

栉孔扇贝中蛋白质的提取条件优化

李 丽¹, 曹亚男², 姜 雯¹, 裴继伟¹, 樊晓彤¹, 李胜杰¹, 刘海梅¹

(1.鲁东大学 食品工程学院, 山东 烟台 264025; 2.烟台市海洋经济研究院, 山东 烟台 264003)

摘要: 为研究栉孔扇贝蛋白质的碱法提取工艺, 优化提取条件。本研究以蛋白质提取率为指标, 通过 pH 值、温度、料液比及反应时间的单因素实验和正交实验对蛋白质提取条件进行优化, 通过复溶、硫酸铵沉淀、透析、冷冻干燥得到栉孔扇贝蛋白质干品。结果表明, 栉孔扇贝蛋白质的最优碱提工艺参数为 pH 值 12、温度 40 ℃、料液比 1 : 30 (W/W)、时间 6 h。在最优碱提条件下提取, 蛋白质的提取率高达 74.33%。用 50%~60% 饱和区间的硫酸铵溶液进行碱溶蛋白回收时, 蛋白质沉淀率达到 90.19%, 栉孔扇贝中蛋白质的总体回收率可达到 67.04%。该研究为栉孔扇贝蛋白质的提取和分离提供了借鉴, 为后续栉孔扇贝蛋白质的开发与利用提供了理论依据。

关键词: 栉孔扇贝; 碱溶法; 硫酸铵沉淀法; 提取率; 蛋白质

中图分类号: S985.3+6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-8020(2021)02-0157-05

中国是世界上最大的贝类生产国, 2018 年, 我国贝类海水养殖产量达到 1 443.9 万 t。我国的扇贝产量也高居世界首位, 据《中国渔业统计年鉴》统计, 2018 年我国扇贝海水养殖产量为 191.8 万 t, 仅次于牡蛎和蛤^[1]。栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 产于我国长岛、蓬莱、威海、大连等北部沿海地区^[2], 是我国主要的贝类养殖品种之一。目前, 栉孔扇贝养殖量高达全国扇贝养殖总量的 70%。

栉孔扇贝是一种高蛋白、低脂肪的海鲜, 其味道鲜美, 具有较高的食用价值^[3]。栉孔扇贝软体部分中含有丰富的维生素、蛋白质、脂肪酸、微量元素和矿物质等多种营养成分, 其中粗蛋白质含量高达 15.10%。通过研究, 已经利用栉孔扇贝中丰富的蛋白质资源生产制备出多种产品, 如浓缩扇贝蛋白^[4]、生物活性肽^[5]、复合氨基酸螯合钙^[6]、海鲜调味品^[7]。蛋白质作为栉孔扇贝的主要成分, 其利用率尚未得到充分的开发。因此, 本研究拟优化栉孔扇贝蛋白质的碱法提取工艺, 探索其分离方法, 为后续栉孔扇贝蛋白质的开发利用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) (烟台红利水产市场); 硫酸铵、氢氧化钠(国药集团化学试剂有限公司); 福林试剂(北京索莱宝科技有限公司)。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FJ200 高速分散均质机(上海标本模型厂); PHS-3C 酸度计(赛多利斯科学仪器北京有限公司); 81-2 磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); SHP-250 生化培养箱(上海培因仪器公司); FC 酶标仪(美国热电公司); LGJ-18S 真空冷冻干燥器(北京松原)。

1.3 方法

1.3.1 粗蛋白含量的测定

采用凯氏定氮法^[8]测定粗蛋白质的含量。

收稿日期: 2021-01-06; 修回日期: 2021-02-20

基金项目: 山东省大学生创新创业训练计划(S201910451140); 鲁东大学学生创新课题(ldlg2019113)

第一作者简介: 李丽(1999—), 女, 云南昆明人, 研究方向为水产品加工与综合利用。E-mail: 1526143423@qq.com

通信作者简介: 刘海梅(1979—), 女, 山东潍坊人, 教授, 博士, 研究方向为水产品加工与综合利用。E-mail: hellen_79@aliyun.com

1.3.2 可溶性蛋白含量的测定

参考福林酚试剂法^[9]测定可溶性蛋白含量。

1.3.3 蛋白质提取制备工艺流程

调整料液比(W/W),将料液在均质机中均质 3 min,调整 pH 值并进行恒温水浴,提取液于 8000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,加入硫酸铵并迅速搅拌使其溶解,于 4 ℃条件下反应 30 min、8000 r·min⁻¹离心 3 min 后取上清液,再次加入硫酸铵并进行快速搅拌,在 4 ℃条件下反应 4 h,8000 r·min⁻¹离心 3 min,取蛋白质沉淀,加 pH 值为 7.2 的磷酸缓冲液进行溶解,用 ddH₂O 透析 24 h,真空冷冻干燥器冻干 24 h,得到蛋白质冻干品。

1.3.4 碱溶法提取蛋白质参数的确定

1.3.4.1 pH 值

调整料液比为 1:25(W/W),均质 3 min,将样液的 pH 值分别调节至 7、8、9、10、11、12,在温度 35 ℃下提取 1.5 h,研究不同 pH 值对蛋白质提取率的影响。

$$\text{蛋白质提取率}(\%) = \frac{\text{提取液中蛋白质含量}}{\text{原料中蛋白质总含量}} \times 100\%$$

1.3.4.2 温度

调整料液比为 1:25(W/W),均质 3 min,调节样液 pH 值至 11,分别在温度 30、35、40、45、50、55 ℃下提取 1.5 h,研究不同温度对蛋白质提取率的影响。

1.3.4.3 料液比

调整料液比分别至 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30(W/W),均质 3 min,调节样液 pH 值至 11,在温度 40 ℃下提取 2 h,研究不同料液比为对蛋白质提取率的影响。

1.3.4.4 时间

调整料液比为 1:25(W/W),调节样液 pH 值至 11,均质 3 min,在温度 40 ℃下,将提取时间分别调整至 1、2、3、4、5、6 h,研究不同提取时间对蛋白质提取率的影响。

1.3.5 蛋白质提取的正交试验

在碱溶单因素试验数据基础上,设计四因素三水平正交试验^[10],正交试验水平设计见表 1。

表 1 碱溶因素水平表
Tab.1 Table of alkali solution factor levels

水平	因素			
	温度/℃	pH 值	料液比/(W/W)	时间/h
1	35	10	1:20	4
2	40	11	1:25	5

3 45 12 1:30 6

1.3.6 硫酸铵沉淀

采用 Robert C Richards 沉淀大西洋鲑鱼蛋白质的方法^[11],进行硫酸铵沉淀实验。

取等量的样品分别加入到 5 个离心管中,每 10 mL 样品依次加入 1.06、1.64、2.26、2.91、3.61 g 的硫酸铵,硫酸铵的饱和度分别达到 20%、30%、40%、50%和 60%。加入硫酸铵后,迅速搅拌使硫酸铵溶解,于 4 ℃条件下反应 30 min。离心即可获得 20%、30%、40%、50%和 60%饱和度下的硫酸铵沉淀蛋白。取上清液,测定每个上清液的体积,并再次按照每 10 mL 样品各加入 0.55、0.56、0.58、0.60、0.62 g 硫酸铵的标准,分别提高 10%的饱和度,继续混匀后,使溶液在 4 ℃条件下静置 30 min,待其沉淀后离心,所得的 5 份沉淀即为 20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%和 60%~70%的硫酸铵区间沉淀下来的优质蛋白质。

1.3.7 数据处理

采用 Excel、SAS9.0 软件绘制曲线和方差分析,以 Duncan 检验法进行显著性水平分析, $P < 0.05$ 为显著, $P < 0.01$ 为极显著。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线绘制

以 BSA 标准品的浓度为横坐标,上清液的吸光度为纵坐标,绘制的标准曲线如图 1 所示。吸光度(y)与 BSA 蛋白标准品浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的关系式为:

$$y = 0.0184x + 0.0668,$$

该曲线 $R^2 = 0.9959$,符合标准曲线要求^[12]。

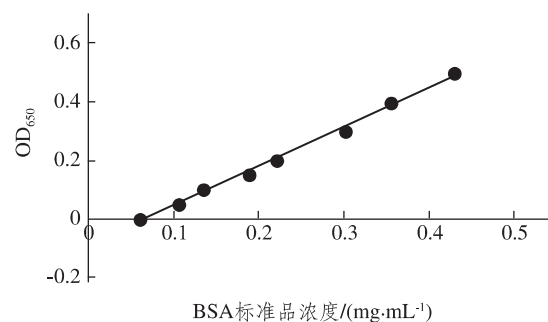
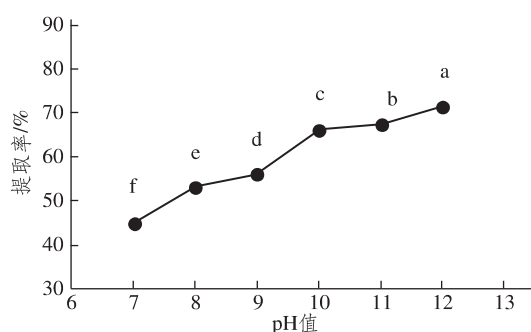


图 1 BSA 标准曲线
Fig.1 BSA standard curve

2.2 碱溶法提取蛋白质的单因素试验

2.2.1 pH 值

栉孔扇贝蛋白质的提取率随 pH 值的变化趋势见图 2。由图 2 可以看出,栉孔扇贝蛋白质的提取率随 pH 值的增加呈现出不断升高的趋势,且 pH 值对蛋白质的提取率有显著性影响 ($P < 0.05$)。当 pH 值为 7 时,蛋白质的提取率最低,为 45.15%,当 pH 值提高到 12 时,蛋白质的提取率达到最高,为 71.51%。若继续提高 pH 值,蛋白质提取率虽然会继续升高,但会增加成本,蛋白质发生水解、脱羧等反应的可能性越来越大,其食用价值也在降低。pH 值过高会致使蛋白质变性^[13],分离时会随着杂质和糖类被分离掉。因此,选择 pH 值为 12 进行栉孔扇贝蛋白质的提取。



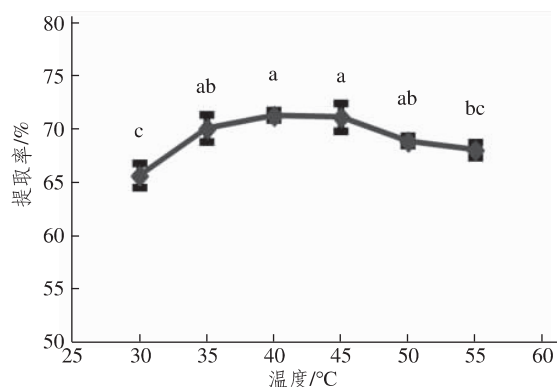
注:图中不同小写字母代表数据之间有显著性差异 ($P < 0.05$)

图 2 pH 值对蛋白质提取率的影响 ($n = 3$)

Fig.2 Effect of pH on protein extraction rate

2.2.2 温度

栉孔扇贝蛋白质的提取率随温度的变化趋势见图 3。由图 3 可以看出,随着温度的升高,蛋白质的提取率呈现出先升高后降低的趋势,且温度对蛋白质提取率有显著的影响 ($P < 0.05$)。当温度为 30 °C 时,蛋白质提取率为 65.68%;当温度提升到 40 °C 时,蛋白质提取率达到最高,为 71.31%;温度继续提升时,蛋白质沉淀率则呈现降低的趋势。分析提取率降低的原因可能为,过高的温度导致了栉孔扇贝中某些蛋白质的空间构象发生了变化。某些蛋白质因高温而变性,蛋白质分子之间相互结合形成沉淀,并最终导致上清液中的蛋白质含量降低^[14]。反应温度在 35 °C 和 40 °C 时,蛋白质的提取率无显著性差异 ($P > 0.05$)。综合考虑,选择温度 35 °C 进行栉孔扇贝蛋白质的提取。



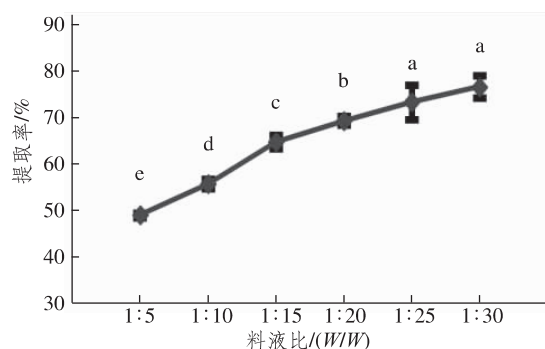
注:图中不同小写字母代表数据之间有显著性差异 ($P < 0.05$)

图 3 温度对蛋白质提取率的影响 ($n = 3$)

Fig.3 Effect of temperature on protein extraction rate

2.2.3 料液比

栉孔扇贝蛋白质的提取率随料液比的变化趋势见图 4。由图 4 可以看出,随着样液中栉孔扇贝含量的降低,蛋白质的提取率呈现出不断升高的趋势,且料液比对蛋白质的提取率有显著的影响 ($P < 0.05$)。当料液比为 1:5 时,蛋白质的提取率最低,为 48.03%;当料液比为 1:30 时,蛋白质的提取率最高,达到 76.63%;料液比在 1:25 和 1:30 时,蛋白质的提取率无显著性差异 ($P > 0.05$)。说明当料液比为 1:25 时,蛋白质已经充分溶解,且调节到更高的料液比会带动溶液、溶剂等成本的增加。综合考虑,选择料液比 1:25 进行栉孔扇贝蛋白质的提取。



注:图中不同小写字母代表数据之间有显著性差异 ($P < 0.05$)

图 4 料液比对蛋白质提取率的影响 ($n = 3$)

Fig.4 Effect of solid-liquid ratio on protein extraction rate

2.2.4 时间

栉孔扇贝蛋白质的提取率随料液比的变化趋势见图 5。由图 5 可以看出,随着时间的延长,蛋白质的提取率呈现出不断升高的趋势,且反应时间对蛋白质的提取率有显著的影响 ($P < 0.05$)。

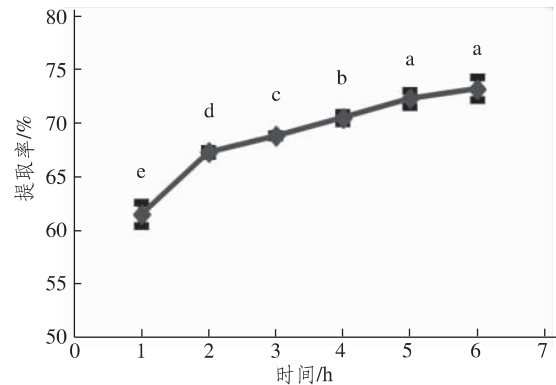
提取时间为 1 h 时,蛋白质提取率最低,为 61.46%;当提取时间为 6 h 时,蛋白质的提取率最高,达到 73.49%。反应时间为 5 h 和 6 h 时,蛋白质的提取率无显著性差异($P>0.05$)。说明当提取时间达到 5 h 后,蛋白质的提取率趋于平稳。此时,扇贝碎肉中的蛋白质已经基本被抽提到溶剂中。因此,选择反应时间 5 h 进行栉孔扇贝蛋白质的提取。

2.3 碱溶法提取蛋白质的正交优化

由于单因素的最优结果可能与全部因素实验的最优结果不一致,因此,必须进行正交优化实验选择出在实际实验中的最优结果。栉孔扇贝碱溶法提取蛋白质的四个单因素(温度、pH、料液比、反应时间)在三个水平下的正交实验结果如表 2。

由方差分析(见表 3)可知,pH 值、料液比、时间对蛋白质提取率具有极显著影响($P<0.01$),反应温度有显著影响($P<0.05$)。各因素对蛋白质

提取率的影响从大到小依次为料液比、时间、pH、温度,最优碱提条件为温度 40 °C、pH 值 12、料液比 1 : 30、反应时间 6 h。在最优碱提条件下,蛋白质的提取率高达 74.33%,河蚬蛋白质的提取率为 74.97%^[12],与本试验结果相近。



注:图中不同小写字母代表数据之间有显著性差异($P<0.05$)

图5 时间对蛋白质提取率的影响($n=3$)

Fig.5 Effect of time on protein extraction rate

表 2 碱溶法提取蛋白的优化实验结果

Tab.2 Optimized experimental results of protein extraction by alkali solution

试验号	A	B	C	D	蛋白质提取率/%
	温度/°C	pH 值	料液比/(W/W)	时间/h	
1	35	10	1 : 20	4	61.13±0.35
2	35	11	1 : 25	5	69.13±1.09
3	35	12	1 : 30	6	74.33±1.21
4	40	10	1 : 25	6	70.47±1.04
5	40	11	1 : 30	4	73.24±0.35
6	40	12	1 : 20	5	64.28±1.18
7	45	10	1 : 30	5	67.37±1.04
8	45	11	1 : 20	6	71.75±0.36
9	45	12	1 : 25	4	68.56±1.19
K1	68.20	66.32	65.72	67.64	
K2	69.33	71.37	69.39	66.93	
K3	69.23	69.06	71.65	72.18	
R	1.13	5.05	5.93	5.26	

注:K 为均值,R 为极差

表 3 方差分析结果

Tab.3 Analysis of variance results

因素	离均平方和	自由度	均方	F 值	P
温度/°C	7.089	2	3.544	4.01	<0.036 4
pH 值	146.208	2	73.104	82.64	<0.001
料液比/(W/W)	115.019	2	57.510	65.01	<0.001
时间/h	160.786	2	80.393	90.88	<0.001

2.4 蛋白质回收

2.4.1 酸沉淀

用 1 mol · L⁻¹ 的盐酸调节样液的 pH 值,当

pH 值调节至 4.1 时到达溶液的等电点。离心后用福林酚试剂法测出上清液的吸光度,经计算得出蛋白质的沉淀率为 77.97%。

2.4.2 硫酸铵沉淀

蛋白质沉淀率随硫酸铵饱和区间的变化趋势见图6。由图6可以看出,硫酸铵的饱和区间对蛋白质的沉淀率具有显著性影响($P < 0.05$)。随着样液中硫酸铵饱和度的不断增加,蛋白质的沉淀率呈现出不断升高的趋势。当样液中硫酸铵的饱和区间为20%~30%时,蛋白质沉淀率最低,为77.08%。此后,蛋白质的沉淀率不断提升,直至硫酸铵饱和区间提升到60%~70%时,蛋白质的沉淀率达到最高,为91.16%。硫酸铵饱和区间在50%~60%和60%~70%时,蛋白质的沉淀率无显著性差异($P > 0.05$)。也就是说,在样液中硫酸铵饱和区间为50%~60%时,蛋白质的沉淀率趋于平稳,样液中的蛋白质已经基本沉淀完全。说明随着硫酸铵的饱和度的提升,样液中蛋白质的含量不断降低,直至溶液中基本不含有蛋白质。此时,提升硫酸铵的饱和度无法沉淀蛋白质,沉淀率趋于平缓^[15]。因此,确定蛋白质沉淀的最佳硫酸铵的饱和区间为50%~60%,此时沉淀率为90.19%。

经硫酸铵沉淀的蛋白质沉淀率明显高于酸沉淀的沉淀率,综合考虑,选择硫酸铵沉淀为蛋白质的回收方法。

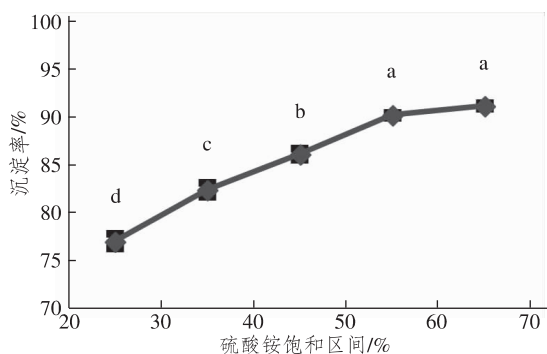


图6 硫酸铵饱和度对蛋白质沉淀率的影响

Fig.6 Effect of ammonium sulfate saturation on protein precipitation rate

3 结论

本研究以栉孔扇贝碎肉为原料,通过碱溶法提取栉孔扇贝肉中的蛋白质,再采用硫酸铵沉淀法将蛋白质从溶液中沉淀出来。通过正交试验优化了碱溶法提取蛋白质的最佳工艺参数:料液比为1:30(W/W)、pH值12、反应温度40℃、时间6h。经验证,此条件下栉孔扇贝中蛋白质的提取率高达74.33%。硫酸铵沉淀蛋白质的最佳饱和区间为50%~60%。此时,蛋白质沉淀率达到了

90.19%。在最佳分离提取条件下,栉孔扇贝分离蛋白质的总体得率为67.04%。

本实验对栉孔扇贝蛋白质的提取和分离具有借鉴意义,为后续栉孔扇贝中的蛋白质的开发和利用提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 《中国渔业统计年鉴》编辑委员会.中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2007-2019.
- [2] 程洁.栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)大片段基因组文库的构建及应用分析[D].青岛:中国海洋大学,2010.
- [3] 李帆.不同干燥及复水工艺对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)品质影响的研究[D].大连:大连工业大学,2017.
- [4] 王灵昭.南极磷虾(*Euphausia superba*)蛋白质深加工新技术研究[D].青岛:中国海洋大学,2013.
- [5] 于志鹏,武思佳,赵文竹,等.海洋贝类蛋白源生物活性肽及肽组学的研究进展[J].食品工业科技,2015,36(22):384-388.
- [6] 高洁,高翔,魏玉西,等.扇贝裙边发酵制备ACE抑制肽的菌种筛选与鉴定[J].核农学报,2018,32(10):94-102.
- [7] 曾文燕,刘璐,王贺,等.华贵栉孔扇贝肉的酶解工艺优化及其产物风味的美拉德改良研究[J].食品科技,2018,43(9):197-203.
- [8] 孟庆玉,李志岭.食品中蛋白质测定国标方法的变化及意见[J].河南预防医学杂志,2017,28(2):114-116.
- [9] 邵泓,吕晶,陈钢.蛋白质含量测定方法的规范化研究[J].中国药品标准,2011,12(2):135-138.
- [10] 卢志宏,蒋琼凤,舒姣,等.杏鲍菇菌糠蛋白质的提取工艺研究[J].广州化工,2019,47(7):93-95.
- [11] RICHARDS R C, O'NEIL D B, THIBAUT P, et al. Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 284(3): 549-555.
- [12] 王学标,何云侠,刘强.福林酚试剂法与缩二脲试剂法测定饲用蛋白酶活力的比较分析[J].畜牧与兽医,2019,51(3):23-28.
- [13] 朱小燕,李相前,王杰,等.pH调节法制备河蚬蛋白质及其营养评价[J].食品科技,2017,42(1):175-181.
- [14] 高飞,韩春然,石彦国,等.南极磷虾蛋白质提取条件优化[J].天然产物研究与开发,2016,28(2):307-312.
- [15] 杨海霞.内蒙甜芥贮藏蛋白的分离纯化及功能特性研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.

(下转第182页)

sumption rate of energy commodities, obviously, forming a consumption structure dominated by traditional high-polluting energy such as straw and coal. In this regard, it is necessary to accelerate the transformation of the rural energy structure to clean energy.

Keywords: residential energy structure; energy amount difference; emission of air pollutants; Shandong Province

(责任编辑 顾建忠)

(上接第161页)

Abstract ID: 1673-8020(2021)02-0157-EA

Optimized Extraction Conditions of Protein from Scallop *Chlamys farreri*

LI Li¹, CAO Yanan², JIANG Wen¹, PEI Jiwei¹, FAN Xiaotong¹, LI Shengjie¹, LIU Haimei¹

(1. School of Food Engineering, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. Yantai Institute of Marine Economy, Yantai 264003, China)

Abstract: To study alkali extraction technology of *Chlamys farreri* protein and optimize the extraction conditions, the protein extraction rate was taken as the index, and the protein extraction conditions including pH, temperature, solid-liquid ratio and reaction time were optimized by the single factor and orthogonal experiment. The dry protein of *Chlamys farreri* was obtained by redissolving, ammonium sulfate precipitation, dialysis and freeze-drying. The results showed that the optimal alkali extraction process parameters of *Chlamys farreri* protein were pH 12, temperature 40°C, ratio of solid to liquid 1:30 (W/W), and extraction time 6 h. Under the optimal alkali extraction conditions, the protein extraction rate was as high as 74.33%. When 50% to 60% saturation range of ammonium sulfate solution was used for alkali-soluble protein recovery, the protein precipitation rate reached 90.19%, and the overall recovery rate of protein in *Chlamys farreri* reached 67.04%. In conclusion, this study provides a reference for the extraction and separation of *Chlamys farreri* protein, and provides a theoretical basis for the subsequent development and utilization of *Chlamys farreri* protein.

Keywords: *Chlamys farreri*; alkali dissolving method; ammonium sulfate precipitation method; extraction yield; protein

(责任编辑 李维卫)