

牡蛎蛋白初步研究

胡亚芹¹, 梅映昊², 赵耘², 赵金华², 姚倩², 蔡培烈²

(1. 国家海洋局杭州水处理中心, 浙江 杭州 310012; 2. 海王集团技术中心, 广东 深圳 518057)

摘 要: 盐析法分离制得牡蛎蛋白, 经凯氏定氮法测得牡蛎粗提物中蛋白含量为 38.6%; 游离氨基氮占总氮含量的 21.6%。通过酶法水解蛋白, 初步分析了牡蛎蛋白的水解特性。SDS 凝胶电泳结果表明牡蛎含有 4 种主要蛋白区带, 平均相对分子质量分别为 16172, 17633, 43227, 57909。

关键词: 牡蛎; 牡蛎蛋白; 酶解 SDS; 凝胶电泳; 等离子体发射光谱(ICP)

中图分类号: R931.74 R917.796 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2003)02-0036-03.

Preliminary Studies on Oyster Protein

HU Ya-qin, MEI Ying-hao, ZHAO Yun, *et al.*

(Development Center of Water Treatment Technology, SOA, Hangzhou, 310012, China)

Abstract: Oyster protein was extracted from fresh oyster using salting-out method. It was determined by Kjeldahl procedure that the protein content was about 38.6% and free amino-nitrogen content of total nitrogen was about 21.6%. Hydrolytic characteristic of oyster protein was analyzed by hydrolytic enzymes. SDS-PAGE results showed there were 4 types of protein zones. And the average molecular weight was 16172, 17633, 43227 and 57909, respectively.

Key words: Oyster; Oyster Protein; hydrolysis; SDS-PAGE; ICP

牡蛎 *Oyster* 是一种海产软体动物, 瓣鳃纲, 牡蛎科^[1]。牡蛎入药在我国已有上千年的历史, 《本草纲目》等均记载了牡蛎的治疗功效, 为一种传统的中药材。

牡蛎提取物的营养分析显示, 牡蛎中含有丰富的糖原、蛋白质、必需氨基酸; 特别是牡蛎中高含量的牛磺酸、多种人体必需微量元素, 包括钙、钾、镁、铁、铜、锌、碘、钴、硒等; 多种维生素, 如 B₁、B₂、B₆、C 和 D 等。

牡蛎中含有的这些生物活性物质, 有显著的医疗保健作用, 受到科技界与产业界的重视。日、欧美、澳洲均有相关产品。深圳海王集团在牡蛎系列产品的开发研究中, 已取得良好的经济和社会效益。其牡蛎的深度开发与研究课题已被列入国家 863。为进一步推进该课题的产业化发展, 正在努力开发研制高效的牡蛎保健食品与药品。牡蛎软体中

含有大量蛋白(约占干物质重的 39%)。为提高牡蛎蛋白的消化吸收效果, 拟将牡蛎中大分子蛋白肽链打断。为此, 本文研究了牡蛎蛋白的酶法水解性质。鉴于牡蛎蛋白 Zn、Cu 含量较高, 故对牡蛎蛋白进行了 ICP 分析, 希望发现有应用价值的金属蛋白。

1 实验材料

近江牡蛎 *Ostrea rivularis* Gould 生物品种由中山大学生命科学学院杨大伟硕士鉴定, 负责人为吕军仪教授。该实验材料牡蛎由深圳海王集团三亚海水养殖基地提供; 紫外分光光度计, 岛津 UV-2201 型; 硫酸铵(分析纯), 广州化学试剂厂; 聚乙二醇 20000, 广州市医药公司化学试剂玻璃仪器批发部进口分装; 透析袋, BioDesign Inc. of New York (8000); 胃蛋白酶, 中国医药集团上海化学试

剂公司进口分装, F990419; 木瓜蛋白酶, MERK, F416547; 标记蛋白, 美国安法玛西亚公司进口试剂; 酚酞指示剂($2.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇); 中性甲醛溶液(在 100mL $36\% \sim 37\%$ 分析纯甲醛溶液中加入 0.8mL 0.25% 酚酞乙醇水溶液, 用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液滴定到微红, 此试剂在用前配制); XY-DI-II28B 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 实验方法

2.1 牡蛎粗提物中蛋白含量测定

凯氏定氮法^[3]测定蛋白含量; 甲醛滴定法测定游离氨基含量^[3]。其原理为游离氨基与甲醛缩合释放 H^+ , 以 NaOH 滴定形成的 H^+ 来计算游离氨基含量。

2.2 酶法水解牡蛎粗提物中所含蛋白

比较胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶对牡蛎蛋白的水解作用。酶解条件^[3]: 系列浓度($8.9, 13.4, 26.7, 32, 80\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的 100mL 牡蛎粗提物分别加入 10mL 酶液(含酶量均为 $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 37°C 孵育水解。甲醛滴定法测定游离氨基生成量。

2.3 牡蛎蛋白分离^[4]

新鲜牡蛎软体, 4°C 下以 2 倍量生理盐水匀浆, $3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15min 。取上清液, 分别加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 使溶液的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度分别达到 $50\%、75\%$ 和 100% , 4°C 下静置 12h 。 $3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15min , 取沉淀, 少量水溶解后, 倒入透析袋进行脱盐。每 2h 换水一次。直至 15% BaCl_2 检测溶液中无 SO_4^{2-} 存在。取蛋白, 考马氏亮蓝法^[5]与凯氏定氮法^[3]同时测定蛋白浓度, ICP 法进行微量元素分析。

2.4 电泳^[6]以及 $\text{Zn}、\text{Cu}$ 含量 ICP 分析

电泳仪胶槽玻璃板以 3% 琼脂密封。以 Tris 缓冲液、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS(十二烷基磺酸钠)、硫酸铵、TEMED(四乙二胺)制备胶体。在 $30\mu\text{L}$ 蛋白样品液中添加 $10\mu\text{L}$ 还原液, 沸水浴 5min , 冷却后备

用。标记蛋白同此处理^[7]。电泳。考马氏亮蓝法染色^[8,9]。ICP 分析由中山大学分析测试中心完成。

3 结果与讨论

3.1 蛋白分离与含量测定

凯氏定氮法测得牡蛎水提物总氮含量为: $(6.186 \pm 0.205)\%$ 。按此计算, 蛋白含量约为: $(38.65 \pm 1.29)\%$; 甲醛滴定法测得游离氨基氮含量为 1.34% ; 由此计算, 游离氨基氮占总氮含量的 21.6% 。

盐析法分离蛋白是经典的方法。以凯氏定氮法与考马氏亮蓝法进行蛋白含量测定, 两法结果相近, 50% 饱和度的硫酸铵盐析所得牡蛎蛋白纯度达 89% , 回收率为 68% 。过高硫酸铵浓度下盐析时, 蛋白纯度下降, 可能与多糖等其它大分子物质沉淀有关, 此外, 盐浓度过高时, 溶液浑浊不易离心。浓度较低时, 蛋白沉淀生成缓慢, 得率降低。经蛋白电泳比较发现, 50% 饱和度的硫酸铵盐析所得牡蛎蛋白与 80% 饱和度的硫酸铵盐析所得牡蛎蛋白的组分一致, 仅部分蛋白含量上有轻微差异, 因此, 在实际研究中, 采用 50% 硫酸铵进行盐析。

3.2 酶解

以胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶水解牡蛎蛋白, 系列底物浓度下, 初速度以胃蛋白酶为最高(见图 1)[粗提物浓度为 $80\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶水解蛋白的 V_{max} 分别为 $9.88、8.75$ 和 4.94 (游高氨基氮 $\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$)。相同底物浓度下, 2.5h 内, 胃蛋白酶和胰蛋白酶对蛋白的水解程度近似, 而木瓜蛋白酶对蛋白的水解程度较低(见图 2)。

结果表明, 对于牡蛎粗提物蛋白, 3 种蛋白酶中, 胃蛋白酶的水解速度较快, 水解程度较高; 胰蛋白酶水解速度略低于胃蛋白酶, 水解程度与胃蛋白酶相当; 木瓜蛋白酶的水解

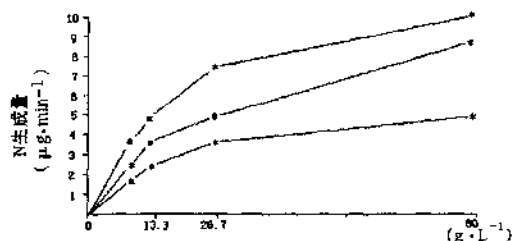


图 1 3 种蛋白酶水解牡蛎粗提物蛋白的底物浓度-初速度曲线(酶浓度为 $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

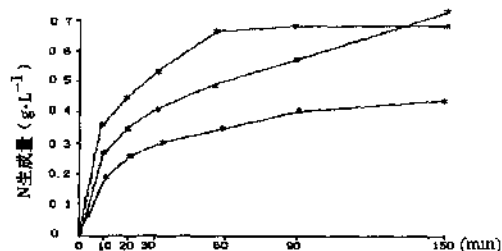


图 2 3 种蛋白酶水解牡蛎粗提物蛋白的时间-产物曲线(牡蛎粗提物浓度为 $26.7\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶浓度为 $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

速度与水解程度均较低。粗提物浓度为 $8.9\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,上述实验条件下,2.5h 后,胃蛋白酶水解蛋白生成的游离氨基氮 ($0.35\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 占粗提物含氮量 ($5.4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 6.5%,对于胰蛋白酶和木瓜蛋白酶,生成的游离氨基氮 ($0.28\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.14\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别占粗提物含氮量的 5.2% 和 2.6%。

故在实际产业化应用中,可采用胃蛋白酶对牡蛎蛋白进行酶解,以期达到水解大分子蛋白,提高其消化吸收效果的目的。

3.3 电泳

本研究采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳。根据各次电泳中标准蛋白的对数相对分子质量对电泳迁移距离作图,经回归计算得出相对分子质量-距离曲线,由此计算主要样品蛋白的相对分子质量。对 9 张电泳胶片 4 个主要蛋白进行相对分子质量分析,结果表明,4 种主要蛋白的相对分子质量分别为:

16172 ± 867 ; 17633 ± 759 ; 43227 ± 1834 ; 57909 ± 2034 。

3.4 ICP 检测

牡蛎总蛋白中 Zn、Cu 含量较高。ICP 分析表明,50% 盐析的牡蛎蛋白中 Zn、Cu 含量分别为 82.46×10^{-6} 和 34.41×10^{-6} 。相对分子质量 9000 以下的蛋白带中 Zn 含量特别高 (381.6×10^{-6} , 对照组含量 $< 0.1 \times 10^{-6}$),说明相对分子质量较低的牡蛎金属蛋白确存在。目前正在对这些蛋白区带进行具体详细分析研究,希望它们具有产业化应用前景。

参考文献

- [1] 江苏中医学院. 中药大字典[M]. 上海: 上海科技出版社, 1995: 1124.
- [2] 田中达郎著, 屈尾忠正编译. 牡蛎提取物[M]. 香港: 香港雅林出版社, 1992: 16.
- [3] 北京大学. 生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988: 91.
- [4] 郭勇. 酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 93.
- [5] Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgramm-quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding[J]. *Analytical Biochem*, 1976, 72: 248.
- [6] 胡书能, 万国贤. 同工酶技术及应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 129.
- [7] Huff-tonergan E, Parrish Jr FC, Robson RM. Effects of postmortem aging time, animal age and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle[J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73: 1064.
- [8] Casserly U, Mooney MJ, Troy D. Standardisation and application of a semi-quantitative SDS-PAGE method for measurement of myofibrillar protein fragments in bovine longissimus muscle[J]. *Food Chemistry*, 2000, 69(4): 379.
- [9] Pommier SA, Poste LM, Butler G. Effect of low voltage electrical stimulation on the distribution of cathepsin D and the palatability of the longissimus dorsi from veal calves fed a corn or barley diet[J]. *Meat Science*, 1987, 21: 203.

(收稿日期: 2002-08-02)