

钝顶螺旋藻多糖提取工艺的研究——三氯乙酸(TCA)法的正交实验优化

孙远征, 张学成, 纪 雷

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 研究了用三氯乙酸(TCA)脱除蛋白质提取钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)多糖的工艺,并以提取率、样品糖含量与蛋白含量为指标,应用正交实验设计优化了提取液pH值、提取温度及提取时间3个因素。结果表明,在提取液pH值为12、提取温度为90℃及提取时间为8h的最佳条件下,所得螺旋藻多糖为白色粉末,提取率为3.10%,糖质量分数为81.79%,蛋白质量分数为0.57%。

关键词: 钝顶螺旋藻多糖; 三氯乙酸(TCA); 正交实验设计

中图分类号: Q539 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)04-0042-06

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)又名钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*),属于蓝藻门(Cyanophyta),蓝藻纲(Cyanophyceae),颤藻目(Oscillatoriales),颤藻科(Oscillatoriaceae),是一种丝状原核藻类,富含蛋白质、脂肪、维生素、矿物质、叶绿素、β-胡萝卜素及多糖^[1]。螺旋藻多糖是存在于螺旋藻中的生物大分子,属酸性杂多糖,其分子由鼠李糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖以及葡萄糖醛酸等分子组成^[2]。研究表明,多糖是螺旋藻中重要的生物活性物质之一^[3],它具有显著的抗病毒抗辐射抗突变功能^[4-6],能提高机体的细胞免疫功能和体液免疫功能^[7-9],抑制癌细胞DNA的合成、抵制癌细胞增殖^[10],减轻辐射所引起的遗传损伤等^[11-14]。由于螺旋藻中大部分是蛋白质,因此在螺旋藻多糖的提取工艺中,脱除蛋白质是一个主要环节。目前制备螺旋藻多糖常用的方法是热水提取、Sevag法除蛋白质,但此方法有机试剂消耗量大,工艺流程长,产品中蛋白质含量较高^[15]。作者对螺旋藻多糖的提取工艺进行了改进,采用碱性溶液提取、三氯乙酸沉淀蛋白质。在螺旋藻多糖的提取工艺中选取合适的提取液pH值至关重要,直接影响提取结果。温度对提取结果也有非常大的影响,螺旋藻多糖在水中的溶解度随温度上升而升高,温度低于50℃时多糖基本没有被提

取,高于50℃时提取率随温度上升而明显升高并且蛋白可变性易被沉淀,使提取物中蛋白含量降低^[16]。提取时间也是影响提取结果的另一因素,由于螺旋藻细胞结构紧密,干藻粉在水中溶解慢,随提取时间增加其提取率也增加,一定时间后基本上达到平衡^[17]。由此可见,提取液的pH值、提取温度及提取时间是能对提取结果产生重大影响的三个因素,合理选取此三因素的实验值才能使提取效果达到最佳。因此,作者采用正交设计方法优化了三个因素的实验条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

螺旋藻粉(由山东无棣生物工程公司提供),95%乙醇、盐酸、三氯乙酸(TCA)、丙酮、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝G250,试剂均为分析纯。

收稿日期: 2005-03-14; 修回日期: 2005-06-14

作者简介: 孙远征(1981),男,硕士研究生,研究方向:藻类生物化学, E-mail: sunyuanzheng81.student@sina.com; 张学成,通讯作者,电话: 0532-82032789, E-mail: xczhang@ouc.edu.cn

1.2 螺旋藻多糖的传统提取方法

称取 100 g 螺旋藻粉, 加入 800 mL 95% 乙醇, 浸泡过夜; 3 600 r/min 离心 20 min, 37°C 烘干藻粉; 按 1: 12 质量比例加双蒸水, 用 NaOH 将溶液 pH 值调至 10; 80°C 水浴 6 h; 3 600 r/min 离心 30 min, 取上清, 加 10% 盐酸将上清液 pH 值调至 7.0, 后逐滴加入 5% 三氯乙酸沉淀蛋白, 4°C 过夜; 3 600 r/min 离心 20 min, 上清再加 5% 三氯乙酸沉淀蛋白, 静置 3 h; 3 600 r/min 离心 20 min, 上清加 5 倍体积 95% 乙醇沉淀多糖, 4°C 过夜; 3 600 r/min 离心 20 min, 取沉淀, 用丙酮洗涤沉淀两次, 冷冻干燥。

1.3 正交实验设计

作者选取了实验中的提取液 pH 值、提取温度及提取时间 3 个因素, 并相应地对每一因素各自选取了 3 个水平: 提取液 pH 值的第 1, 2, 3 水平分别取 10, 11, 12, 提取温度分别取 70, 80, 90°C, 提取时间分别取 4, 6, 8 h, 即 3 因素 3 水平实验。由于是 3 因素 3 水平实验且 3 个因素间无交互作用, 而正交表 $L_9(3^4)$ 是 3 水平表并可安排 4 个因素, 且只需做 9 次试验, 故选 $L_9(3^4)$ 比较合适。正交表 $L_9(3^4)$ 中 ABCD 分别代表 4 个无交互作用的不同因素, ABCD4 列中的数字分别代表该列所填因素的相应水平, 每一行就是一个实验方案, 共 9 次实验^[18]。现只需将提取液 pH 值、提取温度和提取时间 3 因素随机分布到 ABCD4 个因素中的 3 个, 另一列作为空列即可。本文设计为: A 代表提取液 pH 值, B 代表提取温度, C 代表提取时间, D 作为空列。则正交表设计见表 1。

表 1 实验设计的正交表

Tab. 1 The orthogonal table designed in the experiment

实验序号	提取液 pH 值	提取温度(°C)	提取时间(h)	空列(水平)
1	10	70	4	1
2	10	80	6	2
3	10	90	8	3
4	11	70	6	3
5	11	80	8	1
6	11	90	4	2
7	12	70	8	2
8	12	80	4	3
9	12	90	6	1

1.4 提取生物指标的测定

1.4.1 提取率的测定

提取率 = (所得样品质量 / 螺旋藻粉质量) × 100%

1.4.2 样品糖含量的测定(苯酚硫酸法^[19])

标准曲线的制作: 吸取葡萄糖标准溶液(40 mg/L) 0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mL, 各加蒸馏水补足至 2.0 mL, 然后加入 6% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL, 静置 10 min, 摇匀, 室温放置 20 min 后于 490 nm 测吸光度(A)。以糖质量浓度(mg/L)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 作标准曲线。

样品糖含量的测定: 用蒸馏水将样品配成一定浓度的溶液(使糖质量浓度尽量接近葡萄糖标准溶液的质量浓度 40 mg/L 为宜, 分别称取 1~9 号实验的糖样品, 称取的质量依次为 9.0, 9.4, 10.8, 11.0, 11.2, 9.0, 8.8, 9.1, 9.1 mg。本实验中 1, 2, 6, 7, 8, 9 号样品均用蒸馏水在 200 mL 容量瓶中定容至 200 mL, 3, 4, 5 号样品均用蒸馏水在 250 mL 容量瓶中定容至 250 mL), 精密吸取样品溶液 1.6 mL, 置于 10 mL 比色管中, 加蒸馏水补足至 2.0 mL。空白同此。样品管和空白管中加入 6% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 静置 10 min, 摇匀, 室温放置 20 min 后于 490 nm 测吸光度(A)。

多糖质量分数(%) = [A_{490} 值查标准曲线所得糖质量浓度(mg/L) × 样品稀释倍数(1.25) × 样品的定容体积(mL)] / [所测样品的用量(mg) × 1 000] × 100%

1.4.3 样品蛋白含量的测定(考马斯亮蓝 G-250 法^[20])

标准曲线的制作: 吸取牛血清白蛋白标准溶液(100 mg/L) 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 各加蒸馏水补足至 1.0 mL, 然后各加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 5.0 mL, 摇匀, 室温放置 5 min 后于 595 nm 测吸光度(A)。以蛋白质量浓度(mg/L)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 得标准曲线。

样品蛋白含量的测定: 用蒸馏水将样品配成一定浓度的溶液(应用苯酚硫酸法中所配制的样品溶液即可), 精密吸取样品溶液 0.6 mL, 置于 10 mL 比色管中, 加蒸馏水补足至 1.0 mL。空白同此。样品管和空白管中各加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 5.0 mL,

摇匀,室温放置 5 min 后于 595 nm 测吸光度(A)。

蛋白质质量分数(%) = $[A_{595}$ 值查标准曲线所得蛋白质质量浓度(mg/L) × 样品稀释倍数(1.67) × 样品的定容体积(mL)] / [所测样品的用量(mg) × 1 000] × 100%

2 结果

苯酚 硫酸法标准曲线中糖质量浓度依次为: 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 mg/L, 相对应的 A_{490} 依次为: 0.094, 0.129, 0.163, 0.192, 0.239, 0.269, 0.293, 0.331(空白为 0)。标准曲线见图 1。

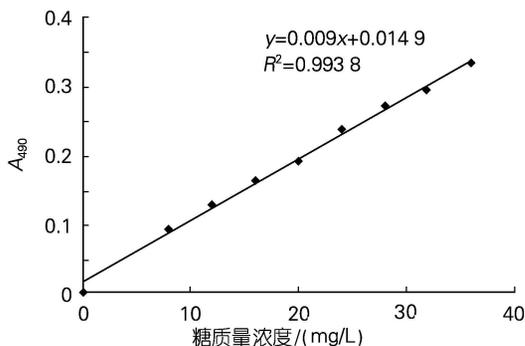


图 1 苯酚 硫酸法的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of phenol sulfuric acid method

考马斯亮蓝 G 250 法标准曲线中蛋白质质量浓度

依次为: 20, 40, 60, 80, 100 mg/L, 相对应的 A_{595} 依次为: 0.216, 0.338, 0.466, 0.611, 0.762(空白为 0)。标准曲线见图 2。

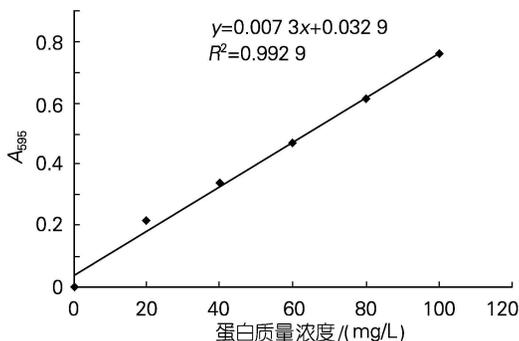


图 2 考马斯亮蓝 G 250 法的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of coomassie brilliant blue G 250 method

依照表 1 所设计的正交表实验序号, 1~9 号 9 次实验每次均取 20 g 螺旋藻粉, 所提取的螺旋藻多糖样品质量依次为: 0.46, 0.66, 0.90, 0.30, 0.52, 0.74, 0.24, 0.32, 0.60 g。

2.1 提取率、样品糖含量和蛋白含量的测定结果

依照前述提取率、糖含量和蛋白含量的测定方法, 1~9 号样品各指标测定结果见表 2。

表 2 样品各生物指标的测定结果

Tab. 2 The results of A_{490} , A_{595} , extraction rate, total carbohydrate contents and protein contents of samples

生物指标	样品								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A_{490}	0.170	0.192	0.182	0.203	0.219	0.222	0.256	0.258	0.265
A_{595}	0.057	0.056	0.051	0.048	0.046	0.044	0.039	0.036	0.035
提取率(%)	2.300	3.300	4.500	1.500	2.600	3.700	1.200	1.600	3.000
糖质量分数(%)	47.870	52.335	53.401	59.375	63.275	63.920	73.579	74.206	76.343
蛋白质质量分数(%)	12.227	11.221	9.566	7.835	6.676	5.632	3.165	1.556	1.055

2.2 提取率、样品糖含量和蛋白含量的极差分析结果

对提取率、糖含量和蛋白含量进行极差分析, 结果见表 3。

由表 3 极差分析可知, 对提取率而言, 提取液 pH 值、提取温度及提取时间的极差分别为 1.434,

2.066, 0.234, 温度对提取率影响最大, pH 值次之, 时间对提取率影响最小。最佳提取条件为提取液 pH 为 10, 提取温度为 90℃, 提取时间为 8h; 对糖含量而言, 提取液 pH 值、提取温度及提取时间的极差分别为 23.400, 4.387, 1.527, pH 值对糖含量影响最大, 温度次之, 时间对糖含量影响最小。最佳提取条件为提取液 pH 为 12, 提取温度为 90℃, 提取时间为 8h;

表 3 提取率、样品糖含量和蛋白含量极差分析

Tab. 3 The range analysis of extraction rate, total carbohydrate contents and protein content

实验	提取液 pH	温度(℃)	时间(h)	空列(水平)	提取率(%)	糖质量分数(%)	蛋白质量分数(%)
1	10	70	4	1	2.30	47.870	12.227
2	10	80	6	2	3.30	52.335	11.221
3	10	90	8	3	4.50	53.401	9.566
4	11	70	6	3	1.50	59.375	7.835
5	11	80	8	1	2.60	63.275	6.676
6	11	90	4	2	3.70	63.920	5.632
7	12	70	8	2	1.20	73.579	3.165
8	12	80	4	3	1.60	74.206	1.556
9	12	90	6	1	3.00	76.343	1.055
均值 1 a	3.367	1.667	2.533	2.633			
均值 2 a	2.600	2.500	2.600	2.733			
均值 3 a	1.933	3.733	2.767	2.533			
极差 a	1.434	2.066	0.234	0.200			
均值 1 b	51.309	60.275	61.999	62.496			
均值 2 b	62.190	63.272	62.684	63.278			
均值 3 b	74.709	64.662	63.526	62.435			
极差 b	23.400	4.387	1.527	0.843			
均值 1 c	11.005	7.742	6.472	6.653			
均值 2 c	6.714	6.484	6.704	6.673			
均值 3 c	1.925	5.418	6.469	6.319			
极差 c	9.080	2.324	0.235	0.354			

注: a、b、c 分别表示提取率、样品糖质量分数和蛋白质量分数对蛋白含量而言, 提取液 pH 值、提取温度及提取时间的极差分别为 9.080, 2.324, 0.235, pH 值对蛋白含量影响最大, 温度次之, 时间影响最小。最佳提取条件为提取液 pH 为 12, 提取温度为 90℃, 提取时间为 8h, 此时蛋白含量最小。

2.3 提取率、样品糖含量和蛋白含量的方差分析结果

由表 4 提取率方差分析可知: 提取温度对提取率影响极显著, 提取液 pH 值对提取率影响显著, 提取时间对提取率影响不显著。三个因素的 F 比分别为 51.450, 108.117, 1.450, 则温度对提取率影响最大, pH 值次之, 时间影响最小, 与极差分析一致。

表 4 提取率方差分析

Tab. 4 The variance analysis of extraction rate

因素	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
提取液 pH	3.087	2	51.450	显著
提取温度	6.487	2	108.117	极显著
提取时间	0.087	2	1.450	
误差	0.06	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$

由表 5 样品糖含量方差分析可知: 提取液 pH 值对样品糖含量影响极显著, 提取温度对样品糖含量影响显著, 提取时间对样品糖含量影响不显著。三个因素的 F 比分别为 620.425, 22.749, 2.647, 则 pH 值对糖含量影响最大, 温度次之, 时间影响最小, 与极差分析一致。

表 5 样品糖含量方差分析

Tab. 5 The variance analysis of total carbohydrate contents

因素	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
提取液 pH	822.683	2	620.425	极显著
提取温度	30.165	2	22.746	显著
提取时间	3.510	2	2.647	
误差	1.33	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$, $F_{0.01}(2,2) = 99.0$

由表 6 样品蛋白含量方差分析可知: 提取液 pH 值对样品蛋白含量影响极显著, 提取温度对样品蛋白含量影响显著, 提取时间对样品蛋白含量影响不显著。三个因素的 F 比分别为 522.262, 34.278, 0.460, 则 pH 值对蛋白含量影响最大, 温度次之, 时间影响最小, 与极差分析一致。

表 6 样品蛋白含量方差分析

Tab. 6 The variance analysis of protein contents

因素	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
提取液 pH	123.776	2	522.262	极显著
提取温度	8.124	2	34.278	显著
提取时间	0.109	2	0.460	
误差	0.24	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$, $F_{0.01}(2,2) = 99.0$

3 讨论

综合以上三个指标的正交实验分析结果可知: 提取液 pH 为 12、提取温度为 90℃、提取时间为 8 h 的提取条件可使样品的糖含量及蛋白含量达到最佳效果; 但对于提取率而言, pH 为 10、温度为 90℃、时间为 8 h 时才能达到最佳提取效果。故作者对此两个提取条件又进行了比较验证: (1) pH 为 12, 温度为 90℃, 时间为 8 h 做 3 次平行实验, 所提取样品质量依次为 0.63, 0.62, 0.60 g, 则提取率为 (3.10 ± 0.1)%。3 次实验均取 8.8 mg 样品, 用蒸馏水在 200 mL 容量瓶中定容至 200 mL, 依照前述方法, 测得 490 nm 和 595 nm 的吸光度分别为 0.272, 0.274, 0.275; 0.034, 0.034, 0.034, 最终测得糖质量分数与蛋白质量分数分别为 (81.79 ± 0.7)%, 0.57%。(2) pH 为 10, 温度为 90℃, 时间为 8 h 这正是表 1 所设计的正交表中的 3 号实验: 提取率为 4.50%, 糖质量分数与蛋白质量分数分别为 53.401%, 9.566%。二者相比之下, pH 为 12、温度为 90℃、时间为 8 h 是最佳的实验条件。传统实验条件是 pH 为 10、温度为 80℃、时间为 6 h, 即是表 1 所设计的正交表中的 2 号

实验: 提取率为 3.30%, 糖质量分数与蛋白质量分数分别为 52.335%, 11.221%。由于提取多糖时藻体中的蛋白质也被提取, 蛋白质的提取可引起细胞结构的破坏, 这有利于多糖的提取, 碱性越强越利于蛋白质的提取并且螺旋藻多糖在水中的溶解度随温度上升而升高, 故优化后的实验条件 pH 为 12、温度为 90℃ 既可使螺旋藻多糖从细胞中充分释放充分溶解, 高温下又可使蛋白易变性被沉淀, 导致样品糖含量明显高于传统条件而蛋白含量又明显低于传统条件。糖含量明显提高而蛋白含量又明显降低使得多糖中杂质减少, 故较传统条件提取率稍偏低。提取时间对实验结果无显著影响, 8h 已可使提取过程达到平衡。再次相比之下, 可知条件优化后实验效果要明显优于传统实验条件, 故确定 pH 为 12、温度为 90℃、时间为 8 h 是最佳实验条件。

参考文献:

- [1] 郭维平, 张可. 螺旋藻多糖的分离、纯化与检测[J]. 江苏食品与发酵, 2003, 1: 22-27.
- [2] 章银良, 李红旗, 高峻, 等. 螺旋藻多糖提取新工艺的研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(2): 13-15.
- [3] 左绍远, 田兴亚. 螺旋藻多糖生物学活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(6): 553-554.
- [4] Hayashi T, Hayashi K. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications[J]. *J Nat Prod*, 1996, 59: 83-87.
- [5] Hayashi K, Hayashi T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis* [J]. *AIDS Res Human Retroviruses*, 1996, 12: 1463-1471.
- [6] Lee J B, Hayashi T. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non heterocystous cyanobacteria[J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 136-138.
- [7] 左绍远, 马润泉. 螺旋藻多糖对小鼠单核巨噬细胞和 K 细胞 ADCC 活性的影响[J]. 大理医学院学报, 1996, 5(1): 3-3.
- [8] Richmond A. *Spirulina* Microalgal Biochemistry[M]. Borowitzka M: Cambridge University Press, 1998. 58-60.
- [9] 左绍远, 朱正宇, 马润泉. 螺旋藻多糖(PSP)对免疫功能的影响[J]. 药物与生物技术, 1996, 3(3): 158-161.
- [10] Patier G. An anticancer activity of polysaccharide from *Spirulina platensis* [J]. *Appl Phycol*, 1993, 5: 343-346.
- [11] 庞启深, 郭宝红, 阮继红. 螺旋藻多糖对核酸内切酶

- 活性和 DNA 修复合成的增强作用[J]. 遗传学报, 1998, 15(5): 374-376.
- [12] 张成武, 曾绍琪, 张媛珍, 等. 钝顶螺旋藻多糖和藻蓝蛋白对小鼠急性放射病的防护效应[J]. 营养学报, 1996, 18(3): 327-331.
- [13] Riccardi G. Production of amino acid by analogresistant mutant of the cyanobacterium *Spirulina platensis* [J]. *Bacteriology*, 1981, 147: 1 00F1 002.
- [14] 郭宝红, 庞启深. 螺旋藻多糖对植物细胞辐射遗传损伤的防护效应[J]. 植物学报, 1992, 34(10): 809-811.
- [15] 王辉, 曾和平, 杨世柱. 螺旋藻水溶性多糖的纯化及其本征特理[J]. 精细化工, 1999, 5: 26-28.
- [16] 钱志刚. 螺旋藻多糖提取新工艺研究[J]. 淮海工学院学报, 2000, 9(2): 50-52.
- [17] 陈运中, 张桂红, 王克安, 等. 螺旋藻粉增溶技术的研究[J]. 食品研究与开发, 1999, 20(1): 12-14.
- [18] 李永乐, 胡庆军. 应用数理统计[M]. 长沙: 国防科技大学出版社, 2003. 52-53.
- [19] 魏绍云, 齐慧玲, 王继伦, 等. 硫酸苯酚法测定白及多糖[J]. 天津化工, 2000, 3: 35-36.
- [20] 刘延琳, 姜彩虹. 白葡萄酒中蛋白质含量的测定——考马斯亮蓝 G 250 法[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 1998, 4: 43-44.

Study on the extraction technology of polysaccharides from *Spirulina platensis* ——the optimized TCA method by Orthogonal design

SUN Yuanyuan, ZHANG Xuocheng, JI Lei

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar., 10, 2005

Key words: polysaccharides from *Spirulina platensis*; TCA; Orthogonal design

Abstract: The extraction technology of polysaccharides from *Spirulina platensis* by removing protein with TCA was studied in this article, the orthogonal design was employed to test the effects of the three factors including pH of water, temperature of extraction and time of extraction on the extraction rate, total carbohydrate contents and protein contents of polysaccharides from *S. platensis* and optimize the three factors. The final result indicated that the optimum pH of water, temperature and time of extraction were 12, 90°C and 8h, under this optimum condition the fraction of polysaccharide gained from *S. platensis* was a white powder, the extraction rate, the fraction of carbohydrate contents and fraction of protein contents were 3.10%, 81.79% and 0.57%.

(本文编辑:张培新)