

牡蛎原肌球蛋白的提取工艺优化

吕春霞¹, 张慧恩¹, 杨留明¹, 雷叶斯¹, 洪梦蓉², 杨 华^{1*}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100; 2. 宁波市检验检疫研究院, 宁波 315100)

摘要: **目的** 探究牡蛎原肌球蛋白提取的最优工艺。**方法** 以养殖牡蛎为原料, 探究料液比、提取次数、提取温度、pH 等单因素对牡蛎原肌球蛋白提取率的影响, 并通过正交实验对其进行优化。**结果** 在 pH 5.5 的基础上得出牡蛎原肌球蛋白提取的最优工艺参数是: 料液比为 1:2, 提取次数为 6 次、提取温度为 100 °C, 此时原肌球蛋白的得率为 6.53%。**结论** 本研究优化的方法大大提高了牡蛎原肌球蛋白的提取率。

关键词: 养殖牡蛎; 原肌球蛋白; 提取工艺

Optimization of extraction process of oyster promyosin

LV Chun-Xia¹, ZHANG Hui-En¹, YANG Liu-Ming¹, LEI Ye-Si¹, HONG Meng-Rong², YANG Hua^{1*}

(1. College of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;
2. Ningbo Inspection and Quarantine Institute, Ningbo 315100, China)

ABSTRACT: Objective To explore the optimal technology for extraction of oyster tropomyosin. **Methods** Taking cultured oyster as raw material, the influences of single factors such as solid-liquid ratio, extraction times, extraction temperature and pH on the extraction rate of tropomyosin from oyster were investigated, and optimized by orthogonal experiment. **Results** On the basis of pH 5.5, the optimal technological parameters for the extraction of oyster tropomyosin were as follows: The ratio of solid to liquid was 1:2, the extraction times were 6, and the extraction temperature was 100 °C. At this time, the yield of tropomyosin was 6.53%. **Conclusion** The optimized method in this study has greatly improved the extraction rate of tropomyosin from oyster.

KEY WORDS: farming oysters; tropomyosin; extraction process

1 引言

牡蛎是世界上第一大养殖贝类, 依附寄生的软体动物, 外面包裹的贝壳, 其中一个较小且平, 另一个较大又突出, 贝壳表面不平整^[1-3]。牡蛎的肉质嫩滑可口, 含有丰富的营养物质(如蛋白质、氨基酸等), 尤其是含有较高的牛磺酸以及人体所必备的多种微量元素、多种维生素, 受到人们的喜爱^[4]。牡蛎肉都可以食用, 而且其肉、壳、

油具有一定的药理作用。牡蛎具有免疫调节、缓解疲劳、抵抗病毒、对肝脏进行保护、降低血糖、对抗肿瘤、抗氧化、降血脂、抑制细菌等作用^[4-7]。在中医学角度上, 牡蛎可以镇定安神, 滋阴补阳, 对心悸失眠、伤神劳脾、腰膝疼痛等症状皆有疗效^[8]。但因其含有致敏原原肌球蛋白, 其致敏性也需引起人们的重视。牡蛎中原肌球蛋白为大分子蛋白, 容易刺激机体免疫系统发生免疫应答产生大量特异性免疫球蛋白 E(immunoglobulin, IgE)抗体, 当此类

基金项目: 浙江省公益项目(LGN18C200003)、宁波市公益项目(2019C10050)、浙江省重点研发计划项目(2019C02071)

Fund: Supported by the Zhejiang Charity Project (LGN18C200003), Public welfare projects in Ningbo (2019C10050), and Key R&D Projects in Zhejiang Province (2019C02071)

*通讯作者: 杨华, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: yanghua@zwu.edu.cn

*Corresponding author: YANG Huang, Ph.D, Professor, College of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China. E-mail: yanghua@zwu.edu.cn

蛋白再次进入体内,便与特异性 IgE 结合促使肥大细胞释放组胺等物质而发生过敏反应^[9,10]。牡蛎过敏可能导致患者出现皮肤红肿、荨麻疹、腹痛、腹泻等多种过敏性症状,严重时甚至可导致休克,甚至危及生命^[11-13],严重影响着过敏人群的身体和生活质量^[12]。Ai 等^[14]通过酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫印迹法(western blot)鉴定发现原肌球蛋白是甲壳类和软体动物的主要交叉反应变应原。张江涛等^[15]通过免疫印迹法、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)、圆二色谱法(circular dichroism spectrum, CD)等实验方法,成功重组了牡蛎原肌球蛋白,为后续原肌球蛋白和牡蛎脱敏技术等研究做出了贡献。

本研究以养殖牡蛎为研究对象,探究提取其原肌球蛋白过程中的 4 个关键因素(料液比、提取温度、提取次数、pH 值)对原肌球蛋白提取率的影响,以此得出最优组合,以期对牡蛎产品的后期加工,及致敏机制的研究等奠定一定的基础。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Avanti J-26XP 高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特); HWS 型恒温恒湿培养箱(宁波江南仪器厂); Multiskan FC 型酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司); FE20 pH 计(瑞士梅特勒-托利多集团); Scientz-11 无菌均质器(宁波新芝超声设备有限公司); FSH-2A 高速匀浆机(上海维城仪器有限公司); DYY-6C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

Tris、30% Acrylamide、SDS、过硫酸铵、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)、BSA 标准品、蛋白质上样缓冲液(5×)(分析纯,北京索莱宝科技有限公司); 考马斯亮蓝(上海捷瑞生物工程有限公司); 牡蛎(宁波路林市场)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

将订购的养殖牡蛎皆去壳、洗净、剖开其腹肉、取出其内脏及排泄物,再次用冰水洗净。用刀将干净的牡蛎肉切碎,分装入若干自封袋中,放入-40℃冰箱内冷冻保存。

2.2.2 标准曲线的制作

蛋白标准曲线的绘制:使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,根据说明书操作,具体配制见表 1。使用酶标仪在 593 nm 的波长下测定上述溶液的吸光度,得出图 1 所示标

准曲线,并得到标准方程 $Y=0.0057X+0.1005$ ($r^2=0.9991$)。

表 1 BSA 标准蛋白配制表

孔号	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈
标准蛋白质溶液/ μL	0	2	4	6	8	12	16	20
PBS 溶液/ μL	20	18	16	14	12	8	4	0
BCA 工作液/ μL	200	200	200	200	200	200	200	200
蛋白质浓度/ μg	0	2	4	6	8	12	16	20

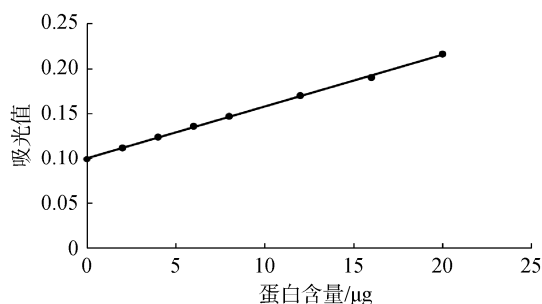


图 1 标准曲线图

Fig.1 Standard chart

2.2.3 提取工艺流程

参考张凌晶等^[6]对牡蛎原肌球蛋白的制备的方法:新鲜的牡蛎去壳、去内脏、剁碎→加入冰冷 Tris-HCl 缓冲液→高速匀浆机捣碎→取悬浮液,沸水浴加热悬浮液→冷却→离心→取上清液→原肌球蛋白粗提液。

2.2.4 提取条件的选择

(1) 料液比的选择

配制 pH 为 7.5, 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液,将所制备的 Tris-HCl 缓冲液放入 4℃ 的冰箱中冷藏保存。

将已剁碎的牡蛎肉糜解冻,准确称取 5 份 30 g 的牡蛎肉糜于 100 mL 的烧杯中,按照料液比为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 分别加入 pH=7.5 的冰 Tris-HCl 缓冲液 30、60、90、120、150 mL 作为浸提液,调节 pH=5.5。将上述 5 份样品用高速匀浆机捣碎 1 min。静置 10 min,将得到的悬浮液倒入小烧杯,于 100℃ 水浴锅中水浴加热 10 min,取出后立即冰水冷却至 4℃。冷却后用高速离心机 9000 r/min 离心 15 min,重复 3 次,4 层纱布过滤取上清液,即为牡蛎原肌球蛋白粗提液。

将每个料液比不同的样品用 PBS 溶液各以 0、2、4、8、10 倍稀释成 5 份,每份各加 20 μL 于 96 孔板的样品孔中,用酶标仪测定其在 593 nm 处的吸光值,计算牡蛎原肌球蛋白的提取率。

(2) 提取次数的选择

将已剁碎的牡蛎肉糜解冻,准确称取 5 份 30 g 的牡蛎肉糜于 100 mL 的烧杯中,分别按照料液比为 1:1 加入 pH=7.5 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(4℃)30 mL 作为提取液,调节 pH 为 5.5。将上述 5 份分别用高速匀浆机捣碎 0、2、4、6、8 次,每次间隔 1 min,捣碎时间不超过 20 s。静

置 10 min, 将得到的悬浮液倒入小烧杯, 于 100 °C 水浴锅中水浴加热 10 min, 取出后立即冰水冷却至 4 °C。冷却后用高速离心机 9000 r/min 离心 15 min, 重复 3 次后, 经 4 层纱布过滤取上清液, 即为牡蛎原肌球蛋白粗提液。

将每个提取时间不同的样品用 PBS 溶液各以 0、2、4、8、10 倍稀释成 5 份, 每份各加 20 μL 到 96 孔板的样品孔中, 用酶标仪测定其在 593 nm 处的吸光值, 计算牡蛎原肌球蛋白的提取率。

(3) 提取温度的选择

将已剁碎的牡蛎肉糜解冻, 准确称取 5 份 30 g 的牡蛎肉糜于 100 mL 的烧杯中, 分别按照料液比为 1:1 加入 pH=7.5 的冰 Tris-HCl 缓冲液 30 mL 作为提取液, 调节 pH 为 5.5。将上述 5 份样品用高速匀浆机捣碎 2 次, 每次间隔 1 min, 捣碎时间不超过 20 s。静置 10 min, 将得到的悬浮液倒入小烧杯, 分别于 20、40、60、80、100 °C 水浴锅中水浴加热 10 min, 取出后立即冰水冷却至 4 °C。冷却后使用高速离心机 9000 r/min 离心 3 次, 每次 15 min, 经 4 层纱布过滤取上清液, 即为牡蛎原肌球蛋白粗提液。

将每个提取温度不同的样品用 PBS 溶液各以 0、2、4、8、10 倍稀释成 5 份, 每份各加 20 μL 到 96 孔板的样品孔中, 用酶标仪测定其在 593 nm 处的吸光值, 计算牡蛎原肌球蛋白的提取率。

(4) 料液混合后 pH 的选择

将已剁碎的牡蛎肉糜解冻, 准确称取 5 份 30 g 的牡蛎肉糜于 100 mL 的烧杯中, 分别按照料液比为 1:1 加入 pH=7.5 的冰 Tris-HCl 缓冲液 30 mL 作为提取液, 将料液混合后的溶液 pH 各调整为 1.5、3.5、5.5、7.5、9.5。将上述 5 份样品用高速匀浆机捣碎 2 次, 每次间隔 1 min, 捣碎时间不超过 20 s。静置 10 min, 将得到的悬浮液倒入小烧杯, 于 100 °C 水浴锅中水浴加热 10 min, 取出后立即用冰水冷却至 4 °C。冷却后使用高速离心机 9000 r/min 离心 3 次, 每次 15 min, 经 4 层纱布过滤取上清液, 即为牡蛎原肌球蛋白粗提液。

将每个提取过程中 pH 不同的样品用 PBS 溶液各以 0、2、4、8、10 倍稀释成 5 份, 每份各加 20 μL 到 96 孔板的样品孔中, 用酶标仪测定其在 593 nm 处的吸光值, 计算牡蛎原肌球蛋白的提取率。

2.2.5 原肌球蛋白提取率的计算

$$\text{原肌球蛋白提取率 } \omega = \frac{C \times V}{m_{\text{总}}} \times 100\%$$

C: 原肌球蛋白的浓度, g/mL;

V: 原肌球蛋白溶液的体积, mL;

$m_{\text{总}}$: 牡蛎的质量, g。

2.2.6 最佳提取工艺的选择

以料液比、提取时间、提物温度、料液混合 pH 为 4 个单因素, 确定 3 个水平进行 $L_9(3^4)$ 实验(表 2), 以原肌球

蛋白提取率为指标, 探究 Tris-HCl 缓冲液提取牡蛎原肌球蛋白的最佳工艺条件。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交因子水平表
Table 2 $L_9(3^4)$ Level table for orthogonal factors

水平	因素			
	A 料液比/ (mL:g)	B 提取次数 /次	C 提取温度 /°C	D 料液混合 pH
1	1:1	2	100	3.5
2	1:2	4	80	5.5
3	1:3	6	60	7.5

2.2.7 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

(1) 凝胶配制

参考杨睿等^[17]方法, 采用间断体系 SDS-PAGE 垂直板凝胶电泳法, 分离鉴定牡蛎原肌球蛋白粗提液。分别制备分离胶和浓缩胶, 详细浓度及制备方法见表 3。

表 3 SDS-PAGE 电泳凝胶配制表
Table 3 MDS-PAGE electrophoresis gel matching table

试剂	分离胶/mL(10%, 10 mL)	浓缩胶/mL (5%, 3 mL)
H ₂ O	4.0	2.1
30 % 丙烯酰胺	3.3	0.5
1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.8)	2.5	/
1.0 mol/L Tris-HCl (pH6.8)	/	0.38
10% SDS	0.1	0.03
10% 过硫酸铵	0.1	0.03
TEMED	0.004	0.003

(2) 制胶

分离胶按照表 3 所示制备, 将配制好的分离胶灌入凝胶板中, 凝固后倒入浓缩胶。

(3) 样品处理及上样

为尽可能消除杂质, 将粗提液再次 18000 r/min 离心 20 min。将蛋白标准品(5 倍)和蛋白质样品以 1:4 混合, 即 6 μL 蛋白标准品与 24 μL 蛋白样品, 使用震荡机混合摇匀 1 min。将样品放入 100 °C 水浴锅水浴加热 8 min, 将冰冻保存的 Marker 取出, 等待上样。取出梳子, 把缓冲液倒入电泳槽中, 将 Marker 和处理好的样品慢慢加进点样孔。

(4) 电泳、染色及脱色

将电泳仪调节为恒压 120 V, 大约 90 min 左右, 指示前沿到达电泳分离胶下沿 1 cm 处, 电泳结束。电泳后小心将凝胶与玻璃板分离, 用考马斯亮蓝 R250 染色 6 h 后, 用醋酸脱色, 脱色结束拍片进行分析。

3 结果与分析

3.1 牡蛎原肌球蛋白提取单因素实验结果

3.1.1 料液比对原肌球蛋白提取的影响

由图 2 可知,料液比在 1:1~1:3 范围内时,原肌球蛋白的提取率随着料液比的变大而呈现出有规律的降幅,在 1:3~1:4 范围内时,原肌球蛋白的提取率剧烈下降,料液比为 1:5 时下降趋势已趋于平缓。折线图整体呈现出下降趋势,由此可见,当料液比为 1:1 时,原肌球蛋白的提取率达到最高值,提取率随着料液比的增高而降低。在原肌球蛋白提取过程中,过多加入提取液用量,易使蛋白溶出达到饱和^[18],导致溶液中蛋白含量稀疏,提取率降低,且高料液比比较消耗原料及试剂。因此,最适料液比选为 1:1。

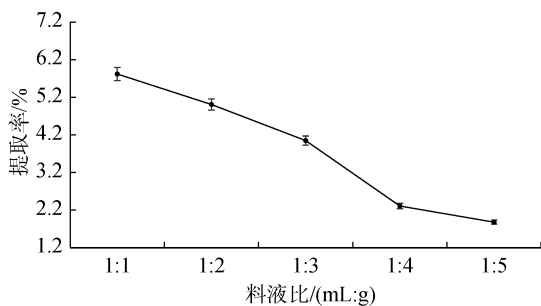


图 2 料液比对原肌球蛋白提取率的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of feed liquid ratio on extraction rate of tropomyosin ($n=3$)

3.1.2 提取次数对原肌球蛋白提取的影响

由图 3 可知,用高速匀浆机匀浆 0~8 次之间,原肌球蛋白的提取率先上升后降低。未用高速匀浆机匀浆时(即 0 次时),原肌球蛋白的提取率较低,而 0~4 次时提取率增幅明显,这说明若牡蛎与提取液接触不充分,二者反应时间少,会使得蛋白溶出量低。使用高速匀浆机匀浆 4~8 次时提取率再次下降,下降趋势缓慢,当匀浆次数为 4 次时,原肌球蛋白提取率达到最高点。适当地对牡蛎进行匀浆提取蛋白,可以使提取液与牡蛎充分接触,但过多次数地进行高速匀浆,可能会增加蛋白质的不稳定性^[19],甚至导致蛋白变性。因此,选择最适提取次数为 4 次。

3.1.3 提取温度对原肌球蛋白提取的影响

温度对原肌球蛋白的提取效果影响如图 4,随着温度的升高,原肌球蛋白提取率逐渐上升。提取温度在 20~40 °C 之间时,原肌球蛋白的提取率升高趋势较为平缓,40~60 °C 时提取率增长剧烈,60~100 °C 时,提取率又逐渐趋向平稳,提取率到达最高点时提取温度为 100 °C。当温度上升时,分子的运动速度逐渐加快,蛋白质的溶解速度也变快,蛋白溶出率增高。且在 20~60 °C 之间时,所提出的蛋白有较多除原肌球蛋白外杂质蛋白,而在提取温度在 80~100 °C 时,所提出的原肌球蛋白较为纯净。因此,考虑到原肌球蛋白纯度问题,最适提取温度选为 100 °C。

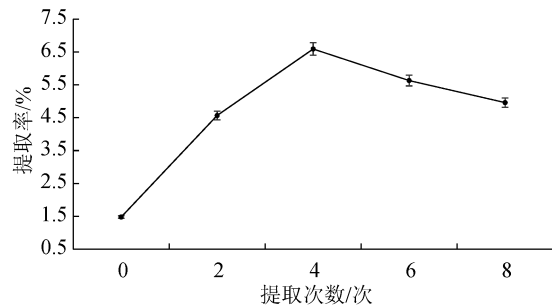


图 3 提取次数对原肌球蛋白提取率的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of extraction frequency on extraction rate of tropomyosin ($n=3$)

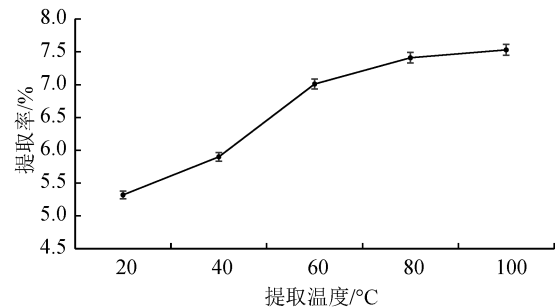


图 4 提取温度对原肌球蛋白提取率的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of extraction temperature on extraction rate of tropomyosin ($n=3$)

3.1.4 料液混合后 pH 对原肌球蛋白提取的影响

提取过程中 pH 的改变会使原肌球蛋白提取率的波动较大,提取率呈先升高后降低的趋势(图 5)。牡蛎肉糜与 Tris-HCl 缓冲溶液混合后,pH 在 1.5~5.5 范围内变动时,原肌球蛋白提取率逐渐增高,后 pH 在 5.5~7.5 范围内变动,蛋白提取率剧烈下降,pH 在 7.5~9.5 时蛋白提取率变化逐渐趋于平稳,当原肌球蛋白的提取率达到最高点时,pH 为 5.5。适当调节 pH 值有利于蛋白质的溶出,但过高或过低的 pH 都可能造成蛋白质的氢键断裂,使蛋白质发生变性,且在强酸或强碱的情况下,所提出的蛋白有较多除原肌球蛋白外的杂质蛋白,而 pH 在 5.5~7.5 时,所得到的原肌球蛋白纯度较高。因此,考虑到原肌球蛋白纯度问题,最适提取 pH 选为 5.5。

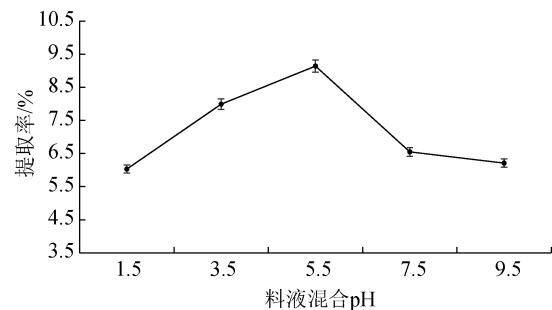


图 5 料液混合后 pH 对原肌球蛋白提取率的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of pH on extraction rate of tropomyosin after mixing ($n=3$)

3.2 正交实验

正交实验法是通过正交设计软件, 以正交表为工具来安排实验方案, 是不完全组合设计。正交实验设计是根据均衡性的实验设计原理来安排实验, 使得部分实验对全组实验具有代表性, 在不同组合实验下, 通过分析可以比较每个因素中的每个水平对实验指标的影响, 从而缩小优选范围^[20]。正交实验中的每个实验结果都非常具有代表性, 能够相对完整地显示出优选范围的一般情况。本实验共有料液比、提取次数、提取温度、料液混合后 pH 4 个单因素, 需要 3 个水平, 经正交表排列后, 得到表 4, 得出还需做 9 组实验。

表 4 正交实验结果
Table 4 Orthogonal test results

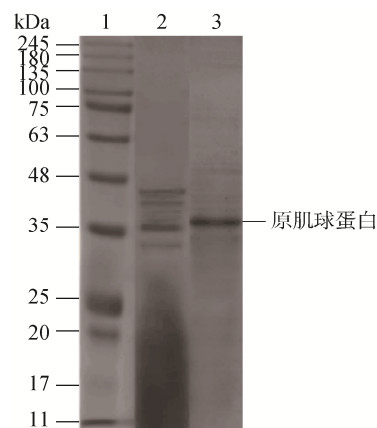
水平	因素				实验结果
	A 料液比 (V:m)	B 提取时 间/次	C 提取温 度/°C	D 料液混 合 pH	
1	1(1:1)	1(2)	1(100)	1(3.5)	5.23±0.34
2	1(1:1)	2(4)	2(80)	2(5.5)	5.71±0.45
3	1(1:1)	3(6)	3(60)	3(7.5)	4.16±0.57
4	2(1:2)	1(2)	2(80)	3(7.5)	3.22±1.01
5	2(1:2)	2(4)	3(60)	1(3.5)	2.64±0.77
6	2(1:2)	3(6)	1(100)	2(5.5)	5.92±0.22
7	3(1:3)	1(2)	3(60)	2(5.5)	1.47±0.93
8	3(1:3)	2(4)	1(100)	3(7.5)	4.59±0.47
9	3(1:3)	3(6)	2(80)	1(3.5)	2.95±0.71
K1	5.03	3.31	5.25	3.61	主次顺序:
K2	3.93	4.31	3.96	4.37	C>A>B>D
K3	3.03	4.34	2.76	3.99	最优水平:
R2	2.03	1.04	2.49	0.76	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂

对牡蛎原肌球蛋白提取率的影响, 由大到小依次是提取温度、料液比、提取次数、料液混合后 pH 值(表 4), 获得原肌球蛋白提取的最佳工艺条件为 A₂B₃C₁D₂, 即牡蛎原肌球蛋白提取料液比为 1:2, 提取次数为 6 次, 提取温度为 100 °C, 料液混合后 pH 为 5.5。在上述 4 种单因素条件下进行了 3 次平行验证实验, 原肌球蛋白提取率为 6.53%, 高出表 4 中每一个组合实验的提取率。综上, 料液比 1:2, 提取 6 次, 提取温度 100 °C, 料液混合后 pH=5.5 为最佳提取工艺条件。

3.3 原肌球蛋白纯化过程电泳分析

牡蛎中含有水溶性蛋白、盐溶性蛋白、不溶性蛋白等多种蛋白^[21]。图 6 中的 2 是未进行纯化的粗蛋白, 可以看出还存在较多杂蛋白, 经高速离心机 18000 r/min 离心 3 次、每次 20 min, 有效去除原蛋白中除原肌球蛋白外的其他蛋白、脂肪等物质对后续检测的干扰, 再次进行电泳。

如图 6 中的 3 所示, 原肌球蛋白的纯度得以显著提升。



注: 1: 标准品 Mark; 2: 肌浆蛋白; 3: 原肌球蛋白

图 6 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig.6 SDS-PAGE gel electrophoresis

4 结 论

本实验通过单因素实验研究料液比、提取次数、提取温度、料液混合后 pH 值对牡蛎原肌球蛋白得率的影响, 采取正交实验法优化牡蛎原肌球蛋白的最佳提取工艺条件, 结果显示 Tris-HCl 缓冲液对原肌球蛋白的得率影响较大。根据确定的最佳工艺条件: 牡蛎原肌球蛋白提取料液比为 1:2, 提取次数为 6 次, 提取温度为 100 °C, 料液混合后 pH 为 5.5, 进行实验, 测出牡蛎原肌球蛋白得率为 6.53%。原肌球蛋白是甲壳类动物的主要过敏原, 以牡蛎为原材料, 对原肌球蛋白的提取工艺进行优化, 对食品过敏及食物脱敏技术的研究都具有重大意义。

参考文献

- [1] 佚名. “中国近海牡蛎的种类、分布和系统演化”研究取得多项重要成果[J]. 中国科技信息, 2013, (3): 15.
Anonymous. Many important achievements have been made in the study of *Species, distribution and systematic evolution of oysters in coastal China* [J]. China Sci Technol Inform, 2013, (3): 15.
- [2] 滕瑜, 王彩理. 牡蛎的营养和降糖作用研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 39-44.
Teng Y, Wang CL. The study on nutrition and sugar-lowered action of *Crassostrea talienwhanensis* [J]. Marine Fish Res, 2005, 26(6): 39-44.
- [3] 徐成, 卢虹玉, 章超桦, 等. 牡蛎酶解提取物对 D-半乳糖致衰小鼠学习记忆的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 347-351.
Xu C, Lu HY, Zhang CH, et al. Effects of enzymatic extractions from oyster on the learning and memory of senile mice induced by D-gal [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(2): 347-351.
- [4] 杨韵, 徐波. 牡蛎的化学成分及其生物活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2015, 17(12): 1345-1349.
Yang Y, Xu B. Research progress on chemical composition of oyster and

- its biological activity [J]. *Mod Chin Med*, 2015, 17(12): 1345–1349.
- [5] 滕瑜, 王彩理. 牡蛎的营养保健及综合利用[J]. *齐鲁渔业*, 2006, (2): 31–32.
Teng Y, Wang CL. Nutritional health care and comprehensive utilization of oysters [J]. *Qilu Fish*, 2006, (2): 31–32.
- [6] 赵永法, 杨建飞. 柴胡加龙骨牡蛎汤在心系疾病中临床应用的研究进展[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(6): 1081–1083.
Zhao YF, Yang JF. Progress in clinical application of *Bupleurum* and oyster keel soup in cardiac diseases [J]. *Chin Med Emerg*, 2016, 25(6): 1081–1083.
- [7] 李颖畅, 王克超, 王亚丽. 水产品过敏原及其消减方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(4): 1033–1038.
Li YC, Wang KC, Wang YL. Research progress allergen of aquatic product and reducing method [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(4): 1033–1038.
- [8] 吴培培. 张仲景应用牡蛎的规律研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
Wu PP. Research on Zhang Zhongjing's application of oyster [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2010.
- [9] Ishikawa M, Shimakura K, Nagashima Y, *et al.* Isolation and properties of allergenic proteins in the oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Fish Sci*, 1997, 63(4): 610–614.
- [10] Ishikawa M, Ishida M, Shimakura K, *et al.* Purification and IgE-binding epitopes of a major allergen in the gastropod turbo cornutus [J]. *Biosci, Biotechnol Biochem*, 1998, 62(7): 1337–1343.
- [11] 冯汉利, 胡小钟, 郭明星, 等. 甲壳类食品过敏原研究及其在出入境检验检疫中的地位[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(1): 207–210.
Feng HL, Hu XZ, Guo MX, *et al.* Study on the crustacean food allergens and its position in entry–exit inspection and quarantine [J]. *Hubei Agric Sci*, 2010, 49(1): 207–210.
- [12] 龙淑筠, 潘剑宇, 陈华, 等. 牡蛎致敏蛋白初步分离和酶解处理对其抗原性的影响[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(4): 307–311.
Long SY, Pan JY, Chen H, *et al.* Oyster allergenic protein preliminary separation and enzymatic activity on its antigenicity [J]. *Chin J Food Hyg*, 2014, 26(4): 307–311.
- [13] Davis CM. Food allergies: Clinical manifestations, diagnoses, and, management [J]. *Curr Prob Pediatr Ad*, 2009, 39(10): 236–254.
- [14] Ai E, Ishizaki S, Shiomi K. Tropomyosins in gastropods and bivalves: Identification as major allergens and amino acid sequence features [J]. *Food Chem*, 2009, 114(2): 634–641.
- [15] 张江涛, 李国明, 方磊, 等. 牡蛎主要过敏原肌球蛋白的重组表达及鉴定[J]. *中国食品添加剂*, 2019, (1): 47–53.
Zhang JT, Li GM, Fang L, *et al.* Recombinant expression and identification of the main allergen tropomyosin in oyster [J]. *China Food Addit*, 2019, (1): 47–53.
- [16] 张凌晶, 蔡秋凤, 刘光明, 等. 太平洋牡蛎肌肉蛋白的模拟胃肠液消化研究[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2011, 16(2): 81–86.
Zhang LJ, Cai QF, Liu GM, *et al.* Simulated gastrointestinal digestion of muscle proteins from *crassostrea gigas thunberg* [J]. *J Jimei Univ (Nat Sci Ed)*, 2011, 16(2): 81–86.
- [17] 杨睿, 吴海强, 刘志刚. 大黄鱼过敏原的提取、分离及免疫学特性鉴定[J]. *卫生研究*, 2009, 38(1): 60–62.
Yang R, Wu HQ, Liu ZG. Extraction, isolation and immunological identification of allergens from *Pseudosciaena crocea* [J]. *J Hyg Res*, 2009, 38(1): 60–62.
- [18] 吴晓红, 王振宁, 郑月明, 等. 松仁中盐溶蛋白的提取工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(10): 259–261.
Wu XH, Wang ZN, Zhen YM, *et al.* Study on the extraction technology of salt-soluble protein from pine nuts [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, 30(10): 259–261.
- [19] 马涛, 王一侠, 金振涛, 等. 三文鱼过敏原小清蛋白分离纯化及免疫结构鉴定[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(4): 1–5.
Ma T, Wang YX, Jin ZT, *et al.* Purification and allergenicity identification of salmon parvalbumin [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(4): 1–5.
- [20] 王玉枝, 邢春峰, 常广平. 分析交互作用方法的应用与比较[J]. *重庆工商大学学报(自然科学版)*, 2010, 27(1): 36–38.
Wang YZ, Xing CF, Chang GP. Application and comparison of the methods of analyzing interaction [J]. *J Chongqing Technol Business Univ (Nat Sci Ed)*, 2010, 27(1): 36–38.
- [21] 张晶晶, 郑惠娜, 章超桦, 等. 牡蛎蛋白分离及其基本组成分析[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(9): 195–199.
Zhang JJ, Zhen HN, Zhang CH, *et al.* The separation and composition of oyster protein [J]. *Food Ferment Ind*, 2013, 39(9): 195–199.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

吕春霞, 硕士研究生, 主要研究方向为食品化学工程与安全控制。

E-mail: 1145305104@qq.com

杨 华, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。

E-mail: yanghua@zwwu.edu.cn