

文章编号: 1004-7271(2000)03-0276-04

·研究简报·

海带中褐藻糖胶的提取与纯化

Extraction and purification of fucoidan from *Laminaria japonica*

郭亚贞, 王 愷

GUO Ya-zhen, WANG Zao

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

(College of Food Science, SFU, Shanghai 200090, China)

关键词: 海带; 褐藻糖胶; 提取; 纯化

Key words: *Laminaria japonica*; fucoidan; extraction; purification

中图分类号: 985.4*1 文献标识码: A

目前, 海带工业的综合利用除了提取褐藻酸钠、碘及少量的甘露醇外, 很少涉及褐藻糖胶的利用, 而褐藻糖胶存在于提取液的废液中。文献报道褐藻糖胶具有抗凝血、澄清血脂、降低胆固醇和抑杀癌细胞等作用^[1,2]。本文对采自浙江象山台下礁海港海带的提取和纯化作比较研究, 从而为如何更好地利用我国的海带资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 原 料

海带(*Laminaria Japonica*), 1998年5月28日采于浙江象山台下礁海港, 烘干, 粉碎。

1.2 褐藻糖胶的提取方法

海带藻粉 → 热水浸提 → 离心 → 取上清液, 滤渣同样条件再提取1次 → 合并2次滤液 → 调节滤液 pH 至中性 → 减压浓缩 → 乙醇沉淀 → 无水乙醚、丙酮洗涤2次 → 真空干燥 → 褐藻糖胶粗品。

1.3 纤维素酶制剂对糖提取的影响实验

采用中科院上海生化所东风生化技术公司提供的每克含酶活在15000单位以上的纤维素酶制剂。作用条件为温度48~50℃, pH4.0, 加Zn²⁺、Mn²⁺和Mg²⁺各0.3%作激活剂^[3], 分别处理1.0和2.0h, 再于pH2.5、80℃提取3h测定提取液中岩藻糖含量及提取得率, 并以此表示褐藻糖胶的提取效果。

1.4 对褐藻糖胶提取不同影响因素的正交试验

采用四因素、三水平, 对各种温度(70、80、90℃)、时间(2、4、6h)、pH(1.5、2.5、3.5)以及加水量(10、15、20倍)条件下的提取进行正交实验, 测定滤液中岩藻糖含量, 并计算褐藻糖胶的得率。

1.5 纯化粗多糖的方法

(1) 季胺盐沉淀法提纯粗多糖

粗褐藻糖胶溶于水中, 加入4mol/L CaCl₂溶液, 离心去除相应的褐藻酸钙沉淀^[4], 上清液加5% CPC, 调节CaCl₂为0.5mol/L, 沉淀过夜, 次日离心, 收集沉淀, 溶于3.0mol/L CaCl₂中, 离心去除其中不

收稿日期: 2000-02-28

作者简介: 郭亚贞(1973-), 女, 浙江宁波人, 研究实习员, 硕士学位, 现在上海水产大学科研处从事科研管理工作。

溶物质,上清液加2倍体积95%乙醇,沉淀再次溶于3.0 mol/L CaCl_2 中,2倍体积乙醇沉淀,次日收集沉淀,无水乙醚、丙酮清洗2次,60℃真空干燥。

(2)乙醇重沉淀提纯粗多糖

2%多糖水溶液,加乙醇至体积分数30%,除去不溶物,继续加乙醇至70%,生成沉淀,依次用无水乙醚、丙酮洗2次,60℃真空干燥。

(3)Sevag法去蛋白

2%多糖水溶液,加入1/5样液体积的氯仿和1/20体积的正丁醇混合,充分振摇,用分液漏斗分离水相,重复操作直至氯仿和水的界面上没有沉淀为止^[5]。

1.6 葡聚糖凝胶柱层析法

Sephadex G-100在0.1 mol/L NaCl洗脱液中溶胀平衡,湿法装柱(2.6 cm × 56 cm)。洗脱液平衡,上样,按10 mL/h的流速,每20 min收集一管,硫酸-苯酚法^[6]监测至无糖检出为止。

1.7 纯度鉴定方法

(1) Sephadex G-100鉴定:操作如1.6葡聚糖凝胶柱层析法。

(2) 醋酸纤维薄膜鉴定:方法见文献^[6]。

1.8 基本化学成分测定方法

岩藻糖含量测定参照文献^[7];糖醛酸含量测定参照文献^[8];硫酸基含量测定的浊度法按照文献^[9];蛋白质含量测定按照文献^[10]的方法。

2 结果与讨论

2.1 不同提取条件对褐藻糖胶的影响

提取条件的选择,不仅直接影响到产品的得率,而且对产品的质量和纯度也会产生一定的影响^[11]。在多糖提取中,较重要的影响因子有温度、酸碱度、时间以及藻粉与提取液的比例等。实验中设计了这些因素与提取率之间的变化曲线,并进一步进行了正交实验。另外还对纤维素酶制剂的最佳作用条件进行了实验。

2.1.1 温度对多糖提取的影响

不同温度提取时糖质量浓度的变化如图1所示。从图1可见,随温度的提高,糖质量浓度不断增加,在80℃时,增加较明显,以后又趋平缓。

2.1.2 pH对多糖提取的影响

pH对提取液中糖质量浓度的影响见图2所示。由图2可见,在pH 2.5,糖质量浓度最大,以后随着pH继续增大,多糖的提取效果又开始下降了,所以实验选取pH 2.5左右来提取多糖。

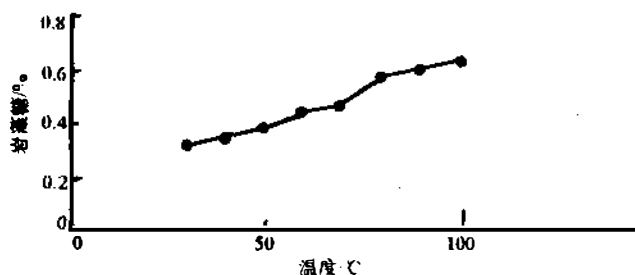


图1 温度对多糖提取的影响

Fig.1 The effect of extracting temperature on fucoidan extraction

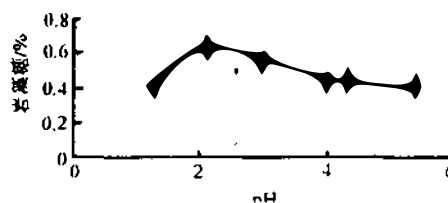


图2 pH对多糖提取的影响

Fig.2 The effect of extracting pH on fucoidan extraction

在王作芸等^[11]提取铜藻中褐藻糖胶的实验中,pH 4.0是最佳条件,Black等^[12]对墨角藻(*F. Vesiculosus*)的实验结果,证实在其它因子均相同的条件下,pH 2.3时的提取率高于pH 4.5时,本实验中pH 2.5左右为最佳,这种差别可能是因为不同藻的褐藻糖胶溶解特性不同而造成的。

2.1.3 时间对多糖提取的影响

时间对多糖提取的影响见图3。由图3可见,6h后再延长提取时间,对提取率没有显著的影响,故提取时间定为6h。

2.1.4 纤维素酶制剂对多糖提取的影响

纤维素酶制剂对多糖提取的影响结果如表1所示。硫酸多糖是存在于细胞间的多糖,由表1可见,纤维素酶能有效地破坏藻体,使细胞间多糖释放出来。在104.0U/g酶量、pH 4.0、温度50℃作用1h,再于80℃、pH 2.5盐酸溶液中提取3h,可获较好的提取效果。与不加酶的提取结果相比较,加酶的作用还是比较明显的。

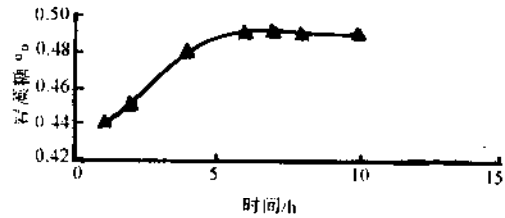


图3 时间对多糖提取的影响

Fig.1 The effect of extracting time on fucoidan extraction

表1 不同酶条件对多糖提取的影响

Tab.1 The effect of different conditions of enzyme treatment on fucose extraction

编号	酶用量 (U/g)	pH 4.0, 50℃, 酶处理时间(h)	pH 2.5 盐酸溶液 80℃, 提取时间(h)	粗糖得率 (%)	岩藻糖含量 (%)
1	208.3	1.0	3.0	6.05	2.99
2	104.0	1.0	3.0	6.21	3.05
3	62.5	1.0	3.0	6.03	2.91
4	104.0	2.0	2.0	4.32	0.87
5	62.5	2.0	2.0	5.28	1.28
6	20.8	2.0	2.0	4.13	0.95
7	0	-	4.0	3.74	0.76

2.1.5 褐藻糖胶提取不同影响因素的正交实验分析

对不同pH(1.5、2.0、2.5)、不同温度(70、80、90℃)和不同加水量(10、15、20倍)进行正交实验,确定多糖提取的最适条件。从正交结果可得出:时间、pH、温度、加水量四因素对多糖提取效果的影响按照从大到小依次为时间、温度、pH、加水量。

综合考虑药品的消耗以及提取率之间的关系,筛选出本实验的最佳提取条件为pH 2.5,温度80℃,加水量10倍,时间6h。

2.2 不同酒精度对多糖回收率的影响

粗多糖配成2%糖水溶液,加入65%~80%之间的不同体积分数酒精来回收多糖,计算回收得率,结果见表2。从表2看,酒精体积分数达到75%以后,再增大酒精体积分数,对回收效果来说,已无显著作用,所以在今后的实验中,酒精量添加为75%体积分数。

表2 不同酒精浓度对回收多糖的影响

Tab.2 The effect of different alcohol concentration on recycling fucoidan

酒精度(%)	65	70	75	80
回收率(%)	80.5	81.9	86.7	87.0

2.3 用葡聚糖凝胶柱层析进一步纯化

季胺盐纯化多糖经自来水、蒸馏水透析,浓缩,干燥后得到多糖上G-100柱,收集第17-31管,经透析,浓缩,再上G-100柱。每次监测洗脱液中糖浓度变化,结果分别见图4、图5。

由图4、5结果可得出,第1次柱层析图谱峰较宽,有拖尾现象,第2次上柱之后峰较尖;两次柱层析得到单一峰部分的多糖和第一次柱层析得到多糖经醋酸纤维薄膜电泳检验,前者斑点有拖尾现象,后者呈一规则圆斑点,说明多次上柱得到样品纯度更高;第二次上柱后收集纯多糖,岩藻糖含量44.4%,总糖含量68.7%(包括硫酸咔唑法测得糖醛酸含量6.4%),硫酸基19.7%;硫酸基与总糖(包括糖醛酸)的摩尔比为1:2,即二摩尔的糖残基上连有一摩尔的硫酸基;蛋白质含量为0.23%,这与刘晓蕙和张翼伸^[13]测得海带褐藻糖胶F2级分含蛋白质0.3%的结果相近。

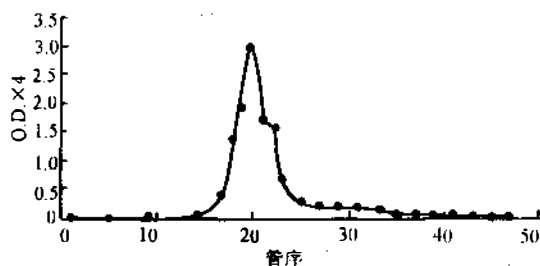


图4 第一次经 Sephadex - G 柱层析图谱

Fig.4 The first chromatogram
with Sephadex - G column

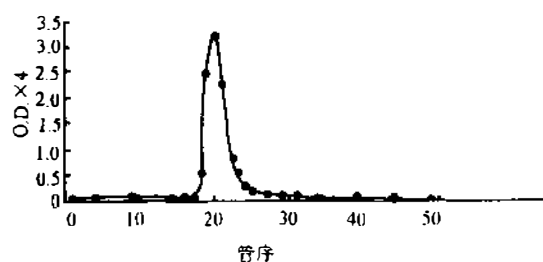


图5 第二次经 Sephadex - G 柱层析图谱

Fig.5 The second chromatogram
with Sephadex - G column

2.4 各种纯化方法的比较

原料藻粉经 Lowry 法测得蛋白质含量 8.2%, 经过 5 次 Sevag 法^[6]去蛋白后测定其中蛋白质含量为 3.7%, 经过季胺盐沉淀法所得多糖含蛋白质为 3.9%。由此可见, 该海带藻粉本身含蛋白质质量较少, 在季胺盐法纯化过程中, 部分蛋白质可能夹杂在褐藻酸钙沉淀中去除, 而用 Sevag 法^[6]去蛋白操作较繁琐, 时间长, 同季胺盐法相比, 去蛋白效果未见特别彻底, 所以在以后的实验操作中不采用 Sevag 法去蛋白。

参考文献:

- [1] 西洋一俊. ガンと海藻[J]. 食品と科学, 1992, 25(3): 32-38.
- [2] 酒井武, 加藤郁之进. 昆布由来フコイダンの特性と食品への利用[J]. 食品と科学, 1998, 6: 89-93.
- [3] 卢睿春, 刘婉乔, 侯振建, 等. 酶法提取马尾藻硫酸多糖的研究[J]. 中国海洋药物, 1997, 62(2): 10-13.
- [4] 西出英一, 冢山贵以子. ガゴメコンブのフコメ含有多糖からの水溶性アルギンの除去[J]. 日本水产学会志, 1982, 48(12): 1771-1773.
- [5] 曹培让, 吴祖道, 王汝聪. 金针菇子实体多糖 PA3DE 的分离、纯化和分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 1989, 21(2): 152-156.
- [6] 张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术[J]. 上海: 上海科技出版社, 1987. 11-13.
- [7] Gibbons M N. The determination of methylpentoses[J]. Analyst, 1955, 80: 267-276.
- [8] Bitter T, H M Muir. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Anal Biochem, 1962, 4: 330-334.
- [9] Dodgson K S, R G Price. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides[J]. Biochem J, 1962, 84: 106-110.
- [10] Lowry R F, Randall. Protein measurement with the Folin Phenol reaction[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [11] 王作芸, 赵学武. 铜藻的褐藻糖胶、褐藻淀粉和褐藻胶的分离及提纯[J]. 水产学报, 1985, 9(1): 71-77.
- [12] Black W A P, E T Dewar, F N Woodward. Manufacture of algal chemical (III)-Laboratory-scale isolation of fucoidan from brown marine algae[J]. J Appl Chem, 1951, (1): 505-517.
- [13] 刘晓蕙, 张翼伸. 海带中褐藻糖胶的分级纯化与结构研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(4): 297-302.