泡叶藻及海带藻渣中岩藻聚糖硫酸酯的提取及其抗氧化活性

刘 旭^{1,2}, 曲桂燕^{2,3}, 周裔彬¹, 袁 毅², 韩丽君²

(1. 安徽农业大学,安徽 合肥 230036; 2. 中国科学院 海洋研究所,山东 青岛 266071; 3. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

> 摘要:采用超声波辅助提取方法提取泡叶藻(Ascophyllum mackaii)及海带(Laminaria japonica)藻渣中岩 藻聚糖硫酸酯,以均匀试验设计建立回归模型优化高效制备提取工艺。采用高效凝胶过滤色谱法 (HPGPC)进行了相对分子质量检测及理化性质分析;利用 Fenton 反应检测法、邻苯三酚自氧化法等进 行了抗氧化活性研究。结果表明,优化的高效制备技术的超声波最佳条件为超声 70 min,温度为 90℃, 水提时间 2 h,料液比1:80,泡叶藻及海带藻渣中岩藻聚糖硫酸酯的高效提取率分别为 4.49%和 3.69%, 分子质量分别为 142 kDa和 136 kDa,泡叶藻和海带藻渣中的岩藻聚糖硫酸酯均具有较好的清除超氧阴 离子自由基、羟自由基能力及还原能力。海带的抗氧化活性总体略高于泡叶藻。

关键词:海藻渣;岩藻聚糖硫酸酯;抗氧化活性;超声波辅助提取;理化性质 中图分类号:Q538 文献标识码:A 文章编号:1000-3096(2013)12-0034-06

岩藻聚糖硫酸酯(fucoidan),又名岩藻多糖或褐 藻糖胶,是一种水溶性的硫酸杂多糖。研究发现岩藻 聚糖硫酸酯具有抗氧化^[1]、抗病毒^[2-3]、抗肿瘤、抗 癌^[4-5]、调节免疫^[6]等多种生物学活性,具有广阔的保 健品、药品开发前景,需求量日益增加。

泡叶藻(Ascophyllum mackaii)和海带(Laminaria japonica)都是海藻工业生产常用原料,被用于提取 碘、甘露醇、褐藻酸钠。提取后剩下大量的海藻渣,因 其缺乏科学利用方法,大都作为肥料甚至作为废料 丢弃。试验发现海藻渣中尚含有十分丰富的岩藻聚 糖硫酸酯,所以将海藻渣作为提取岩藻聚糖硫酸酯 的新原料,寻找一种有效的提取方法来最大程度地 提取海藻渣中的岩藻聚糖硫酸酯,可大大提高海藻 渣的利用率及高附加值。

本文采用超声波辅助提取方法,通过均匀试验设 计建立回归模型优化提取工艺,改进了传统水提法耗 能多,提取时间长,多糖得率较低的缺点^[7-8],有效提 高了海藻渣中岩藻聚糖硫酸酯的提取率。并对从海带 和泡叶藻两种工业藻渣中提取的岩藻聚糖硫酸酯进 行理化性质分析、相对分子质量和抗氧化活性测定, 为海藻渣的高附加值再利用提供了科学依据。

- 1 材料与方法
- 1.1 材料、试剂与仪器

泡叶藻及海带藻渣(采自日照结晶集团),清洗

去除表面杂质,50℃烘箱中干燥至恒重后粉碎,过 100目筛备用L-岩藻糖(Fuc)(Sigma);葡聚糖系列分 子质量标准品;浓硫酸、邻苯三酚、HCl、邻二氮菲、 FeSO₄、H₂O₂等试剂均为国产分析纯。

岛津高效液相色谱仪 SHIMADZULC-20A; 超声 波清洗机; 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备 有限公司); 数显恒温水浴锅 HH-4(国华电器有限公 司); 万能粉碎机; Unico UV-2000 分光光度计(尤尼 科(上海)仪器有限公司); SC-3610 低速离心机(安徽 中科中佳科学仪器有限公司); RE-2000 型旋转蒸发 仪(上海亚荣生化仪器厂); 冷冻干燥机(北京松源华 兴科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 超声波辅助提取方法

泡叶藻及海带藻渣粉在给定条件下超声后再水 浴加热提取多糖。操作完毕后离心,取上清液抽滤, 滤液减压浓缩,后加入95%乙醇至其终体积分数为 30%,静置1 h,离心去褐藻胶,上清液加入95%乙醇 至其终体积分数为70%,离心收集岩藻多糖粗沉淀。 用无水乙醇洗涤沉淀,冷冻干燥得粗品。称重并计算

海洋科学 / 2013 年 / 第 37 卷 / 第 12 期

收稿日期: 2012-12-12; 修回日期: 2013-04-18

基金项目:海洋公益性行业科研专项(201105029-9)

作者简介:刘旭(1987-),女,山东青岛人,硕士研究生,主要从事海 藻多糖研究,电话: 0532-82898741, E-mail: sunnylx.0204@163.com; 韩丽君,通讯作者,研究员, E-mail:ljhan@qdio.ac.cn

得率。

1.2.2 提取试验设计

试验选取pH、超声时间、水浴时间、料液比和 水浴温度5个因素,采用U12*(12⁵)均匀设计试验法, 并通过拟水平法适当改造,依据规定^[9-10]使用,其均 匀性*D*=0.2272,对岩藻聚糖硫酸酯的最佳提取工艺 进行优化。

表1 均匀试验设计因素与水平

	因麦						
	四系	1	2	3	4	5	6
X_1	pН	1	2	3	4	5	6
X_2	超声时间(min)	20	30	40	50	60	70
X_3	水提时间(h)	1	2	3	4	5	6
X_4	料液比	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80
X_5	水浴温度(℃)	40	50	60	70	80	90

1.2.3 岩藻聚糖硫酸酯的理化性质分析

总糖含量测定采用苯酚硫酸法^[11]; 岩藻糖含量测定 采用半胱氨酸盐酸盐法^[12]; 硫酸根含量测定采用明胶 氯化钡比浊法^[13]; 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法。

1.2.4 岩藻聚糖硫酸酯相对分子质量测定

采用高效凝胶过滤色谱法(HPGPC),使用TSKgel-G3000PWxL色谱柱测定多糖分子质量;流动相 为0.05 mol/L Na₂SO₄,柱温30℃,流速1 mL/min,示 差检测器(RID)。将多糖样品配成15 g/L,以标准葡 聚糖分子质量的对数(log M_w)对色谱保留时间(t_R) 作图,得标准曲线(log M_w =-0.3344934 t_R +9.115284; R^2 =0.9998),根据标准曲线及GPC软件计算样品相对 分子质量及分布。

1.2.5 两种海藻废渣中岩藻聚糖硫酸酯的抗氧化活 性测定

1.2.5.1 羟基自由基清除能力测定

利用 Fenton 反应检测各种自由基清除剂对羟自 由基(·OH)的清除作用^[14]。由于·OH 可特异地使邻 二氮菲(1,10-菲罗啉)反应体系褪色,根据褪色程度 用比色法来衡量·OH 的含量。采用固定反应时间法, 在波长 536 nm 处测量被测无反应液的吸光度,并与 空白溶液比较,从而测定多糖和 *L*-抗坏血酸对·OH 的清除作用。

分别取不同浓度的样品溶液加入 5 mmol/L 邻二 氮菲 1.5 mL, 再加 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS)2.0 mL 充分混匀后, 加 7.5 mmol/L FeSO₄ 溶液 1.0 mL,每加一管立即摇匀,加0.1% H₂O₂ 1.0 mL,最后以H₂O 补充体积至总体积为10 mL,反应液37℃保温60 min 后,于536 nm 处测定吸光度(A₅₃₆)。未损伤管以水代替H₂O₂。

清除率(%)=($A_{\#_{\text{H}}} - A_{\#_{\text{H}}}$)/($A_{\#_{\text{H}}} - A_{\#_{\text{H}}}$)×100% 上式中的 $A_{\#_{\text{H}}}$ 、 $A_{\#_{\text{H}}}$ 、 $A_{\#_{\text{H}}}$ 分别表示样品管、损伤 管、未损伤管在上述条件下的吸光度值。

1.2.5.2 超氧阴离子自由基清除能力测定

采用邻苯三酚自氧化法反应测定自由基清除 剂对其产生的超氧阴离子自由基的清除作用^[15]。 取 4.5 mL 0.05 mol/L pH 8.2 Tris-HCl 缓冲液,加入 不同浓度的多糖溶液后,用蒸馏水补充值 8.7 mL, 混匀后,于 25℃水浴中保温 20 min 后,加入 0.3 mL 3 mmol/L 邻苯三酚溶液,迅速摇匀,以 0.01mmol/L HCl 溶液作参照,迅速在波长 325 nm 处测量吸光值, 每隔 30 s 测一次,反应时间为 15 min。

清除率(%)= $(\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0 \times 100\%$ ΔA_0 为不加样品时的邻苯三酚自氧化速率; ΔA 为加 入样品后的邻苯三酚自氧化速率。

1.2.5.3 还原力的测定

还原力的测定采用 Hsieh 等的方法并稍作改 进^[16]。分别取不同浓度的多糖溶液与 2.5 mL 1%铁 氰化钾混合,加入 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.6),混匀后在 50℃保温 20 min。然后加入 2.5 mL 10%三氯乙酸和 0.5 mL 0.1% FeCl₃ 溶液。在 700 nm 处测定混合液的光吸收值。

混合液的光吸收值越高,说明还原力越强。

2 结果与讨论

2.1 超声波法辅助提取岩藻聚糖硫酸酯的 最佳条件

采用超声波辅助提取岩藻聚糖硫酸酯,它具有 时间短、效率高、提取量高等优点。一定的酸度可 有效地降解多糖糖苷键,使更多的小分子质量多糖 分子溶解出来,提高多糖提取率和纯度^[17],但酸度 过高又会使硫酸根降解。由于岩藻聚糖硫酸酯的活 性与硫酸根含量密切相关^[18],故以粗多糖提取率(*Y*_w) 和硫酸根含量(*Y*_s),两者之和(*Y*)为评价指标,综合考 虑各试验因素对指标的影响。根据选定的均匀设计 表,在各组条件下进行实验,结果见表2。

通过 minitab 软件建立多元回归模型, 采用二次 多项式逐步回归, 以 Y(Y_w + Y_s)作为指标, 获得提取

表 2 超声波辅助提取均匀试验设计结果

Tab.2 The analysis results of Ultrasonic-assisted extraction process of fucoidans by uniform design

试验号	X_1	X2 超声时间	X ₃ 水提时间	X_4	X5水浴温度	Y _W 提取率	$Y_{\rm S}$ 硫酸根含量	Y提取率+硫酸根含量
	pН	(min)	(h)	料液比	(°C)	(%)	(%)	(%)
1	1	30	2	1:70	90	4.57	25.52	30.09
2	1	40	4	1:50	90	4.61	18.15	22.76
3	2	60	6	1:30	80	3.47	27.21	30.68
4	2	70	2	1:70	80	3.35	37.05	40.40
5	3	20	4	1:50	70	3.53	21.22	24.75
6	3	40	6	1:30	70	3.10	14.26	17.36
7	4	50	1	1:80	60	3.69	36.86	40.55
8	4	70	3	1:60	60	3.66	30.84	34.50
9	5	20	5	1:40	50	3.23	31.66	34.89
10	5	30	1	1:80	50	3.68	36.59	40.27
11	6	50	3	1:60	40	3.44	26.76	30.20
12	6	60	5	1:40	40	2.92	21.45	24.37

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Variance analysis of regression model

方差来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F 值	P 值	显著性
回归	7	0.0653934	0.0653934	0.0093419	8.9343	0.025702	*
X_1	1	0.0028152	0.0091017	0.0091017	8.7046	0.041955	*
X_2	1	0.0018020	0.0125781	0.0125781	12.0293	0.025622	*
$X_1^* X_5$	1	0.0038842	0.0005015	0.0005015	0.4796	0.526699	
$X_2^* X_5$	1	0.0162390	0.0114549	0.0114549	10.9551	0.029659	*
X2^2	1	0.0009054	0.0036821	0.0036821	3.5215	0.133813	
X4^2	1	0.0380936	0.0102674	0.0102674	9.8195	0.035063	*
$X_2^*X_3$	1	0.0016541	0.0016541	0.0016541	1.5819	0.276907	
误差	4	0.0041825	0.0041825	0.0010456			
合计	11	0.0695759					

注:显著性标注 "*"为显著

岩藻聚糖硫酸酯的回归方程:

 $8.9626e^{-005}X_2^2 + 4.82555e^{-005}X_4^2 + 0.000457851X_2X_3$

回归方程相关系数*R*-*S*q = 93.99%, *R*-*S*q(调整) = 83.48%, *F*=8.9343, *P*=0.025, 小于0.05, 方程通过F检验, 置信度高。综合分析结果表明上述回归方程可以反映多元线性回归模型, 回归分析有效。

影响岩藻聚糖硫酸酯提取率的因素大小: $X_2>X_2X_5>X_4^2>X_1>X_2^2>X_2X_3>X_1X_5$,即超声时间最显著,其次是超声时间和水提温度交互作用、料液比的二次项和pH。 X_3 在逐步回归中被剔出方程,说明水提时间对提取率和硫酸根含量影响不显著,考虑到提取效率,所以在提取过程中取最小值。

根据回归方程及方差分析结果规划求解,确定 6 海洋科学/2013 年 最佳工艺为: 超声时间 70 min, 水提时间 2 h, 温度 90℃, pH=6, 料液比 1:80。

在此条件下,海带藻渣的提取率为 4.49%,硫酸 根含量为 38.20%,两者之和 42.69%均大于试验组, 说明模型选择合适,能够为高效制备海藻渣中岩藻 聚糖硫酸酯提供理论指导。

2.2 两种海藻废渣中岩藻聚糖硫酸酯理化 性质及相对分子质量

在上述最佳提取工艺下分别提取海带和泡叶藻 藻渣中的岩藻聚糖硫酸酯,分别记为 LF, AF。并对其进 行理化性质分析和相对分子质量测定,结果见表 4。

由表可见, AF 的总糖及岩藻糖含量均高于 LF, 但硫酸根含量低于 LF。两者的蛋白质含量均较低, AF 略高于 LF。LF 和 AF 的分子质量均在 130 kDa

海洋科学 / 2013 年 / 第 37 卷 / 第 12 期

表 4 两种海藻渣中岩藻聚糖硫酸酯的理化性质比较

Tab.4	Comparison of	physicochemical	properties of	fucoidans	extracted	from La	iminaria j	j <i>aponica</i> a	nd Asc	ophyllum
	<i>mackaii</i> residue	e								
+¥ 1		(이) 비 카이 는 서는	112 124年	(0/) 山	营业中(0/)				ハフ氏	

样品	提取率(%)	外观与性状	总糖(%)	岩藻糖(%)	硫酸根(%)	蛋白质(%)	分子质量(kDa)
海带 LF	4.49	浅棕色粉末	42.20	27.29	38.20	1.70	142
泡叶藻 AF	3.69	浅棕色粉末	66.56	47.97	13.50	2.16	136

以上, 说明提取的岩藻聚糖硫酸酯为大分子多糖, 可进一步降解为低分子质量多糖进行研究。

2.3 岩藻聚糖硫酸酯对羟基自由基的清除 作用

羟自由基和其他自由基相比,是最活跃的体内活 性氧,是在生命活动的氧化代谢过程中产生的,可导 致大量的疾病发生。对羟自由基清除率的检测也是抗 氧化剂抗氧化活性的指标之一,而且对研究自由基的 生物有着重要意义。由图 1 可知, LF 和 AF 均具有良 好的清除羟基自由基的能力, LF 的清除能力好于 AF。 LF 在浓度为 0.5 g/L 时清除率达到 90%以上,当 AF 的浓度为 1 g/L 时,清除率也达到 80%。说明 LF 和 AF 均具有良好的清除羟基自由基的效果。



图1 岩藻聚糖硫酸酯对羟基自由基的清除能力

Fig. 1 Scavenging capability of fucoidans on hydroxyl radicals

2.4 岩藻聚糖硫酸酯对超氧阴离子自由基 清除作用

超氧自由基是活性氧的一种,在体内由过氧化物歧化酶清除,如果体内过氧化物歧化酶活力下降 或超氧产生过量都会给机体造成危害^[19]。从图 2 可 以看出,两种海藻废渣中的岩藻聚糖硫酸酯在所选 浓度范围内,对超氧阴离子自由基都有一定的清除 作用,且随着浓度的升高,清除率上升。经计算达 50%清除率所需浓度(EC50)LF 为 1.564 g/L, AF 为 1.506 g/L。



图 2 岩藻聚糖硫酸酯对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig. 2 Scavenging capability of fucoidans on superoxide radicals

2.5 岩藻聚糖硫酸酯的还原力

还原力的测定可检验样品是否为良好的电子供 应者,还原力强的样品因为良好的电子供应者,其 供应的电子除了可使 Fe³⁺还原为 Fe²⁺外,也可参与 自由基反应,使自由基成为稳定的物质。由图 3 可知, LF 和 AF 在一定的质量浓度范围内都有显著的还原 能力,且随着浓度的增加而增加,但 AF 的浓度超过 8.0 g/L 后还原力有所下降。总之在该试验测定的浓 度范围内,LF 和 AF 均具有一定的还原能力。



3 结论

采用超声波辅助提取,利用均匀试验设计建立回 归模型,综合考虑提取率和硫酸根含量,优化出岩藻 聚糖硫酸酯的最佳提取条件是:超声时间 70 min,水 提时间 2 h, 温度 90℃, pH=6, 料液比 1:80。在此条 件下, 海带 LF 和泡叶藻 AF 中岩藻聚糖硫酸酯提取 率分别为 4.49%和 3.69%。 LF 硫酸根相对较高而岩 藻糖含量比 AF 低, 两者分子质量分别为 142 kDa 和 136 kDa。两种海藻渣中提取的岩藻聚糖硫酸酯具有 较好的清除超氧阴离子自由基、羟自由基能力及还原 力, LF 的抗氧化能力总体优于 AF, 可能与硫酸根含量 高有关。从海藻渣中提取的岩藻聚糖硫酸酯可以作为 一种天然的抗氧化剂, 值得开发和利用。

参考文献:

- [1] Hou Y, Wang J, Jin W, et al. Degradation of Laminaria japonica fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 153-159.
- [2] Sinha S, Astani A, Ghosh T, et al. Polysaccharides from Sargassum tenerrimum: structural features, chemical modification and anti-viral activity[J]. Phytochemistry, 2010, 71(2-3): 235-242.
- [3] Sokolova R V, Ermakova S P, Awada S M, et al. Composition, structural characteristics, and antitumor properties of polysaccharides from the brown algae Dictyopteris polypodioides and Sargassum sp.[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2011, 47(3): 329-334.
- [4] Anastyuk S D, Shevchenko N M, Ermakova S P, et al. Anticancer activity in vitro of a fucoidan from the brown alga Fucus evanescens and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem massspectrometry[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 186-194.
- [5] Vishchuk O S, Ermakova S P, Zvyagintseva T N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds Saccharina japonica and Undaria pinnatifida: isolation, structural characteristics and antitumor activity[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(17): 2769-2776.
- [6] Na Y S, Kim W J, Kim S M, et al. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from Capsosip

hon fulvescens[J]. International immunopharmacology, 2010, 10(3): 364-370.

- [7] 程仕伟,陈超男,冯志彬,等.海带岩藻多糖的水提 制备及其抗氧化活性研究[J].食品科学,2010(6): 101-104.
- [8] 谌素华,王维民,刘辉,等.亨氏马尾藻岩藻聚糖硫酸酯提取工艺的研究[J]. 食品工业科技,2011(8):269-272.
- [9] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [10] 王钦德,杨坚. 食品试验设计与统计分析(第2版)[M].北京:中国农业大学出版社,2010.
- [11] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [12] Gibbons M N. The determination of methylpentoses[J]. Analyst, 1955, 80(949): 268-276.
- [13] Kawai Y, Seno N, Anno K. A modified method for chondrosulfatase assay[J]. Analytical biochemistry, 1969, 32(2): 314-321.
- [14] 靳菊情,丁东宁,边晓丽,等.银杏叶多糖的化学及清除羟自由基作用[J].西安医科大学学报(中文版).2000(5):417-419.
- [15] 林桂兰,许学书,连文思. 食用菇多糖提取物体外抗
 氧化性能研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版),
 2006,(3):278-281.
- [16] Hsieh C, Yen G. Antioxidant actions of Du-zhong (Eucommia ulmoides oliv.) toward oxidative damage in biomolecules[J]. Life Sciences, 2000, 66(15): 1387-1400.
- [17] 卢茳虹,林宗毅,崔春,等.柠檬酸提取海带渣中多
 糖及其抗氧化活性与结构的研究[J].食品工业科技, 2012,33(023):93-96.
- [18] 刘承颖,王维民.半叶马尾藻中岩藻聚糖硫酸酯的提取工艺研究[J]. 食品科技,2008,(5):194-197.
- [19] Chen Y, Xie M, Nie S, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of Ganoderma atrum[J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 231-241.

Ultrasound assisted extraction and *in vitro* antioxidant activity analysis of fucoidans from *Ascophyllum mackaii* and *Laminaria japonica* residue

LIU Xu^{1,2}, QU Gui-yan^{2,3}, ZHOU Yi-bin¹, YUAN Yi², HAN Li-jun²

(1. College of Tea&Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 3. Depattment of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Dce., 12, 2012

Key words: Ascophyllum mackaii and Laminaria japonica residue; fucoidan; antioxidant activity; ultrasound assisted extraction; physicochemical property

Abstract: Ultrasound assisted extraction was used to extract fucoidans from seaweed residue and the regression model was established by uniform design in order to optimize extraction conditions. The physicochemical properties and molecular weights of fucoidans from *Laminaria japonica* and *Ascophyllum mackaii* residue (LF and AF) were analyzed using high performance gel filtration chromatography (HPGFC) and their antioxidant activities were analyzed using fenton reaction and pyrogallol autoxidation assays. The results showed that the optimal condition was: ultrasound time 70 minutes, hot water extraction time 2 h, extraction temperature 90 and the ratio of solution to algae power was 80 (mL:g). Under this condition, the extraction rates of LF and AF were 4.49% and 3.69%, respectively. Molecular weights of LF and AF were 142 kDa and 136 kDa, respectively. Both LF and AF had strong scavenging capability on hydroxyl radicals and superoxide radicals, and had excellent reducing power. Moreover, LF exhibited a stronger *in vitro* antioxidant activity than NF.

(本文编辑:康亦兼)