

大马哈鱼鱼精蛋白的提取及抑菌作用的研究

刘红玉¹, 姜学芬², 崔洪斌^{1,*}

(1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 黑龙江大通生物技术有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要: 对从大马哈鱼精巢中提取鱼精蛋白的工艺条件及其抑菌活性进行了研究。采用正交试验法筛选提取鱼精蛋白的最佳工艺条件, 其条件为: H_2SO_4 浓度为 7.5%, 用量为鱼精的 3.5 倍, 提取时间 2h, 95% 乙醇用量为鱼精的 3 倍。对鱼精蛋白进行分析, 其蛋白质含量达到 89.7%, 且精氨酸含量较高。该鱼精蛋白对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和酵母菌均具有较强的抑菌活性, 可作为一种天然防腐剂。

关键词: 大马哈鱼; 鱼精蛋白; 抑菌活性

Study on Extraction and Antimicrobial Activities of Protamine from Oncorhynchus Keta Spermary

LIU Hong-yu¹, JIANG Xue-fen², CUI Hong-bin^{1,*}

(1. Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

2. Heilongjiang DaTong Biotechnology Co. Ltd., Harbin 150090, China)

Abstract: Objective: The extraction process of protamine from *Oncorhynchus Keta* spermary and its antimicrobial activities were studied. The extraction conditions of extracting protamine were optimized by the orthogonal design: H_2SO_4 concentration 7.5%, volume H_2SO_4 3.5 times that of speractary volume of 95% alcohol solution 3 times that of spermary and extraction time 2 hours. The nutritive values of the protamine were analysed. The results showed that the protein content of protamine is 89.7%, and the content of arginine is even higher. The results of active test suggested that the protamine shows fairly high antimicrobial activity against gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* as well. It is an effective natural antiseptic.

Key words: *Oncorhynchus Keta*; protamine; antimicrobial activity

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)02-0037-03

大马哈鱼(*Oncorhynchus Keta*)是鲑科(Salmonidae)鱼类, 是黑龙江省特产洄游鱼种, 世界上只有美国、日本、加拿大、俄罗斯、朝鲜半岛和中国为鱼源国, 其营养极为丰富。成熟雄鱼的精巢组织称鱼精, 因具有异味, 多被废弃或作废料。但鱼精中含有鱼精蛋白(protamine), 是一种碱性蛋白质^[1]。其蛋白质结构中精氨酸含量相对较多, 精氨酸具有强化肝功能, 刺激垂体释放促性腺激素的作用, 可治疗男性不育症。同时, 鱼精蛋白具有广谱抗菌活性, 是一种天然防腐剂^[2-3]。由于鱼精蛋白完全是天然成分, 具有很高的安全性, 具有安全、无毒、无副作用的优点^[4], 作为一种新型防腐剂, 在食品工业中具有广阔的应用前景。

目前国内外对鱼精蛋白的研究涉及到一些淡水鱼和海水鱼, 尚无对大马哈鱼鱼精蛋白的研究。本文以大

马哈鱼废弃物——精巢为原料, 提取鱼精蛋白, 并对其抗菌活性进行研究, 不仅为开发新型的天然食品防腐剂提供理论依据, 还可充分利用和开发鱼类资源, 为大马哈鱼的产业化利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 原料

实验用大马哈鱼从超市购买, 剖鱼, 取出精巢, 冰存储用。

1.1.2 试剂和仪器设备

氯化钠、95%乙醇、硫酸、乙醚、丙酮。

布氏漏斗、离心机、高速组织捣碎机、恒温电热真空干燥箱、超净工作台、恒温培养箱、日立L8800

收稿日期: 2006-01-17

*通讯作者

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(GB03B401)

作者简介: 刘红玉(1970-), 女, 博士研究生, 主要从事功能活性物质和食品添加剂的研究。

氨基酸分析仪等。

1.1.3 供试菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Bacillus coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)。

1.1.4 基本培养基

营养琼脂培养基、LB(Luria-Bertani)培养基、麦氏(Meclary)琼脂培养基。

1.2 方法

1.2.1 提取方法

大马哈鱼鱼精蛋白的提取: 根据有关文献和对鱼精蛋白的提取工艺条件的初步实验结果, 我们对提取工艺条件中 H_2SO_4 的浓度、用量、提取时间和 95% 乙醇用量进行了四因素三水平的正交试验, 并用鱼精蛋白的得率作为测定指标。具体方法是: 将鱼精巢解冻, 去除污物和结缔组织, 称取 100g 大马哈鱼精巢于组织捣碎机中, 加入 200ml 0.14mol/L NaCl 溶液, 匀浆 1min 后, 冰浴中搅拌 20min, 静置 10min, 4000r/min 低温(0℃)离心分离 10min, 倾出上清液, 沉淀再重复操作一次。将沉淀物捣碎, 按一定用量加入一定浓度的 H_2SO_4 进行一定时间的冰浴提取, 4000r/min 低温(0℃)离心分离 10min, 上清液过滤, 离心后的沉淀再重复上述操作一次。合并两次提取液, 真空过滤, 滤液用一定量的 95% 冷乙醇沉淀, 离心, 沉淀物用丙酮洗涤两次, 乙醚洗涤一次, 真空干燥, 即得精制鱼精蛋白。

1.2.2 分析检测方法

1.2.2.1 蛋白质的测定

采用凯氏定氮法测定。

1.2.2.2 氨基酸组成分析

采用日立 L8800 氨基酸分析仪测定。

1.2.3 抑菌试验

采用杯碟法^[5]。枯草杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌的培养基为营养琼脂培养基, 大肠杆菌的培养基为 LB 培养基, 酵母菌的培养基为麦氏琼脂培养基。分别注入加热融化的素琼脂 20ml 于平皿中作为底层, 使其在皿底内均匀摊布。凝固后, 在平皿中等距离均匀放入已消毒的牛津杯 6 个。分别另取培养基 30ml 加热融化后, 稍冷, 加入 4ml 菌悬液, 摇匀, 使其在底层上均匀摊布, 作为菌层。取出牛津杯。第一个牛津杯中加入一定浓度的鱼精蛋白溶液 110μl, 其余牛津杯采用二倍稀释法加入样品液, 37℃ 培养, 观察抑菌圈大小。抑菌圈 10mm 以上的作为最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

2 结果与分析

2.1 鱼精蛋白提取工艺条件的选择

根据已有资料和初步的实验分析, 选择 $L_9(3^4)$ 正交表对硫酸的浓度、硫酸用量、提取时间和 95% 的乙醇用量进行正交试验。试验设计如表 1 所示。

表 1 因素水平表
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A H_2SO_4 浓度(%)	B H_2SO_4 用量(倍)	C 乙醇用量(倍)	D 提取时间(h)
1	5.0	2.5	2.5	2.0
2	7.5	3.0	3.0	2.5
3	10.0	3.5	3.5	3.0

以鱼精蛋白的得率作为测定指标, 进行测定。测定结果如表 2 所示。通过分析, 我们得出对得率影响最大的是乙醇用量和硫酸浓度, 其次是硫酸用量, 而提取时间影响最小。

表 2 正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal test

试验号	因素				蛋白质得率(%)
	A H_2SO_4 浓度(%)	B H_2SO_4 用量(倍)	C 乙醇用量(倍)	D 提取时间(h)	
1	1(5.0)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.0)	5.18
2	1	2(3.0)	2(3.0)	2(2.5)	3.25
3	1	3(3.5)	3(3.5)	3(3.0)	4.67
4	2(7.5)	1	2	3	7.43
5	2	2	3	1	5.37
6	2	3	1	2	6.81
7	3(10.0)	1	3	2	2.19
8	3	2	1	3	3.64
9	3	3	2	1	6.26
K_1	13.10	14.80	15.63	16.81	T=44.8
K_2	19.61	12.26	20.94	12.25	
K_3	12.09	17.74	12.23	15.74	
k_1	4.377	4.933	5.210	5.603	$\bar{x}=4.98$
k_2	6.537	4.087	6.980	4.083	
k_3	4.030	5.913	4.077	5.247	
极差 R	2.507	1.826	2.903	1.520	
优水平	A_2	B_3	C_2	D_1	

鱼精蛋白在精巢中通常以核蛋白(DNA-蛋白质)的形态存在, 即核蛋白结合键不牢固, 甚易分开, 所以可用硫酸使其分离, 制成鱼精蛋白硫酸盐。由表 2 可以看出, 当硫酸浓度过低、用量少时, 提取不完全。硫酸浓度过高时, 也不利于提取, 而用量过大时, 对提取效果的改善不明显, 且造成试剂浪费。而当提取时间大于 2h 时, 对结果的影响很小。所以根据试验结果确定: H_2SO_4 浓度为 7.5%, 用量为鱼精的 3.5 倍, 提取时间 2h。鱼精蛋白硫酸盐不溶于酒精或乙醚, 易溶于水。用 95%

乙醇对其进行沉淀, 用量少时, 提取不完全, 根据试验结果确定 95% 乙醇用量为鱼精的 3 倍时, 可以将鱼精蛋白充分沉析出来。

经综合考虑, 我们确定鱼精蛋白的最佳提取工艺条件是: H_2SO_4 浓度为 7.5%, 用量为鱼精的 3.5 倍, 提取时间 2h, 95% 乙醇用量为鱼精的 3 倍。我们对已选定的最佳工艺条件进行重复实验, 获得的鱼精蛋白颜色为白色, 得率为 7.38%。

2.2 鱼精蛋白分析检测结果

鱼精蛋白是所有蛋白质中最简单的一种, 分子量较小。它能溶解于水、稀氨水、酸碱中, 加热则不凝固。我们测得提取出的大马哈鱼鱼精蛋白含量为 89.7%, 对其氨基酸组成进行测定, 测定的结果如表 3 所示。

表 3 大马哈鱼鱼精蛋白氨基酸含量

Table 3 Amino acid content of Oncorhynchus Keta protamine

氨基酸	含量(%)	氨基酸	含量(%)
Asp(天门冬氨酸)	0.13	Ile(异亮氨酸)	0.86
Thr(苏氨酸)	0.08	Leu(亮氨酸)	0.21
Ser(丝氨酸)	4.86	Tyr(酪氨酸)	0.18
Glu(谷氨酸)	0.00	Phe(苯丙氨酸)	0.27
Gly(甘氨酸)	2.37	Lys(赖氨酸)	0.19
Ala(丙氨酸)	0.70	His(组氨酸)	0.05
Cys(半胱氨酸)	0.00	Arg(精氨酸)	53.34
Val(缬氨酸)	2.53	Pro(脯氨酸)	5.55
Met(蛋氨酸)	0.05		

由表 3 中可以看出, 大马哈鱼鱼精蛋白氨基酸组成中不含谷氨酸和半胱氨酸, 其中精氨酸含量很高, 高达 53.34%。由于精氨酸在医学上具有强化肝功能, 刺激下丘脑和垂体释放促性腺激素的作用。因此, 鱼精蛋白可作为治疗男性因精液分泌不足和精子缺乏引起的不育症。此外, 精氨酸还具有降血压、促进消化、抑制肿瘤、抗血栓和抑制血液凝固等功能^[6-7], 可作为研制保健药品的重要药源。

2.3 鱼精蛋白抑菌活性的研究

表 4 大马哈鱼鱼精蛋白的最小抑菌浓度

Table 4 MIC of Oncorhynchus Keta protamine

试验菌	MIC($\mu\text{g/ml}$)
枯草杆菌	2500
奥里斯葡萄球菌	2500
大肠杆菌	3125
铜绿假单胞菌	3125
啤酒酵母菌	6250

大马哈鱼鱼精蛋白对各种腐败菌的抑制作用。大马哈鱼鱼精蛋白对革兰氏阳性菌(G^+): 枯草杆菌、金黄色葡萄球菌; 革兰氏阴性菌(G^-): 大肠杆菌、绿脓杆菌; 酵母菌都有抑菌活性。它们的最低抑菌浓度见表

4。MIC 越低, 表明鱼精蛋白对该菌的抑菌作用越强。由表 4 可以看出, 大马哈鱼鱼精蛋白对革兰氏阳性菌的抑菌作用最强, 其次为革兰氏阴性菌, 而对酵母菌的抑菌作用最弱。大马哈鱼鱼精蛋白对革兰氏阳性菌的抑菌效果最好, 可能与革兰氏阳性菌的细胞壁构成有关。革兰氏阳性菌细胞壁上有磷壁酸, 它带有较多的负电荷, 表面具有较强的负电性, 因此具有正电性的鱼精蛋白可以更好地通过静电作用扰乱革兰氏阳性菌的细胞壁和细胞膜结构, 破坏一些与细胞膜有关的新陈代谢过程, 从而达到抑菌作用。

在食品工业上, 过去主要使用化学合成品作食品防腐剂, 如苯甲酸、山梨酸及其盐类、对羟基苯甲酸酯类等。随着社会经济飞速发展, 人们对防腐剂之类的食品添加剂, 不但在安全性上提出更高的要求, 而且追求添加剂的营养化和功能化。而大马哈鱼鱼精蛋白具有广谱抗菌作用, 作为食品的天然防腐剂, 具有广阔的应用前景。

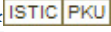
3 结 论

本研究通过正交试验确定提取大马哈鱼鱼精蛋白的最佳工艺条件为: H_2SO_4 浓度为 7.5%, 用量为鱼精的 3.5 倍, 提取时间 2h, 95% 乙醇用量为鱼精的 3 倍。测得该工艺条件下制得的鱼精蛋白得率为 7.38%, 颜色为白色, 蛋白质含量为 89.7%。其氨基酸组成中不含谷氨酸和半胱氨酸, 其中精氨酸含量很高, 高达 53.34%。可作为一种很好的药源和保健食品的新材料。大马哈鱼鱼精蛋白对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和酵母菌均具有较强的抑菌活性, 可作为一种天然的防腐剂。

参考文献:

- [1] 俞加林. 鱼精: 值得开发的药用新资源[J]. 中国海洋药物, 1994, 13(2): 51-52.
- [2] MILLER B, ABRAMS R, DORFMAN A, et al. Antibacterial properties of protamine and histone[J]. Science, 1942, 96: 428-430.
- [3] KAMAL M, MOTOHIRO T. Effect of pH and metal ions on the fungicidal action of salmine sulfate[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1986, 52: 1843-1946.
- [4] OGATA A, ANDO H, KUBO Y, et al. Effects of natural food additive on mouse embryos with the use of whole embryo culture method III Milt protein[J]. Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 1999, 50: 308-310.
- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 561, 1061.
- [6] MOTOHINO T. Protamine and emulsifier as food preservative: Japan, Jp, Kokai Tokyo Koho, 22596[P].
- [7] AKAZAWA H, YAJIMA M. Food preservative containing protamine mixture: Japan, Jp, Kokai Tokyo Koho, 6317679[P].

大马哈鱼鱼精蛋白的提取及抑菌作用的研究

作者: [刘红玉](#), [姜学芬](#), [崔洪斌](#), [LIU Hong-yu](#), [JIANG Xue-fen](#), [CUI Hong-bin](#)
作者单位: [刘红玉, 崔洪斌, LIU Hong-yu, CUI Hong-bin\(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江, 哈尔滨, 150086\)](#), [姜学芬, JIANG Xue-fen\(黑龙江大通生物技术有限公司, 黑龙江, 哈尔滨, 150090\)](#)
刊名: [食品科学](#) 
英文刊名: [FOOD SCIENCE](#)
年, 卷(期): 2007, 28(2)
被引用次数: 1次

参考文献(7条)

1. [MILLER B;ABRAMS R;DORFMAN A](#) [Antibacterial properties of potamine and histone](#) 1942
2. [俞加林](#) [鱼精:值得开发的药用新资源](#) 1994(02)
3. [AKAZAWA H;YAJIMA M](#) [Food preservative containing protamine mixture](#)
4. [MOTOHINO T](#) [Protamine and emulsifier as food preservative](#)
5. [徐叔云;卞如濂;陈修](#) [药理实验方法学](#) 1985
6. [OGATA A;ANDO H;KUBO Y](#) [Effects of natural food additive on mouse embryos with the use of whole embryo culture method](#)
[III Milt protein](#) 1999
7. [KAMAL M;MOTOHIRO T](#) [Effect of pH and metal ions on the fungicidal action of salmine sulfate](#) 1986

引证文献(1条)

1. [郝海燕](#), [沙爱龙](#) [鱼精的研究进展](#)[期刊论文]-[生命科学仪器](#) 2009(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_spkx200702005.aspx