

文章编号:1004-7271(2004)02-0151-06

酶法制备鲢蛋白

施文正,汪之和,吴翼东,唐元俊

(上海水产大学食品学院,上海 200090)

摘要 对比研究几种蛋白酶水解微波解冻后鲢肌肉的效果,单酶水解选择中性蛋白酶为水解鲢肌肉的最适酶种,采用正交实验确定其最佳的水解条件为温度 50℃、酶用量 0.5%、pH 7.0、水解 3h、料比 1:2,蛋白质回收率可达到 90.60%。双酶水解采用中性蛋白酶和风味蛋白酶,正交实验确定最佳水解条件:中性蛋白酶作用 1h 后,添加 0.4% 的复合风味蛋白酶,在 50℃、pH 为 7.0 下水解 4h,蛋白质回收率可达到 94.50%。水解液采用活性炭脱腥后基本无腥苦味,经真空冷冻干燥可制得纯度 91.0% 的蛋白粉。

关键词 鲢;酶解;微波解冻;中性蛋白酶;风味蛋白酶;活性炭;脱腥

中图分类号 S985.1 文献标识码:A

Silver carp fish protein prepared by enzyme

SHI Wen-zheng, WANG Zhi-he, WU Yi-dong, TANG Yuan-jun

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract In this paper, the silver carp hydrolysis by the enzyme was studied. The frozen fish meat was thawed by microwave. By contrast, neutrase have much higher hydrolysis efficiency. The optimum reaction of neutrase was determined by orthogonal design. The parameters are as follows: the reaction temperature is 50℃, the added enzyme dosage is 0.5%, the pH value is 7.0, the weight ratio of meat to water is 1 to 2 and reaction time is 3 hours, the recovery of the protein was 90.60%. The optimum reaction of neutrase and flavourzyme were found in same way. The optimal technical parameters are as follows: 1 hour after neutrase was added, at same degree centigrade and pH value, add 0.4% flavourzyme in and for reaction 4 hours. Recovery of the protein can reach 94.50%. Hydrolysate has little fish-odor when treated with active carbon. Hydrolysate could be dried into fish protein powder by freeze drying technology.

Key words silver carp; enzyme hydrolysis; microwave thaw; neutrase; flavourzyme; active carbon; deodorization

长期以来,大部分低值和小杂鱼类(如鲢、小杂鱼虾等)主要用于加工成为饲料鱼粉,或宠物食品,然而随着人口数量的不断增加,对动物蛋白质的需求量也越来越大,可是陆生动物蛋白的资源有限,满足不了人口快速增长的需要。同时主要经济鱼类资源也在不断地衰退,而低值鱼及小杂鱼产量在不断增加,因此加大对低值鱼的研究利用,开发高附加值的功能蛋白制品很有必要^[1,2]。鱼蛋白水解液是一种将新鲜鱼肉或加工后的废弃物经过一定的理化方法处理后得到的高蛋白、低脂肪的蛋白水解制品。该产品营养丰富,易于消化,可代替鸡蛋、牛奶并用作小麦粉的强化剂,产品中含有较多的多肽和氨基酸,

可纠正机体长期缺乏蛋白质而造成的营养不良现象,并能纠正消化道紊乱,改善消化功能^[3,4]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

鲜活鲢鱼,去鳞、内脏、鳃、头和尾,用水冲洗干净,然后切成 50~70g 的鱼块,冷冻贮藏;中性蛋白酶(neutrase)、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶和复合风味蛋白酶(flavourzyme)。

1.2 主要仪器

高速组织捣碎机,电子分析天平,恒温水槽,定氮仪,微波炉,冷冻干燥器。

1.3 蛋白质水解液制备工艺流程

原料鱼预处理→匀浆→保温酶解→灭酶→减压抽滤→灭菌

1.4 分析测定方法

1.4.1 蛋白质测定

凯氏定氮法^[5]。

1.4.2 氨基酸测定

甲醛滴定法^[5]。

1.4.3 氮回收率测定^[6]

$$\text{氮回收率}(\%) = \frac{\text{水解液中的总氮量}}{\text{原料中的总氮量}} \times 100\%$$

1.4.4 水解度^[6]

$$\text{水解度 DH}(\%) = \frac{\text{水解液中氨基氮的总摩尔数}}{\text{水解液中的总氮摩尔数}} \times 100\%$$

1.5 感官鉴定

固定四个人对水解液的颜色、气味、苦味进行综合评价,并按 1~9 表示最好,9 表示最差)等级进行分类评比。

表 1 评分标准表

Tab.1 Sensory evaluation judgment

分数	指标
9	颜色为深黄或其它颜色,溶液十分浑浊,腥苦味很重
8	颜色为深黄或其它颜色,溶液浑浊,腥苦味很重
7	颜色为深黄色,溶液较浑浊,腥苦味重
6	颜色为深黄色,溶液比较澄清透明,腥苦味一般
5	颜色为黄色,溶液比较澄清透明,腥苦味一般
4	颜色为黄色,溶液比较澄清透明,腥苦味小
3	颜色为淡黄色,溶液比较澄清透明,腥苦味较小
2	颜色无色或淡黄色,溶液澄清透明,腥苦味较小
1	颜色为无色或淡黄色,溶液澄清透明,腥苦味很小

2 实验结果

2.1 酶解鲢蛋白单一酶的确定

在生产蛋白水解液中,酶的选择是关键,它不仅影响反应速度、产品的得率,而且直接影响产品的风味和物理化学特征,本实验分别选用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶在各自最适条件下进行水解^[7,8],酶解液的蛋白质回收率和感官指标如表 2 所示。

表 2 五种蛋白酶酶解效果比较

Tab.2 The comparison of hydrolysates by five proteases

酶种	作用类型	T (°C)	pH	料比	酶用量 (E/S)	时间	蛋白质回收率 (%)	感官指标
木瓜蛋白酶	内切酶	50	6.0	1:2	0.9%	4	90.13	5
中性蛋白酶	内切酶	50	7.0	1:2	0.9%	4	94.28	5
胰蛋白酶	内切酶	50	7.0	1:2	0.9%	4	91.05	5
胃蛋白酶	内切酶	37	2.5	1:2	0.9%	4	72.13	6
枯草杆菌蛋白酶	内切酶	50	6.5	1:2	0.9%	4	94.01	7

通过蛋白质回收率比较,可知除胃蛋白酶外,其它四种酶在各自最适条件下酶解作用后的蛋白质回收率差别并不是很大,结合感官指标并考虑酶的价格因素后,单酶水解采用中性蛋白酶。

2.2 自然解冻与微波解冻的比较

取等量鱼肉分别采取自然解冻(空气)和微波解冻,匀浆后分别加入 0.9% 倍质量的酶、料液比为 1:2、pH 调到 7.0,然后在 50℃ 下水解 4h,测其蛋白质回收率及感官指标。

由表 3 可见,采用微波解冻的鱼肉比采用自然解冻的鱼肉酶解后的蛋白质回收率要高 5 个百分点,因为微波加热解冻的同时使鱼肉蛋白质的空间结构受到微波作用而变性,肽链结构松散而便于酶解,并且采用微波解冻会大大缩短解冻的时间。相比较而言,如果用水流解冻,将浪费大量的水并且会损失一些水溶性蛋白质,而如果采用空气自然解冻,所需时间会很长,并且容易造成鱼肉腐败,综合以上多方面因素考虑,确定解冻鱼肉时采用微波方式。

2.3 中性蛋白酶水解鲢鱼肉的最佳工艺的确定

2.3.1 水解条件的确定

蛋白酶水解主要受温度、pH、时间、酶量和料液比等因素影响,选择温度、pH、时间、酶量和料液比五因素,以蛋白质回收率为指标,做中性蛋白酶水解鲢鱼肉正交实验,实验方案设计及结果见表 4。

表 4 中性蛋白酶水解正交实验结果

Tab.4 The results of hydrolysis orthogonal design by Neutrase

实验号	温度 (℃)	酶量 (%)	pH	时间 (h)	料比	蛋白质回收率 (%)	水解度 DH	感官指标
1	1(45)	1(0.3)	1(6.0)	1(3)	1(1:2)	74.10	22.50	5
2	1	2(0.5)	2(6.5)	2(4)	2(1:3)	83.12	23.81	5
3	1	3(0.7)	3(7.0)	3(5)	3(1:4)	89.14	32.20	5
4	1	4(0.9)	4(7.5)	4(6)	4(1:5)	87.20	30.43	6
5	2(50)	1	2	3	4	89.15	28.66	5
6	2	2	1	4	3	88.12	30.03	5
7	2	3	4	1	2	92.86	32.10	5
8	2	4	3	2	1	94.28	33.50	6
9	3(55)	1	3	4	2	88.70	31.03	5
10	3	2	4	3	1	92.36	24.19	5
11	3	3	1	2	4	87.72	30.61	5
12	3	4	2	1	3	94.14	32.07	5
13	4(60)	1	4	2	3	84.80	24.54	5
14	4	2	3	1	4	88.72	31.47	5
15	4	3	2	4	1	90.86	34.09	5
16	4	4	1	3	2	85.20	35.42	5
K ₁	83.39	84.19	83.79	87.46	87.90			
K ₂	91.10	88.08	89.48	87.48	87.47			
K ₃	90.73	90.15	90.21	88.96	89.05			
K ₄	87.40	90.21	89.31	88.72	88.20			
R	7.71	6.02	6.42	1.50	1.58			

由极差分析可知,各因素对蛋白质回收率影响程度依次为:温度 > pH > 酶量 > 料比 ≈ 时间,考虑到经济因素,确定中性蛋白酶水解鲢鱼肉最佳条件:温度 50℃、酶量 0.5%、pH 7.0、水解时间 3h、料比 1:2,在此条件下水解后的蛋白质回收率为 90.60%,水解度为 34.08%,感官指标为 5。

表 3 微波解冻与自然解冻比较

Tab.3 The comparison of fish meat thawed by microwave and air

	蛋白质回收率(%)	感官指标
微波解冻	94.28	6
自然解冻	89.51	6

2.3.2 最佳脱腥脱苦方法的确定

蛋白质在酶水解后经常会产生苦味,这使酶法水解蛋白在食品工业上的应用受到了严重的限制。酶法水解蛋白是否产生苦味以及苦味的大小与蛋白质的种类、酶的类型、水解度及分离方法等因素有关。产生苦味的物质是一些短肽,称为苦味肽^[9]。苦味肽的长度从几个氨基酸残基到二十几个氨基酸残基不等,这些苦味肽的一个共同的特点是疏水性氨基酸残基所占的比例较大。当疏水氨基酸由于肽键的形成居于肽链非端基底端位置时,表现出最大值,当居于 C、N 端时苦味较低,以游离氨基酸的形式苦味最低。由于水解前疏水性氨基酸残基被包围在蛋白质的四级结构内,没有苦味,而水解后疏水性氨基酸残基的暴露使某些肽片段的疏水性增大而产生苦味。

本实验采用活性炭脱腥苦味,由于苦味肽的疏水性较强,因此利用活性炭的选择性分离法,是蛋白质水解物脱苦脱腥的主要方法之一。根据文献资料,对活性炭进行预处理,即研细。然后考察活性炭用量、pH 和时间对脱腥苦的影响,做正交实验确定活性炭脱腥脱苦的最佳条件,正交实验方案设计及结果见表 5。

表 5 活性炭脱腥脱苦正交实验方案及结果

Tab.5 The results of deodorization orthogonal design by active carbon

实验号	pH	添加量(%)	时间(h)	蛋白质回收率(%)	感官指标
1	I(3.5)	I(0.5)	I(0.5)	92.76	4
2	1	Ⅱ(1.0)	Ⅱ(1.0)	89.01	4
3	1	Ⅲ(1.5)	Ⅲ(1.5)	83.80	3
4	Ⅱ(4.5)	1	2	90.90	4
5	2	2	3	86.92	3
6	2	3	1	90.30	3
7	Ⅲ(5.5)	1	3	91.02	4
8	3	2	1	91.20	4
9	3	3	2	86.30	3
K ₁	88.52	91.56	91.42		
K ₂	89.37	89.04	88.74		
K ₃	89.51	86.80	87.25		
R	0.99	4.76	4.17		

由于活性炭对蛋白质有一定的吸附作用,因此最终结果以蛋白质回收率作为脱腥脱苦结果的指标,兼考虑感官指标,确定活性炭的作用条件为:添加量 1.5%、pH4.5、作用时间 0.5h,测得蛋白质回收率为 90.30%,感官指标为 3。

2.4 双酶组合水解

2.4.1 双酶组合水解最适条件的确定

双酶水解采用中性蛋白酶和复合风味蛋白酶,根据两酶作用性质的不同,采用先用中性蛋白酶水解作用 1h,然后加入复合风味蛋白酶。其中加入复合风味蛋白酶后的最佳水解条件通过正交实验确定,正交实验方案设计及结果见表 6。

由极差分析可知,上述各因素对水解程度影响为:温度 > pH > 酶量 > 时间,最高蛋白质回收率时复合风味蛋白酶的作用条件为:温度 50℃、酶量 0.5%、pH 7.0、水解时间 6h,考虑到实际生产中的经济因素确定采用如下条件:先加入 0.5% 的中性蛋白酶,在温度 50℃、pH 7.0、料比 1:2 下水解 1h,然后添加 0.4% 的复合风味蛋白酶,在 50℃、pH 7.0 下水解 4h,在此条件下测得蛋白质回收率为 94.50%,水解度为 47.20%,感官指标为 4。

2.4.2 活性炭脱腥苦处理

按照中性蛋白酶水解的结果进行处理(活性炭添加量为水解液的 1.5%、调 pH 到 4.5,作用 0.5h),水解液脱腥脱苦效果很好,基本无腥苦味,感官指标可达到 2,颜色呈淡黄色,活性炭脱腥后蛋白质回收

率为 90.30% 相对于酶解开始时的鱼肉,其蛋白质最终回收率为 85.33%(90.30% × 94.50%)。

表 6 风味蛋白酶水解正交实验方案及结果

Tab.6 The results of hydrolysis orthogonal design by Flavourzyme

实验号	温度(℃)	酶量(%)	pH	时间(h)	蛋白质回收率(%)	水解度 DH	感官指标
1	1(45)	1(0.3)	1(6.5)	1(4)	86.80	43.77	5
2	1	2(0.4)	2(7.0)	2(5)	92.14	45.66	5
3	1	3(0.5)	3(7.5)	3(6)	90.24	45.85	5
4	2(50)	1	2	3	94.20	47.13	5
5	2	2	3	1	92.50	45.49	4
6	2	3	1	2	92.31	46.74	4
7	3(55)	1	3	2	88.40	42.77	5
8	3	2	1	3	92.06	45.72	5
9	3	3	2	1	94.39	46.61	4
K ₁	89.73	89.8	90.39	91.23			
K ₂	93.00	92.23	93.58	90.95			
K ₃	91.62	92.31	90.38	92.17			
R	3.27	2.51	3.17	1.22			

2.5 鱼蛋白粉的制备

制得的鱼蛋白水解液经真空冷冻干燥,得到白色或微黄色粉末状成品,且无不良气味,经测定其中蛋白质含量为 91.0%、水分含量为 6.1%、脂肪含量为 1.1%、灰分为 2.3%。产品可作为优良的蛋白质强化剂,具有很好的应用前景^[10]。

3 讨论

3.1 中性蛋白酶制备鱼蛋白水解液水解条件的确定

根据正交实验极差分析的结果,蛋白质回收率最高时的水解条件为:温度 50℃、酶量 0.9%、pH 7.0、水解时间 5h、料比 1:4,测得蛋白质回收率为 94.42%、感官指标为 6。但是从经济价值角度考虑到酶用量的增加将极大增加生产成本,并且 0.5%的酶添加量与 0.9%的添加量对水解程度影响相差也比较小,因此最佳酶添加量采用 0.5%;而时间对水解程度的影响相对很小,而且时间的延长将增加能量的消耗以及生产周期的增加,从而在很大的程度上增加生产成本,因此考虑采用 3h 时间酶解;由于如果料比很小的话,将增加水解液浓缩的成本,且料比对水解后的蛋白质回收率影响相对也较小,因此采用最大料比,即 1:2。综合以上各因素,确定使用单酶(中性蛋白酶)水解鲢鱼肉的最佳条件为:温度 50℃、酶量 0.5%、pH 7.0、水解时间 3h、料比 1:2,在此条件下水解后的蛋白质回收率为 90.60%、水解度为 34.08%、感官指标为 5。

3.2 活性炭脱腥脱苦条件的确定

单纯考虑蛋白质回收率这一评定指标,最适条件应为:活性炭用量 0.5%、pH 5.5、作用时间 0.5h,蛋白质回收率为 92.85%,但感官指标为 5,脱腥脱苦的效果不好,所以不宜采用。再结合感官评定的指标,确定采用的条件为:活性炭用量 1.5%、pH 4.5、作用时间 0.5h,蛋白质回收率为 90.30%、感官指标为 3,感官指标明显好于蛋白质回收率最高时。总体来说,活性炭能够脱去一定的鱼蛋白腥苦味,并且作用后颜色较好,缺点是蛋白质损失较大。

3.3 双酶组合水解最适条件的确定

中性蛋白酶是内切酶,而复合风味蛋白酶是外切酶,外切酶可以有效的去除酶解液中产生苦味的末端氨基酸,不仅能水解部分苦味肽,还可增加一些游离氨基酸,对水解产物的风味有很大的改良作用。

根据两种酶的作用方式,确定了实验中先用中性蛋白酶水解一段时间,再用复合风味蛋白酶水解。

由复合风味蛋白酶正交实验的极差分析可知,各因素对蛋白质回收率的影响程度为:温度 > pH > 酶量 > 时间,最高蛋白质回收率时复合风味蛋白酶的作用条件为:温度 50℃、酶量 0.5%、pH 7.0、水解时间 6h,蛋白质回收率为 94.80%,感官指标为 5。但是考虑到 0.4%的酶量与 0.5%的酶量对蛋白质回收率的影响极差很小,因此采用 0.4%的酶量,实际情况也是如此,相同条件下,用 0.3%、0.4%和 0.5%的酶量相比,后两者相差很小,但比 0.3%的回收率相对增加很多;因为时间因素影响程度最小,而延长将会延长生产周期和增加能耗,从而使生产成本增加,因此采用水解 4h。综合上述因素考虑,因此确定双酶水解鲢鱼肉的最佳酶解条件为:先用 0.5%的中性蛋白酶在温度 50℃、pH 7.0、料比 1:2 下水解 1h,然后添加 0.4%的复合风味蛋白酶,在 50℃、pH 7.0 下水解 4h,在此条件下测得蛋白质回收率为 94.50%,水解度为 47.20%,感官指标为 4。

4 结束语

通过正交实验确定了单酶和双酶水解鲢鱼制备鱼蛋白水解液的最适条件,使得在尽量少的酶用量下获得较高的蛋白质回收率成为可能,并且发现在鱼肉解冻时采用微波解冻,可以很大程度的提高蛋白质回收率,蛋白水解液在用活性炭脱腥脱苦后,基本无腥苦味,经真空冷冻干燥可制得含量达 91.0%的优质蛋白粉,可作为一种优良的蛋白强化剂,具有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] 赵玉红,孔保华. 鱼蛋白水解的研究进展[J]. 肉类工业, 2002, 3: 31-34.
- [2] Rozenn R P. The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus* [J]). J Sci Food Agric, 2001, 81: 1120-1125.
- [3] Liceaga F A, Li C E. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring[J]. J Food Sci, 1999, 64: 1000-1004.
- [4] 刘洋,王长云,薛长湖,等. 鳀鱼蛋白酶水解物的营养评价[J]. 青岛海洋大学学报, 1996, 1: 37-43.
- [5] 大连轻工业学院等合编. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994. 216-221, 232-234.
- [6] 江志炜,沈蓓英,潘秋琴,等. 蛋白质加工技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2003. 263-265.
- [7] 邓尚贵,章超桦. 双酶法在水产品水解动物蛋白制作工艺中的应用研究[J]. 水产学报, 1998, 4: 352-356.
- [8] 张芝芬,杨文鸽,夏文水,等. 木瓜蛋白酶对蛙肉蛋白质的水解[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 3: 299-301.
- [9] 冯红霞,陆兆新,尤华. 苦味肽的形成及脱苦方法的研究[J]. 食品科学, 2002, 5: 151-154.
- [10] Baca D R, Pena V M, Diaz C M. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yields and nutritional value[J]. J Food Sci, 1991, 56: 309-314.