

几种蛋白酶对文蛤肉的水解效果

张绵松, 王海鸥

(江南大学食品学院, 江苏无锡, 214122)

摘要 在一定的酶解条件下, 用 Alcalase 2.4L、胰蛋白酶、复合风味酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶等几种蛋白酶对文蛤肉进行水解; 测定了这几种蛋白酶的水解度, 以及其水解物的氨基态氮含量、可溶性蛋白含量和透明度, 并用凝胶过滤色谱(Sephadex G-25)对水解物的分子质量分布进行了粗略分析。结果表明, Alcalase 水解物分子质量的分布范围较广, 适合制备具有一定肽链要求的短肽, 酸性蛋白酶水解物分子质量较小, 适合制备文蛤调味品, 中性蛋白酶水解物分子质量主要集中在 1 000 u 左右与 10 000u 左右, 胰蛋白酶和复合风味酶的水解物分子质量大部分在 1 500 u 以上。

关键词 文蛤肉, 蛋白酶, 水解物, 凝胶过滤色谱, 分子质量分布

运用发酵工程和酶工程技术, 是开发利用海洋生物蛋白资源的重要途径。蛋白质经蛋白酶酶解后, 其肽产物具有分子质量低, 乳化效果好, 适热能力增加, 易被机体吸收和新的生物活性等优点, 可以被应用到许多领域^[1]。研究发现, 低分子肽较氨基酸更易为人体所吸收, 且具有某些特殊的生理功能, 如可降低血液中的胆固醇, 清除自由基, 预防和治疗高血压, 促进钙质吸收, 增强机体免疫力, 促进肉芽生长从而加速伤口愈合等^[2]。文蛤(*Meretrix Meretrix Linnaeus*)在我主要分布在山东、辽宁、江苏和广西, 每年的采捕量最高达到 25 万 t, 其中江苏省如东县文蛤年出口万吨左右, 是全国最大的养殖出口基地。文蛤中蛋白质含量丰富, 氨基酸种类齐全, 是酶法制备生物活性肽的良好原料。Tsai 等从淡水蛤类(*Corbicula fluminea*, Muller)的蛋白水解物中分离了 2 段具有较高活性的降血压肽^[3]。酶法制备生物活性肽的首要问题是酶的筛选, 所以本研究利用几种蛋白酶酶解文蛤肉, 比较分析各种蛋白酶水解物的分子质量分布, 测定了不同蛋白酶的水解效果, 为以文蛤为原料开发文蛤深加工产品和生物活性肽类做准备。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

文蛤: 江苏南通。蛋白酶: Alcalase 2.4 L 由诺维信公司提供; 胰蛋白酶, 华美生物工程公司; 复合风味酶, 由诺维信公司提供; 酸性蛋白酶, 无锡杰能科; 中性蛋白酶, 无锡杰能科。分子质量标准物: L-

酪氨酸(M_w 181.19 u) 上海长江生化制药厂; $V_{B_{12}}$ (M_w 1355.42 u) 上海化学试剂采购供应站试剂厂; 溶菌酶(M_w 14 400 u) 上海生化公司(加拿大进口分装)。0.45 μ m 微孔滤膜, 上海兴亚净化材料厂。Sephadex G-25 国家医药管理局, 上海医工院益分工贸公司物资经营部。

仪器: 501 型超级恒温器, 上海实验仪器厂有限公司; ZD-2 型自动电位滴定计, 上海第二分析仪器厂; DZ-1 型滴定装置, 上海第二分析仪器厂; BSZ-100 自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂; HL-2S 恒流泵, 上海沪西分析仪器厂; UV-2100 型分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; WZS-I 型阿贝折光仪, 上海。

1.2 试验方法

1.2.1 原料的准备

鲜活文蛤, 静养, 吐沙 → 盐水热烫 → 开壳取肉 → 摘除内脏 → 冷冻后加入约 50% 的水捣碎 → 分装后冻藏备用。

1.2.2 酶解

取适量的文蛤肉放入酶反应器中, 加水调节至所需底物浓度(质量比 2 : 100), 搅拌 0.5min 后, 测定反应前溶液中氨基态氮的浓度, 在各种酶的最适温度和 pH 值条件下加入一定量的酶(20 000 u/g pr.)启动反应, 反应 3 h 后, 100℃灭酶 10min, 接着在 4 000 r/min 离心 20 min, 测定上清液中的氨基态氮的浓度。

1.2.3 氨基态氮的测定

甲醛滴定法^[4]。

1.2.4 可溶性蛋白质含量的测定

微量凯式定氮法^[4]。

第一作者: 硕士研究生(王海鸥为通讯作者)。

收稿日期: 2007-08-22, 改回日期: 2007-12-14

1.2.5 水解度的计算^[4~6]

h_{NH₂} (mmol/g) = (V₁ - V₂) × C / (m × 5 / V × 20 / 100)

DH = (h_{NH₂} - h₀) / h_{tot}

式中: V₁, NaOH 标准溶液的体积 (mL); V₂, 空白消耗的 NaOH 标准溶液的体积 (mL); C, 标准 NaOH 溶液的浓度 (mol/L); m, 文蛤肉中蛋白质的质量 (g); V, 待测溶液体积 (mL); h_{NH₂}, 反应后氨基态氮浓度 (mmol/g); h₀, 反应前氨基态氮浓度 (mmol/g); h_{tot}, 每克原料蛋白的肽键毫摩尔数 (mmol/g), 文蛤蛋白 h_{tot} = 7.8413 mmol/g。

1.2.6 可溶性固形物含量

阿贝折光仪^[4]。

1.2.7 透明度

测定离心后的水解液在 586nm 处的透光率 (%)。

1.2.8 分子质量标准物及水解液前处理^[7]

将分子质量标准物配成浓度为 1~6 mg/mL 的溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取 0.5 mL 进样。水解液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 调整蛋白质浓度至 10 mg/mL, 取 0.5 mL 进样。

1.2.9 凝胶色谱条件

柱尺寸: 100 cm × 1 cm, 凝胶类型: Sephadex G-25^[8], 缓冲液类型: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (含 0.15 mol/L NaCl) pH 7.0。

流速: 0.2 mL/min, 检测波长: 280 nm^[9], 柱床体积: 约 60 mL。

2 结果与分析

2.1 几种蛋白酶水解效果比较 (表 1)

表 1 几种蛋白酶水解效果比较

酶的种类	水解前/后的 氨基态氮 /mmol · g ⁻¹	可溶性 蛋白含量 /mg · mL ⁻¹	DH /%	固性物 含量/%	T _{586nm}
Alcalase	0.00 / 1.28	20.2	16.0	3.4	7.0
酸性蛋白酶	1.14 / 2.82	18.3	21.0	3.2	86.0
中性蛋白酶	0.38 / 1.41	15.9	12.8	2.5	4.3
胰蛋白酶	0.54 / 1.60	24.1	13.3	4.6	1.6
复合风味酶	0.58 / 1.92	13.0	16.8	2.4	2.8

从表 1 可以看出, 酸性蛋白酶水解前的氨基态氮较高, 这可能是文蛤蛋白在酸的作用下部分先水解了的缘故, 也可能正是结合了酸的作用, 酸性蛋白酶的水解产生的氨基态氮比较高, 增加了 1.68 mmol/g,

其水解度也达到了 21.0%。Alcalase 与胰蛋白酶的水解物的可溶性蛋白较高, 分别为 20.2 mg/mL 和 24.1 mg/mL。因为水解液中蛋白质是主要溶解物, 所以其固形物含量的变化与可溶性蛋白的含量基本保持一致, 可溶性蛋白含量越高, 则其可溶性固形物含量也越高。酸性蛋白酶水解物具有较好的透明度, 在 586 nm 处的透光率达到 86%。这是因为在较低 pH 条件下, 较大的蛋白质和多肽更容易沉淀, 在离心时以渣的形式被除去, 有利于水解液的澄清。

2.2 分子量对数与洗脱体积之间的关系

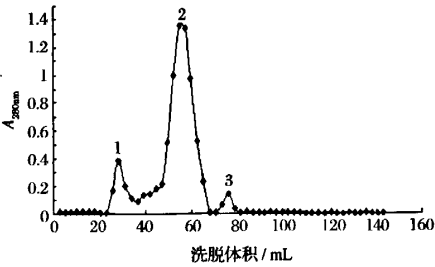


图 1 分子质量标准物凝胶色谱图

从图 1 中的分子质量标准物的凝胶色谱图可以得到, 在特定的色谱条件下, 溶菌酶、V_{B₁₂}、酪氨酸对应的洗脱体积依次为 28.6 mL、54.6 mL 和 75.4 mL (如表 2)。

表 2 各标准物对应的洗脱体积

标号	标准物 名称	分子 质量/u	log(M _w)	洗脱 体积/mL
1	溶菌酶	14400	4.16	28.6
2	V _{B₁₂}	1355.42	3.13	54.6
3	酪氨酸	181.19	2.26	75.4

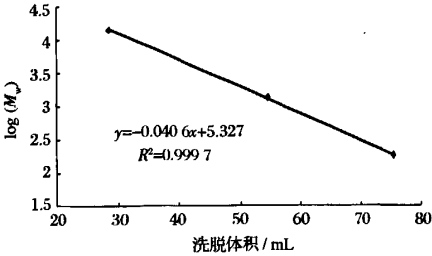


图 2 标准物分子量对数与洗脱体积之间的关系

以溶菌酶 (M_w 14 400 u)、V_{B₁₂} (M_w 1 355.42 u)、酪氨酸 (M_w 181.19 u) 3 种物质作为分子质量标准, 绘制分子质量对数与洗脱体积之间的关系 (如图 2), 图 2 表明物质分子质量的对数值与其洗脱体积成线性关系, 线性相关系数 R² 为 0.999 7, 对应的线性关系方程为 log(M_w) = -0.040 6 × V + 5.327。可以

粗略地计算出未知蛋白的分子质量。

2.3 各种蛋白酶的水解产物分子质量分布

Alcalase 对文蛤肉的水解结果见图 3。Alcalase 是一种来源于地衣芽孢杆菌的内切酶^[10],它具有作用范围广,水解速度快等特点。根据分子质量标准物凝胶色谱图和所得的回归方程可以知道,图 3 中标号 1、2、3、4 和 5 对应的分子质量分别约为 23 380 u、9 530 u、3 884 u、1 675 u 和 317 u。说明 Alcalase 水解物的分子质量范围较广,其中以 1 000 u 到 3 000 u 之间的较多。从 Alcalase 水解速度快和水解物分子质量范围较广的特点出发,可以作为文蛤肉水解初始阶段用酶,然后进一步配合其他蛋白酶生产制备对肽链有特定要求的短肽。

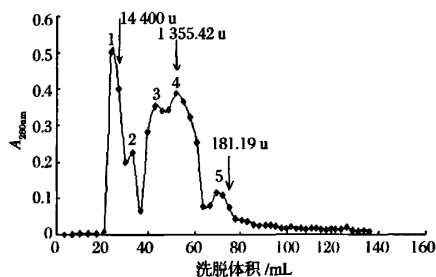


图 3 Alcalase 水解产物的凝胶色谱图

酸性蛋白酶对文蛤肉的水解结果见图 4。根据分子质量标准物凝胶色谱图和所得的回归方程可以知道,图 4 中的标号 1 和 2 对应的分子质量约为 1 771 u 和 535 u。在酸性条件下,大分子蛋白质和部分多肽被离心除去,所以水解物分子量分布相对比较集中,且在酶和酸的共同作用下,蛋白质的水解比较彻底,肽链比较短,大部分在 500 u 左右。另外,其水解液透明度高,可溶性蛋白较高,易被消费者接受。结合其水解度和水解液的透明度来考虑,酸性蛋白酶可用来制备文蛤调味品。

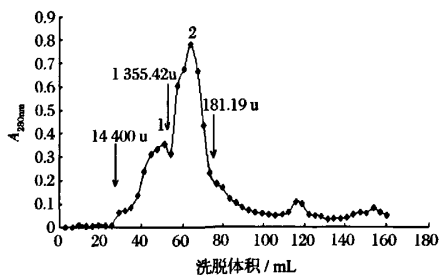


图 4 酸性蛋白酶水解产物的凝胶色谱图

中性蛋白酶对文蛤肉的水解结果见图 5。根据分子质量标准物凝胶色谱图和所得的回归方程可以

知道,图 5 中的标号 1 和 2 对应的分子质量分别为 12 853 u 和 1 030 u。中性蛋白酶的水解物分子质量分布主要集中在 1 000 u 左右与 10 000 u 左右,可结合其他蛋白酶进行短肽的制备。

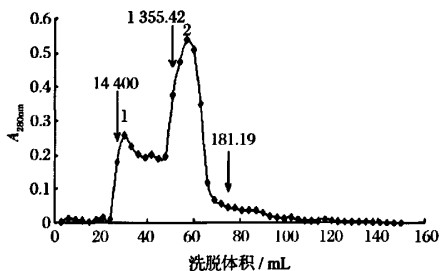


图 5 中性蛋白酶水解产物的凝胶色谱图

胰蛋白酶对文蛤肉的水解结果见图 6,复合风味酶对文蛤肉的水解结果见图 7。根据分子质量标准物凝胶色谱图和所得的回归方程可以知道,图 6 中的标号 1、2、3 和 4 对应的分子质量分别为 13 594.4 u、5 860.8 u、3 344.7 u 和 1 442.0 u。图 7 中的标号 1、2、3 和 4 对应的分子质量分别为 15 208.3 u、8 053.8 u、4 469.1 u 和 1 511.0 u。这 2 张色谱图有些相似,说明它们对文蛤肉的水解方式有一定的共性,其水解物分子质量大部分在 1 500 u 以上。

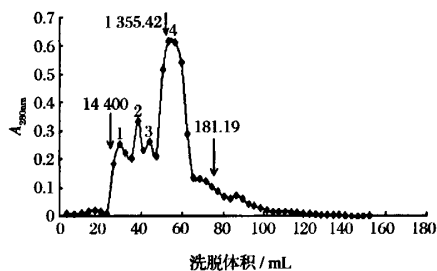


图 6 胰蛋白酶水解产物的凝胶色谱图

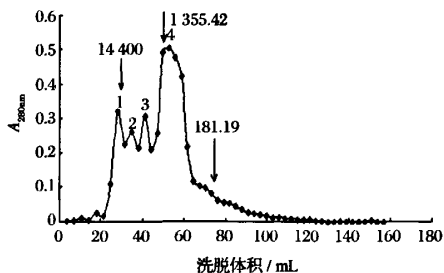


图 7 复合风味酶水解产物的凝胶色谱图

3 结论

Alcalase 水解物分子质量的分布范围较广,适合

制备具有一定肽链要求的短肽,酸性蛋白酶水解物分子质量较小,适合制备文蛤调味品,中性蛋白酶水解物分子质量主要集中在 1 000 u 左右与 10 000 u 左右,胰蛋白酶和复合风味酶的水解物分子质量大部分在 1 500 u 以上。

参 考 文 献

- 1 吴继卫,何海伦,路敬涛,等. 海洋生物蛋白的酶解及酶解产物的抗氧化活性[J]. 海洋科学,2005,29(3):76~80
- 2 曹文红,章超桦,秦小明. 酶解中国毛虾制备低分子肽的研究[J]. 食品与发酵工业 2006,32(11):80~83
- 3 Tsai J S, Lin T C, Chen J L, et al. The inhibitory effects of freshwater clam (*Corbicula fluminea*, Muller) muscle protein hydrolysates on angiotensin I converting enzyme [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 2276~2281
- 4 无锡轻工业学院,天津轻工业学院. 食品分析[M]. 北京:轻工业出版社,1983
- 5 无锡轻工业学院. 食品酶学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994
- 6 Silvestre M P C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 1997, 60(2): 263~271
- 7 陆 健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005
- 8 Xiangzhen Kong, Huiming Zhou, Haifeng Qian. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2007, 102: 759~763
- 9 De F O, P G J, Vilela L et al. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41(9): 1 432~1 438
- 10 Maria M Yust, Justo Pedroche, Julio Giron-Calle, et al. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase[J]. Food Chemistry, 2003, 81: 363~369

Study on the Clam Meat Hydrolyzation by Several Proteolytic Enzymes

Zhang Miansong, Wang Haiou

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Under certain conditions, clam meat was hydrolyzed by Alcalase 2. 4L, trypsin, flavourzyme, acid protease and neutral protease respectively. DH (the degree of hydrolysis), amino nitrogen, soluble protein and transparency of hydrolysates were determined during hydrolysis. Molecular weight distribution of peptides in hydrolysates was determined through GFC (gel filtration chromatography, Sephadex G-25). The results showed that in the products hydrolyzed by Alcalase have peptides with wide molecular weight distribution, which were suitable for the preparation of certain oligopeptide. In the products hydrolyzed by acid protease, peptides were found with small molecular weights, which were suitable for the preparation of flavoring. In the products hydrolyzed by neutral protease, peptides with molecular weights about 1 000 u and about 10 000 u predominated. In the products hydrolyzed by trypsin and flavourzyme, peptides with molecular weights above 1 500 u was predominated.

Key words clam meat, proteolytic enzyme, hydrolysate, gel filtration chromatography, molecular weight distribution

仪器信息网“学术会议”栏目全新改版

应广大用户要求,仪器信息网近日对“学术会议”栏目进行了全面改版。此次改版栏目实现了模块化,设置了如:投稿中心、征集赞助、注册登陆、会议动态、特殊定制等几个功能模块,用户可以根据会议的特点来选择使用,以便更好地利用本网拥有的各项资源。新增的“会议动态”发布功能可以满足会议主办方随时随地发布会议进展新消息的需求,并且其中高质量的新闻更有机会有被本网“业界要闻”栏目收录,并在仪器信息网首页显示。此外,还专门针对无网站的学术会议设置了“特殊定制”模块,本网的设计人员会按照您的需求,提供个性化服务,为您的学术会议打造一片独特的平台,更多详情请与本网联系。

如果您主办分析测试行业相关的学术会议或学术研讨会,请与本网联系,本网免费给您提供一个网上网下宣传的平台;如果您想参加会议,可以直接在网上完成投稿、注册;如果您想赞助大会,请在网上直接登记!

联系电话:010-51654077-8017

联系人:杨旭

电子邮箱:project@instrument.com.cn

网址:http://confer-

ence.instrument.com.cn