

# 超高压对鲢鱼蛋白水解的影响\*

邵 懿, 薛长湖, 李兆杰, 高瑞昌, 常耀光

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛, 266003)

**摘 要** 探讨能否利用超高压技术抑制微生物的生长, 实现低盐短时发酵, 从而改善鱼露的生产工艺。以水解液总氮含量、 $\alpha$ -氨基氮及游离氨基酸组成成分等为指标, 研究了超高压在鲢鱼自身降解过程中所起的作用, 同时讨论了超高压下添加盐、外源酶对超高压作用效果的影响。结果表明, 100 MPa 的压力有利于鲢鱼内源酶对鲢鱼蛋白的水解, 且从氨基酸组成看, 超高压技术的采用对食品营养无破坏作用; 外加风味蛋白酶(flavourzyme)对高压助水解效果有加强作用; 但超高压下, 盐的添加使水解程度有所下降。在 4 种超高压作用条件中, 添加 0.1% 风味蛋白酶(flavourzyme)可得到最大水解度, 为 34.45%。

**关键词** 鲢鱼, 水解蛋白, 风味蛋白酶, 超高压

鱼露(fish sauce)是以水产品为原料, 并在较高盐分对腐败菌的抑制作用下, 依靠鱼体自身含有的各种酶, 经数月乃至数年长期酶解发酵而成的特殊高档氨基酸调味品。传统方式生产的鱼露盐度高, 酶活性受抑制, 使发酵周期有的长达 1 年以上, 且不适应低盐化食品的发展方向。为了缩短发酵周期, 人们先后研究出加温发酵和低盐发酵型工艺, 使发酵周期缩短到 4~6 个月<sup>[1]</sup>。而酶工程的应用则使发酵周期缩短到 24h 以内成为可能<sup>[2]</sup>, 但与此同时, 加工过程中微生物的控制以及酶制剂的昂贵价格都使其应用受到限制。

超高压加工的食品在 1990 年前后相继面世, 主要用于果酱、橘汁及水果蔬菜的加工。其加工食品的独特之处在于不会使食品的温度升高, 而只是作用于非共价键, 共价键基本不被破坏, 所以对食品原有的色、香、味及营养成分影响较小<sup>[3]</sup>。

有资料表明, 30℃ 下 60 MPa 以上的压力处理就可以抑制异养微生物的生长<sup>[6]</sup>, 而多数微生物经 100MPa 以上压力处理即被杀灭<sup>[7]</sup>。而高压对酶的作用效果可分为 2 个方面: 一方面较低的压力能激活一些酶; 另一方面压力较高时可使酶失活<sup>[8]</sup>。较低压力的激活作用可能由于: 低压下酶的构象没有太大变化, 不会失去活力; 压力促使酶从附着而被束缚的状态中解离出来, 提高了酶的活性; 此外在压力作用下细胞膜被损坏或改变了膜的通透性, 使细胞内部的酶泄漏出来, 也会导致酶活性比对照组高。由此推测, 施加适当的高压可起抑菌作用, 这就无需添加盐来防

腐, 这样内源酶可从盐的抑制作用下解放出来, 能更好地发挥作用; 而且高压能使蛋白质适当变性利于酶解; Romuald 等人<sup>[9]</sup>的研究表明, 较低压力会促进组织蛋白酶酶活<sup>[9]</sup>, 而鲢鱼发酵中主要起作用的蛋白酶即为组织蛋白酶 L<sup>[10]</sup>。

实验中采用 100MPa 的压力以及配合其他条件, 力求能通过超高压技术的应用找到能实现低盐短时发酵的更好途径, 且探讨了将超高压应用于鲢鱼蛋白质发酵的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验原料

冰冻鲢鱼, 采购自舟山, 其基本成分为: 粗蛋白 13.76%, 粗脂肪 3.19%, 水分 76.16%, 灰分 3.11%。原料经自然解冻后匀浆, 然后称取一定量, 用聚乙烯包装后进行加压处理, 其余的于 -30℃ 下冻藏备用。

### 1.2 工艺流程

原料 → 自然解冻 → 匀浆 → 包装 → 超高压过程 → 加热灭酶(100℃, 30 min) → 10 倍质量的无氨蒸馏水浸提 30 min → 离心 4 000r/min, 30 min, 吸取清液 → 抽滤(加硅藻土助滤) → 得澄清的水解液, -30℃ 保存, 待分析。

### 1.3 水解条件

A<sub>1</sub> 匀浆液, 常温, 100 MPa, 20 h(同时作常压对照组 B<sub>1</sub>)。

A<sub>2</sub> 匀浆液, 3% NaCl, 常温, 100 MPa, 20 h(同时作常压对照组 B<sub>2</sub>)。

A<sub>3</sub> 匀浆液, 0.1% 风味蛋白酶, 常温, 100 MPa, 20 h。

第一作者: 硕士研究生(李兆杰为通讯作者)。

\* 国家“863”计划项目(2004AA625010), 国家“十五”攻关重大专项计划项目(2001BA501A26)

收稿日期: 2006-10-16, 改回日期: 2006-12-20

A<sub>4</sub> 匀浆液, 3% NaCl, 0.1% 风味蛋白酶, 常温, 100 MPa, 20 h。

## 1.4 测定方法

### 1.4.1 基本成分

总氮: 凯氏定氮法; 粗脂肪: CHCl<sub>3</sub>-甲醇法; 水分: 105℃ 直接干燥法; 灰份: 550℃ 灼烧法; 可溶性固形物: 直接烘干法; 氨基酸含量: OPA 分光光度法; 游离氨基酸成分分析: 835 型氨基酸自动分析仪。

### 1.4.2 水解度及氮利用率

氨基氮: 甲醛滴定法; 氮含量的测定: 凯氏定氮法。

$$\text{水解度}/\% = \frac{\text{水解后增加的氨基氮}}{\text{原料中总氮含量}} \times 100$$

$$\text{氮利用率}/\% = \frac{\text{蛋白质水解物的氮含量}}{\text{原料总氮含量}} \times 100$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 加压水解的效果

#### 2.1.1 超高压对水解程度的影响

蛋白质经内源酶酶解后分解为小分子的肽、氨基酸, 所以水解度的高低可反映蛋白质的降解程度。图 1 中所显示的是 2 种加压条件与常压下蛋白质降解后水解度的对比。

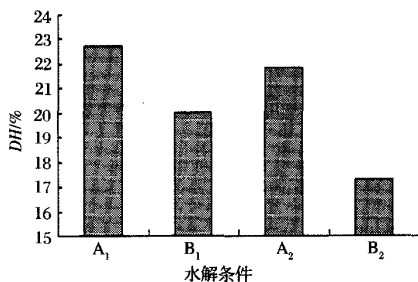


图 1 加压与不加压水解的水解度比较

从图 1 中可见, 在 100 MPa 压力下, 水解效果好于常压水解。这表明, 100 MPa 的压力不会使鳀鱼中的蛋白质水解酶灭活, 而且还可能对蛋白水解酶有激活作用, 此结果与 Ashie 得出的结果吻合[12]。

据报道[13], 蛋白水解产物分子质量分布完全取决于达到的水解度, 而跟酶和底物的种类没有关系; 当水解度达到 20% 时, 约有 96% 的水解产物是分子质量小于 1 000 u 的肽, 一般不会引起人体过敏, 也不具有强烈的苦味[14,15]。100MPa 压力下作用 20 h 水解得到的水解液水解度已大于 20%, 所以此方法生产的鱼露在安全性和风味方面都符合要求。在 A<sub>1</sub> 水解条件下得到的水解度在 20%~25%, 是多肽存

在较多的水解范围, 而且高压水解因不需加盐, 所以其水解得到的肽可浓缩作为功能食品原料的低分子量肽。且高压水解比加热处理更利于原料多不饱和脂肪酸等易氧化营养物质的保留。

#### 2.1.2 超高压对原料利用率的影响

鱼蛋白水解液产品的生产不仅要考察水解度, 还要看原料的利用率, 即液化程度, 这可通过氮利用率来反映。图 2 中给出了加压水解与常压水解的水解液中氮利用率的区别。

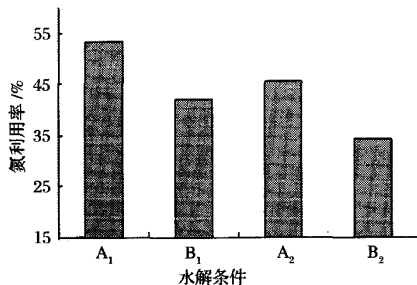


图 2 加压与不加压水解的氮利用率比较

如图 2 所示, 加压水解的氮利用率较高。说明加压水解液中的氮含量要高于常压水解液的氮含量, 1 是由于水解程度较高; 2 是由于加压对于蛋白质的构造有一定的影响, 会使蛋白质的水化作用增强, 促使其溶解性得到改善[16]。Schade 等研究发现, 中等压力(<150 MPa)有利于低聚体蛋白的解离[11]。结合试验结果可知, 100MPa 超高压利于提高鱼类蛋白质的溶解度, 并能促进蛋白质降解。

#### 2.1.3 水解液中多肽含量的比较(表 1)

表 1 高压对水解液中总氮和氨基氮含量的影响

项 目	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>
总 氮	0.387	0.191	0.331	0.267
氨基氮	0.133	0.130	0.130	0.129

由表 1 得知, 常压水解得到的水解液中氨基氮和总氮的差别相对于高压水解液中的要小很多, 而总氮和氨基氮的差值可说明水解液中非氨基酸氮的含量多少, 所以可知高压水解会产生较多的多肽, 这与高压对蛋白质的作用方式有关。在蛋白质的四级结构中, 二级结构是由肽链内和肽链间的氢键来维持的, 而超高压的作用有利于氢键的形成。故而超高压对蛋白质一级结构无影响, 有利于二级结构的稳定, 但会破坏其三级和四级结构, 其疏水结合及离子结合会因体积的缩小而被切断, 迫使蛋白质的原始结构伸展, 立体结构崩溃, 从而导致蛋白质的变性, 所以其水解液中多肽含量要高于常压水解。而有实验[22]

证明,多肽在消化道的吸收率高于相应的氨基酸。且多肽的渗透压低于相应的氨基酸,摄入后不易引起胃肠的不良反应<sup>[23]</sup>。由此可见,高压水解液的营养健康性要高于传统的鱼露加工方法。

#### 2.1.4 超高压对水解液氨基酸组成的影响

表2中给出了水解液的总氨基酸的含量。可见高压作用下,水解液中各种氨基酸含量都要高于常压下的水解液。高压水解液中呈鲜味的谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、蛋氨酸等氨基酸的含量也高于常压水解液中的含量,高压水解液为2.347%,常压水解液中仅为1.911%;且必需氨基酸的含量也比较高,其比例明显高于WHO/FAO标准(35.38%),说明高压不但没有破坏水解液的营养价值,反而使之有所提高。

表2 水解液中氨基酸组成

氨基酸	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>
天门冬氨酸(Asp)	0.488	0.313
苏氨酸(Thr)	0.391	0.344
丝氨酸(Ser)	0.315	0.286
谷氨酸(Glu)	0.463	0.36
甘氨酸(Gly)	0.158	0.152
丙氨酸Ala	0.610	0.567
胱氨酸(Cys)	0.554	0.383
缬氨酸(Val)	0.717	0.585
甲硫氨酸(Met)	0.313	0.233
异亮氨酸(Ile)	0.462	0.328
亮氨酸(Leu)	0.886	0.675
酪氨酸(Tyr)	0.412	0.325
苯丙氨酸(Phe)	0.474	0.347
赖氨酸(Lys)	0.748	0.579
组氨酸(His)	0.377	0.350
精氨酸(Arg)	0.562	0.422
脯氨酸(Pro)	0.203	0.166
色氨酸1(Trp)	—	—
支链氨基酸(BCAA)	2.065	1.588
芳香族氨基酸(AAA)	0.886	0.672
F值 <sup>[15]</sup> BCAA/AAA	2.331	2.363
鲜味氨基酸总量	2.347	1.911
总量	8.133	6.415
必需氨基酸(EAA)	3.991	3.091
必需氨基酸/氨基酸总量(EAA/TAA)	49.07%	48.18%

支链氨基酸(BCAA: Val、Ile、Leu)与芳香族氨基酸(AAA: Tyr、Phe)含量的克分子数比值称为F值(fischer ratio)。此比值与改进肝脏疾病(肝硬化、肝性脑病)有密切关系<sup>[18]</sup>,另外它还与抗疲劳<sup>[19]</sup>、抗缺氧<sup>[20]</sup>以及醒酒的作用有关联<sup>[21]</sup>。通过比较可知,高压水解与常压水解得到的水解液的F值差别不大,可以说二者在这些方面的功能性是相差不大。

#### 2.2 加盐、加酶对超高压水解效果的影响

表3中给出了4种超高压水解的结果,并将其总

氮及氨基氮与一级鱼露的作了比较。可见,这4种水解条件得到的水解效果都已达到了一级鱼露的标准,说明将超高压技术应用于鱼蛋白水解产品的生产是可行的。对在4种条件水解得到的水解度及氮利用率进行比较得出,0.1%风味蛋白酶对于水解程度的提高有很大的作用;3%的盐对鳀鱼内源蛋白酶有抑制作用,不加盐得到的水解液的水解度比加盐的高出1%~4%左右。4种水解条件中,加酶高压水解的效果最好。所以在超高压生产鱼露工艺中可以考虑使用风味蛋白酶。

表3 加压、加盐、加酶的水解效果

项目	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	ZBX(一级)
总氮/g·(100 mL) <sup>-1</sup>	4.26	3.64	5.46	4.41	≥1.2
氨基氮/g·(100 mL) <sup>-1</sup>	1.46	1.43	1.97	1.57	≥0.9
可溶性固形物/%	3.11	3.53	2.56	2.93	
FAA/%	7.05	6.92	8.42	7.80	
DH/%	24.49	23.55	34.45	29.94	
氮利用率/%	53.18	45.45	72.27	60.91	

注:由于采用酸法水解,测定氨基酸含量所以未能测得色氨酸含量。

### 3 结 论

100 MPa超高压处理得到的鳀鱼水解液其水解度比常温常压水解得到的水解液的水解度提高了2%以上。说明100 MPa的压力有利于鳀鱼蛋白质的降解。而且通过氨基酸分析可知超高压工艺对水解液的营养成分无不利影响。0.1%风味蛋白酶的加入,明显地提高了水解度,鳀鱼超高压加酶条件下的水解度要比不添加酶条件下提高约10%。虽然3%的盐有助于盐溶性蛋白质的溶解,但实验结果表明加盐并没有促进高压条件下蛋白降解,推测高压下离子强度的增强对于鳀鱼主要的蛋白降解酶活性有不好的影响。

通过试验可知,超高压应用于鳀鱼鱼露的生产是有可能的,并且效果是令人满意的。更佳的工艺工程尚有待进一步的研究。

#### 参 考 文 献

- 1 窦少华,赵长新,郭继强,等.黄花鱼露制作过程中酶法水解条件的研究[J].中国食品添加剂,2004,(1):30~35
- 2 邓尚贵,章超桦.双酶法在水产品水解动物蛋白制作工艺中的应用研究[J].水产学报,1998,22(4):352~356
- 3 Cheftel J C. High Pressure, Microbial Inactivation and Food Preservation[J]. Food Sci Technol,1995,(1):75~90
- 4 Takashi O, Yujin S, Yasushi A, et al. Autolysis of unsalted fish protein under pressurization[J]. Fisheries Science, 2003,69:1 257~1 262

- 5 汪家琦,侯立宏,骆承岸.超高压杀菌处理对乳品质的影响[J].中国乳品工业,1999,27(5):20~25
- 6 Hendrickx M,Ludikhuyze L,I Vanden Broek et al. Effect of High Pressure on Enzymes Related to Food Quality[J]. Food Science & Technology, 1998, (9):197~203
- 7 Taniguchi Y, Suzuki K. Pressure inactivation of  $\alpha$ -chymotrypsin[J]. Phys Chem,1983,87;5 185~5 193
- 8 Ohmori T,Shigehisa T,Taji S,et al. Biochemical effects of high hydrostatic pressure on the lysosome and proteases involved in it[J]. Biosci Biotech Biochem,1992,56;1 285~1 288
- 9 Romuald Che Ret, Christine Delbarre-Ladrat, Marie De Lamballerie-Anton. High-Pressure Effects on the Proteolytic Enzymes of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Fillets[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53; 3 969~3 973
- 10 Heu M S,Kim H R, Cho D M, Purification and Characterization of Cathepsin L-Like Enzyme from the Muscle of Anchovy[J]. Engraulis Japonica Comp Biochem Physiol, 1997,118(3):523~529
- 11 陈复生. 食品超高压加工技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005. 3
- 12 I N A Ashie,B K Simpson. Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration[J]. Food Research International, 1996, 29;569~575
- 13 P Gonzalez- Tello, F Camacho. Enzymatic hydrolysis of whey Proteinse. Molecular- weight range[J]. Biotechnology and Bioengineering,1994,44: 529~532
- 14 Ney K H. Bitterness of peptides; amino acid composition and chain length[J]. ACS Symposium Series, 1979, 115: 149~173
- 15 Coombs R R A, McLaughlan P. A lergenicity of food proteins and its possible modification[J]. Ann Allergy, 1984, 53: 592~596
- 16 Boonchai B Boonyaratanakornkit, Chan Beum Park, Douglas S Clark. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta,2002,1595:235~249
- 17 韩继福,任建波,王海波,等. 活性炭吸附芳香族氨基酸制备高 F 值寡肽混合物的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32 (1):77~80
- 18 Fischer J E. The utilization of BCAA in the treatment of hepatic coma[A]. In: Capocaccia L, Fischer J E, Rossifanelli F. Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Failure[C]. New York: Plenum, 1984. 11~21
- 19 金宏,许志勤,王先远,等. 支链氨基酸提高大鼠游泳耐力作用探讨[J]. 营养学报, 2001, 23 (1): 48~50
- 20 王梅,谷文英. 高 F 值寡肽混合物的制备及抗疲劳与抗氧化作用[J]. 粮油食品科技, 1999, (3): 6~7
- 21 孙冀平,谷文英. 蛋白肽饮料的醒酒机理和制备工艺的探讨[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25 (4): 64~66
- 22 Siemensma A D. The importance of Peptide Lengths in Hypoallergenic Infant Formulae[J]. Trends Food Sci Techno,1993, 4;16~21
- 23 Adibi, S. A., Glycyl Dipeptides: New Substrates for Protein Nutrition[J]. J Lab Clin Med, 1989,113;665~673

## Effect of High-pressure Processing on the Autolysis of Anchovy

Shao Yi, Xue Changhu, Li Zhaojie, Gao Ruichang, Chang Yaoguang

(Food Science and Engineering College, Ocean University of China Qingdao 266003, China)

**ABSTRACT** The aim of this study is to discuss whether we can obtain the satisfying effect of the autolysis in the short time and low salt or without any addition of salt to improve the process of fish sauce under high pressure on the growth of microorganisms. By measuring and analyzing the total nitrogen,  $\alpha$ -amino nitrogen and component, the effect of high pressure on the autolysis of anchovy, and the effect of salt addition as well as enzyme added on the high pressure hydrolysis were investigated. The result indicated that 100MPa was helpful for the autolysis of anchovy, and it wouldn't destroy the nutrition of hydrolysate; enzyme enhanced the high-pressure process; however, adding salt resulted in the lower hydrolysis rate. The best hydrolysis condition for the autolysis of anchovy in four kinds of conditions is 100 MPa and adding enzyme (0.1% labourzyme), and its degree of hydrolysis under this condition is 34.45%.

**Key words** anchovy, protein hydrolysate, flavourzyme, high pressure