

鱼排酶解物对鳙鱼鱼糜冻藏过程中蛋白质变性的影响

刘艺杰, 薛长湖, 薛勇, 李兆杰, 高昕, 许家超

(中国海洋大学 食品工程系, 山东 青岛 266003)

摘要:利用木瓜蛋白酶、低温碱性酶、风味蛋白酶酶解红鱼(*Sciaenops ocellatus*)鱼排, 分别获得木瓜蛋白酶酶解物(PPH)、低温碱性酶酶解物(LPH)和风味蛋白酶酶解物(FPH)。对3种酶解物化学成分及氨基酸组成进行分析, 结果显示, 3种酶解物中总氨基酸含量都在70%以上, 总氮含量为82.12%~84.61%。酶解物分别以5%(质量比)量加入鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)鱼糜中, 冻藏于-20℃。测定冻藏过程中肌原纤维蛋白质盐溶性和 Ca^{2+} -ATPase活性的变化, 同时测量鱼糜凝胶弹性的变化, 并对冻藏样品进行扫描电镜观察。抗冻效果同商业抗冻剂(4%蔗糖、4%山梨醇、0.3%多聚磷酸盐混合剂)进行比较。结果表明, 各酶解物能够在一定程度上抑制鱼糜蛋白质的冷冻变性, 延缓肌原纤维蛋白质盐溶性和 Ca^{2+} -ATPase活性的下降, 鱼糜凝胶质量下降减少, 其中木瓜蛋白酶酶解物具有最好的效果。

关键词:酶解物; 蛋白质变性; 冻藏; 鱼糜

中图分类号:S983 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)05-0632-06

中国是世界上淡水鱼产量最多的国家, 由于淡水鱼自身的特点, 其加工利用一直处于初级阶段。近年来已有许多学者研究开发淡水鱼鱼糜^[1-3]。针对鱼糜蛋白质低温贮藏极易变性的特点, 一般采用添加糖类、氨基酸及磷酸盐等变性抑制物质的方法^[4], 很好地解决了蛋白质在冻藏过程中质量劣化的问题, 但这些传统的抑制剂给鱼糜带来了人们不期望的甜味。目前, 对许多新型抗冻剂的应用已有部分研究, 如聚葡萄糖、谷氨酸钠、麦芽糊精^[5]等。这些物质也能够较好地抑制蛋白质的冷冻变性, 但由于价格和食品法规等因素, 一直没有得到推广。

随着水产品综合利用的深入研究, 利用水产加工下脚料获得酶解蛋白肽成为研究的热点, 有很多报道^[6-8]介绍了该类酶解物对海洋鱼类鱼糜抗冻变性作用的研究, 证明其能够有效抑制蛋白质的变性, 而有关酶解物在淡水鱼中的应用鲜见报道。本研究利用3种酶酶解红鱼(*Sciaenops ocellatus*)鱼排, 获得3种酶解物, 评价它们对鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)鱼糜冻藏过程中蛋白质变性抑制的情况, 期望获得高附加值天然添加剂, 以推动中国淡水鱼加工业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

下脚料红鱼鱼排由青岛新大地食品有限公司惠赠, 蛋白质含量为8.3%, 脂肪含量为3.2%, 水分含量为71.2%。鲜活鳙鱼购于青岛南山水产品市场。风味蛋白酶和木瓜蛋白酶为南宁庞博生物制品有限公司产品, 酶活力分别为40万U/g和20万U/g。低温碱性酶由黄海水产研究所提供, 酶活力为20万U/g。

1.2 鱼排酶解物的制备

鱼排解冻去杂后加水, 质量比为1:2, 100℃煮沸10 min, 冷却, 按鱼排质量1%分别加入上述3种酶。木瓜蛋白酶水解条件为: 温度50℃, pH 7.0, 时间5 h^[9]。低温碱性酶水解条件为: 温度30℃, pH 8.0, 时间4 h^[10]。风味蛋白酶水解条件为: 温度45℃, pH 6.5, 时间4 h^[9]。酶解后煮沸10 min灭酶, 酶解液经离心分离取上清液, 真空抽滤后, 用相对分子质量20 000标准的中空纤维超滤膜进行过滤, 留取相对分子质量20 000以下的样品溶液, 然后在60℃下减压浓缩至固形物20%左右, 真空冷冻干燥即得酶解物。

收稿日期: 2004-12-10; 修订日期: 2005-01-28。

基金项目: 国家“863”高技术研究发展项目资助(2004AA625010); 国家科技攻关计划项目资助(2001BA501A26)。

作者简介: 刘艺杰(1980-), 男, 硕士, 从事水产化学研究。E-mail: liuyjieouc@yahoo.com.cn

通讯作者: 薛长湖。E-mail: xuech@mail.ccac.edu.cn

1.3 酶解物一般成分及氨基酸组成分析

酶解物水分含量、总氮、灰分、脂肪等成分分别使用 105 ℃ 干燥、凯氏定氮法、550 ℃ 灰化、索氏抽提等常规方法分析^[11]。氨基酸组成分析采用氨基酸自动分析仪,定量 3 种酶解物中总氨基酸含量和游离氨基酸含量。总氨基酸测定时,将样品用 6 mol/L HCl 在 110 ℃ 水解 18 h。

1.4 鲮鱼鱼糜的制备

鲜活鲮鱼三去(去鳞、去内脏、去头)后,获得碎鱼肉分别以其 4 倍质量的冰水漂洗 4 次,用纱布脱水后以 20 目纱网精滤,获得鱼糜,其含水量为 78.5%,符合鱼糜的加工要求^[3]。鱼糜中分别添加 5%(质量比,下同)的酶解物,以添加 4% 蔗糖、4% 山梨醇和 0.3% 多聚磷酸盐混合剂作为抗冻剂对照,以纯鱼糜作为空白对照。各样品含水量统一调整至 80.0%,每 3 g 分装于自封袋中于 -20 ℃ 冷冻保藏,备用。

1.5 鲮鱼肌原纤维蛋白溶液的制备^[11]

以 10 倍量 20 mmol/L Tris-maleate 缓冲液(pH 7.0,内含 0.05 mol/L KCl)洗去鱼糜样品中残留水溶性蛋白质,9 000 r/min 下低温离心 10 min,弃去上清液,在沉淀中加入 10 倍量 20 mmol/L Tris-maleate 缓冲液(pH 7.0,内含 0.6 mol/L KCl),4 ℃ 下提取 1 h 后,9 000 r/min 下低温离心 10 min,上清液即为实验用肌原纤维蛋白溶液。

1.6 肌原纤维蛋白质溶解度和 Ca^{2+} -ATPase 活性测定

肌原纤维蛋白浓度定量用 Biuret 法^[13]测定,提取肌原纤维蛋白总量占总鱼糜蛋白质量的百分比记为肌原纤维蛋白质的溶解度。肌原纤维蛋白质 Ca^{2+} -ATPase 活性能够很好地反应冻藏过程中蛋白质的变性情况,通常被用作评价鱼肉蛋白质变性的指标^[14]。 Ca^{2+} -ATPase 活性测定参考万建荣^[13]方法,同肌原纤维蛋白溶解度测量同时进行。

1.7 凝胶弹性的测定

冷冻鱼糜样品解冻后,加入 3.0% NaCl,5 ℃ 振荡 10 min 后,灌入直径 2.55 cm 的 PVC 肠衣中,参考 Nozaki^[8]方法制作鱼肉肠。测量用凝胶强度检测仪(中国科学院海洋研究所研制),探头直径 11 mm,记录鱼糜凝胶的破断强度,鱼肉肠切为高 3.0 cm 圆柱体,每组样品做 8 个平行,结果取平均值。

1.8 扫描电镜观察

参考 Peizhi Lian^[15]方法。鱼糜样品用戊二醛

固定,梯度乙醇脱水,然后在液氮中冻结取样,在空气中干燥后喷金,用 Cambridge S250MK III 型扫描电镜仪观察鱼糜样品冻藏过程中的结构变化。

2 结果与分析

2.1 酶解物一般成分与氨基酸组成

酶解物的一般成分结果如表 1 所示,总氮含量为 82.12%~84.61%,灰分含量较高,其他各组分含量较少。

表 1 红鱼鱼排酶解物化学成分
Tab.1 Chemical composition of protein hydrolysate from fish frame

酶解物 Protein hydrolysate	总氮 Total N	水分 Water	灰分 Ash	粗脂肪 Cruid lipid	其他 Other
木瓜蛋白酶解物 (PPH)	84.61	1.03	8.41	0.32	5.63
低温碱性酶解物 (LPH)	82.12	1.46	8.61	0.43	7.38
风味酶解物 (FPH)	83.54	1.62	8.93	0.45	5.46

总氨基酸和游离氨基酸含量如表 2 所示。总氨基酸含量都在 70% 以上,3 种酶解物区别不大,风味蛋白酶和木瓜蛋白酶解物中游离氨基酸含量较高,分别为 24.9% 和 8.7%,低温碱性酶解物为 3.4%。酶解物中亲水性氨基酸占主要部分,占总氨基酸含量的 60% 以上,明显对鱼肉蛋白质具有防冻效果的氨基酸^[14]含量高,3 种酶解物中都以谷氨酸含量最高,其次是天冬氨酸。木瓜蛋白酶解物游离氨基酸中,半胱氨酸含量达到 23.1%,明显高于其他 2 种酶解物。

2.2 肌原纤维蛋白质溶解度的变化

鱼糜在冻藏过程中肌原纤维蛋白质溶解度变化情况如图 1 所示,随着冻藏时间的延长,鱼糜中提取肌原纤维蛋白质含量逐渐下降。新鲜鱼糜蛋白溶解度计量为 100%,冻藏 1 d 后,空白组溶解度迅速下降至 61.2%,之后缓慢下降,12 周后,下降至 37.6%,蛋白质变性程度严重。添加酶解物的样品在冻藏前期,肌原纤维蛋白溶解度下降缓慢,未出现蛋白质急剧变性的情况,其变化模式和添加抗冻剂样品相同。木瓜蛋白酶解物显示出较好的抗冻效果,样品冻藏 6 周时,溶解度仅比抗冻剂组低 4.0%。

表 2 红鱼鱼骨酶解物氨基酸含量
Tab.2 Amino acid composition of protein hydrolysate from fish frame g/(100 g)

氨基酸 Amino acid	低温碱性酶解物(LPH)		风味蛋白酶酶解物(FPH)		木瓜蛋白酶酶解物(PPH)	
	总氨基酸 Total Aa	游离氨基酸 Free Aa	总氨基酸 Total Aa	游离氨基酸 Free Aa	总氨基酸 Total Aa	游离氨基酸 Free Aa
天冬氨酸 Asp	7.551	0.126	6.929	0.731	6.667	0.339
苏氨酸 Thr	3.065	0.076	3.058	1.965	3.233	-
丝氨酸 Ser	3.789	0.108	3.653	1.220	3.413	0.013
谷氨酸 Glu	13.536	0.277	12.320	1.565	12.301	0.336
甘氨酸 Gly	8.675	0.094	8.151	0.831	7.127	0.892
丙氨酸 Ala	6.402	0.229	6.088	1.865	5.654	0.483
半胱氨酸 Cys	-	1.113	-	-	-	2.008
缬氨酸 Val	6.353	0.230	6.444	3.554	6.767	0.329
蛋氨酸 Met	2.298	0.06	2.372	1.196	2.503	0.392
异亮氨酸 Ile	2.572	0.284	2.725	1.301	2.909	0.334
亮氨酸 Leu	5.066	0.268	4.994	3.135	5.201	0.973
酪氨酸 Tyr	1.856	0.139	1.865	0.796	2.508	0.230
苯丙氨酸 Phe	2.496	0.111	2.447	1.342	2.709	0.409
赖氨酸 Lys	5.817	0.168	5.749	2.513	5.782	0.601
组氨酸 His	1.289	0.025	1.193	0.430	1.381	0.088
精氨酸 Arg	5.575	0.124	5.409	2.470	5.444	1.268
总量 Total	76.340	3.432	73.397	24.914	73.599	8.695

注:“-”表示微量。
Notes:“-” means trace.

2.3 Ca²⁺-ATPase 活性的变化

测量结果如图 2 所示。随着冻藏时间的延长, Ca²⁺-ATPase 活性呈下降趋势。冻藏 1 天后,空白组活性迅速下降至 46.2%,之后呈缓慢下降趋势。而添加抗冻剂和酶解物的几组样品, Ca²⁺-ATPase

活性均高于同期空白组。酶解物表现出延缓 Ca²⁺-ATPase 活性下降的作用,以木瓜蛋白酶酶解物效果最为明显,其变化趋势和添加抗冻剂组几乎相同,冻藏 12 周后,活性保持了新鲜鱼糜样品的 65.1%,仅比添加抗冻剂组低 6.0%。

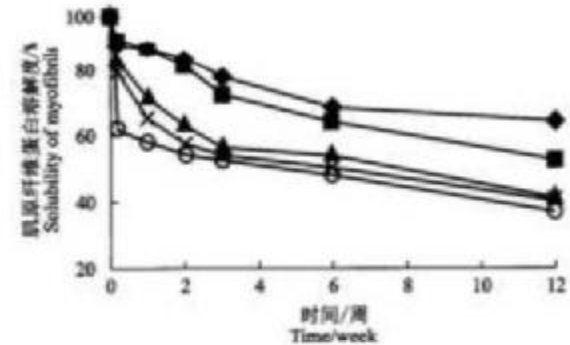


图 1 肌原纤维蛋白质溶解度的变化
○—对照,◆—山梨醇等组(抗冻剂),■—木瓜蛋白酶酶解物组,▲—低温碱性酶解物组,×—风味蛋白酶酶解物组

Fig.1 Solubility changes in myofibrils during frozen storage
○—Control,◆—Sorbitol et al group (cryoprotectant),■—PPH group,▲—LPH group,×—FPH group

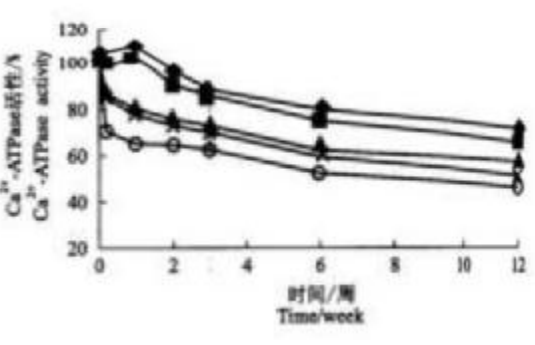


图 2 肌原纤维蛋白 Ca²⁺-ATPase 活性的变化
○—空白,◆—山梨醇等组(抗冻剂),■—木瓜蛋白酶酶解物组,▲—低温碱性酶解物组,×—风味蛋白酶酶解物组

Fig.2 Ca²⁺-ATPase activity changes in myofibrils during frozen storage
○—Control,◆—Sorbitol et al group (cryoprotectant),■—PPH group,▲—LPH group,×—FPH group

2.4 凝胶弹性的变化

鱼糜蛋白质的变性直接影响到鱼糜制品的凝胶弹性,所以凝胶弹性的变化在一定程度上反映了蛋白质变性的情况。取冻藏 30 d 和 60 d 后的鱼糜样品制作鱼肉肠,测量其破断强度,结果如表 3 所示。新鲜鱼糜鱼肉肠破断强度为 $(1\,990 \pm 21.03)$ g。空白组质量下降很快,冻藏 60 d 后破断强度变为 (948 ± 36.82) g。加入酶解物后,凝胶破断强度下降减少,冻藏 60 d 后均保持在 66.8% 以上,酶解物有利于蛋白质的冻藏。但 3 种酶解物作用区别较大,木

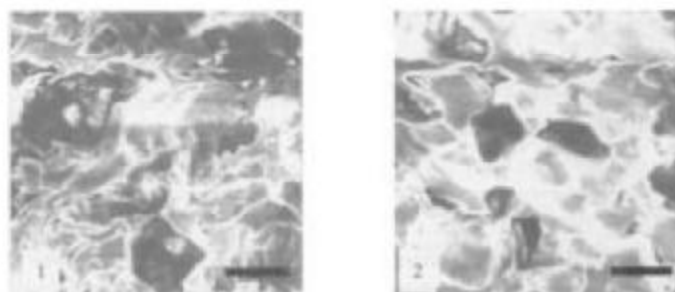
瓜蛋白酶酶解物作用接近抗冻剂,优于其他 2 种酶解物。

2.5 鱼糜在冻藏过程中结构的变化

选取冻藏 90 d 后鱼糜空白样品和添加木瓜蛋白酶酶解物样品进行扫描电镜观察(图 3)。空白样品中组织之间空隙明显,结构疏松,结晶水分含量较高,冰晶颗粒较大。添加木瓜蛋白酶酶解物后,样品结构明显致密,冰晶颗粒减小,冻结水含量较少,蛋白质中结合水含量增加,说明蛋白质的稳定性较好,显示木瓜蛋白酶酶解物对蛋白质变性的抑制作用。

表 3 鱼糜凝胶破断强度变化($n=8$)
Tab.3 Change of surimi gel breaking force ($n=8$)

冻藏时间/d Storage time	分组 Group				
	对照组 Control	山梨醇等 Sorbitol et al.	木瓜蛋白酶酶解物组 PPH group	低温碱性酶解物组 LPH group	风味酶解物组 FPH group
30	$1\,320 \pm 57.57$	$1\,911 \pm 40.86$	$1\,842 \pm 35.35$	$1\,672 \pm 34.54$	$1\,693 \pm 38.15$
60	948 ± 36.82	$1\,701 \pm 42.90$	$1\,587 \pm 25.49$	$1\,343 \pm 38.52$	$1\,331 \pm 31.37$



bar=100 μm

图 3 扫描电镜图片

1:对照; 2:添加木瓜蛋白酶酶解物

Fig.3 SEM micrographs of two samples

1:Control; 2:Addition of PPH

3 讨论

鱼糜蛋白质在冻结贮藏过程中的变性同鱼糜中水的存在状态有很大关系,冻藏时蛋白质结合水与自由水同时结冰,使蛋白质立体结构发生变化进而导致蛋白质变性,这种变性主要是由肌原纤维蛋白质变性引起^[14]。山梨醇、蔗糖等混合剂作为抗冻剂添加到鱼糜中后,能够改变蛋白质中水的状态,这类物质中含有很多-OH,冻藏过程中能与水分子相结合,减少巨大冰晶的形成,增加蛋白质中结合水含量,保持蛋白质的稳定构象。这种机理同样适合于

解释氨基酸对蛋白质冷冻变性的抑制现象^[16]。酶解物中主要成分为肽,氨基酸组成分析显示,亲水性氨基酸在其中占有很大比例,达到氨基酸总量的 65% 以上,以谷氨酸和天冬氨酸含量尤为明显。这些亲水性氨基酸能够与水相互作用形成氢键,保证了冻结过程中水的稳定性,避免了蛋白质空间构象的剧烈变化。3 种酶解物的添加均能够抑制蛋白质初期的急剧变性,改变了鱼肉蛋白质的两步变性模式,肌原纤维蛋白溶解度和 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化很好地表现了蛋白质冻藏过程中的变化情况,并且变化趋势同添加抗冻剂样品十分接近,进一步说

明两者机理的相同之处。对凝胶破断强度的测量也表明酶解物对冻藏鱼糜质量的提高作用,破断强度下降被延缓。电镜照片比较显示,木瓜蛋白酶酶解物能够使蛋白质结构致密,增加了鱼糜中未冻结水分的含量,这同其抗冻机理相符合。酶解物显示出不同的抗冻效果,以木瓜蛋白酶酶解物效果最为明显,这可能与3种酶酶解方式不同,与酶解物中小肽数量及其暴露的-OH多少有关。酶解物作为一种水解蛋白肽,营养价值较高,并且利于人体吸收。由于其来源于自然资源,开发前景很广阔。3种酶解物均有少许苦味及不期望色泽,实际应用中应进行脱苦脱色处理。研究酶解物在鱼糜中作为抗冻剂使用,既能改变传统抗冻剂带来的不利影响,又能保证蛋白质的稳定,为水产品综合利用提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 张俊杰,曹庆孝.我国淡水鱼鱼糜的研究情况[J].食品与发酵工业,2002,28(9):57-63.
- [2] 汪之和,王 健.漂洗条件对鲢鱼糜蛋白质冷冻变性的影响[J].上海水产大学学报,1999,8(3):210-213.
- [3] 吴仪民,王梅洪,韩家珍,等.几种淡水鱼鱼糜特性的研究[J].食品科学,1999,20(9):15-19.
- [4] 汪之和.水产品加工与利用[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [5] Carpenter J F, Crowe J H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes[J]. Cryobiology, 1988, 25: 244-255.
- [6] Zhang N, Yamashita Y, Nonaki Y. Effects of protein hydrolysate of Antarctic krill on the state of water and denaturation of lizard-fish myofibrils during frozen storage[J]. Food Sci & Techn Res, 2002, 8(3): 200-206.
- [7] Hossain M, Abu Ali Khan M, Nonaki Y, et al. Effect of proteolytic squid protein hydrolysate on the state of water and dehydration-induced denaturation of lizard fish myofibrillar protein[J]. J Agr Food Chem, 2003, 51(16): 4 769-4 774.
- [8] Nonaki Y, Hara K, Hossain M, et al. Effect of enzymatic fish-scrap protein hydrolysate on gel-forming ability and denaturation of lizard fish (*Saurida taimi*) surimi during frozen storage[J]. Fisher Sci, 2003, 69: 1 271-1 280.
- [9] 杨 萍,邓尚贵,吴玉康.蛋白酶及其作用方式对制取青鳉鱼肉水解蛋白的影响[J].食品与发酵工业,2003,29(4):91-94.
- [10] 孙 道,修朝阳,王跃军,等.黄杆菌 YS-9412-130 低盐碱性蛋白酶性质鉴定[J].海洋水产研究,2001,22(2):1-10.
- [11] 黄伟坤.食品检验与分析[M].北京:中国轻工业出版社,1997.
- [12] 姜凤英.温度对海胆和养殖对虾蛋白特性的影响[D].青岛:中国海洋大学,1997.
- [13] 万建荣,洪玉蓉,莫印慈,等.水产食品化学分析手册[M].上海:上海科技出版社,1993.
- [14] 周爱梅,曹庆孝,刘 欣,等.冷冻鱼糜蛋白在冻藏中的物理化学变化及其影响因素[J].食品科学,2003,24(3):153-157.
- [15] Lian Pei Zhi. Physicochemical and microstructural changes in minced fish muscles as affected by cryoprotectants[D]. Rhode Island: University of Rhode Island, 2001.
- [16] Noguchi S, Matsumoto J J. Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during frozen storage-II. Preventive effect of some amino acids, peptides, acetylanino acids and sulfur compounds[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1975, 41(2): 243-249.

Effects of enzymatic fish frame protein hydrolysate on denaturation of bighead carp surimi during frozen storage

LIU Yi-jie, XUE Chang-hu, XUE Yong, LI Zhao-jie, GAO Xin, XU Jia-chao

(Department of Food Science & Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: During the frozen-storage, fish muscle undergoes some deterioration in edible qualities and functional properties for the processing. The deterioration of muscle protein is mainly attributed to the frozen denaturation of myofibrils. Recently, a potential use of enzymatic hydrolysates from various food materials, such as fishery products and residues from seafood processing as denaturation-suppressing materials, has been studied. It was well established that some amino acids strongly suppressed protein denaturation during frozen storage. Fish protein hydrolysate is a mixture of various peptides of various lengths. Hence, the suppressive effect of fish protein hydrolysate is highly expected. In this study, the effects of enzymatic protein hydrolysates on denaturation of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) surimi during frozen storage was studied. Three protein hydrolysates were prepared from red drum (*Sciaenops ocellatus*) frame by three enzymes, which were papain, low-temperature alkaline protease and flavourzyme. Their major components and amino acid composition were analyzed. Bighead carp surimi containing 5% (w/w) protein hydrolysates was stored at -20°C . Salt solubility and Ca^{2+} -ATPase activity of myofibrils were measured during frozen storage. Gel breaking force of surimi was measured concurrently. The structure of frozen samples were observed under scanning electron microscope (SEM). Their effects were compared with commercial cryoprotectant (4% sucrose, 4% sorbitol and 0.3% polyphosphate).

The results showed that peptides were the major component of protein hydrolysates, which accounted for 82.12%–84.61%. Hydrophilic amino acids were the most abundant in the amino acid composition. Gly had the highest content, followed by Asp. Addition of protein hydrolysates to surimi suppressed the quick drop of the salt solubility and Ca^{2+} -ATPase activity of myofibrils. Two-step freeze denaturation pattern was converted into one-step denaturation pattern. After 60 days of frozen storage, the breaking force values of the gels without protein hydrolysates was only 47.6%, while the values of gels containing protein hydrolysates were all over 66.8%. The denaturation of surimi protein might be suppressed by the addition of the hydrolysates, especially the hydrolysate prepared by papain.

Key words: protein hydrolysate; protein denaturation; frozen storage; surimi

Corresponding author: XUE Chang-hu. E-mail: xuech@mail.ouc.edu.cn