

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217( 2016) 06-0515-04

## 超声辅助法在亚洲日月蛤多糖提取工艺优化中的应用

胡 伟<sup>1 2</sup> 唐小牛<sup>1 2</sup>

( 皖南医学院 1.医学寄生虫学教研室; 2.活性生物大分子研究安徽省重点实验室,安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 探讨超声辅助法对亚洲日月蛤多糖最佳提取工艺。方法: 分别用热水浸提法和超声辅助热水浸提法提取亚洲日月蛤多糖, 并比较两种方法的生物多糖得率。再分别以液固比、提取温度和提取时间为条件, 采用超声辅助法提取亚洲日月蛤多糖, 通过单因素正交实验确定多糖得率的最优提取条件。结果: 相同条件下, 热水浸提法提取出的亚洲日月蛤多糖得率为 1.05%, 而超声辅助热水浸提法的多糖得率为 1.71%。超声辅助热水法提取亚洲日月蛤多糖的最优条件是: 在超声功率 160 W 条件下, 液固比 40:1( mL/g)、温度为 90℃、时间 4 h, 在此条件下亚洲日月蛤多糖得率为 2.01%, 其中液固比(  $P<0.01$ ) 和提取温度(  $P<0.05$ ) 对多糖提取率影响较大。结论: 超声辅助法提取亚洲日月蛤多糖得率明显优于热水浸提法。

**【关键词】**超声; 亚洲日月蛤; 多糖; 优化

**【中图分类号】**R 284 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2016.06.002

## Optimizing the ultrasound-assisted extraction technology in isolation of the polysaccharide from *Amusium pleuronectes*

HU Wei, TANG Xiaoniu

Department of Medical Parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To optimize the ultrasound-assisted extraction technique in isolating the polysaccharide from *Amusium pleuronectes*. **Methods:** Isolation of polysaccharide from *Amusium pleuronectes* was performed with simple hot water extraction or ultrasound-assisted hot water extraction, and polysaccharide yield was compared pertaining to the two techniques. Then optimal polysaccharide extraction condition was determined by single factor and orthogonal test on water to material ratio, extraction temperature and extraction time basis. **Results:** Polysaccharide yield of *Amusium pleuronectes* was 1.05% by simple hot water extraction and 1.71% by ultrasound-assisted hot water isolation in the same condition. Optimal conditions for polysaccharide production by ultrasound assistance were as follows: ultrasound power at 160 W, water to material ratio by 40:1( mL/g), extraction temperature at 90℃ and extraction time for 4 hours. This condition resulted in polysaccharide yield from *Amusium pleuronectes* by 2.01%. In addition, the water-material ratio and extraction time had great impact on the recovery rate(  $P<0.01$ ;  $P<0.05$ , respectively). **Conclusion:** Ultrasound-assisted hot water extraction may lead to higher polysaccharide yield from *Amusium pleuronectes* than simple hot water isolation technique.

**【Key words】**ultrasound; *Amusium pleuronectes*; polysaccharide; optimization

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目( KJ2014A270)

收稿日期: 2016-08-04

作者简介: 胡 伟( 1987-), 男, 2014 级硕士研究生, ( 电话) 13145531616 ( 电子信箱) 412397487@ qq.com;

唐小牛, 男, 副教授, 硕士生导师, ( 电子信箱) txniu163.com, 通信作者。

[13] NANA DUHME, PATRICK A. SCHWEIZER, DIERK THOMAS, et al. Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation [J]. Eur Heart J, 2013, 34( 35): 2768-2775.

[14] STIEBER J, HERRMANN S, FEIL S, et al. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 100( 25): 15235-15240.

[15] HARZHEIM D, PFEIFFER KH, FABRITZ L, et al. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP [J]. Embo. J, 2008, 27: 692-703.

[16] MIRKO BARUSCOTTI, ANNALISA BUCCHI, CARLO VISCOMI, et al. Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4 [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108( 4): 1705-1710.

亚洲日月蛤 (*Amusium pleuronectes*) 俗称日月贝 属于软体动物门、甲壳纲、莺蛤目、海扇蛤科,广泛分布于我国东南沿海地区,是重要的海洋经济贝类。研究证实,生物多糖在免疫调节、抗肿瘤、抗氧化及抗病毒等方面具有重要的生物学作用<sup>[1-4]</sup>。而贝类多糖是贝壳类动物的主要成分之一,研究发现,贝类多糖也具有多方面的生物学作用,如 Yuan Q 等<sup>[5]</sup> 研究发现缢蛏多糖具有较强的免疫刺激活性; Wang T 等<sup>[6]</sup> 研究证实太平洋牡蛎多糖具有较好的抗高血压作用等。随着生活水平的提高,海洋贝类越来越多地出现在人们餐桌之上,因其味美、营养价值高而深受人们喜爱。生物多糖传统工艺包括水溶剂提取法、乙醇溶剂提取法、酸提取法和碱提取法,不仅耗时长、温度高、浪费资源,且其提取的生物多糖生物活性会降低。所以目前很少用单一的传统工艺提取生物多糖,基本上都是两种提取方法联合使用,从而更快速、更有效的提取生物多糖。贝类生物多糖因其蛋白质含量很高,所以其脱蛋白是难点,因此必须进行多次重复脱蛋白,方可得到纯度较高的贝类多糖。日月贝作为重要的海洋经济贝类,其多糖的提取及生物活性尚不清楚。因此本研究拟优化日月贝多糖提取工艺,从而为日月贝多糖的生物活性研究提供基础。

### 1 材料与方 法

1.1 材料 日月贝(南京众彩批发市场)。

1.1.1 试剂 丙酮、无水乙醇、三氯甲烷、正丁醇(所有试剂均为国产分析纯);活性炭、D301-R 型大孔树脂,均为国产。

1.1.2 主要仪器 MODEL 电子分析天平(上海金山亭林工业开发区),XHF-D 高速分散器内切式匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司),JY96-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),SIGMA® 3-48KS 高速冷冻离心机(德国赛多利斯公司),KW-1000DC 数显恒温水浴锅(江苏金坛市亿通电子有限公司),KQS200B 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),ELELA OSB-2100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),SIMFD8-3 冻干机(北京博医康实验仪器有限公司),U2800 紫外分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 日月贝粗多糖提取 将日月贝去壳、洗净、风干称质量,组织搅碎机搅碎,加丙酮在室温下脱脂 24 h。脱脂后加双蒸水(不同液固比)在超声功率 160 W 条件下冰浴细胞粉碎 30 min。以提取温度和

提取时间为可变因素,在不同条件下水浴提取。提取液经过滤、离心,减压抽滤至原溶液 1/5 容积,加 3 倍容积 95%乙醇 4℃下醇沉 24 h,去除上清,收集沉淀,依次用无水乙醇和丙酮脱水,重复 2 次,加双蒸水复溶 2 次收集复溶液。

1.2.2 脱蛋白 用 Sevage 法脱蛋白(Sevage 试剂为三氯甲烷:正丁醇=4:1)。将复溶液与 Sevage 试剂按照 3:1 的比例混合,在摇床上以 220 r/min 充分混合 1 h 后离心,混合液分三层,收集上层糖溶液。上述步骤重复 10 次,以充分脱去蛋白质。

### 1.2.3 脱色

1.2.3.1 活性炭脱色 取 6 只洁净的试管,向试管中各加入脱蛋白后的日月贝多糖溶液 5 mL,再分别称取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g 颗粒状活性炭,依次加入含有日月贝多糖溶液的试管内摇匀。55℃恒温水浴 2 h 后 12 000 r/min 离心 10 min,取上清双层滤纸抽滤 2 次。测定各试管中糖溶液脱色率<sup>[7]</sup>。

1.2.3.2 大孔树脂脱色 大孔树脂处理:先取一定量的 D301-R 型大孔树脂,用双蒸水浸泡 1 h 后减压去气泡,去水后加 5% NaCl 溶液搅拌 4 h,双蒸水洗至中性;再加 2% NaOH 溶液搅拌 4 h,双蒸水洗至中性备用。

取 6 只洁净的试管,向试管中各加入脱蛋白后的日月贝多糖溶液 5 mL,再分别称取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6g 处理后的 D301-R 大孔树脂,依次加入含有日月贝多糖溶液的试管内摇匀,55℃恒温水浴 2 h 后 12 000 r/min 离心 10 min,取上清双层滤纸抽滤 2 次,测定各试管中糖溶液脱色率。脱色后的多糖提取液经 0.22 μm 滤膜过滤、透析、冷冻干燥,得到纯度较高的日月贝多糖,测其多糖含量。

1.3 多糖含量测定 采用硫酸-萘酚法检测多糖含量<sup>[8]</sup>。硫酸萘酚溶液配制:称取 0.2 g 萘酚放入 100 mL 容量瓶内,加浓硫酸定容至刻度,利用超声清洗器超声使萘酚完全溶解(现配现用)。称取在 105℃条件下烘干至恒质量的葡萄糖 10 mg,置于 100 mL 容量瓶内,加双蒸水定容至刻度并摇匀。在该容量瓶内量取 10 mL 溶液,加入到 100 mL 容量瓶内,并用双蒸水定容至刻度,所得溶液即为标准液。量取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9mL 标准液分别置于 10 mL 试管内,用双蒸水将各体积补至 1.0 mL 之后向各试管内加入 4 mL 硫酸萘酚溶液摇匀并加橡皮塞,先冰浴 10 min 再 100℃水浴 10 min,冷却至室温。利用紫外分光光度计在 620 nm 波长处分别测吸光度值,以葡萄糖标准液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。称取 10 mg 日月贝

粗多糖,加双蒸水稀释至 100 倍后摇匀,吸取 1 mL 溶液,测其吸光度值,根据标准曲线得直线回归方程  $y=0.00432+0.00339x$ ,相关系数  $r^2=0.99938$ 。计算出日月贝多糖得率。计算公式如下:

多糖含量  $N(\%) = M \times D / 0.010 \times 100\%$ ; 多糖得率  $(\%) = W \times N / Q \times 100\%$ 。其中,  $M$  为多糖浓度,  $D$  为稀释倍数,  $Q$  为样本质量( g ),  $W$  为各条件所得多糖质量。

## 2 结果

2.1 多糖提取工艺优化条件 通过单因素实验探讨超声辅助法提取日月贝多糖最优条件,以液料比、温度和时间 3 个因素设计正交实验,见表 1、2。由表 3 可知,液固比(  $P < 0.01$  )和提取温度(  $P < 0.05$  )对多糖提取率影响较大,其影响作用大小依次为  $R_A > R_B > R_C$ ,即影响因素为液固比 > 温度 > 时间,由表 1 和表 2 可知其最佳提取工艺为  $A_2B_3C_2$ ,即其最优提取条件为液固比 40:1( mL/g ),提取温度为 90℃,提取时间 4 h 下,日月贝多糖的提取率为 2.01%。

表 1 超声辅助法提取日月贝多糖正交实验因素水平

因素	A: 液固比/( mL/g)	B: 温度/℃	C: 时间/h
1	30:1	70	3
2	40:1	80	4
3	50:1	90	5

表 2 超声辅助法提取日月贝多糖  $L_9(3^3)$  正交实验结果

序号	因素			提取率/%
	A	B	C	
1	1	1	1	0.74
2	1	2	2	0.79
3	1	3	3	1.05
4	2	1	3	1.71
5	2	2	1	1.77
6	2	3	2	2.01
7	3	1	2	1.17
8	3	2	3	1.43
9	3	3	1	1.64
$k_1$	0.86	1.21	1.38	-
$k_2$	1.83	1.24	1.32	-
$k_3$	1.41	1.57	1.40	-
R	0.97	0.36	0.08	-

表 3 超声辅助法提取日月贝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 值	P 值
A	1.421	2	0.710	212.395	0.005
B	0.201	2	0.100	30.023	0.032
C	0.009	2	0.005	1.369	0.422

## 2.2 活性炭和大孔树脂脱色比较

2.2.1 活性炭脱色 由图 1 可知活性炭对日月贝多糖脱色效果明显,当添加活性炭量为 0.04 g/mL 时,多糖脱色率达 89.51%。随着活性炭量的增加,其脱色率变化不大,但多糖损失量会增多,所以活性炭对日月贝多糖脱色的最优条件为活性炭量为 0.04 g/mL,在 55℃ 恒温水浴条件下脱色 2 h。

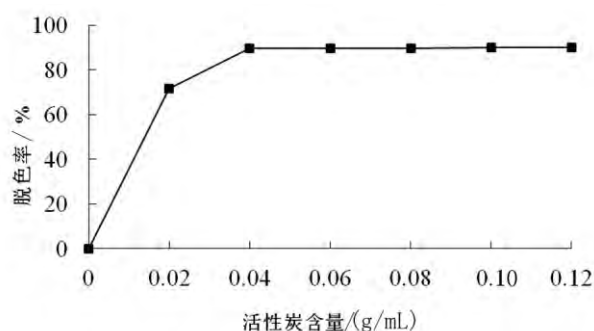


图 1 活性炭脱色效果曲线

2.2.2 大孔树脂脱色 由图 2 可知大孔树脂对日月贝多糖脱色效果明显,当添加大孔树脂量为 0.06 g/mL 时,多糖脱色率达 81.25%。随着大孔树脂量的增加,其脱色率变化不大,但多糖损失量会增多,所以大孔树脂对日月贝多糖脱色的最优条件为大孔树脂量为 0.06 g/mL,在 55℃ 恒温水浴条件下脱色 2 h。

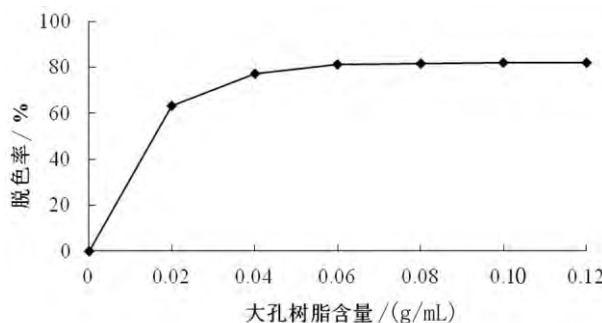


图 2 D301-R 大孔树脂脱色效果曲线

## 3 讨论

超声辅助法提取日月贝多糖,在超声条件下,使液体介质不断受到压缩和拉伸,产生空化作用,其产生的空化泡可以机械地破坏日月贝的细胞结构,使其破裂释放有效糖成份并能更好地溶解在水溶液

中,从而能节约提取时间和能源,并能提高生物多糖提取率。但因其超声条件下会产生大量的热量,故必须进行冰浴细胞粉碎,防止高温破坏生物多糖活性。本研究利用超声辅助热水浸提法提取日月贝多糖,在相同条件下热水浸提法日月贝多糖得率为1.05%,而超声辅助热水浸提法日月贝多糖得率为1.71%,其多糖得率明显比单一热水法多糖得率高。超声辅助法在超声功率160 W条件下,液固比40:1(mL/g)、温度90℃、时间4 h条件下,日月贝多糖提取率为2.01%。目前常用的辅助法提取生物多糖,如陈明等<sup>[9]</sup>利用超临界CO<sub>2</sub>萃取法提取茶多糖; Maran JP等<sup>[10]</sup>利用微波辅助法从芒果皮中提取多糖; Cheng Z等<sup>[11]</sup>利用微波酶辅助法提取五味子多糖; Liu JL等<sup>[12]</sup>采用高压超声波辅助法提取川穹多糖等,其生物多糖提取率较传统工艺有明显的提高。

比较活性炭和大孔树脂两种脱色工艺:活性炭和大孔树脂脱色效果都较明显,活性炭脱色率为89.51%,较大孔树脂81.25%高。目前活性炭脱色和大孔树脂脱色是最常用的两种脱色方法。通过实验研究结果显示:活性炭黏附力强,脱色效果较好,工艺简便、快速,但糖含量损失较多,如果只是将提取的生物多糖溶液经透析后用于动物实验,可以选择脱色效果较好的活性炭脱色。大孔树脂脱色前期对树脂的处理较繁琐,装柱后脱色时间较长,脱色效果不如活性炭脱色,但如果需要进一步分离纯化解析糖结构实验,可选择多糖保留率较高的大孔树脂脱色。糖溶液经初步DEAE Sepharose Fast Flow离子交换层析,色素和一些其他类物质会被截留在层析柱的凝胶内,从而收集到纯度较高的中性糖和酸性糖。

综上所述,超声辅助法提取日月贝多糖得率明显高于传统工艺。超声辅助法在超声功率160 W条件下,其最佳提取条件为:液固比40:1(mL/g)、温度90℃、时间4 h,日月贝多糖得率为2.01%。活性炭脱色率为89.51%,较大孔树脂81.25%高。日月贝多糖提取工艺的优化为日月贝多糖的生物活性研究提供更好的基础。

【参考文献】

[1] WANG Y ,HUANG M ,SUN R *et al.* Extraction ,characterization of a Ginseng fruits polysaccharide and its immune modulating activities in rats with Lewis lung carcinoma [J]. Carbohydr Polym , 2015 ,127: 215-221.

[2] YANG W ,ZHANG H ,JI M *et al.* Antitumor effect of a polysaccharide isolated from as an immunostimulant [J]. Biomed Rep ,2016 ,4 ( 3) : 361-364.

[3] SHARMA SK ,GAUTAM N ,ATRI NS. Optimized extraction ,composition ,antioxidant and antimicrobial activities of exo and intracellular polysaccharides from submerged culture of Cordyceps cicadae [J]. BMC Complement Altern Med ,2015 ,15: 446.

[4] CHEN Y ,XIONG W ,ZENG L *et al.* Comparison of Bush Sophora Root polysaccharide and its sulfate's anti-duck hepatitis A virus activity and mechanism [J]. Carbohydr Polym ,2014 ,102: 333-340.

[5] YUAN Q ,ZHAO L ,CHA Q *et al.* Structural Characterization and Immunostimulatory Activity of a Homogeneous Polysaccharide from *Sinonovacula constricta* [J]. J Agric Food Chem ,2015 ,63( 36) : 7986-7994.

[6] WANG T ,DING J ,LI H *et al.* Antihypertensive activity of polysaccharide from *Crassostrea gigas* [J]. Int J Biol Macromol ,2016 ,83: 195-197.

[7] 何余堂,宫照杰. 玉米花丝多糖脱色方法的研究 [J]. 食品科学 ,2009 ,30( 18) : 50-53.

[8] 位杰,吴翠云,蒋媛,等. 蒽酮法测定红枣可溶性糖含量条件的优化 [J]. 食品科学 ,2014 ,35( 24) : 136-140.

[9] 陈明,熊琳媛,袁城. 超临界CO<sub>2</sub>萃取茶多糖的试验研究 [J]. 安徽农业科学 ,2011 ,39( 1) : 261-263,269.

[10] MARAN JP ,SWATHI K ,ASHVINI G *et al.* Microwave-assisted extraction of pectic polysaccharide from waste mango peel [J]. Carbohydr Polym ,2015 ,123( 5) : 67-71.

[11] CHENG Z ,SONG H ,YANG Y *et al.* Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill [J]. Int J Biol Macromol ,2015 ,76( 4) : 161-168.

[12] LIU JL ,ZHENG SL ,FAN QJ *et al.* Optimisation of high-pressure ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacity of polysaccharides from the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* [J]. Int J Biol Macromol ,2015 ,76: 80-85.