

# 吸附法制备大麻哈鱼硫酸软骨素的工艺优化

赵玲<sup>1</sup> 殷邦忠<sup>1</sup> 刘淇<sup>1\*</sup> 曹荣<sup>1</sup> 赵丹<sup>1</sup> 杨贤庆<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 农业部水产品加工重点实验室 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510301)

**摘要** 以去肉后的大麻哈鱼鱼头为原料, 采用复合酶酶解提取硫酸软骨素, 研究 D958 树脂分离纯化硫酸软骨素的效果; 以解吸率为指标, 研究吸附温度、时间及酶解液 pH 对硫酸软骨素纯化效果的影响。结果表明, 采用 D958 树脂纯化大麻哈鱼鱼头硫酸软骨素的最佳工艺条件为: 酶解液 pH 6.0, 4℃ 吸附 3 h; 此条件下硫酸软骨素的解吸率达 87.66%, 纯化效果最好。因此树脂吸附法能从大麻哈鱼鱼头酶解液中有效分离得到硫酸软骨素, 为大麻哈鱼加工废弃物的高值化利用开辟了一个新途径。

**关键词** 大麻哈鱼; 硫酸软骨素; 分离纯化; 树脂

中图分类号 S986 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)03-0112-05

## Optimized absorption method to isolate chondroitin sulfate from *Oncorhynchus keta*

ZHAO Ling<sup>1</sup> YIN Bang-zhong<sup>1</sup> LIU Qi<sup>1\*</sup> CAO Rong<sup>1</sup>

ZHAO Dan<sup>1</sup> YANG Xian-qing<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangdong 510301)

**ABSTRACT** The levels of chondroitin sulfate in *Oncorhynchus keta* are low, and the traditional method to separate and purify chondroitin sulfate primarily focus on cartilage. The present study was conducted to establish a new method to effectively obtain chondroitin sulfate from the low content raw materials. Chondroitin sulfate was prepared and isolated from the fish head through compound protease digestion and D958 resin adsorption. We also evaluated the effects of pH value of enzymatic hydrolysate, adsorption temperature and time on purification using the desorption capacity of chondroitin sulfate as an index. The results showed that the optimum purification conditions using D958 resin were as follows: the pH of enzymatic hydrolysate was 6.0, and the absorption temperature and time were 4℃ and 3 h respectively. The desorption rate was up to 87.66% under the optimum conditions. Chondroitin sulfate was effectively purified by the resin adsorption method. We have developed a key method to separate and purify chondroitin sulfate from low content raw material, which pave a new pathway for the utilization of wastes from *O. keta* processing.

公益性行业(农业)科研专项(201003055-06)资助

\* 通讯作者。E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830760

收稿日期: 2013-07-30; 接受日期: 2013-08-23

作者简介: 赵玲(1985-), 女, 硕士, 主要从事水产品加工与综合利用研究。E-mail: zhaoling922@sina.com

**KEY WORDS** *Oncorhynchus keta*; Chondroitin sulfate; Separation and purification; Resin; Adsorption

硫酸软骨素(Chondroitin Sulfate, CS)是由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰基-D-氨基半乳糖为基本单位聚合成的酸性粘多糖,具有多种生物活性,主要用于治疗关节炎和冠心病,对神经痛、偏头痛、动脉粥样硬化等病症也具有一定的疗效(Volpi 2009; Uebelhart *et al.* 2006)。CS 广泛分布于动物的软骨、韧带和角膜等组织中。传统上,CS 主要从猪、牛、鸡等畜禽动物的软骨组织中提取得到,因而来源较单一(马淑涛等 1993)。CS 的常用分离方法有乙醇沉淀法、离子交换法、季铵盐配合法、吸附法和纤维素分离法等。其中,谢捷等(2012)采用离子交换法从猪鼻骨酶解液中分离纯化 CS,既提高了产品的质量和收率,又降低了生产成本。

近年来,从海洋生物资源中提取 CS 已经成为众多学者的研究热点,且取得了诸多研究成果。鱼类软骨中 CS 的含量也很丰富(马淑涛等 1992;徐庆阳等 2004),目前国内外学者已经相继从鲨鱼、鲟鱼、鮫鳊鱼、孔鳐、鱿鱼等鱼骨中分离得到 CS(张弘等 2009;许永安等 2011;徐传屯等 2009;李连等 2011;张小军等 2010;刘坤等 2004;Lignot *et al.* 2003;陈小娥等 2008),但从大麻哈鱼骨中分离 CS 鲜有研究报道。

大麻哈鱼 *Oncorhynchus keta*,又名大马哈鱼,是名贵的经济鱼类,素以肉质鲜美、营养丰富著称,是我国重要的出口加工品种,而加工过程中产生大量的鱼头、鱼鳍、鱼骨等副产物尚未得到有效利用。由于大麻哈鱼骨组织大部分为硬骨且 CS 的含量较低,而传统的分离纯化方法主要是针对 CS 含量较高的软骨,因此需要开发新的分离纯化方法。本研究采用 D958 树脂从大麻哈鱼鱼头酶解液中纯化 CS,并研究吸附温度、时间及酶解液 pH 对其纯化效果的影响。该方法解决了低含量 CS 原料——大麻哈鱼头制备 CS 的关键技术,为其加工副产物的高值化利用提供了新途径,具有广阔的发展前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

去肉鱼头的制备:大麻哈鱼鱼头,2012 年 11 月由山东烟台嘉惠海洋科技有限公司提供,投入 80 - 100℃ 水中漂烫后去肉,洗净沥干备用。

D958 树脂(西安蓝晓科技新材料股份有限公司),CS 标准品(Sigma 公司),复合蛋白酶(由胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和脂肪酶按一定比例自行配制而成),活性炭(昆山华光活性炭有限公司),95% 乙醇(食品级,济南圣丰工贸有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 去肉鱼头中基本成分的测定

水分含量:直接干燥法(食品中水分的测定 GB/T5009.3-2003);灰分含量:高温灼烧法(食品中灰分的测定 GB/T5009.4-2010);蛋白含量:凯氏定氮法(食品中蛋白质的测定 GB/T5009.5-2010);脂肪含量:索氏抽提法(食品中脂肪的测定 GB/T 5009.6-2003)。

#### 1.2.2 样品的制备工艺流程

原料预处理→酶解提取→灭酶→离心→脱色脱腥→吸附→装柱→洗脱→浓缩→脱盐→醇沉干燥

##### 1.2.2.1 原料预处理

称取一定量的大麻哈鱼去肉鱼头,加入两倍体积的丙酮浸泡过夜以脱脂。

##### 1.2.2.2 酶解提取

加入适量复合蛋白酶 55℃ 水解 5 h(料液比 1:1),每 10 min 搅拌 1 次,酶解液 pH 值控制在 9.0 左右,酶解结束后升温至 95℃ 灭酶。冷却后,调 pH 至 6.0,离心取上清液,加入 0.3% 的活性炭搅拌脱色,过滤后得酶解液。

### 1.2.2.3 树脂预处理

用去离子水浸泡树脂漂洗干净,然后用85%(V/V)酒精浸泡3h,去离子水洗净。再用两倍体积7%的盐酸溶液浸泡3h,去离子水反复清洗至中性,用两倍体积为8%的NaOH溶液浸泡3h,再用去离子水反复洗至中性备用。

### 1.2.2.4 CS吸附与洗脱

用大孔树脂吸附CS,树脂用量为CS量的10-12倍,低温搅拌吸附1-2h。将吸附后的树脂装柱,先用两倍柱体积pH 6.0、浓度为0.07 mg/ml的NaCl溶液洗脱,再用pH 8.0、浓度为3.0 mg/ml的NaCl溶液洗脱,测定洗脱液中CS含量及蛋白含量,并计算吸附率。

分析方法:

蛋白含量:考马斯亮蓝染色法;CS含量:间苯三酚分光光度计法(高华等 2000;张华琚等 2006)

吸附率(%) =  $(C_0 - C_e) / C_0 \times 100$ , 其中: $C_0$ 为初始质量浓度, $C_e$ 为平衡质量浓度。

### 1.2.2.5 醇沉干燥

向洗脱液中加入适量的NaCl,边搅拌边加入两倍体积的95%乙醇。静置沉淀1h,布氏漏斗过滤,固体烘干,计算CS的得率。

CS得率 =  $m_1 / m_0 \times 100\%$ , 其中, $m_1$ 为CS的质量, $m_0$ 为去肉鱼头的质量(以湿基计)。

### 1.2.3 酶解液pH对分离纯化效果的影响

称取一定量预处理过的树脂于具塞三角锥形瓶中,分别加入适量pH为6.0、7.0、8.0、9.0的酶解液,置于25℃下振荡吸附4h,测定吸附平衡时CS质量浓度,计算解吸率(Volpi *et al.* 1999)。

### 1.2.4 吸附温度对分离纯化效果的影响

称取一定量预处理过的树脂于具塞三角锥形瓶中,加入适量pH为6.0的酶解液,分别置于4、15、25、35、45℃下振荡吸附4h,测定吸附平衡时CS质量浓度,计算解吸率(Volpi *et al.* 1999)。

### 1.2.5 吸附时间对分离纯化效果的影响

称取一定量预处理过的树脂于具塞三角锥形瓶中,加入适量pH为6.0的酶解液,分别置于4℃下振荡吸附1、2、3、4、5h后,测定吸附平衡时CS质量浓度,计算解吸率(Volpi *et al.* 1999)。

所有试验均重复3次,结果以平均值±标准偏差表示,应用SPSS 17.0进行数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 去肉大麻哈鱼鱼头的基本成分

去肉鱼头中基本成分的测定结果,如表1所示。

### 2.2 CS吸附试验结果

以试剂空白为参比液,在400-800 nm范围内扫描,结果如图1所示,在波长446 nm处有最大吸收,这与高华等(2000)的检测结果一致,因而选择446 nm作为测定波长。

经测定,大麻哈鱼去肉鱼头酶解液中蛋白含量为13.56 mg/ml,CS含量为21.16 mg/ml。当酶解液pH为6.0,室温吸附4h后,D958树脂对蛋白的吸附率为18.69%,对CS的吸附率为28.92%;经二次洗脱得到CS,计算其得率为1.29%。

表1 去肉大麻哈鱼鱼头的基本成分

Table 1 The basic components of fish head after removing flesh

项目 Items	水分 Moisture	灰分 Ash	蛋白 Protein	脂肪 Fat
百分比 Percentage(%)	29.45 ± 0.55	11.25 ± 0.22	42.01 ± 0.98	17.18 ± 0.35

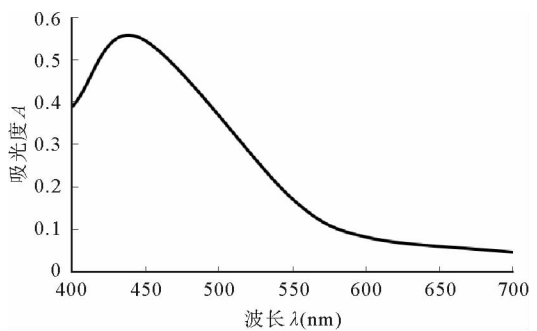


图1 CS的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of chondroitin sulfate

## 2.3 酶解液 pH、吸附温度和时间对纯化效果的影响

以 CS 的解吸率为指标,考察酶解液 pH、吸附温度和时间对分离纯化效果的影响,优化其纯化工艺。

### 2.3.1 酶解液 pH 对纯化效果的影响

酶解液 pH 对 CS 纯化效果的影响见图 2,在一定范围内,随着酶解液 pH 值的升高,CS 的解吸率逐渐降低,有较好的量效关系。当酶解液 pH 值为 6.0 时,CS 的解吸率最高。

### 2.3.2 吸附温度对纯化效果的影响

吸附温度对 CS 纯化效果的影响见图 3,可以看出,随着温度的升高,CS 的解吸率均不同程度地降低;4℃ 时 CS 的解吸率最高。当吸附达到平衡后,提高温度会降低其吸附量。考虑到在酸性环境中,温度过高 CS 会发生部分降解反应,因而选择 4℃ 作为最佳的吸附温度。

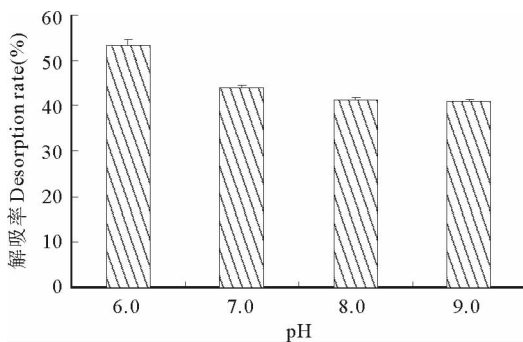


图 2 酶解液 pH 对 CS 纯化效果的影响

Fig. 2 Effect of pH of enzymatic hydrolysate on the purification of chondroitin sulfate

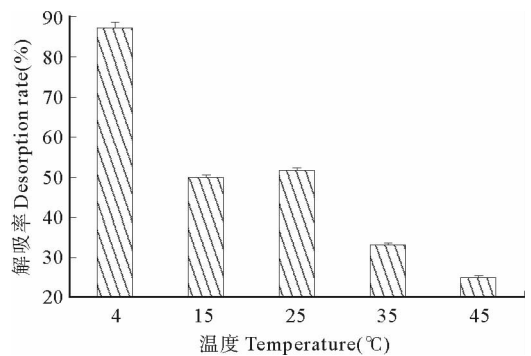


图 3 吸附温度对 CS 纯化效果的影响

Fig. 3 Effect of adsorption temperature on the purification of chondroitin sulfate

### 2.3.3 吸附时间对纯化效果的影响

吸附时间对 CS 纯化效果的影响见图 4。由图 4 可知,随着吸附时间的增加,解吸率也随之升高;当吸附达到平衡时,CS 的解吸率最高,解吸率达 87.66%;吸附达到平衡后,增加吸附时间又会降低其吸附量,解吸率也随之降低,因而选择最佳吸附时间吸附 3 h 后进行二次洗脱。

## 3 结论

本研究以大麻哈鱼加工副产物——鱼头为原料,先将其进行复合酶酶解,采用 D958 树脂纯化 CS,以树脂对蛋白和 CS 的吸附量和解吸率为指标,考察了吸附温度、时间及酶解液 pH 对 CS 纯化效果的影响,获得了最佳纯化工艺条件,即以 D958 树脂纯化 CS 时,酶解液 pH 6.0、4℃ 吸附 3h,在此条件下,CS 的解吸率高达 87.66%。该工艺能最大程度地从大麻哈鱼头酶解液中分离纯化出 CS,解决了低含量 CS 原料——大麻哈鱼头制备 CS 的关键技术,为有效利用大麻哈鱼加工副产物资源提供了科学依据。

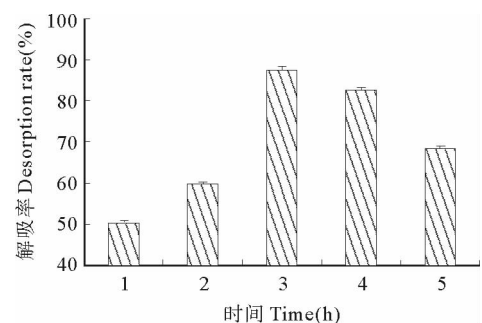


图 4 吸附时间对 CS 纯化效果的影响

Fig. 4 Effect of adsorption time on the purification of chondroitin sulfate

## 参 考 文 献

- 马淑涛,张天民.1992.各类硫酸软骨素制备方法概述.中国医药工业杂志,23(12):557-560
- 马淑涛,张天民,刘立,李南.1993.硫酸软骨素生产工艺探讨.中国药学杂志,12:741-743
- 许永安,陈守平,吴靖娜,廖登远,王茵.2011.鲟鱼硫酸软骨素的制备工艺研究.渔业科学进展,32(3):121-129
- 李连,臧恒昌,孙春晓.2011.硫酸软骨素生产工艺研究进展.中国生化药物杂志,32(5):415-417
- 刘坤,刘飒.2004.孔鳐硫酸软骨素的制备.中国海洋药物,99(3):19-22
- 张小军,张虹.2010.鮫鳔鱼硫酸软骨素的提取及性质研究.食品工业科技,31(12):258-260
- 张弘,谢果凰,茅大振,何斌辉,傅春燕,刘冰冰,杨文鸽.2009.响应面法优化鲨鱼硫酸软骨素的提取条件.食品科学,30(22):231-235
- 张华琚,陈敏,李慧,张世湘.2006.硫酸软骨素间苯三酚光度分析法的改进研究.食品研究与开发,27(7):163-168
- 陈小娥,方旭波,余辉,宋茹.2008.鲑鱼软骨中硫酸软骨素的提取工艺研究.食品科技,32(12):214-217
- 高华,刘坤,于兹东,耿芳宋.2000.间苯三酚分光光度法测定硫酸软骨素的研究.中国生化药物杂志,21(5):247-248
- 徐传屯,关瑞章,郑江,黄世玉,黄文树.2009.养殖鲟鱼软骨中硫酸软骨素的优化提取工艺研究.中国生化药物杂志,30(3):154-157
- 徐庆阳,黎兴荣,石墨,陈宁.2004.硫酸软骨素研究现状.生物技术通讯,15(6):633-635
- 谢捷,罗小芳,朱兴一,王平.2012.离子交换法分离纯化猪硫酸软骨素的研究.浙江工业大学学报,40(2):124-128
- GB/T5009.3-2003 食品中水分的测定 北京:中国标准出版社
- GB/T5009.6-2003 食品中脂肪的测定 北京:中国标准出版社
- GB/T5009.4-2003 食品中灰分的测定 北京:中国标准出版社
- GB/T5009.5-2003 食品中蛋白质的测定 北京:中国标准出版社
- Lignot B, Lahogue V, Bourseau P. 2003. Enzymatic extraction of chondroitin sulfate from skate cartilage and concentration-desalting by ultrafiltration. J Biotechnol 103(3):281-284
- Uebelhart D, Knols R, Debruin ED. 2006. Treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate. Adv Pharmacol 53:475-488
- Volpin N. 2009. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. J Pharm Pharmacol 61(10):1271-1280
- Volpi N, Mucci A, Schenetti L. 1999. Stability studies of chondroitin sulfate. Carbohydrate Research 315(3-4):345-349

订正:《渔业科学进展》2014年35卷第2期第22页,《声学仪器间干扰信号的消除及其在南极磷虾集群研究中的应用》一文,中文摘要中,更正为“白天虾群几何中心分布水层的平均深度为**77.4 m**,”;英文摘要中,更正为“and a mean thickness of **10.8 m** in daytime, while the swarms tended to migrate upward nocturnally at a mean depth of **41.2 m**”