

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180324001

http://www.yykxjz.cn/

焦奎, 高翔, 于佳, 魏玉西, 高洁, 张雪梅, 王金梅, 李钰金. 酶解扇贝裙边制备复合氨基酸螯合钙的研究. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 178-184

Jiao K, Gao X, Yu J, Wei YX, Gao J, Zhang XM, Wang JM, Li YJ. Study of the preparation of compound amino acid-chelated calcium by protease hydrolysis of scallop skirts. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 178-184

酶解扇贝裙边制备复合氨基酸螯合钙的研究*

焦奎¹ 高翔¹ 于佳¹ 魏玉西^{1①} 高洁¹
张雪梅¹ 王金梅² 李钰金²

(1. 青岛大学生命科学学院 青岛 266071; 2. 荣成泰祥食品股份有限公司 荣成 264309)

摘要 扇贝裙边富含蛋白质、脂质等营养成分。为了高值化利用扇贝裙边,本研究选用中性蛋白酶、动物蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶5种酶,以酶解液中游离氨基酸态氮为考察指标,对扇贝裙边进行酶解工艺条件探讨。首先,将5种酶制成复合蛋白酶进行正交实验,确定最佳酶解时间、温度、pH及加酶量,经检验,氨基酸转化率为77%;然后,通过实验确定CaCl₂为最适钙源,以贝壳为原料,通过水飞法和酸法转化可制得贝壳源CaCl₂。将扇贝裙边酶解液中复合氨基酸与来源于贝壳的钙螯合制备复合氨基酸螯合钙,以正交实验筛选出最佳螯合条件。经检验,该螯合反应螯合率达92%。

关键词 扇贝裙边; 脱脂; 酶解; 氨基酸转化率; 复合氨基酸螯合钙; 螯合率
中图分类号 S985.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0178-07

扇贝隶属珍珠贝目(Pterioida),广泛分布于世界各个海域(刘天红等,2013)。我国现在扇贝年产量1400万t,占海水养殖动物总产量的22%。扇贝裙边是扇贝加工后的下脚料(包括扇贝边、性腺和肠腺等),由于受现有加工技术水平的限制,尚未得到大规模高值化利用,是亟待深度开发利用的重要海洋生物资源(魏玉西等,2009)。扇贝裙边蛋白质含量高,对扇贝裙边进行酶解转变为复合氨基酸,可以提高其生物利用率及营养价值。目前,已有学者将扇贝裙边用于加工生产海鲜酱油、贝裙脆片和扇贝酱(严超等,2016)等。关于蛋白质降解制备复合氨基酸的方法一般采用HCl水解法,但该法破坏某些氨基酸(如色氨酸),且HCl挥发性强,对设备的要求较高并容易污染环境(熊竹,2016)。因此,利用蛋白酶酶解法制备复

合氨基酸,被认为是一种更好的加工方式(桑亚新等,2012;宋惠平等,2015)。

Ca是人体必需的营养素,占人体体重的1.5%~2.2%,其中大部分(约99%)以Ca₃(PO₄)₂的形式存在于骨中。中国人的饮食结构以植物性食物为主,不足以满足人体对Ca的需求,需要额外补充Ca(赵妍嫣等,2011),而且对骨骼正常生长和体内生理调节来说,Ca是一种非常重要矿物元素,即使膳食Ca摄入量足够,但是由于Ca²⁺在肠道碱性环境内容易形成沉淀(Vavrusova *et al*, 2014),从而无法被小肠吸收,因此,生物利用率较低(Bao *et al*, 2008),且对胃有刺激作用(Straub, 2007)。

研究发现,蛋白质酶解得到的氨基酸具有较强的Ca²⁺结合活性,如鸡蛋壳粉氨基酸螯合钙(杜冰等,

* 山东省重点研发计划(重大关键技术)项目(2016ZDJS06A01)和青岛市民生科技计划项目(17-3-3-68-nsh)共同资助
[This work was supported by Shandong Province Key Research and Development Project (2016ZDJS06A01), and Qingdao People's Livelihood Technology Project (17-3-3-68-nsh)]. 焦奎, E-mail: 312596995@qq.com

① 通讯作者: 魏玉西, E-mail: yuxiw729@163.com

收稿日期: 2018-03-24, 收修改稿日期: 2018-06-02

2011)、罗非鱼骨粉氨基酸螯合钙(胡振珠等, 2010)、米渣蛋白氨基酸螯合钙(郭艳, 2006)以及文蛤氨基酸螯合钙(郑清等, 2009)等。这类补钙剂可以促进钙离子的生物利用度, 因而 Ca 吸收率较高(丁媛媛等, 2017)。本研究旨在采用复合蛋白酶酶解法, 将扇贝裙边蛋白质酶解成为游离氨基酸, 探索最佳酶解条件, 并进一步将酶解得到的氨基酸与无机钙离子进行螯合制备复合氨基酸螯合钙, 以提高扇贝裙边利用附加值, 为扇贝裙边作为功能性食品提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

实验用的扇贝裙边: 栉孔扇贝, 购自山东省青岛市沙子口; 食品级酶制剂: 中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、动物蛋白酶, 购自广西南宁庞博生物工程有限公司; 酸性蛋白酶, 购自北京索莱宝生物科技公司。分析纯级试剂: 石油醚, NaOH, EDTA-Na₂ 自制复合酶制作过程: 将中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、动物蛋白酶和酸性蛋白酶按等质量均匀混合后, 放于 4℃ 冰箱直至使用。

1.2 仪器与设备

索氏脂肪抽提器; PHS-3C pH 计, 上海雷磁仪器厂; GL-20G-II 冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; SYKAM 全自动氨基酸分析仪 S-433D, SYKAM 公司, 德国; K9840 全自动凯氏定氮仪, 济南海能科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 贝壳为钙源的 CaCl₂ 制备 将贝壳刷洗干净, 先以 0.05 mol/L HCl 浸泡 2 h, 以自来水充净后粉碎至 60~80 目, 水飞法除去密度大的部分后烘干得钙源贝壳粉。取适量钙源贝壳粉, 先加适量 HCl 使贝壳粉完全溶解, 再继续加钙源贝壳粉至加入的贝壳粉不再溶解为止。过滤, 将滤液经浓缩、酒精沉淀、烘干即得贝壳源氯化钙(魏玉西等, 2013)。

1.3.2 氨基酸态氮的测定 甲醛滴定法(杨佩荣, 2003); 总氮(粗蛋白)的测定: 凯氏定氮法(杨佩荣, 2003); pH 测定: pH 酸度计; 钙离子的测定: EDTA 滴定法(金其荣等, 1989); 粗脂肪的测定: 索氏抽提法(GB 5009.6-2016)。氨基酸分析方法: 茚三酮法(GB 5009.124-2016)。

1.4 工艺优化实验

1.4.1 扇贝裙边的预处理 新鲜的扇贝裙边去杂后加入 2 倍体积蒸馏水煮沸 5 min, 沥干并于 96℃ 干燥 6 h, 粉碎, 过 100 目筛, 即得均匀扇贝裙边粉末。

1.4.2 裙边粉末的脱脂 参考罗舜菁等(2017)、郑建明等(2017)方法并加适当改进。取 3 份、每份 10 g 扇贝裙边粉, 各加入 100 ml 无水乙醇, 60℃ 恒温水浴摇床 6 min, 抽滤, 重复 2 次, 过滤、晾干即得脱脂后的扇贝裙边粉末。脂含量测定结果取平均值。

1.4.3 酶解工艺流程 酶解工艺参魏玉西等(2009)并加适当改进。将脱脂后的扇贝裙边粉末加入 20 倍体积的蒸馏水, 加入自制复合酶进行正交酶解实验。酶解完毕以后, 立即升温至 100℃ 灭酶 5 min, 冷却至室温以后, 3500 r/min 离心 30 min, 上清液即为酶解液。测定酶解液中氨基酸态氮含量并计算氨基酸转化率(杨佩荣, 2003)。

1.4.4 螯合钙制备工艺流程 首先对螯合钙的钙源的选择进行了优化, 最后确定以贝壳粉制备的 CaCl₂ 为最优钙源, 然后对螯合过程的时间、pH 及温度因素进行了单因素和正交实验的优化, 用 EDTA 滴定法测定螯合率最终, 确定了最优的螯合工艺。

1.4.5 氨基酸组成分析 分别取扇贝裙边粉末、酶解液和复合氨基酸螯合钙样品, 采用 SYKAM 全自动氨基酸分析仪 S-433D 进行氨基酸组成分析(付萍等, 2016)。

2 结果与分析

2.1 脱脂效果分析

扇贝裙边脱脂结果见表 1。经脱脂处理以后, 扇贝裙边粉末脂肪含量明显降低, 有利于下一步酶解, 并且腥臭味消失, 呈现出扇贝固有的鲜甜味。

2.2 正交实验结果

正交实验选取时间、加酶量、温度和 pH 4 个因素(刘淇等, 2013), 通过预实验确定正交实验的因素和水平, 进而进行正交实验。自制蛋白酶正交设计因素与水平排列见表 2, 正交实验结果见表 3。总体来说, 酶解 pH 的影响最主要, 其次是酶解温度, 而酶解时间和加酶量影响较小, 实验结果与魏玉西等(2009)的研究结果相吻合。根据正交实验的结果, 最后确定最佳酶解条件为: 添加扇贝裙边粉末量 0.15%(w/w) 自制复合蛋白酶, 介质 pH=8, 温度 65℃, 酶解 7 h 后在 100℃ 水浴加热 10 min 灭酶, 即得到复合氨基酸酶解液, 氨基酸转化率达 77%。

表1 脱脂次数与样品脂肪含量
Tab.1 Degreasing times and sample fat content (%)

材料 Raw material	未脱脂裙边粉 Non-degreasing scallop skirt powder	1次脱脂裙边粉 One time of degreasing scallop skirt powder	2次脱脂裙边粉 Two times of degreasing scallop skirt powder
脂肪含量 Fat content	16.60	2.10	0.55

表2 蛋白酶正交设计因素与水平排列
Tab.2 Protease orthogonal experimental design

水平 Levels	因素 Factors			
	A 酶解时间 Enzymolysis time (h)	B 酶解温度 Enzymolysis temperature(°C)	C 酸碱度 pH	D 加酶量 Enzyme dosage(%)
1	5	55	6	0.05
2	6	60	7	0.10
3	7	65	8	0.15

表3 蛋白酶正交实验方案及结果分析
Tab.3 Orthogonal experiment design and results

实验号 No.	酶解条件 Conditions of enzyme hydrolysis				氨基酸转化率 Amino acid conversion rate (%)		
	A	B	C	D	第1次 First time	第2次 Second time	第3次 Third time
	1	2	3	4			
1	1	1	1	1	72.55	72.50	72.55
2	2	2	1	2	75.25	75.20	75.25
3	3	3	1	3	76.65	76.65	76.60
4	2	1	2	3	75.25	75.25	75.30
5	3	2	2	1	77.05	77.05	77.10
6	1	3	2	2	76.50	76.50	76.55
7	3	1	3	2	76.55	76.50	76.60
8	1	2	3	3	76.55	75.55	76.50
9	2	3	3	1	75.75	75.75	75.70
均值 1 \bar{K}_1	74.817	74.783	75.200	75.117			
均值 2 \bar{K}_2	76.267	76.283	75.417	76.100			
均值 3 \bar{K}_3	76.283	76.300	76.750	76.150			
极差 R	1.466	1.517	1.550	0.973			

2.3 螯合因素分析

2.3.1 钙源的选择 不同钙源参与的螯合反应螯合率见表4。由表4可见,5种不同钙源对螯合率的影响差别较大,其中CaCl₂参与螯合反应螯合率最高(达89%)。因此,本研究螯合反应选用CaCl₂为钙源。这与文献(甘林火等,2008)所报道的结果一致。同时为增加贝可利用度,选用贝壳为原料制备CaCl₂。将扇贝壳刷洗干净,先以0.05 mol/L HCl浸泡2 h,以自来水充净后粉碎至60~80目,水飞法除去密度大的部分后,烘干得钙源贝壳粉。取适量钙源贝壳粉,先加适量HCl使贝壳粉完全溶解,再继续加钙源贝壳粉至

表4 钙离子与螯合率的关系

钙离子来源 Source of calcium ion	螯合率 Chelation rate (%)
Ca(OH) ₂	57
CaCl ₂	89
CaCO ₃	38
Ca(C ₆ H ₁₁ O ₇) ₂	65
C ₆ H ₁₀ CaO ₆	33

加入的贝壳粉不再溶解为止。过滤,将滤液经浓缩、酒精沉淀、烘干即得贝壳源CaCl₂。经实验证明,经该方法制备的CaCl₂的螯合率,与分析纯级CaCl₂效果相同。

因此, 以下螯合实验均使用贝壳 CaCl_2 为钙源。

2.3.2 螯合反应单因素实验结果 螯合反应单因素实验结果见图 1、图 2 和图 3。可见, 螯合过程的最佳温度为 40°C , 最佳时间为 40 min , 超过 40 min 以后, 螯合率下降, 最佳 pH 为 9。

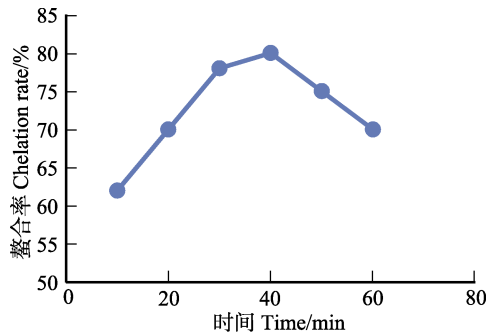


图 1 反应时间对螯合率的影响

Fig.1 The effect of time on the chelation rate

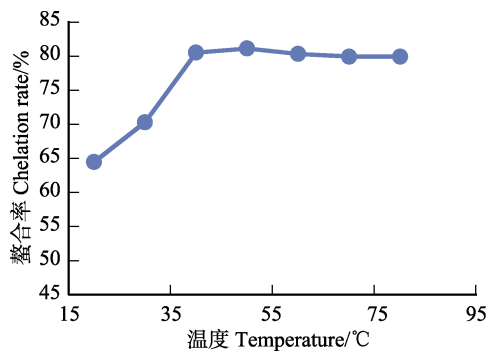


图 2 温度对螯合率的影响

Fig.2 The effect of temperature on the chelation rate

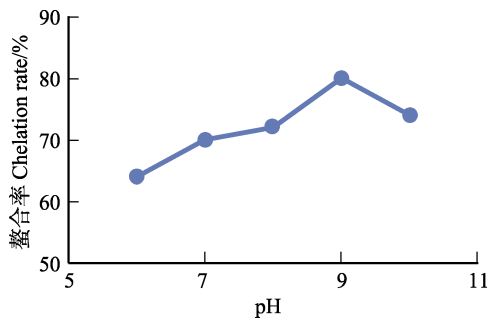


图 3 pH 对螯合率的影响

Fig.3 The effect of pH on the chelation rate

2.3.3 螯合反应正交实验结果 螯合反应正交设计因素与水平排列见表 5, 正交实验方案及结果见表 6。由表 6 可见, 反应时间和介质 pH 对螯合率的影响最主要, 而温度影响最小。具体地说, 最佳螯合反应条件: 反应温度为 40°C , 反应时间为 40 min , 介质 pH 为 9。在此最佳工艺条件下进行螯合反应,

螯合率可达 92%。

2.4 氨基酸组成分析

扇贝裙边粉末中含有丰富的氨基酸, 且含有 7 种人体必需氨基酸(魏玉西等, 2009)。本研究就扇贝裙边粉末、扇贝裙边粉末酶解液以及复合氨基酸螯合钙进行了氨基酸组成及含量测定, 结果见表 7。由表 7 可见, 在扇贝裙边粉末酶解液中, 末中含有较多谷氨酸和天冬氨酸, 因此酶解液有浓郁的鲜味。选用贝壳制备的 CaCl_2 为钙源, 进一步提升了扇贝的利用度, 降低了生产成本。由于酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)更容易与钙离子进行螯合(Liu *et al*, 2013), 在复合

表 5 螯合反应正交实验设计因素与水平排列

Tab.5 Factors and levels arrangement of chelation orthogonal experimental design

水平 Levels	因素 Factors		
	A 酶解温度 Enzymolysis time ($^\circ\text{C}$)	B 酶解时间 Enzymolysis temperature(h)	C 酸碱度 pH
1	30	20	8
2	40	30	9
3	50	40	10

表 6 螯合反应正交实验结果

Tab.6 Chelating reaction orthogonal experimental design and results

实验号 No.	酶解条件 Conditions of enzyme hydrolysis			实验结果 Result of orthogonal design (%)		
	A	B	C	第 1 次 First time	第 2 次 Second time	第 3 次 Third time
	1	2	3			
1	1	1	1	77	76	77
2	2	2	1	85	84	84
3	3	3	1	83	84	83
4	2	1	2	84	83	82
5	3	2	2	90	90	89
6	1	3	2	85	86	85
7	3	1	3	79	79	78
8	1	2	3	80	82	81
9	2	3	3	88	87	86
均值 1 \bar{K}_1	81.667	80.000	80.667			
均值 2 \bar{K}_2	86.333	85.000	85.667			
均值 3 \bar{K}_3	82.333	85.333	84.000			
极差 R	4.666	5.333	5.000			
R^2	20800	20747	20732			

表7 氨基酸组分及含量分析
Tab.7 Analysis of amino acid composition and content

氨基酸 Amino acids	氨基酸所占百分比 Percentage of amino acids		
	扇贝裙边 Scallop skirt	酶解液 Hydrolysate	螯合钙 Chelate calcium
天冬氨酸 Asp	10.61	10.98	22.23
苏氨酸 Thr	4.84	1.54	3.48
丝氨酸 Ser	4.92	5.41	10.76
谷氨酸 Glu	15.72	20.32	33.87
甘氨酸 Gly	9.40	3.64	9.97
丙氨酸 Ala	5.92	2.39	3.21
胱氨酸 Cys	0.36	11.67	0.70
缬氨酸 Val	4.92	0.39	2.37
甲硫氨酸 Met	0.41	0.89	0.69
异亮氨酸 Ile	4.81	0.57	1.53
亮氨酸 Leu	7.84	0.58	1.60
酪氨酸 Tyr	3.39	0.62	0.42
苯丙氨酸 Phe	4.06	0.97	0.84
组氨酸 His	3.22	7.17	4.32
赖氨酸 Lys	6.75	15.48	3.83
精氨酸 Arg	7.23	12.86	1.95
脯氨酸 Pro	5.58	0.17	3.90

注：色氨酸未测

Note: Tryptophan is not detected

氨基酸螯合钙产品中，酸性氨基酸的含量相对于酶解液进一步提升，使天冬氨酸由 10.89% 上升到 22.23%，谷氨酸由 20.32% 上升到 33.87%，因而使得复合氨基酸螯合钙产品有较显著的鲜味；但对于碱性氨基酸，如精氨酸、赖氨酸和组氨酸来说，因它们不易与钙离子进行螯合，所以在复合氨基酸螯合钙产品中其含量均有所下降；对中性氨基酸来说，在复合氨基酸螯合钙产品中的含量均无较大改变。

3 结论

本研究采用多种蛋白酶，对扇贝裙边进行复合蛋白酶酶解，采用正交实验设计进行优化酶解条件，使最终氨基酸转化率达到 77%，较目前所报道的酶解条件(Choi *et al.*, 2012)有更高的氨基酸转化率，且复合氨基酸中含有较多人体必需氨基酸。因为氨基酸的羧基存在钙离子结合能力(Bao *et al.*, 2008)，在酶解之后将氨基酸酶解液与来源于贝壳的无机钙离子进行螯合，制备复合氨基酸螯合钙，通过优化螯合反应条件，最

终使螯合率达到 92%，该产品可以提高人体对钙离子的生物利用率(Hou *et al.*, 2015; Jeon *et al.*, 2010)。因此，本研究结果不仅高值化利用扇贝裙边，将其中氨基酸游离出来并转化为复合氨基酸螯合钙，而且利用贝壳将其中钙质作为复合氨基酸螯合钙的钙源，将扇贝加工废弃物变废为宝，生产出的复合氨基酸螯合钙不仅具有补钙功能，而且具有鲜美的味感，可以作为补钙剂或功能性调味品食用。这对提高扇贝加工下角料的附加值，同时也为我们高值化利用其他水产加工废弃物、减少环境污染，促进蓝色经济的可持续健康发展提供了新的思路和方法。

参 考 文 献

- Bao XL, Lü Y, Yang BC, *et al.* A Study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 2008, 73(3): 117–121
- Choi DW, Lee JH, Chun HH, *et al.* Isolation of a calcium-binding peptide from bovine serum protein hydrolysates. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(6): 1663–1667
- Ding YY, Wang L, Zhang XX, *et al.* Optimized preparation and structural characterization of calcium-chelating polypeptides from wheat germ protein hydrolysate. *Food Science*, 2017, 38(10): 215–221 [丁媛媛, 王莉, 张新霞, 等. 麦胚多肽-钙螯合物制备工艺优化及其结构表征. *食品科学*, 2017, 38(10): 215–221]
- Du B, Cai XK, Xie YC, *et al.* Study on preparation technology of calcium amino acid chelate from eggshell power. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(4): 287–289 [杜冰, 蔡巽楷, 谢伊澄, 等. 蛋壳粉制备氨基酸螯合钙工艺优化. *食品工业科技*, 2011, 32(4): 287–289]
- Fu P, Lü JJ, Liu P, *et al.* Effects of different salinities on the free amino acids composition in the gill of *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 122–126 [付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)鳃中游离氨基酸含量的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 122–126]
- Gan LH, Weng LJ, Deng AH. Progress in preparation of calcium acid chelate. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2008, 30(1): 44–46 [甘林火, 翁连进, 邓爱华. 制备氨基酸螯合钙的研究进展. *氨基酸和生物资源*, 2008, 30(1): 44–46]
- Guo Y. Hydrolysis of rice residue protein and synthesis of complex amino acid with calcium. Master's Thesis of Sichuan University, 2006, 1–73 [郭艳. 水解米渣蛋白及制备氨基酸螯合钙的工艺研究. *四川大学硕士研究生学位论文*, 2006, 1–73]
- Hou T, Wang C, Ma ZL, *et al.* Desalted duck egg white peptides: Promotion of calcium uptake and structure characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(37): 8170–8176
- Hu ZZ, Yang XQ, Ma HX, *et al.* Preparation and antioxidant

- activity evaluation of amino acid chelated calcium from tilapia scraps. *Food Science*, 2010, 31(20): 141–145 [胡振珠, 杨贤庆, 马海霞, 等. 罗非鱼骨粉制备氨基酸螯合钙及其抗氧化性研究. *食品科学*, 2010, 31(20): 141–145]
- Jeon SJ, Lee JH, Song KB. Isolation of a calcium-binding peptide from chlorella protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Nutrition*, 2010, 15(4): 282–286
- Jin QR, Zhang JM, Xu Q. *Organic acid fermentation technology*. China Light Industry Press, 1989 [金其荣, 张继民, 徐勤. 有机酸发酵工艺学. 中国轻工业出版社, 1989]
- Luo SJ, Geng Q, Yan XY, *et al.* Structural and functional properties of rice dreg protein prepared by different degreasing methods. *Food Science*, 2017, 38(5): 202–207 [罗舜菁, 耿勤, 颜小燕, 等. 不同脱脂条件下米渣蛋白的结构及功能性质. *食品科学*, 2017, 38(5): 202–207]
- Liu Q, Xie S, Zhao L, *et al.* Antimicrobial activity of hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 109–113 [刘淇, 谢沙, 赵玲, 等. 菲律宾蛤仔酶解产物的抑菌活性. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 109–113]
- Liu TH, Yu XQ, Sun FX, *et al.* Accumulation and depuration of mercury and MeHg in the tissue of *Chlamys farreri*. *Progress in Fisheries Science*, 2013, 34(5): 119–128 [刘天红, 于晓清, 孙福新, 等. 汞及甲基汞在栉孔扇贝全组织内的积累与净化. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 119–128]
- Straub DA. Calcium supplementation in clinical practice: A review of forms, doses, and indications. *Nutrition in Clinical Practice*, 2007, 22(3): 286–296
- Sang YX, Wang XH, Wang S, *et al.* Research on the process optimization of scallop skirt enzymatic hydrolysis and its amino acid analysis. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(8): 78–86 [桑亚新, 王向红, 王苏, 等. 扇贝裙边酶解工艺优化及其氨基酸分析研究. *中国食品学报*, 2012, 12(8): 78–86]
- Song HP, Yu J, Li S, *et al.* The antibacterial activity of peptides from *Porphyra yezoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 36(2): 140–145 [宋惠平, 于佳, 李钊, 等. 条斑紫菜蛋白酶解多肽的抑菌活性. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 140–145]
- Vavrusova M, Skibsted LH. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 59(2): 1198–1204
- Wei YX, Cui YQ, Wang WX, *et al.* Preparation technology of calcium bis-L-calcium-pyroglutamate from clam shell. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2013, 32(6): 83–86 [魏玉西, 崔育倩, 王文秀, 等. 以蛤蜊壳为钙源的 L-焦谷氨酸钙制备工艺. *中国海洋药物*, 2013, 32(6): 83–86]
- Wei YX, Yin BZ, Liu Q, *et al.* Study on the preparation of amino acid nutrition powder with scallop skirt. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 112–116 [魏玉西, 殷邦忠, 刘淇, 等. 扇贝裙边氨基酸营养粉的制备工艺研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 112–116]
- Xiong Z. Study on preparation of complex amino acid chelated calcium from shrimp powder. *Agricultural Technology Service*, 2016, 33(5): 107–107 [熊竹. 虾粉制备复合氨基酸螯合钙工艺研究. *农技服务*, 2016, 33(5): 107–107]
- Yan C, Mu JL, Wang J, *et al.* Fermentation technology of scallop bean paste. *Food Science and Technology*, 2016, 41(12): 245–249 [严超, 牟建楼, 王颀, 等. 扇贝豆酱发酵工艺条件的研究. *食品科技*, 2016, 41(12): 245–249]
- Yang PR. Development of compound amino acids. *Science and Technology of Food Industry*, 2003, 24 (10): 114–115 [杨佩荣. 复合氨基酸的研制. *食品工业科技*, 2003, 24(10): 114–115]
- Zhao YY, Hu LL, Jiang ST. Optimum conditions of producing collagen polypeptide chelated Ca using pig bone. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2011, 27(S2): 277–281 [赵妍嫣, 胡林林, 姜绍通. 猪骨粉制备胶原多肽螯合钙工艺优化. *农业工程学报*, 2011, 27 (s2): 277–281]
- Zheng JM, Yan JL, Chen SQ, *et al.* Effects of dietary skimmed krill meal on the growth, non-specific immunity and serum physiological metabolism indices of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5) : 107–113 [郑建明, 严俊丽, 陈四清, 等. 脱脂磷虾粉对圆斑星鲽(*Verasper variegatus*)幼鱼生长、非特异性免疫力和血清生理代谢指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 107–113]
- Zheng Q, Wang YQ. Preparation of composite amino acids calcium copper from shell of *Meretrix meretrix* Linnaeus. *Anhui Chemical Industry*, 2009, 35(1): 25–28 [郑清, 王玉琴. 利用文蛤壳制备复合氨基酸螯合钙. *安徽化工*, 2009, 35(1): 25–28]

(编辑 陈辉)

Study of the Preparation of Compound Amino Acid-Chelated Calcium by Protease Hydrolysis of Scallop Skirts

JIAO Kui¹, GAO Xiang¹, YU Jia¹, WEI Yuxi^{1①}, GAO Jie¹,
ZHANG Xuemei¹, WANG Jinmei², LI Yujin²

(1. School of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071; 2. Rongcheng Taixiang Food Co. Ltd, Rongcheng 264309)

Abstract Scallop skirts are by-products of scallop processing that are rich in nutrients such as proteins and lipids. Owing to the limitations of the existing processing technology, they have not been used on a large scale and are not currently of much value. In this study, to effectively utilize the scallop skirt, neutral protease, animal-complex protease, flavor protease, papain, and acidic proteinase were used to hydrolyze the scallop skirt. The free amino acid nitrogen content in the hydrolysate was used as an indicator for optimized reaction conditions. First, alcohol was used to degrease the scallop skirt, which increased the degree of enzymatic hydrolysis. Subsequently, single-factor experiments were performed on five enzymes to select the optimize enzymatic hydrolysis time, temperature, pH, and enzyme dosage. Subsequently, orthogonal experiments were performed to determine the optimum hydrolysis conditions for the five enzymes. The results showed that the amino acid conversion rate of the hydrolysate prepared under the optimum hydrolysis conditions was as high as 77%. In previous studies, calcium chloride was determined to be the most suitable calcium source. The scallop shell was used as a raw material to obtain calcium chloride by acid treatment and water flying, and then calcium chloride was mixed with compound amino acids in the hydrolysate to prepare complex amino acid-chelated calcium. The calcium ion content in the chelated calcium was chosen as an index; subsequently, single factor experiments were performed to determine the time, temperature, and pH of the chelation process. The optimum chelating conditions were screened by an orthogonal experiment. A chelation rate of up to 92% was obtained in the final products. The compound amino acid-chelated calcium not only functions as a calcium supplement, but also has a delicious taste; it can be used as a calcium supplement or functional condiment. Our findings will assist in achieving additional value from scallop-processing waste, and also provide us with novel insights and methods for high-value utilization of other aquatic processing waste.

Key words Scallop skirts; Degrease; Enzymatic hydrolysis; Amino acids conversion rate; Amino acid chelated calcium; Chelation rate

① Corresponding author: WEI Yuxi, E-mail: yuxiw729@163.com