

## 2709 碱性蛋白酶酶解鱼鳞工艺及其产物的功能特性

李春美 彭光华 钟朝辉 韦 兴 胡元华

(华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

**摘 要** 应用正交实验优选鱼鳞蛋白酶解的最佳条件。采用 2709 碱性蛋白酶, 考察了酶量、固形物浓度、反应温度和酶解时间等因素对酶解反应的影响, 确定最适条件。pH 的选择参照了已有实验酶的最适 pH 值, 以水解度、游离氨基酸量为检测指标。结果表明, 鱼鳞酶解宜采用碱性蛋白酶 2709, 用盐酸和氧化钙作软化的预处理, 可使鱼鳞蛋白得到较程度的水解。酶解最佳温度为 50℃, 酶量宜采用 3.0%, 酶解的最佳时间为 5h, 底物浓度宜选择 10%。鱼鳞水解蛋白有很好的吸水性、乳化性、起泡性和溶解性, 水解蛋白对羟基自由基也有很好的清除能力, 其 IC<sub>50</sub> 为 2.1mg/mL, 最大清除率为 93.6%。

**关键词** 鱼鳞 酶解 功能性质 工艺

鱼鳞含有丰富的胶原蛋白、脂肪(卵磷脂、多种脂肪酸)及多种矿物质、维生素和微量元素。研究表明, 鱼鳞具有增强人脑记忆力, 延缓细胞衰老, 减少胆固醇在血管壁的沉积, 促进血液循环, 预防高血压及心脏病等作用。美国免疫学家证实, 用鱼鳞提取物制成的抗癌药 6-硫化鸟嘌呤治疗白血病, 有效率达 70% 以上, 对胃、淋巴癌也有较好治疗效果<sup>[1]</sup>。据统计, 我国淡水鱼年产量已达 1000 多万 t, 其中鱼鳞废弃物约占 3%~5%。而目前鱼废弃物的利用主要是提取脑磷脂、胶原蛋白等, 有关利用鱼鳞制取功能性食品的报道并不多见, 仅有中国水产科学研究院黄海水产研究所的部分研究人员对鱼鳞的运用和鱼鳞提取物用于延缓衰老作用有初步研究<sup>[2,3]</sup>。文中旨在利用现代生物技术, 研究鱼鳞酶解工艺, 并在此基础上对鱼鳞酶解物的功能特性进行研究, 进一步对其其他活性进行评价, 为研制功能性产品提供理论依据。

## 1 材料和方法

## 1.1 实验材料和试剂

鱼鳞: 取鲤鱼鱼鳞, 清水洗净, 60℃ 烘干备用; 碱性蛋白酶 2709: 无锡酶制剂厂, 实测酶活为 99965.1u; 胃蛋白酶: 比活 1:3000, 武汉天源生物工程有限公司, 所有试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方 法

## 1.2.1 鱼鳞总氮的测定

微量凯氏定氮法<sup>[4]</sup>。

## 1.2.2 鱼鳞酶解工艺路线

鱼鳞 → 清洗 → 烘干 → 3% 的 HCl 处理 1d → 饱和石

灰水处理 1d → 洗涤, 调 pH 值 → 加酶 酶解 → 离心 → 上清液 → 冷冻干燥 → 样品

## 1.2.3 水解液游离氨基酸总量

茚三酮比色法<sup>[4]</sup>。

## 1.2.4 鱼鳞水解度 DH 值的测定

氨基酸态氮: 甲醛滴定法<sup>[4]</sup>; 水解度 DH 值<sup>[4]</sup>: 以水解液中的氨基酸态氮与原料中总氮的百分数表示:

$$DH/\% = \frac{\text{水解液氨基酸态氮含量}}{\text{原料总氮含量}} \times 100$$

## 1.2.5 酶活力的测定

福林-酚法<sup>[5]</sup>。

1.2.6 前处理对鱼鳞胶原蛋白水解的影响<sup>[2]</sup>

准确称量干燥鱼鳞 10.0 g, 共 4 份, 经不同的前处理后, 加入 3% 的碱性蛋白酶 2709, 在 pH 8~9, 50℃ 酶解 6h, 观察鱼鳞的水解情况, 结果见表 3。

表 1 (碱性蛋白酶 2.709) 正交实验的设计<sup>[6]</sup>

水平	因 素			
	A(温度)/℃	B(酶量)/%	C(时间)/h	D(底物浓度) /g·mL <sup>-1</sup>
1	45	1.0	5	0.05
2	50	2.0	6	0.10
3	55	3.0	7	0.15

## 1.2.7 酶量、时间对鱼鳞水解的影响

分别准确称量干燥鱼鳞 10.0 g, 共 5 份, 经前处理后, 分别加入 1%、2%、3%、4%、5% 的碱性蛋白酶 2709, 在 pH 8~9, 50℃ 下分别酶解 5、6、7h。观察并记录鱼鳞的水解情况, 结果见表 4。

## 1.2.8 底物浓度对鱼鳞水解的影响

称取干燥鱼鳞 5.0、10.0g、15.0g 和 20.0 g 放入 4 个烧杯, 经前处理后, 加 100 mL 水, 然后分别加入

第一作者: 博士, 副教授。

收稿时间: 2004-08-23, 改回时间: 2004-10-28

3%的碱性蛋白酶 2709,在 pH 8~9,50℃下分别酶解 6h。得到酶解液,测氨态氮含量,计算鱼鳞的水解度,结果见表 5。

### 1.2.9 正交实验

在鱼鳞的酶解工艺中,有诸多因素影响鱼鳞的水解度,经过初步实验,选定提取时间、温度、底物浓度和酶量为主要因素,采用  $L_9(3^4)$  正交表,以水解度为指标,进行正交实验,确定较佳工艺。

### 1.2.10 吸水力<sup>[7]</sup>

在 5 个康威皿的外室中分别加入  $KNO_3$  ( $A_w = 0.528$ ),  $NaOH$  ( $A_w = 0.070$ ),  $NaCl$  ( $A_w = 0.752$ ),  $K_2CO_3$  ( $A_w = 0.427$ ),  $Mg(NO_3)_2$  ( $A_w = 0.528$ ) 饱和溶液,内室中加样品,放置于 25℃ 的恒温干燥器中,每天称样品质量,至恒重为止。

### 1.2.11 乳化能力<sup>[8]</sup>

乳化能力的测定通过 Rakesh 和 Metz 描绘的方法:1 份 2.5 g 的样品与 50 mL 棉籽油一起加入 50 mL  $NaCl$  (浓度 30 g/L) 中溶解,再用质机在用搅拌机 1 000 r/min 下混合 30 min。然后把混合物转移到离心管并在 85℃ 水浴中加热 15 min,然后,在 3 000 r/min 下离心 15 min,乳化能力的计算公式如下:

$$EC = (V_A - V_R) / W_S$$

$V_A$ : 乳化液中油的体积;  $V_R$ : 离心后释放出的油的体积;  $W_S$ : 样品质量。

### 1.2.12 起泡能力<sup>[8]</sup>

通过 Bernardi Donetal 方法计算:1 份 30 mL 的 3% 的分散液用搅拌机在 1 000 r/min 下搅拌 10 min。起泡力 = 搅拌停止时泡沫的体积/液体的体积。

### 1.2.13 酶解产物的溶解性<sup>[8]</sup>

通过测定氮溶解指数 (NSI) 来确定酶解产物在不同 pH 条件下的溶解特性。在 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、7.5、9.0 的缓冲液中加入一定量的干燥样品,25℃ 保温搅拌 1 h,离心,取上清液定氮。按如下方法计算 NSI:

$$NSI = (\text{上清液总氮} / \text{样品总氮}) \times 100\%$$

### 1.2.14 样品对羟自由基的清除活性

采用甲基紫褪色法<sup>[9]</sup>。

用分析天平分别称取甲基紫 0.044 1 g,硫酸亚铁 0.007 0 g,均定容至 50 mL,用移液管吸取 30% 双氧水 0.5 mL,定容到 50 mL,用 HCl 调水的 pH 至 3.5。按表 1 的方法加样,使总体积为 6.0 mL。然后在 580 nm 波长下比色,测得吸光度值,按下式计算清除率:

$$\text{清除率} = (A - A_0) / (A_1 - A_0) \times 100\%$$

表 2 甲基紫褪色法抗羟基自由基加样表

	$A_1$	$A_0$	$A$
样品	-	-	1
甲基紫溶液	0.2	0.20	0.2
硫酸亚铁溶液	-	1.00	1
双氧水	-	1.00	1
pH 3.5 水溶液	5.8	3.8	2.8

## 2 结果与分析

### 2.1 前处理对鱼鳞胶原蛋白水解的影响(表 3)

鱼鳞含有胶原蛋白、硬蛋白及  $CaCO_3$ 、 $CaSO_4$  等成分,不溶于水<sup>[2]</sup>。由于鱼鳞的结构稳定,胶原蛋白网络密集,未经酸碱解处理时水解效果很差。只用酸做软化处理,虽然有一定的作用,但是由于酸滞留于鱼鳞中,不易将其充分洗出,对酶的效力的发挥有抑制。由于粉碎可以增加表面积,提高酸碱处理效果,所以鱼鳞原料应该先粉碎并用酸碱处理,以提高酶解效率。

表 3 不同预处理对鱼鳞水解的影响

预处理	未经任何处理	粉碎	只用酸碱处理	先粉碎再用酸碱处理
茚三酮显色反应	+	++	+++	++++
有无完整鱼鳞	有完整鱼鳞	有鱼鳞碎片	有鱼鳞渣	无

注:“+”多少表示茚三酮显色颜色深浅。

### 2.2 酶用量和水解时间对鱼鳞水解的影响(表 4)

表 4 酶用量和酶解时间对鱼鳞酶解效果的影响<sup>1)</sup>

酶量(质量分数)/%	酶解时间/h		
	5	6	7
1	-	+	+++
2	++	+++	++++
3	+++	++++	++++
4	++++	++++	++++
5	++++	++++	++++

1)“+”多少表示茚三酮显色反应颜色深浅。

表 4 表明,碱性蛋白酶用量以 2%~3%,酶解时间以 6~7 h 为宜。

### 2.3 底物浓度对鱼鳞水解的影响(表 5)

表 5 底物浓度对鱼鳞水解的影响

底物浓度/%	5	10	15	20
6 h 的水解度/%	32.6	34.1	30.6	24.2

由表 5 可知,虽然在底物浓度为 5% 时水解度也较高,考虑到产品得率,底物浓度以 10%~15% 为宜。

### 2.4 正交实验结果分析

由正交试验结果可以看出,温度对水解度的影响

最大,其次是酶量,底物浓度和时间的影响相对较小。最佳酶解工艺是  $A_2B_3C_1D_2$ ,即温度为  $50^\circ\text{C}$ ,酶量为  $3\%$ ,底物浓度为  $10\%$ ,酶解  $5\text{ h}$ 。

## 2.5 水解蛋白的功能特性

### 2.5.1 鱼鳞水解蛋白的吸水力(图1)

鱼鳞中因含有胶原蛋白、硬蛋白及  $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{CaSO}_4$  等成分而不溶于水,而水解蛋白具有很好的吸水性,这为其在食品工业上的应用奠定了基础。

表6 2709 碱性蛋白酶酶解鱼鳞正交试验结果

序号/项目	A/ $^\circ\text{C}$	B/%	C/h	D/%	DH/%
1 = $A_1B_1C_1D_1$	45	1	5	5	18.9
2 = $A_1B_2C_2D_2$	45	2	6	10	21.1
3 = $A_1B_3C_3D_3$	45	3	7	15	19.1
4 = $A_2B_1C_2D_3$	50	1	6	15	23.8
5 = $A_2B_2C_3D_1$	50	2	7	5	29.7
6 = $A_2B_3C_1D_2$	50	3	5	10	33.8
7 = $A_3B_1C_3D_2$	55	1	7	10	16.5
8 = $A_3B_2C_1D_3$	55	2	5	15	20.8
9 = $A_3B_3C_2D_1$	55	3	6	5	25.8
$K_1$	59.1	59.2	73.5	71.4	
$K_2$	106.4	71.6	70.7	74.4	
$K_3$	63.1	78.7	65.3	63.7	
$\bar{K}_1$	19.7	19.73	24.5	23.6	
$\bar{K}_2$	35.47	23.87	23.57	24.8	
$\bar{K}_3$	15.77	6.47	3.4	3.6	
R	15.77	6.47	3.4	3.6	

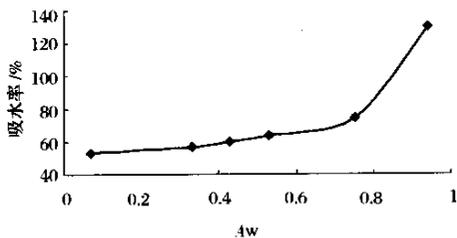


图1 鱼鳞水解蛋白的吸水性

### 2.5.2 鱼鳞水解蛋白的乳化能力

鱼鳞水解蛋白的乳化力强,乳化液稳定,其  $EC = 40.5\%$ 。

### 2.5.3 鱼鳞水解蛋白的起泡力与泡沫稳定性(图2)

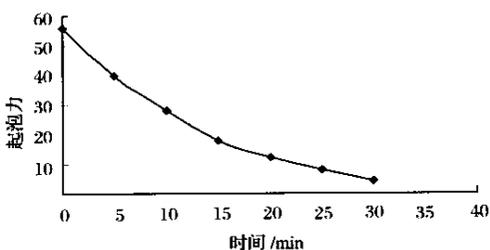


图2 鱼鳞水解蛋白泡沫的稳定性

起泡性是指搅打蛋白产品时捕捉气体形成泡沫的能力,泡沫稳定性是指泡沫间液膜保持液体不析出的能力。这2种性能主要决定于蛋白质结构、组成、pH、温度、浓度等<sup>[10]</sup>。研究表明,鱼鳞水解蛋白的起泡力很强,达  $56\%$ ,但是泡沫稳定性不好,在短短的  $30\text{ min}$  内,泡沫的体积就极显著地减少。

### 2.5.4 鱼鳞水解蛋白的氮溶解指数(图3)

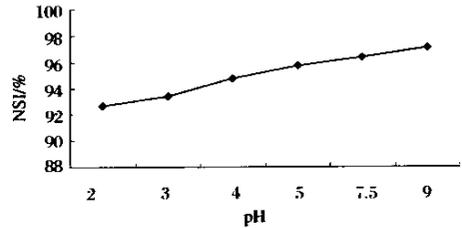


图3 鱼鳞酶解蛋白的氮溶解指数

图3表明,鱼鳞酶解蛋白在所试 pH 条件下溶解性都很好。水解产物溶解性的提高一是由于在水解过程中产生了许多亲水性大的溶解肽;二是由于疏水基在酶解作用下被暴露并被去除<sup>[11]</sup>,导致了疏水作用的降低,增大了可溶性,且水解后更小的分子数和新暴露的离子化氨基和羧基,提高了水解产物的亲水性,大大提高了鱼蛋白的溶解性。从图3中可以看出,碱性条件下的底物蛋白和水解物蛋白的NSI稍高于酸性条件下的NSI,是因为增大pH值,  $\text{COO}^-$  与  $\text{H}_2\text{O}$  的结合力强于  $-\text{COOH}$ <sup>[11]</sup>,所以提高了蛋白质的溶解性。

### 2.5.5 鱼鳞酶解产物对羟基自由基抑制作用(图4)

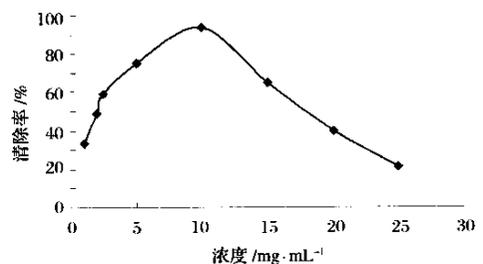


图4 鱼鳞水解物对羟基自由基的清除作用

由图4可知,自由基的清除能力与样品浓度有量效关系。低浓度条件下,随浓度的增加,鱼鳞水解蛋白对羟基自由基的清除率显著增强,当浓度达到  $10\text{ mg/mL}$  时,对羟基自由基的清除率达到最大,超过这个浓度以后,对羟基自由基的清除率又显著下降,这与许多水解蛋白清除自由基活性的规律是相似的。

## 3 结 论

(1) 采用 2709 碱性蛋白酶酶解鱼鳞,原料在洗净烘干后应该粉碎并经过酸碱处理各 1 d,可使鱼鳞的酶解程度显著升高,酶解时最佳温度为 50℃,酶量宜采用 3.0%,酶解的最佳时间为 5 h,底物浓度宜选择 10%。

(2) 鱼鳞提取物有很好的吸水性、乳化性、起泡性和溶解性。

(3) 鱼鳞酶解液对·OH 有较好的清除效果,其 IC<sub>50</sub> 为 2.1 mg/mL,且在浓度低于 10 mg/mL 时清除率与鱼鳞酶解蛋白浓度具有有一定的量效关系。

## 参 考 文 献

- 1 杜海燕,李春燕,王慧等.鱼鳞中羟基磷灰石的提取及其显微结构的研究[J].电子显微学报,2001,20(4):457~458
- 2 刘庆慧,王彩理,张培新等.鱼鳞酶解工艺的研究[J].海洋水产研究,1998,19(2):74~79

- 3 刘庆慧,王彩理,刘丛力.鱼鳞胶原蛋白研究[J].海洋水产研究,2000,21(3):57~61
- 4 大连轻工学院,华南理工大学等合编.食品分析[J].中国轻工业出版社,2002
- 5 周晓云.酶技术[M].北京:石油工业出版社,1994.284~287
- 6 邓尚贵.利用正交实验优化水解工艺[J].水产学报,1997,21(2):220~224
- 7 Quaglia. Influence of the Degree of Hydrolysis on the Solubility of the Protein Hydrolysis from Sardine[J]. J Sci Food Agric, 1987 (38):271~276
- 8 Chobert J M L. Solubility and emulsifying properties of casein modified enzymatically by staphylo Coccus aureus V 8 protease[J]. J Agric Food chem, 1988, 36:220~224
- 9 张乃东,郑威,彭永臻等.褪色光度法测定芬顿体系中产生的羟自由基[J].分析化学研究简报,2003,3(5):552~554
- 10 赵洪根主编.水产品检验[M].天津:天津科学技术出版社,1987.161~166
- 11 鸿巢章二,桥本周久编,郭院风,邹胜祥译.水产利用化学[M].北京:农业出版社,1992

## The Hydrolysis of Fish Scale and Its Properties

Li Chunmei Peng Guanghua Zong Zhaohui Wei Xing Hu Yuanhua

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**ABSTRACT** The hydrolysis conditions of fish scale using 2709 alkaline protease and functional properties of the product were studied. The optimum conditions were found by mono-factor analysis and orthogonal test after fish scale was pre-treated with HCl and CaO, and the conditions are 10% concentration of the substrate, pH 8~9, 50℃ hydrolyzing temperature, 3% ratio of enzyme and substrate. The hydrolysate possesses good solubility, emulsifiability, and foaminess. The hydrolysate also showed good scavenging to·OH, with maximum scavenging rate reached 93.6%.

**Key words** scale enzymatic hydrolysis, functional properties, free radical, scavenging

## 北京首建食品安全食用指数发布制

2005年北京将在全国率先建立“食品安全信用指数”并定期向社会公布,每种流通领域食品都将拥有一本“信用档案”。“食品安全信用指数”是评价食品安全状况的重要指数。指数是根据一个地区半年或一年对重点食品的所有质量抽检结果数据,进行综合分析后计算得出的,将覆盖所有重点监控领域的食品。2005年开始,北京市将把每年政府执法部门对食品的抽检结果、企业自检结果、社会举报情况、对生产基地的检查结果等多项数据汇总起来,综合分析后,以各区县为单位形成该地区的“食品安全信用指数”,定期向社会公众发布一次,为消费者购物提供参考。

此外,2005年还将在北京市实施食品安全信息统一发布,对市场食品安全形势作出前瞻性风险评估,在商场、超市、大型批发市场建立食品监控站,加强食品安全消费引导。

据了解,目前一个覆盖全北京市的食品安全监控网络系统已经开发完成并初步启动,预计2005年上半年全部投入运行,该网络建成后,将可以在多个部门和企业之间实现食品信息的备案、分析、咨询和公示。同时,食品安全信息监测评价体系、食品安全信用监管体系这2大体系将为食品安全多设两双“监控眼”,完善食品安全预警防范和快速反应机制,提高预警和处置能力。