

海蜇糖胺聚糖提取、纯化及其降血脂作用研究

金晓石*, 吴红棉, 钟敏, 雷晓凌

(广东海洋大学海洋食品研究所, 广东 湛江 524025)

摘要:目的 以海蜇为原料, 研究海洋软体动物的糖胺聚糖的提取、纯化工艺步骤, 优化酶解条件; 同时, 对其糖胺聚糖的降血脂作用进行初探。方法 经多酶水解、醇沉后得海蜇糖胺聚糖粗制品(R-GAG), 再经吸附、透析、醇沉及 CTAB 络合沉淀后得海蜇糖胺聚糖纯化物; 动物实验, 造高脂血症小鼠模型, 灌喂海蜇糖胺聚糖粗品 20d 后, 分别通过 LRC 法、乙酰丙酮显色法测定小鼠血清总胆固醇和甘油三酯水平。结果 海蜇糖胺聚糖粗品提工艺中最适酶解条件是: 木瓜蛋白酶 1.5%, 枯草蛋白酶 1.5%, 酶解 5h; 动物实验, $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ R-GAG 灌喂高脂血症小鼠 20d 后, 其血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平分别下降为 $6.83 \pm 1.09 (P < 0.05)$, $4.06 \pm 1.28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} (P < 0.01)$ 。结论 经多酶水解得海蜇糖胺聚糖粗制品具有显著的降血脂作用。

关键词: 海蜇; 糖胺聚糖; 提取; 纯化; 降血脂

中图分类号: TQ460.6.R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2007)04-0041-04

Study on the extraction and purification of glycosaminoglycans from *Rhopilema esculenta* and its antihyperlipidemia effects

JIN Xiao-shi, WU Hong-mian, ZHONG Min, LEI Xiao-ling

(Marine Food Institute, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: **Objective** To study the extraction and purification of glycosaminoglycans from *Rhopilema esculenta* Kishinouye, optimize the enzymolysis process, and its antihyperlipidemia effects were studied. **Methods** Extraction of glycosaminoglycans (GAG) from *Rhopilema esculenta* Kishinouye by hydrolyzation method with papain, subtilisin and trypsin neutral proteinase, ethanol precipitation. The rude product of glycosaminoglycans (GAG) was purified and fractionated by the methods of adsorption, dialysis, ethanol precipitation and CTAB precipitation. The experimental hyperlipidemia mice induced by high fat forage were studied. The total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels were determined. **Results** Optimum enzymolysis process: papain neutral proteinase 1.5%, subtilisin neutral proteinase 1.5%, treated for 5h; The result showed that the levels of TC and TG decreased to $6.83 \pm 1.09 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} (P < 0.05)$, $4.06 \pm 1.28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} (P < 0.01)$ respectively, when the experimental hyperlipidemia mice treated with R-GAG at the doses of $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 20d. **Conclusion** The rude extracts of glycosaminoglycans (GAG) from *Rhopilema esculenta* by hydrolyzation method possessed significant anti-hyperlipidemia action.

Key words: *Rhopilema esculenta* Kishinouye; glycosaminoglycan (GAG); extraction; purification; anti-hyperlipidemia

近十多年, 海洋动物糖胺聚糖具有的特殊结构和活性, 引起了医学界的重视, 国外对海参(体壁)、乌贼(角膜)、大西洋鲷鱼(皮)、甲壳动物等, 国内对鲨鱼(软骨)、海星和刺参

(体壁)等糖胺聚糖报道较多, 但对软体动物报道很少。Cassaro^[1]研究表明, 软体动物含有多糖胺聚糖, 在一系列提取分离步骤中, 完全除去与糖胺聚糖以糖肽键共价结合的肽

或氨基酸残基是很难的。因此,提取多种糖胺聚糖的混合物获得单一组分的纯品是对糖胺聚糖构效关系研究的前提。本研究是综合利用多酶水解和化学纯化方法,通过优化提取和纯化工艺,既得到高活性的产物,又提高了糖胺聚糖产率。同时,为了进一步探究海蜇糖胺聚糖的活性作用,我们进行了高脂血症小鼠动物实验,对其降血脂作用进行评估。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 原料

盐矾海蜇来自湛江市场,经脱盐,脱矾。脱腥后,装于食品保鲜袋中冷藏备用。

动物:昆明种小鼠,20~25g(广东医学院)

1.1.2 试剂

枯草杆菌中性蛋白酶:酶活力 $50,000 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$;胰蛋白酶:酶活力 $100 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$;木瓜蛋白酶:酶活力 $600,000 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$;其余均为分析纯;活性炭:化学纯。

1.2 仪器设备

高速组织捣碎机(Philips);真空抽滤机(2×Z-05 旋片真空泵,浙江黄岩真空泵厂);YX5-A 台式离心机(裕鑫实业有限公司);77-5 型恒温磁力搅拌器(江苏奉县医疗器械厂);电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9245A 型,上海恒科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 粗提工艺

提取分离糖胺聚糖,不仅要破坏蛋白多糖聚集体间的次级键,还要降解蛋白多糖中的核心蛋白链,更主要的是要破坏多糖链与蛋白质的共价结合(糖肽键),从而释放出多糖链。在众多的提取方法中,碱提取法和蛋白酶水解法应用最为广泛。硫酸乙酰肝素、硫酸角质素等的硫酸酯基经碱处理后易发生 Walden 转化,或形成 3,6-内醚衍生物而发生脱硫现象。因此,碱提取法不适于这类多糖的提取。本文用多种蛋白酶水解法,原料匀浆经多种酶水解,以提高蛋白质水解度,从而提高糖胺聚糖得率。

该提取工艺适于大量提取使用,工艺流程:

海蜇→解冻破碎→多酶水解→ 100°C 沸水浴灭酶 10min→双层纱布过滤→离心, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ →醇沉→离心, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ →抽滤,乙醇、丙酮交替洗脱→低温干燥→海蜇糖胺聚糖粗品(R-GAG)。

1.3.2 纯化方法

1.3.2.1 一次纯化(等电点沉淀、透析、醇沉法)

R-GAG→溶于蒸馏水(配成 3% 溶液)→搅拌助溶→调溶液 pH 至 2.0→离心除沉淀, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ →调 pH 至 7.0→离心除沉淀, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ →透析 48h→5% 无水 NaAC 和 1.5 倍体积 95% 乙醇醇沉→ 4°C 静置 24h→ $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 15min→低温干燥得海蜇糖胺聚糖一次纯化品(GAG-1)。

1.3.2.2 二次纯化(CTAB 络合法)

GAG-1→溶于蒸馏水(配成 1% 糖液)→加入 5% CTAB(40°C 下 1~2h)沉淀并凝聚→离心取沉淀(洗净泡沫)→将沉淀溶于 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 进行解离→醇沉→离心, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ →沉淀溶于蒸馏水(2% 溶液)→透析→醇沉→离心, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ →得海蜇糖胺聚糖二次纯化品(GAG-2)。

1.3.3 R-GAG、GAG-1 和 GAG-2 组成分析方法^[7]

(1)总氮的测定:半微量凯氏定氮法^[7];

(2)总糖的测定:蒽酮硫酸法^[7];

(3)糖胺聚糖含量的测定:阿利新蓝法^[9]

1.3.4 动物实验对实验性高脂血症小鼠血脂的影响^[10]

取小鼠 60 只,分为 5 组。正常对照组给以全价小鼠饲料,其余 4 组给以高脂饲料喂养。高脂饲料仿照文献配制:以全价饲料为基础饲料占 70%,加猪油 15%,蛋黄粉 15%,猪胆盐 0.1%。2 个给药组每日分别灌喂海蜇糖胺聚糖粗品(R-GAG)5、10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,阳性对照组灌喂降脂平 1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。正常对照组和造型对照组灌喂等体积生理盐水,连续 20d。末次给药后禁食 14h,小鼠摘眼球取血,分离血清,用 LRC 法测定血清总胆固醇(TC),用异丙醇抽提,乙酰丙酮显色法测定甘油三酯(TG)。

2 结果与分析

2.1 海蜇酶解最适条件的确定^[7]

在海蜇糖胺聚糖提取、纯化工艺中关键是最适酶解条件的确定。酶解时间、pH 及加酶量对酶解效果都有影响。考虑到酶解处理要求在中性条件下进行对多糖提取物的活性保持较好,故采用中性蛋白酶。分别选取了木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和枯草杆菌酶。

木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和枯草杆菌酶各自最适作用温度和 pH 不同,因而不可同时

加入。木瓜蛋白酶: pH 5~7, 60~75℃; 枯草杆菌酶: pH 7.0, 50℃; 胰蛋白酶: pH 8.5, 50℃。

(1)用不同酶量水解匀浆液,显示 3 种酶酶解 5h 后水解度上升已不明显,因此,3 种酶的水解时间均定为 5h;(2)由酶解结果得 3 种蛋白酶达到 1.5% 时对水解度提高已甚微,得到 3 种酶对海蜇糖胺聚糖提取的最大用量为 2.0%。

根据单因素实验结果设计正交试验中各酶加量水平,见表 1。

表 1 正交试验设计及试验结果

试验号 No	胰蛋白酶 trypsin(w/v)	木瓜蛋白酶 papain (w/v)	枯草杆菌酶 subtilisin (w/v)	水解度 DH(%)
1	0.2	0.5	0.5	46.0
2	0.2	1.0	1.0	84.4
3	0.2	1.5	1.5	86.3
4	0.3	0.5	1.0	76.3
5	0.3	0.5	1.5	85.6
6	0.3	1.5	0.5	77.4
7	0.4	0.5	1.5	77.2
8	0.4	1.0	0.5	79.3
9	0.4	1.5	1.0	86.2
K1	72.2	66.5	67.6	
K2	79.8	83.1	83.1	
K3	80.9	83.3	83.3	
极差 R	8.7	16.8	15.7	

正交试验结果表明,木瓜蛋白酶和枯草蛋白酶的极差较大,是影响水解度的主要因素。水解度随酶的加量增加而增加。

综上所述,当酶的加量为:木瓜蛋白酶 1.5%,枯草蛋白酶 1.5%,酶解 5h 后,酶解效果最为理想。

2.2 海蜇粗制品 R-GAG、纯化品 GAG-1、GAG-2 中总糖、糖胺聚糖含量

经过多酶水解提取工艺、蛋白质等电点沉淀、透析、醇沉、CTAB 络合纯化,海蜇糖胺聚糖粗制品中平均含氮量为 1.93%,目标产

物总糖、糖胺聚糖在粗制品和纯化品中的含量见表 2、3。

表 2 海蜇粗制品及纯化品中总糖含量

	R-GAG	GAG-1	GAG-2
A(480nm)	0.122	0.146	0.180
总糖含量	20.2%	24.2%	29.8%

表 3 海蜇粗制品及纯化品中糖胺聚糖含量

	R-GAG	GAG-1	GAG-2
A(480nm)	0.101	0.109	0.143
糖胺聚糖含量	18.5%	20.1%	26.4%

2.3 动物实验结果

表 4 海蜇糖胺聚糖粗制品 R-GAG 对小鼠血脂的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g · kg ⁻¹ · d ⁻¹)	TC(mmol · L ⁻¹)	TG(mmol · L ⁻¹)
正常对照	12	—	7.96 ± 1.50	9.17 ± 1.95
R-GAG(5g · kg ⁻¹)	12	5 × 20	7.43 ± 1.77	5.04 ± 1.55**
R-GAG(10g · kg ⁻¹)	12	10 × 20	6.83 ± 1.09*	4.06 ± 1.28**
降脂平	12	1 × 20	6.39 ± 0.81*	6.80 ± 0.98**

注:与正常对照组相比,* P<0.05,** P<0.01

由表可见,小鼠以正常饲料加灌喂粗 R-GAG($5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、R-GAG($10\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)或降脂平与以正常饲料喂养相比,血清 TC, TG 值均比正常对照组降低, R-GAG($10\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)对 TC 降低效果与降脂平相当, R-GAG($5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、R-GAG($10\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)降低甘油三酯值优于降脂平,且加药前后 TG 有极显著性差异;提示海蜇糖胺聚糖粗制品具有降低高脂血症小鼠血脂的作用。

3 讨论

R-GAG 为海蜇酶解后醇沉所得粗制品,经测定其糖胺聚糖含量为 18.5%,含氮量 1.93%,表明粗制品中尚含有大量蛋白酶、无机盐及其它杂质。蛋白酶(或氮)主要源于两方面:一是未完全水解的蛋白酶在醇沉时随多糖一起沉出,二是粗制品中糖胺聚糖所带肽氨基酸残基。无机盐主要来源是,在用蛋白酶水解法提取糖胺聚糖的过程中,因调 pH 加入的酸碱生成大量的盐(加上原料本身所含的盐分),致使醇沉所得粗制品含大量盐分。因此有必要进行除蛋白和脱盐。为此,本实验用等电点沉淀除去大分子蛋白质,用透析法除去小分子可溶性蛋白质及无机盐,再用醇沉法得到相对较纯的 GAG 粗品。粗品经等电点沉淀后,取离心后的清液 1mL,加 20%三氯乙酸,无浑浊现象,表明蛋白质的清除较彻底,透析后取透析液 1mL,滴加 10%硝酸银,无白色沉淀出现,证明脱盐比较完全。另外,由于海蜇含水量高达 96%,其盐分也很高,故需在实验前先将海蜇反复清洗再浸泡 2~3h 使其脱去盐分,但时间不宜过长,以免盐分完全丢失,有点盐分能有利于粗提进行。

海蜇粗制品经一次纯化即吸附和透析后得 GAG-1,但仍含有少量蛋白质、无机盐等杂质,为此用季铵盐络合法进一步除杂。糖胺聚糖为聚阴离子,可与阳离子洗涤剂形成复合盐沉淀,后者在一定的无机盐浓度即临界浓度下可解离溶解。季铵盐多糖复合物沉淀在加温时凝聚加速,故加温至少 40℃保持 1~2h。CTAB-GAG 络合物经解离、醇沉、

透析后得 GAG-2。

海蜇糖胺聚糖粗提工艺中最适酶解条件是:木瓜蛋白酶 1.5%、枯草蛋白酶 1.5%,酶解 5h;经过蛋白质等电点沉淀、透析、醇沉一次纯化后得海蜇糖胺聚糖纯化品 GAG-1 中总糖和糖胺聚糖的含量均由原来的 18.5%和 20.2%提高到 20.1%和 24.2%,表明一次纯化后大部分蛋白质、无机盐和其它杂质已被除去。

二次纯化用 CTAB 沉淀法,由 GAG-1 到 GAG-2 总糖得率为 29.8%,糖胺聚糖的含量提高到 26.4%,总糖中 88.6%为目标产物糖胺聚糖,进一步纯化了粗制品。

动物实验表明,海蜇糖胺聚糖对高脂血症小鼠血清 TC, TG 值具有显著的降低作用。

参考文献:

- [1] Cassio CMF, Dietrich CP. Distribution of sulphated mucopolysaccharides in invertebrates [J]. *Bibl Chem*, 1997, 252:2254-2261.
- [2] 王长云,管华诗.扇贝边酸性粘多糖的提取[J]. 青岛海洋大学学报,1992,1:203-208.
- [3] 吴红棉,洪鹏志,雷晓凌.珠母贝内脏器中糖胺聚糖粗提物的制备及其生理活性初探[J]. 湛江海洋大学学报,2000,20(3):50-55.
- [4] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1989:235.
- [5] 王长云,管华诗.扇贝糖胺聚糖提取和纯化方法研究[J]. 青岛海洋大学学报,1995,51:203-208.
- [6] 范秀萍,吴红棉,雷晓凌,等.珠母贝氨基多糖的分离纯化及其抗肿瘤活性的初步研究[J]. 中国海洋药物,2005,24(2):32-36.
- [7] 张惟杰. 复合多糖化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987:283-299.
- [8] 沈文梅. 海星酸性粘多糖的理化性质研究[J]. 海洋药物,1996,4:1-5.
- [9] Gold EW. A Simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentrations [J]. *Anal Biochem*, 1979, 99:183-188.
- [10] 徐叔云,卞如潭,陈修. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1991:1275.
- [11] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:228-255.

(收稿日期:2006-09-07)