

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)不同组织中蛋白酶的分布及冷藏过程中酶活力与鲜度变化*

章 骞^{1,2} 陈 宏¹ 阙华勇^{2,3} 李钰金⁴ 孙乐常^{1,2}

翁 凌^{1,2} 张凌晶^{1,2} 刘光明^{1,2} 曹敏杰^{1,2}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院 厦门 361021; 2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心 厦门 361021;
3. 集美大学水产学院 厦门 361021; 4. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003)

摘要 以长牡蛎(*Crassostrea gigas*)为研究对象,采用酶活力测定和 Western blotting 鉴定牡蛎不同组织中氨肽酶、胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶、组织蛋白酶等几种主要蛋白酶的分布,探讨牡蛎肉在 4 °C 冷藏过程中酶活力和鲜度指标的变化规律。结果显示:在牡蛎的外套膜、鳃、闭壳肌和性腺-内脏团四种组织中,亮氨酸氨肽酶、丙氨酸氨肽酶、精氨酸氨肽酶均有较高酶活力;胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶主要分布于性腺-内脏团,在另外三种组织中活性较低;组织蛋白酶 B 和 B+L 绝大部分在性腺-内脏团中表达。在 4 °C 冷藏过程中,酶活力发生明显变化,经 7 d 冷藏后,性腺-内脏团中亮氨酸氨肽酶的酶活力为初始值的 25.15%,丙氨酸氨肽酶的酶活力为初始值的 31.65%,精氨酸氨肽酶的酶活力为初始值的 23.19%;组织蛋白酶 B 和 B+L 的酶活力分别是初始值的 2.59 和 4.23 倍;胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶酶活力上升 44%。随着冷藏时间的延长,牡蛎的鲜度指标发生变化:牡蛎 pH 值呈现先降低,9 d 后上升的趋势;氨基酸态氮含量由初始的(0.26±0.05) g/100g 增加至第 7 d 的(0.31±0.03) g/100g;挥发性盐基氮含量从(5.60±0.64) mg/100g 上升至第 7 d 的(17.50±0.37) mg/100g;SDS-PAGE 分析显示,牡蛎冷藏过程中四种组织的蛋白质均发生了不同程度的降解。本研究揭示了牡蛎在短期冷藏过程中几种主要蛋白酶和鲜度指标的变化规律,为牡蛎的冷藏保鲜提供了参考。

关键词 长牡蛎;酶;冷藏;鲜度;蛋白质降解

中图分类号 Q956; S984 **doi:** 10.11693/hyh20210100016

牡蛎又名蚝,其肉质鲜嫩,营养丰富,在我国沿海地区均有养殖。2019 年我国牡蛎产量达 523 万 t,已成为海水养殖产量最大的主养品类,也是为数不多的保持量效齐增的主养水产品种(张国范等, 2020)。牡蛎加工产品主要有生鲜品、冻品、干制品、罐制品、调味品、休闲即食产品以及活性肽(何定芬等, 2020)、活性多糖(Cheong *et al*, 2017)等功能食品。

生鲜牡蛎肉保留了牡蛎原有的口感和营养,颇受消费者喜爱。牡蛎采收后,在开壳取肉、贮运、销

售等环节,应在低温(0—4 °C)下进行,而且冷藏保鲜时间不宜超过 7 d 才能保持其良好的品质。得益于我国低温贮藏和冷链技术的发展,牡蛎肉的保鲜期得到延长,消费地域也不断扩大。在低温冷藏过程中,影响牡蛎肉品质的主要因素有内源酶和微生物作用引起的糖原酵解、ATP 降解、蛋白质降解以及脂肪氧化导致的风味下降等。内源性蛋白酶以及微生物繁殖产生的胞外酶的作用会分解牡蛎肌肉蛋白质,导致肌肉组织破坏,而蛋白质分解产物——肽、氨基酸和

* 国家重点研发计划,2018YFD0901004 号;财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助。章 骞,硕士,实验师, E-mail: zhangqian@jmu.edu.cn

通信作者:曹敏杰,博士,教授, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

收稿日期:2021-01-17, 收修改稿日期:2021-04-13

低分子含氮化合物浓度的上升,为微生物的进一步生长繁殖提供了有利条件(章超桦等, 2014)。关于牡蛎的冷藏保鲜,已有较多研究报道。基于微生物分析,研究了壳聚糖在牡蛎冷藏期间的抗菌作用(Cao *et al.*, 2009),冰藏过程中牡蛎不同组织中 ATP 相关产物的变化情况也有报道(Yokoyama *et al.*, 1992),采用顶空固相微萃取和主成分分析法鉴定出贮藏过程中新鲜和劣化牡蛎的挥发性成分及其分布特征(Zhang *et al.*, 2009),不同冷冻方式和保鲜剂处理对牡蛎品质的影响也被作了比较研究(Songsaeng *et al.*, 2010)。

水产动物肌肉中含有多种蛋白酶类,如鱼类死亡后由僵直进入软化自溶过程中,对肌肉蛋白降解和游离氨基酸积累起重要作用的酶类主要有组织蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、氨肽酶等(章超桦等, 2018)。我国牡蛎产量逐年增加,消费区域不断扩大,但是,牡蛎在冷藏过程中蛋白质的变化及与其密切相关的蛋白酶活力变化尚未有相关报道。

本研究以长牡蛎为实验材料,比较牡蛎四种不同组织(外套膜、鳃、闭壳肌和性腺-内脏团)中主要蛋白酶类的分布情况,探明牡蛎肉在 4 °C 冷藏过程中酶活力和鲜度指标变化规律,旨在从内源性蛋白酶的角度揭示牡蛎肉在短期(7 d)低温冷藏过程中鲜度变化的机理,为牡蛎的保鲜贮藏提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2019年3月,从福建省厦门市夏商国际水产交易中心采购鲜活长牡蛎(*Crassostrea gigas*) [长(10.55±0.82) cm,宽(5.34±0.38) cm,带壳重(98.73±8.42) g],低温运送回实验室。

兔抗真鲷亮氨酸氨肽酶多克隆抗体(Wu *et al.*, 2008)、兔抗鲍组织蛋白酶 L 多克隆抗体(Shen *et al.*, 2015)由本实验室制备;标准蛋白、二硫苏糖醇(DTT)(采购自美国 Bio-Rad 公司);乙二胺四乙酸(EDTA)(采购自美国 Sigma 公司);氨肽酶荧光底物(Leu-MCA, Ala-MCA, Arg-MCA)、胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶荧光底物(Boc-Phe-Ser-Arg-MCA)、组织蛋白酶荧光底物(Z-Phe-Arg-MCA, Z-Arg-Arg-MCA)(采购自日本 Peptide Institute 公司);其他试剂购于国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯级别。

1.2 仪器与设备

本研究用到主要仪器包括:PT-2100 组织捣碎机(瑞士 Kinematica 公司);WB-14 恒温水浴锅(德国

Memmert 公司);Bio Photometer 紫外分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司);Avanti JA-26.5 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);Agilent 高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司);pH 计(德国 Sartorius 公司);FP-8200 荧光分光光度计(日本 Jasco 公司);Mini-PIII 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);G-BOX 凝胶成像系统(英国 Syngene 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理 新鲜长牡蛎人工开壳取肉后用预冷海水清洗,沥干,随机分成 21 组,每组 5 只,并用密封袋包装,置于(4.0±0.5) °C 冷库冷藏。

1.3.2 蛋白酶活力的测定 取 4 °C 冷藏 0、1、2、3、5、7 d 牡蛎的四种不同组织(外套膜、鳃、闭壳肌和性腺-内脏团),分别加入 4 倍的冰冷蒸馏水,组织捣碎,离心(10 000×g, 15 min, 4 °C)取上清液,分别进行酶活力测定,分析牡蛎不同组织中蛋白酶的分布。

氨肽酶(Aminopeptidase, AP)酶活力测定参照 Zhang 等(2013)的方法,并作适当修改。取 50 μL 上清液与 900 μL 25 mmol/L PBS (pH 7.0, 含 1mmol/L DTT)混合,置于 37 °C 恒温水浴锅中,加入 50 μL 10 μmol/L 的荧光底物(Leu-MCA, Ala-MCA, Arg-MCA)混匀。胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶(Serine Proteinase, SP)活力测定参照 Cao 等(1999)的方法。取 50 μL 上清液与 900 μL 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)混合摇匀,置于 37 °C 恒温水浴锅中,加入 50 μL 10 μmol/L 的荧光底物(Boc-Phe-Ser-Arg-MCA)混匀。组织蛋白酶(Cathepsin)活力测定参照 Barrett 等(1981)的方法。取 50 μL 上清液与 900 μL 25 mmol/L PBS (pH 6.0, 含 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA)混合,置于 37 °C 恒温水浴锅中,加入 50 μL 10 μmol/L 的荧光底物(组织蛋白酶 B+L 的荧光底物为 Z-Phe-Arg-MCA, 组织蛋白酶 B 的荧光底物为 Z-Arg-Arg-MCA)。以上各体系均在对应的温度和 pH 下反应 30 min 后,立即加入 1.5 mL 终止液(甲醇:异丙醇:水=35:30:35, 体积分数)终止反应。用荧光分光光度计在激发波长 380 nm 和发射波长 450 nm 下测定反应释放的 7-氨基-4-甲基香豆素(7-amino-4-methylcoumarin, AMC)的荧光强度,空白组用缓冲液代替荧光底物。

一个酶活力单位(U)定义为每分钟释放 1 nmol AMC 所需要的酶量。

1.3.3 SDS-PAGE 分析 分别取在 4 °C 冷藏 0、1、2、3、5、7 d 牡蛎的四种不同组织样品,加入 4 倍含有 0.5 mol/L NaCl 的 PBS (pH 7.0),组织捣碎,离心

(10 000×g, 15 min)取上清, 样品与上样缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 400 mmol/L DTT, 8% SDS, 0.4%溴酚蓝, 40%甘油)按照 1:3 (体积分数)混合, 95 °C 加热 10 min 后-20 °C 冻藏待用。收集 7 d 的样品后一并进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 参考 Laemmli(1970)的方法, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 电泳结束后用考马斯亮蓝染色, 经脱色液脱色至蛋白条带清晰, 再用凝胶成像系统对结果进行分析。

1.3.4 免疫印迹法分析(Western blotting) 参照 Towbin 等(1979)的文献报道, 将第 0 d 下 4 种不同组织上样于 SDS-PAGE, 蛋白通过半干式电转印转移至硝酸纤维素膜上。将膜以 5%脱脂奶封闭 1.5 h, TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 接着用兔抗真鲷亮氨酸氨肽酶抗体或兔抗鮠组织蛋白酶 L 抗体孵育 1.5 h, TBST 清洗 5 次, 每次 5 min。再以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 孵育 1.5 h, TBST 清洗 7 次, 每次 7 min, 加入 ECL 底物孵育 2 min, 经化学发光成像系统显色, 记录结果。

1.3.5 pH 值的测定 取冷藏第 0、1、2、3、5、7、9、11、13 d 的牡蛎肉样品, 分别进行组织捣碎, 得到肉糜样品备用。称取 5.00 g 肉糜, 加新煮沸后冷却的蒸馏水至 50 mL, 摇匀, 浸渍 30 min 后过滤, 取 25 mL 滤液于 50 mL 烧杯中。按照 GB 5009.237—2016《食品 pH 值的测定》的方法进行 pH 值的测定。

1.3.6 氨基酸态氮的测定 称量上述第 0、1、2、3、5、7 d 的肉糜样品 1.00 g 用蒸馏水溶解后转至 50 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。按照 GB 5009.235-2016《食品中氨基酸态氮的测定第二法》的方法进行氨基酸态氮含量的测定。

1.3.7 挥发性盐基氮的测定 称取上述第 0、1、2、3、5、7 d 的肉糜样品 10.00 g 于蒸馏管内, 加入 75 mL 水, 振摇, 使试样在样液中分散均匀, 浸渍 30 min。按照 GB 5009.228-2016《食品中挥发性盐基氮的测定第二法》的方法进行挥发性盐基氮含量的测定。

1.3.8 数据统计分析 采用 Excel 2007 对数据进行分析 and 制图。

2 结果与分析

2.1 牡蛎不同组织中蛋白酶的分布

新鲜牡蛎不同组织中几种酶的相对活力如图 1 所示。四种组织中, 不同种类的酶, 最高酶活力均出现在性腺-内脏团, 其次为鳃, 外套膜和闭壳肌的酶

活力相当。丙氨酸氨肽酶和精氨酸氨肽酶在鳃中的酶活力约为性腺-内脏团的 80%—90%, 外套膜和闭壳肌中的酶活力约为性腺-内脏团的 40%—60%。亮氨酸氨肽酶在鳃中的活力为性腺-内脏团的 50%, 外套膜和闭壳肌中的酶活力约为性腺-内脏团的 35%。胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶在外套膜、鳃、闭壳肌中的酶活力相当, 仅约为性腺-内脏团的 25%。为了进一步确认酶在不同组织中的蛋白水平差异, 利用兔抗真鲷亮氨酸氨肽酶多克隆抗体和兔抗鮠组织蛋白酶 L 多克隆抗体进行 Western blotting 分析。如图 2 所示, 牡蛎四种组织样品均能与兔抗真鲷亮氨酸氨肽酶抗血清产生免疫反应, 表明该酶在这四种组织中均有表达。亮氨酸氨肽酶在性腺-内脏团中的表达量最高, 其次为鳃, 在外套膜和闭壳肌中的表达量相当。而组织蛋白酶 L 只在性腺-内脏团中有表达, 与酶活力分析结果相同。

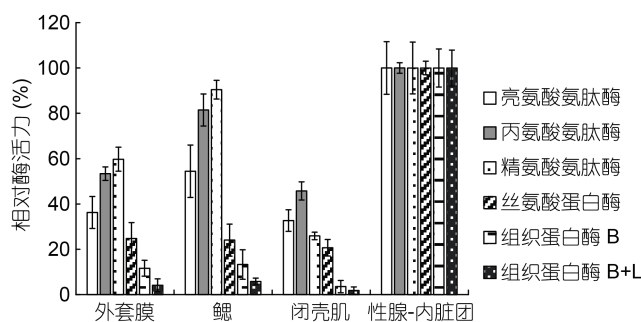


图 1 牡蛎 4 种不同组织中的相对酶活力(n=5)

Fig.1 The relative enzyme activity in 4 different tissues of oyster (n=5)

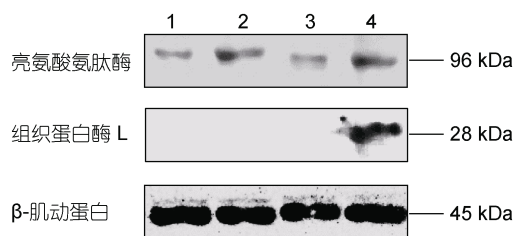


图 2 牡蛎 4 种不同组织中酶分布的 Western blotting 鉴定
Fig.2 Identification of enzyme distribution in 4 different tissues of oyster by the Western blotting

注: 1. 外套膜, 2. 鳃, 3. 闭壳肌, 4. 性腺-内脏团

2.2 冷藏过程中牡蛎不同组织酶活力变化

在冷藏过程中, 酶的作用直接影响牡蛎的品质。如图 3 所示, 三种氨肽酶中亮氨酸氨肽酶的活力最高, 其次为精氨酸氨肽酶, 酶活力最低的是丙氨酸氨肽酶。三种氨肽酶在性腺-内脏团中的初始酶活力分别为(159.03±18.47)、(107.82±12.32)和(3.16±0.07) U/g。

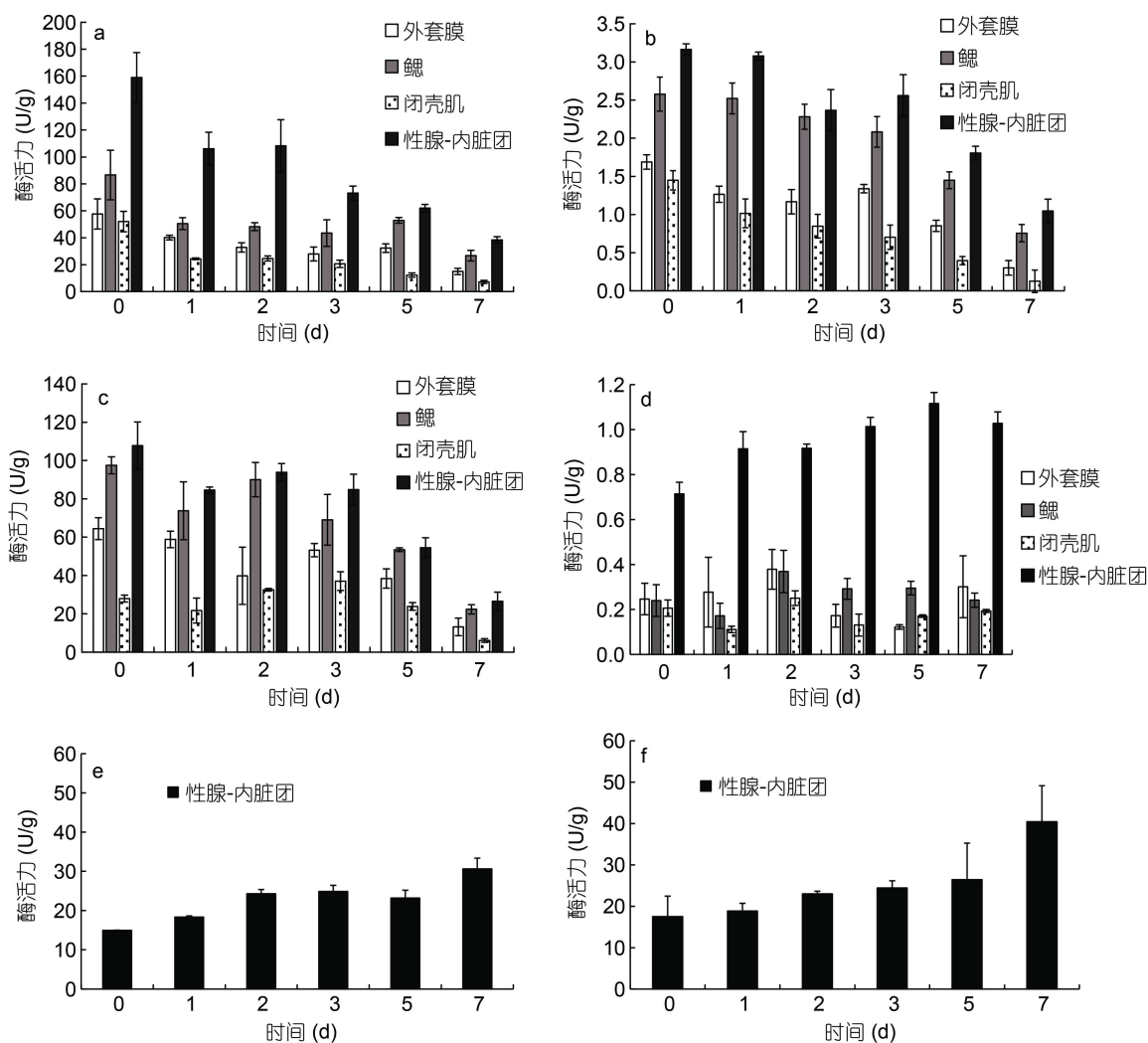


图3 冷藏过程中牡蛎4种不同组织中酶活力的变化($n=5$)

Fig.3 Changes of enzyme activity in 4 different tissues of oyster during cold storage ($n=5$)

注: a. 亮氨酸氨肽酶, b. 丙氨酸氨肽酶, c. 精氨酸氨肽酶, d. 丝氨酸蛋白酶, e. 组织蛋白酶 B, f. 组织蛋白酶 B+L

氨肽酶的酶活力随冷藏时间的延长逐渐降低, 经 7 d 冷藏后, 性腺-内脏团中亮氨酸氨肽酶的酶活力为初始值的 25.15%, 丙氨酸氨肽酶的酶活力为初始值的 31.65%, 精氨酸氨肽酶的酶活力为初始值的 23.19%。胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶主要分布于性腺-内脏团中, 酶活力在冷藏过程中缓慢上升, 经 7 d 冷藏后, 性腺-内脏团中丝氨酸蛋白酶的酶活力上升 44%, 这是酶原被激活的结果。组织蛋白酶 B 和组织蛋白酶 B+L 随着贮藏时间的延长, 酶活力均上升, 组织蛋白酶 B+L 的酶活力上升较组织蛋白酶 B 快, 说明在短期冷藏后期组织蛋白酶 L 对牡蛎品质的影响逐渐加强。组织蛋白酶 B 和组织蛋白酶 B+L 的酶活力至第 7 d 达到最高值, 分别为 (30.61 ± 2.75) 和 (40.44 ± 8.72) U/g, 是初始酶活力的 2.59 和 4.23 倍, 同样, 这是酶原被激

活的结果。

2.3 冷藏过程中牡蛎不同组织的蛋白质降解

牡蛎不同组织蛋白质降解情况如图 4 所示, 在冷藏过程中, 四种组织中的蛋白质均受到不同程度的降解。外套膜(图 4a)中分子量为 40 kDa 的蛋白条带在冷藏的第 7 d 发生较为明显的降解。鳃(图 4b)中分子量为 41、37 和 30 kDa 的蛋白条带在冷藏第 2 d 就发生降解, 并出现低分子量(15 kDa)的蛋白降解条带。冷藏第 3 d, 闭壳肌(图 4c)中分子量为 25—30 kDa 的蛋白降解条带产生。性腺-内脏团(图 4d)中分子量为 40—50 kDa 和 25—30 kDa 的蛋白条带在冷藏第 2 d 发生降解。总体上, 牡蛎组织中鳃和性腺-内脏团中的蛋白发生更为明显的降解现象, 这与这两个组织中内源性蛋白酶的高活力是密切相关的。

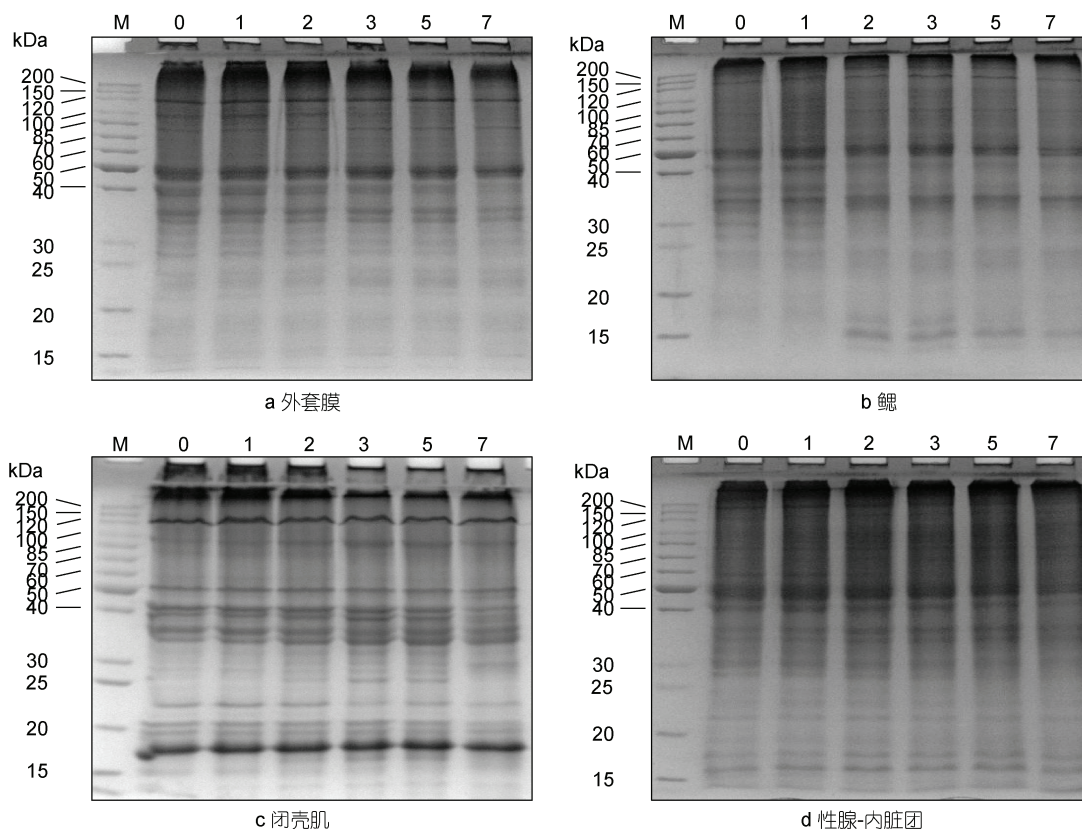


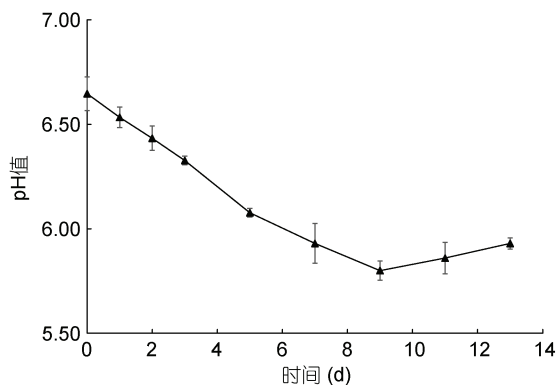
图4 冷藏过程中牡蛎4种不同组织蛋白降解

Fig.4 Protein degradation in 4 different tissues of oyster during cold storage

注: M. 标准蛋白; 0: 0 d; 1: 1 d; 2: 2 d; 3: 3 d; 5: 5 d; 7: 7 d

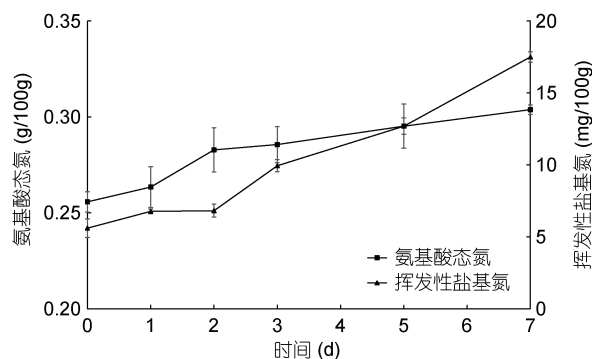
2.4 冷藏过程中牡蛎肉 pH 值的变化

由图5可知, 牡蛎肉在4℃冷藏条件下, pH值随着贮藏时间的延长先降低后上升, pH值从初始的 6.65 ± 0.07 到第9 d达最低值 5.80 ± 0.05 , 随后由于蛋白质降解产生碱性的胺类物质而缓慢上升。但是, 与鱼类相比, 牡蛎肉因含有更多可生成乳酸的糖原, 使得牡蛎在冷藏过程中都处于较低的 pH 值。即便冷藏13 d, 已有浓重腐臭味, 牡蛎的 pH 值仍低于6.0。

图5 冷藏过程中牡蛎肉 pH 值的变化($n=5$)Fig.5 Changes in pH of oyster during cold storage ($n=5$)

2.5 冷藏过程中牡蛎肉氨基酸态氮和挥发性盐基氮含量的变化

氨基酸态氮是指以游离氨基酸形式存在的氮元素含量。该指标在一定程度上可反映牡蛎肉中高分子量蛋白质被蛋白酶降解为低分子量肽后, 进一步被外切酶氨肽酶作用, 导致游离氨基酸量的增加。如图6所示, 新鲜牡蛎肉的氨基酸态氮含量为

图6 冷藏过程中牡蛎肉氨基酸态氮和挥发性盐基氮的变化($n=5$)Fig.6 Changes in amino nitrogen and volatile base nitrogen of oyster during cold storage ($n=5$)

(0.26 ± 0.05) g/100g。4 °C 冷藏第 2 d, 氨基酸态氮含量为(0.28 ± 0.01) g/100g, 第 7 d 为(0.31 ± 0.03) g/100g。挥发性盐基氮是机体在内源酶和微生物的作用下, 蛋白质降解而产生的挥发性碱性含氮物质, 其含量越高, 表明氨基酸被破坏的越多。牡蛎肉中挥发性盐基氮的含量在冷藏前 2 d 保持稳定, 随后快速增长。第 0 d 挥发性盐基氮的含量为(5.60 ± 0.64) mg/100g, 冷藏至第 7 d 其含量达到(17.50 ± 0.37) mg/100g, 增加了 212.5%。

3 讨论

水产动物含有丰富的酶类, 酶类在不同组织中的分布差异与其生理功能密切相关。前期研究中我们发现, 赖氨酸氨肽酶在牙鲆肌肉、肝脏、鳃和肾脏等组织均有分布(陈曦等, 2012)。亮氨酸氨肽酶在真鲷不同组织中都有分布, 在脑和肾脏中含量较高(Wu *et al*, 2008)。对皱纹盘鲍组织蛋白酶 L 研究发现, 该酶存在于性腺和肝胰脏组织中, 而在肌肉、鳃和外套膜中均未检测到该酶的表达(Shen *et al*, 2015)。结合本文对牡蛎的研究结果表明, 氨肽酶广泛分布于水产动物的不同组织中, 而组织蛋白酶 L 主要存在于性腺和肝胰脏(内脏团)中。

牡蛎肉在 4 °C 冷藏过程中, pH 值呈现先下降后上升的“V”字形变化, 并且在第 9 d 时 pH 值最低, 与牛改改等(2020)对牡蛎冷藏保鲜的研究结果一致。动物死后, 随着糖原酵解生成乳酸, pH 值下降, 下降的程度与机体中糖原的含量有关, 糖原含量越高, 乳酸的生成量越多, pH 值越低。后续 pH 的上升主要是由于蛋白质降解产生的氨基酸受微生物的作用进一步分解生成呈碱性的生物胺类物质引起的。

牡蛎肉中氨基酸态氮含量在 4 °C 冷藏的前 7 d 随冷藏时间延长而缓慢增加, 与刘寿春等(2013)报道的罗非鱼片在 0 °C 冷藏过程中氨基酸态氮含量的变化结果类似。牡蛎肉在冷藏过程中氨基酸态氮含量缓慢增加, 与牡蛎肉中胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶、组织蛋白酶和氨肽酶的共同作用有关。牡蛎肉在冷藏前 2 d 是保鲜处理的关键时间点, 此时蛋白质降解程度弱, pH 值、挥发性盐基氮、氨基酸态氮等指标基本稳定。冷藏 2 d 后, 挥发性盐基氮含量增长较快, 这与冷藏后期胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶、组织蛋白酶的高活力以及微生物的作用密不可分。至第 7 d, 挥发性盐基氮含量达到(17.50 ± 0.37) mg/100g, 与张观科等(2012)研究长牡蛎 0—2 °C 冷藏过程中第 7 d 的挥发性盐基氮含量(16 mg/100g)接近, 但已超过卫生标准值规定

的 15 mg/100g, 牡蛎也已失去其特有的气味并有不愉快的腐败气味产生。郭晓伟(2010)的研究发现, 长牡蛎在 4 °C 冷藏 6 d 时挥发性盐基氮值达到 19.6 mg/100g。不同研究者对牡蛎冷藏过程中挥发性盐基氮指标研究的结果不同, 很大可能是由于牡蛎不同产区水域环境及季节的影响, 从而导致其在冷藏过程中产生鲜度指标上的差异。

牡蛎的不同组织中, 蛋白酶活力最高的性腺-内脏团和鳃最先开始蛋白降解, 而后外套膜和闭壳肌中的蛋白逐渐降解。胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶的最适 pH 为 8.0 左右, 在中性附近也有较高活性, 在冷藏初期, 该酶对蛋白的降解起主要作用。随着冷藏时间的延长, 牡蛎的 pH 值不断下降(图 5 所示), 此时最适 pH 为 5.5 的组织蛋白酶 L 和 B 的作用更为突出。因此, 本文认为胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶和组织蛋白酶等蛋白酶的协同作用是牡蛎肉冷藏前期蛋白质降解的主要因素, 而氨肽酶是外切酶, 其作用主要是增加游离氨基酸含量。接下来, 有必要对相关蛋白酶的性质作更深入研究。

冷藏保鲜是世界上历史最悠久的保鲜方法, 因其操作简单、成本低, 至今仍是国内最广泛使用的牡蛎保鲜方法。冷藏保鲜的温度一般维持在 0—4 °C, 本文结果显示牡蛎肉通过 4 °C 冷藏保鲜, 货架期为 6 d, 尚不能满足运往内地市场更长时间货架期的要求。而通过低温并结合降低微生物生长繁殖速度的手段, 可以有效延长牡蛎肉的冷藏货架期。牡蛎肉使用浓度为 3.36 mg/L 的臭氧水浸泡处理 15 min, 4 °C 冷藏的保鲜期为 8 d (袁勇军等, 2009)。气调包装(60% CO₂ / 30% N₂ / 10% O₂)的长牡蛎肉样品在[(4±1) °C] 冷藏条件下, 货架期可达到 11—12 d (曹荣等, 2009)。长牡蛎肉经 350 MPa 超高压处理 10 min 后, 4 °C 冷藏货架期延长至 14 d (刘远平等, 2016)。牡蛎肉轻度热处理(80 °C 隔袋加热 20 min)后, 4 °C 冷藏的货架期可达 15 d (岳敏等, 2019)。今后, 有必要借鉴这些方法并对产生的效果作深入分析。

对长牡蛎中内源性蛋白酶的分布及冷藏过程中蛋白质降解、酶活力和鲜度指标变化规律的研究, 对于采取更加切实有效的措施做好牡蛎冷链物流过程中的牡蛎品质保持具有参考意义。

4 结论

内源性蛋白酶对短期冷藏过程中牡蛎的品质有重要影响。氨肽酶、胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶和组织

蛋白酶等三大类酶在牡蛎的性腺-内脏团中活力最高。氨肽酶在外套膜、鳃、闭壳肌和性腺-内脏团等四种组织中均有表达分布,胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶主要存在于性腺-内脏团,而组织蛋白酶绝大部分在性腺-内脏团中表达。在 7 d 的 4 °C 冷藏过程中,四种组织中的酶活力均发生了明显变化,氨肽酶的活力逐渐降低,而组织蛋白酶和胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶的酶原被激活,酶活力随着时间的延长而升高。四种组织中的蛋白质随冷藏时间的延长而发生不同程度的降解,氨基酸态氮和挥发性盐基氮含量与冷藏时间呈正相关性。

参 考 文 献

- 牛改改,游 刚,张晨晓等,2020. 真空包装牡蛎肉在冷藏和冻藏过程中的品质变化. 食品研究与开发, 41(18): 7—14
- 刘寿春,钟赛意,李平兰等,2013. 蛋白质降解指示冷藏罗非鱼片品质劣变研究. 食品科学, 34(2): 241—245
- 刘远平,史 田,王富龙等,2016. 超高压处理对冷藏牡蛎保鲜效果及品质变化的影响. 食品工业科技, 37(15): 325—328
- 何定芬,谢 超,梁 佳等,2020. 基于 UF、GFC 及 RP-HPLC 的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)蛋白抗衰老小分子活性肽(Zel'ner)的纯化及结构解析. 海洋与湖沼, 51(1): 141—147
- 张观科,刘红英,齐凤生,2012. 生物保鲜对牡蛎冷藏保鲜效果的研究. 水产科学, 31(10): 611—615
- 张国范,李 莉,阙华勇,2020. 中国牡蛎产业的嬗变—新认知、新品种和新产品. 海洋与湖沼, 51(4): 740—749
- 陈 曦,蔡秋凤,刘光明等,2012. 牙鲆肌肉赖氨酸氨肽酶的分离纯化与性质研究. 中国食品学报, 12(6): 22—29
- 岳 敏,苏明月,姜岁岁等,2019. 轻度热处理牡蛎肉在冷藏过程中品质变化. 食品科技, 44(7): 179—184
- 袁勇军,陆宇波,陈 伟等,2009. 臭氧处理和低温保藏对牡蛎保鲜效果研究. 食品科技, 34(10): 137—140
- 郭晓伟,董士远,刘尊英等,2010. 冰温牡蛎的货架期. 食品科技, 35(11): 86—90
- 曹 荣,薛 勇,薛长湖等,2009. 气调包装对太平洋牡蛎冷藏保鲜效果的研究. 食品工业科技, 30(5): 307—309, 319
- 章超桦,秦小明,2014. 贝类加工与利用. 北京: 中国轻工业出版社, 53
- 章超桦,薛长湖,2018. 水产食品学. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 33
- Barrett A J, Kirschke H, 1981. [41] Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. Methods in Enzymology, 80: 535—561
- Cao M J, Osatomi K, Pangkey H *et al*, 1999. Cleavage specificity of a myofibril-bound serine proteinase from carp (*Cyprinus carpio*) muscle. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 123(4): 399—405
- Cao R, Xue C H, Liu Q, 2009. Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. International Journal of Food Microbiology, 131(2/3): 272—276
- Cheong K L, Xia L X, Liu Y, 2017. Isolation and characterization of polysaccharides from oysters (*Crassostrea gigas*) with anti-tumor activities using an aqueous two-phase system. Marine Drugs, 15(11): 338
- Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680—685
- Shen J D, Cai Q F, Yan L J *et al*, 2015. Cathepsin L is an immune-related protein in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)—purification and characterization. Fish & Shellfish Immunology, 47(2): 986—995
- Songsang S, Sophanodora P, Kaewsrithong J *et al*, 2010. Quality changes in oyster (*Crassostrea belcheri*) during frozen storage as affected by freezing and antioxidant. Food Chemistry, 123(2): 286—290
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 76(9): 4350—4354
- Wu G P, Cao M J, Chen Y *et al*, 2008. Leucine aminopeptidase from red sea bream (*Pagrus major*) skeletal muscle: purification, characterization, cellular location, and tissue distribution. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 56(20): 9653—9660
- Yokoyama Y, Sakaguchi M, Kawai F *et al*, 1992. Changes in concentration of ATP-related compounds in various tissues of oyster during ice storage. Nihon-Suisan-Gakkai-Sh, 58(11): 2125—2136
- Zhang L, Cai Q F, Wu G P *et al*, 2013. Arginine aminopeptidase from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle: purification and characterization. European Food Research and Technology, 236(5): 759—769
- Zhang Z M, Li T L, Wang D *et al*, 2009. Study on the volatile profile characteristics of oyster *Crassostrea gigas* during storage by a combination sampling method coupled with GC/MS. Food Chemistry, 115(3): 1150—1157

DISTRIBUTION OF PROTEASES IN DIFFERENT TISSUES OF *CRASSOSTREA GIGAS* AND CHANGES OF ENZYME ACTIVITY AND FRESHNESS DURING COLD STORAGE

ZHANG Qian^{1,2}, CHEN Hong¹, QUE Hua-Yong^{2,3}, LI Yu-Jin⁴, SUN Le-Chang^{1,2}, WENG Ling^{1,2},
ZHANG Ling-Jing^{1,2}, LIU Guang-Ming^{1,2}, CAO Min-Jie^{1,2}

(1. College of Marine Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. National & Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China; 3. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China; 4. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract The distribution of several main enzymes in different tissues of *Crassostrea gigas* were identified by enzyme activity assay and the Western blotting. Enzyme (including aminopeptidase, trypsin-like serine proteinase, and cathepsins) activity variation and freshness index changes during cold storage at 4 °C were investigated. The results show that the activities of aminopeptidases (leucine aminopeptidase, alanine aminopeptidase, and arginine aminopeptidase) were high in the four tissues (mantle, gill, adductor muscle, and gonad-visceral mass). Trypsin-like serine protease was identified in mainly the gonad-visceral mass, with lower activity in other three tissues, while major activities of cathepsin B and B+L were detected in the gonad-visceral mass. During cold storage at 4 °C, the protease activity changed significantly. After 7 days of cold storage, the enzyme activity of leucine aminopeptidase, alanine aminopeptidase, and arginine aminopeptidase in gonad-visceral mass was 25.15%, 31.65%, and 23.19%, respectively as compared to their initial activity. However, the activity of cathepsin B and L was 1.71 and 5.66 times that of the initial value, respectively. The activity of trypsin-like serine protease increased by 44%. During cold storage, the freshness index of oysters also changed. The pH value decreased till the 9th day and then increased. The content of amino nitrogen increased from (0.26±0.05) g/100g to (0.31±0.03) g/100g and that of volatile base nitrogen increased from (5.60±0.64) mg/100g to (17.50±0.37) mg/100g, respectively in 7 days. SDS-PAGE showed that the proteins in four different tissues all degraded to different extents during cold storage. This study revealed the variation rule of several main enzymes and freshness indexes of oysters in the short-term cold storage, providing a reference for the preservation of oysters.

Key words *Crassostrea gigas*; enzyme; cold storage; freshness; protein degradation