

钟玉美, 王雷, 许加超, 等. 不同方法制备的海带褐藻糖胶得率及品质的比较 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(14): 194–203. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080276

ZHONG Yumei, WANG Lei, XU Jiachao, et al. Comparison of the Yield and Quality of Fucoidan Extracted from *Saccharina japonica* by Different Preparation Methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(14): 194–203. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080276

· 工艺技术 ·

不同方法制备的海带褐藻糖胶得率及品质的比较

钟玉美, 王 雷, 许加超, 高 昕, 付晓婷*

(海洋食品加工与安全控制全国重点实验室, 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266000)

摘 要: 为建立褐藻中活性多糖褐藻糖胶的标准制备工艺, 本研究以海带为原料, 选择高温高压提取、酸提取、微波提取 (M400 W、M500 W、M600 W) 3 种方法, 分别使用氯化钙沉淀 (CP) 和乙醇沉淀 (GAP) 脱除褐藻胶, 再使用高浓度乙醇进行醇沉, 得到褐藻糖胶。比较了 10 种提取条件下海带褐藻糖胶的得率, 对提取得到的褐藻糖胶的总糖、总酚、蛋白质、糖醛酸、硫酸基含量进行测定, 并对其 Fe^{3+} 还原能力及 ABTS⁺、DPPH 自由基清除能力进行研究, 并对上述测定结果进行相关性分析, 筛选出高得率、高纯度、抗氧化活性好的褐藻糖胶制备方法。结果表明, 酸提取-钙沉 (AE-CP) 和微波提取-钙沉 (M400 W-CP、M500 W-CP、M600 W-CP) 褐藻糖胶得率分别为 3.821%、3.516%、3.376%、2.998%, 硫酸基含量分别为 17.734%、23.872%、23.376%、22.149%, 蛋白质和总酚含量均在 1% 以下, 糖醛酸含量低于 10%, Trolox 当量 (ABTS⁺ 自由基清除能力) 分别为 5.637、5.336、6.567、5.616 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 均为理想的褐藻糖胶制备方法。其中, 微波提取-钙沉法具有耗时短、溶剂用量少的特点, 符合绿色加工的要求。本研究系统地考察了褐藻糖胶制备方法对其得率和品质的影响, 建立了高得率、高纯度、高抗氧化活性褐藻糖胶的制备工艺。

关键词: 海带, 褐藻糖胶, 钙沉, 分级醇沉, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)14-0194-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080276

本文网刊:



Comparison of the Yield and Quality of Fucoidan Extracted from *Saccharina japonica* by Different Preparation Methods

ZHONG Yumei, WANG Lei, XU Jiachao, GAO Xin, FU Xiaoting*

(State Key Laboratory of Marine Food Processing & Safety Control, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China)

Abstract: In order to establish the standard preparation methodology for bioactive polysaccharide of fucoidan, this study carried out the research of preparation method of fucoidan from *Saccharina japonica*. Three extraction methods, high temperature pressure extraction (HPE), acid extraction (AE), and microwave extraction at 400 W (M400 W), 500 W (M500 W), and 600 W (M600 W) were selected. Subsequently, two precipitation methods, calcium chloride precipitation (CP) and ethanol precipitation (GAP) were used to remove alginate followed by finally precipitation of fucoidan with high concentration ethanol. Fucoidan extracts prepared in totally ten different conditions were collected, of which the contents of total sugar, total phenols, protein, uronic acid, and sulfate groups were analyzed. Meanwhile their antioxidant activities including Fe^{3+} reduction ability, ABTS⁺ and DPPH free radical scavenging ability were determined. The correlation analysis was conducted based on the above determined results to discover the relationship between preparation methods and fucoidan qualities. Accordingly, the preparation methods for fucoidan of high yield, high purity,

收稿日期: 2023-08-29

基金项目: 国家自然科学基金 (32272305); 青岛市关键技术攻关及产业化示范类项目 (22-3-6-ghgg-1-hz)。

作者简介: 钟玉美 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: zhongyumei@stu.ouc.edu.cn。

* 通信作者: 付晓婷 (1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 海藻精深加工, E-mail: xiaotingfu@ouc.edu.cn。

and excellent antioxidant activities were selected. Results showed that the yields of fucoidan by acid extraction with calcium precipitation (AE-CP) and microwave extraction with calcium precipitation (M400 W-CP, M500 W-CP, M600 W-CP) were 3.821%, 3.516%, 3.376%, and 2.998%, respectively. Meanwhile, the sulfate content was 17.734%, 23.872%, 23.376%, and 22.149%, respectively. Their protein and total phenol content were below 1%, the uronic acid content was below 10%, and the Trolox equivalent (ABTS⁺ radical scavenging ability) was 5.637, 5.336, 6.567, and 5.616 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. Thus, the above four preparation conditions were ideal for processing of fucoidan, among which the method of microwave extraction followed by calcium precipitation showed advantages of short processing time and low solvent consumption that met the requirement of the environmental-friendly processing. This study systematically investigated the effects of preparation methods on the yield and quality of fucoidan, which provided a practical preparation methodology for fucoidan from *Saccharina japonica* with high yield, purity and antioxidant activity.

Key words: *Saccharina japonica*; fucoidan; calcium chloride precipitation; graded alcohol precipitation; antioxidant activity

海藻是一种重要的海洋资源,可以作为人类食品^[1]、动物饲料、药品及保健品的原料来源^[2-3]。海带(*Saccharina japonica*),是褐藻门、褐子纲、海带目、海带科、海带属植物,是我国和世界第一大海水养殖藻类^[4]。海带作为一种可食用的大型经济冷水藻类,营养价值丰富,富含甘露醇、碘,含有褐藻多糖和人体所需的钴、硒、铬等微量元素^[5]。多糖作为海带中的主要生物活性成分被证明具有预防肥胖^[6]、抗炎^[7]、免疫^[8]、抗纤维化^[9]、抗肿瘤^[10-11]、抗凝血^[12]、降血脂^[13]、抗氧化^[14]、抗病毒^[15]、抗衰老^[16]、保护肾脏^[17]、抑菌^[18]、增白^[16]等作用。因此,海带多糖具有作为功能性食品、药品原料的良好前景。海带中的活性多糖包括褐藻糖胶、褐藻胶^[19]、褐藻淀粉^[20],其中褐藻胶含量最高、褐藻糖胶次之,褐藻淀粉最少^[21]。

褐藻糖胶(Fucoidan, FCSP),又称岩藻糖胶、岩藻聚糖硫酸酯,是一类硫酸化多糖,具有抗病毒、免疫调节等多种生物活性^[22]。目前已经从海带、岩藻、墨角藻、掌状海带、巨藻等海藻和海参^[23-24]中分离出褐藻糖胶粗品,但通常混有褐藻胶、褐藻淀粉等杂质。研究表明,从不同种类海藻中提取的褐藻糖胶,其结构和化学组成并不相同,如单糖组成、硫酸基取代位点和数量会发生变化;即使从同属或同种的海藻中提取的褐藻糖胶,其结构也存在差异。另一方面,不同的提取方法也会对褐藻糖胶组成和结构产生影响^[23,25-26]。褐藻糖胶是海带细胞壁的结构多糖,海带细胞壁的降解是褐藻糖胶释放的必要条件,因此,制备方法直接影响褐藻糖胶的得率、纯度、分子结构完整性,进而影响其生物活性^[27]。然而,目前还没有标准化的褐藻糖胶提取、纯化方案,不利于性能稳定的高品质褐藻糖胶的产业化制备。

高效的提取及褐藻胶与褐藻糖胶的分离是褐藻糖胶制备方法的关键点。早期褐藻糖胶的提取是在室温或者略高于室温的条件下基于稀酸处理,使用甲醛等进行预处理,以热水为提取溶剂^[27]。近年来开发出多种从海藻中提取褐藻糖胶的方法,如复合酶提取、亚临界水提取、超声提取、非热等离子体、加压液萃取^[28-30]、微波提取^[31]。然而,不同提取方法的提取效率及其对褐藻糖胶结构、性质的影响未见系统

的比较研究。为了提高褐藻糖胶的纯度,需要去除其中的褐藻胶。根据海带褐藻胶和褐藻糖胶性质的差异,可以采用两种方法去除褐藻胶:通过前处理将海带中的褐藻胶转化为水溶性盐,加入氯化钙后生成水不溶性的海藻酸钙并通过离心去除,即钙沉法;利用褐藻酸不溶于乙醇和水的特点,通过前处理将海带中褐藻胶转化为褐藻酸,并加入乙醇将褐藻酸充分沉淀并去除,即醇沉法^[32]。然而,去除褐藻胶的同时,褐藻糖胶在多糖溶液体系中也会发生变化,经过两种去除褐藻胶的方法得到褐藻糖胶的纯度、得率、活性的差异未见研究。由此可见,不同制备方法对褐藻糖胶的得率和品质的影响有待系统地比较研究。

为了对褐藻糖胶的制备方法进行标准化设计,本研究以海带作为原料,系统比较高压水提、酸提取、微波提取的提取效率,对每种提取方式分别进行钙沉法(氯化钙沉淀)、醇沉法(20%乙醇)脱除褐藻胶效果的比较,对得到的褐藻糖胶样品进行化学组成分析和抗氧化活性测定,揭示制备条件与产物性质的相关性,阐明不同制备方法对海带褐藻糖胶得率及品质的影响,从而为海带褐藻糖胶的产业化高效、稳定制备提供实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

海带 采收自山东省荣成市养殖海域,将鲜海带上附着的泥沙、杂质清洗干净,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干至恒重,用粉碎机进行粉碎,过 60 目筛,将得到的藻粉转移到密封袋中于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用;明胶(化学纯)、无水乙醇、氢氧化钠(粒状)、二水合磷酸二氢钠、氯化钡、无水氯化钙、四硼酸钠、三氯乙酸、硫酸钾、过硫酸钾、浓硫酸、浓盐酸、苯酚 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;唑啉 分析纯,上海麦克林化学试剂有限公司;D-葡萄糖醛酸标准品、福林酚、牛血清白蛋白(全组分) 分析纯,北京索莱宝科技有限公司;($\pm$)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid、间苯三酚 分析纯,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Free Radical(DPPH) 分析纯,梯希

爱(上海)化成工业发展有限公司; 2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、ABTS、L-岩藻糖 分析纯, 大连美仑生物技术有限公司; 三氯化铁 分析纯, 天津市北辰方正试剂厂。

LDZM-80L-Ⅱ立式高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂; MAS-Ⅱ Plus 常压微波辅助/合成萃取仪 上海新仪微波化学科技有限公司; ZHSY-50N 振荡培养箱 上海知楚仪器有限公司; SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; L550 台式低速大容量离心机 湘仪离心机仪器有限公司; N-1300 旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司; HH-2 数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; Master-S30 实验室纯水系统 上海和泰仪器有限公司; KQ-250DE 数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; S21-2 恒温磁力搅拌器 上海司乐仪器有限公司; MJ-BL25B3 搅拌机 广东美的生活电器制造有限公司; Epoch 2 微孔板分光光度计 美国伯腾仪器有限公司; FD5-2.5 冻干机 美国西盟国际集团; PL203 电子天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; DFY-C-500D 快速开盖高速粉碎机 温岭市林大机械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 褐藻糖胶提取

1.2.1.1 高压水提取法 参考 Chen 等^[33]的提取方法, 略作改进。称量 5 g 藻粉(记录准确重量), 加入 95% 乙醇, 料液比 1:20(m:v), 40 ℃ 水浴搅拌 2 h 后倾倒入乙醇, 加入超纯水, 料液比 1:30(m:v), 120 ℃ 高压提取 2 h, 纱布过滤后离心得上清液。

1.2.1.2 酸提取法 参考侯宁宁^[34]的提取方法, 略作改进。称量 5 g 藻粉(记录准确重量), 加入超纯水, 料液比 1:30(m:v), 用 1 mol/L HCl 调节 pH4, 振荡培养箱 50 ℃ 水浴 2 h 后升温至 70 ℃, 水浴 3 h, 纱布过滤后离心得上清液, 用 0.1 mol/L NaOH 将上清液 pH 调至中性(pH7)。

1.2.1.3 微波提取法 参考谭洁怡等^[35]的提取方法, 略作改进。称量 5 g 藻粉(记录准确重量), 加入超纯水, 料液比 1:30(m:v), 置于常压微波辅助萃取仪, 70 ℃ 提取 15 min, 提取功率分别为 400、500、600 W, 纱布过滤后离心得上清液。

1.2.2 褐藻胶脱除

1.2.2.1 钙沉法 向 1.2.1 得到的上清液中加入终浓度 2% CaCl₂ 溶液, 于 4 ℃ 冰箱过夜, 3800 r/min 室温离心 25 min, 取上清液, 加入终浓度为 60% 的 95% 乙醇溶液, 于 4 ℃ 冰箱过夜, 离心得沉淀, 加超纯水复溶, 进行透析(截留分子量 3500 Da), 冷冻干燥得褐藻糖胶。

1.2.2.2 分级醇沉法 向 1.2.1 得到的上清液中加入 95% 乙醇溶液至 20%(v/v), 轻微搅拌均匀, 静置片刻后离心, 取上清液, 继续加 95% 乙醇溶液至

60%(v/v), 轻微搅拌均匀, 于 4 ℃ 冰箱过夜, 离心得沉淀, 加超纯水复溶, 进行透析(截留分子量 3500 Da), 冷冻干燥得褐藻糖胶。

1.2.3 褐藻糖胶得率计算 通过不同提取方法从海带中提取褐藻糖胶, 按照以下公式计算得率:

$$\text{褐藻糖胶得率(\%)} = \frac{\text{冻干得到的褐藻糖胶样品质量(g)}}{\text{海带粉质量(g)}} \times 100$$

1.2.4 总糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[36]测定总糖含量, 以岩藻糖作为标准品配制溶液, 取 1.00 mL 标准溶液, 加入 0.5 mL 6% 苯酚溶液以及 2.5 mL 浓硫酸, 混匀, 于 30 ℃ 静置 30 min, 在 490 nm 处测定其吸光值; 以岩藻糖浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标制作标准曲线($y=3.8352x+0.0675$, $R^2=0.9996$)。将用不同提取方法得到的褐藻糖胶样品配成 0.1 mg/mL 的溶液, 取 1.00 mL 样品液, 按上述操作测定吸光值, 代入标准曲线得样品中总糖含量。

1.2.5 蛋白质含量测定 采用 Bradford 法^[37]测定蛋白质含量, 以牛血清白蛋白作为标准品配制溶液, 取 0.2 mL 标准溶液, 加入 1 mL 考马斯亮蓝溶液混匀, 静置 10 min, 在 595 nm 处测定其吸光值; 以牛血清白蛋白浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标制作标准曲线($y=4.1204x+0.2862$, $R^2=0.9991$)。将用不同提取方法得到的褐藻糖胶样品配成 1 mg/mL 的溶液, 取 0.2 mL 样品液, 按上述操作测定吸光值, 代入标准曲线得样品中蛋白质含量。

1.2.6 多酚含量测定 采用福林酚法^[38]测定多酚含量, 以间苯三酚作为标准品配制溶液, 取 0.25 mL 标准溶液, 加入 1 mL 福林酚试剂(1:9, v:v), 混匀, 3 min 后加入 0.75 mL 1%(w/w)碳酸钠溶液混匀, 避光反应 2 h, 在 760 nm 处测定其吸光值; 以间苯三酚浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标制作标准曲线($y=1.8533x+0.0433$, $R^2=0.9991$)。将用不同提取方法得到的褐藻糖胶样品配成 1 mg/mL 的溶液, 取 0.25 mL 样品液, 按上述操作测定吸光值, 代入标准曲线得样品中多酚含量。

1.2.7 糖醛酸含量测定 采用吡啶比色法^[39]测定糖醛酸含量, 以葡萄糖醛酸(α -D-Glucopyranuronic acid)作为标准品配制溶液, 取 1.00 mL 标准溶液, 加入 5 mL 四硼酸钠溶液, 振荡混匀, 沸水浴加热 10 min 后, 冰浴冷却 15 min, 加入 0.2 mL 吡啶溶液, 振荡混匀, 沸水浴加热 10 min, 室温冷却 15 min 后, 测定其在 530 nm 处的吸光值; 以葡萄糖醛酸浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标制作标准曲线($y=8.5389x+0.0676$, $R^2=0.9992$)。将用不同提取方法得到的褐藻糖胶样品配成 1 mg/mL 的溶液, 取 1.00 mL 样品液, 按上述操作测定吸光值, 代入标准曲线得到样品中糖醛酸含量。

1.2.8 硫酸基含量测定 采用明胶-氯化钡比浊

法^[40]测定硫酸基含量,以硫酸钾作为标准品配制溶液,取 0.2 mL 标准溶液加入 3.8 mL 三氯乙酸溶液,再加入 1 mL BaCl₂-明胶溶液,振荡混匀,15 min 后于 360 nm 下测定吸光值,记作 A₁;保持反应体系相同,用 1 mL 明胶溶液代替 BaCl₂-明胶溶液,360 nm 处测吸光值,记作 A₂;以硫酸基浓度为横坐标,以(A₁-A₂)为纵坐标制作标准曲线($y=0.228x+0.0269$, $R^2=0.9992$)。将用不同提取方法得到的褐藻糖胶样品用浓度为 1 mol/L 的盐酸配成 3 mg/mL 的溶液,在 105 ℃ 下水解 6 h,用 0.22 μm PES 滤膜过滤;取 0.2 mL 滤液按上述操作测定 A₁、A₂,根据标准曲线计算样品中硫酸基含量。

1.2.9 体外抗氧化活性测定

1.2.9.1 ABTS⁺自由基清除率测定 以 0.04 mg/mL Trolox 溶液作为标准品,以标准品浓度为横坐标,清除率为纵坐标,制作标准曲线($y=60.777x+1.1066$, $R^2=0.9992$)^[41-42]。将冻干得到的褐藻糖胶样品用超纯水配制成浓度 4 mg/mL 的多糖溶液,取 40 μL 样品溶液,加入 160 μL 稀释后的 ABTS 工作液,室温避光反应 10 min 后,在波长 734 nm 处测定吸光值记作 A_{sample},以超纯水代替 ABTS 工作液,测定 734 nm 处吸光值记作 A_{sample blank},以超纯水代替样品溶液作为对照,测定 734 nm 处吸光值记作 A_{control},以超纯水在 734 nm 处的吸光值作为 A_{control blank}。将计算得到的样品 ABTS⁺自由基清除率代入标准曲线,计算 Trolox 当量。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{control blank}})] \times 100$$

1.2.9.2 FRAP 抗氧化能力测定 以 0.1 mg/mL Trolox 溶液作为标准品,制作标准曲线($y=0.4886x+0.0654$, $R^2=0.9997$)^[43]。将冻干得到的褐藻糖胶样品用超纯水配制成浓度 4 mg/mL 的多糖溶液,取 20 μL 样品溶液,加入 180 μL 配制的 FRAP 试剂,37 ℃ 避光反应 10 min 后,在波长 593 nm 处测定吸光值,代入标准曲线计算 Trolox 当量。

1.2.9.3 DPPH 自由基清除率测定 以 0.04 mg/mL Trolox 溶液作为标准品,以标准品浓度为横坐标,清除率为纵坐标制作标准曲线($y=38.392x+17.089$, $R^2=0.9996$)^[44]。将冻干得到的褐藻糖胶样品用超纯水配制成浓度 4 mg/mL 的多糖溶液,取 100 μL 样品溶液,加入 100 μL DPPH 工作液,室温避光反应 30 min,在波长 515 nm 处测定吸光值记作 A_{sample},以甲醇代替 DPPH 工作液,测定 515 nm 处吸光值记作 A_{sample blank},以甲醇代替样品溶液作为对照,测定 515 nm 处吸光值记作 A_{control},以甲醇在 515 nm 处的吸光值作为 A_{control blank}。将计算得到的样品 DPPH 自由基清除率代入标准曲线,计算 Trolox 当量。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{control blank}})] \times 100$$

1.3 数据处理

所有实验均有 3 个平行,采用 Excel 2010 整理数据;使用 IBM SPSS Statistics 25、GraphPad Prism 9.3.0 软件对数据进行统计分析;使用 TBtools、Cytoscape 绘制热图、相关性图。数据表示为平均值±标准差,通过方差分析(ANOVA)和 Tukey 检验显著性差异($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取的海带褐藻糖胶的得率

本研究选择高温高压水浸提、酸提取两种传统提取方法以及微波提取这一新兴的绿色提取技术对海带褐藻糖胶进行提取,分别通过氯化钙(钙沉)、醇沉对提取物中褐藻胶进行脱除后,进行醇沉得到褐藻糖胶,并计算得率。不同方法提取的褐藻糖胶得率如表 1 所示。结果表明,使用氯化钙脱除褐藻胶时,高压水提-钙沉(HPE-CP)、酸提取-钙沉(AE-CP)、微波 400W-钙沉(M400 W-CP)、微波 500 W-钙沉(M500 W-CP)、微波 600 W-钙沉(M600 W-CP)的褐藻糖胶得率没有显著性差异($P>0.05$),均在 3%~4%;使用 20% 乙醇脱除褐藻胶时,高压水提-分级醇沉(HPE-GAP)、酸提取-分级醇沉(AE-GAP)与微波(400、500、600 W)-分级醇沉的褐藻糖胶得率存在显著性差异($P<0.05$),HPE-GAP 最高,达 13.013%,AE-GAP 得率为 7.516%,微波提取 M400 W-GAP、M500 W-GAP、M600 W-GAP 褐藻糖胶得率没有显著性差异($P>0.05$),得率在 3%~5%。对于同种提取方法,分级醇沉褐藻糖胶得率高于钙沉-醇沉褐藻糖胶得率。

表 1 不同方法提取海带中褐藻糖胶的得率(%)
Table 1 Yield of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods (%)

提取方法	钙沉-醇沉(CP)	分级醇沉(GAP)
高压水提(HPE)	3.491±1.278 ^{cd}	13.013±1.785 ^a
酸提取(AE)	3.821±0.206 ^{cd}	7.516±0.600 ^b
微波400 W(M400 W)	3.516±0.428 ^{cd}	4.088±1.488 ^c
微波500 W(M500 W)	3.376±0.157 ^{cd}	3.752±0.239 ^c
微波600 W(M600 W)	2.998±0.456 ^{cd}	3.695±0.997 ^c

注:表中不同小写字母表示各数值的显著性差异($P<0.05$)。

本研究使用高压高温(120 ℃)、酸处理、微波处理破坏海带细胞壁结构,释放海带多糖,提取褐藻糖胶。Skriptsova 等^[45]使用 0.1 mol/L 盐酸对日本海彼得大帝湾海带褐藻糖胶进行提取,其研究表明褐藻糖胶含量变化范围在 0.98%~4.19%。在本研究中 HPE-CP、AE-CP、M400 W-CP、M500 W-CP、M600 W-CP、M400 W-GAP、M500 W-GAP、M600 W-GAP 褐藻糖胶得率与该研究相近,而 HPE-GAP、AE-GAP 褐藻糖胶得率在 7% 以上,优于上述

报道。高梦祥等^[46]使用微波提取海带多糖,得率为7.2%,提取产物为褐藻胶和褐藻糖胶的混合物,据此推测 HPE-GAP、AE-GAP 褐藻糖胶中可能含有较多的褐藻胶,需进一步测定褐藻糖胶的化学组成,寻找导致褐藻糖胶得率差异较大的原因。

本研究中3种提取方法均能够破坏海带细胞壁、释放海带多糖,然而在破坏海带细胞壁的同时,高压高温(120℃)、酸处理和微波处理也可能会破坏多糖内部糖苷键,使其降解变性,结构发生改变^[47-48],从而影响褐藻糖胶的抗氧化活性。

基于上述问题,本研究进一步对各方法制备的褐藻糖胶进行深入研究,综合不同提取方法对海带褐藻糖胶得率、化学组成和抗氧化活性的影响,以筛选出高得率、高纯度、抗氧化活性好的褐藻糖胶制备方法。

2.2 不同方法提取的海带褐藻糖胶的化学组成

2.2.1 提取方法对总糖含量的影响 褐藻糖胶是一类硫酸化杂多糖,具有复杂的化学结构,不同海藻种类、不同提取方法使其单糖组成发生变化,海带褐藻糖胶的单糖组成以岩藻糖为主,可能含有鼠李糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖等单糖^[33]。因此,本研究以岩藻糖为标准品,采用苯酚-硫酸法测定不同褐藻糖胶样品总多糖含量。在反应过程中,戊糖比己糖更容易反应,糖醛酸的反应速度相对较慢,糖醛酸可能不会完全转化^[49],得到的结果通常低于实际多糖含量。由图1所示, HPE-CP、HPE-GAP、AE-CP、AE-GAP、M400 W-CP、M400 W-GAP、M500 W-CP、M500 W-GAP、M600 W-CP、M600 W-GAP 总糖含量在57.5~66.9 mg/mg, HPE-CP、HPE-GAP、AE-CP、M400 W-CP、M400 W-GAP、M500 W-CP、M500 W-GAP、M600 W-CP、M600 W-GAP 总糖含量没有显著性差异($P>0.05$), AE-GAP 总糖含量略低为57.5 mg/mg,与 HPE-CP、M400W-CP、M500W-CP、M600W-CP 存在显著性差异($P<0.05$),但制备的褐藻糖胶样品的总糖含量均在57%以上,说明在化学

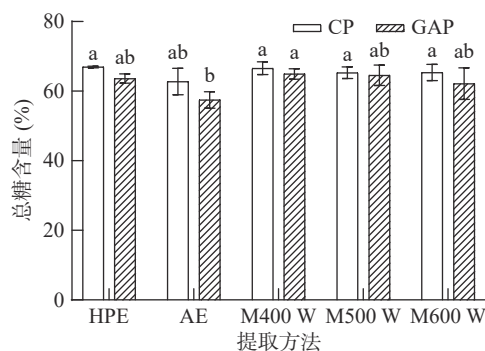


图1 不同方法提取海带中褐藻糖胶的总糖含量

Fig.1 Total sugar contents of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods

注:不同小写字母表示各样品总糖含量具有显著性差异($P<0.05$),图2~图8同。

组成上海带多糖是各样品的主要成分,10种提取方法均对海带多糖进行了有效提取。

2.2.2 提取方法对总酚、蛋白质含量的影响 对褐藻糖胶中糖醛酸含量、硫酸基含量进行测定,以进一步判断各制备方法提取褐藻糖胶的纯度、以及氯化钙和20%乙醇对于褐藻胶的脱除效果。图2、图3的结果表明,各制备方法得到褐藻糖胶样品的多酚含量在1.1%以内,蛋白质含量在1.2%以内。Ni等^[50]制备的海带褐藻糖胶组分的多酚含量为0.05%~0.13%,蛋白质含量为0.74%~1.42%。与之相比,本研究制备的海带褐藻糖胶的蛋白质和多酚含量均较低,具有较高的纯度。天然的多糖-多酚偶联物目前主要通过热水或者碱性溶液进行提取^[51],高温高压提取、酸提取和微波提取均涉及到了加热过程,海带中部分糖苷结合酚可能因此被提取出来,导致制备的褐藻糖胶样品中含有微量的多酚。本研究使用福林酚法测定样品中总酚含量,福林酚试剂也会与还原糖、蛋白质发生交叉反应,提高样品与福林酚试剂反应液的吸光值,即样品总酚含量测定结果与样品实际总酚含量相比会偏高。

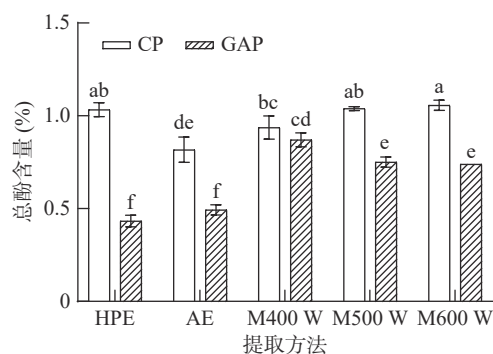


图2 不同方法提取海带中褐藻糖胶的总酚含量

Fig.2 Total phenolic contents of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods

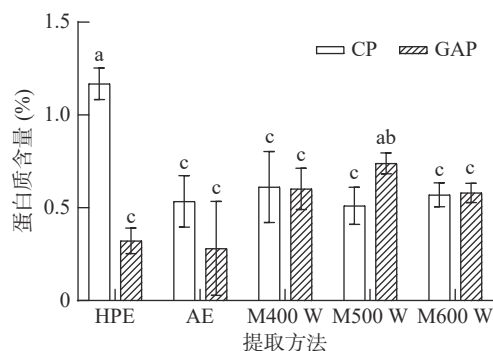


图3 不同方法提取海带中褐藻糖胶的蛋白质含量

Fig.3 Protein contents of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods

2.2.3 提取方法对糖醛酸、硫酸基含量的影响 褐藻胶主要由甘露糖醛酸和古罗糖醛酸两种糖醛酸单体聚合而成,而褐藻糖胶不含糖醛酸,通过测定不同样品中糖醛酸含量可以粗略估计其褐藻胶含量,反应氯化钙、20%(v/v)乙醇脱除褐藻胶的效率,糖醛酸含

量越低,褐藻糖胶纯度越高,褐藻胶脱除效果越好。由图 4 的结果表明,HPE-GAP、AE-GAP、M400 W-GAP、M500 W-GAP、M600 W-GAP 糖醛酸含量远高于同种提取方法下使用氯化钙脱除褐藻胶得到的褐藻糖胶样品的糖醛酸含量,说明使用 20%(v/v)乙醇脱除褐藻胶的效果一般,分级醇沉得率高是由于褐藻胶导致的。使用 20%(v/v)乙醇脱除褐藻胶时,离心得到的褐藻胶沉淀量明显少于氯化钙脱除,说明分级醇沉能够对海带多糖进行分离提取,但是特异性不强,尤其是在 20%(v/v)乙醇浓度下,仅能使部分褐藻胶以不溶性物质形态脱除,而在 60%(v/v)乙醇浓度下,部分褐藻胶及全部的褐藻糖胶以不溶性沉淀的形式析出。使用氯化钙脱除褐藻胶时,HPE-CP 褐藻糖胶糖醛酸含量为 18.0%,使用 20%(v/v)乙醇脱除褐藻胶时,HPE-GAP 褐藻糖胶糖醛酸含量为 38.6%,两者均远高于同组水平,推测可能是由于高温高压不仅破坏了海带细胞壁,还导致部分褐藻胶发生了降解,因此终产物中糖醛酸含量偏高。

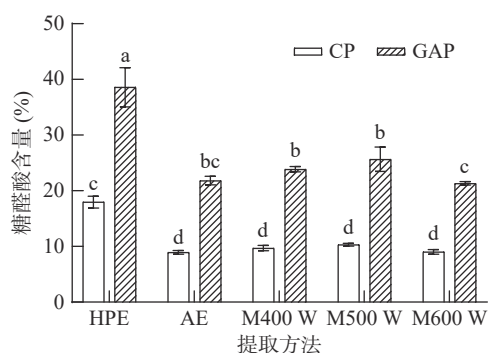


图 4 不同方法提取海带中褐藻糖胶的糖醛酸含量

Fig.4 Uronic acid contents of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods

硫酸基是褐藻糖胶的特征基团,硫酸基含量、取代位点会影响褐藻糖胶的生物活性,例如褐藻糖胶的抗凝活性与其硫酸基含量呈正相关^[52]。因此,定量测定样品中的硫酸基含量,对于推测褐藻糖胶纯度及其构效关系具有重要意义。由图 5 所示,样品中硫酸基含量与糖醛酸含量的变化趋势相反,说明使用氯化钙脱除褐藻胶是更好的选择。HPE-CP、AE-CP、

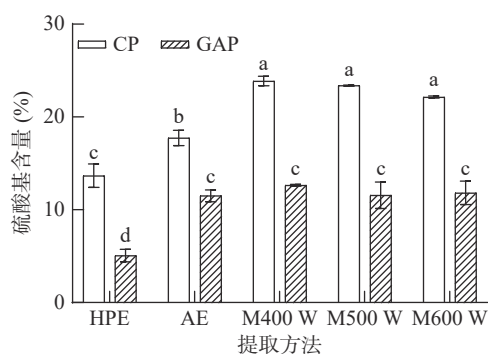


图 5 不同方法提取海带中褐藻糖胶的硫酸基含量

Fig.5 Sulfate group contents of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods

M400 W-CP、M500 W-CP、M600 W-CP、HPE-CP 硫酸基含量分别为 13.7%、17.7%、23.9%、23.4%、22.1%,付燕红等^[53]使用复合酶法对褐藻糖胶进行提取,提取率为 45%,多糖含量为 43.7%,硫酸基含量仅 11.05%。单鑫迪等^[54]通过热水提取得到马尾藻、铜藻、鼠尾藻、海黍子褐藻多糖,利用稀酸沉淀法和氯化钙沉淀法脱除褐藻胶,氯化钙沉淀法褐藻糖胶中硫酸基含量(10%~17%)普遍高于稀酸沉淀法(6%~9%),推测稀酸处理过程中,酸性环境导致褐藻糖胶硫酸基脱落,在本研究中酸提取作用于海带细胞而非直接作用于褐藻糖胶本身,并且提取结束后立即将 pH 调节至中性,一定程度上减少了酸对褐藻糖胶结构的破坏,得到了硫酸基含量较高的褐藻糖胶样品。Sun 等^[55]使用水、酸液、碱液提取海带褐藻糖胶,结果表明酸提取褐藻糖胶中硫酸基含量相对较高。与水提取和碱提取相比,酸提取可以获得硫酸基含量更高的褐藻糖胶^[56]。400、500、600 W 微波钙沉提取的褐藻糖胶硫酸基含量在 22%~24%,没有显著性差异,均优于高压水提和酸提取,说明在 400~600 W 功率范围内,微波提取能更有效地保护褐藻糖胶的结构。

2.3 不同方法提取的海带褐藻糖胶的抗氧化活性

研究表明,褐藻糖胶具有良好的抗氧化活性,ABTS⁺自由基清除能力、对 Fe³⁺的还原能力及 DPPH 自由基清除能力常被用作评估褐藻糖胶的抗氧化能力^[57]。因此,本研究选取以上 3 个抗氧化指标,评估不同方法提取的海带褐藻糖胶抗氧化活性的大小。

不同提取方法得到褐藻糖胶 ABTS⁺自由基清除能力如图 6 所示,HPE-GAP、AE-GAP、M400 W-GAP、M500 W-GAP、M600 W-GAP 的 ABTS 自由基清除能力没有显著性差异($P>0.05$),均维持在较低的水平;HPE-CP、AE-CP、M400 W-CP、M500 W-CP、M600 W-CP 的 ABTS⁺自由基清除能力强,Trolox 当量均在 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 以上,与不同样品硫酸基含量呈正相关,说明样品中硫酸基含量是影响褐藻糖胶抗氧化活性的重要因素。

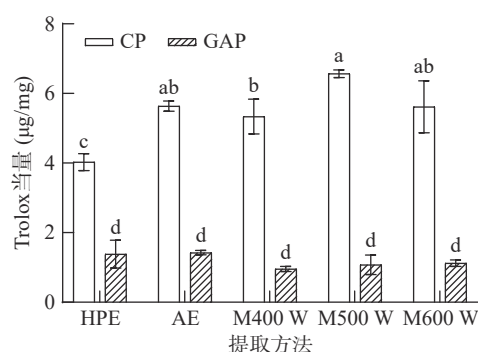


图 6 不同方法提取海带中褐藻糖胶的 ABTS⁺自由基清除能力

Fig.6 ABTS⁺ radical scavenging ability of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods

不同提取方法得到褐藻糖胶 FRAP 抗氧化能力如图 7 所示, HPE-GAP、AE-GAP、M400 W-GAP、M500 W-GAP、M600 W-GAP 的 FRAP 抗氧化能力没有显著性差异 ($P>0.05$), Trolox 当量为 1.38~1.69 $\mu\text{g}/\text{mg}$; HPE-CP、AE-CP、M400 W-CP、M500 W-CP、M600 W-CP 的 FRAP 抗氧化能力突出, Trolox 当量在 2.39~3.17 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

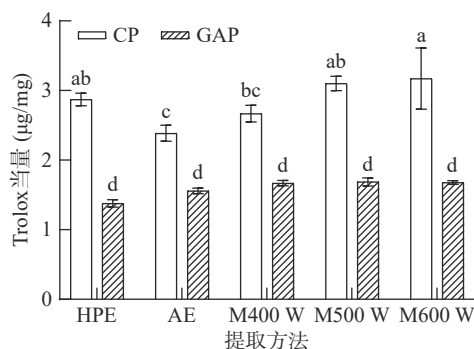


图 7 不同方法提取海带中褐藻糖胶的 FRAP 抗氧化能力
Fig.7 FRAP antioxidant capacity of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods

不同提取方法得到褐藻糖胶 DPPH 自由基清除能力如图 8 所示, HPE-CP 的 DPPH 自由基清除能力最为突出, 与其他样品存在显著性差异 ($P<0.05$), Trolox 当量为 2.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$; AE-CP、M400 W-CP、M400 W-GAP、M500 W-CP、M500 W-GAP、M600 W-CP、M600 W-GAP 自由基清除能力较弱, Trolox 当量为 0.86~1.51 $\mu\text{g}/\text{mg}$, HPE-GAP、AE-GAP 自由基清除能力最弱, Trolox 当量仅有 0.45~0.51 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

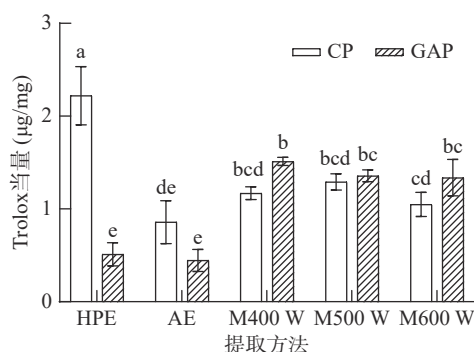


图 8 不同方法提取海带中褐藻糖胶的 DPPH 自由基清除能力

Fig.8 DPPH radical scavenging ability of fucoidan from *Saccharina japonica* using different extraction methods

2.4 不同制备方法与海带褐藻糖胶得率、品质的相关性分析

多糖作为一种具有多种活性的生物大分子物质, 硫酸化修饰可以改变其生物活性, 甚至使之具备新的生物活性^[58]。褐藻糖胶作为一种天然的硫酸化多糖, 不同制备方法对其生物活性的影响需要重点关注, 硫酸基作为影响褐藻糖胶生物活性的重要因素,

可作为评估不同制备方法的关键指标。

不同褐藻糖胶样品的化学组成、抗氧化活性与制备方法的相关性热图分析如图 9 所示。分级醇沉明显提高了褐藻糖胶得率, 但是样品中糖醛酸含量远高于钙沉-醇沉得到的褐藻糖胶样品, 即褐藻胶脱除效果不如氯化钙。对不同制备方法及其检测指标进行 OPLS-DA 分析, 变量投影结果如图 10 所示, 基于重要投影变量得分值大于 1.0 的标准, 进一步评估不同制备方法的差异性。总酚、糖醛酸、硫酸基含量, ABTS⁺自由基清除能力, FRAP 抗氧化能力被筛选为评估不同制备方法的重要指标。这意味着在褐藻糖胶化学组成上, 褐藻糖胶中糖醛酸、硫酸基更容易受到制备方法的影响。在褐藻糖胶抗氧化能力方面, ABTS⁺自由基清除能力、FRAP 抗氧化能力、DPPH 自由基清除能力与总糖、总酚、蛋白质、糖醛酸、硫酸基的相关性如图 11 所示。硫酸基含量与 ABTS⁺自由基清除能力、FRAP 抗氧化能力呈高度正相关, 皮尔逊相关系数分别为 0.863、0.838, 与 DPPH 自由基清除能力呈低正相关, 相关系数为 0.165。Wang

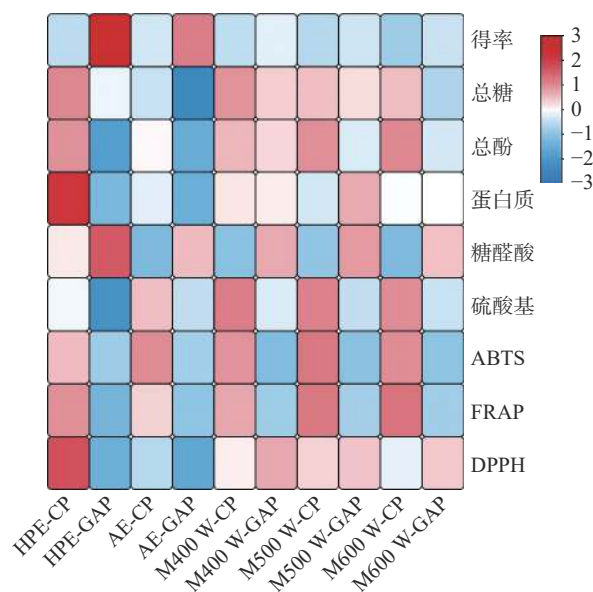


图 9 褐藻糖胶制备方法与其得率、品质的相关性分析
Fig.9 Correlation analysis between extraction methods and yield and quality of fucoidan

注: 热图分析中, 数值以 2 为底取对数, 并对每行进行归一化, 蓝色表示负相关, 红色表示正相关。

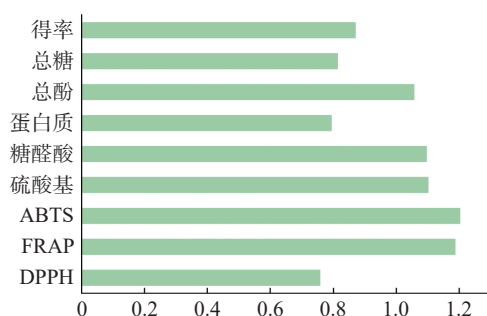


图 10 VIP 重要投影变量

Fig.10 Variable important in projection (VIP)

等^[59]研究表明,海带褐藻糖胶清除超氧自由基能力与其硫酸基含量呈正相关,硫酸盐与岩藻糖的摩尔比褐藻糖胶羟基自由基的清除能力有影响,摩尔比越大,清除能力越高。由此可见,硫酸基含量是表征海带褐藻糖胶抗氧化活性的重要指标。综上所述,应选择硫酸基含量高,糖醛酸含量低的提取方法,即应尽量脱除褐藻胶并保持褐藻糖胶分子的完整性。

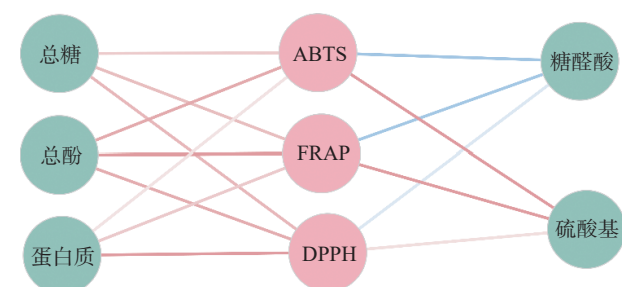


图 11 褐藻糖胶抗氧化活性与总糖、总酚、蛋白质、糖醛酸、硫酸基含量的相关性

Fig.11 Correlation between antioxidant activity of fucoidan and content of total sugar, total phenol, protein, uronic acid and sulfate group

注:线条颜色的深浅表示抗氧化活性与测量指标之间相关性的 大小,蓝色表示负相关,红色表示正相关。

不同制备方法对产物褐藻糖胶的化学组成、杂质含量的影响如图 9 所示。在所有提取方法中,酸提取可以有效降低褐藻糖胶中蛋白质、酚类、糖醛酸等杂质,若想获得纯度高、杂质含量低的褐藻糖胶,酸提取-钙沉是较为理想的制备方法。高温高压提取与之相反,蛋白质、酚类、糖醛酸残留略高,Ponce 等^[60]从狸藻属海藻提取褐藻糖胶,实验结果表明,温度越高,岩藻糖的比例越低,葡萄糖醛酸的比例越高;Yuan 等^[61]的实验也证明了这一点,利用微波辅助提取泡叶藻褐藻糖胶并分析其单糖组成,结果表明在最高提取温度(150℃)时,葡萄糖醛酸是褐藻糖胶的主要成分,在最低提取温度(90℃)时,岩藻糖成为褐藻糖胶的主要成分。本研究高温高压提取温度为 120℃,而酸提取和微波提取温度为 70℃,较高的温度可能是导致产物中糖醛酸含量高的原因,因此高温高压并非理想的提取方法。微波提取制备的褐藻糖胶硫酸基含量最高,ABTS⁺自由基清除能力和 FRAP 抗氧化能力强,若想获得结构完整、硫酸基含量高、抗氧化活性好的褐藻糖胶,微波提取-钙沉是理想的提取方法。微波辅助提取泡叶藻褐藻糖胶,提取溶剂为 0.1 mol/L 盐酸、提取温度 90℃、提取时间 30 min,褐藻糖胶得率 14.55%,产物中硫酸基含量为 28.6%,本研究中微波提取-钙沉硫酸基含量最高为 23.87%,略低于 Yuan 等^[61]的研究结果,由此可见,利用微波对海带中褐藻糖胶进行提取的条件还需进一步优化,如提取溶剂、提取时间、提取温度及功率、料液比等,以提高褐藻糖胶得率,得到高硫酸基含量的褐藻糖胶。

3 结论

本研究使用 10 种制备方法对海带褐藻糖胶进行提取,对比了不同制备方法得到的褐藻糖胶的化学组成及其 ABTS、FRAP、DPPH 抗氧化活性,并分析了制备方法与褐藻糖胶组成及抗氧化活性的相关性。结果表明,10 种方法得到的褐藻糖胶均有一定的抗氧化活性,但提取方法会影响褐藻糖胶的化学组成,进而影响其抗氧化活性。使用分级醇沉对褐藻胶和褐藻糖胶进行分离,不能有效地将褐藻胶从混合物中脱除,而氯化钙沉淀能够有效脱除褐藻胶。与酸提取-钙沉和微波提取-钙沉相比,高压水提-钙沉不是理想的提取方法,其产物糖醛酸含量高、硫酸基含量低;酸提取-钙沉和微波提取-钙沉褐藻糖胶得率高,杂质含量低、硫酸基含量高,酸提取作为一种传统的褐藻糖胶提取方法,技术较为成熟,操作简单;微波提取的褐藻糖胶虽得率略低,但其硫酸基含量最高,ABTS⁺自由基清除能力和 FRAP 抗氧化能力优异,且制备耗时短、试剂少,是环境友好型的绿色加工技术。本研究表征了不同提取方法海带褐藻糖胶化学组成及抗氧化活性的差异,为海带褐藻糖胶提取流程的标准化提供理论依据。但不同提取方法对海带褐藻糖胶细微化学结构的影响还需进一步探索,以便进一步明确褐藻糖胶活性的构效关系。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] TAGLIAPIETRA B L, CLERICI M T P S. Brown algae and their multiple applications as functional ingredient in food production[J]. *Food Research International*, 2023, 167: 112655.
- [2] XIAO S F, CHAN P, WANG T, et al. A 36-week multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, phase 3 clinical trial of sodium oligomannate for mild-to-moderate Alzheimer's dementia[J]. *Alzheimers Research & Therapy*, 2021, 13(1): 62.
- [3] CATARINO M D, AMARANTE S J, MATEUS N, et al. Brown algae *Phlorotannins*: A marine alternative to break the oxidative stress, Inflammation and Cancer Network[J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1478.
- [4] 农业农村部渔业渔政管理局等. 中国渔业统计年鉴-2022[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022. [Fisheries and fisheries administration bureau of the ministry of agriculture and rural affairs, etc. China Fisheries Statistical Yearbook-2022[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2022.]
- [5] 许加超. 海藻化学与工艺学[M]. 北京: 中国海洋大学出版社, 2014. [XU Jiachao. Seaweed chemistry and technology [M]. Beijing: China Ocean University Press, 2014.]
- [6] DUAN M M, SUN X N, MA N, et al. Polysaccharides from *Laminaria japonica* alleviated metabolic syndrome in BALB/c mice by normalizing the gut microbiota[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 996-1004.
- [7] YANG H, HAJ F G, LEE M, et al. *Laminaria japonica* extract

enhances intestinal barrier function by altering inflammatory response and tight junction-related protein in lipopolysaccharide-stimulated Caco-2 Cells[J]. *Nutrients*, 2019, 11(5): 1001.

[8] MCFADDEN B A, VINCENTY C S, CHANDLER A J, et al. Effects of fucoidan supplementation on inflammatory and immune response after high-intensity exercise[J]. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2023, 20(1): 2224751.

[9] KIM M, LEE Y, BAE M, et al. Sugar kelp (*Saccharina latisimi*) inhibits hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2021, 97: 108799.

[10] HSU W, LIN M, KUO T, et al. Fucoidan from *Laminaria japonica* exerts antitumor effects on angiogenesis and micrometastasis in triple-negative breast cancer cells[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 149: 600–608.

[11] TIAN L, LI C M, LI Y F, et al. *Laminarin* from seaweed (*Laminaria japonica*) inhibits hepatocellular carcinoma through up-regulating senescence marker protein-30[J]. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2020, 35(4): 277–283.

[12] HOANG N N, NGUYEN T K, VO T H, et al. Isolation, characterization, and biological activities of Fucoidan derived from *Ceratophyllum Submersum* L.[J]. *Macromolecular Research*, 2022, 30(2): 136–145.

[13] LI N N, FU X D, XIAO M S, et al. Enzymatic preparation of a low-molecular-weight polysaccharide rich in uronic acid from the seaweed *Laminaria japonica* and evaluation of its hypolipidemic effect in mice[J]. *Food & Function*, 2020, 11(3): 2395–2405.

[14] 赖晓芳, 沈善瑞. 海带多糖生物活性的研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2003(5): 436–438. [LAI Xiaofang, SHEN Shanrui. Research progress on the biological activity of kelp polysaccharides[J]. *Biotechnology Communications*, 2003(5): 436–438.]

[15] LI Z H, CUI B, LIU X W, et al. Virucidal activity and the antiviral mechanism of acidic polysaccharides against Enterovirus 71 infection *in vitro*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2020, 64(3): 189–201.

[16] CHEN Q R, KOU L Y, WANG F W, et al. Size-dependent whitening activity of enzyme-degraded fucoidan from *Laminaria japonica*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 225: 115211.

[17] LONG M, LI Q M, FANG Q, et al. Renoprotective effect of *Laminaria japonica* polysaccharide in adenine-induced chronic renal failure[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1491.

[18] CAI J, YANG D M, ZHANG J, et al. Evaluation of bio-guided fraction from *Laminaria japonica* as a natural food preservative based on antimicrobial activity[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 14(2): 735–748.

[19] UENO M, ODA T. Chapter six-biological activities of alginate[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, 2014, 72: 95–112.

[20] 李德远, 徐现波, 熊亮, 等. 海带的保健功效及海带生理活性多糖研究现状[J]. *食品科学*, 2002(7): 151–154. [LI Deyuan, XU Xianbo, XIONG Liang, et al. The current status of research on the health benefits and physiological active polysaccharides of kelp[J]. *Food Science*, 2002(7): 151–154.]

[21] 李林, 罗琼, 张声华. 海带多糖的分类提取、鉴定及理化特性研究[J]. *食品科学*, 2000(4): 28–32. [LI Lin, LUO Qiong, ZHANG Shenghua. Classification, extraction, identification, and physicochemical properties of kelp polysaccharides[J]. *Food Science*, 2000(4): 28–32.]

[22] 李波, 芦菲, 孙科祥. 褐藻糖胶的生物活性研究进展[J].

食品与药品, 2006(6): 18–21. [LI Bo, LU Fei, SUN Kexiang. Research progress on the biological activity of Fucoidan gum[J]. *Food and Drug*, 2006(6): 18–21.]

[23] LI B, WEI X, SUN J L, et al. Structural investigation of a Fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*[J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341(9): 1135–1146.

[24] RIBEIRO A C, VIEIRA R P, MOURAO P, et al. A Sulfated alpha-L-fucan from sea-cucumber[J]. *Carbohydrate Research*, 1994, 255: 225–240.

[25] CHIZHOV A O, DELL A, MORRIS H R, et al. A study of Fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*[J]. *Carbohydrate Research*, 1999, 320(1–2): 108–119.

[26] HEMMINGSON J A, FALSHAW R, FURNEAUX R H, et al. Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria Pinnatifida* (Phaeophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2006, 18(2): 185–193.

[27] ALE M T, MIKKELSEN J D, MEYER A S. Important determinants for Fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds[J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(10): 2106–2130.

[28] ALBOOFETILEH M, REZAEI M, HAMZEH A, et al. Cellular antioxidant and emulsifying activities of Fucoidan extracted from *Nizamuddiniana zanardinii* using different green extraction methods[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(12): e17238.

[29] GAN A, BAROUTIAN S. Subcritical water extraction for recovery of phenolics and Fucoidan from New Zealand Wakame (*Undaria pinnatifida*) seaweed[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2022, 190: 105732.

[30] DOBRINCIC A, ZORIC Z, PEDISIC S, et al. Application of ultrasound-assisted extraction and non-thermal plasma for *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata* polysaccharides pre-treatment and extraction[J]. *Processes*, 2022, 10(2): 433.

[31] DOBRINCIC A, PEDISIC S, ZORIC Z, et al. Microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction of sulfated polysaccharides from *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata*[J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1481.

[32] FERNANDO I P S, DIAS M K H M, MADUSANKA D M D, et al. Fucoidan fractionated from *Sargassum coreanum* via step-gradient ethanol precipitation indicate promising UVB-protective effects in human keratinocytes[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3): 347.

[33] CHEN X D, NI L Y, FU X T, et al. Molecular mechanism of anti-inflammatory activities of a novel sulfated galactofucan from *Saccharina japonica*[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(8): 430.

[34] 侯宁宁. 两种褐藻中多糖的分离分析及其生物活性研究[D]. 青岛: 中国科学院大学, 2017. [HOU Ningning. Isolation and analysis of polysaccharides from two species of brown algae and their biological activities[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences, 2017.]

[35] 谭洁怡, 王飞, 钱垂文. 超声波法提取裙带菜中褐藻多糖硫酸酯的工艺研究[J]. *食品与发酵工业*, 2006(1): 115–117.

[TAN Jieyi, WANG Yifei, QIAN Chuiwen. Study on the ultrasonic extraction of brown algal polysaccharide sulfates from *Undaria pinnatifida*[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2006(1): 115–117.]

[36] DUBIOS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances[J].

Analytical Chemistry, 1956, 28: 250–256.

[37] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical biochemistry*, 1976, 72: 248.

[38] ZENGIN G, NITHIYANANTHAM S, LOCATELLI M, et al. Screening of *in vitro* antioxidant and enzyme inhibitory activities of different extracts from two uninvestigated wild plants: *Centranthus longiflorus* subsp *longiflorus* and *Cerinth minor* subsp *auriculata*[J]. *European Journal of Integrative Medicine*, 2016, 8(3): 286–292.

[39] BITTER T, MUIR H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. *Analytical Biochemistry*, 1962, 4: 330.

[40] DODGSON K S, PRICE R G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides[J]. *Biochemical Journal*, 1962, 84(1): 106–110.

[41] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 26(9): 1231–1237.

[42] SHAO P, CHEN X X, SUN P L. *In vitro* antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62(1-2): 155–161.

[43] BENZIE I, STRAIN J J. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration[J]. *Oxidants and Antioxidants*, PT A, 1999, 299: 15–27.

[44] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *Food Science & Technology*, 1995, 28(1): 25–30.

[45] SKRIPTSOVA A V. Seasonal variations in the Fucoidan content of brown algae from Peter the Great Bay, Sea of Japan[J]. *Russian Journal of Marine Biology*, 2016, 42(4): 351–356.

[46] 高梦祥, 刘恒蔚, 宗明远. 采用微波技术提取海带多糖的工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2006(8): 69–72. [GAO Mengxiang, LIU Hengwei, ZONG Mingyuan. Study on the process of extracting kelp polysaccharides using microwave technology[J]. *Food Research and Development*, 2006(8): 69–72.]

[47] OTERO P, CARPENA M, GARCIA-OLIVEIRA P, et al. Seaweed polysaccharides: Emerging extraction technologies, chemical modifications and bioactive properties[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(13): 1901–1929.

[48] SASAKI C, TAMURA S, SUZUKI M, et al. Continuous microwave-assisted step-by-step extraction of bioactive water-soluble materials and Fucoidan from brown seaweed *Undaria pinnatifida* waste[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2024, 14: 7673–7682.

[49] YUE F F, ZHANG J R, XU J X, et al. Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content

by phenol-sulfuric acid method[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 963318.

[50] NI L Y, WANG L, FU X T, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activities of a fucose-rich fucoidan isolated from *Saccharina japonica*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156: 717–729.

[51] LIU J, BAI R Y, LIU Y P, et al. Isolation, structural characterization and bioactivities of naturally occurring polysaccharide-polyphenolic conjugates from medicinal plants-A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 2242–2250.

[52] CROCI D O, CUMASHI A, USHAKOVA N A, et al. Fucans, but not fucomannoglucuronans, determine the biological activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria saccharina* brown seaweed[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2).

[53] 付燕红, 王庆玉, 付学军, 等. 海带中褐藻糖胶不同提取工艺[J]. *食品工业*, 2019, 40(8): 49–53. [FU Yanhong, WANG Qingyu, FU Xuejun, et al. Different extraction processes for fucoidan in kelp[J]. *Food Industry*, 2019, 40(8): 49–53.]

[54] 单鑫迪, 闫立娜, 凡飞, 等. 不同提取方法对褐藻糖胶理化性质的影响[J]. *中国海洋药物*, 2015, 34(1): 7–12. [DAN Xindi, YAN Lina, FAN Fei, et al. The effect of different extraction methods on the physicochemical properties of Fucoidan gum[J]. *China Marine Pharmaceuticals*, 2015, 34(1): 7–12.]

[55] SUN T H, ZHANG X H, MIAO Y, et al. Studies on antiviral and immuno-regulation activity of low molecular weight Fucoidan from *Laminaria japonica*[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2018, 17(3): 705–711.

[56] LI H Y, YI Y L, GUO S, et al. Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Laminaria japonica*: A review[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370.

[57] DU B, ZHAO Q C, CHENG C H, et al. A critical review on extraction, characteristics, physicochemical activities, potential health benefits, and industrial applications of fucoidan[J]. *eFood*, 2022, 3(4): e19.

[58] WANG Z J, XIE J H, SHEN M Y, et al. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 74: 147–157.

[59] WANG J, ZHANG Q B, ZHANG Z S, et al. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 46(1): 6–12.

[60] PONCE N, PUJOL C A, DAMONTE E B, et al. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: Extraction methods, antiviral activity and structural studies[J]. *Carbohydrate Research*, 2003, 338(2): 153–165.

[61] YUAN Y, MACQUARRIE D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (Fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 129: 101–107.