

## 斑点叉尾鮰下脚料蛋白酶水解工艺优化

周探春<sup>1,2</sup>, 刘焱<sup>1,2</sup>, 邓放明<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:**以蛋白质水解度为考察指标,从木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶中筛选水解斑点叉尾鮰下脚料的适宜蛋白酶,并通过单因素试验和正交试验优化工艺条件。结果表明:5 种蛋白酶中复合蛋白酶的水解度最高;复合蛋白酶酶解斑点叉尾鮰下脚料的最佳酶解条件为温度 55 ℃,时间 4 h, pH 9.0, 酶质量浓度 2 500 U/g, 料液比 1 : 3,在该条件下,蛋白质的水解度为 53.26%。

**关 键 词:**斑点叉尾鮰;蛋白质;蛋白酶;水解度

中图分类号:S879.9

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2013)01-0095-04

## Enzymatic hydrolysis process of byproducts from channel catfish

ZHOU Tan-chun<sup>1,2</sup>, LIU Yan<sup>1,2</sup>, DENG Fang-ming<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Province Key Laboratories of Food Science and Biological Technology, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Using hydrolysis degree of protein as an index, this paper investigated hydrolysis effects and conditions of protein from byproducts in channel catfish with papain, complex protease, flavourzyme, neutral protease and alkali protease with single factor and orthogonal tests. The experimental results showed that the highest hydrolysis degree were complex protease. The optimal hydrolysis degree was achieved at 53.26% with the following conditions: hydrolysis temperature of 55 ℃, hydrolysis time of 4 h, pH 9.0, enzyme concentration 2 500 U/g, the ratio of water to materials 1 : 3.

**Key words:** channel catfish; protease; enzymolysis; hydrolysis degree

斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)富含胶原蛋白和人体必需的不饱和脂肪酸,胆固醇含量低,仅为 0.07%<sup>[1-2]</sup>,营养丰富,具有降血脂、增强免疫力等保健作用<sup>[3]</sup>。在国内水产品加工企业中,斑点叉尾鮰的肉被加工成冷冻鱼片,而在加工过程中产生的富含 DHA、EPA 的鱼头和含有丰富蛋白质、脂肪的鱼皮、内脏等大量下脚料仅被加工成动物饲料<sup>[4]</sup>。充分利用淡水鱼下脚料对水产品加工业、养殖业及环境保护都有着积极的意义。Nilsang 等<sup>[5]</sup>用 Flavourzyme 蛋白酶和 Kojizyme 蛋白酶对鱼罐头生产中的副产物进行了酶解研究。氨基酸、多肽是蛋白酶水解后的

主要产物,具有营养价值高和易消化等特点<sup>[6]</sup>。笔者选用不同蛋白酶对斑点叉尾鮰冷冻鱼片加工后的下脚料进行酶解,筛选适宜的水解酶,并通过单因素试验和正交试验对蛋白酶水解工艺条件进行优化,旨在获得氨基酸丰富的酶解产物。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

斑点叉尾鮰下脚料由湖南省益华水产食品有限公司提供。

收稿日期:2012-12-10

基金项目:国家星火计划重大项目(2011GA770007);湖南省重大科技专项(2010FJ1007-2)

作者简介:周探春(1988—),女,湖南宁乡人,硕士研究生,主要从事食品资源开发与利用研究,514494636@qq.com; \*通信作者, fmdenghna@yahoo.com.cn

## 1.2 主要仪器与试剂

主要仪器有骨泥机(廊坊市冠通机械有限公司)、SKY-200B 恒温培养摇床(常州诺基仪器有限公司)、TDZ-WS 台式低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司)、PHS-3C 上海雷磁酸度计、DL-1 万用电炉(北京中兴伟业有限公司)和 AUY220 岛津分析天平。

主要试剂中的木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶均由合肥博美生物科技有限公司提供;酪蛋白、干酪素、福林酚、甲醛、氢氧化钠、硼酸、硼砂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯,由食品科学与生物技术湖南省重点实验室提供。

## 1.3 方 法

### 1.3.1 原料预处理

将斑点叉尾鮰下脚料洗净,用骨磨机打碎,加入冰水,用骨泥机粉碎,于 1 000 r/min 离心,冷藏于 -20℃ 冰柜中备用。

### 1.3.2 蛋白酶水解

取适量经预处理的鮰鱼下脚料解冻,称取 10 g 原料置于锥形瓶中,100℃ 加热 10 min,灭酶活,5 000 r/min 离心 10 min 后,取 5 mL 上清液定容至 100 mL。3 次重复,以氨基态氮的含量作为评价指标。

### 1.3.3 蛋白酶的筛选

分别选用木瓜蛋白酶<sup>[7]</sup>、复合蛋白酶<sup>[8-9]</sup>、风味蛋白酶<sup>[10]</sup>、中性蛋白酶<sup>[9,11]</sup>、碱性蛋白酶<sup>[12]</sup>,按表 1 设定的条件对下脚料进行酶解,以水解度为指标评价酶解效果,筛选出适宜的蛋白酶。

表 1 各蛋白酶的酶解条件

酶种类	温度/℃	时间/h	pH	酶质量浓度/(U·g <sup>-1</sup> )	料液比
木瓜蛋白酶	60	5	7.0	4 500	1 2
复合蛋白酶	50	4	9.0	3 000	1 5
风味蛋白酶	50	3	6.0	4 000	1 3
中性蛋白酶	45	5	7.0	2 000	1 4
碱性蛋白酶	55	4	9.5	3 000	1 2

### 1.3.4 复合蛋白酶酶解条件的确定

#### 1.3.4.1 单因素试验

以水解度为考察指标,针对酶解温度(40、45、50、55、60℃)、反应时间(2、3、4、5、6 h)、pH(8.0、8.5、9.0、9.5、10.0)、酶质量浓度(1 000、2 000、3 000、4 000、5 000 U/g)、料液比(1 2、1 3、1 4、1 5、1 6)进行单因素试验。试验基本条件:反应温度 50℃,酶解时间 5 h, pH 9.0,加酶量 3 000 U/g,料液比 1 3。水解完后,灭酶活,测定水解度。

#### 1.3.4.2 正交试验

以单因素试验为基础,选取酶解温度、pH、酶质量浓度进行三因素三水平的正交试验,以进一步优化复合蛋白酶的酶解工艺条件。

表 2 正交试验的因素和水平

Table 2 Factors and levels in the orthogonal test design

水平	因素		
	A(温度/℃)	B(pH)	C/(酶质量浓度/(U·g <sup>-1</sup> ))
1	50	8.5	2 500
2	55	9.0	3 000
3	60	9.5	3 500

### 1.3.5 测定方法

酶活力的测定采用 Folin-酚法;总氮含量的测定采用凯氏定氮法<sup>[13]</sup>;氨基态氮含量的测定采用甲醛滴定法<sup>[14]</sup>。水解度=氨基态氮的含量/总氮的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶筛选结果

试验结果表明:木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶等 5 种酶中,复合蛋白酶的水解度(53.73%)最高,其余 4 种酶水解度的差异较小,按水解度从大到小排序为复合蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶,所以,选取复合蛋白酶作为后续试验用酶。

### 2.2 复合蛋白酶酶解工艺的优化结果

#### 2.2.1 单因素试验结果

1) 温度对水解度的影响。由表 3 可知,随着温度的升高,水解度呈先升高后下降的趋势,55℃ 时最大。这是因为温度升高加速了分子的热运动,酶

催化反应速率加快，但温度过高会使酶受热失活，反而降低反应速率，因此，适宜酶解温度为 55 ℃。

表 3  单因素试验结果

Table 3  Results of single factor						
因素	温度/℃	pH	时间/h	酶质量浓度/ (U·g <sup>-1</sup> )	料液比	水解度/%
温度	40	9.0	5	3 000	1 3	38.00
	45	9.0	5	3 000	1 3	46.91
	50	9.0	5	3 000	1 3	50.43
	55	9.0	5	3 000	1 3	53.20
	60	9.0	5	3 000	1 3	41.72
pH	50	8.0	5	3 000	1 3	35.84
	50	8.5	5	3 000	1 3	42.27
	50	9.0	5	3 000	1 3	52.99
	50	9.5	5	3 000	1 3	48.73
	50	10.0	5	3 000	1 3	40.61
时间	50	9.0	2	3 000	1 3	37.72
	50	9.0	3	3 000	1 3	45.89
	50	9.0	4	3 000	1 3	52.97
	50	9.0	5	3 000	1 3	53.68
	50	9.0	6	3 000	1 3	54.01
酶质量浓度	50	9.0	5	1 000	1 3	31.40
	50	9.0	5	2 000	1 3	42.81
	50	9.0	5	3 000	1 3	53.16
	50	9.0	5	4 000	1 3	54.67
	50	9.0	5	5 000	1 3	54.02
料液比	50	9.0	5	3 000	1 2	46.94
	50	9.0	5	3 000	1 3	52.69
	50	9.0	5	3 000	1 4	49.81
	50	9.0	5	3 000	1 5	44.53
	50	9.0	5	3 000	1 6	38.72

2) 时间对水解度的影响。从表 3 可见，随着酶解时间的延长，水解度不断增大，到 4 h 以后，继续延长酶解时间，水解度无明显变化。这是由于酶解时间过短，酶与底物不能充分接触反应，水解度较低；随酶解时间的延长，底物不断被消耗，底物浓度逐渐降低，同时水解产生的部分游离氨基酸对酶解反应具有抑制作用，所以，当酶解到一定时间后，继续延长酶解时间对提升水解度无显著效果。本试验中选取 4 h 作为适宜酶解时间。

3) pH 对水解度的影响。由表 3 可见，水解度随 pH 的增加呈先增后降的趋势，在 pH 9.0 达最大值；在 pH 值大于 9.0 后，水解度随 pH 的提高显著降低。这是因为在不同的 pH 环境下，酶和底物特定的解离基团的解离状态不一样<sup>[15]</sup>，直接影响酶与底物的结合能力；不同的酶只有在其最适 pH 环境中才能达到最大的活性，过高或过低都会使酶的活性下降，从而降低反应速率，因此，适宜 pH 为 9.0。

4) 酶质量浓度对水解度的影响。由表 3 可见，随着酶质量浓度的增加，水解度升高，当酶质量浓度为 4 000 U/g 时，水解度达到最大值；继续增大酶浓度，水解度变化不明显。因为当酶浓度较小时，底物过饱和，反应速率主要受酶的控制；当酶浓度增加到一定程度后，酶与底物的结合趋于饱和；如果继续增大酶浓度，底物浓度就不能满足酶的需求，导致酶解作用受抑制，水解度不再提升。兼顾经济效益，将适宜酶质量浓度确定为 3 000 U/g。

5) 料液比对水解度的影响。由表 3 可知，随料液比的增大，水解度呈先升后降的趋势，在料液比为 1 3 时达最大值。这是因为当料液比很小时，底物和酶的浓度都过高，分布不均匀，不利于底物与酶结合；随着料液比的增大，酶和底物的浓度不断降低，酶和底物的接触减少，也不利于酶解反应，因此，本试验中以 1 3 作为最适料液比。

2.2.2 正交试验结果

由表 4 中正交试验结果的极差值可以看出，各因素对复合蛋白酶酶解效果的影响从大到小依次为酶解温度、pH、酶质量浓度。由极差分析得到的最优组合是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>，从正交实验得到的最优组合是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>。对以上 2 个组合进行验证试验，得出 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub> 的水解率为 54.91%，A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub> 的水解率为 53.26%。因两组合所得的水解率差异较小，因加入过多的酶不但造成浪费，而且对水解液的风味有不利影响，所以选择 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub> 作为本试验的最优组合，即温度 50 ℃，pH 9.0，酶质量浓度 2 500 U/g。

表 4  正交试验结果

Table 4  Combinations and Results of orthogonal test				
试验号	A	B	C	水解度/%
1	1	1	1	46.76
2	1	2	2	52.80
3	1	3	3	47.23
4	2	1	2	50.62
5	2	2	3	55.70
6	2	3	1	53.78
7	3	1	3	45.30
8	3	2	1	49.91
9	3	3	2	44.92
K <sub>1</sub>	48.93	47.56	50.15	
K <sub>2</sub>	53.37	52.80	49.45	
K <sub>3</sub>	46.71	48.64	49.41	
R	6.66	5.24	0.74	

### 3 结论与讨论

以斑点叉尾鮰下脚料为原料,选取木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶分别对其进行酶解,以水解度为考察指标筛选蛋白酶,结果表明,复合蛋白酶的水解效果最好。通过单因素试验和正交试验进一步优化复合蛋白酶的酶解工艺,得出各因素对水解度的影响从大到小依次是酶解温度、pH、酶质量浓度,复合蛋白酶的最佳酶解工艺条件为温度 55 ℃、时间 4 h、pH 9.0、酶质量浓度 2 500 U/g、料液比 1 : 3,在此条件下的水解度为 53.26%。

刘小玲等<sup>[16]</sup>采用酶法从罗非鱼皮中制取胶原肽,选用 0.5%的动物蛋白水解酶,在 61 ℃,pH 6.7 下水解 3 h 时,水解度仅为 9.37%。余杰等<sup>[17]</sup>以质量比 3 : 2 的中性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解鳊鱼头提取水解鱼蛋白时,最适水解条件为温度 50 ℃、pH 7.0、水解时间 4.5 h、料液比 1 : (1.1 ~ 1.5),蛋白质收率 37.1%,所以,与其他酶解工艺相比,本试验中的生产工艺对蛋白质的水解度较大,能较好地获得丰富的氨基酸产物。

#### 参考文献:

- [1] 向建国,周进,金宏. 斑点叉尾鮰的生物学与生理生化特性研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2004, 30(4): 355-358.
- [2] 张晓敏. 带鱼下脚料水解蛋白的制备及其利用研究[D]. 重庆:西南大学, 2008.
- [3] 胡兴,吴标,车科,等. 斑点叉尾鮰鱼露生产工艺研究[J]. 中国调味品, 2008, 33(5): 66-68.
- [4] 韩军,袁售华,过世东,等. 从斑点叉尾鮰鱼头中提取明胶的预处理工艺研究[J]. 大连水产学院学报, 2008, 33(12): 42-46.
- [5] 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(4): 571-578.
- [6] 王凤祥,陈中. 蛋白酶酶解罗非鱼糜的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2011, 12(6): 678-680.
- [7] 周燕芳,詹丽虹. 鲢鱼蛋白酶解条件的研究[J]. 江苏农业科学, 2010(7): 312-314.
- [8] 朱珺杰,姜永江. 食用鱼蛋白粉产品开发研究[J]. 食品与机械, 2009, 30(5): 148-152.
- [9] 张音,夏延斌. 酶解制备鸭肉香精前体物的工艺优化[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2012, 2(4): 217-220.
- [10] 汪少芸,黄景洁. 新型复合酶制备鳊鱼蛋白水解物的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 18(4): 123-127.
- [11] 许晓琴,徐丽. 利用有限酶解技术提高鳊鱼食用肉粉溶解度的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16): 9838-9839, 9981.
- [12] 郭浩楠,杨荣华. 鲢鱼蛋白的酶解及其酶解物功能性质的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 149(2): 106-111.
- [13] 侯曼玲. 食品分析[M]. 北京:化学出版社, 2004: 235-276.
- [14] 陈钧辉. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社, 2003: 57-58.
- [15] 孟昌伟,陆剑锋. 酶法制备鮰鱼排水解蛋白的工艺优化[J]. 肉类工业, 2011(12): 27-31.
- [16] 刘小玲,林莹,尹秀华,等. 罗非鱼皮胶原肽的制备及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 92-95.
- [17] 余杰,陈美珍. 酶法制备水解鳊鱼头蛋白及其应用的研究[J]. 食品工业科技, 2001(1): 45-47.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: Edward ZHANG