

不同蛋白酶酶解罗非鱼肉制备蛋白水解液的过程变化规律研究

赵珊珊, 朱志伟, 曾庆孝, 晁岱秀

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文选择五种蛋白酶(木瓜蛋白酶、Alcalase 2.4 L、Protamex、Neutrase 1.5 MG和Flavourzyme 500 MG)对酶解罗非鱼肉制备蛋白水解液的过程变化规律研究。以Cn、Cp值和蛋白质利用率为指标对酶解过程进行分析,说明不同的酶解工艺参数对酶解过程及产物影响较大,其中Flavourzyme 500 MG生成游离氨基酸态氮含量最高(12 h后达到4.25 mg/mL);木瓜蛋白酶生成短肽含量最高(5 h后达到39.82 mg/mL);Protamex的蛋白质利用率最高(12 h后达到44.74%)。以高含量游离氨基酸的水解液为目的可选用Flavourzyme 500 MG、Protamex;以高含量功能性短肽的水解液为目的可选用木瓜蛋白酶、Alcalase 2.4 L。

关键词: 罗非鱼; 酶解; 蛋白质利用率

中图分类号: TS254.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0115-05

Study of the Enzymatic Hydrolysis of Tilapia Meat by Different Protease

ZHAO Shan-shan, ZHU Zhi-wei, ZENG Qing-xiao, CHAO Dai-xiu

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The enzymatic hydrolysis of tilapia meat by papain, Alcalase 2.4 L, Protamex, Neutrase 1.5 MG and Flavourzyme 500 MG were studied. The nitrogen content of free amino acid (Cn), content of soluble peptides (Cp) and the recovery rate of protein were analyzed during the hydrolysis. Results showed that the highest values of Cn (4.25 mg/ml after 12 h) and Cp (39.82 mg/ml after 5 h) were obtained with Flavourzyme 500 Mg and papain respectively. And the highest recovery of protein was shown as 44.74% using Protamex for 12 h. Thus, Flavourzyme 500 MG and Protamex were suitable for obtaining the hydrolysate containing high nitrogen content of free amino acid, while Papain and Alcalase 2.4 L can be used for high content of soluble peptides.

Key words: tilapia; hydrolysis; the recovery of protein

我国是罗非鱼养殖、加工及出口大国,广东省是罗非鱼加工和出口大省。2005年广东冻罗非鱼(片)约11万吨,约占我国罗非鱼(片)出口总量的70%。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,这些加工下脚料目前大部分以低价卖给饲料厂作原料,造成大量优良资源的浪费。

由于蛋白质水解产物形式多样,使用方便,可以增加食品风味和氨基酸等营养物质含量,可研制成调味料,经济成本低,具有较好的经济效益。近年来,国内一些研究者对水产加工废弃物的综合利用进行了探讨,以酶法为技术手段实现资源的高值化利用研究,应用于调味品等行业,进行酶解有两个主要目的:

收稿日期: 2007-11-02

基金项目: 广东省科技攻关项目(2006B20401004)

作者简介: 赵珊珊(1982-),女,硕士研究生,主要从事食品加工与贮藏方面研究

①获得含量较高的游离氨基酸水解液^[1-4];②获得特定功能性的多肽^[5,6]。成本问题是限制酶解技术应用的重要原因之一,在酶解过程中提高蛋白质利用率,则可降低成本,而目前关于蛋白质酶解利用率研究报道的较少。

本文介绍了以罗非鱼肉为原料,采用木瓜蛋白酶、Alcalase 2.4L、Protamex、Neutrase 1.5MG和Flavourzyme 500MG五种蛋白酶酶解罗非鱼肉制备营养丰富的水解液,综合Cn(游离氨基酸态氮含量)、Cp(可溶性短肽含量)值和蛋白质利用率3个指标分析酶解过程的变化,为下一步开发和利用加工罗非鱼后的下脚料提供实验依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

罗非鱼购于市场,去除内脏,清洗后,去头、去皮、去骨,取肉,-18℃冻藏备用。罗非鱼肉含蛋白

质含量15.7%，水分含量79.6%。

1.2 设备和试剂

KMTD 2500型电热恒温振荡水槽，上海益恒实验仪器有限公司；TDL-40B台式离心机，上海安亭科学

仪器厂；pHS22C型pH计，上海雷磁仪器厂；棱光752N型紫外可见分光光度计，上海精密科学仪器有限公司。

本实验所选用的蛋白酶及其性质见表1。

表1 实验所选用的蛋白酶及性质

Table 1 The protease were selected in experiments

| 蛋白酶名称 | 温度℃ | pH 范围 | 作用位点 | 酶活力 | 提供厂家 |
|------------------|------------|---------------|-------------------------------|-----------|------|
| 木瓜蛋白酶 | 45~65 (60) | 5.0~7.0 (6.0) | 作用位点广泛 | 80 万 U/g | 广州众缘 |
| Alcalase 2.4L | 55~65 (60) | 6.5~8.5 (8.0) | Ala-、Leu-、Val-、Tyr-、Phe-、Trp- | 28 万 U/mL | 诺维信 |
| Protamex | 50~60 (55) | 5.5~7.5 (7.5) | 作用位点广泛 | 20 万 U/g | 诺维信 |
| Neutrase 1.5MG | 45~55 (55) | 5.5~7.5 (7.5) | Leu-、Phe-NH2 等 | 17 万 U/g | 诺维信 |
| Flavourzyme500MG | 50 | 5.0~7.0 (7.0) | 作用位点广泛 | 5 万 U/g | 诺维信 |

注：括号内数值为本实验所选用的酶解温度和pH值。

1.3 实验方法

Cn值的测定：甲醛滴定法^[7]

Cp 值的测定：TCA 法结合双缩脲法

蛋白质利用率：采用微量凯氏定氮进行测定（按GB5009.5-85测定）

蛋白质利用率=上清液中总氮与酶解液总氮的比值×100%

酶活力的测定采用Folin—酚法^[8]

酶活力的定义为：在适当条件下，1 min内水解标准酪蛋白释放出的5%三氯乙酸可溶物与Folin酚反应的吸光度与1 μg酪氨酸相当时所需的酶量为1 U^[9]。

1.4 酶解工艺

罗非鱼肉→清洗绞碎→按比例加水匀浆→调最佳pH值→蛋白酶保温酶解→沸水浴灭酶15 min→4000 r/min离心10 min→上清液过滤→酶解液

1.5 操作要点

1.5.1 原料预处理

将冰冻的罗非鱼肉用常温自来水缓慢解冻，清除异物部分，沥干水分以后，将鱼肉斩碎成小块，在搅拌机中绞碎。

1.5.2 保温酶解

据实验要求，加入一定量的酶，在合适的温度、pH、时间下在恒温振荡水浴反应装置中进行酶解，最后沸水浴加热15 min，使蛋白酶钝化，结束酶解。

1.5.3 离心过滤

将水解液在4000 r/min离心10 min，取上清液用滤纸过滤去除水解液中的油脂。

2 结果与分析

蛋白质的水解必须有蛋白酶的参与，蛋白酶具有专一性，不同的蛋白酶的水解效果不同，所以为了得

到最佳效果，有必要对蛋白酶进行筛选。本文分别选用木瓜蛋白酶、Alcalase 2.4 L、Protamex、Neutrase 1.5 MG和Flavourzyme 500 MG在各酶对应的最适作用条件下水解罗非鱼鱼肉。基于以往实验室的研究基础固定料液比（鱼肉与水的比例：*m/v*）为1:1，加酶量分别为250 U/g、500 U/g、750 U/g，水解时间12 h（酶解时间过长的话酶解液有异味发臭的现象），每隔2 h进行取样，测定其Cn、Cp和蛋白质利用率。

2.1 木瓜蛋白酶

实验中用的木瓜蛋白酶是一种混合蛋白酶，其中含有多种蛋白酶，作用位点广泛。木瓜蛋白酶水解过程中多酶的作用位点不同，对肽链的作用存在多种选择性。对水解液以Cn、Cp值和蛋白质利用率三个评价指标进行测定，结果见图1、图2（实线：Cn值；虚线：Cp值，下同）。

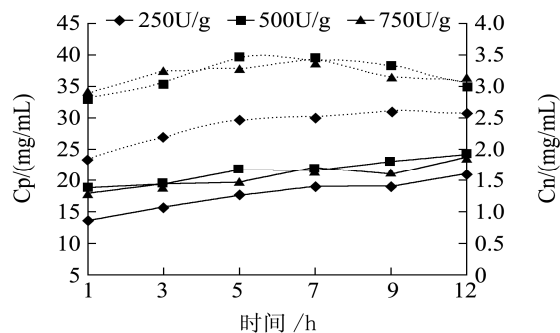


图1 木瓜蛋白酶酶解鱼肉的Cn、Cp值

Fig.1 Cn and Cp value of fish after hydrolyzed by papain

图1中可以看出Cn值在整个水解过程中一直增加，水解12 h后最大Cn值为1.89 mg/mL；Cp值在5 h时达到最大39.81 mg/mL，然后出现下降，水解12 h后为34.90 mg/mL，这些游离氨基酸和可溶性短肽协同作用使酶解液具有鲜味。500 U/g加酶量的酶解效果优于其它2种添加量，这种加酶量可能使酶和底物达

到一个最佳的作用效果，故生成的 Cn、Cp 值较高。加酶量过小，酶的作用浓度下降，势必对酶解造成不利影响；加酶量过多会影响酶与底物的作用效果。蛋白质利用率在酶解前 7 h 有较大的升高，酶解后期升高速度较为缓慢。酶解结束后，罗非鱼鱼肉蛋白质利用率最大 39.22%。

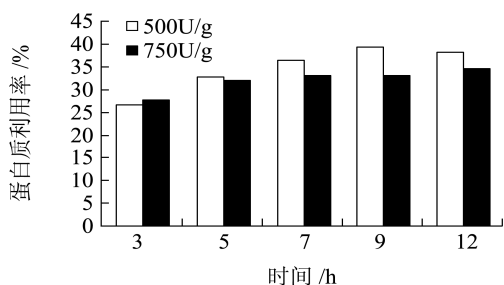


图2 木瓜蛋白酶酶解鱼肉的蛋白质利用率

Fig.2 Protein utilization rate of fish after hydrolyzed by papain

2.2 Alcalase 2.4 L 蛋白酶

Alcalase 2.4 L 是一种深度水解的碱性内切蛋白酶，作用位点Ala-、Leu-、Val-、Tyr-、Phe-、Trp-。蛋白酶的水解催化能力当然与酶本身的性质（活力和稳定性）有关，但底物的特点也会对水解效果产生影响，底物的氨基酸序列可能限制酶的催化作用。

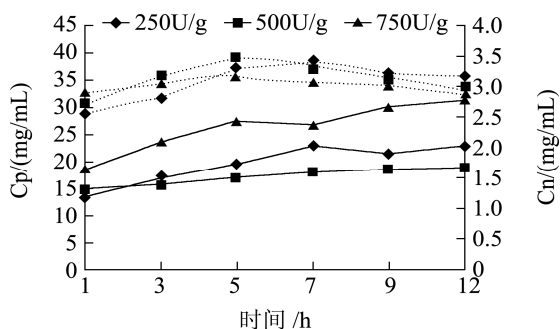


图3 Alcalase 2.4L酶解鱼肉的Cn、Cp值

Fig.3 Cn and Cp value of fish after hydrolyzed by Alcalase 2.4L

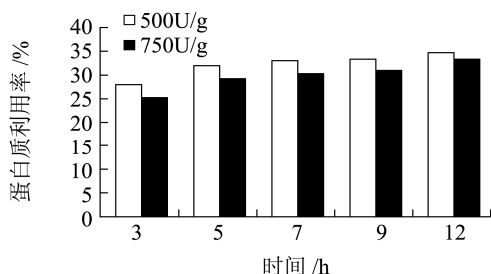


图4 Alcalase 2.4L酶解鱼肉的蛋白质利用率

Fig.4 Protein utilization rate of fish after hydrolyzed by Alcalase 2.4 L

Alcalase 2.4 L水解12 h后Cn值分别是1.67 mg/mL (250 U/g)、2.03 mg/mL (500 U/g)、2.77 mg/mL (750 U/g)。加酶量500 U/g、750 U/g的Cp值曲线与250 U/g

的曲线相比虽然数值偏大，但是曲线较平稳，变化也不明显，可能酶浓度增加到一定量时，再增加浓度对提高Cp值的作用也比较小。最大Cp值是水解5 h后 38.95 mg/mL (500 U/g)。图4中蛋白质利用率最初5 h变化较大，随后增加趋势缓慢。酶解12 h后蛋白质利用率达到最大34.73% (500 U/g)，稍高于750 U/g加酶量的33.09%。

2.3 Protamex 蛋白酶

Protamex 是一种复合型的内切蛋白酶，作用位点广泛。与其它多种内切蛋白酶不同，Protamex 即使在低水解度的情况下也不会产生苦味的蛋白质水解物，能最大限度地避免苦味肽的产生。图 5 中 Cn 值在整个酶解过程中一直增加，500 U/g 加酶量酶解 12 h 达到最大值 2.75 mg/mL。Cp 值先增加后减小，于 7 h 呈现最大值 38.03 mg/mL，其后逐渐变小，说明酶解产物中小分子肽的含量逐渐降低。从图 6 中可以看出，蛋白质利用率是逐渐增大的。750 U/g 的加酶量的蛋白质利用率增加的幅度要比 500 U/g 的大，并且水解 12 h 以后达到最大值 44.74%，500 U/g 加酶量蛋白质利用率增加的幅度不大，从 7 h 后趋于平稳。加酶量对酶解过程的影响较大，加酶量为 750 U/g 时，此时酶浓度可能达到一个最佳的作用效果。

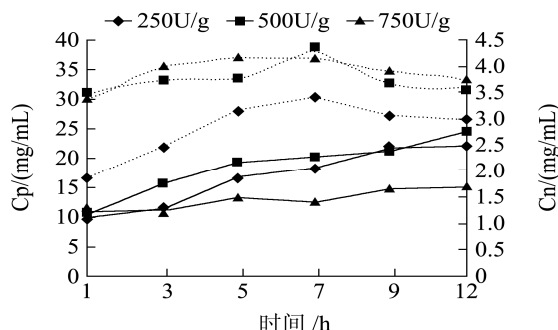


图5 Protamex蛋白酶酶解鱼肉的Cn、Cp值

Fig.5 Cn and Cp value of fish after hydrolyzed by Protamex

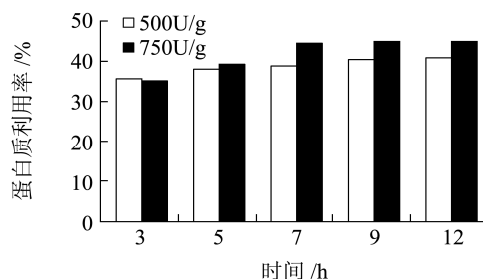


图6 Protamex酶解鱼肉的蛋白质利用率

Fig.6 Protein utilization rate of fish after hydrolyzed by Protamex

2.4 Neutrase1.5MG 蛋白酶

Neutrase 1.5 MG是一种由筛选的枯草杆菌菌株经

深层发酵生成的内切细菌蛋白酶，作用位点为Leu-、Phe-NH₂等。图7中Cn值在整个水解过程中一直保持增加，水解12 h Cn值为1.87 mg/mL（250 U/g加酶量）。Cp值于5 h达到最大值32.68 mg/mL（750 U/g加酶量），然后出现下降，三种加酶量的下降程度不大。由图8可知，水解12 h后蛋白质利用率仅达22.78%（750 U/g加酶量），这与其它4种酶相比其蛋白质利用率最低。

将图7与图1、图3、图5进行比较，实验中水解产物的Cn和Cp值都不高，但是资料显示Neutrase 1.5 MG蛋白酶水解过程中对肽键有比较高的裂解催化能力，可推测蛋白酶在水解过程中促使生成大分子物质的量比较高，这些大分子物质在三氯乙酸的作用下生成沉淀而被去除。

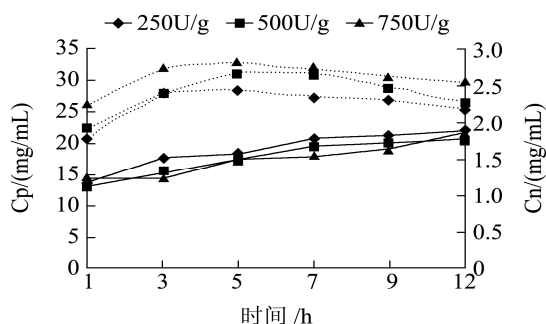


图7 Neutrase 1.5MG酶解鱼肉的Cn、Cp值

Fig.7 Cn and Cp value of fish after hydrolyzed by Neutrase 1.5MG

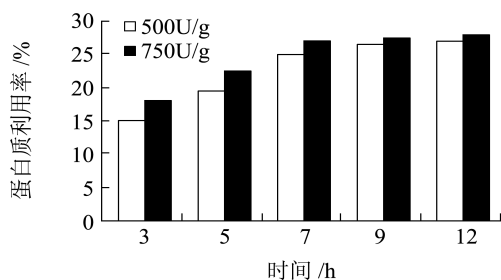


图8 Neutrase 1.5MG酶解鱼肉的蛋白质利用率

Fig.8 Protein utilization rate of fish after hydrolyzed by Neutrase 1.5MG

2.5 Flavourzyme 500 MG酶

Flavourzyme 500 MG是有米曲霉菌种经发酵而制得的，所含酶的种类复杂，其中包含有内切蛋白酶和外切蛋白酶等多种蛋白酶，作用位点广泛，能够进行比较彻底地酶解，特点是产物风味比较好。

图9中产物的Cn值在整个酶解过程中保持比较快的增加趋势，酶解12 h后Cn值高达4.25 mg/mL，5种酶中含量最高。Cp值酶解3 h后达到最大25.15 mg/mL（500 U/g加酶量），随后呈下降趋势，5种酶中含量最低。可能因为Flavourzyme 500 MG含有多种蛋白酶

的作用，作用的位点比较多，生成的氨基酸含量较高。图10中蛋白质利用率呈逐渐上升趋势，水解12 h后达到最大37.54%（750 U/g加酶量）。

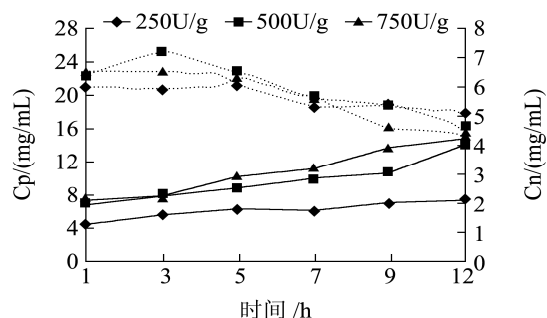


图9 Flavourzyme 500MG酶解鱼肉的Cn、Cp值

Fig.9 Cn and Cp value of fish after hydrolyzed by Flavourzyme 500MG

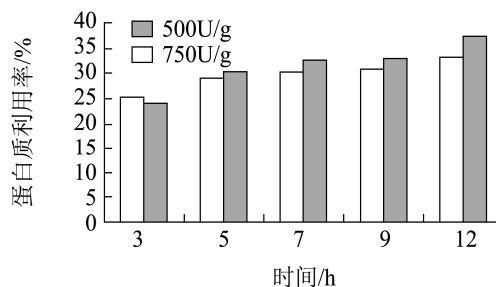


图10 Flavourzyme 500MG酶解鱼肉的蛋白质利用率

Fig.10 Protein utilization rate of fish after hydrolyzed by Flavourzyme 500MG

综上所述，将四种酶的水解液以 Cn、Cp 值和蛋白质利用率为指标进行比较，结果见表2。

表2 四种蛋白酶酶解效果的比较

Table 2 The effect comparison of 4 proteases

| 酶的名称 | 固液比 | 最大 Cn (mg/mL) | 最大 Cp (mg/mL) | 最大蛋白质利用率 |
|-------------------|-----|---------------|---------------|-----------|
| 木瓜蛋白酶 | 1:1 | 1.89 | 39.82 | 39.10% |
| | | (500 U/g) | (500 U/g) | (500 U/g) |
| Alcalase 2.4L | 1:1 | 2.77 | 38.95 | 34.73% |
| | | (750 U/g) | (500 U/g) | (500 U/g) |
| Protamex | 1:1 | 2.75 | 38.03 | 44.74% |
| | | (500 U/g) | (500 U/g) | (750 U/g) |
| Flavourzyme 500MG | 1:1 | 4.25 | 25.15 | 37.54% |
| | | (750 U/g) | (500 U/g) | (750 U/g) |

注：括号内数值为所选用的加酶量。Neutrase 1.5MG的酶解效果不佳，因此没有列入。

Flavourzyme 500 MG 水解程度较高，生成游离氨基酸态氮含量最高（12 h 后达到 4.25 mg/mL），其次是 Alcalase 2.4 L、Protamex、木瓜蛋白酶，最后是 Neutrase 1.5 MG；木瓜蛋白酶生成短肽含量最高（5 h

后达到 39.82 mg/mL,其次是 Alcalase 2.4 L、Protamex、Neutrase 1.5 MG,最后是 Flavourzyme 500 MG。图 2、图 4、图 6 和图 8 比较后得出: Protamex 的蛋白质利用率最高为 44.74%,其次依次是木瓜蛋白酶、Flavourzyme 500 MG、Alcalase 2.4 L、Neutrase 1.5 MG。Flavourzyme 500 MG 包含有内切肽酶和外切肽酶两种活性,可以脱除低水解度蛋白水解液的苦味,根据文献报道,其能改善鸡肉水解物的风味,也可以改善酶解液风味和增加水解度将它与其它酶混合水解。

通过实验可根据对水解液的需求进行酶的选择和复合:若以获得含量较高的游离氨基酸水解液为目标选用 Flavourzyme 500 MG、Protamex;若以获得高含量功能性短肽为目标选用木瓜蛋白酶、Alcalase 2.4 L。

3 结论

3.1 通过木瓜蛋白酶、Alcalase 2.4 L、Protamex、Neutrase 1.5 MG和Flavourzyme 500 MG的水解产物的 Cn、Cp值和蛋白质利用率指标对比,Flavourzyme 500 MG的水解程度较高,Cn值大,游离氨基酸含量最高;木瓜蛋白酶作用位点广泛,Cp值大,生成的短肽含量高;Protamex的蛋白质利用率最高,12 h后达到 44.74%。

3.2 根据以上数据对五种酶的酶解过程变化进行分析,Cn值均随着酶解时间的延长逐渐增加;但是由于酶的种类不同、作用位点不同,酶解过程中短肽含量不同并且Cp值变化的规律一般先是逐渐增大然后到达一定数值以后逐渐减小,这是因为随着水解的进行,大分子蛋白质逐渐被水解成游离氨基酸;而有的Cp值是一直缓缓增加,可能是大分子蛋白质先被水解成分

子量较大的肽,随着水解的进行,这些多肽被水解成分子量更小的肽。

3.3 要是以获得含量较高的游离氨基酸水解液为目标可选用Flavourzyme 500 MG、Protamex或者复合使用;以获得高含量功能性短肽为目标可选用木瓜蛋白酶、Alcalase 2.4 L或者复合使用。

参考文献

- [1] 汪涛,曾庆祝.利用贝类废弃物制造水解动物蛋白[J].青岛海洋大学学报,2003,33(3):361-365
- [2] 吴燕燕,李来好,等.马氏珍珠贝肉营养液的研制及营养评价[J].上海水产大学学报,2000,9(4):313-318
- [3] 郝记明,张静,吉宏武,等.酶解制备吉尾鱼水解蛋白粉的工艺研究[J].现代食品科技,2007,23(3):47-49
- [4] 何雪莲,夏秋瑜,刘四新,等.罗非鱼加工废弃物酶法水解的研究[J].中国酿造,2007,(1):14-16
- [5] 涂宗财,陈剑兵,刘伟,等.酶解鱼鳞胶制备小分子多肽的研究[J].食品科学,2005,26(8):210-213
- [6] Bo Li, Feng Chen, Xi Wang, *et al.* Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. Food Chemistry,(2006),doi: 10.1016/j.foodchem.2006.07.0021-9
- [7] 大连轻工业学院,华南理工大学,郑州轻工业学院等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994
- [8] 李建武编.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994
- [9] Adler-Nissen Jens. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers Co.,1986

(上接第112页)

(4) 脆肉鲩的EAAI高于普通草鱼的EAAI。根据CS,脆肉鲩和普通草鱼的第一限制性氨基酸为蛋氨酸+胱氨酸,第二限制性氨基酸为缬氨酸;根据AAS,脆肉鲩和普通草鱼的第一限制性氨基酸均为蛋氨酸+胱氨酸,脆肉鲩的第二限制性氨基酸为缬氨酸,而普通草鱼的第二限制性氨基酸为亮氨酸。

参考文献

- [1] GB/T 5009.3-2003,食品中水分的测定[S]
- [2] GB/T 5009.5-2003,食品中蛋白质的测定[S]
- [3] GB/T 5009.6-2003,食品中脂肪的测定[S]
- [4] GB/T 5009.4-2003,食品中灰分的测定[S]
- [5] Hashimoto k., *et al.* Muscle Protein Composition of Sardine and Mackerel[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fishery,1979,45:1435-1441
- [6] 范文洵,李泽英,赵煦和.蛋白质食物的营养评价[M].北京:人民卫生出版社,1984
- [7] 汪之和.水产品加工与利用[M].北京:化学工业出版社,2002,219-300
- [8] 杨月欣等主编.中国食物成分表 2002[M].北京:北京大学医学出版社
- [9] 任洁,刘慧集,李杰,韩育章,管敏,郑红萍,普家勇.5种国外引进鱼类的含肉率及营养价值综合评价[J].华中农业大学学报.2005,24(5):495-499

