

文章编号: 1004-7271(2006)03-0328-05

## 紫贻贝多糖脱除蛋白质方法的研究

李苹苹, 丁霄霖

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘 要** 探讨了酶法与 *Sevage* 法联用脱除紫贻贝 (*Mytilus edulis* Linnaeus) 多糖蛋白。通过正交中心组合实验, 应用响应面分析法考察酶法脱蛋白的工艺条件。结果表明, 酶法脱蛋白的最优工艺参数为: pH 7.1, 枯草杆菌中性蛋白酶加入量 0.5 U/mg 粗多糖, 温度 41 °C, 氯化钙加入量 7.4 mg/g, 时间 3 h。在酶解的基础上应用 *Sevage* 法脱除游离蛋白, 适宜的工艺条件为: 氯仿: 正丁醇 = 5:1, 料液比 4:1, 振摇时间 20 min。酶法与 *Sevage* 联用法脱除贻贝多糖蛋白的脱除率为 78.5%; 与其它传统脱蛋白方法比较, 该法适应范围广、样品损耗少、经济、快速、效果理想, 为多糖的分离纯化研究提供了有益的参考。

**关键词** 紫贻贝; 多糖; 枯草杆菌中性蛋白酶; *Sevage* 法; 蛋白质脱除

中图分类号: TS 254.1; S 986 文献标识码: A

## Study on method of protein removal from crude *Mytilus edulis* Linnaeus polysaccharides

LI Ping-ping, DING Xiao-lin

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract** A suitable approach, using enzyme and *Sevage* reagent, to remove protein from the crude blue mussel (*Mytilus edulis* Linnaeus) polysaccharides was suggested. Based on the central composite experiment, the technical conditions for enzymatic digestion were studied by response surface methodology. The results show that the optimal one was pH 7.0; *Bacillus Subtilis* neutral protease 0.5 U/mg crude polysaccharide; temperature 41 °C; calcium chloride 7.4mg/g; time 3h. Then *Sevage* method was applied to remove protein, and the proper conditions were: chloroform: 2-butanol = 5:1, polysaccharides solution: *Sevage* reagent = 4:1, time 20 min. Results showed, compared with other traditional methods, the enzymatic and *Sevage* method possessed many advantages, such as broad applicability, minimum sample loss, economical, rapid, and good performance. It gave some important information to the isolation and purification of other polysaccharides.

**Key words** *Mytilus edulis* Linnaeus; *Bacillus Subtilis* neutral protease; *Sevage* method; deproteinization

贻贝 (*Mytilus edulis* Linnaeus) 是一种食疗佳品, 近几年, 对贻贝的研究开发已引起国内外的广泛重视, 研究表明, 贻贝除含有八种人体必需氨基酸、维生素 B 类及多种微量元素外, 还含有丰富的活性多糖<sup>[1-4]</sup>。如何高效、快速地去除蛋白是多糖研究中一个重要而必需的课题。常用的去除多糖中蛋白质的方法存在流程长、成本高、多糖损失大等不足之处。近几年, 利用酶法与 *Sevage* 法联用脱除多糖蛋白已有报道<sup>[5-6]</sup>, 该法样品损耗少、快速、效果理想, 但用该法脱除贻贝多糖蛋白质尚未见报道。

收稿日期: 2005-10-17

作者简介: 李苹苹 (1975 - ), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 专业方向为天然活性成分及功能食品的研究与开发。Tel: 0510-5869535;

E-mail: lisalee\_818@Hotmail.com.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

样品 贻贝水煮浓缩液。取自浙江舟山,是贻贝传统产品(罐藏、速冻等)生产加工过程的下脚料,由水煮法打开贝壳时的煮出液浓缩制成。

主要试剂 枯草杆菌中性蛋白酶(1.3万 U/g,无锡杰能可公司);氯仿、浓硫酸、氯化钙、苯酚、萘酮、正丁醇等均为分析纯(中国医药集团上海化学试剂总公司)。

主要仪器 紫外-可见分光光度计(上海精密仪器有限公司);离心机(北京医用离心机厂);电子分析天平(上海天平仪器厂);CS501型超级恒温水浴(上海浦东荣丰科学仪器有限公司)。

### 1.2 常规成分测定方法

水分含量测定 参照 GB5009.3-85 进行;原料中粗蛋白含量测定 凯氏定氮法,参照 GB5009.5-85 进行;粗脂肪含量测定 索氏抽提法,参照 GB5009.6-85 进行;总糖含量测定 萘酮-硫酸法<sup>[7]</sup>;可溶性总糖含量测定 苯酚-硫酸法<sup>[8]</sup>;酶解液中蛋白质含量测定 Folin-酚法<sup>[8]</sup>,以牛白蛋白作标准曲线。

### 1.3 贻贝多糖脱蛋白方法

#### 1.3.1 酶法脱蛋白最优工艺条件的选择

首先采用枯草杆菌中性蛋白酶对原料进行脱蛋白处理,酶解条件按四因素五水平的三元二次正交中心组合实验来设计,四因素分别为 pH、加酶量、酶解温度、氯化钙加入量,响应值为酶解液离心后所得上清液中蛋白残留量(g)。根据单因素预试验结果选出最优水平作为试验的零水平,试验因素水平值见表 1(酶解时间均为 3h)<sup>[9]</sup>。根据中心组合设计原理,共设计 31 个实验点,其中可分为 24 个析因点和 7 次的零点试验。采用 SAS 统计分析软件的 RSREG 程序对实验所得数据进行回归拟和及方差分析<sup>[10]</sup>,得到响应值(Y)和各因子之间( $X_1, X_2, X_3, X_4$ )的函数关系并评价其显著性,根据响应面分析图可得到酶解的最佳工艺参数。

表 1 正交中心组合试验的因素与水平

Tab.1 The factors and levels of the central composite experiment

因素	单位	下水平 (-1)	零水平 (0)	上水平 (+1)	变化区间	下星号臂 ( $\gamma = -2$ )	上星号臂 ( $\gamma = +2$ )
pH( $X_1$ )		6.5	7.0	7.5	1.0	6.0	8.0
加酶量( $X_2$ )	mL/L 原料	0.4	0.5	0.6	0.2	0.3	0.7
酶解温度( $X_3$ )	℃	35	40	45	10	30	50
氯化钙加入量( $X_4$ )	mg/g	6	7	8	2	5	9

#### 1.3.2 酶法与 Sevage 法联用脱除贻贝多糖中蛋白

在酶法脱蛋白的基础上采用 Sevage 法脱游离蛋白。原料酶解液离心后所得上清液中加入氯仿-正丁醇混合溶液进行充分振摇,将游离蛋白变性成为不溶物质,经离心分离去除,测定水相中蛋白质残留量。Sevage 法脱蛋白所采用的工艺条件为:氯仿:正丁醇 = 5:1(v/v),料液比为 4:1(w/v),振摇时间为 20 min。经过三次脱蛋白处理后,测定其蛋白残留量。

## 2 结果与分析

### 2.1 原料基本成分含量分析

由表 2 可知,紫贻贝水煮浓缩液中含大量的糖类物质和较多的粗蛋白,二者的百分含量分别为 12.06% 和 5.36%。含量丰富的糖类物质为进一步从紫贻贝水煮浓缩液中提取生物活性多糖类物质提

供了物质依据。由于水煮浓缩液中蛋白质含量较高,对贻贝多糖的纯化影响较大,所以需对原料进行有效脱除蛋白的工艺处理。

表2 紫贻贝水煮浓缩液的营养成份

Tab.2 Nutrition components of the concentrated decoction of blue mussel

营养指标	水分	粗蛋白	总糖	可溶性总糖	粗脂肪
水煮浓缩液(%)	66.79	5.36	12.06	8.03	0.18

## 2.2 酶法脱蛋白最优工艺的确定

采用 SAS 统计分析软件的 RSREG 程序对实验所得数据(表3)进行回归拟和,可得响应值(Y)和各因子之间( $X_1, X_2, X_3, X_4$ )的函数关系如下:

$$Y = 0.453776 + 0.001124X_1 - 0.00169X_2 + 0.007073X_3 - 0.008187X_4 + 0.017808X_1X_1 + 0.0000601X_1X_2 + 0.004055X_1X_3 - 0.011169X_1X_4 + 0.018093X_2X_2 + 0.012605X_2X_3 - 0.002793X_2X_4 + 0.021899X_3X_3 + 0.00421X_3X_4 + 0.013953X_4X_4$$

表3 正交中心组合实验方案设计和实验结果

Tab.3 The design and results of the central composite experiment

设计点	X1	X2	X3	X4	响应值	设计点	X1	X2	X3	X4	响应值
1	-1	-1	-1	-1	0.5588	17	-2	0	0	0	0.4964
2	-1	-1	-1	1	0.5275	18	2	0	0	0	0.5265
3	-1	-1	1	-1	0.5161	19	0	-2	0	0	0.5193
4	-1	-1	1	1	0.5409	20	0	2	0	0	0.5059
5	-1	1	-1	-1	0.5002	21	0	0	-2	0	0.5229
6	-1	1	-1	1	0.5269	22	0	0	2	0	0.5327
7	-1	1	1	-1	0.5503	23	0	0	0	-2	0.5127
8	-1	1	1	1	0.5516	24	0	0	0	2	0.4793
9	1	-1	-1	-1	0.5255	25	0	0	0	0	0.4360
10	1	-1	-1	1	0.5337	26	0	0	0	0	0.4563
11	1	-1	1	-1	0.5536	27	0	0	0	0	0.4516
12	1	-1	1	1	0.5093	28	0	0	0	0	0.4535
13	1	1	-1	-1	0.5565	29	0	0	0	0	0.4657
14	1	1	-1	1	0.4515	30	0	0	0	0	0.4618
15	1	1	1	-1	0.5625	31	0	0	0	0	0.4516
16	1	1	1	1	0.5494						

回归方程各项的方差分析表见表4。对  $\alpha = 0.01, n_1 = 10, n_2 = 16$ , 查 F 分布表, 得  $F_{0.01}(10, 16) = 4.59$ , 求得  $F = (0.037037/10) / (0.007921/16) = 7.48, F > F_{0.01}$ , 所以方程的回归效果高度显著。方差分析表明, 方程二次项影响是显著的, 一次项和交互项影响是不显著的, 说明响应值和因子之间不是简单的线性关系, 而是二次关系。回归方程的复相关系数  $R^2 = 0.8238$ , 可用该回归方程代替真实实验点对实验结果进行分析和预测。

表4 回归方程各项的方差分析表

Tab.4 The variance analysis of the regression coefficient

方差来源	自由度	平方和	平均平方和	F	Prob > F
一次项	4	0.002908	0.000727	1.468673	0.257945
二次项	4	0.028914	0.007228	14.60161	0.0001
交互项	6	0.005215	0.000869	1.755848	0.172135
失拟项	10	0.007381	0.000738	8.20547	0.008988
重复项	6	0.00054	0.00009		
总和	30	0.044958			

由响应面分析图(图1)可得最佳取值为  $X_1 = 0.119 45$  ,  $X_2 = 0.165 28$  ,  $X_3 = -0.258 24$  ,  $X_4 = 0.396 69$  ,即 pH 7.1 枯草杆菌中性蛋白酶加入量 0.5 U/mg 粗多糖 ;温度 41 °C ;氯化钙加入量 7.4 mg/g ;因特征值均为正 ,由模型预测此时蛋白质残留量有最小值为 0.451 2 g。为了检验回归模型的准确性 ,以该法所确定的最佳条件进行实验 ,所得蛋白质残留量为 0.453 6 g ,蛋白质脱除率为 57.7% ,实验值与模型计算值相差 0.538% ,说明该模型能够较好地预测蛋白质残留量。

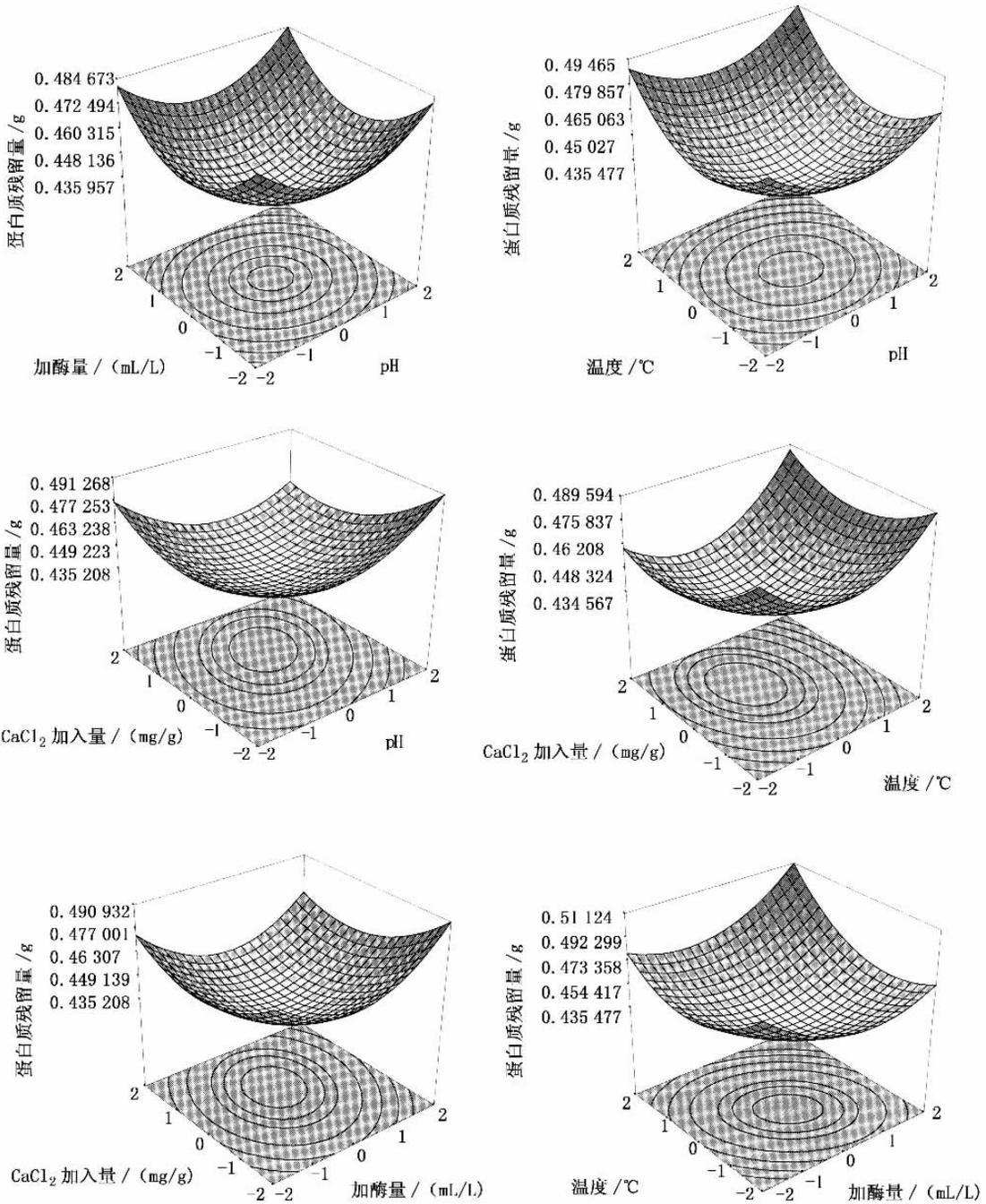


图 1 响应面图和等高线图

Fig.1 The stereogram of response surface analysis and contour map

### 2.3 酶法与 Sevage 法联用脱蛋白的效果及评价

原料液分别采用 Sevage 法(6次)、酶法与 Sevage 法联用来比较脱除蛋白效果及多糖得率,其结果如表 5 所示。实验表明,酶法与 Sevage 法联用,样液中无可见絮状沉淀产生,蛋白质脱除率为 78.5%,多糖得率为 74.9%,明显优于单独使用 Sevage 法。

表 5 不同脱蛋白方法的比较

Tab.5 The comparison of different methods to remove protein

方法	Sevage 法	酶法与 Sevage 法联用
蛋白脱除率	63.2%	78.5%
多糖得率	61.3%	74.9%

酶法与 Sevage 法联用优于 Sevage 法,原因分析如下:

传统的 Sevage 法脱蛋白,一般需反复处理样品多次,只能去除游离蛋白质,但与多糖紧密结合的蛋白质无法去除,同时每次除去蛋白质变性胶状物时,又会损失少量多糖。

酶法与 Sevage 法联用,原料经酶处理后,大部分游离蛋白质及部分与多糖结合的蛋白质被水解,贻贝粗多糖中蛋白质含量大大降低,仅需经过三次 Sevage 法脱蛋白处理,即可达到理想的去除蛋白的效果。

若是 Sevage 法与酶法联用,则后期酶解后复产生的游离蛋白质无法去除,效果不佳。即使采用酶法与 Sevage 法联用脱蛋白,粗多糖中仍含有少量蛋白质,这可能是由于部分蛋白质与多糖结合牢固形成糖复合物。要得到纯多糖制品,还需经过进一步的纯化。

#### 参考文献:

- [1] 马明华,易杨华,汤海峰. 厚壳贻贝多糖 MA 的分离纯化、理化性质及活性研究 [J]. 中国海洋药物, 2004 (4): 14 - 18.
- [2] 洪鹏志,章超桦,吴红棉,等. 翡翠贻贝糖胺聚糖的制备及生理活性初探 [J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(2): 158 - 16.
- [3] 姚滢,魏江洲,王俊,等. 厚壳贻贝多糖的提取和免疫学活性研究 [J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(8): 896 - 899.
- [4] 俞振良,乌义恩,李德英,等. 紫贻贝水提物对大鼠离体子宫、平滑肌的作用 [J]. 中国海洋药物, 1994 (3): 15 - 19.
- [5] 刘成梅,万茵,涂宗财,等. 百合多糖脱蛋白方法的研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(1): 89 - 90.
- [6] 马丽,覃小林,刘雄民,等. 不同的脱蛋白方法用于螺旋藻多糖提取工艺的研究 [J]. 食品科学, 2004, 25(6): 116 - 119.
- [7] 魏永成,罗福成,谢吉光,等. 蒽酮分光光度法测定海藻多糖总含量 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(3): 37.
- [8] 张惟杰(主编). 糖类复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.
- [9] 张农,王勤,李庐峰. 国产中性蛋白酶水解贻贝初探 [J]. 福建水产, 1996 (1): 53 - 56.
- [10] Li Quanhong, Fu Caili. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein [J]. Food Chemistry, 2005, 92(4): 701 - 706.