

文章编号: 1000-0615(2008)03-0471-07

鱼蛋白酶水解物的钙螯合修饰及其功能活性

夏松养, 谢 超, 霍建聪, 邓尚贵

(浙江海洋学院食品与药学学院, 浙江 舟山 316000)

摘要:以低值鱼蛋白为原料通过复合酶水解法和钙修饰法获得了蛋白质酶水解物的修饰产物并对其功能活性进行了初步研究。结果表明,未脱脂的鱼蛋白酶水解物钙螯合修饰的最适宜条件为蛋白质水解度为 5%、螯合 pH 为 7.0、螯合温度为 20 ℃、螯合完成时间为 15 min;无水乙醇分级分离可获得三种螯合组分,水不溶组分(CA)、50%无水乙醇不溶性组分(CB)和 80%无水乙醇不溶性组分(CC);红外光谱分析表明,CA 的钙紧密地与氨基和羧基基团结合形成螯合修饰物,并以钙为中心形成五元环,而 CB 和 CC 组分中钙只与羧基紧密结合形成环状结构;在这些螯合物组分中,CA 具有最高的抗氧化活性,且高达 α -生育酚的 94%,而 CC 具有最高的抗大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的活性,并发现抗菌活性大小与组分的水溶性和分子中电子中继系统的电子缓冲能力有关。本文的研究可望对海洋低值鱼蛋白质的高效利用和蛋白质的酶水解物经螯合修饰后作为食品添加剂在食品工业中的应用奠定理论基础。

关键词:低值鱼;酶;螯合;抗氧化;抗菌

中图分类号:S 985

文献标识码:A

我国每年从海洋中捕获上岸的低值鱼有成百上千吨,常常被用作饲料或肥料,未能很好地为动物和人类提供蛋白质营养。事实上,无论是人类还是动物来说,鱼蛋白属于高质量蛋白质,因为它含有丰富的必需氨基酸和较高的消化吸收性能。因此,我国的大部分低值鱼都应该以食用为目的进行高效开发而不仅仅只用做饲料和肥料,这既能推动这类高蛋白质资源的更好利用,也能成为海洋经济新的增长点之一。

低值鱼蛋白的最为重要的有效利用途径之一是采用生物酶制作鱼蛋白水解物。这不仅能作为分离可溶性氮化合物、不溶性物质和鱼油的有效途径,而且也能获得我们需要的目标产品。鱼蛋白的酶法水解最早可追溯到 20 世纪 40 年代^[1-8]。Kristinsson 等^[9]发现多种海洋鱼蛋白经

过酶法水解后具有良好的生物化学特性和功能特性,并重点研究了从鲑幽门提取得到的混合酶和四种商品酶制剂对大西洋鳕鱼肌肉蛋白质的酶解^[10-11],Liaset 等^[12]也研究了几种商品蛋白酶制剂对生产鱼片产生的碎肉的酶法水解与利用。20 世纪 80 年代末对鱼蛋白水解物的生物活性方面研究逐渐兴起,如 Jeon 等^[13]通过酶法水解和超滤技术的应用较大幅度地提高了水解物的抗氧化活性和 ACE 抑制活性,而邓尚贵等^[14]则采用多酶水解法获得了具有抗贫血活性的蛋白质水解物。本文通过对酶水解物的螯合修饰和改性,丰富低值鱼蛋白质的利用与开发途径,获得品种多样的功能食品或功能食品的基料,对海洋经济的发展和食品工业的进步作出积极的贡献。

收稿日期:2007-06-22

资助项目:浙江省重大科技专项(2007C12013)

作者简介:夏松养(1959-),女,浙江舟山人,副教授,主要从事水产品加工与贮藏研究。Tel: 0580-2550073, E-mail: xiasongyang@sohu.com

1 材料与方法

1.1 酶制剂

木瓜蛋白酶(E. C. 3. 4. 22. 21), 酶活力 $2\ 000\ 000\ \text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$; 风味酶, 酶活力 $400\ 000\ \text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 食品级, 由广西南宁庞博生物制品有限公司提供。两种酶复合后的最适宜水解条件为 pH 6.5, 45 °C, 复合比为 3:1。复合酶失活条件为 90 °C、20 min。

1.2 材料

新鲜低值鱼, 体重 10 ~ 30 g, 长度 2 ~ 7 cm, 注意避免脂肪氧化, 2005 年 9 月至 12 月购于当地市场。原料清洗干净后分为两部分, 一部分作为不脱脂的原料(FM, 脂肪含量 $42.8\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 捣碎匀浆后贮藏于 -18 °C 备用; 另一部分经过 $1\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}\ \text{NaHCO}_3$ 、 $1\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}\ \text{NaCl}$ 和蒸馏水脱脂、捣碎和匀浆后贮藏于 -18 °C 作为脱脂原料(DM, 脂肪含量 $6.2\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 备用。进行酶水解前, 将原料取出并贮放于 -4 °C 的冰箱中过夜。

1.3 螯合水解液的制备

原料加 2 倍体积的蒸馏水混匀, 混合物的 pH 约为 6.5。螯合水解液制备参照复合酶法^[15], 仅将复合比改为 1:1。水解完成后, 将混合液的温度升高到 90 °C 并保持 20 min 以灭酶, 冷却至室温, 用 100 目尼龙布过滤去掉鱼骨等未水解组分, 接着在 $4\ 390 \times g$ 条件下离心 15 min 去掉未水解的组分, 然后采用截留分子量为 6 ku 的超滤膜进行超滤分离, 收集超滤液并贮放于 4 °C 条件备用。

1.4 螯合物的制备

在不断搅拌、不同的温度、不同的时间等条件下, 向超滤液中连续加入 $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2$ 进行螯合修饰。修饰完成后直接在 $4\ 390 \times g$ 离心 15 min 获得水不溶组分(CA); 向分离后的液体中加入无水乙醇直到乙醇浓度达到 50%, 在室温下静置 15 min, 再次离心得到 50% 无水乙醇不溶性组分(CB); 继续向液体中加入无水乙醇至乙醇浓度达到 80%, 在室温下静置 15 min, 再次离心得到 80% 无水乙醇不溶性组分(CC)。在 50 °C、0.1 Mpa 下真空干燥 3 h 去除残留乙醇后放置于干燥器中备用。

1.5 分析方法

蛋白质水解度(DH)的测定 $\text{DH} = (\text{h}/\text{h}_t) \times 100\% = [(B - C)/(A - C)] \times 100\%$, 公

式中, h 是已断裂的肽键数目, h_t 是原料蛋白质结构中总的肽键数目, A 是水解物中总氨基氮数量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 蛋白质), B 是水解物中游离氨基氮数量, C 是原料的游离氨基氮数量。B 和 C 的具体数值可用电位滴定法^[16]测定。

螯合率(CR)的测定 $\text{CR} = [(A - B)/A] \times 100\%$, 公式中 A ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 为样品中钙的总含量, B ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 为样品中游离钙的含量。

螯合组分的红外光谱(IR)分析 对照样品(CS)是复合酶水解液经过滤、超滤和冷冻干燥而获得的。取螯合组分 CA、CB、CC 各 2 mg 与 200 mg KBr 混合, 在红外光下磨成 $2.5\ \mu\text{m}$ 的薄片, 在 60 Mpa 的压力下制成透明的 KBr 薄片。在 $500 \sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 条件下用 IR-435 红外光谱仪测定样品的结构。

抗氧化活性分析 用硫代巴比妥(TBA)法测定样品的抗氧化活性。亚油酸的氧化处理按照 Osawa 等^[17]的方法并略做修改。取 0.2 mL 亚油酸样品于 30 mL 的试管中, 加入 10 mL 99.5% 的酒精和 10 mL、50 mmol、pH 7.0 的磷酸缓冲液。分别取 5 mg 的样品加入试管并用蒸馏水补加到总体积为 25 mL, 40 °C 条件下黑暗中培养 7 d。TBA 分析按照 Ohkawa 等^[18]的方法进行, 含 0.8 mL 水、0.2 mL $81\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{SDS}$ 和 1.5 mL $200\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸溶液用 $10\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{NaOH}$ 和 1.5 mL 0.8% 的 TBA 调整 pH 至 3.5, 取 50 μL 已氧化的亚油酸加入到上述混合液中并在 5 °C 条件下放置 1 h, 然后升温到 100 °C 保持 1 h, 在 535 nm 测定吸光度。与 α -生育酚的相对氧化抑制率(ROIR)按下式计算:

$\text{ROIR} = [(A - B)/(A - C)] \times 100\%$, 公式中 A 为 50 μL 和 0.2 mL 亚油酸混合液的吸光度, B 为 5 mg 供试样品与 0.2 mL 亚油酸混合液的吸光度, C 为 50 μL α -生育酚与 0.2 mL 亚油酸混合液的吸光度。

抗菌活性分析 抗菌活性采用牛津杯双层平板法进行研究^[19]。将 10 mL $20\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 熔化的琼脂加入无菌平板中, 待琼脂完全冷却凝固后, 将无菌的牛津杯按顺序放入琼脂平板中, 当 15 mL 检测培养基冷却到 50 °C 时与 1 mL 含 $10^8\ \text{ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的指示菌溶液混合后也加入到平板中, 取 100 ~ 200 μL 的样品加入到检测平板的圆孔中, 接着在 37 °C 条件下培养 15 h。抑菌圈直径大小表

示抗菌活性。

2 结果与讨论

2.1 原料脂肪含量对水解的影响

对于 FM 而言,其水解曲线包括了大量肽键被快速断裂的初始阶段(1~10 h)和仅有少部分肽键被切断的第二阶段(10~20 h),这种变化规律与沙丁鱼^[20-21]、小龙虾^[22]、鲱^[23]和鲑^[24]蛋白的酶水解曲线相似,并且在水解时间超过 2 h 后的水解过程中,其水解度显著高于 DM(图 1)。对于 DM 而言,其 DH 与水解时间的关系曲线呈现出典型的线性关系。两种原料在水解时存在的显著差异主要是因为脱脂处理也去除了 DM 的可溶性蛋白和内源酶。

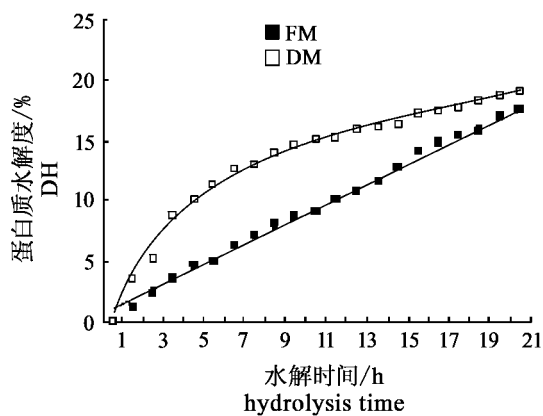


图 1 不同原料的蛋白质水解度与水解时间的关系

Fig.1 Relationship between increased hydrolysis time and DH for different raw materials

水解温度 45 ℃、起始 pH 6.5、料水比(W/V)1/2、木瓜蛋白酶浓度 1 g·L⁻¹、风味酶浓度 1 mL·L⁻¹; DH 与水解时间(X)关系的表达式为: ■ = DM, $DH = 0.8157(X) + 1.0864$ ($R^2 = 0.9933$)和 ○ = FM, $DH = 5.3884\ln(X) + 2.6362$ ($R^2 = 0.9923$)
The hydrolysis temperature 45 ℃, starting pH 6.5, material/water ratios (w/v) 1/2, original papain 1 g·L⁻¹ and flavorase concentrate 1 mL·L⁻¹ respectively. DH as a function of hydrolysis time (X) for the different curves are: (■ = DM) $DH = 0.8157(X) + 1.0864$ ($R^2 = 0.9933$) and (○ = FM) $DH = 5.3884\ln(X) + 2.6362$ ($R^2 = 0.9923$)

2.2 螯合条件的选择

螯合所需要的 DH 的确定 如图 2 所示,无论是 FM 还是 DM 在蛋白质水解度为 5% 时能达到最大螯合率。结果表明螯合所需要的蛋白质水解度为 5%,此时的蛋白质水解物能够提供足够的配位数。

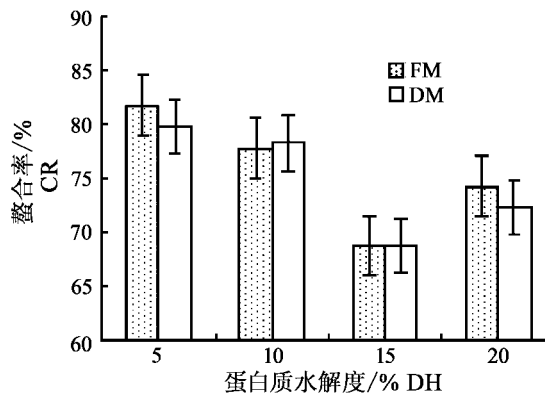


图 2 蛋白质水解度对钙螯合的影响

Fig.2 Relationship between different DH and CR for different raw materials

螯合反应条件:温度 20 ℃,15 min,pH 7

The chelating reaction was carried at 20 ℃ for 15 min under pH 7

螯合 pH 的确定 如图 3 所示,无论是 FM 还是 DM 其螯合率在 pH 4.0~7.0 的范围内都随着 pH 的升高而迅速增加,当 pH 超过 7.0 时,螯合率迅速降低。在 pH 4.0~7.0 的范围内螯合率的迅速增加主要是因为水解物的 -NH₂ 和 -COOH 的配位能力得到增强,但当 pH 超过 7.0 时, Ca²⁺ 更容易与反应体系中的 OH⁻ 结合而形成 Ca(OH)₂,阻碍了 Ca²⁺ 与 -NH₂ 和 -COOH 结合形成螯合物。因此,螯合反应适宜的 pH 应选择为 7.0。

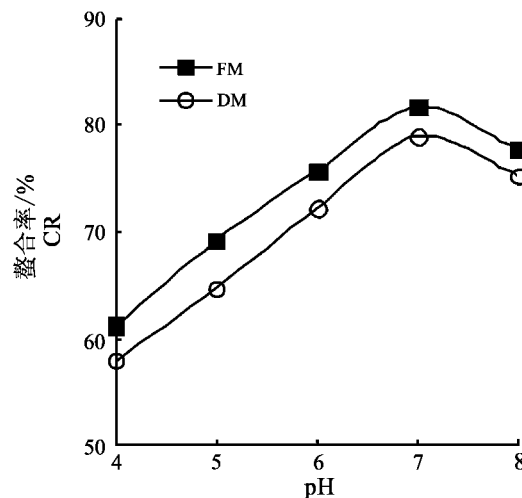


图 3 钙螯合率与 pH 的关系

Fig.3 Relationship between different pH and CR for different raw materials

螯合反应条件:温度 20 ℃,时间 15 min,DH 5%

The chelating reaction was carried at 20 ℃ for 15 min under DH 5%

螯合温度与螯合时间的确定 如图4和5所示,在温度为10~50℃、螯合时间为15~90 min范围内,螯合率没有明显的差异。表明螯合温度与螯合时间对螯合效果没有明显的影响。因此,本研究选择螯合温度为20℃、螯合时间为15 min。

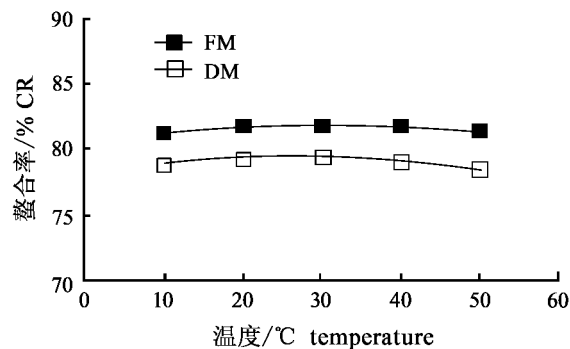


图4 螯合温度对螯合率的影响

Fig.4 Relationship between different temperature and CR for different raw materials

螯合反应条件:螯合时间15 min,螯合 pH 7.0,蛋白质水解度5%
The chelating reaction was carried for 15 min under pH 7.0 and DH 5%

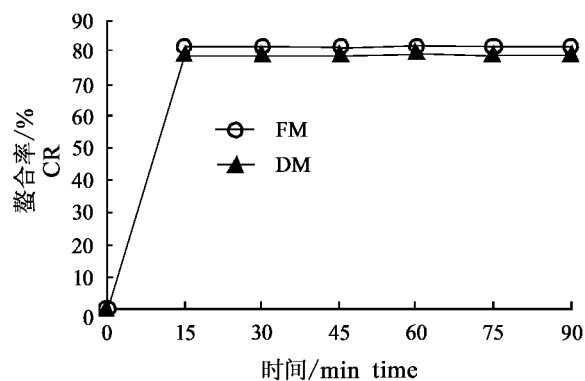


图5 螯合时间对螯合率的影响

Fig.5 Relationship between different time and CR for different raw materials

螯合反应条件:温度20℃,螯合 pH 7.0,蛋白质水解度5%
The chelating reaction was carried at 20℃ under pH 7.0 and DH 5%

2.3 螯合物的结构分析

图6是水解物及三种螯合组分的红外光谱。与水解物相比,组分CA在3130~3030 cm⁻¹的NH⁴⁺峰消失,但在1100 cm⁻¹处出现了PtNH₂吸

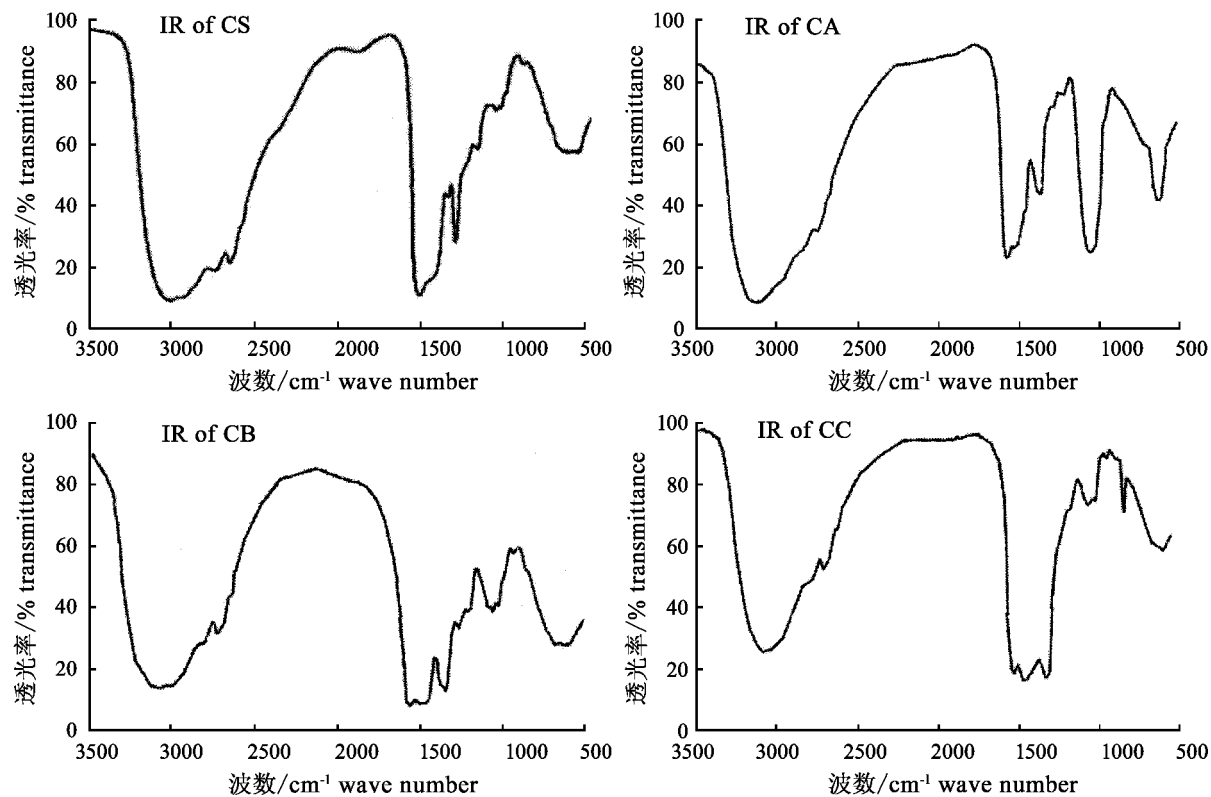


图6 水解物及三种螯合组分的红外光谱

Fig.6 Infra-red spectrum of CS, CA, CB and CC from FM

被用作水溶性天然抗菌剂以控制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的生长和繁殖。

表 1 螯合组分抗大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和枯草芽孢杆菌活性

Tab.1 The antibacterial diameter against *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi* and *B. subtilis* by hydrolysate chelating Ca^{2+}

样品 sample	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	沙门氏菌 <i>S. typhi</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
CS	8	8	8	8
CA	8	8	9	8
CB	8	9	8	9
CC	13	16	9	16

注:对照为 CS,采用牛津杯双层平板法测定抗菌活性,牛津杯直径为 8 mm。指示菌数量为 10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,样品量为 100 ~ 200 μL ,培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$,培养时间为 15 h

Notes: The control used was CS. The activity was determined by the Oxford cup double layer plating method. The diameter of the Oxford cup was 8 mm. The bacterial amount in the indicator bacterial solution was 10^8 mL^{-1} and the sample amount used for the assay was 100 ~ 200 μL , and cultured at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 h

3 结论

低值鱼蛋白质复合酶水解曲线可表达为 $\text{DH} = 5.3884 \ln(X) + 2.6362$ ($R^2 = 0.9923$, 未脱脂)和 $\text{DH} = 0.8157(X) + 1.0864$ ($R^2 = 0.9933$, 脱脂)。钙与酶水解物的螯合最适宜条件分别为 DH 5%、pH 7.0、温度 20 $^{\circ}\text{C}$ 和螯合时间 15 min。采用无水乙醇分级分离法可获得 CA、CB 和 CC 三种螯合组分;通过红外光谱分析发现 CA 组分的 Ca 强烈地与氨基和羧基结合在一起且每一 Ca 可形成 2 个五元环并接的结构,组分 CB 和 CC 则仅与羧基紧密结合。

三种螯合组分都有较好的抗氧化活性,可分别用作天然疏水性和亲水性抗氧化剂。CA 具有最高的抗氧化活性,可达到 α -生育酚的 94%。在三种螯合组分中,只有 CC 具有最高的抗大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的活性。

参考文献:

[1] Tarr H L A. Possibilities in developing fisheries by-products[J]. Food Techol, 1948,2:268 - 277.
[2] Freeman H C, Hoogland P L. Processing of cod and haddock viscera: laboratory experiments[J]. J Fish Res Board Can, 1956,13:869 - 877.

[3] McBride J R, Idler D R, MacLeod R A. The liquefaction of British Columbia herring by ensilage, proteolytic enzymes and acid hydrolysis[J]. J Fish Res Board Can, 1961, 18:93 - 112.
[4] Sen D P, Sripathy N V, Lahiry N L, et al. Fish hydrolysates I: rate of hydrolysis of fish flesh with papain[J]. Food Technol, 1962, 138 - 140.
[5] Hale M B. Relative activities of commercial-available enzymes in the hydrolysis of fish protein [J]. Food Technol, 1969, 23:107 - 110.
[6] Hale M B. Using enzymes to make fish protein concentrates[J]. Mar Fish Rev, 1974, 36:15 - 19.
[7] Mohr V. Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis[M]//Adler-Nissen J, editor. Biochemical aspects of new protein food. New York: Pergamon, 1977, 53 - 62.
[8] Langmyhr E. Thesis [D]. The Norwegian Technical University. Trondheim, Norway, 1981.
[9] Kristinsson H G, Rasco B A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties[J]. CRC Crit Rev Food Sci Nutr, 2000, 40:43 - 81.
[10] Kristinsson H G, Rasco B A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48:657 - 666.
[11] Kristinsson H G, Rasco B A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture [J]. Proc Biochem, 2000, 36:131 - 139.
[12] Liaset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry: chemical characterisation and nutritional evaluation [J]. J Sci Food Agric, 2000, 80:581 - 589.
[13] Jeon Y J, Byun H G, Kim S K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes [J]. Process Biochemistry, 1999, 35:471 - 478.
[14] Deng S G, Peng Z Y, Chen F, et al. Amino acids composition and anti-anaemia action of hydrolyzed offal protein from *Harengula zunasi* Bleeker [J]. Food Chemistry, 2004, 87(1): 97 - 102.
[15] 邓尚贵, 彭志英. 青鳞鱼蛋白复合酶水解动力学模型的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(4):28 - 32.
[16] 赵洪根, 黄慕让. 水产品检验(第一版)[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1987:165 - 166.
[17] Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant

- isolated from leaf wax of eucalyptus leaves[J]. Agric Biol Chem, 1981, 45:735 – 773.
- [18] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. Anal Biochem, 1979, 95:351 – 358.
- [19] 何 宁, 王昌禄, 顾晓波, 等. 杯碟法检测乳酸菌素活性优化条件的研究[J]. 天津轻工业学院学报, 1999, 2:18 – 20.
- [20] Quaglia G B, Orban E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*) [J]. J Sci Food Agric, 1987, 38: 271 – 276.
- [21] Quaglia G B, Orban E. Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases[J]. J Sci Food Agric, 1987, 38:263 – 269.
- [22] Baek H H, Cadwallader K R. Enzymic hydrolysis of crayfish processing by-products[J]. J Food Sci, 1995, 60: 929 – 934.
- [23] Hevia P, Whitaker J, Olott H S. Solubilization of a fish protein concentrate with proteolytic enzymes [J]. J Agric Food Chem, 1976, 24: 383 – 390.
- [24] Hordur G K, Barbara A R. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture [J]. Process Biochemistry, 2000, 36: 131 – 139.
- [25] Uchida K, Kawakishi S. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper (II): ascorbate[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40:13 – 16.
- [26] Kim S K, Jeon Y J, Byun H G, *et al.* Enzymatic recovery of cod frame protein by crude proteinase derived from tuna pyloric caeca[J]. Fish Sci, 1997, 63:421 – 427.
- [27] 宁正祥, 高建华. 食品防腐剂抗菌机理和构效关系 [J]. 广州食品科技, 1997, 13: 1 – 4.

Preparation and bioactivity of Ca^{2+} chelate of hydrolysate by enzymolysis from the waste fish proteins

XIA Song-yang, XIE Chao, HUO Jian-cong, DENG Shang-gui

(College of Food and Pharmacology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: This paper focuses on the preparation and bioactivity of Ca^{2+} chelate of hydrolysate from the waste fish proteins through compound enzymolysis. The optimum formation conditions of the hydrolysate chelating Ca^{2+} are 5% of DH, 7.0 of pH, 20 °C of temperature and 15 min of chelating time for FM (material not being defatted). Three types of hydrolysate chelating Ca^{2+} including CA (deposit after chelating), CB (deposit in 50% of absolute alcohol solution) and CC (deposit in 80% of absolute alcohol solution) were obtained through fractional precipitation with absolute alcohol from FM. Structure analysis through IR revealed that Ca^{2+} had been combined strongly with amino-group and carboxyl-group in each of chelates and each of Ca^{2+} could form 2 five-membered ring structures in CA, however, Ca^{2+} had been only combined strongly with carboxyl-group in CB and CC. Among all of the chelates, the CA possesses the most effective antioxidative activity and the activity is 94% as high as that of α -tocopherol, and only CC possesses the most effective antibacterial activity against *E. coli*, *S. aureus* and *B. subtilis* and the activity depends on the size of the dissolvability in aqueous system and the strength of the electron buffering capability of the electron relaying system for CC. These researches provide a more effective way for the utilization of waste fish proteins and the essential information for the enzymatically hydrolyzed waste fish protein chelating Ca^{2+} as additive in food industry.

Key words: waste fish; enzyme; chelate; antioxidative; antibacterial