

摘要

虎奶菇超支化 β -葡聚糖 (Hyperbranched β -glucan, HBG) 具有特殊的高度支化结构, 分支度最高能达到 70%。HBG 不仅具有水溶性好、分散性高、粘度低、末端羟基多便于功能化改性等特点, 还具有抗肿瘤、抗凝血和增强人体免疫能力等多种生物活性, 因而受到广泛关注。目前对 HBG 的研究主要集中在其分离纯化、以提高产率为目标的发酵优化等方面, 对其活性开发和应用的研究较少, 从而限制了对其功效的进一步研究, 因此有必要选择合适的方法对 HBG 改性修饰进而增强其生物活性。针对上述问题, 本研究通过氯磺酸-吡啶法 (CSA-Pyr) 对 HBG 进行硫酸化修饰, 对修饰后得到的不同取代度的多糖进行结构及形态表征并解析结构与功能关系。在此基础上对 HBG 体外抗氧化活性、糖基化终产物 (Advanced glycation end-products, AGEs) 的形成以及降血糖活性进行评估, 为扩大食药真菌多糖的使用范围提供理论依据。主要研究结果如下:

(1) 通过硫酸钡比浊法和红外等检测方法对能够成功硫酸化修饰 HBG 的酯化剂比例进行筛选, 结果显示能成功得到硫酸化产物 S-HBGs 的酯化剂比例为 1:2、1:2.5、1:3 和 1:3.5, 并且它们具有不同的取代度、分子量以及微观构象。其中 S-HBG_{1:2} 的分子量最大, 达到了 $13.5 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, S-HBG_{1:2.5} 具有最大的取代度 (DS) 0.75, 同时发现 S-HBGs 的 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基团的取代位置在 C-6 位。

(2) 分别对硫酸化修饰成功的产物 S-HBGs 进行结构和形态表征。结果表明, 硫酸化修饰和多糖降解同时发生。S-HBGs 的分子量发生了不同程度的降低, 其中 S-HBG_{1:3.5} 分子量降至 $9.58 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, 粒径减小到 53.29 nm; S-HBGs 的 Zeta 电位随 DS 的减小而下降, S-HBGs 的水溶性随 DS 的增加而增大, 并且最高达到了 83.55%, 硫酸化修饰后 HBG 的三螺旋结构和支链结构未被破坏。

(3) 硫酸化修饰后 HBG 抗氧化活性显著提高, 其中 S-HBG_{1:2} 清除 ABTS^+ 自由基能力和还原力最高, S-HBG_{1:2.5} 具有最高的 DPPH 清除能力 78.73%; DS 较小的 S-HBG_{1:2} (0.55) 和 S-HBG_{1:3.5} (0.27) 对非酶糖基化终产物 AGEs 的抑制效果最好。S-HBGs 相对于 HBG 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶表现出更好的抑制效果, 并且抑制效果与取代度呈正相关, 说明 S-HBGs 具有较好的降血糖效果。

(4) 通过 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程进一步探究 S-HBGs 对 α -淀粉酶的抑制机理, 发现 S-HBG_{1:2} 和 S-HBG_{1:3.5} 表现为混合型抑制, S-HBG_{1:2.5} 和 S-HBG_{1:3} 表现为竞争性抑制。双倒数 Lineweaver-Burk 作图法分析结果初步表明 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型与 S-HBGs 的 DS 有关, 抑制类型随着 DS 的减小表现出由竞争性抑制过渡为混合型抑制的趋势, DS 继续减小则表现为非竞争性抑制。荧光猝灭实验与圆二色谱结果表明 S-HBGs 对两种酶的荧光表现为静态猝灭, 并且 S-HBGs 对酶的二级结构含量影响较小因而对酶构象的破坏作用较小。

关键词: 超支化 β -葡聚糖; 硫酸化修饰; 抗氧化; 非酶糖基化; 降血糖

Abstract

Hyperbranched β -glucan (HBG) from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* has a special highly branched structure with a degree of branching (DB) up to 70%. HBG not only has good water solubility, high dispersion, low viscosity, and many terminal hydroxyl groups, which are convenient for functional modification, but also has a variety of biological activities such as anti-tumor, anti-coagulation and enhancing human immunity, so it has attracted wide attention. The existing research on HBG is mainly concentrated on its isolation and purification, fermentation optimization with the aim of improving yield, but less on its activity development and application, thus limiting further research on its efficacy, so it is especially important to modify the structure and conformation of HBG to enhance its biological activity. To address the above issues, this study used the chlorosulfate-pyridine method (CSA-Pyr) to modify HBG by sulfation. The derived polysaccharides were structurally characterized and then performed on the structure-function relationship analysis. On this basis, the in vitro antioxidant activity, formation of the advanced glycation end-products (AGEs) and hypoglycemic activity of HBG were measured to provide a theoretical basis for expanding the use of fungal polysaccharides in the fields of functional food and medicine. The main findings of the study are as follows: The main findings are as follows:

(1) The esterification agent ratios that could successfully sulfate the HBGs were screened by barium sulfate turbidimetry and FT-IR detection methods. The results showed that the effective ratios of esterification agent on S-HBGs were 1:2, 1:2.5, 1:3 and 1:3.5 to produce different degrees of substitution, molecular weights and microscopic conformations. Among them, S-HBG_{1:2} exhibited the greatest molecular weight of $13.5 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, and S-HBG_{1:2.5} possessed the highest degree of substitution (DS) of 0.75. In addition, the substitution position of the $-\text{SO}_3\text{H}$ group of S-HBGs was found to be at the C-6 position.

(2) The structural and morphological characterization of S-HBGs showed that sulfated modification and polysaccharide degradation occurred simultaneously. The molecular weights (Mw) of S-HBGs were reduced in varying degrees. With the smallest DS, the Mw and particle size of S-HBG_{1:3.5} reduced to $9.58 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ and 53.29 nm, respectively. In addition, the water solubility of S-HBGs was greatly improved relative to that of HBG. With the highest DS, water solubility of S-HBG_{1:2.5} increased to 83.55%. However, the triple helix structure and branched structure of HBG were not significantly destroyed after sulfation modification.

(3) The antioxidant activity of HBG was significantly increased after sulfation. S-HBG_{1:2} having the highest ABTS⁺ radical scavenging ability and reducing power, while S-HBG_{1:2.5} having the highest DPPH scavenging ability of 78.73%. S-HBG_{1:2} (0.55) and S-HBG_{1:3.5} (0.27) with smaller DS showed the best inhibition of non-enzymatic glycosylation end-products (AGEs). In addition, S-HBGs showed better inhibition of α -amylase and α -glucosidase than HBG, and the inhibition effect was positively correlated with the degree of substitution, indicating that S-HBGs have a better hypoglycemic effect.

(4) The inhibition mechanism of S-HBGs against α -amylase was further investigated by the Dixon equation and Cornish-Bowden equation. S-HBG_{1:2} and S-HBG_{1:3.5} exhibited Mixed Type inhibition, and S-HBG_{1:2.5} and S-HBG_{1:3} exhibited competitive inhibition. The results of

Lineweaver-Burk plotting method preliminarily showed that the inhibition type of α -glucosidase by S-HBGs was relevant to the DS of S-HBGs, and the inhibition type showed a transition trend from competitive inhibition to Mixed Type inhibition with the decrease of DS, and a non-competitive inhibition when DS continued to decrease. The results of fluorescence quenching experiments and circular dichroism showed that the fluorescence of S-HBGs exhibited static quenching for both enzymes, and that S-HBGs had less effect on the secondary structure content of the enzymes and thus less destructive effect on the enzyme structure.

Key words: Hyperbranched β -glucan; sulfated modification; antioxidant; non-enzymaticglycosylation; hypoglycemic effect

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 超支化多糖简介.....	1
1.2 虎奶菇超支化 β -葡聚糖	1
1.3 硫酸化多糖的研究进展.....	3
1.3.1 硫酸化修饰的方法.....	4
1.3.2 硫酸化修饰对多糖结构的影响.....	6
1.3.3 硫酸化多糖的功能活性.....	8
1.4 研究目的与意义.....	10
1.5 论文主要研究内容.....	10
1.5.1 研究内容	10
1.5.2 研究路线.....	12
第二章 材料与方法	13
2.1 实验材料.....	13
2.1.1 实验菌株.....	13
2.1.2 主要仪器设备.....	13
2.1.3 主要试剂.....	14
2.1.4 虎奶菇菌核的培养.....	14
2.1.5 虎奶菇超支化 β -葡聚糖提取	14
2.2 虎奶菇超支化 β -葡聚糖的硫酸化	15
2.2.1 酯化剂对硫酸化修饰的影响.....	15
2.2.2 硫酸根含量的测定.....	15
2.3 硫酸化前后虎奶菇超支化 β -葡聚糖的表征	15
2.3.1 傅里叶红外光谱分析.....	15
2.3.2 紫外光谱和荧光光谱分析.....	15
2.3.3 核磁氢谱分析.....	15
2.3.4 分子量.....	16
2.3.5 纳米粒度及电位分析.....	16
2.3.6 水溶性.....	16
2.3.7 二级结构分析.....	16
2.3.8 刚果红实验分析.....	16
2.3.9 分子形貌.....	17
2.4 S-HBGs 活性研究	17
2.4.1 S-HBGs 的抗氧化活性分析	17
2.4.2 S-HBGs 对 NEG 的影响.....	18

2.4.3 S-HBGs 的降血糖活性分析	18
2.5 S-HBGs 降血糖机理分析	19
2.5.1 S-HBGs 对 α -淀粉酶的抑制机理	19
2.5.2 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶的抑制机理	20
2.5.3 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的圆二色谱(CD)	21
第三章 结果与讨论	22
3.1 虎奶菇超支化 β -葡聚糖的硫酸化修饰	22
3.2 硫酸化前后虎奶菇超支化 β -葡聚糖的表征	23
3.2.1 傅里叶红外光谱分析	23
3.2.2 紫外光谱和荧光光谱分析	24
3.2.3 核磁氢谱分析	25
3.2.4 分子量	27
3.2.5 纳米粒度及 Zeta 电位分析	28
3.2.6 水溶性	28
3.2.7 构象特征分析	29
3.2.8 分子形貌	31
3.3 S-HBGs 的体外活性研究	32
3.3.1 S-HBGs 的体外抗氧化能力分析	32
3.3.2 S-HBGs 的抗糖基化活性分析	36
3.3.3 S-HBGs 的降血糖活性分析	40
3.4 S-HBGs 对 α -淀粉酶抑制机理分析	42
3.4.1 S-HBGs 对 α -淀粉酶的抑制动力学	42
3.4.2 S-HBGs 对 α -淀粉酶的荧光猝灭	44
3.4.3 S-HBGs 对 α -淀粉酶的二级结构影响	46
3.5 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶抑制机理分析	47
3.5.1 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学	47
3.5.2 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭	49
3.5.3 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶的二级结构影响	51
主要结论与展望	53
主要结论	53
工作展望	53
参考文献	55
附录 1:S-HBGs 的红外光谱图	60
附录 2:S-HBGs 和酶的圆二色谱图	61

第一章 绪论

1.1 超支化多糖简介

超支化多糖 (Hyperbranched polysaccharide) 作为超支化聚合物 (Hyperbranched polymer) 一类重要的分支, 由于其结构具有高支化度的特点近年来受到越来越多的关注^[1]。超支化聚合物是一种和树枝状聚合物类似的高度支化的聚合物, 通常由单体通过化学键连接而成, 它的结构具有高度支化的特点, 分子之间不会出现链的交缠, 且分子具有多个活性端基官能团。由于上述特殊结构, 它们具有与许多线性聚合物不同的特殊功能, 如粘度低易于溶解、较高的生物活性, 便于进行分子改性修饰等。随着对超支化聚合物的合成、改性、表征以及应用等的深入研究^[1], 超支化聚合物的功能与结构之间独特的关系逐渐被人们发现并进行研究。超支化多糖与普通多糖相比结构特殊, 是一种含有高度支化结构, 同时很多空腔存在于其分子内部, 外围具有较多端基官能团 (-OH, -COOH 或 -NH₂ 等) 而便于进行功能化修饰的多糖类大分子, 这些特点使它们具有能与它所处微环境的物质发生相互作用的潜力, 在食品添加剂和生物医药等诸多领域有着广泛的应用前景。

目前, 超支化多糖分为天然和合成两类, 虽然目前可以利用多种技术方法合成一系列糖分支状、超支化多糖等聚合物, 但与自然界存在的糖类相比, 人工合成的含糖超支化聚合物的结构和功能比较单一。天然超支化多糖是由生物体自发合成的位于细胞壁或者细胞内的生物大分子, 是生物体结构的重要组成部分和能量储存物质。支链淀粉^[2]和糖原作为植物和动物的储能物质是自然界中广泛存在的两种天然超支化多糖。有研究表明在大麦、水稻、拟南芥等植物体内均含有较多的超支化葡聚糖^[3], 其中支链淀粉主要组成单位是 α -D-葡萄糖, 并且其糖链均具有高度的支化结构, 分子内部是以 α -1,4 糖苷键连接, 分子间是以 α -1,6 糖苷键连接, 并且形成簇状结构^[4]。国内外对天然超支化葡聚糖的研究目前主要集中在 β -1,3/1,6-葡聚糖这类具有短分支的多糖, 主要来源于植物或者天然微生物 (海带、酵母和香菇等), 有研究表明其具有免疫调节、抗炎、抗肿瘤、降血糖、降血脂等多种生物学活性^[5], 与免疫调节细菌多糖和合成化合物相比没有明显的副作用。具有长侧链和高度分支结构的超支化 β -葡聚糖近年来不断从各种食药真菌中报道出来, 如灵芝 β -葡聚糖、虎乳灵芝高支化多糖、虎奶菇 SCA 等。其中虎奶菇 (*Pleurotus tuber-regium*, PTR) 超支化 β -葡聚糖 (Hyperbranched β -glucan, HBG) 具有丰富的支链结构、大量的还原性末端基团、良好的生物利用度并且便于进行改性修饰, 但目前相关研究还停留在其分离纯化、以提高产率为目标的发酵优化等方面, 对其潜在活性和应用的相关研究还比较少, 这在一定程度上限制了对其功效的进一步研究, 资源难以得到高效利用。

1.2 虎奶菇超支化 β -葡聚糖

虎奶菇 (*Pleurotus tuber-regium*) 又名虎奶菌、茯苓侧耳、核耳菇等, 属于担子菌

亚门，层菌纲，伞菌目，侧耳科，侧耳属，是一种珍贵的侧耳科食药两用真菌^[6]。虎奶菇具有丰富的药理价值，如防治心血管等疾病^[7]、抗氧化作用^[8]、抑菌作用^[9]、抗衰老和增强体内免疫力等^[10]。已有研究表明，虎奶菇的化学成分主要包括挥发油性成分，氨基酸类，多糖类和矿物质等，其中最主要的具有活性的成分为虎奶菇超支化 β -葡聚糖^[11]，虎奶菇的菌丝体、菌核和子实体等不同生长阶段超支化 β -葡聚糖的含量都很丰富，主要是存在于各个生长阶段的细胞壁中。来自虎奶菇的超支化 β -葡聚糖具有分散性好、粘度低、末端羟基多便于改性修饰等特点，同时还具有天然多糖安全性高、可降解、生物相容性好等优势，因而在食品、生物医药及材料等相关领域均具有广泛的应用潜力^[12]。例如，Zhang M^[1]等人通过对小鼠腹腔注射从虎奶菇菌核提取的 β -葡聚糖组分（Mw=58~171 kDa），发现可有效抑制 BALB/c 小鼠移植的肉瘤 S-180 的增殖，抑制率可达 50%。

β -葡聚糖主要来源于燕麦、大麦、酵母，尤其是一些食用菌，如香菇属的香菇多糖，侧耳菌属的平菇、虎奶菇，裂褶菌属的裂褶菌聚糖，是由 D-葡萄糖在 β -(1 $\rightarrow$ 3)、(1 $\rightarrow$ 4)或(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键上以分枝或不分枝的方式组成的一类非淀粉均多糖，同时也是细胞壁的重要结构大分子^[13]。 β -葡聚糖因为具有特殊的分子结构引起了研究者极大的兴趣，如从斑玉蕈^[14]中纯化的多糖（JHMP-70）是以 β -1, 6-D-Glcp 为主链和 β -1, 3-D-Glcp 为支链构成的。先前的研究表明，虎奶菇菌核细胞壁通过碱提法获得的多糖的主要成分是由 β -1, 4-D-Glcp 作为主链和 β -1, 6-D-Glcp 为支链构成的超支化 β -葡聚糖（SCA-I），因提取方法的差异有时支链中会有少量 β -1, 4, 6-D-Glcp 和 β -1, 3-D-Glcp 残基存在，分支位点主要位于葡聚糖链的 O-6 位，相较于其他来源的葡聚糖，超支化 β -葡聚糖（SCA-I）分支度最高可达 70%，不仅具有超支化聚合物的高分支度和端基官能团含量高的特殊结构，还具有 β -葡聚糖的降血糖、降血脂、增强免疫力等优良特性，是一类特殊的天然 HBG^[15]，HBG 在溶液中的 TEM 如图 1-1（A）和 1-1（B）所示，在水溶液中表现为致密的球形结构，在 SDS 溶液中则表现出高度支化的分支结构，说明 HBG 是通过糖链分支相互缠绕而成的具有特殊结构的超支化多糖。HBG 因具有良好的抗肿瘤、增强人体免疫力等活性而受到广泛关注。虽然高分支结构具有各种优良的性质，但过高的分支度也限制了其构效关系的研究和进一步的开发应用，HBG 的生物活性会直接或间接地受到自身分子结构如高分子量、致密的球形结构以及糖链分支度等的影响，这些因素都可以通过化学修饰而发生不同程度的改变，所以选择化学修饰的方法对 HBG 的分子结构修饰可以通过改变多糖结构提高或赋予多糖生物活性。因此，为深入挖掘 HBG 的应用潜力、拓宽其应用范围，有必要选择合适的化学修饰方法对其进一步改造修饰，以促进 HBG 在食品、医药等领域的应用。

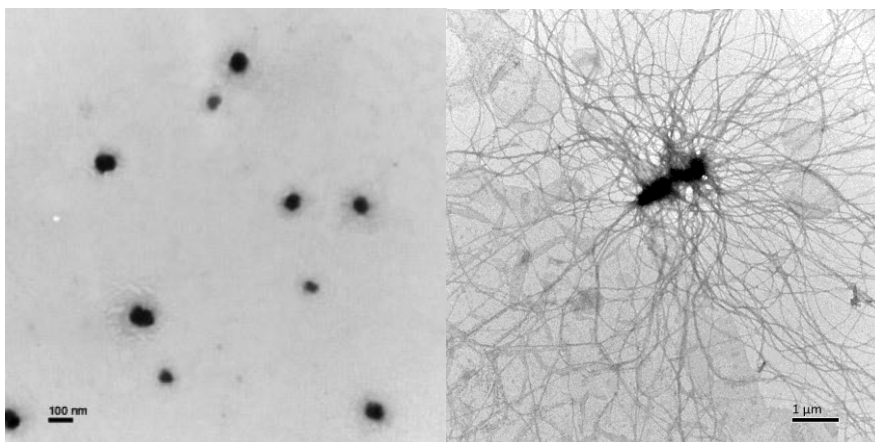
图 1-1 HBG 在水溶液（左）和 SDS 溶液（右）中的 TEM 图像^[15]

Fig. 1-1 TEM images of HBG in aqueous solution (left) and SDS solution (right)

1.3 硫酸化多糖的研究进展

硫酸化多糖（Sulfated polysaccharide）又可称为多糖硫酸酯（polysaccharide sulfate），是天然和半人工合成的酸性多糖^[16]，为聚阴离子化合物。其中人工合成的硫酸多糖是由硫酸根取代多糖大分子糖链上的某些单糖分子的部分-OH 后生成的一类具有复杂化学结构和多功能活性的多糖衍生物^[17]。一般认为多糖的理化性质由其糖基组成、糖苷键、分支度(DB)、取代基种类、溶液构象等结构特征决定，进而影响其多种功能或生物活性，但常因结构特殊导致多糖水溶性差、高分子量等限制了活性的充分发挥，因此一些分子修饰技术如硫酸化修饰被用来改变多糖的结构或构象以增强其生物功能品质^[18]。硫酸多糖因具有多种生物活性如免疫活性和抗凝活性等而受到广泛关注，尤其是自 1987 年发现 HIV 活性可以被硫酸化葡聚糖所抑制后，硫酸化多糖更是成为了多糖修饰研究领域的热点^[19]。

大量研究表明，对天然多糖进行硫酸化修饰后，引入的硫酸根基团能引起静电排斥和空间位阻效应，这会改变多糖原本的空间构象改变，水溶性和糖链的屈伸度都有所提高，硫酸根的引入能通过改变影响多糖活性的因素如多糖的分子量、空间结构、取代基种类、位置和数目等来实现多糖活性的多样性，使自身功能活性较弱或没有表现出明显活性的多糖可以增强其类似活性或在生物体内获得新的活性^[20]。例如，Chaidedgumjorn 等^[21]发现多糖的硫酸化不仅能提高水溶性，还能改变多糖的结构和理化特性，从而改变多糖的生物活性。通常在糖的自由-OH 位置插入-SO₃H 基团，会增加多糖的电荷和静电相互作用，从而提高水溶性，链构象的灵活性和聚集性等，因此多糖的生物活性显著提高。研究发现灵芝硫酸化衍生物表现出较好的抗氧化活性和明显高于天然样品的水溶性^[22]；硫酸化改性分别增强了沙蒿多糖的体外抗氧化活性，玉米丝多糖的抗氧化活性和对 α -淀粉酶的抑制效果^[23, 24]；硫酸化还极大地改善了酵母 β -(1 $\rightarrow$ 3)葡聚糖的极性和溶解度^[25]，这些来自不同资源的硫酸化衍生物可以作为潜在的营养制剂供人类食用，因此硫酸化也被广泛应用于药食同源真菌多糖分子的修饰中。虽然来源于植物、真菌和动物的天然多糖具有多种生物活

性和较少的副作用，是理想的功能性产品，但是天然存在的硫酸化多糖和合成来源的硫酸化多糖因被证明具有广谱的抗病毒抗肿瘤等活性而越来越受到世界各国的关注^[16]。下面对多糖的硫酸化修饰方法以及由此带来的活性改变进行介绍。

1.3.1 硫酸化修饰的方法

目前常用的对多糖进行硫酸化修饰改性的方法有 SO_3 吡啶法、Nagasawa 法（浓硫酸法）、Wolf from 法（氯磺酸-吡啶法）^[26]（表 1-1）。多糖主链的结构往往是多糖硫酸酯化方法的决定因素，Nagasawa 法常用于呋喃多糖，而 Wolf from 法常用于吡喃多糖。

表 1-1 多糖不同硫酸化方法的比较^[16]

方法名称	硫化剂和条件	特点
Nagasawa 法	浓硫酸，吡啶冰水浴	条件稳定，副反应少，化学试剂毒性低；硫酸对多糖的降解和碳化。
Wolf from 法	氯磺酸，吡啶，DMF 冰水浴	最常用的方法 DS 值高，产量高；酸性强，反应剧烈。
SO_3 ·吡啶法	三氧化硫，吡啶冰水浴	化学反应难以控制，操作简单方便；试剂比较昂贵，只适用于实验室的小规模应用

1.3.1.1 Nagasawa 法

Nagasawa 法主要是针对呋喃型多糖的化学修饰，其反应机理是酯化反应过程中，预先制备浓硫酸与正丁醇反应生成的磺化试剂，在冰浴条件下以吡啶为催化剂，将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓慢加入上述磺化试剂中并持续搅拌，加入待硫酸化修饰的约 0.5~1 g 多糖样品继续反应一段时间，将反应液 pH 调至中性，加入无水乙醇过夜沉淀，透析、浓缩和冷冻干燥后获得硫酸酯化产物^[27]。Zhu 等^[28]通过浓硫酸法对来自冬虫夏草菌丝体的多糖进行硫酸化修饰，成功获得了得率为 62.34%、取代度为 0.33 的硫酸化多糖 SPS50，发现 SPS50 的抗肿瘤活性明显高于天然多糖 PS50，并且对 K562 细胞的抑制率达到了 69.92%。龙眼多糖^[29]经过浓硫酸法硫酸化修饰后获得了取代度为 2.011 的硫酸化产物 LPI-S，并且该产物能促进小鼠淋巴细胞增殖，增加小鼠巨噬细胞的胞浆细胞活性，并且能增加巨噬细胞中 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量。梁英等^[30]采用浓硫酸法对平菇多糖修饰后，通过改变浓硫酸体积成功获得具有不同取代度的硫酸酯化平菇多糖，并且其抗氧化性包括还原力和对 3 种自由基的清除力均优于平菇多糖，且其清除能力与取代度呈正相关，说明经硫酸酯化后取代度是影响抗氧化能力的关键因素。浓硫酸法制备硫酸酯化产物反应条件较稳定、试剂毒性较低，但反应过程中硫酸多糖会发生降解和碳化，不利于硫酸基的取代。

1.3.1.2 Wolf from 法

Wolf from 法是针对吡喃型多糖常用的硫酸化修饰方法，其原理如图 1-2 所示，多糖首先溶解于特定溶剂，再与酯化试剂在特定条件下反应，酯化剂制备过程需要在低温条件下将氯磺酸缓慢加入吡啶中，吡啶与氯磺酸的比例通常根据多糖的种类不同而不同，但改变体积比能快速高效的获得成功被硫酸化修饰并且具有不同取代度的多糖^[31]。

Wolfson法中的氯磺酸是一种强酸，在酸性条件下会引起多糖发生降解，多糖通常溶解在适量体积的二甲基亚砜或 N, N-二甲基甲酰胺中，获得多糖悬浮液后将其加入制备好的酯化剂中水浴 3-4 h，冷却至室温后 pH 调为中性，醇沉并复溶后透析冻干，即可得到多糖硫酸酯。氯磺酸-吡啶法制得的硫酸化多糖有较高的产率和取代度，并且原料廉价易得方便回收。

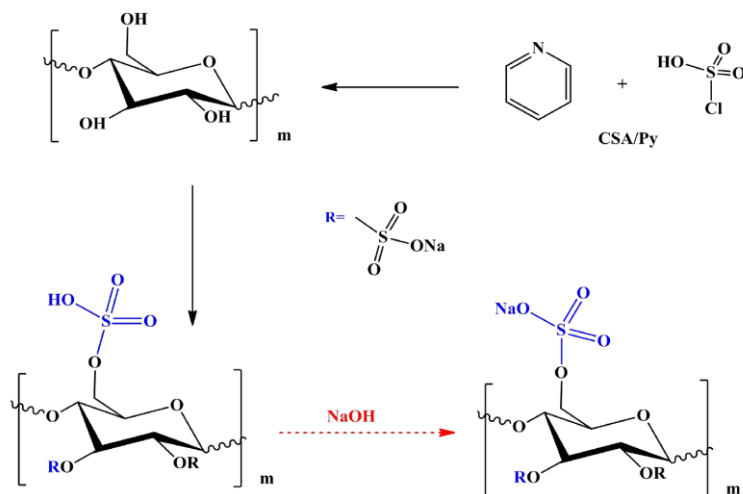


图 1-2 多糖硫酸酯化机理^[17]

Fig.1-2 Mechanism of sulfated polysaccharide

由表 1-2 可知，氯磺酸-吡啶法是目前使用最广泛的方法^[32]。Xie 等^[33]对青钱柳多糖利用 Wolfson 法进行硫酸化处理后，通过调整氯磺酸与吡啶的比例获得了取代度范围在 0.12~0.55 的多糖衍生物，并且 DS 较高的产物抗氧化性能更好，有研究发现青钱柳硫酸化多糖的体外抗氧化活性可能与取代度、Mw、硫酸根含量、蛋白质等含量的整体作用有关。Zhao 等^[34]通过优化氯磺酸-吡啶的比例对银耳多糖进行氯磺酸-吡啶法硫酸化修饰后，获得了取代度在 0.128~1.62 范围内的一系列多糖衍生物，并且衍生物显著抑制了 NDV (Newcastle Disease Virus) 对 CEF (chicken embryo fibroblast) 的感染，这表明引入硫酸根可以显著提高银耳多糖的抗病毒活性，具有作为抗病毒多糖药物的组成部分的潜力。陶咏真等^[35]将从虎奶菇菌核中分离得到的 TM3b 超支化水溶性多糖的 8 个组分分别与氯磺酸-吡啶配合物反应，成功地得到了取代度为 0.28~0.54 的硫酸化衍生物，所有的 TM3b 原生样品和硫酸化衍生物都表现出优于原糖的抗肿瘤活性。此外，磺化衍生物对 HepG2 细胞的体外抑制率高于天然多糖，但取代度与对 HepG2 细胞的抑制活性之间的联系尚不明确。如表 1-2 所示，氯磺酸-吡啶法因能获得 DS 高的产物、并且衍生物得率高、修饰所用原料廉价易得，是目前常用的多糖硫酸化修饰方法。

表 1-2 硫酸酯多糖化学改性法研究现状

Table 1-2 Research status of chemical modification of sulfate polysaccharides

多糖种类	改性方法	最优条件	最佳 DS	活性
平菇多糖 ^[30]	浓硫酸法	浓硫酸 10 mL, 60°C, 90 min	0.48	抗氧化
鸡腿菇多糖 ^[36]	氯磺酸-吡 啶法	酯化剂 1:3, 90°C, 2 h	1.73	抗氧化
蛹虫草多糖 ^[37]	浓硫酸法	0°C, 1 h	2.42	抗氧化
银耳多糖 ^[34]	氯磺酸-吡 啶法	酯化剂 1:6, 80°C, 1.5 h	1.62	抗病毒
香菇多糖 ^[38]	氯磺酸-吡 啶法	60°C, 2 h, 酯化剂 1:2	1.37	抗氧化
黄芪多糖 ^[20]	氯磺酸-吡 啶法	60°C, 4 h, 酯化剂 1:3	2.09	-
黑灵芝多糖 ^[39]	氯磺酸-吡 啶法	100°C, 2 h, 酯化剂 3:1	3.43	免疫调节

1.3.1.3 SO₃·吡啶法

SO₃·吡啶法^[19]是针对酚羟基或含有较强的酸性羟基的多糖常见的硫酸化修饰方法, 步骤主要如下: 吡啶与一定量的三氧化硫在配备有冷凝管和搅拌装置的三颈瓶中反应, 加入一定量的待修饰的多糖样品, 在恒温条件下连续搅一段时间后, 调 pH 至中性, 过夜醇沉后复溶于蒸馏水中, 透析并冻干即得硫酸化多糖产物。利用 SO₃·吡啶法修饰灵芝中 β -葡聚糖 (GLP) 后可获得 DS 范围在 0.83~1.74 内的硫酸酯化产物, 同时通过体外凝血试验 (APTT, PT 和 TT) 发现, 抗凝血活性与取代基、取代基位置、取代度和 Mw 有关, 取代度和 Mw 含量较高的硫酸化 GLP 具有较强的抗凝血活性, 这为多糖活性与化学结构特征的关系研究奠定了基础^[10]。陈士国^[40]等发现利用 SO₃·吡啶法修饰鱿鱼墨多糖后分子量降低, 并且对凝血因子有较好的抑制作用, 这为开发一种新的海洋活性硫酸糖药物奠定了理论基础, 并为硫酸多糖抗凝机理的深入研究提供理论依据。SO₃·吡啶法反应过程较温和、操作步骤方便, 但是所用原料价格较高, 仅限于实验室水平操作。

1.3.2 硫酸化修饰对多糖结构的影响

多糖的生物活性主要是由其结构影响, 同样地, 硫酸酯化多糖的生物活性也与化学结构密切相关。已有研究表明, 硫酸酯化多糖的取代度对其生物活性有较大影响, 更高的取代度 (DS) 证明多糖结合更多的硫酸根基团, 硫酸根基团的引入可以使溶液的性质发生改变, 结构上增加了负电荷的分布, 从而促进多糖的抗病毒潜力及其他生物活性。此外, 多糖的其他化学结构如分子量、多糖的主链性质、空间结构和构象、单糖组成、分支度和溶液构象等都对多糖生物活性有不同程度的影响, 但是这些化学结构会因取代度的改变而发生变化, 因此对多糖进行硫酸化修饰能多方面对多糖进行结构改变, 进而便于对多糖结构功能关系进行深入研究。由于深入探究硫酸化多糖的

结构变化有助于进一步研究其功能活性与结构之间的联系，下面对多糖硫酸化修饰后可能发生的结构改变进行讨论。

1.3.2.1 分子量

大量研究表明，多糖的功能活性会受分子量大小的影响。多糖分子量较大时会引起多糖溶解度低并且黏度高，从而限制生物活性的发挥，但分子量越小并不是意味着活性就越好，因为分子量过低时有时会限制多糖中具有活性的聚合结构的形成，因此改变多糖分子量是提高多糖生物活性的重要方法之一^[41]。例如，Mohsen^[42]等人从褐藻马尾藻（*Sargassum latifolium*）中获得了三组水溶性硫酸多糖，与其他低分子量和 DS 的成分相比，具有较高分子量和 DS 的 SP-III 具有明显的抗 HSV-1 和抗 HAV 活性。然而一些硫酸多糖在分子量较低时也有抗病毒的潜力，Artan^[43]等发现分子量范围在为 3-5 kDa 时，磺化壳聚糖 SCOS III 具有对 HIV-1 复制最好的抑制效果，能显著抑制 HIV-1 诱导的合胞体的形成以及 p24 抗原的产生，抑制机制可能与低分子量的硫酸多糖能更好地被吸收有关。邢荣娥等用氯磺酸-吡啶法获得了分子量不同的壳聚糖硫酸酯，发现它们的抗氧化能力均高于壳聚糖，并且清除能力与浓度呈正相关，其中低分子量的硫酸酯衍生物对于 $O_2\cdot$ 自由基清除能力高于高分子量的壳聚糖衍生物，这些影响说明多糖的活性在很大程度上受分子量的影响^[44]。因此，需要进一步研究多糖的分子量是如何影响其活性的。

1.3.2.2 取代度

多糖和它的硫酸化衍生物所含有的取代基种类、位置和数目是影响其活性的主要因素，其中取代度（Degree of substitution, DS）是证明多糖被硫酸化修饰程度的重要指标，反映的是多糖中羟基被硫酸基团取代的程度，通常采用硫酸钡-比浊法测定^[39]。硫酸多糖的聚阴离子性质与硫酸基团的分布密切相关，较高的 DS 证明多糖结合更多的硫酸基，硫酸基的存在可以改善溶液性质，在结构上增加负电荷分布，促进多糖的抗病毒潜力等^[19,45]。磺化试剂的配比、酯化温度和反应时间对 DS 值有影响。研究表明，硫酸多糖的活性与 DS 呈正相关，DS 越高，抗病毒效果越好。不同 DS（0.68-1.91）的硫酸化当归多糖（APS）经硫酸化修饰后对小鼠白血病病毒具有一定的抗病毒作用，DS 为 1.91 的 APS-1 具有显著的剂量依赖性抗病毒活性，说明 DS 越高疗效越好^[46]。DS 较高（1.5 和 1.9）的硫酸枸杞多糖（LBPS）对淋巴细胞增殖的作用更强，说明硫酸修饰可以增强细胞免疫活性，并且与硫酸多糖的 DS 有一定的相关性^[47]。然而，最高的 DS 并不伴随着具有最高的活性。具有中等大小取代度的海蒿子多糖^[48]（DS=0.85）和梭柄松苞菇^[49]（DS=0.28）的硫酸化产物具有更强的抗氧化活性，因此硫酸多糖的 DS 是影响其生物活性的重要因素。

1.3.2.3 溶液构象

溶液构象是多糖结构与活性之间的关系研究的热点问题之一^[50]。多糖构象主要与链结构和分子内力有关，如氢键、疏水力和静电力、偶极相互作用等，外部条件（如

超声波、加热、pH 值、离子或溶剂) 等都可以改变溶液中多糖的构象^[51]。沃尔默特认为, 多糖大分子在溶液中具有特定的链构象, 这些链构象具有一定的形态特征和灵活性, 硫酸基取代了多糖中的羟基后, 硫酸根的存在引起阴离子之间的排斥作用导致糖链伸长并且部分糖环上的羟基可能会与硫酸基形成氢键从而导致螺旋结构在多糖链局部的形成, 使多糖表现出有活性且有较大有序性的高级构象^[32, 52]。硫酸化的沙蒿多糖由于刚性氢键的弹性断裂在水溶液中表现出更大的随机线圈构象, 并且提高了对 DPPH、O₂· 自由基和羟自由基清除活性和螯合能力。此外, 灵芝多糖的抗氧化活性与其构象变化有关, 硫酸基的引入使多糖更加伸展, 提高了其水溶性, 从而进一步增强了其抗氧化活性^[53]。硫酸化墨藻多糖非硫酸化多糖相比, 硫酸化多糖的分子量更小, 旋转半径更大, 表明硫酸化衍生物可能得到更广泛的延伸。此外, 溶液构象的变化也可能通过增加 NO、IL-1 和 TNF- α 的水平来提高天然多糖的抗癌和免疫调节活性^[54]。

1.3.3 硫酸化多糖的功能活性

硫酸化多糖通常包括自然界中存在的天然硫酸化多糖与人工硫酸化修饰得到的衍生物。由于天然硫酸多糖如红海藻多糖与肝素等都具备抗病毒、抗氧化、抗糖基化作用等生物活性, 因此具有较高的研究价值。天然多糖来源较广泛, 并且具有降血脂、抗凝血、抗氧化、抗病毒等活性, 但自然界中也存在大量的多糖本身不具有生物活性, 它们受理化性质影响和结构特点的限制使其本身具有较弱的活性或不具有生物活性, 从而不能进行进一步的活性研究。因此, 对多糖进行分子修饰为解决上述问题提供了最佳途径。天然多糖经过分子修饰后, 会引起其分子量空间结构等特点的变化, 进而在一定程度上提高生物活性, 有些多糖甚至还能获得新的功能活性。硫酸多糖具有较低的细胞毒性和耐药性, 生物相容性好, 副作用少, 还具有免疫刺激的作用, 这导致了它有作为新的食品补充剂和抗病毒药物的潜力^[55]。因此, 多糖的硫酸化修饰对提高多糖的功能活性具有重要意义。因此下面将针对多糖在被化学修饰后生物活性发生的改变进行讨论。

1.3.3.1 抗氧化活性

近年来, 由于生物体内自由基的过氧化效应与疾病关系的研究越来越受到人们的重视, 推动了抗氧化剂的开发和应用。研究发现一些多糖有清除自由基、抗氧化酶活性等功能活性, 甚至很多天然多糖在实验研究阶段就检测到具有抗氧化活性, 这为治疗某些疾病如由氧自由基损伤引起的疾病治疗提供了药理基础, 但在这些多糖引入硫酸根后可以进一步提高抗氧化活性。例如, 对水溶性玉米丝多糖 (CSPS) 进行硫酸化修饰后发现玉米丝多糖和其硫酸化衍生物都有清除 DPPH 自由基和羟自由基的能力, 且硫酸化玉米丝多糖对自由基的清除能力明显高于玉米丝多糖, 这说明硫酸根的引入能提高玉米丝多糖的生物活性^[56]。Xu 等^[79]对黑加仑多糖进行硫酸化修饰后发现其硫酸化衍生物对 DPPH 的清除能力和还原性都显著增加, 其中对 DPPH 清除能力的 IC₅₀ 值达到了 0.33 mg·mL⁻¹, 且这些活性与取代度的增加有很好的相关性, 其机制可能是由于在

多糖分子中引入了 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基团,导致氢键解离能力较弱,激活了异头碳的提取,从而提高了多糖衍生物的供氢能力,自由基在与环境中的氢原子结合后形成的自由基较稳定,能通过终止链式反应提高对自由基的清除能力。刘阿娟等对虎奶菇菌核多糖进行了化学修饰,包括硫酸化修饰和乙酰化修饰等,发现衍生物的体外抗氧化活性均高于未修饰多糖均高于未修饰多糖,但其取代度、分子量、结构等的改变以及与活性的关系有待进一步研究^[57]。

1.3.3.2 抗肿瘤活性

随着癌症发病率的上升,急需有效的治疗方法来控制人类恶性肿瘤,然而,目前市场上的化疗药物会产生严重的副作用。多糖是一类生物大分子,近年来因其具有抗癌活性或提高常规化疗药物疗效且副作用小而引起了研究者们广泛的研究兴趣。许多天然多糖改性后抗肿瘤活性明显提高,因此大量研究集中在发现抗癌多糖和修饰衍生物上以期开发有效的治疗各种人类癌症的药物。研究表明,采用氯磺酸处理法制备硫酸化虎奶菇超支化多糖,其衍生物对人肝癌 HepG2 细胞具有较高的抗肿瘤活性,表明硫酸化修饰会使多糖的抗肿瘤活性增强^[35]; Shao 等根据硫酸根含量最高的改良角孢多糖在浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 MKN45 胃癌细胞的抑制率最高达到 51.92%推测硫酸根含量可能是影响其抗肿瘤活性的主要因素^[58]。硫酸多糖为肿瘤的防治提供了新的思路,但是关于二者间的作用机制还有待进一步研究。

1.3.3.3 抗病毒活性

从植物、真菌和动物中提取的天然多糖是公认的具有多种生物活性、副作用小的理想功能性产品。其中,天然硫酸化多糖和人工合成硫酸化多糖被证明具有广谱抗病毒活性,越来越受到世界各国的关注。硫酸化多糖的生物活性与分子结构密切相关,硫酸根的引入改变了多糖原有的分子链构象,已有研究观察到多糖的分子修饰可增强抗病毒活性, Mukherjee 等^[59]从各种天然来源获得一系列硫酸多糖,这些化合物表现出较高的抗人巨细胞病毒 (HCMV) 和抗 HSV-1 活性,经计算, EC_{50} 值为 $2.34\sim 7.77\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 并且具有较低的细胞毒性。印楝叶多糖的硫酸衍生物与非硫酸根化合物相比表现出更好的抗 HSV 活性^[19]。因此,深入研究硫酸多糖的生物活性、理化性质和构效关系,有利于开发潜在的抗病毒药物。

1.3.3.4 降血糖作用

随着肥胖病、糖尿病以及心血管疾病等发病率的逐渐上升,糖尿病患者的数量也在不断增多,糖尿病已经严重威胁到人民的健康和生命。在诱发糖尿病及其相关并发症的因素中,蛋白质的非酶糖基化反应 (Non-enzymatic glycosylation, NEG) 是重要因素之一,血糖升高会导致糖尿病患者体内的糖基化终产物和自由基明显增加,产生氧化应激。研究表明,NEG 反应不仅与糖尿病的发展与发生有关,还与微血管病变等其他糖尿病并发症有密切联系,因此寻找有效方法或物质对 NEG 反应进行有效抑制以达到预防糖尿病及其并发症具有重要意义。Qian 等人对霍山石斛多糖进行硫酸化修饰

后发现其硫酸化衍生物对 NEG 的三个阶段都有一定的抑制作用,说明硫酸化霍山石斛多糖具有治疗糖尿病及其并发症的潜力^[60]。

一些消化酶抑制剂如 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制剂可通过抑制碳水化合物的消化以及延缓葡萄糖的吸收来降低餐后高血糖,也是目前减轻糖尿病严重程度的方法之一。据报道,目前使用的酶抑制剂如阿卡波糖具有一些副作用如引起腹胀、腹泻等,这些不良反应可能是由于 α -淀粉酶的过度抑制和结肠中未消化碳水化合物的异常细菌发酵引起的。因此,理想的方法是使用一种酶抑制剂,它对 α -淀粉酶有轻微的抑制活性,但对 α -葡萄糖苷酶有广泛的抑制作用。有研究发现经硫酸化修饰的多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性有显著提高,如桦褐孔菌多糖经修饰后对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性明显增强,但未对 α -淀粉酶的抑制活性进行研究;刘阿娟等^[58]对虎奶菇菌核多糖硫酸化后发现对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用增强,说明硫酸化修饰后虎奶菇菌核多糖有可能应用于控制和治疗糖尿病,但其取代度等结构的改变与抗氧化和酶的抑制活性关系尚不明确,因此未来有必要深入研究多糖硫酸化修饰后对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制效率和机制,为糖尿病及相关并发症的防治提供新的方向。

1.4 研究目的与意义

来自虎奶菇菌核的 HBG 作为一种特殊的天然超支化聚合物,是一种特殊的具有超支化结构天然 β -葡聚糖,不仅具有超支化聚合物的高分支度和端基官能团含量高的特殊结构,还具有 β -葡聚糖的降血糖、降血脂、增强免疫力等优良特性。目前对 HBG 的研究主要集中在其分离纯化、以提高产率为目标的发酵优化等方面,对其活性开发和应用的研究较少,从而限制了对其功效的进一步研究,资源难以得到高效利用,因此对 HBG 结构和构象通过改性修饰来增强其生物活性尤为重要。多糖活性会随多糖结构的改变而变化,而化学修饰如硫酸化会引起理化特点和立体结构等的改变。目前有关虎奶菇 HBG 的硫酸化修饰仅限于抗肿瘤活性的研究,并且通过对引起血糖升高的酶(α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶)的抑制效果的研究并没有与多糖的结构取代度等建立联系,因此通过对 HBG 硫酸化修饰在其结构中引入硫酸根获取具有不同 DS 的衍生物,使其分子构象、链构象、分子量等结构发生改变,进而提高其溶解性,抗氧化,降血糖及对 NEG 的抑制等活性,有助于探究其抗氧化、降血糖等活性与结构变化的关系,为虎奶菇 HBG 的活性开发和应用提供理论基础。本研究旨在对硫酸酯化超支化 β -葡聚糖的结构及其体外活性进行深入研究,为硫酸化超支化 β -葡聚糖在工业制备、医药应用方面如降血糖药物提供理论依据,促进相关产业发展。

1.5 论文主要研究内容

1.5.1 研究内容

本研究采用氯磺酸-吡啶法对虎奶菇超支化 β -葡聚糖进行硫酸化改性,并对硫酸化

修饰后的超支化 β -葡聚糖进行结构形态的表征，分析虎奶菇超支化 β -葡聚糖硫酸化产物的抗氧化，降血糖，抗糖基化等活性变化，进而分析虎奶菇超支化 β -葡聚糖硫酸化修饰后结构与增强的活性之间的关系。具体内容如下：

(1) 虎奶菇超支化 β -葡聚糖氯磺酸-吡啶法改性

根据 PTR-HBG 的糖苷键类型针对性选取氯磺酸-吡啶法对虎奶菇超支化 β -葡聚糖硫酸化改性修饰，以红外光谱、紫外光谱、荧光光谱等方法对具有不同取代度的虎奶菇超支化 β -葡聚糖硫酸化衍生物进行表征，以硫酸钡-比浊法测定取代度，以获得成功被硫酸化修饰且具有不同取代度的硫酸化产物。

(2) 对虎奶菇超支化 β -葡聚糖硫酸化衍生物的表征

对虎奶菇超支化 β -葡聚糖硫酸化衍生物的形态和结构进行表征分析，分别对所含基团、取代度、分子量变化、粒度及 Zeta 电位、二级结构、链构象、螺旋结构等进行测定，综合评价硫酸化修饰影响，并探究不同 DS 的硫酸化产物间的差异。

(3) 硫酸化前后虎奶菇超支化 β -葡聚糖的活性评价

对比硫酸化修饰前后的 PTR-HBG 抗氧化，降血糖，抗非酶糖基化等活性，并进一步分析降血糖机理，结合结构信息进行构效差异分析。

1.5.2 研究路线

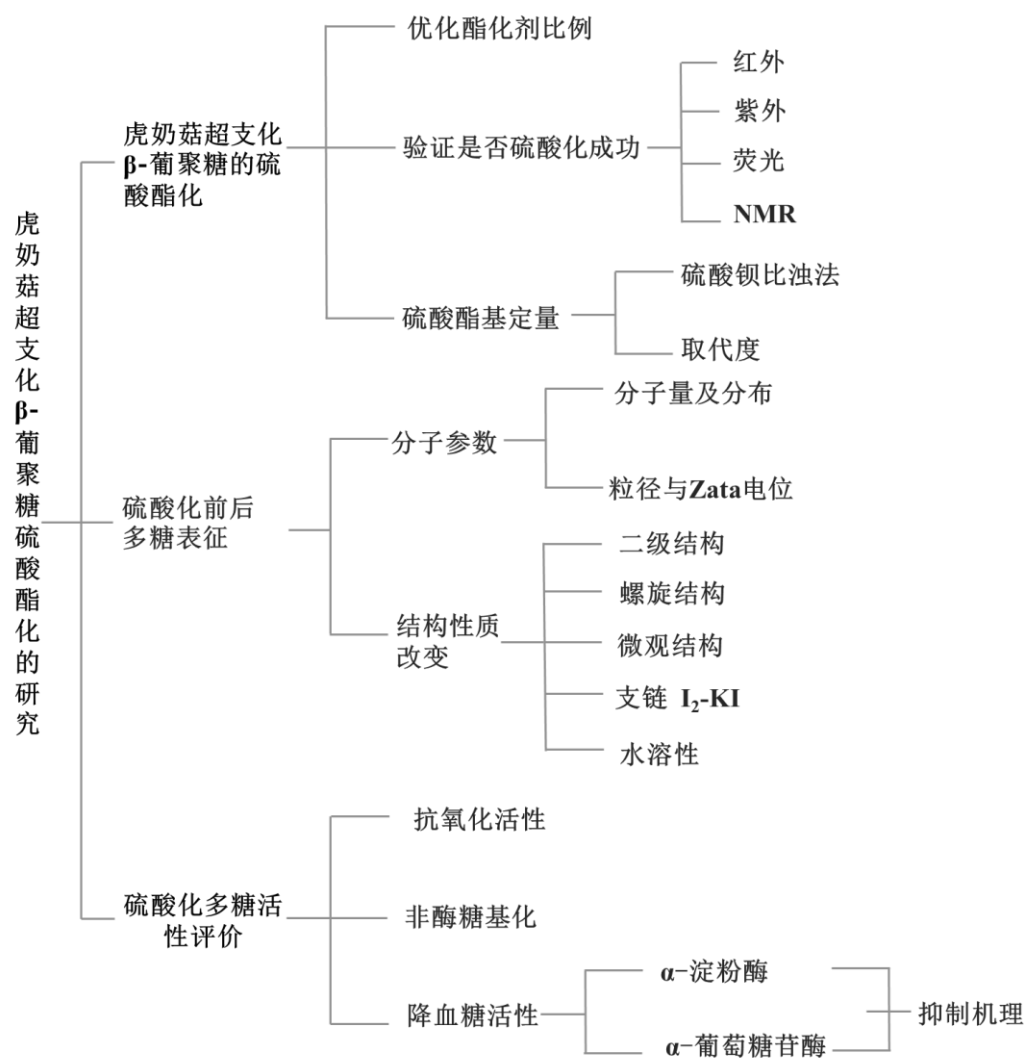


图 1-3 研究路线图

Fig. 1-3 Research roadmap

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验菌株

虎奶菇 (*Pleurotus tuber-regium*), 由本实验室保藏。

2.1.2 主要仪器设备

表 2-1 主要仪器
Table 2-1 Main apparatus

仪器名称	型号	生产厂家
纯水仪	Clever-S15	芷昂仪器(上海)有限公司
电子天平	FA-1004	上海舜宇恒平科学仪器公司
超净工作台	SW-CJ-IF	苏州净化设备有限公司
电热恒温培养箱	HH-B11-360	连云港医疗器械设备厂
气浴恒温振荡器	SHZ-82A	江苏科析仪器有限公司
高压蒸汽灭菌锅	LDZX-40BI	上海申安医疗器械厂
冷冻干燥机	10670-A	北京照生行仪仪器有限设备
超声波清洗器	KQ-100	昆山市超声仪器有限公司
冷冻高速离心机	Legend Micro 17R	美国赛默飞世尔科技有限公司
pH 计	PB-10	季尔国际贸易上海有限公司
恒温金属浴	SHZ-82A	百灵威科技有限公司
多角度激光散射凝胶排阻色谱系统	DAWN HELEOS II	美国怀雅特技术公司
傅里叶红外光谱仪	NEXUS	美国尼高力仪器公司
纳米粒度及 Zeta 电位分析仪	ZEN3700	英国马尔文仪器有限公司
荧光分光光度计	F-7000	日本日立公司
透射电子显微镜	H-7650	日本日立公司
紫外可见分光光度计	日立 U-3900	日本日立株式会社
全数字化核磁共振波谱仪	Avance III 400 MHZ	德国布鲁克公司
圆二色谱仪	MOS450	法国比奥罗杰公司

2.1.3 主要试剂

表 2-2 主要试剂
Table 2-2 Main reagents

名称	英文/简称	生产厂家
氯磺酸	CSA	国药集团化学试剂有限公司
吡啶	Pyr	国药集团化学试剂有限公司
N,N-二甲基甲酰胺	DMF	国药集团化学试剂有限公司
3, 5-二硝基水杨酸	DNS	阿拉丁生化科技股份有限公司
氯化钡	BaCl ₂	国药集团化学试剂有限公司
硫酸钾	K ₂ SO ₄	国药集团化学试剂有限公司
碘	I ₂	国药集团化学试剂有限公司
碘化钾	KI	国药集团化学试剂有限公司
水杨酸	-	国药集团化学试剂有限公司
BCA 蛋白试剂盒	BCA Kit	碧云天生物技术有限公司
α -淀粉酶	α - amylase	上海源叶生物科技有限公司
α -葡萄糖苷酶	α - Glucosidase	上海麦克林生化科技有限公司
对硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷	pNPG	上海麦克林生化科技有限公司
牛血清白蛋白	BSA	百灵威科技有限公司
氨基胍盐酸盐	AG	百灵威科技有限公司
抗坏血酸	Vc	国药集团化学试剂有限公司
谷胱甘肽	GHS	百灵威科技有限公司
阿卡波糖	Acarbose	百灵威科技有限公司
1,1-二苯基-2-苦基肼	DPPH	默克生命科学技术有限公司
总抗氧化能力检测试剂盒	ABTS	上海碧云天生物技术有限公司
NaOH	-	百灵威科技有限公司
其他	-	国药集团化学试剂有限公司

2.1.4 虎奶菇菌核的培养

取生长状态良好的 PTR 菌种接种于 PDA 平板上, 30℃条件下恒温培养 7 天后于保藏于 4℃冰箱, 并对其进行定期菌种转接。将米糠 (20%)、棉籽壳 (30%)、木屑 (50%) 和水 (1:11, v/v) 混合的基质放入聚丙烯树脂制成的专属蘑菇培养袋中, 灭菌后备用。取适量预先培养好的 PTR 菌丝接种至培养袋, 在 30℃、70~85%的相对湿度条件下培养约 4 个月, 待菌核生长至直径 > 5 cm 时收取^[61]。

2.1.5 虎奶菇超支化 β -葡聚糖提取

本实验使用的虎奶菇超支化 β -葡聚糖 (PTR-HBG) 是通过碱提法从菌核中提取所得的, 具体提取方法为: 虎奶菇菌核细胞壁研磨成粉并且干燥处理后, 先用丙酮搅拌脱脂 1 h, 经过三次离心除去上清液以获得沉淀; 将上述沉淀用沸水浸提 2 h, 离心并获得沉淀, 此过程重复三次; 沉淀用 1 M NaOH 在常温搅拌条件下提取 12 h, 离心收集并合并上清, 重复 5 次; 利用 100 kDa 超滤膜进一步处理上清液, 回流液通过添加去离子

水调节为中性，冻干所得浓缩液即获得虎奶菇超支化 β -葡聚糖^[12]。

2.2 虎奶菇超支化 β -葡聚糖的硫酸化

2.2.1 酯化剂对硫酸化修饰的影响

采用氯磺酸-吡啶法制备虎奶菇超支化 β -葡聚糖的衍生物 S-HBGs^[62]。在搅拌和冷却条件下，将 HClSO_3 (CSA) 溶液滴加到无水吡啶 (Pyr) 中，制得不同比例的 CSA:Pyr 酯化剂，实验共采用了 7 种不同的 CSA/Pyr 体积比，分别为 1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5 和 1:4，所有实验均在 30 min 内完成。具体方法为，HBG (300 mg) 在室温下悬浮在 30 mL 的无水 DMF 中并不断搅拌，将多糖悬浮液滴入制备好的不同比例的 CSA/Pyr 酯化剂中。在 70°C 条件下反应 4 h 后，混合物冷却至室温后用 4 mol·L⁻¹ 的 NaOH 中和。醇沉后将沉淀悬浮在蒸馏水中进行透析 4-7 天。通过旋转蒸发浓缩保留混合物，冷冻干燥最终得到 HBG 硫酸化衍生物，分别命名为 S-HBG_{1:1}、S-HBG_{1:1.5}、S-HBG_{1:2}、S-HBG_{1:2.5}、S-HBG_{1:3}、S-HBG_{1:3.5} 和 S-HBG_{1:4}。

2.2.2 硫酸根含量的测定

使用改良的硫酸钡比浊法测定硫酸根含量及取代度 (DS，即一个葡萄糖上的平均磺基数) ^[39]。取 0.181 g K_2SO_4 溶解于去离子水中并定容至 100 mL，分别稀释至 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mM，充分摇匀后分别吸取上述溶液 5 mL 与等体积 25% 的 BaCl_2 混匀，室温下静置 10 min 后测定 400 nm 处的吸光值，制得标准曲线为 $y=0.5469x+0.0465$ ($R^2=0.999$)。将 20 mg 硫酸多糖样品溶解于 20 mL 20% HCl 中，在密封管中于 100°C 水解 6 小时，之后定容至 100 mL，取 5 mL 样品与等体积 25% 的 BaCl_2 混匀。根据以下公式计算 DS^[63]。

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

2.3 硫酸化前后虎奶菇超支化 β -葡聚糖的表征

2.3.1 傅里叶红外光谱分析

称取大约 5 mg 样品，利用傅里叶红外光谱仪并且采用全反射法对硫酸化修饰前后的样品进行光谱检测，测量范围 600~4000 cm⁻¹^[64]。

2.3.2 紫外光谱和荧光光谱分析

使用 TU-3900 分光光度计在 25°C、200~400 nm 范围内获得浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的多糖样品的紫外吸收光谱。对不同样品相同浓度下在 280 nm (λ_{ex}) 处的本征荧光进行测定，在 400~700 nm 处进行发射扫描。。

2.3.3 核磁氢谱分析

将 S-HBGs 样品 (约 30.0 mg) 溶解在 0.5 mL D_2O 中，使用 Bruker Advance 600

MHz NMR 光谱仪在 400 MHz 和 40°C 下进一步检测 ^1H NMR 谱^[65]。

2.3.4 分子量

采用配备了 Ultrahydrogel@TM 2000 (30 cm×7.8 mm, i.d.) 凝胶柱的多角度激光散射凝胶色谱系统 (SEC-MALLS) 对样品的分子量 (M_w , Weight-average molecular mass) 和均方根半径 (Root mean square radius, R.M.S. radius, Radius of gyration, r_g) 等信息进行测定。该设备以浓度为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaNO_3 为洗脱缓冲液, 流速为 $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 其他参数见参考文献^[66]。

2.3.5 纳米粒度及电位分析

样品水溶液的粒径和 Zeta 电位是在纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (Malvern Instruments, UK) 上测定的。将约 2 mg 衍生化前后的多糖样品溶解于 1 mL 蒸馏水中, 超声处理 15 min 以进行充分溶解, 金属浴 80°C 加热至溶液澄清后将样品稀释至浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后进行测定^[67]。

2.3.6 水溶性

为了评估硫酸化修饰对样品水溶性的影响, 每个样品 (200 mg) 分散在 1.0 mL 蒸馏水中, 在 25°C 下连续搅拌 24 h。离心 15 min 后将上清液与 3 倍体积的乙醇混合。沉淀物离心 15 min 后回收, 经过真空干燥并称重^[68]。溶解度的计算如下:

$$\text{水溶性 (\%)} = \frac{\text{沉淀干重}}{\text{样品干重}} \times 100 \quad (2)$$

2.3.7 二级结构分析

2.3.7.1 圆二色谱分析

在 30°C 下, 使用 1.0 cm 路径长度的比色皿, 检测 S-HBGs ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 在 190~300 nm 内的圆二色谱 (CD) 光谱, 以超纯水溶液为空白对照组, 分析 HBG 在硫酸化前后二级结构的变化^[69]。

2.3.7.2 I_2 -KI 实验分析

碘试剂 (1.2 mL, 含 0.2% KI 和 0.02% I_2 , w/v) 与 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液 (2 mL) 混合 10 min 后, 用紫外分光光度计在 300~700 nm 内测定吸光度^[70]。支链淀粉和玉米淀粉 (直链淀粉) 分别作为侧链较长的高支链聚合物和侧链较少或较短的线性聚合物的对照。

2.3.8 刚果红实验分析

刚果红法可用于溶液中多糖的构象测定, 分析 HBG 和 S-HBGs 在溶液中的构象结构。将 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的多糖样品溶液与浓度为 $80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的刚果红溶液混合均匀, 分别加入不同浓度的 NaOH ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

和 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 振荡混匀后静置 10 min, 利用紫外分光光度计连续扫描 400~700 nm 范围内的光谱, 记录 NaOH 浓度不同时溶液的最大吸收波长。以混合了相同浓度 NaOH 并且多糖溶液替换为超纯水溶液的刚果红溶液作为对照, 然后通过相同的方法进行可见光谱的扫描^[71]。

2.3.9 分子形貌

为了观察单个分子的微观结构, 通过透射电镜在 80 kV 加压的条件下进一步分析观察了 HBG 和 S-HBGs 的分子形貌^[15]。将每个样品完全溶解制得浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 然后逐级稀释至 100、50、10 和 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加热至 80°C , 待样品沉积于碳涂层铜网表面并干燥后进行 TEM 观察。

2.4 S-HBGs 活性研究

2.4.1 S-HBGs 的抗氧化活性分析

2.4.1.1 S-HBGs 清除 DPPH 实验

将原糖 (HBG) 与成功硫酸化改性的样品 (S-HBG_{1:2}、S-HBG_{1:2.5}、S-HBG_{1:3} 和 S-HBG_{1:3.5}) 分别配制成浓度为 $0.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 各取 2 mL 样品溶液与等体积 DPPH ($100 \mu\text{M}$) 混合并振荡均匀。黑暗条件下静置 30 min 并测定 517 nm 处的吸光值; 反应体系中的 DPPH 和样品由无水乙醇替代, 测定 517 nm 处的吸光值。以 V_C 和谷胱甘肽 (GSH) 作为阳性对照。将上述数据测量 3 次, 取平均值, DPPH 自由基清除活性 (%) 通过公式 (3) 计算^[72]:

$$\text{自由基清除率 (\%)} = (1 - \frac{A - A_0}{A_1}) \times 100\% \quad (3)$$

其中 A 和 A₁ 为样品和无水乙醇分别与 DPPH 混合后在 517 nm 处的吸光值。A₀ 为样品与无水乙醇混合物在 517 nm 处的吸光度。

2.4.1.2 S-HBGs 清除 ·OH 实验

制备水杨酸-乙醇 (9 mM)、H₂O₂ (8.8 mM)、FeSO₄ 溶液 (9 mM) 和不同浓度的样品溶液 (0.625 、 1.25 、 2.5 、 5 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。将 0.1 mL 样品 ($0.625 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与 0.1 mL FeSO₄、0.1 mL 水杨酸-乙醇溶液、0.1 mL H₂O₂ 溶液和 1.2 mL 蒸馏水在试管中快速混合, 最后加入 H₂O₂ 启动反应, 在 37°C 水浴中反应 1 h 后冷却, 测定 510 nm 处样品的吸光度 A, 样品溶液替换为 0.1 mL 超纯水为空白对照 A₁。实验组中的 0.1 mL H₂O₂ 用 0.1 mL 蒸馏水替代, 作为阴性对照 A₀。上述数据测定 3 次后取平均值, ·OH 清除活性根据公式 (3) 计算^[72]:

2.4.1.3 S-HBGs 清除 ABTS⁺ 实验

ABTS 溶液与等体积的氧化溶液混合, 配制 ABTS⁺ 自由基阳离子溶液, 室温黑暗条

件下静置 12~16 h 后备用。用 PBS 将上述溶液稀释 30~50 倍后制成 ABTS⁺工作液备用。ABTS⁺溶液 (200 μL) 与不同浓度 (0.625~10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的多糖溶液 (10 μL) 混匀, 在 4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 3 min, 去除沉淀的多糖, 以避免其对吸光度值的影响。上清液于室温下反应 6 min, 测定 734 nm 处的吸光度。 V_C 作为阳性对照, 按公式 (3) 计算硫酸多糖样品的 ABTS 自由基阳离子清除活性^[72], 其中 A 和 A_1 分别为样品和 PBS 与 ABTS 混合物在 734 nm 处的吸光度。 A_0 为 PBS 与样品混合物在 734 nm 处的吸光度。

2.4.1.4 S-HBGs 还原力测定

2 mL 浓度不同的样品溶液 (0.625、1.25、2.5、5、10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与等体积的浓度为 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS (pH 6.6) 混合均匀后加入 1% (w/v) 的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 并在 50°C 条件下反应 20 min, 加入 2 mL (w/v) 三氯乙酸后上清液在 4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离心 10 min, 取 2 mL 上述溶液加入等体积蒸馏水与 0.4 mL 0.1% (w/v) FeCl_3 溶液, 室温下反应 10 min, 测定 700 nm 处吸光度, 还原能力与吸光度呈正相关^[72]。

2.4.2 S-HBGs 对 NEG 的影响

2.4.2.1 BSA 的非酶糖基化抑制试验

根据 Yamaguchi^[73]等人报道的方法, 使用牛血清白蛋白 (BSA) 和果糖 (Fru) 作为非酶糖基化反应物, 在正常和加速条件下评估 S-HBGs 对 NEG 的抑制效果。用 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS (pH 为 7.4) 配制浓度为 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 BSA、90 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的果糖溶液和不同浓度的 S-HBGs (0.1, 0.5, 1, 2.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 将上述 BSA、果糖和 S-HBGs 溶液过 0.22 μm 滤膜后等体积混合, 将 S-HBGs 替换为不同浓度的 AG (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mM) 作为阳性对照, 分别在 37°C, 45°C 和 50°C 条件下反应 7 天, 反应结束后, 混合物立即储存在 -20°C 下进行进一步分析。使用 SDS-PAGE 检测糖化牛血清白蛋白的分子质量^[74]。

2.4.2.2 AGEs 荧光强度的测量

利用糖化蛋白在 $\lambda_{\text{ex}}=370$ nm 和 λ_{em} (400~500 nm) 范围内的荧光强度监测 AGEs 的形成。具体来说, 某些 AGEs 在不同激发/发射 (ex/em) 波长下的荧光测量如下: 精嘧啶 320 nm/380 nm, 戊糖苷 335 nm/385 nm, 吡啶类 350 nm/405 nm, 350 nm/440 nm 为总 AGEs。抗糖基化活性用公式 (4) 表示为抑制率^[74]:

$$\text{抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{F_{\text{BSA} + \text{果糖} + \text{样品}}}{F_{\text{BSA} + \text{果糖}}}\right) \times 100 \quad (4)$$

2.4.3 S-HBGs 的降血糖活性分析

2.4.3.1 α -淀粉酶抑制活性

以 20 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 为 7) 配制浓度为 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 α -淀粉酶溶液, 并用相同的缓冲液将 S-HBGs 稀释到一系列不同浓度 (0.625、1.25、2.5、5、10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

取 250 μL 样品与等体积 α -淀粉酶溶液混合, 37°C 下反应 20 min 后加入底物淀粉 500 μL ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 启动反应, 37°C 下静置 10 min 后加入底物两倍体积的 DNS, 于沸水中加热 10 min, 冷却并测定 540 nm 处吸光度^[75]。空白对照为等体积的 PBS 代替 α -淀粉酶溶液, 阿卡波糖则作为阳性对照。样品对 α -淀粉酶活性抑制率按照公式 (5) 计算:

$$\text{抑制率 (\%)} = \left(\frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \right) \times 100 \quad (5)$$

其中, $A_{\text{空白}}$ 为无 S-HBGs 溶液的吸光度, $A_{\text{样品}}$ 为含有 S-HBGs 溶液的吸光度。

2.4.3.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性

用 PBS (20 mM, pH 为 7) 将 α -葡萄糖苷酶配制成浓度为 $1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 取不同浓度的 S-HBGs 溶液 100 μL (0.1、0.25、0.5、0.75、1、2.5、5、10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与等体积的 α -葡萄糖苷酶溶液混合, 混合后在 37°C 下静置 30 min, 相同体积的 pNPG (5 mM) 加入上述溶液, 37°C 下静置 30 min 后加入 1 mL Na_2CO_3 (0.2 M) 终止反应^[75]。对照组用相同浓度的阿卡波糖替换样品, 测定 405 nm 处的吸光值, 利用公式 (5) 计算抑制率。

2.5 S-HBGs 降血糖机理分析

2.5.1 S-HBGs 对 α -淀粉酶的抑制机理

2.5.1.1 S-HBGs 对 α -淀粉酶抑制动力学的测定

S-HBGs 对 α -淀粉酶的抑制动力学是通过设计不同浓度的底物 (糊化后的淀粉) 分别与不同浓度的 S-HBGs 反应的情况下进行的。用 20 mL 的 PBS (pH 为 7) 缓冲液配制一系列的 S-HBGs 溶液 (0.625、1.25、2.5、5、10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和淀粉溶液 (0.5、1、5、10、20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。淀粉溶液在 100°C 的条件下加热糊化 30 min。不同浓度的多糖样品 200 μL 和等体积的不同浓度的淀粉溶液分别混匀后在 37°C 条件下保持 10 min, 向各管中加入 400 μL 浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 α -淀粉酶, 在 37°C 恒温条件下进行酶解反应, 分别于 1、3、6、9、12、15 min 后, 取 300 μL 的混合酶解液与 1 mL DNS 混合并煮沸 5 min 后测定 540 nm 处吸光值。通过 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程来分析 S-HBGs 对 α -淀粉酶的抑制机理及类型^[76]。Dixon 方程用来分析反应的初始速度 (v) 与 S-HBGs 浓度 (i) 的关系, 时间和还原糖含量分别作为横坐标和纵坐标作图, 初始反应速率 (v) 可根据斜率获得, 从而探究对 α -淀粉酶的抑制机理^[75]。通过 Dixon 方程计算 K_{ic} (竞争性抑制常数) 和 K_{iu} (反竞争性抑制常数)。其中混合型抑制类型的 Dixon 方程如公式 (6) 所示:

$$V = \frac{V_{\max} a}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_{ic}} \right) + a \left(1 + \frac{i}{K_{iu}} \right)} \quad (6)$$

混合型抑制类型的 Cornish-Bowden 方程如式如公式（7）所示：

$$\frac{V}{a} = \frac{V_{\max}}{K_m(1 + \frac{i}{K_{ic}}) + a(1 + \frac{i}{K_{iu}})} \quad (7)$$

其中， $V_{\max}$ 代表最大初始反应速度； a 为淀粉浓度； K_m 为米氏常数； i 为抑制剂的浓度； v 代表初始反应速度。

2.5.2 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶的抑制机理

2.5.2.1 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶抑制类型的测定

S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶抑制类型测定的方法参考先前的研究并稍作修改。底物 pNPG 的浓度固定为 5 mM，在不添加样品和添加不同浓度的多糖样品（0.1、0.25、0.5、0.75、1、2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）的条件下，测定不同酶浓度（1、2、3、4 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）条件下的反应初速率并绘图，并判断其是否为可逆性抑制^[75]。

2.5.2.2 S-HBGs 对 α -葡萄糖苷酶抑制动力学的测定

用 PBS（pH 为 7）配制浓度为 1 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 α -葡萄糖苷酶溶液，100 μL 的酶溶液与等体积不同浓度的样品溶液（0、0.1、0.5、1.0、5.0 和 10.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）混合，在 37°C 下反应 10 min。100 μL 不同浓度的 pNPG 溶液（1.25、2.5、5、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）分别添加至上述混合液，测定 405 nm 处吸光值每分钟的变化，记为 pNPG 浓度不同时的反应初速率 V ，通过 Lineweaver-Burk 方程，如公式（8）和（9）所示，将得到的数据绘制为 $1/V$ 和 $1/[S]$ 的关系方程，判断其抑制是否可逆^[69]。

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (9)$$

其中： V 代表反应速率（ $\Delta \text{OD} \cdot \text{min}^{-1}$ ）； $[S]$ 为底物浓度（ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）； $V_{\max}$ 代表酶促反应最大速率（ $\Delta \text{OD} \cdot \text{min}^{-1}$ ）； K_m 表示米氏常数（ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）。

2.5.2.3 S-HBGs 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭

蛋白质（酶）的荧光光谱主要来源于色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸这三种芳香族氨基酸，其中荧光发射主要是由色氨酸引起的。因此，含有色氨酸残基的酶的变化值可以反映蛋白质及其周围环境的变化^[77]。采用日立 F-7000 荧光分光光度计测定 S-HBGs 存在或不存在时 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭。取 300 μL 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 α -淀粉酶与 S-HBGs 样品（0.625、1.25、2.5、5、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）等体积混合，37°C 下保持 5 min；取 300 μL 浓度为 1 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 α -葡萄糖苷酶与不同浓度的 S-HBGs 样品（0.1、0.25、0.5、1、2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）等体积混合，在 37°C 下保持 5 min，扫描速率设置为 120 $\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ，激发波长（ λ_{ex} ）设置为 280 nm，300~500 nm 为发射波长（ λ_{em} ）的扫描范围，两种狭缝宽度（激发和发射）设置为 2.5 nm。在三种温度下（298、304 和 310 K）扫描样品与酶混合液在 300~500 nm 的荧光光谱。由于内滤效应，所测的荧光值均需校正，校正公

式如公式（10）所示，

$$F_c = F_m e^{(A_1 + A_2)/2} \quad (10)$$

其中， F_c 为校正过的荧光强度， F_m 为荧光强度测定值， A_1 为加入抑制剂的样品在激发波长下的吸光值， A_2 表示加入抑制剂的样品在发射波长下的吸光值。

多糖样品与酶之间的猝灭效率遵循 Stern-Volmer 方程，采用 Stern-Volmer 方程测定 HBG 及其衍生物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭^[78]，如公式（11）所示：

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (11)$$

式中： F_0 表示两种酶（ α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶）与 S-HBGs 的荧光值； F 为两种酶（ α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶）在没有 S-HBGs 的情况下的荧光值； $[Q]$ 为样品浓度； K_{sv} 为猝灭常数； K_q 为生物分子猝灭常数； τ_0 为无猝灭剂时酶所含有的荧光物质的平均荧光寿命，约为 10^{-8} s。

2.5.3 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的圆二色谱（CD）

使用圆二色谱（190~250 nm）测定 S-HBGs 存在和不存在时 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 CD 光谱。300 μ L α -葡萄糖苷酶溶液与不同浓度的 S-HBGs 溶液（0.1、0.5、1、5、10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）等体积混合，在 37°C 下反应 15 min，在 190~250 nm 范围内减去 S-HBGs 的背景信号进行测量；将浓度为 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的淀粉酶与不同浓度的 S-HBGs 溶液（0.625、1.25、2.5、5、10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）等体积混合后 37°C 下保持 15 min 得到待测样品，通过减去 S-HBGs 的背景信号进行 CD 图谱的扫描，扫描范围为 190~250 nm。分别以波长（nm）和圆二色性（mdeg）为横纵坐标绘制 CD 色谱图谱，并采用在线 SELCON3 程序（<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>）分析两种酶的二级结构含量变化，以分析硫酸化前后 HBG 对两种酶的二级结构的影响。

第三章 结果与讨论

3.1 虎奶菇超支化 β -葡聚糖的硫酸化修饰

根据已有研究,在利用氯磺酸-吡啶法对 HBG 硫酸化修饰的过程中,酯化剂比例对多糖衍生物的 DS 影响最大,为了获得不同 DS 的 HBG 衍生物样品,选择 1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5 和 1:4 七个比例对 HBG 进行硫酸化修饰,产物分别命名为 S-HBG_{1:1}、S-HBG_{1:1.5}、S-HBG_{1:2}、S-HBG_{1:2.5}、S-HBG_{1:3}、S-HBG_{1:3.5}和 S-HBG_{1:4},以产物中的硫酸根含量为初步评价指标计算 DS。如表 3-1 和图 3-1 所示,氯磺酸-吡啶复合物的体积比能显著影响 S-HBGs 的硫含量,进而影响 DS,其中 S-HBG_{1:1}, S-HBG_{1:1.5}, S-HBG_{1:4} 的 FT-IR 图未出现硫酸酯基的特征吸收峰(附图 1-1),因此未计算 DS。当氯磺酸-吡啶的体积比由 1:1 降至 1:2.5 时,硫含量随氯磺酸比例的减小迅速增大,当体积比为 1:2.5 时具有最高的硫含量,为 10.1%,酯化剂中氯磺酸比例继续降低时,硫含量及 DS 降低,故所选范围内最合适的酯化剂体积比为 1:2.5。酯化剂中氯磺酸比例提高有利于 HBG 羟基上的氢被充分取代,但过量的氯磺酸吡啶在反应过程中容易吸附多糖造成沉积,引起反应的不均匀,不利于更高 DS 的 S-HBGs 的获取^[79]。其次,硫酸化修饰的过程中反应体系呈酸性,氯磺酸占比越大酸性越强,将更容易造成硫酸酯化多糖的降解,降解产生的小分子产物在醇沉和透析过程中损失,引起 DS 的降低,此外酯化剂中吡啶含量过高时衍生物的 DS 也会下降,说明酯化剂中氯磺酸和吡啶过高都不利于硫酸化修饰反应的发生。

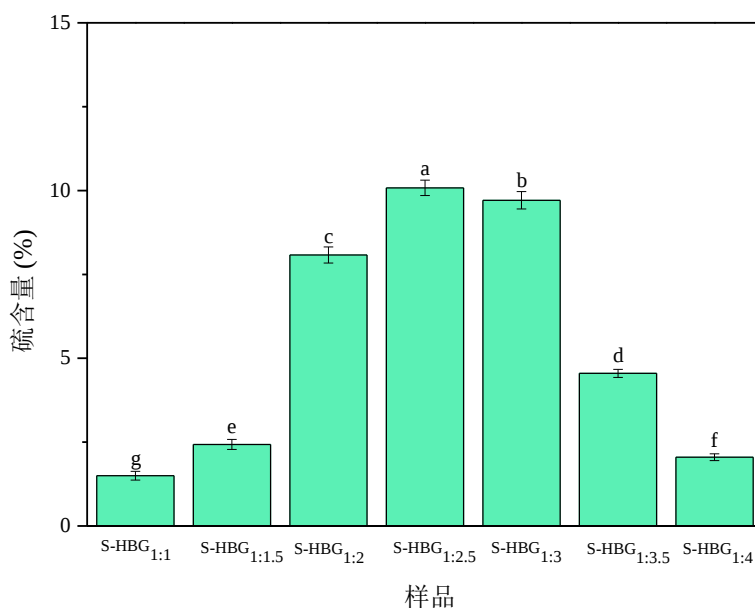


图 3-1 不同酯化剂比例下硫酸化产物的硫含量

Fig. 3-1 The sulfur content of sulfated products under different esterification agent ratio

注: 硫含量上方字母: 相同字母代表无显著差异, 不同字母代表差异显著 ($p < 0.05$)

表 3-1 样品的取代度
Table 3-1 Degree of substitution of the sample

样品	S 含量 (%)	取代度
S-HBG _{1:1}	1.5 ± 0.13	-
S-HBG _{1:1.5}	2.43 ± 0.15	-
S-HBG _{1:2}	8.08 ± 0.24	0.55
S-HBG _{1:2.5}	10.08 ± 0.23	0.75
S-HBG _{1:3}	9.71 ± 0.26	0.71
S-HBG _{1:3.5}	4.55 ± 0.12	0.27
S-HBG _{1:4}	2.05 ± 0.1	-

3.2 硫酸化前后虎奶菇超支化 β -葡聚糖的表征

3.2.1 傅里叶红外光谱分析

多糖的生物活性与结构和官能团有关，如图 3-2 所示，HBG 和所有 S-HBGs 在 -OH 拉伸振动的 3319 cm^{-1} 和 3400 cm^{-1} 附近均出现了典型的强吸收峰。此外，HBG 在约 2900 cm^{-1} 处出现弱吸收带，该吸收带属于糖环中 $-\text{CH}_2$ 基团的 C-H 拉伸振动。 1630 cm^{-1} 处的强吸收，对应于 $\text{O}-\text{C}-\text{CH}_3$ 的拉伸振动。在 $800\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收通常是指多糖的指纹区，其中 1101 cm^{-1} 和 1011 cm^{-1} 附近的吸附带是由糖苷键 (C-O) 和吡喃环 (C-C) 的拉伸振动引起的^[48]。与 HBG 相比，S-HBG_{1:2}、S-HBG_{1:2.5}、S-HBG_{1:3} 和 S-HBG_{1:3.5} 在 1220 cm^{-1} 和 800 cm^{-1} 处出现了两个新的吸收峰。S-HBGs 在 $1212\text{--}1228\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收是由于不对称 $\text{S}=\text{O}$ 的伸缩振动，在 $800\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰是与 $\text{C}-\text{O}-\text{SO}_3$ 基团有关的 C-O-S 对称振动，表明了硫酸根基团的存在。 $800\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ 区域常用于推断硫酸多糖中硫酸基团的位置^[80]，位于 845 cm^{-1} 、 830 cm^{-1} 和 808 cm^{-1} 附近的吸收峰分别属于 3-C、2-C 和 6-C。S-HBG_{1:2}、S-HBG_{1:2.5}、S-HBG_{1:3} 和 S-HBG_{1:3.5} 分别在 799.5 cm^{-1} 、 808.9 cm^{-1} 、 806.3 cm^{-1} 和 798.4 cm^{-1} 处显示中等强度条带，表明 C-O-S 的对称振动，这是由于 C-6 上发生了硫酸根取代。因此，当 CSA/Pyr 体积比为 1:2、1:2.5、1:3、1:3.5 时，CSA-Pyr 法能成功修饰 HBG。

然而，S-HBG_{1:1}、S-HBG_{1:1.5} 和 S-HBG_{1:4} 在 1220 cm^{-1} 和 800 cm^{-1} 附近未出现与硫酸酯基团有关的特征吸收峰，但经过硫酸钡比浊法在未水解条件下，便可检测到少量硫酸根，可能由于酯化试剂在多糖大分子结构中的吸附包裹导致。因此，在 HBG 硫酸化改性过程中，CSA 和 Pyr 的配比应控制在适当的范围内，才能达到预期的效果。

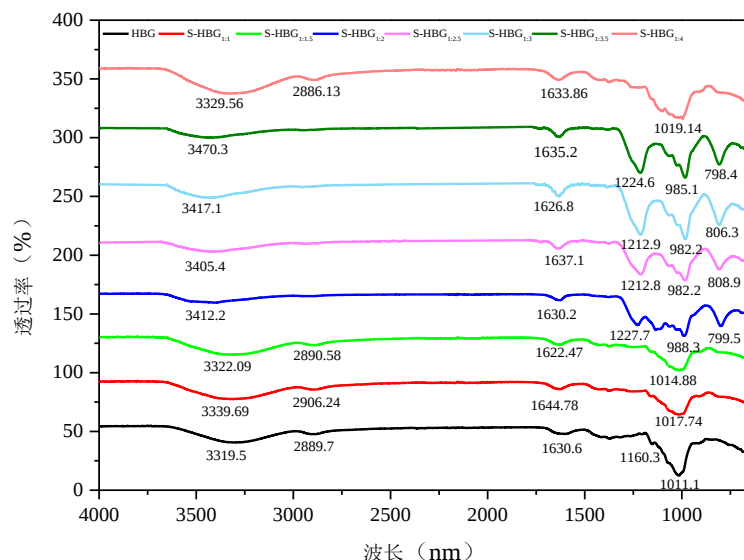


图 3-2 样品的傅里叶红外光谱图

Fig. 3-2 FT-IR spectra of processed samples

3.2.2 紫外光谱和荧光光谱分析

如图 3-3 所示, S-HBG_{1:2}、S-HBG_{1:2.5}、S-HBG_{1:3}、S-HBG_{1:3.5} 的紫外光谱具有 250~300 nm 的典型吸收, 而 HBG 等四种样品在此范围内均无吸收。据文献报道, 硫酸根的引入导致硫酸化多糖衍生物的紫外光谱在 218 nm、264 nm、268 nm 和 286 nm 附近有 -SO₃ 和 -S-O- 的吸收峰^[81]。因此 S-HBG_{1:1}、S-HBG_{1:1.5}、S-HBG_{1:4} 未成功发生硫酸化, 与 FT-IR 分析结果一致。

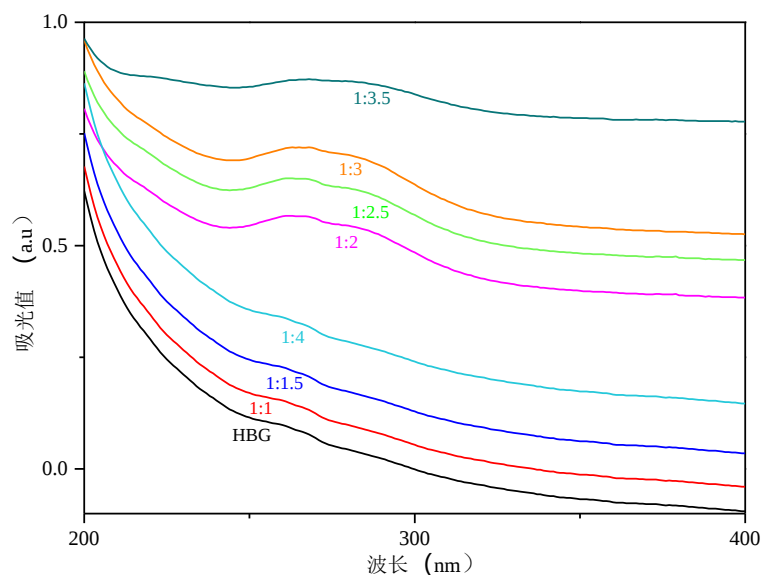


图 3-3 样品的紫外光谱图

Fig. 3-3 UV spectra of processed samples

如图 3-4 所示, S-HBG_{1:2}、S-HBG_{1:2.5}、S-HBG_{1:3}、S-HBG_{1:3.5} 的荧光强度与未经硫酸化改性的相比没有显著变化, 而 S-HBG_{1:1}、S-HBG_{1:1.5}、S-HBG_{1:4} 的荧光强度显著增强。取代基对荧光的影响包括增强荧光、减弱荧光和无显著影响三种, 增强荧光强度需要

有给电子取代基的存在，例如-OH-ORR-NH₂-CN、-NHR、-NR₂、-OCH₃等；减弱荧光强度则需要有得电子取代基存在，包括-COOH、-NO₂、-NO、-SH等，而-NH₃、-R、-SO₃H既不属于给电子取代基又不属于得电子取代基，这些取代基存在时荧光强度不会有显著变化。因此，S-HBG_{1:1}、S-HBG_{1:1.5}和S-HBG_{1:4}的硫酸化修饰是不成功的，该结果与UV及FT-IR结果一致。

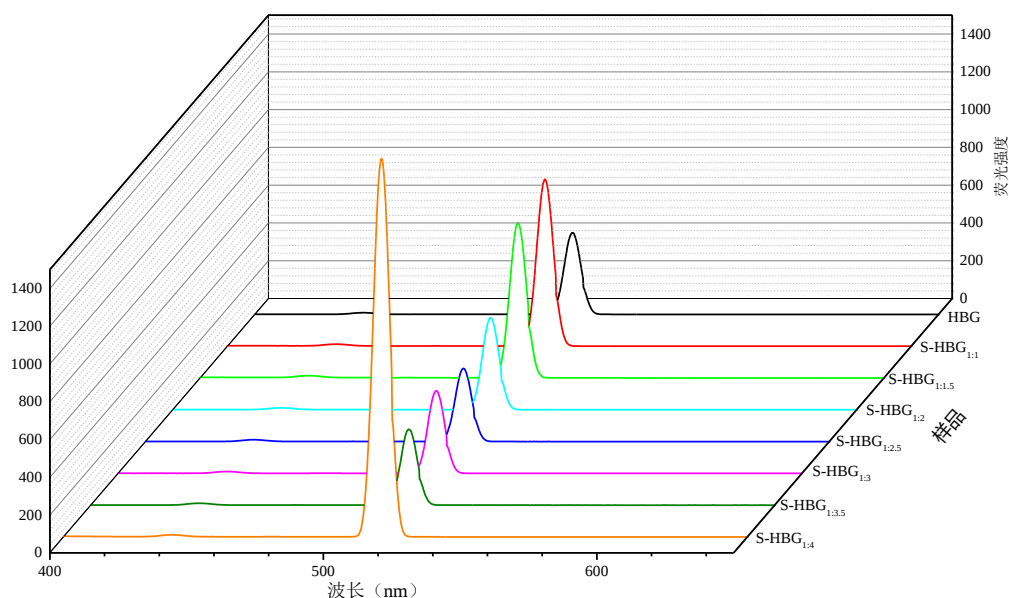


图 3-4 样品的荧光光谱图

Fig. 3-4 Fluorescence intensity of processed samples

3.2.3 核磁氢谱分析

¹H NMR 可用于阐明多糖的糖苷键构象和每个样品的可能硫酸化位点。我们前期的研究表明，PTR 的 HBG 主要由 β -1,4/ β -1,4,6/ β -1,6 糖苷键组成^[15]，因此可以通过与 HBG 的核磁共振数据比较来分析硫酸化后质子的化学位移，判断硫酸化位点。如图 3-5 所示，根据先前的研究，在 4.10、4.23、4.52 和 4.55 ppm 的 ¹H 信号分别归属于 1,4,6- β -D-Glcp、1,6- β -D-Glcp、1,4- β -D-Glcp 残基和末端残基 β -D-Glcp 的异头质子。在 4.62 ppm 和 4.66 ppm 时，两个相对强度相似的信号分别是由 1,3- β -D-Glcp 和 1,3,6- β -D-Glcp 残基的异头质子引起的^[82]。通过比较每个硫酸化多糖残基质子与 HBG 的化学位移，发现 S-HBG_{1:2}、S-HBG_{1:2.5} 和 S-HBG_{1:3} 的 ¹H 信号与 HBG 相比均表现出向低场的化学位移，其中 S-HBG_{1:2} (δ 9.14 ppm, δ 9.03 ppm) 和 S-HBG_{1:2.5} (δ 9.05 ppm, δ 8.94 ppm) 分别在低场出现双峰，这是由 -SO₃H 基团的诱导作用引起的。S-HBG_{1:3} 在 δ 8.23 ppm 和 δ 8.93 ppm 处分别出现三峰和双峰，这是氢原子的自旋耦合效应造成的^[53]，这些结果表明，取代反应发生在 C-6 位置，因此可以认为 HBG 的硫酸取代至少发生在 C-6 位置。与 HBG (4.10-4.66 ppm) 相比，分配给不同异头质子的 S-HBGs 的信号转移到较低的场 (4.23-5.12 ppm)，并且这种化学位移的改变随着 DS 的增加而增加。同时，DS 最大的 S-HBG_{1:2.5} 与 HBG 相比变化最大，不同多糖残基的异头质子信号集中在 4.23-5.12 ppm 范围内，说明磺酸基团 (-SO₃H) 的引入并不影响 HBG 中异头质子信号的分布，但磺酸

基团 ($-\text{SO}_3\text{H}$) 的诱导作用导致氢共振向低场转移, 化学位移增加。随着 DS 的降低, 低场信号强度越来越弱, 这可能是由于磺酸基 ($-\text{SO}_3\text{H}$) 含量的降低导致多糖体系中分子的诱导效应减弱。

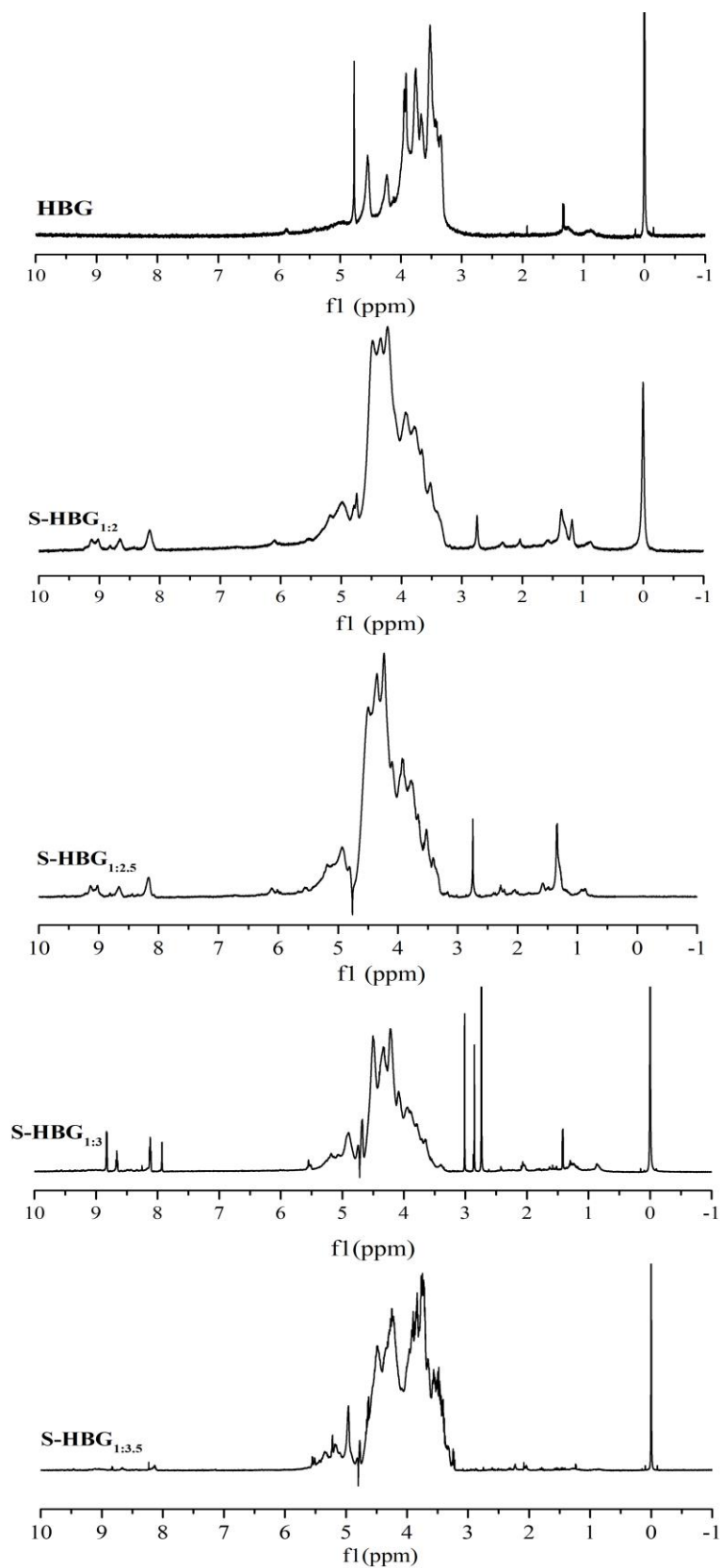


图 3-5 样品的核磁氢谱图

Fig. 3-5 ^1H NMR of processed samples

3.2.4 分子量

如图 3-6 所示, 5 个样品都只有一个对称性良好的单峰, 说明样品的纯度高、均一性好, 其中 DS 最大的 S-HBG_{1:2.5} 分散系数最小 ($d=Mw/Mn$)。如表 3-1 所示, 各硫酸化衍生物的分子量均小于 HBG ($13.62 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), 并随着酯化剂中吡啶比例的增加呈下降趋势。由于硫酸化修饰过程中硫酸根基团的取代会导致多糖分子量增加, 因此推断这一下降趋势是因为多糖分子在修饰过程中发生了不同程度的降解, 这与之前的报道一致^[81]。因此, 在硫酸化反应中, 硫酸化和降解是同时存在的。此外, R.M.S 半径能反映具有支链聚合物的分子尺寸等相关信息, 常用来表示支链聚合物或其他分子在溶液中的紧密程度。HBG 的均方根半径最小 (17.63 nm), 表明 HBG 主要以紧密构象存在于水溶液中, 而 S-HBG 分子的 R.M.S 半径范围在 29.4~38.15 nm 内, 明显高于 HBG, 且随取代度的增加呈现出增大的趋势, 表明 HBG 分子上硫酸根的数量对其空间形态有重要的影响, 而且硫酸化改性使 S-HBG 分子在水溶液中的结构更伸展。

表 3-2 样品的分子量信息

Table 3-2 Molecular weight information of the sample

样品	$Mw \times 10^5$	$Mn \times 10^5$	$Mz \times 10^5$	Mw/Mn	R.M.S radius(nm)
HBG	13.62 ± 0.46	4.798	39.05	2.902	17.63 ± 0.50
S-HBG _{1:1}	8.37 ± 0.96	1.948	55.60	3.802	19.83 ± 1.65
S-HBG _{1:1.5}	6.34 ± 0.04	2.240	65.23	2.830	22.2 ± 0.95
S-HBG _{1:2}	13.5 ± 0.62	7.461	62.16	1.809	38.15 ± 0.4
S-HBG _{1:2.5}	12.31 ± 2.14	8.161	18.87	1.246	33.3 ± 0.6
S-HBG _{1:3}	10.03 ± 0.69	6.911	18.17	1.476	30.5 ± 0.53
S-HBG _{1:3.5}	9.58 ± 0.81	6.372	89.53	1.632	29.4 ± 1.3
S-HBG _{1:4}	5.85 ± 1.39	5.615	13.47	1.290	25.3 ± 1.2

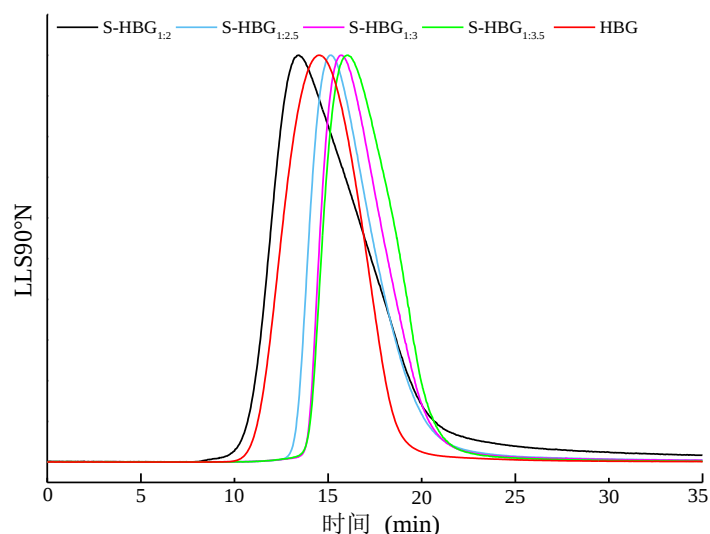


图 3-6 样品的 SEM-MALLS 色谱图

Fig. 3-6 SEM-MALLS chromatogram of the samples

3.2.5 纳米粒度及 Zeta 电位分析

为评价硫酸化修饰前后 HBG 的粒径、Zeta 电位等分子相关参数的变化,通过马尔文粒径仪测定 5 组样品的粒径和 Zeta 电位,结果如表 3-3 所示。与粒径为 55.88 nm、PDI 为 0.121 的 HBG 相比,随着酯化剂中吡啶含量的增加,S-HBGs 的粒径从 98.26 nm 降至 53.29 nm, PDI 从 0.292 减小到 0.230,虽然衍生物的粒径远高于它们的均方根半径,但两者的下降趋势相似,与 Mw 的变化趋势一致。聚合物的分散指数(Polymer dispersity index, PDI)一般用来表征聚合物的分子量分布情况,分散指数越小时分子量分布就会越均匀。结合 DS 和 Mw 的结果可知,聚合物分子在反应中随着磺化衍生过程发生了明显的降解,这与硫酸化修饰过程发生在酸性环境中有关。由于衍生物中-SO₃H 基团的存在会增强聚合物链间的位阻,使硫酸化衍生物的构象更加有序和伸展,从而分子以大粒径的伸展状态存在^[70],然而,由表 3-2 可知 S-HBGs 的粒径随吡啶含量的增加而减小,与分子量的变化表现出相同趋势,所以 HBG 在反应过程中的降解是粒径变化的主要原因。Zeta 电位常用来表示纳米颗粒分散在溶液后的稳定性和状态,纳米颗粒分散在溶液后体系的 Zeta 电位的绝对值越高代表分子间具有更大的静电排斥力,粒子在溶液中就具有更好的分散性和稳定性。S-HBG 的 Zeta 电位的变化与 DS 变化趋势一致,从-19.40 mV 下降到-25.76 mV,再上升到-18.90 mV,说明 S-HBG 中 Zeta 电位的变化与-SO₃H 基团含量呈正相关。这说明 DS 越大的样品越稳定,不易聚集,其中 S-HBG_{1:2.5} 稳定性最好。

表 3-3 HBG 和 S-HBGs 的纳米粒度、分散系数及 Zeta 电位
Table 3-3 Particle size, PDI and Zeta Potential of HBG and S-HBGs

样品	Mean Particle Size/nm	PDI	Zeta 电位/mV
HBG	55.88 ± 3.94	0.121	-22.23
S-HBG _{1:2}	98.26 ± 3.48	0.292	-19.40
S-HBG _{1:2.5}	98.17 ± 1.37	0.266	-25.76
S-HBG _{1:3}	61.63 ± 1.09	0.243	-20.10
S-HBG _{1:3.5}	53.29 ± 1.20	0.230	-18.90

3.2.6 水溶性

如图 3-7 所示,硫酸化修饰显著提高了 HBG 的水溶性,随着取代度的增加,水溶性从 47.6%增加到 83.55%。其中 S-HBG_{1:2.5} 的水溶性最高,为 83.55%,而 S-HBG_{1:3.5} 的水溶性仅为 55.675%。这是由于多糖中引入了硫酸根,增加了离子基团的数量。水溶性变化趋势与 S-HBGs 的 DS 相一致,由于硫酸化作用,多糖具有较高的水溶性^[83]。多糖的高聚合度和分子量通常导致其水溶性和分散性差,进而极大地影响了其生物活性,限制了其在食品和医学领域的应用。

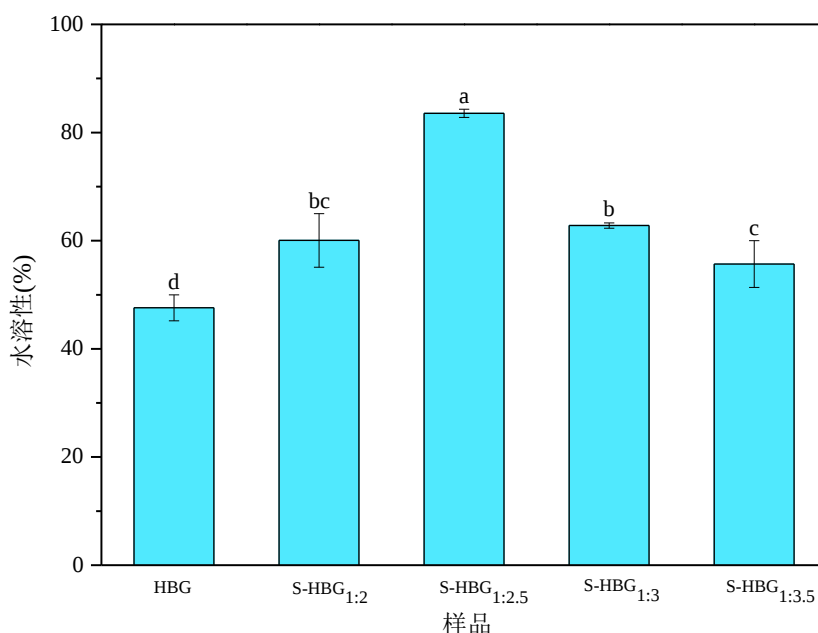


图 3-7 HBG 和 S-HBGs 的水溶性

Fig. 3-7 Water solubilities of HBG and S-HBGs

注：水溶性上方字母：相同字母代表无显著差异，不同字母代表差异显著（ $p < 0.05$ ）

3.2.7 构象特征分析

3.2.7.1 刚果红实验分析

多糖的三重螺旋结构对其生物活性至关重要，刚果红通常用于评价多糖的螺旋构象行为。具有三螺旋结构的样品在稀 NaOH 溶液中可与刚果红结合产生络合物，络合物最大吸收波长由于红移现象明显高于纯刚果红^[71]。通过比较不同 NaOH 浓度下刚果红或样品-刚果红复合物的最大吸收波长来分析 S-HBGs 的三螺旋结构。如图 3-8 所示，与刚果红溶液相比，HBG、S-HBG_{1:2} 和 S-HBG_{1:2.5} 络合物的最大吸收波长在低碱浓度下表现出明显的红移，然后随着 NaOH 浓度的增加而减小，说明这些样品存在规则的三螺旋构象。而 S-HBG_{1:3} 和 S-HBG_{1:3.5} 在不添加 NaOH 浓度时具有最大吸收波长，在 NaOH 浓度为 0.1~0.3 mol·L⁻¹ 范围内最大吸收波长呈现先增加后降低的趋势。这可能是由于 S-HBG_{1:3} 和 S-HBG_{1:3.5} 分子在 NaOH 浓度 0.1~0.3 mol·L⁻¹ 范围内时处于伸展状态而容易与刚果红结合，而在 NaOH 浓度为 0~0.1 mol·L⁻¹ 的碱性溶液中由于聚集导致刚果红不能进入多糖分子结构难以形成络合物。NaOH 浓度的进一步增大使 S-HBG_{1:3} 和 S-HBG_{1:3.5} 的紧密螺旋结构变得松散，与刚果红形成配合物。上述结果表明，S-HBG_{1:3} 和 S-HBG_{1:3.5} 三螺旋结构的稳定性低于 S-HBG_{1:2} 和 S-HBG_{1:2.5}，这与 Zeta 电位的结果一致。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/977014034030006046>