

文章编号:1005-8737(2001)01-0069-04

双酶法在鲨鱼肉水解液制备中的工艺改良研究

吴红棉, 曾少葵, 雷晓凌, 吴文龙

(湛江海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘 要:采用同时添加枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶的改良酶解技术,对鲨鱼肉进行水解。正交试验结果表明,上述二酶同时水解的最适条件为:温度 45℃, pH 7.0, 时间 3 h, 酶浓度 200 U/ml(枯草杆菌中性蛋白酶及木瓜蛋白酶各 100 U/ml), 原料:水=1:5。蛋白质水解率达 83.5%, 所得水解液的氨基酸含量为 45.4 mg/ml, 其中必需氨基酸总量为 19.8 mg/ml。

关键词:鲨鱼肉;双酶水解;水解液;工艺改良

中图分类号:TS254

文献标识码:A

鲨鱼经济价值较高,皮、肝、鳍均可充分利用。但鲨鱼肉因含尿素较高、氨味较浓而影响其鲜食味道。为提高鲨鱼肉的经济价值,本文以条纹斑竹鲨(*Chiloscyllium Plagiosum* Bennett)为原料,经酶解制备成富含氨基酸的水解液。酶水解法是水解鱼蛋白的重要的方法^[1~5]。双酶水解法传统的操作是2种酶按先后顺序进行酶解,本试验选用了2种最适pH值接近的酶种,采用双酶同时加入、同时水解的改良操作方式,以提高水解率、缩短酶解时间、简化操作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鲨鱼 购于湛江市东风市场,经品种鉴定为条纹斑竹鲨。

1.1.2 试剂 枯草杆菌中性蛋白酶:酶活力为1:100 000;胃蛋白酶:酶活力为1:3 000;木瓜蛋白酶:酶活力为1:100 000。盐酸、氢氧化钠、甲醛、三氯乙酸、碳酸氢钠、乙醇,均为分析纯。活性碳、硅藻土,为化学纯。

1.2 仪器设备

收稿日期:2000-06-22

作者简介:吴红棉(1953-),男,湛江海洋大学副教授,暨南大学硕士,从事水产品加工与贮藏方面研究。

JB-90-2 定时恒温磁力搅拌器(上海天平仪器厂);DS-200 高速组织捣碎机(江苏江阴科研器械厂);ZYI-30 型旋片式真空泵(北京医疗仪器修理厂);分析天平(温州天平仪器厂);Hp 1100 液相色谱仪(美国惠普公司)。常规实验设备1套。

1.3 分析方法

1.3.1 常规成分 水分,常压 105℃ 直接干燥法;总灰分,灼烧称量法^[6];粗脂肪,索氏抽提法^[6];粗蛋白,凯氏定氮法^[6];α-氨基氮,甲醛滴定法^[7]。

1.3.2 非蛋白氮(NPN) 称取捣碎鲨鱼肉(原料)5 g,加少量 10% 三氯乙酸研成灰白色,用 10% 三氯乙酸将其转移至离心管(三氯乙酸的最终质量分数为 0.10),离心后取上清液,再用 10% 三氯乙酸洗渣并离心,两次所得上清液用凯氏定氮法测其含氮量。

蛋白质水解效果用水解率表示:

$$\text{水解率}/\% = \frac{\text{被水解的蛋白质}}{\text{原料中原有蛋白质}} \times 100 = \left[\frac{\text{原料中}(\text{总N}-\text{非蛋白N}) - \text{水解液中未水解的蛋白N}}{\text{原料中}(\text{总N}-\text{非蛋白N})} \right] \times 100$$

1.4 脱腥实验

用3步漂洗法^[8](即分别用 0.5% NaHCO₃、D-异抗坏血酸钠、0.3% 稀盐水)或用 75% 乙醇对鲨鱼肉进行脱腥处理。

1.5 工艺流程

鲨鱼肉→脱腥→匀浆→双酶水解→灭酶→过滤
→脱色→抽滤→杀菌→水解液

2 结果与讨论

2.1 常规成分

鲨鱼肉中常规组分见表 1。

表 1 鲨鱼肉常规成分

Table 1 The general composition of shark meat

成分 Component	含量 Content
水分/% Water	74.50
粗蛋白/% Crude protein	21.24
粗脂肪/% Crude fat	3.01
灰分/% Ash	1.23
NPN/(mg·g ⁻¹)	11.24
游离氨基酸/(mg·g ⁻¹) Free amino acids	1.07

表 1 表明鲨鱼肉成分中非蛋白氮含量很高, 占总氮的 33%, 原因是鲨鱼肉中尿素含量高, 脂肪含量也较高, 使之易发生氧化变质。

2.2 最适酶种的确定

在固形物含量相同(鱼肉:水=1:5)、酶浓度相同(各酶浓度均为 100 U/ml)条件下, 分别用枯草杆菌 As 1 398 中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶及其组合, 在各酶的最适 pH 条件下进行酶解, 以水解液中 α -氨基氮为评定指标, 试验结果见表 2。

表 2 不同酶种及不同酶组合水解程度比较

Table 2 Comparison of hydrolysis degrees between different enzymes or mixed enzymes

序号 No	酶种及组合 Enzyme species and mixture	α -氨基氮含量/(mg·ml ⁻¹) Content of α -amino nitrogen in hydrolysate solution
1	枯草杆菌蛋白酶(枯) Subtilisin(Sub)	0.90
2	胃蛋白酶(胃) Pepsin(Pep)	0.38
3	木瓜蛋白酶(木) Papain(Pap)	0.52
4	枯+木(按先后顺序加入) Sub and Pap (added one after another)	1.34
5	枯+胃 Sub and Pep	1.36
6	木+胃 Pap and Pep	1.23
7	枯+木(同时加入) Sub and Pap (added simultaneously)	1.63

注:“枯”、“胃”、“木”均为缩写。All are abbreviations.

数据为 3 次试验的平均值。Values are means for 3 replicates.

从表 2 的结果可看出, 枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同时加入进行水解者(7 号), 其水解液中 α -氨基氮含量最高, 而且比同样酶种按先后顺序进行酶解的样品高出 21.4%。

2.3 最佳酶解条件的确定

2.3.1 酶解时间、固形物含量、pH 值及酶浓度对酶解效果的影响 以酶解时间、原料与水的配比、酶浓度、pH 4 因素各选 3 水平(表 3), 制定 L₉(3⁴) 正交表, 进行优化组合试验, 结果见表 4。

表 3 因素及水平表

Table 3 Factors and levels in the experiment

水平 Level	因素 Factors			
	A	B	C*	D
1	2	1:3	1.0	6.5
2	2.5	1:4	1.5	7.0
3	3	1:5	2.0	7.5

*: 为枯草杆菌蛋白酶及木瓜蛋白酶各半。The proportion of subtilisin and papain was 1:1.

试验中采用 F 检验, 各因素对试验指标的影响程度见表 5。

由表 5 可知, C 因素(酶浓度)对试验结果有显著差异, 在一定范围内, 随着酶浓度的增加, 水解液中 α -氨基氮也呈增加趋势。D 因素(pH)对酶解效果也有显著差异, 结果显示其适宜 pH 为 7.0。A 因

素(时间)、B 因素(原料:水)在 $\alpha=0.05$ 水平上对试验结果的影响没有显著差异。根据 F 值大小, A、B、C、D 4 因素对试验指标影响的主次关系为 C>D>B>A。重复间 F 值小于 1, 没有显著差异。正交实验结果显示最佳方案为 A₂B₃C₃D₂, 即: 酶浓度为 200 U/ml, pH 为 7.0, 原料:水为 1:5, 时间为 3 h。

表 4 $[L_9(3^4)]$ 正交试验方案及试验结果*Table 4 The $[L_9(3^4)]$ orthogonal design and results

试样号 No.	A	B	C	D	试验方案 Design	α -氨基氮/(mg·g ⁻¹ 原料) α -Amino nitrogen	
						I	II
1	1	1	1	1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	7.56	7.68
2	1	2	2	2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	8.53	8.71
3	1	3	3	3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	8.41	8.37
4	2	1	2	3	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	7.88	7.92
5	2	2	1	1	A ₂ B ₂ C ₁ D ₁	7.89	7.96
6	2	3	3	2	A ₂ B ₃ C ₃ D ₂	9.74	9.82
7	3	1	3	2	A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	8.89	8.91
8	3	2	1	3	A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	7.76	7.78
9	3	3	2	1	A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	8.65	8.71

* : 酶解温度为 50℃。The temperature of enzymatic hydrolysis was 50℃.

表 5 F 测验结果

Table 5 The result of F test

变异来源 Source of variation	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
重复间 Replication	1	0.016	0.016	<1		
A	2	0.189	0.094	0.52	4.46	8.65
B	2	1.443	0.722	4.03	4.46	8.65
C	2	2.446	1.223	6.83	4.46	8.65
D	2	2.115	1.058	5.90	4.46	8.65
误差 Error	8	1.432	0.179			
总变异 Total variation	17	7.642				

2.3.2 温度对酶解效果的影响 同时添加枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶,在上述最适条件下,试验不同酶解温度对酶解效果的影响,结果见图 1。

图 1 表明最适酶解温度为 45℃,此时水解液中 α -氨基氮含量为 15.92 mg/g 原料。

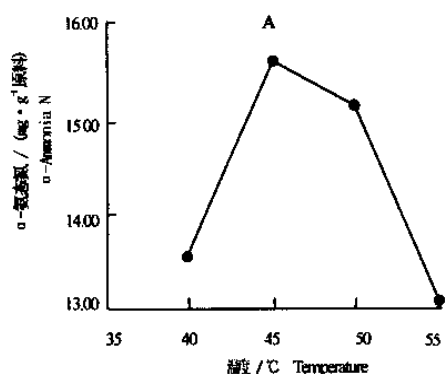


图 1 温度对酶解效果的影响

Fig.1 Effect of temperature on enzymic hydrolysis

2.4 水解液中的氨基酸含量

在酶浓度为 200 U/ml(枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶各半),pH 7.0,原料:水=1:2.5,45℃酶解 3 h,所得样品经液相色谱仪进行氨基酸分析,结果见表 6。

鲨鱼肉水解液中氨基酸含量丰富,总量达 45.4 mg/ml;其中必需氨基酸总量达 19.8 mg/ml,占氨基酸总量的 43.6%;赖氨酸含量高达 5.3 mg/ml,不失为一种氨基酸效价高且全的动物蛋白水解液。

2.5 鲨鱼肉脱腥

脱腥效果表明以三步漂洗法为好。

3 结论

(1)采用枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同时进行酶解的操作方式,比传统操作在酶解时间上缩短了一半,简化了操作,且提高了水解度。

(2)在原料:水=1:2.5 时,采用该酶解技术制得的鲨鱼肉水解液,氨基酸总量高达 45.4 mg/ml,其中必需氨基酸总量高达 19.8 mg/ml,占氨基酸总量的 43.6%。

表 6 鲨鱼肉水解液样品氨基酸分析结果

Table 6 Amino acids in the sample of the shark meat hydrolysate

mg/ml

氨基酸 Amino acids	含量 Concentration	氨基酸 Amino acids	含量 Concentration
天门冬氨酸 Asp	4.4	酪氨酸 Tyr	1.2
谷氨酸 Glu	7.0	缬氨酸* Val	2.5
丝氨酸 Ser	1.4	蛋氨酸* Met	1.5
组氨酸 His	1.6	苯丙氨酸* Phe	2.0
甘氨酸 Gly	2.2	异亮氨酸* Ile	2.6
苏氨酸* Thr	2.1	亮氨酸* Leu	3.8
丙氨酸 Ala	2.7	赖氨酸* Lys	5.3
精氨酸 Arg	3.3	脯氨酸 Pro	1.8
氨基酸总量 Total content	45.4	EAA 总量 Total content of EAA	19.8

*: 为人体必需氨基酸(EAA)。Essential amino acids.

参考文献:

- [1] Mohr, V. Enzymes technology in the meat and fish industries [J]. Proc Biochem, 1980, (6):18.
- [2] Vega, R E, Brennan J G. Enzymic hydrolysis of fish offal without added water[J]. J Food Engin, 1988, (8):201.
- [3] 王长云, 林 洪, 周 东, 等. 从鲑鱼碎肉中提取水解蛋白[J]. 海洋湖沼通报, 1995, (4):33-38.
- [4] 熊光权, 张 弘. 低值淡水鱼的酶法水解[J]. 中国水产, 1992, (8):37-38.
- [5] 陶 研, 黄 健, 黄慧红, 等. 鲢鱼加工废弃物的酶法水解[J]. 水产科技情报, 1997, (4):175-177.
- [6] 无锡轻工学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1983.
- [7] 赵洪根, 黄慕让. 水产品检验[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1987. 165-166.
- [8] 王杏珠. 青鳞鱼加工和利用的研究[J]. 水产科技情报, 1995, 22 (1):29.

Technological improvement of bi-enzyme hydrolysis in preparation of shark meat hydrolysate

WU Hong-mian, ZENG Shao-kui, LEI Xiao-ling, WU Wen-long
(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The shark meat was hydrolyzed with the enzyme hydrolytic technique in which subtilisin and papain were added simultaneously. Through the orthogonal experiment, the optimum condition for the hydrolysis with the bi-enzyme added simultaneously was determined to be 45℃, pH 7.0, taking-time 3 h, enzyme concentration 200 U/ml (subtilisin:papain = 1:1), the proportion between shark meat and water 1:5 (on weight basis). The degree of hydrolysis was 83.5%; the concentration of free amino acids in the hydrolysate was 45.4 mg/ml, and that of essential amino acids was 1.98 mg/ml.

Key words: shark meat; bi-enzyme hydrolysis; hydrolysate solution; technological improvement