

鲟龙鱼硫酸软骨素提取工艺优化研究

周婉君, 郝淑贤, 吴燕燕, 魏 涯, 林婉玲, 王锦旭, 岑剑伟*

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室,
国家水产品加工技术研发中心, 广东广州 510300)

摘 要:利用响应曲面法优化提取西伯利亚鲟龙鱼软骨组织提取硫酸软骨素的工艺条件。研究了碱浓度、沉淀时间、乙醇体积对硫酸软骨素提取率的影响, 在单因素实验基础上采用 Box-Behnken 中心组合实验, 以碱质量浓度、沉淀时间、乙醇体积为影响因素, 以提取率为响应值建立二元多次方程, 通过响应面分析法得到优化组合。结果表明, 最佳工艺条件为: NaOH 0.5 mol/L、乙醇体积 1 倍、沉淀时间 20 min, 提取得硫酸软骨素产率为 57.21%, 预测值产率为 59.31%。

关键词: 鲟龙鱼, 硫酸软骨素, 提取, 响应曲面法

Optimization technology of extraction of the chondroitin sulfate from sturgeon

ZHOU Wan-jun, HAO Shu-xian, WU Yan-yan, WEI Ya,
LIN Wan-ling, WANG Jin-xu, CEN Jian-wei*

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory
of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, National R&D Center
for Aquatic Product Processing, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Extraction of the chondroitin sulfate in sturgeon was studied by response surface methodology. The influence of alkalinity, sedimentation time, ethanol volume on extract rate of chondroitin sulfate was studied. On the basis of single-factor investigation, Box-Behnken central composite experiments were carried out to build the quadratic regression model for the extraction yield with above 3 factors, the optimizing process parameters were: alkalinity 0.5 mol/L, sedimentation time 20 min, ethanol volume 1 times of the extraction solution. Under the optimal processing condition, the yield of chondroitin sulfate was 57.21%, and the forecasted yield was 59.31%.

Key words: sturgeon; chondroitin sulfate; extraction; response surface methodology

中图分类号: TS254.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)13-0209-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.035

鲟龙鱼 (*Acipenser*) 是淡水类中寿命长、个体大、生长快等养殖优点的鱼类, 有很高的科学研究价值和经济价值。近年来, 我国鲟龙鱼的养殖业发展迅猛并取得了显著成效^[1]。鲟龙鱼骨架为软骨组织, 鲟鱼软骨与鲨鱼软骨具有相似功用, 内含有丰富的抗癌因子——硫酸软骨素 (Chondroitin sulfate)。硫酸软骨素是来自动物鼻软骨、喉软管及肌腱等软骨组织, 是从动物软骨组织中提取分离得到的一种重要的酸性粘多糖——糖胺聚糖^[2]。根据文献研究发现硫酸软骨素能缓解关节炎^[3]、抗氧化、免疫调节、降血脂、抗凝血和促进骨质形成^[4], 有较好的保水性和黏性、抗肿瘤、抑制病毒活性, 因此在医药、保健食品及化妆品行业有广泛应用^[5]。从鲟鱼、鲨鱼中提取硫酸

软骨素优化工艺虽然已有多种, 但是以西伯利亚成年鲟龙鱼进行研究还是极少见。本研究利用西伯利亚成年鲟龙鱼软骨为原料, 为了产品的安全性, 通过工艺技术研究改进低碱法优化提取硫酸软骨素, 应用响应面分析法 (Response Surface Methodolgy) 并结合单因素实验对提取工艺进行了优化, 确定最佳的提取工艺条件, 为鲟龙鱼加工副产物高值化利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

西伯利亚鲟龙鱼骨: 由杭州千岛湖鲟龙科技开发有限公司, -18℃冻存; 十二水磷酸氢二钠、二水磷

收稿日期: 2015-01-15

作者简介: 周婉君 (1961-), 女, 本科, 实验师, 主要从事水产品加工与质量安全控制技术方面的研究。

* 通讯作者: 岑剑伟 (1976-), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事水产品加工与质量安全控制技术方面的研究。

基金项目: 国家公益性 (农业) 行业专项 (201003055-06); 国家重大科技成果转化项目 (ZD-2013-345-3); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2012YD01)。

酸二氢钠、氢氧化钠,戊烷磺酸钠,乙酸,甲醇,异丙醇,均为分析纯购自广州化学试剂厂,乙腈(高级纯)购自上海安谱科学仪器有限公司,胰蛋白酶购自广州市齐云生物技术有限公司。

Alpha-4 冷冻干燥机 德国 Christ 公司;3K30 冷冻离心机 德国 Sigma 公司;高速万能搅碎机 上海顶帅有限公司;SCIEN 超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司;安捷伦 1100 液相色谱仪 美国安捷伦公司;GB204 电子天平 长沙湘平科技发展有限公司;MILLI-Q 超纯水机 美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 软骨预处理 将鲟鱼软骨组织置于 90℃ 水浴处理 20min,用刀刮除表面的肌肉及脂肪等杂质,清洗干净,将软骨切碎,用 50℃ 烘箱干燥后粉碎机打碎,密封-18℃ 保存。

1.2.2 粗提取 参考尚军等^[6]的方法进行超声波水解。称取 5g 软骨粉,50mL 磷酸盐缓冲液,0.015g 胰蛋白酶,超声波水解温度 50℃,功率 100%,时间 120min),10000r/min 离心 15min 后取上清液,加入 1.0 倍体积乙醇和至 NaOH 0.4mol/L,搅拌沉淀 30min,10000r/min 离心 20min,取沉淀物用烘箱 50℃ 烘箱干燥约 2h。

1.2.3 复溶 用适量水将上述制得的样品完全溶解,用 40% 的乙酸溶液中和,调 pH 至中性,冷冻离心机 10000r/min 离心 20min 取上清液,-18℃ 冷冻干燥机干燥 24h 后,取出研碎混匀,得到硫酸软骨素粗品。

1.3 硫酸软骨素含量及含量的测定

参考液相色谱法^[7],用乙腈-10mmol/L 戊烷磺酸钠溶液(10:90),作为流动相;流速为 1mL/min;检测波长为 205nm;色谱柱为 C₁₈柱,250mm×4.6mm,粒度 5μm;进样量 20μL。

1.4 硫酸软骨素产率计算

根据硫酸软骨素含量测定结果,计算硫酸软骨素含量,计算公式如下:

硫酸软骨素产率(%) = 硫酸软骨素粗品质量/软骨质量(干重)×100

1.5 响应面法优化设计

根据预实验结果,选取对硫酸软骨素提取有显著影响的三个因素进行优化,即碱液浓度(X₁)、沉淀时间(X₂)和乙醇体积(X₃)进行响应面实验,选用三因子 Box-Behnken^[8]数据统计分析软件对实验数据进行回归分析,如表 1 所示。

表 1 实验因素水平表

Table1 Factors and levels in response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
X ₁ 碱浓度(mol/L)	0.2	0.4	0.6
X ₂ 沉淀时间(min)	20	30	40
X ₃ 乙醇体积(倍)	0.8	1.0	1.2

2 结果与分析

2.1 响应面分析法优化实验结果

选用三因子根据 Box-Behnken 设计的原理,结合单因素实验结果,确定各影响因素的编号水平。分别为 X₁ 碱液浓度(mol/L)、X₂ 沉淀时间(min)、X₃ 乙醇体积(倍)三个响应变量,产率为响应值,响应面设计方案及实验结果见表 2^[9]。

表 2 Box-Behnken 实验结果

Table 2 Design and results of the response surface

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	产率(%)
1	-1	-1	0	45.415
2	1	-1	0	57.845
3	-1	1	0	42.185
4	1	1	0	51.305
5	-1	0	-1	30.01
6	1	0	-1	48.39
7	-1	0	1	46.15
8	1	0	1	53.105
9	0	-1	-1	52.845
10	0	1	-1	47.43
11	0	-1	1	48.725
12	0	1	1	53.88
13	0	0	0	48.725
14	0	0	0	61.04
15	0	0	0	55.815
16	0	0	0	56.965
17	0	0	0	57.845

2.2 回归模型方差分析

根据表 2 的实验设计及实验结果,采用 Design-Expert 软件对实验数据进行分析,得到方差分析结果见表 3^[10]。

表 3 回归模型方差分析结果

Table 3 Variance and error analysis of the response surface

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr > F
模型	811.61	9	90.18	7.15	0.0084
X ₁	274.78	1	274.78	21.77	0.0023
X ₂	12.58	1	12.58	1.00	0.3544
X ₃	67.19	1	67.19	5.32	0.0544
X ₁ X ₂	2.74	1	2.74	0.22	0.6555
X ₁ X ₃	32.63	1	32.63	2.59	0.1519
X ₂ X ₃	27.93	1	27.93	2.21	0.1804
X ₁ ²	223.02	1	223.02	17.67	0.0040
X ₂ ²	3.97	1	3.97	0.31	0.5921
X ₃ ²	138.99	1	138.99	11.01	0.0128
残差	88.34	7	12.62		
失拟	55.99	3	18.66	2.31	0.2182
净误差	32.35	4	8.09		
总离差	899.95	16			
相关系数 R ²	0.9018				

从表 3 分析结果可知,回归模型 Pr > F 值为 0.0084 < 0.01,说明回归模型与响应值的相关极显

著,模型的相关系数为 $0.9018 > 0.9$,说明回归模型能够较好地预测相应的响应变量。而失拟项不显著为 $0.2182 > 0.05$,该模型在理论上反映了响应值的误差较小,拟合度好。

各因素经回归拟合后,可以得到硫酸软骨素含量 Y 对编码自变量(碱浓度、沉淀时间、乙醇体积)的二次多项回归方程(1):

$$Y = 57.44 + 5.86X_1 - 1.25X_2 + 2.90X_3 - 0.83X_1X_2 - 2.86X_1X_3 + 2.64X_1X_3 - 7.28X_1^2 - 0.97X_2^2 - 5.75X_3^2$$

由表3可知,碱浓度 X_1 的一次项、碱浓度的 X_1 的二次项及乙醇体积 X_3 的二次项对硫酸软骨素含量的影响显著;碱浓度 X_1 和乙醇体积 X_3 的一次项、三个因素的一次项、沉淀时间 X_2 和乙醇体积 X_3 的二次项对硫酸软骨素含量影响不显著。因此,可得到优化方程(2):

$$Y = 57.44 + 5.86X_1 - 7.28X_1^2 - 5.75X_3^2$$

2.3 响应曲面分析

根据由拟合的回归模型作响应曲面图和等高线图,结果如图1~图3所示。

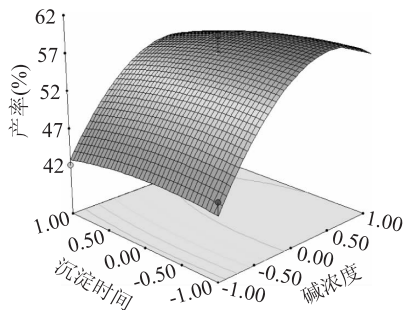


图1 沉淀时间与碱浓度对产率的影响

Fig.1 Effect of precipitation time and alkali concentration on the yield of Chondroitin sulfate

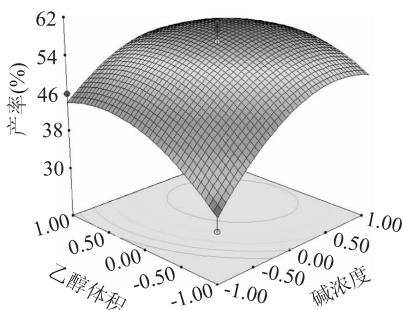


图2 乙醇体积与碱浓度产率的影响

Fig.2 Effect of ethanol and alkali concentration on the yield of Chondroitin sulfate

从图1可知,当乙醇体积定为提取液1倍时,碱浓度的变化对硫酸软骨素含量的影响较显著,随着碱浓度增加硫酸软骨素含量先升高后下降。原因是在低浓度碱液中,部分多糖降解不完全或没有降解。从图2可知,乙醇体积和碱浓度的交互作用较小,而碱浓度在 $0.4 \sim 0.6 \text{ mol/L}$ 范围内,硫酸软骨素的含量较大。从图3可知,乙醇体积和沉淀时间对硫酸软骨素含量的交互作用较强,当沉淀时间一定,乙醇体积为 $0.9 \sim 1.1$ 倍左右时,硫酸软骨素含量较高。

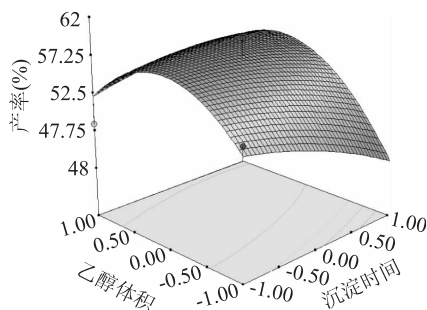


图3 乙醇体积与沉淀时间对产率的影响

Fig.3 Effect of ethanol volume and precipitation time on the yield of Chondroitin sulfate

2.4 最佳工艺参数确定

为了进一步得到各因素的最佳条件组合,使得提取硫酸软骨素含量达到最佳值,采用 Design-Expert 软件对各因素和响应值的数据进行优化分析,以硫酸软骨素含量为响应值,经响应面分析可得到最佳的提取条件:碱浓度 $X_1 = 0.49 \text{ mol/L}$ 、沉淀时间 $X_2 = 20.36 \text{ min}$ 、乙醇体积 $X_3 = 0.98$ 倍,硫酸软骨素含量的预测值为 59.31% 。根据实际操作,将预测条件修正为碱浓度 0.5 mol/L 、沉淀时间 20 min 、乙醇体积1倍,并进行实验得到硫酸软骨素产率为 57.21% ,结果与理论预测值基本相符,对硫酸软骨素提取低碱处理参数具有一定的实际预测价值。根据文献报道郝淑贤^[11]、刘安军^[12]、徐传屯^[13]等的提取硫酸软骨素产率分别是 16.65% 、 35.70% 、 31.56% ,本研究硫酸软骨素产率结果远远高于其它实验结果,从食品安全方面考虑低浓度碱处理方法较为安全,优化工艺条件更有效地提高了硫酸软骨素的产率和质量。

3 结论

通过采用 Box-Behnken 的中心组合设计响应面法建立了3个影响因素(碱浓度、沉淀时间及乙醇体积)和响应值(产率)结合相互作用的数学模型,得出碱处理时硫酸软骨素提取条件的优化。三个因素对硫酸软骨素含量的影响顺序:NaOH 浓度、乙醇体积、沉淀时间,结果表明,最佳优化工艺条件:NaOH 0.5 mol/L 、乙醇体积1倍、沉淀时间 20 min ,按此优化工艺条件得到硫酸软骨素产率为 57.21% ,建立的数学模型能较好地预测各实验因素和考察指标之间的关系。

参考文献

- [1] 孙大江,曲秋芝,马国军,等.中国鲟鱼养殖概况[J].大连水产学院学报,2003,18:216-221.
- [2] 魏涯,赵永强,郝淑贤,等.吡啶法与间苯三酚法测定硫酸软骨素比较研究[J].南方水产科学,2012,8(6):65-71.
- [3] 陈磊,凌培学,张天民.硫酸软骨素在骨关节炎防止中的作用[J].中国生化药物杂志,2008,29(2):137-139.
- [4] 孙丰梅.硫酸软骨素的提取及其降血脂、抗氧化保健功能的研究[D].保定:河北农业大学,2003.
- [5] 徐庆阳,黎兴荣,石墨,等.硫酸软骨素研究现状[J].生物技术通讯,2006,15(6):633-635.

(下转第216页)

有特征吸收峰,这与陈晨^[13]报道的叶绿素铜钠盐的特征吸收峰 405~414nm 和 627~633nm 接近。

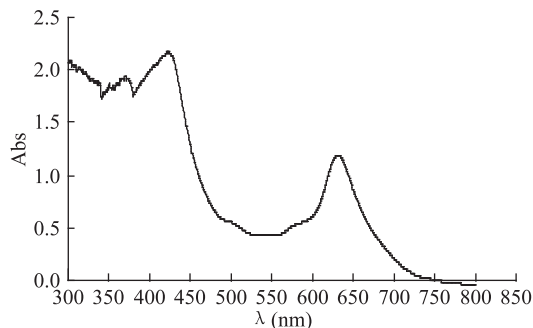


图8 紫外-可见吸收光谱图

Fig.8 UV-Vis absorption spectra

参照食品添加剂叶绿素铜钠盐的标准(GB 26406-2011)对浒苔色素进行测定,结果见表5。被检测的主要指标均符合国家标准,其中总铜和游离铜明显低于标准中规定的最高含量。铜代过程是影响色素产物中总铜和游离铜含量的关键步骤^[14],本研究在有机溶剂提取叶绿素之前对原料进行铜代,并通过清洗、过滤将藻体外的 Cu^{2+} 有效去除,从而有效降低了色素产物中游离铜的含量。

表5 浒苔水溶性色素各项指标测定结果

Table 5 Quality indexes of Enteromorpha water soluble pigment

质量指标	测定值	GB 26406-2011
pH	10.96	9.5~11.0
$E_{1\text{cm}}^{1\%}(405 \pm 3) \text{ nm}$	569.7	≥ 568
吸光度比值	3.41	3.2~4.0
总铜(w%)	4.1	≤ 8
游离铜(w%)	0.013	≤ 0.025
干燥减量(w%)	3.2	≤ 5
铅(mg/kg)	3.87	≤ 5

3 结论

研究表明,在有机溶剂对绿潮藻浒苔提取色素之前,添加 CuSO_4 有助于脱镁叶绿素转化为叶绿素铜,进而提高叶绿素得率。但并非 CuSO_4 添加量越多得率越高,过高的添加量将导致浒苔藻体细胞壁中的氨基等带电基团与藻体内部的脱镁叶绿素竞争性与 Cu^{2+}

结合,使得叶绿素得率显著降低。通过响应面优化方法,得到浒苔水溶性色素最佳工艺参数为:NaOH 添加量为 50mg、反应温度为 45℃、反应时间为 50min,在此最优条件下浒苔色素得率为 1.068mg/mL。该工艺具有操作简单、高效快速的特点,且反应过程避免酸、碱的过度使用,为绿潮藻浒苔原料提供一条高值利用的新途径。

参考文献

- [1] 杨继生,何学志.叶绿素铜钠盐的性质、制备工艺及其应用[J].广州食品工业科技,2002,18(2):33-35.
- [2] 程红艳.浒苔中叶绿素、叶黄素的分析方法建立及叶绿素铜钠的制备初探[D].青岛:国家海洋局第一海洋研究所,2011:25-36.
- [3] 姚东瑞.浒苔资源化利用研究进展及其发展战略思考[J].江苏农业科学,2011,39(2):473-475.
- [4] 郑君秀.叶绿素铜钠盐的制备探讨[J].福建农林科技,1997,24(1):19-21.
- [5] 赵庆生,孙健,肖杰,等.芦笋叶绿素铜钠盐制备过程中提取工艺的研究[J].食品工业科技,2012,33(12):302-305.
- [6] GB 26406-2011.食品添加剂 叶绿素铜钠盐[S].北京,中华人民共和国卫生部.
- [7] 王敏,刘邻渭.叶绿素及衍生物研究进展与护绿工艺分析[J].郑州轻工业学院学报,2001,16(1):63-67.
- [8] 邓丽萍.藻体对水环境中 N、P 及重金属 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 的吸附特征研究[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2008:71-72.
- [9] 潘进芬.海藻对水体中重金属的吸附研究[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2000:17-23.
- [10] 杨桂枝.从海藻中提取、制备叶绿素铜钠盐工艺及稳定性研究[D].天津:天津科技大学,2005:23-24.
- [11] Wang ZP, Shan XF. Study on preparation and stability of sodium copper chlorophyll[J]. Chem Eng, 2004, (9): 50-51.
- [12] 纪平雄,黄自然.氧化糊状叶绿素精制叶绿素铜钠盐研究[J].广东蚕业,1996,30(1):38-32.
- [13] 陈晨,陈军辉,程红艳,等.浒苔叶绿素铜钠盐的制备研究初探[J].中国海洋药物杂志,2012,31(1):21-24.
- [14] 喻薇,纪平雄.铜氨法生产叶绿素铜钠盐工艺优化[J].食品科学,2012,33(12):119-122.

(上接第 211 页)

- [6] 尚军,李来好,吴燕燕,等.响应面优化超声波辅助蛋白酶水解合浦珠母贝肉的条件研究[J].食品科学,2009,30(18):44-49.
- [7] 中国国家标准化管理委员会.GB/T20365-2006.硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖含量的测定[S].北京:中国标准出版社,2006.
- [8] 杨文雄,高彦祥.响应面法及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2005,2:68-71.
- [9] 黄卉,李来好,杨贤庆,等.响应面法优化罗非鱼油微胶囊壁材的研究[J].食品工业科技,2009,30(12):225-228.

- [10] 戚勃,李来好,杨贤庆,等.响应曲面法优化麒麟菜卡拉胶碱处理工艺[J].南方水产科学,2011,7(6):26-34.
- [11] 郝淑贤,魏涯,李来好,等.鲟鱼软骨素提取工艺研究[J].食品工业科技,2012,33(24):253-255,261.
- [12] 刘安军,王慧,朱振元,等.鲟鱼硫酸软骨素提取工艺的研究[J].现代食品科技,2009,25(6):617-619.
- [13] 徐伟屯,关瑞章,郑江,等.养殖鲟鱼软骨中硫酸软骨素的优化提取工艺研究[J].中国生化药物杂志,2004,30(3):154-157,161.