

鲣鱼骨硫酸软骨素提取工艺研究

陈思, 张小军*, 严忠雍, 李佩佩, 方益 (浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增殖重点实验室, 浙江舟山 316100)

摘要 [目的]以鲣鱼骨为原料,对鱼骨硫酸软骨素提取方法进行研究。[方法]以硫酸软骨素提取率为评价指标,通过单因素和正交试验优化鲣鱼骨硫酸软骨素的提取条件。[结果]在酶添加量2.5% (木瓜蛋白酶:胰蛋白酶为1:2)、料液比1:20、提取温度80℃、pH 6.5下浸提24 h、超声处理30 min,鱼骨硫酸软骨素的提取率达2.86%,纯度为90.0%。理化分析显示,鲣鱼骨硫酸软骨素颜色洁白,水分含量9.2%,氨基己糖含量30.1%,氮含量3.05%,葡萄糖醛酸含量26.9%。通过红外光谱分析,确定样品为硫酸软骨素C。[结论]利用优化工艺提取鲣鱼骨中的硫酸软骨素具有可行性,在鲣鱼加工副产物的高值化利用中具有一定的应用前景。

关键词 鲣鱼骨;硫酸软骨素;提取;酶解;超声

中图分类号 S986 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)24-069-03

Extraction Technology of Chondroitin Sulfate from *Katsuwonus pelamis* Bones

CHEN Si, ZHANG Xiao-jun*, YAN Zhong-yong et al (Key Laboratory of Marine Aquaculture, Zhejiang Institute of Marine Fisheries, Zhoushan, Zhejiang 316100)

Abstract [Objective] To research the extraction methods for chondroitin sulfate (CS) with *Katsuwonus pelamis* bones as the raw materials. [Method] With the extraction rate of chondroitin sulfate as the evaluation index, the extraction condition for chondroitin sulfate was optimized by single factor test and orthogonal test. [Result] Under the conditions of 2.5% enzyme supplementation (papain: trypsin = 1:2), 1:20 solid-liquid ratio, 80℃ extraction temperature, pH 6.5, extraction for 24 h, and ultrasonic treatment for 30 min, the extraction rate of chondroitin sulfate reached 2.86% and the purity was 90.0%. Physical and chemical analysis showed that chondroitin sulfate was white, containing 9.2% moisture, 30.1% hexosamine, 3.05% nitrogen, and 26.9% glucuronic acid. Infrared spectroscopic analysis showed that the sample was chondroitin sulfate C. [Conclusion] It is feasible to extract chondroitin sulfate from *Katsuwonus pelamis* bones by the optimized method, showing some potential for value-add utilization in *Katsuwonus pelamis* processing wastes.

Key words *Katsuwonus pelamis* bones; Chondroitin sulfate; Extraction; Enzymolysis; Ultrasound

硫酸软骨素(chondroitin sulfate,简称CS)是关节软骨处蛋白多糖形成所必需的一类糖氨基聚糖,广泛分布于人和动物的骨骼、软骨、肌腱、韧带和血管壁等组织中^[1]。硫酸软骨素具有增强机体免疫、抗关节炎^[2-4]、调节血管生成、降血脂^[5]、抗病毒^[6]、抗凝血^[7-9]、抗肿瘤^[10-11]等生物活性,主要作为处方药用于治疗风湿和类风湿疾病^[12]。此外,硫酸软骨素在医药、保健食品、美容化妆品等领域具有广阔的应用前景。硫酸软骨素主要从猪、牛、羊等畜类软骨组织中提取获得,来源和工艺^[13]较为单一。近年来,海洋生物作为新的药用资源日渐受到重视,已从孔鳐^[14]、鱿鱼^[15]、鲨鱼^[16]、鮫鳐^[17]中提取硫酸软骨素,但对于其他海洋鱼类硫酸软骨素的研究鲜见报道。鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*),属硬骨鱼纲(Osteichthyes)鲈形总目(Pereiformes)鲭科(Scombridae)鲣属(*Katsuwonus*),海洋中上层鱼类,在我国东海和南海的捕捞量大。鲣鱼除鲜销外,主要加工成冷冻鱼片或罐装食品销售,加工过程中产生的副产物占总重量的50%~70%^[18]。鱼骨占副产物的比例较大,有待进一步开发利用。笔者以鲣鱼骨为原料,在选择复合蛋白酶的基础上,对鱼骨硫酸软骨素的提取效率进行研究,以期鲣鱼产品加工副产物的高值化利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 鲣鱼骨,舟山水产公司提供;硫酸软骨素标准品,购于美国Sigma公司;木瓜蛋白酶、胰蛋白酶,购于

国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为分析纯,购于华东医药公司。

723分光光度计,上海第三分析仪器厂;pH计,杭州华光无线电厂;旋转蒸发器,郑州科工贸有限公司;恒温水浴箱,上海医疗器械五厂;AVATAR-360型红外光谱仪,美国尼高力公司;搅拌机,杭州仪表电机厂;离心沉淀机,上海医用分析仪器厂;冷冻干燥仪,北京博医康实验仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 原料处理。新鲜鲣鱼骨将余肉剔净,湿骨60℃烘干后粉碎成粉末,4℃干燥保存。

1.2.2 提取工艺流程。鱼骨干品→木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和蒸馏水提取→离心得上清液→sevag法除蛋白→70%乙醇沉淀→沉淀冷冻干燥→硫酸软骨素粗品。

1.2.3 酶解工艺条件的确定。对复合酶的比例和pH进行优化。取3份各10g鲣鱼骨样品,按2.0%的比例添加木瓜蛋白酶,按1:30(M/V)的料液比加入蒸馏水,分别调节pH为5.0、6.0、7.0,于50℃浸提24h,超声辅助处理30min,测得提取液CS总含量分别为90.7、123.9、185.4mg。另取3份样品,采用胰蛋白酶提取,调节pH为5.0、6.0、7.0,测得提取液CS总含量分别为88.5、164.6、116.7mg。

1.2.4 提取率影响因素的确定。①料液比。取鲣鱼骨10g,酶添加量2.0% (木瓜蛋白酶:胰蛋白酶为1:2),提取温度50℃,pH 6.5下浸提24h,超声辅助处理30min,料液比分别为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50,过滤后测定液体中硫酸软骨素的总含量。②提取温度。取鲣鱼骨10g,酶添加量2.0% (木瓜蛋白酶:胰蛋白酶为1:2),按1:30的料液比加入蒸馏水,pH 6.5下浸提24h,超声辅助处理30min,提取温度分别

基金项目 浙江省公益技术研究项目(2014C32087)。

作者简介 陈思(1984-),女,浙江杭州人,工程师,博士,从事水产品加工及质量安全方面的研究。*通讯作者,高级工程师,博士,从事水产品加工及质量安全方面的研究。

收稿日期 2016-07-06

为40、50、60、70、80℃,过滤后测定液体中硫酸软骨素的总含量。③提取时间。取鲑鱼骨10g,酶添加量2.0%(木瓜蛋白酶:胰蛋白酶为1:2),按1:30的料液比加入蒸馏水,提取温度50℃,pH 6.5下浸提24h,超声辅助提取时间分别为10、20、30、40min,过滤后测定液体中硫酸软骨素的总含量。④酶添加量。取鲑鱼骨10g,按1:30的料液比加入蒸馏水,提取温度50℃,pH 6.5下浸提24h,超声辅助处理30min,酶添加量分别为1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%(木瓜蛋白酶:胰蛋白酶为1:2),过滤后测定液体中硫酸软骨素的总含量。

1.3 测定项目与方法 ①氨基己糖含量。采用卫生部颁布药品标准规定的方法^[19],并对关键的两步:乙酰化和显色操作分别进行改进^[20],做到冰浴乙酰化同时计时,显色随加随计时。氨基己糖含量 $\times 2.82$ 即为CS的含量。②葡萄糖醛酸含量。按照文献^[21]方法进行测定。③氮含量。按照微量凯氏定氮法进行测定。④水分含量。按照常压干燥法进行测定。⑤红外光谱分析。在400~4000 cm^{-1} 波数范围内扫描,KBr压片测定。

2 结果与分析

2.1 酶解工艺条件的确定 由图1可知,木瓜蛋白酶在pH 7.0下提取效果最好,而胰蛋白酶在pH 6.0时提取率最高。在此单因素试验的基础上,进一步比较复合酶比例(木瓜蛋白酶:胰蛋白酶=1:2、1:1、2:1)和pH(6.0、6.5、7.0)对鲑鱼

骨CS提取效果的影响。结果显示,复合酶比例1:2、pH为6.5时CS总含量最高,达205.1mg。

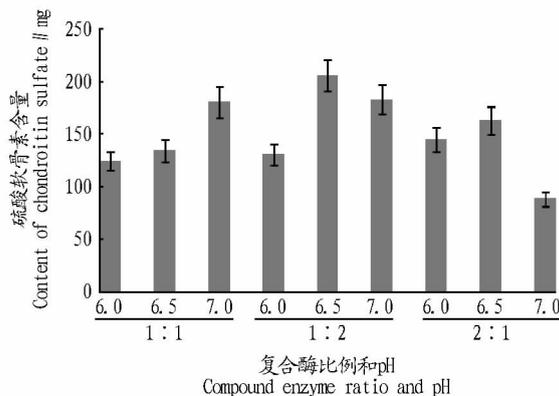


图1 复合酶比例和pH对硫酸软骨素提取率的影响

Fig. 1 Effects of compound enzyme ratio and pH on the extraction rate of the chondroitin sulfate

2.2 硫酸软骨素提取率影响因素的优化

2.2.1 料液比。由图2可知,鲑鱼骨中硫酸软骨素的提取量随料液比的增大变化较为明显,当料液比从1:10提高到1:20时,CS含量增加,但当料液比大于1:20时,CS含量逐渐降低。因此,选择料液比1:20左右较为合适。

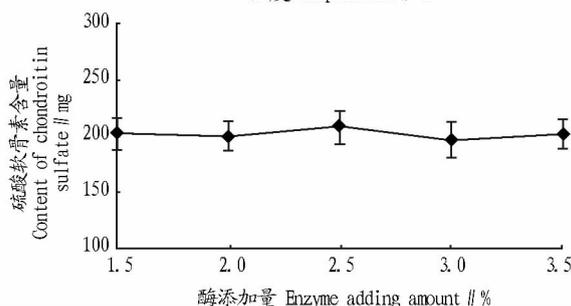
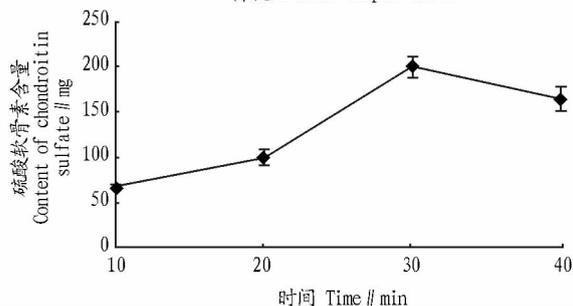
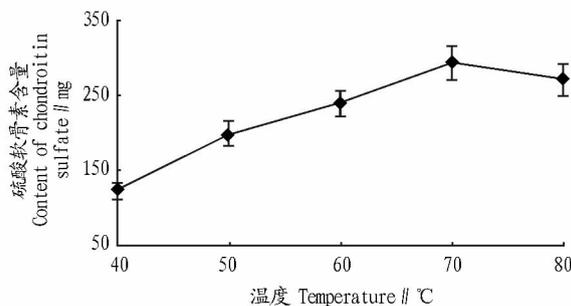
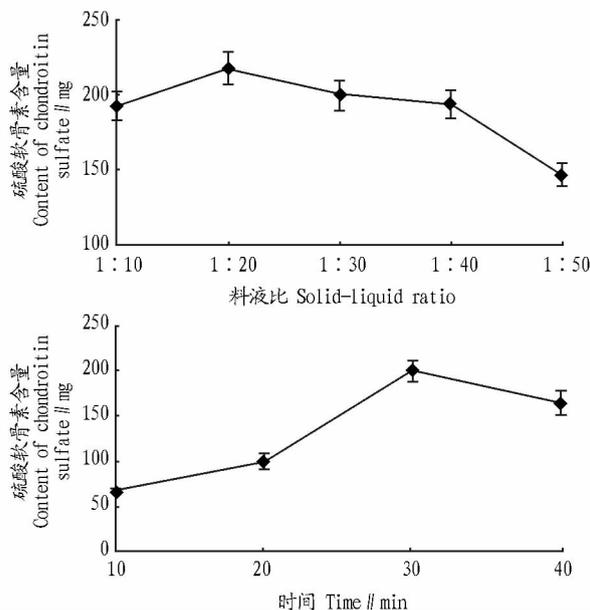


图2 料液比、温度、时间和酶添加量对硫酸软骨素提取率的影响

Fig. 2 Effects of solid-liquid ratio, temperature, time and enzyme adding amount on the extraction rate of the chondroitin sulfate

2.2.2 提取温度。由图2可知,随着提取温度的升高,硫酸软骨素的提取量不断增加,当提取温度为70℃时CS含量达到最大,而后下降。研究表明,蛋白酶的最适温度并非保证最好的提取效果,一定的高温反而有利于CS从鱼骨组织中溶出。考虑到90℃以上的高温可能对多糖的结构和活性有一定的影响,因此,选择60~80℃作为提取的最适温度。

2.2.3 提取时间。由图2可知,随着提取时间的增加,硫酸软骨素的提取量相应增加;当超声提取时间由10min延长至

30min,CS提取率增加趋势明显;当超声提取时间为40min时,CS含量有所下降。因此,选择超声辅助提取时间30min左右为宜。

2.2.4 酶添加量。由图2可知,酶添加量在2.5%时硫酸软骨素的提取量最高。随着酶添加量的增加,CS含量变化趋势平缓,可见酶添加量对CS的提取影响并不显著。

2.3 正交试验结果 根据单因素试验结果,选择料液比、提取温度、超声时间3个对硫酸软骨素提取率影响显著的因

素,以 CS 提取率为指标,按 $L_9(3^3)$ 进行正交试验设计,各因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor		
	料液比(A) Solid-liquid ratio	提取温度(B) Extraction temperature ℃	超声时间(C) Ultrasound time//min
1	1:10	60	20
2	1:20	70	30
3	1:30	80	40

由表 2 可知,超声辅助提取硫酸软骨素的过程中,提取温度对硫酸软骨素的提取率影响最大,其次是超声时间,料液比的影响最小。最佳组合为 $A_2B_3C_2$,即在酶添加量 2.5% (木瓜蛋白酶:胰蛋白酶为 1:2)、料液比 1:20、提取温度 80℃、pH 6.5 下浸提 24 h、超声处理 30 min 的最佳工艺条件下,硫酸软骨素的提取率最高。在此最佳工艺条件下进行验证试验,可从鳕鱼骨中提取到 28.60 mg/g 硫酸软骨素,提取率达 2.86%。

2.4 理化性质分析 取 100 g 鳕鱼骨按照优化的工艺提取

表 3 硫酸软骨素的理化性质

Table 3 Physicochemical properties of chondroitin sulfate

项目 Items	颜色 Color	水分含量 Moisture content//%	氨基己糖含量 Hexosamine content//%	氮含量 Nitrogen content//%	葡萄糖醛酸含量 Glucuronic acid content//%	CS 纯度 CS purity %	CS 得率 CS extraction rate//%
标准 Standard	白色或类白色	≤10.0	国内 ≥24.0 出口 ≥30.1	2.5 ~ 3.8	—	—	—
CS	洁白	9.2	30.1	3.05	26.9	90.0	2.86

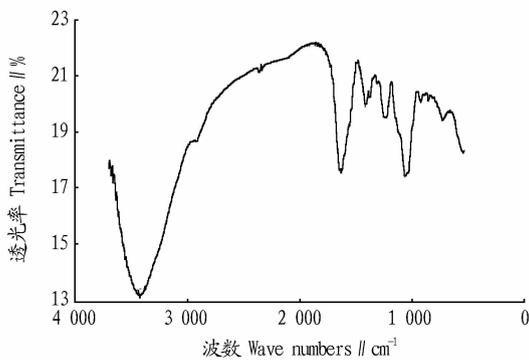


图 3 硫酸软骨素提取率的红外光谱

Fig. 3 Infrared spectrum of the extraction rate of chondroitin sulfate

2.5 红外吸收光谱 由图 3 可知,红外光谱在 3430 cm^{-1} 附近有一宽的强吸收峰,为糖环上羟基($-\text{OH}$)的伸缩振动引起;在 2925 cm^{-1} 附近有糖分子中甲基($-\text{CH}_3$)伸缩振动的特征峰;在 1631 cm^{-1} 附近有乙酰氨基($-\text{NHCOCH}_3$)伸缩振动的特征峰;在 1414 cm^{-1} 附近有羧基($-\text{COO}^-$)的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动;在 1236 cm^{-1} 附近有硫酸基($-\text{O}-\text{SO}_3^-$)的 $\text{S}=\text{O}$ 伸缩振动;在 1069 cm^{-1} 附近有糖环醚($\text{C}-\text{O}-\text{C}$)伸缩振动的

硫酸软骨素,测定所得 CS 的各项指标,其结果见表 3。由表 3 可知,鳕鱼骨硫酸软骨素各项指标均符合卫生部颁布药品标准规定的硫酸软骨素指标^[19]。

表 2 硫酸软骨素提取正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test for the extraction of chondroitin sulfate

试验号 Test No.	因素 Factor			提取率 Extraction rate//%
	A	B	C	
1	1	1	1	1.61
2	1	2	2	2.08
3	1	3	3	2.16
4	2	1	2	2.12
5	2	2	3	2.30
6	2	3	1	2.13
7	3	1	3	1.97
8	3	2	1	1.92
9	3	3	2	2.53
k_1	1.95	1.90	1.89	
k_2	2.18	2.10	2.24	
k_3	2.14	2.27	2.14	
R	0.23	0.37	0.36	

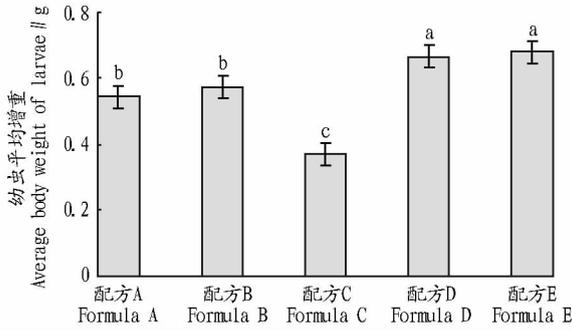
特征峰;在 926 cm^{-1} 附近有吡喃环非对称环伸缩振动的特征峰。表明样品中含有硫酸软骨素所有羟基、甲基、乙酰氨基、羧基、硫酸基和糖环等官能团,以上红外光谱特征与其他研究结果^[17,22]一致,表明鳕鱼骨硫酸软骨素为硫酸软骨素 C。

3 结论

该研究通过系列优化试验建立了鳕鱼骨中硫酸软骨素的提取工艺,为有效利用鳕鱼加工副产物提供了新思路。样品采用木瓜蛋白酶和胰蛋白酶复合酶解,80℃水浸提 24 h 并辅以超声提取,sevag 法除蛋白,最后用 70% 乙醇沉淀获得鳕鱼骨硫酸软骨素。该方法硫酸软骨素提取率达 2.86%,纯度为 90.0%,产品为白色粉末,水分含量 9.2%,氨基己糖含量 30.1%,氮含量 3.05%,葡萄糖醛酸含量 26.9%。红外光谱特征显示其为硫酸软骨素 C。

参考文献

- [1] 李燕妮. 不同降解方法制备低分子量硫酸软骨素的比较[J]. 化学与生物工程,2014,31(3):63-65.
- [2] KELLY G S. The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfates in the treatment of degenerative joint disease[J]. Altern Med Rev,1998,3(1):27-39.
- [3] CHOU M M, VERGNOLLE N, MCDUGALL J J, et al. Effects of chondroitin and glucosamine sulfate in a dietary bar formulation on inflammation, interleukin-1beta, matrix metalloproteinase-9, and cartilage damage in arthritis[J]. Exp Biol Med (Maywood),2005,230(4):255-262.

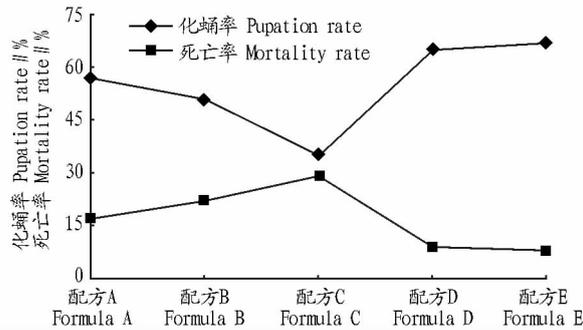


注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图1 复合饲料对黄粉虫幼虫平均体重的影响

Fig. 1 Effects of different compound feeds on the average body weight of *T. molitor* larvae



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图2 不同复合饲料对黄粉虫化蛹率和死亡率的影响

Fig. 2 Effects of different compound feeds on the pupation rate and mortality rate of *T. molitor*

蛹率最低,幼虫生长发育速度迟缓,其发育历期较长。配方E是黄粉虫幼虫生长发育的最适配方。配方E可以加快黄粉虫的生长历期,提高成虫繁殖力,降低黄粉虫的饲养成本。

3 结论与讨论

人工饲料中的营养成分不同搭配可以满足适宜黄粉虫的生长需要,复合饲料培养的黄粉虫生长速较快,生长发育正常,且繁殖周期较短,繁殖力普通较强,对比国内相关报道,其化蛹率和死亡率均略优于其他饲料^[8]。如果饲料的营养成分比例不合理,则会使黄粉虫幼虫的生长发育变缓,蜕皮次数增多,化蛹率和繁殖力显著下降。

该试验采用多种复合饲料进行了黄粉虫幼虫的人工饲养,配方E配制的复合饲料喂的黄粉虫幼虫体重增长明显,配方D的饲料效果也较好,但成本较高。通过对黄粉虫人工饲料的合理搭配,可以有效降低饲养的成本,缩短幼虫的发育历期,提高幼虫的产量。复合饲料玉米粉+螺旋藻粉配制的复合饲料E对于黄粉早幼虫的体重增长明显,其次是玉米粉+胆固醇配制的复合饲料D的饲喂效果也很好,但成本略高。该研究可为黄粉虫的规模化养殖奠定基础。

参考文献

- [1] 蒋素容,蔡艳,周宇娜.不同饲料对黄粉虫幼虫水分及粗蛋白和粗脂肪含量的影响[J].四川农业大学学报,2012,30(6):243-247.
- [2] 张丹,周玉书,李庆辉.不同饲料对黄粉虫幼虫生长发育的影响[J].江苏农业科学,2008(3):274-276.
- [3] 陈彤.黄粉虫养殖与利用[M].北京:金盾出版社,2000.
- [4] 刘伟强,罗来凌.黄粉虫幼虫营养成分分析[J].广州食品工业科技,1999,15(1):56-57.
- [5] 刘炳仁.黄粉虫养殖技术[J].种植与养殖,2000,30(12):47-48.
- [6] 肖银波,周祖基,杨伟,等.复合饲料对黄粉虫幼虫生长及存活的影响[J].生态学报,2003,23(4):673-680.
- [7] 陈根富,刘团举.黄粉虫的生物学特性及养殖技术的研究[J].福建师范大学学报(自然科学版),1992,8(1):66-74.
- [8] 杨文乐,徐敬明.不同饲料配方对黄粉虫幼虫生长发育的影响研究[J].黑龙江畜牧兽医,2013(21):92-94.

(上接第71页)

- [4] 陈磊,凌沛学,贺艳丽,等.硫酸软骨素和玻璃酸钠联合应用治疗木瓜酶致兔膝关节关节炎[J].中国生化药物杂志,2009,30(1):33-35.
- [5] 林进国,刘甘泉.鲨鱼软骨酸性粘多糖对大鼠高血脂影响的研究[J].中国临床医药研究杂志,2007(1):3-4.
- [6] BERGEFALL K, TRYBALA E, JOHANSSON M, et al. Chondroitin sulfate characterized by the E-disaccharide unit is a potent inhibitor of herpes simplex virus infectivity and provides the virus binding sites on gro2C cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280(37):32193-32199.
- [7] MOURAO P A, BOISSON-VIDAL C, TAPON-BRETAUDIÈRE J, et al. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm [J]. Thromb Res, 2001, 102(2):167-176.
- [8] MAKSIMENKO A V, GOLUBYKH V L, TISCHENKO E G. Catalase and chondroitin sulfate derivatives against thrombotic effect induced by reactive oxygen species in a rat artery [J]. Metab Eng, 2003, 5(3):177-182.
- [9] 林洪,姬胜利.硫酸软骨素的药理作用及应用研究进展[J].食品与药品,2006,8(12A):4-7.
- [10] 李东霞,李德良,张双全.鲨鱼软骨多糖的理化性质及其与DNA分子相互作用的研究[J].海洋科学,2000,24(5):40-43.
- [11] 刘克为,迟·依荷巴丽,吕静.鲨鱼软骨素联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌疗效观察[J].中国肿瘤临床与康复,2009,16(2):167-169.
- [12] GOLDBERG S H, VON FELDT J M, LORMER J H. Pharmacologic therapy for osteoarthritis [J]. Am J Orthop, 2002, 31(12):673-680.

- [13] 马淑涛,张天民.硫酸软骨素生产工艺探讨[J].中国医药工业杂志,1993(18):348.
- [14] 刘坤,刘飒.孔羧硫酸软骨素的制备[J].中国海洋药物杂志,2004,99(3):19-22.
- [15] 陈小娥,方旭波,余辉,等.鲑鱼软骨中硫酸软骨素的提取工艺研究[J].食品科技,2008,33(12):214-217.
- [16] 郑江,关瑞章,黄世玉.鲑鱼和鲨鱼硫酸软骨素红外光谱特性的比较研究[J].光谱学与光谱分析,2008(1):106-109.
- [17] 张小军,张虹.鲑鱼软骨硫酸软骨素的提取及性质研究[J].食品工业科技,2010(12):258-260.
- [18] VIZCARRA - M, AGANA L A, AVILA E, SOTELO A. Silage preparation from tuna fish waste and its nutritional evaluation in broilers [J]. J Sci Food Agric, 1999, 79:1915-1922.
- [19] 国药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:二部第六册(生化药品第一分册)[S].北京:化学工业出版社,1998:138-139.
- [20] 齐敬总,闰晓玲,王凤山.硫酸软骨素含量测定方法介绍[J].中国生化药物杂志,2002,23(3):162.
- [21] 凌沛学.透明质酸[M].北京:中国轻工业出版社,2000:41.
- [22] MATHEWS M B, WISNER L A, IWAYAMA Y, et al. Isomeric chondroitin sulfate [J]. Nature, 1958, 181:421.