

酵母 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯 制备工艺的研究

黄国宏

(广西职业技术学院, 广西南宁 530226)

摘要:研究了酵母 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯制备工艺, 通过单因素实验和正交实验, 确定了制备高取代度的酵母 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯的最佳工艺条件为: 0.3g 酵母 β -1, 3-D-葡聚糖分散于 10mL 二甲基甲酰胺中, 磁力搅拌使其充分悬浮, 加入浓度为 15% 氯磺酸的酯化剂 15mL, 在 60℃ 水浴下反应 3h。制备出取代度高达 0.88 的酵母 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯, 且红外光谱表明, 酵母 β -1, 3-D-葡聚糖分子中已经成功引入了硫酸基基团。

关键词: 酵母葡聚糖, 硫酸酯化, 制备

Study on preparation of sulfated yeast β -1, 3-D-glucan

HUANG Guo-hong

(Guangxi Vocational & Technical College, Nanning 530226, China)

Abstract: Preparation of sulfated β -1, 3-D-glucan has been studied in this paper. The DS of 0.88 of sulfated β -1, 3-D-glucan can be got at the optimum parameters of sulfation: adding 0.3g yeast β -1, 3-D-glucan into 10mL dimethylformamide and mixed, then adding 15mL esterifiable reagent (the chlorosulfonic acid concentration = 15% ,v/v) and water-bathed 3 hours at 60℃. The DS of sulfated β -1, 3-D-glucan's is 0.88. The IR indicated that the sulfate-functional group had been introduced successfully in the molecular of β -1, 3-D-glucan.

Key words: yeast glucan; sulfation; preparation

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)08-0261-03

β -1, 3-D-葡聚糖是一类非特异性免疫增强化合物, 能提高机体的免疫功能, 增强抗病能力, 有抗肿瘤、抗细菌、抗病毒、抗真菌、抗寄生虫、降低胆固醇和血脂、促进伤口愈合等功能, 是一种良好的生物效应调节剂 [BRMs]。从酵母细胞壁中分离的酵母 β -1, 3-D-葡聚糖呈中性, 不带电荷, 是一个含有少量 β -1, 6 连接的 β -1, 3-D-葡聚糖, 由于其分子内多羟基的相互作用, 形成了致密的三股螺旋结构, 导致 β -1, 3-D-葡聚糖不溶于水, 这严重制约了其在医药工业上的应用。葡聚糖硫酸酯因其具有广泛的生物学性质, 包括抗病毒、抗肿瘤、抗凝活性等, 特别是近年来发现其具有抗艾滋病的作用, 而受到极大的关注^[1]。本文选取二甲基甲酰胺作为溶剂, 采用氯磺酸-二甲基甲酰胺法对酵母 β -1, 3-D-葡聚糖进行硫酸酯化。通过单因素实验研究了酯化剂中氯磺酸浓度、酯化温度和酯化时间等因素对 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯取代度的影响, 然后通过正交实验着重研究了酯化剂中氯磺酸浓度、酯化温度和时间三个因素与 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯取代度之间的关系, 优

化出 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯制备的最佳工艺, 同时利用红外光谱技术对 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯进行了分子结构鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

氯磺酸, 氢氧化钠, 二甲基甲酰胺 (DMF), 无水乙醇, 明胶, 氯化钡等。

78HW-1 型磁力搅拌器, LGJ-25 型冷冻干燥机, FA/JA 型电子天平, 电热恒温水浴锅, PHS-3C 型精密 pH 计等。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母 β -1, 3-D-葡聚糖的制备 参见文献 [2]。

1.2.2 酵母 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯的制备 称取 0.3g 酵母 β -1, 3-D-葡聚糖于锥形瓶中, 加入 10mL 二甲基甲酰胺, 在室温下剧烈搅拌, 使酵母 β -1, 3-D-葡聚糖充分悬浮于二甲基甲酰胺中。然后逐渐加入氯磺酸浓度在 5%~25% 的酯化剂 15mL, 在 40~80℃ 下搅拌反应 2~4h, 反应结束后立即倒入 100mL 的冰水中, 用 10% 氢氧化钠中和至 pH7.2。加入 3~5 倍体积的无水乙醇, 静置, 离心, 将沉淀用自来水透析 48h, 蒸馏水透析 24h。透析液经冷冻干燥得到白色的酵母 β -1, 3-D-葡聚糖硫酸酯。

收稿日期: 2008-10-30

作者简介: 黄国宏 (1972-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向: 食品加工与保藏及生物活性物质的提取。

1.2.3 酯化剂的制备 参照文献[3]的方法,稍加改进。取 100mL 二甲基甲酰胺放入附有冷凝管、滴液漏斗和搅拌装置的 250mL 三颈圆底烧瓶中,置于冰盐浴冷却到 0℃。然后从滴液漏斗在 30min 内缓慢滴加适量的氯磺酸到二甲基甲酰胺中,分别制备成氯磺酸浓度为 5%、10%、15%、20%、25% 的酯化剂,反应过程始终磁力搅拌且保持在 0℃ 以下,得到的酯化剂为淡黄色的液体,保存于冰箱中供实验使用。

1.2.4 硫酸基含量的测定 参照文献[4]。

1.2.5 酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度的计算

酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯中硫酸基含量通常用取代度(degree of sulfur, DS)来表示。DS 是指酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯上每个葡萄糖残基中含有的硫酸基团的平均个数^[5]。计算公式如下:

$$DS = \frac{1.62 \times S}{32 - 1.02S}$$

式中:S 指硫酸基的质量分数, %。

2 结果与分析

2.1 硫酸酯化条件的单因素实验

2.1.1 酯化过程中酯化剂氯磺酸浓度对取代度的影响 称取 0.3g 酵母 β -1,3-D-葡聚糖 5 份,各加入二甲基甲酰胺 10mL,磁力搅拌使其充分悬浮。分别加入氯磺酸浓度为 5%、10%、15%、20%、25% 的酯化剂 15mL,在 60℃ 下处理 3h,反应结束后立即倒入 100mL 的冰水中,用 10% 氢氧化钠中和至 pH7.2。加入 3 倍体积的无水乙醇,静置,离心,将沉淀用自来水透析 48h,蒸馏水透析 24h。透析液经冷冻干燥即得酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯。以酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度为指标,研究酯化剂氯磺酸浓度对酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度的影响,结果见图 1。

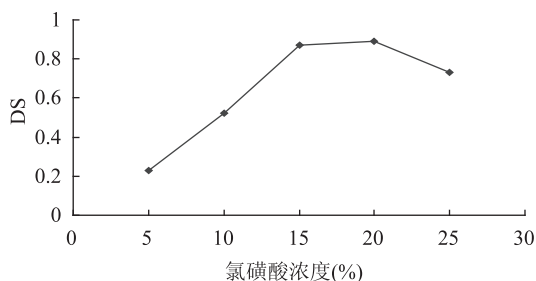


图 1 氯磺酸浓度对硫酸基取代度的影响

图 1 显示,氯磺酸浓度为 5% 时,酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代为 0.23,取代度随酯化剂氯磺酸浓度的增加而增加,氯磺酸浓度为 20% 时取代度达到最大值 0.89,此时成品呈棕褐色。再增加氯磺酸浓度,则会出现酵母 β -1,3-D-葡聚糖明显碳化现象,且取代度下降。其原因可能是因为酯化反应中,氯磺酸过量,形成了大量的硫酸,硫酸将酵母 β -1,3-D-葡聚糖碳化所致,所以酯化剂氯磺酸浓度选用 15% 较佳。

2.1.2 酯化过程中酯化温度对取代度的影响 确定酯化剂中氯磺酸浓度为 15%,其他条件不变的条件下,以酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度为指标,研究酯化温度对酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度的影响,结果见图 2。

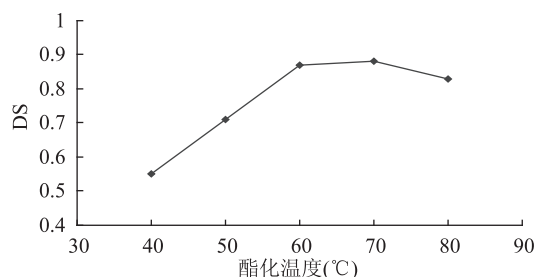


图 2 酯化温度对硫酸基取代度的影响

图 2 显示,酯化温度为 40℃ 时,酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度为 0.55,随着温度的升高,取代度随之增加,到 70℃ 时达到最大值 0.88,但此时成品呈淡棕色。在 80℃ 则出现了碳化现象,且取代度下降,所以酯化温度选用 60℃ 为宜。

2.1.3 酯化过程中酯化时间对取代度的影响 确定酯化剂中氯磺酸浓度为 15%、酯化温度为 60℃,其他条件不变的条件下,以酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度为指标,研究酯化时间对酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度的影响,结果见图 3。

图 3 显示,酯化时间为 2h 时,酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度为 0.58,随着时间的增加,取代度也增大,到 3.5h 时达到最大值 0.88,在 3.5h 后,取代度降低,故酯化时间选用 3h 为宜。

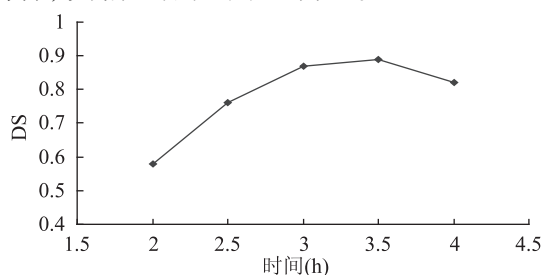


图 3 酯化时间对硫酸基取代度的影响

2.2 硫酸酯化条件的正交实验

在以上单因素实验的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验,选定酵母 β -1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度为考察指标,来进一步优化硫酸酯化条件。硫酸酯化 $L_9(3^4)$ 正交实验的因素水平表、结果及其极差分析表和方差分析表分别见表 1~表 3。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表

水平	因素		
	A 氯磺酸浓度 (%)	B 温度 (°C)	C 时间 (h)
1	10	70	2.5
2	15	60	3.0
3	20	50	3.5

从表 2 可以看出,影响取代度的各因素的主次顺序为 $A > B > C$,即氯磺酸浓度 > 温度 > 时间。各因素的最优水平 $A_2B_2C_2$ 。利用方差来进一步分析各因素影响指标的权重。从表 3 结果可知,因素 A、B、C 的 F 值分别为 7.397、1.293、0.259,只有 $F_A > F_{0.05}(2,6) = 5.14$,显著影响指标。

从表 2 可以看到,实验号 4 和 5 制备的硫酸酯取代度均为 0.89,但实验号 4 制备的硫酸酯呈棕色,有轻微碳化现象,而实验号 5 制备的硫酸酯取代度只

略有上升,但时间却大大延长,从经济上考虑不合适。综合硫酸酯化结果的极差分析和方差分析,优选出实验方案为 A₂B₂C₂,通过进一步的验证实验,在此酯化条件下,得到的酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯取代度为 0.88,所以硫酸酯化的最佳条件为:氯磺酸浓度为 15%,温度 60℃,时间 3h。

表2 L₉(3⁴)正交实验结果

实验号	A	B	C	D(空白)	DS
1	1	1	1	1	0.56
2	1	2	2	2	0.52
3	1	3	3	3	0.46
4	2	1	2	3	0.89
5	2	2	3	1	0.89
6	2	3	1	2	0.63
7	3	1	3	2	0.68
8	3	2	1	3	0.81
9	3	3	2	1	0.76
k ₁	0.513	0.710	0.667	0.737	
k ₂	0.803	0.740	0.723	0.610	
k ₃	0.750	0.617	0.677	0.720	
R	0.290	0.123	0.056	0.127	

表3 正交实验的方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.431	2	7.397	*
B	0.025	2	1.293	
C	0.005	2	0.259	
误差	0.06	6		

注:“*”表示显著影响, F_{0.05}(2,6) = 5.14。

2.3 酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯的理化性质

2.3.1 感官性质 冷冻干燥后的酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯(DS = 0.88)外观呈白色透明的片状,无味无臭。

2.3.2 酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯的红外光谱分析 为了验证酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯的硫酸酯化程度,本实验用取代度为 0.88 的酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯为样品,测定其在 4000~500cm⁻¹范围的红外光谱吸收情况,结果见图 4。

图 4 显示,与酵母 β-1,3-D-葡聚糖的红外图谱对照,酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯的红外图谱在 895cm⁻¹处的特征峰证明了其糖苷键为 β 构型,在 1373、1163、1077cm⁻¹的特征峰说明成品是具有 β-1,

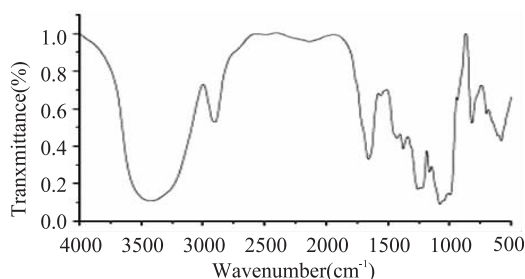


图4 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯样品的红外光谱图

3 键的葡聚糖,说明硫酸化没有破坏酵母 β-1,3-D-葡聚糖主链的结构。红外图谱显示在 1258、819cm⁻¹ 有特征吸收峰,它们分别对应 S = O 拉伸和 C-O-S 振动,是已糖硫酸酯的特征吸收峰。

3 结论

本实验以酵母 β-1,3-D-葡聚糖为原料,通过单因素实验和正交实验,确定了制备高取代度的酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯的最佳工艺条件为:0.3g 酵母 β-1,3-D-葡聚糖分散于 10mL 二甲基甲酰胺中,磁力搅拌使其充分悬浮,加入氯磺酸浓度为 15% 的酯化剂 15mL,在 60℃ 水浴下反应 3h,反应完毕后进一步纯化,即可制备出取代度为 0.88 的酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯。DS 为 0.88 的酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯的红外光谱表明,酵母 β-1,3-D-葡聚糖分子中已经成功引入了硫酸基基团,实验制备的样品为酵母 β-1,3-D-葡聚糖硫酸酯。

参考文献

[1] 何智健,陈建伟,李祥. 多糖的硫酸酯化研究探要[J]. 中医药学刊,2003,21(12):2087~2088.
 [2] 黄国宏,李科德,曾庆孝. 酵母葡聚糖的制备及其理化性质的研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(8):108~112.
 [3] Cirelli A F, Covian J A. Effect of sulfation on the biological activity of β-(1→3)-glucans from the tree fungus cyttaria harioti Fisher[J]. Carbohydrate Research, 1989, 190:329~337.
 [4] 丛建波,王长振,等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量的测定-硫酸钡比浊法研究[J]. 解放军药学学报,2003,19(3):181~182.
 [5] 杨铁虹,贾敏,商澎,等. 当归多糖硫酸酯的合成及其对脾细胞增殖的作用.[J]. 第四军医大学学报,2001,22(5):432~434.

提取率为 92.73%。

参考文献

[1] 朱婕淑,郑继明. 漏芦及其混淆品的简要鉴别[J]. 传统医药,2007,16(4):61.
 [2] 汪毅,李铤,张鹏. 禹州漏芦化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中草药,2005,36(2):146.
 [3] 吕华冲,王素贤,朱廷儒. 禹州漏芦的化学成分研究[J]. 中草药,1989,20(11):2.
 [4] 果德安,高从元,楼之岑. 华东蓝刺头化学成分研究(II)[J]. 中草药,1992,23(10):512.
 [5] 斯黎明. 超临界流体技术及其在中药生产中的应用[J]. 医药工程设计杂志,2004,25(5):11.

(上接第 260 页)

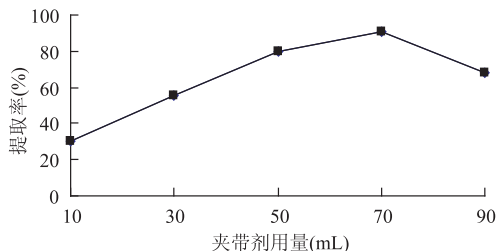


图5 夹带剂用量对 α-三联噻吩提取率的影响

3 结论

经过 3 次重复实验得出,在萃取釜压力为 25MPa,萃取温度为 45℃,萃取时间为 90min,夹带剂用量为 70mL 的条件下,禹州漏芦中 α-三联噻吩的