

水溶性可得然寡糖的制备及其活性研究

王英杰¹, 赵双枝², 苏理², 兰文忠²

(1. 齐鲁工业大学食品与生物工程学院, 山东济南 250353)

(2. 山东省食品发酵工程重点实验室, 山东省食品发酵工业研究设计院, 山东济南 250013)

摘要: 研究了在碱性条件下, 利用双氧水均相氧化降解可得然胶, 制备低分子量水溶性可得然寡糖的工艺条件。通过单因素试验对氢氧化钠浓度、双氧水加量、反应温度、反应时间等影响降解的条件进行了优化, 最终确定了降解的最佳工艺条件是氢氧化钠的浓度为 2 mol/L、双氧水加量为 1.5% (V/V)、降解温度为 40 °C、降解时间为 48 h。利用纸层析和红外光谱对降解产物进行表征, 结果表明降解后产品的化学结构未发生改变。进一步研究了产物可得然寡糖体内抗肿瘤、对竹节虾生长性能影响及抑菌试验, 结果表明: 可得然寡糖具有一定的抑瘤效果, 小鼠实验表明, 剂量为 50 mg/kg 体重时, 抑瘤率可达 48.73%; 竹节虾饲料中添加可得然寡糖可提高其存活率, 添加量为 400 mg/kg 时, 酚氧化酶活力最高, 达到 2.96 U/mg; 可得然寡糖对金黄色葡萄球菌具有一定的抑菌效果, 对大肠杆菌具有较微弱的抑菌效果, 而对安琪酵母菌无抑菌效果。

关键词: 双氧水; 氧化降解; 可得然胶; 抗肿瘤作用; 免疫作用; 抑菌作用

文章编号: 1673-9078(2013)11-2735-2741

Preparation of Water-soluble Curdlan Oligose and Determination of Its Activity

WANG Ying-jie¹, ZHAO Shuang-zhi², SU Li², LAN Wen-zhong²

(1. QILU University of Technology-School of Food & Bioengineering, Jinan 250353, China)

(2. Shandong Food Ferment Industry Research & Design Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Food and Fermentation Engineering, Jinan 250013, China)

Abstract: Soluble curdlan oligose with low molecule weight (CRDO) was prepared from curdlan by oxidative degradation of hydrogen peroxide in alkaline homogeneous phase. The effects of NaOH concentration, dosages of H₂O₂, temperature, and time on curdlan degradation were studied. The optimal hydrolysis conditions were determined as follows: NaOH concentration 2 mol/L, H₂O₂ dosage 1.5% (V/V), temperature 40 °C and reaction time 48 h. The degradative production was examined by paper chromatography and infrared spectrum analysis, which demonstrated that the chemical structure of the hydrolysates had no change. In addition, its antitumor activity antibacterial activity and effects on growth performance of *Penaeus japonicus* were studied. The results showed that it could inhibit the growth of S-180 sarcoma. When CRDO dosage was 50 mg/kg of a rat, the antitumor activity was 48.73%. Meanwhile, it could improve the survival rate of *Penaeus japonicus*, and make the PO activity up to the highest of 2.96 U/mg when CRDO dosage was 400 mg/kg of feed. The antimicrobial tests indicated that the water-soluble CRDO had certain antibacterial effect on *staphylococcus aureus* and had weak antimicrobial effect on *E. coli*, but no inhibition on *angel yeast*.

Key words: hydrogen peroxide; oxide degradation; curdlan; antitumor activity; immunization; antibacterial activity

可得然胶 (curdlan) 又称作热凝胶^[1], 是一种水不溶性的微生物胞外多糖, 化学和酶学分析已经确定, 该多糖是由葡萄糖在 C1 和 C3 位上以 β -1,3-糖苷键连接而成的无分支的均一性 β -1,3-葡聚糖^[2-3]。其大约由 300~500 个葡萄糖残基组成^[4], 平均聚合度为 450, 相对分子质量大约为 74000, 分子式为 (C₆H₁₀O₅)_n, n>250, 一级分子结构如图 1。由于 curdlan 不溶于水、

收稿日期: 2013-07-14

通讯作者: 赵双枝 (1976-), 女, 高级工程师, 研究方向: 微生物学

乙醇和除 DMSO (二甲亚砜) 以外的大部分有机溶剂, 因此应用范围受到很大限制。研究表明^[5-6], 经水解制备的低分子量的可得然寡糖 (curdlan oligomers, CRDO) 具有独特的、优越的生理及药理活性, 如具有抗肿瘤活性、抑制人体逆转录病毒增殖的活性、免疫活性及有助于预防和治疗感染等。

目前, 由 curdlan 降解制备低分子量水溶性 CRDO 的方法主要有酶降解法、酸降解法^[7-8]、超声波降解法以及氧化降解法^[9]。其中, 氧化降解法是近年来研究

多糖降解比较多的一种方法,氧化法具有降解速度快,成本低,易于实现工业化的特点,其中双氧水法(H_2O_2)应用的最多。 H_2O_2 氧化降解多糖具有无毒,无副产物的特点,是一种较理想的化学降解方法。

近几年来关于 curdlan 改性的研究报道较多,但大多数都是通过化学方法在吡喃环上引入亲水性基团制得水溶性 curdlan 衍生物,而对于降解法制备水溶性 CRDO 的研究较少。本文就 H_2O_2 在氢氧化钠溶液中均相降解 curdlan 做了较为系统的研究,通过控制反应时间、反应温度、反应物浓度等条件,制备了低分子量、水溶性 CRDO,并利用纸层析和红外光谱对降解产物进行了表征,探讨了影响降解的一系列因素,并对得到的 CRDO 进行了一系列活性试验研究,如:抗肿瘤活性、免疫活性以及抑菌试验。

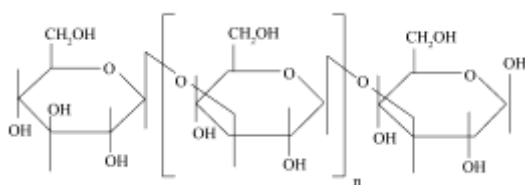


图1 curdlan分子结构图

Fig.1 Molecular structure of curdlan

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

可得然胶,山东省食品发酵工业研究设计院自制;可得然胶标准品,日本武田麒麟公司;氢氧化钠(A.R.),天津广成化学试剂厂;过氧化氢(浓度30%),莱阳市康德化工有限公司;盐酸(优级纯),莱阳市康德化工有限公司;S-180腹水瘤细胞:购于山东省医学科学院药物所。

1.1.2 仪器设备

3924型托盘天平,北京大栅栏天平厂;RE-52A型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;品氏毛细管粘度计,上海市青浦区前明玻璃仪器厂;PHS-25数字式酸度计上海大普仪器有限公司;CR-22E型高速冷冻离心机,日本日立公司;Vertex70型红外光谱仪,德国布鲁克公司;752型分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司。

1.1.3 动物

实验小鼠:SPF级昆明种小鼠,雌雄各半,六周龄,体重 20 ± 2 g,购于山东省中医药大学动物房,生产许可证号:SCXK(鲁)2011-0003;试验用虾苗:竹节虾,由即墨王村镇虾苗场提供,饲养试验在即墨市

王村镇竹节虾养殖场进行。

1.1.4 待试菌种及培养基

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、安琪酵母菌:由山东省食品发酵工程重点实验室提供。

细菌培养基(LB):牛肉膏5g,蛋白胨10g,NaCl 5g,琼脂20g,蒸馏水1000mL,pH 7.2~7.4,121℃灭菌20min。

酵母菌培养基(YEPD):葡萄糖20g,蛋白胨20g,酵母粉10g,琼脂20g,蒸馏水1000mL,pH值6.0,121℃灭菌20min。

1.2 试验方法

1.2.1 水溶性 CRDO 的制备

称取10.00g curdlan 样品,加入盛有160mL蒸馏水的烧杯中,搅拌均匀,待其完全溶胀后,加入40mL 10M的氢氧化钠溶液,将烧杯置于50℃水浴中并不断搅拌使 curdlan 充分溶解,后加入3mL 30%的双氧水搅拌均匀,将样品转移至圆底烧瓶中,40℃条件下搅拌处理48h,冷却至常温后,溶液8000r/min离心处理10min,弃沉淀,上清液用6M的盐酸回调pH至6.0,回调后的样品8000r/min离心处理10min,弃沉淀,上清液50℃条件下减压浓缩4~5倍,浓缩液加入5倍体积95%的乙醇,静置30min后过滤,滤出物用95%乙醇洗涤3~5次除盐,经冷冻干燥即得到水溶性CRDO。

1.2.2 还原糖的测定

斐林试剂法^[10]。

1.2.3 降解产物粘度的测定

curdlan 氧化降解处理后,离心除杂,弃沉淀,上清液用6M的盐酸中和,回调pH至6.0,取10.0mL回调后样品用品氏毛细管粘度计($\Phi 20$)测定样品流下时间,以秒记,即为降解液粘度。

1.2.4 产品溶解性

称取100mg冷冻干燥后的CRDO,加入到10mL蒸馏水中,观察其溶解情况。

1.2.5 CRDO 单糖组分分析(纸层析)

称取50mg CRDO 并加入50mL 2M的 H_2SO_4 后封管,110℃条件下水解2h,冷却后用 $BaCO_3$ 中和,减压抽滤,滤出液浓缩至原体积的1/5,对浓缩液和1%的标准葡萄糖样品进行纸层析,展开剂为:正丁醇:乙酸:水=4:1:5(V/V),显色剂为:苯胺-邻苯二甲酸,105℃烘干5min。

1.2.6 红外光谱测定

取10mg左右冷冻干燥得到的CRDO,与KBr粉末混合,并充分研磨,使其尽可能的分散均匀,用

刮刀将研磨好的粉末转移至不锈钢模具中, 经过压片机压片后, 红外光谱仪在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 区间内扫描。以 curdlan 标准品作对照。

1.2.7 体内抗肿瘤试验^[11]

1.2.7.1 配置可得然寡糖溶液

CRDO 样品配成 0.5 mg/mL (12.5 mg/kg 体重)、 1 mg/mL (25 mg/kg 体重)、 2 mg/mL (50 mg/kg 体重) 的溶液, 而后与生理盐水一起进行 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min 高温灭菌。

1.2.7.2 动物分组

样品做三个浓度梯度, 腹腔注射给药, 样品 12.5 mg/kg 体重、 25 mg/kg 体重、 50 mg/kg 体重分别为 1、2、3 组。以生理盐水为对照, 设立注射给药方式的对照组, 作为第 4 组, 每组均为 10 只小鼠。

1.2.7.3 S-180 肿瘤小鼠模型

抽取 S-180 腹水瘤细胞, 用生理盐水作为稀释液, 配置成细胞数为 5×10^6 个/mL 的细胞悬液, 以每鼠 0.2 mL 接种于小鼠右侧腋窝皮下, 随机分组。24 h 后开始注射给药 0.5 mL/d , 对照组用等量生理盐水注射给药, 连续 10 d, 第 11 d 处死小鼠, 摘取瘤块称重。

1.2.7.4 体内抑瘤率

SPSS 统计学软件分析各组瘤重, 按下式计算抑瘤率:

抑瘤率($\%$)= $(\text{对照组平均瘤重}-\text{给药组平均瘤重})/\text{对照组平均瘤重}\times 100\%$

1.2.8 饲料中添加 CRDO 对竹节虾生长性能的影响^[12]

1.2.8.1 实验饲料

以饲养场提供的饲料为基础饲料, 在基础饲料中分别添加 0 、 200 、 400 、 800 mg/kg 的 CRDO, 配成 4 种饲料, 饲料原料经粉碎过 60 目筛, 按配方精确称量并混匀, 用小型双螺杆挤压机制成粒径 1 mm 、长度 3 mm 左右的颗粒饲料, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2.8.2 试验虾及饲养管理

试验虾苗先在室外循环水泥池中驯养两周至体长 $2\sim 3\text{ cm}$, 体重 1.00 g 左右, 实验开始前禁食 24 h。选择体质健康、大小均匀的虾苗 1200 尾, 随机分为 4 组, 每组设 3 个平行, 每个平行 100 尾虾, 分别投放在大小为 $2\text{ m}\times 1\text{ m}\times 1\text{ m}$ 的自制网箱中, 试验周期为 4 周, 每日在下午 5:00 定量投喂一次, 日投喂量为体重的 2%。第二天上午 9:00 吸出残饵及粪便。每天观察竹节虾吃食、游动状况, 记录死亡情况。试验结束停料 24 h 后称重, 计算存活率、相对增重率, 并测定酚氧化酶 (PO) 活力。

1.2.8.3 竹节虾的生长及存活率计算公式

存活率($\%$)= $(\text{试验结束时虾尾数}/\text{试验开始时虾尾数})\times 100\%$

相对增重率($\%$)= $(\text{试验末体重}-\text{试验初体重})/\text{试验初体重}\times 100\%$

1.2.8.4 竹节虾血清中酚氧化酶(PO)活力测定

以无菌的 1 mL 注射器及针头自竹节虾围心腔取血, 置于离心管中, 静置 2 h, 3000 r/min 离心 10 min , 取上清液作为待测血清, 以左旋多巴(L-dopa)为底物, 将 3 mL 0.1 mol/L 、 pH 6.0 的磷酸钾缓冲液与 $50\text{ }\mu\text{L}$ 0.01 mol/L 的 L-dopa 及 $50\text{ }\mu\text{L}$ 血清于室温下混匀, 每间隔 2 min 读取在 490 nm 波长下的吸光值, 以 OD_{490} 对反应时间(min)作图, 以试验条件下每分钟 OD_{490} nm 增加 0.001 定义为一个酶活力单位。以每毫克蛋白所具有的酶活力单位定义为该酶比活力 (U/mg)。

1.2.9 CRDO 的抑菌试验^[13]

1.2.9.1 待试菌株的活化和菌悬液的制备

将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌接入 LB 培养基、安琪酵母菌接入 YEPD 培养基上活化处理, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h; 安琪酵母菌于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。分别用无菌生理盐水配置一系列均匀的菌悬液, 浓度为 $10^4\sim 10^6\text{ cfu/mL}$, 备用。

1.2.9.2 CRDO 的抑菌性测定

用打孔器将滤纸片制成直径为 9 mm 的圆片, 干热灭菌后放入 2% 的 CRDO 溶液中浸泡 30 min , 以生理盐水作为对照。分别吸取 0.2 mL 的各种待试菌悬液于相应的平板上, 均匀涂布, 用无菌镊子夹取浸有供试液的滤纸片贴在含菌平板上, 每皿贴 3 片, 将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌平板倒置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h, 安琪酵母菌平板倒置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h, 测定抑菌圈直径, 每个菌种平行测定 3 次, 结果取 3 次重复试验的平均值。

1.3 数据分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 数据采用均值 \pm 标准差的方法表示, 以 $p<0.05$ 为有显著性。

2 结果与讨论

2.1 产物表征

2.1.1 CRDO 溶解性

氧化降解后得到的 CRDO 样品能够迅速溶解于水中, 得到澄清透明的溶液。

2.1.2 CRDO 单糖组分分析

CRDO 经完全酸解后与 1% 标准葡萄糖样品的纸层析对照图谱表明, CRDO 的结构单元为葡萄糖, 说明 CRDO 是组分单一的多聚葡萄糖。

2.1.3 红外光谱测定结果

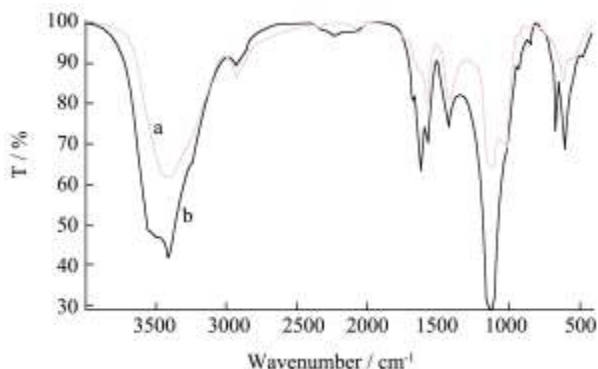


图2 curdlan 标准品 (a) 和 CRDO (b) 的红外光谱

Fig.2 Infrared spectrogram of standard curdlan (a) and CRDO(b)

curdlan 标准品和 CRDO 的红外光谱图如图 2。从红外光谱图可以看出, 水溶性 CRDO 的红外光谱图与 curdlan 标准品几乎一致, 都显示了 β-1,3-葡聚糖的特

征吸收峰^[4-16]: 3400 cm⁻¹ 左右的 C-H, 2890 cm⁻¹ 左右的 C=O, 以及吡喃糖苷的在 1010~1100 cm⁻¹ 左右的三个特征峰和在 890 cm⁻¹ 左右的 β-1,3 糖苷键典型吸收峰。这表明双氧水均相氧化降解 curdlan 得到的水溶性 CRDO 的基本结构未发生改变。

2.2 影响 curdlan 降解的主要因素

2.2.1 氢氧化钠浓度的影响

5% 的 curdlan 样品, 反应温度为 40 °C, 双氧水加量为 1.5% (V/V), 不同浓度的氢氧化钠对 curdlan 氧化降解的影响结果见表 1。

由表 1 可以看出, 随着氢氧化钠浓度的增加, 还原糖含量不断增加, 这是由于在高浓度的碱性环境下, curdlan 的三螺旋结构发生转变, 并以随意盘曲状态存在, 因此更有利于自由基发挥作用; 随着碱浓度的增加降解产物粘度逐渐降低, 但在氢氧化浓度超过 2 mol/L 后, 粘度降低的程度逐渐减小, 再继续增加氢氧化钠的浓度对降解的帮助很小, 综合考虑, 选取实验的最终氢氧化钠浓度为 2 mol/L。

表1 NaOH浓度对curdlan降解的影响 (x̄±s, n=4)

Table 1 Effect of NaOH concentration on curdlan degradation

NaOH 浓度/(mol/L)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
还原糖含量/%	0.38±0.04	0.63±0.07	0.63±0.07	0.92±0.09	1.05±0.16
粘度/s	220.42±14.81	164.54±13.17	105.26±6.97	88.31±6.12	79.06±8.46

2.2.2 双氧水加量的影响

5% 的 curdlan 在 2 mol/L 的氢氧化钠溶液中, 30% 的双氧水加量分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%

(V/V), 40 °C 下搅拌氧化降解 48 h, 测定还原糖含量以及产物粘度, 实验数据见表 2。

表2 双氧水加量对curdlan降解的影响 (x̄±s, n=4)

Table 2 Effect of H₂O₂ dosage on curdlan degradation

双氧水加量/%	0.5	1	1.5	2	2.5
还原糖含量/%	0.21±0.01	0.35±0.03	0.63±0.07	0.65±0.10	0.65±0.09
粘度/s	-	201.82±12.86	105.26±6.97	105.08±12.02	103.71±7.79

注: -表示粘度很大, 基本上无流动性。

由表中数据可以看出, 随着双氧水加量的逐渐增大, 还原糖含量先逐渐增加, 后保持不变; 产物粘度降低的速度也是先增加后降低, 双氧水加量超过 1.5% 时, 对降解的影响不大, 而且严重起泡, 这是由于双氧水初始浓度较高, 加快了其分解为氧气和水的速度,

降低了双氧水的利用率, 当双氧水加量为 2.0% 时, 虽然还原糖含量略有增加, 但产物粘度基本保持不变, 因此, 最终确定双氧水的加量为 1.5% (V/V)。

2.2.3 反应温度的影响

表3 反应温度对curdlan降解的影响 (x̄±s, n=4)

Table 3 Effect of temperature on curdlan degradation

温度/°C	30	35	40	45	50
还原糖含量/%	0.55±0.09	0.65±0.13	0.63±0.07	0.55±0.08	0.45±0.03
粘度/s	263.72±13.25	158.84±13.58	105.26±6.97	77.51±8.69	31.85±3.38
产物颜色	白色	白色	浅黄色	淡粉色	红棕色

5% 的 curdlan 在 2 mol/L 的氢氧化钠溶液中, 加

入 1.5% (V/V) 的 30% 的双氧水, 在 30~50 °C 下水浴

48 h 后离心, 测定上清液还原糖含量以及产物粘度, 实验数据见表 3。

反应温度低, 得到的产品颜色较好, 但降解速度较慢; 反应温度高时, 虽然加快降解速度, 但产物颜色深, 反应温度高于 50 °C, 反应 10 h 后就会有红棕色物质生成, 这可能是由于降解后得到的产物发生了副反应的结果。由表格中数据可以看出: 还原糖含量呈现先上升后下降的趋势, 可能是由于降解后得到的部分还原糖在较高温度下与蛋白质发生美拉德反应,

表4 反应时间对curdlan降解的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

Table 4 Effect of time on curdlan degradation

时间/h	24	36	48	60	72
还原糖含量/%	0.48±0.03	0.55±0.09	0.63±0.07	0.55±0.06	0.43±0.09
粘度/s	311.16±13.21	149.63±12.06	105.26±6.97	81.28±4.56	61.21±5.63

由以上实验数据可以看出, 还原糖含量呈现先上升后下降的趋势, 随着降解时间的延长, 产物粘度逐渐降低, 但其降低的速率逐渐减小, 且随着降解时间的延长, 副反应影响了产物的颜色, 使其逐渐加深, 60 h 时样品的颜色为红色, 不但影响了产品的外观质量, 而且也增加了后处理的难度, 因此本实验最终确定的降解时间为 48h。

2.3 CRDO 活性研究

2.3.1 CRDO 对体内 S-180 肉瘤生长的影响

表5 CRDO对体内S-180肉瘤生长的影响

Table 5 Effect of CRDO on S-180 tumor growth in vivo

组别	剂量/(mg/kg)	瘤重/g	抑瘤率/%
1	12.5	1.2282±0.7133	4.32
2	20	0.9796±0.7415	23.69
3	50	0.6582±0.4121*	48.73
4	-	1.2837±0.9549	-

注: $\bar{x} \pm s$, n=10, 与正常对照组相比, *为 p<0.05。

体内抑瘤实验结果如表 5。由表中数据可以看出, 在本实验设置的剂量下, CRDO 表现了一定的抑瘤效果, 并呈现一定的剂量—效应关系。CRDO 在低剂量下, 抑瘤效果相对较弱; 当剂量达到 50 mg/kg 体重时, 与对照组相比表现出明显抑制肿瘤的作用 (p<0.05), 抑制率达 48.73%。

2.3.2 饲料中添加 CRDO 对竹节虾性能影响

2.3.2.1 饲料中添加 CRDO 对竹节虾生长性能的影响

竹节虾摄食 CRDO 28 d 后的存活率、相对增重率见表 6。与对照组相比, 各试验组竹节虾相对增重率均高于对照组, 并且随饲料中 CRDO 添加量的升高呈现出先升高后降低的趋势, 其中 400 mg/kg 组的相对增重率高出对照组 19.32% (p<0.05); 存活率随着

使得还原糖含量后来降低; 回调后产物粘度大体呈下降趋势, 但下降速率逐渐降低, 最终在 50 °C 下得到的样品颜色为红色, 增加了后处理的难度, 综合上述因素, 制备低分子量水溶性 CRDO 时, 选择的降解温度为 40 °C。

2.2.4 反应时间的影响

反应温度为 40 °C, 双氧水加量为 1.5% (V/V), 5% 的 curdlan 在 2 mol/L 的氢氧化钠溶液中, 反应时间对 curdlan 降解的影响见表 4。

CRDO 添加量的增加而逐渐升高, 但与对照组无显著性差异 (p>0.05)。

表 6 饲料中添加 CRDO 对竹节虾生长性能的影响

Table 6 Effect of feed of CRDO on growth performance of bamboo prawn

添加量/(mg/kg)	平均初始体重/g	平均终末体重/g	存活率/%	相对增重率/%
0	1.02±0.02	4.16±0.05	64.81±4.31	307.84±21.64
200	1.02±0.01	4.32±0.06	69.56±2.38	323.53±18.65
400	1.01±0.03	4.72±0.03*	74.68±6.72	367.33±28.52*
800	1.03±0.05	4.56±0.03*	79.96±3.89	342.72±25.81*

注: $\bar{x} \pm s$, n=3, 与正常对照组相比; *为 p<0.05。

2.3.2.2 饲料中添加 CRDO 对竹节虾 PO 活力的影响

表 7 饲料中添加 CRDO 对竹节虾 PO 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 7 Effects of feed of CRDO on PO activity of bamboo prawn

CRDO 添加量/(mg/kg)	0	200	400	800
酶比活力/(U/mg)	2.43±0.02	2.56±0.19	2.96±0.30	2.86±0.14

饲料中添加 CRDO 对竹节虾 PO 活力的影响见表 7。一般认为, 酚氧化酶在甲壳动物防御外物入侵过程中起着重要的作用。由表中数据可以看出, 添加 CRDO 的竹节虾的 PO 活性均高于对照组, 随着 CRDO 添加量的增加, PO 比活力呈现先上升后下降的趋势, 在添加量为 400 mg/kg 时, PO 比活力达到最大值 2.96 U/mg。

2.3.3 CRDO 的抑菌效果

水溶性 CRDO 抑菌试验结果见表 8。由试验数据可以看出, 经双氧水均相氧化降解制备的水溶性 CRDO 对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌具有较明显的

抑菌效果,对革兰氏阴性菌大肠杆菌具有较微弱的抑菌效果,而对安琪酵母菌则无抑菌效果(如图3)。

表8 水溶性酵母葡聚糖的抑菌效果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 8 Antimicrobial effect of water-soluble CRDO

待试菌种	CRDO 抑菌圈直径/mm	生理盐水抑菌圈直径/mm
大肠杆菌	10.82±0.19	-
金黄色葡萄球菌	13.65±0.23	-
酵母菌	-	-

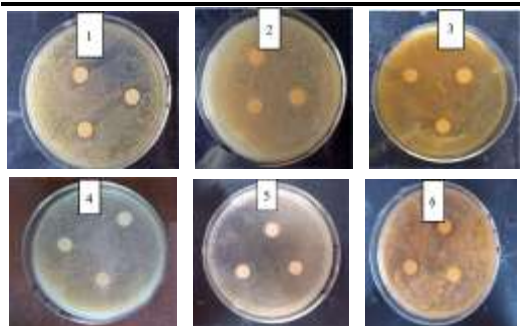


图3 CRDO对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和酵母菌的抑制效果图(生理盐水为对照组)

Fig.3 The inhibitory effects on *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and yeast by CRDO (physiological saline as control)

注: 1: CRDO、金黄色葡萄球菌, 2: CRDO、大肠杆菌, 3: CRDO、安琪酵母菌, 4: 金黄色葡萄球菌对照, 5: 大肠杆菌对照, 6: 安琪酵母菌对照。

3 结论

本研究建立了一种在氢氧化钠均相体系中,以双氧水降解 curdlan 制备低分子量水溶性 CRDO 的方法。通过纸层析及红外光谱检测表明得到的产品其基本化学结构未发生改变,因此,本方法可用于制备低分子量水溶性 CRDO。研究发现,氢氧化钠浓度、双氧水加量、反应温度、反应时间等对产物降解有极大影响。氢氧化钠浓度为 2 mol/L 时降解效果较好;双氧水加量为 1.5% (V/V) 时较为合适,加量过多使得双氧水快速分解,降低了双氧水的利用率;反应温度为 40 °C,温度太高容易导致副反应发生,影响产品色泽;反应时间一般控制在 48 h 左右,延长反应时间,产物颜色加深,影响产品外观质量,增大后处理难度。综上所述,最终得出最佳降解条件为:氢氧化钠浓度 2 mol/L、双氧水加量 1.5% (V/V)、降解温度 40 °C、降解时间 48 h。体内抗肿瘤活性试验表明,采用双氧水均相氧化降解法制备的 CRDO 具有一定的抑瘤效果,并呈现一定的剂量-效应关系,当剂量达到 50 mg/kg 体重时,表现出抑制肿瘤的作用较强,抑制率达 48.73%。饲料中添加 CRDO 对竹节虾生长性能影响的试验表明,

CRDO 可提高竹节虾的存活率以及酚氧化酶活力。CRDO 抑菌试验结果表明,CRDO 对金黄色葡萄球菌具有一定的抑菌效果,对大肠杆菌具有较微弱的抑菌效果,而对安琪酵母菌则无抑菌效果。CRDO 抑菌试验有待于进一步研究,以便更明确揭示 CRDO 用量与抑菌效果之间的规律,使其得到更合理的利用。

参考文献

- [1] Harada T, Masada M, Fujimori K, et al. Production of a firm, resilient gel-forming polysaccharide by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 [J]. *Agr. Biol. Chem.*, 1966, 30: 196-198
- [2] Nakata M, Kawaguchi T, Kodama Y, et al. Characterization of curdlan in aqueous sodium hydroxide [J]. *Polymer*, 1998, 39(6-7): 1475-1481
- [3] Harada T, Yoshimura T, Hidaka H, et al. Production of a neutral acidic polysaccharide succinoglucon by *Alcaligenes faecalis* var. *Myxogenes* [J]. *Agr. Biol. Chem.*, 1965, 29(8): 757-762
- [4] 邱慧霞,赵谋明.一种新型微生物胶凝剂—凝结多糖[J].食品与发酵工业,1998,24(6):66-69
- [5] Qiu H X, Zhao M M. A new type microbial polysaccharide gelling agent-curdlan [J]. *Food and Fermentation Industry*, 1998, 24(6): 66-69
- [5] HIDA T H, ISHIBASHI K, MIURA N N, et al. Cytokine induction by a linear 1, 3-glucan, curdlan-oligo, in mouse leukocytes in vitro [J]. *Inflammation Research*, 2009, 58(1): 9-14
- [6] SHIMIZU J, TSUCHIHASHI N, KUDOH K, et al. Dietary curdlan increases proliferation of bifidobacteria in the cecum of rats [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65(2): 466-469
- [7] Grandpierre C, Janssen H G, Laroche C, et al. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of beta-(1-3)-oligoglucans [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71(2): 277-286
- [8] Masahiro K, Masaaki K, Shinji M, et al. Immunoactivator JP, 10194977 [P]. 1998
- [9] Shengjun Wu, Ruizhen Cai, Yuying Sun. Degradation of curdlan using hydrogen peroxide [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135: 2436-2438
- [10] ZB X 66040-1987, 还原糖测定法[S]
- [10] ZB X 66040-1987, The method of the determination of reducing sugar [S]
- [11] YATAWARA L, WICKRAMASINGHE S, NAGATAKI M, et al. Aureobasidium-derived soluble branched (1,3-1,6) β

- glucan (sophy β -glucan) enhances natural killer activity in leishmania amazonensis-infected mice [J]. Korean J Parasitol, 2009, 47(4): 345-351
- [12] 杨福刚,周洪琪,黄旭雄.不同 β -葡聚糖对凡纳滨对虾稚虾生长及非特异免疫功能的影响[J].上海水产大学学报,2005, 14(3):263-269
Yang F G, Zhou H Q, Huang X X. Effect of beta-glucans on growth and non-specific immune response of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Shanghai Fisheries university, 2005, 14(3): 263-269
- [13] 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
Du L P, Xiao D G, Qi Y M. Study on Antimicrobial Activity of Water- Soluble Yeast Glucan [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2008, 6: 28-30
- [14] 李卫旗,李志昂,何国庆.酶法提取可德兰多糖的研究[J].食品科学,2002,23(7):68-70
Li W Q, Li Z A, He G Q. Study on extraction of curdlan by enzyme method [J]. Food Science, 2002, 23(7): 68-70
- [15] JIN Yang, ZHANG Hongbin, YIN Yimei, et al. Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of rheology, DSC, and AFM [J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(1): 90-99
- [16] LEE C M, JEONG H J, KIM E M, et al. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles decorated with carboxymethyl curdlan [J]. Macromolecular Research, 2009, 17(2): 133-136