

# 双酶分步水解金枪鱼(*Eleotridae*)碎肉制备高 *F* 值酶解液的工艺研究\*

罗红宇<sup>1</sup> 杜帅<sup>1</sup> 郑斌<sup>2</sup> 宋茹<sup>1</sup> 杨会成<sup>2</sup>

(1. 浙江海洋学院食品与医药学院 舟山 316000; 2. 浙江省海洋开发研究院 舟山 316100)

**摘要** 以金枪鱼碎肉为原料, 采用双酶分步水解法制备高 *F* 值酶解液, 通过 Box-Behnken 试验设计, 分别确定两步酶解的最佳条件, 酶解液经活性炭静态吸附去除游离芳香族氨基酸, 对脱芳后的酶解液进行氨基酸组成分析并测定 *F* 值。结果表明, 胃蛋白酶为第一步水解用酶, 酶解的最佳工艺条件为酶用量 650U/g, 料水比 1:7(g/mL), 温度 35.9℃; 风味蛋白酶为第二步水解用酶, 酶解的最佳工艺条件为酶用量 50700U/g, pH 6.51, 温度 51℃, 最终水解度达到 36.87% ± 0.54%; 酶解液在 pH 3.0, 温度 35℃ 条件下, 经 5%(质量体积分数)的活性炭吸附时间 3h 后, 脱芳率达到 63.18%, *F* 值为 30.33, 符合高 *F* 值肽的要求。

**关键词** 金枪鱼碎肉; 双酶水解; 吸附脱芳; 高 *F* 值

**中图分类号** TS254.1

金枪鱼是营养价值和食用价值都非常高的深海鱼类, 已成为人们所喜爱的海洋食品。但金枪鱼在加工过程中会产生约占原料鱼重 11% 的碎肉、暗色肉, 大多作为鱼粉原料进行低值利用。然而这些碎肉与金枪鱼肉一样富含蛋白质、多不饱和脂肪酸等多种营养素, 目前尚无有效的高值化开发利用技术(张青等, 2009)。

高 *F* 值寡肽是一类由 2—9 个氨基酸残基所组成的混合寡肽体系, *F* 值是指支链氨基酸(Val、Ile、Leu)与芳香族氨基酸(Tyr、Trp、Phe)含量的物质的量之比(王梅等, 1998), 当寡肽的 *F* 值大于 20 即为高 *F* 值寡肽。有文献报道, 高 *F* 值寡肽产品具有改善肝性脑病(Soichi *et al*, 1987)、醒酒、护肝等(Shinsuke *et al*, 1991; 王梅等, 1999)生理功能, 此外, 高 *F* 值寡肽含有大量的支链氨基酸, 支链氨基酸具有节氮功能和调节蛋白质代谢的作用, 因此可以减少肌肉蛋白质的分解, 纠正负氮平衡。临床上用于改善手术后和卧床病人的蛋白质营养状况(Mero, 1999), 也可作为运动员比赛后的营养补充剂(Karabatas *et al*, 2000)。此外, 从现代

营养学角度看, 与游离氨基酸相比, 短肽更容易被人体消化吸收(Shuji, 1992), 短肽的生物效价和营养价值比游离氨基酸更高(赵晓芳等, 2003)。

目前高 *F* 值寡肽制备主要采用二步酶解法, 第一步在原料蛋白肽链的芳香族氨基酸处酶切使芳香族氨基酸暴露出来, 第二步将芳香族氨基酸水解呈游离态释放出来; 然后可采用活性炭吸附、凝胶层析法、离子交换法等去除酶解液中的芳香族氨基酸(陈石良等, 1998), 从而获得高 *F* 值寡肽。

本文分别采用胃蛋白酶、风味蛋白酶作为二步水解用酶, 酶解液采用活性炭静态吸附法以去除其所含芳香族氨基酸(以下简称脱芳), 从而制备出高 *F* 值肽混合液。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

金枪鱼碎肉由宁波丰盛食品有限公司提供。胃蛋白酶、风味酶购置于广西南宁庞博生物工程有限公司。活性炭(JH-15 食品级)购置于上海鑫汇活性炭有

\* 2013 年海洋公益性行业科研专项经费资助, 201305013 号; “十二五” 国家科技支撑计划课题资助, 2012BAD29B06 号。罗红宇, 博士, 教授, E-mail: lisa8919@163.com

收稿日期: 2012-11-15, 收修改稿日期: 2013-02-12

限公司。SephadexG-25 葡聚糖凝胶购置于安玛西亚中国有限公司。层析柱(1.6×50cm)购置于金坛市盛蓝仪器制造有限公司。甲醛、盐酸、氢氧化钠、三氯乙酸均为分析级。蒸馏水为双蒸水。

## 1.2 仪器与设备

PHS-3C 型精密酸度计, 上海精密科学仪器有限公司; UV-2102C 型紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; TD5A-WS 型低速离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; HH-6 型数显恒温循环水浴锅, 常州国华电器有限公司; SHA-C 型(数显)水浴恒温振荡器, 常州国华电器有限公司; 日立全氨基酸自动分析仪 L-8900, 日本日立公司; MA99-2A 自动液相层析仪, 金坛市盛蓝仪器制造有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 分析方法

酶解液总氮含量的测定采用凯氏定氮法(无锡轻工大学等, 2009), 氨基态氮含量的测定采用甲醛电滴定法(Justo *et al*, 2004), 样品水解度(DH)和蛋白转化率  $X$  的计算公式(林莉, 2003<sup>1)</sup>分别为:

DH =

$$\frac{\text{水解液中}\alpha\text{-氨基氮含量}-\text{水解前}\alpha\text{-氨基氮含量}}{\text{原料总氮含量}-\text{原料中非蛋白氮}} \times 100$$

$$X = \frac{P - P_0}{S - P_0} \times 100\%$$

式中:  $P$  为酶解液中溶于 10% 三氯乙酸(TCA)氮含量;  $P_0$  为酶解前溶于 10% TCA 氮含量;  $S$  为原料中蛋白质的总氮量。

### 1.3.2 酶解工艺的优化研究

采用双酶分步水解工艺制备寡肽酶解液。通过试验筛选出胃蛋白酶作为第一步水解用酶、风味酶作为第二步水解用酶。以水解度为主要考察指标, 蛋白质转化率为次要指标, 通过单因素试验, 确定温度、料水比、加酶量为试验因素, 以水解度为响应值, 设计三因素、三水平的 Box-Behnken 中心组合实验用以优化第一步酶解工艺, 中心试验重复 3 次以估计试验误差。响应面试验因素水平设计见表 1。

通过单因素试验确定 pH、加酶量、温度为试验因子, 以水解度为响应值, 采用响应面试验来优化第二步酶解工艺, 试验因素水平设计见表 2。

### 1.3.3 样品 F 值的测定

样品经过 6mol/L HCl 水

表 1 Box-Behnken 试验因素水平表

Tab.1 Factors and levels in Box-Behnken experimental design

因素	代码	水平		
		-1	0	1
料水比(g/mL)	$X_1$	1 4	1 5.5	1 7
加酶量(U/g)	$X_2$	400	600	800
温度(°C)	$X_3$	30	35	40

表 2 Box-Behnken 试验因素水平表

Tab.2 Factors and levels in Box-Behnken experimental design

因素	代码	水平		
		-1	0	1
pH	$X_1$	6.5	7	7.5
加酶量(U/g)	$X_2$	48000	50000	52000
温度(°C)	$X_3$	45	50	55

解后利用氨基酸自动分析仪检测氨基酸组成(杨月欣等, 2002; 中华人民共和国卫生部, 2003)。

$F$  值按下式进行计算:

$$F = (\text{Val} + \text{Ile} + \text{Leu}) / (\text{Tyr} + \text{Phe})$$

其中, Val、Ile、Leu、Tyr、Phe 分别指缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的含量(mg/mL)。

### 1.3.4 数据处理方法

试验数据采用 SPSS17.0 软件进行分析, 显著性设定为当  $P < 0.01$  时, 具有统计学上的极显著差异; 当  $P < 0.05$  时, 具有统计学上的显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 第一步酶切工艺优化

采用 Design-Expert7.0 软件对表 3 中数据进行回归拟合, 得到水解度对加酶量、料水比、温度的二次多项回归模型为:  $Y = 12.07 + 0.54X_1 + 0.32X_2 + 0.55X_3 - 0.22X_1^2 - 0.78X_2^2 - 0.84X_3^2 + 0.01X_1X_2 - 0.32X_1X_3 + 0.29X_2X_3$ 。

对模型进行方差分析, 结果(表 4)显示: 模型的一次项  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  和二次项  $X_2^2$ 、 $X_3^2$  及交互项  $X_1X_3$ 、 $X_2X_3$  差异都极显著, 二次项  $X_1^2$  差异显著, 交互项  $X_1X_2$  差异不显著。模型具有显著性( $P = 0.0001 < 0.05$ ), 模型的失拟项(Lack of Fit,  $P = 0.0738 > 0.05$ )差异不显著, 说明所得的回归方程拟合较好, 可行度很高, 可以用于预测设定工艺条件下胃蛋白酶水解金枪鱼碎肉蛋白的水解度和进行工艺优化。

1) 林 莉, 2003. 玉米蛋白酶解制备高 F 值低聚肽及应用研究. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 12—13

表 3 Box-Behnken 设计及试验结果

Tab.3 Box-Behnken experimental design and results

Std	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Predicted	Y DH/%
1	-1	-1	0	11.34%	10.33
2	1	-1	0	13.08%	11.31
3	-1	1	0	13.92%	10.81
4	1	1	0	17.19%	11.83
5	-1	0	-1	11.40%	9.64
6	1	0	-1	13.77%	11.42
7	-1	0	1	11.59%	11.23
8	1	0	1	14.23%	11.75
9	0	-1	-1	10.72%	9.72
10	0	1	-1	12.94%	9.93
11	0	-1	1	9.91%	10.39
12	0	1	1	14.38%	11.76
13	0	0	0	10.96%	12.07
14	0	0	0	10.96%	12.02
15	0	0	0	10.96%	12.12

表 4 二次回归方程模型的方差分析

Tab.4 Variance analysis for the quadratic regression model

方差来源	SS	df	MS	F 值	P 值
Model	10.87	9	1.21	60.16	0.0001
X <sub>1</sub>	2.31	1	2.31	115.16	0.0001
X <sub>2</sub>	0.83	1	0.83	41.46	0.0013
X <sub>3</sub>	2.44	1	2.44	121.68	0.0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	4×10 <sup>-4</sup>	1	4×10 <sup>-4</sup>	0.020	0.8932
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.40	1	0.40	19.78	0.0067
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.34	1	0.34	16.76	0.0094
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.18	1	0.18	8.90	0.0307
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	2.25	1	2.25	111.93	0.0001
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2.61	1	2.61	129.81	<0.0001
Residual	0.1	5	0.020		
Lack of Fit	0.095	3	0.032	12.71	0.0738
Pure Error	0.005	2	2.5×10 <sup>-3</sup>		
Cor Total	10.97	14			

根据回归方程绘制响应曲面图(图 1, 图 2, 图 3), 用于分析加酶量、料水比及温度对水解度的影响情况。

由图可以看出, 料水比对水解度影响极为显著, 水解度随料水比增加而增加, 当料水比低于 1 5.5 时, 其改变对水解度影响较大(曲面弧度较大), 当料水比高于 1 5.5 时, 其改变对水解度影响较小(曲面弧度较小); 温度、加酶量对水解度的影响也极显著, 随着温度、加酶量的升高, 水解度均呈现先升后降的变化趋势。料水比与加酶量的交互作用对水解度的影

响不显著(图 1), 而温度与料水比、加酶量之间的交互作用对水解度的影响显著(图 2、图 3), 这与方差分析的结果一致。说明三因素对水解度的影响并不是简单的线性关系。

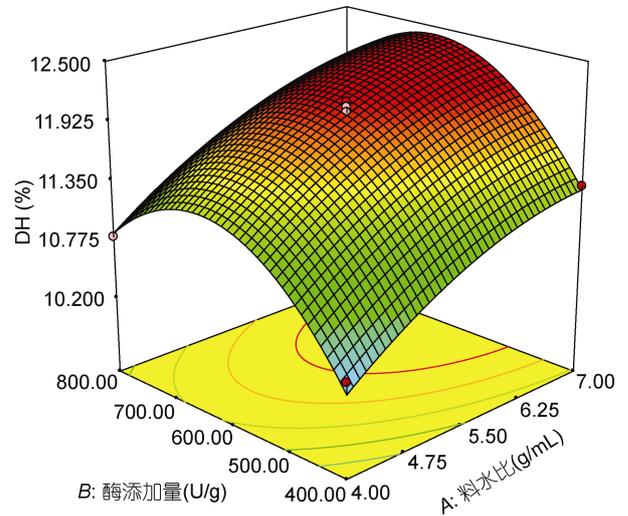


图 1 料水比与酶添加量交互作用的响应面与等高线  
Fig.1 Response surface and contour plot of the interaction between the ratio of material to water and enzyme concentration

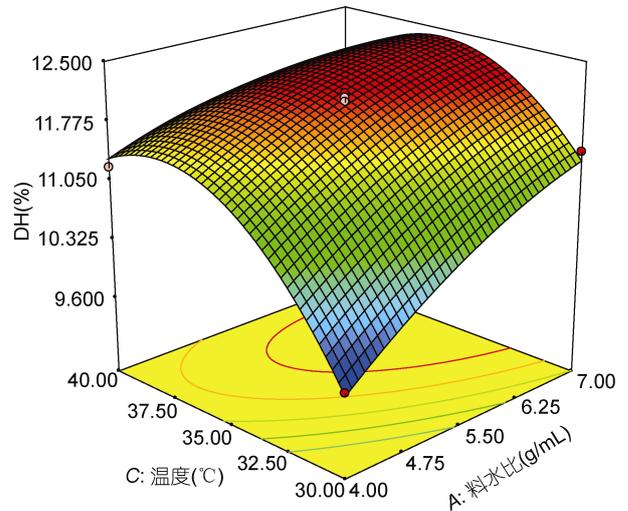


图 2 料水比与温度交互作用的响应面与等高线  
Fig.2 Responsive surface and contour plot of the interaction between the ratio of material to water and temperature

对所得方程进行逐步回归, 删除不显著项后求一阶偏导, 并令其为 0, 可得到第一步酶解的最优工艺条件: 胃蛋白酶添加量为 650U/g, 料水比为 1 7, 温度为 35.9℃, 预测的水解度为 12.45%。在此条件下进行验证试验, 三次平行样的平均水解度为 12.11%±0.87%。说明所得模型准确度高。

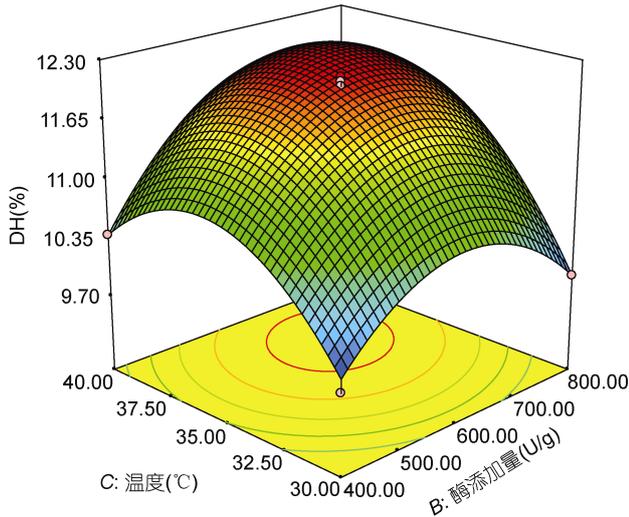


图 3 酶添加量与温度交互作用的响应面与等高线

Fig.3 Responsive surface and contour plot of the interaction between enzyme concentration and temperature

2.2 第二步酶解工艺优化

采用 Design-Expert7.0 软件对表 5 中数据进行回归拟合, 得到水解度对加酶量、pH 值、温度的二次多项回归模型为:  $Y = 35.58 - 1.09X_1 + 0.84X_2 + 0.82X_3 - 0.61X_1^2 - 2.38X_2^2 - 0.94X_3^2 - 0.70X_1X_2 + 0.49X_1X_3 + 0.52X_2X_3$ 。

表 5 Box-Behnken 设计及试验结果

Tab.5 Box-Behnken experimental design and results

Std	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Predicted	Y DH%
1	-1	-1	0	32.13%	31.90
2	1	-1	0	31.36%	31.12
3	-1	1	0	35.21%	35.45
4	1	1	0	31.64%	31.87
5	-1	0	-1	34.78%	34.68
6	1	0	-1	31.63%	31.54
7	-1	0	1	35.44%	35.53
8	1	0	1	34.25%	34.35
9	0	-1	-1	31.12%	31.45
10	0	1	-1	31.76%	31.62
11	0	-1	1	31.71%	31.85
12	0	1	1	34.44%	34.11
13	0	0	0	35.58%	35.59
14	0	0	0	35.58%	35.72
15	0	0	0	35.58%	35.43

对模型进行方差分析, 结果(表 6)显示: 模型的一次项  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ , 二次项  $X_2^2$ 、 $X_3^2$  和交互项  $X_1X_2$  差异都极显著, 二次项  $X_1^2$  和其余交互项均差异显

著。模型具有显著性( $P=0.0003<0.05$ ), 失拟项(Lack of Fit,  $P=0.1121>0.05$ )差异不显著, 说明所得的回归方程拟合较好, 可行性很高, 可以用于预测设定工艺条件下风味蛋白酶切芳香族氨基酸的水解度和进行工艺优化。

根据回归方程绘制响应曲面图(图 4, 图 5, 图 6), 用于分析加酶量、pH 值及温度对水解度的影响情况。结果显示, pH 值对水解度影响极显著, 在试验设计的 pH 值区间, 水解度随 pH 值的增加而降低, 当 pH 值小于 7 时, 其改变对水解度影响较大, pH 值大于 7.0 时,

表 6 二次回归方程模型的方差分析

Tab.6 Variance analysis for the quadratic regression model

方差来源	SS	df	MS	F 值	P 值
Model	48.05	9	5.34	48.22	0.0003
$X_1$	9.42	1	9.42	85.06	0.0003
$X_2$	5.66	1	5.66	51.13	0.0008
$X_3$	5.36	1	5.36	48.43	0.0009
$X_1X_2$	1.96	1	1.96	17.70	0.0084
$X_1X_3$	0.96	1	0.96	8.67	0.0321
$X_2X_3$	1.09	1	1.09	9.86	0.0257
$X_1^2$	1.39	1	1.39	12.56	0.0165
$X_2^2$	20.94	1	20.94	189.09	<0.0001
$X_3^2$	3.27	1	3.27	29.54	0.0029
Residual	0.55	5	0.11		
Lack of Fit	0.51	3	0.17	8.08	0.1121
Pure Error	0.042	2	0.021		
Cor Total	48.61	14			

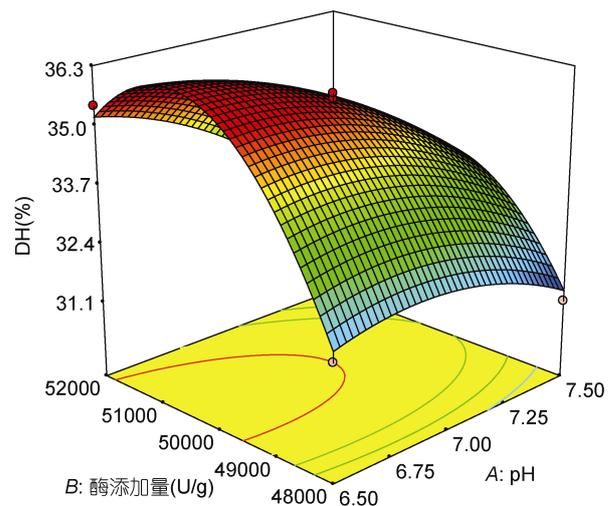


图 4 酶添加量与 pH 值交互作用的响应面与等高线

Fig.4 Responsive surface and contour plot of the interaction between enzyme concentration and pH

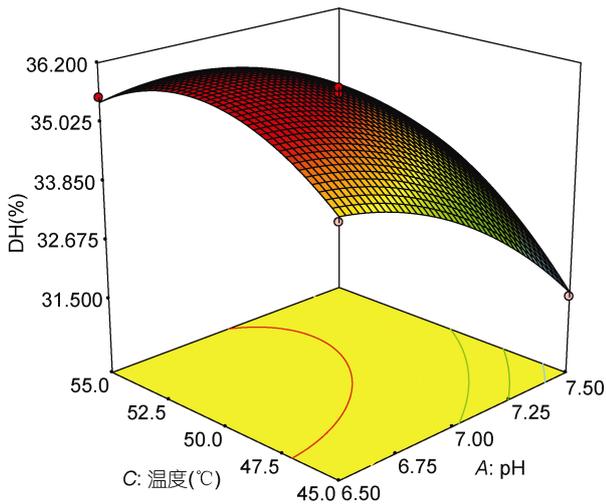


图 5 温度与 pH 值交互作用的响应面与等高线

Fig.5 Responsive surface and contour plot of the interaction between temperature and pH

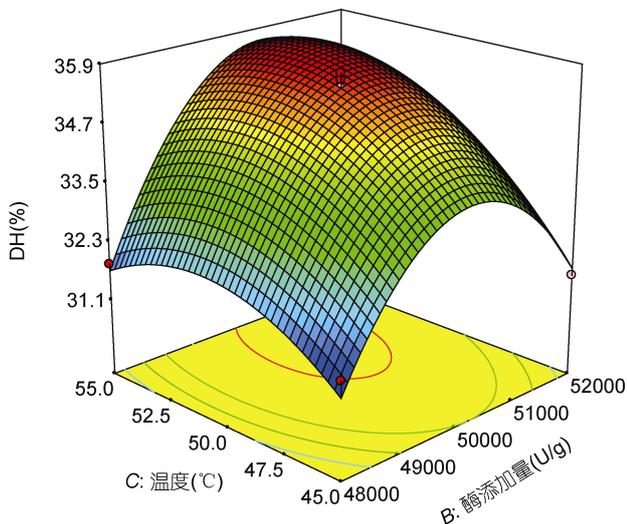


图 6 温度与酶添加量交互作用的响应面与等高线

Fig.6 Responsive surface and contour plot of the interaction between temperature and enzyme concentration

其改变对水解度影响较小; 温度、加酶量对水解度的影响也极显著, 随着温度、加酶量的升高, 水解度均呈现先升后降的变化趋势。三因素的交互作用对水解度的影响都是显著的。这与方差分析的结果一致。说明三因素对水解度的影响并不是简单的线性关系。

对所得方程进行逐步回归, 然后求一阶偏导, 并令其为 0, 可得到第二步酶解的最优工艺条件: 风味蛋白酶添加量为 50700U/g, pH 6.51, 温度 51℃, 预测水解度为 36.37%。在此条件下做验证试验, 三次平行样的水解度为 36.87%±0.54%。说明所得模型准确可靠。

### 2.3 酶解液脱芳及 F 值测定

金枪鱼碎肉蛋白通过两步水解后制备的酶解液, 经真空抽滤获得样品, 在 pH 值 3.0, 温度 35℃条件下, 采用质量体积分数为 5%的粉末型活性炭静态吸附样品 3h, 与空白样品比较, 芳香族氨基酸的脱除率达到 63.18%。

活性炭吸附脱芳后的酶解液经离心得上清液, 氨基酸组成的分析结果见表 7。其中支链氨基酸含量占组成氨基酸总量的 21.42%, 芳香族氨基酸含量仅占组成氨基酸总量的 0.71%, 由此计算出上清液的 F 值为 30.33。该样品已经达到高 F 值要求(F 值 20)。

表 7 高 F 酶解液的氨基酸组成分析

Tab.7 Result of amino acid analysis of high Fischer's ratio hydrolysate

氨基酸名称	含量(mg/mL)	氨基酸名称	含量(mg/mL)
天门冬氨酸	3.43	胱氨酸	0.14
谷氨酸	4.97	缬氨酸	2.73
丝氨酸	2.33	蛋氨酸	1.31
组氨酸	1.94	苯丙氨酸	0.12
甘氨酸	2.82	异亮氨酸	2.09
苏氨酸	2.17	亮氨酸	4.28
精氨酸	2.90	赖氨酸	6.26
丙氨酸	3.72	脯氨酸	1.09
酪氨酸	0.18		
支链氨基酸 (BCAA)	9.10	芳香族氨基酸 (AAA)	0.30
总氨基酸	42.48	F 值 (BCAA/AAA)	30.33

### 3 结论

本文采用双酶分步水解、活性炭静态吸附脱芳来制备高 F 值酶解液。优化的最佳酶解工艺为: 胃蛋白酶为第一步水解用酶, 加酶量 650U/g, 料水比 1 : 7, 温度 35.9℃; 风味酶为第二步水解用酶, 加酶量 50700U/g, pH 6.51, 温度 51℃。在优化的酶解条件下, 两步水解后水解度达到 36.87%±0.54%。酶解液采用 5%(质量体积分数)活性炭静态吸附脱除其中的游离芳香族氨基酸, 在 pH 值 3.0、温度 35℃、时间 3h 条件下, 脱芳率可以达到 63.18%, 酶解液的 F 值达到 30.33, 符合高 F 值肽的要求。

目前国内外制备高 F 值寡肽的原料多采用牛乳酪蛋白、玉米醇溶蛋白、猪血等, 需要通过脱苦、脱色处理才能得到品质较好的产品, 产品的 F 值大多在

21—35(孔芳, 2010<sup>1)</sup>; 刘金伟, 2012<sup>2)</sup>; 李洪山, 2012<sup>3)</sup>)。本试验所用原料为金枪鱼罐头加工中产生的下脚料碎肉和暗色肉, 利用风味蛋白酶进行第二步水解切掉肽链端的芳香族氨基酸的同时, 还切除了链段的部分疏水性氨基酸, 基本消除了酶解液的苦味。本课题组还对活性炭的动态、静态吸附脱芳的效果进行了比较, 结果表明静态吸附脱芳效果更好, 且工艺简单。采用 SephadexG-25 凝胶(Zheng *et al*, 2009) 吸附脱芳及分离纯化效果更好、且比 Biogel 凝胶柱分离结果更优, 加之 SephadexG-25 凝胶还具有一定脱盐功能(陈娟等, 2012), 因此更适合用于产品纯度的提高, 课题组将进一步开展吸附脱芳及凝胶层析分离纯化工艺的优化。本文采用水产品加工的下脚料作为制备高 F 值寡肽的原料, 不仅使这些低值资源得到了高值化利用, 而且减少了环境污染, 在国内还未见此类报道。

### 参 考 文 献

- 王 梅, 谷文英, 1999. 反渗透技术浓缩寡肽水溶液. 粮食与饲料工业, (6): 43—44
- 王 梅, 谷文英, 沈蓓英, 1998. 活性炭色谱法分离制备高 F 值寡肽混合物. 无锡轻工大学学报, 17(4): 41—45
- 无锡轻工大学, 天津轻工业学院, 2009. 食品分析. 北京: 中国轻工业出版社, 231—333
- 中华人民共和国卫生部, 2003. GB/T 5009.124-2003. 食品中氨基酸的测定. 北京: 中国标准出版社, 117—119
- 杨月欣, 王光亚, 2002. 实用食物营养成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 36—52
- 张 青, 王锡昌, 刘 源等, 2009. 中国金枪鱼渔业现状及发展趋势. 南方水产, 5(1): 68—74
- 陈 娟, 郑玉果, 赵 波等, 2012. Sephadex G-25 对乳酸链球菌素溶液脱盐的研究. 中国抗生素杂志, 37(3): 212—215
- 陈石良, 吴建平, 谷文英, 1998. 高 F 值寡肽的研究进展. 食品与机械, (2): 12—14
- 赵晓芳, 张宏福, 2003. 寡肽的营养与制备. 饲料博览, (12): 4—8
- Justo P, Maria M Y, Hassane L *et al*, 2004. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases. International Dairy Journal, (14): 527—533
- Karabatas L M, Fabiano de Bruno L, Pastorale C *et al*, 2000. Branched-chain amino acid-enriched diet: Effects on insulin secretion and cellular immune aggression. Proc Soc Exp Biol Med, 224: 159—165
- Mero A, 1999. Leucine supplementation and intensive training. Sports Med, (27): 347—358
- Shinsuke Miyoshi, Hiromi Ishikawa, Toshiyuki Kaneko, 1991. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -Zein hydrolysate. Agric Biocl Chem, 55(5): 1313—1318
- Shuji Adachi, 1992. Preparation of a peptide mixture with nutritionally definite characteristics from a protein hydrolysate. Proceeding of Asia-Pacific Biochemical Engineering, Singapore, 739—740
- Soichi Arai, Hiroko Kimura, 1987. Comparative nutritional value for amino acids, oligopeptides and soybean protein. American Oil Chemistry Society, 64(12): 1692—1695
- Zheng Huina, Zhang Chaohua, Cao Wenghong *et al*, 2009. Preparation and characterization of *Pinctada martensii* meat protein hydrolysates with a high Fischer ratio. International Journal of Food Science and Technology, 44(6): 1183—1191

1) 孔 芳, 2010. 酶法水解牛乳酪蛋白制备高 F 值寡肽混合物. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 1—2  
 2) 刘金伟, 2012. 酶法制备玉米高 F 值寡肽及抗疲劳活性的研究. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 1—3  
 3) 李洪山, 2012. 猪血高 F 低聚肽制备的工艺优化. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 8—10

## PREPARATION PROCESS OF HIGH FISCHER RATIO HYDROLYSATES FROM TUNA (ELEOTRIDAE) GROUND MEAT BY SEQUENTIAL HYDROLYSIS

LUO Hong-Yu<sup>1</sup>, DU Shuai<sup>1</sup>, ZHENG Bin<sup>2</sup>, SONG Ru<sup>1</sup>, YANG Hui-Cheng<sup>2</sup>

(1. Department of Food and Medical, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316000; 2. Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan, 316100)

**Abstract** The preparation of high-Fischer ratio hydrolysates from the hydrolysis of tuna meat by two-step proteases was studied. Taking degree of hydrolysis (DH) as criterion, binary-enzymes hydrolysis process was optimized by response surface methodology. Hydrolysates derived from tuna meat were statically adsorbed by activated carbon in order to remove liberated aromatic amino acids (AAA). Detection of amino acid composition was carried out after treatment by activated carbon absorption. The results show that the optimum enzymolysis conditions selected by Design-expert 7.0 were as follows: pepsin was selected as the first enzyme, ratio of enzyme to substrate 650U/g, ratio of tuna meat to water 1 : 7 (g/mL), temperature 35.9°C; flavourzyme was selected as the second enzyme, ratio of enzyme to substrate 50700U/g, pH 6.51, temperature 51°C, the highest degree of hydrolysis was 36.87%±0.54%. The optimal absorption condition by activated carbon was ratio of 1 : 20 (W/V), temperature 35°C, time 3h. The Fisher value of hydrolysates (removing AAA) determined on Automatic Amino Acid Analyzer was calculated to be 30.33, and a high AAA absorption ratio was 63.18%.

**Key words** tuna meat; binary-enzymatic hydrolysis; adsorption removal of aromatic amino acids; high Fischer ratio