

文章编号:1009-038X(2005)01-0059-06

牛肉蛋白水解物的酶解制备

谭斌, 丁霄霖

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用 Flavourzyme 与 Protamex 复合蛋白酶对牛肉进行水解, 并以水解度为指标, 采用响应面分析对其酶解条件进行优化, 建立了一个水解模型, 其最优化条件为: 底物质量浓度 4.8 g/dL, 反应起始 pH 值 7.0, 水解温度 52.5℃, 水解时间 9 h, 在此条件下达到最大水解度 50.65%。并对不同水解度水解产物的游离氨基酸含量进行了分析。

关键词: 牛肉蛋白; 酶解; 响应面分析; 游离氨基酸

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Preparation of Beef Protein Hydrolysates by Enzymatic Hydrolysis

TAN Bin, DING Xiao-lin

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Four commercial proteases were evaluated for hydrolysis of beef protein. Hydrolysis conditions were optimized for the mixture of Flavourzyme and Protamex by response surface methodology(RSM). A model of the degree of hydrolysis (DH) was proposed with substrate concentration(S), pH, temperature(T), and time(t) as the model parameters. Based on the DH model, optimum hydrolysis conditions were determined as follows: substrate concentration of 4.8%, pH 7.0, 52.5 °C, and reaction time of 9 h. The hydrolysis degree of beef protein reached a maximum degree of hydrolysis of 50.65% at the optimum hydrolysis conditions. The free amino acid composition of unhydrolyzed and hydrolyzed beef protein at different DH were analysed.

Key words: beef protein; enzymatic hydrolysis; response surface methodology; free amino acids

目前, 水解蛋白已被广泛应用于食品工业, 水解蛋白由于富含氨基酸、氨基酸钠盐与多肽, 通常还作为鲜味料或通过还原糖发生美拉德反应制备热加工肉类香精。传统的水解蛋白制备方法主要是采用酸或碱进行水解制备水解植物蛋白(HVP)或水解动物蛋白(HAP)。碱水解会对精氨酸、半胱氨酸造成破坏, 同时水解风味较差, 一般不被采用。商业化酸水解通常是用 4~6 mol/L 盐酸在 100~

130 °C 的条件下将蛋白质水解 4~24 h, 然后用 NaOH 进行中和。酸水解法虽然水解效率高, 但很难控制其对反应底物中其他有机物质的水解, 最主要的问题, 一是酸水解法将产生一些氯代醇等致癌物质如: 单氯代丙醇-MCPs(1-氯丙醇, 2-氯丙醇, 3-氯丙醇)、二氯代丙醇-DCPs(2, 3-二氯代丙醇, 1, 3-二氯丙醇)及 2-氯-1, 3-丙二醇与 3-氯-1, 2-丙二醇(MCPDs); 二是导致产品中盐分的质量很高(大

收稿日期: 2004-03-10; 修回日期: 2004-04-26.

作者简介: 谭斌(1972-), 男, 湖南衡东人, 食品科学博士研究生。

约质量分数 40%)。而用蛋白酶催化的蛋白质水解既可以避免产生 MCPDs, MCPs 和 DCPs, 也可以避免在最终产品中钠盐含量偏高, 同时与酸碱水解相比产品颜色更浅, 风味更柔和^[1~5]。因此采用商品化蛋白酶水解已开始逐步取代酸碱水解制备 HVP 或 HAP。随着市场的需求, 蛋白质水解物已逐步成为食品与风味料工业的常用配料。

本研究的目的是以瘦牛肉为底物, 应用商品化蛋白酶水解牛肉制备蛋白水解物作为热加工肉类香精的反应物, 以水解度为主要指标对水解条件进行优化。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Flavourzyme, Protamex, Neutrase, Alcalase 等商品化蛋白酶制剂购于丹麦 Novo 公司; 牛肉: 市购; 其它试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

pH-sc 精密 pH 计: 上海雷磁仪器厂产品; 磁力搅拌器: 上海雷磁仪器厂生产; 强力电动搅拌机: 上海标本模型厂生产; 高速组织捣碎机: 上海标本模型厂产品; CS501 型超级恒温水浴: 上海锦屏仪器仪表公司生产; TU-1800SPC 紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器公司生产; 水分测定仪: Mettler Toledo(梅特勒-托利多)DL31 Karl Fischer Titrator, 瑞士生产; 改良式凯氏定氮仪; 日立 L-8800 型氨基酸分析仪。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理 取一定量的牛肉, 加适量水, 于高速组织捣碎机中经过一定的时间绞肉, 然后直接或经过一定温度的加热处理作为酶解原料。

1.3.2 酶水解工艺 天然的或经加热处理的牛肉蛋白原料配制成一定的底物浓度, 用 3 mol/L HCL 或 NaOH 调溶液 pH 值至酶的最适 pH 值。置于 500 mL 的反应杯中, 采用恒温水浴维持酶的最适反应温度。并用磁力搅拌器或强力搅拌机不停搅拌以保证均匀受热。加入一定量的酶制剂启动水解反应, 在不同的时间取样, 然后用 95 °C 条件 5 min 使酶失活终止反应。水解液经离心以便分析。

1.3.3 水解度的测定——OPA 法 水解度按下式计算:

$$\text{水解度(DH)} = (h/h_{100}) \times 100\%$$

其中: h 为酶水解所释放的游离氨基酸; h_{100} 为酸水解作用测得的原料总游离氨基酸, 肉类一般为 7.6。

$$h = \frac{\text{丝氨酸-NH}_2 - \beta}{\text{万方数据 } \alpha} (\text{meqv/g})$$

$$\text{丝氨酸-NH}_2 = [(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times 0.9516 \text{ meqv/L} \times 0.1 \times 100 / (m \times w)$$

其中: m 为样品质量(g), w 为样品中的蛋白质质量分数(%), 0.1 为样品的体积/L, 肉类的 α, β 分别为常数 1.00 和 0.40, $A_{\text{标准}}$: 典型的 A 标准值为 0.8, 空白 A 值为 0.07^[6~8]。

1.3.4 蛋白酶的种类与所选酶用量的确定 对几种酶的相互组合在给定的条件下(Protamex + Flavorzyme: pH 值 7.5, 50 °C; Flavorzyme + Alcalase: pH 7.5, 50 °C; Flavorzyme + Neutrase: pH 值 7.5, 50 °C)对牛肉水解能力进行比较, 加酶量均为质量分数 3%, 水解时间为 4 h。

1.3.5 水解条件的响应面法优化实验 在预实验的基础上, 采用 F+P 复合蛋白酶 [$m(F) : m(P) = 2 : 1$] 进行水解, 结合生产成本等实际情况, 先固定酶水解的加酶质量分数为 1.5%, 然后采用响应面方法(RSM)以水解度(DH)为指标对底物浓度(S, X_1)、反应起始 pH 值(X_2)、反应温度(T, X_3)与反应时间(t, X_4)共 4 个主要水解反应参数进行优化, 建立一个二次多项式回归模型^[9~12]。最高的底物浓度的确定以保证有效搅拌的浓度为准, 各反应变量及其实验设计水平编码值见表 1。

表 1 水解因素水平编码

Tab. 1 Independent variables and experimental design levels expressed in coded

编码	底物质量 浓度/(g/dL)	反应 起始 pH 值	反应 温度/°C	时间/min
-2	2	6	40	60
-1	4	6.5	45	180
0	6	7.0	50	300
1	8	7.5	55	420
2	10	8	60	540

1.4 数据统计分析

单因素实验所得数据采用 Excel 处理, 响应面实验所得数据采用 SAS 与 MATLAB 统计分析。

2 结果与讨论

2.1 原料预处理条件

图 1 为不同加热处理条件对捣碎的牛肉原料水解度的影响。由图 1 可知, 在没有经过加热处理, 即在酶水解的合适温度下(50 °C)水解时水解度最大, 随着原料热处理温度的升高, 水解度降低, 说明牛肉蛋白在不同的变性程度时对水解度影响很大,

变性程度过高反而不利于水解.但在 50 ℃ 条件下如果长时间水解,水解液可能发生腐败变质.因此在实际生产当中需根据水解时间长短在保证水解液不变质的条件下适当热处理.

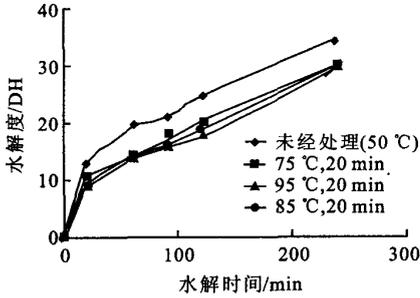


图 1 原料经不同温度热处理的水解进程曲线

Fig. 1 Reaction progress curves for pretreatment of raw beef

2.2 复合酶的水解进程曲线

由于酶反应的专一性,单一酶作用范围小,要想达到较高水解度,本实验采用 F+P, F+A, F+N 3 种复合方式进行水解比较,其结果见图 2. 由图 2 可知, F+P 组合的水解度最大,水解 2 h DH 为

25.58%, 水解 4 h 达到 39.43%. 因此在后面的实验均采用 F+P 复合酶进行水解.

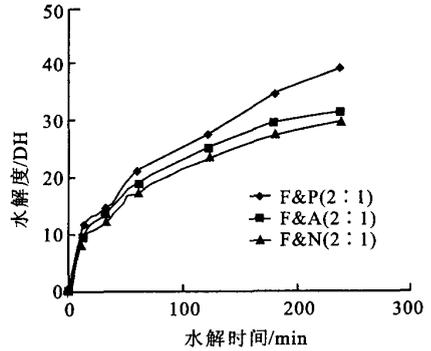


图 2 不同复合酶水解牛肉进程曲线

Fig. 2 Reaction progress curves of different combinations of proteases

2.3 F+P 复合蛋白酶水解牛肉的酶解参数优化

以水解度为指标的 F+P 复合蛋白酶水解牛肉的四因素响应面分析实验设计与结果见表 2, 将两个因素固定在零水平, 然后用水解度与两个不同因素做等值线图(见图 3~5).

表 2 四元二次回归组合设计与实验结果

Tab. 2 Responses of dependent variable to the hydrolysis conditions for F+P

序号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	DH/%	序号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	DH/%
1	-1	-1	-1	-1	23.97	17	2	0	0	0	20.56
2	-1	-1	-1	1	39.74	18	-2	0	0	0	31.33
3	-1	-1	1	-1	24.55	19	0	2	0	0	27.28
4	-1	-1	1	1	39.75	20	0	-2	0	0	30.39
5	-1	1	-1	-1	25.72	21	0	0	2	0	30.40
6	-1	1	-1	1	49.68	22	0	0	-2	0	14.03
7	-1	1	1	-1	19.87	23	0	0	0	2	49.88
8	-1	1	1	1	36.24	24	0	0	0	-2	15.58
9	1	-1	-1	-1	19.29	25	0	0	0	0	34.29
10	1	-1	-1	1	35.07	26	0	0	0	0	33.89
11	1	-1	1	-1	22.21	27	0	0	0	0	33.04
12	1	-1	1	1	40.33	28	0	0	0	0	33.76
13	1	1	-1	-1	25.71	29	0	0	0	0	32.73
14	1	1	-1	1	44.42	30	0	0	0	0	34.01
15	1	1	1	-1	27.82	31	0	0	0	0	34.98
16	1	1	1	1	46.76						

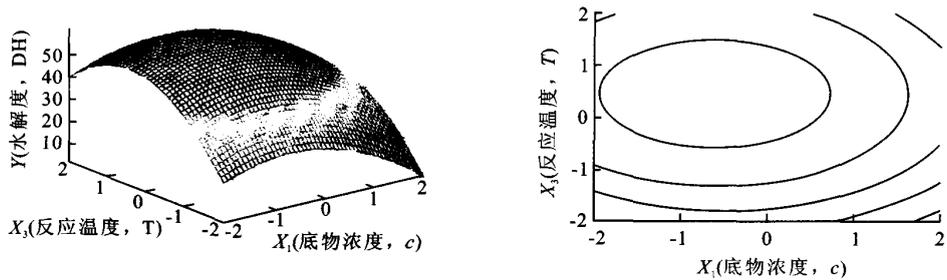
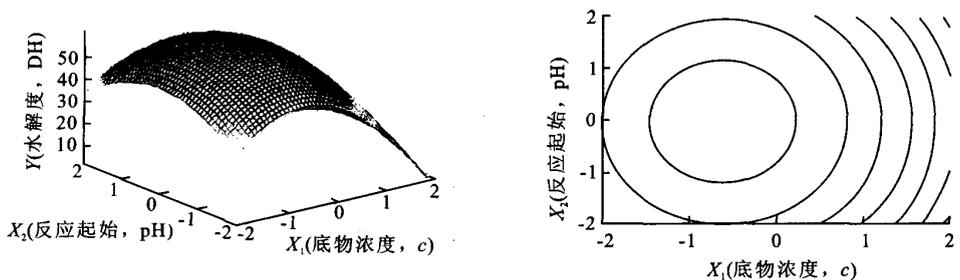
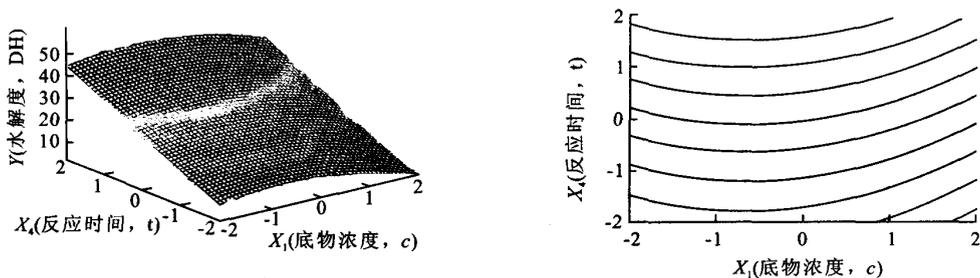
图3 底物质量浓度(X_1)与反应温度(X_3)对水解度的影响响应面图Fig. 3 Response surface plot and contour map for the effects of Substrate concentration(X_1) and temperature(X_3) on DH图4 底物质量浓度(X_1)与反应起始 pH(X_2)对水解度的影响响应面图Fig. 4 Response surface plot and contour map for the effects of substrate concentration(X_1) and initial pH (X_2) on DH图5 底物质量浓度(X_1)与反应时间(X_4)对水解度的影响响应面图Fig. 5 Response surface plot and contour map for the effects of substrate concentration(X_1) and reaction time (X_4) on DH

表3的回归系数与图3~5显示:底物浓度(S , X_1)、反应温度(T , X_3)与反应时间(t , X_4)对水解度具有线性影响;底物浓度与温度具有二次影响;底物浓度与温度对水解度具有交互作用.水解时间的回归系数最大($b=9.051$),是影响水解度的最重要的线性变量.其次是水解温度($b=2.179$),再次是底物浓度($b=-1.878$).删除不显著因子得最佳表达的回归模型为:

$$Y=33.814-1.878X_1+2.179X_3+9.051X_4-1.532X_1^2+4.485X_1X_3-2.464X_3^2$$

通过多元线性回归响应分析得每一个因素的回归万方数据

系数见表3,并得回归模型:

$$Y=33.814-1.878X_1-0.023X_2+2.179X_3+9.051X_4-1.532X_1^2-1.008X_1X_2-0.809X_2^2+4.485X_1X_3+1.052X_2X_3-2.464X_3^2-0.548X_1X_4+0.256X_2X_4+0.214X_3X_4+0.164X_4^2$$

通过参数 R^2 与 F 显著性来确定方程的可靠性.通过SAS软件分析得到的上述模型的 R^2 值与 F 值见表3.由此可以看出该模型的 R^2 为0.8994(>0.85), $F=8.3>F_{0.001}(14,13)=6.33$,说明该模型是可靠的.

表 3 多元线性回归模型系数的 *t* 检验及回归方程显著性分析

Tab. 3 Model coefficients estimated by multiple linear regression for F+P

因子	系数	因子	系数
常数	33.814	交互作用项	
线性项			
S	-1.878*	S×pH	-1.008
起始 pH	-0.023	S×T	4.485
T	2.179**	S× <i>t</i>	-0.548
<i>t</i>	9.054***	T×pH	1.052
二次项		<i>t</i> ×pH	0.256
S ²	-1.532*	T× <i>t</i>	0.214
pH ²	-0.809		
T ²	-2.464**		
<i>t</i> ²	0.164		
R ²	0.8994		
F	8.3		
P>F	0.0002		

注: * 0.1 水平显著性; ** 0.05 水平显著性; *** 0.001 水平显著性; $F_{0.001}(14,13) = 6.33$.

由图 3 可知,在底物为 -1~0,水解温度为 0~1 水解度较大(见图 3),pH 值为 -0.5~0.5 之间水解度较高(见图 4),随着水解时间的延长水解度显著增加,达到最大水解度的时间已经超过实验设计的时间(见图 5),因此考虑结合生产实际与达到尽可能大的水解度,选定水解时间为 2。根据软件分析结果并结合实际得最优化条件见表 4。

表 4 基于实验编码值的优化条件的转化

Tab. 4 Translation of experimental code to real value of the optimum conditions

因素	编码值	实际值
X ₁	-0.6	4.8
X ₂	0	7.0
X ₃	0.5	52.5
X ₄	2	9.0

根据上述结果确定 F+P 最优化的水解条件为:底物质量浓度 4.8 g/dL(蛋白质含量),反应起始 pH 值 7.0,水解温度 52.5 °C。结合实际需要确定水解时间最优值。为了验证模型的有效性,固定酶水解条件在优化条件下(底物质量浓度 4.8 g/dL,反应起始 pH 值 7.0,温度 52.5 °C),在水解时间分别为 1,5,9 h 进行验证实验,其结果见表 5。表 5 表明,预测值与验证实验的实测值非常接近。

表 5 验证实验的预测值与实测值

Tab. 5 Predicted and observed values in the validation experiments

水解时间/h	水解度/%	
	预测值 ^a	实测值 ^b
1(-2)	15.40	16.64±1.24
5(0)	33.51	34.62±1.11
9(2)	51.61	50.65±0.96

注: a. 根据所建模型计算的预测值; b. 3 个水解实验样品的平均值

2.4 氨基酸组成分析

表 6 为未水解牛肉与不同水解度牛肉蛋白水解物的氨基酸组成。

表 6 未水解牛肉与不同水解度牛肉蛋白水解物的氨基酸组成分析

Tab. 6 Amino acid composition of unhydrolyzed and F+P-hydrolyzed beef protein

氨基酸	未水解牛肉的总氨基酸质量分数 ^a	不同水解度下游离氨基酸 ^b 质量浓度/(mg/mL)			
		12% ^c	24%	35%	43%
Asp	1.55	0.059	0.374	0.955	1.33
Thr	0.702	0.769	2.05	3.19	3.51
Ser	0.561	0.268	0.858	1.42	1.35
Glu	2.93	0.163	0.821	2.07	2.81
Gly	0.861	0.077	0.25	0.60	0.976
Ala	1.04	0.352	1.01	1.91	2.50
Cys	0.043	0.117	0.209	0.353	0.483
Val	0.871	0.757	1.67	2.47	2.64
Met	0.46	0.407	1.03	1.45	1.54
Ile	0.817	0.664	1.31	1.98	2.34
Tyr	0.573	0.712	1.52	1.67	1.58
Phe	0.712	1.25	1.99	2.10	2.31
Lys	1.56	0.827	2.49	3.90	4.46
His	0.586	0.203	0.618	0.996	1.21
Arg	1.10	0.801	1.81	2.25	0.00
Pro	0.694	0.00	0.00	0.00	0.00
Leu	1.47	1.85	3.52	4.37	4.52
Total	16.53	9.28	21.5	31.7	33.5

注: a: mg/100mg 牛肉原料 b: mg/mL 牛肉蛋白水解液 c: 水解度(%)。

可以看出,未水解牛肉中谷氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、精氨酸与缬氨酸为其主要的氨基酸,其数量占氨基酸总量的 58% 以上。因为牛肉蛋白在

水解前后的总氮含量是不变的,因此采用游离氨基酸的组成与含量来确定与评价由于蛋白酶水解所释放的氨基酸的种类与含量.游离氨基酸决定着水解物的风味特征,同时游离氨基酸在加工风味料制备过程中比多肽更易发生美拉德反应^[13].在几个不同水解度的样品中,含量较丰富的几种游离氨基酸的为亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸等,显然同于完整蛋白的主要氨基酸含量,而且这个顺序随着水解度的变化并不改变,说明水解过程中所释放的疏水性氨基酸比亲水性氨基酸的数量多.从表6中还可以看出,释放的游离氨基酸中半胱氨酸与蛋氨酸的含量较少,说明水解蛋白中游离的含硫氨基酸的含量非常低.4个样品中总的游离氨基酸的含量与水解度(DH%)之间存在显著的正相关($Y =$

$0.8109X + 0.8849$, $R^2 = 0.9621$).游离氨基酸的分布将影响水解蛋白的风味与可直接参与氨基酸—还原糖反应形成挥发性风味化合物的氨基的数量^[2,13].

3 小 结

1) 采用 Flavourzyme 与 Protamex 复合蛋白酶可制备高水解度的牛肉蛋白水解物,在优化的条件下水解度可达到 50.65%.

2) 水解物中游离氨基酸的含量与水解度(DH%)之间存在显著的正相关($Y = 0.8109X + 0.8849$, $R^2 = 0.9621$).

参考文献:

- [1] Alder-Nissen J. Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins[M]. London: Elsevier Science Publishing Co, 1986.
- [2] Georgios L. Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: Chemical composition and nutritive value[J]. *J Agric Food Chem*, 1978, 26(3): 751—756.
- [3] Tang S, Hettiarachchy N S, Horax R, *et al.* Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes[J]. *Food Chemistry And Toxicology*, 2003, 68(1): 152—157.
- [4] Qi M, Hettiarachchy N S, Kalapathy U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin[J]. *J Food Sci*, 1997, 62(6): 1110—1114.
- [5] 谭斌, 曾凡坤, 吴永娟. 花生蛋白肽的酶法水解工艺研究[J], *食品与机械*, 2000, (3): 14—17.
- [6] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C. Improved methods for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *J food Sci*, 2001, 66(5): 642—646.
- [7] Church F, Swaisgood H E. Spectrophotometric assay using O-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins[J]. *J Dairy Sci*, 1983, 66: 1219—1227.
- [8] M P C. Silvestre review of methods for the analysis of protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 1997, 60(2): 263—271.
- [9] Mullen K, Ennis D M. Rotatable designs in product development[J]. *Food Technology*, 1979, (8): 74—80.
- [10] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002.
- [11] Arzu A, Mayorga H, Gonzalez J. Enzymatic hydrolysis of cottonseed protein[J]. *J Agric Food Chem*, 1972, 20: 805—809.
- [12] Baek H H, Cadwallader K R. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products[J]. *J Food Sci*, 1995, 60(5): 929—935.
- [13] Meara G M, Munro P A. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase[J]. *Meat Science*, 1984, 11, 227—238.

(责任编辑: 杨 萌)