

方格星虫多糖水法提取的条件及优化*

Optimization of Water Extraction for Polysaccharide from *Sipunculus nudus* Linnaeus

许明珠¹, 张琴^{1**}, 童潼¹, 董兰芳¹, 于海瑞²

XU Ming-zhu¹, ZHANG Qin¹, TONG Tong¹, DONG Lan-fang¹, YU Hai-ru²

(1. 广西壮族自治区海洋研究所广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000; 2. 潍坊学院生物与农业工程学院、山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室(潍坊学院)、潍坊高新区天润生物工程研发中心, 山东潍坊 261061)

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Beihai, Guangxi, 536000, China; 2. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Universities of Shandong (Weifang University), College of Biological and Agricultural Engineering, Weifang University, Tianrun Bioengineering R & D Center of Weifang New and High-tech Zone, Weifang, Shandong, 261061, China)

摘要: 分别从料液比、浸提时间、浸提次数、浸提温度等 4 个方面初步研究水法提取方格星虫体壁中的水溶性多糖的条件及优化。在单因素试验结束后, 通过正交试验取四因素三水平得到方格星虫水溶性多糖水提法的最佳组合。结果: 影响方格星虫多糖提取率的主次顺序为浸提温度 > 料液比 > 浸提时间 > 浸提次数, 最佳的浸提条件为: 温度 100℃, 料液比 1 : 12 g/mL, 浸提时间 3h, 浸提次数 4 次。在最优浸提条件下, 方格星虫水溶性多糖水提法所得的最佳提取率为 1.22%。该工艺稳定可行, 能有效提高方格星虫多糖的提取率。

关键词: 方格星虫 多糖 水提 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)04-0285-04

Abstract: The aim of this study is to choose the optimum water extraction process of water soluble polysaccharide from *Sipunculus nudus* Linnaeus. The orthogonal test design with four factors was used to study the effect of the ratio of material to fluid, extraction time, extraction temperature and extraction times on the extracting rate of water soluble polysaccharides from *S. nudus*. The factors that affected polysaccharide yield from *S. nudus* ranked as extraction temperature > ratio of material to fluid > extraction time > extraction times. The optimum extraction conditions were temperature of 100℃, ratio of material to fluid of 1 : 12 g/mL, time for 3h and extraction for 4 times. Under the above conditions, the optimum extraction rate reached 1.22%. This extraction technology is stable and practical with high extraction rate.

Key words: *Sipunculus nudus*, polysaccharide, water extraction, orthogonal test

近年来,随着研究设备和研究方法的进步,多糖的研究对象逐步从陆地生物扩展到海洋生物。海洋生物多糖具有种类多、作用广等特点,目前已有许多

海洋生物多糖应用于药物治疗中。例如服用含有鼠李糖的褐藻酸,能有效缓解恶心、呕吐等症状,并能减少铬、铝等重金属在体内的沉积^[1]。另外从海藻中分离的海藻硫酸多糖具有抗凝血活性,也广泛应用于缺血型心、脑血管疾病^[2]。海洋无脊椎动物等海洋生物含有的一种氨基多糖甲壳素,长期以来应用于临床早期癌症,它不仅具有提高免疫、抑制肿瘤的作用,还能帮助中后期癌症患者减轻放疗后的痛苦^[3]。

常用的粗多糖提取工艺有热水浸提法、超声波或微波辅助法、溶剂浸提法、酶解法以及酸碱浸提法等,各种方法都有自身的优点和缺陷,一般根据需提取的

收稿日期:2013-08-20

修回日期:2013-08-30

作者简介:许明珠(1988-),女,硕士,主要从事水产动物天然产物开发研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 11107011-6);广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25HYS20)资助。

** 通讯作者:张琴(1982-),女,博士,副研究员,主要从事水产动物天然产物开发研究。E-mail:zhangqin821220@163.com。

多糖特性选取合适的工艺。本试验采用的是热水浸提法,该方法的优点是在生产上使用安全,成本低廉,并且相较于酸碱法提取,不容易使多糖的糖苷键断裂,从而保证多糖的活性。

方格星虫在近几年已成为研究热点,在其营养成分^[4]、氨基酸组成^[5]、基础营养研究^[6~9]等方面都有相关报道。此外,方格星虫的多糖也具有很多生理活性,它能明显抑制金色葡萄球菌、大肠埃希菌等细菌的生长^[10];也能较好的抑制人肝癌细胞系 HepG2 2.15 细胞株 HBV-DNA 的复制^[11];它还能促进小鼠(*Mus musculus*)脾淋巴细胞的增殖,提高小鼠的免疫力^[12]。本试验先分别从料液比、浸提时间、浸提温度、浸提次数等 4 个方面进行了单因素试验,找出 4 个单因素的最佳提取条件。之后再 4 个因素分别取 3 个水平进行正交试验,旨在找出水法提取方格星虫体壁水溶性多糖的最优条件。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验采用鲜方格星虫成虫,平均体重为 31.26g,均购自北海市南珠水产市场。在提取多糖之前,先将鲜方格星虫体壁剪开去内脏、血液,用蒸馏水洗涤 2~3 遍,再将其剪碎并用高速组织匀浆机打碎至糊状以备用。多糖提取工艺流程为:对应各试验条件水法浸提→离心(9000r/min 离心 30min)→去蛋白(三氯乙酸充分搅拌后 5000r/min 离心,2~3 次)→醇沉(约至乙醇浓度 75%,4℃过夜)→离心(4℃ 9000r/min 离心 10min)→洗涤(20mL 无水乙醇和丙酮)→冷冻干燥(冷冻干燥机-38℃冷冻干燥 4h)→溶解(20mL 蒸馏水)→透析(截留相对分子量为 100000 以上的玻璃纸流水透析 48h)→50℃水浴浓缩至 1/3→醇沉(约至乙醇浓度 75%,4℃过夜)→离心(4℃ 9000r/min 离心 10min)→冷冻干燥得到粗多糖(冷冻干燥机-38℃冷冻干燥 4h)。

试验药品包括分析纯 95%乙醇、NaOH、苯酚、硫酸、三氯乙酸、葡萄糖等。

1.2 水法提取方格星虫多糖的条件优化

采用热水法提取经预处理的方格星虫水溶性多糖,研究料液比、浸提温度、浸提时间以及浸提次数等因素对多糖浸出率的影响。4 个单因素试验为固定 4 个提取条件中的 3 个条件,改变另外一个条件,以确定变量对方格星虫多糖提取的影响。

试验 1:确定料液比 1:15 g/mL,浸提温度 100℃,浸提次数 5 次,分别取不同的浸提时间,0.5~6h,0.5h 一个梯度共 12 个试验组,根据试验结果中

方格星虫的多糖提取率确定最佳浸提时间。

试验 2:确定浸提温度 100℃,浸提时间 4h,浸提次数 5 次,分别取不同的料液比,1:3g/mL,1:6g/mL,1:9g/mL,1:12g/mL,1:15g/mL,1:18g/mL,1:21g/mL,共 7 个试验组,根据试验结果中方格星虫的多糖提取率确定最佳料液比。

试验 3:确定料液比 1:15g/mL,浸提时间 4h,浸提次数 5 次,分别取不同的浸提温度,40~100℃,10℃一个梯度共 7 个试验组,根据试验结果中方格星虫的多糖提取率确定最佳提取温度。

试验 4:确定料液比 1:15g/mL,浸提温度 100℃,浸提时间 4h,改变浸提次数,分别浸提 1~6 次共 6 个试验组,根据试验结果中方格星虫的多糖提取率确定最佳浸提次数。

1.3 粗多糖质量分数测定

葡萄糖标准曲线采用苯酚-硫酸法测定。具体流程为:取分析级葡萄糖 100℃干燥至恒重→精确称取 535.25mg→蒸馏水溶解→200mL 容量瓶定容(浓度 2.6763g/mL)→取 10mL 定容至 50mL 容量瓶(稀释 5 倍)→分别取 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0mL 置于 20mL 的干燥刻度试管中,加超纯水至体积均为 1.0mL→加入 5%苯酚 2.0mL(摇匀)→加入浓硫酸 3.0mL(冷却至室温)→490nm 处测定其吸光度。以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。将各试验组水法提取的粗多糖按照相同的方法溶解后测得吸光值,参照葡萄糖标准曲线获得多糖浓度。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

图 1 所示为苯酚-硫酸法测吸光值得葡萄糖标准曲线。

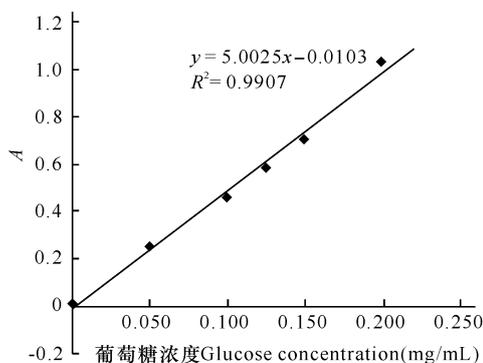


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

2.2 各单因素对方格星虫多糖提取率的影响

从图 2 可知,改变浸提时间对多糖提取率有影响。当浸提时间低于 3h 时,方格星虫的多糖提取率

不理想,提高浸提时间能较为显著的提高多糖提取率。浸提时间在 3.0~4.5h,改变浸提时间对浸提效果并无显著影响。浸提时间为 4.0h 时,多糖的浸提效果最佳,提取率高达 1.16%。当浸提时间大于 4.5h 后,继续增加浸提时间,多糖提取率反而下降。

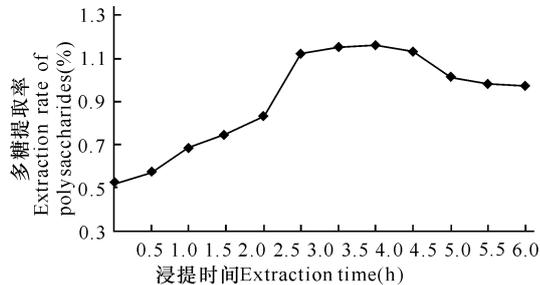


图 2 浸提时间对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of time on the extraction percent of polysaccharides

从图 3 可知,改变水提法的浸提温度也能对方格星虫多糖的提取率产生影响。多糖提取率随着浸提温度从 40℃ 提高到 100℃ 持续增加,在 100℃ 达到最大提取率 1.08%。

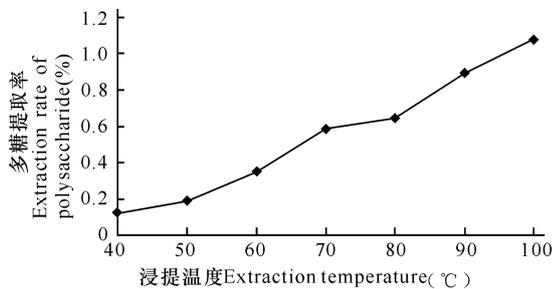


图 3 浸提温度对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the extraction percent of polysaccharides

从图 4 可知,水提法中料液比不同同样影响方格星虫的多糖提取。当料液比低于 1:15g/mL 时,提高料液比,能持续提高多糖的提取率。但当料液比大于 1:15g/mL 时,继续提高料液比,多糖的提取率反而下降。料液比为 1:15g/mL 时,多糖提取率达到最佳,为 1.08%。

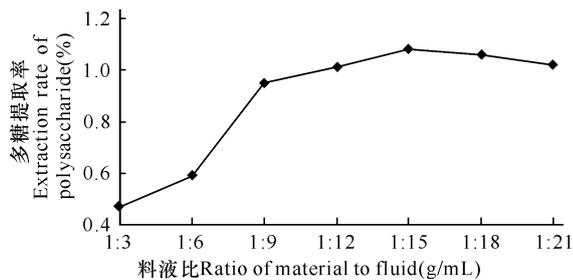


图 4 料液比对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of ratio of material to fluid on the extraction percent of polysaccharides

从图 5 可知,浸提次数对方格星虫的多糖提取率

也有影响。多糖提取率与提取次数并不成正比例关系。浸提次数少于 4 次时,提高浸提次数有利于提高多糖提取率,当浸提次数为 4 次时,多糖提取率达到最大,达 1.09%。之后再提高浸提次数,多糖提取率反而有所下降。

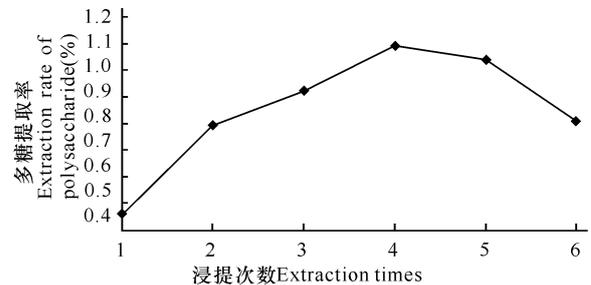


图 5 浸提次数对多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of extract times on the extraction percent of polysaccharides

2.3 方格星虫多糖浸提条件的正交试验优化

完成单因素试验后,根据单因素试验结果,查阅正交实验表,对 4 个影响因素分别取 3 个水平,如表 1 所示分别进行了单因素交互试验。从结果看,4 个因素对方格星虫多糖提取率的影响顺序为浸提温度 > 料液比 > 浸提时间 > 浸提次数,并且 4 个因素之间有交互影响。水法提取方格星虫多糖的最佳条件为料液比 1:12g/mL、浸提温度为 100℃、浸提时间为 3.0h,浸提次数为 4 次,得到的最大多糖提取率为 1.22%。

表 1 正交试验及结果

Table 1 Results of orthogonal test

试验号 Test	料液比 (A) Ratio of material to fluid (g/mL)	浸提温 度(B) Extraction temper- ature (°C)	浸提时 间(C) Extraction time(h)	浸提次 数(D) Extraction times (次)	多糖提取 率 Extraction rate of polysac- charide (%)
1	1(1:9)	1(80)	1(3.0)	1(3)	0.34
2	1	2(90)	2(3.5)	2(4)	0.89
3	1	3(100)	3(4.0)	3(5)	0.64
4	2(1:12)	1	2	3	0.76
5	2	2	3	1	0.93
6	2	3	1	2	1.22
7	3(1:15)	1	3	2	0.45
8	3	2	1	3	0.68
9	3	3	2	1	1.16
K_1	0.62	0.52	0.75	0.81	
K_2	0.97	0.83	0.94	0.85	
K_3	0.76	1.01	0.67	0.69	
R	0.35	0.49	0.26	0.16	
最优水平 Optimal level	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	

备注:表格中 $K_1 \sim K_3$ 为各因素各水平下的多糖平均得率, R 为极差, 等于多糖平均得率最大值减去平均得率最小值。

Note: $K_1 \sim K_3$ represent the mean polysaccharide yield of each factor in each level. R represents the range, R = the maximum average yield - the minimum average yield.

3 讨论

在以往海洋生物多糖研究中,提取方法有很多种,如采用酶法从皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)中提取鲍鱼多糖,多糖的得率高达 19.60%^[13];采取酸法提取青蛤(*Cyclina sinensis*)多糖,多糖的提取率为 1.82%^[14];采用超滤、浓缩、离子交换层析等方法提取、纯化中国鲎(*Tachpleus tridentatus*)鲎抗脂多糖因子^[15]。水法提取多糖的工艺同样在普洱茶(*Camellia sinensis*)茶多糖^[16]、大理百合(*DaLi Liliun brownie*)多糖^[17]、蜗牛(*Cathaica fasciola*)多糖^[18]的提取中得到应用。

在单因素试验中,改变提取时间能影响多糖的提取率,分析原因可能在于多糖存在于方格星虫体壁细胞之中,需要破碎细胞才能溶解出来,增加提取时间有利于提高细胞破碎率,因此多糖的提取率也可增加。但是持续提高浸提时间,由于此方法是热水浸提法,持续的高温,很可能破坏多糖的糖苷键,导致糖苷键断裂,因此最终的多糖提取率下降。而相同提取时间、料液比、提取次数的条件下,高温试验组多糖提取率优于低温试验组的原因可能在于细胞的细胞膜骨架由磷脂双分子层组成,磷脂双分子层表面镶嵌或贯穿有大量蛋白质,高温能使这些蛋白质变性,因而使得存在于细胞质中的多糖得以溶解出来。适当增加料液比以及提高浸提次数能有效提高多糖提取率的原因则可能是二者都能使体壁细胞破碎率升高,从而提高多糖提取率。而高提取次数反而得到低提取率,原因一,可能是在多次提取过程中需转移多糖次数以及需浓缩的多糖溶液量增加,会粘在容器壁上损耗一部分;原因二,可能是反复提取使得原来已经提取出来的多糖,糖苷键被破坏,因此提取率下降。

4 结论

正交试验结果显示水法提取的 4 个提取条件之间有交互影响,料液比为 1:12g/mL,浸提温度为 100℃,浸提时间为 3.0h,浸提次数为 4 次,提取效果最好,得到的最大多糖提取率为 1.22%。在正交实验结果基础上,取最佳提取条件进行了多次试验,结果显示该试验条件稳定性好,多糖高提取率重复性好。

参考文献:

[1] 王琪琳. 略述海洋生物多糖的药用价值[J]. 聊城师院学

报:自然科学版,2002,15(3):59-61.

- [2] 孙惠洁,吴永沛. 海藻硫酸多糖的制备及其抗凝血活性的研究进展[J]. 食品与药品,2007,9(8):54-56.
- [3] 崔淑芳. 壳聚糖植被及副产品综合利用研究[J]. 海洋科学,2002,26(6):12-14.
- [4] 李珂娴,沈先荣,蒋定文,等. 三产地方格星虫主要营养成分比较[J]. 海军医学杂志,2010,31(1):1-3.
- [5] 董兰芳,张琴,童潼,等. 不同生长发育阶段方格星虫氨基酸组成的研究[J]. 南方水产科学,2012,8(5):60-65.
- [6] 张琴,童万平,董兰芳,等. 饲料中脂肪水平对方格星虫稚虫生长性能、体组成及消化酶活性的影响[J]. 渔业科学进展,2011,32(6):99-106.
- [7] 张琴,童万平,董兰芳,等. 饲料蛋白水平对方格星虫稚虫生长和体组成的影响[J]. 渔业科学进展,2012,33(1):86-92.
- [8] 张琴,童潼,童万平,等. 饲料蛋白水平对方格星虫稚虫日增重和消化酶活性的影响[J]. 渔业现代化,2012,39(2):41-46.
- [9] 许明珠,张琴,童万平,等. 饲料糖水平对方格星虫稚虫生长、体组成和消化酶活性的影响[J]. 动物营养学报,2013,25(3):534-542.
- [10] 夏乾峰,谭河林,覃西,等. 方格星虫多糖抗菌活性的初步研究[J]. 中国热带医学,2007,7(12):2192-2193.
- [11] 夏乾峰,谭河林,覃西,等. 方格星虫多糖体外抗乙型肝炎病毒活性的研究[J]. 山东医药,2009,49(8):35-37.
- [12] 彭晓娜,雷晓凌. 方格星虫多糖对小鼠免疫活性的影响[J]. 广东海洋大学学报,2007,27(4):54-57.
- [13] 殷红玲,杨静峰,李冬梅. 酶法提取鲍鱼多糖的研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(12):158-160,170.
- [14] 胡聪聪,杨永芳,丁国芳. 青蛤多糖提取的条件优化及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国民族民间医药,2010(10):28-29.
- [15] 刘樑英,许伟群,苏东辉. 中国鲎抗脂多糖因子的提取、纯化及其活性的初步鉴定[J]. 福建医科大学学报,2003,37(4):364-367.
- [16] 金婷,谭胜兵. 水法提取普洱茶茶多糖条件优化[J]. 安徽农业科学,2012,40(12):7382-7384.
- [17] 周静华,李汉伟. 正交试验优选大理百合多糖提取的工艺[J]. 食品研究与开发,2010,31(4):17-19.
- [18] 湛孝东,王克霞,李朝品. 正交试验优选蜗牛多糖提取工艺的研究[J]. 中国中医药杂,2007,5(10):34-35.

(责任编辑:尹 闯)