

文章编号: 1004 - 7271(2000)03 - 0272 - 04

·研究简报·

提高酶法水解鲢可溶性蛋白质的得率技术

The technique of increasing enzymolysis dissoluble protein proportion of *Engraulis japonicus*

朱碧英¹, 毋瑾超¹, 翟恩礼²

(1. 国家海洋局第二海洋研究所, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江省耀江药业有限公司, 浙江 杭州 310005)

ZHU Bi-ying¹, WU jin-chao¹, ZHAI En-li²

(1. Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou 310012, China; 2. Zhejiang Yaojiang Medicinal Co. Ltd. Hangzhou 310005, China)

关键词: A. S1398 蛋白酶; 动物蛋白酶; 鲢; 水溶蛋白得率

Key words: A. S1398 protease; animal protease; *Engraulis japonicus*; hydrolysis protein proportion

中图分类号: Q814 文献标识码: A

鲢(*Engraulis Japonicus*)属中上层低值鱼,是目前属未充分开发的蕴藏量最大的中上层低值鱼^[1],近年来捕捞量骤增。鲢个体小、脂肪含量高,很难象经济鱼类一样新鲜销售或成品加工。但是鲢营养价值很高,蛋白质含量达鲜重的15%~20%,是优质动物性蛋白质。用生物酶技术提取其高营养的可溶性蛋白质,是鲢深度综合利用的有效加工方法之一。应用生物酶技术开发鲢可溶性蛋白质虽已有报道^[2,3],目前采用的都是枯草杆菌蛋白酶水解的方法。这一方法虽酶价格低,来源丰富,但必须控制低酶量和短时间酶解,否则产品会出现苦涩味,适口性极差。为了获得高得率且适口性好的鲢可溶性蛋白水解技术,我们开展了本项研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

(1)供试样品。新鲜鲢,95℃蒸煮10min,压榨,榨液离心,除去上层油脂,下层水溶液并于榨饼一起,作为样品备用。

(2)供试生物酶。枯草杆菌蛋白酶 A. S1398,酪蛋白转化率3600倍,市场价0.23元/g。动物蛋白酶1508,酪蛋白转化率3500倍,市场价0.33元/g。

1.2 方 法

(1)最佳水解条件确定。用正交法 $L_6(4^3)$ 优选。从生产实际出发,酶量与底物之比采用重量之比。动物蛋白酶1508的酶量因子取枯草杆菌蛋白酶相应市场价格的量(表1,表2)。

(2)苦味评定。以10分制进行评估。苦味分值以评定小组的平均得分。评分标准:无苦味:2;微苦:4;较苦:6;苦:8;很苦:10。

收稿日期:2000-03-27

作者简介:朱碧英(1952-),女,浙江衢州人,高级工程师,主要从事海洋生物资源研究开发工作。

表1 枯草杆菌蛋白酶 A.S1398 正交实验因子水平表
Tab.1 Orthogonal test factors level of A.S1398 protease

因子	水平		
	酶量:底物/w:w	温度/℃	时间/h
1	1:1000	40	2
2	2:1000	45	4
3	3:1000	50	6
4	4:1000	55	8

表2 动物蛋白酶 1508 正交实验因子水平表
Tab.2 Orthogonal test factors level of animal protease

因子	水平		
	酶量:底物/w:w	温度/℃	时间/h
1	0.5:1000	40	2
2	1:1000	45	4
3	1.5:1000	50	6
4	2:1000	55	8

(3)可溶性蛋白质得率测定用凯氏定氮法测定可溶性蛋白质得率

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{水解液的可溶性蛋白质总量}}{\text{样品蛋白质含量}} \times 100$$

供试样品分别加入枯草杆菌蛋白酶 A.S1398、动物蛋白酶 1508, 慢搅拌, 水解后升温灭酶(95℃、10min), 离心分离(4000r/min、15min), 上清液再经真空过滤, 滤液用于分析测定。

(4)氨基酸测定。样品经 5.7N HCl 水解, 温度 110℃, 时间 22h, 水解后定容至 50mL, 用日立 835-50 型氨基酸分析仪测定。

2 结果与讨论

2.1 两种蛋白酶的酶量、温度、作用时间对酶解鳕水溶蛋白得率的影响

酶量、温度、时间是影响酶解程度的主要因素。试验表明, 两种酶的水溶蛋白得率都随着酶量的增加而增加, 但枯草杆菌蛋白酶 A.S1398 较为平缓。动物蛋白酶 1508 在酶量 2:1000 时, 可溶蛋白得率可达 62%, 而枯草杆菌蛋白酶只有 43%(4:1000), 得率只占动物蛋白酶 1508 的 71%(图 1)。延长水解时间, 枯草杆菌蛋白酶 A.S1398 的可溶蛋白得率没有明显增加, 如 2h, 其可溶蛋白得率为 38%, 4h、8h 得率分别为 39%和 42%, 只提高了 1%和 4%。因此实际生产中, 枯草杆菌蛋白酶 A.S1398 水解时间一般定在 2h 左右。延长水解时间对动物蛋白酶 1508 的可溶性蛋白得率有明显提高, 4h、8h 得率分别为 50%和 59%, 与 2h 相比提高了 6%和 16%(图 2)。水解温度从 40~50℃, 两种蛋白酶都有相类似的水解曲线, 呈微弱上升趋势, 55℃得率下降, 且动物蛋白酶 1508 在此温度更为敏感, 得率下降更明显, 说明 50℃以上, 将导致动物蛋白酶 1508 失活。

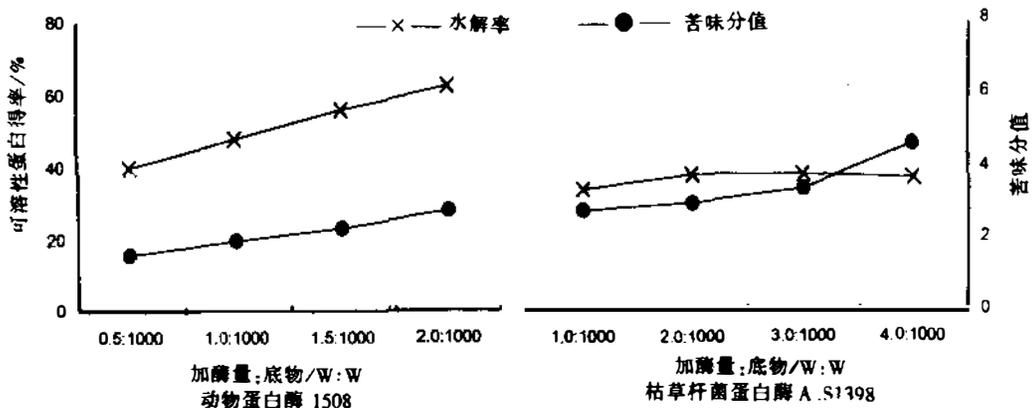


图1 两种酶的加酶量对可溶性蛋白得率和苦味的影响

Fig.1 Addition amount of two proteases affected proportion and bitter of dissoluble protein

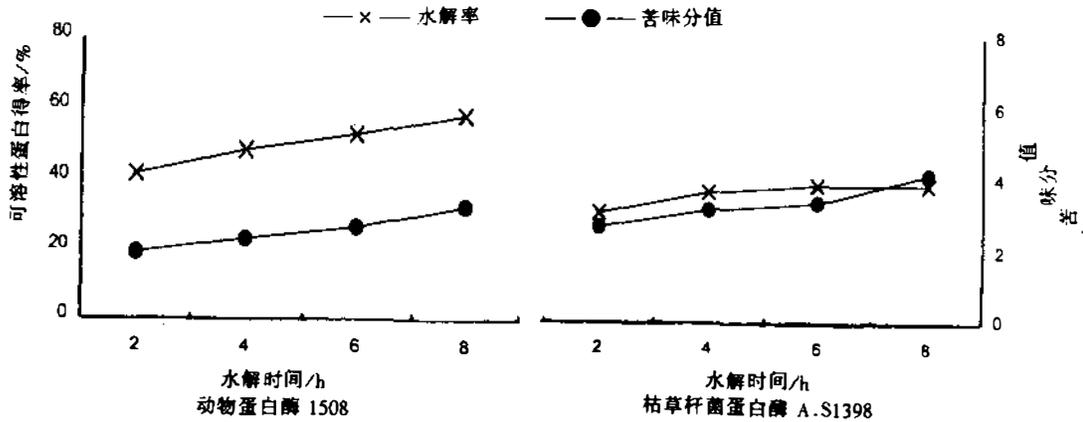


图2 两种酶的水解时间对可溶性蛋白得率和苦味的影响

Fig.2 Hydrolysis time of two proteases affected proportion and bitter of dissoluble protein

2.2 两种蛋白酶的酶量、温度、作用时间对水解液苦味的影响

酶解水溶性蛋白液苦味的产生,是生物酶水解蛋白质在某一条件下产生的普遍现象。苦味强弱随酶的种类、浓度、作用时间和温度不同而有差异^[4]。试验结果证明,酶量增加,作用时间延长,苦味增加(图1,图2)。水解温度从40℃上升到50℃苦味增加,50℃到55℃苦味下降(图3)。总的趋势是得率提高,苦味增加,得率下降,苦味也相应减轻,这可能是水解率高,溶液中苦味肽和苦味游离氨基酸含量相对提高,水解率下降,溶液中苦味肽和苦味游离氨基酸含量相对降低的原因所致^[5,6]。

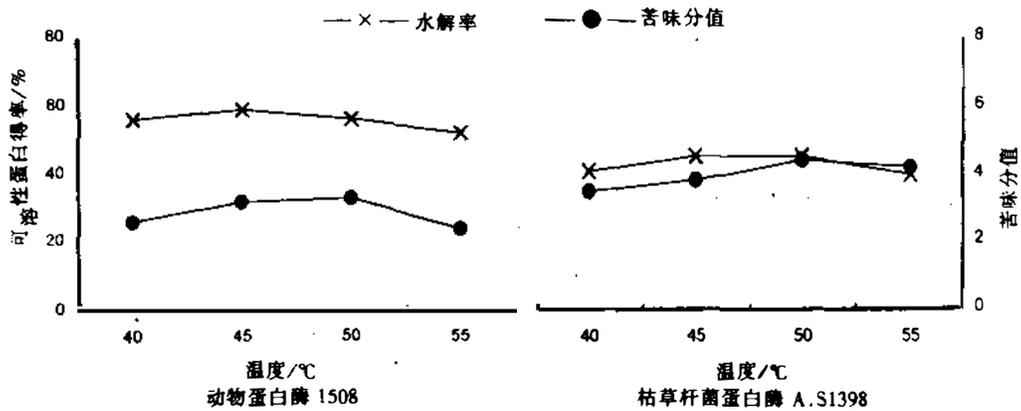


图3 两种酶的水解温度对可溶性蛋白得率和苦味的影响

Fig.3 Hydrolysis temperature of two proteases affected proportion and bitter of dissoluble protein

动物蛋白酶1508的正交试验结果表明,时间因子的苦味和水溶性蛋白质得率的极差最大、温度因子其次,酶量因子最小。因此动物蛋白酶1508水解蛋白质,时间因子是影响水溶蛋白质得率和苦味的主要因素,生产中提高水溶性蛋白质得率,可以提高酶量,控制水解温度和时间。枯草杆菌蛋白酶A.S1398的正交试验结果表明,酶量因子的苦味和水溶性蛋白质得率的极差最大,时间因子其次,温度因子为最小,其酶量因子是直接影响水溶性蛋白质得率和苦味的主要因素。比较酶量、温度、时间对两种蛋白酶的水解液苦味的影响程度,通过图1、图2、图3可发现,三因子对动物蛋白酶1508的水解液苦味的影响小于枯草杆菌蛋白酶A.S1398。

2.3 两种酶水解的水溶性蛋白质氨基酸含量组成分析

表3为两种水溶性蛋白质和原料中各种氨基酸的含量及组成。经酶解后两种水溶性蛋白质中的氨基酸含量均比原料中的高,分别占总蛋白质的99.13g/100g蛋白质、99.02g/100g蛋白质,必需氨基酸含量分别高出原料的2.19g/100g蛋白质和1.72g/100g蛋白质。说明鳀经酶解后获得的水溶性蛋白质营养价值比原来的更高。两种蛋白酶水解的水溶性蛋白质氨基酸含量很接近。动物蛋白酶水解的样品中必需氨基酸量略高于枯草杆菌蛋白酶。谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸等甜味氨基酸含量高于枯草杆菌蛋白酶,因而样品适口性较好,水解后鲜味增强。

3 结语

(1)由正交试验得知,酶量越高,水溶性蛋白质得率越高,苦味增加。动物蛋白酶1508酶量2:1000时,水溶蛋白质得率最高,但有微苦感觉。酶量1.5:1000,适口性较好。水解6h以上,虽然得率提高,但苦味明显增加。综合考虑,动物蛋白酶1508最佳水解条件为酶量:1.5:1000;温度:50℃;水解时间:4h。由此条件再作酶解试验,得率为62.81%,无苦味。氨基酸含量99.13g/100g蛋白质,必需氨基酸41.24g/100g蛋白质,必需氨基酸占总氨基酸的41.60%(表3)。

(2)枯草杆菌蛋白酶A.S1398酶量2:1000时,水解液苦,因而只能取1:1000的加酶量。时间因子超过2h蛋白液较苦。50℃水解率虽比45℃高,但苦味也明显增加。综合考虑,枯草杆菌蛋白酶A.S1398水解鳀的最佳条件为酶量:1:1000;时间:2h;温度:45℃。由此条件再作酶解试验,水解率为35%。分析其氨基酸含量组成(表3),总氨基酸含量为99.02g/100g蛋白质,必需氨基酸含量40.76g/100g蛋白质,占总氨基酸的41.76%,这一结果与刘洋、陈修白等报道的结果基本相符^[7,8]。

(3)枯草杆菌蛋白酶A.S1398只有采取低酶量、短时间水解的方法提取鳀可溶性蛋白质,才能克服高酶量较长时间水解带来的苦味,但是该方法却使水溶性蛋白质得率低,导致产品成本上升,造成资源浪费。如果改用动物蛋白酶1508水解鳀蛋白质,水溶性蛋白质提取率可从35%提高到62.8%。

参考文献:

- [1] 陈德隆. 荣成鳀鱼资源开发、利用的现状与建议采取的对策与措施[J]. 现代渔业信息, 1995, 10(2): 21-23.
- [2] 汪长云, 薛长湖, 陈修白. 低酶水解法提取无苦味鳀鱼水解蛋白[J]. 水产学报, 1995, 19(4): 350-353.
- [3] 钟立人, 毋瑾超. 鲑鱼鱼精蛋白的提取、纯化及其生化特性[J]. 水产学报, 1999, 23(1): 104-107.
- [4] 林秀年, 纪学斌, 杨胜钦. 酵素水解条件对水解淘汰鸡肉品质的影响[J]. 食品科学, 1995, 22(6): 697-713.
- [5] Yanez E, Brennan J C. Enzymatic fish protein hydrolysis: Chemical composition, nutritive value and use as a supplement to cereal protein[J]. J. Food Sci. 1976, 41: 1289-1292.
- [6] Hevial P, Olcott H S. Flavor of enzyme-solubilized fish protein concentrate fractions[J]. J Agric Food Chem. 25 (4): 772-775.
- [7] 刘洋, 王长云, 薛长湖, 等. 鳀鱼蛋白酶水解物的营养评价[J]. 青岛海洋大学学报, 1996, 26(1): 37-42.
- [8] 陈修白, 王长云, 薛长湖. 鳀鱼水解蛋白脱苦方法的研究[J]. 海洋科学, 1995, 5: 1-3.

表3 原料鱼、两种酶解可溶性蛋白质氨基酸含量组成分析
Tab.3 Amino acid compose analysis of material fish and two enzymolysis protein (g/100g 蛋白质)

氨基酸	原料鳀	水解蛋白质	水解蛋白质
天门冬氨酸	10.61	9.28	9.81
苏氨酸	4.87	4.34	3.84
丝氨酸	4.46	3.23	3.80
谷氨酸	14.65	17.90	16.35
甘氨酸	5.91	5.31	5.21
丙氨酸	7.11	6.10	6.02
胱氨酸	1.03	1.01	0.96
缬氨酸	5.23	5.15	5.04
蛋氨酸	3.15	3.10	3.12
异亮氨酸	4.69	4.87	4.89
亮氨酸	8.66	9.71	9.97
酪氨酸	3.71	3.11	3.57
苯丙氨酸	4.60	3.42	3.80
赖氨酸	7.75	10.65	10.40
组氨酸	2.62	2.33	3.29
精氨酸	6.30	4.35	5.81
脯氨酸	3.41	3.65	3.14
TAA	98.76	99.13	99.02
EAA	38.95	41.24	40.76
EAA/TAA	39.44	41.60	41.16

注: (1)水解蛋白质指动物蛋白酶1508水解样品; (2)水解蛋白质指枯草杆菌蛋白酶A.S1398水解样品; (3)TAA: 总氨基酸量; (4)EAA: 必需氨基酸量; (5)EAA/TAA: 必需氨基酸量/总氨基酸量。