

水产蛋白酶解制备鲜味肽

李莹^{1,2}, 黄开红¹, 周剑忠¹, 曾晓雄²

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要:以3种不同类别的水产蛋白为原料, 制备具有风味提升的短肽。通过比较酶解产物的感官特点, 确定 $m_{\text{鲢鱼}}:m_{\text{对虾}}:m_{\text{扇贝}}$ 为 1:1:1; 采用风味蛋白酶与复合蛋白酶双酶水解, 添加两酶质量比为 1:1。采用 Box-Behnken 设计和响应面法(RSM)优化酶解水产蛋白的工艺, 以水解度和感官评分为指标, 探讨酶与底物比([E]/[S])、酶解温度和酶解时间对鲜味肽的感官影响。结果表明: 水产蛋白制备鲜味肽的最佳工艺为[E]/[S]7.5%、底物质量浓度 30g/100mL、自然 pH 值、酶解温度 56℃、酶解时间 5.9h。验证实验表明, 该条件下水产蛋白的水解度和鲜味肽的感官评分分别为 56.32% 和 6.8, 与模型的预测值(55.17% 和 6.9)基本符合。酶解液超滤分离出 4 种组分的鲜味肽, 将其分别进行 Maillard 反应。表明分子质量 2.5~5kD 鲜味肽 Maillard 反应后鲜味浓郁, 无腥苦味。

关键词:鲜味肽; 酶解; 超滤; 美拉德反应

Preparation of Umami Peptides by Enzymatic Hydrolysis of Proteins from Aquatic Products

LI Ying^{1,2}, HUANG Kai-hong¹, ZHOU Jian-zhong¹, ZENG Xiao-xiong²

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China;

2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of this study was to prepare umami peptides from the hydrolysis of a mixture of meat from 3 different species of aquatic products (silver carp, prawn and scallop) at a mass ratio of 1:1:1 with both flavourzyme and protamex at a mass ratio of 1:1. The hydrolysis process was optimized using response surface methodology based on a Box-Behnken experimental design. The effects of enzyme-to-substrate ([E]/[S]) ratio, hydrolysis temperature and hydrolysis time on degree of hydrolysis and sensory evaluations were explored. The optimal hydrolysis conditions were determined as follows: [E]/[S] ratio 7.5%, substrate concentration 30 g/100 mL, natural pH, hydrolysis 56 °C, and hydrolysis duration 5.9 h. Under these conditions, the degree of hydrolysis of aquatic products and the sensory evaluation score of the hydrolysate obtained were 56.32% and 6.8, respectively, close to the predicted values (55.17% and 6.9, respectively). The ultrafiltration of this hydrolysate resulted in 4 umami peptides. Maillard reaction products of each umami peptide with molecular weight between 2.5 kD and 5 kD showed a strong umami and non-bitter taste and no fishy odor.

Key words: umami peptide; enzymatic hydrolysis; ultrafiltration; Maillard reaction

中图分类号: TQ936.16

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)13-0248-06

鲜味(umami)是一种美妙的复杂综合味感, 大量的研究已经表明, 它是一种独立味感, 同酸、甜、苦、咸一样, 应属于基本味感之一^[1]。日本、韩国调味品行业十分发达, 不仅在应用微生物发酵制备传统调味品, 如酱油、鱼露等工艺成熟, 而且在呈味肽的性质、应用规律以及应用生物技术深加工产品方面居世界领先地位, 占据了绝大多数市场份额。近些年, 中国的调味品工业也获得了发展, 统计数字显示, 目前我国复

合调味品产量每年以超过 10% 的幅度增长^[2]。我国是世界上海岸线最长的国家之一, 拥有丰富的海洋资源, 高附加值水产调味料的发展前景广阔。

水解蛋白是热加工香料的主要原料, 主要是因为它能提供热反应所需的前体物质。酶法温和的水解条件, 使得最终水解物具有纯正柔和的口味。用肉类蛋白作肉味香精的原料, 能够保证所有的肉味前体物质产生一些诸如煮肉、炖肉及烤肉的风味^[3]。最初, Yamasaki 等^[4]

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(SBE201037924)

作者简介: 李莹(1981—), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事农产品加工研究。E-mail: hijoly@163.com

用木瓜蛋白酶水解牛肉得到具有增强牛肉风味的八肽,该肽被称为牛肉风味肽、美味提升肽或强化肽。Nishimura 等^[5]从鱼蛋白水解产物中发现多种呈鲜味的低聚肽。Kim 等^[6]对豆酱的水溶提取物进行凝胶分离,得到具有鲜味的鲜味肽。Maeda 等^[7]对日本清酒中风味质量有突出影响的寡肽及氨基酸进行系统阐述,其中苦味肽主要来源于大米蛋白的酶解物,分离纯化得到 5 种苦味肽。Molina 等^[8]对牛奶、绵羊奶和奶山羊奶为原料制备的奶酪水溶物进行凝胶层析,并感官评价分离得到的各组分,其中绵羊奶奶酪的鲜味占主导风味,鲜味最强的组分含有最高浓度的氨基酸和挥发物。研究发现,作为日本米酱厚味真正的物质基础就是美拉德反应产生的分子质量在 1000~5000D 的肽^[9]。

我国在呈味肽基础理论以及应用研究方面比较薄弱。复合调味品存在品质低、风味失真的特点,甚至有的还出现腥味及苦味。Stevenson 等^[10]指出肽酶解液缩合反应是降低蛋白酶解液苦味的一种有效途径。本实验根据不同水产品的呈味特点,选择合适的水产品组合,通过定向酶解技术及超滤,获得鲜味肽。并通过 Maillard 反应有效解决苦味、腥味等问题,制备出风味良好的调味品,为高品质水产调味料的开发提供理论依据和技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

鲢鱼、南美白对虾((12±2)cm,(15±2)g)、扇贝,购自南京孝陵卫菜场。

风味蛋白酶(500LAPU/g,最适 pH5.0~7.0)、复合蛋白酶(1.5AU/g,最适温度 35~60℃,最适 pH 5.5~7.5) 诺维信(中国)投资有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

MM12 绞肉机 广东韶关大金食品机械厂;T25 匀浆机 德国 Ika 集团;FDU-1200 冷冻干燥机 日本东京 Rikakikai 公司;SHZ-22 水浴恒温振荡器 太仓华美生化仪器厂;UniCen MR 台式冷冻离心机 德国 Herolab 公司;500 型精密电子天平 意大利 Bel 公司;RE-6000 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;超滤装置 无锡赛普膜科技发展有限公司;L-8900 氨基酸分析仪 日本日立高科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酶法制备鲜味肽的工艺路线

鲜活水产品→前处理→绞肉→匀浆→酶解→灭酶→冷却→离心→取上清液→超滤→浓缩→冷冻干燥→鲜味肽

1.3.2 操作要点

前处理:挑选鲜活的水产品,除去鱼体表面的鱼鳞及内脏,对虾去除头部,扇贝去壳,用流水冲洗;绞肉:将清洗干净的鲢鱼放入 2 倍质量的水加热 20min,剔去鱼骨,取鱼肉制成鱼糜;将对虾及扇贝绞成肉糜(两次),装袋,−18℃冻藏备用;匀浆:肉糜取出解冻,加水用打浆器匀浆,并加入 20~30mg/kg 的叔丁基对苯二酚(TBHQ)进行抗氧化处理;酶解:加入酶制剂,慢速升温至酶解温度进行保温酶解,每隔 1h 取样测定氨基态氮。灭酶:升温至 95℃保持 10min,使水解液中的蛋白酶失活;离心:过滤除去酶解液中的渣,在 3500r/min 条件下进一步离心 20min,取上清液;超滤:上清液过超滤膜,操作压力 0.5MPa、温度 40℃;浓缩:真空度 0.09MPa、温度 40℃,将超滤液浓缩 5 倍;冷冻干燥:浓缩液在 −50℃冻干,得到鲜味肽干品。

1.3.3 水解度测定

采用 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》凯氏定氮法测定总氮含量,采用 ZBX 66038—1987《氨基态氮测定法》中的甲醛滴定法测定氨基态氮含量。

水解度是指底物蛋白质中被水解肽键数占肽键总数的百分数。它是控制水解过程的一个重要参数。水解度按下式计算:

$$\text{水解度}/\% = \frac{\text{氨基态氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100$$

1.3.4 感官分析

鲜味评定参考 Ogasawara 等^[11]的方法。在纯净水中加入 1.5g/100mL 谷氨酸钠和 0.5g/100mL NaCl 溶液,搅拌均匀,加入 2g/100mL 的样品作为品尝对象,在 60℃恒温水浴 10min,以 2g/100mL 麦芽糊精代替样品溶液作为对照组,进行鲜味评定。评定小组由 8 位经过培训的人员组成,打分采用 7 分制,将麦芽糊精的对照溶液设定为 3 分,最终得分为 8 位感官评定员打分的平均值。

1.3.5 试验设计

采用 Design-Expert7.0 软件 Box-Behnken 中心组合设计和响应面法(response surface methodology, RSM)设计方案,建立数学回归模型,应用 Model Graphs 程序作响应曲面图和等高线图,对工艺参数进行最佳化分析,同时反映不同因素间的交互影响。

1.3.6 酶解液超滤

实验用超滤设备为平板膜系列,膜材料为聚醚砜,超滤膜截留分子质量(M_w)为 10、5、2.5kD,分离出 4

种不同分子质量的多肽组分: 组分 I (> 10kD)、组分 II (5~10kD)、组分 III (2.5~5kD) 和组分 IV (< 2.5kD)。分别将超滤后的各组分溶液浓缩后冻干, -18℃冻藏。超滤过程中采用透过液间断循环冲洗, 防止膜堵塞。

1.3.7 酶解液 Maillard 反应

取不同分子质量的酶解组分 1.5g, 加入 1.5g 葡萄糖、0.3g 生姜粉、0.3g 氯化钠、自然 pH 值、蒸馏水 10mL, 115℃加热 30min 进行 Maillard 反应, 冷却至室温。取反应液 5mL, 蒸馏水稀释 10 倍, 进行感官评定。

1.3.8 氨基酸含量测定

将样品称取一定质量放于玻璃水解管中。加入 6mol/L 盐酸, 抽真空封管。使用水解器在 110℃的温度条件下水解 24h。转移定容后过滤, 取滤液在真空干燥器中干燥成固体, 再稀释并使用 0.02mol/L 盐酸调整浓度后作样品, 用氨基酸分析仪分析样品的氨基酸种类和组成。

1.4 数据统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS13.0 统计软件做方差分析(ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 酶解原料的选择

不同种类的水产品呈现不同的天然风味, 如鱼类、甲壳类及贝类。虾的鲜美与具有爽快甜味的甘氨酸有关, 甜味对蛋白鲜味有明显的增强效果^[12]; 扇贝中的丙氨酸呈略带苦味的甜鲜美味, 琥珀酸是扇贝等贝类的主要呈味成分和特征鲜味成分, 即使在含量很少时, 作用也很明显^[13]; 鱼类肌肉中的低分子肽具有提高鲜度作用, 与其它成分反应会进一步形成各种风味物质, 产品直接体现相应的天然风味。本研究选择鲢鱼、南美白对虾及扇贝 3 种不同类别的水产混合品作为原料, 固定其他因素: $m_{\text{复合蛋白酶}}:m_{\text{风味蛋白酶}}$ 质量比 1:1、底物质量浓度 30g/100mL、 $[E]/[S]$ 为 5%、酶解温度 50℃、时间 5h, 改变原料配比, 对酶解液进行感官评分。

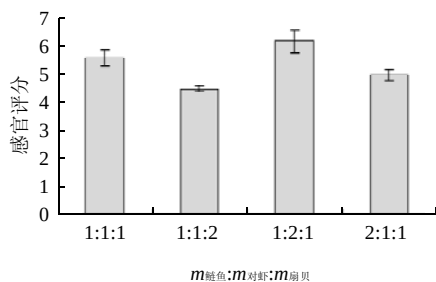


图1 不同原料配比的感官评分

Fig.1 Effect of hydrolysis substrate composition on sensory evaluation score

由图1可知, 当 $m_{\text{鲢鱼}}:m_{\text{对虾}}:m_{\text{扇贝}}$ 为 1:2:1 时, 感官评分最高; $m_{\text{鲢鱼}}:m_{\text{对虾}}:m_{\text{扇贝}}$ 为 1:1:1 时, 感官评分也相对较好。综合考虑原料成本, 选择 $m_{\text{鲢鱼}}:m_{\text{对虾}}:m_{\text{扇贝}}$ 为 1:1:1。

2.2 蛋白酶的选择

不同的酶作用位点不同, 水解蛋白的产物有差异, 呈现不同的风味特点。与许多其他内切蛋白酶不同, 复合蛋白酶可以进行蛋白的深度水解。但是复合蛋白酶是非特异性蛋白质肽键内切酶, 蛋白酶经酶水解后其疏水性氨基酸残基暴露出来, 得到的多肽带有明显的苦味。风味蛋白酶是经深层发酵生产的蛋白酶和肽酶的复合物, 含有内切蛋白酶和外切蛋白酶两种活性, 可以有效的将疏水性氨基酸从脯氨酸末端切除, 有助于酶解形成良好风味^[14]。选择风味蛋白酶与复合蛋白酶酶解水产混合品($m_{\text{鲢鱼}}:m_{\text{对虾}}:m_{\text{扇贝}}$ 为 1:1:1), 酶的总添加量不变, 改变双酶的质量配比, 其他条件同 2.1 节, 测定酶解液的水解度, 并对酶解液进行感官评分。

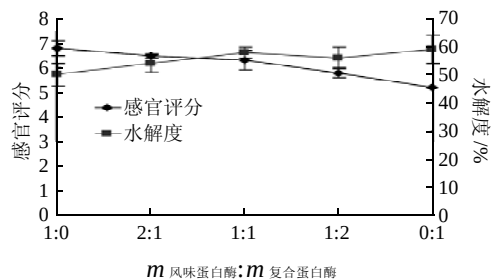


图2 双酶不同质量比对水解效果的影响

Fig.2 Effect of ratio between flavourzyme and protamex on sensory evaluation score and degree of hydrolysis

由图2可知, 当风味蛋白酶为 100% 时, 感官评分最高; 随着风味蛋白酶的比例降低, 复合蛋白酶的比例提高, 感官不断降低; 当复合蛋白酶为 100% 时, 感官评分最低。水解度的变化趋势为先升高后降低, 当 $m_{\text{风味蛋白酶}}:m_{\text{复合蛋白酶}}$ 比为 1:1 时, 水解度达到 58%。综合考虑, 选择风味蛋白酶与复合蛋白酶的质量比为 1:1。

2.3 酶解工艺的优化

为了获得鲜味肽的最大释放量, 在单因素试验结果 ($[E]/[S]$ 10%、酶解温度 55℃、酶解时间 5h、底物质量浓度 30g/100mL、自然 pH 值) 的基础上, 选择 $[E]/[S]$ 、酶解温度及酶解时间 3 个因素为自变量, 以水解度 (Y_1) 和感官评分 (Y_2) 为响应值, 设计三因素三水平的二次回归方程来拟合因素和指标(响应值)之间的函数关系, 采用响应面分析法来寻求酶解最优工艺。试验因素及水平见表 1, 设计方案与结果见表 2。

表1 响应面试验因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

编码及水平	因素		
	A[E]/[S]/%	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/h
-1	5	50	4
0	10	55	5
1	15	60	6

表2 响应面试验设计方案与结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	Y ₁ /%	Y ₂
1	1	-1	0	50.29	5
2	-1	1	0	49.36	6
3	0	0	0	57.01	6.8
4	0	0	0	55.11	6.7
5	-1	-1	0	46.13	6.2
6	1	1	0	51.98	5.3
7	-1	0	1	46.12	6.6
8	-1	0	-1	41.32	4.8
9	1	0	-1	48.21	4.4
10	0	-1	1	52.09	5.8
11	0	0	0	58.32	6.6
12	0	0	0	55.28	6.7
13	0	0	0	56.69	6.7
14	0	1	-1	40.38	4.4
15	1	0	1	54.67	5.8
16	0	-1	-1	49.41	5.2
17	0	1	1	56.21	6.6

2.3.1 回归方程的建立与方差分析

采用 Design-Expert 7.0 软件的 ANOVA 程序, 进行二次回归分析, 选择对响应值显著的各项, 剔除不显著因子, 得到水解度(Y₁)和感官评分(Y₂)对自变量(酶解时间、温度、[E]/[S])的二次多项回归方程为:

$$Y_1 = 56.48 + 2.78A + 3.72C - 4.49A^2 - 4.41C^2 + 3.29BC$$

$$Y_2 = 6.7 - 0.39A + 0.75C - 0.59A^2 - 0.49B^2 - 0.71C^2 + 0.4BC$$

对水产蛋白酶解物水解度(Y₁)和感官评分(Y₂)回归方程的方差分析(表3)表明: 所得 Y₁ 的回归方程显著, Y₂ 的回归方程极显著, 失拟检验不显著, 这说明此回归模型很理想, 用方程 Y₁、Y₂ 拟合 3 个因素与酶解产物水解度和感官评分之间的关系是可行的; 试验误差小, 故可用该回归模型代替试验真实点对结果进行分析。Y₁ 的一次项 A 和 C 均对酶解产物的水解度有极显著的影响, 且影响顺序依次为 C > A, 二次项 A 和 C 有极显著的影响, 交互项 BC 也对水解度有显著影响; Y₂ 的一

次项 A 和 C 均对酶解产物的感官评分有极显著的影响, 二次项 A²、B² 和 C² 以及交互项中的 BC 也对水解度有极显著的影响; 这表明响应值的变化相当复杂, 各个具体的因素对响应值的影响不是简单的线性关系, 而是呈二次关系。

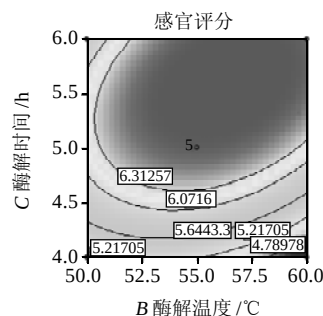
表3 二次回归方程的方差分析

Table 3 Variance analysis of the developed quadratic regression models

方差来源	Y ₁		Y ₂	
	平方和	Prob > F	平方和	Prob > F
模型	432.38	0.0035	11.56	< 0.0001
A	61.72	0.0098	1.20	< 0.0001
B	1.25 × 10 ⁻⁵	0.9988	1.23 × 10 ⁻³	0.7786
C	110.78	0.0022	4.50	< 0.0001
A ²	0.59	0.0045	1.45	< 0.0001
B ²	0.69	0.0520	1.00	< 0.0001
C ²	81.88	0.0049	2.14	< 0.0001
AB	0.59	0.7409	0.063	0.0777
AC	0.69	0.7217	0.040	0.1424
BC	43.23	0.0218	0.640	0.0003
失拟	28.02	0.0701	0.082	0.0666
R ²	0.9250	0.9912		

2.3.2 因素间的交互作用

由表3可知, 交互项 BC 对水解度的影响显著, 对感官评分的影响极显著。重点分析交互项 BC 对感官评分(Y₂)的影响, 固定模型中的 [E]/[S] = 10%, 得到 BC 交互作用对感官评分的子模型, 并根据模型绘制三维曲面图及等高线图, 见图2。随着酶解温度的上升, 感官评分呈现较平缓的先上升后下降的趋势。而酶解时间对感官评分的影响相对较明显, 呈上升趋势。这是因为随着酶解时间的延长, 酶解越来越充分, 呈鲜味的小分子短肽越来越多。酶解温度和时间之间存在协同作用, 在酶作用的最佳温度范围内, 稍微延长酶解时间就会较大幅度地提高感官分值。



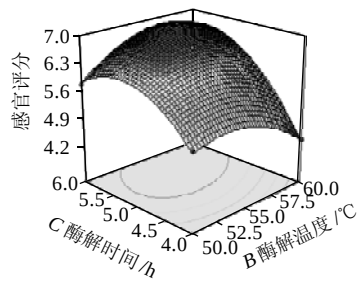


图3 酶解时间和温度对产物感官评分的响应面图和等高线图
Fig.3 Response surface and contour plots showing the effects of hydrolysis time and temperature on sensory evaluation score

对回归模型进行数学分析,得到两者的最大响应值所对应的条件见表4。可见,达到最大的水解度和感官评分所需的因素条件并不完全一致,说明两响应值之间相互制约。在蛋白质酶法水解过程中,期望得到的具有特定功能的活性肽通常是分子质量较小的短肽,若单纯地追求高水解度指标,必然会导致产生大量的游离氨基酸,反而与目标相反。结合表4所得因素值,并考虑成本问题,确定最优的酶解条件为:[E]/[S]7.5%、温度56℃、酶解时间5.9h,此时水产蛋白酶解物的水解度和感官评分预测值分别为55.17%和6.9。

表4 获得最大水解度和感官评分的水解条件

Table 4 Optimal hydrolysis conditions providing maximum degree of hydrolysis and those providing maximum sensory evaluation score

模型	[E]/[S]/%	酶解温度/℃	酶解时间/h	最大值
Y ₁	11.6	56.7	5.6	57.98%
Y ₂	7.5	55.7	5.9	6.9

2.3.3 验证实验

为了验证模型预测值是否准确,进行回归模型的验证实验。采用上述优化后的酶解工艺条件,即[E]/[S]7.5%、酶解温度56℃、底物质量浓度30g/mL、酶解时间5.9h、自然pH值,进行验证实验,平行3次,取平均值,测得水产蛋白的水解度和鲜味肽的感官评分分别为56.32%和6.8,与模型的预测值(55.17%和6.9)基本符合,说明该模型具有实际指导意义。

2.4 酶解液超滤结果

蛋白酶解液普遍含有苦味和腥味,Linde等^[15]用α-环式糊精降低蛋白水解物的苦味。本实验运用超滤技术去除水解液中的微颗粒成分、胶体、高分子物质,包括大多数腥、苦味成分,使产品风味纯正、澄清、色泽诱人,并使小分子风味成分得到一定的浓缩。Claeys等^[16]对鲜肉中分子质量在3~17kD的肽进行量化,并对其感官强度进行分析,分子质量3~10kD的肽对鲜味有明显的相关性。

本研究选择 *m* 鲢鱼:*m* 对虾:*m* 扇贝 为 1:1:1,采用风味蛋白酶与复合蛋白酶双酶水解,添加质量比为 1:1,在[E]/[S] 7.5%、酶解温度 56℃、底物质量浓度 30g/100mL、酶解时间 5.9h、自然 pH 值的条件下水解 5.9h,灭酶,酶解液离心取上清液。在操作压力 0.5MPa、温度 40℃,自然 pH 值的条件下超滤,依次通过分子质量为 10、5kD 和 2.5kD 的超滤膜,分离出 4 种不同分子质量的多肽组分:组分 I (10kD)、组分 II (5~10kD)、组分 III (2.5~5kD)和组分 IV (< 2.5kD),各组分的蛋白回收率见表 5。分别将超滤后的各组分浓缩后冻干,得到各级鲜味肽的干品。

表5 酶解液的超滤分离($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 5 Protein recovery from ultrafiltration separation of hydrolysate obtained under optimal hydrolysis conditions ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组分	分子质量/kD	蛋白回收率/%
I	> 10	2.7 ± 0.3
II	5~10	5.3 ± 0.4
III	2.5~5	19.8 ± 0.8
IV	< 2.5	72.1 ± 1.3

2.5 酶解液不同分子质量组分的 Maillard 反应

表6 酶解液不同分子质量组分 Maillard 反应产物的感官比较

Table 6 Sensory evaluation scores of Maillard reaction products of hydrolysate fractions with different molecular weights

组分	I (> 10kD)	II (5~10kD)	III (2.5~5kD)	IV (< 2.5kD)
感官评分	2.0 ± 0.3	5.3 ± 0.4	6.8 ± 0.2	5.6 ± 0.5

表7 组分III的氨基酸组成及含量

Table 7 Amino acid composition of fraction III

		mg/100g	
成分	含量	成分	含量
谷氨酸	865.30	色氨酸*	213.57
甘氨酸	722.98	缬氨酸*	181.61
丙氨酸	617.08	组氨酸	125.89
天门冬氨酸	518.22	异亮氨酸*	97.62
赖氨酸*	478.03	苯丙氨酸*	88.34
亮氨酸*	411.81	苏氨酸*	45.48
丝氨酸	386.16	胱氨酸	36.16
酪氨酸	339.28	蛋氨酸*	26.34
精氨酸	269.04		
脯氨酸	239.37	总计	5662.28

注: *.必需氨基酸。

肽与糖进行美拉德反应生成特殊香气的物质。肽分子质量的不同,产生的气味和滋味差异较大。表6列出了酶解液不同分子质量组分的 Maillard 反应产物在色泽、气味和滋味的特点,其反应产物在鲜味上呈现出

明显的差异,随着肽组分分子质量的增大而出现鲜味减弱的趋势。分子质量 $>10\text{kD}$ 成分的鲜味不明显,分子质量 $<2.5\text{kD}$ 成分除了鲜味之外还表现出了腥味和苦味,这与它所含较多小分子肽、游离氨基酸以及其他小分子物质有关, Schiffman 等^[17]指出大多数的双肽具有明显苦味。综合评价,分子质量 $2.5\sim5\text{kD}$ 的鲜味肽在 Maillard 反应后口味纯正浓厚、天然鲜美,超出了一般的烹调效果,其氨基酸组成及含量见表 7。

3 讨论与结论

鱼、虾及贝类各种典型水产品是海鲜特征滋味的特有物质基础,产品直接体现相应的天然风味,鲜味饱满的天然风味料必然来自于典型水产品的复合物。本研究选择鲢鱼、对虾及扇贝 3 种不同类别的水产混合品作为原料,综合考虑比较酶解产物的感官特点及原料成本,选择鲢鱼、南极白对虾与扇贝的质量比为 $1:1:1$ 。

目前已有多种利用水产品制备风味料的报道,大多对水产蛋白采用化学法或酶法制备短肽,然后进行美拉德反应制得风味料^[18-19]。技术不足之处表现在:酶解的专一性导致酶解形成的多肽比较集中,缺乏原汁原味的感觉,有苦味。酶的特异性和酶切位点的专一性会影响酶解产物中小分子肽和氨基酸的组成和序列,从而影响产物的风味,本研究采用双酶定向酶解技术,将特异酶切位点的酶组合互补,可作用产生良好风味物质,条件温和,步骤简洁。采用风味蛋白酶和复合蛋白酶双酶水解水产蛋白,综合考虑水解度及感官评分,确定 m 风味蛋白酶: m 复合蛋白酶为 $1:1$ 。响应面法优化酶解水产蛋白制备鲜味肽的最佳工艺为: $[E]/[S]7.5\%$ 、底物质量浓度 $30\text{g}/100\text{mL}$ 、自然 pH 值、酶解温度 56°C 、时间 5.9h 。该条件下水产蛋白的水解度和鲜味肽的感官评分分别为 56.32% 和 6.8 。

在众多的分离方法中,超滤因其具有高效、低能耗、活性回收率高、处理能力范围广、占地面积小、成本低等优点而成为可能实现工业化生产的方法。本研究采用超滤技术分离出 4 种不同分子质量的多肽组分,并分别进行美拉德反应。张晓鸣等^[20]酶解大豆制备风味增强肽,发现分子质量 $3000\sim5000\text{D}$ 的组分其 Maillard 产物能够明显地增强风味,包括鲜味、醇厚味及后味。Rhyu 等^[21]对韩国豆酱的水提物分级,得到分子质量 $500\sim1000\text{D}$ 的部分具有最强的鲜味,对豆酱的风味起决定性贡献作用,分析这部分鲜味物质为含谷氨酸和天冬氨酸的短肽。本研究得到分子质量 $2.5\sim5\text{kD}$ 的鲜味肽,进行 Maillard 反应后鲜味浓郁,口味纯正。

参考文献:

- [1] 翁世兵,孙恢礼.海产鲜味物质及海产品特征滋味的研究进展[J].中国调味品,2007(11): 21-27.
- [2] 刘甲.呈味肽的研究及其在调味品中的应用[J].肉类研究,2010,24(5): 88-92.
- [3] 全拓.肉类食品的风味改良与开发[J].肉类研究,2010(12): 3-8.
- [4] YAMASAKI Y, MAEKAWA K. A peptide with delicious taste[J]. Agricultural Biology and Chemistry, 1978, 42(9): 1761-1765.
- [5] NISHIMURA T, KATO H. Taste of free amino acids and peptides[J]. Food Reviews International, 1988, 4(2): 175-194.
- [6] KIM S H, LEE K A. Evaluation of taste compounds in water-soluble extract of a *doenjang* (soybean paste)[J]. Food Chemistry, 2003, 83(3): 339-342.
- [7] MAEDA Y, OKUDA M, HASHIZUME K, et al. Analyses of peptides in sake mash: forming a profile of bitter-tasting peptides[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(3): 238-246.
- [8] MOLINA E, RAMOS M, ALONSO L, et al. Contribution of low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheeses made of cows', ewes' and goats' milk[J]. International Dairy Journal, 1999, 9(9): 613-621.
- [9] 德永税.解析米酱的厚味原理、美拉德肽的发现[J].中国酿造,2009(7): 186.
- [10] STEVENSON D E, OFMAN D J, MORGAN K R, et al. Protease-catalyzed condensation of peptides as a potential means to reduce the bitter taste of hydrophobic peptides found in protein hydrolysates[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22(2): 100-110.
- [11] OGASAWARA M, KATSUMATA T, EGI M. Taste properties of Maillard reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 600-604.
- [12] GIBBS B F, ALLI L, MULLIGAN C, et al. Sweet and taste-modifying proteins: a review[J]. Nutrition Research, 1996, 16(9): 1619-1630.
- [13] 李朝慧,彭小红.天然水产滋味类产品概述[J].食品工业科技,2007,28(3): 237-241.
- [14] 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,2006,27(7): 141-143.
- [15] LINDE G A, LAVERDE A, Jr, de FARIA E V, et al. Taste modification of amino acids and protein hydrolysate by α -cyclodextrin[J]. Food Research International, 2009, 42(7): 814-818.
- [16] CLAEYS E, de SMET S, BALCAEN A, et al. Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity[J]. Meat Science, 2004, 67(2): 281-288.
- [17] SCHIFFMAN S S, ENGELHARD H H. Taste of dipeptides[J]. Physiology and Behavior, 1976, 17(3): 523-535.
- [18] 褚忠志,于新.鱼类蛋白质酶水解研究进展[J].仲恺农业技术学院学报,2007,20(3): 66-70.
- [19] 崔春,赵谋明,曾晓房,等.酸法和酶法水解海蜇蛋白的呈味作用研究[J].中国调味品,2007(10): 34-43.
- [20] 张晓鸣,高梅娟,颜袁,等.酶解大豆蛋白制备风味增强肽[J].食品与生物技术学报,2009,28(1): 8-13.
- [21] RHYU M R, KIM E Y. Umami taste characteristics of water extract of *doenjang*, a Korean soybean paste: low-molecular acidic peptides may be a possible clue to the taste[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1210-1215.