

南极磷虾蛋白质提取条件优化

高飞¹, 韩春然¹, 石彦国¹, 刘志东^{2*}, 冯实¹, 马庆保³

¹ 哈尔滨商业大学食品工程学院, 哈尔滨 150076; ² 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; ³ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 南极磷虾是地球上多细胞生物中生物量最大的单种生物资源之一。南极磷虾因其巨大的生物资源量及潜在的应用价值而受到广泛关注。本文以冷冻南极磷虾为原料, 优化了南极磷虾蛋白质的提取条件。在单因素实验的基础上, 通过响应面优化实验研究了离心时间、料液比、匀浆时间等对南极磷虾蛋白质得率的影响。结果表明, 南极磷虾蛋白质最佳的提取条件为: 碱溶阶段 pH 11.5, 酸沉阶段 pH 5.5, 离心温度 4 °C, 离心转速 10000 rpm, 离心时间 10 min, 料液比 1:3 (w/v), 匀浆时间 3.0 min; 在以上提取条件下的南极磷虾蛋白质得率为 10.81%。

关键词: 南极磷虾; 蛋白质; 碱溶酸沉; 得率

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.025

Optimization of Extraction Condition of Protein from *Euphausia superba*

GAO Fei¹, HAN Chun-ran¹, SHI Yan-guo¹, LIU Zhi-dong^{2*}, FENG Shi¹, MA Qing-bao³

¹ School of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 50076, China;

² East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

³ College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: As one of the largest biomass of multi-cellular animal species on earth, Antarctic krill (*Euphausia superba*) is paid more attention for its large biomass and potential value in recent years. To improve the extraction yield of Antarctic krill protein, Box-Behnken design was employed based on the single factor experiments. The independent variables, namely centrifugation temperature, solid-liquid ratio and homogenization time on the extraction yield of Antarctic krill protein were evaluated by response surface methodology (RSM). The results showed that the optimum conditions for extracting protein from Antarctic krill were as follows: pH value of alkali-dissolving stage 11.5, pH value of acid-precipitation stage 5.5, centrifugation temperature 4 °C, centrifugation rate 10000 rpm, centrifugation time 10 min, solid-liquid ratio 1:3 (w/v), homogenization time 3 min. Under the optimum conditions, the extraction yield of Antarctic krill protein reached 10.81%.

Key words: Antarctic krill; protein; alkali solubilization and acid precipitation; extraction yield

南极磷虾 (*Euphausia superba*) 是一种生活在南极海域的小型海洋浮游生物, 生物资源量巨大, 年可捕捞量约为 0.6 ~ 1.0 亿吨, 而且不会影响南大洋生态系统的平衡, 目前处于尚未充分开发利用的状态^[1,2]。南极磷虾蛋白质化学组成分析表明其含有 9 种人体必需的氨基酸和人体半必需的精氨酸、组氨酸, 并满足 FAO/WHO/UNU 规定的人体需要量。Grantham 研究发现南极磷虾蛋白质含量约为

60.0% ~ 80.0% (以干基计), 新鲜南极磷虾蛋白质含量约为 11.9% ~ 15.4%^[3]。因此, 南极磷虾有望成为人类未来可以开发利用的一种资源量巨大, 优质的潜在蛋白质资源。由于南极磷虾体内含有活性较高的降解酶, 这些酶会在南极磷虾死后释放出来导致南极磷虾发生自溶现象。因此, 捕获后的南极磷虾须在 3 h 内加工处理完成。这些因素影响了南极磷虾蛋白质的提取。Chen YC 等开展了南极磷虾蛋白质的单次提取技术研究^[4], Wang LZ 等探索了南极磷虾蛋白质的多次提取技术^[5], 李芳等^[6]开展了 pH 对南极磷虾蛋白质分离回收的影响。碱溶酸沉法由于可以实现蛋白质的规模化连续提取, 具有

收稿日期: 2015-09-24 接受日期: 2015-12-16

基金项目: 上海市自然科学基金 (13ZR1449900); 国家自然科学基金 (31471687); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2011M06); 上海市科技兴农项目 (2015-5-5)

* 通讯作者 E-mail: zd-liu@hotmail.com

蛋白质得率高,功能特性影响小的特点而已用于鱼肉等动物性蛋白质的提取^[4]。但是关于南极磷虾蛋白质提取条件更系统的研究报道还较少。

南极磷虾作为一种具有战略性意义的极地海洋生物资源具有独特的重要地位,其深度开发利用具有重要的现实意义^[7,8]。本文以南极磷虾为研究对象,在单因素实验的基础上,采用响应面分析法优化影响南极磷虾蛋白质得率的主要因素,综合考虑生产成本等因素,确定碱溶酸沉法提取南极磷虾蛋白质的较优条件,为南极磷虾蛋白质的深度开发利用提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

南极磷虾(*Euphausia superba*)由上海开创远洋渔业有限公司2014年于南极设得兰群岛海域捕获,运回实验室于-80℃贮藏备用。

TGI-16M高速台式冷冻离心机(湖南湘仪试验仪器开发有限公司);电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);PHS-3C型pH计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂);PRO250均质器(美国Pro Scientific公司);BM255C搅拌机(美的集团有限公司);UV-2102PCS型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯分析仪器有限公司);真空冷冻干燥机(LABCONCO FreeZone公司)。试剂均为分析纯以上级别。

1.2 实验方法

1.2.1 南极磷虾蛋白质的提取工艺流程与得率的计算

冷冻南极磷虾→室温解冻→匀浆→调节pH→离心→回收上清液→调节pH→离心→回收沉淀→

表1 南极磷虾蛋白质提取的因素水平表

Table 1 Factors and levels of extraction condition of Antarctic krill protein

因素 Factor	编码水平 Coding level		
	-1	0	1
离心时间(min) Centrifugation time	5	10	15
料液比(w/v) Solid-liquid ratio	1:1	1:3	1:6
匀浆时间(min) Homogenization time	2	3	5

2 结果与讨论

2.1 南极磷虾蛋白质提取的单因素实验结果

2.1.1 碱溶阶段pH对南极磷虾蛋白质得率的影响

碱溶阶段pH对南极磷虾蛋白质得率的影响结

调节pH至7.0→真空冷冻干燥→南极磷虾蛋白质(-80℃贮存)。

南极磷虾提取液蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白为标准蛋白质制作标准曲线并建立回归方程: $Y = 5.7675X + 0.0099$ ($R^2 = 0.9989$),式中:Y为样品中蛋白质含量,X为吸光度值^[9]。

南极磷虾蛋白质得率(%) =

$$\frac{\text{提取蛋白质含量(g)}}{\text{样品含量(g)}} \times 100\%$$

1.2.2 单因素实验

参考文献报道方法^[8],分别考察碱溶阶段pH(11、11.5、12、12.5),酸沉阶段pH(4.5、5.0、5.5、6.0),离心温度(0、4、8、12℃),离心时间(5、10、20、30min),料液比(1:3、1:6、1:9、1:12(w/v)),匀浆时间(1、2、3、5min)和离心速度(6000、8000、10000、12000rpm)对南极磷虾蛋白得率的影响,综合考察后确定较佳的提取条件进一步优化。

1.3 响应面实验

在单因素实验的基础上,采用Design-Expert(8.0.5版本)软件的Box-Behnken设计模块进行优化。以离心时间(A,min)、料液比(B,w/v)、匀浆时间(C,min)为自变量,以南极磷虾蛋白质得率(Y,%)为因变量,设计了3因素3水平共17个试验点的响应面分析试验,其中12个为析因试验,5个为中心试验,其因素水平分析选取见表1。实验设计方案如表1所示。

1.4 数据处理方法

每组实验重复3次;实验数据采用SPSS 17.0软件处理,进行t检验和方差分析;实验结果采用(平均值±标准差)表示。 $P < 0.05$ 为差异水平显著, $P < 0.01$ 为差异水平极显著。

果见图1。由图1可知,南极磷虾蛋白质溶解度随着体系的pH升高而升高,蛋白质溶出呈现先增加后降低的趋势。pH在11.5时南极磷虾蛋白质得率最高,在pH为12.5时最低。所以,随着体系pH的逐渐增大,得率逐渐提高;当体系的pH超过临界点时,蛋白质分子之间难以聚合沉淀,南极磷虾蛋白质

得率降低^[10]。另外,在极端强碱条件下,可能会引起蛋白质空间结构遭到破坏,导致了蛋白质的得率最低。因此,确定 pH 11.5 为最适的碱溶阶段 pH。

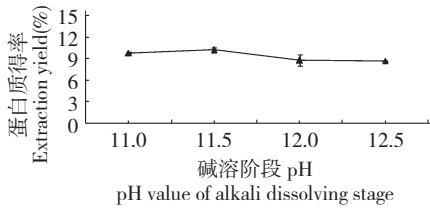


图1 碱溶阶段 pH 对南极磷虾蛋白质得率的影响

Fig. 1 Effect of pH value of alkali dissolving stage on the extraction yield of Antarctic krill protein

2.1.2 酸沉阶段 pH 对南极磷虾蛋白质得率的影响

酸沉阶段 pH 对蛋白质得率的影响结果如图 2。由图 2 可知,在酸沉阶段,南极磷虾蛋白质得率呈现先增高后降低的趋势,在 pH 5.5 时得率最高;但是低于碱溶阶段的蛋白质含量。原因可能是由于碱溶阶段导致不同蛋白质组分溶出较多。由于蛋白质是两性电解质,在某一特定 pH 的体系中,蛋白质基团所带的正电荷与负电荷数恰好相等;此时体系中蛋白质的溶解度最小,蛋白质容易发生聚集、沉淀。综合考虑,酸沉阶段最适 pH 为 5.5。采用碱溶酸沉法提取南极磷虾蛋白质得率比较低的原因可能与南极磷虾含有降解酶和较高含量的水溶性蛋白质有关,特别是其中的肌浆蛋白质的回收主要与离子强度有关。

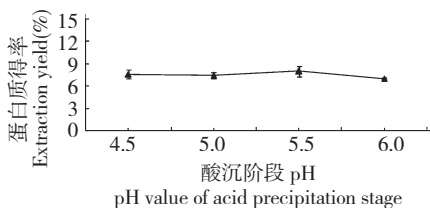


图2 酸沉阶段 pH 对南极磷虾蛋白质得率的影响

Fig. 2 Effect of pH value of acid precipitation stage on the extraction yield of Antarctic krill protein

2.1.3 离心温度、离心时间、料液比、匀浆时间和离心速度对南极磷虾蛋白质得率的影响

离心温度(A)、离心时间(B)、料液比(C)、匀浆时间(D)和离心速度(E)对南极磷虾蛋白质得率的影响见图 3。由图 3(A)可知,随着离心温度的升高,南极磷虾蛋白质的得率呈现先升高后降低的趋势。在 4 °C 时蛋白质得率最高,在 12 °C 时蛋白质得

率最低。分析其原因,可能是由于随着温度的升高,分子运动速度加快,蛋白质分子的构象发生变化,立体结构的伸展促进了蛋白质的增溶,使蛋白质较容易从原料中溶出。研究表明,温度超过一定值时水分子的热运动加剧使得蛋白质结构展开,维持蛋白质空间构象的次级键被破坏,非极性基团的暴露,导致蛋白质分子间发生聚集和沉淀,造成溶解度的降低;随着体系温度的升高,疏水基团充分暴露,形成由二硫键连接的高分子量不溶聚合物,宏观表现为蛋白质的溶解度下降。通常,大部分蛋白质在碱性条件下溶解度比较好,然而在碱溶阶段结束后,离心弃去沉淀收集上清液的环节,将会弃去一部分不溶性的固形物,导致碱溶酸沉后的蛋白质得率降低。因此,最适离心温度为 4 °C。

由图 3(B)可知,随着离心时间的延长,南极磷虾蛋白质的得率呈现先增加后降低的趋势,在离心时间为 10 min 时南极磷虾蛋白质的得率最高,在 30 min 时南极磷虾蛋白质得率最低。分析其原因,可能是由于溶剂与蛋白质需要充分接触一定的时间,才能使蛋白质逐步地溶出;接触时间过短,蛋白质溶出效果不好。因此,综合考虑确定最适离心时间为 10 min。

由图 3(C)可知,料液比在 1:3 时南极磷虾蛋白质得率最高,在 1:12 时南极磷虾蛋白质得率最低。研究表明,较高的料液比可以提高体系的粘度,加快传质的过程;但料液比过小时,在一定程度上也会抑制南极磷虾蛋白质的溶出。料液比过大时,南极磷虾蛋白质在体系中过于分散,有效组分含量过低,增加了回收的难度,导致蛋白质的得率偏低;此外,料液比过大,还需消耗大量的碱和水,也增加了后处理的能耗和产品成本^[10]。因此,综合考虑确定南极磷虾蛋白质提取最适料液比为 1:3。

由图 3(D)可知,匀浆时间在 3 min 时南极磷虾蛋白质得率最高,在 1 min 时南极磷虾蛋白质得率最低,总体呈现先增高后降低的趋势。可能是由于匀浆时间短,物料没有得到充分的匀浆,南极磷虾蛋白质没有充分的溶出,导致南极磷虾蛋白质得率最低。在 3 min 时,南极磷虾蛋白质经过处理,充分释放、分散在溶液中,此时南极磷虾蛋白质的得率最高。但如果匀浆时间过长,匀浆也会产生大量的热引起蛋白质的变性。因此,综合考虑确定南极磷虾蛋白质提取最适匀浆时间为 3 min。

由图 3(E)可知,随着离心速度的增加,南极磷

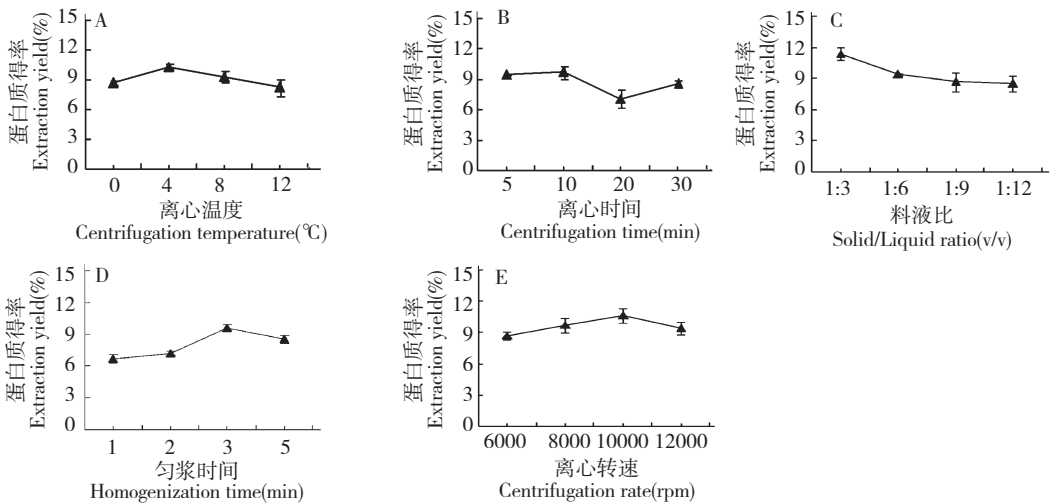


图3 离心温度(A)、离心时间(B)、料液比(C)、匀浆时间(D)和离心速度(E)对南极磷虾蛋白质得率的影响

Fig. 3 Effect of centrifugation temperature (A), centrifugation time (B), solid-liquid ratio (C), homogenization time (D) and centrifugation rate (E) on the extraction yield of Antarctic krill protein

虾蛋白质得率呈现先增加后降低的趋势。在离心速度为 10000 rpm 时,南极磷虾蛋白质的得率最高;离心速度为 6000 rpm 时,南极磷虾蛋白质的得率最低。可能是由于比重不同的物质所受到的离心力的不同导致沉降速度存在差异,最终的分离效果也不

同。因此,综合考虑南极磷虾蛋白质提取的最适离心速度为 10000 rpm。

2.2 响应面模型的建立及结果

2.2.1 响应面模型的建立及显著性检验

表2 响应面实验设计与结果

Table 2 Design and results of the response surface methodology

试验号 No.	A 离心时间 Centrifugation time (min)	B 料液比 Solid-liquid ratio (w/v)	C 匀浆时间 Homogenization time (min)	Y 蛋白质得率 Extraction yield (%)
1	-1	1	0	8.42
2	1	0	1	8.67
3	-1	-1	0	8.04
4	0	0	0	10.27
5	-1	0	1	8.71
6	0	0	0	7.88
7	0	1	1	10.69
8	0	0	0	9.15
9	-1	0	-1	8.37
10	0	1	-1	8.51
11	0	0	0	8.61
12	1	-1	0	8.89
13	0	-1	1	10.76
14	1	1	0	8.92
15	0	0	0	10.89
16	0	-1	-1	10.68
17	1	0	-1	7.90

以 A(离心时间, min)、B(料液比, w/v) 和 C(匀浆时间, min) 为变量, 以南极磷虾蛋白质的得率为响应值, 采用响应面方法优化南极磷虾蛋白质的提取条件, 结果见表 2。采用 Design-Expert. 8. 05b, 求得南极磷虾蛋白质得率对离心时间(A)、料液比(B)、匀浆时间(C)的二次多项回归模型:

$$\text{南极磷虾蛋白质得率}(\%) = 10.76 - 0.23A + 0.21B + 0.32C + 0.36AB + 0.24AC - 0.035BC - 1.11A^2 - 0.99B^2 - 1.12C^2$$

对该回归模型及回归方程的各项系数进行方差

表 3 回归模型的方差分析结果

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) of the regression model

方差来源 Source	平方和 Square sum	自由度 df	均方 Mean square	F	显著性 Sig.
模型 (Model)	18.32	9	2.23	90.37	< 0.0001 ***
A-A	0.25	1	0.25	5.67	0.0024 **
B-B	0.33	1	0.33	7.61	0.0045 **
C-C	0.48	1	0.48	9.61	0.0026 **
AB	0.56	1	0.56	10.54	0.0172 *
AC	0.21	1	0.21	4.12	< 0.0001 ***
BC	4.237E-003	1	4.237E-003	0.079	0.0034 **
A ²	4.89	1	4.89	101.32	< 0.0001 ***
B ²	4.23	1	4.23	85.48	< 0.0001 ***
C ²	5.58	1	5.58	115.13	< 0.0001 ***
残差 Residual	0.39	7	0.048		
失拟性 Lack of Fit	0.057	3	0.077	0.32	0.8567

注: *** $P < 0.001$ 为极显著, ** $P < 0.01$ 为非常显著, * $P < 0.05$ 为显著。

Note: *** $P < 0.001$ indicated extremely significant, ** $P < 0.01$ indicated highly significant, * $P < 0.05$ indicated significant.

表 4 回归方程的可信度分析

Table 4 Creditability analysis of regression equation

项目 Item	变异系数 C. V. %	拟合系数 R-squared	校正拟合系数 Adj R-squared	预测拟合系数 Pre R-squared	信噪比 Adeq precision
	1.29	0.9917	0.9781	0.9299	32.479

2.2.2 响应曲面分析

根据回归模型方程, 做出相应的响应面图和等高线图, 如图 4 所示。等高线的形状可以反映交互项之间作用的强弱, 椭圆形表示两因素交互作用显著, 而圆形则与之相反。A(离心时间)与 C(匀浆时间)之间交互作用非常显著, 等高线表现为椭圆形; 由结果分析可知, 响应面法对南极磷虾蛋白质得率的优化结果为: 离心时间 10.13 min、料液比 1:3.44、匀浆时间 3.29 min, 南极磷虾蛋白质得率的理论

分析、显著性检验, 结果如表 3 所示。模型 $P < 0.0001$, 表明模型方程高度显著, 即不同条件对南极磷虾蛋白质得率影响高度显著; 由回归方程的各项系数显著性检验可知, 二次项离心时间、料液比、匀浆时间 P 均 < 0.0001 , 对南极磷虾蛋白质得率的影响高度显著; 一次项离心时间、料液比、匀浆时间 P 均 > 0.0001 , 对南极磷虾蛋白质得率的影响不显著; 交互项的 AC(离心时间与匀浆时间) $P < 0.0001$, 对南极磷虾蛋白质得率影响显著。

2.3 验证实验

为了验证响应面优化实验所得结果的可靠性, 拟采用上述优化条件进行南极磷虾蛋白质提取验证试验, 考虑到实际操作的可行性, 将南极磷虾蛋白质提取理论技术参数修正为: 料液比(w:v) 1:3, 离心温度 4℃、离心转速 10000 rpm、匀浆时间 3.0 min、离心时间 10 min。在此条件下南极磷虾蛋白质的得率为 10.81%, 与理论值 10.67% 的相对误差为 1.30

值为 10.67%。

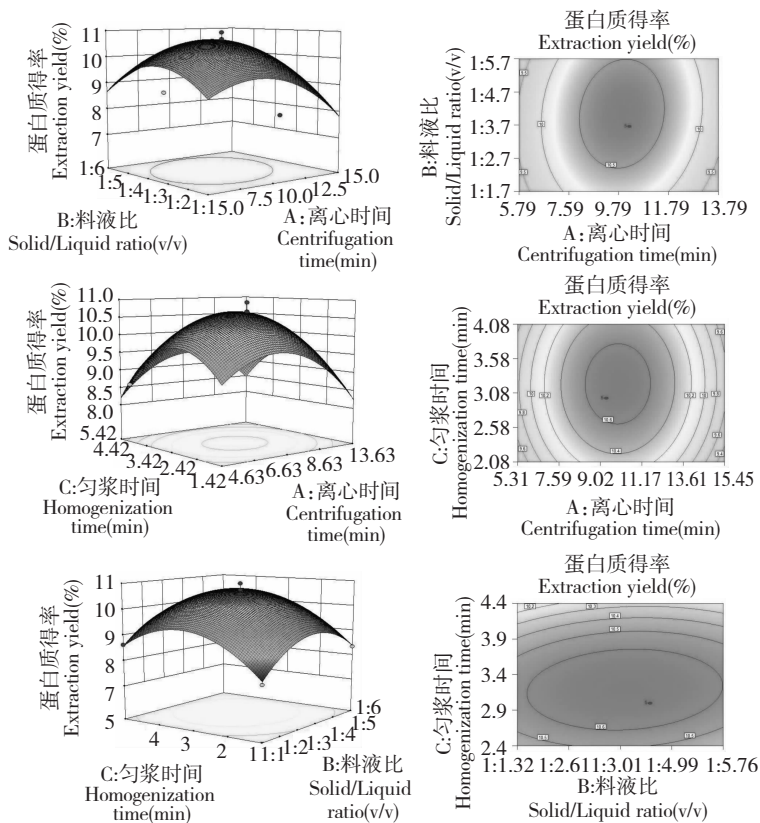


图4 因素交互作用对南极磷虾蛋白质得率影响的响应面图和等高线图

Fig. 4 Response surface plots and contour plots showing the effect of different extraction conditions on the extraction yield of Antarctic krill protein

%。因此,基于响应面法优化获得的理论参数值与验证实际值较接近,表明该模型能够较好的预测南极磷虾蛋白质的提取,进一步验证了该回归模型的可靠性。与已有的研究结果相比,本实验的结果与已有的报道存在差异。分析其原因可能是由于南极磷虾的捕获时间、海域、年份、南极磷虾的生长阶段、贮藏条件等因素影响了蛋白质的含量,以及提取条件和计算方法的差异导致实验结果之间的不同。

3 结论

本文以冷冻南极磷虾为原料,以水为溶剂,通过单因素和响应面实验确定了碱溶酸沉法提取南极磷虾蛋白质的最优条件。综合考虑现实的可能性,最终确定南极磷虾蛋白质的最佳提取条件:碱溶阶段 pH 11.5,酸沉阶段 pH 5.5,离心温度 4 °C,离心速度 10000 rpm,离心时间 10 min,料液比 1:3,匀浆时间 3.0 min。在此最优条件下的南极磷虾蛋白质实际得率为 10.81%,与理论值 10.67% 的相对误差为

1.30%。期望本文的研究成果能够丰富南极磷虾蛋白质的相关研究,为南极磷虾蛋白质的规模化制备提供技术支撑。

参考文献

- 1 Nicol S, Foster J, Kawaguchi S. The fishery for Antarctic krill-recent developments. *Fish Fish*, 2012, 13: 30-40.
- 2 Chen XZ (陈雪忠), Xu ZL (徐兆礼), Huang HL (黄洪亮). Development strategy on Antarctic krill resource Utilization in China. *J Fish Sci China (中国水产科学)*, 2009, 16: 451-458.
- 3 Grantham GJ. The southern ocean; the utilization of krill, southern ocean fisheries survey programme, FAO: Rome GLO/SO/7/3, 1977: 1-61.
- 4 Chen YC, Tou JC, Jaczynski J. Amino acid and mineral composition of protein and other components and their recovery yields from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) using isoelectric solubilization/precipitation. *J Food Sci*, 2009, 74 (2): 31-39.