

海带硫酸化多糖的提取及纯化

程 斌¹⁾ 宋加金²⁾ 赵云峰¹⁾

(¹⁾曲阜师范大学 生命科学学院,山东 曲阜 273165;²⁾曲阜师范大学 科研处,山东 曲阜 273165)

摘 要 对海带硫酸化多糖的水提法与酶解法进行比较,发现酶提法效果较好,粗提得率较水提法提高了 85.9%,纯化后得率提高了 43.6%。纯化过程中,通过正交实验得出 CTAB 沉淀 LPS 的最佳最佳优化条件为 1%粗糖液;5%CTAB(V/V)为 3:2,沉淀时间 6 h,离心时间 12 min。经单因素实验确定了树脂 D315 的脱色条件为:1%多糖液与树脂的体积质量比为 100:1(V/W),脱色时间 6 h,pH 值 5.0,温度 40 ℃。

关键词 海带,硫酸多糖,提取,纯化

中图分类号 Q946.3 **文献标识码** A **文章编号** 1672-6634(2009)02-0051-04

0 引言

海带硫酸化多糖(Laminaria japonica polysaccharide sulfate LPS)是一类硫酸化多糖,又称海带岩藻聚糖硫酸酯或褐藻糖胶,是一系列组成相似的杂多糖混合物^[1]。LPS 具有复杂的、多方面的生物活性,詹林盛^[2]等研究表明 LPS 对改善机体免疫机能具有重要意义;吴晓,杨明亮^[3]实验研究证明了 LPS 具有抗辐射作用;另外大量研究证实 LPS 还具有抗血栓、降血糖、降血脂及抗肿瘤等多种活性^[4],在医药、食品、化妆品、农业等方面具有广阔的应用前景。本实验对 LPS 水提法与酶提法两种提取方法进行比较,分析经两种方法所提多糖成分的差异,用 CTAB 法和大孔树脂法进行分离、纯化,为海带硫酸多糖进行工业化生产和新一代保健食品的开发提供依据

1 材料与方 法

1.1 实验材料与仪器

(1) 材料。原料为荣成市人工养殖厂的干海带,D101 大孔吸附树脂(国药集团化学试剂有限公司)D72 型大孔强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂、D315 弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂、D296 大孔强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂(南开大学化工厂),纤维素酶(150 000 U/g)、果胶酶(20 000 U/g)(上海蓝季科技发展有限公司),考马斯亮蓝 G-250(Fluka 进口分装),其它试剂均为国产分析纯。(2) 仪器与设备。高速组织捣拌机(DS-1 型,上海标本模型厂),电热恒温水浴锅(DK-98-1 型,金坛市正基仪器有限公司),离心机(TDL-5-A 型,上海安亭科学仪器厂),旋转蒸发器(RE52-99 型,上海亚荣盛华仪器厂),循环水式多用真空泵(SHB-III 型,郑州长城仪器厂),真空冷冻干燥机(Flexi-dry systems, Stone Ridge, New York, made in USA),布氏漏斗,35 mm×400 mm 层析柱,紫外分光光度计(3 300 RKD 型,索氏提取器)。

1.2 LPS 的粗提取

(1) 酶提法提取 LPS。准确称取海带,加入 15 倍的水,用高速组织捣碎机捣碎,依次加入纤维素酶 0.25 g,果胶酶 0.5 g,混匀,将 pH 值调至 4.0,于 40 ℃~50 ℃水浴 4 h,再升温至 80 ℃30 min,使酶灭

活,待冷却后收集滤液,将滤渣水洗两次合并滤液.所得滤液调 pH 值至 7.0,经减压蒸馏浓缩至原体积的 1/4~1/5,5 000 r/min 离心 15 min 去除不溶性杂质.上清液加无水乙醇至总体积的 30%,静置沉淀 4 h,离心去除不溶物.上清液加无水乙醇至总体积的 60%,低温过夜沉淀多糖后离心,沉淀依次用无水乙醇、乙醚、丙酮洗数次,冷冻干燥得 LPS 粗品.(2) 水提法提取 LPS. 准确称取海带,加入 20 倍的水,用高速组织捣碎机捣碎.然后在 70 °C 水浴中抽提 4 h,其它步骤与酶解工艺相同.

1.3 LPS 的初步纯化

(1) CTAB 沉淀硫酸化多糖. 将酶解法所提 LPS 粗品用适量蒸馏水溶解,加入 2% 的 CaCl_2 静置 2 h,5 000 r/min 离心 15 min 去除粗糖液中残留的褐藻胶,上清液加 5% 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)沉淀酸性硫酸多糖. 沉淀用 3% 的 KCl 溶解后,用三倍体积的乙醇沉淀,5 000 r/min 离心 15 min,沉淀依次用无水乙醇、乙醚、丙酮洗数次,冷冻干燥.(2) 大孔吸附树脂脱色. 取 100 ml 浓度为 1% 的粗多糖液加入 1 g 处理过的树脂,放入恒温摇床, $T=30\text{ }^\circ\text{C}$ 、120 r/min、10 h,脱色后多糖液经双层滤纸过滤后,测定色素吸光值及糖含量,计算实验前后的溶液的脱色率及多糖回收率^[5],并对所选树脂脱色效果的因素进行研究

1.4 LPS 成分的测定

(1) 多糖含量的测定. 总糖含量测定采用蒽酮硫酸法^[6],还原糖含量测定采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[7],均用葡萄糖作为对照品做标准曲线.

(2) 蛋白质含量的测定. 采用考马斯亮兰比色法^[8],以牛血清白蛋白做标准品绘制标准曲线.

(3) 硫酸根含量测定. 采用比浊法^[9],以硫酸钠做标准品绘制标准曲线.

2 结果与讨论

2.1 酶解工艺的优势

表 1 水提法和酶提法提取物的比较

提取方法	海带量(g)	粗多糖重(g)	硫酸多糖含量(%)	总 SO_4^{2-} 含量(%)	提取率(%)
水提法	1 000	13.4	39.2	27.0	1.34
酶提法	1 000	25	47.19	23.6	2.5

表 2 因素水平表

因素	1	2	3
5%CTAB 体积(ml)	30	40	60
沉淀时间(h)	4	6	8
离心时间(min)	8	10	12

水提法和酶提法提取 LPS 的研究结果表明,经酶提法提取的 LPS 的得率和多糖含量均较水提法高(表 1).

2.2 LPS 的初步纯化工艺

表 3 正交试验结果

序号	CTAB 体积(ml)	沉淀时间(h)	离心时间(min)	硫酸化多糖浓度(mg/ml)	硫酸根含量(mg/ml)
1	30	4	8	4.39	2.91
2	30	6	10	4.53	2.86
3	30	8	12	4.68	3.14
4	40	4	10	5.09	3.25
5	40	6	12	5.25	3.19
6	40	8	8	5.15	3.07
7	60	4	12	5.45	3.30
8	60	6	8	4.90	3.02
9	60	8	10	5.31	3.1
k_1	4.533	4.977	4.813		
k_2	5.163	4.893	4.977		
k_3	5.220	5.047	5.127		
R	0.687	0.154	0.314		
$k_{1'}$	2.970	3.117	3.000		
$k_{2'}$	3.207	3.060	3.077		
$k_{3'}$	3.110	3.110	3.137		
R'	0.237	0.057	0.210		
影响条件	CTAB 体积	>离心时间	>沉淀时间		
最佳条件	60	4	12		

(1) CTAB 沉淀条件的选择. 用 CTAB 纯化海带硫酸多糖粗提物,以纯化多糖的总糖含量以及硫酸根含量为指标,设计 3 因素 3 水平正交试验,正交设计的设计方案及试验结果见表 2 和表 3. 从表 3 可知 CTAB 对硫酸化多糖的沉淀有较好的专一性,由极差分析得到各因素的影响大小依次为 CTAB 体积>离心时间>沉淀时间,从而得出最佳工艺条件为 CTAB 加入量 60 mL,沉淀时间 4 h,离心时间 12 min.

(2) 大孔树脂脱色. 1) 树脂的筛选. 从图 1 可以看出,弱碱型

阴离子交换树脂 D315 具有良好的色素吸收率以及多糖回收率,所以选用树脂 D315 为多糖脱色树脂进行进一步研究. 2)树脂用量及吸附饱和时间的确定. 随着单位体积多糖脱色所用树脂量的增多,脱色率呈递增趋势,当多糖液体体积与树脂质量比值为 1 : 100 时,增量放缓,再增加树脂比例对脱色率提高效果不明显,所以选取多糖液体与树脂质量比值为 1 : 100 作为最佳脱色树脂用量(图 2). 在对脱色饱和时间的研究中,我们发现,当脱色时间为 6 h 时,脱色率不再增加,树脂达到对色素的吸附饱和(图 3). 3)pH 值以及温度对 D315 树脂脱色率的影响.

表 4 几种大孔树脂的物理结构参数

树脂类型	粒径范围 (mm)	比表面积 (m ² /g)	平均孔径 (nm)	外观	极性
D315	0.45-0.6	130-140	200-250	白色球状颗粒	弱极性
D296	0.315-1.25	480-520	110-130	浅黄色球状颗粒	极性
D72	0.3-1.2	50	70-100	乳白色或淡黄色球状颗粒	极性
D101	0.3-1.2	650-700	90-100	白色球状颗粒	非极性

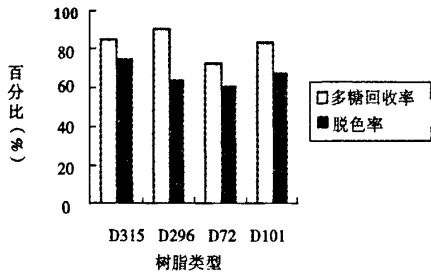


图 1 各树脂处理效果比较

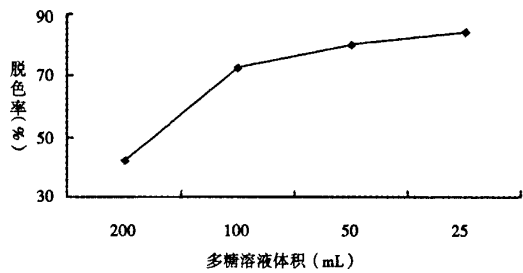


图 2 树脂加入量与脱色效果的关系

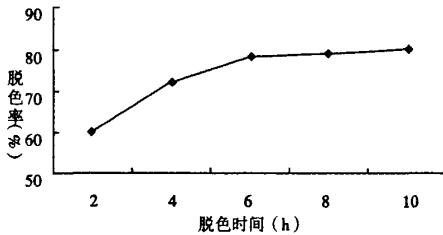


图 3 脱色时间与脱色效果的关系图

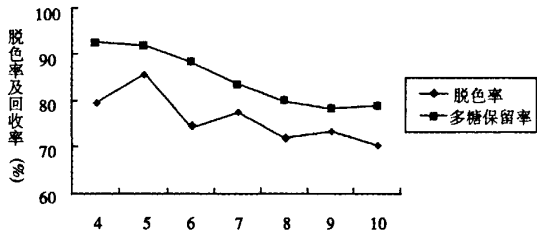


图 4 PH 值对脱色率糖回收及多率的影响

由图 4 可以看出,不同 pH 条件下树脂的吸附效果有较大差异,当 pH 值为 10.0 时,脱色率为 70.5%,而当 pH 为 5.0 时,树脂的脱色效果最好,为 85.6. 由于硫酸多糖为酸性多糖,随着 pH 值的升高,多糖回收率呈现下降的趋势,因此在弱酸条件下脱色最佳,综合考虑后选择在 pH 值为 5.0 进行脱色研究

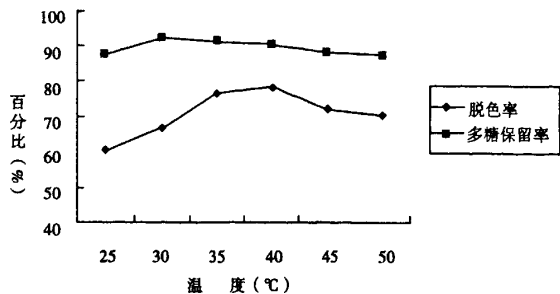


图 5 温度对树脂作用的影响

如图 5 所示,多糖保留率随温度变化不大,温度对 D315 树脂脱色影响较明显,随着温度的升高,脱色率先升高再降低. 当温度升高时,色素分子的扩散速度加快,多糖溶液的粘度下降,有利与色素的吸附,但温度超过 40 °C,色素的解吸也加快,脱色率反而下降,所以确定 40 °C 为最佳温度

3 结论

本文用水提与酶解两种方法对 LPS 进行提取,结果表明,酶解法提取率较高,粗提得率较水提法提高了 85.9%,纯化后得率提高了 43.6%。表 4 列出了水提法酶解法所提多糖纯化前后主要成分的变化情况,经纯化后,两种方法提取的多糖在总糖含量与总硫酸根含量上趋于一致,分别为 45.7%、45.9%;34.7%、35.2%,说明所得多糖是一类物质,且纯度较高,在 280 nm、260 nm 处没有蛋白与核酸的特征吸收,终产品为白色粉末,纯化效果理想。总糖含量较纯化前,水提法所得多糖提高了 6.5%,酶解法多糖含量稍有降低,但硫酸根含量有较大程度的提高(49.15%)

用 CTAB 对粗多糖进行沉淀可以较好地使 LPS 得到纯化,通过正交试验筛选出 CTAB 沉淀 LPS 的最佳优化条件为 1%粗糖液:5%CTAB(V/V)为 3:2,沉淀时间 6 h,离心时间 12 min。在低离子强度条件下,CTAB 可以选择性地沉淀 LPS,对于中性多糖与蛋白含量较高的酶解法粗提物有较好的纯化效果经过对几种树脂的脱色效果比较,我们选择 D315 为 LPS 的最佳脱色树脂,并通过单因素实验确定

了树脂工作条件如下:1%多糖液与树脂的体积质量比为 100:1(V/W),脱色时间 6 h,pH 值 5.0,温度 40 ℃。经脱色后,LPS 脱色率可达到 80%,并且具有较高的多糖保留率。

表 5 粗多糖与纯化后多糖成分比较

样品	水提法		酶解法	
	粗多糖	纯化后多糖	粗多糖	纯化后多糖
海带量(g)	1 000		1 000	
得率(%)	1.34	1.17	2.5	1.68
总糖含量(%)	39.2	45.7	47.19	45.9
磺胺基含量(%)	27.0	34.7	23.6	35.2
蛋白含量(%)	3.8	微量	6.4	微量
色泽	浅褐色	白色	褐色	白色

参 考 文 献

- [1] Duarate M,Cardoso M,Noseda M,et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* [J]. Carbohydr Res,2001,333:281~293.
- [2] 詹林盛,张新生,吴晓红,等. 海带多糖的免疫调节作用[J]. 中国生化药物杂志,2001,22(3):116~118.
- [3] 吴晓昱,杨明亮,黄晓兰,等. 海带多糖的抗辐射作用与脾细胞凋亡[J]. 武汉大学学报(医学版),2004,25(3):241~244.
- [4] 刘树立,王春艳,王 华. 我国海带的加工利用和开发[J]. 食品与药品,2007,9:34~36.
- [5] 胡 娟,李丹丹,金征宇,等. 树脂对菊糖液的脱色研究[J]. 食品与机械,2006,22(6):49~52.
- [6] 张惠芬,樊 健,李宝才,等. 硫酸-萘酚分光光度法测定 SPS 的方法学研究[J]. 昆明理工大学学报,2002,27(3):74~78.
- [7] 王红英,钱斯日古楞,赵前程. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定麦冬多糖含量[J]. 沈阳农业大学学报,2005,36(5):628~630.
- [8] 王文平,郭祀远,李 琳,等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):115~117.
- [9] 樊文乐,吴文洁. 褐藻糖胶中硫酸根质量分数的测定方法[J]. 化学工业与工程技术,2005,26(5):47~49.
- [10] 张文雄,梁 宏,覃海错,等. 螺旋藻酸性杂多糖的分离纯化和分析[J]. 中草药,2000,31(5):326.

Extraction and Purification of *La Minaria* Polysaccharide Sulfate

CHENG Bin¹⁾ SONG Jia-jin²⁾ ZHAO Yun-feng¹⁾

¹⁾School of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China;

²⁾Department of Scientific Research, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract The polysaccharide sulfate was extracted from *La minaria japonica* by water extraction and enzyme extraction. The result showed that enzyme extracting method was more effective than that of water extraction, the extracting rate of crude LPS and pure LPS was increased by 85.9% and 43.6% respectively, compared with that of water extraction. The crude LPS was precipitated using CTAB as precipitant. Through orthogonal experiments, we obtained the optimal technological parameter: ratio of 1% LPS and 5% CTAB 3:2, precipitation time 6h, centrifugal time 12 min. Decolorizing experiments were carried out by single experiment. The best conditions for decoloration were determined as follows: D315 resin, ratio of 1% LPS and resin was 100:1(V/W), Time=6 h, pH=5.0, T=40 ℃.

Key words *Laminaria japonica*, polysaccharide sulfate, extraction, purification