

文章编号:1005-8737(2001)01-0064-05

扇贝边酶解技术研究

曾庆祝, 汪涛, 叶于明

(大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘 要:研究了混合酶水解扇贝边蛋白质的技术条件, 并和单酶水解情况进行了比较。结果表明, 混合酶水解可提高水解液中氨基酸态氮(AAN)含量, 同时改善了水解液风味。本文引进二次正交旋转组合试验设计方案, 系统地研究了影响混合酶水解效果的相关因素, 得出了扇贝边水解液中氨基酸态氮生成量的变化规律一回归模型。应用该模型可对水解液中 AAN 生成量进行预测, 也可进一步优化选择扇贝边的酶解条件。

关键词:扇贝边; 酶解; 综合利用; 正交旋转组合试验设计

中图分类号:S985.36

文献标识码:B

水解动物蛋白(HAP)是以畜禽或水产动物为原料经水解工艺制得的纯天然产品, 其中含有人体需要的多种氨基酸, 营养价值高, 人体易消化吸收, 并且能较好地保持动物原料的固有风味特点。因此, 问世 20 余年来得到迅速的发展和广泛的应用。日本每年使用水解动物蛋白约 1 万 t^[1], 主要应用于方便食品、休闲食品、高档调味料和营养强化食品的生产。我国水产品加工中所产生数量可观的副产品(如生产干贝时的煮汤)或废弃物(如扇贝边)等大部分未被有效利用, 不仅造成资源浪费, 而且污染环境。因此, 充分合理地利用水产品加工中产生的副产品和废弃物, 是水产品加工业急待解决的问题。扇贝边具有较高的营养价值^[2-5], 利用它来生产 HAP 将具有十分重要的社会意义和可观的经济效益。

酶解法由于具有反应条件温和、水解效率高优点, 在 HAP 的生产中得到广泛的应用^[6]。国内学者曾采用正交试验法初步考察了胰蛋白酶、枯草杆菌 1, 398 蛋白酶、栖土曲菌 3, 942 蛋白酶及混合酶等对扇贝边蛋白质的水解效果^[7]。但是, 有关扇贝边蛋白质的酶解技术及影响酶解效果各因素之

间的相互关系等方面的系统研究尚未见报道。为此, 本文着重探讨单酶及混合酶对扇贝边的水解技术, 并利用二次正交旋转组合试验设计, 对混合酶水解扇贝边蛋白质进行系统、深入地研究, 在给出的整个区域上的因素(混合酶添加量、水解温度、水解时间)与指标即水解液中氨基酸态氮(Amino-acid-N, AAN)生成量之间, 建立生产过程的数学模型, 从而可在相应的条件变化范围内预测扇贝边蛋白质的水解程度, 并可对扇贝边的水解条件进行优化选择, 为将来的实际生产提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

扇贝边: 采自大连新盛水产市场; 枯草杆菌 1, 398 蛋白酶: 无锡星达生物工程有限公司; 胰蛋白酶: 上海生物化学试剂公司; 其它试剂均为国产分析纯。超级恒温水浴, 水解罐, 组织捣碎机, 精密酸度计, 电磁搅拌器等。

1.2 方法

1.2.1 扇贝边酶解过程 扇贝边解冻后, 去除贝壳等杂质, 用高速组织捣碎机捣碎, 称取一定量于水解罐中, 按质量比 1:1 加水混匀, 将水解罐放入已恒温的超级恒温水浴器中。待水解罐中料液达到预定温度后加入一定量的蛋白酶, 充分搅拌, 并随时调节

收稿日期: 2000-08-01

作者简介: 曾庆祝(1965-), 男, 大连水产学院讲师, 硕士, 从事水产品贮藏与加工方面研究。

pH,使其保持在规定值。酶解完毕立即终止反应和灭菌,冷却至室温,在转速为 4 800 r/min 下离心 10 min,所得清液即为水解液。

1.2.2 测定方法 酶活力采用 Folin—酚法; AAN 采用电位滴定法。

2 结果与讨论

2.1 单酶及混合酶水解比较

采用正交试验法设计试验方案,分别用两种酶对扇贝边蛋白质进行单酶水解试验,确定出两种酶各自的最佳水解条件,参见表 1。由于蛋白酶对肽键作用的专一性,采用单酶水解时,只能从几个固定的氨基酸残基进行水解,其水解程度受到限制^[8]。因此,综合考虑通过正交试验所确定的单酶水解的最佳条件,研究胰蛋白酶与枯草杆菌蛋白酶按一定比例混合的混合酶水解,首先保持原料液浓度不变,混合酶添加量初定为 1 200 U/g 原料,并稳定 pH=7.3, $t=6$ h; 然后分别选取温度为 50、52.5 和 55℃,胰蛋白酶与枯草杆菌蛋白酶的混合比为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3 进行水解。从图 1 中可以看出,当胰蛋白酶与枯草杆菌蛋白酶的混合比分别为 3:1 时,水解液中 AAN 量在各温度组中均为最高值。由此可见,混合酶的最佳混合比为胰蛋白酶:枯草杆菌蛋白

酶=3:1。在水解温度为 52.5℃ 时溶出的 AAN 量为最大,因此,混合酶最适宜的水解温度为 52.5℃。

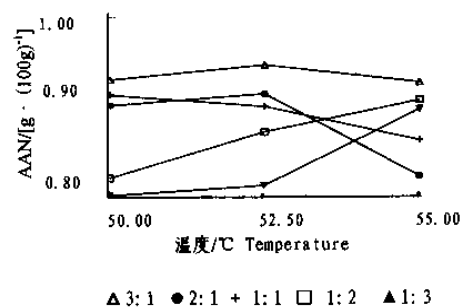


图 1 胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶的酶量比分别为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3 时,温度对 AAN 生成量的影响

Fig. 1 Effect of temperature on content of AAN in hydrolysates with different combinative ratios of trypsin and subtilisin

为了验证混合酶的水解效果,分别在混合酶及两种单酶各自的最佳水解条件下,同时进行 3 种不同的水解比较试验。试验表明(表 1),采用混合酶水解的 AAN 生成量要明显高于单酶水解的值。并且,混合酶水解液的风味要优于单酶水解液。

表 1 酶解条件对比

Table 1 The comparison of enzymic hydrolysis conditions

酶 Enzyme	x_1 (酶量/(U·g ⁻¹)) Amount of enzyme	x_2 (水解温度/℃) Temp. of hydrolysis	x_3 (水解时间)/min Time of hydrolysis	pH	AAN/(g·(100 g) ⁻¹)
胰蛋白酶 Trypsin	1 200	50	360	7.5	0.846 8
枯草杆菌酶 Subtilisin	1 200	55	360	7.0	0.782 5
混合酶 Mixed enzyme	1 200	52.5	360	7.3	0.960 2

2.2 回归模型的建立

在混合酶的最佳水解条件下,重点研究混合酶添加量、水解温度及水解时间 3 个因素对扇贝边水解液 AAN 生成量的影响。根据二次正交旋转组合试验设计的原理^[9],本试验所确定的原变量与编码变量之间的关系见表 2。按表 2 实施 2 个水解试验方案,获得相应的试验结果,见表 3。

利用 Statistica graph 软件对表 3 的试验结果进行处理,得到了水解液中 AAN 含量与各因素之间的相互关系式—回归模型:

$$y = 0.857\ 134 + 0.025\ 792x_1 + 0.009\ 226x_2 + 0.074\ 847x_3 + 0.000\ 362x_1x_2 - 0.001\ 038x_1x_3 -$$

$$0.000\ 063x_2x_3 + 0.009\ 225x_1^2 + 0.002\ 550x_2^2 - 0.014\ 430x_3^2$$

表 2 原变量与编码变量之间的关系

Table 2 Relation between original variables and coded variables

变 量 Variable	因素水平 Factor level				
	-1.682	-1.00	0	+1.00	+1.682
x_1 (酶量/(U·g ⁻¹)) Amount of enzyme	495.4	700	1 000	1 300	1 504.6
x_2 (水解温度/℃) Temp. of hydrolysis	45.8	47.5	50	52.5	54.2
x_3 (水解时间/min) Time of hydrolysis	38.16	120	240	360	441.2

表 3 水解试验方案与结果

Table 3 Results and scheme of hydrolysis

试验号 No.	设计矩阵 Matrix design			试验方案 Test scheme			AAN(y)/ [g·(100 g) ⁻¹]
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁ (酶量/(U·g ⁻¹)) Amount of enzyme	x ₂ (温度)/℃ Temperature	x ₃ (时间/min) Time	
1	1	1	1	1 300	52.5	360	0.984 2
2	1	1	-1	1 300	52.5	120	0.825 8
3	1	-1	1	1 300	47.5	360	0.966 5
4	1	-1	-1	1 300	47.5	120	0.805 2
5	-1	1	1	700	52.5	360	0.949 1
6	-1	1	-1	700	52.5	120	0.783 9
7	-1	-1	1	700	47.5	360	0.930 2
8	-1	-1	-1	700	47.5	120	0.767 4
9	1.682	0	0	1 504.6	50	240	0.912 5
10	-1.682	0	0	495.4	50	240	0.792 9
11	0	1.682	0	1 000	54.2	240	0.849 5
12	0	-1.682	0	1 000	45.8	240	0.818 4
13	0	0	1.682	1 000	50	441.84	0.897 6
14	0	0	-1.682	1 000	50	38.16	0.674 9
15	0	0	0	1 000	50	240	0.833 8
16	0	0	0	1 000	50	240	0.857 1
17	0	0	0	1 000	50	240	0.829 6
18	0	0	0	1 000	50	240	0.864 7
19	0	0	0	1 000	50	240	0.908 7
20	0	0	0	1 000	50	240	0.832 5
21	0	0	0	1 000	50	240	0.873 6
22	0	0	0	1 000	50	240	0.842 5
23	0	0	0	1 000	50	240	0.877 2

对上列方程进行显著性检验, 得: $F_1 = 3.19 < F_{0.05}(5, 8) = 3.69$, $F_2 = 8.01 > F_{0.01}(9, 13) = 4.19$ 。

通过 F 检验的表明, 由二次正交旋转组合试验设计所获得的回归方程与实际情况拟合较好。再用 t -检验对回归系数进行检验, 结果均达到 0.2 以上的显著水平, 作用较显著。继续进行边际效应分析, 结果见表 4。

表 4 不同水平上各因素的贡献率

Table 4 Contribution ratio of each factor at different level

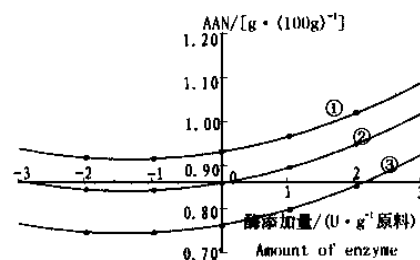
水平 Level	边际效应 Limit effect			贡献率 Contribution ratio
	X ₁	X ₂	X ₃	
-1.682	-0.004 104	0.000 146	0.125 241	X ₃ > X ₁ > X ₂
-1.00	0.008 018	0.003 828	0.104 804	X ₃ > X ₁ > X ₂
0	0.025 792	0.009 226	0.074 847	X ₃ > X ₁ > X ₂
+1.00	0.043 566	0.014 624	0.044 886	X ₃ > X ₁ > X ₂
+1.682	0.043 566	0.014 624	0.044 886	X ₁ > X ₃ > X ₂

由表 4 可见, 在不同水平上各因素对 AAN 生成量的贡献率并不完全相同, 总体看来, 水解时间的贡献率最大。

2.3 各因素与 AAN 生成量之间的关系

采用降维分析法来分析各因素与 AAN 生成量之间的关系。

将模型中的水解温度和时间固定在不同水平上, 即可得到酶添加量与 AAN 生成量关系的一元回归模型(图 2)。



$$①(x_1, -1, -1) y = 0.009 225x_1^2 + 0.026 468x_1 + 0.761 118$$

$$②(x_1, 0, 0) y = 0.009 225x_1^2 + 0.025 792x_1 + 0.857 134$$

$$③(x_1, 1, 1) y = 0.009 225x_1^2 + 0.025 116x_1 + 0.929 264$$

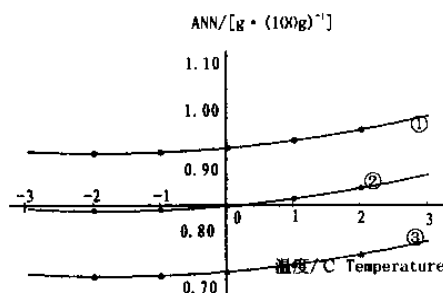
图 2 酶添加量对 AAN 生成量的影响

Fig.2 Effect of enzyme amount on content of AAN in hydrolysates

将模型中的酶添加量和水解时间固定在不同的

水平上,即可得到水解温度与 AAN 生成量关系的一元回归模型(图 3)。

将模型中的酶添加量和水解温度固定在不同的



$$\textcircled{1}(-1, x_2, -1) y = 0.00255x_2^2 + 0.008927x_2 + 0.750252$$

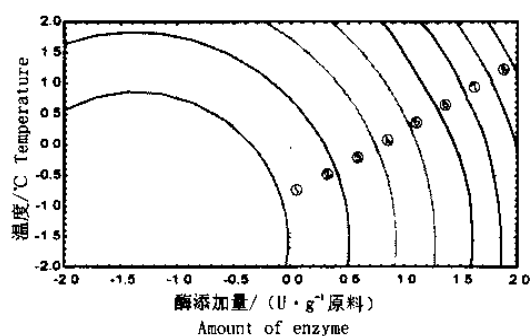
$$\textcircled{2}(0, x_2, 0) y = 0.00255x_2^2 + 0.009226x_2 + 0.857134$$

$$\textcircled{3}(1, x_2, 1) y = 0.00255x_2^2 + 0.009525x_2 + 0.951530$$

图 3 温度对 AAN 生成量的影响

Fig. 3 Effect of temperature on content of AAN in hydrolysates

从图 2、3 可以看出,对于酶添加量和水解温度两个因素而言,随着单因素取值的增加,水解液中 AAN 生成量逐渐增大,并且,另外两个因素取值水平的增加也不同程度地增加了水解液中 AAN 生成量。而对于时间因素而言,随着单因素取值的增加,



$$\textcircled{1}0.840; \textcircled{2}0.857; \textcircled{3}0.873; \textcircled{4}0.889;$$

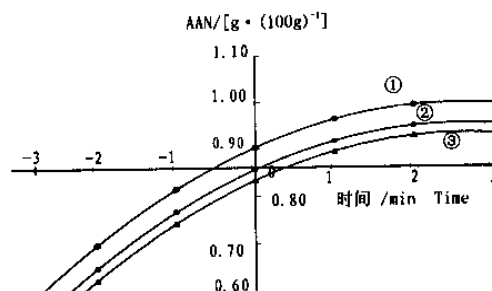
$$\textcircled{5}0.905; \textcircled{6}0.921; \textcircled{7}0.937; \textcircled{8}0.953$$

图 5 酶量与温度对 AAN 生成量的影响

Fig. 5 Effects of enzyme amount and temperature on content of AAN in hydrolysates

从图 5 可看出,当酶添加量较少和水解温度较低时,水解液中 AAN 生成量较低,随着酶添加量和水解温度二因素取值的增加,水解液中 AAN 生成量逐渐增加。当酶添加量较少时,即使水解温度较高,

水平上,即可得到水解时间与 AAN 生成量关系的一元回归模型(图 4)。



$$\textcircled{1}(-1, -1, x_3) y = -0.01443x_3^2 + 0.075948x_3 + 0.834253$$

$$\textcircled{2}(0, 0, x_3) y = -0.01443x_3^2 + 0.074847x_3 + 0.857130$$

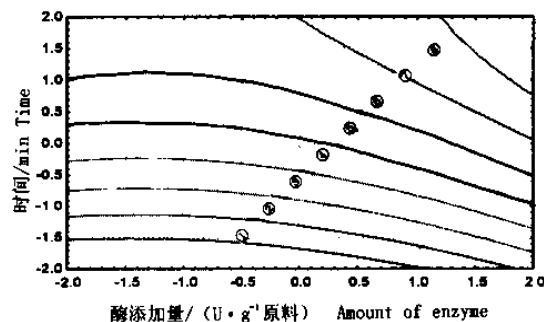
$$\textcircled{3}(1, 1, x_3) y = -0.01443x_3^2 + 0.073746x_3 + 0.904289$$

图 4 时间对 AAN 生成量的影响

Fig. 4 Effect of enzymatic time on content of AAN in hydrolysate

水解液中 AAN 生成量先是增加,当取值水平超过 +1.00 后, AAN 生成量的增加则趋于平缓。

酶添加量与水解温度、酶添加量与水解时间、水解温度与水解时间分别对 AAN 生成量的影响依次见图 5~7。



$$\textcircled{1}0.693; \textcircled{2}0.736; \textcircled{3}0.779; \textcircled{4}0.822;$$

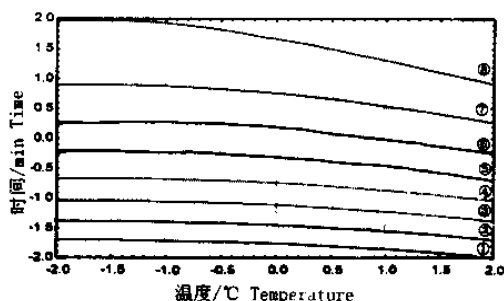
$$\textcircled{5}0.865; \textcircled{6}0.908; \textcircled{7}0.951; \textcircled{8}0.994$$

图 6 酶量与时间对 AAN 生成量的影响

Fig. 6 Effects of enzyme amount and enzymatic time on content of AAN in hydrolysates

水解液中 AAN 生成量也不太高;反之,当酶添加量较多时,即使水解温度较低,水解液中 AAN 生成量仍可达到较高值。图 5 的二维等高线还看出,横向的等高线较密,纵向的等高线较疏,说明在酶添加量

与水解温度的交互作用中,酶添加量对水解液中 AAN 生成量的影响较大,而水解温度的影响则相对较小。酶添加量与水解时间、水解温度与水解时间之间的交互作用也可按此方法进行讨论。另外,我们对回归模型还进行了验证试验,选择在 $x_1 = 1\ 200$ u/g 原料, $x_2 = 52.5^\circ\text{C}$, $x_3 = 5$ h 的条件下对扇贝边进行酶解,经过实际测定发现,水解液中 AAN 生成量: $y_{\text{测}} = 0.912\ 5$ g/100 g,与由回归模型计算所得值: $y_{\text{模}} = 0.923\ 9$ g/100 g 相近,说明该回归模型在所试验的条件变化范围内,能较好地反映扇贝边酶解液中 AAN 氮生成量的变化规律。



①0.687; ②0.724; ③0.762; ④0.799;
⑤0.836; ⑥0.873; ⑦0.910; ⑧0.948

图 7 温度与时间对 AAN 生成量的影响

Fig. 7 Effects of temperature and enzymatic time on content of AAN in hydrolysates

3 结论

(1)混合酶水解扇贝边蛋白质可进一步提高水

解液中氨基酸态氮含量,并改善水解液的风味。

(2)采用扇贝边水解液中氨基酸态氮生成量与各因素之间的关系式—回归模型,可预测扇贝边水解液中氨基酸态氮的生成量,还可优化选择扇贝边的水解条件。

(3)通过对回归模型进行的方差分析和验证试验,可以看出,该模型能够较好地反映扇贝边酶解液中 AAN 生成量的变化规律。

参考文献:

- [1] 赵胜年,翟俊杰.水解动物蛋白(HAP)的应用比较[J].食品科学,1996,17(5):55-57.
- [2] 苏秀榕,李太武,丁明进,等.扇贝营养成分的研究[J].海洋科学,1997,(2):10-11.
- [3] 孙福璋,金海珠,李 硕,等.扇贝边的营养成分及深加工的研究[J].齐鲁渔业,1988,(3):42-44.
- [4] 张 强.栉孔扇贝柱及扇贝边脂肪酸组成与含量[J].中国海洋药物,1996,15(3):28-30.
- [5] 王长云,管华诗.氨基多糖的提取、分离和分析测定方法及其研究进展[J].中国海洋药物,1996,15(1):24-30.
- [6] 赵 利.试论食品工业中蛋白酶水解物的生产[J].食品研究与开发,1997,18(4):8-10.
- [7] 魏玉西,田学琳.扇贝裙边酶水解工艺条件的研究[J].海洋科学,1993,(4):5-7.
- [8] 熊勇华.蚕蛹氨基酸口服液蛋白水解条件的研究[J].广州食品工业科技,1994,(2):19-21.
- [9] 徐中儒.农业试验最优回归设计[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1988.

Hydrolyzing technique for scallop skirt using enzymes

ZENG Qing-zhu, WANG Tao, YE Yu-ming

(Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: A study on the technique conditions was presented for hydrolysis of scallop skirt using mixed enzymes and the hydrolyzing effects were compared with those using single enzyme. The results show that the content of amino-acid nitrogen (AAN) can be increased in the hydrolysates when using mixed enzymes and the flavor of the hydrolysates is also improved. In order to study the relationships between the related factors affecting the hydrolysis effects, a dual quadratic rotary combinative design scheme was employed and a regression model was obtained. The model can be used to forecast the content of AAN content in hydrolysates and to optimize the conditions of enzymic hydrolysis for scallop skirt.

Key words: scallop skirt; enzymic hydrolysis; comprehensive utilization; dual quadratic rotary combinative design