

虾夷马粪海胆生殖腺多糖的提取、纯化及鉴定

曹月刚, 赵 君, 陈泓宇, 陈 宁, 田 姮, 何冬梅, 杨静峰*
(大连工业大学食品学院, 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁 大连 116034)

摘 要: 从虾夷马粪海胆生殖腺中提取纯化出一种多聚甘露糖物质, 并对其结构组成特征进行研究。以海胆生殖腺干粉为材料, 采用木瓜蛋白酶酶解、乙醇醇沉、Sevag法脱蛋白等方法提取得到海胆生殖腺粗多糖。进一步以唾液淀粉酶脱除粗多糖中的糖原组分, 再经过Sephacrose CL-6B色谱柱分离纯化后得到均一的虾夷马粪海胆生殖腺多糖 (polysaccharide from gonad of sea urchin, SUGP)。采用红外光谱、紫外光谱、高效液相色谱法对SUGP的结构特征进行研究。结果表明: SUGP为含有甘露糖的均一多糖, 分子质量为4 436 D。唾液淀粉酶可以去除多糖中的所有葡萄糖成分, 之后其单糖组成仅为甘露糖, 说明虾夷马粪海胆生殖腺多糖结构是由多聚甘露糖与糖原相连接构成的。

关键词: 海胆生殖腺; 多糖; 多聚甘露糖; 糖原

Extraction, Purification and Identification of Polysaccharide from the Gonad of the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*

CAO Yue-gang, ZHAO Jun, CHEN Hong-yu, CHEN Ning, TIAN Heng, HE Dong-mei, YANG Jing-feng*
(National Engineering Research Center of Seafood, School of Food Science and Technology,
Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: A water-soluble polysaccharide (SUGP) from the gonad of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* was obtained and its structural characteristics were elucidated. SUGP was isolated by protease-assisted aqueous extraction, precipitated with ethanol, deproteinized by the Sevag method, further treated with alpha-amylase for the removal of glycogen, and finally purified with gel filtration chromatography. The structural characteristics of SUGP were determined by IR spectroscopy, ultraviolet spectroscopy and high performance liquid chromatography. The results showed that SUGP was a homogeneous polysaccharide with average molecular weight of 4 436 D and contained only mannose. Alpha-amylase eliminated the glycogen present in SUGP, so that producing a purified polysaccharide composed of only mannose, indicating that the sea urchin polysaccharide is a glucomannan that is constructed with polymanna conjugated to glycogen.

Key words: sea urchin gonad; polysaccharide; polymanna; glycogen

中图分类号: Q538

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 21-0016-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201421004

海胆 (*Hemicentrotus pulcherrimus*) 在系统分类上属于棘皮动物门 (Echinodermata), 游在亚门 (Eleutherozoa)、海胆纲 (Echinoidea), 是海洋中一类常见的无脊椎动物^[1]。海胆不但具有较高的营养价值, 同时还具有多种药用价值^[2], 其生物体内含有多种活性物质。海胆中已经发现的活性物质包括氨基酸、多糖、脂类、色素、毒素等^[3-7]。研究发现海胆多糖也具有抗肿瘤和增强机体免疫力等生物活性^[8-9]。张忠玲等^[10]采用水提醇沉、有机溶剂抽提、柱层析、离心超滤等从海胆肠中精确提取多糖, 研究发现这种多糖成分对Bel-7402人肝癌细胞有一定的抗肿瘤作用。Liu Chunhui等^[11]以光棘球海胆

生殖腺为原料, 从中提取纯化得到一种多糖, 并利用体外脾淋巴细胞做了增殖实验测定其免疫活性, 证明其具有较强的体外免疫活性。徐张展等^[12]利用Sephadex G-75色谱柱纯化得到一种分子质量在3.6 kD左右的海胆生殖腺多糖 (polysaccharide from gonad of sea urchin, SUGP), 也证明了其具有体外免疫活性。白日霞等^[13]从马粪海胆棘壳中提取出硫酸多糖, 确定其含有岩藻糖和硫酸基, 并且对癌细胞具有一定的抑制增殖作用。

本实验以虾夷马粪海胆生殖腺为原料, 分离提取出一种均一多糖, 并对其化学组成进行了深入研究, 以期获取这种海珍品多糖的结构信息。

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31301430)

作者简介: 曹月刚 (1988—), 男, 硕士, 研究方向为水产品加工及贮藏工程。E-mail: cyg549886642@126.com

*通信作者: 杨静峰 (1979—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为糖化学与糖生物学。E-mail: 42717505@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜虾夷马粪海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*), 购自大连长兴水产市场。

木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等 生工生物工程(上海)股份有限公司; 氨基酸半乳糖、甘露糖 美国Sigma公司; 乙醇、苯酚、氯仿、丙酮、浓硫酸等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

6890N气相色谱仪(配有SGD-300氮、氧、空发生器) 美国Agilent公司; 高效液相色谱仪(配有ELSD 2000ES型蒸发光检测器) 日本岛津公司; UV-2100紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器公司; PE Frontier傅里叶变换红外光谱仪 美国铂金埃尔默公司; JJ200Y型精密电子天平 美国双杰兄弟(集团)有限公司; PHS-3C精密pH计 上海雷磁仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖的提取

取冷冻干燥后的海胆生殖腺干粉500 g, 粉碎后加入与干粉等体积量的丙酮, 不断搅拌脱脂, 弃去丙酮相并重新更换丙酮直至丙酮无色, 弃去丙酮完成脱脂之后真空干燥除去残余丙酮。脱脂后的干粉加入45 倍体积的水搅拌均匀, 以6 mol/L的NaOH溶液调pH值为8.0, 按干粉质量分数加入2.5%的木瓜蛋白酶酶解, 水解温度50 °C, 时间2.5 h, 之后迅速升温至90 °C灭酶10 min, 冷却至室温后调pH值至中性, 4 000 r/min离心10 min, 离心得到的沉淀部分再重复以上酶解操作, 合并得到的上清液, 然后加3 倍体积的95%乙醇, 醇沉12 h, 离心取沉淀, 冷冻干燥。

1.3.2 虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖脱蛋白

本实验采用两步蛋白酶-Sevag(正丁醇加氯仿)的方法来脱除多糖中含有的蛋白质^[14]。

第一步蛋白酶-Sevag法脱蛋白: 将冷冻干燥后的粗多糖配成质量分数2.0%的水溶液, 依次用胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶酶解(表1)去除多糖共价连接的蛋白质, 酶解后的酶解液采用Sevag法脱除游离蛋白。

表1 蛋白酶的水解条件

Table 1 Hydrolysis conditions for different proteases

酶种类	pH	加酶量/%	温度/°C	时间/h
胃蛋白酶	2.0	2.5	37	2.5
胰蛋白酶	8.0	2.5	37	2.5
碱性蛋白酶	10.0	2.5	50	2.5

注: 加酶量为多糖的质量分数。

第二步蛋白酶-Sevag法脱蛋白: 为进一步脱除共价蛋白, 采用链酶蛋白酶脱蛋白, 将第一步脱蛋白后的海胆生殖腺粗多糖配成质量分数5%的水溶液, 按照

样品含量加入质量分数2.0%的链酶蛋白酶, 装入透析袋中, 0.15 mol/L NaCl溶液作激活剂, 加少量二甲苯防腐, 在37 °C保温24 h, 换透析水4 次。酶解后取溶液按1:1(V/V)加入Sevag试剂(V(氯仿):V(正丁醇)=5:1)^[15-16]重复脱蛋白直到无游离蛋白质出现为止, 上清液经透析冻融离心后冷冻干燥。

1.3.3 虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖除糖原

取冻干后粗多糖加入去离子水配成5.0%的溶液, 将溶液pH值调为6.8, 空腹取2 mL唾液加入溶液, 装入透析袋, 放入大烧杯中, 0.9% NaCl溶液作激活剂, 在37 °C保温6 h, 每1 h更换透析水。之后自来水透析4 h, 冷冻干燥。

1.3.4 虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖纯化

分别采用DEAE-52、Sephacrose CL-6B、Sephadex G-100色谱柱对粗多糖进行分离纯化。将海胆粗多糖通过纤维素柱DEAE-52进行分离纯化, 依次采用去离子水及0.15、0.5 mol/L的NaCl溶液梯度洗脱, 梯度时间为200 min, 将粗多糖配成100 mg/mL的溶液上样到DEAE-52分离柱中, 用恒流泵调节流速为1 mL/min, 每5 min收集1 管, 以苯酚-硫酸法监测并收集相同组分, 相同组分多糖合并、透析、冻干得纯化后多糖。得到的多糖组分再经过Sephacrose CL-6B、Sephadex G-100柱进一步分离纯化, 用0.15 mol/L NaCl溶液做流动相, 恒流泵流速为0.25 mL/min, 每12 min收集1 管, 苯酚-硫酸法监测并收集相同组分, 相同组分多糖洗脱液经合并、透析、冷冻干燥得到均一的SUGP。

1.3.5 SUGP的纯度鉴定

SUGP的纯度鉴定采用凝胶高效液相色谱法, 取1 mg SUGP溶解于1 mL超纯水中, 使其充分溶解, 0.45 μm膜过滤, 以高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析SUGP的纯度。色谱条件: TSK-GEL G-4000PWX柱(7.8 mm×300 mm), 流动相为超纯水, 流速为0.2 mL/min; 检测器: ELSD 2000ES型蒸发光检测器, 漂移管温度80 °C; 载气为N₂, 流速为2.0 L/min。

1.3.6 SUGP分子质量测定

采用Sephacrose CL-6B凝胶柱(1.6 cm×80 cm)测定SUGP分子质量, 洗脱液为0.15 mol/L的NaCl溶液, 流速0.18 mL/min。标液配制: 将分子质量分别为1×10³、5×10³、1.2×10⁴、8×10⁴、2.7×10⁵、4.1×10⁵ D的标准葡聚糖分别溶于双蒸水中, 配制成1 mg/L的溶液, 按分子质量由小到大顺序分别进样, 分离并收集, 苯酚硫酸法跟踪监测糖含量, 在490 nm波长处测定光密度值。以洗脱体积对分子质量的对数进行线性回归处理, 求线性回归方程^[17]。

将精制多糖SUGP溶于双蒸水中制成2 mg/mL的溶液, 于相同条件下进样分析, 记录洗脱体积, 代入回归方程求分子质量。

1.3.7 SUGP的光谱鉴定

紫外光谱鉴定：将SUGP配成500 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，然后利用紫外分光光度计进行光谱扫描。

红外光谱鉴定：将SUGP与KBr以1:100 (m/m)混合研细后，以KBr为本底，在4 000~400 cm^{-1} 波数范围内进行红外光谱扫描。

1.3.8 SUGP的组成分析

SUGP硫酸根含量的测定采用明胶比浊法^[18]。SUGP糖醛酸含量的测定采用间羟基联苯法^[19]。SUGP氨基己糖含量的测定采用比色法^[20]。

1.3.9 糖脂乙酸酯衍生化气相色谱法^[21-22]测单糖组成

1.3.9.1 多糖的水解

准确称取10 mg粗多糖或SUGP溶于2 mL 2 mol/L的三氟乙酸中，充 N_2 密封，在100 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下水解4 h，反复加甲醇并用 N_2 吹干，得到水解产物备用。

1.3.9.2 单糖的衍生化

向水解产物中加入8 mg盐酸羟胺、0.5 mL吡啶、1 mg肌醇，漩涡振荡后，于90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热30 min，取出后冷却至室温，加入0.5 mL乙酸酐，在90 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴乙酰化30 min，反应产物经0.45 μm 滤膜过滤后注入气相色谱进行分析；标准单糖用相同方法处理，并制成标准单糖衍生物混合液。

1.3.9.3 色谱条件

色谱柱：石英毛细管柱（30 m \times 250 μm ，0.25 μm ）；升温程序：0~5.00 min为130 $^{\circ}\text{C}$ ，然后以4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率由130 $^{\circ}\text{C}$ 升至240 $^{\circ}\text{C}$ ，保持10 min，再以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升至250 $^{\circ}\text{C}$ ；载气（ N_2 ）流速2 mL/min，压力171.8 kPa；进样量为5 μL 。

2 结果与分析

2.1 虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖的提取及脱蛋白

虾夷马粪海胆生殖腺干粉的蛋白质含量高达49.21%，脂肪含量为17.4%，总糖含量为16.55%。表明海胆是一种高蛋白质的营养食品。虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖的提取率为8.73%。动物体中的多糖常与蛋白质共价连接在一起，因而一般采用蛋白酶对其处理以利于多糖的提取。再结合Sevag法脱除游离蛋白质，此方法不仅能有效脱除蛋白质，同时也能较好地保留多糖^[23]。经过此方法处理后多糖样品中蛋白质含量为3.54%，总糖含量为40.36%。

2.2 虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖的纯化

经过脱糖原处理后的虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖再以DEAE-52柱进行分离，结果如图1所示。海胆生殖腺粗多糖在15管左右已经被全部洗脱出来了，说明海胆生殖腺粗多糖可能带有一定的正电荷，DEAE-52柱并未起

到多糖分离作用，但可以除去一些杂蛋白等杂质。收集多糖组分分别用Sephacrose CL-6B、Sephadex G-100柱进行下一步纯化，结果如图2所示。

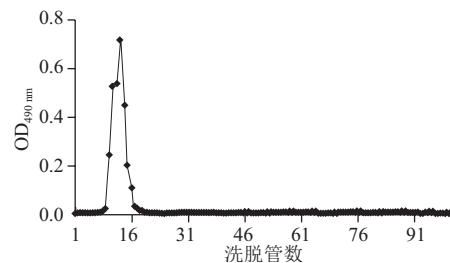
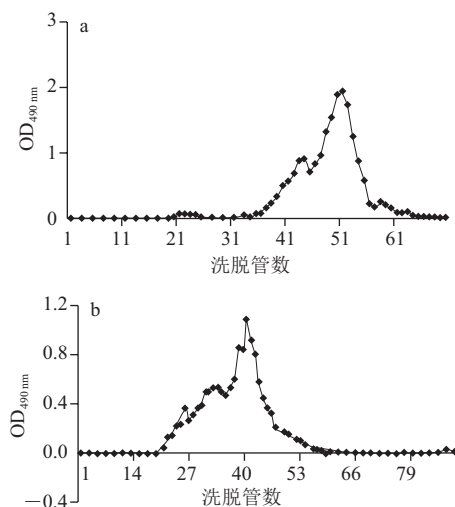


图1 粗多糖在DEAE-52阴离子柱上的洗脱曲线

Fig.1 Chromatogram of crude polysaccharides on DEAE-52 column



a. Sepharose CL-6B柱洗脱；b. Sephadex G-100柱洗脱。

图2 粗多糖的洗脱曲线

Fig.2 Further chromatogram of polysaccharides eluted from DEAE-52 column

Sepharose CL-6B（图2a）和Sephadex G-100（图2b）层析图出现的大峰基本相似，只是出峰时间有差别，但从Sephacrose CL-6B的层析图可以看出在20~25管有很小的峰，因此以Sephacrose CL-6B分离纯化海胆生殖腺粗多糖。收集分离纯化得到的糖含量最高的组分进行透析，冷冻干燥得海胆生殖腺多糖SUGP。

2.3 SUGP的纯度鉴定及分子量

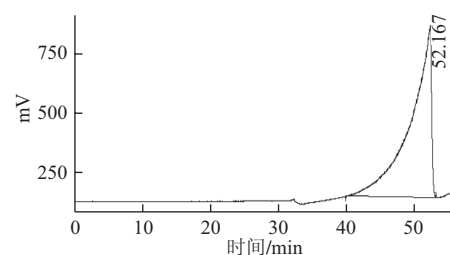


图3 HPLC法鉴定SUGP纯度

Fig.3 HPLC profile of SUGP

如图3所示, SUGP的HPLC图谱中出现单一的峰, 出峰时间较晚, 证明SUGP为一分子质量较小且纯度较高的多糖。测定SUGP的分子质量为4 436 D。

2.4 SUGP紫外分光光度计光谱鉴定

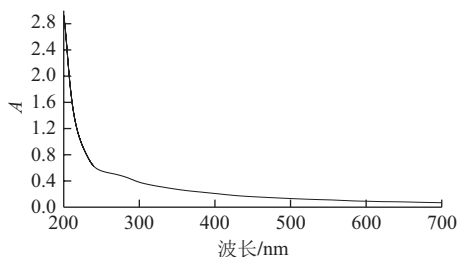


图4 SUGP的紫外光谱图

Fig.4 UV spectrum of SUGP

SUGP水溶液的紫外光谱如图4, 在260、280 nm波长附近曲线平坦, 几乎没有核酸和蛋白质的特征吸收峰, 说明样品中的蛋白质含量很低^[24]。

2.5 SUGP红外光谱鉴定

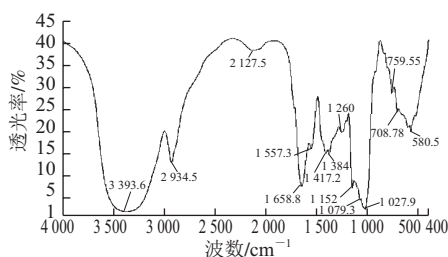


图5 SUGP红外光谱图

Fig.5 IR spectrum of SUGP

SUGP的红外光谱图如图5所示, 在3 393.6、1 027.9 cm^{-1} 波数附近有强吸收, 表示有一OH的O—H键伸缩振动和变角振动; 2 934.5、1 417.2 cm^{-1} 波数附近有吸收, 分别示有C—H键的伸缩振动和变角振动, 均为多糖的特征吸收峰; 1 658.8 cm^{-1} 波数附近有中强吸收, 可能是C=O键的伸缩振动, 或是酰胺键中N—H键的变角振动; 1 260 cm^{-1} 波数附近有很小的吸收峰, 说明—OSO₃—基团含量很少^[25]。

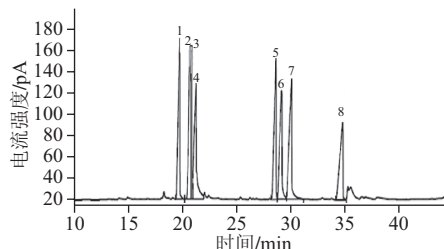
2.6 SUGP组成分析

经测定, SUGP中总糖、蛋白质、硫酸根、糖醛酸、氨基半乳糖、氨基葡萄糖的含量分别为46.25%、2.85%、1.32%、2.16%、4.05%、10.80%。SUGP中测得的硫酸根和糖醛酸数值很小, 结合红外光谱分析SUGP中应该不含有这两种官能团, 而SUGP中氨基葡萄糖含量较高。

2.7 虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖及SUGP单糖组成分析

7种标准单糖气相色谱图见图6, 未知样品的单糖组成按标准单糖保留时间进行定性。未脱糖原前样品

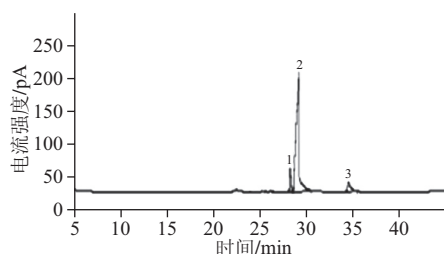
中的单糖组成见图7, 图7中1、2号两个峰分别是甘露糖和葡萄糖, 根据峰面积积分计算其物质的量之比为1.3:37.2。因此海胆生殖腺粗多糖中葡萄糖含量远远高于甘露糖, 推测粗多糖中含有大量糖原, 因此提取过程中采用了唾液淀粉酶对虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖进行脱糖原处理。



1.鼠李糖; 2.阿拉伯糖; 3.岩藻糖; 4.木糖;
5.甘露糖; 6.葡萄糖; 7.半乳糖; 8.肌醇。

图6 标准单糖糖腈乙酸酯衍生物气相色谱图

Fig.6 GC chromatogram of aldoonitrile acetate derivatives of monosaccharide standards



1.甘露糖; 2.葡萄糖; 3.肌醇。

图7 未脱糖原前粗多糖糖腈乙酸酯衍生物气相色谱图

Fig.7 GC chromatogram of aldoonitrile acetate derivatives of crude polysaccharide with glycogen

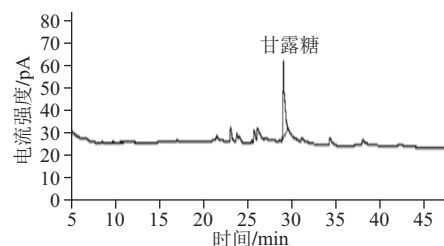


图8 脱糖原后糖腈乙酸酯衍生物气相色谱图

Fig.8 GC chromatogram of aldoonitrile acetate derivatives of purified polysaccharide without glycogen

海胆生殖腺粗多糖经脱糖原并以色谱柱分离纯化后得到SUGP, 其葡萄糖峰消失, 仅剩甘露糖(图8), 这也证实粗多糖中含有大量的糖原, 因此证明虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖是由多聚甘露糖和糖原链接构成。经实验测得1 g粗多糖脱糖原后得到52.4 mg纯多糖。

3 结 论

本实验通过水酶法提取虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖, 提取得到的粗多糖含有甘露糖和葡萄糖, 其物质的量比为1.3:37.2, 粗多糖经过脱糖原处理后只含有甘露糖, 说明虾夷马粪海胆生殖腺多糖结构是由多聚甘露糖与糖原相连接而构成。虾夷马粪海胆生殖腺粗多糖经过进一步分离纯化后得到均一多糖SUGP, 对SUGP进一步进行了分子质量测定, 硫酸根、糖醛酸、氨基葡萄糖含量测定和光谱鉴定。本实验对SUGP理化性质和单糖组成做了初步鉴定, 有关其结构及活性有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2004: 99-202.
- [2] 陆江海, 李瑞声, 张维汉. 海胆化学和药理学研究概况[J]. 中国海洋药物, 1994(2): 38-46.
- [3] YOSHINO K, TAKAO T, SUHARA M, et al. Identification of a novel amino acid, *o*-bromo-*L*-phenylalanine, in egg-associated peptides that activate spermatozoa[J]. Biochemistry, 1991, 30(25): 6203-6209.
- [4] 高翼, 奚涛, 刘纯慧, 等. 海胆壳蛋白的分离纯化及抗肿瘤活性[J]. 中国天然药物, 2007, 4(6): 464-467.
- [5] GONZÁLEZ M, CARIDE B, LAMAS A, et al. Nutritive value of protein from sea urchin, and its effects on intestinal leucine aminopeptidase and intestinal and hepatic gamma-glutamyltranspeptidase[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2001, 52(3): 219-224.
- [6] MURATA Y, SATA N U. Isolation and structure of pulcherrimine, a novel bitter-tasting amino acid, from the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) ovaries[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(11): 5557-5560.
- [7] SHEEAN P D, HODGES L D, KALAFATIS N, et al. Bioactivity of extracts from gonadal tissue of the edible Australian purple sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(4): 694-701.
- [8] 张忠玲, 刘亚民, 韩金祥, 等. 海胆肠提取物的抗肿瘤作用[J]. 肿瘤研究与临床, 2002, 14(5): 302-304.
- [9] 刘纯慧, 奚涛, 林亲雄, 等. 海胆黄多糖的分离、纯化及免疫活性测定[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(3): 7-11.
- [10] 张忠玲, 朱波, 张翠, 等. 海胆肠多糖致Bel7402人肝癌细胞凋亡的扫描电镜观察[J]. 电子显微学报, 2005, 22(6): 467-467.
- [11] LIU Chunhui, LIN Qinxiong, GAO Yi, et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67(3): 313-318.
- [12] 徐张展, 邢莹莹, 周长林, 等. 海胆黄多糖SEP酶解及产物免疫活性测定[J]. 药物生物技术, 2009(4): 342-346.
- [13] 白日霞, 王长海. 马粪海胆壳棘多糖的分离、纯化和抗肿瘤活性的研究[J]. 大连水产学院学报, 2010, 25(2): 183-186.
- [14] 闫雪, 杨静峰, 周大勇, 等. 虾夷扇贝内脏多糖VP-12的分离纯化及性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 172-175.
- [15] 余志刚, 胡谷平, 吴耀文, 等. 鲍鱼多糖Hal-A的甲醇解研究[J]. 有机化学, 2002, 22(5): 367-369.
- [16] 周鸿立, 杨晓虹. 玉米须多糖中蛋白质脱除的Sevag与酶法联用工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 129-132.
- [17] 罗巖辉, 王昭晶, 梁忠岩. 小刺猴头菌子实体多糖的分离、纯化及初步研究[J]. 福建中医学院学报, 2006, 15(4): 32-34.
- [18] 邱芳萍, 张玲, 于健. 硫酸钡比浊法对鹿茸多糖中硫酸基含量的测定[J]. 长春工业大学学报: 自然科学版, 2006, 26(4): 268-270.
- [19] 俞丹, 马龙, 赵军, 等. 琐琐葡萄多糖中糖醛酸含量的测定[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(5): 533-535.
- [20] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 382.
- [21] 宋叶涵, 李冬梅, 杨静峰, 等. 三种色谱法分析鲍鱼生殖腺多糖的单糖组成[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 44-47.
- [22] 于立芹, 范毅, 陈玲, 等. TLC与GC法测定红薯叶多糖的单糖组成[J]. 河南科学, 2011, 29(2): 150-152.
- [23] 李冬梅, 谭凤芝, 杨静峰, 等. 皱纹盘鲍脏脏器多糖的分离纯化及鉴定[J]. 水产科学, 2007, 26(9): 485-488.
- [24] 刘晓连, 李亚蕾, 罗瑞明, 等. 灵武长枣水提多糖结构特征及理化性质[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 120-125.
- [25] 宋叶涵, 刘富俊, 李冬梅, 等. 鲍鱼生殖腺多糖脱硫酸化及光谱鉴定[J]. 大连工业大学学报, 2013, 32(1): 1-3.