



引用格式:李艳,宁厚齐,李迎秋.海藻渣中岩藻聚糖硫酸酯提取工艺优化[J].轻工学报,2020,35(6):9-15.

中图分类号:TS209 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.06.002

文章编号:2096-1553(2020)06-0009-07

海藻渣中岩藻聚糖硫酸酯提取工艺优化

Optimization of extraction process of fucoidan sulfate from seaweed residue

李艳,宁厚齐,李迎秋

LI Yan, NING Houqi, LI Yingqiu

齐鲁工业大学(山东省科学院)食品科学与工程学院,山东 济南 250353

School of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Science), Ji'nan 250353, China

关键词:

岩藻聚糖硫酸酯;海藻渣;酸提法;Dische比色法

Key words:

fucoidan sulfate;
seaweed residue;
acid extraction method;
Dische colorimetric
method

摘要:以海藻渣为原料,采用酸提法提取岩藻聚糖硫酸酯,通过单因素试验和正交试验优化提取工艺条件,并结合 Dische 比色法筛选最优的乙醇沉淀体积分数,以实现岩藻聚糖硫酸酯粗品的纯化.结果表明:采用酸提法提取海藻渣中岩藻聚糖硫酸酯的最佳工艺条件为 HCl 浓度 0.25 mol/L,提取温度 50 ℃,提取时间 2 h,料液比 1:10,在此条件下,岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率为 1.89%;结合 Dische 比色法筛选出最优的乙醇沉淀体积分数为 70%,此时岩藻聚糖硫酸酯的质量浓度达到最大值,为 3.12 μg/mL.

收稿日期:2020-06-04

基金项目:国家自然科学基金项目(31371839);山东省重点研发计划项目(2018YYSP001)

作者简介:李艳(1997—),女,山东省济宁市人,齐鲁工业大学硕士研究生,主要研究方向为食品生物技术.

通信作者:李迎秋(1972—),女,山东省菏泽市人,齐鲁工业大学教授,博士,主要研究方向为食品生物技术.

Abstract: Using seaweed residue as raw material, the fucoidan sulfate was extracted by acid extraction. The extraction process conditions were optimized through single factor experiment and orthogonal experiment. In order to achieve the purification of the crude fucoidan sulfate, the optimal ethanol precipitation volume fraction was screened in combination with the Dische colorimetric method. The results showed that the optimal process conditions for extracting fucoidan sulfate from seaweed residue by acid extraction were HCl concentration 0.25 mol/L, extraction temperature 50 °C, extraction time 2 h, and material-liquid ratio 1 : 10. The extraction rate of crude fucoidan sulfate was 1.89%. Combined with the Dische colorimetric method, the optimal ethanol precipitation volume fraction was 70%. At this time, the mass concentration of fucoidan sulfate reached the maximum, which was 3.12 μg/mL.

0 引言

海藻是指生长在潮间带及亚潮间带肉眼可见的大型藻类,主要包括褐藻(海带、裙带菜、鹿角菜等)、绿藻(扁藻、小球藻、孔石莼等)和红藻(紫菜、石花菜、海萝等)三大类。海藻富含褐藻胶、碘、甘露醇、氯化钾、褐藻淀粉等,可作为食品或医药工业原料,具有极高的经济利用价值。在褐藻胶、碘、甘露醇等的生产过程中,海藻经过浸泡、漂洗、粉碎、干燥等工序处理后,会留下大量的海藻残渣。由于缺乏科学利用的意识,这些海藻残渣或被用作饲料,或被用作肥料,甚而被作为工业废弃物丢弃,既造成了资源的浪费,也加重了沿海环境的污染^[1]。

岩藻聚糖硫酸酯,又名褐藻多糖硫酸酯或褐藻糖胶,通常提取分离自海带等褐藻,是一种分子量约为 10 ~ 100 kDa 的水溶性杂聚多糖,主要由含硫酸基的 L - 岩藻糖 (Fucose) 组成,也含有少量的半乳糖、甘露糖、糖醛酸等,其主要有效成分为 α - L - 岩藻糖 - 4 - 硫酸酯。岩藻聚糖硫酸酯是一种优质的健康食品和药品原料,因含有天然硫酸根,故具有阴离子高分子化合物的特性。研究表明,岩藻聚糖硫酸酯具有多种生理活性,如降血脂、抗慢性肾衰、抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、促进组织再生、增强机体免疫功能等^[2-6]。

实验室常用的提取岩藻聚糖硫酸酯的方法主要有酸提法、热水提取法、CaCl₂ 提取法等。根

据岩藻聚糖硫酸酯的水溶特性, M. E. Duarte 等^[7]采用热水提取法提取海藻中的岩藻聚糖硫酸酯,但此方法会同时提取出海藻样品中的其他多糖和水溶性成分,选择性较低。S. J. Lim 等^[8]选择 CaCl₂ 提取法提取海藻中的岩藻聚糖硫酸酯,利用 CaCl₂ 将海藻酸盐转化为钙盐沉淀,在除去固体残渣后获得较为纯净的岩藻聚糖硫酸酯。酸提法则是利用 HCl 或 H₂SO₄ 水解海藻细胞壁,从而促进岩藻聚糖硫酸酯的提取^[9],该方法同时可将海藻中的海藻酸盐转化为不溶于水的藻酸,并随其他固体残渣一起被去除。1913年, Kylin 首次利用稀醋酸从掌状海带中萃取出了岩藻聚糖硫酸酯,并发现其结构中含有大量的 L - 岩藻糖^[10]。周林林^[11]比较了热水提取法、CaCl₂ 提取法和酸提法对岩藻聚糖硫酸酯得率的影响,发现酸提法的得率最高,分别为热水提取法和 CaCl₂ 提取法的 1.1 倍和 3.5 倍。

利用岩藻聚糖硫酸酯不溶于乙醇的特性,可选择乙醇沉淀法进一步纯化岩藻聚糖硫酸酯粗品,相较于离子交换法,该纯化方法更为简便易行。另外, Dische 比色法常被用来测定岩藻聚糖硫酸酯的质量浓度,该方法目标单一,几乎不受其他单糖的干扰,可快速准确地定量岩藻聚糖硫酸酯中的 L - 岩藻糖^[12-13]。基于此,本文拟采用酸提法提取海藻残渣中的岩藻聚糖硫酸酯,通过单因素试验和正交试验优化提取工艺条件,采用乙醇沉淀法进一步纯化岩藻聚糖

硫酸酯粗品,同时选择 Dische 比色法测定岩藻聚糖硫酸酯的质量浓度,以期对岩藻聚糖硫酸酯的有效提取和海藻残渣的科学利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

海藻残渣,由齐鲁工业大学食品科学与工程学院实验室提供; K_2SO_4 ,天津市大茂化学试剂厂产;无水丙酮,济南试剂总厂产;L-半胱氨酸盐酸盐、三氯乙酸,国药集团化学试剂有限公司产;乙醇(体积分数为95%)、明胶,天津市富宇精细化工有限公司产;L-岩藻糖标准品、HCl,莱阳经济技术开发区精细化工厂产。以上试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

TG16-WS 型高速台式离心机,湖南湘仪开发有限公司产;FD-1A-50 型冷冻干燥机,上海豫明仪器有限公司产;721 型紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司产;Vortex QL-901 型漩涡混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 岩藻聚糖硫酸酯的提取 将海藻残渣粉碎后,过60目筛;取一定量海藻残渣样品,分别加入一定量不同浓度的HCl溶液,于恒温水浴锅中浸提一段时间;冷却至室温后,减压浓缩至原体积的1/3以下;将所得浓缩液用1 mol/L的NaOH溶液调至中性,于4000 r/min条件下离心10 min,冷冻干燥后即得岩藻聚糖硫酸酯粗品。

1.3.2 单因素试验 在前期实验的基础上,选择4种对岩藻聚糖硫酸酯提取率有明显影响的因素,即HCl浓度(0 mol/L、0.10 mol/L、0.15 mol/L、0.20 mol/L、0.25 mol/L、0.30 mol/L)、提取温度(40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃)、提取时间(1 h、2 h、3 h、4 h、5 h)、料液

比(1:5、1:10、1:15、1:20),进行单因素试验,分别测定各单因素对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响。

岩藻聚糖硫酸酯提取率的计算公式为

$$\text{岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率} = \frac{\text{岩藻聚糖硫酸酯粗品质量}}{\text{海藻残渣质量}} \times 100\%$$

1.3.3 正交试验 在单因素试验的基础上,以岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率为指标,以HCl浓度(A)、提取温度(B)、提取时间(C)和料液比(D)4个因素进行四因素三水平 $L_9(4^3)$ 的正交试验设计,以确定岩藻聚糖硫酸酯粗品提取的最佳工艺条件。 $L_9(4^3)$ 的正交试验因素和水平见表1。

表1 $L_9(4^3)$ 的正交试验因素和水平表

Table 1 The factors and levels table of $L_9(4^3)$ orthogonal test

水平	因素			
	A/(mol·L ⁻¹)	B/℃	C/h	D
1	0.15	50	1	1:5
2	0.20	60	2	1:10
3	0.25	70	3	1:15

1.3.4 岩藻聚糖硫酸酯粗品的纯化 采用乙醇沉淀法进一步纯化岩藻聚糖硫酸酯粗品。利用褐藻酸可在低体积分数乙醇(20%~30%)中发生沉淀和褐藻淀粉可溶于较高体积分数乙醇(>60%)的性质,使用不同体积分数的乙醇对岩藻聚糖硫酸酯粗品进行分步沉淀;利用丙酮和活性炭除去色素、脂质、无机盐等杂质;加超纯水复溶后,采用Dische比色法测定岩藻聚糖硫酸酯的质量浓度,以确定最适的乙醇沉淀体积分数,进而获得可行的岩藻聚糖硫酸酯粗品纯化方案。

采用Dische比色法测定海藻残渣样品中岩藻聚糖硫酸酯的质量浓度。配制质量浓度为0.04 g/L的L-岩藻糖标准品溶液和质量分数为3%的L-半胱氨酸盐酸盐溶液^[14]。取L-岩

藻糖标准品溶液 5 份 (0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL), 加蒸馏水至 1.0 mL, 于冰水浴中加入 4.5 mL 体积分数为 14.3% 的 H_2SO_4 溶液, 1 min 后用沸水浴加热并反应 10 min; 降温至室温, 向 5 份溶液中分别加入 0.1 mL 质量分数为 3% 的 L-半胱氨酸盐酸盐溶液, 混匀, 于 37 °C 条件下静置 90 min; 在 396 nm 和 427 nm 处分别测其吸光度值, 并作 L-岩藻糖标准曲线^[15]. 根据测得的 L-岩藻糖质量浓度及标准曲线公式, 即可推算出海藻残渣样品中的岩藻聚糖硫酸酯质量浓度.

1.4 数据处理

每个样品均重复进行 3 次实验, 所得数据采用 Microsoft Excel 2010 软件处理并绘图.

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 HCl 浓度对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响 HCl 浓度对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响如图 1 所示. 由图 1 可以看出, HCl 浓度对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响较明显, 岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率随着 HCl 浓度的增加呈先增大后减小的趋势. 当 HCl 浓度为 0.20 mol/L 时, 岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率最大, 为 1.70%, 这可能是因为随着 HCl 浓度的增加, HCl 分解多糖糖苷键得到更多的小分子量多糖, 进而增大了岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率. 而当 HCl 浓度超过 0.20 mol/L 时, 岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率不增反减, 这可能是因为 HCl 浓度过大会导致岩藻聚糖硫酸酯水解, 从而减小岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率. 因此, 选择 HCl 浓度 0.20 mol/L 作为正交试验的中心值较为适宜.

2.1.2 提取温度对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响 提取温度对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响如图 2 所示. 由图 2 可以看出, 岩藻

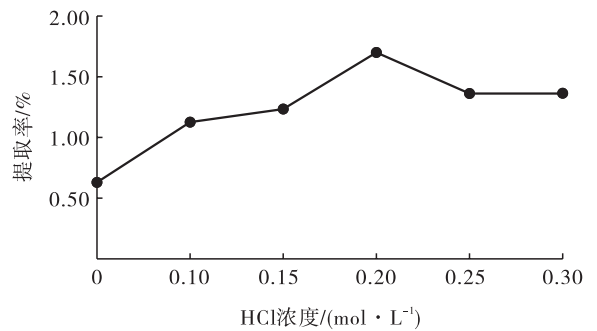


图 1 HCl 浓度对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响

Fig. 1 Effect of HCl concentration on the extraction rate of crude fucoidan sulfate

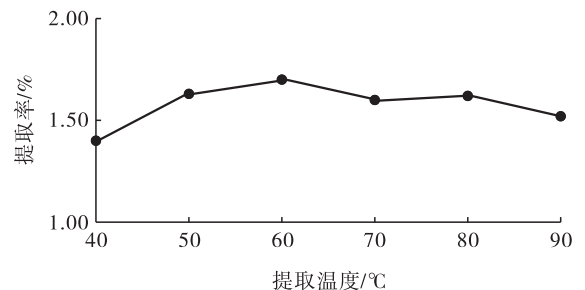


图 2 提取温度对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on the extraction rate of crude fucoidan sulfate

聚糖硫酸酯粗品提取率随着提取温度的升高呈先增大后减小的趋势. 当提取温度低于 60 °C 时, 岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率随着提取温度的升高逐渐增大, 在 60 °C 时达到最大值 1.70%, 这可能是因为温度的提升加剧了分子的热运动, 从而使目标提取物质更易溶出. 温度继续提升至 60 ~ 80 °C 之间, 提取率有轻微波动, 但总体上呈下降的趋势, 这可能是因为温度过高造成了多糖水解, 从而导致岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的降低. 考虑到能耗和高温对设备的损害, 适宜的提取温度应该保持在 50 ~ 70 °C 之间. 因此, 选择提取温度 60 °C 作为正交试验的中心值较为适宜.

2.1.3 提取时间对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响 提取时间对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响如图3所示.由图3可以看出,岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率随着提取时间的增加先增大后减小并趋于平缓.当提取时间小于2 h时,岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率随着提取时间的增加而增大,2 h时达到最大值1.44%,这是因为增加提取时间能使提取更充分,获得更多的目标提取物.当提取时间超过2 h时,岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率逐渐减小并趋于平缓,这可能是因为此时底物已基本反应完全,继续增加提取时间已不能改变岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率,另外,提取时间过长还可能导致多糖水解.因此,选择提取时间2 h作为正交试验的中心值较为适宜.

2.1.4 料液比对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响 料液比对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响如图4所示.由图4可以看出,岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率随着料液比的减小呈先增大后趋于平缓的趋势.随着料液比的减小,岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率逐渐增大,1:10时达到最大值,为1.54%,这是因为HCl溶液用量越多,越有利于充分提取海藻渣里的多糖.考虑到提取工艺的经济成本因素,选择料液比1:10作为正交试验的中心值较为适宜.

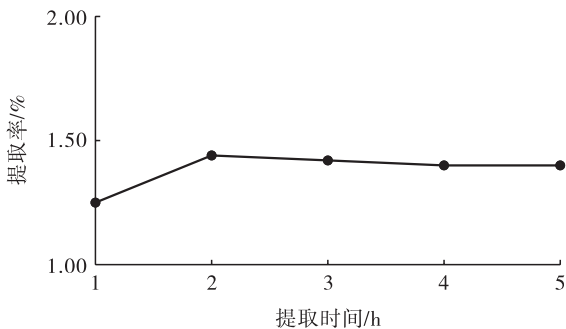


图3 提取时间对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on the extraction rate of crude fucoidan sulfate

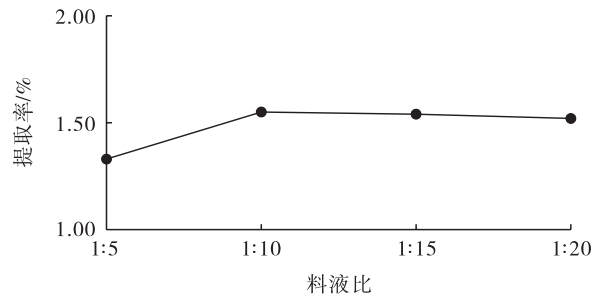


图4 料液比对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of crude fucoidan sulfate

2.2 正交试验结果分析

正交试验结果见表2.由表2可知,4种因素对岩藻聚糖硫酸酯粗品提取率的影响大小为 $A > C > B > D$,即酸提法提取岩藻聚糖硫酸酯粗品时,HCl浓度对提取率的影响最大,其次是提取时间,料液比对提取率的影响最小.最佳的提取工艺条件组合为 $A_3B_1C_2D_2$,即HCl浓度0.25 mol/L,提取温度50℃,提取时间2 h,料液比1:10,在此条件下,岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率为1.89%.

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	3	1	1.72
2	1	2	1	2	1.56
3	1	3	2	3	1.65
4	2	1	1	3	1.68
5	2	2	2	1	1.67
6	2	3	3	2	1.77
7	3	1	2	2	1.89
8	3	2	3	3	1.87
9	3	3	1	1	1.75
k_1	1.64	1.76	1.66	1.71	
k_2	1.71	1.70	1.79	1.74	
k_3	1.84	1.72	1.74	1.73	
R	0.20	0.06	0.13	0.03	
主次因素	$A > C > B > D$				
最优组合	$A_3B_1C_2D_2$				

2.3 岩藻聚糖硫酸酯粗品纯化结果分析

L-岩藻糖标准曲线如图5所示.由图5可以看出,L-岩藻糖标准曲线的回归方程线性关系良好.对L-岩藻糖标准品进行平行测定的结果如表3所示.由表3可知,平均偏差为0.76%,表明采用Dische比色法的测定结果误差小,准确性高,可用于岩藻聚糖硫酸酯质量浓度的测定.

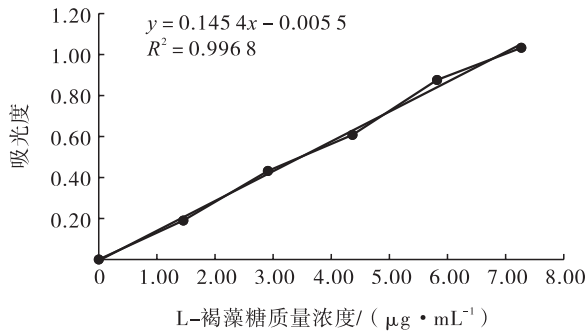


图5 L-褐藻糖标准曲线

Fig.5 L-fucose standard curve

表3 L-岩藻糖标准品的平行测定结果

Table 3 Parallel measurement results of L-fucose standard %

样品	平行测定值			平均值	平均偏差
	第1次	第2次	第3次		
1	21.86	22.11	22.21	22.06	0.76
2	22.56	21.59	23.08	22.41	
3	20.08	21.33	20.08	20.53	

乙醇体积分数对纯化岩藻聚糖硫酸酯粗品的影响见表4.由表4可知,岩藻聚糖硫酸酯的质量浓度随着乙醇体积分数的增加呈先增大后减小的趋势,当乙醇体积分数为70%时,岩藻聚糖硫酸酯的质量浓度达到最大值.因此,纯化岩藻聚糖硫酸酯粗品较适宜的乙醇体积分数为70%.

3 结论

本文采用酸提法提取海藻残渣中的岩藻聚糖硫酸酯,通过单因素试验和正交试验优化的

表4 乙醇体积分数对

纯化岩藻聚糖硫酸酯粗品的影响

Table 4 The effect of ethanol volume fraction on the purification of crude fucoidan sulfate

乙醇体积分数/%	岩藻聚糖硫酸酯质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
30	1.19
40	2.23
50	2.70
60	3.11
70	3.12
80	3.11

最佳提取工艺条件为HCl浓度0.25 mol/L,提取温度50℃,提取时间2 h,料液比1:10,在此条件下,岩藻聚糖硫酸酯粗品的提取率为1.89%.采用乙醇沉淀法进一步纯化岩藻聚糖硫酸酯粗品,结合Dische比色法筛选出最优的乙醇沉淀体积分数为70%,此时岩藻聚糖硫酸酯的质量浓度达到最大值,为3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.本研究可为科学利用海藻残渣提供技术参考,为海洋高附加值产品的提取提供借鉴,有望进一步推动岩藻聚糖硫酸酯等功能性物质的深入研究.

参考文献:

[1] 聂小伟,何粉霞,陈志兵,等.响应面优化海带岩藻聚糖硫酸酯的提取工艺研究[J].食品研究与开发,2017,38(23):44.

[2] 杨月梅,王士斌.新型药物载体岩藻聚糖硫酸酯的研究进展[J].材料导报,2011,25(21):91.

[3] 赵铮蓉,任娟,朱旭祥.褐藻多糖的药理作用与制备[J].海洋学研究,2004,22(3):62.

[4] 杨雷.低聚岩藻多糖的制备及抗寒诱导效应研究[D].大连:辽宁师范大学,2006.

[5] CUMASGI A,USHAKOVA N A,PREOBRAZHENSKAYA M E,et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fu-

- coidans from brown seaweeds [J]. *Glycobiology*, 2007, 17 (5):541.
- [6] BISWAJITA P, SRIMANTA P, RABINDRA N, et al. Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: A journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agent [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164:4263.
- [7] DUARTE M E, CARDOSO M A, NOSEDA M D, et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* [J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 333:281.
- [8] LIM S J, WANAIWA W M, MASKAT M Y, et al. Characterisation of fucoidan extracted from Malaysian *Sargassum binderi* [J]. *Food Chemistry*, 2016, 209:267.
- [9] SENG J L, WAN M W A. Extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed [M] // JAYACHANDRAN V, SUKUMARAN A, SE-KWON K. *Seaweed polysaccharides*. Amsterdam: Elsevier, 2017:27-46.
- [10] 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, 1987:247.
- [11] 周林林. 海带渣中岩藻聚糖硫酸酯提取条件和硫酸基含量测定方法研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [12] 赵增芹. 海带中 L-褐藻糖的测定及其制备 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2004.
- [13] 王春霞, 高鹏, 王晓梅, 等. 海带中岩藻聚糖硫酸酯的测定方法比较 [J]. *轻工科技*, 2014, 30 (9):15.
- [14] KUMAR N S S, NAZEER R A, JAIGENESH R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*) [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(5):1641.
- [15] 蔡璐. 不同分子量马尾藻岩藻聚糖硫酸酯的制备及降血脂机理的初步研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.