

虾夷扇贝柱粗多糖不同提取工艺优化及其化学性质与抗氧化活性的比较

魏婉露¹, 牟雅甜¹, 李智博^{1,2,3}, 赵前程^{1,2,3}, 王海波^{1,2,3*}

(1. 大连海洋大学食品科学与工程学院, 大连 116023; 2. 大连海洋大学, 辽宁省水产品分析检验及加工技术科技服务中心, 大连 116023; 3. 大连工业大学, 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 大连 116034)

摘要: **目的** 优化虾夷扇贝柱粗多糖 2 种提取工艺, 并对比分析 2 种提取方式对扇贝柱粗多糖的化学性质及抗氧化活性的影响。**方法** 以提取率为指标, 在单因素实验基础上, 通过响应面分析法对扇贝柱粗多糖热水浸提法及酶解提取法进行优化, 并比较 2 种粗多糖红外光谱、单糖组成及抗氧化活性。**结果** 热水浸提法的最优工艺为: 料液比 1:3 (g/mL)、浸提时间 6 h、浸提温度 90 °C; 酶解法最优工艺为: 木瓜蛋白酶添加量 0.3%(鲜重)、pH 7.0、酶解温度 55 °C、酶解时间 5 h、料液比 1:3 (g/mL)。2 种粗多糖组成单糖相同, 但各单糖物质的量之比有所不同; 红外光谱结果表明, 2 种粗多糖结构相似, 主要由 α -D 型吡喃糖构成, 且含糖醛酸。抗氧化结果表明, 不同提取方式得到的扇贝柱粗多糖具有不同的抗氧化活性, 酶解法提取的粗多糖具有较高的抗氧化活性。**结论** 本研究确定了虾夷扇贝柱粗多糖 2 种提取方式的最优条件, 酶解法粗多糖提取率较高且具有较好抗氧化活性, 为后续研究提供了理论依据。

关键词: 虾夷扇贝; 粗多糖; 提取方法; 化学性质; 抗氧化活性

Optimization of different extraction processes of crude polysaccharide from *Patinopecten yessoensis* adductor and comparison of its chemical properties and antioxidant activity

WEI Wan-Lu¹, MU Ya-Tian¹, LI Zhi-Bo^{1,2,3}, ZHAO Qian-Cheng^{1,2,3}, WANG Hai-Bo^{1,2,3*}

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Liaoning Provincial Aquatic Products Analysis and Processing Technology Scientific Service Center, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 3. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

ABSTRACT: Objective To optimize 2 kinds of extraction processes for crude polysaccharide from *Patinopecten yessoensis* adductor, and compare and analyze the effects of 2 kinds of extraction methods on chemical properties and antioxidant activity of crude polysaccharide from *P. yessoensis* adductor. **Methods** With the extraction rate as the index, on the basis of single factor experiment, the hot water extraction and enzymatic extraction of crude polysaccharide from *P. yessoensis* adductor were optimized by response surface methodology, and the infrared

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901004)、辽宁省科技重大专项计划项目(2020JH1、10200001)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901004), and the Key Science and Technology Program of Liaoning Province (2020JH1, 10200001)

*通信作者: 王海波, 讲师, 主要研究方向为海洋活性物质。E-mail: wanghaibo@dlou.edu.cn

*Corresponding author: WANG Hai-Bo, Lecturer, College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China. E-mail: wanghaibo@dlou.edu.cn

spectra, monosaccharide composition and antioxidant activity of the 2 kinds of crude polysaccharides were compared.

Results The optimal conditions of hot water extraction were as follows: Solid-liquid ratio 1:3 (g/mL), extraction time 6 h, and extraction temperature 90 °C; the optimal conditions for enzymatic hydrolysis were as follows: Papain 0.3% (fresh weight), pH 7.0, enzymolysis temperature 55 °C, enzymolysis time 5 h and solid-liquid ratio 1:3 (g/mL). The 2 kinds of crude polysaccharides had the same monosaccharide composition, but the amount ratio of each monosaccharide substance was different; the infrared spectrum results showed that the 2 kinds of crude polysaccharides had similar structures, which were mainly composed of α -D pyranose and contained uronic acid. The antioxidant results showed that the crude polysaccharides extracted by different methods had different antioxidant activities, and the crude polysaccharides extracted by enzymatic hydrolysis had higher antioxidant activity.

Conclusion This study determines the optimal conditions for the 2 kinds of extraction methods of crude polysaccharide from *P. yessoensis* adductor, the enzymatic hydrolysis of crude polysaccharide shows high extraction rate and good antioxidant activity, which provides a theoretical basis for the follow-up study.

KEY WORDS: *Patinopecten yessoensis*; crude polysaccharide; extraction method; chemical properties; antioxidant activity

0 引言

扇贝(*Placopecten magellanicus*)隶属于软体动物门,广泛存在于世界各地。扇贝富含多种生物活性物质,如蛋白质^[1]、多糖^[2]、脂质^[3]、酶^[4]、类胡萝卜素^[5]及多不饱和脂肪酸^[6]等,其中,多糖为主要组成部分,具有抗凝血、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、提高机体免疫力等生理功能^[7-9]。多糖主要来源于动植物和微生物^[10],相比于植物,动物体内多糖的结构组成更加复杂,常与其他物质形成复合物。

目前,动物多糖的提取方式大多采用热水法浸提^[11]、碱法浸提^[12]、酶解法浸提^[13]、三相分离法^[14]及超声波辅助提取法^[15]等。热水浸提法对设备要求较低、操作简单,是目前采用最多的提取方法,但该方法所提取的多糖纯度较低,后续需要进行纯化。酶解法提取多糖效率高且安全性好,由于动物多糖与蛋白连接紧密,故该法多用于动物多糖提取,木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和复合蛋白酶为常用的水解酶。研究表明,提取方式的不同会对多糖的性质和生物活性产生影响^[16-17]。何丹等^[18]以羊栖菜为原料,依次采用冷水和热水浸提法提取多糖,2种多糖的单糖组成相似,但热水提取的多糖硫酸根含量更高,具有更好的羟自由基清除效果,而冷水提取的多糖糖醛酸含量更高,清除1,1-二苯基-2-三硝基苯(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)活性更强。田晓静等^[19]分别通过浸提法、微波法、超声波法及酶法提取枸杞多糖。浸提法的提取率最低,为8.14%,而微波法、超声波法和酶法提取率均高于浸提法,提取率分别为10.14%、14.48%和23.68%。

每100 g扇贝闭壳肌中碳水化合物约占15%^[20],含量仅次于蛋白质,因此,在扇贝柱多糖的相关研究中,筛选出高效的提取方法是非常必要的。本研究以虾夷扇贝柱为原料,采用热水浸提法和酶解法提取虾夷扇贝柱粗

多糖,以提取率为指标,采用单因素及响应面实验设计,热水浸提法中考察料液比、浸提时间、浸提温度对粗多糖提取率的影响;酶解法中考察pH、酶解温度、酶解时间、加酶量、料液比对粗多糖提取率的影响。此外,比较了2种方法提取的扇贝柱粗多糖的红外光谱、单糖组成及体外抗氧化活性,为进一步扇贝柱多糖高值化利用及开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)购自大连市长海县。

木瓜蛋白酶(800000 U/g,食品级,天津诺奥酶生产力促进有限公司);单糖标准品、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS](纯度 \geq 98%,北京Solarbio科技有限公司);浓盐酸、浓硫酸、苯酚、无水亚硫酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、过硫酸钾、三氯化铁、三氯乙酸、亚硝酸钠、对氨基苯磺酸、N-1-萘基乙二胺盐酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);氢氧化钠(分析纯,沈阳市联邦试剂厂);95%乙醇(分析纯,北京化工厂);3,5-二硝基水杨酸(分析纯,北京化学试剂公司);铁氰化钾(分析纯,天津光复精细化学研究所);溴化钾(光谱纯,北京博德恒锐科贸有限公司)。

1.2 仪器与设备

FW80高速粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);PB-10酸度计、BS224S分析天平(量程0.0001~220.0000 g)(德国Sartorius公司);HH-4数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);30 kDa超滤膜(上海力敏实业有限公司);101-2-BS电热恒

温鼓风干燥箱(上海平轩科学仪器有限公司); 721 可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); GL-21M 高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); FD-1 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); SYNERGY H1 多功能微孔检测仪(美国 Biotek 公司); FTIR 傅里叶变换红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司); Q20 差示量热扫描仪(美国 TA 仪器); 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 0.45 μm 水系膜(天津津腾实验设备有限公司); Elite Supersil ODS₂ 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)(上海屹利科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 热水浸提法提取粗多糖工艺优化

(1) 单因素实验

称取一定虾夷扇贝柱原料, 以料液比 1:3 (g/mL)、浸提时间 4 h、浸提温度 90 $^{\circ}\text{C}$ 为基础实验条件, 分别考察料液比[1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 (g/mL)]、浸提时间(4、5、6、7、8 h)、浸提温度(60、70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$)对虾夷扇贝柱粗多糖提取率的影响。

(2) 响应面实验设计

在单因素实验结果基础上, 以提取率为考查指标, 采用 Box-Behnken 模型设计三因素三水平响应面实验, 实验设计因素水平见表 1。

表 1 热水浸提法响应面优化因素水平表

Table 1 Response surface optimization factor level table for hot water extraction

因素	符号	编码水平		
		-1	0	1
料液比(g/mL)	A	1:2	1:3	1:4
浸提时间/h	B	5	6	7
浸提温度/ $^{\circ}\text{C}$	C	80	90	100

1.3.2 酶解法提取粗多糖工艺优化

(1) 单因素实验

以料液比 1:3 (g/mL)、木瓜蛋白酶添加量 0.3%、酶解时间 4 h、酶解温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解 pH 7.0 为基础实验条件, 分别考察 pH(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、酶解时间(2、3、4、5、6 h)、酶解温度(45、50、55、60、65 $^{\circ}\text{C}$)、加酶量(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)、料液比[1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 (g/mL)]对虾夷扇贝柱粗多糖提取率的影响。

(2) 响应面实验设计

在单因素实验结果基础上, 以提取率为考查指标, 选取加酶量、料液比、酶解时间 3 个影响因素, 根据 Box-Behnken 模型设计三因素三水平响应面实验, 实验设计见表 2。

表 2 酶解法响应面优化因素水平表

Table 2 Response surface optimization factor level table for enzymatic hydrolysis

因素	符号	编码水平		
		-1	0	1
加酶量/%	X_1	0.3	0.4	0.5
料液比/(g/mL)	X_2	1:2	1:3	1:4
酶解时间/h	X_3	4	5	6

1.3.3 粗多糖提取率的测定

总糖含量测定采用苯酚-硫酸法, 还原糖含量测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[21]。

多糖含量=总糖含量-还原糖含量。虾夷扇贝柱粗多糖提取率按公式(1)计算。

$$\text{提取率}/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: m_1 : 冻干的粗多糖质量(g); m_2 : 原料干重(g)。

1.3.4 虾夷扇贝柱粗多糖的制备

分别按照最优的热浸提工艺及酶解工艺(90 $^{\circ}\text{C}$ 灭酶 10 min)提取虾夷扇贝柱粗多糖, 冷却后过截留分子量 30 kDa 的超滤膜, 收集截留液, 加入 3 倍体积乙醇醇沉过夜, 离心后收集沉淀, 冷冻干燥得到 2 种粗多糖, 用于后续测定其理化性质及活性。

1.3.5 虾夷扇贝柱粗多糖结构表征

(1) 单糖组成分析

单糖组成分析参考江飞凤等^[22]的方法采用 PMP 柱前衍生法进行测定。实验重复 3 次。将收集的水相溶液过 0.45 μm 水系膜后供单糖组成高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。

HPLC 条件: Elite Supersil ODS₂ 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL ; 流动相 A 15%乙腈-磷酸盐缓冲液; 流动相 B 40%乙腈-磷酸盐缓冲液; 梯度洗脱程序: 0~1.00 min, 10% B; 1.01~15.00 min, 10%~35% B; 15.01~50.00 min, 35% B。

(2) 红外光谱分析

将经纯化所得的粗多糖与溴化钾粉末烘至恒重, 称取粗多糖样品 1~2 mg, 与干燥后的溴化钾(200 mg)混合并压成透明的薄片, 在 4000~400 cm^{-1} 范围扫描红外光谱。

1.3.6 虾夷扇贝柱粗多糖体外抗氧化活性测定

(1) ABTS 自由基清除能力测定

参考 CHEN 等^[23]的方法, 分别量取 7.4 mmol/L ABTS 溶液和 2.6 mmol/L 过硫酸钾溶液各 50 mL, 混匀后, 避光反应 12 h, 量取不同浓度的粗多糖样品溶液 0.2 mL, 与 0.8 mL ABTS 工作液混合, 摇匀后静置 6 min, 在 734 nm 波长下测定吸光度值。ABTS 自由基清除率按公式(2)计算。

$$\text{自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_1}{A_0}) \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中: A_1 : 粗多糖样品反应组吸光度值; A_0 : 空白反应组

吸光度值。

(2)总还原力测定

采用铁氰化钾法^[24]测定粗多糖总还原力(ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)。吸取不同浓度的粗多糖样品溶液 0.2 mL 于试管中, 加入 0.5 mL 磷酸缓冲盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)和 0.2 mL 1%铁氰化钾溶液, 50 °C水浴中反应 20 min。反应完成后, 再加入 1 mL 10%三氯乙酸溶液, 3000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀。取上清液 0.5 mL, 与 0.5 mL 蒸馏水及 0.1 mL 0.1%三氯化铁溶液混合, 摇匀后静置 10 min, 于 700 nm 波长下测定吸光度值。FRAP 计算公式见式(3):

$$\text{FRAP} = A_x - A_{x_0} \quad (3)$$

式(3)中: A_x : 粗多糖样品反应组吸光度值; A_{x_0} : 背景组吸光度值, 以蒸馏水替代 0.1%三氯化铁溶液。

(3)亚硝酸根(NO_2^-)清除能力测定

参考常飞等^[25]的方法测定虾夷扇贝柱粗多糖对亚硝酸根的清除能力。称取不同浓度虾夷扇贝柱粗多糖溶液 0.4 mL 于试管中, 等体积加入 5.0 mg/L 亚硝酸钠溶液, 混匀后于 37 °C水浴反应 20 min。随后加入 0.4 mL 0.4%对氨基苯磺酸溶液, 混匀后于 37 °C反应 5 min, 继续加入 0.2 mL 0.2% N-1-萘基乙二胺盐酸, 定容至 5 mL, 静置 15 min 后于波长 540 nm 下测定吸光度值。粗多糖对亚硝酸根的清除能力按公式(2)计算。

1.4 数据处理

绘图采用 Origin 8.5.1 软件绘制, 误差分析采用 Excel 软件, 响应面实验设计及数据分析采用 Design-Expert 8.0.6 软件, 每组实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 热水浸提法提取粗多糖的工艺优化

2.1.1 单因素实验结果

虾夷扇贝柱粗多糖提取率随料液比在 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 (g/mL)范围内呈先增长后降低趋势, 当料液比较低时, 由于溶液较少导致粗多糖溶出不完全, 提取率最低(3.01%); 当料液比达到 1:3 (g/mL)时, 提取率达到最高(4.01%), 因此选择料液比为 1:3 (g/mL)。浸提时间小于 6 h 时, 提取率随时间延长而显著提高, 在 6、7、8 h 时间段, 粗多糖提取率增长缓慢且趋于平缓。综合实验周期考虑, 选择浸提时间为 6 h。提取率随浸提温度的升高而呈先升高后降低的趋势, 在 90 °C时达到最高(4.05%)。其原因在于, 当浸提温度较低时(小于 80 °C), 虾夷扇贝柱粗多糖溶出受限; 而当浸提温度为 100 °C时, 高温使多糖降解, 提取率有所降低, 因此选择浸提温度为 90 °C。

2.1.2 响应面实验结果

根据单因素实验结果, 以料液比(A)、浸提时间(B)、

浸提温度(C)为因变量, 以提取率为响应值, 采用 Box-Behnken 设计实验, 结果见表 3。将表 3 数据进行二次回归分析, 回归方程为: $Y=4.11+0.061A+0.44B+0.019C+0.012AB-0.040AC-0.012BC-0.13A^2-0.44B^2-0.17C^2$ 。

由表 4 分析结果可知, 模型 P 值小于 0.0001, 表明该模型极显著, 失拟项 $P=0.053$, $R^2=0.9968$, 表面此模型可用于分析预测, 且拟合程度良好。料液比(A)、浸提时间(B)对热水浸提法对粗多糖的提取率的影响极显著($P<0.01$)。根据方差分析 F 值得出, 对粗多糖提取率影响的 3 个条件强弱顺序为: $B>A>C$ 。软件分析模型最佳提取条件为: 料液比 1:3.22 (g/mL)、浸提时间 6.22 h、浸提温度 88.67 °C, 在此条件下, 粗多糖提取率预测为 4.19%。最终调整条件为: 料液比 1:3 (g/mL)、浸提时间 6 h、浸提温度 90 °C。

表 3 响应面实验设计与结果
Table 3 Experimental design and results for response surface analysis

序号	A 料液比 (g/mL)	B 浸提时间 /h	C 浸提温度 /°C	提取率 /%
1	1:3	6	90	4.12
2	1:4	6	80	3.88
3	1:4	7	90	4.09
4	1:2	5	90	3.03
5	1:2	6	80	3.68
6	1:3	6	90	4.14
7	1:3	6	90	4.09
8	1:3	6	90	4.11
9	1:2	6	100	3.82
10	1:4	5	90	3.13
11	1:3	7	80	3.92
12	1:3	5	80	3.07
13	1:3	6	90	4.10
14	1:3	7	100	3.91
15	1:3	5	100	3.11
16	1:4	6	100	3.86
17	1:2	7	90	3.94

2.2 酶解法提取粗多糖的工艺优化

2.2.1 单因素实验结果

由于木瓜蛋白酶为偏中性的蛋白酶, 故选择 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)进行考察。在上述 pH 条件下, 粗多糖提取率呈先升高后缓慢下降趋势, 在 pH 7.0 时提取率达到峰值(7.44%), 因此, 选择最优酶解 pH 7.0 进行实验。酶解时间在 2、3、4、5 h 内, 粗多糖提取率随时间延长而显著

增加, 在 5 h 时达到最高(7.24%), 原因在于随着酶解时间的延长, 虾夷扇贝柱组织破坏更完全, 多糖释放更充分, 因此选择最优酶解时间为 5 h。在 45、50、55 °C 范围内, 粗多糖提取率随酶解温度的升高而显著增加, 在 55 °C 时, 粗多糖提取率达到 7.50%。酶解温度大于 55 °C 时, 随着温度的升高粗多糖提取率呈下降趋势。原因在于蛋白酶活力受温度影响较大, 温度升高使酶的活性降低, 因此酶解温度选择 55 °C 最合适。加酶量在 0.1%、0.2%、0.3% 范围内, 随着加酶量的增加, 粗多糖提取率显著提高, 提取率最高达 7.29%。继续增加加酶量, 粗多糖提取率趋于平缓, 基本保持不再显著变化($P>0.05$), 因此, 选择 0.3% 加酶量为最佳条件。酶解法提取粗多糖的提取率随料液比呈先升高后降低趋势, 在料液比为 1:3 (g/mL) 时, 提取率达到最高为 7.22%, 因此选择酶解料液比为 1:3 (g/mL)。

表 4 回归模型方差分析
Table 4 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	2.66	9	0.3	242.22	<0.0001	**
A	0.03	1	0.03	24.56	0.0016	**
B	1.55	1	1.55	1267.28	<0.0001	**
C	0.0028	1	0.0028	2.3	0.17	
AB	0.00063	1	0.00063	0.51	0.50	
AC	0.0064	1	0.0064	5.24	0.056	
BC	0.00063	1	0.00063	0.51	0.50	
A^2	0.07	1	0.07	56.89	0.0001	**
B^2	0.8	1	0.8	654.92	<0.0001	**
C^2	0.13	1	0.13	103.71	<0.0001	**
残差	0.0086	7	0.0012			
失拟项	0.0071	3	0.0024	6.37	0.053	ns
纯误差	0.0015	4	0.00037			
总和	2.67	16				

$R^2=0.9968$, $R^2_{Adj}=0.9927$

注: *表示差异显著; **表示差异极显著; ns 表示不显著, 下同。

2.2.2 响应面实验结果

商品化木瓜蛋白酶最适温度及 pH 相对固定, 故选择加酶量(X_1)、料液比(X_2)、酶解时间(X_3)为考查因变量, 根据单因素实验结果, 以提取率为响应值, 响应面实验设计如表 5 所示。将表 5 数据进行二次回归分析, 回归方程为: $Y=7.36-0.022X_1+0.14X_2+0.060X_3+0.012X_1X_2+0.048X_1X_3+0.018X_2X_3-0.11X_1^2-0.49X_2^2-0.25X_3^2$ 。

由表 6 分析结果可知, 模型 P 值小于 0.0001, 表明该

模型极显著, 失拟项 $P=0.078$, $R^2=0.9917$, 表明此模型可用于分析预测, 且拟合程度良好。料液比(X_2)、酶解时间(X_3)对酶解法提取粗多糖的提取率的影响极显著($P<0.01$)。根据方差分析 F 值得出, 对粗多糖提取率影响的 3 个条件强弱顺序为: $X_2>X_3>X_1$ 。软件分析模型最佳提取条件为: 加酶量 0.29%、料液比 1:3.14 (g/mL)、酶解时间 5.12 h, 在此条件下, 粗多糖提取率预测为 7.37%。最终调整条件为: 加酶量 0.3%、料液比 1:3 (g/mL)、酶解时间 5 h。

表 5 响应面实验设计与结果
Table 5 Experimental design and results for response surface analysis

序号	X_1 加酶量 /%	X_2 料液比 (g/mL)	X_3 酶解时间 /h	提取率 /%
1	0.4	1:3	5	7.34
2	0.4	1:2	6	6.47
3	0.4	1:2	4	6.43
4	0.3	1:2	5	6.66
5	0.5	1:2	5	6.62
6	0.3	1:3	4	6.99
7	0.3	1:4	5	6.86
8	0.5	1:3	4	6.82
9	0.4	1:4	4	6.72
10	0.3	1:3	6	7.06
11	0.4	1:3	5	7.37
12	0.4	1:4	6	6.83
13	0.5	1:4	5	6.87
14	0.4	1:3	5	7.36
15	0.5	1:3	6	7.08
16	0.4	1:3	5	7.39
17	0.4	1:3	5	7.32

2.3 红外光谱分析

虾夷扇贝柱粗多糖红外光谱如图 1 所示, 在波数 3386 cm^{-1} 处代表 -OH 伸缩振动; 而在 2930 cm^{-1} 处分别出现了 C-H 伸缩振动^[26]; 1655 cm^{-1} 处吸收峰为羧酸酯中 C=O 伸缩振动特征峰, 在 1408 cm^{-1} 处为羧基中的 C-O 伸缩振动, 表明粗多糖样品中可能含有糖醛酸结构^[27]; 1200~1000 cm^{-1} 吸收峰为 C-O 伸缩振动信号, 由此可知 2 种粗多糖样品均含有吡喃环结构^[28]。954 cm^{-1} 和 760 cm^{-1} 处吸收峰为 D -葡萄糖吡喃环特征吸收峰; 856 cm^{-1} 处吸收峰表明样品由 α -糖苷键构成。综上所述, 虾夷扇贝柱粗多糖主要为 α - D 型吡喃糖构成, 且含有糖醛酸, 2 种提取方式得到的粗多糖结构相似。

表6 回归模型方差分析
Table 6 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1.64	9	0.18	92.43	<0.0001	**
X_1	0.0041	1	0.0041	2.06	0.1945	
X_2	0.15	1	0.15	76.89	<0.0001	**
X_3	0.029	1	0.029	14.64	0.0065	**
X_1X_2	0.00063	1	0.00063	0.32	0.5906	
X_1X_3	0.0090	1	0.0090	4.59	0.0694	
X_2X_3	0.0012	1	0.0012	0.62	0.4559	
X_1^2	0.055	1	0.055	27.94	0.0011	**
X_2^2	1.01	1	1.01	512.34	<0.0001	**
X_3^2	0.27	1	0.27	138.36	<0.0001	**
残差	0.014	7	0.0020			
失拟项	0.011	3	0.0036	4.95	0.078	ns
纯误差	0.0029	4	0.00073			
总和	1.65	16				

$R^2=0.9917, R_{Adj}^2=0.9809$

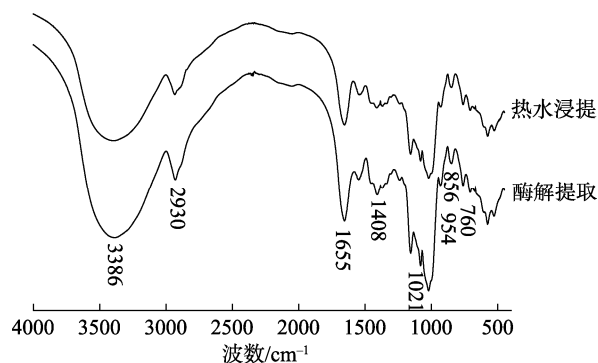


图1 虾夷扇贝柱粗多糖红外光谱图

Fig.1 Infrared spectra of crude polysaccharides from *P. yessoensis* adductor

2.4 单糖组成分析

热水浸提法所提取虾夷扇贝柱粗多糖主要由甘露糖(0.36%)、氨基糖醛酸(0.04%)、鼠李糖(0.18%)、葡萄糖醛酸(0.37%)、半乳糖醛酸(0.50%)和葡萄糖(98.91%)组成;酶解法所提取虾夷扇贝柱粗多糖主要由甘露糖(2.22%)、氨基糖醛酸(1.03%)、鼠李糖(6.98%)、葡萄糖醛酸(0.69%)、半乳糖醛酸(0.57%)和葡萄糖(88.51%)组成。2种虾夷扇贝柱粗多糖组成单糖相同但相对含量差别较大,热水浸提法提取的粗多糖中主要组成单糖为葡萄糖,而酶解处理后甘露糖及鼠李糖相对含量增加,葡萄糖占比减小。分析原因在于,酶解法提取多糖,在提取的同时有一定的纯化解作用,与多糖相连的蛋白组织断裂,多糖结构进一步暴露。可见,多糖结构及组成与提取方法相关,不同提取手段可能影响单糖的组成及比例^[29]。

2.5 抗氧化活性分析

2.5.1 ABTS 自由基清除率

虾夷扇贝柱粗多糖对 ABTS 自由基清除能力如图 2a 所示。随着粗多糖质量浓度的升高,ABTS 自由基的清除率也随之升高。当质量浓度达到 10 mg/mL 时,热水浸提法和酶解法粗多糖的清除率分别为 57.2%和 58.7%。相较于热水浸提法,酶解法得到的粗多糖对 ABTS 自由基清除率更高,半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)分别为 8.96 和 6.70 mg/mL。多糖抗氧化能力与多糖性质有关^[30],研究表明,组成多糖的单糖中甘露糖比例越高^[31],多糖抗氧化活性越强。由单糖组成结果可知,酶解法提取得到的粗多糖中甘露糖占比较大,具有较强的抗氧化活性。

2.5.2 FRAP

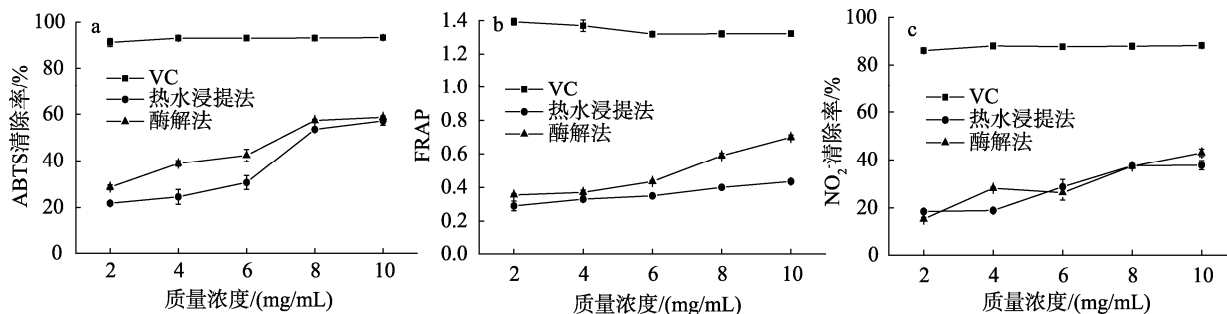
由图 2b 可知,粗多糖总还原力与质量浓度呈正相关。当粗多糖质量浓度达到 10 mg/mL 时,样品总还原力分别为 0.44(热水浸提法)和 0.7(酶解法),酶解提取法所提取虾夷扇贝柱粗多糖的总还原能力高于热水浸提法,与 ABTS 自由基清除能力实验结果一致,表明提取方式对虾夷扇贝柱粗多糖抗氧化活性有一定的影响,酶解法可提高虾夷扇贝柱粗多糖的抗氧化活性。

2.5.3 NO₂清除率

虾夷扇贝柱粗多糖对 NO₂清除能力如图 2c 所示。粗多糖样品 NO₂清除率与质量浓度呈正相关。2种粗多糖对 NO₂的清除作用差别不大,在 10 mg/mL 时,清除率分别为 37.4%(热水浸提法)和 42.66%(酶解法)。此结果与 ABTS 自由基清除率相符。

3 结论与讨论

本研究选择 2 种方法:热水浸提法及酶解法分别对虾夷扇贝柱粗多糖提取工艺进行优化,考察了提取方法对虾夷扇贝柱粗多糖提取率、化学性质及抗氧化活性的影响。结果表明,热水浸提法最优条件为:料液比 1:3 (g/mL)、浸提时间 6 h、浸提温度 90 °C;酶解提取最优条件为:木瓜蛋白酶添加量为 0.3%(鲜重)、pH 7.0、酶解温度 55 °C、酶解时间为 5 h、料液比 1:3 (g/mL)。2种粗多糖红外图谱相似,均具有少量糖醛酸结构。2种粗多糖单糖组成相同,均含有甘露糖、氨基糖醛酸、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和葡萄糖,酶解法较热水浸提法含有较高的甘露糖、氨基糖醛酸和鼠李糖。本研究对 2种粗多糖的 ABTS 自由基清除能力、FRAP 及 NO₂清除能力进行了测定,结果表明 2种粗多糖均具有抗氧化活性,酶解法提取多糖较热水浸提法提取多糖具有较好的抗氧化活性,说明酶解提取时改变了多糖的结构使其抗氧化活性增大。通过 2种提取工艺的优化及粗多糖性质的比较,为后续虾夷扇贝柱多糖进一步高值化利用提供依据。不同提取方式所得多糖分离纯化、结构表征、消化吸收特性有待进一步深入研究。



注: a 为 ABTS 自由基清除率; b 为 FRAP; c 为 NO₂-清除率; 维生素 C (vitamin C, VC)。

图 2 提取方法对虾夷扇贝柱粗多糖抗氧化活性的影响(n=3)

Fig.2 Effects of extract methods on antioxidant activities of crude polysaccharides from *P. yessoensis* adductor (n=3)

参考文献

- MAO FJ, SHI PJ, CHEN H, *et al.* Beneficial effects of polysaccharides on the solubility of *Mytilusedulis* enzymatic hydrolysates [J]. *Food Chem*, 2018, 254(15): 103–108.
- XIE JH, JIN ML, MORRIS GA, *et al.* Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2016, 56(1): 60–84.
- BARBOSA M, VALENTÃO P, ANDRADE PB. Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: Implications for neurodegenerative diseases [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(9): 4934–4972.
- MILUTINOVIĆ A, ZORC-PLESKOVIĆ R, ŽIVIN M, *et al.* Magnetic resonance imaging for rapid screening for the nephrotoxic and hepatotoxic effects of microcystins [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(8): 2785–2798.
- 张喜峰, 杨生辉, 罗光宏, 等. (乙醇+丙酮)/硫酸铵二元双水相萃取分离螺旋藻中β-胡萝卜素[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(3): 393–397. ZHANG XF, YANG SH, LUO GH, *et al.* Extraction of β-carotene from spirulina using ethanol and acetone-ammonium sulphate aqueous two-phase system [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2015, 27(3): 393–397.
- CHENG DW, ZHANG HK, LIU HX, *et al.* Identification and molecular characterization of peroxiredoxin 6 from noble scallop *Chlamys nobilis* revealing its potent immune response and antioxidant property [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 100(15): 368–377.
- SONG S, WANG L, WANG L, *et al.* Structural characterization and anticoagulant activity of two polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* viscera [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136: 579–585.
- 于囡, 刘赛, 王海桃, 等. 扇贝裙边糖胺聚糖体外抗I型单纯疱疹病毒实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(2): 210–213. YU N, LIU S, WANG HT, *et al.* Experimental study of the antiviral effect of glycosaminoglycan from scallop skirt on herpes simplex virus type 1 *in vitro* [J]. *Chin Pharm Bull*, 2008, 24(2): 210–213.
- 李广靖, 崔青曼, 袁春营. 虾夷扇贝下脚料糖胺聚糖的化学组成与生物学功能研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 134–136, 139. LI GJ, CUI QM, YUAN CY. Study on chemical composition and biological activities of glycosaminoglycan from *Patinopecten yessoensis* waste [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(24): 134–136, 139.
- GOU YR, SUN J, LIU J, *et al.* Structural characterization of a water-soluble purple sweet potato polysaccharide and its effect on intestinal inflammation in mice [J]. *J Funct Foods*, 2019, 61: 103502.
- 尹秀莲, 赵瑜辉, 管明, 等. 河蚬多糖提取工艺优化及其免疫活性初步研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(8): 1325–1333. YIN XL, ZHAO YH, GUAN M, *et al.* Optimization of extraction process of *Corbicula fluminea* polysaccharide and preliminary study on its immune activity [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2018, 30(8): 1325–1333.
- 王元秀, 张桂香, 李峰, 等. 酵母多糖的提取及其对雏鸡免疫器官发育的影响[J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 256–259. WANG YX, ZHANG GX, LI F, *et al.* Optimization of extraction conditions of beer yeast polysaccharides and its effects on the development of chick immune organs [J]. *Food Sci*, 2011, 32(2): 256–259.
- CUI QM, CHEN JJ, YUAN CY, *et al.* The study on chemical composition and biological function of glycosaminoglycan from *Mactra veneriformis* [J]. *Food Ind*, 2013, (4): 154–156.
- YAN JK, WANG YY, QIU WY, *et al.* Three-phase partitioning for efficient extraction and separation of polysaccharides from *Corbicula fluminea* [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 163: 10–19.
- PHONGTHAI S, LIM ST, RAWDKUEN S. Ultrasonic-assisted extraction of rice bran protein using response surface methodology [J]. *J Food Biochem*, 2017, 41(2): 1–2.
- DONG HM, LIN S, ZHANG Q, *et al.* Effect of extraction methods on the properties and antioxidant activities of *Chuanminshen violaceum* polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93: 179–185.
- YAN YJ, LI X, WAN MJ, *et al.* Effect of extraction methods on property and bioactivity of water-soluble polysaccharides from *Amomum villosum* [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117: 632–635.
- 何丹, 张旭, 肖保衡, 等. 羊栖菜多糖的提取和抗氧化活性研究[J]. *海洋科学*, 2016, 40(12): 24–29. HE D, ZHANG X, XIAO BH, *et al.* Extraction and antioxidative activity of fucoidan from *Sargassum fusiforme* [J]. *Mar Sci*, 2016, 40(12): 24–29.
- 田晓静, 景冰玉, 王彩霞, 等. 枸杞多糖提取方法的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(2): 439–445. TIAN XJ, JING BY, WANG CX, *et al.* Research progress on extraction methods of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(2): 439–445.
- 谢宗墀. 海洋水产品营养与保健[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991. XIE ZY. Nutrition and health of marine aquatic products [M]. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1991.
- SÖZGEN BK, TÜTEM E, AKYÜZ E, *et al.* Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction [J]. *Talanta*, 2016,

- 147(15): 162–168.
- [22] 江飞凤, 谭晓辉, 胡鹏刚, 等. 超声-微波协同提取柚子皮多糖工艺优化及单糖组成、结构和抗氧化活性分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 196–204.
- JIANG FF, TAN XH, HU PG, *et al.* Optimization of ultrasonic-microwave extraction process of pomelo peel polysaccharide and analysis of monosaccharide composition, structure and antioxidant activity [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(2): 196–204.
- [23] CHEN SL, SHANG HM, YANG JY, *et al.* Effects of different extraction techniques on physicochemical properties and activities of polysaccharides from comfrey (*Symphytum officinale* L.) root [J]. Ind Crop Prod, 2018, 121: 18–25.
- [24] 姜柳, 朱俊向, 汪东风, 等. 茶叶提取液的循环伏安电位测定及与总还原力的相关性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 312–318.
- JIANG L, ZHU JX, WANG DF, *et al.* Relationship between cyclic voltammetry redox potential and total reducing power of tea extracts [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(1): 312–318.
- [25] 常飞, 杨雪果, 肖士成, 等. 脱脂羊脑蛋白水解多肽的分离纯化及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 33–39.
- CHANG F, YANG XG, XIAO SC, *et al.* Purification and antioxidant activity of peptides derived from defatted goat brain protein [J]. Food Sci, 2016, 37(1): 33–39.
- [26] JAN KN, PANESAR PS, RANA JC, *et al.* Structural, thermal and rheological properties of starches isolated from Indian quinoa varieties [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 102: 315–322.
- [27] 王杏, 邓青芳, 陈华国, 等. 桑椹多糖的结构表征及其对乙醇脱氢酶活性的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12): 2329–2333.
- WANG X, DENG QF, CHEN HG, *et al.* Characterization and activity effect on ADH of polysaccharides from mori fructus [J]. Chin J Chin Mater Med, 2017, 42(12): 2329–2333.
- [28] LI XY, WANG L. Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 83: 270–276.
- [29] 宣丽, 刘长江. 不同提取方法对软枣猕猴桃多糖单糖组成及抗氧化活性的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(9): 1260–1265.
- XUAN L, LIU CJ. Effect of different extraction methods on the monosaccharide composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Actinidia arguta* [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25(9): 1260–1265.
- [30] LI WF, HU XY, WANG SP, *et al.* Characterization and anti-tumor bioactivity of astragalus polysaccharides by immunomodulation [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 189: 589–593.
- [31] 胡婷, 辛萌, 周晓琳, 等. 微波法制备甘露糖醛寡糖及其体外抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(3): 27–33.
- HU T, XIN M, ZHOU XL, *et al.* Preparation of mannuronic acid oligosaccharides by microwave-assistant method and study of their *in vitro* antioxidant activities [J]. Chin J Mar Drug, 2014, 33(3): 27–33.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



魏婉露, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋多糖。

E-mail: 962265726@qq.com



王海波, 讲师, 主要研究方向为海洋活性物质。

E-mail: wanghaibo@dlou.edu.cn