

三角帆蚌肉和外套膜中可溶性蛋白的回收与性质比较

严如娟¹, 刘承初^{1,*}, 李应森², 李家乐²

(1.上海海洋大学食品学院, 上海 200090; 2.上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090)

摘要:以采珠后的三角帆蚌肉和外套膜为原料, 分别采用纯水和 5% 的 NaCl 溶液对其中的水溶性和盐溶性蛋白(合称为可溶性蛋白)进行提取, 并对所获得蛋白质的一些性质进行比较研究。实验结果表明, 运用 1:10(m/V)纯水提 1h(沉淀再重复提取 1 次)和 1:10(m/V)5% NaCl 提取 24h 所得的可溶性蛋白回收率均达到 65% 以上, SDS-PAGE 电泳显示, 三角帆蚌外套膜和蚌肉的水溶性蛋白较一致, 而两者的盐溶性蛋白则不同, 差异表现在: 外套膜的盐溶性蛋白在 82~97kD 有 4 条带, 而蚌肉的盐溶性蛋白质只在 97kD 处有一条带。氨基酸分析结果表明, 所提取的可溶性蛋白必需氨基酸含量较高, 均达 46% 以上, 外套膜可溶性蛋白的呈味氨基酸(Glu 和 Asp)占氨基酸总量的 28% 以上, 蚌肉的高达 35% 以上。

关键词:三角帆蚌; 蚌肉; 外套膜; 可溶性蛋白; 回收; 性质

Recovery and Properties of Soluble Proteins from Meat and Mantle of *Hyriopsis cumingii*

YAN Ru-juan¹, LIU Cheng-chu^{1,*}, LI Ying-sen², LI Jia-le²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Soluble proteins were isolated from meat and mantle of *Hyriopsis cumingii* after pearls was harvested and the properties of the proteins isolates were compared. The recovery rates of both the water-soluble protein which was extracted by 1:10 (m/V) water for 1 h two times and the salt-soluble protein which was extracted by 1:10 (m/V) 5% NaCl for 24 h are above 65%. The SDS-PAGE results showed that the water-soluble protein from the mantle is similar to that from the meat. However, the salt-soluble proteins are different, the salt-soluble protein from the mantle having 4 bands from 82 kD to 97 kD, but the salt-soluble protein from the meat having only band at 97 kD. The amino acid composition showed that the soluble proteins isolates have rich essential amino acid above 46%, and the delicious amino acids (Glu and Asp) are above 28% in soluble proteins isolates from the mantle and above 35% in soluble proteins isolates from the meat.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; mantle; meat; soluble proteins; recovery; properties

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0334-04

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)俗称河蚌、珍珠蚌。三角蚌, 淡水双壳类软体动物, 属瓣鳃纲、珠蚌科, 帆蚌属^[1], 是我国特有的淡水珍珠养殖品种。目前, 三角帆蚌在剖蚌采珠后, 除了一些蚌壳用来做装饰品以及部分蚌肉用来加工饲料, 做成酱油外, 仍然有大部分作丢弃处理。周海燕等对三角帆蚌的外套膜和蚌肉进行了较全面的营养分析, 其中蛋白和多糖的总量占其干物

质重的 90% 左右^[2], 本实验在其基础上, 本着对采珠后的三角帆蚌废弃物综合利用的目的, 为对三角帆蚌外套膜和蚌肉中胶原蛋白和多糖的回收提取不产生影响, 采用水提和盐提的方法对三角帆蚌肉和外套膜中的水溶性、盐溶性蛋白进行提取, 并进行一些性质的比较研究, 以对三角帆蚌中的可溶性蛋白(本实验也将两者统称为可溶性蛋白)进行回收利用, 提高其附加值, 达到

收稿日期: 2008-05-31

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项项目(06-05-05B); 上海市高校高水平特色发展项目(6870309); 上海市重点学科建设项目(T1102)

作者简介: 严如娟(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物资源利用。E-mail: yrj8471@126.com

* 通讯作者: 刘承初(1965-), 女, 教授, 博士, 研究方向为海洋生物资源利用、营养与食品安全。E-mail: ccliu@shou.

对采珠后三角帆蚌软体废弃物进行回收利用的目的。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三角帆蚌外套膜及蚌肉由天地润珍珠养殖有限公司提供。将三角帆蚌(4~5年)剖开后,将外套膜中珍珠取出,采集外套膜及斧足部分的蚌肉,分别装入密实袋,保温盒中冰袋保温运回实验室,预冷的蒸馏水清洗分装后, -40℃冰箱冻藏。

除测氨基酸用的试剂为优级纯外,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

电热恒温鼓风干燥箱、电子天平、721型分光光度计、HITACHI CR 21G台式冷冻离心机、恒温水浴锅、Philips HR 2860均质机、Yamato IB-81低温培养箱、81-2型恒温磁力搅拌器、马弗炉、消化炉、HITACHI L-8500氨基酸自动分析仪;迷你垂直电泳槽北京六一厂。

1.3 方法

1.3.1 蛋白等电点的测定

称取60g匀浆混匀后的外套膜,按1:10(m/V)用蒸馏水提取1h,然后各取150ml提取液,调pH4.80、5.00、5.20、5.40四个水平,离心收集沉淀进行冷冻干燥,蛋白沉淀量最大的pH值,即蛋白等电点。

1.3.2 回收产物基本成分分析

水分的测定采用直接干燥法(GB 5009.3—2003);粗蛋白的含量采用微量凯氏定氮法(GB5009.5—2003),粗蛋白与总氮的换算系数采用6.25;总糖的含量采用苯酚硫酸法测定(GB/T 9695.31—91);脂肪的含量采用索氏抽提法(GB 5009.6—2003);灰分的测定采用灼烧重量法(GB 5009.4—2003)。

1.3.3 可溶性蛋白回收率的计算

本研究将回收获得的水溶性和盐溶性蛋白合称为可溶性蛋白。

$$\text{可溶性蛋白回收率} = \frac{\text{水溶性蛋白和盐溶性蛋白的蛋白总量}}{\text{外套膜或蚌肉中可溶性蛋白理论含量}} \times 100\%$$

式中,可溶性蛋白的理论值为粗蛋白减去胶原蛋白的值。

1.3.4 可溶性蛋白的氨基酸组成测定

采用氨基酸自动分析仪进行氨基酸分析,样品采用6mol/L盐酸110℃水解24h,显色剂为茚三酮溶液,详细方法参考GB/T 5009.124—2003。

1.3.5 可溶性蛋白的SDS-PAGE电泳

本实验使用迷你垂直电泳槽,用SDS-PAGE聚丙烯

酰胺凝胶不连续电泳^[3-4]对蛋白质分子量进行测定,并比较外套膜和蚌肉可溶性蛋白的区别。聚丙烯酰胺凝胶可溶性胶的浓度为7.5%,浓缩胶为4.5%。

2 结果与分析

2.1 三角帆蚌可溶性蛋白等电点的确定

对三角帆蚌外套膜水溶性蛋白进行等电点测定,结果如图1所示。

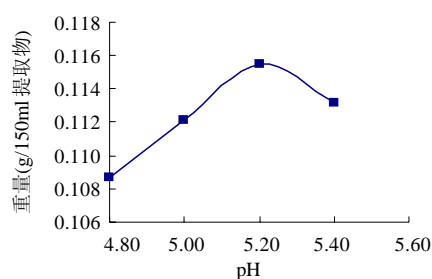


图1 三角帆蚌外套膜水溶性蛋白的等电点

Fig.1 Water soluble protein from mantle of pl of *Hyriopsis cumingi*

由图1可看出在,pH5.20时,蛋白沉淀最多,可以得出外套膜水溶性蛋白的等电点为5.20,与周海燕测得的三角帆蚌蚌肉可溶性蛋白(碱提方法)得到的5.20的等电点^[5]一致,故判断外套膜和蚌肉不同提取方法得到的蛋白的等电点较一致,因此,确定本实验中外套膜以及蚌肉的水溶性及盐溶性蛋白都采取pH5.20进行沉淀。

2.2 提取工艺的确立

由于本实验在回收可溶性蛋白后,将继续对胶原蛋白进行提取回收,所以参考一些胶原蛋白去杂蛋白的方法,为避免碱处理对一些肽键造成水解,采用水提和盐提,对实验条件不断进行改善和重复验证后,得到一套较为可行的实验工艺流程(图2)。

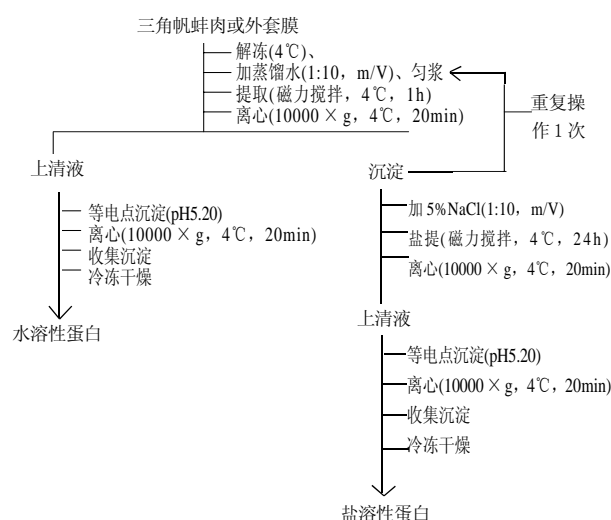


图2 工艺流程图

Fig.2 Techincs process

2.3 三角帆蚌外套膜及蚌肉可溶性蛋白的基本组成及回收率

2.3.1 三角帆蚌外套膜及蚌肉可溶性蛋白的基本组成

根据 1.3.2 中的方法, 对提取得的外套膜和蚌肉可溶性蛋白进行基本组分测定, 结果如表 1 所示。

表 1 三角帆蚌外套膜、蚌肉可溶性蛋白的主要成分含量(%), $\bar{X} \pm SD$
Table 1 Main compositions of soluble proteins isolates from mantle and meat of *Hyriopsis cumingii* (%), $\bar{X} \pm SD$

成分	水溶性蛋白产品		盐溶性蛋白产品	
	外套膜	蚌肉	外套膜	蚌肉
水分	12.82±0.05	13.24±0.07	15.8±0.05	14.49±0.06
蛋白	66.54±0.08	73.93±0.09	75.65±0.33	79.18±0.17
总糖	12.88±0.46	9.65±0.23	0.61±0.03	0.17±0.05
脂肪	6.91±0.23	3.81±0.28	2.73±0.19	2.52±0.34
灰分	1.22±0.07	1.77±0.11	4.36±0.23	3.54±0.17

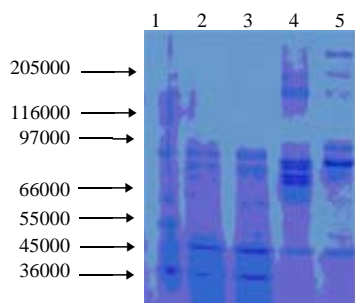
由表 1 可以看出, 所提得的可溶性蛋白含量除外套膜水溶性蛋白为 66.54% 外, 其余均高于 73%, 其中水溶性蛋白多糖含量较高, 占到 10% 左右, 可能是一些蛋白结合型多糖。产物的水分含量仍然较高, 要想进一步提高可溶性蛋白提取物的蛋白含量, 可以适当延长冷冻干燥的时间。

2.3.2 三角帆蚌可溶性蛋白的回收率

根据提取得的水溶性蛋白和盐溶性蛋白总量及蛋白含量和所测得的外套膜和蚌肉中可溶性蛋白的理论含量, 计算可溶性蛋白的回收率, 得到外套膜可溶性蛋白的回收率为 66.21%, 蚌肉可溶性蛋白的回收率为 73.41%。本实验确立的可溶性蛋白提取工艺流程实用可行。

2.4 外套膜和蚌肉可溶性蛋白的比较

对提取到的外套膜和蚌肉的水溶性蛋白及盐溶性蛋白取样, 用样品溶解液溶解以后, 按照 1.3.4 中的方法进行 SDS-PAGE 电泳, 4 个样品的浓度基本一致, 电泳结果如图 3 所示。



1. 标准蛋白: 兔肌源性肌球蛋白(205kD)、大肠杆菌源性 b- 半乳糖苷酶(116kD)、兔肌源性磷酸酶 b(97kD)、牛血清蛋白(66kD)、牛肝源谷氨酸脱羧酶(55kD)、鸡蛋乳清蛋白(45kD)、兔肌源 3- 磷酸甘油醛脱氢酶(36kD); 2. 外套膜水溶性蛋白; 3. 蚌肉水溶性蛋白; 4. 外套膜盐溶性蛋白; 5. 蚌肉盐溶性蛋白。

图 3 三角帆蚌外套膜与蚌肉可溶性蛋白比较

Fig.3 Comparison of soluble proteins from mantle and meat of *Hyriopsis cumingii*

由图 3 可知, 比较三角帆蚌外套膜、蚌肉的水溶性蛋白及盐溶性蛋白, 泳道 1 为标准分子量, 泳道 1 和 2 显示外套膜和蚌肉的水溶性蛋白的电泳图谱一致, 主要分子量集中在 45kD 和 36kD, 在 97kD, 有少量蛋白溶出。泳道 3 和 4 显示, 外套膜的盐溶性蛋白在 82~97kD 共有 4 条带的分布, 且 4 条带的浓度分布较均匀, 而蚌肉的盐溶性蛋白分子量集中在 97kD, 其浓度大约是外套膜盐溶性蛋白 4 条带的总和。因为有关外套膜的可溶性蛋白部分的研究还尚未见报道, 其特殊结构还有待进一步的研究探讨。

此外, 三角帆蚌肉和外套膜的盐溶性蛋白在 45kD 也有少量分布, 是水提过程未提取完全的水溶性蛋白部分。周海燕的碱提方法得到的蚌肉经可溶性蛋白电泳验证分子量分布在 97.4kD 和 45kD^[5], 本实验蚌肉提取得的水溶性蛋白及盐溶性蛋白的电泳图组合以后, 与其结果基本一致。

2.5 可溶性蛋白氨基酸的组成

对提取得的外套膜、蚌肉水溶性及盐溶性蛋白, 经酸水解, 氨基酸自动分析仪测定, 结果如表 2 所示。

由表 2 可得, 三角帆蚌外套膜和蚌肉提取到的水溶性蛋白和盐溶性蛋白的必需氨基酸含量都较高, 外套膜水溶性蛋白和盐溶性蛋白的必需氨基酸含量分别占到它们氨基酸总量的 50.46% 和 48.23%, 蚌肉的为 47.17% 和 46.28%, 所提得的可溶性蛋白必需氨基酸含量高于外套膜、蚌肉本身的必需氨基酸含量(金华三角帆蚌 39.68%, 湖州三角帆蚌 39.64%)^[6], 周海燕^[1]测得外套膜和蚌肉必需氨基酸含量分别为 32.60% 和 42.25%。

从表 2 可以看出, 呈鲜味的 Asp 和 Glu 含量最高, 两者占外套膜水溶性蛋白、蚌肉水溶性蛋白、外套膜盐溶性蛋白和蚌肉盐溶性蛋白氨基酸总量的 28.41%、28.79%、35.70% 和 36.28%, 因此三角帆蚌可溶性蛋白可以用来作为调味品添加到食品中。

比较外套膜和蚌肉的水溶性及盐溶性蛋白氨基酸组成, 水溶蛋白的区别很小, 相差最大的为 Thr、Cys 和 Pro, 分别相差 2.74%、0.91% 和 1.04%。两者的盐溶性蛋白之间仅在胱氨酸的含量上相差 1.14%, 其余的差值均小于 1%。总体来看, 外套膜可溶性蛋白的胱氨酸含量高于蚌肉, 胱氨酸被证明具有一定的多酚氧化酶抑制作用^[7], 产珍珠的外套膜的蛋白尤其是胶原蛋白在对多酚氧化酶的抑制作用可能要高于蚌肉, 这有待进一步对胶原蛋白提取后进行研究。

3 结 论

3.1 外套膜水溶性蛋白的等电点为 pH5.20, 与周海燕碱提的蚌肉可溶性蛋白等电点一致, 本实验中所有可溶性蛋白则均采用了 pH5.20 进行沉淀。

表2 三角帆蚌外套膜和蚌肉可溶性蛋白的氨基酸组成 (mg/g)
Table 2 Amino acid compositions of soluble proteins from mantle and foot meat of *Hyriopsis cumingii* (mg/g)

氨基酸名称	水溶性蛋白		盐溶性蛋白	
	外套膜	蚌肉	外套膜	蚌肉
天冬氨酸(Asp)	43.26(112.78)	64.14(117.58)	56.08(118.45)	63.74(115.93)
苏氨酸(Thr)	20.67(58.89)	17.18(31.49)	21.55(45.52)	25.46(46.31)
丝氨酸(Ser)	18.79(48.99)	27.92(51.18)	23.82(50.31)	27.34(49.73)
谷氨酸(Glu)	65.73(171.36)	92.92(170.34)	112.94(238.54)	135.74(246.89)
甘氨酸(Gly)	17.07(44.50)	25.63(46.98)	13.88(29.32)	14.35(26.10)
丙氨酸(Ala)	20.33(53.00)	31.08(56.98)	30.68(64.80)	37.1(67.48)
胱氨酸(Cys)	16.17(42.16)	18.06(33.11)	18.08(38.19)	14.72(26.77)
缬氨酸(Val)	24.75(64.52)	35.58(65.22)	22.44(47.40)	24.94(45.36)
蛋氨酸(Met)	12.06(31.44)	14.57(26.71)	12.41(26.21)	15.15(27.55)
异亮氨酸(Ile)	19.68(51.31)	28.69(52.59)	20.64(43.59)	25.34(46.09)
亮氨酸(Leu)	30.04(78.31)	44.59(81.74)	53.31(112.60)	61.08(111.09)
酪氨酸(Tyr)	18.51(48.26)	25.4(45.56)	19.32(40.81)	21.13(38.43)
苯丙氨酸(Phe)	19.82(51.67)	29.54(54.15)	16.3(34.43)	18.31(33.30)
赖氨酸(Lys)	31.87(83.09)	49.46(90.67)	39.24(82.88)	48.35(87.94)
组氨酸(His)	10.09(26.30)	14.11(25.87)	6.78(14.32)	8.98(16.33)
脯氨酸(Pro)	14.74(38.43)	26.62(48.80)	5.96(12.59)	8.1(14.73)
必需氨基酸(EAA)	193.55(504.59)	263.09(482.29)	223.30(471.65)	254.47(462.83)
总量	383.58(1000)	545.5(1000)	473.46(1000)	549.81(1000)

注：括号外数字代表该氨基酸占该可溶性蛋白的质量分数(mg/g)；括号内数字代表该氨基酸占总氨基酸的质量分数(mg/g)。

3.2 根据本实验确立的实验方案，可以得到蛋白含量在 66% 以上的可溶性蛋白产品，其余成分主要为多糖和水分，而蚌肉多糖有一定的抑肿瘤作用，可以不去除。

3.3 通过 SDS-PAGE 电泳对三角帆蚌外套膜和蚌肉可溶性蛋白进行比较，结果表明，两个部位的水溶性蛋白图谱一致，而外套膜的盐溶性蛋白构成比较特殊，有待进一步考究。

3.4 通过对可溶性蛋白产物的氨基酸测定，四种可溶性蛋白的必需氨基酸含量都较丰富，均在 45% 以上，Glu 和 Asp 两种呈味氨基酸含量最高，可以作为优质蛋白添加剂和调味剂进行开发利用。

3.5 本提取方案条件温和，且均在低温条件下进行，未涉及强酸强碱的使用，对于水溶性蛋白等电点沉淀以后的上清液，可以用乙醇对多糖进行沉淀回收，而去除盐溶性蛋白后的沉淀主要含有既不溶于水，又不

溶于 5% NaCl 的胶原蛋白，可以进一步采用醋酸胃蛋白酶的方法对胶原蛋白进行回收利用，这样就使得采珠后的三角帆蚌肉和外套膜得到最大程度的回收利用，得到的多糖和胶原蛋白产品可以进行相应的活性研究和产品开发，应用于医药和美容业。

参考文献：

- [1] 钱名全. 名特水产介绍——三角帆蚌[J]. 湖南农业, 2004 (8): 16.
- [2] 周海燕, 刘振华, 刘承初, 等. 采珠后三角帆蚌蚌肉和外套膜的营养成分分析[J]. 食品工业科技, 2006, 27 (11): 170-173.
- [3] 李建武, 肖熊庚, 余瑞元, 等. 生物化学原理与方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 216-223.
- [4] 张承圭, 王传怀, 袁玉荪. 生物化学仪器分析及技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 191-214; 351-385.
- [5] 周海燕. 采珠后三角帆蚌废弃物中蛋白质的回收与理化特性研究[D]. 上海: 上海水产大学, 2006: 30-31; 39.
- [6] 杨文鸽. 三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)营养成分的分析[J]. 浙江水产学院学报, 1997, 16 (3): 201-207.
- [7] 胡健饶, 曹明富. 三角帆蚌多糖抑瘤作用的实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2003 (1): 11-13.