

Study on the Extraction and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Maize Straw

Fenling Li, Hanquan Cai, Xiuping Chen

Hanshan Normal University, Chaozhou Guangdong
Email: lfi8832@126.com

Received: Feb. 17th, 2015; accepted: Feb. 28th, 2015; published: Mar. 5th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Optimum ultrasonic-assisted extraction technology of polysaccharides from maize straw and antioxidant activity of the extract were studied. According to orthogonal design, the optimum conditions for the extraction of polysaccharides were as follows: solid-solvent ratio of 1:50, ultrasonic temperature of 50°C, ultrasonic power of 250 W, and ultrasonic time of 15 min. The fact that maize straw polysaccharides exhibited strong scavenging effects against $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ and excellent reducing power demonstrates good *in-vitro* antioxidant activity of maize straw polysaccharides.

Keywords

Maize Straw, Polysaccharide, Ultrasonic-Assisted Extraction Technology, Antioxidant Activity

玉米秆多糖的提取及抗氧化性研究

李粉玲, 蔡汉权, 陈秀萍

韩山师范学院, 广东 潮州
Email: lfi8832@126.com

收稿日期: 2015年2月17日; 录用日期: 2015年2月28日; 发布日期: 2015年3月5日

摘要

研究了超声波辅助提取玉米秆多糖的最佳工艺及其抗氧化性。结果表明,超声波辅助提取玉米秆多糖的最佳提取工艺参数为:料液比1:50、超声波温度50℃、超声波功率250 W、超声波时间15 min。玉米秆多糖对·OH和 $O_2^{\cdot-}$ 清除作用明显,具有较好的还原力,表明玉米秆多糖具有较好的抗氧化活性。

关键词

玉米秆, 多糖, 超声波辅助法, 抗氧化性

1. 引言

玉米(*Zea mays*)是我国的主要农作物之一,玉米多糖具有减肥降脂[1]、抗辐射、抗肿瘤[2]、增强免疫、降血糖等广泛的生物学活性,目前对于玉米多糖的研究多集中于玉米皮[3]、玉米须[4]、玉米花粉[5]中多糖的提取。我国玉米种植面积和产量均居世界前列,每年产生的玉米茎秆可达上亿吨。玉米茎秆中含有丰富的多聚糖,当前对玉米茎秆多糖提取工艺的研究还较少。本文就玉米秆多糖的分离纯化工艺进行研究,寻找最适合的分离纯化工艺,为回收利用玉米秆等废物资源,提高玉米秆深加工的开发利用提供实验依据。

本试验采用的是超声波辅助提取法,超声波辅助提取法是应用超声波强化提取植物中的有效成分,是一种物理破碎过程。浸提过程中无化学反应,被浸提的化学成分结构和性质不会发生变化,具有提取时间短、提取率高、低能耗等优点,可极大地提高提取效率[6]。而且超声波辅助提取并不影响水溶性多糖的生物活性[7]。因此,超声辅助提取法是一种高效实用的多糖提取方法。但当超声时间和超声温度超过一定范围时也可能导致生物大分子在上述作用和超声波为自由基的氧化还原反应提供能量的情况下发生降解[8]。因此寻找合适的超声波辅助提取多糖的工艺条件显得尤为重要。

本实验采用苯酚-硫酸法测定多糖的含量,苯酚-硫酸法简单、快速、灵敏、重现性好,且生成的颜色持久。用苯酚-硫酸法测定多糖含量时需注意苯酚浓度不宜太高[9][10],这样反应的稳定性不好且易产生操作误差。本次采用5%浓度的苯酚与很多文献报道相符,测定结果较为理想。

自由基是指能独立存在的,含有一个或一个以上不配对电子的任何原子或原子团。只有少数的自由基由于一些空间效应和共振效应化学反应活性很低,绝大多数的自由基由于不配对电子而很不稳定,具有很高的化学反应活性。若反应中产生的不配对电子位于氧,则称为氧自由基,氧自由基是一类与医学关系最为密切的自由基[11]。

自由基主要包括:超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基(·OH)、单线态氧(O_2^1)、过氧化氢(H_2O_2)、脂质自由基($LO\cdot$, $LOO\cdot$, $LOOH$)、氮氧自由基等。其中羟自由基(·OH)是目前所报道的活性氧对生物体毒性最大、危害最大的自由基,它可以通过多种方式与细胞里的生命物质作用引起细胞坏死或突变,生物体内经自由基的研究是现代生物学、生物化学、生物医学的重要课题[12]-[14]。

2. 材料与amp;方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 原料

收获玉米后的玉米秆,烘干粉碎后备用。

2.1.2. 试剂

葡萄糖, 碳酸氢钠, 苯酚, 浓硫酸, 浓盐酸, 双氧水, 焦性没食子酸, 氯化铁, 三羟甲基氨基甲烷, 铁氰化钾, 水杨酸, 硫酸亚铁, 石油醚, 无水乙醇等。

2.2. 实验方法

2.2.1. 玉米秆的多糖提取工艺流程

(1) 玉米秆的预处理

将玉米秆于电热鼓风干燥箱内以 70℃ 左右烘干, 经粉碎机粉碎后, 过 40 目筛得到玉米秆样品粉末。称取粉碎后的玉米秆样品 5.00 g 于索氏提取器中用石油醚(60℃~90℃)回流脱脂两次, 再用无水乙醇回流脱脂两次。1 h/次, 每次试剂用量为 60 mL, 脱脂后烘干[15]。将脱脂烘干后的玉米秆样品粉末进行称重, 计算提取率为 50%。

(2) 玉米秆多糖的提取

采用超声波辅助提取玉米秆多糖, 根据试验设计, 准确称取 1.00 g 处理后的玉米秆样品(平行 2 份)放入碘量瓶中, 按一定比例加入蒸馏水(料液比), 在合适温度(浸提温度)和合适功率(超声波功率)下超声波浸提数小时(浸提时间), 浸提结束后趁热减压抽滤, 收集滤液。

相同条件下, 再将滤渣洗入三角瓶中二次浸提, 浸提数次(浸提次数)后, 合并滤液, 减压浓缩至 2~3 mL。

滤液加 4 倍量 95% 乙醇, 充分搅拌后, 在低温(4 摄氏度)静置过夜。冷冻后, 在 3000 r/min 下, 离心 20 min, 收集沉淀。沉淀物用无水乙醇洗涤两次, 并真空干燥至恒重, 得到的沉淀即为粗多糖。

2.2.2. 多糖含量测定方法的建立

(1) 葡萄糖标准溶液的配制[16]

精确称取葡萄糖标准品 0.1049 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 加去离子水溶解后稀释至刻度, 配成浓度为 1.049 mg/mL 标准葡萄糖溶液备用, 在使用前稀释至葡萄糖浓度为 0.1049 mg/mL。

(2) 5% 苯酚溶液的制备[10]

取苯酚 100 g, 加铝片 0.1 g, 碳酸氢钠 0.05 g, 蒸馏收集 182℃ 馏分, 称取此馏分 7.5 g, 加去离子水定容至 150 mL 混匀, 置棕色瓶中放冰箱备用。

(3) 标准曲线的制备[16]

吸取葡萄糖标准溶液(0.1049 mg/mL) 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL, 分别置于具塞试管中。各加去离子水使体积为 2.0 mL, 再加 5% 苯酚溶液 1.0 mL 摇匀, 迅速滴加浓硫酸 5.0 mL, 摇匀后放置 5 min, 置沸水浴加热 15 min, 取出冷却至室温; 以去离子水为空白, 于 490 nm 处测吸光度(图 1)。根据所得吸光度和相应葡萄糖浓度得标准曲线回归方程。

以葡萄糖标准溶液系列浓度(C)为横坐标, 对应吸光度(A)为纵坐标作图, 结果如图 1。所得回归方程为 $A = 12.727X + 0.1449$, 相关系数 $R^2 = 0.9973$ 。式中 X 为葡萄糖溶液的浓度(mg/mL), A 为吸光度。

(4) 玉米秆多糖含量测定

取玉米秆多糖浸提液溶于适量去离子水中, 转移到 100 mL 容量瓶中, 定容。精密吸取上述溶液 1.0 mL, 按“标准曲线制作”项下操作, 测定吸光度, 根据回归方程求出含量。

计算公式:

$$\text{提取液多糖含量(mg)} = c \times V$$

$$\text{多糖含量(mg/g)} = \frac{V \times c}{W}$$

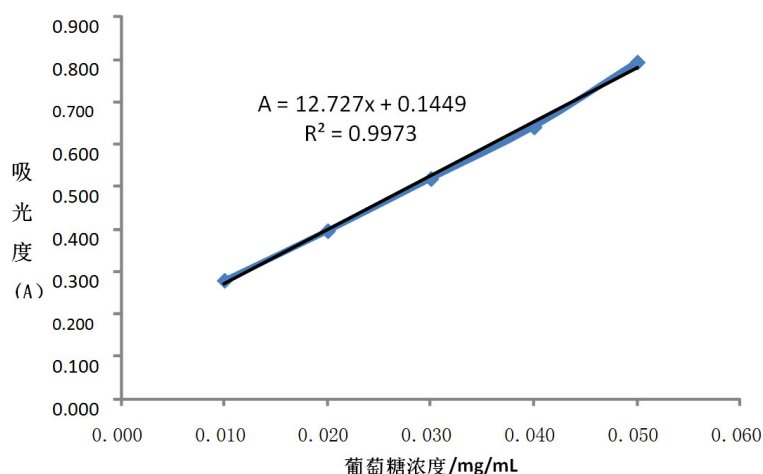


Figure 1. Glucose standard curve

图 1. 葡萄糖标准曲线

式中 c 为标准曲线上查得的葡萄糖浓度(mg/g), V 为玉米秆多糖溶液稀释后的总体积(mL), W 为提取多糖时称取的玉米秆重量(g)

2.2.3. 多糖抗氧化性的研究[16]-[19]

(1) 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力的测定

准确地将玉米秆多糖配成 1.0 mg/mL, 用蒸馏水将该溶液稀释成 7 种浓度: 0.1 mg/mL、0.15 mg/mL、0.2 mg/mL、0.25 mg/mL、0.3 mg/mL、0.34 mg/mL、0.4 mg/mL。利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生 $\cdot\text{OH}$, 在体系内加入水杨酸捕捉 $\cdot\text{OH}$ 并产生有色物质, 该物质在波长 510 nm 处有吸收。如果在反应体系中加入有清除羟自由基能力的物质, 与水杨酸竞争羟自由基, 使有色物质生成量减少。反应体系中含有 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL、9 mmol/L FeSO_4 1 mL、9 mmol/L 水杨酸 - 乙醇 1 mL、不同浓度的多糖溶液 1 mL。最后加 H_2O_2 启动反应, 以蒸馏水作为参比, 在波长 510 nm 处测定各浓度的吸光度值。以 9 mmol/L FeSO_4 1 mL、9 mmol/L 水杨酸 - 乙醇 1 mL、不同浓度的多糖溶液 1 mL 和 1 mL 蒸馏水作为多糖的本底吸收值每个浓度重复 3 次, 取吸光度值的平均值。自由基清除率的计算公式为:

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x_0})}{A_0} \times 100\%$$

式中: A_0 为空白对照液吸光度值, 只加入硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、过氧化氢, 不加入玉米秆多糖溶液的吸光度值; A_x 为加入硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、过氧化氢、玉米秆多糖的吸光度值; A_{x_0} 为加入硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、玉米秆多糖溶液, 不加过氧化氢引发反应的吸光度值。

(2) 超氧阴离子自由基($\text{O}_2\cdot^-$)清除能力的测定

将 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.2) 4.5 mL 与 4.2 mL 蒸馏水混匀, 于 25°C 水浴中保持 20 min 后立即加入 5 mmol/L 邻苯三酚(25°C 预热) 0.3 mL, 混匀, 在 4 min 内, 每隔 30 s 测定 OD325, 计算邻苯三酚溶液的吸光值随时间的变化率。将 1.0 mL 不同浓度的玉米秆多糖与 3.2 mL 蒸馏水混匀, 按上述步骤和条件测定添加样品的邻苯三酚溶液在 325 nm 处吸光值, 计算其吸光值(A_x)。超氧阴离子自由基清除率的计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\%$$

其中 A_0 为空白的平均吸光值, A_x 为试样的平均吸光值。

(3) 还原能力测定

取一定浓度的多糖样品溶液 1 mL 加入 pH 6.6 的磷酸缓冲溶液和 1% $K_3Fe(CN)_6$ 溶液各 2.5 mL 并混合均匀, 混合液在 50℃ 下保温 20 min 之后加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液, 吸取此溶液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% $FeCl_3$, 混合均匀, 30 min 后于 700 nm 波长处测定吸光度。

3. 结果与分析

3.1. 正交实验设计

影响超声波辅助提取法的主要因素有超声波功率、超声波时间、超声波温度、浸提次数、料液比等因素, 通过单因素试验结果分析得出: 浸提次数虽然会对多糖含量有所影响, 随着浸提次数的增加, 多糖含量增大, 但考虑到回收转移较困难, 加之浓缩的成本较高, 操作时间过久, 所以在单因素试验的基础上, 选择超声波功率、料液比、超声波温度、超声波时间这四个因素作为考察对象, 并结合生产实际, 每因素又选取三个水平见表 1, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 以多糖含量为指标, 优选最佳工艺。

从表 2 可看出, 9 号试验结果最好。由极差 R 分析可知, 多糖提取条件因素的主次顺序为 $B > A > D > C$, 即料液比 $>$ 超声波温度 $>$ 超声波时间 $>$ 超声波功率。根据最优水平确定最佳的超声波萃取玉米秆水溶性多糖工艺为 $A_3B_2C_1D_1$, 即超声波温度 50℃、料液比 1:50、超声波功率 250 W、超声波时间 15 min。由于该组合未出现在试验中, 需要测定该条件下玉米秆多糖的提取率, 经测定, 玉米秆在该条件下的提取量达到 7.841 mg/g, 高于正交试验中出现的最高提取率, 说明正交试验确定的最佳超声波萃取条件是合理的。

Table 1. Factors and levels of orthogonal test
表 1. 正交设计因素水平

水平	A 超声波温度(℃)	B 料液比(g/mL)	C 超声波功率(W)	D 超声波时间(min)
1	30	1:40	250	15
2	40	1:50	300	20
3	50	1:60	350	25

Table 2. $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design and test results
表 2. $L_9(3^4)$ 正交试验设计及试验结果

因素	温度(℃)	料液比(g/ml)	功率(w)	时间(min)	多糖含量(mg/g)
实验1	1	1	1	1	4.506
实验2	1	2	2	2	4.680
实验3	1	3	3	3	3.685
实验4	2	1	2	3	2.151
实验5	2	2	3	1	2.111
实验6	2	3	1	2	2.687
实验7	3	1	3	2	4.090
实验8	3	2	1	3	7.529
实验9	3	3	2	1	7.649
K 1	4.290	3.582	4.907	4.755	
K 2	2.316	4.773	4.827	3.819	
K 3	6.423	4.674	3.295	4.455	
极差	4.107	1.191	1.612	0.936	
最优条件	A3	B2	C1	D1	

3.2. 抗氧化性的测定结果

3.2.1. 玉米秆多糖清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力

羟自由基是已知的最强的氧化剂，反应性极强，寿命极短，它几乎可以和所有细胞成分发生反应，对机体危害极大[1]。由图 2 可以看出，玉米秆多糖具有十分强的清除能力，并且随着多糖浓度的增加，清除效果增强。

3.2.2. 玉米秆多糖清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的能力

由图 3 可以看出玉米秆多糖清除超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的能力基本上随着浓度的增加而增强。而与图 1 相比较，玉米秆多糖清除超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的能力比清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力较弱，邻苯三酚在碱性条件下能迅速自动氧化，生产一系列有强光吸收的中间产物，同时释放出 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，与多糖清除 $\cdot\text{OH}$ 不同，多糖只能通过活性羟基提供的氢与活泼的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应生成稳定的化合物水而起到清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的作用，不能从根本上抑制 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生。

3.2.3. 还原能力的测定结果

具有还原力的物质是通过提供氢原子来破坏自由基反应链，从而达到抗氧化的目的。根据 1.2.3 (3) 的测定方法，在波长 700 nm 处测定的吸光度越大，则表明样品的还原能力越强。由图 4 可以看出在 0.1 到 0.3 mg/mL 的范围内玉米秆多糖的还原能力并不强，并且随着多糖浓度的增加，其还原能力逐步增强。

4. 结论

以水作为浸提剂，采用超声波萃取玉米秆中可溶性多糖具有安全快速的特点。本实验从玉米秆中提取玉米秆多糖，并确定了玉米秆多糖的最优提取工艺条件。研究结果表明，影响玉米秆多糖提取的主要因素分别是超声波温度、超声波时间、超声波功率、料液比，其主要次序为：料液比 > 超声波温度 > 超声波时间 > 超声波功率。超声波萃取玉米秆多糖的最佳条件为：超声波温度 70℃、料液比 1:50、超声波功率 250 W、超声波时间 15 min。在这组工艺条件下，玉米秆多糖的提取量高达每 1 g 玉米秆样品可得多糖 7.841 mg。

玉米秆多糖的抗氧化实验结果表明，玉米秆多糖对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除作用明显，具有较好的还原力，

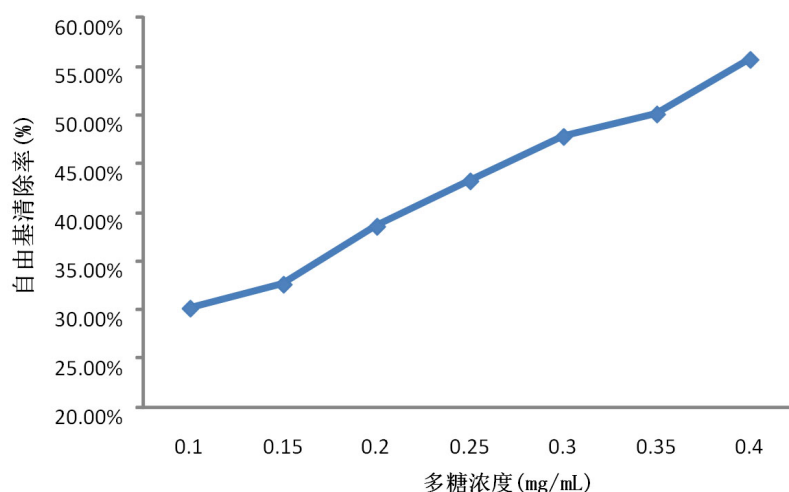


Figure 2. The impact of different polysaccharide concentration on hydroxyl radical $\cdot\text{OH}$ clearance rate

图 2. 不同多糖浓度对羟自由基清除率的影响

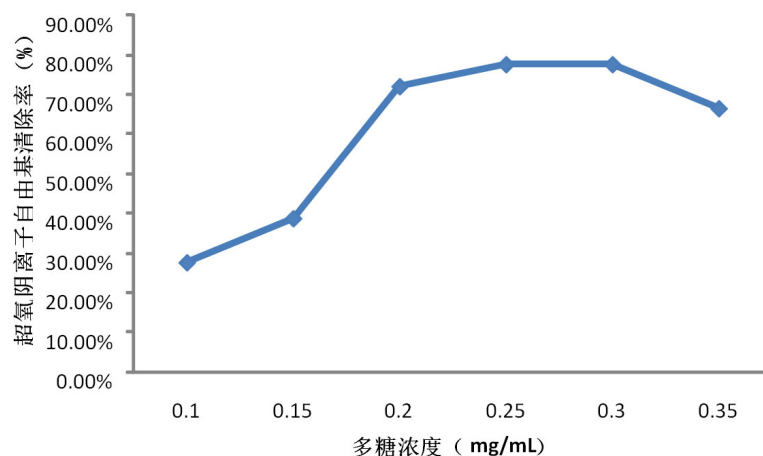


Figure 3. Different polysaccharide concentration on superoxide anion radical scavenging effects

图 3. 不同多糖浓度对超氧自由基清除率的影响

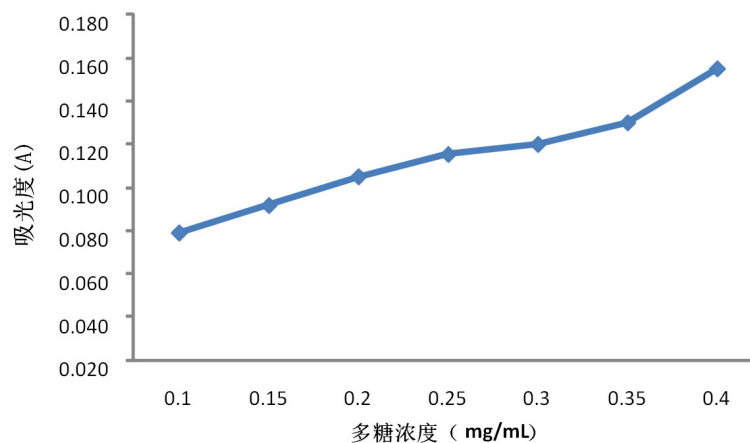


Figure 4. Different polysaccharide concentration on superoxide anion radical scavenging effects

图 4. 不同多糖浓度对超氧自由基清除率的影响

表明玉米秆多糖具有较好的抗氧化活性，但是目前对于其抗氧化性能的研究还停留在表面阶段，有待进一步的深入研究，为玉米秆的开发利用和产业化发展提供技术支持。

参考文献 (References)

- [1] 张艳荣, 刘亭亭, 王大为 (2006) 玉米活性多糖减肥降脂作用的研究. *食品科学*, **5**, 227-230.
- [2] 郑鸿雁, 闵伟红, 昌友权 (2004) 玉米须多糖调节免疫功能研究. *食品科学*, **10**, 291-293.
- [3] 卢菲, 李波, 李春阳, 等 (2008) 玉米皮多糖的制备方法及其活性研究. *安徽农业科学*, **2**, 162-165.
- [4] 周鸿立, 张艳, 金海甲, 等 (2009) 玉米须多糖药理作用及提取纯化研究进展. *吉林化工学院学报*, **1**, 23-26.
- [5] 何余堂, 孟良玉, 赵大军, 等 (2005) 玉米花粉活性多糖的分离提取研究. *食品科学*, **2**, 22-25.
- [6] 李小平 (2004) 红枣多糖提取工艺研究及其生物功能初探. 硕士论文, 陕西师范大学, 西安.
- [7] 龚钢明, 王化田, 韩娜 (2005) 超声波法提取红景天多糖. *食品科学*, **10**, 127-130.
- [8] 李坚斌, 李琳, 李斌, 等 (2006) 超声降解多糖研究进展. *食品工业科技*, **9**, 181-184.
- [9] 董群 (1996) 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究. *中国药理学杂志*, **9**, 550.

- [10] 勾建刚, 刘春红 (2007) 白茅根多糖超声提取的优化. *时珍国医国药*, **11**, 2749-2750.
- [11] 杨联河 (2005) 桑椹多糖的提取与抗衰老作用研究. 硕士论文, 郑州大学, 郑州.
- [12] 阳佛送 (2008) 龙眼多糖的提取、纯化、结构和抗氧化活性研究. 硕士论文, 广西医科大学, 广西.
- [13] Volpi, N. and Tarugi, P. (1999) Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu^{2+} -mediated oxidation of human low-density lipoproteins: Effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate. *Journal of Biochemistry*, **125**, 297-304.
- [14] 张静丽, 王宏勋, 张雯, 张晓昱 (2004) 灵芝、枸杞多糖复合抗氧化作用. *食品与机械*, **6**, 11-12.
- [15] 张桂, 赵国群 (2005) 超声波萃取植物多糖的研究. *食品科学*, **9**, 302-305.
- [16] 宋茹, 韦荣编 (2008) 微波法萃取柑桔皮多糖的研究. *粮油食品科技*, **2**, 24-26.
- [17] 姚以才, 李超, 耿中华 (2011) 芦根多糖的抗氧化活性研究. *食品工程*, **9**, 129-132.
- [18] 李颖, 李庆典 (2010) 桑葚多糖抗氧化作用的研究. *中国酿造*, **4**, 59-61.
- [19] 陈莲, 林河通, 郭巧玲, 陈艺晖, 林艺芬 (2010) 台湾青枣多糖抗氧化活性的研究. *热带作物学报*, **5**, 863-866.