



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106636281 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201710001491.5

(22)申请日 2017.01.03

(71)申请人 广东省农业科学院

地址 510640 广东省广州市天河区金颖路  
29号

(72)发明人 涂杜 徐志宏 陈道明 刘军  
岑梦诗

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 谭英强

(51)Int.Cl.

C12P 21/06(2006.01)

C07K 14/46(2006.01)

A23L 33/18(2016.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图5页

(54)发明名称

一种海鲈鱼副产物的酶解方法及其在乳剂  
产品中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种海鲈鱼副产物的酶解方法及其在乳剂产品中的应用,属于海产品深加工领域。首先通过预处理获得脱脂海鲈鱼加工副产物;调节料水比,调节温度为45-60℃,pH 8-10,加入碱性蛋白酶,充分酶解;不灭酶,继续调节温度为40-55℃,pH 6-8,加入风味蛋白酶,充分酶解;得到酶解产物。本发明首次采用碱性蛋白酶和风味蛋白酶分步复合酶解处理海鲈鱼下脚料,充分利用两种蛋白酶的酶切位点不同,相互作用,互相促进。所获得的四个酶解产物A、B、C、D具有营养和优良乳化性能的双重优点,可以部分替代全营养品中的酪元酸钠,所得到的配方符合临床乳剂产品的要求,同时能够提供更为丰富的多肽和氨基酸。

1. 一种海鲈鱼副产物的酶解方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - (1) 预处理:将海鲈鱼副产物,进行脱脂,干燥,得到脱脂海鲈鱼加工副产物;
  - (2) 酶解:取脱脂海鲈鱼加工副产物,调节料水比,调节温度为45-60℃,pH 为8-10,加入碱性蛋白酶,充分酶解;不灭酶,继续调节温度为40-55℃,pH 为6-8,加入风味蛋白酶,充分酶解;
  - (3) 酶解产物制备:终止酶解反应,灭酶,冷冻干燥备用。
2. 根据权利要求1所述的酶解方法,其特征在于:步骤(1)脱脂用的有机溶剂包括石油醚、乙醚、氯仿。
3. 根据权利要求1或2所述的酶解方法,其特征在于:步骤(1)脱脂时,用石油醚与海鲈鱼副产物按照质量比(2-4):1混合,进行充分搅拌,搅拌时间为0.5-2h,并重复数次,进行脱脂。
4. 根据权利要求1所述的酶解方法,其特征在于:步骤(2)取脱脂鲈鱼加工副产物,调节料水的质量体积比为 1:(3-5)。
5. 根据权利要求1所述的酶解方法,其特征在于:步骤(2)中,碱性蛋白酶的添加量为2000-6000U/g,酶解时间为1h-6h。
6. 根据权利要求1所述的酶解方法,其特征在于:步骤(2)中,风味蛋白酶的添加量为2000-6000U/g,酶解时间为1h-6h。
7. 根据权利要求5或6所述的酶解方法,其特征在于:步骤(2)中碱性蛋白酶和风味蛋白酶的酶解时间均为1.5h,总共3h。
8. 根据权利要求7所述的酶解方法,其特征在于:步骤(3)中,在总的酶解时间为3h的整个酶解过程中,选定酶解4-10min、25-35min、105-115min和175-185min四个时间终止酶解反应,灭酶,离心,取上清液蒸发浓缩,并进行透析,真空冷冻干燥,制备得到四个不同水解度的产物A、B、C、D。
9. 权利要求1-8任一项所述的酶解方法制备得到的酶解产物。
10. 权利要求9所述的酶解产物在乳剂产品中的应用。

## 一种海鲈鱼副产物的酶解方法及其在乳剂产品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于海产品深加工领域,具体涉及一种海鲈鱼副产物的酶解方法及其在乳剂产品中的应用。

### 背景技术

[0002] 我国是鱼类养殖和捕捞大国,水产养殖业发达(赵占西等,2001)。2012年鲈鱼的出塘量为968.49吨,2013年则为785.96吨。

[0003] 鱼类的加工过程会产生大量的废弃物,如鱼头、鱼骨和鱼皮等,废弃的这一部分加工副产物约占原材料总重的40%~50%(龚钢明等,2003),这些废弃物中含有丰富的蛋白质,如鱼鳞中蛋白质含量在60%左右(申锋,2009)。大量加工副产物未得到有效的利用,容易腐烂变质,对环境产生了一定的污染。为了更好的利用这些蛋白质,同时为了保证其食用品质和生产安全,有必要对这些鱼类加工副产物进行深加工。

[0004] 海鲈鱼是广东省产量最高的海洋经济鱼,在其加工过程中产生大量鱼皮、鱼头、鱼骨等副产物,这些废弃物总重量可以占到原料鱼的40%~55%,里面不但含有大量的蛋白质,脂类等,有的还具有一些特殊的活性物质。所以对鲈鱼副产物进行深加工具有重要意义。

[0005] 目前对加工副产物中蛋白质的利用主要有两种方式,碱法提取和酶法提取。酶法水解蛋白质,生成许多小分子肽或氨基酸,易于吸收利用,且其溶解性、保水性、乳化性、起泡性等均可获得一定程度的改善,以满足实际生产应用的需求。不同的酶具有不同的酶切位点,根据实际需求,可以选择不同的酶。单酶酶解存在酶切位点单一,水解能力有限等不足;而添加多种酶进行同步酶解中,由于每个酶的最适反应条件不同,偏离最适条件会让酶活力降低进而影响酶解效果。分步复合酶解是一种组合利用不同酶特性的酶解方式,通过分步酶解可以使酶解产物的组成更加丰富。例如,胃蛋白酶作为位点少,仅作用于肽链两端的芳香族氨基酸,酶解需在酸性条件下进行;而碱性蛋白酶作用位点多,适宜于在碱性条件下进行,两种酶解物的加工性能也有所差异,因此如何根据需求选择不同酶切位点的酶搭配是难点。

[0006] 此外,酶的选择和水解条件在一定程度上也会影响鱼蛋白肽的功能性质,(Croaker et al,2007)。例如,胃蛋白酶酶制备的胶原蛋白肽具有良好的功能性质,起泡性、乳化性等,但是产物粘度较高,溶解性较差,这与胃蛋白酶的酶切位点有很大关系,其仅作用于肽链两端是芳香族的氨基酸,所得多肽片段较大。而木瓜蛋白酶制备的产物溶解性较好,但其他的功能特性如乳化性、起泡性较差,粘度降低。适度的酶解能够改善蛋白质的功能特性,但是水解度较大时,肽链较短,影响产物的凝胶型乳化性等(Yin et al,2008)。

[0007] 蛋白质常用的功能特性主要有溶解性、乳化性、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性、持水性、吸油性等(刘东儿等,2010)。受其本身结构的限制,其部分功能特性往往不能良好的适应食品加工需求,为了更好的利用蛋白质的功能特性,酶法改性是常用的手段。但是如上所述,酶解的工艺以及条件选择对于水解产物的功能关系重大,而且过度酶解会使某些

功能特性大幅降低甚至丧失 (kazunobu T,2009;popineau Y,2002;Gaurav G,2010),进而影响这些水解产物在工业中的应用。

[0008] 目前来说鲈鱼副产物的酶解产物多用于生产鱼粉或调味品等低附加值产品,甚至部分作为废料直接丢弃,没有完全发挥其的营养价值,造成资源与环境浪费。此外,其在临床营养品中的应用也未见报道。

[0009] 现在市面上常见的临床营养品为整蛋白型,但是对于一部分肠胃存在消化吸收功能障碍病人来说,短肽型的预消化营养品利用率高,无需经过消化吸收,则可直接被肠道吸收,这种特性使其是当下的研究热点。但是短肽型营养品尤其是全营养的复杂体系乳剂产品存在稳定性不佳的问题,而添加过多的稳定剂会使体系粘度增大,流动性变差,不利于临床使用。

因此,如何选择不同酶切位点的酶搭配进行复合酶解,研发附加值高的水解产物,并应用于工业生产中,或进一步用于临床营养品的应用,具有重大意义。

## 发明内容

[0010] 本发明为了解决现有技术中存在的海鲈鱼下脚料难以有效综合利用的问题,提供了一种一种鲈鱼副产物的酶解方法及其在乳剂产品中的应用。

[0011] 本发明所采取的技术方案是:

一种海鲈鱼副产物的酶解方法,包括以下步骤:

(1) 预处理:将海鲈鱼副产品,进行脱脂,干燥,得到脱脂海鲈鱼加工副产物;

(2) 酶解:取脱脂海鲈鱼加工副产物,调节料水比,调节温度为45-60℃,pH为8-10,加入碱性蛋白酶,充分酶解;不灭酶,继续调节温度为40-55℃,pH为6-8,加入风味蛋白酶,充分酶解;

(3) 酶解产物制备:终止酶解反应,灭酶,冷冻干燥备用。

[0012] 优选的,步骤(1)中海鲈鱼副产物,包括海鲈鱼鱼头、鱼骨、鱼皮、鱼鳞等。

[0013] 优选的,步骤(1)中,脱脂前需要进行预处理包括:冲洗去血丝,沥干水分,经过充分绞碎。

[0014] 优选的,步骤(1)脱脂用的有机溶剂包括石油醚、乙醚、氯仿。

[0015] 优选的,步骤(1)脱脂用的有机溶剂为石油醚。

[0016] 优选的,步骤(1)脱脂时,用石油醚与海鲈鱼副产物按照质量比(2-4):1混合,进行充分搅拌,搅拌时间为0.5-2h,并重复数次,进行脱脂。

[0017] 优选的,步骤(1)中干燥可采用自然风干的方式。

[0018] 优选的,步骤(2)取脱脂鲈鱼加工副产物,调节料水的质量体积比为1:(3-5)。

[0019] 优选的,步骤(2)调节pH用食用酸或食用碱。

[0020] 优选的,步骤(2)中,碱性蛋白酶的添加量为2000-6000U/g,酶解时间为1h-6h。

[0021] 优选的,步骤(2)调节料水比后,调节温度为50℃~55℃,pH为9~9.5,加入碱性蛋白酶,添加量为3500-4500U/g,酶解时间为1.0-3h。

[0022] 优选的,步骤(2)中,风味蛋白酶的添加量为2000-6000U/g,酶解时间为1h-6h。

[0023] 优选的,步骤(2)中,不灭酶,继续调节温度为45℃~50℃,pH为6.5-7.5,加入碱性蛋白酶,添加量为3500-4500U/g,酶解时间为1.0-3h。

[0024] 优选的,步骤(2)中碱性蛋白酶和风味蛋白酶的酶解时间均为1.5h,总共3h。

[0025] 优选的,步骤(3)中,在总的酶解时间为3h的整个酶解过程中,选定酶解4-10min、25-35min、105-115min和175-185min四个时间终止酶解反应,灭酶,离心,取上清液蒸发浓缩,并进行透析,真空冷冻干燥,制备得到四个不同水解度的产物A、B、C、D。

[0026] 优选的,步骤(3)中,在总的酶解时间为3h的整个酶解过程中,选定酶解5min、30min、110min和180min四个时间终止酶解反应,沸水浴10min灭酶,离心,蒸发浓缩,并进行透析,真空冷冻干燥,制备得到四个不同水解度的产物A、B、C、D。其中,产物A和B仅为碱性蛋白酶酶解后的产物,产物C和D为碱性蛋白酶和风味蛋白酶分步复合酶解后的产物。

[0027] 优选的,步骤(3)透析时,截留分子量为70-120,透析时间为20-30h。

[0028] 本发明以海鲈鱼加工副产物为原料,其中存在大量鱼骨,在酶解过程中,蛋白质被剥离下来,一部分盐也随之进入酶解液,透析脱盐可以去除大部分酶解液中的盐分。

[0029] 上述酶解方法制备得到的酶解产物。

[0030] 上述酶解产物在乳剂产品中的应用。

[0031] 优选的,酶解产物以20%的质量比替代乳剂产品中的酪元酸钠。

[0032] 本发明的有益效果是:

本发明首次采用碱性蛋白酶和风味蛋白酶分步复合酶解处理海鲈鱼下脚料。碱性蛋白酶是一种内切酶,作用时要求在水解处的羟基侧具有芳香族氨基酸(如酪氨酸,苯丙氨酸)或疏水性氨基酸(如亮氨酸,苯丙氨酸)所构成的肽键,具有水解酯键,酰胺键和转酯、转肽功能,其具有较强的蛋白水解能力。风味蛋白酶则是一种以端肽酶为主的复合型蛋白酶,在水解蛋白质时,主要发挥端肽酶的作用,从多肽链的末端水解多肽。本发明充分利用碱性蛋白酶和风味蛋白酶酶切位点的不同,两种蛋白酶相互作用,互相促进,一种蛋白酶切断肽链后,为另外一种蛋白酶提供了更多的酶切位点,从而高效地水解蛋白质;分步酶解,可使酶在各自最适反应条件下酶解,避免了同步酶解时由于每个酶的最适反应条件不同,而影响酶解效果。本发明分步复合酶解3h的水解度为13.96%,大于同步酶解水解度13.18%,大于单酶酶解。

[0033] 本发明所利用的原料为低值海鲈鱼下脚料,达到变废为宝,降低环境污染,提高效益的效果。本发明优化了碱性蛋白酶和风味蛋白酶的酶解条件,分步复合酶解3h的水解度为13.96%,大于同步酶解水解度13.18%,大于单酶酶解。通过控制酶解时间获得四个酶解产物A、B、C、D,水解度分别为3.6%、7.45%、9.59%和13.68%,此时氮收率分别为24.20%、33.44%、50.54%、57.15%。

[0034] 本发明所获得的酶解产物冻干蛋白粉A、B、C和D含有丰富的多肽和氨基酸组成,16种氨基酸组成中,含有8种必须氨基酸,其中组氨酸为婴儿必须氨基酸。根据FAO/WHO评价标准,必须氨基酸含量占非必须氨基酸含量的60%,必须氨基酸含量占总氨基酸含量的40%左右为优质蛋白。根据这一标准,酶解所得的产物A、B、C和D符合上述标准,均为优质蛋白,氨基酸含量丰富平衡效果较好,这为其在临床营养品中的应用提供了良好的物质基础。

[0035] 四个酶解产物性质的研究表明,四个酶解产物的分子量分布从大到小,随着酶解程度的加深,酶解产物A、B、C、D的分子量分布逐渐向低分子量段迁移。加入风味蛋白酶后,酶解产物分布趋于集中,峰强度增加、峰数量减少。酶解产物氨基酸总量和疏水性氨基酸含量均增加,呈现正相关。四个酶解产物的溶解性均良好,四个酶解产物的表面疏水性和乳化

性良好,粘度值良好。符合临床乳剂产品的加工要求。

[0036] 四个酶解产物在临床营养品加工中的应用研究表明,酶解产物A、B、C、D具有营养和优良乳化性能的双重优点,可以部分替代全营养品中的酪元酸钠,所得到的配方符合临床乳剂产品的要求,同时能够提供更为丰富的多肽和氨基酸。

### 附图说明

[0037] 图1为飞行时间质谱图;

图2为飞行时间质谱图;

图3为飞行时间质谱图;

图4为飞行时间质谱图;

图5为飞行时间质谱图;

图6为飞行时间质谱图;

图7为四个酶解产物氮溶解指数NSI的比较;

图8为四个酶解产物乳化性活力指数EAI的对比;

图9为四个酶解产物乳化稳定性ESI的比较;

图10为四个酶解产物剪切速率-粘度变化曲线。

### 具体实施方式

[0038] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0039] 实施例1

将新鲜海鲈鱼鱼头、鱼骨、鱼皮冲洗去血丝,沥干水分,经绞肉机绞碎,将所得鱼糜混匀后,再经绞肉机绞碎一次,分装备用。

[0040] 取适量下脚料,以1:3的质量比加入石油醚脱脂,搅拌1h,重复3次,自然风干12h,得到脱脂鲈鱼加工副产物。

[0041] 取一定量的脱脂鲈鱼加工副产物,调节料水的质量体积比为1:4,设定磁力搅拌器温度为50℃,预热半小时,利用碱调节pH为9,加入碱性蛋白酶,酶添加量4000U/g,酶解温度为50℃,酶解1.5h;不灭酶,利用酸调节pH值为7,加入风味蛋白酶4000U/g,酶解温度为50℃,继续酶解1.5h。酶解期间选定酶解5min、30min、110min和180min四个时间终止酶解反应,获得四个酶解产物A、B、C、D。

[0042] 沸水浴10分钟灭酶终止反应后,4000r/min离心15min。离心后的上清液利用旋转蒸发器将所得的酶解液进行浓缩,浓缩条件:冷凝温度为5℃,加热温度为50~65℃,真空度为5pa,旋转速度为110r/min。酶解液浓缩到一定体积,使用截留分子量100的透析袋透析24h,白天每3h换一次双蒸水,其中夜间间隔8h,透析完成后再次浓缩到一定浓度,将浓缩后的水解液放入真空冷冻干燥器中,控制温度为-82℃,压力为3pa进行冷冻干燥,制成粉状物,得到蛋白水解物。

[0043] 经测定所得产物A、B、C、D的水解度分别为3.6%、7.45%、9.59%和13.68%,氮收率分别为24.20%、33.44%、50.54%、57.15%,氨基酸组成如表1。

[0044] 表1四个酶解产物氨基酸组成及含量分析结果(g/100g)

氨基酸名称	产物 A	产物 B	产物 C	产物 D
Asp (天冬)	1.198	1.869	2.355	2.682
Thr (苏) *	0.676	0.923	1.297	1.730
Ser (丝)	0.841	1.016	1.495	2.039
Glu (谷)	2.841	3.513	4.315	5.236
Gly (甘)	0.304	0.473	0.600	0.780
Ala (丙)	0.586	0.746	1.155	1.681
Cys (半胱)	0.000	0.798	0.851	0.862
Val (缬) *	1.198	1.508	1.955	2.433
Met (蛋) *	0.123	0.976	1.253	1.334
Ile (异亮) *	0.352	0.510	0.661	0.895
Leu (亮) *	1.108	1.480	1.771	2.198
Tyr (酪)	1.480	2.163	2.371	2.803
PHe (苯丙) *	2.993	3.296	2.474	3.046
Lys (赖) *	2.383	2.602	1.589	1.935
His (组) *	2.515	2.043	1.047	0.899
Arg (精)	2.184	1.089	1.379	1.722
疏水性氨基酸	6.359	8.516	9.269	11.586
TEAA	11.348	13.338	12.046	14.470
TNEAA	9.435	11.668	14.521	17.804
TAA	20.782	25.006	26.567	32.274
TEAA/TAA	54.60%	53.34%	45.34%	44.83%
TEAA/TNEAA	120.28%	114.30%	82.96%	81.27%

由表1可得知：四种产物均为优质蛋白。氨基酸的组成和含量是评价蛋白质营养价值的重要指标，表1中列出了酶解产物A、B、C和D冻干蛋白粉的16种氨基酸组成，含有8种必须氨基酸，其中组氨酸为婴儿必须氨基酸。根据FAO/WHO评价标准，必须氨基酸含量占非必须氨基酸含量的60%，必须氨基酸含量占总氨基酸含量的40%左右为优质蛋白。根据这一标准，酶解所得的产物A、B、C和D符合上述标准，均为优质蛋白，氨基酸含量丰富平衡效果较好，这为其在临床营养品中的应用提供了良好的物质基础。

#### [0045] 实施例2

将新鲜海鲈鱼鱼头、鱼骨、鱼皮冲洗去血丝，沥干水分，经绞肉机绞碎，将所得鱼糜混匀后，再经绞肉机绞碎一次，分装备用。

[0046] 取适量下脚料，以1:3的质量比加入石油醚脱脂，搅拌2h，重复2次，自然风干12h，得到脱脂鲈鱼加工副产物。

[0047] 取一定量的脱脂鲈鱼加工副产物，按1:4的质量体积比与水混合，设定磁力搅拌器温度为55℃，预热半小时，调节pH为9.5，加入碱性蛋白酶，酶添加量5000U/g，酶解2h；不灭酶；继续调节温度为45℃，调节pH值为7，加入风味蛋白酶5000U/g，酶解2h。

[0048] 沸水浴10分钟灭酶终止反应后，4000r/min离心15min。离心后的上清液利用旋转蒸发器进行浓缩，浓缩条件：冷凝温度为5℃，加热温度为50~65℃，真空度为5pa，旋转速度为110r/min。酶解液浓缩到一定体积，使用截留分子量100的透析袋透析24h，白天每3h换一次双蒸水，其中夜间间隔8h，透析完成后再次浓缩到一定浓度，将浓缩后的水解液放入真空冷冻干燥器中，控制温度为-82℃，压力为3pa进行冷冻干燥，制成粉状物，得到蛋白水解物。

#### [0049] 实施例3

将新鲜海鲈鱼鱼头、鱼骨、鱼皮冲洗去血丝，沥干水分，经绞肉机绞碎，将所得鱼糜混匀后，再经绞肉机绞碎一次，分装备用。

[0050] 取适量下脚料，以1:4的质量比加入石油醚脱脂，搅拌0.5h，重复3次，自然风干12h，得到脱脂鲈鱼加工副产物。

[0051] 取一定量的脱脂鲈鱼加工副产物，按1:4的质量体积比与水混合，设定磁力搅拌器温度为50℃，预热半小时，调节pH为9.2，加入碱性蛋白酶，酶添加量4500U/g，酶解温度为50℃，酶解2.5h；不灭酶；调节pH值为6.8，加入风味蛋白酶4500U/g，酶解温度为50℃，继续酶解2.5h。

[0052] 沸水浴10分钟灭酶终止反应后，4000r/min离心15min。离心后的上清液利用旋转蒸发器进行浓缩，浓缩条件：冷凝温度为5℃，加热温度为50~65℃，真空度为5pa，旋转速度为110r/min。酶解液浓缩到一定体积，使用截留分子量100的透析袋透析24h，白天每3h换一次双蒸水，其中夜间间隔8h，透析完成后再次浓缩到一定浓度，将浓缩后的水解液放入真空冷冻干燥器中，控制温度为-82℃，压力为3pa进行冷冻干燥，制成粉状物，得到蛋白水解物。

[0053] 实施例4

将新鲜海鲈鱼鱼头、鱼骨、鱼皮冲洗去血丝，沥干水分，经绞肉机绞碎，将所得鱼糜混匀后，再经绞肉机绞碎一次，分装备用。

[0054] 取适量下脚料，以1:3的质量比加入石油醚脱脂，搅拌1h，重复3次，自然风干12h，得到脱脂鲈鱼加工副产物。

[0055] 取一定量的脱脂鲈鱼加工副产物，按1:4的质量体积比与水混合，设定磁力搅拌器温度为50℃，预热半小时，调节pH为9，加入碱性蛋白酶，酶添加量4000U/g，酶解温度为50℃，酶解3h(180min)，不灭酶，调节pH值为7，加入风味蛋白酶4000U/g，酶解温度为50℃，继续酶解3h(180min)。

[0056] 沸水浴10分钟灭酶终止反应后，4000r/min离心15min。利用旋转蒸发器将所得的酶解液进行浓缩，浓缩条件：冷凝温度为5℃，加热温度为50~65℃，真空度为5pa，旋转速度为110r/min。酶解液浓缩到一定体积，使用截留分子量100的透析袋透析24h，白天每3h换一次双蒸水，其中夜间间隔8h，透析完成后再次浓缩到一定浓度，将浓缩后的水解液放入真空冷冻干燥器中，控制温度为-82℃，压力为3pa进行冷冻干燥，制成粉状物，得到蛋白水解物。

[0057] 对比例1

其他同实施例4。

[0058] 不同之处在于：

碱性蛋白酶组：仅利用碱性蛋白酶酶解6h(180+180min)；酶解条件同实施例4；

风味蛋白酶组：仅利用风味蛋白酶酶解6h(180+180min)；酶解条件同实施例4；

分步复合酶解：同实施例4；

同步酶解组：酶解温度为50℃，pH为8，同时加入碱性蛋白酶和风味蛋白酶各4000U/g，酶解时间3h。

[0059] 上述各组的酶解产物均进行灭酶，离心，蒸发浓缩，并进行透析，真空冷冻干燥备用。结果分析见表2。

[0060] 表2不同酶解方式酶解不同时间的水解度对比

时间 (min)	水解度 DH (%)			
	碱性蛋白酶组	风味蛋白酶组	分步复合酶解组	同步酶解组
5	3.83±0.0032	-	-	-
10	6.35±0.0069	-	-	-
20	7.12±0.0073	-	-	-
30	7.56±0.0016	-	-	-
90	8.44±0.0150	-	-	-
180	10.13±0.0011	10.29±0.0010	13.96±0.0153	13.18±0.0053
240	10.72±0.0042	12.10±0.0026	-	-
300	11.91±0.0084	13.41±0.0079	14.79±0.0082	-
360	12.40±0.0121	14.82±0.0011	16.58±0.0019	-

(根据实验目的,仅检测一些关键点的酶解数据,-处表示没有进行数据测定)

如表2所示,双酶酶解的水解能力明显优于单酶酶解,当反应6h时,碱性蛋白酶和风味蛋白酶酶解反应水解度分别为12.40%和14.82%,随着时间的延长,水解度提升缓慢。反应3h时,分步复合酶解与同步酶解的水解度均大于碱性蛋白酶的酶解6h时的水解度,且分步复合酶解的水解度大于同步酶解的水解度,随酶解时间的延长,分步复合酶解可以达到更高的水解度,但是从工业应用角度来看,延长时间会加大经济成本,水解度的提升有限。同步酶解时,综合两种酶的最适pH,选定反应pH为8,pH对酶活的影响较大,造成水解度不如分步复合酶解,总酶添加量的增加使得水解度优于单酶酶解。

[0061] 本发明采取了两种酶分步酶解的方式,与传统的单酶水解或者双酶同步复合酶解均有所不同。单酶酶解存在酶切位点单一,水解能力有限等不足。同步酶解中,由于每个酶的最适反应条件不同,偏离最适条件会让酶活力降低进而影响酶解效果。本发明充分在碱性蛋白酶充分酶解的情况下,加入风味蛋白酶,使得反应的水解度得到进一步提高,缩短了酶解时间,风味蛋白酶所具有的外切活性丰富了产物的氨基酸和多肽的构成。

#### [0062] 对比例2

同实施例1,不同之处在于,复合酶解的顺序进行调整,先进行风味蛋白酶的酶解,不灭酶,再进行碱性蛋白酶的酶解。

[0063] 结果是:水解度为12.25%,氮收率为45.67%。

[0064] 发明人研究中发现碱性蛋白酶和风味蛋白酶催化反应水解度均随着时间的增加而升高。其中碱性蛋白酶催化反应的初期,水解度变化剧烈,这可能与碱性蛋白酶酶切位点较多有关,在适宜的pH值等条件下,酶活较高,酶解反应速率很快。反应30min时,水解度为7.56%,反应90min时水解度上升趋势变缓,此时水解度达到8.44%,酶解3h时,水解度达到10.13%,而继续酶解到6h时,水解度为12.40%。此时,酶解时间的延长并未带来较大幅度的水解度提升,而碱性蛋白酶催化反应的氮收率在90min后基本趋于平缓。风味蛋白酶催化酶解反应水解度随时间的增加逐步上升,在反应前100min,碱性蛋白酶催化酶解反应水解度大于风味蛋白酶,当反应时间超过100min,风味蛋白酶的水解度优于碱性蛋白酶。

[0065] 如果将顺序进行调换后,风味蛋白酶在酶解反应进行90min后,加入碱性蛋白酶,碱性蛋白酶并没有提供更佳的水解效果,反而有所浪费。

#### [0066] 对比例3

其他同实施例1,不同之处在于,碱性蛋白酶解时的pH调节为7.5,风味蛋白酶酶解时pH调节为8.5。

[0067] 结果为水解度为11.35%，氮收率30.58%。

[0068] 由于酶和底物蛋白分子的部分基团的解离状态受pH值的影响非常大，pH值的变化能直接影响到酶的水解效果。酶的本质是具有生物活性的蛋白质，pH值的过高或者过低可以都会破坏其内部空间结构，使酶失去活力。虽然pH值的小幅度变化不会导致酶的变性失活，但是仍会对酶的催化活力产生一定的影响。

[0069] 发明人研究发现，碱性蛋白酶和风味蛋白酶催化酶解反应的氮收率均随着pH的升高先升后降。当pH值在9.5时，碱性蛋白酶催化反应的氮收率最大，当pH值在7时，风味蛋白酶催化反应的氮收率最大。

[0070] 碱性蛋白酶和风味蛋白酶催化酶解反应的水解度也均随着pH的升高先升后降。其中碱性蛋白酶在pH值低于9时，水解度随着pH值的升高增幅明显，水解度变化幅度较大，在pH值为9的时候，水解度最大，而后缓慢下降。风味蛋白酶在pH值为7时水解度最大。

[0071] 综上所述，pH值在9-9.5时，碱性蛋白酶表现出良好的催化性能。而风味蛋白酶的最适pH值为7。本对比例中的pH严重偏离了上述最佳范围，导致水解度和氮收率不佳。

[0072] 本发明酶解产物A、B、C、D的品质分析

将实施例1所得到的冷冻干燥的酶解产物A、B、C、D进行分析。

[0073] 1、实验方法

1.1分子量分布的测定

将冷冻干燥的酶解产物A、B、C、D配成浓度为1mg/ml的溶液，使用基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱仪进行分析，确定其分子量范围。

[0074] 1.2氨基酸构成分析

使用氨基酸自动分析仪进行分析，参照GB/T5009.124-2003。

[0075] 1.3氮溶解指数NSI值的测定

精确称取100mg左右的酶解产物，溶于10ml的去离子水中，室温下磁力搅拌30min，然后NaOH或HCl溶液分别调节pH值为3、5、7、9，再磁力搅拌30min，4000r/min离心15min，取上清液用凯氏定氮法测定蛋白质含量。NSI = 上清液中蛋白质含量 / 总蛋白质含量。

[0076] 1.4乳化能力与乳化稳定性的测定与计算

乳化性测定：将样品配制成浓度为1% (w/v) 蛋白质溶液，调节pH为7.0，取配制好的溶液16ml至50ml离心管，加入4ml纯大豆油，在10,000r/min下，均质60s，取下层乳化液50μL，加入0.1% (W/W) 的SDS溶液5.0ml， $A_0$ 表示500nm处的吸光值 (Pearce and Kinsella1978)。

[0077] 乳化能力大小用乳化活力指数 (Emulsifying Activity Index, 简称EAI) 表示。乳化稳定性 (Emulsion Stability Index, 简称ESI) (Agyare, Addo et al., 2009)。

[0078] 计算公式如下：

$$EAI = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times DF}{\rho \phi (1 - \theta) \times 10000}$$

$$ESI = \frac{A_0}{A_5 - A_{10}} \times 10$$

DF为稀释倍数， $\rho$ 为蛋白浓度，g/mL； $\phi$ 为光程， $\phi = 0.01m$ ； $\theta$ 为油相所占分数； $A_0$ 、 $A_{10}$ 分别为0min和10min时的吸光度。产物比较多时，需精确计时，一管一管测量数值。

[0079] 1.5粘度测定

将酶解产物A、B、C、D配置成浓度为20%蛋白液。采用AR1500流变仪,设定测定条件为:直径60nm锥形板,间隔1mm,测量温度25℃,剪切速率0.1-200-1。

## [0080] 2、结果分析:

### 2.1分子量测定结果

鲈鱼加工副产物酶解产物是氨基酸和多肽的混合物,分子量大小不一,分布在各个分子段,通过基质辅助激光解吸电离串联飞行质谱仪器对其进行分析。由于四个酶解产物获得时间差异较大,水解程度不同,为了准确的反映产物的分子量分布,同时使用分析肽和分析蛋白的方法,分别别为700D~3500D和1000D~20000D段,准确的获知酶解产物的分子量分布。

[0081] 图1、图2反应了酶解产物A的分子量分布,由图1可知,在700D~3500D全段各个分子量均出现大小不同的峰,说明酶解产物A的组成丰富,产物分子量大小不一。这是可能由于碱性蛋白酶的酶解位点多,酶解产物为大小不同的多肽和氨基酸的混合物。在1000D以下的低分子段,可以看到879.758处有一个明显的峰,在1400D-2500D段也有若干较强峰出现,在2500D-3500D段,2989.431D出现强度最强的峰,其左右还有若干强峰。由图2知,3500D-20000D段,有3847.5D和4455.2D两个较强峰,在6000D以上基本上无产物,这可能是由于碱性蛋白酶与底物接触后,酶切位点多,所获得的多肽片段分子量相对较小。酶解产物A是反应5min时获得的,碱性蛋白酶作用时间短,并未获得大分子段肽。

[0082] 图3、4反应了酶解产物B的分子量分布,对比图3与图1可知,酶解产物B的组成更加复杂,各个分子段均出现明显的峰,较强峰左移趋势明显。2000D以下出现若干强峰,2025.927处出现最强峰,这说明随酶解时间的增长,酶解反应更加充分,更多的多肽和氨基酸片段被酶切下来,一部分的分子量较大的多肽被酶解为更小的肽和氨基酸。由图4可知,在3000D-20000D段,3234.3D、3581.9D和4469.7D出现三个明显峰,酶解产物A也有近似的峰,这可能是由于,酶解产物A和B均是由碱性蛋白酶单酶酶解所得,酶解位点相同,作用方式相同,所以在大分子肽段出现近似峰。又因为酶解产物B比A酶解时间长,所以在2000D以下,出现峰强度整体大于2000D以上分子段。

[0083] 图5反应了酶解产物C的分子量分布,3500D以上未检出,2192.958D处出现最强峰。碱性蛋白酶属于非特异性蛋白质肽链内切酶,作用底物广泛,能水解所有羧基侧具有芳香族或疏水性氨基酸,风味蛋白酶同时具有内切和外切活性,能催化水解肽链末端显苦味的疏水性氨基酸。酶解产物C和D是两种酶同时作用的产物,反应体系的pH值适宜风味蛋白酶作用,偏离了碱性蛋白酶的最适pH。对比酶解产物A和B的分子量分布图,可以看出酶解产物C的峰相对集中,峰数量也少于酶解产物A和B,这可能是由于风味蛋白酶的加入,两种酶酶切位点不同,碱性蛋白酶偏离最适pH活性降低,风味蛋白酶起主导作用,同时产物C是碱性蛋白酶酶解90min后加入风味蛋白酶酶解20min时获得的,酶解反应90min时氮收率增加已经趋于平缓,风味蛋白酶的加入,可能更多的是作用于将已获得的分子量较大的多肽酶切为分子量较小的肽,增加酶解产物的游离氨基酸。

[0084] 图6反应了酶解产物D的分子量分布,1466.449D出现最强峰,3500D以上无检出。与酶解产物A、B、C相比,酶解产物D酶解时间最长,3h,酶解反应充分,大分子的多肽被水解为小分子肽段和游离氨基酸,酶解产物D分子量分布主要集中于1500D以下。

[0085] 综上所述,随着酶解时间的延长,酶解产物的分子量分布向低分子段迁移明显,酶

解产物A、B、C、D分子量分布逐渐变小。对比酶解产物A和B,可以发现,随碱性蛋白酶作用时间增加,所得产物组成更加丰富,大分子的肽段被酶切为小分子的肽段。对比酶解产物B和C可知,风味蛋白酶的加入使得产物分布趋于集中,峰强度增加,峰数量减少。由酶解产物D可知,酶解反应3h,产物分子量较小,酶解反应充分。

[0086] 2.2氨基酸构成分析结果见表1和实施例1的分析。

[0087] 2.3四个酶解产物氮溶解指数NSI值的比较研究

由图7可知,四个酶解产物的在不同的酸碱度下溶解性都表现良好,符合产品进一步加工生产的要求。这可能是因为产物以多肽和氨基酸形式存在,酶解导致肽链舒展亲水性基团暴露,电荷密度增大,极性增强,亲水性增强,产物溶解性增加。酶解产物B的溶解性最好,产物D的溶解性一般,产物A和C溶解性表现差不多,可能是因为的冷冻干燥过程中,蛋白质不同程度的变性造成酶解产物复溶性受到一定影响。

[0088] 2.4四个酶解产物乳化能力与乳化稳定性的研究

如图8、9所示,酶解产物A、B、C、D的乳化活力逐渐增强,产物A(EAI为133.804) < 产物B < 产物C < 产物D(EAI为208.191),酶解产物A、B、C之间差异不显著性( $P > 0.05$ ),四个酶解产物的乳化稳定性之间差异不显著性( $P > 0.05$ )。乳化性的提高有利于产物在临床乳剂产品中的进一步应用。

[0089] 决定蛋白质体系乳化能力的根本是亲水性和亲油性的平衡,随酶解进一步深入,暴露出大量的疏水键,产物疏水性氨基酸的含量进一步增加,非极性键在内部形成疏水核,而亲水性氨基酸则分布在表面亲水的环境中(高育哲,2008),提升了酶解产物的表面活性,降低了界面张力。水解度越高,暴露出的疏水基越多,表面疏水性越高,界面张力越低,乳化性越好(YIN S W et al,2008;LIU X M,2005)。

[0090] 2.5四个酶解产物粘度的测定

图10表示酶解产物A、B、C、D随剪切速率增加粘度变化的曲线图,四个样品都表现出良好的假塑性流体性质,粘度值均较低,在较低的剪切速率下粘度值呈急剧下降趋势,在较高的剪切速率下,产物C的粘度值最大,产物D的粘度值最小。

[0091] 本发明酶解产物在临床营养乳剂中的应用

将酶解产物A、B、C、D按照20%的比例替代完全营养品配方(力全平)中的酪元酸钠,完全营养品配方做对照,具体配方见表3,采用高速组织匀浆机,将配置好的营养品乳剂于2,000r/min下,均质15min。测定其对乳化性和乳化稳定性的影响、稳定系数R和粘度值。

[0092] 表3完全营养品配方(力全平)基本成分表

	酪元酸钠	其他蛋白质	糖类	油脂类	复配稳定剂	复配乳化剂	复合微量元素	复合维生素
含量	2.5%	2.5%	约 11%	约 33%	0.15%	0.24%	0.15%	0.15%

注:力全平为保密配方,未列出具体成分及配比。

[0093] 1、酶解产物的替代比对乳化性和乳化稳定性的影响

酶解产物A、B、C、D在0替代时,体系的乳化活力指数为 $881.18\text{m}^2/\text{g}$ ;

酶解产物A以20%替代比时,体系的乳化活力指数为 $601.38\text{m}^2/\text{g}$ ,乳化稳定性为62.1%;

酶解产物B以20%替代比时,体系的乳化活力指数为 $594.35\text{m}^2/\text{g}$ ,乳化稳定性为

67.8%；

酶解产物C以20%替代比时，体系的乳化活力指数为750.86m<sup>2</sup>/g，乳化稳定性为64.7%；

酶解产物D以20%替代比时，体系的乳化活力指数为852.43m<sup>2</sup>/g，乳化稳定性为65.5%。

[0094] 酪元酸钠作为大分子蛋白具有很高的乳化活力，酶解产物A、B、C、D以20%替代酪元酸钠，乳化活性相比0替代比时均有所下降，但仍然具有较高的乳化活性。酶解产物D以20%替代后与0替代无显著差异，说明了酶解产物替代酪元酸钠后仍然具有较好的乳化性和乳化稳定性，复合加工要求。

#### [0095] 2、稳定性系数实验

营养品乳剂是一个复杂体系，含有蛋白质，糖类，酯类，维生素类和矿物质类等，以满足特定的能量和营养需求。在简单体系中表现出良好乳化活性和乳化稳定性的酶解产物并不一定在复杂体系中表现良好。受样品条件的制约无法将其经胶体磨后再经高压均质，本发明以高速组织匀浆机进行一个简单的模拟，对于进一步研究提供参考。

[0096] 稳定系数R：取一定量乳液于2000r/min离心5min，取中间液稀释100倍，用分光光度计及在750nm处测定吸光值A<sub>2</sub>，与离心前的吸光值比A<sub>1</sub>。

[0097]  $R = A_2/A_1$ 。

[0098] 体系的稳定性系数见表4。

[0099] 表4酶解产物替代20%蛋白体系稳定性系数R的比较

	全营养品	产物A替代	产物B替代	产物C替代	产物D替代
稳定系数R	0.7080±0.029	0.5495±0.021	0.2538±0.023	0.1600±0.012	0.538±0.0165

表4所示为四个酶解产物替代全营养品乳剂中20%的酪元酸钠，所得各体系稳定系数R的值。表4结果显示酶解产物20%比例替代酪元酸钠时，产物A和产物D在复杂体系均表现出较好的稳定性能。

#### [0100] 3、粘度值实验

粘度值用数显粘度计测定，结果见表5。

[0101] 表5酶解产物替代20%蛋白体系粘度值的比较

	全营养品	产物A替代	产物B替代	产物C替代	产物D替代
粘度	51.39±0.874	28.49±2.866	42.93±2.373	42.87±2.599	32.45±1.721

由表5结果可知，产物A、B、C、D替代体系的粘度值均较全营养品体系低。粘度值是临床营养品乳剂评价的一个重要指标，临床营养品乳剂因其特殊的功能需求，体系成分较为复杂，稳定困难，稳定剂的添加过多会使体系的粘度增加，流动性变差，无法满足临床病人需要经过鼻胃肠管或着造尿管提供营养物质的需求。产物A、B、C、D替代降低了体系的粘度值，在不经胶体磨和高压均质的工艺条件情况下仍具有良好的稳定性，可以替代全营养品中的部分蛋白。

[0102] 综上所述，本发明所获得水解产物A、B、C、D可以部分替代全营养品中的酪元酸钠，所得到的配方符合临床乳剂产品的要求，同时能够提供更为营养丰富的氨基酸和多肽。

[0103] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。



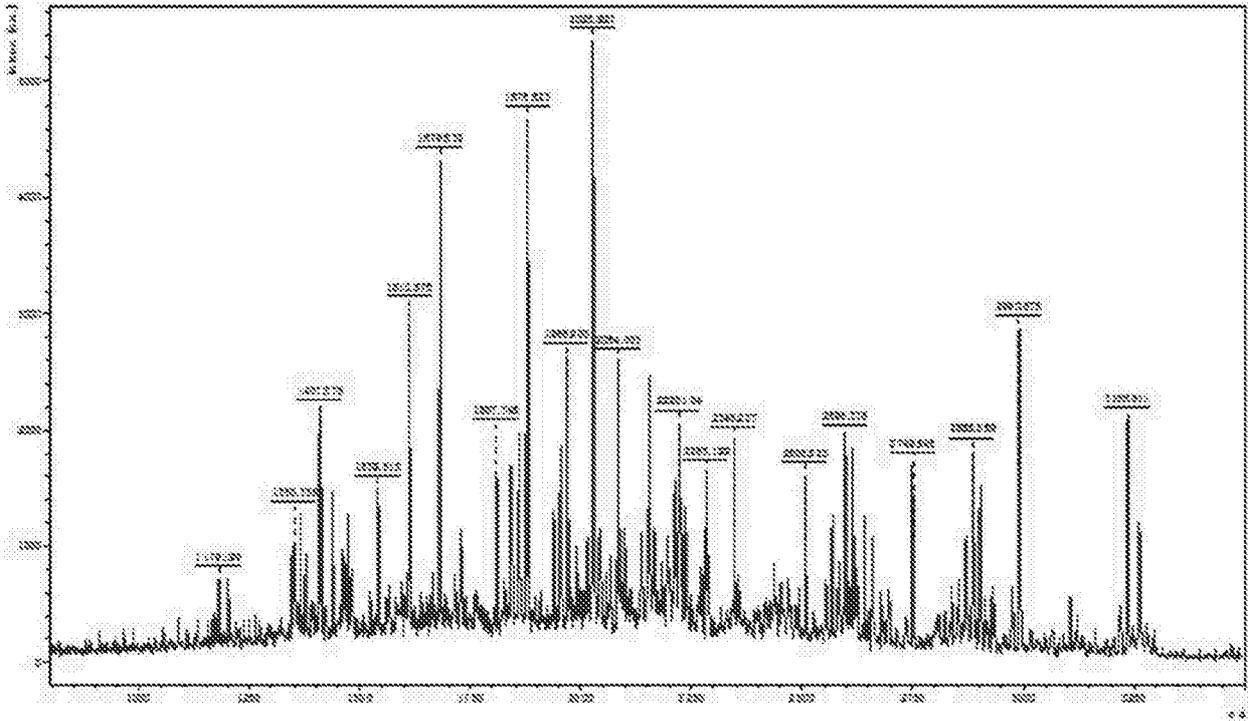


图3

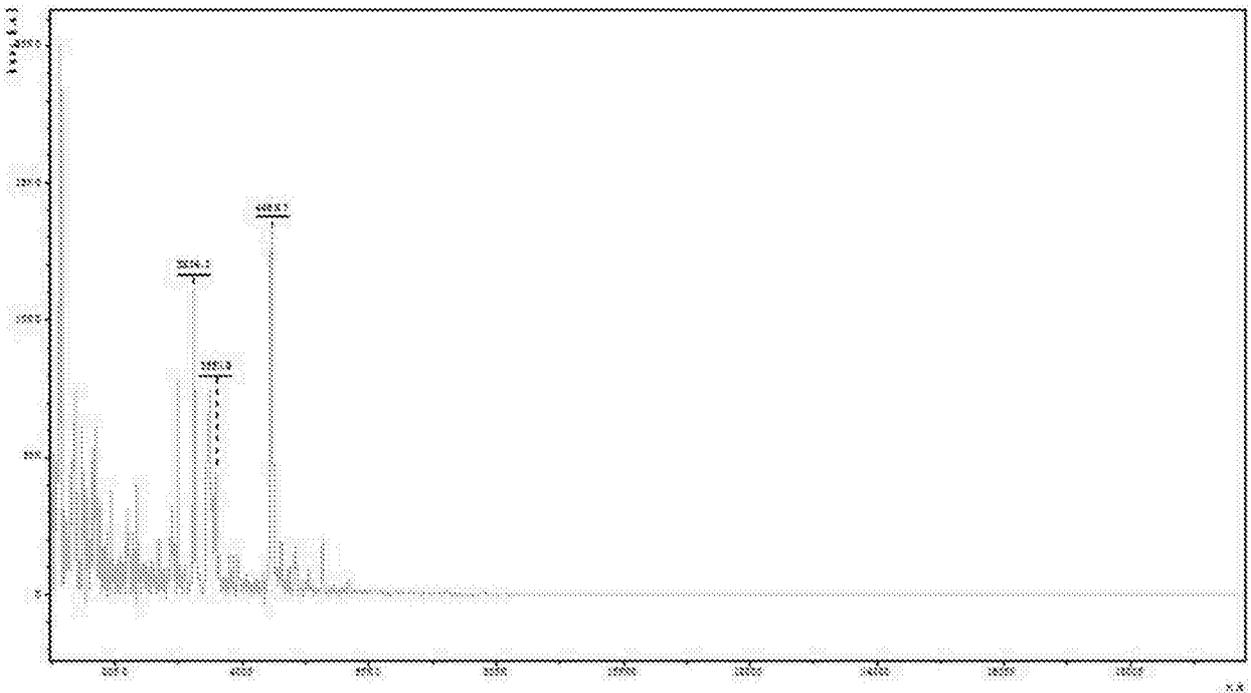


图4

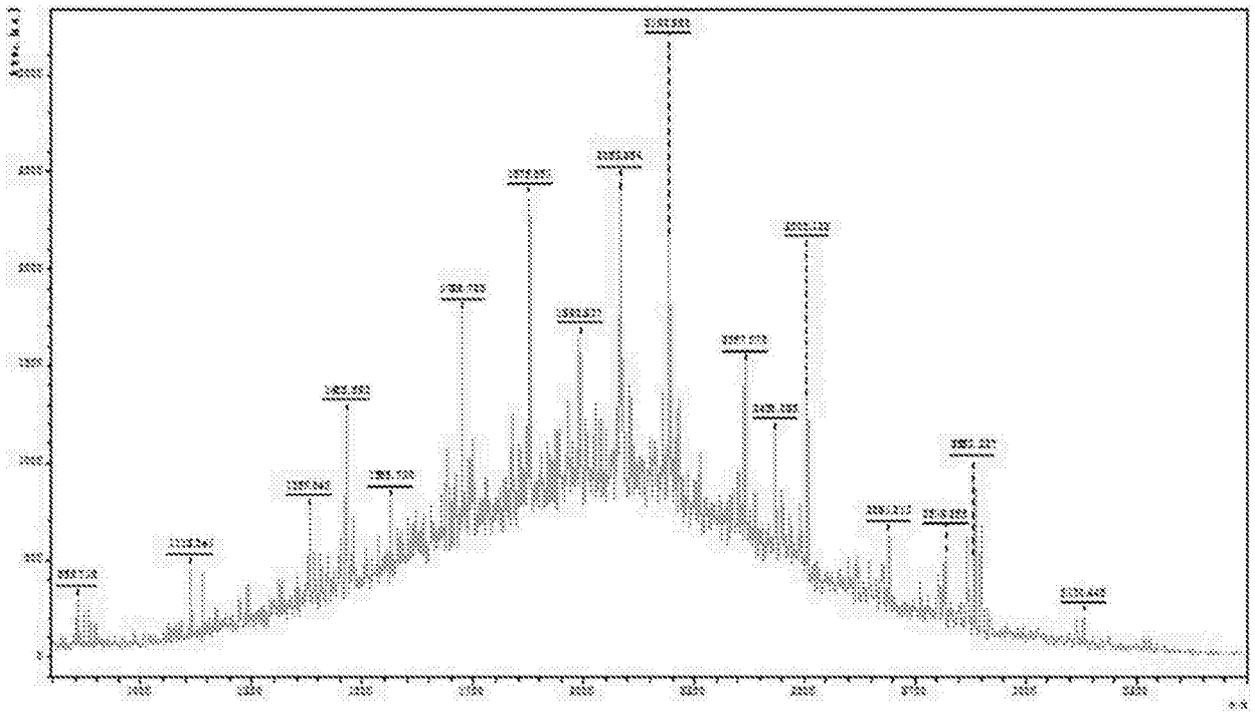


图5

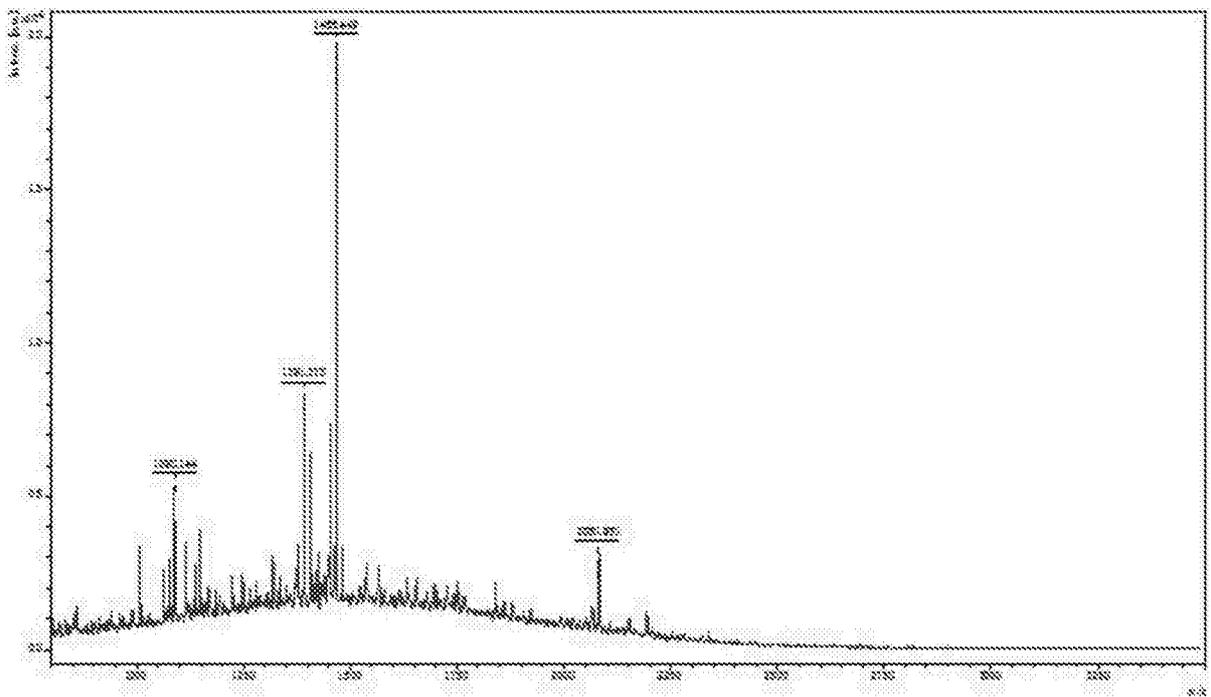


图6

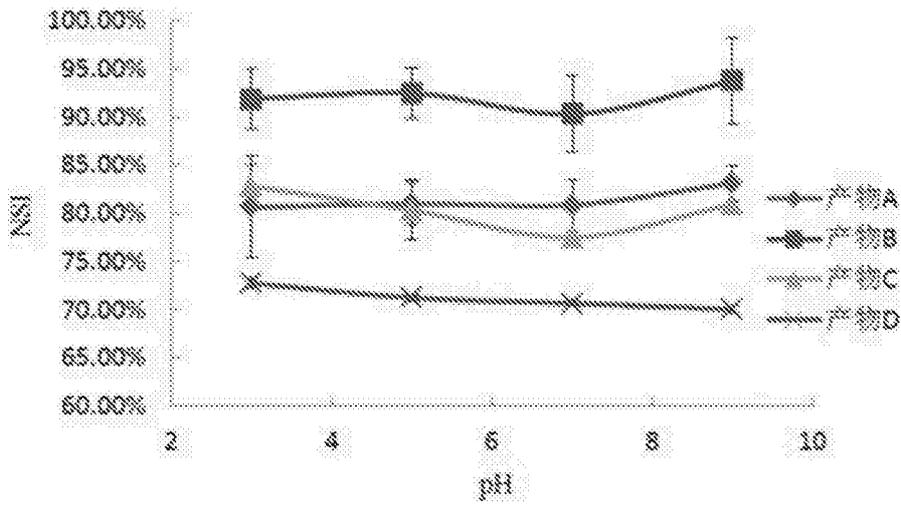


图7

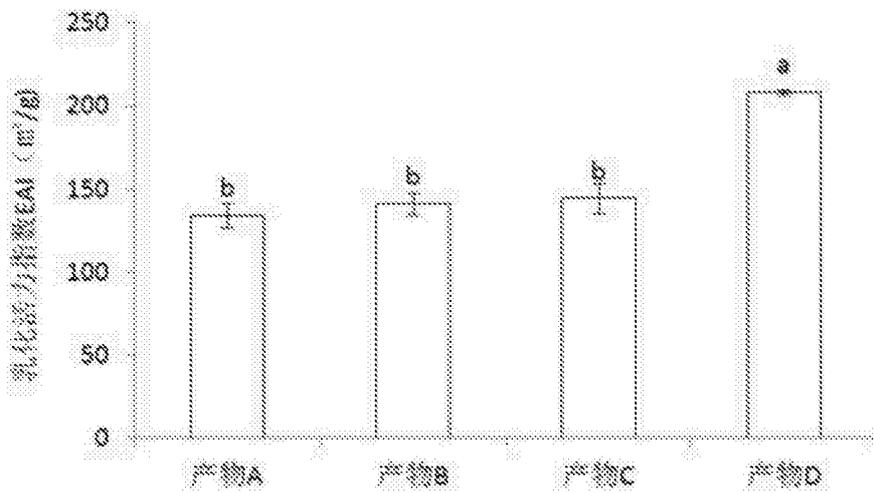


图8

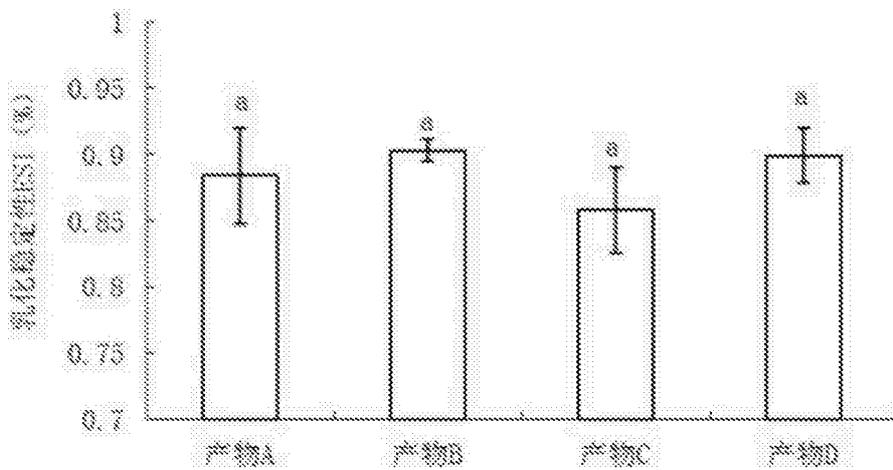


图9

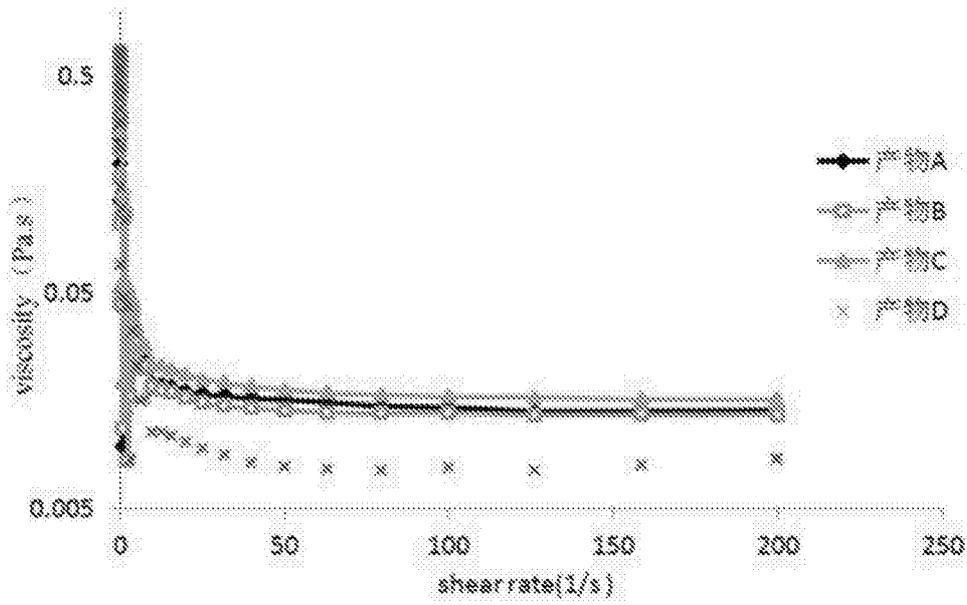


图10