

文章编号:1673-1689(2011)06-0868-06

地木耳多糖的抗氧化性与抑菌作用

张唐伟^{1,2}, 杨乐^{1,2}, 柳青海^{1,2}, 王启兰¹, 谢占玲³, 李天才^{*1}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所,青海西宁810008;2. 中国科学院研究生院,北京100049;
3. 青海大学生物系,810006)

摘要:利用水提醇沉法从地木耳中提取多糖,再经初步纯化后,进行多糖的抗氧化性及抑菌作用实验。结果表明,地木耳多糖对·OH和DPPH自由基有较强的清除作用,且最高清除率分别为71.53%和66.35%。但地木耳多糖对O₂⁻·自由基和亚硝酸盐几乎没有作用效果,最高清除率分别只有33.33%和22.38%。地木耳多糖对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌均有一定的抑制作用,最小抑菌质量浓度MIC在125~250μg/mL之间。而对金黄色葡萄球菌的抑制作用不明显。

关键词:地木耳多糖;抗氧化性;抑菌作用

中图分类号:Q53

文献标识码:A

Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Nostoc Commune* Polysaccharides

ZHANG Tang-wei^{1,2}, YANG Le^{1,2}, LIU Qing-hai^{1,2},
WANG Qi-lan¹, XIE Zhan-ling³, LI Tian-cai^{*1}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810008, China; 2. Graduate University, Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; 3. Department of Biological Science, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: Polysaccharides in *Nostoc commune* Vach. was extracted by water extraction and ethanol precipitation in this study. and further purification to investigated the antioxidant and antimicrobial activities. The results showed that the polysaccharides from *N. commune* could significantly decrease the OH and DPPH free radicals and the rate could arrived at 71.53% and 66.35% respectively. However, the Polysaccharides had little scavenging effect on superoxide anion radicals and nitrite. Furthermore, it was found that the polysaccharides could inhibit the growth of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. The minimal inhibitory concentrations (MIC) varied from 125 to 250μg/mL. No obvious inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* was observed.

Key words: *Nostoc commune* Vach. polysaccharide, antioxidant activity, antimicrobial activity

地木耳(*Nostoc commune* Vauch.)俗称地皮菜、地耳、鼻涕肉、地踏菜、地软、地衣、地捡皮等,为

藻类蓝藻纲念珠藻科(Nostocaceae)念珠藻属植物念珠藻(*Nostoc commune* Vauch.)的藻体。它与发

收稿日期:2010-11-25

基金项目:青海省科技支撑项目(0733211D01)。

*通信作者:李天才(1966-),男,青海乐都人,副研究员,主要从事天然产物化学。Email:tcli@nwiph.ac.cn

菜(*N. flagelliforme* Born. et Flah.)、葛仙米(*N. sphaeroides* kutz.)为同属植物^[1]。地木耳是世界广生种,主要分布在石灰石区和喀斯特岩溶地带^[2]。在我国各地几乎都有分布,资源丰富,并且生命力极强,即使休眠几十年,一遇水又马上恢复生机。地木耳一般在夏秋季雨后采收,去杂质洗净,鲜用或晒干^[3]。据研究地木耳含有丰富的蛋白质、多糖、维生素、钙、磷、铁等,《本草纲目》记载:地木耳气味甘、平、无毒,明目益气,补肾。《中国药典》记载:野生地木耳对补充维生素、蛋白质、清热解毒、凉血明目、夜盲、皮疹赤热等有明显滋补食疗效果。

近年来对地木耳多糖活性的研究主要体现在地木耳多糖对植物生长的促进作用^[4-6],而对地木耳多糖的抗氧化和抑菌活性的研究还未见报道,本实验采用水提醇沉法从地木耳中提取多糖,再经初步纯化后,进行多糖的体外抗氧化性及抑菌作用的研究,为地木耳多糖的生产与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

地木耳于2009年采自青海省西宁市西山。采回后自来水洗净泥沙,后用蒸馏水清洗,自然晾干,粉碎。

细菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由青海大学生物系微生物实验室谢占玲老师提供。

乙醇、丙酮、乙醚、30%双氧水、三氯乙酸、正丁醇、邻二氮菲、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、邻苯三酚、盐酸、三羟甲基氨基甲烷、1,1-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH·为Sigma公司产品);硫酸亚铁、水杨酸、盐酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、亚硝酸钠、柠檬酸、对氨基苯磺酸、盐酸萘己二胺等均为国产市售分析纯。

1.2 仪器与设备

恒温水浴锅:上海精宏实验设备有限公司产品;RE-52AA旋转蒸发器:上海亚荣实验设备有限公司产品;TDL-5-A型离心机:上海安亭科学仪器厂产品;DZF-6050真空干燥箱:上海沪粤明科学仪器有限公司产品;721型可见光分光光度计:上海仪器厂产品;HZP-250型全温振荡培养箱:上海新诺仪器设备有限公司产品;BOXUN超净台:上海优浦科学仪器有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 地木耳多糖样品的制备

称取100g干燥的粉碎过筛的地木耳粉末,用800mL体积分数80%乙醇浸泡24h去脂^[4],用双层纱布过滤。滤渣风干后用60倍蒸馏水90℃水浴浸提5次,每次3h,合并提取液,旋转蒸发浓缩,用Sevag法^[7]多次脱蛋白至蛋白质除尽为止,透析,旋转蒸发浓缩,加入95%乙醇使醇体积分数达到70%,于4℃冰箱中醇沉过夜,离心,沉淀物依次用无水乙醇,丙酮和石油醚洗涤,在烘箱中60℃干燥得白色的地木耳精制多糖,备用。

1.3.2 地木耳多糖抗氧化性能力实验

1) 清除DPPH自由基能力的测定 精确配制浓度为5mmol/L的DPPH·乙醇溶液,将地木耳用蒸馏水溶解,配制成50、100、200、500、1000μg/mL等一系列溶液,精确吸取样品溶液3mL,加入5mL5mmol/L的DPPH·乙醇溶液,混匀后在室温下静置30min,以5mL无水乙醇和3mL蒸馏水的混合液为参比,测定517nm处的吸光值^[8]。然后按下式计算DPPH自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$$

式中: A_0 为空白对照液的吸光度(以蒸馏水代替样品液); A_i 为样品组的吸光度; A_j 为样品溶液本身的吸光度(以无水乙醇代替显色剂)。

2) 清除·OH能力的测定 利用Fenton反应法产生·OH,·OH氧化水杨酸产生有色物质,该产物在510nm处有强吸收峰。体系中加入清除·OH的物质,则会减少有色物质生成,降低吸光度^[9]。具体操作为:取若干支25mL的比色管,加入9.0mmol/L FeSO₄ 0.25mL、9.0mmol/L水杨酸-乙醇溶液0.25mL,不同质量浓度(同1)中的质量浓度梯度)的地木耳多糖溶液5mL,最后加入8.8mmol/L H₂O₂ 0.25mL启动反应,于室温下反应1h。加5mL蒸馏水稀释反应体系,在517nm处测定样品的吸光度A。按1)节计算方法计算清除率。

3) 清除O₂⁻·自由基能力的测定 采用邻苯三酚氧化法^[10]。具体操作为:在10mL试管中加入3mL Tris-HCl缓冲液(pH值8.2),1mL不同浓度(同1)中的浓度梯度)的地木耳多糖溶液,(25±0.5)℃水浴平衡20min后,加入0.3mL 7.0mmol/L的邻苯三酚准确反应4min,加入1mL 10.0mol/L HCl终止反应,在420nm处测定其吸光度A,按1)节计算方法计算清除率。

4) 清除亚硝酸盐能力的测定 当加入地木耳多糖溶液时,地木耳多糖中有效成分与NaNO₂作用将NaNO₂消耗掉,剩余亚硝酸根在酸性条件下,能

使对氨基苯磺酸重氮化,再使其与盐酸 α -萘胺偶合生成红色偶联化合物,测定溶液吸光度,计算亚硝酸盐清除率。

取不同质量浓度(同1.3.1中1)节中的质量浓度梯度)的地木耳多糖溶液10 mL于25 mL容量瓶,加入质量分数0.01%的 NaNO_2 标准溶液0.25 mL,加入柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH值3.0)5 mL,加蒸馏水定容至刻度,37℃下反应1 h。取1 mL反应液于试管中,加入质量分数0.4%的对氨基苯磺酸溶液2 mL,质量分数0.2%盐酸 α -萘胺1 mL,摇匀放置15 min后,用分光光度计在544 nm处测吸光度值,按下式计算清除率求得多糖溶液对亚硝酸盐的清除能力^[11]。

$$\text{清除率}/\% = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 为未加多糖溶液的空白试验(以蒸馏水代替)的吸光度; A 为不同浓度反应液的吸光度。

1.3.3 地木耳多糖抑菌实验

1) 培养基的制备 细菌培养基:牛肉膏3 g、蛋白胨10 g、NaCl 5 g、琼脂15~20 g、水1 000 mL, pH 7.0~7.2。

2) 供试菌种的活化及菌悬液的制备 预先将3种供试菌种接入相对应的斜面培养基上进行活化,细菌置37℃恒温培养箱中培养24 h。然后分别挑取1环已活化好的菌种放入9 mL无菌水中,振荡摇匀,制成一系列菌悬液,菌浓度约为 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL,备用。

3) 抑菌活性的测定 采用滤纸片法^[12]。新华滤纸用打孔器制备直径为9 mm的小纸片,120℃干热灭菌2 h。精制的多糖、青霉素用蒸馏水配制成500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,在试验前经针孔过滤器(0.22 μm)除菌,采用二倍稀释法^[13],用无菌水配制成不同质量浓度的溶液,依次为500、250、125、62.5、31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将制备好的滤纸片无菌状态下于上述各溶液中分别浸泡30 min,备用。同法以无菌水作阴性对照。

倒入各种菌种的固体培养基,待其完全冷却凝固后,再分别移取各菌悬液0.4 mL,用涂布器涂布均匀。每个平板放4个实验样片,1片阴性对照样片,用无菌镊子取样片贴放于平板表面。各样片中心之间相距25 mm以上,与平板的周缘相距15 mm以上。贴放好后,用无菌镊子轻压样片,使其紧贴于平板表面。盖好平皿,置37℃温箱,培养过夜。

4) 最低抑菌浓度(MIC)的测定 向平皿中分别移取不同浓度的稀释液各1.0 mL,然后每平皿中倒入各种菌种相应的温度在45℃左右的培养基

约14 mL,混匀,完全冷却凝固后,每皿分别移取各菌悬液0.4 mL,涂布均匀,同时做溶剂空白对照。在适宜温度下培养,每个质量浓度作3个重复。以完全无菌生长的浓度为最小抑制质量浓度。

2 结果与分析

2.1 抗氧化实验结果

2.1.1 地木耳多糖对DPPH自由基清除作用的测定 清除DPPH自由基的能力可以用来衡量天然抗氧化剂的抗氧化活性。自由基清除剂对DPPH自由基的清除程度与其所接受的电子数成定量关系,也就是说和抗氧化剂的供氢能力有关^[14]。

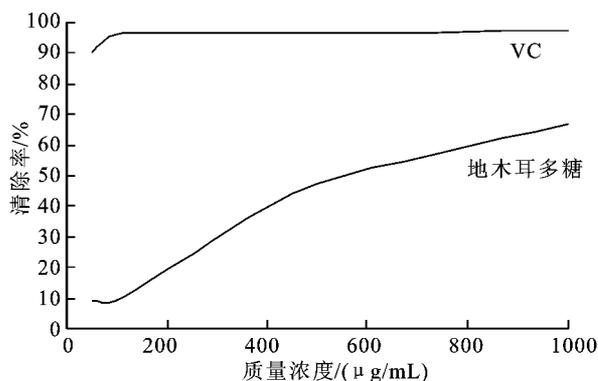


图1 地木耳多糖和VC对DPPH自由基清除作用的比较

Fig. 1 Comparison of DPPH radical scavenging capacity of *Nostoc commune vach* polysaccharide and VC

图1结果表明,VC对DPPH自由基有很强的清除作用,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的VC清除率即可达到90%以上。在实验质量浓度范围内,地木耳多糖对DPPH自由基的清除率随其质量浓度的增加而提高。质量浓度0~0.4 mg/mL范围内,地木耳多糖对DPPH自由基的清除率迅速提高,在0.4~1 mg/mL范围内清除率呈现平稳提升的趋势,最高可达66.35%。

2.1.2 地木耳多糖对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用的测定

$\cdot\text{OH}$ 被认为是活性最强的自由基,也是毒性最大的自由基,辐射损伤等物理、化学因子都会促进其形成,是造成生物有机体过氧化损伤的主要因素。有研究表明, $\cdot\text{OH}$ 是通过 H_2O_2 与金属离子氧化还原反应产生的,因此可以通过螯合金属离子或使金属离子无反应来清除 $\cdot\text{OH}$ ^[15]。VC为已知的 $\cdot\text{OH}$ 清除剂,因此以VC为对照品和地木耳多糖进行比较,结果见图2。由图2可知,在实验质量浓度范围内,地木耳多糖与对照品VC对 $\cdot\text{OH}$ 都有较

强的清除作用,清除率随着二者的质量浓度增加而提高。研究结果还表明,质量浓度 0~0.2 mg/mL 范围内,地木耳多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用急剧上升;质量浓度 0.2~1 mg/mL 范围内,地木耳多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用随质量浓度的增加缓慢提高;最高达到 71.53%。

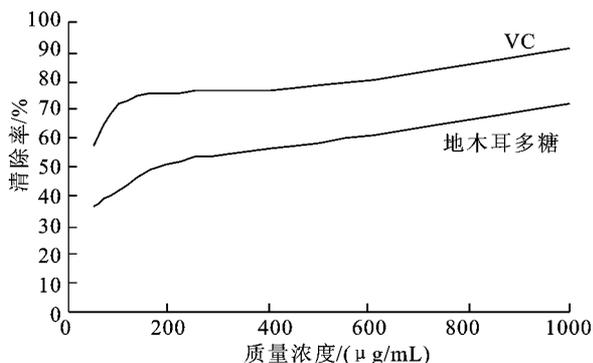


图 2 地木耳多糖和 VC 对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用的比较

Fig. 2 Comparison of hydroxyl radical scavenging capacity between *Nostoc commune vach* polysaccharide and VC

2.1.3 地木耳多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力测定

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 是生物体内第一个氧自由基,是其他活性氧的前体,对生物体内细胞、酶、DNA 及不饱和脂肪酸等物质均能产生影响。生物体内氧化还原反应中,大约有 2%~5% 的氧会产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 是活性氧的一种,是机体内寿命最长的自由基,通常作为自由基链式反应的引发剂,产生活性更强的 H \cdot 自由基,进一步给机体造成危害^[16]。以 VC 为对照品,比较二者对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用。以清除率和质量浓度为横纵坐标作图,结果见图 3。

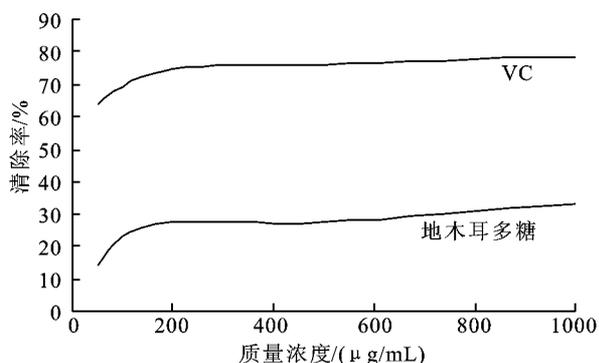


图 3 地木耳多糖和 VC 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除作用的比较

Fig. 3 Comparison of superoxide anion radical scavenging capacity of *Nostoc commune vach* polysaccharide and VC

由图 3 可知,在实验浓度范围内,对照品 VC 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有较强的清除作用,而地木耳多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用较差,最高才达到 33.33%。

2.1.4 地木耳多糖对亚硝酸盐清除能力的测定

亚硝酸盐与仲胺在人体中易合成强致癌物质亚硝胺,而且亚硝酸盐是一种允许在肉制品加工中使用的食品添加剂,采取有效途径清除亚硝酸盐对预防癌症具有重要意义。以 VC 为对照品,比较二者对亚硝酸盐的清除作用。以清除率和质量浓度为横纵坐标作图,结果见图 4。

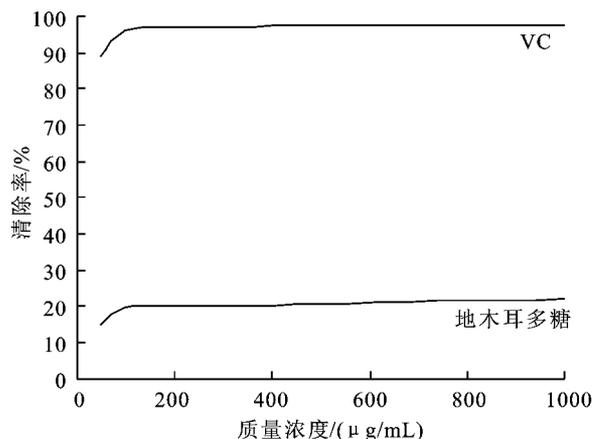


图 4 地木耳多糖和 VC 清除亚硝酸能力的对比

Fig. 4 Comparison of nitrite scavenging capacity of *Nostoc commune vach* polysaccharide and VC

由图 4 可知,在实验浓度范围内,对照品 VC 对亚硝酸盐有较强的清除作用,而地木耳多糖对亚硝酸盐的清除作用很不明显,最高只达到 22.38%。

2.2 地木耳多糖的抑菌实验

地木耳多糖对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌均有一定的抑制效果,且作用相当,但是都不如阳性对照品阿莫西林的抑菌效果强;随着多糖质量浓度的增大,抑制作用增强;最小抑制浓度 MIC 在 125~259 μg/mL 之间见表 1、2。地木耳对金黄色葡萄球菌的抑制作用不明显,由此可见在试验的 3 种微生物中地木耳多糖对微生物的抑制作用具有选择性。

3 结 语

多糖在生物体内发挥作用更为复杂,它可能直接参与猝灭自由基的途径外,还可能与通过调节机体内内源性抗氧化剂的活性相关^[17]。地木耳多糖对 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH 自由基有较强的清除作用,清除率随其质量浓度的增加而提高,且清除率最高可达 71.53% 和 66.35%。但是地木耳多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和亚硝酸的清除能力有限,最高清除率分别只有 33.33% 和 22.38%。通过实验结果表明地木耳多糖具有一定的体外抗氧化作用,因此地木耳多糖在体内抗氧化作用还需进一步的研究。

表1 菌落生长情况

Tab. 1 Growth situation of different microorganisms in the presence of *Nostoc commune* vach polysaccharides

供试菌种	地木耳多糖质量浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)					阿莫西林
	500	250	125	62.5	31.25	
大肠杆菌	—	—	+++	++++	++++	—
金黄色葡萄球菌	+	++++	++++	++++	++++	—
芽孢杆菌	—	—	++	++++	++++	—

注：“—”无菌生长；“+”有少量菌落生长；“++”有不超过 1/3 平皿面积的菌落生长；“+++”有不超过 1/2 平皿面积的菌落生长；“++++”有超过 1/2 平皿面积的菌落生长。

表2 地木耳多糖对各菌种的抑菌圈直径

Tab. 2 Inhibitory zone diameters of *Nostoc commune* vach polysaccharides against different microorganism

供试菌种	地木耳多糖质量浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)					阿莫西林	无菌水
	500	250	125	62.5	31.25		
大肠杆菌	10.71	10.35	10.14	9.63	9.35	12.72	9.00
金黄色葡萄球菌	9.55	—	—	—	—	12.65	9.03
芽孢杆菌	10.62	10.58	10.42	9.64	—	12.82	9.01

注：表2数据为3次重复实验的平均值；—为无抑菌现象。

多糖对各类微生物的生长有不同程度的抑制作用，或者说生长拮抗。但多糖抑菌作用的机制还不十分明确。实验表明，地木耳多糖的抑菌作用还是相对较弱的。对常见的细菌有一定的抑制作用，对同一菌株而言，抑菌效果随多糖质量浓度的增大

而显著。地木耳多糖对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的最小抑制浓度 MIC 在 125~259 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。由于菌种所限，实验仅对常见的3种菌进行了抑菌实验，因此地木耳多糖对其他微生物生长的抑制作用还有待研究。

参考文献(References):

- [1] 朱浩然. 中国淡水藻志(第九卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 253.
- [2] Potts M, Whitton B A. The ecology of cyanobacteria[M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. 465—504.
- [3] 范群艳, 吴向阳, 仰榴青, 等. 地木耳的研究进展[J]. 常熟理工学院学报, 2007, 21(4): 55—59.
FAN Qun-yan, WU Xiang-yang, YANG Liu-qing, et al. Research progress of *Nostoc commune* vach[J]. *Journal of Changshu Institute of Technology*, 2007, 21(4): 55—59. (in Chinese)
- [4] 盛家荣, 翟春, 陈超球. 普通念珠藻多糖的研究[J]. 精细化工, 2001, 18(10): 617—619.
SHENG Jia-rong, ZHAI Chun, CHEN Chao-qiu. Study of polysaccharide of *Nostoc commune*[J]. *Fine Chemicals*, 2001, 18(10): 617—619. (in Chinese)
- [5] 盛家荣, 覃志英, 陈超球. 普通念珠藻中水提、碱提多糖的分离、分析及活性研究[J]. 哈尔滨师范大学: 自然科学学报, 2001, 17(2): 80—84.
SHENG Jia-rong, QIN Zhi-ying, CHEN Chao-qiu. Isolation, characterization and biological activities of polysaccharides from *Nostoc Commune* by water and bas[J]. *Natural Sciences Journal of Harbin Normal University*, 2001, 17(2): 80—84. (in Chinese)
- [6] 范会钦. 从普通念珠藻中提取的植物生长促进剂[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 1991, 9(2): 56—59.
FAN Hui-qian. The extraction of plant-growth-accelerator from *Nostoc commune*[J]. *Journal of Guangxi Normal University*, 1991, 9(2): 56—59. (in Chinese)
- [7] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [8] 梁云. 几种天然抗氧化剂抗氧化性能比较研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [9] 王永宁, 石玉平, 郭珍. 沙枣花中黄酮类化合物对羟基自由基的清除研究[J]. 青海医学院学报, 2003, 24(4): 281—

283.

WANG Yong-ning, SHI Yu-ping, GUO Zhen. Studies on the hydroxyl-group free radical eliminated by flavonoids of *elaegnus angustifolia* flower[J]. **Journal of Qinghai Medical College**, 2003, 24 (4):281-283. (in Chinese)

- [10] 吴雪辉,张喜梅,李廷群,等. 板栗花粗提物的抗氧化活性研究[J]. **现代食品科技**,2008,24 (1) :14-19.
WU Xue-hui, ZHANG Xi-mei, LI Tingqun. Study on antioxidant activity of crude extract from chestnut flower[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2008,24 (1) :14-19. (in Chinese)
- [11] 冯翠萍,洪建华,张弋凡. 果汁对亚硝酸盐清除作用的研究[J]. **山西农业大学学报**,2009,29 (3):261-264.
FENG Cui-ping, HONG Jian-hua, ZHANG Yi-fan. Scavenging activity of fruit juice on sodium nitrite[J]. **Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition)**, 2009, 29 (3): 261-264. (in Chinese)
- [12] 卫生部卫生执法与监督司. 消毒技术规范[M]. 北京:中华人民共和国卫生部,2002:83-93.
- [13] 谷肆静,王立娟. 蒲公英总黄酮的提取及其抑菌性能[J]**东北林业大学学报**,2007,35(5):43-45.
GU Yi-jing, WANG Li-juan. Extraction of total flavonoids from *taraxacum mongolicum* and its bacteriostatic performance [J]. **Journal of Northeast Forestry University**,2007, 35(5):43-45. (in Chinese)
- [14] RICE-TVANTS C, MILLER N J, PAGANGA G. Antioxidant properties of phenolic compounds [J]. **Trends in Plant Science**, 1997, 2: 152-159.
- [15] MILLER N J, SAMPSON J, CANDELASI P, et al. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls[J]. **FEBS Letters**, 1996, 384:240-242.
- [16] 吴雪辉,黄永芳,高强,等. 肉桂精油的抗氧化作用研究[J]. **食品科技**,2007,4:85-88.
WU Xue-hui, HUANG Yong-fang, GAO Qiang. Study on the antioxidant activities of cinnamon essence oil[J]. **Food Science and Technology**, 2007, 4): 85-88. (in Chinese)
- [17] 曾凯宏,明建,曾凯芳. 真菌多糖的结构与功能[J]. **食品科技**,2001,4:66-68.
ZENG Kai-hong, MING Jian, ZENG Kai-fang. The structure and function of fungi polysaccharide[J]. **Food Science and Technology**, 2001,4: 66-68. (in Chinese)