

美拉德反应基液——鳊鱼蛋白酶解液的制备

翁雯,杨荣华,戴志远

(浙江工商大学水产品加工研究所,浙江 杭州,310035)

摘 要 研究以鳊鱼蛋白为原料,经过酶解反应,以期获得风味良好的美拉德反应基液。通过风味蛋白酶与其它蛋白酶复配筛选组合,综合考察影响酶解反应的4个因素:温度、时间、pH和酶添加量,以水解度(DH)为响应值,采用Box-Behnken响应面分析法确定最佳反应条件。研究结果表明,以风味蛋白酶和复合蛋白酶(3:1)复配的组合水解度最高,酶解反应条件为:温度51.5℃,时间5.7 h, pH 7.7,酶添加量0.80%,水解度可达79.46%。在该条件下制得的酶解液腥味弱,苦味值低,有淡淡的鱼香味,可以作为美拉德反应的基液。

关键词 鳊鱼,酶解,水解度,响应面分析法

随着时代的发展,人们对调味品的追求越来越高,利用美拉德反应制备的调味料,具有原味、健康和安全的特点,越来越受到人们的青睐,其中肉味香精是研究最早的一种热反应香精。在20世纪60年代,美国就有用还原糖和氨基酸制备肉类香精的专利发表^[1],到了70年代,美、英、德、日等国家已广泛使用美拉德反应来生产速食汤料。而我国肉味香精工业是伴随方便面工业产生的,2004年,我国肉味香精的生产厂有100多家,年销售额约20亿元人民币,每年以超过10%的速度递增^[2]。由此可见,利用美拉德反应技术生产天然调味品在我国具有广阔的市场前景。目前,我国对于肉类香精的研究已经相当成熟,产品业已产业化生产进入市场,而我国作为淡水资源大国,利用水产资源生产热反应海鲜调味料的品种非常少见。因此,以水产动物水解液为原料,利用美拉德反应生产海鲜味调味料有广阔的应用前景,也可以丰富我国调味品市场。

鳊鱼作为我国特有淡水鱼种,是继四大家鱼之后最普遍食用的鱼类之一,其生长快速,易于养殖。但由于鳊鱼是淡水鱼种,鱼肉腥味较重,鱼刺多而细小,脂肪含量较一般鱼类高,因此,除了国内鲜销外,难以用加工的手段将其作为产品投放市场,或出口海外,这使得鳊鱼作为我国特有资源没有取得应有的经济效益和社会效益。

水产蛋白的控制酶解是实现低值水产品和水产品加工副产物高值化利用的主要途径,因此,本研究考虑利用鳊鱼蛋白为原料,经过酶解制备美拉德反应

基液,为下一步进行美拉德反应制备海鲜味调味料提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

鳊鱼,购于杭州超市。Flavourzyme(风味蛋白酶)、Protamex(复合蛋白酶)、Alcalase(碱性蛋白酶)、Neutrase(中性蛋白酶),诺维信公司生产。磷酸缓冲液、硼酸、三氯乙酸(TCA)、H₂SO₄、NaOH、HCl均为分析纯试剂。Thermo sorvall rc6plus冷冻离心机、Büchi自动凯氏定氮仪、飞鸽牌离心机(上海安亭科学仪器厂)、DK S-22型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)、Mettler Toledo pH计。

1.2 方法

1.2.1 原料预处理

鳊鱼去头、内脏及大的鱼骨,清洗,绞碎,85℃水浴20 min灭鱼体内生酶。待鱼肉冷却后,加入等量去离子水,混合后在4℃,6 000 g条件下离心10 min,用于脱除鱼体表面的油脂^[3],离心后,弃清液。经上述处理的鱼肉通过冷冻干燥后制成鱼粉,在干燥器中保藏。

1.2.2 最佳复合酶的确定

分别把Flavourzyme和Protamex、Alcalase、Neutrase以3:1的比例复合,酶解,测DH值。Flavourzyme和Protamex的酶解条件为50℃, pH 7.0, 5 h; Flavourzyme和Alcalase的酶解条件为50℃, pH 8.0, 5 h; Flavourzyme和Neutrase的酶解条件为50℃, pH 7.0, 5 h。

1.2.3 优化酶解实验

本实验采用响应面(RSM, response surface meth-

第一作者:硕士研究生(杨荣华教授为通讯作者)。

收稿日期:2009-01-17

odology) 设计完成对鳊鱼蛋白酶解条件的筛选,表 1 中列出了实验设计的相关影响因素及设计的因素水平,主要选取 4 个不同的因素(温度、时间、pH 和酶浓度)及 3 个等距离的水平(-1,0 和 +1),以水解度(DH)作为响应值来设计实验。每个实验控制料液比为 1:50,加入特定的酶量,在预先设定的 pH、温度和时间条件下酶解,酶解结束后,利用 95℃ 水浴 10 min 灭酶。

表 1 鳊鱼蛋白酶解因素和水平编码

因素	水平		
	-1	0	+1
温度(X_1)/℃	50.0	52.5	55.0
时间(X_2)/h	4.5	5.0	5.5
pH(X_3)	7.0	7.5	8.0
酶浓度(X_4)/%	0.6	0.7	0.8

1.2.4 水解度(DH)的测定^[4]

取 10 mL 酶解液上清液,加入 10 mL 10% 的三氯乙酸溶液,摇匀,静置 30 min,1 580 g(3 000 r/min)离心力条件下离心 15 min,上清液用全自动凯氏定氮仪定氮。

$$DH/\% = \frac{\text{水解液中可溶于 10\% TCA 溶液的氮量}}{\text{样品中总氮量}} \times 100$$

1.3 数据统计分析

采用 SAS 统计软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 复合酶的确定

以鳊鱼蛋白酶解液作为美拉德反应的基液,要求酶解液具有良好的风味,苦味值低,水解度高,因此,在酶解反应前选择用酶就十分关键。

国外研究人员对降低蛋白酶解液苦味进行了研究,他们发现选用特定的酶,如 Flavourzyme,这是一种蛋白酶/肽酶复合物,含有内切蛋白酶和外切蛋白酶 2 种活力,可以将多肽继续水解成氨基酸,从而降低酶解液的苦味^[5];另外,高水解度可以降低水解液的苦味,与其它蛋白酶相比,碱性蛋白酶水解物的苦味最低^[6]。因此,为保证酶解液具有良好的风味,本研究选择 Flavourzyme 与其它蛋白酶复配的方法进行酶解。复合酶的添加量和 DH 值结果见表 2。由表 2 可见,Flavourzyme 和 Protamex 的复合水解效果最好,因此,选用该复合酶作为本研究试验用。

表 2 不同组合的复配酶加量及 DH 值

复合酶	不同酶添加量时的 DH/%	
	加酶量 1.0%	加酶量 1.6%
Flavourzyme + Protamex	68.80	74.22
Flavourzyme + Alcalase	61.85	67.86
Flavourzyme + Neutrase	58.94	67.38

2.2 鳊鱼酶解工艺参数的优化设计

根据 Box 中心组合设计的原理,设计 4 因素(温度、时间、pH 和酶浓度),3 水平(-1,0 和 +1)的响应面实验。本次实验共有 27 个实验点,其中 3 个为 0 点实验,主要用于估计误差,以水解度为响应值,试验设计与结果如表 3 和表 4 所示。

表 3 Box-Behnken 试验设计与结果

序号	温度/℃	时间/h	pH	酶浓度/%	DH/%
1	50	5	7.5	0.7	65.64
2	50	6	7.5	0.7	74.19
3	55	5	7.5	0.7	69.90
4	55	6	7.5	0.7	68.88
5	52.5	5.5	7	0.6	70.47
6	52.5	5.5	7	0.8	71.94
7	50	5.5	8	0.6	74.88
8	50	5.5	8	0.8	76.50
9	55	5.5	7.5	0.6	73.28
10	55	5.5	7.5	0.8	77.14
11	52.5	5.5	7.5	0.6	72.05
12	52.5	5.5	7.5	0.8	70.52
13	52.5	5	7	0.7	70.59
14	52.5	5	8	0.7	73.18
15	50	6	7	0.7	72.59
16	50	6	8	0.7	75.06
17	55	5.5	7	0.7	70.24
18	55	5.5	8	0.7	74.97
19	52.5	5.5	7	0.7	67.85
20	52.5	5.5	8	0.7	72.24
21	52.5	5	7.5	0.6	73.26
22	52.5	5	7.5	0.8	74.83
23	52.5	6	7.5	0.6	74.52
24	52.5	6	7.5	0.8	76.62
25	52.5	5.5	7.5	0.7	78.69
26	52.5	5.5	7.5	0.7	77.89
27	52.5	5.5	7.5	0.7	79.08

从表 4 的方差分析结果可知,温度、时间和 pH 对鳊鱼蛋白酶解影响较大($P < 0.01$),而酶添加量的影响不显著。因此,3 个显著影响因素对酶解效果的影响依次为:温度 > 时间 > pH。而从交互项影响的显著性分析看,温度和时间、温度和酶添加量的交互影响是比较显著的,其余均不显著,这与 Bhaskar 和 Mahendrakar 的研究结果相一致^[7]。

2.3 回归方程的确定及可信度分析

表 4 影响因素的方差分析

因素	SS	MS	DF	F	Pr > F
一次项					
X_1	158.882 0	31.776 4	5	13.73	0.000 1 * *
X_2	89.181 8	17.836 4	5	7.71	0.001 9 * *
X_3	86.867 0	17.373 4	5	7.51	0.002 1 * *
X_4	17.134 8	3.427 0	5	1.48	0.266 8
交互项					
$X_1 \times X_2$	22.896 2	22.896 2	1	62.21	0.015 7 *
$X_1 \times X_3$	0.028 9	0.028 9	1	0.08	0.805 6
$X_1 \times X_4$	7.263 0	7.263 0	1	19.73	0.047 1 *
$X_2 \times X_3$	0.003 6	0.003 6	1	0.01	0.930 2
$X_2 \times X_4$	0.005 6	0.005 6	1	0.02	0.912 9
$X_3 \times X_4$	0.070 2	0.070 2	1	0.19	0.704 9

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

以酶解鳊鱼蛋白的水解度为响应值的回归方程是关于温度、时间和酶加量的单因素及相关性的函数,其常数项、一次项和二次项系数,以及交互影响的一次项系数见表 5,以下为回归方程:

$$Y = -3\,717.772\,6 + 92.213\,7X_1 + 226.602\,8X_2 + 172.293\,9X_3 + 273.259\,1X_4 - 0.741\,6X_1^2 - 12.149\,3X_2^2 - 11.524\,3X_3^2 - 79.154\,2X_4^2 - 1.914\,0X_1X_2 - 0.068\,0X_1X_3 - 5.390\,0X_1X_4 + 0.302\,9X_2X_3 + 10.845\,4X_2X_4 + 8.945\,4X_3X_4$$

通过 RSM 实验建立的回归方程得到优化的酶解条件为:温度 51.5℃,时间 7.7 h, pH 7.7, 酶添加量 0.80%。预测 DH 值为 79.46%,与实验测得值 79.58% 非常接近,复相关系数的平方达到 0.904 0 (表 6),说明建立的回归方程模型预测值可以较好地

反映各因素对酶解实验的影响。方程的一次项和二次项均为显著(表 7),说明各个具体实验因素堆响应值的影响不是简单的线性关系,而是二次抛物线的关系。酶解实验的失拟项不显著($P > 0.05$)说明模型的拟合程度高。由以上分析可见,本次实验建立的回归方程是有效的。

表 5 二次回归项系数表

因素	系数
常数项	-3 717.772 6
一次项	
X_1 (温度) (L)	92.213 7
X_2 (时间) (L)	226.602 8
X_3 (pH) (L)	172.293 9
X_4 (酶浓度) (L)	273.259 1
二次项	
X_1 (Q)	-0.741 6
X_2 (Q)	-12.149 3
X_3 (Q)	-11.524 3
X_4 (Q)	-79.154 2
交互项	
$X_1 \times X_2$	-1.914 0
$X_1 \times X_3$	-0.068 0
$X_1 \times X_4$	-5.390 0
$X_2 \times X_3$	0.302 9
$X_2 \times X_4$	10.845 4
$X_3 \times X_4$	8.945 4

表 6 模型的可信度分析的统计检验结果

	水解度 (DH)
Mean (均值)	73.222 2
Root MSE (模型误差的平方根)	1.521 3
R-Square (复相关系数的平方)	0.904 0
CV (变异系数)	2.077 7

表 7 回归方程的各项方差分析

方差来源	DF	SS	RS	F-value	Pr > F
Linear (一次项)	4	84.228 3	0.291 1	9.10	0.001 3 * *
Quadratic (二次项)	4	144.441 5	0.499 2	15.60	0.000 1 * *
Crossproduct (交互项)	6	32.910 8	0.113 7	2.37	0.095 9
Total model (总回归)	14	261.580 6	0.904 0	8.07	0.000 4 * *
Lack of fit (失拟项)	10	27.036 6	-	7.35	0.125 7

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 响应曲面图分析

图 1 是控制 pH 为 7.5, 酶添加量为 0.7% 时, 温度和时间的响应面函数图, 从图 1 可以看出, DH 值最高接近 79%, 之后显著下降。从图 2 和图 4 可以发现, 当 pH 上升到 7.7, DH 值也随之上升, 之后缓慢下降, 这说明 DH 值受温度和时间的影响大于 pH 的影响。从图 3 和图 6 可以看出, 当酶添加量超过 0.7% 以后, DH 值趋于稳定。Benjakul 和 Morrissey 使

用 Alcalase 和 Neutrase 进行酶解反应发现, 当酶添加量达到一定量时, 继续添加酶, 尽管可以使 DH 值增加, 但增加量是逐渐减少的, 也就是说水解度趋于稳定^[8]。因此, 本实验的结果也具有上述规律。图 5 显示, 在酶解时间达到 5.7h, DH 值最大, 之后显著下降, 且 DH 值受时间的影响大于受酶添加量的影响。

实验发现, 在水解温度 51.5℃, 时间 5.7 h, pH 7.7, 酶添加量 0.80% 时, DH 值最大, 且在该反应条

件下制得的酶解液具有淡淡的鱼香味,无明显苦味。在 $\text{pH} > 7.7$ 时, DH 值有略微下降;但当水解时间超过 5.7 h 和温度高于 51.5°C 时,有显著下降;当酶添加量 $> 0.7\%$ 时,趋于稳定。

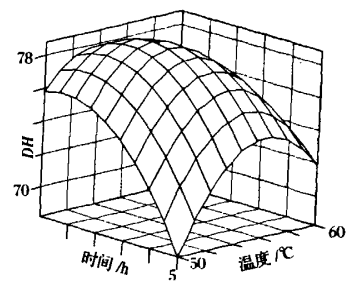


图 1 温度和时间对水解度的响应面图

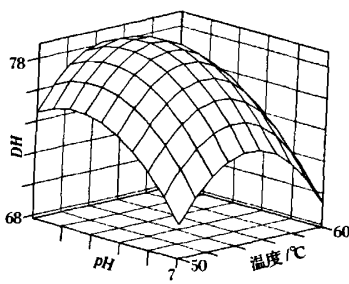


图 2 温度和 pH 对水解度的响应面图

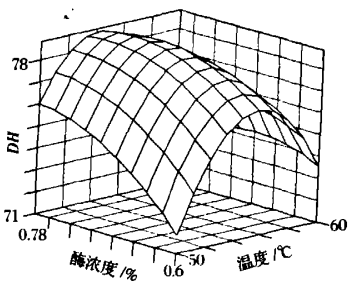


图 3 温度和酶浓度对水解度的响应面图

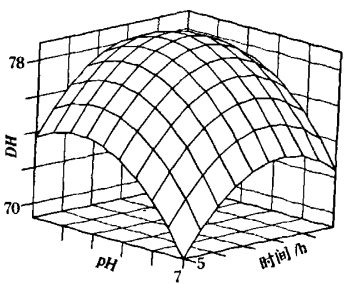


图 4 时间和 pH 对水解度的响应面图

由图 1 - 图 6 可知,随酶添加量的上升, DH 值上升,但酶添加量处于较高水平时, DH 曲面趋于平缓,这可能是酶与底物已经完全反应,因此,酶添加量的上升也不会使水解度升高。提高酶解温度有利于酶

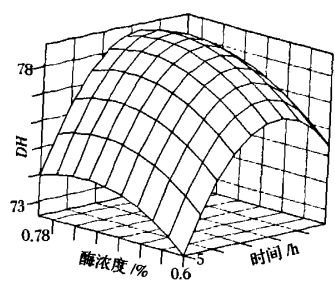


图 5 时间和酶浓度对水解度的响应面图

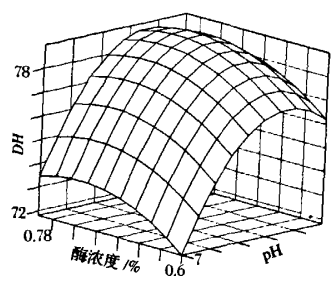


图 6 pH 和酶浓度对水解度的响应面图

活力的提高,从而使水解度上升,但温度过高会钝化酶的活力,不利于酶解反应的进行,所以酶解过程中,温度的控制一定要严格。

3 结论

以鳊鱼蛋白为原料,用 Flavourzyme 和 Protamex (3 : 1) 配比酶解,以水解度为评价指标,通过响应面分析法对鳊鱼蛋白酶解条件进行了优化,得到最佳反应参数:温度为 51.5°C ,时间 5.7 h, $\text{pH} 7.7$,酶添加量 0.80%。在该条件下,预测水解度可达 79.46% 与实测水解度非常接近,说明实验所建立的模型方程可信度高。经本实验制备的酶解液,腥味弱、无明显苦味,有淡淡的鱼香味,可作为美拉德反应制备海鲜调味的基液。

参 考 文 献

- [1] Morton I D P, May C G. Flavour substances and their preparation. British Patent. 836 - 694.
- [2] 刘玉平,孙宝国. 我国食用香料香精的基本状况与发展趋势[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 373 - 375.
- [3] Bhaskar N, Benila T, Radha C, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 3 335 - 3 434.
- [4] 戴志远,张燕平,王宏海,等. 酶法水解梅鱼蛋白的实验

- 研究[J]. 中国食品学报, 2005, 5(4): 91-95.
- [5] Imm J Y, Lee C M. Production of seafood flavor from red hake by enzymatic hydrolysis [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 2 360-2 366.
- [6] Hoyle T, Merritt H. Quality of Fish Protein hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*) [J]. Journal of Food Science, 1994, 59: 76-79; 129.
- [7] Bhaskar N, Mahendrakar NS. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial protease [J]. Biore-source Technology, 2007: 20: 1-7.
- [8] Benjakul S, Morrissey M T. Protein hydrolysate from Pacific whiting solid waste [J]. J Agric Food Chem, 1991, 61: 131-138.

Protein Hydrolysate from *Parabramis pekinensis* for Preparing the Material in Maillard Reaction

Weng Wen, Yang Ronghua, Dai Zhiyuan

(Processing Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

ABSTRACT This paper studied enzymatic hydrolysis of *Parabramis pekinensis* for preparing protein hydrolysate, in the hope of obtaining good flavor as the material used in Maillard reaction. We also investigated Flavourzyme and other proteases association, the hydrolysate with the highest degree hydrolysis (DH) by Flavourzyme and Protame (3:1). The optimum process parameters of the *Parabramis pekinensis* enzymatic hydrolysis were determined with Box-Behnken response surface methodology (RSM). The model equations were regard to the effects of temperature, time, pH and enzyme dosages on the DH. To obtain a high degree of hydrolysis of 79.47% using Flavourzyme and Protame, optimum conditions are: temperature 51.5°C, a hydrolysis time of 5.7 hours, pH 7.7 and enzyme dosage of 0.80%. Under this condition, the hydrolyate had weak fishiness, lower bitterness. The hydrolysate had light fish flavor, so it could use in Maillard reaction.

Key words *Parabramis pekinensis*, enzymatic hydrolysis, DH, RSM

会

讯

2010 中国国际啤酒、饮料制造技术及设备展览会将于 2010 年 9 月举行

2010 中国国际啤酒、饮料制造技术及设备展览会将于 2010 年 9 月 7 日-10 日在北京中国国际展览中心举行。

亚太经济仍保持平稳发展态势,中国和亚洲地区巨大的市场空间仍是全球业界人士关注的焦点。中国政府扩大内需的经济政策,会为中国市场注入新的活力,推动行业发展。中国国际啤酒、饮料制造技术及设备展览会(CHINA BREW CHINA BEVERAGE)将为展商提供更多商机。

中国国际啤酒、饮料制造技术及设备展览会(CHINA BREW CHINA BEVERAGE)是亚太地区业内最具影响力的品牌展会,在全球同类展会中有突出地位,获得业界广泛认可,是世界液态食品技术领域商家在亚洲地区展现品牌实力、发布最新技术和产品的首选商务平台。

2010(第九届)中国国际啤酒、饮料制造技术及设备展览会(CHINA BREW CHINA BEVERAGE 2010)在继续保持强势啤酒、饮料技术展览展示的基础上,展览范围更扩大到葡萄酒、烈性酒、中国黄酒、食用酒精、液态奶生产技术及设备,原辅料及包装容器等。展览范围涵盖液态食品完整产业链,展会内容更为丰富,展会服务领域更为宽广。

2010(第九届)中国国际啤酒、饮料制造技术及设备展览会(CHINA BREW CHINA BEVERAGE 2010)在集中展示全球业内企业品牌形象的同时,将突出诠释最新科技成果在业内的应用,全面昭示产业未来发展方向。为促进科技与产业结合,展会设立科技展览专区。展会还配有高水平专业研讨会。

2010(第九届)中国国际啤酒、饮料制造技术及设备展览会(CHINA BREW CHINA BEVERAGE 2010)以满足参展商的需求为第一要务,提供超值的宣传推广服务。

联系电话:(86-10)6608 5371,6601 7874,6601 7794;传真:(86-10)6601 8904;邮箱:mailto:info@chinabrew-beverage.com

地址:中国北京市西城区西黄城根南街 33 号(100032)

网址:www.chinabrew-beverage.com。