

响应曲面法 优化燕窝糖蛋白提取工艺研究

郑丽娟¹ 李致瑜¹ 简叶叶¹ 谢 勇² 张 怡¹ 郑宝东¹ 徐 晖^{1*}

(1.福建农林大学食品科学学院 福建福州 350002;

2.福建中医药大学药学院 福建福州 350122)

摘 要:通过水浸提法提取燕窝糖蛋白,以蛋白质提取率及多糖提取率为考察指标,研究浸提时间、料液比、浸提次数对燕窝糖蛋白提取效果的影响,并利用响应曲面法对燕窝糖蛋白提取工艺进行优化。结果表明:燕窝糖蛋白提取的最佳工艺条件为:浸提时间为 2.6 h,料液比为 1:47,浸提次数为 2 次,得到的蛋白质提取率为 3.96%,多糖提取率为 1.54%。提取液经浓缩沉淀,透析冻干后得到糖蛋白粗品,其得率为 3.01%。另外,通过此法制备的糖蛋白粗品中蛋白质含量和多糖含量分别为 59.06% 和 19.2%。

关键词:燕窝 糖蛋白 提取 响应曲面

Optimization of the extraction of glycoprotein from bird's nest by response surface methodology

ZHENG Li-juan¹ LI Zhi-yu¹ JIAN Ye-ye¹ XIE Yong² ZHANG Yi¹ ZHENG Bao-dong¹ XU Hui^{1*}

(1.College of Food Science ,Fujian Agriculture and Forestry University ,Fuzhou 350002 ,China;

2.Fujian University of Traditional Chinese Medicine(TCM) ,Fuzhou 350122 ,China)

Abstract: In this paper glycoprotein from bird's nest was extracted by the hot water extraction. The effects of extraction time , material to liquid ratio and extraction times on the extraction rate of glycoprotein were studied ,and the response surface analysis was used to optimize the extraction conditions of glycoprotein from bird's nest. The optimal condition of glycoprotein extraction was obtained with 2.6 hours of extraction time ,1:47 of material to liquid ratio and extracting for 2 times. The extracts were concentrated and precipitated. Finally ,the crude glycoprotein was achieved by dialysis and lyophilization with the yield of 3.01%. In addition ,the protein content and polysaccharide content in the crude glycoprotein prepared by this method were 59.06% and 19.2% respectively.

Key words: bird's nest; glycoprotein; extraction; response surface

中图分类号:TS205.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2017)08-0267-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.043

燕窝为雨燕科(*Apodidae*) 金丝燕属(*Collocalia*) 鸟类分泌出的唾液与其绒羽混合凝结于岩洞深处而筑成的巢窝^[1],富含营养物质如钙、铁、磷、碘等营养元素及水溶性蛋白质、维生素和游离的氨基酸等^[2]。燕窝有美容养颜、养阴润燥、益气补中、润肺止咳等功效,还有抗病毒、抑制血凝反应、提高免疫力、促进细胞分裂、抗氧化、提高骨骼强度等生理活性,燕窝被作为名贵中药,也是美味佳肴,营养和药理价值高,享有“东方鱼子酱”的美称^[3]。

糖蛋白是以蛋白质为主与短链的寡糖通过共价键形成的活性化合物,在性质上更接近蛋白质,有抗氧

化、抗肿瘤、降血糖、降血脂和提高免疫力等多种生理活性^[4],已有从生姜、山药、玉竹等中提取糖蛋白的报道^[5]。糖蛋白是燕窝的主要营养成分之一,营养价值高^[6]。目前,对燕窝糖蛋白的研究主要集中于分离纯化^[7]、结构鉴定^[8]和生物活性^[9]等方面。李晓龙^[10]通过超声浸提 35 min,采用 Savage 法脱除游离蛋白,去离子水透析制备燕窝糖蛋白,其提取率为 2.08%。张世伟等^[11]研究比较中性缓冲液、酸、碱、不同浓度的 SDS 和尿素在不同超声时间下得到的提取效率以确定最优提取方法,最终选用尿素提取 2 min 作为燕盏中唾液酸糖蛋白定量检测的前处理方法。崔慧娥等^[12]

收稿日期:2016-11-08

作者简介:郑丽娟(1990-),女,硕士研究生,主要从事食品营养与功能因子方面的研究,E-mail:zljrl1127@163.com

* 通讯作者:徐晖(1984-),女,讲师,主要从事食品质量安全检测方面的研究,E-mail:xhui1st@163.com。

基金项目:福建省科技厅高校产学研合作项目(2016Y4006);福建省高等学校科技创新团队支持计划(闽教科[2012]03号);福建农林大学高水平大学建设项目(612014042)。

将燕窝经水浴提取、醇析得糖蛋白粗品,分离纯化后得到均一成分,经 SDS-PAGE 凝胶电泳测定其分子量约为 60 kDa; You 等^[13]将燕窝溶于蒸馏水中 4 °C 浸提,离心取上清液,通过 MALDI-TOF/TOF MS 分析显示 α 2-3 连接的唾液酸糖蛋白是酸性哺乳动物几丁质酶样蛋白质,而 α 2-6 连接的唾液酸糖蛋白为酸性哺乳动物几丁质酶。本研究通过水浸提法提取燕窝糖蛋白,并采用响应曲面法对提取单因素进行优化,确定最佳提取工艺,为其进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

燕窝 厦门市丝浓食品有限公司提供;无水乙醇、考马斯亮蓝、牛血清蛋白、磷酸、葡萄糖、苯酚、浓硫酸和硫酸铵等 均为国产分析纯。

WFZUV-2000 型紫外可见分光光度计 尤尼科上海仪器有限公司; Allegra X-30R 真空冷冻干燥机 美国贝克曼库尔特有限公司; SHA-B 恒温水浴振荡器 常州国华电器有限公司; DHG-9140(A) 电热鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司; H1850R 冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 粉碎机 上海鼎广机械设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 燕窝糖蛋白的提取工艺流程 燕窝粉研过 80 目筛,加入去离子水浸提 2 次,3 层纱布过滤,10000 r/min 离心 10 min,取上清液(测定蛋白质含量和多糖含量分别用于蛋白质提取率和多糖提取率计算),55 °C 减压浓缩,加入饱和硫酸铵沉淀,溶于去离子水中,4 °C 透析 48 h(每 6 h 换一次溶液),真空冷冻干燥得到燕窝糖蛋白粗品(测定得率、蛋白质含量和多糖含量)。

1.2.2 燕窝糖蛋白提取的单因素实验设计

1.2.2.1 浸提时间对提取率的影响 选择浸提温度为 80 °C,料液比为 1:40,浸提次数为 2 次,浸提时间分别为 1、1.5、2、2.5、3 h,以蛋白质和多糖提取率为指标,考察浸提时间对糖蛋白提取效果的影响。

1.2.2.2 料液比对提取率的影响 选择浸提温度为 80 °C,浸提时间为 2 h,浸提次数为 2 次,料液比分别为 1:30、1:40、1:50、1:60、1:70,以蛋白质和多糖提取率为指标,考察料液比对糖蛋白提取效果的影响。

1.2.2.3 浸提次数对提取率的影响 选择浸提温度为 80 °C,浸提时间为 2 h,料液比为 1:40,浸提次数为 1、2、3、4 次,以蛋白质和多糖提取率为指标,考察浸提次数对糖蛋白提取效果的影响。

1.2.3 燕窝糖蛋白提取的响应曲面优化设计 根据单因素实验结果,以浸提时间、料液比、浸提次数 3 个因素为自变量,以蛋白质和多糖提取率为指标,进行三因素三水平的响应曲面实验设计,实验因素及水平编码见表 1。

1.2.4 测定方法 蛋白质含量采用考马斯亮蓝染色法^[14]测定;多糖含量采用苯酚-硫酸法^[14]测定。蛋白质与多糖提取率的计算见式(1),糖蛋白得率的计算见式(2):

$$r(\%) = \frac{c_1 v n^{-6}}{m_1} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

表 1 响应曲面实验因素水平表

Table 1 Factors and levels table of response surface methodology

水平	因素		
	A 浸提时间(h)	B 料液比	C 浸提次数
-1	2	1:30	1
0	2.5	1:40	2
+1	3	1:50	3

式中, r : 蛋白质或多糖的提取率,%; c_1 : 提取液中蛋白质或多糖质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; v : 提取液体积, mL ; n : 稀释倍数; m_1 : 燕窝样品的质量, g 。

$$p = \frac{m_2}{m_1} \quad \text{式(2)}$$

式中, p : 糖蛋白得率,%; m_2 : 干燥后糖蛋白质量, g 。

1.3 数据处理方法

采用 Design Expert 8.0 软件对数据进行处理与回归分析。

2 结果与分析

2.1 单因素提取工艺实验

2.1.1 浸提时间对蛋白质和多糖提取率的影响 浸提时间对蛋白质和多糖提取率的影响见图 1,蛋白质与多糖提取率变化趋势一致,浸提时间在 1~2.5 h 之间,提取率显著增大;而在 2.5 h 之后,提取率处于平缓状态,这是因为浸提刚开始时,细胞膜的破碎程度较低,目标成分溶出少,随着浸提时间的延长,使颗粒胞膜的破裂程度增大,有利于促进蛋白质及多糖的溶出,因而提高糖蛋白提取率。而当浸提时间增加到一定程度,颗粒胞膜进一步破裂,使得原料和浸提液能够充分接触,当蛋白质和多糖溶出达到平衡后,糖蛋白提取率随时间变化趋于平缓,因此选择 2.5 h 最为合适。

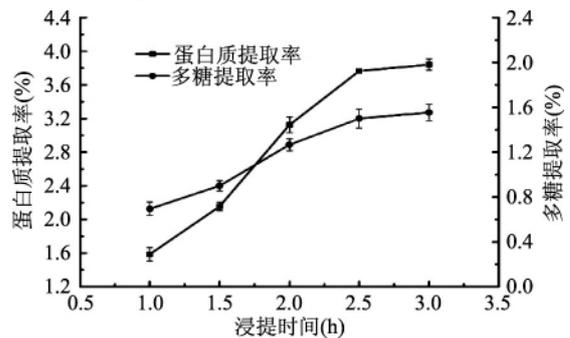


图 1 浸提时间对蛋白质与多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on extraction rate of protein and polysaccharide

2.1.2 料液比对蛋白质和多糖提取率的影响 料液比对蛋白质和多糖提取率的影响见图 2,当料液比小于 1:40 时,提取率随料液比的增大而显著增加($p < 0.05$),而当料液比超过 1:50 时,提取率呈下降趋势。这可能是由于随着液料比的增加,可以增加原料与浸提液的接触面积,使目标成分更充分地溶解出来,使糖蛋白提取率增加;当料液比增加到一定程度时,

蛋白质和多糖溶出达到平衡,而杂质扩散相对增多。因此,综合考虑提高浓缩效率和减少溶剂用量,选用1:40为合适的料液比。

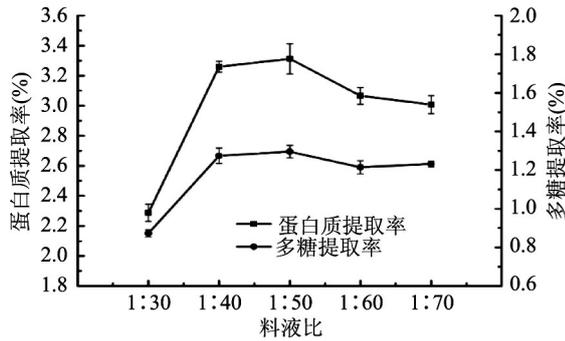


图2 料液比对蛋白质与多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of material to liquid ratio on extraction rate of protein and polysaccharide

2.1.3 浸提次数对蛋白质和多糖提取率的影响 浸提次数对蛋白质和多糖提取率的影响见图3,当浸提次数为2次时,蛋白质和多糖提取率均达到最大值,而当浸提次数超过2次时,提取率呈现下降趋势。这可能是由于随着浸提次数的增加,浸提液内蛋白质和多糖逐渐被提取出来,从而使提取率增加;当浸提次数超过2次时,浸提液内蛋白质和多糖含量达到平衡,可导致糖蛋白浓度降低。因此选择2次为最佳浸提次数。

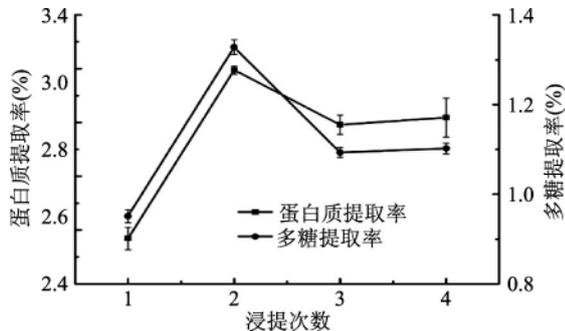


图3 浸提次数对蛋白质与多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction times on extraction rate of protein and polysaccharide

2.2 响应曲面优化分析

2.2.1 回归模型的建立 以浸提时间、料液比、浸提次数为响应因子,应用 Design Expert 8.0 软件分别对表2中的蛋白质提取率和多糖提取率进行二次多项回归拟合,得到二次回归方程。其中,蛋白质提取率 Y_1 的二次回归方程为: $Y_1(\%) = +3.63 + 0.35A + 0.43B + 0.24C + 0.12AB + 0.073AC + 0.12BC - 0.29A^2 - 0.37B^2 - 0.31C^2$,多糖提取率 Y_2 的二次回归方程为: $Y_2(\%) = +1.43 + 0.11A + 0.16B + 0.030C + 0.022AB + 5.275E - 0.03AC + 0.023BC - 0.090A^2 - 0.14B^2 - 0.15C^2$ 。

2.2.2 回归模型分析 对回归模型进行方差分析,结果见表3。蛋白质和多糖提取率的模型皆呈极显著 $p < 0.0001$,表明该模型显著,有很好的统计学意义。蛋白质提取率(Y_1)失拟项 $p = 0.4173 > 0.05$,多

表2 实验设计与结果

Table 2 Design and results of experiment

实验号	A	B	C	蛋白质提取率 $Y_1(\%)$	多糖提取率 $Y_2(\%)$
1	1	1	0	3.80	1.49
2	0	0	0	3.75	1.47
3	0	1	1	3.80	1.37
4	1	0	1	3.71	1.33
5	0	0	0	3.61	1.42
6	1	0	-1	3.14	1.26
7	0	0	0	3.62	1.43
8	-1	0	1	2.79	1.11
9	0	1	-1	3.03	1.27
10	-1	1	0	2.92	1.20
11	1	-1	0	2.78	1.15
12	0	0	0	3.52	1.43
13	0	0	0	3.66	1.38
14	-1	0	-1	2.51	1.05
15	0	-1	-1	2.34	0.96
16	-1	-1	0	2.39	0.95
17	0	-1	1	2.64	0.96

糖提取率(Y_2)失拟项 $p = 0.4781 > 0.05$,均不显著,说明回归方程拟合度较高。蛋白质提取率回归方程的一次项 A、B、C 均极显著 ($p < 0.0001$),其中对实验结果影响顺序为 B(料液比) > A(浸提时间) > C(浸提次数)。交互项 AB、BC 显著,这表明浸提时间 × 料液比、料液比 × 浸提次数对蛋白质提取率均具有交互作用;二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 极显著。多糖提取率回归方程的一次项 A、B 极显著 ($p < 0.0001$),C 为显著 ($p < 0.05$),对实验结果影响顺序与蛋白质影响顺序具有一致性,交互项 AB、BC、AC 均不显著,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 极显著,表明各个单因素对响应值影响较大,但交互作用不明显。

通过对回归模型的可信度分析,结果如表4所示,模型预测系数 $R^2_{(Y1)} = 0.8979$, $R^2_{(Y2)} = 0.9076$,表明该回归模型有较好的预测性。而决定系数 R^2 用于评价回归方程的优劣, R^2 值越接近于1,说明则实验值与预测值的相关性越好^[15],该实验结果 $R^2_{(Y1)} = 0.9878$, $R^2_{(Y2)} = 0.9881$,调整后系数 $R^2_{(Y1)} = 0.9722$, $R^2_{(Y2)} = 0.9728$,表明蛋白质和多糖提取率的实验值与预测值一致性较高。因此,该模型拟合度良好,对蛋白质和多糖的提取效果有较好地预测和分析。

2.2.3 模型交互作用 如图4~图6所示,在不同实验设计组合下,蛋白质和多糖随提取条件的不同表现出不同的变化趋势。其中料液比与浸提时间、料液比与浸提次数之间的交互作用对蛋白质提取率影响显著。如图4(a)可知,在一定范围内,随着浸提时间和料液比的增加,蛋白质提取率增大,到达极值之后,蛋白质提取率呈下降趋势,这可能是因为随着浸提时间和料液比的增加,蛋白质从原料中充分溶出,蛋白质提取率增大;而到达极值之后,蛋白质溶出达到平衡,且料液比增大导致蛋白质浓度降低,因此两

表3 回归模型的方差分析结果

Table 3 Variance analysis of the regression model

方差来源	平方和		自由度	均方		F		p	
	Y ₁	Y ₂		Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂
回归模型	4.52	0.56	9	0.50	0.062	63.15	64.51	<0.0001	<0.0001
A	0.99	0.10	1	0.99	0.10	124.57	108.28	<0.0001	<0.0001
B	1.45	0.22	1	1.45	0.22	182.57	223.01	<0.0001	<0.0001
C	0.46	7.266E-003	1	0.46	7.266E-003	57.80	7.52	<0.0001	0.0288
AB	0.060	1.901E-003	1	0.060	1.901E-003	7.61	1.97	0.0282	0.2036
AC	0.021	1.113E-003	1	0.021	1.113E-003	2.67	0.12	0.1464	0.7443
BC	0.056	2.178E-003	1	0.056	2.178E-003	7.11	2.25	0.0322	0.1770
A ²	0.35	0.034	1	0.35	0.034	43.65	35.64	0.0003	0.0006
B ²	0.58	0.078	1	0.58	0.078	73.47	80.25	<0.0001	<0.0001
C ²	0.39	0.095	1	0.39	0.095	49.64	97.80	0.0002	<0.0001
残差	0.056	6.765E-003	7	7.944E-003	9.665E-003				
失拟项	0.026	2.903E-003	3	8.771E-003	9.678E-003	1.20	1.0	0.4173	0.4781
纯误差	0.029	3.862E-003	4	7.324E-003	9.655E-003				
总和	4.57	0.57	16						

表4 回归模型的可信度分析

Table 4 The credibility analysis of the regression model

项目	标准差 (std.Dev)	平均值 (Mean)	变异系数 (C.V.%)	决定系数 (R ²)	修正决定系数 (修正R ²)	预测决定系数 (预测R ²)	信噪比 (Adeq Precision)
Y ₁	0.089	3.18	2.81	0.9878	0.9722	0.8979	22.747
Y ₂	0.031	1.25	2.49	0.9881	0.9728	0.9076	23.361

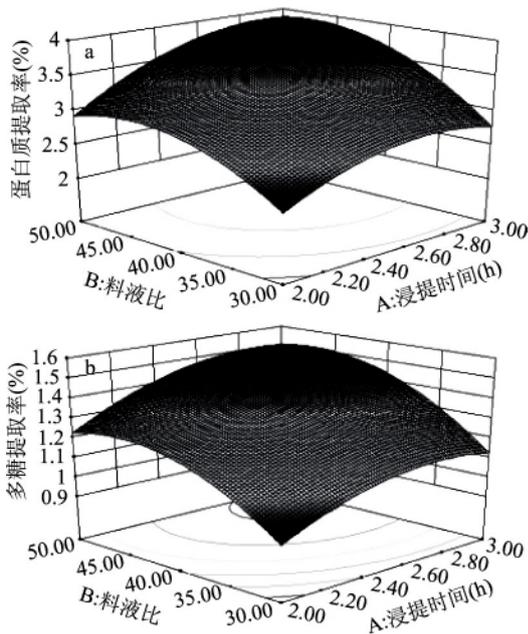


图4 料液比与浸提时间对蛋白质、多糖提取率影响的响应曲面分析

Fig.4 Response surface analysis of the effects of material to liquid ratio and extraction time on extraction rate of protein and polysaccharide

者的交互作用使蛋白质提取率处于缓慢下降趋势。如图6(a)所示,随着料液比和浸提次数的增加,蛋白质提取率呈现先上升后下降的趋势,这可能是由于随着料液比和浸提次数的增加,原料和浸提液充分接触

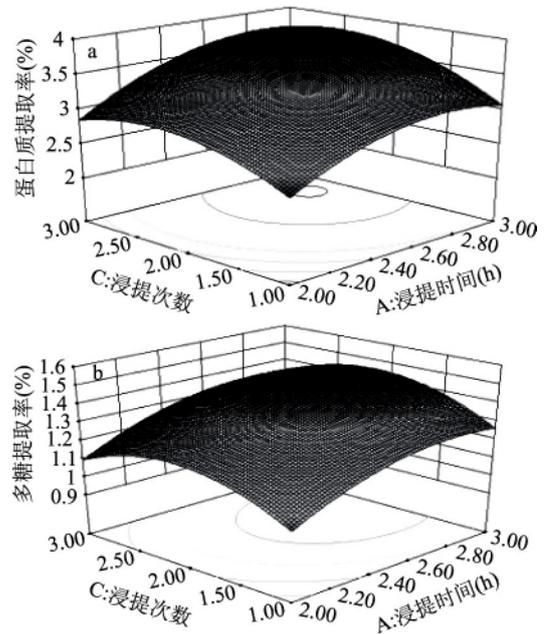


图5 浸提次数与浸提时间对蛋白质、多糖提取率影响的响应曲面分析

Fig.5 Response surface analysis of the effects of extraction times and extraction time on extraction rate of protein and polysaccharide

有利于蛋白质从原料胞膜中扩散出来,蛋白质提取率增加;而达到一定程度,蛋白质溶出趋于饱和,随着料液比的增加,蛋白质提取率下降,因此两者交互作用使得蛋白质提取率呈现先上升后下降的趋势。

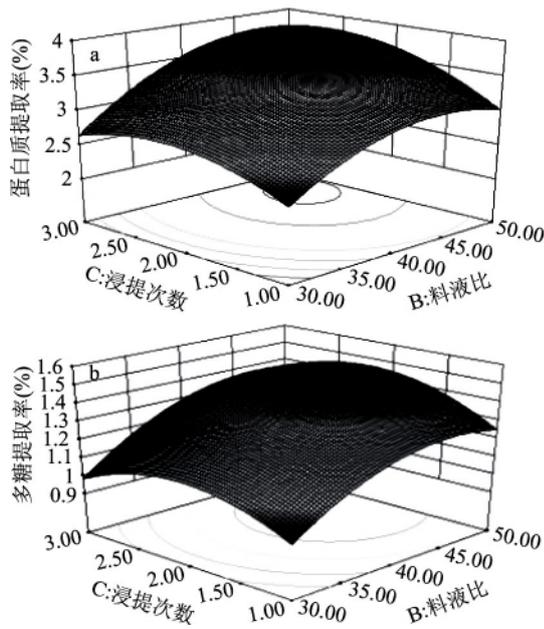


图6 料液比与浸提次数对蛋白质、多糖提取率影响的响应曲面分析

Fig.6 Response surface analysis of the effects of material to liquid ratio and extraction times on extraction rate of protein and polysaccharide

2.2.4 响应曲面优化及验证实验 通过 Design Expert 8.0 软件分析,确定蛋白质和多糖提取率同时达到最高值时,理论最佳条件为:浸提时间 2.63 h、料液比 1:46.58、浸提次数 2.20 次,在此条件下,蛋白质理论提取率为 3.90%,多糖理论提取率为 1.51%。考虑到实际操作性,选取最佳工艺条件为浸提时间 2.6 h、料液比 1:47、浸提次数 2 次。进行 3 次验证实验,得到蛋白质提取率平均值为 3.96%,多糖提取率平均值为 1.54%,误差较小,说明模型拟合度高,可以较好地反映燕窝糖蛋白中蛋白质和多糖的提取情况。

2.2.5 燕窝糖蛋白粗品中蛋白质和多糖含量测定 根据响应曲面最佳工艺条件制备燕窝糖蛋白粗品,其得率为 3.01%。所制备的燕窝糖蛋白粗品中蛋白质含量和多糖含量分别为 59.06% 和 19.2%。

3 结论

本文通过水浸提法提取燕窝糖蛋白,在单因素实验的基础上,利用响应曲面法对燕窝糖蛋白提取工艺进行优化,实验获得的最佳提取工艺条件为:浸提时间 2.6 h、料液比 1:47、浸提次数 2 次,得到的蛋白质提取率为 3.96%,多糖提取率为 1.54%。提取液

(上接第 266 页)

[17]李全国.乐陵枣叶总黄酮的提取,分离纯化,鉴定及其抗氧化活性研究[D].齐鲁工业大学,2014.
 [18]Huang D ,Ou B ,Prior R L.The chemistry behind antioxidant capacity assays [J]. Journal of agricultural and food chemistry , 2005 ,53(6) :1841-1856.
 [19]蔡仲军,陈仕江,尹定华,等.不同产地冬虫夏草清除羟

自由基作用的研究[J].中草药,2004,35(1):57-59.
 [20]赵静,李玉琴,王芳乔,等.6种黄酮类化合物清除超氧阴离子自由基能力及其构效关系[J].中国医药导报,2014,11(29):7-10.
 [21]张雪,周英,管静,等.5种中药材提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用[J].山地农业生物学报,2015(4):51-54.

参考文献

[1]任贻军,王振军,李万江.燕窝的鉴别研究概况[J].云南中医学院学报,2009,32(4):64-65.
 [2]Norhayati M K ,Azman O ,Nazaimoon W M.Preliminary Study of the Nutritional Content of Malaysian Edible Bird's Nest [J]. Malaysian Journal of Nutrition 2010 ,16(3) .
 [3]Wu Y ,Chen Y ,Wang B ,et al. Application of SYBR green PCR and 2DGE methods to authenticate edible bird's nest food [J]. Food Research International 2010 ,43(8) :2020-2026.
 [4]侯清娥,董建伟,王录军.糖蛋白的研究概述[J].农产品加工月刊,2016(1):69-71.
 [5]罗秋水,上官新晨,蒋艳,等.超声波辅助提取紫红薯糖蛋白工艺的优化[J].中国食品学报,2013,13(3):110-114.
 [6]Ma F ,Liu D. Sketch of the edible bird's nest and its important bioactivities [J]. Food Research International ,2012 ,48(2) :559-567.
 [7]Tong T J ,Liu D Y. Isolation and identification of glycopeptide in edible bird's nest [J]. Chin Sci Bull ,1985 ,12: 949-952.
 [8] Nakagawa H ,Hama Y ,Sumi T ,et al. Occurrence of a nonsulfated chondroitin proteoglycan in the dried saliva of Collocalia swiftlets(edible bird's-nest) . [J]. Glycobiology 2007 , 17(2) :157-64.
 [9]由艳燕.燕窝唾液酸糖蛋白的纯化鉴定及体外消化吸收、抗炎活性研究[D].青岛:中国海洋大学,2014.
 [10]李晓龙.燕窝蛋白二维液相色谱分离方法的研究[D].天津:天津科技大学,2010.
 [11]张世伟,赖心田,陈血剑,等.双抗夹心酶联免疫分析法检测燕窝中唾液酸糖蛋白[J].食品工业,2013(6):195-198.
 [12]崔慧娥,李昌模,张燕,等.燕窝糖蛋白纯化及多克隆抗体的制备[J].食品工业科技,2009(7):307-309.
 [13]You Y ,Cao Y ,Guo S ,et al. Purification and identification of α 2-3 linked sialoglycoprotein and α 2-6 linked sialoglycoprotein in edible bird's nest [J]. European Food Research and Technology 2015 ,240(2) :389-397.
 [14]李婷婷,张晖,吴彩娥,等.油茶籽糖蛋白提取工艺优化及抗氧化性[J].农业机械学报,2012,43(4):148-155.
 [15]王倩,刘淑集,林彩平,等.响应面法优化鱿鱼鳃腺糖蛋白提取工艺研究[J].食品工业科技,2014,35(3):261-265.