

文章编号: 1001-7453(1999)03-0057-05

# 鲨鱼硫酸软骨素的研制

胥传来<sup>1</sup>, 周 康<sup>2</sup>

(1. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036; 2. 宜兴市进出口商品检验一科, 江苏宜兴 214206)

**摘要:** 探索了用稀碱-酶解法从鲨鱼软骨中提取硫酸软骨素的生产工艺, 通过实验确定了酶解的温度、酸度和加酶量的范围, 并对提取液温度、盐解液温度等重要参数作了研究, 最后确定了稀碱-酶解法的工艺路线, 为工业化生产提供了依据。

**关键词:** 鲨鱼硫酸软骨素; 稀碱-酶解法; 含氮量; 氨基己糖

中图分类号: TS254.9      文献标识码: A

近年来, 海洋生物作为新的药用资源日渐受到重视。海洋生物具有众多生物活性物质, 为利用它研制和开发保健食品提供了有利条件<sup>[1]</sup>。研究发现, 从鲨鱼软骨中提取的硫酸软骨素, 对许多疾病有很好疗效, 有很高的开发利用价值<sup>[2-7]</sup>。因此, 在我国进行鲨鱼硫酸软骨素的开发和应用研究, 有效利用鲨鱼软骨资源, 生产高附加值产品, 提高我国鲨鱼硫酸软骨素的生产技术水平, 使鲨鱼软骨的加工向深度发展, 既有学术价值又有实际意义。国内一些工厂已开始生产鲨鱼硫酸软骨素, 但目前尚存在着质量不稳定、产品得率低等问题。因此, 如何提高鲨鱼硫酸软骨素工业化生产中产品的得率、优化现有工艺、降低生产成本, 已引起工业界的广泛重视。作者通过实验着重对生产工艺进行了探讨。

## 1 实验器材

### 1.1 材料

洗净鲨鱼软骨, 购自浙江玉环生物制品厂。

### 1.2 试剂

氢氧化钠和盐酸(均为分析纯); 氯化钠和乙酸钠(均为化学纯); 工业酒精(质量分数为95%); 颗粒状活性炭(江苏溧阳活性炭联合工厂生产); 酶制剂(上海生化试剂公司生产)。

### 1.3 仪器

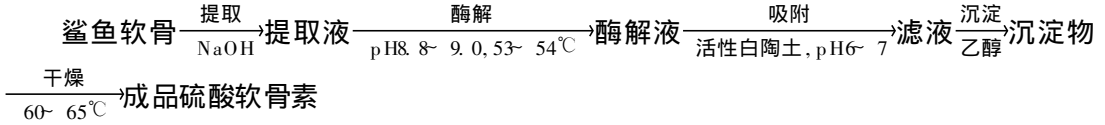
电热恒温水浴锅 上海医疗器械五厂制; ZD-2型 pH计 上海雷磁仪器厂制; 721分光光度计 上海第三分析仪器厂制; 干燥箱 上海市实验仪器厂制。

收稿日期: 1999-03-21; 修订日期: 1998-05-25

作者简介: 胥传来(1965年10月生), 男, 江苏盐城人, 博士研究生, 讲师。

## 2 稀酸 酶解法制取硫酸软骨素

### 2.1 工艺路线



1) 提取: 取洁白碎鲨鱼软骨, 加 6 倍量 2% 的 NaOH, 至室温, 搅拌提取 4 h, 过滤, 滤渣再以 2 倍量 2% 的 NaOH 提取 24 h, 过滤, 合并两滤液。

2) 酶解: 取上清液按体积比 1: 1 用 HCl 调 pH 至 8.8~9.0, 升温至 50°C, 加酶, 于 53~54°C 保温水解, 用三氯乙酸检查水解终点。

3) 吸附: 按体积比 1: 1 以 HCl 调水解液 pH 至 6.8~7.0, 加活性白陶土, 保持 pH 6.8~7.0, 搅拌吸附 1 h, 再用 HCl 调 pH 至 6.4, 停止加热, 静置过滤, 提上清液。

4) 沉淀、干燥: 调 pH 至 6.0, 加 1% 的 NaCl, 溶解, 过滤, 加入 95% 的乙醇, 搅拌使细粒聚集沉淀, 静置 8 h 以上, 收集沉淀, 于 60~65°C 干燥。

### 2.2 产品指标和结果讨论

由表可见, 稀碱酶解法所得产品含氮量平均为 3.982%, 高于含氮量应低于 3.5% 的标准。氨基己糖含量为 24.74%, 接近氨基己糖含量应高于 23% 的标准。但产品得率较高,

表 1 产品的有关指标

含氮量 %	氨基己糖质量分数 %	得率 %	颜色
3.982	24.74	35.0	洁白

颜色洁白, 符合标准。

1) 碱液提取可使软骨中的蛋白质降解并使其变性沉淀, 同时释放出硫酸软骨素。碱浓度高, 提取液中蛋白质等杂质少, 产品含氮量低。反之, 稀碱提取则蛋白质杂质多, 含氮量高, 但稀碱法能避免碱浓度过高引起的产品严重降解<sup>[10]</sup>。

2) 硫酸软骨素是通过一个低聚糖苷与蛋白质分子的丝氨酸残基相连, 酶能水解的肽键有一定特异性, 释放出的硫酸软骨素仍连着多个氨基酸残基或多肽<sup>[10]</sup>, 在以后的纯化中很难除去, 故单靠一步酶解, 含氮量难以降低。

3) 操作中用活性白陶土作吸附剂, 吸附时呈乳白色悬浮液, 离心亦难以除去, 过滤难度更大。

4) 所得产品虽色泽洁白, 但乙醇中为渣状沉淀, 且不全溶于水, 说明其中含有蛋白质等杂质。

5) 产品中氨基己糖含量略偏低, 说明原来的稀碱酶解法工艺存在缺陷, 需要改进。

## 3 稀碱酶解法工艺改进

### 3.1 工艺改进

1) 盐解: 在酶解之前增加一步盐解操作。先将提取液 pH 调至 7~8, 加 2% 的 NaAc 以增加离子强度 (并用作后步操作的促沉淀剂)。加热至 80~90°C, 盐解 20 min。

2) 酶解: 酶解液要随时调 pH 至 8.5~9.0, 因酶解过程 pH 值会发生变化, 不利于酶解继续进行。

3) 吸附: 改用 2% 颗粒状活性炭代替活性白陶土作吸附剂, 加快过滤速度。

### 3.2 产品指标和结果讨论

由表可见,稀碱酶解法经改进工艺后,产品含氮量已降至 3.312%,低于 3.5% 的标准。氨基己糖含量也较先前有所提高,达

表 2 产品的有关指标

含氮量 %	氨基己糖质量分数 %	得率 %	颜色
3.312	26.61	32.3	洁白

26.6%,超过了氨基己糖含量应高于 25% 的标准。产品得率略有降低,但变化不大。

1) 工艺过程中增加了升温盐解一步,使蛋白质在盐析作用下变性沉淀,过滤除去部分蛋白。进一步酶解可使用酶量减少,降低生产成本,最终降低产品含氮量。

2) 酶解时要经常调 pH 值。因在酶解过程中,由于氨基酸的增加,pH 值会下降,需用 NaOH 随时调 pH 值至 8.3~ 9.0,使酶充分发挥作用。

3) 改用颗粒状活性炭做吸附剂,使过滤较为容易,还可减少操作,缩短生产时间,且颗粒状活性炭对氨基酸吸附效果也较理想。

4) 用 2% 的 NaAc 代替 6% NaCl 作助沉淀剂,由于 NaAc 在乙醇中溶解度大,不会引起盐与产品共沉淀,从而保证了产品质量。

### 3.3 酶解参数单因素实验

3.3.1 酶解条件范围的选择 实验中用酶水解软骨提取液,该酶适用条件为 pH9,温度 35~ 56℃。

3.3.2 产品指标的选定 稀碱酶解法制取鲨鱼硫酸软骨素,氨基己糖含量易于达到要求,产品得率也较高,该法关键在于含氮量的降低,故本单因素实验仅以含氮量作为产品指标。

3.3.3 pH 值的变化对含氮量的影响 温度为 53℃,酶量为 0.05 g/dL 时,pH 值的变化对含氮量的影响见表 3。当 pH 在 8.3~ 8.9 范围内时,产品有较低的含氮量,而 pH 值在 8.9 时含氮量最低。

表 3 pH 值和含氮量的关系

pH 值	含氮量 %	pH 值	含氮量 %
7.7	3.439	8.3	3.212
8.9	3.154	9.5	3.744

3.3.4 加酶量的变化对含氮量的影响 在温度 53℃,pH 值 8.9 时,加酶量的变化对含氮量的影响见表 4。可见,加酶量要大于 0.005 g/dL,含氮量才会显著降低,但当加酶量超过 0.03 g/dL 时,对含氮量影响已不大。

3.3.5 温度变化对含氮量的影响 在 pH8.9,酶量为 0.03~ 0.04 g/dL 时,温度和含氮量的关系见表 5。表明,温度在 47~ 53℃ 时,产品含氮量较低,而超出这一范围,产品氮含量则显著升高。

表 4 酶和含氮量的关系

加酶量 / (g/dL)	含氮量 %	加酶量 / (g/dL)	含氮量 %
0.005	3.743	0.01	3.216
0.02	3.189	0.03	3.107
0.04	3.102	0.05	3.1370

表 5 温度和含氮量的关系

温度	含氮量 %	温度	含氮量 %
44	3.468	47	3.215
50	3.187	53	3.209
56	3.571		

### 3.3.6 讨论

1) 稀碱酶解法制取鲨鱼硫酸软骨素,在酶水解糖肽键断裂过程中,破坏多糖链与蛋白质的共价结合是关键的一步<sup>[2]</sup>。

2) 通过以上单因素实验,基本确定了酶解条件,即: pH 值为 8.3~ 8.9;加酶量为 0.02~ 0.04 g/dL;温度为 47~ 53℃。在此条件下,可得到含氮量低于 3.2% 的产品。

### 3.4 正交实验优化酶解参数

为确定最优酶解条件,需在单因素实验的基础上,以含氮量、氨基己糖含量、产品得率3个指标进行考察,进一步做三因素三水平的正交实验,见表6和表7。

表6 因素和水平

水平	因素		
	A (温度 / $^{\circ}\text{C}$ )	B (pH值)	C (加酶量 /( $\text{g}/\text{dL}$ ))
1	47	8.3	0.01
2	50	8.6	0.02
3	53	8.9	0.03

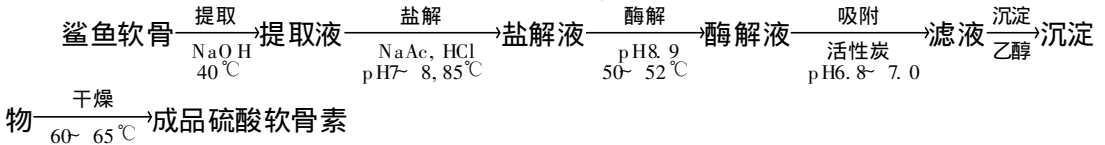
表7 正交试验分析

水平	因素					
	A (温度 / $^{\circ}\text{C}$ )	B (pH值)	C (加酶量 /( $\text{g}/\text{dL}$ ))	含氮量 /%	氨基己糖含量 /%	产品得率 /%
1	1(47)	1(8.3)	1(0.01)	3.155	28.25	35.1
2	1(47)	2(8.6)	2(0.02)	3.059	25.23	34.8
3	1(47)	3(8.9)	3(0.03)	3.071	26.61	35.4
4	2(50)	1(8.3)	3(0.03)	3.063	26.33	36.2
5	2(50)	2(8.6)	1(0.01)	3.063	23.40	34.3
6	2(50)	3(8.9)	2(0.02)	3.224	28.80	35.8
7	3(53)	1(8.3)	2(0.02)	3.141	23.56	33.7
8	3(53)	2(8.6)	3(0.03)	3.098	25.58	34.0
9	3(53)	3(8.9)	1(0.01)	3.089	26.63	35.3

经过对上述正交试验结果的方差分析,确定酶解参数为47~50 $^{\circ}\text{C}$ , pH8.9,提取液加酶量为0.02~0.03 g/dL在该条件下,酶可有效发挥水解作用,得到含氮量低、氨基己糖含量高的产品,并且产品得率也较高。

### 3.5 稀碱-酶解法制取硫酸软骨素最终工艺

通过前面酶解参数实验及其它工艺条件实验,基本可确定出稀碱-酶解法的较优工艺。



1) 提取: 取洁白干燥碎鲨鱼软骨1 kg,加6.25 L 2%的 NaOH于10 L容量瓶中,在40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中提取,隔30 min搅拌一次,浸出液比重达5 Be (20 $^{\circ}\text{C}$ )。纱布过滤,滤渣再以2.5 L质量分数2%的 NaOH于40 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡6 h,偶加搅拌,抽滤,合并滤液(约6 L)。

2) 盐解: 提取液按体积比1:1用 HCl调 pH至7.5,加2%的 NaAc,搅拌使溶解,升温至85 $^{\circ}\text{C}$ ,保温20 min,趁热过滤,得清液。

3) 酶解: 滤液用 HCl调 pH至8.9,升温至50 $^{\circ}\text{C}$ ,加酶1.62 g,水解7 h;在水解过程中,随时调 pH至(8.9±0.1)。在水解后期,用三氯乙酸检测,若水解清液浑浊,酌情添加胰蛋白酶用量。

4) 吸附: 调水解液 pH至6.8~7.0,加2%活性炭,保持 pH6.8~7.0,搅拌吸附1 h,调 pH至6.4,静置过滤。

5) 沉淀、干燥: 调滤液 pH至6.0,加95%乙醇使乙醇体积分数达75%,偶加搅拌,使微粒聚集成大颗粒沉淀,静置8 h以上。收集沉淀,用无水乙醇脱水,于60~65 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥。

## 4 结 语

改进的稀碱-酶解法与原来工艺方法比较,产品含氮量明显降低,收率也有所提高,具有应用于工业生产的实用价值。碱液可使硫酸软骨素分子中所含的羧基和硫酸基与蛋白质相应的碱基形成的盐键发生断裂而将硫酸软骨素游离出来。同时,提取液中存在的蛋白质如明

胶、弹性硬蛋白等,可经加热盐析除去一部分,所得盐解液含蛋白杂质减少,这为以后的纯化提供了方便.盐解液再经适量酶水解、活性炭吸附和乙醇沉淀等步骤,就能得到品质较好的鲨鱼硫酸软骨素.该产品为白色粉末,含氮量在 3.05% ~ 3.15%,氨基己糖质量分数在 2% ~ 29%,收率约为 35%.

## 参考文献:

- [1] 王长云.海洋功能食品研究现状和展望 [J].海洋科学,1997(2): 43~ 45
- [2] 吴梧桐主编.生物制药工艺学 [M].北京:中国医药科学出版社,1993.
- [3] 蔡平.鲨鱼软骨血管形成抑制因子研究与开发现状 [J].中国海洋药物,1996(3): 37~ 39
- [4] 宗翰,简伟强.鲨鱼不患癌症II [M].香港:顺力有限公司,1995.
- [5] 沈同.生物化学上册 [M].北京:高等教育出版社,1997. 36~ 37
- [6] 付德华.鲨鱼酸性粘多糖抗栓作用研究 [J].中国海洋药物,1993(3): 18
- [7] 刘智.硫酸软骨素生产的优化条件 [J].中国医药工业杂志,1990,21(3): 106~ 107
- [8] 沈勃江.不同工艺制备的硫酸软骨素的理化性质差异 [J].中国医药工业杂志,1990,21(5): 208~ 210
- [9] 马淑涛.不同工艺硫酸软骨的理化性质和生物活性 [J].中国医药工业杂志,1993,24(3): 127~ 131
- [10] 马淑涛.不同工艺硫酸软骨素的理化性质和生物活性 [J].中国医药工业杂志,1993(8): 348~ 351

## Study on the Production of Chondroitin Sulfate from Shark Cartilage

XU Chuan-lai, ZHOU Kang

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

**Abstract** A method of dilute alkali-enzyme hydrolysis to extract chondroitin sulfate from the shark cartilage was presented. Several methods to examine the chondroitin sulfate were also discussed, a certain range of temperature, acid concentration, the amount of enzyme exhausted during the enzyme hydrolysis determined. The effect of extracting liquid temperature, salt hydrolysis liquid temperature were investigated.

In this experiment, the kioldahl method and the spectrophotometry method were applied to examine the product. Both the nitrogen content and the hexosamine content are adopted to assess the quality of the chondroitin sulfate.

**Key words** chondroitin sulfate; dilute alkali-enzyme hydrolysis; nitrogen content; hexosamine