

基于主成分分析法优化混合动物蛋白的酶解工艺

唐春红,高雪娇,祝子涵,杨超杰,陈思梦,陈琳莉,吴 丽
重庆工商大学 环境与资源学院,重庆 400067

摘 要:目的 根据混合动物蛋白酶解液的抗氧化性和水解度,探讨其最佳酶解工艺条件。方法 以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标,采用主成分分析法探讨酶的种类,加酶量、酶解时间,酶解温度和 pH 值对由牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白组成的混合动物蛋白酶解液的影响,再通过均匀设计试验确定最佳酶解工艺参数。结果 研究表明:最佳酶解条件为菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶复配使用,各酶添加量均为 1 200 U/g,酶解温度 43 ℃,酶解 pH 值为 6,酶解时间 6 h,该条件下制得酶解液的水解度为 43.12%,总抗氧化能力为 0.079 2 mmol/g,还原力为 0.441 5,感官评分为 32.15。结论 结合主成分分析法和均匀设计试验,从多个评价角度探讨混合蛋白的酶解工艺,最佳工艺所制得的混合动物蛋白酶解液具有良好的抗氧化性和感官滋味;突破了以单一蛋白为底物的传统酶解模式,对更深入地探索混合蛋白酶解规律和实际应用提供了理论条件。

关键词:主成分分析;混合蛋白;多酶复配;酶解;工艺优化;抗氧化性

中图分类号:TS201.4 **文献标识码:**A **doi:**10.16055/j.issn.1672-058X.2025.0005.003

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Mixed Animal Proteins Based on Principal Component Analysis

TANG Chunhong, GAO Xuejiao, ZHU Zihan, YANG Chaojie, CHEN Simeng, CHEN Linli, WU li

School of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

Abstract: **Objective** According to the antioxidant property and hydrolysis degree of the enzymatic digest of mixed animal proteins, the optimum enzymatic process conditions were explored. **Methods** Hydrolysis degree, total antioxidant capacity, reducing power and sensory score were used as evaluation indexes to explore the effects of enzyme type, enzyme addition, enzyme digestion time, enzyme digestion temperature and pH on the enzymatic solution of mixed animal protein composed of beef protein, crucian carp protein and pig trotter collagen protein, and then the optimal enzymatic process parameters were determined by uniform design test. **Results** The research findings indicate that the optimal enzymatic hydrolysis conditions are as follows: a combination of bromelain, neutral protease, and flavor protease, each added at a dosage of 1 200 U/g, with a hydrolysis temperature of 43 ℃, a hydrolysis pH value of 6, and a hydrolysis time of 6 h. Under these conditions, the enzymatic hydrolysate obtained has a degree of hydrolysis of 43.12%, a total antioxidant capacity of 0.079 2 mmol/g, a reducing power of 0.441 5, and a sensory score of 32.15. **Conclusion** Combining the principal component analysis method and the uniform design experiment, the enzymatic hydrolysis process of mixed proteins was explored from multiple evaluation perspectives. The enzymatic hydrolysate of mixed animal proteins prepared under optimal process conditions exhibits favorable antioxidant capacity and sensory flavor. This approach breaks through the traditional enzymatic hydrolysis model that uses a single protein as the substrate and offers a theoretical basis for a more

收稿日期:2024-01-09 修回日期:2024-03-16 文章编号:1672-058X(2025)05-0018-09

作者简介:唐春红(1965—),女,教授,博士,从事食品加工技术研究。

引用格式:唐春红,高雪娇,祝子涵,等.基于主成分分析法优化混合动物蛋白的酶解工艺[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2025,42(5):18-26.

TANG Chunhong, GAO Xuejiao, ZHU Zihan, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of mixed animal proteins based on principal component analysis[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2025, 42(5): 18-26.

in-depth exploration of the enzymatic hydrolysis rules of mixed proteins and their practical applications.

Keywords: principal component analysis (PCA); mixed proteins; multi-enzyme combination; enzymatic hydrolysis; process optimization; antioxidant properties

1 引言

保元汤源于古代宫廷食补秘方,取牛肉、鲫鱼、猪蹄、红枣、山楂五味甘性平之食材,具有益气补虚培元、肺脾肾并补的气血双补功效,且其营养丰富,含有多种动物源蛋白质。相比较于植物源蛋白质,动物源蛋白质因含有全部的人体必需氨基酸,且其氨基酸的含量更高、比例更科学,故称其为“完全蛋白质”^[1-3]。针对食疗保元汤配方中的牛肉、鲫鱼和猪蹄,有研究证明:这3种蛋白具有多种功能活性肽,例如降血压、调节神经和抗癌等。因此,从蛋白的角度探讨食疗保元汤的加工工艺和营养价值,以期能够在一定程度上提高其经济价值,以及为新型保健食品的开发提供理论依据。

随着现代科学技术的发展,针对蛋白质高效利用的技术也日渐成熟。而酶水解法具备较高的安全性、温和的反应条件,以及操作简单易控等优势,因此采用可控酶解的处理方式制备功能活性肽或者改善蛋白的生物化学功能性质,已经成为近年来的热门研究领域^[4-6]。相比于单一酶水解,多种蛋白酶复配使用往往能够提高蛋白质利用率或者水解度。Korhonen 等将碱性蛋白酶、胃蛋白酶以及一些细菌或真菌来源的蛋白酶等进行复合配比酶解,研究发现复合酶能够增加多肽得率,并在一定程度上提高水解度^[7-9];Crowe 等将单一动物蛋白经酶解处理后,原本分子量大、结构复杂和不容易消化的成分被分解,从而导致肉的食用口感、营养价值和消化利用率均得到了提高^[10];刘丹等发现秋刀鱼进一步酶解后可获得具有某一种或多种功能特性的生物活性肽段,同时促进氨基酸组成与高消化率之间达到有效地平衡^[11]。

目前,大部分关于蛋白酶解的实验研究多是以单一蛋白作为底物,探讨它的酶解工艺和功能性作用,未见有关于多来源动物蛋白混合物的研究探讨,而相较于单一蛋白,混合蛋白的氨基酸组成和配比更符合人体需求。基于此,本研究尝试开发一种有效的混合动物蛋白酶解方式,以期对蛋白酶解机理的探讨提供理论基础,并应用到食品生产工艺中。利用6种食品级蛋白酶分别对牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白进行酶解处理,以水解度和总抗氧化能力(T-AOC)为评价指标选择各自的最适蛋白酶,并在此基础上将筛选出的蛋白酶进行复配,运用单因素和均匀设计实验探

讨多酶复配酶解混合动物蛋白的最佳工艺条件。

2 材料与方法

2.1 主要材料与试剂

牛肉、猪蹄、鲫鱼,重庆市南岸区永辉超市;碱性蛋白酶(200 000 U/g)、菠萝蛋白酶(600 000 U/g)、木瓜蛋白酶(800 000 U/g)、十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)、L-亮氨酸(纯度98%),北京索莱宝科技有限公司;复合蛋白酶(120 000 U/g)、中性蛋白酶(100 000 U/g),上海源叶生物科技有限公司;风味蛋白酶(150 000 U/g)、邻苯二甲醛(O-phthalaldehyde, OPA)、N-乙酰-L-半胱氨酸(纯度99%),上海麦克林生化科技有限公司;T-AOC检测试剂盒(ABTS微板法),北京雷根生物技术有限公司。

2.2 仪器和设备

恒温磁力搅拌器、TG-16高速离心机,四川蜀科仪器有限公司;INFINITE 200多功能酶标仪,奥地利帝肯有限责任公司;立式压力蒸汽灭菌器、SHZ-C水浴恒温振荡器,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;PB-10 pH计,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;JY20002电子分析天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

2.3 实验方法

2.3.1 蛋白酶解液的制备

酶解工艺流程:牛肉、鲫鱼和猪蹄等质量混合→121℃高压灭菌30 min→控制1:2料液比→调节pH值→加酶→恒温酶解→灭酶(95℃,15 min)→冷却后离心(8 000 ×g,15 min)→取上清液→蛋白酶解液。

具体操作步骤:首先将牛肉、鲫鱼和猪蹄清洗干净,去除鲫鱼的头、尾和内脏,再等质量混合后,置于121℃下高压灭菌30 min。灭菌完成后,冷却至室温并搅碎,再按照1:2的质量比添加蒸馏水混合均匀,调节pH值和温度至各蛋白酶的最适反应条件后添加各类蛋白酶,恒温酶解5 h。在95℃的水浴条件下反应15 min;冷却至室温后,再以8 000 ×g的离心力进行离心15 min,取其上清液即为酶解液。

2.3.2 蛋白酶的选择

选择6种常见商业用酶,即碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、菠萝蛋白酶和中性蛋白酶,在各类酶的最适反应条件下(条件见表1)分别对牛肉、鲫鱼和猪蹄恒温酶解5 h。为了保证各个种类蛋白

酶的水解能力可比性,因此根据其各自酶活大小来确定加酶量,最终使得酶与底物的比例(E/S)均达到 1 000 U/g 蛋白。酶解完成后,将样品置于 95 ℃ 水浴条件下灭酶 15 min;冷却后,在 8 000 ×g 条件下离心 15 min,过滤取上清液。以总抗氧化能力(T-AOC)和水解度(DH)为评价指标比较各酶的酶解效果,分别筛选出三种动物蛋白水解的最佳蛋白酶。

表 1 蛋白酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of protease

酶种类	加酶量/ (U · g ⁻¹)	pH	温度 /℃	反应时间 /h	料液比 (w · w ⁻¹)
碱性蛋白酶	1 000	9.0~12.0	40~50	5	1:2
木瓜蛋白酶	1 000	6.0~7.0	50~65	5	1:2
复合蛋白酶	1 000	5.0~8.0	40~50	5	1:2
风味蛋白酶	1 000	7.5	50	5	1:2
菠萝蛋白酶	1 000	6.0~6.8	30~45	5	1:2
中性蛋白酶	1 000	7.5	45	5	1:2

2.3.3 复合酶解的单因素实验

由于单酶酶解达不到较高的水解度,且酶解后暴露的疏水性基团会影响酶解产物的感官风味,而多酶复配酶解能够提高水解度、酶解速率以及产物得率,因此采用多酶复配酶解来弥补单酶酶解的不足。

(1) 蛋白酶加酶量的确定。设置 800、1 000、1 200、1 400、和 1 600 U/g 五个水平加酶量,在酶解温度 50 ℃,酶解 pH 值为 7 的条件下酶解 5 h,以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标,优化加酶量。

(2) 酶解时间的确定。设置 1.5、3.0、4.5、6.0 和 7.5 h 5 个水平的酶解时间,在加酶量 1 000 U/g,酶解温度 50 ℃,酶解 pH 值为 7 的条件下进行酶解,以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标,优化酶解时间。

(3) 酶解温度的确定。设置 30、40、50 和 60 ℃ 4 个水平的酶解温度,在加酶量 1 000 U/g,酶解 pH 值为 7 的条件下酶解 5 h,以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标,优化酶解温度。

(4) 酶解 pH 的确定。设置 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 5 个水平的酶解 pH,在加酶量 1 000 U/g,酶解温度 50 ℃ 的条件下酶解 5 h,以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标,优化酶解 pH。

2.3.4 均匀实验设计

在前面单因素实验结果的基础上,选择加酶量、酶

解时间、酶解温度和酶解 pH 4 个因素,按照 $U_5(5^4)$ 均匀设计表设计实验,每组做 3 次平行实验,并用 MATLAB 7.1 软件设计均匀方案,均匀设计因素水平如表 2 所示。

表 2 均匀设计因素水平 $U_5(5^4)$ Table 2 Factors and levels of $U_5(5^4)$ uniform design

实验编号	酶解温度 /℃	酶解 pH	酶解时间 /h	加酶量 (U · g ⁻¹)
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	30	6.5	6.0	1 500
2	35	7.5	4.5	1 200
3	40	6.0	7.0	1 000
4	50	7.0	5.0	500

2.3.5 水解度(DH)的测定

选择 OPA 法测定混合动物蛋白酶解液的水解度^[12]。该方法基于 OPA 与氨基在巯基存在时发生的特异性反应。将 5 mL 的 20% (w/v) SDS 溶液、10 mL 的 50 mmol/L OPA 甲醇溶液、75 mL 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲溶液(pH=9.5)以及 10 mL 的 50 mmol/L 乙酰基-半胱氨酸水溶液混合,得到 OPA 试剂。OPA 试剂现配现用,并在使用前避光搅拌 60 min。取 10 μL 样品与 1.2 mL OPA 试剂混合,反应 10 min 后,测定吸光值 OD₃₄₀。同时以 L-亮氨酸为标准品绘制标准曲线。用 6 mol/L 的 HCl 在 110 ℃ 下水解蛋白质样品 24 h 后测定其所含氨基的总量。DH 的含量用 S_{DH} 表示,DH 的计算见式(1):

$$S_{DH} = \frac{N_{Tx} - N_{To}}{N_{Total} - N_{To}} \times 10 \quad (1)$$

式(1)中, N_{Tx} 为酶解后样品的游离氨基含量,μmol/mL; N_{To} 为酶解前样品的游离氨基含量,μmol/mL; N_{Total} 为蛋白质样品中游离氨基的含量,μmol/mL。

2.3.6 总抗氧化(T-AOC)能力的测定

参照总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(ABTS 微板法)进行测定。将 ABTS 溶液和氧化剂等体积混合,室温避光存放 12 h 后,用蒸馏水将其稀释 30~55 倍成 ABTS 工作液($A_{734} = 0.7 \pm 0.05$ 或 $A_{405} = 1.4 \pm 0.05$)。ABTS 工作液与待测样品按照 40:1 的体积比依次加入 96 孔板中,避免产生气泡,小心混匀,室温反应 5 min 后于 734 nm 或者 405 nm 处测定吸光度。以 Trolox 为标准品绘制标准曲线。

2.3.7 还原力的测定

参考 Sampath Kumar^[13] 方法并略有改变。用蒸馏

水配制一定蛋白浓度的酶解液,取各样品 2 mL,依次加入 2 mL 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液和 1%的铁氰化钾溶液,混合均匀后,将混合液置于 50 ℃ 的条件下保温 20 min。取出待冷却至室温后,加入 2 mL 10%的 TCA 溶液,然后以 3 000 r/min 的转速离心 10 min;取上清液 2 mL,向其中加入 2 mL 的蒸馏水以及 0.4 mL 的 0.1% 氯化铁后,混合均匀,反应 10 min 再测定吸光值 OD_{700} 。

2.3.8 蛋白酶解物的感官评价

参照 GB/T 29605-2013《感官分析—食品感官质量控制导则》和 GB/T 12312-2012《感官分析—味觉敏感度的测定方法》,选择定量描述分析法对混合蛋白酶解物进行感官评价^[14]。由 10 名专业的评定人员对样品的外观、气味、鲜味和苦味 4 个指标进行感官评价,平均分为最终得分,满分 40 分,感官评价标准见表 3^[15-16]。此外,在进行感官评价前,还需要对评定小组进行味觉培训,向其提供两种参考溶液以便更明确样品的滋味程度:咖啡因(0.4 g/L,略有苦味;0.8 g/L,苦味明显),谷氨酸钠(1.0 g/L,鲜味较淡;2.0 g/L,鲜味浓郁)。

表 3 感官评价标准

Table 3 Standards and scores of sensory evaluation		
项目指标	评分标准	评 分
外观	色泽金黄,澄清透明,无浮沫	8~10
	色泽浅黄/偏褐,略有浑浊,较少浮沫	5~7
	色泽呈褐色,有可见浑浊,较多浮沫	0~4
气味	肉香味浓郁,无不良气味	8~10
	肉香味较淡,有较淡腥味	5~7
	无肉香味,有明显腥味	0~4
鲜味	鲜味浓郁,明显咸味	8~10
	鲜味较淡,略有咸味	5~7
	无鲜味,无咸味,有肉腥味	0~4
苦味	无苦味	8~10
	略有苦味,可以接受	5~7
	苦味明显,难以接受	0~4

2.4 统计分析

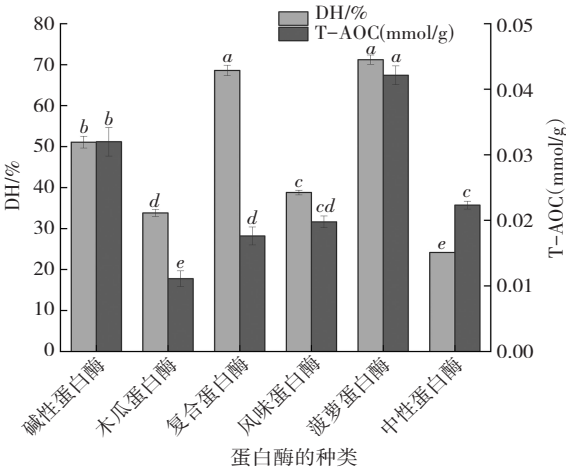
本研究的试验均进行了 3 次平行实验,且所有实验数据结果都采用平均值加标准偏差的形式来表示。与此同时,使用 SPSS 软件进行数据的差异性分析;利用方差分析方法(ANOVA)比较每组数据之间是否存在统计学差异;采用主成分分析法(principal component analysis,PCA)分析单因素实验数据;采用 MATLAB 7.1 软件分析设计均匀实验;使用 Origin 2023 进行绘图。

3 结果与分析

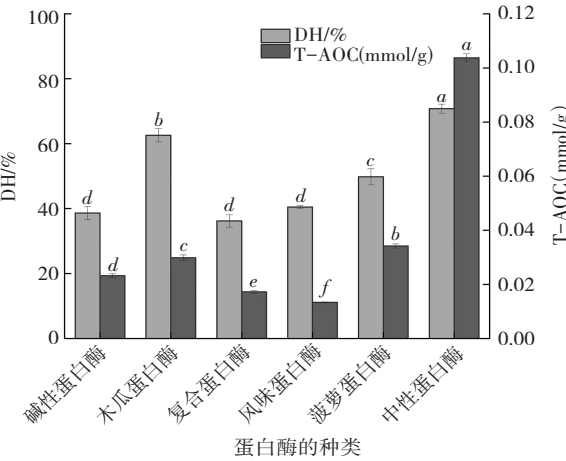
3.1 最佳用酶的筛选

由图 1(a)可知,选择不同的蛋白酶水解牛肉蛋白,其酶解液的水解度和总抗氧化能力具有显著性差异($P<0.05$)。从实验结果来看,菠萝蛋白酶解液的 DH 值最高,为 71.23%,其次为复合蛋白酶,其中菠萝蛋白酶和复合蛋白酶酶解液的水解度与其他 4 种蛋白酶酶解液的水解度差异显著;同时,菠萝蛋白酶解液的 T-AOC 显著高于另外 5 种蛋白酶。综合水解度和总抗氧化能力的比较结果,选择菠萝蛋白酶为牛肉蛋白酶解的最佳用酶,进行后续的最佳工艺条件探讨。

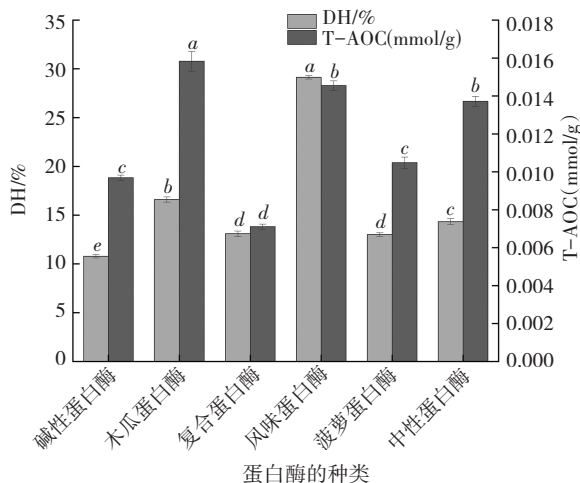
由图 1(b)可知,鲫鱼的中性蛋白酶解液的 DH 和 T-AOC 皆达到了最大值,分别为 70.79%和 0.103 8 mmol/g,与其他五组对比,具有显著性差异($P<0.05$),因此选择中性蛋白酶作为鲫鱼蛋白酶解的最佳用酶。由图 1(c)可知,猪蹄的风味蛋白酶解液的 T-AOC 值略低于木瓜蛋白酶,略高于中性蛋白酶,但其 DH 值显著高于其他 5 种蛋白酶酶解液,为 29.13%。因此,综合考虑两个评价指标后,选择风味蛋白酶作为猪蹄的最佳水解用酶。



(a) 不同蛋白酶对牛肉蛋白酶解液 DH 和 T-AOC 的影响



(b) 不同蛋白酶对鲫鱼蛋白酶解液 DH 和 T-AOC 的影响



(c) 不同蛋白酶对猪蹄蛋白酶解液 DH 和 T-AOC 的影响
 注:不同小写字母代表差异显著($p<0.05$),相同代表差异不显著

图 1 不同蛋白酶对三种动物蛋白酶解液 DH 和 T-AOC 的影响
 Fig.1 Effects of different proteases on DH and T-AOC of three animal protein hydrolysates

3.2 复合酶解的单因素实验

分别对混合蛋白复合酶解过程中的加酶量、酶解时间、酶解温度和酶解 pH 进行单因素实验,以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标,确定最优值。

PCA 是一种聚类显示分析方法,在食品化学领域得到了广泛使用^[17]。PCA 的分析原理是,将实验中多个具有相关性的指标进行降维处理,从而得到了几个相关性较低但仍然保留了大部分原始数据差异的主成分因子^[18-19]。利用 PCA 分析混合动物蛋白酶解液的品质,最终得到了相较于单一评价指标更为准确和全面的综合性分析结果,还防止了具有相关性的指标对品质评价结果产生影响^[20-21]。

3.2.1 加酶量单因素实验结果

在表 4 中,可以看出前 3 个主成分因子的方差贡献率分别为 73.280 %、19.799 %和 6.889%,其累计方差贡献率达到了 99.968%,表明选取的这 3 个主成分因子所包含的信息超过了 95%的原始信息变量,故选择 3 个主成分因子是比较合适的。

表 4 不同加酶量混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量

成 分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	2.931	73.280	73.280
2	0.792	19.799	93.079
3	0.276	6.889	99.968

PCA 综合得分是根据特征向量和特征值计算得来的,反应各指标在主成分因子中的得分^[22]。由表 5 可知,在五个梯度的加酶量中,酶解液的综合得分随着加酶量的增加先上升再降低,1 200 U/g 的加酶量综合得分最高,其次是 1 000 U/g 和 1 400 U/g 的加酶量,这可能是因为当加酶量较少时,酶与底物充分反应,此时酶解液的水解度和抗氧化活性随着加酶量的增加而增加;当加酶量达到一定浓度时,酶趋于饱和导致酶解效果减弱,且加酶量过大时,酶解液的颜色过深,不良气味偏重。由于单因素实验选取的实验范围不够全面,根据其结果,后续的均匀设计实验考虑了极端情况,并扩大了加酶量的范围,探讨是否会出现比 1 200 U/g 更好的情况。

表 5 不同加酶量混合动物蛋白酶解液品质指标综合得分

Table 5 Comprehensive scores of quality indicators of mixed animal protein hydrolysates with different enzyme additions

加酶量/(U · g ⁻¹)	因子 1	因子 2	因子 3	综合得分
800	-0.384 7	1.067 6	-0.500 3	-0.105 0
1 000	0.277 3	0.863 2	0.653 2	0.419 1
1 200	2.192 1	-0.695 3	0.206 3	1.482 9
1 400	0.461 4	-0.482 2	-0.578 6	0.202 8
1 600	-2.546 1	-0.753 3	0.2194	-1.999 8

3.2.2 酶解时间单因素实验结果

表 6 是不同酶解时间混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量。由表 5.1 分析,该单因素实验选择 3 个主成分因子,其特征值为 3.288、0.674 和 0.037,其累计方差贡献率达到了 99.986%,表示选择的 3 个主成分因子包含了原始变量 99.986%的信息量,能较好地解释原始变量信息。根据表 7,可以得出结论,酶解时间过短或过长,酶解液的综合得分都不高。时间过短,酶与底物的作用不充分,酶解产物的抗氧化活性较弱;时间过长,水解过度反而导致酶解产物的活性降低和苦味增强。当酶解时间为 6 h 时,综合考虑 DH、T-AOC、还原力和感官评分 4 个指标,其综合得分最高,为最优酶解条件。据此结果,后续均匀设计时,选择酶解时间的范围为 3~7 h。

表 6 不同酶解时间混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量

Table 6 Principal component analysis explaining total variables for quality indexes of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic times

成 分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	3.288	82.200	82.200
2	0.674	16.851	99.051
3	0.037	0.935	99.986

表 7 不同酶解时间混合动物蛋白酶解液品质指标综合得分
Table 7 Comprehensive scores of quality indicators of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic times

时间/h	因子 1	因子 2	因子 3	综合得分
1.5	-2.029 0	-0.609 3	-0.213 1	-1.772 5
3	-1.649 3	0.208 6	0.293 3	-1.317 8
4.5	0.766 9	1.286 9	-0.109 8	0.846 2
6	2.318 5	-0.784 4	0.068 4	1.774 3
7.5	0.592 9	-0.101 9	-0.038 7	0.469 8

3.2.3 酶解温度单因素实验结果

由表 8 分析可知,在不同酶解温度混合动物蛋白酶解液品质指标 PCA 中,选择 3 个主成分因子后续计算。3 个主成分因子特征值分别为 3.390、0.493 和 0.116,其累计方差贡献率达到了 100%,说明这 3 个主成分因子已经包含了原始变量全部的信息,可以代替原始变量反映混合动物蛋白酶解液品质指标。由表 9 可知,温度过高或过低都会影响蛋白酶的活性,导致酶解液的综合得分降低。在 4 个温度梯度的综合得分中,酶解温度为 40 ℃时的品质指标综合得分最高,达到了 1.659 1,为最优酶解参数。在 40 ℃左右时,蛋白在适度的热作用下,其结构发生变化,内部疏水基团暴露,有利于酶解反应的进行,在一定程度上综合提高了酶解液的水解度,抗氧化活性和感官风味。考虑酶的最适反应条件和实验环境,在后续均匀设计实验中,选择酶解温度的范围为 30~70 ℃。

表 8 不同酶解温度混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量
Table 8 Principal component analysis explaining total variables for quality indexes of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic temperatures

成分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	3.390	84.759	84.759
2	0.493	12.335	97.094
3	0.116	2.906	100.000

表 9 不同酶解温度混合动物蛋白酶解液品质指标综合得分
Table 9 Comprehensive scores of quality indicators of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic temperatures

温度/℃	因子 1	因子 2	因子 3	综合得分
30	-0.192 6	0.652 1	-0.400 1	-0.094 4
40	2.059 5	-0.683 2	-0.078 5	1.659 1
50	0.507 1	0.557 6	0.423 7	0.510 9
60	-2.374 1	-0.526 5	0.054 9	-2.075 6

3.2.4 酶解 pH 单因素实验结果

由表 10 分析可知,在酶解 pH 单因素实验中,选择 3 个主成分因子,其特征值分别为 3.139、0.754 和 0.099,其累计方差贡献率达到了 99.806%,表明这 3 个主成分因子几乎包含完整的原始数据指标信息,可以代替原始变量反应不同酶解 pH 混合动物蛋白酶解液的品质。根据表 11 可知,在 5 组酶解 pH 的综合得分中,当酶解 pH 为 6.5 时,混合动物蛋白的品质指标综合得分最高,达到了 2.099 0,为最优酶解参数。其次综合得分较高的是 pH 为 6 和 7。推测原因,这可能是因为当 pH 为 6~7 时,3 种蛋白酶的活性最好,且底物的溶解性较高,增加了酶与底物的接触概率;当 pH 过高时,蛋白酶失活,无法与底物发生反应。据此结果,在后续均匀设计实验中,酶解 pH 选取的范围为 5~8,探讨是否会有更优值存在。

表 10 不同酶解 pH 混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量
Table 10 Principal component analysis explaining total variables for quality indexes of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic pH values

成分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	3.139	78.475	78.475
2	0.754	18.845	97.320
3	0.099	2.486	99.806

表 11 不同酶解 pH 混合动物蛋白酶解液品质指标综合得分
Table 11 Comprehensive scores of quality indicators of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic pH values

酶解 pH	因子 1	因子 2	因子 3	综合得分
6	-0.490 6	1.332 1	0.076 9	-0.133 5
6.5	2.716 0	-0.133 5	-0.285 1	2.099 0
7	0.625 4	-0.077 5	0.436 8	0.488 9
7.5	-0.933 5	-1.103 1	0.102 1	-0.939 8
8	-1.917 3	-0.018 1	-0.330 8	-1.514 6

3.3 混合动物蛋白酶解的均匀实验结果

按照表 2 设计的因素水平进行实验,各组实验所测得的 DH、T-AOC、还原力和感官评分如表 12 所示。各组样品如图 2 所示。

表 12 $U_5(5^4)$ 均匀设计实验结果

Table 12 Experimental results of $U_5(5^4)$ uniform design

实验编号	酶解温度 /℃	酶解 pH	酶解时间 /h	加酶量 /(U · g ⁻¹)	DH /%	T-AOC /(mmol · g ⁻¹)	还原力	感官评价
	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	30	6.5	6.0	1 500	41.20±3.86	0.113 7±0.008 2	0.381 7±0.017 4	24.23±0.77
2	35	7.5	4.5	1 200	43.51±5.60	0.033 6±0.005 2	0.343 9±0.005 8	26.27±0.82
3	40	6.0	7.0	1 000	45.35±4.83	0.034 4±0.002 2	0.384 9±0.003 0	28.73±0.78
4	50	7.0	5.0	500	39.75±3.29	0.027 9±0.001 2	0.319 2±0.007 6	23.83±1.38

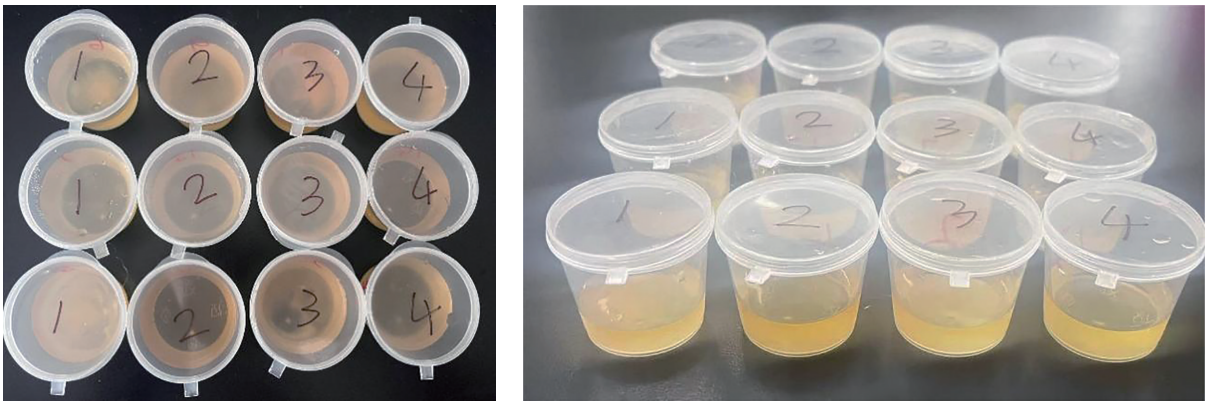


图 2 均匀试验中感官评价的各组样品

Fig. 2 Groups of samples for sensory evaluation in the homogeneity test

3.3.1 线性回归方程的计算

由 SPSS 分析软件对表 12 中均匀设计实验的水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评价结果进行二次多项式逐步回归分析,得到的方程分别为式(2)一式(5):

$$A_1 = 1.617 - 0.0973 \cdot X_2 - 9.856 \times 10^{-5} \cdot X_1^2 - 9.408 \times 10^{-8} \cdot X_4^2 \tag{2}$$

$$A_2 = -0.1927 - 0.002196 \cdot X_2 + 2.8055 \times 10^{-4} \cdot X_1^2 + 1.5977 \times 10^{-7} \cdot X_4^2 \tag{3}$$

$$A_3 = 0.2821 + 1.866 \times 10^{-5} \cdot X_3 \cdot X_4 - 2.926 \times 10^{-8} \cdot X_4^2 \tag{4}$$

$$A_4 = -744.57 + 2.612 \cdot X_1 X_3 + 0.0337 \cdot X_1 X_4 - 0.073 \cdot X_3 X_4 \tag{5}$$

3.3.2 相关系数分析

查临界相关系数表,置信度大于 95%时, $R^2 > 0.3809$,则回归直线对观测值的拟合显著。而表 13 中 4 个模型的相关系数 R^2 分别为 0.817、0.817、0.875 和 0.815 都远大于 0.3809,因此 4 个回归方程成立。同时,各模型调整后的相关系数 R^2 分别为 0.749、0.748、0.847 和 0.746,与其对应的 R^2 相近,说明 4 个回归方程皆稳定。此外,各模型的标准偏差与对应实验测得数据的平均值相除皆小于 10%(实验所允许的误差,仪器误差接近 10%),说明方程具有可靠性。

表 13 相关系数分析

Table 13 Correlation coefficient analysis

模型	R	R^2	调整 R^2	标准估计的 误差	更改统计量				
					R^2 更改	F 更改	df1	df2	Sig. F 更改
1	0.904 ^a	0.817	0.749	0.032 315 3	0.817	11.921	3	8	0.003
2	0.904 ^a	0.817	0.748	0.036 966 4	0.817	11.894	3	8	0.003
3	0.935 ^a	0.875	0.847	0.011 908 7	0.109	7.844	1	9	0.021
4	0.903 ^a	0.815	0.746	59.407 542 9	0.815	11.782	3	8	0.003

3.3.3 最佳酶解工艺及其验证

模拟最佳酶解工艺参数,通过 MATLAB7.1 编程计算,整个计算过程在联想 HP480 计算机运行。 X_1 的取值范围为 30~60 ℃,每间隔 1 计算一次; X_2 的取值范围为 5~8,每间隔 0.5 计算一次; X_3 的取值范围为 3~7 h,每隔 0.5 计算一次; X_4 的取值范围为 500~1 600 U/g,每隔 50 计算一次。 $Y_1 \sim Y_4$ 的方程已由 SPSS 软件进行回归分析后得到,见式(2)一式(5)。

软件分析结果得出当酶解温度 43 ℃,酶解 pH 值为 6,酶解时间 6 h,加酶量 1 200 U/g 为最佳酶解工艺,此时预测的混合动物蛋白酶解液的 DH 为 44.86%,T-AOC 为 0.071 5 mmol/g,还原力为 0.396 7,感官评分为 34.166 7。在该酶解条件下进行 3 次验证实验,测得 4 个指标的平均值分别为 43.12%、0.079 2 mmol/g、0.441 5 和 32.15,验证实验结果与理论结果相近,证明均匀实验设计可靠,可为混合动物蛋白酶解工艺的研究提供参考。

4 结 论

根据实验结果,选出菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶为混合动物蛋白复配酶解用酶。通过单因素实验和均匀设计试验,以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标,得出结论:多酶酶解混合动物蛋白的最佳工艺参数为酶解温度 43 ℃,酶解 pH 值为 6,酶解时间 6 h,加酶量为 1 200 U/g,在此条件下,混合动物蛋白的水解度为 43.12%,总抗氧化能力为 0.079 2 mmol/g,还原力为 0.441 5,感官评分为 32.15。由此,制备出了具有良好抗氧化能力和感官滋味的混合动物蛋白酶解液。本研究为混合动物蛋白的酶解工艺以及深入研究提供了理论基础,后续将对混合动物蛋白酶解物的抗氧化活性进行探究,拟再通过小鼠力竭游泳实验探讨混合动物蛋白酶解产物的抗疲劳功效,以期能应用到食品工业,研发出具有缓解机体疲劳的、促进体能恢复的抗疲劳功能性食品。

参考文献(References):

[1] ALVES A C, TAVARES G M. Mixing animal and plant proteins: is this a way to improve protein technological functionalities?[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 97: 105171.

- [2] 李希宇,杨怀谷,唐道邦,等.牛肉蛋白水解及活性肽功能特性的研究进展[J].食品工业科技,2021,42(13): 379-385.
- LI Xi-yu, YANG Huai-gu, TANG Dao-bang, et al. Research progress on beef proteolysis and functional properties of active peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(13): 379-385.
- [3] OZEL B, ZHANG Z, HE L, et al. Digestion of animal-and plant-based proteins encapsulated in κ -carrageenan/protein beads under simulated gastrointestinal conditions [J]. Food Research International, 2020, 137: 109662.
- [4] 刘丽君,伊丽,李彤,等.驼血蛋白酶解制备抗氧化肽工艺参数[J].食品科技,2019,44(6): 119-125.
- LIU Li-jun, YI Li, LI Tong, et al. Process parameters of preparing antioxidant peptides by enzymolysis camel blood[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(6): 119-125.
- [5] 佟晓红,王欢,刘宝华,等.生物解离大豆蛋白酶解物体外模拟消化抗氧化活性变化[J].食品科学,2019,40(15): 50-56.
- TONG Xiao-hong, WANG Huan, LIU Bao-hua, et al. Changes in antioxidant activity of soybean protein hydrolysates from enzyme-assisted aqueous extraction of oil under simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Science, 2019, 40(15): 50-56.
- [6] OZÓN B, COTABARREN J, VALICENTI T, et al. Chia expeller: A promising source of antioxidant, antihypertensive and antithrombotic peptides produced by enzymatic hydrolysis with Alcalase and Flavourzyme [J]. Food Chemistry, 2022, 380: 132185.
- [7] KORHONEN H, PIHLANTO A. Food-derived bioactive peptides: Opportunities for designing future foods[J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9(16): 1297-1308.
- [8] MEISEL H, FITZGERALD R J. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects[J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9(16): 1289-1295.
- [9] 阮晓慧,韩军岐,张润光,等.食源性生物活性肽制备工艺、功能特性及应用研究进展[J].食品与发酵工业,2016,42(6): 248-253.
- RUAN Xiao-hui, HAN Jun-qi, ZHANG Run-guang, et al. Progress in the preparation, functional properties and applications of food-derived bioactive peptides [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(6): 248-253.

- [10] CROWE K M, FRANCIS C, DIETETICS A O N A. Position of the academy of nutrition and dietetics: Functional foods[J]. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 2013, 113(8): 1096–1103.
- [11] 刘丹. 秋刀鱼蛋白抗氧化肽的分离纯化及其抗疲劳功效研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015: 15–21.
LIU Dan. Study on the purification of antioxidant peptide from Pacific saury protein and its antifatigue activities[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015: 15–21.
- [12] FU Y, LIU J, HANSEN E T, et al. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma[J]. Food Chemistry, 2018, 257: 163–171.
- [13] SAMPATH KUMAR N S, NAZEER R A, JAIGANESH R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*)[J]. Amino Acids, 2012, 42(5): 1641–1649.
- [14] 邬威, 王瑾, 付余. 牛心肌蛋白酶解物的呈味特性与其结构关系研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(8): 15–21.
WU Wei, WANG Jin, FU Yu. Protein hydrolysates from bovine cardiac muscle: Structure-taste relationship [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(8): 15–21.
- [15] 李希宇, 林伟玲, 杨怀谷, 等. 不同蛋白酶水解牛肉蛋白产物的 ACE 抑制活力比较[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 197–204, 161.
LI Xi-yu, LIN Wei-ling, YANG Huai-gu, et al. Comparative study on ACE inhibitor activity of beef protein hydrolyzed by different proteases[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 197–204, 161.
- [16] 张庆春, 余晓婉, 相兴伟, 等. 复配酶法制备南极磷虾鲜味酶解液的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 195–205.
ZHANG Qing-chun, YU Xiao-wan, XIANG Xing-wei, et al. Optimization of preparation process of Antarctic krill hydrolysate with delicate taste by compound enzyme method [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 195–205.
- [17] KERI R, CHETHANA K, SASIDHAR B, et al. Phytochemical composition of *Caesalpinia crista* extract as potential source for inhibiting cholinesterase and β -amyloid aggregation: Significance to Alzheimer's disease [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2018, 8(10): 500.
- [18] GRANATO D, SANTOS J S, ESCHER G B, et al. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 72: 83–90.
- [19] 王建芳, 高山, 牟德华. 基于主成分分析和聚类分析的不同品种燕麦品质评价[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 85–91.
WANG Jian-fang, GAO Shan, MOU De-hua. Quality evaluation of different varieties of oat based on principal components analysis and cluster analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 85–91.
- [20] 符勇, 陶菲, 邵海燕, 等. 荔枝干品质评价指标体系的建立[J]. 中国食品学报, 2013, 13(1): 158–164.
FU Yong, TAO Fei, GAO Hai-yan, et al. Establishment of quality evaluation index system for dehydrated litchi[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(1): 158–164.
- [21] 周全. 几种多元统计分析方法及其在生活中的应用[D]. 荆州: 长江大学, 2012: 24–29.
ZHOU Quan. The introduction of several multivariate statistical method and its application[D]. Jingzhou: Yangtze University, 2012: 24–29.
- [22] FRANCINI A, ROMEO S, CIFELLI M, et al. ^1H NMR and PCA-based analysis revealed variety dependent changes in phenolic contents of apple fruit after drying[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1206–1213.

责任编辑:陈 芳