

海带中褐藻糖胶的制备及其性能研究

摘 要

本文从干海带、鲜海带以及海带废渣液中提取褐藻糖胶。通过单因素实验确定了从不同原料中提取岩藻多糖硫酸酯的最佳方法和条件；又通过对其样品的理化性质分析，比较了用不同原料和提取方法所得褐藻糖胶的差异；然后以甘油等保湿剂为参照，比较了不同提取方法所得褐藻糖胶的吸湿保湿性能。

干海带中褐藻糖胶的浸提用热酸浸提法和超声辅助浸提法。经过提取介质 pH、温度、时间、介质体积以及浸提次数的单因素实验，确定了褐藻糖胶热酸浸提法的最佳工艺条件。浸提液中褐藻糖胶的分离用有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法，其提取率（褐藻糖胶占海带干基的质量百分比）分别为 1.30% 和 1.44%。干海带的超声辅助浸提法条件为：超声频率 100%、pH=4.0、温度为 60℃、其它条件同热酸浸提法，并与同条件下热酸浸提法相比，前者的多糖得率和多糖纯度分别为 0.97% 和 36.3%，后者为 0.52% 和 22.2%。由此可见，干海带中褐藻糖胶的最佳浸提方法为超声-热酸联合浸提法，最佳分离法为高分子电解质沉淀法。

鲜海带中褐藻糖胶的提取用超声波联合浸提法，如超声波-壳聚糖浸提法，超声波-高分子电解质浸提法，超声波浸提法，热酸浸提法，然后用有机溶剂沉淀。四种浸提方法的多糖得率（褐藻糖胶占海带干基的质量百分比）分别为 0.63%、2.2%、0.75%、0.085%。

本文中的海带废渣液是指海带洗菜水（即洗涤海带用水和海带的酸泡水），海带提褐藻胶之后产生的废钙水和渣沥水。由于废钙水和渣沥水的处理方法相同，这两种原料可合并在一起提取多糖。从海带洗菜水中提取褐藻糖胶的方法主要为碱凝沉法和有机溶剂沉淀法；废钙水和渣沥水采用高分子电解质沉淀法。三种废水的提取得率（褐藻糖胶质量占废水体积的比值）分别为 0.26、0.040、0.128(g/L)。由以上结果可知，海带洗菜水中褐藻糖胶含量最高。

本文对有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法从干海带中直接提取的褐藻糖胶以及海带洗菜水和废水中提取的褐藻糖胶纯化品进行了理化性质分析，其结果如下：总糖含量依次为 76.00%、70.00%、76.80%、72.00%；岩藻糖含量依次为 35.61%、36.58%、34.20%、35.75%；硫酸根含量依次为 11.33%、10.80%、9.10%、6.90%。通过有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法的样品多糖纯化品分子量的测定可知，前者的黏均分子量为 4795，重均分子量为 3.42×10^4 ，数均分子量为 $1.21 \times$

10^4 ，分散度为 2.82；高分子电解质沉淀法的黏均分子量为 11000，重均分子量为 1.15×10^5 ，数均分子量为 5.88×10^4 ，分散度为 1.96。高分子电解质沉淀法的褐藻糖胶中高分子电解质残留量的测定结果为：粗多糖样品的残留量为 0.12%，纯化后为 0.022%。重金属测定结果为：直接从海带中提取的多糖和洗菜水提取的多糖铅和汞超标，废钙水和渣沥水中重金属都没有超标。

此外，本文还比较了有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法所得褐藻糖胶与壳聚糖、低聚褐藻胶和甘油在 24h 之内相对湿度为 81%和 43%环境下的吸湿性以及相对湿度为 43%和干燥密闭环境中的保湿性。其结果如下：在 81%和 43%湿度下，有机溶剂沉淀法所得褐藻糖胶吸湿性优于低聚褐藻胶、壳聚糖和甘油，8 小时以后稍逊于甘油。在干燥环境中，褐藻糖胶的保湿率不如甘油，但比另外两种多糖的保湿率好。在 43%环境中，有机溶剂沉淀法所得褐藻糖胶的保湿性最好。由此可见，褐藻糖胶不失为一种天然高效保湿剂。

总之，本文的目的在于通过不同途径和方法从干海带、鲜海带和海带废渣液中提取褐藻糖胶，在传统方法的基础上改进，提出新的提取方法，更为海带废渣液的回收利用提供了工业化的生产途径，同时也为新型天然高效保湿剂的开发提供了理论依据。本文的意义在于提高海带中提取褐藻糖胶得率及其有效成分含量，为海带加工企业解决环境污染问题，提高海带加工产业的附加值。本文所涉及的鲜海带中褐藻糖胶的提取方法、海带废钙水和渣沥水中褐藻糖胶的提取，褐藻糖胶与壳聚糖和褐藻胶寡糖的保湿性的比较目前还未见报道。

关键词：褐藻糖胶；提取；废渣液；理化性质；吸湿保湿

Study on preparation and properties of fucoidan extracted from kelp

ABSTRACT

In this paper, fucoidan was prepared from dried kelp, fresh kelp and waste liquid produced from kelp processing. The best factors were determined by mono-factor experiments. And through analysis of physicochemical properties of fucoidan extracted from different materials, we can get the differences among the four fucoidan samples. And then we take the glycerin, chitin and alginate as frame of reference, to compare the hygroscopic capability and moisture retention of the two fucoidan samples of different molecular weight.

The fucoidan was extracted from dried kelp by ways of acid-hot water and assistant-ultrasonic, and through the mono-factor experiments of pH, temperature, time, soaking times and ratio between medium volume and material weight (V:M) of extraction medium, we got the result that the best extraction pH is 4.0, temperature is 90°C, extraction time is 4h, soaking times is two, V/M is equal to 40. Through the separating ways of ethanol-precipitation and macromolecule electrolyte-precipitation, we can get the production ratio (weight percentage of fucoidan to dried kelp) of fucoidan were respectively 1.30% and 1.44%. The terms of assistant-supersonic way is that the ultrasonic power is 100%, pH is 4.0, temperature is 60°C, and the other terms are the same as acid-hot water. Compared to the acid-hot water way, the fucoidan productivity and purity of the former were 0.97% and 36.3%, and the latter were 0.52% and 22.2%. Thus it can be concluded that the better soaking method was ultrasonic combining hot-acid water way, and the better separating method was macromolecule electrolyte-precipitation.

The assistant ultrasonic extraction method was applied in the fresh kelp, such as ultrasonic-chitin liquid soaking, assistant-ultrasonic and acid-hot water soaking method, then the fucoidan was separated by ethanol, and then the productivity ratio of fucoidan (weight percentage of fucoidan to fresh kelp) were specially 0.63%, 2.2%, 0.75%, 0.085%. Thus, we can see that under the extracting terms of pH=4.0, temperature of 30°C, time of 4h, the best extraction method is ultrasonic-HIGH MOLECULAR WEIGHT ELECTROLYTE soaking method.

The kelp waste liquid in this paper mainly referred to kelp washing water, scrap calcium chloride water and filtrated recreational water caused by industrialized kelp processing. For the calcium chloride water and filtrated recreational water can be dealt in the same way, we can amalgamate the two kind of waste liquid (uniform named waste water). Fucoidan was extracted from kelp washing water by alkaline flocculence

and ethanol precipitation;from scrap calcium chloride water and filtrated recremental water by HIGH MOLECULAR WEIGHT ELECTROLYTE precipitation.And the production ratios(fucoidan weight:volum of waster water) of the three wasted water were especially 0.260,0.040,0.128(g/L).Thus,the fucoidan ratio extracted from kelp washing water was highest.

Physicochemical property of fucoidan extracting by ways and different materials was determined. And the result of fucoidan extracting directly by ethonal precipitation method、HIGH MOLECULAR WEIGHT ELECTROLYTE precipitation method from kelp and extracting from kelp washing water and wasted water was that:the content of total sugar were respectively 76.00%, 70.00%, 76.80%,72.00%;the fucoidan were 35.61%,36.58%,34.2%,35.75%;thevitriolicroot were 11.33%, 10.80%, 9.10%, 6.90%; through the molecular weight determination of fucoidan extracted by ethanol precipitation and HIGH MOLECULAR WEIGHT ELECTROLYTE precipitation method ,we can know the former fucoidan result as follow :the viscosity-average molecular weight was 4795,and weight-average molecular weight 3.42×10^4 , number-average molecular weight was 1.21×10^4 . decentralization degree was 2.82;the later fucoidan result: the viscosity- average molecular weight was 11000,and weight-average molecular weight 1.5×10^5 , number -average molecular weight was 5.88×10^4 . decentralization degree was 1.96. The leftover of macromolecule electrolyte was that: the crude product's was 0.12% and the purified product's was 0.022%.the result of heavy metal determination was:the plumbum and hydrargyrum exceed standard in the fucoidan samples extracted from kelp direct and kelp washing water,and the waster water's were not.

Furthermore, the moisture absorption of the fucoidan, extracted by ethanol and HIGH MOLECULAR WEIGHT ELECTROLYTE were studied in 24h under the relative humidity of 43% and 81%;moisture retained property was studied under relative mudity of 43% and airer,with the holoside、glycerin and chistin.the result is that :under the relative humidity of 81% and 43%,8h before ,the fucoidan extracted by ethanol held the highest moisture absorption ratio,8h after,its under the glycerin. in the airer ,the moisture retained ratio was lower than glycerin. But higher than holoside and chistin..Under relative humidity of 43%,fucoidan extracted by ethanol possessed the best moisture retained ratio.Thus,we can see the fucoidan is a kind of perfect natural moisture ingredient.

All in all, the purpose of this paper is extracting fucoidan from dried kelp,fresh kelp and the wasted liquid caused by kelp processing with different ways,and creates a new technical route basing on traditional methods,and also providing an industrilazed route with the kelp waster liquid, At the same time, offers academic evidence for developing a new type of natural moisture ingredient.This paper aims at improving productivity ratio and available composition content,resolving the polluted entironment by kelp industry, increasing the additional value.The extraction method of fucoidan from fresh kelp, fucoidan extracted from scrap calcium chloride water and filtrated recremental water haven't reported yet now.

KEY WORDS:fucoidan, extract,physicochemical property, moisture absorption and moisture retain

上海水产大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：王金歌

日期：2007年6月20日

上海水产大学学位论文授权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权上海水产大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于 保密 ，在 _____ 年解密后适用本版权书。
 不保密

学位论文作者签名：王金歌

日期：2007年6月20日

指导教师签名：张陵平

日期：2007年6月21日

第一章 引言

1.1 褐藻糖胶概述

褐藻糖胶是指含有相当数量的岩藻糖和硫酸基多糖^[1], 或含有 sulfated α -L-fucoidan 的多糖^[2], 是所有褐藻中所固有的细胞间多糖, 存在于细胞壁基质中。一般生长于潮间带长时间与空气接触的褐藻类中, 如多年生的墨角藻类, 其褐藻糖胶的含量可高达 20%; 生长于较深类的海带类中含量较低, 约为 1-2%^[3]。一般认为褐藻糖胶是以小滴状态存在于褐藻细胞组织或粘液基质中, 并能从叶片表面分泌出来的粘多糖, 分泌出的胶质还参杂有褐藻酸钠。VreeLand (1974) 用高效荧光标记的抗体法和 Alcian 染色法研究了 14 种褐藻胶和褐藻糖胶的位置。结果是, 细胞壁外层 (相当于辐射状排列的原纤维层, 接近于藻体表面) 通常含有大量的褐藻糖胶, 而褐藻胶和褐藻糖胶经常以小滴状薄层位于沿内壁层的边缘, 似乎是新合成出来的, 尚未结合到细胞壁中。同样小滴有时在两层细胞壁的边界看到。在幼藻体内, 褐藻胶在内层壁, 褐藻糖胶在外层壁占优势, 并且这些多糖在成熟期比在幼体时溶解性大^[3]。

海带中褐藻糖胶随季节和部位含量各不相同。深水的海带目 (如掌状海带、极北海带、糖海带等) 中含量为 1-4%。一般来说 3, 4 月份的叶片中含量较茎部多。纪明候等 (1980) 分析了海带叶片各部委中褐藻糖含量的规律呈基部向叶部逐渐升高的趋势, 从 0.14% 增至 1.34%; 边缘比中间部位多。这同海带叶片不同部位中的氮含量分布趋势基本相似。

褐藻糖胶分子是由硫酸基的褐藻糖单位构成。随着人们对这类化合物的深入研究, 了解其结构的复杂性, 得知褐藻糖胶并非单一结构的化合物, 而是由不同化学组分构成的一组化合物 (QuiLet, 1961)。褐藻糖胶的结构非常复杂, 由不同褐藻用不同方法提取所得的褐藻糖胶的组分和比例各不相同, 经确定, 其主要组成单位是 1, 2- α -褐藻糖或 1, 3- α -褐藻糖, C4 上带有硫酸基。另外其分支上还伴有部分半乳糖, 糖醛酸和微量木糖, 但学者们认为这是由不纯物

带来的。不过其后学者们证明，单纯由褐藻糖和硫酸基组成的褐藻糖胶是不存在的。

1.2 褐藻糖胶活性的研究现状

研究表明，褐藻糖胶具有多种生物活性，如抗凝血、抗肿瘤、抗病毒、降血脂、增强免疫力等药理活性^[4]，加上褐藻资源非常丰富，因而成为研究的热点。加上褐藻资源非常丰富，因而成为研究的热点。褐藻糖胶的生物活性主要是由于它们高度的硫酸酯化，此外，与独特的多糖结构和相对分子质量有关。目前，国内外关于褐藻糖胶的活性研究总结如下。

1.2.1 抗凝血

国外学者对褐藻糖胶的抗凝血活性进行了大量的研究。1987年，Nishino^[5]等测定了9种褐藻糖胶的抗凝血活性，包括APTT（活化部分凝血活酶时间）、TT（凝血酶时间）和抗Xa因子活性，结果显示，褐藻糖胶的APTT为12~38 u/mg，TT为0~35u/mg，抗Xa因子活性不显著，对照肝素为167u/mg。其中昆布褐藻糖胶的活性最高，APTT和TT分别为38和35u/mg，羊栖菜褐藻糖胶为25和22u/mg。1991年，Kitamura^[6]等报道三石昆布褐藻糖胶F4级分的抗凝血酶活性为200u/mg，超过对照肝素的140u/mg。1999年，Chevolot^[7]等认为，褐藻糖胶的抗凝活性与2位硫酸基和2,3位双硫酸基的浓度有关。2001年，Duarate^[8]等研究了褐藻(*Sargassumstenophyllum*)中褐藻糖胶的抗凝血活性，认为抗凝血特性主要依赖于含岩藻糖硫酸酯的链部分。郑军等分离纯化海带褐藻糖胶后得到3个级分，都有明显的抗凝血活性，主要是通过内源性凝血途径起作用，对外源性凝血途径的影响不大。2003年，程忠玲^[9]等通过红外光谱分析发现，海带褐藻糖胶具有类似肝素的多糖结构，具有较好的抗凝血活性。2002年，彭波^[10]等研究了海带褐藻糖胶对实验性出血、血栓形成及血小板聚集的影响。结果表明，海带褐藻糖胶能延长动物实验性出血时间并增加出血量，抑制动物实验性动、静脉血栓的形成，其抗血栓作用可能与抑制血小板聚集有关。1989年，Dobashi^[7]等对羊栖菜褐藻糖胶分级得到PD—I和PD—II，它们的APTT均为16u/mg，TT分别为14和36u/mg，肝素为167u/mg。二者的化学组成中半乳糖和硫酸基含量不同，这或许是它们抗凝血活性有差异的部分原因。

总之，褐藻糖胶的抗凝血活性可能与多糖的单糖组成、结构、硫酸基含量以

及硫酸基的位置有关。

1.2.2 抗病毒

2003年, Ponce^[11]等研究了褐藻(*Adenocytisutricularis*)中褐藻糖胶的抗病毒活性和结构之间的关系。在室温下提取制备的褐藻糖胶(galactofucan)对疱疹单纯病毒(herpes simplex virus)1和2有很强的抑制作用, 在70℃下提取制备的褐藻糖胶(uronofucoidan)则没有抗病毒活性。Galactofucan主要由Fuc、Gal和sulfate构成, 而uronofucoidan主要由Fuc和糖醛酸构成, sulfate含量低, 由此推测, sulfate可能是抗病毒活性所必需的。此外, 褐藻糖胶对几种包膜病毒的复制有抑制作用, 如人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency)和人细胞巨化病毒(human cytomegalo- virus)。1995年, 李凡^[12]等报道, 从渤海湾海带(Sea kelp)中提取的褐藻糖胶在体外有抗RNA、DNA的作用。其对骨髓灰质炎病毒1型和柯萨奇B3和A16型, 腺病毒III型, 埃可VI型病毒有明显的抑制作用。表现为能显著抑制细胞病变(CPE)的发生, 使组织培养细胞得到保护。

1.2.3 抗肿瘤

多糖的抗肿瘤作用是近年研究的热点。褐藻糖胶除了直接抑制肿瘤细胞生长外, 还可通过增强机体免疫力, 抑制肿瘤细胞的生长扩散。2000年, 施志仪^[13]等研究发现, 海带褐藻糖胶在体外能抑制QGY₇₇₀₃肝癌细胞进入对数生长期, 从而抑制了肿瘤的生长, 这说明褐藻糖胶的抗肿瘤效应包括直接杀伤肿瘤细胞的途径。

1994年, 王文涛^[14]等报道, 海带硫酸多糖(5~10 mg/kg)能恢复由环磷酰胺引起的免疫低下小鼠的免疫功能, 它是一种对巨噬细胞和T细胞有直接作用的免疫调节剂。1995年, 杨晓林^[15]等研究了从渤海湾海带中提取的褐藻糖胶对小鼠免疫功能的影响, 结果, 褐藻糖胶在体外可诱导白细胞介素-1 (IL-1)和干扰素-Y (IFN-Y)产生, 体内给药可增强T细胞, B细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)功能, 促进对绵羊红细胞(SRBC)的初次抗体应答。

2000年, 宋剑秋^[16]等报道, 对小鼠肉瘤S180给海带褐藻糖胶后, 小鼠腹腔巨噬细胞数量显著增加, 抑瘤率达86.5%。1980年, Usui^[17]等用爱森藻(*Eisenia bicyclis*)褐藻糖胶以50 mg (kg-d)剂量喂养5种荷S180肉瘤的动物, 45 d后肿瘤抑制率

达30%，其中2种动物的肉瘤完全消失。

1.2.4 调血脂

1999年，李德远^[18]等报道口服海带褐藻糖胶能有效地降低小鼠的高胆固醇血清TC水平，最佳剂量为150 mg/kg，而对正常小鼠血清TC无明显影响。海带褐藻糖胶能显著降低大鼠饮食性高脂血症的TC、TG和LDL—C水平，并显著升高HDL—C水平。1994年，王素贞^[19]等观察了褐藻糖胶治疗15例高脂血症患者的疗效，结果显示，褐藻糖胶能明显降低血清胆固醇和甘油三酯的含量，且无肝、肾功能损害等毒副作用。褐藻糖胶是一种类唾液酸样的活性物质，能使细胞表面的负电荷增多，影响血中胆固醇的沉积而产生降低血清胆固醇的作用。1999年，李兆杰^[20]等报道低相对分子质量岩藻聚糖硫酸酯($M_r=8 \times 10^3$)对实验性高脂血症大鼠有显著的降血脂作用。

褐藻糖胶还有降血糖、防辐射、抗氧化、抑制肠腔对重金属的吸收、以及阻止哺乳动物精卵结合的作用。

我国是世界海藻生产大国，但是我国对褐藻的开发利用还不够，基本上是以食品加工和原料出口为主，有些被加工成褐藻胶和甘露醇等。褐藻糖胶在褐藻中的含量虽然相对较少，但其突出的生物活性已越来越引起各国的重视。因此，充分发掘和利用褐藻糖胶天然多糖的资源，对提高褐藻的附加值，发展我国的褐藻加工具有深远的意义。

1.3 褐藻糖胶提取方法的研究现状

褐藻糖胶是一种水溶性多糖，传统的制备方法为：用水（加热或常温浸泡），稀酸或氯化钙溶液提取，然后向浸提液中加入有机溶剂，氢氧化铝，氢氧化铅或季胺盐类表面活性剂，使褐藻糖胶沉淀出来^[21,22]。为了减少脂类，色素，甘露醇和蛋白质等的溶出，在提取褐藻糖胶之前可以先用高浓度有机溶剂或甲醛溶液处理藻体^[1]。目前，新研究报道的提取方法还有微波辅助提取法、超声波提取法和超滤膜提取法等。本文将褐藻糖胶的几种提取方法简述如下：

水提法：本法主要根据褐藻糖胶易溶于水，大部分褐藻胶不溶于水的性质进行的。如陈绍瓅（1970）将75g羊栖菜粉先用300mL, 95%有机溶剂在水浴上加热回流24h，使极性较小的成分溶出→过滤→滤渣加250mL水回流提取4h，冷

却至室温,抽滤→滤渣按相同方法再提取3次→合并提取液,旋转蒸发至粘稠状液体→加氯仿-正丁醇(5:1)100mL,与粘稠液体混合振摇,离心除去蛋白质→反复处理5遍→加3倍95%有机溶剂→抽滤→沉淀依次用无水有机溶剂、丙酮和乙醚浸洗→干燥后得褐藻糖胶粗品6.4g,得率为8.5%。Keiko(1991)将26.7Kg三石昆布用54L沸水浸提20min→过滤→滤渣再用相同条件提取1次→过滤→滤液中加入2倍有机溶剂,沉淀用有机溶剂和乙醚浸洗后干燥,得褐藻糖胶粗品191.8g。得率为0.82%。

稀酸提取:本法是利用褐藻糖胶溶于酸性溶液,而褐藻胶溶于碱的性质,以达到在浸提时尽量减少褐藻胶的溶出,提高褐藻糖胶的浸提率,因而提取物中褐藻糖胶得率的纯度较水提法高。如Kimiko将藻粉用甲醇预处理→取100g预提物→用1.31倍0.17mol/L HCl (pH=2.0)在65~70℃提取1h→离心→沉淀再次提取,重复3次→合并上清液,用NaOH中和→真空蒸发至干后溶于0.5L水→离心除去不溶物→加2倍体积有机溶剂→沉淀用有机溶剂和乙醚浸洗→真空干燥,得褐藻糖胶粗品17.8g,岩藻糖含量为23.7%。

氯化钙提取:本法是利用褐藻酸钙不溶于水,而褐藻糖胶的钙盐溶于水的性质,往浸提液中加入一定浓度的CaCl₂水溶液以沉淀溶出的褐藻酸,达到与褐藻糖胶分离的目的。如Taichi(1980)将500g藻粉用2.5L80%有机溶剂抽提→过滤,滤渣浸在4.5L3.5%甲醛中12h→倒出甲醛,空气干燥→加入2%CaCl₂水溶液,室温搅拌4h→离心→沉淀再于70℃提取2h→离心→合并两次上清液,减压浓缩→透析→冷冻干燥,得褐藻糖胶粗品8.9g。

物理法辅助提取:例如:微波的频率很高,其能量可深入多糖的深层结构^[23],把海藻细胞间质多糖在极短时间内充分溶出,根据这一特性,可以用微波加热法提取褐藻糖胶。这样不仅可以减少其它杂质的溶出,又可以提高多糖得率,比水提和酸提法都好。如刘青梅等用微波直接提取、微波浸泡提取、微波冻融提取法等四种方法提取紫菜多糖,具体内容如下,微波直接提取:微波提取时间8min,一次直接提取并计算提取率;微波一次浸泡提取:样品先在常温下浸泡2h,然后用微波加热提取8min;微波二次浸泡提取:样品先在常温下浸泡2h,用微波加热提取8min,再将残渣加同体积水浸泡2h,用微波加热提取8min;微波冻融提取:将样品加水后在-12℃低温冻结12h,然后微波解冻,上述处理重复二次,而后按微波二次浸泡提取多糖。当功率>200W,时间>16分钟时提取率反而会随功率的提高和时间的增长而下降。但是由于多糖结构与相应的微波功率关系复杂,其作用机制需进一步研究,其工业化生产的推广,还有一定难度。

又例如:超声波提取^[24-25]的原理是超声能量可以破碎细胞,在常温状态,

短时间可使多糖物质释放到水溶液中去, 不仅减少褐藻胶等杂质溶出, 还可以减少高温对多糖结构的破坏, 此法优于以上几种方法。王谦^[26]等在内径 8 cm、有效容积为 1L 的气升式循环超声破碎浸提装置中, 进行了超声波强化海带硫酸酯多糖浸提实验。在 pH=5.0, 提取温度 40℃、液固比 45、提取时间 25 min、通气量 75L/h、超声功率 120W、超声作用时间百分比为 100%的工艺条件下, 硫酸酯多糖的提取率可达 1.86%。

超滤膜法: 超滤膜的特点在于用物理的方法浓缩多糖, 把多糖中的小分子杂质除去, 并可以把不同分子量的褐藻糖胶分离。此法可用于褐藻糖胶的纯化和不同分子量褐藻糖胶的提取, 且不会引入其它杂质。郑军^[27-28]等从海带中提取出的水溶性提取物, 经截留相对分子质量为 100000 的超滤膜浓缩除盐, 再经凝胶柱层析分级得 3 个具有明显抗凝血作用的组分。过菲等采用截留相对分子质量为 6000 的中空纤维超滤膜对羊栖菜粗多糖进行脱盐, 脱盐率达 99.9%, 同时还能除去粗多糖中的部分色素物质, 提高羊栖菜多糖的主要成分褐藻糖胶的含量。

1.4 低分子量褐藻糖胶的研究现状

国内关于褐藻糖胶的研究主要是低分子量岩藻多糖的制备。虽然岩藻多糖对人类健康具有不可估量的作用, 但是高分子多糖对动物也具有一定的药理毒性^[29], 为了消除这种副作用, 研制出对人类有益的岩藻多糖产品, 学者们开始致力于低分子量岩藻多糖的制备以及其应用于药物和保健品方面的研究, 如低分子量岩藻多糖在抗凝血^[30]、降血脂和抗肿瘤方面有显著的疗效。如蔡敬民等^[31]用微生物酶生产岩藻多糖酶, 再利用该酶进一步水解生成低分子量岩藻多糖。其工艺路线如下: 以褐藻为原料, 将原料粉碎、过筛后用水浸提, 温度在 40~100℃时, 搅拌浸提 6~10 小时, 离心去除固形物, 收集滤液、浓缩, 去除淀粉, 有机溶剂分级沉淀, 沉淀物冷冻干燥, 得到岩藻多糖粉末; 对上述岩藻多糖实施酶解反应; 完毕后升温使酶活丧失; 经凝胶色谱分子筛分离, 冷冻干燥得到低分子量岩藻多糖, 使得岩藻多糖酶的制备更加容易, 克服了利用化学法需要高温、高压、耗能的苛刻制备条件, 同时避免了化学法产生糖的聚合度大小不一、纯化难度大及得率低的缺陷; 酶法降解还有利于保护一些含硫侧链基团和其它支链。

钟红茂等^[32]用超滤膜从海洋植物中的褐藻门, 网管藻目, 萱藻科, 毛孢藻

属的常见海藻中分离提取 5000—20000Da 的低分子量岩藻多糖，其性状为固态呈棕色或棕黑色，其单糖组成主要为 90—95% 的鼠李糖和岩藻糖，5—10% 的阿拉伯糖和葡萄糖。

中国海洋大学的研究人员用化学降解法和超滤膜结合的方法研制出一种岩藻聚糖硫酸酯低聚糖^[33]，其工艺特征如下：将岩藻聚糖硫酸酯配成水溶液，加入过氧化氢或次氯酸及其亚硝酸及盐类，岩藻聚糖硫酸酯和氧化剂以 1: 1~3 的重量比例，将所得溶液混合加热，用截流量为 3000~5000 的膜超滤过滤，将超滤外液真空冷冻干燥，即得岩藻聚糖硫酸酯低聚糖。

还有一种方法为自由基降解法^[34]，是在上述化学降解法的基础上改进的。其优势在于可以控制降解速度和所需分子量大小，降解后过凝胶色谱柱得不同分子量的低聚褐藻糖胶。其自由基降解体系为 $\text{Cu}(\text{AC}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和不同浓度的 H_2O_2 溶液，或者为 $\text{VC} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{琥珀酸}$ 体系，流速和浓度用恒流泵控制，60℃ 条件下降解 6 小时左右，分别得分子量大于 15KD，6KD-15KD 和小于 6KD 三个部分低聚岩藻多糖，

国外关于褐藻糖胶的研究主要是粗褐藻糖胶的分离纯化以及从不同海藻中提取所得的岩藻多糖结构分析和抗凝血等活性研究。其主要提取方法为用氯化钙和高分子电解质浸提多糖，然后有机溶剂沉淀得粗多糖，再用 DEAE 纤维素柱，Cellulose 凝胶色谱等级分得纯品，其结构和组成分析用 IR 光谱和核磁共振质谱仪等。如 Maria^[35-36] 等将海藻用热水提取， CaCl_2 和 CPC 进行纯化处理，得到的褐藻糖胶采用离子交换色谱法进行分级。色谱条件为：DEAE Toyoper650M，3.2cm × 45cm，(0.3~1.5) mol/LNaCl 线性洗脱，苯酚硫酸法检测（以岩藻糖计）。得到三个级分，分别透析和冻干，收率为 90%，级分用 1D 2D¹H 和 ¹³CNMR 色谱得其结构为 3-linked α -L-fucopyranose2,4-disulfate and 4-linked $\rightarrow \alpha$ -L-fucopyranose2-sulfate residues: \rightarrow -L-Fuc ρ - (2,4-di-SO₃⁻)-(1→4)-

α -L-Fuc ρ - (2SO₃⁻)-(1→。其硫酸根含量为 13.5~32.8%。在一定的剂量下，可以抑制 U937 细胞的增殖。

KrishnanHa^[37-38] 等将羊栖菜用酸法提取， CaCl_2 和 CPC 进行纯化处理，采用 Ecteola-cellulose 分级，2.64 × 47.1cm，0.5、0.7、1.0、1.2mol/LNaCl 分步洗脱，得到 A、B、C、D4 个级分，由于 D 是唯一显示抗凝血活性的级分，所以对 D 进一步分级。采用有机溶剂分级沉淀法，得到 D-1，D-2，用 DEAE-cellulose (DE23) 纯化后，测得分子量为 42000 和 95000。Colliec S.^[27] 用化学降解法把岩藻多糖分子量为 (20,000 ± 5,000) 的低分子量岩藻多糖，并证明其具有很强

的抗凝血作用,可在临床上应用。

Maria^[39]等将粉团藻的酸提多糖用 DE-Cellulose 进行分级。先用水洗,再用 0.2mol/L NaCl 梯度洗脱,最后用 0.25 和 0.5mol/L NaOH 洗脱,得到 12 个级分。L.-E. Rioux^[40]等将爱森藻和羽叶藻用 2%CaCl₂ 提取得到 E1,用酸提法得到 E2,采用 DEAE-SephadexA-25 进行分级,2.6×60cm,先水洗,后采用 NaCl 梯度洗脱。E1 得到两个级分, E2 得到三个级分。每个级分再用 Sepharose CL-4B 纯化, 0.5mol/L NaCl 洗脱, 则又分成两个级分, 其中分子量较大的 E1-2a 再上柱, 可得到一对称峰。Nazarenko^[30]等对商品褐藻糖胶进行分级。将 1g 褐藻糖胶溶于 50ml 0.2mol/L NaCl, 用 Sepharose 4B (4×83cm) 进行分级, 以 0.2mol/L NaCl 平衡洗脱, 得到三个级分 (A, B, C)。C 用 Sepharose CL-6B (5cm×86cm) 进一步分级, 又得到级分 C1, C2。Jin Won Yang^[31]等将褐藻糖胶溶于 2mmol/L Tris 缓冲液中, 用 QAE-Depharose (1cm×20cm) 进行离子交换色谱分级, 得三个级分。

L.-E. Rioux^[41]用热水提取法从 *Caulerpa racemosa* 绿藻中提取一种具有抗病毒活性的硫酸酯多糖。用离子交换色谱分离粗多糖得以葡聚糖为主链的 F1 片段和两种带有的酸性硫酸酯杂聚糖的 F3 片段, 其组成包括树胶醛糖, 木糖, 半乳糖残基。其中 F1 聚合度为 3~18, 由 α -(1→4) 键连接的葡萄糖组成的寡聚糖, 而 F3 经 ¹³CNMR 色谱和气相色谱-质谱 (GLC-MS) 仪分析是由 (1→3) 连接的半乳糖, 末端残基以-(1→4)-连接的木糖, 和 (1→4)- 和 (1→3, 4)-连接的树胶醛糖组成, 而硫酸基团位于 C-3 位置(1→4)-连接的树胶醛糖和 C-6 位置上的(1→3)-连接的半乳糖。

综上所述, 褐藻糖胶由于具有糖醛酸和硫酸基等荷电基团, 因而可用阴离子交换色谱进行初步分级, 由于多糖组分分子量分布不同, 可再用凝胶过滤色谱进行细分和纯化。以上的研究表明, 即使是从同一种褐藻中制备的褐藻糖胶也是由多种级分组成的, 而且不同的级分, 其功能性质也有很大的差异。

1.5 本文的研究内容

我国是一个人工养殖海带的世界第一大国, 年产干品海带 30 万余吨, 同时也是海带综合利用的大国。当今我国海带生产褐藻胶 18000 吨 (主要出口每年创汇几千万美元)、甘露醇 5000 吨 (少量出口)、碘 250 吨 (主要生产 KIO₃ 用于碘盐)、氯化钾约 5000 吨 (用于钾肥) 这对国民经济的发展起到了积极作用,

它关系到从事海带养殖、加工、运销相关企业几十万人员的就业和社会稳定。由于各种原因，海带加工经济效益差，为生存，相关企业不得不压低海带的收购价格，极大地打击了海带养殖业的积极性。同时在生产加工过程中排放的大量废水和废渣对环境治理也产生负面影响，直接影响了海带综合利用工业的持续发展。

目前，关于海带中褐藻糖胶的研究热点为其提取方法和工艺条件的确定，海带加工废渣液中褐藻糖胶的提取以及其活性研究。本文在传统方法的基础上进一步研究海带热水酸提法，有机溶剂沉淀，高分子电解质沉淀法的工艺条件和超声波提取法。此方法可操作性强，设备和工艺较简单，所需成本低廉，适合工业化生产，也是目前国内外应用最广泛的方法。因此具有较高的科技应用价值和意义，对海带工业化加工的发展和经济提高以及社会高科技的发展也具有推动作用。本文所要解决的问题概括如下：一、海带中褐藻糖胶的直接提取工艺条件的确定；二、海带废水中褐藻糖胶提取工艺的确定；三、不同原料和提取方法所得褐藻糖胶的理化性质比较；四、褐藻糖胶的保湿性能研究，国内外关于褐藻糖胶抗凝血，抗病毒和抗肿瘤等药理活性的研究已很多，但关于其保湿性研究的报道很少。本文第一部分主要是从干、湿两种海带中提取褐藻糖胶，比较这种原料中褐藻糖胶的得率。海带多糖主要包括褐藻胶、海带淀粉、甘露醇和褐藻糖胶。本部分主要目的是通过热水酸提、超声提取等处理方法，把海带中的褐藻糖胶分离出来，而绝大部分褐藻胶仍然留在海带渣中。而这些海带渣还可以用来提取褐藻胶。这样既有利于褐藻糖胶的提取得率，也可以避免在褐藻胶提取中带有褐藻糖胶杂质。褐藻糖胶的提取工艺关键在于如何把溶解在浸提液中的小部分褐藻胶、蛋白质、色素等杂质从褐藻糖胶中分离出来。传统中常用的方法为热水提取法和酸提法，目前采取的较先进的方法有超声辅助浸提法。其分离纯化的理论依据为褐藻糖胶是一种水溶性的酸性多糖，可溶于稀酸，而褐藻胶则不易溶于酸性溶液，而超声波能量可破碎细胞，使多糖溶出。热水酸提工艺过程中，提取介质条件是影响多糖得率的关键因素，本文就褐藻糖胶提取介质的 pH 值、温度、提取时间 (h)、料液比 (V/M)、提取次数等做了单因素实验，通过总糖得率选择最佳条件。结果为 pH=4.0, 温度为 90℃, 提取时间为 4h, V/M=40, 提取次数为 2 次。然后在热水酸提的基础上，结合超声辅助提取，并与同条件下热水酸提法 (pH=4.0, 温度为 60℃, 提取时间为 4h, V/M=40) 比较，得其结果为：超声辅助提取 (超声功率为 1000%, pH=4.0, 温度为 60℃, 提取时间为 4h, V/M=40) 总糖 (总糖占干海带的质量) 得率是热水酸提的 1.73 倍，纯度 (总糖占粗多糖的质量) 是热水酸提法的 1.63 倍。由此可见，超声提取法优于热水酸提法。多糖的初步分

离提取主要采用有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法。根据海带多糖在不同有机溶剂体积分数下溶解度不同，可以用有机溶剂沉淀法提取褐藻糖胶，海带多糖在有机溶剂中的溶解度情况如下：有机溶剂体积分数为 20~30%时，褐藻胶产生沉淀，50%以上时，褐藻糖胶可产生沉淀。本实验做了有机溶剂体积在 60~90%范围内，褐藻糖胶沉淀得率。由于褐藻糖胶是酸性阴离子多糖，还可以用阳离子型高分子电解质法沉淀褐藻糖胶。通常选用的高分子为十六烷基吡啶（CPC）、高分子电解质等阳离子表面活性剂。据报道，高分子结构越对称、分子量越大，络合能力就越好，本实验采用有机溶剂沉淀法和高分子电解质结合法沉淀多糖。通过总糖得率比较有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法的优劣，结果为高分子电解质沉淀法优于有机溶剂沉淀法。

鲜海带的提取工艺为 30℃条件下超声波辅助提取。提取介质分别为壳聚糖溶液、高分子电解质溶液和稀酸溶液。然后与水浴条件下稀酸提取相比，比较这几种方法对鲜海带提取得率的影响。实验结果是超声波提取法的多糖得率远远超过热水浴提取，而三种超声波条件提取法相比，以高分子电解质为提取介质所得总糖提取率最高。由此可见，超声波对鲜海带的细胞破碎作用远远超过对干海带的作用。而提取介质中高分子电解质更有利于鲜海带中褐藻糖胶的溶出和分离。

本文第二部分主要是从海带废渣液中提取褐藻糖胶。海带化工是以海带为原料生产碘、甘露醇、褐藻胶三大传统产品，是我国重要的藻类加工产业。以褐藻胶生产为例，其生产工艺要经过海带浸泡→预处理→消化→冲稀→漂浮→钙析→脱钙→中和转化→烘干等过程。在预处理工序中要用清水反复洗涤附着在藻体表面上的粘滞物，即海带洗菜水；海带采用甲醛浸泡处理后，用水冲洗去掉甲醛而产生的甲醛冲洗水；在海带消化、冲稀、钙析过程中，产生大量的废钙水；在海带消化冲稀之后产生的渣沥水；在漂浮、污水处理最后工序中产生大量的半固体状的海带漂浮渣液。经实验验证，上述这些洗菜水，废钙水，渣沥水和漂浮渣中都含有一定数量的褐藻糖胶。目前海带化工企业除了做碘和甘露醇提取外，其他废水和废渣只是作为废弃物被排放掉，既浪费了宝贵的岩藻多糖资源又存在污染环境问题。利用废水提取褐藻糖胶不仅解决了由于岩藻多糖的存在，影响碘、醇、特别是褐藻胶的质量，而且简化了岩藻多糖的工艺步骤，降低了生产能耗。

为了充分利用海带化工生产过程产生的洗菜水、废钙水以及渣沥水，提高废渣液中岩藻多糖的提取率，本实验在第二章实验基础上采用高分子电解质沉淀法和有机溶剂沉淀法工艺路线提取海带化工产生过程中的渣、液中的褐藻糖胶。本实验首先模拟海带化工生产过程的工艺路线，得到洗菜水、钙化水和渣沥水，初步得出这些废水中的褐藻糖胶得率是否有实际应用价值。通过比较模拟实验从海

带渣液中提取褐藻糖胶得率 0.86%与直接从干海带中提取褐藻糖胶得率 1.44%相比,直接提取法比从海带渣液中提取褐藻糖胶更有利于多糖得率的提高。而这一实验工艺可以成为海带加工业开发海带附加产品的新的工业化提取工艺,即可以尝试从从海带中提取褐藻糖胶,然后再用海带渣提取褐藻胶等。为了确切知道海带工业化加工废渣液的利用率,从海带工业化产生的洗菜水、废钙水、渣沥水,按照同样的方法提取褐藻糖胶,比较实际生产和模拟褐藻糖胶得率的差别。

本文第三部分主要是褐藻糖胶各理化指标,如多糖含量,岩藻糖含量,硫酸根含量,重金属含量,分子量和高分子电解质残留量的测定。这些指标为评价不同原料和方法提取褐藻糖胶的优劣提供了一个必要的依据。另外海带中重金属超标问题屡见报道,已引起食品安全检验的重视,而从海带中提取的褐藻糖胶重金属含量的测定也十分必要,且以往的研究中没有涉及过,按 NY5073-2001 水产品中有毒有害物质限量^[28]标准中所述的重金属如下:总汞,铅,镉,无机砷。如果人体超量摄取这些微量元素,将造成以下危害:过量含镉食品对人体的危害是急性中毒,主要症状为恶心、呕吐、腹泻、腹痛;含铅化合物对人体的影响主要是神经系统、肾脏和血液系统,还会引起肾功能损害,影响儿童的智力发育等;砷慢性中毒表现为疲劳、乏力、心悸、惊厥,还能引起皮肤损伤,出现角质化、蜕皮、脱发、色素沉积,还可能致癌;汞对人体的危害主要表现为头痛、头晕、肢体麻木和疼痛等,总汞中的甲基汞在人体内极易被肝和肾吸收,其中 15%被脑吸收,但首先受损的是脑组织,并且难以治疗,往往促使死亡或遗患终生。因此,褐藻糖胶作为一种活性生物多糖,它的质量安全性更应该受到研究者的重视。

经总糖含量测定可知,干海带有有机溶剂提取、高分子电解质提取、废钙水、洗菜水、中的总糖含量都在 70%以上,具体为 76%, 70%, 72%, 76.8%。从以上实验数据看,洗菜水中的总糖含量最高。由于工业化洗菜水里面除了泥沙之外含有的其他杂质较少。有机溶剂提取法和高分子电解质提取法相比,还是有机溶剂提取法的总糖含量更高,可能是高分子电解质提取过程中引进了高分子电解质残留所致。

经岩藻糖含量测定可知,它的含量与实验原料关系不大,基本都在 35%左右,就两种提取方法相比,高分子电解质沉淀法比有机溶剂沉淀法所得岩藻糖含量高。可能是高分子电解质沉淀法与单一的醇沉法相比,前者经过高分子电解质沉淀和氯化钙溶解,又经有机溶剂沉淀,把褐藻糖胶粗品中的主要杂质褐藻胶去除的较彻底。总的来说本文提取所得褐藻糖胶中岩藻糖含量比文献[2, 3]中的含量都高。经硫酸根含量测定,这几种样品当中的硫酸根含量在 10%左右。其中废水(钙化水和渣沥水)中硫酸根含量只有 6.9%,可能是由于海带在消化处理时,多糖上

的硫酸根结构被破坏或流失。本文所用原材料都是海带，但是提取方法却不一样。而分子量与实验方法关系密切，本文只考察了常用方法——有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法所得褐藻糖胶的粘均分子量和重均分子量。从两者分子量大小来看，有机溶剂沉淀法所得分子量小于高分子电解质沉淀法所得分子量。且前者的分散度大于后者。说明高分子电解质沉淀法所得多糖分子量更均一。从重金属测定结果来看，这四种样品除了钙化水之外，其他三个样品都存在铅和汞超标的问题。原因可能是海带在浸提和冲洗过程中，铅和汞转移到了样品当中。由此可见，这些重金属主要存在于海带表面。由高分子电解质残留测定可知，高分子电解质提取法所得褐藻糖胶粗品中的高分子电解质残留量为 0.1225%，纯化后残留量降至 0.022%。总之，有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法相比，前者的总糖含量和硫酸根比后者高，后者的岩藻糖含量比前者高。两者铅和汞含量都超标。但是有机溶剂沉淀法所得分子量比后者小。洗菜水 II 和钙化水中提取的褐藻糖胶，洗菜水 II 中提取的褐藻糖胶岩藻糖含量和硫酸根含量都比较高，但是重金属超标，而钙化水不存在中金属超标问题。洗菜水 II 和从海带中直接提取的褐藻糖胶相比，基本没有很大差别，但是产品颜色较后者深。

本文第四部分主要以低聚褐藻胶、壳聚糖、甘油为参照，研究褐藻糖胶的保湿性能的优劣。分别在相对湿度为 43% 和 81% 环境下做了单一保湿剂的吸湿性；在密闭的干燥环境和相对湿度为 43% 的环境下做了保湿性研究。由单一保湿剂的吸湿性和保湿性研究可知，褐藻糖胶的吸湿性和保湿性都优于壳聚糖和褐藻胶寡糖。两种不同分子量的褐藻糖胶相比，分子量小的褐藻糖胶吸湿性更好，特别是在 43% 环境中，吸湿性比甘油好。而高分子量的褐藻糖胶更适合高湿度环境下使用，它做为保湿剂可以替代甘油。而保湿性研究表明分子量较小的褐藻糖胶持水性强，是一种可以替代甘油和其它几种高分子多糖的天然多糖保湿剂。甘油做为一种油性保湿剂毕竟和水溶性褐藻糖胶不同。在干燥条件下，甘油在膏霜中可形成油包水状态，比褐藻糖胶保水性好，但是在较湿润环境下，褐藻糖胶的保水性就比甘油高。由此可知，褐藻糖胶是一种天然多糖类高效保湿剂。

1.6 本文的目的和意义

本文的目的在于提高海带综合利用率，增加海带加工业的产品附加值，通过不同途径和工艺路线，为海带以及海带废液中褐藻糖胶的提取提供不同的工艺路线和提取方法，通过褐藻糖胶理化性质的比较，为提高褐藻糖胶产品得率和有效成分含量以及产品安全性提供了一定的理论基础。通过海带加工过程产

生的废水中褐藻糖胶的得率评估了海带加工废水的经济价值和现实意义。褐藻糖胶保湿性能的研究在目前的报道中还很少见，为开发无毒副作用的新型高效天然保湿剂提供一定的理论基础。

本研究对社会经济发展做出了一定的贡献，为海带加工业产品附加值的提高提供了一定的理论基础。在科技创新方面，为废弃物变废为宝，增进环保和生物资源的利用加工方面提供了一暂新的途径。首先，海带废渣液的加工利用将为海带加工企业增加了一条新的生产线，进而为增加社会就业率提高了很多机会；再者，褐藻糖胶生产工艺的改进为提高褐藻糖胶得率和质量打下了基础，这将推进产业科技进步与社会经济增长。与此同时，也为海带加工业减少污水排放，促进环保做了贡献。另外，本文把不同分子量褐藻糖胶与多种天然保湿剂对比，并模拟人体皮肤吸收功能，研究其在膏霜中的保湿性能实验，为开发海洋天然高效保湿剂提供了充分的理论依据。

当然本文研究还有一些难题还有待进一步解决，比如在去除洗菜水中泥沙的同时如何阻止褐藻糖胶的损失，消除褐藻糖胶产品中重金属超标和高分子电解质的残留等问题。

第二章 海带中褐藻糖胶的提取

海带中褐藻糖胶的含量只有 1-4%^[3]。所以工业化海带加工产业主要是提褐藻胶、碘及甘露醇。而褐藻糖胶的提取却很少。为了有效利用资源,提高产品附加值,本文先从海带中直接提取褐藻糖胶,而海带渣可用于提褐藻胶。

本章选干海带和鲜海带为原料,比较不同原料对褐藻糖胶得率的影响。褐藻糖胶常用的提取方法为热水浸提和有机溶剂沉淀法。目前较先进的方法为超声浸提,微波提取和超滤膜过滤法和高分子沉淀法。从工业化角度来讲,热水浸提和有机溶剂沉淀法应用最广泛,此法所需设备简单,成本低,可操作性强,并适宜于大批量生产。而本文也主要为工业化生产考虑,故选用热水酸提法和有机溶剂沉淀法。微波提取对设备的要求高,多糖溶出条件与微波功率相对应的机理复杂。超滤膜成本高,又因褐藻糖胶粘性大,很容易把膜堵塞,且难以清洗,不适合工业化生产。而超声提取对设备要求不是很高,较适合工业化生产,因此,为提高糖胶得率,本文采用了超声波辅助浸提法,分离沉淀方法有有机溶剂沉淀法和高分子电解质-有机溶剂沉淀法。鲜海带中褐藻糖胶主要用壳聚糖和高分子电解质联合超声浸提以及酸浸提。比较不同浸提方法对鲜海带中褐藻糖胶提取率的影响。

2.1 仪器和试剂

浓盐酸,浓硫酸,苯酚,三氯乙酸,丙酮,(以上均为分析纯试剂)。高分子电解质(99%),氢氧化钠,氯化钙,标准葡萄糖(99%)。

鲜海带,干海带:采于青岛

CS101-2A 电热鼓风干燥箱,(控温范围:(室温+10)~300℃,温度波动为±0.5℃,中国)

HZ-3 减压旋转蒸发仪,中国

HY-31 恒温水浴锅,(控温范围:室温 99.9℃,温度波动为±0.5℃,中国)

CHRIST 减压冷冻干燥机,德国

SORVALLRC-5C 超速离心机, LG10-2.4A 高速离心机

721 型可见分光光度计

UV-2000 紫外可见分光光度计

KQ-400DB 数控超声清洗器 (超声频率 6 KHZ, 加热功率 (W): 40-100 (%), 温度范围 20-110℃, 时间 1-480min, 中国)

温度计, 电子天平 (精确至 0.1mg), 干燥器等。

2.2 实验方法

2.2.1 干海带中褐藻糖胶的提取

2.2.1.1 热水酸提法

热水酸提法工艺流程如下: 干海带→水洗、烘干、粉碎→稀盐酸溶液提取→过滤→调节滤液→离心→上清液浓缩→加三氯乙酸除蛋白→上清液用有机溶剂沉淀→离心→上清液用有机溶剂沉淀→离心→沉淀用丙酮、有机溶剂依次洗涤→真空冷冻干燥→褐藻糖胶粗品

pH 单因素实验: 设提取介质 pH 依次为 2.0、3.0、4.0、5.0 四个水平, 其他条件一致为: 水浴温度 70℃、时间 4 小时、液料体积质量比 (V/M)=40 的条件下, 做提取介质 pH 值对褐藻糖胶提取率影响的单因素实验, 浸提液用 60%有机溶剂沉淀, 通过多糖得率筛选出最佳 pH。

温度单因素实验: 设水浴温度依次为 60, 70, 80, 90(℃)四个水平, 其他条件一致为: 介质 pH3.0、时间 4hr、V/M=40 的条件下, 做提取介质温度对褐藻糖胶提取率影响的单因素实验, 通过多糖得率筛选出最佳提取温度。

时间单因素实验: 设浸泡时间依次为 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 四个水平, 其他条件一致为: 提取温度 80℃、pH3.0、V/M 为 30 的条件下, 做提取时间对褐藻糖胶提取率影响的单因素实验, 并通过多糖得率筛选出最佳浸泡时间。

液料比 (V/M) 单因素实验: 设 V/M 依次为 20, 30, 40, 50 的四个水平, 其他条件一致为: 提取温度 70℃、pH3.0、时间 4h 的条件下, 做液料体积质量比 (V/M) 对褐藻糖胶提取率影响的单因素实验, 并通过多糖得率筛选出 V/M 的最佳比值。

海带浸提次数单因素实验: 设海带经过一次浸提、二次浸提、三次浸提, 每次

浸提条件一致为：温度 80℃、pH3.0、时间 4h、V/M 为 40、有机溶剂体积分数为 60%的条件下，比较不同浸提次数所得多糖得率。

2.2.1.2 超声辅助提取法

干海带的超声波提取法为：超声频率 100%，温度 60℃，稀盐酸介质 pH=4.0，V/M=40，超声时间 4h，其它实验步骤同热水酸提法。然后与同条件下热水酸提法相比，对褐藻糖胶得率的影响。

2.2.1.3 有机溶剂沉淀法

有机溶剂沉淀法单因素实验：设有机溶剂体积分数依次为 60%、70%、80%、90% 四个水平，其他条件一致为：温度 80℃、pH=3.0、浸泡时间 4h、V/M=40 的条件下，做有机溶剂体积分数对褐藻糖胶提取率影响的单因素实验，并通过多糖得率筛选出最佳有机溶剂浓度。

2.2.1.4 高分子电解质沉淀法

在文献^[42-46]基础上改进，高分子电解质提取法工艺流程如下：

方案一：干海带→水漂去杂，烘干，粉碎→稀盐酸溶液提取（pH=4.0，温度 80℃，时间 4h，V/M=40，二次浸提）→过滤，合并滤液→调节 pH 至中性→离心→加少量 10%三氯乙酸除蛋白→离心→4%高分子电解质沉淀多糖→离心→（上清液二次用高分子电解质沉淀）沉淀再用 4mol/L C_2Cl_2 溶解→离心→上清液用 60%有机溶剂沉淀→离心→有机溶剂洗涤→冷冻干燥。

方案二：干海带→水漂去杂，烘干，粉碎→稀盐酸溶液提取（pH=4.0，温度 80℃，时间 4h，V/M=40）→过滤，合并滤液→调节 pH 至中性→离心→浓缩→30%有机溶剂沉淀→离心→上清液加少量 10%三氯乙酸除蛋白→离心→上清液用 4%高分子电解质沉淀→离心→上清液用高分子电解质二次沉淀，沉淀用 4mol/L C_2Cl_2 溶解，离心后上清液用 60%有机溶剂沉淀→有机溶剂洗涤→冷冻干燥。

高分子电解质 浓度单因素实验：本实验采用高分子电解质质量浓度 3%、4%、5%，按照 1: 4 的体积比（ $V_{\text{高分子电解质溶液}}: V_{\text{多糖浸提液}}$ ）添加到多糖浸提液中，以多糖得

率为指标考察高分子电解质用量对褐藻糖胶提取率的影响,选择最佳高分子电解质浓度。

氯化钙浓度单因素实验:本实验采用不同浓度氯化钙溶液反萃褐藻糖胶,按照褐藻糖胶与高分子电解质沉淀络合物体积与氯化钙溶液体积比为 2 的条件,做浓度依次为 2mol/L、3mol/L、4mol/L 的氯化钙反萃褐藻糖胶的得率情况,以多糖得率为指标考察氯化钙浓度对褐藻糖胶提取率的影响,选择最佳氯化钙浓度。

2.2.2 鲜海带中褐藻糖胶的提取

通过超声波辅助提取和水浴提取,比较不同浸提法对鲜海带中褐藻糖胶得率的影响。采取提取方法为:水浴提取、超声波提取、超声-高分子电解质辅助提取、超声-壳聚糖辅助提取。

水浴提取法:取鲜海带 500g,切碎之后再果汁机里搅成糊状,然后放进盛有 1000mL 稀盐酸的烧杯中搅拌均匀,再把烧杯置于水浴中保温,之后用两层纱布过滤,滤液调 pH,然后在 60℃, 0.1mpa 条件下旋转蒸发浓缩至体积为 300mL,浓缩液 4000r/min, 10min 离心后,上清液用有机溶剂沉淀,沉淀物在-54℃, 0.001KPa 条件下冷冻干燥 5 小时,即为褐藻糖胶粗品。

超声波提取法:设超声功率为 100%,辅助提取糖胶,然后在 60℃, 0.1mpa 条件下旋转蒸发浓缩至体积为 300mL,浓缩液 4000r/min, 10min 离心后,上清液用 60% 有机溶剂沉淀,沉淀物在-54℃, 0.001KPa 条件下冷冻干燥 5 小时,即为褐藻糖胶粗品。

超声波-高分子电解质提取法:取鲜海带 500g,切碎之后在果汁机里搅成糊状,配制 1000mL 高分子电解质溶液,用盐酸调 pH,超声功率为 100%,提取糖胶,然后在 60℃, 0.1mpa 条件下旋转蒸发浓缩至体积为 300mL,浓缩液 4000r/min, 10min 离心后,上清液用有机溶剂沉淀,沉淀物在-54℃, 0.001KPa 条件下冷冻干燥 5 小时,即为褐藻糖胶粗品。

超声波-壳聚糖提取法:取鲜海带 500g,切碎之后在果汁机里搅成糊状,配制 1000mL 壳聚糖溶液,提取糖胶,然后在 60℃, 0.1mpa 条件下旋转蒸发浓缩至体积为 300mL,浓缩液 4000r/min, 10min 离心后,上清液用 60% 有机溶剂沉淀,沉淀物在-54℃, 0.001KPa 条件下冷冻干燥 5 小时,即为褐藻糖胶粗品。

2.3 多糖含量的测定

多糖含量采用苯酚-硫酸法测定, 在文献^[47-49]基础上改进。标准曲线制作方法如下: 用电子天平准确称量在 105℃烘箱中干燥至恒重的葡萄糖 0.0400g, 蒸馏水溶解定容到 1L 容量瓶中, 配标准葡萄糖浓度为 40mg/L。取 20mL 比色管, 用 1mL 移液管分别取标样 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 (mL), 然后补蒸馏水至 1mL, 取 1mL 蒸馏水作空白, 加 6%苯酚 1mL, 漩涡搅拌器混合均匀后加浓硫酸 5mL, 静置 5min, 混匀后置 70℃水浴中保温 30min, 取出放凉至室温, 再加蒸馏水至 10mL 混匀, 490nm 下测吸光度值。得标准曲线: $y=0.0046x-0.0074$, $R^2=0.9889$ 。待测样品多糖溶液浓度配置为 100~130mg/L, 取样品液 0.5mL, 其他步骤同标准曲线制作。

2.4 结果与讨论

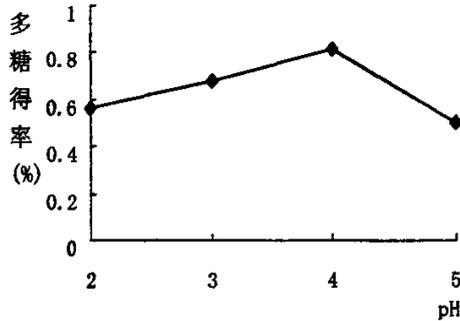
2.4.1 干海带中褐藻糖胶的提取

干海带用稀盐酸浸提, 有机溶剂沉淀和高分子电解质沉淀法分离褐藻糖胶的实验结果如下: 以多糖含量为指标, 通过 pH 值单因素实验, 温度单因素实验, 时间单因素实验和 V/M 单因素实验, 得出最佳浸提条件为 pH4.0, 温度 90℃, 时间 4 小时, V/M 为 40, 海带在同样条件下浸提两次, 所得浸提液得率为 1.3%。通过有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法初步纯化褐藻糖胶的结果如下: 有机溶剂沉淀法选择有机溶剂浓度为 60%, 高分子电解质沉淀法选高分子电解质浓度为 4%, 褐藻糖胶浸提液与高分子电解质溶液体积比为 4: 1。氯化钙浓度为 4mol/L, 氯化钙溶液体积与褐藻糖胶和高分子电解质络合物体积比为 2: 1。提取得率为 1.44%。由此可见, 高分子电解质沉淀法优于有机溶剂沉淀法。

2.4.1.1 热水酸提法条件的确定

热水酸提法是多糖提取中应用最广泛的方法, 本文热水酸提法主要研究了影响提取褐藻糖胶得率条件的单因素实验, pH(2.0, 3.0, 4.0, 5.0), 温度 (60, 70,

80, 90 (°C)), 时间 (2, 3, 4, 5(h)), V/M(20, 30, 40, 50)。图 2-1~2-4 显示了以上四个条件的实验结果, 可见同一因素的不同水平条件下的多糖得率。

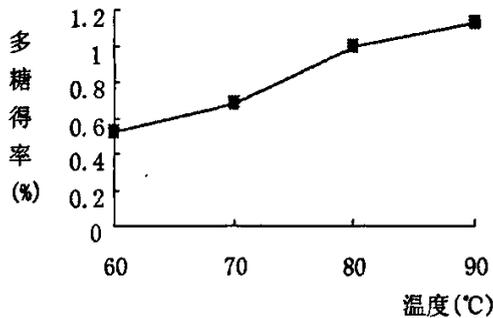


1. 图中产物提取条件为: 介质温度 70°C, 提取时间 4h, 液料体积质量比 (V/M)=40, pH(2.0, 3.0, 4.0, 5.0), 有机溶剂体积分数 60%。
2. 图中多糖得率为所测得的总糖质量 (以葡萄糖计) 占海带干基的质量百分比。

图 2-1. 多糖得率随 pH 变化曲线

Fig2-1. curve of production ratio of polysacchride changing with liquid pH

图 2-1 清晰的表达了不同 pH 值的稀酸介质浸提褐藻糖胶的得率情况。在 pH2~4 之间, 多糖得率随着 pH 值的升高而提高, 在 pH 值 4~5 之间, 得率随着 pH 值的升高略有下降。由此可知, 褐藻糖胶虽是酸性多糖, 但它在不同 pH 的酸性水溶液中的溶解度不同, 据文献^[1], 褐藻糖胶在酸性水溶液中会产生降解, 且 pH 越小, 多糖降解也越快。由本实验结果可知, 褐藻糖胶的最佳浸提液 pH=4.0。

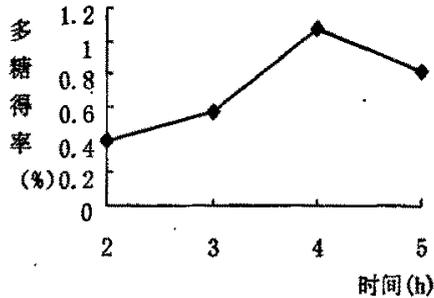


介质温度 (60, 70, 80, 90(°C)), 介质 pH=3.0、时间 4h、V/M=40, 有机溶剂体积分数为 60%

图 2-2. 多糖得率随介质温度变化曲线

Fig2-2. curves of producton ratio about polysacchride changing with temperature

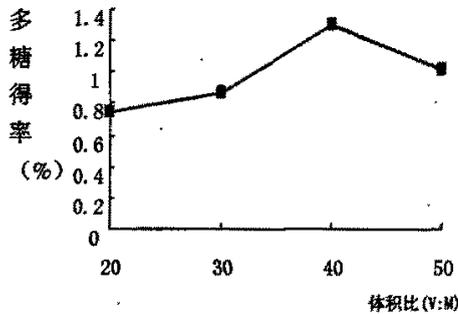
图 2-2 清晰的表达了浸提温度对多糖得率的影响。其结果为多糖得率随温度的上升而增加, 其最佳温度为 90°C, 得率为 1.13%。由此可知, 在稀酸中海带中的褐藻糖胶随着温度的升高溶出率增加。在 60~70°C 和 80~90°C 阶段, 曲线上升趋势于平缓, 提取温度为 80°C 和 90°C 时, 多糖得率增加了 0.13%。70~80°C 阶段, 曲线上升的幅度大于前两个阶段, 提取率升高了 0.32%。



时间 (2.0, 3.0, 4.0, 5.0), 温度 80℃、pH=3.0、V/M=30, 有机溶剂体积分数为 60%

图 2-3. 多糖得率随提取时间变化曲线

Fig2-3. curves of production ratio of polysacchride changing with extracting time



V/M(20, 30, 40, 50), 温度 70℃、pH=3.0、时间 4h, 有机溶剂体积分数为 60%

图 2-4. 多糖得率随介质体积的变化曲线

Fig2-4. curves of production ratio of polysacchride changing with volum of medium

图 2-3、2-4 清晰的表达了浸提时间和介质体积对褐藻糖胶浸提得率的影响。由两图可知, 褐藻糖胶提取得率随浸提时间的变化曲线和液料比(V/M)曲线非常相似, 结果是最佳提取时间为 4h, V/M 为 40。当延长提取时间和增加 V/M 比值时, 多糖得率反而下降。原因可能是随着时间的延长和稀酸体积的增加, 褐藻糖胶降解的速度也加快, 多糖损失也增多。

表 2-1. 海带浸提次数的实验结果

Tab2-1. Results of fucoidan about extraction times

	一次提取	二次提取	三次提取
多糖得率 (%)	1.13	1.28	1.281
多糖纯度 (%)	31.00	34.60	34.55

注: 1. 温度 80℃、pH=3.0、时间 4h、V/M 为 40、有机溶剂体积分数为 60%。

2. 多糖得率 (%): 所测得的多糖质量占海带干基质量的百分比

3. 多糖纯度 (%): 所测得的多糖质量占样品粗多糖的质量百分比 (以下表格相同)

海带中的褐藻糖胶是存在于海带表面和海带细胞间质的水溶性酸多糖。为了使

海带中的褐藻糖胶尽量多的溶出, 本实验通过增加海带的浸提次数来达到这一目的。表 2-1 列出了海带经不同浸提次数后褐藻糖胶的得率和纯度。由表 2-1 可知, 经第二次提取, 多糖得率比第一次增加了 0.15%, 第三次浸提, 得率增加了 0.001%, 而纯度却下降了。原因可能是随着浸提次数的增加即浸泡时间的延长, 海带中褐藻糖胶的溶出量增加了, 更多的杂质如褐藻胶, 褐藻淀粉等也不断溶出到浸提液中, 导致褐藻糖胶纯度下降。因此, 第三次浸提之后, 多糖得率虽然有所提高, 但纯度下降, 同时消耗的水量和能量也增加, 考虑到工业化生产中, 提高的产品附加值可能还没有付出的成本高, 从而失去了研究意义。所以本实验采取二次浸提法提取褐藻糖胶。

2.4.1.2 超声辅助提取法

在超声功率 100%, 其他条件和水浴提取法一致为: 温度 60℃、溶液 pH 值 4.0、V/M=40、提取时间 4 小时, 比较二者对褐藻糖胶提取得率的影响。

表 2-2. 超声波辅助提取与水浴提取实验结果

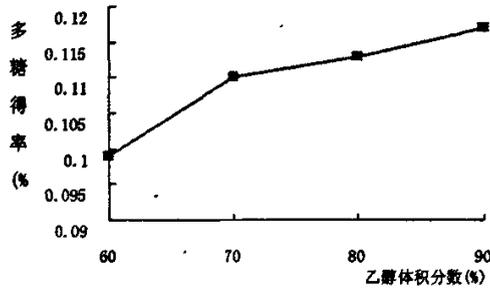
Tab.2-2. Results of production ratio of polysacchride extracted by hot -water method and assistant-ultrasonic method

项目	水浴	超声波
多糖得率 (%)	0.52	0.97
多糖纯度 (%)	22.2	36.3

超声频率 100%, 温度 60℃, pH=4.0, V/M=40, 超声时间 4h

由表 2-2 的实验结果可知, 超声波辅助提取法的多糖得率高于水浴提取法。且前者得率是后者的 1.87 倍, 纯度是后者的 1.63 倍。由此可知, 超声波能促使海带细胞间质中糖胶的溶出。由于褐藻糖胶易溶于水, 所以超声频率对褐藻糖胶的溶解有一定的辅助作用, 并且还可以减少其它杂质的溶出。所以, 超声辅助法是从干海带中提取褐藻糖胶的较理想的方法。

2.4.1.3 有机溶剂体积分数的确定



有机溶剂体积 (60%、70%、80%、90%)，温度 80℃、pH=3.0、浸泡时间 4h、V/M=40

图 2-5. 多糖得率随有机溶剂体积分数的变化曲线

Fig2-5. Curves of production ratio of polysaccharide changing with volum percents of ethanol

图 2-5 清晰的表达了不同体积分数的有机溶剂沉淀褐藻糖胶的得率情况。由上图来看，多糖得率随着有机溶剂体积分数的增加而增加，当有机溶剂浓度达到 90% 时，多糖含量最高，但是增加的幅度很小。特别是有机溶剂体积分数从 70% 提高到 90%，多糖得率只增加了 0.007%，因此可选有机溶剂体积分数为 70%~90%。为节省有机溶剂用量，本文一致用有机溶剂体积分数为 60%。

2.4.1.4 高分子电解质沉淀法条件的确定

高分子电解质沉淀法是利用阳离子型高分子电解质可以和带有硫酸根的酸性阴离子多糖络合产生沉淀的作用来分离多糖的。表 2-2、表 2-3、表 2-4 分别列出了高分子电解质沉淀法的不同实验步骤、不同高分子电解质浓度和氯化钙浓度对褐藻糖胶沉淀和反萃的试验结果。

表 2-3 中的样品 I 的实验步骤简述如下：稀酸浸提（温度 90℃，时间 4h，V/M=40）→三氯乙酸除蛋白→离心→高分子电解质沉淀多糖→离心→（上清液二次用高分子电解质沉淀）沉淀再用 C_2Cl_2 溶解→离心→上清液用有机溶剂沉淀→离心→有机溶剂洗涤→冷冻干燥。

表 2-3 中的样品 II 的实验步骤简述如下：稀酸浸提→调节 pH 至中性→离心→浓缩→有机溶剂沉淀→离心→上清液加少量三氯乙酸除蛋白→离心→上清液用高分子电解质沉淀→离心→上清液用高分子电解质二次沉淀，沉淀用 C_2Cl_2 溶解，离心→上清液用有机溶剂沉淀→离心→有机溶剂洗涤→冷冻干燥。

表 2-2. 高分子电解质沉淀法实验结果比较
Tab2-2. Results of comparison on different processes

	I	II
多糖得率 (%)	1.44	0.47
多糖纯度 (%)	45.3	26.1

由表 2-2 的实验数据可知, 高分子电解质沉淀法的实验方案 I 的总糖得率和纯度都高于实验方案 II, 由方案 I 所得产品性状分析, 第一次所得褐藻糖胶沉淀为灰褐色, 第二次用高分子电解质沉淀所得褐藻糖胶为灰白色颗粒状沉淀, 放置 10min 后沉淀转为黄褐色。5000r/min 离心后, 沉淀用蒸馏水溶解, 不易溶于水, 然后用 2mol/L N_2Cl , 4 倍体积反萃褐藻糖胶, 仍有部分多糖不溶解, 且沉淀黏着在杯壁上, 估计是盐溶液浓度小, 不足于全部置换出褐藻糖胶。方案 II 中有机溶剂沉淀后, 丙酮洗, 干燥后呈灰褐色; 二次萃取后, 有丝状白色絮状沉淀产生, 干燥后仍为白色。直接用有机溶剂沉淀所得产品为灰白色, 相比之下, 有机溶剂沉淀法脱色效果好, 而高分子电解质沉淀所得产品脱色效果不好。

这两种方案的区别在于: 方案 I 中的稀酸浸提液没有经过浓缩和有机溶剂沉淀, 因此引起多糖的损失少。首先, 浓缩可能会引起褐藻糖胶降解, 导致浓缩液中多糖减少。同时多糖浓缩液粘在浓缩的烧瓶中洗涤不出来, 也是引起多糖损失的一个原因。另外有机溶剂沉淀物中有两种颜色不一样的多糖, 其中色泽为乳白色的应该为褐藻糖胶, 另一部分为褐藻胶。另外, 方案一中没有用有机溶剂除褐藻胶, 褐藻胶中有酸性多糖组分, 因此高分子电解质就会把更多的酸性多糖沉淀下来, 在氯化钙反萃过程当中又被溶解, 从而引起方案一中多糖得率的提高。而方案 II 中多糖溶解性小, 可能是高分子电解质过量, 因此测得的多糖含量也比方案 I 低。

表 2-3. 不同浓度高分子电解质沉淀法的实验结果
Tab2-3. Precipitation results with different concentration

高分子电解质浓度 (%)	3%	4%	5%
多糖得率 (%)	1.35	1.44	1.44
多糖纯度 (%)	45	45.3	45.3

稀酸浸提→三氯乙酸除蛋白→离心→高分子电解质沉淀多糖 ($V_{\text{高分子电解质}}:V_{\text{多糖得率}}=4:1$)→离心→(上清液二次用高分子电解质沉淀)沉淀再用 C_2Cl_2 溶解 ($V_{C_2Cl_2}:V_{\text{多糖得率}}=2:1$)→离心→上清液用有机溶剂沉淀→离心→有机溶剂洗涤→冷冻干燥。

表 2-3 的数据表达了海带浸提液体积与高分子电解质溶液体积为 4:1 的基础上通过改变高分子电解质浓度对褐藻糖胶提取率的影响。由此可知, 高分子电解质添加量与酸性多糖质量有关, 由于高分子电解质的氨基与酸性多糖的硫酸基或羧基结合, 当高分子电解质过量时, 溶液中没有更多的阴离子与其络合, 因此沉淀

也不会增加。

当高分子电解质浓度为 3% 时，得率最小，可能是褐藻糖胶没有沉淀完全，高分子电解质浓度达到 4% 时，多糖得率最高，高分子电解质浓度达到 5% 时，多糖得率和纯度都没有增加，说明投加的高分子电解质已经过量。本实验选定当高分子电解质浓度为 4%，多糖溶液体积与高分子电解质溶液体积比为 4。

表 2-4. 不同氯化钙浓度反萃褐藻糖胶的实验结果

Tab2-4. Un-leaching results of fucoidan by calcium chloride with different concentration

氯化钙 (mol/L)	2	3	4
多糖得率 (%)	0.90	1.20	1.43
多糖纯度 (%)	45.0	45.3	45.3

注 I：稀酸浸提→三氯乙酸除蛋白→离心→高分子电解质沉淀多糖→离心→（上清液二次用高分子电解质沉淀）沉淀再用 C_2Cl_4 溶解→离心→上清液用有机溶剂沉淀→离心→有机溶剂洗涤→冷冻干燥。

表 2-4 的数据表达了在褐藻糖胶与高分子电解质络合物体积与氯化钙溶液体积为 2:1 的条件下通过改变氯化钙浓度对褐藻糖胶萃取率的影响。由此可知，用氯化钙溶液置换褐藻糖胶时得浓度应选为 4mol/L。当氯化钙浓度为 2mol/L 时，褐藻糖胶和高分子电解质的复合物几乎不溶解，当浓度为 2mol/L 时，褐藻糖胶与高分子电解质沉淀物仍有部分不溶解，可能是部分褐藻糖胶没有被置换出来，当浓度为 4mol/L 时，褐藻糖胶基本置换完全，但仍有很小部分褐色不溶解的块状物漂浮在溶液表面，可能是褐藻胶钙盐。由此可见，在反萃过程当中，还可以除去一部分褐藻酸，达到进一步纯化的目的。

2.4.2 鲜海带中褐藻糖胶的提取

鲜海带中褐藻糖胶的提取方法为超声辅助浸提法。提取介质分别为 0.2g/L 的高分子电解质，0.2g/L 的壳聚糖，稀盐酸溶液，有机溶剂沉淀。并与水浴提取法比较多糖得率和纯度。

表 2-5. 不同提取方法所得鲜海带中褐藻糖胶实验结果

Tab2-5. Results of fucoidan extracted from fresh kelp by different methods

项目	1	2	3	4
多糖纯度 (%)	19.05	31.16	21.42	4.72
多糖得率 (%)	0.63	2.2	0.75	0.085

注：1. 超声波+壳聚糖提取法；2. 超声波+高分子电解质提取法；3. 超声波提取法；4 水浴提取法。

表 2-5 中数据为超声波-壳聚糖溶液提取法，超声波-高分子电解质溶液提取法，超声波提取法，水浴提取法这四种方法提取鲜海带中多糖得率和纯度。通过这四组数据比较这四种方法的优劣。为了和干海带中提取的褐藻糖胶得率相比，

本文取 4 整条鲜海带切碎后均匀取样在 100℃ 条件的烘箱中干燥至恒重, 测定海带干基占鲜海带质量为 10%。表 2-5 中多糖得率即为多糖质量 (以岩藻糖计) 占海带干基的百分含量。

由以上结果可知, 这四种方法提取多糖得率和多糖纯度的大小依次为: 超声波-高分子电解质提取法 > 超声波提取法 > 超声波-壳聚糖提取法 > 水浴提取法。且超声波-高分子电解质提取法的得率远远高于其它几种方法。它是单一的超声提取率的 2.05 倍, 是壳聚糖+超声波提取法的 2.18 倍, 是水浴提取法的 4 倍。因此, 以高分子电解质溶液作浸提介质, 得率明显提高, 而且多糖含量也会增加, 其纯度达到 31.16%。可能是因为高分子电解质作为一种表面活性剂可促进褐藻糖胶在水中的溶解。而壳聚糖的加入与单一超声波提取法相比, 得率反而下降, 这说明壳聚糖浸提液不利于褐藻糖胶的提取。原因可能是多糖在稀酸中的溶解度有限, 而它的存在降低了褐藻糖胶的溶解度, 另外, 由加入壳聚糖的提取液浓缩后产生的块状沉淀物可知, 褐藻糖胶可被壳聚糖沉淀下来。单一超声波提取与水浴提取相比, 前者的提取得率是后者的 1.94 倍。由此可见, 超声破碎对海带细胞间质褐藻糖胶的溶出有很大的辅助作用, 所以, 超声提取法优于水浴提取, 且超声提取+高分子电解质浸提更有利于褐藻糖胶的提取。

干海带在相同条件下, 多糖得率为 0.32%, 纯度为 28.10%, 而鲜海带在同样条件下的提取得率为 0.75%, 纯度为 21.42%。由此可知, 从鲜海带中提取褐藻糖胶比从干海带中提取褐藻糖胶得率高。原因可能是干海带在制备过程当中, 其表面黏液 (即褐藻糖胶) 有所损失, 另外, 干海带细胞中含水量少, 加上浸泡时间有限, 即使在超声能量的作用下细胞的溶涨和破碎率也不高, 因此褐藻糖胶的溶出较少。而鲜海带的含水量在 90% 左右, 其细胞含水量充足, 再加上超声破碎, 细胞就容易被破坏, 褐藻糖胶的溶出率高, 其提取得率就高。然而, 鲜海带提取过程当中, 随着褐藻糖胶浸提率的提高, 海带中其它成分, 如褐藻胶, 蛋白质等其它成分的溶出率也增加, 因此其多糖纯度比干海带的要低。但是总的来说, 鲜海带中的提取率是干海带中的 2.3 倍, 而纯度只降低了 6.68%, 因此从鲜海带中提取褐藻糖胶比从干海带中提取有优势。会给海带加工业带来更高的经济效益, 但是其不足之处在于, 鲜海带贮存期很短, 不能持续稳定的为生产提供原材料。

2.5 小结

本章主要内容为海带中直接提取褐藻糖胶的工艺条件确定。褐藻糖胶的初步分离方法主要分两部分: 一是褐藻糖胶的浸提, 即选择合适的条件使海带中褐藻糖

胶溶出并转移到提取介质中；二是褐藻糖胶的初步分离，即把浸提液中的褐藻糖胶与其它杂质分离，得褐藻糖胶粗品。第一部分褐藻糖胶的浸提主要是用稀酸热水浸提法和超声波辅助法。原料是粉碎至粒径为 0.25mm 的干海带，通过单因素实验，研究温度、溶液 pH、溶液体积和浸提时间及浸提次数对褐藻糖胶得率的影响。另外做了超声辅助提取对褐藻糖胶浸提得率的影响，并与水浴提取法比较。第二部分褐藻糖胶的初步分离纯化主要用有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法，研究了不同的有机溶剂浓度、高分子电解质浓度和氯化钙浓度对褐藻糖胶提取率的影响。

本研究为海带工业化加工企业提高经济效益又寻找了一条新途径。另外，就鲜海带超声提取而言，提取介质中添加高分子电解质比单一超声提取得率高，可能是高分子电解质溶液有利于褐藻糖胶在介质中的溶解。而添加壳聚糖则不利于褐藻糖胶的提取，与单一超声辅助提取相比，得率反而下降，可能是壳聚糖能和褐藻糖胶结合，产生沉淀的缘故。从鲜海带中提取褐藻糖胶以及其浸提方法——高分子电解质-超声波联合浸提在国内外也没有报道。这种方法可作为提高褐藻糖胶得率的又一新方法，产物颜色洁白，粉末较细，水溶性也很好，且工艺简单，成本低，适合于工业化生产。

第三章 海带废液中褐藻糖胶的提取

目前,利用海带废渣液提取褐藻糖胶的报道很少,主要是从海带经提取碘和甘露醇之后的废液提取褐藻糖胶^[50]。为了充分利用海带化工生产过程产生的废水,本文从海带洗菜水、废钙水以及渣沥水中提取褐藻糖胶。本实验在第二章实验基础上采用高分子电解质沉淀法和有机溶剂沉淀法工艺路线提取海带化工产生过程中的渣、液中的褐藻糖胶。首先模拟海带化工生产过程的工艺路线,得到洗菜水、钙化水和渣沥水,验证这些废水中的褐藻糖胶得率是否有应用价值,然后又从山东某一海带加工厂拿来工业化过程产生的洗菜水、废钙水、渣沥水,按照同样的方法提取褐藻糖胶,比较实际生产和模拟的差别。

3.1 实验方法

3.1.1 模拟的海带加工废渣液中褐藻糖胶的提取

废渣液中褐藻糖胶的提取主要分三部分:海带洗菜水 1(海带漂洗水和海带酸泡水)中褐藻糖胶的提取;褐藻胶生产钙化水中褐藻糖胶的提取;褐藻胶生产渣沥水中褐藻糖胶的提取。整个实验的方法和步骤叙述如下:

1. 海带洗菜水 1 中褐藻糖胶的提取:

- ①用 20 倍干海带质量的自来水洗海带(均以 50g 干海带计),洗至海带表面没有泥沙为止,即为海带漂洗水。
- ②用 20 倍 1%甲醛水浸泡 4 小时,然后弃去甲醛水,再用 10 倍自来水洗静海带表面附着物,此步所得为甲醛浸泡水。目的是为了固色。经实验,从甲醛浸泡水中基本没有褐藻糖胶。
- ③用 15 倍 0.5%硫酸溶液浸泡海带 1 小时,用 12 倍自来水洗涤二次至海带表面无黏液。洗涤水即为海带酸泡水。①步所得海带漂洗水和③步所得酸泡水称为海带洗菜水 1。
- ④合并①、③步所得酸液浸泡水和洗菜水,用 1MN₂OH 调 pH,立刻有絮状沉淀产生。

⑤离心上述④得沉淀,溶于100mL ($V_{\text{蒸馏水}}: V_{\text{干海带}}=2$) 蒸馏水中,调 pH,离心除去不溶物,上清液中加入 C_2Cl_2 40mL(0.8 倍干海带计),沉淀出褐藻胶.上清液用来提取褐藻糖胶。

2. 海带钙化水中褐藻糖胶的提取:

⑥用 30 倍 ($V_{\text{NaCO}_3}: V_{\text{干海带}}=10$) 1.5% NaCO_3 溶液 $60\pm 2^\circ\text{C}$ 保温消化 3.5 小时,至消化完全。

⑦用 250 倍 ($V_{\text{自来水}}: V_{\text{干海带}}=2$) 自来水冲稀消化液,过滤得滤液。

3. 渣沥水中褐藻糖胶的提取:

⑧由⑦步所得滤液,加入 18 倍 ($V_{\text{CaCl}_2}: V_{\text{干海带}}=2$) C_2Cl_2 沉淀出褐藻胶,上清液提取褐藻糖胶。

⑨合并由⑧所得上清液和 ⑤所得上清液,加入 6 倍 ($V_{\text{高分子电解质}}: V_{\text{干海带}}=6$) 高分子电解质. 沉淀 0.5 小时。

⑩往上述⑨所得高分子电解质沉淀中加入 2.1 倍 ($V_{\text{CaCl}_2}: V_{\text{干海带}}=2.1$) C_2Cl_2 不断搅拌,溶解沉淀,离心,除去不溶物褐藻胶,上清液提取褐藻糖胶。

11. 往上述⑩所得上清液中加入有机溶剂,沉淀过夜,得褐藻糖胶。

3.1.2 海带工业化加工废液中褐藻糖胶的提取

3.1.1 章节是模拟工业化生产废渣水中褐藻糖胶的提取工艺,为进一步确认海带在实际生产过程中所得洗菜水 II、钙化水和渣沥水中褐藻糖胶的得率情况,本项目从山东某海带加工厂取得洗菜水(洗菜水和酸泡水)、废钙水和渣沥水原料。工业化海带加工流程见附录。

1. 洗菜水 II 中褐藻糖胶的提取:

洗菜水 II \rightarrow 调 pH, 沉淀 0.5h \rightarrow 离心 \rightarrow 沉淀加 5.6 倍蒸馏水 ($V_{\text{蒸馏水}}: M_{\text{干海带}}$) 溶解 \rightarrow 调 pH \rightarrow 离心 \rightarrow 上清液用有机溶剂沉淀 \rightarrow 无水有机溶剂洗涤 \rightarrow 冷冻干燥 \rightarrow 褐藻糖胶粗品。

2. 钙化水和渣沥水中褐藻糖胶的提取:

钙化水、渣沥水 \rightarrow 高分子电解质沉淀 12h \rightarrow 6000r/min, 8min 离心 \rightarrow 沉淀用 2 倍沉淀物体积 CaCl_2 溶解 \rightarrow 过滤 \rightarrow 滤液用有机溶剂沉淀无水有机溶剂洗涤 \rightarrow 冷冻干燥 \rightarrow 褐藻糖胶粗品。

3.1.3 海带碱炼液中褐藻糖胶的提取

海带碱炼液是指海带在提取褐藻胶前，将海带中含有的一定数量的碘、甘露醇、氯化钾，褐藻酸胶，褐藻淀粉，色素以及泥沙等附着物除去，再将海带切成碎块，用清水充分反复洗涤，直至附着在藻体表面的粘液洗净为止。然后用甲醛溶液浸泡和硫酸溶液浸泡，以上海带的预处理过程产生的水为洗菜水（即上述 3.1.2 章节里面的洗菜水 II）。用氢氧化钠调 pH 之后，上清液用来提碘和提甘露醇，而沉淀即为碱炼液，用来提取褐藻糖胶。

碱炼液→蒸馏水稀释至碱凝沉物体积的 7 倍→用稀盐酸调 pH 值，静置 15min →取上清，留沉淀→上清液浓缩为原体积的 1/15~1/20→5000r，8min 离心，留上清去沉淀→上清液用有机溶剂沉淀，5000r/min，8min 离心→上清液再加有机溶剂→5000r，8min 离心→无水有机溶剂洗涤→冷冻干燥 8h。

3.1.4 壳聚糖絮凝法去泥沙

实验原理：本实验主要以海带洗菜水 II 中有机溶剂沉淀物为例，研究泥沙的去除。由于在工业化漂洗海带预处理的的目的不仅在于冲洗海带表面的褐藻糖胶，同时也要把大量泥沙冲洗掉。其中，大颗粒的泥沙在洗菜水碱凝沉处理后已被除去，但是还有一些很细小的胶体状的泥沙分散体系没有除去，在有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法沉淀褐藻糖胶时，这些泥沙就会随着褐藻糖胶一起沉淀下来。特别是高分子电解质法沉淀的褐藻糖胶产品，色泽为灰褐色，经灰化之后，与褐藻糖胶直接提取法相比，灰份明显偏高。由此可知，后者产物中的泥沙含量偏高。因此，其产物中泥沙的去除是提高洗菜水所产的褐藻糖胶质量的必不可少的步骤。本文主要是从原料中把泥沙去除，具体方法采用壳聚糖絮凝法^[51-53]。由于泥沙是一种带负电荷的分散体系，而壳聚糖是一种阳离子多糖，它可沉降溶液中颗粒不溶物、污泥等带负电荷的杂质。目前，壳聚糖被认为一种环保的，用途很广的絮凝剂，常用来澄清口服液中的果胶、多糖提取液中的蛋白质、水中的污泥和重金属等杂质，达到澄清混浊液体的目的，而且它还不影响多糖提取液中的多糖含量。根据这一性质，我们可以尝试用壳聚糖来沉降洗菜水中泥沙。

实验方法：据文献，壳聚糖的分子量在 30 万~36 万之间，它的絮凝效果最好。另外，它的絮凝效果也与溶液的 pH 值、壳聚糖用量、沉降时间有关系。本实验用分子量为 30 万的壳聚糖为絮凝剂，用 1%醋酸配制浓度为 0.2g/L 的壳聚糖溶液。

做 pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0), 时间 (40min, 80min, 120min, 180min), 壳聚糖用量 (1.25mL, 2.50mL, 3.75mL, 5mL, 6.25mL, 7.50mL, 8.75mL, 10.00mL, 按 100mL30% 有机溶剂沉淀物的 3 倍稀释液计) 的单因素实验。

pH 值单因素实验: 取 5 等份有机溶剂沉降物的原液并分别稀释至 4 倍, 至每份体积为 200mL, 然后用酸度计依次调 pH; 壳聚糖溶液投加量为 5mL, 搅拌后静止 180min 后, 取上清液 1mL, 用蒸馏水稀释至 26 倍后测定 A 值; 上清液稀释 6 倍后, 测定 T 值。以洗菜水原液同等条件下稀释倍数且不投加壳聚糖的测定结果为参照, 比较投加壳聚糖前后, 上清液中多糖的损失率。在波长 400~700nm 范围内扫描, 发现在波长 420nm 条件下, T 值 (透光度) 最大。本实验以蒸馏水为空白, 在 420nm 测样品透光度, 490nm 测多糖吸光度。表 3-3 是去泥沙实验 pH 值单因素的实验结果和数据。

时间单因素实验: 用 5 个烧杯分别量取 10 等份泥沙稀释液 200mL, 其中五份调 pH 5.0, 另五份调 pH 6.0。其它方法和步骤同 pH 单因素实验。为简化实验步骤, 以透光率为指标, 测定 40min, 80min, 120min, 180min, 220min 后的溶液透光率, 筛选出最佳沉降时间。

壳聚糖投加量单因素实验: 实验方法和步骤同 pH 单因素实验, 选择壳聚糖投加量为 2.5mL, 5.0mL, 7.5mL, 10mL, 12.5mL, 15mL, 17.5mL, 20mL, 沉降时间均为 180min, 测定 T 和 A 值。

30%有机溶剂沉淀物稀释倍数实验: 壳聚糖作为一种絮凝剂, 它的絮凝效果和溶液的浓度也有关系, 本实验分别做 30%有机溶剂沉淀物原液, 3 倍稀释液和 5 倍稀释液添加壳聚糖后的絮凝效果。其他实验步骤同 pH 单因素实验。

3.2 结果与讨论

褐藻糖胶是水溶性大分子多糖, 它主要分布在海带的表面和海带细胞间质中。在海带预处理过程中要对海带进行清洗, 在褐藻胶提取过程中要消化, 钙渐等工艺处理。而大部分的褐藻糖胶都残留在处理过程产生的废渣水中。本章节就上述实验的数据结果进行陈述和讨论。主要讨论了模拟废水实验和工业化废水实验中褐藻糖胶的提取情况和洗菜水中的泥沙去除情况进行总结。

3.2.1 模拟从海带加工废水中提取褐藻糖胶的结果与讨论

海带工业化废水和模拟所得海带废水体积以其体积为基准, 计算每升废水中褐藻糖胶的提取得率 ($\text{g}_{\text{褐藻糖胶}}/\text{L}_{\text{废水}}$)。为了比较海带经工业加工提取褐藻胶后产生的废水中提取褐藻糖胶与从海带中直接提取褐藻糖胶得率, 本实验又以海带干基为基准, 计算了模拟海带加工废水中褐藻糖胶的得率 ($\text{g}_{\text{褐藻糖胶}}/100\text{g}_{\text{干海带}}$)。实验结果如表 3-1 所述。

表 3-1 模拟工业化海带加工所得废渣液中褐藻糖胶提取结果

Tab3-1. Production ratio of fucoidan extracted from waste water by simulative industrialized processes of kelp (calculating by per 1000 milliliter)

项目	①	②	③	④ (%)
得率 g/L	0.067	0.036	0.085	0.86

注: ①: 洗菜水 I, 自来水漂洗海带产生的废水和稀硫酸溶液浸泡水; ②: 废钙水, 海带消化液经钙析后产生的清液为废钙水; ③: 渣沥水, 海带消化冲稀后的海带渣用 50 倍水洗后产生的废水; ④ (%) 为从所有废水中提取褐藻糖胶占海带干基的质量百分比。

由表 3-1 的结果可知, 从模拟的工业化废渣液中提取的褐藻糖胶占海带干基的百分比为 0.86%, 而直接从干海带中提取褐藻糖胶的得率 1.44%, 前者得率是后者的 60%, 由此可见, 直接从海带中提取褐藻糖胶的得率为高。但海带经提褐藻胶后, 仍有相当大一部分的褐藻糖胶残留在废液当中, 可见这些废渣液还有一定的利用价值和开发前景。为分析不同来源废水中褐藻糖胶的提取率, 本实验分别做了洗菜水 I, 废钙水和渣沥水中的褐藻糖胶的提取。废钙水中褐藻糖胶的提取率最高, 洗菜水次之, 废钙水中最少。由此可见, 海带经漂洗和酸浸泡后, 表面的褐藻糖胶几乎都残留在洗菜水中。而海带细胞间质中的褐藻糖胶经海带消化处理之后有一部分被碱液条件下的高温处理破坏掉了, 因此, 从三种废水中提取的褐藻糖胶总的得率不高。经分析, 钙化水的体积是渣沥水的 4 倍, 而钙化水中提取的褐藻糖胶只是渣沥水中的 0.42 倍左右, 可能是用 10%氯化钙沉淀褐藻胶时一部分褐藻糖胶可能参杂在褐藻酸钙中, 影响了褐藻胶的纯度, 同时也影响了废钙水中褐藻糖胶的含量。

3.2.2 海带工业化加工废液中提取褐藻糖胶的结果与讨论

考虑到实验室模拟与工业化生产之间会存在一定的误差,为了更确切的得知海带废渣液中褐藻糖胶的提取得率,以海带加工厂生产的海带洗菜水 II、废钙水和渣沥水为原料,研究褐藻糖胶得率。表 3-2 中数据即为各种相应废水中褐藻糖胶的得率情况,以每升废水中提取褐藻糖胶计。

表 3-2. 工业化废渣液中褐藻糖胶提取得率(按 1000mL 废水中提取所得多糖质量计)

Tab. 3-2. Production ratio of fucoidan extracted from industrialized waste water(calculating by per 1000 milliliter)

项 目	洗菜水	废钙水	渣沥水
得率 g/1000mL	0.26	0.040	0.128

由表 3-2 的实验数据可知,从工业化洗菜水 II、渣沥水和钙化水中都能提取数量可观的褐藻糖胶,洗菜水 II 中提取得率最高,其次是渣沥水,废钙水中得率最低。这个结论和上述模拟的工业化废水中提取褐藻糖胶的结果一致,但是具体数值却相差很大,特别是洗菜水 II 和渣沥水中的褐藻糖胶,模拟实验分别是工业化原料中提取率的 2.8 倍和 14 倍。两者相比,还是工业化废水中褐藻糖胶的得率高。原因可能是工业化处理过程中,海带的碱消化液用自来水的冲稀倍数比模拟的要低,所以海带细胞间质中的褐藻糖胶大部分残留在渣沥水中,而钙化水中褐藻糖胶的含量就比较小。工业化海带漂洗的目的就是要把海带表面的碘、褐藻糖胶、甘露醇洗掉,以免这些杂质对提取褐藻胶的纯度有所影响,所以工业化漂洗海带比较彻底,绝大部分海带表面的褐藻糖胶都漂洗在洗菜水 II 中。而渣沥水和钙化水中残留的褐藻糖胶主要是存在与海带细胞壁和细胞间质的多糖,在海带消化冲稀过程中,这部分多糖留在冲稀液里,用氯化钙钙析之后,褐藻胶沉淀下来,上清液中还残留一小部分褐藻糖胶。这部分褐藻糖胶用高分子电解质沉淀法提取出来就是钙化水的褐藻糖胶。而细胞间质中的另外一部分褐藻糖胶主要是附着在海带表皮上的粘性物质,在海带加工的漂浮工序中,这些废渣都漂浮在冲稀液表面。把这些废渣用水稀释漂洗过之后的水就是渣沥水,而渣沥水中褐藻糖胶的含量也相当可观。

3.3.3 去泥沙的结果与讨论

3.3.3.1 pH 条件的确定

壳聚糖是酸溶性多糖，它对颗粒性不溶解物质的沉降作用与介质溶液的 pH 关系密切。本实验在尽量不破坏褐藻糖胶的基础上，通过调节适当的 pH 值，添加壳聚糖使泥沙能够较多的沉淀下来。并研究了不同 pH 值条件下添加壳聚糖对褐藻糖胶含量的影响。以上清液中的透光度为指标，衡量泥沙的去除情况。

表 3-3. pH 单因素实验透光率和吸光度测定结果

Tab.3-3.Results of pH mono factor experimentation about absorbency and transparency

pH	原液	3.0	4.0	5.0	6.0
T (%)	9.25	23	36.75	26.5	28.25
A	0.500	0.338	0.468	0.244	0.292

T (%) 为添加絮凝剂后上清液的透光度；A 为上清液中的多糖吸光度。

表 3-3 中原液是指不用稀盐酸调节 pH 值，也不加壳聚糖的 30% 有机溶剂沉淀物的 3 倍稀释液。与添加过壳聚糖的原液相比，后者的透光度明显提高，说明壳聚糖的确对泥沙有去除作用。而不同 pH 值的实验结果比较，当 pH4.0 时添加壳聚糖，溶液的透光度最大，即泥沙去除越多。而从多糖溶液吸光度数值来看，添加过壳聚糖后的溶液吸光度都比原液低，说明壳聚糖对褐藻糖胶也有吸附沉降作用。但是各个 pH 条件下实验结果相比，pH4.0 时的多糖损失最小，与原液相比损失率为 5% 左右。本选 pH=4.0 为壳聚糖沉降泥沙的最佳 pH。

3.3.3.2 时间条件的确定

壳聚糖是一种高分子多糖，它对泥沙的吸附与沉降时间也有关系。而壳聚糖在酸性水溶液中很容易降解，随着时间的延长，泥沙很可能又分散在溶液当中。所以本文研究了不同絮凝时间，溶液的吸光度和透光度变化情况。以选出最佳沉降时间。

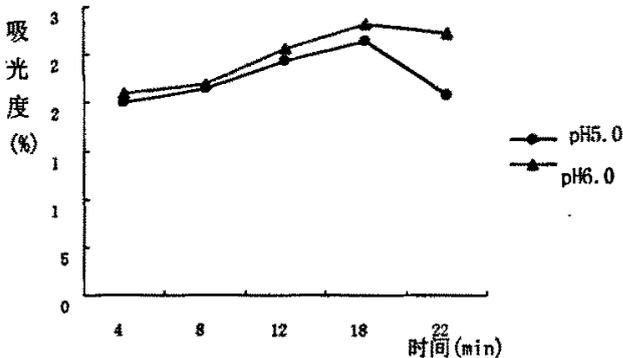


图 3-1. 溶液透光度随时间值变化曲线
Fig3-1. Curves of transparency of solution changing by time

图 3-1 的两条曲线表明了，在 pH5.0 和 pH6.0 条件下，加入壳聚糖后，透光度随着时间的延长，其吸光度变化情况。由结果可知，pH5.0 和 pH6.0 条件下，时间单因素实验的曲线图变化趋势是一致的。当时间达到 180min 时，透光度都达到最大值，这说明 180min 是壳聚糖沉降泥沙的最佳时间点。180min 以后，透光度有所下降。可能是壳聚糖 3 个小时后产生了降解，而壳聚糖分子量小于 30 万时，它的絮凝作用下降，导致泥沙又分散到溶液中。所以，本实验选择 180min 为最佳沉降时间。

3.3.3.3 壳聚糖投加量条件的确定

壳聚糖的添加量是影响泥沙去除率和褐藻糖胶得率的主要因素。添加不足会降低泥沙的去除，而添加过量又会使褐藻糖胶沉淀。为了确定最佳实验条件，观察 200mL 稀释液（3 倍稀释）中分别添加 0.2g/L 壳聚糖溶液在 2.5mL~20mL 范围内的洗菜水的 30% 有机溶剂沉淀液的吸光度和透光度变化情况，并选择透光度和吸光度最大值时壳聚糖的添加量为最佳实验条件。

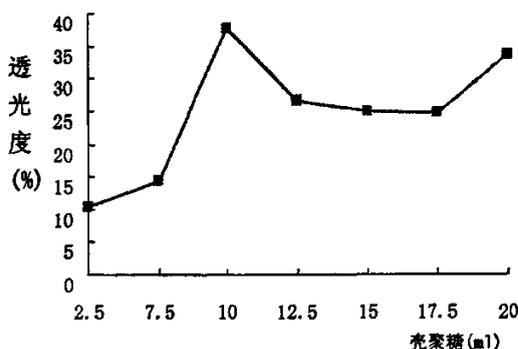


图 3-2 溶液透光度随壳聚糖添加量变化曲线

Fig3-1. Curve of transparency about solution changing with variety of chitan quantity added

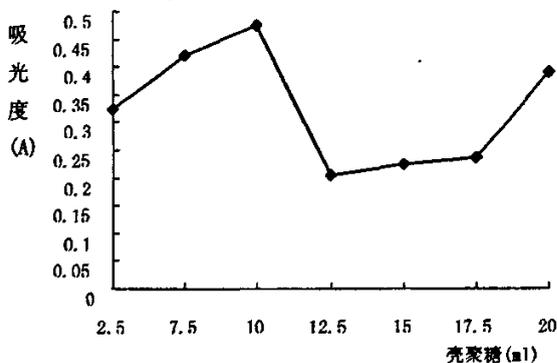


图 3-3 溶液吸光度随壳聚糖添加量变化曲线

Fig3-3. absorbency of solution changing with variety of chitan quantity added

由图 3-2 和图 3-3 所得 30% 有机溶剂沉淀物的透光度和多糖吸光度曲线可知, 当 200mL 30% 凝沉物稀释液中添加壳聚糖 10mL 时, 溶液的透光度和多糖吸光度同时达到最大值。溶液的透光度和吸光度值分别为 37.65% 和 0.475。与未加壳聚糖的洗菜水稀释原液相比, 溶液透光度明显增大, 说明杂质的去除已经达到最佳状态。吸光度值与原液相比降低 0.025, 这说明在除泥沙的过程中也不可避免的要损失掉一部分褐藻糖胶。当壳聚糖投加量为 12.5 时, 溶液透光度和吸光度都达到了最大值, 由此可以知, 过量的壳聚糖会沉降褐藻糖胶, 由于多糖也会影响溶液的浊度, 所以壳聚糖使溶液浊度增大, 随之溶液的透光度也下降。当壳聚糖继续过量时, 溶液透光度和多糖含量都有所回升, 这可能是过量的壳聚糖引起了 30% 有机溶剂沉淀物中的多糖含量。30% 有机溶剂沉淀物中不只含有泥沙, 还有一些褐藻胶等不溶性杂质, 而壳聚糖对这些杂质也有沉淀作用, 因此当添加量为 20mL 时, 溶液底部的沉淀物增多, 溶液的透光度也增大。

3.3.3.4 洗菜水稀释倍数的确定

壳聚糖作为一种絮凝剂，它的絮凝效果和溶液的浓度也有关系，本实验分别做洗菜水原液, 3 倍稀释液和 5 倍稀释液添加壳聚糖后的絮凝效果。其他实验步骤同 3.4.3.1。

表 3-4 洗菜水稀释倍数实验数据

Tab3-4.1 determination of absorbency and transparency about kelp washing water diluted

	原液	3 倍	5 倍
透光度 (%)	27.9	37.65	24.75
吸光度	0.50	0.475	0.39

由表 3-4 的实验数据可知，洗菜水稀释 3 倍之后，所得沉降结果最好，稀释倍数大于 3 倍或小于 3 倍，都不利于泥沙的去除，这可能与分散体系的分散度和分子之间的结合力有关。体系分散度大，分子间的电荷引力就减弱，不利于沉降，而分散度太小时，也不利于絮凝剂的均匀扩散。

3.4 小结

本章的主要内容是从海带加工废渣液中提取褐藻糖胶，这些废渣液包括海带洗菜水、钙化水和渣沥水。针对不同的废液，我们采取了不同的提取方法。为初步了解这些废水的褐藻糖胶得率和提取方法的可行性，模拟了工业化生产废水和褐藻糖胶的提取，然后用工业化生产废水进行褐藻糖胶的提取，证明这些废水的利用价值和确定实验工艺。经研究发现，这些废水比模拟实验所提取的褐藻糖胶更高，特别是洗菜水褐藻糖胶的含量非常可观。此结果表明把工业化废水变废为宝，为海带加工业开发新的产品生产线是一个具有实际意义和开发前景的项目。海带废钙水和渣沥水中褐藻糖胶的提取在国内外还未见报道，本项目的研究为海带加工业提高产品附加值和海带综合利用率提供了一定的理论基础和实践经验。

由于洗菜水中有大量的泥沙，在提取褐藻糖胶过程中，会把部分泥沙沉淀下来，影响到产品的性状和质量。所以，洗菜水中泥沙的去除也是非常必要的。本文以洗菜水的 30% 有机溶剂沉淀物为例，研究其泥沙的去除。根据泥沙的带电性质，可以用阳离子絮凝剂去除泥沙。为了不给产品带来杂质和污染，本实验采用天然絮凝剂分子量为 30 万的壳聚糖沉淀泥沙。以溶液透光度和多糖吸光度为指标，

经过絮凝时间、壳聚糖添加量、洗菜水稀释倍数实验, 得出壳聚糖最佳用量 3000mg/100mL ($M_{\text{壳聚糖}}/V_{\text{洗菜水}}$), 洗菜水最佳稀释倍数为 3 倍, 最佳沉降时间为 180min, 洗菜水最佳 pH 为 4.0。但是用壳聚糖去泥沙的不足之处在于褐藻糖胶的损失。因为壳聚糖是一种阳离子多糖, 在去除泥沙的同时也会把部分褐藻糖胶沉淀下去。多糖损失率为 5%。所以洗菜水中泥沙的去除是本实验的难点, 其机理和方法还有待进一步解决。

第四章 褐藻糖胶理化性质的比较

第二章和第三章中提取褐藻糖胶的原料主要为海带和海带废渣液。提取方法分别为有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法。由于提取方法和原料不同,褐藻糖胶各种成分含量也不尽相同。本章主要分析有机溶剂沉淀法从海带中直接提取、高分子电解质沉淀从海带中直接提取、海带洗菜水中提取、海带加工废钙水中提取的褐藻糖胶样品中岩藻糖含量,硫酸根含量,重金属含量,以及有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法所得褐藻糖胶的分子量。

以往关于褐藻糖胶的研究没有涉及到重金属的测定,但是岩藻多糖有吸附重金属的特性,特别是镉,铅,砷,汞。这些重金属通过水洗,浸泡,醇沉和高分子电解质沉淀等处理工艺之后,在产品中会有所残留。本实验通过测定有机溶剂沉淀法、高分子电解质沉淀法、干海带中直接提取法和海带废液中提取所得褐藻糖胶中重金属残留量考察提取方法和材料对产品中重金属含量的影响。根据欧委会法规 2001 / 22 / EC^[55]和对水产品中的铅,总汞,无机砷,镉的限量标准依次为 0.5mg/kg, 0.5mg/kg, 1.0mg/kg, 0.2mg/kg。

4.1 仪器和试剂

乌式粘度计, 721 型分光光度计, UV-2002 P C 型紫外可见光分光光度计, HY-3101 型电热恒温水浴锅, 台式 CHRIST 型冷冻干燥器(德国 Hettich 公司), GL-20G-II 型低速离心机; AgiLent1100 高效液相色谱(HPGFC), 原子化器, 石墨炉(美国 PE AanaLyst 700), 上海华光 F732-V 智能型测汞仪。无水有机溶剂, 浓盐酸, 浓硫酸, 苯酚, 三氯乙酸, 丙酮, 氢氧化钠, 硫酸钾, 浓硝酸(均为分析纯), 曙红 Y, 酪蛋白标准品, 明胶, 氯化钡, 高分子电解质, 标准岩藻糖(美国 sigma 公司, 纯度 95%)。

样品:

有机溶剂沉淀法所得褐藻糖胶: 干海带→水洗、烘干、粉碎→稀盐酸溶液提取(pH4.0, 80℃, V/M=40, 4h)→过滤→调节滤液 pH=6~7→离心→上清液浓缩至 1/5~1/8→加 10%三氯乙酸除蛋白→上清液用 30%有机溶剂沉淀→离心→上清液用 60%有机溶剂沉淀→离心→沉淀用有机溶剂洗涤→真空冷冻干燥→褐藻糖胶粗品。

高分子电解质沉淀法所得褐藻糖胶：稀酸浸提(pH=4.0, 温度 80℃, 时间 4h, V/M=40)→10%三氯乙酸除蛋白→离心→4%高分子电解质沉淀多糖→离心→(上清液二次用高分子电解质沉淀)沉淀再用 4mol/L C_2Cl_2 溶解→离心→上清液用 60% 有机溶剂沉淀→离心→有机溶剂洗涤→冷冻干燥。

洗菜水中提取所得褐藻糖胶, 钙化水和渣沥水中提取所得褐藻糖胶。

以上四种样品都经有机溶剂重沉淀进行提纯。

4. 2 测定方法

本章测定的多糖样品均为初步纯化过得岩藻多糖。其纯化工艺为：粗多糖→多糖溶解(3%多糖溶液)→离心→上清液用 70%有机溶剂沉淀→无水有机溶剂洗→冷冻干燥→褐藻糖胶纯品。

4. 2. 1 岩藻糖含量的测定^[56]

配制浓度为 1.0g/L 的标准岩藻糖溶液, 用 0.50mL 的移液管分别移取 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35mL, 用蒸馏水补齐至 0.50mL, 蒸馏水做空白。加 2.0mL 5% 苯酚, 10.0mL 浓硫酸(改进)。在漩涡振荡器上混合 1min 后, 静止 5min, 再放置 100℃水浴中恒温 15min, 取出用自来水冷却至室温, 在 620nm 处测吸光度值, 绘制标准曲线。配浓度为 1g/L 的样品溶液, 用 0.50mL 移液管移取样品液 0.30mL, 其它步骤同标准曲线制作过程。得标准曲线回归方程: $Y=0.7186x+0.1441$, $R^2=0.9964$, 计算岩藻糖含量。

4. 2. 2 硫酸根含量的测定

按文献^[57-58], 绘制硫酸根标准曲线, 得回归方程: $Y=0.0017x-0.4104$, $R^2=0.9964$, 可计算 SO_4^{2-} 含量。

4. 2. 3 黏均分子量测定

在文献^[59-60]的基础上改进, 用 0.1mol/L 的 NaCl 溶液作溶剂配制浓度为

15.3g/L (C_0) 的纯化的有机溶剂沉淀法提取的岩藻多糖溶液, 在 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下, 用乌式黏度计测定, 得回归方程: $Y=0.1194x+0.7296$, $R^2=0.9997$, 由公式 $DP=A/C_0 \times 58$ 计算聚合度。其中 $A=0.7296$, $C_0=1.5296$, 计算可得纯化的岩藻多糖平均聚合度约为 28。

配制纯化的高分子电解质沉淀法提取的褐藻糖胶样品浓度为 14.000g/L, 用乌式黏度计测定, 得回归方程为: $Y=0.0318x+1.6211$, $R^2=0.9894$ 。其中 $A=1.6211$, $C_0=1.4000$, 可得其聚合度为 67。

4.2.4 凝胶色谱法测定分子量

在文献^[61]基础上改进, 高效液相凝胶过滤色谱法 (HPGFC) 的测定条件如下: TSKG3000PW 色谱柱, 流动相为 0.1mol/LNaNO_3 , 流速为 0.5mL/min ; 示差折光检测器柱温为 30°C 。标准品为不同分子量的葡聚糖: T-1($M_w=1270$), T-2($M_w=5220$), T-3($M_w=11600$), T-4($M_w=48600$)。根据样品在 HPGFC 的峰型确定其纯度, 由标准多糖的分子量对数与保留时间求得标准曲线, 再由标准曲线及 GPC 软件计算样品分子量及其分布。

4.2.5 高分子电解质残留量的测定

按文献^[62-63]绘制标准曲线, 得标准曲线回归方程^[51]: $y=0.2265x+0.008$, $R^2=0.9990$ 。配制浓度为 3.6g/L 的样品多糖溶液, 在最大吸收波长 544nm 处, 以试剂空白为参比测量吸光度。

4.2.6 重金属含量的测定

铅的测定^[64]:

参照 GB/T5009.12-2003, 干法消化, 石墨炉法, 干燥温度为 120°C , 时间 15s; 灰化温度 600°C , 时间 20s; 原子化温度 1800°C , 时间 7s。

镉的测定^[65]:

GB/T5009.15-2003, 干法消化, 石墨炉法, 干燥温度 140°C , 时间 15s; 灰化温度 850°C , 时间 10s; 原子化温度 1650°C , 时间 5s。

总汞的测定^[66];

GB/T5009.17-2003。五氧化二钒法。测汞仪波长 253.7nm。

无机砷的测定^[67];

GB/T5009.11-2003, 银盐法。分光光度计波长 520nm。

4.3 结果与讨论

本节主要讨论有机溶剂沉淀法直接提取、高分子电解质沉淀法直接提取、海带工业加工洗菜水中提取以及废钙水中多糖含量、岩藻糖含量、硫酸根测定结果以及造成这些差别的主要原因。分子量主要测定了有机溶剂沉淀法直接提取、高分子电解质沉淀法直接提取的褐藻糖胶纯化样品。另外,对高分子电解质沉淀法提取的样品做了高分子电解质残留分析。

4.3.1 岩藻糖和总糖含量的比较

表 4-1. 四种样品的多糖和岩藻糖含量比较

Tab4-1. Comparison of total sugar and fucoidan contents of the four samples

编号	1	2	3	4
多糖含量 (%)	76.00	70.00	72.00	76.80
岩藻糖含量 (%)	35.61	36.58	35.75	34.20

注: 1. 有机溶剂沉淀法从海带直接提取得褐藻糖胶样品; 2. 高分子电解质沉淀法从海带中直接提取的褐藻糖胶样品 3. 钙化水和渣沥水(以下统称为废水)中提取的褐藻糖胶样品 4. 海带洗菜水 II 提取的褐藻糖胶样品。

表 4-1 是上述四种样品的岩藻糖和多糖含量测定结果,每个样品做 3 次平行。。由表中数据来看,样品多糖含量基本上是岩藻糖含量的 2 倍,这说明褐藻糖胶中还含有大量的其它种类单糖,如葡萄糖醛酸、木糖、半乳糖、鼠李糖等。褐藻糖胶中的主要单糖是岩藻糖,而岩藻糖是褐藻糖胶中主要的活性单糖组分。本章测定多糖和岩藻糖的主要目的是研究不同原料和提取方法对多糖纯度和岩藻糖含量的影响。多糖含量都在 70%左右,基本相差不大。其平均值按大小顺序依次排列:洗菜水 II > 海带直接提取 > 钙化水 > 高分子电解质沉淀。其中洗菜水 II 中多糖含量最高,可能是因为海带洗涤时间短,溶出的杂质少,洗菜水 II 中除了泥沙之外基本无其他杂质,因此多糖含量高。高分子电解质提取法和钙化水中提取的多糖

含量少，原因可能是高分子电解质沉淀法提取所得多糖含有高分子电解质残留和其它酸性多糖杂质和蛋白质，从而使总糖含量降低。

从岩藻糖含量分析，大小顺序依次为：高分子电解质沉淀直接提取>钙化水>有机溶剂沉淀直接提取>洗菜水 II。除了钙化水之外，其他三个样品所得岩藻糖含量基本一致，相差在 1%左右。这说明，提取原料对岩藻糖得率影响不大。从提取方法来看，经初步提纯之后，高分子电解质沉淀法所得岩藻糖含量大于有机溶剂沉淀法。

4.3.2 硫酸根含量的比较

硫酸根也是褐藻糖胶的一个重要的活性基团。硫酸根含量与褐藻糖胶的活性关系密切，表 4-2 为四个样品中硫酸根含量的测定结果。

表 4-2. 四种样品硫酸根含量测定结果

Tab4-2 Result of SO_4^{2-} content of the four samples

项目	1	2	3	4
硫酸根含量 (%)	11.33	10.80	6.90	9.10

注：1. 有机溶剂沉淀法从海带直接提取得褐藻糖胶样品；2. 高分子电解质沉淀法从海带中直接提取的褐藻糖胶样品 3. 钙化水和渣沥水（以下统称为废水）中提取的褐藻糖胶样品 4. 海带洗菜水 II 提取的褐藻糖胶样品。

由以上结果可知，硫酸根含量大小顺序依次为：有机溶剂沉淀法（原料为干海带）>高分子电解质沉淀法（原料为干海带）>洗菜水 II 提取>钙化水提取。从海带中直接提取所得褐藻糖胶的硫酸根含量都在 10%以上，且相差不大，但是有机溶剂沉淀法所得硫酸根含量还是略高于高分子电解质沉淀法。与文献[3]的硫酸根含量 10.22%相比，本文所得两个样品硫酸根含量都较高，这表明本实验方法没有破坏褐藻糖胶中硫酸基结构。按原理，高分子电解质能沉淀岩藻多糖硫酸酯，这种沉淀方法所得褐藻糖胶硫酸根含量应较高，但是在硫酸根测定实验过程中，高分子电解质沉淀的褐藻糖胶消化不完全，这可能就是造成相反实验结果的主要原因，由此可看，硫酸根测定方法还需改进。洗菜水 II 提取和高分子电解质提取的褐藻糖胶硫酸根含量相差在 2%以内。而钙化水中硫酸根与前三种样品相比，含量较低，可能是在海带加工过程当中，经过消化处理，硫酸根损失较多。

4.3.3 分子量大小的比较

本章主要考察了不同沉淀方法对到褐藻糖胶分子量大小的影响。测定了纯化的有机溶剂沉淀法样品和纯化的高分子电解质沉淀法样品多糖的粘均分子量和数均/重均分子量。表 4-3、4-4 和图 4-1、4-2 显示了两种多糖样品的粘均分子量测定结果。图 4-5、4-6 是两种样品多糖凝胶色谱法测定数均/重均分子量的图谱。

表 4-3. 纯化的有机溶剂沉淀法提取多糖的黏均分子量测定数值

Tab.4-4 Datas of mucosity-average molecular weight of fucoidan extracted by ethanol

相对浓度 C	空白	C ₀	2/3 C ₀	1/2 C ₀	2/5 C ₀
流过时间 (min)	1.4110	2.6088	2.2171	1.9638	1.8496
相对黏度 η_r		1.8489	1.5393	1.395	1.3108
增比黏度 η_{sp}		0.8490	0.5393	0.395	0.3108
比浓黏度 η_{sp}/c		0.8490	0.8089	0.7900	0.7769

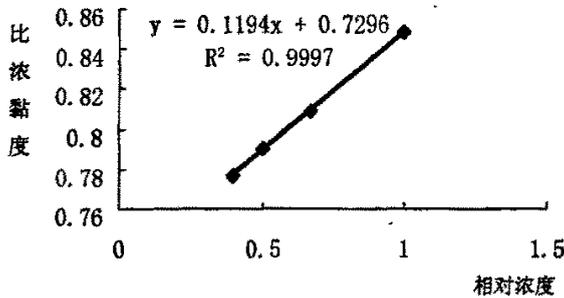


图 4-1. 纯化的有机溶剂沉淀法提取多糖的黏均分子量曲线

Fig4-4. Curve of mucosity-average molecular weight of fucoidan isolated by ethanol

表 4-4. 纯化的高分子电解质沉淀法提取多糖的黏均分子量测定数值

Tab4-4. Datas of mucosity-average molecular weight of fucoidan extracted by macromolecule electrolyte

相对浓度 C	0(空白)	C ₀	2/3 C ₀	1/2 C ₀	2/5 C ₀
流过时间 (min)	1.4110	2.9527	2.401	2.1451	1.9957
相对黏度		2.0926	1.7016	1.5203	1.4144
增比黏度		1.0926	0.7016	0.5203	0.4144
比浓黏度		1.0926	1.0524	1.0406	1.036

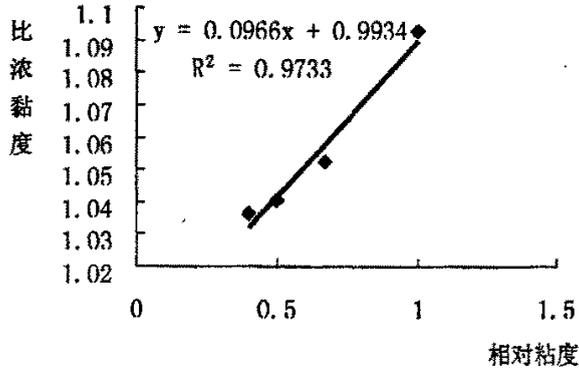


图 4-2. 纯化的高分子电解质沉淀法提取多糖的黏均分子量曲线

Fig4-5 Curve of mucosity-average molecular weight of fucoidan extracted by macromolecule electrolyte

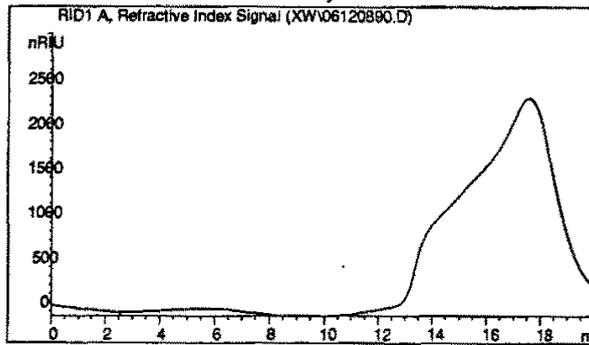


图 4-3. HPGFC 法测得有机溶剂沉淀法所得分子量的色谱图

Chart 4.3. HPGFC chromatogram of of fucoidan isolated by ethanol

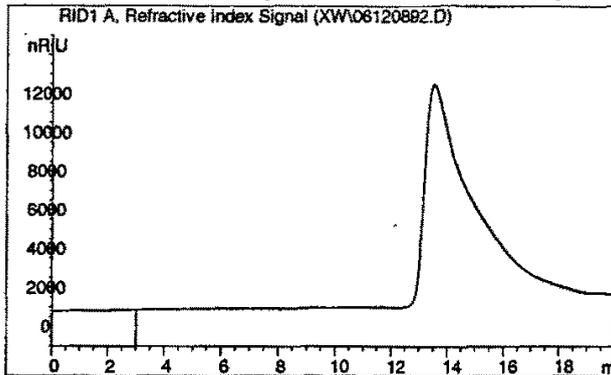


图 4-4. HPGFC 法测得高分子电解质沉淀法所得分子量的色谱图

Fig 4-6.. HPGFC chromatogram of fucoidan isolated by macromolecule electrolyte

表 4-5. 黏均分子量与数均/重均分子量的比较

Tab.4-5. Comparison of molecular weight mensurated by viscosimeter and weight-average

Tab.4-5. Comparison of molecular weight mensurated by viscosimeter and weight-average molecular/number average molecular

	粘均分子量	数均分子量	重均分子量	分散度
有机溶剂沉淀法	4597	12100	34200	2.82
高分子电解质沉淀法	11000	58800	115000	1.96

图表 4-1~4-6 可知, 有机溶剂沉淀法褐藻糖胶粘均分子量为 4597, 重均分子量为 4.2×10^4 , 数均分子量为 1.21×10^4 , 分散度为 2.82; 高分子电解质沉淀法所得的粘均分子量为 1.1×10^4 , 重均分子量为 1.15×10^5 , 数均分子量为 5.88×10^4 , 分散度为 1.96。两者所得分子量没有超过 2×10^5 ^[11]。造成结果偏低的原因可能与提取工艺有关。本实验是用热水酸提法浸提褐藻糖胶, 而高温和酸性溶液都容易引起褐藻糖胶的降解。高分子电解质法所得多糖分子量偏高, 导致分子不同的原因可能是由于高分子电解质法提取工艺过程中没有减压浓缩的过程, 引起多糖降解的程度小。另外, 高分子电解质容易和大分子量的褐藻糖胶结合。另外, 粘均分子量测定结果都偏小, 数均分子量较大, 重均分子量最大, 原因可能是褐藻糖胶本身就是一种高分子杂多糖, 由于其成分复杂, 单糖组分结构和比例不均一, 所以分子量差别也较大。但是从分散度来看, 作为高分子杂多糖, 这种偏差都比较合理。由高效液相凝胶色谱图可知: 有机溶剂沉淀法所得多糖出峰时间为 12~19.5min, 主峰在 18min 左右, 高分子电解质沉淀所得多糖的出峰时间为 13~18min, 主峰在 14min 左右, 由此可见, 前者的洗脱时间较后者长, 因此分子量也小。

由冷冻干燥所得纯化品的颜色和性状可知: 有机溶剂沉淀法所得褐藻糖胶为乳白色偏黄, 结构疏松, 粉末较细; 不含有其他外来杂质, 不影响产品性状。高分子电解质沉淀法所得褐藻糖胶为灰白色, 板结, 呈纤维状。板结的原因可能是高分子电解质和多糖络合物没有被完全置换, 高分子电解质有一定的残留量, 这是其不足之处。

4.3.4 重金属含量的比较

表 4-6~4-9 中第二列数值分别为测定铅、镉 (石墨炉原子吸收法), 总汞 (五氧化二砷法) 和无机砷 (银盐法) 时各个样品的取样量。第 3 列为样品中铅、镉、总汞和无机砷含量。

Tab4-6. determination of plumbum measurement

序号	Pb (mg/kg)
1	0.11
2	1.6
3	4.6
4	未检出

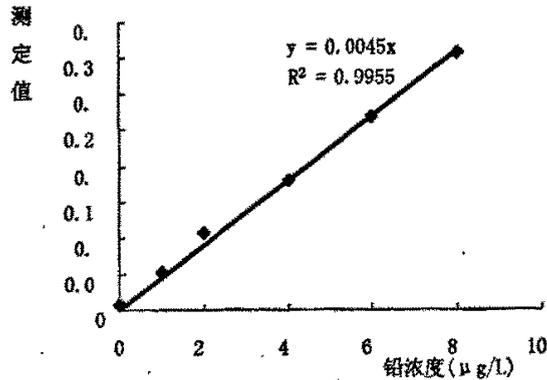


图 4-5. 铅的标准曲线

Fig4-5. Standard curve of plumbum

由表 4-6 铅含量测定结果可知, 渣沥水和钙化水中提取的褐藻糖胶铅未检出, 海带直接提取褐藻糖胶中铅含量为 0.11 mg/kg, 小于国标限定值 0.5mg/kg。洗菜水和高分子电解质提取法所得褐藻糖胶铅含量都超标, 且洗菜水超标严重, 达到 4.6 mg/kg。原因可能是海带中的铅在洗涤过程中都转移到了洗菜水中, 而钙化水和渣沥水中铅含量小。高分子电解质提取法所得褐藻糖胶的含铅量小于有机溶剂沉淀法, 原因可能是铅在有机溶剂中溶解度小, 产生沉淀的缘故。

从表 4-7 镉含量测定结果可知, 有机溶剂沉淀法(干海带为原料)、洗菜水提取、渣沥水提取所得褐藻糖胶的镉含量都未检出。高分子电解质提取法所得褐藻糖胶的镉含量为 0.14 mg/kg, 小于国标限定值 0.20 mg/kg。因此, 本实验所用原料和提取方法不会引起褐藻糖胶中镉含量超标。

表 4-7. 镉的测定结果与数据

Tab4-7. determination of cadmium measurement

序号	Cd (mg/kg)
1	未检出
2	0.14
3	未检出
4	未检出

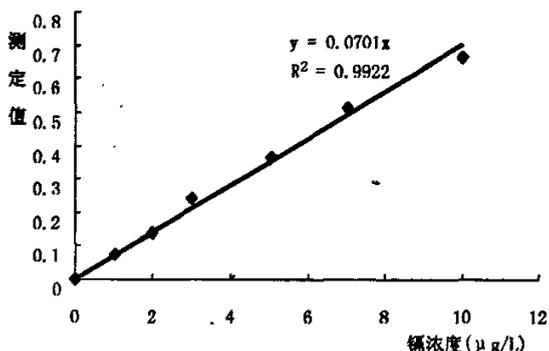


图 4-6. 镉的标准曲线

Fig4-6. Standard curve of cadmium

表 4-8. 汞的测定数据与结果

Tab 4-8. determination of hydrargyrum measurement

序号	吸光度值	Hg (mg/kg)
1	0.015	0.66
2	0.024	0.12
3	0.005	0.013
4	0.002	未检出

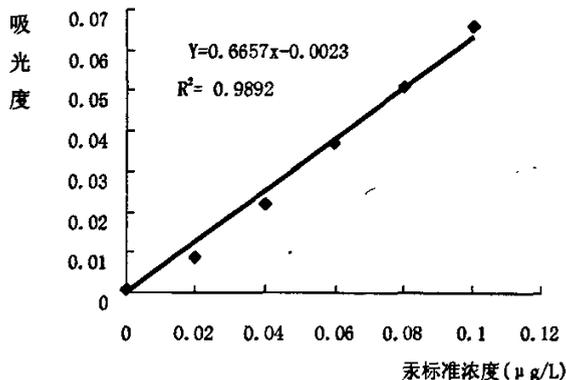


图 4-7. 汞的标准工作曲线

Fig4-7. Standard curve of hydrargyrum

从表 4-8. 总汞的测定结果可知, 除废钙水和渣沥水之外, 其他三种样品汞含量均有检出, 但与欧委会法规 2001 / 22 / EC 中汞含量 0.5mg/kg 的标准相比, 只有有机溶剂沉淀法从海带中直接提取所得褐藻糖胶的汞含量超标。原因可能是海带直接提取法的提取工艺导致汞含量超标。从海带中直接提取的褐藻糖胶是把海带粉碎后经高温酸液二次浸提所得, 浸提时间长达 8 个小时。长时间的浸泡使海带中的汞都转移到了浸提液中, 进而随有机溶剂沉淀又转移到褐藻糖胶产品中。海带洗菜水是海带经过短时间常温漂洗所得, 汞在洗菜水中的含量比较小。由此可得, 褐藻糖胶中汞含量与海带浸泡时间的长短密切相关。高分子电解质提取法

的原料和海带直接浸提法的原料都是干海带，但前者汞含量远小于后者，可能是因为汞在有机溶剂溶液里溶解度小而高分子电解质络合汞的能力很小。所以有机溶剂沉淀法不利于海带中汞的去除。

表 4-9. 无机砷测定数据与结果

Tab.4-9 determination of abio- arsenic measurement

序号	吸光度	As (mg/kg)
1	/	未检出
2	/	未检出
3	/	未检出
4	/	未检出

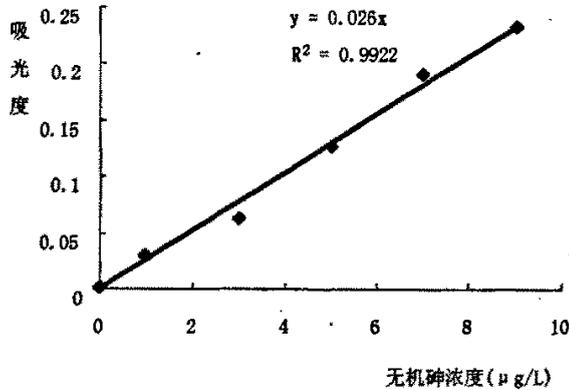


图 4-8. 无机砷标准曲线

Fig4-8.Standard abio- arsenic of hydrargyrum

由表 4-9. 无机砷的测定结果可知，这四个样品中都未有无机砷检出。原因可能是本实验原料砷含量不超标，另外可能是本实验提取工艺可以减少海带中砷在褐藻糖胶中的残留。

总之，从这四个样品的重金属测定结果可知，直接从海带中提取的褐藻糖胶铅、汞超标。从钙化水和渣沥水中提取的褐藻糖胶均未超标。这可能是废水中没有重金属残留，而洗菜水中残留较多。海带直接提取褐藻糖胶中的汞超标严重，这可能和海带的浸泡时间有关，这也是本文采用热水稀酸直接浸泡海带提取褐藻糖胶工艺的不足之处。所以，为了使褐藻糖胶中的重金属不超标，又不降低海带中褐藻糖胶的得率需在提取过程当中进行重金属的去除。高分子电解质提取法所得褐藻糖胶比有机溶剂沉淀法的铅和汞含量少，由此可知，高分子电解质沉淀法在减少重金属残留方面优于有机溶剂沉淀法。

4.3.5 高分子电解质残留量

按文献^[51-52]绘制标准曲线, 根据回归方程^[51]: $y=0.2265x+0.008$ 计算高分子电解质提取的岩藻多糖粗品和纯化后产品的高分子电解质残留量分别为 0.12% 和 0.022%。粗品中高分子电解质残留量较高, 而纯化之后残留量很小, 有的样品经纯化后几乎没有残留。由此分析, 在实验工艺过程中应进一步摸索好高分子电解质的最佳投加量, 尽量减少残留。

4.4 小结

有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法相比, 前者的总糖含量和硫酸根比后者高, 后者的岩藻糖含量比前者高。从重金属残留来看, 两者铅和汞含量都超标。但是有机溶剂沉淀法所得分子量比后者小, 有利于提取小分子褐藻糖胶。洗菜水和钙化水中提取的褐藻糖胶, 洗菜水中提取的褐藻糖胶岩藻糖含量和硫酸根含量都比较高, 但是重金属超标, 而钙化水不存在中金属超标问题。洗菜水和从海带中直接提取的褐藻糖胶相比, 基本没有很大差别, 但是产品颜色较后者深。

第五章 褐藻糖胶的吸湿性能研究

保湿剂是人们日常皮肤护理产品中的一个重要部分,用以保持角质层的水分,维持皮肤弹性,促进皮肤屏障功能的修复等作用。在皮肤科临床工作中,保湿剂有良好的治疗与辅助治疗作用。目前常用的吸湿剂有甘油,甲壳素及其衍生物,透明质酸等^[68]。然而在当今崇尚自然潮流下,多糖保湿剂倍受欢迎。特别是壳聚糖^[69-70],关于其保湿性能的研究报道已很多。褐藻胶寡糖(也称低聚褐藻胶)的保湿性还没有报道。而甘油又是一种常用的廉价的吸湿剂,因此本文以壳聚糖、低聚褐藻胶、甘油为参照,比较了本文不同提取方法所得褐藻糖胶的吸湿和保湿性能。

5.1 仪器和试剂

褐藻糖胶 1 从干海带中直接提取的样品。粗多糖提取条件为 pH4.0, 温度 90 °C, V/M=40, 4h, 二次浸提, 60%体积分数有机溶剂沉淀。纯化品由有机溶剂重沉淀制备, 具体方法参考 2.2.1 和 4.2 章节。测得粘均分子量为 4597 (以下简称有机溶剂沉淀法)。

褐藻糖胶 2 从干海带中直接提取的样品。粗多糖提取条件为 pH4.0, 温度 90 °C, V/M=40, 4h, 二次浸提, 10%三氯乙酸除蛋白, 离心, 4%高分子电解质沉淀 ($V_{\text{高分子电解质}}: V_{\text{多糖溶液}}=4$), 离心, (上清液二次用高分子电解质沉淀) 沉淀再用 4mol/L C_6Cl_2 溶解, 离心, 上清液用 60%有机溶剂沉淀, 离心→有机溶剂洗涤→冷冻干燥。纯化品由有机溶剂重沉淀制备。测得粘均分子量为 11000 (以下简称高分子电解质沉淀法)。

褐藻胶寡糖 褐藻胶用双氧水降解, 粘均分子量为 2000, 自制。

壳聚糖 分子量为 30 万, 水产大学实验室提供。

甘油、干燥器, 饱和碳酸钾溶液 (相对湿度 43%), 饱和硫酸铵溶液 (相对湿度为 81%) C_{16-18} 醇, 硬脂酸, 三有机溶剂胺, 麻油, 医用胶布

5.2 实验方法

5.2.1 单一保湿剂吸湿性能研究

将待测保湿剂试样研细成粉末，在105℃下干燥至恒重，取五个样品（每份0.5000g左右）分别精确称量至0.0001g，置于室温（16℃）条件，相对湿度（RH）为81%（饱和硫酸铵溶液）和43%（饱和碳酸钾溶液）的密闭容器中^[71]，放置4、8、24小时后测定他们的质量，以吸湿率W%为指标，评价它们的吸湿性。

$W(\%) = \frac{M_n - M_0}{M_0}$ ，式中 M_n 为吸湿后样品质量， M_0 为吸湿前样品质量。

5.2.2 单一保湿剂保湿性能研究

室温下将含水量为总体质量分数10%左右的五个样品分别置于2个密闭容器内，一个干燥器相对湿度为43%，另一个干燥器内放置有干硅胶。放置4、8、24小时后分别称重，计算水分残存率。即保湿率ME。

$ME = \frac{m_t}{m_0} \times 100\%$ ，式中 m_t 为放置时间为t时水分的质量； m_0 为放置前水分的质量。

5.2.3 膏霜中保湿剂的保湿性能研究^[72]

为了研究保湿剂在含有油基成分的乳液中的保湿性能，本实验按照膏霜配方，为简化实验影响因素，以最基本的无香膏霜为介质考察保湿剂性能。基本膏霜配方如下：

表 5-1. 膏霜配方成分表

Tab5-1. Ingredients of cream

油基	(%)	水基	(%)
C16 醇	4.60	有机溶剂胺	1.06
硬脂酸	7.34	保湿剂	1.00
麻 油	8.00	去离子水	78.00

取五份 5.000g 左右膏霜，依次加 0.0500g 左右的样品多糖，搅拌均匀后，再

依次取 0.2000g 左右的膏霜，涂在 12mm×72mm 的透气胶布上（胶布贴在玻璃培养皿内），模拟人体皮肤的吸收功能，测试保湿剂的保湿效果。

5.3 结果与讨论

5.3.1 单一保湿剂吸湿性比较

表 5-2 是五种样品的在 43%湿度环境下的吸水率数据，图 5-1 五种样品的在 43%湿度环境下相对应的吸湿率曲线。

表 5-2. 43%环境下的吸湿实验结果

Tab5-2. determination of hygroscopic ratio of the five samples under relative humidity of forty-three percents

样品	0h	4h		8h		24h	
	重量 (g)	重量 (g)	吸湿率 (%)	重量 (g)	吸湿率 (%)	重量 (g)	吸湿率 (%)
①	0.5000	0.5072	101.44	0.5096	101.92	0.5172	103.44
②	0.5112	0.5561	108.78	0.5679	111.09	0.5700	111.36
③	0.5220	0.5900	113.02	0.6067	116.22	0.6153	117.87
④	0.5097	0.5526	108.80	0.5780	113.40	0.5830	114.38
⑤	0.5370	0.5700	106.14	0.6074	113.10	0.6503	121.09

注：①褐藻胶寡糖；②壳聚糖；③褐藻糖胶 1（有机溶剂沉淀法）；④褐藻糖胶 2（高分子电解质沉淀法）；⑤甘油（本章

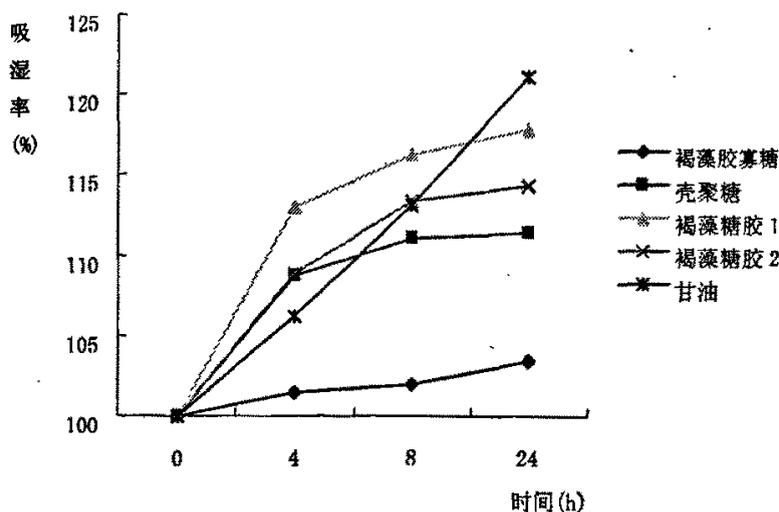


图 5-1. 43%湿度下五个样品的吸湿率曲线

Fig5-1. Hygroscopic ratio curve of the five samples under relative humidity

of forty-three percents

由表 5-2 和图 5-1 的试验数据和吸湿率曲线图可知, 在 24 小时内 43%湿度环境下, 甘油的吸湿率随着时间的延长不断增加, 且基本呈直线上升趋势, 其它四种湿剂在 8 个小时之内的吸湿性很强, 而 8 小时以后, 吸湿性逐渐趋于平缓。这四种保湿剂吸湿性大小排列顺序如下: 褐藻糖胶 1 (有机溶剂沉淀法) > 褐藻糖胶 2 (高分子电解质沉淀法) > 壳聚糖 > 褐藻胶寡糖。在 16 个小时之内, 褐藻糖胶 1 的吸湿率高于甘油, 16 个小时后, 吸湿率比甘油稍有下降, 但也仅次于甘油。综上所述, 褐藻糖胶在 43%湿度环境下的吸湿性优于其他几种多糖, 且它的吸湿性是随着分子量的减小而增加。

表 5-3. 81%湿度环境下的吸湿实验数据

Tab 5-3. Hygroscopic determination of the five samples under relative humidity of eighty-one percents

样品	0h		4h		8h		24h	
	重量 (g)	重量 (g)	吸湿率 (%)	重量 (g)	吸湿率 (%)	重量 (g)	吸湿率 (%)	
①	0.5485	0.5548	101.80	0.5655	103.09	0.6003	109.44	
②	0.4989	0.5533	110.90	0.5629	112.82	0.5691	114.07	
③	0.4800	0.5648	117.66	0.5754	119.87	0.5931	123.56	
④	0.5181	0.5864	113.18	0.6137	118.45	0.6486	125.18	
⑤	0.5215	0.5795	111.12	0.6280	120.42	0.7183	137.73	

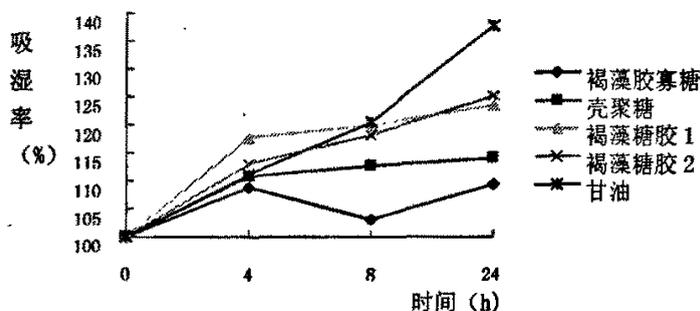


图 5-2. 81%湿度下五个样品的吸湿率曲线

Fig5-2. Hygroscopic ratio of the five samples under relative humidity of Eighty-one percents

由表 5-3 是五种样品的在 81%湿度环境下的吸水率数据, 图 5-2 是五种样品的在 81%湿度环境下相对应的保湿率曲线。五种保湿剂的吸湿性分两个阶段, 8 小时之内, 吸湿性大小排列顺序如下: 褐藻糖胶 1 (有机溶剂沉淀法) > 甘油 > 褐藻糖胶 2 (高分子电解质沉淀法) > 壳聚糖 > 褐藻胶寡糖。8 小时以外, 吸湿性大小改变为: 甘油 > 褐藻糖胶 2 > 褐藻糖胶 1 > 壳聚糖 > 褐藻胶寡糖。其中褐藻糖胶 1 的吸湿性仍略高于褐藻糖胶 2。12 小时以后, 褐藻糖胶 2 的吸湿性略高于褐藻糖

胶 1。说明 12 小时以后，两者吸湿性趋于饱和，且吸湿性基本上一致。

褐藻糖胶是一种水溶性的高分子天然提取物，而且还有消炎杀菌的作用，所以可作为一种新型高效保湿剂代替甘油。

5.3.2 单一保湿剂保湿性比较

表 5-4. 43%环境下保湿率实验数据

Tab5-4. determination of water prevention ratio under relative humidity of forty-three percents

样品	0h		4h		8h		24h	
	水分含量 (g)	含水量 (%)	水分含量 (g)	保湿率 (%)	水分含量 (g)	保湿率 (%)	水分含量 (g)	保湿率 (%)
①	0.0601	10.67	0.0588	98	0.0542	90	0.0448	74
②	0.0603	10.78	0.0617	102	0.0560	92	0.0515	85
③	0.0588	10.60	0.0682	115	0.0749	127	0.0839	142
④	0.0527	9.74	0.0578	109	0.0652	123	0.0706	133
⑤	0.0576	10.33	0.0612	106	0.0678	117	0.0829	143

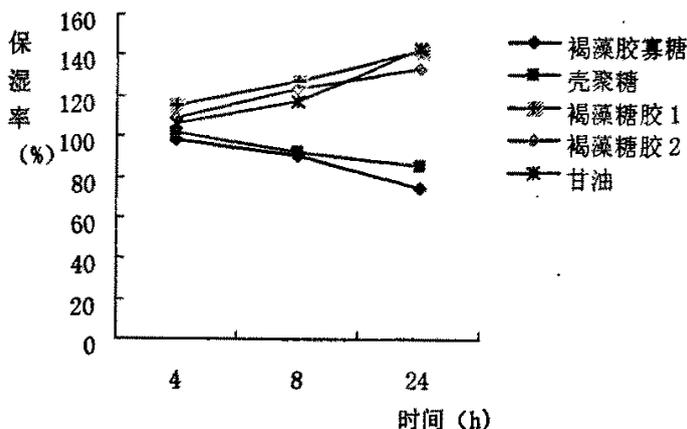


图 5-3.43%湿度下五个样品的保湿率曲线

Fig5-3. Water prevention ratio curves of the five samples under relative humidity of forty-three percents

表 5-4 是五种样品在 24 小时之内 43%湿度环境下的保湿率数据，图 5-3 是相对应的保湿率曲线。由图可知，在 24 小时之内含水量 10%左右的单一保湿剂在 43%湿度环境下的保湿率保湿性能大小顺序如下：褐藻糖胶 1（有机溶剂沉淀法）>褐藻糖胶 2（高分子电解质沉淀法）>壳聚糖>褐藻胶寡糖。与甘油相比，壳聚糖和褐藻胶寡糖的效果都不甚理想，24 小时之后处于失水状态。褐藻糖胶 1，褐藻糖胶 2 和甘油都处于吸湿状态，且褐藻糖胶 1 的保湿性优于甘油；褐藻糖胶 2 的保湿率在 12

小时之内高于甘油, 12 小时之后的保湿性有所下降. 由此可知, 褐藻糖胶是一种优良的保湿剂. 即使在湿度相对较小的环境中还可以从外界吸取水分。

表 5-5 密闭干燥环境中样品保湿率数据

Tab 5-5. Water prevention ratio of the five samples under Sealed desiccator

样品	0h		4h		8h		24h	
	水分含量 (g)	含水量 (%)	水分含量 (g)	保湿率 (%)	水分含量 (g)	保湿率 (%)	水分含量 (g)	保湿率 (%)
①	0.0541	9.59	0.0409	75	0.0330	60	0.0218	40
②	0.0481	10.58	0.0335	69	0.0186	38	0.0055	11
③	0.0523	9.3	0.0624	119	0.0642	122	0.0576	110
④	0.0523	10.56	0.0492	94	0.0477	91	0.0392	74
⑤	0.0541	9.85	0.0552	102	0.0556	102	0.0479	88

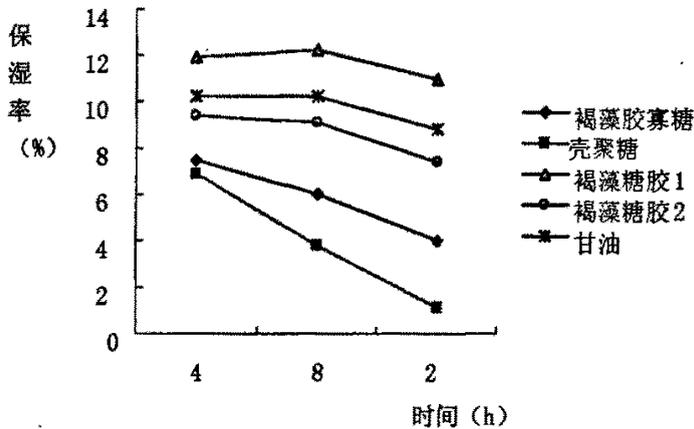


图 5-4. 五个样品在干硅胶干燥器中的保湿率曲线

Fig5-4. Water prevention ratio curves of the five samples under Sealed desiccator

由图表 5-4 可知, 在干燥环境中, 这五种保湿剂的保湿性差别非常明显。他们的保湿率大小排列为: 褐藻糖胶 1 (有机溶剂沉淀法) > 甘油 > 褐藻糖胶 2 (高分子电解质沉淀法) > 褐藻糖胶寡糖 > 壳聚糖。褐藻糖胶的保湿性是最好的, 明显高于甘油, 褐藻糖胶 2 的保湿性次之。所以, 褐藻糖胶不仅适合用于较湿环境下应用, 更适合用于干燥环境。

5.3.3 保湿剂在膏霜中保湿性比较

表 5-6. 五种膏霜在干硅胶干燥器里 24h 后的保湿率实验结果

Tab 5-6. Water prevention ratio of the five kinds of cream

under Sealed desiccator after 24 hours

样品	0h		24h	
	水分含量 (g)	含水量 (%)	水分含量 (g)	保湿率 (%)
0	0.1579	79	-0.0030	-1.8
①	0.1582	79	-0.0015	-0.9
②	0.1581	79	-0.0004	-0.25
③	0.1585	79	0.0023	1.4
④	0.1582	79	0.0006	0.37
⑤	0.1582	79	0.0035	2.2

由表 5-6 可知, 在有干硅胶的干燥器密闭环境下, 以不添加保湿剂的膏霜做参照, 五种添加保湿剂的失水率比参照品失水率小。这说明保湿剂还是有一定的保湿效果。这五种保湿剂的保湿大小顺序依次为: 甘油 > 褐藻糖胶 1 (有机溶剂沉淀法) > 褐藻糖胶 2 (高分子电解质沉淀法) > 褐藻胶寡糖 > 壳聚糖。其中添加褐藻胶寡糖和壳聚糖的膏霜保湿率呈负值, 是一种严重失水的现象, 失去的这一部分是十六醇和硬脂酸反应生成, 可见他们在膏霜中的应用效果很差。

表 5-7. 五种膏霜在 43% 湿度下保湿率

Tab 5-7. Water prevention ratio datas of the five five kinds of cream

under relative humidity of forty-three percents after 24 hours

样品	0h		24h	
	水分含量 (g)	含水量 (%)	水分含量 (g)	保湿率 (%)
①	0.1607	79	-0.010	-6.2
②	0.1588	79	0.0019	1.1
③	0.1591	79	0.0060	3.7
④	0.1603	79	0.0008	0.49
⑤	0.1596	79	0.0010	0.6

由表 5-7 可知, 在 43% 湿度环境下, 五种保湿剂在膏霜中保湿率大小为: 褐藻糖胶 1 (有机溶剂沉淀法) > 壳聚糖 > 甘油 > 褐藻糖胶 2 (高分子电解质沉淀法) > 褐藻胶寡糖。可见在有干硅胶的干燥器中保湿剂的失水率高于在 43% 环境下的失水率。另外, 在干燥环境中, 褐藻糖胶的保湿率不如甘油, 但是比其它几多糖的保湿率都好。

5.4 小结

由单一保湿剂的吸湿性和保湿性研究可知, 褐藻糖胶的吸湿性和保湿性优于壳聚糖和褐藻胶寡糖。不同提取方法所得褐藻糖胶相比, 有机溶剂沉淀法所得褐藻糖胶吸湿性更好, 特别是在 43% 环境中, 吸湿性比甘油好。而高分子电解质沉淀

法的褐藻糖胶更适合用在高湿度环境下，它做为吸湿剂可以替代甘油。有机溶剂沉淀法所得褐藻糖胶无论是在干燥环境中还是在 43%湿度环境下的保湿率都比其他几种多糖高，但比甘油低，而干燥的密闭环境，膏霜中保湿性实验结果却和单一保湿性结果相反，这可能是膏霜中的复杂成分影响所致。甘油在膏霜中可形成油包水状态，比褐藻糖胶保水性好。

本实验比较了有机溶剂沉淀法和高分子电解质沉淀法所得的两种褐藻糖胶的保湿性。得出结论是有机溶剂沉淀法的糖胶保湿性更好些。总之，本研究又发现了褐藻糖胶的另一应用价值——可作为一种天然高效吸湿剂。

参考文献

- [1] ChizhovAO, DellaMomsHR, et al. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*[J]. *Carbohydr Res.*1999,320: 110.
- [2] Bilan M I, Grachev A A, Ustuzhanina N E. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C Ag[J]. *Carbohydr Res.*2002,337:719
- [3] 纪明侯, 著. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 320~334.
- [4] 陈慧玲, 史锋. 褐藻糖胶的药理作用及机制的研究进展[J]. *中国新药与临床杂志.* 2005, 24(6): 487.
- [5] Nishino T, Nagumo T. Sugar constituents and blood—anticoagulant activities of fucose—containing sulfated polysaccharides in nine brown seaweed species[J]. *日本农艺化学会.*1987,61(3):361-363.
- [6] Kitamura K, Matsuo M, Yasui T. Fucoidan from brown seaweed *Laminaria angustata* var *longissima*[J]. *Agric Biol Chem.*1991,55(2): 615-616.
- [7] Dobashi K, Nishino T, Fujihara M, et al. Isolation and preliminary characterization of fucose—containing sulfated polysaccharides with blood—anticoagulant activity from seaweed *Hizikia fusiformis*[J]. *Carbohydr Res.*1989, 194: 315—320.
- [8] Duarate M, Cardoso M, Nosedá M, et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*[J]. *Carbohydr Res.*2001, 333: 281-293.
- [9] 程忠玲, 王松. 褐藻糖胶及其胶原复合物的体外抗凝血活性研究[J]. *功能高分子学报.*2003, 16(4): 557-560.
- [10] 彭波, 项辉, 赵金华, 等. 褐藻多糖硫酸酯影响血小板聚集及血栓形成[J]. *中山大学学报论丛.*2002,22(1): 236-240.
- [11] Ponce NMA, Pujel CA, Damonte EB, et al. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies[J]. *Carbohydr Res.*2003,338:153-165.
- [12] 李凡, 田同春, 右艳春, 等. 褐藻糖胶体外抗病毒作用研究[J]. *白求恩医科大学学报.*1995, 21(3): 255—257.
- [13] 施志仪, 郭亚贞, 王糙. 海带褐藻糖胶的药理活性[J]. *上海水产大学学报.*2000, 9(3): 268-271.
- [14] 王文涛, 周金黄, 邢善田, 等. 海藻硫酸多糖对正常及免疫低下小鼠的免疫调节作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志.*1994, 8(3): 199-202.
- [15] 杨晓林, 孙菊云, 许汉年, 等. 褐藻糖胶的免疫调节作用[J]. *中国海洋药物.*1995, (3): 9-13.
- [16] 宋剑秋, 徐誉泰, 张华坤. 海带硫酸多糖对小鼠腹腔吞噬细胞的免疫调节作用[J]. *中国免疫学杂志.*2000,16: 70.
- [17] Usui T, Asari K, Mizuno T. Isolation of highly purified fucoidan from *Eisenia*

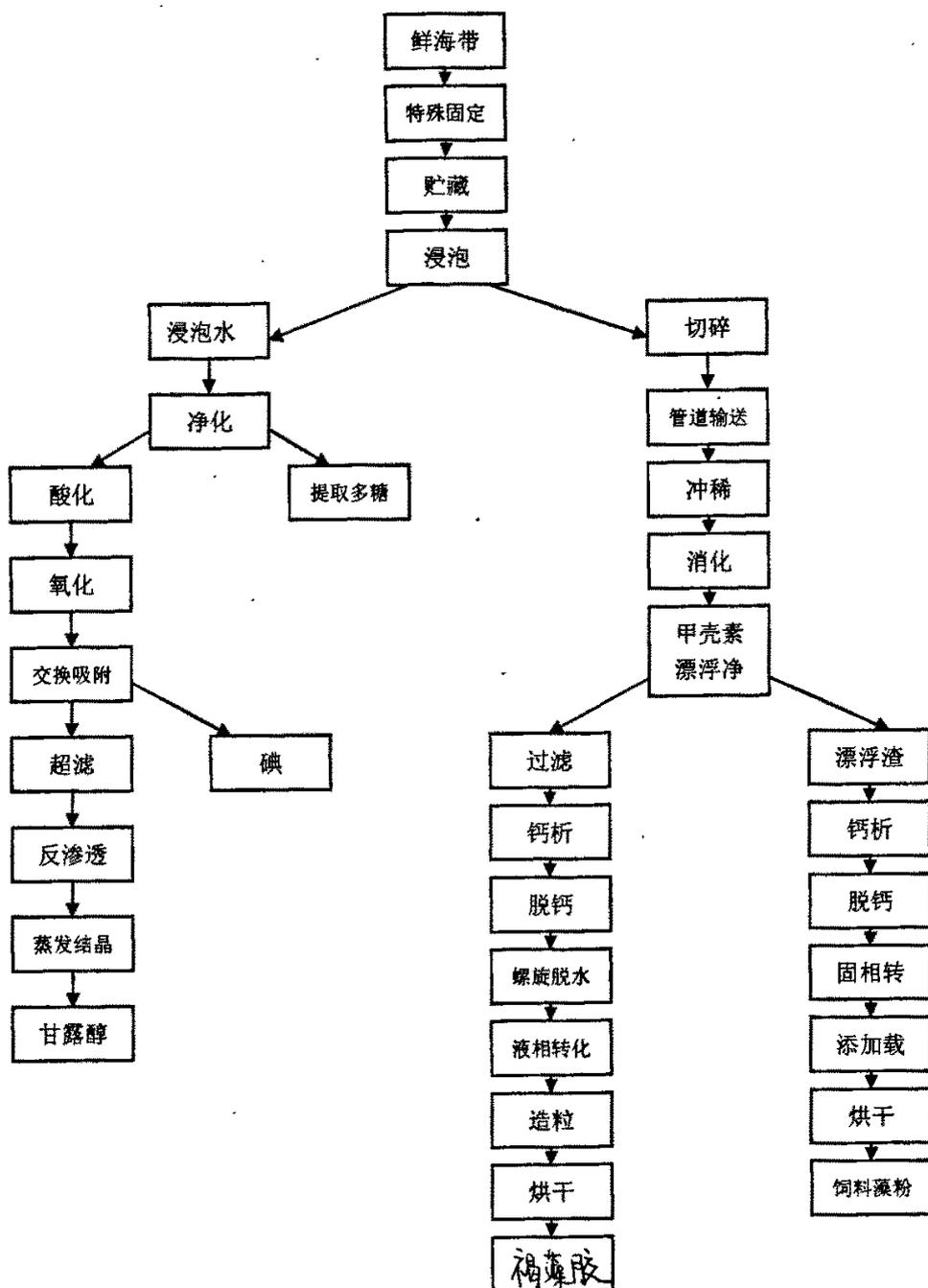
- bicyclics and its anticoagulant and antitumor activities[J]. *Agric Biol Chem.*1980, 44(8): 1965-1966.
- [18]李德远,徐战,张声华. 海带岩藻糖胶对小鼠的高胆固醇血症防治作用[J]. *食品科学.*1999, (1): 45-46.
- [19]王素贞,毕爱芳. 褐藻糖胶治疗动脉粥样硬化临床观察[J]. *康复与疗养杂志.*1994, 9(4): 173—174.
- [20]李兆杰,薛长湖,林洪,等. 岩藻聚糖硫酸酯降血脂及抗氧化作用的研究[J]. *营养学报.* 1999, 21(3): 280-283.
- [21]樊文乐,武文杰. 褐藻糖胶的提取方法[J]. *中国食品添加剂.*2005(5):104.
- [22]刘单凤,衣守志,武文洁. 海带中褐藻糖胶提取方法评述[J]. *天津科技大学学报.*2004, 19(4):24
- [23]刘青梅,杨性民. 采用微波技术提取紫菜多糖的工艺研究[J]. *农业工程学报.*2005, 21(2):153~156
- [24]廖建民,张瑾,沈子龙. 超声波法提取海带多糖的研究[J]. *药物生物技术.*2002, 9(3): 157.
- [25]周军明,崔艳丽,毛建卫. 超声波辅助法提取褐藻糖胶活性成分优化研究[J]. *氨基酸和生物资源.*2005, 27(4):75.
- [26]王谦,黄猛. 气升式反应器超声破碎海带提取硫酸酯多糖[J]. *过程工程学报.*2001, 1(1):59.
- [27]郑军,王英等. 褐藻糖胶的提取纯化及其抗凝血活性的研究[J]. *分子科学学报:中英文版.*2002, 18(2):110.
- [28]鞠国泉,李敬. 海带中褐藻糖胶的提取及其对自由基清除能力的研究[J]. *食品研究与开发.*2006, 28(2):153.
- [29]钱风云,傅德贤. 海带多糖功用研究进展[J]. *精细与专用化学品.*2003, 11(7):12
- [30]张华,孙婕,邹春红. 低分子量岩藻多糖的生产途径及药理用途[J]. *中国甜菜糖业.*2006, (4):32.
- [31]蔡敬民,秦松,吴克等. 微生物酶法制备低分子量岩藻多糖工艺. 中国. C08B37/04(有机物;糖类), CN03112609. X, 2003-01-02.
- [32]钟红茂,赵迪,刘锡金等. 一种海藻多糖制品及其制备方法和用途. 中国 C08B37/04(有机物;糖类). CN01114603. 6, 2001-04-05.
- [33]薛长湖,蔡跃飘,李兆杰等. 一种岩藻聚糖硫酸酯低聚糖的制备方法. 化学;冶金. CN03111833. X, 2003-01-15.
- [34]王琪琳,曲爱琴. 海带硫酸多糖的降解、分离纯化及理化性质分析[J]. *药物生物技术.*2004, 11(5):316~320
- [35]Maria I.Bilan,Alexey A.Grachev,Nadezhda E.Ustuzhanina,etc.A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L.[J].*Carbohydrate Research.*2004(339):511~514.
- [36]Kausik Chattopadhyay, Utpal Adhikari, Patrice Lerouge,ect.Polysaccharides from

- Caulerpa racemosa*: Purification and structural features[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007(68) 407~415.
- [37] Collic S. Fischer A. M. Tapon-Breaudiere J. , Boisson C. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 2(10):2~5.
- [38] Krishnan Hajela, Rajeev Kayestha, Sumati. Carbohydrate induced modulation of cell membrane: II. Spin label study of fluidity changes in peripheral blood lymphocyte membrane[J]. *FERS, Letters*, 1996(380):165~168.
- [39] Collic., Fischer A. M., Tapon-Breaudiere J., ect. Anticoagulant Properties of a fucoidan fraction[J]. *carbohydrate*, 2004(4):231.
- [40] Maria I. Bilan, Alexey A. Grachev, Alexander S. Shashkov, ect. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L[J]. *Carbohydrate Research*, 2006(341):238~245.
- [41] L.-E. Rioux, S.L. Turgeon, M. Beaulieu. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007(xxx):2~4.
- [42] Nazarenko, ect. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 320:123~131.
- [43] Lih-Shiuh Laia, Don-Han Yangb. Rheological properties of the hot-water extracted polysaccharides in *Ganoderma lucidum*[J]. *Carbohydrate Res.* 2007, 21:739
- [44] 伍志春, 房燕丽等. 季铵盐萃取剂从水溶液中萃取褐藻糖胶[J]. *高技术通讯*, 2001, 11(8):35.
- [45] 伍志春, 赵兵. 褐藻糖胶的萃取与反萃[J]. *过程工程学报*, 2001, 1(3):278.
- [46] 伍志春, 赵兵等. 溶剂萃取法从褐藻浸提液中分离提取褐藻糖胶[J]. *过程工程学报*, 2002, 2(2):129
- [47] 彭秧锡, 彭月明. 苯酚-硫酸分光光度法测定玉竹中的多糖含量[J]. *化学分析计量*, 2006, 15(5):30
- [48] 汲晨锋, 季宇彬, 吴涛. 羊栖菜多糖含量测定及多糖组分分析[J]. *世界科学技术:中医药现代化*, 2006, 8(5):50
- [49] 徐斌, 董英, 林琳等. 改良苯酚-硫酸法测定苦瓜中多糖含量[J]. *食品科技*, 2005(7):80.
- [50] 陈婉珠, 芮汉明, 张玲. 海带的工业化应用[J]. *食品与药品*. 2006, 8(08):70
- [51] 陆娴婷, 俞成. 壳聚糖在环保中的应用研究进展[J]. *杭州电子科技大学学报*, 2006, 26(6)
- [52] 郝月, 张晶, 杨翔华, 洪新. 利用壳聚糖预处理高浓度味精废水[J]. *水资源保护*, 2006, 22(6):52.
- [53] 李凤. 不同澄清剂澄清红葡萄酒效果比较[J]. *广西轻工业*, 2006, 22(6):6
- [54] 尹军, 焦畅, 霍玉丰等. 新型絮凝剂在污水处理和污泥脱水中的应用[J]. *吉林*

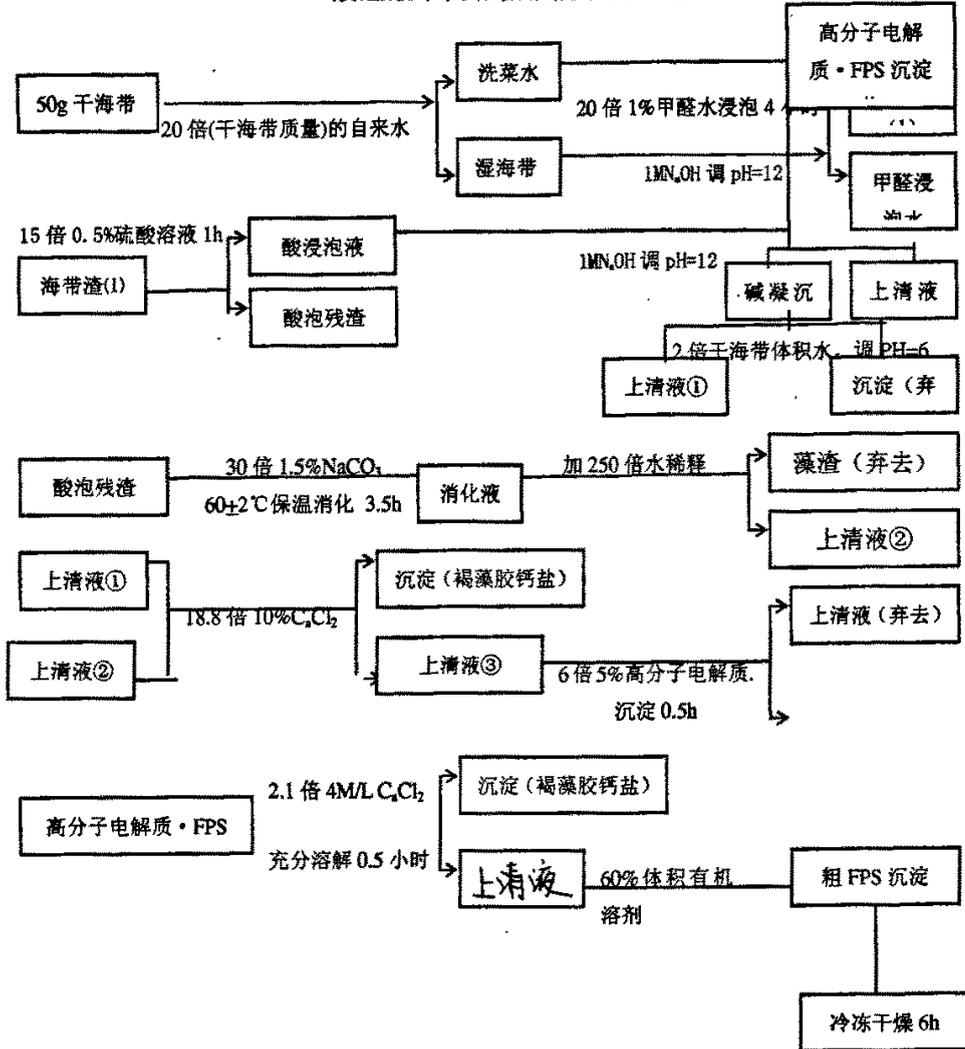
- 建筑工程学院学报, 2006, 23(4):15.
- [55] 中华人民共和国农业部. NY5073-2001, 无公害食品 水产品中有毒有害物质限量. 北京: 中国标准出版社: 2001
- [56] 杨勇杰, 姜瑞芝, 陈英红等. 苯酚-硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. 中成药, 2005, 27(6):707.
- [57] 从建波, 王长振, 李妍等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定-硫酸钡比浊法研究[J]. 解放军药学学报, 2003, 19(3):182.
- [58] 从建波, 王长振, 李妍等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定-硫酸钡比浊法研究[J]. 解放军药学学报研究, 2003, 19(3).
- [59] 赵中华, 孙海川. 一点法测定羧甲基壳聚糖的特性粘度[J]. 海洋水产科学, 2002, 23(3):42.
- [60] 李豪, 王昌军. 关于聚合物分子量的统计意义及其表达[J]. 长江大学学报(自科版), 2006, 3(3):48~49.
- [61] 王菲菲, 赵霞. 低聚古罗糖醛酸数均分子量测定方法的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(B05):76.
- [62] 秦宗会, 谭蓉. 曙红 Y 分光光度法测定阳离子表面活性剂及其机理研究[J]. 分析实验室, 2006, 25(10):113
- [63] 张莉, 王聪, 王红艳. 曙红 Y 与 CTMAB 非共价作用机理的研究及应用[J]. 理化检验:化学分册, 2005, 41(11):803.
- [64] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009. 12—2003[S], 食品中铅的测定方法. 北京:中国标准出版社. 2003.
- [65] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009. 15—2003[S], 食品中镉的测定方法. 北京:中国标准出版社. 2003.
- [66] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009. 17—2003[S], 中华人民共和国国家标准 食品中总汞的测定方法. 北京:中国标准出版社. 2003.
- [67] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009. 11—2003[S], 食品中砷的测定方法. 北京:中国标准出版社. 2003.
- [68] 施昌松, 崔凤玲, 张洪广. 化妆品常用保湿剂保湿吸湿性能研究[J]. 日用化学品科学. 2007, 30(1):26-27.
- [69] 李欣, 易军鹏. 壳聚糖及其衍生物的制备和保湿吸湿性能评价[J]. 河南化工. 2004, 3: 23
- [70] 邵志会, 汪琴, 王爱勤. N-羧丁基壳聚糖的吸湿性和保湿性[J]. 应用化学. 2002, 19(11):23-25.
- [71] 夏永梅, 章克昌. 生物制品与壳聚糖及其在膏霜中的保湿性能评价[J]. 日用化学工业, 2001, 31(6):49.
- [72] 董银卯, 刘宇红. 芦荟保湿性能的研究[J]. 日用化学工业, 2001, 31(6):57.

附录

海带加工流程图



废渣液中褐藻糖胶提取流程图



公式 1: SO_4^{2-} 含量 (%) = $m_1 \times v_1 \times n / (c \times v_2) \times 100\%$ 。

公式 2: 岩藻糖含量 (%) = $m_2 \times v_1 \times n / (c \times v_2) \times 100\%$ 。

m_1 为测得的吸光度值在标准曲线上对应的硫酸根质量;

m_2 为测得的吸光度值在标准曲线上对应的岩藻糖质量;

v_1 为加入待测液的多糖体积;

n 为待测液稀释倍数;

c 为待测液浓度;

v_2 为加入待测液的多糖体积。

公式 3: 相对黏度 η_r $\eta_{r1} = T_1/T_0$, $\eta_{r2} = T_2/T_0$, $\eta_{r3} = T_3/T_0$, $\eta_{r4} = T_4/T_0$

公式 4: 增比浓度 η_{sp} $\eta_{sp1} = \eta_{r1} - 1$, $\eta_{sp2} = \eta_{r2} - 1$, $\eta_{sp3} = \eta_{r3} - 1$, $\eta_{sp4} = \eta_{r4} - 1$

公式 5: 比浓黏度 η_{sp}/C η_{sp}/C = 增比浓度/相对浓度

公式 6: 相对浓度 c $c1 = C_1/C_0$, $c2 = C_2/C_0$, $c3 = C_3/C_0$, $c4 = C_4/C_0$

C_0 为多糖初始浓度

C_1 为第一次用 0.1mol/LNaCl 稀释后浓度;

C_2 为第二次用 0.1mol/LNaCl 稀释后浓度;

C_3 为第三次用 0.1mol/LNaCl 稀释后浓度。

致 谢

本论文研究工作从选题、实验材料选取、实验过程和论文的撰写等各方面都得到了张淑平老师的帮助和倾心指导。张老师大胆的创新能力和果断的做事方式也使我耳濡目染，受益匪浅。这个过程不仅是让我能够顺利完成学业，更重要的是让我学会用科学的思维方法去思考和解决问题，不仅理论上有了提高，更重要的是动手能力和组织协调能力的提高。另外，在科研过程当中，感谢张老师给予我缺点的指正，使我无论以后在工作岗位还是在为人处事方面都有很大帮助。

在试验过程中感谢党培育老师，康永峰老师和孙涛老师对我的指导。

感谢袁国强老师，陈文君老师和毛芳老师和在试验仪器试剂使用方面给我提供的便利条件和帮助支持。

另外感谢师弟赵亮在试验过程中对我的辅助和支持。

在此，向学院所有关心和支持帮助我的老师和同学致以诚挚的敬意和感谢。