

# 海带岩藻聚糖的蛋白质稳定及抗油脂酸败作用

杜慧<sup>1</sup>, 张大艳<sup>1</sup>, 梁嘉茵<sup>2</sup>, 刘华忠<sup>2\*</sup>

(1. 广东海洋大学生化中心, 湛江 524088; 2. 广东海洋大学化学与环境学院, 湛江 524088)

**摘要:** **目的** 探讨海带岩藻聚糖(fucoidan from *Laminaria japonica*, FL)对蛋白质稳定性及油脂抗氧化酸败的作用。**方法** 以小牛血清白蛋白和牛奶为对象, 评价 FL 对蛋白质稳定性的影响; 以花生油和猪油为材料, 评估 FL 对油脂氧化与酸败的抑制效果。**结果** FL 能有效增强牛血清白蛋白和牛奶蛋白质稳定性, 并呈剂量依赖关系。FL 对油脂氧化与酸败均具有较好的抑制效果, 当初始浓度为 4 g/L, 氧化最佳抑制率为 $(65.17 \pm 1.33)\%$ (花生油)和 $(63.32 \pm 1.46)\%$ (猪油); 初始浓度为 6 g/L, 酸价降低最大值分别为  $0.0895 \pm 0.005$ (花生油)和  $0.0857 \pm 0.005$ (猪油)。**结论** FL 能有效维持蛋白质稳定和抑制油脂氧化酸败。

**关键词:** 海带岩藻聚糖; 蛋白质稳定性; 油脂氧化; 油脂酸败

## Stability-keeping effects of proteins and anti-oxidation/-rancidity of oils by fucoidan from *Laminaria japonica*

DU Hui<sup>1</sup>, ZHANG Da-Yan<sup>1</sup>, LIANG Jia-Yin<sup>2</sup>, LIU Hua-Zhong<sup>2\*</sup>

(1. Biochemistry Center, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. College of Chemistry and Environment, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore stability-keeping effects of proteins and anti-oxidation/-rancidity of oil and fat by fucoidan from *Laminaria japonica* (FL). **Methods** Bovine serum albumin and milk were used to evaluate stability-keeping effects of proteins by FL. Peanut oil and lard fat were used to determine anti-oxidation/-rancidity of FL on oil and fat. **Results** FL effectively improved stability of bovine serum albumin and milk at a dose-dependent manner. In addition, oxidation and rancidity of oil and fat were suppressed effectively by FL. When the corresponding dosage of FL was 4 g/L (original concentration), optimal inhibition rates of oil oxidation were  $(65.17 \pm 1.33)\%$  (peanut oil) and  $(63.32 \pm 1.46)\%$  (lard oil), respectively. When the corresponding original concentration of FL was 6 g/L, the largest decreases of acid value were  $0.0895 \pm 0.005$  (peanut oil) and  $0.0857 \pm 0.005$  (lard oil), respectively. **Conclusion** FL can effectively maintain the stability of the protein and the inhibition of oil oxidation.

**KEY WORDS:** fucoidan from *Laminaria japonica*; protein stability; oil oxidation; oil rancidity

## 1 引言

岩藻聚糖(fucoidan)是一种源自海带等褐藻的胞壁间硫酸化多糖, 主要存在于细胞壁基质中, 是褐藻所特有的生物活性物质。尽管不同来源的岩藻聚糖分别含有少量的

木糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸以及乙酰基团, 但多糖骨架主要以  $\alpha$ -L-(1 $\rightarrow$ 3)-吡喃岩藻糖为主链<sup>[1]</sup>。研究表明, 海带岩藻聚糖(fucoidan from *Laminaria japonica*, FL)具有异于其他种属岩藻聚糖的结构特性, 组成主链骨架的  $\alpha$ -L-吡喃岩藻糖, 主要取(1 $\rightarrow$ 3)连

\*通讯作者: 刘华忠, 博士, 教授, 主要研究方向为海洋生物活性物质。E-mail: liuhzbs@163.com

\*Corresponding author: LIU Hua-Zhong, Ph.D, Professor, Guangdong Ocean University, No.1, Haida Road, Mazhang District, Zhanjiang 524088, China. E-mail: liuhzbs@163.com

接方式, 少量取(1→4)连接。硫酸基位于岩藻糖的 C<sub>2</sub> 和/或 C<sub>4</sub> 位, 以及侧链半乳糖的 C<sub>3</sub> 和/或 C<sub>4</sub> 位<sup>[2,3]</sup>。

研究已经证实, 岩藻聚糖是一类多功能硫酸多糖, 具有抗肿瘤、抗菌与抗病毒、抗氧化、降尿酸、抗血栓、抗凝与促凝血、抗炎、免疫调节、降血脂与降血糖、抗补体、增加肠道益生菌、肾脏保护等活性<sup>[4,5]</sup>。毒理学研究表明, FL 是一种无毒的天然活性海洋硫酸多糖。连续口服给药 (300 mg/kg·d)6 个月, Wister 大鼠无不良反应; 当日给药量达到 900~2500 mg/kg 才可见凝血时间延长, 并无其他毒性反应<sup>[6]</sup>。作为我国已沿用千年的海洋中药, 海带(*Laminaria japonica*)主要产于我国海域, 其次为日本和韩国。FL 含量约为 1.66 g/100 g 干海带, 且仅存于海带表层 50~150 μm 处<sup>[7]</sup>, 易于制备。因此, 深入研究 FL 药效学之外的功能, 对于高值化利用海带, 深度利用海洋资源, 助推海洋经济发展, 具有重要的理论意义。本文初步研究了在酸性条件下, FL 的蛋白质稳定性、抗油脂氧化、抗油脂酸败作用, 旨在探讨 FL 用作食品稳定剂与抗氧化剂的可行性。

2 材料与方法

2.1 实验材料

小牛血清白蛋白(广州鼎国生物公司); 考马斯亮蓝 G-250(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氯仿(分析纯, 天津市百世化工有限公司); 冰醋酸(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 磷酸(分析纯, 广东光华科技股份有限公司); 碘化钾(分析纯, 青岛拓海碘制品有限公司); 磷酸二氢钾(分析纯, 上海阿拉丁生化试剂有限公司)。

2.2 实验仪器

UV-5500 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公

司); TGL-16LM 离心机(湖南星科科学仪器有限公司); PHS-25CW 酸度计(上海精密仪器仪表有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 小牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA)溶液稳定性

实验设计详见表 1。分别取 10 mL BSA(3 g/L)溶液与等体积的蒸馏水、不同浓度 FL 溶液(5、10、15 g/L)混匀, 用盐酸调节 pH 至 4.0 后, 保鲜膜(有孔)封存。样品室温放置, 期间每天检查并记录其沉淀情况<sup>[8]</sup>。

2.3.2 牛奶蛋白稳定性

实验设计详见表 2。分别取不同体积的 FL(5 g/L)溶液于 6 mL 鲜牛奶中, 加水至 8 mL, 调 pH 到 4.0, 2500 r/min 离心 25 min, 取上清液 3 mL, 加入 1 mL 预先配制好的考马斯亮蓝溶液(0.01%, G-250)混匀, 10 min 后测定 OD<sub>595 nm</sub> 值<sup>[8]</sup>。

2.3.3 油脂氧化测定

称取 2 g 花生油或猪油加入 1 mL 不同浓度的 FL 溶液(2、4、6、8、10 g/L)于 50 mL 锥形瓶内, 70 ℃强化 1 h。称取 0.02 g 强化后花生油或猪油置 10 mL 具塞比色管中, 加 0.5 mL 氯仿-冰醋酸(2:3, V:V)溶解, 再加入 0.05 mL 碘化钾饱和溶液, 紧塞并轻轻震摇 0.5 min, 然后在暗处放置 3 min。取出后加显色剂(100 mL 水中加入磷酸(1:1, V:V)、0.5%碘化钾、0.5%淀粉、20%磷酸二氢钾溶液各 8 mL, 混匀, 临用时配制)至刻度线<sup>[9]</sup>, 再紧塞上下颠倒均匀, 静置 5 min 后, 测定 OD<sub>580 nm</sub>。

2.3.4 油脂酸败检测<sup>[10]</sup>

分别称取 2 g 猪油和花生油, 加入 1 mL 不同浓度 FL 溶液(2、4、6、8、10 g/L)后, 70 ℃强化 1 h。冷至室温后, 取 3 g 置于锥形瓶中, 加入 50 mL 中性乙醚-乙醇(2:1, V:V)

表 1 BSA 溶液稳定性  
Table 1 Stability of BSA solution

| 序号 | BSA(mL) | FL(mL) | 水(mL) | 总体积(mL) | FL 终浓度(g/L) |
|----|---------|--------|-------|---------|-------------|
| 1  | 10      | 0      | 10    | 20      | 0           |
| 2  | 10      | 10     | 0     | 20      | 2.5         |
| 3  | 10      | 10     | 0     | 20      | 5.0         |
| 4  | 10      | 10     | 0     | 20      | 7.5         |

表 2 牛奶蛋白稳定性  
Table 2 Stability of milk protein

| 序号 | FL(mL) | 蒸馏水(mL) | 鲜牛奶(mL) | FL 终浓度(g/L) |
|----|--------|---------|---------|-------------|
| 1  | 0      | 2       | 6       | 0           |
| 2  | 1      | 1       | 6       | 0.625       |
| 3  | 2      | 0       | 6       | 1.25        |

混合液溶解油脂，振摇，必要时可以温热使猪油溶解，待冷至室温，再加入 2~3 滴酚酞指示液，以氢氧化钠 (0.05 mol/L) 滴定。

按照下式计算酸价 (acid value, AV) 及酸价降低值 ( $\Delta AV$ )

$$AV(\text{mgNaOH/g}) = (1000 \times C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 40) / W$$
$$\Delta AV(\text{mgNaOH/g}) = AV_2 - AV_1$$

式中, AV: 酸值, mg/g;  $W$ : 油脂质量, g;  $C_{\text{NaOH}}$ : 氢氧化钠物质的量浓度, 0.1 mol/L;  $V_{\text{NaOH}}$ : 消耗氢氧化钠的体积, L;  $AV_1$ : 添加 FL 的油脂强化氧化后的酸值, mg/g;  $AV_2$ : 未添加 FL 的油脂强化氧化后的酸值, mg/g;  $\Delta AV$ : 酸值降低值, mg/g。

3 结果与分析

3.1 FL 对 BSA 溶液稳定性的影响

FL 对 BSA 溶液稳定性的影响实验结果见表 3。在酸性条件下, 放置 7 d 后开始出现沉淀, 且 FL 浓度越大, 初始沉淀时间越长。加入 5 g/L 的 FL 的 BSA 溶液, 在第 7 d 就开始沉淀, FL 浓度增加为 10 g/L 时, BSA 溶液则在第 10 d 才开始沉淀, 而加入最大浓度 FL (15 g/L) 时, BSA 溶液则在第 12 d 才开始出现沉淀。

表 3 FL 对 BSA 溶液稳定性的影响  
Table 3 Effects of FL on stability of BSA solution

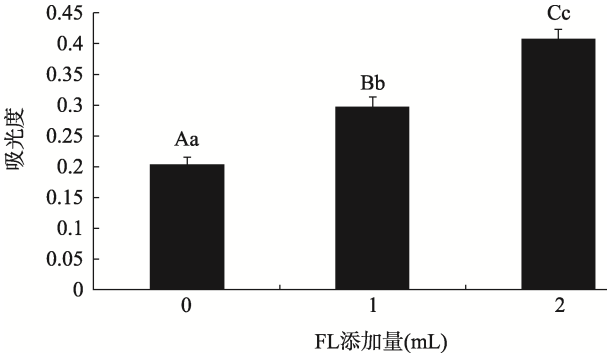
| 天数(d) | 沉 淀       |            |            |
|-------|-----------|------------|------------|
|       | FL(5 g/L) | FL(10 g/L) | FL(15 g/L) |
| 7     | 有         | 无          | 无          |
| 10    | 无         | 有          | 无          |
| 12    | 无         | 无          | 有          |

3.2 FL 对牛奶蛋白稳定性的影响

酸性条件下, 牛奶饮料会出现蛋白质沉淀现象, 本实验利用考马斯亮蓝 G-250 染色法比较了加入褐藻多糖硫酸酯对鲜奶稳定性的影响。实验结果表明, 褐藻多糖硫酸酯在酸性条件下对鲜奶能起到较好的稳定作用。如图 1 所示, 添加 1 mL 多糖溶液的牛奶的吸光度比未加多糖溶液的提高 0.1, 而加入 2 mL 多糖溶液的牛奶最高, 因此褐藻多糖硫酸酯溶液对牛奶具有很好的稳定作用。

3.3 FL 抗油脂氧化的作用

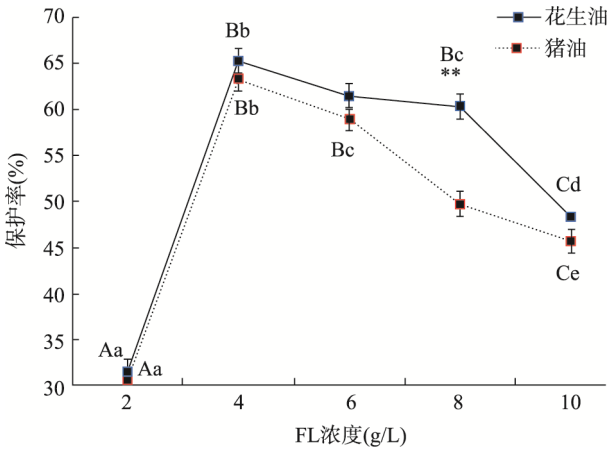
不同质量浓度的 FL 对油脂氧化抑制作用结果如图 2 所示。结果表明, 在所探究的质量浓度范围内 (0~10 g/L), FL 对花生油和猪油 2 种油脂的保护率与其浓度呈现出一



注: 不同的大写字母代表具有极显著性差异,  $P < 0.01$ , 不同小写字母代表具有显著性差异  $P < 0.05$ 。

图 1 FL 对牛奶蛋白稳定性的影响 ( $n=3$ )

Fig. 1 Effects of FL on milk protein stability ( $n=3$ )



注: 组内比较: 不同的大写字母代表具有极显著性差异,  $P < 0.01$ , 不同小写字母代表具有显著性差异  $P < 0.05$ ; 组间比较: \*\*代表具有极显著性差异  $P < 0.01$ 。

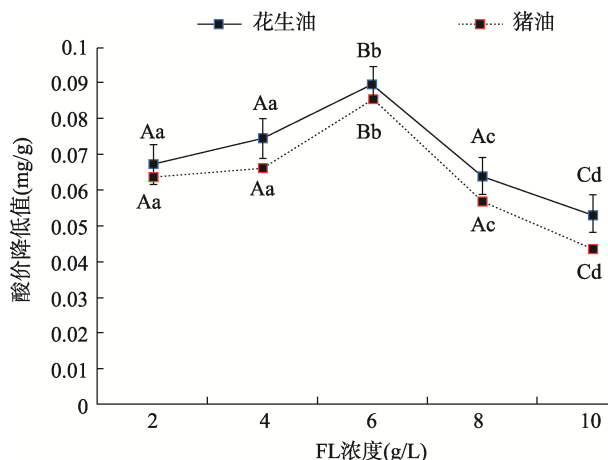
图 2 FL 的抗油脂氧化作用 ( $n=3$ )

Fig. 2 Antioxidant effects of FL on oil and fat ( $n=3$ )

定的规律。当 FL 浓度低于 4 g/L 时, 对油脂的保护率随着 FL 浓度的增大而增大。当 FL 浓度为 4 g/L 时, 对花生油和猪油的保护率分别为 65.17% 和 63.32%。随着 FL 浓度的增大, 对油脂的保护率却呈现逐渐下降趋势。在相同质量浓度条件下, FL 对花生油的保护率依然高于猪油。

3.4 FL 抗油脂酸败水解的抑制作用

不同质量浓度的 FL 对油脂酸败水解的抑制作用结果如图 3 所示。在所探究的质量浓度范围内 (0~10 g/L), FL 对花生油和猪油这 2 种油脂的酸败水解均具有一定抑制作用。当 FL 浓度为 6 g/L, 花生油和猪油的酸价降低值分别为 0.0895 mg/g 和 0.0857 mg/g。FL 对花生油的抗酸败水解的效果稍强于猪油。



注: 不同的大写字母代表具有极显著性差异,  $P < 0.01$ , 不同小写字母代表具有显著性差异  $P < 0.05$ 。

图3 FL抗油脂酸败水解的抑制作用( $n=3$ )

Fig. 3 Anti-rancidity effects of FL on oil and fat ( $n=3$ )

## 4 结论与讨论

本研究发现, FL对BSA和牛奶蛋白均表现出较好的稳定作用。多糖对蛋白的稳定作用机制, 目前有多种理论解释, 如大豆多糖通过中性侧链的空间位阻作用而使蛋白液滴稳定, 而果胶则通过静电排斥作用来稳定蛋白液滴<sup>[8]</sup>。FL是一种富含硫酸根的酸性聚阴离子多糖, 其主链为岩藻糖, 硫酸基主要位于岩藻糖的C<sub>2</sub>和/或C<sub>4</sub>位, 以及侧链半乳糖的C<sub>3</sub>和/或C<sub>4</sub>位<sup>[2,3]</sup>。可见, FL主链和侧链均含有带有负电荷的硫酸基团。因此, 对于上述2种蛋白稳定机制, FL可能更倾向于后者, 通过静电排斥稳定BSA和牛奶蛋白。然而, 该假设尚需后续研究加以证实。

花生油富含不饱和脂肪酸, 猪油是一种不饱和和高级脂肪酸甘油酯。二者均含有不饱和和碳碳双键, 易被氧化。FL已被证明具有较好的抗氧化活性, 能有效清除自由基<sup>[11-13]</sup>。本研究结果表明, FL(4 g/L)对花生油与猪油均具有很好的抗氧化效果, 保护率分别为65.17%和63.32%。FL对油脂的抗氧化能力与浓度相关, 随浓度增加出现先增后减的现象, 在4 g/L后随浓度增加而降低, 这种现象与陈莉华结果类似<sup>[14]</sup>, 其原因可能与2种油脂的不饱和程度、脂肪酸的组成及其脂肪酸双键的位置和数目的不同有关, 使得其氧化产物的种类和数量不同, 进而导致了FL对两种油脂的抗氧化效果差异。另外, 花生油和猪油的粘度不同, 与FL混合时, 产生了不同的溶解度和分散程度, 这也是FL对2种油脂的抗氧化作用有差异的原因。

油脂氧化反应所生成的过氧化物, 是油脂氧化酸败的关键产物。因此, 测定油脂的过氧化值可判定其氧化变质的程度。当过氧化值明显升高时, 表明油脂的氧化稳定性下降, 酸败即将开始。但由于氢过氧化物容易分解而进

一步酸败水解, 因此仅用其代表含量的过氧化值不能全面反映油脂酸败的真实情况。因而, 有必要将游离脂肪酸含量的AV值作为辅助指标来衡量油脂酸败的程度<sup>[10]</sup>。本研究结果说明, FL抗油脂酸败水解的结果类似于抗油脂氧化, FL对抑制花生油和猪油的酸败水解效果亦有所差异, 其中与上述提到的油脂本来的性质有关外, 与FL本身的活性、分子质量、溶解度、粘度和化学结构都有关系<sup>[15]</sup>。

本研究证实, FL对蛋白质具有较好的稳定作用, 能有效对抗油脂氧化酸败。并且, 背景研究揭示FL具有抗肿瘤、抗菌与抗病毒、抗氧化、抗血栓、抗凝与促凝血、抗炎、免疫调节、降血脂与降血糖、抗补体、增加肠道益生菌、肾脏保护等活性<sup>[4,5]</sup>, 且兼具无毒副作用<sup>[6]</sup>、储量丰富以及易于制备<sup>[7]</sup>等优点。因此, FL用作食品添加剂极具潜力。

## 参考文献

- [1] 付志飞, 管华诗, 刘红兵. 褐藻胶的抗肿瘤作用及构效关系研究进展[J]. 中国海洋药物, 2013, 32(4): 76-82.  
Fu ZF, Guan HS, Liu HB. Advances in antitumor activity and structure-activity relationship of fucoidan [J]. Chin J Marine Drugs, 2013, 32(4): 76-82.
- [2] Chen A, Lan Y, Liu J, et al. The structure property and endothelial protective activity of fucoidan from *Laminaria japonica* [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 105: 1421-1429.
- [3] Wang J, Zhang Q, Zhang Z, et al. Structural studies on a novel fucogalactan sulfate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica* [J]. Int J Biol Macromol, 2010, 47: 126-131.
- [4] 宋小雨, 玄光善, 于广利. 岩藻聚糖硫酸酯药理学活性研究进展[J]. 中国海洋药物. 2017, 36(1): 92-97.  
Song XY, Xuan GS, Yu GL. Research advances in pharmacological activities of fucoidan [J]. Chin J Marine Drugs, 2017, 36(1): 92-97.
- [5] 张大艳, 肖为, 陶叶杏, 等. 海带褐藻多糖硫酸酯对腺嘌呤诱导的小鼠高尿酸血症的拮抗作用[J]. 天然产物研究与开发. 2016, 28(3): 433-437.  
Zhang DY, Xiao W, Tao YX, et al. Antagonistic effects of fucoidan from *Laminaria japonica* against adenine-induced hyperuricemia in mice [J]. Nat Prod Res Dev, 2016, 28(3): 433-437.
- [6] Li N, Zhang Q, Song J. Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in Wister rats [J]. Food Chem Toxicol, 2005, 43: 421-426.
- [7] Mizuno M, Nisgitani Y, Tanoue T, et al. Quantification and localization of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(2): 335-338.
- [8] 司华静, 齐军茹, 杨晓泉, 等. 可溶性大豆多糖的提取及对蛋白的稳定作用[J]. 食品工业科技. 2007, 28(10): 116-117.  
Si HJ, Qi JR, Yang XQ, et al. Effects of soybean soluble polysaccharides on protein stability [J]. Sci Tech Food Ind, 2007, 28(10): 116-117.
- [9] 梅盛华, 张伟忠, 刘马英, 等. 碘量比色法测定食品油脂中过氧化值的研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2000, 6(2): 48.  
Mei SH, Zhang WZ, Liu MY, et al. Measurement of peroxide value in food oil with iodine colorimetry [J]. Strait J Prev Med, 2000, 6(2): 48.

- [10] 王晓静, 陈莉华, 向明芳. 火棘果多糖抗油脂氧化酸败分析[J]. 食品与发酵工业, 2016, 5: 175–179.  
Wang XJ, Chen LH, Xiang MF. Analysis for lipid antioxidant activity of polysaccharides from *Pyracantha fortuneana* [J]. Food Ferment Ind, 2016, 5: 175–179.
- [11] Hou Y, Wang J, Jin W, *et al.* Degradation of *Laminaria japonica* fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights [J]. Carbohydr Polym, 2012, 87: 153–159.
- [12] Wang J, Zhang Q, Zhang Z, *et al.* Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica* [J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46: 6–12.
- [13] 张海荣. 修饰多糖的抗氧化自由基活性及其与 DNA 结合机理的荧光法研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2003.  
Zhang HR. Studies on the antioxidative radicals activities of modified polysaccharides and their combination mechanism with DNA by fluorescence analysis [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2003.
- [14] 陈莉华, 龙进国, 谭林艳, 等. 红果参多糖的提取纯化及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2): 170–173.  
Chen LH, Long JG, Tan LY, *et al.* Extraction and purification of polysaccharides from Hongguo ginseng and the comparison of antioxidant

activity [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25(2): 170–173.

- [15] 张俊生, 陈莉华, 朱士龙, 等. 节节草多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 86–89.  
Zhang JS, Chen LH, Zhu SL, *et al.* *In vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf. [J]. Food Sci, 2013, 34(5): 86–89.

(责任编辑: 姜 珊)

## 作者简介



杜 慧, 高级实验师, 主要研究方向化  
学生物学。  
E-mail: 744542841@qq.com



刘华忠, 博士, 教授, 主要研究方向为  
化学生物学。  
E-mail: liuhzbs@163.com