

鲍鱼下脚料制备海鲜酱汁的酶解工艺优化

Technique optimization on enzymatic hydrolysis of seafood sauce by abalone scraps

郑瑞生 杨莹 朱燕汝

ZHENG Rui-sheng YANG Ying ZHU Yan-ru

(泉州师范学院海洋与食品学院, 福建 泉州 362002)

(College of Oceanology and food science, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362002, China)

摘要:以鲍鱼下脚料为主要原料,选用风味蛋白酶与碱性蛋白酶复合酶解制备鲍鱼汁。在单因素试验基础上,通过正交试验优化海鲜酱汁的制作工艺。结果表明,鲍鱼下脚料的最优酶解工艺为:复合蛋白酶添加量 0.2% (其中风味与碱性蛋白酶质量比为 1:2),酶解温度 55℃, pH 8, 时间 5.5 h, 该工艺条件下氨基态氮含量可达 0.198 g/100 mL, 所制作的海鲜酱汁具有独特的海鲜风味, 口感甚佳。

关键词:鲍鱼; 下脚料; 酶解; 海鲜酱汁; 工艺优化

Abstract: Using abalone scraps as the main materials to produce seafood sauce by selecting two kinds of complex enzymes (flavorzyme and alcalase) for enzymatic hydrolysis. Based on single-factor experiments, the orthogonal array design method was employed to optimize the technique of seafood sauce. The results showed that the best enzymatic hydrolysis condition of abalone scraps was achieved: dose of complex enzyme (ratio of flavorzyme to alcalase 1 : 2) 0.2%, the hydrolysis temperature 55℃, pH 8, the hydrolytic time 5.5 h. The content of amino nitrogen was got up to 0.198 g/100 mL in this condition. And the seafood sauce has a unique flavor and good taste.

Keywords: abalone; scraps; enzymatic hydrolysis; seafood sauce; technique optimization

鲍鱼是一种高蛋白、低胆固醇、低脂肪的食物^[1]。随着人们生活水平的提高,鲍鱼的需求量随之上升,市场前景广阔。然而在鲍鱼加工过程中会产生大量下脚料,如鲍鱼内脏,占其软组织重量的 30%~40%^[2],直接丢弃不仅浪费资源,而且还会造成环境污染。

基金项目:泉州市科技计划项目(编号:2013Z42);泉州师范学院青年博士预研基金项目(编号:2015QBJ03);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201510399010);泉州师范学院教改项目(编号:JAX14045);福建省服务海西重点项目(编号:A101)

作者简介:郑瑞生(1979—),男,泉州师范学院副教授,博士。

E-mail: zrs6@163.com

收稿日期:2016-01-02

鲍鱼下脚料富含多糖、矿物质和维生素等营养物质,鲍鱼多糖具有抗肿瘤、增强免疫力、抗氧化等功能^[3-5]。如王莅莎等^[6]提取的鲍鱼脏器粗多糖(AVP)清除羟自由基的 EC₅₀ 强于 Vc, 但还原能力弱于 Vc。伍强等^[7]采用碱性和木瓜蛋白酶分步酶解鲍鱼性腺蛋白制备 ACE 抑制肽, 该工艺需要用滤膜超滤, 制取成本较高。从鲍鱼内脏提取多糖或其它营养元素, 虽能使废弃物得到利用, 但仍面临下脚料综合利用率不高的问题。目前, 市场上的鲍鱼汁大多是通过鲍鱼肉或使用鲍鱼香精来增加鲍鱼风味和香气。一方面, 使用鲍鱼肉直接加工的成本较高, 不利于销售; 另一方面, 鲍鱼香精作为人工增香剂, 相较于原汁原味的鲍鱼汁具有一定的差距, 且不容易被消费者接受。因此, 为提高鲍鱼下脚料综合利用率, 降低鲍鱼汁制作成本, 可利用鲍鱼下脚料制备富含氨基酸和多肽的调味品。如郭芳等^[8]以鲍鱼内脏为主要研究对象, 利用双酶分步水解技术和美拉德反应制备具有海鲜风味的反应型天然调味料, 所制水解液呈浅黄色, 咸味明显; 但氨基酸态氮含量偏低, 鲍鱼固有的鲜味较弱。孙民富^[9]利用鲜鲍经过复合蛋白酶酶解成汁或高压均质细化成汁, 加热浓缩、干燥成固体粉末状调味品。虽鲍鱼调味品已进入工业化生产, 但其加工仍停留于传统调配加工状态, 在加工中选用鲍鱼原料, 增加成本, 同时经过一系列热处理后, 鲍鱼的营养成分势必有所损失, 而对于一些酶解等新型工艺缺乏系统性的研究。因此, 如能综合利用鲍鱼下脚料, 简化酶解工艺, 在提高酶解效率的前提下, 制作味道鲜美、营养价值高的鲍鱼酱汁, 不仅可以避免因丢弃所造成的环境污染问题, 同时还可提高下脚料的利用价值。

本研究拟以皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)下脚料为原料, 通过生物酶降解法, 将鲍鱼下脚料中富含的蛋白质水解成氨基酸, 然后配以各种辅料进行熬煮, 研制一种风味独特, 富含营养的海鲜调味品, 以期作为鲍鱼下脚料的加工再利用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲍鱼:购于泉州市某水产品批发市场。将新鲜的鲍鱼开壳、取肉后,剩下即为其下脚料(包括内脏和裙边),用水冲洗后进行分装(250 g/袋),置于冰箱中冷冻贮藏备用;

木瓜蛋白酶(10 000U/g)、风味蛋白酶(14 000 U/g)、碱性蛋白酶(40 000 U/g):江苏锐阳生物科技有限公司;

食盐、淀粉、白糖、生姜、酱油、香油、料酒、黄原胶、I+G 等:食品级,市售;

氢氧化钠、甲醛:分析纯,广东光华科技股份有限公司;
碳酸氢钠:食品级,广州南先化工有限公司;
柠檬酸:食品级,山东潍坊英轩实业有限公司。

1.2 仪器与设备

智能数显八孔水浴锅:HH-ZK8 型,巩义市予华仪器有限公司;

台式离心机:飞鸽 TDL-40B 型,上海安亭科学仪器厂;
电子天平:JM-B3002 型,诸暨市超泽衡器设备有限公司;

磁力加热搅拌器:CJJ78-1 型,金坛市白塔新宝仪器厂;
pH 计:PHS-3C 型,上海三信仪表厂;
组织捣碎机:JJ-2 型,金坛市白塔新宝仪器厂;
立式压力蒸汽灭菌器:LS-30 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 试验方法

1.3.1 海鲜酱汁生产工艺流程

鲍鱼下脚料→捣碎匀浆→酶解→灭酶→过滤、离心→水解液→加辅料调配→搅拌、均质→装罐→灭菌→成品

1.3.2 海鲜酱汁操作要点

(1) 以鲍鱼下脚料为原料,在前期预试验基础上,原料与水按 1:3($m:m$)混合,放入组织捣碎机中绞碎 10 min,配制样品溶液。

(2) 酶解:加入适量的酶,在合适的 pH 下,酶解一定时间。

(3) 灭酶:放入 100 ℃沸水中灭酶 10 min。

(4) 离心:酶解液于 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液。

(5) 熬煮并拌匀:加入各种调味辅料于酶解上清液中进行熬煮,不断搅拌均质后,文火煮 5 min 至适当稠度。

(6) 装罐:装入 45 mL 旋盖玻璃瓶(在装罐前须对瓶体、瓶盖进行清洗消毒),灌装完后应尽快趁热封口,物料温度保持在 85 ℃以上。

(7) 灭菌、保藏:在温度 110 ℃下,灭菌 30 min,冷却后置于常温下保藏。

1.3.3 氨基酸氮含量测定 按 GB/T 5009.39—2003 执行。

1.3.4 酶解工艺单因素及正交试验设计

(1) 酶制剂的筛选:在预试验基础上,选取木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和碱性蛋白酶作为对象酶,以鲍鱼下脚料浆液为

底物,分别添加用量(以质量分数计,下同)为 0.2%木瓜蛋白酶、0.2%碱性蛋白酶、0.2%风味蛋白酶,以及 0.1%木瓜+0.1%风味、0.1%木瓜+0.1%碱性、0.1%风味+0.1%碱性 3 组复合酶。选择 pH 7(碱性蛋白酶 pH 8.5),温度 50 ℃条件下,酶解时间 5 h。以氨基态氮为评价指标,比较各种蛋白酶及其组合对鲍鱼下脚料水解效果的影响,最终筛选出较优的两种酶制剂。

(2) 复合酶比例对鲍鱼下脚料酶解效果的影响:在酶解温度 50 ℃,pH 8.5,酶解时间 5 h,酶用量 0.2%,分别控制风味与碱性蛋白酶质量比为 3:1,2:1,1:1,1:2,1:3 进行复配,以氨基态氮为评价指标,研究复合酶比例对鲍鱼下脚料酶解效果的影响。

(3) 酶解时间对鲍鱼下脚料酶解效果的影响:在酶解温度 50 ℃,pH 8.5,风味与碱性蛋白酶比 1:1($m:m$),酶用量 0.2%条件下,分别控制酶解时间为 3.0,3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,6.0 h,以氨基态氮为评价指标,研究酶解时间对鲍鱼下脚料酶解效果的影响。

(4) 酶解温度对鲍鱼下脚料酶解效果的影响:在 pH 8.5,酶解时间 5 h,风味与碱性蛋白酶比 1:1($m:m$),酶用量 0.2%的条件下,分别控制酶解温度为 40,45,50,55,60,65 ℃,以氨基态氮为评价指标,研究温度对鲍鱼下脚料酶解效果的影响。

(5) pH 对鲍鱼下脚料酶解效果的影响:在酶解温度 50 ℃,酶解时间 5 h,风味与碱性蛋白酶比 1:1($m:m$),酶用量 0.2%条件下,分别控制酶解 pH 为 6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,以氨基态氮为评价指标,研究 pH 对鲍鱼下脚料酶解效果的影响。

(6) 酶解工艺参数的正交优化:在单因素试验的基础上,采用正交试验对酶解工艺参数进行优化,以氨基态氮为评价指标,综合考虑复合酶比例、酶解温度、时间和 pH 值对鲍鱼下脚料酶解效果的影响。

1.4 数据处理

试验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 酶解单因素试验条件的确定

2.1.1 酶制剂对鲍鱼下脚料酶解效果的影响 对于鲍鱼下脚料酶解生产海鲜酱汁的工艺而言,其产品的品质与风味主要取决于水解酶的特性,故需筛选出高效的蛋白酶。由图 1 可知,风味+碱性蛋白酶组合酶解效果最好,其次是木瓜与碱性蛋白酶组合,而木瓜蛋白酶的酶解效果最差。风味蛋白酶具有内切蛋白酶和外切肽酶两种活性,并能将多肽链的末端和内部的肽键水解^[10]。而碱性蛋白酶属于一种丝氨酸酯酶外高碱性蛋白酶,具有较强的分解蛋白质的能力,在一些水产资源上具有明显优越性^[11]。因此选择风味+碱性蛋白酶作为酶解鲍鱼下脚料的最佳酶制剂。

2.1.2 复合酶比例对鲍鱼下脚料酶解效果的影响 由图 2 可知,随着碱性蛋白酶比例的增高,氨基态氮含量略有上升,

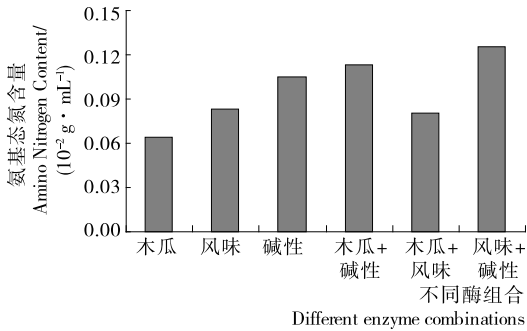


图 1 不同蛋白酶对鲍鱼下脚料水解效果的影响
Figure 1 Effect of different proteases on enzymatic hydrolysis of abalone scraps

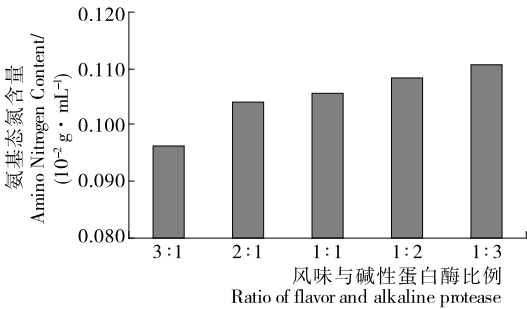


图 2 风味与碱性蛋白酶比例对鲍鱼下脚料酶解效果的影响
Figure 2 Effect of flavor protease and alkaline protease ratio on enzymolysis of abalone scraps

当风味：碱性为 1：2~1：3($m:m$)时,酶解效果达到最佳。可能是在 pH 8.5 的条件下,有利于碱性蛋白酶的酶解,而抑制了风味蛋白酶的作用。但风味蛋白酶比例降低到一定程度,其氨基态氮含量趋于平稳,差异不显著($P>0.05$)。因此,选择风味与碱性蛋白酶在 1：2($m:m$)左右为宜。

2.1.3 酶解时间对鲍鱼下脚料酶解效果的影响 由图 3 可知,随着时间的延长,鲍鱼下脚料中的氨基态氮含量呈现先上升后趋于稳定。当酶解时间为 5.0 h,氨基态氮的含量最高,且差异达到极显著($P<0.01$)。5.0 h 后氨基态氮含量处于平稳状态。这是由于随着时间的延长,酶与底物充分反应,氨基态氮含量增加趋于平稳。由此可见,时间是影响鲍鱼下脚料酶解效果的一重要因素。因此,为了提高酶解效果,选择酶解时间在 5.0 h 左右为宜。

2.1.4 酶解温度对鲍鱼下脚料酶解效果的影响 由图 4 可

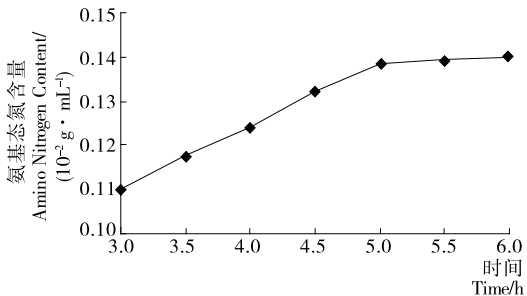


图 3 时间对鲍鱼下脚料酶解效果的影响
Figure 3 Effect of time on enzymolysis of abalone scraps

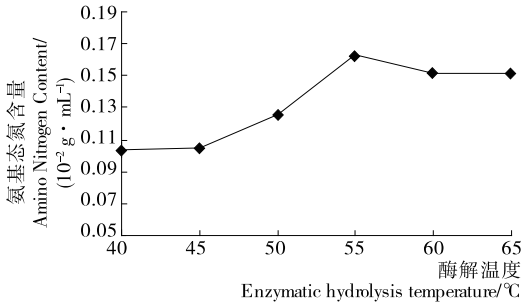


图 4 温度对鲍鱼下脚料酶解效果的影响
Figure 4 Effect of temperature on enzymolysis of abalone scraps

知,随着酶解温度的升高,鲍鱼下脚料中的氨基态氮含量逐渐增加,55℃时氨基态氮含量最高。之后,氨基态氮含量开始下降,且差异达到极显著($P<0.01$)。原因是随温度升高,酶活力增加,促使酶解加速,氨基态氮含量上升。而当温度超过最适温度时,导致酶变性,酶活力下降,影响酶解效果。可见,温度亦是影响鲍鱼下脚料酶解效果的重要因素。因此,为提高酶解效果,选择酶解温度在 55℃左右为宜。

2.1.5 pH 对鲍鱼下脚料酶解效果的影响 由图 5 可知,在 pH 为 6.0~8.5 时,随着 pH 值的升高,氨基态氮含量呈现先上升后逐渐下降的趋势,且差异达到极显著($P<0.01$)。当 pH 达到 7.5 时,氨基态氮含量最高。有研究^[12]表明风味蛋白酶的最适 pH 在 7.5 左右,但其 pH 值活性适应范围较广,而碱性蛋白酶的最适 pH 约在 7~8。综合考虑,选择 pH 在 7.5 左右为宜。

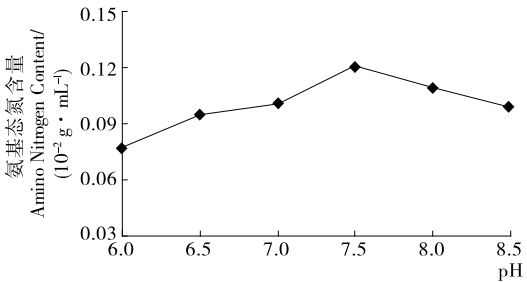


图 5 pH 对鲍鱼下脚料酶解效果的影响
Figure 5 Effect of pH on enzymolysis of abalone scraps

2.2 酶解工艺参数的优化

在单因试验基础上,综合考虑原辅料成本及酶解效果,进行正交试验设计,每组进行两次重复试验,得到氨基态氮平均含量。 $L_9(3^4)$ 正交试验设计见表 1,正交试验结果见表 2。

表 1 正交试验 $L_9(3^4)$ 设计
Table 1 Orthogonal array $L_9(3^4)$ design

水平	A 风味：碱性 ($m:m$)	B 温度/ ℃	C 时间/ h	D pH
1	1:1	50	4.5	7.0
2	1:2	55	5.0	7.5
3	1:3	60	5.5	8.0

表 2 正交试验 L₉ (3⁴) 设计及结果

Table 2 Orthogonal array L ₉ (3 ⁴) design and results						
处理号	A	B	C	D	氨基态氮含量/ (10 ⁻² g·mL ⁻¹)	
1	1	1	1	1	0.150	0.155
2	1	2	2	2	0.162	0.163
3	1	3	3	3	0.167	0.167
4	2	1	2	3	0.170	0.175
5	2	2	3	1	0.167	0.168
6	2	3	1	2	0.151	0.151
7	3	1	3	2	0.173	0.170
8	3	2	1	3	0.170	0.170
9	3	3	2	1	0.147	0.145
K ₁	0.482	0.496	0.473	0.466		
K ₂	0.491	0.500	0.481	0.484		
K ₃	0.488	0.464	0.506	0.510		
R	0.009	0.036	0.032	0.043		

由表 2 可知,在所选定的试验因素中,D(pH)对酶解的影响最大,其次是 B(酶解温度)和 C(酶解时间),A(风味与碱性蛋白酶比例)对酶解的影响最小。将 K 值进行比较,可知 A₂B₂C₃D₃为最优水平。应用 SPSS 13.0 统计软件对正交试验结果进行方差分析,分析结果见表 3。

表 3 正交试验方差分析结果[†]

Table 3 ANOVA result of orthogonal array design					
变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.000	2	0.000	3.693	—
B	0.001	2	0.000	68.038	* *
C	0.000	2	0.000	49.757	* *
D	0.001	2	0.000	81.581	* *
误差	0.000	9	0.000		
总变异	0.002	17			

† * *, 极显著;—, 不显著。

由表 3 可知,在所设定的 4 个因素中,pH、温度、时间 3 个因素对皱纹盘鲍下脚料酶解效果的影响极显著(P<0.01),而风味与碱性蛋白酶间的比例对皱纹盘鲍下脚料酶解效果的影响不显著(P>0.05)。

2.3 实验验证

正交试验结果得到酶解的最佳水平组合为 A₂B₂C₃D₃,即风味与碱性蛋白酶比例 1:2(m:m)、pH 8、酶解时间 5.5 h、酶解温度 55 ℃,在此条件下进行验证实验,重复 3 次,所得氨基态氮含量的平均值可达 0.198 g/100 mL。所得鲍鱼酱汁产品主要质量指标为:色泽为棕黄色,具有鲍鱼特有的气味和滋味,无杂质,整体粘稠度适中。主要理化指标:氯化钠≤8%、菌落总数≤5 000 CFU/g、致病菌(沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌)无检出。

3 结论

酶解技术因其反应条件温和,酶解效果好,安全性高等

优点,在水产品下脚料加工再利用方面得到广泛应用。但对于不同的下脚料需要寻找合适的酶进行水解,才能真正发挥其作用。因此,以氨基态氮含量作为酶解效果的评价指标,筛选出风味与碱性蛋白酶组合的复合酶作为鲍鱼下脚料的最佳酶制剂。通过单因素和正交试验确定鲍鱼下脚料的最佳酶解工艺参数为:风味与碱性蛋白酶 1:2(m:m)、酶解时间 5.5 h、酶解温度 55 ℃、pH 8。在此优化条件下,获得氨基态氮的平均含量为 0.198 g/100 mL,大大高于单一酶解效果。该条件下所制成的鲍鱼酱汁味道更鲜美,且营养价值高。但将鲍鱼下脚料作为海鲜调味料的唯一原料进行使用未免过于单一,为提高产品的海鲜风味,今后拟研究风味比较协调的几种水产品下脚料进行复合酶解,增加其产品的鲜味及口感。

参考文献

[1] 郑瑞生,王则金,童金华,等. 鲍鱼冻藏过程生化及感官指标变化研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(11): 170-177.

[2] 包郁明. 皱纹盘鲍脏器糖蛋白分离纯化及其免疫活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012: 16-17.

[3] Je Jae-young, Park Soo-yeon, Hwang Joung-youl, et al. Amino acid composition and in vitro antioxidant and cytoprotective activity of abalone viscera hydrolysate[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 16: 94-103

[4] Zhou Da-yong, Zhu Bei-wei, Qiao Lu, et al. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera[J]. Food and Bioproducts Processing, 2012, 90(2): 148-154.

[5] Zhou Jin, Zhu Xiao-shan, Cai Zhong-hua. Tributyltin toxicity in abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) assessed by antioxidant enzyme activity, metabolic response, and histopathology[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 183 (1/3): 428-433.

[6] 王莅莎,朱蓓薇,周大勇,等. 鲍鱼脏器多糖的抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(4): 65-68.

[7] 伍强,蔡秋凤,翁凌,等. 利用鲍鱼性腺制备 ACE 抑制肽[J]. 中国食品学报, 2015, 15(10): 91-99.

[8] 郭芳,方婷,林杰,等. 酶法提取鲍鱼内脏蛋白质工艺的研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(9): 125-129.

[9] 孙民富. 一种以鲍鱼为主要原料的调味品及其生产方法: 中国, 10165828A[P]. 2010-03-03.

[10] Martinez T S, Morales A C, Favelatorrese E, et al. Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*): I. A study of hydrolysis parameters using response surface methodology[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 85(1): 98-104.

[11] Zhu Bei-wei, Zhou Da-yong, Li Tao, et al. Chemical composition and free radical scavenging activities of a sulphated polysaccharide extracted from abalone gonad (*Haliotis Discus Hannai* Ino)[J]. Food Chemistry, 2010, 121(3): 712-718.

[12] 陈志锋. 生晒毛虾酶解制备虾风味基料的研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 19-22.