



蓝圆鲈分离蛋白酶解产物的制备及其抗大米淀粉老化特性

孙乐常^{1,2,3}, 孙小舒¹, 林端权^{1,2,3}, 陈玉磊^{1,2,3},
翁凌^{1,2,3}, 缪松^{1,4}, 曹敏杰^{1,2,3*}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学, 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021;

3. 大连工业大学, 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034;

4. 爱尔兰农业部农业与食品发展局 Teagasc 食品研究中心, 爱尔兰 科克 999014)

摘要: 为了进一步拓展海洋鱼类蛋白在食品中的应用, 以蓝圆鲈分离蛋白为原料, 利用酶解改性得到溶解性良好的蓝圆鲈分离蛋白酶解物 (BPIH), 并研究其对大米淀粉 (RS) 短期老化的抑制作用。通过响应面法优化酶解改性工艺制备 BPIH, 并分别按 RS 的 3%、6%、9% (质量百分比) 进行添加。通过测定 RS 的凝沉性、动态黏弹性、热学特性以及微观结构分析评价 BPIH 的抗淀粉老化活性。结果显示, 响应面法确定的最佳条件: 酶底比 5 000 : 1 (U/g)、酶解时间 3 h、料液比 1.00 : 3.81、酶解温度 46.36 °C、酶解 pH 6.30, 氮溶指数 (NSI) 实际值为 85.41%±0.82%, 与预测值 86.37% 接近。该酶解条件下 BPIH 水解度达到 21.62%。BPIH 中小于 1 000 u 的肽占 79.94%, 主要为小分子低聚寡肽。加入 BPIH 可以减弱 RS 的凝沉现象, 降低 RS 在 4 °C 保存过程中的储能模量 (G'), 显著降低老化后 RS 的峰值温度 (T_p) 和焓值 (ΔH_r); 加入 BPIH 的大米淀粉, 老化后微观结构有较大孔洞, 提升了淀粉糊化后保留内部水分的能力。研究表明, BPIH 能够抑制 RS 在 4 °C 保存期间凝胶网络和微晶结构的形成, 同时可能限制了淀粉分子间的聚集, 抑制或延缓 RS 的短期老化。本研究为蓝圆鲈分离蛋白酶解物在食品蛋白配料中的应用提供理论参考。

关键词: 蓝圆鲈; 分离蛋白; 酶解; 淀粉短期老化

中图分类号: S 986.1

文献标志码: A

婴幼儿辅助食品 (辅食) 是除母乳外, 为满足婴幼儿营养与生长发育需要而添加的其他食物^[1]。大米作为谷物类辅食——婴幼儿米粉的主要原料, 富含淀粉、蛋白质及维生素等营养物质, 是婴幼儿首选添加的辅食^[2]。然而大米淀粉经烹饪糊化后易迅速老化, 老化淀粉不仅会使食品质地和味道变差, 降低产品质量, 还会降低其消化吸收率, 这可能为婴幼儿脆弱的消化系统带来负担^[3]。国内外研究显示, 通过向淀粉中添加蛋白质或蛋白

水解物, 可以一定程度上延缓或抑制淀粉的老化行为, 从而可能减少婴幼儿米粉类食品的品质劣化。肖瑜等^[4]研究了不同蛋白质对大黄米淀粉老化的抑制机制, 发现淀粉-蛋白质能够由氢键作用而紧密相连, 而且蛋白质的加入可以降低体系老化焓, 抑制大黄米淀粉重结晶, 从而延缓其老化。Niu 等^[5]发现猪血浆蛋白水解物可以与直链淀粉相互作用, 减少玉米淀粉间的氢键结合, 对抑制淀粉短期老化具有重要作用。Niu 等^[6]使用复合蛋白

收稿日期: 2023-03-08 修回日期: 2023-07-18

资助项目: 福建省科技厅引导性 (重点) 项目 (2023N0014); 农业农村部冷冻调理水产品加工重点实验室开放课题基金 (KLRCAPP2018-03)

第一作者: 孙乐常 (照片), 从事水产品加工与综合利用研究, E-mail: sunlechang@163.com

通信作者: 曹敏杰, 从事水产品加工与综合利用研究, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn



酶制备米糠蛋白水解物, 发现其能够分散于糊化大米淀粉分子之间, 阻止氢键形成, 具有抑制大米淀粉短期和长期老化的作用。

海洋鱼类蛋白具有营养价值高、易消化等优点, 是理想的优质蛋白资源。将鱼类蛋白应用于婴幼儿米粉类产品中, 不仅能赋予产品更丰富的风味, 还能提高产品的营养价值, 满足婴幼儿对优质蛋白摄入的营养要求。为了进一步提高鱼类蛋白的可应用性, 国内外研究学者通过等电点沉淀法制备分离蛋白, 不仅有效回收鱼肌肉中的优质蛋白, 还可去除脂肪、骨刺等杂质^[7]。然而, 制备获得的鱼类分离蛋白经干燥后溶解性差, 直接添加进米粉, 容易发生絮凝、分层等现象, 必须进行一定的改性以提高溶解性。针对这一问题, 目前国内外主要采用单酶或多酶酶解的方法进行改性。Alahmad 等^[8] 使用无花果蛋白酶对鳙 (*Hypophthalmichthys nobilis*) 蛋白酶解改性, 发现改性后其溶解度在所有水解度和 pH 范围内可达到 84.88%~95.48%, 极大提高了鳙蛋白的可应用性。Hemker 等^[9] 对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 副产物分离蛋白进行压力辅助酶解改性, 显著改善了酶解产物的溶解性、乳化性和抗氧化活性。Yathisha 等^[10] 使用碱性蛋白酶酶解沙带鱼 (*Lepturacanthus savala*) 蛋白, 发现酶解能够显著影响蛋白质二级结构, 进而提高酶解产物的溶解性、持油力、ACE-I 抑制和 DPPH 自由基清除活性。蓝圆鲈 (*Decapterus maruadsi*) 又称巴浪鱼, 是我国重要的低值海洋经济鱼类之一。2022 年蓝圆鲈全国捕捞总量达 39.5 万 t, 其中福建省捕捞量 19.0 万 t, 居全国首位^[11]。前期研究发现利用酶解可有效提高蓝圆鲈分离蛋白的溶解性、乳化性、起泡性功能特性, 且溶解度随酶解程度的增加而增加^[12]。

本实验以蓝圆鲈分离蛋白为对象, 以可溶性蛋白回收率(氮溶指数)为酶解改性的评价指标, 采用响应面法优化酶解工艺参数, 将得到的酶解产物按不同添加量添加于大米淀粉中, 以研究酶解产物对大米淀粉短期老化行为的影响, 旨在为水产蛋白在食品配料蛋白中的应用提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

冰鲜蓝圆鲈(每条约重 150 g) 购于厦门市高崎水产批发市场。大米淀粉购于无锡金农生物科技有限公司。木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白

酶、中性蛋白酶, 广西南宁庞博生物工程有限公司。考马斯亮蓝 R-250, 兴隆达公司。色谱级甲醇、乙腈, 美国 Fisher Chemical 公司; 标准牛血清白蛋白 (BSA), 美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

Avanti J-26S XP 大型台式高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司。759 s 紫外可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司。GF-1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司。Mini-PROTEAN 蛋白质电泳装置, 美国 Bio-Rad 公司。Alpha 1-4 LDplus 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司。Phenom Pro 台式扫描电子显微镜, 荷兰 Phenom-World Pr 公司。DHR-2 流变仪、Q2000 差示扫描量热仪, 美国 TA 仪器公司。

1.3 实验方法

提取蓝圆鲈分离蛋白 参考孙乐常等^[8] 的方法, 采用碱溶解-等电点沉淀法制备蓝圆鲈分离蛋白。所有操作均在 4 ℃ 进行。取蓝圆鲈背部肌肉, 加入 8 倍体积冰水组织捣碎, 调节 pH 至 11.0, 搅拌后离心回收上清液, 继续调节 pH 至 5.5, 离心回收沉淀。得到的沉淀加入一定量 NaHCO₃ 调节 pH 至中性, 于 -20 ℃ 保存备用。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照集美大学科技伦理委员会制定的规章制度执行。

蓝圆鲈分离蛋白酶解物的制备 将蓝圆鲈分离蛋白与一定体积超纯水混合并均质, 蛋白悬浊液在酶解温度下预热 20 min, 在不同酶解条件下进行反应。酶解结束后沸水加热 10 min 灭酶, 离心回收蓝圆鲈分离蛋白酶解上清液 (BPIH), 低温保存备用。

氮溶指数 (NSI) 的测定 参考 Sukkhown 等^[13] 的方法, 并做一定修改, 具体: 取 100 μL 分离蛋白悬浊液, 加入 2 倍体积蛋白溶解液 [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 含 8 mol/L 尿素, 2% SDS], 完全溶解后得到总蛋白样品。将酶解上清液和总蛋白样品稀释一定倍数后, 参考 Lowry 等^[14] 的方法测定蛋白含量, 以牛血清蛋白 (BSA) 绘制标准曲线。NSI (%) 计算公式:

$$\text{NSI}(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

式中, m_1 为酶解上清液样品的蛋白含量 (mg/mL); m_2 为酶解前样品的总蛋白含量 (mg/mL)。

水解度的测定 响应面优化后酶解产物的水解度 (DH, %) 参考 Nielsen 等^[15] 的 OPA 法进行

测定, 并略作修改。以 0.1 mg/mL *L*-丝氨酸溶液为标准品, 取 400 μ L 待测样品与 3 mL OPA 试剂混匀, 室温下避光反应 2 min 后测量其在 340 nm 下的吸光度, 以去离子水为空白对照。

$$\text{Ser NH}_2 = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}} \times \frac{0.9516 \text{ meqv}}{L} \times \frac{V \times N}{X \times P} \quad (2)$$

$$h = \frac{\text{Ser NH}_2 - \beta}{\alpha} \quad (3)$$

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (4)$$

式中, A_{sample} 、 A_{standard} 和 A_{blank} 分别表示酶解上清液样品、标准溶液样品和空白对照在 340 nm 的吸光值; V 表示样品体积 (L); N 表示稀释倍数; X 表示样品质量 (g); P 表示样品中所含蛋白质的质量分数; β 查表得 0.40; α 查表得 1.00; h 表示每克蛋白质中断裂的肽键数 (mmol/g); h_{tot} 表示原料总肽键数, 查表得 8.6 mmol/g。

筛选最适用酶 本实验共选用 4 种蛋白酶(木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶), 以酪蛋白为底物测定蛋白酶活性。此步骤固定酶解反应条件为酶底比 5 000 : 1 (U/g)、反应时间 4 h、料液比 1 : 4, 酶解温度和 pH 均控制为蛋白酶最适条件(表 1)。以酶解上清液氮溶指数评价不同酶的酶解效果, 筛选出最合适的酶进行酶解工艺优化。

表 1 4 种蛋白酶的活性及最适酶解条件

Tab. 1 Enzymatic activities of the four proteases and their optimal hydrolysis conditions

蛋白酶种类 protease types	活性/(U/g) enzymatic activity	pH	温度/ $^{\circ}$ C temperature
木瓜蛋白酶 papain	1.57×10^4	6.0	50
风味蛋白酶 flavourzyme	2.18×10^4	7.0	50
碱性蛋白酶 alcalase	5.24×10^5	8.0	50
中性蛋白酶 neutral protease	1.49×10^6	7.0	50

单因素试验 设置试验初始酶解条件为酶底比 5 000 : 1 (U/g)、料液比 1 : 4、酶解温度 50 $^{\circ}$ C、酶解 pH 6.0、酶解时间 4 h。依次以酶底比 (1 000 : 1、3 000 : 1、5 000 : 1、7 000 : 1、9 000 : 1、11 000 : 1 U/g)、料液比 (1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6)、酶解温度 (35、40、45、50、55、60、65 $^{\circ}$ C)、酶解 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、

8.0) 和酶解时间 (1、2、3、4、5、6 h) 为单一变量, 考察不同条件对酶解物 NSI 值的影响。

响应面法优化 在单因素试验基础上, 选择料液比 (A)、酶解温度 (B) 和酶解 pH (C) 为响应因素, 酶解物 NSI 值 (Y) 为响应值, 以 Box-Behnken 设计原理进行响应面分析试验设计, 因素和水平见表 2。运用 Design Expert 12 软件拟合因素与响应值之间的函数关系, 分析回归方程从而预测最优工艺参数。

表 2 响应面试验因素与水平设计表

Tab. 2 Response surface experiment factor and levels

编码 code	因素 factors		
	A	B	C
-1	1 : 3	45	5.5
0	1 : 4	50	6.0
1	1 : 5	55	6.5

注: A. 料液比, B. 酶解温度($^{\circ}$ C), C. 酶解 pH, 下同。
Notes: A. solid-liquid ratio, B. enzymolysis temperature ($^{\circ}$ C), C. enzymolysis pH, the same below.

酶解物分子质量分析 采用高效凝胶过滤色谱法测定酶解产物的分子质量分布, 参考 Wu 等^[16] 的方法, 并作适当修改。使用 TSK gel G2000 SWXL ($\phi 7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$) 色谱柱, 检测波长为 220 nm, 流速设定为 0.5 mL/min, 柱温为 25 $^{\circ}$ C, 上样量 10 μ L。结果利用 GPC offline 软件进行分析, 计算得到酶解物不同分子质量分布比例。

Tricine-SDS-PAGE 参考 Schagger^[17] 的方法进行 Tricine-SDS-PAGE 分析。将未酶解和酶解后样品的蛋白含量稀释至 1 mg/mL, 经 SDS 化后上样进行电泳。

酶解物冷冻干燥 以响应面法优化条件酶解蓝圆鲈分离蛋白, 离心后回收酶解上清液。上清液预冻后真空冷冻干燥 48 h, 粉末样品于低温干燥处保存备用。

淀粉糊凝沉性测定 参照赵小梅等^[18] 的方法并做适当修改, 取 0.3 g 大米淀粉 (RS) 悬浮在 30 mL 超纯水中, 而后将 3%、6% 和 9% 的 BPIH(以淀粉干基计, 质量分数) 添加至淀粉悬浊液中, 沸水加热 20 min 糊化。将淀粉糊转移至 40 mL 黑盖玻璃瓶中, 30 $^{\circ}$ C 下静置, 每隔 1 h 记录上层清液高度 (H_1) 和淀粉糊总高度 (H_0), 共记录 8 h。用上清液的体积分数随时间的变化来绘制曲线, 从而表示淀粉糊的凝沉性, 公式:

$$\text{凝沉性}(\%) = \frac{H_1}{H_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中, H_1 为每小时上清液高度 (cm); H_0 为黑盖玻璃瓶中淀粉糊总高度 (cm)。

淀粉糊动态黏弹性测定 参考 Niu 等^[5] 的方法并做改进, 使用 40 mm 平行铝板进行扫描, 间隙为 1.0 mm。制备质量分数为 5% 的 RS 悬浊液, 分别加入淀粉干基重量的 3%、6% 和 9% BPIH, 漩涡振荡 5 min 后, 立即转移至流变仪帕尔贴板, 样品边缘用硅油液封以防止水分蒸发。测量开始前, 设置帕尔贴板温度为 95 °C, 加热 20 min 使淀粉悬浊液充分糊化, 之后立即将温度降至 4 °C。在 4 °C 条件下, 将储能模量 (G')、损耗模量 (G'') 和损耗角正切 ($\tan\delta$) 作为时间的函数记录 3 h。恒定应变和恒定频率分别设置为 5% 和 1 Hz (线性黏弹区范围)。

热力学性质测定 利用差示扫描量热仪 (DSC), 在超高纯氮气环境下分析 RS 和 RS-BPIH 的热转变温度进行扫描。参考 Niu 等^[5] 的方法, 具体操作: 称取 3 mg RS 于铝坩埚中, 加入不同浓度 BPIH 溶液 6 μL , 使 BPIHs 终浓度为 3%、6% 和 9% (淀粉干基, 质量分数)。所有铝坩埚在室温下密封 12 h 以充分水合。在 30~90 °C, 以 10 °C/min 的恒定加热速率进行热扫描, 执行糊化过程, 记录热转变温度 (T_0 、 T_p 、 T_c) 和糊化焓 (ΔH_g)。糊化后的样品在 4 °C 下储存 5 h, 以加速淀粉老化。然后, 10 °C/min 的恒定速率从 30~90 °C 再次扫描

老化样品, 记录热转变温度和老化焓 (ΔH_r)。

老化淀粉的 SEM (scanning electron microscope) 分析 参考董慧娜等^[19] 的方法并作适当修改。配制质量分数为 7% 的 RS 悬浊液, 分别加入淀粉干基重量的 3%、6% 和 9% BPIH, 糊化后于 4 °C 放置 10 h, 然后取出进行真空冷冻干燥。取冻干的老化淀粉样品, 真空条件下喷金 75 s 后, 于电镜中放大 1000 倍观察微观结构。

1.4 数据分析

实验采用 Design-Expert 12 软件进行响应面试验设计与分析, 采用 Excel 和 Origin 2021 软件绘图, 采用 SPSS 17.0 软件的 Duncan 氏检验进行差异显著性分析 ($P < 0.05$ 为显著差异)。实验数据均重复 3 次, 数据以平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果

2.1 最适用酶的筛选

经风味蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解后, 其产物 NSI 值分别为 $51.50\% \pm 0.81\%$ 、 $66.71\% \pm 1.20\%$ 、 $65.11\% \pm 0.68\%$ 和 $69.37\% \pm 0.36\%$, 其中木瓜蛋白酶为最高值, 碱性蛋白酶和中性蛋白酶次之, 风味蛋白酶最低 (图 1-a)。与未酶解的对照组相比, 酶解 4 h 后, 木瓜蛋白酶酶解的蛋白剩余量最少 (图 1-b), 表明酶解最充分, 与图 1-a 结果一致。综合以上结果, 选择木瓜蛋

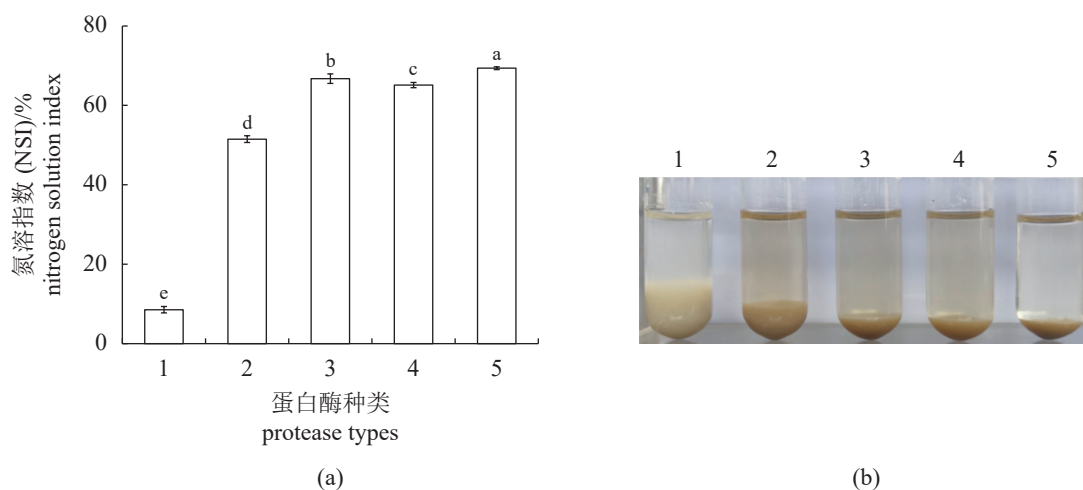


图 1 不同酶酶解的 NSI (a) 与酶解样品 (b)

1. 对照组, 2. 风味蛋白酶, 3. 碱性蛋白酶, 4. 中性蛋白酶, 5. 木瓜蛋白酶。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), NSI. 氮溶指数, 下同。

Fig. 1 The NSI (a) and enzymolysis samples (b) hydrolysed by different proteases

1. control group, 2. flavourzyme, 3. alcalase, 4. neutral protease, 5. papain. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), NSI. nitrogen solution index; the same below.

白酶进行后续的工艺优化。

2.2 单因素试验

对酶底比、料液比、温度、酶解时间和 pH 进行单因素试验。如图 2-a 所示, NSI 值随着加酶量的增加而呈现上升趋势, 但在酶底比为 5 000 : 1 (U/g) 之后, NSI 值则基本保持稳定。为了控制成本, 酶底比选择 5 000 : 1 (U/g)。

随着料液比的增加, NSI 值缓慢增加并趋于平缓 (图 2-b)。在料液比 1 : 4 时达到 NSI 值拐点, 考虑到经济成本, 确定料液比为 1 : 4。

酶解温度对 NSI 值的影响如图 2-c 所示, NSI 值随温度的增加而先增加后略微降低, 在 50 °C 时达到最大值 71.57%。因此, 确定最佳酶解温度为 50 °C。

pH 6.0 时酶解产物的 NSI 值达到最大值 72.04% (图 2-d), 显著高于其他条件 ($P < 0.05$), 所以选择 pH 6.0 为最适酶解 pH。

酶解时间结果显示, NSI 值随酶解时间的延长而逐渐增加并趋于平稳, 在 3 h 时达到最大值 70.97%, 所以选择最佳酶解时间为 3 h (图 2-e)。

2.3 响应面优化试验

响应面试验结果 响应面试验遵循 Box-Behnken 设计原则, 在酶底比为 5 000 : 1 (U/g)、酶解时间 3 h 的条件下, 考察料液比 (A)、温度 (B) 和 pH (C) 对蓝圆鲈分离蛋白酶解物 NSI (Y) 的影响, 响应面设计及其结果如表 3 所示。

回归模型拟合 运用 Design Expert 12 软件对表 3 结果进行多元回归拟合, 建立 NSI (Y) 对料液比 (A)、酶解温度 (B)、酶解 pH (C) 和酶解时间 (D) 的多元二次回归方程:

$$Y = -1823.38 + 58.54A + 35.55B + 309.11C + 0.25AB - 0.08AC - 0.95BC - 9.16A^2 - 0.33B^2 - 20.99C^2 \quad (6)$$

方差分析 回归模型方差分析如表 4 所示,

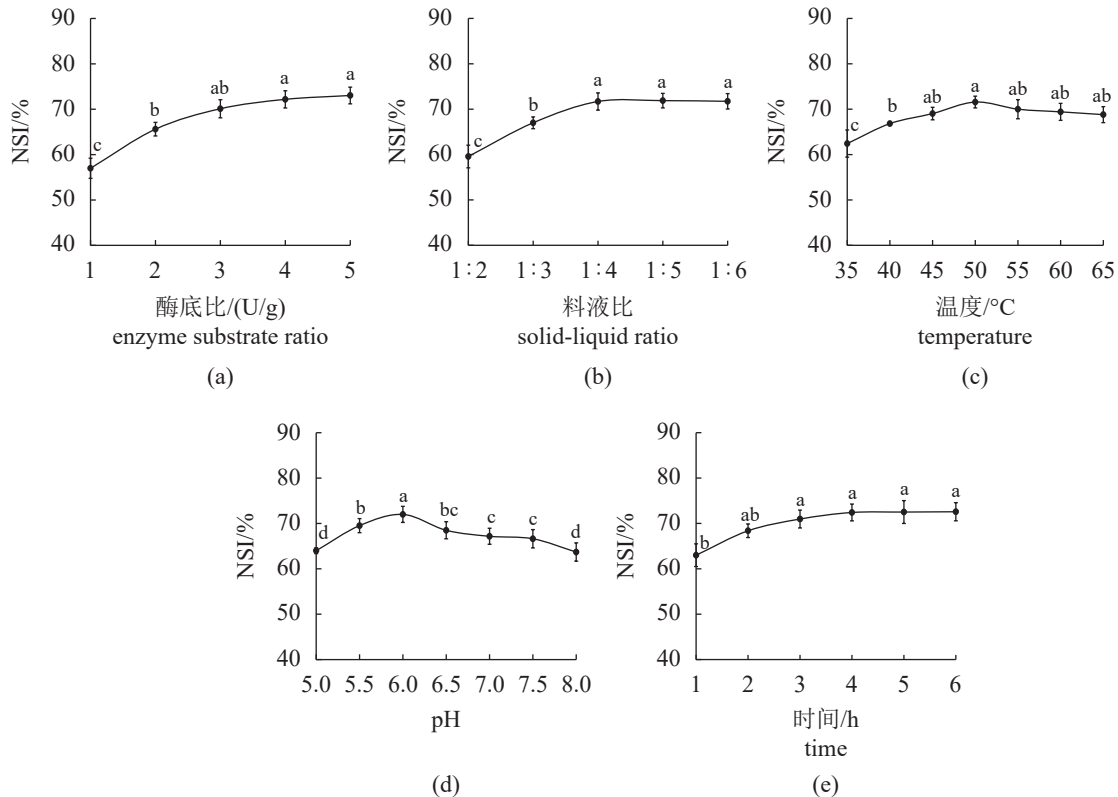


图 2 不同因素对 NSI 的影响

(a) 酶底比, 1. 1 000 : 1, 2. 3 000 : 1, 3. 5 000 : 1, 4. 7 000 : 1, 5. 9 000 : 1; (b) 料液比; (c) 酶解温度; (d) 酶解 pH; (e) 酶解时间。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Influence of different factors on NSI

(a) enzyme substrate ratio, 1. 1 000 : 1, 2. 3 000 : 1, 3. 5 000 : 1, 4. 7 000 : 1, 5. 9 000 : 1; (b) solid-liquid ratio, (c) enzymolysis temperature, (d) enzymolysis pH, (e) enzymolysis time. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表 3 响应面试验设计及结果

Tab. 3 Response surface experimental design and results

编号 standard order	A	B	C	Y/%
1	-1	-1	0	78.11
2	1	-1	0	69.23
3	-1	1	0	55.41
4	1	1	0	51.61
5	-1	0	-1	63.24
6	1	0	-1	59.65
7	-1	0	1	73.56
8	1	0	1	69.82
9	0	-1	-1	71.55
10	0	1	-1	55.25
11	0	-1	1	84.52
12	0	1	1	58.68
13	0	0	0	81.14
14	0	0	0	80.68
15	0	0	0	82.63
16	0	0	0	79.53
17	0	0	0	80.91

注: Y. 氮溶指数NSI.
Notes: Y. nitrogen solution index.

模型 F 值为 136.51, F 值由于噪声而引起的可能性仅为 0.01%, 回归模型 $P < 0.0001$, 二者表明该模型是显著的。模型失拟项 F 值为 1.64, 意味着

样本之间的变化相对于纯误差并不显著; 失拟项 $P = 0.3152 > 0.05$ 为不显著, 对模型是有利的。 R^2 接近 1 时, 模型可以更好地拟合实际实验数据。本研究模型决定系数 R^2 为 0.9943, 这表明 99.43% 的行为变化可由拟合模型解释, 拟合度较高。预测 $R^2 = 0.9461$ 与调整 $R^2 = 0.9871$ 差异小于 0.2, 二者合理一致。信噪比为 34.01, 大于临界值 4.0, 表明信号充足, 模型合理、可用。

自变量影响显著性 根据表 4 可知, A、B、C 对 NSI 值有极显著影响 ($P < 0.01$), 且由 F 值可以确定, 三个因素对模型的影响显著性顺序为温度 (B) > pH (C) > 料液比 (A)。交互项中, 仅有温度/pH (BC) 交互作用极显著 ($P < 0.01$), 其余均无显著影响 ($P > 0.05$)。

因素交互作用分析 图 3 为根据上述的多元二次回归方程及模型方差分析得到的拟合模型响应曲面图和等高线图, 其形状可反映交互作用的强弱, 椭圆表示交互作用显著, 圆形则表示不显著^[20]。由图可知, 温度和 pH 的交互作用对 NSI 有显著影响, 而料液比与温度、料液比与 pH 的交互作用对 NSI 值的影响不显著, 与表 4 结果一致。

响应面优化工艺参数及验证 由回归模型预测的蓝圆鲈分离蛋白最优酶解工艺参数为料

表 4 响应面模型方差分析

Tab. 4 Response surface model analysis of variance

方差来源 source	平方和 sum of squares	自由度 df	均方 mean square	F 值 F -value	P 值 P -value	显著性 significance
模型 model	1936.71	9	215.19	136.51	<0.0001	**
A	50.00	1	50.00	31.72	0.0008	**
B	850.07	1	850.07	539.27	<0.0001	**
C	170.21	1	170.21	107.98	<0.0001	**
AB	6.47	1	6.47	4.11	0.0823	
AC	0.01	1	0.01	0.00	0.9515	
BC	22.730	1	22.730	14.420	0.0067	**
A ²	353.37	1	353.37	224.18	<0.0001	**
B ²	285.05	1	285.05	180.83	<0.0001	**
C ²	115.95	1	115.95	73.56	<0.0001	**
残差 residual	11.03	7	1.58			
失拟项 lack of fit	6.08	3	2.03	1.64	0.3152	
纯误差 pure error	4.95	4	1.24			
总变异 cor total	1947.74	16				

注: ** 差异极显著 ($P < 0.01$), * 差异显著 ($P < 0.05$)。 $R^2 = 0.9943$; $R^2_{Adj} = 0.9871$; $R^2_{Pre} = 0.9461$; 信噪比=34.01。
Notes: ** highly significant difference ($P < 0.01$), * significant difference ($P < 0.05$). $R^2 = 0.9943$; $R^2_{Adj} = 0.9871$; $R^2_{Pre} = 0.9461$; signal-to-noise ratio=34.01.

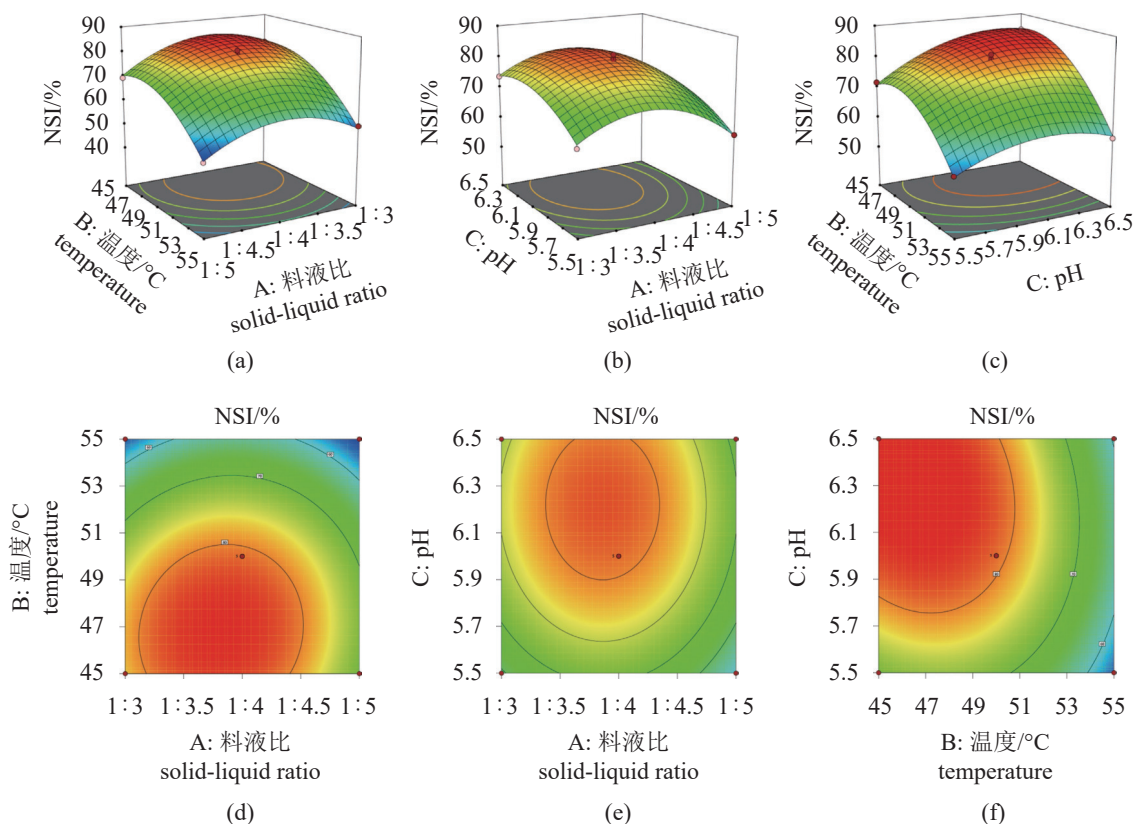


图3 料液比、温度和 pH 交互作用的响应面图和等高线图

Fig. 3 Response surface and contour lines of the interactions between solid-liquid ratio, temperature and pH

液比 1.00 : 3.81、酶解温度 46.36 °C、酶解 pH 6.30, 模型得到的 NSI 预测值为 86.37%。考虑到实际操作的可实施性, 在酶底比为 5 000 : 1 (U/g)、酶解时间 3 h、料液比 1.00 : 3.80、酶解温度 46.40 °C、酶解 pH 6.30 条件下进行验证试验, 通过 3 组平行试验, 得到 BPIH 的 NSI 平均值为 85.41%±0.82%, 与预测值接近, 表明拟合模型可靠。在此酶解条件下得到的 BPIH 水解度为 21.62%。

2.4 分子质量分析

利用高效液相色谱法和 Tricine-SDS-PAGE 分析 BPIH 的分子质量分布, 由图 4-a 可见, BPIH 的出峰时间主要集中在 14~30 min。BPIH 为分子质量小于 3 000 u 的短肽, 其中小于 1 000 u 的肽占 79.94%, 小于 500 u 的肽占 56.44% (表 5), 说明在响应面优化的酶解条件下, 蓝圆鲈分离蛋白被充分酶解为小分子的低聚寡肽, 这与图 4-b 的 Tricine-SDS-PAGE 的结果一致。

2.5 淀粉糊凝沉性

淀粉糊随着时间的延长而逐渐凝沉, 在 2~5 h 时凝沉速率较快, 5 h 后逐渐趋于平稳, 在凝

沉 8 h 后, 所有样品上清液体积比均达到 50% 以上 (图 5)。RS-BPIH 样品上清液体积分数在所有时间下均低于 RS 样品, 并且随着 BPIH 浓度的增加, 上清液体积分数逐渐降低。

2.6 淀粉糊动态黏弹性测定

淀粉糊化后立即降温至 4 °C 进行动态时间扫描, 以分析淀粉糊在 3 h 短期老化过程中的黏弹性变化。RS 的 G' 在 3 h 内持续增长, 其中最初 1 h 内快速上升, 而后增速逐渐减慢并趋于平稳 (图 6-a)。与 RS 相比, RS-BPIH 的 G' 增长趋势与 RS 相似, 但均小于 RS, 且初始 G' 随着 BPIH 添加量的增加而逐渐降低, G' 的增长斜率逐渐变得平缓。RS 和 RS-BPIH 的 $\tan\delta < 1$, 随着时间的增加而降低后逐步趋于平稳 (图 6-b), 说明 $G' > G''$, 样品弹性占主导^[21]。另外, RS-BPIH 的 $\tan\delta$ 值高于 RS, 并且随着 BPIHs 添加量的增加而增加, 说明 RS-BPIH 中的弹性组分较 RS 更少, 与 G' 的变化规律一致。

2.7 DSC 分析

所有样品在 70~80 °C 均可观察到明显的吸热

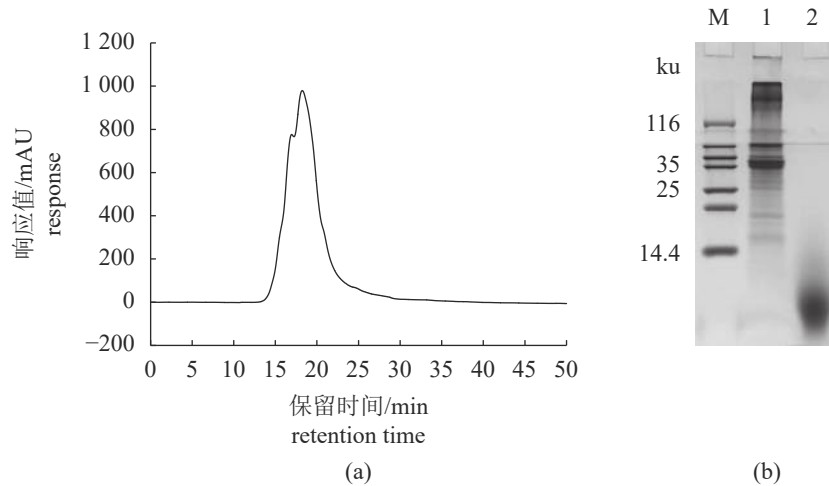


图4 BPIH 分子质量分析

(a) BPIH 的高效液相色谱图; (b) 蓝圆鲈分离蛋白及 BPIH 的 Tricine-SDS-PAGE 分析, M.标准蛋白 Marker, 1.未酶解, 2.酶解后。

Fig. 4 Molecular weight analysis of BPIH

(a) HPLC of BPIH; (b) Tricine-SDS-PAGE analysis of the blue round scud protein isolate and BPIH, M. standard protein Marker, 1. unenzymatic digestion, 2. after enzymatic digestion.

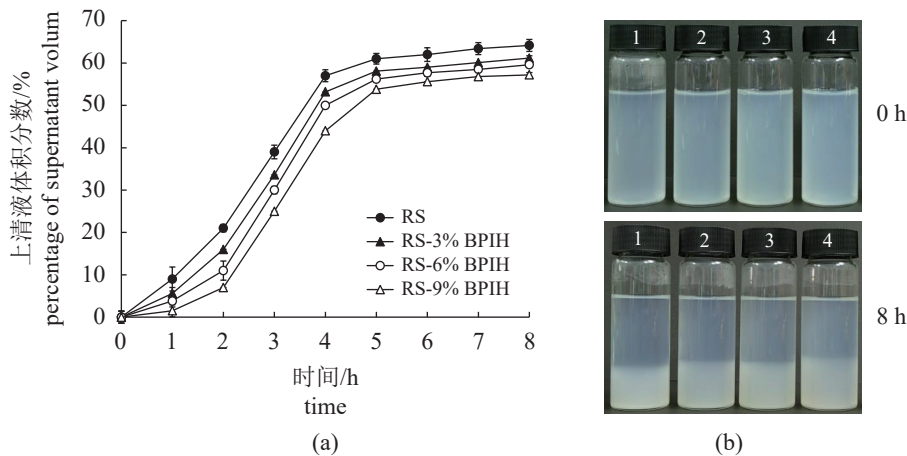


图5 不同浓度 BPIH 对大米淀粉糊凝沉性的影响

(a) 淀粉糊凝沉性随时间的变化; (b) 淀粉糊静置 0 h 和 8 h 的凝沉情况, 1~4 依次表示 RS、RS-3% BPIH、RS-6% BPIH、RS-9% BPIH。

Fig. 5 Effects of different concentrations of BPIH on the retrogradation of rice starch paste

(a) changes in the retrogradation of starch pastes over time; (b) retrogradation of starch paste after standing for 0 h and 8 h, 1-4 indicates RS, RS-3% BPIH, RS-6% BPIH, RS-9% BPIH, respectively.

表5 BPIH 分子质量分布比例

Tab. 5 Molecular weight distribution ratio of BPIH

分子质量/u MW	峰面积百分比/% peak area percentage
>3 000	1.39±0.16
1 000~3 000	18.64±0.19
500~1 000	23.50±0.95
<500	56.44±0.96

峰, 随着 BPIH 浓度的增加, 峰值温度 (T_p) 逐渐升高, 糊化焓值 (ΔH_g) 逐渐降低 (图 7-a)。在加入

9% BPIH 时, 峰值温度从 RS 的 (69.99 ± 0.26) $^{\circ}\text{C}$ 提高到 (74.43 ± 0.39) $^{\circ}\text{C}$, 而糊化焓从 (4.05 ± 0.05) J/g 降低至 (3.11 ± 0.11) J/g (表 6)。

将糊化后的淀粉样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 5 h 后, 再次执行 DSC 升温程序, 与糊化过程的趋势不同, 老化淀粉中只观察到一个轻微的吸热峰 (图 7-b)。对照组 RS 吸热峰出现在 37.73~67.30 $^{\circ}\text{C}$, 峰值温度为 (57.15 ± 0.27) $^{\circ}\text{C}$, 老化焓为 (1.16 ± 0.08) J/g (表 6)。添加 BPIH 后显著增加了老化 RS 的 T_0 , 降低了 T_p 、 T_c 和老化焓 ($P<0.05$)。

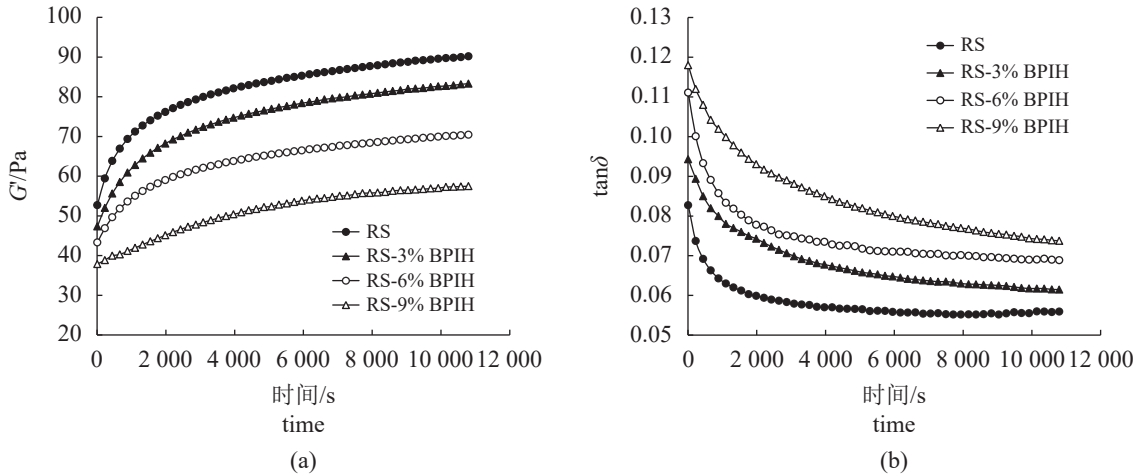


图 6 不同浓度 BPIH 对老化淀粉 G' (a) 和 $\tan\delta$ (b) 的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of BPIH on G' (a) and $\tan\delta$ (b) of retrograded starch

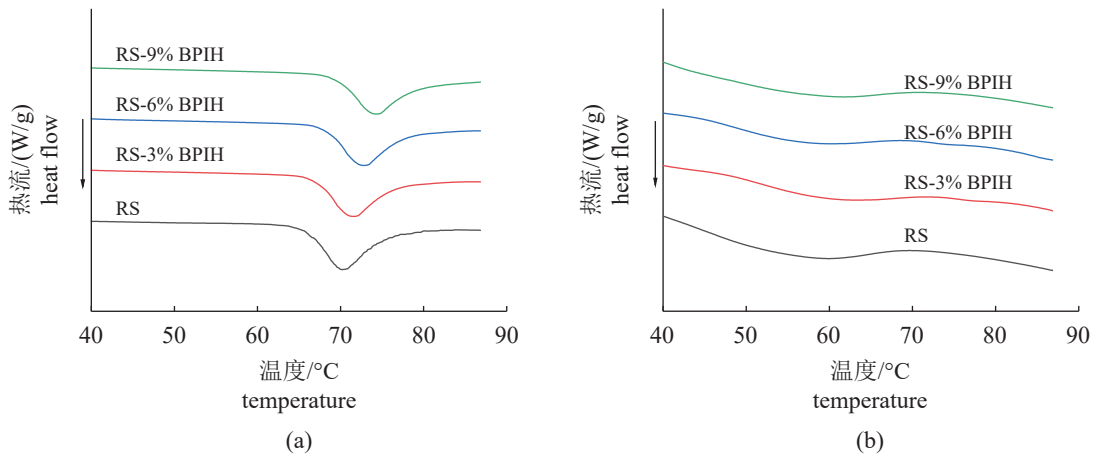


图 7 不同浓度 BPIH 对糊化淀粉 (a) 和老化淀粉 (b) 热分析图谱的影响

Fig. 7 Effects of different concentrations of BPIH on the thermal analysis patterns of gelatinized starch (a) and retrograded starch (b)

表 6 不同浓度 BPIH 对糊化淀粉和老化淀粉转变温度和转化焓的影响

Tab. 6 Effects of different concentrations of BPIH on the transformation temperature and enthalpy of gelatinized starch and retrograded starch

样品 samples	糊化淀粉 gelatinized starch				老化淀粉 retrograded starch			
	$T_0/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$	$T_c/^\circ\text{C}$	$\Delta H_g/(\text{J/g})$	$T_0/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$	$T_c/^\circ\text{C}$	$\Delta H_r/(\text{J/g})$
RS	65.80±0.33 ^c	69.99±0.26 ^c	78.25±1.31 ^c	4.05±0.05 ^a	37.73±0.81 ^d	57.15±0.27 ^a	67.3±0.84 ^a	1.16±0.08 ^a
RS-3% BPIH	68.85±1.25 ^b	71.82±0.42 ^b	80.44±0.08 ^{bc}	3.65±0.07 ^b	39.66±0.67 ^c	56.59±0.02 ^{ab}	66.57±0.23 ^{ab}	0.78±0.05 ^b
RS-6% BPIH	69.57±0.45 ^{ab}	72.26±1.11 ^b	81.93±0.6 ^{ab}	3.41±0.16 ^b	41.42±0.19 ^b	55.09±0.57 ^{bc}	65.32±0.64 ^b	0.59±0.05 ^{bc}
RS-9% BPIH	70.84±0.26 ^a	74.43±0.39 ^a	83.38±0.26 ^a	3.11±0.11 ^c	42.68±0.31 ^a	54.45±1.1 ^c	63.25±0.98 ^c	0.45±0.12 ^c

注: 同一列中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.8 老化淀粉 SEM 分析

图版为扫描电镜观察的 RS 与 RS-BPIH 经 4 °C

10 h 短期老化的微观结构。老化的 RS 与 RS-BPIH 具有清晰的三维凝胶网络(图版)。其中对照组 RS 孔洞细小, 明显形成了更加致密的凝胶网

络, 出现老化的典型状态 (图版-1); 而加入 BPIH 后, 凝胶网络的孔隙随着 BPIHs 添加量的增加而增加 (图版-2~4)。

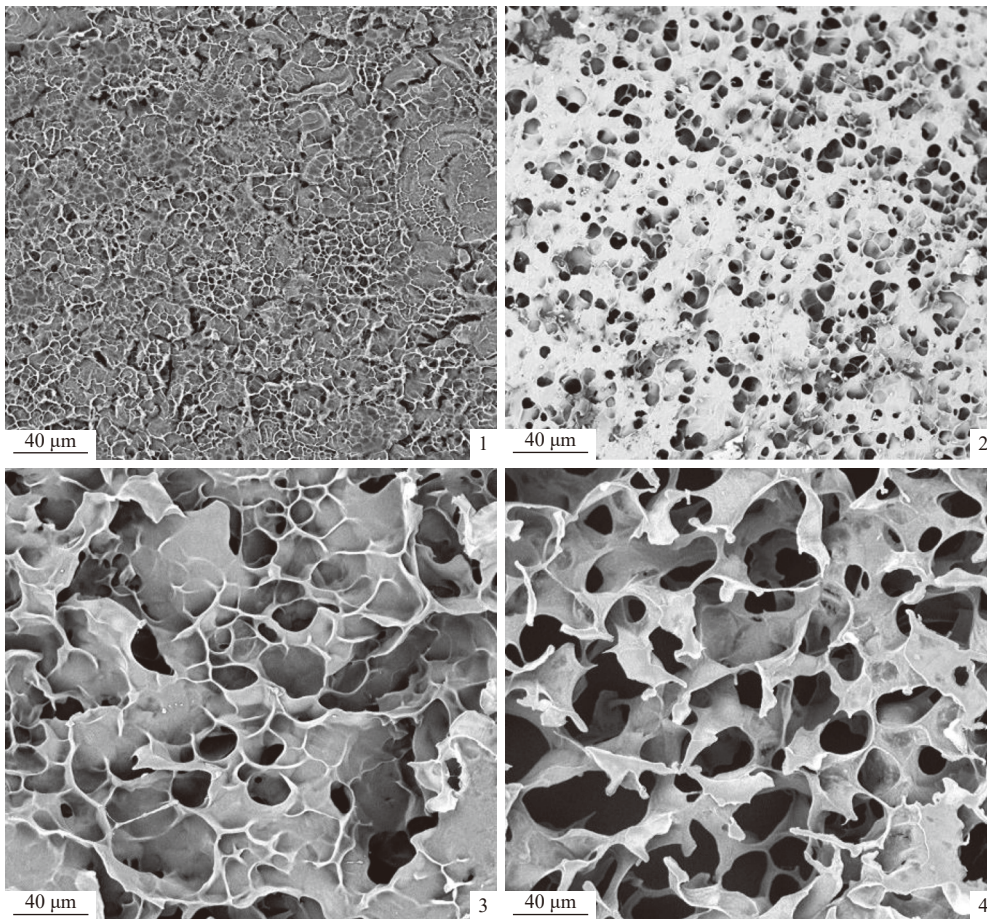
3 讨论

3.1 筛选最适用酶

NSI 是通过测定蛋白质在溶液中的含量来评价蛋白质溶解度的方法, 在酶解反应中具有与水解度相同的变化趋势^[13]。经过 4 种不同蛋白酶酶解后, 产物 NSI 值出现显著差异 ($P < 0.05$), 说明

不同酶对蓝圆鲈分离蛋白酶解效果不同。高 NSI 的蛋白质或肽显示出良好的溶解性, 因此木瓜蛋白酶酶解产物具有相对更好的溶解性, 即为 4 种蛋白酶中最适合酶解蓝圆鲈分离蛋白的一种^[13]。

不同蛋白酶酶解效果的差异可能归因于蛋白底物的氨基酸组成和不同蛋白酶酶切位点的差异^[22]。风味蛋白酶是一种来自米曲霉发酵的内切蛋白酶和外肽酶混合物, 主要从多肽链末端切割氨基酸, 酶解可用的 $-NH_2$ 端数量有限, 所以可能造成酶解速率相对缓慢^[23]。碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶均属于内切酶, 具有广泛的催



图版 大米淀粉-蓝圆鲈分离蛋白酶解粉复合物短期老化扫描电镜图

1-4 依次表示短期老化的 RS、RS-3% BPIH、RS-6% BPIH、RS-9% BPIH。

Plate Image of short-term retrogradation of RS and RS-BPIH

1-4 in order indicates RS, RS-3% BPIH, RS-6% BPIH, RS-9% BPIH for short-term retrogradation.

化活性, 其中碱性蛋白酶对羧基端为芳香族或强疏水性氨基酸残基的肽键有着更高的水解优先性, 而木瓜蛋白酶的酶解位点主要为赖氨酸、精氨酸和甘氨酸的 $-COOH$ 端^[24-25]。孙乐常等^[7] 通过比较不同方法制备的蓝圆鲈分离蛋白的性质差异, 并

对分离蛋白氨基酸组成进行分析, 发现碱溶解-等电点沉淀法提取的分离蛋白中赖氨酸、精氨酸和甘氨酸具有较高含量, 因此相比之下, 木瓜蛋白酶更适合酶解蓝圆鲈分离蛋白, 故选择其进行后续响应面试验优化。

3.2 单因素试验及响应面优化

在单因素试验中, 木瓜蛋白酶添加量和料液比是工艺成本的可控因素。加酶量较小时, 蛋白底物相对过量, 随着加酶量增加, 更多底物被酶解为可溶性短肽, NSI 值随之增加。当继续提高加酶量, 底物中可酶解位点便趋于饱和, NSI 值增速降低^[26]。由图 2-a 可知, 本实验木瓜蛋白酶最适酶底比为 5 000 : 1 (U/g)。料液比方面, 当料液比较低时, 体系中蛋白底物浓度过高, 较少的液体含量限制了酶与蛋白质的相互作用, 导致酶解不充分^[27]。随着水量增加, 反应体系流动性提高, 但水量的持续增加并不会对 NSI 值带来持续的积极影响。因此, 为了节约成本, 选择最佳料液比为 1 : 4 (图 2-b)。酶解温度过低及过高均会影响蛋白酶的作用效果, 当温度为 50 °C 时, 木瓜蛋白酶达到最适作用温度 (图 2-c)。pH 变化可能会导致蛋白酶空间构象的变化, 从而降低酶活性, 并影响酶与底物的结合状态, 因此过酸或过碱的条件均不利于酶解反应进行^[28]。本实验中选择 pH 6.0 为木瓜蛋白酶的最适 pH (图 2-d)。当酶解反应时间为 1~3 h 时, 反应速率与时间正相关, NSI 值随酶解时间的延长而逐渐增加; 之后随着时间的延长, NSI 值增势渐近稳定, 3~6 h 内无显著增加 ($P>0.05$), 所以酶解时间选择 3 h (图 2-e)。

考虑到实际应用中的经济成本, 本研究固定酶底比为 5 000 : 1 (U/g), 酶解时间 3 h, 使用 Design Expert 12 软件分析料液比、温度和 pH 的因素交互作用。软件拟合的回归模型 $P<0.000 1$, 表明该模型显著; 失拟项 $P=0.315 2>0.05$ 为不显著, 可用该回归方程代替试验真实点对实验结果进行分析^[29]。分别将回归模型料液比 (A)、温度 (B)、pH (C) 因素中的一个固定在 0 水平, 可以得到另外两个因素的交互作用对模型的影响关系^[26]。由响应曲面图和等高线图可见, 将料液比固定于 1 : 4 的条件下, 温度取任意水平时, NSI 值随着 pH 的升高而逐渐增大。当 pH 不变时, NSI 值随着温度的降低而增加, 二者交互作用显著 (图 3)。料液比与温度、料液比与 pH 的交互作用对 NSI 值的影响不显著, 与表 4 结果一致。响应面模型预测的最优工艺参数为料液比 1.00 : 3.81、酶解温度 46.36 °C、酶解 pH 6.30, 在该条件下得到的 BPIH 实际 NSI 值为 85.41%±0.82%, 与预测值接近。

3.3 BPIH 的抗淀粉老化特性

在以上结果的基础上, 将冷冻干燥后的 BPIH

与大米淀粉按不同比例混合, 考察其对大米淀粉短期老化的影响。淀粉老化是指经过糊化的淀粉在室温或低于室温放置后, 出现的不透明甚至凝结而沉淀的现象^[30]。这是由于直链淀粉分子间依靠氢键作用形成较大的颗粒或束状结构, 当体积增大到一定程度时, 就形成了沉降^[18]。这种淀粉分子链间的相互吸引与排列, 重新聚集成致密、高度结晶化、不溶性的淀粉分子微晶束的过程, 即为淀粉的老化过程^[17, 31-35]。加入 BPIH 能明显减少糊化 RS 上清液析出 (图 5), 凝沉性减弱, 表明淀粉稳定性有所提高, 即添加 BPIH 可以有效抑制淀粉的老化现象^[31]。

动态黏弹性测定中, 储能模量 (G') 代表糊化淀粉分子网络结构的弹性特性, 是监测淀粉老化进程的重要指标^[33]。损耗模量 (G'') 表示淀粉糊老化过程中的黏性行为变化。损耗因子 ($\tan\delta$) 为 G'' 与 G' 的比值, 表示物质变形所损失能量的比例, 是反映样品黏弹性行为的重要指标^[21]。RS 与 RS-BPIH 在实验时间内 G' 持续上升 (图 6-a), $\tan\delta$ 均小于 1 且大幅降低 (图 6-b), 表明所有样品均发生了淀粉老化。Niu 等^[5] 在研究猪血浆蛋白水解物时也得出了相似的实验结果。这一现象与直链淀粉的聚集密切相关。在淀粉老化的初期, 主要发生的是和直链淀粉有关的短期老化, 由直链淀粉的快速重结晶引发一系列重排, 聚集在一起的分子形成了能让淀粉凝胶弹性更强的三维网状结构^[4-5, 19]。Dun 等^[34] 还提出, G' 随时间延长持续增加, 表明交联直链淀粉网络的形成是冷却后淀粉老化的典型特征。加入 BPIH 后, 大米淀粉的初始 G' 随着 BPIH 添加量增加而逐渐降低, G' 增长斜率也逐渐变得平缓 (图 6-a); $\tan\delta$ 随着 BPIHs 添加量的增加而增加 (图 6-b)。这些结果表明, 添加 BPIH 抑制了直链淀粉的重结晶, 延缓了直链淀粉凝胶网络的形成, 证明 BPIH 具有抑制大米淀粉短期老化的作用, 且该作用存在剂量相关性^[5]。

DSC 分析中, 加入 BPIH 改变了 RS 的糊化性质, 糊化峰值温度 (T_p) 升高, 焓值 (ΔH_g) 降低 (图 7-a)。这一现象可能是淀粉的不完全糊化所导致。淀粉的水分含量对其糊化过程有重要影响, 含水量越多, 淀粉越易糊化^[35]。蓝圆鲈分离蛋白经充分酶解后, 蛋白分子链断裂、伸展, 被掩埋的亲水侧链得以暴露。当把酶解产物加入淀粉中时, 这些亲水侧链与淀粉竞争结合水分, 减少了淀粉的糊化水量, 限制了淀粉与水的相互作用,

从而导致淀粉的不完全糊化, 因此吸热峰值温度向更高温度方向移动^[5,35-36]。淀粉的不完全糊化改变了微晶与非晶态基体之间的作用力, 熔化需要较低的热能^[5], 所以加入 BPIH 后糊化焓显著降低 ($P<0.05$)。将经过糊化的淀粉样品在 4 °C 下短期老化 5 h, 再次进行 DSC 分析, 发现添加 BPIH 后增加了老化 RS 的 T_0 , 降低了 T_p 、 T_c 和老化焓 (ΔH_r) (图 7-b)。淀粉老化形成重结晶, 此时须外加能量, 才能熔化淀粉分子微晶, 因此老化后的淀粉在 DSC 中会出现吸热峰, 且淀粉老化程度越大, 吸热峰越大, 熔融焓也越高^[32,37]。因此 T_p 和 ΔH_r 的降低表明 BPIH 抑制了 RS 在 4 °C 储存期间微晶结构的形成, 阻碍 RS 的短期老化行为, 且 BPIH 浓度越高, 抑制作用越明显。BPIH 能够抑制 RS 短期老化可能是由于其具有活性多羟基, 它们可能与直链淀粉形成氢键, 从而阻断了淀粉分子间及与水分子间的氢键作用, 抑制重结晶^[6,32]。此外, ΔH_r 的降低还可能归因于 RS 不完全糊化, 导致淀粉链的流动性受限^[5]。淀粉老化过程需要水分参与, 水分不仅为淀粉老化提供液体环境, 而且参与淀粉分子重结晶^[37]。添加 BPIH 会与 RS 竞争吸附水分^[35], 降低淀粉链的流动性, 从而阻碍 RS 的短期老化。

使用 SEM 观察淀粉短期老化后的微观结构, 淀粉凝胶网络的孔隙随着 BPIH 添加量的增加而增加 (图版)。淀粉老化后吸水能力下降, 水分析出散失^[32]。孔洞的形成是冷冻干燥过程将水分冻结为冰晶升华所致, 因此冻干前淀粉样品持水能力越强, 则冻干后样品孔洞越多^[19]。加入 BPIH 后凝胶网络孔隙增加, 说明 BPIH 提升了糊化淀粉保留内部水分的能力, 同时 BPIH 还可能限制了淀粉分子间的聚集, 抑制了凝胶网络形成, 一定程度上延缓了大米淀粉的短期老化。

综上所述, 利用响应面法优化木瓜蛋白酶酶解蓝圆鲂分离蛋白的工艺参数, 制备得到的 BPIH 具有抗淀粉老化特性, 能够显著抑制或延缓 RS 的短期老化, 且该作用存在剂量正相关性。这可能是由于 BPIH 抑制了淀粉分子内和分子间氢键的形成, 限制淀粉分子聚集, 阻碍了直链淀粉的重结晶。因此, 蓝圆鲂分离蛋白酶解物与大米淀粉的复配组合, 既丰富了大米淀粉营养价值, 又使其具备了抗淀粉老化能力。本研究可为蓝圆鲂分离蛋白酶解物作为食品蛋白配料提供理论参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 张君慧, 孟金凤, 王宇. 婴幼儿谷类辅食的专利技术概况[J]. *粮食与食品工业*, 2020, 27(3): 29-33.
Zhang J H, Meng J F, Wang Y. Overview of patent technology of children's grain complementary food[J]. *Cereal & Food Industry*, 2020, 27(3): 29-33 (in Chinese).
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 婴幼儿辅食添加营养指南: WS/T 678-2020 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
National Health Commission of the People's Republic of China. Nutrition guidelines of complementary feeding for infants and toddlers: WS/T 678-2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020 (in Chinese).
- [3] Xiao J H, Zhong Q X. Suppression of retrogradation of gelatinized rice starch by anti-listerial grass carp protein hydrolysate[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 72: 338-345.
- [4] 肖瑜, 杨新标, 林楠, 等. 不同蛋白质对大黄米淀粉老化特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(16): 45-51.
Xiao Y, Yang X B, Lin N, et al. Effects of adding different proteins on retrogradation properties of proso millet starch[J]. *Food Science*, 2020, 41(16): 45-51 (in Chinese).
- [5] Niu H L, Han Q, Cao C A, et al. Short-term retrogradation behaviour of corn starch is inhibited by the addition of porcine plasma protein hydrolysates[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 115: 393-400.
- [6] Niu L Y, Wu L Y, Xiao J H. Inhibition of gelatinized rice starch retrogradation by rice bran protein hydrolysates[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 175: 311-319.
- [7] 孙乐常, 林怡晨, 刘伟锋, 等. 蓝圆鲂酸/碱等电点沉淀法分离蛋白凝胶特性与消化特性[J]. *食品科学*, 2019, 40(12): 22-29.
Sun L C, Lin Y C, Liu W F, et al. Gelation and digestive properties of blue round scads (*Decapterus maruadsi*) protein recovered by acidic/alkaline isoelectric solubilization/precipitation[J]. *Food Science*, 2019, 40(12): 22-29 (in Chinese).
- [8] Alahmad K, Xia W S, Jiang Q X, et al. Effect of the degree of hydrolysis on nutritional, functional, and morphological characteristics of protein hydrolysate produced from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) using Ficin enzyme[J]. *Foods*, 2022, 11(9): 1320.
- [9] Hemker A K, Nguyen L T, Karwe M, et al. Effects of

- pressure-assisted enzymatic hydrolysis on functional and bioactive properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product protein hydrolysates[J]. *LWT*, 2020, 122: 109003.
- [10] Yathisha U G, Vaidya S, Sheshappa M B. Functional properties of protein hydrolyzate from ribbon fish (*Lepuracanthus savala*) as prepared by enzymatic hydrolysis[J]. *International Journal of Food Properties*, 2022, 25(1): 187-203.
- [11] 农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2023[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 61.
Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Promotion Station, Hina Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2023[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 61 (in Chinese).
- [12] 刘伟峰. 限制性酶解对蓝圆鲈分离蛋白功能特性的影响[D]. 厦门: 集美大学, 2020.
Liu W F. Effects of limited hydrolysis on the functional properties of protein isolate from blue round scads (*Decapterus maruadsi*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2020 (in Chinese).
- [13] Sukkhown P, Jangchud K, Lorjaroenphon Y, *et al.* Flavored-functional protein hydrolysates from enzymatic hydrolysis of dried squid by-products: effect of drying method[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 76: 103-112.
- [14] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [15] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642-646.
- [16] Wu Q, Cai Q F, Tao Z P, *et al.* Purification and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) gonads[J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 240(1): 137-145.
- [17] Schägger H. Tricine-SDS-PAGE[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 16-22.
- [18] 赵小梅, 李清明, 苏小军, 等. 桂淮系列淮山淀粉性质的测定[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 48-53.
Zhao X M, Li Q M, Su X J, *et al.* Starch properties of new Guihuai cultivars of Chinese yam[J]. *Food Science*, 2018, 39(18): 48-53 (in Chinese).
- [19] 董慧娜, 汪磊, 陈洁, 等. 板栗淀粉-脂质复合物对淀粉老化性质的影响[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2022, 43(1): 49-57.
Dong H N, Wang L, Chen J, *et al.* Effects of fatty acids and cooking methods on aging properties of chestnut starch[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2022, 43(1): 49-57 (in Chinese).
- [20] 涂宗财, 唐平平, 郑婷婷, 等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(5): 160-166.
Tu Z C, Tang P P, Zheng T T, *et al.* Optimization of swimming bladder collagen peptide preparation using response surface methodology and its antioxidant activity research[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(5): 160-166 (in Chinese).
- [21] 王金晓, 胡斐南, 许晨阳, 等. 基于流变学研究容重和含水率对土壤结构力学稳定性的影响[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(19): 147-155.
Wang J X, Hu F N, Xu C Y, *et al.* Effects of soil bulk density and water content on the mechanical stability of soil structure using rheological method[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2021, 37(19): 147-155 (in Chinese).
- [22] 任海伟, 石菊芬, 蔡亚玲, 等. 响应面法优化超声辅助酶解制备藏系羊胎盘肽工艺及抗氧化能力分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(24): 265-273.
Ren H W, Shi J F, Cai Y L, *et al.* Peptides from Tibetan sheep placental protein: optimization of ultrasound-assisted enzymatic preparation using response surface methodology and antioxidant activity evaluation[J]. *Food Science*, 2019, 40(24): 265-273 (in Chinese).
- [23] Xu Y X, Galanopoulos M, Sismour E, *et al.* Effect of enzymatic hydrolysis using endo- and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 14(1): 343-352.
- [24] 黄继翔. 产碱性蛋白酶芽孢杆菌的鉴定[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(2): 157-163.
Huang J X. Identification of a *Bacillus* strain producing alkaline protease[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(2): 157-163 (in Chinese).

- [25] 张钺, 尤留超, 朱颖琨, 等. 基于LC-MS/MS分析不同蛋白酶酶解奶牛胎盘产物差异及其抗氧化活性预测[J]. *中国农业大学学报*, 2021, 26(11): 133-141.
Zhang Y, You L C, Zhu Y K, *et al.* LC-MS/MS based comparative analysis and antioxidant activity prediction of cow placenta hydrolyzed by different proteases[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2021, 26(11): 133-141 (in Chinese).
- [26] 蔡晓, 戴凌燕, 姜鹏, 等. 响应面优化酶法制备高粱醇溶蛋白DPP-IV抑制肽参数[J]. *食品工业*, 2021, 42(6): 132-137.
Cai X, Dai L Y, Jiang P, *et al.* Parameters of kaffirin DPP-IV inhibitory peptides prepared by response surface optimization[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(6): 132-137 (in Chinese).
- [27] 詹妮. 高压脉冲电场辅助酶解河蚌肉制备牛磺酸研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
Zhan N. Study on preparation of taurine from mussel meat with pulsed electric field assisted enzymatic[D]. Changchun: Jilin University, 2020 (in Chinese).
- [28] 林栋, 李丽娟, 何英, 等. 芡实多肽的分步酶解法制备及抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(2): 217-224.
Lin D, Li L J, He Y, *et al.* Two-step enzymatic preparation and antioxidant activity *in vitro* of peptides from *Euryale ferox*[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(2): 217-224 (in Chinese).
- [29] Karki B, Maurer D, Kim T H, *et al.* Comparison and optimization of enzymatic saccharification of soybean fibers recovered from aqueous extractions[J]. *Biore-source Technology*, 2011, 102(2): 1228-1233.
- [30] 阚建全. 食品化学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2016: 121.
Kan J Q. Food chemistry[M]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural University Press, 2016: 121 (in Chinese).
- [31] 牛海力, 孔保华, 刘骞, 等. 猪血浆蛋白水解物对玉米淀粉老化和糊化特性的影响[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(12): 50-58.
Niu H L, Kong B H, Liu Q, *et al.* The influence of hydrolysates of porcine plasma protein on retrogradation and pasting properties of corn starch[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(12): 50-58 (in Chinese).
- [32] 张雨, 张康逸, 张国治. 淀粉老化过程机理及淀粉抗氧化剂应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 316-321.
Zhang Y, Zhang K Y, Zhang G Z. Research progress on starch retrogradation process mechanism and application of starch anti-retrogradation agent[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(13): 316-321 (in Chinese).
- [33] 解明显, 李安平, 李冬阳, 等. 3种晶型淀粉与月桂酸复合对其抗老化特性的影响[J]. *中国粮油学报*, 2022, 37(2): 89-96.
Xie M Y, Li A P, Li D Y, *et al.* Effects of compound of three crystalline starches and lauric acid on starch retrogradation[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2022, 37(2): 89-96 (in Chinese).
- [34] Dun H Y, Liang H S, Li S S, *et al.* Influence of an O/W emulsion on the gelatinization, retrogradation and digestibility of rice starch with varying amylose contents[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106547.
- [35] Li S J, Wei Y M, Fang Y Q, *et al.* DSC study on the thermal properties of soybean protein isolates/corn starch mixture[J]. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2014, 115(2): 1633-1638.
- [36] Yang C H, Zhong F, Goff H D, *et al.* Study on starch-protein interactions and their effects on physicochemical and digestible properties of the blends[J]. *Food Chemistry*, 2019, 280: 51-58.
- [37] 赵启竹. 可溶性大豆多糖对淀粉老化的抑制及影响因素研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021.
Zhao Q Z. Inhibition of soluble soybean polysaccharides on starch retrogradation and influencing factors[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).

Preparation of enzymatic hydrolysate of blue round scad (*Decapterus maruadsi*) protein isolate and its anti-retrogradation effect on rice starch

SUN Lechang^{1,2,3}, SUN Xiaoshu¹, LIN Duanquan^{1,2,3}, CHEN Yulei^{1,2,3},
WENG Ling^{1,2,3}, MIAO Song^{1,4}, CAO Minjie^{1,2,3*}

(1. College of Marine Food and Bioscience Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National and Local Joint Engineering Research Center of Deep Processing Technology for Aquatic Products, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

4. Teagasc Food Research Centre, Ministry of Agriculture, Cork 999014, Ireland)

Abstract: The protein from marine fish is regarded as an ideal resource of high-quality protein thanks to their high nutritional value and good digestibility. The application of fish protein in infant rice flour products can not only give the product a richer flavor, but also improve the nutritional value of the product and meet the nutritional requirements of infants. To further expand the application of marine fish protein in food products, the enzymatic modification of blue round scad (*Decapterus maruadsi*) protein isolate was carried out to obtain blue round scad protein isolate hydrolysate (BPIH) with good solubility. The inhibitory effects of BPIH on short-term retrogradation of rice starch (RS) was investigated. The enzymatic modification process was optimized by response surface methodology, and was added to RS at concentrations of 3%, 6% and 9% (*W/W*). The measurements of coagulability, dynamic viscoelasticity, and thermal properties and microstructure of RS were carried out to evaluate the anti-retrogradation activities of BPIH. The results showed that the optimal conditions determined by response surface methodology were: enzyme bottom ratio of 5 000 : 1 (U/g), enzymatic digestion time of 3 h, feed-to-liquid ratio of 1.00 : 3.81, enzymatic digestion temperature of 46.36 °C, and enzymatic pH of 6.30. The actual value of nitrogen solubility index (NSI) was 85.41%±0.82%, which was close to the predicted value of 86.37%. The degree of BPIH hydrolysis reached 21.62% under these enzymatic conditions. The peptides less than 1,000 u in BPIH accounted for 79.94%, which were mainly small oligopeptides. The addition of BPIH attenuated the coagulation phenomenon of RS, reduced the energy storage modulus (*G'*) of RS during storage at 4 °C, and significantly reduced the peak temperature (*T_p*) and enthalpy (ΔH_r) of RS after aging ($P < 0.05$); the rice starch added with BPIH had larger pores in the microstructure after aging, which enhanced the ability of starch to retain internal water after pasting. These results indicate that BPIH can inhibit the formation of gel network and microcrystalline structure of RS during storage at 4 °C, and may also limit the aggregation between starch molecules and inhibit or delay the short-term aging of RS. The present study provides a theoretical reference for the application of the enzymatic hydrolysate of blue round scad protein isolate in food protein ingredients.

Key words: *Decapterus maruadsi*; protein isolate; enzymolysis; short-term retrogradation of starch

Corresponding author: CAO Minjie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

Funding projects: Key Programs for Science and Technology of Fujian Province (2023N0014); Key Laboratory of Refrigeration and Conditioning Aquatic Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (KLRCAPP2018-03)