

蛋白聚糖纯品。而且灰树花菌丝体和 GFP III 均含有 18 种氨基酸,必需氨基酸和呈味氨基酸含量较高,具有重要的食品保健品开发价值。

参考文献:

- [1]卢兆双,王光远,赵晨,等.灰树花胞内粗多糖提取条件的优化及其提取物的抑瘤作用[J].食用菌学报,2009,16(1):51.
- [2]李恒,孙明丽,李艳玲.泰山灰树花产海藻糖母种培养基的筛选[J].泰山医学院学报,2008,29(12):952.
- [3]Lee BC, Bae JT, Pyo HB, et al. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 30 (5): 574 - 581.
- [4]汪维云,施燕,时宏斌,等.超滤膜分离灰树花多糖的工艺条件优化[J].食品与发酵工业,2010,36(4):190.
- [5]谢文佳,黄小玲.灰树花多糖的生物活性与研究进展[J].食用菌,2010,5(5):1.
- [6]宁慧青.不同食用菌多糖含量的比较研究[J].山西化工,2007,27(3):44-45.

[7]宋玉良,陈建真.灰树花中多糖含量的测定[J].浙江中医学院学报,2000,24(6):67.

[8]周帅,唐庆九,杨焱,等.药用真菌粗多糖蛋白含量测定方法[J].食用菌学报,2010,17(1):72-75.

[9]Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193 (1): 265 - 275.

[10]董纯定.生化药物分析[M].南京:中国药科大学出版,1995:142-150.

[11]杨晓华,于广利,赵峡,等.灰树花糖蛋白中总糖含量的测定[J].中国海洋大学学报,2006,36(6):930.

[12]冯尚坤,徐海菊.灰树花菌丝体多肽的制备及其体外抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2009,30(2):47-50.

[13]周昌艳,张劲松,贾薇,等.一种灰树花蛋白聚糖的制备方法[P].中国:发明专利,200410067300,2006-5-20.

[14]徐泽平,杨传伦,苏亚平,等.一种制备灰树花蛋白聚糖的方法[P].中国:发明专利,CN 101914131 A,2010-12-15.

微生物源性抗氧化剂体外抗氧化能力的初步研究

蔡旋^{1#}, 陈小连^{1#}, 杨帆², 徐建雄^{1*}, 谷娟¹, 张超²

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要:目的:研究微生物源性抗氧化剂的体外抗氧化能力。方法:在体外分别测定微生物源性抗氧化剂、 α -生育酚(V_E)、抗坏血酸(V_C)、L-硫辛酸、表没食子酸儿茶素的还原能力,羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基清除能力及抗脂质过氧化能力,比较微生物源性抗氧化剂与其他抗氧化剂抗氧化能力。结果:微生物源性抗氧化剂有较强的抗氧化能力,体外清除羟自由基、超氧阴离子自由基、DPPH 自由基能力的半数有效量(EC_{50})分别为 184.5 μ g、48.7 μ g、66.1 μ g。与常见抗氧化剂相比,微生物源性抗氧化剂对氧自由基及氮自由基都有较好的清除自由基作用。结论:微生物源性抗氧化剂体外抗氧化作用明显,有进一步开发的价值。

关键词:微生物源性;抗氧化剂;自由基;体外

中图分类号:Q505 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1004-311X.2011.06.160

A Preliminary Research of Antioxidant Capacity by Micro-derived Antioxidants *in vitro*

CAI Xuan^{1#}, CHEN Xiao-lian^{1#}, YANG Fan², XU Jian-xiong^{1*}, GU Juan¹, ZHANG Chao¹

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. College of Life & Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Objective: To preliminary study and compare the antioxidant capacity of micro-derived antioxidants and common food and feed antioxidants *in vitro*. **Method:** test the scavenging capacity, reducing power and anti-lipid peroxidative of the hydroxyl radical, superoxide anion and DPPH from micro-derived antioxidants and common food and feed antioxidants by classic methods *in vitro*. **Result:** Microbial-derived antioxidants have strong free radical scavenging and anti-lipid peroxidative, the EC_{50} of hydroxyl radical, superoxide anion and DPPH scavenging capacity are 184.5 μ g, 48.7 μ g and 66.1 μ g respectively. **Conclusion:** Antioxidants derived from microbes take on obvious antioxidant ability *in vitro*, which have the value of further development.

Key words: micro-derived; antioxidants; free radical; *in vitro*

0 引言

收稿日期:2011-09-05;修回日期:2011-12-01

基金项目:国家自然科学基金项目(30972103);上海交通大学农业与生物学院青年人才发展培育基金项目(NRC201102)资助

作者简介:蔡旋(1985-),男,武汉人,博士生,研究方向:食品及饲料中功能性成份研究;#并列第一作者:陈小连(1978-),女,博士,讲师,研究方向:动物营养与饲料。*通讯作者:徐建雄(1962-),男,上海人,教授,研究方向:动物营养与饲料,Email: jxxu1962@sjtu.edu.cn.

生物体在特定的应激状态下会产生过量自由基,使生物体产生病理反应。抗氧化剂能有效清除自由基,改善生物体的生理状况,因而广受关注。目前常见的抗氧化剂有人工合成和天然产物提取两大类,微生物源性抗氧化剂(micro-derived antioxidants, MA)属于发酵物提取抗氧化剂,较传统的植物提取而言,有着来源丰富、品质易控制、提取分离方便等诸多优势,但目前鲜见关于微生物源性抗氧化剂的研究。本研

究对上海创博生态工程有限公司提供的微生物源性抗氧化剂进行体外抗氧化能力测定,并与常见的食品、饲料抗氧化剂进行对比,旨在初步探讨微生物源性抗氧化剂的抗氧化能力,并为微生物源抗氧化剂的开发应用提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

微生物源性抗氧化剂,由上海创博生态工程有限公司提供。

1.1.2 试剂

α -生育酚(V_E)、抗坏血酸(V_C)、L-硫辛酸、表没食子酸儿茶素(EGCG)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2-脱氧-D-核糖、2-硫代巴比妥酸、吩嗪硫酸甲酯、还原型辅酶I、氯化硝基四氮唑蓝、牛血清白蛋白购自阿拉丁试剂有限公司,均为分析纯,其它试剂购自国药集团化学试剂有限公司,均为国产分析纯。试验中所用水均为双蒸水。

1.1.3 仪器

T6紫外可见分光光度计,北京普析通用有限公司;电子天平,赛多利斯集团;5804R台式离心机,ependorf公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备及成分分析

试验用微生物源性抗氧化剂由上海创博生态工程有限公司提供,该产品是刺梨、沙棘等果实经枯草芽孢杆菌、乳酸杆菌、酪酸梭菌、啤酒酵母菌等有益微生物经固、液复合发酵后,再经提取、浓缩、灭活、冻干等加工工艺制成。主要成分由食品质量监督检测上海站按国标方法测定。

1.2.2 还原能力测定

采用普鲁士蓝 $Fe_4(Fe(CN)_6)_3$ 生成实验进行还原能力测定^[1]。采用终浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 的 V_C 、 V_E 、硫辛酸、EGCG作为对照。

1.2.3 羟自由基清除能力测定

采用 $Fe^{3+}-H_2O_2-EDTA-V_C$ 体系测定微生物源性抗氧化剂的羟基自由基清除能力^[1]。终浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 的 V_C 、 V_E 、硫辛酸、EGCG作为比较。以加纯水为对照,以不加脱氧核糖为空白。羟自由基清除率由以下公式表示:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{MA}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

$\times 100\%$

1.2.4 超氧阴离子清除能力测定

超氧离子自由基在PMS-NADH系统中收集并通过NBT还原法检测。终浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 的 V_C 、 V_E 、硫辛酸、EGCG作为比较。以加纯水为对照,以不加NBT为空白。超氧离子自由基清除率由以下公式表示:

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{MA}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

1.2.5 DPPH自由基清除能力测定

DPPH自由基清除活性检测采用高昌勇的方法^[2]。终浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 的 V_C 、 V_E 、硫辛酸、EGCG作为比较。以加纯水

为对照,以不加DPPH为空白。采用以下公式计算清除率:

$$\text{DPPH清除率}(\%) = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{MA}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

100%

1.2.6 抗脂质过氧化能力测定

采用 Fe^{2+} 诱发磷脂C-2位上的极低密度脂蛋白和低密度脂蛋白过饱和脂肪酸过氧化模型^[3,4]。终浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 的 V_C 、 V_E 、硫辛酸、EGCG作为比较。以加纯水为对照。采用以下公式计算抗脂质过氧化率:

$$\text{抗脂质过氧化率}(\%) = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{MA}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

100%

1.2.7 数据处理与分析

所有试验均重复3次。数据处理采用Excel 2003进行统计分析,结果表示为平均数 \pm 标准差形式。采用origin 8.0进行回归分析和作图。

2 结果与分析

2.1 微生物源性抗氧化剂的成分分析

试验用微生物源性抗氧化剂主要成分由食品质量监督检测上海站按国标方法测得。相关元素组成如下: Mg, 13.60 mg/kg; Fe, 503 mg/kg; Mn, 367 mg/kg; Cu, 1.07 mg/kg; Se, 0.18 mg/kg。相关抗氧化成份含量如下: SOD, 194.000 U/100g; V_C , 322 mg/100g; V_E , 908 $\mu\text{g}/100\text{g}$; 总黄酮, 4.43%; 异黄酮, 1.37%; 谷胱甘肽, 886 mg/100g。

2.2 微生物源性抗氧化剂的还原能力研究

还原力测定是以普鲁士蓝 $Fe_4(Fe(CN)_6)_3$ 生成量为指标,抗氧化剂能将铁氰化钾还原,再利用亚铁离子生成普鲁士蓝,该物质在700nm处有最大吸收峰。吸光值越大,表明样品还原力越强^[5]。

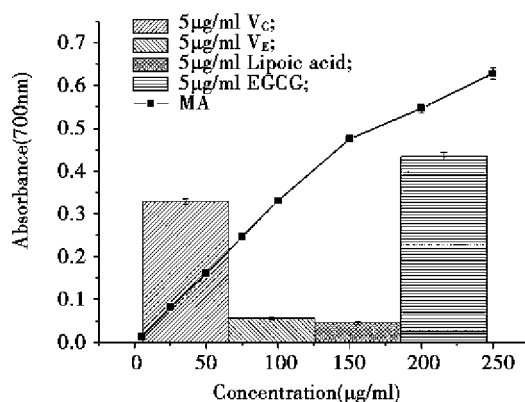


图1 微生物源性抗氧化剂及四种常见抗氧化剂的还原能力

Fig. 1 Reducing power to MA and common antioxidants

由图1可以看出,微生物源抗氧化剂具有很强的还原能力。且在较低浓度下保持较好的线性(在 $5\sim 150\mu\text{g/ml}$ 浓度内 $R^2 = 0.9988$)。常见的抗氧化剂中, V_C 和EGCG的还原力较强,而 V_E 和硫辛酸则较弱。

2.3 微生物源性抗氧化剂的氧自由基清除能力研究

羟自由基和超氧阴离子自由基是两种常见的氧自由基。

本研究利用 $Fe^{3+} - EDTA -$ 抗坏血酸 - 过氧化氢体系产生 $\cdot OH$,而脱氧核糖作为 $\cdot OH$ 的攻击靶。脱氧核糖在受到 $\cdot OH$ 攻击后裂解,与 TBA 反应生成红色化合物。532nm 下有最大吸收峰^[6]。采用 PMS - NADH 系统产生超氧阴离子,超氧阴离子能减少 NBT 的蓝色,通过检测 560nm 处的吸光值来判断系统内超氧阴离子的浓度^[7]。

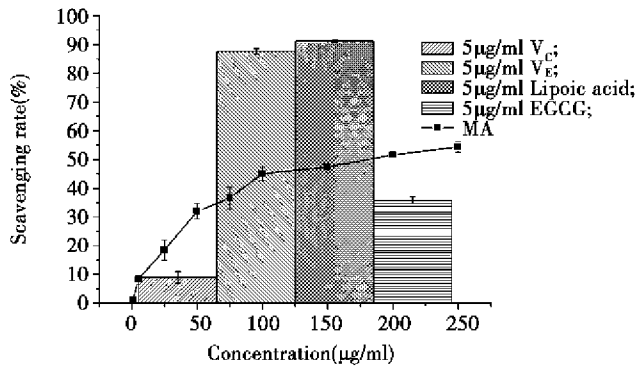


图2 微生物源性抗氧化剂及四种常见抗氧化剂的羟自由基清除率
Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging activity to MA and common antioxidants

由图2可以看出,微生物源性抗氧化剂有一定的羟自由基清除能力,且随浓度的增加而清除效果增强,但较常见抗氧化剂清除效果弱, $EC_{50} = 184.5 \mu g$ 。常见的抗氧化剂中,硫辛酸及维生素E表现出了非常强的羟自由基清除能力,在浓度为 $5 \mu g/ml$ 时清除率就分别达到了 90.95% 和 87.35%。

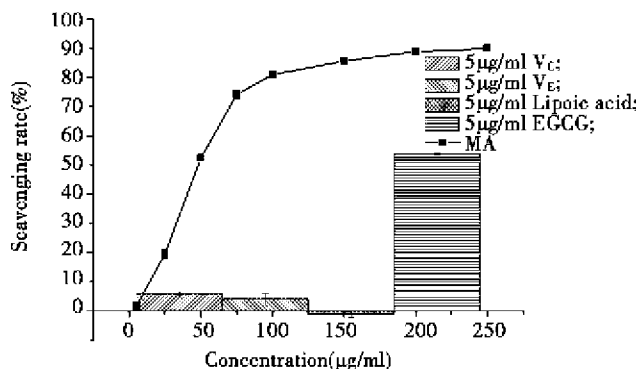


图3 微生物源抗氧化剂及四种常见抗氧化剂的超氧阴离子自由基清除率
Fig. 3 Superoxide anion radical scavenging activity to MA and common antioxidants

由图3可以看出,微生物源性抗氧化剂有一定的超氧阴离子自由基清除能力,且随浓度的增加而清除效果增强,当浓度达到 $75 \mu g/ml$ 以上时,增幅减缓, $EC_{50} = 48.7 \mu g$ 。常见的抗氧化剂中,仅 EGCG 表现出了较强的超氧阴离子自由基清除作用,在 $5 \mu g/ml$ 的浓度时清除率达到 54.18%,而硫辛酸则不表现出超氧阴离子自由基清除能力(与阴性对照比较, $P > 0.05$)。

2.4 微生物源抗氧化剂的含氮自由基清除能力研究

每个 DPPH 分子在溶液中可生成一个稳定的含氮自由基,因此通过 DPPH 法对这种稳定存在的自由基清除能力的

检查,可以反映被测物清除含氮自由基的活性^[8]。由图4可以看出,微生物源性抗氧化剂有较强的 DPPH 自由基清除作用,且在低浓度范围内 ($1 \sim 100 \mu g/ml$) 表现出较好的线性关系 ($R^2 = 0.9963$),当浓度超过 $150 \mu g/ml$ 时,清除率几乎不随浓度的增加而显著升高,在 $250 \mu g/ml$ 时清除率为 93.54%, $EC_{50} = 66.1 \mu g$ 。常见抗氧化剂中, V_C 和 EGCG 的清除 DPPH 自由基效果较好,而 V_E 和硫辛酸的清除率相对较低。

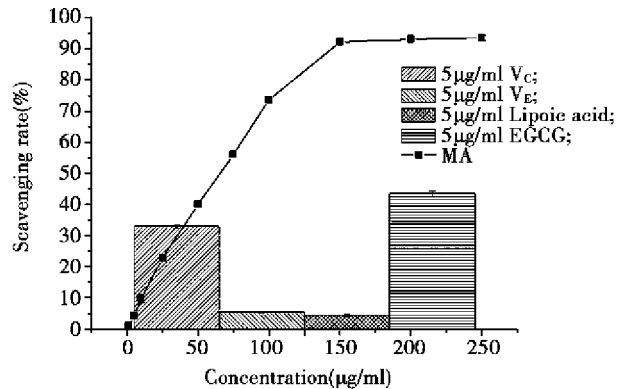


图4 微生物源抗氧化剂及四种常见抗氧化剂的 DPPH 自由基清除率
Fig. 4 DPPH radical scavenging activity to MA and common antioxidants

2.5 微生物源性抗氧化剂的抗脂质过氧化作用

多不饱和酸在自动氧化过程中的最终产物是丙二醛 (MDA),在较低 pH 和高温下,它可以与硫代巴比妥酸 (TBA) 反应生成一种粉红色物质,该物质在 532nm 下有特征吸收^[9],通过对该物质的检测可以分析出样品对脂质过氧化的抑制作用。从图5中可以看出,微生物源抗氧化剂对小鼠肝细胞细胞膜的自氧化的抑制非常显著,在浓度为 $25 \mu g/ml$ 时抑制率就高达 90.60%,在浓度为 $5 \mu g/ml$ 时抑制率为 61.26%,较同浓度的 V_C 、硫辛酸高(抑制率分别为 4.28% 和 12.49%),但较同浓度的 V_E 和 EGCG 的抑制率低(分别为 91.42% 和 99.68%)。

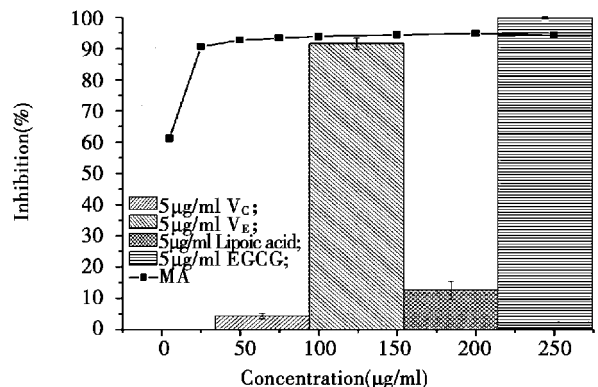


图5 微生物源抗氧化剂及四种常见抗氧化剂对脂质过氧化的抑制率
Fig. 5 Inhibition of lipid peroxidative to MA and common antioxidants

3 讨论

自由基是生物细胞进行正常代谢时产生的。实验证明,机体细胞存在少量氧自由基是维持生命所必需的^[10]。但是,在一些特定的生理状态下(氧化应激),机体代谢产生异常而产生大量自由基,或者由于某些原因体内抗氧化系统(如

SOD、过氧化氢酶、GSH-Px等)功能障碍时,自由基-抗自由基生成系统平衡失调,机体产生氧化应激反应,从而导致多种疾病^[11]。因此,现在许多疾病的根治都归结到对氧化损伤的预防上来^[12]。

目前广泛研究和使用的抗氧化剂按来源一般可分为合成小分子、植物提取物两类。合成小分子抗氧化剂如维生素C、维生素E、BHT等等,具有研究充分,成分简单,价格低廉的特点。但同时也存在清除自由基种类单一,合成存在安全隐患等问题^[13]。植物提取抗氧化剂近年来发展极为迅速,仅2008年一年,发表在*Journal of Agricultural and Food Chemistry*上的与天然抗氧化剂相关的文章就多达158篇^[12],其中多为植物源性抗氧化剂相关研究。植物源性抗氧化剂如茶多酚、人參皂苷、各种植物黄酮等具有多种自由基清除能力强、来源安全可靠、同时兼具其它如免疫调节等功能的特点^[14],但存在原料来源有限,提取成本高、受气候、海拔、地域等多种因素影响而品质稳定性差的缺点。微生物源性抗氧化剂目前局限在某些菌种的抗氧化作用研究,复合抗氧化剂的研究非常罕见,但依据本课题组先前的研究^[11,15],其体内抗氧化作用较好,有较大的开发价值。且相较植物源性抗氧化剂而言,微生物源性抗氧化剂有着来源丰富、品质易控制、提取分离方便等诸多优势,是一种理想的食品、饲料抗氧化添加剂。

体外抗氧化试验研究具有方便、快速、数值稳定的特点而常被抗氧化剂初步分析筛选时采用。还原力实验的结果表明,微生物源性抗氧化剂具有较好铁氰化钾还原能力,说明其具有潜在的抗氧化能力。但从 V_C 、 V_E 、硫辛酸及EGCG的还原力测定数据来看,还原力强并非对所有自由基的清除作用都强,如 V_C 的还原力数值约是 V_E 的6倍,而 $5\mu\text{g/ml}$ 的 V_C 的羟自由基清除率仅同浓度 V_E 的 $1/9$ 。羟自由基和超氧阴离子自由基是体内常见的氧自由基,DPPH自由基常作为含氮自由基的代表进行研究,实验结果说明常见的合成抗氧化剂在清除自由基方面选择性很强,同浓度的 V_C 在羟自由基及超氧阴离子自由基的清除方面都较 V_E 弱,但DPPH自由基清除能力却很强。而硫辛酸在体外仅羟自由基的清除能力非常强,其它自由基清除能力相对均较弱。这种差异与其分子结构及构象有关^[16],也可能与其所处的溶液环境有关。这也说明在日常饲料及食品中,单独添加某一种合成小分子抗氧化剂可能效果并不能达到最佳,而 V_C 、 V_E 、硫辛酸及EGCG在体内共存时,具有一定的协同作用^[17]。在羟自由基、超氧阴离子自由基和DPPH自由基的清除方面,EGCG的效果均较好,且较为平衡。但考虑到EGCG的提取成本,所以其可能更适合作为食品的添加剂,作为饲料添加则可能不太被生产商所接受。在体外抗脂质过氧化方面, V_E 和EGCG的效果非常好,但二者都是脂溶性成分,因此在生产添加时,可能有一定局限性。而本实验采用的微生物源性抗氧化剂虽然在同浓度与常见抗氧化剂比较时($5\mu\text{g/ml}$)效果都不是最佳。但其在各种自由基清除、抗脂质过氧化方面都有一定效果,且作用较为平衡。因此作为饲料或食品抗氧化剂添加时,效果可能会较单一添加某种抗氧化剂更好。另外本实验采用的微生物源性抗氧化剂

未经过进一步的有效成分分离与纯化,还存在较大的提升空间。

4 结论

微生物源性抗氧化剂在体外有良好的抗氧化作用,是一种经济、可靠、理想的饲料、食品抗氧化添加剂,具有进一步研究与开发的价值。

参考文献:

- [1] Ardestani Amin, Yazdanparast Razieh. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(1): 21-29.
- [2] 高昌勇. 正交设计优化紫甘蓝色素提取及抗氧化性研究[J]. *生物技术* 2010, 3: 73-75.
- [3] Ng T. B., Liu Fang, Lu Yanhua, et al. Antioxidant activity of compounds from the medicinal herb *Aster tataricus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2003, 136(2): 109-115.
- [4] 张尔贤, 余丽君, 周意琳, 等. Fe^{2+} 诱发脂蛋白PUFA过氧化体系及对若干天然抗氧化物作用的评价[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1996, 28(2): 218-222.
- [5] 武守华. 四种子囊菌的抗氧化活性及抗氧化成分研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2009: 23.
- [6] John Gutteridge, Barry Halliwell. The deoxyribose assay: an assay both for free hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production [J]. *Biochemical Journal*, 1988, 253(3): 932.
- [7] Gül? in İlhami. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) [J]. *Toxicology* 2006-3, 217(2): 213-220.
- [8] Sharma Om P, Bhat Tej K. DPPH antioxidant assay revisited [J]. *Food Chemistry* 2009, 113(4): 1202-1205.
- [9] Kosugi Hiroko, Kojima Takashi, Kikugawa Kiyomi. Thiobarbituric acid-reactive substances from peroxidized lipids [J]. *Lipids*, 1989, 24(10): 873-881.
- [10] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 生命科学系列. 北京: 科学出版社, 2002, 1.
- [11] 陈小连, 孙婷婷, 徐建雄. 微生物源性抗氧化剂对大鼠抗氧化及损伤修复的作用[J]. *中国饲料* 2010, (22): 11-15.
- [12] Moon, Joon-Kwan, Shibamoto Takayuki. Antioxidant Assays for Plant and Food Components [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57(5): 1655-1666.
- [13] 王明霞, 黄凤洪, 刘昌盛, 等. 天然抗氧化剂对 α -亚麻酸的抗氧化效果研究[J]. *中国油料作物学报* 2007, 29(4): 466-469.
- [14] 龚涛, 王晓辉, 赵靓, 等. 枸杞多糖抗氧化作用的研究[J]. *生物技术* 2010, 20(1): 84-86.
- [15] 孙婷婷, 徐建雄. 微生物源性抗氧化剂对母猪繁殖性能和自由基代谢的影响[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版* 2007, 25(4): 342-346.
- [16] Fuster, Maria, Lampi Anna-Maija, Hopia Anu, et al. Effects of α - and γ -tocopherols on the autooxidation of purified sunflower triacylglycerols [J]. *Lipids*, 1998, 33(7): 715-722.
- [17] 左玉, 谢文磊, 王会. 生物抗氧化剂抗氧化作用的研究进展[J]. *食品与发酵工业* 2006, 32(1): 62-67.