

3.4 初步推断火炬果穗粗提物抗氧化有效成分为酚类物质。另外柠檬酸、抗坏血酸等有机酸性物质对火炬果穗粗提物有抗氧化协同增效作用,这也表明火炬果穗粗提物中含有酚类物质。

参考文献:

- [1] 李炎,包惠燕,等.油脂稳定性与抗氧化方法的研究[J].中国食品工业,1997,4(2):18-22.
- [2] 孟阳,于丽娟.花生壳中黄酮类抗氧化物的提取及在食品工业中的应用[J].食品科学,1997,18(12):27-29.
- [3] Cotell N, et al. Free Rad[J]. Biol Med. 1996, 20: 35-43.
- [4] Alexandre Cavin, Kurt Hostettmann, Wahjo Dyatmyko, Olivier Potterat. Planta Med. 1998, 64: 393-396.
- [5] 全国中等卫生学校统编教材《中草药化学》编写组.《中草药化学》[M].江苏科技出版社,1984,189.
- [6] 南京大学化学系有机化学教研室.《有机化学》(上册)[M].北京:人民教育出版社,1978.
- [7] 高福成,许学勤.食品分离重组工程技术[M].中国轻工业出版社,1998,752.
- [8] 万素英,赵亚军,等.食品抗氧化剂[M].中国轻工业出版社,1998,78.
- [9] Yamamoto K, et al. Biochim Biophys Acta[M], 1988, 958: 19.
- [10] 任国谱,余兵,等.蛋白质及其衍生物的抗氧化性能[J].中国油脂,1997,22(4):47-50.

青鳞鱼肌肉蛋白复合酶水解机制研究

邓尚贵^{1,2}, 杨萍²

(1. 华南理工大学食品生物工程学院, 广东 广州 510640;

2. 湛江海洋大学食品科学与工程系, 广东 湛江 524025)

摘要: 本文研究了海水鱼青鳞鱼(*Harengula Zunasi* Bleeker)肌肉蛋白由木瓜蛋白酶和风味酶复合而成的复合酶水解机制。当水解时间固定为120min时,采用正交试验法优选得到复合酶水解的适宜条件为酶浓度为 7.5×10^3 IU/g蛋白质、温度为45℃、pH6.5和底物浓度为5.5g蛋白质%。在此适宜的水解条件下,蛋白质水解度与水解时间的关系曲线类似于已公开发表的沙丁鱼、小龙虾、鲱鱼及鲑鱼的酶水解曲线;在30~210min的水解时间内,水解机理可以用三个线性方程式来描述: $DH\% = 0.026 \times \text{水解时间} + 8.85$ ($r=0.98$)、产物游离氨基酸总量 $TFAA = 0.16 \times \text{水解时间} + 38.76$ ($r=0.99$)和产物平均链长 $MLPL = 0.019 \times \text{水解时间} + 10.79$ ($r=0.96$)。产物游离氨基酸分析结果揭示了复合酶对胱氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸结合的肽键有最高特异性,而对色氨酸、脯氨酸、天门冬氨酸、丝氨酸、甘氨酸和谷氨酸有最低特异性;同时,在210min之前达到最大水解力(HC)的游离氨基酸或多或少又参与了新的肽键的形成,揭示复合酶对青鳞鱼肌肉蛋白质不仅具有水解作用而且还有合成作用。水解产物含氮量分析表明复合酶水解产物经离心、0.45 μm 和0.22 μm 微孔过滤所得到的三种类型的水解产物的含氮化合物在分子大小方面有一定的差异。分子量分析表明在30~210min的酶水解产物经离心分离后的产物的平均相对分子量没有明显的差异。在从30~210min的整个水解过程中,相对分子量在300以下和1500以上的分子数目发生了明显的变化而相对分子量为1200~1500和900~1200的分子数目却没有明显的变化。不同时刻的复合酶离心水解产物相对分子量为300~1200的分子数目占离心水解产物总分子数的百分数达到66%~78%。本研究的主要成果将会对青鳞鱼的综合利用与加工提供重要的理论基础和基本依据。

关键词: 肌肉蛋白; 青鳞鱼; 酶解; 复合酶; 机制

Mechanism Study on the Enzymolysis of Muscle Proteins from *Harengula Zunasi*

DEN Shang-gui^{1,2}, YANG Ping²

(1. College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. Department of Food Science and Engineering, Zhan Jiang Oceanography University, Zhanjiang 524025, China)

收稿日期: 2003-10-08

基金项目: 广东省科技厅重点资助项目(2KM06002S)

作者简介: 邓尚贵(1966-), 副教授, 在职博士, 研究方向为水产品深加工和食品生物技术。

Abstract: Mechanism of the enzymolysis of muscle proteins from *Harengula Zunasi* Bleeker by compound enzyme that obtained from mixture with papain and flavorease was studied. The optimum conditions of compound enzyme for enzymolysis muscle protein are at enzyme consistency 7.5×10^3 IU/g protein, temperature 45°C , pH 6.5 and substrate consistency 5.5g protein % through orthogonal trial with the constant time of 2 h. Under the optimum conditions, there are 3 linear relationship models expressed as $\text{DH}\% = 0.026 \times [\text{hydrolysis time}] + 8.85$ ($r=0.98$), TFAA (total free amino acids of hydrolysate) $= 0.16 \times [\text{hydrolysis time}] + 38.76$ ($r=0.99$) and MLPL (mean length of peptide linkage of hydrolysate) $= -0.019 \times [\text{hydrolysis time}] + 10.79$ ($r=-0.96$). The analysis of free amino acids revealed that compound enzyme has the strongest hydrolysis specificity toward the peptide linkages supplied by cysteine and phenylalanine-tyrosine and the lowest hydrolysis specificity toward the peptide bonds supplied by tryptophane, proline, asparaginic acid, serine, glycine and glutamic acid. Meanwhile, the amino acids arriving at maximum hydrolyzing capacity before 210 min may have participated in the forming of the new peptide bonds at certain extent after arriving at themselves maximum hydrolyzing capacity. The determining of nitrogen content revealed that there is significant difference of the molecule size of nitrogenous compositions among centrifugal hydrolysates, 0.45 μm hydrolysates and 0.22 μm hydrolysates at same time of a range from 30 to 210 min because their nitrogen content has significant difference. The determining of molecular weight revealed that there is no significant difference in mean of relative molecular weight of all centrifugal hydrolysates and the relative molecular weight being from 300 to 1200 is covered 66% to 78% of total of the molecule number in centrifugal hydrolysates. It is possible to give fundament and recommendations for the all-around utilization of *Harengula Zunasi* due to this work.

Key words: muscle protein; *Harengula Zunasi* bleeker; enzymolysis; compound enzyme; mechanism

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630 (2004) 03-0067-09

海水鱼青鳞鱼 (*Harengula Zunasi* Bleeker) 主要分布于菲律宾、日本、南韩和中国沿海各地, 其年产量达到了 3~4 万吨。尽管在传统上可以把它加工成盐干品、淡干品、罐头及鱼粉等, 然而, 人们一直把它看成是没有什么利用价值的低值鱼类, 因此致使这种鱼没有得到更为合理的利用与开发。近年来的研究成果发现, 青鳞鱼蛋白质含量十分丰富, 是一种值得进行广泛研究与开发的蛋白质源^[1]。如何采用现代生物技术方法充分利用青鳞鱼这一蛋白质资源? 湛江海洋大学的一个研究小组对此已经进行了近十年的研究, 已经开发了鱼肉浓缩蛋白(FPC)^[2,3]、多酶法鱼露^[4,5]、鱼蛋白饮料^[6]、下脚料水解蛋白^[7]、可溶性蛋白^[8]等等。这些研究成果为更好地利用青鳞鱼及其它具有潜在利用价值的低值鱼的开发途径提供了重要的启迪。

利用现代酶技术将鱼及未能充分利用的鱼蛋白转变为功能食品基料的鱼蛋白水解产物(FPH)已经引起了广泛的关注。FPH的生物化学生产方法既可以采用自溶法又可以采用加速水解法^[9]。自溶加工法尽管不需要酶、其操作也简单, 但它要受到鱼体自身消化酶活性的影响、加工生产周期长达几天甚至几个月^[10~12], 因此该法可能因为过长的消化水解时间反而对终产物的功能性质和生物活性肽产生不利影响而很少用来生产食用的FPH。另一方面, 商品蛋白酶的加速水解法比自溶水解法有更多优点, 因为加速水解法可对水解过程进行有控制水解, 还可以控制水解产物的功能性质。商品蛋白酶可以是来自于动物、植物和微生物的酶^[11,12]^[13~26]。加速水解制造的FPH表现出很好的功能性质, 如较高的溶解性^[27~31]、

良好的乳化性^[30, 31]、起泡性^{[22][29~30]}和持水能力^[22,29~31]。随着肽被完整吸收理论的发展以及肽更多生理功能的发现, 含有生物活性肽的FPH的研究将会引起社会的广泛关注。可是, 肽的功能性质又与酶解的模式、酶的活力以及水解度(DH)紧密相关, 因为这些方面的因子要对FPH的分子大小及疏水/亲水平衡产生重要影响。同时, 加速水解是一个十分复杂的生物化学过程, 水解时间越长、水解产物也越复杂。

本研究的主要目的是建立青鳞鱼肌肉蛋白复合酶水解的机制, 复合酶是由木瓜蛋白酶和风味酶按照一定的比例复合而成的。为了获得复合酶对青鳞鱼肌肉蛋白水解的基础数据, 本文主要包括两个方面的实验研究: 首先应用正交试验法确立在水解时间为恒定的2h时复合酶水解的最适宜条件, 其次研究在此最适宜的条件下, 变化的水解时间对DH、产物平均肽链长度(MLPL)、产物游离氨基酸变化、微过滤产物以及水解产物经离心所得到的产物的分子量的影响。

1 材料与方法

1.1 原材料

青鳞鱼, 2002年9~12月购自校园附近的市場。鲜鱼清洗干净后用小刀人工取下鱼肉片, 得到的肉片用 0°C 冰水清洗干净, 然后人工去除鱼皮和黑膜, 同时用冰水清洗干净。得到的肌肉放置于多孔筛网中去掉多余的水分。然后, 用PVC袋进行分装并贮藏于一 18°C 的冰箱中备用。得到的下脚料(包括头、骨、鱼皮及内脏等)也用PVC袋包装贮藏于一 18°C 的冰箱中以供它用。

1.2 化学试剂及酶

实验中的化学试剂均为分析纯或食品级试剂。木瓜蛋白酶(蛋白内切酶, 2000000IU/g)和风味酶(蛋白端切酶及外肽酶, 4000000IU/g)由广西南宁庞博生物有限公司提供。

1.3 实验 I

在 $L_{25}(5^4)$ 因子设计中, 起始 pH、温度、酶浓度([E])和底物浓度([S])的变化情况如表 1 所示。本实验的所有处理均限制水解时间为 120min。各因素的水平确定参考广西南宁庞博生物公司提供的木瓜蛋白酶和风味酶使用手册及课题组以前的研究成果^{[4, 5][6]}。各因素的影响程度采用 DH 的极差大小来评价, 而因素的最佳水平采用最大 DH 值对应的水平, 从而最终确立在水解时间固定为 120min 时复合酶对肌肉蛋白质的最适宜水解条件。

1.4 实验 II

按照实验 I 确立的复合酶最适宜水解条件, 研究变化的水解时间 (30~210min) 对 DH、MLPL、游离氨基酸、微过滤水解物和过滤水解物的分子量的影响。所有水解处理重复 1 次。

1.5 计算

1.5.1 $DH^{[2]}$

$$DH = (h/h_0) \times 100\% = (B-C)/(A-C) \times 100\%$$

公式中, h 是被断裂的肽键数目, h_0 是肌肉蛋白底物中总的肽键数目, A 是肌肉蛋白水解物中总的氨基氮含量, B 是水解产物中游离氨基酸氮含量, C 是原料的游离氨基酸氮含量。经测定, 青鳞鱼肌肉蛋白总的氨基氮含量为 116.5mg/g 蛋白质。因此 A 可以根据这一数值计算出来。 B 和 C 采用下述的电位滴定法进行测定^[3]。

取 10.0ml 达到既定酶解反应终点的反应液于 100.0ml 容量瓶中并用蒸馏水稀释到刻度, 接着取 20.0ml 该稀释液于 200ml 的烧杯中并加入 60ml 蒸馏水, 混匀后用 0.05mol/L 的 NaOH 在不断搅拌状态下滴定到 pH8.2。再加入 10ml 中性甲醛混匀后 0.05mol/L 的 NaOH 在不断搅拌状态下继续滴定到 pH9.2。从 pH8.2 到 9.2 消耗的碱量记录为 V_1 (ml)。空白实验是用 20.0ml 蒸馏水代替酶解稀释液重复上述操作, 从 pH8.2 到 9.2 所消耗的碱量记录为 V_2 (ml)。因此, B 可以通过下列公式计算:

$$B = [(V_1 - V_2) \times M \times 0.014 / (m \times 20/100)] \times 100\%$$

公式中, V_1 (ml) 是从 pH8.2 到 9.2 样品液所消耗的碱量, V_2 (ml) 是空白实验从 pH8.2 到 9.2 样品液所消耗的碱量, M 是碱的浓度 (mol/L), 0.014 是氮的毫摩尔质量 (g/mmol), m 是样品液中鱼肉的质量 (g)。

C 可以按照上述方法测定, 所取样品是用 10.0ml 未酶解液代替 10.0ml 酶解液。

1.5.2 平均肽链长度 (mean length of peptide linkage, MLPL)^[2]

$$MLPL = 100/DH$$

1.6 游离氨基酸分析

不同时刻的酶解产物、未酶解样品及复合酶的游离氨基酸直接采用氨基酸自动分析仪 (Water PICO TAG) 测定。游离的色氨酸用比色法测定, 其条件为: 440nm、pH5.0~5.5、柱温 55℃、反应温度 100℃、反应时间 10~15 min。

1.7 微孔过滤物含氮量

实验 II 中得到的水解产物经离心 (4000 r/min, 15min) 后再经 0.45 μ m 和 0.22 μ m 微孔过滤分别得到 0.45 μ m 和 0.22 μ m 微孔过滤水解物, 它们的含氮量用半微量凯氏定氮法测定。

1.8 离心水解物分子量测定

实验 II 中的酶解物经离心 (4000r/min, 15min) 后得到离心水解物。其分子量采用 515-type ultrahydrogel 色谱法和 Waters 410 示波器 (Waters Co. USA) 测定。测定条件分别为: 柱温 40℃、流动相 0.1mol/L NaCl、流速 0.6ml/min 及 120- 色谱柱 (分子量范围 100~5000)。

2 结果与讨论

2.1 复合酶最适宜条件

表 1 是复合酶对青鳞鱼肌肉蛋白质的水解情况。从表中看到酶浓度因子的极差 R 是最大值, 为 3.48; 其次是温度因子, 为 3.00; 第三是底物浓度因子, 为 1.66; 第四是复合比因子, 为 1.21; 极差最小的是 pH, 为 0.63。这一结果说明在所选定的因子中, 它们对青鳞鱼肌肉蛋白质的水解度的影响力顺序为: 酶浓度 > 温度 > 底物浓度 > 复合比 > pH。

此外, 表中还可看到对于酶浓度因子, $M_{K3} > M_{K4} > M_{K2} > M_{K1}$, 说明酶浓度为 7.5×10^3 U/g 蛋白质时对青鳞鱼肌肉蛋白质可产生最大的水解效果; 对于温度因子, $M_{K2} > M_{K3} > M_{K1} > M_{K4}$, 说明 45℃ 是复合酶水解青鳞鱼肌肉蛋白质的最适宜温度; 对于底物浓度因子, $M_{K3} > M_{K4} > M_{K2} > M_{K1}$, 说明 5.5g 蛋白质 % 是复合酶水解青鳞鱼肌肉蛋白质的最合适的底物浓度; 对于复合比因子, $M_{K3} > M_{K4} > M_{K1} > M_{K2}$, 说明复合比 3:1 (风味酶活力:木瓜蛋白酶活力) 是复合酶水解青鳞鱼肌肉蛋白质的最适宜比例; 对于因子 pH, $M_{K1} > M_{K3} > M_{K4} > M_{K2}$, 说明 pH6.0 是复合酶水解青鳞鱼肌肉蛋白质的最适宜 pH。

因此, 采用复合酶水解青鳞鱼肌肉蛋白质时, 对影响水解度的作用大小顺序是: 酶浓度 > 温度 > 底物浓度 > 复合比 > pH。该酶对青鳞鱼肌肉蛋白质水解的最适宜条件为: 酶浓度为 7.5×10^3 U/g 蛋白质、45℃、底物浓度为 5.5g 蛋白质 %、复合比为 3:1 (风味酶活力:木瓜蛋白酶活力) 和 pH6.0。但是, 从表 3~4 可以看到, pH 对水解度的影响是最小的因素, 各水平之间并没有明显的差异, 而且如果调整反应体系的酸碱度, 势必会增加产物成分的复杂性, 因此建议选择青鳞鱼肌肉组织匀浆液本身的 pH (6.5) 作为复合酶的最合适 pH。因此, 从生产实际出发, 可选择下列条件为复合酶水解青鳞鱼肌肉蛋白质的合适条件: 酶浓度为 7.5×10^3 U/g 蛋白质、45℃、底物浓度为 5.5g 蛋白质 %、复合比为 3:1 (风味酶活力:木瓜蛋白酶

活力)和pH6.5。

2.2 最适宜条件下水解时间对DH的影响

图1是在最适宜条件下水解时间对DH的影响关系曲线。大致包括2个区段 0~30min初始快速增加阶段和30~210min

缓慢增加阶段。第一阶段的快速增加说明有大量肽键被复合酶切断,而第二阶段的缓慢增加说明只有少量肽键被酶切断。复合酶对青鳞鱼肌肉蛋白的水解曲线类似于沙丁鱼^{[3][14]}、小龙虾^[31]、鲱鱼^[18]和鲑鱼^[21]。在较高DH时,可能存在着产物

表1 复合酶对青鳞鱼肌肉蛋白酶解的最适宜条件

实验处理	温度(°C)	[E] (10 ³ IU/g 蛋白质)	复合比 ^b	pH	[S] (蛋白质%)	DH(%)
1	40	1.5	1:3	6.0	8.2	8.84
2	40	3.0	1:2	6.5	6.6	9.27
3	40	4.5	1:1	7.0	5.5	10.21
4	40	6.0	2:1	7.5	4.7	11.26
5	40	7.5	3:1	8.0	4.1	12.21
6	45	1.5	1:2	7.0	4.7	10.22
7	45	3.0	1:1	7.5	4.1	10.17
8	45	4.5	2:1	8.0	8.2	11.56
9	45	6.0	3:1	6.0	6.6	11.81
10	45	7.5	1:3	6.5	5.5	12.34
11	50	1.5	1:1	8.0	6.6	8.63
12	50	3.0	2:1	6.0	5.5	10.78
13	50	4.5	3:1	6.5	4.7	11.57
14	50	6.0	1:3	7.0	4.1	12.17
15	50	7.5	1:2	7.5	8.2	11.93
16	55	1.5	2:1	6.5	4.1	7.51
17	55	3.0	3:1	7.0	8.2	7.62
18	55	4.5	1:3	7.5	6.6	7.38
19	55	6.0	1:2	8.0	5.5	8.15
20	55	7.5	1:1	6.0	4.7	10.4
21	60	1.5	3:1	7.5	5.5	9.05
22	60	3.0	1:3	8.0	4.7	9.07
23	60	4.5	1:2	6.0	4.1	8.83
24	60	6.0	1:1	6.5	8.2	6.79
25	60	7.5	2:1	7.0	6.6	9.81
M _{K1} ^c	10.36	8.86	9.97	10.13	9.35	
M _{K2} ^c	11.22	9.39	9.68	9.5	9.38	
M _{K3} ^c	11.02	9.91	9.24	10.01	11.01	
M _{K4} ^c	8.22	10.04	10.19	9.96	10.51	
M _{K5} ^c	8.72	11.34	10.45	9.93	10.18	
R ^d	3.00	3.48	1.21	0.63	1.66	

^a 所有处理均为 120min;

^b 复合比 = 风味酶活力 / 木瓜蛋白酶活力;

^c M_{K1}、M_{K2}、M_{K3}、M_{K4}、M_{K5} 分别代表各因素的各水平 DH 平均数;

^d R 代表各因素的极差。

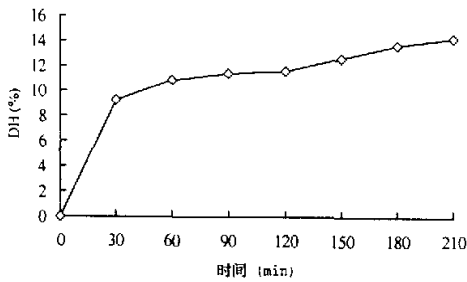


图1 最适宜条件下水解时间对DH的影响

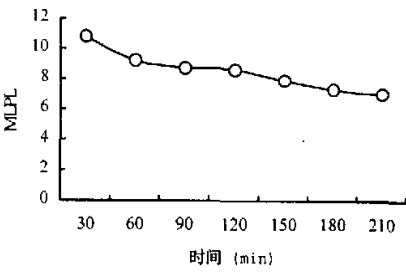


图2 水解时间对MLPL的影响

抑制作用^[30]和/或新肽键的形成作用。同时,在第二阶段,水解时间与DH之间存在着近似的线性相关关系,这种关系可以用下列方程(1)表达:

$$DH\%=0.026\times\text{水解时间}+8.85(r=0.98) \quad (1)$$

2.3 最适宜条件下水解时间对产物肽链平均长度(MLPL)的影响

图2是在最适宜条件下水解时间对MLPL的影响。在30~

210min内,整条曲线呈下降趋势,说明水解产物的MLPL随着水解时间的延长而缩短。由于水解时间与MLPL的线性相关系数 $r=0.96$,因此仍然可以用线性方程式(2)来表达水解时间与水解产物MLPL的关系曲线。

$$MLPL=-0.019\times\text{水解时间}+10.79(r=-0.96) \quad (2)$$

2.3 最适宜条件下水解时间对游离氨基酸的影响

表2是在最适宜条件复合酶在不同时刻从青鳞鱼肌肉蛋

表2 不同时刻复合酶释放出的氨基酸

氨基酸		游离氨基酸 (mmol/100g 蛋白质)						
中文	代号	30min	60min	90min	120min	150min	180min	210min
天门冬氨酸	Asp	0.86	1.05	1.39	1.60	1.11	1.25	1.56
苏氨酸	Thr	1.30	1.72	2.49	1.89	1.85	1.54	2.89
丝氨酸	Ser	0.00	0.30	1.46	1.54	0.00	0.46	0.51
谷氨酸	Glu	1.69	2.10	1.49	1.65	2.58	2.68	2.73
脯氨酸	Pro	0.25	0.41	0.42	0.53	0.45	0.46	0.46
甘氨酸	Gly	1.17	1.18	1.04	1.13	1.24	1.76	1.63
丙氨酸	Ala	3.20	4.39	2.84	3.04	3.95	5.37	4.36
胱氨酸	Cys	2.87	3.35	1.70	1.91	4.84	5.14	3.16
缬氨酸	Val	3.57	3.80	2.90	3.08	3.56	4.48	4.15
甲硫氨酸	Met	2.55	2.99	2.77	2.97	3.64	4.48	4.06
异亮氨酸	Ile	1.76	2.43	2.50	2.72	2.94	3.62	3.69
亮氨酸	Leu	5.14	6.88	5.67	6.20	7.15	9.50	8.72
苯丙氨酸+酪氨酸	Phe+Tyr	6.82	7.03	7.50	8.77	9.57	9.33	10.53
赖氨酸	Lys	0.94	0.89	3.44	3.90	4.07	5.82	5.11
组氨酸	His	2.21	2.13	1.92	2.01	2.12	2.03	2.02
精氨酸	Arg	0.40	1.03	4.93	5.20	3.16	3.10	7.28
色氨酸	Trp	0.15	0.15	0.15	0.16	0.14	0.15	0.15
总和		34.88	41.83	44.61	48.30	52.37	61.17	63.01

*表中数据为实际测定值-(原料的游离氨基酸+复合酶空白的游离氨基酸)所得结果折算为从每100g原料蛋白质中释放出的游离氨基酸的毫摩尔数; *Phe+Tyr是因为酶水解的原因而在氨基酸自动分析仪上无法分开Phe和Tyr两峰所致。

表3 复合酶对鱼肉蛋白质肽键的HC

氨基酸		HC (%)						
中文	代号	30min	60min	90min	120min	150min	180min	210min
天门冬氨酸	Asp	1.07	1.31	1.73	1.99	1.38	1.55	1.94
苏氨酸	Thr	5.53	7.31	10.58	8.03	7.86	6.55	12.28
丝氨酸	Ser	0.00	0.95	4.65	4.90	0.00	1.46	1.62
谷氨酸	Glu	1.55	1.93	1.37	1.52	2.37	2.46	2.51
脯氨酸	Pro	0.68	1.12	1.15	1.45	1.23	1.26	1.26
甘氨酸	Gly	1.57	1.58	1.39	1.51	1.66	2.36	2.18
丙氨酸	Ala	3.90	5.35	3.46	3.71	4.82	6.55	5.32
胱氨酸	Cys	54.26	63.34	32.14	36.11	91.51	97.18	59.74
缬氨酸	Val	6.23	6.64	5.06	5.38	6.22	7.82	7.25
甲硫氨酸	Met	8.84	10.36	9.60	10.29	12.61	15.52	14.07
异亮氨酸	Ile	3.84	5.31	5.46	5.94	6.42	7.90	8.06
亮氨酸	Leu	6.67	8.92	7.35	8.04	9.27	12.32	11.31
苯丙氨酸+酪氨酸	Phe+Tyr	26.82	27.64	29.49	34.48	37.63	36.68	41.40
赖氨酸	Lys	1.35	1.27	4.92	5.58	5.83	8.33	7.31
组氨酸	His	17.13	16.51	14.88	15.58	16.43	15.73	15.66
精氨酸	Arg	0.98	2.52	12.08	12.74	7.74	7.60	17.84
色氨酸	Trp	2.35	2.35	2.35	2.51	2.20	2.35	2.35

白质上释放出氨基酸的情况。如表所示,复合酶可以从肌肉蛋白质上释放出18种氨基酸,只不过存在着释放的量的多少问题。考察表中释放的总游离氨基酸(TFAA)与水解时间的关系,不难发现TFAA与水解时间之间也存在着线性相关关系($r=0.99$),因此,TFAA与水解时间之间的关系可用下列方程式来描述:

$$TFAA=0.16 \times \text{水解时间} + 38.76 (r=0.99) \quad (3)$$

为了更清楚地说明复合酶对肽键的水解情况,引入一个新的概念——水解力(hydrolyzing capacity, HC)。HC定义为复合酶从青鳞鱼肌肉蛋白质上释放出的某氨基酸的量占该氨基酸在肌肉蛋白质中总量的百分数。因此,HC揭示了复合酶断裂某一氨基酸的结合的肽键的能力大小。

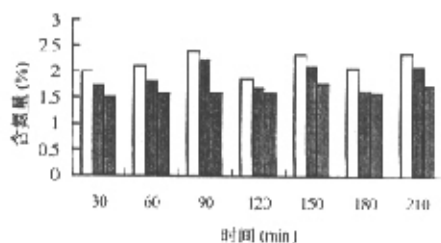
表3是复合酶对鱼肉蛋白质肽键的HC情况,从表中数据可以看出,复合酶对18种蛋白质结构氨基酸肽键的水解能力存在着明显的差异。在30~210min的水解过程中,30min达到max HC的是组氨酸,为17.13%;120min是门冬氨酸、丝氨酸、脯氨酸和色氨酸,HC分别为1.99%、4.90%、1.45%和2.51%;180min是甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、亮氨酸和赖氨酸,分别为2.36%、6.55%、97.18%、7.82%、15.52%、12.32%和8.33%;其余氨基酸都在210min时才达到max HC。除在210min达到max HC的氨基酸外,在210min前达到

max HC的氨基酸,之后HC都有不同程度的降低,说明这些氨基酸被复合酶水解为游离氨基酸后或多或少地又被用于新的肽键合成。

假设max HC>20%为高特异性、<5%为低特异性、5%~20%之间的中等特异性,则由表3可以看到复合酶对胱氨酸和苯丙氨酸+酪氨酸表现出高底物特异性;对色氨酸、门冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、丝氨酸和脯氨酸等表现出低底物特异性,对其余氨基酸表现中等底物特异性。

3.4 水解时间对微孔过滤水解物含氮量的影响

图3复合酶在最适宜条件下对青鳞鱼肌肉蛋白质进行水



□离心水解物 ■0.45 μm 微孔过滤物 ■0.22 μm 微孔过滤物

图3 水解时间对水解过滤物含氮量的影响

解得到的水解产物经离心、 $0.45\ \mu\text{m}$ 及 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔过滤后所得到的过滤液含氮量随时间的变化情况。在整个水解过程中,采用木瓜蛋白酶与风味酶的复合酶对青鳞鱼肌肉蛋白质进行酶解,所得到的水解产物的含氮量随着水解时间的延长而增加。但是,在不同的水解时刻,所得到的水解液经过离心、 $0.45\ \mu\text{m}$ 及 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔过滤所得到的过滤液在含氮量方面却有明显的差异,表现出随着过滤介质孔径的减小,其含氮量也明显减少。这一结果说明复合酶水解产物中含氮复合物分子大小之间存在着明显的差异。

3.5 水解时间对水解物离心过滤液分子量的影响

图中粗实线是累积百分数、细实线是洗脱体积对分子量对数的微分值、横坐标是相对分子量的对数值、左纵坐标是洗脱体积对相对分子量对数的微分值、右纵坐标是分子量切片的累积百分数。 $30'$ 、 $60'$ 和 $210'$ 分别代表水解30min、60min和210min的水解产物。

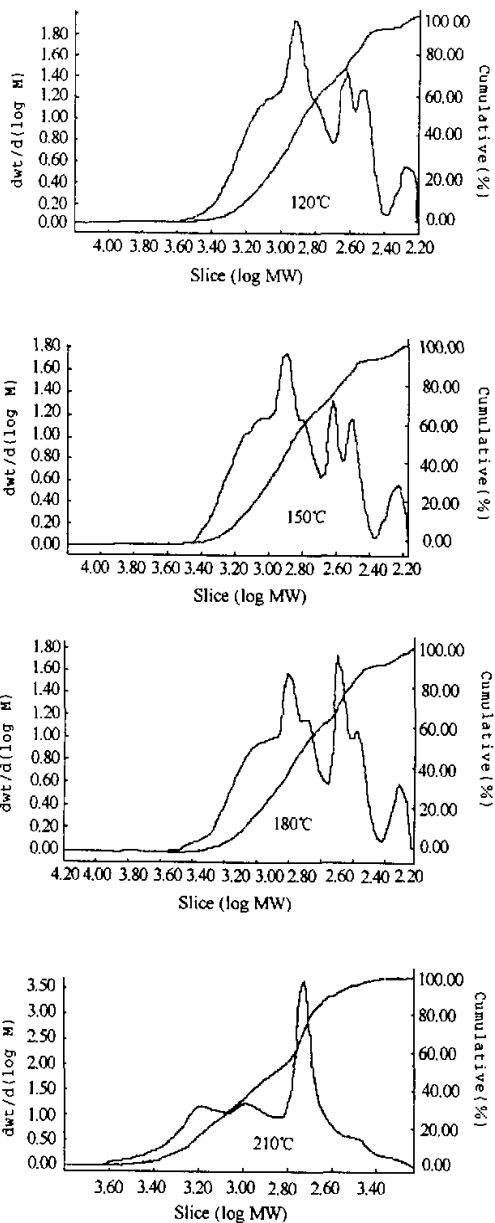
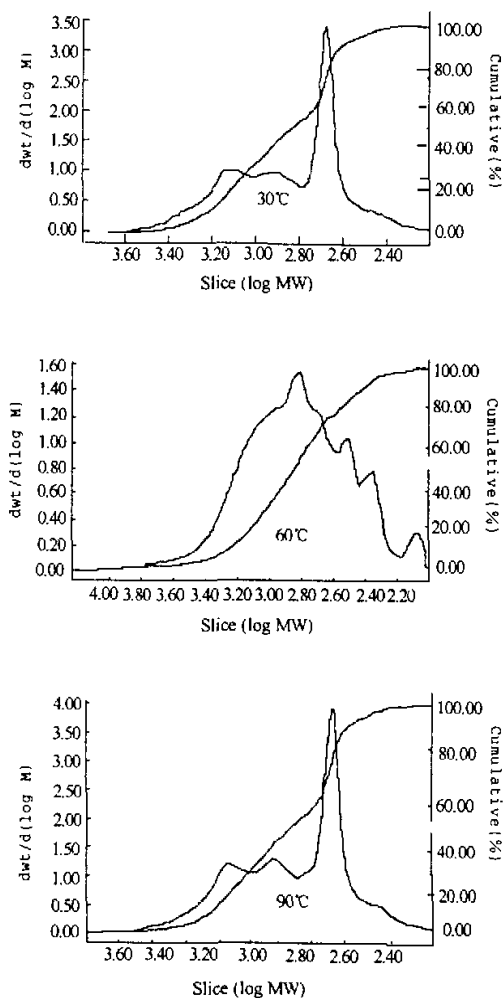


图4 复合酶对青鳞鱼肌肉蛋白水解所得到的离心液的分子量切片图

图4是复合酶在其适宜的条件下和30min至210min的整个水解过程中对青鳞鱼肌肉蛋白质水解所得到的离心液的分子量切片图。从图中可以清楚地看到,30、60、90…210min水解液经过离心后得到的离心液体的平均相对分子量没有明显的差异,它们的平均相对分子量分别是875、986、809、784、796、818和825。在整个水解过程中,随着水解时间从30min到210min的不断增加,相对分子量在300以下的分子数目有较

表4 复合酶离心水解液在某一相对分子量范围的分子的百分数

样品	相对分子量范围					
	<300	300~600	600~900	900~1200	1200~1500	>1500
30min	4	43	16	15	10	12
60min	5	34	23	16	9	13
90min	4	46	17	15	9	9
120min	16	26	28	13	10	7
150min	16	27	26	14	10	7
180min	18	30	23	13	9	7
210min	6	42	19	15	11	7

明显的增加,而相对分子量在300~600、600~900的分子数目的变化较复杂,900~1200及1200~1500的分子数目基本没有变化,1500以上的分子数目略有减少,这正是表4所反映的。在30min到210min的整个水解过程中,相对分子量为300~1200的分子数目占水解产物中总分子数目的61%到78%。

4 结 论

本文研究了复合酶对青鳞鱼肌肉蛋白质的水解机制。酶解肌肉蛋白质的最适宜条件是[E]为 7.5×10^3 IU/g蛋白质、45℃、pH6.5及[S]为5.5 g蛋白质%。在此条件下,酶水解DH、TFAA及MLPL与水解时间之间存在着近似的线性相关关系,并可用方程式分别表达为: $DH\% = 0.026 \times \text{水解时间} + 8.85$ ($r=0.98$)、 $TFAA = 0.16 \times \text{水解时间} + 38.76$ ($r=0.99$)和 $MLPL = -0.019 \times \text{水解时间} + 10.79$ ($r=-0.96$)。复合酶对胱氨酸和苯丙氨酸+酪氨酸结合的肽键有较高的特异性而对色氨酸、脯氨酸、门冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸和谷氨酸结合的肽键表现出较低的特异性。同时,复合酶还具有合成新的肽键的能力,因为在210min前达到最大水解力的氨基酸在量上都有不同程度的减少。在30~210min的整个水解时间的任何时刻得到的水解产物经离心、0.45 μ m和0.22 μ m微孔过滤后过滤液含氮量都有明显的差异,说明反应体系中含氮化合物分子大小也存在着明显的差异。对离心过滤液分子量测试表明不同时刻水解产物的离心过滤液间平均相对分子量没有明显的差异,相对分子量在1200~1500和900~1200的分子数目也没有明显的变化,而相对分子量在300以下及1500以上的分子数目却有明显的变化。在整个30~210min的水解过程中相对分子量从300到1200的分子数目占离心后的过滤液中分子总数的66%到78%。

参考文献:

- [1] 邓尚贵,章超桦,罗宏文,等.青鳞鱼HAP的试制[J].湛江水产学院学报,1996,16(2):58-61.
- [2] 邓尚贵.青鳞鱼肌肉浓缩蛋白的制取[J].上海水产大学学报,2000,9(1):40-44.
- [3] 邓尚贵.青鳞鱼肌肉浓缩蛋白的制取[J].CA,2001,134(10):

655.

- [4] 邓尚贵,彭志英,杨萍,等.多酶法在鱼露生产工艺中的应用[J].食品与发酵工业,2002,28(2):32-35.
- [5] 邓尚贵,章超桦.鱼类多酶水解方法及生产鱼露的工艺[P].中国专利00118904.
- [6] 邓尚贵,章超桦.青鳞鱼蛋白饮料的生产方法[P].中国专利00101517.
- [7] 杨萍,邓尚贵,夏杏洲,等.青鳞鱼下脚料水解蛋白的制取及营养评价[J].海洋科学,2002,26(7):54-58.
- [8] 杨萍,邓尚贵,吴育康,等.木瓜蛋白酶在青鳞鱼可溶性蛋白制造中的应用[J].湛江海洋大学学报,2002,22(6):38-41.
- [9] Mohr V. Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis. In Biochemical Aspects of New Protein Food, ed. J Alder-Nissen, B O Eggum, L Munck, H S J. Olsen, FEBS Federation of European Biochemical Societies, 11th Meeting, Copenhagen, 1977, 44:53-62.
- [10] Kubota M, Sakai K. Autolysis of Antarctic krill protein and its inactivation by combined effects of temperature and pH. Trans[J]. Tokyo Univ Fisheries, 1978, 2: 53-63.
- [11] Raa J, Gildberg A. Fish silage: a review CRC Crit Rev[J]. Food Sci Nutr, 1982, 16: 383-419.
- [12] Mukundan M K, Antony P D, Mair M R. A review on autolysis in fish[J]. Fisheries Res, 1986, (4): 259-269.
- [13] Hale M B. Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish protein[J]. Food Technol, 1969, 23:107-112.
- [14] Hale M B. Using enzymes to make fish protein concentrates[J]. Mar Fish Rev, 1974, 36: 15-19.
- [15] Cheffell C, Ahern M, Wang DIC, et al. Enzymic solubilization of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes[J]. J Agric Food Chem, 1971, 19: 155-161.
- [16] Wessels J P H, Atkinson A. Soluble protein from trash fish and industrial fish. In 27th Annual Report. Fishing Industry Research Institute, Cape Town, Republic of South Africa, 1973, 15-18.

- [17] Mackie I M. Proteolytic enzymes in recovery of proteins from fish waste[J]. *Proc Biochem*, 1974, 9(10):12-14.
- [18] Hlevia P, Whitaker J, Olott H S. Solubilization of a fish protein concentrate with proteolytic enzymes[J]. *J Agric Food Chem*, 1976, 24:383-390.
- [19] Hale M B, Bauersfield P E. Preparation of a menhaden hydrolysate for possible use as a milk replacer[J]. *Mar Fish Rev*, 1978, 40: 14-17.
- [20] Sikorski Z E, Nacz M. Modification of technological properties of fish protein concentrates[J]. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 1981, 13:201-230.
- [21] Haard N F, Feltham L A W, Heilbig N, et al. Modification of proteins with proteolytic enzymes from the marine environment. In *Modification of proteins* (Advances in Chemistry Series 198), eds R.F. Feeney & J.R. Whitaker[M]. American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1982, 223-244.
- [22] Shahidi F, Han X Q, Synowiecki J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*)[J]. *Food Chemistry*, 1995, 53:285-293.
- [23] 何建君, 张弘. 低盐液化鱼蛋白粉的研究[J]. *食品工业*, 1994, (5): 50-52.
- [24] 陈建华, 张弘. 淡水鱼制备混合氨基酸的研究[J]. *中国水产*, 1995, (1): 34-36.
- [25] Hordur G K, Barbara A R. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture[J]. *Process Biochemistry*, 2000, 36: 131-139.
- [26] Benjakul S. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 46: 3423-3431.
- [27] Hoyle N, Merritt J H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*)[J]. *J Food Sci*, 1995, 59:76-79.
- [28] Viera G H F, Martin A M, Saker S S, et al. Studies on the enzymic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* sp.) processing wastes[J]. *J Sci Food Agric*, 1995, 69: 61-65.
- [29] Onodenaloro A C, Shahidi F. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*)[J]. *J Aquat Food Prod Technol*, 1996, 5: 43-49.
- [30] Kristinsson H G, Rasco B A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 657-666.
- [31] Quaglia G B, Orban E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*)[J]. *J Sci Food Agric*, 1987, 38: 271-276.
- [32] Adler-Nissen J. A review of food hydrolysis-specific areas. In *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, ed. Adler-Nissen, J[M]. Elsevier Applied Science Publishers, Copenhagen, Denmark, 1986, 57-109.
- [33] 赵洪根, 黄慕容. 水产品检验手册[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1987, 165-166.
- [34] Quaglia G B, Orban E. Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases[J]. *J Sci Food Agric*, 1987, 38:263-269.
- [35] Baek H H, Cadwallader K R. Enzymic hydrolysis of crayfish processing by-products[J]. *J Food Sci*, 1995, 60:929-934.
- [36] Moreno M M C, Cuadrado V F. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics[J]. *Proc Biochem*, 1993, 28:481-490.
- [37] Adler-Nissen J. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*[M]. Elsevier Applied Science Publishers, 1986, 13-14.

Effect of Strain Storing and Reculturing Conditions on The *Cephalosporium* sp. Mycelium's Fatty Acid Composition

DAI Chuan-Chao YUAN Sheng SHI Yang

(The Biology Science College of Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: To get high content of docosahexaenoic acid (DHA, ω -3), the effects on the *Cephalosporium* sp. mycelium's fatty acid composition of strain storing and culturing conditions were studied. The strains containing microorganism were stored at 20 °C, 4 °C and -20 °C for different times respectively. The fatty acids were analyzed by GC. The results showed that the fatty acid composition was affected by the storing temperature, storing time no matter how the strain was activated on new agar before fermentation. If the strain was cultured on new agar before fermentation, the 10d period was the best storing time to get high

收稿日期: 2003-08-15

基金项目: 江苏省青年基金重点项目 (BQ96025); 江苏省教育厅自然科学研究项目 (03KJB180065)

作者简介: 戴传超 (1970-), 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物工程及微生物生态等方向研究。