

刺参水煮液糖蛋白组成成分分析

陈 宁, 赵 君, 李月惠, 高荣春, 衣 萌, 汪 珊, 杨静峰, 辛丘岩*
(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:目的: 刺参水煮液是刺参加工过程中的副产物, 通过对刺参水煮液营养成分的分析有助于将这种海产珍品加工废弃物转化为高附加值产品。方法: 刺参水煮液经醇沉、透析、冻干, 得到刺参水煮液糖蛋白(glycoprotein in sea cucumber boiling water, GSCB)粗制品; 采用液相色谱和Sephacryl-6B凝胶层析柱确定其糖蛋白组成成分及分子质量; 采用液相色谱-质谱对1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)衍生化的GSCB单糖组成进行分析; 采用液相色谱法对其氨基酸组成进行分析。结果: GSCB主要含有2种糖蛋白, 分子质量分别为964.3 kD和2.5 kD。GSCB含有氨基葡萄糖、甘露糖、氨基半乳糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖6种单糖; 含有18种氨基酸, 其中含有8种人体必需氨基酸, 占氨基酸总量的38.38%。此外, 半必需氨基酸组氨酸的含量在18种氨基酸中占比最高, 占比达到13.21%。结论: GSCB中含有酸性黏多糖物质, 并含有多种必需氨基酸和半必需氨基酸, 是一种良好的营养糖蛋白物质。对其深入开发将有利于变废为宝, 开发出活性良好的功能保健食品。

关键词: 刺参; 水煮液; 糖蛋白; 单糖组成; 氨基酸组成

Chemical Composition of Glycoprotein from Boiling Water Extract of Sea Cucumber

CHEN Ning, ZHAO Jun, LI Yuehui, GAO Rongchun, YI Meng, WANG Shan, YANG Jingfeng, XIN Qiuyan*
(National Engineering Research Center of Seafood, School of Food Science and Technology,
Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Aim: To analyze the nutrient compositions of boiling water extract of sea cucumber, a by-product of the processing of this valuable seafood. Methods: Glycoprotein from sea cucumber boiling water (GSCB) was prepared from by alcohol precipitation, dialysis and lyophilization. The components and molecular weight of the crude glycoprotein were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and Sepharose CL-6B column chromatography, respectively. GSCB was hydrolyzed, derivatized with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, and then analyzed for monosaccharide composition by LC-MS. The amino acid analysis was carried out by HPLC. Results: Two kinds of glycoprotein in GSCB, with molecular weights of 964.3 and 2.5 kD, respectively, were identified. GSCB was composed of glucosamine, mannose, galactosamine, glucose, galactose and fucose. GSCB contained 8 kinds of essential amino acids, which account for 38.38% of the total amino acids. Besides, the content of semi-essential amino acid, histidine, accounted for 13.21% of the total amino acids, which was the most abundant among the 18 kinds of amino acids. Conclusion: Boiling water extract of sea cucumber contains acid mucopolysaccharides and a high amount of essential amino acids. It is a good nutritive material and can be developed into functional and healthy foods.

Key words: sea cucumber; boiling water; glycoprotein; monosaccharide composition; amino acid composition

中图分类号: Q538

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)08-0125-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201508022

全世界海参大约有1 200种, 中国海域分布有140多种, 其中可食用的有20多种。刺参为黄渤海地区的主要海参品种。海参具有高蛋白、低脂肪、低胆固醇等特点, 海参体内生理活性物质十分丰富, 如海参多糖、海参脂质、海参蛋白、海参皂苷、海参外源凝集素等^[1]。刺

参体内的多糖物质具有多种生理活性, 如抗肿瘤、抗凝血、增强免疫力、降血脂、延缓衰老、促进伤口愈合等^[2-6]。随着近年来海参产业化的深度开发, 一些海参加工副产物, 如海参肠、海参水煮液也引起了关注。如赵玲等^[7]以海参水煮液冻干粉为原料, 比较研究了3种不同蛋白酶酶解

收稿日期: 2014-09-09

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: 陈宁(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工。E-mail: 1029023257@qq.com

*通信作者: 辛丘岩(1959—), 男, 高级工程师, 学士, 研究方向为水产品加工。E-mail: 1411892057@qq.com

后得到多肽的抗氧化活性;丁建君等^[8]从海参水煮液中分离出了具有 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用的组分;赵前程等^[9]对海参加工废液中多糖的回收方法进行了研究;李天宝等^[10]研究了海参加工废液中多糖的淋巴细胞增殖活性。但迄今为止尚未见到关于海参加工废液中的糖蛋白营养成分的研究报道。

刺参是我国山东、辽宁和河北沿海一带珍贵而独特的海产珍品,因其营养价值丰富,深受消费者喜爱。但在其深度产业化加工过程中,会产生大量刺参水煮液,其中含有丰富的营养成分,如果能够对其加以综合利用,既能增加产品的附加产值,变废为宝,又能减少浪费及环境污染。本实验对刺参水煮液中糖蛋白的基本组分进行初步的研究,对其单糖组成、氨基酸组成及分子质量进行测定,以期为其营养成分的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刺参(*Stichopus japonicus*)水煮液 大连棒槌岛海产股份有限公司;牛血清蛋白、琼脂糖凝胶Sephacryl标准品 CL-6B 美国GE公司;不同分子质量葡聚糖Dextran 美国Sigma公司;*N,N*-二甲基甲酰胺(色谱纯) 天津光复精细化工研究所;2,4-二硝基氟苯、18种氨基酸标准品 大连依利特分析仪器有限公司;考马斯亮蓝G-250、单糖标准品 北京Solarbio科技有限公司;三氟乙酸 萨恩化学技术有限公司;无水甲醇(色谱纯) 山东禹王实业有限公司;乙腈(色谱纯) 美国Spectrum公司;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)(化学纯) 国药集团化学试剂有限公司;氯仿、氯化钠、无水乙醇、苯酚、硫酸、盐酸、氢氧化钠、冰醋酸(均为分析纯) 天津市大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

UV-5200紫外-可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;BSZ-100自动部份收集器、HL-2恒流泵 上海沪西分析仪器有限公司;LC-10AT液相色谱仪 日本岛津公司;1201型液相色谱仪 大连依利特分析仪器有限公司;TTL-DC型氮吹仪 北京同泰联科技发展有限公司;ENT7冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;PH070A电热鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;L550台式低速离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;ELSD2000ES蒸发光检测器 美国Alltech公司;LXQ液相色谱-线性离子阱质谱仪(配备电喷雾离子源、光电二极管阵列检测器、XCalibur软件操作系统) 美国Thermo公司。

1.3 方法

1.3.1 刺参水煮液糖蛋白(glycoprotein in sea cucumber boiling water, GSCB)的制备

鲜活刺参经剖腹、去肠、去牙清洗后,以夹层锅进行水煮,95℃水煮30 min后过滤得刺参水煮液。

刺参水煮液,加3倍体积无水乙醇醇沉,弃上清液,沉淀经无水乙醇洗后离心(4 000 r/min, 10 min)。沉淀用超纯水复溶,残渣再45℃水浴助溶后2次溶液合并离心(4 000 r/min, 10 min),取上清液,透析脱盐,冻干,得到GSCB粗制品。

1.3.2 组成及分子质量测定

糖含量采用苯酚硫酸法进行测定^[11],以葡萄糖为标准品于波长490 nm处比色。蛋白质组成采用考马斯亮蓝G-250法进行测定^[12],牛血清蛋白为标准品于波长595 nm处比色。分子质量检测采用Sephacryl CL-6B柱层析^[13],以质量分数0.9% NaCl溶液为洗脱液,以2.2 mL/12(min·管)的流速进行洗脱,BSZ-100自动部份收集器收集,苯酚-硫酸法跟踪多糖流出^[14]。以标准葡聚糖为分子质量对照,绘制标准曲线。根据样品流出管数计算分子质量。

1.3.3 液相色谱分析

糖蛋白纯度分析采用液相色谱法^[15],以超纯水配制样品1 mg/mL,0.22 μ m滤膜过滤后进行液相分析,蒸发光检测器检测。

色谱条件:色谱柱TSK4000柱(300 mm \times 7.8 mm, 8 μ m);流动相为超纯水;流速0.2 mL/min;上样量10 μ L。

1.3.4 糖蛋白中单糖的组成分析

采用PMP柱前衍生法进行单糖组成分析^[16]。样品经2 mol/L的三氟乙酸水解后,与等体积0.5 mol/L PMP-甲醇混合,于70℃条件下反应30 min,水复溶后以质谱进行单糖组成检测。色谱条件:色谱柱Silgreen ODS C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);柱温30℃;流动相20 mmol乙酸铵-乙腈(78:22, V/V);流速1 mL/min。

质谱条件:电喷雾离子源;喷雾电压4.5 kV;毛细管温度275℃;毛细管电压37 V;鞘气40 AU;辅助气10 AU;正离子模式检测;扫描方式为全扫描;质量扫描范围 m/z 100~2 000。

1.3.5 糖蛋白中蛋白质的氨基酸组成分析

参照依利特公司AAK氨基酸分析系统进行实验。分别取8 mg样品加入2个安瓿瓶中,分别加3 mL 6 mol/L盐酸溶液和3 mL 4 mol/L NaOH溶液至安瓿瓶,酒精喷灯高温拉丝封口,于110℃进行酸水解和碱水解,时间24 h。将水解后的样品转入蒸发皿,80℃水浴蒸干,用衍生缓冲液将蒸干物溶解并转移进25 mL容量瓶定容。经0.45 μ m微孔滤膜过滤,备用。取经过滤的样液5 mL定容至25 mL棕色容量瓶,加入2.5 mL 2,4-二硝基氟苯溶液混匀,60℃水浴,暗处反应60 min。反应完毕后冷却至室温,加平衡缓冲液定容,静置片刻,用0.45 μ m微孔膜过滤,取10 μ L进样。

色谱分离条件: ODS C_{18} 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 柱温27 $^{\circ}$ C; 流速1.2 mL/min; 检测波长360 nm。流动相A: 乙腈-水 (1:1, V/V); 流动相B: 固体组分4.1 g, 加水约950 mL溶解, 冰醋酸调pH值至6.4~6.8, 加10 mL *N,N*-二甲基甲酰胺, 水定容至1 000 mL, 0.45 μ m微孔滤膜过滤, 超声脱气10 min。洗脱条件如表1所示。

表1 GSCB氨基酸组成分析中液相二元梯度洗脱条件

Table 1 Binary gradient elution procedures of liquid chromatography for amino acid composition analysis of GSCB

序号	时间/min	流动相体积分数/%		备注
		A	B	
1	0	16	84	初始状态
2	0.3	16	84	
3	4	31	69	
4	9.5	36	64	
5	17	55	45	
6	28	65	35	
7	34	100	0	
8	36	100	0	
9	38	16	84	恢复初始状态

2 结果与分析

2.1 GSCB的组成成分

1 L刺参水煮液经醇沉提取后得干粉263.7 mg, 测其总糖含量为质量分数6.23%, 蛋白含量为质量分数13.57%。因刺参水煮液中含有大量盐分, 所以需要经过脱盐处理。提取物经透析后得到GSCB。计算其含量为110.5 mg/L。透析后产物总糖含量增加到质量分数11.87%, 蛋白含量增加到质量分数25.47%。由于透析除去了大量盐分, 故多糖和蛋白含量有所提高。刺参多糖是一种糖胺聚糖, 因而采用葡萄糖作为标准品检测糖含量时, 所得含量会低于其糖的真实含量。可见, GSCB中蛋白和多糖成分含量均较高。

2.2 GSCB的组分分析

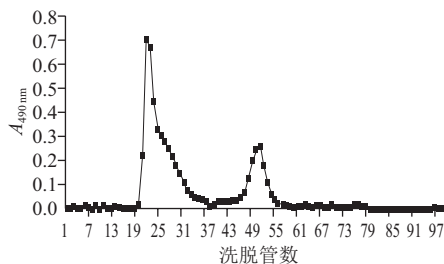


图1 GSCB经过分子筛凝胶Sephrose CL-6B柱的色谱图

Fig.1 Elution profile of GSCB on a Sepharose CL-6B column

GSCB是大分子物质, 以Sephrose CL-6B凝胶层析柱和配备有TSK4000pw凝胶柱的液相色谱对GSCB进行

成分检测。结果见图1、2。两者具有相似的出峰趋势。由图1可知, GSCB主要含有2种大分子糖蛋白, 其中较大的糖蛋白分子质量约为964.3 kD; 较小的糖蛋白分子质量约为2.5 kD。因液相色谱具有较高的分辨率, 图2中显示另有2个峰形较小的糖蛋白出现在高分子质量糖蛋白成分之后。

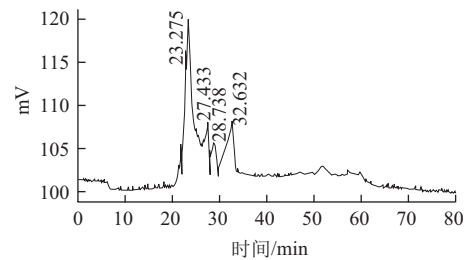


图2 GSCB的凝胶液相色谱图

Fig.2 Elution profile of GSCB by SEC chromatography

2.3 GSCB单糖组成分析

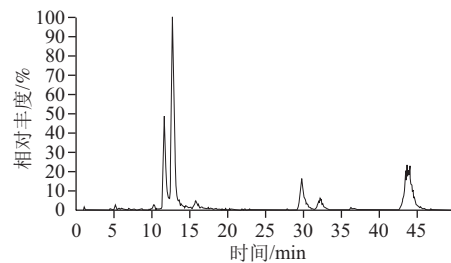


图3 GSCB经PMP衍生化后液相色谱-质谱联用单糖组成分析

Fig.3 LC-MS analysis of monosaccharide composition of GSCB derivatized with PMP

GSCB经PMP衍生化后, 液相色谱-质谱联用分析得到6个主要总离子流峰 (图3)。对照标准单糖的出峰时间与质荷比对GSCB的单糖组成进行定性; 以出峰面积对单糖组成进行定量。由表2可知, GSCB含有6种单糖, 其中氨基葡萄糖、甘露糖和岩藻糖为GSCB的主要成分。这与海参体壁黏多糖是一种酸性黏多糖的报道^[17-19]相符。研究表明酸性黏多糖一般具有抗肿瘤、抗凝血、提高免疫力等一系列的生理活性, 因此GSCB很有可能具有相应的生理活性功能。此外, 有报道^[20]认为海参体内的岩藻聚糖硫酸酯具有抗肿瘤转移作用, 刺参水煮液单糖组成中高占比质量分数 (23.81%) 的岩藻糖暗示其可能具有抗肿瘤转移的活性。

表2 GSCB的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of GSCB

单糖	氨基葡萄糖	甘露糖	氨基半乳糖	葡萄糖	半乳糖	岩藻糖
保留时间/min	11.71	12.79	15.86	29.80	32.20	43.65
峰面积	599 743	1 272 985	65 590	299 422	116 223	743 780
相对含量/%	19.20	40.75	2.10	9.58	3.72	23.81

2.4 GSCB的氨基酸组成分析

表3 GSCB的氨基酸组成
Table 3 Amino acid composition of GSCB

序号	氨基酸	含量/ (g/100 g)	氨基酸模式/ (mg/g)	序号	氨基酸	含量/ (g/100 g)	氨基酸模式/ (mg/g)
1	Asp	7.10	13.92	10	Met	1.15	2.25
2	Glu	6.44	12.63	11	Cys	0.43	0.84
3	Ser	2.54	4.98	12	Ile	2.73	5.35
4	Arg	2.69	5.27	13	Leu	4.02	7.88
5	Gly	2.49	4.88	14	Phe	3.47	6.80
6	Thr	2.86	5.61	15	His	7.64	14.98
7	Pro	2.77	5.43	16	Lys	3.88	7.61
8	Ala	1.84	3.61	17	Tyr	1.69	3.31
9	Val	3.57	7.00	18	Trp	0.51	1.00

对GSCB进行酸水解和碱水解,并与标准品图谱进行比较,得到GSCB的总氨基酸组成情况,如表3所示。根据联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)推荐的理想蛋白质模式,优质蛋白质的必需氨基酸(essential amino acid, EAA)与总氨基酸(total amino acid, TAA)比值应在40%左右, EAA与非必需氨基酸(non essential amino acid, NEAA)比值应大于60%^[21]。从表3可以看出, GSCB中含有18种氨基酸,其中含有8种人体EAA,计算其EAA/TAA为38.38%,计算其EAA/NEAA为62.28%。此外,半必需氨基酸中组氨酸的含量在18种氨基酸含量中最高,计算占TAA比例达到13.21%;精氨酸含量占比为4.65%。由此可见,刺参水煮液中的蛋白成分为高营养蛋白,适宜摄入以补充人体EAA。

2.5 GSCB氨基酸营养评价

表4 GSCB必需氨基酸组成评价
Table 4 Essential amino acid evaluation of GSCB

序号	氨基酸	刺参水煮液氨基酸 模式/(mg/g)	人体蛋白质氨基酸 模式/(mg/g)	FAO/WHO标准 模式/(mg/g)	全鸡蛋蛋白质/ (mg/g)	AAS	CS	EAAI
1	Ile	5.4	4.0	2.5	3.31	1.092	0.825	73.97
2	Leu	7.9	7.0	4.4	5.34	0.914	0.753	
3	Lys	7.6	5.5	3.4	4.41	1.141	0.880	
4	Met+Cys	3.1	3.5	2.2	3.86	0.718	0.409	
5	Phe+Tyr	10.1	6.0	3.8	5.65	1.358	0.913	
6	Thr	5.6	4.0	2.5	2.92	1.144	0.979	
7	Val	7.0	5.0	3.1	4.10	1.152	0.871	
8	Trp	1.0	1.0	0.6	0.99	0.850	0.515	

将GSCB成分的EAA组成与FAO/WHO建议的氨基酸评分标准模式和全鸡蛋蛋白质的氨基酸模式进行比较,得出其氨基酸评分(amino acid score, AAS)、化学评分(chemical score, CS)和必需氨基酸指数(essential amino acid index, EAAI)(表4)。根据表4可知,其限制性氨基酸为Met+Cys,除此之外其AAS及CS数据均接近或大于1,说明GSCB EAA不仅含量高,其合理的构成比例也决定了其高营养价值。EAAI越接近100,食物蛋白与标准蛋白的EAA组成越接近,经计算, GSCB的EAAI高达73.97,远高于中国明对虾(52.58)等高营养价值食品^[22-23]。与人体蛋白质氨基酸模式相比,该模式组成较均衡,且含量丰富,是高生物价蛋白质。此外,其赖氨酸含

量也相当丰富,可以弥补以谷物为主要膳食人群的赖氨酸摄入不足,平衡和提高氨基酸利用率;赖氨酸还是人乳中的第一限制性氨基酸,可作为催乳剂成分。

3 结 论

刺参水煮液副产物中含有大量活性糖蛋白成分,其中主要成分为分子质量约为964.3 kD和分子质量约为2.5 kD的2种糖蛋白物质。GSCB中的多糖是一种酸性黏多糖,含有氨基葡萄糖、甘露糖、氨基半乳糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖。其蛋白成分中含有18种氨基酸,其中含有人体EAA 8种。刺参水煮液作为刺参加工过程中的废弃副产物,其含有多人体所需的营养成分,如果能够对副产物刺参水煮液进行深度加工利用,必将提高我国海参的精深加工程度,减少资源的浪费,带来可观的经济效益。其糖蛋白的结构及营养活性还有待于更深一步的研究。

参考文献:

- [1] 洪佳敏,陈丽娇,梁鹏,等. 海参生物活性成分及其加工现状的研究进展[J]. 科学养鱼, 2014(3): 75-77.
- [2] 苏秀榕,姜永江,常亚青,等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 181-182.
- [3] 蔡彬新,吴成业. 海参多糖的分离纯化方法及其主要生物活性[J]. 福建水产, 2008(3): 70-74.
- [4] 黄日明,王宾,刘永宏. 海参的化学成分及其生物活性的研究概况[J]. 中成药, 2009, 31(8): 1263-1269.
- [5] 闫冰,李玲,易杨华. 海参多糖的生物活性研究概况[J]. 药实践杂志, 2004, 22(2): 101-103.
- [6] 迟玉森,庄桂东,黄福祥,等. 海参多糖对小白鼠伤口愈合的影响[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 211-214.
- [7] 赵玲,耿晓晓,刘淇,等. 刺参水煮液酶解多肽的抗氧化活性[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 69-73.
- [8] 丁建君,杨杰,姜山,等. 刺参水煮液中 α -葡萄糖苷酶活性抑制组分的分离[J]. 产业与科技论坛, 2011, 10(2): 72-73.
- [9] 赵前程,刘先琳,李智博,等. 海参加工废水液中多糖及其组分的分析与回收[J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25(5): 434-439.
- [10] 李天宝,王春利,刘炜,等. 海参加工废水中多糖的提取方法及生物活性研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(5): 19-23.
- [11] 佟海菊,张志胜,孙克岩,等. 苯酚-硫酸法测定海湾扇贝多糖方法的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(10): 447-448.
- [12] 王文平,郭祀远,李琳,等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 115-117.
- [13] 罗耀辉,王昭品,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, 2005, 15(4): 32-34.
- [14] 吴明江,焦丽丽,孙永旭,等. 浒苔多糖EPⅢ的分离与鉴定[J]. 东北师大学报:自然科学版, 2007, 39(1): 97-100.
- [15] ZHU Beiwei, LI Dongmei, ZHOU Dayong, et al. Structural analysis and CCK-releasing activity of a sulphated polysaccharide from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera[J]. Food Chemistry, 2011, 125(4): 1273-1278.
- [16] 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.
- [17] 陈健,郑艾初,肖凯军,等. 糙海参酸性粘多糖的分离及特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 122-126.
- [18] 王远红,吕志华,姜廷福,等. 梅花参中多糖提取工艺及含量测定的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(6): 987-990.
- [19] 李熙灿,曾和平,杨世柱. 黑海参多糖组成的研究[J]. 广州化学, 1998(1): 17-22.
- [20] 王静凤,张珣,李辉,等. 海参岩藻聚糖硫酸酯抗肿瘤转移作用研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2012, 31(2): 14-19.
- [21] 王爱英,许鹏,崔喜艳,等. 微拟球藻蛋白质含量和氨基酸组成分析[J]. 山东师范大学学报:自然科学版, 2014, 29(1): 137-140.
- [22] 徐革峰,王裕玉,白庆利,等. 江鳕肌肉营养成分分析与品质评价[J]. 动物营养学报, 2013, 25(12): 3027-3032.
- [23] 孙雷,周德庆,盛晓风. 南极磷虾营养评价与安全性研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 57-64.