

## 复合酶辅助碱提酸沉法提取紫菜蛋白

贾晓蕾<sup>1</sup>, 沈宇晴<sup>1</sup>, 郭传宇<sup>1</sup>, 潘锦锋<sup>1,2</sup>, 董秀萍<sup>1,2</sup>, 李胜杰<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>大连工业大学食品学院 辽宁大连 116034

<sup>2</sup>国家海洋食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034)

**摘要** 实现优质蛋白的高效供给对于保障我国粮食安全十分重要, 开发新型优质蛋白迫在眉睫。我国具有丰富的海藻资源, 尤其是紫菜蛋白含量较高, 具有潜在的开发价值。本研究旨在优化复合酶辅助碱提酸沉法提取紫菜蛋白, 首先通过单因素实验确定复合酶添加量和质量比、酶解 pH 值、酶解温度及酶解时间的优化范围, 在此基础上选取酶解 pH 值、酶解温度和酶解时间 3 个变量来进行三因素三水平的响应面试验, 建立二次回归模型方程并进行方差分析, 预测并验证得到最佳工艺条件, 即: 酶解 pH=4.6, 酶解温度 52 °C, 酶解时间 115 min, 该条件下紫菜蛋白的得率为 34.25%。试验结果显示 3 个因素中对紫菜蛋白得率的影响程度为: 酶解时间>酶解温度>酶解 pH 值。以上结果为紫菜蛋白的大规模工业提取提供了理论依据和参考。

**关键词** 紫菜蛋白; 碱提酸沉法; 复合酶解法; 响应面法

**文章编号** 1009-7848(2025)02-0238-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.021

近年来, 随着人口的持续增长, 蛋白质的需求量也随之大幅度增加, 导致蛋白质的供应问题日益严峻<sup>[1]</sup>。蛋白质按照来源可分为植物蛋白和动物蛋白。在过去的几十年里, 食物中主要蛋白来源为动物蛋白, 由于长期食用红肉可能会增加慢性病的患病风险<sup>[2]</sup>, 因此人们食物中的蛋白质来源开始从动物蛋白向植物蛋白转变。大豆及一些谷类虽然是良好的植物蛋白来源, 但是存在陆地资源紧张和致敏性等问题<sup>[3]</sup>, 寻找其它植物蛋白来源的需求变得尤为迫切。在此背景下, 海藻被认为是一种合理的蛋白质来源, 一些种类的海藻含有的蛋白质水平与传统蛋白质来源(如肉、蛋、大豆和牛奶)相似<sup>[4]</sup>。此外, 海藻蛋白来源广泛, 不占用陆地及淡水资源, 因此受到广泛关注。我国海藻资源丰富且食用历史悠久<sup>[5]</sup>, 然而, 目前国内对海藻食品多数停留在初加工食品层面, 即仅将海藻进行简单加工处理, 就可直接食用。相比之下, 对于海藻蛋白的提取及其加工特性等方面的研究报道相对较少, 这意味着在海藻蛋白的开发和利用方面还有很大的潜力和空间。

紫菜属红藻门红毛藻科紫菜属的藻类植物, 紫菜蛋白和其它海藻蛋白一样, 属于胞内蛋白<sup>[6]</sup>。紫菜的细胞壁主要分为 2 层: 外层是果胶质, 内层由纤维素组成<sup>[7]</sup>, 受复杂细胞壁结构影响, 蛋白质等胞内物质难以溶出<sup>[8]</sup>。紫菜蛋白的提取步骤主要分为蛋白质的溶出以及蛋白质的沉淀<sup>[9]</sup>, 因此紫菜蛋白提取过程中细胞壁的破坏程度对于蛋白质的提取率具有重要影响。目前植物破壁技术主要为超声波提取、微波萃取、化学破壁和酶法提取等<sup>[10]</sup>。为了高效提取高品质的植物蛋白, 使用酶处理来破坏细胞壁结构是一种可靠的方法, 可以促进植物蛋白的溶出<sup>[11]</sup>。纤维素酶可以降解细胞壁的纤维素骨架, 并催化纤维素的分解<sup>[12]</sup>。果胶酶具有分解果胶、果胶化合物和半纤维素的作用<sup>[13]</sup>。两种酶的联合应用使蛋白质更容易从细胞中释放。邓真真<sup>[14]</sup>在提取坛紫菜蛋白时发现纤维素酶处理法是一种高效方法, 提取率与自溶提取法相比提高约 4%。与传统方法相比, 酶辅助提取法能够更高效地提取蛋白, 减少溶剂和电力的使用, 具有可再生性和特异性<sup>[15]</sup>。其它提取植物蛋白的研究也报道过酶的使用可以增强蛋白质的提取率, 使用酶法预处理后燕麦麸皮中蛋白质提取率达 50% 以上<sup>[16]</sup>。

本试验在碱提酸沉法的基础上运用复合酶体系(纤维素酶和果胶酶)对紫菜蛋白进行辅助提

收稿日期: 2024-02-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272352); 大连市青年科技之星项目(2021RQ019)

第一作者: 贾晓蕾, 女, 硕士生

通信作者: 李胜杰 E-mail: lishj@dlpu.edu.cn

取,首先进行单因素实验来确定复合酶添加量、复合酶质量比、酶解 pH 值、酶解温度和酶解时间的最佳范围。在此试验结果基础上,采用响应面法优化提取条件,通过三因素三水平试验寻找紫菜蛋白的最优提取条件,为紫菜蛋白的提取提供了新的技术路径,为实现紫菜蛋白的工业化生产奠定了重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

干紫菜样品,购于大连甘井子泡崖市场,是红毛藻科紫菜属的条斑紫菜。

纤维素酶、果胶酶,江苏瑞阳生物科技有限公司;盐酸(分析纯级),大连博诺生物化学试剂;氢氧化钠,天津市东丽区天大化学试剂厂;无水碳酸钠,大连诚嘉科技有限公司;*L*-半胱氨酸,北京宝希迪有限公司。

### 1.2 仪器与设备

InfiniteM200 型微量光吸收酶标仪,瑞士 TECAN 公司;PB-10 型 pH 计,德国 SARTORIUS 公司;JJ-668 型研磨机,金华市亚历山大有限公司;CR22N 型台式冷冻离心机,日本 HITACHI 公司;MS 3 型涡旋振荡仪,上海洪记仪器设备有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 紫菜蛋白的提取 紫菜经研磨机粉碎后,用 60 目筛网过滤,称取 0.2 g 干紫菜置于 50 mL 离心管,并按照料液比 1:80 加入去离子水 16 mL 后摇匀,于 4 °C 冷藏过夜。将上述样品在 12 000×g、4 °C、20 min 条件下离心,缓慢弃去上清液,按照不同比例在沉淀中加入一定量纤维素酶和果胶酶,加入去离子水溶解复合酶,然后在容量瓶中定容 20 mL,调节 pH 值,水浴加热,进行酶解反应。酶解结束后,向酶解液中分别加入 NaOH(10 g/L NaOH)、*L*-半胱氨酸(0.5 g/100 mL)摇匀后,20 °C 下振荡提取 3 h,配平后在 12 000×g、室温、20 min 的条件下离心,离心后取上清液,用盐酸调节上清液 pH 值至 5,将酸沉后的溶液配平,于 12 000×g、10 °C、15 min 的条件下进行离心,弃去上清液,将沉淀溶于含有 2 g/100 mL ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )的 0.1 mol/L NaOH 溶液中,并将溶液摇匀。将摇匀的蛋白溶液

适当稀释后,根据 Lowry 法测定<sup>[17]</sup>测定蛋白浓度,计算蛋白得率,每个样品设置 3 个平行。

### 1.3.2 单因素实验

1.3.2.1 加酶量 将加入复合酶的含量当作变量,固定复合酶的质量比(在复合酶中纤维素酶占 70%,果胶酶占 30%),分别在离心管中加入 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 g 的复合酶,将离心管中酶解液 pH 值都调节至 5,然后让样品在 50 °C 下进行酶解反应,持续 100 min。得到紫菜在不同复合酶添加量下的蛋白质得率,并确定最佳加酶量。

1.3.2.2 复合酶质量比 将添加纤维素酶与果胶酶的质量比作为变量,固定加入的复合酶含量为 0.04 g,分别在离心管中加入质量比为 0:10、1:1、7:3、9:1、10:0 的复合酶。将样品的 pH 值都调节成 5,然后让样品在 50 °C 下进行酶解反应,持续 100 min。得到不同复合酶质量比对紫菜蛋白质得率的影响,并确定最佳复合酶质量比。

1.3.2.3 酶解 pH 值 将酶解 pH 值作为变量,固定加入的复合酶含量为 0.04 g,复合酶质量比为 1:1。使用盐酸分别调节酶解液 pH 值为 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0。然后让样品在 50 °C 下进行酶解反应,持续 100 min。得到不同酶解 pH 值条件下紫菜的蛋白质得率,并确定最佳酶解 pH 值。

1.3.2.4 酶解温度 将酶解温度作为变量,固定加入的复合酶含量为 0.04 g,复合酶质量比为 1:1。将样品的 pH 值调节稳定在 4.5,然后让样品分别在 35, 40, 45, 50, 55 °C 的温度下进行酶解反应,持续 100 min。得到紫菜在不同酶解温度下的蛋白质得率,并确定最佳酶解温度。

1.3.2.5 酶解时间 将酶解温度作为变量,固定加入的复合酶含量为 0.04 g,复合酶质量比为 1:1。将样品的 pH 值调节稳定在 4.5,然后让样品在 50 °C 下进行酶解反应,分别持续反应 60, 80, 100, 120, 140 min。研究紫菜在不同酶解时间下的蛋白质得率,并确定最佳酶解时间。

1.3.3 Box-Behnken 响应面优化试验 基于单因素实验的结果,依据 Box-Behnken 的试验设计原理<sup>[18]</sup>,设计三因素三水平的响应面试验,确定酶解过程的最佳条件,并评价交互作用对紫菜蛋白得率的影响。根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原则<sup>[19]</sup>,选择了酶解过程中的主要因素:酶解 pH

值、酶解温度和酶解时间作为变量,并对其进行响应面优化,自变量的编码水平和实际值见表1。

1.3.4 数据分析 使用 Origin 2023 进行试验数据处理,运用 SPSS 22 进行显著性分析,通过 Design Expert 8.0 进行响应面试验分析,所有试验设置3组平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

2.1.1 加酶量对紫菜蛋白得率的影响 由图1可知,添加复合酶后,紫菜蛋白得率显著提高。酶添加量在 0.02~0.04 g 范围内,加酶量越高,紫菜蛋白得率越高,这可能是由于加入少量的酶时,全部的酶均参与反应过程,处于酶反应动力学的初级阶段,上升速度较快。当酶的添加量大于 0.04 g 时,蛋白质得率逐渐下降,可能是由于被提取的蛋白质作为抑制剂与酶结合形成复合物,从而抑制了酶的活性,在之前的研究中也出现过类似的现象<sup>[20]</sup>。当酶的添加量达到一定比例时,酶解效果并没有明显改善甚至降低,反而会造酶的浪费,不能节省提取成本。

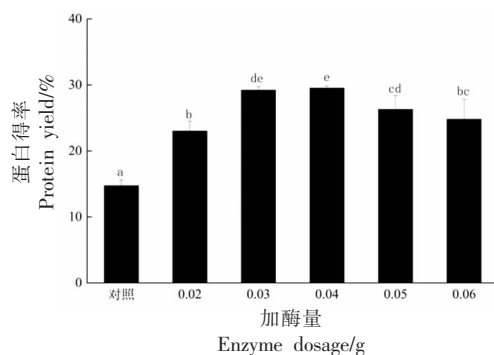
2.1.2 复合酶质量比对紫菜蛋白得率的影响 据报道,酶的特征特异性在单酶酶解过程中受到很大的限制,通过多种酶的结合可以更彻底、更有效地降解微藻的细胞壁<sup>[21]</sup>。通过图2可以发现,在本研究中,当纤维素酶与果胶酶的质量比为 1:1 时,紫菜蛋白得率达到最大值。随着纤维素酶占比的持续增加,蛋白质得率逐渐下降,最终趋于稳定。果胶酶可以水解细胞壁之间的果胶成分,从而破坏细胞壁,分离组织中的细胞<sup>[22]</sup>。纤维素酶能有效降解细胞壁主骨架,促进蛋白质的溶解<sup>[23]</sup>,而当纤维素酶的相对添加量过高时,不利于细胞壁的降解<sup>[24]</sup>。

2.1.3 酶解 pH 值对紫菜蛋白得率的影响 一般来说,酶有使其充分发挥其活性的最佳 pH 值<sup>[25]</sup>。酶的蛋白质构象和活性中心易受酸碱及 pH 值影响,不当的 pH 值或酸碱过量可能会改变其结构并导致失活<sup>[26]</sup>。通过图3可以看出,紫菜蛋白得率先随 pH 值的增加而增加,当 pH 值为 4.5 时紫菜蛋白得率最高,继续增大 pH 值,紫菜蛋白的得率反而出现明显下降,这说明在 pH 值为 4.5 时,纤

表1 响应面分析试验因素水平与编码表

Table 1 Response surface analysis test factor level and coding table

因素	水平		
	-1	0	1
酶解 pH 值( $X_1$ )	4.0	4.5	5.0
酶解温度( $X_2$ )/°C	45	50	55
酶解时间( $X_3$ )/min	80	100	120



注:不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

图1 加酶量对紫菜蛋白得率的影响

Fig.1 Effects of enzyme dosage on protein yield

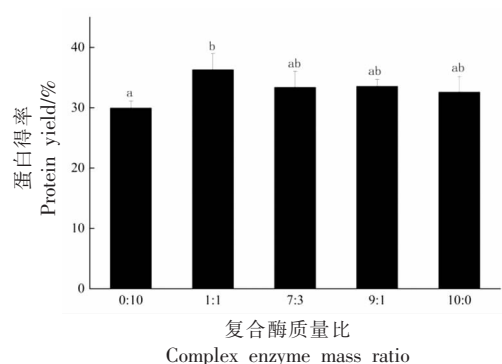


图2 复合酶质量比对紫菜蛋白得率的影响

Fig.2 Effects of complex enzyme mass ratio on protein yield

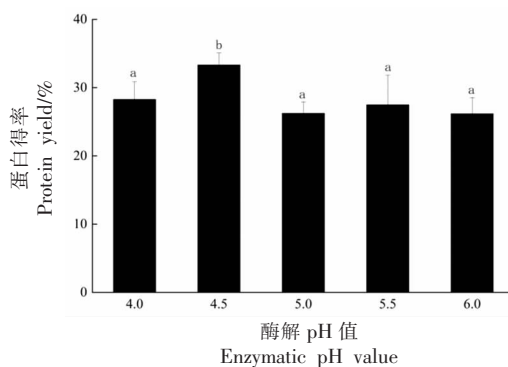


图3 酶解 pH 值对紫菜蛋白得率的影响

Fig.3 Effects of enzymatic pH value on protein yield

纤维素酶和果胶酶的复合酶活性最高。Silas 等<sup>[27]</sup>的报道称纤维素酶生产葡萄糖时的最适 pH 值为 4.5。Zhang 等<sup>[28]</sup>的报道称果胶酶生产木犀草素时的最适 pH 值为 3, 生产芹菜素时的最适 pH 值为 5.5。

**2.1.4 酶解温度对紫菜蛋白得率的影响** 酶解反应温度是影响酶活性的另一个关键因素。通过图 4 可以看出,随着酶解温度的升高,蛋白得率先增加后略有降低。当酶解温度高于 50 ℃时,蛋白得率虽有略微下降趋势但并不显著,说明本试验中复合酶的最适温度为 50 ℃。与 pH 值一样,复合酶在酶解过程中也有一个最适温度。如果温度不在最佳范围内,酶的活性会受到影响,较高的温度会使酶失活(超过 50 ℃)<sup>[29]</sup>,导致酶解不完全,蛋白得率降低。由于蛋白质容易发生热变性,因此,在实际生产过程中,45~55 ℃为适宜的酶解温度范围。为了得到最大的紫菜蛋白得率,同时将反应温度控制在蛋白质不易发生变性的范围内,故选择酶解温度为 50 ℃进行后续试验。

**2.1.5 酶解时间对紫菜蛋白得率的影响** 酶解反应时间也是影响蛋白质得率的一个重要因素。如图 5 所示,紫菜蛋白得率随酶解时间的延长呈现先升高后降低的趋势,在酶解进行 100 min 时达到最高,而继续延长酶解时间,紫菜蛋白得率略有下降,说明长时间的酶解不利于产物获得<sup>[30]</sup>。这是因为底物的量是有限的,而时间的酶解反应不仅不会提高的蛋白质的得率,反而可能会导致蛋白质变性等<sup>[31]</sup>。

## 2.2 响应面试验结果分析

**2.2.1 试验结果及方差分析** 基于单因素实验的结果,分别在加酶量 0.04 g、复合酶质量比为  $m_{\text{纤维素酶}}:m_{\text{果胶酶}}=1:1$ 、酶解 pH=4.5、酶解温度 50 ℃、酶解时间 110 min 时,蛋白得率最高。依据 Box-Behnken 的中心组合设计原则,选择酶解 pH 值、酶解温度和酶解时间作为变量,设置了三因素三水平的响应面试验。将酶解 pH 值(4.0, 4.5, 5.0)、酶解温度(45, 50, 55 ℃)、酶解时间(80, 100, 120 min)作为 3 个因素,设计 17 个组合提取紫菜蛋白,并计算蛋白得率,结果如表 2 所示。

通过响应面分析,得到以下回归方程: $Y = 32.99 + 1.84X_1 + 4.08X_2 + 5.09X_3 + 2.85X_1X_2 -$

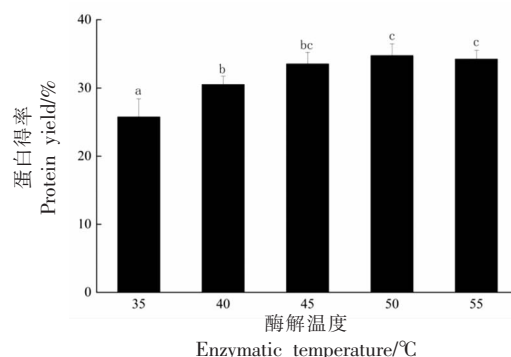


图 4 酶解温度对紫菜蛋白得率的影响

Fig.4 Effects of enzymatic temperature on protein yield

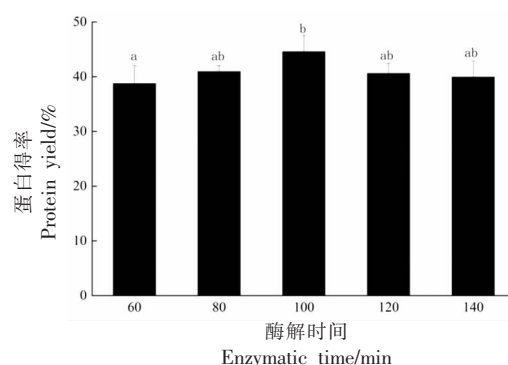


图 5 酶解时间对紫菜蛋白得率的影响

Fig.5 Effects of enzymatic time on protein yield

表 2 响应面分析的设计与结果

Table 2 Design and results of response surface analysis

试验号	编码变量			蛋白得率/ %
	酶解 pH 值( $X_1$ )	酶解温度 ( $X_2$ )/°C	酶解时间 ( $X_3$ )/min	
1	0	-1	-1	12.80
2	0	0	0	35.01
3	0	0	0	34.51
4	0	1	1	30.58
5	0	0	0	30.36
6	-1	0	-1	17.01
7	1	0	1	29.66
8	0	-1	1	20.10
9	-1	1	0	17.81
10	0	0	0	33.54
11	1	0	-1	21.60
12	0	0	0	31.55
13	1	1	0	28.75
14	0	1	-1	18.25
15	-1	-1	0	15.14
16	-1	0	1	30.02
17	1	-1	0	14.70

表3 蛋白得率的方差分析

Table 3 Analysis of variance of protein yield

参数	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	954.44	9	106.05	35.46	<0.0001	***
$X_1$	27.12	1	27.12	9.07	0.0196	*
$X_2$	133.25	1	133.25	44.56	0.0003	***
$X_3$	207.06	1	207.06	69.23	<0.0001	***
$X_1X_2$	32.38	1	32.38	10.83	0.0133	*
$X_1X_3$	6.13	1	6.13	2.05	0.1955	
$X_2X_3$	6.33	1	6.33	2.11	0.1892	
$X_1^2$	100.15	1	100.15	33.49	0.0007	***
$X_2^2$	342.34	1	342.34	114.47	<0.0001	***
$X_3^2$	52.90	1	52.90	17.69	0.0040	**
残差	20.94	7	2.99			
失拟值	5.25	3	1.75	0.45	0.7332	
纯误差	15.68	4	3.92			
总和	975.37	16				

注：“\*\*\*”表示差异极显著( $P<0.001$ ),“\*\*”表示差异非常显著( $P<0.01$ ),“\*”表示差异显著( $P<0.05$ )。

$1.24X_1X_3 + 1.26X_2X_3 - 4.88X_1^2 - 9.02X_2^2 - 3.54X_3^2$ 。

如表3所示,回归模型 $P<0.0001$ ,说明二次回归方程模型差异极显著。一般而言,若模型未能展现出高拟合度,利用拟合响应面来进行试验优化可能会导致结果出现误差<sup>[32]</sup>。决定系数是拟合程度的衡量指标<sup>[33]</sup>, $R^2=0.9785$ ,表明模型拟合度高, $R_{adj}^2=0.9509$ ,说明该模型可以用来解释95.09%的响应值变化,证实了该模型可以准确预测得率与因素之间的关系<sup>[34]</sup>。在本试验中,一次项 $X_1$ (酶解pH值)对蛋白得率影响显著, $X_2$ (酶解温度)、 $X_3$ (酶解时间)对蛋白得率影响极显著,交互项 $X_1X_2$ 对蛋白得率影响显著, $X_1X_3$ 、 $X_2X_3$ 对蛋白得率影响不显著,二次项 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 对蛋白得率影响极显著, $X_3^2$ 对蛋白得率影响非常显著。根据F值结果可以知,酶解pH值、酶解温度、酶解时间3个因素对蛋白得率的影响程度为:酶解时间>酶解温度>酶解pH值。失拟项 $P=0.7332>0.05$ ,表明失拟项不显著,试验误差较小。因此,该模型可用于紫菜蛋白得率的分析。

2.2.2 三因素响应面交互作用分析 三因素(酶解pH值、温度和时间)对得率影响的交互作用如图6~8所示。由图6可知,当控制酶解时间为100 min时,在酶解温度45~55℃范围,蛋白质产量先上升后下降。在酶解pH 4.0~5.0范围,蛋白质产率变化缓慢。虽然酶解pH值对蛋白得率的影响

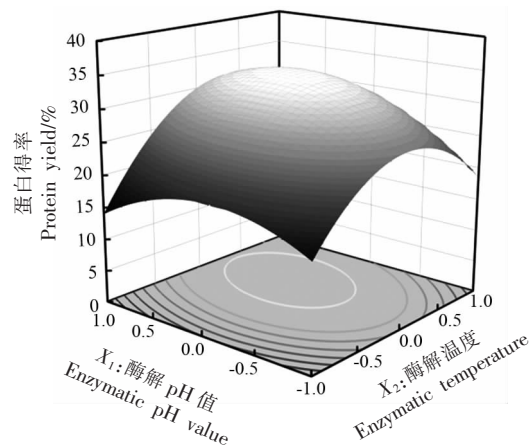


图6 酶解pH值和酶解温度对蛋白质得率的影响  
Fig.6 Effects of enzymatic pH value and enzymatic temperature on protein yield

小,但仍不可忽视其与酶解温度之间的交互作用。酶解温度与酶解pH值之间存在交互作用,且酶解温度对蛋白得率的影响大于酶解pH值。

由图7可知,当控制酶解温度为50℃不变时,在酶解pH 4.0~4.5范围,酶解时间80~100 min范围,蛋白得率增长较快;而在酶解pH 4.5~5.0范围,酶解时间100~120 min范围,蛋白得率变化缓慢。虽然酶解pH值与酶解时间的交互作用并不显著,但从表面陡度来看,酶解时间对蛋白得率的影响大于酶解pH值。

当控制酶解 pH 值为 4.5 不变时,酶解温度和酶解时间的响应面如图 8 所示。蛋白得率随酶解温度的升高呈现先升高后降低的趋势。在酶解时间 80~100 min 范围内蛋白得率增加,酶解时间

100~120 min 范围内蛋白得率变化不显著。虽然酶解温度与酶解时间的交互作用对紫菜蛋白得率的影响不显著,但从表面陡度来观察,酶解时间对蛋白得率的影响大于酶解温度。

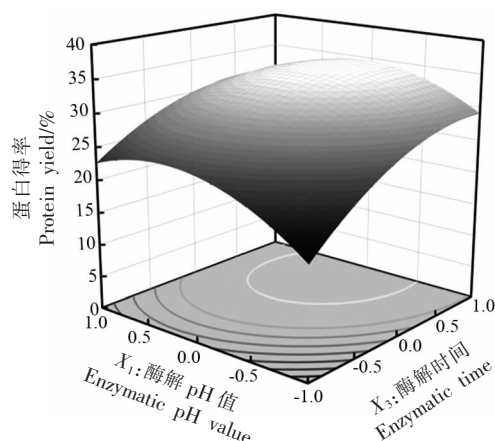


图 7 酶解 pH 值和酶解时间对蛋白质得率的影响

Fig.7 Effects of enzymatic pH value and enzymatic time on protein yield

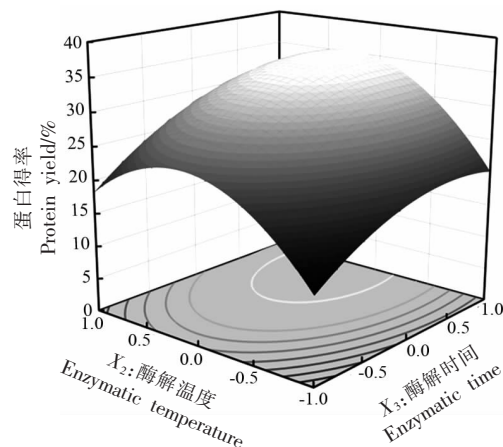


图 8 酶解温度和酶解时间对蛋白质得率的影响

Fig.8 Effects of enzymatic temperature and enzymatic time on protein yield

2.2.3 优化提取条件及验证试验 根据 Design-expert 8.0 的回归方程分析,得到复合酶辅助碱提酸沉法提取紫菜蛋白酶解过程的最佳条件为:酶解 pH 4.59,酶解温度 51.54 °C,酶解时间 114.79 min,为了提高试验得可操作性,将最优条件确定为酶解 pH 4.6,酶解温度 52 °C,酶解时间 115 min。在以上优化设计的基础上,对所建立的模型进行了验证,发现紫菜蛋白得率为 34.25%,接近预测值(蛋白质得率 35.67%),说明回归模型能很好地优化紫菜蛋白的提取条件。

### 3 结论与展望

本试验以紫菜为主要原料,采用复合酶辅助碱提酸沉法提取紫菜蛋白,通过单因素实验确定各种因素的最优条件,然后将单因素实验与响应面实验结合,建立二次回归模型方程并进行方差分析,分析酶解过程中影响紫菜蛋白得率主要因素及其相互作用,优化复合酶辅助碱提酸沉法提取紫菜蛋白的条件,得到最佳工艺条件如下:加酶量 0.04 g,复合酶质量比为  $m_{\text{纤维素酶}}:m_{\text{果胶酶}}=1:1$ ,酶解 pH 4.6,酶解温度 52 °C,酶解时间 115 min,该

条件下紫菜蛋白的产率为 34.25%。同时,经过方差分析得到酶解 pH 值、酶解温度、酶解时间对蛋白得率的影响程度为:酶解时间>酶解温度>酶解 pH 值。本研究提出了一种复合酶辅助碱提酸沉法提取紫菜蛋白的方法,为紫菜蛋白的加工利用提供了理论依据和技术支持。为进一步提高蛋白得率,未来可以在其它方面进行优化,比如在辅助提取的方法方面,可以将超声与酶解联合应用。另外,为了将所提取的紫菜蛋白应用于食品加工中,蛋白的功能特性也有待进一步分析。

### 参 考 文 献

- [1] GARCIA -VAQUERO M, LOPEZ -ALONSO M, HAYES M. Assessment of the functional properties of protein extracted from the brown seaweed *Himantalia elongata* (Linnaeus) SF gray [J]. Food Research International, 2017, 99(Pt 3): 971-978.
- [2] HERTZLER S R, LIEBLEIN-BOFF J C, WEILER M, et al. Plant proteins: Assessing their nutritional quality and effects on health and physical function [J]. Nutrients, 2020, 12(12): 3704.

- [3] QIN P X, WANG T R, LUO Y C. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development[J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2022, 3(7): 100265.
- [4] 夏亚穆, 张振国, 林姣. 海洋藻类蛋白质生物功能的研究[J]. *农产品加工(学刊)*, 2014(12): 60-63.  
XIA Y M, ZHANG Z G, LIN J. Bio-functionalities of proteins derived from marine alga[J]. *Farm Products Processing*, 2014(12): 60-63.
- [5] 王民生. 中国古代利用海藻的考证[J]. *中国渔业经济*, 2001(4): 51-52.  
WANG M S. The textual research on using seaweed in ancient times in China[J]. *Chinese Fisheries Economics*, 2001(4): 51-52.
- [6] 李竹嘉, 徐静雯, 赵勇. 紫菜活性成分提取技术及其功能特性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(20): 437-446.  
LI Z J, XU J W, ZHAO Y. Research progress on extraction technology and functional characteristics of active components from *Porphyra* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(20): 437-446.
- [7] 段杉, 朱伟珊, 吴佳威. 利用纤维素酶辅助提取紫菜藻红蛋白的研究[J]. *水产科学*, 2009(5): 280-283.  
DUAN S, ZHU W S, WU J W. Extraction of phycoerythrin from laver aided by cellulase[J]. *Fisheries Science*, 2009(5): 280-283.
- [8] WANG T, JONSDOTTIR R, KRISTINSSON H G, et al. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43(9): 1387-1393.
- [9] CERMENO M, KLEEKAYAI T, AMIGO -BENAVENT M, et al. Current knowledge on the extraction, purification, identification and validation of bioactive peptides from seaweed[J]. *Electrophoresis*, 2020, 41(20): 1694-1717.
- [10] ECHAVE J, FRAGA -CORRAL M, GARCIA -PEREZ P, et al. Seaweed protein hydrolysates and bioactive peptides: Extraction, purification, and applications[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(9): 500.
- [11] 张倩. 金丝皇菊多肽的制备及活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.  
ZHANG Q. Preparation and activity study of peptides from imperial chrysanthemum[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.
- [12] OYELEKE S B, OYEWOLE O A, EGWIM E C, et al. Cellulase and pectinase production potentials of *Aspergillus niger* isolated from corn cob[J]. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 2012, 5(1): 78-83.
- [13] CHOUDHARI S M, ANANTHANARAYAN L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues[J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(1): 77-81.
- [14] 邓真真. 两种红藻多肽的抗氧化及降血压活性研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.  
DENG Z Z. Study on antioxidant and antihypertensive activities of two kind of red algal peptides[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2019.
- [15] MAI H C, TRAN P M. Enzyme-assisted extraction of lycopene from watermelon fruits: Effect of hydrolysis parameters on lycopene yield [J]. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 2020, 7(5): 401-405.
- [16] LIU J, GUAN X, ZHU D Q, et al. Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41(10): 1913-1918.
- [17] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 256-275.
- [18] WANG Y W, YE Y, WANG L, et al. Antioxidant activity and subcritical water extraction of anthocyanin from raspberry process optimization by response surface methodology [J]. *Food Bioscience*, 2021, 44(1): 101394.
- [19] HUANG Z L, KANG D D, LI J H, et al. Study on the optimization of the enzymatic hydrolysis of antimicrobial protein from *Moringa oleifera* leaves by response surface method[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, 446: 032057.
- [20] SHEN L Q, WANG X Y, WANG Z Y, et al. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods[J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(2): 929-938.
- [21] HUO S H, WANG Z M, CUI F J, et al. Enzyme-assisted extraction of oil from wet *Microalgae*

- Scenedesmus* sp. G4 [J]. *Energies*, 2015, 8 (8): 8165–8174.
- [22] 马晓彬. 果胶酶促降解中的超声波作用途径及机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- MA X B. Research on function routes and mechanisms of ultrasound in the enzymatic degradation of pectin[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [23] ROMMI K, HAKALA T K, HOLOPAINEN U, et al. Effect of enzyme-aided cell wall disintegration on protein extractability from intact and dehulled rapeseed (*Brassica rapa* L. and *Brassica napus* L.) press cakes[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(32): 7989–7997.
- [24] LI J B, ZHOU P F, LIU H M, et al. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 155: 258–265.
- [25] MUKESH KUMAR D J, SARANYA G M, SURESH K, et al. Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste [J]. *Asian Journal of Plant Science & Research*, 2012, 2(3): 369–375.
- [26] 邵素娟. 红松松仁降脂肽的分离及其对脂质代谢的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- SHAO S J. The separation and effects on lipid metabolism of hyplipidemic peptides from Korean pine nuts[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2018.
- [27] SILAS K, BITRUS H K, WADINDA J M, et al. Effects of temperature and pH on *Trichoderma reesei* cellulase activity in glucose production from water melon peel[J]. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2017, 7(3): 253–259.
- [28] ZHANG Q, ZHOU M M, CHEN P L, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis for the extraction of luteolin and apigenin from celery[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(5): C680–C685.
- [29] DALAGNOL L M G, SILVIRA V C C, SILVA H B, et al. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 61(10): 80–87.
- [30] WANG S N, JIANG L Z, LI Y, et al. Optimization on aqueous enzymatic extraction conditions of pine seed protein by response surface method [J]. *Procedia Engineering*, 2011, 15: 4956–4966.
- [31] YUN C, WANG S F, GAO Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic pretreatment for enhanced extraction of baicalin and wogonin from *Scutellaria baicalensis* roots[J]. *Journal of Chromatography B*, 2022, 1188(1): 123077.
- [32] PAGARRA H, RAHMAN R A, ILLIAS R M, et al. Optimization of pectin extraction from *Nephrolepis biserrata* leaves using response surface methodology [J]. *Applied Mechanics & Materials*, 2014, 625: 920–923.
- [33] GUNST R F. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments [J]. *Technometrics*, 2008, 38(3): 284–286.
- [34] MOORTHY I G, MARAN J P, SURYA S M, et al. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72(1): 1323–1328.

### Extraction of Laver Protein by Enzymatic-hydrolysis-assisted pH-shifting

JIA Xiaolei<sup>1</sup>, SHEN Yuqing<sup>1</sup>, GUO Chuanyu<sup>1</sup>, PAN Jinfeng<sup>1,2</sup>, DONG Xiuping<sup>1,2</sup>, LI Shengjie<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

<sup>2</sup>National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, Liaoning)

**Abstract** Efficient supply of high-quality protein is very important to ensure China's food security, and the development of new high-quality protein is imminent. China is rich in seaweed resources, especially laver, which has a high protein content and potential development value. This study aimed to optimize the enzymatic-hydrolysis-assisted pH-shifting method for the extraction of laver protein. Firstly, single-factor experiments were performed to determine the optimal range of the amount of enzyme added, complex enzyme mass ratio, enzymatic hydrolysis pH value, enzymatic hydrolysis



temperature, and enzymatic hydrolysis time. Afterwards, the enzymatic hydrolysis pH value, temperature and time of enzymatic hydrolysis were selected as the three variables to carry out a three-factor and three-level response surface experiment. Results showed that the best technological conditions were: Enzymatic hydrolysis pH 4.6, enzymatic hydrolysis temperature 52 °C and enzymatic hydrolysis time 115 min, the yield of laver protein was 34.25%. Meanwhile, through the analysis of variance, the effects of pH value, temperature and time on protein yield were as follows: Enzymatic hydrolysis time > enzymatic hydrolysis temperature > enzymatic hydrolysis pH value. The above results will provide theoretical basis and reference for the extraction of laver protein for the industry.

**Keywords** laver protein; pH-shifting extraction; enzymatic hydrolysis; response surface methodology