

Study on Antioxidant of Polysaccharide from *Nostoc commum* Vauch

Zhang Huixiang, Wang Xiuli, Yang Shijun, Feng Liangguan, Li Jianping

College of Chemistry & Bioengineering, Guilin University of Technology, Guangxi Guilin, China

Email address:

747140669@qq.com (Zhang Huixiang), wangxiuli1109@163.com (Wang Xiuli), 124058901@qq.com (Yang Shijun), 1327838820@qq.com (Feng Liangguan), 1106236852@qq.com (Li Jianping)

To cite this article:

Zhang Huixiang, Wang Xiuli, Yang Shijun, Feng Liangguan, Li Jianping. Study on Antioxidant of Polysaccharide from *Nostoc commum* Vauch. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 3, No. 6, 2015, pp. 158-161. doi: 10.11648/j.bio.20150306.13

Abstract: Polysaccharide from *Nostoc commum* Vauch. was extracted by water extraction and ethanol precipitation. The content of polysaccharide was determined and its antioxidant activity was researched through reducing power, $\bullet\text{OH}$ radical scavenging, ABTS^+ radical scavenging and anti-lipid peroxidation. The results showed that the content of polysaccharide from *Nostoc commum* Vauch. could reach to approximately 25.3%; the polysaccharide had a concentration-dependent antioxidant effect; the polysaccharide could significantly decreased $\bullet\text{OH}$ radical, its maximal scavenging rate was 98.8%; the polysaccharide also had some effect on ABTS^+ free radical and lipid peroxidation, its maximal scavenging rate and peroxidation rate were respectively 58.3% and 37.2%.

Keywords: *Nostoc commum* Vauch, Polysaccharide, Antioxidant

地木耳多糖的抗氧化作用研究

张会香, 王秀丽, 杨世军, 冯良官, 李建平

桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西桂林, 中国

邮箱

747140669@qq.com (张会香), wangxiuli1109@163.com (王秀丽), 124058901@qq.com (杨世军), 1327838820@qq.com (冯良官), 1106236852@qq.com (李建平)

摘要: 利用水提醇沉法对地木耳中的多糖进行提取纯化, 并对其抗氧化作用进行研究。主要通过还原力、 $\bullet\text{OH}$ 自由基清除力、 ABTS^+ 自由基清除力、抗油脂过氧化性等方法进行抗氧化作用研究。结果表明, 地木耳多糖含量为25.3%, 具有较强的抗氧化能力, 随着多糖浓度的增大而增强。地木耳多糖对 $\bullet\text{OH}$ 自由基清除率高达98.8%, 对 ABTS^+ 自由基清除率和对油脂过氧化作用的抑制率分别为58.3%和37.2%。

关键词: 地木耳, 多糖, 抗氧化性

1. 引言

地木耳学名普通念珠藻(*Nostoc commum* Vauch), 也称地衣、地皮菜、地耳等, 主要生长在含钙量高的地方, 雨后受污染小的山地草原和河堤中也较常见。地木耳具有

较高的营养价值, 而且质地柔软, 味道可口, 是餐桌上的美味菜肴。地木耳中多糖和蛋白质含量较高, 总蛋白含量为21.8%, 总糖含量为23.8%, 此外还含有氨基酸、脂肪、维生素、钙、磷、铁等[1-3]。现代研究证明地木耳能补血益气, 具有清热解毒、凉血明目、促进新陈代谢、清除自由基的功效[4-6]。同时还可以作为水体污染监测植物,

进行环境监测[7]; 还具有固氮作用, 是土壤肥力形成的先锋植物[8]; 并可以作为植物生长促进剂[9]。

随着环境保护意识的增强和科学技术的提高, 人们逐渐认识到化学合成抗氧化剂的弊端和害处。具有天然、高效、低毒等优点的天然抗氧化剂日渐受人青睐, 并被加以开发利用, 正在逐渐取代人工合成抗氧化剂。

本实验是利用水提醇沉法从地木耳中提取多糖, 经过初步纯化后, 测定多糖的含量, 并对其抗氧化作用进行研究, 希望对地木耳的研究提供参考依据。

2. 实验部分

2.1. 主要仪器和试剂

2.1.1. 原料

地木耳: 采自中国广西桂林市郊区。

2.1.2. 主要仪器

BS2245电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)

RE-2000旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)

MGLD5-2A离心机(上海科学仪器厂)

101-1-BS电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)

HH-S₂数显恒温水浴锅(金坛市医疗器械厂)

723PC可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)

XH-300A祥鹤电脑微波超声波组合合成/萃取仪(北京祥鹤科技发展有限公司)

SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)

2.1.3. 主要试剂

无水乙醇; 95%乙醇; 丙酮; 石油醚; 苯酚; 磷酸二氢钠; 磷酸氢二钠; 氯化钠; 乙二胺四乙酸; 浓硫酸; 固体硫酸铵; 三氯醋酸; 铁氰化钾; 三氯化铁; 硫酸亚铁; 水杨酸; 过硫酸钾; 硫代巴比妥酸; 30%双氧水; 抗坏血酸(Vc); 葡萄糖; 以上试剂均为分析纯; ABTS(购自sigma公司, 98%)生化试剂。

2.2. 实验方法

2.2.1. 地木耳多糖样品的制备

(i). 地木耳多糖的提取

将地木耳清洗干净, 65℃烘干, 粉碎, 加入95%乙醇脱脂8h, 自然风干, 取风干的地木耳粉末加入20倍体积的蒸馏水于90℃恒温水浴中浸提, 重复4次, 每次2 h, 过滤, 合并提取液, 60℃减压浓缩至约100mL, 缓慢加入3倍体积的无水乙醇, 混合均匀, 放入4℃的冰箱中静置过夜, 可见白色絮状粗多糖析出, 4000r/min离心20min, 除去上清液, 收集沉淀物依次用无水乙醇、丙酮和石油醚洗涤, 60℃烘干, 得到灰白色的地木耳粗多糖, 在4℃冰箱中保存待用。

精确称取地木耳多糖20.00mg, 置于100mL容量瓶中, 加蒸馏水定容, 摇匀, 即得样品供试液。配成浓度为50、

100、200、500、1000 μg/mL的多糖溶液, 在4℃冰箱中保存备用, 待测。

(ii). 多糖含量的测定

利用苯酚硫酸法[10], 于490 nm波长测定吸光度值。以葡萄糖浓度C(μg/mL)为横坐标, 吸光度值A为纵坐标绘制标准曲线。通过实验测得葡萄糖标准曲线方程为 $y=0.1095x-0.1342$ ($R^2=0.9952$)。在50-1000 μg/mL浓度范围内线性关系良好。

准确称取10.0 mg粗多糖溶解, 置100mL容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 再精密吸取2.0mL, 按上述方法操作, 用蒸馏水作空白对照, 测定吸收值。在标准曲线方程下求得多糖浓度, 再计算出多糖的百分含量。

计算公式1: 多糖百分含量 = $C_{\text{多糖}} \times V / M_{\text{粗多糖}} \times 100\%$

公式1中: $C_{\text{多糖}}$ 为多糖浓度, 单位为μg/mL; $M_{\text{粗多糖}}$ 为粗多糖质量, 单位为μg; V为体积, 单位为mL。

2.2.2. 普鲁士蓝法测定样品的还原能力

取制备的地木耳多糖溶液4.0 mL, 加入0.2 mol/L磷酸缓冲溶液(pH6.6) 2.5 mL和1%K₃Fe(CN)₆ 2.5 mL, 混合均匀, 50℃恒温水浴锅中反应20 min, 取出放入冷水中快速冷却, 再往其中加入10%的三氯醋酸2.5 mL, 振荡均匀后在4000 r/min下离心10 min, 取出上层清液5 mL, 往其中加入5 mL蒸馏水和0.1%FeCl₃溶液1 mL, 充分混匀, 用蒸馏水作空白对照, 反应1 min后用空白对照管较零, 测定反应体系在700 nm波长处的吸光度值[11-12]。以Vc做对照, 研究地木耳中多糖的还原能力。

2.2.3. 水杨酸法测定样品对·OH自由基的清除力

取地木耳多糖溶液5.0mL, 依次加入9mmol/L的FeSO₄溶液0.25mL和9mmol/L的H₂O₂溶液0.25mL, 混合均匀, 静置10 min后再加入9mmol/L的水杨酸0.25mL, 在室温下反应1h, 最后加入5.0mL蒸馏水稀释, 用蒸馏水较零, 测定稀释体系在510nm波长处的吸光度值A_i。同时以无水乙醇代替水杨酸测定样品吸光度值A_j; 以蒸馏水代替样品测定空白吸光度值A₀[13], 根据公式计算出·OH自由基清除率, 以Vc做对照, 研究地木耳中多糖的清除·OH自由基的能力。

计算公式2:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

公式2中: A_i—样品管的吸光度值, A_j—无水乙醇代替水杨酸测定的吸光度值; A₀—蒸馏水代替样品测定空白管的吸光度值。

2.2.4. ABTS法测定样品对ABTS⁺·自由基的清除力

各量取7mmol/LABTS和2.45mmol/L过硫酸钾3mL于棕色容量瓶中混合均匀, 室温避光下反应过夜, 形成ABTS⁺·自由基储存液, 待用。用蒸馏水稀释自由基储存液, 得到732nm处吸光度值为0.712的反应液(0.70±0.02), 取500 μL不同浓度的地木耳多糖溶液于试管中, 再加入3mL反应液, 振荡均匀, 放在室温下避光反应6min, 以蒸

馏水加反应液做空白对照,用蒸馏水较零,测定反应体系在732nm波长处的吸光值 A_i ,根据公式计算 $ABTS^+$ ·自由基清除率[14-15]。以Vc做对照,研究地木耳中多糖的清除 $ABTS^+$ ·自由基的能力。

计算公式3:

$$ABTS^+ \cdot \text{自由基的清除率} (\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%$$

公式3中: A_0 —空白管的吸光度值, A_i —样品管的吸光度值。

2.2.5. 卵磷脂法测定样品抗油脂过氧化性

从新鲜鸡蛋中抽取卵黄,加入适量的0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液 PBS (pH 值为 7.4)配成悬液,再稀释25倍,玻璃棒搅拌30 min,取0.8 mL于试管中,依次加入0.8 mL不同浓度的地木耳多糖溶液(加相同体积的 PBS作为空白对照管),0.4 mL 25 mmol/L 的 $FeCl_2$ 溶液,最后加入磷酸盐缓冲液 PBS至4.0 mL。将混合液放入37℃水浴锅中振荡反应 50 min,反应完后取出,加入1 mL 20%的三氯乙酸使反应停止,放置10min后在3000 r/min下离心15 min,移取4.0 mL上清液,加入2.0 mL0.8% 的硫代巴比妥酸溶液,沸水浴中反应15 min,取出用冷水冷却,用蒸馏水调零,在532 nm波长处测定吸光值 A_i ,根据公式计算抑制率[16-17]。以Vc做对照,研究地木耳中多糖的抗油脂过氧化的能力。

计算公式4:

$$\text{抑制率} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%$$

公式4中: A_0 —空白对照管吸光度值; A_i —样品管吸光度值。

3. 结果与讨论

3.1. 多糖含量的测定

表1 多糖的含量测定 (n=3)。

样品	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	百分含量	标准偏差 (%)
1	25.34	25.3	1.91
2	24.67	24.8	1.87
3	25.89	25.9	1.94

由表1可知,经过初步纯化后的粗多糖中多糖的质量百分含量为25.3%。

3.2. 地木耳多糖的还原力

Vc是已知的一种较强的抗氧化剂,因此,在本实验中用它作为样品抗氧化性的对照。如图1所示,随着地木耳多糖浓度的增大,吸光度值也随之增大,但是和同等浓度下的Vc相比较,地木耳多糖的还原力偏弱。实验结果证实

地木耳多糖具有一定的还原能力,且还原力随浓度增大而增强。

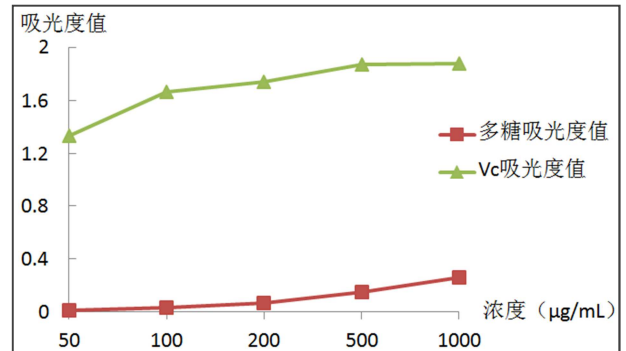


图1 地木耳多糖和Vc的还原力分析。

3.3. 地木耳多糖对·OH自由基的清除能力

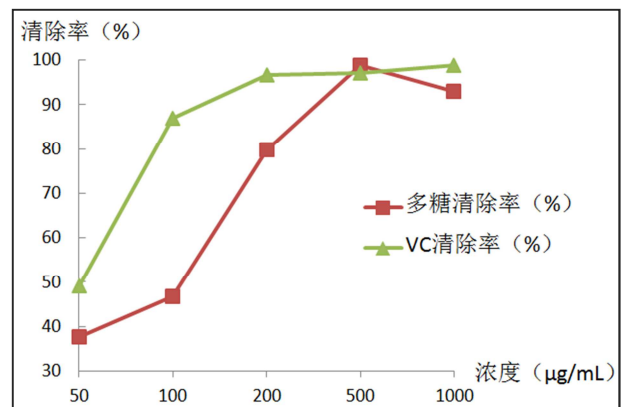


图2 地木耳多糖和Vc对·OH自由基的清除率。

如图2所示,地木耳多糖和对照品Vc对·OH自由基的清除效果都比较好,浓度在50-500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,两者的清除率都随浓度增大而急剧增高,之后趋于平缓。地木耳浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 时,清除率最高,达到98.8%,说明地木耳多糖对·OH自由基有很强的清除作用。

3.4. 地木耳多糖对 $ABTS^+$ ·自由基的清除能力

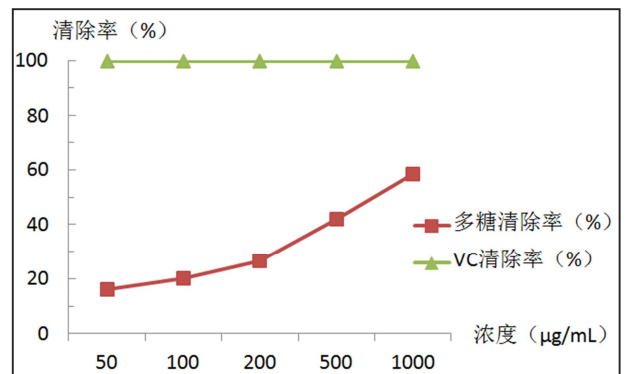


图3 地木耳多糖和Vc对 $ABTS^+$ ·自由基清除率。

如图3所示,Vc对 $ABTS^+$ ·自由基的清除作用非常强,与浓度变化没有关系。在实验浓度范围内,地木耳多糖对

ABTS⁺·自由基的清除率随浓度增大而增高,清除率和浓度呈正相关。地木耳多糖浓度为1000 μg/mL时,清除率达到最高为58.3%,说明地木耳多糖对ABTS⁺·自由基具有清除效果。

3.5. 地木耳多糖的抗油脂过氧化能力

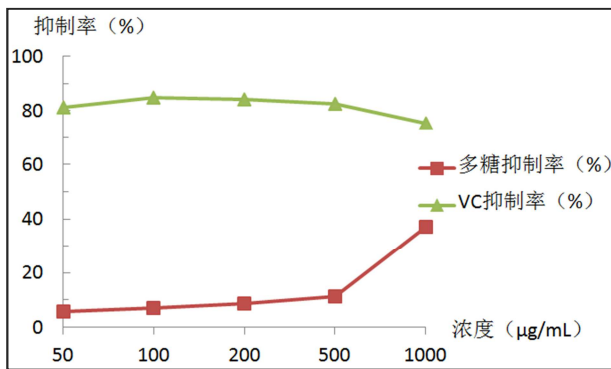


图4 地木耳多糖和VC对脂质过氧化反应的抑制率。

由图4可知,在浓度为50-1000 μg/mL范围内,地木耳多糖和VC对Fe²⁺诱导的脂质过氧化反应的抑制率都随浓度的增大而增高。相比VC,地木耳多糖的抑制效果稍差一些,抑制率最高仅为37.2%。

4. 结论

通过实验发现地木耳多糖具有一定的抗氧化性,并且都和剂量呈量效关系,但在清除不同种类自由基时的作用大小不一。比如,在还原力方面,地木耳多糖有一定的效果,但相比VC而言吸光度值偏小;在·OH自由基清除力方面,地木耳多糖和对照品VC效果相当,最高可达98.8%,甚至超过同浓度对照品VC的清除率97.1%;在清除ABTS⁺·自由基和抗油脂过氧化性方面,地木耳多糖有较强的能力,清除率最高为58.3%和37.2%,小于对照品VC。

通过实验结果证实地木耳多糖具有一定的抗氧化活性,是值得去开发利用的良好天然抗氧化剂。不过,本实验用到的多糖仍属于混合物,需要进行纯化得到多糖纯品再对其抗氧化性进行研究。

致谢

本文为中国广西高校食品安全与检测重点实验室资助项目(Supported by Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Food Safety and Detection);广西矿业与环境科学实验中心资助项目(KH2011YB017)的阶段性成果之一;中国广西自然科学基金(2015GXNSFAA139094)资助项目。

参考文献

- [1] 王瀚,何九军,杨小录.西北常见野菜地木耳的经济价值及其开发利用[J].生物学通报,2011,46(7):6-8。
- [2] 孙苗苗,刁治民,陈克龙.地木耳的经济价值及开发利用研究[J].青海草业,2013,22(3~4):34-42。
- [3] 王志勇,曾青兰,王文娟.地木耳的食用与医疗保健价值研究[J].现代农业科技,2007,(13):7-8。
- [4] Masayuki N., Hitoshi S., Yuji Y., et al. Antioxidative activity and chemical constituents of edible terrestrial Alga *Nostoc commune* Vauch.. [J]. Bioscience biotechnology and biochemistry, 2011,75(11):2175-2177.
- [5] Dixit R. B., Suseela M. R.. Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 103:947-961.
- [6] 曹东,来圣吉.二木琥珀白芍汤治疗精神神经性疾病[J].云南中医中药杂志,1997,28(4):14-15。
- [7] 杨学山,王勋陵.地木耳挂袋法监测大气SO₂污染的可行性研究[J].西北植物学报,1996,14(4):120-121。
- [8] 关秀清,阮学军.地耳生物固氮特性及其在内蒙古草原氮素循环中的作用[J].草地学报,2000,8(1):13-17。
- [9] 盛家荣,范会钦,曾令辉.普通念珠藻的主要营养成分分析[J].广西师院学报(自然科学版),1998,15(4):68-70。
- [10] 张唐伟,李天才.苯酚-硫酸法测定西宁地区地木耳中多糖含量[J].分析实验室,2010,29:219-220。
- [11] 赵平,任鹏,张月萍.原花青素抗氧化活性测定方法比较[J].现代化工,2012,32(5):119-122。
- [12] 张会香,杨世军,梁闪坐.紫甘蓝色素的抑菌性和抗氧化性研究[J].食品工业,2010,(4):64-66,88。
- [13] 刁毅,杨足君.地木耳粗脂肪抗氧化活性[J].生物技术通报,2013,28(12):68-72。
- [14] 李华,李勇,吴莹,等. ABTS法测定葡萄酒抗氧化活性的研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2009,37(11):90-96。
- [15] Hu Q., Xu J.. Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2011, 59: 2026-2033.
- [16] 张强,周正义,王松华,等.大蒜、生姜、洋葱水提取物抗氧化活性的比较[J].食品与发酵工业,2006,(11):107-110。
- [17] 刘明,罗远翔,倪辉,等.固态发酵大豆制备的抗氧化肽的活性分析[J].大豆科学,2007,26(3):381-385。