

低值小杂鱼风味成分磁性超滤膜分离技术

谢慧明, 伍志刚*, 张仕发, 朱莹莹, 吕庆龙

(合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘要: 为建立一种风味成分提取分离新方法, 提高低值小杂鱼附加值, 实现小杂鱼资源深度开发利用。采用生物酶解技术和磁性超滤膜分离技术得到低值小杂鱼中的风味成分, 基膜为截留相对分子质量 2000 的聚砜超滤膜经原位生成法制得磁性超滤膜。超滤分离实验结果表明: 利用此膜在压力 0.4MPa、磁场强度 0.6T 条件下可实现对小杂鱼酶解液中呈鲜味小肽的选择性分离; 以目标产物中呈鲜味的氨基酸占总氨基酸的百分比为指标, 比较胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶分别与风味蛋白酶复合酶解所得风味成分的差异, 结果显示碱性蛋白酶和风味蛋白酶的复合效果较好; 由正交试验优化得到最佳酶解工艺条件为碱性蛋白酶用量 2350U/g、风味蛋白酶用量 700U/g、酶解温度 55℃、酶解时间 6h、料液比 1:10(g/mL), 由此工艺制备出富含鲜味肽和鲜味氨基酸的目标产物, 得率为 6.43%。磁性超滤膜技术可实现风味成分的选择性分离。

关键词: 低值小杂鱼; 酶解; 磁性超滤膜; 呈鲜味氨基酸

Magnetic Ultrafiltration Membrane Separation of Flavor Components from Low Value Trash Fish

XIE Hui-ming, WU Zhi-gang*, ZHANG Shi-fa, ZHU Ying-ying, LÜ Qing-long

(Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: This study aimed to establish a new method to extract and separate flavor compounds from small trash fish, improving the added value of the resource and realizing its in-depth development and utilization. The method was based on bio-enzymatic hydrolysis and magnetic ultrafiltration membrane separation and the magnetic ultrafiltration membrane used was prepared by *in situ* synthesis from polysulfone ultrafiltration membrane with a molecular weight cut-off (MWCO) of 2000. Selective separation was achieved for umami small peptides in small trash fish hydrolysate. The difference in the composition of flavor compounds in small trash fish hydrolysates prepared with flavourzyme in combination with trypsin, papain, neutrase or alcalase was evaluated based on the percentage of umami amino acids in total amino acids, and the results showed that the combination of flavourzyme and alcalase provided optimum hydrolysis of small trash fish. Using orthogonal array design, the optimal conditions for the application of both enzymes to hydrolyze small trash fish was optimized to be: 2350 U/g alcalase dosage, 700 U/g flavourzyme dosage, 1:10 material/liquid ratio, 55 °C and 6 h. The optimized hydrolysate was rich in umami peptides and umami amino acids with a yield of 6.43%. This study suggests that magnetic ultrafiltration membrane separation enables the selective separation of flavor compounds.

Key words: low value small fish; enzymatic hydrolysis; magnetic ultrafiltration membrane; umami amino acid

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0007-04

近年来, 我国调味品行业中肽结构的天然调味品发展迅速, 其中的主要成分为风味小肽。风味小肽具有良好的加工特性、营养功能和生理活性^[1-4]; 其呈味功能复杂, 可参与并影响调味品的香、味形成, 从而提高食品的风味; 与氨基酸相比, 风味小肽具有更优的吸收机制^[5-8]。因此, 开发肽结构调味品的前景广阔。

鲜味肽又称风味提升肽, 是一种补充或增强食品原

有风味的肽类物质^[9-11]。研究表明: 风味提升肽的感官特性与其氨基酸的组成密切相关, 其味感取决于组成氨基酸的原有味感。一般而言, Glu、Asp、Gln、Asn 之间相互结合或与 Thr、Ser、Ala、Gly、Met(Cys)相互结合形成的多元酸钠盐呈鲜味, 如 Glu-Glu、Glu-Asp、Glu-Ser、Glu-Thr、Glu-Gln-Gln、Ser-Glu-Gln 等^[12-14], 其相对分子质量在 200~500 之间。

收稿日期: 2011-03-07

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA100404)

作者简介: 谢慧明(1955—), 女, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工及贮藏。E-mail: xiehuiming-6@163.com

* 通信作者: 伍志刚(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品超级加工。E-mail: lpsyn@163.com

磁性超滤膜是一种可调控截留分子质量的磁性约束膜^[15],即在已知截留分子质量的聚砜基膜上,采用原位生成法将纳米磁性 Fe_3O_4 粒子沉积在膜的孔道中,制成具有磁性的复合超滤膜。通过调控外加磁场强度,可精确改变超滤膜的截留分子质量,进而实现对不同分子质量的目标物质进行高效选择性分离。

我国淡水小杂鱼种类繁多、产量巨大、资源丰富^[16],但因其形体较小、可食用部分少、利润小,市场价值较低。本实验利用酶技术将低值小杂鱼蛋白质降解后,经自制的磁性复合超滤膜有效分离出富含呈鲜味小肽和游离氨基酸(以下简称呈鲜味成分)的风味物质,以提高其附加值,实现低值鱼资源深度开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小杂鱼(产于安徽巢湖)。胰蛋白酶($1.9 \times 10^5 \text{U/g}$)、木瓜蛋白酶($1.1 \times 10^5 \text{U/g}$)、中性蛋白酶($6.8 \times 10^4 \text{U/g}$)、碱性蛋白酶($7.1 \times 10^4 \text{U/g}$)、风味蛋白酶($4.2 \times 10^4 \text{U/g}$)均为食品级(酶活力测定方法为 Folin-酚法) 武汉市合中生化制造有限公司;聚砜超滤膜 安得膜分离技术工程有限公司。

聚乙二醇系列标准品(相对分子质量分别为 2000、1500、1000、800、600、400、200) 汕头市西陇化工厂有限公司; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、无水乙醇等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

MM12 型绞肉机 广东省韶关市食品机械厂; JJ-1A 型精密定时电动搅拌器 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; 分析天平 美国西特公司; 多功能膜分离设备 自制; UV-1600 型紫外分光光度计 北京奥生源科技有限责任公司; S-433D 型氨基酸自动分析仪 德国 Sykam 公司; SHB-III A 型循环水真空泵 郑州长城科工贸有限公司; HH 数显恒温水浴锅 金坛市金城国胜实验仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 磁性超滤膜的制备与截留分子质量的检测

1.3.1.1 原位生成法制备磁性超滤膜^[17]

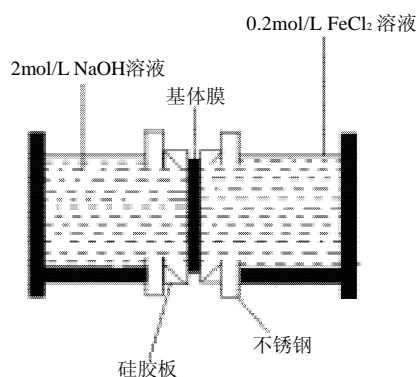


图1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PSF}$ 磁性复合超滤膜制备示意图

Fig.1 Schematic diagram of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PSF}$ magnetic ultrafiltration membrane

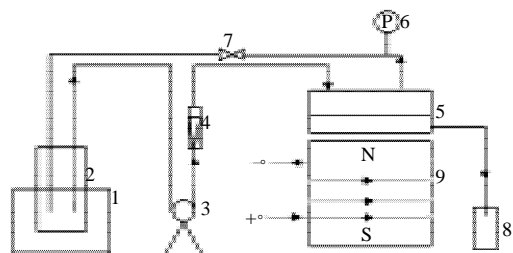
选用截留相对分子质量为 1000、2000、3000 的聚砜超滤膜作为磁性超滤膜的基体膜,以无水乙醇浸泡 10min 后,将其置于超滤膜制备反应器中,如图 1 所示。反应器两侧加入的溶液分别为 2mol/L NaOH 溶液和 0.2mol/L FeCl_2 乙醇溶液,反应 45min 后取出,洗涤、晾干,制得纳米 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{聚砜(PSF)}$ 磁性复合超滤膜(以下简称“磁性超滤膜”)。

1.3.1.2 磁性超滤膜的截留相对分子质量检测

方法参照 HY/T 050—1999《中空纤维超滤膜测试方法》^[18],以不同相对分子质量系列聚乙二醇为标准物质,检测得出,由截留相对分子质量为 1000、2000、3000 的聚砜超滤膜制备的磁性超滤膜在无磁场条件下的截留相对分子质量为 440、770、1380。而目标物质为相对分子质量在 100~500 之间的呈鲜味游离氨基酸和鲜味小肽,故采用截留相对分子质量为 770 的磁性超滤膜来分离目标物质。

1.3.2 磁性超滤膜分离条件的确定

采用如图 2 所示的自制的磁场超滤装置,在 0.4MPa 条件下,以磁性超滤膜对小杂鱼酶解液(按照 1.3.3.2 节方法制得)进行膜分离。在 0~1.0T 间调节磁场强度,收集透过液,并分析透过液中氨基酸组成,每种磁场强度下平行实验 3 次,以呈鲜味的氨基酸占总氨基酸的比例以及呈鲜味氨基酸的回收率为指标,考察磁场强度对呈鲜味成分分离效果的影响,从而确定较适合分离风味成分的磁场强度。



1. 恒温槽; 2. 料液瓶; 3. 进料泵; 4. 流量计; 5. 板式膜; 6. 压力表; 7. 节流阀; 8. 收集瓶; 9. 通电磁铁。

图2 磁场超滤装置示意图

Fig.2 Schematic diagram of magnetic ultrafiltration device

1.3.3 小杂鱼风味成分的提取分离

1.3.3.1 工艺流程

小杂鱼→去杂→清洗→去内脏→绞碎→酶解→灭酶→抽滤→超滤纯化→磁性超滤膜分离→冷冻干燥→目标产物

1.3.3.2 风味成分的提取与纯化

风味成分提取: 采用内切酶和外切肽酶复合的方法分步酶解小杂鱼蛋白质,经灭酶、抽滤后得初提酶解液。

超滤纯化: 选择截留相对分子质量为 10000 的聚砜超滤膜对初提酶解液进行超滤,得到的透过液再用截留

相对分子质量为 3000 的聚砜超滤膜进行二次超滤, 收集透过液, 得到相对分子质量在 3000 以下、总氨基酸含量为 10.646mg/mL 的风味成分提取液, 冷藏备用。

1.3.3.3 内切酶的筛选

选择外切酶为风味蛋白酶, 通过单因素试验从胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶中筛选 1 种内切酶。5 种酶的酶解工艺条件如表 1 所示。

表 1 不同酶的酶解工艺条件
Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of small trash fish by different enzymes

| 酶种类 | | 酶用量/(U/g) | 酶解温度/℃ | 料液比(g/mL) | 酶解时间/h |
|-----|-------|-----------|--------|-----------|--------|
| 内切酶 | 胰蛋白酶 | 520 | 37 | 1:10 | 5 |
| | 木瓜蛋白酶 | 430 | 55 | 1:10 | 5 |
| | 中性蛋白酶 | 460 | 45 | 1:10 | 5 |
| | 碱性蛋白酶 | 640 | 55 | 1:10 | 5 |
| 外切酶 | 风味蛋白酶 | 660 | 50 | 1:10 | 2 |

采用自制的磁性超滤膜, 在一定条件下(设定压力、磁场强度), 对 4 种内切酶分别与风味蛋白酶复合酶解后, 经超滤纯化所得提取液进行磁性超滤膜分离, 分析透过液中氨基酸组成, 每种内切酶平行实验 3 次, 以呈鲜味氨基酸质量占总氨基酸质量的比例为指标, 比较不同内切酶的酶解效果, 确定合适的内切酶。

1.3.3.4 最佳酶解工艺条件的优化

固定料液比为 1:10, 分别选取酶用量、酶解温度、复合酶配比(内切酶:风味蛋白酶)、酶解时间的 3 个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 在常温、0.4MPa、最适磁场强度条件下进行磁性超滤膜分离, 分析透过液中氨基酸组成, 每种工艺条件平行实验 3 次, 以呈鲜味氨基酸的含量为指标, 优化酶解工艺条件。

1.3.4 鲜味氨基酸的检测

1.3.4.1 氨基酸分析方法

样品处理^[19]: 取 500 μ L 样品溶液于安瓿瓶中, 加 1mL 6mol/L 的 HCl 溶液, 氮气吹干, 并用酒精喷灯封管, 置于 110℃ 烘箱中水解 24h。取出, 打开安瓿瓶, 转入 50mL 容量瓶中并用水稀释至刻度, 过滤, 取滤液 10mL 于 50mL 蒸馏烧瓶中用旋转蒸发仪(水浴温度 55℃)蒸发至干, 加样品稀释液 2mL, 过 0.45 μ m 膜, 转入进样瓶中, 供仪器测定用。

氨基酸分析条件: 柱类型为阳离子交换树脂(150mm \times 4.6mm); 三元梯度洗脱; 试剂流速 0.25mL/min; 缓冲液流速 0.45mL/min; 反应器温度 130℃; 进样体积 50 μ L; 分析时间 60min。

1.3.4.2 鲜味氨基酸的计算

目标物质中富含呈鲜味游离氨基酸和鲜味小肽, 而

鲜味小肽的感官特性与其氨基酸的组成密切相关, 其味感取决于组成氨基酸的原有味感。经分析得出, 呈鲜味的游离氨基酸或构成鲜味小肽的氨基酸(以下统称为“鲜味氨基酸”)有以下 8 种: Glu、Asp、Thr、Ser、Ala、Gly、Met、Cys^[9-14]。计算时, 鲜味氨基酸总量为此 8 种氨基酸含量之和。

2 结果与分析

2.1 磁性超滤膜分离条件的确定

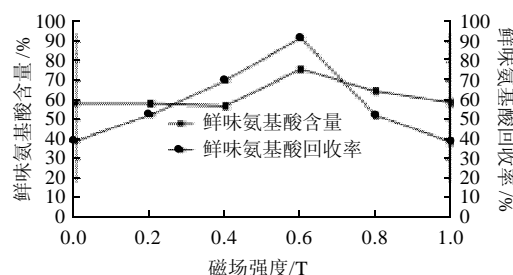


图 3 磁场强度对鲜味成分分离效果的影响
Fig.3 Effect of magnetic field strength on the separation of flavor components

由图 3 可知, 随着磁场强度的增大, 在膜透过液中, 鲜味氨基酸含量以及鲜味氨基酸的回收率均呈现先升高后降低的趋势, 且在 0.6T 时达到峰值。这说明在此磁场条件下, 磁性纳米粒子 Fe_3O_4 产生的磁致伸缩效应和电磁诱导效应, 使磁性超滤膜实现了对鲜味小肽的选择性分离。分析其机理可能有二: 一方面由于磁性膜中填充了具有超顺磁性的纳米 Fe_3O_4 颗粒, 在磁场下由于纳米粒子具有超顺磁性会沿着磁场方向排列, 而且由于 Fe_3O_4 粒子的磁滞伸缩效应尺寸会发生变化, 使膜孔发生变形, 改变截留率; 另一方面由于风味成分中主要成分小肽和游离氨基酸均为两性物质, 由于表面离子化侧链的存在, 使其带有净电荷, 分子通过磁性膜时受到磁力并发生转动, 使风味成分的透过率增大^[20]。当磁场强度达到 0.6T 时, 透过液中鲜味氨基酸占总氨基酸的 76.2%, 鲜味氨基酸的回收率高达 92%。因此可选择 0.6T 作为分离风味成分的最佳磁场强度。

2.2 不同内切酶酶解鲜味成分的效果比较

由于不同内切酶对蛋白质的作用位点不同, 酶解产物亦不同, 故而经磁性膜选择性分离后所得目标产物中鲜味成分的含量存在差异。由图 4 可知, 在外切酶条件不变的情况下, 碱性蛋白酶分解生产鲜味成分的效果最好, 经磁性膜分离后, 透过液中呈鲜味的氨基酸占总氨基酸的比例高达 81.6%, 其次为中性蛋白酶和木瓜蛋白酶, 而胰蛋白酶分解生产鲜味成分的效果较差, 故选用碱性蛋白酶作为酶解小杂鱼风味成分的内切酶。

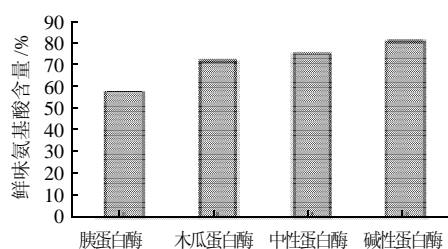


图4 不同内切酶解鲜味成分的效果比较

Fig.4 Comparison of the effectiveness of different exoproteases in hydrolyzing small trash fish into umami amino acids

2.3 最佳酶解工艺条件的优化

采用碱性蛋白酶与风味蛋白酶复合酶解法对小杂鱼蛋白质进行酶解,以透过液中鲜味氨基酸质量浓度为指标,分别选取酶用量、酶解温度、复合酶配比、酶解时间的3个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,试验设计和结果如表2所示。

表2 酶解工艺正交试验设计和结果

Table 2 Orthogonal array design matrix and results for optimizing hydrolysis of small trash fish by the combination of flavourzyme and

| 试验号 | A 酶解温度/℃ | B 酶用量/% | C 复合酶配比(内切酶:风味蛋白酶, m/m) | D 酶解时间/h | 鲜味氨基酸质量浓度/(mg/mL) |
|-------|----------|---------|-------------------------|----------|-------------------|
| 1 | 1(50) | 1(3.0) | 1(1:2) | 1(4) | 4.396 |
| 2 | 1 | 2(4.0) | 2(1:1) | 2(5) | 6.668 |
| 3 | 1 | 3(5.0) | 3(2:1) | 3(6) | 8.181 |
| 4 | 2(55) | 1 | 2 | 3 | 5.637 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 6.798 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 7.626 |
| 7 | 3(60) | 1 | 3 | 2 | 5.293 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 6.592 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 6.995 |
| K_1 | 19.245 | 15.326 | 18.614 | 18.189 | |
| K_2 | 20.061 | 20.058 | 19.300 | 19.587 | |
| K_3 | 18.880 | 22.802 | 20.272 | 20.410 | |
| k_1 | 6.415 | 5.109 | 6.205 | 6.063 | |
| k_2 | 6.687 | 6.686 | 6.433 | 6.529 | |
| k_3 | 6.293 | 7.601 | 6.757 | 6.803 | |
| R | 0.394 | 2.492 | 0.553 | 0.740 | |

主次顺序: $B > D > C > A$ 优水平: $A_2B_3C_3D_3$

由表2可知,影响鲜味氨基酸含量的各因素之间的极差大小排序为 $B > D > C > A$ 。极差分析结果显示,最佳酶解工艺条件为 $A_2B_3C_3D_3$,即酶解温度 55°C 、酶用量5%、碱性蛋白酶:风味蛋白酶=2:1(即碱性蛋白酶用量2350U/g、风味蛋白酶用量700U/g)、酶解时间6h。

由最佳酶解工艺条件进行验证实验,测得酶解液中鲜味氨基酸质量浓度为 8.545mg/mL ,最终目标产物得率为6.43%(真空冷冻干燥后,目标产物的质量与原料小杂鱼质量的比值),氨基酸组成分析结果,产品中鲜味氨基酸含量为79.69%。

3 结论

采用原位生成法,以截留相对分子质量为2000的聚砜超滤膜为基体膜制得磁性复合超滤膜,利用此膜在压力为 0.4MPa 、常温条件下调节磁场强度对小杂鱼酶解液进行膜分离,当磁场强度为 0.6T 时,透过液中鲜味氨基酸占总氨基酸的76.2%,鲜味氨基酸的回收率高达92%。表明磁性超滤膜可实现对鲜味肽的选择性高效分离。

以风味蛋白酶分别与4种内切酶复合酶解小杂鱼蛋白质,比较不同内切酶的酶解效果,结果表明:碱性蛋白酶与风味蛋白酶复合酶解效果最好。酶解液经纯化、分离后,得到膜透过液中的呈鲜味氨基酸占总氨基酸的比例达81.6%。

采用正交试验优化酶解工艺,得到最佳酶解工艺条件为料液比1:10(g/mL)、酶用量5%、碱性蛋白酶:风味蛋白酶=2:1、酶解温度 55°C 、酶解时间6h。该工艺条件下得到的目标产物得率为6.43%,分析产品氨基酸组成,鲜味氨基酸占79.69%。

参考文献:

- [1] 程竹青. 胜肽对食品鲜味的影响[J]. 食品工业(台湾), 2002(9): 3-18.
- [2] 周雪松, 赵谋明. 肽的呈味功能研究[J]. 中国调味品, 2005(6): 38-42.
- [3] 宋钢. 肽结构天然调味品的特性及生产方法[J]. 中国酿造, 2003(3): 42-43.
- [4] 周秀琴. 日本天然调味料开发现状[J]. 中国调味品, 1993(11): 1-8.
- [5] 刘亚, 章超桦. 肽的呈味作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 418-421.
- [6] 武彦文, 欧阳杰. 氨基酸和肽在食品中的呈味作用[J]. 中国调味品, 2001(1): 21-24.
- [7] 廖兰, 赵谋明, 崔春, 等. 肽与氨基酸对食品滋味贡献的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(12): 107-112.
- [8] KIRIMURA J, SHIMITSU A, KIMIZUKA A, et al. The contribution of peptide and amino acids to the taste of food stuffs[J]. Agric Food Chem, 1969, 17(4): 689-695.
- [9] 曹雁平. 食品调味技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 63-64.
- [10] NISHIMURA T, KATO H. Taste of free amino acids and peptides[J]. Food Rev Int, 1988, 4(2): 175-194.
- [11] 梁兰兰, 黄华京, 秦燕, 等. 氨基酸组成对食品风味特征的影响[J]. 中国酿造, 1996(3): 17-19.
- [12] 丁耐克. 食品风味化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 89-98.
- [13] 何欣, 杨荣华. 鲜味物质及其在水产调味品中的应用[J]. 中国调味品, 2005(4): 3-10.
- [14] 陈怡宏. 胜肽在肉类风味上的贡献: 一条呈味胜肽的发现和研发[J]. 食品工业, 1998, 30(8): 48-54.
- [15] 潘见, 谢慧明, 何亚荟, 等. 一种截留率可控的电磁约束分离膜: 中国, 200610040159.1[P]. 2006-12-20.
- [16] 段蕊, 张俊杰. 海洋低值小杂鱼的加工现状和方向[J]. 中国水产, 2006(6): 46-47.
- [17] 潘见, 晋明会, 赵金龙, 等. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PSF}$ 磁性复合超滤膜的制备、表征及应用[J]. 膜科学与技术, 2009, 29(5): 39-43.
- [18] 国家海洋局. HY/T 050—1999 中空纤维超滤膜测试方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [19] 张水华. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 187-189.
- [20] 潘见, 何亚荟, 晋明会, 等. 聚砜- Fe_3O_4 磁性复合超滤膜的制备及应用[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 159-161.