

响应面法优化提纯牛肉肌红蛋白

郑 娅, 胡生海, 何元翔, 王佳妮

(甘肃省农业科学院农产品贮藏加工研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以牛背肌肉为原料, 筛选 Tris-HCl 复合提取液 pH、提取液浓度、提取时间、料液比、硫酸铵溶液饱和度等对肌红蛋白提取有影响的因素, 并从中选出具有显著影响的因素(提取液 pH、提取液浓度、硫酸铵溶液饱和度)进行响应面优化试验, 确定牛肉肌红蛋白提取最优工艺参数提取液 pH 为 8.15、硫酸铵溶液饱和度 90.93 %、提取时间 1.63 h。对粗提蛋白进行纯化及层析交换分离, 得到纯度较高的肌红蛋白含量 2.14 mg/mL, 总蛋白浓度 2.39 mg/mL, 样品纯度达到 91.95%。

关键词: 肌红蛋白; 响应面法优化试验; 提取纯化

中图分类号: TS251.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)11-0040-03

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2019.11.010](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2019.11.010)

Extracted and Purified Myoglobin in Beef Using Response Surface Method

ZHENG Ya, HU Shenghai, HE Yuanxiang, WANG Jiani

(Agricultural Products Storage and Processing Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In this study, *Longissimus dorsi* of cattle was used as the material, and the factors of affect the extraction of myoglobin were screened, such as pH value of Tris-HCl composite extracting solution, extract concentration, extracting time, solid-liquid ratio, ammonium sulfate saturation. The factors with significant influence (pH of the extract, concentration of the extract, saturation of ammonium sulfate solution) were selected for response surface optimization test, and the optimal extraction parameters of beef myoglobin were determined: pH value of extracting solution was 8.15, saturation of ammonium sulfate solution was 90.93 %, and extraction time was 1.63 h. The crude protein was dialysis purification and separation by chromatography exchange, to obtain the high purity myoglobin content was 2.14 mg/mL, the total protein concentration was 2.39 mg/mL, and the purity of the sample reached 91.95%.

Key words: Myoglobin; Response surface optimization test; Extraction and purification

作为牛肉制品加工过程中的重要反应, 脂质氧化是影响安全品质的主因^[1]。其中, 肌红蛋白(Myoglobin, Mb)所介导的脂质自动氧化是脂质氧化的重要途径。Mb 是存在于动物肌肉组织细胞中, 贮存并分配氧的色素类蛋白质, 由 1 条多肽链(珠蛋白, Globin)

和 1 个血红素辅基(Hemin)构成^[2]。根据配位分子的不同, Mb 在肌肉中主要以 3 种形态存在, 即还原型肌红蛋白(myoglobin, Mb)、氧合肌红蛋白(Oxymyoglobin, OxyMb)、高铁肌红蛋白(Metmyoglobin, MetMb)^[3]。肌肉组织作为一个复杂的系统, 不易明确 Mb

收稿日期: 2019-09-18

基金项目: 甘肃省农业科学院科技支撑计划(2017GAAS43)。

作者简介: 郑 娅(1987—), 女, 山东烟台人, 研究实习员, 硕士, 主要从事农产品精深加工与现代贮运方面的研究工作。联系电话: (0)13893282623。

对肌肉脂质的作用,需对其分离纯化后做单项性质研究,总体来说,用 Tris-HCl 缓冲剂提取,并用硫酸铵盐析, Mb 的提取纯化效果最好^[4]。因此,对牛肉中的肌红蛋白进行提取纯化,并保持其还原活性,是进一步探索肌红蛋白性质机理,明确牛肉制品加工环节肉质成分间相互作用的基础研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验原料均取自甘肃祁连牧歌实业有限公司。选取 5 头健康西门塔尔牛,屠宰后取背最长肌,去除表面脂肪筋腱等异物,液氮冷冻运回实验室,置于 -80 ℃ 条件下保存。试验试剂硫酸铵、氯化钠、甘油、EDTA、二巯苏糖醇(DTT),均由天津光复精细化工研究所提供;BSA(牛血清蛋白),由上海国药集团化学试剂有限公司提供;考马斯亮蓝 R-250 和 G-250,由阿拉丁试剂(上海)有限公司提供;三羟甲基氨基甲烷(Tris),由美国 Amresco 公司提供。

1.2 仪器与设备

TGL-24M 台式高速冷冻离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司;SP-756P 紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;Sephadex G-75,美国 GE 公司;PHS-3C pH 计,上海精密科学仪器有限公司;JJ-2 高速组织匀浆器,金坛市富华电器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 肌红蛋白粗提工艺 参考林森森、吴成帆总结的方法^[5],并稍做修改。取牛肉背最长肌,去除表面筋膜及结缔组织,切碎。准确称取一定量肉样,加入 5 倍体积提取缓冲剂(10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,含 1 mmol/L EDTA、0.54 mmol/L 甘油、1 mmol/L DTT,4 ℃),10 000 r/s 下匀浆 1 min,4 ℃ 下静置,然后在 9 600 r/s 下离心 10 min(4 ℃),滤纸过滤,得滤液。在滤液中加入固体硫酸

铵,一边加一边搅拌,至一定饱和度,然后 4 ℃ 下静置 30 min 以充分沉淀蛋白质。在 12 000 r/s、4 ℃ 下离心 30 min,收集沉淀测定样品吸光度,计算样品肌红蛋白含量及其纯度。

1.3.2 肌红蛋白提取工艺优化 采用单因素试验,选取提取时间(A)、pH(B)、提取液浓度(C)、盐析液饱和度(D)、料液比(E)5 个因素,通过单因素试验确定其对肌红蛋白提取量的影响,因子水平见表 1。

表 1 试验因子

pH	提取液浓度 /mmol/L	提取时间 /h	料液比	盐析饱和液浓度 /%
7.8	5.0	0.5	1:2	80
8.0	7.5	1.0	1:3	85
8.2	10.0	1.5	1:5	90
8.4	15.0	2.0	1:7	95
8.6	20.0	2.5	1:8	100

1.3.3 肌红蛋白提取 Plackett-Burman 试验设计 分析上述单因素试验的变化趋势,利用 Design-expert 8.05 软件,以响应值为肌红蛋白含量,设计 Plackett-Burman 试验(N=12)。

1.3.4 响应面优化试验设计 针对肌红蛋白提取工艺,以提高肌红蛋白含量为目标,对影响肌红蛋白提取量的因素进行响应面优化试验。

1.3.5 肌红蛋白提取物透析 经盐析的肌红蛋白沉淀用 2 倍体积的 Tris-HCl(pH 8.5, 10 mmol/L)溶解,置于透析袋中(截留分子量为 8k-14k Da),用相同缓冲液透析 24 h,缓冲液置换 10 次,透析液进行磁力搅拌,控制温度为 0~4 ℃。

1.3.6 凝胶过滤层析分离提纯 选择 Sephadex G-75 作为柱料,将柱子用 pH 8.5, 1 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液平衡,用 0.1 mol/L NaCl 溶液(pH 8.4, 含有 10 mmol/L Tris-HCl)进行线性洗脱,流速为 2 mL/min,紫外检测波长为 280 nm。

1.3.7 相关指标测定 Mb 含量测定采用紫外分光光度法,测定 Mb 溶液在 542 nm 和

700 nm 处的吸光值, 重复 3 次, 取平均值。

Mb 含量计算公式如下:

$$C_{Mb} (\text{mmol/L}) = (A_{542} - A_{700}) \times 2.303, \text{ 其中}$$

Mb 是 3 种衍生型肌红蛋白总量。

Mb 纯度的测定: 总蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定; 标准曲线用 0 ~ 0.1 mg/mL 的牛血清蛋白质测定, 结果用 mg/mL 表示。

$$\text{Mb 纯度} = (\text{Mb 含量} / \text{总蛋白质含量}) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 肌红蛋白单因素试验结果

2.1.1 提取时间对肌红蛋白含量的影响 由图 1 可以看出, 肌红蛋白含量随着提取时间延长, 在 0 ~ 1.5 h 内逐步提高; 在提取 1.5 h 时含量达到最大值, 为 1.63 mg/mL。而后继续延长提取时间, 肌红蛋白含量明显下降。故在提取时间为 1.0 ~ 2.0 h 时, 肌红蛋白含量相对较高。

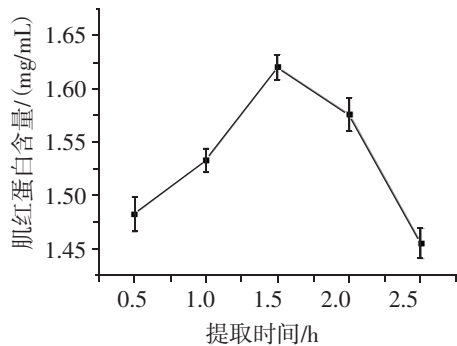


图 1 提取时间对肌红蛋白含量影响

2.1.2 pH 对肌红蛋白含量影响 由图 2 可以看出, 肌红蛋白含量随着 pH 的增大先增加后降低。在 pH 为 8.2 时肌红蛋白含量达

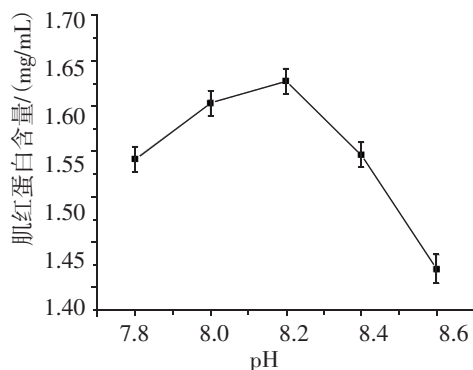


图 2 pH 对肌红蛋白含量的影响

到最大, 为 1.62 mg/mL。而后 pH 继续增加, 肌红蛋白含量明显下降。故在 pH 为 8.0 ~ 8.4 时, 肌红蛋白含量相对较高。

2.1.3 提取液浓度对肌红蛋白含量影响 由图 3 可以看出, 随着提取液浓度增大, 肌红蛋白含量先增大后减小。在提取液浓度为 10.0 mmol/L 时肌红蛋白含量达到最大值, 为 1.61 mg/mL。而后提取液浓度继续增加, 肌红蛋白含量明显下降。故在 7.5 ~ 12.5 mmol/L 时, 肌红蛋白含量相对较高。

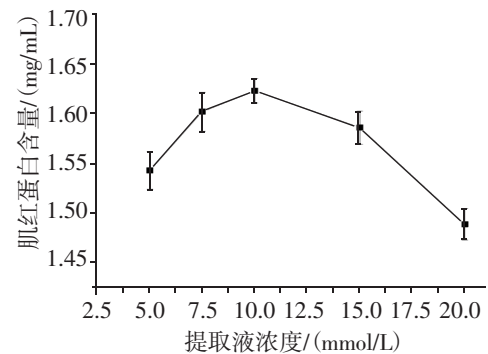


图 3 提取液浓度对肌红蛋白含量影响

2.1.4 料液比对肌红蛋白含量影响 由图 4 可以看出, 随着料液比的增大, 肌红蛋白含量先增大后减小, 在料液比为 1 : 5 时肌红蛋白含量达到最大值, 为 1.62 mg/mL, 而后料液比继续增加, 肌红蛋白含量明显下降。由此看出, 在料液比为 1 : 3 ~ 1 : 7 时, 肌红蛋白含量相对较高。

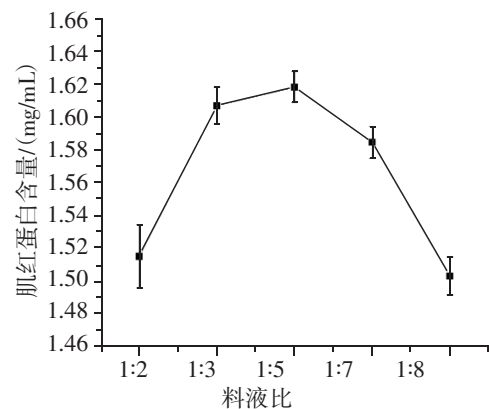


图 4 料液比对肌红蛋白含量影响

2.1.5 硫酸铵饱和度对肌红蛋白含量影响 由图 5 可以看出, 随着硫酸铵溶液饱和度的增高, 肌红蛋白含量呈现先上升后下降的趋

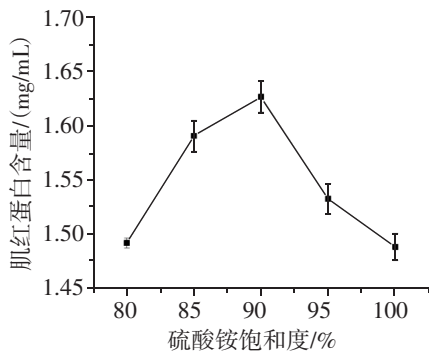


图 5 硫酸铵饱和度对肌红蛋白含量影响

势。硫酸铵溶液饱和度为 90% 时肌红蛋白含量达到最大，为 1.63 mg/mL。整体来看，在硫酸铵饱和度为 85%~95% 时，肌红蛋白含量相对较高。

由表 2、表 3、表 4 可以得出，Plackett-Burman 试验各因素效应的显著性可确定，5 个因素中能显著影响肌红蛋白得率的 3 个因素依次为提取时间 ($P=0.0075$)、硫酸铵饱和度 ($P=0.0016$)、提取液 pH ($P=0.0134$)。从而确定了提取时间、硫酸铵溶液饱和度、提取 pH 等 3 个因素对肌红蛋白提取具有显著影响。

表 2 肌红蛋白制备因子影响水平范围

水平	因素				
	提取时间 /h	pH	提取液浓度 /mmol/L	盐析饱和度 /%	料液比
-1	1.0	8.0	7.5	85	1:3
1	2.0	8.4	15.0	95	1:7

表 3 Plackett-Burman 试验设计及结果

实验号	A	B	C	D	E	肌蛋白含量 / (mg/mL)
1	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.55
2	-1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	1.63
3	1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.47
4	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	1.00	1.53
5	1.00	1.00	1.00	-1.00	-1.00	1.50
6	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.55
7	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.41
8	1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	1.52
9	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.60
10	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	1.53
11	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	1.55
12	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.48

表 4 Plackett-Burman 试验模型方差分析 ($\alpha=0.05$)

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.034	5	0.004 36	12.56	0.003 9**
A	0.008 5	1	0.008 5	15.67	0.007 5**
B	0.006 5	1	0.006 5	12.00	0.013 4*
C	0.002 7	1	0.002 7	4.96	0.067 6
D	0.016	1	0.016	29.63	0.001 6**
E	0.000 3	1	0.000 3	0.55	0.486
残差	0.003 3	6	0.000 54		
总值	0.027	11			
R^2	0.912 8				
Adj. R^2	0.840 2				
Pred. R^2	0.651 2				
CV/%	1.53				

2.2 牛肉肌红蛋白提取工艺的响应面优化试验

以肌红蛋白含量为响应值，在上述单因素试验范围内，通过 Design-expert 软件进一步完成中心旋转组合试验。试验因素水平设计、试验结果见表 5、表 6。中心旋转组合试验方差分析结果(表 7)表明，模型项 $P < 0.01$ ，说明肌红蛋白提取优化，所得回归方程与相

表 5 中心组合试验设计因素水平

水平	因素		
	提取时间 /h	pH	盐析饱和度 /%
-1	1.0	8.0	85
0	1.5	8.2	90
1	2.0	8.4	95

表 6 中心组合试验设计及结果

试验号	A	B	C	肌蛋白含量 / (mg/mL)
1	2.00	8.00	90.00	1.59
2	1.00	8.40	90.00	1.53
3	1.50	8.00	85.00	1.52
4	2.00	8.20	95.00	1.57
5	1.50	8.40	85.00	1.51
6	1.50	8.20	90.00	1.62
7	1.50	8.20	90.00	1.65
8	2.00	8.20	85.00	1.48
9	1.50	8.20	90.00	1.61
10	1.00	8.20	95.00	1.50
11	1.50	8.20	90.00	1.63
12	2.00	8.40	90.00	1.55
13	1.00	8.20	85.00	1.50
14	1.00	8.00	90.00	1.55
15	1.50	8.40	95.00	1.54
16	1.50	8.00	95.00	1.56
17	1.50	8.20	90.00	1.62

表 7 中心组合试验方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.042	9	0.004 4	29.69	<0.000 1**
A	0.001 5	1	0.001 5	9.67	0.017*
B	0.001	1	0.001	6.47	0.038*
C	0.003 2	1	0.003 2	20.46	0.002 7**
AB	0.000 1	1	0.000 1	0.64	0.450 3
AC	0.002	1	0.002	12.95	0.008 8**
BC	0.000 025	1	0.000 025	0.16	0.701 2
A ²	0.008 7	1	0.008 7	55.72	0.000 1**
B ²	0.002 7	1	0.002 7	17.50	0.004 1**
C ²	0.019	1	0.019	124.46	<0.000 1**
残差	0.001 1	7	0.000 16		
失拟项	0.000 18	3	0.000 06	0.25	0.855 6
纯误差	0.000 92	4	0.000 23		
总值	0.043	16			
R ²	0.974 5				
Adj.R ²	0.941 7				
Pred.R ²	0.901 2				
CV/%	0.80				

关因素间的关系极显著。失拟项 $P=0.855 6 > 0.05$ ，确定系数 R -Squared 与 $Adj.R$ -Squared 分别为 97.45% 和 94.17%，二者相差不大。另外，对肌红蛋白含量结果预测进行整体估计， R -Squared 和 $Pred.R$ -Squared 分别为 97.45% 和 90.12%，说明该模型具有较为合理的拟合度。同时，提取时间、pH 两个因素对肌红蛋白含量的影响显著 ($P < 0.05$)；硫酸铵饱和度、提取时间、pH 等 3 个因素的二次项、硫酸铵饱和度及其与提取时间的交互，对肌红蛋白含量影响极显著 ($P < 0.01$)。

肌红蛋白最佳提取参数通过对回归方程求最大值来完成(图 6、图 7、图 8)，最大

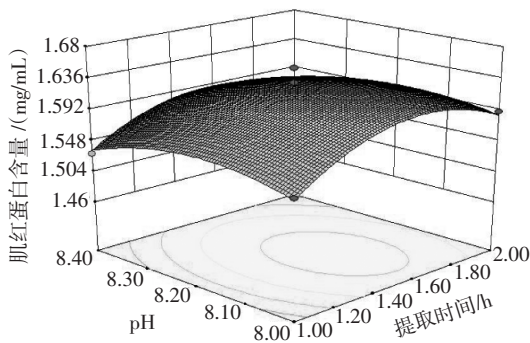


图 6 提取液 pH 与提取时间交互作用的响应曲面

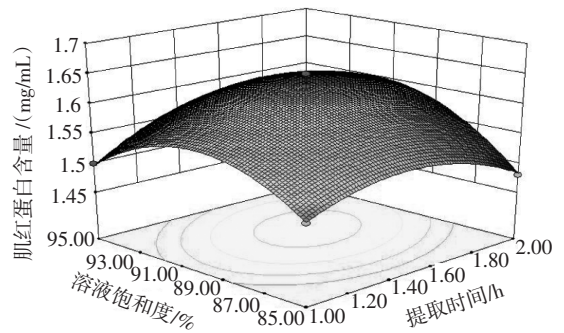


图 7 硫酸铵饱和度与提取时间交互作用的响应曲面

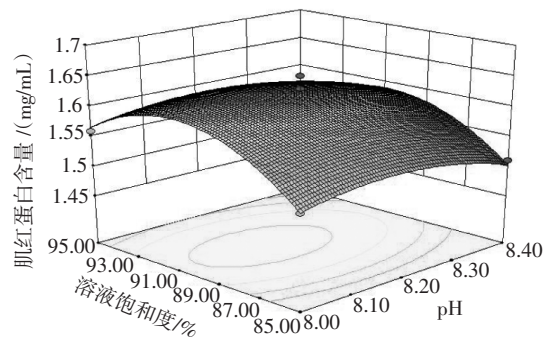


图 8 提取液 pH 与硫酸铵饱和度交互作用的响应曲面

响应值 Y (肌红蛋白含量) 达 1.62 mg/mL，此时对应的因素变量为提取液 pH 8.15、硫酸铵溶液饱和度 90.93 %、提取时间 1.63 h，

而后利用预测所得的最佳提取条件进行 3 次试验, 最终所得肌红蛋白(Mb)平均含量为 1.65 mg/mL, 总蛋白浓度为 9.67 mg/mL。

2.3 牛肉肌红蛋白分离纯化

通过图 9 看出, 经粗提取后, 所得肌红蛋白(Mb)平均含量为 1.65 mg/mL, 总蛋白浓度为 9.67 mg/mL; 再经透析后 Mb 含量为 1.98 mg/mL, 总蛋白浓度 8.13 mg/mL; 最后经凝胶过滤层析得到纯度较高的 Mb 样品, 洗脱图谱显示, 在 280 nm 处有 2 个主吸收峰, 第 2 个峰吸收值最大, 样品显示出浅红棕色, Mb 含量为 2.14 mg/mL, 总蛋白浓度 2.39 mg/mL。

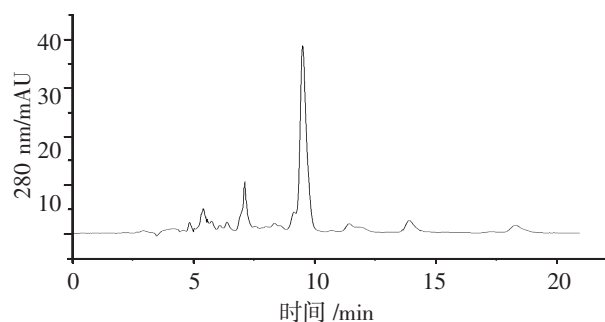


图 9 肌红蛋白层析洗脱曲线

3 小结与讨论

以牛背肌肉为原料, 筛选 Tris-HCl 复合提取液 pH、提取液浓度、提取时间、料液比、硫酸铵溶液饱和度对肌红蛋白提取有影响的因素, 通过响应面优化试验确定牛肉肌红蛋白提取最优工艺参数为提取液 pH 8.15、硫酸铵溶液饱和度 90.93%、提取时间 1.63 h。对牛肌肉中肌红蛋白进行提取分离, 粗提取所得肌红蛋白(Mb)平均含量为 1.65 mg/mL, 总蛋白浓度为 9.67 mg/mL; 经透析处理后 Mb 含量为 1.98 mg/mL, 总蛋白浓度 8.13 mg/mL, 经层析纯化后 Mb 含量为 2.14 mg/mL, 总蛋白浓度 2.39 mg/mL, 样品纯度达到 91.95%。

吴成帆试验发现^[6], Mb 一次沉淀效果低于分级沉淀, 因此本试验逐步添加硫酸铵固体至溶液中, 硫酸铵饱和度达到实验设计。同时, 为防止温度升高导致 Mb 变性氧

化^[7], 关键试验均在 4 ℃ 条件下进行。另外, 为保证 Mb 蛋白活分子链之间不会交联, 影响提取物得率及还原性^[8], 在 Tris-HCl 提取缓冲液加入了甘油、DTT 进行复配, 结合透析及凝胶过滤层析, 此方法不会破坏蛋白的结构与功能^[9], 较高纯度的肌红蛋白可有效提升后续肌红蛋白性质分析、肉质成分相互作用等研究内容准确性与科学性。

参考文献:

- [1] CALKINS C. A fresh look at meat flavor[J]. Meat Science, 2007, 77(1): 63-80.
- [2] LIVINGSTON D J, BROWN W D. The chemistry of myoglobin and its reactions[J]. Food Technology, 1981, 25(3): 244-252.
- [3] PERUTZ, MAX F. Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide[J]. Annual Review of Physiology, 1990, 52(1): 1-26.
- [4] 何俊燕, 李来好, 郝淑贤, 等. 硫酸铵盐析法分离罗非鱼肌红蛋白的研究[J]. 南方水产科学, 2009, 5(2): 17-22.
- [5] 林森森. 扁舵鲈肌红蛋白和脂质氧化的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2014.
- [6] 吴成帆. 牛肉肌红蛋白分离纯化及脂质氧化对其稳定性的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [7] XIONG Y L, BLANCHARD S P, OOI ZUMI T, et al. Hydroxyl radical and ferryl-generating systems promote gel network formation of myofibrillar protein[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(2): C215-221.
- [8] CHAIJAN M, BENJAKUL S, VISESSAN-GUAN W, et al. The effect of freezing and aldehydes on the interaction between fish myoglobin and myofibrillar proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(11): 4562-4568.
- [9] 杨超, 杨明, 韩英素, 等. 发酵液中牛肉风味肽分离纯化方法的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2007(2): 24-27.

(本文责编: 陈伟)