

超声波酶解法提取鼠尾藻多糖

丁昌玲 孙修涛 王飞久* 梁洲瑞 汪文俊 李 涛

(农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 采用超声波及纤维素酶解法提取鼠尾藻多糖,探讨了功率、酶量、温度、时间对鼠尾藻多糖制备的影响,运用单因素设计正交试验,得出 4 种因素对鼠尾藻多糖提取的影响程度由大到小分别是时间、温度、超声波功率、酶量,优化得到最佳提取条件为超声波功率 300 W、酶量 3%、温度 50 °C、时间 15 min;并通过对比分析,得出添加纤维素酶比对照组提取率提高 37.03%。

关键词 鼠尾藻 多糖 超声波 纤维素酶

中图分类号 S986.1 文献识别码 A 文章编号 1000-7075(2011)06-0092-07

Extraction of polysaccharides from *Sargassum thunbergii* by cellulase hydrolysis and ultrasound

DING Chang-ling SUN Xiu-tao WANG Fei-jiu*

LIANG Zhou-rui WANG Wen-jun LI Tao

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The extraction of polysaccharides from *Sargassum thunbergii* by cellulase hydrolysis and ultrasound was studied. Effects of four factors including ultrasonic power, cellulase concentration, extraction time and extraction temperature were discussed. On the basis of single factor analysis, the optimal operation variables were described through orthogonal experiment. Results indicated that influence of factors on the extraction were in the following order: extraction time, extraction temperature, ultrasonic power, and cellulase concentration. The optimal condition for extraction were: 300 W ultrasonic power, 3% cellulase, 50 °C and 15 min. Moreover, the cellulase addition increased the extraction rate by 37.03% compared with the control group.

KEY WORDS *Sargassum thunbergii* Polysaccharide Ultrasonic Cellulase

鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* 是一种重要的经济褐藻,它是北太平洋西部特有的暖温性海藻(曾呈奎等 1962),在我国北起辽东半岛、南至雷州半岛均有广泛分布,是我国沿海常见的一种褐藻(王飞久等

国家“863”项目(2006AA10A416;2012AA100813)和公益性行业(农业)专项(200903030)共同资助

* 通讯作者。E-mail: wangfj@ysfri. ac. cn

收稿日期:2011-01-16;接受日期:2011-09-19

作者简介:丁昌玲(1983-),女,硕士,主要从事海洋生物学研究。E-mail:dingcl0405@163. com, Tel: (0532)85838673

2006)。

鼠尾藻已被应用到各个领域,鼠尾藻多糖是一种易溶于水、粘稠度较高的多糖,许多人针对鼠尾藻多糖和活性物质的抗肿瘤活性机理及清除氧自由基等开展了工作(Ito *et al.* 1976; Yasantha *et al.* 2006; 王学琦等 1992; 张尔贤等 1995; 赵兵等 1999)。从褐藻中提取的生物活性物质具有重要的药用价值(李玉山等 1996; 俞丽君等 1990; 韩晓第等 2005),其中褐藻多糖具有抗氧化、抑制 HIV 病毒活性等作用,其在增强机体免疫等功能上具有重要研究和应用价值(Zhang *et al.* 1995; Farias *et al.* 2001; Tziveleka *et al.* 2003)。在海藻生物活性提取、分离与纯化方面的研究也屡见报道(王华祖 2004; 王凌云 2003; 叶红 2008),应用超声波技术提取海藻多糖已取得一定的效果,谭洁怡等(2006)从裙带菜中提取褐藻多糖硫酸酯,王永良等(2010)从异枝麒麟菜中提取硫酸酯多糖,王以斌等(2009)以酶解辅助超声波提取螺旋藻多糖。但以鼠尾藻为原料进行多糖提取等工艺方面的报道很少。因此本研究拟用超声波及纤维素酶解方法,进行鼠尾藻多糖的制备,获得相关参数,为后续的规模制备和工艺提供参考。

1 实验材料

1.1 藻体预处理

实验材料为鼠尾藻,2010年10月采自青岛太平角。在过滤海水中将鼠尾藻体冲洗3遍,至洗净藻体表面的杂质,再用蒸馏水冲洗两遍,然后放入烘干箱。在温度为50℃、时间为6h的条件下烘干至恒重。取出风干好的藻体,用超微粉碎机粉碎,再用60目筛绢过滤,获得鼠尾藻粉,干燥条件下保存以备后续处理。

1.2 实验仪器与试剂

1.2.1 试验仪器

FDV 高速风选式超微粉碎机, JY92-II 超声波细胞粉碎机, OHG-9073BS-III 型电热恒温鼓风干燥箱, CP214 电子天平, KW-1000DC 数显恒温水浴锅, UV-2802 型分光光度计, pHS-2F pH 计, 800 型低速离心机。

1.2.2 试验试剂

纤维素酶(绿色木霉,酶活力 $\geq 15\ 000\text{U/g}$,国药集团化学试剂有限公司)、葡萄糖、苯酚、3,5-二硝基水杨酸、氢氧化钠、酒石酸钾钠、亚硫酸钠、三氯乙酸(以上化学试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司)、浓硫酸(分析纯,莱阳精细化工厂)。

1 mg/ml 葡萄糖标准溶液:精密称取 105℃干燥至恒重的无水葡萄糖 100 mg,置 100 ml 容量瓶中,加适量水溶解,稀释至刻度,摇匀,即得 1 mg/ml 葡萄糖溶液。

DNS 试剂配制的具体步骤:称取酒石酸钾钠 185.0 g,溶于 500 ml 蒸馏水中,加热至 45℃,于热溶液中依次加入 3,5-二硝基水杨酸 6.3 g,2 mol/L 氢氧化钠溶液 262 ml,苯酚 5.0 g,亚硫酸钠 5.0 g,搅拌至溶解完全,冷却后用蒸馏水定容至 1 000 ml,贮存于棕色瓶中,室温保存,稳定 7 d 后使用。

2 实验方法

2.1 多糖提取流程

称取鼠尾藻干粉 1 000 mg,按体积比为 1:30 加入蒸馏水浸泡 1h 后,调节 pH 至 5.0,按酶量 mg/藻粉 mg 的质量百分比加入纤维素酶,在不同的功率、时间、温度下破壁提取。然后即刻放入 80℃水浴提取 2 h 后,迅速冷却至室温,以 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液,加入终浓度为 3% 的三氯乙酸除去溶液中蛋白质,再以 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液定容到 50 ml,作为检测样品。提取方法主要参照文献(王华祖 2004;

谭洁怡等 (2006)。

2.2 褐藻多糖含量的测定

本研究根据多糖含量=总糖含量-还原糖含量的原则,先用苯酚-硫酸法测定总糖含量,再用3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量。褐藻多糖提取率=(多糖含量/干粉重) \times 100%。

2.2.1 总糖含量测定

2.2.1.1 葡萄糖标准曲线的制作

精确量取质量浓度为1 mg/ml的葡萄糖标准溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,用蒸馏水分别补至1.0 ml,各精确加入5%苯酚溶液1 ml,摇匀,迅速精密滴加浓硫酸5 ml,摇匀,定容至7 ml,静置10 min,在40℃中水浴20 min,在最大吸收波峰490 nm处测定吸光值,以蒸馏水做空白试验,以光密度值为纵坐标,以糖质量浓度为横坐标,得到葡萄糖质量浓度-吸光度标准曲线(图1)。

2.2.1.2 样品液总糖含量的测定

取样品液1.0 ml,用于多糖含量测定,其具体步骤同标准曲线操作。根据标准曲线计算糖含量。

2.2.2 还原糖含量的测定

2.2.2.1 葡萄糖标准曲线的制作

精确量取质量浓度为1 mg/ml的葡萄糖标准溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,用蒸馏水分别补至1.0 ml,加入1.5 ml DNS试剂,摇匀,在沸水中加热5 min,放入烧杯,冷水降温到室温,然后定容至20 ml。在540 nm处测定吸光值,以蒸馏水为空白对照,得到葡萄糖质量浓度-吸光度标准曲线(图2)。

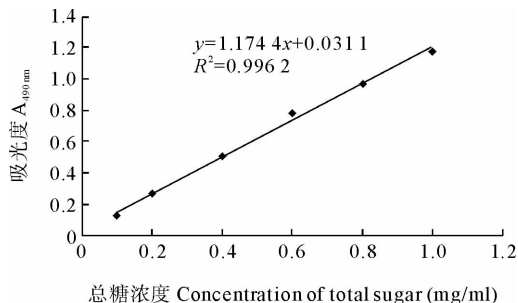


图1 总糖含量的葡萄糖测定标准曲线

Fig.1 Standard curve of tested glucose content from the total sugar

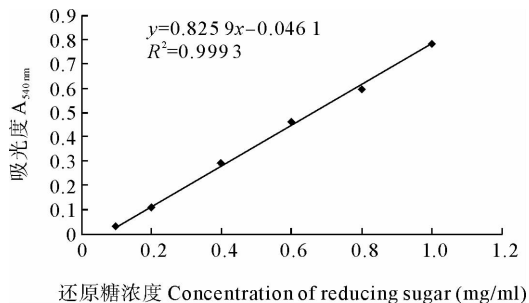


图2 还原糖含量测定标准曲线

Fig.2 Standard curve of the tested glucose contents from the reducing sugar

2.2.2.2 样品液还原糖含量的测定

取样品液1.0 ml,测定多糖含量的具体步骤同以上标准曲线操作,根据标准曲线计算还原糖含量。

2.3 单因素试验

本研究以超声波功率、纤维素酶量、时间和温度4个单因素,进行试验(表1)。另外,在功率300 W、温度50℃、时间10 min时,对比分析了加酶量3%与不加纤维素酶条件下提取率的变化。

2.4 正交试验

整合上面单因子试验结果,以酶量、超声功率、时间、温度为4个因素,设计了4因素3个水平的正交试验,优化适宜的提取条件(表2)。

表 1 鼠尾藻多糖提取单因素试验

Table 1 Single factor test of the extraction of polysaccharide from *S. thunbergii*

单因素 Single factor	单因素梯度 Single factor degrees					条件 Condition
超声波功率(W) Ultrasonic power (W)	100	200	300	400	500	温度为 30 ℃、时间为 10 min、酶量为 1%
纤维素酶量(%) Cellulase concentration (%)	0.5	1	2	3	4	功率为 300W、温度为 30 ℃、时间为 10 min
温度(℃) Extraction temperature (℃)	20	30	40	50	60	功率为 300 W、时间为 10 min、酶量为 1%
时间(min) Extraction time (min)	5	10	15	20	25	功率为 300 W、温度为 30 ℃、酶量为 1%

表 2 鼠尾藻多糖提取正交试验因素水平

Table 2 Factors and levels in the orthogonal test of the extraction of polysaccharide from *S. thunbergii*

水平 Level	因素 Factor			
	A: 超声波功率(W)	B: 酶量(%)	C: 温度(℃)	D: 时间(min)
	A: Ultrasonic power (W)	B: Cellulase concentration(%)	C: Temperature(℃)	D: Time (min)
1	200	1	30	10
2	300	2	40	15
3	400	3	50	20

3 结果与分析

3.1 不同条件对多糖提取的影响

3.1.1 超声波功率对多糖提取的影响

分别在不同功率条件下提取鼠尾藻多糖,超声波功率小于 300W 时,随着功率的增大,超声波产生的空化作用增强,多糖提取率不断提高,如图 3 所示。当功率达到 400W 时,提取率达到最大值,当功率继续增大,超声波作用进一步加强,提取率的变化趋于平缓,提取率开始有下降的趋势。这主要是由于功率变大时提取液流动加速,缩短了提取物在超声场中的时间,减弱了超声波的破壁作用,从而导致了提取率的降低(王永良等 2010;张昌军等 2007)。

3.1.2 纤维素酶对多糖提取的影响

3.1.2.1 加入纤维素酶时提取多糖

以不同纤维素酶量分别提取多糖,结果如图 3 所示。利用纤维素酶水解细胞壁纤维素有利于细胞中多糖溶出。多糖提取率随酶量的增加而增加,酶量小于 2% 时,多糖提取率的增加幅度较大,酶量大于 2% 时,多糖提取率的增加幅度变小,这说明在酶量为 2% 时,纤维素酶与其底物达到饱和,细胞破壁的速率达到最大。酶量大于 2% 时,酶浓度大于其作用底物浓度,一部分纤维素酶不能与底物发生作用,细胞破壁的速率变小,因此多糖提取率增加变得缓慢。

3.1.2.2 未加纤维素酶时提取多糖

为探讨纤维素酶在多糖提取中的作用,将加入纤维素酶的鼠尾藻提取液与未加纤维素酶的鼠尾藻提取液进行多糖含量测定,得到相应的多糖提取率(表 3)。可以看出,加入纤维素酶后多糖提取率比未加纤维素酶时提高了 37.03%。纤维素酶的作用是分解植物细胞壁中的纤维素,改变细胞的通透性,使细胞内的多糖更容易释放出来(张华芳等 2006)。在提取多糖时加入适量的纤维素酶辅助细胞破壁,将会明显提高多糖的得率。

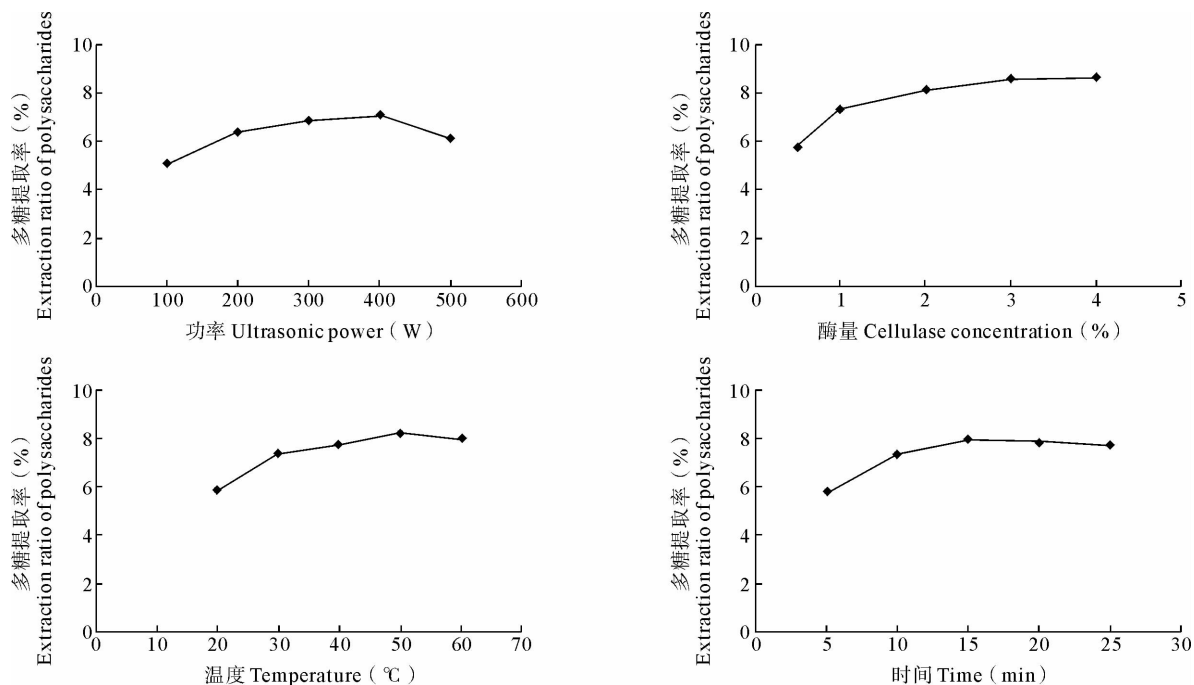


图3 4个因素条件对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of four factors on the extraction of polysaccharides

表3 加入纤维素酶与未加纤维素酶对鼠尾藻多糖提取率的对比分析

Table 3 Comparison between with cellulase and without cellulase condition on the extraction of polysaccharides

提取条件 Factor	功率(W) Ultrasonic power	酶量(%) Cellulase concentration	温度(°C) Temperature	时间(min) Time	提取率(%) Extraction rate
加入纤维素酶 With cellulase	300	3	30	10	7.29
未加纤维素酶 Without cellulase	300	0	30	10	5.32

3.1.3 温度对多糖提取的影响

温度条件下多糖提取率的变化趋势较为明显,由图3可以看出,温度低于40℃时,多糖提取率随时间的增加而增加,多糖提取率增加幅度较大,当温度为40℃时,提取率达到最大,温度大于40℃时,多糖提取率开始降低,这主要是温度升高时酶活性增大,当达到最适温度时酶活性最高,多糖提取率达到最大,温度继续升高,酶活性开始降低,甚至失去酶活性,导致多糖提取率随之降低。可以看出,在温度为40℃时,反应体系中酶活性达到最大,多糖提取率相应达到最大值。

3.1.4 提取时间对多糖提取的影响

通过在5个不同时间条件下作多糖提取实验可知,多糖提取率随提取时间的长短而变化,如图3所示,在时间为5~20 min时,提取时间越长,多糖提取率越大,时间小于15 min时,多糖提取率增加幅度较大,在15 min以后多糖提取率增幅变化不大。可见,短时间内超声波酶解提取多糖效果较为显著。

3.2 超声波酶解法提取多糖的条件优化

根据正交试验(表4)R值大小可以判断,4个因子对鼠尾藻多糖提取的影响程度由大到小分别是时间(D)、温度(C)、超声波功率(A)、酶量(B),由此推断,时间是提取的关键因素。最优提取条件为A2 B3 C3 D2,即:超声功率300 W、酶量3%、温度50℃、时间15 min。在一定范围内,酶量越大,温度越高,鼠尾藻多糖提取率越大,纤维素酶降解细胞壁,温度越高使得多糖物质容易溶出。超声波功率过大或超声时间过长,均会引起

多糖提取率的下降,其原因可能是功率太大会导致破壁作用减弱,时间过长会引起多糖结构断裂(王永良等 2010;张昌军等 2007;尹 艳等 2007)。

表 4 超声波酶解法提取鼠尾藻多糖的正交试验

Table 4 Orthogonal experiment table of the extraction of polysaccharide from *S. thunbergii* by ultrasonic-enzymatic method

实验号 Test number	功率(W) Ultrasonic power (W)	酶量(%) Cellulase concentration (%)	温度(°C) Temperature (°C)	时间(min) Time (min)	多糖提取率 Extraction rate of polysaccharides
1	1(200)	1(1)	1(30)	1(10)	7.29
2	1	2(2)	2(40)	2(15)	8.53
3	1	3(3)	3(50)	3(20)	8.74
4	2(300)	1	2	3	8.11
5	2	2	3	1	8.36
6	2	3	1	2	8.92
7	3(400)	1	3	2	8.61
8	3	2	1	3	7.28
9	3	3	2	1	7.37
k1	8.187	8.003	7.830	7.673	—
k2	8.463	8.057	8.003	8.687	—
k3	7.753	8.343	8.570	8.043	—
R	0.710	0.340	0.740	1.014	—
排序 Sequence		D>C>A>B			—
最佳水平 Optimal level	A2	B3	C3	D2	—
最佳组合 Optimal combination		A2 B3 C3 D2			—

4 讨论

应用超声波提取多糖主要借助于其特殊的机械振动和空化效应,是一种物理破碎过程。通过超声波振动产生的强大能量,加快多糖物质的扩散,同时超声空化作用使介质结构发生变化,物质扩散速度增加,促使有效成分更易进入溶剂中,由此可提高提取或浸出速度 2~10 倍(王铮敏 2002;葛 飞 1999)。应用超声波技术提取多糖,具有操作简单、提取率高的优势。纤维素酶通过水解细胞壁促进多糖溶出,进而提高提取率。本研究采用超声波与纤维素酶结合方法在优化条件下多糖提取率可达 8.92%,比采用酸、碱和热水浸提法相比具有更为突出的效果(卞 俊等 2002;王华祖 2004),比仅用超声波处理而未加纤维素酶条件下(杨方美等 2005;张胜帮等 2009)提取率明显提高,可见应用超声波与纤维素酶结合的方法提取鼠尾藻多糖具有明显优势。

5 小结

本研究通过单因素试验和正交优化试验得到超声波与纤维素酶法提取鼠尾藻多糖的最佳条件,即为超声功率 300 W、酶量 3%、温度 50 °C、时间 15 min,提取率比同条件下未加纤维素酶提高了 37.03%;4 个因素对鼠尾藻多糖提取的影响程度由大到小分别是时间>温度>超声波功率>酶量。

参 考 文 献

- 王飞久,孙修涛,李 锋. 2006. 鼠尾藻的有性繁殖过程和幼苗培育技术研究. 海洋水产研究, 27(5):1~6
- 王以斌,梁 强,何碧娟,黄 灿. 2009. 螺旋藻多糖酶解辅助超声波提取工艺的优化. 现代农业科技, 8:234~235
- 王华祖. 2004. 羊栖菜褐藻糖胶的分离纯化及性质研究. 见:浙江大学硕士研究生学位论文
- 王永良,范 贤,李玉兰,叶彩平,岑颖洲,许少玉. 2010. 超声辅助提取异枝麒麟菜硫酸酯多糖的工艺优化. 食品科学, 31(6):6~10
- 王学琦,张尔贤. 1992. 鼠尾藻多糖对人粒细胞超氧阴离子自由基释放的影响. 中国海洋药物, 11(2):4~6
- 王凌云. 2003. 羊栖菜多糖的提取工艺、化学结构及部分生物活性研究. 见:暨南大学硕士研究生学位论文
- 王铮敏. 2002. 超声波在植物有效成分提取中的应用. 三明高等专科学校学报, 19(4):45~53
- 卞 俊,吴越芳,张吉德,肖 靖. 2002. 羊栖菜多糖不同提取工艺的初步比较. 中华航海医学与高气压医学杂志, 9(3):187~188
- 尹 艳,高文宏,于淑娟. 2007. 多糖提取技术的研究进展. 食品工业科技, 2:248~250
- 叶 红. 2008. 马尾藻多糖的分离纯化、生物活性及结构分析. 见:南京农业大学博士研究生学位论文
- 李玉山,崔 征,殷 军,张晓伟. 1996. 7种马尾藻属海藻碘及微量元素的含量测定. 中国海洋药物, 4:35~57
- 杨方美,王 林,胡秋辉. 2005. 鼠尾藻多糖的制备及其抗氧化活性. 食品科学, 26(2):224~227
- 张尔贤,俞丽君,肖 湘. 1995. 多糖类物质对 O_2^- 和 OH^- 的清除作用. 中国生化药物杂志, 16(1):9~11
- 张华芳,金京顺,谈荣梅,沈 澄. 2006. 正交试验法优选羊栖菜多糖酶法提取工艺. 中国中药杂志, 31(22):1 860~1 862
- 张昌军,原方圆,邵红兵. 2007. 超声波法在提取多糖类化合物中的应用研究. 化工时刊, 21(2):54~56
- 张胜帮,麻卫锋,于 萍. 2009. 羊栖菜多糖提取分离及其清除自由基的活性研究. 食品科学, 30(18):192~195
- 赵 兵,王玉春,孙学兵,欧阳藩,闭静秀,伍志春. 1999. 循环气升式超声破碎鼠尾藻提取海藻多糖. 中国海洋药物, 4:19~23
- 俞丽君,张尔贤,陈洁辉,肖 湘. 1990. 海藻多糖的实验研究——Ⅲ 鼠尾藻与铜藻多糖的分离与纯化. 汕头大学学报(自然科学版), 5(1):55~60
- 葛 飞. 1999. 超声波技术在食品工业中的应用. 肉类工业, 9:43~45
- 韩晓弟,李岚萍. 2005. 鼠尾藻特征特性与利用. 特种经济动植物, (1):27
- 曾呈奎,张德瑞,张峻甫. 1962. 中国经济海藻志. 北京:科学出版社, 56~58
- 谭洁怡,王一飞,钱垂文. 2006. 超声波法提取裙带菜中褐藻多糖硫酸酯的工艺研究. 食品与发酵工业, 32(1):115~117
- Farias, W. R., Nazareth, R. A., and Mourao, P. A. 2001. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. Thromb Haemostasis, 86:1 540~1 546
- Ito, H., and Sugiura, M. 1976. Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thunbergii*. Chem. Pharm. Bull. 24(5):1 114~1 115
- Yasantha, A., Won-Kyo, J., Thava, V., and You-Jin, J. 2006. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. Carbohydr Polym. 66:184~191
- Tziveleka, L., Vagias, C., and Roussis, V. 2003. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. Curr. Top. Med. Chem. 3:1 512~1 535
- Zhuang, C., Itoh, H., Mizuno, T., and Ito, H. 1995. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(4):563~567