

俞益芹, 张焕新, 殷玲, 等. 青鳞鱼蛋白酶解工艺及产物组分分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(3): 701-708.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.03.028

青鳞鱼蛋白酶解工艺及产物组分分析

俞益芹, 张焕新, 殷玲, 祁兴普, 董志俭

(江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 以青鳞鱼鱼肉为原料, 用风味蛋白酶对其进行水解处理制取水解蛋白质, 通过单因素试验考察了酶解温度、加酶量、酶解时间、底物浓度、pH 值等不同因素对青鳞鱼蛋白质水解物中游离氨基态氮含量和水解度的影响。在此基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计, 优化了青鳞鱼水解蛋白质的制备工艺。结果表明: 在水解温度 50 ℃、pH 值 6.5、底物: 水 = 1.0 : 1.9 (质量比)、加酶量 2 200 U/g、酶解时间 300 min 条件下, 青鳞鱼蛋白质的水解度为 14.82%, 与理论预测值之间误差仅为 0.29%, 游离氨基态氮含量为 1.946 mg/ml, 表明采用响应面法优化得到的青鳞鱼蛋白质酶解工艺参数准确可靠。酶解产物主要由 3~19 肽构成, 占总酶解产物的 71.63%, 其中 2~4 肽占总酶解产物的 48.86%。表明青鳞鱼鱼肉经风味蛋白酶水解时主要生成聚合度为 2~4 的小分子寡肽, 风味蛋白酶对青鳞鱼蛋白质具有较强水解作用。

关键词: 青鳞鱼; 风味蛋白酶; 氨基态氮; 水解度

中图分类号: TS254

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)03-0701-08

Enzymatic hydrolysis of harengula zunast protein and hydrolysates analysis

YU Yi-qin, ZHANG Huan-xin, YIN Ling, QI Xing-pu, DONG Zhi-jian

(*Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China*)

Abstract: Using *Harengula zunast* as raw material, the hydrolyzed protein was prepared by hydrolysis of fish meat with flavourzyme. The effects of hydrolysis temperature, enzyme dosage, enzymolysis time, substrate concentration and pH value on the content and hydrolysis degree of free amino nitrogen in hydrolysate of *Harengula zunast* protein were investigated by single-factor experiments. On this basis, the preparation process of hydrolyzed protein was optimized by Box-Behnken experimental design. The optimum hydrolysis parameters were as follows: temperature 50 ℃, pH 6.5, mass ratio of substrate concentration 1.0 : 1.9, enzyme dosage 2 200 U/g, and reaction time 300 min. Under the optimized technology, the hydrolysis degree of *Harengula zunast* protein was 14.82%, and the relative error between predicted value and actual value was 0.29%, the content of free amino nitrogen was 1.946 mg/ml. The results showed that the parameters of protease hydrolysate obtained by response surface method were accurate and reliable. The enzymatic hydrolysates were mainly composed of 3-19 peptides, accounting for 71.63% of the total hydrolysates, and the 2-4 peptide accounted for 48.86%. These results indicated that the small molecular oligopeptides with the degree of polymerization of 2-4 were mainly produced when

Harengula zunast fish meat was hydrolyzed by flavourzyme, and flavourzyme had strong hydrolysis effect on *Harengula zunast* protein.

Key words: *Harengula zunast*; flavourzyme; amino nitrogen; degree of hydrolysis

收稿日期: 2018-08-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31502020); 江苏省“青蓝工程”项目(20160418); 泰州市“311”人才培养工程项目; 泰州市科技支撑计划(农业)项目(TN201712); 江苏农牧科技职业学院院级课题(NSFPT201616)

作者简介: 俞益芹(1974-), 女, 江苏姜堰人, 本科, 高级实验师, 主要从事食品分析研究。

通讯作者: 张焕新, (E-mail) hxinzh@hotmail.com

青鳞鱼(*Harengula zunast*), 硬骨鱼系, 真骨总

目,鲱形目,鲱科的一种,俗名“青皮”、“柳叶青”,属暖水性中上层低值鱼,是中国常见海产鱼种,主要分布于东海、黄海和渤海海域,资源丰富^[1-2]。青鳞鱼肉虽然蛋白质含量高,但它体小多刺,脂肪及血和肉含量高,不宜鲜食,且不耐贮藏,是中国主要的低值海产品^[3]。近年来,由于现代捕捞技术的推广,大中型鱼类资源逐年受到破坏,使得低值小杂鱼迅速繁殖,比重占到海洋捕捞产量的 57%~59%。由于食用价值低,用于食品加工的小杂鱼比重仅约 1/3,大多制作为动物蛋白质饲料或工业原料等低值产品,资源价值未得到充分利用^[4-5]。此外,因加工技术和回收手段落后,造成大量营养成分流失,产品的得率和附加值没有得到有效的提高,资源浪费严重并对环境造成污染^[6]。因此,加大对低值鱼的深加工技术研究以提高其经济附加值对于充分利用水产资源有着非常重要的意义。目前,对青鳞鱼的应用研究主要集中在探讨酶法水解鱼肉提取浓缩鱼蛋白质、多肽以及制作鱼露等^[7-11]终产物的技术研究,而针对酶水解工艺过程各种因素作用的详尽研究报告则相对较少^[12-13],且不太完善。

风味蛋白酶是一种真菌蛋白酶/肽酶的复合体,在中性或微酸性条件下不仅能脱除蛋白质水解液的苦味,同时对蛋白质具有较强的水解能力,可以增进和改善水解液的风味^[14-15]。本研究以青鳞鱼鱼肉为底物,以风味蛋白酶水解鱼肉制取水解蛋白质,探讨酶解反应中各因素对水解物中游离氨基态氮含量和水解度的影响,在此基础上,采用 Box-Behnken 试验设计,优化青鳞鱼水解蛋白质制备的最佳水解工艺参数,旨在为深入研究利用青鳞鱼水解蛋白质提供参考,同时为低值海洋蛋白质的高值化开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与主要试剂

青鳞鱼,购自南通市水产品市场,鲜鱼清洗干净后人工取鱼肉片,去除鱼皮和黑膜;用冷水将鱼肉清洗干净,置于多孔筛网上沥干,然后用 PVC 袋按照 1 袋 80 g 进行封装,并于 -18℃ 冰柜中保存备用。风味蛋白酶(Flavourzyme ©, 24 000 U/g)购自诺维信(中国)投资有限公司,甲醛溶液、石油醚购自上海化学试剂公司,氢氧化钠、盐酸、硫酸钾、硫酸铜、硼酸均为分析纯(上海国药试剂有限公司产品),试验所用水均为蒸馏水。

1.2 试验仪器设备

S-3C 型精密 pH 计购自上海精科雷磁有限公司,MA-45 型水分测定仪购自北京赛多利斯仪器系统有限公司,BS323S 型精密电子天平购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司,R502B 型旋转蒸发器购自上海申生科技有限公司,78-1 型磁力加热搅拌器购自常州国华电器有限公司,JJ-2 型组织捣碎机购自舟山市淀海区海源仪器厂,CXJ-2 型离心机购自上海离心机械研究所,DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱购自上海精密实验设备有限公司。

1.3 分析方法

1.3.1 水分测定 取适量鱼肉置于水分测定仪中,自动测定得出结果。

1.3.2 灰分含量测定 参照 GB 5009.4-2016《食品安全国家标准——食品中灰分的测定》测定灰分。

1.3.3 脂肪含量测定 参照 GB5009.6-2016 中的索氏抽提法测定饮料中的脂肪含量(脂肪含量是粗脂肪)的方法测定。

1.3.4 蛋白质含量测定 参照 GB5009.5-2016 测定蛋白质含量。

1.3.5 游离氨基态氮(AN)含量测定^[16] 采用甲醛滴定法。取 5 ml 离心后的上清液,置于 100 ml 容量瓶中,加蒸馏水定容,摇匀,吸取 20 ml 稀释液于 200 ml 烧杯中,加水 60 ml。开磁力搅拌器,用 0.05 mol/L NaOH 标准溶液标定至 pH 8.20,再加入 10 ml 甲醛溶液,继续用 NaOH 标准溶液标定至 pH 9.20。相同条件下另做一组空白试验。按下列公式计算样品中游离氨基态氮的含量:

$$AN(\text{mg/ml}) = (V_1 - V_0) \times c \times 0.140\ 08 \times 100 \quad (1)$$

式中, c :NaOH 的当量浓度; V_1 :滴定样品时消耗 NaOH 溶液的体积(ml); V_0 :滴定空白时消耗 NaOH 溶液的体积(ml);0.140 08:氮的毫克当量。

1.3.6 水解度(DH)测定^[17]

$$DH = (B - C) / (A - C) \times 100\% \quad (2)$$

式中, A :原料中总氨基氮含量; B :水解液中游离氨基氮含量; C :原料的游离氨基氮含量。

1.4 试验设计

1.4.1 单因素试验 准确称取鱼肉 10 g(精确到 0.01 g),分别置于 250 ml 烧杯中,加入 40 ml 蒸馏水,在 60℃ 水浴锅中热处理 10 min 使鱼肉适度变性。待其冷却后,进行酶解试验。基于风味蛋白酶在其他蛋白质水解中的应用^[18-19],单因素试验的基

本条件设定为:反应温度 50 ℃, pH 6.5, 风味蛋白酶添加量 1 650 U/g, 料水质量比 1 : 4, 反应时间 240 min。反应完成后, 100 ℃ 水浴 5 min 灭酶, 测定游离氨基态氮及水解度。改变影响酶水解的其中一个因素, 其他因素保持不变, 分别考察反应温度、pH 值、风味蛋白酶添加量、反应时间和底物含量对游离氨基态氮和水解度的影响, 每组处理重复 3 次。

1.4.2 响应面分析法优化试验 在试验因素水平不多的情况下, 为了得到全面完整数据, 采用全面试验法: Response surface 3-level factorial design^[20]。根据单因素试验, 选择酶解时间、料水质量比、加酶量 3 个对水解度(DH)有显著影响的因素, 以水解度为响应值, 应用 Design Expert 6.0 的 3-level Factorial 试验设计模块进行优化试验的设计及结果分析, 因素水平见表 1。

表 1 响应面试验因素和水平编码值

Table 1 Coded values of experimental factors and levels in response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A: 酶解时间(min)	240	270	300
B: 底物 : 水(质量比)	1 : 1	1 : 2	1 : 3
C: 加酶量(U/g)	1 100	1 650	2 200

1.4.3 水解液各组分分子量测定 用 Sephadex G-15 柱(1.1 cm × 50.0 cm) 分析检测^[21]。以 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0) 为洗脱液, 流速为 0.4 ml/min, 上样量为 1 ml, QuadTec™ 检测器检测, 检测波长 280 nm。标准样分别为 L-酪氨酸($M_r = 181.19$)、AMP($M_r = 347.2$)、辅酶 I(NAD, $M_r = 681.44$)、短杆菌肽(Bacitracin zinc, $M_r = 1\ 486.2$) , 用缓冲液配成 5 g/L 的溶液备用, 用蓝葡聚糖 2000 测定柱外水体积 V_0 , 然后由标准样的保留时间计算出相应的洗脱体积 V_e , 以相对分子质量的对数值($\lg M_r$) 为横坐标, K_{av} (有效分配系数) 为纵坐标绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 青鳞鱼的常规成分分析

青鳞鱼鱼肉常规成分见表 2, 通过比较青鳞鱼鱼肉、去内脏青鳞鱼和青鳞鱼下脚料, 可以看出随着青鳞鱼加工深度的提高, 蛋白质、脂肪的含量增加,

而灰分减少。蛋白质含量在鱼肉中所占的比率要大于内脏等其他部位。因此, 鱼肉可以用来制造经济价值较高的水解蛋白质, 而内脏等下脚料用来制造经济价值较低的鱼粉更为合适^[22]。和另一种常见海洋低值鱼——鲮鱼相比, 青鳞鱼蛋白质含量更高, 其具有更好的经济价值^[6]。

表 2 青鳞鱼的常规成分

Table 2 Proximate composition of meat from *Harengula zunast*

种类	水分(%)	蛋白质(%)	脂肪(%)	灰分(%)
青鳞鱼鱼肉	52.51	75.6	15.86	6.85
去内脏青鳞鱼	—	68.3	9.07	17.10
青鳞鱼下脚料	—	58.7	18.60	28.50
鲮鱼	—	52.5	29.80	14.60

表格中“—”表示未检测。

2.2 单因素试验

2.2.1 温度对酶解游离氨基态氮和水解度的影响

风味蛋白酶在 40~65 ℃ 内水解青鳞鱼鱼肉时游离氨基态氮和水解度的变化如图 1 所示。由图 1 可知, 在风味蛋白酶水解作用下, 产物中游离氨基态氮含量和水解度呈现明显的相关性, 在 40~50 ℃ 内, 游离氨基态氮含量(AN) 和水解度(DH) 均随温度升高而增加, 当温度升高到 50 ℃, AN 和 DH 分别达到最大值 1.225 mg/ml 和 8.77%。在 50~60 ℃, 二者均呈下降趋势, 原因主要是反应温度过高, 酶分子的空间结构发生改变, 次级键解离, 导致酶活力下降^[23]。同时, 鱼肉蛋白质变性后, 水解难度增加^[24]。因此, 风味蛋白酶水解青鳞鱼鱼肉的最佳酶解温度为 50 ℃。

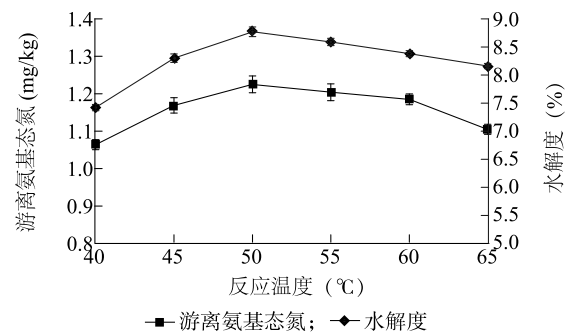


图 1 温度对酶解反应的影响

Fig.1 Effect of temperature on enzymatic hydrolysis

2.2.2 pH 值对酶解游离氨基态氮和水解度的影响

在温度 50 ℃, 加酶量 1 650 U/g, 料水质量比 1 : 4, 时间 240 min 条件下, 探讨 pH 对风味蛋白酶水解

青鳞鱼鱼肉反应的影响,结果如图 2。图 2 表明,在 pH 值 5.5~8.0,游离氨基态氮含量和水解度均变化不大,当 pH 值为 7.0 时,AN 和 DH 分别达到最大值 1.208 mg/ml 和 8.63%。总体来看,在试验选取范围内,pH 值对风味蛋白酶水解青鳞鱼鱼肉反应的影响较小,最佳酶解 pH 值为 7.0。

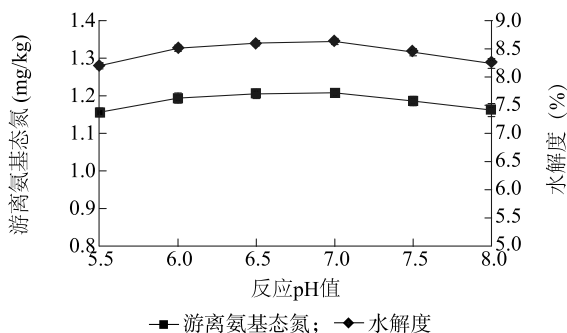


图 2 pH 值对酶解反应的影响

Fig.2 Effect of pH on enzymatic hydrolysis

2.2.3 加酶量对酶解游离氨基态氮和水解度的影响 在反应 pH 值 6.5, 温度 50 ℃, 料水质量比 1 : 4, 时间 4.0 h 条件下, 探讨风味蛋白酶添加量对青鳞鱼鱼肉水解反应的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, 随着风味蛋白酶添加量的增加, 水解度和游离氨基态氮同时增大。风味蛋白酶添加量由 550 U/g 增大至 1 650 U/g 时, 水解曲线斜率增大迅速, 表明反应速度增大, 水解度和产物中游离氨基态氮含量快速提高; 当风味蛋白酶添加量大于 1 650 U/g 时, 水解曲线斜率缓慢减小, 表明反应速度降低, 水解度和产物中游离氨基态氮含量增加缓慢。综合考虑得率与生产成本之间的关系, 确定风味蛋白酶适宜添加量为 1 650 U/g。

2.2.4 时间对酶解游离氨基态氮和水解度的影响 在 pH 值 6.5, 反应温度 50 ℃, 加酶量 1 650 U/g, 料水质量比 1 : 4 条件下, 探讨反应时间对风味蛋白酶水解青鳞鱼鱼肉反应的影响, 结果见图 4。图 4 表明, 随着酶解时间的延长, 水解度逐渐增大, 水解液中游离氨基态氮含量增加。反应时间从 180 min 延长至 270 min, 两者增幅较大。由此可见, 反应时间延长使蛋白质水解为更多的小肽和游离氨基酸。从 270 min 到 300 min 水解度和水解液中游离氨基态氮含量增幅较小, 反应时间至 300 min 时, AN 和 DH 分别达到最大值 1.398 mg/ml 和 10.22%。而

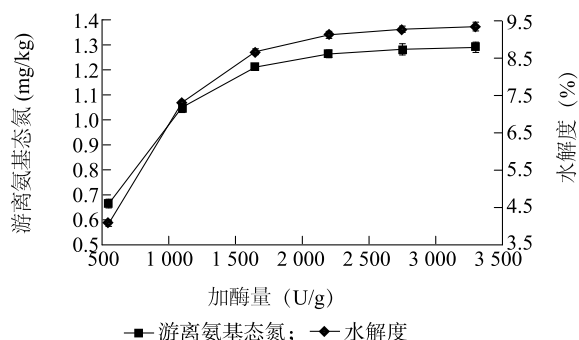


图 3 加酶量对酶解反应的影响

Fig.3 Effect of enzyme dosage on enzymatic hydrolysis

300 min 到 330 min 时 AN 和 DH 都略有下降。因此, 风味蛋白酶水解青鳞鱼鱼肉适宜的酶解时间为 280 min。

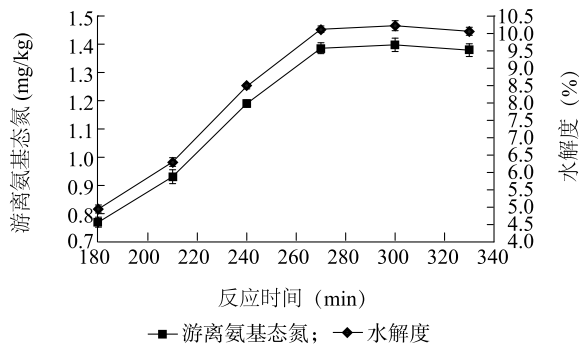


图 4 反应时间对酶解反应的影响

Fig.4 Effect of time on enzymatic hydrolysis

2.2.5 料水质量比对酶解反应的影响 在 pH 值 6.5, 反应温度 50 ℃, 加酶量 1 650 U/g, 时间 240 min 条件下, 探讨料水质量比对风味蛋白酶水解青鳞鱼鱼肉反应的影响, 结果见图 5。图 5 表明, 底物浓度对酶解反应的影响较大。料水比为 1 : 2 (质量比), AN 和 DH 分别达到最大值 1.736 mg/ml 和 13.06%。料水质量比大于 1 : 2 后, 随着加水量的增加, 水解度和游离氨基态氮同时大幅度下降。因此, 风味蛋白酶水解青鳞鱼鱼肉的适宜料水质量比为 1 : 2。

2.3 酶解工艺参数的 RSA 优化

本试验选取对酶解反应影响较大的 3 个因素 (酶解时间、料水质量比和加酶量) 作为自变量, DH 为响应值, 采用响应面分析法在三因素三水平上对酶解反应条件进行优化, 其他两因素条件固定为: 温度 50 ℃, pH 7.0。试验设计及结果见表 3。

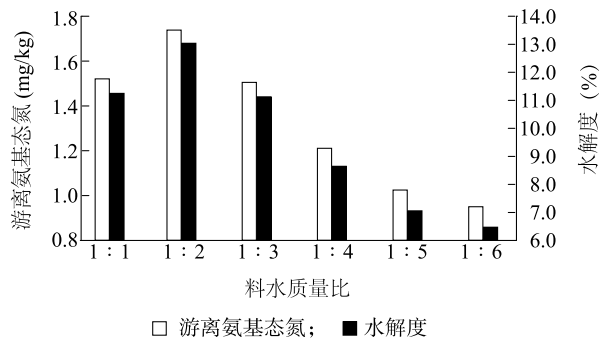


图5 底物浓度对酶解反应的影响

Fig.5 Effect of substrate concentration on enzymatic hydrolysis

表3 响应面分析试验设计及结果

Table 3 Box-Behnken experimental design and results for response surface analysis

试验组	试验水平			DH (%)
	酶解时间	料水质量比	加酶量	
1	1	1	1	12.71
2	1	-1	1	13.47
3	-1	0	1	13.47
4	1	-1	-1	10.83
5	0	0	0	13.65
6	1	0	-1	12.29
7	-1	0	-1	11.71
8	0	0	0	13.88
9	0	-1	1	12.47
10	-1	1	1	11.53
11	-1	-1	1	11.41
12	1	0	0	13.76
13	-1	0	0	13.06
14	-1	1	0	11.11
15	1	0	1	14.06
16	-1	1	-1	10.53
17	0	0	0	12.58
18	0	-1	0	12.00
19	1	1	-1	10.65
20	1	-1	0	12.12
21	0	-1	-1	10.65
22	0	1	1	12.18
23	0	1	-1	10.36
24	0	0	1	14.06
25	-1	-1	0	11.24
26	0	1	0	11.71
27	1	1	0	11.88
28	-1	-1	-1	9.77
29	0	0	0	12.29
30	0	0	0	13.24
31	0	0	0	14.53
32	0	0	0	14.02

表中水平 1,0,-1 见表 1。

试验组 1~28 为析因试验,29~32 为中心试验。32 个试验点分为析因点和零点,其中析因点为自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点;零点为区域的中心点,零点试验重复 4 次,用以估计试验误差。采用 RSA Quadratic Model 对所得数据进行回归分析,回归分析结果见表 4。

表4 回归分析结果

Table 4 Anova results of response surface quadratic model

来源	自由度	平方和	均方	F 值	Prob>F
模型	9	47.811 06	5.312 34	38.026 46	<0.000 1 **
A	1	3.502 42	3.502 42	25.070 82	<0.000 1 **
B	1	0.093 89	0.093 89	0.672 07	0.421 1
C	1	14.724 36	14.724 36	105.399 00	<0.000 1 **
A ²	1	0.309 38	0.309 38	2.214 56	0.150 9
B ²	1	20.787 23	20.787 23	148.797 80	<0.000 1 **
C ²	1	1.152 01	1.152 01	8.246 26	0.008 9 **
A×B	1	0.310 41	0.310 41	2.221 95	0.150 3
A×C	1	0.357 08	0.357 08	2.555 99	0.124 1
B×C	1	0.124 03	0.124 03	0.887 85	0.356 3
残差	22	3.073 43	0.139 70		
失拟项	17	0.796 23	0.046 84	0.102 84	0.999 8
纯误差	5	2.277 20	0.455 44		
总离差	31	50.884 49			

A:酶解时间(min),B:料水质量比,C:加酶量(U/g);**表示差异极显著($P<0.01$)。

由表 4 可知:模型 F 值为 38.03,产生误差的可能性只有 0.01%,具有显著性。“ $Prob>F$ ”值小于 0.010 0,表明计算模型是高度显著的,可以利用该响应面近似模型进行后续的优化设计。在试验中 A、C、 B^2 和 C^2 是显著的模型体系;“ $Prob>F$ ”值大于 0.010 0 表明该因素对模型计算影响不显著^[25]。“失拟 F 值”为 0.10,“ $Prob>F$ ”值大于 0.05 表明不显著,即该模型在被研究的整个回归区域内拟合较好,试验误差小^[26],回归模型能充分说明酶解工艺过程。

对各因素进行回归拟合,得回归方程:

$$DH = 13.590 + 0.440A - 0.072B + 0.900C - 0.210A^2 - 1.700B^2 - 0.400C^2 - 0.160AB + 0.170AC - 0.100BC \quad (3)$$

为了直观表示各因素对响应值的影响,并反映最佳优化条件,作出响应面图和等值线图(图 6、图 7、图 8)。

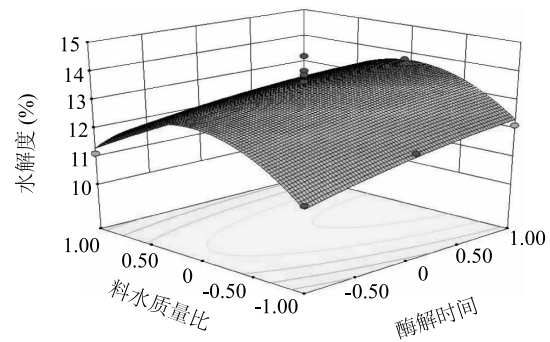
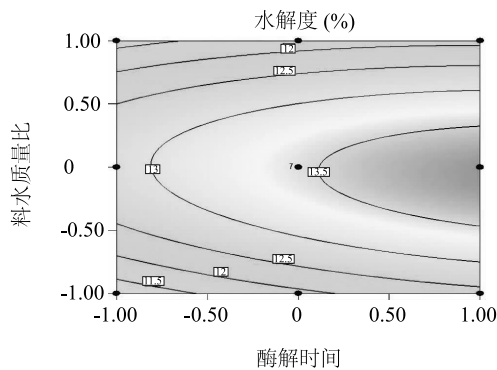


图 6 酶解时间和料水质量比交互影响水解度的响应面及等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots of the interactive effects of the time and substrate concentration on hydrolysis degree

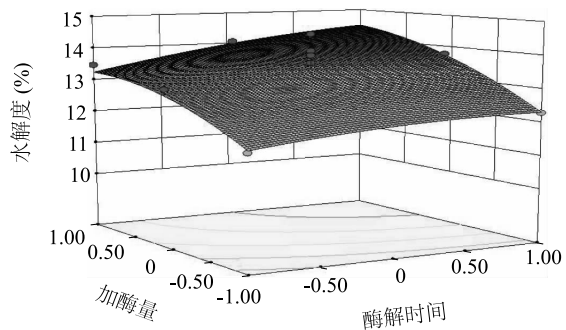
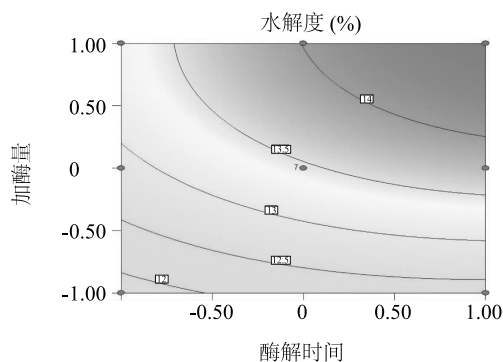


图 7 酶解时间和加酶量交互影响水解度的响应面及等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots of the interactive effects of the time and enzyme dosage on hydrolysis degree

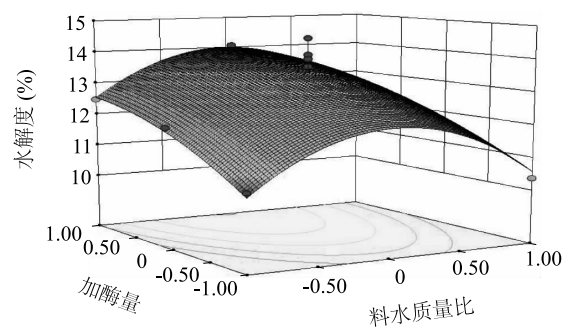
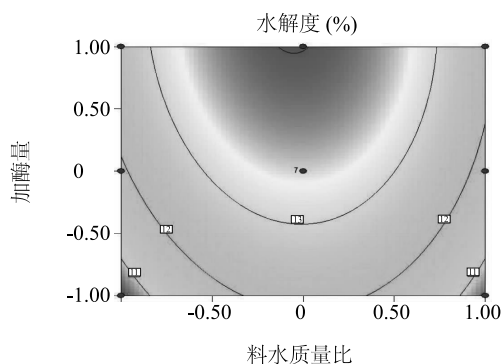


图 8 料水质量比和加酶量交互影响水解度的响应面及等高线图

Fig.8 Response surface and contour plots of the interactive effects of the substrate concentration and enzyme dosage on hydrolysis degree

图 6~图 8 直观地反映了各因素对水解度的影响,由等值线图可以看出存在极值的条件应该在弧形内侧。比较 3 组图可知,加酶量 (C) 对水解度的影响最为显著,表现为曲面较陡;而酶解时间 (A) 次之;料水质量比 (B) 影响最小,表现为曲面较为平

滑,随数值的增加或减少,其响应值变化较小。

在因素水平范围内,进一步确定最佳点的值,运用优化程序“Optimization”求解最佳点,解得: $A=1.00, B=-0.01, C=1.00$,即风味蛋白酶水解青鳞鱼肉的最佳酶解时间为 300 min,最佳料水质量比为

1.0 : 1.9,最佳加酶量为2 200 U/g。在此条件下,酶解反应的鱼肉蛋白水解度 DH 的理论值可达 14.51%。

2.4 最佳工艺条件下的酶解

为检验 RSA 分析法的可靠性,采用上述最佳提取条件进行酶解试验,酶解条件为 pH7.0,温度 50℃,加酶量 2 200 U/g,料水质量比 1.0 : 1.9,时间 300 min,同条件下多次重复试验以减少误差,试验结果见表 5。

表 5 最佳酶解条件下平行试验酶解情况

Table 5 Results of enzymatic hydrolysis in the suitable hydrolysis condition

指标	试验序号				平均值
	1	2	3	4	
AN(mg/ml)	1.918	1.953	1.974	1.939	1.946
DH(%)	14.59	14.88	15.06	14.76	14.82

由表 5 可知,实际测得青鳞鱼蛋白质水解度平均值为 14.82%,与理论预测值 14.51%相比误差小于 0.5%;实际测得游离氨基态氮含量为 1.946 mg/ml。表明采用 RSA 分析法优化得到的水解条件参数准确可靠。在上述的工艺流程和试验确定的工艺条件下,用风味蛋白酶对青鳞鱼鱼肉水解处理,制得的浓缩鱼蛋白质具有如下特性:色泽为白色至灰白色,固体疏松无结块,无腥臭味,易溶于水,口感不苦有鱼肉的鲜味,表明此工艺具有较高实用价值。

2.5 酶解物组分分析

2.5.1 标准曲线的绘制 测得 Sephadex G-15 柱的 V_0 为 14.98 ml,柱床体积为 47.50 ml,由各标准物的保留时间计算出相应的 V_e ,进而计算出有效分配系数 K_{av} ,制作标准曲线(图 9)。由图 9 可见, K_{av} (有效分配系数)与相对分子质量的对数值($\lg Mr$)呈线性关系,回归方程为 $Y = -0.87980x + 2.76771$, $r = 0.99523$,其中 x 为相对分子质量的对数值, Y 为有效分配系数,标准曲线的线性相关系数为 0.99523,说明线性关系很好,可以根据此回归方程计算出待测样品的相对分子质量^[27]。

2.5.2 酶解物分子质量分布 取待测酶解液 2 ml 利用 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离,流速为 0.4 ml/min,每管收集 2 ml,由此得到洗脱峰(图 10)。由图 10 可知,青鳞鱼鱼肉经风味蛋白酶水解后产生

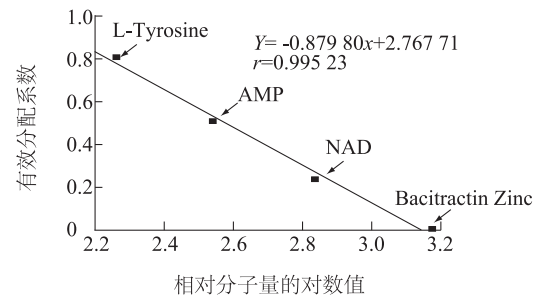


图 9 Sephadex G-15 凝胶层析测定分子量标准曲线图

Fig.9 Standard curve of molecular weight calibrated by Sephadex G-15 gel chromatography

不同分子质量的多肽类物质。酶解样品经过 Sephadex G-15 凝胶分离后出现 8 个明显的洗脱峰,根据标准曲线可以计算出 8 个峰值处的分子质量及含量,分别为 1 484.72 (14.91%)、1 075.34 (5.22%)、674.00 (0.70%)、563.72 (1.94%)、185.28 (48.86%)、61.33 (5.91%)、34.45 (2.88%) 和 9.93 (20.23%)。酶解蛋白质分子质量为 185.28 ~ 1 484.72,酶解产物中主要由小分子的肽(3~19 肽)构成,占酶解产物总量的 71.63%。其中 2~4 肽(分子质量 185.28)占酶解产物总量的 48.86%,由此可见青鳞鱼肉经风味蛋白酶水解后的主要产物为聚合度为 2~4 的小分子寡肽。氨基酸残基最小为 57,平均分子质量为 61.33,酶解产物代表游离氨基酸,占酶解产物总量的 5.91%;而平均分子质量 34.45 和 9.93 洗脱峰的出现表明酶解产物还含有其他杂质和非氨基酸残基类物质^[28-30]。

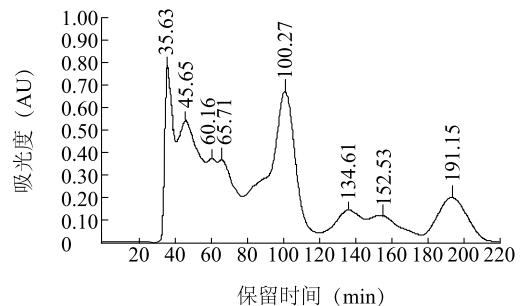


图 10 酶解物 Sephadex G-15 层析图谱

Fig.10 Sephadex G-15 chromatography of hydrolysate

3 结论

通过单因素试验,考察了不同因素对风味蛋白酶水解青鳞鱼鱼肉效果的影响,研究结果表明,在试

验选取的因素水平范围内,结果表明反应温度和 pH 值对酶解效果影响较小,酶解时间、料水质量比和加酶量对酶解效果影响较大;应用响应面设计优化的酶解工艺:pH 值 7.0、酶解温度 50 ℃、加酶量 2 200 U/g、酶解时间 300 min、料水质量比 1.0 : 1.9,在此条件下,游离氨基态氮含量和水解率分别可达 1.946 mg/ml 和 14.82%,且以青鳞鱼鱼肉为原料制得的浓缩鱼蛋白质具有良好的感官特性。酶解产物主要由 3~19 肽构成,占总酶解产物的 71.63%;其中 2~4 肽占总酶解产物的 48.86%。表明青鳞鱼鱼肉经风味蛋白酶水解时主要生成聚合度为 2~4 的小分子寡肽,风味蛋白酶对青鳞鱼蛋白质具有较强水解作用。

参考文献:

- [1] 王杏珠. 青鳞鱼加工和利用的研究[J]. 水产科技情报, 1995, 16(1):28-32.
- [2] 邓尚贵,杨 萍. 青鳞鱼肌肉蛋白复合酶水解机制研究[J]. 食品科学, 2004, 25(3):67-75.
- [3] 范蕴莹. 不同种类低值鱼酶解效果的比较及优化[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7):814-818.
- [4] 段 蕊,张俊杰. 海洋低值小杂鱼的加工方向和现状[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(6):53-56.
- [5] 张海莲. 浅谈海洋低值小杂鱼的综合利用[J]. 河北渔业, 2005(4):7-8.
- [6] 师晓栋,何海伦,王运涛,等. 酶法进行海洋低值蛋白资源高值化利用初探[J]. 海洋科学, 2001, 25(3):4-7.
- [7] 杨 萍,邓尚贵,吴玉廉. 蛋白酶及其作用方式对制取青鳞鱼肌肉水解蛋白的影响[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(4):91-94.
- [8] 杨 萍,邓尚贵. 木瓜蛋白酶在制取青鳞鱼可溶性蛋白中的应用[J]. 广东海洋大学学报, 2002, 22(3):38-41.
- [9] DENG S G, YANG P, YANG Z J, et al. Conditions and hydrolysate of the enzymolysis of *harengula zunasi* *B. muscle* proteins by flavorease[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2004, 24(1):20-27.
- [10] DENG S G, PENG Z Y, CHEN F, et al. Amino acid composition and anti-anaemia action of hydrolyzed offal protein from *Harengula Zunasi*, Bleeker[J]. Food Chemistry, 2004, 87(1):97-102.
- [11] 常志娟,邓尚贵. 青鳞鱼水解蛋白复合果味酸奶的研制[J]. 饮料工业, 2008, 11(2):35-38.
- [12] KAWAGUTI S, KAMISHIMA Y. Electron microscopy on the blue back of a clupeoid fish, *harengula zunasi*[J]. Proceedings of the Japan Academy, 2006, 42(4):389-393.
- [13] 曹文红,冯思涛,莫敏婷,等. 青鳞鱼酶解工艺正交优化及其产物分子量分布的研究[J]. 食品科技, 2013(4):130-135.
- [14] 郭晶晶,马海乐,程 宇,等. 风味蛋白酶水解草鱼肉的试验研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13):248-252.
- [15] 邵俊杰,朱昱璇,黄鸿兵,等. 不同蛋白酶酶解河鲢蛋白的比较[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4):921-926.
- [16] 候曼玲. 食品分析[M]. 北京:化学工业出版社, 2004:76-77.
- [17] WALSH D J, CLEARY D, MCCARTHY E, et al. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking[J]. Food Research International, 2003, 36(7):677-683.
- [18] 陈 杰,马美湖. 风味蛋白酶水解蛋清工艺条件的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(7):43-44.
- [19] 刘 爽,夏杨毅,尚永彪. 鸡蛋蛋清蛋白酶解产物的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(15):409-414.
- [20] 汪怀建,谭文津,丁雪杉,等. 超声波辅助提取玉米芯中木聚糖条件优化研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(7):50-54.
- [21] 陈爱瑛,贾建萍,叶小弟,等. 鱼皮胶原蛋白水解液中小分子寡肽的分子量分布测定[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(2):160-162.
- [22] 张俊杰,段 蕊. 高蛋白鱼粉的加工[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2000, 9(2):44-46.
- [23] 吉 挺,张焕新,殷 玲. 油菜蜂花粉多肽饮料的研制及抗氧化活性评价[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8):135-141.
- [24] 常志娟. 采用复合酶水解青鳞鱼蛋白及水解产物特性研究[D]. 湛江:广东海洋大学, 2005.
- [25] 李 莉,张 赛,何 强,等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8):41-45.
- [26] KUMAR A, PRASAD B, MISHRA I M. Optimization of process parameters for acrylonitrile removal by a low-cost adsorbent using Box-Behnken design.[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 150(1):174-182.
- [27] 姚东瑞,盘赛昆,周鸣谦,等. 菠萝蛋白酶水解泥鳅蛋白制备 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1):180-185.
- [28] 马永强,赵 毅. 大豆蛋白水解物中肽分子分布的研究[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(3):15-17.
- [29] 刘文斌,尹 君,王 恬. 棉粕蛋白及其枯草蛋白酶酶解产物的组分分析[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(11):105-108.
- [30] WANG J, HU J, CUI J, 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.

(责任编辑:陈海霞)