

酶解制备鸭肉香精前体物的工艺优化

张音^{1,2}, 夏延斌^{1,2*}

(1.湖南农业大学 食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家蔬菜加工技术研发分中心, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为获得制备鸭肉香精较优的反应基料, 采用蛋白酶对鸭肉蛋白进行酶解。结果表明: 复合风味蛋白酶和肉类水解专用酶对鸭肉蛋白的水解效果优于木瓜蛋白酶和中性蛋白酶, 前二者复配使用的效果优于单独使用; 酶解的最佳工艺条件为酶解温度 50 ℃, 酶底物比(酶活性与底物蛋白质质量的比)1 500 U/g, 初始 pH 8.0, 酶比(蛋白酶酶活性的比)为 3 : 1(复合风味蛋白酶与肉类水解专用酶的酶比); 在该条件下水解 3 h 得到的酶解液水解度约达 36%; 用水解度约 36%的酶解液参与美拉德反应的产物风味较佳。

关键词: 鸭肉香精; 复合风味蛋白酶; 肉类水解专用酶; 水解度; 美拉德反应

中图分类号: TS202.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)02-0217-04

Optimization of enzymatic hydrolysis for preparation of duck flavor precursors

ZHANG Yin^{1,2}, XIA Yan-bin^{1,2*}

(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. National R & D Center for Vegetable Processing, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to provide the optimally hydrolyzed material for producing duck-flavor essence, proteases were used to hydrolyze the duck protein. The results indicated that the hydrolysis effect of compound flavourzyme and meat enzyme on duck protein were better than that of papain and neutrase. And the effect of using compound flavourzyme and meat enzyme together was better than using the single enzyme alone. The optimal conditions for enzymatic hydrolysis were as follows: hydrolysis temperature, 50 ℃; enzyme/substrate ratio, 1 500 U/g protein; initial pH, 8.0 and compound flavourzyme/meat enzyme ratio, 3 : 1. Under these conditions, the degree of hydrolysis was about 36% after 3 h of reaction. The hydrolysis liquid with 36% duck protein hydrolyzed could produce the best flavor during the Maillard reaction.

Key words: duck flavor; compound flavourzyme; meat enzyme; degree of hydrolysis; Maillard reaction

利用热反应生产肉味香精, 是当前香精工业研究的热点。目前, 肉味香精的研究主要集中在牛肉香精^[1]、猪肉香精^[2]、鸡肉香精^[3-4]及海鲜香精上^[5-6], 对鸭肉香精的研究较少。根据“味料同源”的机理, 利用鸭肉蛋白生产鸭肉香精是未来发展的趋势。鸭肉蛋白未经水解直接用于美拉德(Maillard)反应时, 因其游离的氨基酸含量较少, 与还原糖反应不充分, 产物风味欠佳。若想得到风味纯正、逼真的鸭肉香

精, 则需对鸭肉蛋白进行适当水解。随着酶技术的不断发展和广泛应用, 酶法水解蛋白以其独特的优势, 将代替酸水解法和碱水解法, 成为更加有效的水解方法^[7-9]。为制备香气值高、风味好的鸭肉香精, 笔者以优质鸭肉为原料, 利用不同的蛋白酶对其进行水解, 以期制得复合氨基酸, 再通过美拉德反应制备鸭肉香精。因为氨基酸组成与美拉德反应形成的风味密切相关, 故首先探索鸭肉蛋白的水解条件。

收稿日期: 2011-12-05

基金项目: 湖南东安县人民政府科研项目(11208)

作者简介: 张音(1986—), 女, 湖南湘潭人, 硕士研究生, 主要从事食品化学与营养研究, zhangyin051111@126.com; *通信作者, xy520523@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料与设备

北京鸭购于长沙市某农贸市场；中性蛋白酶来自上海如吉科技发展有限公司；木瓜蛋白酶来自北京鼎国生物技术有限公司；复合风味蛋白酶来自诺维信(中国)生物技术有限公司；肉类水解专用酶来自广州市华琪生物科技有限公司。甲醛、Folin 试剂、无水碳酸钠、三氯乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、干酪素、L-酪氨酸、氢氧化钠、浓盐酸等均为分析纯。

主要设备为 JYL-C012 九阳料理机(九阳股份有限公司)、DK-98-11 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)、80-2 离心机(常州市华普达教学仪器有限公司)、GL-3250B 磁力搅拌器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、722S 可见分光光度计、PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 酶解方法

将鸭肉(不带骨、不带皮)解冻后,用剪刀剪去明显的筋腱和脂肪,切成小块后用九阳料理机搅成肉糜。称取肉糜 10 g,按料液比 1:5 加入 50 mL 水,搅拌均匀,用 3 mol/L 的氢氧化钠溶液或 3 mol/L 的盐酸溶液调至所需的 pH,按酶活性与底物中蛋白质质量之比(酶底物比)加入蛋白酶,在恒温水浴锅中加热酶解。酶解结束后将酶解液迅速升温至 95 ℃,保持 10 min;灭酶,离心,得上清液;吸取 5 mL 上清液,定容至 100 mL,测定水解度。

1.2.2 鸭肉蛋白水解的单因素试验

分别选取不同种类蛋白酶、初始 pH 值、酶解温度、酶底物比进行单因素试验,以确定鸭肉蛋白水解的适宜工艺参数。

1.2.3 鸭肉蛋白水解的正交试验

根据单因素试验结果,选取初始 pH、酶解温度、酶底物比、酶比(蛋白酶酶活性的比)4 个因素进行四因素三水平正交试验,从而确定最优酶解条件。正交试验中水解时间均为 3 h。正交试验的各因素和水平见表 1。

表 1 鸭肉蛋白酶解正交试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels in orthogonal tests for optimizing the conditions for enzymatic hydrolysis of duck protein

水平	酶解温度/℃	酶底物比/(U·g ⁻¹)	酶比	初始 pH
1	50	500	3:1	7.0
2	55	1 000	1:1	8.0
3	60	1 500	1:3	9.0

1.2.4 最佳酶解时间的确定

正交试验后,对最佳酶解时间进行确定:在 60 mL 酶解液中添加 10% 的葡萄糖(相对于酶解液体积的使用量,下同),3% 的盐,0.7% 的 V-B₁,0.15% 的 V-C,110 ℃ 反应 30 min^[14]。于正交试验得到的最佳酶解条件下分别酶解 1、2、3、4 h,用其酶解液进行美拉德反应。用感官评价方法中的排序检验法^[15-19]对 Maillard 反应产物进行感官评价,从而确定酶解液的最佳酶解时间。

1.2.5 测定指标及数据处理

蛋白质含量和氨基态氮含量分别用凯氏定氮法^[10]、甲醛值法^[11]进行测定;酶活力参照文献[12]的方法进行测定;蛋白质水解度参照文献[13]的方法进行测定。

试验数据用 Excel 2007 进行处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同蛋白酶的水解效果

分别用中性蛋白酶(neutrase,简称为 N)、复合风味蛋白酶(composite flavourzyme,简称为 F)、木瓜蛋白酶(papain,简称为 P)和肉类水解专用酶(meat enzyme,简称为 M)对鸭肉蛋白进行水解,水解 3 h 的水解度分别为 24.06%、29.41%、27.99% 和 29.91%,可见,肉类水解专用酶和复合风味蛋白酶对鸭肉蛋白的水解效果较好,中性蛋白酶的效果较差,这是因为复合风味蛋白酶和肉类水解专用酶均含有内切酶和外切酶,能从蛋白质分子的内部和端部同时水解肽键,快速水解肉类蛋白质^[20],而中性蛋白酶和木瓜蛋白酶均属于内切酶,只能水解蛋白质分子内部的肽键,水解效果较差;因此,选取 F、M 作为适宜蛋白酶。

比较 F+M、F+N、F+P 3 种蛋白酶复配方式水解鸭肉蛋白的效果。由图 1 可知,F+M 对鸭肉蛋白的水解效果最好,水解 3 h 的水解度达 31.86%,优于二者单独添加时的效果;效果最差的是 F+N,因此,

在正交试验中采用 F+M 复合酶进行水解。

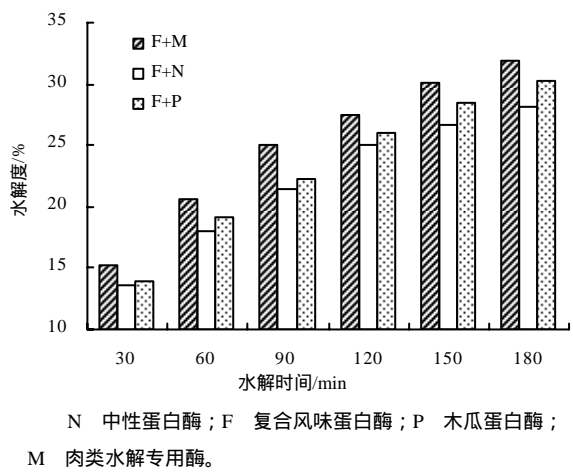


图 1 不同蛋白酶水解不同时间的水解度
Fig.1 Hydrolysis degree of different proteases in different time

2.1.2 不同初始 pH 值的水解效果

用 F+M 复合酶对鸭肉蛋白水解 3 h,在初始 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的水解度分别为 27.53%、29.61%、31.48%、32.39%、31.67%和 27.65%。当初始 pH < 8 时,水解度随着 pH 的升高而增大;当 pH > 8 时,水解度随着 pH 的升高而降低;当 pH=8 时,水解度达最大值 32.39%。风味蛋白酶和肉类水解专用酶的最适 pH 都在中性范围内,但最适 pH 并不是固定不变的,它取决于底物的种类和浓度、酶解的时间和温度、酶制剂的纯度等条件。综合考虑,将 pH 8 确定为适宜 pH。

2.1.3 不同酶解温度的水解效果

在初始 pH 8 条件下,用 F+M 复合酶分别在温度 40、45、50、55、60、70 ℃ 下对鸭肉蛋白进行水

解,水解 3 h 的水解度分别为 23.49%、26.36%、32.82%、30.62%、30.13%和 21.74%,可见,当酶解温度为 40 ~50 ℃ 时,随着温度的升高,水解度上升较快,从 23.49% 提高到 32.82%;当酶解温度为 > 50~60 ℃ 时,水解度降低比较缓慢;当温度 > 60 ℃ 后,风味蛋白酶和肉类水解专用酶的活性降低,水解度迅速下降。综合考虑,酶解温度以 55 ℃ 为宜。

2.1.4 不同酶底物比的水解效果

在初始 pH 8 和酶解温度 55℃ 的条件下,分别按酶底物比 250、500、750、1 000、1 250、1 500 U/g 加入 F、M 蛋白酶,水解 3 h 的水解度分别为 24.31%、28.37%、30.36%、33.60%、33.77%和 36.65%。随着酶底物比的增加,酶解反应的速率增加,水解度呈逐步上升的趋势。在实际生产应用中,可根据目标产物水解度的需要,从生产成本和水解效果的角度,综合考虑加酶量。综合考虑,将 1 000 U/g 确定为适宜酶底物比。

2.2 正交试验结果

根据表 2 中数据,由极差分析可知,各因素对鸭肉蛋白酶解水解度的影响从大到小依次为酶底物比、酶解温度、初始 pH、酶比。由方差分析结果(表 3)可知,酶解温度、酶底物比和初始 pH 对水解度的影响极显著,酶比对水解度的影响不显著。最佳试验组合为酶解温度 50 ℃,酶底物比 1 500 U/g,初始 pH 8.0,酶比为 3 1。该试验组合并未在正交试验中出现。由补充试验结果(水解 3 h 的水解度达 36.55%)可知,最佳水解条件为酶解温度 50 ℃,酶底物比 1 500 U/g,初始 pH 8.0,酶比为 3 1。

表 2 鸭肉蛋白酶解的正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal tests for condition optimization of enzymatic hydrolysis of duck protein						
试验号	酶解温度/℃	酶底物比/(U·g ⁻¹)	酶比	初始 pH	水解度/%	
					I	II
1	50	500	3 1	7.0	27.23	25.65
2	50	1 000	1 1	8.0	32.15	31.25
3	50	1 500	1 3	9.0	31.65	32.07
4	55	500	1 1	9.0	24.99	24.99
5	55	1 000	1 3	7.0	29.83	29.18
6	55	1 500	3 1	8.0	34.79	34.12
7	60	500	1 3	8.0	24.91	24.42
8	60	1 000	3 1	9.0	26.09	27.04
9	60	1 500	1 1	7.0	30.43	29.83
K ₁	180.00	152.19	174.92	172.15		
K ₂	177.90	175.54	173.64	181.64		
K ₃	162.72	192.89	172.06	166.83		
R	17.28	40.70	2.86	14.81		

表 3 正交试验的方差分析结果

Table 3 Variance analysis results of orthogonal tests						
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
区组间	0.688 4	1	0.688 4	2.458 6	5.32	11.26
温度	29.635 6	2	14.817 8	52.920 7**		
酶底物比	139.040 8	2	69.520 4	248.287 1**	4.46	8.65
酶比	0.684 1	2	0.342 1	1.221 8		
初始 pH	18.761 0	2	9.380 5	33.501 8**		
误差	2.240 2	8	0.280 0			
总变异	191.050 1	17				

2.3 最佳酶解时间的确定

于正交试验得到的最佳酶解条件下水解 1、2、3、4 h 的水解度依次为 22.02%、30.87%、36.61%、40.27%。采用 Friedman 检验方法^[19], 得知 4 个样品差异显著。采用多重比较和分组方法进一步确定, 用 1% 显著水平上水解 3 h 得到的酶解液进行 Maillard 反应, 其产物的风味最佳, 水解 2 h 和 4 h 的风味次之, 水解 1 h 的风味最差。

3 结论与讨论

本研究结果表明: 复合风味蛋白酶和肉类水解专用酶对鸭肉蛋白的水解效果优于木瓜蛋白酶和中性蛋白酶, 前二者复配使用的效果优于其单独使用。酶解前, 不进行加热处理水解的效果更好。酶解温度、酶底物比、酶比和初始 pH 4 个因素对于鸭肉蛋白水解度的影响从大到小依次为酶底物比、酶解温度、初始 pH、酶比。在料液比 1:5 的条件下, 鸭肉蛋白酶解的最佳工艺条件为酶解温度 50℃, 酶底物比 1:500 U/g, 初始 pH 8.0, 酶比(复合风味蛋白酶与肉类水解专用酶的酶比)为 3:1。水解 3 h 得到的酶解液水解度达 36%。用该酶解液参与美拉德反应, 其产物的风味较佳。

水解度 30% 的肉类蛋白酶解液参与美拉德反应, 有利于形成较好的肉类风味^[3,21-23]。鸭肉蛋白酶解的水解度约为 35% 时参与美拉德反应得到的产物风味较好^[24]。本研究得到的最佳水解度与文献中的最佳水解度存在一定差距, 这可能与参与美拉德反应的其他原料不同有关。

参考文献:

- [1] 谭斌. Maillard 反应体系制备热加工牛肉风味基料的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [2] 朱新生. 热反应猪肉风味香精的研究与制备[D]. 无锡: 江南大学, 2005.

- [3] 杨二刚. 酶解鸡肉制备热反应天然鸭肉香精的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [4] 岑泳延. 鸡肉酶解及热反应鸡肉香精的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2003.
- [5] 孟绍凤. 虾风味的分析和风味基料的制备[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [6] 隋伟. 热反应虾味香精的制备[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [7] 谭斌, 丁霄霖. 牛肉蛋白水解物的酶解制备[J]. 无锡轻工业大学学报, 2005(1): 59-64.
- [8] 汤高奇, 柳艳霞, 杨继红. 酸法水解动物蛋白工艺研究[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2004(12): 6-7, 17.
- [9] 杨晋. 利用酶解技术和美拉德反应制备海鲜调味料的研究[D]. 上海: 上海水产大学, 2007.
- [10] GB/T 5009.5—2003 食品中蛋白质的测定[S].
- [11] GB/T 5009.39—2003 酱油卫生标准的分析方法[S].
- [12] SB/T 10317—1999 蛋白酶活力测定方法[S].
- [13] 邓尚贵, 杨萍, 杨志娟, 等. 青鳞鱼肌肉蛋白质风味酶水解条件与水解产物研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(1): 20-27.
- [14] 谢颖, 陶宁萍, 王锡昌, 等. 鸭肉酶解液美拉德反应制备鸭肉香精基料的研究[J]. 食品工业科技, 2010(4): 240-242.
- [15] GB/T 14454.2—2008 香料香气评定法[S].
- [16] GB/T 10221—1998 感官分析术语[S].
- [17] GB 10220—1988 感官分析方法总论[S].
- [18] 欧阳杰, 武彦文. 肉类香精的感官评价[J]. 香料香精化妆品, 2003, 12(6): 32-35.
- [19] 吴谋成. 食品分析与感官评价[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 321-326.
- [20] 张永秀, 王世平, 周若兰. Flavourzyme 蛋白酶酶解牛骨制备低聚肽的处理条件研究[J]. 食品工业科技, 2006(7): 141-143.
- [21] Meara G M, Munro P A. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalas[J]. Meat Science, 1984(11): 227-238.
- [22] 张彩菊, 张愨. 利用美拉德反应制备鱼味香料[J]. 无锡轻工业大学学报, 2004(9): 11-15.
- [23] 潘丽红. 热反应干腌火腿香精基料研发[D]. 南京: 南京农业大学, 2008: 6.
- [24] 陈海燕. 热反应鸭肉香精的研究与制备[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.

责任编辑: 王赛群