

一种新的褐藻胶寡糖制备方法——氧化降解法

杨 钊¹, Li Jin-ping^{1, 2}, 张真庆¹, 管华诗¹

(1 中国海洋大学 海洋药物与食品研究所, 山东 青岛 266003; 2 Institute of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala S-751 23 Sweden)

摘要:建立了一种新的褐藻胶寡糖的制备方法,即氧化降解法。通过褐藻胶来源的聚甘露糖醛酸(PM)在不同浓度的过氧化氢、不同温度和不同反应时间下降解优选降解条件。以包含 3~11 糖单体的寡糖混合物为目标产物,以相应的降解产物的平均分子质量为 1500u 为选择标准,获得氧化降解法的最佳条件:过氧化氢浓度 5%,反应温度 90℃,降解时间 2h。以该条件降解 PM 获得的降解产物经圆二色谱、紫外光谱及红外光谱测定表明,制备的寡糖保持了甘露糖醛酸的结构特点。提示该方法可用于褐藻胶寡糖的制备。

关键词:过氧化氢;降解;褐藻胶;寡糖

中图分类号:R284 文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2004)07-0019-03

褐藻胶(algin)是褐藻细胞壁的填充物质,是由甘露糖醛酸(Mannuronic acid, M)和古罗糖醛酸(Guluronic acid, G)结合而成的直链线性嵌段型高聚物。其分子质量较大,在 $10^4 \sim 10^6$ u之间^[1]。如此高的分子质量,使其应用受到限制。通过各种降解方法制备的褐藻胶寡糖,在糖化学、糖生物学、糖工程以及糖类药物研究等领域具有重要的研究价值。近年来,褐藻胶寡糖的生物活性研究取得了重要进展,特别是在抗肿瘤^[2]、促进生长^[3]及抗老年痴呆^[4]等研究方面取得了显著进展。褐藻胶可以用很多方法进行降解,包括酶降解法、物理降解法和化学降解法。如聚甘露糖醛酸(PM)裂解酶和聚古罗糖醛酸(PG)裂解酶的降解机理为 β -消除反应,可以断裂1 \rightarrow 4糖苷键,在非还原端C₄~C₅之间形成双键^[5]。物理降解法包括辐射法、超声降解法等,一般与其他降解方法一起使用,降解产物的极限分子质量为50ku左右,不易制得寡糖^[6]。化学降解法以酸降解为主,使用的酸包括草酸、盐酸、硫酸和甲酸等^[7]。酸降解法存在的缺点是反应耗时长,一般需4~12h,且三废污染严重,产品外观色泽差。曾有用过氧化氢降解法降解壳聚糖等多糖的报道。Nordveit等^[8]发现,当多糖溶液中含有过氧化氢时,溶液的粘度迅速下降,且下降的速度比酸水解快,可以获得外观洁白的降解产物。受其启发,作者首次用过氧化氢直接降解褐藻胶来源的PM,筛选了最佳降解条件,并初步分析了寡糖的结构特点。

1 实验材料

1.1 原料与试剂

PM由中国海洋大学兰太药业有限公司提供,GPC测定方法测定分子质量为8235u(大约为40个甘露糖醛酸残基),根据其圆二色谱图确定其甘露糖醛酸含量在95%以上。所用化学试剂均为分析纯试剂。

1.2 实验仪器

515型高效液相色谱仪,410型示差检测器(RI detector),均为美国Waters公司;TSK G 300(PWXL)(7.8mm \times 300mm)凝胶柱,日本Tosoh公司;J-715圆二色谱仪,日本Jasco公司;NEXUS-470智能型红外光谱仪,美国Nicolet公司;R-410型旋转蒸发仪,瑞士

收稿日期:2004-03-30 修回日期:2004-05-12

基金项目:国家基础研究重大项目前期研究专项;海洋生物多糖的化学与生物学研究——生物细胞膜“天线分子”模拟(2000CCA01600)资助项目的部分内容

作者简介:杨钊(1971-),男,山东临清人,中国海洋大学讲师,博士研究生,从事海洋多糖的研究。电话:0532-2031790 E-mail: yangzhao@ouc.edu.cn;管华诗(1939-),通讯作者,男,山东夏津人,中国海洋大学教授,中国工程院院士,电话:0532-2032951

Büchi 公司。

2 实验方法

2.1 降解条件的优选

取一定量的 PM, 用适量的蒸馏水溶解, 使样品溶液的终浓度为 8%。设计反应温度为 60 °C 和 90 °C, 过氧化氢浓度为 2%, 5% 或 8%。在反应过程的不同时间, 取出适量的反应液, 放至室温。用 4 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液调 pH 至 2.85 滤纸过滤除去不溶解的部分。滤液在搅拌下缓缓加入 3 倍量的 95% 乙醇, 放置过夜。醇沉液抽滤, 沉淀用无水乙醇脱水并烘干。

取少量不同条件下制备的甘露糖醛酸寡糖溶于 2.84% Na₂SO₄ 溶液中, 使其终浓度为 5 g/L, 用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 取 20 μL 用 GPC 测定分子质量, 测定条件为: TSK G 3000PWXL 凝胶柱先用 2.84% Na₂SO₄ 在 0.5 mL/min 流速平衡, 柱温为 40 °C。检测器为 410 型示差检测器 (RI detector)。以标准葡聚糖为分子质量标准品, 根据 6 个不同分子质量标准样的出峰时间, 绘制标准曲线。样品的洗脱数据经 GPC 软件处理, 得到样品的分子质量。

用 GPC 方法测定不同降解条件下产生的寡糖分子质量, 绘制降解曲线, 从中优选出最佳的降解条件。

2.2 氧化降解甘露糖醛酸寡糖结构的初步研究

以最佳降解条件制备的寡糖为样品, 取适量溶于蒸馏水中, 使样品的终浓度为 2 g/L 左右, 以 J-715 型圆二色谱仪进行测定。同时取适量寡糖, 溶于蒸馏水, 稀释到合适的浓度, 于 UV-2102 紫外可见分光光度计 190~400 nm 间扫描, 得到紫外吸收光谱图。取 0.5 mg 寡糖, 加入干燥 KBr 粉末充分混合研细, 在压片机上压成透明薄片, NEXUS-470 智能型红外光谱仪进行红外光谱测定。

对上述各种谱图进行解析并参照相关文献, 初步确定氧化降解甘露糖醛酸寡糖的结构特点。

3 实验结果

3.1 最佳的降解条件的确定

以分子质量 8 235 u (约 40 个甘露糖醛酸残基) 的 PM 为原料, 在不同温度、不同过氧化氢浓度条件下降解一定时间, 得到降解程度不同的寡糖混合物。GPC 法测定这些样品的分子质量, 根据各样品的分子质量绘制不同降解条件下的降解曲线, 如图 1、2 所示。

从降解曲线可以看出, 产物的分子质量 1 h 之内下降很快, 2 h 之后下降很缓慢, 3 h 时基本不再变化。当过氧化氢的浓度一定时, 降解反应的温度越高,

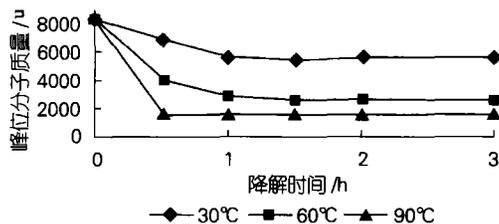


图 1 5% 过氧化氢在不同温度下降解 PM 的曲线
Fig. 1 Curves of 5% hydrogen peroxide depolymerized polymannuronate acid at different temperatures

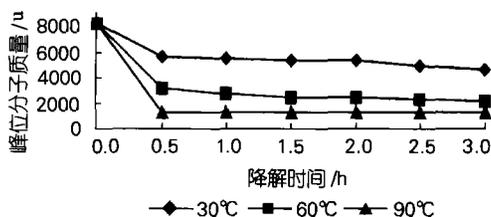


图 2 8% 过氧化氢在不同温度下降解 PM 的曲线
Fig. 2 Curves of 8% hydrogen peroxide depolymerized polymannuronate acid at different temperatures

PM 分子质量降低越快, 产生的寡糖混合物分子质量越小。以过氧化氢浓度 5% 为例, 90 °C 时, 产物的分子质量 0.5 h 内降至 2 ku 以下, 而 30 °C 时, 产物的分子质量 1 h 内降至 6 ku 左右。当降解温度一定时, 过氧化氢的浓度越高, PM 分子质量降低越快, 产生的寡糖混合物分子质量越小。

GPC 法测定的分子质量是一种平均分子质量。当样品的分子质量为 1.5 ku (7 个甘露糖醛酸残基) 左右时, 该寡糖混合物包含三糖至十一糖。这样的分子质量分布为下一步制备系列寡糖单体提供了物质基础。因此以降解产物的分子质量为 1.5 ku 为最佳降解条件的筛选标准。由此, 综合考虑各种因素, 符合该标准的最佳降解条件为: 反应体系含 5% 的过氧化氢, 90 °C 的水浴搅拌下反应 2 h。采用所选最佳降解条件进行寡糖的大量制备。

3.2 氧化降解甘露糖醛酸寡糖结构初步分析

对所得降解产物进行圆二色谱、紫外光谱及红外光谱分析。在圆二色谱图中 200 nm 左右处的峰与 212 nm 左右处的谷的比可以反映样品的 M 含量与 G 含量之比。由氧化降解甘露糖醛酸寡糖的圆二色谱图可以得出, 该寡糖的甘露糖醛酸含量在 95% 以上, 即氧化降解法制备的寡糖的糖醛酸组成未发生变化。

当分子中有双键等共轭结构时, 会在紫外区有特

异性吸收峰。如酶解寡糖由于非还原端 C₄~C₅位之间有双键,在 235nm 处有最大吸收峰^[10]。由氧化降解甘露糖醛酸寡糖的紫外吸收光谱图可以看出,该寡糖在紫外区无特异性吸收峰,说明其结构与酶解褐藻胶寡糖的不同,非还原端 C₄~C₅位之间没有双键。

红外光谱可以对化合物中官能团进行鉴定。从图 3 可以得出, 3407cm⁻¹为羟基的伸缩振动, 1611cm⁻¹为羧酸盐的羰基的非对称伸缩振动, 而 1721cm⁻¹左右为游离羧酸的羰基伸缩振动, 1414cm⁻¹为羧基中 C—O 键的伸缩振动, 1306cm⁻¹为羧基中 O—H 键的变角振动, 1086cm⁻¹为环内醚的伸缩振动, 1044cm⁻¹为 C—O—H 键的伸缩振动, 954cm⁻¹为吡喃糖环的非对称伸缩振动, 879cm⁻¹为端基的 C—H 键的变角振动, 805cm⁻¹为多/寡聚甘露糖醛酸的特征吸收峰。由以上红外光谱数据可以看出,氧化降解甘露糖醛酸寡糖结构中含有羧基、羟基和甘露糖醛酸环等。

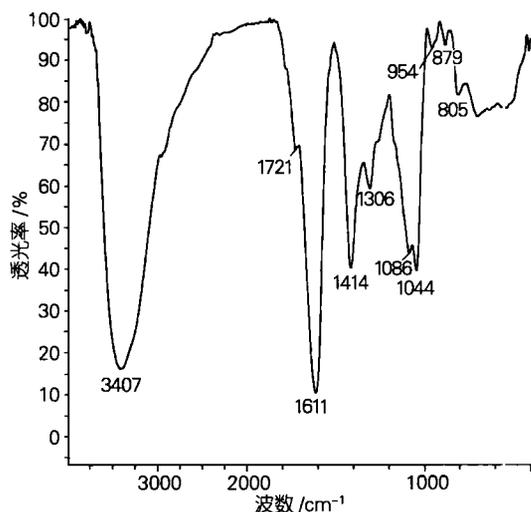


图 3 氧化降解甘露糖醛酸寡糖的红外光谱图

Fig. 3 IR spectrum of oligomannuronate acid depolymerized by hydrogen peroxide

综合以上各种图谱给出的信息可以得出,氧化降解法制备的寡糖仍保持甘露糖醛酸的结构特点。

4 讨论

作者首次采用过氧化氢直接降解 PM 制备了寡糖。在较高的温度下,过氧化氢的降解作用一般只能维持 1.5~2h。在这段时间里,过氧化氢对 PM 产生降解作用。2h 后降解产物的分子质量就基本不再发生变化。可以认为反应已经基本完成。如 90℃ 时,降解反应在 2h 左右完成。这种现象与过氧化氢自身的化学性质有关。过氧化氢极易分解,易挥发,特别是在

高温情况下,分解更快。当过氧化氢耗尽时,降解反应基本中止。

与酶降解法相比,过氧化氢降解法工艺简单,可直接醇沉制备寡糖,无须去除裂解酶,且制备的寡糖分子中没有双键,结构和理化性质稳定。与酸降解法相比,氧化降解法制备的寡糖色泽洁白,产率高(60%)。并且降解反应快,“三废”污染少,易于大规模工业化生产。

过氧化氢降解多糖的机理目前还不清楚。比较公认的降解机理是:过氧化氢在反应体系中会产生羟自由基(·OH),导致 PM 的降解。羟自由基随机地进攻任意长度的糖链上的任意一个糖残基的 C-1 位的氢,发生分子内的重排,断裂 1→4 糖苷键,产生分子质量较小的糖。因此产生的寡糖混合物包括分子质量大小不一的系列寡糖。这为从寡糖混合物中分离纯化寡糖单体打下物质基础。

本研究为制备褐藻胶寡糖提供了一种新的方法,为其他海洋多糖的降解提供了借鉴。现已经开始进行寡糖的分离纯化,并取得了初步成果。

参考文献:

- 翟耀 Cook W H, Smith D B. Molecular weight and hydrodynamic properties of sodium alginate. *翟耀 Can J Med Sci* 1954; 33(3): 227-230
- 翟耀 Iwamoto Y, Xu X, Tamura T, et al. Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytosine production in human mononuclear cells. *翟耀 Biosci Biotech Biochem* 2003; 67(2): 258-263
- 翟耀 Quoc H N, Naotsugu N, Xuan T L. Growth-promotion of plants with depolymerized alginate by irradiation. *翟耀 Radiat Phys Chem* 2000; 59: 97
- 翟耀 陈醜,耿美玉,管华诗,等. 褐藻多糖 GS 201 对脑神经细胞生存的影响. *翟耀 中国海洋药物杂志*, 2001(1): 20-22
- 翟耀 Wong T Y, Preston L A, Schiller N L. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles and applications. *翟耀 Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 289-340
- 翟耀 Toshio Y, Keiko N, Kengo T, et al. Ultrasonic degradation of schizophyllum commune polysacchiide in dilute aqueous solution. *翟耀 J Appl Polym Sci* 1983; 28: 873-878
- 翟耀 Rehm B H A. Alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* CFV M1 prefers the hexameric oligomannuronate as substrate. *翟耀 FEMS Microbiol Lett* 1998; 165(1): 175-180
- 翟耀 Nordveit R J, Vånum K M, Smids O D. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *翟耀 Carbohydr Polym* 1994; 23(4): 253-260

Oxidation depolymerization——a new method for preparation of alginate oligosaccharides

YANG Zhao¹, LI Jin-ping^{1, 2}, ZHANG Zhen-qing¹, GUAN Hua-shi¹

(¹ Marine Drug and Food Institute, Ocean University of China, Qingdao 266003 China; ² Institute of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala S-751 23 Sweden)

Received: Mar. 30 2004

Key words: hydrogen peroxide; depolymerization; alginate; oligosaccharides

Abstract: A new method——oxidation depolymerization was reported for the preparation of alginate oligosaccharides. The optimum depolymerizing condition of polymannuronate acid were selected from the different concentrations of hydrogen peroxide, temperature and time. The harvest sample of 3~11 oligomers with molecular mass about 1500u was selected as the optimum depolymerizing condition. Results showed that using 5% hydrogen peroxide depolymerized 2h at the 90 °C was most effective. The Circular Dichroism (CD), Ultraviolet-spectrophotometry (UV) and Infrared spectrometry (IR) confirmed the structure of oligosaccharides were the same as the polysaccharides, indicating that oxidation depolymerization could be used to prepare alginate oligosaccharides.

(本文编辑:谭雪静)