doi:10.6043/j.issn.0438-0479.201702038

**鲍鱼内脏多糖的提取纯化及其抗氧化抑菌活性**

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：**本研究从鲍鱼内脏提取多糖，通过体外抗氧化活性模型评价其抗氧化活性，以期为鲍鱼废弃物的综合利用提供依据．以皱纹盘鲍内脏为实验材料，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，以多糖得率为指标，结果显示碱性蛋白酶酶解所得多糖得率最高，为6.66%．由单因素实验和正交实验，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ABTS（2,2-联氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐）自由基以及*A*700=0.485（还原能力）对应的鲍鱼内脏粗多糖质量浓度分别为9.6，7.5，8.16 mg/mL，表明所得到的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多糖含量最高．测定其抗氧化活性，结果显示多糖样品在3种抗氧化活性模型中均具有很好的效果．通过Sevage法和反复冻融法除蛋白，过氧化氢除色素，进一步纯化得到了高纯度的鲍鱼内脏多糖（AVP），并采用双层平板法测定其抑菌作用，结果表明AVP对金黄色葡萄球菌（*Staphyloccocus aureus*）、鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）、大肠杆菌（*Escherichia coil*）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；抑菌作用

**中图分类号：**Q 936  **文献标志码：**A

人体正常代谢过程中会产生具有生物活性的自由基．但自由基过多或清除过慢却会导致机体的衰老进程加速，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具有副作用，长期摄入会致使肝损伤、肿瘤等一系列病症出现[2-3]．在这种形式下，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，而占其软体组织的三分之一左右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]提取的鲍鱼脏器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、还原和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 H 22 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细胞具有一定的抑制作用，且在体外能够增强淋巴细胞增殖、腹腔巨噬细胞吞噬功能和NK细胞的杀伤能力．本研究采用酶解法从鲍鱼内脏中提取粗多糖，通过体外抗氧化活性模型评价了其抗氧化活性及抑菌活性，以期为鲍鱼废弃物的综合加工利用提供依据．

**1 材料与方法**

**1.1材料**

**1.1.1实验材料及试剂**

冷冻皱纹盘鲍内脏由莆田汇龙食品有限公司提供；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 U/mg和100 U/mg；酸性蛋白酶为枣庄市杰诺生物酶有限公司产品，酶活力为50 U/mg；胃蛋白酶为生工生物工程有限公司产品，酶活力为3000 U/mg；木瓜蛋白酶为生工生物工程有限公司产品，酶活力为3500 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．

**1.1.2供试菌株与小鼠**

供试的金黄色葡萄球菌（*Staphyloccocus aureus*，菌株编号：FJAT-12029）、鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*，菌株编号：FJAT-10334）、大肠杆菌（*Escherichia coil*，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．小鼠来源：SPF级ICR种小鼠（厦门大学实验动物中心，许可证号：SCXK(闽)2013-0001），体重18~22 g，雌雄各半，共40只；小鼠在厦门大学实验动物中心饲养(许可证号：SYXK(闽)2013-0006)．

**1.2 方法**

**1.2.1 实验材料前处理**

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、生殖腺等为一部分；嗉囊、胃、胃盲管等为一部分。洗净，真空冷冻干燥，粉碎机粉碎，过30目筛，于4℃保存待用．

**1.2.2鲍鱼内脏不同部位多糖得率的测定**

分别测定上述两部分样品的多糖得率．以固液比1:20把鲍鱼内脏干粉溶于蒸馏水中，60℃反应1 h，1400 *g*离心10 min，弃去沉淀，上清液加3倍体积的95%乙醇4℃醇沉过夜，1400 *g*离心10 min，弃去上清液，沉淀真空冷冻干燥，测定鲍鱼内脏不同部位的提取样品的多糖得率．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]，总糖含量减去还原糖含量即为多糖含量[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以释放多糖链，按照供应商提供的每种蛋白酶的最适酶解条件，参照相关文献[14-16]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的缓冲溶液作为溶剂，并设置一蒸馏水提取对照组，料液比为1：20（即1 g干粉中添加20 mL溶剂），加酶量为1.05x104 U/g，酶解3 h后沸水浴灭活10 min，降温至室温，调pH至中性，1400 *g*离心10 min，弃去沉淀，上清液加3倍体积的95%乙醇4℃醇沉过夜，1400 *g* 离心10 min，弃去上清液，沉淀真空冷冻干燥，测定多糖得率。每个因子进行3次平行实验．

**1.2.4碱性蛋白酶单因素实验**

酶解过程中以不同的加酶量（0.6ⅹ104、1.2ⅹ104、2.4ⅹ104、3.6ⅹ104、4.8ⅹ104、6ⅹ104 U/g），pH值（9、9.5、10、10.5、11），酶解温度（30℃、40℃、50℃、60℃、70℃），料液比（1：10、1：20、1：30、1：40、1：50）为考察因素进行反应，酶解结束后沸水浴灭活10 min，将酶解液1400 *g* 离心10 min，弃去沉淀，上清液加3倍体积的95%乙醇4℃沉淀过夜，1400 *g* 离心10 min，弃去上清液，沉淀真空冷冻干燥，测定多糖得率，每个因子进行3次平行实验．

**1.2.5碱性蛋白酶正交实验**

根据单因素实验结果，选取不同因子水平进行正交实验，通过SPSS Statistics 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**

抗氧化实验均以维生素C作为对照组．

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 FeSO4和9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液各1 mL，最后加入8.8 mmol/L H2O2 1 mL，混匀，在37℃下反应1 h，于510 nm处测定吸光度[17]．通过式(1)计算样品对羟自由基的清除率，绘制样品质量浓度（*X*）与羟自由基清除率（*Y*）的关系曲线．

*Y*=(1-) *X* ⅹ100% （1）

式中：*A*1为加入样品溶液的吸光度；*A*2为等体积的蒸馏水代替H2O2的吸光度；*A*0为等体积的蒸馏水代替样品溶液的吸光度．

2）还原能力的测定：

反应体系中先后分别加入0.2 mol/L pH 6.6磷酸缓冲液1.0 mL、1% 铁氰化钾溶液1.0 mL、不同质量浓度的样品溶液0.25 mL，混匀，在50℃反应20 min．再加入10%的三氯乙酸溶液1.0 mL，振荡混匀， 4 000 rpm离心10 min．取上清2.5 mL，再加入2.5 mL蒸馏水与0.1% FeCl3溶液0.5 mL，静置1 0 min，待溶液由黄色变为蓝色后，在700 nm处测吸光度（*A*700）[16]．空白组以等体积去离子水代替样品溶液．

利用线性回归方程y=0.054x+0.044（R2=0.997）计算出的在上述实验测定方法下*A*700=0.485时对应的样品质量浓度，表示还原能力．

3）清除ABTS自由基能力的测定：

参照苏晓雨等[18]的测定方法，将7 mmol/L ABTS与4.8 mmol/L亚硫酸钾等体积混合，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*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，室温静置6 min，然后在734 nm处测溶液的吸光值．通过式**(**2)计算多糖样品对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-) *X* ⅹ100% （2）

式中：*B*1为加入样品溶液的吸光度；*B*2为等体积的蒸馏水代替ABTS的吸光度；*B*0为等体积的蒸馏水代替样品溶液的吸光度．

**1.2.7双酶解提取鲍鱼内脏多糖**

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的鲍鱼内脏多糖干粉再次酶解，方法参照1.2.3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[19]和反复冻融法[19]除蛋白，过氧化氢除色素[20] ，进一步纯化粗多糖．将氯仿：正丁醇按3：1的体积比混合制备成Sevage溶液，与等体积的50 mg/mL多糖溶液混合，剧烈振摇2 min，1000 r/min离心10 min，去除下层有机相和中间蛋白层，上清反复进行此操作，直至中间无明显蛋白层出现．多糖溶液冷冻干燥后再反复冻融除蛋白：将粗多糖样品配成50 mg/mL的溶液，-80 ℃冷冻，解冻，10000 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，采用过氧化氢进行脱色处理：以不同的过氧化氢浓度（0.5%、1%、2%、3%、4%、5%），脱色温度（30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃），脱色时间（10、20、30、40、50、60、80、100、120 min）为考察因素，反应结束后在560 nm处测定吸光度，每个因子进行三次平行实验．将脱色处理后的提取液转移到3500Da的透析袋中，在4 ºC下透析24 h．将透析后的多糖溶液在45ºC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（AVP）样品备用．

**1.2.9 AVP的急性毒理试验**

取6 g AVP定容于12 mL蒸馏水中充分混匀，得到0.5 g/mL供试液．以蒸馏水为对照．将小鼠按性别、体重随机分成两组，雌雄各半，一组20只．灌胃0.015 mL/g，灌胃2次，期间间隔4 h，1天中总给药量为15 mg/g．对照组给予相同体积纯化水．观察时间14 d，观察小鼠存活情况并称重．半数致死剂量LD50计算：采用限量法测数[21]，logLD50=Xk-i(Σp-0.5)，其中Xk为最高剂量组对数值，Σp为死亡率总和，*i*为相邻两组剂量对数值之差，*n*为每组动物数．

**1.2.10 AVP对细菌的抑制作用**

采用琼脂扩散法测定抑菌圈大小[22]．将-20℃冷冻保藏的供试菌种在LB固体培养基上划线活化，置于30℃下活化24 h．从活化后的各个菌落中挑取单菌落，接种于25 mL的LB液体培养基中，接种量为1%，30℃下200 r/min摇菌24 h，制备成菌悬液．将灭菌的LB培养基（含1%的琼脂）15 mL倒入灭菌后的平皿中，制成下层培养基．将灭菌的LB培养基（含0.7%的琼脂）冷却至50℃，接种实验菌（菌密度为106个/mL)，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，分别是4个药物作用浓度，1个阴性对照（蒸馏水）和1个阳性对照（1 mg/mL链霉素和卡那霉素的混合液），在37 ℃恒温培养24 h后观察结果，测量抑菌圈的大小．

**2 实验结果**

**2.1鲍鱼内脏不同部位的多糖含量**

鲍鱼内脏不同部位的多糖含量不同，去除多糖含量较少的部位有利于后期多糖的纯化．经测定，角状消化腺、生殖腺等部位的多糖得率为3.15%，嗉囊、胃、胃盲管等部位的多糖得率为0.19%。因此，后期提取鲍鱼内脏多糖时，事先除去多糖含量很少的嗉囊、胃、胃盲管等部位，以简化后期除杂工艺．

**2.2鲍鱼内脏酶解最适蛋白酶的选择**

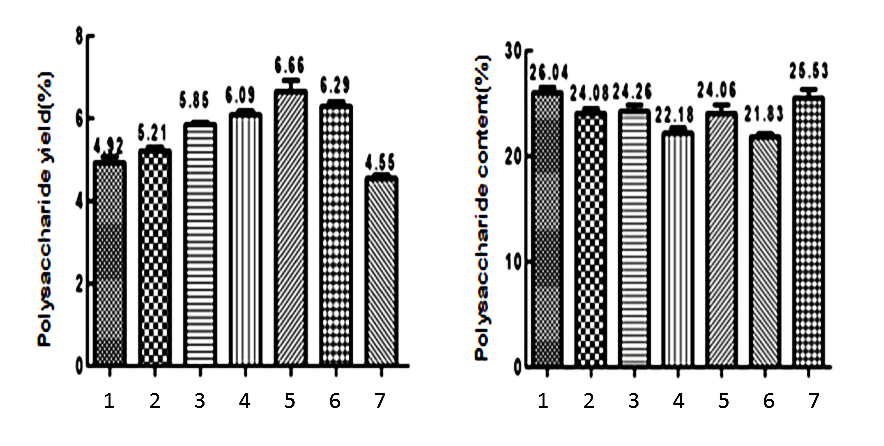
鲍鱼内脏按照各蛋白酶相应的最适酶解条件进行反应，反应条件如表1所示，其中溶剂浓度为0.2 mol/L．以多糖得率和多糖含量为指标，选取酶解效果最佳的蛋白酶．

表1 鲍鱼内脏酶解条件

Tab. 1 Protease hydrolysis conditions of abalone viscera

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 蛋白酶 | 溶剂 | pH | 反应温度/℃ |
| 碱性蛋白酶 | NaOH-H3BO3 | 10 | 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 |
|  | H2O |  | 80 |

六种蛋白酶酶解提取鲍鱼内脏多糖的得率（a）和含量（b）如图1所示，结果显示碱性蛋白酶酶解时，多糖得率最高，为6.66%，而多糖含量各组之间差异不显著．综合考虑，后期选用碱性蛋白酶酶解提取鲍鱼内脏多糖．



(a)

(b)

1：蒸馏水；2：木瓜蛋白酶；3：胰蛋白酶；4：中性蛋白酶；5：；碱性蛋白酶6：酸性蛋白酶；7：胃蛋白酶。

图1 不同蛋白酶酶解对提取鲍鱼内脏多糖得率（a）和含量（b）的影响

Fig. 1 The enzymolysis effects of different protease on yield (a) and content (b) of polysaccharides extracted from abalone visceral

**2.3碱性蛋白酶酶解鲍鱼内脏单因素试验**

碱性蛋白酶酶解鲍鱼内脏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1.2ⅹ104 U/g（图2 (a)），pH10.5（图2 (b)），酶解温度40℃（图2 (c)），料液比1：30（图2 (d)）．

(a)

(d)

(b)

(c)

（a）加酶量；（b）pH值；（c）温度；（d）料液比。

图2碱性蛋白酶酶解的不同因素鲍鱼内脏多糖得率的影响

Fig.2 Effects of different factors of alkaline protease extraction on the yield of abalone viscera polysaccharide

**2.4鲍鱼内脏碱性蛋白酶酶解正交试验**

正交试验结果如表2所示：各因素对多糖含量的影响大小次序为加酶量＞温度＞料液比＞pH；最佳因素组合为加酶量0.6ⅹ104 U/g，温度50℃，pH11，料液比1：40．

表2 正交试验结果

Tab. 2 Result of the orthogonal test

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验号 | | 因素 | | | | | | | | | | | 多糖含量（mg/ mL） | |
| 加酶量（104U/g） | | | 温度（℃） | | | pH | 料液比 | | | |
| 1 | 0.6 | | | 30 | | | 10 | | | 1：20 |  | 0.7211 | | |
| 2 | 0.6 | | | 40 | | | 10.5 | | | 1：30 | 0.7527 | | |
| 3 | 0.6 | | | 50 | | | 11 | | | 1：40 | 0.7990 | | |
| 4 | 1.2 | | | 30 | | | 10.5 | | | 1：40 | 0.7496 | | |
| 5 | 1.2 | | | 40 | | | 11 | | | 1：20 | 0.6897 | | |
| 6 | 1.2 | | | 50 | | | 10 | | | 1：30 | 0.7438 | | |
| 7 | 2.4 | | | 30 | | | 11 | | | 1：30 | 0.6257 | | |
| 8 | 2.4 | | | 40 | | | 10 | | | 1：40 | 0.5983 | | |
| 9 | 2.4 | | | 50 | | | 10.5 | | | 1：20 | 0.6062 | | |
| *k*1 | 0.7576 | | 0.6988 | | | 0.6877 | | | 0.6723 | |  |  | |  |  |
| *k*2 | 0.7277 | | 0.6802 | | | 0.7028 | | | 0.7074 | |  |
| *k*3 | 0.6085 | | 0.7163 | | | 0.7048 | | | 0.7156 | |
| *R* | 0.1496 | | 0.0361 | | | 0.0171 | | | 0.0433 | |

注：k1, k2, k3分别表示不同水平多糖得率的平均值，R表示极差。

**2.5碱性蛋白酶酶解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、还原能力（*A*700=0.485）以及100%清除ABTS自由基的鲍鱼内脏粗多糖质量浓度分别为9.60，8.16 和7.5 mg/mL，对照Vc则分别为0.48，0.08和0.08 mg/mL．结果表明所得到的多糖具有较好的抗氧化活性．

(c)

(b)

(a)

(f)

(e)

(d)

Vc（a）和鲍鱼内脏粗多糖（d）对羟自由基的清除作用；Vc（b）和鲍鱼内脏粗多糖（e）的还原能力；Vc（c）和鲍鱼内脏粗多糖（f）对ABTS自由基的清除作用．

图3 鲍鱼内脏粗多糖的抗氧化活性测定

Fig. 3 Antioxidant activity of abalone viscera polysaccharides

**2.6二次酶解提取鲍鱼内脏多糖**

为了进一步释放多糖链，采用二次酶解提取鲍鱼内脏多糖（提取条件参照表1）．如图4所示，在采用的5种酶中胃蛋白酶二次酶解酶提取的多糖含量最高，为(24.18±1.85)%．因此工艺上在碱性蛋白酶酶解后选用胃蛋白酶酶解二次提取鲍鱼内脏多糖．

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 Polysaccharide contents of abalone viscera polysaccharide derived second time from different protease hydrolysate

**2.7双酶解鲍鱼内脏多糖的抗氧化活性测定**

将得到的双酶解鲍鱼内脏多糖分别进行体外抗氧化活性测定。5种酶二次酶解后的多糖样品清除羟自由基的能力如图5(a)所示，用9.6 mg/mL胃蛋白酶二次酶解得到的鲍鱼内脏多糖羟自由基清除率为100%，优于中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶酶解的多糖样品（分别为96%、99.85%、83.04%、97.16%）；5种酶二次酶解后的多糖样品的还原能力如图5(b)所示，用11.2 mg/mL胃蛋白酶、胰蛋白酶二次酶解得到的鲍鱼内脏多糖测还原能力时，*A*700分别为0.525、0.496，明显优于中性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶酶解多糖样品（分别为0.208、0.178、0.176）；5种酶二次酶解后的多糖样品清除ABTS自由基的能力如图5(c)所示，用10 mg/mL的胃蛋白酶、木瓜蛋白酶二次酶解得到的鲍鱼内脏多糖ABTS自由基清除率分别为88.13%、87.64%，优于中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胰蛋白酶酶解多糖样品（分别为80.16%、61.95%、78.37%）．综合考虑，用胃蛋白酶二次酶解得到的鲍鱼内脏多糖在清除羟自由基、还原能力和清除ABTS自由基方面均具有较好的抗氧化活性．

(a)

(a)清除羟自由基的能力；(b)还原能力；(c)清除ABTS自由基的能力．

图5双酶解鲍鱼内脏多糖的抗氧化活性

Fig.5 The antioxidant activity of abalone viscera polysaccharides

**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体积分数浓度为4%（图6(a)）、温度为60℃（图6(b)）、时间为120 min（图6(c)）时多糖色素脱除率最高．因此选定脱色工艺为：将鲍鱼内脏多糖样品配成5%的溶液，调节pH至9左右，加入4% H2O2原液，60℃脱色2 h，此时鲍鱼内脏多糖的色素脱除率达到88.49%．

A

B

C

（A）H2O2浓度对色素脱除的影响．（B）温度对色素脱除的影响．（C）时间对色素脱除的影响．

图 6 H2O2浓度(a)、脱色温度(b)和脱色时间(c)对去除鲍鱼内脏多糖色素的影响

Fig.6 The effects of H2O2 content (a), temperature (b) and time (c) on depigment of abalone viscera polysaccharide

**2.9鲍鱼内脏多糖急性毒理实验**

急性毒理实验结果显示：灌胃结束后实验小鼠外观、精神状态、行为活动、毛色、呼吸、摄食和大小便等均未见异样，眼、鼻、口腔未出现异常分泌物，小鼠体重增加，全部存活，解剖后观察内脏器官未发生异常病变，结果如图7所示．

采用限量法测得小鼠对鲍鱼内脏多糖的经口急性毒性的耐受计量大于15 mg/g，其LD 50大于15 mg/g，急性毒性分级为无毒．

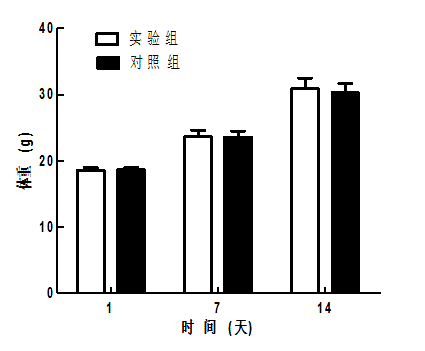


图7 鲍鱼内脏多糖急性毒性试验

Fig. 7 The acute toxicity test of abalone visceral polysaccharide

**2.10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作用如图7和表4所示，可以发现鲍鱼内脏多糖对这四种常见的细菌均有良好的抑制作用．随着鲍鱼内脏多糖浓度增加，抑菌圈直径增大，表现出明显的浓度效应（图8）．当鲍鱼内脏多糖浓度为50 mg/mL时，其对四种菌的抑菌圈直径分别为14.46、14.5、12.28和8.39 mm，效果与阳性对照相当甚至更优．

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 12029-1.jpg  +  3  4  2  -  1 | 10334-1.jpg  -  +  3  4  2  1 | 7239-2.jpg  4  3  +  2  1  - | 346-1.jpg  +  2  1  -  4  3 |
| (a) 金黄色葡萄球菌 | (b) 鼠伤寒沙门氏菌 | (c) 大肠杆菌 | (d) 铜绿假单胞菌 |

—为阴性对照蒸馏水；+为1000 U/mL的链霉素和卡那霉素阳性对照．

图8鲍鱼内脏多糖的抑菌效果

Fig. 8 The antibacterial effect of abalone visceral polysaccharides on *S. aureus, S. typhimurium, E. coli* and *P. aeruginosa*

表3 鲍鱼内脏多糖的抑菌圈测定

Tab. 3 The measurement of the diameter of antibacterial circle of abalone visceral polysaccharides

mm

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 供试菌种 | 不同浓度多糖/(mg·mL-1) | | | | 阳性对照 | 无菌水 |
| 6.25 | 12.5 | 25 | 50 |
| 金黄色葡萄球菌 | 6.69 | 8.74 | 11.62 | 14.46 | ─ | ─ |
| 沙门氏菌 | 6.31 | 8.22 | 11.39 | 14.5 | 7.37 | ─ |
| 大肠杆菌 | 3.44 | 8.62 | 11 | 12.28 | 9.53 | ─ |
| 铜绿假单胞菌 | 5.3 | 6.59 | 7.83 | 8.39 | 7.22 | ─ |
| 注：─表示无抑菌圈，表中数据均为3次重复实验的平均值． | | | | | | |

**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鲍鱼内脏多糖最佳提取工艺条件，并测定了在该条件下提取得到的多糖的抗氧化活性．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是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8.6 mg/mL时，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，用过柱前的2种样品和过柱后的4种成分分别测定其抗氧化活性，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浓度EC 50分别为0.14和0.08 mg/mL，效果更优，但过柱后各成分清除能力都发生不同程度下降．过柱前雌、雄鲍鱼多糖样品的还原能力（*A*700=0.2）分别为9.25和8.17 mg/mL，过柱后多糖含量高的成分还原能力显著下降，含量低者则略微加强，但都低于本实验多糖样品的还原能力（*A*700=0.485）为8.16 mg/mL．也有其他文献[23-25]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，本研究所提取得到的多糖具有较好的抗氧化活性．虽然Vc的抗氧化活性优于提取得到的多糖，但鲍鱼内脏多糖因其取材天然，无副作用，而且经过去蛋白去色素后可得到了高纯度的多糖，因此具有很好的应用前景．

本研究结果还表明鲍鱼内脏多糖对种供试菌都有良好的抑制效果，在25 mg/mL浓度下，其效果远优于阳性对照卡那霉素和链霉素．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应，本研究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 (Chicago)，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，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]苏勇昌，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，2011，125：1273-1278．

[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，2010，6：321-323．

[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]赵巧灵．紫贻贝多糖提取分离、结构鉴定及其生物活性的初步研究[D]．杭州，浙江工商大学，2010．

[16]ZHU B W，WANG L S，ZHOU D Y，et al．Antioxidant activity of sulphated polysaccharide conjugates from abalone(*Haliotis discus hannai Ino*) [J]．European Food Research Technology，2008，227：1663-1668．

[17]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．

[18]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．

[19]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．

[20]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．

[21]胡泳华．肉桂酸衍生物对双孢蘑菇酪氨酸酶抗酶褐变及保鲜的作用机理[D]．厦门：厦门大学，2014，32．

[22]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．

[23] 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．

[24]TSENG Y H，YANG J H，MAU J L．Antioxidant properties of polysaccharides from ganoderma tsugae [J]．Food Chemistry，2008，107 (2)： 732-738．

[25] 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 Activity Analysis of Polysaccharide from Abalone visceral**

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

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

**Abstract:**Natural polysaccharide compounds has a good effect on removing reactive oxygen species of a variety of physical, chemical and biological sources. It has become a potential natural antioxidant. The polysaccharide in this study was extracted from abalone viscera. We evaluated its antioxidant activity by the antioxidant activity model in vitro in order to provide the basical knowledge for comprehensive utilization of abalone viscera. The polysaccharide was obtained by using *Haliotis discus hannai Ino* viscera as material, the alkaline protease, neutral protease, vernase, papain, pepsin and trypsin as protease enzymolysis to release the polysaccharide chain. The antioxidant experiments results showed that when used alkaline protease, the polysaccharides yield was the highest, which was 6.66%. Then by single factor experiment of alkaline protease and the orthogonal experiment, the optimum condition of alkaline protease extracting polysaccharide from abalone visceral was determined. The results of antioxidant activity showed that the concentration of polysaccharide from abalone viscera of 100% removal of hydroxyl free radical was 9.6 mg/mL, while Vc was 0.48 mg/mL; of reducing capacity at *A*700=0.485 was 8.16 mg/mL, while Vc was 0.08 mg/mL; of 100% removal of ABTS radical was 7.5 mg/mL, while Vc was 0.08 mg/mL. The results indicated that the polysaccharide had a good antioxidant activity. When the secondary enzymolysis of enzyme was pepsin, the polysaccharide content and antioxidant activity were the highest. Using sevage method and repeated freezing and thawing method to remove protein and hydrogen peroxide method to depigment, we got the high purity content of abalone visceral polysaccharide (AVP). Double plate method was used to measure bacteriostatic action of AVP, which showed that the AVP could surpress reproduction of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

**Key words:** abalone viscera; polysaccharide; extraction ; purification; antioxidant activity; antibacteria