文章编号:1673-1689(2010)01-0081-03

碱—酶法提取硫酸软骨素的工艺研究

吴枫楠
(吉林龙谷生物科技有限公司,吉林 132101)

摘 要:研究以猪软骨组织为原料,采用碱液提取和酶解相结合的方式提取硫酸软骨素。通过对影响碱液提取效率和酶解效果因素的研究,确定了碱液提取的最佳条件为:碱液的体积分数 7.5%、提取温度为 50 ℃、提取时间 2 h、提取 2 次。酶解的最佳条件为:采用木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的混合酶 1∶1(w∶v)、添加质量分数 1.0%,pH 值 8、提取 36 h。

关键词:硫酸软骨素;碱—酶法;木瓜蛋白酶;胰蛋白酶;猪软骨
中图分类号:Q 81 **文献标识码**:A

Extraction of Sulphuric Acid Cartilage Biotin by Alkali-Enzyme Process

WU Feng-nan
(Rongoo Jilin Biological Technology Co. Ltd., Jilin 132101, China)

Abstract: This aims of this study is to develop an efficient extraction process of chondroitin sulfate from pig cartilage by Alkali-enzyme hydrolysis. For this, the optimum conditions were determined and listed as follows: Density 7.5%, Temperature 50 ℃, Time 2 h, two times. the optimum conditions to extracted enzyme are as follow: Mixed enzyme with quince protein enzyme and trypsin(1∶1)、Additive Quantity: 1.0%, pH =8、Extracting 36 h.

Key words: chondroitin sulfate, alkali-enzyme method, quince protein enzyme, trypsin, pig cartilage

硫酸软骨素(Chondroitin Sulfate,简称 CS)是存在于动物软骨组织中的多种酸性多糖的混合物,主要通过共价键与核心蛋白质相连,以蛋白聚糖的形式存在。具有多种同分异构体,根据硫酸基在半乳糖上的位置不同主要分为硫酸软骨素 A(CSA)和硫酸软骨素 B(CSC)[1]。

硫酸软骨素具有多种生物活性。由于硫酸软骨素具有降低血脂、抗病毒、提高免疫力、抗衰老等功能,被广泛应用于临床和生物医学中。

硫酸软骨素的提取方法主要有:高温高压、中性盐法、碱法、酶解法等,本文采用碱法和酶解法相结合的办法,着重对影响提取的关键步骤进行了研究,从而得到一条优化的生产途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

猪软骨组织(市售),活性炭,胰蛋白酶(活力 1∶250),木瓜蛋白酶(活力 1∶3 000),胃蛋白酶(活力 1∶3 000)。

721 型分光光度计:上海第三分析仪器厂;DHG-06 型系列电热恒温鼓风干燥箱:武汉海声达仪器设备有限公司;HH-2 数显恒温水浴锅:江苏

收稿日期:2008-11-04
作者简介:吴枫楠(1982-),男,蒙古族人,吉林人,助理工程师,主要从事生物技术研究及新产品研发工作。
Email:wunan8866@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

金坛市荣华仪器制造有限公司; LD4_2A 型电动离心机:北京医用离心机厂; PHS —25 型酸度计:上海雷磁仪器厂;抽滤机,JA2002 电子天平。

1.2 试验方法

1.2.1 生产工艺流程

猪软骨组织 —预处理 —粉碎 —碱液浸

清液 1 ——————————清液 2

↑ ↓

泡 —粗滤 —残渣 →二次碱提 —过滤混合

—酶解 —活性炭吸附 —纯化 —脱水干燥 —成品。[2]

1.2.2 最佳工艺条件的确定方法

1) 碱液提取条件的确定方法 由于硫酸软骨素通过共价键与核心蛋白相连接,以蛋白糖的形式存在,因此需以某种方法使共价键断裂,从而使硫酸软骨素释放出来,而碱液可较好的使共价键破裂,而且硫酸软骨素分子上的硫酸基比较稳定,在碱液作用下硫酸软骨素分子结构和分子质量一般不会发生变化,因此本实验采用加入碱液的办法提取硫酸软骨素。实验中以影响碱提效果的主要因素:碱液浓度,提取时间,提取次数,提取温度为试验因子,采用正交试验对提取工艺进行优化。

2) 酶解条件的确定方法 为进一步提高硫酸软骨素的提取效果,同时提高产品的纯度,本实验采用外加蛋白酶的办法去除蛋白质。首先通过单因素试验确定最佳的分解酶,然后在酶确定的基础上,通过以影响酶解的主要因素:酶解温度、pH、酶的添加量、酶解时间为试验因子进行正交试验,对试验条件进行优化[3]。

3) 活性炭吸附 酶解后酶解液 pH 值在 8 左右,滴加盐酸调节水解液 pH 值至 6.5～7.0,温度控制在 50 ℃,在搅拌下 1 ∶1(W/V) 加入颗粒状活性炭,搅拌吸附 1h,然后用盐酸调节 pH 值为 5.0～5.5,并加入 2 g/dL 量的氯化钠,升温近至(85 ℃左右)保温 30 min,趁热用 8 层纱布过滤,滤液再用滤纸过滤两次得澄清的硫酸软骨素液。

4) 纯化脱色 在经活性炭吸附后的溶液中加入乙醇,使乙醇体积分数达到 65 %～70 %并静置过夜,次日可得胶状沉淀。所得沉淀用无水乙醇及丙酮各洗涤 2～3 次,然后过滤,滤渣置 60～65 ℃的真空干燥箱中干燥,即得白色的硫酸软骨素粉[4]。

1.3 分析方法

蛋白质含量的测定:Folin-酚试剂法

产品总得率(%) = (干品硫酸软骨素的质量(g)/干燥猪软骨组织的质量(g) ×100 %[5]

游离氨基酸总量:茚三酮比色法[6]

2 结果与讨论

2.1 碱液提取条件的确定

准确称取 9 份 50g /份的软骨组织粉末于 500 mL 的烧杯中,在料液比为 1 ∶2 的基础上,以碱液浓度、提取时间、提取温度、提取次数 4 个因素进行正交试验(见表 1,2)。

由表 1,2 可知:影响碱液提取的因素依次为:$B > A > C > D$,即碱液浓度对提取的影响最大,提取温度次之,而提取时间和提取次数对提取的影响相对较小。在料液比为 1 ∶2 时碱液提取的最佳组合为 $A_2 B_2 C_2 D_1$ 即:提取温度 50 ℃、碱液体积分数 7.5 %、提取 2 次、提取时间 24 h。

表 1 碱液提取的因素水平表

Tab.1 Factors and levels form of alaklin extraction

水平	因素			
	提取温度/ ℃ *A*	碱液体积分数/ % *B*	提取次数 *C*	提取时间/ h *D*
1	40	5.0	1	24
2	50	7.5	2	36
3	60	10	3	48

表 2 碱液提取的正交试验表

Tab.2 Orthogonal test table of alkali extraction

序号	因素				得率/ %
	A	*B*	*C*	*D*	
1	1	1	1	1	6.13
2	1	2	2	2	6.65
3	1	3	3	3	5.18
4	2	1	2	3	6.77
5	2	2	3	1	7.16
6	2	3	1	2	5.72
7	3	1	3	2	5.62
8	3	2	1	3	5.97
9	3	3	2	1	5.56
K_1	5.99	6.17	5.94	6.28	
K_2	6.55	6.59	6.33	6.00	
K_3	5.72	5.49	5.99	5.97	
R	0.83	1.1	0.39	0.31	

2.2 酶解条件的确定

2.2.1 酶种类的选择

硫酸软骨素与核心蛋白以共价键相连。碱液提取后,为进一步将蛋白质降解,使硫胺素释放出来,本实验采用各种不同的蛋白酶进行降解试验,从而确定最佳分解酶。准确称量 4 份 50 /份的软骨组织粉末于 500 mL 的烧杯中,在 pH 值 8.0、温度 55 ℃、酶添加量为 1.5 %的情况下提取 24 h,然后采用茚三酮与游离氨基酸的显色反应确定蛋白质的降解程度。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　酶种类的选择

Tab. 3　The selccfion of enzyme

酶种类	胃蛋白酶	木瓜蛋白酶	胰蛋白酶	混合酶
显色结果	-	+	+	+ +

注“ + ”号表示颜色深浅,混合酶指木瓜蛋白酶和胰蛋白酶(1 :1)混合酶

由表 3 可知:在相同的作用条件下,木瓜蛋白酶和胰蛋白酶混合酶作用效果最好,而木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的作用效果次之且相似,胃蛋白酶的效果较差。因此本实验采用添加木瓜蛋白酶和胰蛋白酶混合酶(1 ∶1)的方法提取硫酸软骨素。

2.2.2　酶解条件的确定

在酶的种类确定的情况下,准确称取 9 份 50g ／份的软骨组织粉末于 500 mL 的烧杯中,以影响酶解的四个因素:酶解温度、pH、添加量、酶解时间进行正交试验(见表 4,5) 。

由表 4,5 可知:各因素对酶解的影响依次为:$A > B > C > D$,即酶解的温度对酶解效果的影响最大,酶的添加量次之,酶解的 pH 和酶解时间影响相对较小。通过极差分析得最佳的酶解条件为 $A_1 B_2 C_1 D_2$,即酶解温度为 45 ℃、混合酶添加量为 1.0 %、酶解 pH 为 8、酶解时间 36 h。

表 4　酶解正交试验因素水平表

Tab. 4　Factors and levels from of enzyme hydrolysis

水平	因素			
	酶解温度/ ℃ *A*	酶质量分数/ % *B*	酶解 pH *C*	酶解时间/ h *D*
1	45	0.5	8	24
2	50	1.0	9	36
3	55	1.5	10	48

表 5　酶解的正交试验表

Tab. 5　Orthogonal test of enzyme hydrolysis

序号	因素				蛋白质质量分数/ %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.42
2	1	2	2	2	2.30
3	1	3	3	3	2.67
4	2	1	2	3	2.96
5	2	2	3	1	2.72
6	2	3	1	2	2.62
7	3	1	3	2	2.83
8	3	2	1	3	2.51
9	3	3	2	1	3.01
K_1	2.46	2.74	2.52	2.72	
K_2	2.77	2.51	2.76	2.58	
K_3	2.78	2.77	2.74	2.71	
r	0.32	0.26	0.24	0.14	

3　结　语

1) 本文研究以猪软骨组织为原料,通过预处理等工序制得软骨组织粉末,然后在不同的条件下进行提取试验,从而确定了碱液提取的最佳条件为:碱液体积分数 7.5 %、提取温度 50 ℃、提取时间 24 h,提取 2 次,酶解的最佳条件为:以木瓜蛋白酶和胰蛋白酶混合酶为降解酶,在温度为 45 ℃、pH 值为 8、混合酶添加质量分数为 1.0 %的条件下酶解时间 36 h。

2) 最终产品呈白色、略带咸味、无臭,具有较强的吸水性,加热不凝结,易溶于水并形成粘稠溶液,不溶于酒精、乙醚、丙酮等有机溶剂。

3) 主要检测结果为产品总得率为 24.4 %、硫酸软骨素质量分数 92 %、蛋白质质量分数 2.35 %、含水质量分数为 8.72 %、酸碱度为 6.5。

参考文献(References):

[1] 卢学根. 羊软骨粘多糖的酶法提取工艺研究[J]. 食品工业科技,2007(10)184 - 185.
LU Xue-gen: The research of extraction technology of chondroitin sulfate mucopolysaccharides with enzymes from eggshell membrane[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2007(10)184 - 185. (in Chinese)

[2] 武中会. 碱液对牦牛软骨素提取硫酸软骨素工艺的影响[J]. 兽禽业,2008(6).
WU Zhong-hui. Influence on craft of the lye about extract the chs from yak's cartilage[J]. **Livestock and Poultry Industry**, 2008(6). (in Chinese)

[3] 刘国庆,凌庆枝,孙军飞. 蛋壳膜硫酸软骨素的提取工艺及其优化[J]. 食品科学,2007(9)283 - 285.
LIU Guo-qing, LING Qing-zhi, SUN Jun-fei. Optimization of extraction technology of chondroitin sulfate from eggshell membrane[J]. **Food Science**,2007(9)283 - 285. (in Chinese)

[4] 赵培城,高红林,朱顺达. 猪硫酸软骨素提取工艺研究[J]. 食品科学,2004(4)14 - 17.
ZHAO Pei-cheng, GAO Hong-lin, ZHU Shun-da. Study on the extraction technology of the chondroitin sulfate of pig[J]. **Food Science**,2004(4)14 - 17. (in Chinese)

[5]舒坤贤,等. 中华鲟硫酸软骨素提取工艺研究[J]. 食品工业科技,2006(3)151 - 155.28 - 30.
SHU Kun-xian. study on the extraction technology of chondroitin sulfate from aclpenser sinensis grdy cartilage[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2006(3)151 - 155.28 - 30. (in Chinese)

[6] 大连轻工业学院,华南理工大学等合编[M]. 食品分析,中国轻工业出版社,2002.

(责任编辑:杨萌)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net