

近江牡蛎蛋白自溶水解的条件优化

付劲¹, 林捷¹, 郑华¹, 陈植开², 谭爱欣¹, 谢妍纯¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 深圳市千年蚝业发展有限公司, 广东深圳 518104)

摘要: 采用近江牡蛎的内源性蛋白酶对其蛋白质进行自溶水解, 并优化其自溶水解条件。评价了水解时间、初始pH、水解温度、原料占总质量比等因素对自溶水解效果的影响, 确定牡蛎自溶的最佳条件为: 水解时间12 h、初始pH 4、水解温度40或50 °C、原料占总质量比0.5。利用响应面中的Central Composite设计优化了内源性蛋白酶的水解工艺, 以氨基酸态氮含量为评价指标最终确定内源性蛋白酶的最佳酶解工艺条件并修正为: 温度为56.24 °C, 初始pH值为4.00, 原料占总质量比为0.50。在此条件下, 水解液中的氨基酸态氮含量5.73 mg/mL和回归方程的预测值5.81 mg/mL具有较好的拟合性, 水解液中的氨基酸态氮含量比优化前的最大值4.11 mg/mL提高39.42%。

关键词: 近江牡蛎; 内源性蛋白酶; 自溶水解; 响应面法

文章编号: 1673-9078(2012)2-195-199

Optimization of Autolytic Hydrolysis of Jinjiang Oyster (*Crassostrea Rivularis*) with Response Surface Methodology

FU Jin¹, LIN Jie¹, ZHENG Hua¹, TAN Ai-xin¹, XIE Yan-chun¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Shenzhen Qiannian Oyster Products Development Co., Ltd, Shenzhen 518104, China)

Abstract: Jinjiang oyster (*Crassostrea Rivularis*) were hydrolyzed by the endogenous proteases to produce amino acid nitrogen and the influencing factors were tested. The optimum conditions were ascertained as pH 4, temperature 40 or 50 °C, material/total ratio 0.5 and autolysis time 12 h. Three crucial parameters of Jinjiang oyster protein autohydrolysis, including temperature, initial pH value and material/total ratio, were optimized by using the response surface methodology. Results showed that the optimum autohydrolysis conditions were temperature 56.24 °C, initial pH 4.00, material/total ratio 0.50 for 12 h, under which the actual value of amino nitrogen content reached up to 5.73 mg/mL, which was in close agreement with the predicted value of 5.81 mg/mL and higher by 39.42% than that without optimization.

Key words: jinjiang oyster; endogenous proteases; autolytic hydrolysis; response surface methodology (RSM)

近江牡蛎以其分布于淡水入海的河口而得名, 在华南沿海一带广泛养殖已有 700 多年的历史, 是南方沿海最主要的经济贝类^[1]。牡蛎是一种营养价值和药用价值很高的水产品, 其含有丰富的蛋白质、糖原、牛磺酸、氨基酸、维生素和微量元素等营养成分, 以蛋白质的含量高尤为突出^[2]。牡蛎中含有丰富的内源性蛋白酶, 内源酶对天然底物有着高度的催化性和专一性, 在催化程度上有可能比工业酶制剂的效果更显著。牡蛎蛋白质进行水解后, 经过特殊方法分离提取酶解液可得到牡蛎提取物, 其具有增强机体免疫^[3]、保护肝脏^[4,5]、降血糖^[6,7]、降血脂^[8]、抗肿瘤^[9]、抗氧化^[10,11]、抗疲劳^[12]、抑制 ACE 酶活性^[13]等医疗保健功能。同时, 牡蛎酶解液可以加工为各种调味品, 大大提高产

品的附加值。

本实验利用牡蛎内源酶进行水解, 以水解液中的氨基酸态氮含量为响应值, 利用响应面法对自溶水解工艺条件优化, 得到牡蛎自溶过程的最佳工艺条件, 旨在提高短肽和游离氨基酸的含量, 为牡蛎内源性蛋白酶类的利用提供科学依据和指导。

1 材料与方法

1.1 材料

近江牡蛎: 由广东省台山市上川岛养殖场提供。

1.2 方法

1.2.1 水解物的制备

近江牡蛎肉置于斩拌机中, 斩拌成浆, 分别准确称取一定量的牡蛎浆, 置于锥形瓶中, 加入一定比例的去离子水(原料占总质量比, m/m), 用1.0 mol/L的NaOH或HCl溶液调至所需的pH值, 在不同温度条件

收稿日期: 2011-11-06

作者简介: 付劲(1987-), 女, 研究生, 研究方向为食品加工及保藏

通讯作者: 林捷(1966-), 女, 副教授, 研究方向为水产品加工及综合利用

下, 自溶水解一定的时间后取出于加热至100 °C灭酶10 min, 冷却后4500 r/min离心10 min, 取上清液供化学分析。

1.2.2 近江牡蛎肉成分分析和测定方法

水分含量测定采用直接干燥法^[14] (AOAC 950.46); 灰分含量测定采用灼烧称重法^[15] (GB/T 5009.4-2010); 蛋白质含量测定采用凯氏定氮法^[14] (AOAC 940.25); 脂肪含量测定采用索氏提取法^[14] (AOAC 991.36); 氨基酸态氮测定采用甲醛电位滴定法^[16] (GB/T 5009.39-2003)。

1.2.3 统计分析

实验数据的处理均采用SAS 9.0和Design-Expert 7.1.3统计分析软件, 绘图均采用Origin 8.5统计分析软件。

2 结果与分析

2.1 近江牡蛎肉基本成分

表1 近江牡蛎肉基本成分

Table 1 Elementary components of Jinjiang Oyster

成分	含量/%
水分	74.29±1.43
粗蛋白	9.05±0.10
粗脂肪	2.59±0.12
灰分	1.32±0.06

由表1可知, 未经任何处理的近江牡蛎肉中蛋白质含量较高, 达9.05%, 且粗脂肪含量较低, 表明近江牡蛎肉作为酶解的材料具有很大的开发价值。

2.2 水解时间对近江牡蛎自溶水解的影响

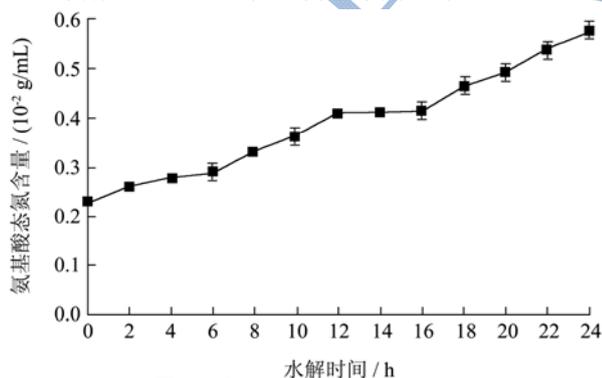


图1 水解时间对水解液中氨基酸态氮含量的影响

Fig.1 Time-course of amino nitrogen content in hydrolysate during Jinjiang oyster protein autohydrolysis

由图1可知, 在初始 pH 6.16、温度 40 °C、原料占总质量比 0.5 的条件下, 自溶水解液中的氨基酸态氮含量随着水解时间的延长而逐渐增加。在 0~12 h, 水解液中氨基酸态氮含量增加较快; 在 12~16 h, 氨基酸态氮含量增加明显缓慢; 在 16~24 h, 氨基酸态

氮含量增加较快, 但 16 h 后的水解液都具有不同程度的酸败味。原因是水解时间延长, 底物逐渐减少, 内源性混合蛋白酶的活力逐渐降低, 产物逐渐增加, 反应速度逐渐下降, 从而增加生产成本和微生物繁殖的机会^[17]。为了提高水解效率, 确定 12 h 为最佳水解时间。后续试验的水解时间均为 12 h。

2.3 初始pH值对近江牡蛎自溶水解的影响

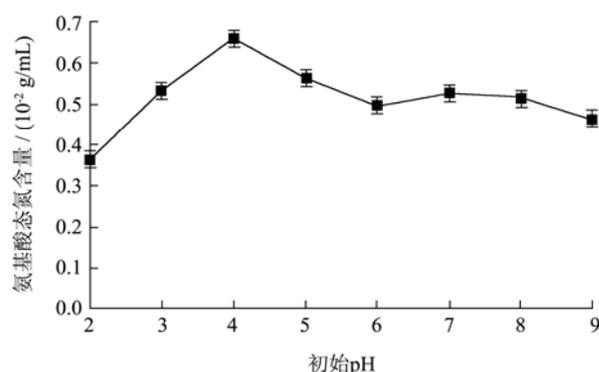


图2 初始 pH 对水解液中氨基酸态氮含量的影响

Fig.2 Initial pH-course of amino nitrogen content in hydrolysate during Jinjiang oyster protein autohydrolysis

由图2可知, 在温度 40 °C、原料占总质量比 0.5 的条件下水解 12 h, 水解离心清液的氨基酸态氮含量随初始 pH 的不同发生明显的变化, 变化范围为 3.61~6.58 mg/mL。在初始 pH 为 4.0, 水解离心清液的氨基酸态氮含量最高, 达到 6.58 mg/mL; 在初始 pH 为 5.0 和 3.0 时, 水解离心清液的氨基酸态氮含量较高, 分别为 5.63 和 5.32 mg/mL; 邓肯分析的结果表明三者具有显著性差异。原因是尽管内源蛋白酶是混合酶, 并且不同的蛋白酶的最适 pH 有差别, 但是由于各种酶的含量、及其生化特性的不同, 最终表现出具有特定的 pH 水解能力。近江牡蛎自溶水解时, 偏酸利于氨基酸态氮的生成, 确定最佳 pH 值为 4。

2.4 温度对近江牡蛎自溶水解的影响

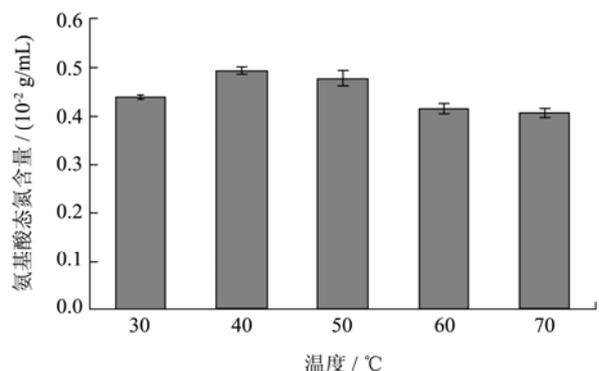


图3 温度对水解液中氨基酸态氮含量的影响

Fig.3 Temperature-course of amino nitrogen content in hydrolysate during Jinjiang oyster protein autohydrolysis

由图3可知, 在初始 pH 6.16、原料占总质量比

0.5 的条件下水解 12 h, 水解离心清液的氨基酸态氮含量随水解温度的不同发生明显的变化。邓肯分析结果表明, 在温度为 40 和 50 °C 时, 自溶水解液中氨基酸态氮含量最高, 分别为 4.93 mg/mL 和 4.78 mg/mL, 与其他温度条件下的氨基酸态氮含量具有显著性差异。综合来看, 在温度 40~50 °C 得到氨基酸态氮含量最高的水解离心清液; 在温度从 50 °C 升高到 60 °C 的过程中, 自溶水解离心清液的氨基酸态氮含量逐渐降低; 原因是 50 °C 下近江牡蛎内源性蛋白酶得到最大发挥, 反应温度过高或过低均不利于氨基酸态氮的生成。温度较低时, 大部分内源性蛋白酶没有被激活, 达不到快速水解的效果; 温度过高, 对酶活力产生抑制作用, 从而影响了酶解速度。因而确定最佳酶解温度为 50 °C。

2.5 原料占总质量比对近江牡蛎自溶水解的影响

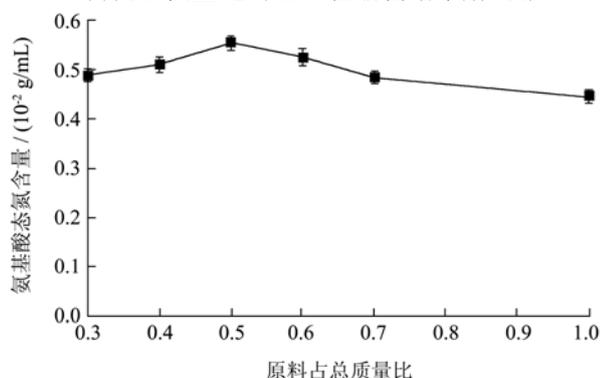


图4 原料占总质量比对水解液中氨基酸态氮含量的影响

Fig.4 Material/total ratio-course of amino nitrogen content in hydrolysate during Jinjiang oyster protein autohydrolysis

由图4可知, 在初始pH 6.16、温度40 °C 的条件下水解12 h, 原料占总质量比对近江牡蛎自溶水解影响较大, 其中在原料占总质量比为0.5时溶出的氨基酸态氮含量最高, 为5.51 mg/mL, 与其他原料占总质量比条件下的氨基酸态氮含量具有显著性差异。原因可能为添加一定的水, 有利于酶的分散和产物的扩散, 从而提高反应速度和产物得率, 但加入过量的水则会降低酶和底物的浓度, 不利于反应的进行^[18]。故确定最佳原料占总质量比为0.5。

2.6 近江牡蛎自溶水解数学模型的建立和响应面分析

在单因素试验的基础上选择温度、初始 pH 和原料占总质量比进行响应面试验, 响应面试验的因素水平表见表 2, 对响应面试验结果进行分析, 建立数学模型方程, 通过数学模型方程确定最优自溶水解条件, 并绘制响应面图, 最后根据得到的最佳条件对数学模型方程进行验证。

表 2 响应面试验的因素水平表

Table 2 Experimental values and coded levels of the independent variables for small composite rotatable design (SCRD)

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
X ₁ [温度(°C)]	33.18	40.00	50.00	60.00	66.82
X ₂ (初始 pH)	2.32	3.00	4.00	5.00	5.68
X ₃ (原料占总质量比)	0.33	0.40	0.50	0.60	0.67

2.6.1 建立的数学模型方程

表 3 响应面试验结果

Table 3 The result of hydrolysis conditions optimization by RSM

编号	X ₁	X ₂	X ₃	氨基酸态氮含量 / (mg/mL)
1	-1	-1	-1	5.92
2	1	-1	1	4.57
3	1	1	-1	4.59
4	1	1	1	4.02
5	0	0	0	6.32
6	-1	1	-1	4.75
7	0	0	0	5.94
8	-1.682	0	0	5.16
9	0	0	0	6.31
10	1	-1	-1	5.50
11	0	0	1.682	5.40
12	1.682	0	0	4.06
13	-1	1	1	5.52
14	0	0	0	6.33
15	-1	-1	1	5.72
16	0	0	0	6.31
17	0	0	0	6.32
18	0	1.682	0	4.75
19	0	0	-1.682	6.21
20	0	-1.682	0	5.58

利用 Design Expert 7.1.3 软件对表 3 试验数据进行多元回归拟合, 建立的近江牡蛎内源酶自溶水解的数学模型方程为:

$$Y=0.63-0.035X_1-0.033X_2-0.019X_3+2.625X_1X_2-0.022X_1X_3+0.013X_2X_3-0.060X_1^2-0.040X_2^2-0.018X_3^2$$

注: Y 为水解液中氨基酸态氮含量 (mg/mL); X₁ 为水解温度 (°C); X₂ 为水解液的初始 pH 值; X₃ 为原料占总质量比。

对该模型进行方差分析, 结果见表 4。

由表 4 可知, 响应面模型显著 $p < 0.0001$, 表明模型极显著; 复相关系数 $R^2 = 0.9776$; 失拟项为 $0.4361 > 0.05$, 失拟性不显著; 说明该模型与实际情况

拟合程度相对较好。因此可以用此模型来分析近江牡蛎自溶水解。

表4 模型的方差分析

Table 4 Model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F
模型	0.11	9	0.013	48.42	<0.0001**
X ₁	0.017	1	0.017	64.80	<0.0001**
X ₂	0.015	1	0.015	58.09	<0.0001**
X ₃	4.920	1	4.920	19.06	0.0014**
X ₁ X ₂	5.512	1	5.512	0.21	0.6539
X ₁ X ₃	3.916	1	3.916	15.17	0.0030**
X ₂ X ₃	1.326	1	1.326	5.14	0.0469*
X ₁ ²	0.052	1	0.052	201.70	<0.0001**
X ₂ ²	0.024	1	0.024	91.52	<0.0001**
X ₃ ²	4.600	1	4.600	17.82	0.0018**
残差	2.582	10	2.582		
失拟项	1.388	5	2.777	1.16	0.4361
纯误差	1.194	5	2.387		
总和	0.12	19			
R ²	0.9776				

注: *表示差异性显著; **表示差异性极显著。

由表4中回归模型系数显著性检验结果可知,模型的一次项X₁(p<0.0001)、X₂(p<0.0001)、X₃(p<0.0001)影响极显著;交互项X₁X₃(p=0.0030<0.01)影响极显著,X₂X₃(p=0.0469<0.05)影响显著,X₁X₂不显著;二次项X₁²(p<0.0001)、X₂²(p<0.0001)、X₃²(p=0.0018<0.01)影响极显著;以上分析表明,有显著性影响的因素效果依次为:温度>初始pH>原料占总质量比。

2.6.2 响应面分析

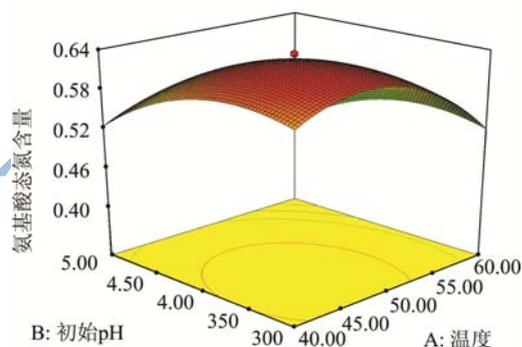


图5 温度和初始pH的响应面

Fig.5 Response surface plot for amino acid content as a function of temperature and initial pH value

由图5可知,水解液中氨基酸态氮含量随温度的升高先增加后减少;从初始pH值的影响来看,氨基酸

态氮含量随pH值的增加先增加后减少。表明温度和初始pH值两因素对水解液中氨基酸态氮含量的影响不存在交互作用。

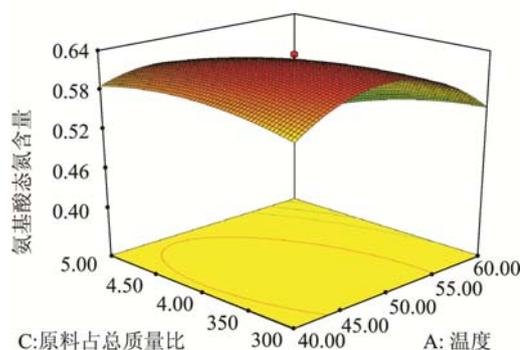


图6 温度和原料占总质量比的响应面

Fig.6 Response surface plot for amino acid content as a function of temperature and material/total ratio

由图6可知,随着温度的升高,水解液中氨基酸态氮含量先增加后减少;从原料占总质量比的影响来看,氨基酸态氮含量随着原料占总质量比的增加而增加,表明低温、低原料占总质量比不利于牡蛎的自水解,温度和原料占总质量比两因素对水解液中氨基酸态氮含量的影响存在交互作用。

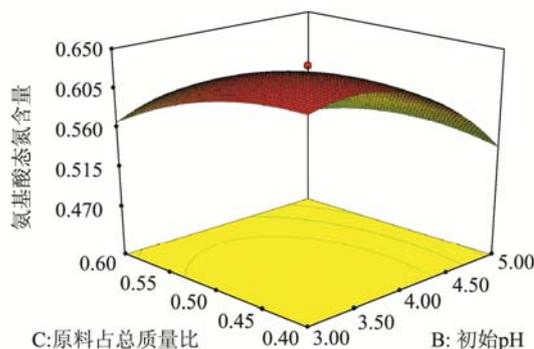


图7 初始pH和原料占总质量比的响应面

Fig.7 Response surface plot for amino acid content as a function of initial pH value and material/total ratio

由图7可知,水解液中氨基酸态氮含量随初始pH值的增加先增加后减少;从原料占总质量比的影响来看,氨基酸态氮含量随着原料占总质量比的增加而减少,表明二者对水解液中氨基酸态氮含量的影响存在交互作用。

2.6.3 回归模型的优化及其验证

根据近江牡蛎内源性蛋白酶自溶水解的数学模型,寻求较大Y值的X₁、X₂、X₃的优化组合,结果如表5所示。用此条件做重复实验,求得氨基酸态氮含量平均值为0.573%,与理论值仅相差1.38%(p<0.005),证明优化结果可信。

表5 旋转设计优化结果

Table 5 The optimization of hydrolysis conditions by RSM

OBS 期望值/(mg/mL)	X ₁	X ₂	X ₃	氨基酸态氮/(mg/mL)	
1	5.81	56.24	4.00	0.50	5.73

3 结论

3.1 通过对近江牡蛎内源性蛋白酶自溶水解的单因素试验和回归分析研究,得到了近江牡蛎自溶水解的最佳水解条件为温度56.24 °C、初始pH 4.00、原料占总质量比0.50。在最佳水解条件下,水解液中的氨基态氮含量为5.73 mg/mL,水解液中的氨基酸态氮含量比优化前的最大值(4.11 mg/mL)提高39.42%。

3.2 建立了近江牡蛎自溶水解的数学模型方程,所得方程的拟合性较好,对近江牡蛎的自溶水解液中氨基酸态氮含量可以进行较好的预测。近江牡蛎蛋白自溶水解的工艺条件的优化,不仅为近江牡蛎蛋白加工利用提供参考资料,而且为牡蛎内源性蛋白酶类的利用提供科学依据和指导。

参考文献

- [1] LAMK, MORTON B. Mitochondrial DNA and morphological identification of new species of crassostrea (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River delta, Hong Kong, China [J]. Aquac, 2003, 228(1/4): 1-13
- [2] 吴园涛,孙恢礼.牡蛎营养功能制品研究进展[J].河北渔业.2007,8:6-9
- [3] Achour A, Lachgar A. Potentialization of IL-2 effects on immune cells by oyster extract (JCOE) in normal and HIV-infected individuals [J]. Biomed & Pharmacother, 1997, 51: 427-429
- [4] Hayshi M. The effect of taurine OX experimental fatty degeneration in primary culture rat hepatocytes [J]. Acta Hepatol JAP, 1990, 31: 331
- [5] 周敏华,章超桦,曾少葵,等.酶解牡蛎肉制备高 F 值寡肽的研究[J].现代食品科技,2009,25(7):751-755
- [6] Yoshiyuki Kimura, Hiroji Ohminami, et al. Effect of extract of oyster on lipid metabolism in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1998, 59: 117-123
- [7] 徐静.牡蛎提取物的降血糖活性研究[D].济南:山东大学硕士学位论文,2005
- [8] 刘赛,等.牡蛎提取物对鹌鹑实验性动脉粥样硬化的抑制作用[J].中国动脉硬化杂志,2001,10(3):97-100
- [9] 王颖,等.牡蛎提取物抗肿瘤作用的实验研究[J].中国海洋药物,1997,16(1):18-22
- [10] T Yoshikawa, Y Naito. Free radical - scavenging activity of Crassostrea gigas extract [J]. Biomed & Pharmacother, 1997, 51: 328-332
- [11] 吴海涛,缪琪,朱蓓薇.牡蛎水提液的抗氧化特性[J].食品与发酵工业,2005(28):44
- [12] 陈骞.牡蛎糖原的提取与抗疲劳活性研究[D].江南大学.2005,6
- [13] 欧成坤,杨瑞金.牡蛎酶解产物的 ACE 抑制活性和清除自由基活性研究[J].食品工业科技,2005,26(3):59-62
- [14] AOAC (2000). Official methods of analysis (17th ed.) [M]. Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemists
- [15] GB/T 5009.4 2010,食品中灰分的测定
- [16] ICS 67.040 GB/T 5009.39 2003,酱油卫生标准的分析方法
- [17] 林奕封,曾庆孝,朱志伟,等.利用内源蛋白酶对虾头水解的研究[J].广州食品工业科技.2003,2(19):5-7
- [18] Wenhong, Chaohua Zhang, Pengzhi Hong, et al. Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis [J]. Food Chemistry, 2008, 10: 176-183