

文章编号: 1004-7271(2002)01-0048-05

酶法水解海鳗肉的工艺条件

曾少葵¹, 章超桦¹, 雷晓凌¹, 张静¹, 廖艳²

(1. 湛江海洋大学食品工程系, 广东 湛江 524025; 2. 湛江海洋大学测试中心, 广东 湛江 524025)

摘要 采用添加枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶的双酶同时水解技术, 对海鳗肉进行水解。正交试验的方差分析及多重比较结果表明, 适宜的酶解工艺条件为 pH7.0、温度 45℃、加酶量为原料的 2% (枯草杆菌中性蛋白酶:木瓜蛋白酶 = 1:1), 水解时间为 2.5h。蛋白质水解率为 75%, 所得水解液的 α -氨基氮含量为 166mg/100mL, 经浓缩后的氨基酸总量为 1.23g/100mL, 其中必需氨基酸占氨基酸总量的 57.8%, 谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)等呈味氨基酸含量较高, 占总量的 23%。

关键词 海鳗肉; 酶法水解; α -氨基氮; 氨基酸

中图分类号: TS254.4 文献标识码: A

The technology of enzymatic hydrolysis for the muscle of *Muraenesox cinereus*

ZENG Shao-kui¹, ZHANG Chao-hua¹, LEI Xiao-ling¹, ZHANG Jing¹, Liao Yan²

(1. Department of Food Engineering, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Testing Center, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract The muscle of marine eel was hydrolyzed with the enzyme hydrolytic technique in which subtilisin and papain were added simultaneously. The analysed results of the orthogonal experiment and multiple comparison indicate that the optimum conditions for the hydrolysis with the bi-enzyme were pH7.0, temperature 45℃, enzyme concentration 2.0% of raw material (subtilisin: papain = 1:1), taking time 2.5h. The degree of hydrolysis was 75%. The content of α -Amino nitrogen was 166 mg/100mL in the hydrolysate. The concentration of free amino acids is 1.23g/100mL in the condensed solution, which accounts for 57.8% of the total free amino acid. The condensed solution is rich in tasty amino acids such as glutamic acid, aspartic acid, glycine and alanine, which accounts for 23% of the total free amino acid.

Key words muscle of *Muraenesox cinereus*; enzymatic hydrolysis; α -Amino nitrogen; amino acids

海鳗 (*Muraenesox cinereus*) 俗称门鳘, 属海鳗科, 为我国沿海主要经济鱼类之一。目前, 我国对海鳗的加工主要是制成冷冻鱼片出口, 在加工过程中, 产生大量的废弃物——海鳗碎肉及鱼排等。实际上碎肉及鱼排中均含有可利用的蛋白质, 可采用酶水解法提取其中的鱼蛋白^[1], 达到充分利用资源的目的。双酶水解法较常用的操作是 2 种酶按先后顺序加入进行水解, 而本试验采用枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同时加入水解的方法, 可提高海鳗肉的水解效果和缩短水解时间, 降低生产成本, 为海鳗碎肉

及鱼排(骨肉)的加工利用提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 原料

海鳗购于阳江。经去头、尾、骨、内脏、皮后清洗,分装冷冻备用。

酶制剂:枯草杆菌中性蛋白酶:酶活力为 $1:10^5$,无锡杰能科学生物工程有限公司提供;木瓜蛋白酶:酶活力为 $1:6 \times 10^5$,广州远天酶制剂厂提供。

1.2 方法

1.2.1 α -氨基氮和蛋白质测定

α -氨基酸采用甲醛滴定法,蛋白质采用微量凯氏定氮法^[2];

1.2.2 蛋白质水解率计算

计算式参考文献[3]

$$\text{蛋白质水解率}(\%) = \frac{\text{水解前原料纯蛋白} - \text{水解后残留的纯蛋白}}{\text{水解前原料纯蛋白}} \times 100$$

1.2.3 水解液氨基酸组成分析

采用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪测定。

1.3 工艺流程

海鳗肉 → 捣碎 → 双酶同时水解 → 灭酶 → 过滤 → 浓缩 → 水解液

2 结果与讨论

2.1 酶解工艺条件的确定

2.1.1 组合酶种的确定

水解动物蛋白常用的酶有胰蛋白酶、胃蛋白酶、枯草杆菌中性蛋白酶(subtilisin)及木瓜蛋白酶(papain)。胰蛋白酶水解效力高,但其水解液带有浓烈的碱味;胃蛋白酶水解的适宜 pH 为 3.5~4.0,水解液呈酸性且有较强的苦味,而枯草杆菌中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的适宜 pH 为中性,水解液的肉味几乎不受影响。基于上述原因,确立用后两种酶对海鳗肉进行水解。在 pH 7.0、温度 50℃ 条件下,以相同的底物浓度(肉:水=1:4)、相同的酶浓度(200IU),分别用枯草杆菌中性蛋白酶、木瓜蛋白酶及其组合,对海鳗肉水解 2h,测定水解液中的 α -氨基氮,试验结果见表 1。

由表 1 可知,枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同时加入进行水解,其效率要优于单酶水解,也比双酶按先后顺序进行水解的效果好。这可能是因为单一蛋白酶的水解作用会产生许多寡肽和多肽,而枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶适宜的 pH 值比较接近,两者共同作用时可形成互补,因而效果更好。进一步试验确定温度、pH 对双酶同时水解效果的影响。

2.1.2 温度对水解效果的影响

以海鳗肉重量的 2% 同时加入枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶(比例为 1:1),肉与水比例为 1:4, pH 7.0,在不同的温度条件下对海鳗肉进行水解,测定各水解液的 α -氨基氮,得到其水解度对温度的依赖关系如图 1 所示。

从图 1 中可知,双酶同时进行水解时,效果最好的温度为 50℃。

表 1 不同酶种及组合的水解效果比较

Tab.1 Comparison of hydrolysis result between different enzymes and mixed enzymes

酶种	α -氨基氮(mg/100g)
A	89.4±0.8
B	81.4±0.2
A+B(按先后顺序加入)	89.6±0.6
A+B(同时加入)	101.0±0.5

注:A表示枯草杆菌中性蛋白酶,B表示木瓜蛋白酶。

2.1.3 pH对水解效果的影响

在50℃、相同的底物浓度及酶浓度、不同的pH条件下对海鳗肉进行水解。pH对海鳗肉水解效果的影响如图2所示。

由图2可知,海鳗肉双酶同时水解以在pH7.0条件下为优。

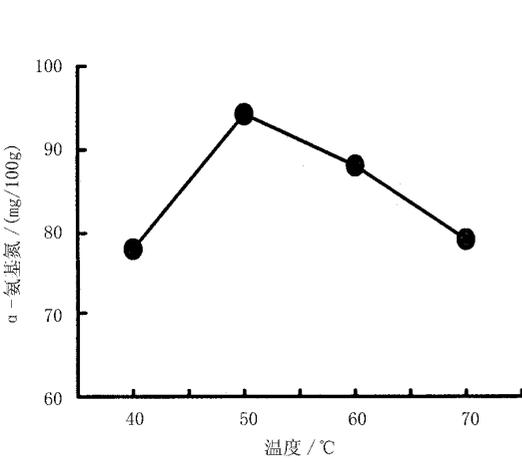


图1 温度对水解效果的影响

Fig.1 The effect of temperature on the hydrolytic efficiency

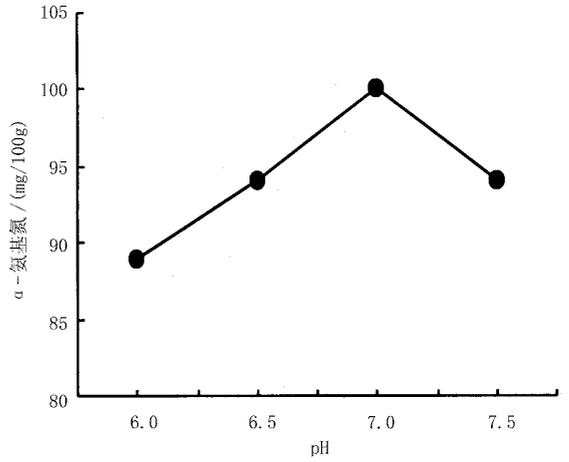


图2 pH对水解效果的影响

Fig.2 The effect of pH on the hydrolytic efficiency

2.1.4 正交试验及方差分析

影响酶水解效率的主要因素有pH、温度、酶浓度和时间。在单因素实验的基础上,选择pH(A)、温度(B)、酶浓度(C)和时间(D)4个因素,每个因素确定3个水平,以水解液中的 α -氨基氮为试验指标,设计 $L_4(3^4)$ 正交试验(表2)来优化各因素组合。

表2 $L_4(3^4)$ 正交设计及结果

Tab.2 $L_4(3^4)$ orthogonal design and result

序号	A	B	C	D	α -氨基氮(mg/g 原料)	
					I	II
1	I(6.5)	I(45)	I(1.6)	I(1.5)	6.7	6.8
2	I(6.5)	Ⅱ(55)	Ⅱ(2.0)	Ⅱ(2.0)	7.8	7.7
3	I(6.5)	Ⅲ(65)	Ⅲ(2.4)	Ⅲ(2.5)	6.5	6.3
4	Ⅱ(7.0)	I(45)	Ⅱ(2.0)	Ⅲ(2.5)	8.2	8.4
5	Ⅱ(7.0)	Ⅱ(55)	Ⅲ(2.4)	I(1.5)	7.7	7.7
6	Ⅱ(7.0)	Ⅲ(65)	I(1.6)	Ⅱ(2.0)	5.8	5.9
7	Ⅲ(7.5)	I(45)	Ⅲ(2.4)	Ⅱ(2.0)	7.5	7.6
8	Ⅲ(7.5)	Ⅱ(55)	I(1.6)	Ⅲ(2.5)	7.7	7.5
9	Ⅲ(7.5)	Ⅲ(65)	Ⅱ(2.0)	I(1.5)	5.8	5.7

2.1.5 各因素对试验指标的影响

对正交试验结果进行方差分析,采用F检验考察各因素对试验指标的影响程度(表3)。

由表3可知,A因素、B因素对试验结果有极显著影响,C因素、D因素对试验结果有显著影响。根据各因素的F值大小,A、B、C和D对水解液中 α -氨基氮影响的主次关系为B>A>D>C。

2.1.6 水解适宜条件的确定

F测验是整体概念。水解适宜条件的确定采用最小显著极差法中的q值法^[4]来选定(表4)。

表 3 F 检验结果
Tab.3 The results of F -test

变异来源	DF	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
重复间	1	0.0005	0.0005	< 1		
A	2	1.80	0.90	9.09	4.46	8.65
B	2	9.53	4.77	48.1	4.46	8.65
C	2	1.05	0.53	5.35	4.46	8.65
D	2	1.47	0.74	7.47	4.46	8.65
误差	8	0.7925	0.099			
总变异	17	14.643				

表 4 不同因素水平间的差异显著性

Tab.4 The significance of different factor and level

因素水平	A			B			C			D		
	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3
α -氨基氮 k	46.7	41.9	41.8	46.2	45.1	36.1	43.6	43.2	40.4	44.6	42.3	40.4
显著性水平 $\alpha=0.05$	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a
显著性水平 $\alpha=0.01$	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A

由表 4 可知, A_2 与 A_1 无显著差异, A_2 与 A_3 间无显著差异, 可见双酶同时水解的适宜 pH 为 6.5 ~ 7.5, 但以 pH7.0 为最佳; B_2 与 B_1 无显著差异, B_2 与 B_3 间在 $\alpha=0.01$ 水平有极显著差异, 但 B_2 较优, B_1 次之, 其适宜的温度为 45 ~ 55℃, 从节省能源来看, 选择 45℃ 即 B_1 较合适。 C_2 与 C_3 、 C_2 与 C_1 不存在显著差异, 但 C_2 较优; D_3 与 D_2 、 D_3 与 D_1 无显著差异, 但 D_3 较优。可见 枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同时对海鳗肉水解的适宜条件为 $A_2B_1C_2D_3$, 即 pH7.0、温度 45℃, 加酶量 2.0%(原料), 时间 2.5h。这与单因素的研究结果基本一致。

2.2 蛋白质水解率

经测定, 采用枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶在上述条件下同时对海鳗肉水解, 蛋白质水解率为 75.0%, 基本上达到盐酸水解水平, 且在温和的条件下进行, 不易产生异变物质, 一些对人体有益海洋生物活性物质如牛磺酸等得以较好保存。据报道, 牛磺酸具有抑制血小板凝集, 降血脂、血压, 降低胆固醇, 保护视力, 促进大脑发育, 防治胆结石等多种生理功能^[5]。

2.3 浓缩水解液的氨基酸组成

水解液过滤后浓缩到原体积的 1/2, 所得样品直接用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪测定其氨基酸组成, 结果见表 5。

从表 5 可知, 海鳗肉浓缩水解液中氨基酸含量丰富, 共检出 19 种氨基酸, 其中必需氨基酸占氨基酸总

表 5 海鳗肉浓缩水解液氨基酸组成

Tab.5 Amino acid composition of the condensed

hydrolyzed solution		(mg/100mL)	
氨基酸	含量	氨基酸	含量
甘氨酸 Gly	53.6	丙氨酸 Ala	69.4
缬氨酸 Val	102	亮氨酸 Leu	200
异亮氨酸 Ile	71.4	丝氨酸 Ser	43.6
苏氨酸 Thr	47.8	甲硫氨酸 Met	65.8
胱氨酸 Cys	6.6	天门冬氨酸 Asp	49.4
谷氨酸 Glu	49.8	酪氨酸 Tyr	70.7
苯丙氨酸 Phe	147	脯氨酸 Pro	15.7
色氨酸 Trp	18	精氨酸 Arg	128
赖氨酸 Lys	56.5	组氨酸 His	30.9
牛磺酸 Atu	82.3		
氨基酸总量	1226.2		
必需氨基酸	708.5		
N 回收率(%)	88.7		

量的 57.8%; 此外, 6 种呈鲜味氨基酸 (Glu、Gly、Asp、Ala、Pro、Ser) 的含量占氨基酸总量的 23%, 海洋生物中的重要天然生理活性物质——牛磺酸 (82.3mg/100mL) 含量较高, 对儿童生长发育有重要作用的精氨酸含量高达 128mg/100mL; 从其含氮量来看, 海鳗肉双酶水解浓缩液中游离氨基酸的含氮量占其非蛋白氮的 88.7%。该酶解液呈淡黄色, 澄清透明, 具有鱼肉的鲜味, 苦味较淡, 略有腥味, 可与桂圆、红枣等中药提取液调配来掩盖其腥味, 制成具有一定保健功能的营养液。有关的工艺配方还有待于进一步的研究。

3 结论

采用枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同时加入方法,对海鳗肉进行水解,其工艺条件为 pH 7.0, 温度 45℃, 加酶量 2.0%(原料), 时间 2.5h, 水解效果较好。水解液经浓缩到原体积的 1/2 后的氨基酸总量达 1226.2mg/100mL, 其中必需氨基酸占 57.8%。若将海鳗肉的酶解工艺条件应用于鱼排及碎肉水解, 因后者的蛋白质含量要低些, 可在同样的温度及 pH 条件下, 减少加酶量, 缩短水解时间而获得同样的水解效果。

参考文献:

- [1] 王长云, 林洪, 周东, 等. 从鳕鱼碎肉中提取水解蛋白[J]. 海洋湖沼通报, 1995, 11(4): 34-38.
- [2] 许安邦, 张水华, 董斌, 等. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 75-236.
- [3] 吴红棉, 曾少葵, 雷晓凌, 等. 双酶水解法在鲨鱼肉水解液制备中的工艺改良研究[J]. 中国水产科学, 2001, 24(1): 69-72.
- [4] 马育华, 卢宗海, 莫惠栋, 等. 田间试验和统计方法[M]. 北京: 农业出版社, 1987. 96-101.
- [5] 章超桦, 吴红棉, 洪鹏志, 等. 马氏珠贝肉的营养成分及其游离氨基酸组成[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 180-184.

下期文章摘要

文蛤染色体的研究

吴萍, 董建萍, 倪建国, 崇加荣

(苏州大学水产系, 江苏 苏州 215006)

摘要: 采用 PHA 和秋水仙素体内注射法, 以鳃组织为材料, 低渗—空气干燥法制片, 对文蛤的染色体进行了分析研究。结果表明, 文蛤染色体绝对长度较小, 为 0.91 ~ 1.96 μm , 其二倍体数目为 $2n = 38$, 核型公式为 $N = 18m + 14sm + 6t$, 染色体总臂数 $NF = 70$ 。同时, 本文还对帘蛤科种类的核型演化关系进行了初步探讨。

盐度对日本对虾幼虾生长与瞬时耗氧速率的影响

臧维玲¹, 戴习林¹, 江敏¹, 姚庆祯¹, 林晓¹, 徐桂荣², 丁福江²

(1. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090; 2. 上海申漕特种水产开发公司, 上海 201507)

摘要: 就盐度对日本对虾幼虾生长与氧代谢水平的影响进行了研究, 结果表明, 盐度 S 对日本对虾幼虾的生长、存活率有显著影响, 当 S 为 10.2 ~ 26.9 时, 幼虾生长效果最佳, 盐度为 20.3 时, 增长率和增重率为最大。盐度与溶氧水平明显影响日本对虾幼虾瞬时耗氧速率(V), V 与 DO 具有良好的线性关系, 且随 DO 的增加而增大。