

鱼鳞中糖缀合物的提取与体外抗氧化活性研究

刘安军, 袁博, 曹东旭, 刘爽, 樊柳荫

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文探索了利用碱浸提和酶法从淡水鱼鳞中提取糖缀合物的技术, 通过考察NaOH浓度、料液比、提取时间对糖缀合物提取效率的影响, 确定了其提取的最佳条件为: 0.3 mol/L NaOH溶液、料液比为1:5、室温提取18 h。对提取物初步分析后, 进行体外抗氧化活性研究, 结果表明鱼鳞糖缀合物对DPPH·、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 有较强的清除能力, 同时也有较好的还原能力和抗脂质过氧化能力。

关键词: 鱼鳞; 糖缀合物; 提取; 自由基; 抗氧化

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)10-0007-05

Research on the Isolation of a Glycoconjugate from Fish Scale and Its Antioxidant Activity

LIU An-jun, YUAN Bo, CAO Dong-xu, LIU Shuang, FAN Liu-yin

(School of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The alkaline and enzymatic extractions of a glycoconjugate from fish scale were researched. The best extraction reagent, the concentration of the extraction reagent, the solid- fluid ratio and the extracting time were found to be NaOH solution, 0.3 mol/L, 1:5 and 18 h, respectively. Evaluation of the antioxidant activity of the achieved glycoconjugate showed that the glycoconjugate could efficiently scavenge DPPH·, $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$. Besides, it had high reducing capacity and strong ability to prevent lipid peroxidation.

Key words: fish scale; glycoconjugate; extraction; free radical; antioxidation

我国是水产品生产大国, 鱼品在加工的过程中产生了大量的下脚料, 其质量约占原料鱼的40%~55%, 如果不进行有效处理, 不仅会造成环境的污染, 而且会浪费大量的宝贵资源。鱼鳞含丰富的胶原蛋白、多糖等活性物质^[1], 近年来不断发现多糖类物质具有调节免疫功能、抗肿瘤、抗病毒病菌、降血糖血脂、抗溃疡等作用^[2]。但现大部分都以磨成鱼粉的形式作为饲料处理, 产品附加值低, 若找到合理的提取工艺即可生产出高附加值的保健品。糖缀合物的分离分析是目前比较活跃的研究领域, 但大部分都集中在哺乳动物、深海软骨鱼^[3]或海洋棘皮动物^[4]的范围内, 而淡水鱼这一领域还较少有相关报道。本文探讨了鱼鳞中糖缀合物的分离制备方法及其体外抗氧化活性研究, 为水产副产品的精深加工和高附加值利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

收稿日期: 2007-08-14

基金项目: 天津市科技大学引进人才科研启动基金资助 (20060422)

作者简介: 刘安军 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 副产品高附加值的开发利用及功能性食品研究

1.1.1 原料: 鲤鱼鱼鳞 (塘沽水产品市场)

1.1.2 主要试剂: 氢氧化钠、硫酸、乙醇 (分析级); 电泳上样缓冲液 (Takara); 考马斯亮蓝R250、G250、阿里新兰、氯化硝基四氮唑蓝NBT (Sigma公司); 硫代巴比妥酸 (生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司); 复合蛋白酶 (生物制剂, 广西南宁庞博生物工程有限公司)。

1.2 仪器设备

透析袋; 离心机; 微量移液器 (Thermo); 酶标仪 (Thermo Electron U.S.A.); Sp-2120型紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 糖缀合物的提取

精确称取鱼鳞, 加入一定比例的氢氧化钠溶液搅拌提取, 倾析法取上清液^[5]; 将上清液调至pH 3, 产生大量酸性蛋白沉淀, 7000 r/min离心5 min后取上清液; 再将上清液调至pH至8.0后加入5%的复合蛋白酶 (6万~230万 U/g), 52 °C酶解3 h, 100 °C将酶灭活10 min后离心5 min, 取上清液于55 °C减压浓缩; 向浓缩液加入4倍无水乙醇, -20 °C下静置过夜, 收集沉淀, 复溶、洗涤3次, 除去一部分醇溶性杂质, 再透析

48 h去除小分子杂质^[6]；冷冻干燥，称重，得鱼鳞糖缀合物备用。

1.3.2 多糖含量测定：采用苯酚-硫酸法^[7]

1.3.3 蛋白质含量测定：采用考马斯亮蓝比色法^[8]

1.3.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）鉴定糖缀合物

采用12%分离胶，5%浓缩胶将上述样品做电泳分析。上样后80 V恒压电泳，待样品进入分离胶后电压调成100 V，3 h后起胶分别染蛋白和染多糖。

1.3.5 糖缀合物体外抗氧化能力的测定

取鱼鳞糖缀合物提取物，配制成各浓度梯度的溶液，分别进行以下试验。

1.3.5.1 还原能力测定：采用普鲁士蓝法^[9]。

1.3.5.2 清除1,2-二苯代苦味肼基自由基（DPPH·）能力测定

取50 μmol/L的DPPH·醇溶液200 mL，加70 μL不同浓度的待测溶液，在室温下放置60 min后，在517 nm波长下测吸光度得 A_i ；以无水乙醇代替底物DPPH·测吸光度得 A_j ；空白组以蒸馏水代替待测溶液反应测得 A_0 。以 V_c 作为对照进行比较。

清除率（%）= $[A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$

1.3.5.3 清除超氧阴离子（ $O_2^{\cdot-}$ ）能力测定

采用核黄素-光照法^[10-11]。

以 V_c 作为对照，计算清除率。

1.3.5.4 清除羟自由基（ $\cdot OH$ ）能力测定

利用 Fenton 反应产生 $\cdot OH$ ，采用 2-脱氧-D-核糖法测定^[12]。

以 V_c 做对照，计算清除率。

1.3.5.5 抗脂质过氧化能力的测定

在试管中依次加入1 mL卵磷脂质体PBS分散体系，1 mL 400 μmol/L的 $FeCl_3$ 溶液，1 mL 400 μmol/L的 V_c 溶液和1 mL鱼鳞糖缀合物液，混匀，于37 °C水浴中避光60 min，再加入2 mL TCA-TBA-HCl混合液90~100 °C水浴15 min，速冷，以3000 r/min的转速离心10 min，取上清液在532 nm波长下测吸光度值 A_i ；以PBS代替底物TCA-TBA-HCl混合液测得 A_j ；空白组以蒸馏水代替待测溶液测得 A_0 。同时以 V_E 作为对照。

抑制过氧化率（%）= $[A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$

2 结果与讨论

2.1 鱼鳞糖缀合物最佳提取条件的确定

采用常温提取法，用4倍乙醇沉淀，分别考察以下各因素。

2.1.1 NaOH浓度的确定

取100 g鱼鳞，按料液比为1:5分别加入0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L、0.4 mol/L的NaOH溶液，室温下搅拌18 h后，用4倍乙醇沉淀出糖缀合物。采用硫酸-苯酚比色法测定鱼鳞糖缀合物的糖含量，以 A_{490nm} 为指标考察NaOH浓度对糖缀合物提取效率的影响。结果如图1所示，该结果说明随着NaOH浓度的提高，提取率明显升高，到0.3 mol/L时糖含量最大，再增加NaOH浓度后提取率反而稍微下降，这可能是由于高浓度的碱破坏了糖链的结构引起的。

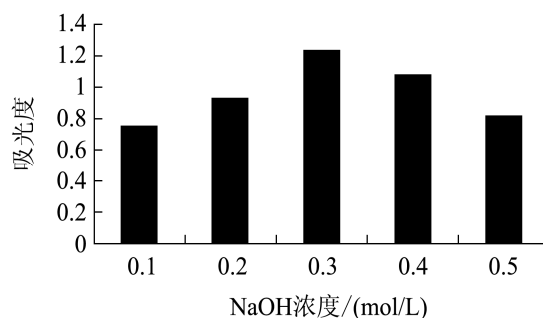


图1 浓度对提取的影响

Fig.1 Influence on extracting of concentration

2.1.2 料液比的确定

分别取100 g鱼鳞，按料液比分别为1:4、1:5、1:6、1:7加入0.3 mol/L NaOH溶液，室温下分别搅拌18 h，用4倍乙醇沉淀后得到鱼鳞糖缀合物，测吸光度。结果如图2所示，该结果说明随着NaOH体积的增加，提取率也增加，但达到1:5后吸光度基本保持稳定，因此在1:5时即可达到较好的提取效果。因为当碱液达到一定量时就会充分溶解糖缀合物，增大提取液的量也不会提高提取率。

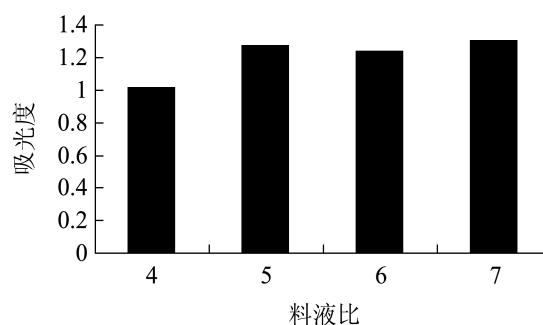


图2 料液比对提取的影响

Fig.2 Influence on extracting of the material fluid ratio

2.1.3 搅拌时间的影响

分别取100 g鱼鳞，按料液比为1:5、加入500 mL 0.3 mol/L NaOH溶液，室温下分别搅拌9 h、12 h、15 h、18 h、21 h，用4倍乙醇沉淀得到鱼鳞糖缀合物，测吸光度。结果如图3所示，该结果说明吸光度随时间的增大而增大，但到达一定时间后不再有明显的增加，糖

缀合物已完全溶解在提取液中, 因此提取18 h即可。

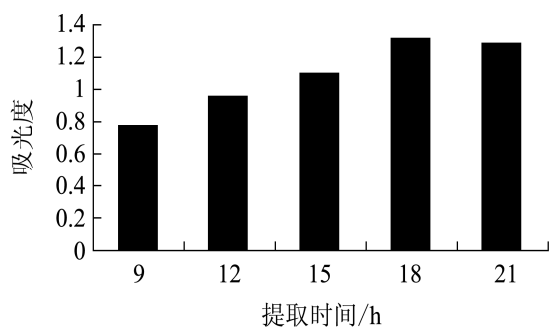


图3 时间对提取的影响

Fig.3 Influence on extracting of the time

2.1.4 结论

通过单因素实验的结果发现经过0.3 mol/L NaOH、料液比为1:5、常温提取18 h后, 用4倍乙醇沉淀, 可以得到提取率较高的鱼鳞糖缀合物。

2.2 鱼鳞糖缀合物成分的初步分析

2.2.1 多糖和蛋白分析

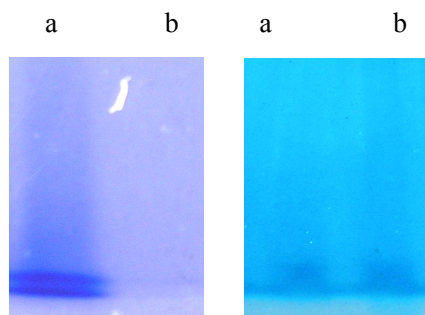
经最优条件提取, 除蛋白前后提取物中多糖和蛋白质含量的测定结果如表1所示。从表1可知通过调电点和使用复合酶, 可以有效的去除杂蛋白和糖链上的结合蛋白, 从而提高多糖含量。

表1 鱼鳞糖缀合物中多糖、蛋白质的含量

Table 1 Polysaccharide and protein content

样品	多糖含量/%	蛋白质含量/%
除蛋白前	9.5	60.3
除蛋白后	22.3	2.8

2.2.2 SDS-PAGE 所得结果



A: 除蛋白前样品

B: 除蛋白后样品

A: Before disposing of protein

B: After disposing of protein

(a. 染蛋白 Protein b. 染多糖 Polysaccharide)

图4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.4 SDS-PAGE

从图4的电泳图可知, 提取物在未除蛋白前, A有明显的蛋白带; 经酸沉蛋白和酶解蛋白后蛋白带基本消失。而多糖带均比较明显, 且含量有所增加。

2.3 体外抗氧化活性验证

2.3.1 还原能力的测定

一般情况下, 鱼鳞糖缀合物的还原能力与抗氧化活性之间有显著的相关性。根据1.3.5.1的测定方法, 先对鱼鳞糖缀合物的还原能力进行了测定, 其中吸光度越大表示还原能力越大。由图5可以看出, 鱼鳞糖缀合物具有一定还原能力, 且浓度具有正相关性, 当浓度达到24 mg/mL时, 吸光度值基本稳定。还原能力的测定为其能清除活性氧等自由基或发挥抗氧化作用提供了可能^[13]。

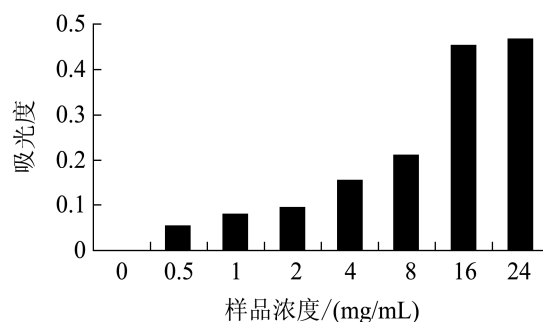


图5 鱼鳞糖缀合物的还原能力

Fig.5 The reducing capacity of sample

2.3.2 鱼鳞糖缀合物对DPPH·的清除作用

DPPH·的稳定性较好, 可以作为检验物质抗氧化性的首选。由图6可知, 在清除DPPH·方面鱼鳞糖缀合物的作用略低于常用抗氧化剂Vc, 浓度在低于4 mg/mL时两者均有良好的量效关系; 当浓度大于4 mg/mL浓度时, 随着浓度的增大, 清除能力趋于平缓, 基本达到85%以上。

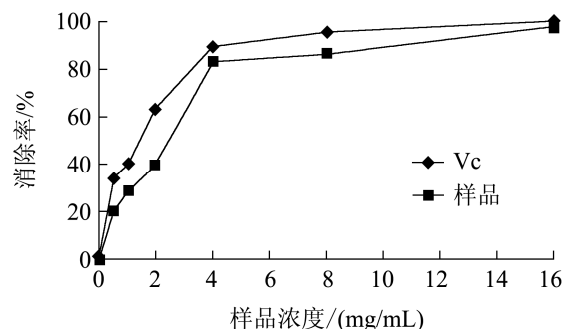


图6 鱼鳞糖缀合物对DPPH·的清除效应

Fig.6 The effect of scavenging DPPH·

2.3.3 提取物对超氧自由基(O₂⁻)的清除作用

O₂⁻自由基与许多疾病有密切的联系, 因此测定其对超氧阴离子自由基的清除作用具有重要的意义。由图7可知, 与Vc相比鱼鳞糖缀合物对O₂⁻均具有较好的清除能力, 并且清除率随着浓度的增大而增大; 当浓度达到10 mg/mL时, 清除能力基本稳定, 保持在90%以上。

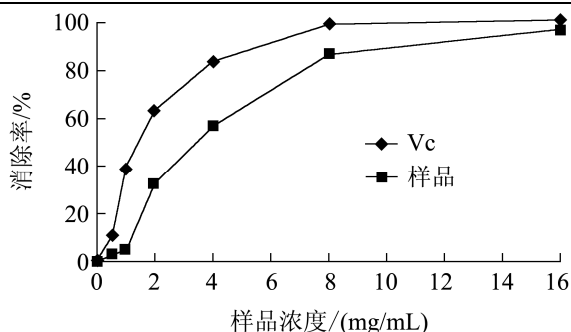


图7 提取物对O₂^{·-}清除效应

Fig.7 The effect of scavenging O₂^{·-}

2.3.4 鱼鳞糖缀合物对·OH的清除作用

羟自由基的化学性质极为活泼，也是毒性最大的自由基，可以与多种有机物或无机物反应。由图8可知，与Vc相比鱼鳞糖缀合物对·OH具有较强的清除作用，当浓度为8 mg/mL时，鱼鳞糖缀合物对·OH的清除能力基本稳定，清除率保持92%以上。

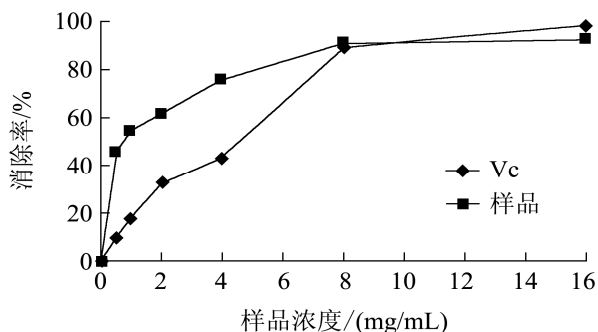


图8 鱼鳞糖缀合物对·OH的清除效应

Fig.8 The effect of scavenging ·OH

2.3.5 鱼鳞糖缀合物抗卵磷脂脂质过氧化能力测定

自由基会与细胞膜中的不饱和脂类发生反应，脂类的过氧化随老化及致癌作用而不断上升；卵磷脂常被用作细胞模型而进行体外的脂质过氧化研究。由图9可知，鱼鳞糖缀合物具有较好的抗卵磷脂脂质过氧化活性，其抗脂质过氧化能力稍次于常用抗氧化剂V_E，且有良好的量效关系，但随着浓度的增大量效关系逐渐不明显，浓度达到18 mg/mL时基本稳定。

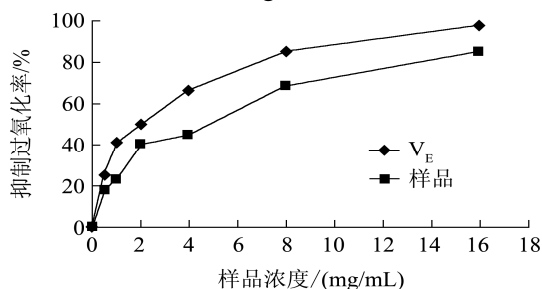


图9 鱼鳞糖缀合物的抗脂质过氧化能力

Fig.9 The effect of inhibition lipid peroxidation

3 结论

3.1 通过各单因素试验确定了提取鱼鳞糖缀合物的最佳条件为：0.3 mol/L NaOH溶液、料液比为1:5、室温提取18 h。提出的糖缀合物经初步测定含有一定的糖和结合蛋白，经碱提取过的剩余鱼鳞已完全洗去表面的多糖类物质后，可将其脱钙，用于提取同样具有很强生物活性及生物功能的胶原蛋白^[14]。

3.2 当人体生长发育成熟或在患有某些疾病的情况下，体内清除氧自由基的能力受到影响，使机体内氧自由基过量，氧自由基作用于蛋白质、细胞膜、核酸，导致相应疾病的产生^[15-16]，人体适当摄入一些抗氧化剂对维持机体自由基的代谢平衡，保持身体健康具有重要的意义。鱼鳞糖缀合物经体外抗氧化实验发现与常见Vc相比具有显著清除DPPH·、O₂^{·-}、·OH的作用，与V_E相比具有较强的抗卵磷脂脂质过氧化作用，且均呈一定浓度依赖性，具有较高的保健价值。本课题的研究具有较高的实用价值和应用前景，可为我国淡水鱼产品的深加工产业提供一条新的思路。

参考文献

- [1] 光翠娥,黄敏.加强淡水鱼的加工与综合利用[J].食品研究与开发,2005,26(3),25-27
- [2] 卢睿春.酶法提取马尾藻硫酸多糖的研究[J].中国海洋药物,1997,(2):10-13
- [3] 江龙法,吴胜军,程虎.鲨鱼软骨粘多糖的制备工艺研究[J].淮海工学院院报,2000,19(4):49-52
- [4] 唐孝礼,邱彭新.黑海参酸性粘多糖的分离纯化.动物药研究[J].中药材,1995,22(5):223-225
- [5] 罗红宇.赤鲷软骨粘多糖的制备[J].食品科学,2004,5(11):135-137
- [6] 黄健,杨安平,江国森.中华芦荟多糖的提取[J].现代中药研究与实践,2004,18(2):58-59
- [7] 高莉,刘捷,田义静,等.马齿苋多糖提取纯化工艺的初步研究[J].食品研究与开发,2006,27(4):59-63
- [8] 李建武,余瑞元,袁明秀.生物化学实验原理和方法[M].北京大学出版社,1994,11:174-176
- [9] 晏文杰,李家璞,杜平.类黄酮抗氧化力与其结构之关系[J].台湾农业化学与食品科学,2000,38(1):80-88
- [10] 冯亦颖,刘炳治.龙胆泄肝汤对氧自由基和羟自由基诱导的脂质过氧化的影响[J].中国中医眼科杂志, 2000,10(2): 63-65

(下转第14页)