

响应面法优化蛋壳膜硫酸软骨素提取工艺

刘涛¹, 张铁鹏¹, 栾欣悦², 刘贺¹, 刘宁¹

(1. 哈尔滨商业大学 食品工程学院, 哈尔滨 150076;

2. 泰州专利战略推进与服务中心有限公司, 江苏 泰州 225300)

摘要: **目的** 以鸡蛋壳膜为原材料, 采用碱盐法提取硫酸软骨素。**方法** 以多糖提取率为指标研究提取时间、提取温度、碱盐比和液料比对试验的影响。在单因素实验基础上, 用响应曲面法分析优化试验的各种条件。**结果** 得到了提取蛋壳膜硫酸软骨素的最佳工艺参数, 提取时间为 8 h, 提取温度为 65 °C, 碱盐比为 6:1, 液料比为 15:1。在此条件下, 硫酸软骨素的提取率为 74.0%。**结论** 通过响应曲面设计试验及验证试验证明该最佳反应条件具有一定的可靠性与可行性。

关键词: 硫酸软骨素; 鸡蛋壳膜; 提取; 响应曲面; 多糖

中图分类号: TQ460 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2019)17-0048-08

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2019.17.008

Use of Response Surface Analysis for Optimization of Extraction Process of Chondroitin Sulfate from Egg Shell Membrane

LIU Tao¹, ZHANG Tie-peng¹, LUAN Xin-yue², LIU He¹, LIU Ning¹

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. Taizhou Patent Strategy Promotion and Service Center Co., Ltd., Taizhou 225300, China)

ABSTRACT: The work aims to extract chondroitin sulfate in the alkali-salt method with the egg shell membrane as raw material. The polysaccharide extraction rate was used as index to study the effects of extraction time, extraction temperature, alkali-salt ratio and liquid-solid ratio on the test. On the basis of single factor test, various conditions of test were analyzed and optimized in the response surface method. The experiment results showed that, the best process parameters for the extraction of egg shell membrane were as follows: extraction time of 8 h, extraction temperature of 65 °C, alkali-salt ratio of 6:1, and liquid-to-solid ratio of 15:1. Under these conditions, the extraction rate of chondroitin sulfate was 74.0%. The response surface design test and verification test show that the proposed optimal reaction condition is reliable and feasible.

KEY WORDS: chondroitin sulfate; egg shell membrane; extraction; response surface; polysaccharide

蛋壳膜俗称“凤凰衣”, 存在于蛋清和蛋壳之间, 由直径为 2 μm 的纤维组成, 呈网状结构, 是一种主要由角膜和黏多糖类相结合组成的复合蛋白质, 其溶

化后可以获得乙酰氨基葡萄糖半乳糖硫酸软骨素、氨基酸等可溶性高分子化合物混合物^[1-3]。由于物种成分蛋壳膜种类繁多、结构特点独特^[4], 因此被广泛应

收稿日期: 2019-06-03

基金项目: 黑龙江省教育厅项目 (12541199); 黑龙江省自然科学基金面上项目 (C2018036); 2018 年度哈尔滨商业大学校级一般项目 (18XN080)

作者简介: 刘涛 (1978—), 男, 硕士, 哈尔滨商业大学副研究员, 主要研究方向为农产品加工及贮藏工程。

通信作者: 刘宁 (1978—), 女, 博士, 哈尔滨商业大学教授, 主要研究方向为农产品加工及贮藏工程。

用于医药、环境工程、轻工业等多个领域^[5]。

硫酸软骨素(Chondroitin Sulfate, 简称CS)是来源于动物的软骨和鸟类卵的壳膜等组织的酸性粘多糖即糖胺聚糖^[6-9]。硫酸软骨素用途广泛,可用作药物,随着对硫酸软骨素研究的深入,硫酸软骨素在环保、美容、药用、食品等行业的应用越来越广泛^[10-12]。我国禽蛋行业所产生的鸡蛋壳量巨大,从鸡蛋壳膜中提取硫酸软骨素不仅从来源上极大提高了硫酸软骨素的产量,也增加了禽蛋产业的产业附属价值,减少了固体废物的产生,有利于环境保护^[13]。

硫酸软骨素提取的方法有许多种,比较常见的有高温高压法、碱提法、中性盐法等^[14-16],以上几种方法里,使用浓碱提取时所得到的产品颜色比较深,并且剩余的废碱液还会污染环境;使用稀碱提取时得到的产品蛋白质与氮的含量比较高,生产的时间也比较长。文中以剩余的鸡蛋壳膜为原材料进行蛋壳与蛋壳膜之间的分离,使用多种方法由蛋壳膜中提取并纯化得到硫酸软骨素,通过一系列分析方法以及试验得到最适宜的鸡蛋壳膜硫酸软骨素的制备关键技术,让硫酸软骨素得到更广泛的应用。

1 试验

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 主要仪器

主要仪器:电热恒温水浴锅(HWS24),上海一恒科学仪器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9123A),上海一恒科学仪器有限公司;低速离心机(LD4-2A),北京医用离心机厂;紫外可见分光光度计(UV-5100B),上海元析仪器有限公司;摇摆式高速万能粉碎机(DFY-500),温岭市林大机械有限公司;调温电热器,上海苏进仪器设备厂;架盘药物天平等。

1.1.2 试剂与材料

原材料为市售鸡蛋。试剂主要有盐酸、氢氧化钠、氯化钙、氯化钠、硫酸、无水碳酸钠,均为分析纯,以及葡萄糖标准品、金属铝片、苯酚等。

1.2 方法

1.2.1 硫酸软骨素的制备工艺流程

硫酸软骨素的制备工艺流程:鸡蛋壳→浓盐酸浸泡→壳膜分离→干燥→粉碎→碱试剂→盐试剂→水浴提取→离心→醇沉→再溶解→二次醇沉→脱水干燥→成品。

1.2.2 硫酸软骨素制备的最佳工艺参数

为了获得最佳工艺参数,试验采用碱盐法基于提取时间、液料比(粉末状蛋壳膜与蒸馏水的体积比)

碱盐比(氯化盐与氢氧化钠的质量比)提取温度等4个因素研究对硫酸软骨素提取率的影响,进而得出最佳工艺。

1) 提取时间对于硫酸软骨素提取效果的影响。准确称量2g粉末状的蛋壳膜放入锥形瓶里,选取蛋壳膜液料比为10:1、碱盐比为3:1,进行3次平行试验,随后在40℃的水浴锅里分别加热2,4,6,8,10h,然后将水解液离心分离,得到上层清液,通过苯酚H₂SO₄法测出各条件下多糖的平均含量。将多糖提取率作为指标,得出最佳提取时间。

2) 液料比对于硫酸软骨素提取效果的影响。准确称量2g粉末状的蛋壳膜放入锥形瓶里,各自以10:1,12:1,14:1,16:1,18:1的液料比,且碱盐比为3:1,进行3次平行试验。随后在40℃的水浴锅里加热8h,将水解液离心分离,得到上层清液,再通过苯酚-硫酸法测出各条件下多糖的平均含量。将多糖提取率作为指标,得出最佳液料比。

3) 碱盐比对于硫酸软骨素提取效果的影响。准确称量2g粉末状的蛋壳膜放入锥形瓶里,各液料比为16:1,碱盐比为4:1,5:1,6:1,7:1,8:1,进行3次平行试验。随后在40℃的水浴锅里加热8h,将水解液离心分离,得到上层清液,再通过苯酚H₂SO₄法测出各条件下多糖的平均含量。将多糖提取率作为指标,得出最佳碱盐比。

4) 提取温度对于硫酸软骨素提取效果的影响。准确称量2g粉末状的蛋壳膜放入锥形瓶里,液料比为16:1、碱盐比为7:1,进行3次平行试验。随后分别在50,55,60,65,70℃水浴锅里加热8h,将水解液离心分离,得到上层清液,再通过苯酚-硫酸法测出各条件下多糖的平均含量。将多糖提取率作为指标,得出最佳提取温度。

5) 响应面法优化以确定最佳提取条件。在单因素试验基础上,利用响应面法中的试验设计及响应曲面图等来优化碱盐法提取硫酸软骨素的工艺。选择提取时间、提取温度、碱盐比和液料比作为独立变量,每个因素的高、中、低水平分别由+1,0,-1表示,见表1。

表1 响应曲面试验因素水平与编码
Tab.1 Response surface test factor level and coding

因素	A (提取时间)/h	B (提取温度)/°C	C (碱盐比)	D (液料比)
-1	6	60	6:1	14:1
0	8	65	7:1	16:1
1	10	70	8:1	18:1

1.2.3 苯酚-硫酸法检测多糖^[17]

苯酚-硫酸法测定多糖时,多糖会先在H₂SO₄作用下水解成单糖,同时会很快就脱水生成糖醛衍生

物,随后多糖会和苯酚生成橙黄色化合物,最后用比色法进行测定^[2]。

1) 制作标准曲线。称量 20 mg 标准葡聚糖放入 500 mL 容量瓶里,用蒸馏水定容到刻度。各自吸取 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 及 1.8 mL, 分别用蒸馏水添加到 2.0 mL, 同时加入 1.0 mL 体积分数为 6% 的苯酚和 5.0 mL 浓 H₂SO₄, 摇匀并进行冷却。常温静置 20 min 后在 490 nm 下测出光密度, 用蒸馏水作空白对照, 用多糖微克数作为横坐标, 用光密度值作为纵坐标, 绘制出标准曲线。

2) 测定样品含量。取 0.25 mL 的样品, 用蒸馏水添加到 2.0 mL, 紧接着加入 1.0 mL 6% 的苯酚和 5.0 mL 浓 H₂SO₄, 摇匀并进行冷却。常温静置 30 min 后在 490 nm 下测出光密度。每一次测定都取双样进行对照。根据标准曲线算出多糖含量。

1.3 多糖提取率计算

将测定的吸光度值代入苯酚-硫酸法测总糖的标准曲线, 得出相应的多糖浓度 C。

$$\text{粗多糖得率} = (C \times \text{定容体积} / \text{试样质量}) \times 100\%$$

$$\text{多糖的提取率} = (\text{粗多糖质量} / \text{蛋壳膜中糖质量}) \times 100\%$$

1.4 苯酚-硫酸法测定总糖的标准曲线

苯酚-硫酸法测多糖的标准曲线方程是 $y = 0.028x - 0.013$, $R^2 = 0.982$ 。

2 结果与讨论

2.1 单因素法研究蛋壳膜硫酸软骨素的工艺

2.1.1 提取时间对多糖提取效果的影响

提取时间对硫酸软骨素的提取效果影响见图 1。通过图 1 可以发现, 在其他条件都不变的情况下, 随

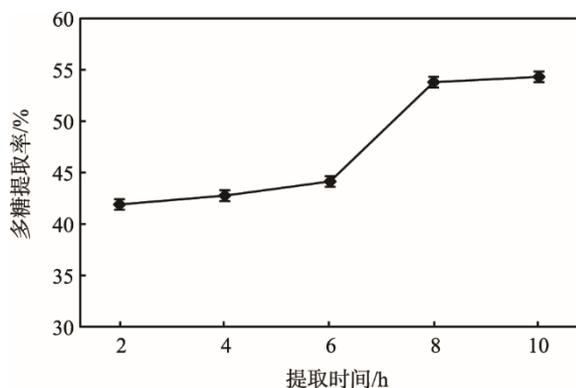


图 1 提取时间对硫酸软骨素的提取效果影响

Fig.1 Influence of extraction time on extraction effects of chondroitin sulfate

着反应时间的增长, 硫酸软骨素提取率的趋势表现为先逐渐变大后趋于平缓。当反应时间增加到 8 h 时, 硫酸软骨素提取率最大, 多糖质量是糖类的 53.8%, 这可能是因为反应开始之后伴随着提取时间增加, 反应进行的更加完全; 提取时间为 8 h 时已基本完全反应, 继续增加提取时间, 提取率也不会继续变大, 同时还会造成能源与时间的浪费。试验结果表明, 反应时间应该控制在 8 h 左右。

2.1.2 液料比对多糖提取效果的影响

液料比对硫酸软骨素提取效果的影响见图 2。通过图 2 可以发现, 在其他条件不变的情况下, 随着液料比的增加, 硫酸软骨素提取率呈现先升高后降低的趋势。当液料比增加到 16:1 时, 硫酸软骨素提取率最大, 这时多糖质量是糖类的 47.5%。这可能是因为随着液料比的增大, 蛋壳膜和溶剂相接触的表面积也会逐渐增大, 这样更加有利于反应的进行。液料比为 16:1 时达到最适反应条件, 同时继续增加液料比对试验的影响并不是很大, 还会浪费试剂。试验结果表明, 液料比应该控制在 16:1 左右。

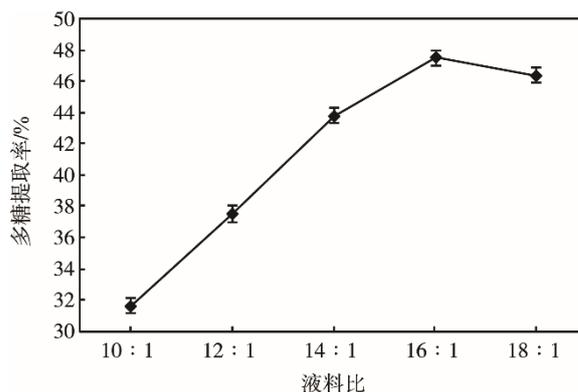


图 2 液料比对硫酸软骨素的提取效果影响

Fig.2 Influence of liquid-solid ratio on extraction effects of chondroitin sulfate

2.1.3 碱盐比对多糖提取效果的影响

碱盐比对硫酸软骨素提取效果的影响见图 3。通过图 3 可以发现, 在其他条件都不变的情况下, 随着碱盐比的增加, 硫酸软骨素提取率呈现先升高后降低的趋势。当液料比增加到 7:1 时, 硫酸软骨素提取率最大, 这时多糖质量是糖类的 55%。这可能是因为碱添加过多时, 蛋壳膜的性质会发生一定程度改变, 进而影响了硫酸软骨素提取。试验结果表明, 碱盐比应该控制在 7:1 左右。

2.1.4 提取温度对多糖提取效果的影响

提取温度对多糖的提取效果影响见图 4。通过图 4 可以发现, 在其他条件都不变的情况下, 随着反应温度的增加, 硫酸软骨素提取率呈现先升高后降低的趋势。当反应温度增加到 65 °C 时, 硫酸软骨素提取

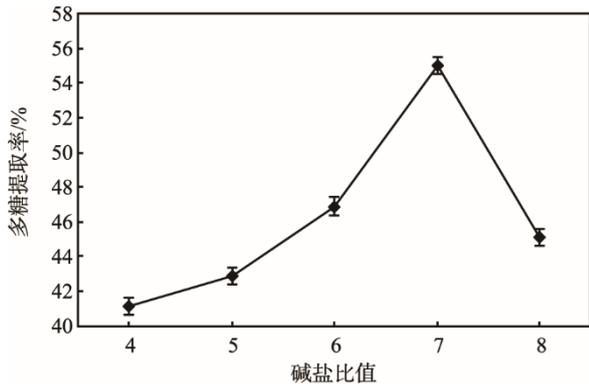


图 3 碱盐比对硫酸软骨素提取效果的影响

Fig.3 Influence of alkali-salt ratio on extraction effects of chondroitin sulfate

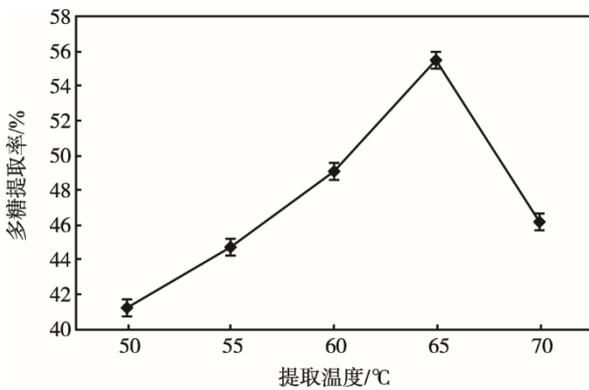


图 4 提取温度对多糖提取效果的影响

Fig.4 Influence of extraction temperature on extraction effects of polysaccharide

率最大，这时多糖质量是糖类的 55.5%，这可能是因为当反应温度太高时，蛋壳膜性质发生很大改变，极大地影响了硫酸软骨素的提取。试验结果表明，反应温度应该控制在 65℃左右。

2.2 响应曲面法优化蛋壳膜硫酸软骨素的提取工艺^[18]

2.2.1 设计响应曲面试验

为了优化蛋壳膜硫酸软骨素的提取工艺，采用 Box-Behnken 设计试验方案，对影响蛋壳膜硫酸软骨素提取的 4 个主要因素进行优化试验。选择提取时间、提取温度、液料比和碱盐比作为独立变量制作显著水平表，试验结果见表 2。

2.2.2 建立模型方程及显著性检验

使用 Design-Expert7.0.0 统计软件进行响应面分析表 2 所得的试验数据，得到回归模型方差分析，见表 3。

根据 Design-Expert 7.0.0 软件，对通过在单因素试验基础上确定的 4 因素 4 水平组成的 29 组试验方案试验数据进行多元二次拟合，可以获得多糖提取率 (Y) 的回归模型为：

$$\text{多糖提取率} = 72.30 - 1.96A + 2.29B - 8.42C - 2.42D + 5.50AB - 1.50AC - 3.13AD + 2.25BC + 3.88BD - 1.00CD - 4.80A^2 - 4.67B^2 - 10.36C^2 - 3.11D^2$$

由表 3 可知，模型 $P < 0.0001$ ，表示该模型回归显著；失拟项 P 值为 0.0945，表示失拟项为不显著；模型复相关系数是 0.9851，表明这个模型可以解释 98.51% 的响应值变化，即这个模型和实际的试验拟合良好，试验误差小，证明应用响应曲面法优化的蛋壳膜硫酸软骨素提取工艺是可行的。各因素之间交互作

表 2 蛋壳膜硫酸软骨素的提取工艺 4 因素 3 水平 Box-Behnken 试验结果

Tab.2 4-factor 3-level Box-Behnken test results of chondroitin sulfate extraction process of egg shell membrane

因素	A/h	B/℃	C	D	多糖提取率/%
1	0	-1	1	0	44.5
2	-1	0	0	-1	68.0
3	-1	0	1	0	51.0
4	-1	1	0	0	61.0
5	1	0	0	1	56.5
6	-1	0	0	1	68.5
7	0	0	1	1	46.5
8	1	0	0	-1	68.5
9	-1	-1	0	0	67.5
10	0	0	0	0	72.5
11	0	-1	-1	0	66.0
12	0	-1	0	-1	69.0
13	0	0	0	0	73.5
14	0	0	-1	1	65.5
15	0	1	0	-1	64.5
16	0	1	0	1	67.5
17	1	-1	0	0	52.0
18	0	-1	0	1	56.5
19	0	0	0	0	71.5
20	0	0	-1	-1	67.5
21	0	0	1	-1	52.5
22	0	0	0	0	71.5
23	1	0	-1	0	66.0
24	0	0	0	0	72.5
25	1	1	0	0	67.5
26	-1	0	-1	0	64.5
27	0	1	-1	0	67.5
28	1	0	1	0	46.5
29	0	1	1	0	55.0

表3 蛋壳膜硫酸软骨素的提取工艺 Box-Behnken 试验方差的分析结果

Tab.3 Analysis results of Box-Behnken test variance for chondroitin sulfate extraction process of egg shell membrane

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	2068.97	14	147.78	66.23	< 0.0001 **
A	46.02	1	46.02	20.63	0.0005 **
B	63.02	1	63.02	28.24	0.0001 **
C	850.08	1	850.08	380.99	< 0.0001 **
D	70.08	1	70.08	31.41	< 0.0001 **
AB	121.00	1	121.00	54.23	< 0.0001 **
AC	9.00	1	9.00	4.03	0.0643
AD	39.06	1	39.06	17.51	0.0009 **
BC	20.25	1	20.25	9.08	0.0093 **
BD	60.06	1	60.06	26.92	0.0001 **
CD	4.00	1	4.00	1.79	0.2019
A ²	149.19	1	149.19	66.86	< 0.0001 **
B ²	141.51	1	141.51	63.42	< 0.0001 **
C ²	695.97	1	695.97	311.92	< 0.0001 **
D ²	62.67	1	62.67	28.09	0.0001 **
残差	31.24	14	2.23		
失拟项	28.44	10	2.84	4.06	0.0945
纯误差	2.80	4	0.70		
总和	2100.21	28			
标准差	1.49				
均值	62.81				
变异系数	2.38				
R ²	0.9851				

注：**表示差异极显著 (P<0.01)；上角标 2 表示二次项的交互作用

用对蛋壳膜硫酸软骨素提取率的影响主次顺序是：
 $AB > BD > AD > BC > AC > CD$ ，其中 AB, BD, AD, BC 之间的交互作用影响为极显著水平； AC, CD 之间交互的作用没有达到显著水平，因此不进行详细分析。

2.2.3 响应曲面分析

AB, AD, BD, BC 即提取时间与提取温度、提取时间与液料比、提取温度与液料比、提取温度与碱盐比之间交互作用得出的响应面和等高线见图 5—8。

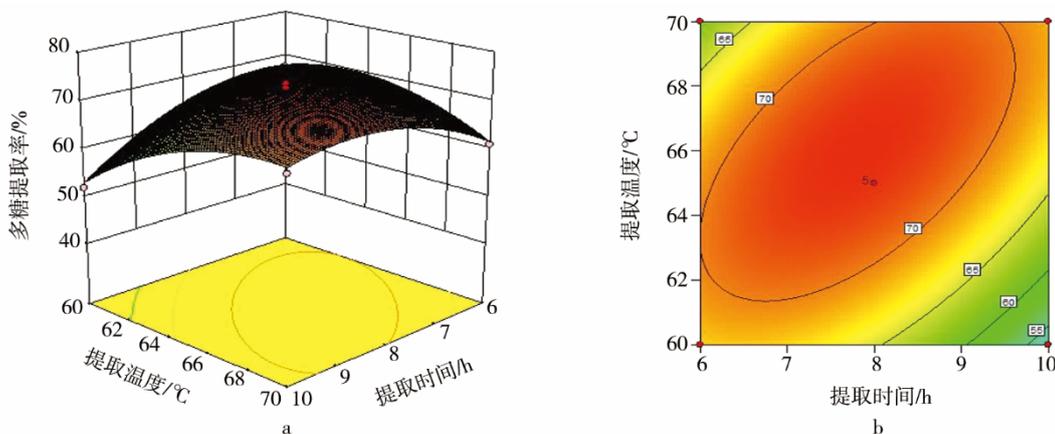


图5 提取温度与提取时间 2 个因素的交互作用对硫酸软骨素提取效果影响

Fig.5 Influence of interaction between extraction temperature and extraction time on the extraction effect of chondroitin sulfate

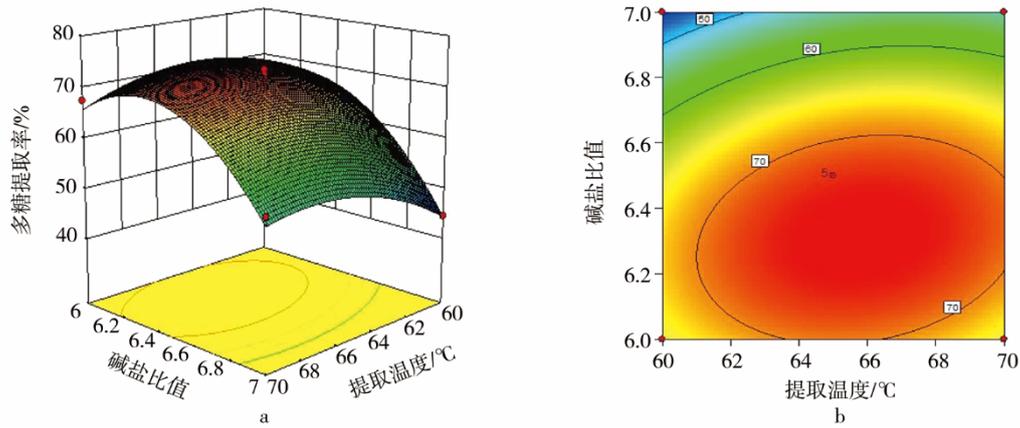


图 6 提取温度与碱盐比之间的交互作用对硫酸软骨素提取效果影响

Fig.6 Influence of interaction between extraction temperature and alkali-salt ratio on the extraction effect of chondroitin sulfate

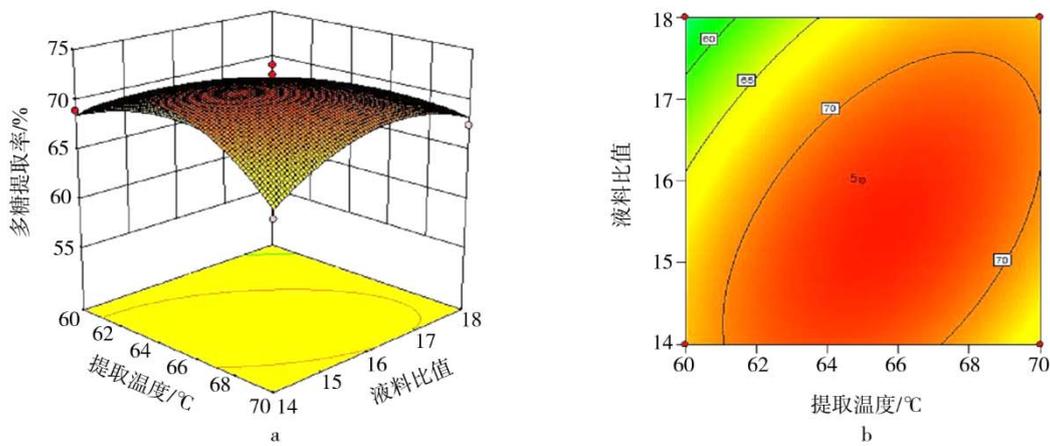


图 7 提取温度与液料比之间的交互作用对硫酸软骨素提取效果影响

Fig.7 Influence of interaction between extraction temperature and liquid-solid ratio on extraction effect of chondroitin sulfate

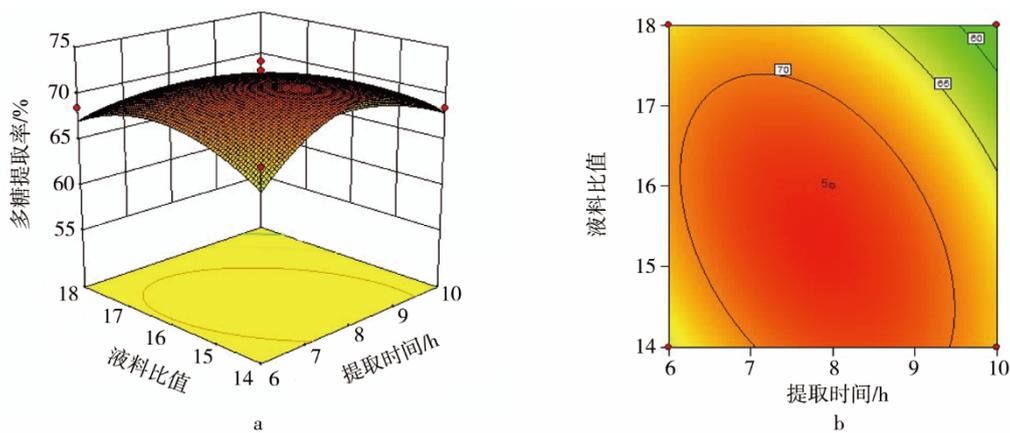


图 8 液料比与提取时间之间的交互作用对硫酸软骨素提取效果影响

Fig.8 Influence of interaction between liquid-solid ratio and extraction time on extraction effect of chondroitin sulfate

等高线的形状可以表示出交互效应的大小和强弱，椭圆度代表两因素的交互作用越显著。

分析了优化二次回归模型的数据，获得了使用蛋壳膜提取硫酸软骨素的最佳条件：提取时间为 7.91 h、提取温度为 65℃、碱盐比为 6.31：1、液料比为 15.39：1。根据实际情况对其修正，提取时间为 8 h、

提取温度为 65℃、碱盐比为 6：1、液料比为 15：1。按照得到的最佳提取工艺参数，对蛋壳膜硫酸软骨素提取率进行计算，并进行 3 次平行验证试验，得到蛋壳膜硫酸软骨素提取率分别为 74.5%、72.5%、75.0%，平均值是 74.0%，与预测值（74.35%）基本相同。这表明通过响应曲面方法预测得出的优化工艺参数是

非常准确可靠、可行且行之有效的。

3 结语

使用废弃的蛋壳作为原材料,通过壳膜分离的方式得到蛋壳膜,同时用碱盐法对蛋壳膜进行水解提取硫酸软骨素。经单因素试验确定各因素的水平范围,随后通过响应曲面法分析并优化,最终确定蛋壳膜硫酸软骨素提取最佳工艺参数:提取时间为8 h、提取温度为65℃、碱盐比为6:1、液料比为15:1。在此条件下,硫酸软骨素提取率为74.0%。通过响应曲面设计试验及验证试验证明该最佳反应条件具有一定的可靠性与可行性。

此试验所采用的方法与其他方法比较,虽具有生产成本低,提取效率高,且适合工业化生产的优点,但试剂消耗量大,同时所提取得到的硫酸软骨素含有许多杂质,还需在更好的试验条件下进一步对所得硫酸软骨素进行分离纯化,才可得到更加纯品的硫酸软骨素。

参考文献:

- [1] 罗灿, 刘焱, 刘伦伦. 蛋壳膜角蛋白的资源化利用研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2014(5): 55—58.
LUO Can, LIU Yan, LIU Lun-lun. Research Progress of Egg Shell Membrane Keratin Resource Utilization[J]. Agricultural Products Processing (Journal of Science), 2014(5): 55—58.
- [2] TSAI W, YANG J, LAI C, et al. Characterization and Adsorption Properties of Eggshells and Eggshell Membrane[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(3): 488—493.
- [3] CHEN W, LI B, XU C, et al. Chemiluminescence Flow Biosensor for Hydrogen Peroxide Using DNA Zyme Immobilized on Eggshell Membrane as a Thermally Stable Biocatalyst[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2009, 24(8): 2534—2540.
- [4] 朱文婷, 吴士筠, 杨惠, 等. 酶法提取鸡蛋壳膜中透明质酸的工艺优化[J]. 食品科技, 2016, 41(1): 204—209.
ZHU Wen-ting, WU Shi-yun, YANG Hui, et al. Process Optimization of Enzymatic Extraction of Hyaluronic Acid from Egg Shell and Membrane[J]. Food Science and Technology, 2016, 41(1): 204—209.
- [5] 安艳茹, 夏梦颖, 黄玉萍, 等. 鸡蛋壳膜的开发利用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 375—378.
AN Yan-ru, XIA Meng-ying, HUANG Yu-ping, et al. Development and Utilization of Egg Shell Film[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(3): 375—378.
- [6] 宫瑞泽, 祁玉丽, 霍晓慧, 等. 鹿气管硫酸软骨素的提取分离与抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2019, 44(1): 291—296.
GONG Rui-ze, QI Yu-li, HUO Xiao-hui, et al. Study on the Extraction and Isolation of Chondroitin Sulfate from Deer Trachea and Its Antioxidant Activity[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 291—296.
- [7] SUGAHARA K, MIKAMI T, UYAMA T, et al. Recent Advances in the Structural Biology of Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2003, 13(5): 612—620.
- [8] HE G, YIN Y, YAN X, et al. Optimisation Extraction of Chondroitin Sulfate from Fish Bone by High Intensity Pulsed Electric Fields[J]. Food Chemistry, 2014, 164(3): 205—210.
- [9] 武瑞赟, 刘蕾, 张金兰, 等. 鲟鱼硫酸软骨素对结直肠癌细胞抑制作用[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 223—229.
WU Rui-yun, LIU Lei, ZHANG Jin-lan, et al. Inhibitory Effect of Chondroitin Sulfate on Colorectal Cancer Cells in Sturgeon[J]. Food Science, 2017, 38(21): 223—229.
- [10] 李崇阳, 李艳, 牟德华. 氨基葡萄糖硫酸软骨素促进骨骼健康作用研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 382—385.
LI Chong-yang, LI Yan, MOU De-hua. Research Progress of Glucosamine Sulfate Chondroitin Promoting Bone Health[J]. Food Science, 2015, 36(23): 382—385.
- [11] 李燕妮, 郭琳, 许维娜. 秘鲁巨鱿软骨硫酸软骨素理化性质研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(16): 23—25.
LI Yan-ni, GUO Lin, XU Wei-na. Study on the Physicochemical Properties of Chondroitin Sulfate in Giant Squid Cartilage in Peru[J]. Food Research and Development, 2016, 37(16): 23—25.
- [12] 栾欣悦. 蛋壳膜多糖的提取及应用研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2016.
LUAN Xin-yue. Study on Extraction and Application of Eggshell Membrane Polysaccharide[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2016.
- [13] 周跃钢. 硫酸软骨素的研究进展及其应用前景[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(21): 1821—1825.
ZHOU Yue-gang. Research Progress and Application Prospect of Chondroitin Sulfate[J]. Chinese Journal of Pharmacy, 2016, 51(21): 1821—1825.
- [14] 宋志鹏, 徐丽萍, 王鑫. 超声波辅助复合酶提取鸡软骨中硫酸软骨素[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2016, 32(1): 38—43.
SONG Zhi-peng, XU Li-ping, WANG Xin. Ultrasonic Assisted Complex Enzyme Extraction of Chondroitin

- Sulfate from Chicken Cartilage[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Science Edition), 2016, 32(1): 38—43.
- [15] 熊双丽, 李安林, 张晓娟. 猪肺管硫酸软骨素的提取分离与抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 93—96.
XIONG Shuang-li, LI An-lin, ZHANG Xiao-juan. Study on the Extraction and Isolation of Chondroitin Sulfate in Pig Lung Tubes and Its Antioxidant Activity [J]. Food Industry Science and Technology, 2014, 35(17): 93—96.
- [16] OLIVEIRA A P V, FEITOSA V D A, OLIVEIRA J M D, et al. Characteristics of Chondroitin Sulfate Extracted of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Processing[J]. Procedia Engineering, 2017, 200: 193—199.
- [17] 刘宁, 栾欣悦, 刘涛, 等. 木瓜蛋白酶提取蛋壳膜中硫酸软骨素的研究[J]. 农产品加工, 2015(13): 1—4.
LIU Ning, LUAN Xin-yue, LIU Tao, et al. Study on Extraction of Chondroitin Sulfate from Egg Shell Membrane by Papain[J]. Processing of Agricultural Products, 2015(13): 1—4.
- [18] 谢晶, 尹义捐, 杨欲成, 等. 响应面法优化鹅全骨硫酸软骨素的酶法提取工艺[J]. 肉类研究, 2018, 32(8): 40—45.
XIE Jing, YIN Yi-juan, YANG Yu-cheng, et al. Optimization of Enzymatic Extraction Process of Chondroitin Sulfate from Goose by Response Surface Method[J]. Meat Research, 2018, 32(8): 40—45.