

微波辅助 H_2O_2/V_C 降解制备低分子量浒苔多糖的研究

杜国丰, 尹梦琪, 梁飞龙, 姜宁, 陈红漫, 矫继峰, 刘凤翊

Preparation of Low-molecular-weight *Enteromorpha* Polysaccharides by Microwave-assisted Degradation with H_2O_2/V_C

DU Guofeng, YIN Mengqi, LIANG Feilong, JIANG Ning, CHEN Hongman, JIAO Jifeng, and LIU Fengyi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022080224>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

低分子量酵母甘露聚糖的制备及其抗氧化性研究

Study on Preparation and Its Antioxidant Activity of Yeast Mannan with Low Molecular Weight

食品工业科技. 2020, 41(13): 202-206 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.032>

不同取代度蕨麻硒多糖的制备、表征及体外抗氧化活性

Preparation, Characterization and *in Vitro* Antioxidant Activity of Selenium *Potentilla anserina* L. Polysaccharide with Different Substitution Degrees

食品工业科技. 2019, 40(12): 191-198 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.031>

皱盖疣柄牛肝菌多糖LRP-I 和LRP-II 结构表征及抗氧化活性分析

Structural Elucidation and Antioxidant Activity of LRP-I and LRP-II Polysaccharide from *Leccinum rugosiceps*

食品工业科技. 2020, 41(21): 8-14 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020061>

绣球菌低分子量多糖的制备工艺优化及其分子量的测定

Optimization of Preparation Process and Molecular Weight Determination of Low Molecular Weight Polysaccharide from *Sparassis crispa*

食品工业科技. 2020, 41(4): 161-165, 178 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.027>

人参果多糖的分离纯化及体外抗氧化活性研究

Research on extraction, purification and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharide from ginseng berry

食品工业科技. 2018, 39(4): 73-76, 99 <https://doi.org/>

葛根多糖纯化工艺及其抗氧化性能研究

Purification Technology of *Pueraria lobata* Polysaccharide and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2020, 41(24): 131-136 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030122>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

杜国丰, 尹梦琪, 梁飞龙, 等. 微波辅助 H_2O_2/V_C 降解制备低分子量浒苔多糖的研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 37–44. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080224

DU Guofeng, YIN Mengqi, LIANG Feilong, et al. Preparation of Low-molecular-weight *Enteromorpha* Polysaccharides by Microwave-assisted Degradation with H_2O_2/V_C [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 37–44. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080224

· 研究与探讨 ·

微波辅助 H_2O_2/V_C 降解制备低分子量浒苔多糖的研究

杜国丰^{1,*}, 尹梦琪¹, 梁飞龙¹, 姜 宁², 陈红漫³, 矫继峰¹, 刘凤翊¹

(1. 营口理工学院化学与环境工程学院, 辽宁营口 115014;

2. 营口理工学院外语教研部, 辽宁营口 115014;

3. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要: 为制备抗氧化活性较强的低分子量多糖, 以辽宁营口沿海地区的浒苔为原料, 采用微波辅助 H_2O_2/V_C 降解法制备低分子量浒苔多糖, 利用 DEAE-52、Sephadex G-100 进行层析分离, 对比浒苔多糖降解前后的理化性质与抗氧化活性, 通过红外光谱法对降解后的浒苔多糖进行结构表征, 利用薄层层析、高效液相色谱对分离到的多糖 LEP IIIa 组分进行单糖组成分析。结果表明, 利用微波辅助 H_2O_2/V_C 降解可在较短时间 (15 min) 降解得到低分子量的浒苔多糖, 经层析分离后, 得到 3 种低分子量浒苔多糖 LEP I、LEP II、LEP IIIa, 分子量 M_w 分别为 (23.6±0.5)、(24.6±0.6)、(22.9±0.5) kDa。与未降解的浒苔多糖相比, 微波辅助 H_2O_2/V_C 降解得到的低分子量多糖的分子量、粘度均显著降低 ($P<0.05$); 抗氧化活性显著增强 ($P<0.05$)。降解产物的分子量均在 30 kDa 以下, 粘度在 2 mPa.s 以下; 8 mg/mL LEP IIIa 的总抗氧化能力由降解前的 (315.2±10.3) U/mL 增加到 (661.8±18.3) U/mL, 铁离子还原能力由降解前的 51.3%±1.0% 增加到 83.4%±2.2%。LEP IIIa 的红外光谱结果表明其是一种硫酸多糖, 硫酸基含量 14.6%±0.5%; 薄层层析结合高效液相色谱分析表明 LEP IIIa 是一种由葡萄糖、鼠李糖、糖醛酸等组成的含硫酸基团低分子量多糖, D- (+)-甘露糖、L- (+)-鼠李糖、D-葡萄糖醛酸、D- (+)-葡萄糖的摩尔比为 0.97:4.43:3.13:24.8。本研究表明, 利用微波辅助 H_2O_2/V_C 降解制备低分子量浒苔多糖, 能够明显改善多糖的理化性质, 显著提高其抗氧化能力, 制备的多糖可以作为功能性成分用于抗氧化相关的功能食品和保健品的开发。

关键词: 多糖, 低分子量浒苔多糖, 制备, 抗氧化活性, 纯化, 表征

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)12-0037-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080224

本文网刊:



Preparation of Low-molecular-weight *Enteromorpha* Polysaccharides by Microwave-assisted Degradation with H_2O_2/V_C

DU Guofeng^{1,*}, YIN Mengqi¹, LIANG Feilong¹, JIANG Ning², CHEN Hongman³, JIAO Jifeng¹, LIU Fengyi¹

(1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Yingkou Institute of Technology, Yingkou 115014, China;

2. Basic Courses Teaching and Research Department, Yingkou Institute of Technology, Yingkou 115014, China;

3. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to prepare low-molecular-weight polysaccharides with high antioxidant activity, low-molecular-weight *Enteromorpha* polysaccharides were prepared by the method of microwave-assisted H_2O_2/V_C degradation using *Enteromorpha prolifera* from the coastal area of Yingkou, Liaoning Province as raw materials. In the present thesis, DEAE-52 and Sephadex G-100 were used for chromatography separation and physicochemical properties and antioxidant activity

收稿日期: 2022-08-23

基金项目: 辽宁省自然科学基金区域创新联合基金计划“海洋藻类多糖的分离及构效关系研究”(2022-YKLH-13), 营口理工学院大学生创新创业项目“海洋藻类植物浒苔低聚糖的制备”(X202214435038)。

作者简介/通信作者: 杜国丰 (1984-), 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 海洋多糖生物化学, E-mail: duguofeng0417@yiku.edu.cn。

of *Enteromorpha* polysaccharide were compared before and after degradation. Then structural characterization of the degraded *Enteromorpha* polysaccharide was obtained by infrared spectroscopy, and monosaccharide composition of LEPⅢa (obtained by separation) was analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Results showed that low-molecular-weight *Enteromorpha* polysaccharide could be prepared in a short time (15 min) by microwave-assisted degradation with H_2O_2/V_C and three kinds of low-molecular-weight *Enteromorpha* polysaccharide LEPⅠ, LEPⅡ and LEPⅢa with M_w being (23.6 ± 0.5) , (24.6 ± 0.6) and (22.9 ± 0.5) kDa respectively were obtained by chromatographic separation. Compared with untreated *Enteromorpha* polysaccharide, low-molecular-weight polysaccharide obtained by microwave-assisted H_2O_2/V_C degradation were significantly reduced ($P<0.05$). The antioxidant activity was significantly enhanced ($P<0.05$). Molecular weight of the degradation products was lower than 30 kDa, with viscosity lower than 2 mPa·s. The total antioxidant capacity of LEPⅢa with a concentration of 8 mg/mL increased from (315.2 ± 10.3) U/mL to (661.8 ± 18.3) U/mL, and reducing capacity of ferric ion increased from $51.3\%\pm1.0\%$ to $83.4\%\pm2.2\%$ after degradation. Infrared spectroscopy of LEPⅢa showed that LEPⅢa was a kind of sulphated polysaccharide with sulfate accounting for $14.6\%\pm0.5\%$. TLC and HPLC analysis showed that LEPⅢa was a low-molecular-weight polysaccharide containing sulfuric acid group, composed of glucose, rhamnose, uronic acid, etc., with molar ratio of D-(+)-mannose, L-(+)-rhamnose, D-glucuronic acid and D-(+)-glucose being 0.97:4.43:3.13:24.8. Thus, the present thesis concluded that microwave-assisted degradation with H_2O_2/V_C used to prepare low-molecular-weight *Enteromorpha* polysaccharides could significantly improve physicochemical properties and antioxidant capacity of polysaccharide, and the prepared *Enteromorpha* polysaccharides could be used as a functional component in antioxidant-related functional foods and health care products.

Key words: polysaccharide; low-molecular-weight *Enteromorpha* polysaccharides; preparation; antioxidant activity; purification; characterization

近年来,我国辽宁营口沿海地区的藻类繁殖活动中经常出现石莼属(*Ulva*)绿藻^[1],被鉴定为浒苔(*Enteromorpha prolifera*)。浒苔是一类重要的食用和药用经济海藻^[2],在本草书中记载其具有清热解毒、利水消肿等功效^[3],其富含碳水化合物、矿物质、粗纤维及少量蛋白质和脂肪^[4],浒苔多糖(*Enteromorpha* polysaccharide, EP)是其细胞壁主要活性成分,其主要由硫酸化的鼠李糖、糖醛酸和木糖组成^[5]。近年来,已被广泛报道其具有抗癌^[6]、抗氧化^[7]、降血脂^[8]、降血糖^[9-10]和免疫调节活性^[11],成为国内外藻类多糖研究的热点^[12]。

目前,可通过酶水解、酸水解和氧化降解等方法获得低分子量浒苔多糖^[13]。酶水解对多糖链中糖苷键的断裂具有很高的特异性,无法用于产业化开发。酸水解和氧化降解,需要较高的浓度或较长的反应时间,导致糖单元结构的改变,破坏必要的生物活性基团^[14]。目前,微波辅助提取技术已成功用于海藻多糖生物活性化合物的提取^[15]。Le 等^[16]采用微波辅助技术,对绿藻孔石莼(*Ulva pertusa*)多糖的提取工艺进行了响应面法优化,并评价了其抗氧化活性。杨君等^[17]对微波提取裂片石莼(*Ulva fasciata*)多糖的工艺进行优化,多糖提取率达到 16.37%。

H_2O_2/V_C 氧化降解是一种可控性强、环境友好的获得低分子量多糖的方法^[18]。 H_2O_2 分解产生的羟自由基氧化断裂多糖间糖苷键,低浓度 V_C 的加入可增加自由基的数量,多糖的降解速率明显提高^[19]。谭诗敏等^[20]采用 H_2O_2/V_C 体系降解香水莲花多糖,发现降解时间为 60 min 的低分子量多糖抗氧化活性更高。Wu 等^[21]利用 H_2O_2/V_C 对马尾藻科 *Sargassum*

crassifolium 中的岩藻多糖进行了降解,产物低分子量岩藻多糖显示出较强的人肺癌 A-549 细胞凋亡作用,提示其具有较强的自由基清除能力。

微波辅助 H_2O_2/V_C 法降解多糖,操作简便、短时高效、无毒无害、降解效果较好,吸引了越来越多的学者的关注。刘欢^[22]利用微波辅助 H_2O_2/V_C 降解法,探究舌状蜈蚣藻(*Grateloupia livida*)多糖的最佳工艺条件,评价降解多糖的体外抗氧化能力,得到抗氧化能力较强的降解多糖。目前有关 H_2O_2/V_C 降解法制备低分子量浒苔多糖(low-molecular-weight *Enteromorpha* polysaccharide, LEP)鲜有报道。本研究以辽宁营口沿海地区绿藻浒苔为原料,探索了微波辅助 H_2O_2/V_C 降解法制备 LPE 的抗氧化能力,分离、表征与组分鉴定方法,以期建立一种快速、节能、环保的海洋藻类低分子量抗氧化活性多糖提取方法,为低分子量浒苔多糖的应用研究提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

浒苔(*Enteromorpha prolifera*) 2021 年 8 月采自辽宁营口鲅鱼圈附近海域。自来水洗净,60℃烘干至恒重,高速多功能粉碎机粉碎,过 100 目筛得浒苔粉;木瓜蛋白酶(8000 U/mg) 索莱宝生物科技有限公司;透析膜(截留分子量 5 kDa) Spectrum 化学(上海)有限公司;DEAE 纤维素 52 北京索莱宝科技有限公司;葡聚糖标准品(5、25、50、80、150、410、1500 kDa) 美国 Sigma 公司;单糖标准品(L-(+)-鼠李糖、D-(+)-木糖、D-(-)-果糖、D-(+)-甘露糖、D-(+)-葡萄糖、D-(+)-半乳糖、D-(+)-半乳糖醛

酸、D-葡萄糖醛酸) 美国 Sigm-Aldrich 有限公司; 三氟乙酸(HPLC $\geq 99.5\%$) Macklin(上海)生化科技有限公司; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 国药集团化学试剂有限公司; 总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒 南京建成生物工程研究所有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

特制普通玻璃层析柱($\Phi 1.6 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$) 上海沪西分析仪器厂有限公司; TSK-GEL 4000PWXL 凝胶色谱柱($\Phi 7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$) 日本 Tosoh 公司; LC1260 II 高效液相色谱仪 美国 Agilent 科技公司; UV-5800PC 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司; ALPHA 2-4LD 冷冻干燥机 德国 CHRIST 公司; MCR101 高级旋转流变仪 德国 Anton Paar 公司; DZF-6050 真空干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; Nicolet Nexus 5DXC FT-IR 红外光谱扫描仪 美国 Nicolet 公司; TG16-WS 数显高速离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司; UNIC 7200 型可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; JA5003 电子分析天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; HH-6 型数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 低分子量苕苔多糖(LEP)的制备 取一定量磨碎过筛的苕苔粉,加入 20 倍体积无水乙醇,75 $^{\circ}\text{C}$ 回流萃取 2 h,除去脂类、黄酮、多酚等醇溶性杂质,冷却后过滤、干燥得脱脂除杂苕苔粉。取 10 g 脱脂苕苔粉,加入 500 mL 去离子水,充分混匀,置于微波反应器密闭容器中,500 W 功率 80 $^{\circ}\text{C}$ 辅助提取 15 min。将提取液离心,减压浓缩至 100 mL,加入 400 mL 95% 乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。4000 r/min 离心 10 min,将沉淀溶于 200 mL 去离子水中,加入 3% (W/V)木瓜蛋白酶,调节 pH6.5,50 $^{\circ}\text{C}$ 水解 1 h 除去蛋白杂质,酶解液用 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀,4000 r/min 离心 10 min,将沉淀再次溶于 100 mL 去离子水中,加入 20 mL 氯仿和 4 mL 正丁醇进一步去除游离蛋白质,将水相溶液浓缩冻干,得到白色粉末状苕苔粗多糖(EP)。采用文献 [22] 的方法稍加改动,将提取的 EP 溶于 200 mL 去离子水中,分别加入 0.2 mL 30% H_2O_2 和 2 mL 1 mol/L V_C 溶液,混匀后,置于微波反应器密闭容器中,使用磁力搅拌器搅拌,500 W 功率 55 $^{\circ}\text{C}$ 辅助降解 15 min,所得溶液去离子水透析过夜、冻干,得到低分子量苕苔多糖(LEP)。根据公式计算多糖得率^[23]。以牛血清白蛋白为标准,采用 Bradford 法^[24] 测定蛋白质含量。

$$X(\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

式中: X 表示多糖得率,%; m 表示冻干后多糖质量, g; M 表示脱脂苕苔粉质量, g。

1.2.2 LEP 的分离纯化 采用文献 [25-26] 的方法,利用 DEAE-52、Sephadex G-100 对 LEP 进行层析

分离。将 1 g LEP 溶于 20 mL 去离子水,注入经去离子水平衡的 DEAE-52 层析柱中,上样后,用去离子水洗脱柱,流速 6 mL/5 min/管,然后分别用 0.1、0.5、1.0 mol/L NaCl 溶液逐步洗脱,收集多糖组分,苯酚-硫酸法结合醋酸纤维素薄膜电泳^[27] 进行检测,将非单一组分浓缩,经 Sephadex G-100 凝胶层析,以去离子水洗脱进一步分离,将所得各单一组分冻干。

1.2.3 LEP 理化性质测定

1.2.3.1 分子量测定 多糖的分子量测定采用文献 [28] 的高效凝胶渗透色谱法(HPGPC),稍加改动。经 0.22 μm 滤膜过滤的 0.1 mol/L NaNO_3 为流动相,流速 1.0 mL/min,将 10 mg 样品溶于 10 mL 去离子水,经 0.45 μm 微孔过滤,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 15 μL 。用 M_w 分别为 5、25、50、80、150、410、1500 kDa 的葡聚糖标准品进行标定,计算 LEP 各组分的分子量。

1.2.3.2 硫酸根含量测定 硫酸根含量采用 Dodgson 等^[29] 的 BaCl_2 -凝胶法进行测定。

1.2.3.3 粘度测定 将分离出的 LEP 各组分去离子水配成 10 mg/mL 溶液,利用旋转流变仪测定粘度。

1.2.4 LEP 的抗氧化活性测定

1.2.4.1 LEP 总抗氧化能力测定 取 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 g 不同组分的 LEP 样品与未降解的 EP 样品,分别加入到 100 mL 去离子水中,混匀后得不同浓度(1、2、4、8、10 mg/mL)的样品液,以对应浓度的 V_C 为阳性对照。采用 T-AOC 试剂盒测定各样品液的总抗氧化能力。

1.2.4.2 LEP 铁离子还原能力测定 吸取 1 mL 上述不同组分不同浓度的样品液,加入同体积 0.2 mol/L pH6.6 的磷酸缓冲液和 1% 六氰合铁酸钾,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min,再加入同样体积的 10% 三氯乙酸终止反应,取 2 mL 反应液加入 2 mL 蒸馏水和 0.4 mL 0.1% FeCl_3 溶液,室温反应 10 min,700 nm 处测定吸光度。以对应浓度的 V_C 为阳性对照。结果以样品与对应浓度 V_C 的吸光度百分比表示。

1.2.5 LEP 紫外光谱和红外光谱分析 配制 1 mg/mL 的 LEP 溶液,在 190~400 nm 波长区间,利用紫外可见分光光度计进行紫外区扫描。2 mg LEP 干燥样品与 200 mg 干燥 KBr 混合,压片,利用红外光谱仪测定 LEP 在波数 4000~400 cm^{-1} 区间的红外吸收光谱。

1.2.6 LEP 单糖组成的薄层层析 称取 20 mg LEP 样品于 20 mL 西林瓶中,加入 2 mL 2 mol/L H_2SO_4 ,100 $^{\circ}\text{C}$ 水解 6 h,2.5 mol/L NaOH 调至 pH7.0,去离子水稀释至 5 mL 作为 LEP 样品水解液。参照 Johansson 等^[30] 的方法,取活化的硅胶 G 薄板,在距底边 1.5 cm 水平线上分别点 1% 的单糖标准品溶液和 LEP 样品水解液各 5 μL ,以氯仿/冰乙酸/水(30:35:5, V/V/V)为展层剂,苯胺-二苯胺-磷酸为显色剂,对各种单糖标准品和 LEP 样品水解液进行显色,比较色斑颜色及 R_f 值,对 LEP 样品水解液中的单糖组

成进行鉴定。

1.2.7 LEP 单糖组成的 HPLC 分析 5 mg LEP 样品加入 5 mL 三氟乙酸, 在 121 °C 下密封水解 2 h, 参照文献^[31]的方法, 将水解液用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生处理, 反相高效液相色谱法分析其单糖组成。流动相: 0.1 mol/L pH6.9 磷酸盐缓冲液/乙腈(20:80, V/V), 以乳糖作为内标物, 检测器为示差折光检测器, 柱温 25 °C, 进样量为 5 μ L。利用峰面积计算各单糖组分的摩尔比。单糖标准品甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GlcA)、半乳糖醛酸(GalA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)采用相同的方法进行分析检测。

1.3 数据处理

所有实验均进行三次重复, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。利用 Excel、SPSS22.0 等进行数据的处理和分析, 采用 Origin 2021 绘图。

2 结果与分析

2.1 LEP 的化学成分分析

浒苔粉经过预处理除杂、多糖提取、酶结合 Sevag 法脱蛋白、微波辅助 H_2O_2/V_C 降解、透析、浓缩及冷冻干燥后, 质地比较膨松, 便于后续溶解操作。实验中得白色低分子量浒苔粗多糖 1.17 ± 0.05 g, 多糖得率为 $11.7\%\pm0.5\%$, 蛋白质含量为 $0.65\%\pm0.3\%$ 。

2.2 LEP 的层析分离纯化

LEP 经 DEAE-52 柱层析的洗脱曲线如图 1 所示。从图 1 可知, LEP 经不同离子强度的溶液洗脱后, 共出现 3 个洗脱峰, 分别编号为 LEP I、LEP II、LEP III, 对应洗脱液分别为去离子水、0.1 mol/L、0.5 mol/L NaCl, 在 0.5 mol/L NaCl 洗脱阶段出现了多糖含量相对较高的峰(LEP III), 收集、浓缩各含糖峰位的组分, 测定多糖含量依次为 0.095 ± 0.005 、 0.304 ± 0.003 、 0.598 ± 0.028 g/g LEP。进一步观察发现 LEP III 多糖组分的分离效果较差。LEP III 经过醋酸纤维素薄膜电泳分析(图 2), 发现不是单一组分, 经 Sephadex G-100 凝胶柱层析进一步纯化, 结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出: LEP III 经过 Sepha-

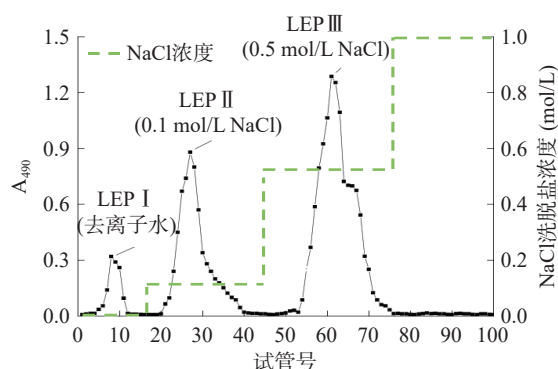


图 1 LEP 的 DEAE-52 柱层析洗脱曲线

Fig.1 DEAE-52 column chromatography elution curve of LEP

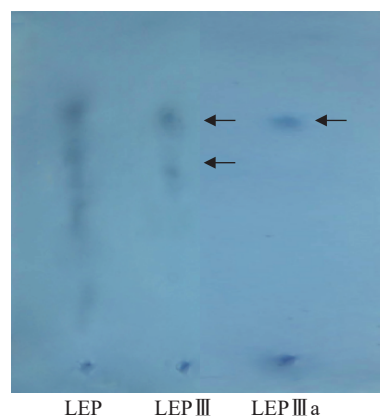


图 2 LEP 不同组分的醋酸纤维电泳图

Fig.2 Electrophoretic diagram of acetate fibers for different components of LEP

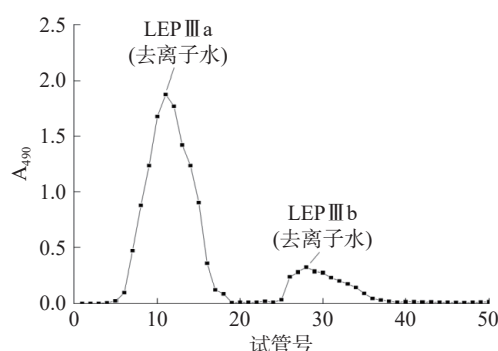


图 3 LEP III 的 Sephadex G-100 凝胶柱层析曲线

Fig.3 Sephadex G-100 gel column chromatography curve of LEP III

dex G-100 凝胶柱层析, 利用去离子水洗脱, 分离得到了两个峰, 即 LEP III a 和 LEP III b, 多糖含量分别为 0.542 ± 0.022 和 0.056 ± 0.002 g/g LEP, 由于 LEP III b 含糖量较低, 所以未作研究。合并 LEP III a 主峰的洗脱液, 浓缩冻干, 所得低分子量浒苔多糖 LEP III a 为白色粉末状, 经测定多糖得率为 $6.3\%\pm0.3\%$ 。

2.3 LEP 理化性质分析

浒苔多糖不同组分的得率、理化性质见表 1。随着粗多糖的降解与分离, 多糖得率呈降低趋势, 通过离子交换、凝胶过滤两步纯化, 得到两种主要的得率较高的单糖组分 LEP II、LEP III a, 其中 LEP III a 单一组分多糖得率为 $6.3\%\pm0.3\%$ 。浒苔多糖经降解后, 分离到的组分(LEP I、LEP II、LEP III a)的 M_w 、硫酸根含量、粘度相差均不大, 分别在 22.9~24.6 kDa、13.8%~14.6%、1.5~1.6 mPa·s 之间。有文献报道 M_w 和粘度会影响多糖及其金属离子配合物的生物抗氧化活性, 相对较高的分子量会在一定程度上降低其溶解度, 从而限制其有效吸收^[32]。采用微波辅助 H_2O_2 降解法制备得到的产物 M_w 均在 30 kDa 以下, 粘度在 2 mPa·s 以下, 多糖的粘度与分子量呈现出一定的正相关性。低分子量硫酸多糖更容易通过质子供体作用进入细胞内而发挥其功效, 比高分子量的硫酸多糖具有更强的抗氧化活性^[33]。

表 1 浒苔多糖不同组分的得率、理化性质
Table 1 Yield and physicochemical properties of varied components of *Enteromorpha* polysaccharides

样品	多糖得率 (%)	重均分子量M _w (kDa)	硫酸根含量 (%)	粘度 (mPa·s)
EP	13.5±0.5 ^c	1276.4±14.1 ^b	14.2±0.3 ^a	364.5±3.4 ^b
LEP	11.7±0.5 ^d	23.8±0.5 ^a	15.1±0.4 ^a	1.8±0.1 ^a
LEP I	1.1±0.1 ^a	23.6±0.5 ^a	14.2±0.3 ^a	1.5±0.1 ^a
LEP II	3.6±0.1 ^b	24.6±0.6 ^a	13.8±0.3 ^a	1.6±0.1 ^a
LEP III a	6.3±0.3 ^c	22.9±0.5 ^a	14.6±0.5 ^a	1.5±0.1 ^a

注: 同一列中不同字母表示有显著差异($P<0.05$)。

2.4 LEP 的抗氧化能力分析

微波辅助 H₂O₂/V_C 降解法制备的 LEP 各组分的总抗氧化能力、铁离子还原能力如图 4、图 5 所示。由图可知, 在相同的多糖浓度下, EP 降解后各组分多糖的总抗氧化能力、铁离子还原能力相比降解前显著增强($P<0.05$), 同时, LEP III a 组分显示出相对较高的抗氧化能力, 其与 LEP I、LEP II 两种组分之间存在显著性差异($P<0.05$)。同一多糖组分, 总抗氧化能力、铁离子还原能力随着浓度的升高而增强, 在浓度 8 mg/mL 以后趋于稳定, 此时 LEP III a 的总抗氧化能力由降解前的 (315.2±10.3) U/mL 增加到 (661.8±18.3) U/mL, 高于 2 mg/mL V_C 的总抗氧化能力 (624.5±17.3) U/mL。铁离子还原能力由降解前的 51.3%±1.0% 增加到 83.4%±2.2%, 与此同时, 相同浓度下 LEP I 与 LEP II 组分的铁离子还原能力分别为 74.2%±1.6% 和 70.2%±1.3%。LEP 的铁离子还原能力表现出与总抗氧化能力相同的趋势。多糖的抗氧化活性受分子量、分支结构以及空间结构的影响很大^[34]。结合表 1 中相关数据, 发现 EP 经 H₂O₂/V_C 氧化降解后, 多糖组分的硫酸根含量几乎未发生变化 ($P>0.05$), 说明粗多糖 EP 含有硫酸根的部分不易被降解, 可以得到硫酸根含量稳定的低分子量片段。与此同时, 分子量由 (1276.4±14.1) kDa 下降到 30 kDa 以下, 粘度由 (364.5±3.4) mPa·s 降至 2 mPa.s 以下。结合 EP 降解前后理化性质的变化与抗氧化活性的关系, 推测分子量和粘度是影响浒苔多糖抗氧化能力的重要因素。V_C 具有可解离出氢离子的烯醇式羟基, 通过逐级供给电子而转变成半脱氢抗坏血酸和脱氢抗坏血酸以实现清除活性氧自由基达到抗氧化的目的。在 EP 的 H₂O₂/V_C 降解体系中, 羟基自由基是一种强大的反应物, 可与植物细胞壁上多糖的氢发生反应, 导致特定糖苷键发生断裂, EP 大分子的空间网络结构发生解聚, 使其分子结构中暴露出大量的包括羟基在内的供电子活性基团, 使多糖水解产物的抗氧化活性增强。这与 Khan 等^[35] 报道的江蓠 (*Gracilaria blodgettii*) 硫酸多糖的抗氧化活性可以通过水解而增强的结果一致。同时, 多糖的粘度随着分子间氢键的破坏与主碳链的降解而迅速降低, 消除了高粘度对多糖组分扩散与吸收的不利影响, 大大提高了

LEP 的生物利用率与活性。此外, 在分子量、粘度与硫酸根含量无显著差异的情况下, LEP III a 组分相比 LEP I 与 LEP II 表现出更强的抗氧化能力, 推测其与糖链的单糖组成有关, 因此在后续的色谱分析中, 我们对 LEP III a 组分进行了进一步鉴定。

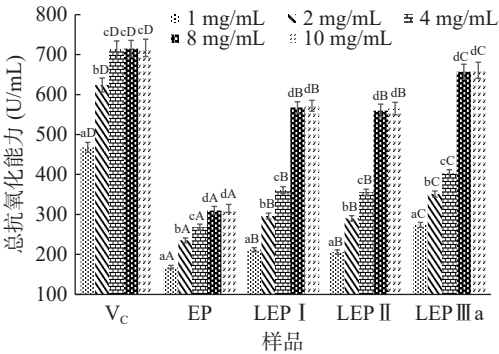


图 4 微波辅助 H₂O₂/V_C 降解对 EP 总抗氧化能力的影响
Fig.4 Effect of microwave-assisted H₂O₂/V_C degradation on total antioxidant capacity of EP

注: 图中不同小写字母代表同一组分不同浓度间总抗氧化性差异显著 ($P<0.05$); 不同大写字母代表同一浓度不同组分间总抗氧化性差异显著 ($P<0.05$); 图 5 同。

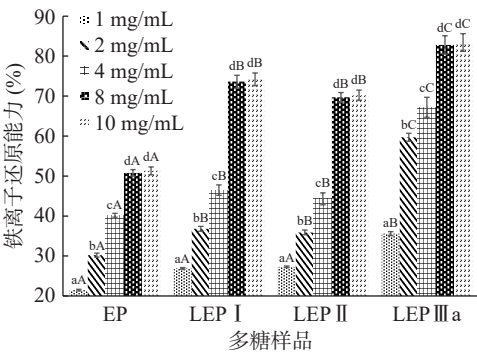


图 5 微波辅助 H₂O₂/V_C 降解对 EP 铁离子还原能力的影响
Fig.5 Effect of microwave assisted H₂O₂/V_C degradation on Fe reducing capacity of EP

2.5 LEP III a 光谱分析

对 LEP III a 进行了 190~400 nm 波长区间紫外光谱扫描, 结果见图 6。从图 6 中可以看出, 在 260~280 nm 范围内未发现有吸收峰, 说明经过木瓜蛋白酶结合 Sevag 法复合脱蛋白效果较好。

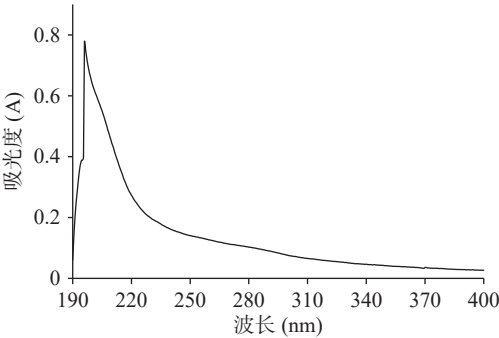


图 6 LEP III a 的紫外光谱扫描图
Fig.6 Ultraviolet spectrum scanning of LEP III a

对 LEP III a 进行了红外光谱扫描分析, 结果如图 7 所示。LEP III a 在大约 3411 cm^{-1} 处有一个强而宽的吸收峰是 O-H 特征伸缩振动峰, 2964 、 2830 cm^{-1} 处吸收峰是 $-\text{CH}_3$ 与 $-\text{CH}_2-$ 基团中的 C-H 伸缩振动, 2715 cm^{-1} 处存在弱的醛基基团 C-H 的伸缩振动峰。 2345 cm^{-1} 处出现的微弱吸收峰与样品吸附 CO_2 的伸缩振动有关^[36]。 1600 cm^{-1} 附近的较宽吸收峰对应羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动, 同时表明结合水的存在, 1363 cm^{-1} 处的吸收峰是一个羧基的 C-O 的伸缩振动, 这两处吸收峰表明 LEP III a 中含有糖醛酸组分。 1137 cm^{-1} 处的强烈吸收峰是由 S=O 的对称伸缩振动引起的, 844 、 620 cm^{-1} 处的特征吸收可能对应硫酸基团在轴向位置的弯曲振动, 表明 LEP III a 是一种硫酸多糖^[37]。 775 cm^{-1} 处的峰为吡喃糖苷的伸缩振动, $900\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 区域的弱峰为 C-O 或糖苷键的伸缩振动, C-OH 的弯曲振动^[38-39]。 红外光谱分析表明 LEP III a 具有多糖的特征吸收峰, 是一种含吡喃糖苷的硫酸多糖。

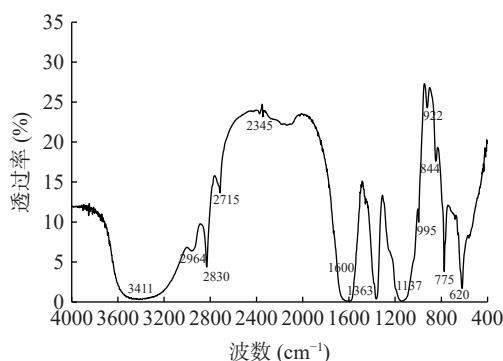


图 7 LEP III a 的红外光谱扫描图

Fig.7 Infrared spectrum scanning of LEP III a

2.6 LEP III a 单糖组成的薄层色谱分析

单糖标准品及 LEP III a 水解液的薄层层析结果如图 8 所示。从图 8 中可以看出, 各种单糖标样经



图 8 单糖标准品和 LEP III a 水解液的薄层层析图

Fig.8 TLC of monosaccharide standard and LEP III a hydrolysate

注: 自左向右依次为: L-(+)-鼠李糖、D-(+)-木糖、D-(+)-半乳糖、D-葡萄糖醛酸、D-(+)-甘露糖、D-(-)-果糖、D-(+)-葡萄糖、LEP III a 水解液。

层析显色后, 显示出不同颜色的斑点。Garfias 等^[40]利用薄层色谱识别仙人掌(*Opuntia ficus*)果胶酸水解过程中释放的单糖, 报道了包括 Rha、Xyl、Man、GalA、Ara、Gal 在内的 6 种单糖标准品的 R_f 值分别为 0.47、0.43、0.4、0.4、0.4、0.39。结合该报道与试验中标准单糖的 R_f 值, 初步表明 LEP III a 多糖水解液中含有 Rha、GlcA, 可能含有 Man、Fuc、Glc, 并不能最终确定 LEP III a 单糖的组成。

2.7 LEP III a 单糖组成的高效液相色谱分析

通过高效液相色谱来对 LEP III a 的单糖组成进行了进一步鉴定, 结果如图 9 所示。图 9(a)中, 7 种单糖标品在不同的保留时间分别出现色谱峰。图 9(b)中 LEP III a 水解液分别在 8.43、11.26、12.31、17.73 min 时出现色谱峰, 与单糖标品的保留时间对比, 提示浒苔多糖 LEP III a 主要由 D-(+)-葡萄糖构成, 此外还含有少量的 L-(+)-鼠李糖、D-葡萄糖醛酸和微量的 D-(+)-甘露糖, 根据峰面积确定各单糖在分子组成上的摩尔比为: 0.97:4.43:3.13:24.8。Kim 等^[41]报道甘露糖和硫酸盐含量与抗氧化活性有关。Li 等^[42]研究表明, 富含糖醛酸和硫酸基团的低分子量绿藻石莼多糖表现出较好的抗氧化能力。抗氧化活性对比试验结合红外光谱与高效液相色谱的结果表明, 浒苔多糖 LEP III a 是一种具有抗氧化潜力的低分子量海藻多糖。

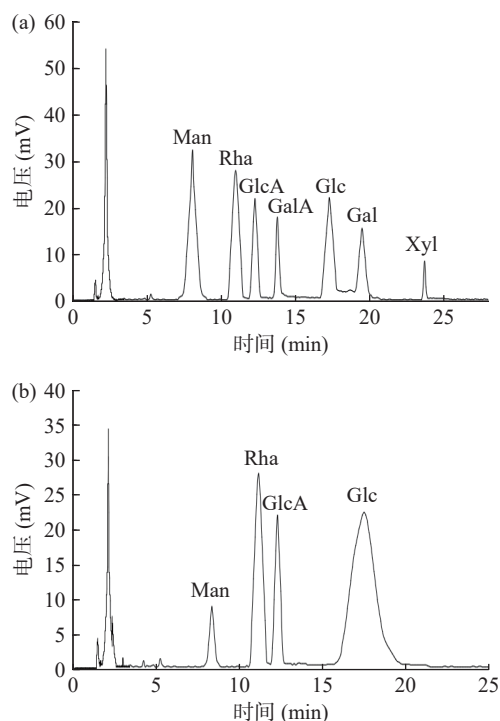


图 9 单糖标准品(a)和 LEP III a(b)的 HPLC 色谱图

Fig.9 HPLC chromatograms of monosaccharide standard (a) and LEP III a (b)

3 结论

本研究以辽宁营口鲅鱼圈海域浒苔为原料, 利用微波辅助 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{V}_\text{C}$ 法对浒苔多糖进行降解, 经过木瓜蛋白酶和 Sevag 法脱蛋白、DEAE-52 离子交换

层析与 Sephadex G-100 凝胶柱层析分离,得到 3 种 LPE 组分 LEP I、LEP II、LEP III a。相比未降解前的 EP, 3 种 LEP 组分的理化性质发生较大变化, M_w 分别降至 $(23.6 \pm 0.5, 24.6 \pm 0.6, 22.9 \pm 0.5)$ kDa, 粘度分别降至 $(1.5 \pm 0.1, 1.6 \pm 0.1, 1.5 \pm 0.1)$ mPa.s; 8 mg/mL LEP 各组分的总抗氧化能力由降解前的 (315.2 ± 10.3) U/mL 增加到 $(572.3 \pm 13.3, 565.7 \pm 12.5, 661.8 \pm 18.3)$ U/mL; 铁离子还原能力由降解前的 $51.3\% \pm 1.0\%$ 增加到 $74.2\% \pm 1.6\%, 70.2\% \pm 1.3\%, 83.4\% \pm 2.2\%$ 。说明采用微波辅助 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{V}_\text{C}$ 解法可制备抗氧化活性更强的小分子多糖。利用红外光谱、薄层色谱结合高效液相色谱对 LEP III a 进行了单糖组分分析, LEP III a 是一种由葡萄糖、鼠李糖、糖醛酸等组成的含硫酸基团的低分子量多糖, 硫酸基含量 $14.6\% \pm 0.5\%$, 分子量 (22.9 ± 0.5) kDa。

微波辅助 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{V}_\text{C}$ 降解制备低分子量浒苔硫酸多糖的方法, 不仅提高了多糖的抗氧化能力, 还缩短了降解时间 (15 min), 制备得到的低分子量浒苔多糖可以作为功能性成分用于抗氧化相关的功能食品和保健品的开发, 为辽宁营口地区海洋藻类多糖的开发利用及高抗氧化活性多糖的快速降解制备提供实验依据, 为更好的开发浒苔资源、深入研究其构效关系奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘欢, 陈胜军, 杨贤庆. 海藻多糖的提取、分离纯化与应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 341–346. [LIU H, CHEN S J, YANG X Q. Advances of extraction, purification and application of polysaccharides from seaweeds[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 341–346.]
- [2] SWATHI N, KUMAR A G, PARTHASARATHY V, et al. Isolation of *Enteromorpha* species and analyzing its crude extract for the determination of *in vitro* antioxidant and antibacterial activities[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2022, 23: 1–10.
- [3] TANG Z H, GAO H W, WANG S, et al. Hypolipidemic and antioxidant properties of a polysaccharide fraction from *Enteromorpha prolifera*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58: 186–189.
- [4] NING L M, YAO Z, ZHU B W. Ulva (*Enteromorpha*) polysaccharides and oligosaccharides: A potential functional food source from green-tide-forming macroalgae[J]. Marine Drugs, 2022, 20(3): 202.
- [5] KIDGELL J T, MAGNUSSON M, DE NYS R, et al. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function[J]. Algal Research, 2019, 39: 101422.
- [6] JIAO L L, LI X, LI T B, et al. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*[J]. International Immunopharmacology, 2009, 9(3): 324–329.
- [7] ESSA H L, GUIRGUIS H A, EL-SAYED M M H, et al. Ultrasonically-extracted marine polysaccharides as potential green antioxidant alternatives[J]. Proceedings, 2020, 67(1): 23.
- [8] MANLUSOC J K T, HSIEH C L, HSIEH C Y, et al. Pharmacologic application potentials of sulfated polysaccharide from marine algae[J]. Polymers (Basel), 2019, 11(7): 1163.
- [9] WASSIE T, NIU K M, XIE C Y, et al. Extraction techniques, biological activities and health benefits of marine algae *Enteromorpha prolifera* polysaccharide[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 747928.
- [10] 李霞, 张国柱, 刘志飞, 等. 肠浒苔多糖降血糖活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 321–326. [LI X, ZHANG G Z, LIU Z F, et al. Hypoglycemic activity of *Enteromorpha intestinalis* polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(15): 321–326.]
- [11] HAO H L, HAN Y, YANG L H, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of a novel polysaccharide from green alga *Caulerpa racemosa* var *peltata*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 134: 891–900.
- [12] QIU S M, AWEYA J J, LIU X J, et al. Bioactive polysaccharides from red seaweed as potent food supplements: A systematic review of their extraction, purification, and biological activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 275: 118696.
- [13] 胡馨月, 张维, 赵行, 等. 浒苔低聚糖的制备及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(12): 123–129. [HU X Y, ZHANG W, ZHAO H, et al. Preparation and antioxidant activities of oligosaccharides from *Enteromorpha prolifera*[J]. Food Research and Development, 2021, 42(12): 123–129.]
- [14] QIN C Q, DU Y M, XIAO L, et al. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan[J]. Polymer Degradation and Stability, 2002, 76(2): 211–218.
- [15] CIKOŠ A M, JOKIĆ S, ŠUBARIĆ D, et al. Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae[J]. Marine Drugs, 2018, 16(10): 348.
- [16] LE B, GOLOKHVAST K S, YANG S H, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Ulva pertusa* and evaluation of their antioxidant activity[J]. Antioxidants, 2019, 8(5): 129.
- [17] 杨君, 黄芳芳, 秦敏朴, 等. 裂片石莼多糖微波辅助提取工艺优化及其卷烟保润应用[J]. 河南农业大学学报, 2015, 49(5): 688–695. [YANG J, HUANG F F, QIN M P, et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Ulva fasciata* and its moisture retention[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2015, 49(5): 688–695.]
- [18] CUI J F, LI Y P, YU P, et al. A novel low molecular weight *Enteromorpha* polysaccharide-iron (III) complex and its effect on rats with iron deficiency anemia (IDA)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 412–418.
- [19] ZHOU M Y, NIE S P, YING J Y, et al. Ascorbic acid induced degradation of polysaccharide from natural products: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151: 483–491.
- [20] 谭诗敏, 罗志刚, 程建华. $\text{H}_2\text{O}_2\text{-V}_\text{C}$ 降解对香水莲花多糖结构与活性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 48–53. [TAN S M, LUO Z G, CHENG J H. Effect of $\text{H}_2\text{O}_2\text{-V}_\text{C}$ Degradation system on the structure and activity of polysaccharides from *Nymphaea hybrid*[J]. Food Science, 2021, 42(24): 48–53.]
- [21] WU T C, HONG Y H, TSAI Y H, et al. Degradation of *Sargassum crassifolium* fucoidan by ascorbic acid and hydrogen peroxide, and compositional, structural, and *in vitro* anti-lung cancer analyses of the degradation products[J]. Marine Drugs, 2020, 18(6): 334.
- [22] 刘欢. 舌状蜈蚣藻多糖的提取、降解及抗氧化活性研究

- [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019. [LIU H. Study on extraction, degradation and antioxidant activity of polysaccharide from *Grateloupia livida* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.]
- [23] 杜国丰, 陈红漫, 阚国仕, 等. 苦瓜多糖铁的制备及其对小鼠降血糖活性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 353–356. [DU G F, CHEN H M, KAN G S, et al. Study on preparation of *Momordica charantia* polysaccharide-iron complex and its hypoglycemic activities in diabetic mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(9): 353–356.]
- [24] 张龙翔, 张庭芳, 孔令媛. 生物化学实验方法与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 136–137. [ZHANG L X, ZHANG T F, KONG L Y. Biochemical experimental methods and techniques [M]. Beijing: Higher Education Press, 1997: 136–137.]
- [25] XU J, XU L L, ZHOU Q W, et al. Isolation, purification, and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 81: 1026–1030.
- [26] ZHAO S F, HE Y, WANG C G, et al. Isolation, characterization and bioactive properties of alkali-extracted polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(11): 552.
- [27] 向维, 丁馨, 张薛磊, 等. 彩虹明樱蛤酸性多糖的提取与纯化[J]. 浙江大学学报(医学版), 2012, 41(5): 569–575. [XIANG W, DING X, ZHANG X L, et al. Extraction and purification of acidic polysaccharide from *Moerella iridescens*[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2012, 41(5): 569–575.]
- [28] WANG Y F, MAO F F, WEI X L. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from leaves, flowers and seeds of green tea[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(1): 146–153.
- [29] DODGSON K S, PRICE R G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides[J]. *Biochemical Journal*, 1962, 84: 106–110.
- [30] JOHANSSON A, JASSON P E, WIDMALM G. Structure of the polysaccharide Zanflo elaborated by *Erwinia tahitica* ATCC 21711[J]. *Carbohydrate Research*, 1994, 264(1): 129–134.
- [31] SUN H H, MAO W J, CHEN Y, et al. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp F23-2[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(1): 117–124.
- [32] CHI Y Z, LI Y P, ZHANG G L, et al. Effect of extraction techniques on properties of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their applicability in iron chelation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 181: 616–623.
- [33] SEEDEVI P, MOOVENDHAN M, VIRAMANI S, et al. Bioactive potential and structural characterization of sulfated polysaccharide from seaweed (*Gracilaria corticata*) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 155: 516–524.
- [34] QI H Y, ZHANG Z P, LIU J Q, et al. Comparisons of isolation methods, structural features, and bioactivities of the polysaccharides from three common panax species: A review of recent progress [J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 4997.
- [35] KHAN B M, ZHENG L X, KHAN W, et al. Antioxidant potential of physicochemically characterized *Gracilaria blodgettii* sulfated polysaccharides[J]. *Polymers*, 2021, 13(3): 442.
- [36] REZAZADEH N H, BUAZAR F, MATROODI S. Synergistic effects of combinatorial chitosan and polyphenol biomolecules on enhanced antibacterial activity of biofunctionalized silver nanoparticles[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 19615.
- [37] 崔洁芬, 杜春影, 迟永洲, 等. 浒苔多糖铁的制备工艺优化及其结构表征[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 161–165, 170. [CUI J F, DU C Y, CHI Y Z, et al. Optimization of preparation process of *Enteromorpha prolifera* polysaccharide-iron and its structure characterization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(5): 161–165, 170.]
- [38] 吕海涛, 肖宝石, 高玉杰. 浒苔多糖的酶法提取、纯化及初步结构鉴定[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(8): 33–36. [LÜ H T, XIAO B S, GAO Y J. Study on the extraction, purification and structural characterization of polysaccharide from *Enteromorpha* [J]. Food Research and Development, 2013, 34(8): 33–36.]
- [39] CHEN S, SATHUVAN M, ZHANG X, et al. Characterization of polysaccharides from different species of brown seaweed using saccharide mapping and chromatographic analysis[J]. *BMC Chemistry*, 2021, 15(1): 1.
- [40] GARFIAS SILVA V, CORDOVA AGUILAR M S, ASCANIO G, et al. Acid hydrolysis of pectin and mucilage from Cactus (*Opuntia ficus*) for identification and quantification of monosaccharides[J]. *Molecules*, 2022, 27(18): 5830.
- [41] KIM S Y, KIM E A, KIM Y S, et al. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* leaves against oxidative stresses[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91: 804–811.
- [42] LI W, JIANG N, LI B, et al. Antioxidant activity of purified ulvan in hyperlipidemic mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 971–975.