

超声波辅助碱-酶水解法提取牦牛气管硫酸软骨素工艺研究

顾培发¹, 曹佳佳* 青海师范大学化学化工学院, 青海 西宁 810000

* 通讯作者: 曹佳佳 (1984-), 女, 实验师, 硕士。研究方向: 天然产物开发

基金项目: 青海师范大学校级本科生创新创业项目“牦牛气管中硫酸软骨素的提取及应用开发”

摘要:以废弃牦牛气管为原料, 采用超声波辅助碱-酶水解法提取硫酸软骨素, 通过探究料液比, 超声功率, 超声时间对其得率的影响, 并确定最佳提取条件结合正交法得出最优工艺路线。试验表明, 超声波辅助碱-酶水解法提取硫酸软骨素最优工艺条件为: 料液比 1 : 10, 超声波功率为 390 W, 超声时间为 50 min 的条件下硫酸软骨素的得率可达 17.34%。

关键词: 硫酸软骨素; 超声波提取; 正交法; 天然产物提取

硫酸软骨素 (Chondroitin sulfate, 简称 ChS) 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^[1-3]。ChS 可帮助促进眼角膜创伤的愈合, 缓解一定程度上的眼部干燥症状, 也常被用来改善和治疗关节疼痛的病症, 以及抗肿瘤和抑制病毒活性有一定治疗意义^[4]。我国硫酸软骨素的大部分产地主要在南方沿海地区, 主要提取材料有海产和畜牧产品, 例如鲟鱼, 金枪鱼头, 鱿鱼软骨, 也有鸡胸软骨, 鹅全骨, 猪骨等, 其原料大部分是动物软骨。

牦牛喉软管是牦牛屠宰后, 取走畜牧产品后遗留下的副产物之一。其中含有大量优质的硫酸软骨素。但目前, 大量屠宰企业将牦牛喉软管作为废物处理, 处理方式一般为廉价出售, 或用于加工饲料, 没有资源循环利用的意识。优化处理牦牛屠宰后的副产物, 避

免污染环境, 保有其经济价值, 这已经成为众多屠宰企业亟待解决的问题。

目前 ChS 的典型提取工艺有碱提取法、酶提法、超声波法以及发酵法等^[5]。试验以青海牦牛气管为原材料, 利用超声波辅助碱-酶水解快速提取硫酸软骨素, 并采用单因素实验结合正交试验法对最佳提取条件进行探究, 为青海牦牛气管的加工利用提供一定的科学依据。

1 试剂材料与试验方法

1.1 试验药品与实验器材

1.1.1 实验原材料

当地购买现宰牦牛喉软骨 (购于青海省西宁市城东区)。

1.1.2 试验所需药品



固体氢氧化钠、碱性蛋白酶、活性炭、无水乙醇。

1.1.3 实验器材

KQ-250DV 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、EH35A 数控加热台（北京莱伯泰科仪器股份有限公司）、TDZ5-WS 离心机（湖南赫西仪器装备有限公司）、SHZ-D III 予华牌循环水真空泵（巩义市予华仪器有限责任公司）、G120-SO 电子天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）、粉碎机（北京市永光明医疗仪器有限公司）。

1.2 试验方法

1.2.1 牦牛气管硫酸软骨素提取的工艺流程

取新鲜牦牛气管原材料洗净，沸水加热至肉质变白取出，待降温后剥取气管软骨部分并粉碎，待颗粒软骨干燥后称取一定量至于烧杯中，加入 0.1 mol/L NaOH 溶液进行常温消解 30 min，后置入超声波清洗器中超声，取出烧杯并进行离心处理，取上清液调节 pH 至 9—11 并加入一定量碱性蛋白酶，35 ℃ 水浴 30 min（酶解），加入过量活性炭并加热至沸腾，进行脱色、吸附蛋白，待降温后将该液体进行抽滤，取滤液加入无水乙醇沉淀并离心，取离心沉淀再次用无水乙醇充分脱水，所得淡黄色产物即为硫酸软骨素；低温干燥后研钵磨成粉末，取粉末制成溶液并在紫外分光光度计进行定量，利用数据进行得率和纯度的计算。

1.2.2 原料处理

取低温冷冻的牦牛喉管原料于热水中煮 15—20 min，取出降温到室温，剥离肌肉、油脂部分，取出白色牦牛气管软骨，用粉碎机粉碎，放置阴凉处晾干，得牦牛气管软骨粗品备用。

1.2.3 牦牛气管硫酸软骨素提取工艺条件的优化

采用超声波辅助碱-酶水解法提取硫酸软骨素，先通过单因素实验探究料液比，超声功率，超声时间，找出主要因子和水平，再和正交实验相结合对提取条件

进行优化处理，得出最优提取工艺条件。

1.2.4 硫酸软骨素得率计算

得率 = 产品质量 / 原料质量 × 100 %

硫酸软骨素的含量测定采用硫酸-吡唑法。一定量的硫酸软骨素提取物加入浓硫酸溶液后，经过加热水解生成多糖，再与吡唑溶液反应产生紫红色化合物，利用紫外分光光度计进行含量的计算。

2 结果与分析

2.1 超声波辅助碱-酶水解法提取牦牛气管硫酸软骨素法的单因素试验

2.1.1 碱消解液与粗品料液比对产物得率的影响

随着料液比的不断增大，硫酸软骨素的得率先增后减，如图 1 所示，在 1:10 的料液比下其得率最大，纯度也是先增后减，在 1:10 料液比下可得到最佳纯度。因此，确定最佳料液比为 1:10。

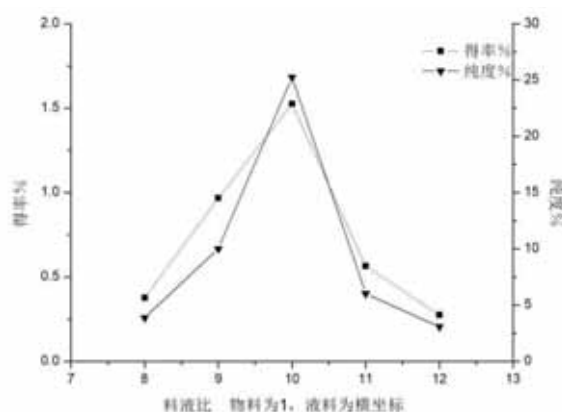


图 1 料液比对 ChS 得率的影响

2.1.2 超声功率对牦牛喉管硫酸软骨素得率的影响

如图 2 所示，当超声功率在 275—475 W 时，超声功率对硫酸软骨素的得率影响较明显，之后趋于平稳；而其纯度的变化趋势与得率近乎一致，且在 390 W 时得率最高。



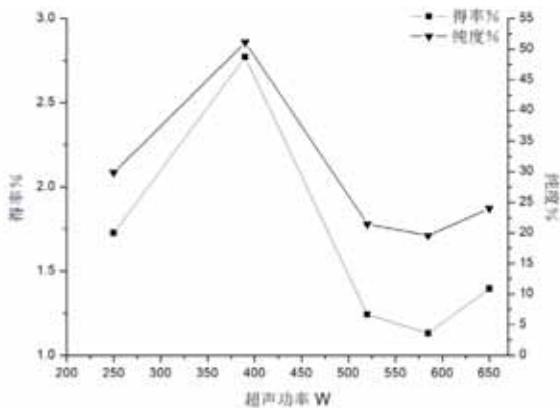


图2 超声功率对 ChS 得率的影响

2.1.3 超声时间对牦牛喉管硫酸软骨素得率的影响

超声时间的长短对牦牛喉管硫酸软骨素得率有显著的影响,如图3所示,并且在超声 50 min 时其得率达到最大,随后便随着超声时间的增加而逐渐下降。最终选择超声时间 50 min 为最佳提取时间。

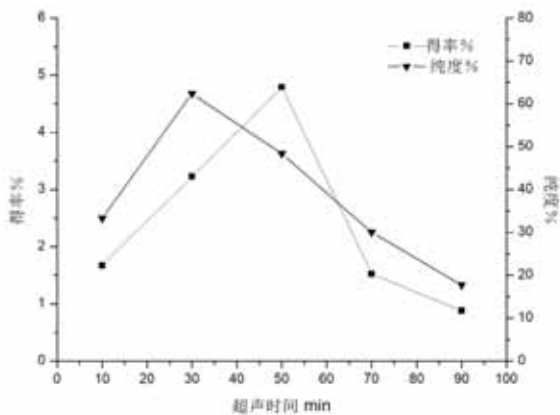


图3 超声时间对 ChS 得率的影响

2.2 正交试验探究最佳提取条件

表1 正交因素设计表

水平	A 料液比	B 超声功率	C 超声时间
1	1:9	250	30
2	1:10	390	50
3	1:11	520	70

实验结果中 A、B、C 三个因素的极差 R 值从大到小排列为 $A > C > B$, 说明四个因素对提取率的影响顺序为 $A > C > B$, 这说明在上述三个因素中, 料液比对得率的影响最大 (1:10), 其次是超声时间 (50 min), 影响最小的是超声功率 (390 W), 结合单因素实验, 可以看出在一定的原料下, 超声波辅助提取对牦牛气管中的硫酸软骨素的得率具有较明显的影响, 且此法操作简单, 绿色环保。

3 结论

以牦牛屠宰后的副产品之一牦牛软骨为原材料, 提取其中具有经济价值的物质——硫酸软骨素, 探讨提取 ChS 更为环保、更为安全高效的提取条件, 以期获得高质量、健康、环保的产品, 并对牦牛屠宰场废弃物的加工利用提供了思路和方法。

试验数据表明, 利用超声波辅助碱-酶水解法提取硫酸软骨素是一条可行的工艺路线, 通过单因素实验及正交试验, 确定牦牛气管硫酸软骨素最佳的提取条件为 A2B2C2, 即料液比 1:10, 超声功率 390 W, 超声时间 50 min, 在此组合之下, 其得率可达 17.34%, 而且超声波辅助对硫酸软骨素的得率具有明显的提高。■

参考文献

- [1] 谢晶, 周艳红, 杨欲成, 等. 鹅骨中硫酸软骨素的碱提工艺优化研究 [J]. 中国农学通报, 2020, 36(18): 141-146.
- [2] 户业丽, 韩福平, 刘倩, 等. 酶法提取人工养殖鲟鱼头中硫酸软骨素的工艺研究 [J]. 食品科技, 2011, 36(6): 147-149.
- [3] 吴枫楠. 碱-酶法提取硫酸软骨素的工艺研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1): 81-83.
- [4] 李南. 硫酸软骨素的开发及生产工艺控制 [J]. 上海水产大学学报, 1998:38-43.
- [5] 熊双丽, 李安林, 吴照民, 等. 鸡胸软骨硫酸软骨素的提取及分离纯化 [J]. 农业工程学报, 25(1): 271-275.

