

# 鱿鱼内脏糖蛋白提取工艺及其免疫活性初步研究

章建设, 雷晓凌

(广东海洋大学食品学院, 广东 湛江 524025)

**摘要:** 本文分析了鱿鱼内脏的一般营养成分; 探索了 NaCl 溶液提取鱿鱼内脏糖蛋白的工艺流程及工艺条件; 并初步探讨了鱿鱼内脏糖蛋白对小鼠免疫功能的影响。结果表明: 鱿鱼内脏中含有较高的蛋白质; 提取的最佳工艺条件是: 料液比为 1:6、浸提时间为 60 min、NaCl 浓度为 3%、浸提温度为 80 °C; 该工艺所提取得糖蛋白具有一定的免疫活性。

**关键词:** 鱿鱼内脏; 糖蛋白; 提取; 免疫活性

**中图分类号:** TQ936.22; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2008)02-0167-04

## Extraction of Glycoprotein from Squid Viscera and its Immunomodulation

ZHANG Jian-she, LEI Xiao-ling

(College of Food science and technology of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** The General nutrients of squid viscera were analyzed and the extraction of glycoprotein from squid viscera by NaCl solution was investigated. The immunoregulation effect of the glycoprotein was also researched. Results showed that squid viscera contained high contents of proteins. The optimum extraction conditions were as follows: ratio of solid to liquid of 1:6, extraction time of 60 min, NaCl content of 3% and temperature of 80 °C. Our experiments also confirmed the extracted glycoprotein possessed immunomodulation activity.

**Key words:** squid viscera; glycoprotein; extraction; immunomodulation

大量研究表明, 海洋生物中提取的糖蛋白具有显著的生理活性, 如栉孔扇贝糖蛋白<sup>[1]</sup>和文蛤糖蛋白<sup>[2]</sup>具有抗肿瘤和提高免疫的活性, 目前对鱿鱼中糖蛋白及其生理活性的研究国内未见报道。鱿鱼属软体动物门头足纲<sup>[3]</sup>, 产量大, 肉质嫩而多汁, 近年来鱿鱼加工业发展迅速。但是在鱿鱼加工过程中仅对鱿鱼的可食部分进行利用, 而将其内脏等下脚料直接抛弃或者加工成低值的饲料。本试验采用盐溶液热水浸提法提取鱿鱼内脏糖蛋白, 确定其得率较高的浸提工艺, 并对所提取的粗品进行初步的免疫活性评价, 为综合利用鱿鱼内脏糖蛋白奠定基础。

### 1 材料

**原料:** 鱿鱼购自湛江东风市场, 为鲜鱿鱼 (2006年 11 月)。剖开后取其内脏放入 -18 °C 冰箱保藏备用。

**动物:** 昆明小鼠 80 只, 雌雄各半, 体重 18±2 g, 清洁级 (SPF), 广东医学院提供。

**试剂:** 环磷酰胺 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 05060321), 其它试剂均为分析纯。

### 2 方法

#### 2.1 一般营养成分测定

水分: 常压干燥法<sup>[4]</sup>; 粗蛋白质: 半微量凯氏定氮法<sup>[4]</sup>; 脂肪: 索氏抽提法<sup>[4]</sup>; 灰分: 灼烧法<sup>[4]</sup>; 总糖: 蒽酮-硫酸法<sup>[4]</sup>。

#### 2.2 提取工艺<sup>[5,6]</sup>

(反复煮提)沉淀

↑

鱿鱼内脏→丙酮脱脂→打浆→煮提→低速离心 (2500 r/min, 10 min) →上清液→浓缩→透析脱氯化钠→加硫酸铵至饱和度为 80%→离心 (4500 r/min, 20 min) →透析脱硫酸铵→冷冻干燥→糖蛋白粗品

#### 2.3 免疫功能评价实验

##### 2.3.1 碳廓清实验

昆明种小鼠 80 只, 雌雄各半, 随机分为 8 组, 即空白对照组、鱿鱼内脏糖蛋白 (Glycoprotein from Squid Viscera, GSV-0) 三个剂量组、环磷酰胺 (CY) 免疫抑制组和 GSV-0 三个剂量治疗组 (GSV-0+CY)。每日罐喂 GSV-0 一次, 连续 7 d。免疫抑制组于试验第 1、3、5 d 皮下注射 CY 30 mg/kg, 末次给药后 1 h, 按 10

mL/kg 尾静脉注射稀释的印度墨汁, 于注入墨汁后 2 min 和 10 min 分别从眼静脉丛取血 20 μL, 立即加入装有 2 mL 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的试管中, 于 680 nm 比色, 按下面方法计算廓清指数<sup>[7,8]</sup>。

$$K = (\lg OD_2 - \lg OD_1) / (t_2 - t_1)$$

OD<sub>1</sub>、OD<sub>2</sub>—在时间 t<sub>1</sub>、t<sub>2</sub> 时所取血的吸光度; t<sub>2</sub>-t<sub>1</sub>—取血的时间差

### 2.3.2 免疫器官重量的测定

以上各组动物活杀后取脾、胸腺称湿重并计算脾和胸腺指数<sup>[7,8]</sup>。

## 3 结果与讨论

### 3.1 一般营养成分测定

表 1 鱿鱼内脏的一般营养成分/%

Table 1 Nutritional components of squid viscera

	水分	总蛋白	总糖	灰分	脂肪
湿重含量	79.4	11.87	1.81	2.11	3.04
干重含量	--	57.62	8.79	10.24	14.76

一般营养成分测定结果见表 1, 鲜鱿鱼内脏中除水分外蛋白含量最高, 且总糖含量比较高, 可以推断鱿鱼内脏中含有较高的糖蛋白。另外鱿鱼内脏中脂肪含量很高, 为了避免脂肪对糖蛋白提取过程的影响, 所以在提取前应进行脱脂处理。

### 3.2 鱿鱼内脏糖蛋白的提取单因素试验

#### 3.2.1 料液比的选择

在确定浸提液为 3% 的 NaCl 溶液, 浸提温度为 80 °C、浸提时间为 45 min 的条件下浸提两次, 比较不同料液比对糖蛋白得率的影响, 以选择最佳料液比, 结果见图 1。

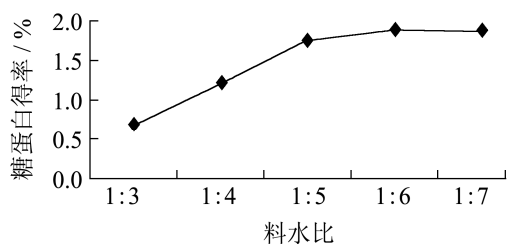


图 1 料水比对糖蛋白得率的影响

Fig.1 Effects of the rate of water to solid on extraction yield of glycoprotein

由图 1 可知, 鱿鱼内脏糖蛋白的得率随料液比的增大而随之提高, 但达到 1:5 后增加的比较缓慢, 得率基本不变。从浸提效果和减少溶剂用量考虑, 最佳的料水比为: 1:5。

#### 3.2.2 浸提时间的选择

浸提温度为 80 °C, 浸提液为 3% 的 NaCl 溶液,

料液比为 1:5, 比较不同浸提时间对糖蛋白得率的影响, 结果见图 2。

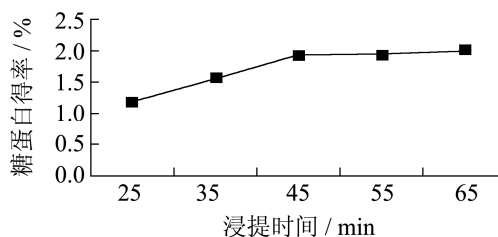


图 2 浸提时间对糖蛋白得率的影响

Fig.2 Effects of time on extraction yield of glycoprotein

由图 2 可知, 在鱿鱼内脏糖蛋白的提取过程中, 随着浸提时间的延长, 糖蛋白的得率随之提高, 25~45 min 时, 糖蛋白得率增加的快, 45 min 以后糖蛋白的得率增加的比较缓慢, 得率基本不变, 所以选取最佳浸提时间为 45 min。

#### 3.2.3 浸提液浓度的选择

浸提温度为 80 °C, 料液比为 1:5, 浸提时间为 45 min, 浸提液分别采用不同浓度的 NaCl 盐溶液, 比较不同盐浓度对糖蛋白得率的影响, 结果见图 3。

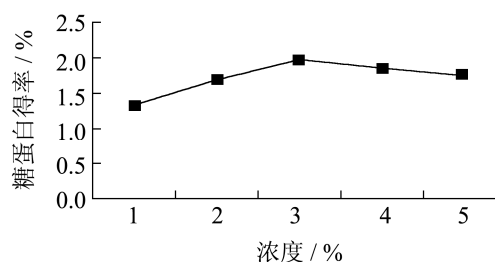


图 3 NaCl 浓度对糖蛋白得率的影响

Fig.3 Effects of concentration of NaCl on extraction yield of glycoprotein

由图 3 可知, 在低盐浓度时, 随着 NaCl 浓度的增大, 糖蛋白得率随之提高。但盐浓度达到 3% 以后, 糖蛋白的得率随盐浓度增大出现下降的趋势, 所以选取最佳 NaCl 浓度为 3%。

#### 3.2.4 浸提温度的选择

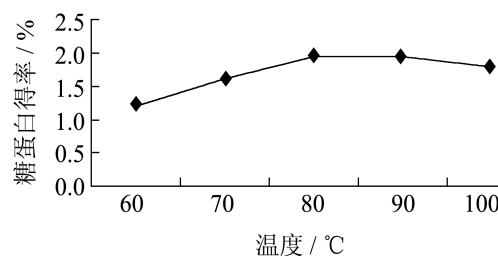


图 4 浸提温度对糖蛋白得率的影响

Fig.4 Effects of temperature on extraction yield of glycoprotein

浸提液为 3% 的 NaCl 溶液, 料液比为 1:5, 浸提

时间为 45 min, 比较不同浸提温度对糖蛋白得率的影响, 结果见图 4。

由图 4 可知, 鱿鱼内脏糖蛋白的得率随提取温度的升高而提高, 但到了 80~90 °C 升高的趋势已经不再明显, 当温度继续升高时出现下降趋势。这可能是由于在 70 °C 以下的温度时, 对细胞的破碎作用比较小, 分子运动也不剧烈, 故糖蛋白提取率不高; 随着温度的不断增高, 分子运动加剧, 细胞破裂程度较大, 糖蛋白浸出率随之升高<sup>[9]</sup>。温度太高时, 细胞膜并不会无限制的破裂, 所以糖蛋白的得率不会无限制的上升, 并且会出现蛋白质变性。所以选择最佳浸提温度为 80 °C。

### 3.3 浸提糖蛋白最佳工艺条件的确定

提取工艺试验设计: 由单因素实验选择料液比、浸提时间、浸提液浓度、浸提温度作为因素, 以糖蛋白得率为指标做正交实验。结果见表 2, 表 3。

表 2 鱿鱼内脏糖蛋白提取工艺因素水平表

Table 2 Factors and levels of extraction of glycoprotein from squid viscera

水平	A 料液比	B 时间/min	C NaCl 浓度/%	D 温度/°C
1	1:4	35	2	70
2	1:5	45	3	80
3	1:6	55	4	90

表 3 L9 (3<sup>4</sup>) 实验方案及试验结果分析

Table 3 Design of Orthogonal experiment and Results

实验号	A	B	C	D	糖蛋白得率/%
1	1(1:4)	1(35)	1(2)	1(70)	1.34
2	1	1	2(3)	2(80)	1.85
3	1	1	3(4)	3(90)	1.80
4	2(1:5)	2(45)	2	3	1.61
5	2	2	3	1	1.45
6	2	2	1	2	1.40
7	3(1:6)	3(55)	3	2	2.08
8	3	3	1	3	1.69
9	3	3	2	1	2.24
K1	5.09	5.03	4.43	5.03	
K2	4.46	4.99	5.70	5.33	
K3	6.01	5.44	5.33	5.10	
R	0.52	0.15	0.02		

由表 3 极差分析结果表明, 影响糖蛋白得率的因素主次顺序为 A>C>B>D, 最佳提取条件为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, 即料液比为 1:6、浸提时间为 60 min、浸提液盐浓度为 3%、浸提温度为 80 °C, 糖蛋白得率最高, 是提取

鱿鱼内脏糖蛋白较理想的工艺条件。

### 3.4 免疫功能评价

免疫功能评价结果见表 4: GSV-0 三个剂量治疗组的廓清指数均明显高于免疫抑制组对照组 ( $p<0.05$  或  $p<0.01$ ), 其中 100 mg/kg 剂量治疗组甚至超过了正常对照组水平 ( $p<0.05$ ); GSV-0 三个剂量组的均明显高于正常对照组水平 ( $p<0.05$  或  $p<0.01$ )。这说明 GSV-0 能使小鼠体内单核巨噬细胞的吞噬能力增强, 从而提高小鼠的免疫力。

表 4 GSV-0 对正常小鼠及免疫抑制小鼠胸腺指数、脾指数和廓清指数的影响 (n=10,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Effects of GSV-0 on thymus index, splenic index and clearance index of normal and immunosuppressive rats

组别	剂量 (mg/kg·d)	廓清指数	胸腺指数	脾指数
Control	-	0.0323±0.0099	4.30±0.97	2.49±0.24
CY	30	0.02073±0.0027*	2.21±0.51**	1.99±0.36*
	30+10	0.0503±0.0206 $\Delta\Delta$ *	3.31±0.54 $\Delta$	2.19±0.39
Y+GSV-0	30+30	0.0466±0.0163 $\Delta$	2.28±0.48	2.12±0.40
	30+100	0.0512±0.0310	2.57±0.78	2.23±0.67
	10	0.0544±0.0069**	4.87±0.57	2.43±0.39
GSV-0	30	0.0521±0.0066*	6.59±0.63**	2.58±0.34
	100	0.0624±0.0136**	5.74±0.67*	2.56±0.22

注: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , 以 Control 组为对照;  $\Delta$  $p<0.05$ ,  $\Delta\Delta$  $p<0.01$ , 以 CY 组为对照

GSV-0 对 CY 造成的免疫损伤有一定的修复作用, 与 CY 组相比较, 10 mg/kg 剂量的治疗组对胸腺指数的修复作用较明显 ( $p<0.05$ ), 30 mg/kg 和 100 mg/kg 剂量的治疗组对胸腺指数均有一定修复作用, 但作用不明显。30 mg/kg 剂量组对小鼠的胸腺指数有非常显著的提高 ( $p<0.01$ ), 100 mg/kg 剂量组对小鼠的胸腺指数有显著的提高 ( $p<0.05$ ), 10 mg/kg 剂量组对小鼠的胸腺指数有一定的提高, 但无统计学意义。

GSV-0 三个剂量治疗组和三个剂量组均对小鼠的脾指数有一定的提高和修复作用, 但均无显著性差异。

## 4 结论

4.1 鱿鱼内脏的一般营养成分测定表明, 鱿鱼内脏中蛋白质含量最高, 且总糖含量比较高, 可推断其中含有较高的糖蛋白;

4.2 影响鱿鱼内脏糖蛋白提取的主要条件为料液比、NaCl 浓度、浸提时间、温度。通过对单因素梯度实验

(下转第 166 页)