

文章编号:1000-0615(2009)02-0342-06

龙须菜多糖的降解及其降解产物的抗氧化活性

杨文鸽¹, 谢果凰¹, 徐大伦¹, 竺巧玲², 卢佳芳¹, 周星宇¹

(1. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波市质量技术监督局鄞州分局, 浙江 宁波 315100)

摘要:采用维生素 C 和过氧化氢体系诱导产生的自由基降解龙须菜多糖, 并对龙须菜多糖及其降解产物的抗氧化活性进行分析。结果表明, 在维生素 C 和过氧化氢反应体系中, 龙须菜多糖的降解反应在 2 h 内基本完成, 降解后得到的 4 种产物分子量分别为 21 492, 12 864, 5 417 和 3 043 u, 降解反应未导致龙须菜多糖去硫酸化, 但 3,6-内醚-半乳糖含量略有降低; 在清除超氧阴离子自由基、DPPH 自由基和还原 Fe^{3+} 方面, 龙须菜多糖的抗氧化活性随分子量的降低而增强, 而在清除羟基自由基方面, 抗氧化活性却随多糖分子量的降低而减弱。

关键词:龙须菜多糖; 降解; 抗氧化活性; 分子量

中图分类号:S 985.4

文献标识码:A

龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 是一种重要的经济海藻, 能大量吸收海水中的 N、P 和 CO_2 , 释放 O_2 而净化海区环境, 减缓赤潮发生, 加上具有藻体大、适应性强、生长快等优点^[1], 是我国继海带、紫菜和裙带菜之后的第四种人工栽培海藻。近年来沿海各地龙须菜养殖业发展迅速, 资源丰富, 因此如何充分利用和开发龙须菜资源是急需解决的问题。

从海藻中提取的多糖具有多种生物学功能, 如抗肿瘤、抗病毒、降血脂及抗氧化作用等。但许多天然多糖是高分子化合物, 无法通过机体屏障到达细胞而影响其生物学功能^[2]。对多糖进行降解, 得到适宜分子量的多糖片断或寡糖, 可以提高多糖的生物活性。如法国科学家从褐藻中提取高分子岩藻聚糖, 通过降解和离子交换色谱法, 制得具有较强抗凝血活性的低分子量岩藻聚糖^[3]; 师然新等^[4]制备并试验不同分子量角叉菜多糖对小鼠肝癌 H-22 抑瘤率的影响, 结果表明多糖被降解至一定范围时能有效提高其抑瘤率, 但若被继续降解, 则抑瘤效率下降。多糖降解的方法主要有化学降解、酶降解和超声波降解等。这些方

法对多糖的降解大多数是随机的, 降解产物的分子量范围较大; 另外尽管有专一性的糖苷酶, 但由于其价格较为昂贵, 不适合大规模工业生产^[2]。研究表明自由基能降解多糖, 降解初始阶段, 自由基快速攻击糖链, 夺取与 C 相连的 H 原子, 生成羟基自由基, 这些产物自由基可以互相反应, 也可与 O_2 反应生成相应的过氧化自由基, 而过氧化自由基极不稳定, 导致多糖碳链断裂而降解。自由基作为多种生物大分子的“破坏者”, 降解多糖后的产物具有很窄的分子量分布, 有望成为新型的、理想的降解工具^[5]。

龙须菜富含多糖, 含量可达藻体干重的 30% 左右。已有研究表明龙须菜多糖具有抗突变、抗肿瘤等生理活性^[6-7]。但有关龙须菜多糖的降解及其降解产物抗氧化作用的研究未见报道。本文采用维生素 C 和过氧化氢体系诱导产生的自由基降解龙须菜多糖, 制备不同分子量的龙须菜多糖降解产物, 并对它们的抗氧化活性进行研究, 以探讨龙须菜多糖分子量与抗氧化作用之间的关系, 为利用海藻资源开发新药和保健食品提供理论基础。

收稿日期:2008-06-30 修回日期:2008-10-03

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2003AA625030);宁波市科技局科研攻关项目(2004C100034)

通讯作者:杨文鸽, Tel:0574-87600551, E-mail:yangwenge@nbu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

龙须菜(*G. lemaneiformis*) 2006年7月采自浙江象山港某网箱养殖基地,清洗去除泥沙等杂物,干燥粉碎后备用。

龙须菜多糖(*G. lemaneiformis* polysaccharide, 简称GLP):本实验室自制。以龙须菜干粉为原料,热水浸提法制得粗多糖,进一步用DEAE-Sephadex A-25纯化,Sephacryl S-300凝胶色谱法测得龙须菜多糖的平均分子量为49 981 u。

1.2 方法

龙须菜多糖降解产物的制备及其性质的测定

(1) 龙须菜多糖降解时间的确定

取龙须菜多糖(GLP) 4 g,配成0.5%水溶液。25℃下加入10 mmol/L浓度的维生素C(V_C)和过氧化氢(H_2O_2)降解,搅拌,反应不同时间(20,40,60,120,240,480 min),利用旋转式粘度计(型号NDJ-1)测定反应液粘度,由粘度的变化确定龙须菜多糖合适的降解时间。

(2) 不同分子量降解产物的制备

取一定浓度的龙须菜多糖溶液,按表1加入 V_C 和 H_2O_2 进行降解,透析(截留分子量为3000 u),80%乙醇沉淀,无水乙醇洗涤后冷冻干燥,得到4组降解产物。降解产物复溶于水,上Sephadex G-200层析柱,去离子水洗脱,每管4 mL收集洗脱液,蒽酮-硫酸法检测,根据洗脱曲线仅合并最大单一峰形的洗脱液,洗脱液浓缩后加入无水乙醇沉淀,干燥。得到的4种多糖降解产物分别记为DP1、DP2、DP3和DP4。

表1 不同分子量降解产物的制备条件

Tab.1 Preparation condition of degraded products with different molecular weight

多糖降解产物 degraded polysaccharide products	抗坏血酸 (mmol/L) ascorbate	过氧化氢 (mmol/L) hydrogen peroxide
DP1	3	3
DP2	5	5
DP3	7	7
DP4	9	9

(3) 多糖降解产物化学组成和分子量的测定

多糖含量:蒽酮-硫酸比色法^[8]

硫酸基含量:明胶BaCl₂法^[8]

3,6-内醚-半乳糖含量:间苯二酚比色法^[9]

多糖及其降解产物的分子量:Sephacryl S-300凝胶色谱法测定。

龙须菜多糖及其降解产物抗氧化活性的测定

(1) 对Fe³⁺的还原能力

采用铁氰化钾法^[10]测定。

(2) 清除1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH·)能力^[11]

样品液2 mL,加2 mL DPPH·溶液(乙醇配制)摇匀,静置30 min,于517 nm波长下测定吸光度。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

式中, A_1 :样品液+DPPH·溶液的吸光度;

A_2 :样品液+乙醇溶液的吸光度;

A_0 :DPPH·溶液+蒸馏水的吸光度。

(3) 清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)能力

采用改良的邻苯三酚自氧化法^[12]。

(4) 对羟基自由基($\cdot OH$)的抑制率

参照Smironff等^[13]方法并改进。取6 mmol/L FeSO₄溶液2 mL,不同浓度的多糖溶液2 mL,6 mmol/L H₂O₂溶液2 mL,静置10 min后加入6 mmol/L水杨酸溶液2 mL,静置后510 nm比色。

$$\cdot OH \text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

式中, A_0 :空白对照;

A_1 :某质量浓度多糖的吸光值;

A_2 :无水杨酸时多糖的吸光值。

1.3 数据处理

实验数据平行测定3次,结果用平均值±标准差表示。数据用SPSS(11.5)软件进行单因素方差分析,Duncan氏多重比较分析组间差异显著性程度,显著性水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 龙须菜多糖的降解

龙须菜多糖降解时间的确定 许多研究报道,植物体内大量存在的抗坏血酸可以还原氧分子产生H₂O₂,而植物体内的还原态金属离子与产生的H₂O₂发生Fenton反应,产生羟基自由基。羟基自由基可以降解细胞壁多糖,从而促进植物生长和果实发育^[5]。模拟植物体内的这种反应,

采用 H_2O_2 和 V_C 反应体系对龙须菜多糖进行降解。 H_2O_2 和 V_C 的添加比例对多糖降解反应产生影响,文献报道 H_2O_2 和 V_C 浓度比值在 0.8 ~ 1.7 时降解坛紫菜多糖的效率最高^[14], V_C 浓度过大,会导致反应效率降低。

本文参照文献[14]进行预实验,确定 H_2O_2 和 V_C 浓度比值为 1.0 时降解龙须菜多糖的效率最高,所以选择在龙须菜多糖溶液中添加等浓度的 V_C 和 H_2O_2 ,降解不同时间后,通过粘度计测定反应液粘度,结果见图 1。可以看出,反应开始阶段,溶液的粘度迅速降低,反应中产生的自由基使多糖迅速降解。随着时间的延长,龙须菜多糖溶液的色泽下降,粘度变化趋于平稳,反应液的粘度在 2 h 后几乎未变,说明多糖降解反应在 2 h 内已基本完成。因此在后续操作中,确定龙须菜多糖的降解时间为 2 h。

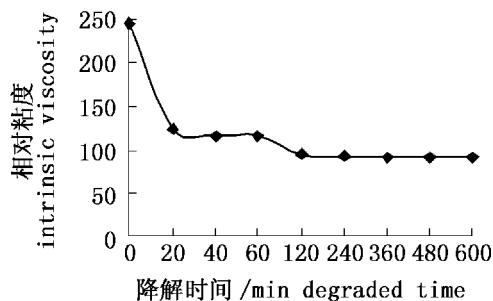


图 1 龙须菜多糖降解时间的确定

Fig.1 Determination of degraded time for *G. lemaneiformis* polysaccharide

龙须菜多糖降解产物的制备及其化学性质取一定浓度的龙须菜多糖溶液,按表 1 加入 V_C 和 H_2O_2 降解 2 h。降解液乙醇沉淀,冷冻干燥后复溶于水,上 Sephadex G-200 层析柱纯化、收集,得到的降解产物分别记为 DP1、DP2、DP3 和 DP4,测定各降解产物的化学组成和分子量(表 2)。

表 2 龙须菜多糖及其降解产物的化学组成和分子量
Tab.2 Chemical properties and molecular weight of *G. lemaneiformis* polysaccharide and its degraded products

多糖及其降解产物 polysaccharide and its degraded products	硫酸基含量(%) sulfate content	3,6-内醚-半乳糖含量(%) 3,6-anhydro-galactose content	分子量(u) molecular weight
GLP	17.70	37.98	49 981
DP1	17.70	35.95	21 492
DP2	17.67	35.99	12 864
DP3	17.70	33.45	5 417
DP4	17.77	36.04	3 043

Zhao 等^[14]使用 V_C 和 H_2O_2 对紫菜胶进行降解,通过控制 V_C 和 H_2O_2 的摩尔比和在反应液中的浓度可获得所需分子量的降解产物,研究表明当 V_C 与 H_2O_2 的摩尔比为 1 时,降解效率最高,并且降解产物的主链结构与未降解的紫菜胶相比未发生改变。由表 2 可以看出,自由由基降解反应并未导致龙须菜多糖去硫酸化,与未降解的龙须菜多糖(GLP)相比,各降解产物的硫酸根含量几乎未变;而 3,6-内醚-半乳糖的含量均有所降低,说明降解时自由基有可能攻击糖链上的糖环。

海藻多糖具有较好的生理活性,其活性与其硫酸基含量和分子柔韧性有关^[15];一般硫酸基含量越高其生理活性越好;降低硫酸多糖分子链的柔韧性可以增强抗病毒活性,而分子链的柔性随 3,6-内醚-半乳糖含量的减少而下降。与未降解的龙须菜多糖相比,采用自由基降解得到的产物硫酸基含量仍保持在 17.67% 以上,而 3,6-内醚-半乳糖含量有所降低,降解产物在保持硫酸基含量的同时多糖分子链的柔性下降,使降解的龙须菜多糖能保持良好的生理活性。

2.2 龙须菜多糖及其降解产物的抗氧化活性

龙须菜多糖及其降解产物对 Fe^{3+} 的还原能力 具有抗氧化能力的物质所提供的电子能使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,图 2 显示了龙须菜多糖及其降解产物对 Fe^{3+} 的还原能力。

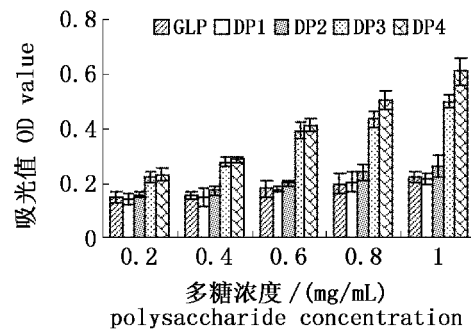


图 2 龙须菜多糖及其降解产物对 Fe^{3+} 的还原能力
Fig.2 Reductive ability of *G. lemaneiformis* polysaccharide and its degraded products on Fe^{3+}

可以看出,龙须菜多糖及其降解产物对 Fe^{3+} 具有一定的还原能力,并且随着多糖分子量的降低,对 Fe^{3+} 的还原能力增大。分子量较大的 GLP、DP1、DP2 还原能力较弱,之间差异不显著 ($P > 0.05$),并且随添加量的增大,还原能力变化不显著 ($P > 0.05$);而 DP3、DP4 的还原能力显著

高于 GLP、DP1、DP2 样品 ($P < 0.05$), 随 DP3、DP4 添加量的增加, 吸光值增加明显, 当 DP3、DP4 添加量达 0.60 mg/mL 以上时还原能力显著增加 ($P < 0.05$), 表明低分子量的龙须菜多糖对 Fe^{3+} 的还原能力与其添加量呈明显的量效关系。低分子量的 DP3 和 DP4 具有较强的还原能力, 这可能与小分子多糖结构松散, 氢键作用弱, 暴露在外的活性基团比结构紧密的高分子多糖多, 因此能提供更多的电子。

龙须菜多糖及其降解产物清除 DPPH· 的能力 如图 3 所示, 龙须菜多糖及其降解产物对 DPPH· 的清除能力与分子量及添加浓度有关。随着多糖浓度的增加, 清除率逐渐增大, 而且不同浓度之间的差异显著 ($P < 0.05$), 表明龙须菜多糖清除 DPPH· 能力与其添加量有量效关系。随着多糖分子量的降低, 对 DPPH· 的清除能力逐渐增强, 除了 DP2 和 DP3 之间的差异不显著 ($P > 0.05$) 外, 其余不同分子量组之间差异显著 ($P < 0.05$)。在实验条件下 DP4 的清除率一直在 60% 以上, 添加量在 1.25 mg/mL 时 DP4 对 DPPH· 的清除率接近 100%。

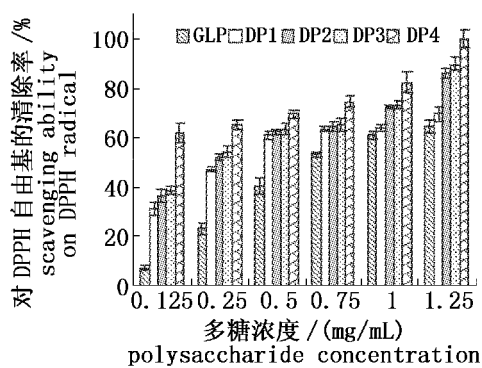


图3 龙须菜多糖及其降解产物对 DPPH· 的清除能力

Fig. 3 Scavenging ability of *G. lemaneiformis* polysaccharide and its degraded products on DPPH radical

对 DPPH· 的清除作用与抗氧化剂的氢给予能力有关, DPPH· 能够接受电子或 H· 形成稳定的反磁性分子^[16], 分子量最小的 DP4 显示最强的有机自由基清除作用, 分子内具有更多接受质子氢的基团, 可能是因为和其他样品相比有更强的电子给予能力。

龙须菜多糖及其降解产物清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力 采用邻苯三酚自氧化法研究龙须菜多糖及其降解产物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除效果, 结果见图 4。

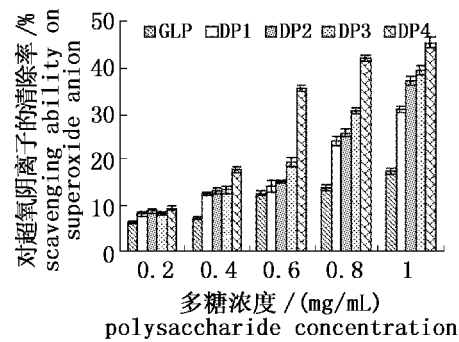


图4 龙须菜多糖及其降解产物对超氧阴离子的清除能力

Fig. 4 Scavenging ability of *G. lemaneiformis* polysaccharide and its degraded products on superoxide anion

可以看出, 未降解的龙须菜多糖 GLP 的抑制作用最弱, 降解后多糖的抑制作用有不同程度提高, 其中 DP1 与 DP2, DP2 与 DP3 差异不显著 ($P > 0.05$), 其余不同分子量的龙须菜多糖及其降解产物清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力均差异显著 ($P < 0.05$)。多糖浓度对清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力有显著影响 ($P < 0.05$), 尤其是降解产物 DP4, 随着添加量的增加, 对邻苯三酚自氧化的抑制能力显著高于其它多糖样品。

龙须菜多糖中存在 $-\text{OH}$ 和 SO_4^- 基团, 可与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应以清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。海藻多糖降解后活性基团暴露, 分子量越小暴露的活性基团越多, 容易与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 充分作用, 所以在一定分子量范围内多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用随分子量降低而提高。

龙须菜多糖及其降解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的抑制率 水杨酸能有效捕捉 $\cdot\text{OH}$ 并生成有色物质, 但若加入具有清除 $\cdot\text{OH}$ 的物质, 便会与水杨酸竞争, 从而使有色产物生成量减少。图 5 为龙须菜多糖及其降解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率。

由图 5 可知, 不同分子量的龙须菜多糖对 $\cdot\text{OH}$ 有一定程度的清除作用, 其中 GLP 和 DP1, DP2 和 DP3 差异不显著 ($P > 0.05$), 其余不同分子量组之间差异显著 ($P < 0.05$), 在各剂条件下 GLP 和 DP1 表现出较强的清除能力, 降解产物 DP4 的分子量最小, 在各剂条件下对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率最弱, 可见龙须菜多糖分子量降低到一定值后对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力降低。

多糖浓度对清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力影响显著 ($P < 0.05$), 在实验范围内随着多糖浓度的增大, 对

·OH的清除能力随之增强,且具有明显量效关系。

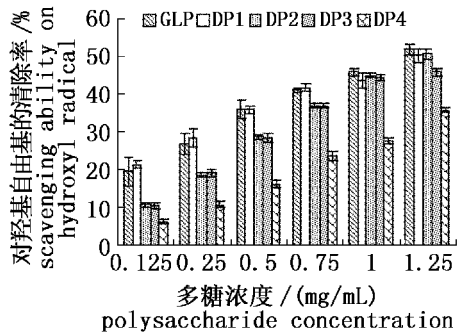


图5 龙须菜多糖及其降解产物对羟基自由基的清除率

Fig. 5 Scavenging ability of *G. lemaneiformis* polysaccharide and its degraded products on hydroxyl radical

3 结论

龙须菜多糖具有多种生物学功能,其生物学功能和多糖分子量、硫酸基含量及单糖组成等密切相关。采用 V_c 诱导的Fenton体系产生羟基自由基对龙须菜多糖进行降解,反应开始时溶液的粘度突发性降低,降解反应在2 h内基本完成;降解产物的3,6-内醚-半乳糖含量有所降低,分子链的柔性下降,但硫酸基含量基本未变,龙须菜多糖仍能保持良好的生理活性。利用自由基降解龙须菜多糖快速、有效,而且得到的降解产物分子量分布范围较小,不失为一种降解多糖的有效方法。

实验表明,龙须菜多糖及其降解产物均有一定的抗氧化作用,并伴有剂量效应关系,随多糖浓度的增加,其抗氧化活性增强;龙须菜多糖及其降解产物的分子量对其抗氧化活性有一定影响,在清除超氧阴离子自由基、DPPH自由基与还原 Fe^{3+} 方面,龙须菜多糖的抗氧化活性随着分子量的降低而增大,未降解的GLP的抗氧化作用最弱,分子量最小的降解产物DP4的抗氧化活性最强;但在清除羟自由基时,未经降解的多糖GLP和分子量较大的降解产物DP1表现出较强的清除能力,随多糖分子量的降低,对·OH的清除能力降低。自由基与机体的衰老、心血管疾病、肿瘤、炎症等生理现象相关,龙须菜多糖及其降解产物能清除自由基,提示该多糖可能在抗衰老、抗肿瘤和抗炎症等方面发挥作用,有望开发成药用或

保健品多糖,以提高龙须菜的经济利用价值。

参考文献:

- [1] 徐永健,陆开宏,管保军. 不同氮磷浓度及氮磷比对龙须菜生长和琼胶含量的影响[J]. 农业工程学报, 2006, 22(8): 209-213.
- [2] 王琪琳,曲爱琴,王海仁. 海带硫酸多糖的降解、分离纯化及理化性质分析[J]. 药物生物技术, 2004, 11(5): 316-320.
- [3] Nardella A, Chaubet F, Boisson V C, et al. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* [J]. Carbohydr Res, 1996, 289: 201-208.
- [4] 师然新,徐祖洪,李智恩. 降解的角叉菜多糖的抗肿瘤活性[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(6): 653-656.
- [5] Miller J G, Fry S C. Characteristics of xyloglucan after attack by hydroxyl radical [J]. Carbohydr Res, 2001, 332(4): 389-403.
- [6] 邓志峰,纪明侯. 龙须菜和扁江篱多糖的组成及其抗肿瘤效果[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 575-580.
- [7] 陈美珍,余杰,龙梓洁. 龙须菜多糖抗突变和清除自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 219-222.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 10-92.
- [9] Yape W. Calorimetric determination of 3, 6-anhydro-L-galactose and galactose in marine algae polysaccharides[J]. Anal Chem, 1960, 32: 1327-1330.
- [10] Jayaprakasha G K, Singh R P, Sakariah K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro* [J]. Food Chem, 2001, 73: 285-290.
- [11] 吕禹泽,宋钰,吴国宏,等. 葡萄多酚的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 213-216.
- [12] 曾小玲. 七种菊科植物抗活性氧作用的研究对超氧阴离子自由基的清除作用[J]. 中国现代医学杂志, 1999, 9(2): 44-52.
- [13] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochem, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [14] Zhao T T, Zhang Q B, Qi H M. Degradation of porphyrin from *Porphyra haitanensis* and the

- antioxidant activities of the degraded porphyrans with different molecular weight [J]. *Int J Biol Macromol*, 2006, 38:45-50.
- [15] 孟春,郭养浩,石贤爱,等.海藻多糖生理活性及分子修饰[J].*中国生物工程杂志*, 2004, 24(3): 35-38.
- [16] Soares J R, Dinis T C, Cunha A P, *et al.* Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*[J]. *Free Radical Res*, 1997, 26: 469-478.

Degradation of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide and antioxidation of its degraded products

YANG Wen-ge¹, XIE Guo-huang¹, XU Da-lun¹, ZHU Qiao-ling², LU Jia-fang¹, ZHOU Xing-yu¹

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Ningbo Yingzhou Bureau of Quality and Technical Supervision, Ningbo 315100, China)

Abstract: To discuss the effect of polysaccharide molecular weight on the antioxidation, *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide was degraded by free radical from ascorbate and hydrogen peroxide in combination, then the antioxidative activity of *G. lemaneiformis* polysaccharide and its degraded products was determined. The results showed that *G. lemaneiformis* polysaccharide was degraded basically by the reaction system of ascorbate and hydrogen peroxide in two hours, and four kinds of degraded polysaccharide were achieved with molecular size of 21 492, 12 864, 5 417 and 3 043 u, respectively. In the degradation, the sulfate contents were not changed but 3,6-anhydro-galactose contents of degraded products decreased a little. Moreover, the higher the molecular weight of *G. lemaneiformis* polysaccharide, the weaker the power of reducing Fe^{3+} , scavenging superoxide anion radical ($\text{O}_2^- \cdot$) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. However, the inhibitory activity against hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) decreased with the degradation.

Key words: *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide; degradation; antioxidation; molecular weight