罗非鱼内脏蛋白酶特性及内脏蛋白自溶工艺研究

荣婧，蒋爱民，郭善广，吴著敏，吴德彬
（华南农业大学食品学院，广东广州 510640）

摘要：以罗非鱼内脏为原料，研究内源蛋白酶酶学特性；利用正交试验对其自溶工艺进行优化，结果表明：罗非鱼内脏内源蛋白酶在pH 5~11 范围内有较好的稳定性，在 40~50 ℃条件下，罗非鱼内脏蛋白酶活性最稳定；罗非鱼内脏自溶的最佳工艺为：pH 8，温度 45 ℃，料液比 1:2 条件下的自溶 4 h 产物氮收率为 73.21%，水解度为 18.78%。

关键词：罗非鱼内脏；内源蛋白酶；自溶；氮收率；水解度

文章篇号：1673-9078(2012)6-651-654

The Enzyme Characteristics of Endogenous Protease and Autolysis Technology of Tilapia Viscera

RONG Jing, JIANG Ai-min, GUO Shan-guang, WU Zhu-min, WU De-bin
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The enzyme characteristics of endogenous protease were analyzed and the optimum autolysis conditions were determined by the orthogonal test. Result showed that the endogenous protease of Tilapia viscera was stable at pH of 5~11 and 40~50℃. The optimum conditions for autolysis of viscera were pH 8, temperature 45℃, raw/water materials 1:2 and reaction time 4 h, under which the nitrogen recovery ratio and degree of hydrolysis were 73.21% and 18.78% respectively.

Key words: tilapia viscera; endogenous protease; autolysis; nitrogen recovery ratio; degree of hydrolysis

罗非鱼（*Oreochromis*, tilapia）是原产于热带、亚热带暖水性鱼类，有尼罗、莫桑比克、奥里亚、米来西等十多个品种，具有繁殖力强、生长速度快、耐粗食、抗病力强等优点，是当前淡水养殖业的重要养殖品种之一。随着全球性海洋捕捞渔业资源的衰退，国际市场独水产养殖产品的需求越来越大[1]。罗非鱼是当前淡水养殖业的重要养殖品种之一，2009 年我国产量约为 125.7 万 t[2]。广东省地理气候条件优越、培育养殖技术成熟，是我国养殖罗非鱼最早、养殖面积最多和产量最高的地区[1]。2009 年广东罗非鱼产量约为 59 万 t，占全国罗非鱼产量的 47%，2010 年产量高达 60 万 t[2]。

罗非鱼片加工出肉率一般在 32%~35%，超过重量 60%以上的下脚料未经充分利用，特别是蛋白质含量较高的内脏[3]。这些加工下脚料如果不进行有效处理，不仅会污染环境，而且会浪费大量的营养物质。利用酶法处理鱼内脏是获得可作为蛋白质和氨基酸的强化剂应用的液态蛋白的有效途径[4]。酶法处理的酶可以是鱼内脏的内源酶，也可以添加外源商业酶。鱼内脏中蛋白酶含量丰富，所含蛋白酶在较宽的温度范围内都具有活性，是良好的蛋白酶来源[5]。采用内源酶的最大好处是成本低、活性较高、与底物结合好。因此以罗非鱼加工后所剩下的内脏为原料进行酶资源的开发、利用有着积极的意义。本文试图通过对罗非鱼混合内脏蛋白酶的活性测定，提供罗非鱼自溶的适宜温度和 pH 范围，研究了罗非鱼内脏自溶工艺，以期为罗非鱼内脏进一步综合利用打下基础。

收稿日期：2012-03-27

基金项目：广东省科技计划项目（2009B020313003）；广东省重大科技专项（2010A080403002）

作者简介：荣婧（1986-），女，硕士研究生，食品加工与贮藏

通讯作者：蒋爱民（1957-），男，教授，博士，畜禽产品加工与质量安全控制

1 材料与方法

1.1 原料

罗非鱼内脏，广州市天河区长湴农贸市场购买。

1.2 主要仪器设备

凯氏定氮仪 8200：FOSS 公司；索式脂肪测定仪 2043：FOSS 公司；紫外分光光度计 UV-1800：岛津

有限公司；恒温水浴锅 HH-4：常州澳华仪器有限公司；电子天平 BSA124S：赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；冷冻高速离心机 5804R：德国艾本德仪器公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酶解产物工艺流程

罗非鱼内脏→预处理→酶解→离心取清液→检测

1.3.2 常规分析

水分含量的测定按常压干燥法（GB/T 5009.3）；蛋白质含量的测定按凯氏定氮法（GB/T 5009.6）；粗脂肪的测定按索氏抽提法（GB/T 5009.6）；灰分的测定按灰化法（GB/T 5009.4）。

1.3.3 内源蛋白酶酶活测定

取刚宰杀的新鲜鱼内脏(或内脏器官)，用捣碎机捣碎后，加入 4 倍经预冷(4 ℃)的 0.5% KCl 溶液，于 4 ℃下静置 30 min，离心(4000 r/min)，取出上层清液，经 4 ℃下预冷的 KCl 稀释到 5 倍，用 Folin 酚法测酶活[6]。

1.3.3.1 内源蛋白酶最适 pH 和酸碱稳定性分析

最适 pH 测定：根据罗非鱼内脏原浆 pH 约为 6.63，分别选择 pH 3、4、5、6、7、8、9、10、11 的缓冲溶液和等量的酶液混合，放置一段时间后，在 37 ℃下测定酶液在不同 pH 条件下活力的变化。蛋白酶活力以 OD_{660nm} 值表示。

pH 稳定性测定：将酶液与等量的不同 pH 缓冲液混合后放置一段时间，以酪蛋白为底物每隔 30 min 测定酶的剩余活性。将 4 ℃条件下放置的酶液在相同条件下测得的酶活力定义为 100%，计算酶的剩余活性。

1.3.3.2 内源蛋白酶最适温度和热稳定性分析

最适温度：在 pH 9 下，以 2%酪蛋白为底物，测定在不同温度下(30、40、50、55、60、65、70 ℃)下，罗非鱼内脏蛋白酶的活力，以 OD_{660nm} 值表示。

温度稳定性：将酶液在不同温度条件下放置一段时间，以酪蛋白为底物每隔 30 min 测定酶的剩余活性，将 4 ℃条件下放置的酶液在相同条件下测得的酶活力定义为 100%，计算酶的剩余活性。

1.3.4 罗非鱼内脏蛋白酶水解产物的制备

称取一定量的鱼内脏，绞碎，按比例加入适量的蒸馏水，用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节至所需的 pH，恒温水浴一定时间，水解结束后用沸水浴灭酶 10 min，于 3000 r/min 离心 20 min，取清液即为酶解液。

1.3.5 水解度

氨基态氮用甲醛电位滴定法测定，水解度按下式计算：

水解度：$DH=(AN-AN_0)/N\times100\%$

式中，AN 为原料酶解液中游离氨基态氮的含量，10^{-2} g/g；AN_0 为原料酶解前游离氨基态氮的含量，10^{-2} g/g；N 为罗非鱼内脏原料中总蛋白氮的含量，10^{-2} g/g。

1.3.6 氮收率

用凯氏定氮法测定 1.3.4 中制备的水解液的含氮量，再按下式计算氮收率：

氮收率（%）=水解液中总氮含量/原料总氮量×100%

2 结果与讨论

2.1 原料特性分析

2.1.1 原料基本理化指标

表 1 罗非鱼内脏基本理化指标

Table 1 The basic components of Tilapia viscera

脂肪/%	蛋白质/%	水分/%	灰分/%
36.87±0.12	6.69±0.04	48.13±0.77	5.76±0.02

由表 1 可知，罗非鱼内脏中水分含量 48.13%，蛋白质含量为 6.69%，脂肪 36.87%，灰分 5.76%。

2.1.2 pH 对罗非鱼内脏蛋白酶活的影响

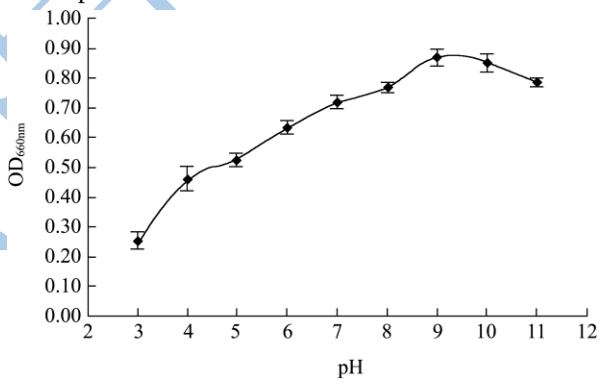


图 1 pH 对罗非鱼内脏蛋白酶酶活的影响

Fig.1 Effect of pH values on endogenous protease activity of Tilapia viscera

pH 对酶活的影响随酶的来源不同而异。图 1 表明，在 37 ℃罗非鱼内脏蛋白酶活性随 pH 升高呈先上升后下降的趋势。在 pH 9.0 时达到最大，当 pH 值大于 9.0 以后蛋白酶活力逐渐下降。由此可知。罗非鱼混合内脏的最适 pH 为 9.0，与国内外其他来源的鱼内脏内源酶的最适 pH 在 8.0~10.0 基本相符[7]。

2.1.3 罗非鱼内脏蛋白酶的 pH 稳定性

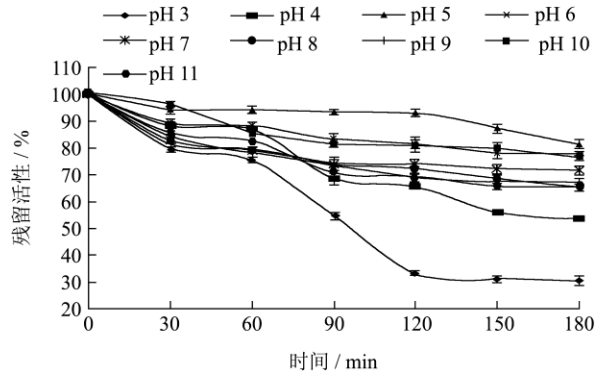


图 2 罗非鱼内脏蛋白酶的 pH 稳定性

Fig.2 The pH stability of endogenous protease enzyme of Tilapia viscera

由图 2 可知，在 pH 3 的酸性条件下，罗非鱼内脏蛋白酶最不稳定，在 1~2 h 间活性迅速下降到 50%以下。在 pH 5~11 的条件下，罗非鱼内脏蛋白酶较稳定，在 3 h 后均能保持在 60%以上。

2.1.4 温度对罗非鱼内脏蛋白酶活性的影响

由图 3 可见，随着温度的升高，罗非鱼内脏内院蛋白酶呈先上升后下降的趋势。从 30 ℃到 55 ℃，罗非鱼内脏蛋白酶活稳定上升并在 55 ℃达到最高；超过 55 ℃后，罗非鱼内脏活性直线下降，在 65 ℃之后基本失活。

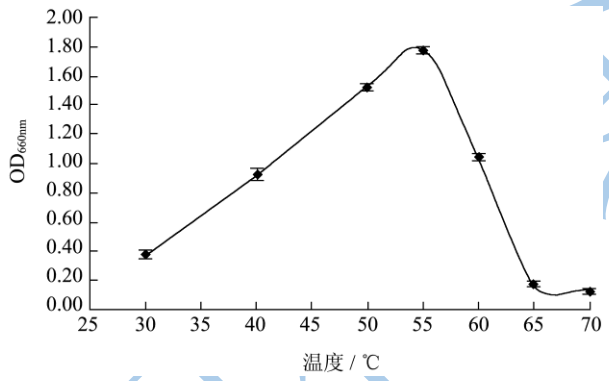


图 3 温度对罗非鱼内脏蛋白酶活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on endogenous protease activity of Tilapia viscera

2.1.5 罗非鱼内脏蛋白酶的温度稳定性

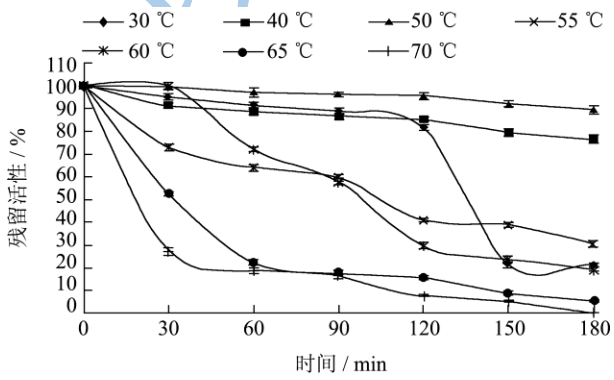


图 4 罗非鱼内脏蛋白酶活性的温度稳定性

Fig.4 The thermo stability of endogenous protease of Tilapia viscera

由图 4 可知，在 40~50 ℃条件下，罗非鱼内脏蛋白酶活性最稳定，3 h 后仍能保持 80%以上的残留活性；在 30 ℃、55~60 ℃条件下，180 min 时酶活均降到 20%左右；在 65~70 ℃条件下，罗非鱼内脏蛋白酶活相当不稳定，在 30 min 后基本没有酶活。

2.2 罗非鱼内脏自溶工艺条件优化

2.2.1 温度对罗非鱼自溶效果的影响

利用内源酶对罗非鱼内脏进行蛋白质水解的方式称为罗非鱼内脏的自溶。温度是蛋白质水解的重要参数，通过 2.1.4 及 2.1.5 的结果，选择 40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃等 5 个不同温度，在 pH 9,、料液比 1:2、水解时间 4 h 条件下，研究温度对罗非鱼内脏自溶效果的影响，结果见图 5。

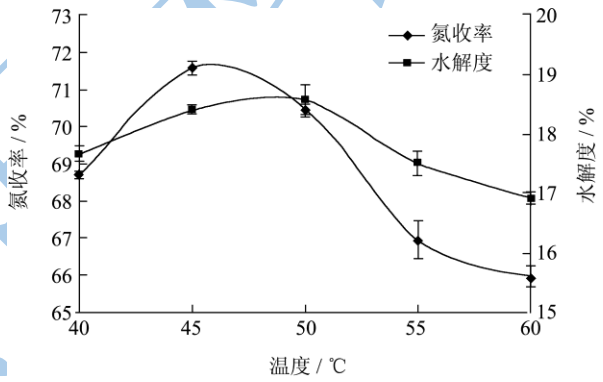


图 5 温度对罗非鱼内脏自溶产物的氮收率和水解度的影响

Fig.5 Effect of temperature on nitrogen recovery ratio and hydrolysis degree of Tilapia viscera autolysis

由图 5 可知，随着温度的上升，蛋白回收率和水解度均呈先上升后下降的趋势。在 45 ℃时，氮收率达到最高 71.58%；从 45 ℃到 60 ℃，随着温度的上升氮收率下降较快，在 60 ℃降到 65.98%。从 45 ℃到 50 ℃，随着温度的升高水解度呈缓慢上升趋势，在 50 ℃达到最高 18.56%，50 ℃之后逐渐下降，在 60 ℃降到 16.94%。

2.2.2 起始 pH 对罗非鱼内脏自溶效果的影响

pH 是影响罗非鱼内脏自溶效果的另一主要因素，根据 2.1.2 和 2.1.3 的结果选择了 pH 7、8、9、10、11 等 5 个不同 pH，在 50 ℃,、料液比 1:2、水解时间 4 h 条件下，研究 pH 对罗非鱼内脏自溶效果的影响，结果见图 6。

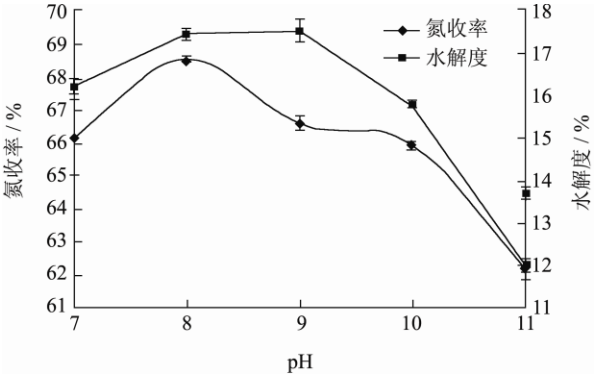


图 6 pH 对罗非鱼内脏自溶产物的氮收率和水解度的影响

Fig.6 Effect of initial pH value on nitrogen recovery ratio and hydrolysis degree of Tilapia viscera autolysis

如图 6 所示，pH 升到 9 时水解度达到最大，为 17.56%，这与罗非鱼内脏内源蛋白酶酶活在 pH 9 附近活性最大有关；pH 8 时氮收率最高，为 68.56%；pH 从 9~11 的变化过程中，酶解产物的氮收率和水解度都逐渐降低，在 pH 11 分别降到 62.18%和 12.02%。

2.2.3 料液比对罗非鱼内脏自溶效果的影响

在酶解过程中，底物的浓度也会影响酶与其结合的催化效果。选择 1:1、1:2 、1:3、1:4、1:5 等 5 种不同的料液比例，在 pH 9，50 ℃，水解时间 4 h，结果见图 7。

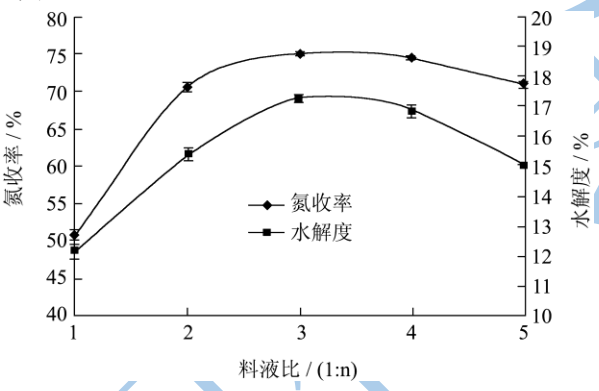


图 7 料液比对罗非鱼内脏自溶产物的氮收率和水解度的影响

Fig.7 Effect of ratio of mineral to water on nitrogen recovery ratio and hydrolysis degree of Tilapia viscera autolysis

由图可知，随着增加到 1:3，氮收率和水解度都急速上升，在 1:3 时达到最大，分别是 74.91%和 17.24%；当料液比继续增加，氮收率趋于平稳；水解度略有下降，在 1:5 时降到 15.02%。

2.2.4 罗非鱼自溶工艺条件的优化

在单因素实验的基础上，采用正交试验 $L_9(3^4)$综合考察内脏内源酶在 pH 值、温度、料液比 3 个因素下对罗非鱼内脏水解效果的影响，其结果如表 2 所示，方差分析见表 2。

表 2 内源酶水解罗非鱼内脏蛋白质水解条件正交试验及结果

Table 2 Result of orthogonal design for Tilapia viscera hydrolysis by endogenous enzyme

序号	实验因素			指标	
	A (初始 pH)	B (温度/℃)	C (料液比)	氮收率/%	水解度/%
1	1(7)	1(40)	1(1:1)	45.66±0.76	13.03±0.26
2	1	2(45)	2(1:2)	67.08±1.12	16.43±0.32
3	1	3(50)	3(1:3)	70.89±1.18	16.14±0.31
4	2(8)	1	2	65.06±1.08	17.35±0.24
5	2	2	3	72.44±1.21	18.21±0.36
6	2	3	1	49.16±0.82	15.79±0.19
7	3(9)	1	3	69.06±1.15	15.54±0.27
8	3	2	1	48.13±0.79	15.07±0.24
9	3	3	2	67.36±1.12	17.01±0.33
K_1	61.21	59.93	47.65		
K_2	62.22	62.55	66.5		
K_3	61.52	62.47	70.80		
R	1.01	2.62	23.15		
k_1	15.2	15.31	14.63		
k_2	17.12	16.57	16.93		
k_3	15.87	16.31	16.63		
r	1.917	1.26	2.3		

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance of the results

因素	氮收率					水解度				
	偏差平方和	自由度	F	P	显著性	偏差平方和	自由度	F	P	显著性
pH	1.61	2	4.23	0.19		5.67	2	52.30	0.02	*
温度	13.36	2	35.17	0.03	*	2.68	2	24.66	0.04	*
料液比	909.55	2	2393.68	0.00	**	9.38	2	86.48	0.01	*

注：*表示显著（P<0.05）**表示极显著（P<0.01）。

从表 3 可知，水解条件对罗非鱼内脏外源酶解产物的氮收率和水解度有一定影响，反应条件中的料液比和温度对氮收率分别有极显著和显著影响，pH、温度、料液比对水解度均有显著影响。就氮收率而言，影响大小顺序依次为:料液比>温度>pH，最优组合为 $A_2B_2C_3$ 即 pH 8，温度 45 ℃，料液比 1:3；就产物的

水解度而言，影响大小顺序依次为料液比>pH>温度，最优组合为 $A_2B_2C_2$ 即 pH 8，温度 45 ℃，料液比 1:2。综合各因素考虑，其最优自溶工艺参数为：pH 8，温度 45 ℃，料液比 1:2。经验证试验，在此条件下的水解产物氮收率为 73.21%，水解度为 18.78%。

3 结论

3.1 罗非鱼内脏蛋白酶在 pH 5~11 范围内有较好的稳定性，其最适 pH 为 9，在 pH 3 的酸性条件下，罗非鱼内脏蛋白酶最不稳定。罗非鱼内脏蛋白酶的最适温度为 55 ℃，在 40~50 ℃条件下，罗非鱼内脏蛋白酶活性最稳定，在 30 ℃、55~70 ℃条件下，活性不稳定，随着时间的增加，活性损失较多。

根据罗非鱼内脏蛋白酶的酶学特性，在单因素的基础上，以氮收率和水解度作为评价指标，优选出的最佳工艺条件为：pH 8，温度 45 ℃，料液比 1:2，其酶解液的氮收率最高为 73.21%，水解度为 18.78%。

参考文献

[1] 陈胜军,李来好,扬贤庆,等.我国罗非鱼产业现状分析及提高罗非鱼出口竞争力的措施[J].南方水产,2007,1:75-80

[2] 雷光英,曹俊明,万忠,等.2010 年广东罗非鱼产业发展现状分析[J].广东农业科学,2011,8:12-14

[3] 余佳.鲢内脏酶水解工艺及其产物特性的研究[D].华中农业大学硕士学位论文,2009

[4] 易美华,王斌,刘石生,等.罗非鱼加工下脚料酶法制备液化蛋白的研究[J].中国热带医学,2007,7(7):1078-1097

[5] Cancre I, Ravallec R, van WormhoudtA, et al. Secretagogues and growth factors in fish andcrustacean protein hydrolysates [J]. MarBiotechno,l1999, 1(5): 489- 499

[6] 郭彩华.带鱼内脏蛋白酶的性质[J].集美大学学报,1997,2(2):58-61

[7] 黄烨,谢锐田,何建妹,等.罗非鱼肠道胰蛋白酶和猪胰蛋白酶性质对比研究[J].食品工业科技,2011,32(5):215- 222

现代食品科技