

虾夷扇贝内脏多糖 SVP-12 的分离纯化及性质研究*

闫雪, 杨静峰, 周大勇, 李韬, 朱蓓薇

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连, 116034)

摘 要 采用蛋白酶水解提取法提取虾夷扇贝内脏粗多糖。采用 2 步蛋白酶-sevag 法脱除粗多糖中的蛋白质。粗多糖先后经 Sephacryl-S 200 凝胶过滤层析柱和 DEAE-52 阴离子交换层析柱分离得到多糖组分 SVP-12。SVP-12 经高效液相色谱鉴定为均一的多糖, 其分子质量约为 170 ku, 其中多糖含量为 72.05%, 蛋白含量为 2.74%, 硫酸根含量为 12.57%, 氨基己糖含量为 8.46%。气相色谱法检测结果表明, SVP-12 含有鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖, 其摩尔比例约为 1.65 : 2.54 : 4.05 : 5.60 : 1.48 : 4.90 : 1.00。

关键词 扇贝内脏, 多糖, 分离纯化, 相对分子质量, 单糖组成

多糖又称为多聚糖, 是构成生命的四大基本物质之一。1970 年代以来, 科学家发现, 多糖及糖复合物具有多种多样的生物学功能, 这使多糖研究成为生命科学领域的热点之一。近年来, 研究者将多糖研究的触角伸向海洋。王长云^[1]从海湾扇贝边中提取分离出一种具有显著抗凝血活性的氨基多糖。孙福生等人^[2]从扇贝裙边提取了一种具有抗动脉粥样硬化活性的糖氨聚糖 SS-GAG(氨基多糖)。殷红玲等人^[3]从虾夷扇贝内脏中提取了具有羟基自由基清除活性的多糖。Sasaki 等人^[4]从盘鲍中分离出一种具有抗肿瘤功效的糖蛋白。沈鸣等人^[5]从鲍鱼中提取到具有增强免疫力、抗癌功能的多糖。

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)是大型低温海产双壳贝类, 原主产于日本北海道及俄罗斯远东地区, 于 1980 年代初期引进我国, 主要养殖区域在辽宁省长海县。虾夷扇贝主要食用其贝柱, 在加工贝柱的过程中产生了以脏器为主的下脚料, 约占整个虾夷扇贝质量的 30%, 大部分被丢弃, 造成极大的资源浪费和环境污染。本课题组在前期研究中, 提取了虾夷扇贝脏器粗多糖, 通过优化提取条件, 粗多糖得率可达原料干重的 8%^[3]。

在此基础上, 本文对虾夷扇贝内脏粗多糖的分离纯化及部分理化性质进行了研究, 以期对虾夷扇贝脏器多糖资源的深度开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*), 由大连獐子岛渔业集团股份有限公司提供。在新鲜虾夷扇贝中将其内脏取出, 冷冻干燥至水分含量低于 9%, 粉碎, 过 20 目筛, 得扇贝内脏粉, 储藏于 -20 °C 冰箱中备用。

1.2 仪器与试剂

6890N 气相色谱仪: 美国 Agilent; SCL-10AVP 高效液相色谱仪: 日本岛津; ELSD 2000ES 型蒸发光检测器: 美国 Alltech; UV-2100 型紫外可见分光光度计: 尤尼柯上海仪器有限公司; LG-1.0 型真空冷冻干燥机: 沈阳航天新阳速冻设备制造有限公司。Sephacryl-S 200 丙烯葡聚糖凝胶: 瑞典 Pharmacia 公司产品; DEAE-52: Whatman 公司产品; Sepharose CL-6B 凝胶: 瑞典 Pharmacia 公司产品; 标准分子量葡聚糖: 瑞士 Fluka 公司产品; 木瓜蛋白酶: 广州远天公司产品; 胰蛋白酶: 厦门星隆达化学试剂有限公司产品; 胃蛋白酶: 杭州中香化学有限公司产品; 碱性蛋白酶: 北京东华强盛生物技术有限公司产品; 链酶蛋白酶: 北京索莱宝科技有限公司产品; 其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.3 方法

1.3.1 扇贝内脏多糖提取、脱蛋白及分离纯化

1.3.1.1 扇贝内脏多糖的提取

依照本课题组前期建立的蛋白酶水解提取法提取扇贝脏器粗多糖^[3]。

1.3.1.2 扇贝内脏粗多糖脱蛋白

先采用 2 步蛋白酶-sevag 法脱蛋白。第 1 步: 粗

第一作者: 硕士研究生(朱蓓薇教授为通讯作者)。

* 国家“863”计划(No. 2007AA091804), 国家“十一五”科技支撑计划(No. 2008BAD94B07)

收稿日期: 2008-09-18

多糖先依次用胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶酶解^[6],酶解液采用 Seville 法^[7]脱除蛋白(所采用的蛋白酶及酶解条件见表1);第2步:第1步脱蛋白后样品采用链酶蛋白酶水解,酶解液采用 Seville 法脱除蛋白(链酶蛋白酶酶解条件:将多糖配成5%的水溶液,按酶:蛋白=1:20的比例加入链酶蛋白酶,加少量二甲苯防腐,0.15 mol/L NaCl 作激活剂,在37℃酶解24 h)。经上述步骤处理后的样品再采用反复冻融法除蛋白。粗多糖经脱蛋白后,得到扇贝内脏多糖(Scallop Viscera Polysaccharides, SVP)。

表1 蛋白酶的水解条件

酶种类	pH 值	加酶量 ¹⁾ /%	温度 /℃	底物浓度 /%	时间/h
胃蛋白酶	2.0	2.5	37	2	4
胰蛋白酶	8.0	2.5	37	2	4
碱性蛋白酶	10.0	2.5	40	2	4

注:1)加酶量为多糖的质量百分比。

1.3.1.3 扇贝内脏粗多糖分离纯化

采用 Sephacryl-S 200 凝胶过滤柱(1.8 cm×65 cm)对 SVP 进行分离纯化,上样量为 2 mL(25 mg/mL)。采用 0.15 mol/L NaCl 以 0.48 mL/min 的流速平衡和洗脱。每管收集洗脱液 5.8 mL,采用苯酚-硫酸法检测多糖。洗脱液经合并、透析、浓缩得多糖组分 SVP-1。

采用 DEAE-cellulose 52 阴离子交换柱(2.2 cm×40 cm)对 SVP-1 进行分离纯化,上样量为 2 mL(50 mg/mL)。采用 0.15~3.9 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱,流速为 1 mL/min,梯度时间为 220 min。同上法检测。组分经合并、透析、浓缩及冻干后获得多糖组分 SVP-12。

1.3.2 SVP-12 的纯度鉴定

采用凝胶高效液相色谱法鉴定其纯度。色谱条件:TSK-GEL G4 000 PWXL 柱(7.8 mm×300 mm),流动相为超纯水,流速为 0.3 mL/min;检测器:ELSD 2000ES 型蒸发光检测器,漂移管温度 80℃;载气为 N₂,流速:2.0 L/min;进样量 20 μL(1 mg/mL)。

1.3.3 SVP-12 的光谱鉴定

1.3.3.1 紫外光谱鉴定

将 SVP-12 配制成 2 g/L 的溶液,在 190~700 nm 进行紫外扫描。

1.3.3.2 红外光谱鉴定

将 SVP-12 与 KBr 以 1:100 比例混合研细后,以 KBr 为本底,在 4 000~400 cm⁻¹ 波数范围内描

红外吸收。

1.3.4 SVP-12 分子质量的测定

采用 Sepharose CL-6B 柱(800 mm×16 mm),洗脱液为 0.15 mol/L NaCl 溶液,流速为 0.18 mL/min,每管收集 4.8 mL,苯酚-硫酸法测多糖分布,以标准分子质量葡聚糖(1.0×10³, 5.0×10³, 1.2×10⁴, 8.0×10⁴, 2.7×10⁵ u)绘制 lgMr-Ve 标准曲线,并测算样品的分子质量^[8]。

1.3.5 SVP-12 的组成分析

1.3.5.1 SVP-12 中硫酸基鉴定及含量测定

明胶比浊测定法测定样品中硫酸基含量^[9]。

1.3.5.2 SVP-12 的氨基己糖测定

比色法测定样品中氨基己糖含量^[9]。

1.3.6 SVP-12 的单糖组成测定

5 mg 多糖样品中加入 2 mol/L 三氟乙酸 1.0 mL,在 120℃下水解 2 h,水解液移入蒸发皿中,于 80℃水浴中加无水乙醇除酸。水解后单糖采用乙酰化方法衍生,以肌醇为内标^[10]。

气相色谱条件 色谱柱:AJW&HP-88 Capillary column(100 m×250 μm×0.25 μm)(Agilent, 美国);程序升温:180℃保持 3 min,再以 10℃/min 的速度升至 230℃,保持 20 min,再以 5℃/min 的速度升至 240℃,保持 20 min,再以 5℃/min 的速度升至 250℃,保持 30 min;载气(N₂)流速 0.5 mL/min,压力 171.8 kPa;进样量为 5 μL。

2 结果与讨论

2.1 扇贝内脏粗多糖脱蛋白

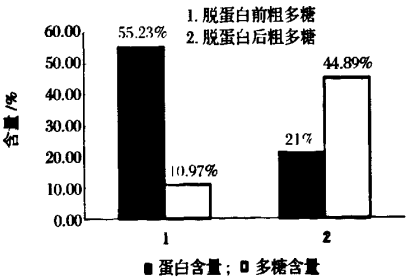


图1 蛋白酶-sevage 法的脱蛋白效果

从动物中提取的多糖,往往含有大量的蛋白质,在分离纯化及结构鉴定前,需要脱除蛋白质。本实验采用 2 步蛋白酶-sevage 法除蛋白,取得较好的效果。从图 1 可见,样品经除蛋白处理后,蛋白的含量从 55.23% 降到 21%,而多糖的百分含量从 10.97% 升高到 44.89%,这为后期的分离纯化及结构鉴定做了

较好的准备。

2.2 Sephacryl-S 200 凝胶过滤层析分离多糖

从图 2 可见,粗多糖经 Sephacryl-S 200 柱分离后只出现 1 个明显的多糖峰,说明粗多糖在该柱上没有得到有效的分离。对该峰进行收集获得的多糖组分,其质量占总上样量的 73%,说明 Sephacryl-S 200 凝胶柱除去了一些小分子杂质。同时,该多糖组分的洗脱体积接近柱子的外水体积,可以推断其分子量接近于 S 200 凝胶柱的分子质量分离上限(250 ku)。

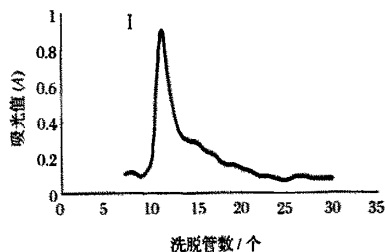


图 2 SVP 在 Sephacryl-S 200 柱上的洗脱曲线

2.3 DEAE-52 阴离子交换层析分离多糖

由图 3 可见,多糖组分经 DEAE-52 阴离子柱分离后,出现 3 个明显的糖峰。其中 II 号峰峰形好,且可收集量大,本文就以该组分(SVP-12)为研究对象进行性质分析。

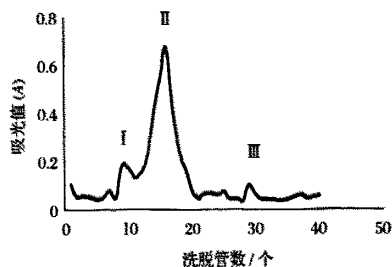


图 3 SVP-1 在 DEAE-52 阴离子柱上的洗脱曲线

2.4 HPLC 匹配 GEL-TSK 柱进行 SVP-12 的纯度鉴定

由图 4 可见,SVP-12 经 GEL-TSK 柱分离后的图谱呈现狭窄单一的对称峰,说明其分子质量较均一。

2.5 光谱分析

由图 5 可见,SVP-12 在 260 nm 和 280 nm 处无明显吸收峰,说明其核酸和蛋白质的含量极低。

SVP-12 的红外光谱图如图 6 所示,在 3409.09 cm^{-1} 处有 1 强且宽的吸收峰,系多糖上的 O—H 形成分子间、内氢键;1042.81 cm^{-1} 附近有强吸收,示有

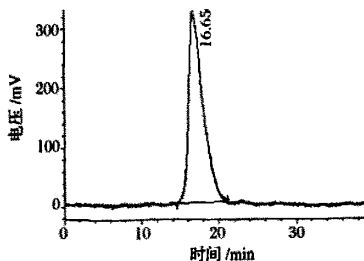


图 4 HPLC 凝胶色谱法鉴定 SVP-12

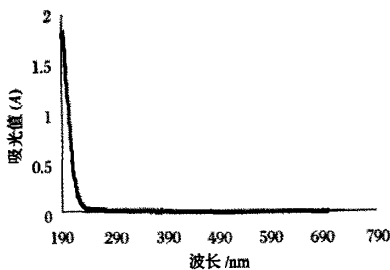


图 5 SVP-12 的紫外光谱图谱

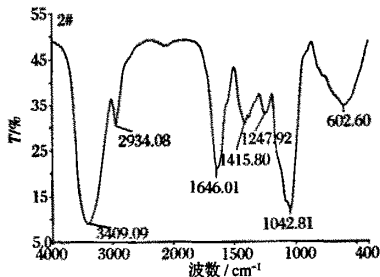


图 6 SVP-12 的红外光谱图谱

O—H 键变角振动;2934.08 cm^{-1} 附近的肩峰为饱和 C—H 伸缩振动的信号;1415.80 cm^{-1} 附近有吸收;有 C—H 键的变角振动,这些都是多糖的特征吸收峰。1646.01 cm^{-1} 附近有较强吸收,可能是 C=O 键的伸缩振动,或是酰胺键中 N—H 键的变角振动;1247.92 cm^{-1} 也有强吸收,证明有一 OSO_3^- 基团的 S=O 伸缩振动。

2.6 SVP-12 的分子质量

采用 1.3.4 所述方法,由标准曲线计算得到 SVP-12 的分子质量约为 170 ku,接近于 Sephacryl-S 200 分离范围上限 250 ku。

2.7 SVP-12 的组成分析结果

经处理的 SVP-12 盐酸水溶液,在滴加氯化钡试剂后,立刻变浑浊,生成不溶于酸的白色沉淀,表明多糖中含有硫酸基,是一种 SO_3^- 酯多糖,这与红外光谱鉴定的结果吻合。经测定,SVP-12 中硫酸根含量

为 12.57%。此外, SVP-12 中还含有 72.05% 的多糖, 2.74% 的蛋白以及 8.46% 氨基己糖。

单糖组成分析结果表明, SVP-12 是一种杂多糖, 是由鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖组成。根据外标法计算其摩尔比为 1.65 : 2.54 : 4.05 : 5.60 : 1.48 : 4.90 : 1.00。

3 结论

实验对扇贝内脏粗多糖进行了分离纯化, 并对纯化后所获取的多糖组分进行了部分理化性质研究。动物多糖与植物多糖相比, 蛋白含量较高, 为其纯化和鉴定带来了不便, 所以要进行脱蛋白处理。实验中采用 2 步蛋白酶-sevag 法脱蛋白, 蛋白含量从脱蛋白前的 55.23% 降到 21%, 效果明显。脱蛋白后的多糖样品先后经凝胶过滤层析法及阴离子交换层析法进行分离, 获得了均一的多糖组分 SVP-12, 说明分离纯化路线合理。

通过红外光谱检测, 发现 SVP-12 为含有氨基和硫酸基的多糖, 其分子质量大约为 170 ku, 其中多糖含量为 72.05%, 蛋白含量为 2.74%, SO_4^{2-} 含量为 12.57%, 氨基己糖含量为 8.46%。气相色谱法检测结果表明, SVP-12 含有鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖, 其摩尔比例约为 1.65 : 2.54 : 4.05 : 5.60 : 1.48 : 4.90 : 1.00。SVP-12 的

结构及单糖间相互连接方式还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 王长云, 管华诗. 海湾扇贝边中氨基多糖的研究[J]. 中国水产科学, 1994, 1(2): 32~39
- 2 孙福生, 刘赛, 刘宗保. 扇贝糖氨聚糖对 U937 细胞泡沫化的影响[J]. 中国新医药, 2004, 3(10): 6~8
- 3 殷红玲, 马媛, 王璐, 等. 虾夷扇贝内脏多糖的提取及清除羟基自由基作用的研究[J]. 水产科学, 2007, 26(5): 255~258
- 4 Sasaki Takkuma, Nakamichi K. Preparation of antitumor-agent from shellfish[P]. US, us4390468. 1983
- 5 沈鸣, 陈建伟. 氨基多糖的药理研究进展[J]. 上海医药, 2001, 22(6): 268~270
- 6 程婷婷, 李冬梅, 李韬, 等. 鲍鱼脏器多糖提取条件的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 209
- 7 Franz G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts[J]. Plant Medical, 1989, 55: 493~497
- 8 罗焱辉, 王昭晶, 梁忠岩. 小刺猴头菌子实体多糖的分离、纯化及初步研究[J]. 福建中医学报, 2005, 15(4): 32
- 9 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 16, 80, 91
- 10 张芳, 尹鸿萍, 王曼, 等. 硫酸酯化螺旋藻酸性多糖的气相色谱中不同衍生化方法比较[J]. 药物生物技术, 2002, 9(5): 278~280

Study on Isolation, Purification and Property of A Polysaccharice SVP-12 Form Scallop (*Patinopecten yessoensis*) Viscus

Yan Xue, Yang Jingfeng, Zhou Dayong, Li Tao, Zhu Beiwei

(College of Biology and Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

ABSTRACT The crude polysaccharides were obtained from Scallop (*Patinopecten yessoensis*) Viscus by proteolytic extraction method. It was deproteinated by two step protease-sevag method and purified by Sephacryl-S 200 gel filtration column and DEAE-52 anion exchange column consecutively. Through the procedure, a polysaccharide named SVP-12 was obtained. SVP-12, with the molecular weight of about 170 ku, appeared as a homogeneous polysaccharide by HPLC. It contains 72.05% of polysaccharide, 2.74% of protein, 12.57% of sulfate, and 8.46% of amino hexose. GC analysis indicated that SVP-12 was composed of rhamnose, fucose, arabian, xylose, mannose, galactose and glucose with the molar ratio of 1.65 : 2.54 : 4.05 : 5.60 : 1.48 : 4.90 : 1.00.

Key words scallop viscera (*Patinopecten yessoensis*), polysaccharides, purification, relative molecular weight, monosaccharide composition