

## 方格星虫多糖碱法提取工艺研究\*

# Optimization of Alkaline Extraction for Polysaccharide from *Sipunculus nudus* Linnaeus

许明珠<sup>1</sup>,张琴<sup>1\*\*</sup>,童潼<sup>1</sup>,于海瑞<sup>2</sup>,董兰芳<sup>1</sup>

XU Ming-zhu<sup>1</sup>,ZHANG Qin<sup>1</sup>,TONG Tong<sup>1</sup>,YU Hai-rui<sup>2</sup>,DONG Lan-fang<sup>1</sup>

(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:**【目的】研究碱法提取方格星虫体壁中水溶性方格星虫多糖的条件及优化。【方法】根据料液比、浸提时间、浸提温度、碱液浓度对多糖得率的影响,并通过正交试验得到方格星虫水溶性多糖浸提工艺优选因素组合。【结果】影响方格星虫多糖得率的因素主次顺序为浸提温度>料液比>浸提时间>碱液浓度;最佳浸提条件为温度50℃,料液比1:6 g/mL,时间4h,碱液(NaOH)的质量分数为8%。【结论】最佳浸提工艺条件下多糖浸提提取率最大为1.81%。

**关键词:**方格星虫 多糖 碱提 优化

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)02-0164-05

**Abstract:**【Objective】To choose the optimum alkaline extraction process of water-soluble polysaccharide from *Sipunculus nudus* Linnaeus. 【Methods】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 alkali concentration on the extracting rate of water-soluble polysaccharides from *S. nudus*. 【Results】The order of the factors that affect the yield of *S. nudus* polysaccharide is extraction temperature>ratio of material to fluid> extraction time> alkali concentration; the optimum extraction conditions were temperature 50℃, ratio of material to fluid 1:6 g/mL, time 4h and alkali (NaOH) content of 8%. 【Conclusion】Under the above conditions, the optimum extraction rate is 1.81%.

**Key words:** *Sipunculus nudus*, polysaccharide, alkaline extraction, optimizing

收稿日期:2013-09-04

修回日期:2013-10-11

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的研究。

\* 广西科学研究与技术开发计划(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的研究。E-mail: zhangqin821220@163.com。

【研究意义】由于生活环境的不同,海洋生物多糖的种类和活性与陆地生物多糖不尽相同,本文旨在研究碱法提取方格星虫多糖的条件及其优化,找出碱法提取方格星虫多糖的最优条件。【前人研究进展】多糖因构成成分不同而分为均一性多糖和不均一性多糖。早期的多糖研究主要对象集中在陆地植物方面,

近年来,随着海洋生物的开发,海洋生物多糖的研究也逐步开展。研究发现,海洋生物多糖的种类大体分为3种,海洋微生物多糖、海藻多糖和海洋动物多糖<sup>[1,2]</sup>。这些多糖具有不同的生理作用,例如,从海洋湿润黄杆菌(*Flavobacterium uliginosum*)的代谢产物中得到一种胞外杂多糖 Marinactan,具有增强免疫活性、促进体液免疫和细胞免疫的功能<sup>[3]</sup>;从褐藻中提取的海带多糖和褐藻胶分别具有降血糖<sup>[4]</sup>和降血脂<sup>[5]</sup>的作用;从仿刺参肠道提取的粗多糖对小鼠 H22 肝癌实体瘤具有抑制作用<sup>[6]</sup>。

本试验方格星虫是北部湾沿海地带特色海产品之一,目前已有许多学者针对其营养需求等进行相关研究<sup>[7~10]</sup>。在其多糖研究方面,已有报道:热水提取法的最大提取率为 1.22%<sup>[11]</sup>,另外已证实方格星虫多糖具有抗菌、抑制乙型肝炎病毒活性以及提高小鼠免疫活性等生理作用<sup>[12~14]</sup>。【拟解决的关键问题】本试验从料液比、浸提时间、浸提温度、碱液浓度等4个方面,分别进行了单因素试验,之后再从4个因素分别取3个水平,通过正交试验研究碱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 材料及预处理

鲜方格星虫成虫均购自北海市南珠水产品市场,平均体质量为 30.2g。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。

预处理:用解剖剪将鲜活的方格星虫纵向剖开,体壁用蒸馏水洗涤,剪成 1cm<sup>2</sup>左右的小段,经高速组织匀浆机匀浆打碎成糊状。按照试验方法选取的料液比加入设定浓度的 NaOH,用设定的温度恒温水浴提取相应时间,提取之后用 15%的盐酸调节 pH 值至 7.0,再 9000r/min 离心 30min(KR25i,美国 Thermo 公司出品),收集上清液。在上清液中加入三氯乙酸,充分搅拌后 5000r/min 离心,收集上清液去除沉淀(沉淀为蛋白),此步骤重复 2~3 次。收集的上清液与 95%乙醇溶液按 1:3 的比例(约至乙醇浓度 75%)4℃过夜,之后 4℃条件下 9000r/min 离心 10min,分别加入无水乙醇和丙酮洗涤多次沉淀后置通风处晾干。将沉淀用超纯水溶解后装入能截留相对分子量为 10000 以上的玻璃纸流水透析 48h,溶液与 95%乙醇溶液 1:3 的比例再沉淀,离心,冷冻干燥(Coolsafe 1104L,Denmark,丹麦 LaboGene 公司出品)得到方格星虫粗多糖。

### 1.2 碱提方格星虫多糖的条件优化

研究料液比、浸提温度、浸提时间以及碱液浓度

等因素对多糖浸出率的影响。

#### 1.2.1 最佳料液比的确定

改变试验料液比,分别取 1:3g/mL、1:4g/mL、1:5g/mL、1:6g/mL、1:7g/mL、1:8g/mL、1:9g/mL、1:10g/mL,其他条件为浸提时间 3h,浸提温度 60℃,碱液浓度 6%。根据方格星虫多糖的提取率确定最佳料液比。

#### 1.2.2 最佳浸提温度的确定

改变试验浸提温度,分别取 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃,其他条件为料液比 1:5g/mL,浸提时间 3h,碱液浓度 6%。根据方格星虫多糖提取率确定最佳温度范围。

#### 1.2.3 最佳浸提时间的确定

改变试验浸提时间,分别取 1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h,其他条件为料液比 1:5g/mL,浸提温度 60℃,碱液浓度 6%。根据方格星虫多糖提取率的影响选择最佳浸提时间。

#### 1.2.4 最佳浸提碱液浓度的确定

改变浸提碱液浓度,分别取 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%,其他条件为浸提时间 3h,浸提温度 60℃,料液比 1:5g/mL。根据其方格星虫多糖的提取率确定最佳浸提次数。

#### 1.2.5 多糖浸提条件正交试验

完成各个单因素试验后,为确定各个单因素之间的交互影响,因此在预实验的基础上进行了正交试验。正交试验采用四因素、三水平,从 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验表中确定各个试验组合,得出最佳浸提条件。

### 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。精密称取 100℃干燥至恒重的对照葡萄糖 508.5mg,加水溶解,定容于 200mL 容量瓶中,配成 2.5425mg/mL 的葡萄糖标准溶液。吸取稀释 5 倍的葡萄糖标准溶液 0mL、0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1.0mL 置于 20mL 的干燥刻度试管中,加超纯水至体积均为 1.0mL,再分别加入 5%苯酚 2.0mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 3.0mL,冷却至室温,490nm 处测定其吸光度(UV6300,上海美谱达公司出品),以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。将葡萄糖溶液换成粗多糖用同样的方法测定吸光度,精密称取 100℃干燥至恒重的各组粗多糖 200mg 左右,加水溶解,定容于 200mL 容量瓶中,配成溶液。吸取稀释 5 倍粗多糖溶液 0.4mL 置于 20mL 的干燥刻度试管中,加超纯水至体积均为 1.0mL,再分别加入 5%苯酚 2.0mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 3.0mL,冷却至室温,490nm 处测定其吸光度,得到的吸光值参照标准曲

线获得多糖浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄糖标准曲线

采用苯酚-硫酸法绘得葡萄糖标准曲线,结果如图1所示。

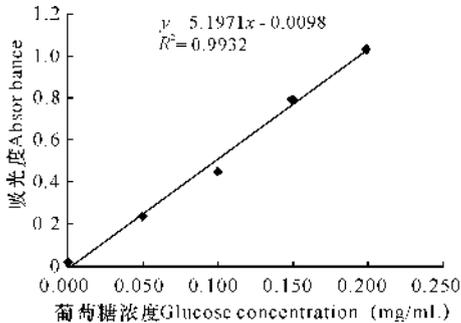


图1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

### 2.2 料液比对多糖提取率的影响

如图2所示,随着料液比的增加,方格星虫多糖提取率呈先增后降的趋势。当料液比小于1:5g/mL时,增加料液比有利于提高方格星虫的多糖提取,当料液比大于1:5g/mL时,继续提高方格星虫与碱液的料液比将使多糖提取率持续下降。以获取最大多糖提取率为目的,单因素试验中碱法提取方格星虫多糖的最适料液比为1:5g/mL。

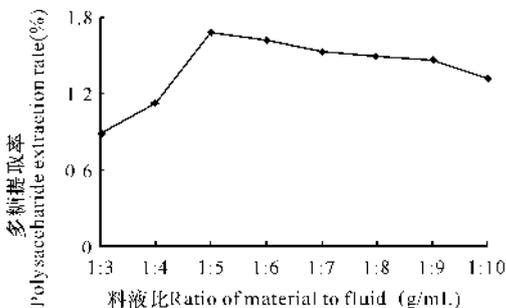


图2 料液比对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of ratio of material to fluid on the extraction percent of polysaccharides

### 2.3 浸提温度对多糖提取率的影响

如图3所示,当提取温度为50℃、60℃、70℃时,多糖的提取率都比较高,低于或高于此温度,多糖的提取率都不理想,低提取温度对提取率的影响要大于高提取温度。以获取最大多糖提取率为目的,单因素试验中碱法提取方格星虫多糖的最适温度为60℃。

### 2.4 浸提时间对多糖提取率的影响

如图4所示,方格星虫多糖提取中浸提时间对多糖提取率也有影响。浸提时间3h最佳,提取率为1.58%。延长浸提时间并不能持续提高多糖提取率。以获取最大多糖提取率为目的,单因素试验中碱法提

取方格星虫多糖的最适提取时间为3h。

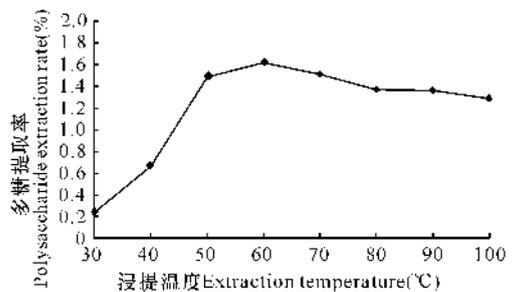


图3 浸提温度对多糖提取率的影响

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

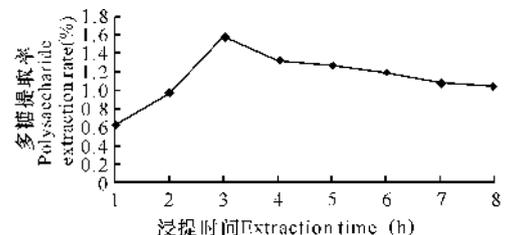


图4 浸提时间对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of time on the extraction percent of polysaccharides

### 2.5 碱液浓度对多糖提取率的影响

如图5所示,方格星虫多糖提取使用的碱液浓度同样影响多糖的提取率。碱液浓度为6%时,多糖提取率最高,为1.38%。图5结果还显示,碱液浓度过高比碱液浓度过低更不利于方格星虫的多糖提取。以获取最大多糖提取率为目的,单因素试验中碱法提取方格星虫多糖的最适碱液浓度为6%。

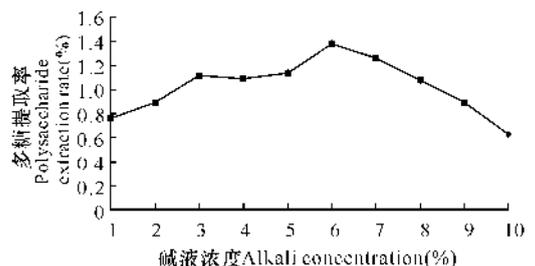


图5 碱液浓度对多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of alkali concentration on the extraction percent of polysaccharides

### 2.6 方格星虫多糖浸提条件的正交试验优化

本试验设计为查相关正交表所得,根据预实验结果,对4个影响因素分别取3个水平。从表1和表2结果可以看出,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>碱液浓度。碱法提取方格星虫多糖的最佳条件为料液比1:6g/mL、浸提温度为50℃、浸提时间为4h、碱液浓度为8%,得到的最大多糖提取率为1.81%。

表 1 碱法提取条件的因素水平

Table 1 The Factors and levels of alkaline extraction

| 水平<br>Levels | 因素 Factors                                  |  |                               |                                     |
|--------------|---|--|-------------------------------|-------------------------------------|
|              | 料液比(A)<br>Ratio of material to fluid (g/mL) | 浸提温度(B)<br>Extraction temperature (°C) | 浸提时间(C)<br>Extraction time(h) | 碱液浓度(D)<br>Alkali concentration (%) |
| 1            | 1:5   | 50                                     | 3                             | 4                                   |
| 2            | 1:6   | 60                                     | 4                             | 6                                   |
| 3            | 1:7   | 70                                     | 5                             | 8                                   |

表 2 正交试验及结果

Table 2 Results of orthogonal test

| 试验号<br>Test number    | 因素 Factors                                  |  |                               |                                     |   |
|-----------------------|---|--|-------------------------------|-------------------------------------|---|
|                       | 料液比(A)<br>Ratio of material to fluid (g/mL) | 浸提温度(B)<br>Extraction temperature (°C) | 浸提时间(C)<br>Extraction time(h) | 碱液浓度(D)<br>Alkali concentration (%) | 多糖提取率<br>Polisaccharide extraction rate (%) |
| 1                     | 1   | 1                                      | 1                             | 1                                   | 1.59  |
| 2                     | 1   | 2                                      | 2                             | 2                                   | 1.53  |
| 3                     | 1   | 3                                      | 3                             | 3                                   | 1.21  |
| 4                     | 2   | 1                                      | 2                             | 3                                   | 1.81  |
| 5                     | 2   | 2                                      | 3                             | 1                                   | 1.58  |
| 6                     | 2   | 3                                      | 1                             | 2                                   | 1.57  |
| 7                     | 3   | 1                                      | 3                             | 2                                   | 1.64  |
| 8                     | 3   | 2                                      | 1                             | 3                                   | 1.32  |
| 9                     | 3   | 3                                      | 2                             | 1                                   | 1.53  |
| K 1                   | 1.44  | 1.68                                   | 1.49                          | 1.57                                |   |
| K 2                   | 1.65  | 1.48                                   | 1.62                          | 1.58                                |   |
| K 3                   | 1.50  | 1.44                                   | 1.48                          | 1.45                                |   |
| R                     | 0.21  | 0.24                                   | 0.15                          | 0.13                                |   |
| 最优水平<br>Optimal level | A2  | B1                                     | C2                            | D3                                  |   |

### 3 结论

已有研究发现,方格星虫体壁蛋白含量非常高,因此在碱提多糖过程中作了蛋白去除的相关处理<sup>[15,16]</sup>。本试验在开始前,以水提多糖法作为对照试验,结果显示碱提法的多糖提取率远远大于水提法的多糖提取率,这与朱建飞等<sup>[17]</sup>在紫苏饼粕多糖提取中的结果一致。赵东贤等<sup>[18]</sup>在研究福寿螺(*Pomacea canaliculata*)多糖提取工艺时,发现碱提法能提高福寿螺酸性多糖的提取率。另外多糖碱提工艺也同样应用于绿疣海葵(*Anthopleur midori*)、毛肤石鳖(*Acanthochiton rubrolineatus*)、平背蜆(*Gaetice depressus*)及绒毛近方蟹(*Hemigrapsus penicillatus*)等海产品中<sup>[19]</sup>。本文的结果显示,从单因素结果来看,方格星虫碱法提取多糖工艺最佳单因素提取水平分别为料液比 1:5g/mL、温度 60°C、提取时间 3h、碱液浓度

6%。通过正交试验进行单因素交互试验后,方格星虫碱法提取多糖的最佳提取工艺为料液比 1:6g/mL,浸提温度 50°C,浸提时间 4h、碱液浓度 8%,得到的最大多糖提取率为 1.81%。经重复试验证明,该工艺条件稳定性好,多糖提取率高,可进一步投入工业化生产。

### 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.  
Wang Q L. Outline medicinal value of marine biological polysaccharide[J]. Journal of Liaocheng Teachers University: Natural Science Edition, 2002, 15(3): 59-61.

[2] 梁宁,杨磊,李静. 多糖研究进展[J]. 吉林农业,2011,5:321,329.  
Liang N, Yang L, Li J. Research progress of polysaccharide[J]. Jilin Agriculture, 2011, 5: 321, 329.

[3] Umezawa H, Okami Y, Kurasawa S, et al. Marinactan, antitumor polysaccharide produced by marine bacteria [J]. The Journal of Antibiotics, 1983, 36(5): 471.

[4] Konno C, Hikino H. Isolation and hypoglycemic activity of panaxans M, N, O and P glycans of Panax ginseng roots [J]. Pharmaceutical Biology, 1987, 25(1): 53-56.

[5] 李福川,唐志红,崔博文,等. 三种海带多糖的降糖作用 [J]. 中国海洋药物, 2000, 5: 12-15.  
Li F C, Tang Z H, Cui B W, et al. Hypoglycemic activity of three polysaccharides from *Laminaria japonica* [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2000, 5: 12-15.

[6] 王斌,袁甜,张译文,等. 仿刺参肠多糖提取物对小鼠实体瘤的抑制作用 [J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 195-199.  
Wang B, Yuan T, Zhang Y W, et al. The antitumor effect of intestinal polysaccharides in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(3): 195-199.

[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.  
Zhang Q, Tong W P, Dong L F, et al. Effects of dietary protein level on growth performance and body composition of juvenile peanut worm, *Sipunculus nudus* linnaeus [J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(1): 86-92.

[8] 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.  
Xu M Z, Zhang Q, Tong W P, et al. Effects of dietary carbohydrate level on growth, body composition and digestive enzyme activities of juvenile peanut worm, *Sipunculus nudus* [J]. Chinese Journal of Animal Nutri-

- tion,2013,25(3):534-542.
- [9] 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.  
Zhang Q,Tong W P,Dong L F,et al. Effects of dietary lipid levels on growth performance, body composition and digestive enzyme activities of juvenile peanut worm, *Sipunculus nudus* linnaeus[J]. Progress in Fishery Sciences,2011,32(6):99-106.
- [10] 张琴,童童,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.  
Zhang Q,Tong T,Tong W P,et al. Effects of dietary protein levels on weight growth and digestive enzyme activities of peanut worm, *Sipunculus nudus* linnaeus, larvae[J]. Fishery Modernization,2012,39(2):41-46.
- [11] 许明珠,张琴,童童,等. 方格星虫多糖水法提取的条件及优化[J]. 广西科学,2013,20(4):285-288.  
Xu M Z,Zhang Q,Tong T,et al. Optimization of water extraction for polysaccharide from *Sipunculus nudus* linnaeus[J]. Guangxi Sciences,2013,20(4):285-288.
- [12] 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.  
Xia Q F,Tan H L,Qin X,et al. Preliminary observation on the antibacterial activity on polysaccharides in *Sipunculus nudus* [J]. China Tropical Medicine,2007,7(12):2192-2193.
- [13] 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.  
Xia Q F,Tan H L,Qin X,et al. The study of anti-hbv polysaccharide from *Sipunculus nudus* Linnaeus [J]. Shandong Medical Journal,2009,49(8):35-37.
- [14] 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.  
Peng X N,Lei X L. Effect of polysaccharide extracted from *Sipunculus nudus* on the immunity of mouse[J]. Journal of Guangdong Ocean University,2007,27(4):54-57.
- [15] 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.  
Li K X,Shen X R,Jiang D W,et al. Comparison of the nutritive components in *Sipunculus nudus* from three different places of Chinese coastal areas[J]. Journal of Navy Medicine ,2010,31(1):1-3.
- [16] 董兰芳,张琴,童童,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.  
Dong L F,Zhang Q,Tong T,et al. Amino acid composition of peanut worm *Sipunculus nudus* at different growth stages[J]. South China Fisheries Science,2012,8(5):60-65.
- [17] 朱建飞,杨喙啦,陈岗,等. 碱提紫苏饼粕多糖的工艺优化[J]. 食品研究与开发,2011,32(2):69-71.  
Zhu J F,Yang S L,Chen G,et al. Optimization of extracting technology of polysaccharide for *Perilla* meal by alkali[J]. Food Research and Development,2011,32(2):69-71.
- [18] 赵东贤,王克霞. 福寿螺多糖提取工艺优选[J]. 安徽医药,2010,14(5):529-530.  
Zhao D X,Wang K X. Extraction process of polysaccharide from *Pila gigas* Spix[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal,2010,14(5):529-530.
- [19] 刘兴杰,刘传琳,任虹,等. 海葵等四种动物粘多糖碱提取的比较研究[J]. 烟台大学学报:自然科学与工程版,2001,14(4):264-268.  
Liu X J,Liu C L,Ren H,et al. Comparison of alkaline extraction of glycosaminoglycans from four marine invertebrates[J]. Journal of Yantai University: Natural Science and Engineering Edition,2001,14(4):264-268.

(责任编辑:尹 闯)