

坛紫菜蛋白质提取工艺优化及其特性分析

徐海菊, 冯尚坤, 陈正冬, 鲍若晗

Optimization of Extraction Process and Properties of Protein from *Porphyra haitanensis*

XU Haiju, FENG Shangkun, CHEN Zhengdong, and BAO Ruohan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021090055>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

超声波辅助提取玉木耳多糖及其抗氧化活性分析

Ultrasound Assisted Extraction of Polysaccharides from *Auricularia cornea* Ehrenb. and Its Antioxidant Activity Analysis

食品工业科技. 2020, 41(23): 142–148

双孢菇废弃菇柄多糖的超声波提取及其体外抗氧化活性

Optimization of ultrasonic extraction and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharide from *Agaricus bisporus* stipe

食品工业科技. 2018, 39(2): 163–167

柑橘皮蛋白质提取工艺优化及抗氧化活性研究

Optimization of Extraction Process of Protein from Citrus Peel and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2021, 42(16): 154–162

超声波辅助杂多酸提取竹叶多糖工艺优化及其生物活性研究

Optimization of Preparation and Its Biological Evaluations of Bamboo Leaves Polysaccharides Extracted by Ultrasonic Extraction Assisted by Heteropoly Acid

食品工业科技. 2020, 41(6): 185–192,209

红参-红景天功能饮品加工工艺优化及其提高免疫力功能评价

Optimization of Processing Technology of Red Ginseng-*Rhodiola* Functional Drinks and Evaluation of Its Improving Immune Function

食品工业科技. 2019, 40(19): 200–204,265

桑葚籽黄酮超声酶解提取工艺优化及其抗菌、抗氧化活性

Optimization of Ultrasonic Enzymatic Extraction of Flavonoids from Mulberry Seed and Its Antibacterial and Antioxidant Activities

食品工业科技. 2019, 40(2): 175–182



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

徐海菊, 冯尚坤, 陈正冬, 等. 坛紫菜蛋白质提取工艺优化及其特性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 206–214. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090055

XU Haiju, FENG Shangkun, CHEN Zhengdong, et al. Optimization of Extraction Process and Properties of Protein from *Porphyra haitanensis*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(12): 206–214. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090055

· 工艺技术 ·

坛紫菜蛋白质提取工艺优化及其特性分析

徐海菊, 冯尚坤, 陈正冬, 鲍若晗
(台州科技职业学院, 浙江台州 318020)

摘要: 为了开展坛紫菜高值化加工利用, 以坛紫菜为原料、蛋白质提取率为评价指标, 通过考察提取溶剂、超声时间和功率、料液比、pH 等单因素实验、正交试验设计优化超声波提取工艺, 对其等电点、乳化性、起泡性等基础特性进行分析, 并进行抗氧化活性测定。结果表明, 在超声全程时间 50 min、超声功率 1350 W 条件下, 坛紫菜蛋白质提取率为 $60.98\% \pm 1.01\%$ 。同时通过对所提取的坛紫菜蛋白质特性分析结果显示, 坛紫菜蛋白质的等电点为 4.5, 在等电点附近, 坛紫菜蛋白质有较好的泡沫稳定性, 可达 $80.84\% \pm 2.95\%$; 抗氧化测定结果显示, 坛紫菜蛋白质在 5~50 mg/mL 范围内具有较强的抗氧化活性, 浓度为 50 mg/mL 时, 总抗氧化能力为 2.89 ± 0.09 U/mL, $ABTS^+$ 自由基清除能力相当于 0.83 ± 0.08 mmol/L Trolox, DPPH 清除率在 10 mg/mL 时达到 $68.04\% \pm 0.73\%$ 。该研究可以为坛紫菜资源的开发利用提供一定的理论依据和技术支持。

关键词: 坛紫菜蛋白, 超声波提取, 特性, 抗氧化活性, 工艺优化

中图分类号: TS201.2⁺1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)12-0206-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090055

本文网刊:



Optimization of Extraction Process and Properties of Protein from *Porphyra haitanensis*

XU Haiju, FENG Shangkun, CHEN Zhengdong, BAO Ruohan

(Taizhou Vocational College of Science & Technology, Taizhou 318020, China)

Abstract: The protein extraction rate from *Porphyra haitanensis* was investigated as index to carry out high-value processing and utilization of *Porphyra haitanensis*. The supersonic wave extraction techniques of protein from *Porphyra haitanensis* were studied by single factor experiments and orthogonal method. Extraction solvent, ultrasonic time and wave power, solid-liquid ratio and pH were investigated, and the *Porphyra haitanensis* protein was analyzed for its spectral properties such as isoelectric point, emulsification, foaming, and antioxidant activities. The optimum extraction conditions of *Porphyra haitanensis* protein were as follows: Ultrasonic wave power 1350 W, working time 50 min. Under these conditions, the extraction ratio of *Porphyra haitanensis* protein was $60.98\% \pm 1.01\%$. The results showed that the isoelectric point (pI) of *Porphyra haitanensis* protein was 4.5. At the isoelectric point, *Porphyra haitanensis* protein had better foam stability, reaching $80.84\% \pm 2.95\%$. *Porphyra haitanensis* protein extract exhibited an excellent antioxidant ability within 5~50 mg/mL. When the concentration was 50 mg/mL, the total antioxidant capacity was 2.89 ± 0.09 U/mL and the scavenging capacity of $ABTS^+$ radical was equivalent to 0.83 ± 0.08 mmol/L Trolox, and the scavenging capacity of DPPH radical was $68.04\% \pm 0.73\%$ at 10 mg/mL. This study can provide theoretical basis and technical support for the exploitation and utilization of *Porphyra haitanensis* resources.

Key words: *Porphyra haitanensis* protein; ultrasonic extraction; properties; antioxidant activities; process optimization

随着人类对优质蛋白质需求的不断增长, 海洋藻类作为新型蛋白质的来源越来越受到人们的广泛

关注。坛紫菜(*Porphyra haitanensis*), 隶属红藻门(Rhodophyta)、红藻纲(Rhodophyceae)、红毛菜科

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 台州市科技计划项目(20ny21)。

作者简介: 徐海菊(1974-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品精深加工, E-mail: 106243708@qq.com。

(Bangiaceae)、法紫菜属(*Pyropia*), 是一种生长在沿海潮间带中高潮区的岩礁或筏架上的大型藻类, 是我国特有的经济海藻之一, 主要分布在浙江、福建和广东等省^[1-3]。

坛紫菜味道鲜美, 含有大量人体所必需的蛋白质、多糖、氨基酸、矿物质和维生素, 有着“营养宝库”的美称^[4-6]。坛紫菜蛋白质含量达到 31.33%~50.94%, 脂肪含量 0.34%~1.04%, 具有低脂肪高蛋白的特点^[7]。针对这一特点, 对其蛋白质进行研究和综合开发利用, 可以提供人们对于高品质蛋白质的需求。但目前对于坛紫菜蛋白质的提取与特性研究较少, 而且不同种类的紫菜蛋白在含量、组成与特性方面存在较大差异, 因此开展坛紫菜蛋白的提取工艺和特性研究, 对提高坛紫菜原料附加值具有十分重要的意义。

传统提取方法如水溶液提取法、组织破碎法和反复冻融法, 存在着产品耗时长、易变性、提取率低和能耗高等缺点。随着提取技术的发展, 新型提取方法如超声波辅助提取法、微波辅助提取法和液氮研磨法被应用到蛋白质的提取过程中, 具有设备简单、安全环保、无化学残留、耗时短、效率高等优势。本研究以坛紫菜为原料, 研究开发一种超声波辅助提取坛紫菜蛋白质的方法, 并对其蛋白质的理化性质及抗氧化特性进行研究, 旨在为坛紫菜资源的开发利用提供一定的理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

坛紫菜 采自浙江省台州市路桥海胜水产养殖场, 水洗, 除去泥沙等杂质, 晾干备用; 总蛋白定量试剂盒(BCA 法)、ABTS 试剂盒、T-AOC 测定试剂盒

南京建成生物工程研究所; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司; DPPH 色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 氯化钙、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸、硫酸铵等 均为分析纯; 金龙鱼大豆油 超市购买。

DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司; JY99-IIDN 超声波细胞破碎仪 上海沪析实业有限公司; Avanti J-26 高速冷冻离心机

贝克曼库尔特; SUNRISE 吸光酶标仪 瑞士 TECAN 公司; GB204 电子天平 瑞士 METTLER 公司; FOSS 2300 全自动凯氏定氮仪 上海艾研生物科技有限公司; Delta320 精密 pH 计 梅特勒-托利多仪器公司; 751 石英比色皿 宜兴市伟鑫仪器有限公司; Alpha1-4 冷冻干燥机 德国 Christ; UV2550 紫外可见分光光度计 日本 SHIMADZU 公司; T50 均质机 德国 IKA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 超声波法辅助提取蛋白的单因素实验 坛紫菜蛋白提取工艺流程^[8-10]: 坛紫菜→50 ℃ 烘干至恒重→高速粉碎机粉碎→过 120 目筛→称取藻粉→按料液比(w:v)加入溶剂→磁力搅拌器搅拌均匀→超

声辅助提取→4 ℃, 10000 r/min 离心 15 min→取上清液→测定蛋白含量。

以上工艺流程中蛋白质提取率的计算公式如下:

$$\text{蛋白提取率}(\%) = \frac{\text{上清液中蛋白质的含量}}{\text{坛紫菜藻粉中蛋白质含量}} \times 100$$

式 (1)

式中, 坛紫菜粉蛋白质含量测定采用凯氏定氮法, 上清液中蛋白质含量测定采用 BCA 试剂盒测定。

单因素实验根据前期预实验及参考文献^[9-10], 考察了不同溶剂(蒸馏水、20 mmol/L pH7.0 PBS、20 mmol/L CaCl₂)、超声发生时间和间隔时间(2、3、4、5、6、7、8 s)、料液比(50:4、50:5、50:6、50:7、50:8、50:9、50:10 mg/:mL)、pH(3、4、5、6、7、8、9)、超声功率(180、540、900、1260、1440、1620 W)和超声全程时间(10、20、30、40、50、60 min)对坛紫菜蛋白提取率的影响。单因素实验时, 其他条件分别按固定为蒸馏水、超声发生时间和超声间隔时间为 4 s、料液比 50:5 mg/mL、pH7、超声功率 1260 W、超声全程时间 20 min。

1.2.2 坛紫菜粉蛋白质含量的测定 采用微量凯氏定氮法测定蛋白质含量, 参照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》^[11]。

1.2.3 正交试验设计 在单因素实验结果的基础上, 以超声全程时间(A)、pH(B)、超声功率(C)确定正交试验设计自变量及水平, 以蛋白质提取率为考察指标, 进行三因素三水平正交试验, 以确定超声处理的最佳工艺条件。试验因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平设计
Table 1 Factor level charts of orthogonal test

水平	因素		
	A 超声全程时间(min)	B pH	C 超声功率(W)
1	45	6.5	1170
2	50	7.0	1260
3	55	7.5	1350

1.2.4 坛紫菜蛋白制备过程中的光谱学特征 坛紫菜蛋白的制备工艺流程: 超声离心得到的蛋白溶液, 装入透析袋, 放入饱和度为 60% 硫酸铵溶液中盐析, 在 4 ℃ 下静置过夜后, 离心 20 min(4 ℃, 4900 r/min), 收集沉淀, 加入少量蒸馏水溶解后置于透析袋除盐, 在 4 ℃ 下连续透析 48 h, 中间换水 4~5 次, 截留液用 PEG 20000 浓缩后冷冻干燥得到蛋白质粉末。

对不同工艺阶段后的组分进行 200~700 nm 全波长扫描, 得到光谱扫描图。

1.2.5 坛紫菜蛋白特性分析

1.2.5.1 等电点的测定 取得到的蛋白提取液, 50 mL 共 7 份, 调整 pH 分别为 3、4、4.5、5、6、7、8、9; 10000 r/min 离心分离 15 min 后取上清液, 用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定, 记录在 595 nm 处的吸光度, 吸光度最小时的 pH 即为坛紫菜蛋白的等电点。

1.2.5.2 乳化性质的测定 根据 Pearce 等^[12]的方法测定。配制 6 mL 0.1%(w/v)的样品复溶液,将 pH 分别调到 3.5、4、4.5、5、5.5 然后加入 2 mL 的金龙鱼大豆油,利用高速分散器 1×10^4 r/min 均质 1 min 后,立刻从底部取 25 μ L 样液,加入 0.1%的 SDS 溶液 5 mL 混匀。以 SDS 溶液为空白,测定其在 500 nm 处的吸光值。放置 15 min 后,再测定一次。乳化活性及乳化稳定性的计算公式如下:

$$\text{乳化活性}(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{C \times \varphi \times L \times 10^4} \quad \text{式(2)}$$

$$\text{乳化稳定性}(\text{min}) = \frac{A_0 \times 15}{A_0 - A_{15}} \quad \text{式(3)}$$

式中: C 为溶液中的蛋白质浓度(g 蛋白/mL); φ 为油相在乳化液中所占的比例(0.25); L 为比色杯宽度(1 cm); N 为稀释倍数; A_0 为初始乳化液的吸光度值; A_{15} 为 15 min 后的吸光度值。

1.2.5.3 起泡性质的测定 参照 Fernandez 等^[13]的方法略有改动。取 20 mL 2%(w/v)的蛋白溶液,分别调 pH 至 3.5、4、4.5、5、5.5 后,在高速分散器中以 1×10^4 r/min 均质 2 min,测量此时泡沫和溶液的总体积 V_0 及搅拌停止 30 min 后泡沫和溶液的总积 V_1 ,起泡性及泡沫稳定性按如下公式表示:

$$\text{起泡性}(\%) = \frac{V_0 - 20}{20} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

$$\text{泡沫稳定性}(\%) = \frac{V_1 - 20}{V_0 - 20} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: V_0 表示搅拌停止时泡沫和溶液的总积, mL; V_1 表示搅拌停止 30 min 后泡沫和溶液的总积, mL。

1.2.5.4 坛紫菜蛋白质的抗氧化能力测定 按试剂盒说明书进行测定。样品浓度 0、5、10、20、40、50 mg/mL,每个浓度重复实验 3 次,取平均值,按下式计算总抗氧化能力。

$$\text{总抗氧化能力}(\text{U/mL}) = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{0.01 \times 30} \times \frac{\text{反应液总量}}{\text{取样量}} \quad \text{式(6)}$$

1.2.5.5 DPPH 自由基清除能力测定 采用 96 孔板测定样品的 DPPH 自由基清除活性^[14]。在 96 孔板内,精确移取 20 μ L 样品(浓度 0~10 mg/mL)+180 μ L 的 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液,室温下将二者混合均匀,避光放置 30 min,517 nm 处测定其吸光值,用 $A_{\text{样品}}$ 表示。空白组以无水乙醇代替样品,对照组以无水乙醇代替 DPPH 溶液,其吸光值分别用 $A_{\text{对照}}$ 和 $A_{\text{空白}}$ 表示。以 Trolox 做阳性对照。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100 \quad \text{式(7)}$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 表示样品+DPPH; $A_{\text{对照}}$ 表示样品+无

水乙醇; $A_{\text{空白}}$ 表示无水乙醇+DPPH。

1.2.5.6 ABTS⁺自由基清除能力测定 参照 ABTS 试剂盒说明书配制 ABTS 所需工作溶液。用样品配制溶液对标准品进行稀释,把 10 mmol/L Trolox 标准溶液依次稀释成 0.1、0.2、0.4、0.8、1 mmol/L。于 96 孔板内分别加入工作液和样品,将加好样品的孔板混和均匀,室温孵育 6 min 后测定 405 nm 处的吸光值。

1.3 数据处理

实验数据以平均值 \pm 标准差表示,采用 Excel 软件进行数据整理及作图,采用 SPSS Statistics 23.0 软件进行统计分析, Duncan 氏法进行显著性差异分析, $P < 0.05$, 差异显著。

2 结果与分析

2.1 坛紫菜粉蛋白质含量

本实验所采用的原料坛紫菜的蛋白质含量为 $21.02\% \pm 0.11\%$ (以干基计), 远高于海带 ($10.2\% \sim 10.7\%$)^[15]、脆江蓠 ($10.12\% \sim 14.13\%$)^[16] 和羊栖菜 (6.05%)^[17] 中蛋白质含量,表明坛紫菜是一种蛋白含量较高的可食用海藻资源。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 不同溶剂对提取率的影响 由表 2 可知,用不同溶剂溶解坛紫菜粉时,进行超声波破碎细胞后得到的蛋白质提取率有所不同,其中以蒸馏水和 20 mmol/L pH7.0 PBS 为溶剂进行超声波细胞破碎后,蛋白质提取率显著高于以 20 mmol/L CaCl_2 为溶剂时的提取率 ($P < 0.05$)。考虑到简便操作,本实验选取蒸馏水为溶剂。

表 2 不同溶剂时的坛紫菜蛋白质提取率
Table 2 Protein extraction rate of *Porphyra haitanensis* in different solvents

溶剂	提取率(%)
蒸馏水	39.78 ± 2.93^a
20 mmol/L pH7.0 PBS	40.78 ± 1.55^a
20 mmol/L CaCl_2	25.86 ± 1.15^b

注: 不同字母的两项间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2.2 超声间隔时间对蛋白质提取率的影响 由图 1 可见,固定超声发生时间为 4 s 时,随着超声间隔时间的增加,坛紫菜蛋白质的提取率先上升后迅速下降,在 4 s 时达到最高点,在 5~7 s 范围内保持平稳,到达 8 s 时又迅速下降,之后随着超声间隔时间的增加,超声实际作用时间减少,不利于蛋白质的溶出。因此,选择超声细胞破碎仪的占空比为 50%(即超声发生时间 4 s,超声间隔时间 4 s),此时超声破碎效率最高。

2.2.3 料液比对提取率的影响 从图 2 可见,随料液比的增加,坛紫菜蛋白质提取率呈先上升后下降的趋势。当料液比为 50:8 mg/mL 时,提取率达到最大,达到 47.28%,其他后随着料液比的增加,提取率开始

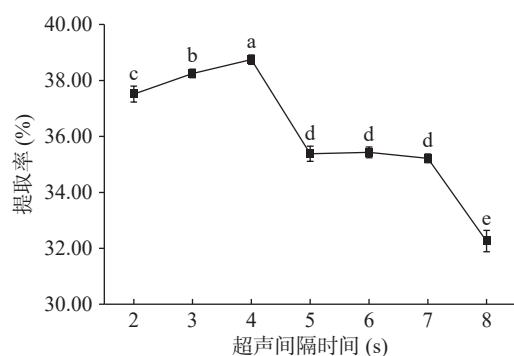


图 1 超声间隔时间对蛋白质提取率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic interval time on protein extraction rate

注: 不同小写字母代表样品间的显著差异($P<0.05$); 图 2~图 5、图 9~图 13 同。

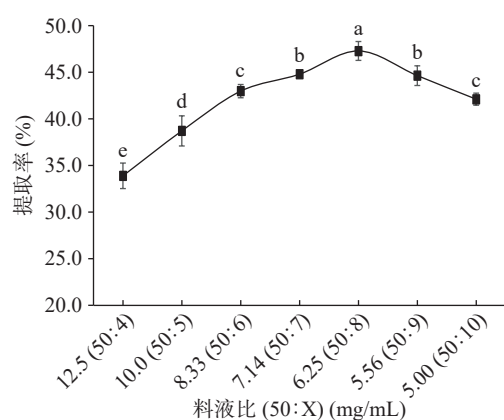


图 2 料液比对蛋白质提取率的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on protein extraction rate

呈下降趋势。这是由于当溶剂用量较低时,藻粉溶液粘度大,液体难以产生空化泡,导致超声波处理效果弱化;随着溶剂用量增大,溶液粘度降低,超声波的空化作用加强,蛋白质提取率上升;当料液比继续增加时,由于细胞壁破裂导致的内容物大量溶出,使得溶液的粘度大幅升高,影响了蛋白质的溶出量,因而提取率下降^[18]。此外,料液比过高带来提取液中蛋白质浓度降低的问题,这也是实际生产时应当考虑的问题。

2.2.4 pH 对蛋白质提取率的影响 由图 3 可知,在 pH3~9 范围内,溶液 pH 对舌状蜈蚣藻蛋白质提取率的影响比较明显。随着 pH 的增大,提取率呈现先增加随后趋于平衡的趋势,当 pH 为 7 时达到最大值。这可能是因为随着 pH 的升高,两性解离性质使得蛋白质分子的表面电荷增加,蛋白质对水的亲和性增强,与此同时,一部分非水溶性蛋白转变为水溶性的蛋白;但是当 pH 升高到偏碱性条件时,蛋白质容易变性,导致在水溶液中的溶解度降低,使得提取率稍有降低^[19]。

2.2.5 超声功率对提取率的影响 由图 4 可见,随着超声功率的增加,蛋白质的提取率呈现逐渐提高趋势,在 1260 W 处到达最高点后降低,各处理组间存在显著性差异($P<0.05$)。超声功率影响超声作用,超

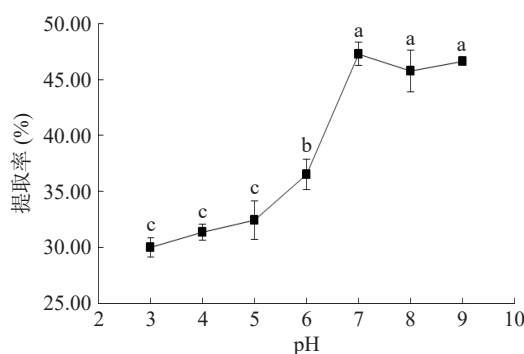


图 3 pH 对蛋白质提取率的影响

Fig.3 Effect of pH on protein extraction rate

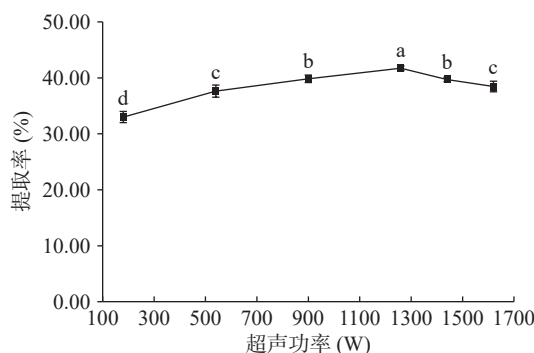


图 4 超声功率对蛋白质提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on protein extraction rate

声功率越高,空化强度越大,超声效果越好,有效成分分离越快。在超声功率较小时,超声强度不足以完全破碎细胞壁,随着空化效应和机械效应的增强,蛋白质分子与水分子之间相互作用增强,促进蛋白质的溶解^[20]。到达 1260 W 时,蛋白质得以完全充分地溶出,然而继续增大超声功率,产生的热效应使部分蛋白质发生变性,形成沉淀,在后续操作中被除去,因此提取率下降。考虑到生产成本和仪器使用寿命,超声波功率选择 1080~1440 W 较为合适。

2.2.6 超声全程时间对提取率的影响 由图 5 可见,保持其它条件不变,改变超声全程时间时,坛紫菜蛋白质提取率随时间的延长先升高后下降。与对照组 (0 min, 即未经过超声处理)相比,处理组的蛋白质提取率显著提高($P<0.05$)。由于溶胀作用,对照组中也会有蛋白质溶出,这正是溶胀法提取蛋白的原理。但

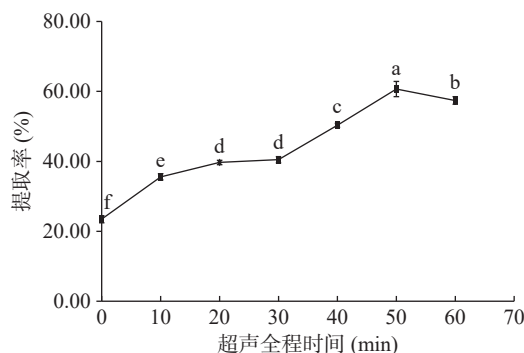


图 5 超声全程时间对蛋白质提取率的影响

Fig.5 Effect of whole ultrasonic time on protein extraction rate

由于溶胀法的效率太低,不利于实际的大规模生产,同时也说明了利用超声波破碎细胞壁提取蛋白质的必要性。

在 0~50 min 范围内,随着时间的延长蛋白质提取率升高,这是因为延长超声时间能让更多细胞的细胞壁破碎,使细胞内蛋白质更多地溶解出来。当时间超过 50 min 时,溶液温度随着超声时间的延长而增高,原本位于蛋白质结构内部的疏水基团暴露,蛋白质分子间通过非共价键相互聚集形成沉淀,因此蛋白质提取率下降^[21]。

2.3 正交试验结果与验证实验

由表 3 可见,各因素对坛紫菜蛋白质提取率的影响程度不一致。影响由大到小分别为: A>C>B,即超声全程时间对提取率的影响最大,其次是超声功率,最后是 pH,最优水平组合为 A₂B₂C₃,即超声全程时间 50 min, pH7, 超声功率 1350 W。

表 3 正交试验结果
Table 3 Results of orthogonal test

实验号	A	B	C	提取率(%)
1	1	1	1	43.29±2.35
2	1	2	2	49.25±1.82
3	1	3	3	57.15±1.75
4	2	1	3	57.98±1.61
5	2	2	1	60.98±1.93
6	2	3	2	56.80±1.66
7	3	1	2	56.09±1.86
8	3	2	3	56.95±2.00
9	3	3	1	46.17±2.84
K ₁	149.69	157.36	150.44	
K ₂	175.76	167.19	162.13	
K ₃	159.21	160.12	172.09	
k ₁	49.90	52.45	50.15	
k ₂	58.59	55.73	54.04	
k ₃	53.07	53.37	57.36	
极差R	8.69	3.28	7.21	
主次因素	A>C>B			
最优组合	A ₂ B ₂ C ₃			

从正交表中可以看出,最优水平组合 A₂B₂C₃ 并不在正交试验的 9 组实验中,因此在 A₂B₂C₃(超声时间 50 min, pH7, 超声功率 1350 W)条件下进行三次验证实验,测得坛紫菜蛋白质的提取率为 60.98%±1.01%。以同样作为藻类蛋白的提取工艺为参考,提取率在 50% 左右^[22-24]。

2.4 坛紫菜蛋白质制备过程中的紫外-可见光谱特征

将超声破碎提取得到的上清液、盐析后蛋白提取液以及透析后的蛋白质溶液进行 200~700 nm 全波长扫描,得到完整的光谱扫描图如图 6~图 8 所示。

图 6 中出现了 4 个吸收峰,分别在 326、494、540、668 nm 处。326 nm 处的特征吸收峰,说明上清液中含有维生素等物质,因为维生素等物质的特征吸收峰在 330 nm 附近^[25]。668 nm 处的吸收峰则表明蛋白提取液中含有少量的叶绿素 a^[26]。

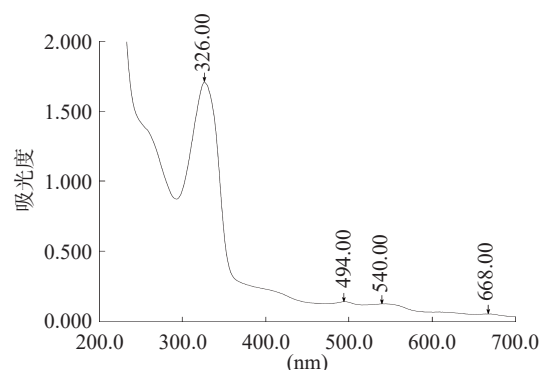


图 6 超声后蛋白提取液吸收光谱图

Fig.6 Absorption spectrogram of protein extract after ultrasound

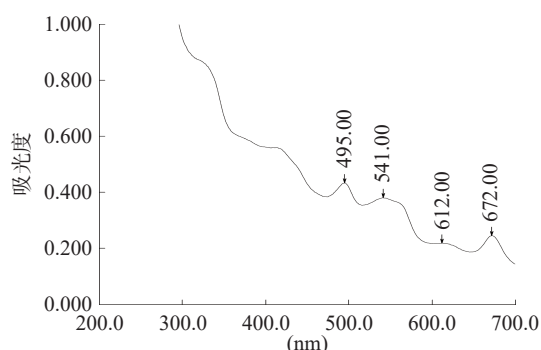


图 7 盐析后蛋白提取液吸收光谱图

Fig.7 Absorption spectrogram of protein extract after salting out

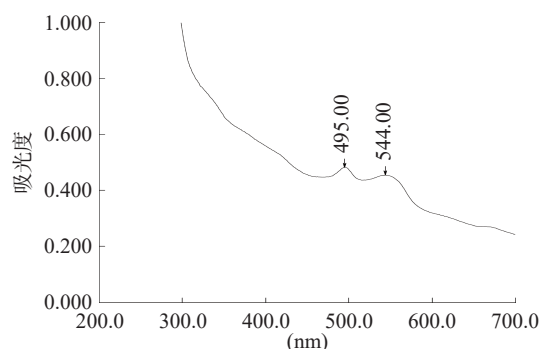


图 8 透析后蛋白提取液吸收光谱图

Fig.8 Absorption spectrogram of protein extract after dialysis

如图 7 所示,盐析后的蛋白提取液的 4 个吸收峰,分别在 495、541、612、672 nm 处。与盐析之前对比,326 nm 处的高吸收峰消失,说明通过盐析除去了大部分的维生素等杂质。同时,经过硫酸铵盐析,蛋白质的浓度有所提高,从而使得 612 nm 处的微弱吸收峰显现出来,说明上清液中可能存在藻蓝蛋白,因为藻蓝蛋白的特征吸收峰在 620 nm 附近。而图 8 在 495 和 544 nm 处存在吸收峰,说明经过透析后,藻蓝蛋白的吸收峰消失,提示若想从坛紫菜蛋白质提取物中进一步获得高纯度的藻红蛋白,盐析和透析等分离纯化操作是必要的^[27]。

从图 6~图 8 可以看出,上清液在 220~280 nm 曲线吸收较高,是因为大部分氨基酸在紫外区的吸收

峰多集中在 200~220 nm, 苯丙氨酸(Phe)的吸收峰在 222 与 259 nm, 酪氨酸(Tyr)的吸收峰在 231 及 272 nm, 色氨酸(Trp)的吸收峰在 227 与 279 nm^[26]。

同时,通过对比超声提取液、盐析液及透析后溶液吸收光谱的特征吸收峰,可以发现吸收峰的红移现象,如表 4 所示。据文献报道,蛋白质的纯度、溶液 pH 不同都会影响其光谱特性^[27]。

表 4 坛紫菜蛋白质制备过程中溶液吸收光谱图的特征吸收峰

Table 4 Characteristic absorption peaks of solution absorption spectra during protein preparation of *Porphyra haitanensis*

溶液	吸收峰(nm)		
超声提取液	494	540	668
盐析液	495	541	672
透析后溶液	495	544	—

2.5 坛紫菜蛋白质的特性

2.5.1 等电点 由图 9 可见,当 pH 在 3~9 变化时,吸光度值先下降然后上升,在 pH4.5 时,吸光度达到低谷,蛋白质的溶解度最小,说明此点即为坛紫菜蛋白质的等电点。

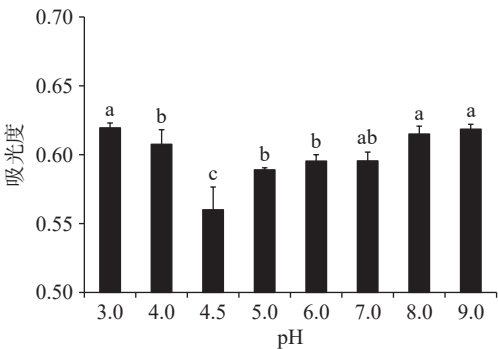


图 9 蛋白质等电点测定结果
Fig.9 Determination results of protein isoelectric point

2.5.2 乳化性质 图 10 所示为坛紫菜蛋白质的乳化活性(EAI)随 pH 的变化情况。从图中可看出,在 3.5~5.5 范围内,随着 pH 增大,蛋白质的乳化活性先减弱后增强,在 pH4.5 时乳化活性最差。接近 pI 时,蛋白质溶解度小,对乳化作用的影响小。偏离 pI 时,

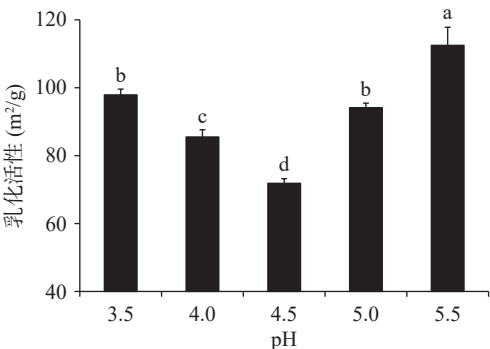


图 10 坛紫菜蛋白质的 pH-乳化活性
Fig.10 pH-emulsifying activity of *Porphyra haitanensis* protein

蛋白质氨基酸侧链的离解,产生了有利于乳化体系稳定的静电斥力,避免了液滴聚集^[28]。

由图 11 可见,与乳化活性一致,pH4.5 时坛紫菜蛋白质的乳化稳定性达到最低值。这可能是由于蛋白浓度较低时,分子间相互作用较大,蛋白质与油相互作用较小,因此空气-油界面形成的膜较薄且不稳定^[29]。坛紫菜蛋白在 pH5.5 时乳化活性可达 112.49±5.33 m²/g,乳化稳定性为 40.52±1.08 min,其乳化活性远高于吴凤娜^[30]提取的海带蛋白(40 m²/g),但乳化稳定性与其(105 min)相比则较低。这也提示,坛紫菜蛋白质具有开发成天然乳化剂的潜力,可通过物理、化学和生物学方法对其进行蛋白质改性,使其获得更加良好的乳化性质。

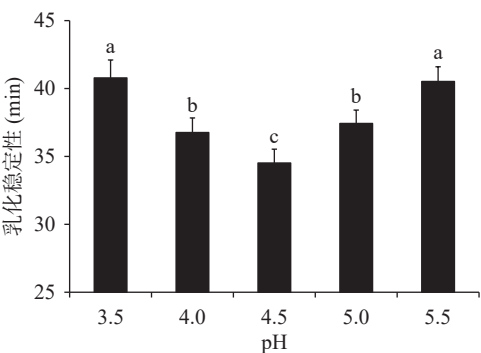


图 11 坛紫菜蛋白质的 pH-乳化稳定性
Fig.11 pH-emulsifying stability of *Porphyra haitanensis* protein

2.5.3 起泡性质 由图 12 可见,在 pH3.5~5.5 范围内,随着 pH 增大,坛紫菜蛋白质的起泡性呈现先减弱后增强的趋势,在 pH4.5 时起泡性最差。这可能是由于偏离蛋白质等电点时,蛋白质的溶解性增强,使蛋白质黏度下降,从而增加了蛋白质的起泡性。在 pH3.5~5.5 时,坛紫菜蛋白质的起泡性在 20.25%~24.75% 范围内变动,而李玉娥等^[31]提取的燕麦分离蛋白在 pH2~9 时,起泡性在 8%~21% 范围内变动。

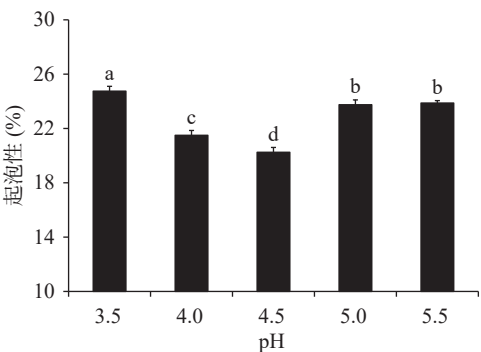


图 12 pH 对蛋白质起泡性的影响
Fig.12 Effect of pH on protein foaming

由图 13 可见,坛紫菜蛋白质的泡沫体系在接近 pI 时很稳定,一般来说具有良好发泡能力的蛋白质其泡沫稳定性一般很差。坛紫菜蛋白质在 pH4.5 时泡沫稳定性可达 80.84%±2.95%,而许英一等^[32]从提

取的燕麦蛋白的泡沫稳定性最高在 60% 左右, 吴凤娜^[30] 提取的海带蛋白的泡沫稳定性最高在 80% 左右, 说明本实验提取的坛紫菜蛋白质具有良好的泡沫稳定性。

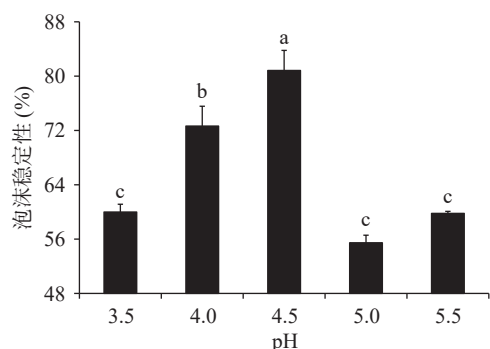


图 13 pH 对蛋白质起泡稳定性的影响

Fig.13 Effect of pH on protein foaming stability

2.6 坛紫菜蛋白质的抗氧化能力

2.6.1 总抗氧化能力 由图 14 可知, 在 0~50 mg/mL 范围内, 随着浓度提高, 坛紫菜蛋白质总抗氧化能力先提高后趋于稳定, 存在一定的量效关系。当浓度为 50 mg/mL 时, 坛紫菜蛋白质的 T-AOC 值为 2.89 ± 0.09 U/mL, 表明坛紫菜蛋白具有一定的抗氧化能力。总抗氧化能力(T-AOC)能够反映被测物中各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成的总抗氧化水平, 在医学领域、生物学研究中用于检测各种抗氧化物溶液的综合抗氧化活性。实验结果显示坛紫菜蛋白质具有开发为天然抗氧化剂的潜力。

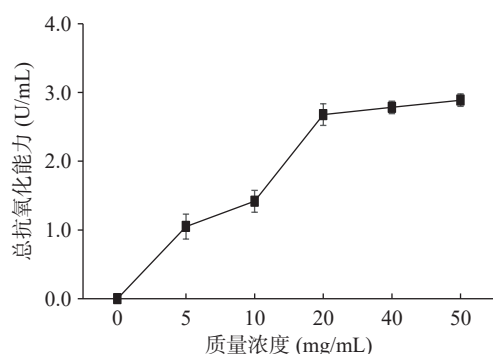


图 14 坛紫菜蛋白质的总抗氧化能力

Fig.14 Total antioxidant capacity of *Porphyra haitanensis* protein

2.6.2 DPPH 自由基清除能力 坛紫菜蛋白质对 DPPH 的清除作用见图 15。在 0~10 mg/mL 范围内, 坛紫菜蛋白质对 DPPH 自由基表现出一定的清除活性, 且与其浓度水平成量效关系, 即随浓度得升高, 对 DPPH 的清除率也增强。经 SPSS 22.0 软件计算, 其 DPPH 半数清除浓度 IC_{50} 为 3.79 mg/mL。坛紫菜蛋白质对 DPPH 的清除作用低于 Trolox。

当坛紫菜蛋白浓度 10 mg/mL 时, 对 DPPH 的清除率达到 $68.04\% \pm 0.73\%$ 。而胡双飞等^[14] 所提取的螺旋藻粗蛋白, 其 DPPH 清除率在 10 mg/mL 时

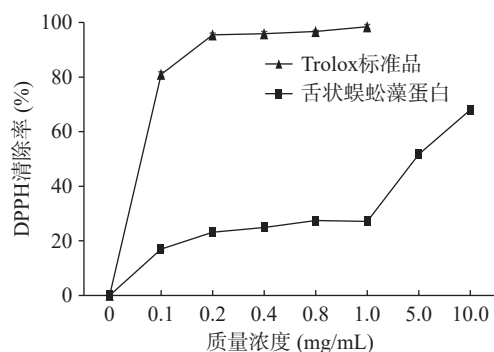


图 15 坛紫菜蛋白质的 DPPH 自由基清除能力

Fig.15 DPPH free radical scavenging capacity of *Porphyra haitanensis* protein

接近 60%, 显著高于传统水提取方法提取的粗蛋白 DPPH 清除率, 表明本实验所提取的坛紫菜蛋白质具有较强的 DPPH 自由基清除能力。

2.6.3 ABTS⁺ 自由基清除能力 以 Trolox 浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 如图 16 所示。

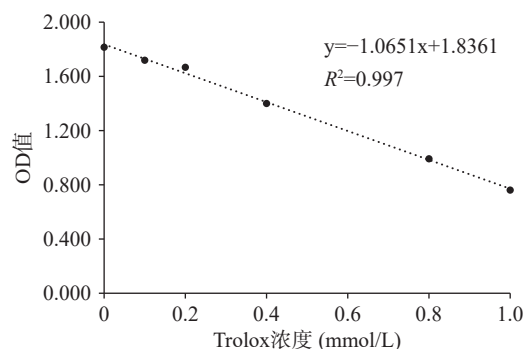


图 16 Trolox 溶液标准曲线

Fig.16 Standard curve of Trolox solution

如图 17 所示, 当样品浓度从 5 到 50 mg/mL 时, 坛紫菜蛋白质的 TEAC 值先增加后趋于稳定, 表明坛紫菜蛋白质对 ABTS⁺ 自由基有一定的清除作用。当蛋白浓度为 50 mg/mL 时, TEAC 值达到 0.83 ± 0.08 mmol/L, 即相当于具有 0.83 倍 Trolox 的 ABTS⁺ 自由基清除能力。

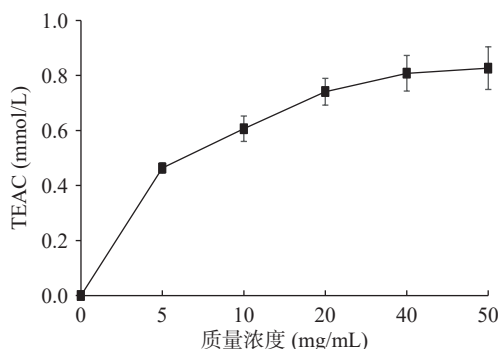


图 17 坛紫菜蛋白质的 TEAC 值

Fig.17 TEAC value of *Porphyra haitanensis* protein

由上述抗氧化结果分析可知, 当坛紫菜蛋白质浓度在一定范围内增加时, 清除自由基的能力也逐渐增强。增大到一定程度时, 清除自由基的能力增长的

趋势越来越缓慢,清除率难以达到较高水平。有文献报道,蛋白质在经体外模拟胃肠液消化后抗氧化能力增强^[33-34],而与蛋白质消化产物的抗氧化作用紧密相关的是消化产物中的小分子肽类。生物活性肽所具有的功能活性比蛋白质更加丰富,这也提示,对于坛紫菜蛋白质的开发利用,可以从酶解获得生物活性肽的方面进行研究。

3 结论

本研究以坛紫菜为原料,确定了超声辅助提取坛紫菜蛋白质的最适提取工艺,其提取率达到 $60.98\% \pm 1.01\%$;对所提取的坛紫菜蛋白质特性指标和抗氧化特性分析显示其溶液具有较好的泡沫稳定性,坛紫菜蛋白质在 $5 \sim 50 \text{ mg/mL}$ 范围内具有较强的抗氧化活性,浓度为 50 mg/mL 时,总抗氧化能力为 $2.89 \pm 0.09 \text{ U/mL}$,ABTS⁺自由基清除能力相当于 $0.83 \pm 0.08 \text{ mmol/L}$ Trolox, DPPH 清除率在 10 mg/mL 时达到 $68.04\% \pm 0.73\%$ 。本研究内容是对坛紫菜蛋白质提取工艺和其特性的初步研究,下一步有待对其分离纯化,分子结构等方面开展研究,并根据其特性将提取到的坛紫菜蛋白应用于食品、化工等领域以发挥其功效作用。

参考文献

- [1] 王旭雷,马颖超,鲁晓萍,等.法紫菜生物多样性及其栽培生物学基础[J].海洋科学,2017,41(2):125-135. [WANG X L, MA Y C, LU X P, et al. A review of species diversity of *Pyropia* and fundamental studies of *Pyropia* cultivation[J]. Marine Sciences, 2017, 41(2): 125-135.]
- [2] 张忠山.坛紫菜多糖的化学结构修饰及其构效关系研究[D].青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所),2010. [ZHANG Z S. Study on chemical structure modification and structure-activity relationship of *Porphyra* polysaccharide[D]. Qingdao: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2010.]
- [3] 丁洪昌,严兴洪.紫菜遗传育种研究进展[J].中国水产科学,2019,26(3):592-603. [DING H C, YAN X H. Advances in *Pyropia* genetics and breeding[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 592-603.]
- [4] 吴晓雯,王铁杆,刘颖,等.我国东南沿海坛紫菜遗传多样性研究[J].海洋学研究,2020,38(4):58-64. [WU X W, WANG T G, LIU Y, et al. Genetic diversity of *Pyropia haitaensis* along the southeast coast of China[J]. Journal of Marine Sciences, 2020, 38(4): 58-64.]
- [5] CHEN X, WU M H, YANG Q, et al. Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitaensis* and the application in liposome-meat system[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 77: 468-474.
- [6] YU P, ZHANG Y S. Separation and purification of *Porphyra haitaensis* polysaccharide and its preliminary structural characterization[J]. Separation Science & Technology, 2017, 52(11): 1835-1842.
- [7] 田雨,江艳华,郭莹莹,等.紫菜营养品质及食用价值研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(12):4929-4936. [TIAN Y, JIANG Y H, GUO Y Y, et al. Research progress on nutritional quality and edible value of *Porphyra*[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(12): 4929-4936.]
- [8] YU M, LIU H, SHI, et al. Preparation of resveratrol-enriched and poor allergic protein peanut sprout from ultrasound treated peanut seeds[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 28: 334.
- [9] PREECE K E, HOOSHYAR N, KRIJGSMAN A J, et al. Pilot-scale ultrasound-assisted extraction of protein from soybean processing materials is not recommended for industrial usage[J]. Journal of Food Engineering, 2017, 206: 1-12.
- [10] CHEN Y Y, ZHANG D J. Optimization of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) of flavones from *Vaccinium bracteatum* Thunb leaves[J]. Food & Machinery, 2016.
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.5 食品中蛋白质的测定[S].北京:中国标准出版社,2016. [Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009.5 Determination of protein in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [12] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of protein: Evaluation of turbidimetric technique[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1978, 26: 716-723.
- [13] FERNANDEZ Q A, MACARULLA M T. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 1997, 51: 331-342.
- [14] 胡双飞,张学武,范晓丹.超声耦合亚临界水提取螺旋藻粗蛋白及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2018,34(9):150-157. [HU S F, ZHANG X W, FAN X D. Crude protein extraction from *Spirulina platensis* by ultrasound coupling subcritical water and its anti-oxidant activity[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(9): 150-157.]
- [15] 姚海芹,王飞久,刘福利,等.食用海带品营养成分分析与评价[J].食品科学,2016,37(12):95-98. [YAO H Q, WANG F J, LIU F L, et al. Chemical analysis and nutritional assessment of new varieties of *Saccharina japonica*[J]. Food Science, 2016, 37(12): 95-98.]
- [16] 陈伟洲,蔡少佳,刘捷,等.养殖海藻皱紫菜和脆江蓠的主要营养成分分析[J].营养学报,2013,35(6):613-615. [CHEN W Z, CAI S J, LIU J, et al. Analysis and evaluation of the nutritional components of bred *Porphyra crispata* and *Gracilaria chouae*[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2013, 35(6): 613-615.]
- [17] 张晓梅,郭芮,苏红,等.羊栖菜营养成分分析与安全性评价[J].食品工业科技,2018,39(4):296-300. [ZHANG X M, GUO R, SU H, et al. Nutritional composition analysis and safety evaluation of *Sargassum fusiforme*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(4): 296-300.]
- [18] 张会香,陈晶晶,杨世军,等.地木耳细胞的破碎和藻蓝蛋白提取工艺的研究[J].食品工业,2017,38(10):112-116. [ZHANG H X, CHEN J J, YANG S J, et al. Study of cell breaking and extraction of phycocyanin from *Nostoc commune*[J]. The Food Industry, 2017, 38(10): 112-116.]
- [19] 刘高梅,任海伟.不同功率超声波对芸豆蛋白理化和功能性质的影响[J].中国粮油学报,2012,27(12):17-21. [LIU G M, REN H W. Effect of ultrasonic power on physicochemical and func-

- tional properties of kidney bean protein (KBP)[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2012, 27(12): 17-21.]
- [20] 毕爽, 马文君, 李杨, 等. 脉冲电场-超声波作用对黑豆球蛋白功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(9): 7-12. [BI S, MA W J, LI Y, et al. Combined effect of pulse electric field and ultrasound on functional properties of black soybean globin[J]. *Food Science*, 2016, 37(9): 7-12.]
- [21] 董欣, 王丽燕. 氨基酸紫外光谱的再测定[J]. *德州学院学报*, 2015(2): 44-46. [DONG X, WANG L Y. The determination of amino acids of ultraviolet absorption spectrum[J]. *Journal of Dezhou University*, 2015(2): 44-46.]
- [22] 王婷, 马海乐, 曲文娟, 等. 条斑紫菜蛋白和多糖的逆流脉冲超声辅助提取技术研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(13): 228-230. [WANG T, MAH L, QU W J, et al. Study on extraction technology of protein and polysaccharide from *Porphyra striata* by countercurrent pulse ultrasonography[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(13): 228-230.]
- [23] 姚兴存, 舒留泉, 盘赛昆, 等. 条斑紫菜蛋白提取与抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2012, 33(20): 113-118. [YAO X C, SHU L Q, PAN S K, et al. Protein extraction and antioxidant activity of *Porphyra*[J]. *Food Science*, 2012, 33(20): 113-118.]
- [24] 于娇, 胡晓, 杨贤庆, 等. 海洋藻类藻胆蛋白的提取、纯化与应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(11): 314-318, 326. [YU J, HU X, YANG X Q, et al. Advances in extraction, purification and application of phycobili protein from marine algae[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(11): 314-318, 326.]
- [25] 程凌江, 蒋丽金, 马金石. 条斑紫菜中R-藻红蛋白的纯化及其 α 和 β 亚基的分离与发色团含量的测定[J]. *海洋与湖沼*, 1990(4): 337-342. [CHENG L J, JIANG L J, MA J S. Purification of R-phycoerythrin in *Porphyra yezoensis* and separation, chromophore determination of its α and β subunits[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1990(4): 337-342.]
- [26] 张发宇, 余金卫, 张浏, 等. 巢湖蓝藻藻蓝蛋白纯化过程中紫外-可见吸收光谱特征分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2017, 37(3): 806-810. [ZHANG F Y, YU J W, ZHANG L, et al. UV-Vis spectrum characteristics of phycocyanin purification in water from chao lake[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2017, 37(3): 806-810.]
- [27] 王慧, 赵井泉, 张建平. 螺旋藻藻胆体核心复合物结构与功能的研究-四种变藻蓝蛋白复合物的分离及光谱特性的研究[J]. *生物物理学报*, 1996, 12(3): 394-399. [WANG H, ZHAO J Q, ZHANG J P. Structure-function relationship and energy transfer in allophycocyanin core of spirulia platense study of separation and spectral charactersitics of four forms of allophycocyanin complexes[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1996, 12(3): 394-399.]
- [28] 管斌, 林洪, 王广策. 食品蛋白质化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. [GUAN B, LIN H, WANG G C. Food protein chemistry[M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2005.]
- [29] 刘永, 毕永钧. 介质对蛋清蛋白乳化性及乳化稳定性的影响[J]. *中国食品添加剂*, 2010(6): 127-129, 146. [LIU Y, BI Y J. Effect of medium on the emulsification and emulsion stability of the egg white protein[J]. *China Food Additives*, 2010(6): 127-129, 146.]
- [30] 吴凤娜. 海带蛋白提取及理化性质的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012. [WU F N. Study on protein extraction from kelp and its physicochemical properties[D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry, 2012.]
- [31] 李玉娥, 王愈, 陈振家. 燕麦分离蛋白的提取及功能性测定[J]. *粮油食品科技*, 2018, 26(4): 31-35. [LI Y E, WANG Y, CHEN Z J. Extraction of oat protein isolate and determination of the functionality[J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2018, 26(4): 31-35.]
- [32] 许英一, 王宇, 林巍. 燕麦蛋白理化性质研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 45(3): 385-388. [XU Y Y, WANG Y, LIN W. Study on physicochemical properties of oat protein[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2018, 45(3): 385-388.]
- [33] 程超, 李伟, 汪兴平, 等. 葛仙米藻胆蛋白的体外消化特性[J]. *食品科学*, 2012, 33(15): 6-10. [CHEN C, LI W, WANG X P, et al. Digestion characteristics *in vitro* of Phycobiliprotein from *Nostoc sphaeroides* Kuting[J]. *Food Science*, 2012, 33(15): 6-10.]
- [34] 夏亚穆, 张振国, 林姣. 海洋藻类蛋白质生物功能的研究[J]. *农产品加工(学刊)*, 2014(23): 60-63. [XIA Y M, ZHANG Z G, LIN J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae[J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2014(23): 60-63.]