

四种蛋白酶对牡蛎的酶解效果研究

冯丹丹,冯金晓,薛勇*,李兆杰,王玉明,薛长湖

(中国海洋大学食品科学与工程学院,山东青岛 266003)

摘要:以太平洋牡蛎(*Ostrea rivularis Gould*)为研究对象,研究了四种蛋白酶酶解对太平洋牡蛎的氨基态氮、总酸、矿质元素及牛磺酸含量的影响。通过比较酶解过程中总酸和氨基氮含量变化可知,枯草杆菌中性蛋白酶的水解程度最高,其次为风味蛋白酶,木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶的水解程度较低。对酶解过程中酶解液内所含牛磺酸及Zn、Cu、Se的研究。结果表明,木瓜蛋白酶酶解液中牛磺酸含量最高,为4.01mg/mL,风味蛋白酶酶解液中Zn、Cu、Se含量最高,分别为67.40、26.73 μ g/mL、270.92 μ g/L。为优化牡蛎酶解工艺条件或以牡蛎为原料制备富硒饮料等提供了理论基础。
关键词:牡蛎,酶解,氨基态氮,牛磺酸,总酸

Effect of four kinds of protease on pacific oyster in the process of enzymatic hydrolysis

FENG Dan-dan, FENG Jin-xiao, XUE Yong*, LI Zhao-jie, WANG Yu-ming, XUE Chang-hu

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The effects of four kinds of protease enzymatic on pacific oyster during enzymatic hydrolysis on the content of amino nitrogen, total acid, mineral elements and the influence of the content of taurine were studied. The changes of total acid hydrolysis process and amino nitrogen showed that *Bacillus subtilis* neutral protease induced the highest degree of enzymatic hydrolysis, followed by flavourzyme, hydrolysis papain and bromelain. The changes of taurine and Zn, Cu, Se in enzymatic hydrolysate during hydrolysis was studied. The results showed that the contents of taurine were maximum in Papain enzymatic hydrolysate, 4.01mg/mL and the contents of Zn, Cu, Se were maximum in flavor proteinase enzymatic hydrolysate, 67.40, 26.73 μ g/mL, 270.92 μ g/L respectively. The results of this investigation may provide a scientific basis for the optimizing the enzymatic hydrolysis process conditions or oyster oysters raw material for the preparation of selenium-enriched drinks.

Key words: pacific oyster; enzymatic hydrolysis; amino nitrogen; taurine; total acid

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)12-0189-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.12.031

牡蛎(*Ostrea rivularis Gould*),肉肥爽滑,味道鲜美,营养丰富,素有“海底牛奶”之美称,是我国著名的海产贝类。中国是世界养殖大国,对世界养殖总产量的贡献率已达70%^[1]。牡蛎是一种高蛋白、低脂肪的食品。牡蛎蛋白氨基酸组成完善,婴幼儿所需的组氨酸和精氨酸含量较高,除20种常见氨基酸外,还含有 β -氨基丙酸、 γ -氨基丁酸、鸟氨酸、牛磺酸等多种游离氨基酸,尤以天然牛磺酸含量丰富。牡蛎还富含钙、铁、锌、锰和硒等矿物质及微量元素,特别是锌和硒的含量丰富。

近年来牡蛎等水产品的深加工日益受到重视,其中利用生物酶法处理水产动物蛋白是牡蛎深加工的一个重要方面,这种加工途径既保留了牡蛎原有的生物活性物质,同时又赋予了新的活性成分^[2-4],使牡蛎蛋白生产附加值明显提高。目前水解动物蛋白

常用的蛋白酶有胰蛋白酶、胃蛋白酶、枯草杆菌中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶及风味蛋白酶等^[5-7]。本文对四种蛋白酶对牡蛎酶解效果及酶解液中牛磺酸等物质含量随酶解时间的变化进行研究,为确定太平洋牡蛎的最优酶解工艺提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

太平洋牡蛎样品 购于青岛市团岛市场;菠萝蛋白酶(50万U/g)、木瓜蛋白酶(65万U/g) 南宁庞博生物工程有限公司;风味蛋白酶(500 LAPU/g) 诺维信生物技术有限公司;枯草杆菌中性蛋白酶(20万U/g,以下简称中性蛋白酶) 无锡杰能科生物有限公司;其他试剂 均为分析纯(AR)。

PHS-3S型pH计 上海大普仪器有限公司;电动匀浆机 国华科技有限公司;721型分光光度计 上

收稿日期:2014-09-09

作者简介:冯丹丹(1990-),女,硕士研究生,研究方向:水产品加工与贮藏。

*通讯作者:薛勇(1976-),男,副教授,研究方向:水产品加工与贮藏。

海精密科学仪器有限公司; AA-6800型原子吸收分光光度计 日本岛津公司; 高速离心机 上海安亭科学仪器厂; JJ-精密增力电动搅拌器、79-1型磁力加热搅拌器 常州国华电器有限公司; 1100型高效液相色谱仪 美国Agilent公司; 电感耦合等离子体发射光谱仪 北京时代利和科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 牡蛎基本成分测定

1.2.1.1 牛磺酸含量测定方法 采用GB/T 5009.169-2003中的高效液相色谱法测定。

1.2.1.2 锌含量测定方法 采用GB/T 5009.14-2003的原子吸收光谱法。

1.2.1.3 铜含量测定方法 采用GB/T 5009.13-2003的原子吸收光谱法。

1.2.1.4 硒含量测定方法 采用石墨炉原子吸收光谱法。其中无机硒的提取采用水提法^[8]。有机硒含量以总硒含量减去无机硒含量计。

1.2.1.5 其他矿物质和微量元素含量测定方法 采用电感耦合等离子体原子吸收光谱法(ICP-AAS)。

1.2.2 牡蛎酶解液的制备 取牡蛎肉流水解冻, 采用组织捣碎机制备牡蛎肉匀浆, 然后取一定量的匀浆, 按照1:1的比例加水, 调节体系初始条件为各种酶的最适作用条件, 根据底物中的蛋白质含量添加适量的酶, 酶解过程中按酶解时间10、30、60、120、180、240、300、360、480min取样, 样液加热至90~100℃灭酶10min, 冷却至室温, 静置, 4500×g离心15min, 取上清液, -20℃冻藏待测。酶解条件如表1所示。

表1 酶解条件

Table 1 Hydrolysis conditions

蛋白酶种类	酶解温度(℃)	酶解初始pH	加酶量(%)
中性蛋白酶	50	7.0	2
风味蛋白酶	55	7.0	2
菠萝蛋白酶	55	7.0	2
木瓜蛋白酶	60	6.5	2

1.2.3 酶解过程中指标的测定

1.2.3.1 总酸(以乳酸计)及氨基态氮含量的测定 采用中性甲醛电位滴定法, 其中酶解时间为10、30、60、120、180、240、300、360min。

1.2.3.2 牛磺酸及锌、铜、硒含量的测定 同1.2.1。

1.2.4 数据分析方法 利用SAS 8.1软件对所得数据进行分析。所有实验重复三次, 最终结果为三个平行实验结果的平均值。

2 结果与分析

2.1 原料牡蛎中基本成分的含量

牡蛎肉中的牛磺酸、矿物质和微量元素测定结果见表2。牛磺酸是一种人体必需的非蛋白质氨基酸^[9],

可以抑制血液中的胆固醇含量, 对增强体质, 提高工作效率、解除疲劳、恢复视力、改善肝脏功能等有独特的保健作用。由表1可知, 牡蛎肉中含有丰富的牛磺酸, 其含量达到6.69mg/g。有研究发现, 墨鱼、元宝虾、海蛭、蚌蛤、花蛤中牛磺酸的含量分别为10.15、4.94、4.67、10.44、22.14mg/g^[10]。

牡蛎肉中含有丰富的硒、镁、钙、锌、铁等矿物质和微量元素, 尤其是钙、锌、硒含量丰富。锌和硒对人体而言具有十分重要的生理功能, 如抗衰老、抗毒性、抗癌、治疗溃疡、提高食欲和增强组织再生能力等作用^[11]。同时, 牡蛎肉中也含有少量的镉等有毒重金属元素, 对此必需有足够的重视, 并在牡蛎加工过程中加以适当的处理。

2.2 牡蛎酶解过程中指标的变化

2.2.1 牡蛎酶解过程中氨基态氮含量的变化 四种蛋白酶酶解液中氨基态氮含量随酶解时间的变化见图1。四种蛋白酶酶解液中氨基氮含量均随酶解时间的延长呈现上升趋势, 在酶解初始的60min内上升趋势显著, 此时间段氨基态氮含量增加最多的是风味蛋白酶和中性蛋白酶, 其酶解液中氨基氮含量从初始的0.100g/100mL分别增加至0.376g/100mL和0.362g/100mL。菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解液中的氨基态氮含量在酶解初始的60min内虽显著增加, 但上升趋势缓于风味蛋白酶和中性蛋白酶。60min后, 四种蛋白酶酶解液中的氨基态氮含量均缓慢增加。酶解至360min时, 酶解液中氨基态氮含量较高的是中性蛋白酶0.540g/100mL和风味蛋白酶0.524g/100mL, 较低的是木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶, 分别为0.354g/100mL和0.326g/100mL。

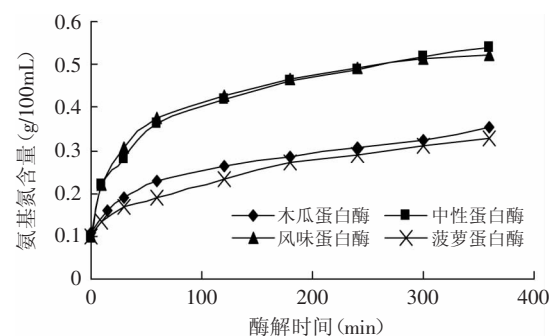


图1 氨基氮含量随酶解时间的变化

Fig.1 Change of amino nitrogen content during hydrolysis

2.2.2 牡蛎酶解过程中总酸含量的变化 鱼贝类肌肉的酸性组分包括乳酸、丙酸、丙酮酸、草酸、富马酸、苹果酸、柠檬酸等, 对鱼贝类酶解液的感官特性(风味、颜色和香气)有较大的影响^[12]。如乳酸可以提高缓冲能力, 对呈味起增强作用^[13]。测定四种蛋白酶酶解液中总酸含量随酶解时间的变化, 结果见图2。四

表2 牡蛎肉中基本成分含量(以鲜重计)

Table 2 Elementary composition of oyster (on wet basis)

元素	牛磺酸	Zn	Cu	Se	Ca	Cd	Fe	Mg	Mn	Na
含量(μg/g)	6690	91.28	53.89	0.68	141.20	0.78	70.76	149.71	4.39	535.7

种蛋白酶酶解液中总酸含量在前60min内上升显著, 60min后上升趋势减缓。酶解至360min时, 酶解液中总酸含量最大的是木瓜蛋白酶, 为4.91g/L, 总酸含量最小的是菠萝蛋白酶和风味蛋白酶, 均为3.51g/L, 总体来说酶解过程中四种酶解液中总酸含量相差不大。

大部分牡蛎肉的酸性成分在基本成分酶解的前2h即释放出来, 且含量快速增加, 这可能是因为牡蛎肉的微观组织结构已基本被破坏, 乳酸菌代谢糖类。随着自溶水解时间的延长, 总酸含量增加变缓、变小, 这个阶段增加的有机酸可能主要来自微生物生长产酸^[12]。

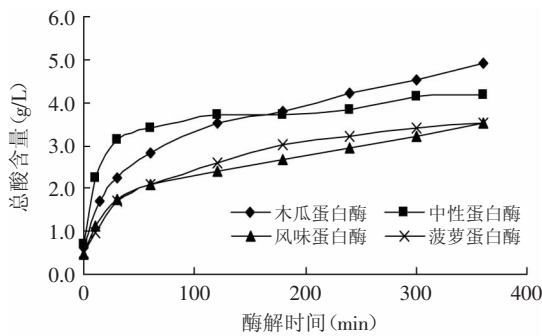


图2 总酸含量随酶解时间的变化

Fig.2 Change of total acid content during hydrolysis

2.2.3 酶解过程中牛磺酸含量的变化 牛磺酸是一种人体必需的非蛋白质氨基酸^[14], 在酶解过程中, 蛋白质被分解为多肽和氨基酸, 酶解液中氨基酸组成不断发生变化, 牛磺酸含量也不断改变^[9]。对牡蛎酶解过程中酶解液的牛磺酸含量进行测定, 结果见图3。随酶解时间的延长, 牡蛎蛋白的水解程度不断增大, 酶解液中牛磺酸含量也逐渐增加, 同样呈现出增加速度先快后慢的现象。至酶解终点时, 木瓜蛋白酶酶解液中牛磺酸含量最高, 为4.01mg/mL。其他从高到低依次为中性蛋白酶3.76mg/mL、风味蛋白酶3.58mg/mL、菠萝蛋白酶3.43mg/mL。

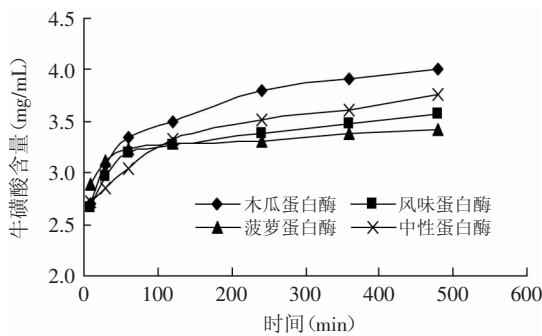


图3 牛磺酸含量随酶解时间的变化

Fig.3 Change of taurine content during hydrolysis

2.2.4 酶解过程中锌含量的变化 由于我国近海水域的富营养化程度不断加重, 牡蛎中的微量元素含量的测定备受关注, 对于研究我国近海海域牡蛎中微量元素含量的分布情况有重要的现实意义^[15]。牡蛎肉中含有丰富的铁、锌、钙、锰和硒等矿物质和微

量元素, 具有抗癌、抗衰老、抗毒性等生理功能。对牡蛎酶解过程中酶解液的锌含量进行测定, 结果见图4。随酶解时间的延长, 牡蛎蛋白的水解程度不断增大, 酶解液中锌含量也逐渐增加, 呈现出增加速度先快后慢的现象。酶解结束时, 四种蛋白酶酶解液中锌含量相差不大, 最高的是风味蛋白酶酶解液67.40μg/mL, 最低的是菠萝蛋白酶酶解液55.34μg/mL, 中性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解液居中。

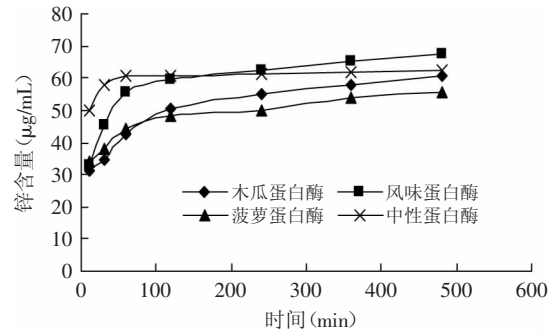


图4 锌含量随酶解时间的变化

Fig.4 Change of Zn content during hydrolysis

2.2.5 酶解过程中铜含量的变化 铜是人体必需的微量元素^[16], 水产动物体内的铜除作为金属酶组成部分直接参与体内代谢外, 还能维持铁的正常代谢, 有利于血红蛋白合成和红细胞成熟, 同时参与骨形成。对牡蛎酶解过程中酶解液的铜含量进行测定, 结果见图5。随酶解时间的延长, 牡蛎蛋白的水解程度不断增大, 酶解液中铜含量逐渐增加。酶解结束时, 四种蛋白酶酶解液中铜含量相差不大, 最高的是风味蛋白酶酶解液26.73μg/mL, 最低的是菠萝蛋白酶酶解液20.23μg/mL, 中性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解液居中。

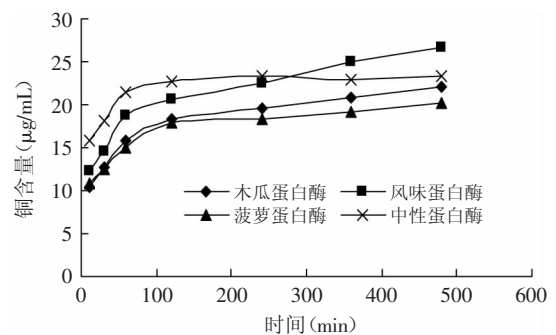


图5 铜含量随酶解时间的变化

Fig.5 Change of Cu content during hydrolysis

2.2.6 酶解过程中硒含量的变化 硒是人体必需的微量元素, 硒与疾病发生有着密切关系, 特别是心脏病、癌症、肝病与缺硒有关, 同时, 过量食用硒也会引起疾病^[17]。对牡蛎酶解过程中酶解液的硒含量进行测定, 结果见图6。四种酶解液中的硒含量随酶解时间的延长不断增大, 但风味蛋白酶酶解液中的硒含量明显高于另外三种蛋白酶酶解液, 为270.92μg/L, 中性蛋白酶其次, 为219.60μg/L, 木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶

酶解液中硒含量较低,分别为154.88、133.81 $\mu\text{g/L}$ 。

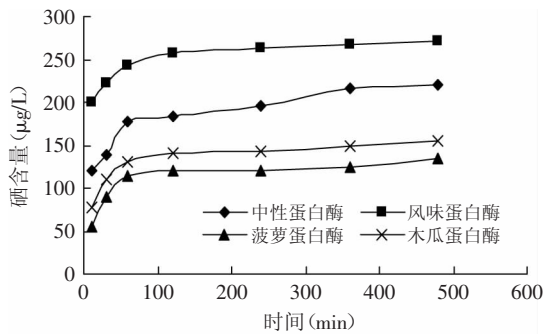


图6 硒含量随酶解时间的变化

Fig.6 Change of Se content during hydrolysis

3 结论

本文研究了菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶及中性蛋白酶四种单酶制剂在其较适宜的作用条件下对牡蛎酶解的影响,结果表明枯草杆菌中性蛋白酶的水解度最高,其次为风味蛋白酶,木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶的水解度较低。对酶解过程中酶解液内所含Zn、Cu、Se以及牛磺酸等活性物质的研究。结果表明:牛磺酸含量最高的是木瓜蛋白酶酶解液,Zn、Cu、Se含量最高的是风味蛋白酶酶解液。

参考文献

- [1] 车斌. 中国大陆牡蛎市场分析[J]. 中国渔业经济,2003(5): 12-13.
- [2] Liu Z, Dong S, Xu J, et al. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelain[J]. Food Control,2008,19(3):231-235.
- [3] Liu Z,Zeng M,Dong S,et al. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvested strawberries[J]. Postharvest Biology and Technology,2007,46(1):95-98.
- [4] Wang J,Hu J,Cui J,et al. Purification and identification of a

ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry,2008,111(2):302-308.

- [5] 滕瑜,乔向英. 牡蛎酶解工艺条件的研究[J]. 海洋水产研究,1997,18(1):112-116.
- [6] Kim D S, Baek H H, Ahn C B, et al. Development and characterization of a flavoring agent from oyster cooker effluent[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2000,48(10): 4839-4843.
- [7] Chuapohuk P,Raksakulthai N. Use of papain and bromelain in the production of oyster sauce[J]. Asean Food Journal,1992(7):196-196.
- [8] 贺立东. 分光光度法测定富硒酵母中有机硒的含量[J]. 食品工业科技,2000,21(5):67-68.
- [9] Froger N,Moutsimilli L,Cadetti L,et al. Taurine:The comeback of a nutraceutical in the prevention of retinal degenerations[J]. Progress in Retinal and Eye Research,2014,41:44-63.
- [10] 李丽莉. 几种海产品中氨基酸及牛磺酸含量的比较[J]. 氨基酸和生物资源,1999(2):28-29.
- [11] Zhang C H, Hong P Z, Deng S G, et al. Food chemical characteristic of two kinds of shellfish in South China Sea and its application for preparing aquatic hydrolyzed animal protein[J]. Food of 21st Century-Food and Resource Technology Environment, 2000:84-88.
- [12] 徐伟. 鱿鱼加工废弃物低盐鱼酱油速酿工艺及生化特性研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2008.
- [13] 孟凌玉. 虾头酶解产物微生物混合发酵工艺及其风味成分的变化[D]. 湛江:广东海洋大学,2013.
- [14] 陈申如,胡阳,倪辉,等. 高效液相色谱法测定牡蛎中牛磺酸含量[J]. 中国食品学报,2013(2):193-198.
- [15] 杨奎真,郑康,郑永军,等. 乳山湾牡蛎无机元素的测定与指纹图谱研究[J]. 中国海洋药物,2013(2):41-46.
- [16] 冯宗榴,黄家琛,李增禧. 现代微量元素研究[M]. 北京:中国环境科学出版社,1987:265.
- [17] 徐铁民. 石墨炉测定富硒鸡蛋中的硒[J]. 微量元素与健康研究,2006(6):74.

(上接第188页)

Agric,1996,71:124-128.

- [9] 王俊,周光宏,徐幸莲,等. 发酵香肠成熟过程中理化性质变化研究[J]. 食品科学,2004,25(10):63-65.
- [10] Hernández P,Zomeño L,Ariño B,et al. Antioxidant,lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes[J]. Meat Science,2004,66(3):525-529.
- [11] Armero E, Barbosa J A, Toldra F, et al. Effects of the terminal sire type and sex on pork muscle Cathepsins(B,B+Land H),cysteine proteinase inhibitors and lipolytic enzyme activities[J]. Meat Science,1999,51(2):185-189.
- [12] 徐欢. 金华火腿特征风味成分分析及与脂质水解氧化相

关性研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2009:35-43.

- [13] 邰延军,周光宏,徐幸莲,等. 金华火腿加工过程中内源脂肪酶活力变化特点研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(8):1-6.
- [14] 徐为民,徐幸莲,周光宏,等. 南京板鸭生产过程中脂肪酶和磷脂酶的活力变化研究[J]. 食品科学,2007,28(11):302-304.
- [15] Motilva M J,Toldrá F,Nadal M I,et al. Pre-freezing hams affects lipolysis during dry-curing[J]. Journal of Food Science, 1994,59(2):303-305.
- [16] 陆瑞琪,邰延军,孙敬,等. 金华火腿现代化生产过程中脂质及内源酶的变化特点[J]. 食品与机械,2008,24(3):17-21.