

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190810001

http://www.yykxjz.cn/

张家源, 张洪才, 陈舜胜. 暗纹东方鲀鱼精蛋白的提取工艺优化研究. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 168–176  
Zhang JY, Zhang HC, Chen SS. Optimization of extraction process of protamine from *Takifugu obscurus*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 168–176

## 暗纹东方鲀鱼精蛋白的提取工艺优化研究\*

张家源<sup>1,2</sup> 张洪才<sup>1,2</sup> 陈舜胜<sup>1,2①</sup>

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 2. 国家淡水水产品加工技术研发分中心(上海)  
食品科学与工程国家级实验教学示范中心(上海海洋大学) 上海 201306)

**摘要** 以暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)精巢组织为原料, 采用酸提法提取鱼精蛋白。以得率为指标, 通过正交实验, 确定了最佳的提取参数。结果显示, 提取鱼精蛋白的影响因素重要性依次为: 提取次数>硫酸用量>硫酸浓度>95%乙醇用量; 最佳提取工艺条件: 硫酸浓度为 0.2 mol/L、硫酸用量为 2.5 倍、提取次数为 2 次、95%乙醇用量为 2.5 倍。在此工艺条件下, 暗纹东方鲀鱼精蛋白的得率为 3.82%, 蛋白含量达 89.01%。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)可知, 提取的粗鱼精蛋白有 2 个条带, 分子量分别在 25 和 20 kDa 附近。分析其氨基酸组成发现, 暗纹东方鲀鱼精蛋白属于双鱼精蛋白, 其中, 精氨酸和丙氨酸含量相对较高, 分别占 31.40%和 17.39%。本研究对暗纹东方鲀鱼精蛋白更好地应用在食品和医药领域具有重要意义。

**关键词** 暗纹东方鲀; 鱼精蛋白; 提取; 工艺优化

**中图分类号** TS254.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0020-09

鱼类的精巢俗称鱼白, 因其具有特殊的气味, 常被作为废弃物丢弃, 是鱼类加工的副产品之一。从鱼类的精巢中可以提取到一种碱性蛋白质, 即鱼精蛋白。鱼精蛋白(Protamine)又称精蛋白, 是一种高度聚阳离子肽, 可代替精子细胞中的组蛋白, 当其与 DNA 结合时形成核蛋白, 等电点在 11~13 之间(Xie *et al.*, 2018; Egawa *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2019; Potter *et al.*, 2005)。鱼精蛋白的分子量较小, 由 30~50 个氨基酸组成, 可溶于水, 不溶于丙酮、乙醚等有机溶剂, 富含核酸、蛋白和微量元素等活性成分(陈金梅等, 2015)。由于鱼精蛋白特殊的生物学组成而使其异于其他蛋白质有着独特的功能。鱼精蛋白是肝素唯一的拮抗剂, 可用于外科手术后中和肝素, 同时, 由于鱼精蛋白具有良好的生物兼容性, 因此, 可作为运输药物的载体(Gill *et al.*, 2006; Kishimoto *et al.*, 2012; Park *et al.*,

2017; González-Aramundiz *et al.*, 2015; Sommers *et al.*, 2017)。此外, 鱼精蛋白还可作为一些食品中的抗菌成分应用在食品保鲜领域, 具有安全性高、抗菌性能好、热稳定性高等优点。其在碱性条件下具有明显的抗菌活性, 是一种很有前途的抗菌剂(Guan *et al.*, 2017)。因此, 无论在医学领域还是食品领域, 鱼精蛋白都有着重要的作用和应用价值。

鱼精蛋白常以 DNA-蛋白质的形态存在, 其结合键不牢固, 易断开, 可用硫酸将其断开, 制成鱼精蛋白硫酸盐, 再用有机溶剂析出沉淀(李若琦等, 2014)。提取反应过程: DNA-蛋白质+H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>→硫酸鱼精蛋白+DNA+H<sub>2</sub>O(吴燕燕等, 1999)。对 DNA-核蛋白和 RNA-核蛋白溶解度的研究发现, 当 NaCl 浓度为 0.14 mol/L 时, DNA-核蛋白溶解度仅为水中溶解度的 1%, 而 RNA-核蛋白有相当大的溶解度, 因此,

\* 国家自然科学基金面上项目(31471685)和上海市高校知识服务平台项目(ZF1206)共同资助 [The work was supported by National Natural Science Foundation of China (31471685), and Shanghai University Knowledge Service Platform Project (ZF1206)]. 张家源, E-mail: JYZhangshou@163.com

① 通讯作者: 陈舜胜, 教授, E-mail: sschen@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-08-10, 收修改稿日期: 2019-08-30

选用 0.14 mol/L NaCl 来沉淀 DNA-核蛋白(谢俊杰等, 2002)。因鱼的种类不同, 提取得到的鱼精蛋白也存在较大差异。目前, 国内外学者主要从鲑鱼(*Oncorhynchus keta*)和鲱鱼(*Clupea pallasii*)的成熟精巢中提取鱼精蛋白, 而对河鲀(*Tetraodontidae*)鱼精蛋白的研究较少。河鲀, 又名鲀、吹肚鱼、气泡鱼等, 属硬骨鱼纲、鲀形目、鲀科、东方鲀属, 主要分布在我国渤海、东海、黄海及江河下游, 为近海与河川底层肉食性海产有毒鱼类(杨春等, 2003)。野生河鲀毒性较高, 而人工养殖的河鲀基本无毒。中国河鲀资源丰富, 据统计, 中国海水养殖河鲀产量约为 23000 t, 淡水养殖河鲀产量约为 5000 t。暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)是主要养殖种类之一, 主要养殖区域是江苏、广东和福建地区(张迪等, 2017)。江苏地区主要为淡水养殖河鲀, 产量约占全国总河鲀淡水养殖的 68%。

本研究以暗纹东方鲀精巢为原料, 采用酸法提取鱼精蛋白, 通过 6 个单因素实验, 探讨硫酸浓度、硫酸用量、提取时间、提取次数、提取温度和 95%乙醇用量对鱼精蛋白提取的影响, 并通过正交法优化其提取工艺, 得到最佳提取工艺条件, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)分析暗纹东方鲀鱼精蛋白的分子量, 并对其氨基酸含量进行测定。本研究对河鲀精巢的高效利用具有重大意义, 以期河鲀鱼精蛋白可以更好地应用在食品和医药领域。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

暗纹东方鲀精巢(2019年2月, 冷冻运输)江苏中洋集团提供。

NaCl、95%乙醇、丙酮、乙醚和硫酸(均为分析纯), 国药集团上海化学试剂有限公司; 考马斯亮蓝染色液 G-250、SDS-PAGE 电泳液、BeyoGel™SDS-PAGE 预制胶(4%~20%), 上海碧云天生物技术有限公司; 2×Protein Loading Buffer, 天根生化科技(北京)有限公司; Real Band 蛋白预染, 美国 Marker Bio Basic Inc (BBI); 蛋白定量测试盒, 南京建成生物工程研究所。

### 1.2 仪器与设备

FJ-200 高速分散均质机, 上海标本模型厂; GL-26M/MI 立式高速冷冻离心机, 上海赵迪生物科技有限公司; AUW320 电子分析天平, 日本岛津公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; UV-1800PC 紫

外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 氨基酸自动分析仪 L-8800, 日本日立公司; LGJ-12 冷冻干燥机, 河南兄弟仪器设备有限公司; DHG-9076A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; TY-80A/S 脱色摇床, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; DYCZ-24DN 电泳槽、DYY-6C 型电泳仪, 北京六一仪器厂。

### 1.3 方法

**1.3.1 样品制备** 将暗纹东方鲀精巢组织解冻后, 用蒸馏水清洗干净(主要去除附着的杂物, 如结缔组织、腺体、脂肪等), 沥干水分, 分装在密封袋中(每袋约 200 g), -30℃冷藏备用。

**1.3.2 原料基本营养成分测定** 水分测定参考(GB 5009.3-2016)《食品中水分的测定》中的直接干燥法; 灰分测定参考(GB 5009.4-2016)《食品中灰分的测定》中的食品中总灰分的测定; 蛋白质测定参考(GB 5009.5-2016)《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法; 脂肪测定参考(GB 5009.6-2016)《食品中脂肪的测定》中的索氏抽提法。

**1.3.3 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺** 工艺流程: 解冻后的精巢组织→捣碎→匀浆→离心→弃上清液, 沉淀重复操作 1 次→H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液提取→离心→收集离心的上清液→过滤→冷乙醇沉淀→丙酮洗涤→乙醚洗涤→冷冻干燥→鱼精蛋白粗品。

参照白婵等(2018)和曹文红等(2017)的方法稍作修改。称取 100 g 暗纹东方鲀精巢于组织捣碎机中, 加入 2 倍体积 0.14 mol/L 的 NaCl 溶液, 匀浆 1 min, 冰浴搅拌 15 min, 静置 15 min, 于 4℃、8000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀重复操作 1 次, 收集沉淀, 加入 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 在一定温度下提取一定时间, 4℃、10000 r/min 离心 10 min, 收集离心的上清液, 过滤, 滤液用一定体积的 95%乙醇冰浴沉淀过夜后离心, 所得沉淀用丙酮洗涤 2 次, 乙醚洗涤 1 次, 冷冻干燥即得暗纹东方鲀鱼精蛋白粗品。

### 1.3.4 硫酸提取法提取条件单因素实验

(1)硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响 设定硫酸用量为 3 倍(ml/g), 提取温度为(25±1)℃, 提取时间为 0.5 h, 提取 2 次, 95%乙醇用量为 3 倍(ml/g), 分别控制硫酸浓度为 0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 mol/L, 探讨硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

(2)硫酸用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响 设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 提取温度为(25±1)℃, 提取时间为 0.5 h, 提取 2 次, 95%乙醇用量为 3 倍(ml/g), 分别控制硫酸用量为 1、2、3、4 和 5 倍, 探

讨论硫酸用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

### (3) 提取次数对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 硫酸用量为 3 倍 (ml/g), 提取温度为(25±1)℃, 提取时间为 0.5 h, 95% 乙醇用量为 3 倍 (ml/g), 分别控制提取次数为 1、2、3、4 和 5 次, 探讨提取次数对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

### (4) 提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 硫酸用量为 3 倍 (ml/g), 提取温度为(25±1)℃, 提取 2 次, 95% 乙醇用量为 3 倍 (ml/g), 分别控制提取时间为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 h, 探讨提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

### (5) 提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 硫酸用量为 3 倍

(ml/g), 提取时间为 0.5 h, 提取 2 次, 95% 乙醇用量为 3 倍 (ml/g), 分别控制提取温度为 10℃、20℃、30℃、40℃ 和 50℃, 探讨提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

### (6) 95% 乙醇用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

设定硫酸浓度为 0.3 mol/L, 硫酸用量为 3 倍 (ml/g), 提取温度为(25±1)℃, 提取时间为 0.5 h, 提取 2 次, 分别控制 95% 乙醇用量为 1、2、3、4 和 5 倍, 探讨 95% 乙醇用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响。

**1.3.5 硫酸提取法正交实验** 根据单因素实验结果, 选择硫酸浓度、硫酸用量、提取次数和 95% 乙醇用量进行  $L_9(3^4)$  正交实验, 以确定暗纹东方鲀鱼精蛋白的最佳提取工艺条件, 实验因素与水平设计见表 1。

表 1  $L_9(3^4)$  暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺正交实验设计因素水平

Tab.1 Factors and their levels used in  $L_9(3^4)$  orthogonal design of the extraction of *T. obscurus* protamine experiments

水平 Level	A: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 浓度 Sulfuric acid concentration (mol/L)	B: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 用量 Sulfuric acid dosage (倍)	C: 提取次数 Number of extractions (次)	D: 95% 乙醇用量 95% ethanol dosage (倍)
1	0.2	2.5	1	2.5
2	0.3	3.0	2	3.0
3	0.4	3.5	3	3.5

**1.3.6 暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的测定** 准确称取 10 mg 提取的粗鱼精蛋白, 用生理盐水定容至 10 ml, 配制成 1 mg/ml 的蛋白溶液。再用蛋白定量试剂盒进行测定。

蛋白质提取率按公式(1)计算:

$$R_1 = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $R_1$  为暗纹东方鲀鱼精蛋白得率(%),  $A_1$  为蛋白质量(g),  $A_0$  为暗纹东方鲀精巢质量(g)。

### 1.3.7 暗纹东方鲀鱼精蛋白相对分子质量的测定

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Tricine-SDS-PAGE) 对提取的暗纹东方鲀鱼精蛋白进行分析, 以确定该鱼精蛋白的相对分子质量。100 v 恒压电泳约 100 min, 至溴酚蓝迁移至距凝胶下端约 1 cm 处, 停止电泳, 取出凝胶, 用考马斯亮蓝染色液染色 30 min, 再用脱色液脱色至背景褪色、条带清晰可见 (Compton *et al.*, 1985; Sedmak *et al.*, 1977; Schagger, 2006)。测量迁移距离, 计算相对迁移率( $R_f$ ) (徐明生等, 2004)。

**1.3.8 暗纹东方鲀鱼精蛋白的氨基酸组成** 采用 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定方法》进行样品前处理。

氨基酸自动分析仪条件: 色谱柱(4.6 mm I.D. × 60.0 mm); 分离树脂: 阳离子交换树脂; 柱温度: 57℃; 检测波长: 570 nm(脯氨酸 440 nm); 1 通道缓冲溶液流速: 0.40 ml/min; 反应液: 茚三酮试剂; 2 通道反应液流速: 0.35 ml/min; 进样量: 20 μl。

## 1.4 数据处理

所测结果为 3 次重复实验的平均值, 采用 Origin 8.5 软件进行作图, SPSS Statistics 17.0 软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 暗纹东方鲀精巢基本成分

暗纹东方鲀精巢的营养成分见表 2。从表 2 可以看出, 含水量较高, 达 80.22%; 其次是粗蛋白, 占湿重的 14.66%; 脂肪含量较低, 仅占湿重的 1.73%。通过计算, 粗蛋白占暗纹东方鲀精巢干重的 74.12%, 脂肪占 8.75%, 说明暗纹东方鲀精巢是富含蛋白质, 而脂肪含量很低的产品, 与胡晓璐等(2013)研究的鲉鱼精巢组织基本成分的结论一致。

表 2 暗纹东方鲀精巢的基本成分  
Tab.2 Basic composition of the *T. obscurus* testis

成分 Composition	水分 Water	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude fat	灰分 Ash
含量 Content (%)	80.22	14.66	1.73	1.60

注: 各组分含量按湿重计

Note: The content of every composition was counted on wet weight

## 2.2 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺单因素实验

### 2.2.1 硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响见图 1。低浓度的硫酸对鱼精蛋白提取不完全, 硫酸与鱼精蛋白结合较少, 生成的鱼精蛋白硫酸盐较少, 得率较低, 适当提高硫酸浓度, 可帮助拆分核酸与目标蛋白之间的键, 提高目标蛋白得率, 当浓度达到 0.3 mol/L 时, 蛋白的提取接近饱和, 得率为 3.51%, 出现峰值后, 得率会随浓度的增大而降低, 此时, 高浓度的硫酸会使蛋白质暴露出更多的疏水基团 (Omana *et al.*, 2010), 从而破坏蛋白结构, 导致蛋白质可能被部分水解, 降低了鱼精蛋白的含量。该结果与刘淑集等(2019)的研究一致, 均表现出相对较高浓度的硫酸会使鱼精蛋白的得率下降。从图 1 中还可以看出, 暗纹东方鲀鱼精蛋白受硫酸浓度影响明显, 所以选择硫酸浓度值为 0.3 mol/L 为最适宜条件。

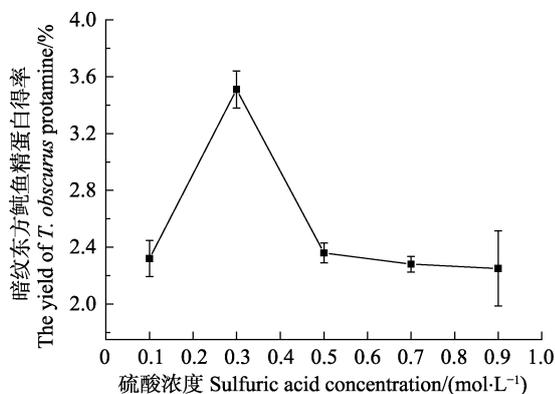


图 1 硫酸浓度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率影响  
Fig.1 Effect of sulfuric acid concentration on the yield of *T. obscurus* protamine

### 2.2.2 硫酸用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

硫酸用量对得率的影响见图 2。硫酸用量从 1 ml/g (体积与质量比, 下同) 增加到 5 ml/g 时, 鱼精蛋白得率呈先升高、后降低, 最后趋于平稳的变化趋势。当硫酸用量较少时, 体系过小而导致鱼精蛋白溶解不完全, 适当增加硫酸提取液有助于鱼精蛋白溶出, 当硫酸用量为 3 ml/g 时, 鱼精蛋白得率最高, 蛋白质溶出达到饱和, 继续增加硫酸用量, 鱼精蛋白得率出现小

幅度降低, 主要是因为提取液体积过大, 增加了操作体系的整体规模, 也增大操作过程中的损失率, 因而对得率产生负面影响。故使得蛋白得率最大化的最佳硫酸用量为 3 ml/g。

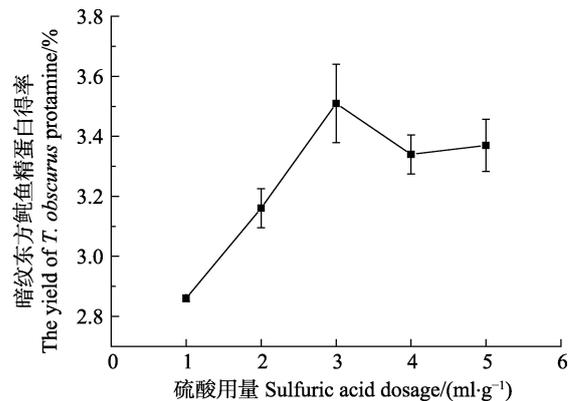


图 2 硫酸用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率影响  
Fig.2 Effect of sulfuric acid dosage on the yield of *T. obscurus* protamine

### 2.2.3 提取次数对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

提取次数对鱼精蛋白得率的影响见图 3。暗纹东方鲀鱼精蛋白经过 2 次提取后, 继续增加提取次数时, 得率反而降低, 说明残渣中可提取的鱼精蛋白在第 2 次基本被提取完全, 继续重复提取只会增加操作过程中的损失, 降低鱼精蛋白得率。因此, 提取次数 2 次为最佳。

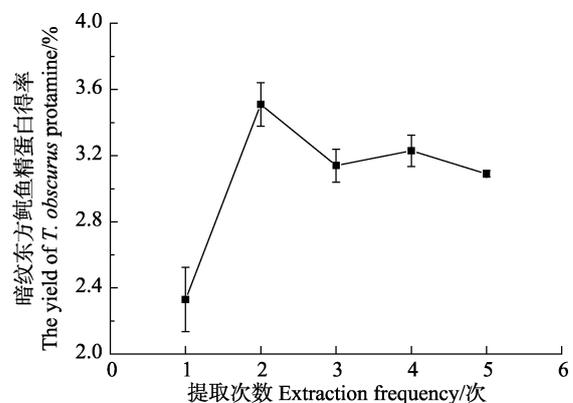


图 3 提取次数对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响  
Fig.3 Effect of extraction frequency on yield of *T. obscurus* protamine

### 2.2.4 提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响见图4。随着提取时间从0.5 h延长到2.5 h,暗纹东方鲀鱼精蛋白得率整体呈下降趋势,说明延长提取时间不能提高鱼精蛋白的得率。从加入硫酸开始提取计时,0.5 h前,硫酸会辅助鱼精蛋白与核酸之间的键断开,随着时间的增加,得率逐渐降低,可能是因为之前被分离出来的鱼精蛋白被酸水解,因此,绝大多数的精蛋白都在0.5 h内被提取出来。综合来看,0.5 h时,鱼精蛋白溶解量与损失量差值达到最大化,得率较高,提取较为充分,故选取提取时间为0.5 h比较合适。

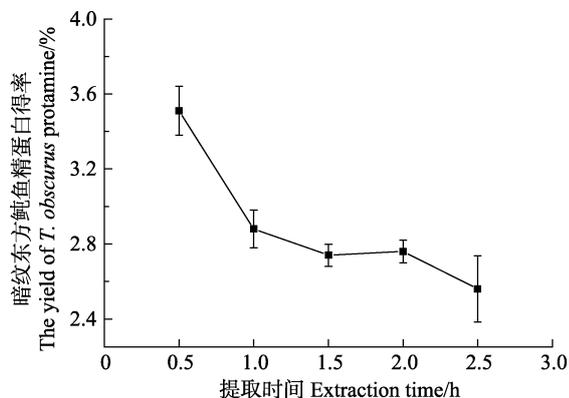


图4 提取时间对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响  
Fig.4 Effect of extraction time on the yield of *T. obscurus* protamine

### 2.2.5 提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响

提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响见图5。温度较低时,对鱼精蛋白得率产生副作用,当温度从10℃升高到50℃时,鱼精蛋白得率呈现先升高后趋于平稳的趋势。因为适当升高温度可使分子的运动速度加快,提高了蛋白的溶出率(洪晶等,2013)。继续增加温度,鱼精蛋白得率没有明显升高,而是在此基础上浮动,说明该鱼精蛋白的耐热性较好,不易受温度的影响而变性。总体来看,温度对河鲀鱼精蛋白的提取率影响并不大,提取得到的蛋白均为白色,因此,在简化提取条件和节约操作成本的角度考虑,选取室温提取比较好。

**2.2.6 95%乙醇用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响** 乙醇用量对鱼精蛋白得率的影响见图6。随着乙醇用量的增大,暗纹东方鲀鱼精蛋白得率呈先增长后降低的趋势,用量3倍时,得率达到最高点,继续增加乙醇用量,鱼精蛋白得率呈缓慢下降趋势,可能是乙醇用量过大,破坏了蛋白的结构,影响得率。因此,最佳用量为3 ml/g。

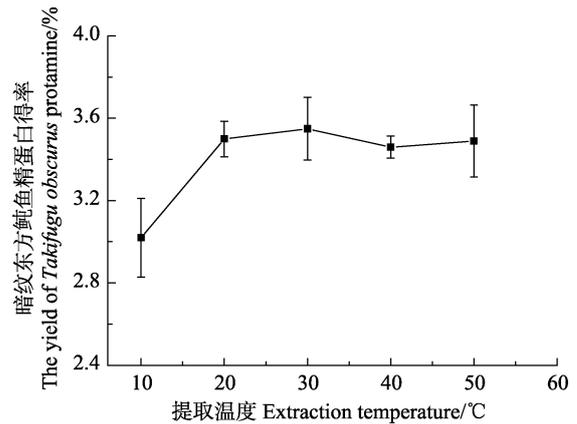


图5 提取温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的影响  
Fig.5 Effect of extraction temperature on the yield of *T. obscurus* protamine

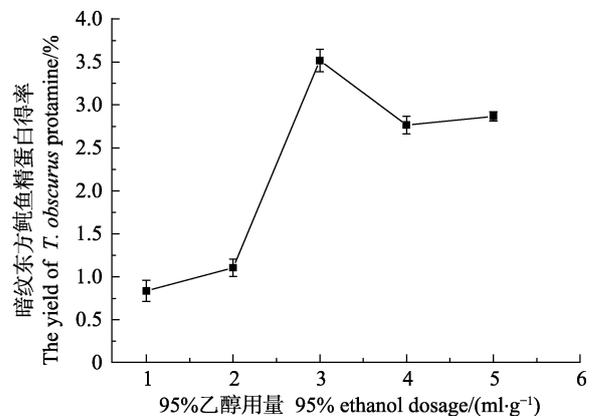


图6 乙醇用量对暗纹东方鲀鱼精蛋白得率影响  
Fig.6 Effect of icy ethyl alcohol dosage on the yield of *T. obscurus* protamine

## 2.3 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺优化

根据单因素实验结果,分别以硫酸浓度、硫酸用量、提取次数和95%乙醇用量为考察因素,以暗纹东方鲀鱼精蛋白得率为评价指标,按 $L_9(3^4)$ 进行正交实验,优化最佳提取条件,结果见表3。

由表3可知,在9个实验设计组中,第4组的提取效果最好,蛋白得率达到3.04%;其次为第2组,蛋白得率达到3.01%;由极差分析可知,影响暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的因素主次为: C>B>A>D,即提取次数>硫酸用量>硫酸浓度>95%乙醇用量。暗纹东方鲀鱼精蛋白提取最优工艺组合为 $A_1B_1C_2D_1$ ,即硫酸浓度为0.2 mol/L、硫酸用量为2.5倍、提取次数为2次、冷乙醇用量为2.5倍。该工艺条件下提取的鱼精蛋白得率可达3.82%,高于各实验组中暗纹东方鲀鱼精蛋白的得率。

表 3  $L_9(3^4)$ 暗纹东方鲀鱼精蛋白提取工艺正交实验结果  
Tab.3  $L_9(3^4)$  orthogonal result of the extraction of *T. obscurus* protamine

实验号 Test number	A: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 浓度 Sulfuric acid concentration (mol/L)	B: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 用量 Sulfuric acid dosage (倍)	C: 提取次数 Number of extractions (次)	D: 95%乙醇用量 95% ethanol dosage (倍)	河鲀鱼精蛋白得率 Puffer-fish protamine yield (%)
1	1	1	1	1	2.09
2	1	2	2	2	3.01
3	1	3	3	3	1.81
4	2	1	2	3	3.04
5	2	2	3	1	1.87
6	2	3	1	2	1.37
7	3	1	3	2	1.69
8	3	2	1	3	1.59
9	3	3	2	1	2.61
$K_1$	6.91	6.82	5.05	6.57	
$K_2$	6.28	6.47	8.66	6.07	
$K_3$	5.89	5.79	5.37	6.44	
$k_1$	2.303	2.273	1.683	2.190	
$k_2$	2.093	2.157	2.887	2.023	
$k_3$	1.963	1.930	1.790	2.147	
$R$	0.340	0.343	1.204	0.167	
最优水平 Optimal level	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	

由表 4 可知, 校正模型具有显著性, 其中, 硫酸浓度(A)、硫酸用量(B)对提取率的影响( $P < 0.05$ ), 提取次数(C)对提取率的影响( $P < 0.01$ ), 95%乙醇用量(D)对提取率的影响( $P > 0.05$ ), 依次对应与蛋白得

率的关系依次为显著、显著、极显著和不显著。四者在暗纹东方鲀鱼精蛋白提取过程中需重点控制的顺序为: 提取次数>硫酸用量>硫酸浓度>95%乙醇用量。

表 4 正交实验方差分析  
Tab.4 Analysis of variance of the experimental results of orthogonal array design

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squared deviation	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
校正模型 Correction model	6.165	8	0.771	28.406	<0.0001	**
截距 Intercept	80.772	1	80.772	2977.467	<0.0001	**
A: 硫酸浓度 Sulfuric acid concentration	0.353	2	0.177	6.510	0.0178	*
B: 硫酸用量 Sulfuric acid dosage	0.373	2	0.186	6.868	0.0154	*
C: 提取次数 Number of extractions	5.348	2	2.674	98.575	<0.0001	**
D: 95%乙醇用量 95% ethanol dosage	0.091	2	0.045	1.670	0.2416	
误差 Error	0.244	9	0.027			

\*: 差异显著,  $P < 0.05$ ; \*\*: 差异极显著,  $P < 0.01$

\*: The difference is significant,  $P < 0.05$ ; \*\*: The difference is highly significant,  $P < 0.01$

## 2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)确定暗纹东方鲀精巢中抗菌活性蛋白的相对分子量及分析其成分组成见图7。由图7可知,所提取的暗纹东方鲀精巢组织中的抗菌活性蛋白组分由2个条带组成,主体成分相对分子量在17~25 kDa之间。经计算,暗纹东方鲀鱼精蛋白2条区带的相对迁移率( $R_f$ )分别为0.7814和0.8772。以标准蛋白分子量的对数为纵坐标,相对迁移率( $R_f$ )为横坐标,进行直线回归分析(图8),回归系数 $R^2=0.9934$ ,回归方程为 $Y=-1.1073X+2.2321$ 。暗纹东方鲀鱼精蛋白的分子量分别为23.27和18.23 kDa。在相关鱼类精巢抗菌活性蛋白的研究中,此抗菌活性蛋白的相对分子质量大于徐明生等(2004)测得鲤鱼(*Cyprinus carpio*)抗

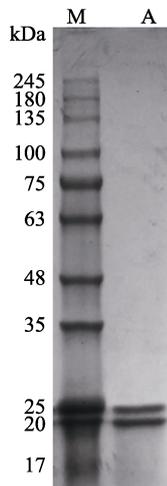


图7 暗纹东方鲀鱼精蛋白 Tricine-SDS-PAEG 电泳  
Fig.7 *T. obscurus* protamine  
Tricine-SDS-PAEG electrophoresis

M: 预染蛋白 Marker; A: 暗纹东方鲀鱼精蛋白  
M: Pre-stained protein marker; A: *T. obscurus* protamine

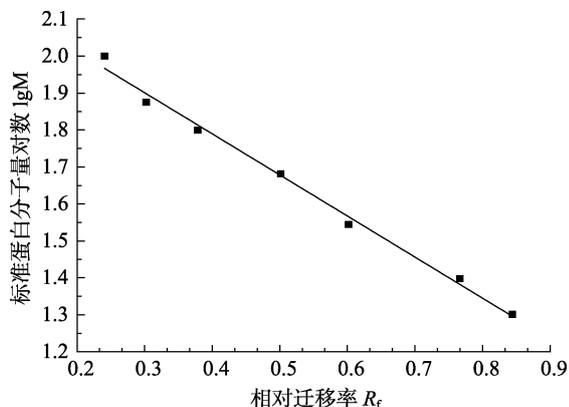


图8 相对分子量标准曲线  
Fig.8 Standard curve of the molecular weight

菌鱼精蛋白纯品的分子量(15.32 kDa)。本研究提取的暗纹东方鲀粗鱼精蛋白有2个条带,分析其原因主要有2点,一是样品中含有其他杂蛋白,二是该蛋白质分子具有几个亚基。也有研究表明,鱼类精巢抗菌活性蛋白组分并不单一,它是由互相类似的数种成分组成。

## 2.5 暗纹东方鲀鱼精蛋白的氨基酸组成

暗纹东方鲀鱼精蛋白的氨基酸组成见表5,从表5中可以看出,丙氨酸和精氨酸是该鱼精蛋白的主要氨基酸,相对含量分别为17.39%和31.40%,约占总氨基酸的50%。这与刘红玉等(2007)研究的大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的氨基酸组成较为类似,均含有较高的精氨酸。碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)占31.87%,与鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)中碱性氨基酸含量相近(谢俊杰等,2001)。但与俞加林(1994)文中提到的精氨酸占2/3以上的结果有明显差别。分析其原因可能是随着时间的延长,人工养殖的河鲀由于食物、地理位置和环境等差异,导

表5 暗纹东方鲀鱼精蛋白氨基酸组成分析

Tab.5 Amino acid composition analysis of  
*T. obscurus* protamine

氨基酸种类 Amino acid type	含量 Content (g/100 g)	相对含量 Relative content
天冬氨酸 Asp	3.07	4.84
苏氨酸 Thr*	3.07	4.84
丝氨酸 Ser	3.56	5.61
谷氨酸 Glu	3.01	4.75
甘氨酸 Gly	3.93	6.70
丙氨酸 Ala	11.03	17.39
缬氨酸 Val*	3.72	5.86
甲硫氨酸 Met*	0.34	0.54
异亮氨酸 Ile*	2.23	3.52
亮氨酸 Leu*	3.98	6.27
酪氨酸 Tyr	1.56	2.46
苯丙氨酸 Phe*	1.51	2.38
赖氨酸 Lys*	-	-
组氨酸 His	0.3	0.47
精氨酸 Arg	19.92	31.40
脯氨酸 Pro	2.24	3.53
半胱氨酸 Cys	-	-
总氨基酸量 Total amino acid amount	63.43	100.00
总必需氨基酸量 Total essential amino acid amount	14.85	23.41

\*: 必需氨基酸; -: 未检测到

\*: Essential amino acid; -: Not detected

致目前河鲀精巢的氨基酸组成与过去有所差异。根据氨基酸的组成和种类, 可将鱼精蛋白分为 3 类, 分别是单鱼精蛋白、双鱼精蛋白和双鱼精蛋白。因暗纹东方鲀鱼精蛋白含有精氨酸和组氨酸, 所以属于双鱼精蛋白。

### 3 结论

本研究采用硫酸提取法提取暗纹东方鲀鱼精蛋白, 通过正交实验法优化得到最佳提取工艺: 硫酸浓度为 0.2 mol/L、硫酸用量为 2.5 倍、提取次数为 2 次、冷乙醇用量为 2.5 倍。影响暗纹东方鲀鱼精蛋白得率的因素主次为: 提取次数>硫酸用量>硫酸浓度>95%乙醇用量。温度对暗纹东方鲀鱼精蛋白的得率影响较小, 说明暗纹东方鲀鱼精蛋白具有很好的耐热性。在最佳提取工艺条件下, 暗纹东方鲀鱼精蛋白的得率最大为 3.82%。由 Tricine-SDS-PAGE 电泳可知, 鱼精蛋白的分子量较小, 粗提法得到的鱼精蛋白经电泳后出现 2 个条带, 说明该粗鱼精蛋白杂质较少。经计算, 暗纹东方鲀鱼精蛋白的分子量分别为 23.27 和 18.23 kDa。丙氨酸和精氨酸是该鱼精蛋白的主要氨基酸, 相对含量分别为 17.39% 和 31.40%, 约占总氨基酸的 50%。根据氨基酸的组成种类和数量来分, 暗纹东方鲀鱼精蛋白属于双鱼精蛋白。该研究为河鲀鱼精蛋白的高效利用奠定理论基础。接下来可对该鱼精蛋白的理化特性进一步研究。

### 参 考 文 献

- Bai C, Rao DH, Xiong GQ, *et al.* Enzymatic extraction optimization of protamine peptides from sturgeon by response surface methodology. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(4): 180–185 [白婵, 饶丹华, 熊光权, 等. 响应面法优化鲟鱼精蛋白肽的酶解提取. *食品与发酵工业*, 2018, 44(4): 180–185]
- Cao WH, Liu ZJ, Lin Y, *et al.* Optimization of the extraction technology and preliminary study on antibacterial activity of protamine from the testis of Giant grouper. *Food Science and Technology*, 2017, 42(11): 261–265 [曹文红, 刘忠嘉, 林芸, 等. 中巨石斑鱼精巢鱼精蛋白提取工艺优化及其抗菌活性的初步研究. *食品科技*, 2017, 42(11): 261–265]
- Chen JM, Li F, Zheng YQ, *et al.* The review of comprehensive utilization with high value of squid processing by-products. *Fishery Modernization*, 2015, 42(1): 44–47 [陈金梅, 李锋, 郑允权, 等. 鱿鱼加工副产物高值化综合利用综述. *渔业现代化*, 2015, 42(1): 44–47]
- Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 1985, 151(2): 369–374
- Egawa Y, Hayashida R, Seki T, *et al.* Fluorometric determination of heparin based on self-quenching of fluorescein-labeled protamine. *Talanta*, 2008, 76(4): 736–741
- Fu XD, Liu YN, Zhu L, *et al.* Flocculation activity of carp protamine in microalgal cells. *Aquaculture*, 2019, 505: 150–156
- Gill TA, Singer DS, Thompson JW. Purification and analysis of protamine. *Process Biochemistry*, 2006, 41(8): 1875–1882
- González-Aramundiz JV, Olmedo MP, González-Fernández Á, *et al.* Protamine-based nanoparticles as new antigen delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 97(Pt A): 51–59
- Guan GM, Sha JC, Zhu DD. Heparin-MPA dual modified CdS quantum dots used as a simple and rapid label-free fluorescent sensor for protamine and hemin detection. *Microchemical Journal*, 2017, 133: 391–397
- Hong J, Chen TT, Tang MR, *et al.* Optimization of protein extraction technology from Chinese Leek seeds by response surface method. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(12): 89–96 [洪晶, 陈涛涛, 唐梦茹, 等. 响应面法优化韭菜籽蛋白质提取工艺. *中国食品学报*, 2013, 13(12): 89–96]
- Hu XL, Liu SJ, Wu CY. The extraction process research of squid protamine. *Journal of Fujian Fisheries*, 2013, 35(6): 434–440 [胡晓璐, 刘淑集, 吴成业. 鱿鱼鱼精蛋白的提取工艺优化研究. *福建水产*, 2013, 35(6): 434–440]
- Kishimoto S, Ishihara M, Takikawa M, *et al.* Novel experimental and clinical therapeutic uses of low-molecular-weight heparin/protamine microparticles. *Pharmaceutics*, 2012, 4(1): 42–57
- Li RQ, Han L, Li RR, *et al.* Optimization of ultrasonic assistant protamine extraction processing parameters using response surface methodology in bovine testes. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(16): 212–216 [李若琦, 韩玲, 李儒仁, 等. 超声波辅助提取牛睾丸中精蛋白工艺优化. *食品工业科技*, 2014, 35(16): 212–216]
- Liu HY, Jiang XF, Cui HB. Study on Extraction and antimicrobial activities of protamine from *Oncorhynchus keta* spermary. *Food Science*, 2007, 28(2): 37–39 [刘红玉, 姜学芬, 崔洪斌. 大马哈鱼鱼精蛋白的提取及抑菌作用的研究. *食品科学*, 2007, 28(2): 37–39]
- Liu SJ, Chen WY, Xu M, *et al.* Study on optimization of the extraction of protamine from *Takifugu flavidus*. *Fishery Modernization*, 2019, 46(2): 73–80 [刘淑集, 陈梧英, 许旻, 等. 菊黄东方鲀鱼精蛋白提取工艺优化研究. *渔业现代化*, 2019, 46(2): 73–80]
- Omana DA, Xu Y, Moayed V, *et al.* Alkali-aided protein extraction from chicken dark meat: Chemical and functional properties of recovered proteins. *Process Biochemistry*, 2010, 45(3): 375–381
- Park J, Hwang SR, Choi JU, *et al.* Self-assembled nanocomplex of PEGylated protamine and heparin-suramin conjugate for accumulation at the tumor site. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 535(1–2): 38–46
- Potter R, Hansen LT, Gill TA. Inhibition of foodborne bacteria by native and modified protamine: Importance of electrostatic interactions. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103(1): 23–34
- Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 16–22
- Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, 1977, 79(1–2): 544–552

- Sommers CD, Ye HP, Liu J, *et al.* Heparin and homogeneous model heparin oligosaccharides form distinct complexes with protamine: Light scattering and zeta potential analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 140: 113–121
- Wu YY, Li LH, Yang XQ, *et al.* Study on the extraction process of nucleoprotein and protamine. *Food Science*, 1999(7): 30–33 [吴燕燕, 李来好, 杨贤庆, 等. 核蛋白和鱼精蛋白提取工艺的研究. *食品科学*, 1999(7): 30–33]
- Xie JJ, Xiong Y, Zhao L, *et al.* Purification and identification of chub *Aristichthys nobilis* protamine. *Jiangxi Science*, 2001, 19(4): 214–217 [谢俊杰, 熊瑜, 赵利, 等. 鲢鱼(*Aristichthys nobilis*) 鱼精蛋白的纯化和鉴定. *江西科学*, 2001, 19(4): 214–217]
- Xie JJ, Zhao L, Xiong Y, *et al.* Extraction of squid protamine. *Journal of Beijing Fisheries*, 2002(5): 35–37 [谢俊杰, 赵利, 熊瑜, 等. 鲢鱼鱼精蛋白的提取. *北京水产*, 2002(5): 35–37]
- Xie M, Zhang F, Liu LJ, *et al.* Surface modification of graphene oxide nanosheets by protamine sulfate/sodium alginate for anti-cancer drug delivery application. *Applied Surface Science*, 2018, 440: 853–860
- Xu MS, Chen JP, Shang Guan XC. Separation, purification and identification a kind of protein with antibacterial activity from cyprinoid. *Science and Technology of Food Industry*, 2004, 25(10): 51–54 [徐明生, 陈锦屏, 上官新晨. 鲤鱼抗菌精蛋白的分离纯化及鉴定. *食品工业科技*, 2004, 25(10): 51–54]
- Yang C, Su XR, Li TW, *et al.* Extraction and determination of tetrodotoxin from low toxicity pufferfish. *Natural Product Research and Development*, 2003, 15(5): 398–400 [杨春, 苏秀榕, 李太武, 等. 低毒河豚鱼毒素的提取和检测. *天然产物研究与开发*, 2003, 15(5): 398–400]
- Yu JL. Fish essence: New medicinal resources worth developing. *Chinese Marine Medicine*, 1994, 13(2): 53–54 [俞加林. 鱼精: 值得开发的药用新资源. *中国海洋药物*, 1994, 13(2): 53–54]
- Zhang D, Yang ZY, Zhang YL. Development status and development countermeasures of China's puffer-fish breeding industry. *Scientific Fish Farming*, 2017(12): 1–3 [张迪, 杨正勇, 张英丽. 中国河鲀养殖产业发展现状与发展对策. *科学养鱼*, 2017(12): 1–3]

(编辑 陈 辉)

## Optimization of Extraction Process of Protamine from *Takifugu obscurus*

ZHANG Jiayuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Hongcai<sup>1,2</sup>, CHEN Shunsheng<sup>1,2①</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. National Research and Development Branch Center for Freshwater Aquatic Products Processing Technology (Shanghai), National Experimental Teaching Demonstration Center of Food Science and Engineering (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306)

**Abstract** The fish's testis, commonly known as fish white, is often discarded as waste owing to its specific odor and is one of the by-products of fish processing. A basic protein, protamine, can be extracted from the testis of fish. Protamine has the advantages of high safety, good antibacterial performance, and high thermal stability. It can be used as an antibacterial ingredient in some foods in the field of food preservation. It has obvious antibacterial activity under alkaline conditions and is a promising antibacterial agent. Here, the testis of *Takifugu obscurus* was used as the raw material, and the protamine was extracted by acid extraction. The extraction coefficient was used to determine the optimal extraction parameters. According to the results of orthogonal test, the importance factors of the extraction of protamine are as follows: extraction times > sulfuric acid dosage > sulfuric acid concentration > 95% ethanol; optimal extraction conditions are: sulfuric acid concentration 0.2 mol/L, sulfuric acid dosage is 2.5 times, the number of extractions was 2, and the amount of 95% ethanol was 2.5 times. Under this condition, the extraction rate of protamine from *T. obscurus* was 3.82%, and the protein content was 89.01%. According to the tricine-SDS-PAGE, the extracted crude protamine has two bands with molecular weights of 25 kDa and 20 kDa, respectively. Analysis of its lytic acid composition found that arginine and alanine content were relatively higher, accounting for 31.40% and 17.39%, respectively. This study is of great significance for the efficient use of testes of puffer-fish (dark-spotted oriental carp), and also lays a theoretical foundation for the application of stag beetle (dark-spotted oriental carp) protamine in the food and pharmaceutical fields.

**Key words** *Takifugu obscurus*; Protamine; Extraction; Process optimization

① Corresponding author: CHEN Shunsheng, E-mail: sschen@shou.edu.cn