

盐溶性猪肝蛋白提取及功能特性和结构分析

Extraction and functional characteristics and structural analysis of porcine liver salt soluble protein

王浩阳¹ 刘丽莉^{1,2} 程伟伟^{1,2} 徐宝成^{1,2} 苏克楠¹

WANG Hao-yang¹ LIU Li-li^{1,2} CHENG Wei-wei^{1,2} XU Bao-cheng^{1,2} SU Ke-nan¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023;

2. 农产品干燥装备河南省工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology,

Luoyang, Henan 471023, China; 2. Agricultural Products Drying Equipment Henan

Engineering Technology Research Center, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要: 目的: 优化盐溶性猪肝蛋白 (salt soluble liver proteins, SSLP) 的制备工艺, 提高猪肝副产物利用率。方法: 以提取率为指标, 分析 NaCl 浓度、pH、提取时间、固液比对 SSLP 提取率的影响, 通过正交旋转优化试验确定最佳制备工艺。以水溶性猪肝蛋白 (water soluble liver proteins, WSLP) 为对照, 对 SSLP 的功能特性 (溶解度、起泡性、泡沫稳定性、乳化性、乳化稳定性等) 进行对比分析, 并通过傅里叶红外光谱, 低场核磁共振和差式扫描量热法分析其结构变化。结果: SSLP 最佳制备工艺为 NaCl 浓度 0.4 mol/L, pH 8, 提取时间 12.95 h, 料液比 ($m_{\text{猪肝}} : V_{\text{缓冲液}}$) 1 : 4.6 (g/mL), 提取率为 10.60%。FT-IR 分析结果显示 SSLP 特征官能团吸收峰明显, 二级结构中 β -转角相对含量 39.91%, α -螺旋相对含量 13.55%, β -折叠相对含量 21.32%, 无规卷曲相对含量 25.23%; LF-NMR 分析结果表明 SSLP 结合水高, 保水性更高; DSC 结果表明 SSLP 的变性温度为 78.68 °C。结论: 在最佳工艺条件下制备的 SSLP 的溶解度、起泡性、乳化性、乳化稳定性均优于 WSLP, 是开发猪肝蛋白产品的优质来源。

关键词: 猪肝; 盐溶性猪肝蛋白; 功能特性; 结构

Abstract: **Objective:** Optimize the preparation process of salt-soluble porcine liver protein and improve the utilization rate of porcine liver by-products. **Methods:** Taking the extraction rate as the index, the effects of NaCl concentration, pH, extraction time and solid-liquid ratio on the extraction rate of SSLP were

analyzed, and the optimal preparation process was determined by orthogonal rotation optimization test. Taking water soluble liver proteins (WSLP) as the control, the functional characteristics (solubility, foaming, foam stability, emulsification, emulsification stability, etc.) of SSLP were compared and analyzed, and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was used, the structural changes were analyzed by low field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) and differential scanning calorimetry (DSC). **Results:** The optimum extraction process of SSLP was NaCl concentration 0.4 mol/L, pH 8, extraction time 12.95 h, solid-liquid ratio 1 : 4.6 (g/mL), and the extraction rate was 10.60%. FT-IR analysis showed that the absorption peak of characteristic functional groups of SSLP was obvious and in the secondary structure β -The relative content of corner was 39.91%, α -The relative content of helix was 13.55%, β -The relative content of folding was 21.32%, and the relative content of random curl was 25.23%; LF-NMR analysis showed that SSLP had higher bound water and higher water retention; DSC results showed that the denaturation temperature of SSLP was 78.68 °C. **Conclusion:** SSLP prepared under optimal process conditions has better solubility, foaming, emulsification and emulsification stability than WSLP, which is a high-quality source for the development of pig liver protein products.

Keywords: porcine liver; salt soluble porcine liver protein; functional characteristics; structure

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: U1704114); 洛阳市社会发展专项 (编号: 2101021A)

作者简介: 王浩阳, 男, 河南科技大学在读硕士研究生。

通信作者: 刘丽莉 (1974—), 女, 河南科技大学教授, 博士。

E-mail: yangliuyilang@163.com

收稿日期: 2022-09-17 **改回日期:** 2023-02-08

猪肝不仅具有补肝、明目、养血的功效, 还含有丰富的蛋白质, 营养价值颇高, 是一种优良的蛋白质来源^[1]。但猪肝有味道腥、苦味重、易褐变等特点, 在实际应用中受到限制。目前国内外关于猪肝的研究多集中于猪肝酱、猪肝粒等产品研发^[2-4]、活性成分提取^[5-7]等方面, 对

猪肝中蛋白质的研究相对较少。

猪肝蛋白种类繁多,有水溶性、盐溶性、不溶性等蛋白质,且蛋白质特性各异。目前肝脏蛋白的提取方法有碱溶酸沉法、水溶液提取法、有机溶剂提取法等。Sobha 等^[8]采用硫酸铵沉淀法从骆驼肝中分离出铁蛋白,并对其评价。史建超^[9]通过乙醇沉淀法提取鸡肝蛋白粉,确定最佳提取工艺。Zouari 等^[10]采用碱溶酸沉法从火鸡肝中提取蛋白质并分析其结构和功能特性,发现肝蛋白具有较好的起泡能力与乳化能力。Devatkal 等^[11]利用水溶液提取法从水牛肝中提取蛋白,发现水溶性蛋白(20%~40%)比盐溶性蛋白(7%~15%)多,且盐溶性蛋白中存在高分子量蛋白质。康梦瑶等^[12]通过超声处理水溶性蛋白,当超声功率为 420 W,超声时间为 7 min 时,水溶性蛋白的乳化性能最好。而盐溶性蛋白具有良好的热诱导凝胶能力,对肉制品的加工及品质具有重要作用,其研究一直备受关注。

目前大部分关于猪肝蛋白的研究都集中于对水溶性蛋白功能特性的研究,缺乏对盐溶性蛋白的相关研究。研究拟利用水溶液提取法制备盐溶性猪肝蛋白,优化盐溶性猪肝蛋白的提取工艺,并以水溶性猪肝蛋白为对照,分析盐溶性猪肝蛋白结构和功能特性,为猪肝蛋白的开发利用提供一定的理论依据,以期对肝脏副产物的再利用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜猪肝:河南洛阳大张超市;

Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 :分析纯,德州润昕实验仪器有限公司;

NaCl :分析纯,西安天茂化工有限公司;

KBr :分析纯,天津市光复经济化工研究所;

SDS :分析纯,无锡市亚泰联合化工有限公司;

BSA :分析纯,合肥博美生物科技有限责任公司。

1.2 仪器与设备

pH 计:PH-3E 型,浙江谱析仪器有限公司;

冷冻离心机:H1-16TR 型,杭州旌斐仪器科技有限公司;

紫外可见光光度计:RM-T2600S 型,青岛瑞明仪器设备有限公司;

自动定氮仪:K1305A 型,上海晟声自动化分析仪器有限公司;

傅里叶红外光谱仪:ALPHA 型,德国布鲁克公司;

差示扫描量热仪:DSC30 型,上海精科智能仪器有限公司;

核磁共振仪:MQC 型,英国 Oxford Instruments 公司;

真空冷冻干燥机:FD1200 型,北京菲尔普科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 盐溶性猪肝蛋白和水溶性猪肝蛋白的提取 参考 Steen 等^[13]提取蛋白的方法并适当改进。称取一定质量的新鲜猪肝,去血水、筋膜,然后加入 4 倍体积的磷酸盐缓冲液溶液(0.05 mol/L, pH 7.4),用匀浆机以 10 000 r/min 的转速匀浆;将匀浆物于 4 ℃ 条件下以 10 000 r/min 转速在冷冻离心机中离心 30 min,取上清液,透析脱盐,冷冻干燥即为水溶性猪肝蛋白(WSLP)。

收集上述沉淀并加入不同提取条件的 NaCl 溶液,混合均匀后调整 pH,然后在 4 ℃ 的冰箱中静置 15 h,经纱布初滤、离心后得到上层溶液,即为 SSLP 溶液。透析脱盐,冷冻干燥即为盐溶性猪肝蛋白(SSLP)。

1.3.2 SSLP 制备的工艺优化

(1) 单因素试验:在前期试验的基础上,分别考察 NaCl 浓度(0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mol/L)、pH(5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)、料液比 $[m_{\text{猪肝}} : V_{\text{缓冲液}}]$ 分别为 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 (g/mL)、提取时间(5, 10, 15, 20, 25, 30 h)对 SSLP 提取率的影响。

(2) 正交旋转试验:依据单因素的试验结果,选取 NaCl 浓度、pH、提取时间、固液比为影响因子,将 SSLP 的提取率作为响应值,利用 Box-Behnken 进行四因素三水平的正交旋转试验设计,确定 SSLP 的最佳制备工艺。

1.3.3 蛋白含量的测定 采用考马斯亮蓝法。

1.3.4 SSLP 功能性质测定

(1) 溶解度测定:参照文献^[14],按式(1)计算溶解度。

$$s = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

s ——溶解度, %;

m_1 ——上清液中蛋白质质量, g;

m_2 ——蛋白质总量, g。

(2) 起泡性和泡沫稳定性测定:参照文献^[15],按式(2)、式(3)分别计算起泡性和泡沫稳定性。

$$P_F = \frac{V_1}{V_2} \times 100\%, \quad (2)$$

$$P_{FS} = \frac{V_{60}}{V_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

P_F ——起泡性, %;

V_1 ——停止搅拌时泡沫体积, mL;

V_2 ——搅拌前液体体积, mL;

P_{FS} ——泡沫稳定性, %;

V_{60} ——60 min 后泡沫体积, mL;

V_0 ——初始泡沫体积, mL。

(3) 乳化性和乳化稳定性测定:参照文献^[16],按式(4)和式(5)分别计算乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性(ESI)。

$$E_{AI} = \frac{2 \times 2,303}{\rho \times (1 - \varphi)} \times A_{500} \times D_F, \quad (4)$$

$$E_{SI} = \frac{A_{30}}{A_0} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

E_{AI} ——乳化活性指数, m^2/g ;

A_{500} ——500 nm 处吸光度;

φ ——油的体积/乳化体系体积;

ρ ——蛋白浓度, g/L ;

D_F ——稀释倍数, 101;

E_{SI} ——乳化稳定性, %;

A_0, A_{30} ——乳化体系在 0, 30 min 时的吸光度。

1.3.5 SSLP 结构测定

(1) 傅里叶红外光谱(FT-IR)测定: 参照文献[17]的方法, 并稍作修改。将提前干燥好的 KBr 分别与 SSLP、WSLP 以质量比 100 : 1 放在研磨钵中, 顺时针研磨成粉末, 混合均匀, 并在样品罐中以 15~20 MPa 的压力压制。样品用红外光谱仪在 400~4 000 cm^{-1} 范围内扫描, 设定分辨率为 4 cm^{-1} 。

(2) 低场核磁共振(LF-NMR)测定: 参照文献[18]。

(3) 差式扫描量热(DSC)测定: 参照文献[19]的方法分别测定 SSLP、WSLP 的变性温度。分别称取 3~5 mg SSLP 与 WSLP, 以空坩锅为对照组, 设置升温速率 10 $^{\circ}C/min$, 温度范围 20~150 $^{\circ}C$, 氮气流速 100 mL/min,

扫描得到曲线。

1.4 数据处理

每个试验平行重复 3 次, 采用 Origin 9.0 软件和 Design-Expert 8.0.5 对试验数据进行分析处理与绘图。

2 结果与分析

2.1 SSLP 制备的单因素试验结果

由图 1(a)可知, 随着 NaCl 浓度增加, SSLP 提取率呈先上升后下降趋势。当 NaCl 浓度为 0.4 mol/L 时, SSLP 提取率最大, 是因为在低盐情况下, SSLP 与盐离子相互作用形成双电层, 降低了静电作用, 从而增加了 SSLP 的溶解度, 随 NaCl 浓度继续增加, 盐离子与 SSLP 分子的电荷互相中和抵消, 破坏了之前形成的双电层, 导致提取率下降^[20]。

如图 1(b)所示, 随着 pH 的增加, SSLP 提取率呈先上升后下降趋势。当 pH 为 7.5 时, SSLP 提取率最大。pH 5.5 接近 SSLP 的等电点, 此时蛋白质表面的电荷较少、静电斥力减少, 蛋白质分子排列紧密, 部分蛋白质发生聚集沉淀, 在水相中的分散系数减少、SSLP 溶解度降低, 而偏离等电点时, SSLP 表面分别带净的正或负电荷, 静电斥力增加, SSLP 溶解度增加, 提取率升高^[21]。

由图 1(c)可知, 随着料液比的增大, SSLP 的提取率也逐渐增加, 当料液比超过 1 : 4 (g/mL) 时, 提取率反而逐渐降低。NaCl 溶液的加入, 使得 SSLP 分子表面电荷

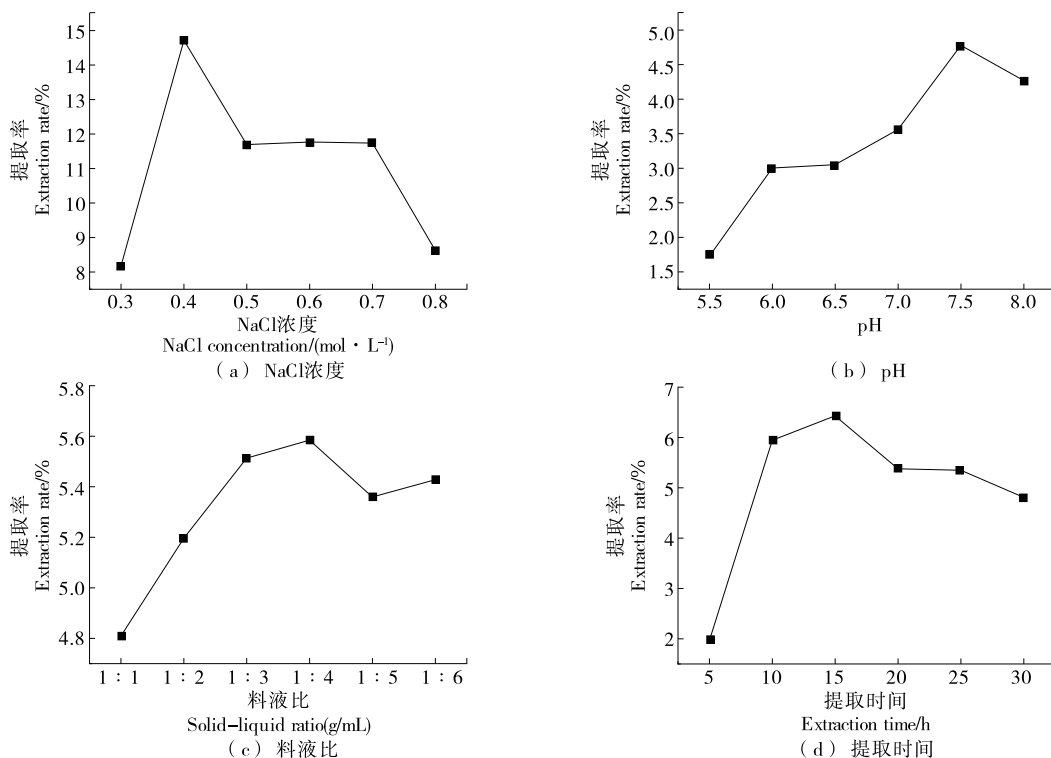


图 1 SSLP 制备的单因素试验结果

Figure 1 Single factor test results of SSLP extraction

增多,SSLP 分子的水合作用增强,导致提取率增加。

由图 1(d)可知,随提取时间的增加,SSLP 提取率呈先上升后下降趋势。当提取时间为 15 h 时,SSLP 提取率最大。这是因为长时间处于高盐环境中,SSLP 可能发生盐析现象,或是与其他成分结合,使得 SSLP 提取率下降。

2.2 SSLP 制备的正交旋转试验结果

SSLP 制备的正交旋转试验因素水平见表 1,试验方案及结果见表 2,计算各项回归系数,拟合得到自变量 NaCl 浓度、pH、提取时间、固液比对 SSLP 提取率的回归模型为:

$$Y = 0.524\ 22 + 4.135\ 76A - 0.555\ 47B + 0.043\ 725C + 0.326\ 26D + 0.254\ 54AB + 0.026\ 004AC - 0.104\ 03AD - 5.302\ 33 \times 10^{-3} BC + 0.060\ 426BD + 2.574\ 82 \times 10^{-3} CD - 7.469\ 97A^2 + 0.020\ 745B^2 - 9.180\ 67 \times 10^{-4} C^2 - 0.086\ 260D^2. \quad (6)$$

由表 3 可知,该模型 $R^2 = 0.934\ 4$,失拟项不显著 ($P = 0.934\ 4 > 0.05$),回归模型极显著 ($P = 0.003\ 2 < 0.01$),表明该模型与实际情况拟合程度较好;从 F 值得以得出,四因素对试验的影响大小为 $D > C > B > A$ 。

表 1 SSLP 提取试验因素及水平
Table 1 Factors and levels of SSLP extraction

水平	A NaCl 浓度/ (mol · L ⁻¹)	B pH	C 提取时 间/h	D 料液比 (g/mL)
-1	0.3	7.0	10	1 : 3
0	0.4	7.5	15	1 : 4
1	0.5	8.0	20	1 : 5

表 2 正交旋转试验设计及结果
Table 2 Response surface test design and results

编号	A	B	C	D	提取率/%	编号	A	B	C	D	提取率/%
1	0	0	0	0	8.95	16	0	1	0	-1	6.91
2	-1	0	-1	0	7.87	17	1	0	0	-1	5.12
3	-1	0	0	-1	4.36	18	0	1	-1	0	8.98
4	0	-1	-1	0	9.88	19	0	1	1	0	8.27
5	0	0	0	0	9.89	20	1	0	0	1	8.28
6	0	0	0	0	8.78	21	0	-1	0	-1	6.14
7	1	1	0	0	8.47	22	1	0	1	0	7.59
8	-1	0	1	0	6.87	23	0	1	0	1	10.64
9	-1	0	0	1	8.34	24	0	0	1	-1	4.38
10	-1	1	0	0	8.02	25	0	0	0	0	8.21
11	0	-1	1	0	10.20	26	0	0	-1	-1	5.89
12	1	-1	0	0	7.35	27	1	0	-1	0	7.57
13	0	0	0	0	11.47	28	0	-1	0	1	7.50
14	0	0	1	1	8.93	29	0	0	-1	1	9.43
15	-1	-1	0	1	7.91						

2.3 利用回归方程确定最佳参数

经过正交旋转优化试验和回归方程分析,得出最佳制备 SSLP 的条件为:NaCl 浓度 0.4 mol/L,pH 8,提取时间 12.95 h,料液比 1 : 4.6 (g/mL),此时提取率为 10.60%。考虑到实际操作,将最佳制备条件修改为:NaCl 浓度 0.4 mol/L、pH 8、提取时间 13 h、固液比 1 : 4.6 (g/mL),在此条件下,得出蛋白提取率为 (10.41 ± 0.16)%,与预测值接近,说明模型与实际结果拟合程度较好,证明响应面优化提取 SSLP 是可行的。

2.4 SSLP 功能性质

由表 4 可知,SSLP 溶解度要优于 WSLP,可能是因为在中性盐环境中,SSLP 分子表面电荷增加,电荷之间互相排斥,SSLP 分子间斥力也随之增加,静电斥力减缓了 SSLP 之间的凝聚,增大了其在溶液中的溶解度^[22]。SSLP 的起泡性优于 WSLP,泡沫稳定性低于 WSLP,可能与 SSLP 分子结构的展开有关^[23];乳化性表示每单位重量蛋白质(m²/g)的界面稳定面积,与乳状液形成过程中蛋白质包裹油水界面的能力有关,数量级为 SSLP> WSLP;乳化稳定性表示 30 min 后剩余乳液浊度的百分比,数量级为 SSLP>WSLP,可能是因为 SSLP 经过中性盐处理后,内部分子结构展开,暴露出疏水性基团,与油相接触面积变大,有利于 SSLP 在油水界面的吸附,使 SSLP 的乳化性与乳化稳定性增加^[24]。

2.5 SSLP 结构

2.5.1 FI-IR 分析 由图 2 可知,SSLP 和 WSLP 分别在 3 299.45,3 296.88 cm⁻¹ 处出现峰型变宽的情况,说明此

表 3 SSLP 制备工艺的方差分析及显著性检验[†]

Table 3 Analysis of variance and significance test of SSLP extraction process

误差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	0.180	14	0.013	4.72	0.003 2
A	2.195×10 ⁻⁴	1	2.195×10 ⁻⁴	0.08	0.779 5
B	1.162×10 ⁻³	1	1.162×10 ⁻³	0.43	0.522 0
C	2.494×10 ⁻³	1	2.494×10 ⁻³	0.93	0.352 2
D	0.090	1	0.090	33.25	<0.000 1
AB	6.479×10 ⁻⁴	1	6.479×10 ⁻⁴	0.24	0.631 4
AC	6.762×10 ⁻⁴	1	6.762×10 ⁻⁴	0.25	0.624 1
AD	4.329×10 ⁻⁴	1	4.329×10 ⁻⁴	0.16	0.694 6
BC	7.029×10 ⁻⁴	1	7.029×10 ⁻⁴	0.26	0.617 4
BD	3.651×10 ⁻³	1	3.651×10 ⁻³	1.36	0.263 8
CD	6.630×10 ⁻⁴	1	6.630×10 ⁻⁴	0.25	0.627 5
A ²	0.036	1	0.036	13.44	0.002 5
B ²	1.745×10 ⁻⁴	1	1.745×10 ⁻⁴	0.07	0.802 8
C ²	3.417×10 ⁻⁴	1	3.417×10 ⁻⁴	1.27	0.279 0
D ²	0.048	1	0.048	17.92	0.000 8
残差	0.038	14	2.693×10 ⁻³		
失拟项	0.021	10	2.080×10 ⁻³	0.49	0.934 4
纯误差	0.017	4	4.227×10 ⁻³		
总和	0.220	28			

[†] P<0.01 表示影响极显著;P<0.05 表示影响显著。

表 4 两种蛋白的溶解度、起泡性、泡沫稳定性、乳化性、乳化稳定性分析[†]

Table 4 Solubility, foaming, foam stability, emulsifying property and emulsifying stability of two proteins

样品	溶解度/%	起泡性/%	泡沫稳定性/%	乳化性/(m ² ·g ⁻¹)	乳化稳定性/%
SSLP	89.58±0.04 ^a	38.74±0.02 ^a	51.82±0.06 ^b	56.29±0.06 ^a	53.69±0.04 ^a
WSLP	85.23±0.02 ^b	32.56±0.03 ^b	66.31±0.05 ^a	48.28±0.05 ^b	41.74±0.03 ^b

[†] 字母不同表示差异显著(P<0.05)。

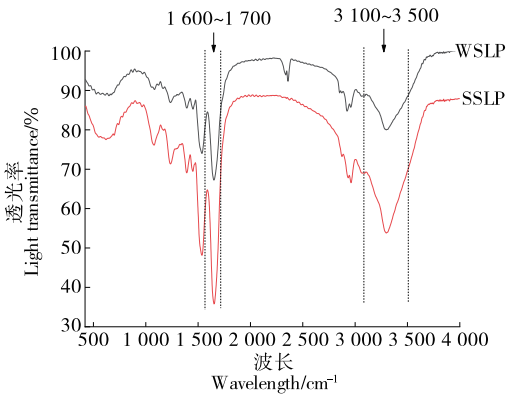


图 2 两种蛋白的 FT-IR 光谱图

Figure 2 FT-IR spectra of two proteins

处存在着氢键,缔合程度大,O—H 伸缩振动导致峰型变宽^[25]。酰胺 I 带(1 600~1 700 cm⁻¹)与氢键作用力紧密相关,对分析蛋白质二级结构最具代表性。两种蛋白在波数 1 600~1 700 cm⁻¹ 具有相同特征的最大吸收峰,SSLP 在此波数范围内的峰值位于 1 656.15 cm⁻¹,WSLP 则红移至 1 652.29 cm⁻¹,这是因为中性盐溶液使 WSLP 的氢键减弱,分子内螺旋度减少,C=O 收缩振动受到影响,使得 WSLP 的酰胺 I 带峰值发生偏移现象。

通过 Peakfit Version 4.2 分别对图 2 中 1 600~1 700 cm⁻¹ 处的 SSLP 与 WSLP 的峰谱图进行去卷积、二阶求导和高斯拟合处理,得到表 5。可以看出,两种蛋白的二级结构有显著不同,SSLP 二级结构的主要成分是 β -转角,占总量的 39.91%;两种蛋白的 α -螺旋结构基本相同;SSLP 的无规则卷曲大于 WSLP,说明 SSLP 结构的随机性更强;SSLP 的 β -转角大于 WSLP, β -折叠却小于 WSLP,是因为 SSLP 在盐溶液的影响下, β -折叠易变性,进而转化为 β -转角,与吴黎明等^[26]的研究结果一致。而蛋白结构中 α -螺旋与 β -折叠含量之比反映出凝胶品质,比例越低,凝胶性能越好,可以看出 SSLP 的 α -螺旋与 β -折叠含量之比低于 WSLP,凝胶特性更好,与张秋会等^[27]的研究一致。

2.5.2 LF-NMR 分析 横向弛豫时间的长短,反映样品水分子中 H⁺ 受束缚的程度,时间短则束缚程度高,自由度低,时间长则束缚程度低,自由度高^[28]。从图 3 可以看出,SSLP 与 WSLP 有 3 个不同的峰值,根据弛豫时间的不同,可分为 3 种:结合水(0.01~5 ms)、吸附水(5~

表 5 两种蛋白的二级结构含量[†]

Table 5 Secondary structure contents of two proteins

样品	β -转角	α -螺旋	无规卷曲	β -折叠
SSLP	39.91±0.02 ^a	13.55±0.03 ^a	25.23±0.05 ^a	21.32±0.01 ^b
WSLP	34.73±0.01 ^b	13.34±0.04 ^b	13.51±0.01 ^b	38.43±0.02 ^a

[†] 字母不同表示差异显著(P<0.05)。

20 ms)、自由水(20~1 000 ms)。此外,SSLP 样品的信号值整体高于 WSLP,表明 SSLP 分子与水分子的结合更加紧密,导致 SSLP 样品的自由水减少,结合水增加,SSLP 的保水性增强。

由表 6 可知,两种蛋白结合水(T_{21})峰比例变化的大

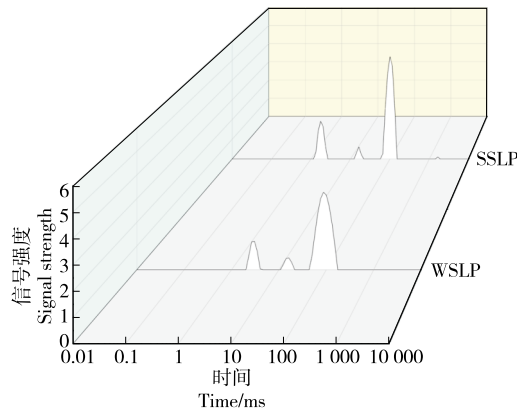


图 3 两种蛋白的横向弛豫时间瀑布图

Figure 3 Waterfall diagram of transverse relaxation time of two proteins

表 6 两种蛋白的弛豫时间(T_2)值变化[†]

Table 6 Changes of relaxation time (T_2) values of two proteins

样品	T_{21} 峰比例/%	T_{22} 峰比例/%	T_{23} 峰比例/%	T_2 峰面积总和
SSLP	22.299±0.05 ^a	4.312±0.08 ^b	73.390±0.81 ^b	26.893±0.12 ^a
WSLP	15.153±0.01 ^b	6.002±0.05 ^a	78.826±0.04 ^a	24.766±0.45 ^b

[†] 不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

小为:SSLP>WSLP,表明 SSLP 中有更多的结合水,可能原因是随着 SSLP 分子结构的展开,中性基团和带电基团的数量增加,SSLP 吸引并结合了更多的水分子。吸附水(T_{22} 、 T_{23})峰比例大小为 SSLP<WSLP,而 SSLP 的 T_2 峰面积总和大于 WSLP 的,可能是因为 SSLP 的网络孔径大,与水分子接触面积较大,导致水化表面积较大,所以 SSLP 的 T_2 峰面积总和较大,保水性较强。

2.5.3 DSC 分析 由图 7 可知,两种蛋白的 DSC 曲线变化趋势相似,但 WSLP 的 DSC 曲线明显低于 SSLP 的。峰值温度能对蛋白质的热稳定性进行表征,热焓值能对蛋白质的聚集程度进行表征。SSLP 和 WSLP 的热变性温度分别为 78.68,75.28 ℃,热焓值分别为 19.58,

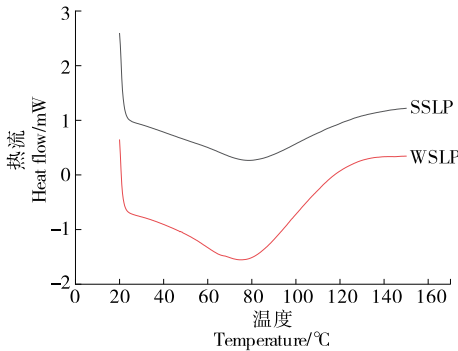


图 4 两种蛋白的 DSC 曲线

Figure 4 DSC curves of two proteins

27.29 J/g,说明热稳定性 SSLP>WSLP,聚集程度为 SSLP<WSLP,原因可能是在磷酸盐缓冲液影响下,WSLP 结构发生变性,非共价键断裂,致使其热稳定性与热焓值发生变化,稳定性不如 SSLP。

3 结论

通过正交旋转试验对盐溶性猪肝蛋白制备的工艺进行优化,确定最佳制备工艺为 NaCl 浓度 0.4 mol/L, pH 8,提取时间 12.95 h,料液比($m_{\text{猪肝}} : V_{\text{缓冲液}}$)1 : 4.6 (g/mL),此时提取率为 10.60%。但试验中的盐溶性蛋白为粗提物,具体的盐溶性蛋白单体成分及含量尚不明确,还需进行深入研究,如何进一步分离纯化也是今后研究的方向之一。

参考文献

[1] 王英,李洪军. 猪肝的利用现状及开发前景[J]. 肉类工业, 2004 (9): 14-16.
WANG Y, LI H J. Utilization status and development prospect of pig liver[J]. Meat Industry, 2004(9): 14-16.
[2] 卢雪松,丁捷,任正伟,等. 方便菜肴泡椒猪肝粒生产工艺优化[J]. 中国调味品, 2016(8): 45-48.
LU X S, DING J, REN Z W, et al. Optimization of production process of pork liver particies with pickled peppers[J]. China Condiment, 2016(8): 45-48.
[3] 王熙,姚微,曲彤旭,等. 盐水猪肝加工工艺的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2009(4): 81-83.
WANG X, YAO W, QU T X, et al. Research on the processing crafts of boiled pig liver with salt[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2009(4): 81-83.
[4] 余静,王卫,张佳敏,等. 猪肝调味酱加工工艺优化[J]. 成都大学学报, 2017, 36(3): 247-251.
YU J, WANG W, ZHANG J M, et al. Optimization of processing technology of pig liver sauce[J]. Journal of Chengdu University, 2017, 36(3): 247-251.
[5] 黄静,于素亚. 猪肝卵磷脂提取工艺研究[J]. 广东农业科学, 2010(1): 105-106.
HUANG J, YU S Y. Study on extraction technology of lecithin from pig liver[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010(1): 105-106.
[6] 褚晨艳,杨澜,颜子晨,等. 猪肝过氧化氢酶的提取及其对脂肪的抗氧化特性[J]. 轻工科技, 2018(4): 1-3.
ZHU C Y, YANG L, YAN Z C, et al. Extraction of catalase from pig liver and its antioxidant properties to fat[J]. Light Industry Science and Technology, 2018(4): 1-3.
[7] 李德玲,刘欣,王丽红,等. 猪肝中提取纯化动物酯酶的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 379-381.
LI D L, LIU X, WANG L H, et al. Study on isolation and purification of animal esterase from pig liver[J]. Food Science, 2007, 28(11): 379-381.
[8] SOBHA G, SURYAKALA S, GEETHA C, et al. Camel kidney

- ferritin: Isolation and partial characterization [J]. Veterinary Research Communications, 2000, 24(5): 287.
- [9] 史建超. 肝蛋白粉制备技术及有效成分研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2008: 17-35.
- SHI J C. Study on preparation technology and effective components of liver protein powder[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2008: 17-35.
- [10] ZOUARI N, FAKHFAKH N, AMARA-DALI W B, et al. Turkey liver: Physicochemical characteristics and functional properties of protein fractions[J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(2): 142-148.
- [11] DEVATKAL S, MENDIRATTA S K, KONDAIAH N, et al. Physicochemical, functional and microbiological quality of buffalo liver[J]. Meat Science, 2004, 68(1): 79-86.
- [12] 康梦瑶, 丁景, 鲁小川, 等. 超声波处理对水溶性猪肝蛋白乳化的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 144-151.
- KANG M Y, DING J, LU X C, et al. Effect of ultrasonic treatment on emulsification characteristics of water-soluble pig liver protein [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3): 144-151.
- [13] STEEN L, GLORIEUX S, GOEMAERE O, et al. Functional properties of pork liver protein fractions[J]. Food and Bioprocess Technology, 2016, 9(6): 970-980.
- [14] GONG K J, SHI A M, LIU H Z, et al. Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate [J]. Journal of Food Engineering, 2016, 170: 33-40.
- [15] 杨希娟, 党斌, 吴昆仑, 等. 青稞蛋白的超声波辅助提取工艺及其功能特性研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(6): 48-56.
- YANG X J, DANG B, WU K L, et al. Study on ultrasonic assisted extraction technology and functional characteristics of highland barley protein[J]. Chinese Journal of Food, 2013, 13(6): 48-56.
- [16] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1978, 26(3): 716-723.
- [17] MACHIDA S, IDOTA N, SUGAHARA Y. Interlayer grafting of kaolinite using trimethylphosphate[J]. Dalton Transactions, 2019, 48(31): 11 663-11 673.
- [18] 周俊鹏, 朱萌, 章蔚, 等. 不同冷冻方式对淡水鱼品质的影响 [J]. 食品科学, 2019, 40(17): 247-254.
- ZHOU J P, ZHU M, ZHANG W, et al. Effect of different freezing methods on the quality of freshwater Fish[J]. Food Science, 2019, 40(17): 247-254.
- [19] 刘丽莉, 代晓凝, 杨晓盼, 等. 喷雾冷冻干燥对鸡蛋清蛋白结构和特性的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 30-35, 41.
- LIU L L, DAI X N, YANG X P, et al. Effect of spray freeze drying on the structure and properties of egg white protein[J]. Food & Machinery, 2020, 36(1): 30-35, 41.
- [20] 寇明钰. 花椒籽蛋白质分离提取及功能性质的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006: 11-23.
- KOU M Y. Study on protein isolation and functional properties of *Zanthoxylum bungeanum* seeds [D]. Chongqing: Southwest University, 2006: 11-23.
- [21] 尚永彪, 李洪军, 夏杨毅, 等. 溶液环境对 PSE 猪肉肌原纤维蛋白溶解度及热诱导凝胶强度的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 35-39.
- SHANG Y B, LI H J, XIA Y Y, et al. Effect of solution conditions on solubility and heat-induced gel strength of PSE porcine myofibrillar proteins[J]. Food Science, 2010, 31(5): 35-39.
- [22] 李莹, 王鹏, 徐幸莲, 等. 超高压处理对低磷酸盐鸡胸肉盐溶蛋白凝胶的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 60-66.
- LI Y, WANG P, XU X L, et al. Effect of ultra high pressure treatment on salt soluble protein gel of low phosphate chicken breast[J]. Food Science, 2013, 34(5): 60-66.
- [23] 孙卓, 李佩珊, 盛龙, 等. 超声处理对蛋清粉速溶性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 78-86.
- SUN Z, LI P S, SHENG L, et al. Effect of ultrasonic treatment on instant solubility of egg white powder[J]. Food Science, 2018, 39(21): 78-86.
- [24] 潘成磊, 丁景, 董唯, 等. 热处理温度对猪肝水溶性蛋白乳化性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 45(16): 82-89.
- PAN C L, DING J, DONG W, et al. Effects of heat treatment temperature on emulsifying properties of water-soluble proteins in pig liver [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 45(16): 82-89.
- [25] 齐宝坤, 赵城彬, 江连洲, 等. 不同热处理温度下大豆 11S 球蛋白 Zeta 电位、粒径和红外光谱分析[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 61-65.
- QI B K, ZHAO C B, JING L Z, et al. Analysis of zeta potential, particle size and infrared spectroscopy of 11S Glycinin at different heat treatment temperatures[J]. Food Science, 2018, 39(24): 61-65.
- [26] 吴黎明, 周群, 周骁, 等. 蜂王浆不同贮存条件下蛋白质二级结构的 Fourier 变换红外光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(1): 82-87.
- WU L M, ZHOU Q, ZHOU X, et al. FT-IR assessment of the secondary structure of proteins in royal jelly under different storage conditions[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(1): 82-87.
- [27] 张秋会, 李苗云, 柳艳霞, 等. 离子强度对 11S 大豆球蛋白和鸡肌球蛋白的二级结构及凝胶特性的影响[J]. 河南农业大学学报, 2018, 52(3): 424-429.
- ZHANG Q H, LI M Y, LIU Y X, et al. Effects of ionic strength on secondary structures and gel characters of 11S globulin and chicken myosin[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2018, 52(3): 424-429.
- [28] 姜程耀, 林松毅, 李冬梅, 等. 电子束辐照对葵花籽蛋白微观结构和水解特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 100-104.
- JIANG C Y, LIN S Y, LI D M, et al. Effect of electron beam irradiation on microstructure and hydrolysis characteristics of sunflower seed protein[J]. Food Science, 2020, 41(1): 100-104.