

三角帆蚌 *Hgriopsis cumingii* 肉酶解工艺的研究

杨文鸽 黄晓春 庄荣玉 徐大伦 董明敏

(宁波大学生命科学与生物工程学院,宁波 315211)

摘要 探讨了 As1.398 中性蛋白酶水解三角帆蚌肉的具体工艺条件。通过正交实验,确定其最佳水解条件为:温度 50℃,酶用量 2.8%,肉水比 1:2,时间 9h。综合考虑各方面的因素,在实际生产中可采用 40~45℃,酶用量 2.4%,肉水比 1:2 或 1:1,时间 8h 对蚌肉进行酶解。水解液可用于生产功能性蛋白饮料及调味配料。

关键词 蚌肉 酶解 中性蛋白酶 水解度

利用酶水解动植物蛋白得到营养丰富、风味独特的酶解蛋白液一直是食品开发利用的研究热点之一。国内外许多学者曾对鳃鱼、贻贝、扇贝边、鸡肉、鲑鱼肉、鳗鲡头、牡蛎、鲑鱼、螺旋藻等进行酶解研究^[1-4],获得一系列产品(例蚝油、鸡精)。在欧美、日本等国,已先后利用蛋白水解液研究出各种风味的调味料,分别用于汤类、色拉及各种快餐食品的调味。此外酶解蛋白还广泛应用在保健品、医药及饲料中,取得了较高的经济价值。

三角帆蚌(*Hgriopsis cumingii*)是江浙一带淡水珍珠养殖的主要品种,采珠后的蚌肉数量相当丰富。含丰富的蛋白质,其中必需氨基酸及谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸等呈味氨基酸含量较高,具有较高的营养价值和独特的鲜味。国内学者曾报道,从蚌肉中提取的蛋白聚糖 HB 组分有较强的抗肿瘤活性,并报道了取珠后的三角帆蚌、圆背无齿蚌肉等的营养成分分析^[5]。但对蚌肉蛋白的利用,酶法水解蚌肉及其制品方面的研究未见报道。本文利用 As1.398 中性蛋白酶对蚌肉进行酶解,通过单因素实验和正交实验,以水解度为指标,研究酶解工艺的最佳条件,旨在开发利用取珠后的蚌肉提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 蚌肉

三角帆蚌长 21.5~22.5cm,高 14.5~15.5cm,取自绍兴珍珠养殖场。剥壳,去珍珠后采肉,经初步切碎后,再用高速组织捣碎机捣碎均匀成蚌肉糜,蛋白质含量为 9.52%(湿基)。

1.2 酶制剂

枯草杆菌中性蛋白酶(As1.398 中性蛋白酶):食品级,无锡杰能科生物工程有限公司提供,实测酶活力为 8.0×10^4 u/g。酶活力单位定义:30℃,pH7.0,水解酪蛋

白每分钟产生酪氨酸 $1\mu\text{g}$ 为 1 个酶活力单位。

1.3 实验方法

蛋白质含量测定:微量凯氏定氮法^[6]。

氨基酸(AA-N)测定:电位滴定法^[7]。

水解度(DH): $DH = (6.25 \times \text{氨基酸含量} / \text{粗蛋白质含量}) \times 100\%$ 。

蚌肉酶解液的制备:蚌肉糜→按肉水比加一定量的水,搅拌均匀→调 pH 值至中性→加入一定量的酶→充分搅匀→酶解→灭酶(90℃,10min)→5000 r/min 高速离心 5min 左右→取清液,用蒸馏水定容至 100mL,得酶解液,测氨基酸。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 预处理温度对蚌肉水解度的影响

蚌肉悬浮液(肉水比为 1:4)分别在室温(15℃)、30、40、50、60 和 70℃加热 10min,然后在酶用量 2.0%,40℃,pH7.0 下酶解 4h,测定其水解度,结果见图 1。可以看出,与未预处理(室温 15℃)相比,30℃的加热处理对提高蚌肉的水解度有明显的作用,而随着处理温度的提高,水解度又开始慢慢下降。

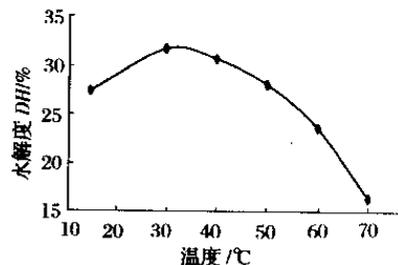


图 1 预处理温度与水解度的关系

一般来说,动物蛋白受热时,蛋白质发生变性,肽键暴露,有利于酶解。但由实验结果看来,蚌肉似乎并

不如此,可能跟原料的质地、结构有关,蚌肉蛋白在高温下热变性过度,凝固后酶反而难渗入底物,从而使水解效果下降。

30℃预处理后,水解度达到最大值 33.02%,未预处理(室温 15℃)的水解度为 30.46%。在实际生产中可根据具体情况决定是否需要加热预处理。若加工环境温度较高,则可以降低生产成本。

2.1.1.2 加酶量的确定

当底物量一定,在酶饱和和底物之前,酶用量越大,蛋白质的水解度也越大,但酶量加大,生产成本提高。将蚌肉悬浮液(肉水比为 1:4)的 pH 值调至中性,分别加入蚌肉量 1.8%、2.0%、2.2%、2.4%、2.6%、2.8% 的酶进行水解(40℃, 4h),测定其水解度,结果见图 2。

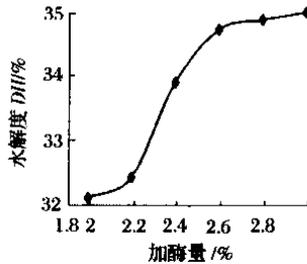


图 2 加酶量与水解度的关系

可以看出,随着加酶量的增大,水解度逐渐上升,酶量在 1.8%~2.4% 之间,水解度上升较快,而当加酶量超过 2.4% 时,水解度上升的趋势很平缓,从经济角度来考虑,选酶用量为蚌肉的 2.4% 比较适宜。

2.1.1.3 酶解温度的确定

温度从影响蛋白酶催化反应的速度及蛋白酶的稳定性 2 个方面影响酶解反应的效率。将蚌肉悬浮液(肉水比为 1:4)用 NaOH 调 pH 值至中性,固定化酶用量 2.4%,分别在 30、35、40、45 和 50℃ 下酶解 4h 后测定水解度,结果见图 3。

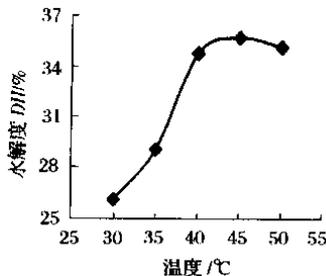


图 3 温度与水解度的关系

可以看出,温度由 30℃ 上升到 40℃,水解度从 25.98% 迅速增大到 34.72%。45℃ 时,水解度达最大值 35.63% 继续升高温度,水解度又有所下降。考虑到 40℃ 与 45℃ 时水解度变化不大,故选定在 40~

45℃。

2.1.1.4 肉水比的选择

分别按蚌肉与水的比例为 1:5、1:2、1:3、1:4、1:5 制得蚌肉糜悬浮液,调 pH 值至中性,酶量 2.4%,40℃,酶解 4h 后测定其水解度,找出最佳的底物浓度-肉水比。由图 4 可知,当蚌肉与水的比例为 1:2 时,水解度达最大值 36.20% 继续增加水的比例,酶的浓度降低,水解率下降。总的说来,底物浓度对水解度的影响不是很大,当肉水比为 1:1、1:2 时水解度分别达到 35.76% 和 36.20%,两者相差不大,因此可根据实际情况选择。如生产液体调味料时,可采用 1:2 以达到高水解度,而生产固体调味料时,采用 1:1 可节省生产后期浓缩干燥时间及能耗。

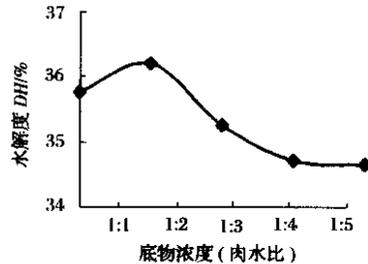


图 4 底物浓度与水解度的关系

2.1.1.5 酶解时间的选择

蚌肉悬浮液(肉水比 1:2)用 NaOH 调 pH 值至中性,酶用量为 2.4%,在 40℃ 下分别酶解 4、5、6、7、8、9、10h 后测定其水解度,寻找最佳的酶解时间。结果如图 5 所示。

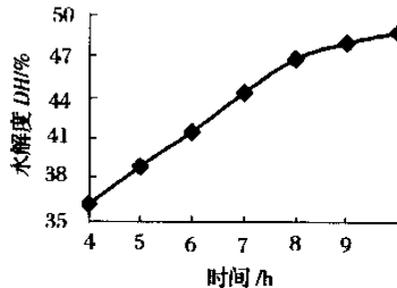


图 5 酶解时间与水解度的关系

可以看出,随着酶解时间的延长,水解度越来越大,但 8h 后水解度上升的趋势变缓,因此酶解时间选 8h 为宜。由单因素实验确定 As1.398 中性蛋白酶水解蚌肉的最佳条件是:40~45℃、酶量 2.4%、肉水比 1:2、酶解 8h。

2.2 正交实验

考虑到酶解时,各种因素之间相互联系,在上述单因素实验的基础上,综合考虑实际情况,进行正交实验,以确定合适的酶解条件。采用正交表 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$

进行实验,各因素和水平如表 1 所示,正交实验设计及结果分析如表 2。

表 1 正交实验各因素和水平表

因素水平	温度/℃	酶量/%	时间/h	底物浓度
1	35	2.2	6	1:1
2	40	2.4	7	1:2
3	45	2.6	8	
4	50	2.8	9	

表 2 正交实验设计及结果分析表(n=3)

序号	A	B	C	D	水解度/%
1	1	1	1	1	32.77
2	1	2	2	2	37.42
3	1	3	3	1	38.07
4	1	4	4	2	42.08
5	2	1	2	1	41.15
6	2	2	1	2	42.60
7	2	3	4	1	48.01
8	2	4	3	2	47.46
9	3	1	3	2	45.90
10	3	2	4	1	48.13
11	3	3	1	2	44.15
12	3	4	2	1	43.41
13	4	1	4	2	48.08
14	4	2	3	1	48.67
15	4	3	2	2	47.99
16	4	4	1	1	46.59
k_1	37.58	41.98	41.53	43.35	
k_2	44.81	44.21	42.49	44.46	
k_3	45.40	44.56	45.03		
k_4	47.83	44.89	46.58		
R	10.25	2.91	5.05	1.11	

由表 2 的极差分析可知,用 As1.398 中性蛋白酶水

解鲜肉,影响水解度的主次因素顺序为:温度 > 时间 > 加酶量 > 底物浓度,酶解的最佳工艺组合为 $A_4B_4C_4D_2$ 。

表 3 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F	显著性
A	233.63	3	77.88	84.10	***
B	20.80	3	6.93	7.49	***
C	64.13	3	21.38	23.08	**
D	4.93	1	4.93	5.32	*
误差	4.63	5	1.54		
总和	328.12	15			

注: $F_{0.05(3,5)} = 5.41$, $F_{0.01(3,5)} = 6.61$, $F_{0.001(3,5)} = 12.06$, $F_{0.001(1,5)} = 16.26$,其中带***有高度显著影响,**有显著影响,*没有显著影响。

由于最佳组合 $A_4B_4C_4D_2$ 并没有在正交实验中出现,为确定其是否为最佳工艺条件,进行验证实验,即在 50℃,酶量 2.8%,肉水比 1:2 的条件下酶解 9h,测得水解度为 52.94%,这要高于正交表中任一数值。

表 3 的方差分析表明,因素酶解温度和时间对蚌肉的水解度有高度显著影响作用,因素加酶量对水解度有显著影响作用底物浓度没有显著影响。

图 6 为酶解因素对水解度影响的直观图。可以看出,因素 A(温度)的 2、3、4 各水平之间的 K 平均值相差不大,且加酶量)的 2、3、4 各水平之间的 K 平均值更是很接近,且(时间)的 3、4 水平间的 K 平均值相差不大。

从原料、成本、能耗、人力上考虑,选择以下条件进行酶解: $A_2B_2C_3D_2$ (40℃,酶量 2.4% 8h,肉水比 1:2); $A_3B_2C_3D_2$ (45℃,酶量 2.4% 8h,肉水比 1:2)。

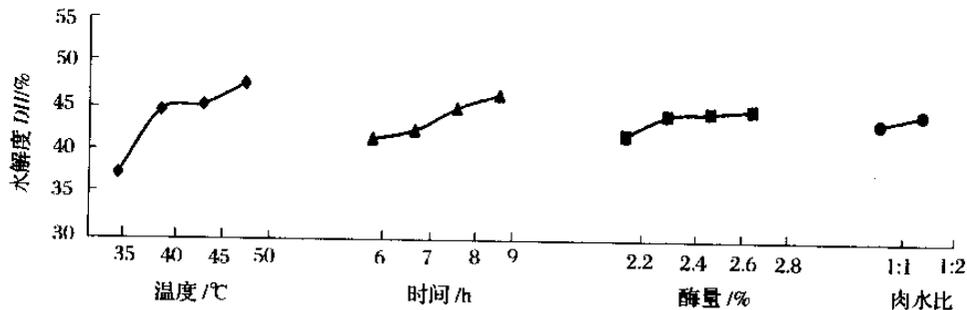


图 6 酶解因素对水解度影响的直观图

实验结果测得 $A_2B_2C_3D_2$ 组合的水解度为 46.77%; $A_3B_2C_3D_2$ 组合的水解度为 47.94%。由其水解度的大小来看,确实没有 $A_4B_4C_4D_2$ 组合的水解度 52.94% 大,

但 $A_2B_2C_3D_2$ 及 $A_3B_2C_3D_2$ 组合的酶解温度只有 40℃、45℃,时间 8h。从节省能源、酶量、时间等以降低成本考虑,在实际生产中,可根据情况采用 $A_2B_2C_3D_2$ 及

A₃B₂C₃D₂ 两种组合之一。

4 结 语

采用单因素实验及正交试验提出 A₅1.398 中性蛋白酶水解蚌肉蛋白的最佳工艺条件,为酶解蚌肉蛋白及其制品的研究提供了有价值的理论数据,为蚌肉的深加工利用开辟了一条新途径。A₅1.398 中性蛋白酶水解蚌肉蛋白的最佳工艺条件:50℃,9h,加酶量 2.8%,肉水比 1:2。影响因素主次顺序为温度,时间,加酶量,肉水比。

结合实际生产过程中人力资源、原料成本、能耗等具体情况,建议如下:蚌肉可不经加热预处理,酶解工艺条件可以考虑:40~45℃,酶解时间 8h,加酶量

2.4%,肉水比根据生产目的选择 1:2 或 1:1。

参 考 文 献

- 1 汪秋安. 食品工业科技,1999,20(4):66~67
- 2 熊善柏,王启明,赵山. 食品工业科技,2000,21(4):17~19
- 3 王长云. 海洋湖沼通报,1995(4):33~39
- 4 吴少雄,刘光东. 广州食品工业科技,1997(3):9~11
- 5 杨文鸽. 浙江海洋学院学报,1997,16(3):201~207
- 6 北京师范大学生物系编. 基础生物化学实验. 北京:高等教育出版社,1998.142~145
- 7 无锡轻工业大学、天津轻工业学院合编. 食品分析. 北京:中国轻工业出版社,1998.216~219



生物活性肽系列饮料面市

由中国食品发酵工业研究院研制,北京市牛栏山酒厂北京酒泉太空水饮料公司生产的“激情”生物活性肽系列饮料春节前投放市场。该饮料是用中国食品发酵工业研究院自行开发的大豆生物活性肽配以果汁、多种无机盐精心调配而成,有青苹果、草莓及橙子 3 种口味。

大豆生物活性肽是国家“九五”重点科技攻关项目及国家创新技术项目的技术成果。实验证明,大豆活性肽具有抗氧化、抗疲劳、降血压等多种生理功能,效果显著,是一种多功能营养配料。将活性肽用于饮料目前只有英国及日本两家公司生产。“激情”生物活性肽系列饮料的面市,填补了我国生物活性肽饮料的空白,更为广大消费者提供了一种健康的选择。



品牌保健酒角逐市场

由于我国白酒市场呈现衰退趋势,一些白酒厂家为了寻求出路,纷纷进行产业调整,其中保健酒转型就是一个方向。有业内人士指出,随着国人生活水平的逐年提高,保健酒势必成为中国白酒业的发展方向,而保健酒市场的迅速扩张也指日可待。

目前,中国保健酒市场可以说是群雄纷起,但形成规模的品牌保健酒不多。从经营手段、经营理念等诸多方面来看,尚没有一个全国性主导品牌。可以说,在人们健康观念日益增强的情况下,谁把握了先机,谁就能推出具有号召力的全国性品牌。

五粮液集团旗下的五浪液保健酒公司已经拥有龙虎酒等 6 个品牌,前不久又推出 1 个新品牌,而茅台不老酒亦被摆上了醒目的位置,同样引人注目的还有老 4 大名酒中的山西汾酒,准备了竹叶青、金汾酒 2 种品牌,其中竹叶青即是打着保健酒甚至是保健食品的旗号,新华联旗下的金六福酒业在完成对无比古方酒的收购整合后,重新定位了消费群体的无比古方酒也开始在市场露脸。

另外,烟台张裕集团旗下的三鞭酒和十全大补酒、鹿龟酒等也已大张旗鼓地进入了市场。在这些推出保健酒的企业中,各大企业选择重点各不相同,五粮液与茅台 2003 年不约而同选择在一些新市场特别是北京启动保健酒销售攻势,培养自己的市场。但更多人的目光还是集中在传统的保健酒 6 大市场——广东、山东、湖南、湖北、浙江、上海 5 省 1 市。