

小黄鱼蛋白酶水解工艺研究

纪莹¹, 张国增^{1,2}, 周素梅²

(1. 大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600; 2. 中国农业科学院 农产品加工研究所, 北京 100094)

摘要: 以小黄鱼为原料, 以水解度为指标, 利用蛋白酶解技术对小黄鱼蛋白进行酶解。单酶水解实验中, 选用碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶, 结果表明, 以木瓜蛋白酶酶解小黄鱼其水解度最高, 故选择木瓜蛋白酶为最佳酶, 并在此基础上进行酶解工艺的研究。小黄鱼蛋白酶解工艺研究中, 主要研究料液比、酶解温度、加酶量和酶解时间对水解效果的影响。结果表明, 水解度随加酶量、水解时间、料液比以及温度的增加而增加, 但在加酶量 0.2 mg/dL、水解时间 4 h、料液比 1:3(g:mL) 之前水解度增加速度较快, 之后其增加速率明显减慢; 从正交实验中得到最佳组合为: 水解温度为 60 ℃, 水解时间为 4 h, 加酶量取 0.2, 料液比为 1:5(g:mL)。各因素对水解度的影响顺序为: 料液比 > 酶解温度 > 加酶量 > 酶解时间。经正交实验优化后, 其水解度最高可达 49.50%。

关键词: 小黄鱼; 蛋白质; 酶解

中图分类号: S 37 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0555-05

Hydrolyzing of Small Yellow Croaker Fish Protein

Ji Ying¹, ZHANG Guo-zeng^{1,2}, ZHOU Su-mei²

(1. College of Life Sciences, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China; 2. Institute of Agro-Products Processing Science and Technology Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to take full advantage of pseudosciaena polyactis and increase their added value, the hydrolyzing of small yellow croaker fish protein were studied in this manuscript. The enzymatic hydrolysis of protein in small yellow croaker fish by alcalase, flavourzyme, papain and protomex were firstly studied and papain was selected for further study with the degree of hydrolysis (DH) as index. Then the effect of papain on the the degree of hydrolysis (DH) was investigated by single factor test and orthogonal experiment. The results of the single factor test showed that DH increases with the amount of enzyme, hydrolysis time, the ratio of small yellow croaker fish to water and the temperature and the optimum conditions listed as follows: 0.2 mg/dL enzyme, reaction time 4 h, the ratio of small yellow croaker fish to water 1:3. Furthermore, the optimum conditions was determined by the orthogonal experiment, and listed as follows: the amount 0.4 mg/dL, hydrolyzed for 4h at 60 ℃ and the ratio of mall yellow croaker fish to water at the ratio of 1:5. The effect those factors on DH was the ratio of small yellow croaker fish to water > temperature > amount of enzyme > time.

Key words: small yellow croaker, protein, enzymatic hydrolysis

收稿日期: 2010-10-28

作者简介: 纪莹(1980-), 女, 吉林通化人, 工学博士, 讲师, 主要从事功能性食品及品质改良研究。E-mail: yingji@dlnu.edu.cn

小黄鱼为我国主要经济鱼类之一,主要分布在我国渤海、黄海和东海。其肉质鲜嫩,营养丰富,是优质食用鱼,也是婴幼儿及病后体虚者的滋补和食疗佳品,但是由于加工方式传统,小黄鱼尚未得到充分开发^[1]。以鱼肉蛋白为底物,利用控制酶解技术生产具有生物活性的酶解产物是一个值得深入研究的领域,。将鱼肉蛋白控制酶解后不仅可增大溶解性,提高营养价值,而且产生了蛋白质所不具备的活性,因此可极大提高淡水鱼的附加值^[2-6]。

本文主要研究了单酶水解小黄鱼的最佳酶解工艺,为提高小黄鱼的利用,增加其经济附加值提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验原料:小黄鱼,市售;主要试剂:碱性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶均购自丹麦诺维信公司;木瓜蛋白酶购自广西庞博生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验仪器和设备

PHS-3C 酸度计:上海精密科学仪器有限公司;SBH-B 型水浴恒温振荡摇床:上海丰盟科技材料有限公司;PL203 电子秤:梅特勒-托利多电子精密仪器厂;UV-2100 型紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司;LXJ-II B 型低速大容量多管离心机:上海安亭科学仪器厂;DS-1 高速组织捣碎机:上海标本模型制造厂。

1.3 实验方法

1.3.1 原料处理 小黄鱼,经去头、去皮及内脏后将血水和黑膜等清除清洗干净,取鱼肉(去鱼刺),分份装入双层聚乙烯袋中,置于-20℃冷冻备用。

1.3.2 小黄鱼蛋白酶解工艺流程 鱼肉→(解冻)→破碎→匀浆→鱼糜液→90℃下预处理 10 min→冷却→加碱性蛋白酶的一组调 pH 至 8.0→加入蛋白酶→酶解→将酶解液置于沸水浴中加热灭酶(5 min)→冷却→离心(4 000 r/min, 15 min)→蛋白酶水解液

1.3.3 不同蛋白酶酶解小黄鱼蛋白的研究 按如上工艺条件,在 0.5 mg/dL(以蛋白量计)加酶量、55℃、料液比 1:4(g:mL)的条件下,分别选用碱性蛋白酶(Alcalase)、复合蛋白酶(Protomex)、木瓜

蛋白酶(Papin)、风味蛋白酶(Flavourzyme)4 种蛋白酶对小黄鱼蛋白酶解 4 小时,测定其水解度,从而选取最佳水解单酶。

1.3.4 小黄鱼蛋白酶解工艺参数的单因素实验

1)酶浓度对木瓜蛋白酶酶解的影响 控制固液比 1:4(g:mL)、酶解时间为 3 h、温度为 55℃、在不同的加酶量(0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/dL)下酶解小黄鱼肉蛋白,测定其水解度。

2)温度对小黄鱼蛋白酶解的影响 控制料液比为 1:4(g:mL)、酶解时间为 3 h、加酶量 0.5% (mg/dL)、在不同的温度(30、40、50、60℃)下酶解小黄鱼肉蛋白,测定其水解度。

3)酶解时间对小黄鱼蛋白酶解的影响 控制料液比为 1:4(g:mL)、酶解温度为 55℃、加酶量 0.5 mg/dL、在不同的时间(1、2、4、6、8 h)酶解小黄鱼肉蛋白,测定其水解度。

4)料液比对小黄鱼蛋白酶解的影响 控制酶解温度为 55℃、酶解时间为 3 h、加酶量 0.5 mg/dL、在不同的料液比(mg:dL)(1:2、1:3、1:4、1:6、1:8)下酶解小黄鱼肉蛋白,测定其水解度。

1.3.5 优化小黄鱼蛋白酶解工艺参数的正交实验

根据单因素试验结果,选择不同酶解因素的适当水平,进行正交实验。以蛋白水解度为指标确定最佳酶解条件组合。

1.3.6 水解程度评价 蛋白质的水解度(DH)被定义为,水解断裂的肽键数占样品蛋白质中的总肽键数的百分数。实验采用 TCA 法^[7]。

蛋白质水解度(DH)=(水解液可溶于 10% TCA 的氮量/总氮量)×100%

1.3.7 样品的总氮质量的测定 半自动凯氏定氮法^[8]。

1.3.8 TCA 可溶性氮质量的测定 福林-酚法测定^[9]。

2 结果与分析

2.1 最适蛋白酶的确定

木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和复合蛋白酶对小黄鱼蛋白酶解的水解度均比较高,但以木瓜蛋白酶为最高,而风味蛋白酶的水解度明显很低(见图 1)。因此,选取木瓜蛋白酶为最佳酶解用酶,并以此酶进行一下实验,进一步研究其最佳酶解工艺,以提

高水解度。

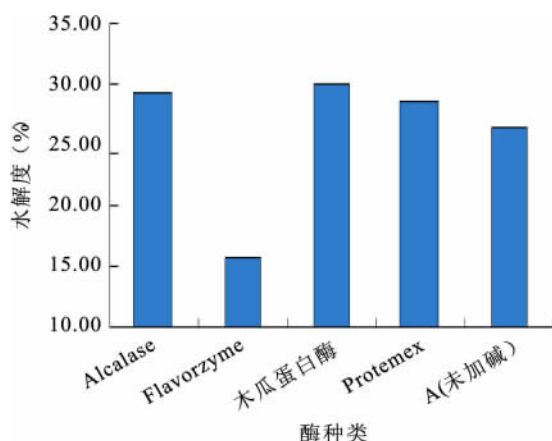


图1 不同蛋白酶酶解小黄鱼肉蛋白的水解度

Fig. 1 Effect of protease type on the hydrolysis of small yellow croaker fish protein

2.2 加酶量对木瓜蛋白酶水解度的影响

随着酶用量的增加,水解度也会随之会逐渐增加,但水解度在加酶量小于 0.2 g/dL 时会随酶量增加而迅速增加,在酶用量高于 0.2 g/dL 之后,虽然水解度仍在提高,但其增加速度明显下降(见图 2)。这很可能是由于生成的蛋白酶解物对酶的抑制或所有可以被酶作用的肽键都已与酶结合,即酶用量已经饱和所导致。酶解液中高浓度的可溶性短肽会使酶解反应速率下降^[10]。因此,如果在反应同时除去反应液中的酶解物,可能会使酶解反应速率和水解度都有所升高,从而提高生产效率和经济效益。

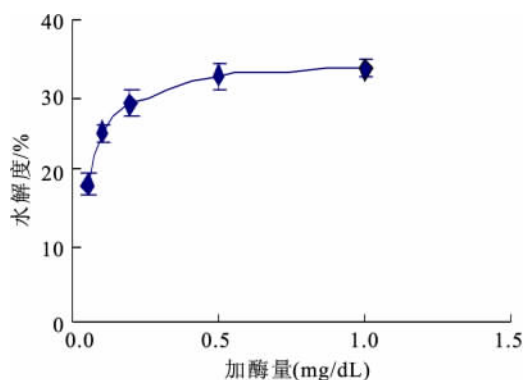


图2 加酶量对水解度的影响

Fig. 2 Effect of enzyme content on the hydrolysis of small yellow croaker fish protein

2.3 酶解温度对木瓜蛋白酶水解度的影响

由图 3 可以看出,水解度随温度上升,不断升高。但在 50 °C~60 °C 时其水解度升高程度已变得平缓,根据生产厂家给出的最佳水解温度 50 °C,并

考虑到实际生产中成本及温度过高不易控制等因素,故没有继续更高温度的实验。

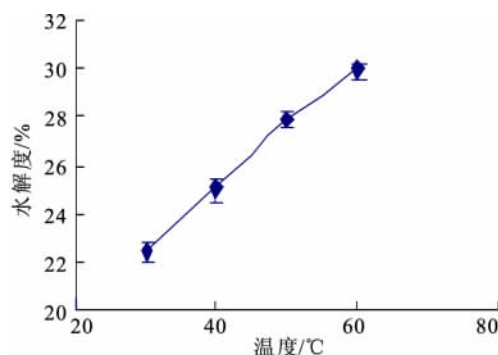


图3 酶解温度对水解度的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the hydrolysis of small yellow croaker fish protein

2.4 酶解时间对木瓜蛋白酶水解度的影响

随酶解时间的增加,料液的水解度逐渐增加,在 2~4 h 内水解度的增加十分显著,4 h 之后其增加程度趋于平缓,水解度增加不大,基本达到其最大值(见图 4)。其可能有两方面原因。第一,随着时间的增加,蛋白逐渐被水解为短肽,酶底物减少,产物增加,这都是降低酶反应速率的因素,使水解速度下降;第二,本实验所用方法是用 TCA 将大分子蛋白及短肽沉淀后的可溶性蛋白含量,而当水解出大量短肽后,可能促使木瓜蛋白酶催化大量短肽进一步水解为更短的小肽,此时的前后两种短肽都无法被 TCA 所沉淀,使得虽然有水解在发生,但所测水解度变化不大^[11]。

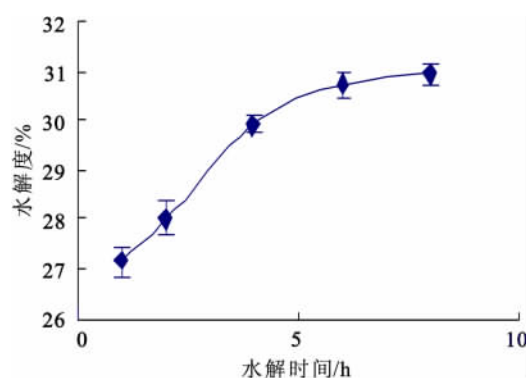


图4 酶解时间对水解度的影响

Fig. 4 Effect of enzymatic time on the hydrolysis of small yellow croaker fish protein

2.5 料液比对木瓜蛋白酶水解度的影响

随料液比的增加水解度随之增加,在料液比小于 1:3(g:mL)时,随料液比其水解度增加速度交

快,在料液比 1 : 3 (g : mL) 之后,水解度增加速度十分缓慢。其原因可能是液固比较小时,也许底物浓度过高,分散不均匀,过多底物分子堆集于酶的活动中心,从而会影响酶催化速度及产物分子的扩散,故水解度较低;液固比过大的话,一方面虽然使底物分散更均匀,溶解度增加,但同时酶的浓度下降,势必对蛋白水解造成不利影响^[12]。

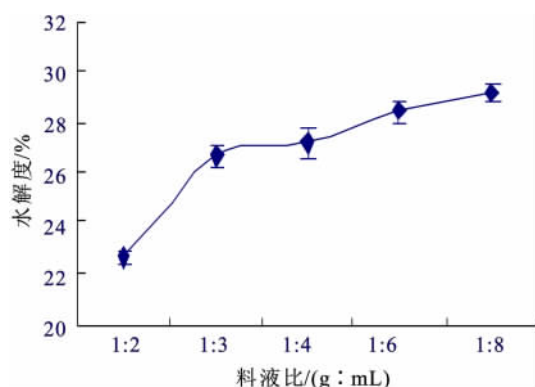


图 5 料液比对水解度的影响

Fig. 5 Effect of the ratio of small yellow croaker fish to water on the hydrolysis of small yellow croaker fish protein

2.6 优化小黄鱼蛋白酶解工艺条件的正交实验

为了得到较准确的工艺条件及参数,对加酶量、酶解温度、酶解时间、料液比 4 个主要因素,以水解度为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计进行实验,对酶解小黄鱼蛋白的条件进行了优化,实验安排见表 1,实验结果见表 2。

表 1 木瓜蛋白酶的正交实验因素与水平

Tab. 1 Factors and level of orthogonal experiment

水平	因素			
	A 温度/ ℃	B 时间/ h	C 加酶量/ (mg/dL)	D 料液比
1	50	3	0.2	1 : 3
2	55	4	0.3	1 : 4
3	60	5	0.4	1 : 5

表 2 木瓜蛋白酶酶解条件正交实验及结果

Tab. 2 Results of orthogonal experiment

实验号	A 温度/ ℃	B 时间/ h	C 加酶量/ (mg/dL)	D 料液比/ (g : mL)	水解度/%
1	50	3	0.2	1 : 3	40.96
2	50	4	0.3	1 : 4	43.15
3	50	5	0.4	1 : 5	48.77

续表 2

实验号	A 温度/ ℃	B 时间/ h	C 加酶量/ (mg/dL)	D 料液比/ (g : mL)	水解度/%
4	55	3	0.3	1 : 5	48.85
5	55	4	0.4	1 : 3	43.75
6	55	5	0.2	1 : 4	43.69
7	60	3	0.4	1 : 4	49.39
8	60	4	0.2	1 : 5	49.50
9	60	5	0.3	1 : 3	43.57

对正交试验的结果采用极差分析的方法比较各因素对试验结果的影响大小。根据表 3 中计算的极差的大小可以看出,各因素对水解度影响的主次顺序为:料液比 > 酶解温度 > 酶用量 > 酶解时间,可知料液比对木瓜蛋白酶酶解小黄鱼蛋白水解度的影响最大,而酶解时间对水解度的影响则很小。并可得出最适水解条件为 $A_3B_1C_3D_3$,即水解温度为 60℃,水解时间为 4 h,加酶量取 0.2 mg/dL,料液比为 1 : 5 (g : mL),其水解度可达 49.50%。

表 3 木瓜蛋白酶酶解条件正交实验极差分析

Tab. 3 Range analysis of the orthogonal experiment

实验号	A 温度/ ℃	B 时间/ h	C 加酶量/ (mg/dL)	D 料液比/ (g : mL)
K_1	132.88	139.20	134.15	128.28
K_2	136.29	136.40	135.57	136.23
K_3	142.46	136.03	141.91	147.12
k_1	44.29	46.40	44.72	42.76
k_2	45.43	45.47	45.19	45.41
k_3	47.49	45.34	47.30	49.04
R	3.19	1.06	2.59	6.28

3 结 语

本文以小黄鱼为原料,以水解度为指标,利用蛋白酶解技术对小黄鱼蛋白进行酶解,研究结果如下:

1) 以水解度为选酶指标,选用碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶对小黄鱼鱼肉进行酶法水解,结果表明酶解效果木瓜蛋白酶、复

合蛋白酶、碱性蛋白酶水解度都较高,但其中以木瓜蛋白酶水解度最高,风味蛋白酶最差。故采用木瓜蛋白酶作为酶解用最佳单酶,并在此基础上进一步研究其最佳水解工艺。

2)在单因素实验中可以看出,水解度随加酶量、水解时间、料液比以及 30~60℃ 范围内温度的增加而增加,但在加酶量 0.2 mg/dL、水解时间 4

h、料液比 1:3(g:mL)之前水解度增加速度较快,之后其增加速率明显减慢。

3)从正交实验中得到最佳组合为:水解温度为 60℃,水解时间为 3 h,加酶量取 0.4 mg/dL,料液比为 1:5(g:mL)。各因素对水解度的影响顺序为:料液比>酶解温度>加酶量>酶解时间。经正交实验优化后,其水解度可达 49.50%。

参考文献(References):

- [1] Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2000, 40: 43—81.
- [2] Cheftel CC, Ahern M, Wang DIC, et al. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate: Batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes[J]. **J Agric Food Chem**, 1971, 19: 155—161.
- [3] Amarowicz R, Shahidi F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates[J]. **Food Chemistry**, 1997, 58: 355—359.
- [4] Je JY, Park PJ, Kim SK. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate[J]. **Food Research International**, 2005, 38: 45—50.
- [5] You L, Zhao M, Cui C, et al. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2009, 10: 235—240.
- [6] Imm JY, Lee CM. Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1999, 47: 2360—2366.
- [7] Ren J, Zhao M, Shi J, et al. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology[J]. **Food Science and Technology**, 2008, 41: 1624—1632.
- [8] Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*) [J]. **Food Chemistry**, 2007, 103: 1385—1394.
- [9] Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. **Food Research International**, 2003, 36: 949—957.
- [10] Aspö SI, Horn SJ, Eijlsink VG. H. Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera[J]. **Process Biochemistry**, 2005, 40: 1957—1966.
- [11] Liaset B, Espe M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials[J]. **Process Biochemistry**, 2008, 43: 42—48.
- [12] Nilsang S, Lertsiri S, Supphantharika M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases[J]. **Journal of Food Engineering**, 2005, 70: 571—578.