

响应面法优化紫贻贝蛋白酶解工艺条件

吕振磊¹, 刘朝龙¹, 王雨生^{1,2}, 陈海华^{1,*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109; 2. 青岛农业大学学报编辑部, 山东 青岛 266109)

摘要: 分别采用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和风味蛋白酶 7 种蛋白酶对紫贻贝蛋白的酶解工艺条件进行研究。根据水解度和感官评定的结果, 确定中性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶可以作为紫贻贝蛋白酶解的外加蛋白酶。将上述 4 种蛋白酶进行两两复配, 通过试验确定复合蛋白酶与中性蛋白酶按 1:1 进行复配, 可作为紫贻贝蛋白酶解的最适复配酶。采用响应面优化分析得出复配蛋白酶最佳酶解条件为酶解时间 2h、pH7、酶解温度 50℃、酶添加量 0.4%, 在此条件进行实验, 测得水解度为 70.25%, 游离氨基酸总量增加了 388.46%。

关键词: 紫贻贝; 蛋白酶; 酶解

Optimization of Hydrolysis Conditions for Mussel (*Mytilus edulis*) Protein by Response Surface Methodology

LÜ Zhen-lei¹, LIU Zhao-long¹, WANG Yu-sheng^{1,2}, CHEN Hai-hua^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Editorial Department of Journal of Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The mussel protein from *Mytilus edulis* was hydrolyzed by neutral protease, alkaline protease, acidic protease, protamex, papain, trypsin and flavourzyme. According to the degree of hydrolysis and sensory evaluation, neutral protease, protamex, papain and flavourzyme were the appropriate exogenous enzymes for the hydrolysis of mussel protein. Meanwhile, the compound enzyme for the hydrolysis of mussel protein was the mixture of protamex and neutral protease at the ratio of 1:1. The optimum hydrolysis conditions of compound enzyme were explored by response surface methodology. The results showed that the optimal hydrolysis conditions were hydrolysis time of 2 h, hydrolysis pH of 7, hydrolysis temperature of 50 °C, and enzyme addition amount of 0.4%. Under the optimal hydrolysis conditions, the degree of hydrolysis was up to 70.25%. Moreover, the free amino acids in the hydrolysates revealed an increase by 388.46%.

Key words: *Mytilus edulis*; protease; hydrolysis

中图分类号: TS254

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0061-06

紫贻贝别名青口螺, 属贻贝科。据联合国粮农组织数据显示, 目前全球贻贝产量已近 200 万吨, 其中紫贻贝市场占有率最高, 达 75%。我国是世界上最大的贻贝生产国, 年产量达 50 万吨, 表明贻贝产业在我国具有较大的经济价值^[1]。紫贻贝肉味鲜美, 营养丰富, 是传统的滋补食品和药材。研究表明, 紫贻贝的水解物具有抗肿瘤、抗氧化、抗凝血、降血压、降血脂、提高免疫力等作用^[2-4], 如果能充分开发利用其有效成分, 将会产生巨大的社会效益和经济效益, 对于提高人们生活水平和充分利用海洋生物资源均具有重大意

义。目前, 国外对紫贻贝的研究主要集中在生物学上的观察及生长环境的探究, 但对紫贻贝进一步的研究未有报道^[5]。紫贻贝在我国的研究刚起步, 以水产品蛋白水解物为基料的医药品和食品报道很少^[6], 这为研究紫贻贝及其酶解液在食品中的应用提供了广阔空间。国内对紫贻贝营养成分的分析及其食品化学特性和生化特性已有一定的研究^[7-10], 但对紫贻贝蛋白酶解的研究较少^[11-12], 且主要集中于降血压肽和抗菌活性肽等方面的研究^[13-15], 而用于美拉德反应制取海鲜味香精的紫贻贝蛋白酶解液的研究未见报道。由于不同的蛋白酶在酶解过程

收稿日期: 2011-07-16

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2010CL027); 山东省高等学校优秀青年教师国内访问学者项目(2010D104)

作者简介: 吕振磊(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为酶制剂在食品中的应用。E-mail: lzlyym_ok@126.com

* 通信作者: 陈海华(1973—), 女, 教授, 博士, 研究方向为酶制剂在食品中的应用。E-mail: haihchen@163.com

中作用的位点不相同,导致蛋白的水解程度有所差异,所得酶解产物的氨基酸含量和风味特征也有所差别,所以有必要对适合于制备海鲜风味基料的紫贻贝蛋白酶解的复配酶、酶解规律及最适的酶解条件进行研究。

本实验主要研究中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和风味蛋白酶对紫贻贝蛋白水解的影响,从酶解反应时间、pH值、酶解温度和酶的添加量四个因素着手,以水解度(degree of hydrolysis, DH)和相应的感官评定为指标,从中筛选出适合水解紫贻贝蛋白的酶制剂;对筛选出的酶制剂进行两两复配,确定水解紫贻贝蛋白的最适复配酶及其最佳配比,并对复配酶的酶解条件进行优化,以期期为这种复配酶在水产品中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫贻贝 市购;中性蛋白酶(5×10^4 U/g)、碱性蛋白酶(1×10^5 U/g)、酸性蛋白酶(5×10^4 U/g) 石家庄市兴达酶制剂有限公司;复合蛋白酶(1×10^5 U/g)、风味蛋白酶(5×10^5 U/g) 广州柏棠贸易有限公司;木瓜蛋白酶(8×10^5 U/g) 郑州坤利食品添加剂有限公司;胰蛋白酶(3×10^5 U/g) 汉中鑫博尔生物工程有限公司。

氢氧化钠、盐酸、浓硫酸、硼酸、硫酸钾、硫酸铜、酚酞、甲基红指示剂、溴甲酚绿指示剂、亚甲基蓝指示剂、95%乙醇、无水乙醚、石油醚、乙酸镁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、甲醛均为分析纯。

1.2 仪器与设备

BS224S 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;DELTA320PH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;85-2 恒温磁力搅拌器 北京华人新创科技有限公司;JJ-2 组织捣碎均浆机 常州国华电器有限公司;LXJ-IIB 低速离心机 上海安亭科学仪器厂;HH-2 数显恒温水浴锅 上海双捷实验设备有限公司;DHG-9070A 型电热鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;HITACHI835-50 氨基酸分析仪 日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 原料基本组分分析

水分:参照 GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》中常压直接干燥法;总灰分:参照 GB 5009.4—2010《食品中灰分的测定》;粗脂肪:参照 GB/T 14772—2008《食品中粗脂肪的测定》中索氏抽提法;粗蛋白:参照 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法。

1.3.2 紫贻贝的酶法水解

1.3.2.1 工艺流程

紫贻贝肉(冻藏)→解冻→捣碎→加磷酸缓冲液→调 pH 值→水浴升温→加酶水解→灭酶→离心→水解液→测定水解度。

1.3.2.2 操作要点

取适量冷冻紫贻贝肉,在室温下自然解冻,切成大约 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 的小块,称取原料 80g,用组织捣碎机高速捣碎 5min,移入烧杯,加入 30% 磷酸盐缓冲液,保持固液比 1:3,用 1mol/L 氢氧化钠或盐酸溶液调 pH 值,在恒温水浴中升温到预定温度,加入一定量蛋白酶,搅拌均匀,酶解。酶解结束后,进行沸水浴灭酶 20min,使酶失活,自然冷却,4000r/min 离心 20min,所得上清液即为酶解液,酶解液定容至 500mL,测定游离氨基氮的含量。

1.3.3 游离氨基氮的测定

采用甲醛电位滴定法^[16-17]。

1.3.4 水解度的测定^[18-19]

水解度是衡量蛋白质水解程度的一个重要指标,指水解断裂的肽键数目占总肽键数目的百分比。水解断裂的肽键数可通过水解释放出的氨基氮数目来测定,并计算水解度。

$$\text{水解度} / \% = \frac{\text{游离氨基氮化}}{\text{总氮量}} \times 100$$

1.3.5 酶解液的感官鉴评

由 10 位人员组成品尝小组,对各种蛋白酶在其最适作用条件下所得到的紫贻贝蛋白酶解液进行感官评定,采用 10 分制对水解液的气味和味道进行评价。

1.3.6 单因素试验设计

各种蛋白酶的酶解 pH 值、时间、温度、添加量等作用条件如表 1 所示,固定其中的 3 个因素,改变 1 个因素进行单因素试验。

表 1 单因素试验不同蛋白酶的作用条件
Table 1 Hydrolysis conditions of different proteases

作用条件	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	酸性蛋白酶	复合蛋白酶	木瓜蛋白酶	胰蛋白酶	风味蛋白酶
pH	7	8	4	7	6	8	6
温度 / °C	50	50	40	50	50	40	50
添加量 / %	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3
酶解时间 / h	2.5	3	2	2	2	2	1.5

1.3.7 响应面试验设计

参考中性蛋白酶和复合蛋白酶的单因素实验结果,采用响应面方法在三因素五水平上对 pH 值、温度、酶添加量进行优化。根据中心组合设计原理进行试验设计,试验因素与水平设计见表 2。

表2 响应面法优化因素与水平
Table 2 Factors and levels of the response surface tests

因素	水平				
	-1.6818	-1	0	1	1.6818
X ₁ pH	6	6.6271	7	7.3729	8
X ₂ 温度	45	48.1356	50	51.8644	55
X ₃ 添加量	0.2159	0.3	0.35	0.4	0.4841

1.3.8 数据处理及分析

利用 Design Expert 7.0 软件中的多元线性回归分析程序, 拟合二阶多项式方程, 研究 pH 值、酶解温度、酶添加量对紫贻贝水解度的影响, 对得到的回归方程的系数进行显著性比较, 并进一步分析试验因素及水平对响应值的影响。

1.3.9 氨基酸的组成分析

采用氨基酸分析仪对紫贻贝蛋白酶解前后的游离氨基酸进行测定, 具体方法参照 GB/T 18246—2000《饲料中氨基酸的测定》。

2 结果与分析

2.1 原料基本成分

表3 紫贻贝蛋白中几种基本成分含量
Table 3 Basic compositions in mussel meat

基本成分	水分	灰分	粗脂肪	粗蛋白
含量/%	82.1 ± 1.2	1.62 ± 0.13	1.75 ± 0.1	9.71 ± 0.15

由表3可知, 紫贻贝中蛋白质含量为9.71%左右, 约占干基质量的54.25%, 可见紫贻贝干基中以蛋白含量为最高, 因此紫贻贝可以作为蛋白酶解的原料。

2.2 各种蛋白酶的单因素试验考察

2.2.1 不同酶解时间对紫贻贝蛋白水解度的影响

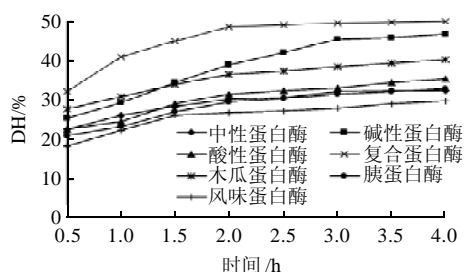


图1 酶解时间对水解度的影响
Fig.1 Effect of hydrolysis time on DH

由图1可知, 水解度随着酶解时间的延长而增大, 中性蛋白酶在2.5h以后, 碱性蛋白酶在3h以后, 酸性

蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶在2h以后, 风味蛋白酶在1.5h以后, 水解度变化不显著, 这说明酶解反应基本达到平衡状态。

2.2.2 pH 值对紫贻贝蛋白水解度的影响

蛋白酶是一种具有生物活性的物质, 环境的pH值直接影响着酶及蛋白质分子的某些解离基团的解离状态。只有在特定的pH值条件下, 酶及底物蛋白质的解离基团才能处于易于结合并转化成产物的解离状态, 否则酶的活性就会受到抑制, 甚至失活。由图2可知, 随着酶解pH值的递增, 水解度呈先增后降的趋势, 其中中性蛋白酶和复合蛋白酶在pH值为7时, 碱性蛋白酶和胰蛋白酶在pH值为8时, 酸性蛋白酶在pH值为4时, 木瓜蛋白酶在pH6时, 风味蛋白酶在pH5时, 其水解度达到最大值。

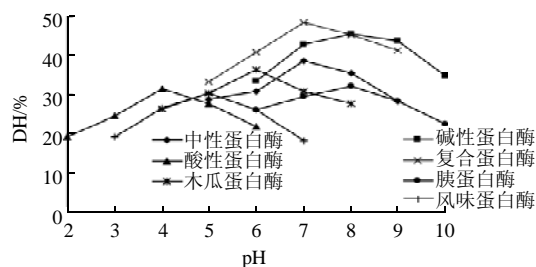


图2 酶解pH值对水解度的影响
Fig.2 Effect of hydrolysis pH on DH

2.2.3 不同酶解温度对紫贻贝蛋白水解度的影响

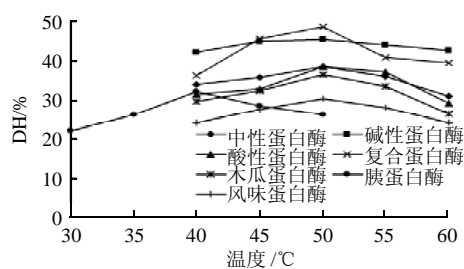


图3 不同酶解温度对水解度的影响
Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on DH

由图3可知, 随着温度的升高水解度呈先升后降的趋势, 胰蛋白酶在40℃时水解度达到最大值, 中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶都在温度50℃时水解度达到最大值, 低于或高于这一温度, 水解度都有所降低。这是因为在较低温度时, 温度处于主导地位, 随着温度的升高, 体系的内能逐渐增大, 分子运动加剧, 酶与底

物之间的接触机会增多,催化效率增强,反应速度加快,水解度增大。但是酶是一种具有生物活性的蛋白质,当温度过高时,酶蛋白的特定结构发生变化,酶的活性也会逐渐降低,甚至完全失活。由于碱性蛋白酶在温度45℃和50℃时,水解度没有显著性差异,且温度越高酶越不稳定,所以认为碱性蛋白酶的最适酶解温度为45℃。

2.2.4 蛋白酶不同添加量对水解度的影响

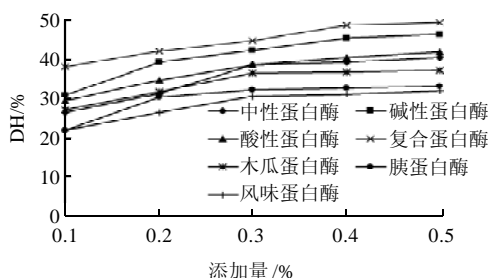


图4 蛋白酶不同添加量对水解度的影响
Fig.4 Effect of enzyme addition amount on DH

由图4可知,随着酶添加量的增加水解度呈增加的趋势,中性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和风味蛋白酶的添加量超过0.3%时,碱性蛋白酶和复合蛋白酶的添加量超过0.4%时,继续增加酶的添加量,水解度增加不显著。这是因为低于上述添加量时,底物能被酶作用的位点过量,水解度随酶用量增加而逐渐增大;在酶解后期,剩余的能够参与酶解反应的底物的位点减少,于是出现水解度随加酶量的增加而变化较小的现象。从生产工艺与经济成本考虑,选择中性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和风味蛋白酶的最适添加量为0.3%,碱性蛋白酶和复合蛋白酶的最适添加量为0.4%。

2.3 筛选适合水解紫贻贝的蛋白酶

表4 不同蛋白酶对紫贻贝蛋白水解度和酶解液感官品质的影响
Table 4 Effects of different proteases on DH and sensory evaluation of mussel hydrolysate

蛋白酶	时间/h	pH	温度/℃	添加量/%	水解度/%	气味评分	味道评分
中性蛋白酶	2.5	7	50	0.3	38.6 ± 0.6	7.0 ± 0.2	7.5 ± 0.4
碱性蛋白酶	3.0	8	45	0.4	45.5 ± 0.8	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1
酸性蛋白酶	2.0	4	50	0.3	38.6 ± 0.6	3.5 ± 0.1	4.5 ± 0.2
复合蛋白酶	2.0	7	50	0.4	48.6 ± 0.8	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.1
木瓜蛋白酶	2.0	6	50	0.3	36.5 ± 0.3	7.0 ± 0.3	6.5 ± 0.2
胰蛋白酶	2.0	8	40	0.3	31.1 ± 0.3	6.5 ± 0.3	6.0 ± 0.2
风味蛋白酶	1.5	5	50	0.3	30.4 ± 0.8	8.0 ± 0.4	8.5 ± 0.3

通过测定各种蛋白酶在其最适酶解条件下的水解度,并对其进行感官评定,来筛选适合水解紫贻贝的蛋白酶,结果如表4所示。

由表4可知,在最适酶解条件下,中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、复合蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解度均较高,但碱性蛋白酶和酸性蛋白酶的酶解液味道刺激,风味较差,感官评分较低,不适合做紫贻贝蛋白酶解的外加酶;胰蛋白酶和风味蛋白酶的水解度相对较低,但风味蛋白酶酶解液味道鲜美,海鲜味浓郁,感官评分较高。鉴于紫贻贝蛋白酶解液的水解度和感官评定,初步选择中性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶作为紫贻贝蛋白水解的外加酶。

2.4 筛选适合水解紫贻贝的复配蛋白酶及其最佳配比

2.4.1 复配蛋白酶的筛选

单一蛋白酶的水解度比较低,并且水解液略带苦涩味,其原因是有些蛋白质含有疏水性氨基酸,它们常隐藏在蛋白质内部,一旦水解暴露出来就会显出苦涩味^[20]。采用不同蛋白酶之间的复配进行酶解可以使含疏水性氨基酸的蛋白质进一步水解,提高蛋白质的水解率,同时又能降低苦涩味的产生。通过上述实验,对初步筛选出的紫贻贝蛋白水解的外加酶进行两两复配,研究不同种类的复配蛋白酶对紫贻贝蛋白酶解的影响,来筛选适合水解紫贻贝蛋白的复配蛋白酶。酶解结果如表5所示。

表5 不同复配蛋白酶对紫贻贝酶解液感官的影响
Table 5 Effects of different enzyme mixtures on the sensory evaluation of mussel hydrolysate

类型	配比	pH	时间/h	温度/℃	添加量/%	水解度/%	气味评分	味道评分
复合+木瓜	1:1	6.5	2	50	0.3	59.3 ± 0.8	7.0 ± 0.2	7.5 ± 0.2
复合+风味	1:1	6	2	50	0.3	56.2 ± 0.7	8.0 ± 0.3	8.0 ± 0.3
复合+中性	1:1	7	2	50	0.3	63.7 ± 0.9	7.5 ± 0.2	7.5 ± 0.1
中性+木瓜	1:1	6.5	2	50	0.3	54.9 ± 0.2	8.0 ± 0.4	8.5 ± 0.2
中性+风味	1:1	6	2	50	0.3	47.1 ± 0.2	9.0 ± 0.3	9.5 ± 0.4
风味+木瓜	1:1	5.5	2	50	0.3	52.9 ± 0.8	8.5 ± 0.2	9.0 ± 0.3

由表5可以看出,中性蛋白酶与复合蛋白酶复配后的水解度最高,与其他复配酶有显著差异,中性蛋白酶与风味蛋白酶复配后的水解度最低;中性蛋白酶与复合蛋白酶复配后的水解产物的风味与其他复配酶没有明显的差异。综合考虑各种复配酶酶解液的水解度和感官评定,选择中性蛋白酶与复合蛋白酶作为酶解紫贻贝蛋白的复配酶。

2.4.2 复配蛋白酶最佳配比的筛选

复合蛋白酶与中性蛋白酶的作用条件为pH7、时间2h、温度50℃、添加量0.3%,二者不同配比对紫贻贝水解液的影响如表6所示。

表6 复合蛋白酶与中性蛋白酶复配比例对紫贻贝酶解液感官品质的影响

Table 6 Effects of different ratios between protamex and neutral protease on the sensory evaluation of mussel hydrolysate

配比(复合/中性)	水解度/%	气味评分	味道评分
1:1	63.7 ± 0.9	7.5 ± 0.2	7.5 ± 0.1
1:2	57.3 ± 0.4	7.5 ± 0.3	8.0 ± 0.3
1:3	51.9 ± 0.7	8.5 ± 0.2	9.1 ± 0.3
1:4	48.5 ± 0.4	8.5 ± 0.1	9.0 ± 0.4
2:1	65.5 ± 0.9	6.0 ± 0.3	6.5 ± 0.2
3:1	68.1 ± 0.8	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.2
4:1	72.5 ± 0.9	5.1 ± 0.1	4.5 ± 0.1
2:3	55.4 ± 0.6	8.0 ± 0.3	8.5 ± 0.2
3:4	56.4 ± 0.4	8.2 ± 0.4	8.2 ± 0.3
4:3	62.7 ± 0.6	7.0 ± 0.2	7.1 ± 0.1
3:2	64.2 ± 0.8	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.2

由表6可知,随着复配酶中的中性蛋白酶所占比例的增加,水解度呈下降的趋势;随着复合蛋白酶比例的增加,水解度略有增加,但水解液的风味变差,复配比为3:1和4:1的复配酶其水解液风味最差,不适合调味品的加工;其余配比的复配酶对水解液风味的影响没有太大的差异。根据酶解液水解度和感官评定,同时考虑到两种酶的价格,选择复合蛋白酶与中性蛋白酶的配比为1:1,这无论从生产还是产品风味的角度考虑都具有实际意义。

2.5 复配蛋白酶酶解紫贻贝条件的响应面优化

2.5.1 响应面试验及方差分析

表7 复配蛋白酶酶解紫贻贝响应面优化试验方案及结果

Table 7 Design and results of response surface tests

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	水解度/%
1	-1	-1	-1	56.036
2	1	-1	-1	54.624
3	-1	1	-1	54.076
4	1	1	-1	60.756
5	-1	-1	1	63.7
6	1	-1	1	66.444
7	-1	1	1	59.644
8	1	1	1	70.07
9	-1.682	0	0	54.54
10	1.682	0	0	61.976
11	0	-1.682	0	60.976
12	0	1.682	0	63.582
13	0	0	-1.682	53.42
14	0	0	1.682	68.96
15	0	0	0	66.504
16	0	0	0	66.7
17	0	0	0	66.7
18	0	0	0	66.19
19	0	0	0	66.504
20	0	0	0	66.896

试验设计和试验结果见表7,方差分析及显著性比较结果见表8。利用Design Expert 7.0软件对所得数据进行回归分析,对各因素回归拟合后,得到回归方程为: $DH/\% = 66.57 + 2.27X_1 + 0.59X_2 + 4.43X_3 + 1.97X_1X_2 + 0.99X_1X_3 - 0.58X_2X_3 - 2.85X_1^2 - 1.42X_2^2 - 1.81X_3^2$ 。

表8 水解度回归模型方差分析表

Table 8 Variance analysis of regression equation

因素	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	550.05	9	61.12	365.58	< 0.0001
X ₁	70.11	1	70.11	419.39	< 0.0001
X ₂	4.83	1	4.83	28.91	0.0003
X ₃	268.02	1	268.02	1603.22	< 0.0001
X ₁ X ₂	31.10	1	31.10	186.04	< 0.0001
X ₁ X ₃	7.81	1	7.81	46.69	< 0.0001
X ₂ X ₃	2.65	1	2.65	15.84	0.0026
X ₁ ²	116.77	1	116.77	698.49	< 0.0001
X ₂ ²	29.26	1	29.26	175.03	< 0.0001
X ₃ ²	47.21	1	47.21	282.39	< 0.0001
残差	1.67	10	0.17		
失拟相	1.38	5	0.28	4.72	0.0569
纯误差	0.29	5	0.058		
总离差	551.72	19			
R ²					0.9970
R ² _{Adj}					0.9942

注: $P < 0.05$, 差异显著; $P < 0.01$, 差异极显著。

由表8可以看出,此模型的 $P < 0.0001$, 响应面回归模型达到极显著水平。相关系数 $R^2 = 0.9970$, 说明该回归方程回归效果比较好, 99.7% 的数据可以用这个方程解释; $R^2_{Adj} = 0.9942$, 说明可信度高。各因素中一次项、二次项、交互项都是极显著的($P < 0.01$), 说明各因素及其相互间的交互作用对水解度有极显著的影响。失拟项各项数据分析表明该模型失拟不显著, 说明该回归方程能较好的拟合真实的响应面。通过比较方程一次项系数绝对值的大小, 可以判断因子影响的主次性^[21], 本试验中酶的添加量对水解度的影响最大, 其次是 pH 值, 最后是酶解温度。

2.5.2 优化工艺参数的验证

经响应面分析得出3个影响因素的最佳组合为 pH7、酶解温度 50.22℃、酶添加量 0.4%, 预测的水解度达到 70.14%。为了检验模型预测的准确性, 在最佳酶解条件 pH7、酶解温度 50℃、酶添加量 0.4% 条件下进行实验, 测得的水解度为 70.25%, 与预测值基本接近, 表明预测值和真实值之间有很好的拟合性, 进一步验证了模型的可靠性。

2.6 酶解液中游离氨基酸组成分析

采用氨基酸分析仪对酶解前和在最佳酶解条件下制备得到的酶解液进行了分析检测。氨基酸的组成和含量如表9所示。

表9 游离氨基酸组分分析

Table 9 Profile analysis of free amino acids before and after enzymatic hydrolysis

酶解前游离氨基酸的组成		酶解后游离氨基酸的组成	
氨基酸名称	含量	氨基酸名称	含量
天门冬氨酸	0.265	天门冬氨酸	1.268
苏氨酸*	0.082	苏氨酸*	0.580
丝氨酸	0.117	丝氨酸	0.751
谷氨酸	0.384	谷氨酸	1.693
甘氨酸	0.675	甘氨酸	1.280
丙氨酸	0.221	丙氨酸	0.779
胱氨酸	0.027	胱氨酸	0.027
缬氨酸*	0.120	缬氨酸*	0.729
蛋氨酸*	0.059	蛋氨酸*	0.274
异亮氨酸*	0.053	异亮氨酸*	0.590
亮氨酸*	0.091	亮氨酸*	0.861
酪氨酸	0.059	酪氨酸	0.499
苯丙氨酸*	0.056	苯丙氨酸*	0.455
赖氨酸*	0.127	赖氨酸*	1.173
组氨酸	0.031	组氨酸	0.263
精氨酸	0.219	精氨酸	1.294
脯氨酸	0.058	脯氨酸	0.282
氨(不计)	0.058	氨(不计)	0.561
氨基酸总和	2.642	氨基酸总和	12.905

注: *,必需氨基酸。

由表9可知,酶解前和酶解后氨基酸的种类相同,都检测出17种氨基酸;但酶解前后游离氨基酸的总量及各种氨基酸的含量差别明显,酶解前游离氨基酸总量为2.642mg/mL,酶解后为12.905mg/mL,增加了388.46%;各种氨基酸中变化率最大的是异亮氨酸1013.21%,最小的是甘氨酸89.63%,除甘氨酸外,其他氨基酸的变化率均高于250.00%;酶解后天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸和精氨酸的含量丰富,都超过了1mg/mL。有报道指出,谷氨酸、甘氨酸和精氨酸在美拉德反应中对海鲜味产生贡献^[22]。所以,紫贻贝蛋白酶解液可进一步用于制备海鲜味香精。

3 结 论

3.1 综合考虑各种蛋白酶酶解液的水解度和感官评定,选择中性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶四种酶之间进行两两复配,通过响应面试验确定了复合蛋白酶与中性蛋白酶按最适配比1:1进行复配,可作为紫贻贝蛋白酶解的最适复配酶。在其最佳酶解条件(酶解2h、pH7、酶解温度50℃、酶添加量0.4%)下进

行实验,测得的水解度为70.25%。

3.2 酶解前和酶解后氨基酸的种类都为17种,酶解前游离氨基酸总量为2.642mg/mL,酶解后为12.905mg/mL,增加了184.88%;在美拉德反应中对海鲜味产生贡献的谷氨酸、甘氨酸和精氨酸含量丰富,都超过1mg/mL。所以,紫贻贝蛋白酶解液可进一步用于制备海鲜味香精。

参考文献:

- [1] 宋宏霞. 紫贻贝(*Mytilus edulis*)抗菌肽的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [2] 刘志峰, 李桂生, 李萍, 等. 贻贝提取物抗高血脂作用的观察[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(6): 9-10.
- [3] ZHU Haibo, GENG Meiyu, GUAN Huashi. Antihypertensive effect of D-polymannuronic sulfate and its related mechanisms in renovascular hypertensive rats[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2000, 21(8): 727-732.
- [4] 王俊. 厚壳贻贝多糖 MPs 分离纯化、理化性质与立体结构测定及生物学活性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2006.
- [5] 姚滢. 东海厚壳贻贝多糖的分离提纯和免疫学活性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2005.
- [6] 赵玉红, 孔保华. 鱼蛋白水解的研究进展[J]. 肉类工业, 2000(3): 31-34.
- [7] 庆宁, 林岳光, 金启增. 翡翠贻贝软体部营养成分的研究[J]. 热带海洋, 2000, 19(1): 81-84.
- [8] 刘志峰, 李桂生. 紫贻贝营养成分的分析及重金属的检测[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2002, 15(2): 147-150.
- [9] 章超桦, 洪鹏志, 邓尚贵. 翡翠贻贝肉的食品化学特性及其在海鲜调味料的应用[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 267-270.
- [10] 邱春江. 在不同贮藏条件下生化特性、保鲜及酶解研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [11] 朱志伟, 曾庆孝, 吴小勇. 翡翠贻贝的酶法水解工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(10): 41-44.
- [12] 邓尚贵, 章超桦, 黄晋. 翡翠贻贝双酶水解法的建立[J]. 水产学报, 2000, 24(1): 72-75.
- [13] 毋瑾超, 汪依凡, 方长富. 贻贝酶解降压肽的降压活性及其安全性评价[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 648-652.
- [14] 张艳萍, 戴志远, 张虹. 紫贻贝酶解物中降压肽的超滤分离[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 46-51.
- [15] 刘尊英, 董士远, 曾名勇, 等. 紫贻贝酶解产物抗菌活性及其工艺优化研究[J]. 食品科技, 2007, 32(2): 145-146.
- [16] 张水华. 食品分析实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 47-49.
- [17] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 22-23.
- [18] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 15(11): 65-67.
- [19] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642-646.
- [20] ADLER-NISSEN J. Enzymatic hydrolysis of food proteins[M]. Maryland: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 12-14.
- [21] 周存山, 马海乐, 胡文彬. 条斑紫菜多糖提取工艺的优化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(9): 194-197.
- [22] BENJAKU1 S, MORRISY M T. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1997, 45(9): 3423-3430.