

酶解制备金乌贼抗氧化产物的工艺优化及营养评价

徐银峰, 王 斌*, 冯 刚, 罗红宇, 曲有乐
(浙江海洋学院食品与药学学院, 浙江 舟山 316000)

摘 要: 目的: 研究金乌贼蛋白抗氧化酶解产物(antioxidant enzymatic hydrolysate, AEH)的制备和脱苦工艺, 并对其氨基酸组成和营养价值进行评价。方法: 分别以 $\cdot\text{OH}$ 清除率和苦味值为指标, 利用正交试验设计对木瓜蛋白酶制备 AEH 的水解条件及活性炭脱苦工艺进行优化; 利用氨基酸自动分析仪测定 AEH 的氨基酸组成; 以鸡蛋蛋白为标准蛋白和 WHO/FAO 必需氨基酸参考模式为评价标准, 采用氨基酸系数比值法对 AEH 营养价值进行评价。结果: 木瓜蛋白酶的最佳酶解条件为酶用量 1.0%、pH7.0、温度 55℃、酶解时间 5h; 活性炭脱除苦味的最佳工艺为活性炭用量 3.0%, 处理时间 120min, 温度 40℃; 在此处理条件下, AEH 可基本脱除苦味且清除羟自由基活性远高于蛋白粗提物的活性: AEH 粗蛋白含量为 18.07%, 氨基酸种类齐全, 含量为 95.95%, 必需氨基酸占氨基酸总量的 42.00%, 第一限制性氨基酸为缬氨酸, AEH 必需氨基酸指数为 93.7, 谷氨酸等呈味氨基酸占氨基酸总量的 38.68%。结论: AEH 具有很高的营养价值和良好的风味, 是一种理想的补充蛋白源。

关键词: 金乌贼; 抗氧化酶解产物; 木瓜蛋白酶; 脱苦

Preparation Optimization and Nutrition Evaluation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysate from *Sepia esculenta*

XU Yin-feng, WANG Bin*, FENG Gang, LUO Hong-yu, QU You-le
(School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: Objectives: The preparation of antioxidant enzymatic hydrolysate (AEH) from *Sepia esculenta* by papain hydrolysis and the debittering of AEH by activated carbon adsorption were explored. Meanwhile, the nutritional value of AEH was also evaluated. Methods: The hydrolysis of *Sepia esculenta* and the debittering of AEH were optimized by orthogonal array design based on hydroxyl free radical scavenging rate and bitterness sensory score, respectively. The amino acid composition of AEH was determined by means of automatic amino acid analyzer. The nutrition value of AEH was analyzed based on its amino acid and chemical scores, calculated using egg protein as standard protein and the WHO/FAO reference model for essential amino acids as an appraisal criterion (EAA). Results: The optimal enzymatic hydrolysis conditions were hydrolysis temperature of 55 °C, pH 7.0, enzymatic hydrolysis time of 5 h and enzyme amount of 1.0%; the optimal debittering conditions were activated carbon amount of 3.0%, debittering time of 120 min and debittering temperature of 40 °C. The AEH obtained under these conditions with basically no bitterness had even higher hydroxyl free radical scavenging activity than crude protein extract from *Sepia esculenta*. The crude protein content of AEH was 18.07%. Meanwhile, AEH was rich in all kinds of amino acids with a total content of 95.95%. Moreover, essential amino acids (EAA) accounted for 42.00% of the total amino acids. The first limited amino acid was Val. The EAA index was 93.7 when compared with egg. The content of palatable and sweet taste amino acids like glutamic acid accounted for 38.68% of the total amino acids. Conclusion: The AEH has strong antioxidant capacity and high nutrition value and can therefore provide an ideal source of protein supplements.

Key words: *Sepia esculenta*; antioxidant enzymatic hydrolysate (AEH); papain; debittering

中图分类号: TQ936.16

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0068-05

收稿日期: 2010-04-14

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81001393); 浙江省自然科学基金项目(Y2080579; Y2090678);
浙江省优先主题重点项目(2009C03017-2)

作者简介: 徐银峰(1969—), 男, 实验师, 本科, 研究方向为海洋药物。E-mail: xuyf@zjou.edu.cn

* 通信作者: 王斌(1977—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为海洋药物。E-mail: binwang4159@126.com

金乌贼(*Sepia esculenta*)亦称墨鱼、乌鱼、斗鱼、目鱼、梧桐花等,广泛分布于我国沿海,俄罗斯远东海域,日本本州、四国、九州海域,朝鲜西海岸、南海岸海域以及菲律宾群岛海域,其中我国黄、渤海产量较多^[1]。它不仅是中国沿岸渔业的重要捕捞对象,也是一种具有较高经济价值的优良品种。金乌贼不但富含蛋白质、钙、磷、铁,以及钙硒、碘、锰等微量元素,还含有丰富的DHA、EPA和大量牛磺酸,可有效减少血管壁内所累积的胆固醇,对于预防血管硬化、胆结石的形成有很好疗效,同时还能补充脑力、预防老年痴呆症等。因此对容易罹患心血管疾病的中老年人来说,金乌贼是有益健康的食物。金乌贼属于高蛋白低脂肪滋补食品,且必需氨基酸组成接近全蛋蛋白,是一种优质的蛋白来源^[2]。因此,借鉴已有的蛋白酶解工艺和活性肽制备工艺,将有可能从中获得活性显著的功能肽产品,为金乌贼的精深加工提供借鉴的依据。

抗氧化与人类的健康有密切的关系,当人体的抗氧化能力出现障碍如自由基的产生、脂质过氧化、抗氧化酶活力降低等,会导致细胞损伤,引起心脏病、癌症、衰老等多种疾病^[3-4]。因此寻找适当的外源性抗氧化剂清除体内自由基,对治疗疾病和保护人体健康很有益处。已有研究表明,蛋白酶解物具有很好的自由基消除作用^[5-10]。本实验利用正交试验对木瓜蛋白酶解制备金乌贼抗氧化酶解物(antioxidant enzymatic hydrolysate, AEH)的工艺参数和脱苦工艺进行优化,利用氨基酸自动分析仪对AEH的氨基酸组成进行分析,研究结果为金乌贼蛋白抗氧化肽的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金乌贼于2009年10月购于舟山市南珍水产品市场,由浙江海洋学院赵盛龙教授鉴定为金乌贼(*Sepia esculenta*),标本存放于浙江海洋学院药学实验室。木瓜蛋白酶 上海源聚生物科技有限公司进口分装;所用去离子水均为二次蒸馏水;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

8350 氨基酸自动分析仪、U-2800 紫外可见分光光度计 日本日立集团;HD 21C-A 核酸蛋白检测仪 上海康华生化仪器制造有限公司;SC-15 超级恒温槽 宁波江南仪器厂;Anke TDL-40B 离心机 上海安亭科技仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酶解制备 AEH 及脱苦工艺路线

金乌贼经除杂、去骨、去内脏和切块后,按料液比1:1(g/mL)加入磷酸盐缓冲液(pH7.4, 0.02mol/L),高速组织捣碎机匀浆,按照试验设计加入木瓜蛋白酶酶解到预定时间,于90℃加热15min灭酶,离心取上清液,加入活性炭脱苦,离心,上清液经减压浓缩、真空干燥,制得AEH,于-20℃冷冻保存。

1.3.2 木瓜蛋白酶酶解条件的优化

以羟自由基清除率为指标考察单因素酶用量、酶解时间、提取液pH值、温度对木瓜蛋白酶酶解制备AEH的影响。根据单因素试验结果设计正交试验,确定木瓜蛋白酶酶解制备AEH的工艺条件, L₉(3⁴)正交试验设计因素和水平见表1。

表1 酶解制备金乌贼抗氧化产物的正交试验因素水平表
Table 1 Factors and their coded levels used in the orthogonal array design for optimizing AEH preparation

水平	因素			
	A 酶用量 /%	B 酶解 pH	C 酶解温度 /℃	D 酶解时间 /h
1	0.8	6	45	3
2	1.0	7	50	4
3	1.2	8	55	5

1.3.3 抗氧化试验

清除羟自由基能力按照罗红字的方法测定^[11]。取0.7mmol/L 邻二氮菲 1mL 于试管中,依次加入2mL 磷酸盐缓冲液(pH7.4),1mL 蒸馏水,充分混匀后,加入浓度0.75mmol/L 硫酸亚铁 1mL,混匀,加入1mL 质量分数0.12%的H₂O₂,37℃水浴90min,于536nm处测其吸光度,为A_p;用1mL 蒸馏水代替1mL H₂O₂,为A_b;用样品代替1mL 蒸馏水,为A_s。

$$\text{羟自由基清除率} / \% = \frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \times 100$$

1.3.4 AEH 脱苦工艺的正交试验设计

用活性炭对AEH进行脱苦处理,选用活性炭用量、时间、温度等因素做正交试验 L₉(3⁴),确定脱苦条件。

1.3.5 一般营养成分测定方法

水分含量:参照GB 6435—86《饲料中水分的测定方法》;蛋白质含量:参照GB 6432—86《饲料粗蛋白测定方法》;脂肪含量:参照GB 6433—86《饲料粗脂肪测定方法》;灰分含量:参照GB 6438—86《饲料粗灰分测定方法》。

1.4 分析方法

1.4.1 水解产物苦味评价

取1mL AEH 分别加入1、2、3、4、5、6、7、8、9mL 去离子水,混合均匀后,由9名感官评定员从

低浓度到高浓度依次品评,直至尝出苦味为止,取去离子水的添加量为对应的分值^[12]。

1.4.2 AEH 的氨基酸组成分析

氨基酸测定参照舒妙安等^[13]方法进行。样品的前处理采用盐酸水解法:酶解产物粉末烘干后放入试管中,加入 6mol/L 优级纯盐酸,经超声和抽真空后封口于 110℃ 烘箱内水解 24h,水解样品放入蒸发皿蒸干后移入容量瓶定容过滤,然后上机分析。色氨酸采用碱水解法测定。

1.4.3 氨基酸营养评价方法

根据 FAO/WHO 于 1973 年提出的人体必需氨基酸(essential amino acid, EAA)均衡模式和鸡蛋蛋白模式^[14],进行 EAA 评分(amino acid score, AAS)、化学评分(chemical score, CS)和必须氨基酸指数(essential amino acid index, EAAI)的评分。

氨基酸分/%=每克待评蛋白质中 EAA 含量/FAO/WHO 模式中每克蛋白质相应 EAA 含量×100

化学分/%=每克待评蛋白质中 EAA 含量/每克鸡蛋蛋白质中相应 EAA 含量×100

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 AEH 酶解时间对羟自由基清除率的影响

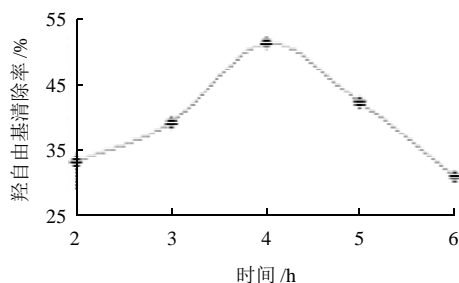


图1 AEH 酶解时间对羟自由基清除率的影响

Fig.1 Effect of hydrolysis time on hydroxyl free radical scavenging rate of AEH

如图1所示,AEH 酶解时间对羟自由基清除率的影响显著。随着酶解时间的延长,AEH 对羟自由基的清除率逐渐增加,4h 的 AEH 对羟自由基清除率达到最高值,而超过 4h AEH 对羟自由基清除率迅速下降。原因可能是水解时间超过 4h,蛋白水解度继续增加,抗氧化肽的含量逐渐减少。因此,酶解时间以 4h 为宜。

2.1.2 AEH 酶用量对羟自由基清除率的影响

如图2所示,随着酶用量的增大,AEH 对羟自由基清除率上升;当酶用量超过 1.0% 时,羟自由基清除率上升趋缓,因此选择酶用量为 1.0%。

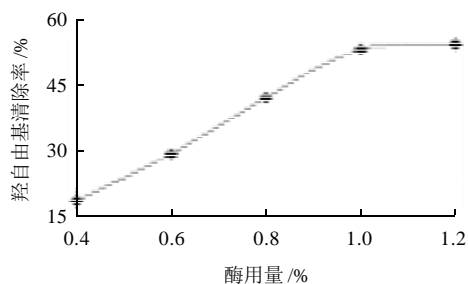


图2 AEH 酶用量对羟自由基清除率的影响

Fig.2 Effect of enzyme amount on hydroxyl free radical scavenging rate of AEH

2.1.3 AEH 酶解温度对羟自由基清除率的影响

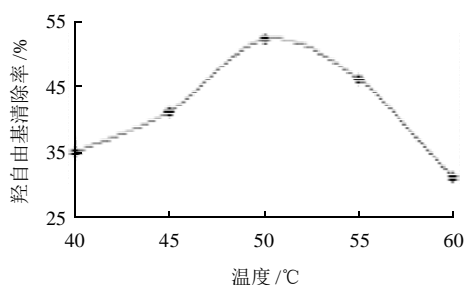


图3 AEH 酶解温度对羟自由基清除率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on hydroxyl free radical scavenging rate of AEH

如图3所示,在一定温度范围内,AEH 对羟自由基清除率受温度影响显著。随着温度的上升,羟自由基清除率逐渐增大。当温度超过 50℃ 时羟自由基清除率开始下降,所以选择酶解温度 50℃。

2.1.4 AEH 酶解 pH 值对羟自由基清除率的影响

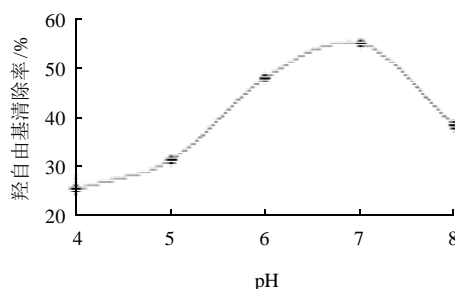


图4 AEH 酶解 pH 值对羟自由基清除率的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis pH on hydroxyl free radical scavenging rate of AEH

如图4所示,对 AEH 羟自由基清除率受酶解 pH 值的影响显著。随着 pH 值的上升,羟自由基清除率逐渐增大。当 pH 值达到 7.0 时羟自由基清除率达到最高值,随后开始下降。所以选择酶解 pH 7.0。

2.2 木瓜蛋白酶水解金乌贼蛋白制备 AEH 的正交试验
为了全面考察影响因素及其交互作用,在单因素试

验及数据分析基础上,以酶用量、酶解温度、pH值、酶解时间为考察因素,每个因素各取3个水平,并以羟自由基清除率为考察指标,做 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表2。从极差(R)值可以看出,各因素对木瓜蛋白酶酶解金乌贼蛋白的影响程度依次为 $B > D > C > A$,即酶解pH值是优化条件中影响最大的因素,加酶量的影响最小,最佳酶解工艺条件为 $A_2B_2C_3D_3$,即酶用量1.0%, pH7.0, 酶解温度55℃, 酶解时间5h。按 $A_2B_2C_3D_3$ 条件进行3次平行试验,羟自由基的清除率达到64.97%,高于表2中每一组试验测定结果,也高于粗提蛋白39.87%的清除率。

表2 木瓜蛋白酶水解金乌贼蛋白制备AEH的正交试验结果

Table 2 Experimental scheme and results of the orthogonal array design for optimizing AEH preparation

试验号	因素				·OH清除率/%
	A 酶用量/%	B 酶解pH	C 酶解温度/℃	D 酶解时间/h	
1	0.8(1)	6(1)	45(1)	3(1)	50.19
2	0.8	7(2)	50(2)	4(2)	59.86
3	0.8	8(3)	55(3)	5(3)	53.10
4	1.0(2)	6	50	5	54.17
5	1.0	7	55	3	64.34
6	1.0	8	45	4	46.57
7	1.2(3)	6	55	4	53.69
8	1.2	7	45	5	64.51
9	1.2	8	50	3	41.71
k_1	54.38	53.68	53.76	51.90	
k_2	55.03	62.90	51.91	53.37	
k_3	53.12	47.13	57.04	57.26	
R	1.91	15.77	3.28	5.36	

2.3 活性炭脱苦试验

通过正交试验得到不同试验条件下,AEH的苦味值,见表3。优选试验方案为 $A_3B_3C_1$,即活性炭用量3.0%、处理时间120min、温度40℃。各因素对AEH苦味的影响次序为活性炭用量>处理时间>温度。

表3 活性炭脱苦正交试验结果

Table 3 Experimental scheme and results of the orthogonal array design for optimizing AEH debittering

试验号	A 活性炭用量/%	B 时间/min	C 温度/℃	苦味值/分
1	2.0(1)	60(1)	40(1)	6.47
2	2.0	90(2)	45(2)	5.93
3	2.0	120(3)	50(3)	5.37
4	2.5(2)	60	45	5.15
5	2.5	90	50	4.66
6	2.5	120	40	3.75
7	3.0(3)	60	50	3.24
8	3.0	90	40	2.54
9	3.0	120	45	1.97
k_1	5.92	4.95	4.25	
k_2	4.52	4.38	4.35	
k_3	2.58	3.79	4.42	
R	3.34	1.16	0.17	

已有研究表明,蛋白短肽中的苦味是由酶解所释放出的疏水性氨基酸残基,特别是长链的芳香族氨基酸残基所致;随着水解反应的进行,疏水性氨基酸侧链暴露增多,苦味也逐渐增强^[14]。从而利用苦味物的疏水性,采用疏水性吸附剂即可脱除苦味。活性炭不仅可以有效去除苦味,而且还可以起到脱色的作用,同时其原料便宜、易于操作和产业化推广,目前在生产中应用较多。本试验研究表明,活性炭用量对苦味的去除具有重要作用,在优化的试验条件下AEH的苦味值可减小到1.74分,苦味基本脱除。

2.4 AEH的一般化学成分

AEH的水分含量为72.16%,粗蛋白质含量为18.07%,粗脂肪为0.97%,灰分为1.25%。提示AEH具有蛋白质含量高,脂肪和灰分含量较低的特点。

2.5 AEH的氨基酸组成

表4 AEH的氨基酸组成与含量

Table 4 Amino acid composition analysis of the AEH obtained under optimized preparation and debittering conditions

氨基酸	粗蛋白AEH中含量/(mg/g)	氨基酸	粗蛋白AEH中含量/(mg/g)
Glu Δ	150.3 \pm 0.05	Pro	41.2 \pm 0.07
Asp Δ	105.4 \pm 0.10	Ser	42.4 \pm 0.04
Trp*	9.80 \pm 0.02	Thr*	45.4 \pm 0.06
Arg	67.1 \pm 0.04	Phe*	38.4 \pm 0.18
Ala Δ	65.1 \pm 0.13	Tyr*	36.4 \pm 0.11
Leu*	72.9 \pm 0.06	Val*	36.0 \pm 0.07
Lys*	69.4 \pm 0.07	Met*	34.7 \pm 0.14
Gly Δ	50.3 \pm 0.04	His	32.7 \pm 0.06
Ile*	48.8 \pm 0.19	Cys*	11.2 \pm 0.09
鲜味氨基酸	255.7	甘味氨基酸	115.4
EAA	403.0	总氨基酸	959.5

注:*,EAA; Δ ,DTAA。

对AEH进行氨基酸组成分析,结果见表4。AEH中含有Thr、Val、Leu、Ile、Phe、Lys和Met等人体EAA,EAA含量占氨基酸总量的42.00%。AEH中EAA与非必需氨基酸(NEAA)的比值为72.41%。根据FAO/WHO的理想模式,优质蛋白质其EAA与总氨基酸的比值为40%左右、EAA与NEAA的比值60%以上。由此可见,AEH氨基酸组成符合理想模式。另外,Asp和Glu是呈鲜味氨基酸,含量占总量的26.65%;Ala和Gly是呈甘味氨基酸,它们的含量占总量的12.03%;这4种呈味氨基酸(DTAA)占氨基酸总量的38.68%,共同赋予了AEH良好的海鲜风味。此外,Lys和Arg含量也很高,在促进儿童生长发育过程中具有重要作用。

一种营养价值较高的食物蛋白质不仅所含的EAA种类要齐全,而且EAA之间的比例也要适宜,最好能与人体需要相符合,这样EAA吸收最完全,营养价值最高。从表5可知,AEH中第一限制性氨基酸为Val,第

二限制性氨基酸为 Trp。除 Trp 和 Val 外,均高于 100,并且总量也超过 FAO/WHO 计分模式,说明 AEH 中 EAA 含量符合 FAO/WHO 模式。从化学分看,第一限制性氨基酸为 Trp,第二限制性氨基酸为 Val、Ile 等 4 种,其值接近或高于 100,平均值为 104.05; Met 等 4 种 EAA 低于 100,平均值为 92,即 AEH 的 EAA 与鸡蛋 EAA 比较接近,但部分氨基酸含量也存在一定差异。AEH 的 EAA 指数 (EAAI) 为 93.7。综合分析,AEH 是一种优质的蛋白源。另外,人们常食用的大米、小麦等食物最缺乏的一般都是 Lys、Met 和 Ser, Lys 常列为人体主要的限制性氨基酸。因此,AEH 中赖氨酸的高含量正好与人们常食用的食物起到蛋白质互补作用,以弥补大米、小麦等食物蛋白质的不足,提高蛋白质的利用价值。

表 5 AEH 中 EAA 含量与鸡蛋和 FAO/WHO 模式的比较

Table 5 Comparisons of EAA contents of AEH, egg and FAO/WHO model

氨基酸	FAO/WHO 模式/(mg/g)	鸡蛋/ (mg/g)	AEH/(mg/g 粗蛋白)	氨基酸分	化学分
Ile	40	49	48.8	122.0	99.6
Leu	70	66	72.9	104.1	110.5
Lys	55	66	69.4	126.2	105.2
Met + Cys	35	47	45.9	131.1	97.7
Phe + Tyr	60	86	74.8	124.7	87.0
Thr	40	45	45.4	113.5	100.9
Trp	10	17	9.8	98.0**	57.6*
Val	50	54	36.0	72*	66.7**

注: *.第一限制氨基酸; **.第二限制氨基酸。

3 结 论

本实验利用正交试验设计对木瓜蛋白酶水解金乌贼蛋白的酶解条件及活性炭脱苦工艺进行优化,并通过正交试验得到最佳酶解工艺,酶用量 1.0%、pH7.0、酶解温度 55℃、酶解时间 5h。最佳的脱苦工艺为活性炭用量 3.0%、处理时间 120min、温度 40℃。在此处理条件下,AEH 的苦味值达 1.74 分,苦味基本脱除,而且 AEH 具有较高的清除羟自由基的作用。AEH 的蛋白含量 18.07%,氨基酸组成分析表明,该产物富含 Lys

等人体 EAA, EAA 含量占氨基酸总量的 39.26%; Glu 等呈味氨基酸占游离氨基酸总量的 38.83%,赋予了 AEH 较高的营养价值和良好的风味。本实验证明 AEH 具有很好的抗氧化活性和很高的营养价值,为今后进一步开发利用金乌贼蛋白提供理论支持。

参考文献:

- [1] 郝振林,张秀梅,张沛东.金乌贼的生物学特性及增殖技术[J].生态学杂志,2007,26(4):601-606.
- [2] 樊甄姣,吕振明,吴常文,等.野生金乌贼蛋白质和脂肪酸成分分析与评价[J].营养学报,2009,31(5):513-515.
- [3] 王新,何玲玲,刘彬.苦丁茶冬青叶多糖的分离纯化及其对羟自由基的清除作用[J].食品科学,2008,29(6):37-40.
- [4] 展锐,库尔班,苟萍.火绒草提取物抗氧化活性的研究[J].食品科学,2010,31(3):153-159.
- [5] HSU K C. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product [J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 42-48.
- [6] KIM S K, KIM Y T, BYUN H G, et al. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(4): 1984-1989.
- [7] 王志兵,邱芳萍,解耸林.鹿角盘蛋白多肽的制备与活性研究[J].中国食品学报,2008,8(3):28-32.
- [8] 谢超,邓尚贵,夏松养,等.带鱼(*Trichiurus lepturus*)下脚料蛋白水解物的成分分析及抗高血脂功效的研究[J].海洋与湖沼,2009,40(3):307-312.
- [9] JE J Y, PARK P J, KIM S K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate [J]. Food Research International, 2005, 38(1): 45-50.
- [10] BOUGATEF A, NEDJAR-ARROUME N, MANNI L, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins[J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 559-565.
- [11] LUO H Y, WANG B, YU C G, et al. Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2010, 4(18): 2557-2565.
- [12] 靳挺,武玉学,吴天星.酶法制备龙头鱼水解蛋白的研究[J].中国食品学报,2009,9(1):22-28.
- [13] 舒妙安,马有智,张建成.黄鳍肌肉营养成分的分析[J].水产学报,2000,24(4):339-344.
- [14] 中国预防医学科学院,营养与食品卫生研究所.食物成分表(全国代表值)[M].北京:人民卫生出版社,1995.
- [15] 何慧,王进,裴凡,等.蛋白质水解物与苦味的构效关系及脱苦研究[J].食品科学,2006,27(10):571-574.