

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0268 - 05

营养鲜味剂的研制

许学书, 王宏, 周家春, 魏东芝

(华东理工大学生物反应器国家重点实验室, 上海 200237)

摘要:通过酶法水解将小梅鱼制备成营养型高档调味剂.用酶对小梅鱼进行水解,结果表明温度、pH、酶的种类、酶的组合、酶添加的顺序对产物的分布有影响.在初始 pH 值为 8,温度为 50 ℃ 时,胰酶水解产物中小分子产物含量较高.胰酶的水解产物用微生物风味复合酶进一步酶解,可脱除苦味.对产物进行氨基酸分布检测,结果显示,产物中含 18 种氨基酸,总氮质量分数为 126.4 mg/g(以 N 计), α -氨基氮质量分数为 60.8 mg/g.

关键词:鲜味剂;酶;水解;鱼

中图分类号:TS 201

文献标识码:A

Preparation of Nutrient Flavor

XU Xue-shu, WANG Hong, ZHOU Jia-chung, WEI Dong-zhi

(Chemical Engineering Research Center ECUST, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Seven proteases (from different resources: animal, plant and microorganism) and their variant combinations were evaluated for hydrolysis of small miscellaneous fish according to different analysis results. The results showed that reaction temperature, different enzyme, their different combinations, and order of enzyme adding had effects on the product distribution. The optimal combination for the highest yield, good taste, and economy was Pancreatin and Flavourzyme. The optimal hydrolytic conditions for the purpose of highest yield were pH 8 and 50 ℃. The product was dried into powder as a flavor-adjusting agent. Eighteen amino acids were contained in the flavor powder with 126.4 mg/g of total nitrogen, and 60.8 mg/g of α -amino nitrogen.

Key words: flavor; enzyme; hydrolysis; fish

味精是第一代鲜味剂,为单一氨基酸,从营养平衡的观点看,过多地摄入某一种氨基酸会阻碍其它氨基酸的吸收,从而引起营养不平衡,对人体的健康不利,且过多食用会引起口渴.开发新的有利于人体健康的营养鲜味剂是非常必要的.

鱼的营养价值较高,但将鱼粉直接作为调味品,则水溶性不好,以此制成的水溶性调味品,腥味

较重,味道也不鲜.通过生物技术将鱼肉水解,可以保留鱼的营养,更易为人体所吸收.水解液不仅富含各种氨基酸、短肽、核酸、维生素,而且具有一定的保健功能.

Sen 和 Sripathy^[1,2]等曾用木瓜蛋白酶水解海水鱼 *Rastrelliger canagurta* 和淡水鱼 *Barbus car-naticus*,水解产物用于微生物培养. Beak 和 Cadwal-

收稿日期:2002-01-16; 修订日期:2002-03-27.

作者简介:许学书(1949-),女,上海人,工学硕士,教授.

万方数据

lader^[3]曾用 10 种商品酶对小龙虾加工过程中的副产物进行水解,制备调味品.针对国内水产资源特点,作者以低值梅鱼为水解对象,制备营养型调味品.选择来源于动物、植物和微生物的各种酶样进行比较并复合使用,在温度和 pH 对水解的影响等方面进行了研究.

1 材料与方法

1.1 材料

原料:小梅鱼,宁波润发冻品有限公司提供.

酶:微生物碱性内切蛋白酶(Alcalase)、微生物中性内切蛋白酶(Neutrase)、微生物复合蛋白酶(Protamex)、微生物复合风味蛋白酶(Flavourzyme)、木瓜酶-植物蛋白酶(Papainase)和胰酶-动物蛋白酶(Pancreatin),分别由 Novo 公司和浙江金华宝键生化厂提供.核酸酶(Nuclease),实验室自制.

1.2 仪器

UV-754 型紫外可见分光光度计,上海第三分析仪器厂产品;凯氏定氮仪,上海玻璃仪器厂产品;300 型氨基酸分析仪,Beckman 公司产品.

1.3 原料预处理及酶解

将杂鱼去头、去内脏后用水洗净,沥水后称重,100 g 鱼加水 100 mL,煮沸 5 min,冷却后用组织捣碎机打成浆状,置冰箱备用.

将鱼浆的 pH 值和温度调至酶解反应所需条件,按比例加入酶.恒温,搅拌反应至预定的时间,再加入第二种酶,酶解完毕,煮沸灭酶,过滤,取清液分析.

1.4 分析方法

总氮:凯氏定氮法;氨基氮:甲醛法;清液中蛋白质和核酸及其水解产物:紫外吸收法(280 nm 和 260 nm);清液中蛋白质和三肽以上多肽:双缩脲法(540 nm);浊度:可见光吸收法(640 nm);苦味:感官评定法^[4].

2 结果与讨论

2.1 原料分析

将去头、去内脏的杂鱼,用组织捣碎机打成浆状,经测定,鲜鱼中总固形物质量分数为 186 mg/g,总氮质量分数 204 mg/g, α -氨基氮质量分数为 1 mg/g,灰分为 0.372 mg/g.

2.2 酶的筛选

由于各种酶的最适宜反应温度不同,需同时考虑 50℃和 60℃的反应状况,以酶解 16 h 的反应结

果作为评价标准.按照供应商建议的酶用量加入酶,分别测定 $A_{260\text{ nm}}$ 值、总氮及氨基氮质量浓度(AN)结果见表 1.

表 1 不同酶的水解结果

Tab.1 The results for different enzymes

酶	$A_{260\text{ nm}}$		TN/(mg/mL)		AN/(mg/mL)	
	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
Papainase	0.432	0.408	18.23	17.01	3.65	3.69
Pancreatin	0.494	0.403	22.62	17.42	6.03	4.2
Alcalase	0.379	0.399	16.04	18.00	3.96	3.83
Protamex	0.360	0.398	15.06	16.26	3.83	3.25
Neutrase	0.350	0.361	13.9	13.48	1.69	2.13

表 1 中 TN 表示反应后清液中总氮的质量浓度,TN 越高,得率越高;AN 表示氨基氮的质量浓度.表 1 的结果表明,50 °C 下用 Pancreatin 水解的总氮、氨基氮质量浓度都明显高于其他各组实验.比较 50 °C 和 60 °C 下反应的结果,Alcalase 和 Protamex 在 60 °C 下反应所得的清液中总氮比 50 °C 下反应的高,Papainase 和 Neutrase 在 60 °C 下反应所得的清相氨基氮比 50 °C 下反应的高.可见不同的酶在不同的温度下所得产物的分布是不同的.

图 1 是各组实验的 AN/TN 值.AN/TN 表示总的蛋白质中氨基酸所占的比例,也可粗略表征水解物的平均肽段大小,AN/TN 值越大,平均肽链越短.从图 1 可明显看出用 Alcalase、Pancreatin 和 Protamex 在较低温度下反应所得的小分子产物较多.而用 Papainase 和 Neutrase 在较高温度下反应所得的小分子产物较多.50 °C 下用 Pancreatin 水解的 AN/TN 值最大.可见对于不同的酶,温度对产物分布的影响是不同的.50 °C 下用 Pancreatin 水解的 AN/TN 和 TN 的值最大,即得率最高,产物肽链最短,水解程度最高.

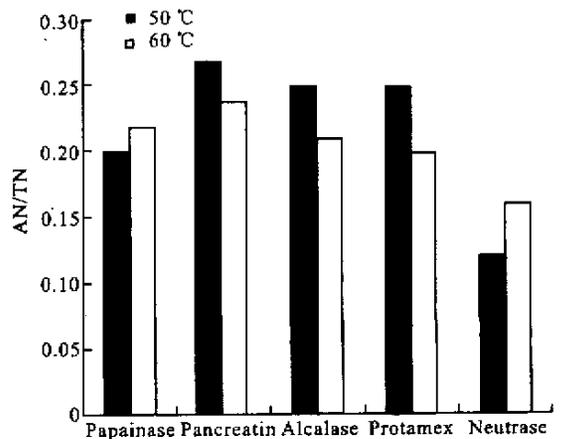


图 1 不同酶在不同温度下水解的 AN/TN

Fig. 1 AN/TN for different enzymes hydrolyzed at 50 °C and 60 °C

用不同酶水解所得产物的苦味程度依次为：

Papainase > Alcalase > Pancreatin > Protamex > Neutrase

综合鲜鱼蛋白质自解与酶解等因素, Neutrase 水解产物的口味较好, 但 Neutrase 水解得率太低. Pancreatin 在 50 °C 下的反应, 得率高, 肽链短, 但带苦味. 苦味通常由苦味肽引起, 与酶的作用位置有关, 用其他合适的酶进一步水解, 有可能脱除苦味.

2.3 酶的组合

通常认为对于大分子底物的水解用多种酶的组合效果较好, 各种酶有不同的作用部位, 可使反应后的片断更短, 因此进行了多种组合(第 1 种酶加入 4 h 后加入第 2 种酶), 见表 2.

表 2 酶的组合

Tab.2 The combination of enzymes

实验号	酶	$A_{280\text{ nm}}$	$A_{540\text{ nm}}$	AN/ (mg/mL)	$A_{640\text{ nm}}$
1	Pancreatin + Papainase ¹⁾	0.239	0.789	2.53	0.21
2	Papainase + Pancreatin ²⁾	0.344	0.543	3.18	0.04
3	Papainase + Protamex	0.202	0.756	2.53	0.04
4	Alcalase + Pancreatin	0.252	0.909	4.02	0.65
5	Alcalase + Protamex	0.380	1.054	3.37	0.74
6	Pancreatin + Protamex	0.365	1.117	3.11	1.05
7	Protamex + Nuclease + Flavourzyme	0.343	0.338	1.56	1.10
8	Pancreatin + Neutrase + Flavourzyme	0.288	0.494	5.49	0.07
9	Protamex + Neutrase	0.228	0.530	2.43	0.07
10	Protamex + Neutrase + Flavourzyme	0.230	0.468	2.85	0.09
11	Pancreatin + Flavourzyme	0.467	0.328	5.78	0.02

注: 1) 为先加 Pancreatin 后加 Papainase, 2) 为先加 Papainase 后加 Pancreatin.

但从结果看, 对比单一酶的作用, 除第 5、7 和 11 组实验的组合外, 其余多酶组合比使用一种酶的得率低. 由于蛋白质水解反应体系中含多个平行反应, 反应的速率不但与底物的总浓度有关, 还与各底物之间的比例有关, 采用不同的酶组合会使反应体系中的各不同片断间的比例发生变化, 从而影响

总反应速率, 这是一些组合酶的作用比单一酶差的原因之一. 此外不同来源的酶(动物酶、植物酶和微生物酶)之间是否存在相互切割、相互抑制的作用尚需进一步研究. 从第 1 和第 2 组实验判断, 酶的添加顺序对产物的分布和得率也有影响. 第 11 组实验, 先用 Pancreatin, 后用 Flavourzyme, 清液中相 280 nm 的吸收值(即氨基氮质量浓度)最高, 双缩脲反应的吸收值和混浊度最低, 是其中水解程度最高的. 该组实验得率达 95%, 水解液中 AN/TN 达到 0.566.

2.4 pH 对胰酶反应的影响

图 2 为不同 pH 条件下用 Pancreatin 水解的结果. 可见, 除双缩脲反应的检测之外, 其余分析结果都表明 pH 为 8 时的反应结果较好. pH 为 8 时双缩脲反应的吸收值较高有两种可能性, 一是该酶水解大分子蛋白质的速度快, 使清液中的大分子肽浓度较高; 二是该酶将清液中多肽降解成氨基酸的速度慢. 由于 pH 为 8 时实验测得的 260 nm 和 280 nm 的吸收值最高, 故可推知其原因是因为清液多肽的浓度高, 而不是因为肽降解成氨基酸的速度比其他组慢. 还可知 260 nm 与 280 nm 下的吸收值之比在不同的 pH 下略有不同. 如果 260 nm 处的紫外吸收主要取决于核酸类物质浓度, 280 nm 处的紫外吸收主要取决于蛋白质浓度, 则其比值变化说明: 不同 pH 条件下水解产物中核酸类物质与蛋白质类物质的比例是不同的, 因为胰酶是一种粗酶, 含多种活性组分, pH 对不同活性组分的影响是不同的.

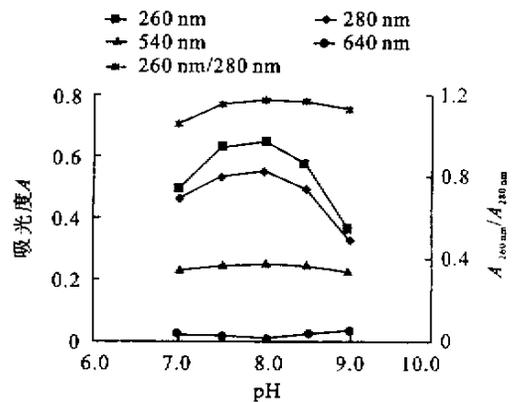


图 2 不同 pH 条件下 Pancreatin 的反应结果

Fig.2 The hydrolysis results by Pancreatin at different pH for 4 h

图 3 为 Pancreatin 在 pH 为 8 时的水解历程. 清液 260 nm 和 280 nm 的吸收值随时间升高, 说明清液中的蛋白质和核酸的水解物含量随反应的进行而升高. 双缩脲反应后 540 nm 下的吸收值随时间先上升后下降, 可见反应初期系统中以蛋白质被切

割成大分子多肽的反应为主,后期反应以清液中
大分子肽被酶水解成短肽和氨基酸的反应为主。
640 nm 的吸光率下降,说明混浊度下降,即溶液中可凝
蛋白质的含量随反应下降。清液中水解产物浓度
高,浊度低表明水解液中可凝蛋白质含量少,产品
水溶性好。

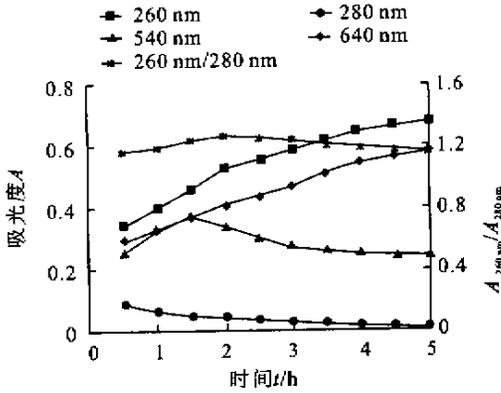


图 3 初始 pH 8 时 Pancreatin 的水解历程

Fig.3 The time course of hydrolysis by Pancreatin at (initial) pH 8

2.5 温度的影响

不同温度下的胰酶失活曲线如图 4 所示。可见
胰酶在 40 °C 下保持 160 min 基本上不失活,实验中
胰酶在 0.2 mg/mL 的质量浓度下可以保持 14 h 不
失活。50 °C 下保持 30 min 活力不变,而在 60 °C 下
30 min 胰酶活力就只有原来的 75% 左右。因此一次
加酶,如不限制时间,则 40 °C 反应也可,但由于 40
°C 仍易染菌,而且反应速度较慢。因此生产中反应
温度选为 50 °C。

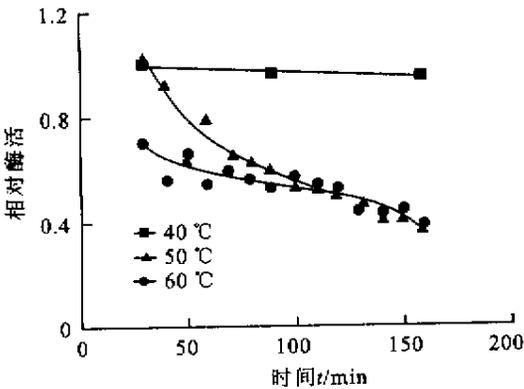


图 4 不同温度下的胰酶失活曲线

Fig.4 The in active curve at different temperature

如果反应速度用单位时间内上清液在 280 nm
处所增加的吸光度表示,则反应初期各温度下的反
应产物质量浓度基本上随时间呈线性增长,用最小
二乘法对各温度下反应初期产物质量浓度的增长
进行回归,可得各温度下产物质量浓度随时间线性

增长的斜率,该斜率代表产物增长的初始速率(见
表 3)。

表 3 不同温度下的反应初速

Tab.3 Initial reaction rate at different temperature

t/°C	反应速度/h ⁻¹	γ ²
40	0.077	0.99
50	0.135	0.99
60	0.189	0.99

2.6 Flavourzyme 反应的时间进程

Flavourzyme 是真菌蛋白酶和肽酶的复合体,含
内切蛋白酶和外切蛋白酶两种活性,可用于脱除低
水解度产物(苦味蛋白)的苦味。

含鲜鱼 50% 的鱼浆用 Pancreatin 水解 4 h 后,
煮沸灭酶后过滤。滤液中加入 0.5% (体积分数)的
Flavourzyme,在 50 °C, pH 6 时进行酶反应。用产物
α-氨基氮的浓度表示反应的进程,结果如图 5 所示。
图中的曲线形状表明反应受底物的抑制。

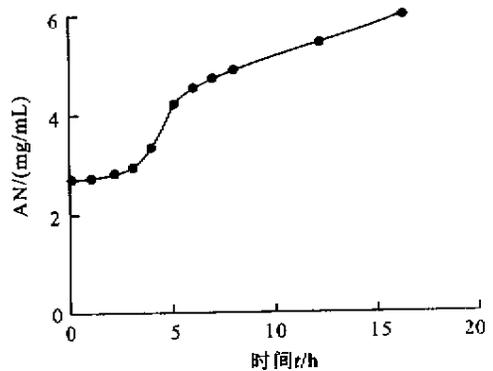


图 5 Flavourzyme 反应的时间进程

Fig.5 The time course hydrolysis by Flavourzyme

2.7 成品

用 Pancreatin 和 Flavourzyme 组合作用的鱼浆
水解液,经过滤,真空浓缩,冷冻干燥成淡黄色粉状
成品。成品在常温下溶解于水,水溶液透明无沉淀。
成品的氨基酸分布如图 6 所示。

成品总氮质量分数为 126.4 mg/g (以 N 计),
α-氨基氮质量分数为 60.8 mg/g, α-氨基氮占总氮的
48% 质量分数。

3 结论

以低值小梅鱼为底物,用 Papainase、Pancreatin、
Alcalase、Neutrase、Protamex 以及它们的各种组合
进行水解。结果表明温度、不同酶的组合、酶的添加
顺序对产物的分布有影响。温度对不同酶作用的产
物分布的影响是不同的。用 Alcalase、Pancreatin 和

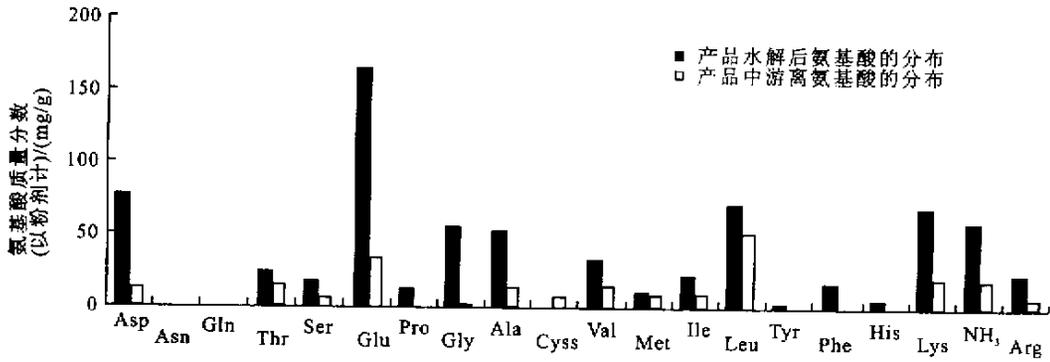


图 6 成品中氨基酸分布

Fig. 6 Distribution of amino acid in product

Protamex 在较低温度下反应所得的小分子产物较多. 而用 Papainase 和 Neutrase 在较高温度下反应所得的小分子产物较多. 在 50 °C 和 60 °C 以及不同 pH 下用 Pancreatin 进行水解, 结果表明, 50 °C 和 pH = 8 的条件较好. 将 Pancreatin 和 Flavourzyme 先

后作用于小梅鱼鱼浆, 制备所得淡黄色粉状营养型调味剂富含 18 种氨基酸, 总氮质量分数 126.4 mg/g, α-氨基氮质量分数为 60.8 mg/g, 在常温下全溶于水, 溶液透明无沉淀.

参考文献:

- [1] SEN D P. Fish hydrolysates[J]. *Food Technology*, 1962, 5:138-141.
- [2] SRIPATHY N V, SEN D P, LAHIRY N L. Fish hydrolysates[J]. *Food Technology*, 1962, 5:141-142.
- [3] BEAK H H, CADWALLADER K R. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products[J]. *Journal of Food Science*, 1995, 60(5):929-934.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.

(责任编辑 杨萌 朱明)

(上接第 267 页)

由此蔬菜混合汁做出的绿色豆腐颜色光亮, 口味清香, 在原有的豆腐味的基础上还带有淡淡的蔬菜味.

2) 经过实验得出胡萝卜汁: 豆乳体积比为 50:250 是最佳工艺参数. 由此蔬菜汁做出的红色豆腐颜色鲜亮, 口味适中, 略带有淡淡的胡萝卜口味.

3) 经过实验得出黑芝麻汁: 豆乳体积比为 50:250 是最佳工艺参数. 由此黑芝麻汁做出的黑色豆腐质地细嫩, 颜色灰黑, 口味同时带有黑芝麻味和豆香味.

4) 3 种彩色豆腐的蛋白质含量基本上与普通豆腐一致.

参考文献:

- [1] 张振山, 方继功. 豆制品食品生产工艺与设备[M]. 北京: 中国食品出版社, 1988. 45.
- [2] 吴嘉根. 谷物与大豆食品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995. 9-12.
- [3] 曾繁坤. 果蔬加工工艺学[M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1996. 21-43.

(责任编辑 李春丽)