

文章编号: 1004-7271(2005)01-0089-04

·研究简报·

影响紫菜多糖提取的几种因子

Several factors to affect primary extraction of polysaccharides from *Porphyra*

刘 凤, 顾中凯, 何培民

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

LIU Feng, GU Zhong-kai, HE Pei-min

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 多糖; 条斑紫菜; 提取量; 外界因素

Key words: polysaccharide; *Porphyra yezoensis*; ratio of extraction; factors

中图分类号: S 917 文献标识码: A

紫菜多糖是海藻类多糖中的一种,在结构上与肝素(hep)相似,都是多糖的硫酸酯类^[1]。周慧萍等^[2-5]研究发现紫菜多糖在抗凝血、降血脂、提高免疫力、抗衰老等方面都有一定的生物活性。张伟云等^[6]研究发现一种紫菜多糖能开发成为免疫抑制剂用于临床免疫亢进的治疗。Yoshizawa 等^[7]还发现条斑紫菜多糖具有激活巨噬细胞的功能,可提高肿瘤坏死因子(TNF)的产量。以上研究说明紫菜多糖可以开发为一种重要海洋药物。目前关于紫菜多糖提取的影响因子还缺乏系统的研究,因此本文主要对影响紫菜多糖粗提的重要外界因素进行研究,为今后紫菜多糖提取工艺和紫菜多糖药物研究提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)2003年1-3月采自江苏如东海区,经洗净后晾干,并保存在-20℃备用。

1.2 紫菜样品前处理

紫菜经60℃烘干2h,然后剪碎成3~5mm大小的细末。将细末装入索氏抽提器,置于水浴锅上加热,并用酒精回流3h,去除脂肪。结束后,将回流过的细末放置于白纸上自然阴干。

1.3 紫菜多糖的抽提方法

紫菜多糖的抽提方法参见文献^[8]。称5.00g紫菜,分别加入100mL,150mL,200mL,250mL,300mL溶液(即物液比1:20,1:30,1:40,1:50,1:60)恒温水浴3h,抽滤,残渣再次恒温水浴一定时间后,抽滤,合并两次抽提液。浓缩到一定的体积,待测。

1.4 紫菜多糖的测定

测定方法为苯酚-硫酸法^[9]。准确称取标准葡萄糖 20 mg 于 500 mL 容量瓶中,加水至刻度,分别取 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 1.6 及 1.8 mL,各以水补至 2.0 mL,然后加入 6% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL,静置 10 min,摇匀,室温放置 20 min 后于 490 nm 处测吸光值(OD),以 2.0 mL 水按同样显色作为空白,横坐标为多糖微克数,纵坐标为光密度值,制作标准曲线。提取液准确稀释一定倍数,吸取 1.0 mL (相当于 10 μg 左右的多糖),按上述步骤操作,测光密度,以标准曲线即可计算样品中多糖含量。然后计算出紫菜多糖提取量。

待测液浓度值 = (OD + 0.0084) / 0.006

多糖提取量 = (待测液浓度值 \times 稀释倍数 \times 提取液体积) / 原料的干重

1.5 实验设计

1.5.1 物液比

设 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60 7 个组,确定紫菜多糖提取物液比合适研究范围,然后以 1:30, 1:40, 1:50 设三个梯度组,每组 3 个平行。

1.5.2 温度

设 70 $^{\circ}\text{C}$, 90 $^{\circ}\text{C}$, 100 $^{\circ}\text{C}$ 3 个温度梯度组,每组 3 个平行。

1.5.3 pH 值

设 pH = 6, pH = 7, pH = 8 3 个梯度组,每组 3 个平行。

1.5.4 超声波

去脂后的紫菜在水煮前用超声波分别处理 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 然后按上述 1.3 的方法提取、测定。

1.5.5 浸提时间

第一次水煮时间为 3h, 第二次水煮时间为 2.5 h, 3.5 h (合计时间为 5.5 h, 6 h, 6.5 h), 合并两次抽提液,测定多糖提取量。

1.5.6 正交实验设计

pH 值(因素 A), 温度(因素 B), 物液比(因素 C), 时间(因素 D)为考虑因素,分别设 3 个水平,选用四因素三水平正交实验表 $L_9(3^4)$ 。因素水平安排见表 1,测定多糖的提取量作为最佳提取方案的考察指标。

2 结果

2.1 物液比对提取量的影响

物液比为 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60 时,各组多糖提取量的实验结果分别为 9.74%, 12.35%, 14.39%, 17.53%, 15.42%。可以看到,物液比为 1:50 时,多糖提取量为最高,可达到 17.53%。

2.2 温度对提取量的影响

70 $^{\circ}\text{C}$, 90 $^{\circ}\text{C}$, 100 $^{\circ}\text{C}$ 3 个温度梯度组下多糖的提取量分别为 15.15%, 18.98%, 19.46%。可以看出,随着温度的提高,多糖的提取量升高。从实验数据可看出,紫菜多糖提取量随着温度的上升而上升,温度达到 100 $^{\circ}\text{C}$ 时,紫菜多糖最高提取量为 19.46%。

2.3 不同 pH 对提取量的影响

在提取液 pH 值为 6, 7, 8 的前提下,分别在物液比 1:30, 1:40, 1:50 和 100 $^{\circ}\text{C}$, 90 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$ 温度条件下进行了多糖的提取,实验结果见图 1。

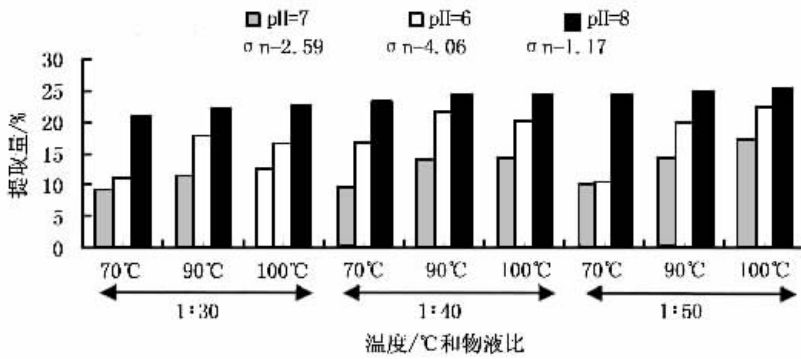


图1 各种情况下的提取量

Fig.1 The extraction content under all kinds of conditions

从图1中可以看出, pH对紫菜多糖的提取量影响较大, 其中 pH=8时多糖的提取量最高, 可以高达25.18%; 其次为 pH=6; pH=7时多糖的提取量最低, 仅为9.13%~17.4%。在 pH=8时, 多糖的提取量变化较小, 而在 pH=6和 pH=7时, 变化较大。在 pH=8、温度为100 °C、物液比为1:50时多糖提取量最高。

2.4 浸提时间对多糖提取量的影响

紫菜多糖第一次水浴提取3 h后, 抽提后的残渣进行第二次2.5, 3, 3.5 h的提取。结果发现在较少时间差范围内, 时间因素对多糖提取量的影响并不太大(见表1)。

2.5 超声波对多糖提取量的影响

在 pH=8、温度为100 °C、物液比1:50的条件下, 去脂后紫菜在水浴前用超声波分别处理10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 紫菜多糖提取量分别为22.68%, 28.57%, 27.71%, 27.13%。从得出的数据可以清楚地看到, 超声波振荡破碎对结果确有影响。从不振荡25.18%, 振荡10 min后达到26.68%, 20 min后达到最高峰28.57%。

2.6 正交分析

用正交实验设计分析各条件对多糖提取量影响程度, 结果见表1、表2:

表1 因素位极表

Tab.1 Factors on different positions

	A	B	C	D
因素	pH值	温度	物料比	时间
水平1	7 (A ₁)	100 °C (B ₁)	1:30 (C ₁)	5.5 h (D ₁)
水平2	6 (A ₂)	90 °C (B ₂)	1:40 (C ₂)	6 h (D ₂)
水平3	8 (A ₃)	70 °C (B ₃)	1:50 (C ₃)	6.5 h (D ₃)

3 讨论

影响多糖提取的因素主要是多糖向溶剂相扩散的容易程度及多糖在所使用溶剂中的溶解度的大小^[10]。在浸提过程中必须考虑物液比, 若浸出液太多, 不利于以后的分离; 若太少, 提取液粘稠, 提取不彻底^[10]。本实验在物液比1:50, T=100 °C时, 多糖提取量较高。另一方面多糖在溶剂中溶解度的大小与所使用的溶剂的理化性质有密切关系, 一般来说酸性多糖物质易溶于碱性溶剂中, 碱性多糖物质易溶于酸性溶剂中^[10]。在本实验采用物液比1:50, 同时在 pH=8时条件下提取多糖, 其多糖提取量较高, 可

高达到 25.18% ,同时多糖提取量也较稳定。此结果比史焯和史升耀^[11]文献的实验结果更高,他们在碱性条件下($\text{pH} = 8$)提取紫菜多糖量最高只达到 19.1% ,说明用高物液比(1:50),能够提高多糖提取量。当转为 $\text{pH} = 6$ 的酸性时,与 $\text{pH} = 7$ 对比,多糖提取量有不同程度的上升,但是波动较大。这可能是由于紫菜多糖中含有大量酸性多糖^[8],酸性多糖在酸性条件下不太稳定所造成的^[10]。

表 2 正交结果表

Tab.2 Grades of influence of different factors

实验号	A	B	C	D	对应提取量(%)
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	12.57
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	14.09
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	10.17
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	20.22
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	20.09
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	11.10
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	25.18
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	22.06
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	23.23
I	36.83	57.97	45.73	55.89	
II	51.41	56.24	57.54	50.37	
III	70.47	44.50	55.44	52.45	
R	33.64	13.47	11.81	5.52	

从表 2 中可见,在实验条件范围内,极差(R)显示其影响因子的影响程度依次排序为 $A > B > C > D$,即 pH 值对多糖提取结果影响最大,温度其次,物料比再次之,时间最小(仅指时间大约为半小时左右)。从正交实验结果看,第七实验号 $A_3B_1C_3D_2$ 条件下提取量最高。但考虑到对多糖后期活性的影响及其大规模提取的经济效益和经济成本,第九实验号 $A_3B_3C_2D_1$ 为最佳的选择,即处理条件为 $\text{pH} = 8$, $T = 70\text{ }^\circ\text{C}$; 物液比为 $= 1:40$,时间为 5.5 h,提取量可以达到 23.23%。

超声波提取多糖的过程是一个物理过程,浸提过程无化学反应,对生物活性物质活性影响不大,且可很大程度上提高多糖提取量^[12],本实验使用超声波 20 min,使多糖的提取量从 25.18% 提高到 28.57%,可见超声波处理可以很大程度上提高紫菜多糖提取量。

参考文献:

- [1] 崔秀生,宋晓虹. 紫菜多糖与天青 I 异染作用的研究[J]. 中国海洋药物,2000,19(3):28-30.
- [2] 周慧萍,陈琼华. 紫菜多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 中国药科大学学报,1989,20(4):231.
- [3] 周慧萍,陈琼华. 紫菜多糖对机体细胞的保护作用[J]. 中国药科大学学报,1989,20(6):340-343.
- [4] 周慧萍,陈琼华. 紫菜多糖的抗凝血和降血脂作用[J]. 中国药科大学学报,1990,21(6):358-360.
- [5] 周慧萍,陈琼华. 紫菜多糖对核酸蛋白质生物合成和免疫功能的影响[J]. 中国药科大学学报,1989,20(2):86-88.
- [6] 张伟云,周建峰,陈颢,等. 紫菜多糖对免疫细胞及肿瘤细胞生长的影响[J]. 生命科学研究,2002,6(2):167-170.
- [7] Yoshizawa Y, Ametani A, Tsunehiro J, et al. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility[J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(10):1933-1937.
- [8] 周慧萍,陈琼华. 紫菜多糖的提取、分离和鉴定[J]. 中国药科大学学报,1989,20(3):170-171.
- [9] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987. 124-128.
- [10] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州:华南理工大学,1996. 3-4.
- [11] 史焯,史升耀. 紫菜胶与紫菜琼胶[J]. 海洋科学,1994(1):48-52.
- [12] 赵兵,王玉春,欧阳藩,等. 超声波在药物提取中的应用[J]. 中草药,1999,30(9):1-3.