

文章编号: 1000- 0615(2003)02- 0163- 06

牡蛎的营养成分及蛋白质的酶法水解

汪何雅, 杨瑞金, 王 璋
(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 研究了牡蛎肉的营养成分和其蛋白质的酶法水解。结果表明, 牡蛎肉中蛋白质和糖原含量分别为 50.63% 和 22.41%, 其氨基酸组成完善, 8 种必需氨基酸占氨基酸总量的 40%; 537 酸性蛋白酶比较适合于牡蛎蛋白质的水解, 其优化的作用条件为: 加酶量为 $1700\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白质、pH4、50℃、2h, 在此条件下, 水解液中的蛋白质和糖原提取率分别为 78.23% 和 50.58%, 水解液中的游离氨基酸和牛磺酸分别占总氨基酸的 39.27% 和 12.47%。

关键词: 牡蛎; 水解; 蛋白质; 蛋白酶

中图分类号: Q591.2 文献标识码: A

Nutritional components and proteolysis of oyster meat

WANG He ya, YANG Rui jin, WANG Zhang
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The nutritional components and proteolysis of oyster meat were investigated. The results showed that the gross protein and glycogen in oyster meat were 50.63% and 22.41% respectively. The distribution of amino acids was perfect, and the total quantity of 8 essential amino acids accounted for 40 percent of total amino acids. The 537 acid protease was suitable for the proteolysis of oyster, and the optimal conditions were: E/ S= $1700\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ protein, pH4, 50℃ and 2 hours. In the optimal condition, the yield of soluble protein and glycogen reached 78.23% and 50.58% based on that in raw material respectively, and the total free amino acids and taurin were 39.27% and 12.47% based on the total amino acids in the hydrolysate respectively.

Key words: oyster; hydrolysis; protein; protease

牡蛎肉味鲜美, 营养丰富, 有“海中牛奶”之称^[1], 是我国首批列为药食同源的保健疗效食品之一^[2]。牡蛎的蛋白质含量可高达 50%, 并且氨基酸组成完善, 为优质蛋白质; 其游离氨基酸中还含有丰富的牛磺酸, 牛磺酸具有消炎解毒、保肝利胆、降血脂、促进幼儿大脑发育及安神补脑等作用^[3]; 此外, 牡蛎肉中还含有丰富的糖原、二十二碳六烯酸(DHA)和二十碳五烯酸(EPA)等不饱和脂肪酸、维生素以及硒和锌等矿物质^[4]。

牡蛎是我国四大养殖贝类之一, 在广东、广西、福建、浙江、台湾等沿海地区都进行大量人工养殖。目前, 国内牡蛎以鲜食和制成干肉制品为主, 少量加工成蚝油或其它调味品。随着牡蛎养殖业的快速发展, 牡蛎已出现供过于求和价格下跌的趋势, 开发牡蛎加工利用的新途径已成为牡蛎养殖业进一步发展的先决条件。本文从分析牡蛎肉的主要营养成分着手, 通过选择合适的蛋白酶的种类及作用条件, 将牡

蛎肉中的蛋白质水解成小肽,制成一种富含短肽和营养素的味道鲜美的牡蛎营养液。

1 材料和方法

1.1 实验材料

牡蛎为从江苏连云港市场上购得的太平洋牡蛎。胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性 Alcalase 分别由上海生化试剂厂、广西大学研究所和丹麦 NOVO NORDISH 公司提供, A. S. 1398 中性蛋白酶和 537 酸性蛋白酶由无锡酶制剂厂提供,其它试剂均为分析纯或试剂纯。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解工艺过程

将新鲜牡蛎肉洗净后用组织捣碎机捣成匀浆。取一定量的牡蛎肉匀浆,以 1:1 的比例加水,加入适量的酶后在合适条件下恒温水解,在水解过程中不断加酸或碱以保持 pH 恒定。水解一定时间后,加热至 90~100℃灭酶 10 min,然后将水解液以 3000 r·min⁻¹离心 15 min 得到清液。

1.2.2 各项成分的测定方法

水分:干燥法^[5];灰分:灼烧法^[5];粗蛋白质:半微量凯氏定氮法^[5];粗脂肪:氯仿-甲醇提取法^[5];糖原:蒽酮比色法^[6],取牡蛎肉三氯醋酸(TCA)提取液或水解液,加蒽酮试剂并在沸水浴中显色 15min,冷却后于 620nm 比色;无机质:铁、锌、锰和钙采用火焰原子吸收分光光度法测定,铅和砷采用石墨炉原子吸收分光光度法测定,汞采用氢化物原子吸收分光光度法测定,硒采用荧光分光光度法测定;游离氨基酸:茚三酮比色法^[5];氨基酸:日立式氨基酸分析仪测定^[5]。

DHA、EPA:GC/MS 色谱法。取上述过程中所得的脂肪 0.1g 于 25mL 的容量瓶中,加乙醚-正己烷(2:1)2.5mL,甲醇 2.5mL,0.8mol·L⁻¹氢氧化钾-甲醇溶液 2.5mL,摇匀,静置 10min,定容,取上层脂肪酸甲酯,用无水硫酸钠干燥,进样分析。

水解度:三硝基苯磺酸(TNBS)法^[7]。取用十二烷基磺酸钠(SDS)稀释了的水解液 0.1mL,加 2mL 0.2125mol·L⁻¹、pH 为 8.2 的磷酸盐缓冲溶液和 1mL 0.1% 的 TNBS 溶液,放入 50℃ 的恒温水浴锅,用黑布蒙起反应 1h,加 4mL 0.1N 的盐酸终止反应,室温放置 30min,340nm 比色;

537 酸性蛋白酶酶活:取不同量的酶液(0.1~1.0 mL)并用 0.1 mol·L⁻¹醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH 4.0)补足体积到 1.0 mL,然后在每个管中再加入 1 mL 预先在 40℃ 保温的 1% 酪蛋白溶液,在 40℃ 保温 10min,立即各加入 2 mL 5% 三氯醋酸,迅速摇匀,于室温放置 30min。过滤后收集滤液,在 1mL 滤液中加 5 mL 的 0.4 mol·L⁻¹碳酸钠溶液和 1mL 福林试剂,在 40℃ 中显色 20 min,680 nm 下比色。

2 结果与讨论

2.1 牡蛎肉的成分

牡蛎是一种高蛋白、低脂的食品,总脂肪仅 6.95%,糖原 22.41%,总灰分 9.35%,水分 82.72%,而蛋白质 50.63%,达到其干物质的一半以上。牡蛎蛋白质的氨基酸组成完善(表 1),8 种必需氨基酸的含量较高,占氨基酸总量的 40%,而且婴幼儿所需的组氨酸和精氨酸含量较高,所以牡蛎蛋白质是一种优质蛋白质。牡蛎肉蛋白质中的呈味氨基酸(谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸和丙氨酸等)的含量也较高,总量占氨基酸总量的 33%,因此牡蛎肉味道鲜美。牡蛎肉中还含有丰富的牛磺酸,其含量达到 3.332%。牛磺酸是一种人体必需的非蛋白质氨基酸^[8],具有很重要的生理活性^[4]。此外,牡蛎肉中还含有 22.41% 的糖原,糖原也是一种很重要的生理活性物质,它是人体内细胞进行代谢的能量,可改善心脏和血液功能,并能增进心脏功能^[9]。

牡蛎肉中含有丰富的铁、锌、钙、锰和硒等矿物质和微量元素,特别是锌和硒的含量丰富(表 2)。锌

和硒对人体而言十分重要,所涉及的生理功能范围较广,主要有抗癌、抗衰老、抗毒性、治疗溃疡、提高食欲和增强组织再生能力等作用^[10]。然而,牡蛎肉中也含有少量的铅和砷等有毒重金属元素,对此我们必需有足够的重视,并在牡蛎加工中加以适当的处理。

牡蛎肉中脂肪含量不到7%(表3),其中 ω -3 不饱和脂肪酸 DHA 和 EPA 的含量较高,占总脂肪的28%。DHA 和 EPA 有助于降低冠心病的发病率和死亡率;DHA 和 EPA 还能调节体内的抗氧化能力,消除自由基,所以有抗衰老的作用;另外,DHA 是人脑细胞形成发育及运动必不可少的物质基础,并对强化视力有很好的作用^[11]。

表1 牡蛎肉中各种氨基酸的含量

Tab. 1 Content of amino acids of oyster meat

氨基酸 amino acids	含量(% ,以干重计) content (% , on dry basis)	相对含量(% , W/W) relative content	氨基酸 amino acids	含量(% ,以干重计) content (% , on dry basis)	相对含量(% , W/W) relative content
牛磺酸(TAU)	3.332	7.76	天冬氨酸(ASP)	4.512	9.50
苏氨酸(THR)*	2.055	4.78	丝氨酸(SER)	1.828	4.26
谷氨酸(GLU)	5.097	11.87	甘氨酸(GLY)	2.596	6.05
丙氨酸(ALA)	2.657	6.19	半胱氨酸(CYS)	0.388	0.90
缬氨酸(VAL)*	2.211	5.15	蛋氨酸(MET)*	1.054	2.45
异亮氨酸(ILE)*	1.682	3.92	亮氨酸(LEU)*	2.904	6.76
酪氨酸 TYR	1.115	2.60	苯丙氨酸(PHE)*	2.021	4.71
赖氨酸(LYS)*	3.351	7.80	组氨酸(HIS)	0.970	2.26
精氨酸(ARG)	3.221	7.50	脯氨酸(PRO)	1.910	4.45
色氨酸(TRP)*	0.474	1.10			

注: TRP 的量是用碱水解所测得,其它氨基酸的量都用酸水解所测得;相对含量是指某种氨基酸含量占氨基酸总含量的百分数;有“*”号者为必需氨基酸

Notes: The content of TRP was determined after alkali hydrolysis, and composition of other amino acids was determined after acid hydrolysis; Relative content of each amino acid was expressed as a percentage of the total amino acids (W/W); * means essential amino acids

表2 牡蛎肉中各种无机质的含量(对干重)

Tab. 2 Content of minerals in oyster meat (on dry basis)

元素 minerals	铁 Fe	锌 Zn	锰 Mn	钙 Ca	硒 Se	铅 Pb	砷 As	汞 Hg
含量 content	427.8	337.2	27.95	5313	2.333	0.977	4.407	未检出

表3 牡蛎肉中各种脂肪酸的相对百分含量

Tab. 3 Fatty acids composition in oyster meat

脂肪酸 fatty acids	14 0	16 0	16 1	18 0	18 1	18 2	20 1	20 4	20 5	22 6
含量 content	3.95	25.53	4.79	4.26	10.42	1.98	4.51	4.74	19.96	8.14

由于糖原是可溶性的,并且不需经过降解就能被人体吸收并起到生理调节功能,所以,本实验主要以蛋白质为研究对象,选择蛋白酶对牡蛎肉进行水解,把蛋白质从不可溶的状态转到可溶状态,并使蛋白质降解为相对分子质量较小的、更容易被人体所吸收的短肽,制成具有保健功能的牡蛎营养液。

2.2 牡蛎肉的水解工艺研究

2.2.1 蛋白酶的选择

为了达到理想的水解效果,首先进行了5种蛋白酶的水解对比试验。表4和表5列出这几种蛋白酶的建议水解条件和在此条件下水解牡蛎肉匀浆的效果。

表4 酶水解条件

Tab. 4 The conditions of enzymatic hydrolysis

	pH	温度(°C) temperature	时间(h) time	E/S
537 酸性蛋白酶 537 acid protease	3.0	40	3	6%
胃蛋白酶 pepsin	3.0	55	3	10%
木瓜蛋白酶 papain	5.0	60	3	10%
1398 中性蛋白酶 1398 neutral protease	7.0	45	3	2%
alcalase	8.5	50	3	12(AU·kg ⁻¹)

表5 5种酶的水解效果比较

Tab. 5 The comparisons of the results of 5 proteases to hydrolyze oyster protein

	外观 appearance		理化指标 physical and chemical indexes		
	颜色 color	浑浊度 turbidity	蛋白质提取率(%) recovery rate of protein	糖原提取率(%) recovery rate of glycogen	游离氨基酸(mmol·g ⁻¹ protein) free amino acids
537 酸性蛋白酶 537 acid protease	浅黄 light yellow	-	77.73	58.41	2.841
胃蛋白酶 pepsin	灰 grey	++	80.63	83.86	2.689
木瓜蛋白酶 papain	灰白 grey white	+	71.26	62.21	3.374
1398 中性蛋白酶 1398 neutral protease	暗灰 dark grey	++	89.06	63.70	5.204
alcalase	暗绿 dark green	++	93.21	59.54	5.023

注：“-”代表澄清，“+”代表较浑浊，“++”代表很浑浊；游离氨基酸的单位mmol·g⁻¹蛋白质是指每克蛋白质原料中产生的游离氨基酸的毫摩尔数

Notes:“-”, “+” and “++” mean clarified, turbid, and much turbid, respectively; The unit of free amino acids (mmol·g⁻¹protein) refers to the quantity (in mmol) of free amino acids produced by the hydrolysis of one gram oyster meat

从表4可看出,酸性蛋白酶水解液的蛋白质提取率和糖原提取率都较低,但外观上只有酸性蛋白酶水解液的颜色比较理想,而且也只有这种水解液是澄清的。尽管其它蛋白酶的蛋白质提取率和蛋白质水解程度均较高,但是考虑到混浊的产品需要澄清和脱色,而这必然导致更为复杂的加工工艺和更多的工艺损失,以及水解残渣可以进一步制成其它形式的产品,最后决定选择酸性蛋白酶进行试验。

2.2.2 酸性蛋白酶作用条件的优化

pH: 酸性蛋白酶在3个pH下的水解结果见表6。结果表明,在这3个pH下蛋白质和糖原提取率相差不大,蛋白质提取率在pH3.5时最高。考虑到产品的口味,选择pH4.0进行酶解。

反应温度: 在pH4条件下温度对酸性蛋白酶水解牡蛎蛋白质的影响见图1。从图1可以看出温度为50℃时蛋白质提取率最高,这是因为当温度低于50℃时酶不易激活,而当温度大于50℃时部分酶失活,所以选择反应温度以50℃为宜。

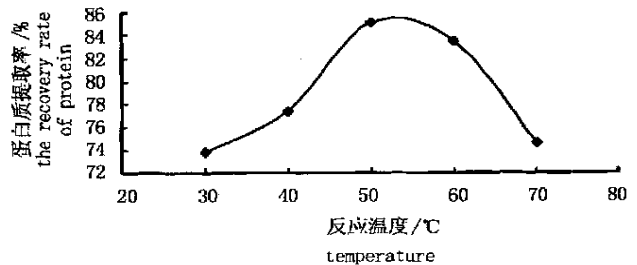


图1 蛋白质提取率和反应温度的关系

Fig. 1 Effect of temperature on proteolysis of oyster meat

表6 pH对牡蛎肉酶解效果的影响

Tab. 6 Effect of pH on the proteolysis in oyster meat

pH	蛋白质提取率(%) recovery rate of protein	糖原提取率(%) recovery rate of glycogen	游离氨基酸(mmol·g ⁻¹ protein) free amino acids	味道 flavor
3.0	77.73	58.41	2.841	极酸 strong acid
3.5	81.31	60.96	3.388	酸 acid
4.0	78.66	61.29	3.218	微酸 weak acid

加酶量: 在以上确定的条件下加酶量与蛋白质提取率的曲线如图 2。从图 2 可看出, 但当加酶量达到 $1700\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白质时, 蛋白质的提取率随加酶量的增加而上升的趋势就很平缓。综合考虑蛋白质的提取率和经济性, 选择加酶量 $1700\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白质。另外, 未加酶时蛋白质提取率也可达到 53%, 这是因为牡蛎肉中本身就含有较高的游离氨基酸, 并且含有内源蛋白酶。

DH 随水解时间的变化: 在以上确定的水解条件下加酶水解, 每隔一定时间取出水解液测其水解度, 所得结果见图 3。从图 3 可看出, 当水解到 2h 后, 水解速度变慢, 所以选择酶解时间为 2h。

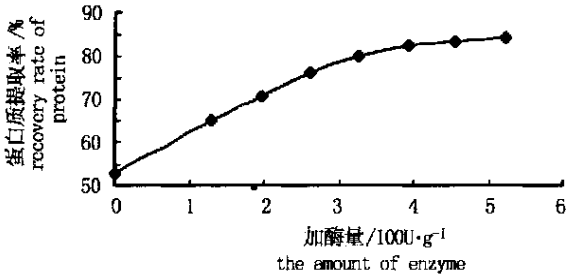


图 2 蛋白质提取率随加酶量的变化

Fig. 2 Effect of the amount of enzyme on proteolysis

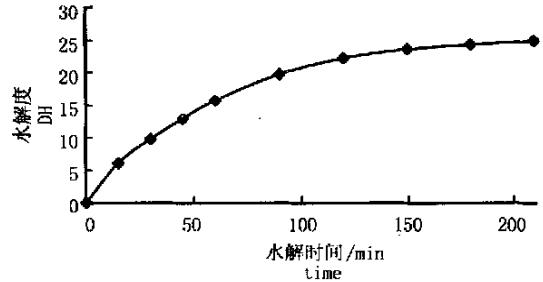


图 3 牡蛎肉的酶解进程

Fig. 3 Time course of proteolysis of oyster meat

2.3 水解液的成分分析

在以上确定的条件下水解得到的水解液呈淡黄色透明状态, 其水解液蛋白质提取率为 78.23%, 糖原提取率为 50.58%。水解液的中各种氨基酸齐全, 游离氨基酸占总氨基酸的 39.27%, 这说明水解液中有多于 60% 的氨基酸以可溶性肽的形式存在。另外, 水解液中牛磺酸的含量达到氨基酸总量的 12.47% (表 7), 且以游离态的形式存在。

表 7 水解液的游离氨基酸和总氨基酸的分析

Tab. 7 Composition of free amino acids and total amino acids in the hydrolysate

氨基酸 amino acids	游离氨基酸含量 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) free amino acids	总氨基酸 total amino acids	
		含量 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) content	质量百分含量 (% , W/W) relative content
牛磺酸 (TAU)	3.934	3.762	12.47
天冬氨酸 (ASP)	0.352	2.700	8.95
苏氨酸 (THR)	0.370	1.277	4.23
丝氨酸 (SER)	0.224	1.293	4.29
谷氨酸 (GLU)	1.131	4.133	13.70
甘氨酸 (GLY)	0.517	1.882	6.24
丙氨酸 (ALA)	1.014	2.104	6.97
半胱氨酸 (CYS)	-	0.220	0.73
缬氨酸 (VAL)	0.327	1.180	3.91
蛋氨酸 (MET)	0.226	0.587	1.95
异亮氨酸 (ILE)	0.174	1.010	3.34
亮氨酸 (LEU)	0.758	1.885	6.25
酪氨酸 TYR	0.385	0.845	2.80
苯丙氨酸 (PHE)	0.467	0.974	3.23
赖氨酸 (LYS)	0.494	2.235	7.41
组氨酸 (HIS)	0.077	0.504	1.67
精氨酸 (ARG)	0.608	1.912	6.34
脯氨酸 (PRO)	0.746	1.659	5.50
色氨酸 (TRP)	0.019	-	-

注: 这里采用的是酸水解法测定总氨基酸含量, 在此条件下色氨酸全部被破坏, 丝氨酸和苏氨酸有 10% ~ 15% 被破坏^[12]

Notes: The composition of total amino acids was determined by acidic hydrolysis method. Under this condition the TRP was destroyed fully, and 10% ~ 15% SER and THR was destroyed^[12]

3 结论

牡蛎肉的主要营养成分为蛋白质和糖原,含量分别为 50.63% 和 22.41%; 其氨基酸组成完善,8 种必需氨基酸含量占氨基酸总量的 40%,而且还含有丰富的牛磺酸。此外,牡蛎肉中还含有多种矿物质和微量元素,特别是锌和硒的含量丰富。尽管由酸性蛋白酶水解得到牡蛎肉水解液的各项营养成分含量相对较低,但其水解液澄清透明,颜色呈淡黄色,易于被消费者接受。酸性蛋白酶理想的作用条件为: pH4, 温度 50℃, 加酶量 $1700\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白质, 反应时间为 2h。在优化的条件下,采用酸性蛋白酶水解牡蛎肉匀浆,水解液中可溶蛋白质的提取率为 78.23%,糖原提取率为 50.58%,水解液中游离氨基酸占总氨基酸的 39.27%,牛磺酸占总氨基酸的 12.47%。

参考文献:

- [1] Teng Y, Qiao X Y, Qu K M. Studies in enzymatic hydrolysis technique of oysters [J]. Mar Fish Res, 1997, (6): 112- 116. [滕瑜, 乔向英, 曲克明. 牡蛎酶解工艺条件的研究[J]. 海洋水产研究, 1997, (6): 112- 116.]
- [2] Chen B L, Wang S Z, Wu S G. Study on the extraction of amino acids from oyster aqueous extract [J]. Applicable Technology Market, 1998, (4): 25- 26. [陈必琏, 王绍钊, 吴松刚. 牡蛎水提取氨基酸的研究[J]. 适用技术市场, 1998, (4): 25- 26.]
- [3] Tan L Y, Zhang C H, Xie C H, et al. The bioactivity of taurin and its distribution in the marine creature [J]. J Zhanjiang Fish Univ, 2000, (3): 23- 25. [谭乐义, 章超桦, 薛长湖, 等. 牛磺酸的生物活性及其在海洋生物中的分布[J]. 湛江海洋大学学报, 2000, (3): 23- 25.]
- [4] Mao W J, Li Y. Study and exploitation of marine functional food (2) [J]. Chinese J Mar Drug, 1997, (3): 50- 53. [毛文君, 李翊. 海洋功能食品的研究开发(二)[J]. 中国海洋药物, 1997, (3): 50- 53.]
- [5] Dalian Institute of Light Industry, Zhengzhou Institute of Light Industry. Food analysis [M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1994. 137- 243. [大连轻工业学院, 郑州轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 137- 243.]
- [6] Carroll N V, Longley R W, Roe J H. The determination of glycogen and muscle by use of anthrone reagent [J]. J Biol Chem, 1956, (220): 583 - 593.
- [7] Jens Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysis by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. J Agriculture and Food Chemistry, 1979, (27): 1256- 1262.
- [8] Suman J A. Taurine in development [J]. Physiol Reverence, 1993(73): 119.
- [9] Li Q X. Health caring food from oysters and the survey of its exploitation in other countries [J]. Chinese J Marine Drug, 1989, (2): 47- 52. [李青选. 牡蛎保健食品及国外开发的概况[J]. 中国海洋药物, 1989, (2): 47- 52.]
- [10] 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 [A]. Food of 21st Century- Food and Resource Technology Environment [C]. 2000, 84- 88. [章超桦, 洪鹏志, 邓尚贵, 等. 二种南海产贝类的食品化学特性及其在水产 HAP 的应用[A]. 21 世纪的食品- 食品与资源、技术、环境 [C]. 2000, 84- 88.]
- [11] Jin Q H, Li G L. Study on the nutritional components of Chinese silver carp [J]. Food Science, 1998, 19(8): 41- 43. [金庆华, 李桂林. 中国鲢鱼营养成分的研究[J]. 食品科学, 1998, 19(8): 41- 43.]
- [12] Lu Z X. Methods of study on protein and enzyme [M]. Beijing: Science Press, 1989. 40- 41. [鲁自贤. 蛋白质和酶学研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 40- 41.]