

毛蚶多糖提取及脱色工艺的优化

孙启山,唐小牛

(皖南医学院寄生虫教研室,安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 探讨毛蚶多糖的提取及脱色工艺,为毛蚶多糖开发提供理论依据。方法 采用水提法提取毛蚶多糖,硫酸-蒽酮法测定多糖含量,利用正交试验确定毛蚶多糖最优提取条件;分别采用活性炭、H₂O₂、大孔树脂对毛蚶多糖进行脱色,并探讨脱色率与多糖损失率的关系。结果 液固比为35:1(ml/g)、温度为80℃、提取时间为2 h时提取率最高,为9.20%。H₂O₂浓度为12.00%时脱色效果最好,脱色率为58.90%,多糖损失率为28.90%;活性炭添加量为0.08 g/ml时脱色效果最佳,脱色率为61.90%,多糖损失率为32.70%;大孔树脂含量为0.1 g/ml时,脱色率为66.60%,多糖损失率为27.50%。结论 毛蚶多糖热水浸提法工艺经济、简单、合理可行。

关键词:毛蚶多糖;提取工艺;正交试验;脱色

中图分类号:R343.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2019)02-0127-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2019.02.002

Optimization of extraction and decolorization of *Scapharca subcrenata* polysaccharide

Sun Qishan, Tang Xiaoni

(Department of Parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To explore the extraction and decolorization technology of polysaccharide from *Scapharca subcrenata* and provide theoretical basis for the exploitation of *Scapharca subcrenata* polysaccharide.

Methods *Scapharca subcrenata* polysaccharide was extracted by water extraction method, the content of polysaccharide was determined by anthrone-sulfuric acid method, and the optimum extraction conditions were proved by orthogonal test. Activated carbon, H₂O₂ and macroporous resin were used to decolorize the *Scapharca subcrenata* polysaccharides, and the relationship between decolorization rate and polysaccharide loss rate was explored. **Results** The optimal extraction rate was the highest (9.20%) when the ratio of liquid to solid was 35:1 (ml/g), the temperature was 80 °C, and the extraction time was 2 hours. The decolorization effect was the best when H₂O₂ concentration was 12.00%, and the decolorization rate was 58.90% and polysaccharide loss rate was 28.90%. The best decolorization effect was achieved when the added amount of activated carbon was 0.08 g/ml, the decolorization rate was 61.90% and polysaccharide loss rate was 32.70%. When the content of macroporous resin was 0.1 g/ml, the decolorization rate was 66.60% and the loss rate of polysaccharides was 27.50%. **Conclusion** The hot water extraction technology of *Scapharca subcrenata* polysaccharide is economical, simple, reasonable and feasible.

Key words: *Scapharca subcrenata* polysaccharide; extraction technology; orthogonal test; decolorization

毛蚶(*Scapharca subcrenata*)属于软体动物门双壳纲(Bivalvia)、魁蛤目、魁蛤科、毛蚶属,肉质丰富,含有丰富的天然活性成分,具有很大的食用药用价值,是重要的海洋资源,多糖就是天然活性成分之一。天然

多糖是天然产物中的一大类,又称多聚糖,是生物体重要组成部分,重要的天然产物资源之一^[1]。天然多糖有抗氧化^[2-3]、抗炎^[4]、抗肿瘤^[5-6]、抗辐射^[7]、提高免疫力^[8]等生物学功能,对治疗和预防多种疾病具有巨大

基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2018A0263)

第一作者简介:孙启山(1985-),男,在读硕士研究生,E-mail:517325230@qq.com

通信作者简介:唐小牛(1967-),男,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:天然产物与抗感染免疫,E-mail:txniu@163.com

潜力。

天然多糖最常用的提取方法主要有水浸提法、酸碱提法、超声波辅助提取法、复合酶提取法等,不同方法各有各的优缺点^[9-10]。贝类属于动物,含有大量蛋白质,所以贝类多糖提取与纯化比植物多糖困难。为了防止多糖的结构在反复提取与纯化过程中被破坏,本研究采用简单、经济且不破坏多糖结构的热热水浸提法提取毛蚶多糖^[11]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 毛蚶(产地中国扬州),丙酮、无水乙醇、萘酮、浓硫酸、双蒸水、三氯甲烷、正三醇、 H_2O_2 (试剂均为分析纯);D105 大孔树脂,10—20 目活性炭(合肥睿捷生物有限公司),考马斯亮蓝试剂盒(合肥睿捷生物有限公司)。

1.2 仪器 SHKE6000-8CE 震荡仪(美国赛默飞世尔公司)、TP-8XL 真空冷冻干燥机(美国 SP Scientific 公司)、Infinite 200PRO 多功能酶标仪、Hei-VAP HL Adv 真空旋转蒸发仪(德国德祥科技有限公司)、J-26XP 离心机(美国 Beckman Coulter)。

1.3 提取工艺

1.3.1 毛蚶多糖提取 取新鲜活毛蚶 2000 g 去壳,取肉反复清洗,匀浆,匀浆液加等倍体积丙酮浸泡 24 h 脱脂,倒去丙酮冷冻真空干燥得脱脂毛蚶干粉,准确称取脱脂后的毛蚶干粉 2 g,以提取温度、浸提时间、料液比为可变因素水浴搅拌提取。将提取液以 6000 r/min 上离心机,离心 20 min,取上清液并旋转蒸发至原体积的 1/3,加 4 倍体积无水乙醇 4℃ 过夜,倒去乙醇收集沉淀,沉淀分别用丙酮和无水乙醇反复清洗 3 次,双蒸水复溶即得毛蚶粗多糖溶液。

1.3.2 脱蛋白 采用较温和的 seavage(三氯甲烷与正三醇 4:1)法^[12]脱蛋白,seavage 试剂与多糖溶液 3:1 (V/V)置于摇床剧烈摇动 2 h 后 5000 r/min 离心 20 min,溶液分三层,用吸管将上层多糖溶液吸出,重复此步骤直至无中间蛋白层析出。

1.3.3 脱色

1.3.3.1 脱色率测定 用全自动酶标仪在 420 nm 波长下检测毛蚶多糖脱色前后吸光值(OD),根据公式脱色率(%)=(A1-A2)/A1×100%,A1 是脱色前的多糖溶液的 OD 值,A2 是脱色后的 OD 值。

1.3.3.2 活性炭脱色 准确称量 0.05 g、0.10 g、0.15 g、0.20 g、0.25 g、0.30 g、0.35 g、0.40 g 活性炭,然后分别置于 8 支试管中,向各试管加入已脱蛋白的多糖溶液 3 ml,60℃ 水浴 60 min,10 000 r/min 离心 20 min,分别吸取各管上清液测量各试管中多糖脱

色率及多糖损失率。

1.3.3.3 过氧化氢(H_2O_2)脱色 向 5 ml 多糖溶液中加入不同浓度的双氧水(H_2O_2)溶液(4%、8%、12%、16%、20%、24%、28%),于 60℃ 水浴 60 min,分别测量各管多糖脱色率及损失率。

1.3.3.4 大孔树脂脱色 分别以浓度为 0.02 g/ml、0.04 g/ml、0.06 g/ml、0.08 g/ml、0.10 g/ml、0.12 g/ml、0.14 g/ml 大孔树脂脱色,分别检测各管多糖脱色率及损失率。

1.3.4 毛蚶多糖正交试验设计 见表 1。

表 1 毛蚶多糖正交试验因素水平

因素	A:液固比(ml/g)	B:温度(℃)	C:时间(h)
1	10:1	40	2
2	30:1	60	3
3	50:1	80	4

1.3.5 多糖的测定 通过硫酸-萘酮法测多糖含量。硫酸萘酮溶液配制:称取 0.1 g 萘酮置于 50 ml 容量瓶中用浓硫酸定容至刻度线,并用超声波混匀,得 0.02 g/ml 硫酸萘酮溶液置于棕色玻璃瓶中备用。标准葡萄糖溶液配制:将无水葡萄糖在 105℃ 下干燥至恒重,准确称取 200.00 mg 置于 1 L 容量瓶中,双蒸水定容至刻度线,得 0.20 mg/ml 标准葡萄糖溶液。标准曲线绘制:取 5 支 10 ml 洁净试管分别加入 0.10 ml、0.20 ml、0.30 ml、0.40 ml、0.50 ml 标准葡萄糖溶液,用双蒸水将体积不足 0.50 ml 的试管补至 0.50 ml,向各试管中加硫酸萘酮溶液 2.00 ml 并用橡皮塞塞紧试管口,小心充分摇匀后置于 100℃ 沸水中水浴 10 min,取出试管冰浴 10 min。全自动酶标仪在 625 nm 波长测 OD 值,并根据 OD 值绘制标准曲线。根据标准曲线得回归方程为: $y = 3.5957x - 0.0059$,相关系数 $r^2 = 0.9947$ 。多糖含量可根据回归方程计算,多糖提取率(%)=每份样品所含多糖质量/每份原料的质量×100%。多糖损失率(%)=(脱色前的多糖量-脱色后的多糖量)/脱色前的多糖量×100%。

2 结果

2.1 毛蚶多糖的提取 毛蚶多糖提取工艺优化,以液固比、提取的温度、提取的时间 3 个因素做正交试验,见表 1、表 2。由表 3 可知液固比对毛蚶多糖的提取率影响最大,提取的时间对毛蚶多糖提取率影响最小,影响因素大小依次为固液比>提取温度>提取时间,从表 2 可知毛蚶多糖提取最优工艺是 A2B3C1,液固比为 35:1(ml/g)、温度为 80℃、时间为 2 h 时提取率最

高,为 9.20%。

表 2 毛蚶多糖提取正交试验结果

序号	因素			提取率 (%)
	A:液固比 (ml/g)	B:温度 (°C)	C:时间 (h)	
1	1(20)	1(50)	1(2)	3.68
2	1(20)	2(65)	2(3)	4.46
3	1(20)	3(80)	3(4)	4.98
4	2(35)	1(50)	2(3)	7.82
5	2(35)	2(65)	3(4)	8.09
6	2(35)	3(80)	1(2)	9.20
7	3(50)	1(50)	3(4)	5.41
8	3(50)	2(65)	1(2)	6.60
9	3(50)	3(80)	2(3)	7.10
K1	4.37	5.64	6.29	
K2	8.37	6.38	6.36	
K3	6.37	7.09	6.47	
R	4.01	1.45	0.18	

表 3 毛蚶多糖正交实验结果方差分析

因素	偏差平方和	自由度	均方	F	P
A	23.960	2	11.980	501.722	0.002
B	3.183	2	1.692	66.662	0.015
C	0.202	2	0.101	4.235	0.191

2.2 H₂O₂ 脱色 加入 H₂O₂ 浓度为 12% 时脱色效果最好,脱色率为 58.90%,多糖损失率为 28.90%。见图 1。

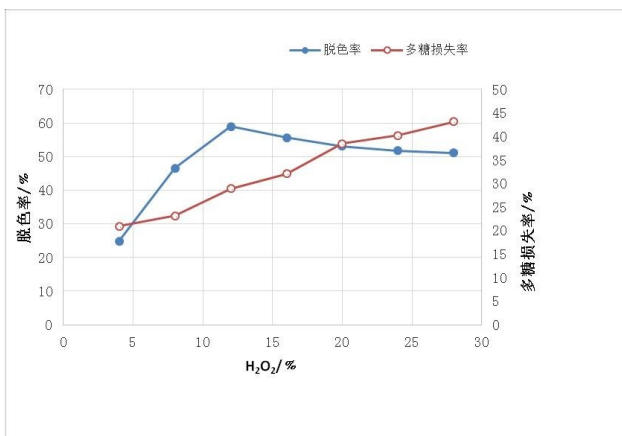


图 1 H₂O₂ 浓度对多糖脱色率及损失率的影响

2.3 活性炭脱色 活性炭添加量为 0.08 g/ml 时脱色效果最佳,脱色率为 61.90%,多糖损失率为 32.70%。见图 2。

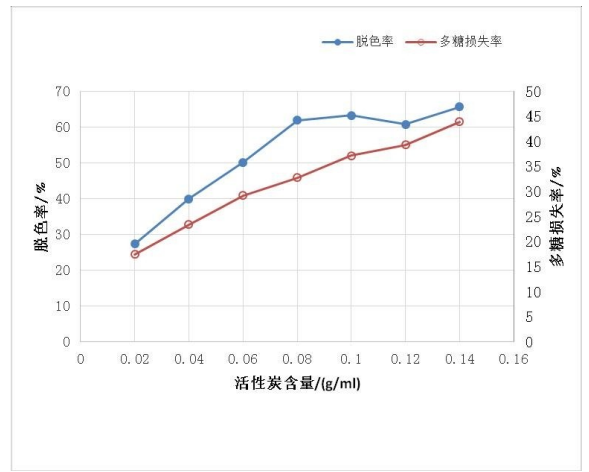


图 2 活性炭对多糖脱色率及损失率的影响

2.4 大孔树脂脱色 添加大孔树脂含量为 0.1 g/ml 时,脱色率为 66.60%,多糖损失率为 27.50%。见图 3。

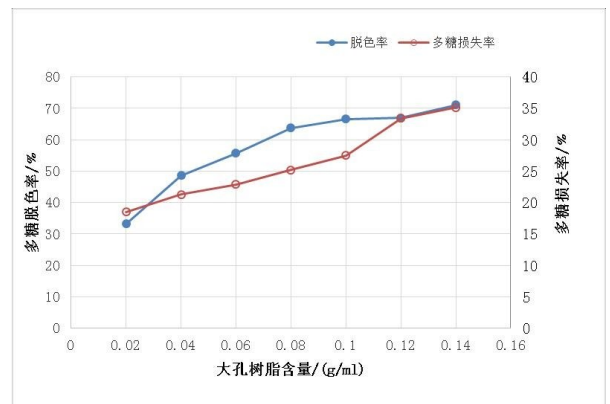


图 3 大孔树脂对多糖脱色率及损失率的影响

3 讨论

贝类多糖提取有热水浸提法、复合酶提法、酸碱提取法、超声波辅助提取法等,酸碱提取法需严格控制 pH 值且可能破坏多糖结构,复合酶提取法提取效率高但可能会引入新的蛋白质,且对提取温度及 pH 值要求严格,热水浸提法虽然提取率相对低,但具有操作简单且不破坏多糖结构等优点,为最常用的多糖提取方法。本研究通过热水浸提法对毛蚶多糖在不同液固比、提取温度、提取时间进行正交试验探讨毛蚶多糖最佳提取条件。

多糖脱色方法主要有 H₂O₂^[13]、活性炭^[14]、大孔树脂^[15] 3 种工艺,3 种脱色工艺对毛蚶多糖脱色率及多糖损失率分别为:H₂O₂ 脱色率为 58.90%,多糖损失率为 28.90%;活性炭脱色率为 61.90%,损失率为 32.70%;大孔树脂脱色率为 66.60%,多糖损失率

27.50%，其明显优于活性炭及 H_2O_2 脱色工艺。 H_2O_2 脱色是利用氧化反应使有色物质失去颜色，脱色效果明显，但有色物质仍然存在于多糖溶液中且 H_2O_2 影响硫酸蒽酮法测多糖，需要加热去除后方能用硫酸蒽酮法测多糖含量；活性炭脱色操作方便，快捷，价格低廉，脱色效果明显，应用最广泛，活性炭粉末混入溶液中需高速离心后去除；大孔树脂脱色效果最好且多糖损失率低，但价格较活性炭和 H_2O_2 昂贵且脱色时间长，操作复杂。

综上所述毛蚶多糖热水浸提法最佳提取工艺为液固比 35:1(ml/g)、温度为 80℃、提取时间为 2 h 时，提取率最高为 9.20%。大孔树脂脱色的脱色率为 66.60%，明显优于 H_2O_2 法(58.90%)和活性炭(61.90%)，大孔树脂脱色多糖损失率(27.50%)较 H_2O_2 法(28.90%)和活性炭法(32.70%)低。毛蚶多糖提取工艺的研究为毛蚶多糖的组分、分子量、分子结构及生物活性研究提供基础。

参考文献:

[1] 王如才,王昭萍,张建中.海水贝类养殖学[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1993.

[2] Liu Y,Sun Y, Huang G. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2018, 111:780-786.

[3] Mei X,Yi C,Huang G. Preparation Methods and Antioxidant Activities of Polysaccharides and Their Derivatives [J]. Mini Rev Med Chem,2017,17(10):863-868.

[4] Jiao H,Shang XH,Dong Q,et al. Polysaccharide Constituents of Three Types of Sea Urchin Shells and Their Anti-Inflammatory Activities[J]. Mar Drugs, 2015, 13(9): 5882-5900.

[5] Zong A,Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides

from natural resources: a review of recent research[J]. Carbohydrate Polymers,2012,90(4):1395-1410.

[6] 黄宏思,黄衍强,韦鹏涯.黄芪多糖协同紫杉醇对肿瘤细胞的杀伤作用[J].右江民族医学院学报,2010,32(1):3-5.

[7] Shi J,Cheng C,Zhao H,et al. In vivo anti-radiation activities of the *Ulva pertusa* polysaccharides and polysaccharide-iron(III) complex[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2013,60:341-346.

[8] Chen F,Huang G. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 211-216.

[9] 李容,钟兆银,姜艳,等.川木瓜多糖的化学修饰及其活性研究[J].右江民族医学院学报,2018,40(5):418-422.

[10] Shen S,Cheng HR,Li X,et al. Effects of extraction methods on antioxidant activities of polysaccharides from camellia seed cake[J]. Eur Food Res Technol, 2014,238:1015-1021.

[11] Tahmouzi S,Ghods M. Optimum extraction of polysaccharides from motherwort leaf and its antioxidant and antimicrobial activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2014,112:396-403.

[12] 张瑞娟,柯莉娜,郑静,等.鲍鱼内脏多糖的提取、纯化及其抗氧化和抑菌活性[J].厦门大学学报:自然科学版, 2018,57(1):58-64.

[13] 车向前,常明泉,陈芳,等. H_2O_2 对白及多糖脱色工艺研究[J].实用药物与临床,2018,21(1):70-73.

[14] 车向前,常明泉,陈林,等.正交试验法优选白及多糖活性炭脱色工艺[J].中国药师,2017,20(8):1370-1373.

[15] 张玉,吕文平,寇兴然,等.大孔树脂对金钗石斛粗多糖脱色的研究[J].食品与生物技术学报,2018,37(2): 211-216.

收稿日期:2019-01-10;修回日期:2019-02-26