

史芮源, 曹文红, 张雨婕, 黄锐鑫, 刘珍妮. 罗非鱼鱼皮酶解物对罗非鱼鱼片的冷冻保护作用[J]. 广东农业科学, 2019, 46(7): 121-129.

罗非鱼鱼皮酶解物对罗非鱼鱼片的冷冻保护作用

史芮源¹, 曹文红^{1,2}, 张雨婕¹, 黄锐鑫¹, 刘珍妮¹

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东省水产品加工与安全重点实验室 / 广东省海洋生物制品工程实验室 / 广东省海洋食品工程技术研究中心 / 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要:【目的】以罗非鱼鱼皮为研究对象, 评价其酶解产物的冷冻保护活性, 为新型安全、高效的无磷抗冻剂开发提供基础数据。【方法】以水解度为指标, 对碱性蛋白酶的酶解温度、pH 值、酶添加量进行单因素试验, 再采用正交试验确定最佳酶解时间, 使用高效体积排阻色谱法对优化条件下所得酶解产物进行分子量测定, 以解冻失水率、盐溶性蛋白含量、Ca²⁺-ATPase 活性、巯基含量为抗冻活性指标对酶解产物的冷冻保护作用效果进行探究。【结果】使用碱性蛋白酶水解罗非鱼皮, 正交试验得到其最优酶解条件为温度 55 ℃、pH 7.5、酶添加量为 0.7%, 确定最佳酶解时间为 3 h; 优化条件下的酶解产物分子量主要集中在 367.05~6 264.80 u。在 5% 剂量条件下, 6 周冻藏期内酶解产物处理的鱼肉失水率、盐溶性蛋白含量、Ca²⁺-ATPase 酶活性、总巯基等冷冻保护作用生化指标均接近或优于含磷抗冻剂处理, 并显著优于空白对照。【结论】罗非鱼皮碱性蛋白酶酶解产物对罗非鱼片的冷冻变性有显著抑制作用。

关键词: 罗非鱼鱼皮; 碱性蛋白酶; 酶解产物; 抗冻剂

中图分类号: S983

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2019) 07-0121-09

Cryoprotective Effect of Hydrolysate of Tilapia Skin on Tilapia Fillets

SHI Ruiyuan¹, CAO Wenhong^{1,2}, ZHANG Yujie¹, HUANG Ruixin¹, LIU Zhenni¹

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety/Guangdong Province

Engineering Laboratory for Marine Biological Products/Guangdong Provincial Engineering Technology

Research Center of Marine Food/Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of

Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Taking tilapia skin as the research object, the cryoprotective activity of its enzymatic hydrolysate was evaluated to provide basic data for the development of new safe and efficient non-phosphorus antifreeze agent. 【Method】With degree of hydrolysis as the index, a single factor experiment was conducted on the alkaline protease enzyme solution temperature, pH value and the addition amount of enzyme, and the index was optimized by orthogonal experiment, to determine the optimal hydrolysis time. The molecular weight of enzymatic hydrolysate product obtained under the condition of optimization was determined by using high performance size exclusion chromatography. And the cryoprotective effect

收稿日期: 2019-04-09

基金项目: 广东省大学生创新创业训练计划项目 (CXXL2018061); 广东省科技计划项目 (2014B020204001)

作者简介: 史芮源 (1998—), 女, 在读本科生, 研究方向为食品科学与工程, E-mail: 2567901318@qq.com

通信作者: 曹文红 (1977—), 男, 博士, 教授, 研究方向为海洋生物资源应用, E-mail: cchunlin@163.com

of enzymatic hydrolysis product was explored with thawing water loss rate, salt soluble protein content, Ca^{2+} -ATPase activity and sulfhydryl content as indexes of antifreeze activity. 【Result】 The tilapia skin was hydrolyzed by alkaline protease, and the optimal hydrolysis conditions were obtained by orthogonal test: reaction temperature at 55 °C, pH of 7.5, with an enzyme dose of 0.7% and enzymatic hydrolysis time of 3h. Under the optimal conditions, the molecular weight of enzymatic hydrolysates mainly ranged from 367.05 u to 6264.80 u. At a dosage of 5%, the biochemical indexes(thawing water loss rate, salt-soluble protein content, Ca^{2+} -ATPase activity and total sulfhydryl) of freezing protection effect of enzymatic hydrolysate group during 6 weeks of freezing storage were similar to or better than those of phosphorus-containing antifreeze group, and were significantly better than those of blank control group. 【Conclusion】 The enzymatic hydrolysate of tilapia skin hydrolyzed by alkaline protease could significantly inhibit the freezing denaturation of tilapia fillets.

Key words: tilapia skin; alkaline protease; enzymatic hydrolysate; antifreeze agent

【研究意义】由于水产品高蛋白、低脂肪、高水分的特性,冷冻保藏是水产品加工保藏过程中的主要方式,而在此期间发生的蛋白质冷冻变性是导致其品质下降的主要原因^[1],目前最为有效的避免水产品冷冻变性的措施是添加抗冻保护剂,常用的抗冻剂有蔗糖、多聚磷酸盐、海藻糖等^[2]。蔗糖会使产品带有甜味,且对肥胖者、糖尿病、高血糖患者等特殊人群产生不利影响,磷酸盐过多摄入对人体钙质的吸收也有一定影响。食源性的抗冻保护剂则可以有效避免这些问题,利用鱼皮开发新的抗冻保护剂,既可以提高鱼类的附加价值,解决鱼皮浪费问题,又能为进一步研究蛋白型抗冻剂提供理论依据。【前人研究进展】林炳萍等^[3]对鲈鱼肉酶解产物的研究发现,其对带鱼鱼糜蛋白的冷冻变性有良好的抑制效果;刘永乐等^[4]研究发现鲢鱼复合蛋白酶酶解物具有一定抗冻保护效果;张怡等^[5]探究了碱性蛋白酶对金线鱼鱼皮进行酶解的最优条件,并对其理化性质进行探究;DU等^[6]研究了鸡皮胶原蛋白水解物对天然肌动球蛋白的抗冻保护作用,发现其具有减缓蛋白质冷冻变性和氧化作用;束玉珍等^[7]对鲈鱼肉酶解物进行了研究,发现其具有一定的抗冻保护作用。【本研究切入点】有关研究表明,食品蛋白质水解物多肽,尤其是水产品加工副产物中的衍生多肽,可以有效抑制水产品在冷冻保藏过程中发生的蛋白质冷冻变性,且冷冻保护效果可与传统抗冻剂媲美,避免传统抗冻剂存在的危害,使得鱼类副产物得到充分利用^[8]。不同鱼源的酶解条件可能具有较大差异,罗非鱼作为消耗量极大的品种,未见利用其鱼皮开发抗冻保护剂的相关报道,需进行酶解条件的优化,同时对其抗冻保护活性进行评估。【拟解决的关键问题】利用罗非鱼鱼皮酶解制得酶解产物,对

酶解时的温度、酶添加量、pH值与时间进行探究,并以罗非鱼鱼片为实验对象,对比酶解产物与含磷抗冻保护剂对其保水性、 Ca^{2+} -ATPase活性、盐溶性蛋白与巯基含量的影响差异,以期为开发新型食源性抗冻保护剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2018年5~8月在广东海洋大学广东省水产品加工与安全重点实验室及水产品深加工广东普通高等学校重点实验室进行。

材料与试剂:罗非鱼冷冻鱼皮,购于湛江国联水产有限公司;新鲜罗非鱼,购于湛江霞山东风市场;碱性蛋白酶(来源为微生物,2.4 AU/g),购于诺维信(中国)生物科技有限公司;维生素B12(1355.38 u)、溶菌酶(14300 u)、马尿酸-组氨酸-亮氨酸(429.47 u)、L-酪氨酸(181.19 u),购于美国Sigma公司。

仪器:CR22GLL台式高速冷冻离心机,长沙英泰仪器有限公司;VULCAN.3-550PD.马弗炉,美国VULCAN公司;FDU-1100真空冷冻干燥机,埃朗科技国际贸易有限公司;PHS-25C精密pH计,上海康仪仪器股份有限公司;HH-6数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;N-1100V-WB旋转蒸发仪,上海埃朗仪器有限公司;LC20AD高效液相色谱,日本岛津公司;UV2550紫外分光光度计,日本岛津公司。

1.2 试验方法

1.2.1 罗非鱼鱼皮酶解产物的制备 冷冻鱼皮于室温解冻,去鱼鳍、鱼鳞以及与鱼皮粘连的鱼肉,清水洗净后切成细条状,脱脂后2.5%氯化钠溶液处理10 h,沥干后加入1:1的去离子水热烫软化,然后捣碎成鱼浆,1:1加入去离子水,

搅拌 15 min，然后加入一定量的碱性蛋白酶，调节 pH、温度进行酶解，酶解一定时间后，将酶解液转移至 100 ℃热水中灭活 15 min，8 000 r/min 冷冻离心 20 min 后，取上清液于 0.1 MPa 真空度、50 ℃旋转蒸发浓缩，转移至冷冻干燥箱干燥后备用。

1.2.2 酶添加量、温度、pH 值对鱼皮酶解的影响 单因素试验各设置 5 个处理，分别为酶添加量（碱性蛋白酶占鱼皮的百分数）0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%；温度 55、60、65、70、75 ℃；pH 值 6.5、7.0、7.5、8.0，3 次重复，通过计算酶解液的水解度比较酶解效果，选取最优酶添加量、温度、pH 值进行正交试验。

1.2.3 酶解条件的优化 选取不同酶添加量、温度、pH 对罗非鱼鱼皮酶解产物进行反应条件的单因素影响研究（表 1），通过计算酶解液的水解度比较酶解效果，选取最优的酶添加量、反应温度、pH，进行 3 因素 3 水平正交优化试验。

表 1 罗非鱼鱼皮水解试验因素水平
Table 1 Levels of factors for the hydrolysis test of tilapia skin

水平 Level	A : 温度 Temperature (℃)	B : 酶添加量 Addition amount (%)	C : pH
1	55	0.5	7.0
2	60	0.7	7.5
3	65	0.9	8.0

1.2.4 水解度的测定方法 运用凯氏定氮法测原料中的总氮量^[9]；使用甲醛滴定测酶解液中游离氨基态氮含量^[10]。水解度平行测定 3 次。

水解度 $DH(%) = \frac{\text{酶解液中游离氨基态氮的含量 (g)}}{\text{样品中总氮量 (g)}} \times 100$

1.2.5 酶解产物肽分子量测定 参照文献^[11]的方法，稍做修改，使用高效体积排阻色谱法（HPSEC）测定酶解产物分子量分布状况。色谱条件：流动相为 Tris-HCl 缓冲液（pH 8.3、浓度 0.05 mol/L）；色谱柱：Waters Protein-pak 60A（WAT085250）；0.7 mL/min 的洗脱速度；25 ℃柱温；加 20 μL 样品，样品浓度稀释到 100 μg/mL；214 nm 波长进行检测。标准品分别为：维生素 B12（1 355.38 u）、溶菌酶（14 300 u）、马尿酸-组氨酸-亮氨酸（429.47 u）、L-酪氨酸（181.19 u）。以分子量的对数 lgM 为纵坐标、

保留时间 (t) 为横坐标，得到分子量回归方程： $\lg M = -0.4567t + 8.9462 (R^2 = 0.9976)$ 。

1.2.6 冻藏罗非鱼鱼片的处理

（1）洗净新鲜罗非鱼，去鱼头、鱼鳍、鱼尾和内脏后再次用清水洗净，此过程温度控制在 10 ℃左右。（2）鱼肉片和皮、骨分离后将鱼肉切成均匀的薄片并均等分入小烧杯中，分成 3 个处理：以鱼片重量的 0.5% 加入复合磷酸盐抗冻剂为含磷抗冻剂处理、以鱼片重量的 5% 加入罗非鱼皮酶解产物为酶解产物处理、无任何添加为空白对照。（3）于 -75 ℃冰箱冻藏 2 h 再转移至 -18 ℃中冻藏，而后取样测定冻藏过程中的各项冷冻保护活性生化指标。

1.2.7 酶解产物冷冻保护作用研究 （1）失水率测定。参考俞裕明^[12]的方法，在冷藏 0、1、2、3、4、6 周测定罗非鱼鱼片失水率，3 次重复。

失水率 (%) = $\frac{\text{浸泡后的质量} - \text{解冻后的质量}}{\text{浸泡后的质量}} \times 100$

（2）盐溶性蛋白制备及测定。参照万建荣^[13]方法稍作修改：称取 3 g 解冻后的罗非鱼鱼片加入磷酸盐缓冲液（I=0.05，pH=7.5）30 mL 进行研磨，研磨 5 min 后于 4 ℃、8 000 r/min 冷冻离心 15 min，重复 2 次，取沉淀物，向其中加入 30 mL 氯化钠溶液（pH=7.0，0.6 mol/L），0~4 ℃提取 20 h 后于 4 ℃、8 000 r/min 离心 15 min，取上清液测定。采用 Follin 酚法测定上清液蛋白质含量（盐溶性蛋白含量），冻藏 0、1、2、3、4、6 周检测罗非鱼鱼片盐溶性蛋白含量，3 次重复。

（3）Ca²⁺-ATPase 酶活测定。根据超微量 Ca²⁺-ATPase 测试盒的方法和步骤来测量罗非鱼鱼片的 Ca²⁺-ATPase 酶活，吸光度波长 636 nm，光径 0.5 cm，冻藏 0、1、2、3、4、6 周分别测定 1 次罗非鱼鱼片 Ca²⁺-ATPase 酶活，3 次重复。Ca²⁺-ATPase 酶活计算公式：

$$TPase \text{ ATPase 活力} \left(\frac{U}{\text{mgprot}} \right) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度} (0.02 \mu\text{mol/mL})$$
$$\times \frac{6 \times 2.8}{\text{待测样品浓度 (mgprot/mL)}}$$

（4）总巯基含量测定。参照 BENJAKUL^[14]

的方法,在冷藏 0、1、2、3、4、6 周取样检测,3 次重复。

试验数据使用 Excel 2016 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 鱼皮酶解单因素试验结果

2.1.1 酶添加量对鱼皮酶解的影响 由于酶添加量在某一区间对蛋白质水解作用影响较大,通过预实验确定酶添加量区间为 0.1%~0.9%。从图 1 可以看出,当酶添加量为 0.7% 时,提取效果最为明显,水解度值最大、为 30.17%。酶添加量为 0.5%、0.9% 时,水解度分别为 27.64%、29.58%,正交试验时酶添加量选用 0.5%、0.7%、0.9%。

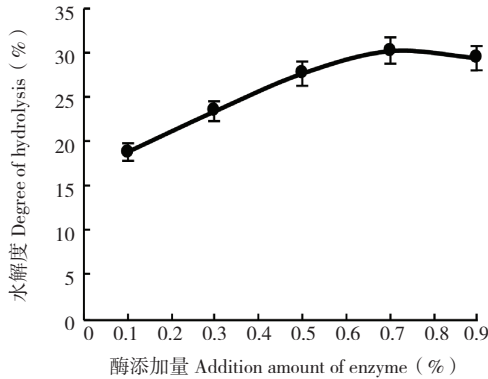


图 1 酶添加量对罗非鱼鱼皮酶解的影响
Fig. 1 Effect of enzyme addition on the enzymatic hydrolysis of tilapia skin

2.1.2 温度对鱼皮酶解的影响 温度可能对酶解作用时酶与底物的结合方式产生作用,造成酶解产物成分不同。从图 2 可以看出。温度为 65 ℃ 时,鱼皮酶解产物水解效果最明显,水解度达到 31.05%,温度为 55、60 ℃ 时,水解度分别为 26.64%、30.17%,大部分蛋白酶的最佳温度在

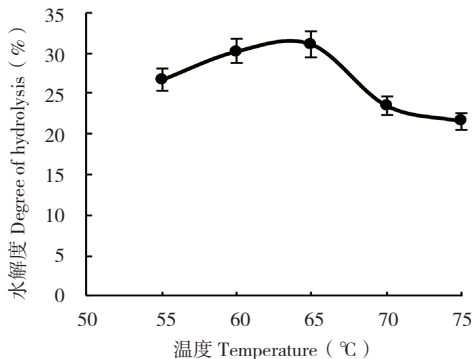


图 2 温度对罗非鱼鱼皮酶解的影响
Fig. 2 Effect of temperature on the enzymatic hydrolysis of tilapia skin

40~60 ℃,酶活性在低温下受到抑制,而酶解温度过高则容易导致酶失活,因此正交试验时选取的酶解温度为 55、60、65 ℃。

2.1.3 pH 值对鱼皮酶解的影响 pH 值过大或者过小均可能造成酶失活,导致水解度下降,本实验采用的是碱性蛋白酶,因此选择 pH 值较大的区间进行单因素试验,结果见图 3。pH 为 7.5 时,鱼皮水解度最大,为 35.40%,pH 为 7.0 和 8.0 时作用效果较好,确定正交试验时 pH 值选取 7.0、7.5、8.0。

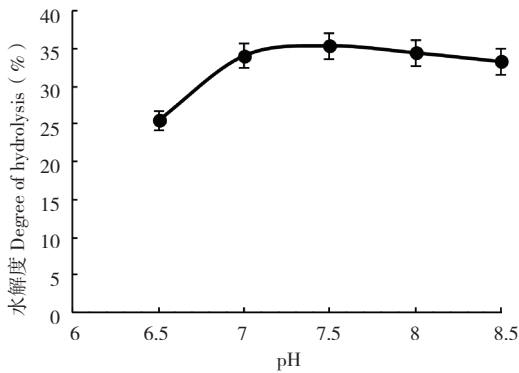


图 3 pH 值对罗非鱼鱼皮酶解的影响
Fig. 3 Effect of pH on the enzymatic hydrolysis of tilapia skin

2.2 鱼皮酶解工艺正交优化结果

酶添加量、温度、pH 值 3 个因素对碱性蛋白酶的水解产生影响大小不一,需要进行正交试验,优化酶解因素,鱼皮酶解条件正交试验结果见表 2。由表 2 可知,对酶解产物水解度影响最大的因素是酶添加量(B),极差值为 9.95,其次是温度(A)和 pH(C),极差值分别为 3.00、2.85,根据各因素平均水平,得出最佳提取组合为 A1B2C2,即温度 55 ℃、酶添加量 0.7%、pH7.5。

酶解时间达到一定时,对水解度几乎没有影响,时间过长可能使具有抗冻活性的片段失活,因此需探究不同时间对 A1B2C2 组合水解度的影响,结果见图 4。0~7 h 内,随着酶解反应时间增加,水解度也随之上升,0~3 h 内,水解度上升趋势尤为明显,而 4~7 h 内,水解度无显著变化,表明在 3 h 左右酶解反应基本完成,因此确定最佳反应时间为 3 h。

2.3 酶解产物肽分子量分布

酶解产物肽分子量的分布如图 5 所示。根据 HPSEC 得到的分子量回归方程,可计算出罗非

表 2 酶解正交试验结果
Table 2 Orthogonal experiment result of the enzymatic hydrolysis

序号 Number	A :温度 Temperature (℃)	B :酶添加量 Adding quantity (%)	C :pH	水解度 Degree of hydrolysis (%)
1	1	1	1	25.07
2	1	2	2	38.25
3	1	3	3	28.99
4	2	1	2	24.86
5	2	2	3	32.91
6	2	3	1	23.51
7	3	1	3	20.37
7	3	1	3	20.37
8	3	2	1	28.99
9	3	3	2	22.92
K_1	30.77	23.44	25.86	
K_2	27.09	33.38	28.68	
K_3	24.09	25.14	27.42	
R	3.00	9.95	2.85	

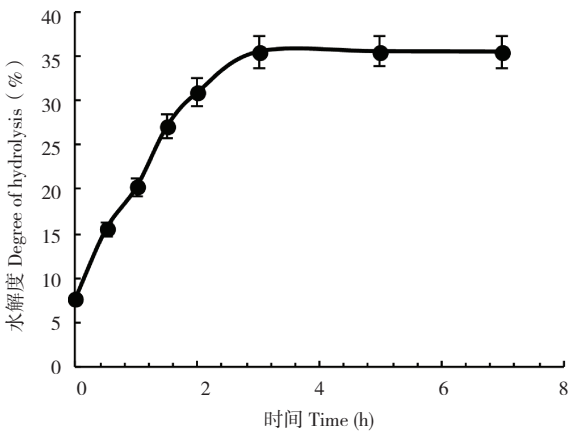


图 4 酶解时间对罗非鱼鱼皮酶解的影响
Fig.4 Effect of time on the enzymatic hydrolysis of tilapia skin

鱼鱼皮酶解产物的分子分布情况，结果见表 3。由表 3 可知，酶解产物肽的分子量主要分布在

367.05~6264.80 u，其中分子量在 6 264.80 u 左右的多肽类占 43.71%，367.05 u 分子量附近的比重分别为达 26.68%。孙丽洁 [19] 得到的抗冻多肽分子量主要分布在小于 3 000 u 区间，目前研究结果表明抗冻多肽相对分子质量较低，具有较强的冷冻保护活性，可能是因为分子质量小的多肽更容易与冰晶表面结合，阻碍冰晶生长，而小分子肽也可以与水形成氢键，增强冻结过程水的稳定性，减少大冰晶形成 [1]。

2.4 酶解产物冷冻保护效果

2.4.1 冻藏过程中罗非鱼鱼片失水率变化 鱼肉的保水性是判断冷冻保护效果的重要指标之一，罗非鱼鱼片失水率在冻藏过程中的变化如图 6 所示。冻藏时间延长导致罗非鱼鱼肉失水率上升，且空白对照上升幅度较复合磷处理和酶解产物处

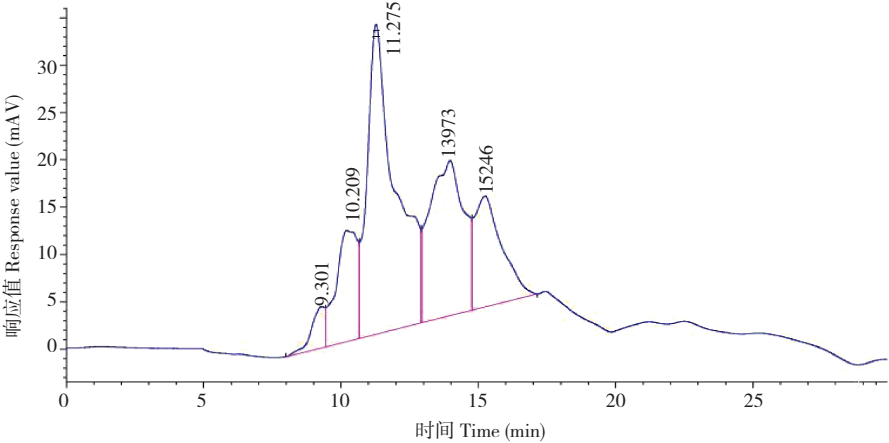


图 5 罗非鱼鱼皮酶解产物的 HPSEC 图谱
Fig.5 HPSEC map of the enzymatic hydrolysate of tilapia skin

表 2 酶解正交试验结果
Table 2 Orthogonal experiment result of the enzymatic hydrolysis

保留时间 Retention time (min)	分子量 Molecular weight (u)	峰面积 Peak area	占比 Proportion (%)
9.031	49938.25	148.29	2.75
10.209	19219.84	636.80	11.83
11.275	6264.80	2353.31	43.71
13.973	367.05	1436.15	26.68
15.245	96.24	809.23	15.03

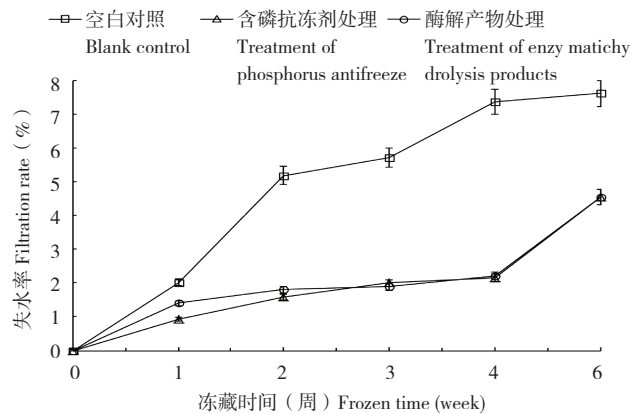


图 6 冻藏过程中罗非鱼片失水率变化
Fig.6 Variation of water loss rate of tilapia fillets during the frozen storage

理大。冻藏 4 周后，空白对照失水率达到 7.38%，含磷抗冻剂处理的失水率为 2.16%，酶解产物处理的失水率为 2.22%，与含磷抗冻剂处理失水率接近。冻藏 6 周时，空白对照的失水率仍显著高于含磷抗冻剂处理组和酶解产物处理。

2.4.2 冻藏过程中罗非鱼鱼片盐溶性蛋白含量变化 肌原纤维蛋白是鱼肉蛋白在冻藏过程主要的变性部分，因此将盐溶性蛋白含量在冻藏过程中的变化作为评价鱼皮酶解产物的冷冻保护作用的指标。如图 7 所示，3 个处理样品的盐溶性蛋白浓度在冻藏 1~6 周均呈下降趋势，而

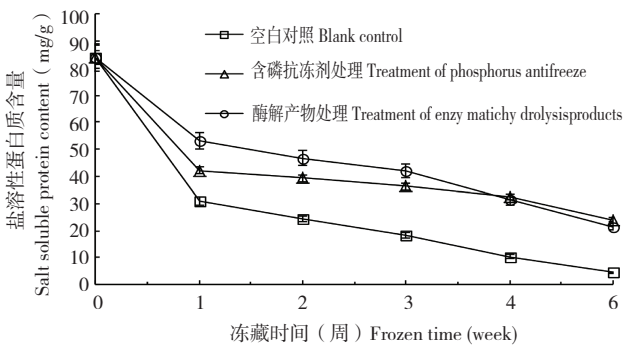


图 7 冻藏过程中罗非鱼片盐溶性蛋白含量变化
Fig. 7 Changes of salt soluble protein content in tilapia fillets during the frozen storage

空白对照的下降趋势更为明显。冻藏 1 周时，空白对照的盐溶性蛋白由最初鲜鱼盐溶性蛋白含量为 84.13 mg/g 下降到 31.13 mg/g，含磷抗冻剂处理和酶解产物处理则分别下降到 41.18、53.19 mg/g；冻藏 1 周后，下降幅度减缓；冻藏 4 周后，含磷抗冻剂处理和酶解产物处理的盐溶性蛋白含量基本相同。冻藏 6 周结束时，空白对照、含磷抗冻剂处理、酶解产物处理盐溶性蛋白含量分别为 4.65、24.02、21.39 mg/g，相比冻藏开始时分别下降了 94%、71%、74%，而当冻藏时间在 1~4 周时，酶解产物处理的盐溶性蛋白质含量略高于含磷抗冻剂处理。

2.4.3 冻藏过程中罗非鱼鱼片 Ca^{2+} -ATPase 酶活变化 冻藏中形成的冰晶和升高的离子强度使蛋白质发生改变，导致肌球蛋白球状头部的 Ca^{2+} -ATPase 酶活下降 [15]。因此，在冻藏过程中 Ca^{2+} -ATPase 酶活的变化情况可以作为鱼肉冷冻保护效果的指标 [7]。罗非鱼鱼片 Ca^{2+} -ATPase 酶活冻藏过程中的变化如图 8 所示，冻藏开始时，空白对照组酶活下降速度最快，冻藏 1 周后，3 组 Ca^{2+} -ATPase 酶活分别为 0.113、0.1619、0.1661 $\mu\text{molPi/mgprot} \cdot \text{h}$ ，分别下降了 45%、21.19%。含磷抗冻剂处理组和酶解产物处理的 Ca^{2+} -ATPase 酶活下降速度较慢。冻藏结束时，

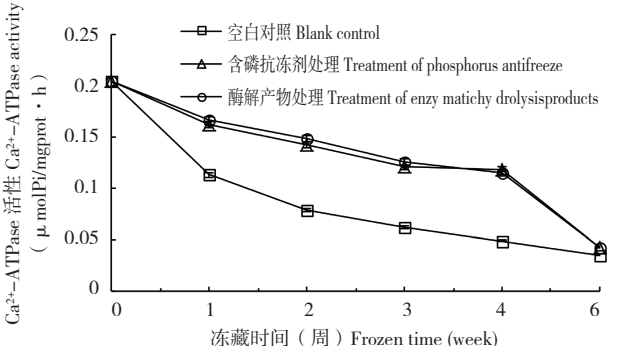


图 8 冻藏过程中 Ca^{2+} -ATPase 酶活变化
Fig. 8 Changes of Ca^{2+} -ATPase activity during the frozen storage

3 组 Ca^{2+} -ATPase 酶活分别为 0.035、0.0429、0.0427 $\mu\text{molPi}/\text{mgprot} \cdot \text{h}$ ，基本相等，含磷抗冻剂处理组略高。

2.4.4 冻藏过程中罗非鱼鱼片总巯基变化 活性巯基和隐藏性巯基是存在于肌原纤维蛋白中的两类巯基，活性巯基可分为 SH_1 、 SH_2 、 SHa [15]，肌球蛋白头部 SH_1 和 SH_2 与 Ca^{2+} -ATPase 酶活性关系密切 [16]，冻藏时肌原纤维蛋白中活性巯基会被暴露氧化 [17]，因此在冻藏过程中总巯基的减少量可以作为蛋白质冷冻保护效果的指标 [16]。从图 9 可以看出，从冻藏开始到结束，总巯基含量均呈下降趋势，含磷抗冻剂处理组和酶解产物处理组下降趋势基本相同，冻藏 6 周后，空白对照、含磷抗冻剂处理、酶解产物处理的总巯基含量分别为 5.176×10^{-5} 、 5.265×10^{-5} 、 $5.333 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ，分别下降 38%、37%、36%，空白对照最低，含磷抗冻剂处理次之，酶解产物处理最高。

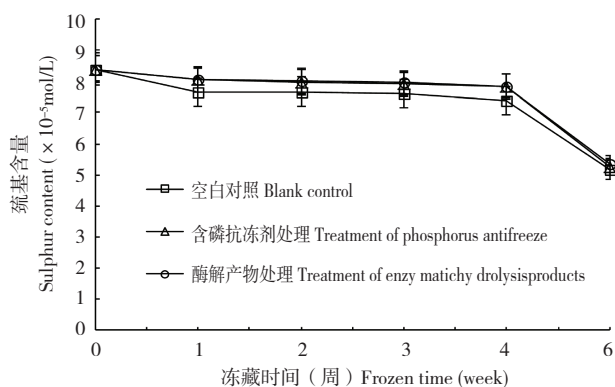


图 9 冻藏过程中罗非鱼片总巯基含量的变化
Fig. 9 Changes of total sulphur content in tilapia fillets during the frozen storage

3 讨论

酶解过程中，酶添加量、反应温度、pH 值、酶解时间均会对酶解产物的成分造成很大影响，张怡等 [5] 对金线鱼鱼皮酶解优化的结果表明，碱性蛋白酶最佳酶解条件为：底物与酶比例 30 : 1、时间 147 min、温度 50 °C、pH 值 9，此条件下的抗冻蛋白得率为 49.25 (±1.34) %，分子量 $\geq 5\ 000 \sim 10\ 000 \text{ u}$ 的多肽抗冻效果最佳。洪燕婷等 [18] 与孙丽洁等 [19] 对蛋白酶酶解温度的研究结果表明，大部分蛋白酶的最佳酶解温度在 40~60 °C，汪少芸等 [20] 实验数据表明，碱性蛋白酶对鱼皮酶解的最佳 pH 值在 7~9，漆嫚等 [21] 使用胰蛋白酶酶解鲈鱼蛋白最佳温度为 40 °C，李

高荣等 [22] 研究碱性蛋白酶最佳温度为 45 °C。由于计算方法、实验原料、碱性蛋白酶的厂家以及原料处理方法不同，且不同鱼源的含量与结构有所不同，温度、酶添加量与 pH 值对其酶解效果的影响也不相同，优化所得温度较高，反应时间较长，酶添加量与 pH 值均较低。本研究制备的罗非鱼鱼皮酶解产物分子量主要分布在 367.05~6 264.80 u 范围内，根据文献报道此区间内的多肽物质具有较好的冷冻保护活性。

水产品的保水性、 Ca^{2+} -ATPase 酶活性、盐溶性蛋白与巯基含量是衡量抗冻剂冷冻保护效果的重要指标，冷冻过程中细胞的损伤是由大冰晶造成，由此引起蛋白质变性，从而导致解冻时汁液流失增加 [23]。复合磷酸盐抗冻剂能够使得蛋白质空间结构中容纳更多的水分子，从而减少鱼肉的失水率 [24]。而鱼源性酶解产物可以阻挡不同水分子之间的位移，从而使冷冻过程中鱼肉肌原纤维水分比较稳定。束玉珍等 [7] 对鲈鱼肉酶解物进行研究发现，鱼肉酶解产物具有一定的保水性，添加鱼肉酶解产物组样品 Ca^{2+} -ATPase 酶活性明显高于空白，多磷酸盐抗冻剂和鱼肉酶解物在不同程度上均有保护活性巯基的作用。

本研究亦发现，含磷抗冻剂处理和酶解产物处理的鱼片失水率在冻藏过程中减少幅度较低，说明多磷酸盐抗冻剂和酶解产物对鱼肉在冻藏过程中有提高保水性的作用；复合磷酸盐和酶解产物可以减缓鱼片 Ca^{2+} -ATPase 酶活性和巯基含量的下降速度，一定程度上抑制蛋白质冷冻变性，具有冷冻保护作用，酶解产物处理效果较含磷抗冻剂处理好。SULTANBAWA [25] 研究显示，-18 °C 冻藏 4 个月的蓝鳍鱼糜蛋白，盐溶性蛋白含量由 60% 下降至 19%，其中空白对照最为严重，多磷酸盐抗冻剂和酶解产物均可以减缓这种变性，酶解产物的作用效果略优。多磷酸盐具有良好的纤维改善性质 [26]，可以稳定肌原纤维蛋白的构象，起到保水的作用，海藻糖等糖类则可以与极性基团结合，减少结合水的含量，同时与更多的水分子形成易解离的氢键，抑制冰晶的形成 [27]，鱼皮酶解产物的抗冻保护效果主要源于分布在 367.05~6 264.80 u 范围内的酶解产物含有大量暴露的羟基等亲水基团，可以与水构成氢键，以增强水的稳定性，进而避免鱼肉蛋白空间结构的剧烈变化，另一方面酶解产物能够在一定程度上抑

制脂肪的氧化,阻止了鱼肉蛋白羰基化合物形成并且有效降低了总巯基损失^[28],但是对于具体是哪些序列的基因具有抗冷冻变性的作用,有待进一步研究探索。

本研究从多方面证明鱼皮碱性蛋白酶酶解产物具有较强的抗冻保护活性,其具体的抗冻活性多肽有待进一步分离纯化与鉴定分析。

4 结论

以罗非鱼鱼皮为原料,单因素和正交试验优化了碱性蛋白酶酶解罗非鱼皮的最佳工艺参数:温度 55℃、酶添加量 0.7%、pH7.5;在最佳酶解工艺参数下所得酶解产物分子量主要集中在 367.05~6 264.80 u;以失水率、盐溶性蛋白含量、Ca²⁺-ATPase 酶活、总巯基含量为指标显示,以 5% 添加量的酶解产物处理对冷冻罗非鱼片的冷冻变性保护效果优于空白对照和含磷抗冻剂处理,表明以肽为主体的罗非鱼皮碱性蛋白酶酶解产物具有良好的冷冻保护活性。

参考文献 (References):

- [1] 刘建华,苏琦,罗亚洪,刘书来,丁玉庭.蛋白质及多肽作为水产品抗冻剂的应用及其机理[J].食品与发酵工业,2017,43(10):283-288.doi:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.014002.
LIU J H, SU Q, LUO Y H, LIU S L, DING Y T. Application and mechanisms of proteins and polypeptides as cryoprotectants in aquatic products [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(10): 283-288.doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.014002.
- [2] 程琳丽,马海霞,李来好.几种保水剂对冻罗非鱼片的保水效果[J].广东农业科学,2014,41(7):101-105.doi:10.3969/j.issn.1004-874X.2014.07.027.
CHENG L L, MA H X, LI L H. Effects of different water retaining agents on frozen tilapia fillets [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(7): 101-105.doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.07.027.
- [3] 林嫔萍,揭珍,束玉珍,杨文鸽,徐大伦,严小军.鲐鱼肉酶解物添加量对带鱼鱼糜蛋白抗冻效果的影响[J].核农学报,2015,29(5):940-945.doi:10.11869/j.issn.100-8551.2015.05.0940.
LIN X P, JI Z, SHU Y Z, YANG W G, XU D L, YAN X J. Cryoprotective effects of mackerel hydrolysate addition on the hairtail surimi during frozen storage [J]. *Nuclear Agronomy*, 2015, 29(5): 940-945.doi: 10.11869/j.issn.100-8551.2015.05.0940.
- [4] 刘永乐,田苗苗,李向红,俞健,王发祥,王建辉,黄铁群.鲢鱼酶解物对冻融鱼糜制品品质及其蛋白质体外消化率的影响[J].食品与机械,2018,34(10):118-123.doi:10.13652/j.issn.1003-5788.2018.10.025.
LIU Y L, TIAN M M, LI X H, YU J, WANG F X, WANG J H, HUANG Y G. Effects of silver carp hydrolysate on quality and in vitro protein digestibility of freeze-thawed surimi products [J]. *Food & Machinery*, 2018, 34(10): 118-123.doi: 10.13652/j.issn.1003-5788.2018.10.025.
- [5] 张怡,吴珊,傅维擎,黄灿灿,曾红亮,郑宝东.金线鱼鱼皮抗冻蛋白酶法制备工艺优化[J].农业工程学报,2017,33(5):301-307.doi:10.11975/j.issn.1002-6819.2017.05.043.
ZHANG Y, WU S, FU W Q, HUANG C C, ZENG H L, ZHENG B D. Optimization of preparation of antifreeze proteins of fish skin from *Nemipterus virgatus* by using protease [J]. *Journal of Agricultural Engineering*, 2017(5): 301-307.doi: 10.11975 / j. i. SSN.1002-6819.2017.05.043.
- [6] DU L, BETTI M. Chicken collagen hydrolysate cryoprotection of natural actomyosin: Mechanism studies during freeze-thaw cycles and simulated digestion [J]. *Food Chemistry*, 2016, 211: 791-802.doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.092.
- [7] 束玉珍,杨文鸽,徐大伦,张进杰.鲐鱼肉酶解物对带鱼鱼糜蛋白冷冻变性的影响[J].中国食品学报,2014,14(1):68-73.
SU Y Z, YANG W G, XU D L, ZHANG J J. Effect of Mackerel Hydrolysate on Protein Denaturation of Hairtail Surimi during Frozen Storage [J]. *Chinese Food Journal*, 2014, 14(1): 68-73.
- [8] NIKOO M, BENJAKUL S. Potential application of seafood-derived peptides as functional ingredients, antioxidant-cryoprotectant: A review [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 19: 753-764.
- [9] GB 5009.5-2016, 食品中蛋白质质的测定[S].
GB 5009.5-2016, Determination of protein value in food [S].
- [10] GB 5009.235-2016, 食品中氨基酸态氮的测定[S].
GB 5009.235-2016, Determination of amino acid nitrogen in food [S].
- [11] 何小庆.波纹巴非蛤活性肽的酶法制备及其免疫活性的研究[D].湛江:广东海洋大学,2014.
HE X Q. Enzymatic preparation and immunocompetence research of Paphia undulate peptides [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014.
- [12] 俞裕明,李汴生,朱志伟,阮征,黄娟,蒙名燕,李兵,黄建强.不同冻结速率对南方鲇冷冻鱼片理化和感官品质的影响[J].上海水产大学学报,2008,17(3):350-356.
YU Y M, LI B S, ZHU Z W, RUAN Z, HUANG J, MENG M Y, LI B, HUANG J Q. Effects of different freezing rates on the physicochemical and sensory qualities of *Silurus meridion* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008.17(3): 350-356.
- [13] 万建荣.水产食品化学分析手册[M].上海:上海科学技术出版社,1993.
WAN J R. Manual of chemical analysis of aquatic products [M]. Shanghai: Shanghai science and technology press, 1993.
- [14] BENJAKUL S, SEYMOUR T A, MORRISSEYM T. Physicochemical changes in pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. *Journal of Food Science*, 1997, 62(4): 729-733.doi: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb15445.x.
- [15] SONPONGSE W, ITOH Y, OBATAKE A. Effect of cryoprotectants and a reducing reagent on the stability of actomyosin during ice storage [J]. *Fisheries Science*, 1996, 62(1): 73-79.
- [16] 张静雅.白鲢鱼糜蛋白的冷冻变性机理及抗冻剂的应用研究[D].

- 合肥: 合肥工业大学, 2012.
- ZHANG J Y. Research on frozen denaturation mechanism of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi protein and application of cryoprotectants [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012.
- [17] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, THONGKAEW C, TANAKA M, BENJAKUL S. Comparative study on physicochemical changes of muscle protein from some tropical fish during frozen storage [J]. *Food Research International*, 2003, 36: 787–795. doi: 10.1016/S0963-9969(3)00073-5
- [18] 洪燕婷, 汪少芸, 黄茂坤, 薛雅茹, 林志杰. 食品源鱼皮明胶抗冻多肽的酶解工艺 [J]. 通化师范学院学报, 2018, 39(02): 60–64. doi: 10.13877/j.cnki.cn22-1284.2018.02.016.
- HONG Y T, WANG S Y, HUANG M K, XUE Y R, LING Z J. Effects of different freezing rates on the physicochemical and sensory qualities of *Silurus meridionalis* fillets [J]. *Journal of Tonghua Normal University*, 2018, 39(02): 60–64. doi: 10.13877/j.cnki.cn22-1284.2018.02.016.
- [19] 孙丽洁. 鱼皮抗冻多肽的制备及其提高冷冻面团抗冻性的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- SUN L J. Study on the preparation of antifreeze peptide from fish skin and its cryoprotective effects on frozen doughs [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [20] 汪少芸, 赵立娜, 邵彪, 饶平凡. 一种利用碱性蛋白酶酶解鱼皮胶原蛋白制备的抗冻多肽: 中国, CN201310441724.5 [P]. 2013–12–25.
- WANG S Y, ZHAO L N, SHAO B, RAO P F. An antifreeze polypeptide prepared by enzymatic hydrolysis of fish skin collagen by alkaline protease: China, CN201310441724.5 [P]. 2013–12–25.
- [21] 漆嫚, 赖永强, 周春霞, 杨萍, 洪鹏志. 酶法水解对罗非鱼鱼皮蛋白物化性质的影响 [J]. 广东农业科学, 2013, 40(9): 96–98, 102. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2013.09.029.
- QI M, LAI Y Q, ZHOU C X, YANG P, HONG P Z. Effect of enzymatic hydrolysis on physicochemical properties of Tilapia Skin Protein [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(9): 96–98, 102. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2013.09.029.
- [22] 李高荣, 欧阳茜茜, 杨萍, 陈法锦, 黄娜, 李普旺, 李思东, 罗荣琼. 罗非鱼皮多肽的制备及其对烫伤修复的应用 [J]. 广东农业科学, 2017, 44(10): 88–95. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2017.10.015.
- LI G R, OUYANG Q Q, YANG P, CHEN F J, HUANG N L, LI P W, LI S D, LUO R Q. Preparation of tilapia skin polypeptide and its application in scald repair [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2017, 44(10): 88–95. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2017.10.015.
- [23] 汪之和, 王憫, 苏德福. 冻结速率和冻藏温度对鲢肉蛋白质冷冻变性的影响 [J]. 水产学报, 2001, 25(6): 564–569. doi: 10.3321/j.issn: 1000-0615.2001.06.016.
- WANG Z H, WANG M SHU D F. Effects of freezing rate and frozen stored temperature on freeze denaturation of *Hypophthalmichthys molitrix* muscle protein [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(6): 564–569. doi: 10.3321/j.issn: 1000-0615.2001.06.016.
- [24] 夏松养. 水产食品加工学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- XIA S Y. Aquatic food processing science [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.
- [25] SULTANBAWA Y, LI C. Cryoprotective effects of sugar and polyol blends in ling cod surimi during frozen storage [J]. *Food Research International*, 1998, 31(2): 87–98.
- [26] 李振铎, 井月欣, 张健, 许高军, 赵云苹, 王共明, 刘芳, 李焕军. 多磷酸盐在冷冻鲑鱼鲷鱼片加工中的安全应用 [J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(3): 127–132.
- LI Z D, JING Y X, ZHANG J, XU G J, ZHAO Y P, WANG G M, LIU F, LI H J. Study on the safety of sodium polyphosphates treatment in frozen Pollock Fillets and Flounder Fillets [J]. *China Food Additives*, 2019, 30(3): 127–132.
- [27] 廖丹, 陈雪, 张原. 海藻糖抗冻保护作用研究进展 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(18): 83–85. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2011.18.034.
- LIAO D, CHEN X, ZHANG Y. Research progress on antifreeze protective effect of trehalose [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 38(18): 83–85. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2011.18.034.
- [28] MEHDI N, SOOTTAWAT B, Xu X M. Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince [J]. *Food Chemistry*, 2015, 181. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.095.

(责任编辑 白雪娜)