

酶法提取方格星虫多糖的条件及优化*

Optimum Condition for Enzyme Extraction of Polysaccharide from *Sipunculus nudus* Linnaeus

张琴¹, 童潼¹, 许明珠¹, 于海瑞^{2**}, 董兰芳¹

ZHANG Qin¹, TONG Tong¹, XU Ming-zhu¹, YU Hai-rui², DONG Lan-fang¹

(1. 广西壮族自治区海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000; 2. 潍坊学院生物与农业工程学院 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室(潍坊学院) 潍坊高新区天润生物工程研发中心, 山东潍坊 261061)

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai, Guangxi, 536000, China; 2. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Universities of Shandong (Weifang University), College of Biological and Agricultural Engineering, Weifang University, Tianrun Bioengineering R & D Center of Weifang New and high-tech Zone, Weifang, Shandong, 261061, China)

摘要:【目的】确定胰蛋白酶酶解法提取方格星虫(*Sipunculus nudus*)体壁中水溶性多糖的最优条件。【方法】分别从料液比、浸提温度、浸提时间、浸提 pH 值、酶底比等 5 个方面进行了初步研究。研究分为两部分进行, 先确认提取方法中各单因素的最优条件, 再根据单因素试验结果选取 4 个主要因素(料液比、浸提温度、浸提 pH 值、酶底比), 进行四因素三水平的正交试验, 得到方格星虫水溶性多糖水提法的最佳组合。【结果】正交试验结果表明: 对方格星虫多糖提取率影响最大的为浸提温度, 其次是 pH 值和料液比, 影响最小的为酶底比。最佳浸提条件为: 温度 60℃、pH 值 8.0、料液比 1 : 12g · mL⁻¹、酶底比为 2.0%、时间 3h。【结论】在最优浸提条件下, 方格星虫水溶性多糖酶提法所得的最佳提取率为 1.59%。此方法高效稳定可行, 能有效提高方格星虫的多糖提取率。

关键词: 方格星虫 多糖 酶解法 正交试验

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2014)02-0158-06

Abstract:【Objective】To choose the optimum enzyme extraction process of water-soluble polysaccharide from *Sipunculus nudus* Linnaeus.【Methods】The test design with five factors was used to study the effect of the ratio of material to fluid, extraction temperature, extraction time, pH and dosage of enzyme on the extracting rate of water-soluble polysaccharides from *S. nudus*. After single factor tests, the four main factors (material to fluid, extraction temperature, pH and dosage of enzyme) of orthogonal test was used to choose the best combination.

【Results】The order of the factors that affect the yield of *S. nudus* polysaccharide is extraction

temperature > pH > ratio of material to fluid > dosage of enzyme; the optimum extraction conditions were temperature 60℃, pH 8.0, ratio of material to fluid 1 : 12g · mL⁻¹, enzyme 2.0% and time 3h.【Conclusion】Under the above conditions, the optimum extraction rate is 1.59%. The extraction technology is stable and practical with high extraction rate.

收稿日期:2013-09-04

修回日期:2013-10-11

作者简介:张琴(1982-),女,博士,主要从事水产动物天然产物开发的研究。

* 广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 11107011-6);广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25HYS20)资助。

** 通讯作者:于海瑞(1967-),男,博士,副教授,主要从事水产动物天然产物开发的研究。E-mail:yhr6003@hotmail.com。

【研究意义】多糖有同多糖和杂多糖之分,由相同单糖聚合而成的多糖称为同多糖,如淀粉、纤维素等;由不同单糖聚合而成的则为杂多糖,如透明质酸、硫酸软骨素等^[1]。多糖的生物学活性具有多元化、复杂化。近几年来,为了进一步拓展多糖研究的广阔性及彻底性,研究学者将目光由陆地生物多糖转向海洋生物多糖的研究上。随着研究的深入,海洋生物多糖的药用、保健功效逐步被发现。例如,甲壳质能有效减少肝脏中有毒物质的积累,从而降低肝脏损伤^[2];螺旋藻多糖具有促进细胞新陈代谢,增强机体免疫力的功效,并且能抑制癌细胞增殖^[3];壳聚糖具有抗炎以及抗凝血等作用^[4];方格星虫多糖具有抗病毒、抗菌、抗氧化、抗辐射、抗疲劳、提高免疫力和记忆力等生物学功能^[5~11]。**【前人研究进展】**方格星虫(*Sipunculus nudus*)作为北部湾地区特有经济品种之一,因肉质脆嫩、营养丰富而深受广大消费者的喜爱。方格星虫的多糖提取有多种方法,如夏乾峰等^[6]采用热水提取法提取方格星虫体壁多糖进行多糖抗菌实验;张桂和等^[12]采用酶解法分离纯化方格星虫体壁和血液多糖,同时鉴定了其性质。**【拟解决的关键问题】**本试验采取胰蛋白酶酶解法对其水溶性多糖进行提取,分别进行料液比、浸提 pH 值、浸提温度、浸提时间以及酶底比 5 个单因素试验,确定各个单因素的最佳提取条件。再根据单因素试验结果进行四因素三水平的正交试验,确定各个单因素之间的交互影响,最终得以确定酶法提取的最佳条件,为日后方格星虫多糖提取工业化研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验用方格星虫购于北海市南珠市场;平均体重为 33.54g,静态时体长为 12.37~15.25cm。

1.2 方格星虫多糖的提取及条件优化

洗净的方格星虫→解剖取体壁→体壁经高速组织匀浆机磨碎得体壁肉酱→加入适量胰蛋白酶酶解→灭酶→离心(9000r/min 离心 30min)→去蛋白(三氯乙酸充分搅拌后 5000r/min 离心,2~3 次)→醇沉(约至乙醇浓度 75%,4℃ 过夜)→离心(4℃ 9000r/min 离心 10min)→洗涤(20mL 无水乙醇和丙酮)→冷冻干燥(冷冻干燥机-38℃ 冷冻干燥 4h)→得到粗多糖。

以提取率为指标确定最佳料液比、最佳浸提温度、最佳浸提时间、最佳浸提 pH 值以及最佳酶底比。

然后选取 4 个主要的影响因素,进行四因素三水平正交试验,以确定影响浸提率的主要因素之间的交互作用,从而得到酶法提取方格星虫水溶性多糖的最优条件。

多糖提取率(Polysaccharide yield,%) = m/M 。式中: m 为粗多糖质量,单位 g; M 为提取所用方格星虫体壁肉酱的质量,单位 g。

1.3 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法。精密称取 105℃ 干燥至恒重的对照葡萄糖 508.5mg,加水溶解,定容于 200mL 容量瓶中,配成 $2.5425\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖标准溶液。吸取稀释五倍的葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 置于 20mL 的干燥刻度试管中,以超纯水补至 1.0mL,再分别加入 6% 苯酚 1.0mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5.0mL,冷却至室温,490nm 处测定其吸光度,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。将葡萄糖溶液换成粗多糖用同样的方法测定吸光度,参照标准曲线获得多糖浓度。

2 结果与分析

2.1 浸提温度对多糖提取率的影响

pH 值 7.0,料液比 1 : 9g · mL⁻¹,酶底比 1.5%,于 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃ 下分别酶解 3h,不同浸提温度下方格星虫多糖的提取率见图 1。方格星虫的多糖提取率与浸提温度的关系呈先增后降趋势。当浸提温度维持在 55~65℃ 之间时,多糖提取率基本处于平衡,分别为 1.12%、1.17%、1.07%;继续提高浸提温度,多糖提取率反而下降,可能的原因是提取温度超过一定范围会造成动物多糖断裂降解。由于升高温度会造成提取多糖的成本增加,因此综合考虑浸提温度单因素试验中酶法提取方格星虫水溶性多糖的最佳提取温度为 55℃。

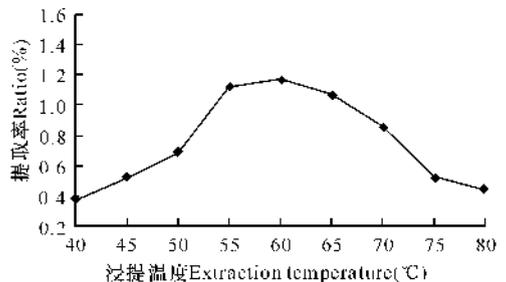


图 1 浸提温度对多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the extraction percent of polysaccharides

2.2 浸提时间对多糖提取率的影响

温度 60℃, pH 值 7.0,料液比 1 : 9g · mL⁻¹,

酶底比 1.5%，分别反应 1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h，不同浸提时间下方格星虫多糖提取率结果见图 2。方格星虫的多糖提取率与浸提时间大体上也呈先增后降趋势，过短的浸提时间造成酶解反应不完全，不利于方格星虫的多糖提取；适当延长浸提时间能显著提高多糖的浸提率，超过 3h 后再延长浸提时间同样使得浸提率下降，原因在于酶解时间过长，造成酶解液变质。浸提时间单因素试验表明酶法提取方格星虫水溶性多糖的最佳提取时间为 3h。

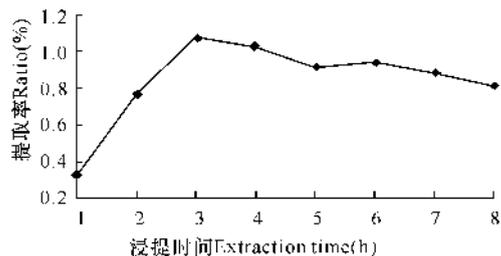


图 2 浸提时间对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of time on the extraction percent of polysaccharides

2.3 浸提料液比对多糖提取率的影响

pH 值 7.0，酶底比 1.5%，分别选取料液比为 1 : 3g · mL⁻¹、1 : 6g · mL⁻¹、1 : 9g · mL⁻¹、1 : 12g · mL⁻¹、1 : 15g · mL⁻¹、1 : 18g · mL⁻¹，在 60℃ 水浴中酶解 3h，不同浸提料液比时方格星虫多糖提取率结果见图 3。从图中可知，料液比为 1 : 12g · mL⁻¹ 的试验组多糖浸提率最高，达 1.32%。低料液比和高料液比试验组的多糖浸提率都不理想。料液比单因素试验表明酶法提取方格星虫水溶性多糖的最佳料液比为 1 : 12g · mL⁻¹。

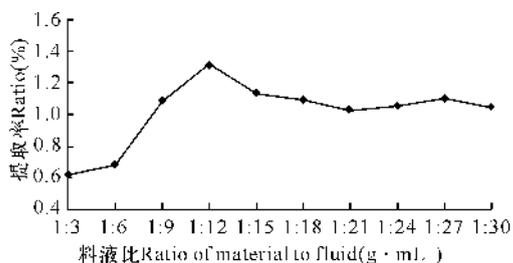


图 3 料液比对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of ratio of material to fluid on the extraction percent of polysaccharides

2.4 胰蛋白酶添加量对多糖提取率的影响

温度 60℃，pH 值为 7.0，料液比为 1 : 12g · mL⁻¹，在酶底比分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0% 的条件下反应 3h，得到的浸提结果如图 4 所示。当胰蛋白酶添加量低于 2.0% 时，方格星虫多糖提取率较低，增加蛋白酶

的添加量有利于提高多糖的提取率。但是持续添加胰蛋白酶含量并不能持续提高多糖的提取率，过高的胰蛋白酶含量反而会略微降低方格星虫的多糖提取率。胰蛋白酶添加量单因素试验表明酶法提取方格星虫水溶性多糖的最佳酶量为 2.0%。

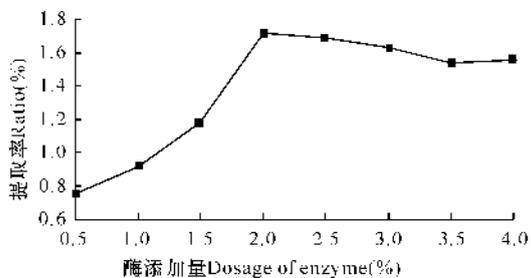


图 4 酶添加量对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of dosage of enzyme on the extraction percent of polysaccharides

2.5 pH 值对多糖提取率的影响

料液比 1 : 12g · mL⁻¹，酶底比 2.0%，pH 值选择 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0，于 60℃ 水浴中酶解 3h，得到的浸提结果如图 5 所示。弱酸性的提取环境不利于方格星虫多糖的提取，碱性环境下 pH 值大于 8.0 也会使得提取率显著下降。当 pH 值为 8.0 时，得到最大的提取率 1.12%。pH 值单因素试验表明酶法提取方格星虫水溶性多糖的最适 pH 值为 8.0。

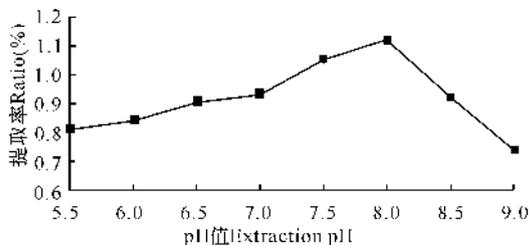


图 5 pH 值对多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of pH on the extraction percent of polysaccharides

2.6 酶法提取方格星虫多糖的正交试验优化

得到各单因素最佳提取条件之后，选择主要的 4 个因素（料液比、浸提温度、浸提 pH 值以及酶底比）进行正交试验。正交试验设计为四因素三水平，如表 1 所示，4 个因素对方格星虫多糖提取率的影响顺序为浸提温度 > pH 值 > 料液比 > 酶底比。酶法提取方格星虫多糖的最佳条件为浸提温度 60℃、料液比 1 : 12g · mL⁻¹、pH 值 8.0、酶底比 2.0%、浸提时间 3h，在此条件下提取得到的最大多糖提取率为 1.59%。

表 1 正交试验及结果

Table 1 Results of orthogonal test

试验号 Test number	因素 Factors				提取率 Ratio (%)
	(A)料液比 Ratio of material to fluid (g · mL ⁻¹)	(B)浸提温度 Extraction temperature(°C)	(C)pH 值 Extraction pH	(D)酶底比 Dosage of enzyme(%)	
1	1(1 : 9)	1(55)	1(7.0)	1(2.0)	1.03
2	1	2(60)	2(7.5)	2(2.5)	1.39
3	1	3(65)	3(8.0)	3(3.0)	1.12
4	2(1 : 12)	1	2	3	1.34
5	2	2	3	1	1.59
6	2	3	1	2	1.19
7	3(1 : 15)	1	3	2	1.37
8	3	2	1	3	1.25
9	3	3	2	1	1.21
K1	1.18	1.25	1.16	1.28	
K2	1.37	1.41	1.31	1.32	
K3	1.28	1.17	1.36	1.24	
R	0.19	0.24	0.20	0.08	
最优水平 Optimal level	A2	B2	C3	D1	

3 讨论

自 2004 年广西海洋研究所首次在国内国外突破了方格星虫人工育苗技术难关以来,科技人员在方格星虫繁殖发育^[13~15]、营养需求与饲料开发^[16~18]等方面开展了系列的研究。目前已有相关研究报道了水法提取方格星虫多糖的条件^[19]。酶法提取多糖的方法已在许多种海洋生物多糖提取中得到应用,如采用胃蛋白酶和胰蛋白酶(依次加入)辅助提取中国蛤蜊(*Macra chinensis*)中的蛤蜊多糖^[20];采用木瓜蛋白酶提取糙海参(*Holothuria scabra* Jaeger)中酸性粘多糖^[21]、皱纹盘鲍(*Haliotis discushannai* Ino)中鲍鱼多糖^[22]以及海带(*Laminaria japonica* Aresch)中的海带多糖^[23];另外在鲨软骨多糖提取中,复合使用胰蛋白酶和木瓜蛋白酶比单独使用木瓜蛋白酶或胰蛋白酶的多糖提取率要高^[24]。

方格星虫体壁多糖存在于体壁细胞的细胞质中,需破碎细胞使细胞质溶解至水中才能提取出来。胰蛋白酶能有效降解体壁细胞细胞膜上存在的蛋白质,破坏细胞膜机构,提高细胞破碎率,从而提高多糖提取率。在第一部分单因素试验中,不同的浸提温度对多糖提取率产生影响,原因在于低于最适温度,胰蛋白酶的活性较低,使得蛋白酶的作用发挥不完全;而过高的温度又会导致胰蛋白酶失活,也不利于细胞破碎。改变提取时间能影响多糖提取率的原因可能在于,胰蛋白酶是一种肽链内切酶,需要反应一定时间才能充分破坏细胞膜结构,从而提高体壁细胞破碎

广西科学 2014 年 4 月 第 21 卷第 2 期

率。而过长的提取时间,则可能导致已经溶解于水中的多糖在长时间高温作用下糖苷键断裂,导致最终多糖提取率下降。改变料液比影响多糖提取率则可能是,低料液比使得酶的作用发挥不完全,而高料液比又导致细胞破碎不完全,这些都直接关系到多糖的浸出。适当增加酶底比能有效提高细胞破碎率,但是浸提过程中当酶量与料液比达到平衡之后,再继续添加酶并不能持续起到提高多糖得率的作用。同时,胰蛋白酶在反应过程中只有在最适 pH 值的环境中才能发挥出最大作用,这也就解释了过低和过高的 pH 值的试验组多糖的得率较低的原因。

4 结论

通过单因素试验和正交试验,得到胰蛋白酶酶解法提取方格星虫多糖的最优条件为提取温度 60℃、料液比 1 : 12g · mL⁻¹、pH 值 8.0、酶底比为 2.0%、提取时间 3h,最大多糖提取率为 1.59%。正交试验结束后,根据最优提取条件进行了多次试验,结果表明多糖高提取率稳定性好,该试验条件可进一步实现工业化生产。

参考文献:

- [1] 王镜岩. 生物化学(上)[M]. 北京:高等教育出版社, 2002.
Wang J Y. Biochemistry(volume 1)[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002.
- [2] 陈恋. 海洋生物多糖的高值化开发[J]. 食品与药品, 2007, 9(4): 68-70.
Chen L. Present condition and prospect of high-valued

- marine polysaccharide[J]. Food and Drug, 2007, 9(4): 68-70.
- [3] 姚滢,魏江洲,王俊,等. 海洋生物多糖的研究与发展[J]. 生命的化学, 2005, 25(2): 166-167.
Yao Y, Wei J Z, Wang J, et al. Research and development of marine biological polysaccharides[J]. Chemistry of Life, 2005, 25(2): 166-167.
- [4] 徐静,谢蓉桃,林强,等. 海洋生物多糖的种类及其生物活性[J]. 中国热带医学, 2006, 6(7): 1277-1278, 1228.
Xu J, Xie R T, Lin Q, et al. The category and bioactivity of polysaccharide of marine organisms[J]. China Tropical Medicine, 2006, 6(7): 1277-1278, 1228.
- [5] 夏乾峰,谭河林,覃西,等. 方格星虫多糖抗乙型肝炎病毒的实验研究[J]. 山东医药, 2010, 50(7): 44-45.
Xia Q F, Tan H L, Qin X, et al. The study of anti-hbv polysaccharide from *Sipunculus nudus* linnaeus [J]. Shandong Medical Journal, 2010, 50(7): 44-45.
- [6] 夏乾峰,谭河林,覃西,等. 方格星虫多糖抗菌活性的初步研究[J]. 中国热带医学, 2007, 7(12): 2192-2193.
Xia Q F, Tan H L, Qin X, et al. Preliminary observation on the antibacterial activity on polysaccharides in *Sipunculus nudus* [J]. China Tropical Medicine, 2007, 7(12): 2192-2193.
- [7] 董兰芳,张琴,童潼,等. 方格星虫多糖抗菌和抗氧化活性研究[J]. 广西科学, 2013, 20(4): 289-293.
Dong L F, Zhang Q, Tong T, et al. Studies on the antimicrobial and antioxidant activities of polysaccharide in *Sipunculus nudus* [J]. Guangxi Sciences, 2013, 20(4): 289-293.
- [8] 李珂娴,沈先荣,蒋定文,等. 方格星虫多糖对小鼠抗辐射能力的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2011, 18(3): 33-36.
Li K X, Shen X R, Jiang D W, et al. Protective effect of polysaccharides from *Sipunculus nudus* on radiation injury in mice[J]. Chinese Journal of Nautical Medicine and Hyperbaric Medicine, 2011, 18(3): 33-36.
- [9] 刘玉明,钱甜甜,莫琳芳,等. 方格星虫多糖对运动小鼠抗疲劳作用实验研究[J]. 中国海洋药物, 2012, 31(3): 41-44.
Liu Y M, Qian T T, Mo L F, et al. Study on the anti-fatigue effects of polysaccharides from *Sipunculus nudus* in mice[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2012, 31(3): 41-44.
- [10] 彭晓娜,雷晓凌. 方格星虫多糖对小鼠免疫活性的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(4): 54-57.
Peng X N, Lei X L. Effect of polysaccharide extracted from *Sipunculus nudus* on the immunity of mouse[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2007, 27(4): 54-57.
- [11] 何颖,沈先荣,蒋定文,等. 方格星虫多糖对记忆障碍模型小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国海洋药物, 2012, 31(1): 38-41.
He Y, Shen X R, Jiang D W, et al. Effects of *Sipunculus nudus* polysaccharides on learning and memory in memory obstruction model mice[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2012, 31(1): 38-41.
- [12] 张桂和,赵谋明,王伟. 方格星虫多糖分离纯化及性质鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 63-66.
Zhang G H, Zhao M M, Wang W. Isolation, purification and property identification of polysaccharide contained in *Sipunculus nudus* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006, 25(4): 63-66.
- [13] 邹杰,彭慧婧,童潼,等. 方格星虫亲体养殖与生殖细胞发育[J]. 水产科学, 2011, 30(8): 467-470.
Zou J, Peng H J, Tong T, et al. Broodstock culture and germ cell development in *Sipunculus nudus* [J]. Fisheries Science, 2011, 30(8): 467-470.
- [14] 宋忠魁,刘婷,杨家林,等. 广西沿海裸体方格星虫群体遗传多样性及遗传分化[J]. 水产科学, 2011, 30(12): 749-753.
Song Z K, Liu T, Yang J L, et al. Genetic diversity and genetic structure of *Sipunculus nudus* in coastal Guangxi area[J]. Fisheries Science, 2011, 30(12): 749-753.
- [15] 彭慧婧,杨家林,邹杰,等. 光裸方格星虫繁殖习性的初步观察[J]. 海洋渔业, 2012, 34(2): 231-234.
Peng H J, Yang J L, Zou J, et al. Preliminary observations on the breeding habits of *Sipunculus nudus* [J]. Marine Fisheries, 2012, 34(2): 231-234.
- [16] 张琴,童万平,董兰芳,等. 饲料中脂肪水平对方格星虫稚虫生长性能、体组成及消化酶活性的影响[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 99-106.
Zhang Q, Tong W P, Dong L F, et al. Effects of dietary lipid levels on growth performance, body composition and digestive enzyme activities of juvenile peanut worm, *Sipunculus nudus* Linnaeus [J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(6): 99-106.
- [17] 张琴,童万平,董兰芳,等. 饲料蛋白水平对方格星虫稚虫生长和体组成的影响[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 86-92.
Zhang Q, Tong W P, Dong L F, et al. Effects of dietary protein level on growth performance and body composition of juvenile peanut worm, *Sipunculus nudus* Linnaeus [J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(1): 86-92.
- [18] 许明珠,张琴,童万平,等. 饲料糖水平对方格星虫稚虫生长、体组成和消化酶活性的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(3): 534-542.
Xu M Z, Zhang Q, Tong W P, et al. Effects of dietary carbohydrate level on growth, body composition and digestive enzyme activities of juvenile peanut worm, *Sipunculus nudus* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(3): 534-542.
- [19] 许明珠,张琴,童潼,等. 方格星虫多糖水法提取的条件及优化[J]. 广西科学, 2013, 20(4): 285-288.

- Xu M Z, Zhang Q, Tong T, et al. Optimization of water extraction for polysaccharide from *Sipunculus nudus* Linnaeus[J]. Guangxi Sciences, 2013, 20(4): 285-288.
- [20] 常林瑞, 黄清荣, 孙振兴, 等. 中国蛤蚧多糖提取物抑制蚕豆根尖细胞微核形成的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(28): 12155-12156.
- Chang L R, Huang Q R, Sun Z X, et al. Study on *Mactra chinensis* polysaccharide extracts inhibiting micronucleus formation of *Vicia faba* root tip cells[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(28): 12155-12156.
- [21] 郑艾初, 陈健, 彭超英. 糙海参酸性粘多糖的提取纯化工艺探讨[J]. 现代食品科技, 2007, 23(5): 65-67.
- Zheng A C, Chen J, Peng C Y. Extraction and purification of acidic mucopolysaccharide from *Holothuria scabra* Jaeger[J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(5): 65-67.
- [22] 殷红玲, 杨静峰, 李冬梅, 等. 酶法提取鲍鱼多糖的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(12): 158-160, 170.
- Yin H L, Yang J F, Li D M, et al. Optimum condition for extraction of polysaccharide from abalone[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(12): 158-160, 170.
- [23] 张慧玲, 任秀莲, 魏琦峰, 等. 酶法提取纯化海带多糖的工艺[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(10): 101-104.
- Zhang H L, Ren X L, Wei Q F, et al. Extraction and purification process of polysaccharides from *Laminaria japonica* Aresch by enzyme test[J]. Food Research and Development, 2007, 28(10): 101-104.
- [24] 肖凯军, 蔡妙颜, 郭祀远, 等. 鲨软骨粘多糖的酶法提取及组分分析[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 74-77.
- Xiao K J, Cai M Y, Guo S Y, et al. Extraction of shark cartilage mucopolysaccharides by enzymolysis and their composition analysis[J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 2005, 33(5): 74-77.

(责任编辑: 陈小玲)

(上接第 157 页 Continue from page 157)

- [16] 黄虹. 血清脂质过氧化代谢产物丙二醛测定方法的改进[J]. 镇江医学院学报, 1999, 9(3): 457-458.
- Huang H. The improved determination method for lipid peroxidation product, malondialdehyde in the blood serum[J]. Journal of Zhenjiang Medical College, 1999, 9(3): 457-458.
- [17] Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, et al. Measurement of protein using bichinchoninic acid [J]. Analytical biochemistry, 1985, 150(1): 76-85.
- [18] Letendre J, Chouquet B, Rocher B, et al. Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis* [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2008, 148: 211-216.
- [19] Chen M Y, Yang H S, Delaporte M, et al. Immune response of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2007, 345: 52-60.
- [20] Letendre J, Chouquet B, Manduzio H, et al. Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis* [J]. Marine Environmental Research, 2009, 67: 69-74.
- [21] Vidal-Liñán L, Bellas J. Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis* —Implications for marine pollution monitoring [J]. Science of the Total Environment, 2013, 461-462: 56-64.
- [22] Pampanin D M, Ballarin L, Carotenuto L, et al. Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002, 131(3): 605-614.

(责任编辑: 陈小玲)