

## 摘要

本文采用三种方法提取岩藻多糖(水提醇沉法、水提酸沉法、水提酸沉酶解法), 分别得到样品1、样品2和样品3, 对它们的品质及抗氧化活性进行测定。结果显示, 样品3具有最好的品质以及最佳的抗氧化活性, 样品3的得率为 $6.67\% \pm 0.46\%$ , 总糖含量为 $68.22\% \pm 1.31\%$ , 硫酸根含量为 $24.90\% \pm 0.15\%$ , 岩藻糖含量为 $41.10\% \pm 0.87\%$ , 蛋白质含量为 $6.50\% \pm 0.04\%$ , 糖醛酸含量为 $3.80\% \pm 0.01\%$ , 同时得到副产物褐藻胶得率为 $10.14\% \pm 0.07\%$ 。对·OH自由基、DPPH自由基、ABTS自由基的抑制作用以及还原力测定表明, 样品1、2、3均具有抗氧化活性, 且依次为样品3>样品2>样品1。单因素实验表明方法2、3最佳提取条件为: 温度为 $90^{\circ}\text{C}$ , 时间为2h, 液料比为 $40\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

## 材料&方法

### 1. 材料与试剂

>干海带(购于福建漳州东山岛); 细菌学蛋白胨、LB琼脂 广东环凯微生物科技有限公司; 酵母粉 生工生物工程(上海)股份有限公司; 褐藻胶裂解酶 $10000\text{U/g}$  西格玛奥德里奇(上海)有限公司; 其它试剂均为分析纯产品。  
>恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司; SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司; 冷冻高速离心机 德国 Eppendorf公司; FE20 pH计 梅特勒-托利多称重设备系统有限公司; PS301F电子天平 赛多利斯科学仪器; Epoch2T微量酶标仪 美国伯腾公司; MLX201小型台式高速离心机 美国精骐公司; ALP全自动灭菌锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; ZHWY-2102/ZWY-200D 双层全温度培养摇床 上海智城分析仪器制造有限公司。

### 2. 岩藻多糖制备

>岩藻多糖的制备采用了三种方法, 分别是水提醇沉法、水提酸沉法、水提酸沉酶解法。

>水提醇沉法(方法一): 海带清洗干燥→粉碎过筛(60目)→预处理(乙醇:三氯甲烷:水=4:2:1)→烘干→提取(酸提)→沉淀糖(60%乙醇)→除褐藻胶→成品(样品1)

>水提酸沉法(方法二): 清洗干燥→粉碎过筛(60目)→提取(水提)→除杂(pH=1.4, 高速离心)→调节pH至中性→透析→冷冻干燥→成品(样品2)

>水提酸沉酶解法(方法三): 清洗干燥→粉碎过筛(60目)→提取(水提)→除杂(pH=1.4, 高速离心)→调节pH至中性→酶解(褐藻胶裂解酶)→透析→冷冻干燥→成品(样品3)

### 3. 总糖含量测定

采用苯酚-硫酸法对岩藻多糖中总糖的百分比含量进行测定。

### 4. 岩藻糖含量测定

采用高效液相色谱(HPLC)法对样品中岩藻糖组分进行定量分析。

### 5. 其他理化指标含量测定

>采用氯化钡-明胶比浊法测定岩藻多糖中的硫酸根百分比含量。

>采用考马斯亮蓝法对岩藻多糖中的蛋白质百分比含量进行测定。

>采用硫酸-咔唑法测定岩藻多糖中的糖醛酸百分比含量。

### 6. 岩藻多糖的傅立叶红外光谱

将三种岩藻多糖样品分别称取 $1.5\text{mg}$ 与烘干至恒重的KBr粉末混合, 研磨均匀后, 用压片机压成半透明薄片, 置于红外光谱仪中, 在 $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ 波长处进行检测, 记录三种岩藻多糖的红外谱图。

### 7. 岩藻多糖的抗氧化活性测定

对岩藻多糖的还原能力、清除·OH自由基、ABTS自由基以及DPPH自由基的能力进行测定。

## 结果

### 1. 三种方法制备岩藻多糖样品及关键指标对比结果

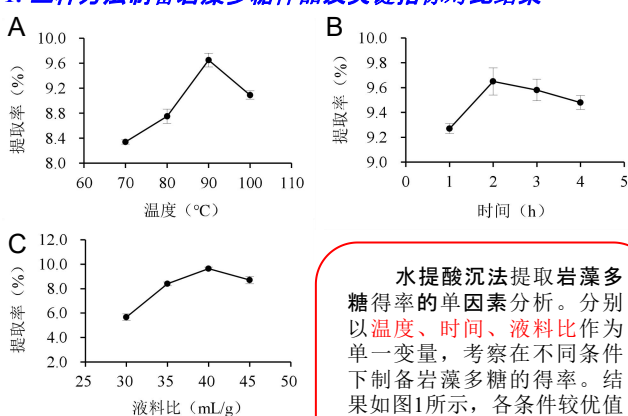


图1 水提酸沉法岩藻多糖得率单因素分析  
Fig.1 Single factor analysis of fucoidan yield

水提酸沉法提取岩藻多糖得率的单因素分析。分别以温度、时间、液料比作为单一变量, 考察在不同条件下制备岩藻多糖的得率。结果如图1所示, 各条件较优值分别为温度 $90^{\circ}\text{C}$ , 时间2h, 液料比 $40:1\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

表1 三种样品的关键指标对比  
Tab.1 Critical indicators of three samples

关键指标	样品1	样品2	样品3
岩藻多糖得率(%)	$5.87 \pm 0.23$	$9.65 \pm 0.11$	$6.67 \pm 0.46$
总糖含量(%)	$61.01 \pm 0.32$	$56.67 \pm 0.25$	$68.22 \pm 1.31$
硫酸根含量(%)	$21.10 \pm 0.14$	$22.10 \pm 0.09$	$24.90 \pm 0.15$
岩藻糖含量(%)	$32.10 \pm 0.31$	$36.70 \pm 0.28$	$41.10 \pm 0.87$
蛋白质含量(%)	$11.30 \pm 0.13$	$7.80 \pm 0.17$	$6.50 \pm 0.04$
糖醛酸含量(%)	$13.10 \pm 0.13$	$12.00 \pm 0.11$	$3.80 \pm 0.01$
褐藻胶得率(%)	$6.88 \pm 0.15$	$10.14 \pm 0.07$	$10.14 \pm 0.07$

三种方法制得样品的关键指标对比如表1所示。样品3的关键指标含量显著高于样品1和样品2, 说明样品3品质优于样品1和样品2, 故采用水提酸沉酶解法能制备出更优质的岩藻多糖样品。

### 2. 岩藻多糖的抗氧化研究

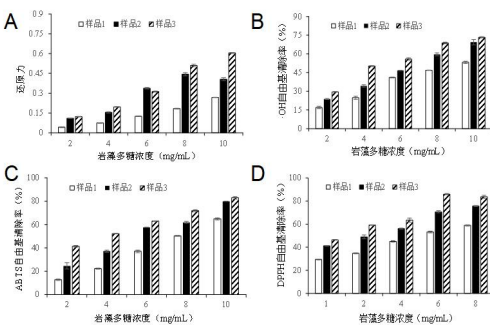


图2 岩藻多糖的抗氧化活性研究结果  
Fig.2 Antioxidant activity of fucoidan

图A,B,C,D分别表示三种样品中岩藻多糖浓度与其还原能力、清除·OH自由基、ABTS自由基以及DPPH自由基能力的关系。结果显示, 在 $0\text{-}10\text{mg/mL}$ 浓度范围内, 三种样品的抗氧化能力大小依次为样品3>样品2>样品1, 且均随浓度增大而增强。

### 3. 响应面法优化岩藻多糖的提取

表2 Box-Behnken实验因素和水平  
Tab.2 Factors and levels of Box-Behnken test

因素	-1	0	1
提取温度, A ( $^{\circ}\text{C}$ )	80	90	100
提取时间, B(h)	1	2	3
液料比, C ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )	35	40	45

在前期单因素试验的结果上, 根据响应面中心组合实验原理, 以提取时间、提取温度、提取液料比自变量, 以岩藻多糖的得率为响应值设计实验。

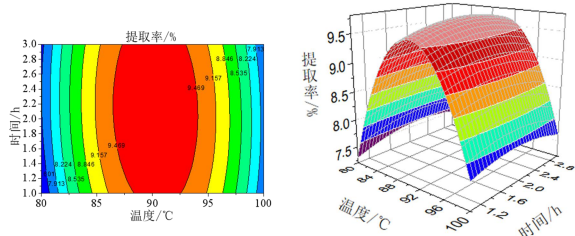


图3 提取时间与提取温度对岩藻多糖得率的影响的响应曲面图和等高线图  
Fig.3 Response surface and contour plot of effect of extraction time and extraction temperature on the yield of Fucoidan

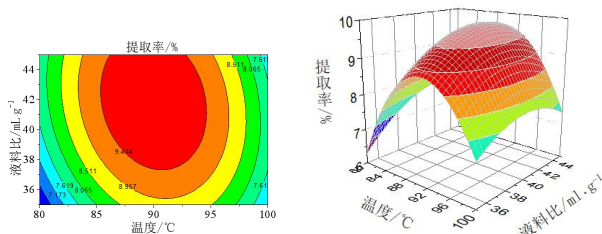


图4 液料比与提取温度对岩藻多糖得率的影响的响应曲面图和等高线图  
Fig.4 Response surface and contour plot of effect of liquid to material ratio and extraction temperature on the yield of Fucoidan

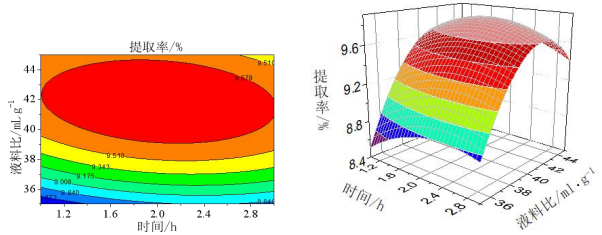


图5 液料比与提取时间对岩藻多糖得率的影响的响应曲面图和等高线图  
Fig.5 Response surface and contour plot of effect of liquid to material ratio and extraction time on the yield of Fucoidan

通过响应面法优化岩藻多糖的水提酸沉提取工艺, 对岩藻多糖的水提酸沉提取优化后的工艺条件为: 提取温度为 $90^{\circ}\text{C}$ , 提取时间为2 h, 提取液料比为 $40\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。优化条件下, 岩藻多糖得率为 $9.65\%$ , 与理论得到的相对误差很小, 表明建立的模型可靠合理, 拟合效果好。

## 结论

本研究以海带为原料, 探究非醇沉提取法对岩藻多糖的得率、品质及抗氧化活性的影响, 在保持岩藻多糖品质和活性的基础上, 寻找一种更为安全高效的提取方法。主要研究结果: 1.水提酸沉酶解法(方法3)制备岩藻多糖比水提醇沉法(方法1)和水提酸沉法(方法2)有更高的得率、更优质的理化指标。2.生物活性分析结果表明, 三种方法制备的岩藻多糖均具有显著的抗氧化活性, 且方法3制备的多糖抗氧化活性最强。3.采用响应面对方法3的水提酸沉步骤进行优化, 工艺条件优化结果为: 温度 $90^{\circ}\text{C}$ , 液料比 $40:1\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , 提取时间2 h, 优化条件下岩藻多糖得率为 $9.65\% \pm 0.11\%$ 。通过对三种提取岩藻多糖方法的比较, 证明水提酸沉酶解法是一种合理的提取方法, 提取得到的岩藻多糖品质优良。同时对提取方法进行了优化, 为岩藻多糖的工业化、经济化、安全化提取打下了基础。