

# 不同提取方法对龙须菜多糖性质的影响

游丽君, 张云林, 温玲蓉, 刘瑞海, 扶雄

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文以龙须菜为原料, 比较了热水、超声、超声协同热水和柠檬酸提取 4 种方法所得多糖的性质。研究表明: 柠檬酸提取所得多糖的得率最高, 为  $17.81 \pm 0.34\%$ , 其多糖分子量和粘度较低, 多糖分子量的均一性较高。抗氧化实验表明, 柠檬酸提龙须菜多糖具有较高的抗氧化性, 其氧自由基清除能力 (ORAC) 值可达  $298.735 \pm 6.57 \mu\text{mol Trolox/g}$ , 在多糖浓度为  $2.0 \text{ mg/mL}$  时, DPPH 自由基清除率可达  $65.79 \pm 0.3\%$ , 还原力为  $0.765 \pm 0.01$ , 均显著高于其他方法所提多糖。柠檬酸提多糖能够有效地抑制  $\alpha$ -淀粉酶的活性。相关性分析表明, 龙须菜多糖的多糖含量及糖醛酸含量与抗氧化、 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性之间呈正相关, 而硫酸基含量、分子量、PDI 值和粘度与抗氧化、 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性之间呈负相关。因此, 柠檬酸提取是一种有效的提取龙须菜多糖的方法。该法能有效地提高多糖得率, 增加产物中糖醛酸含量, 降低硫酸基含量、分子量及其粘度, 并提高多糖分子量的相对均一性。

**关键词:** 龙须菜; 多糖; 柠檬酸; 提取; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2016)6-148-155

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.024

## Effect of Extraction Method on the Properties of Polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis*

YOU Li-jun, ZHANG Yun-lin, WEN Ling-rong, LIU Rui-hai, FU Xiong

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** *Gracilaria lemaneiformis* was used as the raw material to compare the properties of four polysaccharide extraction processes: GWP, GUP, GUWP, and GCP, which involve extractions using hot water, ultrasonic waves, ultrasonic-hot water, and citric acid, respectively. The results showed that GCP had the highest yield of  $17.81 \pm 0.34\%$  among the four polysaccharides, relatively low molecular weight and apparent viscosity, and a high degree of uniformity of molecular weight. Antioxidant activity analyses indicated that GCP exhibited a relatively strong antioxidant capacity, and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) value was  $298.735 \pm 6.57 \mu\text{mol Trolox/g}$ . When the concentration of GCP was  $2.0 \text{ mg/mL}$ , the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity and the reducing power were  $65.79 \pm 0.3\%$  and  $0.765 \pm 0.01$ , respectively, which were significantly higher than the values of polysaccharides extracted using other methods. In addition, GCP could effectively inhibit  $\alpha$ -amylase activity. Correlation analysis showed that the antioxidant activity and inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase of the polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* had a positive correlation with the content of polysaccharides and uronic acid, and a negative correlation with the sulfate group content, molecular weight, polydispersity index (PDI) value, and viscosity. Therefore, citric acid extraction is an effective method to extract polysaccharides from *G. lemaneiformis*. This method can effectively increase the polysaccharide yield and the uronic acid content in the product, reduce the sulfate group content, molecular weight, and viscosity, and improve the molecular weight uniformity of polysaccharides.

**Key words:** *Gracilaria lemaneiformis*; polysaccharides; citric acid; extraction; antioxidant activity

龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*), 又名海发菜、线菜、江蓠、牛毛, 系红藻门 (*Rhodophyta*)、杉藻目

收稿日期: 2015-07-31

基金项目: 广东省自然科学基金 (2014A030313242); 中央高校科研业务费项目(海藻多糖抗皮肤光老化的功效及机理研究); 广东省领军人才项目(Rui Hai Liu); 广东省科技计划项目 (2013B090700008); SRP 项目《生物活性多糖的分离纯化及功效研究》

作者简介: 游丽君 (1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向食品营养与健康

(*Gigartinales*)、江蓠科 (*Gracilariaceae*)、江蓠属 (*Gracilaria*) 的一种温带性红藻, 原产于我国山东省和辽宁, 是我国传统的药食两用的海藻类植物。近年来在福建、广东等沿海省市养殖成功并大量栽培, 是我国继紫菜、海带、裙带菜之后的第四大栽培海藻<sup>[1]</sup>。《本草纲目》记载“龙须菜, 甘, 无毒。治癭结热气, 利小便”。近年来有学者对其进行营养成分分析及评价表明, 龙须菜是一种高膳食纤维、高蛋白、低脂肪, 富含矿物质的食用海藻, 具有较高的保健和营养价值<sup>[2]</sup>。

龙须菜因其多糖含量高达 30% 左右而备受关注, 目前研究表明, 海藻类多糖具有抑制肿瘤、免疫调节、降血脂、抗凝血、抗菌、肾脏保护和抗病毒等多种生理及药理活性<sup>[3]</sup>。

龙须菜因为其藻体比较坚硬, 提取困难而限制了它的应用, 因此, 寻找一种能有效提高多糖得率和生物活性的提取方法越来越重要。目前, 龙须菜多糖的提取主要有冷水浸提、热水浸提、微波和超声辅助提取、酶解浸提及碱提等<sup>[4]</sup>, 其研究方向主要集中于提取条件的优化, 而对于不同方法提取的龙须菜多糖的理化性质则报道较少, 且利用柠檬酸提取龙须菜多糖还未见报道。由于不同的提取方法对多糖的生物活性有很大影响, 因此, 本文采用柠檬酸、热水、超声波、超声协同热水提取 4 种方法提取龙须菜多糖, 并对其理化性质及体外抗氧化和降血糖活性进行比较研究, 初探其结构与活性的关系, 以期龙须菜多糖的进一步研究与开发利用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

龙须菜购自青岛, 藻体较粗, 圆柱状, 米黄色, 去除杂质, 粉碎后得藻粉备用。

AAPH、Trolox、DPPH、荧光素钠盐 (FL)、 $\alpha$ -淀粉酶: 美国 Sigma 公司; 柠檬酸、氯化铁、铁氰化钾、氢氧化钾、三氯乙酸 (TCA)、无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、浓硫酸、三氟乙酸、明胶、硫酸钾、氯化钡、盐酸羟胺、二氯甲烷、醋酸酐、吡啶、肌醇均为分析纯; 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT)、BHA, 均为食品级。

### 1.2 仪器与设备

荧光酶标仪 Varioskan Flash, 美国 Thermo 公司; UV-2100 紫外可见分光光度计, 广州广一科学仪器有限公司; DFY-500 摇摆式中药粉碎机, 温岭市林大机械有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; pH-3E pH 计, 苏州江东精密仪器有限公司; TDL-5 台式飞鸽离心机, 杭州汇尔仪器设备有限公司; 数显式电热恒温水浴锅, 上海博迅实业有限公司; 高功率数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Breeze 高效凝胶渗透色谱仪, 美国 Waters 公司; HAAKE MarsIII 旋转流变仪, 德国赛默飞世尔公司; 气象色谱仪 7890A, 美国 Agilent 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 龙须菜原料预处理

将经粉碎的龙须菜粉按料液比 1:4 ( $m/V$ ) 的比例加入 95% 乙醇于圆底蒸馏瓶中, 保持微沸回流 3 h, 除去上清液得滤渣, 再加入 4 倍体积 95% 乙醇回流 1 h。过滤, 于 40 °C 烘箱中挥干乙醇, 即得除去色素及醇溶性杂质的龙须菜藻体备用。

#### 1.3.2 龙须菜多糖的制备

##### 1.3.2.2 传统水提法

称取 10.0 g 龙须菜藻粉, 加入 500 mL 去离子水, 于 100 °C 提取 2 h, 取出, 3500 r/min 离心 10 min, 除去藻渣, 55 °C 旋转蒸发浓缩至约 100 mL。加入 4 倍体积 95% 乙醇, 于冰箱中 4 °C 醇沉过夜。4500 r/min 离心 20 min, 除去乙醇上清液, 保留沉淀, 冷冻干燥, 即得水提粗多糖 (GWP)。

##### 1.3.2.3 超声波提取法

称取 10.0 g 龙须菜藻粉, 加入 500 mL 去离子水, 于超声波清洗器中提取 30 min (320 W, 50 °C)。其余步骤同 1.3.2.2, 得超声提取粗多糖 (GUP)。

##### 1.3.2.4 超声协同热水提取法

称取 10.0 g 龙须菜藻粉, 加入 500 mL 去离子水, 按 1.3.2.3 方法超声提取后, 按 1.3.2.2 条件热水提取, 得超声协同热水提取粗多糖 (GUWP)。

##### 1.3.2.5 柠檬酸提取法

称取 10.0 g 龙须菜藻粉, 加入 500 mL 柠檬酸溶液 (pH=2), 于 100 °C 提取 2 h, 取出, 3500 r/min 离心 10 min, 除去藻渣, 提取液用氢氧化钾 (4 M) 调节至中性, 55 °C 旋转蒸发浓缩至约 100 mL。加入 4 倍体积 95% 乙醇, 于冰箱中 4 °C 醇沉过夜。4500 r/min 离心 20 min, 除去乙醇上清液, 所得沉淀用少量水复溶, 冷冻干燥, 即得柠檬酸提粗多糖 (GCP)。

#### 1.3.3 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法测定龙须菜多糖的含量, 标准品采用充分干燥的葡萄糖, 以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标制作标准曲线。

多糖得率按下式计算:

$$\text{多糖得率}(\%) = (\text{多糖含量}/\text{原料质量}) \times 100\%$$

#### 1.3.4 多糖硫酸根含量测定

采用硫酸钡比浊法<sup>[5]</sup>测定龙须菜多糖的硫酸根含量。

#### 1.3.5 多糖糖醛酸含量测定

采用咔唑比色法<sup>[6]</sup>测定龙须菜多糖的糖醛酸含量, 以半乳糖醛酸为标准品。

#### 1.3.6 多糖分子量的测定

参照游丽君等<sup>[7]</sup>的方法略作修改, 采用凝胶渗透色谱法 (GPC) 测定分子量。称取冷冻干燥的多糖样

品适量,配制成 2.0 mg/mL 溶液,用 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤,取过滤清液待用。色谱条件:柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ; 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 为流动相,流速 0.6ml/min,进样量 40  $\mu\text{L}$ ; TSK 凝胶保护柱 (40 mm $\times$ 6.0 mm), TSKG-4000K 凝胶柱 (300 mm $\times$ 7.8 mm) 和 TSKG-2500K 凝胶柱 (300 mm $\times$ 7.8 mm); Waters 2414 示差折光检测器检测。配制一系列不同分子量的葡聚糖溶液作为标样,做标准曲线。样品的分子量根据其相应的洗脱体积对照标准曲线进行计算。

### 1.3.7 多糖粘度的测定

称取适量的多糖样品,配制成 2 mg/mL 的多糖溶液。采用 HAAKE Mars-III 旋转流变仪,设定样品台温度 37  $^{\circ}\text{C}$ ,使用 C60 号转子,剪切速度 30.0 /s,读数每秒一次,测量时间 60 s。三次平行,结果为三次试验的平均值。

### 1.3.8 单糖组成的测定

参照 Lin 等<sup>[7]</sup>报道的糖精乙酸酯衍生物气相色谱法,适当修改后对龙须菜多糖的单糖组成进行分析。称取多糖样品 20 mg,加入 5 mL 三氟乙酸 (4 M),110  $^{\circ}\text{C}$  水解 2 h。水解液于 50  $^{\circ}\text{C}$  真空旋转蒸发至干,用色谱纯甲醇清洗 3 次,得多糖水解物。在多糖水解物中依次加入 10 mg 盐酸羟胺、1 mg 内标肌醇和 2 mL 吡啶,密封,90  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min 后加入 2 mL 醋酸酐 90  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min,加入 2 mL 水终止反应。加入 2 mL 二氯甲烷萃取,重复 2 次,合并二氯甲烷相,加入无水硫酸钠干燥过膜备用。气相色谱检测程序:HP-5 石英毛细管柱 (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ); 恒压模式,20 PSI; 程序升温:初始柱温 100  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 0.5 min; 然后以 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 140  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 5 min; 以 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  速度升至 160  $^{\circ}\text{C}$ ; 再以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  速度升到 250  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 5 min; 进样口采用不分流模式,温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ,氮气为载气; FID 检测器的温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ,氮气、氢气、空气流速分别为 25、30 和 400 mL/min; 进样体积 1  $\mu\text{L}$ 。各种单糖标准品 (鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖) 按照相同步骤进行实验,按照相同的检测程度,将处理后的标准品单糖进行气相色谱分析。

### 1.3.9 多糖的抗氧化活性实验

#### 1.3.9.1 氧自由基清除能力 (ORAC 值) 测定

参考 Huang 等<sup>[8]</sup>的方法略作修改。用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 配制 0.5mg/mL 待测多糖样品溶液,以及 0~200  $\mu\text{M}$  不同浓度梯度的 Trolox 标准溶液。在 96 孔板中依次加入 20  $\mu\text{L}$  样品溶液 (Trolox、多糖样品、BHT), 40  $\mu\text{L}$  荧光素 (FL) 溶液 (3.5 nmol/L) 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下预热 15 min,接着迅速加入 140  $\mu\text{L}$  现配的 AAPH

(12 mmol/L) 溶液。读数前震荡 10 min,使溶液充分混匀。在激发波长 485 nm,发射波长 538 nm 条件下每 2 min 测定一次各孔吸光值,连续测定 2 h。每个样品 3 个平行。计算荧光熄灭曲线下的净面积,以 Trolox 浓度及其对应的净面积绘制标准曲线,再根据样品的净面积代入标曲,即得多糖样品的 ORAC 值,以  $\mu\text{mol}$  Trolox/g 表示。

#### 1.3.9.2 DPPH 自由基清除能力测定

参考 Blois<sup>[9]</sup>的方法略作修改,测定多糖样品对 DPPH 自由基的清除能力。取 2 mL 不同浓度的多糖溶液 (0.25~2 mg/mL),加入 2 mL DPPH 乙醇溶液 (0.2 mmol/L),涡旋混匀,室温下避光反应 30 min,在 517 nm 处测吸光值  $A_i$ 。以 2 mL 蒸馏水加 2 mL 无水乙醇混合液进行调零,以分别对应的相同浓度多糖溶液 2 mL 加 2 mL 无水乙醇的吸光值为对照 ( $A_j$ ), 2 mL DPPH 溶液加 2 mL 无水乙醇混合后所测吸光值为  $A_c$ 。BHA 为阳性对照。龙须菜多糖对 DPPH 自由基清除能力按下式计算:

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

#### 1.3.9.3 多糖还原力的测定

参照 Oyaizu<sup>[10]</sup>的方法并加以修改。2 mL 不同浓度的多糖溶液 (0.25~2 mg/mL) 加入 2 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 M, pH 6.6) 和 2 mL 铁氰化钾溶液 (1%,  $m/V$ ), 混匀后在恒温水浴锅中 50  $^{\circ}\text{C}$  保温 20 min,接着加入 2 mL TCA (10%,  $m/V$ ) 终止反应,涡旋混匀后,3500 r/min 离心 10 min,取上清液 (2 mL) 与 2 mL 蒸馏水和 0.4 mL 氯化铁充分混匀,室温下静置反应 10 min。在 700 nm 处测量吸光度值, BHT 为阳性对照。

#### 1.3.10 多糖抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性的测定

参照 Pavan 等<sup>[11]</sup>的方法,在 20 mL 的试管中加入 500  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -淀粉酶 (0.5 mg/mL) 溶液和 500  $\mu\text{L}$  样品,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min。加入 500  $\mu\text{L}$  淀粉 (1%,  $m/V$ ) 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min。最后加入 1 mL DNS 试剂沸水浴 5 min 灭酶,加入 10 mL 去离子水稀释,以阿卡波糖为阳性对照组,分别在 520 nm 处检测吸光值。

#### 1.3.11 数据处理

实验数据均以均数 $\pm$ 标准偏差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间的差异显著性分析、聚类分析及不同因素间的相关性分析均采用 SPSS 16.0 统计软件进行,检验水平为  $p < 0.05$  时为差异显著,具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同提取方法的龙须菜多糖得率

不同方式提取龙须菜多糖的得率如图 1 所示, 传统热水提取、超声波提取、超声协同热水提取、柠檬酸提取的多糖得率分别为  $14.87 \pm 0.18\%$ 、 $8.26 \pm 0.26\%$ 、 $16.73 \pm 0.36\%$ 、 $17.81 \pm 0.34\%$ 。由结果可知, 柠檬酸提多糖得率最高, 其次是超声协同热水提取法, 超声提取法得率最低。相关研究表明柠檬酸可有效地降解海藻胶, 使多糖溶出<sup>[12]</sup>, 从而提高得率; 本文中超声提取多糖得率最低, 与前人的<sup>[13]</sup>的报道有所差别, 可能是原料品种的差异以及超声提取温度较低的影响。在提取温度、提取时间、料液比相同情况下, 柠檬酸提取多糖得率约为传统水提法的 1.2 倍, 与超声协同热水提取多糖得率有显著性差异。

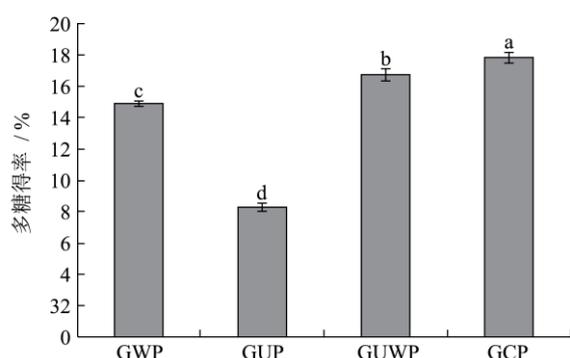


图 1 不同提取方法所得龙须菜多糖的得率

Fig.1 Extraction yield of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* using different extraction methods

表 1 不同提取方法所得龙须菜多糖的粘度和分子量分布

Table 1 Apparent viscosity and molecular weight distribution of the polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis*

多糖样品	GWP	GUP	GUWP	GCP
平均分子量/kDa	1571.0 <sup>a</sup>	2010.13 <sup>b</sup>	2002.75 <sup>c</sup>	21.17 <sup>d</sup>
PDI(=Mw/Mn)	15.24 <sup>a</sup>	11.77 <sup>b</sup>	18.46 <sup>c</sup>	1.11 <sup>d</sup>
粘度/(mPa S)	38.67 ± 0.4 <sup>a</sup>	29.41 ± 0.03 <sup>b</sup>	25.55 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.89 ± 0.003 <sup>d</sup>

注: a、b、c、d、e表示不同样品间多糖得率差异的显著性 ( $p < 0.05$ ), 相同字母表示无显著性差异, 不同字母表示有显著性差异。

据中外学者报道, 多糖的分子量与其生物活性有密切联系。Choi J 等<sup>[14]</sup>发现经辐射降解获得的低分子量海带多糖可显著提高抗氧化性; Hou 等<sup>[15]</sup>报道了用双氧水降解的多糖具有更高的自由基清除能力。因此, 用柠檬酸提取的多糖 GCP 可能具有更高的抗氧化活性。

如表 1 所示, 不同方法提取的龙须菜多糖的粘度均存在显著差异, 柠檬酸提取的多糖 GCP 的粘度最小为  $0.89 \pm 0.003$  mPa S, GWP、GUP 和 GUWP 的粘度分别为  $38.67 \pm 0.4$ 、 $29.41 \pm 0.03$ 、 $25.55 \pm 0.02$  mPa s。

研究表明, 粘度与生物活性也有关联, 多糖往往由于粘度高而限制了其在临床上的应用。由结果可知, 柠檬酸可显著降低多糖的粘度, 超声也可轻度降低多

注: a、b、c、d、e表示不同样品间多糖得率差异的显著性 ( $p < 0.05$ ), 相同字母表示无显著性差异, 不同字母表示有显著性差异。

## 2.2 不同方法提取龙须菜多糖的粘度和分子量分布比较

用不同方法提取得到的龙须菜多糖的分子量如表 1 所示, 所有龙须菜多糖均只洗脱出一个主峰, GWP、GUP、GUWP、GCP 的平均分子量依次为 1571.0 ku、2010.13 ku、2002.75 ku、21.17 ku。柠檬酸提取的龙须菜多糖 GCP 分子量最小, 仅约为传统水提法得到的 GWP 分子量的 1.35%, 超声提取和超声协同热水提取所得多糖 GUP 和 GUWP 的 1%。PDI 值即 Mw/Mn, 反映样品间分子量分布的宽度, 值越大, 表示分子量分布越广, 值越小, 表示分子量分布越窄越集中。比较 4 中不同方法提取的龙须菜多糖的 PDI 值, 柠檬酸提多糖 GCP 最小为 1.11, GWP、GUP、GUWP 则分别为 15.24、11.77、18.46。可见, 酸法提取可以有效地降解糖链, 使所得多糖的分子量显著降低, 且分子量均一, 而超声波提取及超声协同热水提取所得多糖分子量最大, 可能原因是该温度下超声波对龙须菜细胞壁的作用并不明显, 不能有效降解大分子多糖。

糖粘度, 因此, 用柠檬酸提取多糖为其临床应用提供了新途径。

## 2.3 不同方法提取龙须菜多糖的单糖组成

如表 2 所示, 不同方法提取的龙须菜多糖中性糖的单糖组成相近, 半乳糖含量均占较大比重, 其中, GUWP 半乳糖含量最高占 82.6%, GWP 半乳糖占 79.8%, GUP 半乳糖占 36.3%, GCP 半乳糖占 44.1%。余杰等<sup>[16]</sup>采用纸层析结合化学分析研究龙须菜多糖的单糖组成, 结果表明龙须菜多糖主要由半乳糖与 3,6-内醚半乳糖组成, 与本文所得结果基本一致。GWP、GUP、GUWP 均未检测出鼠李糖, 而柠檬酸提多糖 GCP 则含较高的鼠李糖, 所占百分比为 19.3%。

柠檬酸提多糖 GCP 还有较高的葡萄糖含量, 占 17.0%, 水提多糖 GWP 次之, 占 14.9%。此外, GCP 中阿拉伯糖含量较其他方法提取的多糖较高, 占 5.88%。Fan 等<sup>[17]</sup>的研究结果表明龙须菜多糖主要含半乳糖和少量的鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖, 其摩尔比为 29.64:0.19:0.21:0.59:1.00, 本实验所得结果与之相近。

表 2 不同提取方法所得龙须菜多糖的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of the polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* extracted with different methods

标准单糖	GWP	GUP	GUWP	GCP
鼠李糖	-	-	-	19.3
阿拉伯糖	0.16	0.2	0.32	5.88
木糖	5.1	3.8	7.0	11.6
甘露糖	-	54.9	3.9	2.0
葡萄糖	14.9	4.7	6.2	17.0
半乳糖	79.8	36.3	82.6	44.1

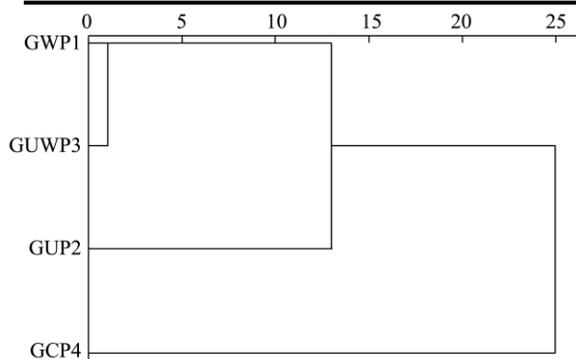


图 2 聚类分析所得的系统树图

Fig.2 Dendrogram derived from the hierarchical cluster analysis

注: 不同提取方法所得龙须菜多糖的单糖组成。

多变量统计技术是用于查看和分析复杂数据的合适工具。聚类分析是一种理想的多变量统计技术, 主要有分层聚类法和迭代聚类法。由于研究的样品或指标(变量)之间存在着不同程度的相似性, 即亲疏关系——以样品间距离衡量, 因此可以根据待评价样品的多个观测指标, 计算样品点与其他样品点之间的距离, 把相似程度较大的样品聚合为一类, 而其他相似程度较大的样品聚合为另一类<sup>[18]</sup>。根据不同提取方法所得龙须菜多糖的单糖组成, 比较其距离, 得到不同提取方式的多糖结构系统树图(表示亲缘关系的树状图解, 图 2)。由图 2 可见, 系统聚类分析可将这四种提取方式分为 3 类, 其中第一类为传统热水提取和超声协同热水提取, 说明这两种提取方式的多糖在结构方面更相似; 第二类为传统热水提取和超声提取; 第三类为传统热水提取、超声提取和柠檬酸提取。由此可见柠檬酸提取的龙须菜多糖的结构与其他提取方

式的结构有着很大的差异, 而结构的差异可能会导致活性的差异性。

## 2.4 不同方法提取龙须菜多糖的糖醛酸和硫酸根含量比较

表 3 不同提取方法所得龙须菜多糖的糖醛酸和硫酸根含量

Table 3 Content of uronic acids and sulfate groups of the polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* obtained using different extraction methods

多糖样品	总糖含量/%	糖醛酸含量/%	硫酸根含量/%
GWP	41.19±0.89	22.51±0.26 <sup>c</sup>	37.01±1.23 <sup>a</sup>
GUP	37.83±1.02	19.77±0.3 <sup>d</sup>	38.72±1.96 <sup>a</sup>
GUWP	43.12±1.25	24.26±0.35 <sup>b</sup>	33.07±1.22 <sup>b</sup>
GCP	66.68±1.78	33.92±0.22 <sup>a</sup>	19.64±1.0 <sup>c</sup>

注: a、b、c、d 表示不同样品间多糖得率差异的显著性 ( $p < 0.05$ ), 相同字母表示无显著性差异, 不同字母表示有显著性差异。

大量研究表明, 多糖中硫酸根和糖醛酸含量对其生物活性功能有着直接关系, 因此测定多糖中硫酸根和糖醛酸含量有重要的意义。由表 3 可知, 柠檬酸提多糖 GCP 的糖醛酸含量最高而硫酸根含量最低, 其含量分别为 33.92±0.22%、19.64±1.0%, 超声提取多糖 GUP 糖醛酸含量最低而硫酸根含量最高, 其含量分别为 19.77±0.3%、38.72±1.96%。GWP、GUWP 的糖醛酸含量和硫酸根含量均相近。

## 2.5 不同方法提取龙须菜多糖的抗氧化性比较

### 2.5.1 不同方法提取龙须菜多糖的氧自由基清除能力 (ORAC)

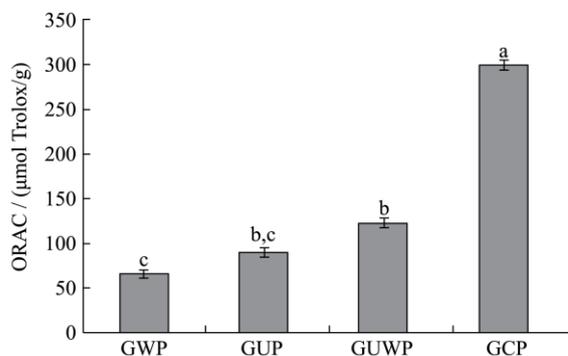


图 2 不同提取方法所得龙须菜多糖的 ORAC 值

Fig.2 ORAC value of the polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* obtained using different extraction methods

注: a、b、c 表示不同样品间多糖得率差异的显著性

( $p < 0.05$ )，相同字母表示无显著性差异，不同字母表示有显著性差异。

ORAC 法是评价物质抗氧化性的重要指标，因为它是一种基于氢原子转移 (HAT) 的方法，一般地被认为是最接近真实生理环境氧化过程。比较不同提取方式的龙须菜多糖氧自由基吸收能力 (ORAC) 如图 2 所示。柠檬酸提取的龙须菜多糖 GCP 氧自由基吸收能力最高，达  $298.735 \pm 6.57 \mu\text{mol Trolox/g}$ ，GUP 和 GUWP 的 ORAC 值差异不显著，分别为  $88.752 \pm 6.67 \mu\text{mol Trolox/g}$  和  $119.748 \pm 8.52 \mu\text{mol Trolox/g}$ ，而水提多糖 GWP 的 ORAC 值最低，为  $65.213 \pm 3.66 \mu\text{mol Trolox/g}$ 。结果显示，柠檬酸提多糖 GCP 的氧自由基吸收能力显著高于用其他方法提取的多糖。

### 2.5.2 不同方法提取龙须菜多糖的 DPPH 自由基清除能力

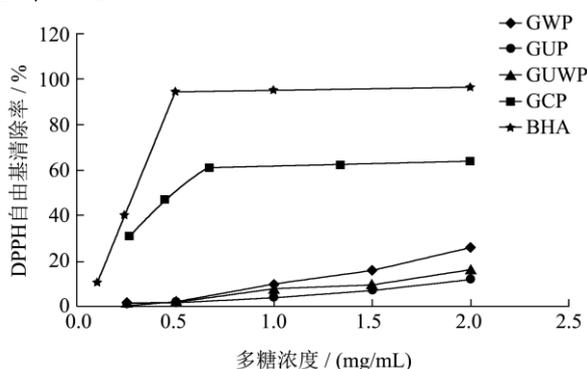


图 3 不同提取方法所得龙须菜多糖的 DPPH 自由基清除率  
Fig.3 DPPH radical scavenging rate of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* obtained using different extraction methods

DPPH 是一种稳定的自由基，在 517 nm 处有强吸收峰，当有抗氧化剂存在时，其单电子与之配对而使得吸收峰逐渐消失，其褪色程度与其所接受的电子数成定量关系，因此被广泛用于评价抗氧化剂清除自由基的活性。不同方法提取的龙须菜多糖 DPPH 自由基清除能力如图 3 所示，多糖的 DPPH 自由基清除率均与浓度成正相关。柠檬酸提多糖 GCP 的 DPPH 自由基清除率显著高于其他方法提取的多糖，在多糖浓度为 0.67 mg/mL 时，清除率就达到了  $61.76 \pm 0.3\%$ ，超声波提取多糖 GUP 的 DPPH 自由基清除率最低，当多糖浓度为 2.0 mg/mL 时，清除率只有  $12.38 \pm 0.2\%$ 。除柠檬酸提多糖，其他方法提取的多糖 DPPH 自由基清除能力无显著差异。所有不同方法提取的多糖其 DPPH 自由基清除能力均低于抗氧化剂 BHA，在浓度为 0.5 mg/mL 时，BHA 对 DPPH 自由基的清除率已达  $94.89 \pm 1.5\%$ ，但在较低浓度条件下，GCP 与 BHA 对自由基的清除率无显著差异，如在 0.25 mg/mL 浓度条

件下，GCP 和 BHA 的 DPPH 自由基清除率分别为  $30.98 \pm 0.2\%$  和  $38.96 \pm 0.3\%$ 。

### 2.5.3 不同方法提取龙须菜多糖的还原力比较

还原力测定的原理是抗氧化剂可将赤血盐 (铁氰化钾) 还原成黄血盐 (亚铁氰化钾)，进一步生成 Perl 普鲁士蓝，在 700 nm 处有强吸收峰。因此在 700 nm 波长下测定吸光度值，以检测普鲁士蓝的生成量，吸光度值越高，表明还原能力越强。如图 4 所示，抗氧化剂 BHT 的还原力要显著高于龙须菜多糖，在 0.16 mg/mL 时就达到了  $1.08 \pm 0.02$ 。还原力的大小与多糖浓度成线性相关，柠檬酸提多糖 GCP 的还原力要明显高于其他方法提取的多糖，浓度在 2.0 mg/mL 时，还原力为  $0.76 \pm 0.01$ ，超声波提多糖 GUP 还原力最低，2.0 mg/mL 浓度下，还原力仅为  $0.17 \pm 0.003$ 。除柠檬酸提多糖 GCP 外，其他方法提取多糖的还原力无显著性差异。不同方法提取龙须菜多糖的还原力大小次序为：GCP > GWP > GUWP > GUP，与其 DPPH 自由基清除能力的趋势相一致。

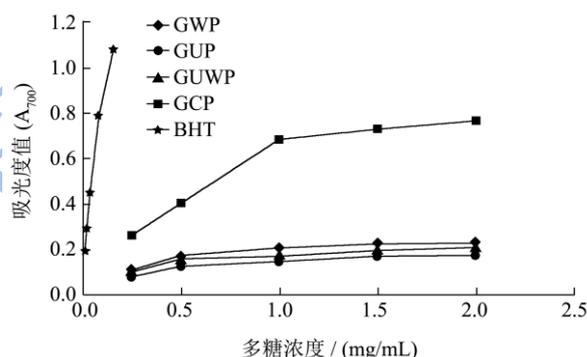


图 4 不同提取方法所得龙须菜多糖的还原力  
Fig.4 Reducing power of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* obtained using different extraction methods

### 2.6 不同方法提取龙须菜多糖的 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性比较

淀粉的水解是血中葡萄糖的主要来源， $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶分别是淀粉水解和肠道吸收过程中的关键酶。研究表明，抑制这些酶的活性可以显著降低餐后血糖水平的提高，因此通过抑制  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性是控制 II 型糖尿病的有效途径。IC<sub>50</sub> 值表示抑制率达到 50% 时样品的浓度，IC<sub>50</sub> 值越小表明抑制效果越好。如图 5，表明了不同方法提取的龙须菜多糖对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性。其中，柠檬酸提多糖 GCP 的 IC<sub>50</sub> 值最小，为  $3.94 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ ，显著低于阿卡波糖的 IC<sub>50</sub> 值 ( $22.94 \pm 0.89 \mu\text{g/mL}$ )，即 GCP 的抑制  $\alpha$ -淀粉酶的活性最好。GUP 与 GUWP 的 IC<sub>50</sub>

值无显著性差异,均高于GWP。结果表明,不同方法提取龙须菜多糖的 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性大小依次为GCP>GUWP>GUP>GWP。

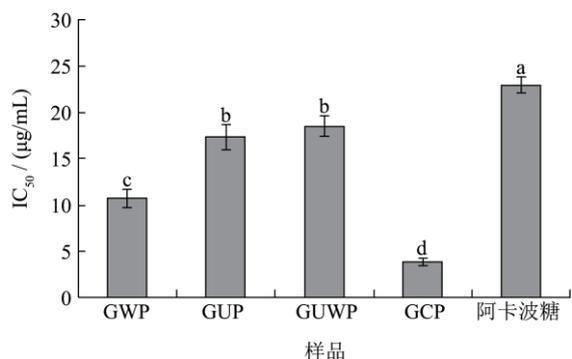


图5 不同提取方法所得龙须菜多糖的 $\alpha$ -淀粉酶抑制率  
Fig.5 IC<sub>50</sub> of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* obtained using different extraction methods on  $\alpha$ -amylase activity

注: a、b、c、d表示不同样品间多糖得率差异的显著性( $p<0.05$ ),相同字母表示无显著性差异,不同字母表示有显著性差异。

研究表明,多糖的生物活性与其结构有密切关系,如分子量、化学组成、糖苷键、分支度、立体构象等。比较研究表明,硫酸根含量低、糖醛酸含量高的低分子量多糖GCP,其清除自由基的能力显著高于其他方法提取的多糖,说明分子量、硫酸根含量和糖醛酸含量对多糖清除自由基活性有很大的影响,比较发现硫酸多糖中低硫组分的糖醛酸含量较高,其清除自由基的活性也高,说明糖醛酸容易被氧自由基氧化降解,从而清除自由基。此结果与硫酸多糖的活性研究结果一致<sup>[19]</sup>。此外,GCP也表现出最强的 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性,这可能与其单糖组成有关。Yu KW等<sup>[20]</sup>研究显示,具有降血糖活性的红藻类多糖通常包含半乳糖醛酸聚糖区(光滑区)和带中性糖侧链的鼠李半乳糖醛酸区(发形区),其活性中心在阿拉伯半乳糖

侧链和光滑区上,而本实验中GCP含有较高的半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖,因此体外降血糖活性好。多糖分子量、单糖组成、糖醛酸和硫酸根含量与其生物活性的内在联系还需进一步研究。

## 2.7 龙须菜多糖物化性质与活性之间的相关性分析

龙须菜多糖物化性质(如多糖含量、糖醛酸含量、硫酸基含量、分子量、PDI值和粘度)与活性(如抗氧化和降血糖活性)之间的相关性见表4。结果表明,多糖含量与抗氧化活性之间显著正相关,而多糖含量与 $\alpha$ -淀粉酶抑制率(IC<sub>50</sub>值)负相关,并未表现出显著相关性。同样地,糖醛酸含量与抗氧化活性之间呈显著正相关,但是与 $\alpha$ -淀粉酶抑制率(IC<sub>50</sub>值)呈非显著性负相关。然而,硫酸基含量、分子量、PDI值和粘度均与抗氧化活性之间负相关,而与 $\alpha$ -淀粉酶抑制率(IC<sub>50</sub>值)正相关。对于 $\alpha$ -淀粉酶抑制率而言,其IC<sub>50</sub>值越小表明抑制效果越好,表现负相关关系。因此,龙须菜多糖的多糖含量以及糖醛酸含量与抗氧化、体外降血糖活性之间正相关,而龙须菜多糖的硫酸基含量、分子量、PDI值和粘度与抗氧化、体外降血糖活性之间负相关。柠檬酸提取龙须菜多糖能够有效地提高多糖含量,增加其糖醛酸含量,降低硫酸基含量,降低多糖分子量及其粘度,并使多糖分子量相对均一。这可能是柠檬酸提取龙须菜多糖表现出较强活性的原因。此外,抗氧化活性之间,如ORAC值、DPPH清除率以及还原力之间均表现出显著正相关性,其相关系数分别为0.966、0.977和0.999。而抗氧化活性与体外降血糖活性之间虽然表现出正相关关系,然而其相关性并不显著。这一结果说明,龙须菜多糖的抗氧化活性可能是其体外降血糖活性的原因之一。

表4 龙须菜多糖物化性质与活性之间的相关性

Table 4 Correlation of physicochemical properties with activities of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis*

	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8	Col9
Col7	0.979 <sup>a</sup>	0.961	-0.983	-0.917	-0.869	-0.987			
	0.020 <sup>b</sup>	0.039	0.017	0.083	0.131	0.013			
Col8	0.987	0.957	-0.959	-0.988	-0.926	-0.919	0.966		
	0.013	0.043	0.041	0.012	0.074	0.081	0.034		
Col9	0.988	0.958	-0.964	-0.979	-0.928	-0.937	0.977	0.999	
	0.012	0.042	0.036	0.021	0.072	0.063	0.023	0.001	
Col10	-0.849	-0.818	0.778	0.949	0.823	0.636	-0.745	-0.889	-0.866
	0.151	0.182	0.222	0.051	0.177	0.364	0.255	0.111	0.134

注: 其中Col1~Col9,分别表示多糖含量、糖醛酸含量、硫酸基含量、分子量、PDI值、粘度、ORAC值、DPPH清除率(1

mg/mL)、还原力(1 mg/mL)和 $\alpha$ -淀粉酶抑制率(IC<sub>50</sub>值);<sup>a</sup>表示相关系数;<sup>b</sup>表示 $p$ 值, $p < 0.05$ 表示显著相关。

### 3 结论

在本研究中,采用了传统热水提取法、超声波提取法、超声协同热水提取法以及柠檬酸提取法4种方法提取了龙须菜多糖,并对其得率、分子量、粘度、单糖组成、糖醛酸和硫酸根含量进行了测定。结果表明:4种不同提取方法得到的龙须菜多糖在结构和生物活性方面均存在差异,其中,柠檬酸提法得到的多糖得率最高,粘度和分子量都显著低于其他方法提取的多糖,且溶解性最好,便于对龙须菜多糖做进一步的纯化。活性实验结果表明,不同方法提取得到的龙须菜多糖都具有一定的抗氧化性和 $\alpha$ -淀粉酶的抑制性,综合氧自由基清除实验、DPPH自由基清除实验、还原力实验和抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性实验,柠檬酸提多糖的抗氧化性和对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制性显著高于其他方法所提多糖。综上所述,柠檬酸提取龙须菜多糖能够有效地提高多糖含量,增加其糖醛酸含量,降低硫酸基含量,降低多糖分子量及其粘度,并使多糖分子量相对均一。这可能是柠檬酸提取龙须菜多糖表现出较强活性的原因,其抗氧化降血糖活性的相关机制及构效关系有待进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 张学成,费修纭,王广策,等.江蓠属海藻龙须菜的基础研究与大规模栽培[J].中国海洋大学学报:自然科学版,2009,39(5):947-954  
ZHANG Xue-cheng, FEI Xiu-geng, WANG Guang-ce, et al. Genetic studies and large scale cultivation of *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(5): 947-954
- [2] 周峙苗,何清,马晓宇.东海红藻龙须菜的营养成分分析及评价[J].食品科学,2010,31(9):284-287  
ZHOU Shi-miao, HE Qing, MA Xiao-yu. Evaluation of nutritional components in *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Food Science, 2010, 31(9): 284-287
- [3] 王新梅,闫美艳.海藻多糖生物活性研究进展[J].齐鲁药事,2009,28(4):228-231  
WANG Xin-mei, YAN Mei-yan. The progress of research in Seaweed polysaccharides biological activity [J]. Qilu Pharmaceutical Affairs, 2009, 28(4):228-231
- [4] 竺巧玲,杨文鹤,楼乔明,等.提取工艺对龙须菜多糖得率及其抗氧化性能的影响[J].食品科技,2008,33(2):162-164  
ZHU Qiao-ling, YANG Wen-ge, LOU Qiao-ming et al. The impact of yield of polysaccharides and ant oxygenic property extracted with technical conditions from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Food Science and Technology, 2008, 33(2): 162-164
- [5] 陈乾,马天翔,郭宏举,等.硫酸钡-比浊法测定褐藻糖胶中硫酸根的含量[J].药学实践杂志,2012,30(2):118-120  
CHEN Qian, MA Tian-xiang, GUO Hong-ju et al. Determination of the sulfate content in sulfated fucans by barium sulfate turbidity [J]. Journal of Pharmaceutical Practice, 2015, 30(2): 118-120
- [6] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction. [J]. Analytical Biochemistry, 1962, 4(4): 330-334
- [7] 游丽君,冯梦莹,刘钧发,等.不同提取方法对灵芝多糖性质的影响研究[J].现代食品科技,2013,29(6):1207-1212  
YOU Li-jun, FENG Meng-ying, LIU Jun-fa, et al. Characteristics of *Ganoderma lucidum* polysaccharide prepared by different methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1207-1212
- [8] Huang W Y, Majumder K, Wu J. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals [J]. Food Chemistry, 2010, 123(3): 635-641
- [9] Blois M S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [J]. Nature, 1958, 181(4617): 1199-1200
- [10] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. [J]. Jpn. J. Nutr. Diet, 1986, 44
- [11] Bellamakondi P K. Anti-hyperglycemic activity of *Caralluma umbellata* Haw [J]. Bioimpacts Bi, 2014, 4(3): 113-6
- [12] Wu Q, Zheng C, Ning Z, et al. Modification of low molecular weight polysaccharides from *tremella fuciformis* and their antioxidant activity in vitro [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2007, 8(7): 670-679.
- [13] 黄芳,梁倩倩,周宏.响应面法优化龙须菜多糖提取工艺[J].食品工业科技,2013,34(7):260-264  
HUANG Fang, LIANG Qian-qian, ZHOU Hong. Optimization of extraction conditions for polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(7): 260-264
- [14] Choi J I, Kim H J. Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity [J]. Carbohydr Polym, 2013, 97(2): 358-362
- [15] 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
- [16] 余杰,王欣,陈美珍,等.潮汕沿海龙须菜的营养成分和多糖组成分析[J].*食品科学*,2006,27(1):93-97
- YU Jie, WANG Xin, CHEN Mei-zhen, et al. Analysis nutritional components and polysaccharide composition of *Gracilaria lemaneiformis* from Chaoshan coast [J]. *Food Science*, 2006, 27(1): 93-97
- [17] Fan Y, Wang W, Song W, et al. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88: 1313-1318
- [18] Sun W, Zhao Q, Zhao M, et al. Structural evaluation of myofibrillar proteins during processing of cantonese sausage by raman spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(20): 11070-11077
- [19] Nishino T. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities [J]. *Carbohydrate Research*, 1989, 186(1): 119-129
- [20] Yu K W, Kiyohara H, Matsumoto T, et al. Structural characterization of intestinal immune system modulating new arabino-3, 6-galactan from rhizomes of *Atractylodes lancea* dc [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 46: 147-156