

酶法水解鲢鱼蛋白及其 水解液合成酱类香味料的研究

(华南理工大学食品与生物工程学院,广州 510640)
(广州香怡食品添加剂有限公司)

刘通讯 李媛 王永江
林勉

摘要:以内切酶和外切酶对鲢鱼蛋白进行了分步水解,得到较高水解度的水解蛋白,并以该水解物为原料,利用美拉德反应制取酱类香味料。结果表明,经酶解后的水解液能获得理想的酱类香味料,从而大大提高了水解动物蛋白的使用价值。

关键词:鲢鱼,水解,酱类香味料

Abstract: Silver carp protein was hydrolyzed by the combination of endo-peptidase and exopeptidase to obtain high DH hydrolysates, then generation of sauce flavor from the hydrolysates through Maillard reaction was studied. The results showed that the hydrolysates could successfully produce perfect sauce flavor, which greatly improved the value of HAP.

Key words: silver carp; enzymatic hydrolysis; sauce's flavor

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2004)09-0086-03

酱油等传统调味品在我国食品工业中占有相当重要的地位,但多年来酱油的生产均采用大豆、花生等植物原料,主要的鲜味添加物是味精,而 I+G 主要用于一些高档酱油等调味品中。在发达国家,利用多种来源的动物水解蛋白开发的调味品在整个调味品市场中占有相当大的比例,接近 50%,已经改变了传统以味精为主的结构。因此,开发以动物蛋白为主的氨基酸类高档调味品是调味品发展的主要趋势之一。为此,本文研究鲢鱼蛋白的酶法水解及其水解物合成酱类香味料的工艺条件,为淡水鱼和水解动物蛋白的加工利用开拓新用途。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

收稿日期: 2004-01-04

作者简介: 刘通讯,男,硕士生导师,研究方向:粮食、油脂蛋白质化学与工程。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(编号:031348)。

鲢鱼 市售鲜活鲢鱼,实验前去头、去内脏、去鳞、采肉以备用;**酶制剂** 由 NovoNordisk 提供,Alcalase(A)2.4AU/g,Neutrane(N)0.5 AU/g,Flavorzyme (F)1000LAPU/g,Kojizyme (K)800 LAPU/g,Trypsin(T)350FIPU/g。

JJ 电子天平 常熟市双杰测试仪器厂;**HHS4 型电热恒温水浴锅** 上海浦东跃欣科学仪器厂;**KDN-04A 定氮仪** 上海新嘉电子有限公司;**Waters 高效液相色谱仪、PICO.TAG 氨基酸分析柱** 美国;**高压杀菌锅** 上海申安医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 鲢鱼酶法水解工艺流程 鱼肉→捣碎→加入等量的水→加内切酶水解→加外切酶水解→灭酶→除渣→离心分离→水解液

1.2.2 美拉德反应合成酱香料 取自制酶解液 50mL,按设计配比加入各种材料,搅拌均匀,调 pH 后置于 200mL 玻璃瓶中,密封,于高压杀菌锅中进行热处理。

1.2.3 测定方法

1.2.3.1 鱼肉蛋白测定 微量凯氏定氮法^[1]。

1.2.3.2 水解度 DH 的测定 以水解液中氨基态氮^[1]与总氮的百分比计。

1.2.3.3 水解物氨基酸分析 采用美国 Waters 高效液相、PICO.TAG 氨基酸分析柱,条件为:38℃,254nm 检测波长,流速为 1mL/min。

2 结果与分析

2.1 鲢鱼蛋白的酶法水解

在各种不同水解条件下,鲢鱼蛋白的水解度 DH 变化情况如表 1 所示。

2.1.1 预处理对水解度的影响 由表 1 可知,经加热(100℃,10min)或冷冻预处理(-18℃,24h)的样品其 DH 值上升较缓慢,最终 DH 值大大低于新鲜样品,

表 1 不同水解因素对 DH 值的影响 (pH6, 50°C, 100g 原料+100g 水)(%)

水解因素	原料	水解时间(h)					
		2	4	7	10	12	24
0.1gA	鲜鱼	9.92	14.06	15.28	17.12	18.02	
	热处理	6.17	7.86	8.96	10.41	11.11	
	冷冻处理	7.21	9.02	10.33	11.42	12.03	
不同内切酶水解							
0.1gA	鲜鱼	9.92	14.06	15.28	17.12	18.02	
0.1gN	鲜鱼	9.78	12.51	15.77	16.48	17.03	
0.1gT	鲜鱼	7.37	8.79	11.9	12.47	13.49	
不同比例 A:N							
0.1gE (A:N=2:1)	鲜鱼	9.34	15.31	18.66	21.05	22.16	
0.1gE (A:N=1:2)	鲜鱼	8.86	14.58	17.13	18.18	18.79	
0.1gE (A:N=1:1)	鲜鱼	6.47	13.79	17.68	19.03	20.21	
2h 后加入 F 和 K A:N=2:1							
0.10g F	鲜鱼	9.34	25.02	31.98	33.87	34.91	40.11
0.10g K	鲜鱼	9.34	24.16	33.69	38.46	39.34	48.89
0.15g K	鲜鱼	9.34	24.89	35.16	40.01	41.17	49.21
0.20g K	鲜鱼	9.34	30.88	37.08	42.42	45.75	53.16
0.1g E (A:N=2:1) +0.1gK							
0.02%Nisin	鲜鱼	9.34	31.04	40.77	44.75	48.58	50.22
5%NaCl	鲜鱼	9.34	29.02	33.82	35.19	36.17	40.25
10%NaCl	鲜鱼	9.34	25.12	29.18	33.69	34.01	37.55
5%酵母	鲜鱼	9.34	34.97	42.84	48.59	53.14	57.92
8%酵母	鲜鱼	9.34	31.12	40.17	44.58	49.1	52.18
空白对照	鲜鱼	9.34	24.16	33.69	38.46	39.34	48.89

这说明鲢鱼蛋白的预处理不利于酶水解,这与植物蛋白需要适当变性才能提高水解度的情况相反^[2]。原因是鱼蛋白以 SH 基为主,加热或冷冻等预处理使分子间或分子内的二硫键交联,致使结构变得更紧密,酶解位点也被包埋,同时也与鱼肉内源酶在预处理过程中失活有关。

2.1.2 内切酶水解鱼蛋白 在单酶水解实验中,碱性内切蛋白酶和中性蛋白酶的水解速度较快,水解液苦味较小,其 DH 值大于胰酶作用的水解液。从经济和水解效果考虑,选用微生物来源的两种蛋白酶: Alcalase 和 Neutrase 较合适。由于这两种蛋白酶的作用位点及专一性不同,两者以不同比例复合水解时,效果不同,由表 1 可知,比例为 2:1 时水解液 DH 值较大,水解效果最好。

2.1.3 外切酶水解 由于碱性蛋白酶和中性蛋白酶均为内切酶,仅作用于蛋白质分子内部生成肽、肽、多肽等小分子物质,最终氨态氮得率低,且风味差,因此有必要采用外切酶进行进一步水解。Flavourzyme 与 Kojizyme 都能从 N 端或 C 端水解下单个氨基酸,但底物位点有所不同。Kojizyme 作用的水解液 DH 值较 Flavourzyme 大,且随酶用量增加, DH 逐渐提高。因此, Kojizyme 更适合与内切酶协同水解,且价格较低。因此,本实验在内切酶水解 2h 后添加 0.1% 的 Kojizyme 进一步水解。

2.1.4 防腐剂对水解度的影响 酶解过程中不断释放出氨基酸,为微生物繁殖提供了良好的生长基料。此外,还有生物氨,如三甲氨、硫化物等恶臭物质随

之一起释放出来,造成了水解液的腐败变质,风味变差。因此,有必要添加合适的防腐剂。NaCl 和 Nisin 都具有防腐效用,但前者对酶蛋白有抑制作用,降低了水解液的 DH 值;而 Nisin 是一种高效、无毒的天然食品防腐剂,能有效抑制革兰氏阳性菌的生长繁殖,且对 DH 值无任何影响。利用 Nisin 对水解液进行防腐具有较好的前景。

2.1.5 酵母对酶解的影响 由于鱼酶解液中不良的苦味和腥味,大大抑制了它在食品工业中的应用。基于此,本实验在使用内切酶水解 2h 后,同时加入一定量的酵母和 Kojizyme。由于酵母含有丰富的蛋白质、氨基酸和酶系统(如蛋白酶、脂肪酶、乳糖酶等),不仅能进一步提高鲢鱼蛋白的水解度,还大大改善了水解液的风味。由表 1 可知,5% 的酵母对 DH 的影响最大,感官分析也表明该水解液中的苦味和鱼腥味大大降低。这与文献报道的活性酵母或酵母中抽提出的酶系能完全去除鸡蛋白水解液中的苦味肽相一致^[3,4]。同时,酵母自溶物中含有丰富的小肽、氨基酸、维生素 B₁ 和 I+G 等,又可为下一步的 Maillard 反应提供很好的前体物质。

2.1.6 酶解条件优化 综合上述单因素实验,最佳酶解条件为: 鱼肉加等量水,以 0.02%Nisin 为防腐剂, pH6, 50°C 下用 0.1% 内切酶 (A:N=2:1) 水解 2h, 再用 0.1% 的 Kojizyme 和 5% 酵母继续水解 22h。在此条件下,其氨基酸组成如图 1。24h 后,水解液中游离氨基酸含量接近 60%,且 8 种必须氨基酸占总氨基酸含量的 54.36%。水解过程中,酵母、防腐剂 Nisin

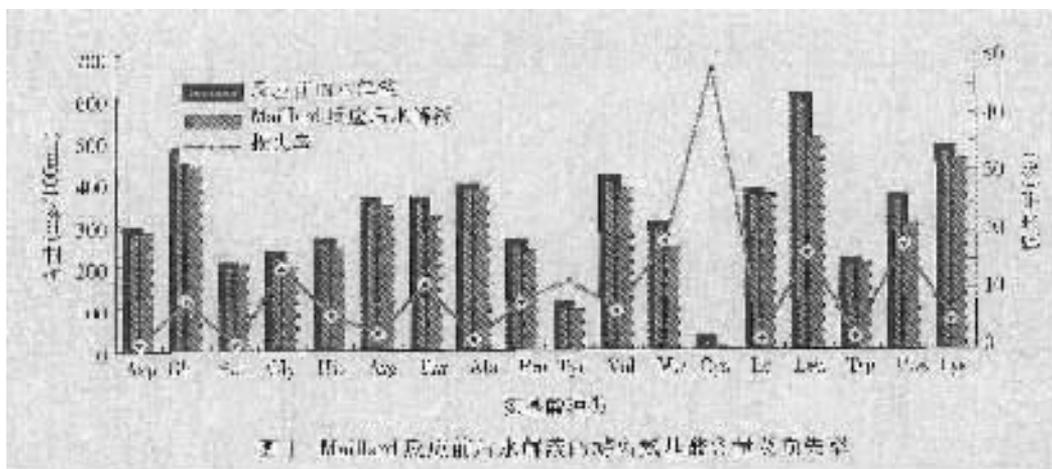


图1 Maillard反应前后水解液内游离氨基酸含量及损失率

的使用大大减少了水解液的腥、苦等不良风味。

2.2 美拉德反应酱类香味料的制备

近年来,我国已有不少采用海产品制作调味品的报道,如利用虾皮^[5]、鱼肉^[6]、螺蚌^[7]等动物原料生产海鲜酱油等,但市场上所见到的高档鲜味酱油却很少,多是日本进口的小包装产品,价格昂贵。为此,本实验在前期研究的基础上^[8],采用2.5%的复合还原糖(木糖:葡萄糖=1:20),将各实验配料与自制水解液均匀混合后,在pH5下进行美拉德反应,结果如表2所示。

表2 反应条件对氨基酸损失及风味的影响
(2.5%还原糖;木糖:葡萄糖=1:20,pH5)

美拉德反应条件	氨基酸	风味描述
温度(°C) (20min)	108	5.63 无特征酱香
	115	7.86 弱酱香,略有烤肉香
	120	8.27 酱香最强
时间(min) (120°C)	10	7.75 酱香不明显,鲜味突出
	20	8.26 酱香最强,略有鲜味
	30	11.8 酱香明显,略有焦糖香,无鲜味
乙醇(20min, 120°C)	0.10%	8.26 弱酱香,香味单纯
	0.20%	8.65 酱香浓郁,醇厚
	0.30%	9.42 酱香较浓,略有苦味和酸味
蒜粉(20min, 120°C)	0.10%	7.58 酱香醇厚
	0.20%	7.92 酱香较好,略带蒜味
	0.35%	8.28 酱香微弱,蒜味增强
胡椒粉(20min, 120°C)	0.02%	8.04 酱香浓厚
	0.05%	8.73 酱香稍弱,略有椒香
	0.10%	9.27 酱香微弱,椒香增浓

由表2的单因素实验总结出美拉德反应制取酱味料的最佳工艺为:2.5%的复合还原糖(木糖:葡萄糖=1:20)与0.2%乙醇,0.1%蒜粉,0.02%胡椒粉混合于120°C下热处理20min,最终得到了酱香浓郁、鲜味醇厚的调味料。通过氨基酸分析得出反应前后游离氨基酸损失率为8%(图1)。由图知,Cys损失最多,其次为Met、Phe、Leu、Tyr、Gly等,这说明本反应体系中,参与酱香形成的主要是含硫氨基酸和疏水性氨基酸。此外,体现水解液鲜味的谷氨酸、天冬氨酸损失较小,且反应后水解液中的鱼腥味完全去除,这可

能是鱼腥味的主要成分三甲氨也参与了Maillard反应的结果。

3 结论

综上所述,联合使用内切酶和外切酶可以使鱼蛋白深度水解,24h后,水解液中游离氨基酸含量接近60%,且8种必需氨基酸齐全,占总氨基酸含量的54.36%,具有较高的营养价值。水解过程中酵母、防腐剂Nisin的使用大大减少了水解液的腥、苦等不良风味。而Maillard反应不但可以完全去除原水解液中的鱼腥味,而且可增加呈味氨基酸和海鲜特有的鲜香味,从而成功地开发出高档次的鱼鲜酱油。该产品具有以下特点:a.大大改善了大豆发酵或化学分解酱油中氨基酸的平衡程度,使产品氨基酸达到动物完全蛋白质的要求;b.赋予产品特有的海鲜香味,提高产品档次和市场价值。因此鱼蛋白酱油的开发不仅拓宽了低值鱼的利用价值,而且弥补了我国高档酱油的不足。

参考文献:

- [1] 黄伟坤等编.食品检验与分析[M].北京:中国轻工业出版社,1993.
- [2] 刘通讯,朱小乔,杨晓泉.多酶协同作用生产大豆多肽的研究[J].食品科学,2002,16(1):22~25.
- [3] 刘通讯,林勉,杨兰.鸡酶解液中苦味肽的提取及微生物法脱苦的研究[J].食品科学,1999(10):10~12.
- [4] Thibault P A, et al. Process for debittering of protein hydrolysates and the products so produced[P]. French Patent and Application,1989,FR2625~651.
- [5] 孙俊华,等.虾味酱油的研制[J].中国调味品,1997(9):11~12.
- [6] 迟玉森,等.鱼鲜酱油制作工艺研究[J].中国调味品,1996(5):15~17.
- [7] 王建军,等.利用扇贝裙边提取风味料的研究[J].中国调味品,1995(2):8~10.
- [8] 刘通讯,吴肖,林勉.花生粕蛋白酶解液Maillard反应合成肉类香味料的研究[J].食品科学,2001(4):25~27.