



同反应活性。

假设黄豆苷原的各种反应活性为 100, 每种异黄酮左线为抗氧化性。中线为抗溶血性, 右线为清除自由基能力。

4.1 异黄酮类化合物中具有各种不同取代情况的酚羟基, 分子中心的  $\alpha$ 、 $\beta$  不饱和吡喃酮使异黄酮类化合物表现出一定的抗氧化活性。从上面的研究结果我们提出了异黄酮化合物有效酚羟基的概念: 它是指异黄酮在清除活性氧和抑制猪油过氧化过程中起到稳定自由基中间体和金属络合作用的那类羟基。异黄酮体中的有效酚羟基应当指 5-羟基、7-羟基, 其中 5-羟基抑制猪油过氧化是第一位的; 而清除自由基 7-羟基则成为第一位的。

4.2 所有糖苷比其相应的异黄酮配基活性降低。除了钝化 7-羟基的原因外, 糖苷化后结构的改变也是重要的影响因素, 这在抗溶血作用中表现突出。此结果与医学实践相吻合: 许多医学家和流行病学家研究证实<sup>[3]</sup>, 日本的豆豉、印度尼西亚的纳豆是造成该地区各种癌症、心血管疾病、妇女疾病发病率低的主要原因

之一。这些发酵大豆食品中的异黄酮糖苷均已降解为游离的异黄酮。另外, 对异黄酮化合物的吸收代谢研究表明: 异黄酮先经消化系统降解为游离态, 然后才被吸收进入循环系统发挥作用的。

4.3 本文通过体外模拟生物反应, 研究了异黄酮类化合物在不同反应体系中的作用; 当然, 理论研究的目的是应用于实践, 异黄酮在人体中的各种生物活性包括抗氧化、抗溶血和清除自由基需要进一步的临床医学实践证实。

#### 参考文献

- 1 江文德. 简介大豆中的异黄酮. 食品工业, 1999, 30 (9): 6~11.
- 2 赵云峰. 植物雌激素的研究进展. 食品科学, 1999, 7: 6~10.
- 3 王春娥. 大豆异黄酮的成分、含量和特性. 食品科学, 1998, 19 (40): 39~44.
- 4 胡春. 黄桐化合物的抗氧化作用研究. 食品与发酵工业, 1996, 3: 46~50.
- 5 Agostinno Molteni. In Vitro hormonal effects of soybean isoflavones. Journal of nutrition, 1995, 751~755.
- 6 Michael Naim. Soybean isoflavones. Characterization, Determination and antifungal activity. J. Agr. Food Chem, 1974, 22(5).
- 7 Mario Foti. Flavonoids, Coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. J. Agric. Food Chem, 1996, 44(20): 501.
- 8 Dan E. Pratt. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. Journal of food science, 1979, 44: 1720~1722.
- 9 Dan E. Pratt. Water soluble antioxidant activity in soybeans. Journal of food science, 1972, 37: 322.
- 10 P. A. Murphy. Phytoestrogen content of processed soybean products. Food technology, 1982, 60.

## 木耳多糖的提取与抗活性氧的研究

李雪华 龙盛京 广西医科大学化学教研室 南宁 530021

**摘要** 目的: 从木耳提取木耳多糖 (AAPS), 分析木耳多糖对各类活性氧的清除能力。建立了热水提取-乙醇沉淀-氯仿、正丁醇去蛋白提取工艺。并采用化学发光分析法测定 AAPS 对活性氧 ( $H_2O_2$ 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ )、 $O_2^{\cdot-}$  (超氧阴离子自由基)、 $\cdot OH$  (羟自由基) 以及  $H_2O_2$  的清除作用。木耳多糖的得率为 0.748%, 总糖含量为 74.67%。清除  $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、白细胞呼吸爆发中产生的氧自由基活性的 AOV 值分别为 105.324、34930.795、606.5、-0.859。结论: AAPS 具有清除氧自由基的作用, 其活性大小与多糖的用量正相关。在全血生理环境下, 对全血化学发光中活性氧的清除能力最强。提示木耳多糖最好的作用效果在全血生理环境状态下。

**关键词** 木耳多糖 活性氧 化学发光分析 分离 提取

**Abstract** To isolate and extract an edible fungus (*Auricularia auricula-judae*) polysaccharide (AAPS) and analyse its effect on cleaning all kinds of oxygen radicals, a technique of hot water extract, ethanol sedimentation, chloroform and butanol deproteinization was preformed. Sugar content

was also determined. With the help of chemiluminescent analysis, AAPS was separately determined for cleaning up oxygen free radicals of  $H_2O_2$ ,  $O^{\cdot-}_2$ ,  $\cdot OH$ . The extraction rate of AAPS was 0.748%. Total sugar content was 74.67%. AOV was determined respectively as 105.324 for  $\cdot OH$  34930.795 for  $O^{\cdot-}_2$ , 606.5 for  $H_2O_2$ , and 0.859 for oxygen free radicals from phagocytic of leucocyte in whole blood Chemiluminescence. The test showed that AAPS could weed out oxygen radical, and its effect increased with increasing amount of sugar. AAPS had the strongest ability in clearing up oxygen free radicals from chemiluminescence in whole blood under the circumstance of whole blood physiology.

Key words An edible fungus Polysaccharide Oxygen free radical Chemiluminescent Isolation Extract

人体在正常生理作用下产生的超氧阴离子自由基  $O^{\cdot-}_2$  会被超氧化物歧化酶 SOD 作用生成  $H_2O_2$ , 而  $H_2O_2$  可迅速被细胞内的过氧化酶除去, 当这些酶不足时或者  $O^{\cdot-}_2$  过多, 而无法及时除去时,  $H_2O_2$  可与另一  $O^{\cdot-}_2$  在变价铁离子催化下, 迅速生成氧化性更强的氢氧自由基  $\cdot OH$ ,  $\cdot OH$  几乎可与细胞内的一切有机化合物反应, 从而破坏核酸、蛋白质、氨基酸脂类化合物, 进而损伤细胞的结构与功能。如果能找到最佳抗氧化剂来清除或阻断这些活性氧的生成, 就不会对机体造成损伤<sup>[1]</sup>。本文通过从木耳中提取木耳多糖, 利用化学发光法体外实验, 研究木耳多糖对各种活性氧的清除作用。为木耳多糖在抗衰老抗氧化作用方面提供科学依据。

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 材料: 广西百色木耳

1.2 试剂: 鲁米诺为法国 Merch-Schuchrat 公司的产品; 酵母多糖为 Sigma 公司的产品; 酵母浸膏为生化试剂; 双氧水、连苯三酚、碳酸钠、碳酸氢钠、抗坏血酸、硫酸铜、磷酸氢钠、葡萄糖等均为国产分析纯试剂; 所用水均为双蒸水。

1.3 仪器: DG3030 发光光度计 (南京华东电子管厂生产)

## 2 实验方法

2.1 木耳多糖的提取: 取 200g 木耳洗净、泡胀, 匀浆机捣细, 于 2L 蒸馏水中慢火中沸 4h, 过滤, 滤渣用同法水提 4 次, 合并水提液。减压浓缩。加 4 倍于滤渣体积的 95% 乙醇, 静置过夜。分出沉淀物溶于 200ml 蒸馏水中, 并于流动水中用玻璃纸透析 4d 除去小分子杂质。透析液减压浓缩, 再醇沉。水溶, 醇沉, 直至沉淀物中木耳色素提取完为止。将沉淀物用相对于沉淀物体积的 1/5 体积氯仿与 1/25 体积正丁醇去除蛋白 5 次。将去蛋白后的粗多糖液再次醇沉, 将沉淀溶于蒸馏水中, 再于蒸馏水中透析 5d。减压浓缩。再次醇沉, 得灰白色沉淀的木耳多糖 (AAPS), 经硫酸-苯酚颜色反应为棕红色, 与硫酸-萘酚试剂反应呈深绿色证明

所提取物质为多糖。

以下抗活性氧活性测定均以此粗多糖 AAPS 作供试品。

### 2.2 分析

2.2.1 总糖含量测定 采用硫酸-苯酚法<sup>[2]</sup>。

2.2.2 0.5%AAPS 对碱性连苯三酚体系 (非酶体系) 产生的  $O^{\cdot-}_2$  的清除作用的测定方法参照文献<sup>[3]</sup>, 在测定管中依次加入 pH=10.16, 0.1L  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  配制的 5mmol/L 鲁米诺 800  $\mu$ l, 加入不同体积的 0.5% 的木耳多糖, 混匀后置于仪器测定室中, 于 30℃ 加入 6mmol/L 连苯三酚 (用 10mmol/L HCl 配制) 100  $\mu$ l, 启动反应, 测 5s 内发光强度平均值。每个样品取三种不同体积, 每种体积平均测定 3 次, 取平均值; 以双蒸水作空白对照; 按下式计算清除率:

清除率 (%) = (空白对照值 - 样品值) / 空白对照值  $\times$  100% (1)

结果以清除率为 50% 时, 所需样品的量  $CI_{50}$  表示。

2.2.3 0.5%AAPS 清除  $H_2O_2$  的测定方法对照文献<sup>[4]</sup>略加改进。依次在测定管中加入 pH=10.77 的  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  缓冲液 500  $\mu$ l, 加入 10mmol/L  $H_2O_2$  100  $\mu$ l, 加入不同  $\mu$ l 数的 0.5%AAPS 供试液 (空白不加), 混匀后置于发光仪中于 30℃ 加入 5mmol/L 鲁米诺与 10mmol/L CTMAB (溴代十六烷基三甲胺) 1:1 的混合液 500  $\mu$ l。启动反应, 延时 15s, 测定 10s 内发光强度的平均值。每个样品平行做三次, 取平均值, 按下式计算相对发光抑制率:

发光抑制率 % = (空白对照值 - 样品值) / 空白对照值  $\times$  100% (2)

结果以清除率为 50% 时, 所需样品的量  $CI_{50}$  表示。

2.2.4 0.5%AAPS 清除羟氧自由基  $\cdot OH$  的测定方法参照文献<sup>[5]</sup>略加改进。1.8mmol/L VC 用 500mmol/L 磷酸钠缓冲液配制, 其余试剂改用双蒸水配制。使用时所有试剂, 供试液均于 37℃ 恒温水浴箱中保温。在测定管中加入 1.8mmol/L VC 0.2ml, 加 1.8mmol/L  $CnSO_4$  0.4ml, 加 500mg/ml 酵母 0.2ml, 加 0.2mol/L pH=6.2 磷酸钠缓冲液 0.6ml。启动反应, 测定 10s 内发光强度的总值。每样品平行测定三次, 取平均值, 按 (1) 式计算清除率。结果以清除率为 50% 时, 所需样品的量

$Cl_{50}$  表示。

2.2.5 0.5%AAPS对全血化学发光强度的影响的测定方法参考文献<sup>[6]</sup>的方法略加改进。选用Wistar大鼠,后腿注射0.15ml甲醛液,使之致炎。12h后,双腿水肿,眼球取血5.4ml,抗凝血以1:8的比例用Hanks液稀释,得43ml应用液,摇匀放入冰箱内静置1h。在测定管中加入Hanks液稀释的血样0.9ml,加50  $\mu$ l鲁米诺(1mmol/L) 37℃恒温水浴10min,加不同量的供试液,恒温37℃ 10min,加5mg/ml酵母多糖100  $\mu$ l后,恒温水浴10min,置发光仪器室测定60s内发光强度积分值。样品平行测定3次,取平均值。按(2)式计算发光抑制率。结果以清除率为50%时,所需样品的量 $Cl_{50}$ 表示。

利用以上几个产生活性氧化系衡量木耳多糖的清除能力的原理是大同小异的。仅只是所产生不同类型活性氧的机制不同而已。 $H_2O_2$ 鲁米诺体系是在弱碱性条件下, $H_2O_2$ 氧化鲁米诺而发光。抗坏血酸 $Cu^{2+}$ - $H_2O_2$ 体系为,抗坏血酸首先还原 $Cu^{2+}$ 为 $Cu^+$ , $Cu^+$ 可以还原 $H_2O_2$ 为羟离子和羟自由基,羟自由基攻击酵母,从酵母壁中获取电子,同时伴随化学发光;在碱性条件下,碱性连苯三酚能迅速自氧化释放出活性氧 $O^{\cdot-}_2$ ,所生成的 $O^{\cdot-}_2$ 能与鲁米诺反应立即发光;全血化学发光是利用吞噬细胞(PC)在吞噬时出现呼吸爆发,而产生多种活性氧,包括 $O^{\cdot-}_2$ 、 $H_2O_2$ 、游离羟基 $\cdot OH$ 、单线态 $^1O_2$ ,这些活性氧与细胞内某些可激发物质发生反应,产生化学发光,以鲁米诺来增强其化学发光。以上几个体系所产生的化学发光的强度与这些活性氧的量成正比。在这些体系中加入供试液,若供试液能清除活性氧,则体系的发光强度下降,这样可用发光抑制率的大小表示供试剂清除活性氧的程度。

### 3 结果

为了更好地进行相关比较,我们以生物体内公认的抗氧化剂VC作为比较标准(抗坏血酸- $Cu^{2+}$ - $H_2O_2$ 体系以硫脲作为比较标准),按下式计算木耳多糖各体系的抗氧化值AOV:

$$AOV = \frac{SL_{测} - SL_{标}}{SL_{标}}$$

$$\text{其中 } SL_{测} = \text{测定原液 } Cl_{50} \times \text{固体 } Cl_{50}$$

$$SL_{标} = \text{标准原液 } Cl_{50} \times \text{标准固体 } Cl_{50}$$

规定VC(或硫脲)的AOV值为零。当AOV<0时,说明样品抑制能力大于标准品VC(或硫脲),反之亦然,与标准品相比,正值越大,抑制能力就越小。

3.1 清除 $O^{\cdot-}_2$ : 碱性连苯三酚自氧化体系的发光强度

与样品量成负相关,其 $Cl_{50}$ 为2.852mg, AOV为34930.8。清除 $O^{\cdot-}_2$ 活性的结果表明,加入0.5%AAPS 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, 清除率分别为22.956%, 44.799%, 75.702%, 随着糖量的增加其清除率上升。阳性对照: 加入0.5%VC 1  $\mu$ l、3  $\mu$ l、5  $\mu$ l, 清除率分别为14.83%, 51.39%, 81.18%,  $Cl_{50}$ 为0.0153mg。

3.2 清除 $\cdot OH$ : 抗坏血酸- $Cu^{2+}$ - $H_2O_2$ 体系发光强度与样品量成负相关,其 $Cl_{50}$ 为4.723mg, AOV为105.324。加入0.5%AAPS 500  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, 1500  $\mu$ l, 抑制率分别为31.013%, 51.316%, 74.97%, 抑制率与AAPS量呈正相关。阳性对照: 加入0.5%硫脲10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 其抑制率分别为7.324%, 28.254%, 54.389%,  $Cl_{50}$ 为0.458。

3.3 清除 $H_2O_2$ :  $H_2O_2$ 鲁米诺发光体系发光强度与样品量成负相关,其 $Cl_{50}$ 为0.2608mg, AOV为605.5。加入0.5%AAPS 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 其抑制率分别为10.096%, 48.593%, 66.028%, 随着AAPS量的增加抑制率逐渐上升。阳性对照: 加入0.5%VC 1  $\mu$ l, 3  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 清除率分别为14.245%, 62.236%, 94.074%,  $Cl_{50}$ 为0.0107mg。

3.4 清除全血化学发光中白细胞呼吸爆发产生的 $O^{\cdot-}_2$ 、 $\cdot OH$ 、 $H_2O_2$ : 全血化学发光体系发光强度与样品量成负相关,其 $Cl_{50}$ 为0.071mg, AOV为-0.859。加入0.5%AAPS 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 其抑制率分别为44.324%, 69.89%, 77.49%, 随着AAPS量的增加其抑制率逐渐上升。阳性对照: 加入0.5%VC 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l清除率分别为25.74%, 52.33%, 70.25%,  $Cl_{50}$ 为0.190mg。

从以上各体系的AOV值可看出,木耳多糖在全血化学发光体系中,即相当于在生物体的生理环境条件下,对活性氧的清除能力最强,其清除活性氧的能力比维生素C还要强(木耳多糖以VC作阳性对照时的AOV为-0.859);其次为对 $\cdot OH$ 的清除作用较强,对连苯三酚法中 $O^{\cdot-}_2$ 的清除能力最弱。其顺序为: 全血化学发光中( $O^{\cdot-}_2$ 、 $\cdot OH$ 、 $H_2O_2$ ) >  $\cdot OH$  >  $H_2O_2$  >  $O^{\cdot-}_2$  (AOV值分别为: -0.859、105.324、606.5、34930.795)。从标准阳性对照品VC的 $Cl_{50}$ 看,其清除顺序为 $H_2O_2$  >  $O^{\cdot-}_2$  > ( $O^{\cdot-}_2$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ ),其 $Cl_{50}$ 分别为2.14、23.052、7.173。说明VC与木耳多糖的清除能力不同,VC清除 $H_2O_2$ 的能力最强,而清除全血化学发光中活性氧的能力最弱,即其清除氧自由基的前体的能力较强,而木耳多糖清除氧自由基的能力较强。

## 4 讨论

许多糖类除营养作用之外,还具有特殊的药理学特性。其中多糖对肿瘤、肝炎、心血管病、糖代谢、抗衰老等方面所具有的一些独特活性,而且毒性极低,没有直接的细胞毒性。初步研究证明,多糖对网状内皮系统、细胞免疫、体液免疫及DNA、RNA、蛋白质的合成,诱导干扰素和糖代谢等方面均具有一定的作用。

本实验的木耳多糖是用热水提取后得到的多糖,由具有 $\beta$ -1,3-结合直链构成的葡萄糖上以3与1的比率,在6位上具有 $\beta$ 结合葡萄糖侧链,分子量为56万的抗肿瘤性葡聚糖<sup>[7]</sup>。多糖成分为葡萄糖醛酸酯 木糖:甘露糖:葡萄糖(摩尔比为0:1.9:2.9:1.8)<sup>[8]</sup>。从本文结果看,木耳多糖对各种活性氧均具有抗氧化作用,原因是多糖分子上具有还原性的半缩醛羟基,可与氧化剂-活性氧发生氧化还原反应。另外,木耳多糖在全血化学发光中对活性氧的清除能力最强,可能是木耳多糖与机体维系自由基平衡的物质可共同协调发挥作用,充分发挥了木耳多糖的抗氧化能力。因为在机体中,外来多糖作为一种半抗原或完全抗原存在会刺激机体产生免疫反应。提示木耳多糖为人体血液系统中的抗氧化反应的首选物质。其次,木耳多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力也较强,而 $\cdot\text{OH}$ 氧化能力最强,对人体造成的危害最大,因此,可利用木耳多糖来清除体内的 $\cdot$

$\text{OH}$ 。再者,从木耳多糖与VC对活性氧的抗氧化效果(木耳多糖清除全血化学发光中的活性氧最强,而VC反而最弱;VC清除 $\text{O}^{\cdot-}_2$ 最强)可知,同一药物在不同的环境下会有不同的抗氧化效力,在使用时,宜让其处于最佳的反应环境以发挥其最大的抗氧化效力。

## 参考文献

- 1 许士凯主编.抗衰老药理学.中国医药科技出版社.北京:1994,40.
- 2 Dubot M.Gilles KA,Hamilton JK,et al.Colorimetric method for determination of sugars and related substance.Anal Chem,1956,28:350.
- 3 李雪华,龙盛京.三种根茎类食物抗氧自由基的比较研究.食品科学,1998,19(2):13.
- 4 龙盛京,秦爱娟.化学发光分析法研究广西茶叶水提取物抗活性氧的作用.广西医学院学报,1992,9(3):1.
- 5 陈季武,胡天喜.测定 $\cdot\text{OH}$ 产生与清除的化学发光体系.生物化学与生物物理进展,1992,19(2):136.
- 6 徐孝仪,程松高.人全血化学发光技术及其临床应用.中国免疫学杂志,1986,2(1):34.
- 7 生物化学与生物物理学报,1988,20(60):614.
- 8 友田正司.生药中生物活性多糖(6).国外医学中医中药分册,1990,12(3):18.

## 黄原胶生产菌株 *Xanthomonas campestris*-9902 代谢调控的研究

李柏林 胡德亮 陈有容 齐凤兰 上海水产大学食品学院 200090

徐明全 深圳农业科学研究中心 518000

**摘 要** 本研究就*Xanthomonas campestris*-9902菌株的产胶潜能,以及过程代谢调控对黄原胶(Xanthangum)发酵的影响进行了研究。结果表明 在适当改进培养基组成和进一步完善工艺控制的前提下,*X. Campestris*-9902菌株是一支较好的黄原胶工业生产菌种。研究还发现,碳氮比、微量元素、前体物质和表面活性剂等,对黄原胶的后期生物合成,特别是胶粘性大分子的形成,有极其重要的影响。发酵培养基的改变和补料工艺的优化,可明显提高产胶率。

**关键词** 生物合成 发酵 黄原胶 代谢调控

**Abstract** In this paper, the potential productivity and effect on metabolism and regulation during fermentation of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*-9902 were studied. The results showed that *X. Campestris*-9902 was a proficient strain when the medium composition and process were properly improved. Furthermore, the carbon-to-nitrogen ratio, trace elements, precursor and surfactant etc. Played an important role in the later stage of biosynthesis, especially in the formation of viscous polymer. The production could be enhanced evidently if the medium and fed-batch process were optimized.

**Key words** Biosynthesis Fermentation Xanthan gum Metabolism and regulation