

复配酶法制备南极磷虾鲜味酶解液的工艺优化

张庆春, 余晓婉, 相兴伟, 韩 眇, 邵天伦, 何潇庭, 刘晔峰, 丁玉庭, 刘建华, 蔡燕萍

Optimization of Preparation Process of Antarctic Krill Hydrolysate with Delicate Taste by Compound Enzyme Method

ZHANG Qingchun, YU Xiaowan, XIANG Xingwei, HAN Tiao, SHAO Tianlun, HE Xiaoting, LIU Yefeng, DING Yuting, LIU Jianhua, and CAI Yanping

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040293>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

酶解-发酵法制备鱼鲜汁的工艺优化

Optimization of Enzymatic Hydrolysis–Fermentation Process for Preparing Fish Juice

食品工业科技. 2021, 42(22): 185–192

南极磷虾酶解工艺优化及酶解产物对牡蛎肉的冷冻保护作用

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process of Antarctic Krill and Cryoprotective Effect of Enzymatic Hydrolysates on Oyster Meat

食品工业科技. 2020, 41(1): 252–257,265

南极磷虾副产物酶解蛋白胨工艺优化及实际应用

Optimization and Practical Application of Enzymatic Hydrolysis of Peptone Antarctic Krill By-products

食品工业科技. 2019, 40(21): 198–202,224

响应面法优化南极磷虾蛋白酶解物溶解性工艺

Optimization of hydrolysis process on solubility of protein from Antarctic krill(*Euphausia superba*)by response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(5): 151–156

响应面法优化酸酶结合法水解牡蛎肽工艺

Optimization of Hydrolysis Process of Oyster Peptide by Acid–Enzyme Binding Method Based on Response Surface Methodology

食品工业科技. 2019, 40(17): 167–172

酶解弯乌贼组织蛋白制备酸溶性肽的工艺优化

Optimization on the Preparation Process of Acid Soluble Peptides from *Symplectoteuthis oualaniensis* Tissue Protein by Enzymolysis

食品工业科技. 2018, 39(19): 175–180,187



关注微信公众号，获得更多资讯信息

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. doi:10.13386/j.issn1002-0306.2021040293

ZHANG Qingchun, YU Xiaowan, XIANG Xingwei, 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. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040293

复配酶法制备南极磷虾鲜味酶解液的工艺优化

张庆春^{1,2},余晓婉^{1,2},相兴伟^{1,2,3},韩眺^{1,2},邵天伦^{1,2},何潇庭^{1,2},刘晔峰⁴,丁玉庭^{1,2,3},
刘建华^{1,2,3},蔡燕萍^{1,2,3,*}

(1.浙江工业大学食品科学与工程学院,浙江杭州 310014;
2.国家远洋水产品加工技术研发分中心(杭州),浙江杭州 310014;
3.海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心,大连工业大学,辽宁大连 116034;
4.浙江养生堂天然药物研究所有限公司,浙江杭州 310024)

摘要:以脱脂南极磷虾粉为原料,采用复配酶法制备鲜味酶解液。以感官评价、多肽得率、水解度等评价手段,进行外源酶的筛选及单因素实验。为进一步优化酶解液滋味,以呈鲜味的氨基酸总量为指标进行酶解工艺优化。结果表明:最佳酶解条件为:胰蛋白酶和胃蛋白酶复配比 1:100,总加酶量为 2800 U/g,料液比 1:4 g·mL⁻¹,酶解 pH7.0,酶解温度 40 ℃,酶解时间 3 h,该条件下获得的酶解产物中鲜味游离氨基酸含量为 331.79 mg/100 mL。除色氨酸外,其余八种必需氨基酸含量占总氨基酸的 63.66%,游离苦味氨基酸占总氨基酸的 27.83%,游离鲜甜味氨基酸占总氨基酸 26.22%,与鲜味形成具有关键作用的游离谷氨酸和游离天冬氨酸共占总游离氨基酸的 10.26%。本研究可为南极磷虾鲜味调味料等产品的开发提供理论基础和技术指导。

关键词:脱脂南极磷虾粉,酶解,鲜味氨基酸,工艺优化,复配酶法

中图分类号:TS254.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2022)02-0195-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040293

本文网刊:



Optimization of Preparation Process of Antarctic Krill Hydrolysate with Delicate Taste by Compound Enzyme Method

ZHANG Qingchun^{1,2}, YU Xiaowan^{1,2}, XIANG Xingwei^{1,2,3}, HAN Tiao^{1,2}, SHAO Tianlun^{1,2}, HE Xiaoting^{1,2}, LIU Yefeng⁴, DING Yuting^{1,2,3}, LIU Jianhua^{1,2,3}, CAI Yanping^{1,2,3,*}

(1.College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;
2.National R & D Branch Center for Pelagic Aquatic Products Processing(Hangzhou), Hangzhou 310014, China;
3.Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;
4.Zhejiang Yangshengtang Natural Medicine Research Institute Co., Ltd., Hangzhou 310024, China)

Abstract: In this paper, defatted Antarctic krill powder was used as raw material to prepare hydrolysate with delicate taste by compound enzyme method. By means of sensory evaluation, peptide yield and degree of hydrolysis, the screening of exogenous enzymes and single factor experiments were carried out. In order to further optimize the taste of enzymatic hydrolysate, the total amount of amino acids with delicate flavor was used as the index to optimize the enzymatic hydrolysis condition. The results showed that the optimal hydrolysis conditions were as follows: The ratio of trypsin and pepsin 1:100, the total amount of enzyme 2800 U/g, the liquid and material ratio 1:4 g·mL⁻¹, the pH of enzymatic hydrolysis 7.0, the temperature of enzymatic hydrolysis 40 ℃, and the time of enzymatic hydrolysis 3 h. Under these conditions, the content of

收稿日期: 2021-04-29

基金项目: 浙江省教育厅科研项目(Y202043190);浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2020R403028);国家自然科学基金面上基金项目(31972104);“十三五”国家重点研发计划项目(2019YFD0901603);浙江省重点研发计划项目(2019C02076);舟山市“五大会战”科技项目(2017C12030)。

作者简介: 张庆春(1998-),女,本科,研究方向:食品科学,E-mail: 17857309904@163.com。

*通信作者: 蔡燕萍(1987-),女,硕士,工程师,研究方向:水产品加工与保鲜,E-mail: caiyp@zjut.edu.cn。

free amino acids with delicate taste in the hydrolysate was 331.79 mg/100 mL. Except tryptophan, the remaining eight essential amino acids accounted for 63.66% of the total amino acids. Free bitter amino acids accounted for 27.83% of the total amino acids, and free sweet amino acids accounted for 26.22% of the total amino acids. Free glutamic acid and free aspartic acid, which played a key role in the formation of umami taste, accounted for 10.26% of the total free amino acids. This study could provide theoretical basis and technical guidance for the development of Antarctic krill flavoring products.

Key words: defatted Antarctic krill powder; enzymatic hydrolysis; umami amino acids; process optimization; compound enzyme method

南极磷虾是全球海洋中最大的单种可捕生物资源,其贮存量约为 6.5~10.0 亿吨,近年来日益受到关注^[1-2]。南极磷虾具有高蛋白^[2]、低脂肪^[3]、富含矿物质元素^[4]以及富含 DHA、EPA 等优质不饱和脂肪酸^[5]的营养特点,也是虾青素、磷脂、壳聚糖等热敏性营养物质的来源^[6]。目前,南极磷虾通常被加工成南极磷虾油脂,剩余部分一般被简单加工成粉状的动物或水产饲料^[7-9],使得脱脂南极磷虾粉产品附加值低。目前,对南极磷虾的深加工与应用少有报道。

南极磷虾肽具有降血压、抗氧化、抗疲劳、以及改善老年性骨质疏松症等功效^[10-11],因而具有很大的开发潜力,但相关研发仍然较少。迄今为止,关于水产品酶法制备酶解液,提高产品可利用价值的研究报道屡见不鲜^[12-16]。然而,这些报道侧重研究商业蛋白酶,如利用风味蛋白酶酶解,以水解度或总氮回收率为指标,检测产品的酶解效率,忽略了酶解程度对酶解产物部分滋味的影响。目前,已有多项关于酶解物呈味研究的实验,黄百祺等^[17]研究了四种龟肉酶解液,发现呈甜味与苦味的氨基酸具有一定规律性,吴书建等^[18]和于亚辉等^[19]发现鱼虾贝类水解产物中的呈味物质主要有核苷酸、有机酸、无机离子、肽、游离氨基酸等,其中游离氨基酸和多肽的种类及含量在很大程度上影响酶解产物的风味特征,曾晨等^[20]筛选出风味蛋白酶和木瓜蛋白酶为大黄鱼干鲜味肽酶解提取的复合酶,酶解效率高且所得酶解液分子量集中于鲜味肽相对分子量范围。1978 年, Yamasaki 等^[21]在经过木瓜蛋白酶处理后的牛肉中分离出一种八肽 (beefy meaty peptide, BMP),命名为鲜味肽 (umami peptide)。自此以后鲜味肽广受关注,目前,对鲜味肽的定义为分子量在 150~5000 Da 之间,由氨基酸组成的一些具有鲜味或增强风味的多肽^[22]。鲜味酶解液热量低,天然健康,易于食用,具有很好的开发前景和应用价值。

前期研究发现,南极磷虾中鲜甜味氨基酸含量丰富,而目前以鲜甜味游离氨基酸总量为指标评价南极磷虾蛋白酶解效果的研究尚未见报道。本研究以酶解效率为指标,以感官评价为手段,通过合理控制酶解时间及水解度,筛选出一种新型的复合蛋白酶。借助氨基酸组成分析,以鲜甜味游离氨基酸总量为指标,通过正交试验优化酶解条件,制备出一种呈鲜甜味的南极磷虾酶解液。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脱脂南极磷虾粉 山东鲁华海洋生物科技有限公司;风味蛋白酶(20万U/g) 广州馨之味食品配料商城;胰蛋白酶(4000 U/g) 宁波鼎元食品科技有限公司;菠萝蛋白酶(5万U/g)、碱性蛋白酶(10万U/g)、胃蛋白酶(10万U/g)、中性蛋白酶(10万U/g)、木瓜蛋白酶(10万U/g) 河南圣斯德实业有限公司;细胞色素 C(12500 Da)、抑肽酶(6500 Da)、芽孢杆菌(1450 Da)、乙酰丙氨酸-酪氨酸-精氨酸(451 Da)、乙基丙氨酸(189 Da) Sigma 公司;其他试剂 均为分析级。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 河南省予华仪器有限公司; Allegra64R 高速冷冻台式离心机 美国 BECKMAN; 电子天平 达俊电器有限公司; FA1204 电子天平 常州市幸运电子设备有限公司; K9840 自动凯氏定氮仪 济南海能仪器股份有限公司; L-8900 全自动氨基酸分析仪 日立公司; TSK gel 2000 色谱柱(7.8 mm×300 mm, 粒径 5 μm,)

Waters 高效液相色谱仪分析柱,日本 Toko Seiki Ltd.;高效液相色谱 美国 Agilent Technologies。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解工艺流程 脱脂南极磷虾粉→控制适当料液比→调节 pH(柠檬酸)→加酶→恒温酶解→灭酶(沸水浴 15 min)→离心(8000 r/min, 4 °C, 10 min),过滤取上清→鲜味酶解液。

具体操作步骤:将脱脂南极磷虾粉用纯水控制在一定的料液比后,用柠檬酸调节脱脂南极磷虾液至一定的 pH 后按照一定的比例添加各类酶,并在一定的温度下酶解一定时间,酶解结束后于沸水浴灭酶 15 min。灭酶后的样品在 8000 r/min, 4 °C 的条件下离心 10 min。离心结束后取上清液过滤后所得滤液即鲜味酶解液。

1.2.2 外源酶的筛选 以脱脂南极磷虾粉为原料,选择 7 种常见商品外源酶,即风味蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶,并在各自最适酶解条件下(产品厂家提供)进行酶解(条件见表 1),沸水浴灭酶 15 min,终止反应过程,冷却至室温后,8000 r/min 条件下离心 10 min,过滤取上清液,通过测定其水解度、多肽得率以及感官评价比较各酶的酶解效果。

表 1 外源酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of exogenous enzymes

酶种类	加酶量(U·g ⁻¹)	温度(℃)	pH	料液比(g·mL ⁻¹)	时间(h)
胰酶	2400	50	7.8~8.5	1:4	6
胃蛋白酶	2400	35	2.0~3.0	1:4	6
中性蛋白酶	2400	50	6.8~7.0	1:4	6
风味酶	2400	50	7.0	1:4	6
菠萝蛋白酶	2400	50	6.0~8.0	1:4	6
碱性蛋白酶	2400	50	10.0	1:4	6
木瓜蛋白酶	2400	50	6.0~7.0	1:4	6

1.2.3 多酶复合酶解配方的选择 参考吴书建等^[18]的外源酶选择实验并结合外源酶筛选实验结果, 将优选出的外源酶按以下 6 个配方进行多酶复合酶解(35 ℃, 4 h), 以滋味感官评价和酶解效率为指标, 确定复合酶的最佳复配比例。其中, 复配酶配方: 两种最优酶 1、酶 2 按酶 1: 酶 2=1:7、1:15、1:50、1:100、1:150、1:200 的添加比例进行复配。

1.2.4 复合酶解的单因素实验

1.2.4.1 外源酶加酶量的筛选 采用优选出的多酶复合配方, 设置 800、1000、1500、2400 和 3000 U/g 五个水平加酶量, 料液比 1:4 g·mL⁻¹, pH8.0, 35 ℃ 条件下酶解 4 h, 以滋味感官评价和酶解效率为评价指标, 优化加酶量。

1.2.4.2 外源酶料液比的筛选 采用优选出的多酶复合配方, 2400 U·g⁻¹ 样品的加酶量, 设置 1:3、1:4、1:5、1:6 g·mL⁻¹ 四个水平料液比, pH8.0, 35 ℃ 条件下酶解 4 h, 以滋味感官评价和酶解效率为评价指标, 优化料液比。

1.2.4.3 外源酶酶解温度的筛选 采用优选出的多酶复合配方, 加酶量 2400 U·g⁻¹、料液比 1:4 g·mL⁻¹, pH8.0, 设置 25、30、35、40、45 ℃ 五个酶解温度, 酶解 4 h, 以滋味感官评价和酶解效率为评价指标, 优化酶解温度。

1.2.4.4 外源酶酶解时间的筛选 采用优选出的多酶复合配方, 加酶量 2400 U·g⁻¹、料液比 1:4 g·mL⁻¹, pH8.0, 酶解温度 40 ℃, 设置 1、2、3、4、5 h 五个水平酶解时间, 以滋味感官评价和酶解效率为评价指标, 优化酶解时间。

1.2.4.5 酶解 pH 筛选 采用优选出的多酶复合配方, 加酶量 2400 U·g⁻¹、料液比 1:4 g·mL⁻¹, 酶解温度 40 ℃, 设置 4.0、5.5、6.5、7.5、8.0 五个水平 pH, 酶解 4 h, 以滋味感官评价和酶解效率为评价指标, 优化酶解 pH。

1.2.5 正交试验 根据单因素实验结果, 选取加酶量、酶解 pH、酶解温度、酶解时间进行四因素三水平正交优化实验。以鲜味肽、鲜味游离氨基酸、多肽得率为指标确定最佳酶解工艺。正交试验因素及水平见表 2。

表 2 正交试验因素与水平表

Table 2 Orthogonal experimental factors and level table

水平	A加酶量(U·g ⁻¹)	B温度(℃)	C pH	D时间(h)
-1	2000	30	7.0	2.5
0	2400	35	7.5	3.0
1	2800	40	8.0	3.5

1.2.6 感官评价 参照 GB/T 12312-2012 感官分析味觉敏感度测定方法^[23], 感官评价标准见表 3, 从多名人员中筛选出 10 位感官评价人员, 对酶解液进行感官评价, 评定成员每评定一个样品前用蒸馏水漱口, 取待评定样品 1~2 mL 置于口中, 10 s 后吐出, 漱口取参比液品尝, 鲜味参比样为谷氨酸钠溶液, 浓度 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 mg·mL⁻¹ 对应的鲜味评分值为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 分, 对不同组分进行感官评价。为避免感官评价人员相互之间会产生主观影响, 评价人员分开评定。

表 3 感官评价标准

Table 3 Standard and scores of sensory evaluation

项目	评分标准	评分(分)
色泽(满分3分)	色泽很深	1
	色呈黄色	2
	色呈淡黄色	3
	有明显腥味	1
香气(满分3分)	无明显味道	2
	有鲜虾味	3
	有酸、苦涩、有异味	1
	有甜味、欠鲜味、虾味	2
滋味(满分4分)	有甜味、有鲜味或虾味	3
	有鲜甜味并伴随虾味	4

1.2.7 酶解效率测定

1.2.7.1 多肽得率的测定 取洁净的培养皿, 称量质量 m₂, 将离心(8000 r/min, 4 ℃, 10 min)过后的蛋白酶解液倒入, 再将样品放入-80 ℃ 的冰箱中进行预冻 3~4 h, 冷冻 3~4 h 后取出放入冷冻干燥机中进行干燥, 待完全干燥后取出并称量质量 m₁^[24]。计算多肽得率。

$$\text{多肽得率}(\%) = \frac{m_1 - m_2}{M} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: m₁: 干燥后培养皿的总质量, g; m₂: 空培养皿的质量, g; M: 称取的脱脂南极磷虾粉的质量, g。

1.2.7.2 水解度(DH)的测定 水解度按照下式计算:

$$\text{DH}(\%) = \frac{\text{氨基态氮}}{\text{总氮}} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: DH 表示水解度, %。

总氮含量根据国标 GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定^[25] 中微量凯氏定氮法结合自动凯氏定氮仪进行测定。

氨基态氮含量参考 ZB X 66038-1987 氨基态氮测定法^[26], 略有调整: 吸取 5.0 mL 酶解液, 定容至

100 mL, 吸取 20 mL 置于 250 mL 烧杯中, 使用磁力搅拌器, 用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 标准液滴定至 pH8.2。加入 10.0 mL 甲醛溶液, 混匀, 再用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液继续滴定至 pH9.2, 记下消耗 NaOH 溶液的毫升数。同时取未酶解的虾粉样品, 做空白试验。

1.2.8 氨基酸组成测定 感官评分受主观影响因素较大, 因此采用高效液相色谱法(HPLC)测定呈味氨基酸, 此法对酶解液呈味特征具有较高的灵敏度与重现性^[27]。

HPLC 操作方法如下:

使用 Waters 高效液相色谱仪进行检测, 分析柱选用 TSK gel 2000 色谱柱($7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$, 粒径 $5 \mu\text{m}$), 并使用 UV 检测器在 220 nm 下检测分离的样品。柱温保持在 30°C ; 流动相为乙腈/水/三氟乙酸($45:55:0.1, \text{v/v}$); 流速保持在 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。标准品: 细胞色素 C; 抑肽酶; 芽孢杆菌; 乙酰丙氨酸-酪氨酸-精氨酸; 乙基丙氨酸。由此得到的分子量分布标准曲线如图 1:

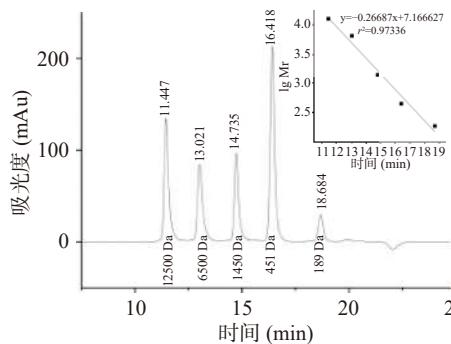


图 1 分子量分布标准曲线

Fig.1 Standard curve of molecular weight distribution

1.2.8.1 总氨基酸组成测定 准确称取酶解液 4 g, 小心加入水解管中防止挂壁, 继续加入 1:1 的分析纯盐酸约 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 mL, 氮吹仪吹氮气 15 min 后封管。110 ℃ 水解 24 h 后, 取出冷却开管。消解后的样品溶液过滤并定容至 100 mL 棕色容量瓶中。准确吸取定容后的样品 2 mL, 置氮吹仪上脱酸。温度 60°C , 脱至干燥。准确加入 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液 20 mL 旋涡器上混匀, 取样品过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤小柱, 上机按 GB/T 5009.124-2016 食品安全国家标准

标准食品中氨基酸的测定^[28] 方法进行氨基酸测定。

1.2.8.2 游离氨基酸组成测定 取 1 mL 酶解液, 加入 4 mL 5% 磷酸水杨酸沉淀多肽及蛋白, 用高速冷冻离心机 $18000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液保存, 用 0.45 和 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后上机分析, 按 GB/T 5009.124-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定^[28] 方法进行氨基酸测定。

1.3 数据处理

采用 SPSS 软件对数据的差异性进行分析, 采用方差分析(ANOVA)比较每组数据之间是否存在统计学差异($P<0.05$ 为显著性差异), 每组样品做 3 次平行试验, 采用均值±标准差表示, 采用 Origin 9.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 外源酶的筛选

2.1.1 不同外源酶对酶解液滋味的影响 脱脂南极磷虾粉经 7 种常见外源蛋白酶分别水解后, 其酶解液感官滋味评定结果如表 4 所示, 添加不同外源酶获得的各样品其感官评分存在着明显差异。这是因为, 不同酶的作用位点不同, 从而产生不同种类的氨基酸与多肽, 不同的氨基酸均有不同的溶解性与味感, 因此产生了不同味道的水解蛋白^[29]。

2.1.2 不同外源酶对酶解液水解度和多肽得率的影响 综合图 2 和表 4 可见, 胰蛋白酶酶解液的酶解

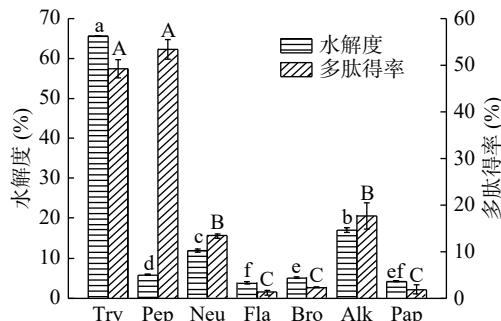


图 2 不同外源酶对南极磷虾蛋白的酶解效果

Fig.2 Enzymatic hydrolysis effect of different exogenous enzymes on Antarctic krill protein

注: 不同小写字母表示水解度差异显著($P<0.05$); 不同大写字母表示多肽得率差异显著($P<0.05$); 图 4~图 8 同; Try: 胰蛋白酶; Pep: 胃蛋白酶; Neu: 中性蛋白酶; Fla: 风味蛋白酶; Bro: 菠萝蛋白酶; Alk: 碱性蛋白酶; Pap: 木瓜蛋白酶。

表 4 不同外源酶处理后获得的酶解液感官评价结果

Table 4 Sensory evaluation results of enzymatic hydrolysate after treatment with different exogenous enzymes

组分	感官评价分值(分)								平均值(分)	感官鉴定
	胰蛋白酶	3	4	5	3	5	4	5		
胃蛋白酶	7	8	6	7	8	8	7	7	8	7.5
中性蛋白酶	4	5	3	4	3	3	4	3	3	3.6
风味蛋白酶	5	6	5	5	6	5	6	5	7	5.6
菠萝蛋白酶	6	7	6	7	7	8	7	6	6	6.6
碱性蛋白酶	3	4	4	3	5	4	3	3	4	3.7
木瓜蛋白酶	3	4	5	4	4	4	5	4	4	4.1

效率最佳, 水解度 DH 最高可达到 65%, 多肽得率 49%, 但其感官评价较低。胃蛋白酶酶解液的多肽得率最高, 感官评分最佳, 但其 DH 较低。其他五种酶的 DH、多肽得率均处于较低水平。单一外源酶作用效果虽各有优点, 但酶解作用效果有限, 各自单独作用效果无法同时达到滋味和酶解效率最优, 添加外源酶辅助酶解法可改善酶解滋味及效率。因此, 本研究拟采用单酶酶解效果最佳的胰蛋白酶和胃蛋白酶两种酶复合进行后续的酶解条件优化研究。

2.2 多酶复合配方的选择

采用优选出的酶 1(胰蛋白酶)和酶 2(胃蛋白酶), 按照 1.2.3 中的多酶复合配方酶解脱脂南极磷虾粉蛋白, 其感官评分及酶解效果如图 3 所示。由图 3 可知, 随着复配酶比例的增加, DH 不断下降, 感官评分不断提高。配方 4(胰蛋白酶: 胃蛋白酶=1:100)感官评分的增加值逐渐趋于平缓, DH 变化也趋于稳定。有研究表明, DH 与酶解液的滋味并不呈线性相关, DH 越大, 酶解液的感官评分不一定最好, 并且随着 DH 增加, 一些疏水性氨基酸暴露及肽的含量增加, 反而影响酶解液的感官滋味^[30]。结合图 3 趋势, 本实验选择感官评分最优, 水解度相对较好的配方 4 为最优条件(胰蛋白酶: 胃蛋白酶=1:100), 并进行后续研究。

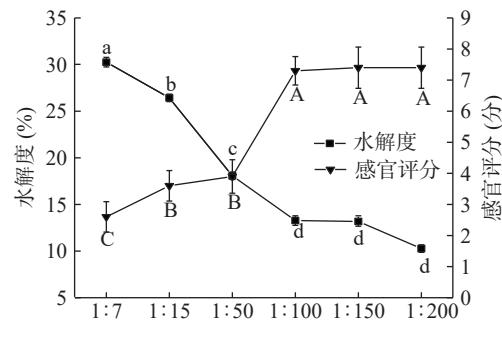


图 3 不同比例复合酶的酶解效果

Fig.3 Effect of compound enzymes on the enzymatic hydrolysis at different ratios

注: 不同小写字母表示水解度差异显著($P<0.05$); 不同大写字母表示感官评分差异显著($P<0.05$)。

2.3 复合酶解的单因素实验

2.3.1 加酶量对酶解液的影响

2.3.1.1 加酶量对酶解液滋味的影响 不同加酶量对酶解液的感官评分, 结果如表 5 所示, 不同外源酶

添加量可对滋味造成显著性影响。1500、2400、3000 U/g 样品加酶量获得的酶解液感官评分明显高于其他样品, 拥有较好的感官滋味。

2.3.1.2 加酶量对酶解液水解度和多肽得率的影响

不同加酶量获得的酶解液的酶解效率结果如图 4 所示。可发现随着加酶量的增加, 酶解液的 DH 和多肽得率均呈现先增加后平缓的趋势。当加酶量大于 2400 U·g⁻¹ 时, DH 逐渐下降, 多肽得率增加逐渐趋于平缓。可能由于酶解过程是底物与酶的特异性结合过程, 在底物浓度保持不变的情况下, 随着加酶量的增加, 底物与酶接触的反应量增加, 加酶量与反应速率成正相关, 因此酶解效率大幅度增加。当加酶量与底物结合逐渐趋于饱和状态时, 继续加酶时多肽得率涨幅逐渐趋于平缓。同时, 复配酶之间可能还存在相互作用, 在加酶量少时, 相互作用影响不明显, 而加酶量大时, 相互作用明显, 可能造成酶活力降低, 导致水解度逐渐下降^[31]。加酶量 2400 和 3000 U·g⁻¹ 的酶解效率、感官滋味均处于较优状态。但当加酶量增加至 3000 U·g⁻¹ 时, 其酶解效率的增长趋势不如加酶量为 2400 U·g⁻¹, 故从生产成本考虑选择 2400 U·g⁻¹ 的加酶量。

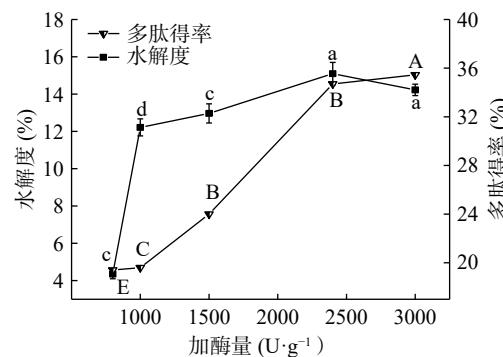


图 4 不同加酶量处理条件下的酶解效果

Fig.4 Effect of different enzyme amounts on enzymatic hydrolysis

2.3.2 料液比对酶解液的影响

2.3.2.1 料液比对酶解液滋味的影响 不同料液比对酶解液的感官评分如表 6 所示, 不同料液比对酶解液滋味造成的感官评分结果影响十分显著, 其中料液比 1:4 与 1:5 g·mL⁻¹, 在感官评分上明显优于其他样品。料液比高于 1:6 g·mL⁻¹ 时, 滋味一般, 鲜味较弱, 由于加水量多, 酶解液被稀释。料液比 1:5 g·mL⁻¹

表 5 不同加酶量处理条件下的感官评价结果

Table 5 Sensory evaluation results of different enzyme amounts

加酶量(U/g)	感官评分(分)							平均值(分)	感官评价
	2	3	4	5	6	7	8		
800	2	3	4	2	2	3	2	2.5	苦味较浓, 鲜味与虾味较淡
1000	4	3	4	4	5	3	4	3.9	微苦, 有微鲜甜味与虾味
1500	7	8	7	7	6	8	7	7.0	微甜、有鲜味伴随一点微苦味
2400	7	8	8	7	8	7	8	7.5	有鲜甜味与虾味, 微微涩
3000	8	9	8	8	8	7	8	8.0	具有鲜甜味, 虾味较淡

表6 不同料液比处理条件下的感官评价结果

Table 6 Sensory evaluation results under different solid-liquid ratio treatment conditions

料液比(g·mL ⁻¹)	感官评分(分)										平均值(分)	感官评价
	5	4	5	4	4	5	4	5	4	5		
1:3	5	4	5	4	4	5	4	5	4	5.5	黄色、甜、微涩	
1:4	7	8	8	8	9	8	8	9	7	8.1	淡黄色、甜、有鲜味与虾味	
1:5	7	8	8	7	9	8	8	7	8	7.8	淡黄色、微甜、有鲜味、微涩	
1:6	7	8	7	7	8	7	8	7	7	7.4	淡黄色、微涩、甜味与鲜味减弱	

获得酶解液鲜味值最高(7.8分),但其苦涩味也明显高于其他料液比。因此,相比而言,在料液比1:4 g·mL⁻¹条件下,酶解液具有更好的感官滋味,在感官滋味评分上获得较高得分。

2.3.2.2 料液比对酶解液水解度和多肽得率的影响

不同料液比对酶解液酶解效率影响如图5所示。不同料液比之间的DH、多肽得率差异明显,多肽得率随料液比的增加而增加,之后逐渐降低,DH随着料液比增加而降低,渐渐趋于平缓。随着料液比的增加,相当于降低了反应体系中的酶浓度及底物浓度,从而使得酶促反应速度降低,水解度下降。料液比在1:3 g·mL⁻¹时虽然水解度最大,但由于水解过程中水量过少,体系过于粘稠,出现结块贴壁等现象,导致酶解不充分。而当料液比为1:4 g·mL⁻¹时,其水解度相比于前者下降不多,且多肽得率明显增加,当料液比为1:5 g·mL⁻¹时多肽得率虽然增加,但DH过低。因此将料液比固定为1:4 g·mL⁻¹,进行后续的实验。

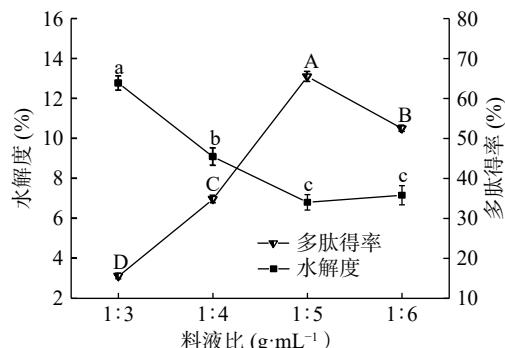


图5 不同料液比对酶解液酶解效率的影响

Fig.5 Effect of different solid-liquid ratios on enzymatic hydrolysis efficiency

2.3.3 酶解温度对酶解液的影响

2.3.3.1 酶解温度对酶解液滋味的影响 不同酶解温度对酶解液的感官评分结果如表7所示,不同样

品之间滋味存在显著差异。胰蛋白酶和胃蛋白酶的最适温度存在一定的差异,不同温度对酶的反应作用具有显著的影响,从而导致配方4(胰蛋白酶:胃蛋白酶=1:100)对酶解液的酶解效率和滋味产生差异。酶解温度25与30℃获得的酶解液的感官滋味几乎相似,在鲜味上无明显差异,感官评分几乎一致。因此,该范围内存在具有更好滋味酶解液的最佳酶解温度。

2.3.3.2 酶解温度对酶解液水解度和多肽得率的影响

不同酶解温度条件下的酶解效率如图6所示,随着温度升高,DH升高,多肽得率呈先升高后平缓并逐渐下降的趋势。在25~45℃时,DH随着温度的增加而增加,多肽得率随着温度的增加先增加而后逐渐降低,在35℃时多肽得率最高,分析可能是由于温度在低于35℃时,随着温度的上升复合酶酶解效率加强,反应速度加快;而超过其最适温度范围时,酶活性降低。综合感官评价和酶解效率的综合得分,选择酶解温度为35℃。

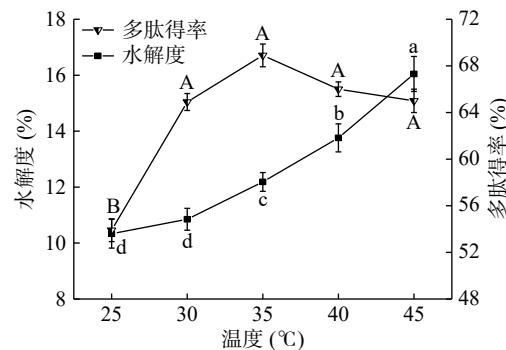


图6 不同温度处理条件下对酶解效率的影响

Fig.6 Effect of different temperature treatment conditions on enzymatic hydrolysis efficiency

2.3.4 酶解时间对酶解液的影响

2.3.4.1 酶解时间对酶解液滋味的影响 不同酶解时间对酶解液感官评分如表8所示,不同酶解时间对酶解液滋味评定具有明显影响,其中酶解时间在

表7 不同温度处理条件下的感官评价结果

Table 7 Sensory evaluation results under different temperature treatment conditions

温度(℃)	感官评分(分)										平均值(分)	感官评价
	7	8	7	8	7	7	8	8	7	8		
25	7	8	7	8	7	7	8	8	7	8	7.5	淡黄色、虾味、甜度适中、后味微腥
30	8	7	8	8	7	8	7	7	8	7	7.5	淡黄色、淡淡的虾味,甜度中等
35	8	9	7	8	7	8	9	8	8	8	8.0	淡黄色、虾味浓郁、甜度中等
40	7	8	7	8	7	7	7	7	7	7	7.0	淡黄色、微虾味、淡甜味、微涩
45	6	7	7	6	6	6	5	7	5	5	6.0	黄色、微苦味、虾味浓郁,微涩

表 8 不同酶解时间处理条件下的感官评价结果

Table 8 Sensory evaluation results under different enzymatic hydrolysis time treatment conditions

时间(h)	感官评分(分)										平均值(分)	感官评价
	1	4	5	5	6	4	4	5	5	6		
1	7	8	8	9	8	8	7	8	9	7	7.9	淡黄色, 鲜甜味有所增加
2	7	7	8	8	7	8	7	8	7	8	7.5	淡黄色, 鲜甜味几乎没有变化, 伴随一点微苦味
3	8	8	9	8	9	8	9	8	7	7	8.1	黄色、鲜甜味明显
4	7	7	8	8	8	7	7	8	7	8	7.5	黄色、甜度不变, 鲜味淡一点, 微腥

2、4 h 的酶解液具有较好的感官评价结果, 鲜味适当且口感良好, 其中酶解 4 h 相比于 2 h 鲜味更加明显。

2.3.4.2 酶解时间对酶解液水解度和多肽得率的影响 酶解效率如图 7 所示, 可发现酶解 3 h 的样品 DH 和多肽得率最高, 分别为 16% 和 50%。分析可能是在最初加入外源酶时, 由于底物充足, 酶解速度较快, 以降解蛋白质为主, 多肽得率及 DH 增加迅速, 3 h 以后随着酶解时间增加, 底物开始减少, 所以蛋白质分解速率降低, 肽分解速率升高, 肽得率降低。综合表 8 感官评分结果得外源酶酶解时间 3 h 最佳。

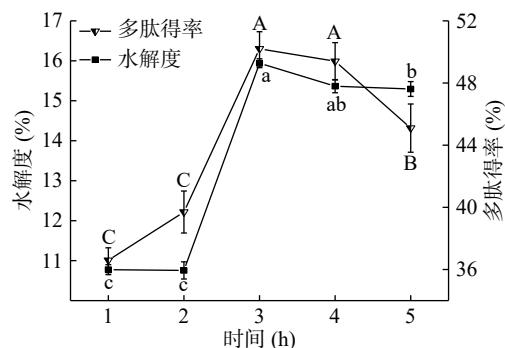


图 7 不同酶解时间处理条件下对酶解效率的影响

Fig.7 Effect of different enzymatic hydrolysis time treatment conditions on enzymatic hydrolysis efficiency

2.3.5 pH 对酶解液的影响

2.3.5.1 pH 对酶解液滋味的影响 不同 pH 对酶解液感官评分如表 9 所示, 不同 pH 处理条件下对酶解液滋味评定具有明显影响, 其中 pH 在 7.5 和 8.0 时酶解液具有较好的感官评价结果, 鲜味适当且口感良好, 感官评价结果表明, 复合酶的最佳酶解 pH 在 7.5~8.0 之间。

2.3.5.2 pH 对酶解液水解度和多肽得率的影响 由图 8 可以看出, 当 pH 低于 7 时, 随着 pH 的升高, 多肽得率增幅逐渐平缓并出现下降趋势, DH 增长也趋

于平缓, pH 继续增加时 DH 无显著变化($P>0.05$)。这可能是由于每种酶都有其最适 pH, 当 pH 偏小或偏大, 酶的反应速率都会受到一定程度的抑制, 使得酶解不充分^[32]。将水解度、多肽得率与酶解液感官评价结果综合分析, 确定酶解的最适 pH 条件为 7.5。

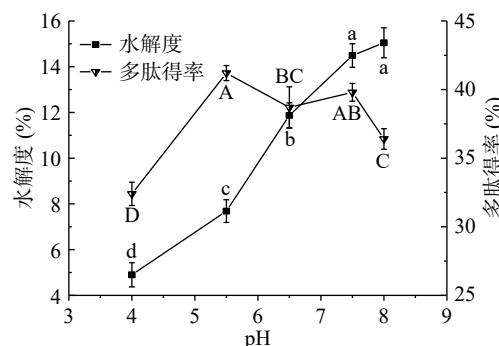


图 8 不同 pH 处理条件下对酶解效率的影响

Fig.8 Effect of different pH treatment conditions on enzymatic hydrolysis efficiency

2.4 正交优化试验结果

氨基酸是蛋白质的主要组成成分, 食品中氨基酸的种类和含量是衡量其营养质量和感官呈味特征的一项重要指标^[33], 如某些海产品中的特征“肉香”来源于组氨酸^[34]。因此选择肽类氨基酸和游离氨基酸为正交实验指标进行研究。其中呈鲜味的氨基酸主要是天冬氨酸和谷氨酸, 呈甜味的主要是丝氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、苏氨酸, 呈苦味的代表性氨基酸主要酪氨酸、组氨酸、精氨酸、缬氨酸^[17]。

以鲜甜味游离氨基酸为指标, 对正交试验结果进行极差分析得表 10, 发现各因素的影响程度依次为时间、加酶量、pH、温度, 最佳试验组合为 A₃B₃C₁D₁, 即加酶量 2800 U·g⁻¹、温度 40 °C、pH 7.0、酶解时间 2.5 h。以鲜味肽为指标, 对正交试验结果进行极差

表 9 不同 pH 处理条件下的感官评价结果

Table 9 Sensory evaluation results under different enzymatic hydrolysis pH treatment conditions

pH	感官评分(分)										平均值(分)	感官评价
	4	3	4	4	3	3	4	3	3	4		
4.0	7	8	8	9	8	8	7	8	9	7	7.9	淡黄色, 鲜甜味有所增加
5.5	7	7	8	8	7	8	7	8	7	8	7.5	淡黄色, 鲜甜味几乎没有变化, 伴随一点微苦味
6.5	8	8	9	8	7	8	9	8	8	8	8.0	黄色、鲜味明显
7.5	8	8	9	8	9	8	9	8	7	7	8.1	黄色、甜度不变, 鲜味淡一点, 微腥
8.0	8	8	9	8	9	8	9	8	7	8	7.5	黄色、甜度不变, 鲜味淡一点, 微腥

表 10 脱脂南极磷虾蛋白水解液的正交试验方案与结果分析
Table 10 Orthogonal experimental scheme and result analysis of defatted Antarctic krill protein hydrolysate

实验号	因素				鲜甜味游离氨基酸 (mg/100 mL)	鲜味肽 (mg/100 mL)	多肽得率 (%)
	A加酶量(U·g ⁻¹)	B温度(℃)	C pH	D时间(h)			
1	1	1	1	1	305.88	39.49	26.45±0.65
2	1	2	2	2	303.40	44.04	31.35±1.85
3	1	3	3	3	304.39	44.33	29.05±1.15
4	2	1	2	3	301.33	44.99	36.70±1.40
5	2	2	3	1	302.98	43.95	42.10±3.90
6	2	3	1	2	301.81	43.33	46.45±1.75
7	3	1	3	2	302.55	42.76	43.65±0.25
8	3	2	1	3	304.64	39.45	48.45±1.25
9	3	3	2	1	306.54	39.07	51.85±3.25
鲜甜味游离氨基酸K ₁	913.67	909.76	912.33	915.4			
鲜甜味游离氨基酸K ₂	906.12	911.02	911.27	907.76			
鲜甜味游离氨基酸K ₃	913.73	912.74	909.92	910.36			
R	7.61	2.98	2.41	7.64			
因素主次: D>A>B>C							
鲜味肽 K ₁	127.86	127.24	122.27	122.51			
鲜味肽 K ₂	132.27	127.44	128.1	130.13			
鲜味肽 K ₃	121.28	126.73	131.04	128.77			
极差R	10.99	0.71	8.77	7.62			
因素主次: A>C>D>B							
多肽得率K ₁	87.55	106.8	121.35	120.7			
多肽得率K ₂	125.25	121.9	120.2	121.45			
多肽得率K ₃	144.25	128.35	115.5	114.9			
极差R	18.9	7.18	1.95	2.18			
因素主次: A>B>D>C							

分析,发现各因素的影响程度依次为加酶量、pH、时间、温度,最佳试验组合为 A₂B₂C₃D₂, 即加酶解量 2400 U·g⁻¹、温度 35 ℃、pH8.0、酶解时间 3.0 h。以多肽得率为指标,对正交试验结果进行极差分析,发现各因素的影响程度依次为加酶量、温度、时间、pH,最佳试验组合为 A₃B₃C₁D₂, 即加酶量 2800 U/g、温度 40 ℃、pH7.0、酶解时间 3.0 h。

上述三个组合中,均存在重合的最优条件,为使最终产品的该三个指标达到较优水平,认为最佳组合即为每组重合的最优条件组合。因此,判断最佳酶解工艺组合为 A₃B₃C₁D₂, 即加酶量 2800 U·g⁻¹、温度 40 ℃、时间 3.0 h、pH7.0, 所得酶解液的鲜甜味游离氨基酸为 331.79 mg/100 mL, 鲜味肽为 36.04 mg/100 mL, 多肽得率为 54.5%。

2.5 鲜味脱脂南极磷虾酶解液的氨基酸组成

考虑实际需要,对上述工艺条件进行了调整,确定实际最佳工艺条件为: 加酶量 2800 U·g⁻¹、温度 40 ℃、时间 3.0 h、pH7.0。在此条件下进行三次验证试验以考察试验结果的可靠性,鲜甜味氨基酸结果如表 11 所示,多肽得率为 54.5%。

食物的感官风味主要来源于食品中的蛋白质降解生成的氨基酸或小分子肽,以及其他相关的衍生物。因此氨基酸的组成对酶解产物的风味具有重要影响。南极磷虾粉在酶解过程中会导致疏水性氨基酸增多,产物苦味增加^[35],鲜甜味氨基酸能掩盖苦味,

因此食物的鲜甜味及苦味与人们是否能接纳或排斥该种食物紧密相关。

从表 11 可以看出,虽然色氨酸没有测出,但其余八种必需氨基酸的含量占到了总氨基酸的 63.66%,说明酶解液必需氨基酸含量高,具有较好的营养价值。最佳工艺条件下获得水解物的游离氨基酸组成中,游离苦味氨基酸占总氨基酸的 27.83%,游离鲜甜味氨基酸占总氨基酸 26.22%,与鲜味形成具有关键作用的游离谷氨酸和游离天冬氨酸共占总游离氨基酸的 10.26%,游离鲜甜味氨基酸含量较高,是酶解液具有良好风味的基础^[36]。获得的水解物总氨基酸组成中,鲜甜味氨基酸占总氨基酸 26.09%,苦味氨基酸占总氨基酸的 28.39%,ΣEAA/ΣAA 与 ΣEAA:ΣNEAA 分别为 63.37% 和 1.73:1。水解物的总游离氨基酸占总氨基酸的 96.14%,总游离苦味氨基酸占总苦味氨基酸的 92.46%。游离鲜甜味氨基酸占总鲜甜味氨基酸的 96.62%,其中游离鲜甜味氨基酸占总鲜甜味氨基酸 97.42%,游离甜味氨基酸占总甜味氨基酸的 96.12%。

同时,从氨基酸的组成中可以看到,赖氨酸的组成含量较高,赖氨酸是米、面中的第一限制氨基酸。因此可以将南极磷虾酶解液,添加到有需要的食品中,可以实现氨基酸互补,从而达到提高食品的营养价值。获得的水解物氨基酸组成营养价值高,且具有良好鲜甜味滋味,为脱脂南极磷虾粉进一步的开发利用提供了可能。

表 11 脱脂南极磷虾酶解液的氨基酸组成(mg/100 mL)
Table 11 Amino acid composition of Antarctic krill hydrolysate (mg/100 mL)

氨基酸	游离氨基酸含量	总氨基酸含量	氨基酸	游离氨基酸含量	总氨基酸含量
甘氨酸▲	27.63±0.17	30.73±0.26	苯丙氨酸	348.08±2.95	356.30±0.50
丙氨酸▲	70.56±0.09	71.73±0.26	赖氨酸◆	115.84±1.19	120.76±0.29
组氨酸◆	27.47±0.00	30.42±0.05	异亮氨酸	44.79±1.33	45.58±0.59
酪氨酸◆	46.47±0.33	50.92±0.12	ΣNEAA	459.94	482.21
丝氨酸▲	33.97±0.50	35.79±0.32	ΣEAA	805.62	834.16
天冬氨酸●	41.06±0.59	42.56±0.57	ΣSUAA	331.79	343.38
谷氨酸●	88.80±0.00	90.75±0.28	ΣBAA	352.22	373.69
精氨酸◆	106.03±0.71	110.55±0.10	ΣAA	1265.55	1316.36
脯氨酸▲	17.96±0.06	18.78±0.46	ΣEAA/ΣAA	63.66%	63.37%
亮氨酸	126.44±0.21	129.41±0.75	ΣEAA/ΣNEAA	1.75	1.73
缬氨酸◆	56.41±0.25	61.04±0.95	ΣSUAA/ΣAA	26.22%	26.09%
苏氨酸▲	51.82±0.32	53.06±0.07	ΣBAA/ΣAA	27.83%	28.39%
蛋氨酸	62.23±0.24	68.01±0.02			

注: 苦味氨基酸(◆); 鲜味氨基酸(●); 甜味氨基酸(▲); 必需氨基酸(EAA); 非必需氨基酸(NEAA); 鲜甜味氨基酸(SUAA); 苦味氨基酸(BAA); 总氨基酸(AA); 天冬氨酸、谷氨酸含量,一部分分别由天冬酰胺、谷氨酰胺转化而来。

用奠定了研究基础。

3 结论

单一外源酶作用效果虽各有优点,但酶解过程控制不佳会导致酶解液苦涩味偏重,无法同时使滋味和酶解效率达到最优。不同酶在不同作用时间对南极磷虾蛋白水解作用位点不同,因此选用多酶复合酶解,可优化酶解滋味及效果,减少苦味肽与疏水性氨基酸的生成,使得大量鲜甜味氨基酸得以释放,改善了酶解液的风味,提高了南极磷虾粉蛋白酶解效率。单因素实验和正交试验确定了具有良好感官滋味及多肽得率的最佳酶解条件为:加酶量 2800 U·g⁻¹,温度 40 ℃,时间 3.0 h, pH 7.0,该酶解条件下获得的酶解液具有良好鲜味,为脱脂南极磷虾粉的加工利用及深入研究提供理论基础和技术指导。

参考文献

- [1] SIMON C J, TRUONG H H, NOBLE T H, et al. Microbial biomass, marine invertebrate meals and feed restriction influence the biological and gut microbiota response of shrimp *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture, 2020, 520(4): 734679.
- [2] 刘永新, 李梦龙, 方辉, 等. 南极磷虾的资源概况与生态系统功能[J]. 水产学杂志, 2019, 32(1): 55–60. [LIU Y X, LI M L, FANG H, et al. Resources status and ecosystem function in Antarctic krill[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(1): 55–60.]
- [3] YIN L A, JIANG X M, FAN Y, et al. Preparation, gel electrophoresis analysis, and nutritional evaluation of a functional krill protein concentrate with low fluoride level from Antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2017, 26(8): 958–968.
- [4] 王凌云, 邓尚贵, 李钰金, 等. 南极磷虾蛋白粉的制备工艺[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 133–138. [WANG L Y, DENG S G, LI Y J, et al. A preparation process to produce Antarctic krill protein powder[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(6): 133–138.]
- 45(6): 133–138.]
- [5] 邱卫华, 余丽萍, 谢营梁. 南极磷虾粉的营养与功能[J]. 现代渔业信息与战略, 2010, 25(8): 14–16. [QIU W H, YU L P, XIE Y L. Nutrition composition and function of Antarctic krill meal[J]. Fishery Information & Strategy, 2010, 25(8): 14–16.]
- [6] 冯迪娜, 袁玥, 苏学锋, 等. 南极磷虾资源综合利用研究现状[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(8): 120–122. [FENG D N, YUAN Y, SU X F, et al. Research status of comprehensive utilization for Antarctic krill resource[J]. Food Research and Development, 2015, 36(8): 120–122.]
- [7] 谈俊晓, 赵永强, 李来好, 等. 南极磷虾综合利用研究进展[J]. 广东农业科学, 2017, 44(3): 143–150. [TAN J X, ZHAO Y Q, LI L H, et al. Research progress on comprehensive utilization of Antarctic krill[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2017, 44(3): 143–150.]
- [8] 李翔, 徐国辉, 姜光朋, 等. 南极磷虾粉替代鱼粉对公子小丑鱼生长性能、饲料利用和体色的影响[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2019, 36(3): 213–217. [LI X, XU G H, JIANG G M, et al. Effect of fish meal replaced by Antarctic krill meal on growth performance, feed utilization and body color of juvenile ocellaris clownfish[J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2019, 36(3): 213–217.]
- [9] XU H G, ZHAO M, ZHENG K K, et al. Antarctic krill (*Euphausia superba*) meal in the diets improved the reproductive performance of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) broodstock[J]. Aquaculture Nutrition, 2017, 23(6): 1287–1295.
- [10] 徐恺, 刘云, 王亚恩, 等. 南极磷虾脱脂蛋白肽抗疲劳和耐缺氧实验研究[J]. 食品科学, 2011, 3(11): 310–313. [XU K, LIU Y, WANG Y E, et al. Anti-fatigue and anti-hypoxia functions of degreased peptides from Antarctic krill in mice[J]. Food Science, 2011, 3(11): 310–313.]
- [11] 王一名, 毛相朝, 曹雪, 等. 磷酸化南极磷虾肽调控 Wnt/β-连接蛋白通路改善大鼠骨质疏松症[J]. 中国食品学报, 2018,

- 18(3): 8–15. [WANG Y M, MAO X C, CAO X, et al. Phosphorylated peptides from Antarctic krill improving osteoporosis in ovariectomized female rats through Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(3): 8–15.]
- [12] ISSA K M, CHEORUN J, RIZWAN T M. Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors—a systematic review[J]. Meat Science, 2015, 110(8): 278–284.
- [13] NOMAN A, XU Y S, AL-BUKHAIWI W Q, et al. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon(*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme[J]. Process Biochemistry, 2018, 67(4): 19–28.
- [14] 涂丹, 张益奇, 叶繁, 等. 酶解制备鱼鳞蛋白降血压肽的工艺优化[J]. 核农学报, 2019, 33(1): 120–128. [TU D, ZHANG Y Q, YE F, et al. Optimization of the preparation process of fish scale protein blood pressure reducing peptide by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(1): 120–128.]
- [15] 丁慧璞, 欧阳伟虹, 黄玉婷, 等. 小黄鱼边角料的酶解工艺及酶解液性能研究[J]. 核农学报, 2020, 34(9): 2021–2031.
- [16] DING H P, OUYANG W H, HUANG Y T, et al. Study on enzymatic solution technology and enzymatic solution performance of little yellow fish scrap[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(9): 2021–2031.]
- [17] 林海燕, 王珊珊, 孙珊, 等. 响应面法优化南极磷虾亚铁螯合肽制备工艺及其理化性质[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 166–173. [LIN H Y, WANG S S, SUN S, et al. Optimization of preparation of iron-chelating peptides from Antarctic krill by response surface methodology and its physicochemical properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(21): 166–173.]
- [18] 黄百祺, 黄创成, 吴巨贤, 等. 4种龟肉酶解液的氨基酸及呈味特性比较[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(8): 12–17. [HUANG B Q, HUANG C H, WU J X, et al. Amino acids and flavor properties of 4 tortoise ase solutions were compared[J]. Food Research and Development, 2021, 42(8): 12–17.]
- [19] 吴书建, 张佳男, 高世珏, 等. 南美白对虾虾头制备鲜味水解物的研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4): 34–42, 50. [WU S J, ZHANG J N, GAO S Y, et al. Preparation of hydrolysate with umami from white shrimp(*Penaeus vannamei*) head[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(4): 34–42, 50.]
- [20] 于亚辉, 陈沁雯, 李晓婷, 等. 基于主成分分析法的鸡汤与不同鸡肉酶解液中游离氨基酸的对比分析[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(4): 681–688. [YU Y H, CHEN Q W, LI X T, et al. Comparative analysis of chicken soup and free amino acids in different chicken enzyme solutions based on main component analysis[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2020, 54(4): 681–688.]
- [21] YAMASAKI Y, MAEKAWA K. A peptide with delicious taste[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1975, 23(1): 49–53.
- [22] 张佳汇, 王芳, 闫丹丹. 鲜味肽介绍及其在调味料中应用的探讨[J]. 食品工业, 2021, 42(5): 204–207. [ZHANG J H, WANG F, YAN D D. Introduction of umami peptide and its application in seasonings[J]. The Food Industry, 2021, 42(5): 204–207.]
- [23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 12312 感官分析—味觉敏感度测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 12312 Sensory analysis-method for determination of sensitivity to taste[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.]
- [24] 李明杰. 南极大磷虾多肽制备工艺优化、脱氟及其体外活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012. [LI M J. Optimization of preparation process, defluorination and *in vitro* activity of Antarctic krill polypeptide[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.]
- [25] 中华人民共和国卫生部. GB 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.5 National standards for food safety determination of protein in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [26] 中华人民共和国专业标准. ZB X 66038-1987 氨基态氮测定方法[S]. 上海: 上海市科学酿造研究所, 1987. [Professional Standards of the People's Republic of China. ZB X 66038-1987 Determination of amino nitrogen[S]. Shanghai: Shanghai Scientific Brewing Institute, 1987.]
- [27] 赵静, 丁奇, 孙颖, 等. 香菇菌汤及酶解液中滋味成分及呈味特性的对比分析[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 99–104. [ZHAO J, DING Q, SUN Y, et al. Comparison of taste compounds and taste characteristics of shiitake mushroom soup and enzymatic hydrolysate[J]. Food Science, 2016, 37(24): 99–104.]
- [28] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.124 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009.124 National food safety standards determination of amino acids in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [29] 林奕, 陈丽娇, 董乐. 文蛤肉酶法水解条件的优化及最适蛋白酶的选择[J]. 保鲜与加工, 2009, 9(5): 48–52. [LIN Y, CHEN L J, DONG L. Optimization of hydrolysis conditions and selection of optimal protease[J]. Storage and Process, 2009, 9(5): 48–52.]
- [30] 戴志远, 郭瑞, 张燕平, 等. 动物蛋白水解酶法制备梅鱼鲜味酶解液的研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 3(8): 71–75. [DAI Z Y, GUO R, ZHANG Y P, et al. Preparation of fish umami enzyme solution by animal proteolysase method[J]. Food and Fermentation Industry, 2011, 3(8): 71–75.]

- [31] DEEPA B, ANURADHA C V. Effects of linalool on inflammation, matrix accumulation and podocyte loss in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2013, 23(4): 223–234.
- [32] 杨杰. 鱼骨营养成分分析及鱼骨休闲食品的研制 [D]. 石河子: 石河子大学, 2018. [YANG J. The analysis of fish bone nutrition and the development of fish bone leisure food[D]. Xinjiang: Shihezi University, 2018.]
- [33] 宋武刚. 响应面法优化武定鸡风味基料加工工艺的研究 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2017. [SONG W G. Study on the processing process of flavor base by response method[D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2017.]
- [34] FAN Y, YIN L, XUE Y, et al. Analyzing the flavor compounds in Chinese traditional fermented shrimp pastes by HS-SPME-GC/MS and electronic nose[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2017, 16(2): 311–318.
- [35] 郭兴峰, 魏芳, 周祥山, 等. 苦味肽的形成机理及脱苦技术研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(21): 207–211. [GUO X F, WEI F, ZHOU X S, et al. Research progress of bitter peptide formation mechanism and technology[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(21): 207–211.]
- [36] 陈怡颖, 丁奇, 赵静, 等. 鸡汤及鸡肉酶解液中游离氨基酸及呈味特性的对比分析 [J]. *食品科学*, 2015, 36(16): 107–111. [CHEN Y Y, DING Q, ZHAO J, et al. Comparative analysis of free amino acids and flavor properties in chicken soup and chicken enzyme solution[J]. *Food Science*, 2015, 36(16): 107–111.]