

浒苔多糖的磷酸化修饰工艺

孙雪¹, 潘道东^{1,2,*}, 曾小群¹, 曹锦轩¹

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 南京师范大学 国家乳品加工技术研发分中心, 江苏 南京 210097)

摘要: 利用离子交换层析和凝胶层析对浒苔多糖进行分离纯化, 并探讨其磷酸化修饰的最佳工艺条件。通过单因素试验确定反应温度、反应时间、反应 pH 值、磷酸化试剂质量浓度的取值范围, 再用响应面设计法确定磷酸化修饰的最佳条件。结果表明: 反应时间、磷酸化试剂质量浓度显著影响浒苔多糖磷酸化程度, 当反应温度 80℃、反应时间 5h、反应 pH9.0、磷酸化试剂质量浓度 0.10g/mL 时, 磷酸化修饰的浒苔多糖磷酸根含量(以 P 计)达到 14.40%。

关键词: 浒苔多糖; 磷酸化; 响应面法优化

Phosphorylation Modification of Polysaccharides from *Enteromorpha*

SUN Xue¹, PAN Dao-dong^{1,2,*}, ZENG Xiao-qun¹, CAO Jin-xuan¹

(1. College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Branch of National Dairy Processing Technology Developing Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: This study was undertaken to optimize the phosphorylation of *Enteromorpha* polysaccharides prepared by hot water extraction, deproteinization, decolorization, and sequential chromatographic purification on DEA-Sepharose Fast Flow and Sephadex G-100 columns. Phosphate group content in phosphorylated products was investigated with respect to reaction conditions including temperature, reaction time, pH and phosphorylation agent dosage (sodium tripolyphosphate-sodium trimetaphosphate at a mass ratio of 6:1) by one-factor-at-a-time experiments and subsequent response surface analysis. The optimal phosphorylation conditions were pH 9.0, temperature 80 °C and phosphorylation agent dosage 0.10 g/mL for a reaction duration of 5 h. Under these conditions, the phosphate group content in phosphorylated products was 14.40%.

Key words: polysaccharides from *Enteromorpha*; phosphorylation; response surface methodology (RSM)

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0073-05

浒苔(*Enteromorpha*)是一种大型绿藻,在我国野生藻类中资源丰富,在东南沿海均有分布,是浙江沿海的优势种。浒苔中含有大量的水溶性硫酸多糖^[1],浒苔多糖具有降血脂、降低过氧化脂(lipid peroxide, LPO)含量、提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力、消炎、抑制皮肤癌等生理功能,是优良的天然食用和药用活性成分来源,具有广阔的开发前景。

研究表明,多糖的活性直接或间接地受其分子结构的影响,采取一定的方法对多糖分子结构进行修饰,可以提高或赋予多糖更多活性、降低其毒副作用^[2-4]。目前对多糖进行修饰的常见方法有硫酸化、羧甲基化、乙酰化、烷基化、磺酰化、磷酸

化等^[4-5],许多天然多糖经硫酸化修饰后的生物活性增强,尤其是抗病毒、抗肿瘤、抗艾滋病、对机体的免疫功能方面显著增强,因而受到极大关注^[6-8]。磷酸化修饰是一种共价修饰,是支链上的羟基被磷酸根取代的过程。磷酸化多糖可使一些原本不具有活性的多糖显示了抗肿瘤等生理活性^[9]。但是目前关于磷酸化修饰主要集中在淀粉、壳聚糖和纤维素等^[10-12],浒苔多糖磷酸化修饰方面的研究至今未见有报道。

利用混合磷酸盐试剂对浒苔多糖进行磷酸化研究,获得浒苔多糖磷酸化的最佳工艺条件,以期为浒苔多糖资源的开发利用,以及开发新的保健因子、功能性食品或药品等应用提供理论依据。

收稿日期: 2011-05-27

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(Z3110211)

作者简介: 孙雪(1987—),女,硕士研究生,主要从事食品生物技术研究。E-mail: haosunxue@126.com

* 通信作者: 潘道东(1964—),男,教授,博士,主要从事畜产品加工研究。E-mail: daodongpan@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

浒苔干品 浙江省奉化市腾宇养殖有限公司。

三偏磷酸钠(STMP)、三聚磷酸钠(STPP)(均为分析纯) 国药集团上海试剂公司; DEAE-Sepharose Fast Flow、Sephadex G-100 美国 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

FD-1D-80 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; CXG-1 电脑恒温层析柜 上海沪西分析仪器有限公司; FE20 pH 计 瑞士梅特勒-托利多仪器公司; DKS-26 电热恒温水浴锅 宁波江南仪器厂; H2500R-2 高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司; UNICO 紫外-可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 浒苔多糖的提取与分离纯化

浒苔干品粉碎后过 40 目筛, 以 1:75(g/mL) 的料水比于 90℃ 水浴浸提 2 次, 每次 4h, 得到多糖的浸提液, 旋转蒸发浓缩, 经酶法脱蛋白, 过氧化氢脱色后, 加入 4 倍体积的 95% 乙醇, 沉淀经冷冻干燥后得到浒苔多糖粗品。将粗品再经 DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-100 层析柱分离纯化, 苯酚硫酸法^[13]追踪检测, 收集得率较高的组分, 经透析除盐后冷冻干燥得到浒苔多糖纯品。

1.3.2 浒苔多糖的磷酸化

小烧杯中用水溶解一定量的磷酸化试剂(三聚磷酸钠与三偏磷酸钠质量比为 6:1), 溶解后再加入精制的 0.01g/mL 浒苔多糖, 调 pH 值后, 在一定温度条件下反应一定时间, 样液用 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀 24h, 将醇沉多糖冷冻干燥, 再于 60℃ 水浴中复溶, 复溶后的溶液于透析袋选用截留相对分子质量为 10000 的透析袋以蒸馏水为透析液透析 2d, 将透析袋内液体浓缩到适量体积后进行冷冻干燥得磷酸化衍生物。

1.3.3 磷酸根的测定(钼蓝比色法)

以磷酸二氢钾为标准物, 分别置于 25mL 比色管中, 依次加入 2.0mL 5% 钼酸铵溶液, 摇匀, 静置几秒后, 分别加入 1.0mL 2% 亚硫酸钠溶液和 1.0mL 0.5% 的对苯二酚溶液, 摇匀, 加水至刻度, 静置 30min 后, 以参比调零, 在波长 660nm 处测定吸光度^[14], 以磷酸根标准液(以 P 计)质量浓度为横坐标、相对吸光度为纵坐标作标准曲线, 得出标准曲线方程。

取适量的样品于烧杯中, 分别加入 1mL 浓硫酸和浓硝酸, 在电炉上加热至冒烟, 然后待冷却后加入 1mL 30% 的过氧化氢溶液, 再缓慢加热, 重复以上的步骤

直至瓶内不再冒烟, 溶液呈无色透明或淡黄色。冷却后加入 1mL 6mol/L 盐酸, 在电炉上加热使酸彻底分解, 转移至 50mL 的容量瓶中定容。取 5mL 按标准曲线操作方法测定吸光度, 根据回归曲线计算出磷酸根(以 P 计, 下同)的含量。

1.3.4 单因素试验

影响浒苔多糖磷酸化修饰的因素很多, 如反应温度、反应时间、反应 pH 值、磷酸化试剂质量浓度等。为提高浒苔多糖的磷酸根含量, 采用单因素试验考察影响浒苔多糖磷酸根含量(以 P 计)的关键因素。

反应温度: 固定磷酸化试剂质量浓度 0.1g/mL、反应时间 2h、反应 pH6.0, 研究不同反应温度对浒苔多糖磷酸根含量的影响; 反应时间: 固定磷酸化试剂质量浓度 0.1g/mL、反应温度 90℃、反应 pH6.0, 研究不同反应时间对浒苔多糖磷酸根含量的影响; 反应 pH 值: 固定磷酸化试剂质量浓度 0.1g/mL、反应温度 90℃、反应时间 5h, 研究不同 pH 值对浒苔多糖磷酸根含量的影响; 磷酸化试剂质量浓度: 固定反应温度 90℃、反应时间 5h、反应 pH9.0, 研究不同磷酸化试剂质量浓度对浒苔多糖磷酸根含量的影响。

1.3.5 响应面优化试验

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken Design 中心组合试验设计原理^[15], 以磷酸化试剂质量浓度、反应温度、反应时间、反应 pH 值为自变量, 磷酸化浒苔多糖中磷酸根含量为响应值, 设计四因素三水平的响应面分析试验, 以确定磷酸化最优工艺条件。

2 结果与分析

2.1 标准曲线方程的建立

根据 1.3.3 节方法进行实验, 结果建立的磷酸根标准曲线回归方程为: $y = 0.0004x + 0.0001$, $R^2 = 0.9997$, 其中 y 为吸光度、x 为磷酸根标准液质量浓度。

2.2 单因素试验

为了提供浒苔多糖磷酸化修饰后磷酸根含量的对照依据, 本研究在单因素试验前, 首先测定了未经磷酸化修饰的浒苔多糖的磷酸根含量为 2.833%。

2.2.1 反应温度的考察

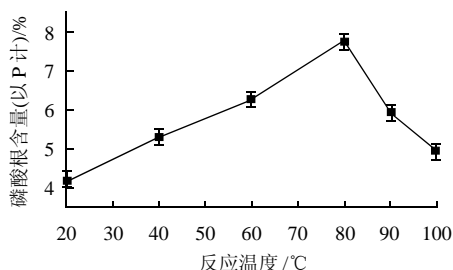


图 1 反应温度对磷酸根含量的影响

Fig.1 Effect of reaction temperature on phosphate group content in phosphorylated products

由图1可知,在20~90℃范围内,随着温度的升高,磷酸根含量逐渐升高,且含量跟随温度的变化较显著。反应温度越高,含量越高,这可能是因为随温度升高,反应体系能量升高,使高分子键的活性增强,磷酸化试剂的利用率也会随之增加^[16],但80℃以后,温度继续升高磷酸根含量反而显著下降,这是由于在温度较低时(30℃),多糖基本不发生变化;但是在酸性条件下,当温度升高到一定程度,就会破坏多糖结构,使其降解,磷酸根含量上升缓慢。

2.2.2 反应时间的考察

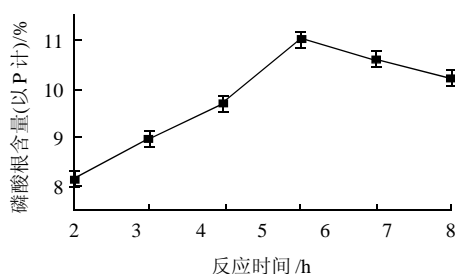


图2 反应时间对磷酸根含量的影响

Fig.2 Effect of reaction time on phosphate group content in phosphorylated products

由图2可知,反应时间在5h时产物中磷酸根含量最高,当反应时间在5h以内时,随着反应时间的延长,产物中磷酸根含量呈上升趋势,而当反应时间超过5h时,产物磷酸根含量逐渐降低,这是由于在5h以内时,延长反应时间,使反应更充分的缘故。随着时间的延长,浒苔多糖在较高的温度条件下长时间反应,可能会使溶液中的多糖降解,从而使磷酸根含量下降^[17-18]。

2.2.3 反应pH值的考察

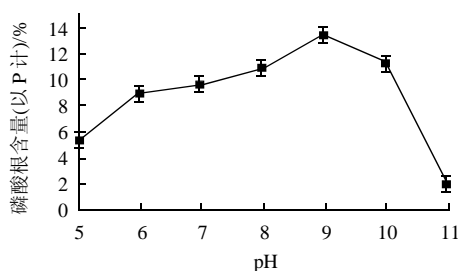


图3 反应pH值对磷酸根含量的影响

Fig.3 Effect of reaction pH on phosphate group content in phosphorylated products

由图3可知,反应pH值对浒苔多糖磷酸根量有较显著的影响。多糖的磷酸根含量在pH9.0时达到最大值(13.5%),这可能是因为pH9.0时对磷酸化接枝反应的进行起到了催化作用,使磷酸盐更充分地取代了多糖枝

链上的羟基。在pH5.0和pH11.0时,磷酸根含量最低,可能是因为混合磷酸盐在较低的pH值条件下会分解成活性较低的焦磷酸钠和正磷酸钠,而pH值过高会对浒苔多糖的磷酸化反应产生不良的影响。

2.2.4 磷酸化试剂质量浓度的考察

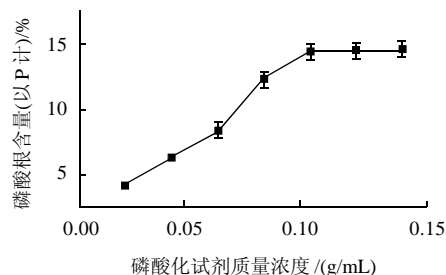


图4 磷酸化试剂质量浓度对磷酸根含量的影响

Fig.4 Effect of phosphorylation agent dosage on phosphate group content in phosphorylated products

由图4可知,一定范围内(0.02~0.14g/mL),浒苔多糖结合磷的含量随磷酸盐质量浓度的升高而升高,这可能是因为随着磷酸盐质量浓度升高,磷酸盐之间的结合迅速上升,造成结合磷的含量升高,而当质量浓度高于0.1g/mL时,磷酸根含量维持平衡,这可能是由于高浓度磷酸化试剂使浒苔多糖结合磷达到饱和。

2.3 响应面优化试验

表1 磷酸化工艺条件优化响应面分析及结果

Table 1 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A 磷酸化试剂质量浓度/(g/mL)	B 反应温度/℃	C 反应时间/h	D 反应pH值	产物中磷酸根含量/%
1	0(0.10)	1(100)	1(6)	0(9)	8.51 ± 0.21
2	0	0(90)	-1(4)	-1(8)	9.89 ± 0.11
3	1(0.12)	0	1	0	13.1 ± 0.30
4	0	1	0(5)	-1	5.92 ± 0.09
5	0	-1(80)	-1	0	9.86 ± 0.12
6	-1	0	1	0	12.34 ± 0.22
7	0	0	1	-1	10.80 ± 0.17
8	0(0.08)	-1	0	-1	9.22 ± 0.18
9	0	-1	1	0	11.1 ± 0.23
10	-1	1	0	0	7.42 ± 0.15
11	0	-1	0	1(10)	10.60 ± 0.23
12	-1	0	0	1	11.2 ± 0.20
13	1	-1	0	0	11.86 ± 0.31
14	1	0	-1	0	12.85 ± 0.21
15	1	1	0	0	9.37 ± 0.26
16	0	0	-1	1	8.78 ± 0.17
17	0	0	0	0	14.21 ± 0.28
18	-1	0	0	-1	10.43 ± 0.14
19	0	0	0	0	14.8 ± 0.32
20	-1	0	-1	0	11.82 ± 0.17
21	0	0	1	-1	10.75 ± 0.06
22	-1	-1	0	0	6.66 ± 0.08
23	1	0	0	1	11.49 ± 0.38
24	1	0	0	-1	11.30 ± 0.20
25	0	0	0	0	14.55 ± 0.16
26	0	1	0	1	6.04 ± 0.10
27	0	1	-1	0	6.93 ± 0.05

在单因素试验基础上,以磷酸化试剂质量浓度、反应温度、反应时间、反应 pH 值为自变量,磷酸化浒苔多糖中磷酸根含量为响应值,设计四因素三水平的响应面分析试验,试验的因素和水平、试验方案及结果见表 1。

2.3.1 回归方程的建立

利用 Design Expert 7.0.0 软件对表 2 数据进行多元回归拟合,得到磷酸化浒苔多糖的磷酸根得率(Y)对磷酸化试剂质量浓度(A)、反应温度(B)、反应时间(C)、反应 pH 值(D)的二次多项回归模型为:

$$Y = 9.42 + 2.78A - 0.59B + 1.21C + 0.12D - 0.22AB - 0.23AC + 0.010AD + 0.21BC - 0.056BD - 8.267 \times 10^{-3}CD - 0.37A^2 - 3.70B^2 - 1.25C^2 - 2.54D^2$$

F 检验反映的是回归模型的有效性,包括失拟性检验和回归方程显著性检验。方差分析(表 2)显示,模型 P 值小于 0.01,表明该模型方程极显著,不同处理间的差异高度显著,说明该方法是准确可靠的,使用该方程模拟真实的四因素三水平分析可行。

失拟项 $P = 0.1770 > 0.05$,不显著,说明此回归模型比较理想,可信度较高。模型精密度为 $16.600 > 4$,说明试验精度很高。 R^2_{Adj} 为 0.9228,说明建立的模型能够解释 92.28% 响应值的变化,能很好地描述各因素对浒苔多糖磷酸根接枝量的变化规律。因此该模型能准确地模拟各因素对磷酸根含量的影响^[19]。

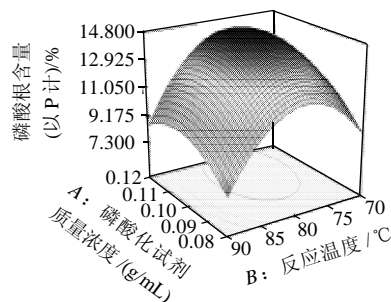
回归方程中,变量的正系数表明该变量的正向变化可引起响应值的增加;负的二次项的系数表明方程的抛物面开口向下,具有极大值点,能够进行最优分析。

表 2 响应面试验结果的方差分析结果

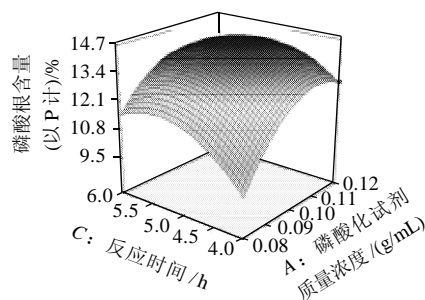
Table 2 ANOVA for each term in the developed regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	122.09	14	8.72	23.18	< 0.0001
A 磷酸化试剂质量浓度	17.48	1	17.48	46.48	< 0.0001
B 反应温度	0.53	1	0.53	1.41	0.2581
C 反应时间	2.28	1	2.28	6.06	0.0300
D 反应 pH 值	0.022	1	0.022	0.058	0.8145
AB	0.81	1	0.81	2.15	0.1682
AC	0.88	1	0.88	2.33	0.1526
AD	1.620×10^{-3}	1	1.620×10^{-3}	4.307×10^{-3}	0.9488
BC	0.18	1	0.18	0.49	0.4983
BD	0.013	1	0.013	0.034	0.8573
CD	2.734×10^{-4}	1	2.734×10^{-4}	7.268×10^{-4}	0.9789
A ²	11.91	1	11.91	31.65	< 0.0001
B ²	72.86	1	72.86	193.69	< 0.0001
C ²	8.38	1	8.38	22.28	0.0005
D ²	34.42	1	34.42	91.50	< 0.0001
残差	4.51	12	0.38		
失拟项	4.45	10	0.44	13.75	0.0697
纯误差	0.065	2	0.032		

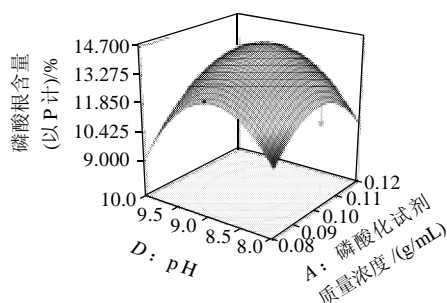
由表 2 可以看出,在所选的各因素水平范围内,对结果的影响排序为 $A > C > B > D$ 。因素 A 对浒苔多糖磷酸根接枝量的影响极显著($P < 0.01$),C 对浒苔多糖磷酸根接枝量的影响显著($P < 0.05$),B、D、AB、AC、AD、BC、BD、CD 对浒苔多糖磷酸根接枝量的影响不显著($P > 0.05$), A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对浒苔多糖磷酸根接枝量的影响极显著。表明试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系,二次项对响应值也有很大的影响,交互项作用的影响较小。这与模拟回归中线性项和二次项影响显著相对应^[20]。采用 Design-Expert 软件根据多元回归拟合分析处理 4 个因素对浒苔多糖磷酸根含量的响应面分析结果见图 5。



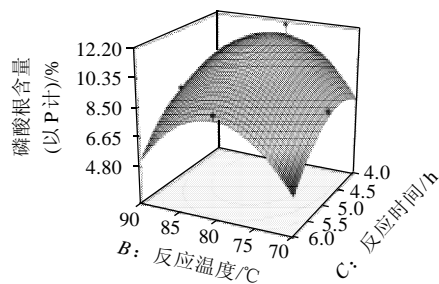
a. 磷酸化试剂质量浓度和反应温度



b. 磷酸化试剂质量浓度和反应时间



c. 磷酸化试剂质量浓度和反应 pH 值



d. 反应温度和反应时间

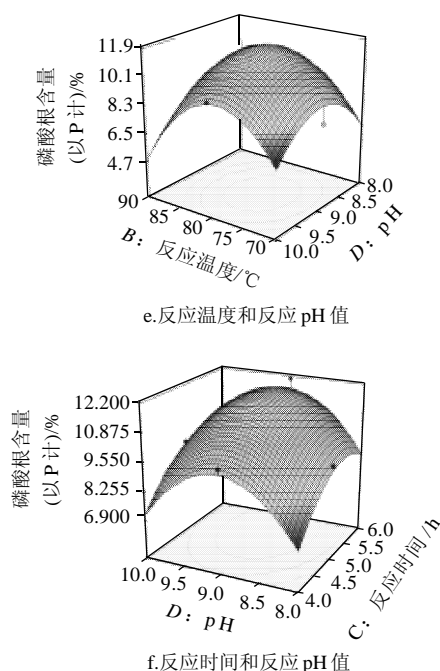


图 5 各两因素交互作用对磷酸根含量影响的响应面图

Fig.5 Response surface plots showing the interactive effects of four reaction conditions phosphate group content in phosphorylated products

2.3.2 模型的优化和验证

通过以上分析可以得到最佳的磷酸化条件,即在磷酸化试剂质量浓度 0.10g/mL、反应温度 77.93℃、反应时间 5.34h、反应 pH9.05 条件下制备磷酸化浒苔多糖,得到的磷酸根含量可达 14.62%,根据实际情况,选择磷酸化试剂质量浓度 0.10g/mL、反应温度 80℃、反应时间 5h、反应 pH9.0,此条件下测定浒苔多糖的磷酸根含量为 14.40%,与预测值接近,说明该模型可以很好地预测浒苔多糖磷酸化反应条件与磷酸根含量之间的关系^[21]。同时也证明了响应面法优化浒苔多糖中增加磷酸根含量反应工艺参数的可行性。

3 结 论

3.1 在试验设计范围内,影响磷酸化浒苔多糖磷酸根接枝量的顺序为:磷酸化试剂质量浓度>反应时间>反应 pH 值>反应温度。

3.2 本实验建立了一个以磷酸根含量为响应值,以磷酸化试剂质量浓度、反应温度、反应时间和反应 pH 值为因子的数学模型,并且通过 Design-Expert 7.0.0 Trial 软件分析出该模型在 95% 水平上能够拟合试验数据。优化后确定的最优制备条件为磷酸化试剂质量浓度 0.10g/mL、反应温度 80℃、反应时间 5h、反应 pH9.0。

3.3 在最优工艺条件下进行验证实验,测得磷酸根含量为 14.40%,这与理论值误差在 2% 左右。磷酸化多糖

得率为 48.6%。所以,利用响应面法优化得到磷酸化浒苔多糖的制备条件真实可靠,能够为浒苔多糖磷酸化衍生物在保健因子、功能性食品或药品领域中的应用提供理论依据,在实践中具有指导意义。而真实值比理论值偏低,可能是试验过程中仍存在干扰因素,建议在深入研究过程中考虑的因素能更彻底、更全面。

参考文献:

- [1] 孟春,郭养浩,石贤爱,等.海藻多糖生物活性剂及分子修饰[J].中国生物工程杂志,2004,24(3): 35-38.
- [2] 周慧萍,蒋巡天,陈琼华,等.浒苔多糖的降血脂及其对 SOD 活力和 LPO 含量的影响[J].生物化学杂志,1995,11(2): 161-165.
- [3] CHOO K S, SNOEIJIS P, PEDERSÉN M. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahleriana*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 298(1): 111-123.
- [4] 王兆梅,李琳,郭祀远,等.多糖结构修饰研究进展[J].中国医药工业杂志,2002,33(12): 616-620.
- [5] 赖萍,林跃鑫.天然多糖分子修饰研究进展[J].生命的化学,2003,23(3): 183-187.
- [6] 王长云,管华诗.多糖抗病毒作用研究进展.Ⅱ.硫酸多糖抗病毒作用[J].生物工程进展,2000,20(2): 3-8.
- [7] GARCIA G, CAVALLARO L, BROUSSALIS A. et al. Biological and chemical characterization of the fraction with antitumor activity from *Achyrocline flaccida*[J]. Planta Medica, 1999, 65(4): 343-346.
- [8] 何智健,陈建伟,李祥.多糖的硫酸酯化研究进展[J].中医药学刊,2003,21(12): 2087-2088.
- [9] INOUE K, KAWAMOTO K, NAKAJIMA H, et al. Chemical modification and antitumor activity of a D-manno-D-glucan from *Microellabosporia grisea*[J]. Carbohydr Res, 1983, 115: 199-208.
- [10] 杨铭铭,卢小丽,曲敏,等.淀粉磷酸酯的研究进展[J].哈尔滨商业大学学报,2001,17(1): 43-46.
- [11] 宋玥,林强.磷酸化壳聚糖制备工艺研究[J].安徽农业科学,2010,38(1): 48-50.
- [12] SUFLET D M, CHITANU G C, POPA V I. Phosphorylation of polysaccharides: New results on synthesis and characterisation of phosphorylated cellulose[J]. Science Direct, 2006, 66(11): 1240-1249.
- [13] 杨林莎,李玉贤,李明丽,等.苯酚-硫酸比色法测定百合多糖的含量[J].中国中医药信息杂志,2004,11(8): 704-705.
- [14] 徐大伦,黄晓春,杨文鸽,等.浒苔多糖的分离纯化及其对非特异性免疫功能的体外实验研究[J].中国食品学报,2006,6(5): 17-21.
- [15] 费荣昌.试验设计与数据处理[M].4版.无锡:江南大学出版社,2001: 59-63.
- [16] 伍煜贤,张歧荣,甘伟民.双变性淀粉磷酸酯的合成与性能研究[J].广东化工,1995,21(1): 27-29.
- [17] 罗儒显. PS- I 型阴离子淀粉的研制[J].五邑大学学报,1997,11(1): 24-28.
- [18] 周家春,张达力,曾瀚权.淀粉磷酸化及其抗冷冻脱水的研究[J].广州食品工业科技,1999,16(1): 43-45.
- [19] 朱彩平,高贵田,李建科,等.应曲面法优化微波辅助提取平菇多糖工艺研究[J].食品科学,2010,31(4): 68-72.
- [20] 欧阳辉,余估,陈小原,等.响应面分析法优化湘西月见草籽油的超临界萃取工艺研究[J].食品科学,2010,31(2): 42-45.
- [21] 申迎宾,范子剑,麻浩.响应面法优化发芽豇豆积累 γ -氨基丁酸工艺条件的研究[J].食品科学,2010,31(2): 10-16.