

马粪海胆生殖腺粗多糖提取工艺研究

牛宗亮, 王荣镇, 董新伟, 郭承华

(烟台大学 化学生物理工学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 采用 L9(3⁴)正交实验, 以马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)生殖腺粗多糖得率为指标, 研究提取温度、提取时间、料水比、提取次数 4 个因素对马粪海胆生殖腺粗多糖提取工艺的影响。以正交实验的实验条件和马粪海胆生殖腺粗多糖得率为自变量和因变量建立多元线性模型, 所得到的统计参数分别为 $R=0.922$, $F=2.854$, 并用所建立的线性模型预测两个实验条件的多糖得率。

关键词: 马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*); 粗多糖; 正交实验; 提取工艺; 多元线性回归

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)05-0029-04

海胆是一种低等的海洋无脊椎动物, 属于棘皮动物门(Echinodermata) 海胆纲(Echinoidea)。中国黄渤海海域常见的海胆有 5 种, 包括马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)、紫海胆(*Anthocardia crassispina*)、海刺猬(*Glyptocidaris crenularis*)、中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)和光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)^[1]。目前, 国内外对海胆资源利用不够充分, 综合开发利用水平较低。对海胆资源一般局限于其生长习性、基因的结构、规律、功能、物种系统进化、受精卵的发育以及海胆用于食品保健等方面的研究^[2-5], 但对其活性物质研究较少。Murata 等^[1]使用反相高效液相色谱测定了马粪海胆的一种氨基酸—pulcherrimine; 美国学者 Biermann^[6]对海洋模式生物—光棘球海胆种系发生和进化的进行了深入的研究; 韩国学者 Youn-Ho Lee^[7]对光棘球海胆的系统进化和分歧进化时间进行了研究; 海胆多糖可以通过免疫调节和抗氧化途径, 达到抗肿瘤作用^[8]; 刘纯慧等^[9]在光棘球海胆中成功分离出几种多糖纯品, 并做了抗肿瘤和免疫活性的研究, 对马粪海胆生殖腺多糖的制备未见报道。

传统多糖提取方式一般为高温水提, 作者以马粪海胆生殖腺粗多糖得率为指标, 研究提取温度、提取时间、料水比、提取次数 4 个因素对马粪海胆生殖腺粗多糖提取的影响, 采用 L9(3⁴)正交实验法研究马粪海胆生殖腺粗多糖提取工艺, 为生产提供理论依据。

多元线性回归 (Multiple linear regression) 方法是实验中一个常用的方法, 回归方程如下所示:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_n X_n \quad (1)$$

在方程中 Y 是性质, 也就是因变量, X_1 到 X_n 代

表不同的描述符, b_1 到 b_n 代表这些描述符的系数, b_0 是方程的截距。本方法是在 SPSS 软件中运行。

多元线性逐步回归分析的优点, 在于能在为数众多的变量中, 经过筛选找出较为重要的因子, 以建立对观测数据最优化的回归方程。所谓最优化的方程具有以下两方面的意义: 一方面, 为了预报精确, 希望在最终的回归方程中包含了尽可能多的因素, 特别是那些对 Y 有显著作用的因素不能遗漏; 另一方面, 为了使用方便, 又希望预报方程中包含尽量少的变量, 况且若方程中包含对因变量根本不起作用或作用很小的量, 那么剩余平方和不仅不会由于这些变量而减少多少, 相反由于(剩余) 自由度的减少, 剩余方差反而有可能增大。同时, 这些对因变量影响不显著的变量, 也会影响回归方程的稳定性, 使回归方程的效果降低^[10]。

1 材料、仪器与试剂

马粪海胆为市售, 2009 年 4 月购于烟台红利海鲜市场。主要仪器: 20PR-520 型冰冻离心机(日本 Hitachi Koki 有限公司); R-205 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司); DZF-6020 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司); T6 新世纪型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); 所有试剂均为分析纯。

收稿日期: 2009-06-19; 修回日期: 2009-10-20

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2008E05)

作者简介: 牛宗亮(1983-), 男, 内蒙古乌兰浩特人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物活性物质研究, E-mail: nzl5423@163.com; 郭承华, 通信作者, 电话: 0535-6903551, E-mail: gch@ytu.edu.cn

2 实验方法

2.1 正交实验方案

影响多粗糖提取的主要因素为提取温度、提取时间、料水比、提取次数,故选用这4项为考察因素,每个因素拟定3个水平。选用L9(3⁴)正交表(表1),共做9组实验。

表1 4因素3水平正交实验表

Tab. 1 The orthogonal experimental design chart with four variables and three levels

水平	主要因素			
	A	B	C	D
1	70	1	10	1
2	80	2	15	2
3	90	3	20	3

注: A 为提取温度(°C); B 为提取时间(h); C 为用水量(倍); D 为提取次数(次)。下同

2.2 正交实验

取新鲜马粪海胆生殖腺,粉碎,使用等量丙酮浸泡,8 h后,倒出上层丙酮,反复4次,收集残渣减压浓缩,真空干燥至恒重,经上述步骤除去脂类等杂质^[11]。取干燥至恒重的残渣9份,每份1g,放入100 mL提取瓶中,按正交方案提取。正交实验中每次倒出的提取液经7 000 r/min离心10 min,收集上清液,沉淀转回提取瓶中继续提取。最后将水提多糖溶液浓缩定容在50 mL容量瓶中。

2.3 苯酚-硫酸法测定总糖含量标准曲线的绘制

采用苯酚-硫酸法^[12],精密称取105干燥至恒重的葡萄糖0.1711g,定容至100 mL容量瓶中,蒸馏水溶解并稀释至刻度。得到1.711 g/L葡萄糖溶液。精密吸取1.711 g/L葡萄糖溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5和3 mL,分别置于50 mL容量瓶中,并用蒸馏水定容至刻度,即得系列葡萄糖标准溶液。分别精密吸取上述标准溶液各1 mL,置于10 mL比色管中,以1 mL蒸馏水为空白,每管加经重蒸的5%的苯酚1 mL,加盖并混匀。再分别加入5 mL浓硫酸,加盖,于漩涡振荡器上彻底混匀1 min,室温静置5 min,沸水浴加热10 min,取出后冷水浴冷却至室温,于490 nm波长处测定吸光度,以吸光度A对应浓度C回归。

2.4 样品多糖含量的测定

分别精密吸取0.25 mL正交实验样品,蒸馏水补齐1 mL,按“硫酸苯酚法测定总糖含量标准曲线的绘制”方法测定A值,并带入回归方程计算多糖浓度。则马粪海胆生殖腺粗多糖得率计算公式为:

$$T = mcD / 1000M \times 100\% \quad (2)$$

式中:T为马粪海胆生殖腺粗多糖得率,m为样品检测时稀释倍数,本实验稀释倍数为4,D为待测多糖样品溶液体积,本实验体积为50 mL,c为多糖浓度,M为马粪海胆生殖腺质量。

3 结果与讨论

3.1 正交实验样品多糖含量测定

(1)苯酚-硫酸法多糖回归方程 $A = 8.1723C - 0.0567 (R^2 = 0.9992)$,其中,A为吸光度,C为糖浓度。(2)线性范围0.017 11 ~ 0.102 66 g/L。硫酸苯酚法测定总糖含量标准曲线见图1。

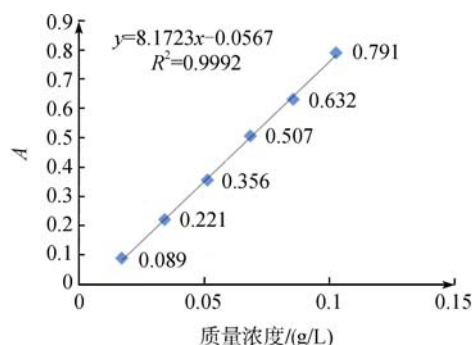


图1 硫酸苯酚法测定总糖含量标准曲线

Fig. 1 Calibration curve for glucose determination by the phenol sulfuric acid method

用上述标准曲线测定正交实验所得样品的多糖含量,结果见表2。根据表2的极差分析,可知,D因素(提取次数)的极差最大,C因素(料水比)次之,A因素(提取温度)最小。所以影响马粪海胆生殖腺粗多糖提取工艺的因素大小为:提取次数>料水比>提取时间>提取温度,见图2。

3.2 马粪海胆生殖腺粗多糖的提取的最佳工艺

根据极差分析,得到马粪海胆生殖腺粗多糖的提取的最佳工艺—A₁B₁C₃D₃,即70水浴1 h,料水比为1:20,共3次。按上述9组同样操作,验证最佳条件,共平行3组。得率平均值为1.66%。

表 2 正交实验分析结果

Tab. 2 Results of the orthogonal experiments

实验号	因素				多糖得率(%)
	A	B	C	D	
1	70	1	1:10	1	0.66
2	70	2	1:15	2	1.24
3	70	3	1:20	3	1.67
4	80	1	1:15	3	1.31
5	80	2	1:20	1	0.91
6	80	3	1:10	2	0.96
7	90	1	1:20	2	1.49
8	90	2	1:10	3	1.04
9	90	3	1:15	1	0.48
K1	3.56	3.46	2.65	2.05	
K2	3.18	3.18	3.04	3.69	
K3	3.01	3.11	4.07	4.02	
R	0.55	0.35	1.42	1.97	

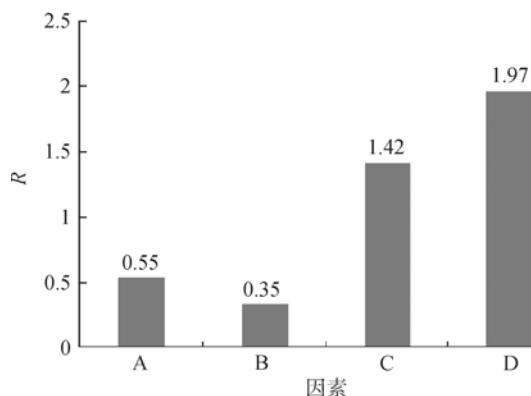


图 2 极差分析

Fig. 2 The analysis of the range

A. 提取温度; B. 提取时间; C. 料水比; D. 提取次数
 A. extraction temperature; B. extraction time; C. the ratio of starting material/water; D. times of extraction

3.3 多元线性回归模型(MLR)的建立

对正交实验所取的 4 个自变量 (X_i) 和确定的应变变量 (Y), 采用 SPSS 统计软件对上述相关参数进行逐步回归, 建立海胆多糖得率和提取参数之间的线性模型:

$$y = 0.459 - 0.008 \times T - 0.053 \times t + 0.044 \times r + 0.354 \times n$$

式中: T 为提取温度, t 为提取时间, r 为料水比, n 为提取次数。所得到的模型的 $R=0.922$, $F=2.854$, 说明多糖得率和提取工艺有显著的相关关系。

3.4 MLR 模型的预测

为了检验建立的回归模型的合理性, 用正交试

验中的 3 号和 8 号进行预测, 预测值及实验值见表 3。

表 3 MLR 模型的预测结果

Tab. 3 The predicted results of the MLR model

序号	实测值(%)	预测值(%)
3	1.67	1.68
8	1.04	1.14

从表中可以看出 MLR 模型对于 3 号和 8 号实验的预测结果较满意, 说明此模型具有很好的预测能力, 可以应用于多糖得率的预测, 为实验提供了很好的理论依据。

4 结论

笔者认为, 针对海洋生物多糖的提取类实验, 在一定范围内, 料水比、提取次数、提取时间与得率一般均正相关, 所以采用正交实验, 用极差分析得到的最佳条件不一定是最大值, 实验也验证了这个结论。但是通过正交实验找到影响提取得率的因素的大小还是非常必要的, 它可以在指导生产的过程中降低成本。同时, 采用正交实验可以通过具有代表性的实验建立线性模型, 使得到的线性方程具有更广泛的指导意义。

本实验采用正交实验研究马粪海胆多糖的提取工艺, 并首次用正交实验多得到的结果建立了海胆多糖得率和提取参数之间的多元线性回归模型, 将

所得到的模型用于海胆多糖得率的预测, 结果令人满意, 说明此模型可以用于多糖得率的预测, 所以该模型可以应用于生产实践。

参考文献:

- [1] Murata Y, Sata N U. Isolation and Structure of Pulcherimine, a novel Bitter-Tasting amino acid, from the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) ovaries[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2000, 48: 5 557-5 560.
- [2] Yokota N, Sawada H. Experimental and field studies on foraging behavior and activity rhythm of hard-spined sea urchin *Anthocidaris crassispina*[J]. **Fisheries Science**, 2006,72: 796-803.
- [3] Liu C H, Lin Q X, Gao Y, *et al.* Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2007, 67: 313-318.
- [4] Yatsuya K, Nakahara H. Diet and stable isotope ratios of gut contents and gonad of the sea urchin *Anthocidaris crassispina* (A. Agassiz) in two different adjacent habitats, the *Sargassum area* and *Corallina area*[J]. **Fisheries Science**, 2004, 70: 285-292.
- [5] Agatsuma Y, Seki T. Instantaneous effect of dibromomethane on metamorphosis of larvae of the sea urchins *Strongylocentrotus nudus* and *Strongylocentrotus ermedius*[J]. **Aquaculture**, 2006, 251: 549-557.
- [6] Biermann C H, Kessing B D. Phylogeny and development of marine model species:strongylocentrotid sea urchins[J]. **Evolution & Development**, 2003, 5(4): 360-371.
- [7] Lee Y H. Molecular phylogenies and divergence times of sea urchin species of strongylocentrotidae, echinoida[J]. **Molecular Biology and Evolution**, 2003, 20(8): 1 211-1 221.
- [8] 张忠玲, 朱波, 张翠, 等. 海胆肠多糖致 Bel7402 人肝癌细胞凋亡的扫描电镜观察[J]. **电子显微学报**, 2003, 22(6): 467-467.
- [9] 刘纯慧, 叶亮, 林亲雄, 等. 海胆黄多糖 SEP 的制备及其抗肿瘤作用研究[J]. **药物生物技术**, 2006, 13(6): 429-432.
- [10] 阎伟, 宗世祥, 骆有庆, 等. 逐步回归模型在油蒿钻蛀性害虫预测中的应用[J]. **北京林业大学学报**, 2009, 31: 140-144.
- [11] 田昌林, 鲍忠剑, 田文儒, 等. 丙酮法和碱法脱脂对胶原蛋白生产的影响[J]. **动物医学进展**, 2007, 28(4): 43-47.
- [12] 李妍, 魏建, 许旭, 等. 苯酚-硫酸法定量测定桔梗多糖的研究[J]. **时珍国医国药**, 2009, 20(1): 5-7.

Optimization of extracting crude polysaccharides from the gonad of *Hemicentrotus pulcherrimus*

NIU Zong-liang, WANG Rong-zhen, DONG Xin-wei, GUO Cheng-hua

(Chemistry and Biology College, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Jun., 19, 2009

Key words: *Hemicentrotus pulcherrimus*; crude polysaccharide; orthogonal experiment; extraction process; multiple linear regression

Abstract: The extraction temperature, extraction time, ratios of starting material/water and times of extraction were selected as variables in the L9(3⁴)experimental design. Their different effects on the yield of polysaccharides extracted from the gonad of *Hemicentrotus pulcherrimus* were studied. In addition, a multiple linear regression model, in which the yield of polysaccharide was a function of the experiment conditions of the orthogonal experiments, was constructed to simulate the yields of polysaccharides under two experimental conditions. The statistic parameters were $R = 0.922$ and $F = 2.854$.

(本文编辑: 康亦兼)