

# 球等鞭金藻胞外多糖的体外抗氧化活性和理化性质的初步分析

孙颖颖<sup>1</sup>, 王 辉<sup>2</sup>

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 北京市医疗器械检验所, 北京 101111)

**摘要:** 前期研究采用离子交换柱层析和凝胶柱层析, 制备到一种球等鞭金藻胞外纯多糖 ECPS III。在此基础上, 采用化学比色法研究了 ECPS III 的体外抗氧化活性; 同时, 通过测定 ECPS III 中的硫酸基和糖醛酸含量, 初步分析了 ECPS III 的理化性质。结果表明, ECPS III 具有清除超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )、羟基自由基( $\cdot OH$ )和过氧化氢( $H_2O_2$ )等活性氧的能力和一定的还原力。其中, ECPS III 对  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  的清除能力较强。ECPS III 中的硫酸基和糖醛酸含量分别为 76.90 mg/g 和 17.1%, 是一种富含硫酸基和糖醛酸的酸性多糖。

**关键词:** 球等鞭金藻; 胞外多糖; 抗氧化活性; 理化性质

中图分类号: Q949.6 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)05-0045-05

海洋微藻在生长过程中会不断向外分泌黏性物质, 称为胞外产物(Extracellular products, ECP)<sup>[1]</sup>。胞外多糖(Extracellular polysaccharides, ECPS)是胞外产物的主要组成成分, 在海洋生态系统的微食物链及微生态系统中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。研究表明, 微藻胞外多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗辐射和免疫调节等生理活性<sup>[3-6]</sup>。例如, 黄键等<sup>[3]</sup>指出, 紫球藻(*Porphyridium cruentum*)胞外多糖在体外具有抗乙肝病毒作用。王大志等<sup>[4]</sup>指出, 爪哇曲壳藻亚缢变种(*Achnanthes javanica* var *subconstricta*)、咖啡形双眉藻(*Amphora coffeaeformis*)和多枝舟形藻(*Navicula ramosissima*)胞外多糖具有抗病毒 VHSV 和 ASFV 活性。Sogawa 等<sup>[5]</sup>发现一种浮游硅藻具有抗肿瘤 K-562 细胞活性。Umamura 等<sup>[6]</sup>发现裸甲藻(*Gymnodinium* sp.)多糖具有免疫调节作用。目前, 某些微藻胞外多糖的抗氧化活性也被报道<sup>[7-10]</sup>。石全见等<sup>[7]</sup>指出紫球藻胞外多糖具有清除超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )和羟基自由基( $\cdot OH$ )的能力, 对它们的半抑制率  $IC_{50}$  分别为 0.114 g/L 和 0.619 g/L。朱劲华等<sup>[8]</sup>指出硒化紫球藻胞外多糖在实验设定的较低浓度范围内具有抗氧化活性。蔷薇藻(*Rhodella reticulata*)<sup>[9]</sup>和裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)<sup>[10]</sup>等 2 种海洋微藻的胞外多糖能有效清除  $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot-}$  和过氧化氢( $H_2O_2$ )等活性氧。

前期研究发现, 球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)有较高含量的胞外多糖(ECPS), 可达藻细胞干质量

的 30%<sup>[11]</sup>。采用离子交换柱层析和凝胶柱层析等分离技术进行了纯化, 制备到一种胞外纯多糖, 记为 ECPS。在此基础上, 本文通过测定胞外纯多糖 ECPS 对  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$  和  $H_2O_2$  等活性氧的清除以及还原力, 研究了其体外抗氧化活性; 同时, 通过测定 ECPS 中的硫酸基和糖醛酸的含量, 初步分析了其理化性质, 以为球等鞭金藻胞外多糖的开发应用提供理论依据和实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

球等鞭金藻胞外纯多糖 ECPS 为白色粉末状固体, 由江苏省海洋生物技术重点实验室制备。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 球等鞭金藻胞外多糖对超氧阴离子的清除作用

采用邻苯三酚自氧化体系产生超氧阴离子<sup>[12]</sup>。反应体系为 3.0 mL 的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.2), 其中含有 3 mmol/L 邻苯三酚, 以及不同浓

收稿日期: 2012-06-17; 修回日期: 2012-09-06

基金项目: 连云港市科技攻关工业项目(CG0803-1); 淮海工学院人才引进科研启动项目(KQ08001)

作者简介: 孙颖颖(1978-), 女, 黑龙江桦南人, 副教授, 博士, 主要从事海洋生化工程研究, 电话: 0518-85895430, E-mail: syy-999@163.com

度的多糖样品溶液(0.05 ~ 1.6 g/L, 分别为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 g/L, 下同)。在 325 nm 波长测定反应液吸光度的变化速率。抑制率(%) =  $(A - B) / A \times 100$ ,  $A$  为对照组吸光度的变化速率,  $B$  为样品组吸光度的变化速率。

### 1.2.2 球等鞭金藻胞外多糖对羟基自由基的清除作用

在 Smirnoff 等方法<sup>[13]</sup>的基础上, 加以改进, 测定对羟基自由基的清除作用。在 3 mL 150 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.4)中含有 10 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ , 2 mmol/L 水杨酸钠, 6 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  以及不同浓度的多糖样品溶液(0.05 ~ 1.6 g/L, 同上)。37 °C 下反应 1 h, 测定 510 nm 处的吸光度。抑制率(%) =  $[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$ ,  $A_{\text{control}}$  为对照组的吸光度值,  $A_{\text{sample}}$  为样品组的吸光度,  $A_{\text{sample blank}}$  为样品空白的吸光度。

### 1.2.3 球等鞭金藻胞外多糖对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的清除作用

采用分光光度法测定多糖对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用<sup>[14]</sup>。多糖样品溶解在 3.4 mL 的 PBS 中(pH 7.4), 再加入 0.6 mL 40 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 摇匀后, 在室温下反应 10 min, 在 230 nm 处测定吸光度。抑制率(%) =  $[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$ ,  $A_{\text{control}}$  为对照组的吸光度,  $A_{\text{sample}}$  为样品组的吸光度,  $A_{\text{sample blank}}$  为样品空白的吸光度。

### 1.2.4 球等鞭金藻胞外多糖的还原力

参考文献<sup>[15]</sup>方法, 测定多糖还原力。0.5 mL 不同浓度的多糖样品溶液, 1.25 mL PBS(pH 6.6, 0.2 mol/L)溶液以及 10 g/L  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液 1.25 mL, 50 °C 下反应 20 min。然后, 加入 100 g/L TCA 1.25 mL, 6 000 r/min 离心 10 min。2.5 mL 上清液与 0.25 mL 新配制的 1 g/L  $\text{FeCl}_3$  混合, 摇匀后, 在 700 nm 处检测反应体系溶液的吸光度, 溶液的吸光度增加说明样品的还原力增强。

### 1.2.5 球等鞭金藻胞外多糖的硫酸基测定

采用硫酸比浊法<sup>[16]</sup>检测, 由标准硫酸盐作参比绘制标准曲线。

### 1.2.6 球等鞭金藻胞外多糖的糖醛酸测定

采用硫酸-吡嗪法<sup>[17]</sup>测定, 以葡萄糖醛酸作参比绘制标准曲线。

## 1.3 数据处理

实验数据采用 SPSS11.5 软件包进行独立样本检验统计分析,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异。

## 2 结果和分析

### 2.1 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS III 对超氧阴离子的清除作用

由图 1 可以看出, 在浓度 0.05 ~ 1.6 g/L 范围内, ECPS 对超氧阴离子的清除率随多糖浓度升高而显著( $P < 0.05$ )增强。当浓度为 1.6 g/L 时, 抗坏血酸(Vc)和 ECPS 对超氧阴离子的清除率分别为 52.7% 和 48.5%。在实验设定浓度范围内, ECPS 对超氧阴离子的清除作用与 Vc 接近。

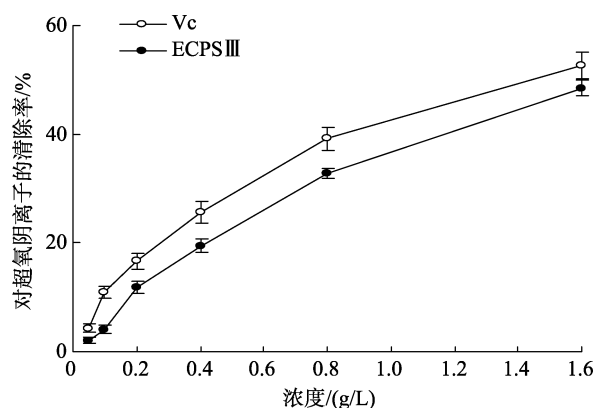


图 1 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS 对超氧阴离子的清除作用

Fig. 1 Scavenging activity of extracellular polysaccharide ECPS III from *Isochrysis galbana* against superoxide radical with ascorbic acid applied as a positive control

### 2.2 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS III 对羟基自由基的清除作用

图 2 表明, 随着多糖浓度的升高, ECPS 对羟基自由基的清除作用显著( $P < 0.05$ )增强。当浓度为 1.6 g/L 时, ECPS 对羟基自由基的清除率分别达到 63.6%。Vc 浓度为 0.8 g/L 时, 其对羟基自由基的清除率为 64.2%, 这表明, ECPS 具有中等清除羟基自由基的能力。

### 2.3 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS III 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的清除作用

在图 3 中, 当多糖浓度从 0.05 增加至 1.6 g/L 时, ECPS 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除率从 7.76% 升至 49.8%, 其对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用随多糖浓度的升高而显著( $P < 0.05$ )增强。在实验设定浓度范围内, ECPS 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用显著( $P < 0.05$ )低于 Vc 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用。

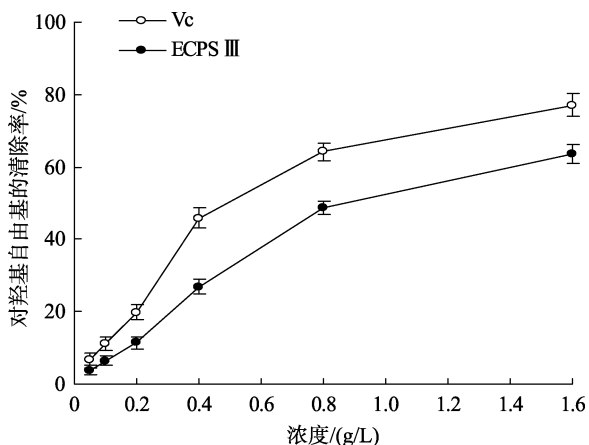


图 2 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS III 对羟基自由基的清除作用

Fig.2 Scavenging activity of extracellular polysaccharide ECPS III from *Isochrysis galbana* against hydroxyl radical with ascorbic acid applied as a positive control

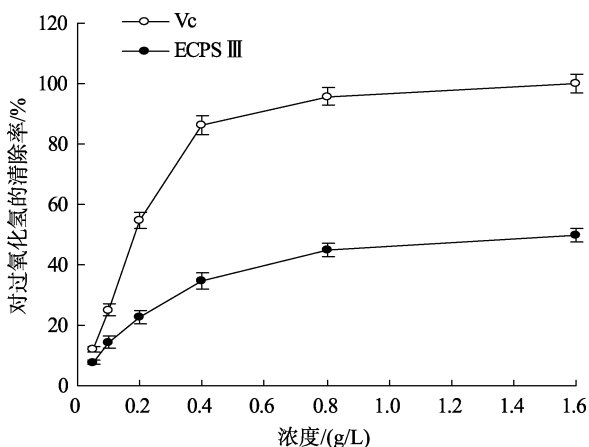


图 3 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS III 对过氧化氢的清除作用

Fig.3 Scavenging activity of extracellular polysaccharide ECPS III from *Isochrysis galbana* against hydrogen peroxide with ascorbic acid applied as a positive control

### 2.4 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS III 的还原力

随着多糖浓度的升高, ECPS III 的还原力显著 ( $P < 0.05$ ) 增加。在实验设定浓度范围内, Vc 对赤血盐溶液的还原作用显著 ( $P < 0.05$ ) 高于 ECPS III 对赤血盐溶液的还原作用(图 4)。

### 2.5 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS III 的硫酸基和糖醛酸含量

硫酸基标准曲线为,  $y = 5.1419x - 0.0306$  ( $R^2 = 0.9881$ ), 其中,  $x$  为硫酸基质量(mg),  $y$  为  $A_{530}$ 。

葡萄糖醛酸的标准曲线为,  $y = 5.1419x - 0.0306$  ( $R^2 = 0.9818$ ), 其中,  $x$  为葡萄糖醛酸质量(mg),  $y$  为  $A_{360}$ 。

通过计算, 得到 ECPS III 中硫酸基和糖醛酸含量, 分别为 76.90 mg/g 和 17.1%。

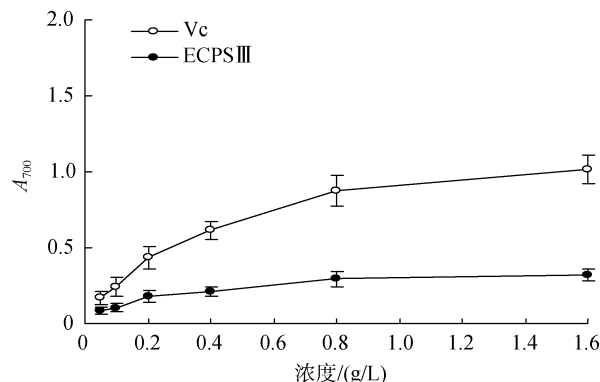


图 4 球等鞭金藻胞外多糖 ECPS III 的还原力

Fig. 4 Total reductive potential of extracellular polysaccharide ECPS III from *Isochrysis galbana* with ascorbic acid applied as a positive control

## 3 讨论

微藻胞外多糖是微藻在生长代谢过程中分泌到细胞壁外、易与菌体分离的水溶性多糖或多糖复合物, 具有多样性和复杂性等特点, 并且因为其理化性质独特, 生物活性优良而备受关注。球等鞭金藻富含多不饱和脂肪酸, 蛋白质和多糖<sup>[18-20]</sup>, 是水产养殖业中常用的饵料微藻。近年来, 随着微藻多糖研究的深入, 对球等鞭金藻多糖的研究日益增多<sup>[18-23]</sup>。然而, 相对于其他微藻多糖而言, 球等鞭金藻多糖的研究尚处于起步阶段, 尤其是胞外多糖的研究<sup>[11, 21]</sup>。

通过前期研究, 制备到球等鞭金藻胞外纯多糖 ECPS III。在此基础上, 本文通过测定 ECPS III 对  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$  和  $H_2O_2$  等活性氧的清除作用和还原力, 初步分析了 ECPS III 的体外抗氧化活性。结果表明, ECPS III 具有清除  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$  和  $H_2O_2$  的能力, 尤其对  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  的清除作用较强。以 Vc 作为对照, ECPS III 具有中高等强度清除  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  的能力(图 1、图 2 和图 3)。ECPS III 具有一定的还原力, 但显著低于 Vc 的还原力(图 4)。

王凌等将紫球藻胞外多糖进行降解处理, 发现其降解组分的总还原力与 Vc 相近, 对  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  的清除率可达到 94.89% 和 88.98%<sup>[24]</sup>。石全见采用降解和衍生化两种修饰方法处理紫球藻胞外多糖, 制备到一种具有较强抗氧化能力的多糖, 对  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  的清除率在 70% 以上<sup>[25]</sup>。这些研究表明, 微藻胞外多糖通过某些处理(降解、硫酸酯化和

羧甲基化等)可以提高其抗氧化活性。因此,通过某些处理,很可能进一步提高 ECPS 的抗氧化能力。

同时,本文还测定了 ECPS 中的糖醛酸含量,为 17.1%。梅秋红等<sup>[26]</sup>指出铜绿微囊藻胞外纯多糖 EAPA 的糖醛酸含量为 10.74%。林寿<sup>[27]</sup>认为糖醛酸的存在是酸性多糖具有特殊生理活性的重要原因之一。梅秋红等<sup>[26]</sup>发现铜绿微囊藻胞内多糖的糖醛酸含量高于其胞外多糖的糖醛酸含量,为 12.75%。他们指出胞内多糖的酸性较胞外多糖更强,从而可能导致它们的生物学效应有所区别。硫酸基也是微藻多糖具有生物活性和生理功能的主要官能团<sup>[28, 29]</sup>。石全见等<sup>[25]</sup>发现不同硫酸基含量的多糖抗氧化能力存在明显差异,随着硫酸基含量增大,多糖抗氧化能力增强。本研究中,ECPS 中硫酸基含量为 76.90 mg/g,铜绿微囊藻胞外纯多糖 EAPA 的硫酸基含量为 44.44 mg/g<sup>[26]</sup>,新月菱形藻和紫球藻胞外多糖的硫酸基含量不超过 4%<sup>[30-31]</sup>。上述结果表明,ECPS 中硫酸基和糖醛酸含量较高。

球等鞭金藻是一种已经实现大规模养殖的海洋微藻,在培养过程中能产生含量丰富的胞外多糖<sup>[21]</sup>,并且胞外多糖中酸性多糖的含量显著高于中性多糖的含量。同时,本文结果表明,胞外纯多糖具有一定的抗氧化活性,还富含硫酸基和糖醛酸。这就表明,球等鞭金藻胞外多糖具有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 高亚辉,荆红梅,黄德强,等. 海洋微藻胞外产物研究进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 35-37.
- [2] 王大志,黄世玉,程兆第. 营养盐水平对四种海洋浮游硅藻胞外多糖产量的影响[J]. 台湾海峡, 2003, 22(4): 487-492.
- [3] 黄键,陈必链,游文朗. 紫球藻胞外多糖的分离及体外抗乙肝病毒活性的初步研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2005, 24(5): 18-21.
- [4] 王大志,黄世玉,程兆第. 三种海洋硅藻胞外多聚物形态、微细结构及组成的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(3): 273 - 278.
- [5] Sogawa K, Yamada T, Sumida T, et al. Induction of apoptosis and inhibition of DNA topoisomerase- in K-562 cells by a marine microalgal polysaccharide [J]. Life Sciences Including Pharmacology Letters, 2000, 66(16): 227 -231.
- [6] Umemura K, Yanase K, Suzuki M, et al. Toshiwo inhibition of DNA topoisomerases and , and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide [J]. Biochemical Pharmacology, 2003, 66(3): 481 - 487.
- [7] 石全见,孙利芹,周妍,等. 紫球藻胞外多糖抗氧化和免疫调节活性的研究[J]. 海洋通报, 2009, 28(5): 85-90.
- [8] 朱劲华,王敏,张威,等. 硒化紫球藻胞外多糖毒性及抗氧化活性的研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2008, 27(4): 48-51.
- [9] Bilian Chen, Wenlang You, Jian Huang, et al. Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(5): 833-840.
- [10] 汪少芸,江勇,孟春,等. 海洋微藻裂壶藻发酵液胞外多糖的制备及活性研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2011, 39(5): 786-791.
- [11] 孙颖颖,雷琪瑶,刘筱潇,等. 球等鞭金藻胞内和胞外多糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 55-59.
- [12] Zou G L, Gui X L, Zhu R P. A new method on the determination of SOD: Modified pyrogallol self-oxidation [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1986, 4: 71-73.
- [13] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28: 1057-1060.
- [14] Ruch K J, Cheng S J, Klauning J E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechin isolated from Chinese green tea [J]. Carcinogenesis, 1989, 10: 1003-1008.
- [15] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucoseamine [J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [16] Kato T. Effects of *Spirulina* (*S. platensis*) on dietary hypercholesterolemia in rats [J]. J Jap Soc Food Sci, 1984, 37: 323-332.
- [17] Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids [J]. Biol Chem, 1947, 16(7): 189-198.
- [18] Sukenik A, Wahnnon R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition ( ): *Isochrysis galbana* [J]. Aquaculture, 1991, 97(1): 61-72.
- [19] 戴俊彪,吴余庆. 室内外培养海洋单细胞微藻的生长及生化组分[J]. 海洋科学, 2000, 24(6): 29-32.
- [20] 王长海,孙颖颖. 营养盐对球等鞭金藻生长及多糖等

- 生化成分含量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(11): 13-17.
- [21] 浦寅芳, 孙颖颖, 严军威, 等. 不同环境因子对球等鞭金藻胞内和胞外多糖合成的影响[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2008, 17(4): 61-64.
- [22] 吴曼, 李文权, 张赛金, 等. 海洋微藻多糖提取纯化条件的研究[J]. 海洋技术, 2004, 23(1): 9-12.
- [23] 张赛金, 李文权, 邓永智, 等. 海洋微藻多糖的红外光谱分析初探[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44: 212-214.
- [24] 王凌, 孙利芹, 赵小惠. 一种微藻多糖的理化性质及抗氧化和保湿活性[J]. 精细化工, 2012, 1: 20-25.
- [25] 石全见. 紫球藻多糖的分子修饰及其体外抗氧化作用[D]. 烟台: 烟台大学, 2007.
- [26] 梅秋红, 张玲, 王习达, 等. 铜绿微囊藻(*Microcystic aeruginosa*)胞内酸性多糖和胞外酸性多糖理化性质的比较研究[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 180-184.
- [27] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 104.
- [28] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 193-198.
- [29] 刘艳, 杨海波, 于媛, 等. 两种微藻多糖的性质及结构特征的研究[J]. 水产科学, 2008, 27(3): 125-128.
- [30] 郑维发, 陈才法, 鲍康德, 等. 新月菱形藻胞外多糖的成分及其硫酸酯的制备[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1790-1793.
- [31] 夏海锋, 姚善泾. 紫球藻的培养及其硫酸多糖的分离纯化[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 75-78.

## Study of *in vitro* antioxidation and physical and chemical characteristics analysis of extracellular polysaccharides isolated from *Isochrysis galbana*

SUN Ying-ying<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory Of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Beijing Institute of Medical Device Testing, Beijing 101111, China)

Received: Jun.,17,2012

**Key words:** *Isochrysis galbana*; extracellular polysaccharides; antioxidation activity; physical and chemical characteristics

**Abstract:** The extracellular polysaccharides, ECPS, has been successfully isolated from marine microalgae *Isochrysis galbana* through a combination of anion-exchange column chromatography and repeated gel chromatography in previous study. Its *in vitro* antioxidant activities and physical and chemical properties were investigated. The results showed that ECPS has good antioxidant activities and particularly it has relative stronger scavenging activities against superoxide radical and hydroxyl radical. ECPS is a acidic polysaccharide rich in sulfuric acid radicals and uronic acid. The contents of sulfuric acid radicals and uronic acid were 76.90 mg/g and 17.1% in ECPS, respectively.

(本文编辑: 康亦兼)