

# 羊软骨粘多糖提取与分离

苏现波<sup>1</sup>, 刘安军<sup>2</sup>

(1.河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071001;

2.天津科技大学食品科学与生物工程学院, 天津 300122)

**摘 要:** 本文通过对羊软骨粘多糖的几种提取方法的比较, 得出最佳的提取方法, 并分析了其原因; 然后将提取的粘多糖经二乙氨基乙基纤维素(DEAE-纤维素)进行初步分离。

**关键词:** 羊软骨; 粘多糖; 提取; 分离

## Extraction and Separation of Mucopolysaccharide of Goat Cartilage

SU Xian-bo<sup>1</sup>, LIU An-jun<sup>2</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Hebei Agriculture University, Baoding 071001, China;

2.College of Food Science and Bioengineering, Tianjin Sci-technology University, Tianjin 300122, China)

**Abstract:** The object of this paper is to extract mucopolysaccharide from goat cartilage and separate the extraction by Diehlaminoethy so as to determine the optimal extraction and separation technology. In addition, the reason is analyzed in this paper.

**Key words:** goat cartilage; mucopolysaccharide; extraction; separation

中图分类号: Q538

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)05-0099-04

羊软骨是羊屠宰加工的副产品, 来源丰富, 含有胶原蛋白、粘多糖、氨基酸及丰富的钙、磷等矿物质。其中粘多糖的含量较高, 它是由氨基己糖和己糖醛酸交替结合而成的不分支的长链聚合物, 是一类杂多糖, 在这些线形长链的分子上分布着组成和数量不同的酸性基团, 其中主要为羧酸根离子和硫酸根离子<sup>[1]</sup>; 粘多糖具有多种生理活性物质。例如抗病毒、抗凝血及提高机体免疫力等。

由于羊软骨是羊体内的一种高致密组织(主要由软骨细胞和含有胶原蛋白及大量蛋白多糖的细胞外基质构成), 具有较强的粘弹性和抗张力强度。因此必须充分破坏软骨致密的立体结构, 最大限度的降解软骨, 才能使软骨粘多糖、蛋白质等有效成分尽可能地释放出来, 才能有效的提取粘多糖。

虽然植物多糖和软骨鱼类多糖的提取和分离已经有过详细报道, 牛软骨也有类似报道, 但从羊软骨中提取和分离粘多糖还未曾见到有过类似报道, 本实验对羊软骨粘多糖进行了提取和初步分离。

### 1 料与方法

#### 1.1 原料 新鲜羊软骨(市售)。

收稿日期: 2003-08-04

作者简介: 苏现波(1978-), 男, 研究生, 研究方向为功能性食品。

#### 1.2 试剂

氢氧化钠, 氯化钠, 盐酸, 硫酸, 咔唑, 葡萄糖醛酸, 甲醇, 考马斯亮蓝, 阿里新兰, 丙烯酰胺, 过硫酸铵, 十二烷基磺酸钠, N,N-亚甲基双丙烯酰胺, 异丁醇, 氯仿, 甘氨酸, 三羟甲基氨基甲烷, 硫酸钾, 硫酸铜, 硼酸, 二乙氨基乙基纤维素。

#### 1.3 主要仪器、设备

核酸蛋白检测仪, 中空纤维膜过滤器, 离心机, 稳压稳流电泳仪, 凯氏定氮仪, 垂直电泳槽, 强力电动搅拌机, 真空干燥箱, 旋转蒸发器, 多功能振荡器, 电热恒温水浴锅, 紫光扫描仪, 切片机。

#### 1.4 软骨的处理

##### 1.4.1 前处理

市售新鲜羊软骨刮去残留物, 清洗干净、凉干, 将其冷冻后, 用羊肉切片机将其切成1~2mm厚度的细条状。

##### 1.4.2 除脂

取一定量的软骨条将其浸于氯仿、甲醇、水(1:2:0.8)的混合液中, 振荡过夜。捞出软骨条后用大量的水冲洗残留液体, 凉干。将其切碎后备用。

##### 1.4.3 干物质含量测定<sup>[2]</sup>

取经上述处理过的羊软骨 20g, 将其平铺在表面皿(已经烘干)上, 准确称量总重  $W_1$ , 然后置于 110℃ 的真空干燥箱中烘干 2h, 取出后迅速称量其总重  $W_2$ 。

干物质的含量  $= (W_1 - W_2) / 20 \times 100\%$

### 1.5 粘多糖的提取

羊软骨粘多糖的提取不同于高等植物、微生物和藻类, 后者的细胞比较脆弱, 结构相对松散, 一般采用研磨法、组织捣碎法、超声波法、压榨法等方法。但是软骨中的粘多糖链通过次级键形成, 因而提取和分离粘多糖仅仅是依靠破坏次级键的作用是不够的, 而必须以降解蛋白质的方法, 破坏多糖与蛋白质的共价键结合, 方能达到粘多糖的提取目的<sup>[3]</sup>。采用蛋白酶水解法是一种有效的提取软骨粘多糖的方法, 但其成本相对较高。本实验对提取和初步纯化粘多糖的方法进行了初步探讨。

#### 1.5.1 碱提取法

此方法包括两种途径。一种是浓碱不加热法; 另一种是稀碱加热法。具体做法如下。

**浓碱法** 将软骨 200g 溶于一定量的碱液中, 使其终浓度为 1.2mol/L, 搅拌 36h, 软骨可消化完毕, 然后用稀盐酸(1mol/L)将其 pH 调节至 pH=3.0 为止, 3000r/min 离心 20min, 去除沉淀(主要为 II 型胶原蛋白和少部分杂蛋白), 向上清液中缓慢加入食盐, 至沉淀产生最多为止, 2000r/min 离心 15min。离心后的上清液经中空纤维膜过滤器处理以去除小分子的多肽和非多糖物质, 浓缩后即得到粘多糖的粗提物。

**稀碱法** 将 200g 软骨溶于一定量的碱液中, 使其终浓度为 0.3mol/L, 70℃ 搅拌 3h, 软骨即可以完全消化, 然后按上述浓碱法处理。

#### 1.5.2 酸提法

在一定量的 0.1mol/L 的盐酸和 0.05mol/L 的硫酸中各加入 200g 软骨, 至于 70℃ 的水浴中搅拌 6h, 直至软骨消化完毕。然后用氢氧化钠中和盐酸提取液; 用碳酸钙中和硫酸提取液, 3000r/min 离心 20min, 去除沉淀。向上清液中缓慢加入食盐, 至沉淀产生最多为止, 2000r/min 离心 15min。去除沉淀后的液体经中空纤维滤膜过滤器处理以去除小分子的多肽和非多糖物质, 浓缩后即得到粘多糖的粗提物。

### 1.6 粘多糖的含量测定

#### 1.6.1 标准曲线的绘制

分别计算各浓度葡萄糖醛酸标准溶液 3 次吸光度的平均值, 绘制标准曲线见图 1。

回归方程为:  $Y = 0.004x + 0.0038$  ( $R^2 = 0.9991$ )。

#### 1.6.2 咔唑法测定各提取物的多糖含量<sup>[4]</sup>

软骨粘多糖占干物质的百分含量 =

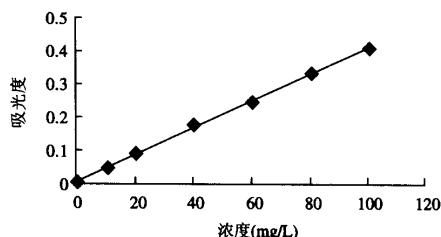


图1 标准曲线图

$$\frac{\text{粘多糖的质量}}{200 \times 20.5\%} \times 100\%$$

用此方法提取的粘多糖中常含有较多的蛋白质, 因此必须除去, 去除蛋白一般采用那些使蛋白质沉淀而多糖不沉淀的试剂, 如酚、三氯乙酸、鞣酸等, 近来多采用 Sevag<sup>[5]</sup>法, 用氯仿:戊醇(或丁醇)=4:1 比例混合后, 加到样品中振摇, 样品中的蛋白质变性成不溶状态, 存留在氯仿和水交接面, 可离心除去。但此操作须重复多次处理, 不仅费时而且多糖的损失较多。本实验采用二乙氨基乙基纤维素(Diehlinowthy)简称 DEAE-纤维素为交换剂, 其功能基团为  $-O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH + (CH_2CH_3)_2$ 。

#### 1.7.1 DEAE-纤维素的活化

将所用的二乙氨基乙基纤维素用 1mol/L 的氢氧化钠浸泡 4h, 用蒸馏水清洗至 pH=7.0; 加入 1mol/L 的盐酸继续浸泡 4h 后, 再用蒸馏水清洗至中性; 重新用 1mol/L 的氢氧化钠浸泡 4h, 使用之前用蒸馏水清洗至中性。

#### 1.7.2 层析分离<sup>[6]</sup>

经活化的 DEAE-纤维素装入 800 × 25mm 的离子交换柱中。量取一定量的粘多糖的粗提液从交换柱的顶部加入。固定流速为 1ml/min, 用蠕动泵加入 pH 为 7.0, 浓度分别为 0.2、0.4、0.6mol/L 氯化钠溶液洗脱。用自动收集器收集洗脱流出液。

各取 2ml 的洗脱液, 用酒精将其沉淀并去除离子。然后用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)定性分析洗脱液中所含成分, 电泳结果如下: 图 2 是用考马斯亮蓝(CBB)染色的蛋白带, 图 3 是用阿里新兰(Alcian Blue)染色的同一块儿胶板的粘多糖电泳带。泳道 1 为 0.2mol/L 的氯化钠洗脱液所含的蛋白质和多糖; 泳道 2 为 0.4mol/L 的氯化钠洗脱液所含的蛋白质和多糖; 泳道 3 为 0.6mol/L 的氯化钠洗脱液所含的蛋白质和多糖。

#### 1.8 洗脱液中粘多糖的含量测定

收集各洗脱液, 准确量取各洗脱液的体积, 用咔唑法测定其多糖的含量。凯氏定氮法测定各洗脱液的蛋白质含量<sup>[4]</sup>。

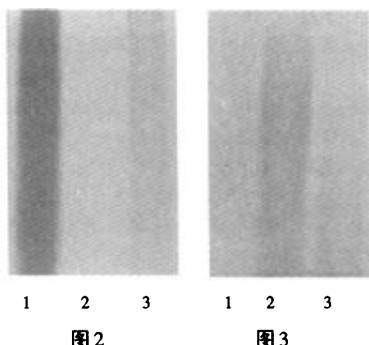


图2

图3

## 2 结果与讨论

羊软骨粘多糖的提取过程中, 软骨与碱或酸的充分接触是提高消化速度的一个关键因素。由于此反应为固液反应, 和固相表面积有重要关系。在一定范围内软骨量越大, 表面积越大与碱或酸接触的反应物越多, 降解速度也相应变快。所以软骨的碎切是提高反应速度的一个重要的途径。

羊软骨中干物质的含量为 20.5%(经三次重复测定所得的平均值)。盐酸提取液的粘多糖占羊软骨干物质的质量百分含量为 3.80%; 硫酸提取液的粘多糖占 3.68%; 浓碱提取液的粘多糖占 9.54%; 稀碱提取液的粘多糖占 11.32%。由此结果可知: 两种酸所提取的粘多糖的得率无太大的差别; 碱提法的粘多糖得率高于酸提法(原因可能是酸性条件引起多糖的糖苷键的断裂, 从而不易于粘多糖的提取); 在两种碱提法中稀碱加热法比浓碱法提取率要高, 但是必须控制碱浓度和加热的温度。其原因如下: 在碱提法中, 随提取液的氢氧化钠的浓度升高, 提取率也随之升高, 最后达到平衡。有资料<sup>[7]</sup>显示氢氧化钠浓度在 1mol/L 范围内时, 当氢氧化钠的浓度增加到 0.3mol/L 以后, 再增加氢氧化钠的浓度并不能显著增加粘多糖的提取率。说明碱浓度增加一方面可增加软骨的降解速度; 另一方面粘多糖的降解速度也随之增加, 从而粘多糖的得率并未显著升高。同时当氢氧化钠的浓度提高后, 提取液颜色变深并出现异味<sup>[8]</sup>。温度升高加速了软骨的降解速度, 在一定程度上有利于粘多糖的提取, 同时温度升高也可引起蛋白质和粘多糖发生副反应, 所以必须把提取温度控制在适当的范围内。本实验发现当提取液的氢氧化钠的浓度为 0.3mol/L, 提取温度升高到 50℃时, 提取液颜色(与 20℃基本相同)略显淡黄色、基本无异味; 提取温度升高到 60℃时, 提取液为淡黄色、基本无异味; 提取温度升高到 70℃时, 提取液为黄色、稍有异味; 当提取温度升高到 80℃时, 提取液变成橙红色、异味较强。

由于此实验过程中粘多糖的粗提液经过中空纤维膜

过滤器处理后, 粗提物中的大分子物质为粘多糖和蛋白质的混合物, 基本不存在分子量小于 5000 的小分子杂质, 并不影响阴离子吸附剂(二乙氨基乙基纤维素)对蛋白质和粘多糖的吸附。粘多糖的粗提物经二乙氨基乙基纤维素吸附后, 分别用 0.2、0.4、0.6mol/L 氯化钠溶液洗脱, 各洗脱液电泳结果显示: 泳道 1 中有大量蛋白质被洗脱下来, 未见有清晰的多糖带, 结果说明, 此时洗脱液中含有大量的蛋白质, 多糖的含量很少; 泳道 2 中没显示有蛋白带, 但多糖带染色特别深, 说明此时洗脱液中含有大量的粘多糖, 几乎无蛋白质存在; 泳道 3 中蛋白带清晰, 略显示多糖带, 说明此洗脱液中含有一定量的蛋白质, 且有少量的多糖存在。定量测定结果说明: 0.2mol/L 的氯化钠洗脱液中的蛋白质含量占总蛋白量(三种不同浓度氯化钠洗脱液中所含蛋白质的总和)的 69.2%, 粘多糖占总糖量(三种不同浓度氯化钠洗脱液中所含粘多糖的总和)的 2.4%; 0.4mol/L 的氯化钠洗脱液中的蛋白质含量占总蛋白量的 4.7%, 粘多糖含量占总糖量的 72.7%; 0.6mol/L 的氯化钠洗脱液中的蛋白质含量占总蛋白量的 26.1%, 粘多糖含量占总糖量的 24.9%。由以上结果可以看出当氯化钠洗脱液的浓度为 0.4mol/L 时, 粘多糖得到了一定的分离, 但另两个不同浓度的氯化钠洗脱液中的粘多糖未得到分离, 其原因可能是二乙氨基乙基纤维为阴离子交换剂, 其吸附作用不但与被吸附样品所带的电荷有关而且和被吸附样品的分子大小有关, 而本实验所提取的粘多糖分子量有一定的差别, 而且粘多糖的种类也不相同。此外, 本实验发现随着提取用液(酸或碱)的浓度升高, 部分粘多糖的糖苷键和蛋白聚糖的糖肽键发生断裂, 所得的粘多糖的分子量减小, 从而增加了二乙氨基乙基纤维素对其的吸附力, 这时需用较大浓度的洗脱剂才能将其洗脱下来。实验发现当粘多糖的分子量减小时, 0.4mol/L 的氯化钠洗脱百分率大大减小, 而 0.6mol/L 的氯化钠洗脱液中多糖的得率显著升高。

## 3 结论

通过以上实验可以得出采用 0.3mol/L 的氢氧化钠并加热到 60~70℃提取羊软骨粘多糖是比较适合的方法, 此提取方法不但使粘多糖提取率较高; 同时也有利于粘多糖的分离。用二乙氨基乙基纤维素作为吸附剂时, 当氯化钠的浓度达到 0.4mol/L 时粘多糖被大量的洗脱下来, 而此时洗脱下来的蛋白质却很少, 从而使粘多糖得到了一定程度的分离。如果要进一步得到单一的多糖, 则须进行分级处理。要充分研究羊软骨粘多糖的生理、生化作用, 则需要用纯化的粘多糖或是单一粘多糖作为研究对象; 然而本实验所分离得到的粘多糖中仍含有一定量的蛋白质, 在以后的实验中需进一步进行研究。

## 参考文献:

- [1] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学[M].高等教育出版社,2002.66-71.
- [2] 邓必阳,张展霞.鲨鱼软骨营养成分分析及其评价[J].营养学报,1999,21:1.
- [3] 肖凯军,李琳,等.鲨鱼软骨粘多糖及其分离、纯化和应用[J].上海水产大学学报,1999,8:2.
- [4] 宁正祥.食品成分分析手册[M].中国轻工业出版社,1997.52-53,72-74.
- [5] 李玲.多糖的分离纯化与分析[J].新疆工学院学报,1996,17:2.
- [6] 倪杭生,李润,等.透明质酸的离子交换层析纯化[J].中国医药工业杂志,2001,32:11.
- [7] 肖凯军,郭祀远,陈健,等.鲨鱼软骨降解动力学及微观结构分析[J].广西大学学报,2000,25:2.
- [8] 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):4.

## 壳聚糖—海藻酸钠微胶囊对葡萄多酚控制释放的研究

张 峻, 吉伟之, 陈晓云, 齐 欣  
(天津市园艺工程研究所, 天津 300384)

**摘 要:** 对壳聚糖—海藻酸钠包埋法制备葡萄多酚微胶囊的工艺进行了研究, 考察了微胶囊在模拟胃液和肠液环境中的控制释放效果。结果表明: 壳聚糖浓度对微胶囊的包埋率影响最大; 在 pH6.0 的条件下制备的微胶囊比 pH5.0 时制备的微胶囊对葡萄多酚具有更好的控释效果; 被包埋物分子量越大, 持续释放时间越长。

**关键词:** 壳聚糖—海藻酸钠微胶囊; 多酚类物质; 控制释放

### Mimic Study on Controlled Release of Grape Polyphenols from Chitosan-sodium Alginate Microcapsules

ZHANG Jun, JI Weizhi, CHEN Xiao-yun, QI Xin  
(Tianjin Horticultural Engineering Institute, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** The encapsulation of grape polyphenols by chitosan-sodium alginate was studied. Also the controlled release of grape polyphenols from microcapsules was investigated under the conditions of mimic gastric and intestinal juice. The results showed that the loading efficiency of microcapsules was mostly affected by the concentration of chitosan. The microcapsules prepared at pH6.0 exhibited slower release of grape polyphenols than that at pH5.0. The larger the molecular weight of encapsulated substances, the longer the release time from the chitosan-sodium alginate microcapsules.

**Key words:** chitosan-sodium alginate microcapsules; polyphenols; controlled release

中图分类号: TQ 033

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)05-0102-03

自从 Abraham<sup>[1]</sup>发明海藻酸钠—聚赖氨酸—海藻酸钠微胶囊以来, 微胶囊技术广泛用于人工器官研制、细胞及酶的固定化、药物控制释放等生物技术领域。海藻酸钠是存在于褐藻中的天然高分子, 由  $\beta$ -1,4-D-甘露糖醛的钠盐和  $\alpha$ -1,4-L-古洛糖醛酸的钠盐共聚而成。海

藻酸钠与多价阳离子(如钙离子)接触时会瞬时凝胶化, 因此可利用此特性对蛋白质、细胞等物质进行包埋, 这一制备过程简单, 并且避免了高温、有机溶剂等有害的条件, 利于保持被包埋物的活性。当用于包埋药物时, 可以增加药物稳定性, 降低药物在体内的副作用,

收稿日期: 2003-08-04

基金项目: 天津市自然科学基金重点资助项目(993804011)

作者简介: 张峻(1968-), 男, 副研究员, 研究方向为食品生物技术。