

响应面法优化香港巨牡蛎蛋白酶解工艺的研究

徐 艳¹, 孙雪萍¹, 张秀国², 杨家林¹, 黄国强¹, 张 琴¹

(1. 广西海洋研究所 海洋生物技术重点实验室, 广西 北海 536000; 2. 北京航空航天大学北海学院, 广西 北海 536000)

摘要: 以水解度为指标, 比较了 6 种蛋白酶对香港巨牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 的水解效果。在单因素考察实验的基础上, 采用 Box-Behnken 模型响应面设计, 建立香港巨牡蛎蛋白酶解的二次回归模型, 确定最佳的水解条件。实验结果表明, 海产品专用蛋白酶对香港巨牡蛎蛋白的水解效果优于其他蛋白酶, 该酶的最佳水解条件为: 酶与底物比为 5.93%, 酶解时间为 4.07 h, 酶解温度为 54.6 °C。在此条件下, 海产品专用蛋白酶酶解香港巨牡蛎蛋白的水解度达到 25.73% ± 2.39%。本研究为香港巨牡蛎的开发和利用提供了理论依据。

关键词: 香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*); 水解度; 响应面分析

中图分类号: TS254.1 Q516 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)03-0042-06

doi: 10.11759/hyxx20140609001

牡蛎(*Ostrea rivularis* Gould) 属贝类, 又名蚝、别称海蛎子, 是一种极珍贵的海产软体动物。我国牡蛎的主要种类有近江牡蛎、褶牡蛎、密鳞牡蛎、大连湾牡蛎和长牡蛎等, 广泛分布在广东、福建、山东等沿海^[1]。牡蛎肉质鲜美, 含有丰富的蛋白质、糖原、氨基酸, 以及功能性多肽、维生素和矿物质等营养成分, 在西方亦有“Sea Milk”之美称^[2], 具有巨大的食用价值和药用价值^[3], 是我国卫生部第一批批准的既是药材又可作为食品的保健品^[4]。牡蛎离水后死亡快、不耐冻, 且容易被微生物污染, 保鲜、贮藏技术难度大, 传统加工制品有牡蛎干和蚝油等^[5]。近年来随着人工养殖牡蛎技术的改善和产量的提高, 加之人们对牡蛎丰富的营养价值、特异的生理活性功能的消费追求增加, 传统加工模式已不能与发展“蓝色海洋经济”的时代旋律相协调, 严重制约了行业的发展。对牡蛎进行高值化的开发利用, 有助于推动我国海洋产业的迅速发展^[6]。

牡蛎含有大量营养活性物质^[2], 关于牡蛎天然药物的开发、利用研究已成为国内外的研究热点。已有研究^[7, 8]表明, 牡蛎水解蛋白生物活性肽具有抗菌、降血压^[9]和抗氧化能力^[10]等生物活性。早期利用酸、碱对生物蛋白进行水解, 由于其安全性差、产物功效丧失显著、营养成分损失等问题, 已逐渐被生物蛋白酶技术所取代。利用现代酶制剂对牡蛎进行适度、定向酶解处理, 可制备特定分子质量大小的生物活性肽、氨基酸, 提高原料消化吸收率和利用率, 增

加其营养价值和生物活性功能^[2]。

广西钦州素有“大蚝之乡”的美誉, 盛产香港巨牡蛎, 是制备生物活性肽的良好原料。本研究采用响应面分析法优化了钦州香港巨牡蛎的蛋白酶解工艺, 以期在香港巨牡蛎的开发和利用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

新鲜牡蛎由钦州市海华蚝业科技开发有限公司提供, 取肉, 干燥, 粉碎后过 80 目筛备用; 三硝基苯磺酸 (TNBS), 购自 Sigma 公司; 蒸馏水; 0.1 mol/L HCl 溶液; 1% 十二烷基硫酸钠溶液; 0.2125 mol/L pH 8.2 磷酸缓冲溶液; 20 g/L 硼酸; 40% NaOH(质量比); 甲基红指示剂。胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、Alcalase、复合蛋白酶 (Protamex)、风味蛋白酶 (Flavourzyme) 和海产品专用蛋白酶购自诺维信生物技术有限公司; 其余试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

DK-S24 电热恒温浴锅(上海精宏实验设备有限

收稿日期: 2014-06-09; 修回日期: 2014-06-26

基金项目: 广西科学院基本科研业务费资助项目(13YJ22HYS15); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 09321004)

作者简介: 徐艳(1981-), 女, 山东临沂人, 助理研究员, 硕士, 主要从事海洋天然产物研究, 电话: 0779-2052295; E-mail: xuyango528@163.com; 孙雪萍, 通信作者, 电话: 0779-2075089, E-mail: 690917809@qq.com

公司、太仓精密仪器设备有限公司); SPECTRA MR 酶标仪(DYNEX); 美的微波炉(广州美的微波炉制造有限公司); FA1004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司); 氮磷钙测定仪(上海洪纪仪器设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白含量的测定^[11]

采用凯氏定氮法测定香港巨牡蛎的蛋白含量为 $63.5\% \pm 6.44\%$ 。

1.3.2 水解用酶的筛选

取 1.5 g 香港巨牡蛎蛋白粉, 加入 30 mL 水, 按照表 1 中 6 种蛋白水解酶(胃蛋白酶, 木瓜蛋白酶, Alcalase, 复合蛋白酶, 风味蛋白酶和海产品专用蛋白酶) 最适应的酶解条件进行酶解, 酶与底物比设定为 5%, 搅拌酶解 4 h 后, 开水煮沸 10 min 灭酶, 4 000 g 离心 10 min, 取上清液测定水解度。

表 1 6 种蛋白水解酶最适宜的反应条件

Tab.1 The optimal experimental conditions of six enzymes

酶	pH	温度(°C)
胃蛋白酶	2	37
木瓜蛋白酶	6	60
Alcalase	8.5	50
复合蛋白酶	7	50
风味蛋白酶	6	50
海产品专用蛋白酶	7	55

1.3.3 水解度的测定^[12]

取水解上清液 0.5 mL, 并加入 1% SDS 2.5 mL 进行稀释。取稀释液 15 μ L, 再依次加入 1% SDS 35 μ L, pH 8.2 磷酸缓冲溶液 1 000 μ L, 0.1% 三硝基苯磺酸(TNBS)500 μ L。混匀后置于 50 °C 烘箱中避光反应 1 h。加 0.1% HCl 2 mL 终止反应, 室温静置 30 min。在 340 nm 处测定吸光值。以赖氨酸为参照制作标准曲线。按照下式计算水解度 (DH, Degree of Hydrolysis)。

水解度=

$$\frac{\text{水解后的游离氨基浓度} - \text{水解前的游离氨基浓度}}{\text{总肽键浓度}} \times 100\%$$

总肽键数=水解液蛋白浓度 $\times h_{\text{tot}}$ (底物中肽键总数, 由氨基酸分析结果得到香港巨牡蛎每克蛋白所含肽键数为 9.6 mmol/g)

1.3.4 单因素考察

在确定水解用酶的基础上, 进行了酶与底物比 (E/S , 质量比), 酶解时间和酶解温度的单因素考察。

取香港巨牡蛎蛋白 1.5 g, 加入 30 mL 水, 按照不同酶与底物比 (E/S , 3%, 4%, 5%, 6%, 7%), 55 °C 搅拌酶解 4 h 后, 开水煮沸 10 min 灭酶, 4000 g 离心 10 min, 取上清液测定水解度。

取香港巨牡蛎蛋白 1.5 g, 加入 30 mL 水, 按照 E/S 为 6%, 55 °C 搅拌酶解不同时间(2, 3, 4, 5, 6 h), 开水煮沸 10 min 灭酶, 4 000 g 离心 10 min, 取上清液测定水解度。

取香港巨牡蛎蛋白 1.5 g, 加入 30 mL 水, 按照 E/S 为 6%, 在不同温度下(30, 40, 50, 60, 70 °C) 搅拌酶解 5 h 后, 开水煮沸 10 min 灭酶, 4 000 g 离心 10 min, 取上清液测定水解度。

1.3.5 响应面分析实验设计

采用 Design Expert 8.05 软件, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 以水解度为响应值, 在单因素试验结果基础上, 综合考虑实际生产的需要, 选取了酶与底物比 (E/S), 酶解时间和酶解温度进行响应面实验设计, 见表 2。

表 2 响应面实验因素水平表

Tab.2 Factors and levels of RSM experiment

水	因素		
	X_1 (E/S , %)	X_2 (酶解温度, °C)	X_3 (酶解时间, h)
-1	5	50	4
0	6	55	5
1	7	60	6

1.3.6 统计分析

重复 3 次试验, 结果取其平均值。采用 Design Expert 8.05 软件对数据进行响应面分析, 包括显著性差异分析、方差分析以及最佳实验条件和最佳响应值预测。

2 结果与讨论

2.1 水解用酶的筛选

由图 1 可知, 6 种蛋白水解酶对香港巨牡蛎蛋白水解效果相差较大。胃蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解效果较差。Alcalase、复合蛋白酶和风味蛋白酶水解效果较好。海产品专用蛋白酶的水解效果最佳, 水解度达到 $23.63\% \pm 3.16\%$ 。因此选择海产品专用蛋白酶用于水解香港巨牡蛎蛋白。

2.2 单因素考察

由图 2 可知, 随着 E/S 比例的升高, 水解度随

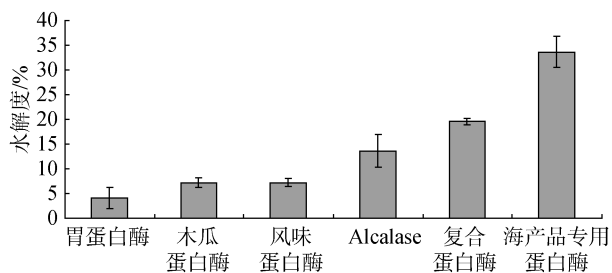


图 1 6 种蛋白水解酶对香港巨牡蛎蛋白的水解效果

Fig. 1 Comparison of *C. hongkongensis* protein hydrolysis by six proteases

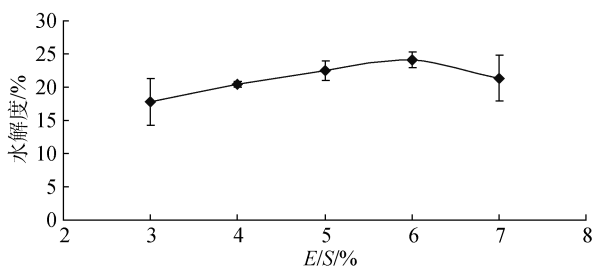


图 2 E/S 对水解度的影响

Fig. 2 Effect of E/S on hydrolytic degree

之升高。但是当 E/S 超过 6% 时, 水解度出现下降的趋势, 可能是由于酶浓度逐渐为底物所饱和的原因, 因此选择 E/S 为 5%~7% 作为响应面考察的范围。

由图 3 可知, 牡蛎蛋白的水解度随着时间的增多而增大, 当到达某一值后则不在发生变化。2~5 h 之间, 水解度逐渐上升, 而在 5~6 h 之间水解度有所下降。这说明了在 5 h 左右时牡蛎蛋白基本水解达到平衡, 因此选择 4~6 h 作为考察范围。

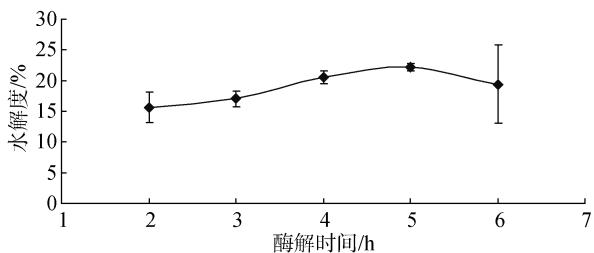


图 3 酶解时间对水解度的影响

Fig. 3 Effect of time on hydrolytic degree

由图 4 可知, 随着温度的不断上升, 牡蛎蛋白的水解度先上升而后下降。在 30~50 °C 之间牡蛎蛋白的水解度上升明显, 当 50~60 °C 之间牡蛎蛋白的水解度降低, 虽然温度升高能够提高化学反应的速率, 但是酶是一种具有催化活性的蛋白质, 温度过高会导致其部分失去催化活性, 从而会减低酶促反应速

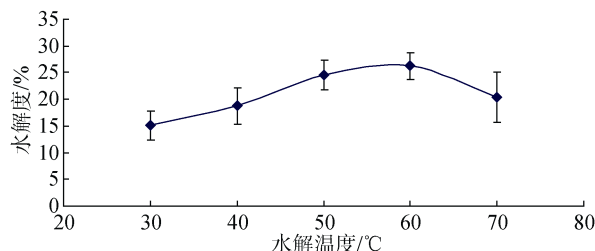


图 4 酶解温度对水解度的影响

Fig. 4 Effect of temperature on hydrolytic degree

率, 因此选择 50~60 °C 作为考察范围。

2.3 响应面实验设计分析及结果

2.3.1 模型建立及显著性差异分析

利用 Design-expert 软件对表 2 的数据进行多元回归拟合, 得到水解度(Y)对酶与底物比(X_1), 酶解时间(X_2) 和酶解温度(X_3)的多元二次回归模型为:

$$Y = 25.85 - 0.34X_1 - 0.29X_2 - 0.24X_3 - 0.33X_1X_2 - 0.090X_1X_3 - 0.055X_2X_3 - 1.60X_1^2 - 1.35X_2^2 - 0.12X_3^2$$

由表 3 可知, X_1 和 X_2 的二次项达到极显著水平。同时由 F 值可以看出, 在酶与底物比, 酶解时间和酶解温度这 3 个因素中, 酶与底物比对水解度的影响最大, 其次为酶解温度和时间。同时由方差分析可以看出, 回归模型的 P 值为 0.007 2, 表明回归模型显著。失拟项的 P 值为 0.947 1, 表明失拟误差相对于纯误差是不显著的, 同时该模型具有较好的回归系数 ($R^2=0.906 4$), 说明该实验设计是可靠的, 能够很好地描述实验结果, 使用回归方程代替真实的实验点进行香港巨牡蛎蛋白酶解的分析和预测是可行的。

2.3.2 响应面直观分析

响应面分析图是响应面面对各实验因素所构成的三维空间的曲面图, 从响应面分析图上可以看出最佳参数及各参数之间的相互作用。

由图 5A 和图 5a 可知, 酶与底物比的变化对水解度的影响高于酶解温度, 在两个因素的全值变化范围内, 水解度均呈现先增加后降低的趋势, 两者的交互作用在图形中反映出适宜的条件会使水解度到达最大值, 但是过高或过低都会使水解度降低。由图 5B 和图 5b 可知, 酶与底物比和酶解时间对水解度的影响不大, 在两个因素的全值变化范围内, 水解度随酶与底物比的增加呈现先增加后降低的趋势, 随着酶解时间的不断延长, 水解度趋于平稳, 在图 5C 和图 5c 中, 也可以观察到同样的变化趋势。

综合以上单因素及响应面分析实验结果, 使用 Design-expert 软件, 得到最佳的酶解条件如下: 酶

表 3 Box-Behnken 试验设计及结果

Tab.3 Experimental design and results of Box-Behnken

实验号	X_1 (E/S, %)	X_2 (酶解温度, °C)	X_3 (酶解时间, h)	Y (DH, %)
1	5	50	5	23.04
2	7	50	5	23.22
3	5	60	5	23.23
4	7	60	5	22.11
5	5	55	4	24.81
6	7	55	4	24.11
7	5	55	6	24.33
8	7	55	6	23.27
9	6	50	4	24.83
10	6	60	4	24.22
11	6	50	6	24.64
12	6	60	6	23.81
13	6	55	5	26.24
14	6	55	5	26.56
15	6	55	5	25.89
16	6	55	5	24.64
17	6	55	5	25.93

表 4 响应面回归方程方差分析

Tab.4 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	$P > F$ 值
模型	22.37	9	2.49	7.53	0.0072
X_1	0.91	1	0.91	2.76	0.1406
X_2	0.70	1	0.70	2.11	0.1898
X_3	0.46	1	0.46	1.40	0.2760
X_1X_2	0.42	1	0.42	1.28	0.2952
X_1X_3	0.032	1	0.032	0.098	0.7632
X_2X_3	0.012	1	0.012	0.037	0.8536
X_1^2	10.76	1	10.76	32.59	0.0007
X_2^2	7.71	1	7.71	23.36	0.0019
X_3^2	0.064	1	0.064	0.19	0.6725
残差	2.31	7	0.33		
失拟项	0.18	3	0.061	0.115	0.9471
净误差	2.13	4	0.53		
总离差	24.68	16			

与底物比为 5.93%，酶解时间为 4.07 h，酶解温度为 54.6 °C，预期达到的水解度为 25.98%。考虑时间生产情况，最佳酶解条件修正为：酶与底物比为 5.9%，酶解时间为 4 h，酶解温度为 54 °C。按照确定的最佳酶解条件进行酶解验证试验($n=3$)，所得的实际水解度为 25.73% ± 2.39%，说明所建立的实验模型能够真实地反映三因素对于复合蛋白酶酶解香港巨牡蛎蛋白的影响，所得到的酶解工艺可靠稳定。

3 结论

本研究通过单因素考察和响应面分析法，研究了酶与底物比，酶解时间和酶解温度对香港巨牡蛎蛋白水解的影响。通过 Box-Behnken 设计响应面法建立三因素三水平的响应面分析实验，经过优化得到最佳酶解条件。采用海产品专用蛋白酶酶解，酶与底物比为 5.9%，酶解时间为 4 h，酶解温度为 54 °C。在此条件下，水解度达到 25.73% ± 2.39%，说明该酶解工艺稳定可靠，对实际生产具有指导意义，但对该酶解液的分子质量分布及其生物活性等还有待于进一步研究。

酶解物的活性与水解度、分子质量等特性有关，进而很多学者以之作为衡量酶解效果的主要指标^[13-15]。一般来说，酶解物的水解度随酶解程度的增加而增加，而分子量随之减小，酶解物活性显著增加，然而酶解达到一定程度之后，产物活性反而随着反应的进行而有所下降，这是因为随着酶解程度的提高，酶解物中有活性的短肽被分解成氨基酸或其活性基团被破坏，从而导致产物活性下降。因此，制备活性肽时需严格控制酶解条件，既要保证蛋白质能够充分酶解，使更多的活性肽段被水解出来，同时又要适当控制酶解程度，获得较高活性的产物。

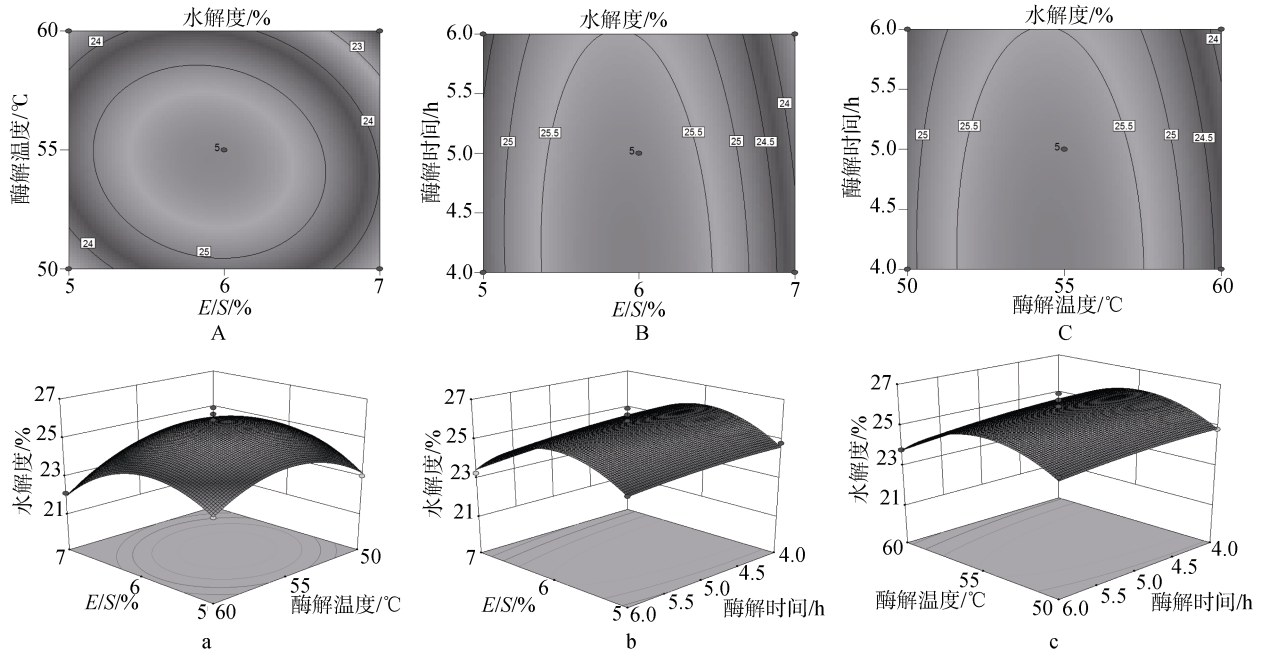


图 5 三因素的等高线图及响应面三维分析图

Fig. 5 Three-dimensional chart and corresponding contour plot

参考文献:

[1] 腾瑜, 王彩理. 牡蛎的营养和降糖作用研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 39-44 .

[2] 王亮, 杜卫华, 孙金才, 等. 牡蛎肉双酶复合水解工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(3): 97-100 .

[3] 腾瑜, 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, 18(1): 112-116 .

[4] 叶盛权, 吴晖, 赖富饶, 等. 牡蛎酶解过程的成分变化及脱腥初步研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3): 262-265 .

[5] 陶晶, 杨瑞金, 张文斌, 等. 牡蛎净化工艺的研究[J]. 食品科技, 2008, 7: 108-112 .

[6] 欧成坤. 酶法制备牡蛎生物活性肽新工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.

[7] Jung K S, Min J L, Hye J G, et al . Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Molecular Immunology, 2013, 53(1/2): 88-98 .

[8] Liu Z Y, Zeng M Y, Dong S Y, et al. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvested strawberries[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 46(1): 95-98 .

[9] Wang J P, Hu J N, Cui J Z, et al . Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 302-308 .

[10] Qian Z J, Jung W K, Byun H G, et al . Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3365-3371 .

[11] 杨涛, 万端奇, 吴正奇, 等. 海参内脏制备海参多肽工艺优及其抗氧化测定[J]. 食品科技, 2014, 39(3): 218-222 .

[12] Cian R E, Martínez-Augustin O, Drago S R . Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina* [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 364-372 .

[13] Je J Y, Park P J, Byun H G, et al . Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis* [J]. Bioresource Technology, 2005, 96 (14): 1624-1629 .

[14] 朱凤仙, 戴志远, 张燕平, 等. 酶解制备水产动物活性肽研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(11): 159-162 .

[15] 张莉莉, 严群芳, 王恬, 等. 大豆生物活性肽的分离及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 208-210 .

Improvement of *Crassostrea hongkongensis* hydrolysis by Response Surface Methodology

XU Yan¹, SUN Xue-ping¹, ZHANG Xiu-guo², YANG Jia-lin¹, HUANG Guo-qiang¹, ZHANG Qin¹

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai 536000, China;
2. Beihai College of Beihang University, Beihai 536000, China)

Received: Jun., 9, 2014

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; Degree of hydrolysis; Response surface methodology (RSM)

Abstract: Using DH (the degree of hydrolysis) as the main index, the hydrolysis of *Crassostrea hongkongensis* using six proteases was compared. On the basis of single factor experiment, response surface methodology and Box-Behnken model were employed to establish the quadratic model for optimization of the hydrolysis conditions. Results showed that the DH of marine products protein-specific protease was higher than that of others. The optimum hydrolysis condition was as follows: the ratio of enzyme to substrate was 5.93%, hydrolysis time was 4.07 h and the hydrolysis temperature was 54.6 °C. Under this condition, DH reached 25.73%±2.39 %. This study aims to provide theoretical basis for the development and utilization of *C. hongkongensis*.

(本文编辑: 康亦兼)