

文章编号:1673-1689(2006)01-0096-03

金枪鱼碎鱼肉中肌红蛋白的初步提取和纯化

徐群英, 汪之和, 王立井, 钟晓明

(上海水产大学 食品学院, 上海 200090)

摘要:研究了从肌红蛋白含量较高的金枪鱼加工废弃物碎鱼肉中提取氧合肌红蛋白,得到了提取的最佳实验条件:样品体积 2.5 倍的 0.01 mol/L pH 8.6 Tris-HCl 缓冲液、提取 1.5 h、硫酸铵饱和度 90% 盐析等,并经透析、DEAE-Sepharose FF 离子交换柱进行了初步的层析纯化,得到蛋白质量分数达 87.11% 的肌红蛋白。

关键词:肌红蛋白;提取;纯化

中图分类号:S 965.332

文献标识码:A

The Primary Extraction and Purification of Myoglobin from Drossy Meat of Tuna

XU Qun-ying, WANG Zhi-he, WANG Li-jing, ZHONG Xiao-ming

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The Myoglobin was extracted from drossy meat of Tuna. The optimal conditions were determined through experiments and shown as followings: ratio of Tris-HCl buffer (pH 8.6) to sample of 2.5 v/m, extraction for 1.5 hours, utilization of 90% ammonium sulfate for salting out, etc. Primary purification was carried out with good results.

Key words: Myoglobin; extraction; purification

肌红蛋白(Myoglobin, Mb)是一种单体血红素蛋白,存在于一些无脊椎动物的肌肉和大多数脊椎动物的心脏肌和骨骼肌中^[1]。在肌肉组织肌浆中肌红蛋白的质量分数约为 0.2%~2%^[2],相对分子质量为 16 000~17 000,能可逆地与氧结合,具有转运和储存氧的作用。

血红蛋白(Hemoglobin, Hb)是存在于动物体内的另一种主要色素,能进行相同的反应,结构相似,分子内的蛋白质都为珠蛋白,并都和含铁的非蛋白质部分——血红素(Heme)络合。肌红蛋白所含的铁仅占活畜体内总铁质量的 10%。牲畜屠宰并将含铁的血红蛋白排放干净后,肌肉组织内就会

有 95% 的残留铁归属肌红蛋白所有,并成为主要的色素^[3]。

肌红蛋白在 540 nm、580 nm 区域有特征吸收峰,而在 560 nm 处呈现低谷。这一特点被用于测定肌红蛋白的浓度^[6],并作为纯度鉴定的一个标准^[7]。

国外对肌红蛋白的研究较早,内容包括肌红蛋白的氧化特性、动力学、分离和纯化,但主要以畜牧类动物为研究材料^[4~6],水产动物研究较少,对废弃物的研究利用尚未见报道。国内对肌红蛋白的研究大多为性质研究,提取纯化方面做得极少^[7],作者首次报道了在金枪鱼中提取和纯化肌红蛋白的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

金枪鱼碎鱼肉:冷冻于 $-25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中。

1.2 实验仪器

FJ-200 超速分散匀质机, SORVALL RC 5C PLUS 超速离心机, UV-2102PC 紫外-可见分光光度扫描仪, 722 型分光光度计, HD-98-9A 核酸蛋白检测仪, Master Flex 2000A-1 蠕动泵, Type 3057 Portable Recorder 生理记录仪等。

1.3 实验方法

1.3.1 肌红蛋白的提取 准确称取一定质量金枪鱼碎鱼肉, 加入适当比例的 Tris-HCl 缓冲液抽提、抽滤, 滤液于 $14\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 超速离心, 除去沉淀, 上清液用 $1\ \text{mol}/\text{L}$ NaOH 溶液调整 pH 至 7.60 , 加入适当饱和度的硫酸铵盐析, 静置, 再次进行超速离心, 沉淀加入少量 Tris-HCl 提取缓冲液溶解, 同一缓冲液中透析 $24\ \text{h}$, 聚乙二醇浓缩后通过离子交换柱进一步纯化, 测定结果。以上实验均在冰浴中进行。粗提液、透析后溶液、层析前液体和层析洗脱液进行紫外-可见分光光度扫描, 确定肌红蛋白浓度, 比较各实验步骤的作用和效果。

1.3.2 肌红蛋白的纯化 肌红蛋白粗提液经透析后做进一步的层析纯化。实验层析材料选用 DE-AE-Sephrose FF, $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ pH 8.6 Tris-HCl 缓冲液与 $200\ \text{mmol}/\text{L}$ NaCl 溶液做梯度洗脱, 收集洗脱液(每 $4\ \text{min}$ 收集一管), 记录 $280\ \text{nm}$ 光吸收, 并进行分光光度扫描。

1.3.3 肌红蛋白纯度的计算 肌红蛋白含量的计算参照文献[6]的公式: $Mb(\text{mg}/\text{g}) = (A_{525} - A_{700}) \times 2.303 \times n$, 其中 Mb 为 3 种形式肌红蛋白的总量, n 为稀释倍数。用双缩脲法测定其中粗蛋白含量, 计算肌红蛋白的纯度。

2 结果与讨论

2.1 提取方案的确定

2.1.1 提取液固比和提取时间组合试验 缓冲液的体积与碎鱼肉质量的比例(液固比)和提取时间对提取率影响较大, 实验设计了这两个因素的组合试验。根据文献[7], 确定提取条件为 $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ pH 8.4 Tris-HCl 缓冲液, 提取液固比分别为 2.0 、 2.5 、 3.0 倍, 提取时间分别为 1.0 、 1.5 、 $2.0\ \text{h}$, 硫酸铵饱和度为 85% 进行提取, 超速离心后沉淀加入少量提取缓冲液溶解, 静置过夜, 上清液用 UV-2102 PC 紫外-可见分光光度扫描仪测定 $480\sim 640\ \text{nm}$ 的

光吸收值, 取波峰和波谷区域最大光吸收值作图, 结果见图 1。

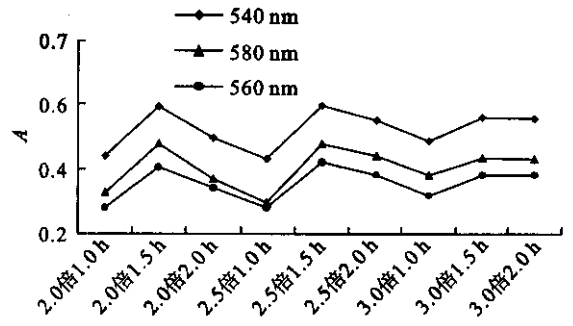


图 1 萃取液固比和时间组合实验结果图

Fig. 1 Effects of extraction proportion-time combination

由图可知, 提取时间为 $1.5\ \text{h}$ 的提取效果比 $1.0\ \text{h}$ 和 $2.0\ \text{h}$ 的都好, 而对于提取体积这一因素, 相对样品质量 2.5 倍和 2.0 倍体积时, 提取效果较好, 而 2.5 的最好, 故实验选定 2.5 倍液固比、提取 $1.5\ \text{h}$ 为最佳实验条件。

2.1.2 提取缓冲液浓度的选定 不同的实验样品应用不同的缓冲浓度, 文献用 $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ Tris-HCl 缓冲液做为实验提取试剂[7], 实验选用 $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ 和 $0.05\ \text{mol}/\text{L}$ 两种浓度进行试验, 比较提取效果, 结果见图 2。

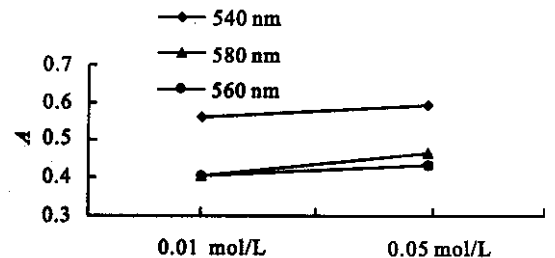


图 2 不同浓度缓冲液结果比较图

Fig. 2 Effects of different buffer-concentrations

由图可知, $0.05\ \text{mol}/\text{L}$ 的缓冲液提取结果较好, 但缓冲液的浓度对实验结果影响很小, 根据经济原则, 选定 $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ pH 8.6 的 Tris-HCl 缓冲液作为最佳提取溶液。

2.1.3 提取缓冲液 pH 值的确定 确定提取条件为 $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ 、两倍于样品质量体积的缓冲液, 提取时间 $1.5\ \text{h}$, 硫酸铵饱和度为 90% 的情况下, 选用 pH 值分别为 7.2 、 8.0 、 8.2 、 8.4 、 8.6 、 8.8 的 Tris-HCl 缓冲液及 pH 6.8 的磷酸缓冲液分别进行提取实验, 结果见图 3。

由图可知, 同为 Tris-HCl 缓冲液, 大于肌红蛋白等电点 pH 值的缓冲液提取效果好, 其中 pH 8.6

Tris-HCl 缓冲液提取效果最好,且比文献中所用的 pH 6.8 磷酸缓冲液提取效果更好,说明从不同原料中提取肌红蛋白应使用不同缓冲液,且碱性缓冲液提取效果比酸性缓冲液效果好,故实验选定 pH 8.6 的 Tris-HCl 缓冲液为最佳提取缓冲液。

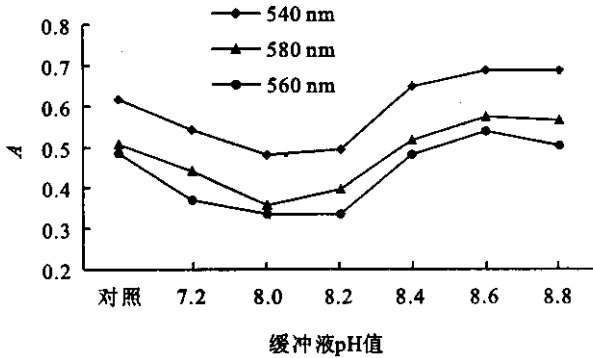


图3 不同 pH 缓冲液提取结果图
Fig. 3 Effect of different pH's buffer

2.1.4 硫酸铵饱和浓度的确定 确定提取条件为 0.01 mol/L pH 8.6 Tris-HCl 缓冲液、缓冲液体积两倍于样品质量、提取时间为 1.5 h,将等分的实验样品分别加入使饱和度达到 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 的硫酸铵进行提取,结果见图 4。

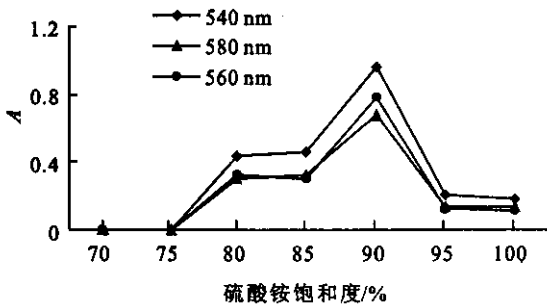


图4 不同硫酸铵饱和度提取结果图
Fig. 4 Effect of different Ammonium Sulfate Saturation

实验结果表明,硫酸铵饱和度对肌红蛋白的提取影响极为显著,硫酸铵饱和度低于 80% 时,在 540 nm 和 580 nm 区域没有特征吸收峰,肌红蛋白未发生沉降,这与文献报道一致。硫酸铵饱和度为 90% 时,提取效果最好。故实验选定硫酸铵饱和度为 90%。

2.2 肌红蛋白的初步纯化

上述提取条件得到的粗提液,经透析后再用离子凝胶层析作进一步的纯化,共离子凝胶层析结果见图 5。

第十二管到十七管(即保留时间从 48 min 到 68 min),洗脱液呈现黄色,280 nm 光吸收也呈现显著的峰,推测是肌红蛋白,进一步做 480~640 nm

的分光光度扫描后证明,图 6 中的第一个峰即是肌红蛋白。

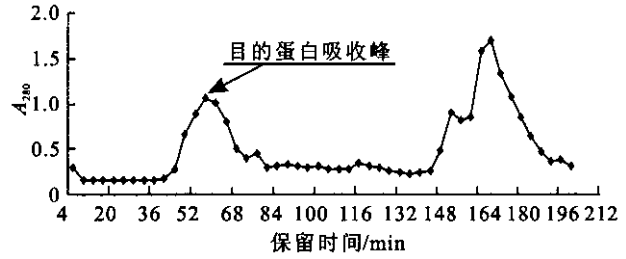


图5 离子交换柱洗脱图

Fig. 5 Results of purification with Ion-Exchange column

扫描洗脱液保留时间为 60 min 的一管,结果见图 6。发现在 540 nm 和 580 nm 区域为肌红蛋白的特征吸收峰,说明实验提取得到了肌红蛋白。

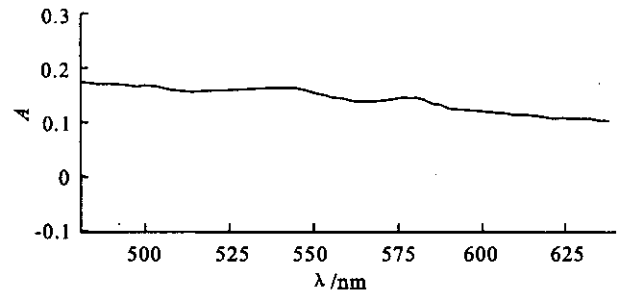


图6 洗脱液保留时间 60 min 一管分光光度扫描结果

Fig. 6 Scanning result of the elute with retention time of 60 min

2.3 肌红蛋白的纯度

将从金枪鱼碎鱼肉中提取肌红蛋白的粗提液和经过透析后的样品液及经层析分离的洗脱液进行肌红蛋白质量浓度测定,结果见表 1。

表1 肌红蛋白纯度

Tab. 1 Results of Myoglobin concentrations

项目	A_{525}	A_{700}	Mb 质量浓度/(mg/mL)	粗蛋白 Mb 质量浓度/(mg/mL)	Mb 纯度/%
粗提液	0.227 458	0.070 740	3.609 2	—	—
透析后样品液	0.278 833	0.102 392	4.063 4	18.655 6	21.78
层析洗脱液	0.088 808	0.039 439	1.137 0	1.305 2	87.11

由此可知,透析将肌红蛋白的纯度提高了 1.1 倍,而离子交换层析将其纯度提高了 4 倍,达到了很好的纯化效果。另外,金枪鱼碎鱼肉中肌红蛋白的含量虽比加工成产品用的金枪鱼肉低,但是差距不是很大,仍有利用价值。

Acta, 2001, 1547:262—267.

- [29] Sodermana O, Johanssonb U. Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and application[J]. **Current Opinion in Colloid&Interface Science**, 2000,4:391—401.
- [30] Ducret A, Giroux A, Trani M, et al. Enzymaticpreparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acid in organic media under reduced pressure[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1995, 48(3): 214—221.
- [31] Arcos J A, bernabe M, CristinaOtero. Quantitive enzymatic production of 6-o-acylglucose esters[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1998,57(5):505—509.
- [32] Arcos J A, Charles G, Otero C. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2001,73(2): 104—110.
- [33] Coulon D, Girardin M, Ghoul M. Enzymaticsynthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors[J]. **Process Biochemistry**, 1999,34:913—918.
- [34] 张念湘,曹淑桂,董桓,等. 有机相中脂肪酶催化糖酯合成的研究[J]. *高等化学学报*, 1996,17(9):1404—1407.
- [35] Soultani S, Engasser J M, Ghoul M. Effect of acyl donor chain length and sugarracyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2001, 11:725—731.
- [36] Watanabe Y, Miyawaki Y, Adachi S, et al. Continuous production of acyl mannoses by immobilized lipase using a packed-bed reactor and their surfactant properties[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2001, 8:213—216.
- [37] Yan Y, Bornscheuer U T, Stadler G, et al. Regioselective lipase-catalyzed synthesis of glucose ester on a preparative scale [J]. **Eur J Lipid Sci Technol**, 2001, 103:583—587.
- [38] Ferrer M, Cruces M A, Bernab M, et al. Lipase-catalyzed regioselectiveacylation of sucrose intwo-solvent mixtures[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1999, 65(1): 10—15.
- [39] Maugard T, Legoy M D. Enzymatic synthesis of derivatives of vitaminA in organic media[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2000, 8:275—280.
- [40] Bousquet M P, Willemot R M, Monsan P, et al. Enzymatic synthesis of α -butylglucoside lactate: Anew α -hydroxy acid derivative[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1999,62(2):225—234.
- [41] Park O J, Kim D Y, Dordick J S. Enzyme-catalyzed synthesis of sugar-containing monomers and linear polymers[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2000,70:208—216.
- [42] Kitagawa M, Tokiwa Y. Synthesis of polymerizable sugar ester possessing long spacer catalyzed by lipase from *Alcaligenessp.* and its chemical polymerization[J]. **Biotechnol Lett**, 1998,20:627—630.
- [43] Shibatani S, Kitagawa M, Tokiwa Y. Enzymatic synthesis of vinyl sugar ester in dimethylformamide[J]. **Biotechnol Lett**, 1997,19:511—514.
- [44] Zhang X, Kobayashi T, Adachi S, et al. Lipase-catalyzed synthesis of 6-o-vinylacetyl glucose in acetonitrile[J]. **Biotechnol Lett**, 2002,24: 1097—1100.
- [45] Sereti V, Stamatis H, Pappas C, et al. Enzymatic acylation of hydroxypropyl cellulose in organic media and determination of ester formation by diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy 496[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2001,72(4):495—500.

(责任编辑:朱明)

(上接第98页)

参考文献:

- [1] David J, Daniel A, Duane W. Myoglobin interspecies structural differences: effects on autoxidation and oxygenation[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1986,249:106—115.
- [2] 王海燕,彭增起. 肌红蛋白的功能特性[J]. *肉类工业*, 2001,242:36—40.
- [3] Inger M, Arve Iversen, Grete Skrede. Quantitative determination of myoglobin and haemoglobin in beef by high-performance liquid chromatography[J]. **Meat Science**, 1990,28:313—320.
- [4] Jay B Fox. The chemistry of meat pigments[J]. **Food Processing**, 1966,14:207—210.
- [5] Renerre M, Anton M. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles[J]. **Meat Science**, 1992,32:331—342.
- [6] Trout G R. Variation in myoglobin denaturation and color of cooked beef, pork and turkey meat as influenced by pH, sodium chloride, sodium triphosphate and cooking temperature[J]. **J Food Sci**, 1989,54:536.
- [7] 孙京新,周光宏,徐幸莲,等. 猪肉中氧合肌红蛋白分离、纯化及其氧化特性研究[J]. *食品科学*, 2002,23:27—31.
- [8] Renerre M, Anton M. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles[J]. **Meat Science**, 1992,32:331—342.

(责任编辑:朱明)