

胡玥明, 孙桂菊, 姚宏亮. 响应面法优化鸡小肠黏膜唾液酸提取工艺 [J]. 福建农业学报, 2020, 35 (6): 665–672.

HU Y M, SUN G J, YAO H L. Response Surface Optimization of Sialic Acid Extraction from Chicken Small-intestine Mucosa [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 (6): 665–672.

响应面法优化鸡小肠黏膜唾液酸提取工艺

胡玥明¹, 孙桂菊^{1*}, 姚宏亮^{2,3*}

(1. 东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室/营养与食品卫生学系, 江苏 南京 210009; 2. 金陵科技学院食品科学系, 江苏 南京 210038; 3. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】优化鸡小肠黏膜唾液酸提取工艺, 为肉鸡加工副产物开发再利用提供新思路。【方法】以鸡小肠黏膜为原料, 以唾液酸提取量为指标, 先采用单因素试验, 在几种提取唾液酸常用酸中筛选最佳酸, 进一步确定提取酸浓度、提取时间、液料比等 3 个因素影响唾液酸提取量的优化范围。在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计方法, 进行 3 因素 3 水平响应面优化设计, 共进行 17 组处理, 每组处理 3 次重复, 考察柠檬酸浓度、提取时间、液料比等 3 个因素对唾液酸提取量的影响, 从而确定鸡小肠黏膜唾液酸提取的最佳工艺参数。【结果】鸡小肠黏膜唾液酸提取最佳工艺参数为: 柠檬酸浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 提取时间 4 h, 液料比 32.20 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)。考虑实际操作的简便, 确定唾液酸提取的最佳工艺参数为: 柠檬酸浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 提取时间 4 h, 液料比 30 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)。在此条件下, 得到的唾液酸提取量为 $(1\ 010.39 \pm 21.87) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 与预测值 $1\ 025.69 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 无明显差异。【结论】通过响应面法优化了唾液酸提取工艺条件, 提高了鸡小肠黏膜唾液酸提取量, 为鸡小肠废弃物开发再利用提供新的思路。

关键词: 响应面法; 鸡小肠黏膜; 唾液酸

中图分类号: TS201

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2020) 06-0665-08

Response Surface Optimization of Sialic Acid Extraction from Chicken Small-intestine Mucosa

HU Yueming¹, SUN Guiju^{1*}, YAO Hongliang^{2,3*}

(1. Department of Nutrition and Food Hygiene/Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering of Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 2. Food Science Department, Jinling Institute of Technology, Nanjing, Jiangsu 210038, China; 3. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: 【Objective】A process of extracting sialic acid from chicken small-intestine mucosa was optimized for the utilization of a broiler processing byproduct. 【Method】A single factor experiment was conducted to select appropriate acid for the extraction. Then, a 3-factors Box-Behnken test was designed to optimize the acid concentration, time, and liquid-to-material ratio in extracting sialic acid from chicken intestinal mucosa. 【Result】Seventeen experiments were performed in triplicate to arrive at the optimized process that utilized citric acid at a concentration of $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in a liquid-to-material ratio of 32.20 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$), which was simplified to 30 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$), to extract for 4 h. The resulting extract contained sialic acid $(1\ 010.39 \pm 21.87) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, which was close to the targeted goal of $1\ 025.69 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. 【Conclusion】The optimized sialic acid extraction from chicken small-intestine mucosa provided a new venue for byproduct utilization and waste reduction in poultry processing.

Key words: Response surface method; chicken small-intestine mucosa; sialic acid

收稿日期: 2019-11-22 初稿; 2020-04-17 修改稿

作者简介: 胡玥明 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 食品与健康 (E-mail: hymingsu@163.com)

* 通信作者: 孙桂菊 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品功效 (E-mail: gjsun@seu.edu.cn); 姚宏亮 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全 (E-mail: dlyaohongliang@jst.edu.cn)

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX(17)3035]

0 引言

【研究意义】肉鸡加工过程中,鸡肠通常被当作加工副产物直接丢弃,不仅形成浪费,如处理不当,还会造成环境负担^[1]。唾液酸是一类带羧基的九碳化合物酰基衍生物的通称^[2],其最重要的 2 种形式为 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)和 N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)^[3]。Neu5Gc 分布于猪、牛、羊等红肉食品中,鸡、鸭等禽类及鱼类中含有的唾液酸仅为 Neu5Ac^[4]。研究证实,正常人体内含有的唾液酸仅为 Neu5Ac^[5], Neu5Ac 在人体内发挥多种生物学功能,具有抗病毒、抗炎、提高学习记忆能力等多种作用,是对人体有益的唾液酸。人类对红肉食品的摄入是造成 Neu5Gc 在人体内蓄积的主要途径^[6], Neu5Gc 会加快癌症的进程,对人体健康造成有害影响^[7]。自然界中,燕窝是 Neu5Ac 含量最高的天然物质,但燕窝价格高昂,对于大部分人而言,难以负担。因此,寻找安全廉价的唾液酸来源,意义重大。【前人研究进展】现阶段,对唾液酸的研究多集中于其生物学功能,研究证实其在抗病毒、抗炎^[8-9]及促进神经系统发育、提高学习记忆能力^[10-11]等方面发挥重要作用。唾液酸的制备方法主要有化学合成法、酶合成法、微生物发酵法和天然物提取法^[12-14]。前 3 种方法具有生产工艺复杂、经济成本较高等缺点。从天然原料中提取 Neu5Ac 的方法,由于制备原料安全可靠无污染,且能实现某些物质的开发再利用,从而达到一定的经济效益,因此,对此法的研究近年来较为热门。刘静波等^[15]采用二次回归正交旋转组合设计,水解鸡蛋壳膜制备唾液酸的最佳工艺;陈璇等^[16]酶解猪小肠黏膜肝素加工废弃物,得到高唾液酸化的黏蛋白;范群艳^[17]采用响应面法,优化微波结合木瓜蛋白酶提取得到燕窝唾液酸的工艺。【本研究切入点】目前,以鸡小肠黏膜为原料提取唾液酸尚未见报道。鸡小肠黏膜,可作为制备唾液酸的安全廉价来源,从而为鸡副产物的开发再利用提供新的思路。【拟解决的关键问题】本文拟通过单因素试验初步确定提取唾液酸的各因素水平,采用响应面优化试验,得到提取唾液酸的最佳工艺条件,从而为鸡小肠黏膜的开发再利用提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡肠废弃物,常州立华食品有限公司;唾液酸标品,美国 sigma 公司;乙酸丁酯、正丁醇,麦克林

中国;三氯甲烷、甲醇、盐酸、硫酸、三氟乙酸、冰醋酸、柠檬酸、硫酸铜、间苯二酚等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

SCIENTZ-10N, 18ND 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;紫外分光光度计,北京莱伯泰科仪器股份有限公司;H2050R 台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;IMS-20 雪花制冰机,常熟市雪科电器有限公司;LS-1 离心浓缩仪,湖南平凡科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 原材料的处理 将收集到的鸡肠废弃物取小肠部分,匀浆,真空冷冻干燥去除水分。待样品冻干后,用高速万能粉碎机粉碎成粉末,过 50 目筛,制得鸡小肠黏膜冻干粉备用。

1.3.2 间苯二酚-盐酸法测定唾液酸标准曲线的建立 唾液酸的测定方法主要有间苯二酚-盐酸法、高效液相色谱法等,有研究表明,这 2 种方法测定的结果无明显差异^[18]。本研究采取间苯二酚-盐酸法测定唾液酸含量,参考中国药典三部^[19]唾液酸测定方法,将唾液酸标准品精确配制成 5、10、20、40、60、80、100、120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准液待测液,分别取 2 mL 于 10 mL 试管中,同时用 2 mL 超纯水作为空白对照,加入显色剂(用 30% 盐酸溶解 3.1 mg 硫酸铜,2 mg 氯化铬,0.1 g 间苯二酚,定容到 50 mL)2 mL,振荡,于沸水浴中加热微沸 15 min,立即取出冰浴冷却到室温。向每管各加入 4 mL 乙酸丁酯-正丁醇(85:15)萃取剂,旋涡混匀,静置 10 min,立即取上层提取液,于 586 nm 处测吸光度。以 OD 值为纵坐标,以唾液酸质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,绘制标准曲线。

1.3.3 唾液酸提取量的确定 准确称取 0.1 g 鸡小肠黏膜冻干粉,加入体积比 2:1:1 的氯仿:甲醇:水混合液,旋涡混匀 60 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 混匀 10 min 去除脂肪,取沉淀,分别以一定浓度一定体积的不同酸于 80 $^{\circ}\text{C}$ 下提取一定时间,然后立即放入碎冰中冷却以终止反应,4 $^{\circ}\text{C}$ 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,旋干,复溶,按照 1.3.2 的方法测定吸光值,对照标准曲线,计算唾液酸提取量。

1.3.4 唾液酸提取单因素试验 参考已有研究^[20-21],选取提取酸、酸浓度、提取时间、液料比 4 个因素进行单因素试验。考虑到试验的安全性与可操作性,固定提取温度为 80 $^{\circ}\text{C}$,按 1.3.3 的方法,以唾液酸提取量为指标,先比较不同酸(盐酸、硫酸、冰醋酸、三氟乙酸、柠檬酸)对唾液酸提取效果的影

响。在筛选出最佳酸的基础上，考察酸浓度（0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mol·L⁻¹），液料比（10：1、20：1、30：1、40：1、50：1、60：1 mL·g⁻¹），提取时间（2、2.5、3、3.5、4、4.5 h）对唾液酸提取效果的影响。

1.3.5 响应面法优化唾液酸提取工艺 以单因素试验结果为基础，在筛选出最佳提取酸的前提下，根据 Box-Benhnken 设计原理，以唾液酸提取量为响应值，进一步优化酸浓度、提取时间、液料比对唾液酸提取效果的影响。采用 Design-Expert8.0.6 软件进行 3 因素 3 水平响应面优化试验，试验因素及水平如表 1 所示。

表 1 响应面优化试验因素与水平
Table 1 Coded factors in response surface experiment

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 柠檬酸浓度 Citric acid concentration (mol·L ⁻¹)	0.05	0.10	0.15
B 提取时间/h Extraction time/h	3.0	3.5	4.0
C 液料比 Liquid-to-material ratio/ (mL·g ⁻¹)	20：1	30：1	40：1

1.4 数据处理与分析

所有处理均设 3 次平行，各项结果以 Mean±SD 表示，采用 Design-Expert8.0.6 进行响应面优化，数据采用 IBM SPSS 22.0 软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

唾液酸标品为标准物质，以唾液酸浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制标准曲线。结果如图 1，

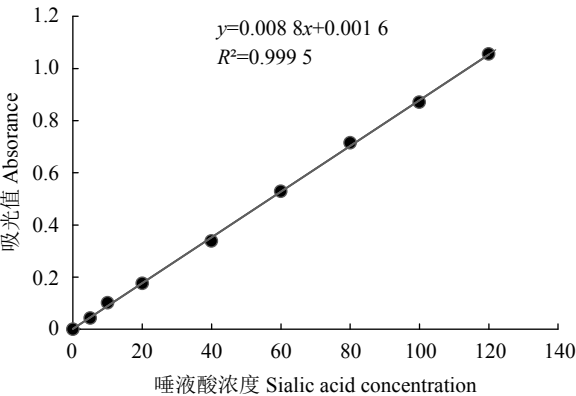


图 1 唾液酸标准曲线
Fig. 1 Standard curve of sialic acid

得到的回归方程为 $y=0.0088x+0.0016$ ， $R^2=0.9995$ 。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 不同酸对唾液酸提取量的影响 固定提取温度 80℃，提取时间 3 h，液料比 30：1（mL·g⁻¹）时，考察不同酸对唾液酸提取量的影响。根据有关文献研究^[20]，选定所用酸的浓度分别为：盐酸 0.05 mol·L⁻¹、硫酸 0.05 mol·L⁻¹、醋酸 2 mol·L⁻¹、三氟乙酸 0.1 mol·L⁻¹、柠檬酸 0.05 mol·L⁻¹。由图 2 可知，5 种酸释放唾液酸的能力大小依次为盐酸>硫酸>柠檬酸>三氟乙酸>醋酸，盐酸、硫酸、柠檬酸提取得到的唾液酸的量相近，无明显差异，结果与袁玲^[22]的研究相似。在实际实验过程中，用盐酸和硫酸处理的样品得到的唾液酸粗品，出现发黑的情况，其他 3 种酸处理所得到的唾液酸粗品，均是白色粉末状，原因可能是由于盐酸与硫酸的酸性过强，破坏了唾液酸结构。为了避免黑色物质对试验结果造成影响，选取唾液酸提取能力强的常见有机酸柠檬酸作为提取所用酸。

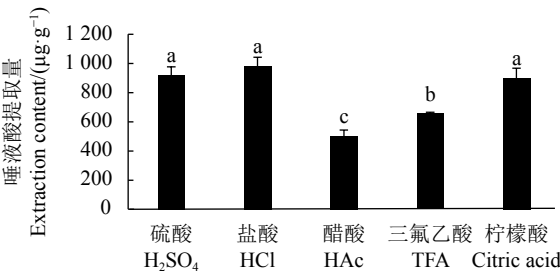


图 2 不同酸对唾液酸提取量的影响
Fig. 2 Effect of different acids on sialic acid extraction

2.2.2 酸浓度对唾液酸提取量的影响 固定提取温度 80℃，提取时间 3 h，液料比 30：1（mL·g⁻¹）时，考察柠檬酸浓度对唾液酸提取量的影响。由图 3 可

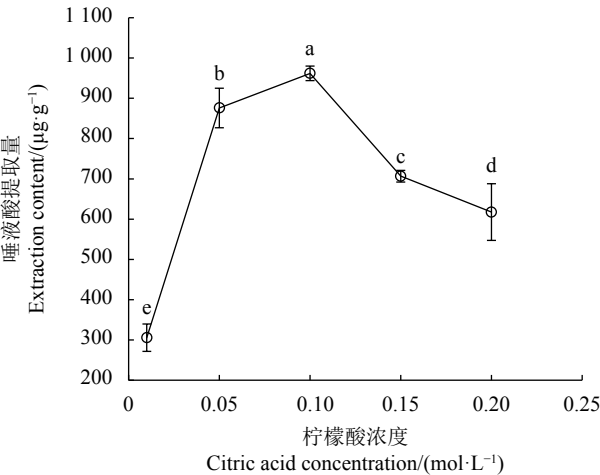


图 3 柠檬酸浓度对唾液酸提取量的影响
Fig. 3 Effect of citric acid concentration on sialic acid extraction

知,随着柠檬酸浓度的增加,唾液酸提取量呈现先增大后减小的趋势。当柠檬酸浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,唾液酸释放量达到最高值,结果与袁玲^[22]的研究相似。在一定范围内,提取率随着酸浓度的增加而增加,而后,随着酸浓度的增加,过强的酸环境会破坏释放出的唾液酸,反而造成唾液酸提取量的减少。当柠檬酸浓度从 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,唾液酸提取量虽然增长缓慢,但两者之间差异显著 ($P < 0.05$),柠檬酸浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为提取最佳条件。综上所述,选取柠檬酸浓度范围为 $0.05 \sim 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行进一步优化试验。

2.2.3 提取时间对唾液酸提取量的影响 固定提取温度 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$,柠檬酸浓度 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,液料比 $30:1 (\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$ 时,考察提取时间对唾液酸提取量的影响。由图 4 可知,唾液酸提取量随提取时间的延长,呈先增高后降低的趋势,在提取时间为 3.5 h 时,唾液酸提取量达到峰值。提取时间越长,越有利于唾液酸的释放,当提取时间增加到一定程度时,样品与柠檬酸反应完全,唾液酸的释放也相对完全。而后,随着提取时间的增加,唾液酸不再释放,相反,长时间的酸环境使解离出的唾液酸发生降解,造成唾液酸提取量的降低。综合考虑唾液酸提取量的多少及提取工艺的简便等因素,选择提取时间 $3 \sim 4 \text{ h}$ 进行后续优化试验。

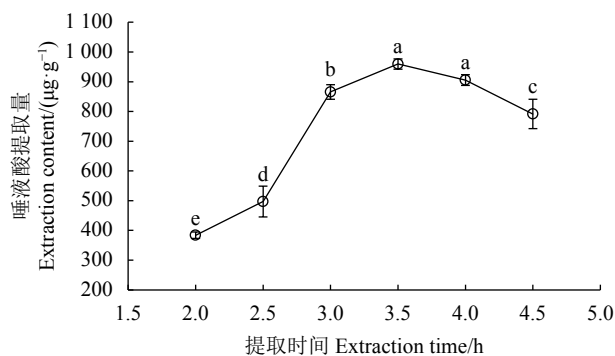


图 4 提取时间对唾液酸提取量的影响

Fig. 4 Effect of process time on sialic acid extraction

2.2.4 液料比对唾液酸提取量的影响 固定提取温度 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$,柠檬酸浓度 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,提取时间 3 h 时,考察液料比对唾液酸提取量的影响。由图 5 可知,唾液酸提取量随着液料比的增大,呈现先增大后减少的趋势。在一定范围内,提取率随着溶剂的增加而增加。当溶剂增加到对样品的溶解趋于饱和时,此时唾液酸提取率达到最高值。此后再加大溶剂的量,提取率不会上升,相反还可能造成其他水溶性物质溶解增大,而阻碍柠檬酸对唾液酸的提取。考

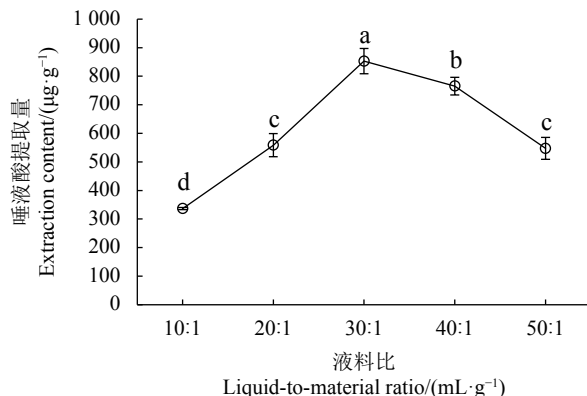


图 5 液料比对唾液酸提取量的影响

Fig. 5 Effect of liquid-to-material ratio on sialic acid extraction

虑到上述因素及提取工艺的简便,选择液料比为 $20:1 \sim 40:1 (\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$ 进行响应面优化试验。

2.3 响应面优化试验

2.3.1 响应面试验设计方案与结果 以单因素试验结果为基础,确定响应面优化的因素、水平。采用 Design-Expert8.0.6 软件,以唾液酸提取量为响应值,进行 3 因素 3 水平的响应面优化试验,共进行 17 组试验,设计方案及结果见表 2。

2.3.2 模型的建立及显著性分析 用 Design-Expert8.0.6 软件包对表 2 数据进行多元回归拟合,得到的回归方程为: $Y(\text{唾液酸提取量}) = 945.00 - 47.79A + 99.63B + 121.65C + 25.05AB + 108.47AC - 64.43BC - 47.90A^2 - 25.12B^2 - 132.62C^2$ 。对回归方程进行方差分析,结果如表 3 所示。

由表 3 可知,模型的 P 值 < 0.0001 ,表明唾液酸提取量的回归模型极显著,失拟项 F 值为 0.25 , P 值为 0.8568 ,失拟项不显著,该回归模型的拟合程度良好,能较好解释响应的变异。模型的确定系数 $R^2 = 0.9818$,表明此方程与试验结果的拟合度良好,该模型能较好地反应实际情况,试验误差小;调整确定系数 $R_{adj}^2 = 0.9299$,表明该模型能解释 92.99% 的响应值变化,该回归方程能较准确预测唾液酸提取的最佳工艺条件。对各项相关系数的方差分析结果显示,一次项 B 、 C ,交互项 C^2 对唾液酸提取量的影响极显著;一次项 A ,交互项 AC 、 BC 对试验结果的影响高度显著;二次项 A^2 对试验结果的影响显著。 F 值的大小能直观反应各因素对试验结果影响程度的大小,比较 A 、 B 、 C 三项影响因素 F 值的大小,可确定三者对唾液酸提取量影响程度的大小依次为:液料比 $>$ 提取时间 $>$ 柠檬酸浓度。且柠檬酸浓度与液料比之间、提取时间与液料比之间存在交互作用。

2.3.3 响应面优化分析 等高线和响应面图能反映各个因素之间的交互作用及各因素对响应值的影

表 2 响应面试验设计与结果
Table 2 Design and results of response surface experiment

试验号 Serial number	A柠檬酸浓度 Citric acid concentration	B提取时间 Extraction time	C液料比 Liquid-to-material ratio	唾液酸提取量 Extraction content/ (μg·g ⁻¹)
1	-1	0	-1	790.84
2	-1	1	0	1 000.86
3	0	1	1	950.73
4	1	0	-1	499.70
5	0	0	0	957.89
6	0	0	0	914.93
7	0	-1	-1	494.93
8	-1	0	1	812.32
9	0	-1	1	871.98
10	1	-1	0	693.00
11	0	0	0	986.52
12	0	0	0	969.81
13	0	0	0	895.84
14	0	1	-1	831.41
15	-1	-1	0	860.05
16	1	1	0	934.02
17	1	0	1	955.06

表 3 回归模型的方差分析
Table 3 Analysis of variance (ANOVA) on regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value
模型 Model	374 300.00	9	41 583.83	42.02	<0.000 1
A柠檬酸浓度 Citric acid concentration	18 268.21	1	18 268.21	18.46	0.003 6
B提取时间 Extraction time	79 413.08	1	79 413.08	80.25	<0.000 1
C液料比 Liquid-to-material ratio	118 400.00	1	118 400.00	119.64	<0.000 1
AB	2 510.51	1	2 510.51	2.54	0.155 2
AC	47 062.96	1	47 062.96	47.56	0.000 2
BC	16 606.19	1	16 606.19	16.78	0.004 6
A ²	9 660.27	1	9 660.27	9.76	0.016 7
B ²	2 656.16	1	2 656.16	2.68	0.145 4
C ²	74 053.89	1	74 053.89	74.83	<0.000 1
残差 Residual	6 927.20	7	989.60		
失拟项 Lack of fit	1 100.69	3	366.90	0.25	0.856 8
误差 Error	5 826.51	4	1 456.63		
总和 Cor total	381 200.00	16			

响。图 6 是 A、B、C 任意 2 个因素与唾液酸提取量之间的三维立体响应面图及其等高线在水平面上的投影作出的平面图。响应面曲面的坡度能反映各因素及其交互作用对响应值影响的程度，曲面的坡度

越陡，说明因素间的交互作用越强。等高线的形状及密度能反映是否存在交互作用，若等高线呈椭圆形，两因素间存在交互作用；若等高线呈圆形，则不存在交互作用^[23]。等高线图表明，柠檬酸浓度与

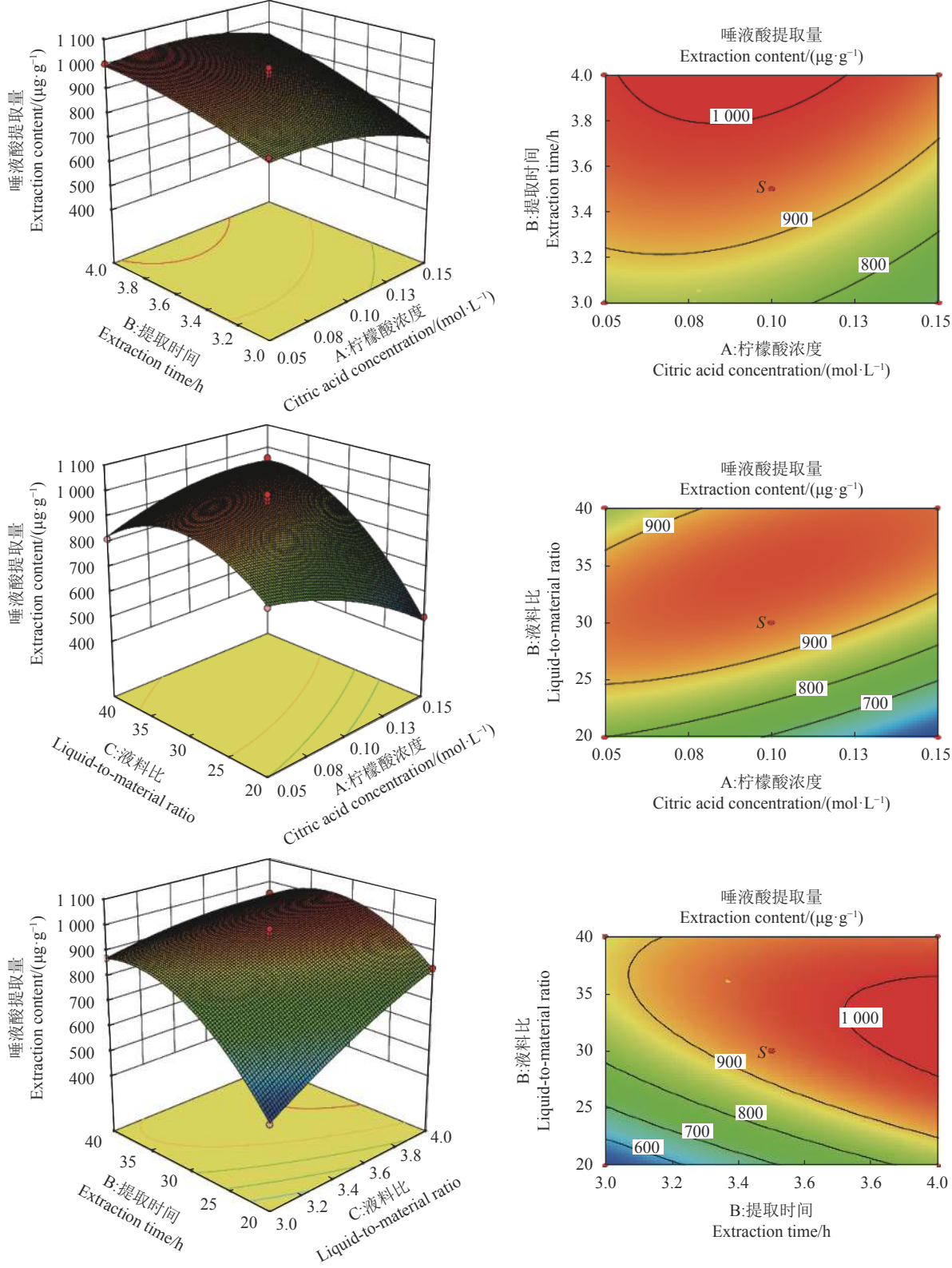


图 6 各因素交互作用对唾液酸提取量影响的响应面分析结果
Fig. 6 Response surface on interactions of factors in sialic acid extraction

液料比之间,提取时间与液料比之间存在交互作用。这与方差分析的结果一致,进一步验证了模型的准确性和可靠性。

2.3.4 最佳提取工艺参数的确定与模型验证 根据响应面优化分析结果,得到唾液酸提取的最佳工艺参数为:柠檬酸浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,提取时间 4 h,液料比 32.20 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 时,唾液酸提取量最大,其预测值为 $1\,025.69 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。为了实际操作的简便,将提取工艺参数调整为柠檬酸浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,提取时间 4 h,液料比 30 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)。试验重复 3 次,3 次平行试验结果为 $(1\,010.39 \pm 21.87) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,与预测值接近,两者无明显差异。说明模型的拟合度良好,能准确预测唾液酸提取量,对实际应用具有参考价值。

3 讨论与结论

鸡小肠黏膜唾液酸制备工艺,对肉鸡加工废弃物开发再利用有重要影响,能实现一定的经济效益。研究表明,鸡蛋壳膜^[15]、燕碎^[17]等天然原料中能提取出唾液酸,寻找制备唾液酸的安全廉价原料来源引起研究者的广泛关注。本文以鸡小肠黏膜为原材料,以唾液酸提取量为指标,优化唾液酸提取工艺。酸水解法由于不具有专一性、释放唾液酸较彻底的优点,因此采用酸水解法提取唾液酸。提取酸、酸浓度、提取时间、提取温度、液料比等均是影响提取量的重要因素。试验结果显示,柠檬酸与盐酸、硫酸提取唾液酸的能力相近。柠檬酸作为常见有机酸,在提取过程中,没有像盐酸、硫酸一样,由于酸性过强,出现破坏唾液酸结构的情况。因此,提取唾液酸的最佳酸为柠檬酸,与袁玲^[22]的研究结果一致。酸浓度、提取时间、液料比等 3 个因素对唾液酸提取工艺的影响较大^[20-21],这 3 个因素影响唾液酸提取量能力大小依次为:液料比>提取时间>柠檬酸浓度。当溶剂对唾液酸的溶解达到饱和时,再增加溶剂的量,唾液酸提取量不会上升,反而因其他水溶性物质的溶解增加,阻碍唾液酸的提取。另外,考虑到节约溶剂的使用,确定液料比 30 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)。提取时间过长,唾液酸在长时间的酸性环境下发生降解,唾液酸提取量反而下降。从提取工艺简便的角度出发,确定提取时间 4 h。柠檬酸浓度过高,酸性过强,不仅会破坏唾液酸结构,使提取率下降,还会引入更多的柠檬酸杂质,因此,确定柠檬酸浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经响应面优化提取工艺后,得到的唾液酸含量为 $(1\,010.39 \pm 21.87) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,与鸡蛋壳膜中的提取量相近^[20]。鸡小

肠黏膜作为肉鸡加工废弃物,具有经济成本低、方便大量收集的优点,具有进一步开发利用的价值。

本文通过单因素试验确定柠檬酸为提取唾液酸的最佳用酸,在单因素试验的基础上,采用 Design-Expert8.0.6 软件,对柠檬酸浓度、提取时间、液料比三因素进行响应面优化。在此基础上,考虑实际操作的简便易行,确定唾液酸提取的最佳工艺条件为:柠檬酸浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,提取时间 4 h,液料比 30 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)。在此条件下,测得唾液酸提取量为 $(1\,010.39 \pm 21.87) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,与预测值基本相符,模型准确可靠,具有实际参考价值,为鸡小肠黏膜中唾液酸的提取提供了技术参考,从而为鸡肠废弃物的开发再利用开辟了新的方向。但鸡小肠黏膜唾液酸的纯化、结构鉴定等仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] BERTSCH A, COELLO N. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96 (15) : 1703-1708.
- [2] BLIX F G, GOTTSCHALK A, KLENK E. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids [J]. *Nature*, 1957, 179 (4569) : 1088.
- [3] CHEN X, VARKI A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids [J]. *ACS Chemical Biology*, 2010, 5 (2) : 163-176.
- [4] 王毛毛. 动物性食品中唾液酸测定及唾液酸复合物高通量提取方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
WANG M M. Establishment and optimization of method for sialic acid detection from animal-originated foods and the high-throughput method for sialylated conjunction extraction[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [5] VARKI A. Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (S2) : 8939-8946.
- [6] FONG B Y, MA L, KHOR G L, et al. Ganglioside composition in beef, chicken, pork, and fish determined using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64 (32) : 6295-6305.
- [7] PEARCE O M T, LÄUBLI H. Sialic acids in cancer biology and immunity [J]. *Glycobiology*, 2016, 26 (2) : 111-128.
- [8] STUCKER K M, SCHOBEL S A, OLSEN R J, et al. Haemagglutinin mutations and glycosylation changes shaped the 2012/13 influenza A(H3N2) epidemic, Houston, Texas [J]. *Eurosurveillance*, 2015, 20 (18) : 20-34.
- [9] ROTA P, PAPINI N, LA ROCCA P, et al. Synthesis and chemical characterization of several perfluorinated sialic acid glycals and evaluation of their *in vitro* antiviral activity against Newcastle disease virus [J]. *MedChemComm*, 2017, 8 (7) : 1505-1513.
- [10] 卞冬生, 王新月, 谢子讓, 等. 孕鼠补充唾液酸对其雄性子代鼠学习

- 记忆能力的影响[J]. 营养学报, 2016, 38 (4): 361-365.
- BIAN D S, WANG X Y, XIE Z X, et al. Effects of sialic acid supplementation on learning and memory of male pups in pregnant rats [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2016, 38 (4): 361-365. (in Chinese)
- [11] WANG B, YU B, KARIM M, et al. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, 85 (2): 561-569.
- [12] 朱德强, 詹晓北, 吴剑荣, 等. 生物转化合成N-乙酰神经氨酸的关键因素 [J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38 (4): 64-70.
- ZHU D Q, ZHAN X B, WU J R, et al. Key limiting factors for the whole-cell synthesis of N-acetyl neuraminic acid by recombinant *Escherichia coli* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38 (4): 64-70. (in Chinese)
- [13] 吴剑荣, 詹晓北, 朱莉. 大肠杆菌发酵液中唾液酸的提取 [J]. *中国医药工业杂志*, 2003, 34 (1): 10-12.
- WU J R, ZHAN X B, ZHU L. Preparation of sialic acid from *Escherichia coli* K235-WXJ4 [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2003, 34 (1): 10-12. (in Chinese)
- [14] 高霖, 朱莉, 杨泽林, 等. 高分子质量聚唾液酸生产菌株诱变筛选及其发酵优化 [J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45 (10): 22-28.
- GAO L, ZHU L, YANG Z L, et al. Mutagenesis and fermentation optimization of *Escherichia coli* K235 producing high molecular weight polysialic acid [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45 (10): 22-28. (in Chinese)
- [15] 刘静波, 陶旭, 姜玮, 等. 利用二次回归正交旋转组合设计优化鸡蛋壳膜唾液酸提取工艺 [J]. *吉林大学学报(工学版)*, 2012, 42 (4): 1071-1076.
- LIU J B, TAO X, JIANG W, et al. Technology optimization of Sialic acid isolation from hen eggshell membrane by quadric regression orthogonal rotary tests [J]. *Journal of Jilin University(Engineering and Technology Edition)*, 2012, 42 (4): 1071-1076. (in Chinese)
- [16] 陈璇. 猪小肠黏膜肝素加工废弃物中黏蛋白的提取分离、结构表征及免疫活性评价[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- CHEN X. Extraction, isolation, structural characterization and immunological activity evaluation of mucins from the waste during heparin preparation from porcine small intestinal mucosa[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.(in Chinese)
- [17] 范群艳. BBD法优化燕窝唾液酸水提工艺及燕窝水解物对果蝇寿命的影响 [J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2015, 44 (4): 424-429.
- FAN Q Y. Optimum process conditions of birds nest sialic acid by aqueous extraction and the effects on extending the lifespan of *Drosophila* [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University(Natural Science Edition)*, 2015, 44 (4): 424-429. (in Chinese)
- [18] 秦淑红, 朱爱华. HPLC法·酶法和间苯二酚法检测生物制品中唾液酸含量方法学比较 [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46 (20): 162-163, 166.
- QIN Q H, ZHU A H. Comparison of the methods for the determination of sialic acid by HPLC, enzymatic and resorcinol methods [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46 (20): 162-163, 166. (in Chinese)
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [20] 苏薇. 鸡蛋壳膜N-乙酰神经氨酸的制备及对幼年大鼠学习记忆能力的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- SU W. Preparation of N-acetylneuraminic acid from eggshell membrane and its effect on learning and memory abilities of young rats[D]. Changchun: Jilin University, 2014.(in Chinese)
- [21] 李敬, 钟文俊, 王晓云, 等. 响应面法优化燕窝唾液酸的提取工艺 [J]. *中药材*, 2017, 40 (7): 1670-1674.
- LI J, ZHONG W J, WANG X Y, et al. Optimization of sialic acid extraction from birds nest by response surface methodology [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2017, 40 (7): 1670-1674. (in Chinese)
- [22] 袁玲. 燕碎中唾液酸的提取纯化及其对幼年大鼠学习记忆能力的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- YUAN L. Extraction and purification of sialic acid from edible bird's nest fragment and its effect on learning and memory abilities of young rats[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.(in Chinese)
- [23] FAN T, HU J G, FU L D, et al. Optimization of enzymolysis-ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Momordica charabtia* L. by response surface methodology [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 115: 701-706.

(责任编辑: 张梅)