

硫酸软骨素制备工艺研究进展

赫欣睿, 武中庸, 叶永丽, 高旭东, 陈士恩*

西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730124

摘要: 硫酸软骨素是一类具有丰富生物活性的酸性高分子黏多糖, 广泛应用于医学、食品和化妆品等领域, 市场前景巨大。本文对硫酸软骨素的提取和纯化工艺进行综述, 阐述了硫酸软骨素的制备工艺现状, 以期对硫酸软骨素的深入研究与开发提供理论依据。

关键词: 硫酸软骨素; 提取; 纯化

中图分类号: TS251.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.040

Review on Preparation Technology of Chondroitin Sulfate

HE Xin-rui, WU Zhong-yong, YE Yong-li, GAO Xu-dong, CHEN Shi-en*

Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730124, China

Abstract: Chondroitin sulfate is an acidic macromolecular mucopolysaccharide and widely applied in the industries of medicine, food and cosmetic for its biological activities, which has a huge market prospects. The extraction and purification processes of chondroitin sulfate were reviewed in this paper. The preparation process of chondroitin sulfate were described, which would lay a foundation for further research and development of chondroitin sulfate.

Key words: chondroitin sulfate; extraction; purification

硫酸软骨素 (Chondroitin Sulfate, CS) 是来自动物喉骨、鼻软骨、气管等富含软骨组织的一类重要硫酸化链状高分子黏多糖^[1], 根据化学结构不同可分为硫酸软骨素 A、B、C、D、E 等。硫酸软骨素结构多样, 分子结构的不同往往表现出不同的生理活性, 如抗凝^[2], 抗血栓^[3,4], 抗炎^[5], 抗氧化^[6]等重要生理活性。硫酸软骨素在抑止癌症^[7,8]、促进骨生长和促进骨骼恢复^[9,10]、调节动脉油脂和治疗动脉硬化^[11]、治疗骨关节疾病、调节中枢神经修复与再生^[12,13]等方面表现出了巨大的作用。在食品加工领域中, 硫酸软骨素对改善食品风味、质地、光泽及保湿性等方面也有重要作用^[14], 因而其作为膳食补充剂和保湿剂广泛应用于食品及化妆品领域^[15]。硫酸软骨素表现出的重要作用使其愈加被人们重视, 但不同来源的硫酸软骨素在含量、组成上存在差异, 而且, 来源于陆生动物与水生动物的硫酸软骨素的糖基链长和硫酸化程度差异较大, 因此硫酸软骨素提取纯化方法的优化与改进显得愈加重要。本文

主要对硫酸软骨素的国内外制备工艺现状进行了综述, 以期为后续的科学研究与生产提供理论依据。

1 硫酸软骨素的提取研究现状

目前, 硫酸软骨素的提取方法多为中性盐法、碱法、酶法、碱盐法、超声波法、乙酸抽提法、酶催化法、发酵法等。

1.1 中性盐提取法

适当离子强度的中性盐溶液可使软骨组织中的硫酸软骨素和蛋白质发生分离而沉淀。Meyer^[16]等发现使用中性盐溶液提取硫酸软骨素可避免其降解。10% 氯化钙提取, 氯仿-戊醇(1:4) 去除蛋白质, 后以 2 倍量乙醇沉淀, 最后采用 Lloyd 试剂进行精制。而以透析法去除杂质、氯化六氨合钴纯化, 或以磷钨酸纯化, 均可使工艺简化。以 30% 氯化钾或再复配加 1% 碳酸钾提取、高岭土吸附除去杂蛋白, 可提高产品产率^[17]。该方法提取的产品较白, 但产率低, 容易浪费原材料, 不利于提高经济效益。

1.2 碱提取法

硫酸软骨素与蛋白质结合之间的 O-糖苷键在强碱环境中容易发生 β -消去反应, 导致糖-肽键断裂, 使硫酸软骨素释出^[18]。硫酸软骨素的分子链降

收稿日期: 2016-06-13 接受日期: 2016-06-29

基金项目: 教育部动物医学生物工程专业创新团队 (IRT13091); 国家科技支撑计划 (2015BAD29B05)

* 通讯作者 Tel: 86-018109421848; E-mail: chshien@163.com

解程度会因碱液的浓度不同而改变。碱液浓度越大、温度越高、提取时间越长,则分子降解程度越大。碱提取法主要有:浓碱提取工艺、稀碱提取工艺。浓碱法提取得到的硫酸软骨素颜色稍暗,并且造成严重的环境污染;稀碱提取法得到的硫酸软骨素含氮量较高,残留有较多的蛋白质,而且反应时间较长。叶琳弘^[19]等采用碱液浸提法对鱿鱼软骨中硫酸软骨素的提取工艺进行研究。结果表明其最佳提取工艺条件为:料液比 1:8 (g/mL)、浸提温度 50 °C、浸提时间 5.3 h, NaOH 浓度 3%。此工艺条件下,硫酸软骨素的提取率为 62.89%。

1.3 碱盐提取法

碱性条件下,硫酸软骨素和蛋白质间的糖-肽键发生断裂,释放出游离态的硫酸软骨素,同时蛋白质在一定的离子强度下沉淀析出,这种方法既能避免强碱环境使硫酸软骨素进一步降解,又有利于去除蛋白质等杂质^[20]。一定范围内,硫酸软骨素的产率

和纯度随着碱液浓度的增加而提高^[21]。目前碱盐法主要有稀碱稀盐提取工艺、稀碱浓盐提取工艺。采用稀碱浓盐工艺时,蛋白质在盐解温度低于 80 °C 时将沉淀不完全,体系粘稠度也将因为彻底解离的复合物而升高。使用此法所得的硫酸软骨素其产率和纯度均较低。朱瑞芬^[22]等以 NaOH 碱化的氯化钠溶液从动物气管中提取硫酸软骨素,其最好产率为 16.4%。

李瑞国^[23]对浓碱提取工艺(I)、稀碱提取工艺(II)、稀碱稀盐提取工艺(III)、稀碱浓盐提取工艺(IV)四种生产工艺进行了对比试验研究,结果表明浓碱提取工艺提取时间较短,但产品颜色较深,分子量小;其余三种工艺实际操作简单,产品色泽好,分子量较大,尤以稀碱浓盐提取工艺制备的产品质量较高。但是四种生产工艺的生产周期长,不利于生产效益和经济效益的增长。表 1 为四种工艺条件下产品的测定结果。

表 1 四种工艺条件下产品测定结果

Table 1 The measurement results of products under 4 conditions

项目 Item	指标 Index	I	II	III	IV
收率 Yield (%)		14.9	15.1	14.4	14.1
氨基己糖含量 Content of amido-hexose (%)	≥24	27.86	26.79	27.02	30.16
澄清度 A640	≤0.050	0.027	0.021	0.016	0.019
氮含量 Nitrogen content (%)	2.5~3.8	3.16	3.49	3.35	2.98

1.4 酶提取法

胶原蛋白和粘蛋白等在蛋白酶的作用下能够水解成氨基酸,硫酸软骨素与氨基酸在某些溶剂中溶解性的不同,采用此方法能够分离提取实现硫酸软骨素。酶法作用条件温和,一般不会使硫酸软骨素发生降解,因而酶解法是目前生产中普遍使用的方法。实践中所用酶应选择专一性较低的蛋白酶,采用两种以上酶制剂可以加强水解,常用酶有胰酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶等^[24]。随着硫酸软骨素和蛋白进行联产,一种复合了胶原蛋白酶、脂肪酶和糖原酶的硫酸软骨素专用酶逐渐被推广,它解决了蛋白中的盐度和风味问题,将成为生产用酶的趋势^[25]。因胶原蛋白和粘蛋白等在中性或弱酸性条件下是可溶的,不易被分离除去^[26],酶法常与碱法联合使用。主要有稀碱-酶解提取法、浓碱-复合酶酶解提取法、复合酶酶解提取法和酶解-树脂提取法。此法产率、纯度较高,生产周期短,污染小,是

一种较理想的硫酸软骨素制备方法。刘宁^[27]等采用木瓜蛋白酶对蛋壳膜进行酶解提取硫酸软骨素。其在 48 °C 温度、pH 值 8.0、酶添加量 4200 U · g⁻¹ 条件下酶解时间 2.5 h, 所得最佳提取率为 75.31%。该方法环境污染小、提取率较高,适用于蛋壳膜硫酸软骨素的提取。

1.5 超声波法

该法利用碱性条件下蛋白质易离解的性质和超声波的热学机制,促使蛋白质迅速解离以达到去杂蛋白的目的,后经脱色、沉淀和干燥可得合格的硫酸软骨素。超声波法提取硫酸软骨素其操作简便、生产周期短、节约生产成本,但所得硫酸软骨素的含量和得率并无明显提高^[28,29]。超声波提取硫酸软骨素时处理时间不宜太长,否则会离解出许多杂质,增加去除难度。该方法主要包括超声波辅助法、超声波辅助-碱-双酶-乙醇法等。

徐丽萍^[30]等以鸡胸软骨为原料,采用超声波辅

助碱-酶法提取硫酸软骨素。最佳工艺条件为:碱浓度 4%,酶添加量 $1.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,料液比 1000:5923 (g/mL),硫酸软骨素的得率为 23.94%。尹孝萍^[31]等以牦牛气管为原料,采用超声波辅助碱处理提取硫酸软骨素。其工艺条件为:料液比 1:6 (g/mL),超声波功率 550 W,超声时间 30 min,在提取温度 35 °C、pH 为 12 的条件下硫酸软骨素的得率可达 18.97%。

1.6 乙酸抽提法

Nakano^[32]等利用乙酸水溶液提取硫酸软骨素。-20 °C 条件下冷冻软骨,使用前 4 °C 条件解冻。软骨放于乙酸调节后 pH 为 4.5 的水中,于 37 °C 条件下抽提 7 h。在抽提液沸腾后将其浓缩,并于 90 °C 温度条件下干燥后得到硫酸软骨素粗品。该方法中影响硫酸软骨素提取率的主要因素是 pH 值。而在同样条件下,在抽提时加入适量乙酸钠,硫酸软骨素的提取率可以提高 6%。该工艺操作简便、成本低,适于规模化生产使用。

1.7 酶催化法

酶催化聚合反应是合成结构明确的天然或非天然聚合物(尤其是多糖类化合物)的方法之一^[33]。Kobayashi^[34,35]课题组利用睾丸透明质酸酶体外催化 N-乙酰软骨二糖噁唑啉单体 6 或其硫酸化单体

9,经开环逐步加成聚合作用合成软骨素及硫酸软骨素。该过程选择性高,目前无法产业化生产。Sugiura^[36]等利用固定化软骨素合成酶突变体(D-241K 和 D-521K)催化制备软骨素低聚糖。其可以制得不同分子量大小的低聚糖产物,但是未报道产率。

1.8 发酵法

自然界中许多细菌、真菌等微生物自身能够合成低聚合度的硫酸软骨素及其类似物^[37]。因条件限制,目前研究主要集中在巴斯德杆菌、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌等 3 种微生物。Rimler^[38]以巴斯德杆菌合成软骨素类荚膜多糖,但其为家禽霍乱致病菌,不适用于产品安全。目前发酵法生产硫酸软骨素研究的主要菌株是大肠杆菌,但 E. coli K4 的发酵产物果糖软骨素(K4CPS)需经复杂的修饰步骤才可获得硫酸软骨素,这不但增加生产成本,还会降低目标产品的最终得率。Cimini^[39]等通过插入外源基因使其在胞内稳定表达,并对重组菌成功进行了放大培养,最终 K4CPS 的产量达到 9.2 g/L。刘立明^[40]等人筛选得到一株无需硫酸化修饰、可直接获取硫酸软骨素的枯草芽胞杆菌,其无致病性,有望成为发酵法生产硫酸软骨素的最佳菌株。几种提取方法的比较结果见表 2。

表 2 几种提取方法结果比较

Table 2 Comparison of the results of several extraction methods

方法 Method	提取率 Extraction yield	生产周期 Manufacture cycle	影响 Influence
中性盐法	低	长	浪费材料
碱法	高	长	污染环境
碱盐法	低	长	环境污染较小
酶法	高	短	环境污染较小
超声波法	低	短	节约成本
乙酸抽提法	低	短	节约成本
发酵法	较低	较长	安全简便

2 硫酸软骨素的分离纯化研究现状

目前提取硫酸软骨素的最终产物多为不同种类的硫酸软骨素与另外的杂质蛋白和糖胺聚糖的混合物,因此需要将其纯化以去除杂质以提升纯度;同时纯化过程还是不同种类硫酸软骨素的分离过程,其可得到成分单一的硫酸软骨素 A 或硫酸软骨素 C。目前常用的硫酸软骨素纯化方法:有机溶剂沉淀法、

季铵盐化合物沉淀法、超滤膜过滤法、色谱法、电泳法等。

2.1 有机溶剂沉淀法

动物软骨中的不同成分在有机溶剂中的溶解性不同,根据这种特性可实现硫酸软骨素与杂质的分离。硫酸软骨素内含有硫酸基、羧基等亲水基团,故其易溶于水,不溶于乙醇、甲醇和丙酮等有机溶剂。常用的沉淀法有乙醇沉淀法和盐液沉淀法。乙醇沉

淀法是工业化生产硫酸软骨素的传统方法,但该方法所得产品纯度不高,一般与其他方法联用以获得纯度高的产品。高蕊^[41]等以猪软骨为原料,采用有机溶剂纯化法制取硫酸软骨素。该试验中将提取液和乙醇的体积比定为 1:25,并在乙醇体积分数为 80%、NaCl 质量浓度为 30 g/L、pH 值为 6.4 的条件下采用醇沉 3 次的方法,其硫酸软骨素的得率为 56.76%。

2.2 季铵盐化合物沉淀法

溶液中硫酸软骨素以聚阴离子形式存在,其与季铵盐化合物结合可形成低水溶性的季铵盐络合物。季铵盐络合物不溶于低离子强度的水溶液,但当增大水溶液离子强度并使其达一定临界值时,就会发生解离并且溶解,利用这一性质即可达到纯化硫酸软骨素的目的^[42]。季铵盐化合物因试剂消耗成本较高,适于实验室小量制备和工业规模生产中价格高的产品。这种纯化方法通常需将硫酸软骨素的浓度控制 0.1%~1.0% (*m/v*) 左右,若浓度太高,则季铵盐化合物会与其中的其他杂质产生沉淀反应^[43]。宋居易^[44]等以鲟鱼头骨和脊骨为原料,采用季铵盐纯化沉淀法制取硫酸软骨素。在季铵盐质量浓度 1 g/100 mL、作用温度 20 ℃、作用时间 1.5 h、乙醇沉淀体积分数 75%、溶液 pH 为 7 条件下制得硫酸软骨素纯品的产率为 22.0%,纯度为 95.32%。

2.3 超滤膜过滤法

制备硫酸软骨素过程中可产生多种杂质,如蛋白质、多肽、氨基酸和无机盐的混合物等,其中蛋白质可加热除去,而各种小分子可溶性溶质可通过超滤膜过滤法除去。通常超滤膜的截断分子量介于 10 000~30 000,此法适合硫酸软骨素中杂质的去除。但操作过程要求严格,过高的压力和温度会导致膜的压密作用。许立和^[45]改进了膜分离技术工艺,使的硫酸软骨素纯度可达 95.2%、获得率提高了 3%、降低了乙醇的消耗,并且简化了操作。陆钊^[46]等采用超滤-离子层析法精制猪硫酸软骨素。其以微孔滤膜处理原料液,在超滤膜截留分子量为 10 kD、超滤压力 0.25 MPa、超滤温度 25 ℃、溶液 pH 为 9 的条件下获得的产物纯度为 95.74%,产率为 80.15%。该方法精确度和准确度较高,可用于猪硫酸软骨素的精制。

2.4 离子交换色谱法

离子交换色谱法是纯化硫酸软骨素的一种重要

方法。经常使用的阴离子交换剂有:树脂、纤维素和葡聚糖凝胶等。Narita^[47]等使用阴离子交换树脂,硼酸-氯化钠洗脱体系,流速 2.0 mL/min,柱温 55 ℃,压力 1.5~3.4 kg/cm² 情况下纯化了硫酸软骨素。当氯化钠浓度为 1.5 mol/L 时,可获得回收率达 85% 的硫酸软骨素产品。王鑫^[48]等以鸡软骨为原料,采用阴离子交换树脂和凝胶层析法对提取的硫酸软骨素粗品进行纯化。结果显示:D218 型阴离子交换树脂在吸附液用量与树脂体积比为 1:1、吸附流速为 1.0 mL/min、吸附时间为 60 min、洗脱剂浓度为 3.0 mol/L、洗脱剂用量与树脂体积比为 5:1、解析时间 75 min 条件下获得的硫酸软骨素纯度为 72.03%。

2.5 电泳法

电泳法原理是根据化合物所带电荷的类型和数量不同,实现硫酸软骨素与其它杂质分离。电泳法的优点在于高分辨率、目标物纯度高和回收率高,此法适合用于分析研究。Volpi^[49]采用硝化纤维膜电泳(60mm×100mm,孔径 0.45 μm),加样量为 1.0~10.0 μg,电泳条件为 0.1 mol/min,电泳 40 min,可得到纯度和回收率都为 100% 的硫酸软骨素产品。

3 结论与展望

如上所述,每种方法都有其优缺点。中性盐法提取率低且浪费原材料,经济效益低;碱法提取率较高,但生产周期较长,且污染环境;酶法产率和纯度较高,生产周期较短,污染较小,是一种较理想的提取方法;超声波法提取率较低且杂质去除较难,这限制了生产上的应用;乙酸抽提法操作简便,生产周期短且成本低,但是目前国内还未采用大规模生产;发酵法操作方便且安全,但菌株培养困难而且容易发生突变。

纯化方法中,乙醇沉淀法为生产中的常用方法,但是其产品纯度不高。季铵盐价格较贵,适合实验室制备,不易于工业生产。超滤膜技术、离子交换技术等新材料、新技术对于进一步提高产品纯度与活性,满足人们对精制品的不同需求具有重要意义,是今后发展的方向。

随着技术的发展,硫酸软骨素的提取、纯化方法也必将得到巨大改善和提高。发展一种能够集工艺简便、产品质量好、纯度高和经济效益高于于一体的新型方法,对于经济的发展具有重大意义。

参考文献

- 1 Volpi N. Adsorption of glycosaminoglycans onto coral-a new possible implant biomaterials for regeneration therapy. *Biomaterials*, 1999, 20:1359-1363.
- 2 Maruyama T, *et al.* Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its *O*-sulfonation. *Carbohydr Res*, 1998, 306:35-43.
- 3 Alberto MF, *et al.* Antithrombotic and anticomplementary properties of a very low molecular mass dermatan sulfate. *Thromb Res*, 2008, 122:109-116.
- 4 Tovar MF, *et al.* Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls; implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1740:45-53.
- 5 Legendre F, *et al.* Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1 β -stimulated chondrocytes - study in hypoxic alginate bead cultures. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16:105-114.
- 6 Zheng J, *et al.* Study on antioxidation activity of chondroitin sulfate from sturgeon. *Biotechnology*, 2008, 136:586-587.
- 7 Liu Y, *et al.* Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and chondroitin sulfate A on human monocytic THP-1 cell migration. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 2005, 43:216-220.
- 8 Fthenou E, *et al.* Chondroitin sulfate A chains enhance platelet derived growth factor-mediated signalling in fibrosarcoma cells. *Biochem. Cell Biol*, 2006, 38:2141-2150.
- 9 Basalo IM, *et al.* Chondroitin sulfate reduces the friction coefficient of articular cartilage. *J Biomech.* 2007, 40:1847-1854.
- 10 Mitsuhiko K, *et al.* Chondroitin sulfate for the treatment of hip and knee osteoarthritis: current status and future trends. *Life Sci*, 2009, 85:477-483.
- 11 Meyer BJ, *et al.* Fractionation of cholesteryl ester rich intermediate density lipoprotein subpopulations by chondroitin sulphate. *Atherosclerosis*, 2007, 195:28-34.
- 12 Kazuyuki S, *et al.* Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17:536-545.
- 13 Galtrey CM, *et al.* The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev*, 2007, 54:1-18.
- 14 Xiong SL(熊双丽), *et al.* Progress in acidic polysaccharide. *Food Sci Technol*(食品科技), 2010, 35:80-83.
- 15 Zhou S. Health food useful for improving water content of skin, obtained by mixing components including hyaluronic acid, chondroitin sulfate, fish collagen, vitamin C powder, glycine, proline, extract of grape seeds and starch. CN102210425A, 2011-10-12.
- 16 Meyer K, *et al.* On Glycoproteins VI. The preparation of chondroitin sulfuric acid. *J Biol Chem*, 1937, 119:507-510.
- 17 Chen HL(陈红丽), *et al.* Research extracting method of chondroitin sulfate. *Henan Sci*(河南科学), 2008, 26:1039-1041.
- 18 Way WK, *et al.* Determination of chondroitin sulfate in nutritional supplements by liquid chromatography. *J Liquid Chromatogr Related Technol*, 2000, 23:2851-2860.
- 19 Ye LH(叶琳弘), *et al.* Optimization of preparation of chondroitin sulfate by alkali leaching method. *J Fujian Fisher*(福建水产), 2014, 36:428-435.
- 20 Liu Z(刘智), *et al.* Optimization of conditions for the production of chondroitin sulfate. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 1990, 21:106-107.
- 21 Zhong H(钟华). Application of orthogonal experiment method to choose the optimum conditions of chondroitin sulfate. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 1992, 3:49-50.
- 22 Zhu RF(朱瑞芬), *et al.* Preparation of chondroitin sulfate. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2000, 31:255-256.
- 23 Li RG(李瑞国). Exploration of different process for production of chondroitin sulfate. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2003, 34:221-222.
- 24 Hui YZ(惠永正), *et al.* Chemistry and Life Science(化学与生命科学). Beijing: Chemical Industry Press, 1991:141-143.
- 25 Wang A(王安), *et al.* Status and prospect of enzymes used in chondroitin sulfate extraction. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2011, 32:182.
- 26 Tang XJ(汤先觉), *et al.* Preparation and determination of the content of chondroitin sulfate. *J Chongqing Med Univ*(重庆医科大学学报), 1999, 4:374-376.
- 27 Liu N(刘宁), *et al.* Papain extracting chondroitin sulfate of eggshell membrane. *Proc Agric Prod*(农产品加工), 2015, 7:1-4.
- 28 Pu ZJ(蒲志军), *et al.* The study on preparation of chondroitin sulfate by means of ultrasonic wave. *J Sichuan Normal Univ*(四川师范大学学报), 2000, 23:640-641.
- 29 Ma YH(马永华), *et al.* Research overview of chondroitin sulfate. *China Animal Husband Veterin Med*(中国畜牧兽医), 2007, 34:138-140.
- 30 Xu LP(徐丽萍), *et al.* Optimization of process conditions for the extraction of chondroitin sulfate by response surface methodology. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2014, 35:201-205.

- 31 Yin XP(尹孝萍), *et al.* Study on extraction process of chondroitin sulfate from Yak Trachea. *Food Ind* (食品工业), 2015, 36:88-91.
- 32 Nakano T, *et al.* An economical method to extract chondroitin sulphate-peptide from bovine nasal cartilage. *Canadian Agric Eng*, 2000, 42:205-208.
- 33 Shi YG(石玉刚), *et al.* Microbial and chemical production of chondroitin sulfate. *Progr Chem* (化学进展), 2014, 26:1378-1394.
- 34 Kobaiashi S, *et al.* Enzymatic synthesis of chondroitin and its derivatives catalyzed by hyaluronidase. *J Am Chem Soc*, 2003, 125:14357-14369.
- 35 Fujikawa S, *et al.* Enzymatic synthesis of chondroitin 4-sulfate with well-defined structure. *Biomacromolecules*, 2005, 6:2935-2942.
- 36 Sugiura N, *et al.* Sequential synthesis of chondroitin oligosaccharides by immobilized chondroitin polymerase mutants. *Glycoconj J*, 2008, 25:521-530.
- 37 Jolly JF. Microbial-derived chondroitin sulfate. US20100063001A1. 2009.
- 38 Rimler RB, *et al.* Influence of chondroitinase on indirect hemagglutination titers and phagocytosis of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F. *Veterin Microbiol*, 1995, 47:287-294.
- 39 Derosa M, *et al.* Biotechnological production of chondroitin. WO2010136435A1. 2009.
- 40 Liu LM(刘立明), *et al.* A product by chondroitin sulfate and strain screening method using the fermentation production of chondroitin sulfate. CN201110127831.1, 2011-05-18.
- 41 Gao R(高蕊), *et al.* Purification of chondroitin sulfate by solvent sedimentation from pig cartilage. *J Harbin Univ Commerce*(哈尔滨商业大学学报), 2015, 31:593-597.
- 42 Kakeki K, *et al.* Use of a binary mixture of quaternary ammonium salts in fluorometric determination of glycosaminoglycans. *Anal Biochem*, 1997, 252:56-61.
- 43 Volpi N, *et al.* Characterization of a small chondroitin sulfate proteoglycan isolated from the mucus surrounding the embryos of *Vivi parusater*. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1380:239-248.
- 44 Song JY(宋居易), *et al.* Sturgeon chondroitin sulfate preparation process optimization. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 2014, 19:116-123.
- 45 Xu LH(许立和). Application of technology of separation by membrane in separation of chondroitin sulfate. *Amino Acids Biotic Res*(氨基酸和生物资源), 2002, 3:38-39.
- 46 Lu Z(陆钊), *et al.* Refinement of porcine chondroitin sulfate by UF membrane-ion-exchange chromatography. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), 2012, 34:171-175.
- 47 Narita H, *et al.* Identification of glycosaminoglycans using high-performance liquid chromatography on a hydroxyapatite column. *Anal Biochem*, 1995, 232:133-136.
- 48 Wang X(王鑫), *et al.* Optimization the purification conditions of chondroitin sulfate in chicken cartilage. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2015, 41:142-146.
- 49 Volpi N. Disaccharide analysis and molecular mass determination to microgram level of Single sulfated glycosaminoglycan species in mixtures following agarose-gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1999, 273:229-239.

(上接第 374 页)

- 25 Huang ZX(黄遵锡), *et al.* Transformation of *Taxus brevifolia* by agrobacterium rhizogenes and taxol production in hairy roots culture. *Acta Botan Yunnanica* (云南植物研究), 1997, 19:292-296.
- 26 Chen ND(陈乃东), *et al.* Study on monosaccharide compositions of polysaccharide in *Dendrobium* stems of different resources by PMP-HPCE. *J Chin Med Mater* (中药材), 2015, 38:1608-1611.
- 27 Chen ND, *et al.* Similarity evaluation of different origins and species of *Dendrobiums* by GC-MS and FTIR analysis of polysaccharides. *Int J Anal Chem*, 2015, 2015:713410.
- 28 Chen ND, *et al.* Discrimination and similarity evaluation of tissue-cultured and wild *Dendrobium* species using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Molecul Struc*, 2015, 1086:255-265.
- 29 Chen ND, *et al.* Rapid discrimination of different cultivated ages of tissue-cultured and wild *Dendrobium huoshanense* as well as wild *Dendrobium henanense* using FTIR and 2D-COS IR. *J Molecul Struc*, 2015, 1101:101-108.
- 30 Chen ND(陈乃东), *et al.* Cleaving hydroxyl radicals activity of the alkaloids from *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng detected by on-line HPLC-UV-CL system. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2015, 36:276-280.
- 31 Huang LQ(黄璐琦), *et al.* Secondary metabolites accumulating and geoherb formation under environmental stress. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32:277-280.
- 32 Guo LP(郭兰萍), *et al.* Habitat characteristics for the growth of *Atractylodes lancea* based on GIS. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30:565-569.