, Deyun Wang, Yuanliang Hu, et al. Immuno-enhancing activity of sulfated Auricularia auricular polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(4):1117-1122.

[14] Xiaona Zhao, Yuanliang Hu, Deyun Wang, et al. Optimization of sulfated modification conditions of tremella polysaccharide and effects of modifiers on cellular infectivity of NDV [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(1):44-49.

[15] Fujii N, Futaki S, Funakosh S, et al. Studies on peptides 33-Residue Peptide peptide corresponding to the the entire Amino-Acid Sequence of human Cholecystokinin[J]. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 1988, 36(9):3281-3291.

[16] Popek T, Lis T. Synthesis and X-ray structures of sulfate esters of fructose and its isopropylidene derivatives. Part 1: 2,3:4,5-di-O-isopropylidene- β -D-fructopyranose 1-sulfate and 4,5-O-isopropylidene- β -D-fructopyrano-se 1-sulfate [J]. Carbohydrate Research, 2002, 337(9):787-801.

[17] 刘国庆,谢科,姚振乐,等. 硫酸化酵母多糖制备工艺及其鉴定[J]. 食品工业, 2011(5):71-74.

[18] 张丽萍,张翼伸,孙非,等. 硫酸化对金顶侧耳多糖构象及生物活性的影响[J]. 生物化学与生物物理学报, 1994, 26(4):417-421.

[19] 韩亮,许正宏,陶文沂. 玉米芯木聚糖硫酸酯化条件的研究[J]. 纤维素科学与技术, 2005, 13(2):26-32.

[20] 许泓瑜,韩亮,许正宏. 玉米芯木聚糖硫酸酯抗凝血活性及其机制的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4):545-548.

[21] 许泓瑜,韩亮,许正宏. 玉米芯木聚糖硫酸酯抗凝血及抗血

