

# 鲟鱼头骨多糖的提取及性质研究

黄琪琳, 陈若雯, 丁玉琴, 熊善柏

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北省水产品加工工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 以鲟鱼头骨为原料, 采用稀碱和酶法相结合的方法提取鲟鱼骨多糖, 经乙醇沉淀并冷冻干燥后得到产品。通过单因素和正交试验对提取工艺进行优化, 并对产品进行组分分析和初步结构鉴定。研究表明, 以多糖得率为检测指标, 确定的最佳条件为: NaOH 浓度 3wt%, 浸提时间 6h, 酶添加量 0.6%, 酶解时间 5h。成品的氨基己糖、己糖醛酸、总硫酸基、N-硫酸基含量分别为 18.79%、21.91%、15.96%、13.32%, 组成多糖的氨基己糖鉴定为氨基半乳糖。

**关键词:** 鲟鱼头骨; 多糖; 提取; 性质

## Preparation and Properties of Polysaccharide from *Acipenser schrenckii* Skull

HUANG Qi-lin, CHEN Ruo-wen, DING Yu-qin, XIONG Shan-bo

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Aquatic Product Engineering and Technology Research Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** By the step-by-step procedure of dilute alkali extraction, trypsinase-catalyzed hydrolysis, protein removal by trichloroacetic acid, ethanol precipitation, and freeze-drying, crude polysaccharide was obtained from *Acipenser schrenckii* skull. The conditions of dilute alkali extraction and trypsin-catalyzed hydrolysis were optimized by single factor analysis and orthogonal test. Furthermore the prepared product was subjected to composition and structural analysis. Results showed that the optimal extraction and hydrolysis conditions were as follows: extracting crushed dry *Acipenser schrenckii* skull for 6 h with 3wt% alkali solution, and hydrolyzing the extract for 5 h with trypsinase dosage of 0.6%, respectively. The contents of hexosamine, hexosuronic acid, total sulfate group and N-sulfate group in the polysaccharide were 18.79%, 21.91%, 15.96% and 13.32%, respectively. Moreover, the hexosamine component in this polysaccharide was identified as galactosamine.

**Key words:** *Acipenser schrenckii* skull; polysaccharide; extraction; property

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)12-0135-05

软骨中的多糖属于糖胺聚糖<sup>[1]</sup>, 它是一类重要的生理活性物质, 目前主要用于动脉粥样硬化、病毒感染等疾病的治疗<sup>[2]</sup>, 还发现它具有抗凝血、抗血栓、抗癌、降血脂等作用, 具有很大的研发价值<sup>[3]</sup>。家禽、鲨鱼类的动物是目前主要的软骨来源, 但家禽的软骨产量很低, 鲨鱼多是靠自然捕捞, 其来源也会受到资源的限制和季节的影响<sup>[4]</sup>。因此, 需要进一步寻找其他易得而又稳定的软骨资源, 以满足市场的需求<sup>[5]</sup>。鲟鱼的软骨含量很高, 而且中华鲟人工繁殖技术已经获得成功, 鲟鱼养殖业发展迅速, 养殖生产已经形成了一定的规模。因此, 鲟鱼可能成为更理想的软骨资源<sup>[6]</sup>。

糖胺聚糖 (GAG) 只是相应蛋白聚糖整体分子结构中的“含糖片段”, 具有羧基和硫酸基, 由 N-乙酰-D-

氨基己糖和己糖醛酸(或半乳糖)通过不同的糖苷键组成二糖重复单元构成<sup>[7]</sup>。糖胺聚糖通过共价键与蛋白聚糖的核心蛋白连接, 还通过静电作用或立体化学效应和其他蛋白质结合。因此, 软骨多糖的制备需要使与之结合的蛋白质降解<sup>[8]</sup>。目前常用以下三种方法提取: 碱提取法、蛋白酶水解法及中性盐提取法, 其中以酶法水解最好, 具有产物降解少而产量高等优点<sup>[9]</sup>。本实验以中华鲟头骨为原料, 采用稀碱和酶法相结合的工艺提取软骨多糖, 研究软骨多糖的提取分离及部分理化性质, 为鲟鱼软骨多糖的活性研究和深加工利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期: 2008-11-25

基金项目: 武汉市青年科技晨光计划资助项目(200850731358)

作者简介: 黄琪琳(1974-), 女, 讲师, 博士, 主要从事食品大分子(多糖、蛋白质)的结构与功能研究。

E-mail: whuhql@126.com

鲟鱼头骨 山峡鲟业公司。

胰蛋白酶 拜尔迪生物技术有限公司；其他试剂均为分析纯；实验用水均为蒸馏水。

电热干燥箱、分光光度计、电子天平、pH计、台式离心机、紫外光谱仪、红外光谱仪、真空冷冻干燥机。

## 1.2 方法

### 1.2.1 鲟鱼软骨多糖的提取工艺流程

鲟鱼头骨→粉碎→碱提→调pH值→胰蛋白酶酶解→脱蛋白→乙醇沉淀→离心，得沉淀→冷冻干燥→成品

### 1.2.2 操作要点

原料预处理：将鱼头解冻后切成块，投入沸水浴中煮2~3min，捞起用水洗净，除去肌肉和油脂，50℃恒温电热干燥箱中烘干5h，粉碎。

碱提：称取5g粉碎后的软骨，加入6倍体积的2%、3%、4%、5%、6%、7%的NaOH于40℃摇床中提取2、3、4、5、6、7h，浸提完全后于4000r/min离心机离心10min，取上清液滴加6mol/L HCl调节pH值为8.5<sup>[8,10]</sup>。

酶解：加入0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%的胰蛋白酶，在50℃酶解1、2、3、4h。

脱蛋白：酶解完加入3%三氯乙酸沉淀蛋白，过滤后的滤液用6mol/L HCl调节pH值至6.0。

醇沉、干燥：在酶解液中加入3倍体积的95%(V/V)乙醇，4℃静置过夜后离心，沉淀用少量无水乙醇洗涤两次后，冷冻干燥得多糖成品<sup>[10-11]</sup>。

### 1.2.3 检测方法<sup>[12]</sup>

总糖含量的测定：苯酚-硫酸法；还原糖含量的测定：Somogyi-Nelson法，多糖含量=总糖含量-还原糖含量；可溶性蛋白的测定：考马司亮蓝法；氨基己糖的测定：Elson-morgan法，根据标准曲线将样品的吸光度换算得到氨基己糖含量(%), 并通过吸光度的比值( $A_{610}/A_{510}$ )判断氨基己糖是氨基半乳糖( $A_{610}/A_{510} \approx 1$ )还是氨基葡萄糖( $A_{610}/A_{510} \approx 10$ )；己糖醛酸的测定：硫酸-咔唑法；硫酸基团的测定：玫瑰酸钠法，根据标准曲线将吸光度换算得到N-硫酸基和总硫酸基含量(%)。

### 1.2.4 多糖结构鉴定

紫外光谱分析：将多糖产品配制成1mg/ml的溶液，以蒸馏水做空白对照，在波长190~500nm之间扫描得紫外扫描图谱。

红外光谱分析：将多糖产品经溴化钾压片，于红外光谱仪上扫描，扫描范围为4000~600 $\text{cm}^{-1}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取工艺研究结果

#### 2.1.1 碱液浓度对多糖含量的影响

在40℃条件下，经预处理的头骨按料液比为1:6(V/V)加入2%、3%、4%、5%、6%、7%的NaOH溶液中，浸提4h，离心，测定上清液中的多糖含量，考察碱液浓度对多糖含量的影响(图1)。

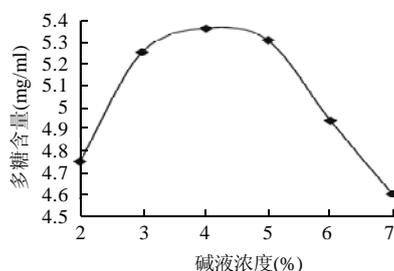


图1 碱液浓度对多糖含量的影响

Fig.1 Effects of alkali concentration on production of polysaccharide

图1显示，多糖含量随着碱液浓度的提高先增加后又变为逐渐降低的趋势，且随着碱液浓度的提高，提取液颜色变深，故确定4%为最佳碱提取浓度。在稀碱溶液中，由于-O-糖肽链的开裂( $\beta$ -消去反应)，使多糖从蛋白聚糖中释出<sup>[7]</sup>。而多糖分子上的硫酸基较稳定，一般不会断裂而改变分子大小和结构，不会影响软骨多糖的活性<sup>[4-5]</sup>。但在强碱作用下部分糖苷键可能因碱处理而断裂，而且碱浓度升高，软骨中的一些其他物质的溶解度增大，造成提取物中的杂质含量增加，使糖含量相对降低<sup>[3]</sup>。

#### 2.1.2 浸提时间对多糖含量的影响

在40℃条件下，经预处理的头骨按料液比为1:6(V/V)加入4% NaOH溶液中，浸提2、3、4、5、6、7h，离心，测定上清液中的多糖含量。浸提时间对多糖含量的影响见图2。

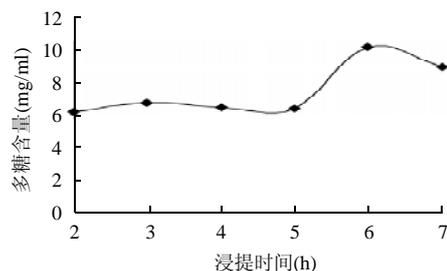


图2 碱提时间对多糖含量的影响

Fig.2 Effects of duration of alkali extraction on production of polysaccharide

由图2可看出，6h为最佳提取时间。提取时间过长，原料中的黏多糖发生的 $\beta$ -消去反应速度减慢，糖链的释放会逐渐停止。而且碱提时间过长会造成对糖链反应过度(副反应)，例如发生于糖链还原端外切的去皮反应，使多糖结构发生变化<sup>[7]</sup>。同样，随着碱提时间的延长，软骨中的一些其他物质的溶解度增大，造成

提取物中的杂质含量增加,使糖含量相对降低。

2.1.3 加酶量对多糖含量的影响

在40℃条件下,经预处理的头骨按料液比为1:6(V/V)加入4% NaOH溶液中,浸提6h,离心,取上清液调节pH值至8.5,加入0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%的胰蛋白酶后于50℃酶解4h。加酶量对多糖含量的影响见图3。

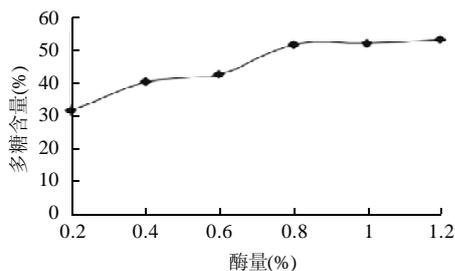


图3 加酶量对多糖含量的影响

Fig.3 Effects of trypsinase dosage on production of polysaccharide

由图3可看出,多糖含量随着加酶量的提高呈先增加后逐渐平缓的趋势,加酶量超过1.0%时多糖含量基本趋于平缓,此时加酶量达到饱和,反应速度不再随酶量的增加而加快<sup>[13]</sup>。而酶作为一种蛋白质,残留在酶解液中成为杂质,给三氯乙酸沉淀除杂蛋白会带来困难,因此确定加酶量1.0%为最佳加酶量。

2.1.4 酶解时间对多糖含量的影响

在40℃条件下,经预处理的头骨按料液比为1:6加入4% NaOH溶液中,浸提6h,离心,取上清液调节pH值至8.5,加入1.0%(酶量与软骨之比)胰蛋白酶50℃酶解1、2、3、4h。酶解时间对多糖含量的影响见图4。

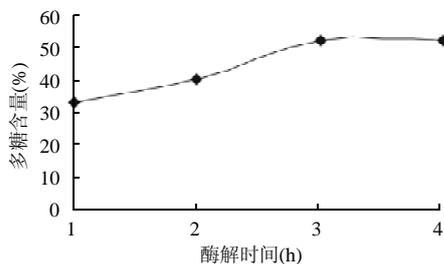


图4 酶解时间对多糖含量的影响

Fig.4 Effects of hydrolysis duration on production of polysaccharide

由图4可看出,提取中酶解时间超过3h时,酶促反应时间的延长并没有使多糖含量上升。这可能是因为胰蛋白酶在pH值低于6.0的条件下比较稳定,而在较高pH值条件下会发生自我消化而遭到破坏,且随着时间的延长,这种不可逆破坏作用增加<sup>[14]</sup>。此外,未被破

坏的酶分子可以利用变性酶分子作为底物,即胰蛋白酶酶解变性胰蛋白酶,随着时间的延长,具有活性的酶分子数量减少,导致酶解物中糖含量不再增加。故确定酶解时间选用3h。

2.1.5 正交试验结果

针对提取工艺中的四个关键因素,以碱液浓度、浸提时间、加酶量、酶解时间为试验因素,以多糖得率为检测指标,设计L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验。正交试验设计见表1,结果见表2。

表1 正交试验因素水平表  
Table 1 Factors and levels of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test

水平	因素			
	A 碱液浓度(%)	B 浸提时间(h)	C 加酶量(%)	D 酶解时间(h)
1	3	5	0.6	3
2	4	6	0.8	4
3	5	7	1	5

表2 正交试验结果

Table 2 Results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test and range analysis

试验号	A	B	C	D	多糖得率(%)
1	1	1	3	1	49.97
2	1	2	1	3	50.36
3	1	3	2	2	40.17
4	2	1	2	3	29.89
5	2	2	3	1	39.47
6	2	3	1	2	32.48
7	3	1	3	2	45.45
8	3	2	1	3	46.53
9	3	3	2	1	31.91
K <sub>1</sub>	352.01	313.90	323.88	302.08	
K <sub>2</sub>	255.11	316.91	277.91	296.24	
K <sub>3</sub>	309.97	286.29	315.30	318.78	

表3 正交试验结果方差分析表

Table 3 Analysis of variance for results of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F值	p值
模型	6760.01	8	845.00	4.94	0.0024
碱液浓度	4722.03	2	2361.01	13.80	0.0002
碱提时间	569.46	2	284.73	1.66	0.2171
加酶量	1194.85	2	597.43	3.49	0.0523
酶解时间	273.68	2	136.84	0.80	0.4646
误差	3078.51	18	171.03		

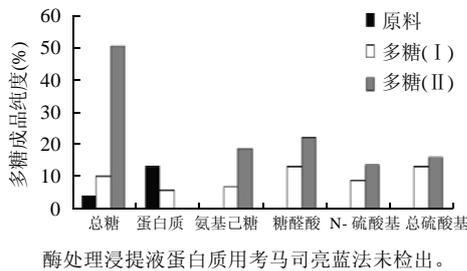
由表3可知,碱液浓度对提取物的多糖含量影响较大,其次为加酶量,浸提时间和酶解时间影响较小。通过直观分析和综合考虑,最优组合为A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即碱液浓度为3wt%、碱提时间为6h、酶解时间为5h、胰蛋白酶用量为0.6%。

因此, 鲟鱼多糖最佳提取工艺为: 以 3wt% 的 NaOH 为提取溶剂, 在 40℃ 下摇床振荡提取 6h, 碱提液在 4000r/min 离心 10min, 取上清液, 调 pH 值至 8.5, 加入 0.6% 的胰蛋白酶, 于 50℃ 下酶解 5h。

## 2.2 产品成分分析与鉴定

### 2.2.1 理化指标

原料经过稀碱提取、脱蛋白、乙醇沉淀、冷冻干燥得到多糖产品 I。原料经稀碱提取、蛋白酶酶解、脱蛋白、乙醇沉淀、冷冻干燥后得到多糖产品 II, 对其成分进行比较分析, 结果见图 5。



酶处理浸提液蛋白质用考马斯亮蓝法未检出。

图5 产品成分分析与鉴定

Fig.5 Composition comparison among *Acipenser schrenckii* skull, polysaccharide (product I) prepared by the procedure used in this study and polysaccharide (product II) prepared by the procedure without trypsinase-catalyzed hydrolysis

稀碱条件可以使蛋白聚糖的糖-肽键断裂, 释放糖链, 而软骨中的其他蛋白质如胶原蛋白和黏蛋白在稀碱条件下不易水解, 且在一定条件下与黏多糖共溶于碱提液中, 从而影响提取效果。而胰蛋白酶可作用于蛋白质分子中的某些肽键, 使胶原蛋白和黏蛋白等水解成短肽或氨基酸, 再根据氨基酸与黏多糖在某些溶剂中的溶解性不同, 实现多糖与其他杂质的提取分离。酶法条件温和, 不会引起黏多糖发生降解<sup>[15]</sup>。因此软骨经碱提、酶解后得到的多糖 II 纯度比没有经酶解的多糖 I 高。

软骨黏多糖为氨基己糖和己糖醛酸交替结合而成的长链分子, 在这些线型长链分子上分布着组成和数量不同酸性基团, 其中主要为羧基和硫酸根离子, 它们具有和带正电荷离子和大分子相互作用的能力, 又称为聚阴离子, 因此具有多种生物活性<sup>[16]</sup>。由图 5 看出, 硫酸根离子等成分经酶解后纯度均有显著提高, 故黏多糖的提取以碱酶法较好, 较之碱法提取的多糖其纯度增长了几倍, 相应成分纯度也有较显著的提高。测定氨基己糖时  $A_{1100}/A_{1320} \approx 1$ , 故产品中所含氨基己糖为氨基半乳糖<sup>[12]</sup>。

### 2.2.2 紫外吸收光谱

将多糖产品 II 配制成 1mg/ml 的溶液, 以蒸馏水做空白对照, 在波长 190~500nm 之间扫描得紫外扫描图谱如图 6 所示。

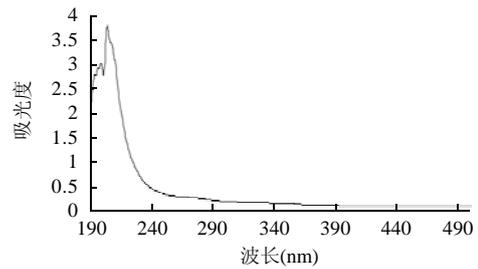


图6 碱酶法提取的多糖的紫外光谱

Fig.6 UV spectrum of product I

图 6 表明, 样品在波长 200nm 附近有糖的较强吸收峰, 而在 260 和 280nm 处无明显吸收峰, 说明多糖中几乎不含有核酸和蛋白质。

### 2.2.3 红外光谱鉴定

将多糖产品 II 经溴化钾压片, 于红外光谱仪上扫描, 扫描范围为 4000~600 $\text{cm}^{-1}$ , 结果见图 7。

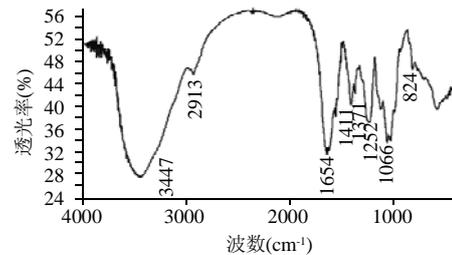


图7 碱酶法提取的多糖的红外光谱

Fig.7 IR spectrum of product I

如图 7 所示, 产品多糖的红外吸收光谱显示典型的硫酸黏多糖的吸收特征, 与透明质酸有相似的吸收峰<sup>[17]</sup>。表明样品在 3400 $\text{cm}^{-1}$  处有强 O-H 和 N-H 的伸缩振动特征吸收峰, 存在多糖羟基; 1240 $\text{cm}^{-1}$  及 820 $\text{cm}^{-1}$  (存在硫酸基) 有特征吸收峰, 且为 C<sub>6</sub> 位上的硫酸根, 在 1400~1320 $\text{cm}^{-1}$  处有 C-O 伸缩振动和 O-H 弯曲振动耦合产生的两个吸收峰, 说明存在糖醛酸上游羧基结构和多糖羟基结构; 均在 1650 $\text{cm}^{-1}$  处有 C=O 伸缩振动特征吸收峰, 表明存在乙酰氨基结构, 这些基团均为黏多糖的特征基团<sup>[18-23]</sup>。

## 3 结论

经过单因素试验和正交试验确定鲟鱼头骨软骨多糖的最佳提取工艺为: NaOH 浓度 3wt%、浸提时间 6h、酶添加量 0.6%、酶解时间 5h。多糖提取液经脱蛋白、乙醇沉淀、冷冻干燥后得到白色粉末产品。经成分分析和初步结构鉴定, 成品的氨基己糖、糖醛酸、总硫酸基、N-硫酸基含量分别为 18.79%、21.91%、15.96%、13.32%。测定氨基己糖实验确定组成多糖的氨基己糖为

氨基半乳糖。多糖红外光谱图显示黏多糖特征基团—NH—、—COO—、—NHCOCH<sub>3</sub>及C<sub>6</sub>位上的SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>的吸收峰。

#### 参考文献:

- [1] 吴辉辉, 桑卫国, 罗红宇. 赤鲟软骨粘多糖制备的研究进展与应用前景[C]//第二届中国食品研究生论坛论文集, 2005: 1019-1021.
- [2] 王琨, 叶继丹, 赵吉伟, 等. 鲟鱼软骨对小鼠生长及肝损伤的保护作用研究[J]. 集美大学学报, 2005, 10(3): 200-205.
- [3] 陈晶. 鲟鱼软骨多糖制备工艺注射液及降脂作用的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2004.
- [4] JOON-SOO S, A-RANG I, SEUNG M C, et al. Evaluation of chondroitin sulfate in shark cartilage powder as a dietary supplement: raw materials and finished products[J]. Food Chemistry, 2007, 101: 532-539.
- [5] 王琨, 叶继丹, 刘永. 鲟鱼软骨主要营养成分分析及评价[J]. 营养学报, 2006, 28(2): 187-188.
- [6] 舒坤贤, 张继承. 中华鲟硫酸软骨素提取工艺[J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 151-155.
- [7] 朱丹. 鲟鱼软骨多糖的研究[D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2004.
- [8] 肖凯军, 李琳, 郭远, 等. 鲨鱼软骨多糖及其分离、纯化和应用[J]. 上海水产大学学报, 1999, 18(2): 163-169.
- [9] 盛家荣, 曾令辉. 多糖的提取、分离及结构分析[J]. 广西师范学院学报, 1999, 16(4): 49-54.
- [10] 叶振南, 邵家坪. 粗多糖的提取、分离及结构研究[J]. 中国药事, 2000, 5(14): 329-332.
- [11] 张崢, 耿芳宋, 高华. 猪软骨中硫酸软骨素的分离纯化[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(3): 144-146.
- [12] 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.
- [13] 江龙法, 吴胜军. 鲨鱼软骨粘多糖的制备工艺研究[J]. 淮海工学院学报, 2000, 9(1): 49-52.
- [14] LEE E S, PARK K H, KANG D M. Protein complexed with chondroitin sulfate in poly (lactide-co-glycolide) microspheres[J]. Biomaterials, 2007, 28(17): 2754-2762.
- [15] GARNJANAGOONCHORN W, WONGEKALAK L, ENKAGUL A. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage[J]. Chemical Engineering and Processing, 2007, 46: 465-471.
- [16] CLARE M G, JAMES W F. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system[J]. Brain Research Reviews, 2007, 54(1): 1-18.
- [17] 李东霞, 李德良, 张双全. 鲨鱼软骨多糖的理化性质与DNA分子相互作用的研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(5): 40-43.
- [18] 宋过剩, 曹珍年. 硫酸软骨素的提取与分析鉴定[J]. 现代科学仪器, 2003(3): 60-61.
- [19] 王长云, 管诗华, 李八方. 扇贝氨基多糖的红外光谱分析[J]. 海洋湖沼通报, 1994(3): 39-44.
- [20] 王旭珍, 张秀香, 徐士良. 刺参酸性粘多糖的分离鉴定[J]. 烟台师范学院学报, 1999, 15(3): 213-216.
- [21] 王亚, 陈彦, 夏树开, 等. 硫酸软骨素制备工艺的优化[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(1): 12-14.
- [22] 高华, 刘坤, 于兹东, 等. 硫酸软骨素生产新工艺研究[J]. 青岛大学学报, 2003, 18(4): 55-58.
- [23] ANANDA S A, GLORIA O, QIU X D, et al. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of chondroitin-6-sulfate[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68: 116-121.