

鲤鱼酶解液化技术研究

殷金莲,孙 卉,谢顺虎,杨 阳,张红勇,徐怀德

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了确定木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶酶解鲤鱼的最佳酶解条件及其酶解效果,应用正交试验和对比试验对鲤鱼酶解液化技术进行了研究,并对酶解前后游离氨基酸含量进行了分析。结果表明,胰蛋白酶酶解鲤鱼的最佳酶解条件为:酶用量 24 g/kg,酶解温度 50 ℃,pH 值 7.0,在此条件下酶解 3 h 后氨基态氮含量为 59.2 mg/L;枯草杆菌蛋白酶的最佳酶解条件为:酶用量 0.16 g/kg,酶解温度 45 ℃,pH 值 8.0,在此条件下酶解 4 h 后氨基态氮含量为 44.6 mg/L;木瓜蛋白酶的最佳酶解条件为:酶用量 10 g/kg,酶解温度 60 ℃,pH 值 7.0,在此条件下酶解 4 h 后氨基态氮含量为 102.6 mg/L。枯草杆菌蛋白酶酶解鲤鱼后,游离氨基酸含量由 185.91 mg/L 增加到 779.91 mg/L,增加了 76.16%。通过对 3 种蛋白酶在最佳条件下酶解鲤鱼的比较可知,枯草杆菌蛋白酶酶解效果较好。

[关键词] 鲤鱼;酶解;胰蛋白酶;木瓜蛋白酶;枯草杆菌蛋白酶;氨基态氮

[中图分类号] TS254.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0060-05

Technology research of enzymatic hydrolysis for the muscle of carp

YIN Jin-lian, SUN Hui, XIE Shun-hu, YANG Yang, ZHANG Hong-yong, XU Huai-de

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The optimum conditions of trypsin, subtilisin, and pepsin enzymatic hydrolysis for carp was studied, and the effect of enzymatic hydrolysis was compared. Orthogonal experiment and comparative research were used to study enzymatic hydrolysis conditions of carp, and analyze the content of free Amino acids before and after enzymatic hydrolysis for carp. The optimum conditions for the trypsin enzymatic hydrolysis were enzyme concentration 24 g/kg, enzymatic temperature 50 ℃, and pH 7.0. Under this condition the content of amino nitrogen was 59.2 mg/L after 3 hours of enzymatic hydrolysis. The optimum conditions for the Subtilisin were enzyme concentration 0.16 g/kg, enzymatic temperature 45 ℃, pH 8.0, and the content of amino nitrogen was 44.6 mg/L after 4 hours. The optimum conditions for the Pepsin Enzymatic hydrolysis were enzyme concentration 10 g/kg, enzymatic temperature 60 ℃, pH 7.0, and the content of amino nitrogen was 102.6 mg/L after 4 hours of enzymatic hydrolysis. After subtilisin enzymatic hydrolysis for carp, the content of free Amino acids increased from 185.91 mg/L to 779.91 mg/L, increasing by 76.16%. Through comparing the three protease enzymatic hydrolysis for carp, subtilisin was the better protease for carp.

Key words: carp; enzymatic hydrolysis; trypsin; pepsin; subtilisin; amino nitrogen

鲤鱼属淡水鱼,具有很高的营养价值和药用价值,《食疗本草》和《本草纲目》中均有记载。鲤鱼含有极为丰富的易被人体消化吸收的蛋白质,蛋白利用率高达 98%,可提供人体必需的氨基酸;在临床

1 收稿日期] 2006-05-09

[基金项目] 西北农林科技大学科技创新基金项目

[作者简介] 殷金莲(1984-),女,山西大同人,在读硕士,主要从事天然产物提取分离研究。E-mail: yin4008@163.com

[通讯作者] 徐怀德(1964-),男,陕西榆林人,副教授,主要从事软饮料、果品蔬菜贮藏与加工、天然产物提取研究。

E-mail: xuhuaide@sohu.com

上对门静脉性肝硬化腹水或浮肿、慢性肾炎水肿均有消肿的效果^[1]。但在烹饪或初级加工时,其营养物质吸收及利用率低,若将其蛋白质酶解为多肽及游离氨基酸,既解决了鲤鱼加工的脱腥难题,又将鲤鱼蛋白水解成易于人体消化吸收和富含功能活性物质的营养液,可以开发以鲤鱼为主要原料的新型调理食品、临床疗效食品,满足不同人群的生理需求。

在蛋白质的多肽链内部存在着多功能区,经蛋白酶酶解所得的酶解液中含有大小不同的多肽片段以及游离氨基酸。不同蛋白酶的水解部位有差异,水解得到的短肽结构和功能也不同^[2]。选择合适的蛋白酶水解这些多肽链,可得到所需要的高活性多肽^[3]。有关水产品蛋白质酶解的研究已有报道,如徐怀德等^[4-6]对不同蛋白酶水解甲鱼的工艺条件和酶解液生物饮料加工技术,以及鲤鱼酶解发酵制饮料的加工技术进行了研究。但由于甲鱼原料的限制,对其进行酶解研究的成本较高,而鲤鱼原料丰富,在我国分布范围极广,对其进行加工研究,可以为鲤鱼深加工提供理论依据。为此,本研究对胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶酶解鲤鱼的工艺条件进行了探讨,并对酶解前后的游离氨基酸含量进行了分析。

1 材料与方 法

1.1 材料及主要仪器、设备

1.1.1 试验材料 鲤鱼:购于陕西杨凌市场,为淡水养殖鲤鱼。胰蛋白酶(酶活力 > 250 U/g),木瓜蛋白酶(酶活力 > 2 000 U/g),购于润德生物工程有限公司;枯草杆菌蛋白酶(酶活力 1 600 U/mg),购于上海蓝季生物工程有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备 AF-I 型电子恒温水浴槽,北京化玻联医疗器械有限公司;A-88 型组织捣碎机,江苏金坛医疗仪器厂;Beckman 121 型氨基酸自动分析仪,日本日立公司。

1.2 鲤鱼酶解工艺流程

鲤鱼 宰杀去内脏 清洗沥干 切块 按肉骨与水质量比 1 : 10 加入高压锅中预煮约 15 min 绞

碎打浆 酶解 得鲤鱼酶解液。

1.3 试验设计

酶用量、酶解温度、pH 和酶解时间为影响蛋白质酶解的主要因素^[2]。本试验先固定各酶的酶解条件(酶用量、酶解温度、pH)测定不同酶解时间酶解液的氨基态氮含量,确定各酶的最佳酶解时间,再采用 L₉(3⁴) 正交表,以氨基态氮含量为指标,在最佳酶解时间进行正交试验,确定各酶的最佳酶解条件。

1.4 测定方法

1.4.1 氨基态氮含量的测定 采用双指示剂甲醛滴定法^[7]。

取两个干净的三角瓶,各吸取 10 mL 酶解液,第一个瓶中加入 5 mL 甲醛和 3 滴酚酞,摇匀静置 1 min 后,用 0.01 mol/L NaOH 标准液滴定,消耗体积为 V₁;第二个瓶中加入 3 滴中性红指示剂,摇匀静置 1 min 后,用 0.01 mol/L NaOH 标准液滴定,消耗体积为 V₂。按下式计算鲤鱼酶解液中氨基态氮含量:氨基态氮含量/(mg/L) = c × (V₁ - V₂) × 100/10,式中:c 为 NaOH 标准液浓度(mol/L)。

1.4.2 游离氨基酸含量的测定^[8] 取一定量的溶液,用 6 mol/L HCl 在 110 ℃ 水解 24 h,过滤、蒸干、再溶解、定容至 50 mL,作为测定游离氨基酸组成的分析样。按照此方法测定鲤鱼高压水煮液和鲤鱼枯草杆菌蛋白酶酶解液(在枯草杆菌蛋白酶最佳酶解条件下酶解)中的游离氨基酸组成及其含量。

2 结果与分析

2.1 单酶最佳酶解时间的确定

从表 1 可以看出,随着酶解时间的延长,鲤鱼酶解液中氨基态氮含量均呈增加趋势。其中胰蛋白酶酶解 3 h 以上时,酶解液中氨基态氮含量增加不显著,说明胰蛋白酶的最佳酶解时间为 3 h;枯草杆菌蛋白酶酶解 4 h 以上时,酶解液中氨基态氮含量增加不显著,而木瓜蛋白酶酶解 4 h 以上时,酶解液中氨基态氮含量有所下降,说明枯草杆菌蛋白酶、木瓜蛋白酶的最佳酶解时间均为 4 h。

表 1 不同酶解时间对蛋白酶酶解鲤鱼氨基态氮含量的影响

Table 1 Amino nitrogen contents of enzymatic hydrolysis carp at different enzymatic time

酶种类 Enzymatic type	酶解条件 Enzymatic hydrolysis condition		pH	氨基态氮含量/(mg · L ⁻¹) Concentration of amino nitrogen				
	酶用量/(g · kg ⁻¹) Enzyme concentration	酶解温度/ Temperature		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
胰蛋白酶 Trypsin	24	50	8.0	24.8	45.4	54.4	57.5	56.0
枯草杆菌蛋白酶 Subtilisin	0.08	50	7.0	44.1	50.0	60.0	67.5	68.0
木瓜蛋白酶 Pepsin	8	50	7.0	65.4	76.5	94.1	101.8	95.0

2.2 鲤鱼最佳酶解工艺条件的确定

2.2.1 胰蛋白酶最佳酶解工艺条件的确定 以胰蛋白酶用量分别为 16, 20, 24 g/kg, 酶解温度分别为 45, 50, 55 °C, pH 分别为 7.0, 8.0, 9.0, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, 以酶解 3 h 氨基态氮含量为指标, 确定其最佳酶解条件。

从表 2 可知, 各因素对胰蛋白酶酶解效果影响的大小顺序是: 酶解温度 > 酶用量 > pH。胰蛋白酶

的最佳酶解条件为 $A_3B_2C_1$, 即酶用量 24 g/kg, 酶解温度 50 °C, pH 值 7.0, 在此条件下胰蛋白酶酶解鲤鱼蛋白的氨基态氮含量为 74.5 mg/L。为了证实正交试验的可靠性, 将最佳酶解条件和正交表中试验较好者(4号)进行重复试验, 结果表明, 最佳酶解条件下氨基态氮含量为 74.4 mg/L, 4号试验重复结果为 74.1 mg/L, 重现性较好, 说明此次试验结果可靠。

表 2 胰蛋白酶酶解鲤鱼蛋白 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果分析

Table 2 Design of $L_9(3^4)$ orthogonal test and experimental result of trypsin

序号 Order	酶用量(A)/(g·kg ⁻¹) Enzymatic concentration	酶解温度(B)/ Temperature	pH(C)	氨基态氮含量/(mg·L ⁻¹) Content of amino nitrogen
1	1(16)	1(45)	1(7.0)	68.5
2	1	2(50)	2(8.0)	59.9
3	1	3(55)	3(9.0)	44.9
4	2(20)	1	2	74.2
5	2	2	3	64.5
6	2	3	1	71.4
7	3(24)	1	3	68.9
8	3	2	1	74.5
9	3	3	2	55.7
K_1	0.057 8	0.070 5	0.071 5	
K_2	0.070 0	0.066 3	0.063 3	
K_3	0.066 4	0.057 3	0.059 4	
R	0.012 2	0.013 2	0.012 1	

2.2.2 枯草杆菌蛋白酶最佳酶解工艺条件的确定

以枯草杆菌蛋白酶用量分别为 0.08, 0.12, 0.16 g/kg, 酶解温度分别为 45, 50, 55 °C, pH 分别为 6.0, 7.0, 8.0, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, 以酶解 4 h 氨基态氮含量为指标, 确定其最佳酶解条件。

从表 3 可知, 各因素对枯草杆菌蛋白酶酶解效果影响的大小顺序是: pH > 酶解温度 > 酶用量。枯草杆菌蛋白酶的最佳酶解条件为 $A_3B_1C_3$, 即酶用量

0.16 g/kg, 酶解温度 45 °C, pH 值 8.0, 在此条件下枯草杆菌蛋白酶酶解鲤鱼蛋白的氨基态氮含量为 48.2 mg/L。为了证实正交试验的可靠性, 将最佳酶解条件和正交表中试验较好者(6号)进行重复试验, 结果表明, 最佳酶解条件下的氨基态氮含量为 48.0 mg/L, 6号试验重复结果为 42.5 mg/L, 重现性较好, 说明此次试验结果可靠。

表 3 枯草杆菌蛋白酶酶解鲤鱼蛋白 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果分析

Table 3 Design of $L_9(3^4)$ orthogonal test and experimental result of subtilisin

序号 Order	酶用量(A)/(g·kg ⁻¹) Enzymatic concentration	酶解温度(B)/ Temperature	pH(C)	氨基态氮含量/(mg·L ⁻¹) Content of amino nitrogen
1	1(0.08)	1(45)	1(6.0)	36.0
2	1	2(50)	2(7.0)	39.2
3	1	3(55)	3(8.0)	33.7
4	2(0.12)	1	2	34.1
5	2	2	3	33.8
6	2	3	1	42.8
7	3(0.16)	1	3	48.2
8	3	2	1	31.9
9	3	3	2	22.8
K_1	0.036 3	0.039 4	0.036 9	
K_2	0.036 9	0.035 0	0.032 0	
K_3	0.034 3	0.033 1	0.038 6	
R	0.002 6	0.006 3	0.006 6	

2.2.3 木瓜蛋白酶最佳酶解工艺条件的确定 以木瓜蛋白酶用量分别为 6, 8, 10 g/kg, 酶解温度分别

为 50,55,60 ,pH 分别为 6.0,7.0,8.0,按 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验,以酶解 4 h 氨基态氮含量为 指标,确定该酶的最佳酶解条件。

从表 4 可知,各因素对木瓜蛋白酶酶解效果影响的大小顺序是:酶用量 > 酶解温度 > pH。木瓜蛋白酶的最佳酶解条件为 A₃B₃C₂,即酶用量 10 g/kg,酶解温度 60 ,pH 值 7.0,在此条件下木瓜蛋白酶

酶解鲤鱼蛋白的氨基态氮含量为 125.9 mg/L。为了证实正交试验的可靠性,将最佳酶解条件和正交表中试验较好者(6 号)进行重复试验,结果表明,最佳酶解条件下的氨基态氮含量为 125.0 mg/L,6 号试验重复结果为 107.0 mg/L,重现性较好,说明此次试验结果可靠。

表 4 木瓜蛋白酶酶解鲤鱼蛋白 L₉(3⁴) 正交试验设计及结果分析

Table 4 Design of L₉(3⁴) orthogonal test and experimental result of pepsin

序号 Order	酶用量(A)/(g·kg ⁻¹) Enzymatic concentration	酶解温度(B)/ Temperature	pH(C)	氨基态氮含量/(mg·L ⁻¹) Content of amino nitrogen
1	1 (6)	1 (50)	1 (6.0)	80.8
2	1	2 (55)	2 (7.0)	69.6
3	1	3 (60)	3 (8.0)	75.0
4	2 (8)	1	2	84.6
5	2	2	3	88.8
6	2	3	1	108.0
7	3 (10)	1	3	86.1
8	3	2	1	84.2
9	3	3	2	125.9
K ₁	0.075 1	0.083 8	0.091 0	
K ₂	0.093 8	0.080 9	0.093 4	
K ₃	0.098 7	0.103 0	0.083 3	
R	0.023 6	0.022 1	0.010 1	

2.3 胰蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解液的比较

各自的最佳酶解条件下,对同种底物、相同浓度底物进行酶解,结果见表 5。

利用胰蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、木瓜蛋白酶在

表 5 不同蛋白酶酶解鲤鱼蛋白效果的比较

Table 5 Comparison of different enzymatic hydrolysis carp protein

酶种类 Enzymatic type	最佳酶解条件 Parameter			酶解液 Enzymatic hydrolysis fluid			
	酶用量/(g·kg ⁻¹) Enzymatic concentration	酶解温度/ Enzymatic temperature	pH	酶解时间/h Enzymatic time	氨基态氮含量/ (mg·L ⁻¹) Amino nitrogen	pH	感官状态 Sense state
胰蛋白酶 Trypsin	24	50	7.0	3	59.2	6.0	鱼腥味、淡香、黄色、不透明 Fish flavor, light aroma, yellow, opacity
木瓜蛋白酶 Pepsin	10	60	7.0	4	102.6	6.5	鱼腥味、无香味、淡黄、较透明 Fish flavor, out of aroma, light yellow, some limpidity
枯草杆菌蛋白酶 Subtilisin	0.16	45	8.0	4	44.6	6.7	鱼腥味淡、有香味、灰黄色、不透明 Light fish flavor, aroma, luridness, opacity

由表 5 可知,胰蛋白酶酶解时间最短,酶解 3 h 后氨基态氮含量为 59.2 mg/L,木瓜蛋白酶酶解 4 h 后氨基态氮含量为 102.6 mg/L,枯草杆菌蛋白酶酶解 4 h 后氨基态氮含量为 44.6 mg/L。虽然枯草杆菌蛋白酶水解后的氨基态氮含量稍少,但其用量小,色泽、香味均优于木瓜蛋白酶及胰蛋白酶,且木瓜蛋

白酶发酵后腥味并无太多减少,口味不好。综合考虑认为,枯草杆菌蛋白酶为酶解鲤鱼的最佳蛋白酶。

2.4 枯草杆菌蛋白酶酶解鲤鱼前后氨基酸含量的变化

由表 6 可以看出,鲤鱼在未酶解之前,各游离氨基酸含量很低,其中色氨酸、缬氨酸、丙氨酸均未检

出,总游离氨基酸含量只有 185.91 mg/L,经枯草杆菌蛋白酶酶解后,游离氨基酸含量迅速增加,总量达到 779.91 mg/L,增加了 76.16%,并产生了色氨酸、缬氨酸、丙氨酸,说明酶解后鲤鱼酶解液中营养成分含量明显提高。

酸、缬氨酸、丙氨酸,说明酶解后鲤鱼酶解液中营养成分含量明显提高。

表 6 枯草杆菌蛋白酶酶解鲤鱼前后游离氨基酸组成及含量的变化

Table 6 Amino acids contents before and after subtilisin enzymatic hydrolysis carp protein

氨基酸 Amino acid	游离氨基酸 Free amino acids			口味 Taste
	高压水煮液/(mg·L ⁻¹) High pressured poach fluid	鲤鱼酶解液/(mg·L ⁻¹) Carp enzymatic hydrolysis	增减率/% Increasing rate	
天冬氨酸 Asp.	1.50	60.18	97.51	酸 Acetous
苏氨酸 Thr	4.94	18.27	72.96	甜 Sweet
丝氨酸 Ser.	6.79	21.81	68.87	酸甜 Sweet and acetous
谷氨酸 Glu.	9.17	20.79	55.89	酸 Acetous
脯氨酸 Pro.	9.82	31.20	68.53	甜苦 Sweet and bitter
甘氨酸 Gly.	30.51	73.66	58.58	甜 Sweet
丙氨酸 Ala.	未检出 Undetection	39.32	100	甜 Sweet
胱氨酸 Cys.	12.20	1.25	-89.75	苦 Bitter
缬氨酸 Val.	未检出 Undetection	24.25	100	苦 Bitter
蛋氨酸 Met.	5.95	65.63	90.93	苦 Bitter
异亮氨酸 Ieu.	4.32	31.99	86.50	苦 Bitter
亮氨酸 Leu.	8.75	101.90	91.41	苦 Bitter
酪氨酸 Tyr.	4.14	26.37	84.30	微苦 Light bitter
苯丙氨酸 Phe.	3.80	25.61	85.16	微苦 Light bitter
赖氨酸 Lys.	12.58	84.26	85.07	苦 Bitter
组氨酸 His.	65.86	130.80	49.65	苦 Bitter
精氨酸 Arg.	5.58	11.81	52.75	苦 Bitter
色氨酸 Trp.	未检出 Undetection	10.91	100	苦 Bitter
总量 Total	185.91	779.91	76.16	

3 结论与讨论

(1) 胰蛋白酶的最佳酶解条件为:酶用量 24 g/kg,酶解温度 50 ℃,pH 值 7.0,酶解时间 3 h,在此条件下酶解液中氨基态氮含量较高,为 59.2 mg/L。

(2) 枯草杆菌蛋白酶的最佳酶解条件为:酶用量 0.16 g/kg,酶解温度为 45 ℃,pH 值 8.0,酶解时间 4 h,在此条件下酶解液中氨基态氮含量较高,为 44.6 mg/L。

(3) 木瓜蛋白酶的最佳酶解条件为:酶用量 10 g/kg,酶解温度 60 ℃,pH 值 7.0,酶解时间 4 h,在此条件下酶解液中氨基态氮含量较高,为 102.6 mg/L。

(4) 通过 3 种蛋白酶对鲤鱼酶解效果的比较可知,枯草杆菌蛋白酶为酶解鲤鱼的最佳蛋白酶,鲤鱼经枯草杆菌蛋白酶酶解后游离氨基酸含量有明显增加。

(5) 由于试验过程中原料批次的不同,会使试验结果产生较大的差距,为此要保证在对比试验中所用原料为同一批次,使结果具有可比性。

(6) 鲤鱼蛋白酶解液的功能特性有待进一步研

究,包括对其活性多肽进行分离、提纯及结构鉴定,同时鲤鱼酶解液可进一步加工制作各种营养保健食品。

[参考文献]

- [1] 黄志斌.水产品综合利用工艺学[M].北京:中国农业出版社,1998:1-35;142-150.
- [2] 崔继科,刘景顺.大豆分离蛋白酶解的研究(一)[J].郑州粮食学院学报,1998(9):43-45.
- [3] Lzawa N, Tanabe S, Nishimura T, et al. Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviar* aminopeptidase[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45:543-545.
- [4] 徐怀德,殷金莲,孙 卉,等.鲤鱼酶解发酵制饮料的技术研究[J].农业工程学报,2006,22(11):257-260.
- [5] 徐怀德,李志成,段旭昌,等.甲鱼酶解液化技术研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(5):45-48.
- [6] 徐怀德,李志成,段旭昌,等.甲鱼生物饮料加工技术研究[J].中国食品学报,2004(3):48-52.
- [7] 吴谋成.食品分析与感官评定[M].北京:中国农业出版社,2002:77-80.
- [8] 杨惠芬,李明元,沈 文.食品卫生理化检验标准手册[M].北京:中国标准出版社,1997.