

鼠尾藻多糖的制备及其抗氧化活性

杨方美, 王 林, 胡秋辉

(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 采用正交试验设计, 得到了鼠尾藻多糖的最佳提取条件: pH=4, 破壁功率 600W, 破壁时间 200s, 提取温度 100℃, 提取时间 6h, 三氯乙酸浓度 3%(W/V), 乙醇浓度 70%(V/V); 在此条件下, 多糖提取率可达到 6.24%(W/W)。通过 Sepharose 4B 柱对该多糖进行了层析纯化, 并用自由基清除方法测定了其体外抗氧化活性, 结果表明: 鼠尾藻多糖有较高的抗氧化活性, 对 DPPH· 的清除率在 50% 以上, 对 ·OH 和 O₂· 直接清除能力也超过了 30%。

关键词: 鼠尾藻; 多糖; 制备; 抗氧化活性

Preparation of Polysaccharide Derived from *Sargassum thunbergii* and Its Antioxidant Activity

YANG Fang-mei, WANG Lin, HU Qiu-hui

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Through an orthogonal design L₁₆(4³), the optimized preparing condition of polysaccharide from *Sargassum thunbergii* was found at pH=4, applying ultrasound at 800W for 200s, incubating at 100℃ for 6h, and 3% (W/V) of trichloroacetic acid and 70% (V/V) of ethanol. The extraction yield of polysaccharide was up to 6.24%. The crude polysaccharide was purified with Sepharose 4B column chromatography and the antioxidant activity of polysaccharide from *Sargassum thunbergii* was determined by radical scavenging methods. The result showed that the polysaccharide had satisfactory antioxidant activity: the scavenging rate was more than 50% towards DPPH·, and was also more than 30% towards ·OH and O₂·.

Key words: *Sargassum thunbergii*; polysaccharide; preparation; antioxidant activity

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文献编号: 1002-6630(2005)02-0224-04

海藻多糖具有抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、溶血栓、抑制 HIV 病毒和增强机体免疫功能的活性, 已越来越引起世界各国的重视^[1~3]。鼠尾藻多糖是从鼠尾藻中提取得到的一种白色海绵状水溶性多糖; 具有较强的生理活性, 能促进人粒细胞超氧阴离子自由基的释放; 提高超氧化物歧化酶活性; 对小鼠肉瘤 S₁₈₀、人食管癌细胞株(EC₁₀₉)均有明显的抑制作用^[4]。

本文研究了鼠尾藻多糖的制备技术参数, 并有自由基清除方法测定了其体外抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料

鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*) 青岛海洋研究所提供。

1.1.2 试剂

Sepharose 4B, Pharmacia 公司; DPPH、Trolox、α-生育酚, Sigma 公司; 其它试剂均为 AR 级。

1.2 方法

1.2.1 多糖的制备

采用超声波破壁、热水浸提、层析纯化方法^[5~9], 具体工艺流程为:

鼠尾藻干粉→加水混匀(L/S=20)→破壁→三氯乙酸(TCA)除蛋白→调节 pH→水浴→离心(5000r/min, 12min)→减压浓缩上清液→乙醇沉淀(过夜)→离心(4000r/min, 10min)→热水溶解沉淀→活性炭脱色→透析(48h)→层析纯化→冷冻干燥

1.2.1.1 鼠尾藻细胞破壁方法

向 10g 干藻粉中加入 200ml 去离子水, 混匀, 在冰浴的条件下利用超声波细胞粉碎机(上海新芝生物技术研

收稿日期: 2004-05-08

基金项目: 江苏省高技术研究计划资助项目(BG2002323、BG2003318)

作者简介: 杨方美(1963-), 女, 副教授, 研究方向食品化工原理。

究所)破壁,然后在pH=6.0,提取温度90℃,提取时间4h,破壁时间200s,TCA浓度3%,乙醇浓度80%的条件下提取多糖。

1.2.1.2 多糖提取条件的优化方法

在鼠尾藻破壁后的提取过程中,采用L₁₆(4⁵)正交试验设计进行条件优化,如表1。

表1 正交试验因素—水平设计
Table 1 Factor-level design of orthogonal experiment
L₁₆(4⁵)

因素 水平	水浴温度 (℃)	TCA 浓度 % (m/V)	pH	水浴时间 (h)	乙醇浓度 % (V/V)
1	70	0	4	2	70
2	80	1	6	4	75
3	90	2	8	6	80
4	100	3	10	8	85

1.2.1.3 粗多糖的纯化方法

以上样量4ml,样品浓度500mg/L,洗脱剂(去离子水)流速30ml/h对鼠尾藻粗多糖进行Sephrose 4B柱(50×2.7cm)层析纯化。每管收集3ml,进行多糖定量测定,出现单一洗脱峰,冷冻干燥后呈白色海绵状。

1.2.2 多糖含量的测定方法

采用硫酸—苯酚法,以葡萄糖作标准^[10]。

1.2.3 多糖抗氧化活性的测定

1.2.3.1 羟自由基(·OH)清除活性的测定

H₂O₂和Fe²⁺混合发生Fenton反应,生成具有很高的反应活性的·OH,其能被水杨酸有效的捕捉,并生成有色物质;但若加入具有清除作用的物质,便会与水杨酸竞争,从而使有色产物生成量减少。本实验以Smironff等^[11]的方法为基础并改进,在10ml的试管中依次加入6mmol/L的FeSO₄溶液2ml,不同浓度的多糖溶液2ml,6mmol/L的H₂O₂溶液2ml,摇匀,静置10min,再加入6mmol/L的水杨酸溶液2ml,摇匀,静置30min后于510nm处测其吸光值。清除率计算公式为:清除率S/%=[1-(A_i-A_j)/A₀]×100%。其中A₀为空白对照;A_i为某质量浓度多糖的吸光值;A_j为无水杨酸时多糖的吸光值。

1.2.3.2 超氧自由基(O₂⁻·)清除活性的测定

PR(对连苯三酚)在弱碱性介质中会自身氧化分解产生O₂⁻·,利用O₂⁻·清除剂能使PR自氧化产物在325nm处的吸收峰受到抑制这一特点,进行光化学方法测定^[12,13]。用50mmol/L、pH8.2的Tris-HCl缓冲液配制制成不同质量浓度的多糖溶液,然后各取5ml,分别加入10μl 50mmol/L的PR水溶液,测定其在325nm处2min内吸光值的变化,4min内测完。清除率计算公式为:清除率S/%=[1-ΔA/ΔA₀]×100%。其中ΔA为2min内某质量浓

度多糖的吸光值变化;ΔA₀为2min内空白对照的吸光值变化。

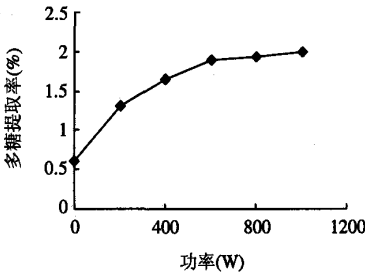
1.2.3.3 DPPH 自由基(DPPH·)清除活性的测定

以BHT、Trolox、α-生育酚作为参照,根据Alexandre C和Takashi Y等人的研究,并进行设计改良,用DPPH法测定分析比较了其抗氧化活性。DPPH·在517nm处有一强吸收,当有抗氧化剂存在时,由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,因而可用光化学方法进行测定^[14]。具体方法是:2ml抗氧化剂溶液中加入2×10⁻⁴mmol/L的DPPH无水乙醇溶液2ml,摇匀,于517nm处测定其吸光度,每5min测一次,直至吸光度的变化在1%以内。其中BHT、α-生育酚为0.1mg/mL无水乙醇溶液;Trolox为0.1mg/ml水溶液;鼠尾藻多糖为2mg/mL水溶液。抑制率计算公式为:抑制率S/%=[1-(A_i-A_j)/A₀]×100%。其中A₀为未加抗氧化剂时DPPH溶液的吸光值;A_i为加了抗氧化剂后DPPH溶液的吸光值;A_j为抗氧化剂溶液的吸光值。

2 结果与讨论

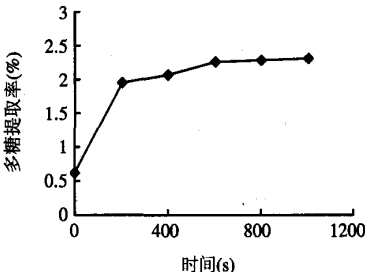
2.1 多糖制备条件的筛选和优化

2.1.1 超声波破壁条件的筛选



a. 破壁功率与多糖得率的关系

注: L/S=20, pH=6.0, 提取温度90℃, 提取时间4h, 破壁时间200s, TCA浓度3%, 乙醇浓度80%。



b. 破壁时间与多糖得率的关系

注: L/S=20, pH=6.0, 提取温度90℃, 提取时间4h, 破壁功率800W, TCA浓度3%, 乙醇浓度80%。

图1 超声波破壁对多糖提取率的影响
Fig.1 Effect of breaking parameters on the polysaccharide yield

表2 正交试验结果及分析
Table 2 Result and analysis of orthogonal experiment $L_{16}(4^5)$

因素水平	水浴温度(℃)	TCA 浓度 % (m/V)	pH	水浴时间(h)	乙醇浓度 % (V/V)	提取率 % (W/W)
1	1	1	1	1	1	1.758
2	1	2	2	2	2	1.296
3	1	3	3	3	3	2.057
4	1	4	4	4	4	2.112
5	2	1	2	3	4	1.429
6	2	2	1	4	3	2.370
7	2	3	4	1	2	2.539
8	2	4	3	2	1	3.301
9	3	1	3	4	2	2.554
10	3	2	4	3	1	5.109
11	3	3	1	2	4	5.185
12	3	4	2	1	3	3.807
13	4	1	4	2	3	3.054
14	4	2	3	1	4	3.944
15	4	3	2	4	1	5.405
16	4	4	1	3	2	6.165
R1	1.806	2.199	3.870	3.012	3.893	
R2	2.410	3.178	2.984	3.209	3.139	
R3	4.164	3.797	2.964	3.690	2.822	
R4	4.642	3.846	3.204	3.110	3.168	
R	2.836	1.647	0.906	0.678	1.071	

注：L/S=20，破壁功率 600W，破壁时间 200s。

从图 1 可以看出，通过超声波破壁可大大提高多糖的提取率，且破壁功率越大，时间越长，多糖的提取率越高，但超过一定水平之后，提取率匀增长缓慢，再考虑到能耗和效率等因素，选用 600W，200s 较为合适。

2.1.2 多糖提取条件的筛选

正交试验结果与分析，如表 2。

试验结果表明，鼠尾藻多糖最佳提取条件为：水浴温度 100℃，TCA 浓度 3%(m/V)，pH=4，水浴时间 6h，乙醇浓度 70%(V/V)。由极差 R 分析发现，各影响因素对多糖提取率影响大小顺序为：水浴温度> TCA 浓度>乙醇浓度> pH >水浴时间。

综上所述，鼠尾藻多糖的最佳制备条件为：pH=4，破壁功率 600W，破壁时间 200s，提取温度 100℃，提取时间 6h，TCA 浓度 3%(W/V)，乙醇浓度 70%(V/V)。在此条件下，多糖提取率可达到 6.24%(W/W)，纯度为 55.53%。

2.3 多糖的抗氧化活性

2.3.1 多糖对 ·OH 和 O_2^- 的清除活性

从图 2 和图 3 可以看出，鼠尾藻多糖对 ·OH 和 O_2^- 有一定的直接清除作用，清除率匀在 30% 以上，且在

一定范围内，清除率与多糖浓度成正相关。

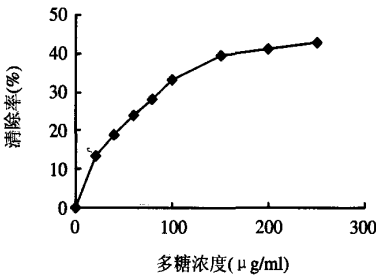


图 2 鼠尾藻多糖对 ·OH 的清除作用
Fig.2 The scavenging effect of polysaccharide on ·OH

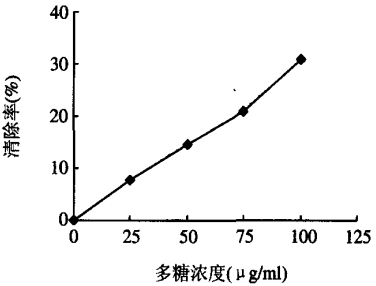
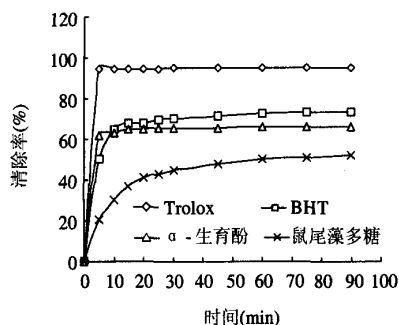


图 3 鼠尾藻多糖对 O_2^- 的清除作用
Fig.3 The scavenging effect of polysaccharide on O_2^-

2.3.2 鼠尾藻多糖的抗氧化活性

从鼠尾藻多糖、BHT、Trolox 和 α -生育酚在 DPPH 体系中的抗氧化动态变化中(如图 7), 可以看出, Trolox 和 α -生育酚能快速清除自由基, 5min 后, 表现出较为稳定的抗氧化活性; BHT 稍慢一些, 但也明显快于鼠尾藻多糖, 鼠尾藻多糖 60min 后才基本趋于稳定。这也说明该多糖是一种长效的抗氧化剂。各物质的最终抗氧化活性顺序为: Trolox > BHT > α -生育酚 > 鼠尾藻多糖。



注: BHT、 α -生育酚为 0.1mg/ml 无水乙醇溶液; Trolox 为 0.1mg/ml 水溶液; 鼠尾藻多糖为 2mg/ml 水溶液。

图 4 不同抗氧化剂的抗氧化活性比较(DPPH 法)

Fig.4 The scavenging effect of antioxidants on DPPH ·

结果表明, 鼠尾藻多糖有较高的抗氧化活性, 对 DPPH · 的清除率在 50% 以上, 对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot$ 直接清除能力也超过了 30%。而自由基与其它生理现象紧密相关, 如衰老、肿瘤、心血管疾病、炎症等^[15], 这也提示该多糖可能在生物体防衰老、抗肿瘤和抗炎等方面发挥作用。

参考文献:

- [1] Zhuang C, Itoh H, Mizuno T, et al. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*) [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59: 563-567.
- [2] Farias W R, Nazareth R A, Mourão P A. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation[J]. Thromb Haemostasis, 2001, 86: 1540-1546.
- [3] Tziveleka L, Vagias C, Roussis V. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms[J]. Curr Top Med

Chem, 2003, (3): 1512-1535.

- [4] Itoh H, Noda H, Amano H. Immunological analysis of inhibition of lung metastases by fucoidan (GIV-A) prepared from brown seaweed *Sargassum thunbergii*[J]. Anticancer Res, 1995, 15: 1937-1947.
- [5] Wang X, Wu G, Chen J, et al. Separation, purification and structural characterization of acidic polysaccharide from *Microcystic aeruginosa*[J]. J Chin Med Mat, 2003, 26: 865-867.
- [6] Zhu W, Ooi V E C, Chan P K S, et al. Isolation and characterization of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* and determination of its anti-herpes activity [J]. Biochem Cell Biol, 2003, 81: 25-33.
- [7] Sanya H, Waraporn G, Sunanta P. Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from *Durian rinds* (*Durio zibethinus* Murr.): isolation, fractionation, characterisation and bioactivity[J]. Carbohydr Polym, 2004, 56: 471-481.
- [8] Ponce N M A, Pujol C A, Damonte E B, et al. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies[J]. Carbohydr Res, 2003, 338: 153-165.
- [9] Ganesh K, Han-Seung J, Jang-Won C, et al. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450[J]. Enzyme Microb Technol, 2004, 34: 673-681.
- [10] Gabriela C, Norma S, Maria I B, et al. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method[J]. J Microbiol Meth, 2003, (1): 69-73.
- [11] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28: 1057-1060.
- [12] 李贵荣, 杨胜圆. 党参多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J]. 化学世界, 2001, (8): 421-423.
- [13] 吴广枫, 汤坚. 芦荟多糖的纯化与体外抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2002, (9): 130-132.
- [14] Sanchez-Moreno C, Larrauri J A, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols[J]. Sci Food Agric, 1998, 76: 270-276.
- [15] Halliwell B, Gutteridge J M C, Cross C E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?[J]. Lab Clin Med, 1992, 119: 598-620.