

铜藻的褐藻糖胶、褐藻淀粉 和褐藻胶的分离及提纯

王作芸 赵学武

(山东海洋学院生物系)

提 要

本文研究了从铜藻中分离提取褐藻糖胶、褐藻淀粉和褐藻胶的方法。用稀盐酸溶液加温搅拌提取藻粉后,在提取液中含有褐藻糖胶和褐藻淀粉,可加乙醇至50%和80%分别将其沉淀出来。藻渣含有褐藻酸钠,可加温加碱而制备出。并用正交实验设计求出提取条件中的温度、pH和时间的最适配比。对于褐藻糖胶的提取,以温度70°C、时间2小时和提取液pH为4时最适。对于褐藻淀粉的提取,以温度70°C、时间1小时和提取液的pH为2时较优。

本文还对粗褐藻糖胶和褐藻淀粉的提纯进行了研究,证明二者均可用酒精分级沉淀法处理而得到纯品,不需要采用较复杂的季胺盐法和离子交换树脂法。

本工作证实铜藻是我国褐藻中含有三种多糖的较好藻种,从中可提褐藻糖胶3.5%,褐藻淀粉3.1%和褐藻酸钠17.8%。

马尾藻是我国产量最大的一属野生杂藻,其体内除含有在工业中有较广泛用途的褐藻胶外)还含有褐藻淀粉(Laminaran)和褐藻糖胶(Fucoidin)。我们从铜藻中提取出的褐藻淀粉硫酸酯,在药理和临床中均证实具有降低高血脂的疗效^{[1][2]}。褐藻糖胶对放射性物质⁹⁰和重金属有吸附能力,尤以对有毒金属铅和铜等吸附效应显著^[3]。铜藻中的褐藻糖胶和褐藻胶的初步药理实验证明,其有减轻金属中毒症状的效用。迄今为止,我国褐藻工业仅限于对褐藻胶的提取。因此,研究从褐藻中提取和分离粘多糖的方法,对其进行综合利用,将提高褐藻的实用价值,降低藻源成本,对开展褐藻的利用有一定的价值。

材料和分析方法

铜藻于1979年3月采自广东惠来县靖海镇海湾,晒干后,粉碎,经60目过筛,存放于干燥处待用。

经分析,所用铜藻粉的主要组成成分见表1。

主要分析方法:褐藻糖胶测定用硫酸—半胱氨酸法(Larsen 1979)^[7];褐藻糖胶硫

表1 铜藻主要组成成分(干重)

成 分	水 分	灰 分	褐 藻 酸	褐 藻 淀 粉	褐 藻 糖 胶
含量(%)	19.5	20.7	21.8	5.1	6.1

酸根的测定方法是先将褐藻糖胶用 1N 盐酸回流水解 12 小时,然后加 10%氯化钡生成沉淀,将沉淀在 300°C下灰化 1 小时,再在 600°C下灰化 1 小时,称重并换算出硫酸根含量,此值为水解硫酸根含量;将褐藻糖胶先灰化,然后按上述同样的硫酸钡重量法测出硫酸根含量,此值为灰分硫酸根含量;褐藻淀粉测定用葡萄糖氧化酶法^[4];褐藻酸测定用硫酸和 9-氮杂芴比色法,主要依照纪明候的方法^[9]并参照 South 1977 法^[11],将硫酸试剂改为硫酸—硼砂试剂;粘度的测定用滚球式粘度计,温度 20°C, 10%水溶液。

结果与讨论

(一) 褐藻糖胶与褐藻淀粉的最适提取条件

提取条件的不同,不仅直接影响到产品的得率,而且对产品的质量和纯度也会产生一定的影响。因此,对最适提取条件的确定极为重要。对粘多糖提取的较重要的影响因子中,包括温度、酸碱度、时间以及藻粉与提取液的比例等。在我们的预实验中,初步确定藻粉与提取液之比为 1/10,如果此比例太低,则提取后的溶液太浓,粘度过大,从而不便于继续处理;如果比例太高,则提取的溶液水分占比例过高,从而增加了下步处理的工作量和药品的消耗,所以将藻粉与提取液之比确定为 1/10 是较合适的。

提取方法是将 1 份藻粉加 10 份稀盐酸溶液,在恒温水浴上加热搅拌提取一定时间后,过滤,藻渣用于褐藻胶的提取,滤液加乙醇至 50%(v/v),离心(2000 转/分),沉淀为粗褐藻糖胶,在上清液中继续加乙醇至 80%(v/v),离心,沉淀为粗褐藻淀粉。主要提取工艺流程如图 1 所示。

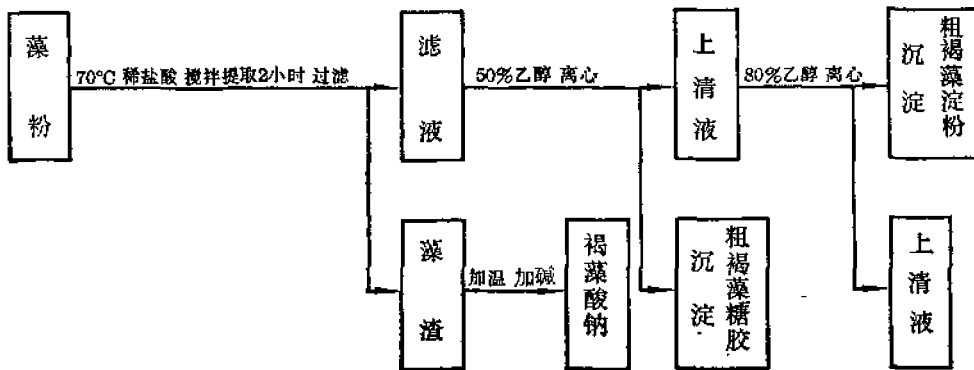


图 1 铜藻粘多糖的提取和分离步骤示意图。

为确定最适提取条件,采用 $L_8(2^7)$ 正交试验设计表(表 2),试验共重覆三次。

表 2 褐藻粘多糖提取条件试验设计表

水平	因素	时间(小时) A	温度(°C) B	提取液 pH 值 C
1		1	80	2
2		2	70	4

通过对试验结果的分析,对于粗褐藻糖胶的提取,以温度 70°C , 时间 2 小时和提取液的 pH 为 4 较好。粗褐藻糖胶的 pH 的 K_2 和 K_1 之差为 2.80, 相差 4.81%; 温度的 K_2 与 K_1 相差 9.42%; 时间 K_2 和 K_1 相差 4.48%。若以褐藻糖胶的主要成份——岩藻糖的含量来计算,也表现出与粗褐藻糖胶相同的趋势,温度对岩藻糖提取的影响和对粗褐藻糖胶相同,差别最显著, K_2 与 K_1 相差 8.10%; pH 的 K_2 和 K_1 相差 5.85%, 时间的 K_2 和 K_1 相差 4.13%。对于褐藻淀粉的提取条件,以温度 70°C , 时间 1 小时和提取液 pH 为 2 较优,温度的 K_2 和 K_1 相差 1.25%; pH 的 K_1 与 K_2 相差 4.69%; 时间的 K_1 和 K_2 相差 2.81%。详见表 3。

表 3 褐藻粘多糖提取条件分析表

试验号	列号	A	B	C	粗褐藻糖胶 得率(%)	褐藻淀粉 得率*(%)	岩藻糖得率 (%)
		1	2	3			
1		1	1	1	11.2	2.23	2.25
2		1	1	2	13.9	2.21	2.77
3		1	2	1	15.9	2.15	3.17
4		1	2	2	14.3	2.35	2.84
5		2	1	1	14.2	2.24	2.94
6		2	1	2	14.6	2.02	2.94
7		2	2	1	14.1	2.26	2.78
8		2	2	2	15.2	2.05	3.07
粗 糖 胶	K_1	55.30	53.90	55.40			
	K_2	58.10	59.50	58.00			
	K_1-K_2	-2.80	-5.60	-2.60			
岩 藻 糖	K_1	11.08	10.90	11.14			
	K_2	11.73	11.86	11.62			
	K_1-K_2	-0.70	-0.96	-0.48			
褐 藻 淀 粉	K_1	8.94	8.70	8.88			
	K_2	8.57	8.81	8.63			
	K_1-K_2	0.37	-0.11	0.25			

* 按葡萄糖含量计算

温度对铜藻的褐藻糖胶和褐藻淀粉提取的影响表现为,提取率均随温度提高而增加,这一结果与 Percival 等。(1950)^[36]和 Black 等(1951、1952)^[5,7]对墨角藻属及海带属的褐藻进行实验的结果相同。温度在 70°C 以上的提取率均高于 30°C 以下的提取率。pH 对铜藻褐藻糖胶提取的影响,表现为 pH 为 4 时的提取率高于 pH 为 2 时的提取率,但 Black 等对墨角藻 *F. Vesiculosus* 的实验结果,证实与其它因子均相同的条件下, pH 为 2.3 时的提取率高于 pH 为 4.5 时,这恰与本文用铜藻进行的实验结果相反。本文结果表明,铜藻中的褐藻糖胶在 pH4 条件下的溶解性比在 pH2 条件下的要高,因此其在 pH4 的提

取溶液中较易被提取出来。而墨角藻的褐藻糖胶的溶解特性则与铜藻的相反,故在 pH2 的溶液中的提取率高于 pH4 的溶液。pH 对铜藻褐藻淀粉的提取的影响,和其它作者用不同的褐藻所得的结果相同, pH2 条件下的提取率高于 pH4。时间因子与提取率的关系表现为,铜藻的褐藻淀粉的提取,在 1 小时后可能已接近平衡,继续增加提取时间,将不再提高提取率;但对褐藻糖胶的提取,2 小时的提取率高于 1 小时,可能需要较长时间方能将褐藻糖胶从藻粉中提取完全。如 Percival 等^[10]采用的提取时间是 20 小时;Black 等^[7]在其它因子相同的条件下,对墨角藻褐藻糖胶的提取,时间为 15 小时的提取率为 77.6%,而时间减半为 7.5 小时的提取率为 67.8%,由此可见经过 7.5 小时的提取仍未达到平衡。因此,对铜藻的褐藻糖胶的提取时间为 2 小时,可能仍太短,但由于考虑到延长长时间会引起褐藻淀粉和褐藻胶的水解,将导致后二者的提取率及产品质量的降低,因此不宜采用更长的时间。

(二) 褐藻糖胶和褐藻淀粉的提纯方法

以上分离出之褐藻糖胶和褐藻淀粉含有较多的杂质,需进一步提纯方能制备出适于工业和医药用途的产品。

褐藻糖胶的提纯方法,是将上述分离出的粗褐藻糖胶 20 克加 200 毫升水,溶解 12 小时后,搅拌加入 80 毫升 4M 氯化钙,放置过夜,离心(4000 转/分),弃去沉淀。上清液分为二份,一份加乙醇至 30%(v/v),放置 4 小时以上,离心弃去沉淀,在上清液中继续搅拌加入乙醇至 60%(v/v),放置过夜,离心(4000 转/分),收集沉淀,用 95%乙醇和无水乙醇分别洗涤二次后,烘干得褐藻糖胶 3.81 克,主要流程如图 2 所示。粗褐藻糖胶含岩藻糖为 18.5%,提纯后含岩藻糖为 44.7%,按岩藻糖计算,回收率为 92.1%。另一份上清液加 50 毫升 5%N-氯代十六烷吡啶(以后简称 C. P. C),形成白色沉淀物,离心后弃去上清液,用 25 毫升 0.5M 氯化钙洗涤沉淀,然后加 150 毫升 3M 氯化钙,3000 转/分离心,将上部白色胶状物取走,小心倾倒入中部溶液,避免底部沉淀浮起进入中部溶液,在中部之溶液中加入 300 毫升 90%乙醇,静置 4 小时后,离心弃去上清液,重用氯化钙溶解,再加乙醇 60%(v/v)处理两次,最后沉淀物用 95%乙醇和无水乙醇洗涤,干燥得褐藻糖胶 1.56 克,含岩藻糖 47.2%,按岩藻糖计算其回收率为 39.8%,结果见表 4。褐藻糖胶的提纯方法主要有二种:乙醇分级沉淀法和季胺盐类沉淀法^[5,7,10],用 C. P. C 或十六烷三甲基溴化胺(CTAB)能与具有高分子的电解质性质的褐藻糖胶产生沉淀,而将其分离提纯。因不同藻类的褐藻糖胶中的岩藻糖含量变化很大,因此难于同其它作者进行不同方法的提纯效率的对比。但从我们对同一份粗褐藻糖胶提纯的结果,可以看出乙醇分级沉淀法回

表 4 用 CPC 法和酒精分级沉淀法提纯粗褐藻糖胶

提纯方法	粗褐藻糖胶			提纯的褐藻糖胶						
	水分 (%)	灰分 (%)	岩藻糖 (%)	水分 (%)	灰分 (%)	岩藻糖 (%)	灰分 SO ₄ (%)	水解 SO ₄ (%)	粘度 (厘泊)	得率
CPC 法	5.6	30.9	18.5	7.2	27.4	47.2	21.8	30.8	6.6	39.8
酒精分级沉淀法	5.6	30.9	18.5	8.0	28.8	44.7	19.4	29.8	6.8	92.1

收率比较高,约大于 C. P. C 沉淀法的二倍多。尽管其纯度略比 C. P. C 法低,按岩藻糖含量来计算约低 5%,由于操作比较简便,减低因 C. P. C 的消耗的成本,并且得率较高,因此,我们认为酒精分级沉淀法适于采用。此法的主要工艺流程如图 2 所示。

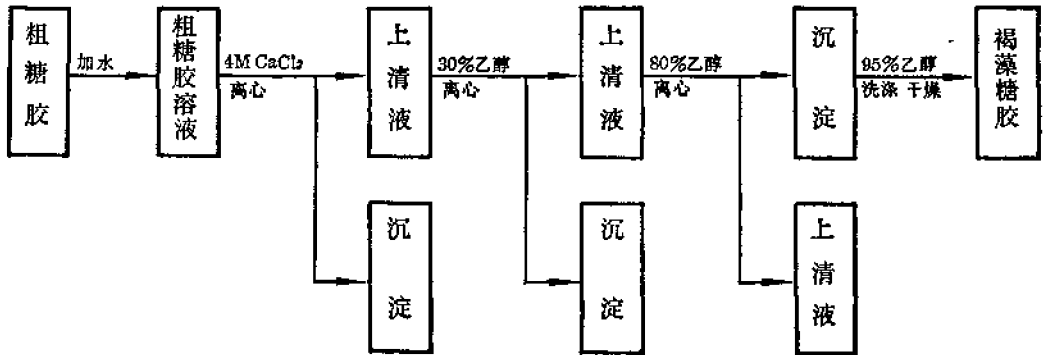


图 2 酒精分级沉淀法提纯粗褐藻糖胶示意图

褐藻淀粉的提纯方法：将粗褐藻淀粉(淡褐色,含葡萄糖量 80—85%),1 份加 5 倍蒸馏水充分溶解后,搅拌加入乙醇至 60%(v/v)静置过夜,3000 转/分离心弃去沉淀,在上清液中继续加入乙醇至 80%(v/v),2000 转/分离心,收集沉淀,用 95%乙醇和无水乙醇洗涤后,60°C下烘干得褐藻淀粉其纯度按葡萄糖含量计算为 89—91%,颜色为白色略带淡黄。铜藻之褐藻淀粉系可溶性褐藻淀粉,从褐藻中提纯可溶性褐藻淀粉比较困难,如 Black 等 1951 的研究工作^[9],将克劳氏海带(*Laminaria cloustoni*)的可溶性褐藻淀粉粗提取物用离子交换树脂(Zeo-Karb 225)法处理后,其纯度仍仅达到 76.6%,灰分 1.3%。不同褐藻的褐藻淀粉之细微结构和理化性质存在一定的差异。因此尽管我们采用比离子交换树脂法略较简单的酒精分级沉淀法对粗褐藻淀粉进行提纯,其纯度却高于用离子交换树脂法提纯的克劳氏海带的褐藻淀粉的纯度。我们曾在预实验中将两种方法对铜藻的褐藻淀粉的提纯进行过比较,二者比较相近。由于离子交换树脂繁杂,继续深入比较意义不大。从铜藻中分离与提纯褐藻糖胶和褐藻淀粉的得率见表 5。

表 5 从 100 克铜藻中提取褐藻糖胶和褐藻淀粉得率*

提 取 物	干 重(克)	岩藻糖含量(%)	葡萄糖含量(%)	得 率
粗褐藻糖胶	14.2	12.7	—	62.5
褐藻糖胶	3.5	44.7	—	57.6
粗褐藻淀粉	3.82	—	8.81	69.2
褐藻淀粉	3.1	—	90.5	60.8

* 褐藻糖胶得率以岩藻糖的提取率计算,褐藻淀粉得率以葡萄糖计算

(三) 褐藻胶的分离和提纯

将提取褐藻淀粉和褐藻糖胶过滤后的藻渣,按提取开始时的干藻粉重量,加入 10 份水和 12%的碳酸钠,在恒温水浴中(70°C±1°C)搅拌消化 1.5 小时,然后再加 45 份水,充分搅匀后,静置过夜。用虹吸法吸取上清液,在上清液中加硫酸将 pH 调至 2,静置 4 小

时,减压通过 100 目筛,将湿滤并加二倍量的医用乙醇,再加 Na_2CO_3 调至 $\text{pH}=7$,抽滤,干燥,即得到以钠盐形式存在的酸——褐藻酸钠。由于褐藻酸钠是我国褐藻工业中的主要产品,已有完整和定型的制备工艺,实验室的小量提取分离方法和大型工业生产工艺差别较大。因此,本实验工作仅证实从铜藻中提取褐藻糖胶和褐藻淀粉仍可继续提取褐藻酸钠,而关于其最适的分离和提纯条件,未进行深入探讨。

结 语

铜藻是我国野生的大型褐藻,从中可综合提取出褐藻糖胶、褐藻淀粉和褐藻胶,是我国迄今为止所发现的同时含有较多的三种多糖的唯一藻源,有可能成为藻胶工业的藻种。

将干铜藻粉在稀酸溶液中加温搅拌提取后,可将褐藻糖胶和褐藻淀粉提取出来,再加乙醇至 50% 和 80% 就可先后将这二种物质沉淀出。褐藻糖胶的最适提取条件是温度 70°C , $\text{pH}=4$ 和时间 2 小时,褐藻沉淀的最适提取条件是温度 70°C , $\text{pH}=2$ 和时间 1 小时。

粗褐藻糖胶和粗褐藻淀粉可用酒精分级沉淀法制得纯品。1 份粗褐藻糖胶溶于 10 份水中,加 1 份 4M 氯化钙溶液,离心后,上清液加乙醇至 30% 和 60%, 弃去 30% 乙醇浓度之沉淀,收集 60% 之沉淀,即得纯褐藻糖胶。1 份粗褐藻淀粉溶于 5 份水中,加乙醇至 50% 和 80%, 收集 80% 乙醇之沉淀,即得纯褐藻淀粉。

得率为:褐藻糖胶(含岩藻糖 44.7%) 3.5%;褐藻淀粉(含葡萄糖 91%) 3.1% 和褐藻酸钠 17.8%。

参 考 文 献

- [1] 韩琴琴等,1980. 褐藻粉硫酸酯降脂及其抗凝作用的初步研究. 中华心血管杂志, 8(8): 218—220.
- [2] 纪明侯,张燕霞,1962. 褐藻酸 9-氮杂苄比色定量法的研究. 海洋科学集刊, 1: 196—204.
- [3] 赵学武等,1981. 褐藻淀粉硫酸酯的血脂澄清和降血脂作用的研究. 海洋湖沼通报, 3: 46—50.
- [4] 赵学武,王作芸,1981. 用葡萄糖氧化酶、过氧化物酶和联大茴香胺法测定褐藻中的褐藻淀粉. 海洋学报, 3: 629—633.
- [5] Anno, K., et al., 1966. Isolation and purification of fucoïdin from brown seaweed *Polyotia wrightii*. *Agr. Biol. Chem.*, 30(5): 495—499.
- [6] Black, W. A. P. et al., 1951. Manufacture of algal chemicals. III. Laboratory-scale isolation of laminarin from brown marine algae. *J. appl. Chem.*, I, 505—517.
- [7] W. A. P. Black, et al, 1952. Manufacture of algal chemicals. IV. Laboratory-Scale isolation of fucoïdin from brown marine algae. *J. Sci. Food Agric.*, 3, 122—129.
- [8] Larsen, B., 1978. Fucoïdan, In J. A. Hellebust and J. S. Craigie (eds.); *Physiological and Biochemical methods*. 151—156. Cambridge University Press.
- [9] Paskins-Hurlburt, et al., 1978. Fucoïdan: Its binding of lead and other metals. *Bot. Mar.* 21: 13—22.
- [10] Percival, E. V. G. and A. G. Ross, 1950. Fucoïdin. Part I. The isolation and purification of fucoïdin from brown seaweeds. *J. Chem. Soc.*, 717—721.
- [11] South, G., 1977. Alginate levels in New Zealand Durvillaea, with particular reference to age relations in *D. antarctica*, In A. Jensen, and J. Stein (eds); *Proc. 9th Intern. Seaweed Symp.*, 185. Science Press.

**EXTRACTION AND ISOLATION OF ALGINIC ACID, LAMINARAN
AND FUCOIDAN FROM *SARGASSUM HORNERI*
(TURN) C. Ag.**

Wang Zuoyun and Zhao Xuewu

(Shandong College of Oceanology)

Abstract

Sargassum, one of the most prevalent seaweeds in China, is also the only one with a high content of fucoidan, laminaran and algin among all the marine algae in China. Therefore, the utilization of the seaweed is obviously important for our country. In order to furnish some basic data to the seaweed industries, methods for the extraction and isolation of mucilage have been studied.

The samples were collected in Huilai Xian, South China. The algae was analysed on dry basis it contains 5.1% of laminaran, 6.1% of fucoidan and 21% of alginic acid.

Methods of extraction and isolation: Dried seaweed was extracted with a dilute HCl solution at a constant temperature for a definite time. The extract was then filtrated and washed. Crude fucoidan was precipitated at 50% alcohol. Crude laminaran was obtained at 80% alcohol. Alginate was extracted from the residue with alkali.

The optimum conditions for extraction, consists of stirring for two hours at 70°C with HCl solution at pH 4.

Purification: By dissolving one part of crude fucoidan in ten parts of distilled water and then one part of 4M CaCl₂ solution was added. After centrifugalized, the supernatant was fractionally precipitated with 30% and 60% of alcohol precipitation in 30% alcohol was impurities and in the 60% fraction was fucoidan.

One part of crude laminaran was dissolved in five parts of water, and fractionally precipitated in 50% and 80% alcohol and in the 80% fraction was laminaran.

The yields are fucoidan (containing 44.7% of fucose) 3.9%; laminaran (containing 91% of glucos) 3.1% and sodium alginate 17.8%.