

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80581

硫酸酯化紫球藻胞外多糖的制备工艺 及抗氧化活性研究

段东洁 张 炜 隋成博 张 浩 张国栋

(青海师范大学化学化工学院, 青海 西宁 810000)

摘要: [目的] 提高紫球藻胞外多糖 (*Porphyridium aeruginum* exopolysaccharide, EPS) 的生理活性及应用范围。[方法] 采用浓硫酸法修饰 EPS, 以硫酸基取代度为指标, 利用响应面法对紫球藻胞外多糖硫酸酯 (sulfated *Porphyridium aeruginum* exopolysaccharide, S-EPS) 的制备工艺进行优化, 同时对 S-EPS 理化性质进行测定。[结果] 最佳工艺条件为反应时间 6 h、反应温度 26 °C、 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}=4:5$, 此条件下取代度为 0.8075 ± 0.0087 。红外分析证明 EPS 被成功硫化。热重分析表明 S-EPS 的热稳定性优于 EPS。粒径与 Zeta 电位分析表明, 取代度越大的样品越稳定, $-\text{SO}_3\text{H}$ 基团含量越高, 电位绝对值越大, 不易聚集。抗氧化活性试验结果显示, S-EPS 对 DPPH· 的清除率为 92.17%, 明显高于 EPS 的。[结论] 硫化修饰提高了 EPS 的抗氧化能力, 说明硫化修饰是一种较为可行的改善多糖的方法。

关键词: 紫球藻; 胞外多糖; 硫酸酯化; 抗氧化活性

Preparation technology and antioxidant activity of exopolysaccharide from sulfated *Porphyridium aeruginum*

DUAN Dongjie ZHANG Wei SUI Chengbo ZHANG Hao ZHANG Guodong

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810000, China)

Abstract: [Objective] To improve the biological activity and application range of *Porphyridium aeruginum* exopolysaccharide (EPS). [Methods] EPS was modified using the concentrated sulfuric acid method, with the degree of sulfation as the indicator. The preparation process of sulfated *P. aeruginum* exopolysaccharide (S-EPS) was optimized using response surface methodology. The physicochemical properties of S-EPS were also determined. [Results] The optimal conditions were a reaction time of 6 h, a reaction temperature of 26 °C, and a mass ratio of ammonium sulfate to EPS of 4:5. Under these conditions, the degree of substitution was 0.8075 ± 0.0087 . Infrared analysis confirmed that EPS was successfully sulfated. Thermogravimetric analysis showed that the thermal stability of S-EPS was superior to that of EPS. Particle size and Zeta potential analysis indicated that samples with a higher degree of substitution were more stable, with higher $-\text{SO}_3\text{H}$ group content, larger absolute potential, and less aggregation. The results of the antioxidant activity experiment showed that the DPPH· clearance rate of S-EPS was 92.17%, significantly higher than EPS. [Conclusion] Sulfation modification improved the antioxidant capacity of EPS, indicating that sulfation is a feasible method for enhancing polysaccharides.

Keywords: *Porphyridium aeruginum*; exopolysaccharide; sulfate esterification; antioxidation activity

紫球藻 (*Porphyridium aeruginum*) 是一种较为原始的单细胞藻类, 生长于淡水、海水和湿润的泥土中, 能够产生许多生物活性物质, 如藻胆蛋白、多不饱和脂肪酸等物质。此外, 紫球藻还可分泌大量含硫酸基团的胞外多糖^[1], 占细胞生物量的 20%~50%, 且胞外多糖具有较高的

硫酸盐含量 (2.0%~4.5%), 这与其具有较高的抗氧化活性有关^[2]。

紫球藻胞外多糖 (*Porphyridium aeruginum* exopolysaccharide, EPS) 是紫球藻分泌到周围环境的一种高分子量聚合物^[3]。EPS 具有复杂的化学结构, 大多数

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 22268035)

通信作者: 张炜 (1972—), 女, 青海师范大学教授, 硕士。E-mail: zhangwei@qnu.edu.cn

收稿日期: 2024-06-24 改回日期: 2025-01-11

是由葡萄糖和半乳糖通过糖苷键连接而成的杂多糖。研究^[4]表明, EPS具有抗氧化、抗病毒、抗菌、抗癌等活性。然而, 低活性阻碍了其广泛应用^[5]。因此, 多糖的分子修饰是改善多糖理化性质的重要方法。通过分子修饰, 多糖的抗氧化和免疫调节能力显著提高。一些水溶性较差的多糖经过改性后, 其水溶性也得到了显著提高。研究表明, 磺化^[6]、磷酸化^[7]、羧甲基化^[8]、乙酰化、硒化是多糖改性的常用方法^[9]。其中磺化修饰是在多糖的碳链上引入硫酸基团, 通常取代附着在 C-2、4 或 6 上的羟基上, 使其多糖的抗氧化、抗病毒等活性有显著提高。浓硫酸法^[10]、三氧化硫-吡啶法、氯磺酸-吡啶法^[11]是硫酸化改性最常用的 3 种方法。其中浓硫酸法具有试剂方便易得、制备流程简单易行、易分离、毒性低等优点^[12]。紫球藻胞外多糖作为紫球藻的一种生物活性成分, 其化学修饰已成为研究的热点领域, 引起了许多学者们的关注。

到目前为止, 关于多糖磺化改性的方法和机理已有许多研究报道, 利用氯磺酸-吡啶法进行硫酸化改性的研究相对较多, 但利用浓硫酸法对紫球藻胞外多糖硫酸酯的制备工艺及生物活性的研究中国未见报道。研究拟利用浓硫酸法, 以紫球藻胞外多糖为原料, 紫球藻胞外多糖硫酸基取代度为指标, 通过单因素试验探究其对硫酸基取代度的影响, 并利用响应面法优化其制备工艺, 同时对紫球藻胞外多糖硫酸酯 (sulfated *Porphyridium aeruginum* exopolysaccharide, S-EPS) 的结构及其抗氧化活性进行测定。旨在为硫酸酯化多糖在食品、保健品、药品等领域的深入应用提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

紫球藻: 编号 FACHB-744, 中国科学院淡水藻种库;
浓硫酸、硫酸铵、正丁醇、氢氧化钠、抗坏血酸、硫酸钾、二水合氯化钡、七水合硫酸亚铁: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;

水杨酸: 分析纯, 上海广诺化学试剂有限公司;

1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH): 分析纯, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司;

邻苯三酚、过氧化氢: 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂;

三羟甲基氨基甲烷: 生化试剂, 索莱宝生物科技有限公司;

无水乙醇: 分析纯, 天津利安隆得华有限公司;

MD44 (截留相对分子质量为 8 000~14 000) 透析袋: 索莱宝生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

冷冻干燥机: VFD-2000 型, 北京博医康实验仪器有限公司;

离心机: H1850 型, 湖南湘仪实验仪器有限公司;

酸度计: PB-10 型, 赛多利斯科学仪器有限公司;

加热磁力搅拌器: TC-100C 型, 德国 IKA 公司;

傅里叶红外光谱仪: IR Spirit 型, 日本 Shimadzu 公司;

紫外分光光度计: TU-1901 型, 北京普析通用仪器有限公司;

激光粒度分析仪: DelasaMaxPro 型, 贝克曼库尔特商贸有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 紫球藻胞外多糖制备 将紫球藻藻液在 8 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 浓缩后按照 $V_{\text{水}}:V_{\text{乙醇}}=1:4$ 的比例混匀, 4 °C 下醇沉过夜, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 透析, 在 10 Pa, 200 K 条件下冷冻干燥 12 h 得 EPS。将干燥的 EPS 收集并贮藏在无菌的密封容器中, 备用。

1.3.2 硫酸酯化紫球藻胞外多糖制备 在冰浴中制备浓硫酸与正丁醇 ($V_{\text{浓硫酸}}:V_{\text{正丁醇}}=2:1$) 的混合物。随后加入一定量的硫酸铵, 在 0 °C (冰水浴) 下搅拌 10 min。然后缓慢加入一定量的 EPS, 持续搅拌, 在一定温度下反应一定时间。反应完成后, 用 5.00 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值为 7。将样品缓慢加入透析袋并贴好标签, 使用蒸馏水透析, 每隔 2 h 更换一次蒸馏水, 透析至无法检测出硫酸根离子即可。按照 $V_{\text{水}}:V_{\text{乙醇}}=1:4$ 的比例混匀, 4 °C 下醇沉过夜, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 透析, 在 10 Pa, 200 K 条件下冷冻干燥 12 h 得 S-EPS。

1.3.3 硫酸基取代度测定 采用改良的硫酸钡比浊法测定硫酸根含量及取代度 (D_s , 即一个葡萄糖上的平均硫酸基数量)^[13]。称 0.09 g 硫酸钾配制成 50 mL 溶液, 分别稀释至 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 mmol/L, 在充分振荡混匀之后, 分别取上述溶液 1 mL 与 4 mL 水、5 mL 的质量分数 25% 氯化钡溶液混匀, 室温下放置 10 min, 随后在 400 nm 处测量吸光度, 绘制标准曲线为 $y=0.007\ 09x-0.016\ 01$, $R^2=0.999\ 3$ 。将 10 mg S-EPS 样品溶于 10 mL 体积分数 20% 盐酸溶液中, 在密封管中水解 6 h, 并用水定容至 50 mL, 取 5 mL 样品与等体积质量分数 25% 氯化钡溶液混匀。根据式 (1) 和式 (2) 计算 D_s ^[14]。

$$S = \frac{W_s}{W} \times 100\%, \quad (1)$$

$$D_s = \frac{1.62 \times S}{32 - 1.02 \times S}, \quad (2)$$

式中:

- W——多糖的质量,mg;
- S——该多糖的硫酸基含量,%;
- W_s ——该多糖溶液中的硫酸基质量,mg;
- D_s ——多糖的硫酸基取代度。

1.3.4 单因素试验设计

(1) $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ 对 S-EPS 取代度的影响:固定 EPS 质量 0.1 g,反应温度 0 °C、反应时间 6 h,探究 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ (2:5,3:5,4:5,5:5,6:5)对 S-EPS 硫酸基取代度的影响。

(2) 反应时间对 S-EPS 取代度的影响:固定 EPS 质量 0.1 g, $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}=4:5$,反应温度 0 °C,探究反应时间(2,4,6,8,10 h)对 S-EPS 硫酸基取代度的影响。

(3) 反应温度对 S-EPS 取代度的影响:固定 EPS 质量 0.1 g, $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}=4:5$,反应时间 6 h,探究反应温度(0,10,20,30,40 °C)对 S-EPS 硫酸基取代度的影响。

1.3.5 响应面优化试验 根据 Box-Behnken 响应面设计的中心组合试验设计原理^[15],在单因素试验的基础上,以 S-EPS 硫酸基取代度为响应值, $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ 、反应时间、反应温度为响应因子,对 S-EPS 制备工艺进行三因素三水平的响应面优化试验。

1.3.6 红外光谱分析 利用红外光谱仪,在 4 cm^{-1} 的分辨率下,将 EPS 和 S-EPS 试样与 KBr 按质量比 1:100 混合后,在 $400\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 范围内扫描^[16]。

1.3.7 热重分析 分别取 10 mg EPS 和 S-EPS 样品置于铂坩埚内,以 N_2 作保护气,升温速率 $10\text{ °C}/\text{min}$,从 35 °C 加热到 550 °C,用热重分析仪采集 EPS、S-EPS 的热重分析(thermogravimetric analysis, TG)、示差热重量(differential thermogravimetric analysis, DTG)数据。

1.3.8 纳米粒度及电位分析 配制 0.1 mg/mL 的样品溶液,通过激光粒度仪测量样品的粒度分布和 Zeta 电位^[17]。

1.3.9 抗氧化活性测定 根据梁英等^[18]的方法,以 L(+)-抗坏血酸溶液作为阳性对照,DPPH·清除能力在 517 nm 处测定吸光度值; $\cdot\text{OH}$ 清除能力采用 Fenton 反应体系,在 510 nm 处测定吸光度值; O_2^- 清除能力采用邻苯三酚自氧化法,在 325 nm 处测定吸光度值。

1.4 数据处理

所有试验均进行 3 次平行重复测定,试验结果以平均值±标准偏差表示,采用 SPSS 软件进行方差分析;采用 OMNIC 9.2 软件处理红外数据和绘图,其他数据采用 Origin 2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ 对 S-EPS 取代度的影响 由图 1 可知,随着硫酸铵含量增大,S-EPS 硫酸基取代度逐渐升高,在

$m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}=4:5$ 的情况下,其取代度最高可达 $0.566\,3\pm 0.006\,0(P<0.05)$ 。但随着 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}>4:5$,取代度呈下降趋势。这主要是因为硫酸铵的加入,使多糖与酯化剂之间发生了较好的吸附作用。当硫酸铵含量逐渐增加时,浓度逐渐饱和,致使反应平衡向左移动,反应产物发生降解,从而导致 S-EPS 取代度降低。故最佳 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}=4:5$ 。

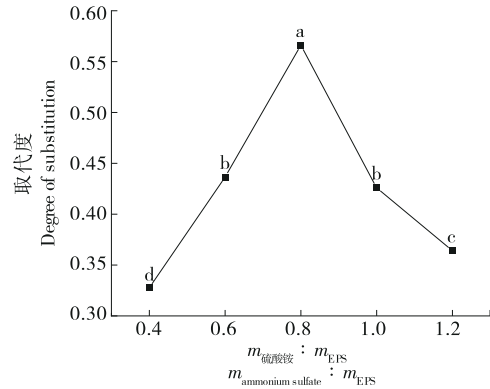
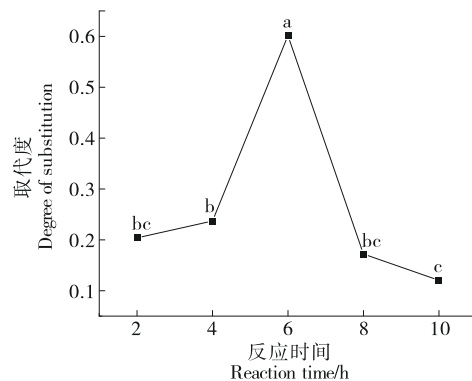


图 1 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ 对 S-EPS 取代度的影响

Figure 1 Effect of the mass ratio of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to EPS on degree of substitution of S-EPS

2.1.2 反应时间对 S-EPS 取代度的影响 由图 2 可知,S-EPS 硫酸基取代度随着反应时间的增加呈先增大后减小趋势,在 6 h 内,S-EPS 的取代度最高可达 $0.602\,8\pm 0.033\,0(P<0.05)$ 。但在 6 h 后,其取代度有所降低,其原因可能是反应时间的延长导致浓硫酸对多糖进行了脱水碳化,造成了多糖的分解。故最佳反应时间为 6 h。

2.1.3 反应温度对 S-EPS 取代度的影响 由图 3 可知,S-EPS 硫酸基取代度随着反应温度的上升呈先增大后减

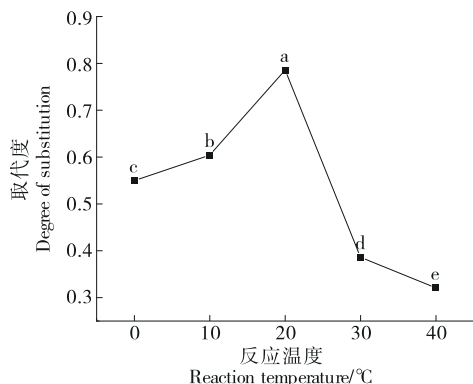


字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 2 反应时间对 S-EPS 取代度的影响

Figure 2 Effect of reaction time on the degree of substitution of S-EPS

小趋势,在 20 °C 时,S-EPS 的取代度最高可达 0.787 2±0.015 0($P<0.05$)。当反应温度超过 20 °C 后,取代度却逐渐下降。这可能是因为提高反应温度有助于多糖与酯化剂的充分混合,使反应速度加快,反应达到平衡。而在快速达到平衡后,温度升高,平衡向左移动,则会引起多糖的降解,从而造成 S-EPS 的取代度下降。故最佳反应温度为 20 °C。



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 3 反应温度对 S-EPS 取代度的影响

Figure 3 Effect of reaction temperature on the degree of substitution of S-EPS

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面优化试验 基于单因素试验结果进行响应面优化试验,以硫酸基取代度为指标,以 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ 、反应时间、反应温度为影响因素,进行响应面优化试验。试验因素及水平见表 1。

表 1 响应面优化试验中使用的因素及其水平

水平	A 反应时间/h	B 反应温度/°C	C $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$
-1	4	10	3:5
0	6	20	4:5
1	8	30	5:5

2.2.2 回归模型建立及分析 响应面优化试验设计与结果见表 2。利用 Design-Expert 12 软件,拟合得到 S-EPS 硫酸基取代度的二次多元回归方程为

$$Y = -6.1483 + 1.02491A - 0.032945B + 10.45406C - 0.000418AB + 0.036357AC + 0.056409BC - 0.085362A^2 - 0.000199B^2 - 7.46542C^2 \quad (3)$$

由表 3 可知,模型的拟合优度 $R^2=0.9937$, $P<0.0001$,说明该模型具有统计学显著性。失拟项 $P=0.8714>0.05$,不显著,说明模型的拟合度良好^[19];而修正判定系数 $R^2_{\text{Adj}}=0.9856$,表示可以用此模型来预测 98.56% 的响应

值。 $R^2_{\text{Pred}}=0.9768$ 与 $R^2_{\text{Adj}}=0.9856$ 的值相差 <0.2 ,说明该响应面设计合理^[20]。在该模型中,A、BC、 A^2 、 C^2 对 S-EPS 的硫酸基取代度影响极显著 ($P<0.01$),C 影响显著 ($P<0.05$),其他影响不显著。

表 2 响应面设计及试验结果

Table 2 Response surface design and experimental results

试验号	A	B	C	D_s
1	0	0	0	0.7721
2	1	0	1	0.1830
3	0	-1	-1	0.5929
4	1	1	0	0.4842
5	1	-1	0	0.4842
6	-1	1	0	0.4138
7	1	0	-1	0.2239
8	0	0	0	0.8024
9	0	-1	1	0.3218
10	0	1	-1	0.4195
11	0	0	0	0.8154
12	0	0	0	0.8559
13	0	0	0	0.7640
14	0	1	1	0.5996
15	-1	0	1	0.0708
16	-1	0	-1	0.1699
17	-1	-1	0	0.3804

表 3 D_s 值的方差分析†

Table 3 ANOVA for value of D_s

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.0000	9	0.1114	122.54	<0.0001	**
A	0.0145	1	0.0145	15.95	0.0052	**
B	0.0024	1	0.0024	2.61	0.1501	
C	0.0067	1	0.0067	7.33	0.0303	*
AB	0.0003	1	0.0003	0.31	0.5963	
AC	0.0008	1	0.0008	0.93	0.3669	
BC	0.0509	1	0.0509	56.00	0.0001	**
A^2	0.4909	1	0.4909	539.93	<0.0001	**
B^2	0.0017	1	0.0017	1.83	0.2183	
C^2	0.3755	1	0.3755	412.96	<0.0001	**
残差	0.0064	7	0.0009			
失拟项	0.0009	3	0.0003	0.23	0.8714	
纯误差	0.0054	4	0.0014			
总差	1.0100	16				

† *表示差异显著($P<0.05$);**表示差异极显著($P<0.01$)。

2.2.3 响应面模型分析 通过使用 Design-Expert 12 对回归方程的统计学研究,发现反应温度、反应时间、 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ 对紫球藻胞外多糖硫酸酯化硫酸基取代度产生了重要的影响。如图 4 所示,反应温度与反应时间的响应面陡峭,等高线呈椭圆形,两者的交互作用显著;反应时间与 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ 的陡峭度大致一样,等高线

呈圆形,两者交互作用不显著; $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ 与反应温度的响应面陡峭,等高线呈椭圆形,两者的交互作用显著;相对于图 4(f),图 4(b)的等高线颜色变化较大,可判定 AB 的交互作用大于 BC 的^[21]。这与表 3 中的方差分析一致,其影响顺序依次为反应时间> $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}$ >反应温度。

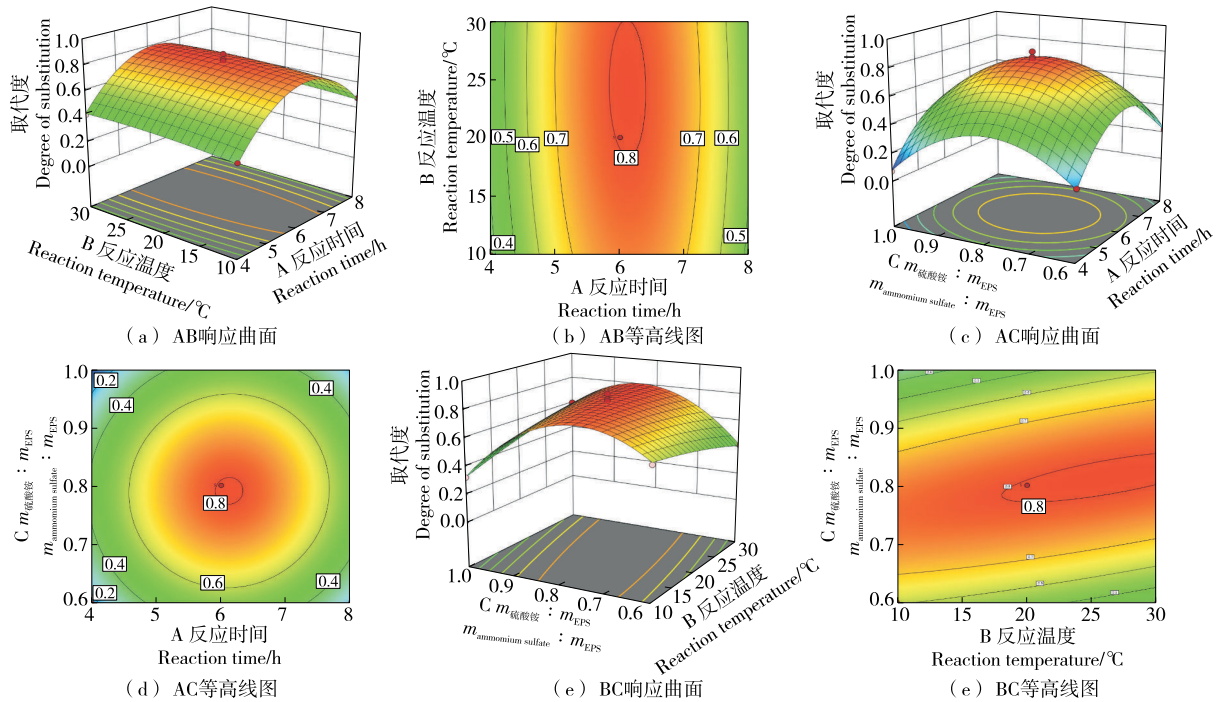


图 4 响应曲面及等高线图
Figure 4 Response surface and contour plots

2.2.4 模型验证 统计软件 Design-Expert 12 优化 EPS 硫酸酯化工艺条件为反应时间 6.11 h、反应温度 26.21 °C, $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}=0.81$, 预测硫酸酯化多糖的 D_s 值为 0.808 0。根据实际情况,调整反应条件为反应时间 6 h、反应温度 26 °C、 $m_{\text{硫酸铵}}:m_{\text{EPS}}=4:5$ 。经验证,最优条件下硫酸酯化多糖的 D_s 值为 0.8075 ± 0.0087 , 符合模型计算。

2.3 红外光谱分析

多糖的生物活性与其结构及功能基团密切相关^[22]。从图 5 可以看出,在 3400 cm^{-1} 下, EPS 及 S-EPS 都具有很强的一OH 吸收峰,但 S-EPS 的一OH 吸收峰有所降低,说明硫酸酯化紫球藻胞外多糖已合成成功。多糖的指纹区通常在 $800\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ 范围内有吸收,其中 1125 cm^{-1} 是由糖苷键(C—O)拉伸振动引起的, 1050 cm^{-1} 附近的吸附带是由吡喃环(C—C)的拉伸振动引起的。S-EPS 在 $930\sim 950\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰是 C—O—C 不对称伸缩振动峰,在 830 cm^{-1} 处出现了 C—O—S 特征吸收峰。试验结果表明,硫酸根离子可以在胞外多糖的糖残基上进行

修饰,从而获得硫酸酯化多糖。

2.4 热重分析

如图 6 所示, EPS 与 S-EPS 的 TG、DTG 均呈现两步降解模式,第 1 个吸收热峰分别出现在 $45.15, 79.59\text{ °C}$, 此阶段质量损失分别为 11.52%, 8.60%, 可能是多糖中的游离

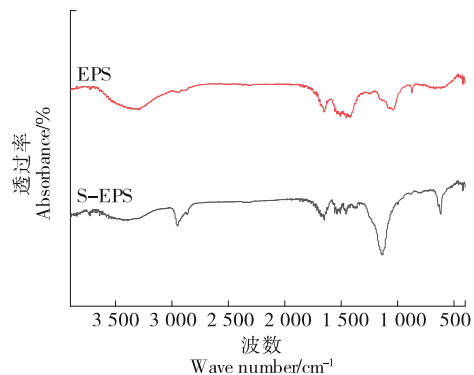


图 5 EPS 和 S-EPS 的红外光谱图
Figure 5 FT-IR spectrogram of EPS and S-EPS

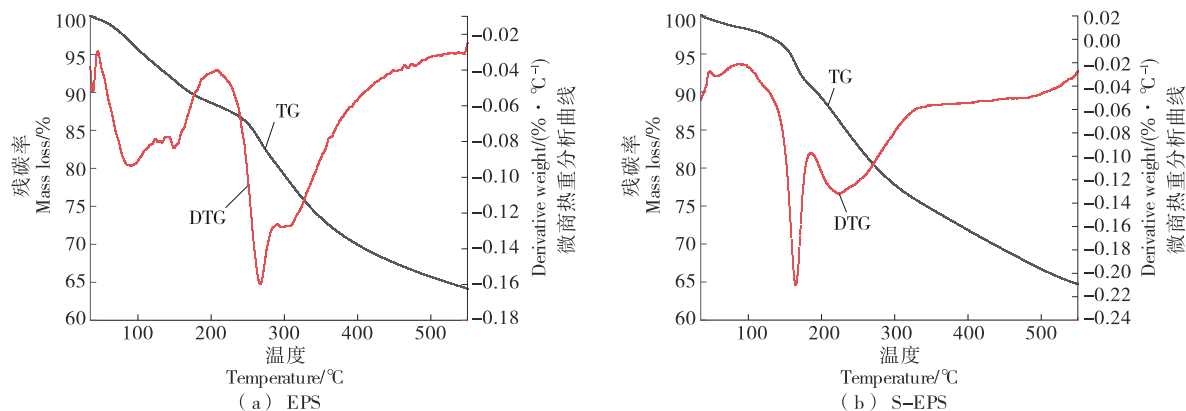


图6 EPS和S-EPS的热重分析图

Figure 6 Thermogravimetric analysis diagram of EPS and S-EPS

水、结合水损失造成的^[23]。第2个吸收热分别在120~320, 150~300 °C出现,第2阶段质量损失分别为24.34%, 26.69%,表明多糖发生剧烈分解,可能是由于碳链断裂导致,最终残碳率分别为64.16%, 64.75%,表明S-EPS的热稳定性优于EPS。这可能是由于多糖残基上硫酸基团的增加,基团结构更加稳定,而未修饰前多糖残基相比更容易暴露。因此,经硫酸酯化后多糖热稳定性更为优异。

2.5 纳米粒度及电位分析

采用激光粒度分析仪对4组S-EPS及EPS的粒径及Zeta电位进行分析,结果见表4。与粒径为299.0 nm的EPS相比,S-EPS的粒径是随着 D_s 的增加而增大的。结合 D_s 可知,聚合物分子在反应中随着磺化衍生过程发生了明显的降解,这与磺酸化修饰过程发生在酸性环境中有关^[24]。通过引入磺酸基,提高了高分子链间位阻,提高了其结构的有序性和延展性,使其具有较大的颗粒尺寸。因此,聚合物颗粒尺寸的改变是由于反应中EPS的降解所致。Zeta电势通常用来表征粒子在水中的稳定状态,粒子间的静电斥力越大,相应的Zeta电势绝对值越大,粒子在水中的分散性和稳定性就越好。从表4可以看出,Zeta电位随 D_s 的增大而减小:从-20.73 mV降至-31.25 mV;说明S-EPS中Zeta电位的变化与 $-SO_3H$ 基团含量呈正相关。结果表明,粒径较大的试样具有较高的稳定性和较低的团聚度,而以S-EPS-4为最佳处理条件的S-EPS的稳定性最好。

2.6 抗氧化活性

2.6.1 DPPH·清除能力 如图7所示,EPS与S-EPS表现出一定的清除能力,且随样品质量浓度的增加而增强($P<0.05$)。当取代度从0.224(S-EPS-1)增加到0.808(S-EPS-4)时,DPPH·最大清除率由76.79%提升到92.17%,提高了15.38%,表明随着硫酸基取代度的提高,其清除DPPH·的能力也会相应提高,这是因为硫酸基团

表4 不同 D_s 值S-EPS的粒径与Zeta电位Table 4 Particle size and Zeta potential of S-EPS with different D_s values

样品	D_s	平均粒径/nm	Zeta电位/mV
EPS	—	299.0	-20.73
S-EPS-1	0.224	538.0	-27.06
S-EPS-2	0.419	626.8	-27.45
S-EPS-3	0.600	931.1	-28.71
S-EPS-4	0.808	971.1	-31.25

可以通过提高多糖的供氢能力来提高其抗氧化能力。经过磺化后的S-EPS都表现出比EPS更强的清除效果,其原因可能是经磺化修饰后, $-OSO_3H$ 取代多糖分子中部分 $-OH$,使其清除自由基能力增强^[25]。

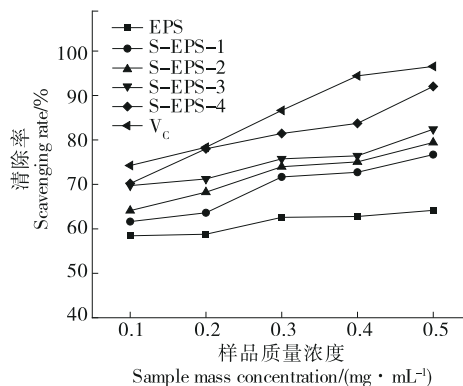


图7 EPS和S-EPS对DPPH·清除能力的测定

Figure 7 Determination of DPPH· scavenging ability by EPS and S-EPS

2.6.2 ·OH清除能力 由图8可知,样品质量浓度为0.5 mg/mL时,EPS和S-EPS的清除效果均有显著提升($P<0.05$)。当取代度从0.224(S-EPS-1)增加到0.808

(S-EPS-4) 时, $\cdot\text{OH}$ 的最大清除率由 32.25% 提升到 34.37%, 说明 S-EPS 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力也会随着取代度的增加而不断增强, 但是 S-EPS-1、S-EPS-2、S-EPS-3 和 S-EPS-4 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力均低于同浓度下的 V_c 阳性对照。

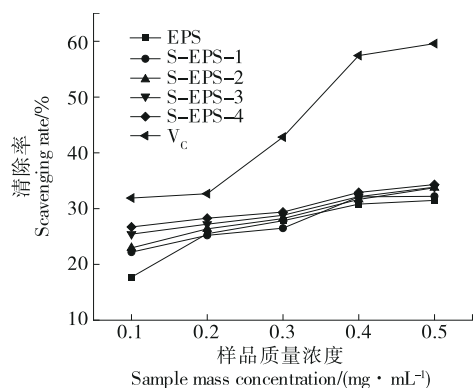


图 8 EPS 和 S-EPS 对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的测定

Figure 8 Determination of $\cdot\text{OH}$ scavenging ability by EPS and S-EPS

2.6.3 O_2^- ·清除能力 由图 9 可知, 样品质量浓度为 0.1~0.3 mg/mL, EPS 和 S-EPS 的清除能力基本保持一致, 而当样品质量浓度达到 0.5 mg/mL 时, EPS 的清除率达到了 25.38%, S-EPS-4 的清除率达到了 44.55%, 硫化后的多糖样品表现出更强的 O_2^- ·清除能力 ($P < 0.05$)。当取代度从 0.224 (S-EPS-1) 增加到 0.808 (S-EPS-4) 时, O_2^- ·的最大清除率由 33.25% 提升到 44.55%, 提高了 11.3%, 说明随着取代度的增加, S-EPS 对 O_2^- ·清除能力也不断增加。

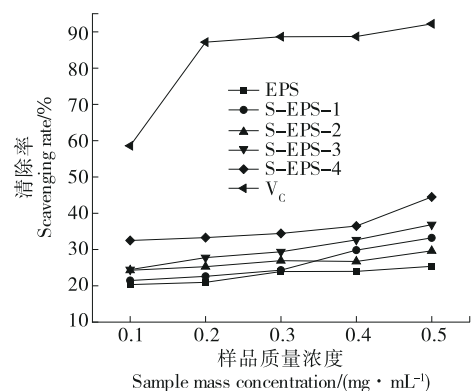


图 9 EPS 和 S-EPS 对 O_2^- ·清除能力的测定

Figure 9 Determination of O_2^- · scavenging ability by EPS and S-EPS

3 结论

紫球藻胞外多糖硫酸酯化的最佳工艺条件为反应时

间 6 h、反应温度 26 °C、 $m_{\text{硫酸胺}}:m_{\text{EPS}}=4:5$ 。该条件下硫酸酯化多糖的取代度为 0.8075 ± 0.0087 , 达到较高取代度。经硫酸化改性后的紫球藻胞外多糖硫酸酯具有较高的稳定性、较低的团聚度和优异的抗氧化活性。抗氧化作用具有一定的剂量依赖性, 且在样品质量浓度 $> 0.4 \text{ mg/mL}$ 时, 对于 DPPH· 的清除率十分接近 0.4 mg/mL 抗坏血酸。硫酸酯化改性可以有效提高紫球藻胞外多糖的抗氧化活性, 而后续将对硫酸酯化后的紫球藻胞外多糖的抗氧化能力的增加是否受到相对分子质量、结构以及理化性质的影响进行探究。

参考文献

- [1] LI S H, JI L, SHI Q W, et al. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292: 122048.
- [2] TANNIN-SPITZ T, BERGMAN M, VAN-MOPPES D, et al. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(3): 215-222.
- [3] LIU L, POHNERT G, WEI D. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14(10): 191.
- [4] MU S, YANG W J, HUANG G L. Antioxidant activities and mechanisms of polysaccharides[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2021, 97(3): 628-632.
- [5] LIU T B, REN Q Q, WANG S, et al. Chemical modification of polysaccharides: a review of synthetic approaches, biological activity and the structure-activity relationship[J]. *Molecules*, 2023, 28(16): 6 073.
- [6] LIANG L, AO L, MA T, et al. Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Lady Godiva) polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 447-455.
- [7] WANG X M, ZHANG Z S, YAO Z Y, et al. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 58: 225-230.
- [8] TAO Y Z, ZHANG R Q, YANG W, et al. Carboxymethylated hyperbranched polysaccharide: synthesis, solution properties, and fabrication of hydrogel[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 128: 179-187.
- [9] WANG J L, YANG X P, BAO A J, et al. Microwave-assisted synthesis, structure and anti-tumor activity of selenized *Artemisia sphaerocephala* polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 95: 1 108-1 118.

- [10] NIU C M, LIU Y N, YANG Y X, et al. Advances in sulfonated modification and bioactivity of polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253 (Pt 6): 126400.
- [11] DAR A A, ABROL V, SINGH N, et al. Recent bioanalytical methods for the isolation of bioactive natural products from genus *Codonopsis*[J]. Phytochemical Analysis, 2023, 34(5): 491-506.
- [12] CHEN Y, YAO F K, MING K, et al. Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity[J]. Molecules, 2016, 21 (12): 1 705.
- [13] CHEN Y, ZHANG H, WANG Y X, et al. Sulfated modification of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities[J]. Food Chemistry, 2015, 186: 231-238.
- [14] LIU W, WANG H Y, YAO W B, et al. Effects of sulfation on the physicochemical and functional properties of a water-insoluble polysaccharide preparation from *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(6): 3 336-3 341.
- [15] CHEN W W, JIA Z B, ZHU J J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from thick-shell mussel (*Mytilus coruscus*) and their antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1 116-1 125.
- [16] 蒋茂婷, 冉艳红, 刘娜, 等. 蒜皮水溶性多糖的制备及结构表征[J]. 食品科学, 2022, 43(6): 57-65.
JANG M T, RAN Y H, LIU N, et al. Preparation and structural characterization of water-soluble polysaccharide from garlic skin[J]. Food Science, 2022, 43(6): 57-65.
- [17] LI X Y, WANG L, WANG B B. Optimization of encapsulation efficiency and average particle size of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides nanoemulsions using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2017, 229: 479-486.
- [18] 梁英, 毕红梅, 郑文凤, 等. 平菇多糖硫酸酯制备工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(1): 175-179.
LIANG Y, BI H M, ZHENG W F, et al. Optimization of preparation technology and antioxidant activity of polysaccharide sulfate from *Pleurotus ostreatus*[J]. Food & Machinery, 2021, 37(1): 175-179.
- [19] XIE Y T, GUO X, MA Z Y, et al. Efficient extraction and structural characterization of hemicellulose from sugarcane bagasse pith[J]. Polymers, 2020, 12(3): 608.
- [20] 胡润锋, 李浚哲, 李鹏飞, 等. 响应面法优化硒化桑叶多糖的制备工艺及其体外抗氧化活性[J]. 中南林业科技大学学报, 2022, 42(8): 148-157.
HU R F, LI J Z, LI P F, et al. Optimization of selenized mulberry leaf polysaccharides preparation by response surface methodology and determination of the antioxidant activity in vitro[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2022, 42(8): 148-157.
- [21] 孙聪聪, 庞道睿, 黎尔纳, 等. 响应面法优化 β -半乳糖苷酶法制备低聚半乳糖工艺[J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 246-255.
SUN C C, PANG D R, LI E N, et al. Optimization of preparation of galactooligosaccharides by β -galactosidase using response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 246-255.
- [22] WANG J L, GUO H Y, ZHANG J, et al. Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 897-905.
- [23] ABUDUWAILI A, NUERXIATI R, MUTAILIFU P, et al. Isolation, structural modification, characterization, and bioactivity of polysaccharides from *Folium Isatidis*[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 176: 114319.
- [24] TANG L Y, SUN Y H, GE P P, et al. Biogenetic nanocarriers with enhanced pH stability formed by zein and selectively depolymerized mushroom hyperbranched β -glucans[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 209: 1 771-1 783.
- [25] 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.