

鲍鱼内脏多糖的提取、纯化及其抗氧化和抑菌活性

张瑞娟,柯莉娜,郑 静,石 艳,王 勤*

(厦门大学生命科学学院,福建 厦门 361102)

摘要:以皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)内脏为实验材料,采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶 6 种蛋白酶对其进行酶解提取多糖,结果显示碱性蛋白酶酶解所得多糖得率最高,为 6.66%,进而由单因素试验和正交试验确定了碱性蛋白酶提取鲍鱼内脏多糖的最佳工艺条件.将得到的鲍鱼内脏粗多糖进行体外抗氧化活性测定,结果显示:100%清除羟自由基、100%清除 2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS)自由基以及 700 nm 处吸光度(A_{700})为 0.485 时代表的还原能力对应的鲍鱼内脏粗多糖质量浓度分别为 9.6、7.5、8.2 mg/mL,表明所得粗多糖具有较好的抗氧化活性.采用双酶解法以提高多糖含量,结果显示胃蛋白酶二次酶解所得的多糖含量最高,且多糖样品在 3 种抗氧化活性模型中均具有很好的效果.采用 Sevage 法和反复冻融法去除蛋白,过氧化氢脱除色素,进一步纯化得到高纯度的鲍鱼内脏多糖,并采用双层平板法测定其抑菌活性,结果表明其对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)都具有较好的抑制作用.

关键词:鲍鱼内脏;多糖;提取;纯化;抗氧化活性;抑菌活性

中图分类号:Q 936

文献标志码:A

文章编号:0438-0479(2018)01-0058-07

人体正常代谢过程中会产生具有生物活性的自由基,这些自由基累积过多或清除过慢会加速机体的衰老进程,并诱发炎症、免疫失调、恶性肿瘤等多种疾病^[1].人工抗氧化剂一般都有副作用,长期摄入会引起肝损伤、肿瘤等一系列病症^[2-3],因此,亟待获取天然且安全的抗氧化物.从天然生物中提取的多糖类化合物,对于各种来源的多种活性氧都具有良好的清除效果,有望成为天然抗氧化剂^[4-5].

鲍鱼价格昂贵,而约占其软体组织 1/3 的内脏在加工过程中则经常被当成废弃物或低值饲料,这大大降低了鲍鱼的使用价值,并且造成了环境污染^[6].已有研究发现鲍鱼内脏多糖具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力等生物学作用^[7-10].王莅莎等^[7]提取的鲍鱼内脏多糖具有较好的清除羟自由基的能力、较弱的还原能力和很弱的络合能力;苏永昌等^[8]提取的鲍鱼内脏多糖同时具有清除羟自由基和还原超氧阴离子自由基的能力;朱莉莉等^[9]提取的鲍鱼内脏多糖具有明显抑

制 H22 肿瘤细胞生长的作用,肿瘤抑制率均大于 50%,且有一定的剂量依赖性;王莅莎等^[10]提取的鲍鱼内脏多糖对 HeLa 细胞和 K562 细胞生长具有一定的抑制作用,且在体外能够增强淋巴细胞的增殖、腹腔巨噬细胞的吞噬和自然杀伤细胞的杀伤能力.但目前的鲍鱼内脏多糖提取存在工艺复杂、得率较低等问题.为简化工艺,提高得率,本研究采用酶解法从鲍鱼内脏中提取并纯化多糖,通过体外抗氧化活性模型评价其抗氧化活性并测定其抑菌活性,以期鲍鱼废弃物的综合加工利用提供依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

冷冻的皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)内脏由莆田汇龙食品有限公司提供;供试的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 菌株编号 FJAT-

收稿日期:2017-02-22 录用日期:2017-05-15

基金项目:国家海洋公益性行业科研专项(201405016)

* 通信作者:qwang@xmu.edu.cn

引文格式: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.

Citation:ZHANG R J,KE L N,ZHENG J,et al.Extraction,purification and antioxidant and antibacterial activity analysis of polysaccharides from abalone viscera[J].J Xiamen Univ Nat Sci,2018,57(1):58-64.(in Chinese)



12029)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, 菌株编号 FJAT-10334)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, 菌株编号 FJAT-7239)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, 菌株编号 FJAT-346)均来自福建省农业科学院。

碱性蛋白酶和中性蛋白酶为合肥博美生物科技有限责任公司产品,酶活力分别为 200 和 100 U/mg;酸性蛋白酶为枣庄杰诺生物酶有限公司产品,酶活力为 50 U/mg;胃蛋白酶和木瓜蛋白酶为上海生工生物工程股份有限公司产品,酶活力分别为 3 000 和 3 500 U/mg;胰蛋白酶为无锡酶制剂厂产品,酶活力为 250 U/mg;其他试剂均为国产分析纯试剂;使用的蒸馏水为去离子重蒸水。

1.2 实验方法

1.2.1 鲍鱼内脏的前处理

将冷冻的鲍鱼内脏解冻、洗净,按部位将其分成两部分:角状消化腺和生殖腺为一部分;嗦囊、胃和胃盲管为另一部分。洗净后真空冷冻干燥,粉碎机粉碎,过 30 目筛,于 4 °C 保存待用。

1.2.2 鲍鱼内脏多糖得率的测定

以料液比(即溶质质量(g)与溶剂体积(mL)的比例)1:20 把鲍鱼内脏干粉溶于蒸馏水中,60 °C 反应 1 h;1 400 g 离心 10 min,弃去沉淀,上清液加 3 倍体积的 95%(体积分数,下同)乙醇 4 °C 醇沉过夜;1 400 g 离心 10 min,弃去上清液,沉淀真空冷冻干燥,分别测定鲍鱼内脏不同部位样品的多糖得率。采用苯酚-硫酸法测定总糖含量^[11],3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)测定还原糖含量^[12],总糖与还原糖含量之差即为多糖含量^[13],计算提取后样品中多糖占所用鲍鱼内脏干粉的质量分数,即为多糖得率。

1.2.3 最适蛋白酶的选择

采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶 6 种蛋白酶对鲍鱼内脏干粉进行酶解,按照供应商提供的每种蛋白酶的最适酶解条件,参考文献[14]设计对比实验,选择多糖得率最高的酶作为后续实验使用的蛋白酶。具体操作如下:取 0.5 g 鲍鱼内脏干粉,配制相应 pH 的缓冲液作为溶剂,并设置一蒸馏水对照组;料液比为 1:20,加酶量为 1.05×10^4 U/g,酶解 3 h 后沸水浴灭活 10 min,降温至室温,调节 pH 至中性;1 400 g 离心 10 min,弃去沉淀,上清液加 3 倍体积的 95%乙醇 4 °C 醇沉过夜;1 400 g 离心 10 min,弃去上清液,沉淀真空冷冻干燥,测定多糖得率。每种酶进行 3 次平行实验。

1.2.4 碱性蛋白酶单因素试验

以不同的加酶量(0.6×10^4 , 1.2×10^4 , 2.4×10^4 , 3.6×10^4 , 4.8×10^4 , 6×10^4 U/g)、pH(9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0)、酶解温度(30, 40, 50, 60, 70 °C)和料液比(1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50)为考察因素进行反应,酶解结束后按 1.2.3 中操作步骤进行后续处理并测定多糖得率,每个因子进行 3 次平行实验。

1.2.5 碱性蛋白酶正交试验

根据单因素试验结果,选取不同因子水平进行正交试验,通过 SPSS 17.0 软件进行统计分析,得出最佳提取条件。

1.2.6 鲍鱼内脏粗多糖的抗氧化活性测定

1) 清除羟自由基能力的测定

量取 1 mL 不同质量浓度的粗多糖溶液,分别加入 9 mmol/L 硫酸亚铁溶液和 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液各 1 mL,再加入 8.8 mmol/L 过氧化氢(H_2O_2)溶液 1 mL,混匀后在 37 °C 下反应 1 h,于 510 nm 处测定吸光度^[15]。通过式(1)计算粗多糖样品对羟自由基的清除率,绘制羟自由基清除率(Y)与样品质量浓度(X)的关系曲线。

$$Y = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0})X \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_1 为加入粗多糖溶液时的吸光度; A_2 为等体积的蒸馏水代替 H_2O_2 溶液时的吸光度; A_0 为等体积的蒸馏水代替粗多糖溶液时的吸光度。

2) 清除 2,2-联氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基能力的测定

参照苏晓雨等^[16]的测定方法,将 7 mmol/L ABTS 溶液与 4.8 mmol/L 亚硫酸钾溶液等体积混合,在室温下避光放置 12~16 h,即得 ABTS 自由基储备液。把 ABTS 自由基储备液稀释到 734 nm 处的吸光度(A_{734})为 0.700 ± 0.001 ,作为工作液。在 10 mL 具塞试管中吸取不同质量浓度的粗多糖溶液 0.2 mL,加入 3.8 mL ABTS 工作液,摇匀后于室温静置 6 min,然后测定溶液的 A_{734} 值。通过式(2)计算粗多糖样品对 ABTS 自由基的清除率,绘制 ABTS 自由基清除率(Y)与样品质量浓度(X)的关系曲线。

$$Y = (1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0})X \times 100\% \quad (2)$$

式中: B_1 为加入粗多糖溶液时的吸光度; B_2 为等体积的蒸馏水代替 ABTS 溶液时的吸光度; B_0 为等体积的蒸馏水代替粗多糖溶液时的吸光度。

3) 还原能力的测定

反应体系中依次加入 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS,pH 6.6)1.0 mL,1%(质量分数)铁氰化钾溶液 1.0 mL,不同质量浓度的粗多糖溶液 0.25 mL,混匀后在 50 ℃反应 20 min.再加入 10%(质量分数)三氯乙酸溶液 1.0 mL,振荡混匀,4 000 r/min 离心 10 min.取上清 2.5 mL,再加入 2.5 mL 蒸馏水与 0.1%(质量分数)氯化铁溶液 0.5 mL,静置 10 min,待溶液由黄色变为蓝色后,测定 700 nm 处的吸光度 (A_{700})^[14].空白组以等体积蒸馏水代替粗多糖溶液.

利用线性回归方程 $y = 0.054x + 0.044 (R^2 = 0.997)$ 计算出在上述测定方法下 $A_{700} = 0.485$ 时对应的样品质量浓度,以此表示还原能力^[14].

1.2.7 双酶解提取鲍鱼内脏粗多糖

采用中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶 5 种蛋白酶对碱性蛋白酶酶解所得的鲍鱼内脏粗多糖干粉再次酶解,方法参照 1.2.3 中所述,选择多糖含量最高、抗氧化能力最强的酶作为后续实验使用的蛋白酶.

1.2.8 鲍鱼内脏粗多糖的纯化

采用 Sevage 法和反复冻融法去除蛋白^[17], H_2O_2 脱除色素^[18],进一步纯化粗多糖.

将三氯甲烷和正丁醇按体积比 3:1 混合制备成 Sevage 溶液,再与等体积的 50 mg/mL 粗多糖溶液混合,剧烈振荡 2 min,1 000 r/min 离心 10 min,去除下层有机相和中间层蛋白,取上清反复进行此操作直至中间层无明显蛋白出现.粗多糖溶液冷冻干燥后再反复冻融去除蛋白:将粗多糖样品配成 50 mg/mL 的溶液,−80 ℃冷冻后解冻,10 000 r/min 离心 10 min,取上清反复进行此操作直至离心后无明显沉淀出现.

多糖溶液冷冻干燥后,采用 H_2O_2 进行脱色处理:以不同的 H_2O_2 体积分数(0.5%,1%,2%,3%,4%,5%)、脱色温度(30,40,50,60,70,80 ℃)和脱色时间(10,20,30,40,50,60,80,100,120 min)为考察因素,反应结束后测定 560 nm 处的吸光度(A_{560}),每个因子进行 3 次平行实验.

将脱色处理后的提取液转移到截留分子质量为 3 500 ku 的透析袋中,在 4 ℃下透析 24 h.将透析后的多糖溶液在 45 ℃下旋转蒸发浓缩,然后真空冷冻干燥制得高纯度的鲍鱼内脏多糖样品备用.

1.2.9 鲍鱼内脏多糖对细菌的抑制活性测定

采用琼脂扩散法测量抑菌圈大小^[19].将−20 ℃冷冻保存的供试菌种在 LB 固体培养基上划线,置于 30

℃下活化培养 24 h.挑取单菌落接种于 25 mL LB 液体培养基中,30 ℃下 200 r/min 摇菌培养 24 h,制备成菌悬液.将灭菌的 15 mL 含 1%(质量分数)琼脂的 LB 培养基倒入灭菌后的平皿中,制成下层培养基.将灭菌的含 0.7%(质量分数)琼脂的 LB 培养基冷却至 50 ℃,接种供试菌,菌密度为 10^6 mL^{−1},摇匀后制成上层培养基.用打孔器在平板上打孔,孔的直径为 0.8 cm,每个平板上打 6 个孔,分别对应于 4 个多糖处理浓度、1 个阴性对照(蒸馏水)和 1 个阳性对照(1 000 U/mL 链霉素和卡那霉素的混合液),在 37 ℃恒温培养 24 h 后测量抑菌圈大小.

2 结果与分析

2.1 鲍鱼内脏不同部位的多糖得率

经测定,角状消化腺和生殖腺部位的多糖得率为 3.15%,嗦囊、胃和胃盲管部位的多糖得率为 0.19%.因此,后续实验中提取鲍鱼内脏多糖时,事先除去多糖得率很底的嗦囊、胃和胃盲管等部位,以简化后续除杂工艺.

2.2 鲍鱼内脏酶解最适蛋白酶的选择

鲍鱼内脏按照各蛋白酶相应的最适酶解条件进行反应,反应条件如表 1 所示,其中缓冲液浓度为 0.2 mol/L.以多糖得率为指标,选取酶解效果最佳的蛋白酶.

表 1 鲍鱼内脏蛋白酶酶解条件
Tab.1 Conditions for protease enzymolysis of abalone viscera

蛋白酶	缓冲液	pH	反应温度/℃
碱性蛋白酶	NaOH-H ₃ BO ₃	10.0	40
酸性蛋白酶	柠檬酸-柠檬酸钠	3.0	40
中性蛋白酶	PBS	7.0	50
木瓜蛋白酶	PBS	7.0	65
胰蛋白酶	Tris-HCl	8.0	37
胃蛋白酶	KCl-HCl	2.0	37
	H ₂ O		80

6 种蛋白酶酶解提取鲍鱼内脏多糖的得率如图 1 所示,可见采用碱性蛋白酶酶解时多糖得率最高,为 6.66%,且显著高于木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶($p < 0.05$),故后期选用碱性蛋白酶酶解提取鲍鱼内脏多糖.

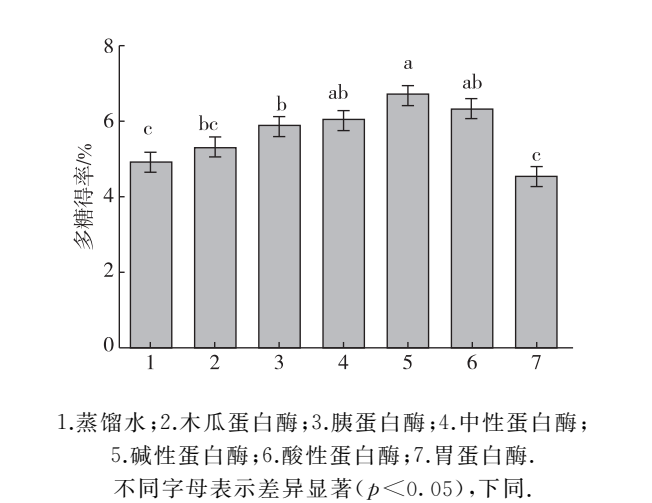


图 1 不同蛋白酶酶解对鲍鱼内脏多糖得率的影响
Fig.1 The enzymolysis effects of different proteases on the yield of polysaccharides from abalone viscera

2.3 碱性蛋白酶酶解条件单因素试验

碱性蛋白酶酶解的单因素试验结果如图 2 所示.以多糖得率为指标,获得的最佳酶解条件为:加酶量 1.2×10^4 U/g,pH 10.5,温度 40 ℃,料液比 1:30.

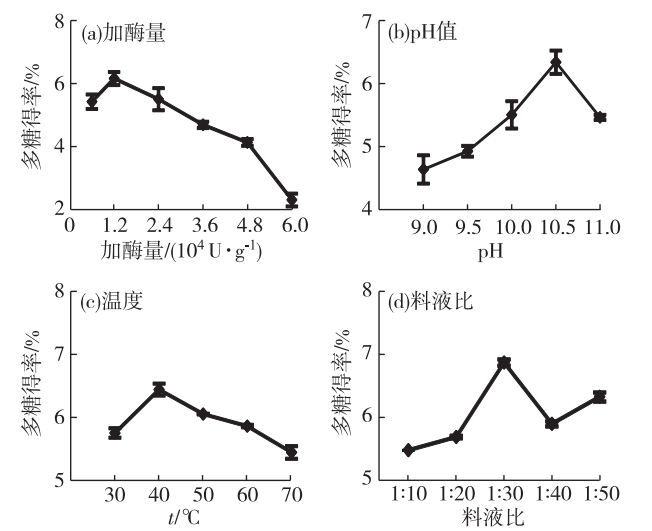


图 2 碱性蛋白酶酶解的不同因素对鲍鱼内脏多糖得率的影响
Fig.2 Effects of different factors of alkaline protease enzymolysis on the yield of polysaccharides from abalone viscera

2.4 碱性蛋白酶酶解条件正交试验

正交试验结果如表 2 所示:各因素对多糖质量浓度的影响大小次序为加酶量>料液比>温度>pH;最佳因素组合为加酶量 0.6×10^4 U/g,温度 50 ℃,pH 11.0,料液比 1:40.

表 2 正交试验结果
Tab.2 Result of the orthogonal test

实验 编号	因素				$\rho(\text{多糖})/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$
	加酶量/ ($10^4\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)	$t/^\circ\text{C}$	pH	料液比	
1	0.6	30	10.0	1:20	0.721 1
2	0.6	40	10.5	1:30	0.752 7
3	0.6	50	11.0	1:40	0.799 0
4	1.2	30	10.5	1:40	0.749 6
5	1.2	40	11.0	1:20	0.689 7
6	1.2	50	10.0	1:30	0.743 8
7	2.4	30	11.0	1:30	0.625 7
8	2.4	40	10.0	1:40	0.598 3
9	2.4	50	10.5	1:20	0.606 2
k_1	0.757 6	0.698 8	0.687 7	0.672 3	
k_2	0.727 7	0.680 2	0.702 8	0.707 4	
k_3	0.610 1	0.716 3	0.704 8	0.715 6	
R	0.147 5	0.036 1	0.017 1	0.043 3	

注: k_1,k_2,k_3 分别表示不同水平多糖质量浓度的平均值, R 表示极差.

2.5 鲍鱼内脏粗多糖的抗氧化活性测定

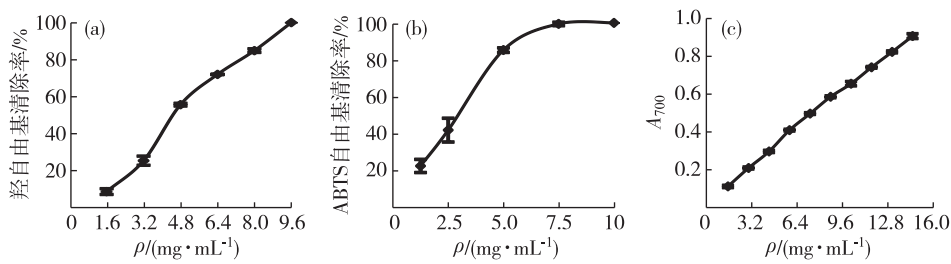
将得到的鲍鱼内脏粗多糖进行体外抗氧化活性测定,结果如图 3 所示.100%清除羟自由基、100%清除 ABTS 自由基以及还原能力($A_{700}=0.485$)对应的鲍鱼内脏粗多糖质量浓度分别为 9.6,7.5 和 8.2 mg/mL,表明所得粗多糖具有较好的抗氧化活性.

2.6 鲍鱼内脏粗多糖的二次酶解提取

为了进一步释放多糖链,对提取的鲍鱼内脏粗多糖进行二次酶解提取,提取条件参照表 1.如图 4 所示,在采用的 5 种蛋白酶中,胃蛋白酶二次酶解提取的多糖含量最高,为 $(24.18\pm1.85)\%$.因此,在碱性蛋白酶酶解后选用胃蛋白酶二次酶解效果较好.

2.7 双酶解提取所得鲍鱼内脏多糖的抗氧化活性测定

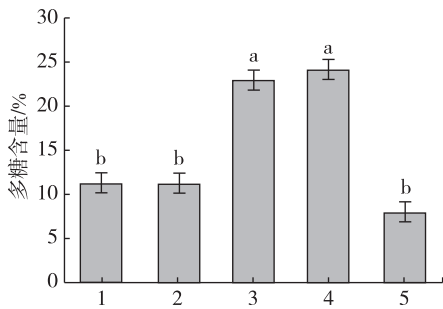
将双酶解得到的鲍鱼内脏多糖分别进行体外抗氧化活性测定,结果如图 5 所示.5 种酶二次酶解所得多糖样品清除羟自由基的能力如图 5(a)所示,随着酶浓度的增加,5 种酶的羟自由基清除率均有所提高,其中胃蛋白酶效果最好,9.6 mg/mL 胃蛋白酶二次酶解所得鲍鱼内脏多糖的羟自由基清除率为 100%,优于中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶二次酶解所得多糖样品(分别为 96.00%,99.85%,



(a)清除羟自由基的能力;(b)清除 ABTS 自由基的能力;(c)还原能力.

图 3 鲍鱼内脏粗多糖的抗氧化活性

Fig. 3 Antioxidant activities of primary abalone viscera polysaccharides



1.木瓜蛋白酶;2.中性蛋白酶;3.胰蛋白酶;
4.胃蛋白酶;5.酸性蛋白酶.

图 4 不同蛋白酶二次酶解鲍鱼内脏多糖的多糖含量

Fig. 4 Contents of abalone viscera polysaccharides derived from secondary emzymolysis by different proteases

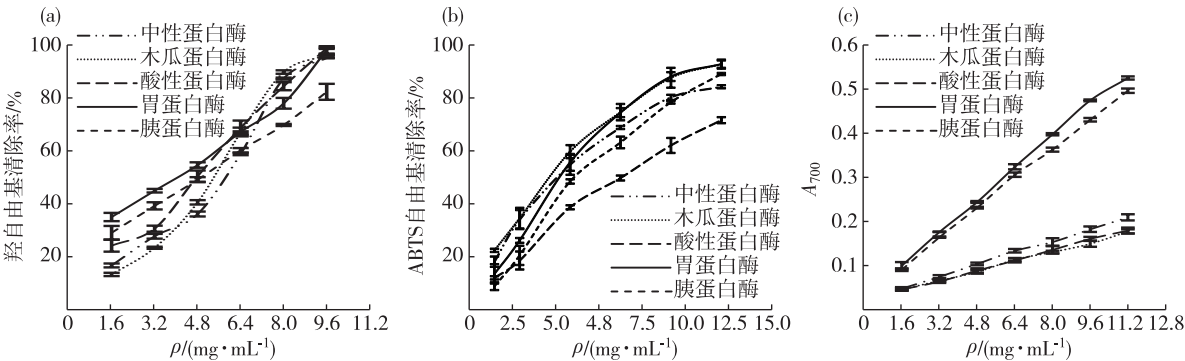
83.04%,97.16%);5 种酶二次酶解所得多糖样品清除 ABTS 自由基的能力如图 5(b)所示,均呈现浓度效应,且胃蛋白酶和木瓜蛋白酶处理组效果最好,10.0 mg/mL 胃蛋白酶和木瓜蛋白酶二次酶解所得鲍鱼内脏多糖的 ABTS 自由基清除率分别为 88.13%和 87.64%,优于中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胰蛋白酶二

次酶解所得多糖样品(分别为 80.16%,61.95%,78.37%);5 种酶二次酶解所得多糖样品的还原能力如图 5(c)所示,均呈现浓度效应,且胃蛋白酶和胰蛋白酶处理组效果最好,用 11.2 mg/mL 胃蛋白酶和胰蛋白酶二次酶解所得鲍鱼内脏多糖测定还原能力时, A_{700} 分别为 0.525 和 0.496,优于中性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶二次酶解所得多糖样品(分别为 0.208,0.178,0.176).

综合比较上述结果,胃蛋白酶二次酶解得到的鲍鱼内脏多糖在清除羟自由基、清除 ABTS 自由基和还原能力方面均具有较好的抗氧化活性.

2.8 H₂O₂ 脱除鲍鱼内脏多糖色素

H₂O₂ 脱除鲍鱼内脏多糖色素的结果如图 6 所示,H₂O₂ 的体积分数为 4%,温度为 60 ℃,时间为 120 min 时多糖色素脱除率最高.因此确定最优脱色工艺为:将鲍鱼内脏多糖样品配成质量分数为 5%的溶液,调节 pH 至 9 左右,加入 4%(体积分数)H₂O₂ 溶液,60 ℃脱色 2 h.此时鲍鱼内脏多糖的色素脱除率达到 88.49%.



(a)清除羟自由基的能力;(b)清除 ABTS 自由基的能力;(c)还原能力.

图 5 不同蛋白酶二次酶解所得鲍鱼内脏多糖的抗氧化活性

Fig. 5 Antioxidant activities of abalone viscera polysaccharides derived from secondary emzymolysis by different proteases

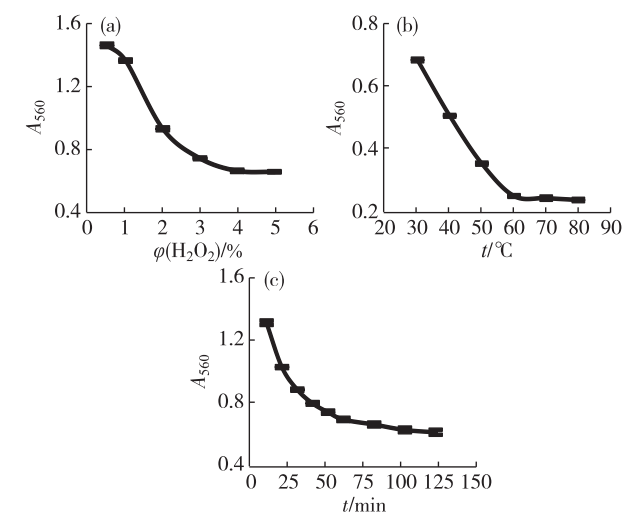


图 6 H_2O_2 体积分数(a)、脱色温度(b)和脱色时间(c)对脱除鲍鱼内脏多糖色素的影响
Fig. 6 Effects of H_2O_2 content (a), temperature (b) and time (c) on depigment of abalone viscera polysaccharides

2.9 鲍鱼内脏多糖的抑菌作用

鲍鱼内脏多糖对金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的抑制效果如表 3 所示,可见随着多糖浓度增加,4 种常见细菌的抑菌圈直径均增大,表现出明显的浓度效应.当多糖质量浓度达到 25 mg/mL 时,其对 4 种细菌的抑菌圈直径分别为 11.62,11.39,11.00 和 7.83 mm,效果比阳性对照(链霉素和卡那霉素混合液)更好.

表 3 鲍鱼内脏多糖的抑菌圈直径
Tab. 3 Diameters of the antibacterial circles of abalone visceral polysaccharides mm

供试菌种	$\rho(\text{多糖})/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$				阳性对照	阴性对照
	6.25	12.5	25	50		
金黄色葡萄球菌	6.69	8.74	11.62	14.46	—	—
鼠伤寒沙门氏菌	6.31	8.22	11.39	14.50	7.37	—
大肠杆菌	3.44	8.62	11.00	12.28	9.53	—
铜绿假单胞菌	5.30	6.59	7.83	8.39	7.22	—

注:—表示无抑菌圈;数据为 3 次平行实验的平均值.

3 讨 论

本研究通过碱性蛋白酶提取单因素试验和正交试验确定了酶解提取鲍鱼内脏粗多糖的最佳工艺条件,并测定了在该条件下提取所得粗多糖的抗氧化活性.罗晓航等^[6]采用高压脉冲电场酶法辅助提取鲍鱼

内脏多糖,当多糖质量浓度为 10 mg/mL 时对羟自由基的清除率为 25.25%,而本研究中提取的鲍鱼内脏多糖样品在多糖质量浓度为 9.6 mg/mL 时,羟自由基清除率就达到 100%.王莅莎等^[7]采用碱性蛋白酶和胃蛋白酶分别酶解雌、雄皱纹盘鲍,再经 Sephadex G-100 洗脱共分离出 4 种成分,分别测定过柱前的 2 种样品和过柱后的 4 种成分的抗氧化活性,结果显示过柱前雌、雄鲍鱼内脏多糖样品清除羟自由基的半数有效质量浓度分别为 0.14 和 0.08 mg/mL,效果更优,但过柱后成分清除羟自由基的能力都有不同程度的下降.过柱前雌、雄鲍鱼内脏多糖样品的还原能力($A_{700}=0.2$)分别为 9.25 和 8.17 mg/mL,过柱后多糖质量浓度高的成分还原能力显著下降,质量浓度低者则略微加强^[7],但都低于本研究中碱性蛋白酶酶解所得多糖样品的还原能力($A_{700}=0.485$)8.16 mg/mL.类似地,也有其他文献^[20-22]报道纯化后的多糖化合物抗氧化活性较粗多糖更弱.出现这种现象的原因可能是单酶解所得鲍鱼内脏粗多糖样品中含有较多具有较好抗氧化活性的小分子物质,如低聚糖、多肽、氨基酸、脂肪酸、脂蛋白和一些重金属离子,而这些小分子物质在双酶解的过程中被去掉了一部分.综合分析表明,本研究中提取得到的鲍鱼内脏多糖具有较好的抗氧化活性,因此具有很好的应用前景.

本研究结果还表明纯化后的鲍鱼内脏多糖对 4 种供试菌都有良好的抑制效果,在 25 mg/mL 质量浓度下,其效果明显优于阳性对照.因此,鲍鱼内脏多糖具有较好抗氧化活性的同时,又能对常见的细菌产生抑制效果,该结果为鲍鱼内脏多糖在食品保鲜、医药保健等方面的应用提供了理论基础.

参考文献:

[1] BUTTERFIELD D A, CASTENG A A, POCERNICH C B, et al. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(8): 444-461.

[2] GRICE H C. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium[J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 26(8): 717-723.

[3] BECKER G L. Preserving food and health: antioxidants make functional, nutritious preservatives[J]. Food Processing, 1993(12): 54-56.

[4] CHEN H X, ZHANG M, QU Z S, et al. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2002, 77(2): 111-116.

- 2008, 106(2): 559-563.
- [5] CHEN Y, XIE M Y, NIE S P, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 231-241.
- [6] 罗晓航, 余鑫, 卢晓燕, 等. 鲍鱼脏器粗多糖体外抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2012, 31(6): 10-16.
- [7] 王莅莎, 朱蓓薇, 周大勇, 等. 鲍鱼脏器多糖的抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2009, 24(4): 65-68.
- [8] 苏永昌, 刘淑集, 王茵, 等. 鲍鱼内脏多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 吉林农业, 2010(10): 170-171.
- [9] 朱莉莉, 孙黎明, 李冬梅, 等. 鲍鱼内脏蛋白多糖体内对 H22 肝癌的抑制作用[J]. 营养学报, 2009, 31(5): 478-481.
- [10] 王莅莎, 朱蓓薇, 孙黎明, 等. 鲍鱼内脏多糖的体外抗肿瘤和免疫调节活性研究[J]. 大连工业大学学报, 2008, 27(4): 289-293.
- [11] ZHU B W, LI D M, ZHOU D Y, et al. Structural analysis and CCK-releasing activity of a sulfated polysaccharide from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera [J]. Food Chemistry, 2011, 125(4): 1273-1278.
- [12] 张永勤, 王哲平, 宋雨梅, 等. 还原糖测定方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 321-323.
- [13] 程迪, 于洁, 董丽, 河南产牡丹皮中多糖含量的测定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(2): 518.
- [14] 宿玮. 高品质海地瓜多糖制备工艺研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012: 26.
- [15] 贾彦明, 闵伟红. 海带多糖的分离纯化及体外抗氧化作用的研究[J]. 农产品加工学刊, 2010(8): 26-29.
- [16] 苏晓雨, 王振宇. 红松子种皮提取物活性成分及抗氧化作用研究[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(4): 99-102.
- [17] 刘春燕. 鲍鱼内脏多糖的结构和活性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2011: 9.
- [18] 陈健, 耿安静, 徐晓飞. 香菇多糖的过氧化氢脱色工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 293-295.
- [19] ZHU Y J, SONG K K, LI Z C, et al. Antityrosinase and antimicrobial activities of trans-cinnamaldehyde thiosemicarbazone [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12): 5518-5523.
- [20] WANG Z J, LUO D H. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(1): 54-58.
- [21] TSENG Y H, YANG J H, MAU J L. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae* [J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 732-738.
- [22] LI X M, LI X L, ZHOU A G, et al. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits *in vitro* [J]. European Polymer Journal, 2007, 43(2): 448-497.

Extraction, Purification and Antioxidant and Antibacterial Activity Analysis of Polysaccharides from Abalone Viscera

ZHANG Ruijuan, KE Lina, ZHENG Jing, SHI Yan, WANG Qin*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: The polysaccharides were obtained using abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera as the material in this study and enzymolyzed by alkaline protease, neutral protease, vernalase, papain, pepsin and trypsin. The results of antioxidant experiments showed that the yield of polysaccharides was the highest up to 6.66% when alkaline protease was used. Then through the single factor experiment and the orthogonal experiment, the optimal condition for alkaline protease extracting polysaccharides from abalone viscera was determined. Results of antioxidant activity showed that the concentration of primary polysaccharides from abalone viscera for 100% removal of hydroxyl free radical was 9.6 mg/mL, the concentration for 100% removal of ABTS radical was 7.5 mg/mL, and the concentration of reducing capacity at $A_{700}=0.485$ was 8.2 mg/mL. The results indicated that the polysaccharides had a good antioxidant activity. Additionally, the polysaccharide content and antioxidant activity were the highest with secondary enzymolyzing by pepsin. Furthermore, we got the high-purity abalone visceral polysaccharides with Sevage method and repeated freezing and thawing method to remove proteins, and with hydrogen peroxide method for depigment. Finally, double plate method was used to measure antibacterial activity of the abalone visceral polysaccharides, which showed that the purified polysaccharides suppressed reproduction of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* efficiently.

Key words: abalone viscera; polysaccharide; extraction; purification; antioxidant activity; antibacterial activity