

基于响应面优化的褶牡蛎中金属硫蛋白提取工艺研究

姚冬儿¹, 杨慧琳¹, 斯兴开¹, 张宾¹, 孙继鹏²

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江舟山 316022)

(2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建厦门 361005)

摘要: 探究褶牡蛎中金属硫蛋白的提取方法并优化其分离制备工艺。以褶牡蛎为原料, 采用 Cd²⁺诱导机体产生 MT, 然后根据单因素实验、Box-Behnken 实验原理, 以牡蛎组织与提取液物料比、提取温度、提取 pH 及缓冲液浓度为影响因素, 以金属硫蛋白提取量作为响应值, 进行牡蛎金属硫蛋白提取工艺响应面优化分析。结果发现, 提取条件对金属硫蛋白提取量影响从大到小依次为: 物料比>提取 pH 值>提取温度=缓冲液浓度, 进而获得最佳提取工艺参数为: 物料比 1:4, 提取液 pH 9.0, 提取温度 30℃, 缓冲液浓度 0.25 mol/L, 提取时间 2 h。在此参数条件下, MT 提取量为 0.221 mg/g, 该结果与模型的预测值基本相符。研究结果可为海洋源金属硫蛋白分离提取以及进一步的活性开发与应用, 提供一定的参考与基础。

关键词: 褶牡蛎; 金属硫蛋白; 制备; 响应面

文章编号: 1673-9078(2018)02-189-196

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.030

Optimization for the Extraction Process of Metallothionein from Oyster (*Crassostrea plicatul*) Based on Response Surface Methodology

YAO Dong-er¹, YANG Hui-lin¹, SI Xing-kai¹, ZHANG Bin¹, SUN Ji-peng²

(1.Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, College of Food and Medicine, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)(2.Third Institute of Oceanography, State oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the extraction of metallothionein (MT) from oyster (*Crassostrea plicatul*) and optimize its separation and preparation process. According to the single factor experiment and the Box-Behnken experimental principle, the response surface methodology was performed in this experiment, with the material ratio of the oyster tissue to extract, the extraction temperature, the pH value and buffer concentration were taken as the experimental factors, and the extraction capacity of MT was taken as the response value to perform optimization analysis for the extraction process of metallothionein from oyster (*Crassostrea plicatul*) based on response surface methodology. The results showed that the effects of extraction conditions on the amount of metallothionein extraction descending order were as follows: the ratio of oyster tissue to extraction buffer > pH > extraction temperature = buffer concentration, and then the optimum extraction process parameters were as follows: the material ratio of was 1:4, the value of pH was 9.0, the extraction temperature was 30°C, the concentration of buffer was 0.25 mol/L, and the extraction time was 2 h. Under these conditions, the obtained MT was 0.221 mg/g, which were almost consistent with the predicted data of the model. These results could provide a reference and theoretical basis for the separation and extraction of marine metallothionein in addition to its further exploitation and application of the activity.

Key words: oyster; metallothionein; preparation; response surface methodology

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 化学名为金

收稿日期: 2017-09-18

基金项目: 中国博士后基金项目 (2016M590663、2017T100518); 浙江省公益性项目 (201632080、201632081); 浙江海洋大学大学生科技创新项目

作者简介: 姚冬儿 (1997-), 女, 研究生, 研究方向: 水产品加工及贮藏

通讯作者: 张宾 (1981-), 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工及贮藏;

孙继鹏 (1980-), 博士, 副研究员, 研究方向: 水产品高值化利用

属硫组氨酸三甲基内盐, 其是一类低分子量、高巯基含量、能结合金属离子, 且具有独特功能的蛋白质。MT 富含半胱氨酸 (20~30%) 且不含组氨酸和芳香族氨基酸等, 其广泛存在于多种动物、植物、微生物体内, 其在个体生长发育及环境适应等方面发挥着重要作用^[1]。机体内 MT 可被重金属离子、细胞毒性药物、有机化学药物、细胞因子、荷尔蒙激素及应激刺激等

多因素诱导而合成。研究表明, MT 可表现出显著的重金属的解毒和调节^[2]、参与细胞调节与免疫代谢^[3]、防辐射^[4]、清除生物体内自由基^[5]等多种生物活性, 已广泛应用于农业、医药、保健、生物工程和环境保护等各个领域。

近年来, MT 的生物功能已被越来越多的学者们所认识和开发, 对其结构、特性、基因调控及生物学功能的研究也日趋深入, 但对其应用与产品开发仍有诸多限制和不足^[6]。纯度较高的 MT 在市场上的价格仍旧居高不下, 其主要原因在于未能找到一种合理高效的提纯技术, 且动植物提纯量少的缺点仍旧严重制约着 MT 的工业化发展^[7]。目前, 关于 MT 的提取及分离纯化已有较多介绍, 诸如加热除杂蛋白、缓冲液匀浆离心法、凝胶过滤、离子交换及多种层析结合法等, 然而其分离纯化方法仍有待进一步提高, 仍存在如杂蛋白干扰严重、MT 提取率不高等问题^[8,9]。本研究以褶牡蛎中金属硫蛋白 (MT) 为对象, 通过 Cd^{2+} 诱导褶牡蛎体内产生 MT, 优化牡蛎体内 MT 提取条件, 以期获得 MT 制备的最佳工艺, 为天然高效的海洋源 MT 产品开发与应用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

褶牡蛎 (*Crassostrea plicatul*) 购自浙江省舟山市东河水产批发市场, 壳长 8.4~8.8 cm, 壳高 3.0~3.7 cm, 体重 22~28 g。氯化镉、三羟甲基氨基甲烷、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钠、硼酸及 EDTA 等试剂, 均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

XHF-D 型内切式匀浆机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Milli-Q 型超纯水仪, 美国 Millipore 公司; DLSB-20/20 型低温冷却液循环泵, 郑州长城科工贸有限公司; RC6 Plus 型高速冷冻离心机, Thermo Scientific 公司; DSHZ-300 型恒温振荡器, 江苏太仓市实验设备厂等。

1.3 实验方法

1.3.1 牡蛎体内 MT 的诱导

选取生长活力良好的褶牡蛎个体, 进行海水暂养驯化 2 d, 暂养期间不投喂饵料。将暂养牡蛎放入塑料养殖箱中, 60 只/箱, 每只养殖箱注入含 0.5 mg/L Cd^{2+} 的净化海水 40 L (盐度 27 ± 1 , pH 8.0 ± 0.2 , 水温 $18 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$); 保持连续充氧, 但不投喂饵料; 每隔 24 h

更换含相同 Cd^{2+} 浓度海水 1 次。采用 Cd^{2+} 诱导 10 d 后, 取出牡蛎个体, 在 $0\sim 4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下, 将牡蛎进行解剖, 获得牡蛎肉置于 $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下进行贮存备用。

1.3.2 牡蛎 MT 提取优化

1.3.2.1 单因素实验

(1) 物料比对 MT 提取效果影响: 取牡蛎组织约 5 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 按牡蛎组织:缓冲液 (g/mL) 比例分别为 1:2、1:3、1:4、1:6、1:8 和 1:10, 加入 0.25 mol/L 、pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液, $45 \text{ } ^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡提取 2 h 后, 将混合体系以 10000 r/min 离心 20 min ($4 \text{ } ^\circ\text{C}$), 收集上清液测定 MT 含量。

(2) 提取温度对 MT 提取效果影响: 取牡蛎组织约 5 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 按牡蛎组织:缓冲液 (g/mL) 比例为 1:4, 加入 0.25 mol/L 、pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液, 分别于 20、30、40、50、60 和 $70 \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下, $45 \text{ } ^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡提取 2 h 后, 将混合体系以 10000 r/min 离心 20 min ($4 \text{ } ^\circ\text{C}$), 收集上清液测定 MT 含量。

(3) 提取 pH 对 MT 提取效果影响: 取牡蛎组织约 5 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 按牡蛎组织:缓冲液 (g/mL) 比例为 1:4, 分别加入 pH 为 3、4、5、6、7、8、9 和 10、 0.25 mol/L Tris-HCl 缓冲液, $45 \text{ } ^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡提取 2 h 后, 将混合体系以 10000 r/min 离心 20 min ($4 \text{ } ^\circ\text{C}$), 收集上清液测定 MT 含量。

(4) 提取液浓度对 MT 提取效果影响: 取牡蛎组织约 5 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 按牡蛎组织:缓冲液 (g/mL) 比例为 1:4, 加入 pH 8.5、浓度分别为 0.01、0.05、0.10、0.20、0.30 和 0.50 mol/L Tris-HCl 缓冲液, $45 \text{ } ^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡提取 2 h 后, 将混合体系以 10000 r/min 离心 20 min ($4 \text{ } ^\circ\text{C}$), 收集上清液测定 MT 含量。

(5) 提取时间对 MT 提取效果影响: 取牡蛎组织约 5 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 按牡蛎组织:缓冲液 (g/mL) 比例为 1:4, 加入 0.25 mol/L 、pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液, $45 \text{ } ^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡提取, 提取时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 和 6.0 h 后, 将混合体系以 10000 r/min 离心 20 min ($4 \text{ } ^\circ\text{C}$), 收集上清液测定 MT 含量。

1.3.2.2 响应面优化设计

在以上单因素实验基础上, 采用 Design-Expert 7.0 软件中 Box-Behnken 中心组合设计原理进行响应面实验设计, 具体选取物料比、提取温度、缓冲液 pH 及浓度四个因素, 进行提取工艺优化研究。

1.3.3 牡蛎 MT 含量测定

取 $20 \mu\text{L}$ MT 上清液, 加入 $3 \mu\text{L}$ 20% (m/V) TCEP 溶液、 $10 \mu\text{L}$ 1 mg/mL SBD-F 溶液和 $75 \mu\text{L}$ 、pH 10.5 反应缓冲液 (含 1 mol/L 硼酸、 30 mmol/L EDTA 和 0.8

mol/L KOH), 混匀后 50 °C 水浴反应 30 min, 加入 10 μ L、4 mol/L HCl 溶液终止反应。将混合体系采用 20 mmol/L、pH 7.5 定容缓冲液定容至 1 mL, 混合均匀溶液经 0.22 μ m 水系膜后进行 HPLC 分析。色谱流动相: 乙腈:磷酸缓冲液 (25 mmol/L, pH 7.5):甲醇体系=18:80:2; 色谱柱: ODS-BP (Sinocrom, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) C₁₈ 柱; 进样量: 40 μ L; 洗脱时间: 20 min; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 25 °C; 激发波长 380 nm, 发射波长 510 nm; 标准品: 兔肝 MT; MT 保留时间: 7.3~7.7 min。

1.3.4 数据统计与分析

采用 origin 8.0、SPSS 及 Design Expert 8.0 进行处理, 实验数据均为 3 次平行实验的平均值, 结果表示为平均值 \pm 标准差。

2 结果与讨论

2.1 单因素结果及分析

2.1.1 物料比对牡蛎 MT 提取效果的影响

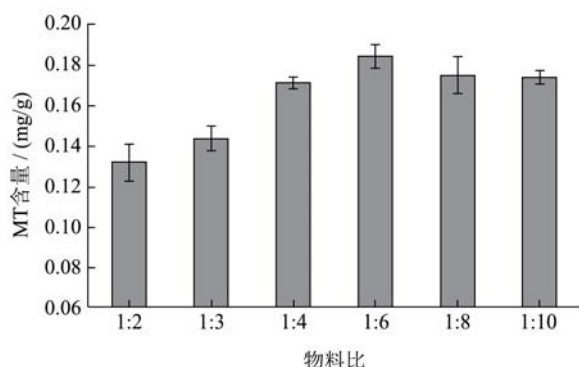


图1 物料比对牡蛎 MT 提取效果的影响

Fig.1 Effects of material ratio on the extraction of MT from oyster

提取液采用缓冲液的主要作用是促进可溶蛋白溶出及为其提供相对稳定的环境, 防止其变性发生。研究表明, 水产动物体内 MT 分子量较小, 采用与生理体液相容性较好、性质温和的 Tris-HCl 缓冲液进行浸提, 可有效将 MT 从牡蛎组织提取出来^[10]。由图 1 结果可知, 牡蛎组织与提取缓冲液的物料比在 1:2~1:6 范围内, 提取 MT 含量随缓冲液加入体积的增加而逐渐上升; 当物料比为 1:6 时, MT 提取含量达到最大值为 0.184 mg/g; 继续增加提取液的加入量, MT 提取量趋于平缓, 未出现显著提高 ($p>0.05$)。随着缓冲液用量增大, 其与已破碎的组织接触更加充分, 从而使得更多的 MT 释放到液相中。但是, 过多缓冲液的稀释作用必然会降低提取液中的浓度, 不便于测定和使用, 同时还会造成提取成本的增加。因此, 初步确

定牡蛎组织与提取缓冲液的物料比为 1:4~1:6。

2.1.2 提取温度对牡蛎 MT 提取效果的影响

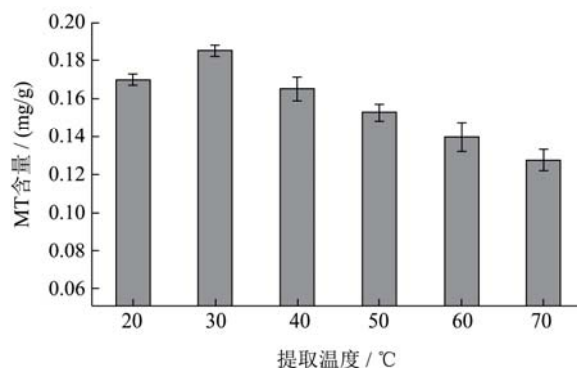


图2 提取温度对牡蛎 MT 提取效果的影响

Fig.2 Effects of temperature on the extraction of MT from oyster

提取温度是影响蛋白质稳定的最重要因素, 一般温度越高, 蛋白质的稳定性越低。MT 由于其特殊的坚固构象, 而具有较强的热稳定性, 因此短时间的热提取处理不会影响牡蛎 MT 的生物活性^[11]。由图 2 可知, 提取温度在 20~70 °C 范围内, MT 提取量呈先上升后下降的趋势。当提取温度较低时 (20~30 °C), MT 提取效果较佳, 30 °C 时 MT 提取量达最大值 0.185 mg/g; 当超过 30 °C 后, MT 提取量有所降低, 可能是因为较高温使部分组织蛋白变性而影响 MT 提取量所致。励建荣等^[12]也认为, 采用较高温 (75 °C) 除杂蛋白的方法制得 MT 粗制品, 也存在一定弊端, 其加热时间不太明确, 对提取 MT 纯度及后续纯化带来不便。因此, 初步确定提取温度为 30 °C。

2.1.3 提取液 pH 对牡蛎 MT 提取效果的影响

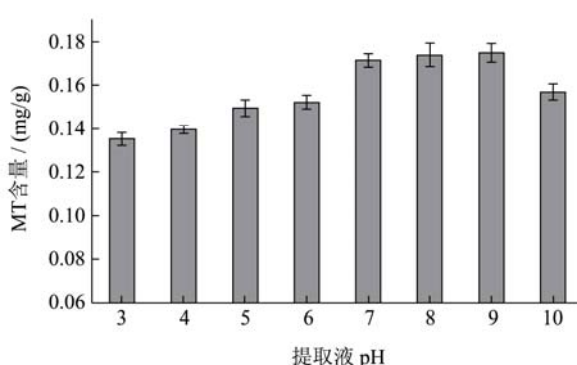


图3 提取液 pH 对牡蛎 MT 提取效果的影响

Fig.3 Effects of pH on the extraction of MT from oyster

由图 3 结果发现, 随着提取液 pH 值的变化, MT 提取量呈先增加后平缓再降低的趋势; 当 pH 在 3~9 之间, MT 提取量随 pH 提高而逐渐增加; 当 pH=9 时, MT 含量达到最高为 0.174 mg/g; 而当 pH>9 时, MT 提取量逐渐下降, 故初步确定最佳提取液 pH 值为 9。MT 等电点在 3.5~6.0 范围内^[13], 因此当提取缓冲液

pH 在 3~6 时, MT 溶解减少而发生聚集, 因此所获得的 MT 提取量较低; 提取缓冲液 pH 在 8~9 时, 偏离 MT 的等电点, 致使获得 MT 提取量显著提高。

2.1.4 提取缓冲液浓度对牡蛎 MT 提取效果的影响

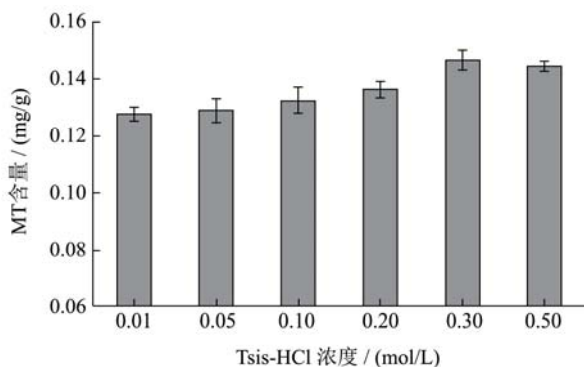


图 4 提取缓冲液浓度对牡蛎 MT 提取效果的影响

Fig.4 Effects of buffer concentrations on the extraction of MT from oyster

提取缓冲液的离子强度, 对 MT 提取量也具有重要影响。随着提取液浓度的增高, 溶液的离子强度随之增大, 而较高的离子强度可能会造成提取蛋白质的沉淀发生^[14]。由图 4 结果可知, 在提取缓冲液浓度为 0.01~0.30 mol/L 范围内, MT 提取量逐渐上升, 在 0.30 mol/L 时达最大值 0.146 mg/g; 在 0.30~0.50 mol/L 范围内, MT 提取率呈平缓稍下降趋势, 因此初步确定最佳缓冲液浓度为 0.30 mol/L。

2.1.5 提取时间对 MT 提取效果的影响

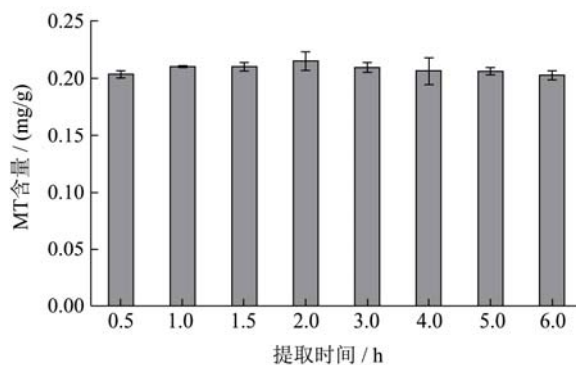


图 5 提取时间对牡蛎 MT 提取效果的影响

Fig.5 Effects of time on the extraction of MT from oyster

如图 5 所示, 提取时间对 MT 提取含量的影响相对较小, 在 0.5~6.0 h 提取时间范围内, MT 提取量变化呈平缓趋势; 在提取 2.0 h 时 MT 含量达到稳定值 0.214 mg/g, 确定最佳提取时间为 2 h。

2.2 响应面实验结果及分析

2.2.1 响应面实验结果

根据单因素实验结果, 选取对 MT 提取量具有显著影响的 4 因素, 即提取缓冲液 pH、提取时间、物料比和提取缓冲液浓度, 进行 4 因素 3 水平 Box-Behnken 中心组合实验设计, 以 MT 提取量为相应值, 进行 29 组实验, 包括 24 组析因实验及 5 组中心实验用以估计误差, 结果如表 1 所示。

表 1 中心组合实验设计与结果

Table 1 Experimental design and results of center combination

序号	A 提取 pH 值	B 提取温度/°C	C 缓冲液浓度/(mol/L)	D 物料比	Y 提取量/(mg/g)
1	9	30	0.4	1:3	0.201
2	10	30	0.2	1:5	0.154
3	9	30	0.3	1:5	0.231
4	9	20	0.3	1:3	0.218
5	9	30	0.4	1:7	0.201
6	9	40	0.3	1:3	0.212
7	9	30	0.2	1:3	0.223
8	10	30	0.4	1:5	0.156
9	10	40	0.3	1:5	0.160
10	8	30	0.4	1:5	0.190
11	9	40	0.4	1:5	0.176
12	9	20	0.4	1:5	0.181
13	9	40	0.3	1:7	0.169
14	9	30	0.2	1:7	0.191
15	9	40	0.2	1:5	0.190
16	8	30	0.3	1:3	0.213

转下页

接上页

17	9	20	0.3	1:7	0.205
18	8	20	0.3	1:5	0.181
19	9	30	0.3	1:5	0.234
20	10	20	0.3	1:5	0.182
21	9	20	0.2	1:5	0.196
22	10	30	0.3	1:7	0.162
23	8	40	0.3	1:5	0.200
24	8	30	0.3	1:7	0.163
25	8	30	0.2	1:5	0.207
26	9	30	0.3	1:5	0.240
27	10	30	0.3	1:3	0.195
28	9	30	0.3	1:5	0.226
29	9	30	0.3	1:5	0.235

2.2.2 MT 提取量响应面分析

利用 Design Expert 7.0 软件, 将表 1 中实验数据进行多元方程回归拟合, 建立 MT 提取量与各因素变量的二次多元回归模型:

$$Y=0.23-0.012A-4.667E-003B-4.667-003C-0.014D-0.01AB+4.75E-003AC+4.25-003AD+2.5E-004BC-7.5E-003BD+8E-003CD-0.035A^2-0.021B^2-0.022C^2-0.011D^2$$

由表 2 方差分析可知, 模型 $F=10.54$, $p<0.0001$,

说明响应面回归模型极其显著, 具有统计学意义。对残差项各数据进行分析, 失拟项 $F=5.39$, $Pr=0.0594>0.05$, 说明方程实际拟合中非正常误差所占比例小, 拟合度较高。决定系数 $R^2=0.9133$, 说明该模型能解释 91.33%响应值变化, 因而模型拟合程度良好, 实验误差小, 适合于牡蛎 MT 提取量的分析和预测。

表 2 提取含量二次多项模型方差分析表

Table 2 The variance analysis table of quadratic polynomial model of extraction content

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	Pr>F
模型	0.016	14	1.163E-03	10.54	<0.0001
A	1.752E-03	1	1.752E-03	15.87	0.0014
B	2.613E-04	1	2.613E-04	2.37	0.1462
C	2.613E-04	1	2.613E-04	2.37	0.1462
D	2.437E-03	1	2.437E-03	22.08	0.0003
AB	4.201E-04	1	4.201E-04	3.81	0.0713
AC	9.025E-05	1	9.025E-05	0.82	0.3812
AD	7.225E-05	1	7.225E-05	0.65	0.4320
BC	2.500E-04	1	2.500E-04	2.265E-03	0.9627
BD	2.250E-04	1	2.250E-04	2.04	0.1753
CD	2.560E-04	1	2.560E-04	2.32	0.1501
A ²	7.859E-03	1	7.859E-03	71.20	<0.0001
B ²	2.980E-03	1	2.980E-03	26.99	0.0001
C ²	3.120E-03	1	3.120E-03	28.27	0.0001
D ²	7.932E-04	1	7.932E-04	7.19	0.0179
失拟项	1.439E-03	10	1.439E-03	5.39	0.0594
残差	1.545E-03	14	1.104E-04	-	-
误差	1.068E-04	4	2.670E-05	-	-
总离差	0.018	28	-	-	-

注: 若“Pr>F”值<0.05, 说明因素对响应值影响显著。

由回归方程的系数显著性检验可知,因素 A 和因素 D 的 P 值均小于 0.05,说明缓冲液 pH 值和物料比对牡蛎 MT 提取量影响极其显著。平方项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 也均小于 0.05,说明 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 对 MT 提取量均有显著影响。由表 3 结果可知,信噪比 Adeg Precision 值较高 (11.0160),说明该模型可预测。通过比较回归方程中一次项系数可知,影响 MT 提取量的影响因素主次为 $D>A>B=C$,即物料比>提取 pH 值>提取温度=缓冲液浓度。

表 3 变异系数

Table 3 Coefficient of variation

Std.Dev	0.011	R-Squared	0.9133
Mean	0.20	Adj R-Squared	0.8266
C.V.%	5.35	Pred R-Squared	0.5258
PRESS	8.453E-003	Adeg Precision	11.0160

2.2.3 交互因子效应分析

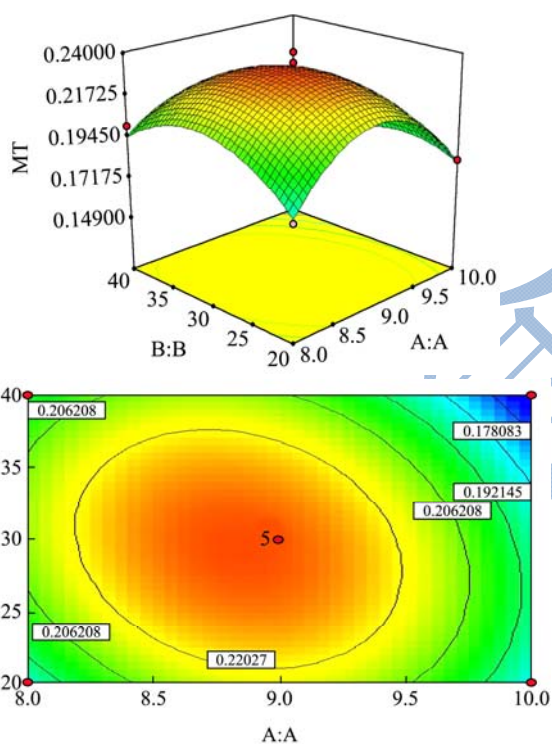


图 6 提取液 pH 和温度对 MT 提取量的影响

Fig.6 Effects of pH and temperature on the extraction of MT from oyster

按照所得二元二次回归方程对两两因素进行运算,获得交互因子响应面及等高线图,结果如图 6~11 所示。处理条件的改变对响应值的影响,可通过响应曲面的坡度陡峭或者平缓体现出来。等高线形状可反映出交互作用强弱,椭圆形表示两因素交互作用较强,圆形则表示两因素交互作用较弱;等高线排列越密集,说明因素变化对 MT 提取量影响越大。在同一椭圆形区域内,牡蛎 MT 提取量相同,在椭圆形中心点即为

MT 提取量的最高点,由中心向边缘逐渐减少。由结果可知,所有曲面图都呈良好的抛物线形状,说明各因素的交互作用明显,而各曲面图均开口朝下,说明实验结果 Y (MT 提取量) 在实验区域内有最大值。

(1) 提取液 pH 和温度对 MT 提取量的影响

由图 6 结果可知,随着提取液 pH 值增加和提取温度升高,MT 提取量呈先上升后下降趋势,表明适当增大提取 pH 值及温度,可一定程度的提高 MT 提取量。在提取液 pH 值 (A) 与提取温度 (B) 交互作用的等高线中,由于 pH 值等高线疏密程度比提取温度等高线密度大,故提取液 pH 值对响应值峰值的影响比提取温度大。因此,当提取液 pH 为 8.5~9.0、提取温度为 28~32 °C 时,可获最佳 MT 提取效果。

(2) 提取液 pH 和缓冲液浓度对 MT 提取量的影响

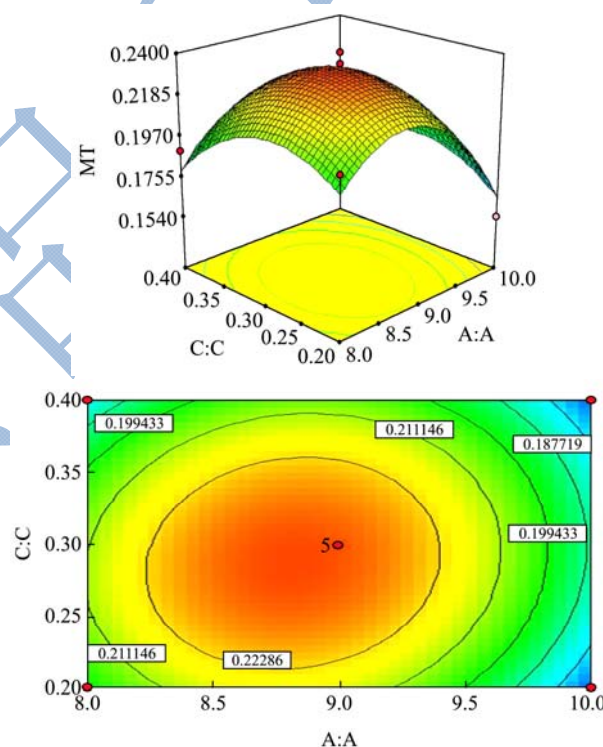


图 7 提取液 pH 和缓冲液浓度对 MT 提取量的影响

Fig.7 Effects of pH and buffer concentration on the extraction of MT

由图 7 可知,随着提取液 pH 值和缓冲液浓度增加,MT 提取量也均呈先上升后下降趋势。从构成等高线可看出,沿 A 轴移动过程中,其等高线比沿 C 轴的等高线密度更大,说明在 pH 值 (A) 和缓冲液浓度 (C) 的交互作用中,提取液 pH 值对 MT 提取效果影响较缓冲液浓度影响更大。因此,当 pH 为 8.5~9.0、缓冲液浓度为 0.25~0.30 mol/L 时,可获最佳 MT 提取效果。

(3) 提取液 pH 和物料比对 MT 提取量的影响

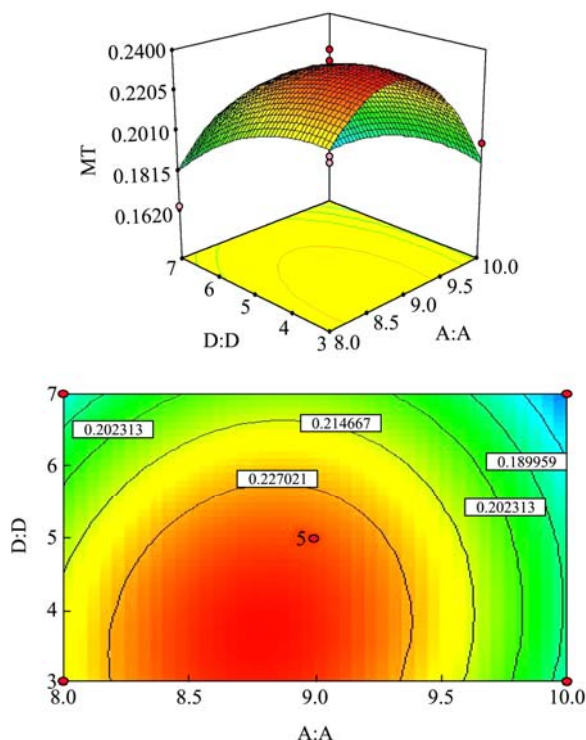


图 8 提取液 pH 和物料比对 MT 提取量的影响

Fig.8 Effects of pH and material ratio on the extraction of MT

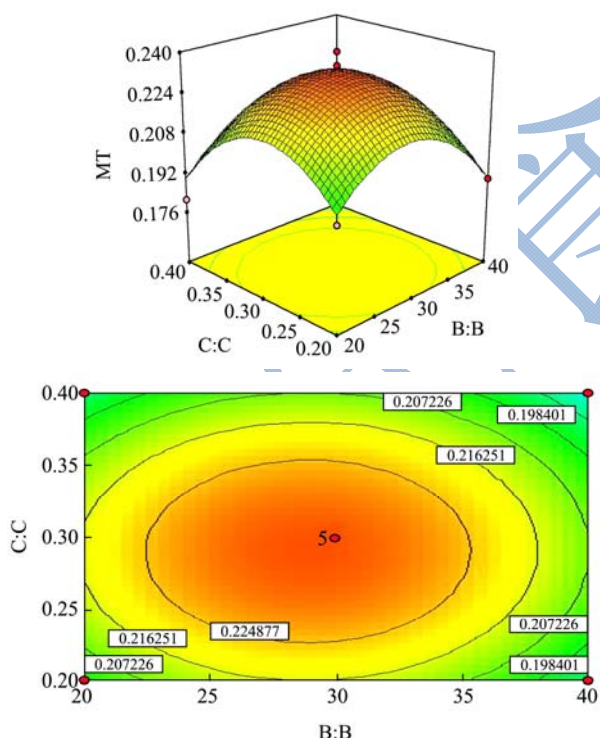


图 9 提取液温度和缓冲液浓度对 MT 提取量的影响

Fig.9 Effects of temperature and buffer concentration on the extraction of MT

由图 8 可知,随着提取液 pH 值和物料比的增加,MT 提取量呈现先上升后下降的趋势;而随物料比的增加或减小,MT 提取量变化程度相对平缓。在 pH

值 (A) 与物料比 (D) 交互作用的等高线中,由于 pH 值对等高线疏密程度影响比物料比的影响更大些,因此提取液 pH 值的影响作用较物料比大。当 pH 为 8.5~9.0、料物比为 3.5~4.0 时,能使 MT 提取效果最佳。

(4) 提取温度和缓冲液浓度对 MT 提取量的影响

由图 9 可知,随着提取温度和缓冲液浓度增加,MT 提取量呈先增加后减小趋势。在提取温度 (B) 与缓冲液浓度 (C) 交互作用等高线中,沿 B 轴等高线与沿 C 轴等高线密度差别不大,可知提取温度与缓冲液浓度对响应值峰值的影响相当。当提取温度为 28~32 °C、缓冲液浓度为 0.25~0.30 mol/L 时,可获最佳 MT 提取效果。

(5) 提取温度和物料比对 MT 提取量的影响

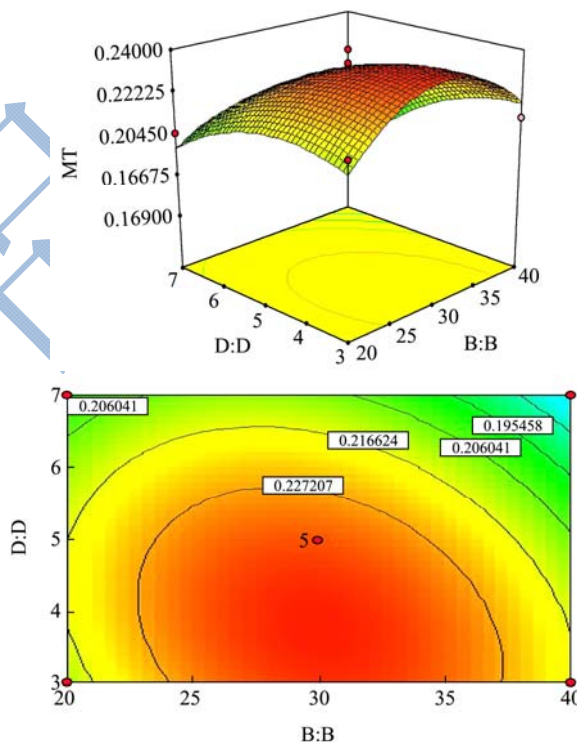


图 10 提取温度和物料比对 MT 提取量的影响

Fig.10 Effects of temperature and material ratio on the extraction of MT

由图 10 可知,随提取温度和物料比的升高,MT 提取量呈现先增加后减小趋势;与图 8 结果类似,随物料比增加或减小,MT 提取量变化程度相对平缓。在提取温度 (B) 和物料比 (D) 交互作用中,温度对等高线疏密程度影响明显大于物料比,说明提取温度影响作用较物料比大。当提取温度为 28~32 °C、料物比为 3.5~4.0 时,可获最佳 MT 提取效果。

(6) 缓冲液浓度和物料比对 MT 提取量的影响

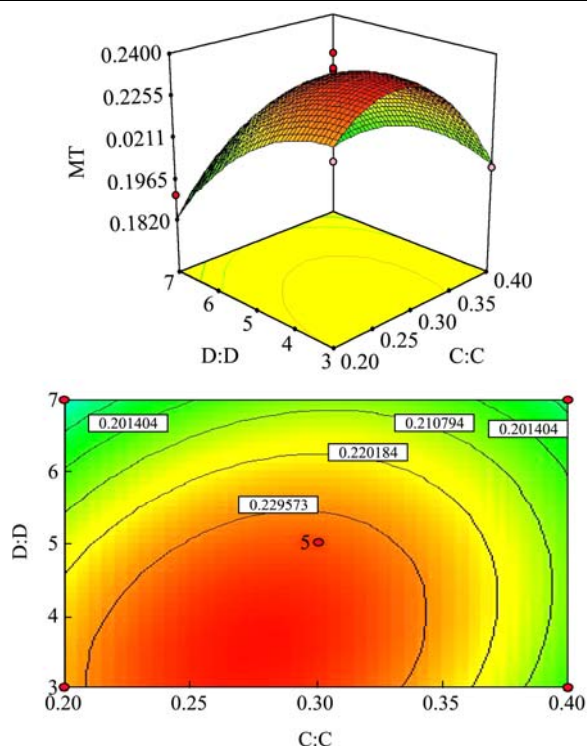


图 11 缓冲液浓度和物料比对 MT 提取量的影响

Fig.11 Effects of buffer concentration and material ratio on the extraction of MT

图 11 曲面图与等高线分布图,和图 8 结果大体相同,即提取缓冲液浓度的变化对响应值的影响幅度明显,即在提取缓冲液浓度(C)和物料比(D)交互作用中,缓冲液浓度的影响作用较物料比更大。当缓冲液浓度为 0.25~0.30 mol/L、料物比为 3.5~4 时,可获得最佳 MT 提取效果。

2.2.4 最佳提取工艺验证

利用 Design-Expert 7.0 软件分析实验数据,确定最优提取条件为:提取液 pH 9.0,提取温度 30 °C,提取缓冲液浓度 0.25 mol/L,物料比为 1:4;考虑到实际操作便利,确定提取时间为 2 h。在此条件下,进行 3 次平行实验,MT 提取量平均值为 0.221 mg/g,模型对 MT 提取量的理论最优值为 0.239 mg/g,两者之间差值为 0.018 mg/g,误差较小,两者吻合性较好,说明模型可行。

3 结论

以牡蛎组织为原料,利用单因素实验、中心组合 Box-Behnken 实验设计及响应面分析法,对牡蛎中 MT 的提取制备工艺进行了优化,获得了最佳制备参数为:牡蛎组织与提取液间的比例为 1:4,提取液 pH 9.0,提取温度 30 °C,缓冲液浓度 0.25 mol/L,提取时间 2 h。在此参数条件下,MT 提取量为 0.221 mg/g,该结果与建立模型的预测值基本相符。后续将对牡蛎 MT 进

一步的纯化及应用开展深入研究。

参考文献

- [1] 吕新芳,毛伟腾,滑朝阳,等.海洋无脊椎动物金属硫蛋白研究进展[J].海洋通报,2015,3:241-246
LV Xin-fang, MAO Wei-teng, HUA Chao-yang, et al. A review on the research of metallothionein in marine invertebrates [J]. Marine Science Bulletin, 2015, 3: 241-246
- [2] Zhang B, Shi Z R, Wang X L, et al. Depuration of cadmium from blue mussel (*Mytilus edulis*) by hydrolysis peptides and chelating metal elements [J]. Food Research International, 2015, 73(11): 162-168
- [3] Thirumorthy N, Sunder A S, Kumar K M, et al. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology [J]. World Journal of Surgical Oncology, 2011, 9: 54
- [4] Lu C, Satoh M, Tohyama C, et al. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role [J]. Toxicology, 1999, 132(2-3): 85-98
- [5] 王颖,王欣卉,徐炳政,等.金属硫蛋白体内抗氧化功能研究进展[J].食品工业科技,2016,37(10):377-380
WANG Ying, WANG Xin-hui, XU Bing-zheng, et al. Research progress of metallothionein function *in vivo* antioxidant [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 377-380
- [6] Shinichiro T. Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2012, 5: 41
- [7] 孟范平,肖静,赵顺顺,等.海洋动物金属硫蛋白的提取与分析技术研究进展[J].中国海洋大学学报,2010,40(6):41-46
MENG Fan-ping, XIAO Jing, ZHAO Shun-shun, et al. Research progress on the extraction and analysis of metallothioneins in marine animals [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(6): 41-46
- [8] Costa P M, Repolho T, Caeiro S, et al. Modelling metallothionein induction in the liver of *Sparus aurata*, exposed to metal-contaminated sediments [J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2008, 71(1): 117-124
- [9] 陈洁,韩亮,李国跃,等.金属硫蛋白的分离纯化技术及功能研究进展[J].广东药学院学报,2013,29(5):565-569
CHEN Jie, HAN Liang, LI Guo-yue, et al. Progress on the separation and purification technology and function of metallothionein [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2013, 29(5): 565-569
- [10] Bebianno M J, Langston W J. Metallothionein induction in *Mytilus edulis*, exposed to cadmium [J]. Marine Biology,

- 1991, 108(1): 91-96
- [11] Khati W, Ouali K, Mouneyrac C, et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use in biomonitoring [J]. Energy Procedia, 2012, 18(1): 784-794
- [12] 励建荣,宣伟,李学鹏,等.金属硫蛋白的研究进展[J].食品科学,2010,31(17):392-395
LI Jian-rong, XUAN Wei, LI Xue-peng, et al. Research progress in metallothionein [J]. Food Science, 2010, 31(17): 392-395
- [13] Romero-Isart N, Vasák M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 88(3-4): 388-396
- [14] 肖静.海洋双壳类动物金属硫蛋白的提取与分析技术研究[D].青岛:中国海洋大学,2010
XIAO Jing. Research on the extraction and analysis of metallothioneins in marine bivalve [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010

现代食品科技