

郭峰君, 杨乐乐. 自由基联合超声降解法在海带岩藻聚糖硫酸酯中的应用[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(12): 204–207.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.043

# 自由基联合超声降解法在海带岩藻聚糖硫酸酯中的应用

郭峰君<sup>1</sup>, 杨乐乐<sup>2</sup>

(1. 北海职业学院, 广西北海 536000; 2. 北海市环境监测中心站, 广西北海 536000)

**摘要:**为研究广西海域海带岩藻聚糖硫酸酯的基本组成, 用水提醇沉法提取岩藻聚糖硫酸酯, 用自由基联合降解法降解广西海域海带岩藻聚糖硫酸酯, 获得低分子量杂多糖, 对广西海域海带的硫酸根含量、岩藻糖含量等指标进行测定, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳法对自由基降解方法获得的低分子量多糖分子量分布进行研究。结果表明, 利用自由基氧化降解联合超声降解法能得到分子量较低且分布比较广的杂多糖, 说明该方法简单、降解速率快、无毒副作用, 正交试验得出, 当超声功率为 400 W, 温度为 60 ℃, 时间为 60 min, pH 值为 8.0 时降解速率最佳。

**关键词:**广西海带; 岩藻聚糖硫酸酯; 自由基降解; 超声降解; 凝胶电泳法

**中图分类号:** R282.77      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2020)12-0204-04

海带 (*Laminaria japonica*), 别称纶布、昆布、江白菜, 不但可以食用, 其药用价值在本草纲目等医书中也早有记载, 是生长在低温海水中的一种多年生大型藻类<sup>[1]</sup>。广西海岸线较长, 北部湾盛产海带。岩藻聚糖硫酸酯 (Fucoidan), 别称褐藻胶, 是褐藻、海参和海胆中特有的一种以岩藻糖为主的硫酸酯多糖<sup>[2]</sup>, 主要富集在细胞壁中<sup>[3-4]</sup>。不同产地、不同提取方式, 岩藻聚糖硫酸酯结构存在差异<sup>[5]</sup>。岩藻聚糖硫酸酯主要由硫酸化的岩藻糖和少量的糖醛酸、半乳糖、木糖、甘露糖、葡萄糖等组成, 是一种水溶性杂多糖<sup>[6]</sup>。海带中岩藻聚糖硫酸酯的分子量大, 糖组成复杂, 分子量分布范围较广。Alban 等发现, 分子量高的岩藻聚糖较难被吸收, 而分子量低的则溶解性好、黏度小、吸收利用率高、生物活性较高<sup>[7]</sup>。目前, 美国、日本、俄罗斯、德国、挪威等国家的岩藻聚糖产品均已上市或进行临床应用, 在中国也有岩藻聚糖硫酸酯开发上市<sup>[8-10]</sup>。岩藻聚糖硫酸酯具有多种生物活性, 而生物在消化利用大分子量多糖上存在障碍<sup>[11]</sup>。

岩藻聚糖硫酸酯的药理活性与其分子量大小、单糖组成、硫酸根含量、糖苷键连接方式都具有相

关性<sup>[12-13]</sup>。药理功效已被许多学者证明, 但构效关系仍需深入研究, 是研究的重点和难点, 所以多糖的结构仍然是研究热点。制备安全的低分子量多糖是发展趋势<sup>[14]</sup>。低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯的制备, 目前常采用的方法有自由基降解法、酶解法、酸降解法、碱降解法、超声波法等<sup>[15-20]</sup>。酸、碱降解法由于有残留, 安全性存在问题, 自由基法、酶解法和超声波法可应用于海洋药物的研发。目前, 岩藻聚糖硫酸酯是海洋多糖药物研究中的热点之一。

本研究采用自由基降解法联合超声波降解法对岩藻聚糖硫酸酯进行降解, 通过正交试验得出最优降解条件, 并用电泳法对降解后多糖的分子量分布进行比较分析, 以期对低分子量岩藻聚糖硫酸酯结构研究和产品开发提供试验支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

海带, 购于北海南珠市场; 岩藻糖标准品, Sigma 公司生产; 乙醇、稀盐酸、浓硫酸、苯酚、明胶硫酸钡、过氧化氢、醋酸铜等均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

主要仪器设备有 FW-100 万能粉碎机、DHG-9037A 型电热恒温鼓风干燥箱、AR224CN 电子分析天平、UV-1800 紫外分光光度计、Nicolet-Nexus 470 红外分光光度计、Tanon EPS300 电泳仪、ZL10-250C 超声仪。

收稿日期: 2019-07-03

基金项目: 2016 年度广西高校中青年教师基础能力提升项目 (编号: KY2016YB756)。

作者简介: 郭峰君 (1989—), 女, 山东烟台人, 硕士, 讲师, 主要从事海洋活性物质研究。E-mail: 543635983@qq.com。

### 1.3 方法

1.3.1 岩藻聚糖硫酸酯的提取 采用水提醇沉的方法进行岩藻聚糖硫酸酯的提取,主要步骤:将海带清洗、烘干、粉碎后过筛,制成粉末;采用水提醇沉法(80 ℃热水提取,上清液用 30%、60%、85% 乙醇醇沉)用透析袋透析除去金属离子和盐;旋蒸浓缩后烘干,得到海带粗多糖 GF0。

1.3.2 广西海域海带岩藻聚糖硫酸酯基本成分测定 (1)水分含量采用 GB 5009.3—2010《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中的直接干燥法进行测定。(2)蛋白质含量测定采用 GB 5009.5—2010《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法。(3)脂肪含量测定采用 GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》中的索氏提取法。(4)总糖含量测定采用苯酚硫酸法<sup>[21]</sup>,主要步骤:称取适量岩藻糖标准品,配成 1 mg/mL 的溶液,分别加水稀释制成 0.12 ~ 0.20 mg/mL 不同浓度的标准溶液,并分别吸取一定量于试管中,加入等量 6% 苯酚溶液,摇匀后迅速加入 5 倍体积的浓硫酸,漩涡振荡混匀,室温放置 0.5 h 后于 490 nm 波长处测定其吸光度,并绘制标准曲线;将海带粗多糖样品配成 0.1% 溶液,按上述步骤测定。(5)岩藻糖含量的测定采用 Gibbons 比色法<sup>[22]</sup>,具体方法:取岩藻糖标准溶液(100 μg/mL)0.0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL,用蒸馏水定容至 1.0 mL;冰水浴下加入 4.5 mL 87% 的浓硫酸,混匀;1 min 后,沸水浴加热 10 min,迅速冷却至室温,加入 0.1 mL 3% 的半胱氨酸盐酸盐,混匀,静置 90 min 后,在 400 nm 和 430 nm 处分别测定吸光度,并绘制标准曲线;配制 0.1% 的海带粗多糖溶液,取 0.2 mL,测定吸光度,通过标准曲线计算岩藻糖含量。(6)硫酸根含量的测定采用明胶比浊法<sup>[23]</sup>,具体方法:分别取标准硫酸钾溶液(0.35 mg/mL)0.0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,定容至 3.0 mL,加 0.2 mol/L 稀盐酸 3.8 mL,明胶硫酸钡 1 mL,混匀后静置 30 min,在 500 nm 处测量吸光度。取海带粗多糖样品 0.025 g,加 0.2 mol/L 稀盐酸 8 mL,密封水浴加热 4 h 后,冷却至室温,定容至 25 mL,配制成 0.1% 的样品,取 1 mL 测定吸光度。

1.3.3 基本结构测定 采用红外光谱法<sup>[24]</sup>测定海带粗多糖基本结构,用溴化钾研磨压片后,在 4 000 ~ 4 00 cm<sup>-1</sup>波长范围内进行光谱扫描。

1.3.4 自由基降解 采用自由基降解法<sup>[25]</sup>进行降

解:取 1 mL 20 mg/mL 海带粗多糖,加入 0.026 7 mol/L 醋酸铜,保持 pH 值在 7.5 左右,60 ℃ 恒温加热条件下加 20 μL/h 的 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应 6 h。10 000 r/min 离心 30 min,除去大部分 Cu<sup>2+</sup>,将 pH 值调至中性。

1.3.5 电泳法分析多糖的分子量分布 采用丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)法测定海带多糖的分子量分布。利用一定浓度的硼酸、Tris 和乙二胺四乙酸(EDTA)配制外室缓冲液,甘氨酸、Tris 配制内室缓冲液。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和蔗糖用外室缓冲液配成 15% 分离胶和 5% 浓缩胶,脱气备用。电泳分析时电压为 200 V,时间为 30 min 左右。用阿利新蓝染色 30 min 左右后,用乙酸脱色。根据硫酸软骨素标准品电泳距离计算出标准曲线。

1.3.6 超声法复合自由基降解法 取 1 mL 用“1.3.4”节中的方法降解过的多糖,分别以超声功率、温度、时间、pH 值进行正交试验(表 1)。DNS 标准曲线法<sup>[26]</sup>:以还原糖释放量为降解指标,以葡萄糖为标准品,在 520 nm 的吸收光谱下测定吸光值。计算公式:还原糖释放量 = 降解后还原糖浓度 - 降解前还原糖浓度。将 1 mg/mL 海带粗多糖在不同的超声功率、时间、温度、pH 值下进行正交试验。

表 1 超声法单因素试验设计

水平	因素			
	A:超声功率(W)	B:温度(℃)	C:时间(min)	D:pH 值
1	300	40	20	7.5
2	400	50	40	8.0
3	500	60	60	8.5

## 2 结果与分析

### 2.1 基本成分测定结果

测得岩藻糖含量标准曲线为  $y = 0.0007x + 0.0003$ ,  $r^2 = 0.9933$ ;硫酸根含量标准曲线为  $y = 2.776x + 0.007$ ,  $r^2 = 0.9992$ 。经过计算,粗多糖的提取率为 1.44%,岩藻糖占总糖含量的 30.09%,硫酸根含量为 38.21%(表 2),说明广西海域海带岩藻聚糖硫酸酯硫酸根含量较高,具有很高的药用价值。

广西海域海带多糖与其他海域多糖结构相似。由图 1 可知,在 3 000 ~ 2 800 cm<sup>-1</sup>处出现不同程度的振动吸收,2 936 cm<sup>-1</sup>处为 C—H 伸缩振动峰,是岩藻糖的甲基吸收峰,较弱;1 632 cm<sup>-1</sup>处出现的强吸收峰是 N—H 变角振动峰,1 417 cm<sup>-1</sup>处是 C—O

表 2 广西海域海带基本成分测定

样品	水分含量 (%)	蛋白质含量 (%)	总糖含量 (%)	硫酸根含量 (%)	脂肪含量 (%)	岩藻糖在总糖含量中的占比 (%)
广西海域海带	10.08 ± 0.98	9.86 ± 0.67	70.33 ± 3.25	38.21 ± 0.18	0.12 ± 0.04	30.09 ± 0.76

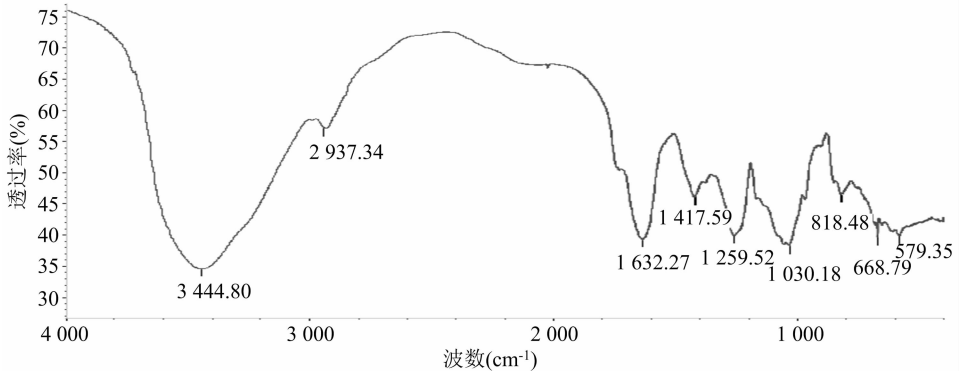
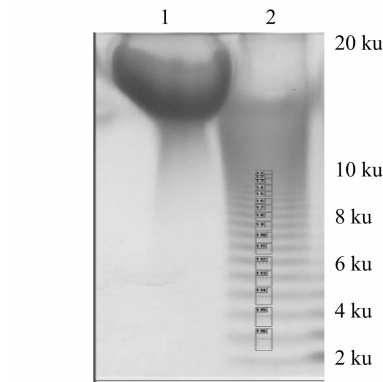


图1 广西海域岩藻聚糖硫酸酯红外图谱

的伸缩振动峰,为吸收峰,说明有糖醛酸;1 259 cm<sup>-1</sup> 处是 S=O 官能团的伸缩振动峰,是强吸收峰;C—O—S 伸缩振动峰与多糖链上硫酸根的位置有关,是连接在岩藻糖 C4 位上的直立键硫酸根,818 cm<sup>-1</sup> 左右出现的吸收峰表示该多糖的硫酸根连接在该糖的 C2 或 C3 上,属于 α-D-半乳吡喃糖。

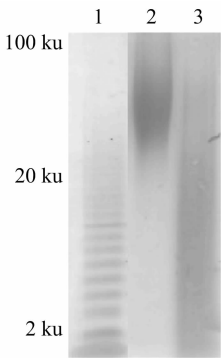
2.2 分子量计算

根据图 2 中硫酸软骨素分子量标准品计算分子量与移动距离之间的标准曲线,  $y = -0.000\ 9x + 4.445\ 5$ ,  $r^2 = 0.997\ 9$ 。通过计算,分子量为 2~8 ku 的硫酸软骨素,分子量与电泳距离呈线性关系。已知硫酸软骨素的分子量为 14 ku,以标准品为对照,可估算得到,降解前硫酸多糖分子量为 20~100 ku,降解后硫酸多糖的分子量小于 20 ku(图 3)。说明自由基氧化降解得到低分子量岩藻聚糖硫酸酯,产物主要是寡糖和分子量低于 8 ku 的低分子量组分,得到的是分子量分布比较广的杂多糖。



1—硫酸软骨素; 2—硫酸软骨素酶解物

图2 硫酸软骨素和硫酸软骨素酶解物的 PAGE 图谱



1—硫酸软骨素标准品; 2—海带多糖; 3—降解后的海带多糖

图3 岩藻聚糖硫酸酯自由基降解 PAGE 图谱

2.3 降解工艺优化结果

通过正交试验结果(表 3)可知,影响降解的主要因素为超声功率>时间>温度>pH 值。可以看出,最佳配比为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>。当超声功率为 400 W,温度为 60 ℃,时间为 60 min,pH 值为 8.0 时降解速率最佳。

3 讨论与结论

海带岩藻聚糖硫酸酯的分子量大且分布范围较广,糖组成复杂。大分子量的多糖在服用过程中会出现出血等副作用,因此,分析海带岩藻聚糖硫酸酯分子量大小对其功能型产品的开发及海带高值化利用具有重要意义。本试验对广西海域海带的基本成分进行确定,并用自由基降解法结合电泳法分析岩藻聚糖硫酸酯的分子量分布。结果表明,广西海域海带岩藻聚糖硫酸酯硫酸根含量较高。由于在一定范围内硫酸多糖的分子量与电泳距离呈线性关系,采用离子交换 PAGE 凝胶电泳法分析

表 3  $L_9(3^3)$  正交试验结果

试验号	A	B	C	D	降解速率 (%)
1	1	1	1	1	33.28
2	1	2	2	2	34.12
3	1	3	3	3	35.11
4	2	1	2	3	34.99
5	2	2	3	1	36.33
6	2	3	1	2	35.76
7	3	1	3	2	35.55
8	3	2	1	3	34.77
9	3	3	2	1	35.27
$k_1$	34.170	34.603	34.603	34.960	
$k_2$	35.690	35.073	34.790	35.143	
$k_3$	35.197	35.380	35.663	34.953	
$R$	1.520	0.777	1.060	0.190	

分子量分布,利用 0.026 7 mol/L 醋酸铜,60 ℃ 恒温加热条件下,加 20  $\mu$ L/h 的 15%  $H_2O_2$  反应 6 h 后,采用联合超声法降解自由基,联合超声功率为 400 W,温度为 60 ℃,时间为 60 min,pH 值为 8.0 时降解速率最佳。说明该方法简单、经济,能直观准确地反映多糖分子量的分布状况。自由基降解法联合超声降解法具有操作简单、降解速率快、无毒副作用等优点,得到的低分子量岩藻聚糖硫酸酯是分子量分布比较广的杂多糖。

#### 参考文献:

- [1] 范晓,韩丽君,郑乃余. 我国常见食用海藻的营养成分分析[J]. 中国海洋药物,1993,12(4):32-38.
- [2] 张彦民,李宝才,朱利平,等. 多糖化学及其生物活性研究进展[J]. 昆明理工大学学报(理工版),2003,28(3):140-145,149.
- [3] Jiao G L, Yu G L, Zhang J Z, et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae[J]. Marine Drugs,2011,9(2):196-223.
- [4] Vo T S, Kim S K. Fucidans as a natural biosective ingredient for functional foods[J]. Journal of Functional Foods,2013,5(1):16-27.
- [5] Ermakova S, Kusaykin M, Trincone A, et al. Are multifunctional marine polysaccharides a myth or reality? [J] Front Chem,2015,3:39.
- [6] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京:科学出版社,1997:318-319.
- [7] Alban S, Franz G. Characterization of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate[J]. Thromb Research,2000,99(4):377-388.
- [8] Wang J, Zhang Q B, Jin W H, et al. Effects and mechanism of low molecular weight fucoidan in mitigating the peroxidative and renal damage induced by ademine[J]. Carbohydrate Polymers,2011,84

(1):417-423.

- [9] Wang J, Wang F, Yun H, et al. Effect and mechanism of fucoidan derivatives from *Laminaria japonica* in experimental adenine - induced chronic kidney disease[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012,139(3):807-813.
- [10] Wu Y N, Ye M, Du Z Z, et al. Carboxymethylation of an exopolysaccharide from *Lachnum* and effect of its derivatives on experimental chronic renal failure[J]. Carbohydrate Polymers, 2014,114:190-195.
- [11] Nagamine T, Nakazato K, Tominoka S, et al. Intestinal absorption of fucoidan extracted from the brown seaweed, *Cladosiphon okamuranus* [J]. Marine Drugs,2014,13(1):48-64.
- [12] 曲桂燕. 5 种褐藻岩藻聚糖硫酸酯提取纯化及其功能活性的比较研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2013:19-25.
- [13] 李芳. 不同分子量海带岩藻聚糖硫酸酯消化吸收、免疫及抗病毒活性的比较研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2012:28-29.
- [14] 孙华,张彦昊,张翔,等. 普鲁兰多糖在食品保鲜和生物医学中的应用综述[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):48-52.
- [15] 陈亚静,王维民,湛素华,等. 马尾藻岩藻聚糖硫酸酯降解工艺的研究[J]. 食品工业科技,2012,33(20):284-287.
- [16] Zhang Q B, Qi H M, Zhao T T, et al. Chemical characteristics of polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta) [J]. Carbohydrate Research,2005,340(15):2447-2450.
- [17] Li B, Lu F, Wei X, et al. Fucoidans structure and bioactivity[J]. Molecules,2008,13(8):1671-1695.
- [18] Cumashi A, Ushakova N A, Preobrazhenskaya M E, et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds[J]. Glycobiology,2007,17(5):522-541.
- [19] Wijesinghe W, Jeon Y J. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds:a review[J]. Carbohydrate Polymers,2012,88(1):13-20.
- [20] Kwak J Y. Fucoidan as a Marine anticancer agent in preclinical development[J]. Marine Drugs,2014,12(2):851-870.
- [21] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江人民出版社,1994:56-78.
- [22] Gibbons M N. The determination of methylepentoses[J]. Analyst, 1955,80:268-276.
- [23] Dodgson K S, Price R G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides [J]. Biochemical Journal,1962,84(1):106-110.
- [24] 嵇国利,于广利,吴建东,等. 暴发期条浒苔多糖的提取分离及其理化性质研究[J]. 中国海洋药物,2009,28(3):7-12.
- [25] Chen R H, Chang J R, Shyr J S. Effects of ultrasonic conditions and storage in acidicsolutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan[J]. Carbohydrate Research,1997,299(4):287-294.
- [26] 胡锡阶,肖建辉,肖瑜,等. 3,5-二硝基水杨酸比色法定糖的条件优化[J]. 遵义医学院学报,2005,28(1):9-11.