

海带废渣中提取岩藻聚糖硫酸酯的工艺研究

刘旭^{1,2}, 曲桂燕^{2,3}, 周裔彬¹, 袁毅², 韩丽君²

(1. 安徽农业大学, 安徽 合肥 230036; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 中国海洋大学, 山东 青岛 266100)

摘要: 采用响应曲面分析法研究了氯化钙水提法从海带废渣中提取岩藻聚糖硫酸酯的制备技术。在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 试验设计原理, 通过建立数学模型对提取温度、提取时间、料液比等因素进行显著性和交互性分析研究, 获得了最佳提取制备参数。结果表明, 提取温度 68℃, 提取时间 6 h, 料液比 1:80 时, 可以获得 3.95% 的岩藻聚糖硫酸酯。其中岩藻糖含量为 17.47%, 硫酸根含量为 37.14%。

关键词: 岩藻聚糖硫酸酯; 海带废渣; 响应面法

中图分类号: Q53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)12-0025-07

岩藻聚糖硫酸酯是存在于褐藻中的一种水溶性杂多糖, 其主要成分除了 L-岩藻糖和硫酸根外, 还含有半乳糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、糖醛酸、蛋白质^[1-2]等。研究表明, 岩藻聚糖硫酸酯具有广泛的生理活性, 如具有抗氧化^[3]、抗凝血^[3-4]、抗病毒^[5]、抗肿瘤^[6]、降血脂^[7]、抗癌^[8-9]、调节免疫^[10]等作用, 具有广阔的保健品、药品开发前景。

海带废渣是工业上用海带提取碘、甘露醇、褐藻酸钠后剩余的残渣, 研究其成分发现, 其中含有的营养物质相当于原海带干重的 70% 左右^[11], 除了含有粗纤维素、蛋白质、多糖、矿物质和微量元素等, 还含有相当含量价值极高的岩藻聚糖硫酸酯。但大量的海带废渣因成分复杂, 且广泛存在于生产过程中产生的废水中, 难以处置和开发, 故随着生产的完成作为废弃物排放, 不仅浪费其大量的有效成分, 还带来一系列环境污染问题。

目前提取岩藻聚糖硫酸酯的原料大多为新鲜海带^[1, 12-13], 但以海带废渣为原料提取岩藻聚糖硫酸酯还未见报道。海带废渣杂质较多, 含较多褐藻胶, 褐藻胶遇水膨胀, 使海带废渣在水溶液中吸水膨胀, 从而吸附大量提取溶剂。此外, 大量褐藻胶的存在也给后期岩藻聚糖硫酸酯的纯化带来困难, 使提取更加复杂和不易实施, 影响岩藻聚糖硫酸酯实际提取率。CaCl₂ 可与褐藻胶生成不易膨胀的褐藻酸钙, 从而抑制海带膨胀^[14]。本文采用氯化钙水提法从海带废渣中提取岩藻聚糖硫酸酯, 并采用响应面分析法(response surface methodology, RSM)^[15-21], 利用合理

的试验设计, 采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最佳提取参数, 并以响应面分析对提取参数进行优化, 解决了提取参数多变量的问题, 获得了最佳提取参数以及较高的提取率。

1 材料、仪器与试剂

海带废渣(采自日照结晶集团), 清洗去除表面杂质, 50℃ 烘箱中干燥至恒重后粉碎, 过 100 目筛备用。

电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备有限公司); 数显恒温水浴锅 HH-4(国华电器有限公司)万能粉碎机; Unico UV-2000 分光光度计(尤尼科(上海)仪器有限公司); SC-3610 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); RE-2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。所用试剂均为国产分析纯。

95% 乙醇; K₂SO₄、BaCl₂、明胶、浓盐酸; L-半胱氨酸盐酸盐、浓硫酸以上试剂均为国产分析纯。L-岩藻糖(Sigma)。

收稿日期: 2012-02-22; 修回日期: 2012-06-01

基金项目: 海洋公益性行业科研专项(201105029-9)

作者简介: 刘旭(1987-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事海藻多糖研究, 电话: 0532-82898741, E-mail: sunnylx.0204@163.com; 周裔彬, 通信作者, E-mail: zhouyibin@ahau.edu.cn; 韩丽君, 通信作者, E-mail: ljhan@qdio.ac.cn

2 试验方法

2.1 提取工艺

称取 5 g 海带废渣粉, 以不同料液比(g/mL) (1%CaCl₂)加入水混匀, 在不同条件下提取多糖。操作完毕后离心, 取上清液抽滤, 滤液减压浓缩, 后加入 95%乙醇至其终体积分数为 30%, 静置 1 h, 离心去褐藻胶, 上清液加入 95%乙醇至其终体积分数为 70%, 离心收集岩藻多糖粗沉淀。用无水乙醇洗涤沉淀, 冷冻干燥得粗品。称重并计算得率。

2.2 单因素试验

选取提取温度、提取时间、料液比这三个对岩藻聚糖硫酸酯提取率有显著影响的因素, 以提取率为考察指标, 得出较佳的单因素水平进行响应面试验。参考以往文献, 设提取温度 6 个水平, 分别为 40, 50, 60, 70, 80, 90。其他试验条件一致: $V_{\text{水体积}}/W_{\text{干粉重量}}=40$, 提取时间 4 h; 提取时间 6 个水平, 分别为 2, 3, 4, 5, 6, 7 h。其他试验条件一致: $V_{\text{水体积}}/W_{\text{干粉重量}}=40$, 温度为 70; 料液比 6 个水平, 分别为 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80。其他试验条件一致: 提取时间 4 h, 温度为 70。

2.3 响应面法优化提取工艺

根据 Box-Behnken 试验设计原理, 综合单因素试验结果, 选取提取温度、提取时间、料液比 3 因素进行响应面优化试验, 采用 Design-Expert8.0 软件进行回归分析。响应面试验的因素和水平编码值见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Tab. 1 Factors and Levels of response surface analysis

因素编码	水平		
	-1	0	1
A 温度参数()	60	70	80
B 时间参数(h)	4	5	6
C 料液比参数	1:60	1:70	1:80

2.4 分析方法

2.4.1 岩藻糖含量测定(半胱氨酸盐酸盐法^[22]):

以 L-岩藻糖为标准糖绘制标准曲线, 标准曲线 $y=0.0019x+0.0015$, $R^2=0.9985$ 。

样品含量测定: 取配制的 0.1% 样品溶液 0.2 mL,

按标准糖的方法测定其吸光度, 通过标准曲线方程计算其岩藻糖含量。

2.4.2 硫酸根含量测定——明胶氯化钡比浊法^[23]

以硫酸钾为标准品绘制标准曲线, 标准曲线: $y=2.6728x+0.0075$, $R^2=0.9962$ 。

样品含量测定: 取一定量样品放入安瓿瓶中, 加 2 mol/LHCl 8 mL, 待样品溶胀后, 封管, 在水浴锅中加热 4 h, 取出冷至室温。把样品从安瓿瓶中取出, 用蒸馏水慢慢少量冲洗, 定容至 25 mL。滤纸过滤, 取 1 mL 按标准品方法测其吸光度, 通过标准曲线方程计算其岩藻糖含量。

2.5 数据处理

本试验利用统计分析软件 Design-Expert8.0 进行试验设计和数据分析, 每组试验重复 3 次, 结果以平均值 ± 标准偏差表示。

3 结果与讨论

3.1 单因素试验结果

3.1.1 提取温度对岩藻聚糖硫酸酯提取率的影响

固定料液比 1:40, 分别在提取温度为 40~90 下提取 4 h, 提取温度对提取率的影响见图 1。

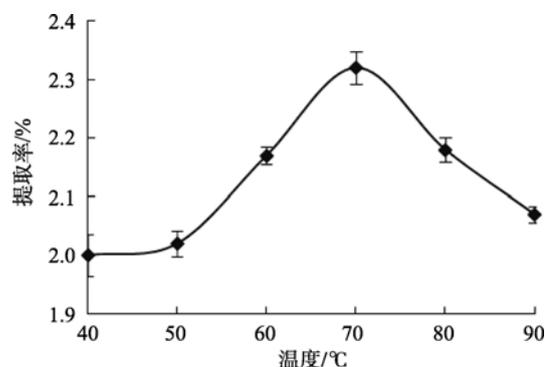


图 1 温度对岩藻聚糖硫酸酯提取率的影响

Fig. 1 The effect of extraction temperature on fucoidan yield

由图 1 可知, 当温度由 40~70 时, 岩藻聚糖硫酸酯提取率迅速上升, 最高达到 2.3%; 但当温度继续升高, 在 70~90 时, 得率反而下降。可能随着温度的升高, 岩藻聚糖硫酸酯发生降解, 导致得率有所下降。

3.1.2 提取时间对岩藻聚糖硫酸酯提取率的影响

固定提取温度为 70, 料液比 1:40, 分别提取 2~7 h, 提取时间对提取率的影响见图 2。

由图 2 可知, 当提取时间由 2 h 延长至 5 h, 岩藻

聚糖硫酸酯提取率不断升高，最高达到 2.37%；但当提取时间继续延长至 7 h 时，提取率呈现下降趋势。这可能是由于提取时间过长导致多糖部分降解。

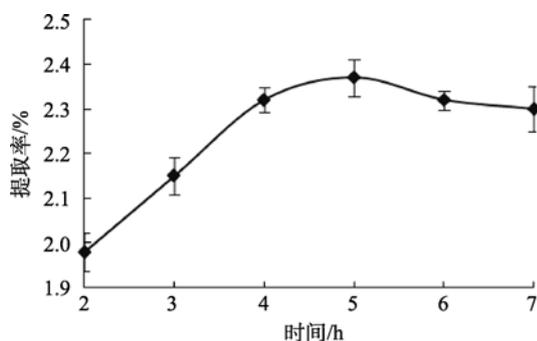


图 2 时间对岩藻聚糖硫酸酯提取率的影响

Fig. 2 The effect of extraction time on fucoidan yield

3.1.3 料液比对岩藻聚糖硫酸酯提取率的影响

固定提取温度为 70 ，提取时间为 4 h，料液比分别为 1 : 30 ~ 1 : 80，料液比对提取率的影响见图 3。

由图 3 可知，随着料液比的增加，岩藻聚糖硫酸酯的提取率不断升高，当料液比为 1 : 80 时，提取率达到最高 3.41%，但当料液比从 1 : 70 增长到 1 : 80 时，提取率上升趋于平缓。考虑生产成本，料液比不

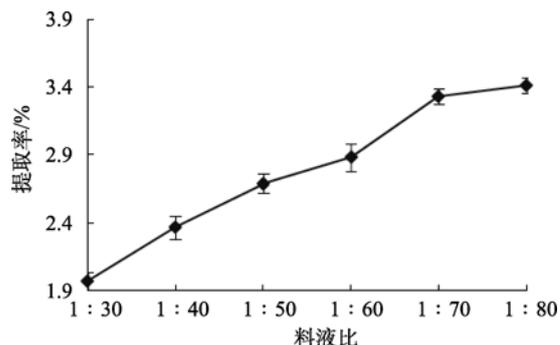


图 3 料液比对岩藻聚糖硫酸酯提取率的影响

Fig. 3 The effect of material/liquid ratio on fucoidan yield

宜再增加。

3.2 响应面法优化岩藻聚糖硫酸酯提取工艺条件

3.2.1 响应面试验设计与结果

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理，设计了 3 因素 3 水平的响应面分析试验。共有 17 个试验点，其中 12 个分析点，5 个为零点以评估试验误差。岩藻聚糖硫酸酯得率为响应值。Box-Behnken 试验设计和结果见表 2。

利用 Design-Expert8.0 统计软件，对表 2 中提取

表 2 响应面分析试验设计及结果

Tab. 2 Experimental design for response surface analysis and corresponding experimental data

试验号	A(温度)	B(时间)	C(料液比)	Y(提取率)
1	-1	-1	0	2.52±0.057
2	1	-1	0	3.26±0.043
3	-1	1	0	3.27±0.051
4	1	1	0	3.43±0.069
5	-1	0	-1	2.53±0.047
6	1	0	-1	3.31±0.056
7	-1	0	1	3.46±0.065
8	1	0	1	3.62±0.046
9	0	-1	-1	2.91±0.039
10	0	1	-1	2.97±0.045
11	0	-1	1	3.57±0.038
12	0	1	1	3.77±0.071
13	0	0	0	3.29±0.065
14	0	0	0	3.35±0.069
15	0	0	0	3.41±0.063
16	0	0	0	3.48±0.065
17	0	0	0	3.45±0.069

率试验数据进行多元回归拟合, 获得岩藻聚糖硫酸酯提取率对编码自变量提取温度、提取时间和料液比的二次多项回归方程。根据试验结果建立的数学模型为: $Y=3.40+0.23A+0.15B+0.34C-0.15AB-0.16AC+0.035BC-0.18A^2-0.010B^2+9.500E-003C^2$ 。

3.2.2 回归模型方差分析

利用 Design-Expert8.0 统计软件对回归模型进行方差分析, 结果如表 3 所示。

由表 3 可知, 模型具有高度显著性。失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率, 表 3 中失拟项

不显著, 表明模型选择合适。同时, 软件分析得到模型的相关系数 $R^2=0.9570$, 相关度较好。变异系数 (CV) 反映模型的置信度, CV 值越低, 模型的置信度越高, 本试验的 CV 为 3.35%, 表明此模型拟合度和可信度均较高, 方差分析表明预测值和实测值之间具有高度相关性, 因此能用此模型对岩藻聚糖硫酸酯提取率进行分析和预测。从表 3 还可以看出, 对提取率影响的大小依次为料液比 (C)、温度 (A)、时间 (B)。温度和时间 (AB)、温度 and 料液比 (AC) 交互作用显著。

表 3 回归模型的方差分析

Tab. 3 Variance analysis of the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.87	9	0.21	17.31	0.0005	**
A	0.42	1	0.42	35.17	0.0006	**
B	0.17	1	0.17	14.47	0.0067	**
C	0.91	1	0.91	75.74	<0.0001	**
AB	0.084	1	0.084	6.99	0.0332	*
AC	0.096	1	0.096	7.99	0.0255	*
BC	4.900E-003	1	4.900E-003	0.41	0.5437	
A ²	0.13	1	0.13	10.78	0.0134	*
B ²	0.043	1	0.043	3.53	0.1022	
C ²	3.800E-004	1	3.800E-004	0.032	0.8640	
残差	0.084	7	0.012			
失拟项	0.061	3	0.020	3.44	0.1318	
纯误差	0.024	4	5.880E-003			

注: **.P<0.01, 差异极显著; *.P<0.05, 差异显著。

3.2.3 响应曲面分析

RSM 方法的图形是特定的响应面 (Y) 与对应的因素构成的一个三维空间在二维平面上的等高图, 每个响应面对其中两个因素进行分析, 另外两个因素固定在零水平。从中可以直观地反映各因素对响应值的影响, 从试验所得的响应面分析图上可以找到它们在提取过程中的相互作用将建立的回归模型中的任意两个因素固定在零水平, 得到另外两因素的交互影响, 二次回归方程的响应面及其等高线图, 见图 4。

图 4 直观地反映了各因素及交互作用对响应值的影响, 比较图 4 中 6 个图可以看出: 提取温度、提取时间和料液比与岩藻聚糖硫酸酯得率存在显著的相关性。提取温度与提取时间 (AB), 提取温度与料液比 (AC) 对岩藻聚糖硫酸酯提取率的交互效应较显著, 表现为曲线较陡; 而提取温度与料液比 (BC) 对岩藻

聚糖硫酸酯提取率的交互作用不显著, 表现为曲线较平滑。

3.2.4 岩藻聚糖硫酸酯最佳提取条件的确定与验证试验

在选取的各因素范围内, 根据回归模型通过 Design-Expert 8.0 软件分析得出岩藻聚糖硫酸酯最佳提取条件为: 提取温度 68, 提取时间 6 h, 料液比 1 : 80。在此条件下软件基于回归模型预测提取率为 3.83%。

按照优化试验方案进行验证试验, 重复 3 次, 取平均值, 实测岩藻聚糖硫酸酯得率为 (3.95 ± 0.065)%, 与软件预测值相对误差为 0.0304, 说明所选模型合适, 优选的提取工艺适合岩藻聚糖硫酸酯的提取。岩藻聚糖硫酸酯粗品中岩藻糖含量为 (17.47 ± 0.022)%, 硫酸根含量为 (37.14 ± 0.025)%。

4 结论

试验以海带废渣为原料，在单因素试验的基础上，利用响应面建立了二次多项数学模型回归方程：

$Y=3.40+0.23A+0.1515B+0.34C-0.15AB-0.16AC+0.035BC-0.18A^2-0.010B^2+9.5 \times 10^{-3}C^2$ 。该方程拟合度较高，能较好地预测岩藻聚糖硫酸酯提取率随各参数变化的规律。回归模型方差分析得到温度、时

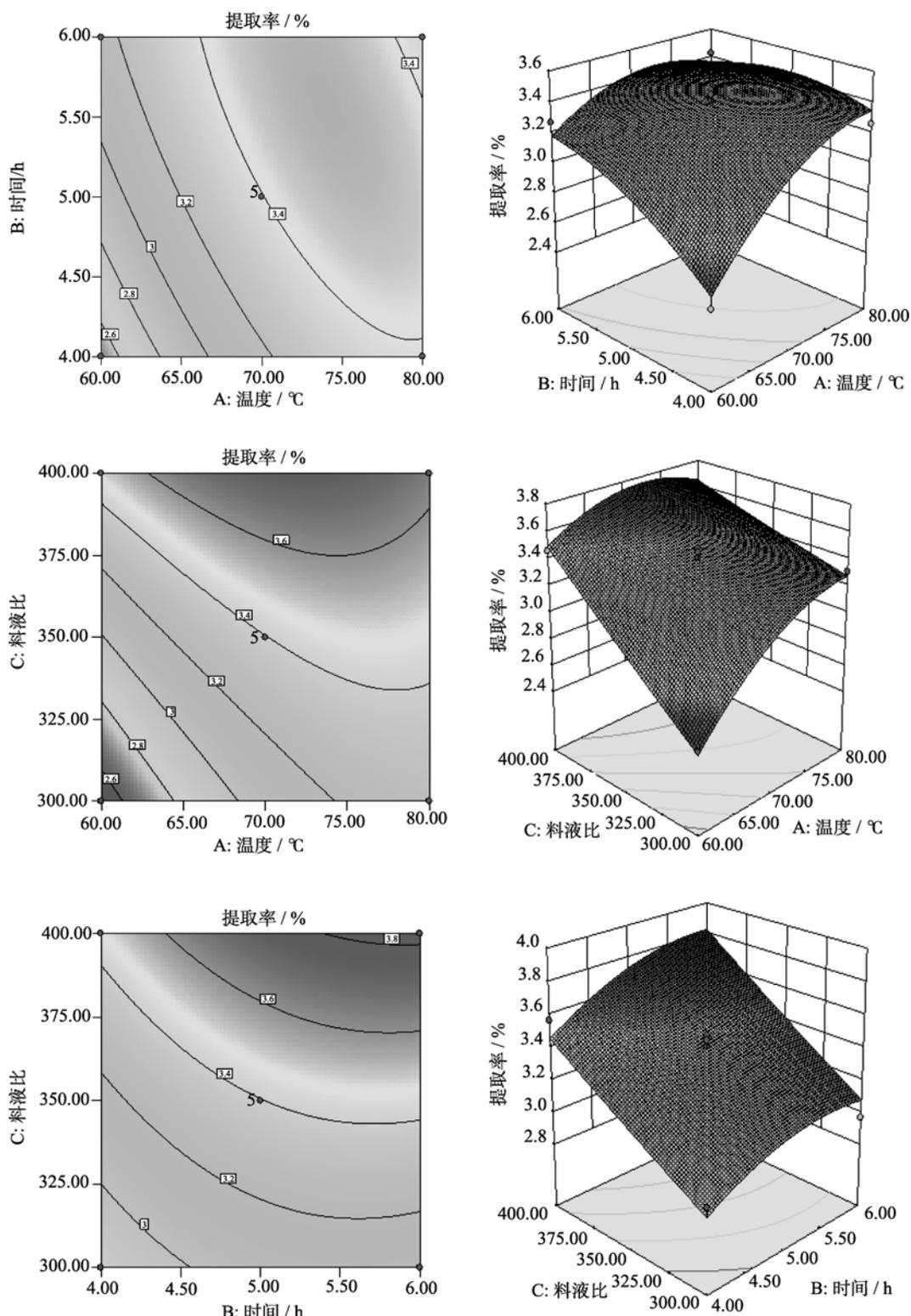


图 4 各因素交互作用对岩藻聚糖硫酸酯提取率影响的响应面图及等高线图

Fig. 4 Response surface and contour plots showing the interactions of the extraction conditions

间、料液比对提取率有极显著影响,并且温度和时间、温度和料液比的交互作用影响很大。利用响应面曲面及其等高线分析方法对岩藻聚糖硫酸酯提取工艺进行优化,得到优化工艺参数:提取温度 68 ,提取时间 6 h,料液比 1:80。模型预测优化工艺获取岩藻聚糖硫酸酯提取率的预测值 3.83%,通过试验验证,实际提取率为 3.95%。粗品中岩藻糖含量为 17.47%,硫酸根含量为 37.14%。因此本文从海带废渣中提取岩藻聚糖硫酸酯,与以往从海带或其他藻类中提取相比较^[2, 4, 9, 24],成本低廉,且对海带废渣的利用具有一定意义。

参考文献:

- [1] 王晶. 海带褐藻多糖硫酸酯的结构、化学修饰与生物活性研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.
- [2] 刘翼翔, 陈昭华, 陈俊, 等. 岩藻聚糖的提取及化学成分分析[J]. 食品工业科技, 2009(2): 223-225.
- [3] Costa L S, Fidelis G P, Cordeiro S L, et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2010, 64(1): 21-28.
- [4] Chandā A N P, Matsuhira B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, 42(3): 235-240.
- [5] Sinha S, Astani A, Ghosh T, et al. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: structural features, chemical modification and anti-viral activity[J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2-3): 235-242.
- [6] Sokolova R V, Ermakova S P, Awada S M, et al. Composition, structural characteristics, and antitumor properties of polysaccharides from the brown algae *Dicthyoptera polypodioides* and *Sargassum* sp.[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2011, 47(3) :329-334
- [7] 谌素华, 王维民, 刘辉, 等. 马尾藻岩藻聚糖硫酸酯纯化及降血脂功能研究[J]. 食品与发酵工业, 2010(5): 28-41.
- [8] Anastyuk S D, Shevchenko N M, Ermakova S P, et al. Anti-cancer activity in vitro of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 186-194.
- [9] Vishchuk O S, Ermakova S P, Zvyagintseva T N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics and antitumor activity[J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(17): 2769-2776.
- [10] Na Y S, Kim W J, Kim S M, et al. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*[J]. *International immunopharmacology*, 2010, 10(3): 364-370.
- [11] 解秋菊, 闫培生, 池振明. 真姬菇发酵海带废渣制备多糖的抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2011(2): 115-117.
- [12] 赵亮, 陈舜胜, 张淑平. 海带中褐藻糖胶的不同提取纯化方法的研究[J]. 安徽农业科学, 2008(15): 6161-6162.
- [13] 冯珍鸽, 王力, 吴永沛, 等. 褐藻中岩藻聚糖的化学成分及其对超氧离子的抑制作用[J]. 食品研究与开发, 2010(3): 66-68.
- [14] 肖策, 李多伟, 逢敏洁, 等. 从海带中提取褐藻糖胶工艺的研究[J]. 西北药学杂志, 2008(4): 212-214.
- [15] 彭勇胜, 王江之, 黄程, 等. 响应面法优化姬松茸多糖的提取工艺[J]. 现代食品科技, 2011(9): 1119-1122.
- [16] 吴定, 刘长鹏, 路桂红, 等. 响应面法优化麦胚凝集素分离纯化工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2011(11): 23-26.
- [17] Wang Z, Li J, Cheong S, et al. Response surface optimization of the heparosan N-deacetylation in producing bioengineered heparin[J]. *J Biotechnol*, 2011, 156(3): 188-196.
- [18] 张则鸣, 张拥军, 金晖, 等. 响应面法优化南瓜多糖的提取工艺及其降糖作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(1): 45-49.
- [19] 吴祥庭, 朱涛, 郑巧敏, 等. 响应面法优化山药皮中皂苷提取的研究[J]. 中国粮油学报, 2011(6): 91-96.
- [20] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001(3): 91-94.
- [21] 陈健, 孙爱东, 高雪娟, 等. 响应面分析法优化超声波提取槟榔原花青素工艺[J]. 食品科学, 2011(4): 82-86.
- [22] Gibbons M N. The determination of methylpentoses[J]. *Analyst*, 1955, 80(949): 268-276.

- [23] Kawai Y, Seno N, Anno K. A modified method for chondrosulfatase assay[J]. *Analytical biochemistry*, 1969, 32(2): 314-321.
- [24] 程仕伟, 陈超男, 冯志彬, 等. 海带岩藻多糖的水提制备及其抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2010(6): 101-104.

Extraction of fucoidan from *Laminaria japonica* residue

LIU Xu^{1,2}, QU Gui-yan^{2,3}, ZHOU Yi-bin¹, YUAN Yi², HAN Li-jun²

(1. College of Tea&Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 3. Department of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Received: Feb.,22,2012

Key words: fucoidan; *Laminaria japonica* residue; RSM

Abstract: Response surface methodology (RSM) was used to optimize the extraction of fucoidan by calcium chloride solution from *Laminaria japonica* residue. On the basis of single factor experiment, mathematical modeling was established to analyze the significance and interactions between extraction temperature, extraction time and material/liquid ratio. The optimum extraction conditions were extraction temperature of 68 °C, extraction time of 6 h and material/liquid ratio of 1 : 80 (g : mL). Under this optimum condition the extraction rate was up to 3.95%. The contents of fucose and sulfate group were 17.47% and 37.14%, respectively.

(本文编辑: 康亦兼)