

赵起越, 鞠馨瑶, 吴超, 等. 鳕鱼骨低苦味多肽酶解制备及其特性研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 138-144. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020040149

ZHAO Qiyue, JU Xinyao, WU Chao, et al. Preparation and Characteristics of Low-Bitter Peptides from the Enzymatic Hydrolysate of Cod Bone [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 138-144. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020040149

· 工艺技术 ·

# 鳕鱼骨低苦味多肽酶解制备及其特性研究

赵起越<sup>1,2</sup>, 鞠馨瑶<sup>1,2</sup>, 吴超<sup>1,2</sup>, 徐献兵<sup>1,2,\*</sup>, 杜明<sup>1,2,\*</sup>

(1. 海洋食品深加工省部共建协同创新中心, 辽宁大连 116034;

2. 大连工业大学食品学院, 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁大连 116034)

**摘要:** 本研究以鳕鱼骨为原料, 通过控制水解度降低鳕鱼骨酶解液的苦味, 并分析了水解物中的多肽与游离氨基酸对苦味的产生机制。结果表明通过木瓜蛋白酶适度水解 2 h, 鳕鱼骨酶解液水解度达到 7.48%, 苦味值为 5.80, 并且多肽主要分布在 1500~2000 Da; 另外, 第一次酶解后将沉淀进行高压蒸煮热处理 (121 °C, 30 min), 使鱼骨表面变得松散, 再次添加混合酶对沉淀进行酶解, 以实现鳕鱼骨的深度水解, 水解度达到 49.24%, 水解物中多肽分子量较小, 主要分布在 500~1000 Da, 苦味值为 6.03, 游离氨基酸显著高于仅一次水解后的含量。通过控制水解度从而限制了苦味的产生, 这种低苦味酶解肽的制备为其在食品中的应用奠定了基础。

**关键词:** 鳕鱼骨, 酶解, 低苦味, 多肽

中图分类号: S937.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2021)14-0138-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020040149

## Preparation and Characteristics of Low-Bitter Peptides from the Enzymatic Hydrolysate of Cod Bone

ZHAO Qiyue<sup>1,2</sup>, JU Xinyao<sup>1,2</sup>, WU Chao<sup>1,2</sup>, XU Xianbing<sup>1,2,\*</sup>, DU Ming<sup>1,2,\*</sup>

(1. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, China;

2. National Engineering Research Center of Seafood, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**Abstract:** In this study, cod bones were used as raw material. The bitterness of cod bone hydrolysate was reduced by controlling the degree of hydrolysis, and the mechanism of peptide and free amino acids in the hydrolysate on bitterness was analyzed. The results showed that the degree of hydrolysis reached 7.48% and the bitterness value was 5.80 through mild hydrolysis for 2 h. The peptides were mainly distributed between 1500 and 2000 Da. In addition, the precipitate was subjected to high-pressure cooking and heat treatment (121 °C, 30 min) to make the surface of the fish bone loose after the first enzymolysis. The degree of hydrolysis reached 49.24% and the bitterness value was 6.03 through extensive hydrolysis for 2 h. The peptides were mainly distributed between 500 and 1000 Da. Free amino acids were significantly higher than the content after only the first hydrolysis. By controlling the degree of hydrolysis to limit the production of bitterness, the preparation of this low-bitterness enzymatic peptide laid the foundation for its application in food.

**Key words:** cod bone; proteolysis; low bitterness; peptide

鳕鱼加工后, 大约占鱼重 15% 的鱼骨作为废弃物处理, 带来了重大经济损失和环境污染等问题<sup>[1]</sup>。

有研究表明, 鳕鱼骨中富含 35.8% 的蛋白质, 而脂肪含量仅有 1%, 说明鳕鱼骨是一种优质的蛋白源加工

收稿日期: 2020-04-14

基金项目: 辽宁省“兴辽英才计划”项目“海产品蛋白高质化加工关键技术及产品开发”(XLYC1802047); 大连市杰出青年科技人才项目“水产蛋白活性肽产业化制备关键技术”(2017RJ09)。

作者简介: 赵起越 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: 18342272396@163.com。

\* 通信作者: 徐献兵 (1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: xianbingxu@dlpu.edu.cn。

杜明 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: duming@dlpu.edu.cn。

原材料<sup>[2]</sup>。近年来,通过酶制剂进行蛋白质的回收利用技术愈发成熟,相比于其他水解方法,酶水解具有高效、安全、便捷等特点<sup>[3]</sup>。一些研究针对不同蛋白原料提出了各种酶解配方和技术,但酶解不当会导致苦味的产生从而影响食品的口感和品质,该问题一直困扰着蛋白酶解技术在食品产品开发中的普遍推广应用<sup>[4]</sup>。理论上苦味的产生与疏水氨基酸的暴露程度有关,控制蛋白酶解过程中疏水性氨基酸的暴露有望减少酶解液苦味的产生<sup>[5-6]</sup>。许多文献报道了酶解动物骨生产酶解肽的研究<sup>[7]</sup>,而对于鳕鱼骨酶解的研究,范巍巍等<sup>[8]</sup>在同等条件下使用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、动物蛋白酶分别对鳕鱼骨进行水解,木瓜蛋白酶获得的水解物产生的苦味最低。但是针对酶解技术的特异性,直接应用相关酶解技术参数和配方酶解鳕鱼骨无法得到满意产品,本研究主要针对鳕鱼骨这一特有蛋白原料开发低苦味酶解肽,目前没有相关技术报道。

本文以鳕鱼骨为原料,通过适度水解和深度水解的方法,以电子舌测定的苦味值为指标,监测酶解物苦味的产生。同时采用纳升液相串联四级杆飞行时间质谱(Nano-LC-Q-TOF-MS/MS)技术对不同酶解多肽进行分子结构鉴定,建立多肽结构与苦味形成

的关系,为低苦鳕鱼骨多肽产品的开发提供技术指导和理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

冰冻鳕鱼骨 青岛益和兴食品有限公司;木瓜蛋白酶( $1 \times 10^4$  U/g) 南宁庞博生物工程有限公司;碱性蛋白酶( $2 \times 10^5$  U/g) 北京索莱宝科技有限公司;风味蛋白酶( $5 \times 10^4$  U/g) 诺维信中国生物技术有限公司;胰蛋白酶( $5 \times 10^4$  U/g) 美国 Sigma 公司;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS) 上海吉至生化科技有限公司。

CF16RX II 高速离心机、LA8080 氨基酸自动分析仪、SU8010 冷冻扫描电镜 日本 Hitachi 公司;YXQ-LS-50G 自动电压力灭菌锅 上海博讯有限公司;RLPHR1-4 真空冷冻干燥机 德国 Marin Christ 公司;UDK129 自动凯氏定氮仪 北京盈盛泰科技有限公司;TS-5000Z 电子舌 日本 Insent 公司;Impact II Q-TOF 质谱仪 布鲁克科技有限公司;EASY-Nlc 1200 纳升液相 赛默飞世尔科技公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 鳕鱼骨蛋白的水解 鳕鱼骨水解的工艺流程见图 1。

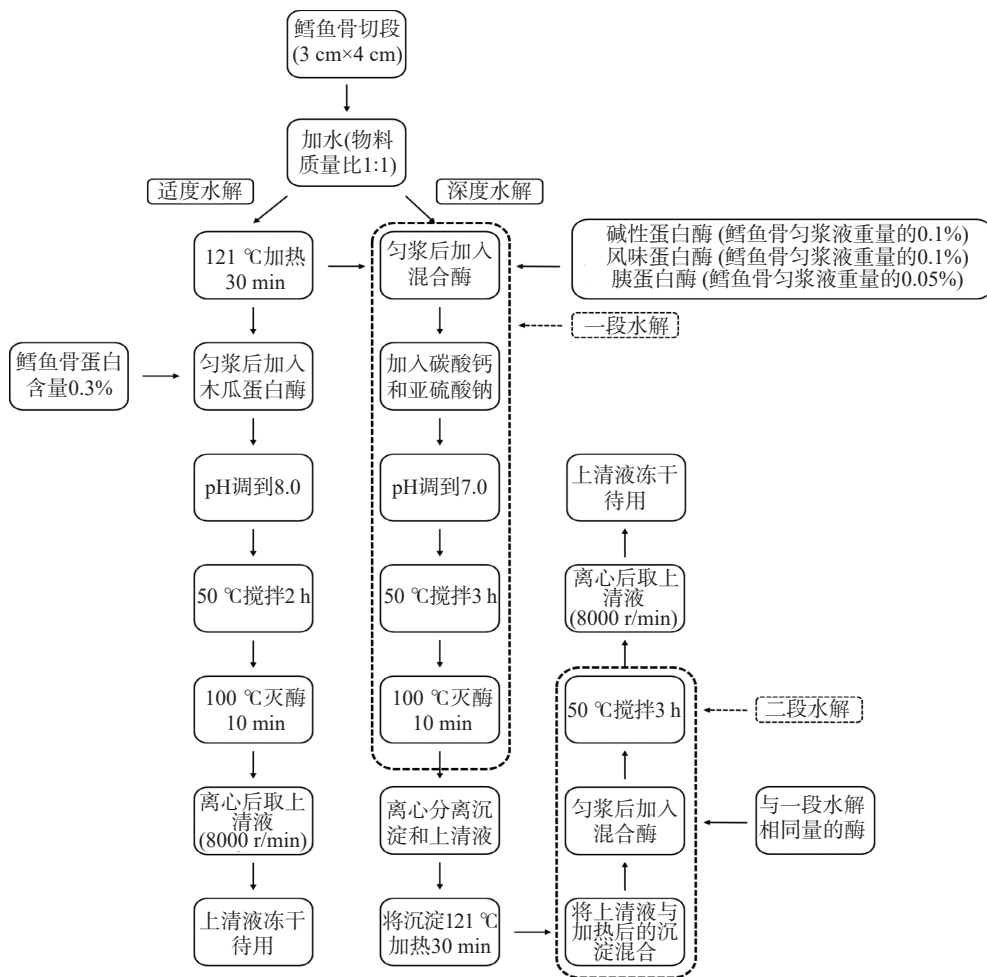


图 1 鳕鱼骨水解的工艺流程

Fig.1 The process flow diagram of cod bone hydrolysis

1.2.2 水解度的测定 参考周慧江等<sup>[9]</sup>的方法,将水解上清液稀释 100 倍,取 100  $\mu\text{L}$  稀释液加入试管中,添加 900  $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲液(pH8.2)补充至 1 mL,加入 2 mL 的 TNBS(0.05%)溶液,振荡混匀后避光在 50  $^{\circ}\text{C}$  下反应 60 min,加入 4 mL 的 0.1 mol/L HCl 终止反应后,在 340 nm 波长下测定吸光度。以 L-亮氨酸作为标准品绘制标准曲线,在 0~60 mmol/L 范围内绘制标准曲线。拟合的线性方程为: $y=0.0112x+0.0892$ ,  $R^2=0.9991$ 。x 为氨基质量浓度(mmol/L), y 为吸光值。

$$\text{DH}(\%) = \frac{A_{N_2} - A_{N_1}}{N_{\text{pb}}} \times 100$$

式中:DH 为水解度(%);  $A_{N_1}$  为蛋白水解前氨基氮含量(mmol/g);  $A_{N_2}$  为蛋白水解后氨基氮含量(mmol/g);  $N_{\text{pb}}$  为蛋白底物中肽键氮含量(mmol/g)。

1.2.3 蛋白质含量的测定 根据 GB5009.5-2010<sup>[10]</sup>方法进行蛋白质含量的测定。

1.2.4 冷场扫描电镜 将 5  $\mu\text{g}$  酶解后的鳕鱼骨冻干粉均匀涂抹在胶条上,并贴在样品台上,喷金后在真空下通过气锁传送装置转移到舱室中心,并在观察前以 80 kV 的电压进行传导,在 5 kV 的电压下获得扫描电子显微镜图像。

1.2.5 电子舌的测定 取 30 mL 水解上清液放置在样品杯中,电子舌开始测定前,对鲜味(AAE)、咸味(CTO)、酸味(CAO)、苦味(COO)和涩味(AE1)这五种电极传感器进行 24 h 的活化,然后将传感器完全浸入到样品杯中进行测定,每个样品测定三次取平均值。

1.2.6 游离氨基酸的测定 将水解上清液以 10000 $\times$ g 离心 10 min 除去不溶物,然后加入等体积的丙酮,并以 10000 $\times$ g 再次离心除去大蛋白,干燥后加入同等体积的 0.02 mol/L HCl,通过 0.20  $\mu\text{m}$  的滤膜进行过滤。处理过的样品通过 Hitachi 高性能阳离子交换柱(柱温 57  $^{\circ}\text{C}$ )进行分析,衍生温度 135  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相流速为 1 mL/min。

1.2.7 多肽序列的测定 水解产物用 Cleanert S C18-SPE 色谱柱进行脱盐处理<sup>[11]</sup>,将脱盐的水解物干燥后溶解在 0.1% 的甲酸水中。载有 4  $\mu\text{L}$  的样品通过纳升液相上的 PepMap C<sub>18</sub> 柱(2  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}\times$ 15 cm)进行分离,流速为 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。流动相 A 为超纯水,流动相 B 为 80% 的乙腈,分别向 A 相和 B 相中添加 0.1% 甲酸。0~82 min 时,流动相 B 从 9% 增加至 90%; 82~90 min 时,流动相 B 从 90% 降至 2%; 90~95 min 时,流动相 B 从 2% 增加至 9%。洗脱后,通过 Q-TOF-MS/MS 质谱鉴定分离出的化合物。峰的标记和肽段的鉴定通过 Mascot v1.4.0.38 软件进行。分析质荷比范围为 50~2200。每个样品进行三次重复分析。蛋白质数据库来自 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>。

## 1.3 数据处理

本研究采用 SPSS 16.0 软件进行显著性分析,各组数据均取平均值,  $P<0.05$  表示差异显著。所有数据均使用 Origin 8.5 软件分析数据并作图。每组数据重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 鳕鱼骨蛋白水解对苦味的影响

2.1.1 适度水解不同时间下水解度以及苦味和涩味的变化 如图 2 可知,鳕鱼骨水解度在 0~180 min 增加较快,180~240 min 时基本趋于稳定。如图 3A 可知,在 120 min 之前,水解度的增加没有引起苦味的显著变化,直到 180 min 时,酶解物中的苦味具有显著性提高( $P<0.05$ ),并且之后苦味也随着时间的增加而增加。如图 3 所示,对照组(0 min)与第 60 min 和第 120 min 时的苦味值无显著性差异,苦味值分别为 6.1、5.9 和 5.8,这可能由于水解时间过短,水解不完全导致一些具有苦味特征的短肽没有暴露,苦味值没有显著性的变化。同时,60 min 时电子舌测定的涩味值为 13.27,120 min 时涩味值为 11.67(图 3B),因此在 120 min 时,酶解液具有很低的苦味强度,并且涩味相比于对照组(0 min)也有了显著性的降低,所以在 120 min 时鳕鱼骨酶解液具有较好的风味特征。综上所述,当水解时间达到 120 min,水解度达到 7.48% 时,酶解物无明显的苦味特征。

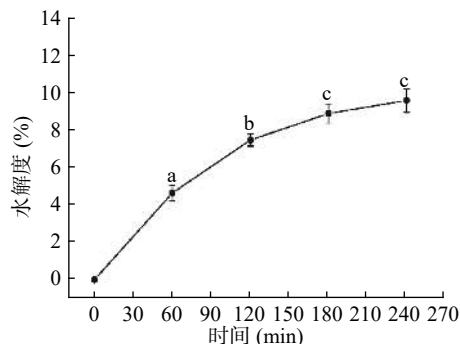


图2 适度水解不同时间下水解度的变化

Fig.2 The change of the degree of hydrolysis under different time of mild hydrolysis

注:图中小写字母不同表示不同组之间差异显著( $P<0.05$ );图3-图4同。

2.1.2 深度水解不同时间下水解度以及味道值的变化 通过碱性蛋白酶、风味蛋白酶和胰蛋白酶对鳕鱼骨进行深度水解,但由于骨类物质特殊的刚性结构,水解效率会受到限制,如猪骨在中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶的作用下水解度仅能达到约 14%<sup>[12]</sup>,本实验通过两步水解解决了鳕鱼骨水解效率低的缺点。如图 4 所示,加入混合酶后 2 h 水解度趋于平稳,在第 2~3 h 虽然水解度有显著性的提升( $P<0.05$ ),但从趋势上看,水解度趋于平稳,已经达到了平衡的状态(一段水解)。将第一段水解的鳕鱼骨沉淀高压蒸煮 30 min 后,继续加混合酶进行水解,发

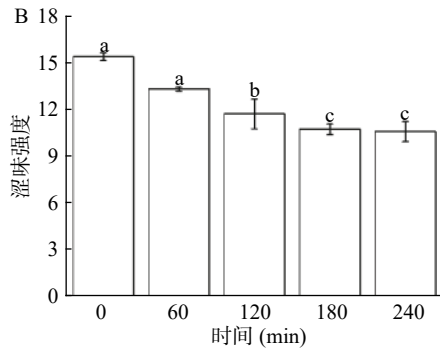
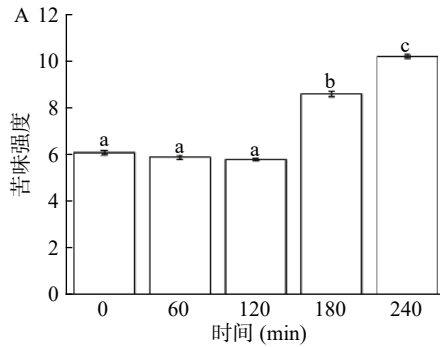


图 3 适度水解不同时间下苦味强度和涩味强度的变化  
Fig.3 The change of bitterness intensity and astringency intensity under different time of mild hydrolysis

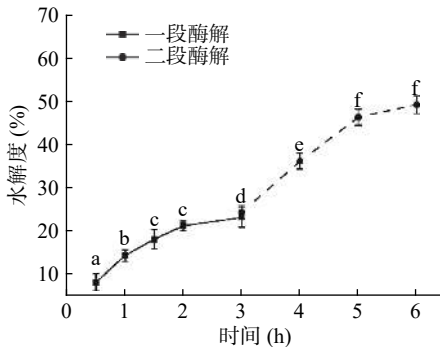


图 4 深度水解不同时间下水解度的变化  
Fig.4 The change of degree of hydrolysis under different time of extensive hydrolysis

现水解度有较为显著的增加, 直至第 6 h 趋于平衡, 此时水解度高达 49.24%(二段水解)。

如图 5 所示, 将一段水解与二段水解后的鳕鱼骨沉淀进行对比, 发现一段水解后鳕鱼骨表面呈现约 100 nm 的长条纹路, 二段水解后鳕鱼骨表面呈现约 20 nm 的圆形颗粒。这表明高压蒸煮有效地软化了鳕鱼骨的刚性结构, 使混合酶能够更深入地对底物进行水解, 促进水解度的增加。同时测定鳕鱼骨及其一段水解与二段水解后沉淀中的蛋白含量, 鳕鱼骨原料(干重)中的蛋白质含量为 59.65%, 第一阶段水解后, 沉淀物中(干重)蛋白质的含量减少到 14.26%, 而二段水解后蛋白质含量减少到 9.36%, 说明深度水解的方式可以提高鳕鱼骨蛋白质的水解效率, 从而提高水解度, 达到深度水解的效果。

如表 1 所示, 对一段水解与二段水解后的上清

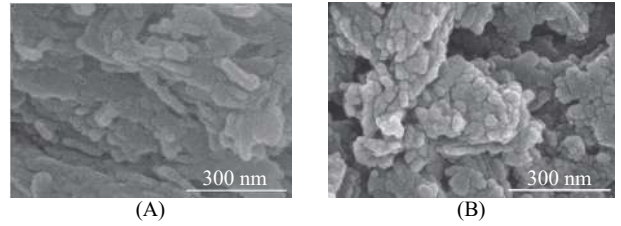


图 5 一段酶解后(A)与二段酶解后(B)鳕鱼骨表面的扫描电镜图(150000×)

Fig.5 The scanning electron micrograph of cod bone surface after the first (A) and second (B) enzymolysis(150000×)

液进行了味道值的电子舌测定, 二段水解后的综合味道值要优于一段水解后, 尤其苦味显著降低( $P < 0.05$ ), 这可能由于长链肽的进一步水解使多肽中的疏水性氨基酸残基水解成游离氨基酸, 而游离氨基酸对苦味无明显影响<sup>[13-14]</sup>, 导致苦味的降低。游离氨基酸的产生对鲜味的变化具有较大的影响, 如谷氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸这些呈味氨基酸的增加会导致鲜味上升<sup>[15]</sup>。随着水解度的增加, 大量的盐类物质也会随之产生, 这些物质促使着水解物咸味的增加<sup>[16]</sup>。深度水解后的味道变化有利于其在食品中进行应用, 通过水解达到增鲜、减咸、减苦的效果, 并且避免了其他物质的添加, 更有利于健康以及现代食品的加工理念<sup>[17]</sup>。

表 1 两段式酶解后鳕鱼骨酶解上清液电子舌味道值  
Table 1 The taste value of enzymatic supernatant electronic tongue after the second enzymolysis

	苦味	涩味	鲜味	咸味
一段酶解	7.33±0.26 <sup>a</sup>	0.95±0.13 <sup>a</sup>	15.98±0.05 <sup>a</sup>	0.39±0.33 <sup>a</sup>
二段酶解	6.03±0.45 <sup>b</sup>	0.55±0.25 <sup>b</sup>	16.64±0.18 <sup>b</sup>	1.31±0.25 <sup>b</sup>

注: 同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.2 深度水解对鳕鱼骨水解物游离氨基酸的影响

深度水解是通过游离氨基酸的无苦特性降低蛋白水解物中的苦味, 当鳕鱼骨水解度达到 49.24% 时, 大量的疏水性氨基酸残基会转化为游离氨基酸, 如表 2 所示, 在一段水解中, 丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸这六种疏水性游离氨基酸占总游离氨基酸含量的 36.09%, 进行深度水解后, 六种疏水性氨基酸的含量相比于一段水解时上升幅度分别为 39.51%、92.25%、67.45%、48.78%、41.31%、21.43%, 并且疏水性游离氨基酸占总游离氨基酸含量的 37.09%。这表明多肽中的一些疏水性氨基酸残基被水解成游离氨基酸, 导致酶解液中疏水性多肽的降低, 从而抑制了苦味的产生。

## 2.3 适度水解与深度水解的鳕鱼骨多肽对苦味的影响

通过 Nano-LC-Q-TOF-MS/MS 对多肽分子量的分布进行研究, 如图 6 所示, 对适度水解和深度水解的多肽分子量进行排布, 发现无论适度水解还是深度水解, 多肽的分子量主要都在 500~3000 Da 的范围内。木瓜蛋白酶进行适度水解时, 多肽主要集中

表2 两段式酶解后鳕鱼骨酶解上清液游离氨基酸的含量  
Table 2 The free amino acid content of cod bone hydrolysate supernatant after the second enzymolysis

氨基酸	一段水解 (nmol/L)	二段水解 (nmol/L)	上升幅度 (%)
天冬氨酸(Asp)	17.97±0.22	30.85±1.13	71.68
苏氨酸(Thr)	9.21±0.28	12.13±0.65	31.70
丝氨酸(Ser)	10.73±0.09	14.40±0.86	34.20
谷氨酸(Glu)	6.23±0.56	9.33±0.12	49.76
脯氨酸(Pro)	15.96±6.75	21.24±3.37	33.08
甘氨酸(Gly)	1.80±1.20	3.92±0.35	117.78
丙氨酸(Ala)	36.78±2.88	51.31±1.89	39.51
半胱氨酸(Cys)	8.17±1.75	12.70±1.47	55.45
缬氨酸(Val)	11.61±2.63	22.32±0.99	92.25
蛋氨酸*(Met)	3.41±0.30	5.71±0.57	67.45
异亮氨酸*(Ile)	17.16±0.23	25.53±0.84	48.78
亮氨酸(Leu)	23.99±2.87	33.90±7.36	41.31
酪氨酸(Tyr)	51.58±2.32	57.15±0.37	10.80
苯丙氨酸*(Phe)	75.87±2.96	92.13±1.18	21.43
赖氨酸(Lys)	28.63±2.56	40.57±2.87	41.70
组氨酸(His)	2.06±0.51	2.55±0.49	23.79
精氨酸(Arg)	146.67±1.50	186.72±2.68	27.31

注: \*为疏水性氨基酸。

分子量要大于深度水解,并且木瓜蛋白酶的作用位点位于赖氨酸残基和精氨酸残基<sup>[18-19]</sup>,赖氨酸和精氨酸并不是疏水性氨基酸,这会促使一些疏水性氨基酸残基位于肽链内部,并且多肽的卷曲也可能使一些疏水性氨基酸残基隐藏在肽链内部,促使苦味降低。在深度水解时,由于酶切作用点的增加和两段式水解的技术手段,深度水解的多肽分布基本上以短肽为主,更导致了疏水性氨基酸残基转化成游离氨基酸,这是促使深度水解苦味较低的主要因素<sup>[5,20]</sup>。通过不同技术手段进行苦味控制,这种简便、安全的技术可以应用于食品加工中,适度水解液的多肽分子量较大,具有良好的乳化性和起泡性,可以用于乳液方面的研究<sup>[21-22]</sup>;深度水解液的多肽分子量较小,游离氨基酸含量较高,拥有较好的活性和鲜味,可以广泛应用于调味料、保健食品等方面的开发<sup>[23]</sup>。

由表3、表4可知,将适度水解和深度水解后鳕鱼骨酶解物中数量较多的30种肽段进行研究。总体上,无论适度水解还是深度水解,多肽主要都来自胶原蛋白、肌球蛋白和肌动蛋白,尤其是胶原蛋白居

表3 适度水解后鳕鱼骨酶解物的多肽序列

Table 3 The polypeptide sequence of cod bone hydrolysates after mild hydrolysis

肽段	分子量(Da)	蛋白来源
LVVDGVK	728.4433	肌酸激酶M型
EAPLNPK	767.4161	肌动蛋白
IIAPPER	794.4624	肌动蛋白, α-骨骼肌
KLEGDLK	801.4564	肌球蛋白重链, 骨骼肌
FAGDDAPR	847.3817	肌动蛋白, α-骨骼肌
LQLVDKL	942.5384	肌球蛋白重链, 骨骼肌
IHLDDALR	951.5119	肌球蛋白重链, 骨骼肌
AGFAGDDAPR	975.4393	肌动蛋白, α-骨骼肌
STPHFVR	979.4984	肌球蛋白重链, 骨骼肌
LTEAPLNPK	981.5467	肌动蛋白, α-骨骼肌
EQIDNLQR	1014.5072	肌球蛋白重链, 骨骼肌
FAGDDAPRAV	1017.4872	肌动蛋白, α-骨骼肌
RDLTDYLM	1041.4806	肌动蛋白, α-骨骼肌
LGEQIDNLQR	1184.6104	肌球蛋白重链, 骨骼肌
GSLEQEKLLR	1186.6640	肌球蛋白重链, 骨骼肌
HHTFYNELR	1215.5793	肌动蛋白, α-骨骼肌
DLTDYLMKIL	1223.6437	肌动蛋白, α-骨骼肌
NWDDMEKIW	1235.5254	肌动蛋白, α-骨骼肌
ELEEISERLE	1245.6106	肌球蛋白重链, 骨骼肌
RDLTDYLMKI	1266.6615	肌动蛋白, α-骨骼肌
TNWDDMEKIW	1336.5770	肌动蛋白, α-骨骼肌
WDDMEKIWHHTFY	1806.7776	肌动蛋白, α-骨骼肌
GIITNWDDMEKIWHH	1893.8829	肌动蛋白
RDLTDYLMKIL	1395.7397	肌动蛋白, α-骨骼肌
LGEQIDNLQRVK	1411.7757	肌球蛋白重链, 骨骼肌
NWDDMEKIWHH	1509.6456	肌动蛋白, α-骨骼肌
NWDDMEKIWHHT	1610.6924	肌动蛋白, α-骨骼肌
WDDMEKIWHHTF	1643.7162	肌动蛋白, α-骨骼肌
DLQHRLEAEQLAL	1650.8277	肌球蛋白
NWDDMEKIWHHTF	1757.7578	肌动蛋白, α-骨骼肌

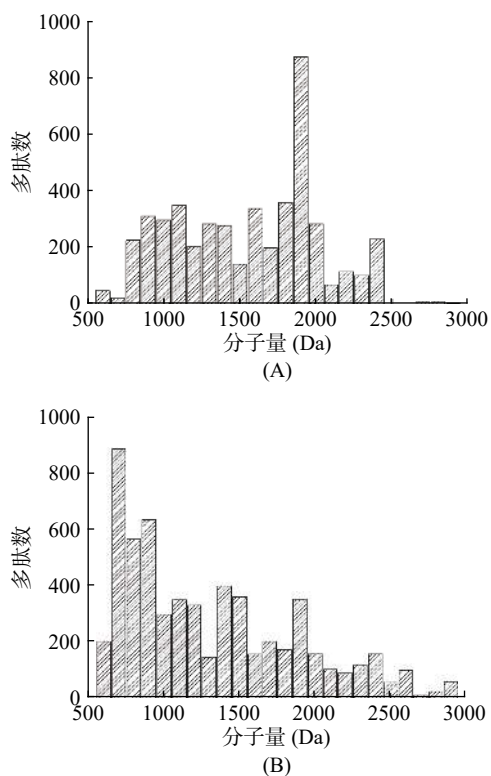


图6 适度水解(A)与深度水解(B)后鳕鱼骨酶解液中多肽分子量的分布

Fig.6 The molecular weight distribution of cod bone hydrolysates after mild (A) and extensive (B) hydrolysis

在 1000~2000 Da 的范围内,并且在 1800~1900 Da 的范围内多肽含量最高,大于 2000 Da 的多肽数量较少。在混合酶作用下的深度水解中,多肽数量主要集中在 500~1500 Da 的范围内,并在 600~700 Da 的范围内出现了峰值。综上所述,适度水解后的多肽总体

表 4 深度水解后鳕鱼骨酶解物的多肽序列  
Table 4 The polypeptide sequence of cod bone hydrolysates after extensive hydrolysis

肽段	分子量(Da)	蛋白来源
GAPGPAG	525.2548	胶原 $\alpha$ -1(I)链
AGAPGPA	539.2696	胶原 $\alpha$ -1(I)链
GAEGAPG	557.2469	胶原 $\alpha$ -1(I)链
ANGLAGA	573.2981	胶原 $\alpha$ -1(I)链
GAPGPAGAR	752.3880	胶原 $\alpha$ -1(I)链
APPHIFS	767.3970	肌球蛋白
GPPGPTG	581.2809	胶原 $\alpha$ -1(I)链
GHRGFTG	730.3507	胶原 $\alpha$ -1(I)链
GAPGPQG	582.2762	胶原 $\alpha$ -1(I)链
GPSGNIG	600.2865	胶原 $\alpha$ -1(I)链
RGPPGPM	710.3534	胶原 $\alpha$ -1(I)链
ASGPAGPR	711.3659	胶原 $\alpha$ -1(I)链
TEAPLNPK	868.4612	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
GQKDSYVG	852.3982	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
AEREIVR	871.4828	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
LQDLVDKLQ	1070.5965	肌球蛋白重链, 骨骼肌
GTTMYPGIADR	1180.5560	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
VAPEEHPVL	989.5160	肌动蛋白
IWHHTFY	1002.4736	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
PGPGPMG	611.2739	胶原 $\alpha$ -2(I)链
SGPAGPR	640.3296	胶原 $\alpha$ -1(I)链
GPMGPRG	670.3218	胶原 $\alpha$ -1(I)链
GFSGLDGAKG	907.4393	胶原 $\alpha$ -1(D)链
ALPHAIM	907.502	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
MYPGIADR	921.4372	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
SGPMGPR	700.3332	胶原 $\alpha$ -1(I)链
VFPSIVG	717.4045	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
APGPVGPAG	721.3754	胶原 $\alpha$ -1(I)链
NWDDMEKIWH	1372.5861	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌
RDLTDYLMKIL	1379.7446	肌动蛋白, $\alpha$ 骨骼肌

多,这也间接证明了鳕鱼骨中含有大量的胶原蛋白,并且适度水解中多肽的分子量偏大,多肽主要集中在大于 1000 Da 的区域;深度水解中多肽的分子量偏小,多肽主要集中在 1000 Da 以下。

如表 3 所示,在适度水解中六种疏水性氨基酸(Ala、Val、Met、Leu、Ile、Phe)占氨基酸总量的 31.17%,并且氨基酸多数位于多肽的中间位置。有研究表明疏水性氨基酸位于肽的 C-末端或 N-末端时,苦味会更重<sup>[24-25]</sup>。在表 4 中,多数的多肽氨基酸数量少于 10 个,六种疏水性氨基酸占总氨基酸的 30.13%,在 C-末端或 N-末端的多肽主要是甘氨酸,由于甘氨酸不属于疏水性氨基酸,所以产生的苦味值较低。

### 3 结论

本研究以鳕鱼骨为原料,通过蛋白酶水解技术将鳕鱼骨中的蛋白质进行回收利用,通过控制水解度的方法控制水解物苦味的产生,并探究水解物中多肽和游离氨基酸对于苦味的产生机制。结果表明,适度水解时,添加蛋白含量 0.3% 的木瓜蛋白酶酶解 2 h,

此时酶解物的苦味值在水解度达到平衡前最低;通过两段式酶解,添加底物质量 0.1% 的碱性蛋白酶、0.1% 的风味蛋白酶和 0.05% 的胰蛋白酶,在高压蒸煮技术的辅助下水解 6 h 的酶解物无明显的苦味特征,通过控制水解度的方法抑制了酶解过程中大量苦味的产生,这种低苦的酶解液可以作为天然乳化剂用于各种饮料、调味品等食品中。但酶解液中苦味肽的种类以及作用机制仍需进一步的探索。

### 参考文献

- [1] 王鸿泽,赵聪颖,兰海铭,等. 鳕鱼排加工工艺的研究[J]. 食品安全导刊, 2018, 203(12): 149-150.
- [2] Toppe J, Albrektsen S, Hope B, et al. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species[J]. *Comparative Biochemistry Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 146(3): 395-401.
- [3] 李宏凯. 酶法水解植物蛋白概况[J]. *中国食品添加剂*, 2010(4): 206-210.
- [4] 刘伯业. 小麦蛋白低苦味肽的制备及其脱苦机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 5-10.
- [5] Kukman I L, Zelenik-blatnik M, Abram V. Isolation of low-molecular-mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1995, 704(1): 113-120.
- [6] Shinoda I, Tada M, Okai H, et al. Bitter taste of h-pro-phe-pro-gly-pro-ile-pro-oh corresponding to the partial sequence (positions 61-67) of bovine b-casein, and related peptides[J]. *Journal of Agricultural Chemical Society of Japan*, 1986, 50(5): 1247-1254.
- [7] Liu H, Li Y, Diao X, et al. Effect of porcine bone protein hydrolysates on the emulsifying and oxidative stability of oil-in-water emulsions[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, 538: 757-764.
- [8] Fan, W W, Tan X Y, Xu X B, et al. Relationship between enzyme, peptides, amino acids, ion composition, and bitterness of the hydrolysates of Alaska pollock frame[J]. *Journal of Food Biochemistry* 2019, 43(4): e12801.
- [9] 周慧江,朱振宝,易建华. 核桃蛋白水解物水解度测定方法比较[J]. *粮食与油脂*, 2012, 25(2): 28-30.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 5009.5-2010 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 2-6.
- [11] Burton L J, Rivera M, Hawsawi O, et al. Muscadine grape skin extract induces an unfolded protein response-mediated autophagy in prostate cancer cells: A TMT-based quantitative proteomic analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164115.
- [12] 白艳红,张相生,赵电波,等. 分步酶解猪骨粉提取猪骨素的工艺研究[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(12): 1696-1699.
- [13] 周雪松. 蛋白质酶解物苦味形成机理及控制研究[J]. *粮食与油脂*, 2004, 18(8): 20-24.
- [14] Dauksas E, Slizyte R, Rustad T, et al. Bitterness in fish protein hydrolysates and methods for removal[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2004, 13(2): 101-114.

- [ 15 ] 曾晓房. 鸡骨架酶解及其产物制备鸡肉香精研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2007: 5-10.
- [ 16 ] 安灿, 王欣, 陈美龄. 蛋白酶水解龙头鱼产生咸味的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2017(1): 135-140.
- [ 17 ] 吴莉莉, 陈俊香. 双酶法降解核酸生产核苷酸食品增鲜剂: 酵母深加工高附加值产品[J]. *甘蔗糖业*, 2000(3): 32-36, 41.
- [ 18 ] Chobert J M, Unklesbay N, Hsieh F H, et al. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2004, 52(19): 5895-5901.
- [ 19 ] Matoba T, Hata T. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures[J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 2004, 36(8): 1423-1431.
- [ 20 ] Ishibashi N, Ono I, Kato K, et al. Role of the hydrophobia amino acid residue in the bitterness of peptides[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1988, 52(1): 91-94.
- [ 21 ] Zhao J, Xiong Y L. Interfacial peptide partitioning and undiminished antioxidative and emulsifying activity of oxidatively stressed soy protein hydrolysate in an O/W emulsion[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 61(2): 322-329.
- [ 22 ] Agboola S O, Singh H, Munro P A, et al. Destabilization of oil-in-water emulsions formed using highly hydrolyzed whey proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(1): 84-90.
- [ 23 ] Slattery H, Fitzgerald R J. Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a bacillus proteinase[J]. *Journal of Food Science*, 2008, 63(3): 418-422.
- [ 24 ] Fitz Gerald R J, O'Cuinn G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(2): 234-237.
- [ 25 ] Kim H O, Li-Chan E C Y. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(26): 10102-10111.