

鸭肉磷脂酶的提取及水解模拟体系初探

王道营, 诸永志, 徐为民*, 曹建民

(江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要:初步研究了鸭肉磷脂酶提取及水解模拟体系中有机相的脂肪酸组成。通过分析肌内磷脂在反应前、磷脂酶水解模拟体系中以及对对照实验中脂肪酸组成的变化, 研究鸭肉磷脂酶的水解特性。结果表明, 鸭肉磷脂酶对磷脂的水解存在多不饱和脂肪酸位的选择性。

关键词:鸭肉, 磷脂酶, 提取, 水解模拟体系

Preliminary research on extraction of phospholipases in duck meat and model system of hydrolysis

WANG Dao-ying, ZHU Yong-zhi, XU Wei-min*, CAO Jian-min

(Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Extraction of phospholipases in duck meat and fatty acids composition in model system of hydrolysis was preliminary studied. Through analyzing changes of intramuscular phospholipids fatty acids composition before reaction, model system of phospholipases hydrolysis and control experiment, hydrolysis characteristic of duck meat was researched. The results showed phospholipases in duck meat hydrolyzing phospholipids had selectivity to polyunsaturated fatty acids.

Key words: duck meat; phospholipases; extraction; model system of hydrolysis

中图分类号: TS201.2*5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)06-0147-03

肉制品中脂类物质可以分为皮下脂肪(subcutaneous fat)、肌间脂肪(intermuscular fat)和肌内脂肪(intramuscular fat)^[1], 因在脂肪的分离提取过程中, 肌间和肌内脂肪难以分开, 因此广义上也统称为肌内脂肪, 肌内脂肪对肉的风味影响最为重要^[2,3]。鸭肉肌内脂肪的磷脂和甘油酯分别在磷脂酶和脂肪酶水解作用下, 水解生成游离脂肪酸, 脂肪酸继续发生氧化作用, 最后生成肉制品的风味物质或风味物质前体^[4]。许多研究表明, 肉制品的风味与磷脂水解以及后续的脂肪酸氧化作用关系更为密切^[5,6]。本文主要研究在水解模拟体系中鸭肉磷脂酶水解肌内磷脂的情况, 旨在揭示肌内磷脂的水解机理, 为鸭肉加工过程的质量控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸭肉原料品种为麻鸭(2.0kg左右) 购自当地农贸市场; C_{14:0}(豆蔻酸)、C_{14:1}(肉豆蔻脑酸)、C_{16:0}(棕榈酸)、C_{16:1}(棕榈油酸)、C_{18:0}(硬脂酸)、C_{18:1}(油酸)、C_{18:2}(亚油酸)、C_{20:4}(花生四烯酸)、C_{22:4}(二十二碳四烯酸)、C_{22:6}(二十二碳六烯酸)脂肪酸标准样品 均购于

Sigma 公司; 氯仿、异丙醇、乙酸、乙醚、2,2-二甲氧基丙烷、三氟化硼、盐酸、Tris、NaCl、CaCl₂ 均为分析纯。

岛津 GC-14B 气相色谱 Shimadzu 公司; T 25 型分散器 IKR; Allegra 64R 冷冻离心机 美国 Beckman; RE-85C 真空旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器公司; 100MG 氨丙基(BOND ELUT LRC-NH₂) 固相萃取小柱 VARIAN。

1.2 实验方法

1.2.1 肌内磷脂的提取

1.2.1.1 脂质提取 根据 Folch 等的方法^[7] 提取脂质。取 10.0g 鸭腿肌, 低速匀浆后用氯仿-甲醇(2:1, V/V)定容至 200mL, 静置 1h, 过滤后加入 0.2 倍体积的生理盐水(7.3g · L⁻¹ NaCl、0.5g · L⁻¹ CaCl₂), 然后 3000r · min⁻¹离心 15min, 取下层液体用真空旋转蒸发器 44℃水浴真空蒸干, 在-20℃贮存备用。

1.2.1.2 磷脂分离 根据 García 等的方法^[8], 称取 220.0mg 脂质, 用 5.5mL 氯仿溶解。先用 1mL 氯仿活化小柱, 将 0.5mL 脂质氯仿溶液移入氨丙基硅胶小柱中, 然后依次用 2mL 氯仿-异丙醇(2:1, V/V)和 3mL 的 2% 乙酸-乙醚(M/M)洗脱小柱, 弃去洗脱液, 最后用 3.0mL 甲醇溶液洗出磷脂并收集, 共收集 10 次, 其中的 2 次单独收集用于分析水解前肌内磷脂的脂肪酸组成, 其他 8 次集中收集挥干溶剂, 即为制备的肌内磷脂样品。

1.2.2 底物溶液的配制 将制备的肌内磷脂样品溶

收稿日期: 2008-10-15 * 通讯联系人

作者简介: 王道营(1979-), 男, 研究实习员, 主要从事肉品加工与质量控制研究。

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2008GB2C100111)。

表1 鸭肉磷脂酶水解模拟反应产物中磷脂的脂肪酸组成(%)

脂肪酸	反应前	磷脂酶水解模拟反应产物	对照反应产物(缓冲液)
豆蔻酸 C _{14:0}	2.62	2.59	2.56
棕榈酸 C _{16:0}	18.38	19.50	19.67
硬脂酸 C _{18:0}	26.05	29.41	27.32
饱和脂肪酸 Σ SFA	47.05	51.50	49.55
肉豆蔻脑酸 C _{14:1}	1.35	0.62	0.95
棕榈油酸 C _{16:1}	3.54	2.44	2.61
油酸 C _{18:1}	19.81	20.42	20.57
单不饱和脂肪酸 Σ MUFA	24.70	23.48	24.13
亚油酸 C _{18:2}	3.65	1.82	2.45
花生四烯酸 C _{20:4}	19.17	18.55	18.95
二十二碳四烯酸 C _{22:4}	2.05	1.49	1.79
二十二碳六烯酸 C _{22:6}	3.38	3.17	3.13
多不饱和脂肪酸 Σ PUFA	28.25	25.03	26.32

解于 1.0mL Tris-HCl 缓冲液(0.1mol·L⁻¹, pH8.0)中,混匀即为底物溶液^[9]。

1.2.3 鸭肉磷脂酶的提取

1.2.3.1 粗酶液的制备 将 10g 鸭股二头肌修剪干净,于 30mL Tris-HCl 缓冲液(0.1mol·L⁻¹, pH8.0)中均质(12000r·min⁻¹, 3min), 12000×g 离心 20min, 上清液过滤即为粗酶液。

1.2.3.2 初步纯化酶液的制备 取 10mL 粗酶液,加入 50% 饱和度的硫酸铵盐析 1h(4℃), 12000×g 离心 20min, 取下层沉淀物,用 10mL Tris-HCl 缓冲液(0.1mol·L⁻¹, pH8.0)溶解,即为初步纯化的酶液。

1.2.3.3 磷脂酶水解模型的建立 酶解反应:按 4:1 的比例,在 0.8mL 初步纯化的酶液或 Tris-HCl 缓冲液(0.1mol·L⁻¹, pH8.0)中加入 0.2mL 的底物溶液,置于 7mL 的小离心管中,混匀后在 40℃ 保温 40min; 水解产物萃取:反应结束后,在反应体系中加入 4.0mL 氯仿-甲醇(2:1, V/V),混匀后 3000r·min⁻¹ 离心 15min, 下层有机相即为水解产生的游离脂肪酸、未水解的和部分水解的磷脂; 水解产物分离:方法同 1.2.1 中磷脂的分离,用 2% 乙酸-乙醚(M/M)洗脱小柱后,收集的洗脱液即为游离脂肪酸,最后用 3.0mL 甲醇溶液洗出磷脂。

1.2.4 游离及磷脂脂肪酸的气相色谱(GC)法分析

1.2.4.1 游离脂肪酸及磷脂的甲酯化 将样品挥干溶剂后,加入 2mL 14% 三氟化硼-甲醇(质量比)使脂肪酸甲酯化(60℃ 水浴 30min, 用 2,2-二甲氧基丙烷作水清除剂吸收甲酯化生成的微量水)。冷却后加 1.0mL 水和 1.0mL 正己烷振荡,静置分层后完全吸取上层有机层,挥干溶剂,用正己烷定容至 0.4mL,以备气相色谱测定。

1.2.4.2 脂肪酸甲酯的气相色谱分析 岛津 GC-14B 气相色谱(Shimadzu 公司), CP-Sil88 柱(50m×0.25mm×0.20μm, Fame 公司); 进样口温度 280℃, 火焰离子检测器(FID)温度 280℃; 柱升温程序:160~220℃, 6℃·min⁻¹, 220℃ 保持 30min; 氢气 60kPa, 空气 50kPa, 载气(高纯氮)80kPa; 进样量:1.5μL, 分流比 1:40; 采用峰面积归一法确定各种脂肪酸的相对含量。

2 结果与分析

2.1 鸭肉磷脂酶水解模拟反应产物中磷脂的脂肪酸组成

由表 1 可以看出,反应前磷脂的脂肪酸组成中硬脂酸、油酸、花生四烯酸等的含量较高,在磷脂酶水解模拟反应后和对照反应后的磷脂中三种脂肪酸含量均较高;磷脂酶水解模拟反应后磷脂中饱和脂肪酸含量增加,单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸含量降低,其中以多不饱和脂肪酸减少最多,而在对照反应中却不存在这一现象,因此可以初步得出,鸭肉磷脂酶水解可能存在多不饱和脂肪酸位的选择性,在南京板鸭加工过程中也存在类似规律^[10]。

2.2 鸭肉磷脂酶水解模拟反应产物中游离脂肪酸组成

由表 2 可以看出,磷脂酶水解模拟反应后,游离脂肪酸中饱和脂肪酸含量低于反应前的磷脂中饱和脂肪酸含量,而多不饱和脂肪酸含量增高;在对照反应中,磷脂在缓冲液中也发生微弱水解(脂肪酸甲酯气相色谱峰面积很小),其游离脂肪酸组成与反应前磷脂脂肪酸组成无明显联系;其进一步证明了鸭肉磷脂酶水解可能存在多不饱和脂肪酸位的选择性。

3 结论

鸭肉磷脂酶对磷脂的水解存在多不饱和脂肪酸位的选择性,磷脂酶的纯化、分离以及具体的选择性有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Timon M L, Ventanas J, Carrapiso A I, et al. Subcutaneous and intermuscular fat characterization of dry-cured Iberian hams [J]. Meat Science, 2001, 58: 85~91.
- [2] Ruiz C J, Ventanas J, Cava R, et al. Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition [J]. Food Research International, 2000, 33: 91~95.
- [3] Martín L, Córdoba J J, Ventanas J, et al. Changes in intramuscular lipids during ripening of Iberian dry-cured ham [J]. Meat Science, 1999, 51: 129~134.
- [4] Toldrá F. Proteolysis and lipolysis in flavor development of dry-cured meat products [J]. Meat Science, 1998, 49: 101~110.

表2 鸭肉磷脂酶水解模拟反应产物中游离的脂肪酸组成(%)

脂肪酸	反应前	磷脂酶水解模拟反应产物	对照反应产物(缓冲液)
豆蔻酸 C _{14:0}	0.00	1.99	10.39
棕榈酸 C _{16:0}	0.00	17.37	10.21
硬脂酸 C _{18:0}	0.00	26.34	8.79
饱和脂肪酸 ΣSFA	0.00	45.70	29.39
肉豆蔻脑酸 C _{14:1}	0.00	0.00	13.98
棕榈油酸 C _{16:1}	0.00	5.77	16.70
油酸 C _{18:1}	0.00	18.83	16.36
单不饱和脂肪酸 ΣMUFA	0.00	24.60	47.04
亚油酸 C _{18:2}	0.00	7.67	13.76
花生四烯酸 C _{20:4}	0.00	16.83	9.82
二十二碳四烯酸 C _{22:4}	0.00	1.79	0
二十二碳六烯酸 C _{22:6}	0.00	3.40	0
多不饱和脂肪酸 ΣPUFA	0.00	29.69	23.58

[5] Gandemer G.Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products [J]. Meat Science, 2002, 62:309~321.

[6] Toldrá F, Mónica Flores, Yplanda S. Dry-cured ham flavour: enzymatic generation and process influence [J]. Food Chemistry, 1997, 59(4):523~530.

[7] Folch J, Lees M, Stanley G H S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. Journal of Biology Chemistry, 1957, 226:487~509.

[8] García R J A, Gibert J, Díaz I. Determination of neutral lipids from subcutaneous fat of cured ham by capillary gas chromatography and liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1994, 667:225~233.

[9] 李维琳, 袁德军, 傅家忠. 检测磷脂酶 A₂ 的气相色谱法的建立与应用[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2):183~185.

[10] 王道营, 徐为民, 徐幸莲, 等. 南京板鸭加工过程中肌内磷脂与游离脂肪酸含量的变化[J]. 福建农林大学学报, 2008(3):320~323.

(上接第 146 页)

最为迅速,随着水解的进行,水解度和 12% TCA-N 的变化均趋于平稳,增加缓慢。

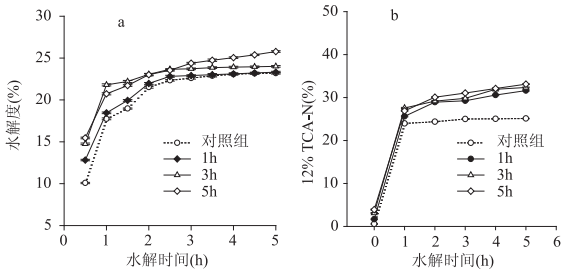


图4 FeCl₃ 体系中不同氧化时间
对蛋白水解度和 TCA 可溶性氮的影响

3 结论

通过以上研究发现,所有氧化后的蛋白的活性巯基都是降低的,更易于发生水解作用,无论是水解度还是 12% TCA-N 都有明显的增加。这些结果表明,氧化促进了蛋白酶的水解,提高了水解敏感性。这可能意味着氧化使蛋白的结构发生较大改变,暴露酶的作用位点,更易于酶解反应的发生。因此,氧化后的蛋白可能更利于消化吸收,但是对酶解影响的程度要依赖于具体的氧化条件和取决于氧化程度。

参考文献

[1] 赵立艳,丛涛,赵霖,等. Alcalase 蛋白酶水解花生蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(3):119~124.

[2] Rawdkuen S, Benjakul S. Whey protein concentrate: Autolysis inhibition and effects on the gel properties of surimi prepared from tropical fish [J]. Food Chemistry, 2008, 106:1077~1084.

[3] Frankel E N. Lipid Oxidation [M]. The Oily Press, Dundee, Scotland, 1998.

[4] Liu G, Xiong Y L. Electrophoretic Pattern, Thermal Denaturation, and in Vitro Digestibility of Oxidized Myosin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48:624~630.

[5] Srinivasan S, Hultin H O. Chemical, physical, and functional properties of cod proteins modified by a nonenzymic Free-Radical-Generating System [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45:310~320.

[6] Hardham J F. The determination of total and reactive sulfhydryl of whey protein concentrates [J]. Aust Journal of Dairy Technology, 1981, 35:153.

[7] Lee S Y, Morr C V, Ewan Y W. Structure and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH [J]. Journal of Food Science, 1992, 57(5):1210~1214.

[8] Adler-Nissen J. Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins [M]. Applied Science Publisher, 1986.122~166.

[9] 管晓, 姚惠源, 张鸣镝. 燕麦麸分离蛋白的酶解对其功能性质的影响[J]. 农业工程学报, 2006, 22(11):217~222.

[10] Ponnampalam R, Goulet G, Amiot J. Some functional and nutritional properties of oat flours as affected by proteolysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35:279~285.

[11] Davies K J A. Degradation of oxidized protein by the 20S proteasome [J]. Biochimie, 2001, 83:301~310.

[12] Morzel M, Gatellier P, Sayd T, et al. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins [J]. Meat Science, 2006, 73:536~543.