

糙海参酸性粘多糖的分离及特性研究

陈健 郑艾初 肖凯军 林福兰

(华南理工大学轻工与食品学院, 广州, 510640)

摘要 研究了糙海参酸性粘多糖酶水解及乙醇沉淀的分离纯化方法, 通过 GPC 测定其重均分子质量为 59 934 u, 研究了其光谱特性。其氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖、硫酸根含量分别为 16.40%、19.40%、11.08% 和 28.15%, 通过对其理化性质的研究, 为更好地利用这一生物资源提供了依据。

关键词 糙海参, 粘多糖, 分离纯化, 光谱特性

糙海参 (*Holothuria scabra* Jaeger) 属棘皮动物门海参纲, 海参科, 又名象牙参、白参、明玉参等, 体长 6~20 cm, 直径 1~6 cm, 表面呈黄白色, 在我国主要分布于西沙、海南、广东中西部, 是南海最常见的食用海参。研究表明, 海参酸性粘多糖具有抗肿瘤、降血脂、抗凝血等药理活性, 糙海参是理想的药食两用材料^[1]。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

海参, 购于广州海产品市场, 为冷冻鲜品, 经中国科学院南海海洋研究所张汉华研究员鉴定为糙海参。

甲苯氨蓝(中国医药集团上海化学试剂公司), 咪唑(中国医药集团上海化学试剂公司), 地衣酚(上海化学试剂一厂), *D*-(+)氨基半乳糖(Sigma 公司), 盐酸-*L*-半胱氨酸(上海润捷化学试剂有限公司), *D*-岩藻糖(Alfa Aesar 公司), 葡聚糖硫酸钠(天津川页生化制品有限公司), 肝素钠(中国医药集团上海化学试剂公司, 160 IU/mg), 硫酸软骨素 C(Sigma 公司), 葡聚糖标准品系列(Sigma 公司, 分子质量为 4 400 u、9 900 u、21 400 u、43 500 u、124 000 u、196 000 u、277 000 u、401 000 u)。

1.2 实验仪器和设备

Waters Breeze 凝胶渗透色谱仪(美国 Waters 公司), pH S-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂), 水平电泳仪(大连科迈仪器公司), UV-2102PC 紫外可见分光光度计(上海 Unico 公司), 7200 分光光度计(上海 Unico 公司), 红外光谱仪(德国 Bruker 公司), 冷冻干燥机(Beckman 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 糙海参粘多糖的分离纯化^[2]

糙海参去内脏、洗净、粉碎, 加 2 倍水, 加 0.4% 海参质量的木瓜蛋白酶, 55℃, pH 6.0~6.5 水解 12 h, 加热至 85℃ 灭酶, 6 000 r/min 离心 10 min, 得上清液, 经减压浓缩, 40% 乙醇沉淀, 再经丙酮、乙醇脱脂, 得海参粗多糖。

粗多糖重新溶解于去离子水, 分别以 717 和 732 离子交换树脂纯化, 30% H₂O₂ 溶液脱色, 三氯乙酸法除蛋白、透析, 经 DEAE-Sephrose F.F. 柱层析(2.5×18 cm)进行分级纯化, 以 0.5 mol/L 的 NaCl 为洗脱剂, 按 5 mL 体积分部收集, 以硫酸-苯酚比色法测定多糖含量, 合并多糖出峰部分, 真空冷冻干燥得白色纯品。

1.3.2 琼脂糖凝胶电泳分析^[3]

以巴比妥缓冲液 0.06 mol/L (pH 8.5) 配置成 0.8% 琼脂糖液, 于 80℃ 水浴加热制胶。上样量 8 μL, 在 105 V 下电泳 40 min, 以 0.1% 十六烷基三甲基溴化铵溶液固定, 于 50℃ 烘箱干燥, 冷却后置甲苯胺蓝溶液染色, 以脱色液 [V(乙酸): V(乙醇): V(水) = 0.1:5:5] 漂至背景无色为止。

1.3.3 凝胶渗透色谱法分子量的测定

凝胶色谱柱为 TSKG5000_{PWXL} 及 TSKG3000_{PWXL} 双柱串接, 前接保护柱, 柱温 40℃, 流动相为 0.02 mol/L KH₂PO₄, 流速 0.6 mL min。

1.3.4 红外光谱测定

将糙海参酸性粘多糖与 KBr 压片, 再以傅立叶变换红外光谱仪进行扫描, 扫描范围 4 000~400 cm⁻¹。

1.3.5 蛋白质测定

以 UV-2102PC 紫外可见分光光度计进行紫外扫描, 扫描范围 190~400 nm。

1.3.6 硫酸基含量测定

BaCl₂-硫酸比浊法^[4]。

分别取 0.01 mol/L 的 K₂SO₄ 溶液 0、20、40、60、

第一作者: 博士, 讲师。

收稿日期: 2006-05-17

80、100、120、140、180、200 μL 于 0~10 号的试管中,各管均补水至 200 μL ,加入 3.8 mL 4% 的三氯乙酸,再加入 1 mL 0.5% 的 BaCl_2 明胶溶液,室温下静置 10~20 min 再测定 360 nm 下的吸光度值,另取 22 mg 糙海参多糖,溶于 5 mL 6 mol/L 的 HCl 中,100 $^\circ\text{C}$ 油浴中加热 6 h,取出,水中迅速冷却至室温,吸取 200 μL ,加入 3.8 mL 4% 的三氯乙酸,再加入,1 mL 0.5% 的 BaCl_2 明胶溶液,室温下静置 15 min 再测定,以蒸馏水经同样处理作为空白样,求得吸光度值,通过标准曲线计算出硫酸根的质量。

1.3.7 己糖醛酸含量测定^[5]

1.3.7.1 吡唑法

以微量注射器精密吸取标准溶液 0, 10, 20, 30, 50 μL 于带塞试管中,补加水使各管至 250 μL ,放入冰水中冷却,加入 1.4 mL 浓 H_2SO_4 ,摇匀后置 85 $^\circ\text{C}$ 水浴中加热 20 min,取出后冷至室温,经移液器加入 50 μL 吡唑溶液,混匀后,室温下静置 2 h。在 530 nm 下测吸光度值,绘制标准曲线。另取样品溶液(0.5 mg/mL)40 μL 于带塞试管中,补加水至 250 μL ,余操作同标准曲线,求得含量 C 。

1.3.7.2 地衣酚法

以微量注射器精密吸取标准溶液 0, 5, 10, 20, 30, 50 μL 于带塞试管中,补加水使各管至 400 μL ,加入地衣酚法试液 1.2 mL,混匀后在 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中加热 100 min。冷却后测读 660 nm 光吸收值,绘制标准曲线。另取样品溶液(0.5 mg/mL)40 μL 于带塞试管中,补加水至 400 μL 。余操作同标准曲线,求得含量 O 。

1.3.8 氨基半乳糖含量测定

Ludowieg 法^[6]。

分别取 0.4 mg/mL 的氨基半乳糖标准溶液 0、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500 μL 于带塞试管中,补加水至 500 μL ,加入碱性乙酰丙酮 1 mL,沸水浴中作用 25 min,冰浴中迅速冷却。加入无水乙醇 3 mL 及对二甲苯甲醛 1 mL,强力振荡,置 60 $^\circ\text{C}$ 水浴中加热 1.5 h,冷至室温,测 510 nm 处吸光度。

将本品与 4 mol/L 的 HCl 配成 8 mg/mol 的溶液,100 $^\circ\text{C}$ 水解 14 h,再稀释到 0.08 mg/mol,取稀释液 500 μL ,其余操作同标准溶液。

1.3.9 岩藻糖含量测定

Dische 法^[7]。

取 0.5 mL 糙海参粘多糖(0.4 mg/mL),加 4.5

mL H_2SO_4 溶液[$V(\text{浓硫酸}) : V(\text{水}) = 6 : 1$]摇匀后静置 15 min,沸水浴 10 min,冷却,加入 0.1 mL 3% 盐酸半胱氨酸,摇匀,静置 60 min,以空白白管调零,测 456 nm 处光吸收值,空白管以双蒸水代替粘多糖,其余操作同,以纯的 D -岩藻糖为标准,根据标准曲线计算样品中 D -岩藻糖的含量。

2 结果与讨论

2.1 糙海参粘多糖的柱层析

糙海参粘多糖,DEAE-Sephrose F.F. 柱层析多糖分布结果如图 2 所示,海参多糖分子质量分布较为集中。

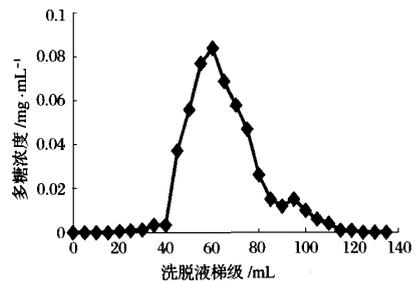
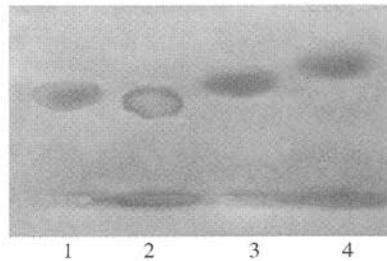


图 1 海参多糖的 DEAE Sepharose F.F 柱层析图

2.2 琼脂糖电泳分析

由琼脂糖电泳分析可知,侧链带硫酸根阴离子基团的四种多糖样品在电场中均发生迁移,向正极移动,其电迁移的距离从大到小的顺序依次是:葡聚糖硫酸钠>肝素钠>糙海参粘多糖>硫酸软骨素 C,糙海参粘多糖的电迁移距离不及葡聚糖硫酸钠和肝素钠,但比硫酸软骨素 C 略大,显示其所带的负电荷也比硫酸软骨素 C 多。



1-糙海参粘多糖,2-硫酸软骨素 C,3-肝素钠,4-葡萄糖硫酸钠

图 2 四种酸性多糖的琼脂糖凝胶电泳图

2.3 糙海参粘多糖样品的紫外光谱分析

多糖样品经紫外-可见分光光度计检测,发现只在 206~207 nm 处有强吸收(见图 3),而在 254 nm 和 280 nm 处紫外吸收很弱,显示产品蛋白质和核酸

含量很低。

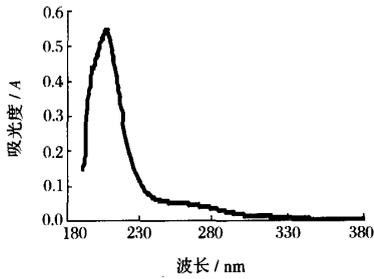


图3 海参多糖的红外光谱图

2.4 红外光谱测定

糙海参粘多糖的傅立叶变换红外光谱如图3所示,其中 3419 cm^{-1} (强) 为 -OH 特征吸收峰, 2929 cm^{-1} 为 C-H 伸缩振动, 1649 cm^{-1} (强) C=O 为伸缩振动, 1377 cm^{-1} (弱) 为 -COO- 中 C=O 对称伸缩振动, 1255 cm^{-1} (强) 为硫酸酯基特征吸收峰, 1067 cm^{-1} (强) 为 S=O 伸缩振动, 930 cm^{-1} (较弱) 为吡喃环对称摇摆振动, 856 cm^{-1} (弱) 为 α -糖苷键 $\text{C}_4\text{-H}$ 横变角振动。

本品在官能团区 ($4000\sim 1300\text{ cm}^{-1}$) 红外吸收与各类硫酸软骨素几乎一致,而在指纹区 ($1300\sim 400\text{ cm}^{-1}$) 则表现出细微的差别,本品分别在 822 cm^{-1} 、 856 cm^{-1} 、 928 cm^{-1} 、 1029 cm^{-1} 和 1067 cm^{-1} 附近具有特征吸收峰,与文献报道得硫酸软骨素 E (4,6-二硫酸软骨素) 的相应的红外吸收峰很接近^[8]。并且,图2的电泳图也显示,本品在电场中迁移的距离比硫酸软骨素 C (4-硫酸软骨素) 略大,表明其所带负电荷也更多。这些结果表明,本品主要含较硫酸软骨素 E。

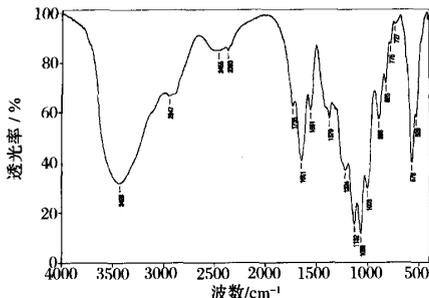


图4 海参多糖的红外光谱图

2.5 糙海参多糖的分子质量

图5为葡聚糖 Dextran 系列标准品经 Breeze GPC 软件处理得到标准曲线,以标准葡聚糖分子质量得对数 $\log M_w$ 对洗脱体积进行回归得到葡聚糖 Dextran 系列标准品的 GPC 标准曲线图。

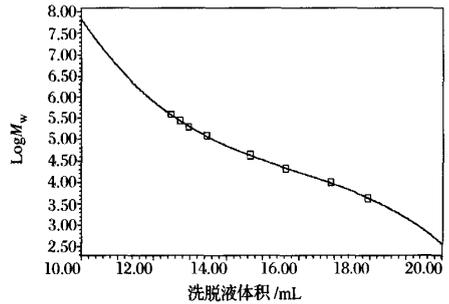


图5 葡聚糖 Dextran 系列标准品 GPC 标准曲线图

经 Breeze GPC 软件可计算出糙海参多糖重均分子质量为 $59\,934\text{ u}$, 数均分子质量为 $47\,870\text{ u}$, 峰位分子质量为 $54\,147\text{ u}$, 分子质量分布宽度 (M_w/M_n) 为 1.25, 分子质量分布较为集中。

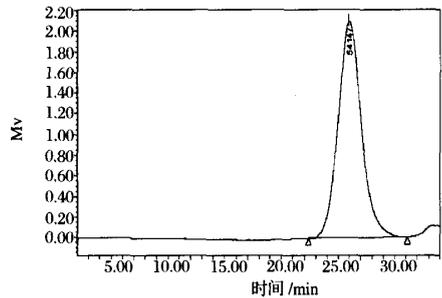


图6 糙海参粘多糖的 GPC 色谱图

2.6 多糖的组分含量测定

表1 糙海参粘多糖分子基团组成

组分	含量/%	分子比值
氨基半乳糖	16.40	1
葡萄糖醛酸	19.40	1.28
岩藻糖	11.08	0.68
硫酸酯	28.15	1.72

表1为由化学分析法得到其主要组分的百分含量。通过吡啶法和地衣酚法测定的己糖醛酸含量分别为 19.40%, 15.58%, 由于 $\text{C/O} = 19.40/15.58\% = 1.24 > 1$, 表明糙海参中的己糖醛酸为葡萄糖醛酸^[5]。

3 讨论

(1) 通过电泳和红外光谱分析,糙海参粘多糖主要成分是硫酸软骨素 E, 即 4,6-二硫酸软骨素, 具有更强的中和带正电荷物质的能力。

(2) 糙海参中氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖、硫酸酯含量分别为 16.40%、19.40%、11.08%、和 28.15%。糙海参已经成为南方海域大量养殖的品种,在食用海参中,糙海参价格相对便宜,加强糙海参粘多糖等有效成分的研究,可为更好的利用这一丰富

的生物资源提供理论支持和应用依据。

参 考 文 献

- 1 马天舒,葛迎春.海参活性物质的药理研究进展[J].特产研究,2003,25(1):57~60
- 2 李良铸,李明晔,最新生化药物制备技术[M].北京:中国医药科技出版社,2001.311~321
- 3 Dietrich Carl P. McDuffie Norman M. Identification of acidic muco- polysaccharides by agarose gel electrophoresis [J]. Journal of Chromato- graphy 1977, 130:299~304
- 4 Dodgson K S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters[J]. Journal of Biochemistry, 1961 (78):312~319
- 5 张唯杰.复合多糖生化研究技术(第二版)[M].浙江:浙江大学出版社,1999.408
- 6 Ludowieg J. Calorimetric differentiation of hexamines[J], Analytical Biochemistry, 1967, 19: 80
- 7 Dische Z. A specific reaction of methylpentose and a spectrophotometric micromethod for their determination [J]. Journal of Biological Chemistry, 1948, 175:595
- 8 黄骞中,温玉麟.动物活性成分化学[M].天津:天津科学技术出版社,1995.1 006~1 030

Studies on Isolation and Partial Characterization of Acidic Mucopolysaccharide from *Holothuria scabra* Jaeger

Chen Jian Zheng Aichu Xiao Kaijun Lin Fulan

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT Mucopolysaccharide was extracted and purified from fresh *Holothuria scabra* Jaeger by means of enzymic hydrolysis and alcohol precipitation. Its molecule weights was 59 934ua by GPC. The spectrum characterizations of mucopolysaccharide have also been studied in this article. The percentage of galactosamine content, glucuronic acid, fucose and sulfate in mucopolysaccharide was 16.40%, 19.40%, 11.08% and 28.15% respectively. The research helped us to make full use of this bioresource.

Key words *Holothuria scabra* Jaeger, mucopolysaccharide, extraction and purification, spectrum characterizations

行业
动态

科·汉森“新菌种”使低脂酸乳口味更佳

科·汉森公司(Chr. Hansen)推出6种新菌种,开发目标是新菌种能够令酸乳的粘稠度增加20%,同时保留了科·汉森DVSa菌种口味温和、快速发酵和品质稳定等的一贯优点。

增加20%粘稠度能使低脂或无脂酸乳产品仍然保持良好的奶油感和顺滑的口感。现在科·汉森推出的新菌种令低脂产品在外观、口感和口味等方面都和全脂酸乳相仿,满足了食品生产商及消费者的需求。

新的菌种名字分别是YF-L901、YF-L902、YF-L705、YF-L706、ABY-10和ABT-10。在把这些产品推向市场之前,科·汉森在大型酸乳厂对这些新菌种进行了严谨的测试。科·汉森一直致力于为市场提供现代酸乳生产所需要的优质、稳定、安全、高度灵活的新菌种。科·汉森是一家为食品、乳制品、人体保健和营养、动物保健行业提供配料的全球生物技术公司。通过扎实的科研工作,科·汉森致力于提高食品质量及改善全球人类健康,它在菌种、益生菌、酶、色素、香精、香辛料、药片涂料赋形剂等领域皆首屈一指。科·汉森的产品用于食品和饮料、医药、膳食补充剂和农产品。

构建高产基因工程菌 武汉大学氨基酸研究取得新突破

2006年10月28日,武汉大学生命科学院与武大弘元公司共同研发的腺苷蛋氨酸,通过省科技厅组织的专家鉴定。

研发人员应用基因工程技术改造酵母菌、构建高产基因工程菌,并通过创新发酵和精制提取工艺最终取得成果,被专家认为是国内首创。

武汉大学在1970年以水解法生产胱氨酸为起点,奠定了中国氨基酸工业化的基础。目前,该校在应用酶法和基因工程法制备氨基酸方面处于国内领先地位。武大弘元公司目前拥有全球规模最大的半胱氨酸及其衍生物生产基地,以及酰化氨基酸、酯化氨基酸、氨基酸复合盐、氨基酸原料药、鸟氨酸等6大生产基地。腺苷蛋氨酸的研发成功,使武汉继续保持在全国氨基酸研究领域的领先地位。