

# 双酶水解紫贻贝制备酵母调味料研究\*

刘树青 江晓路 牟海津

(中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

**摘要:** 利用复合蛋白酶、复合风味蛋白酶、中性蛋白酶对紫贻贝进行双酶水解, 水解效果比较后选择使用复合蛋白酶和复合风味蛋白酶作为复合水解酶, 同时采用产酯酵母发酵技术制备调味料, 通过电位滴定法测定单菌株和多菌株发酵对双酶水解贻贝肉产总酯的影响。结果表明: 产酯酵母 1274 在双酶水解后, 接种量为 5%、发酵温度 28℃, 发酵时间 72h 时总酯含量为 0.65%, 相同条件下, 产酯酵母 1274 和 1202 多菌株发酵时总酯含量为 0.78%, 经产酯酵母发酵后的调味料, 酯香味浓郁, 给予产品以发酵特有的风味。

**关键词:** 紫贻贝, 产酯酵母, 发酵, 双酶水解

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0058-05

## Preparation of Yeast-fermented Seasoner from *Mytilus edulis* Hydrolyzed by Bienzyme<sup>\*</sup>

LIU Shu-Qing JIANG Xiao-Lu MU Hai-Jin

(College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract:** Protamex, flavorzyme and neutrase were used for bienzyme hydrolysis of *Mytilus edulis*. Protamex and flavorzyme were determined as the optimal hydrolases by analysis of hydrolysis effects. After bienzyme hydrolysis, ester forming yeast fermentation was used to prepare seasoner. The effects of fermentation of single or compound strains on the value of FAN were detected by formaldehyde titration method. The results showed that the value of FAN was 0.65% when the conditions of ester forming yeast 1274 were as follows: inoculation volume 5% (v/v), fermentation temperature 28℃ and culture time 72h after bienzyme hydrolysis; the value of FAN was 0.78% when the hydrolytic solution was fermented by compound strains including ester forming yeast 1274 and 1202 under the same fermentation conditions. After fermentation of ester forming yeast, the seasoner gave a full-bodied smell of ester with fermentation flavour.

**Key words:** *Mytilus edulis*, Ester forming yeast, Fermentation, Bienzyme hydrolysis

利用复合蛋白酶, 复合风味蛋白酶 (内切 + 外切), 中性内切蛋白酶, 对海产品中低值鱼、虾、贝类进行深度分级水解, 获得氨基酸含量高, 营养丰富、风味良好的水解液, 是制作海鲜调味品的好基料。应用生物酶解的方法所获得的水解物, 避免了酸水解存在的氨基酸破坏及氯丙醇毒性问题, 使调味品中氨基酸组成配比更趋合理<sup>[1]</sup>。有研究表明, 过去贝类等软体动物中不含 AMP 脱氢酶因而不能生成 IMP (肌苷酸), 而目前已从鱿鱼、牡蛎、贻贝等部分软体动物中发现有 IMP 的生成<sup>[2]</sup>。IMP 除自身呈鲜味之外, 与谷氨酸共存时显示鲜味增效作用, 因此, IMP 的存在可使贻贝水解液更具有良好的海鲜风味特征<sup>[3]</sup>。

\* 中国海洋大学校基金资助项目 (No. 2004JY06)

通讯作者 Tel: 0532-2032290, E-mail: Liushq@ouc.edu.cn

收稿日期: 2005-02-03, 修回日期: 2005-03-28

产酯酵母 (Ester forming yeast), 亦称生香酵母, 是指可生成较多酯类物质的酵母的通称<sup>[4]</sup>。具有较强的氧化特性和产酯能力, 能将糖类及其衍生物转化成乙醇、乙酸和 CO<sub>2</sub>, 有机酸与醇类产生酯化作用形成乙酸乙酯, 使发酵液具有酯香气及醇香气。后期发酵中可使蛋白质水解为氨基酸, 酵母 RNA 降解后生成的嘌呤核苷酸, 与谷氨酸钠盐起协同作用, 具有强烈的增鲜效果。由于酵母菌体含有丰富的维生素、氨基酸和无机盐类等成分, 所以制得的酵母调味料具有很高的营养价值。同时, 产酯酵母还能利用原料中的糖产生大量的酯类物质, 使发酵液具有独特的香味<sup>[5]</sup>。

对水产品的酶解以及自然发酵, 许多科研工作者已经进行了比较深入的研究<sup>[6]</sup>, 但是, 对在发酵过程中引入产酯酵母, 使发酵液产生其他独特的香味的研究还很少。本文以紫贻贝为原料, 利用双酶水解后加入产酯酵母制备酵母调味料的工艺研究, 取得了较理想的试验结果, 制备出了低成本、高营养, 风味独特的高附加值的天然海鲜调味品。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

紫贻贝 (*Mytilus edulis*), 购于青岛市团岛双星农贸市场, 鲜度良好。蛋白酶: 复合蛋白酶 (Protamex 1.5AU/g), 复合风味蛋白酶 (Flavorzyme 1,000AU/g), 中性蛋白酶 (Neutrase 1.5AU/g)。丹麦诺和诺德公司出品。

### 1.2 菌株

产酯酵母 (Ester forming yeast) 1201、1202、1274 均由本实验室保存。

### 1.3 发酵培养

产酯酵母接种于麦芽汁培养基中 (6~8°Bx), 28℃振荡培养 3d, 测定发酵液中总酯含量。

### 1.4 一般营养成分测定

游离氨基氮 (FAN), 甲醛滴定法<sup>[6]</sup>; 总酯, 电位滴定法<sup>[7]</sup>; 粗蛋白, 微量凯氏定氮法<sup>[8]</sup>; 粗脂肪, 索氏抽提法<sup>[8]</sup>; 总酸, 碱滴定法<sup>[8]</sup>; 总糖, 直接滴定法<sup>[8]</sup>; 水解率 (DH) 测定用 TCA 法<sup>[9]</sup>。水解率定义为: 游离氨基酸态氮的含量占原料总蛋白质含量的百分率。

### 1.5 感官鉴定

色泽、口感、气味的评定。

### 1.6 试制品的工艺流程

原料→清洗去壳→贝肉匀浆→酶解→灭酶冷却→酵母菌发酵→过滤→调味→装瓶杀菌。

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫贻贝肉的常规成分分析

紫贻贝鲜品除水分 (81.5%) 外, 粗蛋白含量较高, 总糖含量次之, 灰分和粗脂肪含量较低 (表1)。据章超桦<sup>[2]</sup>等报道, 贻贝肉蛋白质的 18 种氨基酸中必需氨基酸含量丰富, 均衡, 高蛋白质赋予了紫贻贝的高营养价值。值得注意的是紫贻贝鲜品中总糖含量达到 3.34%, 较其它种类贻贝都高。而总糖中还原糖的存在具有调和提取液的

呈味物质,使提取物保持风味浓厚而持久。

表1 紫贻贝鲜品的常规成分

成分	水分	灰分	粗蛋白	粗脂肪	总糖
含量 (%)	81.5	1.89	11.8	1.52	3.34%

## 2.2 不同双酶组合对贻贝水解液的影响

2.2.1 不同双酶组合的酶解条件:已经过优选酶解条件而确定的各种蛋白酶的水解条件如表2。

表2 双酶酶解条件

蛋白酶	t (°C)	pH	加酶量 (%)	t (h)
复合蛋白酶 + 复合风味蛋白酶 P	50	6.0	0.4	30' + 6
复合风味蛋白酶 + 中性蛋白酶	50	6.5	0.4	6 + 2
复合蛋白酶 + 中性蛋白酶	50	7.0	0.4	30' + 2

2.2.2 双酶对酶解液中 FNA 及感官指标的影响:利用3种双酶组合在表2条件下对紫贻贝进行酶解,并测定水解液中氨基酸态氮(FAN)的含量,同时进行感官评定,结果见表3。

表3 双酶水解对贻贝酶解液的影响

蛋白酶	FAN (mg/100ml)	DH (%)	感官评定
复合蛋白酶 + 复合风味蛋白酶	830.5	45	黄褐色; 鲜味浓
复合风味蛋白酶 + 中性蛋白酶	532.3	28	黄褐色; 略有苦味
复合蛋白酶 + 中性蛋白酶	760.3	34	黄褐色; 鲜味较浓

由于不同的蛋白酶酶水解蛋白质的位点不同,水解效果各异。单一的中性蛋白酶或复合蛋白酶均具有内切酶,对原料的水解率和水解液中 FAN 值较高,但水解液的风味也较差。复合风味蛋白酶具有内切酶和外切酶的组分,其中的端肽酶能不同程度水解在水解过程中产生的苦味肽,从而达到降低苦味的效果。但复合风味蛋白酶对原料的水解程度较低,综合上述因素,采用双酶酶解,结果如表3所示。所以在发酵制备酵母调味料时,均采用复合风味蛋白酶 + 复合蛋白酶和复合蛋白酶 + 中性蛋白酶双酶进行水解。

## 2.3 产酯酵母 1274, 1202, 1201 菌株产酯能力比较

在无菌 12°BX 的麦芽汁发酵液中,分别接种产酯酵母 1274, 1202 和 1201 菌株,28°C 振荡培养 72h,分别测定发酵液中总酯含量,结果见表4。

表4 3株产酯酵母的产酯水平

菌株	1274	1202	1201
总酯 (%)	0.83	0.77	0.62

由表4可看出,3株产酯酵母的产酯能力为1274 > 1202 > 1201,3株产酯酵母发酵液中1274菌株酯香及醇香味浓郁,起泡能力最强,1202菌株次之,由此选择产酯量高,感官风味好的菌株1274和1202进行单菌和混合菌发酵,制备酵母调味料。

## 2.4 单菌株和多菌株发酵对双酶酶解贻贝肉产总酯的影响

**2.4.1 单菌株发酵对产总酯的影响:**选择表3中两组高水解率的双酶组合,分别按表2中酶解条件对匀浆后贝肉进行酶解。酶解结束后,100℃灭酶冷却,无菌操作加入5%葡萄糖,2%无水乙醇(促进乙酸乙酯的生成),再分别接种2%产酯酵母1274和1202菌株,28℃恒温发酵,每隔1d取滤液测定总酯量,结果见表5。

表5 单菌株发酵对双酶水解紫贻贝肉产总酯的影响

酶种	t (h)							
	1274 产总酯量 (%)				1202 产总酯量 (%)			
	24	48	72	96	24	48	72	96
复合风味蛋白酶 + 复合蛋白酶	0.45	0.58	0.65	0.60	0.40	0.52	0.60	0.55
复合蛋白酶 + 中性蛋白酶	0.40	0.54	0.61	0.56	0.35	0.48	0.55	0.50

从表5可看出,随着发酵时间延长,产总酯量逐渐增加,当发酵时间延长至96h时,总酯量有所下降。比较二个双酶组合,复合风味蛋白酶+复合蛋白酶组的效果更好一些,产总酯量高于复合蛋白酶+中性蛋白酶组。接种1274菌株产总酯量高于1202菌株,发酵液的酯香味浓郁、持久。

通过实验结果认为,游离氨基酸态氮生成的多少,主要取决于不同复合蛋白酶的酶解作用。加入产酯酵母后,发酵液除了FAN值高以外,产酯酵母可去除腥味、异味,更重要的是能赋予食品和调味品以发酵特有的某种风味。

**2.4.2 多菌株发酵对产总酯的影响:**选择1274和1202菌株,选用表3中两组高水解率的双酶组合,分别按表2中酶解条件对贝肉匀浆进行酶解。此后操作步骤同2.4.1中所述,结果见表6。

表6 多菌株发酵对双酶水解紫贻贝肉产总酯的影响

酶种	1274 + 1202 产总酯量 (%)			
	24h	48h	72h	96h
复合风味蛋白酶 + 复合蛋白酶	0.55	0.68	0.78	0.70
复合蛋白酶 + 中性蛋白酶	0.51	0.56	0.65	0.62

从表6可看出,总酯含量随着发酵时间延长,逐渐增高,72h达到0.78%,发酵时间延长至96h时,呈下降趋势,结果与表5相符。表明发酵时间选择72h最为适宜。同时也证明,两组双酶组合中,复合风味蛋白酶+复合蛋白酶组高于另外一组。而选用多菌株发酵,能促进微生物种间的协同作用,使发酵液中微生物群体稳定,发酵产物可互相补充,最终提高发酵产品的风味和香味。

## 2.5 产酯酵母对贻贝肉水解液成品感官评定

利用两组双酶水解贻贝肉,经产酯酵母发酵,得到的成品感官评定见表7。

表7 产酯酵母对发酵液的感官评定

蛋白酶	1202	1274	1274 + 1202
复合蛋白酶 + 复合风味蛋白酶	黄褐色	黄褐色	黄褐色
	鲜味重	鲜味重	鲜味重
	无醇香味	醇香味重	有醇香味
复合蛋白酶 + 中性蛋白酶	黄褐色	黄褐色	黄褐色
	鲜味重	鲜味重	鲜味重
	无醇香味	醇香味重	有醇香味
	略有苦味	略有苦味	略有苦味

从表7的感官评定来看,利用复合风味蛋白酶+复合蛋白酶的双酶酶解贻贝肉,得到的水解液加入产酯酵母1274或1274+1202菌株发酵,最终产品鲜味浓郁,酯香味丰富,与前述的试验结果一致。采用复合蛋白酶+中性蛋白酶进行酶解,口感略苦。

## 2.6 试制品的一般成分

成品酵母调味料一般成分见表8。

表8 试制品的一般成分(%)

项目	粗脂肪	总糖	粗蛋白	总酸	FAN值	pH
酵母调味料	5.52	1.25	1.1	1.98	0.83	6.0

如前所述,紫贻贝肉蛋白质含量丰富,适合制作营养丰富的海鲜调味料。本研究采用双酶水解与发酵相结合的方法,试制出了贻贝酵母调味料产品。此产品营养丰富而均衡,是一种高附加值、风味良好的天然调味品。

## 3 结论

(1) 复合风味蛋白酶+复合蛋白酶水解紫贻贝肉,酶解温度50℃,时间6h,加酶量0.4%,其FAN值和水解率分别达到0.83%和45%,获得较好的水解效果。

(2) 产酯酵母1274菌株的产酯水平较高,在实验条件为多菌株发酵,72h时的总酯含量在0.78%,且1274菌株产酯能力较强,使发酵液的酯香浓郁,风味良好。

(3) 产酯酵母多菌株发酵,能促进微生物种间的协同作用,其总酯含量高于单菌株发酵组,且发酵液的风味和酯香味浓厚。

(4) 发酵产品不产生异味,产酯酵母能去除腥味和苦味,屏蔽咸味的效果。无致病性,直接混合纯培养于基质中,通过相互间的协调共同发酵。

## 参考文献

- [1] 林伟锋,赵谋明,姚毓才. 食品工业科技, 2002, 23(11): 90~92.
- [2] 章超桦,洪鹏志,邓尚贵,等. 水产学报, 2000, 24(3): 267~270.
- [3] 邓尚贵,章超桦,黄晋. 水产学报, 2000, 24(1): 72~75.
- [4] 吴桂珍,李秀英,马金杰. 高师理科学刊, 2000, 20(1): 57~59.
- [5] 刘仲敏,刘安邦,吴强. 中国调味品, 2002, 6: 3~5.
- [6] 朱志伟,曾庆伟,吴小勇. 食品工业科技, 2002, 23(10): 42~44.
- [7] 刘群,扬福祺,尚维,等. 酿酒, 1996, 5: 27~28.
- [8] 大连轻工业学院,华南理工大学,郑州轻工业学院等合编. 食品分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [9] 赵新淮. 食品科学, 1994, 1: 65~67.