

文章编号:1005-8737(2001)03-0073-04

不同酶解条件对鲢鱼蛋白水解物 苦味及氨基酸组成的影响

朱碧英, 毋瑾超

(国家海洋局 第二海洋研究所, 浙江 杭州 310012)

摘要:研究了不同酶解的鲢鱼可溶性产物苦味及呈味氨基酸组成的差异, 以及其水解时间、水解率对苦味的影响。结果表明, 随着酶解时间延长和水解率的提高, 几种水解液的苦味值都有不同程度增强。胃蛋白酶和胰蛋白酶的复合水解液表现出随水解时间的延长, 水解率提高明显, 苦味强度上升平缓。当水解率从42%提高到78%时, 苦味值只提高了2, 水解液总的苦味分值为3.5; 枯草杆菌蛋白酶水解2 h后苦味分值急剧提高, 水解4 h后苦味分值达到6, 水解液味道很苦, 水解率从32%提高到62%时, 苦味分值提高到了7, 水解液总的苦味值为8.5。两种方法水解获得的可溶性产物氨基酸及必需氨基酸组成含量接近, 但胃蛋白酶、胰蛋白酶复合水解的可溶性产物具有更高的氨基酸分值, 主要鲜味氨基酸含量略高于枯草杆菌蛋白酶水解产物, 苦味氨基酸则相反。

关键词:酶解; 鲢鱼; 蛋白水解物; 苦味; 氨基酸

中图分类号:Q814

文件标识码:A

鱼蛋白质经酶水解可形成肽类和游离氨基酸, 其产物往往出现不同程度的苦味。对去苦味的研究已有许多报道, 如刘洋等^[1]曾用活性炭吸附和 β -环糊精掩盖法降低枯草杆菌蛋白酶水解的鲢鱼蛋白水解液的苦味; 王长云等^[2]研究了用低酶量枯草杆菌蛋白酶和短时间水解法降低鲢鱼蛋白水解产生的苦味。国外报道采用 Plastein 的方法^[3], 在酶的作用下, 将水解苦味肽重新塑合, 产生一种无苦味的肽。采用吸附和低酶量短时间水解方法降低水解产物的苦味, 会导致水解物产量降低; 用 Plastein 方法重新合成无苦味肽, 技术要求高、且增加生产成本, 实际生产应用未见有报道。研究证明, 水解液的苦味产生与其疏水性氨基酸的量和侧链的位置有关, 当疏水性氨基酸含量相对低或位于肽链的末端位置

时苦味较低^[4]。选择合适的酶, 用多酶进行复合水解, 使疏水性氨基酸位于肽链末端或尽可能少进入水解产物中, 不会随着水解度的提高水解液苦味增加, 该方面的研究国内未见报道。本研究采用胃蛋白酶和胰蛋白酶复合水解鲢鱼蛋白质, 并与枯草杆菌蛋白酶水解产物比较, 探讨它们对鲢鱼可溶性蛋白的苦味及氨基酸组成的影响, 这对选择合适的酶制取高质量的海洋低值鱼可溶性蛋白寡肽具有理论指导意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 粗鲢鱼蛋白 新鲜鲢鱼, 95℃ 蒸煮 10 min, 压榨, 榨液离心, 除去上层油脂, 下层水溶液与榨饼一起烘干, 备用。鲢鱼粗蛋白样品为干品, 其主要成分中蛋白含量为 60.5%、粗脂肪 13.4%、盐(NaCl) 10.8%、水分 10.2%。

1.1.2 酶 枯草杆菌蛋白酶 AS 1.398, 酶活力:

收稿日期:2001-03-09

基金项目:浙江省科技重大项目资助(981103106)

作者简介:朱碧英(1952-), 女, 副研究员, 主要从事海洋生物资源开发研究。

75 000 u/g;胃蛋白酶,酶活力:60 000 u/g;胰蛋白酶,酶活力:70 000 u/g。

1.1.3 实验试剂 均为优级纯。

1.2 测定方法及实验仪器

1.2.1 总氮及蛋白质 用凯氏定氮法。

1.2.2 氨基酸态氮 用甲醛滴定方法。

1.2.3 氨基酸 用贝克曼 System 6300 型氨基酸分析仪测定。

1.2.4 脂肪 用索氏提取法。

1.3 实验方法

1.3.1 胃蛋白酶和胰蛋白酶复合水解液制备 定量称取已制备的鲢鱼粗蛋白粉,加一定量的水煮沸 15 min,等样品冷却后倒入组织捣碎机中捣碎 5 min,用于酶解。将捣碎后的样品加入胃蛋白酶(酶活力 60 000 u/g),酶量为 60 u/ml 水解液。胃蛋白酶最适 pH 为 1.5~2.0,根据实验材料含盐量高,属微碱性,且随着水解时间延长,pH 下降的特点,设计了 pH 5.0、温度 42℃ 的条件下,在一密闭容器中搅拌水解。每隔 2 h 取一定量水解液,用于测定蛋白水解率和苦味值。5 h 后将水解液 pH 调至 8.0,加入胰蛋白酶(酶活力 70 000 u/g),酶量为 70 u/ml 水解液,继续水解。最后升温灭酶活。样品于 4 000 r/min 离心 10 min,弃去沉淀,上清液再经真空过滤,滤液用于分析测定。

1.3.2 枯草杆菌 AS 1.398 蛋白酶水解液制备 定量称取已制备的鲢鱼粗蛋白粉,加一定量的水煮沸 15 min,等样品冷却后倒入组织捣碎机中捣碎 5 min,用于酶解。将捣碎后的样品加入枯草杆菌 AS 1.398 蛋白酶(酶活力 75 000 u/g),酶量为 75 u/ml 水解液、pH 7.0、温度 42℃ 的条件下,在一密闭容器中搅拌水解。每隔 2 h 取一定量水解液,用于测定蛋白水解率和苦味值。

1.4 计算方法

1.4.1 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。

1.4.2 水解率 用凯氏定氮法测定可溶性蛋白质水解率,计算公式为:

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

2 结果与讨论

酶解蛋白液苦味的产生,是酶水解蛋白质在一

定条件下产生的普遍现象。水解液苦味的强弱与酶的种类、酶量、水解时间有直接关系。图 1 是枯草杆菌蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶复合水解鲢鱼蛋白质,水解液的苦味分值与水解时间和水解率之间的关系。由图 1 可知,几种蛋白酶水解液苦味值随着水解时间的延长和水解率的提高都有所提高。但胃蛋白酶和胰蛋白酶的复合水解表现出随水解时间的延长,水解率提高明显,苦味强度上升平缓。而枯草杆菌蛋白酶水解 4 h 内苦味分值急剧上升,味道很苦,蛋白水解率却比复合蛋白酶低。

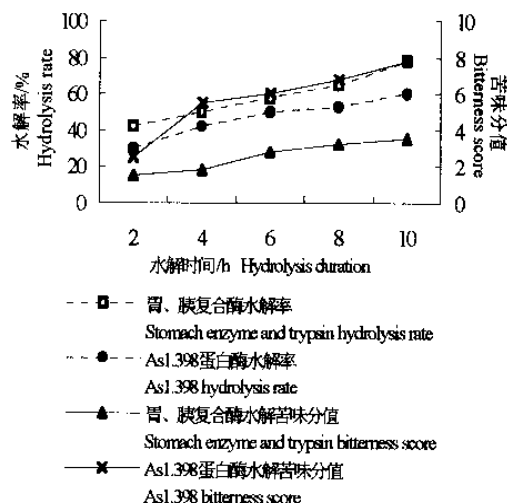


图 1 几种水解液苦味值、水解率与水解时间之间的关系
Fig.1 Bitterness score or hydrolysis rate of several enzymic protein hydrolysates vs. hydrolysis duration

研究表明,苦味与水解产物中的疏水性氨基酸在肽链中的位置及含量有关。当疏水性氨基酸位于肽链非末端位置,表现出苦味最大,位于肽链末端,苦味较低。酶水解蛋白质破坏了原有蛋白的结构,使原来隐藏于分子内部的疏水性氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸等暴露于分子表面,因而几种酶的水解产物都有不同程度的苦味产生。由于胃蛋白酶、胰蛋白酶都是内切酶,胃蛋白酶主要水解亮氨酸与缬氨酸、酪氨酸与亮氨酸以及芳香族氨基酸之间的肽键,胰蛋白酶能专一水解与赖氨酸或精氨酸结合的肽键,因而可使大部分疏水性氨基酸位于肽链末端,故使蛋白水解液苦味值较低^[4]。朱碧英等^[1]用高效液相色谱分析了胃蛋白酶、胰蛋白酶复合水解产物的分子组成,发现其肽类物质占 96%,游离

氨基酸只占 4%, 而且分子量 1 000 以下的 2~8 个氨基酸残基的寡肽占 54%, 证明了用胃蛋白酶、胰蛋白酶复合水解可获得低苦味的寡肽产物。杆菌类蛋白酶是一种非专一性蛋白水解酶^[6], 水解产物中疏水性氨基酸不一定位于肽链末端, 获得的苦味肽含量较高, 使枯草杆菌蛋白酶水解产物苦味较强。如延长水解时间, 水解产物则以游离氨基酸为主^[7]。林秀年等^[8]也曾报道动物蛋白酶和植物蛋白酶水解的蛋白液适口性比微生物来源的蛋白酶好。

胃蛋白酶、胰蛋白酶复合水解和枯草杆菌蛋白酶水解的鲢鱼蛋白水解产物的氨基酸组成含量见表 1。2 组水解产物中氨基酸和必需氨基酸含量都较接近, 而且都高于原料组。其中赖氨酸含量特别高, 是原料组的近 2 倍。赖氨酸是谷物蛋白的限制性氨基酸, 用鲢鱼蛋白水解产物强化谷物, 可提高其蛋白质利用率。复合酶水解产物中的胱氨酸、枯草杆菌蛋白酶水解产物中的脯氨酸含量却远低于原料组而未能检出, 这大概是酶的水解专一性所导致的。

表 1 酶解鲢鱼蛋白水解产物氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of enzymic anchovy protein

hydrolysates	% 干重 Dryweight		
氨基酸 Amino acid	PTAH	ASAH	RAAA
天门冬氨酸 Asp	8.38	7.34	5.67
苏氨酸 Thr	3.38	2.68	2.60
丝氨酸 Ser	2.62	2.51	2.38
谷氨酸 Glu	12.82	12.14	7.84
脯氨酸 Pro	2.02	微量 Trace	1.83
甘氨酸 Gly	4.37	3.21	3.17
丙氨酸 Ala	5.63	5.43	3.81
胱氨酸 Cys	微量 Trace	0.11	0.55
缬氨酸 Val	4.43	4.65	2.80
甲硫氨酸 Met	2.70	2.67	1.68
异亮氨酸 Ile	3.53	4.61	2.51
亮氨酸 Leu	5.62	6.22	4.64
酪氨酸 Tyr	1.52	2.10	1.98
苯丙氨酸 Phe	3.64	2.86	2.74
组氨酸 His	2.41	3.56	1.40
赖氨酸 Lys	8.09	8.23	4.14
色氨酸 Trp	1.03	1.01	0.91
精氨酸 Arg	1.82	5.58	3.37
总量 Total	74.01	74.91	53.75
必需氨基酸 EAA	32.42	32.93	22.02
必需氨基酸/氨基酸总量 EAA/TAA	43.80	43.96	40.97

PTAH: 胃蛋白酶和胰蛋白酶鲢鱼水解产物 Anchovy hydrolysates by pepsin and trypsin. ASAH: ASI. 398 中性蛋白酶鲢鱼水解产物 Anchovy hydrolysates by ASI. 398 neutral enzyme; RAAA: 原料鱼氨基酸 Raw anchovy amino acids. 下同 The same below.

1) 朱碧英, 毋瑾超, 胡锡钢. 酶解鲢鱼可溶性肽分子组成结构及营养评价[J]. 中国海洋药物, 2001(待刊).

2 组鲢鱼蛋白水解产物及鲢鱼原料的主要鲜味与苦味氨基酸组成含量见表 2。与原料鱼相比, 水解产物主要鲜味和苦味氨基酸含量都有不同程度的提高, 因而鲜味和苦味都比原料鱼更强烈。不同种酶的水解产物的主要鲜味和苦味氨基酸组成含量也不同。胃蛋白酶、胰蛋白酶复合水解的产物鲜味氨基酸含量高于枯草杆菌蛋白酶, 苦味氨基酸则相反。因而通过选择合适的酶, 减少苦味氨基酸进入到水解产物中, 可制备出鲢鱼助鲜调味品。

表 2 酶解鲢鱼蛋白水解产物主要鲜味和苦味氨基酸^[9]含量

Table 2 The content of major delicious and bitterness amino acid of enzymic anchovy protein hydrolysates

	% 干重 Dry weight		
氨基酸 Amino acid	PTAH	ASAH	RAAA
鲜味氨基酸 Delicious amino acid			
谷氨酸 Glu	12.82	12.14	7.84
甘氨酸 Gly	4.37	3.21	3.17
丙氨酸 Ala	5.68	5.43	3.81
总量 Total	22.87	20.78	14.82
苦味氨基酸 Bitterness amino acid			
组氨酸 His	2.41	3.56	1.40
精氨酸 Arg	1.82	5.58	3.37
蛋氨酸 Met	2.70	2.67	1.68
缬氨酸 Val	4.43	4.65	2.80
色氨酸 Trp	1.03	1.01	0.91
异亮氨酸 Ile	3.53	4.61	2.51
苯丙氨酸 Phe	3.64	2.80	2.74
总量 Total	19.56	24.88	15.41

胃蛋白酶、胰蛋白酶水解的鲢鱼蛋白水解物必需氨基酸含量与枯草杆菌蛋白酶相似, 但都高于原料鱼。与畜禽相比高于全精猪肉、全精牛肉、更高于鸡蛋粉, 略低于去皮鸡肉。胃蛋白酶、胰蛋白酶复合水解的产物氨基酸分值仅次于中国对虾, 说明其具有较平衡的必需氨基酸组成, 生物利用率高(表 3)。

参考文献:

- [1] 刘洋, 王长云, 薛长湖, 等. 鲢鱼水解蛋白脱苦方法的研究[J]. 海洋科学, 1995, (5): 1-3.
- [2] 王长云, 薛长湖, 陈修白. 低酶水解法提取无苦味鲢鱼水解蛋白[J]. 水产学报, 1995, (4): 350-353.
- [3] Lalasidis G. A new method that eliminating the bitterness of peptide[J]. Ann Nutr Alim, 1978(32): 709-712.

表 3 EAPH 与中国对虾、鸡肉、精猪肉、精牛肉和鸡蛋中 8 种必需氨基酸组成比较

Table 3 Comparing of 8 essential amino acids composition in EAPH with prawn, chicken, lean pork, beef and egg

氨基酸 Amino acid	PTAH	ASAH	RAAA	中国对虾 ¹⁾ Prawn	精猪肉 ²⁾ Lean pork	精牛肉 ²⁾ Beef	鸡蛋 ²⁾ Egg	% 干重 Dry weight	
								鸡肉 ²⁾ Chicken	FAO/WHO
色氨酸 Trp	1.03	1.01	0.91	1.67	1.06	0.90	0.76	1.04	1
蛋氨酸 Met	2.70	2.67	1.68	2.87	2.18	2.19	1.62	2.47	3.5
苏氨酸 Thr	3.38	2.68	2.60	3.94	3.98	4.00	2.48	4.32	4
亮氨酸 Leu	5.62	6.22	4.64	7.89	6.36	6.29	4.38	6.92	7
缬氨酸 Val	4.43	4.65	2.80	4.46	4.43	4.48	3.23	7.23	5
赖氨酸 Lys	8.09	8.23	4.14	7.76	6.36	6.21	2.68	6.92	5.5
异亮氨酸 Ile	3.53	4.61	2.51	4.27	3.35	3.30	2.38	6.92	4
苯丙氨酸 Phe	3.641	2.861	2.741	4.171	3.141	3.021	2.681	3.391	6
合计 Total	32.42	32.93	22.02	37.03	30.86	30.39	20.21	35.94	
氨基酸分值 Amino acid score	61	47.7	45.7	69	52	50	45	56	

¹⁾ 第一限制性氨基酸 First limited amino acid.

- [4] Matoba T, Hata T. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures[J]. Agr Biol Chem, 1972, (8): 1423 - 1431.
- [5] 朱碧英, 毋瑾超. 提高酶法水解鲢鱼可溶性蛋白质的得率技术[J]. 上海水产大学学报, 2000(3): 272 - 275.
- [6] Lalasidis G, Bostrom S. Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: Chemical composition and nutritive value[J]. J Agric Food Chem, 1978, (3): 751 - 756.
- [7] 刘洋, 王长云, 薛长湖, 等. 鲢鱼蛋白酶水解物的营养评价[J]. 青岛海洋大学学报, 1996(1): 37 - 43.
- [8] 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(6): 697 - 713.
- [9] Lahl W J, Grindstaff D A. Spices and seasonings: Hydrolyzed proteins[R]. Proceedings of the 6th SIFST Symposium on Food Ingredients - Applications, Status and Safety. 1989: 56 - 58.

The influence of different enzyme hydrolysis on bitterness and amino acids composition of hydrolysed protein from *Engraulis japonicus*

ZHU Bi-ying, WU Jin-chao

(Second Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Using pepsin (6 000 u/g) and trypsin(70 000 u/g) as complex enzyme to hydrolyze the meat meal of *Engraulis japonicus*, and meanwhile using bacillus subtilisin AS1.398(75 000 u/g) as the control enzyme to hydrolyze the same sample. The results show that the bitterness of both hydrolysate increased with the prolonging of hydrolysis duration and the increasing of hydrolysis rate. To the hydrolysate of the complex enzyme, the hydrolysis rate increased obviously and the bitterness increased smartly with the prolonging of hydrolysis duration; when the hydrolysis rate went up from 42% to 78%, the bitterness score increased by 2, being 3.5. To the hydrolysate of bacillus subtilisin AS1.398, after 2h's hydrolysis, the bitterness score increased sharply; the bitterness score was about 6 after 4h's hydrolysis and the hydrolysate was very bitter; as the hydrolysis rate went up from 32% to 62%, the bitterness score increased by 7, being 8.5. In the 2 kinds of hydrolysate, the soluble and essential amino acids were almost at the same level of content in amino acids composition. The soluble products in the hydrolysate of the complex enzyme had more amino acid scores and higher delicious amino acids content than that of bacillus subtilisin, while the bitterness was on the contrary.

Key words: enzymic hydrolysis; *Engraulis japonicus*; hydrolyzed protein; bitterness; amino acids composition

1) 天津农学院水产系对虾饵料组. 对虾人工配合饵料研究报告. 2) 中国医学科学院. 食物成份表.