

海洋硅藻中金藻昆布多糖提取纯化工艺 和定量检测方法优化

王珊, 杨润青, 魏东*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 金藻昆布多糖 (Chrysolaminarin) 是一种具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、降血脂和免疫调节等多种功效的 β -1,3-葡聚糖。海洋硅藻中富含金藻昆布多糖, 但提取纯化工艺和准确定量分析方法是当前研究和开发的瓶颈。该研究对海洋硅藻三角褐指藻胞内金藻昆布多糖的提取纯化工艺进行了优化, 建立的最佳条件为: 以 Tris-EDTA 缓冲液提取冻干藻粉 4 次后, 采用终浓度为 10% 的三氯乙酸 (Trichloroacetic Acid, TCA) 除蛋白后再进行醇沉回收多糖。随后系统比较了苯胺蓝荧光检测法、苯酚-硫酸法、凝胶液相色谱法检测其含量的方法学。结果表明, 苯胺蓝荧光检测法的最佳检测范围为 1~40 $\mu\text{g/mL}$, 具有最低检测下限 (4.12 $\mu\text{g/mL}$)、最高精密性 (相对标准偏差 1.27%) 和最好重现性 (相对标准偏差 2.49%), 加样平均回收率高达 100.85%, 显著优于其他两种方法。该研究建立的优化工艺和检测新方法为金藻昆布多糖的开发利用提供了技术支持。

关键词: 三角褐指藻; 金藻昆布多糖; 提取; 纯化; 荧光检测法

文章编号: 1673-9078(2023)08-181-187

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.0872

Optimization of Extraction-purification Process and Quantitative Detection for Chrysolaminarin from Marine Diatoms

WANG Shan, YANG Runqing, WEI Dong*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Chrysolaminarin is a kind of β -1,3-glucan possessing many functions such as anti-oxidative, anti-tumor, hypoglycemic, hypolipidemic and immunomodulatory activities. Marine diatoms are rich in chrysolaminarin, but extraction-purification process and accurate quantitative determination method are the bottlenecks of current research and development. In this study, the extraction-purification process for the intracellular chrysolaminarin from marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* was optimized, and the optimal conditions were established as follows: The freeze-dried algal powder was extracted four times with the Tris-EDTA buffer, and the protein was removed using trichloroacetic acid (TCA; final concentration 10%) before the polysaccharide was recovered via alcohol precipitation. The aniline blue fluorescence method, phenol-sulfuric acid method and gel chromatography method were used to compare systematically the determined contents. The results showed that the aniline blue fluorescence method had the optimal detection range of 1~40 $\mu\text{g/mL}$ and the lowest detection limit (4.12 $\mu\text{g/mL}$), the highest precision (relative standard deviation (RSD) 1.27%), the best reproducibility (RSD 2.49%) and high average recovery rate in spiked samples (100.85%), thereby being superior to other two methods. The optimized process and new detection method established in this study provide technical support for the development and utilization of chrysolaminarin.

Key words: *Phaeodactylum tricornerutum*; chrysolaminarin; extraction; purification; fluorescence determination method

引文格式:

王珊,杨润青,魏东.海洋硅藻中金藻昆布多糖提取纯化工艺和定量检测方法优化[J].现代食品科技,2023,39(8):181-187

WANG Shan, YANG Runqing, WEI Dong. Optimization of extraction-purification process and quantitative detection for chrysolaminarin from marine diatoms [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 181-187

收稿日期: 2022-07-12

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金重点项目 (2019B1515120002)

作者简介: 王珊 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 工业生物技术, E-mail: 1751608645@qq.com

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 工业生物技术, E-mail: fewd304@scut.edu.cn

金藻昆布多糖 (Chrysolaminarin) 是一类水溶性的 β -1,3-葡聚糖, 主要由葡萄糖通过 β -1,3-糖苷键主链和少量的 β -1,6-糖苷键支链连接而成^[1], 广泛存在于硅藻、金藻和黄藻等海洋微藻中, 作为微藻光合作用的主要产物储存于藻细胞液泡内^[2]。金藻昆布多糖具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、降血脂、强化免疫等 β -葡聚糖特有的生物活性^[3-5]。研究表明, 具有生物活性的 β -葡聚糖分子量一般在 4~5 ku; 与大型海藻来源的褐藻 β -葡聚糖 (分子量一般在 5 000 ku 以上) 和酵母来源的 β -葡聚糖 (50~2 400 ku) 相比, 金藻昆布多糖分子量低 (1~40 ku), 具有更高的免疫活性^[6], 可作为免疫刺激剂和益生元, 在功能性食品和动物饲料领域具有广泛的应用潜力^[7,8]。目前没有金藻昆布多糖标准品, 尚缺乏准确的定量检测方法, 严重影响了其结构与功能研究和应用。

目前, 针对藻基 β -1,3-葡聚糖含量的检测方法主要包括酶法^[9,10]、高效凝胶色谱法^[11,12]和物理化学方法^[13]。酶法主要利用特异性水解酶将 β -葡聚糖水解为寡糖, 再用 β -葡萄糖苷酶进一步水解为葡萄糖, 测定葡萄糖含量后换算为 β -葡聚糖含量。酶法优点是结果准确, 缺点是酶试剂价格昂贵、步骤繁琐且受酶的种类和纯度影响较大^[14]。高效凝胶色谱法不仅可以测定 β -葡聚糖分子量, 还可对其含量进行定量。通过示差折光检测器测定不同分子量的 β -葡聚糖和待测样品, 以保留时间与样品最接近的葡聚糖标准品比较后建立标准曲线, 再用外标法测定样品中 β -葡聚糖的含量^[15]。该方法的优点是准确度高、重现性好, 缺点是对样品纯度要求较高, 样品一般需经纯化处理, 操作时间长。苯酚-硫酸法是一种常用的物理化学法, 主要原理是多糖在浓硫酸作用下脱水生成的糠醛或羟甲基糠醛能与苯酚络合成一种橙红色化合物, 经比色法在 485 nm 波长下测定葡萄糖含量, 再换算为 β -葡聚糖含量。其优点是试剂易得、操作简便, 但样品中的多糖和寡糖的存在导致该方法专一性较差^[16]。目前, 金藻昆布多糖的测定常用苯酚-硫酸法^[17,18]和凝胶色谱法^[1], 但仍缺乏方法学上的系统比较和筛选。

金藻昆布多糖的提取纯化及定量检测是工业生产的关键技术之一。本研究对硅藻中金藻昆布多糖的水提、醇沉提取纯化工艺进行了优化, 并利用 β -1,3-葡聚糖能与荧光剂特异性结合并增强荧光强度的原理^[19,20], 建立了新型苯胺蓝荧光检测法测定金藻昆布多糖含量。通过苯酚-硫酸法、凝胶液相色谱法和苯胺蓝荧光检测法的方法学比较, 评价其结果的准确度和经济实用性。

1 材料与方法

1.1 藻种、培养基与培养条件

三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) CCMP 1327 由中国科学院水生生物研究所胡晗华研究员惠赠。采用改良的兼养 f/2 培养基 (表 1) 进行斜面保种, 盐度 20‰, pH 值 8.0, 斜面保存温度 4 °C。藻种活化时, 置于 50 mL 装有无菌改良 f/2 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于 20 °C、光照强度 10 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、转速 150 r/min 的恒温光照摇床中进行连续光照培养 3~5 d 后, 以 10% 接种量转接至装有 100 mL 无菌改良 f/2 培养基的 250 mL 三角瓶中, 相同条件下培养 6~8 d 至对数期用于后续研究。配制的培养基在 121 °C 下高温灭菌 15 min, 尿素母液经过滤除菌后加入已灭菌、冷却到室温的培养基中。

1.2 试剂与仪器

标准品酵母 β -1,3 葡聚糖, 北京百灵威科技有限公司; 苯胺蓝染料, 上海迈坤化工有限公司; 三氯乙酸, 上海麦克林生化科技有限公司; 胰蛋白胨, 广东环凯微生物科技有限公司; 总氮试剂, 美国 HACH 公司; 甘油、尿素、硝酸钠等均为分析纯试剂。CYTATION-5 酶标仪, 广州市众创生物科技有限公司; 高效凝胶渗透色谱仪 (1525 型高效液相色谱泵), 美国 Waters 公司; 凝胶色谱柱 (Prevail Carbohydrate ES, 5 μm), 美国安捷伦科技有限公司; TissueLyse-24 珠磨仪, 上海净信实业发展有限公司。

表 1 改良的 f/2 培养基组成

Table 1 Composition of modified f/2 medium

组成成分	含量 (1 L)	组成成分	含量 (1 L)	组成成分	含量 (1 L)
甘油	9.20 g	胰蛋白胨	1.17 g	尿素	3.00 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	10.00 mg	Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	30.00 mg	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15 mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36 mg	CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.80 μg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.30 μg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.00 μg	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.00 μg	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180 μg
Thiamine·HCl (VB ₁)	200.00 μg	Biotin (VH)	1.00 μg	Cyanocobalamin (VB ₁₂)	1.00 μg

1.3 研究内容

1.3.1 96 微孔板的筛选

通过测定空白 96 孔板的背景荧光强度,筛选出对样品检测精密度无显著性影响的微孔板类型。采用酶标仪在激发波长为 398 nm、发射波长为 502 nm 下,测定来自生工(Sangon Biotech)和康宁(Corning Incorporated Costar)两家品牌的透明板、白板和全黑板的荧光强度值,筛选出荧光强度最低的 96 板用于后续实验。

1.3.2 藻粉中金藻昆布多糖提取条件优化

1.3.2.1 藻粉提取次数

收集新鲜藻细胞在 4 °C 下 8 000 r/min 离心 5 min,真空冷冻干燥后准确称取 15 mg,悬浮于 12 mL pH 值 8.0 的 Tris-EDTA (TE) 缓冲液(配制 5 mmol/L EDTA 溶液,用 10 mmol/L Tris-HCl 调节 pH 至 8.0)中,50 °C 温水浴 30 min。在细胞破碎仪中 70 Hz 破碎 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,收集所有上清液 S。分别重复提取 2、4、6 次,最终合并上清液。随后加入三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)溶液使其终体积分数为 10%,50 °C 水浴 60 min,10 000 r/min 离心 20 min,得到上清液 F。将上清 F 与 5 倍无水乙醇混合,置于 -20 °C 冰箱过夜,次日取出,再以 10 000 r/min 离心 20 min,收集粗多糖样品沉淀物 T。将湿沉淀 T 溶解在蒸馏水中,稀释、定容至 10 mL 作为待测液^[21]。

1.3.2.2 TCA 溶液体积分数

利用 TE 缓冲液提取冻干藻粉 4 次,向收集的上清液 S 中加入 TCA 溶液使其终体积分数分别 5%、10%、15%,以考察其去除蛋白能力。其余条件同 1.3.2.1。

1.3.2.3 醇沉

分别称取冻干藻粉 10、15、20 mg,利用 TE 缓冲液提取冻干藻粉 4 次,向收集的上清液 S 中加入 TCA 溶液使其终体积分数为 10%。对得到的上清液 F 进行醇沉与不醇沉的处理对比。其余条件同 1.3.2.1。

1.3.3 金藻昆布多糖测定方法的比较

1.3.3.1 苯胺蓝荧光检测法

准确称取酵母 β -1,3-葡聚糖 20.00 mg,溶解于 1 mol/L 氢氧化钠溶液并定容至 100 mL,配置成 200 μ g/mL 葡聚糖母液,稀释为 1、2、5、10、15、20、30、40、60 μ g/mL 系列工作液。在 1.10 mL 工作液中加入 2.10 mL 苯胺蓝工作液,50 °C 水浴 30 min。将反应液 pH 值调至 9.6 后室温放置 30 min,去除未反应的试剂。取 200 μ L 反应液在 398 nm 激发波长和 502 nm 发射波长条件下测定其荧光强度。绘制标准曲线为 $Y=89.57X+4\ 264.50$ ($R^2=0.99$),其中 X 为酵母

β -1,3-葡聚糖质量浓度, Y 为荧光强度。

取 1.3.2 中 1.00 mL 金藻昆布多糖待测液,加入 0.10 mL 6 mol/L 氢氧化钠溶液,80 °C 水浴 30 min。随后迅速将离心管插入冰浴中 10 min,随后加入苯胺蓝工作液,反应后取 200 μ L 反应液测定反应液荧光强度,通过标准曲线计算金藻昆布多糖含量。

1.3.3.2 苯酚-硫酸法

准确称取无水葡萄糖 20.00 mg,用蒸馏水溶解并定容至 100 mL,制备 200 μ g/mL 葡萄糖储备液,稀释为 2、4、6、8、10、20、40、60、80、100、120 μ g/mL 系列工作液。取 1 mL 待测样液加入 1 mL 5% (m/V) 苯酚溶液及 5 mL 浓硫酸,室温静置 10 min 后摇匀,避光静置 20 min,在 490 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线为 $Y=0.007\ 9X+0.057$ ($R^2=1.00$),式中 X 为葡萄糖质量浓度, Y 为反应物的吸光度。

准确称取 5 mg 冻干藻粉,加入 10 mL 超纯水,50 °C 水浴 30 min,取 1 mL 待测样液加入 1 mL 5% (m/V) 苯酚溶液及 5 mL 浓硫酸,室温静置 10 min 后摇匀,避光静置 20 min,取上清在 490 nm 处测定吸光度,通过标准曲线计算葡萄糖含量,结果乘以转换系数 0.90 计算 β -1,3-葡聚糖含量^[22]。

1.3.3.3 凝胶液相色谱法

称取 200.00 mg 分子量为 5 200 u 的酵母 β -1,3-葡聚糖标准品,50% (V/V) 乙腈水溶液并定容至 100 mL 以配置 200 μ g/mL β -葡聚糖母液,稀释为 40、60、80、100、200、400、600、800、1 000、2 000 μ g/mL 系列工作液,用于后续凝胶色谱上机。采用 1525 型高效液相色谱泵、Prevail Carbohydrate ES (250 mm \times 4.6 mm) 色谱柱;流动相为 75% (V/V) 乙腈溶液;流速为 1.0 mL/min;柱温 35 °C;Waters 2414 示差折光检测器,进样量 20 μ L;每个样品运行时间 15 min。绘制标准曲线为 $Y=141.11X-2\ 394.60$ ($R^2=1.00$),式中 X 为 β -葡聚糖质量浓度, Y 为峰面积。经测定,酵母 β -1,3-葡聚糖的出峰保留时间为 9.141 min。

取 1.3.2 中提取后的粗多糖沉淀物 T 复溶于 5 mL 流动相中,用于凝胶液相色谱分析,通过标准曲线计算金藻昆布多糖含量。经测定,金藻昆布多糖的出峰保留时间为 9.753 min。

1.3.3.4 检测下限、精密度及重现性比较

样品的检测下限是相对于空白可检测到的最低样品浓度,也就是最低检测浓度。定义样品检测下限为 3 倍的空白标准偏差(即 3 δ 空白),样品定量检测下限为 10 倍的空白标准偏差(即 10 δ 空白)。

按照 1.3.3.1~1.3.3.3 方法重复测定同一样品 5 次,计算相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD)

值,考察三种方法的精密性;按照 1.3.2 确定的金藻昆布多糖的最佳提取条件制备 5 份冻干藻粉提取物的待测液,采用 1.3.3.1~1.3.3.3 方法测定样品浓度,考察样品的重现性。

1.3.3.5 样品加标回收率测定

精密称取待测冻干藻粉 6 份,采用 1.3.2 优化的金藻昆布多糖的最佳提取条件得到粗多糖,分别向 6 份粗多糖中加入 2 mL 40 μg/mL 酵母 β-1,3-葡聚糖进行加样回收实验,用超纯水稀释至 10 mL,得待测样液。按照样品测定步骤进行测试,若测定结果显示加样回收率均在方法要求范围 100%±5%内,说明方法准确度较高。

1.4 数据分析

采用 Origin 9.0 和 SPSS 软件对数据进行处理和统计学分析,实验数据均采用平均值±标准误差 (Mean±SD) 标出。采用单因素分析法和 t-检验进行显著性分析,不同字母之间表示显著性差异(P<0.05)。

2 结果与讨论

2.1 96 微孔板的筛选

生工 (Sangon Biotech) 和康宁 (Corning Incorporated Costar) 两家品牌的 96 孔透明板和全黑板对不同品牌 96 孔板的背景荧光强度如图 1 所示。结果表明,生工品牌 96 孔全黑板的背景荧光强度最低(700 左右),对待测样品的荧光强度影响最小;而使用透明板或白板的荧光强度高于 4 000。预实验结果表明,本实验待测样品的荧光强度为 4 000~8 000,因此透明板或者白板会直接影响检测结果的精密性。综上,选择生工品牌 96 孔全黑板用于后续样品荧光强度的检测。

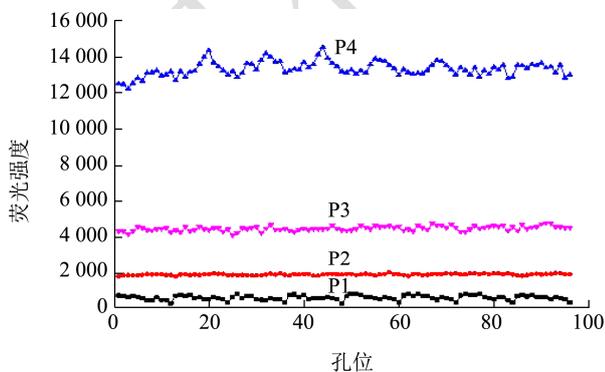


图 1 不同品牌 96 微孔板的背景荧光强度

Fig.1 Background fluorescence intensity of 96-well microplates from different brands

注: P1 为生工黑板; P2 为康宁黑板; P3 为康宁透明板; P4 为生工白板。

2.2 藻粉中金藻昆布多糖提取纯化工艺优化

TE 缓冲液提取次数、TCA 终体积分数和醇沉与否对金藻昆布多糖含量测定值的影响如图 2。由图 2a 可知,藻粉中金藻昆布多糖含量测定值随着 TE 缓冲液提取次数的增加而增大,当提取次数为 6 时,多糖含量测定值最高 (18.81%干质量)。说明提取次数越多,金藻昆布多糖的测定含量就越高,但提取次数为 4 次和 6 次时,多糖的测定含量无显著差异 (P>0.05)。研究表明,水提法提取谷物中 β-葡聚糖时,适当延长提取时间可以显著提升产物得率^[23]。因此,为了降低提取时间成本并获取高得率,选择 TE 缓冲液提取次数为 4 次用于后续优化。

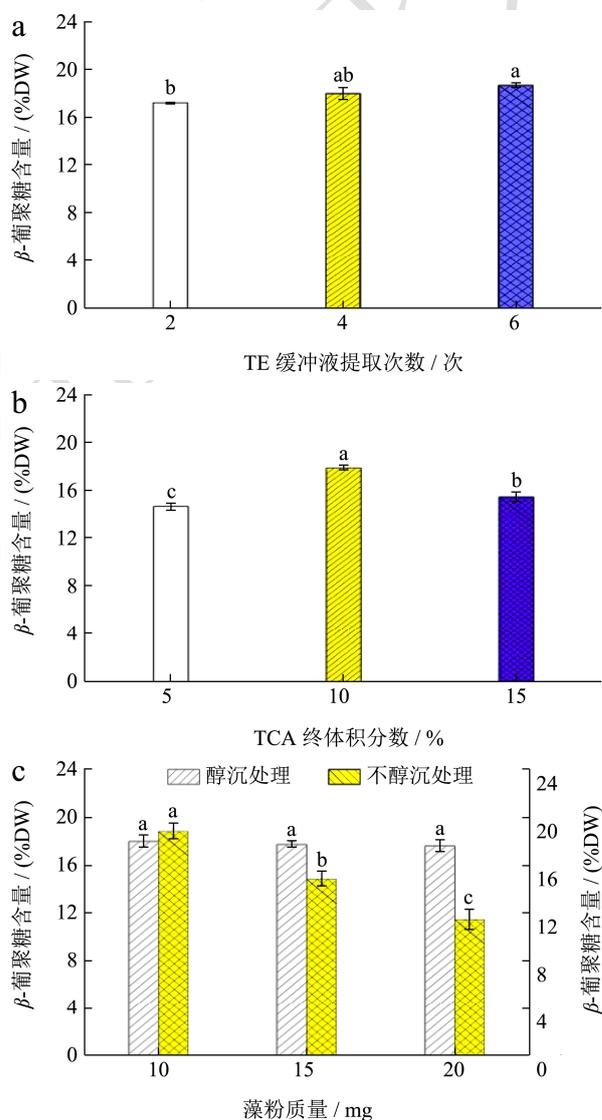


图 2 TE 缓冲液提取次数 (a)、TCA 终体积分数 (b) 和醇沉与否 (c) 对金藻昆布多糖含量测定值的影响

Fig.2 Effects of extraction times by TE Buffer, TCA concentrations and extraction with or without ethanol precipitation on the detected value of chrysolaminarin content

注: 不同字母 a、b、c 代表均值之间存在显著性差异 P<0.05。

如图 2b 所示, 随着 TCA 终体积分数的提高, 金藻昆布多糖的含量测定值呈现先升高后降低的趋势。当 TCA 终体积分数为 10% 时, 多糖含量测定值最高 (17.91% 干质量), 比 5% 和 15% 条件下高出 22% 和 16% ($P < 0.05$)。辛泉伯等^[24]研究了 Sevag 法和 TCA 法除蛋白对湛江等鞭金藻中多糖组成和结构特征的影响, 结果表明采用 Sevag 法处理 2 次或 10% (V/V) TCA 法可以获得最大的多糖回收率和最小的蛋白残留率, 其结果与本研究结果相似。故选择 10% (V/V) TCA 体积分数条件进行后续实验。

如图 2c 所示, 经醇沉处理后, 不同质量藻粉中金藻昆布多糖含量的测定值无显著性差异; 而未经醇沉处理组中, 多糖含量测定值显著降低 ($P < 0.05$)。研究表明, 在三角褐指藻胞内岩藻黄素、二十碳五烯酸和金藻昆布多糖的同步提取中, 4 °C 过夜醇沉后金藻昆布多糖的得率高达 43.54%^[1]。本实验所用样品为同一批次培养实验中收获的藻粉, 其胞内金藻昆布多糖含量无差异, 说明醇沉处理对多糖析出至关重要, 大大提高了金藻昆布多糖含量检测的准确度。故后续对粗多糖进行醇沉过夜处理后再测定金藻昆布多糖含量。

2.3 金藻昆布多糖检测下限、精密度及重现性

如表 2 所示, 苯胺蓝荧光法、苯酚-硫酸法和凝胶色谱法线性方程回归范围分别为 1~40、2~120 和 40~2 000 $\mu\text{g/mL}$, 检测下限分别为 4.12、4.56 和 14.93 $\mu\text{g/mL}$ 。其中, 苯胺蓝荧光法的检测范围最小, 凝胶色谱法检测范围最广。但是, 苯胺蓝荧光法的检测下限最低, 有利于测定低生物量、低含量样品中金藻昆布多糖的含量。

苯胺蓝荧光法、苯酚-硫酸法和凝胶色谱法的精密度和重现性比较结果见表 2。结果表明, 三种方法的精密度 RSD 均小于 5%, 尤其苯胺蓝荧光法的精密度最高 (RSD 为 1.27%)。而凝胶液相色谱法的精密度最低 (RSD 为 4.74%), 可能是示差折光检测器灵敏度较低, 对样品的检测下限要求较高。在重现性上, 苯胺蓝荧光检测法测得样品含量的 RSD 最低 (2.49%), 说明该方法重现性最好。据报道, 在燕麦 β -葡聚糖的三种测定方法 (酶法、凝胶色谱法和刚果红法) 中, 凝胶色谱法的重现性 RSD 最大为 5.27%^[14], 与本研究结果基本一致。这是因为凝胶色谱法对样品的纯度要求较高, 样品前处理的醇沉过程对该方法检测结果影响较大, 意味着样品需要纯化, 工作量大、成本高。上述结果表明, 苯胺蓝荧光法测定三角褐指藻中金藻昆布多糖含量的精密度和重现性最好。

表 2 金藻昆布多糖测定方法学的比较

Table 2 Comparison of the methodology for chrysolaminarin determination

方法	苯胺蓝荧光法	苯酚-硫酸法	凝胶色谱法	
线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	1~40	2~120	40~2000	
检测下限/ $(\mu\text{g/mL})$	4.12	4.56	14.93	
精密度	22.28	24.08	21.84	
	21.83	23.06	22.51	
	测定结果/ $(\mu\text{g/mL})$	22.35	24.71	23.26
	22.51	23.95	24.08	
	21.96	25.09	21.42	
	平均值/ $(\mu\text{g/mL})$	22.19 ^b	24.18 ^a	22.62 ^b
RSD/%	1.27	3.22	4.74	
重现性	22.28	24.08	22.84	
	21.43	25.47	21.33	
	测定结果/ $(\mu\text{g/mL})$	21.95	24.96	21.95
	22.86	24.20	23.92	
	21.75	27.11	24.81	
	平均值/ $(\mu\text{g/mL})$	22.05 ^b	25.16 ^a	22.97 ^b
RSD/%	2.49	4.88	6.17	

注: 不同字母表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

2.4 加样回收率

在三种方法的线性范围内, 考察低浓度标准品 (酵

母 β -1,3-葡聚糖) 的加样回收率, 测定结果如表 3 所示。结果表明, 苯胺蓝荧光检测法的加标回收率范围在 96%~105% 之间, 平均回收率为 100.85%, RSD 最

小(3.12%),说明苯胺蓝荧光法对于三角褐指藻中金藻昆布多糖的测定更为准确,是优选检测方法。苯酚硫酸法的加样回收率范围在106%~116%之间,尽管RSD较小(3.19%),但该方法测定结果比实际值偏高,因此不适宜联用校正因子来直接衡量 β -1,3-葡聚糖的含量。凝胶液相色谱法的加样回收率范围在98%~109%之间,平均回收率(104.19%)与苯胺蓝荧光法差别不大,可应用于测定金藻昆布多糖的含量。郑立等^[21]研究结果同样表明,利用苯胺蓝染色法可以较为

准确地测定海带中昆布素(Laminarin)含量,其精密度和稳定性的RSD分别为2.52%和2.09%。韩素芳等^[25]利用快速荧光光谱法检测桑黄中的多糖含量,其精密度和加样回收率分别为4.07%和92%~104%,表明此方法适用性好,检测出桑黄粗多糖中 β -葡聚糖含量为19.86%。苯胺蓝荧光检测法为新型的检测金藻昆布多糖含量的方法,与常规检测方法相比,其经济成本低、检测的精确度和重现性高,被认为是三角褐指藻中金藻昆布多糖的最佳检测方法。

表3 回收率测定结果

Table 3 Results of standard recovery

方法	样品测定值/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加标后样品测定值/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
苯胺蓝荧光法	22.28	30.54	103.25	100.85 ^c	3.12
	21.43	29.18	96.88		
	21.95	29.83	98.50		
	22.86	31.06	101.25		
	21.75	30.10	104.38		
苯酚-硫酸法	24.08	33.10	112.75	112.48 ^a	3.19
	25.47	34.70	115.38		
	24.96	33.91	111.88		
	24.20	32.74	106.75		
	27.11	36.36	115.63		
凝胶色谱法	22.84	31.10	103.25	104.19 ^b	3.94
	21.33	29.18	98.13		
	21.95	30.24	103.56		
	23.92	32.52	107.50		
	24.81	33.49	108.50		

注:不同字母表示显著性差异 $P<0.05$ 。

3 结论

本研究针对三角褐指藻中金藻昆布多糖的提取纯化工艺进行了优化,建立了藻粉中含量快速检测的苯胺蓝荧光法。对三角褐指藻胞内金藻昆布多糖的提取工艺进行优化,建立了最佳条件为:TE缓冲液提取4次、以终体积分数10%的TCA溶液除蛋白后对样品进行醇沉处理。经对比三种方法(苯胺蓝荧光法、苯酚-硫酸法和凝胶液相色谱法)的检测下限、精确度、重现性和加样回收率,确定藻粉中金藻昆布多糖含量的最佳检测方法为苯胺蓝荧光法。该方法精密度高、重现性好、加标回收率高,为后续研究和产品品质控制提供了关键分析技术。

参考文献

[1] Zhang W Y, Wang F F, Gao B Y, et al. An integrated biorefinery process: Stepwise extraction of fucoxanthin,

eicosapentaenoic acid and chrysolaminarin from the same *Phaeodactylum tricorutum* biomass [J]. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 2018, 32: 193-200.

[2] Schreiber V, Dersch J, Puzik K, et al. The central vacuole of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*: identification of new vacuolar membrane proteins and of a functional Di-leucine-based targeting motif [J]. *Protist*, 2017, 168(3): 271-282.

[3] Sellimi S, Maalej H, Rekik D M, et al. Antioxidant, antibacterial and *in vivo* wound healing properties of laminarin purified from *Cystoseira barbata* seaweed [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 119: 633-644.

[4] Taylor H B, Gudi R, Brown R, et al. Dynamics of structural and functional changes in gut microbiota during treatment with a microalgal beta-glucan, paramylon and the impact on

- gut inflammation [J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 1-23.
- [5] Carballo C, Chronopoulou E G, Letsiou S, et al. Antioxidant capacity and immunomodulatory effects of a chrysolaminarin-enriched extract in Senegalese sole [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82: 1-8.
- [6] Kadam S U, Tiwari B K, O'Donnell C P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015, 50(1): 24-31.
- [7] Carballo C, Pinto P I S, Mateus A P, et al. Yeast beta-glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 31-39.
- [8] Ben Atitallah A, Hentati F, Dammak M, et al. Effect of microalgae incorporation on quality characteristics and functional and antioxidant capacities of ready-to-eat fish burgers made from common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Applied Sciences-Basel*, 2019, 9(9): 1830.
- [9] Thanardkit P, Khunrae P, Suphantharika M, et al. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, 18(6): 527-539.
- [10] 田晓丽,杨萍,姜文侠.酵母细胞壁 β -D-葡聚糖定量测定方法的比较分析[J]. *食品科学*, 2016,37(2):99-103.
- [11] Giovani G, Rosi I. Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 116(1): 19-24.
- [12] 徐婷婷,刘艳,张子健,等.高效液相色谱法测定酵母细胞壁中甘露聚糖和 β -葡聚糖[J]. *中国酿造*, 2016,35(7):180-183.
- [13] 曾婷,蒙嵩,谢晓婷.刚果红法与流动分析荧光法测定 β -葡聚糖的对比[J]. *啤酒科技*, 2013,5:42-45.
- [14] 刘廷竹,董云,常晓燕,等.燕麦 β -葡聚糖含量不同测定方法的适用性和相关性比较[J]. *食品工业科技*, 2019,40(13):197-201.
- [15] 周春晖,周丹丹,刘婷婷,等.高效凝胶色谱法测定猴头菇多糖分子量及含量[J]. *食品研究与开发*, 2016,37(21):123-127.
- [16] 白瑞斌,马玉玲,张培,等.苯酚-硫酸法结合校正因子法测定含半乳糖醛酸的多糖中的糖含量[J]. *中国药房*, 2017,28: 2974-2978.
- [17] Popovich C A, Faraoni M B, Sequeira A, et al. Potential of the marine diatom *Halamphora coffeaeformis* to simultaneously produce omega-3 fatty acids, chrysolaminarin and fucoxanthin in a raceway pond [J]. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 2020, 51: 102030.
- [18] Xia S, Gao B Y, Fu J Q, et al. Production of fucoxanthin, chrysolaminarin, and eicosapentaenoic acid by *Odontella aurita* under different nitrogen supply regimes [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 126(6): 723-729.
- [19] Graham L M, Tsoni S V, Willment J A, et al. Soluble dectin-1 as a tool to detect beta-glucans [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2006, 314(1-2): 164-169.
- [20] 刘艳芳,唐庆九,张劲松,等.灵芝提取物 β -1,3-葡聚糖含量测定及多糖成分分析[J]. *菌物学报*, 2018,37(11):1525-1531.
- [21] 郑立,韩平,刘涛,等.海带中昆布素的荧光定量检测及提取工艺优化[J]. *海洋科学*, 2012,36(5):75-80.
- [22] 白沙沙,赵萌,于佳立,等.不同品种小麦籽粒中 β -葡聚糖含量的比较研究[J]. *中国食物与营养*, 2016,22(12): 69-72.
- [23] Maheshwari G, Sowrirajan S, Joseph B. Extraction and isolation of beta-glucan from grain sources-a review [J]. *Journal of Food Science*, 2017, 82(7): 1535-1545.
- [24] 辛泉伯,罗薇,孙可澄,等.除蛋白方式对湛江等鞭金藻多糖的组成、结构特征和体外抗肿瘤活性的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2019,34(3):428-435.
- [25] 韩素芳,贺亮,刘亚群,等.桑黄中 β -葡聚糖快速荧光光谱检测研究方法研究[J]. *现代化工*, 2014,34(6):156-158.