

珍珠贝肉蛋白酶解过程浑浊形成机理研究*

吴胜旭¹, 赵谋明¹, 崔春¹, 章超桦²

1(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州, 510640) 2(广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江, 524088)

摘 要 以浑浊度为指标, 研究不同酶解时间珍珠贝肉蛋白酶解液浑浊度与粒度分布之间的联系, 结果表明, 二者呈正相关关系($R^2=0.91$); 而凝胶渗透色谱表明酶解 3h 大部分蛋白质被降解成小分子肽, 粒度分布结果显示酶解体系中粒度从 383.9nm 快速增加到 801.4nm, 氨基酸分析结果表明此过程中肽基疏水性氨基酸含量从 0h 的 22.29% 上升到 3h 的 28.79%, 而表面疏水性从 559.69 下降至 3h 的 138.96, 二硫键数目维持在 470 μ mol/g, 这证明了浑浊物是在酶解初期由肽聚集形成的, 疏水相互作用在浑浊物形成过程中起重要作用。

关键词 浑浊, 粒度分布, 表面疏水性, 二硫键

珍珠贝是大宗低值蛋白资源之一, 利用酶技术进行加工处理是提高其附加值的重要手段之一。珍珠贝肉蛋白在蛋白酶作用下被降解为游离氨基酸、寡肽, 其功能特性如溶解性^[1]、起泡性、凝胶性等发生显著改变。研究发现, 贝肉酶解过程中, 酶解液会出现严重浑浊现象。Otte 等人^[2,3]也报道了对小麦蛋白进行适度水解会导致肽凝集, 这些凝集的物质主要是通过静电相互作用和疏水相互作用形成的。蛋白酶解液的出现浑浊会导致酶解液储藏过程中蛋白质的沉淀, 这会严重影响其外观形态和限制其进一步加工利用, 同时蛋白沉淀还会导致其蛋白质营养价值的改变, 而贝肉酶解浑浊现象和形成机理至今未见报道。

本文以经过不同时间酶解的酶解液为研究对象, 以浑浊度作为指标, 研究浑浊度变化和酶解液粒度分布的内在联系, 采用凝胶渗透色谱追踪不同酶解时间酶解液中肽的分子质量分布变化, 同时确定肽类物质之间的表面疏水性, 二硫键的含量的变化, 证实肽的释放, 以及其中疏水相互作用和二硫键等对浑浊度的影响, 探讨贝肉蛋白酶解浑浊物形成机理, 为消除酶解过程中浑浊物提供理论依据和方法指导。

1 材料与方法

1.1 原料及主要试剂

马氏珍珠贝肉, 购于湛江东风市场; 酶制剂, 复合蛋白酶(Protamex), 购于诺维信公司; 化学试剂: β -巯基乙醇(β -Me), 北京鼎国生物技术有限公司, Ellman

试剂[5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)], 1-苯胺基-8-萘磺酸(1-anilino-8-sulfonate ANS), Sigma 公司; 尿素: 天津市福晨化学试剂厂; 三氯乙酸(TCA), 天津市东丽区天大化学试剂厂。以上试剂均为化学纯试剂。

1.2 主要仪器设备

752N 型紫外-可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; Amersham ATBasic 蛋白快速纯化系统, 美国 GE Healthcare 公司; 激光粒度分布仪 Zeta potential Analyzer, 德国; Waters 高效液相色谱仪, 美国; Gluostar Galaxy 荧光光度计, 德国; CR22G 冷冻离心机, 日本。

1.3 酶解液的制备

贝肉按料液比 1:1 加入蒸馏水在恒温振荡器中预热至 53 $^{\circ}$ C 后加入 1.5% (质量比, 按原料质量计) 复合蛋白酶进行酶解, 待酶解结束后将温度升高至 98 $^{\circ}$ C 保温 15 min 灭酶, 冷却后于 6 000 r/min 下冷冻离心 15 min, 抽滤后取上清液备用。

1.4 酶解液浑浊度的测定

采用分光光度计进行监控。用 752N 紫外可见分光光度计在室温下操作, 载样的玻璃比色皿厚度为 0.5 mm, 将经过不同酶解时间的酶解液载于比色皿后置于光度计中, 调整至预定波长后测定吸光度值, 同时以去离子水做空白对照。

1.5 可溶性固形物含量的测定

取样品以去离子水为空白对照调 0, 用阿尔贝折光仪测定。

1.6 酶解液粒度分布的测定

将事先制备好的酶解液用专用比色杯装后适度调整浓度使其 Average Count Rate 在 100~800

第一作者: 硕士研究生(赵谋明教授为通讯作者)。

* 农业部“948”项目(2006-G42), 粤港招标突破项目(2007A020901001)

收稿日期: 2008-10-08

kcps,置于 Zeta potential Analyzer 上待其读数稳定后测定,一个样品循环测定 5 次,循环时间为 2 min。

1.7 酶解液分子量分布的测定

采用凝胶色谱法,检测条件:Amersham 蛋白分析纯化系统,Superdex peptide 10/300GL 分析柱;洗脱液:NaCl 11.7g + Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.06 g + NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.35 g + 超纯水 800 mL;流速 0.5 mL/min,检测波长 214 nm。标准肽样品分子量的对数值与洗脱体积拟合直线方程为 $y = -0.1547x + 5.6431$ 。

1.8 氨基酸组成分析

氨基酸分析参照 Speckann 等方法将样品液酸解后采用 HPLC 分析,色氨酸含量则是将样品液碱解后采用 HPLC 分析。检测条件:美国 Waters 高效液相色谱,PICO. TAG 氨基酸分析柱,温度 38℃,流速 1 mL/min,检测波长 254nm。

1.9 表面疏水性的测定

酶解液表面疏水性的测定方法根据文献^[4-6]的方法进行。用 0.01mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)配制成不同的蛋白质浓度和 8.0mol/L 的 1-苯胺基-8-萘磺酸(1-anilino-8-sulfonate ANS)溶液。取 20μL ANS 溶液加到 4 mL 蛋白质溶液中,混合均匀,迅速测定混合物的荧光强度,激发波长和吸收波长分别是 380nm 和 470nm,同时测定未加荧光探针的相应浓度的蛋白质溶液荧光强度做为空白。以蛋白质浓度对荧光强度做图,采用最小二乘法进行曲线拟合,直线的斜率即是蛋白质的表面疏水性 H_s 。

1.10 巯基/二硫键(SH/S-S)含量分析

参照 Beveridge 等 SH/S-S 分析方法^[7]。

2 结果与分析

2.1 酶解过程中浑浊度的变化规律

根据 Berne^[8]等人的研究结果,可见光区域下波长的光吸收值可以反应出指示液体中颗粒大小和含量的变化,结合 Doncet^[9]等人报道,实验采用 420 nm 作为测定浑浊度的吸收波长。

在酶解过程中,酶解液浑浊程度在酶解初期稍有上升,在 3h 后则逐渐下降但下降程度不大,在酶解至 36h 时,其 OD₄₂₀ 仍然高达 1.256,根据 Berne^[8]的研究结论,影响酶解液浑浊程度的主要因素有:(1)可溶性固形物含量;(2)可溶性物质的粒径大小。由图 1 可知,酶解过程中固形物含量与酶解液浑浊度之间相关性不显著(其相关系数 $R^2 = 0.3803$),所以浑浊度

的大小可能直接决定于浑浊体系中固形物粒径的大小,根据图 2 所示,酶解过程中可溶性物质的粒径大小变化趋势和浑浊度变化呈现出一致性,二者有着明显的正相关关系(其相关系数 $R^2 = 0.91$),所以酶解过程中浑浊现象是由于酶解液体系中物质的粒径变大而形成的。

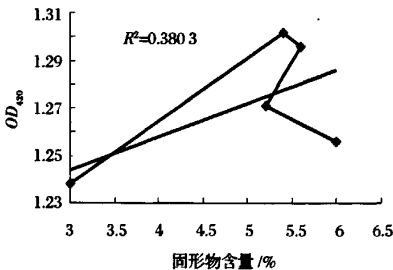


图 1 固形物含量与浑浊度相关性分析图

2.2 酶解液浑浊形成机理探讨

2.2.1 酶解过程中酶解液体系的粒径分布变化趋势

由图 2 所示,随着酶解的进行,酶解体系中物质的粒径在酶解前 3h 有大幅度增加,从起始的 383.9 nm 快速增加到 801.4 nm,在这个过程中大部分大分子蛋白随着蛋白酶的作用被降解成分子量较大的肽体系,总体分子量呈现下降趋势〔见图 3(a)(b)〕。此过程中粒径本应减小,但事实上在酶解前 3 h,酶解液颗粒大小(图 1)和浑浊度都是不减反而增加,这极有可能是由于部分肽之间相互凝集造成的,于泓鹏^[10]等人也曾经发现,大豆分离蛋白酶解初期可能形成凝聚导致酶解液浑浊度在酶解初期有所上升。

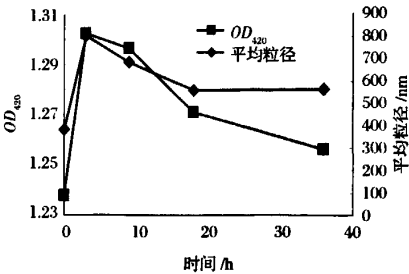


图 2 酶解过程中酶解液浑浊度和粒度分布变化

酶解至 3~18 h,酶解体系中可溶性物质的粒径呈现下降的趋势,但在 18 h 之后吸光值固定在 560 nm 左右,3~18 h 粒径下降可能是因为形成的凝集物表面仍然存在着部分蛋白酶作用位点,蛋白酶能够对部分凝集物进行降解,这与 Otte^[2]等人研究蛋白酶对酶促乳清蛋白凝集物存在进一步降解的结果一致,此后酶作用位点饱和,酶的作用停止,由图 3(c)、

图 3(d)也可看出在 18h 后大分子量肽含量并没有明显下降。

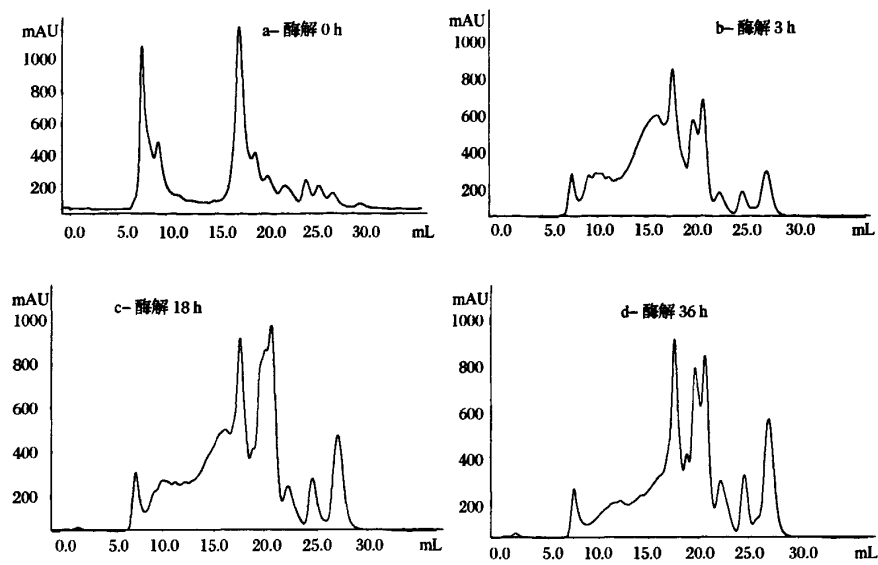


图 3 不同酶解时间酶解液分子量分布变化

2.2.2 酶解过程中肽表面疏水性变化趋势

氨基酸分析结果表明(表 1),随着酶解的进行,留在肽基上的疏水性氨基酸含量在最开始的 3h 内呈现上升趋势,从 0 h 的 22.29%增加至 3 h 的 28.79% (质量分数下同),而从 3~9 h 之间变化很少,仅仅下降至 27.21%,此后含量有所减少但在酶解后期肽基氨基酸含量一直维持在 22%左右。随着酶解的进行,酶解液体系的表面疏水性非但没有上升反而急剧下降(图 4),从 0 h 的 559.69 下降至 3 h 的 138.96,减少 75%,此后稍有回升,但在 9 h 后有所下降并最

终稳定在 80 左右。

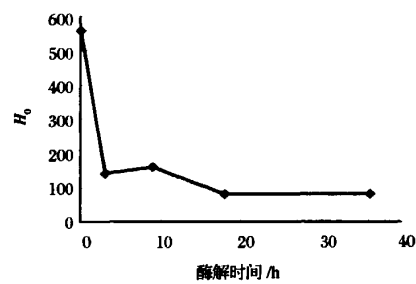


图 4 酶解过程中酶解液表面疏水性变化

表 1 肽基疏水性氨基酸含量变化

疏水性氨基酸	肽基疏水性氨基酸占肽中总氨基酸比例/%				
	0 h	3 h	9 h	18 h	36 h
脯氨酸(Pro)	4.27	6.26	6.50	7.55	4.26
酪氨酸(Tyr)	3.06	2.56	5.18	1.83	1.76
缬氨酸(Val)	3.78	3.58	3.27	2.30	2.93
异亮氨酸(Ile)	3.58	3.30	2.30	1.27	2.37
亮氨酸(Leu)	1.61	4.03	2.80	1.13	3.50
苯丙氨酸(Phe)	2.64	2.45	1.65	1.85	0.98
赖氨酸(Lys)	3.35	6.61	5.51	6.22	6.04
总量	22.29	28.79	27.21	22.15	21.84

理论上,在酶解过程中随着蛋白质的降解,一些原先隐藏在蛋白质结构内部的疏水性基团会逐渐暴露出来,这会导致酶解液体系的表面疏水性的上升。酶解开始阶段随着蛋白质降解成肽,大量的疏水氨基

酸从蛋白质结构中暴露出来,为了躲避和水的作用这些疏水基团必须通过一定的相互作用而结合形成肽聚集体,这可能是酶解前期酶解液中表面疏水性下降的主要原因,这和 Lee 等人的研究结论相一致^[11]。

此后由于形成的聚集体表面存在着部分蛋白酶的作位点^[2],随着蛋白酶的作用聚集体上的部分疏水氨基酸仍有可能暴露出来,这会造成阶段性表面疏水性的回升,随着酶的进一步作用该部分疏水性氨基酸会被以氨基酸和小肽的形式释放而导致表面疏水性下降并最终随着酶作用位点的饱和而使得表面疏水性固定在一个水平。

2.2.3 酶解过程中自由巯基、二硫键变化趋势

由图5可见,随着酶解的进行,酶解液中巯基总量和游离巯基的数量都出现减少的趋势,而二硫键数目并没有太大的变化,基本上是维持在470 $\mu\text{mol/g}$ 左右,这表明了酶解过程中出现的浑浊现象并不是由于自由巯基之间形成二硫键而形成的,Shigeru Utsumi等人^[12]也报道过二硫键在大豆蛋白形成凝集过程中是不必要的。

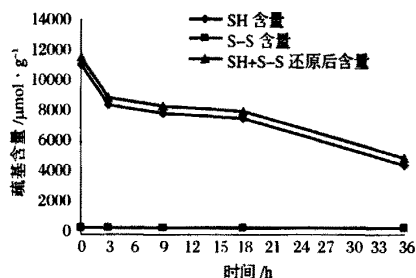


图5 酶解过程中酶解液中自由巯基,二硫键含量变化趋势

3 讨论

酶解过程中,浑浊度的变化是由粒径变化引起的,而粒径的变化是由于在酶解液体体系中形成一些新的聚集物质,酶解液平均粒径明显增加发生在酶解开始的3h内,而在这个过程中酶解液中蛋白质分子被降解生成大量的肽,理论上平均粒径应该下降,所以这些肽必须必然存在一定的相互作用而形成聚集体,同时酶解液中肽上的疏水氨基酸呈现增加趋势而表面疏水性却急剧下降,这可能说明了大部分疏水氨基酸为了躲避和水的作用而埋藏在聚集体内部形成强的疏水相互作用,这些疏水相互作用对聚合物的形成起主要作用。

3~36 h酶解液的平均粒径有下降的趋势,而留在肽上面的疏水氨基酸而呈下降趋势,这可能在疏水聚合物形成后其表面存在蛋白酶作用位点,但在18~36 h下降趋势稳定,表明此时蛋白酶作用位点已经趋于饱和。

参 考 文 献

- 1 Adler-Nissen J. Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility[J]. J Agric Food Chem, 1976, 24(6): 1090~1093
- 2 Otte J, Ju ZY, Faergemand M, et al. Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins [J]. J Food Sci, 1996, 61(5): 911~916
- 3 Otte J, Lomholt S B, Ipsen R, et al. Aggregate formation during hydrolysis of β -lactoglobulin with a Glu and Asp specific protease from *Bacillus licheniformis* [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 4 889~4 896
- 4 Alizadeh-Pasdar N, Li-Chan E C. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(2): 328~334
- 5 Molina Ortiz S E, Añón M C. Analysis of products, mechanism of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysate [J]. Journal of American Oil Chemists Society, 2000, 77(12): 1 293~1 301
- 6 Rao A, Shallo H E, Ericson A P. Characterization of soy protein concentration produced by membrane ultrafiltration [J]. J Food Sci, 2002, 67(4): 1 412~1 418
- 7 Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. J Food Sci, 1974, 39: 49~51
- 8 Berne B J. Interpretation of the light scattering from long rods [J]. J Mol Biol, 1974, 89: 755~758
- 9 Doucet Dany, Gauthier Sylvie F, Otter Don E, et al. Enzymatic induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase; comparison with the plastein reaction and characterization of interactions [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 6 036~6 042
- 10 于泓鹏,唐传核,曾庆孝,等.大豆分离蛋白水解多肽聚集物的组成及相互作用[J].华南理工大学学报(自然科学版), 2006, 34(8): 105~109
- 11 Lee B, Richards FM. The Interpretation of Protein Structure; Estimation of Static Accessibility [J]. J Mol Biol, 1971, 55(3): 379~400
- 12 Shigeru Utsumi, John E Kinsella. Forces involved in soy protein gelation: Effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S, and soy isolate [J]. J Food Sci, 1985, 50: 1 278~1 282

(下转第34页)

- test for gushing tendency in brewing materials[C]. Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Oslo, 1993,
- 9 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680~685
 - 10 Haikara A, Sarlin T, Nakari Setälä T, et al, Method for determining a gushing factor for a beverage[P]. EP, 1071949, 2000
 - 11 Wessels J, De Vries O, Asgeirsdóttir S A, et al. The thin mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the Sc3 hydrophobin gene[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137(10): 2 439~2 445
 - 12 Wessels J, De Vries O, Asgeirsdóttir S A, et al. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*[J]. Plant Cell, 1991, 3(8): 793~799

The Effect of *Fusarium poae* on Beer- gushing

Wang Jin¹, Qian Zhu², Shi Weichen³, Dou Shaohua⁴, Zhao Changxin¹

1(College of Biology and Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

2(Dalian COFCO MALT Ltd. , Dalian 116200, China)

3(China Fermentation Industry Association, Beijing 100833, China)

4(College of Biological Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China)

ABSTRACT There are many factors can induce beer—gushing. This paper was aimed to investigate beer-gushing caused by *Fusarium poae* contamination. The results showed that hydrophobins produced by *Fusarium poae* could induce beer-gushing. When adding 0.3 mg hydrophobins to 610 mL beer contents, it resulted in 63.1 g beer gushing. Besides, the hydrophobins were Heat-stable Protein and it could be partly removed by 0.45 μm nitrocellulose filter.

Key words *Fusarium poae*, hydrophobins, beer-gushing

(上接第 30 页)

Research on Turbid Formational Mechanism of Pearl Oyster Protein During Hydrolysis

Wu Shengxu¹, Zhao Mouming¹, Cui Chun¹, Zhang Chaohua²

1(College of Light industry and Food ,South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

2(College of Food Science and Technology ,Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

ABSTRACT In this paper, using turbidity as a meter, we study the correlation between turbidity and particle distribution of the pearl oyster protein hydrolysate at different times, the result implies a positive relationship between them($R^2=0.91$). Gel Permeation Chromatograph Scanning spectra show protein is degraded into peptides in the first 3 hours. The particle distribution analysis of hydrolysate shows the particle sizes increase from 383.9 nm to 801.4 nm. The amino acids analysis indicates the hydrophobic amino acids content of peptides also increases from 22.29% to 28.79%, the surface hydrophobicity decreases from 559.69 to 138.96 in the first 3 hours, the content of disulfide bond remains at 470 μmol/g till the hydrolysis terminal, showing that the turbid is formed by the peptides through aggregation in the beginning hydrolysis stage, and hydrophobic interaction plays an important part during the turbid formation.

Key words turbid, particle distribution, surface hydrophobicity, disulfide bond