

[文章编号] 1007-7405(2017)06-0024-10

泡叶藻聚糖脱色工艺的研究

韦敬柳^乙¹, 陈艳红^{1,2,3,4}, 杜希萍^{1,2,3,4}, 倪辉^{1,2,3,4}, 朱艳冰^{1,2,3,4},
肖安风^{1,2,3,4}, 蔡慧农^{1,2,3,4}, 姜泽东^{1,2,3,4}

- (1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门南方海洋研究中心经济海藻资源化利用重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021;
4. 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了选取最优的脱色工艺以脱除泡叶藻 (*Ascophyllum nodosum*) 聚糖发色基团或物质, 通过比较活性炭吸附、有机溶剂(甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮和四氢呋喃)萃取、大孔树脂(D101、D101-1、DM130)吸附、 H_2O_2 氧化等不同脱色方法对泡叶藻聚糖脱色效果的影响, 研究表明, H_2O_2 氧化法优于大孔树脂吸附法、活性炭吸附法和有机溶剂萃取法。进一步以脱色时间、脱色温度、 H_2O_2 质量分数和脱色pH值为因素, 进行单因素试验确定关键影响因素及其水平, 并采用 $L_9(3^4)$ 正交设计进行试验, 以泡叶藻聚糖的白度值和脱色后聚糖保留率为指标, 并分析脱色后的泡叶藻聚糖对诱导小鼠吞噬细胞RAW264.7生成一氧化氮活性的影响, 筛选出具有较好保留泡叶藻聚糖免疫诱导潜力的 H_2O_2 氧化法的脱色工艺条件。结果表明, H_2O_2 氧化法脱除泡叶藻聚糖发色基团或物质最佳工艺条件为: H_2O_2 质量分数8.6%, 脱色时间4.0 h, 脱色温度60℃, pH值11.0, 泡叶藻聚糖白度值达到 $(61.05 \pm 1.12)\%$, 提高了4.1倍, 聚糖保留率为 $(90.02 \pm 0.03)\%$ 。

[关键词] 泡叶藻聚糖; 脱色工艺优化; 白度值; 保留率; 活性

[中图分类号] TS 201.2

Study on Decolorization of Sulfated Polysaccharide Isolated from Brown Alga *Ascophyllum nodosum*

WEI Jingliuyi¹, CHEN Yanhong^{1,2,3,4}, DU Xiping^{1,2,3,4}, NI Hui^{1,2,3,4}, ZHU Yanbing^{1,2,3,4},
XIAO Anfeng^{1,2,3,4}, CAI Huinong^{1,2,3,4}, JIANG Zedong^{1,2,3,4}

- (1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed, Xiamen Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen 361021, China;
3. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering Technology, Xiamen 361021, China;
4. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to obtain the optimum decolorization method for removing the chromophoric group or substances in ascophyllan, the efficiencies of various decolorization methods with different materials including activated carbon, organic solvent (methanol, ethanol, isopropanol, acetone, and tetrahydrofuran), macroporous resin (D101, DM130, and D101-1), and H_2O_2 were compared. The results showed that the H_2O_2 -decoloriza-

[收稿日期] 2017-05-16

[修回日期] 2017-06-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31501441); 福建省自然科学基金项目(2015J01140); 集美大学科研基金项目(ZC2014008)

[作者简介] 韦敬柳乙(1990—), 女, 硕士生, 主要从事海藻多糖分离纯化及生物活性研究。通信作者: 姜泽东(1982—), 男, 副教授, 博士, 主要从事海藻加工研究, E-mail: zdjiang@jmu.edu.cn。

tion method was more efficient than other methods. To further determine the optimum decolorization technologic parameters of H_2O_2 -decolorization method, the quantitative effects of times, temperatures, H_2O_2 concentrations, and pH values on the whiteness value and the retention rate of decolored ascophyllan were investigated using a single factor experiment method and a $L_9(3^4)$ orthogonal design experiment method, then the activities of decolored ascophyllans on NO production in RAW264.7 cells were analyzed. The results showed that the optimum decolorization technologic parameters were as follows: the H_2O_2 concentration 8.6%, the decoloring time 4.0 h, the decoloring temperature 60 °C, and the pH 11.0. Under this condition, the whiteness value of ascophyllan was $(61.05 \pm 1.12) \%$ increased by 4.1 times, and its retention rate reached to $(90.02 \pm 0.03) \%$.

Keywords: ascophyllan; decolorization optimization; whiteness value; retention rate; activity

0 引言

泡叶藻 (*Ascophyllum nodosum*), 又称岩衣藻, 是一种大型的海洋褐藻, 主要在北大西洋沿岸生长与繁殖。泡叶藻含有丰富的褐藻胶, 约占藻体总多糖的 79%, 是工业生产褐藻胶、碘和甘露醇的主要原料之一^[1-2]。除褐藻胶外, 泡叶藻还含有泡叶藻聚糖和岩藻聚糖, 它们分别约占藻体总多糖的 13% 和 8%^[2]。在我国的工业生产上, 泡叶藻主要被用于提取褐藻胶; 在农业生产上, 泡叶藻常被用来制作化肥、饲料等; 在食品行业中, 泡叶藻主要被用来制作海藻粉。近年来, 大量研究指出, 泡叶藻聚糖具有多种优良的生物活性, 如免疫诱导^[3-6]、抗氧化^[7-8]、抗肿瘤^[9-10]、抗炎症^[11]等, 这些生物活性使其在食品和生物医药领域有着重要的应用价值和良好的开发前景。

泡叶藻聚糖属于褐藻多糖硫酸酯中的一种, 传统工艺法提取的泡叶藻聚糖纯度不高, 且含有一定的杂质基团, 聚糖多呈褐色或深褐色, 溶解度较差, 黏度差异较大, 不利于对其生物活性、结构与构效关系的研究, 且不能直接用于功能食品精细加工和医药品生产, 从而导致生产成本较高。然而, 目前对泡叶藻聚糖的研究报道主要集中在提取工艺以及生物活性研究方面, 对其脱色及高效纯化工艺尚缺乏研究。目前针对多糖常用的脱色方法一般有有机溶剂萃取法、活性炭吸附法、树脂吸附法^[12-13]、双氧水 (H_2O_2) 氧化法^[14]等。其中, 活性炭吸附法中炭粉不易去除, 而且成本较高^[15]; 树脂吸附法对多糖组分有吸附能力, 造成多糖保留率较低, 且脱色效果不理想^[16]; H_2O_2 氧化法脱色具有脱色效率高、操作简单、快捷的特点, 且没有异味, 不易复色^[17]。

本文通过比较活性炭吸附、有机溶剂 (甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮和四氢呋喃) 萃取、大孔树脂 (D101、D101-1、DM130) 吸附、 H_2O_2 氧化等不同脱色方法对泡叶藻聚糖脱色效果的影响, 进一步通过比较脱色后泡叶藻聚糖白度值和聚糖保留率, 对泡叶藻聚糖的 H_2O_2 氧化脱色工艺条件进行优化, 并结合分析经各优化工艺脱色后的泡叶藻聚糖对诱导小鼠吞噬细胞 RAW264.7 生成一氧化氮活性 (免疫诱导活性评价指标之一), 筛选出具有较好保留泡叶藻聚糖免疫诱导潜力的脱色工艺条件, 为泡叶藻聚糖的精深加工及其在食品领域、生物医药领域的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

泡叶藻购于青岛明月海藻集团; 透析袋 (3500 u cut-off) 购于上海源叶生物科技有限公司; 活性炭粉末购于江苏志康炭业有限公司; 小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 购于中国科学院上海细胞库。

大孔树脂 (D101、D101-1、DM130) 购于河北宝思吸附材料科技有限公司; 甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、四氢呋喃、体积分数 95% 乙醇、盐酸、冰醋酸、过氧化氢、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾等购于上海国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯; 脂多糖购于 Sigma-Aldrich 中国上海公司; DMEM 培养基购于美国 HyClone 公司; 胎牛血清购于以色列 Biological Industries; 100 × 抗生素 (10 000 IU/mL 氨苄青霉素和 10 g/L 硫酸链霉素) 溶液购于 Sigma-Aldrich 中国上海公司。

1.2 仪器与设备

ZXRD-85110 型电热恒温振荡水槽 (上海恒科学仪器有限公司); FE20/EL20 型 pH 酸度计 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); Avanti J26XP 高速冷冻离心机 (德国贝克曼公司); Free Zone 6 plus 型真空冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); ADCI-2000 系列全自动白度仪 (北京辰泰克仪器技术有限公司); HERACELL Vois 160i 型 CO₂ 培养箱 (德国赛默飞世尔科技公司); 培养倒立显微镜 (日本 Nikon 公司); 1300 SERIES AL 型生物安全柜 (德国赛默飞世尔科技公司); BioTek Cytation-5 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司)。

1.3 大孔树脂的预处理

参照文献 [18], 将树脂用体积分数 95% 乙醇浸泡至充分溶胀, 去除乙醇后, 用蒸馏水洗涤至无白色浑浊且无醇味, 再用质量分数 5% NaOH 溶液浸泡 2~4 h, 用水洗至中性; 再用质量分数 5% HCl 溶液浸泡 3 h 后, 用蒸馏水洗涤至中性备用。

1.4 泡叶藻聚糖的制备

泡叶藻洗净、烘干后粉碎, 过 60 目标准筛, 藻粉按料液比 1:30 (g:mL) 加水, 沸水浴浸提 2 h, 冷却至室温, 过滤并离心除去藻渣。用 HCl 溶液调上清液 pH 值至 1.3, 于 4 °C 下过夜放置, 经冷冻离心 (6253 r/min, 20 min) 去除褐藻胶沉淀, 上清液用 NaOH 溶液调至中性后, 于 4 °C 下用体积分数 50% 乙醇过夜沉淀, 冷冻离心 (6253 r/min, 20 min) 获取沉淀, 沉淀过程重复 2 次并合并沉淀物, 经纯水透析 (3500 u cut-off) 后, 冷冻干燥获得泡叶藻聚糖。

1.5 不同脱色方法对泡叶藻聚糖脱色的初步分析

活性炭吸附法: 取 15.0 mL 泡叶藻聚糖溶液 (4.0 g/L), 按质量体积比加入 3.0% 的活性炭, 室温脱色 12 h, 离心 (6253 r/min, 5 min), 上清液冷冻干燥至恒重备用。

有机溶剂萃取法: 取 60.0 mg 泡叶藻聚糖粉末 5 份, 分别加入 15.0 mL 甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮和四氢呋喃试剂沉淀聚糖, 室温脱色 12 h 后, 离心 (6253 r/min, 5 min) 弃上清液, 取出沉淀, 烘干至恒重后备用。

大孔树脂吸附法: 将大孔树脂 (D101、D101-1、DM130) 活化^[19]后, 填入层析柱 (2.6 cm × 20 cm), 取 5.0 mL 泡叶藻聚糖溶液 (4.0 g/L), 上样进入大孔树脂的层析柱, 室温孵育 12 h, 蒸馏水洗至洗脱液无色, 收集洗脱液溶液, 冷冻干燥至恒重备用。

H₂O₂ 氧化法: 15.0 mL 泡叶藻聚糖溶液 (4.0 g/L), 分别加入 1.4, 3.0, 7.5 mL 的质量分数 30% H₂O₂ 至其终质量分数分别为 2.5%, 5.0%, 10.0%, 室温孵育 12 h, 经纯水透析 (3500 u cut-off) 后冷冻干燥至恒重, 备用。

分别以干燥后泡叶藻聚糖的保留率和白度值为指标, 比较不同脱色方法对泡叶藻聚糖脱色效果的影响。

1.6 H₂O₂ 氧化法脱色单因素试验和正交试验

1.6.1 H₂O₂ 质量分数单因素试验

取 15.0 mL 泡叶藻聚糖溶液 (20.0 g/L), pH 值调至 7.0, 分别加入 0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mL 的质量分数 30% H₂O₂ 至其终质量分数分别为 0, 1.4%, 2.7%, 5.0%, 8.6%, 置于 40 °C 的电热恒温水槽脱色 1.0 h, 脱色后泡叶藻聚糖样品经纯水透析 (3500 u cut-off) 后, 冷冻干燥至恒重, 计算泡叶藻聚糖的保留率, 并用白度仪测定泡叶藻聚糖的蓝光白度值。

1.6.2 脱色时间单因素试验

取 15.0 mL 泡叶藻聚糖溶液 (20.0 g/L), pH 值调至 7.0, 加入质量分数 30% H₂O₂ 至其终质量分数为 5.0%, 电热恒温水槽加热至 40 °C 后, 分别脱色 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 h, 脱色后泡叶藻聚糖样品经透析 (3500 u cut-off) 后冷冻干燥至恒重, 计算泡叶藻聚糖的保留率, 并用白度仪测定泡叶藻聚糖的蓝光白度值。

1.6.3 脱色温度单因素试验

取 15.0 mL 泡叶藻聚糖溶液 (20.0 g/L), pH 值调至 7.0, 加入质量分数 30% H_2O_2 至其终质量分数为 5.0%, 置于不同温度 (20, 40, 60, 80 $^{\circ}C$) 的电热恒温水槽脱色 1.0 h, 脱色后泡叶藻聚糖样品经透析 (3500 u cut-off) 后冷冻干燥至恒重, 计算泡叶藻聚糖的保留率, 并用白度仪测定泡叶藻聚糖的蓝光白度值。

1.6.4 脱色 pH 值单因素试验

取 15.0 mL 泡叶藻聚糖溶液 (20.0 g/L), pH 值分别调至 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, 加入质量分数 30% H_2O_2 至其终质量分数为 5.0%, 电热恒温水槽加热至 40 $^{\circ}C$ 后脱色 1.0 h, 脱色后泡叶藻聚糖样品经透析 (3500 u cut-off) 后冷冻干燥至恒重, 计算泡叶藻聚糖的保留率, 并用白度仪测定泡叶藻聚糖的蓝光白度值。

1.6.5 H_2O_2 氧化法脱色正交试验

在单因素试验的基础上, 综合评价泡叶藻聚糖白度值、聚糖保留率、能源耗损等因素, 运用正交设计方法, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计确定泡叶藻聚糖的最佳脱色工艺条件, 根据 H_2O_2 单因素脱色试验结果, 选取各因素水平, 按照因素水平设计, 对影响脱色的主要因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验 (见表 1)。

表 1 泡叶藻聚糖脱色正交试验因素及水平

Tab. 1 The factors and levels of orthogonal experiment for the decoloration of ascophyllan

水平 Levels	因素 Factors		
	H_2O_2 质量分数 The concentrations of H_2O_2 /% (A)	时间 Time/h (B)	温度 Temperature/ $^{\circ}C$ (C)
1	2.7	1.0	40
2	5.0	2.0	60
3	8.6	4.0	80

1.7 泡叶藻聚糖白度值的测定

参考文献 [20], 取脱色前和脱色后的泡叶藻聚糖粉末, 均匀平铺于全自动白度仪 (ADCI - 2000) 的恒压粉体制样器内, 采用 CIE - XYZ 表色系统, 即 $W_r = R_{457}$, 其中: W_r 为表色系统中的蓝光白度值; R_{457} 为表色系统中的 ISO R_{457} 视亮度 (即白度)。具体操作方法参照 ADCI - 2000 系列全自动白度仪使用手册进行测定。

1.8 泡叶藻聚糖保留率的测定及计算方法

分别将脱色前泡叶藻聚糖粉末和脱色后获得的泡叶藻聚糖粉末置于干热烘箱中, 于 50 $^{\circ}C$ 条件下, 干燥至恒重, 采用脱色前后泡叶藻聚糖质量变化计算泡叶藻聚糖保留率, 计算公式如下:

$$\text{泡叶藻聚糖保留率}/\% = (\text{脱色后泡叶藻聚糖质量} / \text{脱色前泡叶藻聚糖质量}) \times 100.$$

1.9 泡叶藻聚糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 活性分析

1.9.1 泡叶藻聚糖样品溶液配制

取脱色前后的泡叶藻聚糖样品, 分别用 $1 \times$ PBS (0.1 mol/L) 配成 10.0 g/L 样品溶液后经 0.22 mm 滤膜过滤除菌, 备用。取 16 μ L 泡叶藻聚糖样品溶液 (10.0 g/L), 加入 784 μ L DMEM 培养基进行稀释, 得到 200 mg/L 泡叶藻聚糖样品溶液, 再取 200 mg/L 的泡叶藻聚糖样品溶液 400 μ L, 加入 400 μ L 的 DMEM 培养基按 1:1 的比例进行稀释, 得到 100 mg/L 泡叶藻聚糖样品溶液, 重复此规律进行逐级稀释, 依次获得 50, 25, 12.5, 6.25, 0 mg/L 泡叶藻聚糖样品溶液, 以上步骤均在无菌操作中完成。

1.9.2 RAW264.7 细胞培养

参考文献 [11, 21], RAW264.7 细胞呈贴壁状生长, 用含质量分数 10% 胎牛血清、100 IU/mL 氨苄青霉素和 100 mg/L 硫酸链霉素的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}C$ 下、含质量分数 5.0% CO_2 的 HERA-CELLVois 160i 型 CO_2 培养箱中传代培养。

1.9.3 泡叶藻聚糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 测定

参照文献 [11, 21], 将 RAW264.7 细胞 (3×10^4 个/孔) 接种于 96 孔细胞培养板中, 经过夜培养细胞贴壁后, 加入脱色前和经最佳工艺条件脱色后不同浓度 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/L) 的泡叶藻聚糖样品溶液, 以 DMEM 培养基为空白对照, 以 LPS (10 μ g/L) 为阳性对照, 每组样品做 3 个平行, 于 37 $^{\circ}$ C 下、含质量分数 5.0% CO₂ 的细胞培养箱中诱导 24 h 后, 每孔取出 50 μ L 上清液置于 96 孔板, 然后向上清液中加入 100 μ L Griess 试剂 (含 3 mmol/L 磺胺酸, 30 μ mol/L N-1-(萘基)乙二胺二盐酸盐, 质量分数 25% 冰醋酸), 避光孵育 20 min, 于 A₅₄₀ 处测定吸光度值。同时, 取 50 mL 已知浓度 (0, 6.25, 12.5, 25, 50 mmol/L) 的 NO₂⁻ 标准溶液置于 96 孔板中, 加入 100 μ L Griess 试剂, 绘制标准曲线, 计算培养基上清液中 NO 的浓度。将 RAW264.7 细胞 (3×10^4 个/孔) 接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞过夜培养贴壁后, 分别加入经不同工艺条件脱色后的泡叶藻聚糖样品溶液 (200 mg/L), 以 DMEM 培养基为空白对照, 每组样品做 3 个平行, 于 37 $^{\circ}$ C 下、含质量分数 5.0% CO₂ 的细胞培养箱中诱导 24 h 后, 每孔取出 50 μ L 上清液, 按上述方法计算培养基上清液中 NO 的浓度。

2 结果与分析

2.1 不同脱色方法对泡叶藻聚糖脱色效果的影响

表 2 的实验结果表明, 大孔树脂吸附法和 H₂O₂ 氧化法对泡叶藻聚糖脱色效果优于活性炭吸附法和有机溶剂萃取法。泡叶藻聚糖经活性炭、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇及四氢呋喃脱色后, 其颜色仍呈深褐色, 与未处理组相比无明显变化; 不同型号的大孔树脂吸附对泡叶藻聚糖脱色均有不同的效果, 其中 D101 大孔树脂脱色效果最好, 泡叶藻聚糖呈淡黄色; H₂O₂ 氧化法对泡叶藻聚糖脱色效果最佳, 随着 H₂O₂ 质量分数的增加, 泡叶藻聚糖的白度值明显得到提升, 当脱色反应体系中 H₂O₂ 质量分数为 10.0% 时, 脱色处理后获得的泡叶藻聚糖样品呈白色。结果表明, H₂O₂ 氧化法脱色效果最佳, 故本研究进一步通过比较脱色后泡叶藻聚糖的白度值和聚糖保留率, 对其 H₂O₂ 氧化脱色工艺条件进行优化。

表 2 不同脱色方法对泡叶藻聚糖脱色效果的影响

Tab.2 The effects of different methods on the decolorization efficiency for ascophyllan

	脱色方法 Methods for the decolorization												
	活性炭吸附法 Activated carbon method		有机溶剂萃取法 Organic solvent method					大孔树脂吸附法 Macroporous resin method			H ₂ O ₂ 氧化法 H ₂ O ₂ -decolorization method		
	未处理 Untreated	活性炭 Activated carbon	甲醇 Methanol	乙醇 Ethanol	丙醇 Acetone	异丙醇 Isopropanol	四氢呋喃 Tetrahydrofuran	DM130	D101-1	D101	2.5%	5.0%	10.0%
深褐色 Puce	+	+	+	+	+	+							
褐色 Brownness									+			+	
浅褐色 Sandy beige											+		+
淡黄色 Faint yellow													+
白色 Whiteness													+

2.2 H₂O₂ 氧化脱色工艺条件对泡叶藻聚糖脱色效果的影响

2.2.1 H₂O₂ 质量分数对泡叶藻聚糖脱色效果的影响

图1表明,在脱色温度、脱色时间、脱色体系 pH 值一定的条件下,随着脱色反应体系中 H₂O₂ 质量分数的增加,脱色处理后获得的泡叶藻聚糖样品白度值逐渐上升,当反应体系中 H₂O₂ 质量分数达到 8.6% 时脱色效果最佳,获得的泡叶藻聚糖样品的白度值为 $(24.97 \pm 0.58)\%$ 。说明,随着 H₂O₂ 质量分数的增加,分解产生的 OOH⁻ 也增多,有利于氧化分解聚糖中的一些发色基团或物质^[22]。随着 H₂O₂ 质量分数的增加,泡叶藻聚糖保留率均维持在 95% 以上。因此,结合泡叶藻聚糖白度值及聚糖保留率, H₂O₂ 质量分数水平范围选择 2.7% ~ 8.6%。

2.2.2 脱色时间对泡叶藻聚糖脱色效果的影响

图2表明,在脱色温度、H₂O₂ 质量分数、脱色体系 pH 值一定的条件下,随着脱色时间的延长,脱色处理后获得的泡叶藻聚糖样品白度值逐渐升高,当脱色时间为 4.0 h 时,泡叶藻聚糖白度值达到 $(27.98 \pm 0.31)\%$,泡叶藻聚糖保留率为 $(94.99 \pm 0.47)\%$ 。因此,结合脱色后泡叶藻聚糖白度值及聚糖保留率,脱色时间因素水平范围选择 1.0 ~ 4.0 h。

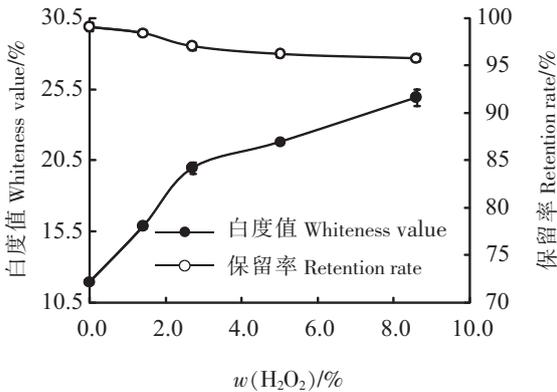


图1 H₂O₂ 质量分数对脱色泡叶藻聚糖白度值和保留率的影响

Fig.1 The effects of H₂O₂ concentrations on the whiteness value and the retention rate for decolorized ascophyllan

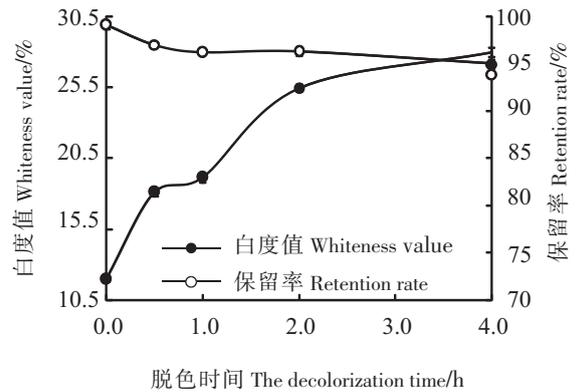


图2 脱色时间对脱色泡叶藻聚糖白度值和保留率的影响

Fig.2 The effects of time on the whiteness value and the retention rate for decolorized ascophyllan

2.2.3 脱色温度对泡叶藻聚糖脱色效果的影响

图3结果表明,在 H₂O₂ 质量分数、脱色时间、脱色体系 pH 值一定的条件下,随着脱色温度的提高,泡叶藻聚糖白度值明显上升。因为脱色反应体系温度升高可以加速 H₂O₂ 的分解,从而有效地促进 OOH⁻ 的产生,有利于脱除泡叶藻聚糖中的一些发色基团或物质。当脱色反应体系温度达到 80 ℃ 时,白度值达到 $(70.05 \pm 0.02)\%$,说明, H₂O₂ 在较高温度条件下对泡叶藻聚糖中发色基团或物质可进行有效地分解和脱除作用,从而使 H₂O₂ 氧化脱色法对泡叶藻聚糖脱色效果达到最佳。相反,随着脱色体系温度的逐渐升高,脱色后泡叶藻聚糖的保留率逐渐降低,当温度达到 80 ℃ 时,聚糖的保留率下降至 $(75.15 \pm 0.32)\%$ 。表明,随着反应体系温度的升高, H₂O₂ 在脱除发色基团或物质的同时,对泡叶藻聚糖也产生氧化降解作用,从而使部分聚糖被降解成小分子多糖或寡糖,导致大分子聚糖的保留率下降。因此,结合脱色后泡叶藻聚糖白度值及保留率,脱色温度因素水平范围选择 40 ~ 80 ℃。

2.2.4 脱色体系 pH 值对泡叶藻聚糖脱色的影响

图4结果表明,在 H₂O₂ 质量分数、脱色时间、脱色温度一定的条件下,随着脱色体系 pH 值的提高,泡叶藻聚糖白度值缓慢提高。当脱色体系 pH 值为 3.0 时,泡叶藻聚糖白度值为 $(17.78 \pm 1.03)\%$,当脱色体系 pH 值达到 11.0 时,脱色后泡叶藻聚糖白度值显著提高到 $(29.17 \pm 0.27)\%$,表明 H₂O₂ 氧化脱色法在反应体系为碱性条件下脱色效果较好。杨晓宽等^[17]对绿芦笋可溶性膳食纤维白度的研究表明,酸性介质中的 H⁺ 抑制了 H₂O₂ 的分解,碱性介质中 OH⁻ 促进了 H₂O₂ 的分解。因

此, 在反应体系为碱性条件下, 更有利于 H_2O_2 的氧化脱色, 而考虑到碱性条件下的脱色工艺在工业生产中易造成环境污染, 因此, pH 值因素不列入正交试验分析。

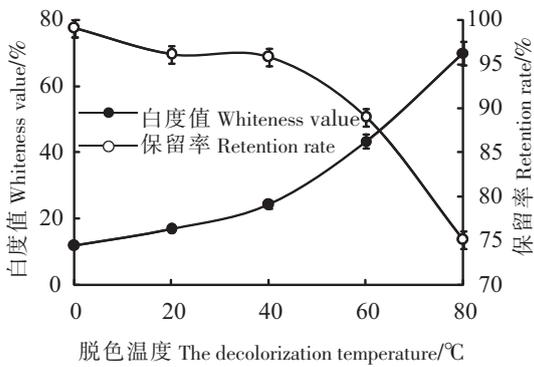


图 3 温度对脱色泡叶藻聚糖白度值和保留率的影响
Fig.3 The effects of temperature on the whiteness value and the retention rate for decolorized ascophyllan

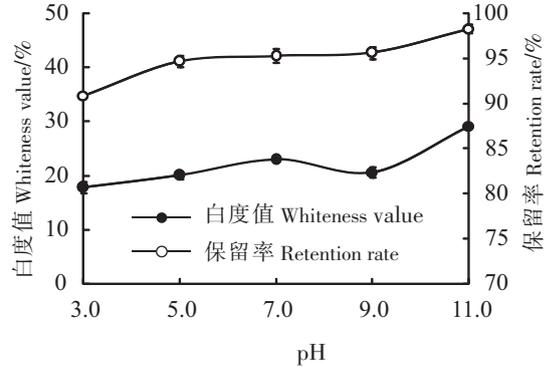


图 4 体系 pH 值对脱色泡叶藻聚糖白度值和保留率的影响
Fig.4 The effects of pH on the whiteness value and the retention rate for decolorized ascophyllan

2.2.5 H_2O_2 氧化法脱色多因素正交试验

如表 3 中极差 R_1 值比较所示, 泡叶藻聚糖白度值与各因素间的相关性影响顺序依次为 $C > B > A$, 即脱色温度 $>$ 脱色时间 $>$ H_2O_2 质量分数, 获得最佳脱色效果 (白度值) 因素水平为 $A_3B_3C_3$, 即: H_2O_2 质量分数 8.6%, 时间 4.0 h, 温度 80 °C。表 3 中极差 R_2 值显示, 泡叶藻聚糖保留率与各因素间的相关性影响顺序依次为 $C > B > A$, 即脱色温度 $>$ 时间 $>$ H_2O_2 质量分数, 获得聚糖较好保留率因素水平为 $A_3B_1C_1$, 即: H_2O_2 质量分数 8.6%, 时间 1.0 h, 温度 40 °C。表 4 方差分析结果显示, A、B 因素对脱色后泡叶藻聚糖白度值均无显著性影响 ($F < F_a$), C 具有显著影响 ($F > F_a$), 表明脱色温度对泡叶藻聚糖的 H_2O_2 氧化法的脱色效果起主要作用。表 5 方差分析结果显示, A、B、C 3 种因素对经 H_2O_2 氧化法脱色的泡叶藻聚糖的保留率均无显著性影响 ($F < F_a$)。

表 3 泡叶藻聚糖的 H_2O_2 氧化脱色法因素水平正交试验设计及结果

Tab.3 The orthogonal array design and results of H_2O_2 oxidation decoloration for ascophyllan

实验组号 Experiment number	因素水平 Levels of factors			白度值 Whiteness value/%	保留率 Retention rate/%
	$w(H_2O_2)$ /% (A)	t /h (B)	θ /°C (C)		
1	2.7	1.0	40	18.44	99.20
2	2.7	2.0	60	36.67	94.24
3	2.7	4.0	80	81.06	66.22
4	5.0	1.0	60	40.79	93.32
5	5.0	2.0	80	75.79	73.21
6	5.0	4.0	40	33.81	94.57
7	8.6	1.0	80	70.54	81.56
8	8.6	2.0	40	32.83	93.44
9	8.6	4.0	60	61.05	90.02
K_1	45.39	43.26	28.36		
K_2	50.13	48.43	46.17		
K_3	54.81	58.64	75.80		
R_1	9.42	15.38	47.44		
k_1	86.55	91.36	95.74		
k_2	87.03	86.96	92.53		
k_3	88.34	83.60	73.66		
R_2	1.79	7.76	22.07		

表 4 泡叶藻聚糖白度值方差分析结果

Tab.4 The results of variance analysis on the whiteness value for decolored ascophyllan

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Free degree	F	F _a	显著性 Significance
A	133.01	2	3.07	19.00	
B	367.65	2	8.48	19.00	
C	3445.17	2	79.44	19.00	*
误差 Error	43.37	2			

表 5 泡叶藻聚糖保留率方差分析结果

Tab.5 The results of variance analysis on the retention rate for decolored ascophyllan

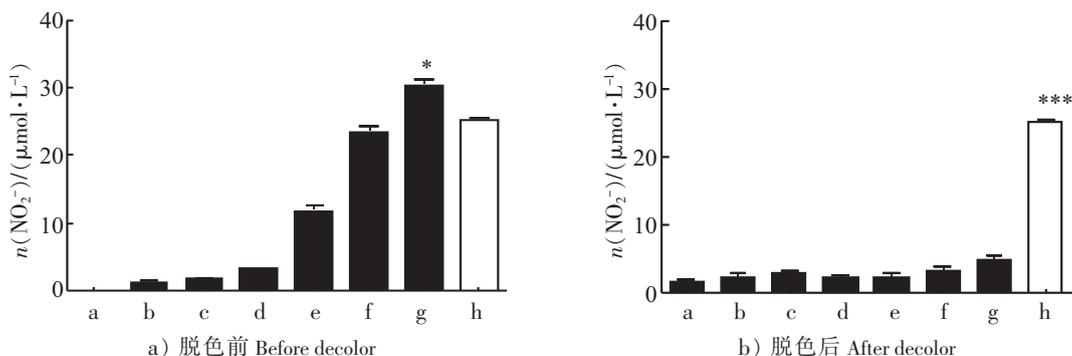
方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Free degree	F	F _a	显著性 Significance
A	5.13	2	0.10	19.00	
B	90.79	2	1.80	19.00	
C	853.36	2	16.89	19.00	
误差 Error	50.53	2			

2.2.6 验证实验

准确量取 15.0 mL 泡叶藻聚糖样品溶液 (20.0 g/L) 于大试管中, 按最佳脱色工艺进行 3 次平行试验, 结果表明, 经最佳工艺脱色后泡叶藻聚糖白度值和聚糖保留率分别达到 (81.48 ± 0.05)%, (61.93 ± 0.62)%(n = 3)。可见, 此脱色工艺有效可行。

2.2.7 最佳脱色工艺脱色前后多糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 的测定结果

浓度梯度实验中, 图 5a 结果表明, 脱色前泡叶藻聚糖显著诱导 RAW264.7 细胞生成 NO, 且呈浓度依赖性: 当泡叶藻聚糖质量浓度为 200 mg/L 时, 脱色前泡叶藻聚糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 显著高于阳性对照组 LPS 的诱导活性 (25.37 ± 0.25) μmol/L。图 5b 结果表明, 在最佳脱色工艺条件下, 即脱色温度为 80 °C、H₂O₂ 质量分数为 8.6%、脱色时间为 4.0 h 时, 脱色后获得的泡叶藻聚糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 的活性不显著。由此得出, 虽然脱色反应体系保持较高温度能有效地提高泡叶藻聚糖的白度值, 但脱色后获得的泡叶藻聚糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 的活性显著降低。



说明: a, b, c, d, e, f, g 分别表示 ρ(泡叶藻聚糖)=0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/L, h 表示 ρ(LPS)=10 μg/L。
Notes: a, b, c, d, e, f, g indicated ρ(ascophyllan)=0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/L, h indicated ρ(LPS)=10 μg/L.

图 5 脱色前泡叶藻聚糖和最佳脱色工艺脱色的泡叶藻聚糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO

Fig.5 The effects of ascophyllan and decolored ascophyllan obtained from the optimum decolorization technology on NO production in RAW264.7 cells

2.2.8 正交实验组多糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 的测定结果

正交实验中, 由不同脱色条件下获得的泡叶藻聚糖 (D1-As、D2-As、D3-As、D4-As、D5-As、D6-As、D7-As、D8-As、D9-As) 诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 的结果如图 6 所示。其中, D3-As、D5-As、D7-As 与脱色前泡叶藻聚糖样品 (As) 诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 活性相比显著降低, 而

D1-As、D2-As、D4-As、D6-As、D8-As、D9-As 能显著诱导 RAW264.7 细胞生成 NO, 表明其具有潜在的免疫诱导活性。结合表 3 泡叶藻聚糖的 H₂O₂ 氧化脱色法各因素水平正交试验设计及泡叶藻聚糖脱色效果, D9-As 的白度值和聚糖保留率较为理想, 其白度值达到 (61.05 ± 1.12)%, 保留率达到 (90.02 ± 0.03)%。因此, D9-As 的脱色工艺 (质量分数 8.6% H₂O₂、脱色时间 4.0 h、脱色温度 60 °C) 为泡叶藻聚糖 H₂O₂ 氧化脱色法的最优脱色工艺, 既可以较好地保留泡叶藻聚糖的活性, 又可以最大限度提高其白度值和聚糖保留率。

徐明芳等^[23]在研究 H₂O₂ 氧化脱色法对马尾藻 (*Sargassum natans*) 褐藻胶脱色工艺条件时发现, 当加入不同量 (2.0, 5.0, 8.0, 12.0 mL) 质量分数 30% H₂O₂, 脱色时间为 30 min, 体系 pH 值为 11.0 时, 获得的褐藻胶虽然色泽较白, 但其黏度、多糖保留率与脱色前相比大大降低。徐宝芹等^[24]采用单因素试验分析缘管浒苔 (*Enteromorpha linza*) 粗多糖的 H₂O₂ 氧化脱色方法最佳条件, 发现脱色工艺条件为: 脱色温度 30 °C, 脱色时间 30 min, H₂O₂ 终质量分数 21.4%, 获得多糖损失率和脱色率分别为 48.8% 和 64.4%。这些研究报道与本研究获得的脱色工艺条件相比, 其 H₂O₂ 不仅用量大, 而且多糖损失率高, 脱色率较低。曹柳^[25]在研究海带 (*Laminaria japonica*) 褐藻胶粗多糖的 H₂O₂ 氧化脱色法时发现, 其脱色条件为: H₂O₂ 质量分数 1.0%, pH 值为 9.0 的粗多糖溶液在 45 °C 恒温下脱色 5.0 h, 获得粗多糖脱色率为 (61.51 ± 2.78)%, 粗多糖保留率为 (95.29 ± 1.73)%, 这与本研究的脱色工艺条件获得的聚糖保留率相比, 均保持较高的多糖保留水平。

3 结论

H₂O₂ 氧化脱色法对具有强效免疫诱导活性的泡叶藻聚糖脱色效果明显, 单因素试验结果表明, 泡叶藻聚糖白度值、保留率与脱色温度之间的相关性最大; 正交试验表明, 最佳工艺 (脱色温度 80 °C、H₂O₂ 质量分数 8.6%、脱色时间 4.0 h) 脱色后获得泡叶藻聚糖白度值和保留率分别达到 (81.48 ± 0.05)%, (61.93 ± 0.62)%, 此条件下获得的泡叶藻聚糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 的活性显著降低。本文综合分析脱色后获得泡叶藻聚糖的白度值、保留率及其诱导 RAW264.7 细胞生成 NO 的活性强弱, 最终确定 H₂O₂ 氧化脱色法对泡叶藻聚糖的最优脱色工艺为: H₂O₂ 质量分数 8.6%, 脱色时间 4.0 h, 脱色温度 60 °C, 脱色后多糖白度值和多糖保留率分别为 (61.05 ± 1.12)%, (90.02 ± 0.03)%, 此条件下, 泡叶藻聚糖白度值、保留率及活性均处于较优的水平。

[参 考 文 献]

[1] 曲桂燕. 五种褐藻岩藻聚糖硫酸酯提取纯化及其功能活性的比较研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
 [2] NAKAYASU S, SOEGIMA R, YAMAGUCHI K, et al. Biological activities of fucose-containing polysaccharide ascophyllan isolated from the brown alga *Ascophyllum nodosum* [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2009, 73(4): 961-964. DOI:10.1271/bbb.80845.
 [3] JIANG Z D, OKIMURA T, YAMAGUCHI K, et al. The potent activity of sulfated polysaccharide, ascophyllan, isolated from *Ascophyllum nodosum* to induce nitric oxide and cytokine production from mouse macrophage RAW264.7 cells: compari-

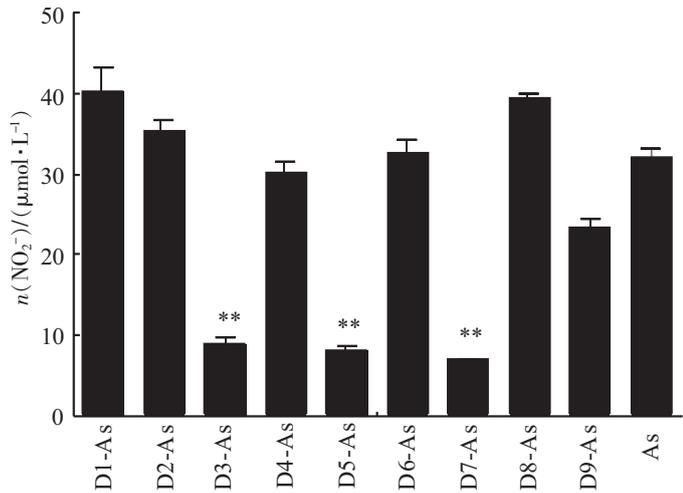


图 6 脱色前后泡叶藻聚糖诱导 RAW264.7 细胞生成 NO

Fig.6 The effects of ascophyllans and decolored ascophyllan on NO production in RAW264.7 cells

- son between ascophyllan and fucoidan [J]. Nitric Oxide, 2011, 25(4): 407-415. DOI:10.1016/j.niox.2011.10.001.
- [4] NAKANO K, KIM D, JIANG Z D, et al. Immunostimulatory activities of the sulfated polysaccharide ascophyllan from *Ascophyllum nodosum* in *in vivo* and *in vitro* systems [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2012, 76(8): 1573-1578. DOI:10.1271/bbb.120232.
- [5] WANG Y J, JIANG Z D, KIM D, et al. Stimulatory effect of the sulfated polysaccharide ascophyllan on the respiratory burst in RAW264.7 macrophages [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 52: 164-169. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.008.
- [6] ZHANG W, DU J Y, JIANG Z D, et al. Ascophyllan purified from *Ascophyllum nodosum* induces Th1 and Tc1 immune responses by promoting dendritic cell maturation [J]. Marine Drugs, 2014, 12(7): 4148-4164. DOI: 10.3390/md12074148.
- [7] 刘旭, 曲桂燕, 周裔彬, 等. 泡叶藻及海带藻渣中岩藻聚糖硫酸酯的提取及其抗氧化活性 [J]. 海洋科学, 2013, 37(12): 34-39.
- [8] ABU R, JIANG Z D, UENO M, et al. *In vitro* antioxidant activities of sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 59(4): 305-312. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2013.04.035.
- [9] ABU R, JIANG Z D, UENO M, et al. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 458(4): 727-732. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.01.061.
- [10] JIANG Z D, ABU R, ISAKA S, et al. Inhibitory effect of orally-administered sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on the growth of sarcoma-180 solid tumor in mice [J]. Anticancer Research, 2014, 34(4): 1663-1671.
- [11] JIANG Z D, HAMA Y, YAMAGUCHI K, et al. Inhibitory effect of sulphated polysaccharide porphyran on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. Journal of Biochemistry, 2012, 151(1): 65-74. DOI:10.1093/jb/mvr115.
- [12] 肖香, 薛丁萍, 王瑶, 等. 玉米朊的脱色技术研究进展 [J]. 食品科技, 2014, 39(1): 178-182.
- [13] 虞小珊, 张丰进, 蒋琳兰. 响应面法优化紫果西番莲果皮可溶性膳食纤维脱色工艺研究 [J]. 食品工业, 2016, 37(2): 83-87.
- [14] 朱越雄, 孙海一, 曹广力. 野生糙皮侧耳子实体多糖的脱色素效果比较 [J]. 光谱实验室, 2005, 22(5): 1070-1073.
- [15] 孔凡利, 张名位, 邝瑞彬, 等. 大孔吸附树脂对荔枝枝多糖的脱色条件研究 [J]. 食品科技, 2012, 37(5): 179-183.
- [16] 陈健, 耿安静, 徐晓飞. 香菇多糖的过氧化氢脱色工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 293-295.
- [17] 杨晓宽, 常学东, 范国伟. 芦笋老茎可溶性膳食纤维脱色工艺优化及品质研究 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 95-103.
- [18] 商锋, 尹胜, 肖潇, 等. 大孔吸附树脂纯化制备京尼平苷酸的研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(1): 93-97.
- [19] 唐艳, 邓尚贵, 张宾, 等. 乌梅提取物脱色工艺及其抑菌机理的初步研究 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(5): 102-109.
- [20] BERARDINI N, KNODLER M, SCHIEBER A, et al. Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2005, 6(4): 442-452. DOI:10.1016/j.ifset.2005.06.004.
- [21] JIANG Z D, UENO M, NISHIGUCHI T, et al. Importance of sulfate groups for the macrophage-stimulating activities of ascophyllan isolated from the brown alga *Ascophyllum nodosum* [J]. Carbohydrate Research, 2013, 380: 124-129. DOI:10.1016/j.carres.2013.05.018.
- [22] 王文彤, 张岩, 陶遵威. 正交试验优化苦豆子多糖的双氧水脱色工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1234-1237.
- [23] 徐明芳, 高孔荣, 刘婉乔. 对马尾藻褐藻胶漂白工艺条件的探讨 [J]. 食品科学, 1996, 17(10): 44-47.
- [24] 徐宝芹, 周琦, 张立新. 缘管浒苔中粗多糖脱色方法的研究 [J]. 食品科技, 2012, 37(5): 170-174.
- [25] 曹柳. 褐藻胶的提取纯化、氧化降解及体外活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2015.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)