

动物蛋白酶酶解鱿鱼内脏工艺研究

黄敬哲 张修正 裴继伟 刘海梅 赵 芹

(鲁东大学 食品工程学院,山东 烟台 264039)

摘要: 鱿鱼内脏是鱿鱼生产加工过程中产生的主要废弃物,其富含蛋白质,具有较高的开发价值。本文以水解度和感官评定为指标,采用单因素和正交试验方法,研究酶添加量、酶解温度、酶解时间、pH 四个因素对鱿鱼内脏水解度的影响,确定动物蛋白酶酶解鱿鱼内脏最佳工艺。结果表明,最佳酶解工艺条件为:加酶量 1.8% 酶解温度 55 ℃ 酶解时间 6 h pH 7.5。所制备的鱿鱼内脏酶解液色泽呈现棕褐色,溶液澄清,鱿鱼风味比较明显,水解度可达 36.9%,可作为水产调味品的基料使用。

关键词: 鱿鱼内脏; 动物蛋白酶; 工艺优化; 水解度

中图分类号: S985.3+6 文献标志码: A 文章编号: 1673-8020(2022)01-0083-06

鱿鱼(Squid)属头足类海洋软体动物,也被称为柔鱼,体内富含丰富的蛋白质、氨基酸、多糖等营养物质^[1-2],具有生命周期短,生长快的特点^[3],是我国重要的远洋渔业捕捞鱼种之一^[4]。根据《中国渔业统计年鉴》统计数据,2019年我国鱿鱼捕获量约为29万t,约占全年海洋捕捞量的2.9%^[5]。鱿鱼产品的开发利用主要集中在鱿鱼丸^[6]、鱿鱼脆片^[7]、鱿鱼风味腊肠^[8]、调味鱿鱼丝^[9]、鱿鱼松夹心酥和鱿鱼粒酥饼^[10]等鱿鱼肉制品方面,加工过程中产生的下脚料,如鱿鱼内脏等,一般当作废弃物处理,这不仅会造成资源的浪费,还会造成环境污染^[11-12],因此,对鱿鱼加工副产物,特别是鱿鱼内脏的高值化利用成为当下研究热点之一。

鱿鱼内脏营养丰富,其中水分含量占29.70%,蛋白质含量占31.70%,脂肪含量占34.30%^[13],且含有一定量的EPA和DHA^[14],具有较高的开发利用价值。李朝宗等^[15]以鱿鱼内脏为原料,对鱿鱼酱油的酿造工艺进行了研究;林煌华等^[16]以鱿鱼内脏为原料,对鱿鱼内脏粗提油的精制工艺进行了优化研究;杨嘉梁等^[17]以鱿鱼内脏为原料,对鱿鱼内脏多糖的分离纯化进行了研究。因此,本试验以鱿鱼内脏为原料,拟利用动物蛋白酶,对鱿鱼内脏进行酶解工艺的优化,制备出高质量的鱿鱼内脏酶

解液,为开发出深受消费者喜爱的海鲜调味基料,提高鱿鱼整体的利用率和附加值,减少资源的浪费提供理论基础和技术途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鱿鱼内脏(烟台红利水产市场);甲醛溶液、氢氧化钠、盐酸(国药集团化学试剂有限公司);动物蛋白水解酶(南宁庞博生物工程有限公司)。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

电热恒温干燥箱、电热恒温水浴锅(龙口市先科仪器公司);B941413143型酸度计(上海梅特勒-托利多有限公司);JRX-20L型曲线升温消化炉(济南精锐分析仪器有限公司);60063537型凯氏定氮仪(丹麦福斯分析仪器制造公司);81-2型磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司);TG18G型高速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

收稿日期:2021-06-20;修回日期:2021-08-15

基金项目:山东省大学生创新创业训练计划项目(s201910451070);国家级大学生创新创业训练计划项目(201710451116);山东省重点研发计划(医用食品)(2018YYSP009);校企合作项目(28000101)

第一作者简介:黄敬哲(1996—),男,山东烟台人,研究方向为生物活性物质。E-mail:984429162@qq.com

通信作者简介:赵芹(1983—),女,山东青岛人,副教授,博士,研究方向为生物活性物质。E-mail:candyffff@163.com

1.3 方法

1.3.1 工艺流程

鱿鱼内脏→捣碎蒸煮→调整料液比(1:5)→动物蛋白酶酶解→沸水浴灭酶 15 min→冷却→离心→酶解液。

1.3.2 氨基态氮测定

酶解液中氨基态氮的含量采用甲醛法^[18]测定。取 2 个 25 mL 的锥形瓶,其中一个加入 0.05 mol 的标准甘氨酸溶液,另一个加入等体积的鱿鱼内脏酶解液。向两个锥形瓶内滴加 5 滴酚酞溶液,混匀后再滴加 2 mL 甲醛溶液,分别用 0.02 mol·L⁻¹的标准氢氧化钠溶液滴定至溶液显现红色。重复上述步骤两次,记录每次滴定使用的标准氢氧化钠溶液的体积。

$$\text{样品中氨基态氮含量} = \frac{(V_1 - V_2) \times N_1 \times 14.08 \times 0.5}{m} \quad (1)$$

其中: V_1 为鱿鱼内脏酶解液耗用标准氢氧化钠溶液的平均体积(mL); V_2 为甘氨酸溶液耗用标准氢氧化钠平均体积(mL); N_1 为标准氢氧化钠溶液的物质的量浓度(mol·L⁻¹)。

1.3.3 总氮含量的测定方法

酶解液中总氮含量采用凯氏定氮法^[19]测定。

$$\text{样品中总氮的含量} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 0.014}{m \times 100} \times F \times 100\% \quad (2)$$

其中: V_1 为样品消耗硫酸标准液的体积(mL); V_2 为空白组消耗硫酸标准溶液的体积(mL); N 为硫酸标准溶液的物质的量浓度(mol·L⁻¹); m 为样品的质量(体积)(g(mL)); F 为氮换算为蛋白质的系数。

1.3.4 水解度的测定方法

测定鱿鱼内脏酶解液水解度,公式如下:

$$\text{水解度}(DH) = \frac{X \times V}{N\% \times M \times 1000} \quad (3)$$

其中: $N\%$ 为原料中的总氮含量; M 为原料重量(g); X 为酶解液中的氨基态氮质量浓度(mg·mL⁻¹); V 为上清液体积(mL)。

1.3.5 感官评定标准

选择 10 名感官评定员(5 男 5 女)进行感官评定,要求评定人员在实验前 2 h 未进食、吸烟,且单独进行评定^[20]。评定过程依据评价标准,从鱿鱼内脏酶解液的滋味、苦涩味、香气、腥味、色泽和体态等方面进行打分,满分为 60 分,分数越高

则酶解液质量越好。具体标准如表 1 所示。

表 1 感官评定标准
Tab.1 Sensory assessment criteria

| 项目 | 标准 | 评分 |
|------|----------------|------|
| 滋味 | 鱿鱼鲜味浓郁,口味鲜美 | 9~10 |
| | 鱿鱼鲜味较明显,口味自然 | 7~8 |
| | 鱿鱼鲜味一般,口味勉强 | 5~6 |
| | 鱿鱼鲜味较淡,口味较差 | 3~4 |
| | 无鲜味,存在异味 | 1~2 |
| 苦味 | 没有苦味 | 9~10 |
| | 苦味较淡 | 7~8 |
| | 苦味可以忍受 | 5~6 |
| | 苦味难以忍受 | 3~4 |
| | 苦味令人厌恶 | 1~2 |
| 鱿鱼香气 | 鱿鱼香气浓郁 | 9~10 |
| | 鱿鱼香气一般,可察觉 | 7~8 |
| | 鱿鱼香气较明显,易察觉 | 5~6 |
| | 鱿鱼香气较淡,不易察觉 | 3~4 |
| | 无鱿鱼香气 | 1~2 |
| 腥味 | 无腥味 | 9~10 |
| | 略有腥味 | 7~8 |
| | 腥味一般 | 5~6 |
| | 腥味浓郁 | 3~4 |
| | 腥味刺鼻 | 1~2 |
| 色泽 | 棕褐色,深浅适中 | 9~10 |
| | 棕褐色,色泽均匀 | 7~8 |
| | 颜色过深或过浅,色泽比较均匀 | 5~6 |
| | 颜色过深或过浅,色泽不均匀 | 3~4 |
| | 颜色暗淡或发黑 | 1~2 |
| 形态 | 体态澄清透明 | 9~10 |
| | 体态较澄清 | 7~8 |
| | 体态较浑浊 | 5~6 |
| | 体态浑浊 | 3~4 |
| | 体态浑浊,有沉淀 | 1~2 |

1.3.6 酶解工艺的优化

以水解度为实验衡量指标,采用单因素试验依次确定加酶量和酶解时间对酶解效果的影响。在单因素试验的基础上,以水解度和感官评定为指标,采用正交试验优化研究最佳酶解工艺条件。

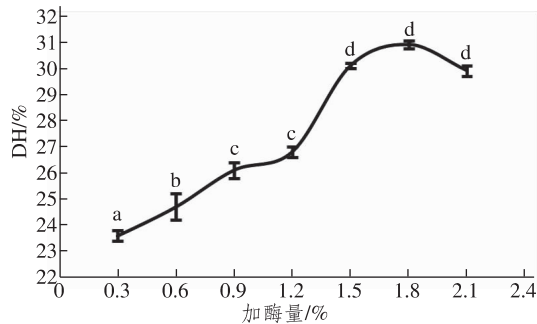
2 试验结果

2.1 单因素试验

2.1.1 加酶量的确定

控制动物蛋白酶酶解鱿鱼内脏的温度为 50 °C, pH 为 7, 酶解时间为 4 h, 加酶量梯度设置为 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%、1.8%、2.1%, 水解度受加酶量的影响如图 1 所示。由图

1 可知 随着加酶量梯度增加,水解度呈现先上升后平缓的趋势,当加酶量为 0.3% 时,水解度最小。当加酶量为 1.8% 时,水解度达到最大值,为 30.9% 左右。但加酶量为 1.5%、1.8%、2.1% 时,水解度之间不存在显著性差异 ($P > 0.05$) ,因此综合经济节约考虑,初步确定动物蛋白酶最适添加量为 1.5%。



注: 图中不同字母代表数据之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

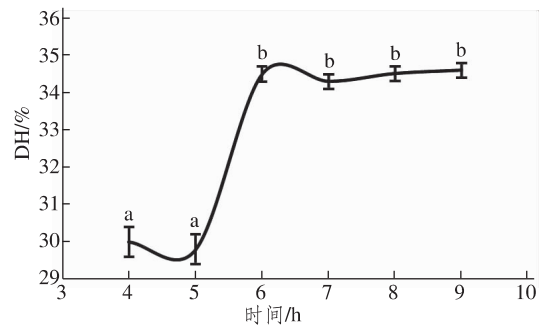
图 1 加酶量与水解度的关系

Fig.1 The relation between the amount of enzyme added and degree of hydrolysis

2.1.2 酶解时间的确定

控制动物蛋白酶酶解鲑鱼内脏的酶解温度为 50 °C ,pH 为 7 ,加酶量为 1.5% ,设置时间梯度为 4、5、6、7、8、9 h ,动物蛋白酶酶解鲑鱼内脏水解度受时间的影响如图 2 所示。由图 2 可知,随着酶解时间的增加,水解度呈现先平稳后急剧上升然后再平稳的趋势,当酶解时间为 6 h 时,水解度达到最大值,为 34.5% 左右。之后继续增加酶解时

间,水解度保持平稳,不存在显著性差异 ($P > 0.05$) ,因此,初步确定最适酶解时间为 6 h。



注: 图中不同字母代表数据之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

图 2 时间与水解度的关系

Fig.2 The relation between time and degree of hydrolysis

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,以酶解温度、pH、酶解时间、加酶量四个因素为自变量,设计四因素三水平正交优化试验,正交试验水平设计见表 2 ,正交试验结果见表 3。

表 2 酶解正交试验因素水平

Tab.2 Factor level of orthogonal experiment of enzymatic hydrolysis

| 水平 | 酶解温度/°C | pH | 酶解时间/h | 加酶量/% |
|----|---------|-----|--------|-------|
| 1 | 45 | 6.5 | 5 | 1.2 |
| 2 | 50 | 7.0 | 6 | 1.5 |
| 3 | 55 | 7.5 | 7 | 1.8 |

表 3 酶解正交试验结果

Tab.3 The orthogonal experiment results of enzymatic hydrolysis

| 试验号 | 温度/°C | pH | 时间/h | 加酶量/% | 水解度/% |
|-------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 28.76 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 29.85 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 33.36 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 32.87 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 32.57 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 32.39 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 34.99 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 34.08 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 33.48 |
| K_1 | 91.97 | 96.62 | 95.23 | 94.81 | |
| K_2 | 97.83 | 96.50 | 96.20 | 97.23 | |
| K_3 | 102.55 | 99.23 | 100.92 | 100.31 | |
| k_1 | 30.66 | 32.21 | 31.74 | 31.60 | |
| k_2 | 32.61 | 32.17 | 32.07 | 32.41 | |
| k_3 | 34.18 | 33.08 | 33.64 | 33.44 | |
| R | 3.53 | 0.91 | 1.90 | 1.83 | |

方差分析结果见表 4。根据表 4 可以得出: 温度、时间、加酶量、pH 对于水解度都具有显著性影响。根据表 3 中的 R 值可以看出, 影响水解度的因素的主次顺序为: 温度 > 时间 > 加酶量 > pH。

根据正交优化试验结果, 确定最佳酶解工艺条件为: 酶解温度 55 ℃, 酶解时间 7 h, 加酶量 1.8%, pH 为 7.5。此条件下测得酶解液的水解度为 37.6%。

表 4 方差分析结果

Tab.4 Results of anova

| 方差来源 | 偏差平方和 | 自由度 | 均方 | F | 显著性 |
|-------|------------|-----|------------|-------------|-----|
| 修正模型 | 94.500 | 8 | 11.813 | 153.520 | |
| 截距 | 28 513.550 | 1 | 28 513.550 | 370 573.216 | |
| 温度 | 56.249 | 2 | 28.124 | 365.516 | ** |
| pH | 5.172 | 2 | 2.586 | 33.608 | ** |
| 时间 | 17.963 | 2 | 8.981 | 116.726 | ** |
| 加酶量 | 15.117 | 2 | 7.558 | 98.232 | ** |
| 误差 | 1.385 | 18 | 0.77 | | |
| 总计 | 28 609.436 | 27 | | | |
| 修正后总计 | 95.885 | 26 | | | |

注: **代表极显著($P < 0.01$)。

2.3 感官评定

根据表 1 中的评分准则对最佳酶解工艺条件制备的酶解液进行感官评定, 评定结果取平均值, 具体分数如图 3 所示, 此时得到的酶解液感官评定分数为 40 分, 其鱿鱼特征气味较明显, 没有苦涩味, 色泽棕褐色, 深浅均匀, 但是体态浑浊。

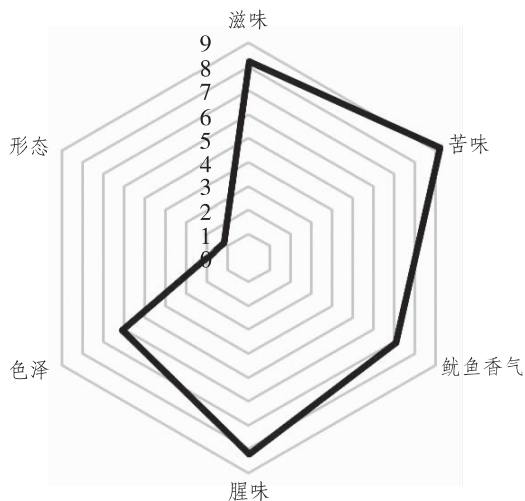


图 3 最优酶解液的感官评定雷达图

Fig.3 Sensory evaluation radar chart of enzymatic hydrolysate prepared by orthogonal method

2.4 基于感官评定的酶解条件的优化

以水解度为指标, 通过单因素和正交优化试

验得到最佳酶解工艺条件, 此条件下制得的酶解液分层并产生浑浊, 分析原因可能是由于酶解时间过长造成的脂肪氧化。为了获得质地澄清的酶解液, 拟将感官评定指标与水解度指标结合进行进一步优化。在最佳酶解工艺条件组合的基础上进行时间检验, 设置时间梯度为 3、4、5、6、7 h。实验结果发现, 酶解 6 h 时酶解液体态较为澄清, 而酶解 7 h 时, 酶解液出现浑浊。因此, 在最佳酶解工艺条件的基础上, 选择 6 h 作为新的最佳酶解时间。再次设计四因素三水平正交试验对优化后的酶解工艺条件进行验证, 正交试验水平设计见表 5, 正交试验结果见表 6。验证了优化后的最佳酶解工艺条件为: 酶解温度 55 ℃, 酶解时间 6 h, 加酶量 1.8%, pH 7.5, 此条件下测得酶解液水解度为 36.9%, 感官评分为 46 分(见图 4)。与优化前相比, 酶解液水解度略有下降, 感官评分有较大提高, 综合考虑, 优化后的酶解工艺条件更为适宜。因此, 最终确定最佳酶解工艺条件为: 酶解温度 55 ℃, 酶解时间 6 h, 加酶量 1.8%, pH 7.5。

表 5 酶解优化正交因素水平

Tab.5 The orthogonal factor level of enzymatic hydrolysis optimization

| 水平 | 温度/℃ | pH | 时间/h | 加酶量/% |
|----|------|-----|------|-------|
| 1 | 45 | 6.5 | 4 | 1.2 |
| 2 | 50 | 7 | 5 | 1.5 |
| 3 | 55 | 7.5 | 6 | 1.8 |

表6 酶解优化正交试验结果

Tab.6 The orthogonal experiment results of enzymatic hydrolysis optimization

| 试验号 | 温度/℃ | pH | 时间/h | 加酶量/% | 水解度/% |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 25.82 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 27.96 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 30.66 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 28.86 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 29.82 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 28.02 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 31.28 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 30.66 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 30.44 |
| K_1 | 84.17 | 85.96 | 84.50 | 86.08 | |
| K_2 | 86.70 | 88.17 | 86.99 | 86.99 | |
| K_3 | 92.38 | 89.12 | 91.76 | 90.18 | |
| k_1 | 28.06 | 28.65 | 28.17 | 28.69 | |
| k_2 | 28.90 | 29.39 | 29.00 | 29.00 | |
| k_3 | 30.79 | 29.71 | 30.59 | 30.06 | |
| R | 2.74 | 1.05 | 2.42 | 1.37 | |

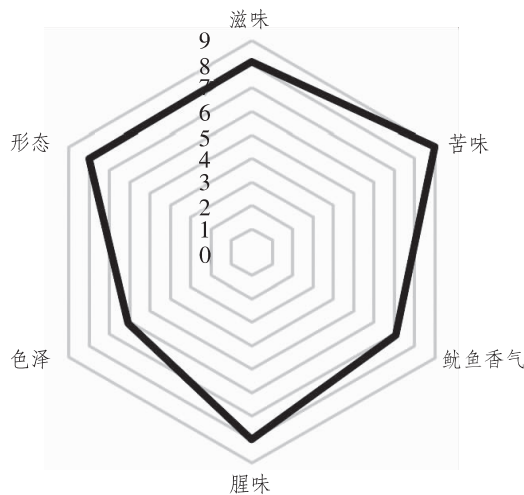


图4 优化之后的酶解液的感官评定雷达图

Fig.4 Sensory evaluation radar chart of the enzymatic hydrolysate after optimization

3 结论

鱿鱼内脏是鱿鱼生产加工过程中产生的主要副产物,富含多种营养物质,直接丢弃不仅造成资源的浪费,还会造成环境污染,通过酶解工艺,实现其高值化利用具有重要意义。本文以鱿鱼内脏为研究对象,以水解度和感官评定作为评价指标,研究酶解温度、酶解时间、pH、加酶量四个因素对于鱿鱼内脏的影响,通过单因素和正交优化试验,得到最佳酶解工艺条件:动物蛋白酶加酶量1.8%,酶解温度55℃,酶解时间6h,pH7.5。在此条件下制备的酶解液水解度比较高,可达

36.9%,色泽呈现棕褐色,鱿鱼风味比较明显,溶液澄清,没有出现浑浊,优化效果显著,为将鱿鱼内脏开发成新型海鲜调味基料提供了论依据。

参考文献:

- [1] 刘玮伟,蒋凯俊,邵仲柏,等.海洋头足类动物资源综合利用研究进展[J].江苏海洋大学学报(自然科学版),2020,29(3):31-36.
- [2] 陈惠云,王翰韬,曾纪豪,等.鱿鱼下脚料复合酶法制备海鲜酱汁的工艺研究[J/OL].食品与发酵工业,1-7(2021-06-25)[2021-08-22].https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026731.
- [3] 刘金立,陈新军.世界大洋性鱿钓渔业研究评述[J].上海海洋大学学报,2019,28(3):331-343.
- [4] 朱文慧,宦海珍,步营,等.低温贮藏和解冻过程对鱿鱼品质的影响研究进展[J].食品科学,2017,38(17):279-285.
- [5] 农业部渔业渔政管理局.2019中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2019:58-63.
- [6] 郭立志.秘鲁鱿鱼鱼丸的研究[J].食品研究与开发,2004(5):74-75.
- [7] 薛冬梅,陈菊,薛崇祥,等.鱿鱼脆片的加工工艺研究[J].湖南农业科学,2019(10):89-92.
- [8] 赵亚舫.鱿鱼风味腊肠的研制及货架期预测[D].天津:天津科技大学,2019.
- [9] 曲映红,陈新军,陈舜胜.我国鱿鱼加工利用技术研究进展[J].上海海洋大学学报,2019,28(3):357-364.
- [10] 粟薇.鱿鱼松夹心酥和鱿鱼粒酥球产品的研发及品质研究[D].大连:大连工业大学,2017.

- [11] 于丁一,朱敬萍,张小军,等. 鱿鱼加工副产物活性物综合利用新进展[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版) 2019, 38(1): 83-88.
- [12] 傅志宇,郑杰,于笛,等. 鱿鱼内脏的营养价值及综合利用研究进展[J]. 食品工业科技 2019, 40(4): 307-311.
- [13] 吴同辉. 凯氏定氮法测定速冻调制食品蛋白质过程探讨[J]. 肉类工业 2020(6): 37-39.
- [14] HUANG L S, LIANG J H. Fractionation of urea-pretreated squid visceral oil ethyl esters[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society 2001, 78(5): 473-476.
- [15] 李朝宗,司伟兰,段杉. 以鱿鱼内脏酿造鱿酱油的制曲工艺研究[J]. 中国调味品 2011, 36(12): 83-86.
- [16] 林煌华,谢友坪,马瑞娟,等. 鱿鱼内脏粗提油的精制工艺优化及其理化指标分析[J]. 食品工业科技 2020, 41(6): 172-179.
- [17] 杨嘉梁,陈小娥,方旭波,等. 鱿鱼内脏多糖的分离纯化、理化性质及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报 2019, 19(4): 116-124.
- [18] 杨文博,张英华. 蛋白质水解度的测定方法研究[J]. 中国调味品 2014, 39(3): 88-90.
- [19] 吴同辉. 凯氏定氮法测定速冻调制食品蛋白质过程探讨[J]. 肉类工业 2020(6): 37-39.
- [20] 邓立青. 基于模糊数学综合感官评价的调理鱿鱼配方的研究[J]. 肉类工业 2020(1): 29-32.

Enzymatic Hydrolysis of Squid Viscera with Animal Protease

HUANG Jingzhe, ZHANG Xiuzheng, PEI Jiwei, LIU Haimei, ZHAO Qin

(School of Food Engineering, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: Squid viscera is the main waste produced in the process of squid production and processing. It is a typical high protein, low-fat substance, rich in nutrition and has high development value. Taking the degree of hydrolysis and sensory evaluation as indexes, the effects of enzyme addition, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time and pH on the degree of hydrolysis of squid viscera were studied by single factor and orthogonal test methods, and the best enzymatic hydrolysis process of squid viscera by animal protease was determined. The results showed that the optimum enzymatic hydrolysis conditions were as follows: enzyme dosage 1.8%, enzymatic hydrolysis temperature 55 °C, enzymatic hydrolysis time 6 h, pH 7.5. The color of the obtained squid visceral enzymatic hydrolysate is brown, the solution is clear, the squid flavor is obvious, and the degree of hydrolysis can reach 36.9%. It can be used as the base material of aquatic condiments.

Keywords: squid viscera; animal protease; process optimization; degree of hydrolysis

(责任编辑 李维卫)