

杜氏盐藻多糖提取工艺的优化

戴 军^{1,2}, 王 旻³, 尹鸿萍³, 汤 坚^{1,2}

1(江南大学分析测试中心, 江苏无锡, 214122)

2(江南大学食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏无锡, 214122)

3(中国药科大学生命科学学院, 江苏南京, 210009)

摘 要 针对杜氏盐藻多糖的提取, 通过单因素试验选取实验因素与水平, 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 在单因素试验的基础上采用三因素三水平的响应面分析法, 以多糖提取率为响应值作响应面, 并进行回归分析。结果表明, 杜氏盐藻多糖提取的理想工艺条件为: 提取温度 81℃, 提取液 pH8.80, 提取时间 210 min; 液料比为 25:1(v/w) 时, 杜氏盐藻多糖的提取率达到 8.77%。红外光谱等分析结果显示, 在该工艺条件下提取的杜氏盐藻多糖产品中含有酸性多糖, 并含有一定量的硫酸酯多糖, 糖苷键主要是 α 型。

关键词 杜氏盐藻, 多糖, 提取, 响应面分析

杜氏盐藻 (*Duanaliella salina*) 是单细胞、无细胞壁的绿藻类浮游生物, 一般生长于海水、咸水湖及盐池中^[1]。人工大规模培养的杜氏盐藻主要用于生产 β-胡萝卜素。以往人们对杜氏盐藻的生物学特性、生产培养技术及其中积累的高含量 β-胡萝卜素的提取分离研究较多, 而对杜氏盐藻中多糖类物质的研究利用很少^[1,2]。从盐藻中提取出 β-胡萝卜素后的藻渣中仍含有丰富的多糖、蛋白质、维生素及微量元素等可利用的营养成分, 其中的多糖具有免疫调节、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性^[3,4]。因此, 深入研究和开发盐藻多糖, 对于充分利用盐藻渣资源, 提高盐藻开发的综合效益具有重要意义。

实验中, 以提取出 β-胡萝卜素后的盐藻渣为原料, 在碱性条件下热水浸提, 再调不同 pH (等电点法) 去除蛋白质, 然后醇沉、离心并干燥得到粗多糖; 在单因素实验基础上应用响应面分析法, 以藻多糖的提取率为响应值, 对提取温度、pH、提取时间等影响藻多糖提取率的主要工艺参数进行了优化; 并利用红外光谱等方法对最优条件下提取的藻多糖产品进行了初步的定性分析。

1 实验方法

1.1 材料与试剂

杜氏盐藻粉 (由内蒙古兰太生物工程公司提供), 按文献方法^[5] 提取出 β-胡萝卜素, 去除其他醇溶性物质并干燥, 作为本实验提取多糖的原料。95% 乙醇、无水乙醇、HCl、H₂SO₄、苯酚、葡萄糖、无水 Na₂SO₃、

NaOH、酒石酸钾钠等, 均为分析纯; 3,5-二硝基水杨酸, 化学纯。

1.2 主要仪器

恒温水浴锅 (HH-2), 金坛市新航仪器厂; 离心机 (LD4-2A), 北京医用离心机厂; 增力电动搅拌机 (JB50-D), 上海标本模型厂; 旋转蒸发器 (R-201), 上海申科机械研究所; 精密 pH 计 (pHS-3C), 上海雷磁仪器厂; 循环水式多用真空泵 (SHB-111), 河南省巩义市站街光亚仪器厂; 分光光度计 (722 型), 上海精密科学仪器有限公司。

1.3 藻多糖提取率的测定

以苯酚-硫酸法^[6] 测定产品中多糖含量, 再按式 (1) 计算提取率:

$$\text{多糖的提取率}/\% = \frac{\text{多糖含量} \times \text{产品质量}}{\text{藻渣粉原料质量}} \times 100 \quad (1)$$

1.4 藻多糖提取的工艺流程

称取一定量的藻渣粉 $\xrightarrow[\text{调碱性}]{\text{加数倍水}}$ 热水浴浸提 \rightarrow 冷却 \rightarrow 回调中性 \rightarrow 高速离心 (4 000 r/min) 20 min \rightarrow 取清液 $\xrightarrow[\text{回调中性}]{\text{调不同 pH 除蛋白}}$ 高速离心 (4 000 r/min) 20 min \rightarrow 上清液 \rightarrow 真空浓缩 \rightarrow 加 3.8 倍 95% 乙醇 $\xrightarrow{\text{静置}}$ 离心、沉淀再用水溶解 \rightarrow 再醇沉 $\xrightarrow{\text{静置}}$ 抽滤 \rightarrow 体积分数 75% 乙醇、无水乙醇和丙酮分别洗涤 \rightarrow 真空干燥、称重。

2 结果与分析

2.1 提取过程中的单因素影响

影响杜氏盐藻多糖提取率的因素较多, 如: 提取温度、提取液 pH、提取时间、液料比等, 在进行响应

第一作者: 在职博士研究生, 副研究员。

收稿日期: 2007-02-26

面分析之前,先通过单因素实验来选取实验因素与水平。

2.1.1 提取时间对藻多糖提取率的影响

文献中显示,盐藻多糖的提取大多在碱性条件下进行^[2,3],故首先选择提取液 pH 为 10,在液料比 (mL : g) 为 25 : 1,提取温度为 80℃ 的条件下提取不同时间,观察提取时间对藻多糖提取率的影响,结果见图 1。

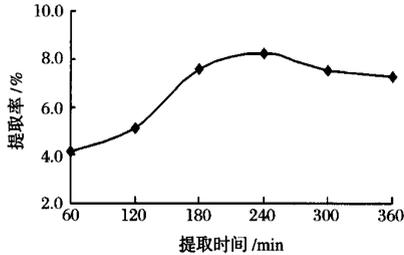


图 1 提取时间对提取率的影响

图 1 显示,在 240 min 之前,随着提取时间的增加,藻多糖提取率明显增大;240 min 之后,多糖提取率出现下降趋势。这是由于随着提取时间的增加,有利于多糖的溶出,因此在一定时间范围内多糖提取率增加;如果提取时间过长,则会引起多糖降解,从而使多糖提取率下降。同时为了缩短工时减少能耗,选择提取时间为 240 min 左右进行后续实验。

2.1.2 提取液 pH 对藻多糖提取率的影响

在提取温度 80℃、液料比 25 : 1 时,改变提取液 pH,分别提取 240 min,观察提取率随提取液 pH 的变化,结果见图 2。

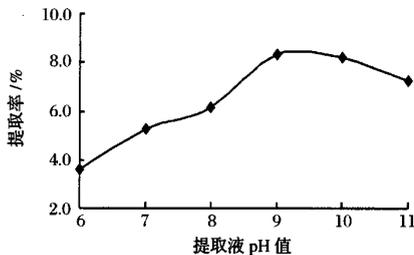


图 2 提取液 pH 值对提取率的影响

由图 2 可以看出,提取液 pH 9~10 时,藻多糖的提取率最高;在 pH 6~9 时,随着 pH 值的增大,藻多糖的提取率逐渐增加,这是因为盐藻多糖中有一部分酸性多糖,它们随着提取液碱性的增强,更易被溶出;另外,多糖与蛋白质等物质之间可能会以非共价键形态结合在一起,在碱性条件下,蛋白质等物质易被溶解,从而将多糖释放出来。pH 10~11 这个阶段,多糖的提取率略有下降,这是因为在热碱环境下

有一部分多糖可能被降解,从而导致了溶液中多糖含量的下降。因此选择提取液 pH 9 左右进行优化实验。

2.1.3 提取温度对藻多糖提取率的影响

调节提取液 pH 10、液料比为 25 : 1,改变提取温度,提取 240 min,观察提取温度对藻多糖提取率的影响,结果见图 3。

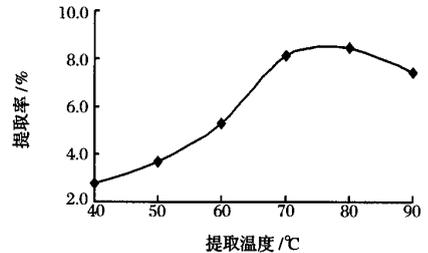


图 3 提取温度对提取率的影响

由图 3 可知,提取温度控制在 70~80℃ 时,藻多糖的提取率较高;在 40~70℃ 这个阶段,随着温度的升高,多糖在水中的溶解度逐渐增大,因而多糖的提取率不断增大;但当温度过高时(高于 80℃),多糖的提取率则下降,这也可能是因为碱性条件下高温易导致多糖降解;另外温度越高,制得的多糖产品色泽越深。因此,提取温度选择 70~80℃。

2.1.4 液料比对藻多糖提取率的影响

控制提取液 pH 为 10,改变液料比,在 80℃ 条件下提取 240 min,观察液料比对藻多糖提取率的影响,结果见图 4。

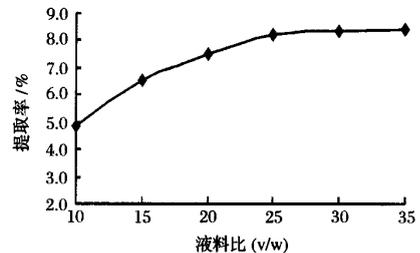


图 4 液料比对提取率的影响

由图 4 可以看出,液料比小于 25 : 1 时,随着提取液用量的增加,多糖提取率增大;液料比超过 25 : 1,提取率增加的趋势变得平缓。这是由于在同一温度下,随着提取液用量的增加,多糖总的溶出量增加,因此可以提高多糖的提取量,另一方面也可以减低体系中蛋白质的浓度,降低蛋白质沉淀对多糖的吸附,从而降低提取过程中多糖的损失。此实验中,液料比为 25 : 1 和 30 : 1 时提取率变化不大,再增加水料比

对多糖的溶出无明显效果,反而会增加下游浓缩工艺的负担,因此选用液料比 25 : 1 较为合适和经济。

2.2 采用响应面分析法优化杜氏盐藻多糖提取工艺

2.2.1 响应面分析因素水平的选取

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,综合 2.1 单因素实验,选取提取温度、提取液 pH、提取时间等对藻多糖的提取影响较大的 3 个因素,采用三因素三水平的响应面分析方法^[7],实验因素与水平设计见表 1。

表 1 三因素三水平表

变量名称	符号	间距	代 码		
			-1	0	1
提取温度/℃	X_1	20	50	70	90
提取液 pH	X_2	2	7	9	11
提取时间/min	X_3	60	180	240	300

2.2.2 响应面分析方案及结果

根据实验设计进行了 15 组试验,实验方案及结果见表 2 和表 3;并作出响应面图,分别见图 5~图 7。

表 2 响应面分析方案及结果

试验号	X_1	X_2	X_3	多糖提取率/%
1	0	-1	-1	6.616 638
2	0	-1	1	5.277 052
3	0	1	-1	5.559 205
4	0	1	1	2.437 888
5	-1	0	-1	6.647 070
6	-1	0	1	4.070 961
7	1	0	-1	8.860 010
8	1	0	1	6.561 977
9	-1	-1	0	6.179 270
10	-1	1	0	4.190 054
11	1	-1	0	6.279 181
12	1	1	0	5.489 322
13	0	0	0	8.345 049
14	0	0	0	8.295 492
15	0	0	0	8.361 871

表 3 回归方程各项的方差分析表

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	显著性
一次项	3	21.119 4	0.459 0	22.45	**
二次项	3	22.150 3	0.481 4	23.55	**
交互项	3	1.172 6	0.025 5	1.25	
回 归	9	44.442 4	0.965 9	15.75	
参 差	5	1.567 7			
总离差	14	46.010 1			

$$F_{0.01}(9,5) = 10.2, F_{0.05}(3,2) = 19.2, F_{0.1}(3,2) = 9.16$$

试验 1~12 是析因试验,13~15 是中心试验。15 个试验点分为析因点和 0 点。其中析因点为自变量,取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点;0 点为区域的中心点,0 点试验重复 3 次,用来估计试验误差。

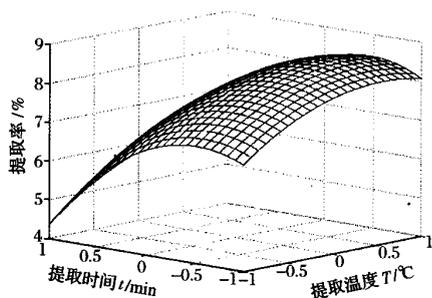


图 5 $Y = (X_1, X_3)$ 的响应面

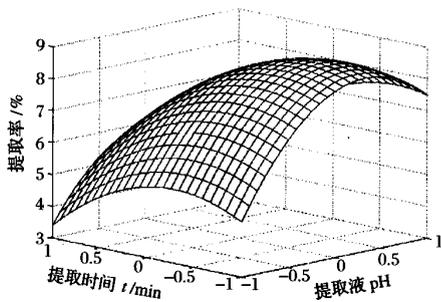


图 6 $Y = (X_2, X_3)$ 的响应面

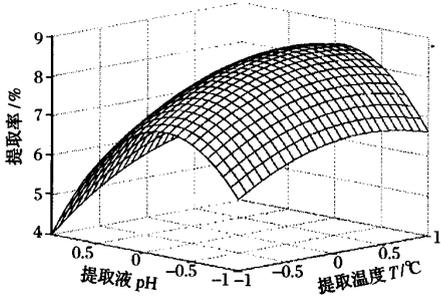


图 7 $Y = (X_1, X_2)$ 的响应面

采用 SASRREG 程序对表 2 中的藻多糖的提取率进行二次多项式回归拟合,获得藻多糖的提取率对提取温度、提取液 pH、提取时间的多元回归方程为:

$$Y = 8.353\ 136\ 936 + 0.762\ 890\ 741X_1 - 0.834\ 458\ 25X_2 - 1.166\ 879\ 825X_3 - 0.628\ 187\ 532X_1 \times X_1 + 0.299\ 839\ 496X_2 \times X_1 - 2.190\ 493\ 695X_2 \times X_2 + 0.069\ 520\ 348X_3 \times X_1 - 0.445\ 433\ 188X_3 \times X_2 - 1.189\ 947\ 279X_3 \times X_3$$

从表 3 可知,用上述回归方程描述各因素与响应值之间的关系时,其因变量和全体自变量之间的线性关系显著 ($r = 44.4424/46.0101 = 0.97$),方程的 F 值 $= 15.75 > F_{0.01}(9,5)$,说明用上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,方程高度显著,说明这种实验方法是可靠的。

图 5~图 7 直观地反映了各因素对响应值的影响,比较这 3 个图可知,提取液 pH (X_2) 对藻多糖提

取率的影响最为显著,表现为曲线较陡;而提取温度(X_1)与提取时间(X_3)次之,表现为曲线较为平坦。

$$\begin{cases} 0.762890741 - 1.256375064X_1 + 0.299839496X_2 + 0.069520348X_3 = 0 \\ -0.83445825 + 0.29983949X_1 - 4.380987390X_2 - 0.445433188X_3 = 0 \\ -1.166879825 + 0.069520348X_1 - 0.445433188X_2 - 2.379894558X_3 = 0 \end{cases}$$

解此方程组,得: $X_1 = 0.556741$, $X_2 = -0.106192$, $X_3 = -0.454168$ 。

即藻多糖提取的理想条件为:提取温度 81°C , 提取液 pH8.79, 提取时间 212.75 min。模型预测达到的最高提取率为 8.8748%。

为检验响应面分析法的可靠性,并考虑到实际工艺控制的方便,将最佳提取条件修正为提取温度 81°C , 提取液 pH8.80, 提取时间 210 min; 液料比为 25:1(v/w)时,在此条件下实际测得的提取率为 8.77%,与理论预测值相比相对误差低于 2%。说明采用响应面分析法优化得到的提取条件参数准确可靠,具有实用价值。

2.3 藻多糖产品的分析

以红外光谱检测在所确定的工艺条件下提取的多糖产品的红外光谱特征(图 8a)的结果显示,在 3405 cm^{-1} 处有一宽吸收峰,是糖的羟基 OH 伸缩振动吸收;在 2927 cm^{-1} 和 1374 cm^{-1} 处有 2 个特征峰,分别为糖类 C-H 伸缩振动与变角振动; $1150\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 处的强吸收峰为吡喃环的醚键 C—O—C

为了进一步确证最佳点的值,对回归方程求一阶偏导数,并令其等于 0,得到下列方程组:

和碳氧键 C—O 的伸缩振动吸收; 1576 cm^{-1} 和 1404 cm^{-1} 处的 2 吸收峰分别为羧基的反对称和对称伸缩振动吸收^[8](HPAEC 分析结果已证实糖醛酸的存在^[9]); 1244 cm^{-1} 处还有一吸收峰,是硫酸基(S=O 伸缩振动)的特征吸收^[10](浊度法测定结果和体积排阻特性的研究结果均证明硫酸基确实存在^[11])。这些结果表明,杜氏盐藻多糖产品中含有酸性多糖,并含有一定量的硫酸酯多糖。图 8(b)是低 pH 值条件下提取的多糖产品的红外光谱图,虽有多糖的一般特征吸收,但没有明显的硫酸基吸收峰,且羧基特征吸收明显比图 8(a)弱(均与 $1150\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 处吸收强度相比较)。这说明碱性条件下有利于硫酸酯多糖和含有糖醛酸的酸性多糖的充分提取(可能因为硫酸基和羧基易使多糖分子相互间,甚至还可能会与蛋白质等其他大分子间,由于氢键或静电作用发生缔合或形成螺旋结构,因而在中性或偏酸性条件下不易解离和溶于水)。此外,图 8(a)在 833 cm^{-1} 处有一较强吸收,提示该多糖产品的糖苷键主要是 α 型^[12]。

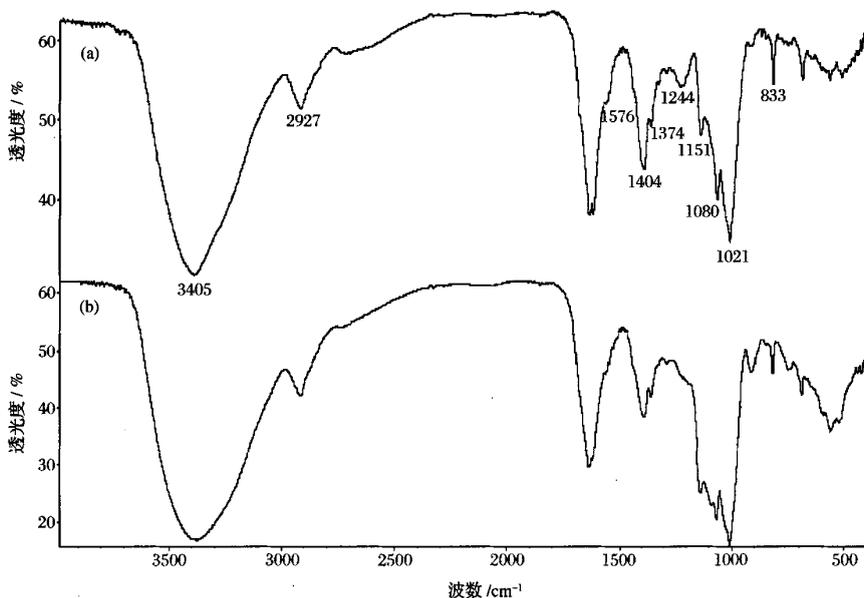


图 8 杜氏盐藻粗多糖产品的红外光谱图

检测仪器: Nicolet Nexus FT-IR spectrometer(Thermo Electron Corporation)

制样方法: 固体, KBr 压片法; 1~2 mg 样品, 100 mg KBr

3 结 论

对影响杜氏藻多糖提取的主要因素的最佳水平范围及其交互作用进行了研究和探讨,通过响应面分析方法建立了影响藻多糖提取的二次多项式数学模型,从而求得杜氏藻多糖提取的理想条件为:提取温度 81℃,提取液 pH8.80,提取时间 210 min;液料比为 25:1(v/w)时,杜氏盐藻多糖的提取率达到 8.77%。红外光谱分析结果显示,该工艺条件下提取的杜氏盐藻多糖产品中含有酸性多糖,并含有一定量的硫酸酯多糖,糖苷键主要是 α 型。

参 考 文 献

- 1 陈峰,姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.144~173
- 2 薛巧如,尹鸿萍,王旻,等. 杜氏藻多糖的分离、纯化及结构分析[J]. 药物生物技术,2003,10(2):96~99
- 3 丁新,李玲凤. 关于盐藻多糖的研究[J]. 海湖盐与化工,1996,24(6):4~6
- 4 Fabregas J, Garcia D, Fernandez-Alonso M. *In vitro* inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae [J]. Antiviral Res, 1999, 44(1):67~73
- 5 刘广发,楼士林,游兰英,等. 10种(株)杜氏藻 β -胡萝卜素提取及含量比较[J]. 厦门大学学报(自然科学版),1995,34(1):94~98
- 6 张水华. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,2004.124~125
- 7 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002.135~142
- 8 常建华,董绮功编著. 波谱原理及解析[M]. 北京:科学出版社,2001.58~118
- 9 戴军,梁立娜,尹鸿萍,等. 刘艳芳. 高效阴离子交换色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. 食品与发酵工业,2006,32(11):133~137
- 10 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.195
- 11 戴军,尹鸿萍,陈尚卫,等. 杜氏盐藻多糖的高效体积排阻色谱保留特性及其分析方法的研究[J]. 色谱,2006,24(6):560~565
- 12 徐任生主编. 天然产物化学[M]. 北京:科学出版社,1993.416~418

Optimization of Extraction Technique of Polysaccharides from *Duanaliella salina*

Dai Jun^{1,2}, Wang Min³, Yin Hongping³, Tang Jian^{1,2}

1(Testing & Analysis Center of Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

2(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Wuxi 214036, China)

3(College of Life Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT Aiming at the extraction of polysaccharide from *Duanaliella salina*, experiment factors and levels were firstly selected by single-factor tests in this paper. According to the Box-Behnken center-uni- experimental design principles, the method of response surface analysis with 3 factors and 3 levels was adopted. The factors influencing the extracted technology were determined by means of regression analysis and response surface was graphed with the extraction rate of *Duanaliella salina* polysaccharide as the response value. The results showed that the optimum conditions were: the extraction temperature of 81℃, pH value of extraction of 8.80, extraction time of 210 min, and that the extraction rate of *Duanaliella salina* polysaccharide was up to 8.77% while ratio of water to material was 25:1(v/w). The polysaccharide products extracted from *Duanaliella salina* under optimum condition were analyzed by infrared and other methods. The results indicated that there were acidic polysaccharides with uronic acid and sulfated polysaccharides in the products. Their glycosidic bond were α -type mainly.

Key words *Duanaliella salina*, polysaccharides, extraction, response surface analysis (RSA)