

肠浒苔多糖微波辅助提取工艺的优化

Optimization on microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Enteromorpha intestinalis*

刘玉凤^{1,2} 贾淑颖^{1,2} 郝再彬^{1,2} 李艳伟³ 李霞^{1,2}
LIU Yu-feng^{1,2} JIA Shu-ying^{1,2} HAO Zai-bin^{1,2} LI Yan-wei³ LI Xia^{1,2}

(1. 桂林理工大学广西高校食品安全与检测重点实验室, 广西 桂林 541004;

2. 桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004; 3. 浙江大学, 浙江 杭州 310012)

(1. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Food Safety and Detection, Guilin, Guangxi 541004, China;

2. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi 541004, China;

3. Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)

摘要:以单因素试验考察了微波功率、提取时间、提取温度、提取次数及料液比等因素对肠浒苔多糖提取量的影响,采用 Design-Expert 8.0.5 软件对微波辅助提取肠浒苔多糖的提取条件进行响应面法优化。结果表明,影响肠浒苔多糖微波辅助提取主要因素的主次顺序为:提取温度>微波功率>提取次数>提取时间。肠浒苔多糖微波辅助提取的最佳工艺条件为:微波功率 500 W,提取时间 15 min,提取温度 90 ℃,提取 2 次,料液比 1:30(g/mL),粗多糖的得率为 11.38%,该条件下测得的多糖含量为 31.34%。可为肠浒苔多糖提取工艺的研究提供参考。

关键词:肠浒苔;多糖;微波辅助提取;优化

Abstract: In order to optimize the conditions of microwave assisted extraction of polysaccharides from *Enteromorpha intestinalis*, the effect of 5 factors including microwave power, including the extraction duration, temperature, times of extraction and solid/liquid ratio on the extraction yield, which was investigated by the single factors in experiment. The extraction conditions were further optimized by the response surface methodology with the Design-Expert 8.0.5 software. The results showed that their effects were in the order of temperature > microwave power > times of extraction > extraction duration. The optimal extraction conditions of microwave assisted extraction of polysaccharides from *E. intestinalis* were determined as followed: microwave power 500 W, extraction duration

15 min, temperature 90 ℃, extracting 2 times, solid/liquid ratio of 1:30 (g/mL). Under these optimal conditions, the experimental yield was 11.38% with polysaccharides content of 31.34%. It provides a reference in the research of extraction technology of *E. intestinalis* polysaccharides.

Keywords: *Enteromorpha intestinalis*; polysaccharides; microwave assisted extraction; optimization

浒苔俗称浒苔、海青菜、苔菜、苔条,常见的有浒苔(*Enteromorpha prolifera*)、缘管浒苔(*Enteromorpha linza*)、扁浒苔(*Enteromorpha compressa*)、条浒苔(*Enteromorpha clathrata*)、肠浒苔(*Enteromorpha intestinalis*)等^[1]。浒苔自然繁殖能力很强,产量巨大,全藻可食用,营养价值较高。现代药理学证明浒苔中多糖有多种生理功能,如抗菌^[2]、抗肿瘤^[3-4]、抗氧化^[5]、降血糖血脂^[6]等。

微波辅助提取是在传统提取基础上发展起来的,可使细胞内溶物的溶出增加,易被溶剂溶解^[7]。该法可以缩短萃取时间、降低能耗、减少溶剂用量、提高收率和纯度、降低生产成本,且对热不稳定性物质有较好的提取效果,已被广泛用于多糖^[8]、蛋白^[9]、精油^[10]、多酚^[11]、总黄酮^[12]、酶^[13]等天然活性成分的提取。目前已有微波辅助提取浒苔多糖的报道^[5,14-15],但均未考虑提取次数或提取温度的影响。

本研究拟考察微波功率、提取温度、提取时间、料液比以及提取次数等因素对肠浒苔多糖提取量的影响,并采用响应面法优化其提取工艺,旨在为肠浒苔的高值化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

无水乙醇:分析纯,广东汕头西陇化工有限公司;
葡萄糖:分析纯,天津市巴斯天化工有限公司;

基金项目:国家自然科学基金(编号:31200269);广西自然科学基金项目(编号:2014GXNSFBA118134);广西壮药产业化工程院科研项目(编号:2014GXZYCYH03);桂林理工大学博士科研启动资金项目资助

作者简介:刘玉凤,女,桂林理工大学在读硕士研究生。

通讯作者:李霞(1981-),女,桂林理工大学副教授,硕士生导师。

E-mail:biology754@163.com

收稿日期:2016-03-21

苯酚、浓硫酸:分析纯,西陇化工股份有限公司;
考马斯亮蓝 G-250: 分析纯,美国 Sigma 公司;
牛血清白蛋白:生物试剂,上海蓝季科技发展有限公司。

1.2 材料与仪器

肠浒苔(*Enteromorpha intestinalis*):采于中国浙江;
电子天平:EL303 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;
旋转蒸发器:RE-52A 型,上海亚荣生化仪器厂;
紫外可见分光光度计:UV760CRT 型,上海傲谱分析仪器有限公司;
离心机:DL-5-B 型,上海安亭科学仪器厂;
电脑微波超声波组合合成/萃取仪:XH-300A 型,北京祥鹤科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 微波提取 取肠浒苔样品 5 g,按一定液料比加入一定量去离子水,微波提取。提取液离心得上清液。将上清液浓缩,加无水乙醇至醇浓度 80%,4 ℃静置 24 h,4 000 r/min 离心 15 min,取沉淀,干燥,得到浒苔粗多糖。

1.3.2 多糖测定 采用苯酚硫酸法。

(1) 标准曲线的制备:以葡萄糖绘制多糖浓度标准曲线。准确量取 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 葡萄糖溶液,分别加到 10 mL 试管中,蒸馏水定容至 1 mL,迅速摇匀。加入 6% 的苯酚溶液 0.5 mL,迅速混匀,加入硫酸 2.5 mL,小心混匀,静置 20 min。精确量取蒸馏水 1 mL,操作步骤同上,作为空白对照组,用紫外—可见分光光度计,于 490 nm 波长处测定标准品与对照组的吸光度,以葡萄糖毫克数为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线。

(2) 多糖含量测定:将样品配置成浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,分别取 1 mL 样品溶液于试管中,苯酚硫酸法测定各收集液多糖含量。肠浒苔中多糖含量按式(1)计算,多糖得率按式(2)计算:

$$w = \frac{S}{0.1 \times 1 \times 0.9} \times 100\%, \tag{1}$$

$$R = \frac{m_1}{m} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:
w——肠浒苔中多糖含量,%;
S——标准曲线上查得多糖毫克数,mg;
0.1——待测肠浒苔多糖样品浓度,mg/mL;
1——多糖含量测定所取体积,mL;
0.9——葡萄糖校正系数;
R——多糖得率,%;
m₁——肠浒苔粗多糖提取量,g;
m——肠浒苔样品量,g。

1.3.3 提取工艺的单因素试验

(1) 微波功率:在料液比 1 : 30(g/mL),提取温度 70 ℃,提取时间 10 min,提取 1 次的条件下,考察微波功率(200,400,600,800 W)对浒苔多糖提取量的影响。

(2) 提取时间:在料液比 1 : 30(g/mL),提取温度

70 ℃,微波功率 400 W,提取 1 次的条件下,考察提取时间(5,10,15,20,25 min)对浒苔多糖提取量的影响。

(3) 提取温度:在料液比 1 : 30(g/mL),提取时间 10 min,微波功率 400 W,提取 1 次的条件下,考察提取温度(70,80,90,100 ℃)对浒苔多糖提取量的影响。

(4) 提取次数:在料液比 1 : 30(g/mL),提取温度 70 ℃,微波功率 400 W,提取时间 10 min 的条件下,考察提取次数(1,2,3,4 次)对浒苔多糖提取量的影响。

(5) 料液比:在提取温度 70 ℃,微波功率 400 W,提取时间 10 min,提取 1 次的条件下,考察料液比(1 : 20,1 : 30,1 : 40,1 : 50,g/mL)对浒苔多糖提取量的影响。

1.3.4 提取工艺响应面法优化 以微波功率、提取时间、提取温度和提取次数为自变量,多糖提取量为响应值。利用 Design-Expert 8.0.5 软件中的 Box-Behnken 软件优化肠浒苔多糖的提取条件。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

由图 1 可知,以葡萄糖绘制的标准曲线方程为 $y = 1.47x - 0.013\ 2$, $R^2 = 0.999\ 5$,在多糖含量为 20~100 μg 时具有良好的线性关系。

2.2 单因素试验结果

单因素试验结果表明,在试验范围内料液比对浒苔多糖提取量的影响不大,故进行响应面优化时不予考虑,并将其固定为 1 : 30(g/mL)。根据中心组合 Box-Behnken 原理,选择提取功率、提取时间、提取温度和提取次数 4 个影响因素为自变量,多糖提取量为响应值,设计 4 因素 3 水平的试验,因素水平取值见表 1。

2.3 响应面法优化试验结果

2.3.1 响应面设计试验结果及分析 试验设计方案与结果见表 2。

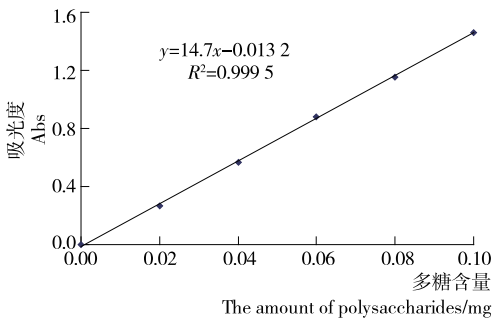


图 1 葡萄糖标准曲线
Figure 1 The standard curve of glucose

表 1 因素水平表

Table 1 The factor level table				
水平	A 微波功率/W	B 提取时间/min	C 提取温度/℃	D 提取次数
—1	200	10	80	1
0	400	15	90	2
1	600	20	100	3

表 2 Box-Behnken 中心组合试验设计方案及结果					
Table 2 Design and results of Box-Behnken center combination experiment					
编号	A	B	C	D	Y 多糖提取量/g
1	0	0	−1	1	0.533
2	0	0	−1	−1	0.525
3	0	−1	0	1	0.556
4	0	0	1	1	0.562
5	1	0	1	0	0.550
6	0	0	0	0	0.552
7	0	−1	0	−1	0.501
8	−1	0	−1	0	0.382
9	−1	1	0	0	0.424
10	1	−1	0	0	0.547
11	1	0	0	−1	0.552
12	−1	0	0	−1	0.416
13	0	−1	1	0	0.555
14	1	0	−1	0	0.544
15	0	1	0	1	0.564
16	0	1	0	−1	0.512
17	1	0	0	1	0.565
18	−1	0	1	0	0.443
19	0	0	0	0	0.571
20	−1	0	0	1	0.427
21	0	0	0	0	0.575
22	0	1	−1	0	0.540
23	0	0	0	0	0.569
24	−1	−1	0	0	0.414
25	0	−1	−1	0	0.533
26	0	1	1	0	0.564
27	0	0	1	−1	0.549
28	0	0	0	0	0.560
29	1	1	0	0	0.570

对试验数据进行二次多项式回归拟合,得回归方程为:
$$Y=0.57+0.069A+5.667\times10^{-3}B+0.014C+0.013D+3.25\times10^{-3}AB-0.014AC+5\times10^{-4}AD+5\times10^{-4}BC-7.5\times10^{-4}BD+1.25\times10^{-3}CD-0.067A^2-0.011B^2-0.011C^2-0.014D^2。$$
(3)

由表 3 可知,该二次方程模型高度显著,失拟不显著,说明该方程能充分反映实际情况;回归方程模型相关系数 $R^2=0.975\ 2$,说明模型与实际试验拟合性较好,试验误差较小,可信度高,证明应用响应面法优化肠浒苔多糖微波提取工艺可行;模型校正系数 $R^2_{adj}=0.950\ 4$,说明试验结果有 95.04%受到所选因素的影响,具有参考性。

由图 2 可知,相比于其他因素间的交互作用,微波功率与提取温度的交互作用较显著,二者对提取结果的影响会随

表 3 回归方差分析					
Table 3 Analysis of regression variance					
来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
模型	0.091	14	6.498E−03	39.34	< 0.000 1
A	0.056	1	0.056	340.88	< 0.000 1
B	3.853E−04	1	3.853E−04	2.33	0.148 9
C	2.296E−03	1	2.296E−03	13.90	0.002 2
D	1.925E−03	1	1.925E−03	11.66	0.004 2
AB	4.225E−05	1	4.225E−05	0.26	0.620 9
AC	7.563E−04	1	7.563E−04	4.58	0.050 5
AD	1.000E−06	1	1.000E−06	0.01	0.939 1
BC	1.000E−06	1	1.000E−06	0.01	0.939 1
BD	2.25E−06	1	2.25E−06	0.01	0.908 7
CD	6.25E−06	1	6.25E−06	0.04	0.848 6
A ²	0.029	1	0.029	176.89	< 0.000 1
B ²	8.381E−04	1	8.381E−04	5.07	0.040 9
C ²	8.381E−04	1	8.381E−04	5.07	0.040 9
D ²	1.203E−03	1	1.203E−03	7.28	0.017 3
回归	2.313E−03	14	1.652E−04		
失拟指数	1.967E−03	10	1.967E−04	2.28	0.221 8
纯误差	3.452E−04	4	8.630E−05		
总和	0.093	28			

着其中一个因素的改变而有明显的变化。结合表 3 可知,各因素对肠浒苔多糖提取量的影响次序为:微波功率>提取温度>提取次数>提取时间。

2.3.2 验证实验 利用 Design-Expert 8.0.5 软件计算求解,结果表明,肠浒苔多糖微波提取的最佳条件为微波功率 496.78 W,提取时间 16.55 min,提取温度 93.51 ℃,提取 2.48 次,在此条件下肠浒苔粗多糖提取量的预测值为 0.588 g。考虑到试验的可操作性,取微波功率 500 W,提取温度 90 ℃,提取时间 15 min,提取 2 次,该条件下肠浒苔多糖提取量为(0.569±0.008) g,即得率为 11.38%,此时测得多糖含量为 31.34%,且提取量偏差较小,工艺条件稳定。此结果比 29 组的结果(0.570 g)略低,但其功率为 600 W,提取了 20 min,从经济成本考虑,最优工艺条件成本低,经济效益好。而 400 W,90 ℃,15 min 的条件下,提取 2 次所得多糖提取量均值为 0.565 g,虽略低于最优条件下提取得到的,但该条件下所提取的多糖量波动较大,所以不予考虑。

3 结论

本研究采用微波提取肠浒苔多糖,确定了肠浒苔多糖微波提取的最优条件,在微波功率 500 W,提取温度 90 ℃,提取时间 15 min,提取 2 次的条件下,肠浒苔粗多糖得率为 11.38%。这与响应面模型方程计算结果接近,说明试验条件合理,可为浒苔多糖大规模生产提供理论依据。但提取得到的粗多糖中含多糖为 31.34%,还含有较多杂质,后续可通过脱除蛋白或色谱层析等方式对其进行纯化,以提高多糖纯度,对进行多糖的结构测定和高值化应用具有十分重要的意义。

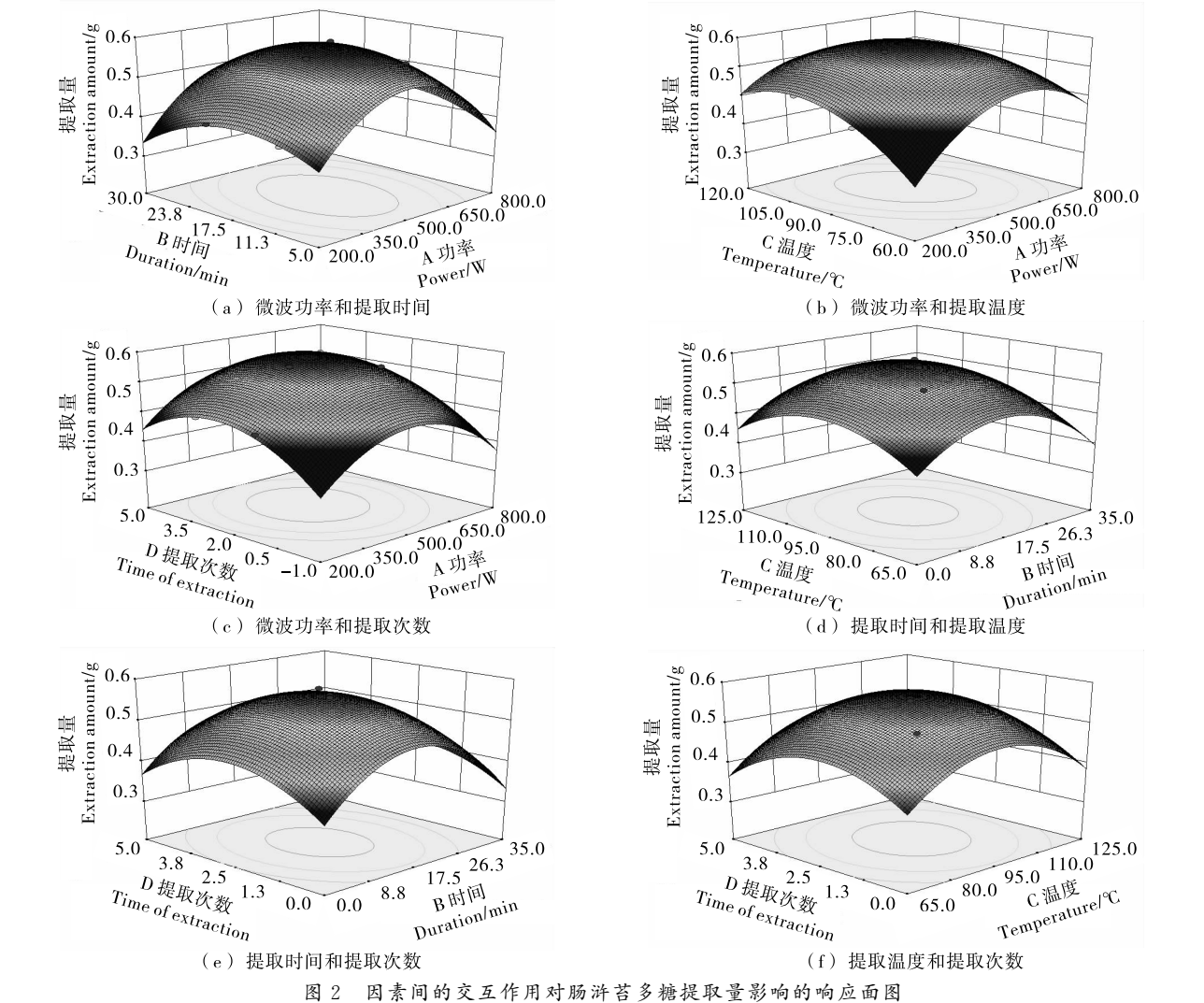


图 2 因素间的交互作用对肠浒苔多糖提取量影响的响应面图
Figure 2 Response surface plots (3D) showing the effects of variables

参考文献

[1] 王建伟, 阎斌伦, 林阿朋, 等. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生长及孢子释放的生态因子研究[J]. 海洋通报, 2007, 26(2): 60.

[2] GAO Yuan, YUE Qin-yan, GAO Bao-yu, et al. Optimization preparation of activated carbon from *Enteromorpha prolifera* using response surface methodology and its adsorption studies of fluoroquinolone antibiotics [J]. Desalination and Water Treatment, 2015, 55(3): 624-636.

[3] LAHAYEL Marc, ROBICL Audrey. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from Green Seaweeds[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(6): 1 765-1 774.

[4] 焦丽丽. 肠浒苔多糖结构及生物活性研究[D]. 吉林: 东北师范大学, 2009: 59-64.

[5] 徐银峰, 王斌, 苏传玲, 等. 浒苔多糖的微波辅助提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2011, 30(3): 211-216.

[6] 孙士红. 碱提浒苔多糖降血脂作用研究[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(15): 118-182.

[7] 王章姐, 郁万杨, 张梦茹. 植物多糖研究进展[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(6): 39-40.

[8] 岳春, 李靖靖, 方永远. 虫草多糖微波辅助提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 192-195.

[9] 杨志伟, 王钰, 揭雅娇, 等. 微波辅助提取杜仲翅果籽粕蛋白的工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 205-208.

[10] 王娟, 央金卓嘎, 黄惠华. 茶树花精油超高压、超声波与微波辅助萃取工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 146-148, 180.

[11] 周海旭, 李忠海, 钟海雁, 等. 微波辅助乙醇提取樟树叶多酚工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 161-163, 203.

[12] 陈铁壁, 肖乐, 杨盟盟, 等. 金桂花中总黄酮的微波辅助提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 185-188.

[13] LI Sheng-nan, HAN Dan-dan, ROW Kyung Ho. Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from some marine algae by response surface methodology[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2012, 29(5): 650-656.

[14] 陈小梅, 甘纯玘, 陈彩玲, 等. 响应面法优化微波辅助提取浒苔多糖工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(4): 44-48.

[15] 郭雷, 陈宇. 响应面法优化超声辅助提取浒苔多糖的工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 117-121.