

硫酸化酵母葡聚糖体外和体内对大肠杆菌抑制作用的比较

牛宏彦 杜丽平 张学况 肖冬光

(工业微生物教育部重点实验室,天津科技大学生物工程学院,天津市工业微生物重点实验室,天津 300457)

摘要: 以酵母碱不溶性葡聚糖为原料,硫酸为酯化剂,在尿素-二甲基亚砷溶液中进行硫酸酯化反应得到易溶于水的白色硫酸化葡聚糖。利用得到的硫酸化葡聚糖进行体外和体内抑制大肠杆菌效果研究。体外抑菌实验结果表明,硫酸化葡聚糖在体外对大肠杆菌的生长没有抑制作用。小鼠活体实验显示,硫酸化葡聚糖能显著提高大肠杆菌致腹膜炎的小鼠的成活率。

关键词: 酵母葡聚糖; 硫酸化; 硫酸化葡聚糖; 抑菌; 大肠杆菌

中图分类号:Q53;Q81

文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2010)03-0037-03

Comparison of the Inhibition Effects of Sulfated Glucan on *E.coli* in Vitro & in Vivo

NIU Hong-yan, DU Li-ping, ZHUANG Xue-kuang and XIAO Dong-guang

(Industrial Microbe Key Lab of Ministry of Education, Bioengineering College of Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Alkali-insoluble β -glucan was used as raw materials to produce water-soluble white sulfated glucan by sulfuric esterification in urea-DMSO solution with sulfuric acid as esterifying agent. Then the inhibition effects of the produced sulfated glucan on *E.coli* in vitro and in vivo were studied. Its bacteriostasis in vitro showed that it could not inhibit the growth of *E.coli* in vitro. In vivo experiments in mice suggested that sulfated glucan could significantly enhance the survival rate of mice with peritonitis induced by *E.coli*.

Key words: β -glucan; sulfated; sulfated dextran; bacteriostasis; *E.coli*

酵母碱不溶性葡聚糖是一种以 β -1,3为主链并伴有间或的 β -1,6侧链的天然高分子聚合物,具有多种免疫刺激活性,能够通过刺激免疫系统对生物反应进行修饰,保护机体免受异物的感染,增强机体的免疫能力,抑制肿瘤,抗氧化和促进伤口愈合等作用^[1-3],是一种重要的生物效应应答剂(biological response modifiers, BRM)。但由于酵母碱不溶性葡聚糖难溶于水,其应用受到了很大限制。因此增加其水溶性是一个急需解决的问题,增溶的主要方法有酸解、酶解、超声波、热变性和化学修饰。其中化学修饰法是比较常用的一种方法,而硫酸化是葡聚糖化学修饰的一个重点。修饰后的硫酸化葡聚糖同样具有免疫增强活性,且其水溶性明显优于葡聚糖,能够扩展葡聚糖作为免疫活性增强剂的应用范围,开发前景十分广阔。

本文以酵母碱不溶性葡聚糖为原料,硫酸为酯化剂,在尿素-二甲基亚砷溶液中进行硫酸酯化反应得到易溶

于水的白色硫酸化葡聚糖。并对其在体外和体内对大肠杆菌的抑制作用进行了研究和比较。

1 材料与方法

1.1 碱不溶性酵母葡聚糖制备^[4]

称取干燥的酵母细胞壁粗提物 100 g,加入 3% 的氢氧化钠溶液 600 mL,搅拌均匀,将混合物置于 75 °C 水浴中加热 3 h,冷却至室温,4000 r/min 离心 10 min,沉淀物水洗两遍。水洗过的沉淀物,加入 3% 的氢氧化钠溶液 400 mL,混合均匀后置于 100 °C 条件下处理 2 h,冷却至室温,4000 r/min 离心 10 min,重复水洗 2 次。沉淀用丙酮处理,4000 r/min 离心 10 min,重复用丙酮洗涤 2 次,置于 40 °C 干燥,得到酵母不溶性葡聚糖。

1.2 供试菌种和动物

大肠杆菌(*E.Coli*),由天津科技大学菌种保藏中心提供。ICR/HSD 小鼠,约重 18 g,购自中国人民解放军军事

收稿日期:2009-12-09

作者简介:牛宏彦(1983-),男,山东人,硕士研究生,研究方向:分离纯化。

作者简介:肖冬光(1956-),教授,博士生导师,xdg@tust.edu.cn。

医学院实验动物中心。

酵母细胞壁粗提物,由安琪酵母股份有限公司提供。

1.3 培养基

细菌培养基:牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 15 g、琼脂 20 g、水 1 L、pH7.2~7.4,121℃灭菌 20 min。

1.4 主要试剂及设备

氢氧化钠、丙酮、浓硫酸、二甲基亚砷均为分析纯。

油浴恒温振荡器,PL 403 电子天平,DL-5000B 大容量离心机,80 mm-G6 过滤漏斗,透析袋,D-37520 真空冷冻干燥机(德国 Martin Christ),722-S 型可见分光光度计,WQF-510 傅立叶变换红外光谱仪。

1.5 硫酸化葡聚糖的制备^[5]

准确称取酵母 β -D-葡聚糖 2.0 g 溶于含 36 g 尿素的 50 mL 二甲基亚砷中,搅拌溶解,边搅拌边缓慢滴加 50 mL 含 5 mL 浓硫酸的二甲基亚砷混合液。然后,置于 100℃ 的油浴恒温振荡器中,在 100 r/min 的转速下进行酯化反应。反应 4 h 后,将反应液快速冷至室温,并加去离子水至 2 L。稀释后的溶液 5000 r/min 离心 10 min,得上清液用 G6 的沙芯漏斗(1.2~2 μ m)过滤以除去未反应的酵母葡聚糖微粒。过滤后的溶液装入透析袋用超纯水透析,共透析 5 d,每天换水 1 次。最后将透析所得液体浓缩至 200 mL,冷冻干燥得硫酸化酵母葡聚糖。

1.6 硫酸化葡聚糖的红外光谱测定

采用溴化钾压片法,用 WQF-510 傅立叶变换红外光谱仪测定。

1.7 体外抑菌实验方法^[6-9]

1.7.1 供试菌株的活化和菌悬液的制备

将供试菌种大肠杆菌接入细菌试管斜面培养基上。置 37℃ 恒温培养箱内培养 24 h。挑取 1 环活化好的大肠杆菌放入 9 mL 无菌生理盐水中,振荡摇匀,制成一系列菌悬液,浓度为 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL,备用。

1.7.2 体外抗菌实验

用无菌水把硫酸化葡聚糖配成 150 mg/mL 的水溶液,再用二倍稀释法得到 75 mg/mL、35.5 mg/mL、17.75 mg/mL、8.875 mg/mL 4 个系列浓度的稀释液,用无菌水作阴性对照,同系列浓度的链霉素作阳性对照。在超净工作台上,分别吸取 1×10^8 cfu/mL 0.1 mL 加入到冷却的培养基平板中,均匀涂布,再向平皿中等距离放入 3 个牛津杯,分别加入无菌水、硫酸化葡聚糖溶液和链霉素,每个菌种做 3 组平行实验。将涂有菌液的平皿置恒温培养箱培养,在 37℃ 恒温培养箱内培养 24 h,观察并测量抑菌圈的大小。

1.8 小鼠活体抑菌实验^[11]

1.8.1 OD 与菌数标准曲线的回归方程

将供试菌种大肠杆菌接入细菌试管斜面培养基上。

置 37℃ 恒温培养箱内培养 24 h。挑取 1 环活化好的大肠杆菌放入 50 mL 无菌细菌液体培养基中,37℃,50 r/min 水浴摇床培养 18 h,取 10 mL 大肠杆菌培养液离心洗涤,所得菌体用生理盐水稀释成 OD 值在 0.9~1 之间的菌液,将此液分别做 1:1、1:1.2、1:1.4、1:1.6、1:1.8、1:2 6 个稀释度稀释,分别测定其 OD 值。与此同时将 6 个稀释度的菌液进行准确的细菌平板计数。记录 OD 值和相应的计数结果。计算出 OD-细菌数曲线的回归方程: $y=1.531x+0.0276$,相关系数 $r=0.9995$ 。

1.8.2 抗菌实验

将 20 只 SCI 小鼠分成 2 组,每组 10 只,用药组以 250 mg/kg 的剂量腹腔注射 0.5 mL 硫酸化葡聚糖水溶液,对照组小鼠注射同等剂量的葡萄糖溶液。24 h 后对各小鼠腹腔注射 1 mL 的菌浓度为 1×10^8 个/mL 的大肠杆菌菌液,此菌液依 1.8.1 中的方法得到。从菌液注射完毕开始计时,此后的 30 h 内分别记录各组小鼠的存活情况。

2 结果与分析

2.1 硫酸化葡聚糖红外光谱的测定

图 1 是葡聚糖及其衍生物的红外光谱图。由图 1 可以看出,与葡聚糖相比,硫酸化葡聚糖的红外图谱在 1235.7 cm^{-1} 处出现较强的不对称 S=O 伸缩振动吸收峰。在 815.2 cm^{-1} 处,出现与 C-O-SO₃ 基团相关的对称性 C-O-S 吸收峰。这两个特征性吸收峰表明硫酸基已与葡聚糖连接。

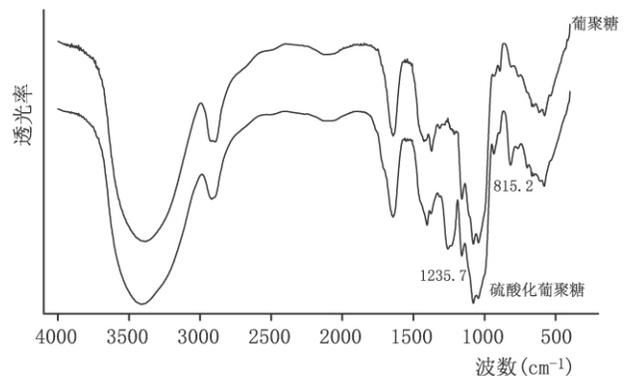


图 1 葡聚糖硫酸化的红外光谱图

2.2 硫酸化葡聚糖的抑菌效果

硫酸化葡聚糖的抑菌效果见表 1。由表 1 可以看出,硫酸化酵母葡聚糖对大肠杆菌没有抑制作用。

2.3 硫酸化葡聚糖的小鼠活体抑菌实验

对 SCR 小鼠腹腔注射 250 mg/kg 剂量的硫酸化葡聚糖,24 h 以后再对小鼠注射菌浓度为 1×10^8 个/mL 的大肠杆菌菌悬液,结果见图 2。

由图 2 可以看出,硫酸化葡聚糖对小鼠有着明显的免疫预防作用,注射葡萄糖的对照组小鼠的成活率只有

表1 样品的抑菌效果

项目	样品浓度 (mg/mL)			
	8.875	17.75	35.5	75
硫酸化葡聚糖	—	—	—	—
链霉素	+	++	+++	++++
无菌水	—	—	—	—

注：“+”个数越多表示抑菌圈越大；“-”表示无明显抑菌圈。

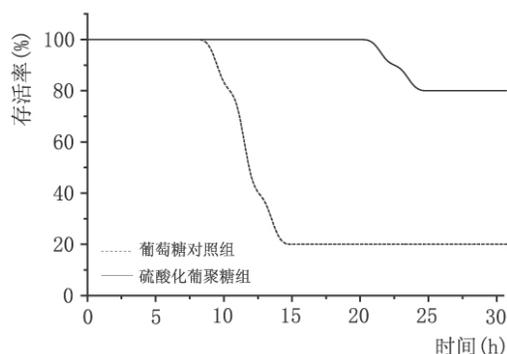


图2 硫酸化葡聚糖小鼠活体抗大肠杆菌实验结果

20%, 而注射了硫酸化葡聚糖的用药组小鼠的成活率达到80%, 明显高于对照组小鼠。

3 结论

在助溶剂尿素的协助下, 把酵母葡聚糖溶于二甲基亚砜(DMSO)中, 以二甲基亚砜硫酸混合液为硫酸化试剂, 对酵母碱不溶性葡聚糖进行硫酸化修饰, 得到白色硫酸化葡聚糖易溶于水。通过体外抑菌实验和小鼠活体抑菌实验对所得葡聚糖的生物活性进行检测。结果表明, 硫酸化葡聚糖在体外对大肠杆菌无抑制作用, 但是用硫酸化葡聚糖对小鼠进行腹腔注射能显著提高小鼠的免疫防疫能力, 减小大肠杆菌致腹膜炎小鼠的死亡率。硫酸化葡聚糖不能直接抑制大肠杆菌的生长, 但是可以通过激活机体的免疫系统来抵制大肠杆菌的感染。体内和体外抗

(上接第36页)

造环境的可能性最大, 因此同一酒厂内的酵母菌群组成相对较为稳定, 不同产地甚至不同酒厂的白酒酿造酵母则可能存在较大差异。

因此, 要进一步探明多粮浓香型白酒糟醅中酵母菌的种属分布及菌群变化的规律, 还需深入研究, 如发酵不同阶段酵母的区系变化, 不同酵母菌株代谢产物对白酒化学成分、感官特性的影响等。对分离得到的某些具有特殊应用价值的酵母菌, 还可开展提高出酒率、改善白酒风味等方面的应用研究, 甚至还可筛选到用于发酵木糖生产酒精, 单细胞蛋白生产等多个领域的酵母菌株。

参考文献:

[1] 陈敏. 浓香型酒发酵过程中糟醅微生物动态研究[J]. 酿酒科技, 1998, 89(5): 26-28.

菌实验的比较进一步表明硫酸化葡聚糖是一种生物反应效应剂, 其活性机制是通过激活机体的免疫系统来表现其生物活性。

参考文献:

- [1] Ohno, N, Miura, T, Miura, N, N, Adachi, Y, Yadomae, T. Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan[J]. Carbohydrate Polymers. 2001, vol. 44: 339-349.
- [2] Ozcan Erel. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions[J]. Clinical Biochemistry. 2004, 37: 112-119.
- [3] David L. Williams, Henry A, et al. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Immunopharmacology, 1991, vol. 22: 139-156.
- [4] 廖鲜艳, 顾国贤, 李崎, 李永仙. 啤酒废酵母残渣制备碱性不溶性葡聚糖[J]. 酿酒, 2001, 28(1): 75-77.
- [5] David L. Williams, Henry A. Pretus, Rose B. McNamee, et al. Development of a water-soluble, sulfated (1→3)-β-D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Carbohydrate Research, 1992, 235: 247-257.
- [6] 杜丽平, 肖冬光, 祁业明. 水溶性酵母葡聚糖抑菌活性研究[J]. 酿酒科技, 2008, (6): 28-30.
- [7] 杜连祥, 等. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992.
- [8] 张庭廷, 潘继红, 聂刘旺, 等. 金樱子多糖的抑菌和抗炎作用研究[J]. 生物学杂志, 2005, 22(2): 41-42.
- [9] 王忠民, 王跃进, 周鹏. 葡萄糖多糖抑菌特性的研究[J]. 食品发酵与工业, 2005, 31(1): 77-79.
- [10] David L. Williams, Henry A. Pretus, Rose B. McNamee, et al. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Immunopharmacology, 1991, 22: 139-156.

- [2] 赵东, 乔宗伟, 彭志云. 浓香型白酒发酵过程中酒醅微生物区系及其生态因子演变研究[J]. 酿酒科技, 2007, 157(7): 37-39.
- [3] 张文学, 乔宗伟, 胡承, 等. 浓香型白酒糟醅中真菌菌群的多样性分析[J]. 四川大学学报(工程科学版), 2006(9): 98-101.
- [4] 吴飞, 陈红英, 胡承, 等. 浓香型白酒糟醅中可培养酵母 18S rDNA1 全序列的系统学分析[J]. 酿酒科技, 2006, (4): 23-25.
- [5] 庄名扬, 孙远孟, 胡森, 等. Hs-1、Hs-4 在全兴系列浓香型白酒生产中应用[J]. 酿酒科技, 1993, (5): 40.
- [6] 王治国, 夏明星, 管清先, 等. 应用产酯酵母提高浓香型白酒质量的研究[J]. 酿酒科技, 1994, (4): 13-15.
- [7] J.A. 巴尼特, R.W. 佩恩, D. 亚罗. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [8] 张文学, 岳元媛, 向文良, 等. 浓香型白酒酒醅中化学物质的变化及其规律性[J]. 四川大学学报(工程科学版), 2005, (7): 44-48.