浒苔多糖超声波提取工艺的研究

唐志红[1]，于志超[1]，赵巍[1]，郭静[1]，高丽[1]，秦松[2]
（1.烟台大学海洋学院，山东烟台 264005）（2.中国科学院烟台海岸带可持续发展研究所，山东烟台 264003）

摘要：本文对浒苔多糖的超声波提取工艺进行了研究。通过Box-Benhnken试验设计，选取液料比、超声功率和提取时间作为优化因素，采用响应面分析法对浒苔多糖的超声波提取工艺进行了优化。结果显示，超声波提取浒苔多糖的最佳工艺条件为：液料比54.81:1，超声功率531.17 W，提取时间为272 s。在此条件下，浒苔多糖的提取率为17.42%，与预测值接近。同传统的热水浸提法相比，多糖提取率有所提高，且提取时间大大缩短。该优化工艺可用于浒苔多糖的提取。

关键词：浒苔多糖；响应面法；超声波提取

文章篇号：1673-9078(2011)1-56-59

Ultrasonic Extraction of Polysaccharides from *Enteromorpha*

TANG Zhi-hong[1], YU Zhi-chao[1], ZHAO Wei[1], GUO Jing[1], GAO Li[1], QIN Song[2]
(1.Marine College, Yantai University, Yantai 264005, China) (2.Yantai Institute of Coastal Zone Research for Sustainable Development, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Enteromorpha* was studied and the extraction conditions were optimized by response surface methodology (RSM), based on a Box-Behnken design. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: ratio of liquid to solid 54.81:1, ultrasonic power 531.17 W, extraction time 272 s. Under the optimized conditions, the yield of polysaccharides was 17.42%, which was closed to the predictive yield. The extraction method showed higher extraction rate but lower extraction time than traditional hot-water extraction, which can be used for the extraction of *Enteromorpha* polysaccharides.

Key words: *Enteromorpha* polysaccharides; response surface methodology; ultrasonic extraction

浒苔（*Enteromorpha*）是一种大型绿藻，俗称苔条、青海苔等，为绿藻门石莼目石莼科浒苔属的藻类植物，自古以来即为食用和药用藻类。浒苔富含糖类、蛋白质、粗纤维及矿物质，同时还含有脂肪和维生素[1]。其主要成分浒苔水溶性多糖是药理活性很强的成分[2]，具有的抗氧化、降血脂、抗菌、抗病毒及增强免疫力等多种生物学活性[3~7]，有广阔的开发价值和应用空间。因此，优化浒苔多糖提取工艺，对扩大其应用和工业化生产具有重要的现实意义。

响应面分析法(Response Surface Methodology，RSM) 利用合理的试验设计采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系，通过回归方程寻求最优工艺参数的一种实验设计方法和数据统计方法[8]。它与正交试验设计法不同，具有试验周期短，求得的回归方程精度高，能研究几种因素间交互作用等优点。已广泛应用于化学化工、生物工程、食品工业等方面[9]。在前期单因素试验的基础上，本工作采用响应面法对浒苔多糖的超声波提取工艺进行了优化，以期获得最优的工艺参数，从而提高浒苔多糖的提取率。

收稿日期：2010-09-09

基金项目：山东省优秀中青年科学家科研奖励基金（2007BS08017），烟台大学大学生科技创新基金(090602)

作者简介：唐志红（1974-），博士，副教授，研究方向：海洋生物活性物质

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

浒苔，采于山东青岛，取清洗干燥后的样品粉碎，过 50~60 目筛，备用；苯酚、浓硫酸、浓盐酸、无水乙醇、葡萄糖、浓硫酸等试剂均为国产分析纯。

LXJ-ⅡB型低速大容量多管离心机，上海安亭科学仪器厂；DZKW-4型电子恒温水浴锅，上海金桥科技仪器厂；AR-1104电子天平，奥克斯国际贸易上海有限公司；HP-8453型紫外可见分光光度计，惠普公司；JY92-Ⅱ超声波细胞粉碎机，上海棱谱仪器仪表有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 多糖的超声波提取

分别称取浒苔样品 1 g，按一定液料比加入一定量去离子水，超声波提取一定时间。提取液经离心、

去沉淀，得到上清液。然后将上清液浓缩到一定体积，加无水乙醇至 80%进行醇沉，离心，取沉淀，干燥得到浒苔粗多糖。

1.2.2 多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法[10]。以葡萄糖为标准，在490 nm处测定葡萄糖浓度与吸光度的对应关系，制作标准曲线。标准曲线的回归方程为y=13.767x+0.0199，R^2=0.9959。精确称取浒苔粗多糖100 mg，水溶解后定容到100 mL，摇匀，作为多糖储备液。精确量取多糖储备液0.1 mL，加水至l mL，按测定标准曲线同样的方法测其吸光值。

1.2.3 多糖提取率的计算

多糖提取率=多糖质量/原料质量×100%

1.2.4 响应面优化实验设计

综合前期单因素试验的结果，应用 Minitab 软件，根据 Box-Benhnken 试验设计原理，以液料比、超声功率、提取时间 3 个因素为自变量，浒苔多糖提取率为响应值，进行试验设计，并采用响应面分析法在 3 因素 3 水平上对提取过程进行优化。试验因素与水平见表 1。

表1 试验因素与水平

Table 1 The factors and levels for Box-Behnken design

水平	因素		
	A 液料比（mL:g）	B 超声功率/W	C 提取时间/s
-1	40:1	360	200
0	50:1	500	260
1	60:1	640	320

1.2.5 验证实验

精确称取三组浒苔样品各 1 g，按最佳提取工艺条件进行实验，计算多糖提取率。

2 结果与讨论

2.1 响应面法对浒苔多糖提取工艺的优化

2.1.1 试验设计方案及结果

采用Box-Benhnken试验设计方法，对料液比X_1、超声功率X_2和提取时间X_3各水平进行如下编码：X_1=(A-50)/10，X_2=(B-500)/140，X_3=(C-260)/60。试验方案及结果见表2。试验1~12为析因试验，13~15为中心试验。15个试验点分为析因点和零点，其中析因点为自变量取值在X_1、X_2、X_3所构成的三维顶点，零点为区域的中心点，零点试验重复3次，用以估计试验误差。

2.1.2 回归方程方差分析和回归系数显著性检验

对表2中数据进行回归分析，获得浒苔多糖提取率(Y)对编码自变量（料液比X_1、超声功率X_2和提取时间X_3）的二次多项回归方程：$Y=17.14+1.635\ X_1+0.605\ X_2+0.8425\ X_3+0.22\ X_1X_2-0.785\ X_1X_3+1.755\ X_2X_3-1.6275\ X_1^2-2.4575\ X_2^2-2.0625\ X_3^2$，对回归方程进行方差分析(见表3)，该模型的$P<0.01$，说明模型回归高度显著；相关系数$R^2$ =0.9722，表明方程拟合较好；CV=4.95%，较低，说明试验操作可信；同时失拟项也进一步表明回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系，综上可以确定回归方程为浒苔多糖超声波提取工艺的优化提供了一个合适的模型。

表2 Box-Behnken试验设计及结果

Table 2 Experiment design and results of Box-Behnken

试验号	X_1	X_2	X_3	多糖提取率(Y)/%
1	-1	-1	0	11.37
2	1	-1	0	13.92
3	-1	1	0	11.75
4	1	1	0	15.18
5	0	-1	-1	12.27
6	0	-1	1	11.08
7	0	1	-1	10.36
8	0	1	1	16.48
9	-1	0	-1	10.51
10	1	0	-1	15.63
11	-1	0	1	12.84
12	1	0	1	14.82
13	0	0	0	17.41
14	0	0	0	17.32
15	0	0	0	16.69

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for regression equation

类型	自由度	平方和	均方	*F* 值	*P* 值
回归	9	86.6611	9.6290	19.41	0.002
残差	5	2.4801	0.4960		
失拟	3	2.1723	0.7241	4.70	0.180
纯误差	2	0.3078	0.1539		
总和	14	89.1412			

回归系数的显著性检验(见表4)表明：方程中X_1、X_2X_3、X_1^2、X_2^2、X_3^2项对Y值的影响非常显著，X_3对Y值的影响显著。分析结果同时也表明试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系，二次项和交互项对响应值也有很大的的影响。

表4 回归方程系数显著性检验

Table 4 Significance testing of regression coefficient

类型	回归系数	标准误差	*F* 值	*P* 值
常量	17.1400	0.4066	42.153	0.000
X_1	1.6350	0.2490	6.566	0.001
X_2	0.6050	0.2490	2.430	0.059
X_3	0.8425	0.2490	3.384	0.020
X_1X_2	0.2200	0.3521	0.625	0.560
X_1X_3	-0.7850	0.3521	-2.229	0.076
X_2X_3	1.7550	0.3521	4.984	0.004
X_1^2	-1.6275	0.3665	0.625	0.007
X_2^2	-2.4575	0.3665	-2.229	0.001
X_3^2	-2.0625	0.3665	4.984	0.002

2.1.3 浒苔多糖的超声波提取工艺的响应面分析与优化

根据回归分析结果做出相应的响应面的3D和等值线图（见图1~3），以确认料液比X_1、超声功率X_2和提取时间X_3三因素对多糖提取率(Y)的影响。从图1可以看出，X_1与X_2的交互作用并不显著，它们对Y值的影响并不会随着另一因素的改变而有明显变化。同时也可以看出，X_1对Y值影响的显著性要大于X_2。图2中X_1、X_3也表现出与图1相似的规律。图3表明X_2、X_3的交互作用显著，在所选范围内，X_2取不同的编码值时X_3对Y值的影响表现出不同的规律：当X_2处于低水平条时，随着X_3的增加，Y值出现上升趋势，而在X_2处于高水平下，随着X_3的增加，Y值反而出现降低。同样，X_3取不同的编码值时X_2对Y的影响也表现出不同的变化趋势。从单个因素对Y值的影响来看，X_2的影响显著性要大于X_3。三个因素对Y值的影响以及各因素之间的交互影响与回归分析结果相吻合。从响应面的最高点和等高线可以看出在所选的范围内存在极值，响应面的最高点同时也是等值线中的最小椭圆的中心点。通过岭嵴分析得到浒苔多糖最佳超声波提取工艺条件为：液料比54.81:1，超声功率531.17 W，提取时间为272 S，理论最佳提取率为17.68%。

2.2 验证实验

为了检验模型预测的准确性，按最佳提取条件提取，实验重复3次。3次平行实验的多糖提取率分别为17.23%，17.31%和17.72%，平均提取率为17.42%，与理论预测值相比相对误差为1.47%。可见响应面法对浒苔多糖超声波提取工艺的优化是可行的，提取工艺具有实际应用价值。

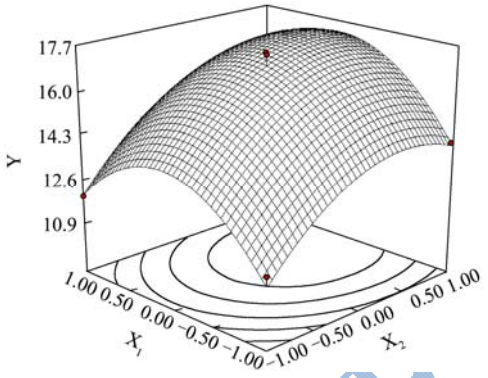


图1 Y=f（X_1、X_2）的响应面和等高线图

Fig.1 Respon se surface and contour of Y = f (X_1、X_2)

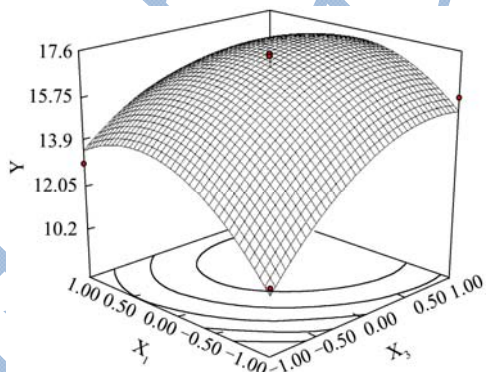


图2 Y=f（X_1、X_3）的响应面和等高线图

Fig.2 Respon se surface and contour of Y = f(X_1、X_3)

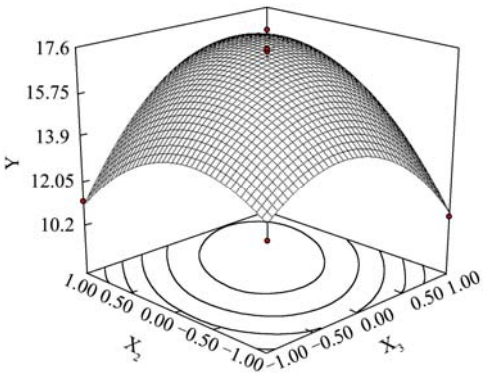


图3 Y=f（X_2、X_3）的响应面和等高线图

Fig.3 Respon se surface and contour of Y = f (X_2、X_3)

2.3 超声提取法与热水浸提法比较

分别采用按响应面法优化得到的最佳超声波提取条件和最优热水浸提条件提取浒苔多糖(另文发表)，比较两种方法。结果见表5。从表5可知，超声波提取法与传统热水提法相比，提取时间缩短95.8%，多糖提取率提高22.17%。

表5 超声波提取法和热水浸提法比较

Table 5 Comparison of ultrasonic extraction and hot-water extraction

方法	液料比 (mL:g)	提取时间 /min	多糖提取率 /%
超声波提取法	54.81:1	4.8	17.42
热水浸提法	63.49:1	195.6	13.93

3 结论

在前期单因素试验的基础上，本研究通过Box - Benhnken试验设计，建立了影响浒苔多糖提取率的二次多项数学模型，并应用响应面分析法对影响浒苔多糖超声波提取的主要因素（液料比、超声功率、提取时间）进行了优化。结果显示，浒苔多糖超声波提取的最佳工艺条件为：液料比54.81∶1，超声功率531.17 W，提取时间为272 s。在此条件下，实际提取率17.42%，与模型理论预测值17.68%的相对误差为1.47%。该方法与传统热水浸提法相比，提取时间缩短95.8%，多糖提取率提高22.17%。实验结果证明，利用响应面法对浒苔多糖超声波提取工艺进行优化，可获得最优的工艺参数，为浒苔多糖的进一步深入研究奠定基础。

参考文献

[1] 吉宏武,赵素芬.南海 3 种可食绿藻化学成分及其营养评价[J].湛江海洋大学学报,2005,19(3):19-23

[2] 周慧平,蒋巡天,王淑如.浒苔多糖的降血脂及对 SOD 活力和 LPO 含量的影响[J].生物化学杂志,1995,11(2):161-165

[3] 许晶晶,唐志红,王景玉,等.浒苔多糖的纯化及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2009,30(10):134-137

[4] 林文庭.浅论浒苔的开发与利用[J].中国食物与营养, 2007, 9: 23- 25

[5] Vlachos V, Critchley AT, A von Holy. Antimicrobial activity of extracts from selected Southern African marine macroalgae[J]. South African Journal of Science, 1997, 93(7): 328-332

[6] Hudson J B, Kim J H, Lee M K, *et al*. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities [J]. Journal of Applied Phycology, 1999, 10 (5): 427-434

[7] Kiyoka Higashi Okai, Shuzo Otani, Yasuji Okai, *et al*. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, Enteromorpha prolifera (sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis[J]. Cancer Letters, 1999, 140 (1): 21-25.

[8] 杨志岩,尹树花,白明,郭丽梅.油松花粉中总黄酮提取的响应面优化[J].现代食品科技,2008,24(3):253-256

[9] 刘军海,黄宝旭,蒋德超.响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(2):114-118

[10] 温升南,唐健,华洋林,杨公明.超高压提取灵芝孢子粉多糖的工艺研究.现代食品科技,2009,25(4):420-442

现代食品科技