

## 微波辅助碱法提取匙吻鲟软骨蛋白-多糖复合物的工艺

丁俊胄<sup>1,2,3</sup>, 沈 硕<sup>1,3</sup>, 熊善柏<sup>1,2,3</sup>, 赵思明<sup>1,2,3</sup>, 黄琪琳<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070;  
2. 国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心, 湖北 武汉 430070;  
3. 湖北省水产品加工工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 以匙吻鲟软骨为材料, 利用微波辅助稀碱法提取软骨中的蛋白-多糖复合物, 在对碱浓度、微波功率、微波时间和液料比进行单因素试验的基础上设计正交试验, 优化提取条件。结果表明, 在液料比为 15:1 (V/W), 碱浓度为 0.9%, 微波功率为 360 W, 微波处理为 9 min 时, 得率达到最优值 15.72%。与常规碱法提取相比, 微波辅助提取不仅降低了碱用量, 更加环保, 而且缩短了提取时间, 提高了得率。

**关键词:** 匙吻鲟; 软骨; 微波辅助; 蛋白-多糖复合物; 提取

**中图分类号:** TS 201.1

**文献标识码:** A

匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 是古老的软骨鱼类, 其软骨主要包含蛋白质和多糖两种成分, 粗蛋白质占干品重量 50% 左右, 总糖含量约占干重的 20%<sup>[1]</sup>。匙吻鲟的科研价值和潜在的经济效益已被广泛认同<sup>[2]</sup>。匙吻鲟软骨的生物学功效与鲨鱼软骨近似, 国内外科研人员的研究成果表明, 从软骨中可以提取一系列具有药用价值的成分, 这些成分具有防癌、降血脂、增加人体免疫力等功效<sup>[3]</sup>。随着我国鲟鱼大量人工养殖, 产量增加, 软骨也随着增多<sup>[4]</sup>, 其功效成分的提取工艺、性质以及构效关系等成为近年研究的热点。软骨组织结构致密, 蛋白质和多糖不易从中溶出, 需要通过各种手段破碎细胞壁、分离缔结组分或糖化合物。动物软骨中的蛋白与多糖通过共价结合形成复合物<sup>[5-6]</sup>, 提取蛋白-多糖复合物的方法较多, 而不同提取条件下提取率及蛋白质、多糖在提取产物中的组成比例存在差异。在较低的碱浓度下, 提取物中蛋白质含量较高, 通常在其基础上再经过 Sevage 法脱蛋白可以获得多糖和蛋白质产物<sup>[7]</sup>。国内外关于动物多糖提取和分析有许多报道, 已经从鲟鱼、乌贼、鲨鱼、三角帆蚌等水生动物中提取分离出各类活性多糖<sup>[8-11]</sup>。

微波辅助提取工艺对环境不构成威胁, 并提高了提取速度和效率, 其在植物功效成分的萃取中应用广泛<sup>[12-18]</sup>, 而应用在动物软骨功效成分提取中鲜有报道。本试验在碱法提取的基础上采用微波辅助提取匙吻鲟软骨中的蛋白-多糖复合物, 提高提取物的得率, 优化了工艺条件, 为匙吻鲟软骨多糖和蛋白质类的新型功能产品开发提供了可靠的技术基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**原料** 匙吻鲟由湖北省仙桃水产品推广中心提供活鱼, 在实验室宰杀、清洗后冷冻贮藏。试验时取出软骨, 剔除附着于软骨上的残肉、粘膜等, 经流水冲淋后进行热水浸煮 15 min 除杂, 沥干, 剪碎至 1~2 mm 粒径备用。

**主要试剂** 氢氧化钾、无水乙醇、石油醚、浓硫酸苯酚、咪唑、考马斯亮蓝等试剂均为国产分析纯。

**主要仪器** 微波炉: WLS-1 型, 南京三乐微波研究所; 离心机: TDL-5-A 型, 上海安亭科学仪器厂; 真空冷冻干燥机: PD-1A-50, 北京博医试验仪器有限公司; 分析天平: AC-210S 型,

收稿日期: 2010-08-26 修回日期: 2010-11-04

资助项目: 国家科技支撑计划(2006BAD30B01)

通讯作者: 黄琪琳, E-mail: hql@mail.hzau.edu.cn

德国 Sartorius 公司;水浴锅:HH-6 型,江苏省常州市国华电器有限公司。

### 1.2 蛋白质和总糖的测定

可溶性蛋白质含量测定采用微量凯氏定氮(GB 50095-85);多糖测定采用硫酸-苯酚法<sup>[19]</sup>。

### 1.3 微波辅助提取工艺

称取一定量的软骨加入稀碱溶液,置于小烧杯中,用玻璃盖好。在不同微波条件下进行间歇式处理样品,冷却后继续微波处理 1 min,然后取出振荡,重复此过程直至达到预定的时间。取出盛有样品的小烧杯,待冷却后用稀盐酸调节 pH 至中性,在 3 000 r/min 下离心 10 min,取上清液,然后加入 95% 乙醇(体积 1:1),4 ℃ 放置进行沉淀。取沉淀用蒸馏水溶解,冷冻干燥,即得软骨蛋白-多糖复合物。

### 1.4 单因素试验设计

**碱浓度对得率的影响** 参照“1.3”中的方法,设定微波功率为 360 W,微波时间为 9 min,液料比为 15:1 (V/W),在碱浓度分别为 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%、1.8%、2.1% 的条件下提取鲟鱼软骨功效成分,并计算其得率。

**微波功率对得率的影响** 参照“1.3”中的方法,设定碱浓度为 0.9%,微波时间为 9 min,液料比为 15:1 (V/W),在微波处理功率分别 120、240、360、480、600 W 的条件下提取鲟鱼软骨功效成分,并计算其得率。

**微波时间对得率的影响** 参照“1.3”中的方法,设定碱浓度为 0.9%,微波功率为 360 W,液料比为 15:1 (V/W),在微波处理时间分别为 3、6、9、12、15 min 的条件下提取鲟鱼软骨功效成分,并计算其得率。

**液料比对得率的影响** 参照“1.3”中的方法,设定碱浓度为 0.9%,微波功率为 360 W,微波时间为 9 min,在液料比 (V/W) 分别为 5:1、10:1、15:1、20:1、25:1 的条件下提取鲟鱼软骨功效成分,并计算其得率。

### 1.5 数据处理

采用 SAS 8.1 和 Microsoft Excel 软件进行数据处理。

## 2 结果

### 2.1 单因素试验结果

**碱浓度对软骨提取物得率的影响** 随着碱

浓度的增大,提取物得率呈上升趋势,碱浓度达 0.9% 后,呈现平缓趋势(图 1)。碱在一定程度上能破坏软骨的致密组织,对提取起到较好的效果,但是随碱浓度的增大,软骨中多糖和蛋白质的释放趋于缓慢,得率增加不显著。而碱浓度过高,对提取物的生物活性有较大的影响,因此应当选择合适的碱浓度。

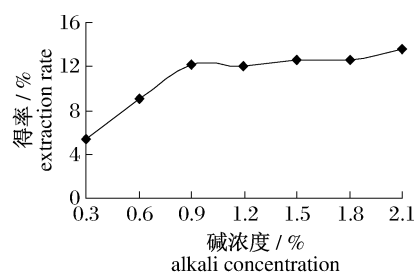


图 1 碱浓度对匙吻鲟软骨蛋白-多糖复合物得率的影响

Fig. 1 Effect of alkali concentration on extraction rate of protein-polysaccharide complex

**微波功率对软骨提取物得率的影响** 随着微波处理功率的增大,得率随之增大,在微波处理 360 W 时,随微波处理的功率增大,得率变化较为平缓(图 2)。

**微波时间对软骨提取物得率的影响** 随着微波处理时间的延长,软骨提取物得率先增加,当达到 9 min 后,得率的增加趋势趋于平缓(图 3)。微波时间的延长,细胞吸收的热量增加,从而使细胞更容易破碎,时间过长,也容易使物料溢出和提取物中的活性成分发生变性,控制合适的提取时间,既能节约能源,也能得到活性较高的提取产物。

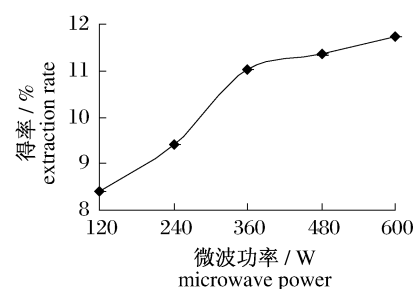


图 2 微波功率对匙吻鲟软骨蛋白-多糖复合物得率的影响

Fig. 2 Effect of microwave power on extraction rate of protein-polysaccharide complex

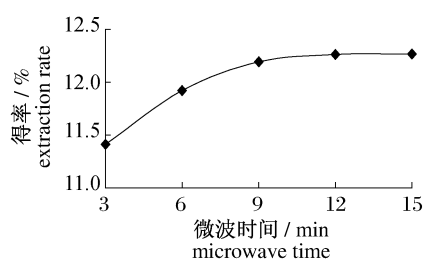


图3 微波时间对匙吻鲟软骨蛋白-多糖复合物得率的影响

Fig.3 Effect of microwave time on extraction rate of protein-polysaccharide complex

液料比对软骨提取物得率的影响 不同的液料比对软骨提取物的得率影响很大,随着液料比的增加,得率先增加,在液料比达 20 mL/g 后,随液料比的增大,得率下降(图 4)。合适的液料比,能使细胞中的蛋白质和多糖较好的溶出。

## 2.2 提取条件优化

根据单因素试验的结果,分别以碱浓度(A)、微波功率(B)、微波时间(C)和液料比(D)为试验因子,以软骨蛋白-多糖复合物得率为指标,进行  $L_9(3^4)$  正交试验,考察因素和水平如表 1 所示,正交试验设计方案及结果见表 2,方差分析见表 3。

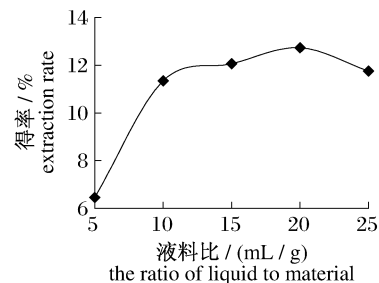


图4 液料比对匙吻鲟软骨蛋白-多糖复合物得率的影响

Fig.4 Effect of the ratio of liquid to material on extraction rate of protein-polysaccharide complex

表1 正交试验设计表

Tab.1 Orthogonal design of experiment

水平 level	A 碱浓度 (%) alkali concentration	B 微波功率 (W) microwave power	C 微波时间 (min) microwave time	D 液料比 (mL/g) the ratio of liquid to material
1	0.6	240	6	10
2	0.9	360	9	15
3	1.2	480	12	20

表2 正交试验设计及结果

Tab.2 Design and result of orthogonal experiment

试验号 test number	A 碱浓度 (%) alkali concentration	B 微波功率 (W) microwave power	C 微波时间 (min) microwave time	D 液料比 (mL/g) the ratio of liquid to material	得率 (%) extraction rate
1	0.6	240	6	10	9.13 ± 0.18
2	0.6	360	9	15	11.48 ± 0.15
3	0.6	480	12	20	9.28 ± 0.15
4	0.9	240	12	20	11.44 ± 0.08
5	0.9	360	9	10	9.89 ± 0.31
6	0.9	480	6	15	11.68 ± 0.10
7	1.2	240	12	15	9.90 ± 0.06
8	1.2	360	6	20	10.17 ± 0.01
9	1.2	480	9	10	10.33 ± 0.01

注:得率 (%) = 提取软骨蛋白-多糖复合物质量/软骨质量 × 100; n = 3,  $\bar{x} \pm s$ 。

Notes: extraction rate (%) = weigh of extracted protein-polysaccharide complex/total weigh of cartilage; Each value represents the mean of 3 replicate pens each treatment.

表3 正交试验方差分析

Tab.3 Orthogonal test analysis of variance

因素 factor	A 碱浓度 (%) alkali concentration	B 微波功率 (W) microwave power	C 微波时间 (min) microwave time	D 液料比 (mL/g) the ratio of liquid to material
F/α	197.52/0.00	3.89/0.012	13.81/0.00	130.01/0.00

注:  $\alpha \leq 0.01$ , 极显著影响;  $\alpha \leq 0.05$ , 显著影响。

Notes:  $\alpha \leq 0.01$ , extremely significant;  $\alpha \leq 0.05$  significantly.

由表3可知,碱浓度、微波功率、微波时间、液料比对软骨提取物的得率均有显著或极显著影响,以碱浓度影响最大,其次依次为液料比、微波时间和微波功率,即  $A > D > C > B$ 。根据平均值确定最佳的工艺条件为  $A_2 D_2 C_1 B_2$ : 碱浓度为0.9%,液料比15:1(V/W),于360 W微波功率下处理9 min,在此最佳提取条件下进行实验,提取物得率为15.72%。

### 3 讨论

自然界中存在多种天然的蛋白-多糖复合物,易被人体吸收,能够参与、影响和调控人体代谢和生理功能,对于某些疾病的治疗针对性强、副作用低<sup>[20]</sup>。软骨蛋白-多糖复合物主要存在于动物软骨等结缔组织中,构成机体组织间质,具有一定生物活性和功能,而不同结构、不同来源及不同提取方法、复合物中蛋白质与多糖的不同组成比例,都会使提取物的生物活性产生较大差异。通常从动物组织中提取的蛋白-多糖复合物往往含有大量蛋白质,蛋白与多糖结合成蛋白糖、糖蛋白、激素类糖蛋白、酶糖蛋白等,并且具有独特的生物学功能,这些独特的功能与蛋白的链长和多糖的链结构、主链长度有较大的关系<sup>[21-22]</sup>。多年来我国对软骨蛋白-多糖复合物的基础研究和应用研究已全面深入的展开,从组成分析、药理作用、提取技术、纯化方法、新产品开发利用等方面都展开了广泛而深入的研究。蛋白质与多糖之间多种作用力维持着复合物的网状复合结构,具有良好的乳化性活性、溶解性、稳定性等,改善食品品质,因而,各类人工合成的复合物亦是近几年研究的热点,在食品行业应用广泛<sup>[23-26]</sup>。

目前,国内外针对各品种鲟鱼软骨中功能性多糖的研究较多,而对于匙吻鲟软骨中蛋白-多糖复合物提取工艺的研究相对较少。本文以匙吻鲟软骨为原料,研究软骨中功效成分——蛋白-多糖复合物的提取工艺,并进行正交优化,得到了最佳工艺参数。本研究在降低碱浓度的同时,引入微波辅助的提取方法,获得了较高的提取物得率。微波处理有利于软骨细胞中蛋白-多糖复合物的溶出,微波在加热的过程中,水作为介质迅速吸收热量,水汽化产生的压力将细胞膜和细胞壁冲破,形成微小孔洞,细胞内部和细胞壁水分减少,细胞收缩,表面出现裂纹,空洞或裂纹的存在

使细胞外部溶剂更容易进入细胞内,溶解并释放出细胞内成分<sup>[27]</sup>。与常规的碱法提取方法相比较,微波辅助碱法具有更强的渗透性,提高了提取效率,缩短了提取时间。正交优化后稀碱-微波提取匙吻鲟软骨功效成分的最佳工艺为液料比15:1(V/W),碱浓度为0.9%,于360 W微波功率下处理9 min,提取物得率为15.72%。相比舒坤贤等<sup>[28]</sup>提取鲟鱼软骨功效成分时使用碱浓度为5%,碱提时间4 h,及郭斌<sup>[27]</sup>提取虹鱼软骨功效成分时使用碱浓度为4%,提取时间18 h,本方法更快速,更高效,更环保。提取物中蛋白质组份所占比例较高,按照最优提取工艺制备复合物呈白色,通过测定,其中蛋白质占  $87.92 \pm 0.38$  (干基,%),总糖占  $11.32 \pm 0.08$  (干基,%),故可在此基础上进一步进行分离、纯化及酶解,制备各种功能性多糖、多肽。

### 参考文献:

- [1] 王琨,叶继丹,刘永. 鲟鱼软骨主要营养成分分析及评价[J]. 营养学报,2006,28(2):187-188.
- [2] 郝淑贤,石红,杨贤庆,等. 鲟鱼软骨成分分析及营养评价[J]. 食品与发酵工艺,2002,32(9):72-74.
- [3] 陈启明,陈金芳,李娜. 鲟鱼软骨素保湿霜的制备及保湿性评价[J]. 化学与生物工程,2007,24(5):67-69.
- [4] 胡梦红,王有基. 鲟鱼加工产品及其开发前景[J]. 北京水产,2006(6):55-58.
- [5] 李宏,单保恩. 糖蛋白糖链与肿瘤的关系[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2003,24(1):22-23.
- [6] TURGEON S L, SCHMITT C, SANCHEZ C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2007,12(4):166-178.
- [7] 郭育东,单斌,李敏仪. 苦瓜多糖脱蛋白方法的比较研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(7):3225-3227.
- [8] 殷涌光,韩玉珠,丁宏伟. 动物多糖的研究进展[J]. 食品科学,2006,27(3):256-262.
- [9] 黄琪琳,陈若雯,丁玉琴,等. 鲟鱼头骨多糖的提取及性质研究[J]. 食品科学,2009,30(12):135-139.
- [10] 梁中琴,姜开余,杨吉成,等. 鲨鱼软骨提取物抑瘤作用及其机制研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2001,18(4):269-271.

- [11] QIAO D L, HU B, GAN D, *et al.* Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76(3):422-429.
- [12] LIU Z L, WANG J, SHEN P, *et al.* Microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of ferulic acid from *Radix angelicae sinensis* [J]. *Separation and Purification Technology*, 2006, 52:18-21.
- [13] FISHMAN M L, CHAU H K, HOAGLAND P D, *et al.* Microwave-assisted extraction of lime pectin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20:1170-1177.
- [14] 梁艳, 应苗苗, 吕英华, 等. 微波辅助提取仙人掌多糖的工艺研究[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(7):159-162.
- [15] 董华强, 宁正祥, 崔志新, 等. 微波辅助提取多穗柯嫩叶黄酮工艺研究[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(2):213-217.
- [16] BALLARD T S, MALLIKARJUNAN P, ZHOU K, *et al.* Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120:1185-1192.
- [17] 艾志录, 郭娟, 王育红, 等. 微波辅助提取苹果渣中苹果多酚的工艺研究[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(6):188-191.
- [18] 吴素萍. 微波碱法提取小麦胚蛋白工艺条件的探讨[J]. *粮食与饲料工业*, 2009(2):21-23.
- [19] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1994:372-395.
- [20] 凌沛学, 荣晓花, 张天民. 动物来源糖胺聚糖医药应用进展[J]. *中华临床医药杂志*, 2003, 49(16):83-86.
- [21] 李宏, 单保恩. 糖蛋白糖链与肿瘤的关系[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2003, 24(1):22-23.
- [22] 杨江涛, 杨娟, 谢红. 刺梨多糖粗品与纯品体外抗氧化作用[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(2):94-96.
- [23] AL-HAKKAK J, KAVALE S. Improvement of emulsification properties of sodium caseinate by conjugating to pectin through the Maillard reaction [J]. *International Congress Series*, 2002, 1245:491-499.
- [24] SATO R, KATAYAMA S, SAWABE T, *et al.* Stability and emulsion-forming ability of water-soluble fish myofibrillar protein prepared by conjugation with alginate oligosaccharide [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(15):4376-4381.
- [25] SHU Y W, SAHARA S, NAKAMURA S, *et al.* Effect of the length of polysaccharide chains on the functional properties of the Maillard-type lysozyme-polysaccharide conjugate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44(9):2544-2548.
- [26] 申瑞玲, 田广瑞. 食品中蛋白质-多糖混合体系研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2009, 7:1-3.
- [27] 郭斌, 朱丹, 翟铁红. 稀碱法提取虹鱼硫酸软骨素最佳工艺条件研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2009, 36(4):600-601.
- [28] 舒坤贤, 张继承, 袁帅, 等. 中华鲟硫酸软骨素提取工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(3):23-25.

## Extraction technology optimization of microwave-assisted alkali for protein-polysaccharide complex from *Polyodon spathula* cartilage

DING Jun-zhou<sup>1,2,3</sup>, SHEN Shuo<sup>1,3</sup>, XIONG Shan-bai<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Si-ming<sup>1,2,3</sup>, HUANG Qi-lin<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. National R & D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing, Wuhan 430070, China;

3. Aquatic Product Engineering and Technology Research Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** *Polyodon spathula* cartilage as the cartilage tissue mainly contains two kinds of functional components: protein and polysaccharide, which possess anti-tumor, anti-aging effects and so on. The extraction, structure as well as activities of polysaccharides from the cartilage were investigated extensively and deeply. However, the extract technology for protein-polysaccharide complex has less been reported compared with polysaccharides. Therefore, the present work uses *Polyodon spathula* cartilage as material, and focuses on the process of protein-polysaccharide complex extracted by microwave-assisted alkali. The effects of alkali concentration, microwave power, microwave time and the ratio of liquid to material on the extract yield of protein-polysaccharide complex were studied by single factor analysis. On the basis of single factor analysis, the orthogonal test was performed to optimize the extract technology of microwave-assisted alkali. The results indicated that the optimum conditions of protein-polysaccharide complex from *Polyodon spathula* cartilage were cartilage with the ratio of liquid to material (15:1, V/W), was extracted by 0.9% alkali solution, and was synchronously treated with 360 W microwave power for 6 min to obtain extract yield of 15.72%. The extraction technology of the microwave-assisted alkali can reduce the consumption of alkali, shorten the extraction time, and enhance the extract yield of cartilage. This work is favorable to further purification of proteins and polysaccharide component from *Polyodon spathula* cartilage, as well as to development of new health food and medicinal function products by providing the technical basis.

**Key words:** *Polyodon spathula*; cartilage; microwave-assisted; protein-polysaccharide complex; extraction

**Corresponding author:** HUANG Qi-lin. E-mail: hql@mail.hzau.edu.cn,