白鲢鱼排酶解蛋白的制备及营养成分分析

孟昌伟，陆剑锋*，薛 莲，宫子慧，林 琳，叶应旺，姜绍通
(合肥工业大学生物与食品工程学院，安徽 合肥 230009)

摘 要：以白鲢鱼排为实验材料，选用风味蛋白酶酶解制备蛋白水解液。考察起始pH值、酶解温度、料液比、加酶量、酶解时间对水解度的影响，采用Box-Behnken中心组合设计和响应面分析法，确定最佳工艺条件。结果表明：最佳工艺条件为起始pH7.59、酶解温度44.9℃、料液比30:100(g/mL)、加酶量4.02%、酶解时间5h，此条件下水解度可达26.17%；氨基酸及矿质元素的营养分析结果表明，白鲢鱼排酶解产物具有较高的食用与营养价值。

关键词：白鲢鱼排；风味蛋白酶；响应面；氨基酸；矿物质元素

Preparation and Nutritional Composition Analysis of Enzymatic Hydrolysates from Silver Carp Frame

MENG Chang-wei，LU Jian-feng*，XUE Lian，GONG Zi-hui，LIN Lin，YE Ying-wang，JIANG Shao-tong
(College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract：The purpose of this study was to optimize the hydrolysis of silver carp frame by flavourzyme and analyze the nutritional composition of resultant enzymatic hydrolysates. Five process conditions including pH, temperature, material-to-liquid ratio, enzyme dosage hydrolysis time were optimized by Box-Behnken experimental design combined with response surface methodology to be 7.59, 44.9 ℃, 30:100 (g/mL), 4.02% and 5 h, respectively. Under the optimized conditions, the degree of hydrolysis was 26.17%. The obtained hydrolysate was rich in amino acids and mineral elements, indicating its highly edible and nutritional value.

Key words：silver carp frame；flavourzyme；response surface methodology；amino acids；mineral elements
中图分类号：TS254 文献标识码：A 文章编号：1001-8123(2011)07-0024-05

目前，市场上已经开发的淡水鱼加工产品有分割鱼片、冷冻鱼糜及其鱼糜制品等，但在加工过程中会产生大量的废弃物，传统上对于鱼废弃物的处理主要是用来加工鱼饲料，甚至直接丢弃，其经济价值没有得到充分利用。白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)是我国“四大家鱼”之一，其肉质鲜嫩、营养丰富、较宜养殖，为我国主要的淡水养殖鱼种。焦道龙[1]在利用白鲢制备鲢鱼鱼糜的实验中发现，加工过程中产生的下脚料(鱼排、内脏、鱼鳞、鱼皮)占到鱼体质量的60%左右，并提出加大综合利用下脚料的设想。对富含蛋白质的低值水产品和水产加工副产品进行酶解综合利用，不仅可以提高其附加值，改善水产蛋白资源的营养及功能特性，同时还可以减少对环境的污染，产生良好的经济效益[2]。

已有的研究表明，鲢鱼是一种富含EPA和DHA的淡水鱼，含有丰富的氨基酸和人体必需微量元素[3]。鲢鱼蛋白经酶催化水解后，水解液中含有较丰富的氨基酸和肽类，营养功能和品质都会得到大幅度改善，同时可以减轻不良风味[4]。刘通讯等[5]采用酶法水解制得鲢鱼蛋白水解产物，并以此为原料，利用美拉德反应制备出酱类香味料；朱碧英等[6]对鲢鱼酶解肽的相对分子质量组成进行了测定，并进一步研究了淡水鱼活性肽的降血脂作用；Safari等[7]将白鲢鱼头酶解产物添加到微生物培养基中，证明酶解产物完全可以作为微生物培养的廉价氮源。本实验从4种蛋白酶中优选出风味蛋白酶对白鲢鱼排进行酶解，并采用响应曲面法对其酶解条件进行工艺优化，最后对水解产物的氨基酸及矿质元素进行营养分析，旨在为白鲢鱼排的综合利用提供理论参考。

收稿日期：2011-06-30
基金项目：安徽省“十一五”重大科技攻关专项(08010301078)
作者简介：孟昌伟(1986—)，男，硕士研究生，主要从事水产品加工与贮藏研究。E-mail：mengcw6678@sina.com
*通信作者：陆剑锋(1976—)，男，副研究员，博士，主要从事水生动物资源的保护和综合利用研究。E-mail：lujf@sibs.ac.cn

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

白鲢鱼排 安徽省明光市永言水产(集团)有限公司；风味蛋白酶 南宁庞博生物工程有限公司；氢氧化钠、盐酸、甲醛等(均为分析纯)。

CT15RT台式高速冷冻离心机 上海天美生化仪器设备工程有限公司；90-3型双向定时恒温磁力搅拌器 上海沪西分析仪器厂有限公司；DK-20超级循环水浴磁力搅拌器 江苏金坛市文华仪器有限公司；PHS-3C精密pH计 上海大普仪器有限公司；FD-1B-50冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司；S7130氨基酸全自动分析仪 德国Sykam公司；AA800原子吸收光谱仪 美国Perkin Eime公司。

1.2 水解产物的制备工艺

白鲢鱼排→洗净绞碎→调节料液比→调节初始pH值→加酶保温酶解(不断搅拌)→沸水浴灭酶10min→高速离心→抽滤→水解产物→浓缩、冷冻干燥

1.3 方法

1.3.1 基本营养成分测定

水分：参照GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》中直接干燥法进行测定；灰分：参照GB 5009.4—2010《食品中灰分的测定》进行测定；粗蛋白：参照GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法测定；粗脂肪：参照GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》中索氏抽提法测定。

1.3.2 水解度的测定

氨态氮含量的测定采用甲醛电位滴定法(参照GB/T 5009.39—2003《酱油卫生标准的分析方法》)。水解度(degree of hydrolysis，DH)的计算公式：

$$\text{水解度 DH/\%}=\frac{\text{酶解后}\ \alpha\text{氨态氮含量}-\text{酶解前}\ \alpha\text{氨态氮含量}}{\text{原料中总氮含量}}\times 100$$

1.3.3 氨基酸组成测定

称取冷冻干燥后的样品7mg，放入消化管中，加入8mL 6mol/L HCl溶液，充入氮气后旋紧螺丝盖，置于135℃烘箱中水解4h。水解结束冷却后移至坩埚，于60℃水浴锅中挥发盐酸，再加入少量双蒸水蒸干，重复两次，用适量pH2.20的缓冲溶液溶解稀释。最后用0.22μm微孔滤膜抽滤，滤液采用氨基酸全自动分析仪进行测定。

1.3.4 矿物质元素的测定

精确称取冷冻干燥后的样品0.5g(精确到0.0001g)于锥形瓶中，加入10mL硝酸和5mL高氯酸，在电热板上加热，消解完全后转入50mL容量瓶中，用去离子水定容，摇匀后采用原子吸收光谱仪进行测定。

1.3.5 白鲢鱼排酶解工艺

1.3.5.1 酶的筛选

取出绞碎的白鲢鱼排，常温解冻。按比例加入蒸馏水，加酶量1%，在各自最佳的温度与pH值条件(表1)下酶解3h，在100℃水浴锅中灭酶10min，冷却后离心(8040×g)，并抽滤、定容，取20mL进行甲醛电位滴定测定水解度。

表1 4种蛋白酶的水解条件

Table 1 Optimal reaction conditions of four proteases

酶类	pH	温度/℃	料液比(g/mL)	加酶量/%
中性蛋白酶	7.0	50	20:100	1
碱性蛋白酶	8.0	50	20:100	1
木瓜蛋白酶	7.5	50	20:100	1
风味蛋白酶	7.5	50	20:100	1

1.3.5.2 单因素试验设计

酶解白鲢鱼排单因素试验的基本条件定为料液比20:100(g/mL)、起始pH7.5、酶解温度50℃、加酶量1%、酶解时间3h。改变其中一个条件，固定其他条件以分析各单因素对DH的影响。各因素水平为料液比15:100、20:100、25:100、30:100、35:100(g/mL)，起始pH6.5、7、7.5、8，酶解温度40、45、50、55℃，加酶量1%、2%、3%、4%、5%，酶解时间1、2、3、4、5、6、7、8h。每个水平重复实验两次，结果取平均值。

1.3.5.3 响应面法对酶解工艺进行优化

根据Box-Benhnken的中心组合试验设计原理，在单因素试验基础上，选取起始pH值、加酶量、酶解温度3个因素，采用三因素三水平的响应面分析方法，试验因素与水平设计见表2，数据采用Design-expert 7.0软件进行分析。

表2 Box-Behnken设计试验因素水平及编码

Table 2 Factors and their coded levels in Box-Benhnken experimental design

因素	编码值	水平		
		−1	0	1
起始pH	X_1	7	7.5	8
酶解温度/℃	X_2	40	45	50
加酶量/%	X_3	3	4	5

2 结果与分析

2.1 白鲢鱼排的基本成分

由表3可知，除水分外，白鲢鱼排的粗蛋白含量最高，达到19.60%。由此可见，白鲢鱼排的蛋白质含量较为丰富，进一步对其综合利用将会产生较大的经济效益。

表 3 白鲢鱼排基本成分(以湿基计)

Table 3 Basic chemical composition of silver carp frame (on wet matter basis)

%

成分	水分	脂肪	粗蛋白	灰分
含量	69.41 ± 0.38	4.07 ± 0.05	19.60 ± 0.85	6.81 ± 0.24

2.2 白鲢鱼排的酶解工艺

2.2.1 酶的筛选

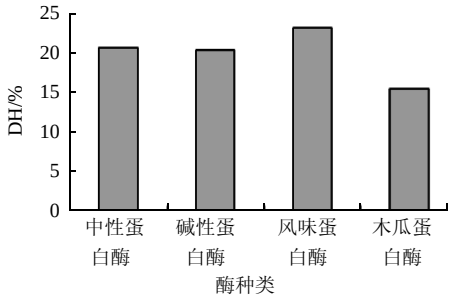

图 1 不同蛋白酶的水解效果比较

Fig.1 Comparison of hydrolysis degrees of silver carp frame by different proteases

由图 1 可知，在各酶的最适条件下，4 种酶的水解能力从大到小依次为：风味蛋白酶＞中性蛋白酶＞碱性蛋白酶＞木瓜蛋白酶。不同蛋白酶的水解能力不同，主要是因为不同蛋白酶对肽键的专一性不同。如果对某种蛋白酶敏感的肽键在底物蛋白中的含量较多，那么用这种蛋白酶来水解底物蛋白所得的水解度就高；反之，则水解度就低[8]。风味蛋白酶是一种真菌内切蛋白酶、外切肽酶的复合体，具有内切蛋白酶和外切肽酶两种活性，可以将多肽继续水解成氨基酸，从而降低酶解液的苦味[9]。基于风味蛋白酶较高水解度、酶的自身特性以及酶解产物的风味等方面，本实验选择风味蛋白酶作为实验用酶。

2.2.2 酶解白鲢鱼排单因素试验

2.2.2.1 料液比的确定

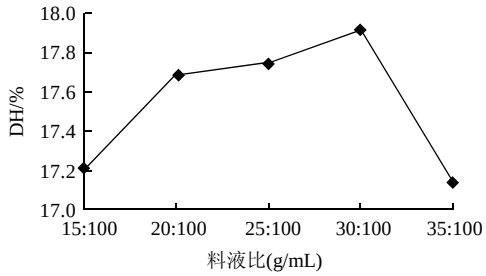

图 2 料液比对水解度的影响

Fig.2 Effect of material-to-liquid ratio on hydrolysis degree of silver carp frame

由图 2 可知，随着料液比的不断升高，DH 不断增大，在料液比为 30:100 时达到最大，随后迅速下降，故选择料液比为 30:100。直观分析可知，料液比对 DH 的影响很小，不带入优化试验。

2.2.2.2 起始 pH 值的确定

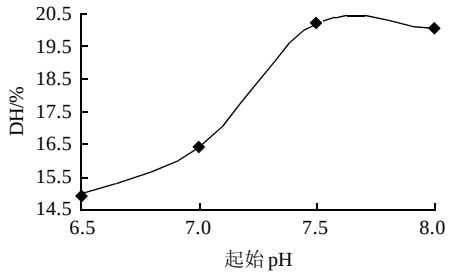

图 3 初始 pH 值对水解度的影响

Fig.3 Effect of pH on hydrolysis degree of silver carp frame

由图 3 可知，DH 随 pH 值的升高呈先上升后下降的趋势，在 pH7.5 时 DH 达到最大。不同的 pH 值条件下，酶分子和底物分子中基团的解离状态发生改变，从而影响酶分子的构象以及酶与底物的结合能力和催化能力。在极端的 pH 值条件下，酶分子的空间结构发生改变，从而引起酶的变性失活，只有在适宜 pH 值范围内，酶才能显示其催化活性[10]。因 pH 值对 DH 影响显著，故将其带入优化试验，中心点为 pH7.5。

2.2.2.3 酶解温度的确定

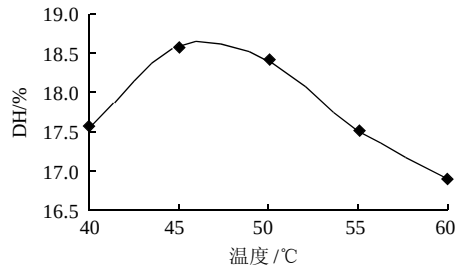

图 4 水解温度对水解度的影响

Fig.4 Effect of temperature on hydrolysis degree of silver carp frame

由图 4 可知，DH 随温度的升高呈先上升后下降的趋势，在 45℃的时候 DH 达到最大。酶解过程中，酶解温度对酶解程度的影响包括两个方面，即增加酶解速度和使蛋白酶失活。在一定范围内升高温度，体系内能逐渐增大，酶与底物之间接触的机会增多，使酶解的速度加快；另一方面，酶解温度过高时蛋白酶变性，酶解效率随之降低[11]。温度作为酶的重要影响因素且对本试验 DH 影响较大，故将此因素带入优化试验，中心点为 45℃。

2.2.2.4 加酶量的确定

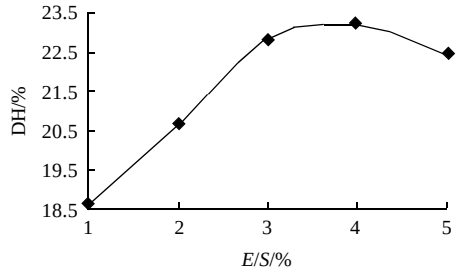

图 5 加酶量对水解度的影响

Fig.5 Effect of enzyme dosage on hydrolysis degree of silver carp frame

由图 5 可知，随着加酶量的不断增加，水解度不断上升，加酶量 4% 时 DH 达到最大，但当加酶量过高时，由于酶本身的相互水解作用加强，将阻碍酶对底物的水解，导致 DH 下降[12]。所以，加酶量选择 4%，并带入优化试验，中心点为 4%。

2.2.2.5 酶解时间的确定

酶的催化速度会受到产物的影响，反应初期，产物的抑制作用小，随着时间的延长，酶活力的逐渐下降，游离的小肽和氨基酸增多，产物的抑制作用增加[13]。由图 6 可知，5～7h 间的水解度增加不明显，表现出平稳趋势，因此确定 5h 为最佳酶解时间。由于酶解时间在 5～7h 间水解度变化非常小，所以此单因素不带入优化试验。

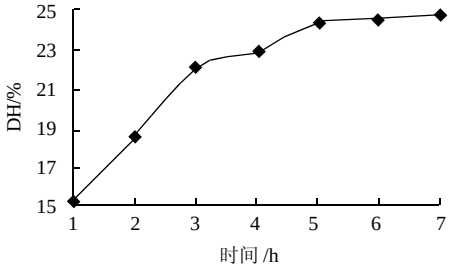

图 6 水解时间对水解度的影响

Fig.6 Effect of hydrolysis time on hydrolysis degree of silver carp frame

2.2.3 酶解白鲢鱼排的响应面优化

本试验安排了 14 个试验点，可分为两类：其一是析因点，自变量取值在 X_1、X_2、X_3 所构成的三维顶点，共有 12 个析因点；其二为零点，为区域的中心点，零点试验重复 2 次，用以估计试验误差。试验安排及结果见表 4 。

对表 4 中的试验数据进行回归分析，得到二次多元回归方程为：$Y = 25.75 + 0.47X_1 - 0.12X_2 + 0.29X_3 + 0.56X_1X_2 - 1.10X_1X_3 + 0.19X_2X_3 - 1.18X_1^2 - 0.20X_2^2 - 2.28X_3^2$。

对回归模型进行方差分析，结果见表 5。回归方程中各变量对响应值影响的显著性，由 F 检验来判定，概率 P 值越小，则相应变量的显著程度越高。从表 5 可以看出，回归模型达到显著水平($P < 0.05$)，并且失拟项不显著，说明该方程对试验拟合较好，并且该模型的 $R^2 = 0.9576$，说明该模型与实际实验拟合较好。自变量与响应值之间线性关系显著，因此可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析[14]。

表 4 响应面试验方案及结果

Table 4 Experimental design and results for response surface methodology

试验号	X_1 起始 pH	X_2 酶解温度 /℃	X_3 加酶量 /%	水解度 /%
1	－1	0	－1	20.80
2	－1	0	1	23.25
3	1	0	－1	23.54
4	1	0	1	21.50
5	0	－1	－1	22.90
6	0	1	－1	22.63
7	0	－1	1	23.52
8	0	1	1	24.02
9	－1	－1	0	24.50
10	1	－1	0	24.84
11	－1	1	0	22.80
12	1	1	0	25.36
13	0	0	0	26.00
14	0	0	0	25.51

表 5 回归方程的方差分析

Table 5 Variance analysis of the regression model of hydrolysis degree of silver carp frame

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
X_1	1	1.80	1.80	5.89	0.0722	
X_2	1	0.11	0.11	0.37	0.5767	
X_3	1	0.68	0.68	2.21	0.2105	
X_1X_2	1	1.23	1.23	4.02	0.1154	
X_1X_3	1	4.84	4.84	15.8	0.0165	*
X_2X_3	1	0.15	0.15	1.48	0.5250	
X_1^2	1	4.43	4.43	14.45	0.0191	*
X_2^2	1	0.13	0.13	0.43	0.5462	
X_3^2	1	16.69	16.69	54.47	0.0018	**
模型	9	27.71	3.08	10.05	0.0201	*
残差	4	1.23	0.31			
失拟	3	1.11	0.37	3.07	0.3919	
纯误差	1	0.12	0.12			
总和	13	28.93				

注：* 表示在 $\alpha = 0.05$ 水平上显著；** 表示在 $\alpha = 0.01$ 水平上显著。

回归方程各项系数的方差分析结果表明，因素 X_3^2 对水解度的影响高度显著($P < 0.01$)，X_1^2 及 X_1X_3 的交互效应对水解度的影响显著($P < 0.05$)。这表明各影响因素对于水解度的影响不是简单的线性关系[15]。

对回归方程进行数学规划，在设定的因素水平内，得出 DH 最高的优化组为 pH7.59、加酶量 4.02%、

酶解温度44.88℃，在此条件下，DH的理论值达到25.8038%。

2.2.4 验证实验

利用Design-Expert 7.0软件分析得到最大水解度为25.8038%。但考虑到实际操作情况，将温度改为44.9℃进行验证，得到的实验值为26.17%，与理论值(25.8036%)之间的相对误差为1.42%。证明响应面优化出来的最佳酶解工艺合理可行。

2.3 酶解产物氨基酸分析

表6 白鲢鱼排酶解产物的氨基酸组成

Table 6 Amino acid composition of enzymatic silver carp frame hydrolysate

氨基酸	含量/%	氨基酸	含量/%
天冬氨酸(Asp)	10.76	蛋氨酸(Met)*	2.48
苏氨酸(Thr)*	4.96	异亮氨酸(Ile)*	5.24
丝氨酸 (Ser)	3.35	亮氨酸(Leu)*	9.05
谷氨酸(Glu)	15.64	酪氨酸(Tyr)	0.81
甘氨酸(Gly)	14.03	苯丙氨酸(Phe)*	4.46
丙氨酸(Ala)	9.75	组氨酸(His)	3.36
半胱氨酸(Cys)	0.34	赖氨酸(Lys)*	8.14
缬氨酸(Val)*	5.52	精氨酸(Arg)	2.1

注：*.必需氨基酸(EAA)；本实验采用酸水解法处理蛋白样品，因酸水解法会导致Trp被破坏，所以Trp未能被正常检测出。

由表6可知，白鲢鱼排酶解产物至少含有16种氨基酸，包括人体必需的7种氨基酸(不包括Trp)——Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe和Lys。其中以Glu、Gly、Asp含量较高，分别占15.64%、14.03%、10.76%，而Cys含量最低(0.34%)。此外，Lys也较高(8.14%)，可以弥补谷物食品中Lys的不足[16]。

EAA占总氨基酸(TAA)的39.85%，非必需氨基酸(NEAA)占TAA的61.15%；EAA与NEAA的比值为66.25%。据FAO/WHO(1973)提出的理想模式标准[17]，质量较好的蛋白质其EAA/TAA为40%左右，EAA/NEAA在60%以上，白鲢鱼排酶解产物的氨基酸组成符合此评价标准，属于比较优质的蛋白源。

2.4 酶解产物的矿物质元素组成

矿物质元素是维持生命及正常新陈代谢所必需的，不能在人体内合成，必需通过膳食进行补充。由表7可知，白鲢鱼排酶解产物中的宏量元素以钙含量最高，达到21.305mg/g，其他依次为钠、钾、镁。微量元素中铁、锌、铜含量也较高，能够较好地满足人体对矿质元素的需求。

表7 酶解产物中矿物质元素与微量元素的含量(以干质量计)

Table 7 Contents of micro and macro mineral elements in enzymatic silver carp frame hydrolysate (on dry matter basis)

μg/g

矿物质元素	钙	铁	锌	铜	镁	钾	钠
含量	21305	19.96	5.451	16.825	632.9	11890	1741.65

由于高蛋白饮食能够促进肠道对钙的吸收、改善骨的平衡[18]。因此，白鲢鱼排酶解产物既能补充优质蛋白，又能促进钙的吸收，是一种较为优良的营养滋补品。

3 结 论

通过单因素和响应面优化试验，得到风味蛋白酶酶解白鲢鱼排的最佳工艺组合为起始pH7.59、酶解温度44.9℃、料液比30:100、加酶量4.02%、酶解时间5h，此条件下水解度可达26.17%。酶解产物的营养成分分析表明，白鲢鱼排酶解产物具有较高的食用与营养价值，值得深度开发利用。此外，白鲢鱼排酶解后残留的碎骨渣亦可对其进行(如钙质提取等方面)深入研究，以进一步提高低值淡水鱼的综合附加值。

参考文献：

[1] 焦道龙. 鲢鱼鱼糜的加工工艺及相关特性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2010.
[2] 王龙, 叶克难. 水产蛋白资源的酶解利用研究现状及展望[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 807-812.
[3] 金庆华, 李桂玲. 中国鲢鱼营养成分的研究[J]. 食品科学, 1998, 19(8): 41-43.
[4] 刘红, 王宏海, 叶婧, 等. 响应面法优化鲢鱼蛋白酶解液制备工艺的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13785-13787.
[5] 刘通讯, 李媛, 王永江, 等. 酶法水解鲢鱼蛋白及其水解液合成酱类香味料的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(9): 86-88.
[6] 朱碧英, 毛秀珍. 鲢鱼蛋白酶解肽分子组成及其降血脂作用的初步研究[J]. 营养学报, 2005, 27(5): 422-424.
[7] SAFARI R, SARAVI H N, POURGHOLAM R, et al. Use of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) head as peptone for *Vibrio anguillarum* and optimization using response surface method (RSM)[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2011, 20(2): 247-257.
[8] 赵梅. 罗非鱼下脚料酶解工艺的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
[9] 曹川, 包建强. 酶法水解鲢鱼蛋白质及副产物研究进展[J]. 山西农业科学, 2010, 38(10): 60-64.
[10] 郭勇. 酶工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2004: 6-8.
[11] 黎海彬, 司华静, 牟洪生. 虾米蛋白的酶解过程研究[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 62-64.
[12] 张琦. 生物活性肽制备的研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2003, 22(3): 20-21.
[13] 赵梅, 吴成业. 罗非鱼鱼排酶解工艺的响应面法优化[J]. 食品研发与开发, 2007, 28(5): 48-52.
[14] SEN R, SWAMINATHAN T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(4): 358-363.
[15] NILSANG S, LERTSIRI S, SUPHANTHARIKA M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 70(4): 571-578.
[16] 陆剑锋, 焦道龙, 张伟伟, 等. 速冻蟹黄粉的营养成分分析及品质评价[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 251-255.
[17] FAO/WHO AD HOC expert committee. Energy and protein requirements [R]. FAO Nutrition Meeting Report Series, 1973: 40-73.
[18] KERSTETTER J E, GAFFNEY E D, O'BRIEN K O, et al. Dietary protein increases intestinal calcium absorption and improves bone balance: an hypothesis[J]. International Congress Series, 2007, 1297: 204-216.