

糙海参酸性粘多糖的提取纯化工艺探讨

郑艾初, 陈健, 彭超英

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文研究了糙海参多糖的提取纯化方法, 提取的最适提取条件为: pH 6.0, 木瓜蛋白酶浓度为 250 U/g, 水解温度为 60 °C, 水解时间为 9.0 h。

关键词: 糙海参; 多糖; 提取; 纯化

中图分类号: O629.12; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)05-0065-03

Extraction and Purification of Acidic Mucopolysaccharide from *Holothuria scabra* Jaeger

ZHENG Ai-chu, CHEN Jian, PENG Chao-ying

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

Abstract: The isolation and purification of acidic mucopolysaccharide from *Holothuria scabra* Jaeger was studied in this paper. The optimal pH value of the homogenized juice of sea cucumber, the dosage of papain, the temperature and stirring time were 6.0, 250 U/g, 60 °C and 9.0 h, respectively.

Key words: *Holothuria scabra* Jaeger; polysaccharide; extraction; purification

糙海参 (*Holothuria scabra* Jaeger), 又名象牙参、糙参、明玉参、白参、白食参, 主产于我国广东、广西、海南等南部沿海省份^[1], 属大宗海参产品, 在各类海参产品中, 经济价值较低。有研究表明, 海参酸性粘多糖具有抗肿瘤、降血压、防止血栓等生理功能^[2], 有关糙海参多糖的分离纯化方法的报道较少, 本文研究了从糙海参提取纯化酸性粘多糖的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

糙海参购自广州黄沙水产批发市场; 紫外分光光度计 (Unisco 公司); 所有试剂均为分析纯。

1.2 糙海参粗多糖的提取

将冷冻的糙海参解冻, 加入 3 倍体积的水, 匀浆, 用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L CH₃COOH 调节 pH 值, 加入木瓜蛋白酶, 放置于恒温水浴槽中, 进行酶解, 酶解时用 NaOH 和 CH₃COOH 调 pH 值使其稳定。

取出海参消化液, 加热至 80~90 °C 灭酶活, 3000 r/min 离心 10 min, 弃去下层不溶物, 取上清液; 然后在上清液加入 2 倍体积的无水乙醇, 冰箱中静置过夜, 取出, 3000 r/min 离心 10 min, 取沉淀, 先后以丙酮、

收稿日期: 2007-01-26

作者简介: 郑艾初, 硕士研究生, 主要研究方向为生物分离技术

乙醇洗脱, 真空冷冻干燥得粗多糖。

1.2.1 酶解 pH 值的选择

取 5 份 50 g 糙海参, 解冻、匀浆后, 分别用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L CH₃COOH 调 pH 至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 加入 210 U/g 的木瓜蛋白酶, 60 °C 水浴作用 7 h, 比较不同 pH 值的得率。

多糖测定采用硫酸苯酚法^[3]。

1.2.2 酶解温度的选择

取 5 份 50 g 糙海参, 解冻、匀浆后, 调 pH 至 7.0 后加入 210 U/g 的木瓜蛋白酶, 分别在 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 下水浴 7 h, 比较不同酶解温度的得率。

1.2.3 加酶量的选择

取 5 份 50 g 糙海参, 解冻、匀浆后, 调节 pH 至 7.0, 分别加入 85 U/g、250 U/g、415 U/g、585 U/g、750 U/g 的木瓜蛋白酶, 60 °C 水浴 7 h, 比较不同加酶量的得率。

1.2.4 酶解时间的选择

取 5 份 50 g 糙海参, 解冻、匀浆后, 调节 pH 至 7.0, 加入 210 U/g 的木瓜蛋白酶, 60 °C 水浴 4 h、6 h、8 h、10 h、12 h, 比较不同酶解时间的得率。

1.3 糙海参粗多糖的脱色

本文用活性炭吸附脱色和 H₂O₂ 氧化脱色。

活性炭脱色: 将粗多糖配成 0.5% 的水溶液, 加入

0.5%活化过的活性炭,搅拌,作用 30 min 后真空抽滤,取滤液。

过氧化氢脱色:将粗多糖配成 0.5%溶液,用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 9.0,加入 1/7 体积的 30% H₂O₂,50 °C 中水浴加热 1 h,取出,冷却至室温,并用 CH₃COOH 调 pH 至 7.0^[4]。脱色后用苯酚-硫酸法测多糖得率,确定两者优劣。

1.4 糙海参粗多糖的蛋白去除

本文用 Sevag 法和醋酸钾沉淀法去除粗多糖中蛋白。

Sevag 法^[5]:粗多糖溶液与三氯甲烷、正丁醇以 1:0.5:2(v/v/v)的比例混合均匀,3000 r/min 离心 10 min,去沉淀,反复操作至上清液中双缩脲反应呈阴性为止;然后在上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇,4 °C 静置过夜,3000 r/min 离心 10 min,取沉淀,冷冻干燥。

醋酸钾沉淀法^[6]:在粗多糖溶液中加入醋酸钾至其浓度为 2 mol/L,4 °C 静置过夜,3000 r/min 离心 10 min,取沉淀,冷冻干燥。

2 实验结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶解 pH 值的选择

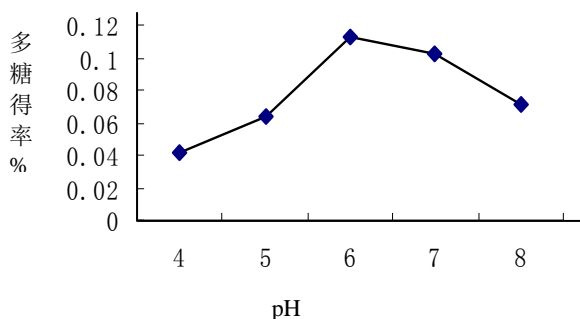


图 1 不同 pH 值对多糖得率的影响

如图 1 所示, pH 值在 5.0~6.0 时得率不断上升,之后又逐渐下降,最佳 pH 值应在 6.0 左右。

2.1.2 酶解温度的选择

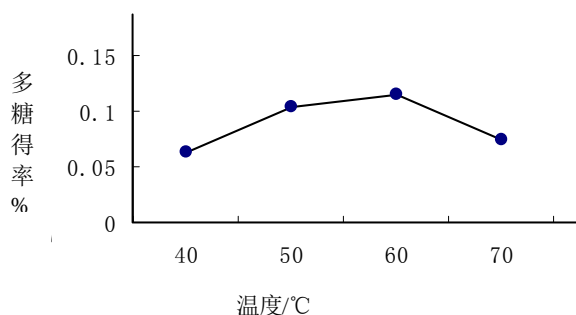


图 2 不同酶解温度对多糖得率的影响

如图 2 所示,在 40~60 °C 时多糖得率不断上升,

60~70 °C 时开始下降,最适酶解温度在 60 °C 左右。

2.1.3 加酶量的选择

如图 3 所示,当加酶量从 85 U/g 增加到 250 U/g,多糖得率显著上升;从 250 U/g 增加到 415 U/g,多糖提取率稍微增大,再提高加酶量就很难增大多糖提取率了,这可能是多糖在 250~415 U/g 时已基本已提取完全,因此最适加酶量在 250 U/g 附近。

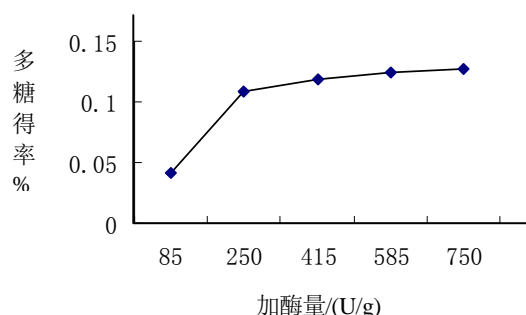


图 3 不同加酶量对多糖得率的影响

2.1.4 酶解时间的选择

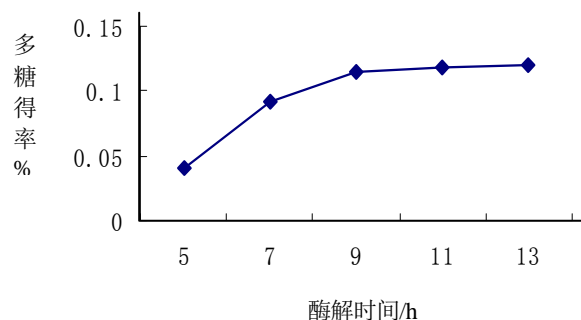


图 4 不同酶解时间对多糖得率的影响

如图 4 所示,酶解时间由 5 h 增加到 9 h,多糖得率不断增加;此后再延长酶解时间,多糖提取率增加不大,这可能是多糖在 7~9 h 已经基本被提取完全,因此,最佳酶解时间应在 9 h 左右。

2.2 正交试验的优化

为获取最佳实验条件,选取 pH、温度、加酶量和酶解时间四因素进行正交试验,因素水平见表 1,结果见表 2。

从表 2 知,各因素对多糖得率的影响为: pH > 加酶量 > 温度 > 时间,最佳提取条件为: pH 6.0,木瓜蛋白酶浓度为 250 U/g,水解温度为 60 °C,反应时间为 9.0 h。

表 1 多糖提取的因素水平表

水平	A.pH	B.温度/°C	C.酶量/(U/g)	D.酶解时间/h
1	5.50	47	200	8.5
2	6.0	60	250	9.0
3	6.5	63	300	9.5

表 2. 多糖提取条件的正交试验

序号	因素				多糖得率 /%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.038
2	1	2	2	2	0.089
3	1	3	3	3	0.075
4	2	1	2	3	0.105
5	2	2	3	1	0.127
6	2	3	1	2	0.092
7	3	1	3	2	0.064
8	3	2	1	3	0.065
9	3	3	2	1	0.094
K ₁	0.202	0.207	0.195	0.259	
K ₂	0.324	0.281	0.288	0.245	
K ₃	0.223	0.261	0.266	0.245	
R	0.041	0.025	0.031	0.005	

2.3 糙海参粗多糖脱色方法的比较

表 3 不同脱色方法的多糖损失率

脱色方法	过氧化氢法	活性炭法
多糖损失率/%	23.37±1.21	24.42±1.03

如表 3, 活性炭吸附法的多糖损失率高于过氧化氢法, 且操作繁琐, 过滤缓慢, 故选择过氧化氢法脱色较好。

2.4 糙海参粗多糖除蛋白方法的比较

表 4 不同除蛋白方法的多糖损失率

除蛋白方法	Sevag 法	醋酸钾沉淀法
粗多糖损失率/%	71.32±1.73	64.52±1.58

如表 4, 醋酸钾沉淀法多糖损失率较小, 操作简便, 所用试剂醋酸钾比 Sevag 法中使用的三氯甲烷和正丁醇安全, 所以采用醋酸钾沉淀法脱去多糖中的蛋白较好。

3 结论

糙海参酸性粘多糖的提取纯化工艺为: 将海参匀浆调 pH 至 6.0 后加入 250 U/g 的木瓜蛋白酶, 60 °C 水浴 9.0 h; 然后用 H₂O₂ 氧化脱色粗提品 30 min, 醋酸钾沉淀法除去蛋白可。

参考文献

- [1] 温尚开等. 广西常见海参种类的鉴定[J], 中药材, 1994, 17 (10):16-19
- [2] A.S. Mourao, A. M. Guimaraes, et al. British Journal of Haematology[J], 1998, 101, 647-652
- [3] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术(第 2 版)[M]. 浙江: 浙江大学出版社, 1999: 11-12
- [4] 唐孝礼等. 黑海参酸性粘多糖的分离纯化[J]. 中药材, 1999, 22 (5): 223-225
- [5] 余华. 海带多糖中蛋白质去除方法的对比研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2005, 24(4): 265-268
- [6] 段君. 刺参酸性粘多糖的提取及其性质与结构分析[D]. 大连: 大连轻工业学院(硕士学位论文), 2003: 20
- [7] 彭志英. 食品酶学导论(第 1 版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 163-165

《现代食品科技》理事会邀请函

《现代食品科技》是由国家“985 工程”和“211 工程”重点建设大学的华南理工大学主办的全国知名的食品科技类期刊, 具体事务依托拥有国家和广东省重点学科的轻工与食品学院运行, 1985 创刊, 月刊, 具有较高的知名度, 2005 年的影响因子为 0.336, 近 5 年影响因子为 0.365, 影响力位居全国食品类杂志前列。

企业要走向市场, 要让社会、客户认识和接受自己, 除了要有质量过硬的产品和高素质服务以外, 更应该借助高水平的学府、科研机构、学术期刊来宣传自己、推介自己和包装自己, 为企业创造良好的外部环境和社会美誉度, 为创造一流品牌打下基础。

为了感谢大家的支持和厚爱, 同时扩大和提高食品企业的知名度和美誉度, 经华南理工大学批准, 从 2007 年开始成立《现代食品科技》杂志理事会, 诚邀广大企事业单位加入理事会。有关资料可向编辑部索取(地址: 广州五山华南理工大学轻工与食品学院, 邮编: 510640, 电邮: xdspkj@sohu.com, 电话: 87112373)。