

Study on Extraction and Purification of Polysaccharides from *Thais clavigera* Kuster

Feifei Ge, Hejun Cai, Bin Yu, Pan Zhao, Youle Qu*

College of Food and Pharmaceutical Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan

Email: youle1960@sina.com

Received: Jul. 23rd, 2014; revised: Aug. 2nd, 2014; accepted: Aug. 16th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: The present study aims to optimize the extraction and purification procedure for polysaccharides from *Thais clavigera* Kuster. **Method:** We used water, ethanol to extract the polysaccharides and microwave-ultrasonic wave aided extraction. The effects of temperature, material-liquid ratio on the yield and ultrasonic power and the concentration of ethanol precipitation from *Thais clavigera* Kuster were investigated through the orthogonal analysis. **Result:** The optimum technology condition for extraction and purification of polysaccharides from *Thais clavigera* Kuster was determined as follows: temperature is 70°C, material-liquid ratio on the yield is 1:10, ultrasonic power is 600 w, the concentration of ethanol precipitation is 90%, obtaining the highest amount of polysaccharides. **Conclusion:** The optimized extraction and purification procedure is simple, quick and efficient. The result establishes the foundation for the further study of the polysaccharides from *Thais clavigera* Kuster.

Keywords

Thais clavigera Kuster, Polysaccharide, Orthogonal Experimental

疣荔枝螺多糖提取工艺研究

葛飞飞, 蔡和君, 俞斌, 赵盼, 曲有乐*

浙江海洋学院食品与药学学院, 舟山

Email: youle1960@sina.com

*通讯作者。

收稿日期：2014年7月23日；修回日期：2014年8月2日；录用日期：2014年8月16日

摘要

目的：优化疣荔枝螺多糖的提取工艺。方法：采用水提醇沉法并辅以超声微波法，考虑提取温度、提取料液比、提取时间以及提取的超声功率为变量，采用单因素实验和正交试验优化工艺条件。结果：本实验在提取温度为70℃、提取料液比为1:10、提取功率为600 w、乙醇沉淀浓度为90%时，得到的疣荔枝螺多糖的量最多。结论：该提取、精制工艺简便、快捷、高效，为疣荔枝螺多糖的进一步研究提供了基础。

关键词

疣荔枝螺；多糖；工艺优化

1. 引言

多糖(polysaccharide)是由糖苷键结合的糖链，至少要超过10个以上的单糖组成的聚合糖高分子碳水化合物。随着对海洋生物研究的深入，海洋生物中还有多糖的生物活性引起了广泛的关注，对于海带[1]、短蛸章鱼[2]、福寿螺多糖[3]等生物中，提取的多糖对海洋生物的研究有着重要的意义。疣荔枝螺(*Thais clavigera* Kuster)属于腹足纲狭舌目荔枝螺科荔枝螺属，俗称辣螺。这种螺类在我国可以常年养殖[4]，是舟山群岛的重要经济贝类，对其多糖提取工艺研究不仅是对动物多糖提取提供一种方法，更是对海洋资源开发提供一种思路。

目前，动物多糖提取的主要方法是煎煮法、酶解法、微波法、超声法等，其中煎煮法存在原材料消耗量大、提取时间长、提取率低等缺点，有文献报道将超声波和微波协同使用应用于对中药苷类成分的提取中可以提高苷类的提出率并缩短提取时间[5]-[7]，故考察超声微波在疣荔枝螺多糖的提取中应用的可行性。超声波-微波协同法提取是将超声波和微波2种技术有机结合起来，充分利用超声波振动的空穴作用及微波的高能作用，克服常规超声波和微波萃取之不足，具有速度快、能耗小、有利于极性和热不稳定性组分的萃取等优点[8]。本实验对超声辅助提取疣荔枝螺多糖的工艺进行研究，并采用吸光度测量的方法对提取工艺进行优化，确定了提取的最佳工艺，为位于潮间的疣荔枝螺多糖的提取带提取新工艺进行了有益的探索。

2. 材料、试剂与仪器

2.1. 材料

疣荔枝螺(*Thais clavigera* Kuster)购自浙江舟山定海南珍菜场，去壳后取所有螺肉，清洗后，制成匀浆，分装于冰柜中备用。

2.2 试剂

蒸馏水、无水乙醇、正丁醇、三氯甲烷、苯酚、硫酸、葡萄糖，均为市售品。

2.3. 仪器

详鹤电脑微波超声波组合合成/萃取仪 XH-300A；CR21G 冷冻离心机(日本日立)；FD-1000 冷冻干燥

机(上海爱朗仪器有限公司); 旋转蒸发器 RE-2000A(上海亚荣生化仪器厂); UV-1100 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); JJ-2 组织捣碎机(上海梅香仪器有限公司)。

3. 试验方法

3.1. 多糖分离提取流程

原料→匀浆→超声微波浸提→8层纱布过滤→离心(12,000 r/min, 15 min, 4 °C)→取上清液→浓缩→乙醇沉淀→离心(12,000 r/min, 15 min, 4°C)→取沉淀→复溶于 100 ml 的蒸馏水中→除蛋白(sevage 试剂, 氯仿: 正丁醇 4:1)→离心除变性蛋白→取上清液→冷冻干燥→多糖粗提物。

3.2. 多糖的检测

苯酚-硫酸法[9]测定多糖总含量, 本研究以超声微波提取后的上清液中的总糖含量作为多糖提取率的指标。

$$\text{多糖提取率}(\text{mg/g}) = \frac{\text{浸提液中总糖的量}}{\text{原料质量}}$$

3.2.1. 标准曲线

精密称取 105°C 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 100 mg 至 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液(1 mg/mL)。精密吸取该储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 ml 于 50 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 配成系列标准溶液。精密移取 1.0 mL 系列标准溶液于 10 ml 具塞刻度试管中, 加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 迅速精密加入 5.0 mL 浓硫酸, 立即摇匀。室温下放置 30 min, 以蒸馏水 1.0 ml 同法作空白参比, 490 nm 处测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标、浓度 C(μg/ml)为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $y = 0.0092x - 0.0466$, $R^2 = 0.9952$ 。

3.2.2. 多糖含量测定[10]

精密称量得到的粗多糖质量并测定: 准确称取单因素实验和正交试验已冷冻干燥的疣荔枝螺多糖粉末 0.015 g, 置 15 mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度。取该供试品溶液 1.0 mL 置于 10 mL 具塞刻度试管中, 参照“2.2.1”项下方法, 自“加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀”起操作, 于 490 nm 的波长下测定吸光度, 代入回归方程即可计算出粗多糖中以葡萄糖计的糖含量, 进而计算以葡萄糖计的多糖得率。

3.3. 单因素实验

以多糖提取率为指标, 在保持其他因素相同条件下, 分别研究提取温度、提取料液比、提取的超声功率以及醇沉是乙醇浓度 4 个因素对疣荔枝螺多糖提取效果的影响。

3.4. 疣荔枝螺多糖提取的正交试验

在 2.3 单因素试验基础上, 选择提取温度、提取料液比、提取的超声功率以及醇沉是乙醇浓度为考察因素, 以菊花多糖得率为考察指标, 采用正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验(表 1), 确定疣荔枝螺多糖超声微波提取法的最佳工艺条件。

根据正交实验表设计实验组, 分别进行实验。

4. 结果与分析

4.1. 提取温度对疣荔枝螺多糖提取效果的影响

分别以 50°C、60°C、70°C、80°C、90°C 的温度水提, 在料液比为 1:12 的情况下, 以 400 W 的超声

功率提取 10 min, 以 95% 的乙醇沉淀, 检测结果中多糖含量。研究表明, 随提取温度的提高, 多糖的绿不断增加, 70℃ 达到最高(图 1)。从得到的多糖干品发现, 随着温度的升高, 多糖色泽加深。

4.2. 不同料液比对多糖提取效果的影响

在 60℃ 的温度下水提, 分别以 1:8、1:10、1:12、1:14、1:16 的料液比, 以 400 W 的超声功率提取 10 min, 以 95% 的乙醇沉淀, 检测结果中多糖含量。研究表明, 随料液比的增加而增加, 在 1:16 的时候降低, 在 1:8~1:12 缓慢增加, 在 1:14 的时候达到最高(图 2)。

4.3. 不同乙醇浓度对多糖提取效果的影响

分别以 60℃ 的温度下, 在料液比为 1:12 的情况下, 以 400 W 的超声功率提取 10 min, 分别用 75%、

Table 1. Factors of orthogonal experiment

表 1. 正交设计因素

水平	提取温度/℃	料液比	超声功率/W	醇沉浓度/%
	A	B	C	D
I	50	1:10	500	95%
II	60	1:12	600	90%
III	70	1:14	700	85%

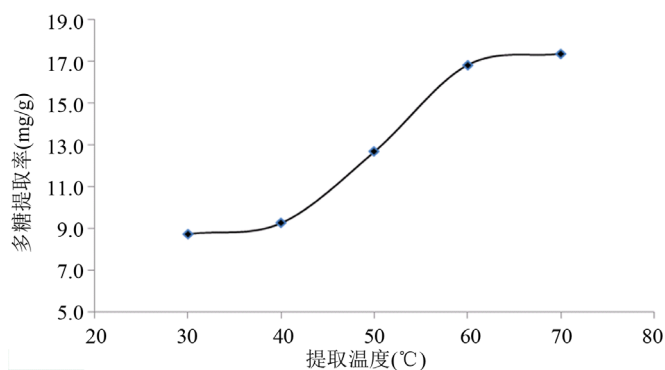


Figure 1. Different influence on the effect of polysaccharide extraction temperature on hot screw lift

图 1. 不同提取温度对辣螺多糖提效果的影响

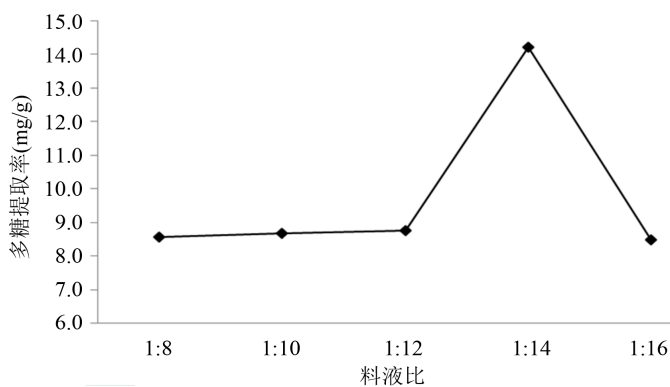


Figure 2. Different material liquid ratio on the hot effect of snail polysaccharide to ask

图 2. 不同料液比对辣螺多糖提效果的影响

80%、90%、95%的乙醇和无水乙醇沉淀多糖，检测结果中多糖含量。研究表明，随着乙醇浓度的降低，疣荔枝螺多糖的提取率明显下降，在乙醇浓度为95%的时候，疣荔枝螺多糖的提取率最高(图3)。

4.4. 不同超声功率对多糖提取效果的影响

在30℃，料液比为1:12的情况下超声提10 min，超声功率为400 W、500 W、600 W、700 W、800 W，用95%的乙醇沉淀多糖，检测结果中多糖含量。研究表明，随着超声功率的提高，疣荔枝螺多糖的提取率先上升后下降，在500 W的时候达到最高点(图4)。

4.5. 提取制备工艺的正交实验结果与分析

按L9正交试验，结果见表2。另外各取0.02 g粉末苯酚硫酸测定方式测定其光吸收值，计算各自的粗多糖得率。对水提取工艺正交实验设计的结果进行统计学处理，正交试验表分析表明，以多糖得率为指标，各因素对疣荔枝螺多糖提取工艺影响程度依次为提取料液比(B) > 提取温度(A) > 乙醇浓度(D) > 超声功率(C)，没有显著性差异的是C和D因素，有显著性差异的是B因素，即提取粗多糖得率最高的工艺条件为A3B1C2D2，即温度为70℃，料液比为1:10，超声功率为600 W，乙醇浓度为90%。

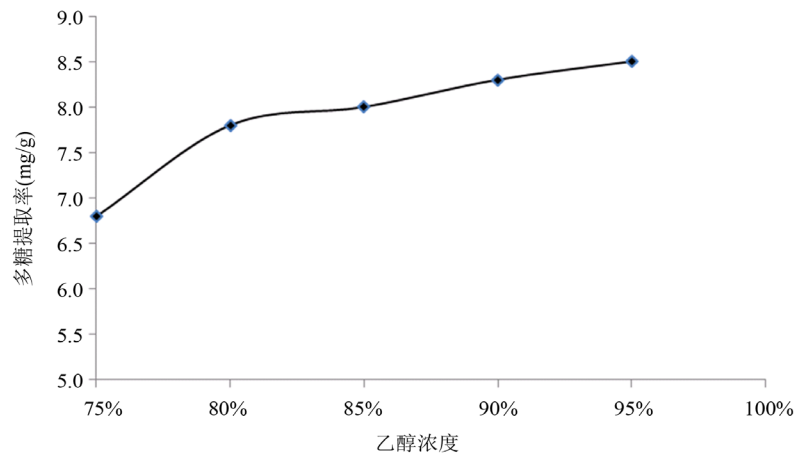


Figure 3. Different influence on the effect of ethanol concentration to spicy snail polysaccharide

图3. 不同乙醇浓度对辣螺多糖提效果的影响

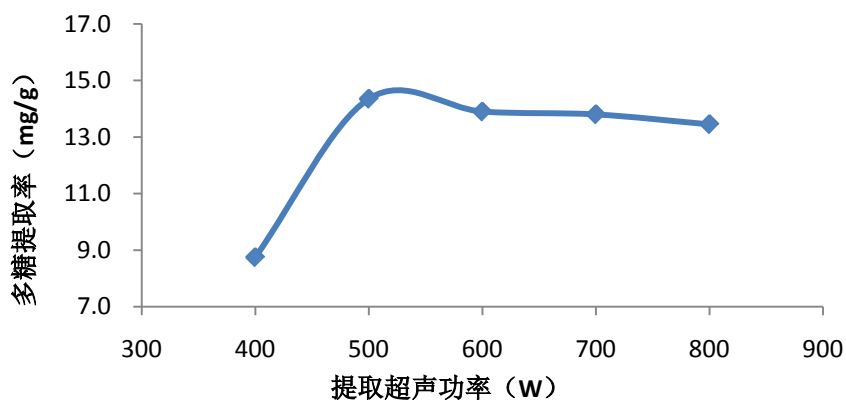


Figure 4. Different influence on the effect of ultrasonic power to spicy snail polysaccharide

图4. 不同超声功率对辣螺多糖提效果的影响

Table 2. Orthogonal experiment for the extraction of polysaccharides from *Thais clavigera* Kuster

表 2. 疣荔枝螺多糖提取工艺正交试验

试验序号 No.	因素 Factors				多糖得率/% Yield		
	A	B	C	D	I	II	均值
1	1	1	1	1	0.69	0.87	0.78
2	1	2	2	2	1.57	1.35	1.46
3	1	3	3	3	0.98	0.38	0.68
4	2	2	1	3	0.76	0.90	0.83
5	2	3	2	1	1.26	0.64	0.95
6	2	1	3	2	1.95	0.51	1.23
7	3	3	1	2	1.45	2.29	1.87
8	3	1	2	3	2.33	1.93	2.13
9	3	2	3	1	1.97	1.53	1.75
k1	0.97	1.38	1.16	1.16	粗多糖提取率极差分析: B > A > D > C 最佳工艺: A ₃ B ₁ C ₂ D ₂		
k2	1.00	1.35	1.51	1.52			
k3	1.92	1.17	1.22	1.21			
R	0.94	1.03	0.35	0.36			

5. 结论

海洋生物多糖的提取方法有很多种,为使疣荔枝螺多糖充分提取,先将疣荔枝螺螺肉制成匀浆待用。本实验采用单因素分别筛选提取温度、超声功率、料液比及醇沉工艺条件,采用正交分析的方法对本实验进行进一步工艺优化。实验结果表明,超声微波法协同辅助提取乙醇沉淀的最优工艺条件为温度 70℃,料液为 1:10,超声功率 600 W,乙醇浓度 90%。本实验采用的方法中,超声微波法辅助提取疣荔枝螺多糖能充分利用超声波及微波的热效应、空穴作用、机械作用、高能作用等,提取方法简单、效率高,苯酚-硫酸法测定多糖含量是经典的方法之一,使用该方法测定多糖的含量相对于比较快速、便捷、便于应用于实际,说明本实验所采用的工艺稳定并可行,对于疣荔枝螺多糖提取优化的工艺对动物多糖的研究有一定的参考价值。

参考文献 (References)

- [1] 廖建民, 张瑾, 沈子龙 (2000) 超声波法提取海带多糖的研究. 中国药科大学生物制药学院, 南京.
- [2] 文松松, 赵峡, 高英霞, 于广利 (2010) 短蛸章鱼多糖的提取分离和基本性质分析. *中国海洋药物杂志*, **1**, 24-31.
- [3] 许桂芹, 陈强, 黄志坚 (2008) 福寿螺多糖的分离纯化及其生物活性研究. 农林大学, 福建.
- [4] 赵汝翼, 程济民, 赵大东, 等 (1982) 大连海产软体动物志. 海洋出版社, 北京, 56-58.
- [5] 郭孝武, 谢国莲 (1997) 超声提高益母草总碱提出率的实验研究. *中国中药杂志*, **22**, 353.
- [6] 梁京芸, 柴家前, 刘永庆 (2007) 中草药化学成分提取新方法. *山东畜牧兽医*, **28**, 34-36.
- [7] 李婷, 侯晓东, 陈文学, 等 (2006) 超声波萃取技术的研究现状及展望. *安徽农业科学*, **34**, 3188-3190.
- [8] 蒋永红, 唐仕荣 (2009) 银杏渣中多糖的超声波-微波协同萃取及抗氧化性研究. *食品工业科技*, **7**, 244-246.
- [9] 张惟杰 (1992) 糖复合物生化研究技术(第二版). 浙江大学出版社, 浙江, 11-12.
- [10] 王秀奇, 编著(1998) 基础生物化学实验. 高等教育出版社, 北京, 164.