

三角帆蚌多糖的超声波辅助提取 及体外抗菌活性

乔德亮^{1,2}, 何晓梅¹, 韦传宝¹, 孙传伯¹, 朱旺生^{1,2}

(1. 皖西学院生物与制药工程学院, 安徽六安 237012;

2. 皖西学院农业工程设计与技术服务中心, 安徽六安 237012)

摘要:运用超声波辅助热水浸提、乙醇沉淀、Sevag 法脱蛋白的方法提取三角帆蚌多糖。在单因素实验基础上,运用响应面法中的 Box-Behnken 设计对三角帆蚌多糖的超声辅助提取参数进行优化。牛津杯-抑菌圈法测量三角帆蚌多糖的体外抗菌活性。结果表明:超声波辅助提取三角帆蚌多糖的最优提取条件为超声功率 600W、超声提取温度 50℃、超声提取时间 48min、水料比 12mL/g。使用此操作条件,多糖的得率为 4.61%。当质量浓度小于 40mg/mL 时,三角帆蚌多糖对大肠杆菌、藤黄微球菌无抑制作用;质量浓度大于 10mg/mL 时,对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有抑制作用,并且呈现出剂量-效应关系。三角帆蚌多糖对 3 种细菌抑制作用的强弱顺序是:金黄色葡萄球菌 > 蜡样芽孢杆菌 > 枯草芽孢杆菌。

关键词:三角帆蚌, 多糖, 超声波, 提取, 抗菌活性

Ultrasonic-assisted extraction and *in vitro* antibacterial activity of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*

QIAO De-liang^{1,2}, HE Xiao-mei¹, WEI Chuan-bao¹, SUN Chuan-bo¹, ZHU Wang-sheng^{1,2}

(1. College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China;

2. Agricultural Center of Engineering Design and Technical Service, West Anhui University, Lu'an 237012, China)

Abstract: Polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* were extracted by using methods of ultrasonic-assisted hot water lixiviation, ethanol precipitation and Sevag's deproteinization. On the base of single-factor tests, parameters combination for the ultrasonic-assisted extraction of *H. cumingii* polysaccharides was optimized by using Box-Behnken design of response surface methodology. Antibacterial activities of *H. cumingii* polysaccharides were evaluated *in vitro* by using method of Oxford cup-inhibition zone. Results showed that optimum conditions for the extracting of *H. cumingii* polysaccharides were ultrasonic power 600W, extracting temperature 50℃, extracting time 48min and ratio of water to raw material 12mL/g. Practicing this optimal condition, extraction yield of polysaccharides from *H. cumingii* was 4.61%. When polysaccharide concentration was less than 40mg/mL, no obvious inhibitory effect of *H. cumingii* polysaccharides on *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* was observed. When polysaccharide concentration was more than 10mg/mL, polysaccharides of *H. cumingii* could inhibit the growth of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* in a dose-dependent manner. The antibacterial activity of *H. cumingii* polysaccharides against *Staphylococcus aureus* was the strongest, followed by *Bacillus cereus*, then the inhibitory effect on *Bacillus subtilis* was the weakest.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; polysaccharides; ultrasonic wave; extraction; antibacterial activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)15-0072-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.15.006

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii* Lea) 俗称三角蚌、珍珠蚌、河蚌等, 为我国特有的淡水贝类, 是我国最主要的淡水珍珠养殖母蚌之一, 其养殖业已遍及浙

江、安徽、江苏、湖北、湖南、江西、福建等多个省份。三角帆蚌除了用于培育珍珠外, 其蚌肉还富含动物蛋白、多糖类及其它营养成分, 有着多种重要用途。已有一些报道, 三角帆蚌蚌肉富含多糖类物质, 具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力等作用^[1-4]。

多糖的提取通常采用“热水浸提、乙醇沉淀”法, 但此法需要较高的温度和较长的时间且提取得率也较低。超声波辅助提取能够提高多糖的提取得率, 已被广泛应用于多糖的提取中, 此技术是高效提取

收稿日期: 2013-12-24

作者简介: 乔德亮 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物功能因子。

基金项目: 国家自然科学基金 (31271853); 安徽省自然科学基金 (1308085MC33)。

多糖的技术措施之一^[5-7]。已有研究显示,多糖类物质具有一定的抑菌作用^[8-9]。三角帆蚌多糖的超声波辅助提取及抗菌活性未见报道。本文利用超声波辅助提取技术,在单因素实验的基础上通过响应面法(RSM)对三角帆蚌多糖的提取参数进行优化,同时测量分析了该多糖的体外抗菌活性,为三角帆蚌多糖的进一步研究和开发利用积累一些资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三角帆蚌 购于安徽省无为县珍珠养殖场,取其内脏组织用75% (体积分数)的乙醇浸泡备用。实验菌种大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)由本院微生物实验室提供。

超声波清洗器 KQ-600B 型,昆山市超声仪器有限公司;旋转蒸发仪 RE-5200 型,上海亚荣生化仪器厂;紫外可见分光光度计 Alpha-1500 型,上海光谱元仪器有限公司;隔水式恒温培养箱 GRP-9080 型,上海森信实验仪器有限公司;洁净工作台 SW-CJ-IBU 型 苏州安泰空气技术有限公司;压力蒸汽灭菌锅 LDZX-50KBS 型,上海申安医疗器械厂等。

葡萄糖标准品购于 Sigma 公司,其它试剂均为常规分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖的超声波辅助提取 参照姚以才等^[8]、张海艳等^[10]报道的方法稍作修改。取保存备用的材料50g 加去离子水,置超声波清洗器里进行热水浸提(超声功率600W,水料比5~20mL/g,超声提取温度20~80℃,超声提取时间10~50min)。将浸提液离心(5000r/min、15min)取上清液,沉淀物用相同方法再提取2次,离心(5000r/min、15min)取上清液。合并3次上清液,置旋转蒸发器50℃减压浓缩至适量,浓缩液加3倍体积无水乙醇(乙醇终浓度为75%)沉淀过夜,离心(5000r/min、15min)取沉淀物,得到水溶性粗提物。粗提物采用 Sevag 法^[11]脱除游离蛋白,得粗多糖。粗多糖中多糖含量的测定参照 Dubois 等^[12]、张惟杰^[13]报道的苯酚-硫酸比色法稍作修改,以葡萄糖标准品为标样制作标准曲线。

多糖得率(%) = [粗多糖中多糖质量(g)/原材料质量(g)] × 100。

在单因素实验基础上进行响应面实验,每组实验设置3个平行,实验结果以平均值 ± 标准差表示,因素水平的确定以多糖得率为判断指标。

1.2.2 多糖提取参数优化的实验设计 参照姜绍通等^[14]、纪学芳等^[15]报道的方法稍作修改。超声功率为600W,选择超声提取温度、超声提取时间及水料比3个单因素分别进行实验。超声提取温度设置20、35、50、65和80℃五个梯度,超声提取时间及水料比分别是40min和15mL/g;超声提取时间设置10、20、30、40和50min五个梯度,超声提取温度及水料比分别是65℃和15mL/g;水料比设置5、10、15和

20mL/g四个梯度,超声提取温度及时间分别是65℃和40min。

通过单因素实验,几个变量的中心点值及适宜范围已被初步确定。在此基础上,运用 Design experts 软件,选择 Response surface 法中的 Box - Behnken 设计进行三因素三水平的参数优化实验。为便于统计计算,对各因素水平进行编码(表1),各因素的实验水平及其响应值、预测值列于表2。再运用 Design experts V6.0 软件对实验数据进行回归分析,拟合出三元二次回归方程,模型方程的显著性由 F-检验来检测。

表1 各因素编码及水平
Table 1 Code and levels of factors

因素	编码及水平		
	-1	0	+1
A 温度(℃)	35	50	65
B 时间(min)	30	40	50
C 水料比(mL/g)	10	15	20

1.2.3 多糖体外抗菌活性测定 参照姚以才等^[8]、许瑞波等^[9]、王晶晶等^[16]、赵成萍等^[17]报道的方法稍作修改。配制牛肉膏-蛋白胨培养基并灭好菌备用。斜面培养使菌种复苏,然后制备菌悬液。用接种环刮取已复苏的斜面培养基上菌落2~3次于液体培养基中,37℃摇瓶培养18~24h。调整培养液浓度,使600nm吸光值为0.6~0.8,制成菌悬液,4℃冰箱保存备用。

实验用培养皿每个倒6mL培养基,冷却凝固。试管每支加6mL未冷却的培养基,迅速吸取适宜浓度的摇瓶培养液0.2mL加入试管中,摇匀,立即倒入含有已凝固培养基的培养皿中,冷却凝固。轻轻放置牛津杯(直径7.8mm)。取0.2mL不同浓度的多糖溶液(0、10、20、40mg/mL)加入牛津杯中,37℃培养18~24h。观察生长情况,测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 单因素实验对三角帆蚌多糖提取得率的影响

超声提取温度、超声提取时间及水料比3个单因素分别进行了实验,结果如图1~图3所示。当温度小于50℃时,超声提取温度对三角帆蚌多糖得率的影响呈正向显著性($p < 0.05$);温度大于50℃时,超声提取温度对三角帆蚌多糖得率的影响不显著($p > 0.05$)(图1)。当时间小于40min时,超声提取时间对三角帆蚌多糖得率的影响呈正向显著性($p < 0.05$);时间大于40min时,超声提取时间对三角帆蚌多糖得率的影响不显著($p > 0.05$)(图2)。当水料比小于15mL/g时,水料比对三角帆蚌多糖得率的影响呈正向显著性($p < 0.05$);水料比大于15mL/g时,水料比对三角帆蚌多糖得率的影响不显著($p > 0.05$)(图3)。所以50℃、40min及15mL/g分别被选作后续响应面实验超声提取温度、超声提取时间及水料比的中心点值。

2.2 响应面实验优化三角帆蚌多糖的提取参数

2.2.1 模型预测及统计分析 不同提取参数组合条

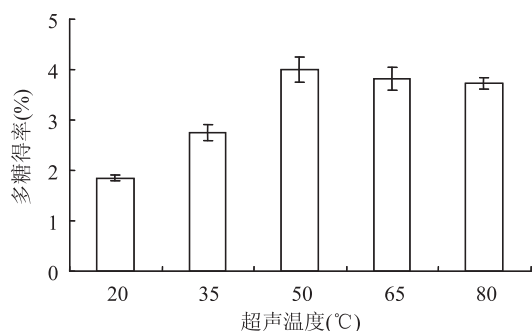


图1 超声提取温度对多糖得率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic extracting temperature on the yield of polysaccharides

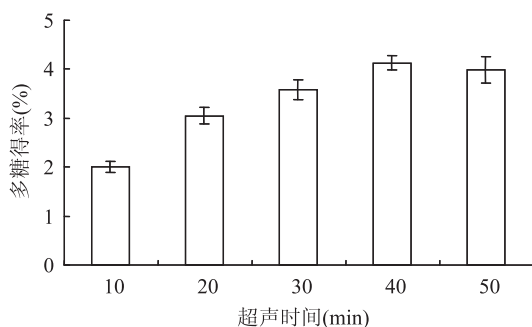


图2 超声提取时间对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic extracting time on the yield of polysaccharides

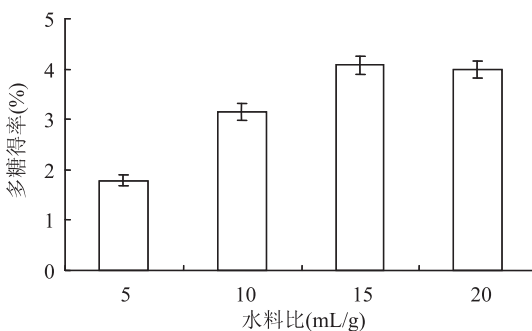


图3 水料比对多糖得率的影响

Fig.3 Effect of ratio of water to raw material on the yield of polysaccharides

件下,响应面实验的实验结果列于表2。由表可知,在这些实验条件下,多糖得率的范围为2.16%~4.90%,其最高值出现在中心点条件下,即超声提取温度50℃、超声提取时间40min、水料比15mL/g。运用Design-Expert V6.0软件,对实验结果进行多元回归分析,三角帆蚌多糖得率的预测值可由下面的三元二次方程进行预测计算: $Y = 4.43 - 0.26A + 0.40B - 0.31C - 0.90A^2 - 0.78B^2 - 0.60C^2 - 0.26AB + 0.43AC - 0.81BC$ 。这里A、B、C分别是超声提取温度、超声提取时间以及水料比的编码值。

p 值可作为显著性检验的工具。 p 值越小,则回归模型及相应变量的相关性就越显著。当 $p < 0.05$ 时,回归模型相应项目的相关性就被认为是显著的^[18]。失拟项不显著,表明回归模型模拟得比较好,可以较好地用来分析数据。多元回归模型的回归系

数、方差分析及统计显著性检验列于表3。方差分析结果表明,回归模型是高度显著的, F -检验显示回归模型有很高的 F 值($F = 19.19$)和极低的 p 值($p < 0.001$)。所有回归变量中,除了AB的相关性不显著外,其它回归变量数的相关性都是显著或极显著的,A、C及AC是显著的模型项目,B、 A^2 、 B^2 、 C^2 及BC是极显著的模型项目。

表2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Design matrix and results of the Box-Behnken experiment

实验号	A	B	C	多糖得率(%)	
				实验值	预测值
1	-1	-1	0	2.16 ± 0.13	2.33
2	1	-1	0	2.47 ± 0.19	2.35
3	-1	1	0	3.54 ± 0.21	3.66
4	1	1	0	2.80 ± 0.17	2.62
5	-1	0	-1	4.01 ± 0.25	3.91
6	1	0	-1	2.35 ± 0.14	2.55
7	-1	0	1	2.65 ± 0.16	2.45
8	1	0	1	2.69 ± 0.15	2.79
9	0	-1	-1	2.23 ± 0.15	2.15
10	0	1	-1	4.59 ± 0.24	4.56
11	0	-1	1	3.12 ± 0.28	3.15
12	0	1	1	2.26 ± 0.16	2.34
13	0	0	0	4.39 ± 0.31	4.43
14	0	0	0	4.04 ± 0.12	4.43
15	0	0	0	4.34 ± 0.27	4.43
16	0	0	0	4.90 ± 0.36	4.43
17	0	0	0	4.46 ± 0.26	4.43

2.2.2 响应曲面图和等高线图分析 响应曲面图和等高线图是回归模型的图表解释法。通过这些图表,可以观察了解各个变量实验值与响应值之间的关系以及两两变量之间交互作用的类型,然后再进一步对工艺参数进行优化。此技术已被广泛应用于生化生产过程工艺参数的优化^[8,15,19]。等高线图的形状可以反映两被测变量之间交互作用的显著与否,椭圆形等高线表明两被测变量之间交互作用是显著的,而圆形等高线则意味着两被测变量之间交互作用不显著,可以忽略不计^[18]。

本研究显示的三个响应曲面图及其等高线图列于图4~图6中。由图可以看出,三角帆蚌多糖得率对被检变量(超声提取温度、超声提取时间、水料比)的变化是敏感的,被检变量A与B之间交互作用不显著,A与C、B与C的交互作用都是显著的。此结果与回归模型的方差分析结果一致。进一步分析图谱发现,三角帆蚌多糖得率最高值的提取条件是适中的超声提取温度(图4、图5)、稍长的超声提取时间(图4、图6)、稍低的水料比(图5、图6)。

2.2.3 提取参数的优化 通过Design-Expert V6.0软件求出被检参数的最优值,即超声提取温度49.86℃、超声提取时间47.89min、水料比11.94mL/g。在此条件下,三角帆蚌多糖得率的预测值是4.62%,

表3 多元回归模型的回归系数及其显著性检验

Table 3 Regression coefficients and their significance tests for the quadratic polynomial model							
模型项目	回归系数	标准误	方差和	均方差	F 值	p 值	显著性
模型			14.51	1.61	19.19	0.0004	***
常数项	4.43	0.13					
A	-0.26	0.10	0.53	0.53	6.25	0.0410	*
B	0.40	0.10	1.29	1.29	15.33	0.0058	**
C	-0.31	0.10	0.76	0.76	9.00	0.0199	*
A ²	-0.90	0.14	3.44	3.44	40.98	0.0004	***
B ²	-0.78	0.14	2.56	2.56	30.43	0.0009	***
C ²	-0.60	0.14	1.50	1.50	17.85	0.0039	**
AB	-0.26	0.14	0.28	0.28	3.28	0.1130	
AC	0.43	0.14	0.72	0.72	8.60	0.0219	*
BC	-0.81	0.14	2.59	2.59	30.85	0.0009	***
失拟项			0.20	0.068	0.71	0.5941	

注 * 显著水平 0.05, ** 显著水平 0.01, *** 显著水平 0.001。

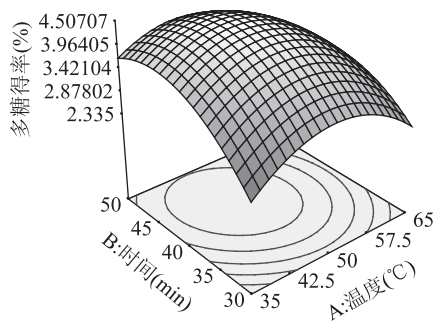


图4 超声提取温度和时间对多糖得率影响的响应曲面图
Fig.4 Response surface plot showing the effect of extracting temperature(A) and extracting time(B) on the polysaccharides yield

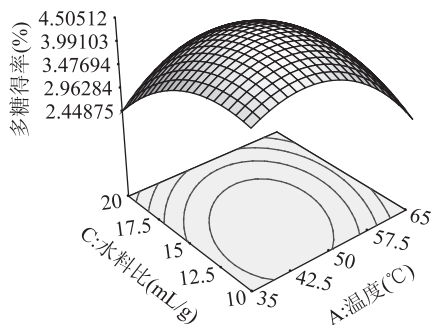


图5 超声提取温度和水料比对多糖得率影响的响应曲面图
Fig.5 Response surface plot showing the effect of extracting temperature(A) and ratio of water to raw material(C) on the polysaccharides yield

稍高于图形分析所得的数值。考虑到操作的方便性,最优提取参数确定为超声功率 600W、超声提取温度 50℃、超声提取时间 48min、水料比 12mL/g。使用这些参数,三角帆蚌多糖的得率为 4.61%,稍低于预测的最大值。

2.3 三角帆蚌多糖的体外抗菌活性

采用牛津杯-抑菌圈法研究三角帆蚌多糖对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌及藤黄微球菌的抑菌效果,以抑菌圈直径的大

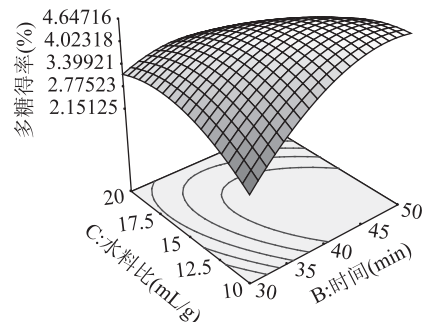


图6 超声提取时间和水料比对多糖得率影响的响应曲面图
Fig.6 Response surface plot showing the effect of extracting time(B) and ratio of water to raw material(C) on the polysaccharides yield

小来评价抑菌效果的强弱。不同质量浓度三角帆蚌多糖的体外抗菌实验结果列于表 4。当质量浓度小于 40mg/mL 时,三角帆蚌多糖对大肠杆菌、藤黄微球菌无抑制作用;质量浓度大于 10mg/mL 时,对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有不同程度的抑制作用,且随着多糖浓度的增加这种抑制作用呈现逐渐增强的趋势。在几个实验浓度组别中,三角帆蚌多糖对 3 种细菌抑制作用的强弱顺序都是:金黄色葡萄球菌 > 蜡样芽孢杆菌 > 枯草芽孢杆菌。

3 结论

在单因素实验基础上运用 Box-Behnken 实验设计对超声波辅助提取三角帆蚌多糖的工艺条件进行优化,其最优提取参数为:超声功率 600W、超声提取温度 50℃、超声提取时间 48min、水料比 12mL/g。在此条件下,三角帆蚌多糖的得率为 4.61%。

采用牛津杯-抑菌圈法研究三角帆蚌多糖对几种常见细菌的抑菌效果。当质量浓度小于 40mg/mL 时,三角帆蚌多糖对大肠杆菌、藤黄微球菌无抑制作用;质量浓度大于 10mg/mL 时,对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有不同程度的抑制作用。此抑制作用的强弱与多糖浓度呈正相关性。在相同浓度条件下,三角帆蚌多糖对 3 种细菌抑制

表4 三角帆蚌多糖对几种常见细菌的抗菌效果

Table 4 Antibacterial effects of *Hyriopsis cumingii* polysaccharides on some bacterial strains

浓度组别 (mg/mL)	抑菌圈直径(mm)					
	蜡样芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	藤黄微球菌	无菌水
I (10)	11.5 ± 0.67	13.5 ± 0.95	10.5 ± 0.51	-	-	-
II (20)	15.5 ± 0.83	16.5 ± 1.14	12.0 ± 0.69	-	-	-
III (40)	18.5 ± 1.02	19.0 ± 1.29	16.0 ± 1.01	-	-	-

注:牛津杯直径 7.8 mm;-:表示无抑菌现象。

作用的强弱顺序是:金黄色葡萄球菌 > 蜡样芽孢杆菌 > 枯草芽孢杆菌。

参考文献

- [1] 陈文星,吴皓,陆茵,等.珠蚌多糖对实验性移植肿瘤及NK细胞活性的作用[J].中国海洋药物,2007,26(2):30-33.
- [2] Dai Z, Zhang H, Zhang Y, et al. Chemical properties and immunostimulatory activity of a water-soluble polysaccharide from the clam of *Hyriopsis cumingii* Lea [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(2):365-369.
- [3] Qiao D, Ke C, Hu B, et al. Anti-oxidant activities of the polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(2):199-204.
- [4] Qiao D, Hu B, Gan D, et al. Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3):422-429.
- [5] Yan Y, Yu C, Chen J, et al. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83:217.
- [6] 乔德亮,赵峰,黄海忠,等.双孢蘑菇多糖超声波辅助提取及体外抗氧化活性(英文)[J].中药材,2012,35(8):1340-1347.
- [7] 贺婷,向莹,陈健.滑子菇多糖超声辅助提取工艺及抗氧化活性评价[J].食品工业科技,2013,34(7):235-239.
- [8] 姚以才,耿中华,王乃馨,等.芦根多糖的超声辅助提取及其抗菌活性[J].食品科学,2011,32(14):147-151.

- [9] 许瑞波,高颖颖,万蓓蓓,等.北五味子叶多糖的提取及抑菌活性[J].食品科学,2012,33(20):33-37.
- [10] 张海艳,郑玲.马齿苋多糖的提取及体外抗菌活性[J].江苏农业科学,2011,39(5):413-415.
- [11] Sevag M G, Lackman D B, Smolens J. The isolation of components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form [J]. Journal of Biological Chemistry, 1938, 124:425.
- [12] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Biochemistry, 1956, 28:350.
- [13] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1999:11.
- [14] 姜绍通,汪洪普,潘丽军.响应面法优化微波辅助提取芋头多糖工艺研究[J].食品工业科技,2013,34(3):215-219.
- [15] 纪学芳,徐怀德,张淑娟,等.响应面实验优化超声波提取光皮木瓜黄酮和多糖复合物[J].食品科学,2013,34(6):47-51.
- [16] 王晶晶,孟宪军.纯化对无梗五加果多糖抑菌活性的影响[J].食品工业科技,2011,32(12):173-174.
- [17] 赵成萍,冯翠萍,常晓敏.灵芝多糖抑菌作用的研究[J].食用菌,2012,(2):60-62.
- [18] Muralidhar R V, Chirumamila R R, Marchant R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9(1):17-23.
- [19] Kalil S J, Mauger F, Rodrigues M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization [J]. Process Biochemistry, 2000, 35(6):539-550.

因本刊已被《中国知网》(包括“中国知网”优先数字出版库)独家全文收录,所以所付稿酬中已包含该网站及光盘应付的稿酬。