

超声波法提取裙带菜中褐藻多糖硫酸酯的工艺研究*

谭洁怡 王一飞 钱垂文

(广州暨南大学生物医药研究开发基地, 广东, 510632)

摘要 利用超声波法从裙带菜(*Undaria pinnatifida*)中提取褐藻多糖硫酸酯(FSP), 以多糖提取率为指标, 通过单因素和正交优化实验确立了提取 FSP 的最佳工艺条件, 并与传统热水提取法进行了比较。结果表明, 100 倍加水量、在 1 000 W 功率下超声处理 20 min 能得到最大的多糖提取率。采用优化工艺, FSP 得率(16.87%)、纯度(74.19%)和硫酸基含量(10.22%)比传统水提法分别提高了 23.59%、30.92% 和 13.94%, 色素和蛋白等杂质的析出减少, 是一种良好的提取多糖方法。

关键词 超声提取, 褐藻多糖硫酸酯, 裙带菜, 正交实验

褐藻多糖硫酸酯(Fucose-containing sulfated polysaccharides, FSP)又称为褐藻糖胶(Fucoidan)、岩藻聚糖硫酸酯、岩藻聚糖, 是存在于所有褐藻中的细胞间多糖。它是一种水溶性杂多糖, 其主要成分除了 L-岩藻糖和硫酸根外, 还含有半乳糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、糖醛酸、蛋白质和 K、Na、Ca、Mg 等金属离子。越来越多的研究表明, 褐藻糖胶具有广泛的生理活性, 并且其活性与硫酸根含量和位置密切相关。如具有抗病毒, 调节免疫系统, 抗辐射, 抗凝血, 抗氧化, 抗肿瘤, 降血糖, 降血脂等作用^[1~4]。

裙带菜(*Undaria pinnatifida*)为多年生大型褐藻, 属于昆布纲, 是我国养殖的 3 大经济海藻之一, 其干粉总糖含量达 38.58%。本课题以此为原料, 研究了超声提取技术对褐藻糖胶提取率的影响, 并进行了工艺优化, 为大力开发褐藻资源提供实验依据。

1 仪器和材料

1.1 仪器

JY98-3 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所), 台式冷冻高速离心机(德国 Hettich 公司), 核酸蛋白分析仪(美国 Backman 公司), DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司)。

1.2 材料与主要试剂

裙带菜, 2003 年 4~6 月采自大连海面。L-Fucose 岩藻糖, Sigma 公司。G-250, 进口分装。浓硫

酸, 6% 苯酚, 600 μg/mL 标准硫酸基溶液, 0.5% 明胶溶液, 1% 氯化钡-0.5% 明胶溶液, 及其余常规试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 裙带菜的预处理

将裙带菜洗净晒干, 粉碎机粉碎, 过 80 目网筛后置干燥器中备用。

2.2 超声提取 FSP 的单因素考察

称取一定量的藻粉, 加入蒸馏水混匀, 按照各种条件(液固比、功率、时间)于冰浴中超声处理, 离心, 取上清液浓缩。加入 95% 乙醇至终浓度 20%, 离心除去水溶性褐藻胶, 取上清液。再加入乙醇至终浓度 60%, 离心, 沉淀用无水乙醇、丙酮洗涤, 烘干得 FSP。

2.3 超声提取 FSP 正交试验

在单因素实验的基础上, 用正交实验进行条件优化。采用 $L_9(3^4)$ 正交表对藻粉进行超声提取并测定含量, 每次试验重复 3 次, 取平均值。水平-因素表设计如表 1。提取液 FSP 制备同 2.2。

表 1 水平因素表

水平	因素		
	水:藻粉(A)/mL:g	超声功率(B)/W	超声时间(C)/min
1	60:1	600	20
2	80:1	800	25
3	100:1	1000	30

2.4 分析方法

2.4.1 多糖含量测定

采用苯酚硫酸法。标准曲线制备: 以岩藻糖单糖为标准, 参考文献[5]。以多糖浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标制标准曲线, 回归方程表明, 5~25 μg/mL 线性关系良好。

第一作者: 硕士研究生(王一飞教授为通讯作者)。

* 广东省科技计划项目(2005A10904001), 广东省自然科学基金团队项目(2004E039213), 广东省科技计划项目(国际科技合作计划)(2005B50301017), 广州市科技攻关计划项目(2005Z3-E0411)基金资助

收稿日期: 2005-10-28

样品含量测定:称取一定量的 FSP 加水定容成 1 mg/mL 溶液,取适量溶液按标准曲线制备方法测定多糖含量,计算多糖提取率:

$$\text{多糖提取率}/\% = \frac{\text{测得的多糖含量(g)}}{\text{投入原藻粉的量(g)}} \times 100$$

2.4.2 硫酸基的 Dodgson 法定量测定

标准曲线制备:参考文献[6]。以硫酸基浓度为横坐标,吸光度为纵坐标制标准曲线,测得回归方程。

样品含量测定:称取一定量 FSP 制成 1.5 mg/mL 的 1 mol/L HCl 溶液,100℃ 密封加热 3 h,冷却后取 0.2 mL 按标准曲线制备方法测定硫酸基含量。

2.4.3 Bradford 法测定蛋白含量

参考文献[7]。

3 结果与讨论

3.1 超声波法提取褐藻糖胶的单因素实验

3.1.1 加水量对多糖提取率的影响

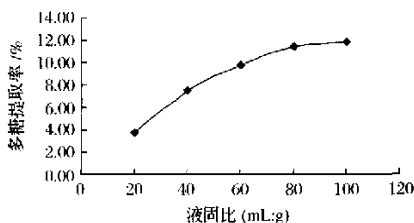


图1 液固比对多糖提取率的影响
(超声功率 400W, 超声时间 20 min)

从图1可看出,多糖提取率随着液固比的增加而增加。液固比在 20~80 范围内提取率增加迅速,大于 80 后提取率上升的幅度不大,液固比为 100 时,达最大提取率 11.82%。一般来说,增加溶剂的比例有利于传质扩散,但在实际操作中溶液体积过大不利于后续的浓缩和分级醇析实验,因此应依据实验条件调整适合的液固比。

3.1.2 超声功率对多糖提取率的影响

一般认为空化作用、热效应和机械作用是超声提取的理论依据,而超声功率即强度决定了超声波和介质相互作用程度,从而影响 3 种作用对有效物质的提取效果。

从图2可知,随着超声功率加大,热效应增强,多糖提取率随之明显升高,800 W 时提取率达峰值 12.96%,此时强烈的空化作用瞬间造成细胞壁破裂,加速有效成分的溶出、扩散。随后再提高超声功率达 1000 W,提取率稍微下降,为 12.82%,说明对于特定目标产物的提取,超声强度和空化作用的影响有一定的范围。实验数据表明,超声处理功率大于 800 W

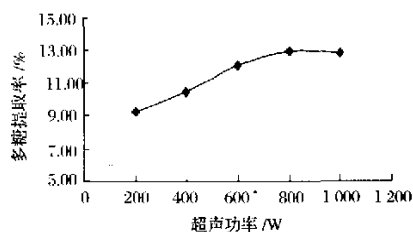


图2 超声功率对多糖提取率的影响
(液固比 80, 超声时间 20 min)

时多糖提取可能达饱和状态。

3.1.3 超声时间对多糖提取率的影响

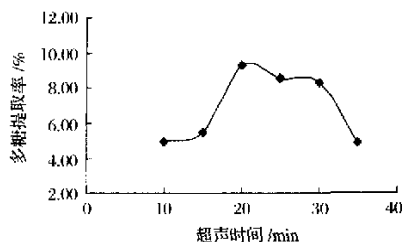


图3 超声时间对多糖提取率的影响
(液固比 80, 超声功率 400W)

图3表明,短时间(小于 15 min)超声处理时提取率较低;延长处理时间至 20 min,提取率快速增加并达到峰值(9.29%)。20~30 min 时间段,提取率稍有波动,再增加时间,提取率则迅速下降。由于褐藻糖胶主要存在于细胞间和细胞壁中,超声处理时间太短(小于 15 min)不足以破碎细胞,释放多糖;时间太长,则超声波的机械剪切力对多糖有一定的降解和破坏作用,同时会增加杂质含量,降低多糖含量。数据表明,作用时间在 20~30 min,对多糖的提取效果较好。

3.2 超声提取褐藻糖胶正交实验

分别考察了液固比、超声功率、超声时间对多糖提取率的影响后,应用正交法探讨这 3 个因素对提取率影响,确定超声波法提取多糖的最佳工艺条件,结果见表 2。

表2 超声提取褐藻糖胶正交实验结果

试验号	A	B	C	多糖提取率/%
1	1	1	1	7.80
2	1	2	2	10.70
3	1	3	3	12.22
4	2	1	3	10.22
5	2	2	1	10.68
6	2	3	2	12.70
7	3	1	2	11.96
8	3	2	3	12.63
9	3	3	1	11.24
K_1	30.74	29.98	29.72	
K_2	33.60	34.03	35.38	
K_3	35.83	36.16	35.07	
R	5.09	6.18	5.66	

从正交结果和极差分析看出,3因素对提取率的影响程度是:B>C>A,即功率>时间>液固比。超声提取褐藻糖胶最佳组合为:B₃C₂A₃,即超声功率1000 W,超声时间25 min,液固比100。

3.3 超声法和传统水提法的比较

根据实验结果,超声波法和传统热水提法所得FSP含量及各种指标的对比结果如表3所示。

表3 超声法和热水提法提取效果比较

	超声法	水提法
提取条件	液固比100,1000W,25 min	液固比80,90℃,6 h
提取液颜色	浅,清亮透明黄绿色	深,半透明棕褐色
FSP产品性状	黄褐色颗粒	棕褐色颗粒
褐藻胶得率/%	6.06	4.88
FSP得率/%	16.87	13.65
FSP中糖含量/%	74.19	56.67
FSP中SO ₄ ²⁻ 含量/%	10.22	8.97
FSP中蛋白含量/%	1.16	1.27

比较结果显示,超声法的优势在于温度(冰浴)和时间(25 min)远低于水提法(90℃和6 h),有利于降低能耗,极大缩短了提取时间和操作周期。实验数据说明,利用超声提取工艺能增加提取率和保持产物生物活性(与硫酸基含量密切相关),所得FSP无论在得率、糖含量(纯度)或SO₄²⁻含量都明显优于传统热水提取,分别高出23.59%、30.92%和13.94%。褐藻胶(Algin)是另一种广泛应用于医药、食品、化工的褐藻多糖^[8],本实验数据表明,超声法也能增加褐藻胶的提出率。2种提取方法均用分级醇析提取FSP,虽未进行除蛋白和脱脂纯化步骤,但所得产品中的杂蛋白含量都很低。试验过程中,经热水提取离心所得粗提液呈深棕褐色,明显比超声处理的提取液颜色深,FSP产品颜色也比超声法的深,提示了利用超声波作为天然产物提取手段能有效减少色素的析出,在

实际应用中利于简化除色素等预处理步骤。综上所述,超声波法是一种良好的多糖提取新工艺。

4 结 论

将超声技术应用于裙带菜多糖的提取,不仅能够增加糖类物质的得率,保持有效成分的活性,同时减少色素等杂质析出,简化提取纯化流程。文中探讨了与超声波作用效应相关的液固比、超声功率和时间因素对多糖提取率的影响,同时采用正交实验确立最佳条件。正交优化条件为液固比100、超声功率1000 W、超声时间25 min。所得FSP得率、纯度和硫酸基含量分别高于传统水提法23.59%、30.92%和13.94%,与传统水提法相比具有处理时间短、提取温度低等优点。超声技术提取多糖等天然产物显现良好的应用前景。

参 考 文 献

- 1 陈吴然,胡庭俊. 硫酸多糖抗病毒作用研究[J]. 动物医学进展, 2005,26(4):54~57
- 2 吴晓旻,杨明亮,黄晓兰,等. 褐藻糖胶对照射大鼠淋巴细胞凋亡及相关基因表达影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2004,24(1):33~34
- 3 彭波,许实波,许东晖,等. 褐藻多糖硫酸酯的抗凝和纤溶活性[J]. 中草药, 2001,32(11):1015~1018
- 4 滕霞,丛建波,田晓华,等. 海藻硫酸多糖抗氧化与抗肿瘤作用的实验研究[J]. 营养学报, 1998,20(1):48~52
- 5 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1999.11~12
- 6 强亦忠,王崇道,邵源,等. 海藻硫酸多糖的制备及其性质研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2003,23(4):391~393
- 7 [美]F. Ausubel著,颜子颖,王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1999.332
- 8 刘斌,王长云,张洪荣,等. 海藻多糖褐藻胶生物活性及其应用研究新进展[J]. 中国海洋药物杂志, 2004,23(6):36~41

Extraction of Fucose-containing Sulfated Polysaccharides (FSP) from *Undaria pinnatifida* by Supersonic Method

Tan Jieyi Wang Yifei Qian Chuiwen

(Guangzhou Jinan Biomedicine Research and Development Center, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT A new method—supersonic wave was applied to extract Fucose-containing sulfated polysaccharides (FSP) from *Undaria pinnatifida*. The technological parameters, such as volume ratio of liquid to solid, power of ultrasonic wave and processing time were investigated systemically. Using orthogonal experiment, the optimization extract condition of FSP was obtained. FSP extraction rate, polysaccharide content and sulfate group content increased by 23.59%, 30.92% and 13.94% respectively compared to that of traditional extraction method. Supersonic wave method can also decrease pigment solution and protein content in FSP.

Key words supersonic wave, fucose-containing sulfated polysaccharides(FSP), *Undaria pinnatifida* orthogonal experiment