

尖紫蛤全脏器中糖胺聚糖提取工艺的研究

李孟婕, 范秀萍, 吴红棉, 胡雪琼

(广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524025)

摘要: 采用单因素实验, 研究尖紫蛤全脏器中糖胺聚糖的分离提取工艺条件并进行初步纯化, 同时进行电泳鉴定。尖紫蛤全脏器中糖胺聚糖的最佳分离提取条件为: 木瓜蛋白酶和枯草杆菌中性蛋白酶用量分别为 0.6% 和 0.79%, 水料比为 1:1, 酶解温度为 58 °C, 酶解时间为 4 h, 经酶解、离心去蛋白、醇沉、洗涤、干燥, 得糖胺聚糖粗制品(SAG-0), 得率为 2.58%, 糖胺聚糖含量为 26.7%。粗制品经脱色、等电点沉淀、超滤、醇沉、洗涤、干燥, 得糖胺聚糖精制品(SAG-1), 得率为 1.48%, 糖胺聚糖含量为 40.1%。

关键词: 尖紫蛤; 糖胺聚糖; 提取

文章编号: 1673-9078(2011)1-80-83

Extraction of Glycosaminoglycan from the Whole Viscera of *Sanguinolaria acuta*

LI Meng-Jie, FAN Xiu-ping, WU Hong-mian, HU Xue-qiong

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The extraction of glycosaminoglycan from the whole viscera of the *Sanguinolaria acuta* was studied by single factor experiment. And the extracts was preliminarily purified and identified by electrophoresis. The optimal conditions for the enzymatic extraction of glycosaminoglycan from *Sanguinolaria acuta* were determined as follows: papain dosage 0.6%, subtilisin dosage 0.79%, the ratio of purified water to material 1.0:6, enzymolysis temperature 58 °C, and enzymolysis time 4 h. Crude glycosaminoglycan (SAG-0) was achieved with the yield of 2.58%. After enzymatic extraction, deproteinization by centrifugation, ethanol precipitation, washing and drying, SAG-0 was achieved with the glycosaminoglycan content of 26.7%. Then SAG-0 was purified by decoloration, isoelectric precipitation, hyperfiltration, ethylalcohol precipitation, washing and drying, giving glycosaminoglycan superfine products (SAG-1) with the yield rate and glycosaminoglycan content being of 1.48% and 40.1%, respectively.

Key words: *Sanguinolaria acuta*; glycosaminoglycan; extraction

尖紫蛤(*Sanguinolaria acuta*)俗称“沙螺”或“西施舌”, 分布于我国福建和广东沿海, 生活在河口咸、淡水交汇处, 尤以广东省吴川市鉴江产量最多, 最高年产量达5万kg。尖紫蛤肉嫩味美, 营养价值高, 深受群众喜爱, 据分析蛤肉干含蛋白质58.65%, 糖类5.31%, 脂类8.75%, 且有药用功效, 可治疗哮喘病等。尖紫蛤的个体较大, 生长快, 是一种有增养殖前途的经济贝类。但目前除用于食用外, 还未见深加工的相关报道, 可以说是一种尚未得到充分开发利用的海洋贝类资源。

近十年来, 动物中蛋白多糖的糖链部分—糖胺聚糖, 因具有抗凝血、抗肿瘤、降血脂、提高免疫力等

收稿日期: 2010-10-10

基金项目: 广东海洋大学自然科学研究项目 (C1012115)

作者简介: 李孟婕 (1986-), 硕士研究生, 研究方向为海洋活性物质

通讯作者: 范秀萍 (1979-), 女, 讲师

多种活性^[1], 已引起国内外医药界的广泛关注。就国内而言, 研究者从刺参、海星、鲨鱼、扇贝、马氏珠母贝等海洋动物中提取后分离出各种糖胺聚糖, 并对这些糖胺聚糖的理化性质、生理活性、药用价值进行了广泛研究, 国外的研究者也对海参^[2]、乌贼^[3]、甲壳动物^[4]中分离提取的糖胺聚糖进行了研究报道。本研究通过单因素实验, 确定尖紫蛤糖胺聚糖的提取条件, 为进一步开发海洋贝类糖胺聚糖的活性提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

尖紫蛤(*Sanguinolaria acuta*): 购自湛江市东风市场去壳后所得的全脏器, 分装, -18 °C冰柜中冷冻备用。

1.1.2 主要试剂

枯草杆菌中性蛋白酶(酶活50000 U/g)、胰酶(酶活500 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活150000 U/g): 无锡酶制剂厂生产; 肝素(Heparin), 效价150 IU/mg, 购自上海生化试剂公司; 琼脂糖(Agarose)、葡萄糖、阿利新蓝、考马斯亮蓝; 活性炭、硅藻土等均为分析纯。

1.2 仪器设备

高速组织捣碎机(PHILIPS); SHZ-D(III)循环水式真空泵; 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); BS110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); TDL-5-A 低速台式离心机(东莞市全科技玻璃仪器有限公司); DHG-9245A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 糖胺聚糖的提取与精制

尖紫蛤全脏器经匀浆、酶解后离心醇沉, 再经有机溶剂洗涤干燥得到糖胺聚糖粗品 SAG-0。提取结果以提取率为评价指标, 提取率=(糖胺聚糖粗品得率×粗品中糖醛酸的含量)×100%。SAG-0 经等电点去蛋白, 超滤脱盐浓缩后醇沉得到 SAG-1。

1.3.2 检测方法

糖醛酸含量的测定: 硫酸-咔唑法; 硫酸基含量的测定: 明胶-氯化钡沉淀法; 总糖胺聚糖含量的测定: 阿利新蓝比色法; 总糖含量的测定: 苯酚-硫酸法; 蛋白含量的测定: 考马斯亮蓝法;

1.3.2 数据分析方法

采用 SAS 软件对均匀实验结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 尖紫蛤糖胺聚糖提取条件的确定

2.1.1 酶种类对糖胺聚糖提取率的影响

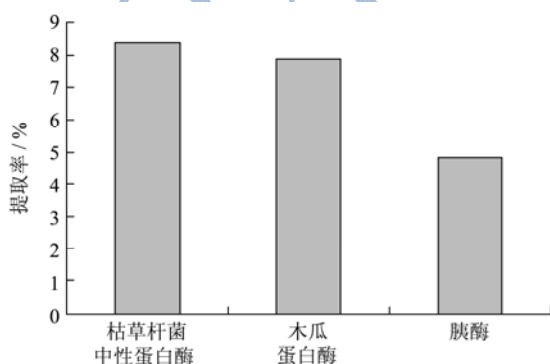


图1 酶种类对糖胺聚糖提取率的影响

Fig.1 Effects of enzymes on SAG-0 yield

分别以质量分数为 0.4% 的枯草杆菌中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶三种蛋白酶作为分解酶, 在料

水比为 1:1, 50 °C 下浸提 4 h, 比较不同蛋白酶的提取率, 结果如图 1 所示。

由图 1 可知: 三种蛋白酶的提取效果为: 枯草杆菌中性蛋白酶>木瓜蛋白酶>胰酶。枯草杆菌中性蛋白酶的提取率达到 8.4%。

2.1.2 酶用量对糖胺聚糖提取率的影响

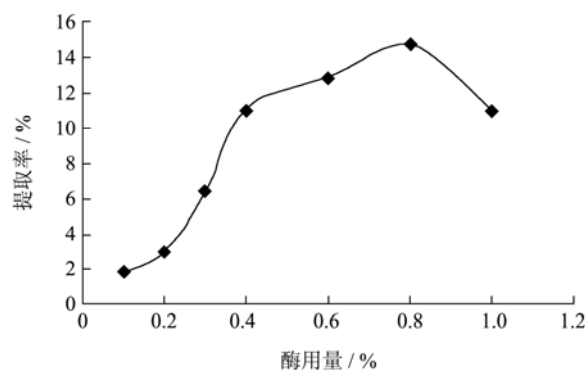


图2 酶用量对糖胺聚糖提取率的影响

Fig.2 Effects of enzyme dosage on the SAG-0 yield

由图 2 可知, 提取率随酶用量的增多而最多, 但在酶用量为原料质量 1% 时反而有所下降, 可能是酶用量过大时, 将其中的糖胺聚糖降解为还原糖。在酶用量为原料质量 0.8% 时, 糖胺聚糖的提取率达到最大, 为 14.6%。

2.1.3 料液比对糖胺聚糖提取效果的影响

采用为原料质量 0.8% 的枯草杆菌中性蛋白酶作为酶解剂, 料液比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4, 在 50 °C 下酶解 4 h, 测定不同料液比对其提取效果的影响, 结果如图 3 所示。

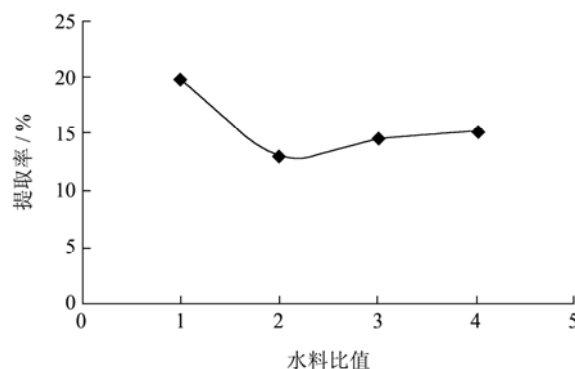


图3 水液比对糖胺聚糖提取效果的影响

Fig.3 Effects of ratio of water to material on SAG-0 yield

由图 3 可知, 提取率随料液比的增加而减少, 可能是蒸馏水的量越大酶解越不彻底, 在料液比为 1:1 时, 糖胺聚糖的提取率达到最大, 为 19.8%。

2.1.4 酶解时间对糖胺聚糖提取效果的影响

采用为原料质量 0.8% 的枯草杆菌中性蛋白酶作为酶解剂, 料液比为 1:1, 在 50 °C 下分别酶解 2、3、

4、6、8 h, 测定不同时间对其提取效果的影响, 结果如图 4 所示。

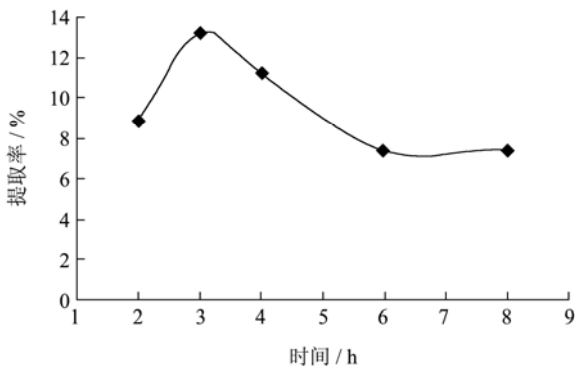


图 4 酶解时间对糖胺聚糖提取效果的影响

Fig.4 Effects of enzymolysis time on SAG-0 yield

由图 4 可知, 在时间为 3 h 时, 糖胺聚糖的提取率达到最大为 18, 以后随着时间的增加而减少, 说明当时间过久, 其中的糖胺聚糖也开始被降解为还原糖。

2.1.5 温度对糖胺聚糖提取率的影响

采用为原料质量 0.8% 的枯草杆菌中性蛋白酶作为酶解剂, 料液比为 1:1, 分别在 30、40、50、60、70 °C 下酶解 3 h, 测定不同温度对其提取效果的影响, 结果如图 5 所示。

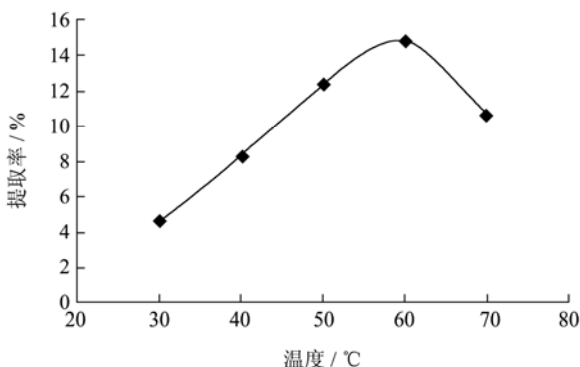


图 5 温度对糖胺聚糖提取率的影响

Fig.5 Effects of enzymolysis temperature on SAG-0 yield

由图 5 可知, 随着温度的增加, 提取率也升高, 但温度到达 70 °C 时, 提取率反而下降, 说明当温度超过 70 °C 时, 枯草杆菌中性蛋白酶的活性已经被钝化, 因此在温度为 60 °C 时, 糖胺聚糖提取率达到最大, 为 19.8%。

2.2 均匀实验设计与结果

在上述单因素实验的基础上, 采用均匀实验设计探讨尖紫蛤全脏器中糖胺聚糖的提取工艺条件。实验设计与结果见表 1。

采用 SAS 软件对结果进行分析, 得到回归方程 $Y(\%)=12.967+0.5X_1+0.24X_2+0.134X_3-0.37X_4+0.59X_1X_1+0.14X_2X_2-0.096X_3X_3+0.324X_4X_4$

使用 Matlab 软件对回归方程进行分析, 得知酶用量在 0.79%, 水料比在 0.6:1, 提取时间 3.35 h, 提取温度在 58 °C 时为最佳条件, 在此条件下进行验证实验, 提取率为 20.6%。

表 1 糖胺聚糖提取 U₅(5⁴) 均匀实验方案与结果

Table 1 Uniform design results of the extraction of SAG-0

酶用量 X ₁ /%	水料比 X ₂ (m/V)	时间 X ₃ /h	温度 X ₄ /°C	提取率 Y/%
0.6	0.5:1	3	60	17.3
0.7	1.5:1	2	55	15.6
0.8	0:1	3.5	50	12.6
0.9	1:1	2.5	45	13.2
1.0	2:1	4	65	18.7

2.3 单酶与双酶提取效果比较

①木瓜蛋白酶^[5]: 酶用量为原料质量的 0.6%, 水料比为 1:1, 在 50 °C 下酶解 4 h, 检测酶解液中的提取率, 结果如图 6 所示。

②枯草杆菌中性蛋白酶: 酶用量为原料质量的 0.79%, 水料比为 0.6:1, 在 58 °C 下酶解 3.35 h, 检测酶解液中的提取率, 结果如图 6 所示。

③双酶: 木瓜蛋白酶用量为原料质量的 0.6%, 枯草杆菌中性蛋白酶用量为原料质量的 0.79%, 水料比为 1:1, 在 58 °C 下酶解 4 h, 检测酶解液中的提取率, 结果如图 6 所示。

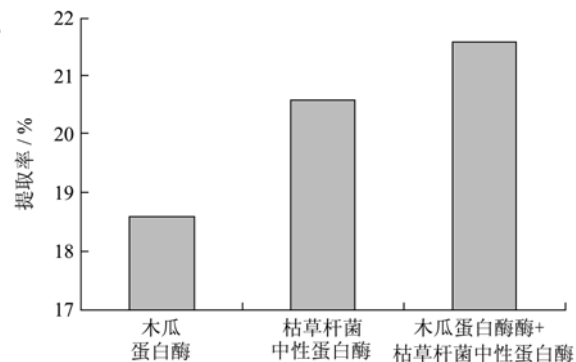


图 6 单酶与双酶提取效果比较

Fig.6 Effects of single enzyme and binary enzymes on SAG-0 yield

由于单酶对蛋白质的水解是有限的, 为了更好地确定提取的条件, 所以做一个单双酶比较实验如图 6。从图中可知, 在枯草杆菌中性蛋白酶中加入木瓜蛋白酶时能提高糖胺聚糖的提取率, 酶解液中的提取率达到最高, 为 21.6%, 所以本实验采用双酶作为酶解剂。

2.4 尖紫蛤糖胺聚糖的理化性质分析结果

2.4.1 尖紫蛤糖胺聚糖的组成分析

尖紫蛤糖胺聚糖 SAG-0、SAG-1 均为褐色粉末,

溶于水，不溶于乙醇、丙酮、乙醚等有机溶剂。水溶液透明，较高浓度时呈黄色，且粘稠状。其组成分析见表 2。经过初步纯化后，蛋白含量下降，糖胺聚糖含量、糖醛酸含量和硫酸基含量增大，说明初步纯化效果有效。

表 2 尖紫蛤糖胺聚糖的化学组成 (%)

Table 2 Chemical composition of glycosaminoglycan from *Sanguinolaria acuta*

	糖醛酸	硫酸基	糖胺聚糖	蛋白	总糖	得率
SAG-0	7.98	1.3	26.00	6.92	46.77	2.58
SAG-1	16.75	1.69	40.05	1.30	63.15	1.48

2.4.2 不同来源糖胺聚糖的化学组成

表 3 不同来源糖胺聚糖的化学组成 (%)

Table 3 Chemical composition of glycosaminoglycan from different sources

GAG 粗品	总糖	糖胺聚糖	得率
近江牡蛎 ^[5]	61.3	13.6	2.4
珠母贝 ^[6]	12.6	33.3	1.0
翡翠贻贝 ^[7]	26.5	26.04	0.98

由表 3 可知，尖紫蛤得率高于近江牡蛎、珠母贝和翡翠贻贝，总糖高于珠母贝和翡翠贻贝，糖胺聚糖高于近江牡蛎和珠母贝，说明尖紫蛤是较好的糖胺聚糖源。

2.5 尖紫蛤糖胺聚糖电泳鉴定

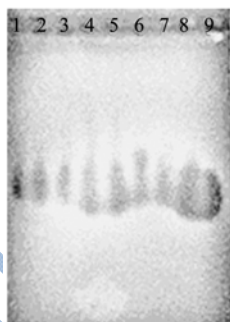


图 6 琼脂糖凝胶电泳

Fig.6 Agarose gel electrophoresis

注：1、2、3-粗制品；4、5-精制品；6、7-硫酸软骨素；8、9-肝素。

表 4 SAG-0 和 SAG-1 的电泳相对迁移率

Table 4 Relative migration rate of SAG-0 and SAG-1

电泳液(巴比妥缓冲液)	肝素	硫酸软骨素	粗制品 (SAG-0)	精制品 (SAG-1)
0.06 mol/L	1.00	0.92	0.90	0.95

糖胺聚糖为多聚阴离子，糖链上阴离子基团的类别、多少以及连接位置的差异，都可能导致它们在电泳中表现出不同的迁移率，因此可以利用该性质判断

所得糖胺聚糖是否为“纯品”。琼脂糖凝胶电泳技术在糖胺聚糖分离、制备、鉴别和定量方面的应用越来越多。结果见表 4，在巴比妥缓冲系统中，肝素的迁移率最高，从迁移率来看，SAG 类似于硫酸软骨素结构。从图 6 中的斑点可看出，精制品的迁移率大于粗制品，说明经过初步纯化的样品有所见效。

3 结论

本文通过对糖胺聚糖提取工艺及其理化性质的研究得出如下结论：

3.1 酶解法提取尖紫蛤糖胺聚糖粗品的最佳工艺参数为木瓜蛋白酶和枯草杆菌中性蛋白酶用量分别为 0.6% 和 0.79%，水料比为 1:1，酶解温度为 58 ℃，酶解时间为 4 h，多糖得率为 2.58%。

3.2 糖胺聚糖粗制品中糖醛酸含量为 7.98%，总糖和总蛋白含量分别为 46.77% 和 6.92%，总糖胺聚糖含量为 26.00%，硫酸基含量为 1.3%。粗多糖中存在较多的蛋白质，推测该蛋白可能是与糖形成了牢固的复合物。精制品中糖醛酸含量为 16.75%，总糖和总蛋白含量分别为 63.15% 和 1.30%，总糖胺聚糖含量为 40.05%，硫酸基含量为 1.3%。

3.3 琼脂糖凝胶电泳表明肝素的迁移率最高，从迁移率来看 SAG 类似于硫酸软骨素结构。

参考文献

- [1] 张豁中,温玉麟.动物活性成分化学[M].天津:天津科学技术出版社,1995
- [2] Kariya Y,Watabe S,Ochiai Y,et al. Glicosaminoglycan from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*[J].Comp Biochem Physiol, 1990, 95B(2) : 387-392
- [3] Karamanos N K, Mamouras A, Tsegenidis T, et al. Isolation and chemical study of the glycosaminoglycan from Squid cornea [J]. International Journal of Biochemistry, 1991, 23(1): 67-72
- [4] Ehrich J, Patel B, Stivals S. Comparative Studies of mucopoly- saccharides from marine animals, II, III *Leuceborus (Lesueur) and various crustaceans* [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1981, 52(1):99-101
- [5] 孙国勇.木瓜蛋白酶酶解罗非鱼肉的工艺研究[J].食品科技, 2010,2:43-45
- [6] 胡雪琼,吴红棉,刘芷筠,等.近江牡蛎糖胺聚糖的酶解提取及其抗肿瘤活性研究[J].食品研究与开发,2009,30(7):3-6
- [7] 李瑞,吴红棉,范秀萍,等.响应面法优化翡翠贻贝糖胺聚糖提取工艺的研究[J].现代食品科技,2010,26(2):175-179