

文章编号:1673-1689(2010)02-0294-04

沙棘多糖 HRP Ia 生物活性初探

田晓艳¹, 刘延吉^{*2}, 祝怀宇², 朱显静¹

(1. 辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院, 辽宁 抚顺 113001; 2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 研究了沙棘多糖(*Hippophae rhamnoides* L. polysaccharide, HRP) 保健功能及其抑菌作用。分别对 HRP、HRP I、HRP Ia 进行自由基 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{R}\cdot$ 清除、抑菌效果及最小抑菌浓度的测定。HRP Ia 对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 $\text{R}\cdot$ 清除率最高,清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 $\text{R}\cdot$ 所需最大质量浓度分别为:1 000、400、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; HRP Ia 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、腊状芽孢杆菌等菌种均有一定的抑制作用。

关键词: 沙棘多糖; 多糖; 自由基; 抑菌作用; 生物活性

中图分类号: TS 241

文献标识码: A

Determination of Polysaccharide HRP Ia Biological Activity from *Hippophae rhamnoides* L.

TIAN Xiao-yan¹, LIU Yan-ji^{*2}, ZHU Huai-yu², ZHU Xian-jing¹

(1. Environmental Technology and Biotechnology College, Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology, Fushun 113001, China; 2. Biotechnology College, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: This manuscript was to study the health function and bacteriostasis of HRP from *Hippophae rhamnoides* L. Through determining the scavenging capacity of $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{R}\cdot$, and bacteriostasis and minimal inhibitory concentration by HRP, HRP I and HRP Ia, it has been found proven that HRP Ia exhibit highest scavenging capacity on on $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\text{R}\cdot$. The maximum concentration for cleaning these free radical is 1000, 400, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Furthermore, HRP Ia can also inhibit the growth of *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and so on.

Key words: *Hippophae rhamnoides* L, polysaccharide, free radical, bacteriostasis, biological activity

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L)为胡颓子科 植物,是防风固沙的理想材料。沙棘果实中的活性

收稿日期:2009-05-25

基金项目: 国家 863 计划项目(2004AA247010)

作者简介: 田晓艳(1971 -),女,辽宁沈阳人,农学硕士,讲师,主要从事食品生物技术方面的研究。Email:maggi-etian2002@163.com

*通信作者: 刘延吉(1959 -),男,辽宁大连人,农学博士,副教授,主要从事食品生物技术方面的研究。Email: yanjiliu@yahoo.com.cn

成分已达到 190 多种,油中的活性成分有 106 种,其中脂溶性维生素有 6 种,脂肪酸 22 种,脂类 42 种,黄酮和酚类 36 种。沙棘黄酮具有抗心肌缺氧缺血、抗心率失常、提高耐缺氧能力、降血脂、清胆固醇、抑制血小板聚集、抗溃疡、抗肿瘤、抗炎、抗过敏、抗氧化、抗衰老、抗辐射、抗菌、抗病毒以及增强免疫力等功效。沙棘多糖(HRP)有较强的抗氧化作用,还对引起病毒性心肌炎的病毒具有明显的抑制作用。华东师大黄晓青等采用沙棘果榨汁提油后的果渣及籽渣提取的 2 种沙棘多糖为材料,通过研究沙棘多糖对小鼠实验性高脂血症的影响,观察其降血脂作用,证明沙棘多糖具有降低血清 LDL-C,降低肝脏 TC 和高脂饮食引起的血糖升高,降低 SGO T 活性,保持肝脏功能。目前对多糖生物学功效的研究愈来愈引起国内外药理学家、生物学家和化学家们的兴趣,它已成为当代生物学的热门领域^[1-4]。作者对沙棘多糖进行体外清除自由基活性及其抑菌作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

沙棘多糖:由沈阳农业大学生物科学技术学院实验室自行制备;细菌:大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、腊状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌;真菌:番茄煤霉、棉花红腐、黑曲霉由沈阳农业大学生物科学技术学院微生物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 清除 $\cdot\text{OH}$ 的测定 参考 Fenton 反应体系,体系中加入水杨酸,则产生有色产物,并在波长 510 nm 处有强吸收;若反应体系加入具有清除 $\cdot\text{OH}$ 功能物质,则与水杨酸竞争 $\cdot\text{OH}$,使有色产物生成量减少^[5]。清除率 $E(\%) = [A_0(\text{对照}) - A_{510}(\text{样品})] / A_0(\text{对照}) \times 100\%$ 。

1.2.2 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的测定 邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化,产生超氧阴离子自由基(Superoxide anion free radical, SAFR),此 SAFR 继续加速其自氧化反应。若及时清除 SAFR,就会抑制其自氧化反应速率,借此观察沙棘水溶性多糖对 SAFR 的影响^[6]。

1) 邻苯三酚自氧化产物吸收曲线的制备:对 3 mmol/L 邻苯三酚在 pH 8.2, 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中的自氧化产物进行扫描(扫描范围 280~600 nm),确定测试波长。取 2.8 mL 的 Tris-HCl (pH 8.2)缓冲液,2 mL 蒸馏水,混匀后在 25 °C 水浴中保温 20 min,取出后立即加入在 25 °C 预热过

的 3 mmol/L 邻苯三酚 0.2 mL,空白管为 10 mmol/L HCl,迅速摇匀后倒入比色杯,325 nm 下每隔 30 s 测定吸光度,计算线性范围内每分钟吸光度的增加 ΔA_0 ,即邻苯三酚的自氧化速率。自氧化速率为 $\Delta A_0 / \Delta t = 0.006 / \text{min}$ 。

2) 沙棘多糖清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的测定:按上述方法操作,在加入邻苯三酚前,先加入一定体积的多糖溶液,蒸馏水减少相应体积。清除率 $E(\%) = (\Delta A_0 / \Delta t - \Delta A / \Delta t) / (\Delta A_0 / \Delta t) \times 100\%$ 。 ΔA_0 为邻苯三酚的自氧化反应速率, ΔA 为加入多糖溶液后邻苯三酚的自氧化反应速率。

1.2.3 清除 $\text{R}\cdot$ 的测定 浓乙醇在碱性有氧环境、强紫外线下光解产生 CH_3CHOH_2 , CH_3C 作为自由基引发剂,直接作用于大豆植物油分中的多不饱和脂肪酸形成 $\text{R}\cdot$,经共轭和氧化形成脂过氧自由基($\text{ROO}\cdot$),再分解为丙二醛(MDA),它可以与硫代巴比妥酸(TBA)发生反应,产生红色物质。产生的反应体系含乙醇体积分数 95%、大豆油体积分数 0.01%, 0.1 mol/L FeSO_4 -EDTA, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0)及不同质量浓度的多糖,紫外光照射 60 min。再加 20%三氯醋酸 1 mL,混匀,加 0.67% TBA 1.5 mL,沸水浴 10 min, 532 nm 测定吸光度,清除率 $(E\%) = (A_0 - A_{\text{样品}}) / A_0 \times 100\%$ ^[6]。

1.2.4 抑菌效果的测定 将沙棘粗多糖 HRP 及 HRP Ia 分别配制成质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的饱和多糖溶液备用。将已灭菌的滤纸片置于灭菌的沙棘多糖 HRP 及 HRP Ia 溶液中,浸泡 30 min,无菌生理盐水作对照。制作菌平板,4 次重复。同一培养皿中,生理盐水浸泡 1 片滤纸片作为对照,多糖液浸泡 2~3 片滤纸片。细菌培养 24 h,观察其抑菌效果并测定抑菌圈的直径。真菌培养 48 h,观察其抑菌效果并测定抑菌圈的直径。

1.2.5 最小抑菌浓度(MIC)的测定 将 HRP 及 HRP Ia 配制成质量浓度为 6.25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列溶液。取不同质量浓度的多糖液各 1.0 mL,再取各菌悬液 0.2 mL,倒入 60 °C 左右的固体培养基中充分混匀,冷却凝固后倒置恒温培养,2 次重复,不长菌的最低质量浓度为最小抑制质量浓度。

2 结果与分析

2.1 沙棘多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除

由图 1 可以看出,在 200~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,HRP、HRP I、HRP Ia 对 $\cdot\text{OH}$ 清除率随多糖质量浓度增加而增大,且最大清除率为 HRP Ia

(71.1%) > HRP I(66.9%) > HRP(10.3%),推测 HRP Ia 是清除 ·OH 的主要活性物质。

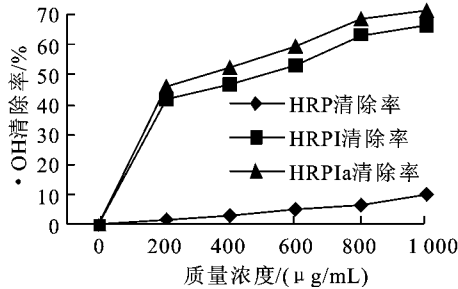


图 1 沙棘多糖对 ·OH 的清除

Fig. 1 Scavenging effect of HRP, HRP I, HRP Ia on ·OH

2.2 清除 O^{·-}₂ 的测定

邻苯三酚的自氧化曲线见图 2,线性关系为 $y = 0.0058x + 0.34$,所以取 $\Delta A_{0}/\Delta t = 0.006/\text{min}$ 。

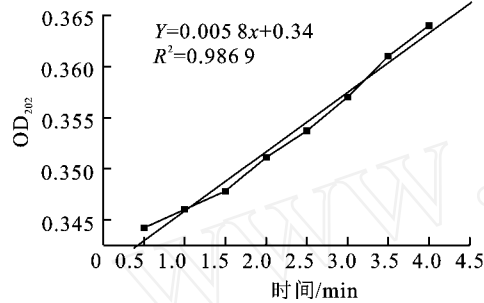


图 2 邻苯三酚自氧化曲线

Fig. 2 Self-oxidation of Pyrogallol

由图 3 可知,在 80~400 μg/mL 的质量浓度范围之内,HRP、HRP I、HRP Ia 对 O^{·-}₂ 的清除率随多糖质量浓度增加而增大。但在 400~480 μg/mL 区域内,HRP I、HRP Ia 的清除率均有所下降,推测是由于多糖的质量浓度过高产生了助氧化作用,从而使清除率下降。最大清除率分别为 HRP Ia (55%) > HRP I(51.2%) > HRP (33.3%),推断 HRP Ia 是清除 O^{·-}₂ 的主要活性物质。

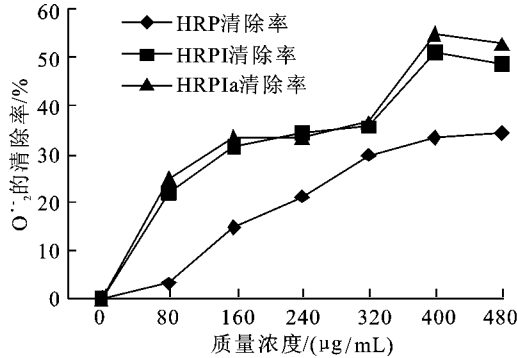


图 3 沙棘多糖对 O^{·-}₂ 的清除

Fig. 3 Scavenging effect of HRP, HRP I, HRP Ia on O^{·-}₂

2.3 沙棘多糖清除 R·的测定

由图 4 可知,在 80~480 μg/mL 的质量浓度范围内,HRP、HRP I、HRP Ia 对 R·的清除率随着多糖质量浓度的增加而减小。这可能是由于在自由基引发剂存在的条件下,多糖也可能自动氧化,产生新的有机自由基,高质量浓度多糖清除的自由基数目可能少于其自身产生自由基的数目;但低质量浓度的多糖溶液中,可能是减少了多糖分子与自由基引发剂的反应几率,从而表现出多糖的抗氧化作用。沙棘多糖对 R·的清除率远小于对 ·OH、O^{·-}₂ 的清除作用,最大清除率分别为: HRP Ia (30.05%) > HRP I(25.38%) > HRP(2.14%),再次推断 HRP Ia 是清除 R·的主要活性物质。

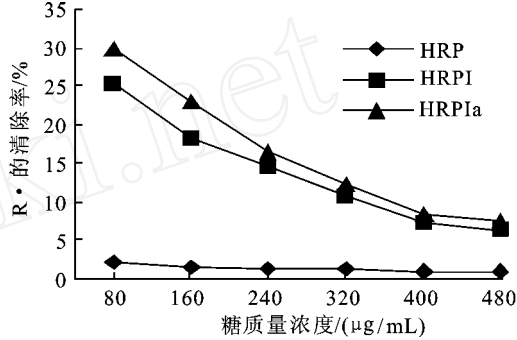


图 4 沙棘多糖对 R·清除

Fig. 4 Scavenging effect of HRP, HRP I, HRP Ia on R·

2.4 沙棘多糖抑菌作用

沙棘多糖的抑菌实验结果显示,沙棘多糖 HRP Ia 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、腊状芽孢杆菌、番茄煤霉、棉花红腐等菌种均有一定的抑制作用。沙棘多糖 HRP 仅对于大肠杆菌、腊状芽孢杆菌有一定抑制作用,对于真菌无抑制作用。但沙棘多糖对苏云金芽孢杆菌、黑曲霉均无抑制作用,见表 1、2。

表 1 沙棘多糖对细菌的抑菌圈大小

Tab. 1 Size of antimicrobial circle of HRP and HRP Ia to bacterium 单位:mm

沙棘多糖	菌种			
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	腊状芽孢杆菌	苏云金芽孢杆菌
HRP	9	-	10	-
HRP Ia	11	14	13	-

表 2 沙棘多糖对真菌的抑菌圈大小

Tab. 2 Size of antimicrobial circle of HRP and HRP Ia to fungus 单位:mm

沙棘多糖	菌种		
	番茄煤霉	棉花红腐	黑曲霉
HRP	—	—	—
HRP Ia		13	12

2.5 最小抑菌浓度(MIC)的测定

1) HRP 最小抑菌浓度(MIC):MIC 腊纸状芽胞杆菌为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;MIC 大肠杆菌为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2) HRP Ia 最小抑菌浓度(MIC):MIC 大肠杆菌为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;MIC 腊纸状芽胞杆菌为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;MIC 枯草杆菌为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;MIC 番茄煤霉为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$;MIC 棉花红腐为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

沙棘多糖 HRP、HRP I 和 HRP Ia 具有清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}^{\cdot-}_2$ 及 $\text{R}\cdot$ 的功能,并且清除率分别为 HRP Ia > HRP I > HRP。因为 HRP 是粗多糖,进一步提取后得 HRP I,再纯化得 HRP Ia,前期提取实验各组分得率分别为:HRP 10.17%、HRP 18.95%、HRP Ia 3.2%;HRP 的得率是 HRP Ia 得率的 3.18 倍^[7],而 HRP Ia 清除自由基的能力是 HRP 的 1.65~14.04 倍。说明精多糖 HRP Ia 是主要活性物质,而粗多糖 HRP 及 HRP I 中其他杂质的活性

低。精多糖 HRP Ia 主要由木糖、甘露糖、葡萄糖组成,这些单糖都含有还原性半缩醛基,这可能与多糖的抗氧化活性有关。沙棘多糖 HRP Ia 的抑菌效果再一次证明了 HRP Ia 是沙棘多糖中主要活性物质。

1) 沙棘多糖具有清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}^{\cdot-}_2$ 及 $\text{R}\cdot$ 的功能,并且清除率 HRP Ia > HRP I > HRP。HRP Ia 清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}^{\cdot-}_2$ 及 $\text{R}\cdot$ 所需最大质量浓度分别为:1 000、400、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2) 沙棘多糖 HRP Ia 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、腊状芽孢杆菌、番茄煤霉、棉花红腐等菌种均有一定的抑制作用;沙棘多糖 HRP 仅对于大肠杆菌、腊状芽孢杆菌有一定抑制作用,对于真菌无抑制作用。HRP 最小抑菌浓度(MIC):腊状芽孢杆菌 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;大肠杆菌 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。HRP Ia 最小抑菌浓度(MIC):大肠杆菌 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;腊状芽孢杆菌 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;枯草杆菌 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;番茄煤霉 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$;棉花红腐 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

参考文献(References):

- [1] 聂凌鸿,宁正祥. 广东淮山水溶性多糖的分离纯化及体外抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 129 - 132.
NIE Ling-hong, NING Zheng-xiang. Study on the isolation, purification and antioxidative activity of water soluble polysaccharide of *D. fordii* prain et burkill[J]. **Food Science**, 2003, 24(11): 129 - 132. (in Chinese)
- [2] 程荷凤,李小凤,东野广智. 化橘红水溶性多糖的化学及体外抗氧化活性的研究[J]. 化学世界, 2002, (2): 91 - 93.
CHENG He-feng, LI Xiao-feng, DONGYE Guang-zhi. Study on chemistry and antioxidative activity of water soluble polysaccharide of *exocarpium Citri grandis*[J]. **Chemical World**, 2002, (2): 91 - 93. (in Chinese)
- [3] 芮海云,吴国荣,陈景耀,等. 白芨中性多糖抗氧化作用的实验研究[J]. 南京师大学报:自然科学版, 2003, 26(4): 94 - 98.
RUI Hai-yun, WU Guo-rong, CHEN Jing-yao, et al. Study on antioxidant activity of neutral polysaccharide from *Bletilla striata*[J]. **Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition**, 2003, 26(4): 94 - 98. (in Chinese)
- [4] 陈益. 半夏多糖的结构与抗肿瘤活性研究[D]. 西安:陕西师范大学, 2007.
- [5] 丁利君,周国栋. 莲子水溶性糖的提取及其对自由基清除能力的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 252 - 254.
DING Li-jun, ZHOU Guo-dong. Extracting of water-soluble polysaccharides from lotus seed and effect of polysaccharides on scavenging free radicals[J]. **Food Science**, 2002, 23(8): 252 - 254.
- [6] 邹国林,桂兴芬,钟晓玲,等. 一种 SOD 的测定方法—邻苯三酚自氧化法的改进. 生物化学与生物物理进展, 1986, (4): 71 - 73.
ZOU Guo-lin, GUI Xing-fen, ZHONG Xiao-ling, et al. A method of assaying SOD-modified pyrogallol autoxidation[J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 1986, (4): 71 - 73. (in Chinese)
- [7] 田晓艳,刘延吉,祝寰宇,等. 沙棘多糖 HRP Ia 纯化及鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1): 23 - 26.
TIAN Xiao-yan, LIU Yan-ji, ZHU Huan-yu, et al. Purification, identification of polysaccharide HRP Ia of *Hippophae rhamnoides L* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(1): 23 - 26. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)