

# 沙海参多糖的分离和特性研究

王玲, 陈健, 姜建国, 郑艾初

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 通过木瓜蛋白酶酶解方法从沙海参中提取粗多糖, 再经  $H_2O_2$  脱色、乙酸钾除蛋白、柱层析等程序后得到精制的酸性粘多糖。琼脂糖凝胶电泳试验表明: 该多糖为单一成分, 经 GPC 法测定重均分子量为 98748。沙海参粘多糖中硫酸基、葡萄糖醛酸、氨基半乳糖、岩藻糖含量分别为 27.73%、19.04%、14.38%、10.12%。

**关键词:** 沙海参; 酸性粘多糖; 分子量; 组成

中图分类号: O629.12; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0655-04

## Studies on Isolation and Characteristics of Acidic Mucopolysaccharide

### from *Holothuria arenicola* Sempe

WANG Ling, CHEN Jian, JIANG Jian-guo, ZHENG Ai-chu

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

**Abstract:** Crud acidic mucopolysaccharide was extracted from enzymatic hydrolyzate of *Holothuria arenicola* Sempe by papain and then discolored with  $H_2O_2$ . After removing the protein with KAc, the mucopolysaccharide further was further purified by column chromatography, and analyzed by agarose electrophoresis. The Mw of this mucopolysaccharide was 76,008, and the content of sulfate, glucuronic acid, galactosamine and fucose in the mucopolysaccharide were 28.08%, 20.71%, 15.38%, and 12.48% respectively.

**Key words:** *Holothuria arenicola* Sempe; mucopolysaccharide; molecular weight; composition

沙海参 (*Holothuria arenicola* Semper), 分布于台湾、西沙群岛, 几乎是纯热带种, 可供食用, 但体壁太薄, 经济意义不大<sup>[1]</sup>。本文将开展沙海参多糖分离纯化、分子量分布及单糖组成等方面的研究, 为进一步开发这类海洋生物资源奠定基础。

## 1 材料与试剂

### 1.1 实验材料

沙海参, 购自广州市一德路干货批发市场, 由南海水产研究所研究员张汉华鉴定。

### 1.2 实验试剂

考马斯亮蓝 (上海伯奥生物科技有限公司), 甲苯胺蓝 (中国医药集团上海化学试剂公司), 葡萄糖醛酸 (Sigma 公司), 唑啉 (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), 对二甲氨基苯甲醛 (上海三爱思试剂有限公司), D-(+)-氨基半乳糖

(Sigma 公司), 盐酸-L-半胱氨酸 (上海伯奥生物科技有限公司), D-岩藻糖 (Alfa Aesar 公司), 葡聚糖标准品系列 (分子量分别为 4400、9900、21400、43500、124000、196000、277000、401000, Sigma 公司), 木瓜蛋白酶 (酶活, 提供单位)。

### 1.3 实验仪器与设备

pHS-25 型酸度计 (上海雷磁仪器厂), KDC-40 低速离心机 (科大创新公司), 水平电泳仪 (大连科迈仪器公司), Waters Breeze 凝胶渗透色谱仪 (美国 Waters 公司), Vector 33 型傅里叶变换红外光谱仪 (Bruck 公司), Savant Modulyod 冷冻干燥系统 (Thermo 公司), TU-1810 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 沙海参粗多糖的分离纯化

取水发 2 d 的沙海参, 加入 3 倍体积的  $K_2CO_3$  (0.5 mol/L), 50 °C 水浴中作用 2 h; 取出, 冷却至室温, 以醋酸调 pH 值至中性, 加入海参质量 1.0% 的木瓜蛋白酶, 50 °C 水浴中作用 14 h; 取出, 85 °C 水浴中静置 5 min 以灭酶; 再冷却至室温, 醋酸与 1 mol/L NaOH

收稿日期: 2008-02-23

作者简介: 王玲, 女, 在读硕士, 主要从事食品化学和生物分离技术方面的研究工作。

通讯作者: 陈健, 副教授, 主要从事天然产物化学和生物分离技术方面的研究工作

调 pH 值至中性, 3000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 冰箱中静置过夜, 再以 3000 r/min 离心 10 min, 取沉淀, 先后以丙酮、乙醇除脂, 再进行真空冷冻干燥, 得粗多糖。

取冷冻干燥后的粗多糖复溶, 配成 0.5% 的水溶液, NaOH 调 pH 至 9.00 左右, 加入溶液体积 1/7 的 30% 的  $H_2O_2$ , 50 °C 水浴中作用至颜色转为微黄色, 取出, 并以醋酸回调 pH 至 7.00 左右; 再加入醋酸钾使其浓度达到 2 mol/L, 冰箱中过夜, 3000 r/min 离心 10 min, 取沉淀进行真空冷冻干燥, 得脱色、除蛋白的多糖。

将 30 mg 脱色、除蛋白的海参多糖溶于 15 mL 双蒸水中, 上样到 26 mm×500 mm 的 SepHadex G-200 葡聚糖凝胶层析柱中, 以双蒸水为洗脱液, 0.5 mL/min 进行洗脱, 按 5 mL 体积分部收集, 将收集液进行苯酚-硫酸法<sup>[2]</sup>测定浓度, 并将多糖出峰部分合并, 进行真空冷冻干燥, 得纯化多糖样品。

## 2.2 蛋白质含量的测定

考马斯亮蓝法<sup>[3]</sup>; 190~400 nm 紫外扫描。

## 2.3 琼脂糖凝胶电泳法

0.5% 琼脂糖液制板, 0.06 mol/L 巴比妥 (pH 8.5) 为缓冲液, 固定电压 150 V, 电泳 120 min。取出凝胶板, 置于十六烷基三甲基溴化铵液 1 h, 80 °C 烘箱中干燥, 冷却后将干板置于 0.1% 甲苯胺蓝液 (以  $V_{\text{乙酸}}:V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}=0.1:5:5$  配制) 中染色 10 min, 脱色液漂洗至背景无颜色<sup>[2]</sup>。

## 2.4 溶解性和比旋光度测定

测定沙海参多糖在不同溶剂中的溶解性; 将沙海参多糖配成水溶液, 置于以 100 mm 观测管中, 室温下钠光测定其旋光度<sup>[4]</sup>。

## 2.5 凝胶渗透色谱法测分子量

采用 GPC 法测定其分子量, 以 TSK G-5000<sub>PWXL</sub> 和 TSK G-3000<sub>PWXL</sub> 两根色谱柱串接, 前接保护柱, 柱温箱温度为 40 °C, 流动相为 0.02 mol/L  $KH_2PO_4$ , 流速 0.6 mL/min, 以标准葡聚糖系列作为分子量的标准。

## 2.6 红外光谱扫描

将经纯化的沙海参粘多糖与 KBr 压片, 在红外光谱仪中进行扫描。

## 2.7 硫酸基含量测定

$BaCl_2$ -硫酸比浊法<sup>[5]</sup>。20 mg 沙海参纯化多糖溶于 5 mL 6 mol/L 的 HCl 中, 在 100 °C 油浴中水解 14 h, 取出, 冷却至室温, 取 200  $\mu$ L 水解液, 加入 4% 三氯乙酸 3.8 mL、0.5%  $BaCl_2$  明胶溶液 1 mL, 室温下静置 15 min, 双蒸水经同样操作做空白样, 0.01 mol/L

$K_2SO_4$  做标准曲线, 于 330 nm 处测定光吸收值。

## 2.8 己糖醛酸含量的测定

以咪唑法、地衣酚法测其己糖醛酸含量和种类<sup>[2]</sup>。取 0.5 mg/mL 的纯化多糖溶液 50  $\mu$ L, 补水至 250  $\mu$ L, 冰浴中冷却, 加入 1.4 mL 浓硫酸, 摇匀后置 85 °C 水浴中加热 20 min, 取出, 冷却至室温, 加入咪唑溶液 50  $\mu$ L, 摇匀, 室温下静置 2 h, 以双蒸水经同样操作作为空白样, 标准葡萄糖醛酸作标准曲线, 530 nm 处测样品己糖醛酸的 C 值。

取 0.5 mg/mL 的纯化多糖溶液 40  $\mu$ L, 补水至 400  $\mu$ L, 加地衣酚试液 1.2 mL, 混匀, 100 °C 水浴中加热 100 min, 冷却, 以双蒸水经同样操作作为空白样, 标准葡萄糖醛酸做标准曲线, 660 nm 处测样品己糖醛酸含量的 O 值。

## 2.9 氨基己糖的定性和定量

以 Blunenkranz-Wagner 法定性<sup>[2]</sup>, 100 °C 乙酰化反应之后在 535 nm 处以双蒸水经同样操作作为空白样, 测得光吸收值记为  $A_h$ ; 25 °C 乙酰化反应之后在 530 nm 处以双蒸水经同样操作作为空白样, 测得光吸收值记为  $A_l$ 。若  $A_h/A_l \approx 1$ , 则样品中所含的氨基己糖为氨基半乳糖。

若样品中氨基己糖为氨基半乳糖, 以 Ludweig 法定量<sup>[6]</sup>。取沙海参纯化多糖盐酸水解液 50  $\mu$ L, 补水至 500  $\mu$ L, 加入碱性乙酰丙酮 1 mL, 100 °C 水浴中作用 25 min, 冰水浴中冷却至室温, 加入无水乙醇 3 mL, Ehrlich 试液 1 mL (Ehrlich 试液由 3.2 g 对二甲氨基苯甲醛溶于 60 mL 浓盐酸与 60 mL 的 95% 乙醇混合液而制成), 强力震荡, 60 °C 水浴中加热 90 min, 取出并冷却至室温, 以双蒸水经同样操作作为空白样, 以标准氨基半乳糖作标准曲线, 510 nm 处测吸光度。

## 2.10 岩藻糖含量的测定

Disch 法<sup>[7]</sup>。取 0.5 mg/mL 的样品溶液 0.4 mL, 补水至 1.0 mL, 冰浴中加入 4.5 mL 98% 硫酸, 混匀, 静置 20 min, 100 °C 水浴中加热 10 min, 取出, 自来水中冷却至室温, 加入 0.1 mL 3% 盐酸-L-半胱氨酸, 混匀, 室温下静置 60 min, 以双蒸水经同样操作作为空白样, 以标准 D-岩藻糖做标准曲线, 456 nm 处测吸光度。

# 3 结果与讨论

## 3.1 沙海参多糖的层析

沙海参多糖的 SepHadex G-200 洗脱结果如图 1 所示, 多糖分子量分布较为集中。

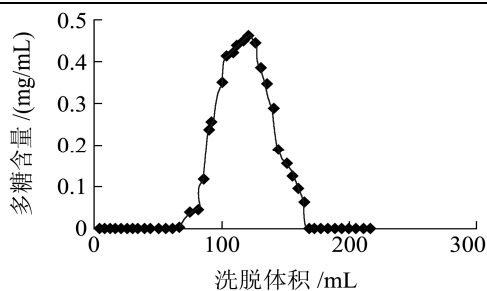


图1 沙海参酸多糖的 SepHadex G-200 柱层析图

Fig.1 Chromatogram of mucopolysaccharide by SepHadex G-200 column

3.2 蛋白质含量的测定

考马斯亮蓝法测得纯化多糖样品中不含蛋白质,紫外扫描所得 254 nm、280 nm 附近不出现吸收峰,说明样品中不含蛋白质。

3.3 琼脂糖凝胶电泳

电泳结果为单一斑点,说明所得纯化多糖为单一成分。

3.4 沙海参多糖的比旋光度

沙海参多糖可溶于水、稀酸、稀碱、稀盐溶液,易溶于热水,不溶于乙醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷等有机溶剂,其比旋光度为 $-47^\circ$ 。

3.5 沙海参多糖的分子量

多糖的 GPC 测定结果如图 2 所示。经 Breeze GPC 软件分析,测得其  $M_w$ 、 $M_n$ 、 $M_p$  分别为 98748、118074、125538,分子量分布宽度为 1.20。

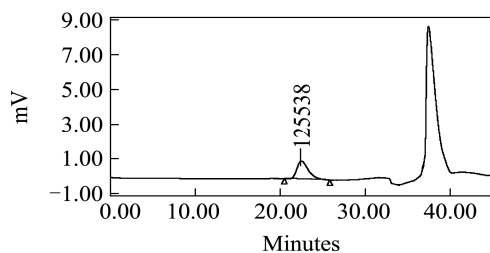


图2 沙海参多糖的 GPC 色谱图

Fig.2 GPC Chromatogram of mucopolysaccharide

3.6 红外光谱扫描

红外光谱扫描结果如图 3 所示。位于  $3421\text{ cm}^{-1}$ 、 $1068\text{ cm}^{-1}$ 、 $1040\text{ cm}^{-1}$  (强) 三处吸收峰表明糙海参多糖中含有较多的羟基;而吸收峰  $1650\text{ cm}^{-1}$  (强) 表明其含有较多的氨基;  $1421\text{ cm}^{-1}$ 、 $1378\text{ cm}^{-1}$ 、 $1234\text{ cm}^{-1}$  (强) 糙海参多糖含有较多的羧基;  $858\text{ cm}^{-1}$ 、 $1234\text{ cm}^{-1}$  (强) 表明其含有硫酸酯。经与参考文献对比,本样品主要含硫酸软骨素 E<sup>[8]</sup>。

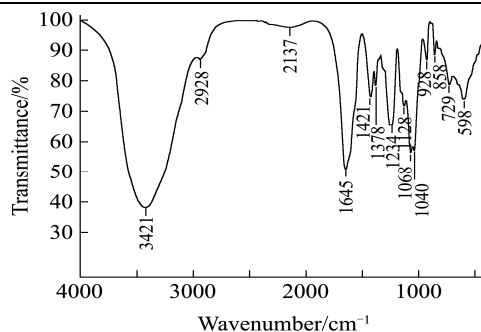


图3 沙海参多糖的红外光谱

Fig.3 FT-IR spectrum of mucopolysaccharide

3.7 单糖和硫酸基的测定结果

测得己糖醛酸含量的 C 值、O 值分别为 19.04%、16.44%,由于  $C/O=1.16$ ,可以确定这种己糖醛酸是葡萄糖醛酸。

Blunenkrantz-Wagner 法测得  $A_h$  值、 $A_l$  值分别为 0.374、0.316,  $A_h/A_l=1.18\approx 1$ ,所以沙海参多糖中所含的氨基己糖为氨基半乳糖。

硫酸基、葡萄糖醛酸、氨基半乳糖、岩藻糖含量分别如表 1 所示。

表 1 沙海参多糖主要组分的组成

Table 1 Contents of the main components of mucopolysaccharide

组分	硫酸基	葡萄糖醛酸	氨基半乳糖	岩藻糖
含量/%	27.73	19.04	14.38	10.12
分子比值	1	0.67	0.52	0.36

3.8 讨论

沙海参是我国热带海域广泛分布的海参品种,目前对其研究较少,本文通过对其多糖的分离纯化及结构组成方面的研究,为将来进一步开展其生理活性和其他相关研究提供依据。

参考文献

[1] 廖玉麟.中国动物志棘皮动物门海参纲[M],北京:科学出版社,1997  
 [2] 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  
 [3] 吴耀生,等.新编生物化学实验(第 1 版)[M],北京:人民卫生出版社,2002  
 [4] 大连理工大学.分析化学实验[M],大连:大连理工大学出版社,1989

(下转第 724 页)