

Verkefnaskýrsla
23 - 05



Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

SEPTEMBER 2005

**MÆLINGAR Á LÍFVIRKUM EFNUM
Í ÍSLENSKU SJÁVARFANGI**

UPPSETNING MÆLIÐFERÐA

Margrét Geirsdóttir
Katrín Ásta Stefánsdóttir

Mælingar á lífvirkum efnum í íslensku sjávarfangi

Uppsetning mæliaðferða

Margrét Geirsdóttir og Katrín Ásta Stefánsdóttir

Rannsóknstofnun fiskiðnaðarins

Reykjavík september 2005

Skýrsluágríp Rannsóknastofnunar fiskiðnaðarins

Icelandic Fisheries Laboratories Report Summary



Titill / Title	Mælingar á lífvirkum efnum í íslensku sjávarfangi ~Uppsetning mæliaðferða~ / Bioactive compounds in Icelandic seafood ~Methodology~		
Höfundar / Authors	Margrét Geirsdóttir og Katrín Ásta Stefánsdóttir		
Skýrsla Rf / IFL report	23-05	Útgáfudagur / Date:	Sept. 2005
Verknr. / project no.	1634		
Styrktaraðilar / funding:	AVS		
Ágríp á íslensku:	<p>Efnin saponin og kondróitín sulfat eru dæmi um efni sem finnast í sjávarfangi og eru talin hafa jákvæð áhrif á heilsu manna, með öðrum orðum þau hafa lífvirkni. Lífvirk efni eru undirstaða þess að hægt sé að framleiða fæðubótarefni og markfæði en þessar vörur eru mjög eftirsóttar í nútíma samfélagi.</p> <p>Við Íslandsstrendur finnst fjölbreytt lífríki sem í dag er einungis nýtt að hluta. Sem dæmi um sjávarfang sem talið er að innihaldi þessi lífvirku efni eru sæbjúgu og skötubörð. Nauðsynlegt er að mæla þessi lífvirku efni í íslensku sjávarfangi til að það eigi möguleika á markaði sem fæðubótarefni og markfæði.</p> <p>Í þessari skýrslu eru kynntar aðferðir til að mæla lífvirku efni saponin og kondróitín sulfat. Ef þessi lífvirku efni finnast í íslensku sjávarfangi hefur opnast leið til að nýta enn betur lífríkið við Íslandsstrendur og auka verðmæti sjávarfangs.</p>		
Lykilorð á íslensku:	Lífvirk efni, uppsetning mæliaðferða, saponin, chondroitin sulfat, sæbjúgu		
Summary in English:	<p>The chemicals Chondroitin sulfate and Saponin are known for their bioactive properties having wide positive effects on human health. Bioactive properties are the base for production of functional foods. The market for functional foods is big and is increasing rapidly.</p> <p>To make it possible for Icelandic seafood to be competitive on this market it's important to be able to measure the content of those chemicals in Icelandic raw material. In this project the aim is to set up methods to measure Chondroitin sulfate and Saponin. In that way it is possible to increase the value of Icelandic seafood in the future.</p>		
English keywords:	Bioactive properties, chemical analysis, saponin, chondroitin sulfate, sea cucumber.		

Efnisyfirlit

1. Inngangur	4
2. Aðferðir	5
2.1. Saponin.....	5
Saponin einangrun.....	5
Hemólítískur stuðull (Haemolytic index).....	6
2.2. Chondroitin Súlfat	6
3. Ályktanir.....	6
4. Heimildir	6
5. Viðauki	7

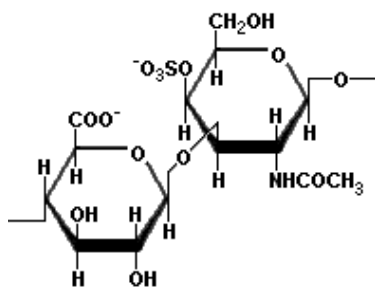
1. Inngangur

Við Íslandsstrendur finnst fjölbreytt lífríki sem í dag er einungis nýtt að hluta. Sem dæmi um sjávarfang sem hingað til hefur ekki verið nýtt eru sæbjúgu (*Cucumaria frondosa*) (mynd 1).



Neysla sæbjúgna er að mestu bundin við Asíu og eru það aðallega Kínverjar sem neyta þeirra. Í Kína er löng hefð fyrir neyslu sæbjúgna gegn ýmsum krankleikum svo sem þreytu, getuleysi, vandamálum í blöðruhálskirtli og liðabólgu [1, 2]. Sæbjúgu eru eftirsótt vara, bæði vegna neyslueiginleika en ekki síður vegna þeirra jákvæðu áhrifa sem þau eru talin hafa á heilsu manna. Matvæli sem hafa jákvæð áhrif á heilsu manna eru sögð hafa lífvirkni og eru notuð við framleiðslu á fæðubótarefnum og markfæði (Functional foods).

Í seinni tíð hafa verið gerðar ýmsar rannsóknir á því hvaða efni bera ábyrgð á þessari markfæðisvirkni sæbjúgna. Sýnt þykir að aðallega saponin og kondróítín sulfat (chondroitin sulfate) séu þau efni sem gefa sæbjúgunum hina jákvæðu eiginleika (mynd 2).



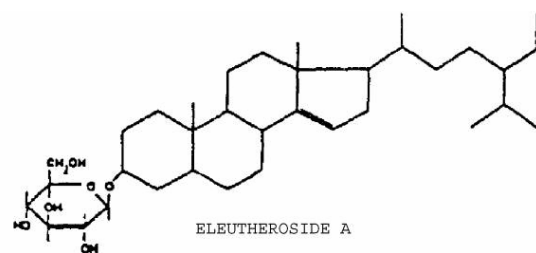
Mynd 2. Kondróítín sulfat (til vinstri) og saponin.

Saponin hefur verið nefnt Gingsen hafsin, bæði vegna virkni sinnar en einnig efnasamsetningar sem minnir á byggingu virkra efna í gingseni. Miklar rannsóknir fara nú fram á virkni saponins. Sem dæmi má nefna að rannsóknir hafa sýnt að saponin hefur drepanði áhrif á HIV veiruna sem veldur alnæmi [3]. Kondróítín sulfat er meðal annars talið hafa góð áhrif á liði og er selt sem fæðubótarefni í töfluformi [2].

Stærstu markaðir fyrir sæbjúgu eru í Austurlöndum fjær en markaðir hafa einnig opnast á Vesturlöndum á undanförunum árum vegna aukins áhuga á notkun þeirra í fæðubótarefni og markfæði. Vegna aukinnar eftirspurnar hefur framboð á sæbjúgum frá hefðbundnum svæðum ekki verið nægjanlegt sem hefur leitt af sér hátt verð. Það er því tækifæri til að koma sæbjúgum frá nýjum svæðum inn á markaðinn.

Aðalástæða fyrir neyslu sæbjúgna í Asíu er hin jákvæðu áhrif þeirra á heilsu. Erfitt getur reynst að afla markaða fyrir íslensk sæbjúgu í Asíu ef ekki eru til mælingar sem sýna fram á að svipað magn lífvirkra efna finnist í íslenskum sæbjúgum og erlendum. Til að það sé mögulegt að sæbjúgu frá Íslandi geti reynst gjaldgeng á markaði er mikilvægt að geta sýnt fram á að eiginleikar hinna lífvirku efna þeirra séu sambærilegir við þau sæbjúgu sem þegar eru á markaði.

Í þessu verkefni var aðalmarkmiðið að þróa og setja upp mæliaðferðir á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins til að mæla magn og/eða virkni þeirra eftirsóttu efna sem finnast í sæbjúgum. Með uppsetningu á þessum aðferðum fæst ekki einungis tækifæri til að mæla magn efnanna í íslenskum sæbjúgum og gera mögulega nýtingu á þessu vannyta hráefni heldur einnig til að mæla efnin í öðru íslensku sjávarfangi. Til dæmis er þekkt að kondróítín sulfat finnst í skötubörðum [4].



Ef þessi lífvirku efni finnast í íslensku sjávarfangi hefur opnast leið til að nýta enn betur lífríkið við Íslandsstrendur og auka verðmæti sjávarfangs.

2. Aðferðir

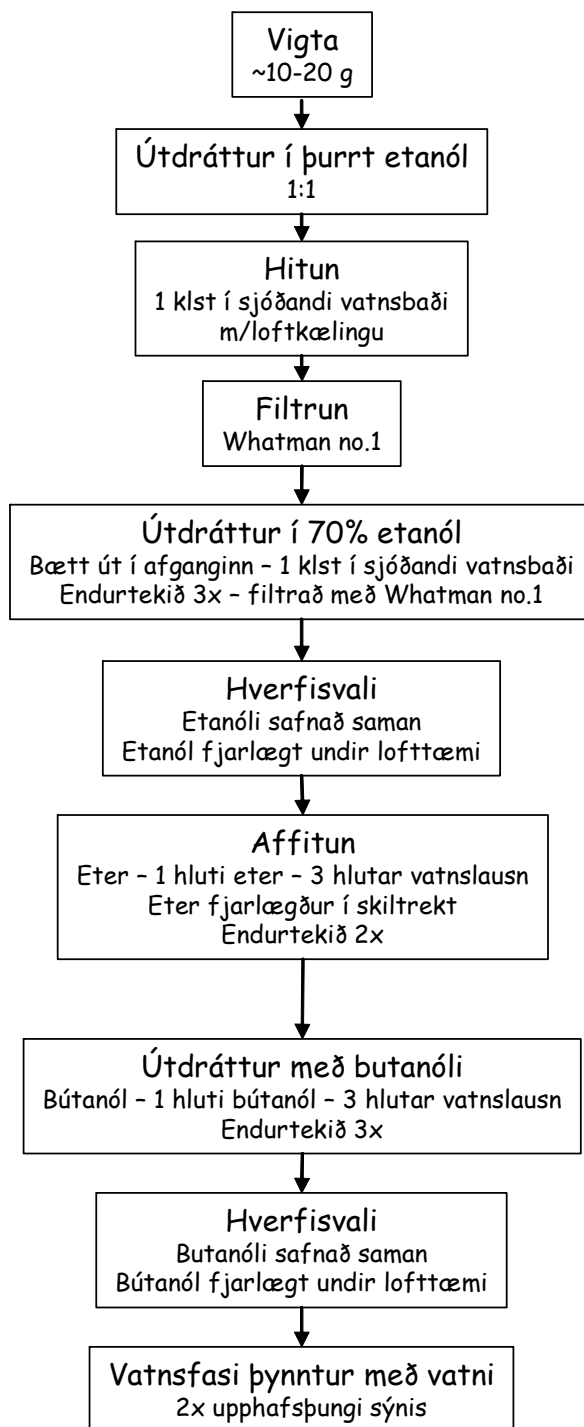
2.1 Saponin

Saponin er yfirflokkur yfir flokk efna. Mjög dýrt og tímafrekt er að mæla hvert þessara efna. Mikilvægara er að kanna heildarmagn efna-flokksins. Einn eiginleika saponins er að það getur rofið frumuhimnu rauðra blóðkorna. Annar eiginleiki þeirra er leysanleiki í mismunandi lausnum. Með því að nota ákveðna röð af leysum er hægt að einangra saponin frá öðrum efnunum. Að lokum er svo nefndur hemólýtískur stuðull reiknaður út frá hæfni hins einangraða fasa til að rjúfa rauð blóðkorn. Með samanburði við staðlaröð er hægt að reikna magn saponins í sýninu.

Saponin einangrun

Saponin er einangrað á eftirfarandi hátt (mynd 3) [4]. Sýni vigtað (10 til 20 g), sett í suðufloesku ásamt sama magni af þurrri (100%) etanóli og hitað í eina klukkustund í vatnsbaði með loftkælingu. Eftir klukkustund er etanólið síað og sama magn af 70% etanóli bætt út á sýnin og blandan hituð upp að nýju. Þetta er endurtekið tvisvar sinnum og eftir hverja hitun er lausnin síuð með Whatman no. 1 súpappír. Etanóli safnað saman og fjarlæggt undir lofttæmi í hverfisvala (rotovapor). Að þessu loknu er vatnsfasi eftir sem inniheldur hin eftirsóttu saponinefni. Fita er fjarlægð úr vatnsfasa með því að nota eter á eftirfarandi hátt. Út í vatnsfasa er bætt 1/3 hluta af eter sem eftir blöndun og aðskilnað er fjarlægður í skiltrekt (Separatory Funnel) (mynd 4). Affitun endurtekin tvisvar sinnum.

Að lokum er saponin dregið út í bútanól þrisvar sinnum í 1/3 rúmmál vatnsfasa í hverjum útdrætti. Bútanól fjarlæggt í skiltrekt með pípettu (toppfasi). Butanól fasar sameinaðir og bútanól fjarlæggt undir lofttæmi í hverfisvala. Efni sem eru til staðar eftir að bútanól hefur verið fjarlæggt eru leyst upp í vatni. Þyngd vatns á að vera tvöfalt magn upphaflegrar þyngdar sýnis. Þessi lausn er notuð sem sýni fyrir mælingar á hemólýtískum stuðli.



Mynd 3. Saponin útdráttur fyrir mælingu á hemólýtískum stuðli.



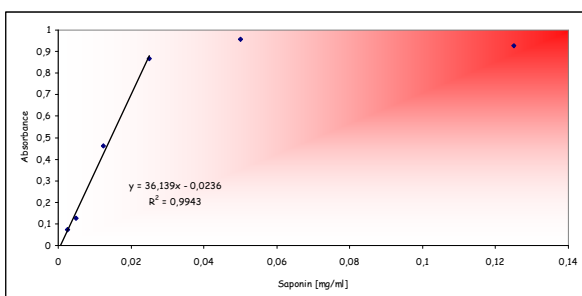
Mynd 4. Skiltrekt notuð við saponin einangrun.

Hemólítískur stuðull (Haemolytic index)

Hemólítískur stuðull er mældur á eftirfarandi hátt [6]: Kindablóð í Alsever's lausn er keypt til dæmis hjá Rannsóknastofu Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum. Þanta þarf á föstudegi og er blóðið keyrt út á mánudagsmorgni (2005). Fyrst þarf að einangra heil rauð blóðkorn með því að þvo burt rofnar himnur. Fyrst eru þrjú ml af blóði þvegnir með salt-fosfat stuðpúðalausn pH 7,2 (PBS – sjá viðauka). Þvottur er framkvæmdur tvisvar sinnum með PBS, fyrst með 7 ml og síðan 10 ml og að því loknu einu sinni með 10 ml af 0,9% NaCl (w/v) lausn. Á milli þvotta er lausnin sett í skilvindu (~350xg) og efri fasa (supernatant) hent. Botnfasi að loknum þvotti er nefndur þvegin rauð blóðkorn (Packed sheep blood cells) og er notaður í næstu skref.

Einn millilítri af þvegnum rauðum blóðkornum er þynntur að 200 ml með 0,9% NaCl lausn. Við hverja mælingu er blandað saman 5 ml af þynntum blóðkornum og 0,5 ml af sýni í tilraunaglassi, blandað vel og látið standa í 30 mínútur við 30°C. Að því loknu skilvindað (5 mínútur, 4500 rpm, borðskilvinda) og gleypni mæld í toppfasa við 540 nm í 1 cm kúvettu í ljósmæli.

Saponin úr Quillaja berki (Sigma S4521) er notað sem staðall í staðalkúrva. Saponinmagn yfir 0,025 mg/ml gefur 100% hemólýsu samkvæmt mynd 5, frumuhimnur allra rauðra blóðkorna sem eru til staðar hafa verið rofnar.



Mynd 5. Staðalkúrfa fyrir hemólýtískan staðal. Saponin úr Quillaja berki (Sigma S4521).

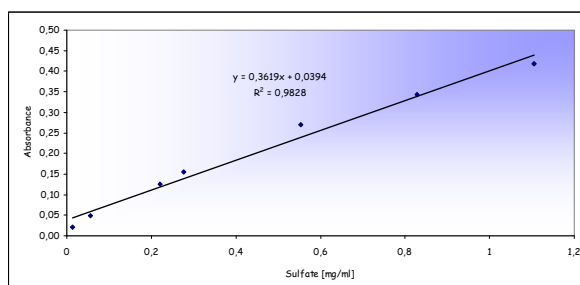
2.2 Kondróítín Súlfaat

Kondróítín súlfaat er mælt á eftirfarandi hátt [7,8]: Sýni vigtað í mæliflösku og 0,5 ml af 90% maurusýru (formic acid) bætt í fyrir hver 30 mg af þurrefni í sýni. Teflontappi settur á flöskuna og sýnið hitað við 100°C í 6 klst. Þá er 2,5 ml af eimuðu vatni bætt í fyrir hver 30 mg þurrefni og lausnin hituð áfram í tvær klst við 100°C. Lausn með 3,8 ml af 4% þríklóróedik-

sýru (Trichloroacetic acid) og einum ml af BaCl₂-gelatin lausn (sjá fyrir neðan) búin til og 200 µl af sýni bætt við. Eftir 20 mínútur við herbergishita er gleypni mæld við 360 nm í ljós-gleypnimæli.

Lausn af BaCl₂-gelatin er búin til á eftirfarandi hátt. Fyrst er búin til 0,5% gelatinlausn í 65°C heitu vatni og geymd yfir nótt við 4°C. Lausnin er látin standa í tvær klukkustundir við herbergishita fyrir notkun. Því næst eru tvö grömm af BaCl₂ leyst upp í 400 ml af 0,5% gelatin lausninni.

Staðalkúrva er búin til með kalíum sulfáti (K₂SO₄) (mynd 6). Kondróítín sulfat magn er reiknað með því að margfalda sulfat magn með 2,2 sem er umbreytingarstuðull fyrir hlutfall mólmassa kondróítín sulfats og barium sulfats.



Mynd 6. Staðalkúrfa fyrir kondróítín sulfat þar sem notað er kalíum sulfat.

3. Ályktanir

Vel tókst til að setja upp mæliaðferðir til að mæla saponin og kondróítín sulfat.

Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins hefur nú möguleika á að mæla þessi efni í íslensku sjávarfangi og auka möguleika á því að framleiða lífvirkar afurðir til framleiðslu á fæðubótarefnum og markfæði. Hefur því opnast möguleiki til að auka nýtingu á því sjávarfangi sem finnst við strendur Íslands og auka verðmæti sjávarafurða.

4. Heimildir

- [1] <http://www.seacucumber.cn/english/theory.asp>
- [2] <http://www.psoriasis.com/seacucumber.html>
- [3] Newman MJ, Wu JY, Gardner BH, Anderson CA, Kensil CR, Recchia J, Coughlin RT, Powell MF (1997). Induction of cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte responses specific for HIV-1 gp120 using saponin adjuvant (QS-21) supplemented subunit vaccine formulations. *Vaccine*, **15**: 1001-1007.
- [4] Lignot B., Lahogue V. and Bourseau P. (2003). Enzymatic extraction of chondroitin sulfate from skate

cartilage and concentration-desalting by ultrafiltration. *J. Biotechnol.*, 103: 281-284.

- [5] Mackie AM, Singh HT and Owen JM (1977). Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.*, **56**: 9-14.
- [6] Matsuno T, Sakushima A and Ishida T (1973). Seasonal variations of saponin and its distribution in the body of sea-cucumber, *Stichopus japonicus*. *Bull. of the Jap. Soc. Sci. Fish.*, **39**: 307-310.
- [7] Park DC, Gu YS, Ji CI and Kim SB (2001). Enzymatic hydrolysis conditions for preparation of Sea Cucumber hydrolysates containing Chondroitin sulfate. *Food Sci. Biotechnol.*, **10**: 86-689.
- [8] Dodgson KS (1961). Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *J. Biochem.*, **78**: 312-319.

5. Viðauki

Saltfosfat-stuðpúðalaun - PBS (Phosphate-buffered Saline)

Grunnlausn

Setjið í 100 ml mæliflösku:

80 ml H₂O

3,38g Na₂HPO₄·2H₂O Di-

Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat

Þegar það er uppleyst bæta við

0,79 g NaH₂PO₄·H₂O -

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat

Fylla að marki með afjónuðu vatni

Vinnulaun

Í 1L mæliflösku:

800 ml H₂O

40 ml grunnlaus

8,5 g NaCl

Þegar efni eru uppleyst fylla að marki með afjónuðu vatni.

Stilla sýrustig á pH 7,2 með 1M NaOH/ 1M HCl