

响应面法优化罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 鱼排蛋白分段酶解工艺*

操龙飞¹ 游华军² 陈子涵³ 马英¹ 熊何健³ 鄢庆枇¹

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 厦门中坤食品有限公司 厦门 361022;
3. 集美大学生物工程学院 厦门 361021)

摘要 采用生物蛋白酶酶解罗非鱼鱼排蛋白,以水解度(DH)为指标,进行了单酶、复合酶酶解效果的比较分析,并利用响应面分析方法(RSM)对酶解参数进行优化。结果表明,采用风味蛋白酶和木瓜蛋白酶双酶组合分段酶解,固定总酶添加量为 3.0%、双酶复合比 2:1、酶解时间 3h、分段酶解时间比 0.6:1,酶解温度 56℃,分段酶解 pH 为 7.0 和 6.2 时,酶解效果最佳,罗非鱼鱼排蛋白水解度达到 32.49%,酶解产物中游离氨基酸含量达 32.84mg/g 鱼排,占罗非鱼鱼排总氨基酸含量的 25.43%,其中呈味氨基酸含量达 18.48%,必需氨基酸含量达 67.96%。

关键词 罗非鱼鱼排,酶解,响应面法,水解度
中图分类号 TS201.1

罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),又称白色三文鱼,属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Cichlidae)、罗非鱼属(*Tilapia*),为中小型鱼类,是联合国粮农组织推荐养殖的一种热带亚热带暖水性经济鱼类,主要在亚洲、中南美洲和非洲等地区养殖生产。我国是全球罗非鱼最大养殖生产国和最大出口贸易国(贺艳辉等, 2009; 祝璟琳等, 2010),2008 年底我国罗非鱼产量已占全球的一半,出口量高居世界第一位(肖炜等, 2010)。罗非鱼加工产品主要为条冻全鱼和鲜、冻鱼片,在鱼片加工过程中,会产生占鱼重 60% 以上的鱼排、鱼头、鱼皮等加工副产物,副产物富含蛋白质、不饱和脂肪酸等成分(Ovissipour *et al*, 2009),但目前除少部分用于生产廉价饲料外,多被废弃。加工副产物的综合利用已成为罗非鱼加工业亟待解决的重要问题(Kristinsson *et al*, 2000)。

采用现代生物技术对动植物蛋白进行酶解处理,已成为一种有效的动植物蛋白资源加工利用方式(Šližyte *et al*, 2005; Wanasundara *et al*, 2002)。

Georgios(1978)对酶法水解鱼类蛋白的营养价值和化学成分进行分析,表明低分子量的肽类和游离氨基酸有很高的营养价值,Aspmo 等(2005)利用碱性蛋白酶对鳕鱼内脏进行酶解,接近 95% 蛋白质水解为游离氨基酸和肽类物质。Suthasinee 等(2005)利用风味蛋白酶和 Kojizyme 酶制备鱼类液化蛋白,表明风味蛋白酶水解液无苦味,经喷雾干燥后蛋白质含量高达 66%。水解蛋白除保留了原料的营养成分外,由于蛋白质被水解为肽及游离的 L 型氨基酸,易溶于水,有利于人体消化吸收,比原有的风味更为突出(Guerard *et al*, 2001)。近年来,蛋白水解生物活性肽的作用也引起人们的关注,活性肽具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等功能(管华诗等, 2004),DING 等(2011)用生物酶解方法制得的乌贼墨寡肽有明显的抗肿瘤活性,阎欲晓(2009)分别对木瓜蛋白酶、中性蛋白酶水解罗非鱼肉的水解条件进行优化,检测了各组分对超氧自由基清除率及活性肽分子量分布情况,存在具有超氧自由基清除作用的活性肽。

* 国家“863”计划项目,2007AA09Z115 号;福建省科技重点项目,2009I0019 号,2009N0045 号;集美大学创新团队基金,2010A003 号;集美大学潘金龙基金,ZC2010017 号。操龙飞, E-mail: caolonfei@163.com

通讯作者: 鄢庆枇, 博士, 教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

收稿日期: 2010-12-15, 收修改稿日期: 2011-02-21

酶法水解蛋白反应条件温和,影响水解度的因素主要有水解条件(温度、pH、时间)、酶浓度、蛋白酶类型等(Kristinsson *et al*, 2000; Chabanon *et al*, 2007)。本研究以罗非鱼鱼排为原料,采用双酶分段水解制备液化蛋白,利用两种蛋白酶酶解位点的不同可以进一步提高水解度的特点,通过响应面分析方法(RSM)对酶解条件进行优化,建立罗非鱼鱼排制备液化蛋白的分段酶解工艺。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料与设备

罗非鱼鱼排(罗非鱼加工过程中取鱼片后剩下的骨架部分)由福建龙海市嘉荣水产有限公司提供, -20℃以下贮藏备用。

碱性蛋白酶(Alcalase)、风味蛋白酶(Flavourzyme)、中性蛋白酶(Neutrase)和复合蛋白酶(Protamex)购于诺维信(中国)生物技术有限公司;木瓜蛋白酶(Papain)购于广西庞博生物工程有限公司;氨基酸混合标样: H 型, Wako, 日本;其它试剂均为分析纯。

意大利 VELP 公司 UDK132 凯氏定氮仪; 日本日立 L-8900 氨基酸自动分析仪; 梅特勒-托利多 pH211 酸度计。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解工艺流程 原料 解冻 粉碎 鱼浆混合液 酶解 灭酶 离心、过滤 蛋白酶解液。

罗非鱼鱼排经粉碎后,调整固液比,得鱼浆混合液,经 0.2mol/L NaOH、HCl 溶液调整至合适 pH,置于 250ml 烧杯中,加入蛋白酶,并于恒温水浴锅中酶解一定时间,酶解后立即置于 95℃ 水浴中灭酶 5min (Guerard *et al*, 2002), 灭酶后立即冷却, 4000r/min 离心、过滤,去除上层油脂后得到液化蛋白。

1.2.2 测定方法 酶活力的测定: Folin-酚法(李建武, 1994); 总氮测定: 凯氏定氮法(GB5009.5-85); 氨基酸态氮测定: 甲醛滴定法(Suthasinee *et al*, 2005); 水解度(DH) = (酶解液中的氨基氮质量/原料中总氮质量) × 100%。

原料中总氨基酸含量测定: 试样置于水解管中,加入 6mol/L HCl 溶液抽真空融封, 110℃ 水解 12h, 打开水解管, 转入 25ml 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 过滤, 取滤液 1ml 于 10ml 烧杯中, 置于真空干燥器中抽酸, 12h 后, 用 0.02mol/L HCl 溶液溶解完全抽酸后的固体, 在空气中放置 30min, 过 0.45μm 微膜, 氨基酸自动分析仪上样检测(Ovissipour *et al*, 2008);

酶解液中游离氨基酸含量测定: 将酶解液加入等体积 10% 三氯乙酸, 混匀静止, 经 1000r/min 离心 10min, 上清液过 0.45μm 微膜, 氨基酸自动分析仪上样检测(兰小红, 2009)¹⁾;

L-8900 氨基酸自动分析仪仪器条件: 进样量 20μl, 氮气压力: 32MPa; pump1 流速 4.0ml/min, 压力 8.0MPa; pump2 流速 3.5ml/min, 压力 0.8MPa; 分离柱温度 50℃, 反应柱温度 135℃。

1.3 数据分析

采用 Design Expert 7.0 软件和 Excel 方差分析。

2 结果与分析

2.1 单酶水解效果的比较

选择 5 种常用商业蛋白酶, 酶的活力(实测)及其性质见表 1。分别在其推荐酶解温度与 pH 条件下进行样品酶解处理: 酶解时间 4h, 固液比 1 : 2, 酶添加量(相对于原料 g/g, 下同)分别为 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%, 并做三组平行, 以水解度(DH)为评价指标, 比较酶解效果, 结果见图 1。

由图 1 可知, 当酶添加量为 0.1% 时, 5 种酶处理

表 1 实验所选用蛋白酶及其性质
Tab.1 Proteases and their properties in this study

名称	作用类型	测定酶活力(× 10 ⁴ U/g)	生产厂家
中性蛋白酶(Neutrase 1.5MG)	内切	10.02	Novozymes
复合蛋白酶(Protamex)	内切 + 外切	9.15	Novozymes
风味蛋白酶(Flavourzyme 500MG)	内切 + 外切	2.03	Novozymes
碱性蛋白酶(Alcalase 2.4L)	内切	42.11	Novozymes
木瓜蛋白酶(Papain)	内切	12.34	广西庞博

1) 兰小红, 2009. 大豆肽美拉德反应特性研究. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 1—35

样品水解度均达 10% 以上, 继续增加酶的添加量, 碱性蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶酶解效果增加不明显, 添加量达到 3.0% 时, 酶解液的水解度分别为 19.80%、17.46%、17.09%, 风味蛋白酶和木瓜蛋白酶的酶解能力较强, 酶解液水解度随添加量的增加上升明显, 添加量为 3.0% 时, 酶解液水解度分别为 28.22%、24.01%, 故选用具有内切作用的木瓜蛋白酶和具有复合酶解作用的风味蛋白酶进行双酶复合酶解的研究。酶解曲线显示初始酶解速度较快, 随着时间延长酶解速度降低, 这与 Guerard 等(2002)和 Benjakul 等(1997)的酶解结果一致。

2.2 木瓜蛋白酶、风味蛋白酶单酶水解条件

2.2.1 固液比的确定

风味蛋白酶添加量为 1.0%, 木瓜蛋白酶添加量为 0.5%, 酶解时间 4h, 固液比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4, 其它因素不变。以水解度为指标, 分别分析固液比对两种酶单酶酶解效果的影响。

固液比较小时, 底物浓度高, 分散不均匀, 会影响酶催化速度及产物分子的扩散, 也会增加实际生产操作难度; 固液比过大, 虽然底物分散更加均匀, 溶解度增加, 但酶浓度下降, 对蛋白水解造成不利, 同时会增加后续操作(浓缩、干燥等)的难度。表 2 中,

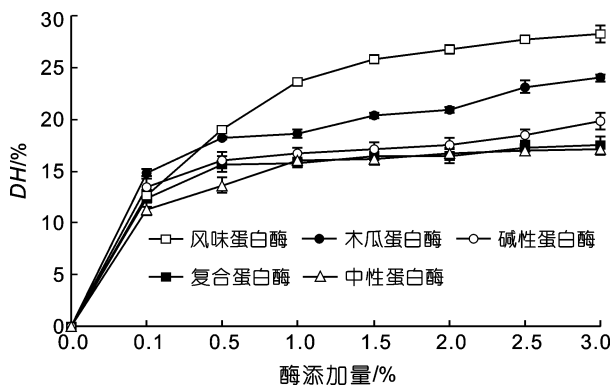


图 1 不同蛋白酶水解效果的比较

Fig.1 Comparison of the enzymatic hydrolysis effects of different proteases

表 2 固液比对酶解效果的影响

Tab.2 The influence of solid-liquid ratio on the enzymatic hydrolysis effects

固液比	DH(%)	
	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶
1:1	19.11 ± 0.35	16.28 ± 0.34
1:2	23.13 ± 0.46	17.80 ± 0.68
1:3	22.10 ± 0.19	16.11 ± 0.45
1:4	22.00 ± 0.23	16.10 ± 0.20

两种酶的固液比对水解效果影响变化趋势较为一致, 从 1:1 升至 1:2 时, 水解度有所增加, 当固液比大于 1:2 时水解度略有下降。结合实际生产成本和可操作性, 两种酶蛋白酶解固液比选择 1:2 较为适宜。

2.2.2 酶解时间的确定

风味蛋白酶添加量为 1.0%, 木瓜蛋白酶添加量为 0.5%, 固液比为 1:2, 酶解时间分别为 10、60、120、180、240、300min, 其它因素不变, 以水解度为指标, 分析酶解时间对两种酶单酶酶解效果的影响。

由表 3 可知, 随着酶解时间的延长, 水解度逐渐增大, 结果与 Kristinsson 等(2000)分析的一致。酶解时间 180min 内水解度有较快的增长, 180min 后水解度增长趋于平缓, 且酶解时间过长也容易导致酶解液的微生物感染, 造成酶解液变质, 所以酶解时间选用 180min 为两酶适宜酶解时间。

表 3 酶解时间对酶解效果的影响

Tab.3 The influence of hydrolysis time on the enzymatic hydrolysis effects

时间(min)	DH(%)	
	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶
10	6.80 ± 0.83	8.35 ± 0.32
60	13.90 ± 0.65	11.39 ± 0.54
120	17.05 ± 0.38	15.07 ± 0.65
180	22.24 ± 0.06	17.01 ± 0.23
240	23.13 ± 0.56	18.46 ± 0.67
300	25.00 ± 0.37	19.50 ± 0.66

2.2.3 起始 pH 的确定

风味蛋白酶添加量为 1.0%, 木瓜蛋白酶添加量为 0.5%, 固液比 1:2, 酶解时间 3h, 起始 pH 分别设为 5.0、6.0、7.0、8.0, 其它因素不变, 以水解度为指标, 分析起始 pH 对两种酶单酶酶解效果的影响。

酶的催化作用需要一定的 pH 环境, pH 环境会影响蛋白质在溶液中的解离状态, 从而影响酶的活性。木瓜蛋白酶属巯基蛋白酶, 可水解蛋白质和多肽中精氨酸和赖氨酸的羧基端, 风味蛋白酶通常含有丝氨酸、金属蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶, 随着酶解过程中游离氨基酸的产生, 体系 pH 会逐渐降低, 所以不同起始 pH 对水解度有一定的影响。由表 4 可知, 风味蛋白酶、木瓜蛋白酶适宜 pH 有明显差异, 分别为 7.0 和 6.0。

2.2.4 温度的确定

风味蛋白酶添加量为 1.0%, pH 7.0, 木瓜蛋白酶添加量为 0.5%, pH 6.0, 固液比为 1:2, 酶解时间 180min, 其它因素不变, 温度分别

为 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃，以水解度为指标，分析酶解温度对两种单酶酶解效果的影响。

由表 5 可知，风味蛋白酶和木瓜蛋白酶水解效果随温度变化趋势表现一致，水解温度 30℃到 50℃之间时，水解度逐渐升高，在 50℃时水解度达到最大，高于 50℃水解度逐渐减小，所以选择 50℃为两种蛋白酶的酶解温度。

表 4 起始 pH 对酶解效果的影响

Tab.4 The influence of original pH on the enzymatic hydrolysis effects

起始 pH	DH(%)	
	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶
5	20.45 ± 0.32	15.55 ± 0.29
6	20.73 ± 0.45	16.76 ± 0.23
7	22.75 ± 0.65	16.05 ± 0.59
8	19.83 ± 0.38	15.61 ± 0.10

表 5 酶解温度对酶解效果的影响

Tab.5 The influence of hydrolysis temperature on the enzymatic hydrolysis effects

温度(℃)	DH(%)	
	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶
30	12.98 ± 0.22	12.71 ± 0.32
40	19.53 ± 0.45	13.69 ± 0.33
50	23.36 ± 0.72	21.82 ± 0.42
60	18.94 ± 0.65	18.15 ± 0.12
70	13.27 ± 0.33	14.37 ± 0.34

2.3 双酶分段酶解工艺的选择

2.3.1 双酶分段酶解与单酶酶解效果的比较 蛋白酶对肽键作用具有专一性，采用单酶酶解时，只能从固定的酶解位点进行酶解，酶解过程受到限制。因此，选用酶解效果最好的风味蛋白酶和木瓜蛋白酶对罗非鱼鱼排进行双酶复合酶解，由于风味蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解的适宜 pH 不同，需分步加入，进行分段酶解。比较双酶分段酶解与各蛋白酶单酶酶解效果，结果见图 2。双酶分段酶解条件为：先加入风味蛋白酶，再加木瓜蛋白酶，总酶解时间 4h，双酶酶解时间比 1:1，酶添加量复合比 2:1。

木瓜蛋白酶是一种内切杆菌蛋白酶复合体，风味蛋白酶是从真菌——曲霉(*Aspergillus oryzae*)得到的一种既具有肽链内切酶活性又具有肽链端酶活性的蛋白酶，利用两种酶酶解位点不同可以进一步提高水解度。由图 2 可知，采用双酶复合酶解明显提

高了罗非鱼鱼排蛋白的水解度，两种蛋白酶对罗非鱼鱼排蛋白酶解有较好的互补作用，而且高水解度能够降低液化蛋白的苦味。

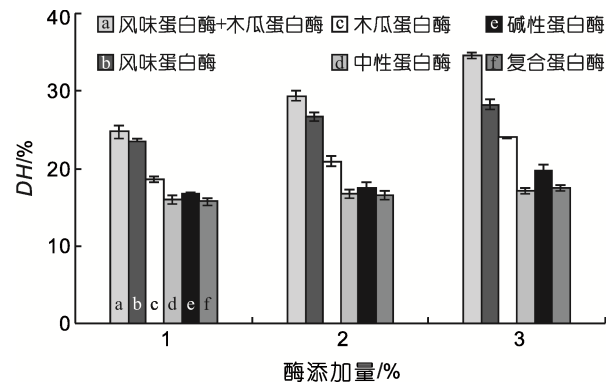


图 2 双酶分段酶水解与单酶酶解效果的比较

Fig.2 Comparison of enzymatic hydrolysis effects of compound enzymes and single enzyme

2.3.2 分段酶解总酶添加量的确定 固定酶解时间比 1:1，酶添加量复合比 2:1，在总酶添加量分别为 1.0%、3.0%、5.0%时，比较酶解时间 10、60、120、180、240、300min 水解度变化，总酶添加量对罗非鱼鱼排蛋白水解效果的影响结果见图 3。

由图 3 可知，水解度随水解时间的增加逐渐提高，随着酶添加量的增加，水解进程曲线逐渐靠近，当酶添加总量 3.0%时，继续加酶，水解度上升变化不大，证明酶添加量的增加与水解度不成正比(Bhaskar *et al*, 2008; Benjakul *et al*, 1997), Batista 等(2010)的研究表明，随着酶浓度的增加，虽然水解度上升，但是水解速率并不成比例上升，本实验选择复合酶总添加量为 3.0%为宜。

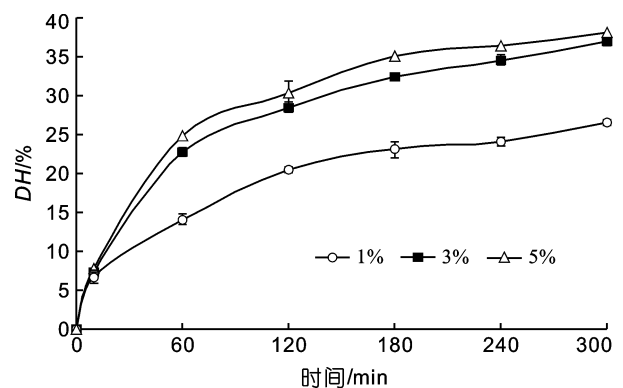


图 3 双酶分段酶解的酶解进程曲线

Fig.3 Enzymatic process curves of compound enzymatic hydrolysis

2.4 双酶分段水解条件的响应面法优化

2.4.1 响应面分析因素水平的选取及实验结果 采用响应面(RSM)分析法对双酶分段水解条件进行优化分析。响应面分析法除了分析变量的影响,还可以生成一个数学模型,准确地描述因素影响过程(Shankar *et al.*, 2008)。综合单因素实验结果,固定酶解时间 3h,总酶添加量 3.0%,双酶添加量复合比 2 : 1,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理进行三因素三水平实验设计,以酶解时间比、酶解温度和起始 pH 为自变量,以水解度为响应值,实验因素和水平见表 6,实验结果见表 7。

表 6 响应面因素水平
Tab.6 Design form of response surface methodology

水平	A(时间比)	B(温度, °C)	C(起始 pH)
1	1 : 2	40	7.0 5.0
0	1 : 1	50	7.0 6.0
- 1	2 : 1	60	7.0 7.0

表 7 响应面实验结果

Tab.7 Experimental results using response surface methodology

试验号	A	B	C	DH(%)
1	- 1	- 1	0	28.63
2	1	- 1	0	28.65
3	- 1	1	0	30.57
4	1	1	0	27.39
5	- 1	0	- 1	28.46
6	1	0	- 1	27.13
7	- 1	0	1	31.86
8	1	0	1	31.46
9	0	- 1	- 1	25.35
10	0	1	- 1	25.86
11	0	- 1	1	29.47
12	0	1	1	30.20
13	0	0	0	31.51
14	0	0	0	31.58
15	0	0	0	31.86

2.4.2 实验模型的建立和优化分析 利用 Design Expert 7.0 软件对表 3 实验数据进行多元回归拟合,获得响应值水解度 Y 对自变量酶解时间比(A)、酶解温度(B)和起始 pH(C)的二次多项回归模型方程为:

$$DH = 31.60 - 0.61A + 0.24B + 2.02C - 0.80AB + 0.23AC + 0.055BC - 0.39A^2 - 2.40B^2 - 1.48C^2$$

回归方程中各变量对响应值影响的显著性由 F

检验判定, P 值越小,则相应变量的显著程度越高,回归分析结果列于表 8。

表 8 回归模型方差分析
Tab.8 Variance analysis of the regression equation

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	2.99	1	2.99	39.34	0.0015**
B	0.46	1	0.46	6.06	0.057
C	32.76	1	32.76	431.23	< 0.0001**
AB	2.56	1	2.56	33.69	0.0021**
AC	0.22	1	0.22	2.85	0.1524
BC	0.012	1	0.012	0.16	0.7063
A^2	0.56	1	0.56	7.38	0.042*
B^2	21.22	1	21.22	279.24	< 0.0001**
C^2	8.08	1	8.08	106.39	0.0001**
模型	66.5	9	7.39	97.25	< 0.0001**
残差	0.38	5	0.076		
失拟检验	0.36	3	0.12	13.05	0.072
纯误差	0.018	2	9.233×10^{-3}		
总变异	66.88	14			

注: *表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)

从模型方差分析可知,模型整体为显著水平,表明回归曲线模型与试验结果数据吻合良好。从整体分析,模型 P 值 < 0.0001,表明该二次多项回归模型高度显著,失拟检验 $P = 0.072 > 0.05$,不显著,表明模型与实际情况拟合很好,可用此模型对试验进行分析和预测。 $R^2 = 0.9944 (> 0.85)$,预测值与实测值之间具有高度的相关性,仅有 1.59%的变异不能由该模型解释($R_{adj}^2 = 0.9841$),因此可用此模型对水解度含量进行分析预测(Shankar *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; 徐大伦等, 2011)。

方程中各项系数绝对值大小直接反映了各因素对响应值的影响程度,系数的正负反映了影响的方向(Ovissipour *et al.*, 2010)。由于该方程的二次项系数均为负值,方程代表的抛物线开口向下,存在极大值。根据表 7 实验结果绘出水解度随 3 因素变化的等高线图和响应面图,如图 4、图 5、图 6 所示,时间比和酶解时间二因素交互作用明显,时间比和起始 pH 二因素对水解度的影响具有一定交互作用,而起始 pH 和酶解温度二因素交互作用不明显。

综上所述,根据 RSM 分析得出 3 个影响因素的最佳组合为: 时间比 0.6 : 1, 温度 56.16°C, 分段酶解

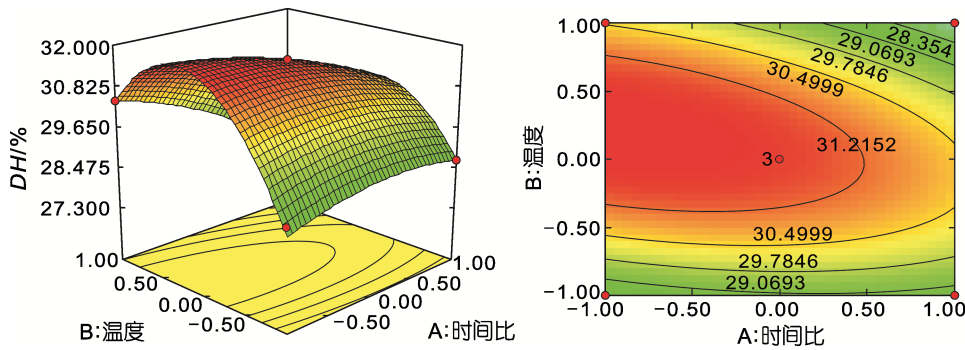


图4 时间比和酶解温度对水解度的交互影响的响应面图和等高线图

Fig.4 Contour plots and response surface describing the interactive effects of time ratio and enzymatic hydrolysis temperature on the degree of hydrolysis
注: 右图等高线数值表示水解度 $DH(\%)$

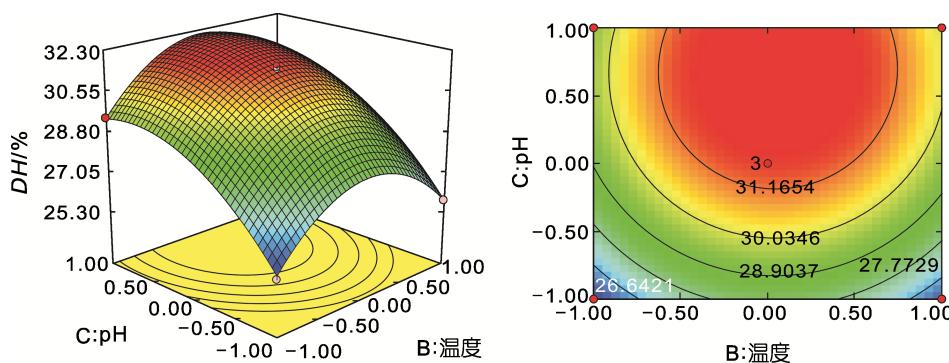


图5 起始 pH 和酶解温度对水解度的交互影响的响应面图和等高线图

Fig.5 Contour plots and response surface describing the interactive effects of original pH and enzymatic hydrolysis temperature on the degree of hydrolysis
注: 右图等高线数值表示水解度 $DH(\%)$

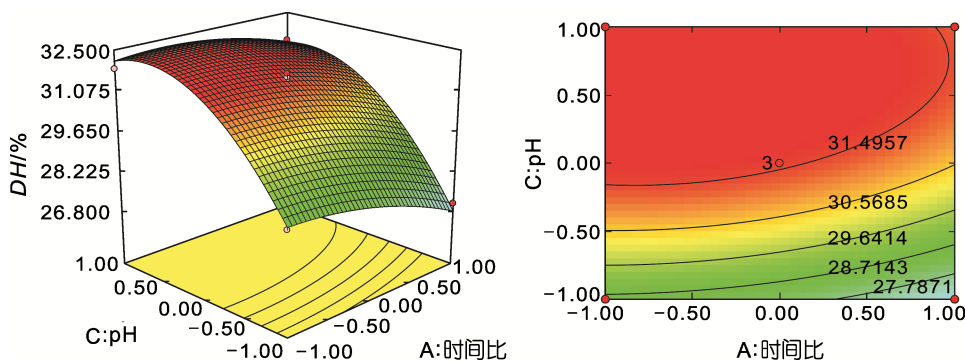


图6 起始 pH 和酶解时间比对水解度的交互影响的响应面图和等高线图

Fig.6 Contour plots and response surface describing the interactive effects of original pH and hydrolysis time ratio on the degree of hydrolysis
注: 右图等高线数值表示水解度 $DH(\%)$

pH 7.0 和 6.17, 此时水解度可达到 32.49%。考虑实际试验操作方便性和可行性, 将理论值修订为: 时间比 0.6 : 1、温度 56℃、分段酶解 pH 7.0 和 6.2, 在此条件下进行验证实验, 实测水解度 (DH) 为 $(33.45 \pm$

0.35)% , 与理论值误差为 2.95% , 表明模型能较好地预测实际水解度。

2.5 酶解液游离氨基酸分析
对水解前每克罗非鱼鱼排中总氨基酸含量及其水解后酶解液中游离氨基酸含量进行分析, 结果见表 9。

由表 9 可知, 未酶解罗非鱼鱼排蛋白中谷氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、丙氨酸、亮氨酸为其主要的氨基酸, 其数量占氨基酸总量的 59.14% , 酶解产物中游离氨基酸含量可达 32.84mg/g 鱼排, 可达到罗非鱼鱼排总氨基酸含量的 25.43% , 含量较丰富的几种游离氨基酸为亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、缬氨酸等, 其中呈味氨基酸含量达 18.48% , 必需氨基酸含量达 67.96% 。

3 结论

采用不同蛋白酶对罗非鱼鱼排进行酶解, 风味蛋白酶和木瓜蛋白酶对罗非鱼鱼排蛋白分段酶解效果最佳, 当以总酶添加量 3.0% , 双酶复合比 2 : 1, 总酶解时间 3h, 双酶水解时间比 0.6 : 1, 酶解温度 56℃, 分段酶解 pH 为 7.0 和 6.2 时, 水解度可达到 32.49%。通过酶解得到的罗非鱼鱼排蛋白酶解液游离氨基酸含量可达 32.84mg/g 鱼排, 且含有大量的呈味氨基酸, 含量高达 18.48% , 滋味鲜美, 同时降低了罗非鱼原有的鱼腥味, 工艺简单、周期短、营养丰富, 具有良好的开发价值和市场前景。

表9 罗非鱼鱼排总氨基酸和酶解液游离氨基酸含量
Tab.9 Contents of total amino acids in tilapia frames and free amino acids in enzymatic hydrolyzates

氨基酸	总氨基酸含量(mg)	游离氨基酸(mg)	氨基酸	总氨基酸含量(mg)	游离氨基酸(mg)
Asp*	12.45	0.12	Ile**	4.87	2.17
Thr**	6.11	0.38	Leu**	9.61	6.59
Ser*	5.76	0.14	Tyr	1.8	0.37
Glu*	19.87	1.11	Phe**	4.95	3.93
Gly*	13.33	1.55	Lys**	10.70	4.62
Ala*	10.40	2.43	His	2.76	0.97
Cys	0.90	0.20	Arg	9.18	2.90
Val**	5.41	2.61	Pro*	7.81	0.72
Met**	3.21	2.02	合计	129.12	32.84

注: *表示呈味氨基酸、**表示必需氨基酸

参 考 文 献

- 李建武, 1994. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 168—190
- 肖 炜, 杨 弘, 李大宇等, 2010. 同种罗非鱼(*Tilapia*)不同地区选育群体的遗传多样性分析. 海洋与湖沼, 41(4): 530—536
- 祝璟琳, 杨 弘, 邹芝英等, 2010. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验. 海洋与湖沼, 41(4): 590—596
- 贺艳辉, 张红燕, 龚赟翀等, 2009. 我国罗非鱼出口面临的机遇与挑战. 中国渔业经济, 27(3): 85—89
- 徐大伦, 颜伟华, 杨文鸽等, 2011. 响应面法优化双髻鲨(*Sphyrna zygaena*)肌肉盐溶蛋白的提取和凝胶形成条件. 海洋与湖沼, 42(2): 289—293
- 阎欲晓, 2009. 罗非鱼活性肽分离及抗氧化能力研究. 水产科学, 5(28): 276—279
- 管华诗, 韩玉谦, 冯晓梅, 2004. 海洋活性多肽的研究进展. 中国海洋大学学报, 34(5): 761—766
- Aspmo S, Horn S, Eijsink V, 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochemistry, 40: 1957—1966
- Batista I, Ramos C, Coutinho J *et al*, 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochemistry, 45: 18—24
- Benjakul S, Morrissey M T, 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3423—3430
- Bhaskar N, Mahendrakar N S, 2008. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. Bioresource Technology, 99(10): 4105—4111
- Chabanon G, Chevalot I, Framboisier X *et al*, 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. Process Biochemistry, 42: 1419—1428
- Chen H C, Ju H Y, Twu Y K *et al*, 2010. Optimized enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester by RSM. N Biotechnol, 27(1): 89—93
- DING Guo-Fang, HUANG Fang-Fang, YANG Zui-Su, 2011. Anticancer activity of an oligopeptide isolated from hydrolysates of *Sepia* Ink. Chinese Journal of Natural Medicines, 9(2): 0151—0155
- Georgios Lalasidis, 1978. Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: chemical composition and nutritive value. Agric Food Chem, 26(3): 751—756
- Guerard F, Dufosse L, Broise D *et al*, 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11(4/6): 1051—1059
- Guerard F, Guimas L, Binet A, 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 19—20, 489—498
- Kristinsson H G, Rasco B A, 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40: 43—81
- Ovissipour M R, Abedian A M, Motamedzadegan A *et al*, 2008. The effect of enzymatic hydrolysis on amino acids composition of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera protein hydrolysate. 18th National Congress on Food Technology, Khorasan Science and Technology Park, Mashhad, Iran, 10: 15—18
- Ovissipour M R, Ghomi M R, 2009. Biotechnology in seafood production. Tehran, Iran: Islamic Azad University Publication, 1—198
- Ovissipour M R, Kenari A A, Ali Motamedzadegan *et al*, 2010. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). Food Bioprocess Technol, DOI 10.1007/s11947-010-0357-x
- Shankar T J, Sokhansan J S, Bandyopadhyay S, 2008. A case study on optimization of biomass flow during single-screw

- extrusion cooking using genetic algorithm (GA) and response surface methodology. *Food and Bio-process Technology*, 4(3): 498—510
- Suthasinee Nilsang, Sittiwat Lertsiri, Manop Supphantharika *et al*, 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70: 571—578
- Šližyte R, Rustad T, Storror I, 2005. Enzymatic hydrolysis cod (*Gadus morhua*) by-products optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 40(12): 3680—3692
- Wanasundara P K, Amarowicz R, Pegg R B *et al*, 2002. Preparation and characterization of hydrolyzed proteins from defibrinated bovine plasma. *Food Sci*, 67(2): 623—630

OPTIMIZATION OF THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) FRAMES PROTEIN USING RESPONSE SURFACE METHOD

CAO Long-Fei¹, YOU Hua-Jun², CHEN Zi-Han³, MA Ying¹,
XIONG He-Jian³, YAN Qing-Pi¹

(1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen, 361021; 2. Xiamen Doingcom Food Co., Ltd., Xiamen, 361022;
3. Bioengineering College of Jimei University, Xiamen, 361021)

Abstract The enzymatic hydrolysis of tilapia frames protein by different protease was studied, and the degree of hydrolysis (*DH*) was assayed during the hydrolyzing. Based on the single-factor test, the surface analysis methodology (RSM) was used to optimize the enzymatic reaction parameters. Results showed that the enzymatic effects of two proteases, flavourzyme and papain proteases were the best when added to the reaction system sequentially. The total enzyme dosage was 3.0%; the ratio of flavourzyme and papain proteases was 2 : 1. The total enzymatic time lasted for 3h, and time ratio for the two proteases was 0.6 : 1. The enzymatic reaction was under the temperature of 56°C, and pH first 7.0 and then 6.2. The *DH* of 32.49% was achieved under the optimized conditions. The concentration of free amino acids in the hydrolysates is 32.84mg/g, accounting for 25.43% of the total amino acids in Tilapia frames. The flavor amino acids and essential amino acids occupied up to 18.48% and 67.96% of the free amino acids respectively.

Key words Tilapia frames, Enzymatic hydrolysis, Surface analysis methodology, Hydrolysis

2011 年度《海洋与湖沼》动态

(1) 《海洋与湖沼》2011 年最新公布的总被引频次在海洋科学期刊中名列第一位; 影响因子为 1.404, 学科影响指标和综合评价总分均列海洋科学期刊首位; 综合评价总分在全国科技期刊中排第 18 位。

(2) 荣获 2011 年度百种中国杰出学术期刊奖。

(3) 荣获 2011 年度中国精品科技期刊奖。