

文章编号: 1674-5566(2015)05-0783-06

不同分子量条斑紫菜多糖体外抗氧化活性研究

何 芳^{1,2}, 汪之和^{1,2}, 马婉婉^{1,2}, 施文正^{1,2}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 采用 4 种不同截留分子量(MWCO)的超滤膜对条斑紫菜多糖(*Pyropia yezoensis* Polysaccharide, PP)进行分离, 得到分子量分别为 PP I (MW ≥ 100 000)、PP II (MW: 50 000 – 100 000)、PP III (MW: 10 000 – 50 000)、PP IV (MW: 5 000 – 10 000) 和 PP V (MW ≤ 5 000) 5 种不同分子量的多糖, 进一步对 5 种多糖进行体外抗氧化活性研究。结果表明, 在实验浓度范围内, 不同分子量的 PP 都具有较强的抗氧化能力, 对羟自由基(·OH)、超氧阴离子(·O₂⁻)、DPPH·自由基都具有较好的清除作用, 自由基清除率均随多糖浓度的增加而增大, 呈现量效关系; 抗氧化能力与其相对分子质量大小相关, 分子量较小的 PP V (MW ≤ 5 000) 抗氧化能力最佳, 明显高于分子量较大的 PP I (MW ≥ 100 000)。超滤能够实现不同分子量 PP 的良好分离, 可作为条斑紫菜多糖活性成分开发利用的一种新方法。总多糖中, MW 在 5 000 以下的 PP 为主要功效成分, 开发利用价值较大。

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)是我国、日本和韩国的主要栽培种, 主要分布在我国的黄海、渤海、东海北部沿岸以及日本列岛和朝鲜半岛沿岸^[1]。条斑紫菜在分类上属于红藻门红毛菜科, 是一种营养丰富的高蛋白、低脂肪食用海藻^[2]。紫菜的加工品主要为淡干紫菜饼、海苔等干制品, 近几年随着紫菜产量的提高, 紫菜加工也逐步向精深加工方向发展。多糖具有降血糖、抗凝血^[3]、抗肿瘤^[4-5]、抗疲劳^[6]、抗辐射^[7]、抗氧化^[8-9]、提高免疫力^[2,10]等生理活性, 已广泛应用于医药、食品、化妆品等领域。

自由基是机体氧化反应中产生的一类含有未配对电子基团、分子或原子的有害化合物^[11], 主要包括羟自由基、超氧阴离子等, 是人体内的代谢产物, 在正常情况下, 处于动态平衡且浓度

研究亮点: 条斑紫菜资源丰富, 但其产品较为单一, 精深加工有待进一步开发, 多糖是其主要营养成分之一, 具有多方面的生物活性; 超滤分离法与普通的柱层析分离法相比, 具有处理量大、快捷的特点, 适合工业化生产; 不同分子量多糖抗氧化活性差异明显, 探索活性较高的最适分子量多糖可以提高其利用价值。

关键词: 条斑紫菜; 多糖; 分子量; 抗氧化; 深加工

中图分类号: S 985.4

文献标志码: A

很低。当这一平衡被打破, 就会对机体的组织和细胞造成损伤, 进而引起慢性疾病及衰老效应, 目前已经发现有 100 余类病症^[12]。抗氧化是多糖的重要应用领域之一, 与其他外源性抗氧化剂相比, 抗氧化多糖具有低毒、安全和来源广等特点^[13], 因此多糖作为天然抗氧化剂具有很高的开发价值。

近年来, 多糖的研究逐渐引起人们的重视, 多糖组成较为复杂, 分子量可从几千到几十万, 研究表明, 多糖的生物活性与其相对分子量大小有关, 相对分子量越大, 体积越大, 越不利于多糖跨过多重细胞膜障碍而进入生物体内发挥生物学活性, 但分子量过低也无法形成产生活性的聚合结构^[13]。有关不同分子量条斑紫菜多糖抗氧化活性的研究几乎没有, 因此本研究以条斑紫菜

收稿日期: 2015-03-15

修回日期: 2015-04-09

基金项目: 国家科技支撑计划(2015BAD17B01); 上海高校一流学科建设项目(B-5005-13-0002-4); 上海市科委工程中心建设(11DZ2280300); 上海市高校知识服务平台项目(ZF1206)

作者简介: 何 芳(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏工程。E-mail: 550367557@qq.com

通信作者: 施文正, E-mail: wzshi@shou.edu.cn

为原料,超滤膜分离法对条斑紫菜多糖提取液进行分离,研究不同分子量多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)、DPPH \cdot 自由基的清除作用,评价紫菜多糖的抗氧化活性,以期为紫菜多糖的药理作用以及进一步提高紫菜的利用价值提供科学的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

条斑紫菜,购于江苏省大丰市。经烘干、粉碎、过筛后,备用。

1.1.2 主要试剂

主要试剂:DPPH(1,1-二苯基-2-苦基肼)为Sigma公司产品;浓硫酸;标准葡萄糖;三氯乙酸(TCA);无水乙醇;重蒸酚;硫酸亚铁;水杨酸;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸、双氧水、邻苯三酚等均为国产分析纯。

1.1.3 仪器与设备

主要仪器及设备:UV/V-16/18型紫外可见光光度计(上海美谱达仪器有限公司);电热鼓风干燥箱(上海讯博实业有限公司医疗设备厂);数显恒温水浴锅(上海慧泰仪器制造有限公司);H2050R台式高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司);空冷冻干燥机(德国Christ公司);R206旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);循环水式多用真空泵(上海申生生物技术有限公司);粉碎机(九阳股份有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 不同分子量段条斑紫菜多糖的提取与制备

称取一定量的条斑紫菜粉末,按液料50:1(mL/g)加入蒸馏水,100℃水浴保温2 h,减压抽滤后滤渣重复上述操作一次,合并两次多糖提取液,TCA除蛋白后分别透过分子截留量为100 000、50 000、10 000、5 000的超滤系统

(Sartorius stedim, Vivaflow 200),将多糖提取物按分子量大小分为MW≥100 000(PP I)、50 000~100 000(PP II)、10 000~50 000(PP III)、5 000~10 000(PP IV)、MW≤5 000(PP V)5部分。每部分分别在50℃下减压旋转蒸发浓缩至1/5体积,加入4倍体积无水乙醇沉淀多糖,置于4℃冰箱中静置过夜,析出的絮状物沉淀4 000 r/min离心15 min,收集沉淀物后真空冷冻干燥,得到不同分子量段的多糖样品。

1.2.2 多糖含量的测定

多糖提取率Y(yield of polysaccharide)采用苯酚-硫酸法^[14]测定,以葡萄糖为标准物,在490 nm处分别测定PP I、PP II、PP III、PP IV、PP V多糖的含量。

$$Y(\%) = 100 \times CNV/W \quad (1)$$

式中:C为多糖提取液浓度(mg/mL);N为稀释倍数;V为多糖提取液体积(mL);W为干紫菜粉质量(mg)。

1.2.3 多糖体外抗氧化活性浓度设计

分别将5种分子量段多糖PP I、PP II、PP III、PP IV、PP V配制5个浓度梯度:2、4、6、8、10 mg/mL,进行试验。

1.2.4 多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力的测定

用水杨酸法测定PP对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力,参照YANG等的方法稍作改进^[15]。配制好各试剂后,按表1依次加入各试剂,混匀,37℃水浴反应0.5 h后,蒸馏水调零,在波长510 nm下测定吸光度值,每个浓度平行测定3次,取其平均值,测定结果以清除率 S_A (scavenging activity)表示。

$$S_A(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 为空白对照吸光度; A_{x0} 样品本底吸光度; A_x 为测定样品吸光度。

表1 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力测定各管试剂配制

Tab. 1 Reagent preparation for scavenging activity of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)

处理 preparations	双蒸水 double-distilled water	9 mmol/L 硫酸亚铁 ferrous sulfate	9 mmol/L 水杨酸 salicylic acid	样本 samples	8.8 mmol/L 过氧化氢 hydrogen peroxide	mL
空白对照管 blank tube	1	1	1			0.2
样本对照管 samples contrast	0.2	1	1	1		
测定管 measuring tube		1	1	1	0.2	

1.2.5 多糖对超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)清除能力的测定

对超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)清除能力的测定采用邻苯三酚自氧化法^[15]。配制好的各试剂按表2依次加入反应试管中,迅速混匀,在波长325 nm下测定吸光度值,从第1分钟开始读吸光度值,每隔30 s读一次。每个浓度组平行测定3次,取

其平均值,以下式计算清除率 S_A (scavenging activity)。

$$S_A (\%) = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: ΔA_0 为邻苯三酚自氧化速率。 ΔA 为加入样品后邻苯三酚的自氧化速率。单位均为吸光度值每分钟的增值。

表2 超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)清除能力的测定各管试剂配制

Tab. 2 Reagent preparation for scavenging activity of superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)

处理 preparations	50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2)	双蒸水 double-distilled water	样本 samples	10 mmol/L 盐酸 hydrochloric acid	45 mmol/L 邻苯三酚 pyrogallol	mL
空白对照管 blank tube	4.5	0.5		0.01		
自氧化管 autoxidation tube	4.5	0.5			0.01	
测定管 measuring tube	4.5		0.5		0.01	

1.2.6 多糖对DPPH·清除能力的测定

参照JIA等^[16]的方法。分别取不同浓度的多糖样品溶液4 mL,加入1 mL用无水乙醇配制的DPPH溶液,并使DPPH终浓度为0.8 mmol/L。充分混匀后置于暗室中静置30 min,于517 nm波长处测定吸光度。按公式(2)计算DPPH·清除率 S_A (scavenging activity)。

2 结果与分析

2.1 不同分子量多糖分布结果

多糖提取液经过超滤膜分离后,不同分子量段PP占总糖比例见图1,分离出的PP中,PP I占总多糖含量最高为32.44%,PP II占18.57%,PP III占15.68%,PP IV占14.58%,PP V占18.73%。

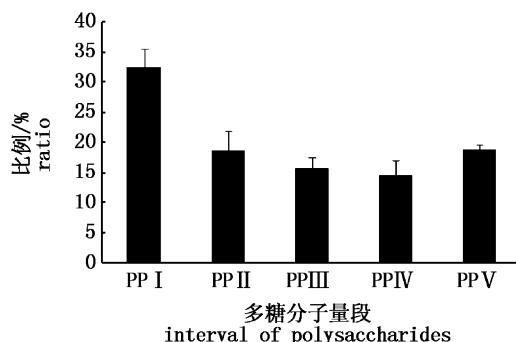


图1 不同分子量段PP分布比例

Fig. 1 Distribution ratios of PP with different molecular weight

2.2 多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

从图2中可以看出,5种不同分子量的条斑紫菜多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力有所差

异,但均表现出了清除能力,并且呈明显的剂量依赖关系。在多糖浓度为2 mg/mL时,PP V就显示出较强的清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力,其清除率达到15%以上;在浓度为4 mg/mL时,PP II和PP III对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用明显增强,清除率均达到了18%以上,是PP I的4.5倍左右;在浓度为10 mg/mL时,PP V对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率达到最大,为51.83%,说明相对分子质量较小的条斑紫菜多糖有较强的清除 $\cdot\text{OH}$ 作用。

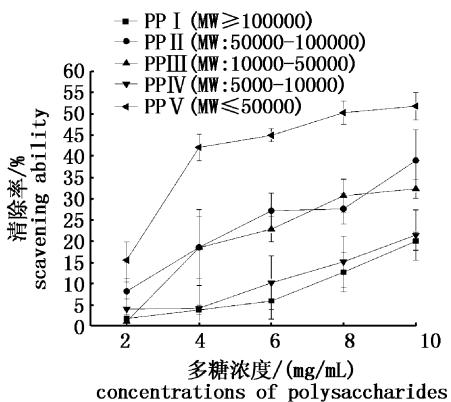


图2 多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

Fig. 2 Scavenging effects of PP on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)

2.3 多糖对超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)的清除作用

超氧阴离子是生物体内第一个氧自由基,是其他活性氧的前体,能导致细胞死亡、酶失活、DNA和膜的降解,并能引起不饱和脂肪酸和其他易受影响物质的过氧化^[17]。因此,研究紫菜多糖对超氧阴离子的清除能力是研究其抗氧化活性的重要指标。不同分子量的条斑紫菜多糖对超

氧阴离子的清除能力如图3所示,在实验浓度范围内,清除率随多糖浓度的增加而增大,PP V和PP II在浓度为6 mg/mL时,清除率达到53%以上,清除作用明显;PP IV在较高浓度(10 mg/mL)时清除作用最大为67.79%,是最小清除率PP III的1.3倍。

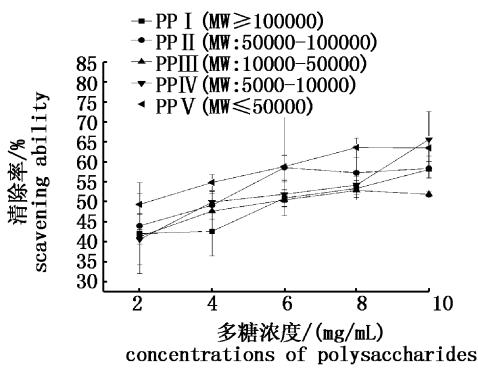


图3 多糖对超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)的清除作用

Fig. 3 Scavenging effects of PP on superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)

2.4 多糖对DPPH·自由基的清除作用

不同分子量多糖对DPPH·自由基清除活性的影响如图4所示,从图中可以看出5种不同相对分子质量的条斑紫菜多糖对DPPH·均有不同程度的清除作用,其清除能力均随多糖浓度的增大而增强,但当多糖浓度达到10 mg/mL时,清除率反而有所下降。PP V对DPPH·的清除作用最

强,其次为PP IV,而PP III和PP I相对较弱,在浓度为8 mg/mL时,PP I、PP II、PP III、PP IV和PP V的清除率分别为27.18%、31.19%、30.09%、33.99%和38.45%。

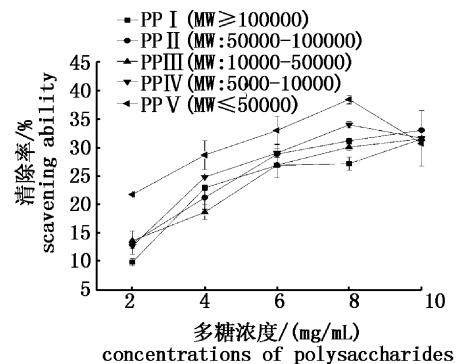


图4 多糖对DPPH·自由基的清除作用
Fig. 4 Scavenging effect of PP on DPPH free radical

2.5 不同分子量多糖抗氧化能力分析比较

从总体上观察(表3),5种不同分子量的条斑紫菜多糖中,分子量较小的PP V(MW≤5 000)和分子量介于50 000~100 000的PP II对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)具有较强的清除作用,PP V和PP IV(MW:5 000~10 000)对DPPH·自由基的清除作用高于分子量较大的多糖。考虑将粗多糖PP用降解和超滤相结合的方法得到抗氧化活性较高的分子量段多糖,为高效利用条斑紫菜多糖寻找新的方法。

表3 条斑紫菜多糖体外抗氧化能力顺序表

Tab. 3 The order of polysaccharides from *Pyropia yezoensis* in antioxidant properties

抗氧化指标 antioxidant indicators	不同分子量条斑紫菜多糖抗氧化能力顺序 the order of polysaccharides from <i>Pyropia yezoensis</i> in antioxidant properties
羟自由基($\cdot\text{OH}$) hydroxyl radical	PP V > PP II > PP III > PP IV > PP I
超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$) superoxide anion	PP V > PP II > PP IV > PP I > PP III
DPPH·自由基 DPPH free radical	PP V > PP IV > PP II > PP III > PP I

3 讨论

本研究采用超滤膜法分离条斑紫菜多糖提取液,得到了良好的分离效果,可作为PP开发利用的一种新方法。体外抗氧化活性试验表明,不同分子量的PP都具有抗氧化能力,对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)、DPPH·自由基都具有较好的清除作用,自由基清除率均随多糖浓度的增加而增大,表现出量效关系。不同相对分子质量的多糖,在不同的抗氧化体系中,其抗氧

化活性差异明显,PP V和PP II对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)具有较好的清除能力,PP V和PP IV对DPPH·自由基的清除率高于PP II、PP III和PP I。抗氧化能力与其相对分子质量大小相关,分子量较小的PP V(MW≤5 000)对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)和DPPH·自由基的清除作用均高于其他分子量段的多糖,抗氧化能力最佳。PP V抗氧化活性最强,利用价值最大,但其所占总糖比例较少,只占PP组分的19%左右,PP I占粗多糖比例虽高,但

其活性较低,因此可考虑将活性较低的大分子PP用降解和超滤相结合的方法得到分子量合适的小分子多糖,为高效利用条斑紫菜多糖寻找新方法,也为开发高附加值条斑紫菜深加工产品奠定基础。

参考文献:

- [1] 张盼盼,杨锐,吴小凯.江苏省条斑紫菜产业现状调研[J].宁波大学学报:理工版,2014,27(1):18-22.
ZHANG P P, YANG R, WU X K. Laver industry in Jiangsu province: Investigation [J]. Journal of Ningbo University: NSEE, 2014, 27(1): 18 - 22.
- [2] 邱伟芬,杨文建,薛梅,等.条斑紫菜多糖的纯化、理化性质及其免疫活性研究[J].食品科学,2013,34(23):51-56.
QIU W F, YANG W J, XUE M, et al. Purification, physicochemical properties and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Porphyra yezoensis* [J]. Food Science, 2013, 34(23): 51 - 56.
- [3] 徐景燕.残次坛紫菜营养成分分析及其多糖分离纯化和生理活性研究[D].汕头:汕头大学,2011.
XU J Y. Study on Nutritional components analysis and extraction, separation, Physiological activities of the polysaccharide from abandoned *Porphyra haitanensis* [D]. Shantou: Shantou University, 2011.
- [4] 张杰,杨旭东,王歲.条斑紫菜多糖对人肝癌Bel7402抗肿瘤作用的初步研究[J].中国食物与营养,2010(8):82-84.
ZHANG J, YANG X D, WANG W. Study on the anti-tumor effects of *Porphyra yezoensis* polysaccharide on human hepatocellular carcinoma Bel7402 cells [J]. Food and Nutrition in China, 2010 (8): 82 - 84.
- [5] MA G X, YANG W J, MARIGA A M, et al. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 114: 297 - 305.
- [6] 郑飞.蓝莓多糖对衰老小鼠运动耐力及抗疲劳效果研究[J].食品科学,2014,35(21):249-252.
ZHENG F. Anti - fatigue effect of polysaccharides extracted from Blueberry in Mice[J]. Food Science, 2014, 35(21): 249 - 252.
- [7] SHI J M, CHENG C L, ZHAO H T, et al. In vivo anti-radiation activities of the *Ulva pertusa* polysaccharides and polysaccharide-iron (Ⅲ) complex[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60: 341 - 346.
- [8] ZHAO Z Y, ZHYANG Q, LI Y F, et al. Optimization of ultrasound extraction of *Alisma orientalis* polysaccharides by response surface methodology and their antioxidant activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 119: 101 - 109.
- [9] ZHOU C S, YU X J, ZHANG Y Z, et al. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Udea[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87 (3): 2046 - 2051.
- [10] LI C, HUANG Q, FU X, et al. Characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 75: 298 - 305.
- [11] 郝杰,查学强,鲍素华,等.霍山石斛不同分子量多糖体外抗氧化研究[J].食品科学,2009,30(15):94-98.
HAO J, ZHA X Q, BAO S H, et al. In vitro antioxidant activities of polysaccharides with different molecular mass from seedlings of *Dendrobium huoshanense* [J]. Food Science, 2009, 30(15): 94 - 98.
- [12] MARX J L. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. Science, 1987, 235(4788): 529 - 531.
- [13] 鲍素华,查学强,郝杰,等.不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究[J].食品科学,2009,30(21):123-127.
BAO S H, ZHA X Q, HAO J, et al. In vitro antioxidant activity of polysaccharides with different molecular weights from *Dendrobium candidum* [J]. Food Science, 2009, 30 (21): 123 - 127.
- [14] 马瑞君,郭守军,杨永利,等.正交试验法优选坛紫菜多糖的提取工艺[J].食品科学,2006,27(12):524-526.
MA R J, GUO S J, YANG Y L, et al. Optimizing technique of extracting polysaccharide from *Gracilaria lamaneiformis* by Orthogonal test[J]. Food Science, 2006, 27 (12): 524 - 526.
- [15] YANG W F, WANG Y, LI X P, et al. Purification and structural characterization of Chinese yam polysaccharide and its activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 1021 - 1027.
- [16] JIA X J, DING C B, YUAN S, et al. Extraction, purification and characterization of polysaccharides from Hawk tea[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99: 319 - 324.
- [17] SAKANAKA S, ISHIHARA Y. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates [J]. Food Chemistry, 2008, 107 (2): 739 - 744.
- [18] 周小伟,钟瑞敏.紫菜多糖提取工艺技术及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2014,35(19):43-47.
ZHOU X W, ZHONG R M. Study on extraction of porphyra polysaccharide and its antioxidant properties [J]. Food Research and Development, 2014, 35(19): 43 - 47.

Study on antioxidant activity of polysaccharides with different molecular weights from *Pyropia yezoensis* in vitro

HE Fang^{1,2}, WANG Zhihe^{1,2}, MA Wanwan^{1,2}, SHI Wenzheng^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this research, polysaccharides from *Pyropia yezoensis* were separated by four ultrafiltration membranes in different molecular weight cut-off(MWCO) to obtain five parts of relative molecular weight : PP I (MW \geqslant 100 000), PP II (MW:50 000 – 100 000), PP III (MW:10 000 – 50 000), PP IV (MW:5 000 – 10 000) and PP V (MW \leqslant 5 000), for further study ,the antioxidant activity of PP with different molecular weights was determined. The results showed that PP with different molecular weights all have antioxidant capacity in the experimental concentration range of PP ,they all have good hydroxyl radical (·OH) scavenging activity , superoxide anion (·O₂⁻) radical scavenging effects and DPPH radical scavenging activity , and scavenging rate increased with increasing concentration of polysaccharides , showing a dose-effect relationship; antioxidant activity was related to the size of its relative molecular weight, and the antioxidant activity of small molecular polysaccharide PP V (MW \leqslant 5 000) was best, significantly higher than the greater molecular weight PP I (MW \geqslant 100 000). Ultrafiltration technology could achieve good separation of PP, it could be used as a new method for the development and utilization of the active component from *Pyropia yezoensis*, and the PP of MW below 5 000 was the main active component and worthy of exploitation in future.

Key words: *Pyropia yezoensis*; polysaccharide; molecular weight; antioxidant; deep processing