

利用罗非鱼废弃碎肉制备低聚肽的研究

袁学会¹, 申铨日¹, 周玉莹², 孔祥莹¹, 梁琦¹, 易美华^{1*}

(1.海南大学, 海南海口 570228; 2.海南泉溢食品有限公司, 海南海口 571127)

摘要:为了利用罗非鱼废弃碎肉制备低聚肽,研究了采用酶解、膜分离和冷冻干燥等技术制备低聚肽的工艺,先通过4组单因素实验确定最佳酶,再用16组正交实验,以水解度、氮溶出率和三氯乙酸溶解指数为指标,对酶解工艺进行优化,最后对其进行膜分离和冷冻干燥。结果表明,用此工艺制得的蛋白粉总氮含量为15.8%,其中分子量小于1000u的肽占总含量的88%,符合GB/T 22729-2008对低聚肽粉的规定。

关键词:罗非鱼碎肉,低聚肽,酶制剂,膜分离

Study on the preparation of oligo peptide with the scrap chopper of Tilapia

YUAN Xue-hui¹, SHEN Xuan-ri¹, ZHOU Yu-ying², KONG Xiang-ying¹, LIANG Qi¹, YI Mei-hua^{1*}

(1.Hainan University, Haikou 570228, China;

2.Hainan Brich Aquatic Products Co., Ltd., Haikou 571127, China)

Abstract: The enzymatic hydrolysis, membrane separation and freeze drying process were used to prepare oligo peptide with the scrap chopper of Tilapia. Through 4 single-factor experiments and 16 groups of orthogonal tests, degree of hydrolysis, nitrogen leaching rate and trichloroacetic acid soluble as indexes, the enzymatic hydrolysis process was optimized. The results indicated that the process of protein powder of total nitrogen content was 15.8%, the total content of peptide was 88% which molecular weight less than 1000u. It conformed to GB/T 22729-2008 on oligopeptides power regulations.

Key words: scrap chopper of Tilapia; oligopeptides; enzyme; membrane separation

中图分类号:TS254.9

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2011)11-0264-04

中国是世界第一大罗非鱼养殖国与出口国,每年罗非鱼的产量与出口量占全世界的50%以上,海南作为全国罗非鱼最大的养殖与出口基地,罗非鱼加工产生的废弃物逐年增多,对罗非鱼废弃物进行增值加工显得日益迫切。低聚肽一般是由3~9个氨基酸组成的蛋白质前体,或是蛋白酶作用于食物蛋白后降解至含3~9个氨基酸残基的产物,分子量小于1000u^[1]。以往的观点认为,蛋白质进入机体后,最终被分解为氨基酸才能被机体吸收^[2],但是近年来随着对肽释放和吸收理论研究的深入,发现蛋白质被摄入后,并不完全水解成氨基酸,而是大部分以低聚肽的形式被吸收^[3-4],并且具有比游离氨基酸吸收快、吸收率好、耗能低、不易饱和、生物效价高等特点^[5],各种肽之间运转无竞争与抑制性,使底物对机体的不同生理状态具有更大的适应性,是沟通细胞间、血管间联系的信使,为内分泌、外分泌、神经系统

行使传递功能,从而使机体组成了高度严密的系统,保证了生物体的生长、发育和繁殖的正常进行,对改善肠道系统和术后患者的营养状况和免疫功能具有很好的作用^[6]。任玮等人的研究表明,低聚肽具有较强的抗氧化能力和自由基清除能力^[7],此外,动物实验研究表明,低聚肽具有一定的降血脂、调节血糖、增强免疫力、增加骨密度等活性^[8]。低聚肽目前已作为高端的保健食品功能配料,成为营养健康产业热点之一,国家也在近年来相继出台了相关的标准对低聚肽进行规范。通过16组正交实验确定其最佳工艺,即温度38℃、pH8.5、底物浓度15%、酶用量1%、反应时间4h,再用超滤膜对酶解液进行膜分离,得到的水解液经浓缩后进行冷冻干燥,获得活性较高的罗非鱼低聚肽粉。用此方法制得的罗非鱼低聚肽粉,经测定,总氮含量为15.8%,其中分子量小于1000u的肽占总含量的88%,符合GB/T 22729-2008对低聚肽粉的规定。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

罗非鱼碎肉 海南泉溢食品有限公司提供;碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶 广州诺维信投

收稿日期:2011-08-16 * 通讯联系人

作者简介:袁学会(1986-),男,硕士研究生,研究方向:食品资源开发与利用。

基金项目:国家科技人员服务企业行动项目(2009GJE20022)。

资有限公司; 胰蛋白酶 北京格源天润生物技术有限公司; 碱性脂肪酶 深圳绿微康生物工程公司; 浓硫酸、浓盐酸、三氯乙酸、甲醛、硫酸铜、硫酸钾、氢氧化钠、乙酸、乙酸钠、对硝基苯酚、乙酰丙酮、硫酸铵等试剂 均为分析纯; 食用白醋 广东海天调味食品有限公司。

722 分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司; LGJ-10 冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司; UF2519 超滤机 星达超滤技术有限公司; 分析天平 上海良平仪器仪表有限公司; 组织捣碎机 金坛市华诚恒磊实验仪器厂; 微孔滤膜 上海市新亚净化器件厂; 循环水式真空泵 河南省予华仪器有限公司; 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 雷磁 pH 计 上海精科仪器有限公司; HH-S26S 电热恒温水浴锅 金坛市大地自动化仪器厂; JB90-D 型强力电动搅拌机 上海标本模型厂; 移液枪 美国热电公司(Thermo)。

1.2 检测方法

- 1.2.1 蛋白质含量测定 GB/T 5009.5。
- 1.2.2 游离氨态氮的测定 采用甲醛电位滴定法。
- 1.2.3 水解度的测定 水解度(%) = 酶解液中游离氨基态氮 / 酶解液中总氮含量 × 100%。
- 1.2.4 氮溶出率的测定 氮溶出率(%) = 酶解液中总氮含量 / 碎肉中总氮含量 × 100%。
- 1.2.5 氮溶解指数(NSI)的测定 取 20mL 酶解液, 用 2mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节 pH 静置 60min 后于 4000r/min 离心分离 20min 取上清液测定总氮含量。
- 1.2.6 三氯乙酸溶解指数(TCA-NSI)的测定 将 20mL 20% 三氯乙酸(TCA)溶液加到 20mL 酶解液中, 混合振荡, 静置 60min 后于 4000r/min 离心分离 20min 取上清液测定总氮含量。

TCA-NSI(%) = 上清液中总氮含量 / 酶解液中总氮含量 × 100%

1.2.7 低聚肽含量的测定 采用 GB/T 22729-2008 中高效凝胶过滤色谱法进行测定, 即以多孔性填料为固定相, 依据样品组分分子体积大小进行分离, 在肽键的紫外吸收波长为 220nm 条件下进行检测, 使用 GCP 软件对色谱图和数据进行处理, 计算得到蛋白质水解物的相对分子量大小及分布范围, 最终得到结果。委托江南大学分析测试中心测定。

1.3 工艺流程

罗非鱼碎肉 → 脱腥 → 水煮 → 沥干 → 搅碎 → 脂肪酶脱脂 → 漂洗 → 150 目过滤 → 酶解 → 精滤 → 膜分离 → 浓缩 → 冷冻干燥

- 1.3.1 脱腥 将碎肉浸泡在 1.5% 的食用白醋溶液中, 30min 后即可用清水漂洗 15min, 去掉杂质^[8]。
- 1.3.2 水煮 将沥净的原料用 80℃ 温水处理 5min^[9], 沥干后用组织捣碎机捣碎。
- 1.3.3 脂肪酶脱脂 料液比 1:5、温度 32℃、pH8.3~8.7、碱性脂肪酶 40U/mL, 脱脂 40min^[10]。
- 1.3.4 酶解 将脱脂后的鱼糜沥干, 称量后置于洁净的烧杯中, 加入一定 pH 的缓冲溶液, 置于恒温水

浴锅中, 到达要求温度后加入一定量的酶, 反应结束后, 加热煮沸 7min, 灭酶活^[11]。

1.3.5 精滤 使酶解液在真空抽滤机上通过 2μm 的微孔滤膜, 得到清澈、微黄的透明酶解液。

1.3.6 膜分离 将精滤后的酶解液调节 pH 至 8.0~8.2, 使用 UF2519 超滤机, 使酶解液通过分子截流量为 1000u 的超滤膜, 得到含低聚肽的酶解液。清洗超滤机时, 先用 pH9~9.2 的碱液循环清洗 15min, 再用 pH2~2.5 的酸液循环清洗 15min, 最后用 50℃ 的清水循环清洗 10min。

1.4 酶类型的选择

通过四组单因素实验, 从碱性蛋白酶(Alcalase)、风味蛋白酶(Flavourzyme)、胰蛋白酶和复合蛋白酶中选择最佳酶。反应条件为底物浓度 10%、酶用量 0.5%、酶解时间 4h, 并分别在其最佳 pH 和温度(见表 1) 的情况下, 测定其三氯乙酸溶解指数及游离氨态氮含量, 考察酶解情况, 对酶的类型进行选择。

表 1 不同酶的最佳 pH 和温度

酶类型	最佳 pH	最佳温度(℃)
胰蛋白酶	8.5	38
风味蛋白酶	7.0	50
碱性蛋白酶	7.5	55
复合蛋白酶	7.0	50

1.5 正交实验

以胰蛋白酶为最佳酶, 设计 L₁₆(4⁵) 的正交实验, 因素水平表见表 2。

表 2 正交实验因素水平表

水平	因素				
	A 温度(℃)	B pH	C 底物浓度(%)	D 酶用量(%)	E 时间(h)
1	29	7.5	15	0.5	3
2	32	8.0	20	0.75	4
3	35	8.5	25	1	5
4	38	9.0	30	1.25	6

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

不同酶在相同条件下进行四组单因素实验, 测定其三氯乙酸溶解指数及游离氨态氮含量, 结果见图 1。

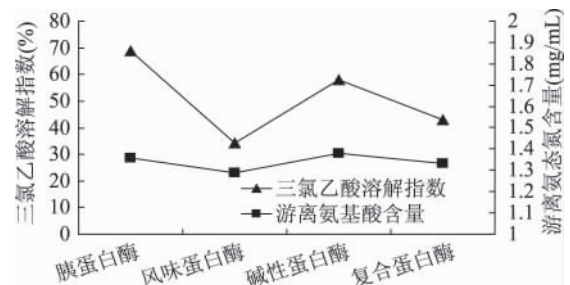


图 1 相同条件下几种酶的酶解情况

由图 1 可知, 相同条件下, 四种酶解液的游离氨态氮的含量在 1.3~1.4mg/mL 之间波动, 差距不大, 而胰蛋白酶的三氯乙酸溶解指数最高, 由此可见, 胰蛋白酶效果最突出, 为最佳酶。

2.2 正交实验结果

通过 $L_{16}(4^5)$ 的正交实验,得到了对于水解度、氮溶出率及三氯乙酸溶解指数的最佳工艺和因素主次顺序,我们采用正交实验综合平衡法对实验结果进行分析,最终得到最佳工艺和因素主次顺序,正交实验结果见表3,实验结果分析见表4。

表3 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	E	水解度 (%)	氮溶出率 (%)	三氯乙酸溶解指数 (%)
1	1	1	1	1	1	35	42.8	58
2	1	2	2	2	2	24	36.8	67
3	1	3	3	3	3	17	41	58
4	1	4	4	4	4	10	38.8	70
5	2	1	2	3	4	41	41.5	80
6	2	2	1	4	3	26	43.6	85
7	2	3	4	1	2	14	35.4	78
8	2	4	3	2	1	10	34.9	88
9	3	1	3	4	2	22	53.4	23
10	3	2	4	3	1	23	34.4	74
11	3	3	1	2	4	16	56	60
12	3	4	2	1	3	13	33.3	72
13	4	1	4	2	3	24	46	19
14	4	2	3	1	4	23	48.7	45
15	4	3	2	4	1	15	51.8	53
16	4	4	1	3	2	9	53.7	89

表4 实验结果分析

指标	A	B	C	D	E	
水解度 (%)	k_1	21.5	30.5	21.5	21.25	20.75
	k_2	22.75	24	23.25	18.5	17.25
	k_3	18.5	15.5	18	22.5	20
	k_4	17.25	10.5	17.75	18.25	22.5
	极差 R	5	20	5.5	4.25	5.25
	因素主次顺序	B > C > E > A > D				
优方案	$A_2B_1C_2D_3E_4$					
氮溶出率 (%)	k_1	39.85	45.925	49.025	40.05	40.975
	k_2	38.85	40.875	40.850	43.425	44.825
	k_3	44.275	46.05	44.5	42.65	41.825
	k_4	50.05	40.175	38.65	46.9	46.25
	极差 R	11.2	5.87	10.375	6.85	5.275
	因素主次顺序	A > C > D > B > E				
优方案	$A_4B_3C_1D_4E_4$					
三氯乙酸溶解指数 (%)	k_1	63.25	45	73	63.25	68.25
	k_2	82.75	67.75	68	58.5	64.25
	k_3	57.25	62.25	53.5	75.25	58.5
	k_4	51.5	79.75	60.25	57.75	63.75
	极差 R	31.25	34.75	19.5	17.5	9.75
	因素主次顺序	B > A > C > D > E				
优方案	$A_2B_4C_1D_3E_1$					

由正交实验结果可得到对于水解度、氮溶出率、三氯乙酸溶解指数三个不同指标的因素主次顺序和最优方案。由水解度、氮溶出率、三氯乙酸溶解指数及游离氨基态氮的计算方法可推出他们之间的数量关系,可知水解度与低聚肽的含量成反比,氮溶出率、三氯乙酸溶解指数与低聚肽含量成正比,所以在保持氮溶出率和三氯乙酸溶解指数较高的情况下,保证水解度较低。

根据正交实验综合平衡法的原则,因素的主次

顺序为 A(温度) > C(底物浓度) > D(酶用量) > B(pH) > E(时间),最佳工艺为 $A_4B_3C_1D_3E_2$,即温度为 38°C , pH 为 8.5,底物浓度为 15%、酶用量 1%,反应时间 4h,酶解后将酶解液精滤、冷冻干燥,得到低聚肽粉。用此工艺制得的低聚肽经检测总氮量为 15.2%,平均分子量为 1800u,分子量小于 1000u 的肽占总蛋白的 35%,与 GB/T 22729-2008 对低聚肽粉的规定有一定差距。

2.3 膜分离

为了使低聚肽含量达到标准要求,在最佳酶解工艺的基础上,我们采用了一种新型的分离技术——超滤膜分离技术,与传统的分离技术相比,具有能耗低、单级分离效率高、设备简单、无相变、无污染等优点^[12]。经过分离、浓缩及冷冻干燥后,得到低聚肽粉。经江南大学分析测试中心检测,样品总氮含量为 15.8%,其中分子量小于 1000u 的肽占 88% 以上,符合 GB/T 22729-2008 对低聚肽粉的规定。

表5 低聚肽分子量分布表

分子量范围 (u)	峰面积百分比 (%) $\lambda_{220\text{nm}}$	数均分子量	重均分子量
> 5000	0.12	6091	6280
5000~3000	1.23	3555	3610
3000~2000	2.17	2344	2375
2000~1000	8.04	1319	1373
1000~500	32.20	660	687
500~180	54.02	285	312
< 180	2.22	/	/

注:委托江南大学分析测试中心测试。

3 结论

3.1 罗非鱼废弃碎肉酶解制备低聚肽的最佳工艺为:温度 38°C , pH 8.5,底物浓度 15%、酶用量 1%,反应时间 4h,因素的主次顺序为温度 > 底物浓度 > 酶用量 > pH > 时间。此工艺制得的酶解液经膜分离和冷冻干燥后,得到的蛋白粉经检测总氮含量为 15.8%,分子量小于 1000u 的肽占总蛋白的 88% 以上,符合 QB/T 22729-2008 对低聚肽粉的规定。

3.2 将酶解、膜分离以及冷冻干燥等工艺相结合制备低聚肽,整个过程基本不用加热,节能、环保、无污染、高效率,对罗非鱼废弃物进行了有效地利用;并且使用膜分离技术成本低、设备简单、有利于产业化实现。

参考文献

- [1] 李小勇,李洪军.高 F 值寡肽研究进展[J].粮食与油脂,2006(6):9-11.
- [2] 林峰,马勇,徐亚光,等.基于分子量分布的食源性低聚肽品质评价[J].食品发酵与工业,2008,34(9):128-131.
- [3] 易维学,胡顺涛,姜宇.大豆低聚肽的开发与应用[J].精细与专用化学用品,2001(1):15-17.
- [4] Yamakawa M. Peptide digestion and absorption in humans: portal vein hepatic vein, and peripheral venous amino acid concentration[J].Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition,1997(6):88-91.

(下转第 269 页)

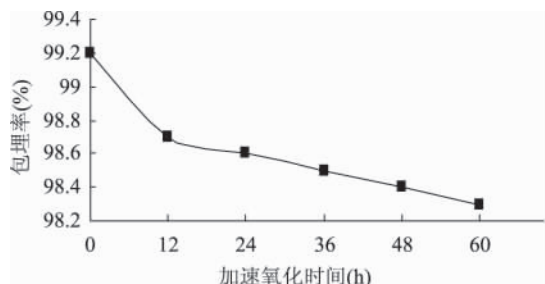


图2 包埋率随时间的变化

没有壁材的保护也更容易氧化变质。从图2中可知,制备的罂粟籽油鲜味粉样品的表面油含量低,包埋率达到了99.2%,包埋效果很好,加热氧化实验结果表明,表面油含量和油脂包埋率变化不大,这说明微胶囊的壁材成膜性好,囊壳的致密性好。

2.3.3 罂粟籽油鲜味粉过氧化值(POV)的测定 罂粟籽油微胶囊鲜味粉过氧化值是指芯材油脂-罂粟籽油的过氧化值。将罂粟籽油微胶囊鲜味粉置于60℃烘箱中进行加热快速氧化破坏实验,测定实验过程中鲜味粉过氧化值的变化,实验结果见图3。

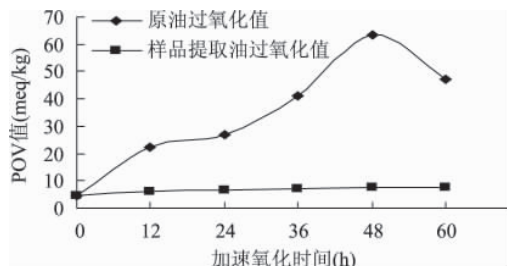


图3 鲜味粉及原料油过氧化值随时间变化值

从图3可以看出,原料罂粟籽油和鲜味粉的过氧化值相差不多,鲜味粉POV稍大于原料油的POV值,说明在制备鲜味粉即对罂粟籽油微胶囊化过程中,油脂过氧化值增加不多,工艺不会对油脂造成质量改变,工艺是可行、合理的;在整个加热实验过程中,原料罂粟籽油的过氧化值从4.53meq/kg上升到最高点63.52meq/kg,油脂已经氧化严重;然后开始下降,并不说明油脂氧化减弱,而是过氧化物从此点开始分解速度大于产生积累的速度,油脂在进一步氧化。这一曲线符合油脂氧化规律;鲜味粉的POV值上升缓慢,加热60h后,POV值仅为7.74meq/kg,符合油脂卫生标准,可以安全食用。同时,也进一步说明微胶囊化工艺可行,配方正确,壁囊致密性好即壁材成膜性好,包埋率高。

2.3.4 罂粟籽油鲜味粉酸价(AV)的测定 罂粟籽油微胶囊鲜味粉的酸价实际是指芯材油脂-罂粟籽

油的酸价,测定原料油及鲜味粉的酸价及其变化,实验结果见图4。

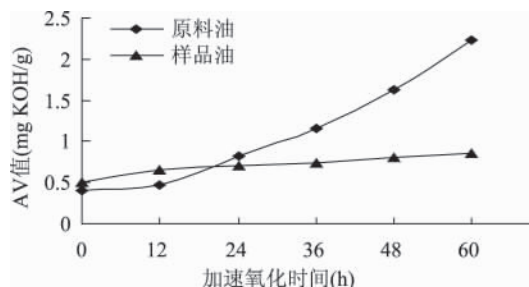


图4 鲜味粉及原料油酸价的变化

从图4可以看出,原料油酸价0.4mg KOH/g,制成鲜味粉为0.5mg KOH/g,仅上升了0.1个酸价,说明微胶囊化工艺过程不会造成油脂的过度变质,工艺可行、合理,可应用于工业生产;在60℃实验期间,原料油酸价比鲜味粉上升快,尤其在加热36h以后,原料油酸价上升速度明显加快,说明微胶囊化技术包埋保护了芯材罂粟籽油,产品配方的壁材成膜性良好。在0~12h范围内,鲜味粉的酸价上升速度稍快于原料油,这是因为鲜味粉含有表面油,即未被包埋的罂粟籽油被广泛地分布在鲜味粉颗粒的表面上,与空气接触的面积明显多于原料油。

3 结论

3.1 制备得到的罂粟籽油微胶囊鲜味粉颜色为白色,粉末细小均匀,略带罂粟籽油的清香味,入口醇鲜厚重;热水中溶解分散速度快,形成的复原乳状液表观细腻,色泽亮白,无分层结膜现象。

3.2 制备的罂粟籽油微胶囊鲜味粉,经过60℃加热加速氧化实验、对加热后小试产品复原乳状液性能进行分析,包埋率可达到99.2%、过氧化值(POV)变化值为3.21meq/kg以及酸价(AV)的变化值为0.36mgKOH/g,以上实验结果均表明,微胶囊制备工艺可行、合理,壁材成膜性好,可以应用于工业实验性生产,同时,也表明鲜味粉具有较好的贮存稳定性。

参考文献

[1]康建之.神奇的御米油[R].中国医学指南 2007(1).
 [2]吴娇,郑为完,周德红,等.粉末油脂过氧化值测定方法的研究[J].中国油脂 2006 31(7):54-56.
 [3]周德红,郑为完,吴娇,等.月见草油粉末油脂及月见草油的过氧化值在贮存期间的变化[J].食品与发酵工业 2005 31(12):153-155.

(上接第266页)

[5]樊金娟,张幼竹.植物源低聚肽研究进展[J].食品科技, 2009, 34(7):175-178.
 [6]任伟,金振涛,陈亮,等.食源性低聚肽体外抗氧化活性研究[J].食品发酵与工业 2008 34(12):44-46.
 [7]李勇.生物活性肽研究现状和进展[J].食品发酵与工业, 2007 33(1):3-9.
 [8]邓后勤,夏延斌,曹小彦,等.鱼制品脱腥技术研究进展[J].食品发酵工业 2006 32(5):109-112.

[9]黄春艳.酶解淡水鱼蛋白制取血管紧张素转化酶抑制肽的研究[D].武汉:华中农业大学 2004.
 [10]陈胜军,李来好,杨贤庆,等.脂肪酶在鲑脱脂中的应用[J].食品科学 2007 28(2):153-155.
 [11]裘迪红,周涛,戴志远,等.鲑鱼蛋白水解液脱苦脱腥的研究[J].食品科学 2001 22(5):37-39.
 [12]陈红霞.膜分离及应用展望[J].化工技术与开发 2005, 34(5):14-18.