



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02104684.0

[43] 公开日 2003 年 9 月 3 日

[11] 公开号 CN 1439663A

[22] 申请日 2002.2.20 [21] 申请号 02104684.0

[71] 申请人 株式会社角弘

地址 日本青森市

共同申请人 高垣啓一

[72] 发明人 高垣啓一

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 杨九昌

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称 软骨型蛋白聚糖的提取和纯化方法

[57] 摘要

本发明涉及提取和纯化软骨型蛋白聚糖的新方法，并且提供了粗蛋白聚糖的提取方法，特征在于使用酸作为软骨洗脱溶剂。

1. 一种粗蛋白聚糖的提取方法，其特征是用酸作为软骨的洗脱溶剂。
2. 一种粗蛋白聚糖的提取方法，包括：
  - 5 用乙酸作为软骨的洗脱溶剂提取粗蛋白聚糖，  
过滤含有粗蛋白聚糖的溶液以从所述溶液中去除残渣，  
离心分离过滤所得到的滤液，  
将氯化钠饱和的乙醇液加入到离心所得的上清液中，  
然后将所述加入氯化钠饱和的乙醇液的上清液离心分离以将粗
  - 10 蛋白聚糖浓缩到所述沉淀物中。
  3. 一种进一步提高粗蛋白聚糖纯度的方法，包括：
    - 用乙酸作为软骨的洗脱溶剂提取粗蛋白聚糖，  
过滤含有粗蛋白聚糖的溶液以从所述溶液中去除残渣，  
离心分离过滤所得到的滤液，
    - 15 将氯化钠饱和的乙醇液加入到离心所得的上清液中，  
将所述加入氯化钠饱和的乙醇液的上清液离心分离以将粗蛋白  
聚糖浓缩到所述沉淀物中，  
用乙酸作为所述粗蛋白聚糖的洗脱溶剂溶解所述含有粗蛋白聚  
糖的沉淀，
    - 20 然后渗析。

## 软骨型蛋白聚糖的提取和纯化方法

## 技术领域

5 本发明涉及一种软骨型蛋白聚糖提取和纯化的新方法。

## 背景技术

被认为是缀合碳水化合物的软骨型蛋白聚糖分子特征在于具有图 1 所示结构，它是一种具有下述结构特征的生物聚合物。也就是，由数个到数十个每个分子量从数万到数十万的糖胺聚糖链（以下简称 GAG）结合成具有数万到数十万的分子量、被称为核蛋白的仅有一个主链的蛋白分子。GAG 可以被划分为数种，如可依其基本结构划分为硫酸软骨素或硫酸皮肤素，它基本上是一种长链杂酸多糖类，由二糖与氨基糖和糖醛酸的重复结构组成。在所述结构中，除外透明质酸的 GAG 与核蛋白结合并形成蛋白聚糖。

15 在几乎所有的动物生物体中，蛋白聚糖总是作为细胞外基质的一种重要的成分而存在，与胶原蛋白和透明质酸的存在相似，细胞外基质存在于细胞间（见图 2）。并且，它不但是生物体构成的重要部分，而且形成了细胞周围的物理环境，控制各种细胞活性如偶合、增殖或分化。每一种细胞外基质成分或者 GAG 分别具有诸如贮水、供水、解毒或者止痛的功能。当这些成分相互结合形成大分子结构时每一种成分交互作用，显示出更明显的效果。

25 作为本发明目的的软骨型蛋白聚糖与胶原蛋白、透明质酸或 GAG 相比，具有巨大分子量并且具有复杂的结构。因此，即便是蛋白聚糖本身与细胞外基质中的其他成分相比都具有更好的贮水和供水能力，不仅如此，依靠其 GAG 部分的生物信息信号组织，还可以具备其他功能。

30 一方面，目前，蛋白聚糖的提取和纯化方法，通常以牛或者鲸鱼的软骨作为起始原料，用有毒的或有害的试剂，如氯仿、甲醇或盐酸胍，通过复杂的过程实现提取和纯化。这种方法被认为没有达到工业化水平。市场上仅有几种作为试剂的蛋白聚糖少量销售，价格大约每克数千万日元。

本发明的申请人曾经发明了一种提取和纯化蛋白聚糖的大量生

产的简单方法，用鲑鱼的嗅觉软骨为原料可以实现工业规模，已经申请了专利（日本专利申请 11-331375，申请日 1999 年 11 月 22 日），这种方法实际上包括鲑鱼嗅觉软骨的破碎过程、去油过程、用溶剂提取及渗析过程。通过该方法，以大量生产和低成本为特征的提取和纯化方法得以实现，然而，在该方法中不仅使用氯仿、甲醇或盐酸胍，甚至使用有害试剂如用于蛋白降解酶的阻滞剂。因此，用作进入人体药物的原料及健康食品或补品的添加剂的可能性就比较困难，且其应用被限于非药化学品或化妆品。进一步说，由于上述化学试剂的市场价格相当昂贵，提取和纯化成本的降低是有限的。

另一方面，由于本专利申请人展示了一种低成本的蛋白聚糖，从而不仅在化妆品工业而且在食品加工行业、保健食品或补品及药品工业中，对与蛋白聚糖相关物质发展的决心也增强了。然而，对于食品加工行业、保健食品或补品及药品工业，蛋白聚糖的大量应用中，必须对蛋白聚糖的纯化方法给予特殊考虑。通常在传统的蛋白聚糖的提取和纯化方法中，胍的盐酸盐被普遍使用。但是，对于蛋白聚糖的一些新的应用，强烈要求不使用所述胍的盐酸盐以及象氯仿、甲醇或用于蛋白降解酶的阻滞剂这样的有毒或有害试剂。更进一步地，强烈要求发展一种更简单更低成本的蛋白聚糖的提取和纯化方法。

本发明的发明人对蛋白聚糖的提取和纯化方法的发展进行了深入的研究，在该过程中不使用有毒的或有害的试剂，并且以更简单更低成本为特征，进而完成了本发明。换句话说，本发明的目的是提供更简单更低成本的软骨型蛋白聚糖的提取和纯化方法。

#### 发明概述

本发明权利要求 1 是一种粗蛋白聚糖的提取方法，其特征是用酸作为软骨的洗脱剂。本发明权利要求 2 是一种粗蛋白聚糖的纯化方法，包括用乙酸作为软骨的洗脱剂提取粗蛋白聚糖，过滤含有粗蛋白聚糖的溶液以从所述溶液中去掉残渣，离心分离过滤所得到的滤液，将氯化钠饱和的乙醇液加入到离心所得的上清液中，然后将所述加入氯化钠饱和的乙醇液的上清液离心分离以将所述粗蛋白聚糖浓缩到该沉淀物中。本发明权利要求 3 是纯化粗蛋白聚糖的进一步改进的方法，包括用乙酸作为软骨的洗脱剂提取粗蛋白聚糖，过滤含有粗蛋白聚糖的溶液以从所述溶液中去掉残渣，离心分离过滤所得到的滤液，

将氯化钠饱和的乙醇液加入到离心所得的上清液中，将所述加入氯化钠饱和的乙醇液的上清液离心分离以将所述粗蛋白聚糖浓缩到该沉淀物中，用乙酸作为所述粗蛋白聚糖的洗脱剂溶解所述含有粗蛋白聚糖的沉淀，然后，再渗析。

- 5 也就是，本发明的关键在于，在所有的提取和纯化粗蛋白聚糖过程中，用乙酸、氯化钠和非修饰的乙醇替代象氯仿、甲醇或用于蛋白降解酶的阻滞剂这样的有毒或有害试剂。上述的这些试剂，即乙酸、氯化钠和非修饰的乙醇，是在食品加工行业中通常使用的试剂。出于实现更简化提取和纯化方法的目的，在上述专利申请(JPA 11-331375)
- 10 中使用的尿素取代的过程和通过 DEAE-Sephacel 方法分离和纯化的过程被省略了。

#### 附图说明

图 1 为蛋白聚糖的结构模型，图 2 为细胞外基质的示意图解，图 3 为粗蛋白聚糖的洗脱状态与洗脱时间的变化关系。

- 15 图中，每一个数字标识表示如下：1：核蛋白，2：糖胺聚糖链，3：透明质酸，4：胶原蛋白，5：蛋白聚糖。

#### 具体实施方式

通过下面描述更详细说明本发明。

- 20 作为本发明蛋白聚糖的初始原料，牛或鲸鱼的软骨均可以使用，然而从易于获取和价格的角度出发，倾向于使用鲑鱼的嗅觉软骨。特别是，希望使用在使用鲑鱼的食物加工如罐头工业的生产过程中废弃的白鲑鱼的头部，在日本 Aomori 县的海边，这种以白鲑鱼为原料的沿海水产业比比皆是。

- 25 作为本发明中所用的乙酸，可以使用任何一种食品用或工业用乙酸，可以根据蛋白聚糖的应用目自愿选择。乙酸洗脱剂的期望浓度按照后面提到的实验结果为大约 4%，然而该浓度并不是限定的。

#### 实施例

- 30 以食品加工厂制罐头过程中废弃的白鲑鱼头部为初始原料，该原料从 Aomori 县的海边沿海水产业获得，头部通常被临时保藏在-30℃的温度下。

将上述保藏的原料在 4℃解冻 20 小时，用餐刀从头部剔除嗅觉软骨，初始原料即准备完成，从鲑鱼嗅觉软骨上用镊子去除固体脂

肪，再用生理盐水漂洗干净。然后，用手工粉碎机粉成细粉，得到了鲑鱼嗅觉软骨的碎骨肉。

将部分所述碎骨肉浸入4℃的商业用稀释到10w/v的酿造醋酸中（稀释到4%浓度，即是乙酸在醋中相同的浓度，因此简称为4%乙酸溶剂），分别浸泡0, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168小时并且搅拌。获得了粗蛋白聚糖的洗脱状态与洗脱时间的变化关系，用吡啶-硫酸法得到糖醛酸的量表示，获得的结果见图3。图3很清楚地表明，洗脱粗蛋白聚糖的量在最初的24小时内有明显的增加，洗脱量的增加在24小时之后不再明显。从获得的结果看，用4%乙酸溶剂洗脱粗蛋白聚糖的最有效时间为48小时。

根据上述结果，将50g的鲑鱼嗅觉软骨的碎骨肉浸入4℃、4%乙酸溶剂中48小时，搅拌，以洗脱嗅觉软骨获得粗蛋白聚糖（权利要求1）。

然后将洗脱液用不锈钢网（150 $\mu$ m）过滤以去除没有洗出的物质。然后，含粗蛋白聚糖的溶液被离心分离（4℃，10000r.p.m.，20分钟）。将三倍量的氯化钠饱和的乙醇液加入到所得上清液中，再次离心分离（4℃，10000r.p.m.，20分钟），得到含粗蛋白聚糖的浓缩沉淀（权利要求2）。

将所得含粗蛋白聚糖沉淀再次溶于4%乙酸溶剂中，然后将该溶液与水在截留分子量为1000Kda的纤维素酯膜渗析管中充分渗析，获得高纯度的液态蛋白聚糖（权利要求3）。

所得液态蛋白聚糖最好冻干以粉末状保藏。在本实施例中将渗析后的内容液冻干后获得了240mg粉状蛋白聚糖样品。

权利要求3方法获得的蛋白聚糖样品按下述方法测得化学特征。

化学分析结果见表1。

表1 鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖样品的化学分析

摩尔比			蛋白 (%w/w)
己糖胺	糖醛酸	硫酸酯	
1.00	0.99 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	6.99

<sup>a</sup>表示当己糖胺的量以1.00计时的摩尔比

表1中，糖醛酸和硫酸酯的量用当己糖胺的量以1.00计时的摩

尔比表示,分别为 0.99 和 0.67。显然这三个成分存在的量几乎是相同的。另外,核蛋白的量为 6.99%(w/w),与糖醛酸的比例(核蛋白/糖醛酸)为 0.23(w/w)。这个数值是说明蛋白聚糖的纯度的指数并且接近理论值 0.2。

- 5 分析组成该蛋白样品的多种氨基酸,结果表明甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸的量非常高。换句话说,在所有的 1000 个氨基酸残基中,总的甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸残基占 386,同时,羟基脯氨酸的残基占 2。羟基脯氨酸是胶原蛋白中的典型氨基酸,可以识别到在这种鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖中胶原蛋白的混杂,但是量很少,可以说不显著。
- 10 因此,可以说得到的鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖纯度非常高。

为了获得与鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖分子大小相关的信息,用 SB805HQ 柱(8×300mm)进行高效液相色谱分析,流出物的位置由 215nm 处的 UV 吸收峰所证实。将这个结果与市售的试剂牛嗅觉软骨蛋白聚糖进行比较。在鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖的情况下,从 SB805HQ 柱流出物的位置(Kav)被认为是在 0.28 处的一对称峰,而牛嗅觉软骨蛋白聚糖情况下是 0.17。这些结果表明鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖分子大小小于牛嗅觉软骨蛋白聚糖。

15

此外,将鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖的核蛋白部分用链霉蛋白酶进行消化,将剩余的 GAG 样品置于用乙酸纤维素制成的薄膜上和标样硫酸软骨素(Ch6S)、硫酸皮肤素(DS)、透明质酸(HA)一起进行电泳分析。根据与标样硫酸软骨素(Ch6S)单带重合的结果,很明显鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖的大部分 GAG 是硫酸软骨素。

20

对二糖单元的异构体也进行了研究。蛋白聚糖用链霉蛋白酶消化后,进一步用软骨素酶 ABC 消化,生成的不饱和二糖用高效液相色谱(Polyamin-II)进行分析,所得结果示于表 2。表 2 的结果显示,大部分 GAG 为单硫酸化二糖单元。

25

表 2 不饱和二糖分析

$\Delta$ Di-0S	$\Delta$ Di-6S	$\Delta$ Di-4S	$\Delta$ Di-diSD	$\Delta$ Di-triS
15.1	59.4	25.1	0.3	0.1

如上所述,初始原料为鲑鱼嗅觉软骨的蛋白聚糖的获得仅使用列明的食品添加剂的试剂[如,“食品添加剂分析方法释义(Explanation of Analytical Method of Additives in Foods),第三部分,非

30

化学合成化合物的食品添加剂”，Akio Tanimura 等编著（1992，Kodansha）]，或者是用作食品保藏剂及调味品材料的试剂[“食品安全供应大全（Encyclopedia of Safety Supply of Food）” Kageaki Kuriihara 等编著（1995，Sangyo Chosakai 出版中心）]的事实可以被称为划时代的创新。甚至，本发明生产过程节省了时间并且避免了麻烦，诸如用尿素取代的过程和通过 DEAE-Sephacel 方法分离和纯化的过程被省略了，也可以被称为划时代的创新。也就是说，通过本发明，开发简化和低成本地提取和纯化蛋白聚糖的目的得以实现。

由上述结果，通过本发明方法获得的鲑鱼嗅觉软骨蛋白聚糖可以由口服摄入，其纯度几乎与常规的方法获得的产物相同。

目前，透明质酸已经可以通过细菌安全大量地生产，并用于医药应用。同时，蛋白聚糖被认为具有很好的保水性能、供水性能、解毒性能和止痛性能，以及基于 G A G 部分预期具有其他功能。然而通过提取和纯化的传统方法获得的蛋白聚糖不能给人开药方，影响了在人体方面的使用。进一步地，直至本发明方法发展和应用之前，源自鲑鱼嗅觉软骨的缀合碳水化合物蛋白聚糖的分离尚无人尝试。然而，通过本发明，具有优异性能的蛋白聚糖的安全、大批量的提取和纯化已变为可能。因此，对蛋白聚糖的需求变得更迫切，亦期望获得更广泛应用。

另外，由于不使用象氯仿、甲醇或丙酮等用于从鲑鱼头部去除固体脂肪的有机溶剂，废液的处理变得不再必要，结果不再存在环境问题。本发明的过程是简单而有效的，由所述方法获得的蛋白聚糖是安全的，可以由口服摄入。由于本发明的进展，使得在化妆品、非药化学品、药品、药物产品、食品加工、保健食品、人造内部器官等方面新应用产品的发展成为可能。因此，本发明对人类健康和医药领域作出了巨大的贡献。

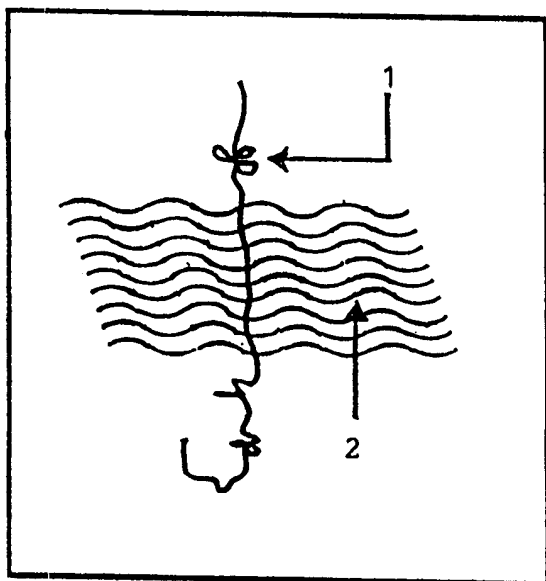


图 1

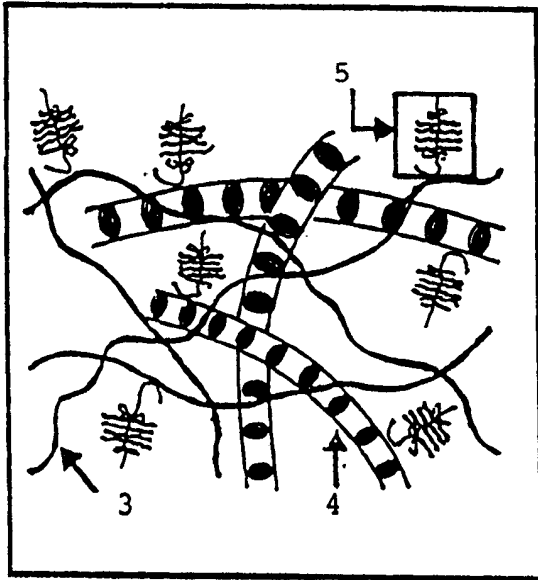


图 2

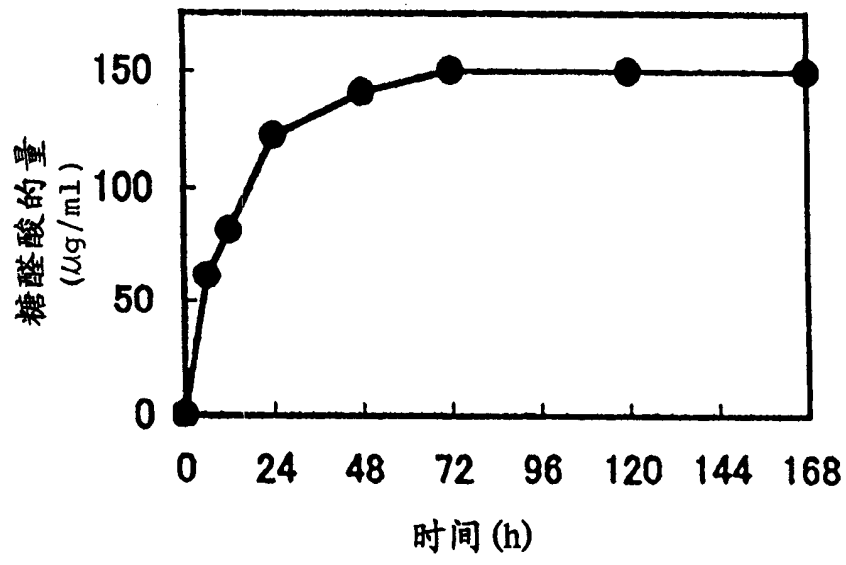


图 3