

3 种低值海参中海参多糖的提取分离及化学组成研究*

胡艳芳,董书君,续晓琪,于龙,常耀光,薛长湖,王彦超

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛, 266003)

摘 要 海参是我国重要的经济水产品,具有多种营养及生理调节功能。海参多糖是海参的主要功效成分之一。文中以 3 种低值海参-黄玉参(*Stichopus naso*)、沙参(*Holothuria floridana*)及土耳其参(*Holothuria tubulosa*)为实验原料,在利用分子生物学方法确认其种属的基础上,提取其中的海参多糖,并利用阴离子交换层析分离纯化出海参硫酸软骨素及海参岩藻聚糖硫酸酯 2 种组分。分别采用柱前衍生-HPLC 法、离子色谱法及高效凝胶排阻色谱法分析各样品的单糖组成、硫酸根含量及分子质量。结果表明:海参多糖及其组分的化学组成随海参来源的不同而存在差异。

关键词 低值海参;岩藻聚糖硫酸酯;硫酸软骨素;单糖组成;硫酸根含量;分子质量

海参(sea cucumber)是棘皮动物门海参纲动物的总称。世界海参资源丰富,全球约有海参 1 100 余种,其中可食用者 40 余种^[1]。海参自古以来即被我国人民视为滋补食品,现已证实海参体壁中含有海参多糖、磷脂、皂苷、胶原蛋白等多种功效成分^[2-3]。除养殖品种仿刺参外,其他品种的海参尤其是一些进口海参由于价格相对低廉,在我国市场上也形成了可观的消费量。低值海参口感较差,食用价值较低,研究并利用其中的功效成分,将是实现低值海参资源高值化利用的有效途径。

海参多糖是海参体壁的重要组成部分,主要包括海参硫酸软骨素(sea cucumber chondroitin sulfate, SC-CHS)及海参岩藻聚糖硫酸酯(sea cucumber fucoidan, SC-FUC) 2 种组分。其中,SC-CHS 是具有硫酸软骨素主链结构及岩藻糖支链的一种酸性黏多糖,已被证实具有降血脂^[4]、抗肿瘤^[5]、抗凝血^[6]、增强免疫力^[7]、抗血栓形成^[8]多种生理调节功能;SC-FUC 主要由岩藻糖及硫酸根组成,能够有效预防酒精性胃溃疡^[9]、保肝^[10]、预防急性酒精中毒^[11]以及抵抗破骨细胞的形成^[12]。多糖类物质的功能与其化学组成密切相关。Luo 等^[6]对 *Holothuria edulis*、*Apostichopus japonicas* 及 *Holothuria nobilis* 海参多糖组分的抗凝血活性研究表明,由于 SC-CHS 及 SC-FUC 的单糖组成及硫酸根含量不同导致其抗凝血活性具有较大差异;

张珣等^[13]比较研究了海地瓜(*Acaudina molpadioides*)与北大西洋瓜参(*Cucumaria frondosa*) SC-FUC 的抗肿瘤作用,发现硫酸化程度较高的北大西洋瓜参 SC-FUC 的抗肿瘤作用较强。因此,提取海参多糖并明确其化学组成是对海参多糖进行研究与开发的前提基础。

基于此背景,本研究拟以 3 种市售价格均低于 1 000 元/kg 的低值海参为原料,首先通过分子生物学手段确证其种属,在此基础上提取海参多糖,并利用阴离子交换色谱对海参多糖进行分离纯化,进而对海参多糖及其各组分的单糖组成、硫酸根含量及分子质量等性质进行分析。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

商品名为黄玉参、沙参及土耳其参的 3 种低值海参干品购于青岛市南山水产市场;海洋生物 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司;Taq Mix,俄罗斯 Biomed 公司;木瓜蛋白酶,广西南宁庞博生物工程有限公司;氯化十六烷基吡啶(cetylpyridinium chloride, CPC),上海生工生物工程有限公司;Express-Ion D,美国 GE healthcare 公司;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP),分析纯,上海化学试剂公司;乳糖(Lac),上海化学试剂有限公司;D-甘露糖(Man)、D-(+)-氨基半乳糖(GalN)、D-(+)-氨基葡萄糖(GlcN)、D-葡萄糖、D-半乳糖(Gal)、D-葡萄糖醛酸(GlcUA)、L-岩藻糖(Fuc)、右旋糖酐系列标准品(dextran, M_w 5 000、12 000、50 000、150 000、270 000、410 000、670

第一作者:硕士研究生(常耀光副教授为通讯作者)。

* 高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20110132120015)、海洋公益性行业科研专项(No. 201105029)

收稿日期:2014-07-09,改回日期:2014-10-22

000、1 400 000), Sigma 公司; 乙腈(色谱纯), 美国 Honeywell 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

UV-2550 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; 冷冻干燥机(Alpha 1-4LD), 德国 Christ 公司; 1100 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; ICS-2000 型离子色谱仪, 美国 Dionex 公司; PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司。

2 实验方法

2.1 海参种属鉴定

利用分子生物学手段, 通过扩增、比对 16S rDNA 基因序列鉴定各海参的种属。将 3 种干海参洗净、烘干、磨粉后, 以海洋生物 DNA 提取试剂盒分别提取其基因组 DNA。参照 Kerr^[14] 报道中的引物(16Sar: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3', 16Sbr: 5'-CTCCG-GTTTGAAGTCAGATCA-3'), 以基因组 DNA 为模板进行 PCR。PCR 反应体系为: DNA 模板 10~100 ng、引物(10 μ mol/L)各 2.5 μ L、Taq Mix 25 μ L、双蒸水补充至 50 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 反应 30 s 变性; 95 $^{\circ}$ C 反应 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 4 min。PCR 产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序。利用 NCBI 的 BLAST 程序, 将测得序列与 Gene Bank 数据库中的序列进行比对, 找到一致度最高的基因序列从而确认各海参的拉丁文名。

2.2 海参多糖的提取

取 50 g 海参体壁干粉加入 1.5 L 乙酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 6.0, 含 5 mmol/L EDTA 及 5 mmol/L 半胱氨酸盐酸盐)及 5.0 g 木瓜蛋白酶, 60 $^{\circ}$ C 水浴反应 12 h。酶解液离心(4 500 r/min, 10 min), 取上清液并加入 80 mL CPC 溶液(0.1 g/mL), 于室温下放置 12 h 后将沉淀溶解于 750 mL V(4 mol/L NaCl): V(乙醇) = 100: 15 溶液中。加入 1.5 L 体积分数 95% 乙醇溶液, 4 $^{\circ}$ C 下静置 12 h 后离心, 沉淀以蒸馏水复溶, 以截留分子质量为 8 000~14 000 Da 的透析袋进行透析, 截留液冻干后得到海参多糖。测定各海参多糖的单糖组成及硫酸根含量。

2.3 海参多糖的分离纯化

利用 Express-Ion D 阴离子交换填料(3.8 cm \times 25 cm)对海参多糖进行分离纯化。取各海参多糖 1.0 g 溶于 30 mL 25 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 6.3) 缓冲液中, 以 0~2 mol/L NaCl 进行线性梯度洗脱, 流速 5 mL/min, 利用分部收集器收集馏分, 以改

良苯酚-硫酸法^[15]检测各管中多糖含量。对测定曲线上的峰尖各管进行收集, 并以截留分子质量为 8 000~14 000 Da 的透析袋透析, 冻干后得到海参多糖的各组分, 分别测定各组分的单糖组成、硫酸根含量及分子质量。

2.4 单糖组成测定

采用 PMP 柱前衍生-HPLC 法测定单糖组成^[16-17]。称取各样品 2.0 mg 置于安瓿瓶中, 加入 1 mL 2 mol/L TFA, 充氮气封管, 110 $^{\circ}$ C 下水解 8 h, 冷却至室温, 挥干, 并以超纯水复溶, 以 0.3 mol/L NaOH 溶液调至中性, 定容至 1 mL。取 400 μ L 加入 50 μ L 2 mmol/L 的 Lac, 加入 450 μ L PMP 及 450 μ L 0.3 mol/L NaOH, 70 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min, 冷却后以 450 μ L 0.3 mol/L HCl 中和, 后以 1 mL 三氯甲烷萃取, 取上层水相进行色谱分析。色谱条件: 色谱柱, Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 分离柱(4.6 mm \times 150 mm); 柱温, 25 $^{\circ}$ C; 流动相, 流动相 A, 体积分数 10% 乙腈 + 0.1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ - CH_3COOH 缓冲液(pH 5.5), 流动相 B, 体积分数 25% 乙腈 + 0.1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ - CH_3COOH 缓冲液(pH 5.5); 时间梯度为 0~40 min, 体积梯度为 45%~100% B; 流速, 1.0 mL/min; 进样体积, 10 μ L。利用各单糖标准品进行定量。

2.5 硫酸根含量测定

硫酸根含量测定采用离子色谱法^[18]。取各样品 2.0 mg 于安瓿瓶中, 加 1 mL 2 mol/L TFA, 充氮气封管, 于 110 $^{\circ}$ C 下水解 10 h, 后挥干 TFA, 以超纯水溶解并定容至 25 mL, 进行上机测定。色谱条件: 色谱仪: ICS-2000 离子色谱仪; 色谱柱: Ionpac AS11-HC (4 mm \times 250 mm); 抑制器: ASRS ULTRA II 阴离子抑制器, 抑制电流: 90 mA; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 淋洗液: 20 mmol/L KOH; 流速: 1.2 mL/min; 进样体积: 25 μ L; 定量标准品: Na_2SO_4 。

2.6 分子质量测定

利用高效凝胶排阻色谱法(HPSEC)法测定分子质量。色谱条件如下: 色谱柱: TSK-gel G4000 PWxl (30.0 cm \times 7.8 mm i. d.); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 检测器: 示差检测器(RID); 流动相: 0.2 mol/L NaCl; 流速: 0.5 mL/min。以各分子质量的 dextran 为标准品, 利用 Aglient GPC 计算样品的分子质量。

2.7 统计分析

样品重复测定 3 次, 取其平均值。实验数据处理采用 SPSS16.0 分析软件, 显著性差异分析采用 LSD 检测。以 $P < 0.05$ 为统计检测显著性差异。

3 结果与讨论

3.1 种属鉴定

对市售3种低值干海参的种属进行鉴定,结果列于表1。

表1 海参种属鉴定结果

Table 1 Species identification of sea cucumbers

商品名	近似基因序列 Gene Bank 编号	一致 度/%	种属拉丁名
黄玉参	KF479391.1	99	<i>Stichopus naso</i>
沙参	EU220803.1	99	<i>Holothuria floridana</i>
土耳其参	GU797606.1	99	<i>Holothuria tubulosa</i>

目前市售海参的商品名称仍较为混乱,大多使用俗名,一种多名、重名的现象普遍,多种进口海参品种亦缺乏对应的中文学名,一般按照形态、产地等信息命名贴标。鉴于此情况,有必要首先对海参的种属进行鉴定,以保证研究结论的准确性。由于鲜活海参不易于储藏运输,海参一般以干制品的形式出售,而加工过程中原料的形态学特征往往遭到破坏,因此拟通

过传统形态学方法准确鉴别干海参的种类其难度较大。分子生物学方法为海参的种属鉴定提供了可靠手段。线粒体DNA结构简单,包含蛋白质、rRNA、tRNA等编码基因及非编码控制区,有一定的遗传自主性,这些功能区段常作为开展遗传进化研究的重要标记^[19-20],费来华等^[21]扩增了10个海参种的16S rDNA序列,结果发现16S rDNA序列在不同科属间存在明显差异,是鉴定海参种属的适宜序列。

对商品名为“黄玉参”、“沙参”及“土耳其参”3种海参的16S rDNA序列进行PCR扩增、测序及BLAST分析,在Gene Bank数据库中发现了与其一致度高达99%的已知16S rDNA序列,分别来源于*Stichopus naso*、*Holothuria floridana*及*Holothuria tubulosa*,从而确定了3种海参的种属信息。其中,黄玉参属于楯手目刺参科,沙参、土耳其参属于楯手目海参科。

3.2 海参多糖的提取与分析

以蛋白酶酶解结合CPC沉淀提取得到海参多糖,其得率及其化学组成如表2所示。

表2 各海参多糖的得率、单糖组成及硫酸根含量

Table 2 Yield and chemical characteristics of polysaccharides from various sea cucumbers

多糖来源	得率/%	单糖组成(摩尔比)	硫酸根含量/%
黄玉参	7.37	Fuc: GlcUA: GalN: GlcN: Gal: Man = 1:0.24:0.16:0.08:0.13:0.24	24.12 ± 1.69
沙参	8.06	Fuc: GlcUA: GalN: GlcN: Gal: Man = 1:0.10:0.50:0.32:0.36:0.14	21.67 ± 1.88
土耳其参	6.94	Fuc: GlcUA: GalN: GlcN: Gal: Man = 1:0.15:0.44:0.34:0.39:0.13	21.93 ± 2.10

得率数据表明,3种海参体壁中均含有丰富的海参多糖,是海参多糖提取的良好原料。3种海参多糖均由多种单糖组成,包括中性糖、氨基糖及糖醛酸,虽种类一致,但3种海参多糖的单糖组成比例之间存在差异。3种海参多糖均含有丰富的硫酸根,三者硫酸根含量之间无显著性差异。

3.3 海参多糖的分离纯化

利用Express-Ion D填料纯化海参多糖的分离图谱如图1所示。

由于3种海参多糖均具有较高含量的硫酸根,属于阴离子多糖,因此可通过阴离子交换色谱法对其进行分离纯化。Express-Ion D是一种新型的弱阴离子交换纤维素,具有快速吸附和解吸附的动力学性能。本研究采用该填料对海参多糖进行分离纯化,各种海参多糖经NaCl线性梯度洗脱后,其分离图谱均呈现出2个洗脱峰;第1个峰的洗脱盐浓度约为0.9 mol/L,第2个峰洗脱的盐浓度约为1.2 mol/L,2个

峰的分离度较好。将2个组分分别命名为F1及F2,其得率及单糖组成的分析结果列于表3。单糖组成的测定结果表明,各海参多糖的F1组分中均含有GlcUA、GalN及GlcN,符合SC-CHS的单糖组成特征^[22-23],确认为SC-CHS;F2组分的组成单糖仅有Fuc一种,确认为SC-FUC。后续HPSEC实验发现收集得到的各SC-CHS及SC-FUC组分均具有良好的纯度。

3种海参的海参多糖均由SC-CHS及SC-FUC 2个组分组成,这与目前大部分关于海参多糖的研究报道相吻合。Mourao等人^[15]报道在*Ludwigothurea grisea*中还存在一种由Fuc和少量氨基糖组成的多糖组分,Luo等^[6]在*Holothuria nobilis*中发现了一种不含硫酸根的中性葡聚糖,VarshaKale等^[24]报道在北大西洋瓜参中存在含有乙酰神经氨酸的多糖,上述组分在本研究的3种海参中都没有被发现,提示不同来源的海参多糖之间存在着种间差异性。

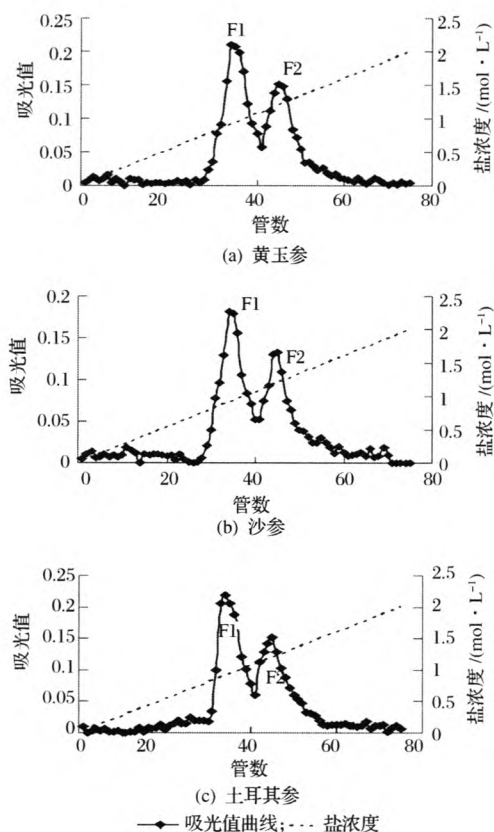


图1 各海参多糖 Express-Ion D 分离图谱
Fig. 1 Express-Ion D separating curves of crude polysaccharides from various sea cucumbers

表3 各海参多糖组分的得率、单糖组成、分子量及硫酸根含量

Table 3 Yield, molecular mass, monosaccharide composition and sulfate content of Ion D separated fractions

组分	得率/%	单糖组成(摩尔比)	分子量/kDa	硫酸根含量/%
黄玉参 F1	3.73	Fuc: GlcUA: GalN: GlcN: Gal: Man = 1: : 0.24: 0.39: 0.06: 0.20: 0.47	119.3	25.39 ± 0.06
黄玉参 F2	3.22	Fuc	625.7	23.53 ± 0.03
沙参 F1	5.26	Fuc: GlcUA: GalN: GlcN: Gal: Man = 1: 0.25: 1.47: 0.23: 0.33: 0.83	87.0	23.29 ± 0.67
沙参 F2	2.49	Fuc	1 275.3	21.24 ± 0.30
土耳其参 F1	5.27	Fuc: GlcUA: GalN: GlcN: Gal: Man = 1: 0.17: 0.76: 0.21: 0.29: 0.73	87.0	22.49 ± 0.13
土耳其参 F2	1.16	Fuc	2 169.2	20.09 ± 0.57

3 种海参 SC-FUC 及 SC-CHS 的硫酸根含量丰富,均大于 20%。比较发现,SC-FUC 的硫酸根含量显著高于同种海参来源 SC-CHS 的硫酸根含量($P < 0.05$);黄玉参 SC-FUC 及 SC-CHS 的硫酸根含量均显著高于沙参及土耳其参中同种多糖组分的硫酸根含量($P < 0.05$)。3 种海参中,黄玉参属于刺参科,广泛分布于印度洋及太平洋海域;而沙参及土耳其参属于海参科,前者主要分布于墨西哥湾及加勒比海地区,后者主要分布于地中海。不同海参多糖之间的差异可能与海参的种属及生长海域等因素有关。

3.4 海参多糖组分的化学组成分析

各海参多糖组分的化学组成分析结果列于表 3。黄玉参、沙参及土耳其参 SC-CHS 所含单糖的种类相同,但各单糖比例之间存在明显差异,提示上述 3 种海参的 SC-CHS 具有不同的一级结构。Kariya 等人^[12]对日本刺参(*Stichopus japonicus*) SC-CHS 的研究发现,其组成单糖仅为 GlcUA、GalN 及 Fuc,樊绘曾等人^[23]对玉足海参 SC-CHS 的研究指出,其组成单糖也仅含有 GlcUA、GalN 及 Fuc 3 种单糖。黄玉参、沙参及土耳其参 SC-CHS 中除含有 GlcUA、GalN 及 Fuc 外,还含有 GalN、Gal 及 Man 等单糖,提示 3 种海参 SC-CHS 可能具有新颖结构。3 种海参 SC-CHS 的分子质量相对集中,均在 100 kDa 左右。

3 种海参的 SC-FUC 均仅由 Fuc 一种单糖组成。于龙等人^[25]研究发现,北大西洋瓜参 SC-FUC 中含有较高含量的 Gal,Zhang 等人^[26]从日本刺参体壁中提取得到的 SC-FUC 除含有大量 Fuc 外也含有少量 Gal,但在梅花参(*Thelenota ananas*)、海地瓜及美国肉参(*Isostichopus badionotus*)的 SC-FUC 中均没有发现 Gal 的存在^[27-29]。3 种 SC-FUC 的分子量巨大,彼此之间亦存在差异,且均高于相同海参来源 SC-CHS 的分子质量,这与宿玮等人^[30]的研究结果类似。

4 结论

黄玉参、沙参及土耳其参 3 种低值海参中的海参多糖由 SC-CHS 及 SC-FUC 2 个组分组成。对各样品的单糖组成、硫酸根含量及分子质量的分析结果表明,3 种海参多糖及其组分的化学组成随海参来源的不同而存在差异。本文是对上述 3 种海参中多糖的首次研究,结果可为其开发利用提供理论依据,并为进一步研究各海参多糖组分的精细结构与功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 张凤漆. 棘皮动物门(中国经济动物志)[M]. 北京: 科学出版社, 1963: 49-115.
- [2] 樊绘曾. 海参: 海中人参——关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001(4): 37-44.
- [3] Hirata T, Zaima N, Yamashita K, et al. Recent advances in researches on physiologically active substances in holothurians [J]. Journal of Ocean University of China, 2005, 4(3): 193-197.
- [4] LIU H, KO W, HU M. Hypolipidemic effect of glycosaminoglycans from the sea cucumber *Metriatyla scabra* in rats fed a cholesterol-supplemented diet [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(12): 3 602-3 606.
- [5] 徐雷雷, 王静凤, 李辉, 等. 岩藻糖基化海参硫酸软骨素抑制肿瘤血管新生作用的研究[J]. 中国海洋药物, 2012(4): 14-19.
- [6] LUO L, WU M, XU L, et al. Comparison of physicochemical characteristics and anticoagulant activities of polysaccharides from three sea cucumbers [J]. Marine Drugs, 2013, 11(2): 399-417.
- [7] 孙玲, 徐迎辉, 许华林. 刺参酸性粘多糖对细胞免疫的增强作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991(5): 394-395.
- [8] Mourao P A S, Giumaraes B, Mulloy B, et al. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action [J]. Br J Haematol, 1998, 101(4): 647-652.
- [9] WANG Y, SU W, ZHANG C, et al. Protective effect of sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan against ethanol-induced gastric damage [J]. Food Chem, 2012, 133(4): 1 414-1 419.
- [10] 朱昱哲, 王静凤, 石迪, 等. 海参岩藻聚糖硫酸酯对长期饮酒小鼠肝脏保护作用的研究[J]. 营养学报, 2012(5): 474-477.
- [11] 滕来宾, 王静凤, 杨延存, 等. 海参岩藻聚糖硫酸酯对小鼠急性酒精中毒防治作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2011(6): 835-839.
- [12] Kariya Y, Mulloy B, Imai K, et al. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis [J]. Carbohydr Res, 2004, 339(7): 1339-1346.
- [13] 张珣, 王静凤, 徐雷, 等. 海地瓜和冰岛刺参海参岩藻聚糖硫酸酯抗肿瘤作用的比较研究[J]. 食品科学, 2012(7): 251-255.
- [14] Kerr A M, Janies D A, Clouse R M, et al. Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuridae: aspidochirotida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence [J]. Mar Biotechnol, 2005, 7(1): 53-60.
- [15] Mourao P A S, Bastos I G. Highly acidic glycans from sea cucumbers. Isolation and fractionation of fucose-rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea* [J]. Eur J Biochem, 1987, 166(3): 639-645.
- [16] 马定远, 陈君, 李萍. 柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成[J]. 分析化学, 2002(6): 702-705.
- [17] Fu D, O'Neill R A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1995, 227(2): 377-384.
- [18] 尹利昂, 陈士国, 薛长湖, 等. 4种海参中含岩藻糖支链的硫酸软骨素化学组成差异分析[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 增刊: 63-68.
- [19] 牛屹东, 李明, 魏辅文. 线粒体DNA用作分子标记的可靠性和研究前景[J]. 遗传, 2001, 23(6): 593-598.
- [20] Saccone C, Giorgi C D, Gissi C, et al. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system [J]. Gene, 1999, 238(1): 195-209.
- [21] 费来华, 李赞, 陈家鑫. 10种海参16SrDNA序列多样性及其亲缘关系分析[J]. 中国水产科学, 2008(5): 755-765.
- [22] CHEN S, LI G, WU N, et al. Sulfation pattern of the fucose branch is important for the anticoagulant and antithrombotic activities of fucosylated chondroitin sulfates [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(4): 3 054-3 066.
- [23] 樊绘曾, 陈菊娣, 吕培宏, 等. 玉足海参酸性多糖的研究[J]. 药学学报, 1983(03): 203-208.
- [24] Kale V, Freysdottir J, Paulsen B S, et al. Sulphated polysaccharide from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* affect maturation of human dendritic cells and their activation of allogeneic CD4(+) T cells in vitro [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 2(2): 108-117.
- [25] 于龙, 薛长湖, 宿玮, 等. 北大西洋瓜参岩藻聚糖硫酸酯分离纯化及结构分析[J]. 食品科学, 2012(19): 83-87.
- [26] ZHANG Y, SONG S, SONG D, et al. Proliferative effects on neural stem/progenitor cells of a sulfated polysaccharide purified from the sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. J Biosci Bioeng, 2010, 109(1): 67-72.
- [27] YU L, XUE C, CHANG Y, et al. Structure elucidation of

- fucoidan composed of a novel tetrafucose repeating unit from sea cucumber *Thelenota ananas* [J]. Food Chem, 2014, 146: 113 – 119.
- [28] YU L, XU X, XUE C, et al. Enzymatic preparation and structural determination of oligosaccharides derived from sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan [J]. Food Chem, 2013, 139(1 – 4): 702 – 709.
- [29] CHEN S, HU Y, YE X, et al. Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus* [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(7): 989 – 1 000.
- [30] 宿玮, 薛长湖, 崔宏博, 等. 3 种海参多糖的分离纯化及其化学组成差异分析 [J]. 中国食品学报, 2012(8): 215 – 216.

Separation and chemical composition analysis of polysaccharides from three kinds of low-price sea cucumbers

HU Yan-fang, DONG Shu-jun, XU Xiao-qi, YU Long,
CHANG Yao-guang, XUE Chang-hu, WANG Yan-chao

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT Sea cucumbers have various biological activities. Polysaccharide is one of the major functional components in sea cucumbers. In this study, three low-price sea cucumbers *Stichopus naso*, *Holothuria floridana* and *Holothuria tubulosa* were used as materials. After the species identification by molecular biological method, crude polysaccharide were extracted, separated and purified by anion exchange chromatography. As a result, sea cucumber chondroitin sulphate (SC-CHS) and sea cucumber fucoidan (SC-FUC) were obtained. PMP-HPLC method, ion chromatography and High performance size exclusion chromatography were respectively used to analyze monosaccharide composition, sulfate content and molecular weight of each sample. Results showed that the chemical composition of crude polysaccharides, SC-CHS and SC-FUC extracted from different sea cucumber were different. This study was the first research on polysaccharides of *Stichopus naso*, *Holothuria floridana* and *Holothuria tubulosa*, and would be beneficial to the utilization of three sea cucumbers.

Key words low-price sea cucumber; CHS; FUC; monosaccharide composition; sulfate content; molecular weight