

紫菜多糖硫酸化修饰及生物活性分析

李 瑶, 熊欣琪, 徐 畅, 冯学珍, 冯书珍

Sulfated Modification and Bioactivity Analysis of Polysaccharide from *Porphyra*

LI Yao, XIONG Xinqi, XU Chang, FENG Xuezhen, and FENG Shuzhen

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030027>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

天然多糖的硫酸化修饰对其生物活性影响研究进展

Research Progress of Sulfated Modification of Natural Polysaccharide on Their Bioactivities

食品工业科技. 2019, 40(6): 298-302 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.051>

牡蛎蛋白酶解多肽降糖及抗氧化活性评价

Evaluation of hypoglycemic and antioxidant activity for peptides from oyster protein

食品工业科技. 2018, 39(3): 28-31 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.03.006>

黄精多糖的提纯、硫酸化和羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究

Purification, Sulfation Modification and Carboxymethylation Modification of Polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2019, 40(21): 45-51 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.21.008>

蒙自蹄盖蕨醇提物的不同萃取物的抗氧化、降血糖及抗炎活性

Antioxidant, Hypoglycemic and Anti-inflammatory Activities of Different Parts Partitioned from the Ethanol Extracts of *Athyrium Mengtzeense* Hieron

食品工业科技. 2019, 40(14): 62-67 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.14.010>

平阴玫瑰花托多糖的结构特征及抗氧化活性分析

Structural characterization and antioxidant activity of receptacle polysaccharide from pingyin rose

食品工业科技. 2018, 39(8): 61-66 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.08.012>

苦瓜多糖铁的制备及其对小鼠降血糖活性研究

Study on preparation of Momordica charantia polysaccharide-iron complex and its hypoglycemic activities in diabetic mice

食品工业科技. 2017(09): 353-356 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.060>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李瑶,熊欣琪,徐畅,等.紫菜多糖硫酸化修饰及生物活性分析[J].食品工业科技,2024,45(1):192-198. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030027

LI Yao, XIONG Xinqi, XU Chang, et al. Sulfated Modification and Bioactivity Analysis of Polysaccharide from *Porphyra*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 192-198. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030027

· 工艺技术 ·

紫菜多糖硫酸化修饰及生物活性分析

李瑶^{1,2},熊欣琪¹,徐畅¹,冯学珍¹,冯书珍^{1,2,*}

(1.广西科技大学医学部,广西柳州 545006;

2.广西科技大学理学院,广西柳州 545006)

摘要:以紫菜为原料,采用微波辅助酶法制备紫菜多糖,浓硫酸法合成硫酸化紫菜多糖,通过单因素及正交试验对紫菜多糖硫酸化修饰工艺条件进行优化,利用傅里叶红外光谱仪鉴定修饰结果,并比较浓硫酸法与氯磺酸-吡啶法对硫酸化多糖抗氧化与降血糖活性的影响。结果表明:浓硫酸法进行硫酸化的最佳条件为料液比 1:80 g/mL,紫菜多糖与硫酸铵质量比 10:9 g/g,反应时间 33 min,最高取代度为 2.94;红外光谱指征修饰后的紫菜多糖在 801、1123 cm^{-1} 处有硫酸基团的特征吸收峰,硫酸基团的可能取代位置为 C-6;硫酸化后的紫菜多糖对 DPPH、 O_2^- 和 OH 自由基的清除作用及 α -葡萄糖苷酶的抑制作用均显著高于硫酸化前 ($P<0.05$);浓硫酸法修饰紫菜多糖的抗氧化活性及降血糖活性均显著高于氯磺酸-吡啶法 ($P<0.05$),说明浓硫酸法更适用于紫菜多糖的硫酸化修饰。研究结果为开展食源性紫菜多糖的进一步利用提供了参考。

关键词:紫菜,多糖,硫酸化,抗氧化活性,降血糖活性

中图分类号:TS201.1

文献标识码: B

文章编号:1002-0306(2024)01-0192-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030027



本文网刊:

Sulfated Modification and Bioactivity Analysis of Polysaccharide from *Porphyra*

LI Yao^{1,2}, XIONG Xinqi¹, XU Chang¹, FENG Xuezheng¹, FENG Shuzhen^{1,2,*}

(1.School of Medicine, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China;

2.School of Science, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: The polysaccharides were obtained by microwave-assisted enzymatic extraction from *Porphyra*, and then modified by sulphate method. Single factor and orthogonal experiments were used to optimize the sulfated modification process of polysaccharides, which were identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The antioxidant and hypoglycemic activity changes of the polysaccharides modified by sulphate and chlorosulfonic acid-pyridine method were also studied. Results showed that the optimal technology parameters were the ratio of solid to liquid 1:80 g/mL, the mass ratio of *Porphyra* polysaccharide to ammonium sulfate 10:9 g/g, reaction time 33 min, and the maximum degree of substitution was 2.94. FT-IR showed that the characteristic absorption peaks of sulfate radical group appeared near 801 and 1123 cm^{-1} , and the possible substitution position of sulfate radical group was C-6. The sulfate modification could significantly improve the scavenging ability of DPPH, O_2^- and OH free radicals and the inhibitory effect on α -glucosidase activity of the polysaccharides ($P<0.05$). The antioxidant and hypoglycemic activity of the polysaccharides modified by sulphate method were both higher than that by chlorosulfonic acid-pyridine method ($P<0.05$), indicating that sulphate method was applicable to modify the *Porphyra* polysaccharide. This study provides a theoretical basis for the further development of polysaccharides from *Porphyra* as a functional food.

收稿日期: 2023-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001208);中央引导地方科技发展资金项目资助(桂科 AD20159063);博士基金项目(校科博 17Z05);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2019KY0366)。

作者简介: 李瑶(1998-),女,硕士研究生,研究方向:天然药物分子生物学,E-mail: lylzjlhj@163.com。

*** 通信作者:** 冯书珍(1987-),女,博士,副教授,研究方向:天然药物分子生物学,E-mail: fengshuzhen@gxust.edu.cn。

Key words: *Porphyra*; polysaccharide; sulfated; antioxidant activity; hypoglycemic activity

紫菜(*Porphyra*)是我国重要的药食同源红藻,紫菜中含有多糖、蛋白质、维生素等多种活性物质^[1]。其中,紫菜多糖的结构与琼胶类似,占紫菜干质量的20%~40%,含量丰富且易提取^[2],在抗氧化、降血糖等生物活性方面发挥着重要作用^[3-5]。

天然多糖生物活性相对较弱,常采用化学修饰的方法改善其生物活性,其中,硫酸化修饰是多糖化学修饰中常用的修饰方法之一^[6-7]。硫酸化修饰主要通过多糖的糖基上引入硫酸基团,使多糖结构发生改变进而增加多糖的生物活性^[8-9]。浓硫酸法^[10]和氯磺酸-吡啶法^[11]是多糖硫酸化修饰的主要方法。氯磺酸-吡啶法进行硫酸化修饰,具有取代度高、产物回收率高的优点,但腐蚀性极强,对人体危害巨大^[12-13];而浓硫酸法则具有产物杂质少,且易分离的优势^[14]。现有研究指征不同硫酸化修饰方法对多糖生物活性的影响不一,如:浓硫酸法进行硫酸化修饰能显著提高老鸦瓣多糖对 DPPH 自由基的清除能力,但对羟自由基的清除能力的影响较弱^[15];氯磺酸-吡啶法进行硫酸化修饰显著增强了鸡腿菇多糖对羟自由基的清除能力,但对超氧阴离子自由基的清除作用较弱^[16]。尚不明确与氯磺酸-吡啶法相比,浓硫酸法修饰紫菜多糖是否更适用于生物活性的提高。

以广西北部湾紫菜为研究对象,采用浓硫酸法对紫菜多糖进行硫酸化修饰,通过单因素和正交试验获取最佳酯化条件,初步鉴定修饰前后的多糖结构,比较不同硫酸化修饰方法(氯磺酸-吡啶法和浓硫酸法)对紫菜多糖抗氧化活性和降血糖活性的影响,以期明确紫菜多糖的硫酸化修饰方法,进一步提高其原有生物活性,为紫菜多糖的进一步开发与利用提供参考依据和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

紫菜 采自广西北部湾海域(20°54'10"~21°40'30" N, 109°05'20"~109°11'35" E),经大连海洋大学邢坤副教授鉴定为红藻门紫菜属;阿卡波糖(99%)、4-硝基苯- α -D-葡萄糖苷(98%)、 α -葡萄糖苷酶(10 U/mg) Sigma 公司;中性蛋白酶(50 U/mg) 北京索莱宝科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

DFT-200 高速万能粉碎机 温岭市林大机械有限公司;AL104 高密度电子天平 梅特力-托利多仪器公司;LGJ-50C 冷冻干燥机 上海精宏实验设备有限公司;DH-9077A 电热恒温干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;TDL-5000bR 台式离心机 上海安亭科学仪器厂;KW-1000DC 水浴锅 州蒙特仪器制造公司;UV-2600 紫外分光光度计 株式会社岛津制作所;DF-101S 恒温加热磁力搅拌器 巩义市予华仪器有限责任公司;MultiskanGO 全波长扫描酶标

仪 赛默飞世尔科技有限公司;Nicolet6700 傅里叶红外光谱仪 上海莱睿科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 紫菜多糖的提取 参照冯学珍等^[17]的方法,略作修改。取新鲜采集的紫菜反复清洗,自然风干后粉碎、过筛于干燥器中备用。准确称取粉末 5.00 g,95% 无水乙醇浸泡过夜,冷冻干燥,加适量蒸馏水调节溶液 pH 至 7.0,600 W 微波辅助提取 90 s,离心,浓缩,醇沉,静置过夜,沉淀干燥得紫菜粗多糖。将紫菜粗多糖与中性蛋白酶按 1:0.5 于 50 ℃ 水浴反应 2 h,后沸水灭活 5 min,重复多次,直至测定 280 nm 处无吸收峰,说明蛋白质已除。将酶解液离心,减压浓缩,干燥得紫菜多糖(*Porphyra* polysaccharide, PP)。

1.2.2 浓硫酸法制备硫酸化紫菜多糖的工艺优化

1.2.2.1 浓硫酸法 称取 0.10 g 紫菜多糖与浓硫酸按照一定料液比混合后置于带有干燥管和搅拌装置的三颈烧瓶中,加入 2.5 mL 正丁醇,通过温和搅拌的方法,冰浴冷却至 0 ℃,加入一定量的硫酸铵,反应一定时间。反应结束后调节溶液 pH 至 7.0,透析,离心,上清液减压浓缩,冷冻干燥即得硫酸化紫菜多糖(Sulfated *Porphyra* polysaccharide, SPP)。

1.2.2.2 单因素实验方法 准确量取 2.5 mL 正丁醇,在料液比 1:80 g/mL、紫菜多糖与硫酸铵质量比 10:6 g/g、反应时间 25 min 条件下,研究料液比(1:70、1:80、1:90、1:100、1:110 g/mL)、紫菜多糖与硫酸铵质量比(10:4、10:6、10:8、10:10、10:12 g/g)、反应时间(15、20、25、30、35 min)对硫酸化紫菜多糖取代度的影响。

1.2.2.3 正交试验设计 在单因素实验设计的条件下,选取料液比(A)、紫菜多糖与硫酸铵质量比(B)和反应时间(C)作为正交试验因素,每个因素选择 3 个水平,以 SPP 取代度为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行工艺优化。具体的正交试验设计因素及水平见表 1。

表 1 硫酸化紫菜多糖的正交试验设计因素及水平
Table 1 Levels and factors of orthogonal experiments of SPP

水平	A 料液比 (g/mL)	B 紫菜多糖与硫酸铵质量比 (g/g)	C 反应时间 (min)
1	1:75	10:9	27
2	1:80	10:10	30
3	1:85	10:11	33

1.2.3 氯磺酸-吡啶法制备硫酸化紫菜多糖 参照 CHEN 等^[18]的方法,略作修改。准确称取 0.1 g 紫菜多糖悬浮于 10.0 mL 的 N,N -二甲基甲酰胺中,搅拌 20 min 后,加入装有酯化试剂(V 氯磺酸:V 吡啶=1:3)的三颈瓶中,75 ℃ 水浴条件下反应 1.5 h。反应

完成后,加入适量冰水,以 2.5 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 至中性。加入三倍体积的无水乙醇于 4 ℃ 冰箱中过夜,离心、透析、浓缩、冷冻干燥即得硫酸化紫菜多糖(SPP1)。

1.2.4 取代度测定

1.2.4.1 硫酸根含量测定 标准曲线的绘制采用氯化钡-明胶法^[19]。称取干燥至恒重的硫酸钾粉末 217.50 mg,以 1.0 mol/L 的盐酸定容至 50.0 mL 容量瓶,得硫酸根标准溶液。准确吸取不同体积的硫酸钾标准溶液(0.08、0.16、0.24、0.32、0.40 mL),加入 1.0 mol/L 的盐酸补足至 0.4 mL,加入 7.6 mL 3% 三氯乙酸和 2.0 mL 0.2% 的氯化钡-明胶溶液,充分摇匀,静置 15 min 后,在 360 nm 处测定吸光度 A_1 ,以 2.0 mL 0.5% 的明胶溶液代替氯化钡-明胶溶液,重复上述操作,在 360 nm 处测定吸光度 A_2 。以硫酸根的浓度为横坐标, A_1-A_2 为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.4.2 取代度的测定 取硫酸化紫菜多糖 2.00 mg,溶于 1.0 mol/L 盐酸中,充分振摇,待完全溶解后置沸水浴中反应 1 h,吸取 0.2 mL 反应液进行样品分析,按照 1.2.4.1 测定吸光值,根据标准曲线计算硫酸根的百分含量后按式(1)计算取代度 DS(Degree of substitution, DS):

$$DS = \frac{1.62S}{32 - 1.02S} \quad \text{式(1)}$$

式中:DS 为样品取代度,S 为硫酸根的百分含量(%)。

1.2.5 红外光谱分析 分别称取 2.00 g 硫酸化修饰前后的紫菜多糖样品,溴化钾压片,在 4000~500 cm^{-1} 的波数范围内经傅里叶变换红外光谱仪测定。

1.2.6 生物活性分析

1.2.6.1 抗氧化活性分析 分别配制不同质量浓度修饰前后的紫菜多糖溶液,以相同质量浓度的维生素 C 作为阳性对照,参考冯书珍等^[20]的方法,测定其对 DPPH、 O_2^- 和 OH 自由基的清除能力并计算 IC_{50} 值。紫菜多糖对 DPPH、 O_2^- 和 OH 自由基的清除率按式(2)计算。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 是样品组的吸光度值, $A_{\text{对照}}$ 是对照组的吸光度值, $A_{\text{空白}}$ 是空白组的吸光度值。

1.2.6.2 降血糖活性分析 以阿卡波糖为阳性对照,参考冯学珍等^[21]的方法,测定不同质量浓度下硫酸化前后的紫菜多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用并计算 IC_{50} 值。紫菜多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率按式(3)计算。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{药物反应}} - A_{\text{药物对照}}}{A_{\text{空白反应}} - A_{\text{空白对照}}}\right) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: $A_{\text{药物反应}}$ 是药物反应组的吸光度值, $A_{\text{药物对照}}$ 是药物对照组的吸光度值, $A_{\text{空白反应}}$ 是空白反应组的

吸光度值, $A_{\text{空白对照}}$ 是空白对照组的吸光度值。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2021、SPSS(SPSS 22.0 Windows, SPSS Inc, Chicago, USA)、Origin 2022、正交设计助手 II(V 3.1)和 Graphpad Prism 9 对数据进行统计分析与作图。硫酸化前后的紫菜多糖的抗氧化活性和降血糖活性进行单因素方差分析(One-way ANOVA, 置信水平 95%),多重比较用 S-N-K 法,结果以 $\bar{x} + \sigma / \sqrt{n}$ 的形式表示。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 料液比对取代度的影响 随着料液比的增大, SPP 的取代度呈现先升高后降低的趋势(图 1)。在料液比为 1:80 g/mL 时,取代度达到最大值 2.07 ± 0.01 ,当料液比大于 1:80 g/mL 后,取代度呈现逐渐显著下降的趋势($P < 0.05$),分析原因可能是由于过高的浓硫酸含量会破坏多糖结构^[22],导致取代度降低。因此,将料液比确定在 1:75~1:85 g/mL 范围内最合适。

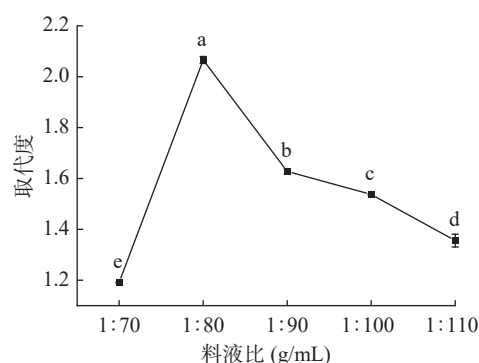


图 1 料液比对取代度的影响

Fig.1 Effect of the ratio of solid to liquid on the DS
注:不同英文字母表示数据差异显著($P < 0.05$),图 2、图 3 同。

2.1.2 紫菜多糖与硫酸铵质量比对取代度的影响 随着紫菜多糖与硫酸铵质量比的增加,其取代度呈现先显著增大后显著减小趋势($P < 0.05$,图 2),在 10:10 g/g 时达到最大,为 2.81 ± 0.02 ,说明此时硫酸化反应完全,取代度最高;当紫菜多糖与硫酸铵质量比大于 10:10 g/g 时,多糖溶液中硫酸铵含量过高,

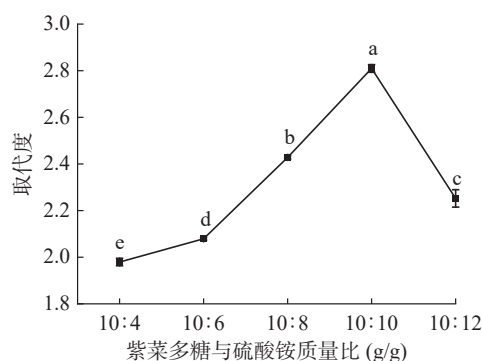


图 2 紫菜多糖与硫酸铵质量比对取代度的影响

Fig.2 Effect of the mass ratio of *Porphyra* polysaccharide to ammonium sulfate on the DS

酸性太强,容易造成多糖降解,且易造成板结现象,硫酸化反应不充分,导致取代度降低^[23]。因此,紫菜多糖与硫酸铵质量比选择 10:8~10:12 g/g 范围内最合适。

2.1.3 反应时间对取代度的影响 由图 3 可知,在 15~30 min 内, SPP 的取代度随反应时间的延长逐渐增大,在反应时间为 30 min 时, SPP 的取代度最高,为 2.850±0.001,当反应时间大于 30 min 时(35 min),取代度显著下降($P<0.05$)。推测原因可能是在 30 min 内,利于酯化剂的扩散,进而促进酯化剂与多糖分子结合,取代度升高;随着时间进一步增加,反应体系中硫酸浓度过高,导致糖苷键断裂,取代度降低^[24]。因此,反应时间确定为 25~35 min 合适。

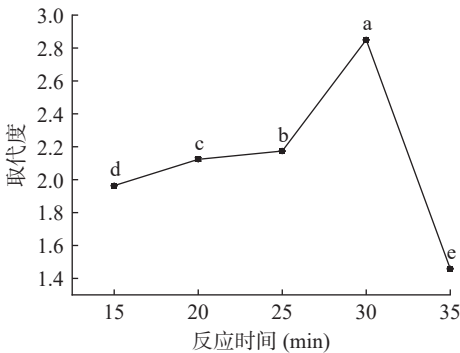


图 3 反应时间对取代度的影响
Fig.3 Effect of reaction time on the DS

2.2 紫菜多糖硫酸化最佳工艺条件的确定

2.2.1 正交试验结果 影响硫酸化紫菜多糖取代度的因素依次为 A>C>B,即料液比>反应时间>紫菜多糖与硫酸铵质量比(表 2)。方差分析结果(表 3)表明,料液比显著影响硫酸化紫菜多糖的取代度($P<0.05$),反应时间、紫菜多糖与硫酸铵质量比对取代度无显著影响($P>0.05$)。硫酸化修饰紫菜多糖 SPP 的最优条件组合为 A₂C₃B₁,结合单因素实验结果,最终确

表 2 硫酸化紫菜多糖的正交试验结果
Table 2 Orthogonal experimental results of SPP

试验号	因素			取代度
	A 料液比	B 紫菜多糖与硫酸铵质量比	C 反应时间	
1	1	1	1	1.04
2	1	2	3	1.38
3	1	3	2	2.29
4	2	2	2	2.85
5	2	3	1	1.68
6	2	1	3	2.94
7	3	2	1	2.10
8	3	3	3	1.16
9	3	1	2	1.42
k _{ij}	1.57	2.49	1.56	
k _{2j}	1.80	2.11	1.71	
k _{3j}	1.61	2.19	1.83	
R	0.93	0.4	0.58	
因素排序	A>C>B			
最佳组合	A ₂ C ₃ B ₁			

表 3 方差分析结果
Table 3 Variance analysis results

因素	偏差平方和	自由度	F比	显著性
A	5.13	2	11.29	0.001
B	0.79	2	1.74	0.201
C	1.54	2	3.39	0.054
误差	4.55	20		
总计	12.02	26		

定 SPP 的最佳工艺为:料液比 1:80 g/mL、反应时间为 33 min、紫菜多糖与硫酸铵质量比为 10:9 g/g,最高取代度为 2.94,高于杨燕敏等^[25]对红枣多糖硫酸化修饰的研究。

2.2.2 验证实验 称取 1.00 g 紫菜多糖,在最佳硫酸化工艺条件下(料液比 1:80 g/mL、反应时间 33 min、紫菜多糖与硫酸铵质量比 10:9 g/g)进行实验,计算硫酸化紫菜多糖的取代度。结果表明,硫酸化紫菜多糖的平均取代度为 2.94,与正交试验结果一致。

2.3 红外光谱分析

如图 4 所示, SPP 和 PP 均在 3500~3300、3000~2800、2000~1500、1400~700 cm⁻¹ 范围内显示出多糖的特征吸收峰^[26-28]。与 PP 相比, SPP 在 1100~1250 和 800~850 cm⁻¹ 范围内出现吸收峰,均提示存在硫酸基团^[29-30],即在 1123.29 cm⁻¹ 出现的吸收峰,对应 S=O 的不对称伸缩振动;在 801.47 cm⁻¹ 出现的吸收峰,可能与半乳糖 C-6 上 C-O-S 的对称伸缩振动有关,说明硫酸基团在 C-6 上发生了较大的取代^[31]。结果表明采用浓硫酸法对紫菜多糖进行硫酸化修饰是成功的。紫菜多糖经硫酸化修饰后其主体结构基本未被破坏,但由于受硫酸基团的影响,多糖的透光率也发生变化,其它特征吸收峰相比原始位置发生了偏移^[32]。

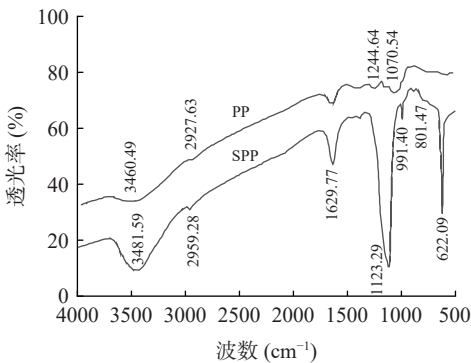


图 4 硫酸化修饰前后的紫菜多糖红外谱图
Fig.4 FT-IR of *Porphyra* polysaccharide before and after sulfate modification

2.4 硫酸化修饰前后的生物活性分析

2.4.1 抗氧化活性分析 SPP、SPP1 和 PP 对 DPPH、超氧阴离子、羟自由基的清除作用均随着浓度的增大而增大(图 5)。与 XU 等^[33]的研究不同,在 0~5 mg/mL 浓度范围内, SPP、SPP1 对 DPPH、超氧阴离子、羟自由基三种自由基清除率的 IC₅₀ 均显著低于 PP

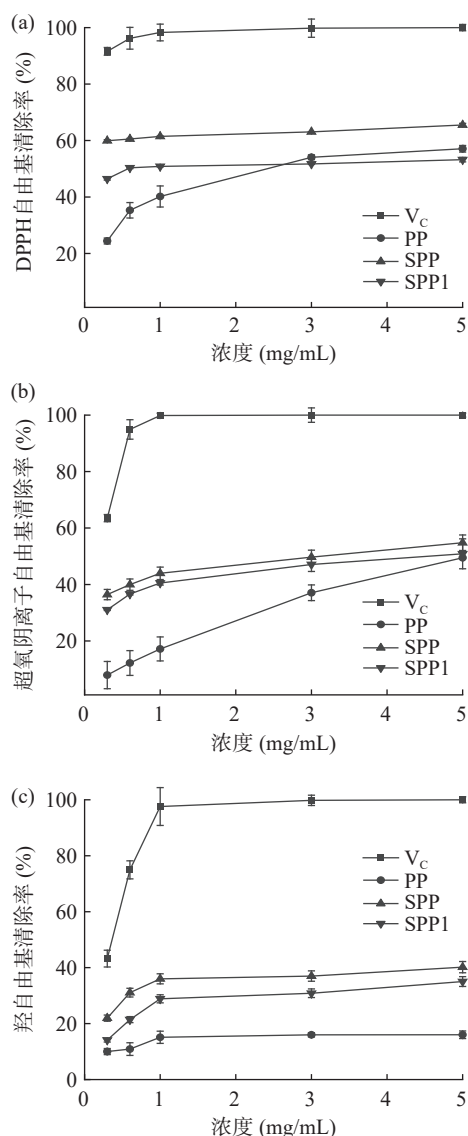


图5 硫酸化修饰前后紫菜多糖的抗氧化活性

Fig.5 Antioxidant activity of *Porphyra* polysaccharide before and after sulfate modification

($P<0.05$, 表4), 说明硫酸化修饰后的紫菜多糖抗氧化活性显著高于修饰前, 这可能是由于硫酸基团的加入对自由基的清除能力存在促进作用, 进而增强紫菜多糖的抗氧化活性^[32]。浓硫酸法修饰后的紫菜多糖, 其对三种自由基的清除率均显著高于氯磺酸-吡啶法($P<0.05$), 说明浓硫酸法更适用于促进紫菜多糖的抗氧化活性。

表4 硫酸化修饰前后紫菜多糖生物活性的半抑制浓度(IC_{50})
Table 4 IC_{50} of *Porphyra* polysaccharide before and after sulfate modification

多糖	IC_{50} (mg/mL)			
	DPPH自由基	超氧阴离子自由基	羟自由基	α -葡萄糖苷酶
SPP	0.004±0.003 ^c	2.69±0.33 ^c	19.44±0.89 ^a	13.56±0.35 ^c
SPP1	0.95±0.63 ^b	4.32±0.53 ^b	23.89±0.50 ^b	16.24±1.47 ^b
PP	2.40±0.40 ^a	5.23±0.29 ^a	26.59±0.98 ^a	26.18±4.66 ^a

注: 同列不同小写字母表示不同紫菜多糖 IC_{50} 间具有显著性差异($P<0.05$)。

2.4.2 降血糖活性分析 SPP、SPP1 和 PP 均对 α -葡

萄糖苷酶具有一定的抑制作用, 且随着浓度的增加, 抑制作用逐渐增强(图6)。当浓度达到 20 mg/mL 时, SPP、SPP1 和 PP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率最高, 分别为 24.27%、23.17%、11.89%; 在 0~20 mg/mL 浓度范围内, SPP、SPP1 对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的 IC_{50} 值显著低于 PP($P<0.05$, 表4), 分别为 13.56 ± 0.35 、 16.24 ± 1.47 、 26.18 ± 4.66 mg/mL, 说明硫酸化修饰可以显著增强紫菜多糖的降血糖活性, 与 XIAO 等^[34]的研究一致, 这可能是由于硫酸基团的加入, 增强了多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 导致葡萄糖从活性位点的扩散变慢, 延缓了葡萄糖的吸收速度^[35-36]。其中, SPP1 的降血糖活性的 IC_{50} 显著高于 SPP($P<0.05$), 说明与氯磺酸-吡啶法相比, 浓硫酸法修饰能显著提高紫菜多糖的降血糖活性。

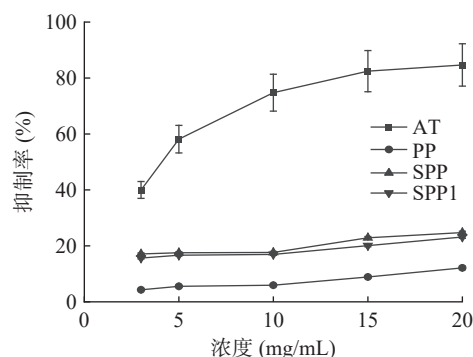


图6 硫酸化修饰前后紫菜多糖的降血糖活性

Fig.6 Hypoglycemic activity of *Porphyra* polysaccharide before and after sulfate modification

注: AT 代表阳性对照阿卡波糖。

3 结论

采用浓硫酸法对广西北部湾紫菜多糖进行硫酸化修饰, 影响取代度的关键因素为: 料液比>反应时间>紫菜多糖与硫酸铵质量比。确定最佳工艺优化条件为: 料液比 1:80 g/mL, 反应时间 33 min, 紫菜多糖与硫酸铵质量比 10:9 g/g, 最高取代度为 2.94。红外光谱表明, 紫菜多糖经硫酸化修饰后出现硫酸基团特征吸收峰, 其硫酸基团的可能取代位置为 C-6。

硫酸化修饰后的紫菜多糖, 其对 DPPH、超氧阴离子、羟自由基的清除作用及 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 均显著高于硫酸化前($P<0.05$), 说明应用硫酸化修饰提高紫菜多糖生物活性是可行的。同时, 浓硫酸法对紫菜多糖抗氧化活性、降血糖活性的促进作用显著高于氯磺酸-吡啶法($P<0.05$), 约高 1.59%~12.28%, 说明应用硫酸化修饰促进紫菜多糖生物活性时, 可优先考虑浓硫酸法。

本文基于前期研究结果, 侧重解析了硫酸化修饰对广西北部湾紫菜多糖原有生物活性如抗氧化活性、降血糖活性的促进作用, 浓硫酸法是否同样适用于显著增加食源性海藻多糖新的生物活性, 如抗凝血活性、降血脂活性等, 值得进一步研究。

参考文献

- [1] HE D, WU S Y, YAN L P, et al. Antitumor bioactivity of porphyrin extracted from *Pyropia yezoensis* Chonsoo2 on human cancer cell lines[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(15): 6722–6730.
- [2] 赵保力, 张英锋, 李长江, 等. 紫菜多糖的提取及化学成分[J]. *化学教学*, 2010, 275(3): 52–54, 65. [ZHAO B L, ZHANG Y F, LI C J, et al. Extraction and chemical composition of polysaccharides from *Porphyra*[J]. *Education of Chemistry*, 2010, 275(3): 52–54, 65.]
- [3] WU Y T, HUO Y F, XU L, et al. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra haitanensis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165(2): 2116–2125.
- [4] ZENG A, YANG R, YU S, et al. A novel hypoglycemic agent: polysaccharides from laver (*Porphyra* spp.)[J]. *Food Funct*, 2020, 11(10): 9048–9056.
- [5] LI Y T, HUO Y F, WANG F, et al. Improved antioxidant and immunomodulatory activities of enzymatically degraded *Porphyra haitanensis* polysaccharides[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(5): e13189.
- [6] HU H B, LI H M, HAN M G, et al. Chemical modification and antioxidant activity of the polysaccharide from *Acanthopanax leucorrhizus*[J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 487: 107890–107890.
- [7] 苏靖程, 张传单, 范方宇. 无籽刺梨渣可溶性膳食纤维硫酸酯化改性及性质分析[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(3): 255–261. [SU J C, ZHANG C D, FAN F Y. Sulfation modification and properties analysis of soluble dietary fiber from *Rosa sterilis* pomace[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(3): 255–261.]
- [8] ZHAO Y P, WANG H G, TIAN N N, et al. Sulfate modification and evaluation of *in vitro* Anti-HIV activity of *Lycium barbarum* polysaccharides[J]. *Chemistry Select*, 2022, 7(37): e00695.
- [9] LI Z W, DU Z M, WANG Y W, et al. Chemical modification, characterization, and activity changes of land plant polysaccharides: A review[J]. *Polymers*, 2022, 14(19): 4161.
- [10] 巩晓佩. 硫酸化修饰红枣多糖的结构表征及生物活性的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2021. [GONG X P. Study on the structure characterization and biological activity of sulfated modified jujube polysaccharide[D]. Shihezi: Shihezi University, 2021.]
- [11] 谭西, 周欣, 陈华国. 多糖结构修饰研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(4): 341–349, 356. [TAN X, ZHOU X, CHEN H G. Research progress on structural, modification of polysaccharides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(4): 341–349, 356.]
- [12] 伍磊. 硫酸酯化裂褶多糖的制备、结构表征及其体外活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021. [WU L. Study on the preparation, structure characterization and *in vitro* bioactivities of sulfated schizophyllan[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.]
- [13] 刘波, 袁利鹏, 熊波, 等. 多糖的硫酸酯化及其对结构和功能活性的影响研究进展[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(22): 372–375. [LIU B, YUAN L P, XIONG B, et al. Research advance in polysaccharides sulfated and its effect on the structure and function activity of polysaccharides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(22): 372–375.]
- [14] 徐瑶. 超声波辅助苹果膳食纤维硫酸酯化改性[D]. 西安: 陕西科技大学, 2015. [XU Y. The Ultrasound-assisted sulfated modification of dietary fiber from apple[D]. Xian: Shaanxi University of Science & Technology, 2015.]
- [15] CAO Y Y, JI Y H, LIAO A M, et al. Effects of sulfated, phosphorylated and carboxymethylated modifications on the antioxidant activities *in-vitro* of polysaccharides sequentially extracted from *Amana edulis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 887–896.
- [16] 李国荣, 刘娜女, 张静, 等. 鸡腿菇多糖硫酸酯化条件的优化及抗氧化活性研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(11): 127–133. [LI G R, LIU N N, ZHANG J, et al. Optimization on the sulfated modification of polysaccharides from *Coprinus comatus* and evaluation of antioxidant activity[J]. *Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed)*, 2010, 38(11): 127–133.]
- [17] 冯学珍, 伍善广, 孔靖, 等. 超声辅助提取石莼多糖工艺优化及其清除 DPPH·自由基活性研究[J]. *中药材*, 2013, 36(11): 1870–1872. [FENG X Z, WU S G, KONG J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharide from *Ulva lactuca* and its scavenging DPPH· free radical activity[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2013, 36(11): 1870–1872.]
- [18] CHEN F, HUANG G L, YANG Z Y, et al. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 673–680.
- [19] 姚秋萍, 何可群, 黎璐, 等. 鱼腥草多糖硫酸酯化修饰及清除自由基活性[J]. *食品工业*, 2019, 40(8): 36–39. [YAO Q P, HE K Q, LI L. Sulfated modification and scavenging effect on free radicals of *Houttuynia cordata* polysaccharides[J]. *The Food Industry*, 2019, 40(8): 36–39.]
- [20] 冯书珍, 谢广燕, 刘南英, 等. 两种海藻内生菌的分离及其抗氧化活性研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(6): 99–105. [FENG S Z, XIE G Y, LIU N Y, et al. Isolation and antioxidative activities of algal endophytes[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(6): 99–105.]
- [21] 冯学珍, 覃慧逢, 冯书珍. 网地藻多糖对 α -葡萄糖苷酶体外抑制作用的研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(3): 35–40. [FENG X Z, QIN H F, FENG S Z. Study on inhibition kinetics of polysaccharide from *Dictyota dichotoma* on α -glucosidase[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(3): 35–40.]
- [22] 高爽, 王鑫, 马永强, 等. 硫酸酯化甜玉米芯多糖的制备[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2016, 32(5): 537–541. [GAO S, WANG X, MA Y Q, et al. Sulfated modification of polysaccharides from sweet corn cobs[J]. *Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition)*, 2016, 32(5): 537–541.]
- [23] 李思雨. 小球藻多糖提取纯化及其改性研究[D]. 南宁: 广西民族大学, 2022. [LI S Y. Study on extraction, purification and modification of *Chlorella* polysaccharide[D]. Nanning: Guangxi Minzu University, 2022.]
- [24] 马波, 鞠家宽. 硫酸酯化洋葱多糖的制备及其抗氧化活性的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(6): 73–78. [MA B, JU J K. Preparation and antioxidative activities of sulfated onion polysaccharides[J]. *China Food Additives*, 2019, 30(6): 73–78.]
- [25] 杨燕敏, 郑振佳, 李桂芹, 等. 改性红枣多糖的制备和结构表征[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(9): 8–14. [YANG Y M, ZHEN Z J, LI G Q, et al. Preparation and structure characterization of modified Jujube polysaccharides[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(9): 8–14.]
- [26] BARTOLOMEU W S S, MIGUEL A C, ANA I. B, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27(2): 287–292.

- [27] 陈红漫, 郭龙伟, 章少在, 等. 小分子苦瓜多糖 MCP II a 的纯化及结构分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(10): 90–94. [CHEN H M, GUO L W, ZHANG S Z, et al. Purification and structural analysis of a polysaccharide from bitter melon (*Momordica charantia*)[J]. *Food Science*, 2015, 36(10): 90–94.]
- [28] 侯萍, 马军, 陈燕, 等. 几种海藻粗多糖的理化性质及结构特征分析[J]. *热带海洋学报*, 2018, 37(2): 55–62. [HOU P, MA J, CHEN Y, et al. Analysis of physicochemical properties and structure characteristics of several crude algal polysaccharides[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2018, 37(2): 55–62.]
- [29] 郭金英, 朱蓓茹, 任国艳, 等. 发菜胞外多糖硫酸化条件的优化及红外光谱分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 61–67. [GUO J Y, ZHU B R, REN G Y, et al. Optimization of sulfation conditions and infrared spectroscopy analysis of *Nostoc flagelliforme* exopolysaccharide[J]. *Food Science*, 2016, 37(24): 61–67.]
- [30] LIANG W, MAO X, PENG X, et al. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101: 776–785.
- [31] HEN Z H, LIU Y X, WANG D, et al. Preparation, chemical structure and α -glucosidase inhibitory activity of sulfated polysaccharide from *Grifola frondosa*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 98: 105289.
- [32] 朱影, 屠洁, 赵静, 等. 硫酸酯化修饰对白背三七多糖抗氧化性能的影响[J]. *中国食品添加剂*, 2017, 165(11): 64–70. [ZHU Y, TU J, ZHAO J, et al. Effects of sulfating modification on antioxidative activities of polysaccharides from *Gynura davuricata* (L.) DC[J]. *China Food Additives*, 2017, 165(11): 64–70.]
- [33] XU Y Q, GAO Y K, LIU F, et al. Sulfated modification of the polysaccharides from blackcurrant and their antioxidant and α -amylase inhibitory activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 1344–1354.
- [34] XIAO H, FU X, CAO C, et al. Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 407–414.
- [35] ANUSREE M, KAJAL C. Pharmacological potential of sulfated polygalactopyranosyl-fucopyranan from the brown seaweed *Sargassum wightii*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(3): 1971–1988.
- [36] 靳文娟, 鲁晓翔. 硫酸化鸡油菌多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. *食品科技*, 2012, 37(8): 168–172. [JIN W J, LU X X. The effects of sulfating *Cantharellus cibarius* polysaccharide on α -glucosidase activity[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(8): 168–172.]