



# 利用正交试验优化贻贝水解工艺 APPLICATION OF ORTHOGONALTY TRIALS IN HYDROLYZED LINNAEUS

邓尚贵 章超桦

(湛江海洋大学水产学院, 524025)

DENG Shang-Gui, ZHANG Chao-Hua

(Fishery College of Zhanjiang Ocean University, 524025)

**关键词** 贻贝, 蛋白酶, 正交试验

**KEYWORDS** Linnaeus, Protease, Orthogonality trials

翡翠贻贝 (*Perna viridis* L.) 在分类学上属瓣鳃纲贻贝属贻贝科, 分布于我国东海南部与南海, 印度洋与西太平洋, 是我国主要的养殖贝类资源 [王如才 1988]。贻贝蛋白质含量高, 含有人体所需的 8 种必需氨基酸, 脂肪含量低, 但必需脂肪酸和多不饱和脂肪酸系列的 EPA 和 DHA 的含量甚高。此外, 还含有大量的维生素和人体所必需的锰、锌、硒、钴和碘等多种微量元素。贻贝还具有相当高的药用价值, 据《本草纲目》记载: 贝肉可治虚劳伤惫、精血衰少、吐血久痢、肠鸣腰痛等。近代科学证明贻贝能补阴止血、镇静降压、可治大肠子宫出血、头昏眼花和阳萎早泄等。正因为贻贝具有较高的营养价值、经济价值和药用价值, 我国沿海贻贝养殖发展很快。据统计, 1992 年, 我国贻贝产量达 49.5 万吨, 几乎占世界贻贝产量的一半。贻贝上水后保鲜期短, 一般是 1~2 天, 即使加冰运销, 也只能保存三天, 因此, 贻贝的鲜销范围不广 [黄炎标等 1994]。大量贻贝集中上市, 往往引起滞销, 影响渔民的生产积极性。为了解决贻贝出路, 促进贻贝养殖事业的发展, 必须解决好贻贝的加工和保鲜, 生产多种多样的水产食品以适应市场的需要。目前, 贻贝的加工产品有贻贝油、冷冻贻贝肉、清蒸贻贝罐头和油渍熏制贻贝罐头, 但它们的加工方法简单, 不能适应食品工业的发展和现代快节奏的生活, 因此, 有必要对贻贝进行深层的加工研究, 更好地发挥其经济价值和药用价值。本文的主要目的是以正交试验来探索贻贝最适的酶法水解工艺条件, 为进一步有效地合理利用贻贝寻找新的途径。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 原料

翡翠贻贝肉, 购自湛江市场, 原料新鲜。枯草杆菌中性蛋白酶, 酶活力 100 000 单位/克, 无锡酶制剂厂出品。胃蛋白酶, 酶活力 3 000 单位/克, 武汉生化制药厂出品。氯化钙(分析纯)。

收稿日期: 1995-07-24

## 1.2 分析方法

氨基酸氮——甲醛滴定法;粗蛋白——微量凯氏定氮法[赵洪根等 1987]。

## 1.3 仪器设备

WCJ-802 型控温式磁力搅拌器, MKC-300N 高速组织捣碎机。

## 1.4 贻贝处理过程

贻贝肉  $\xrightarrow[\text{捣碎}]{100\text{ g, 加水 } 400\text{ mL}}$  肉浆  $\xrightarrow[\text{恒温}]{\text{中性蛋白酶, CaCl}_2}$  水解液 I  $\xrightarrow[\text{恒温}]{\text{灭酶后, 胃蛋白酶}}$  水解液 II

原料加水捣碎后, 恒温至一定温度, 加入枯草杆菌中性蛋白酶, 搅拌均匀, 使酶解在恒温下进行。酶解后加热灭酶再用胃蛋白酶进一步水解, 灭酶后得到贻贝水解液 II。

## 2 正交试验及统计分析

### 2.1 枯草杆菌中性蛋白酶对贻贝肉的水解

试验中以水解液氨基酸含量为指标, 选择 pH(A), 温度(B), 酶浓度(C), 氯化钙浓度(D)和时间(E)五个因素, 每个因素确定 4 个水平, 选择  $L_{16}(4^5)$  正交表进行试验[郑海燕 1987, 南京农业大学 1979](如表 1), 其实施处理数为全面实施 1/64。

表 1  $L_{16}(4^5)$  正交设计及结果

Table 1  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design and result

序号	A	B(°C)	C(%)	D(%)	E(h)	氨基酸(mg/100mL)	
	1	2	3	4	5	I	II
1 = A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub>	1(6.5)	1(45)	1(0.1)	1(0)	1(1.5)	77	76
2 = A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	1(6.5)	2(50)	2(0.2)	2(0.1)	2(2.0)	87	80
3 = A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> E <sub>3</sub>	1(6.5)	3(55)	3(0.3)	3(0.2)	3(2.5)	117	106
4 = A <sub>1</sub> B <sub>4</sub> C <sub>4</sub> D <sub>4</sub> E <sub>4</sub>	1(6.5)	4(60)	4(0.4)	4(0.3)	4(3.0)	89	97
5 = A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>4</sub>	2(7.0)	1(45)	2(0.2)	3(0.2)	4(3.0)	162	159
6 = A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>4</sub> E <sub>3</sub>	2(7.0)	2(50)	1(0.1)	4(0.3)	3(2.5)	151	144
7 = A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>4</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub>	2(7.0)	3(55)	4(0.4)	1(0)	2(2.0)	119	105
8 = A <sub>2</sub> B <sub>4</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	2(7.0)	4(60)	3(0.3)	2(0.1)	1(1.5)	116	130
9 = A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> D <sub>4</sub> E <sub>2</sub>	3(7.5)	1(45)	3(0.3)	4(0.3)	2(2.0)	146	140
10 = A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub>	3(7.5)	2(50)	4(0.4)	3(0.2)	1(1.5)	147	148
11 = A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>4</sub>	3(7.5)	3(55)	1(0.1)	2(0.1)	4(3.0)	154	157
12 = A <sub>3</sub> B <sub>4</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>3</sub>	3(7.5)	4(60)	2(0.2)	1(0)	3(2.5)	142	140
13 = A <sub>4</sub> B <sub>1</sub> C <sub>4</sub> D <sub>2</sub> E <sub>3</sub>	4(8.0)	1(45)	4(0.4)	2(0.1)	3(2.5)	170	168
14 = A <sub>4</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>4</sub>	4(8.0)	2(50)	3(0.3)	1(0)	4(3.0)	154	162
15 = A <sub>4</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub> E <sub>1</sub>	4(8.0)	3(55)	2(0.2)	4(3.0)	1(1.5)	120	126
16 = A <sub>4</sub> B <sub>4</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub>	4(8.0)	4(60)	1(0.1)	3(0.2)	2(2.0)	106	116

#### 2.1.1 各因素对试验指标的影响

试验中采用 F 测验研究各因素对试验指标的影响程度(表 2)。

表 2 F 测验结果

Table 2 The result of F tests

变异来源	DF	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
重复间	1	0.3	0.3	<1		
A	3	15364.6	5121.5	163.9	3.29	5.42
B	3	1995.6	665.2	21.3	3.29	5.42
C	3	553.4	184.5	5.9	3.29	5.42
D	3	659.9	220	7.0	3.29	5.42
E	3	5965.1	1988.4	63.5	3.29	5.42
误差	15	469.1	31.3			
总变异	31	25008				

由表 2 可以看出,五个因素的 F 值均大于  $F_{0.01}$ , 说明五个因素对试验结果都有极显著影响,即这种影响出现的概率在 99% 以上。根据 F 值的大小,五个因素对试验指标影响的主次关系是 A 因素 > E 因素 > B 因素 > D 因素 > C 因素。说明 pH 和水解时间是水解过程的主要因素。重复间 F 值小于 1,说明试验重复间不存在显著差异。

### 2.1.2 水解最佳条件的确立

水解最佳条件的确定采用最小显著极差法中的 q 值法来选定。由表 3 可知下列几点:

$A_3$  与  $A_4$  无显著差异,  $A_3$  与  $A_2$ 、 $A_1$  有极显著差异;  $A_4$  与  $A_2$ 、 $A_3$  无显著差异,但与  $A_1$  有显著差异;  $A_2$  与  $A_1$ 、 $A_3$  有显著差异,但与  $A_4$  无显著差异。这说明用枯草杆菌中性蛋白酶水解贻贝肉的最适 pH7.0~8.0,但以 pH7.5 为最佳。

$B_1$  与  $B_3$ 、 $B_4$  有极显著差异,  $B_1$  与  $B_2$  没有显著差异;  $B_2$  与  $B_3$ 、 $B_4$  有极显著差异。因此,  $B_1$  较优,  $B_2$  次之,说明枯草杆菌中性蛋白酶水解贻贝的最适温度为 45~50℃,从节约能源的角度考虑,建议选择 45℃ 即  $B_1$ 。

表 3 不同因素水平间的差异显著性

Table 3 The significantly different of factor levels

因素水平	A				B				C				D				E			
	3	4	2	1	1	2	3	4	3	4	2	1	2	3	4	1	3	4	1	2
氨基酸含量	1174	1122	1006	729	1098	1073	1004	986	1071	1043	1016	961	1062	1061	1031	975	1138	1134	940	899
差异显著性 $\alpha=0.05$	A	AB	B	C	A	A	B	C	A	A	A	B	A	A	AB	B	A	A	BC	C
$\alpha=0.01$	a	ab	b	c	a	ab	bc	c	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	bc	c

$C_3$  与  $C_1$  存在显著差异,其它均不存在显著差异,因此,  $C_3$  较优。这说明最适酶浓度为 0.2%~0.4%,从成本的角度考虑,建议  $C_2$  即酶浓度选择 0.2%。

$D_2$  与  $D_1$  有显著差异,  $D_2$  与  $D_3$ 、 $D_4$  无显著差异;  $D_3$  与  $D_1$  有极显著差异,其它均无显著差异。因此,  $D_2$  较优。这说明贻贝肉中的钙离子不足以用来激活枯草杆菌蛋白酶,需外加钙离子。

$E_3$  与  $E_2$ 、 $E_1$  有极显著差异,与  $E_4$  无显著差异,虽然  $E_4$  与  $E_2$ 、 $E_1$  也存在极显著差异,但  $E_4$  耗时太长。这说明该酶在 2.5~3.0 小时内已基本结束水解,从生产周期的角度考虑,宜选取 2.5 小时即  $E_3$ 。

## 2.2 胃蛋白酶对水解液 I 的进一步水解

试验中以水解液氨基酸含量为指标,选择 pH(A)、温度(B)、酶浓度(C)三个因素,时间因子固定为 2.0 小时。每个因素确定为 3 个水平,选用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验(表 4)。其实验处理数为全面实施的 1/3。

表 4  $L_9(3^4)$  正交设计及结果Table 4  $L_9(3^4)$  orthogonal design and result

序号	A(pH)	B(°C)	C(%)	氨基氮(mg/100mL)	
	1	2	3	I	II
1 = $A_1B_1C_1$	1(3.0)	1(50)	1(0.2)	249	257
2 = $A_1B_2C_2$	1(3.0)	2(55)	2(0.5)	268	273
3 = $A_1B_3C_3$	1(3.0)	3(60)	3(0.8)	254	261
4 = $A_2B_1C_2$	2(3.5)	1(50)	2(0.5)	267	272
5 = $A_2B_2C_3$	2(3.5)	2(55)	3(0.8)	275	282
6 = $A_2B_3C_1$	2(3.5)	3(60)	1(0.2)	279	282
7 = $A_3B_1C_3$	3(4.0)	1(50)	3(0.8)	280	288
8 = $A_3B_2C_1$	3(4.0)	2(55)	1(0.2)	277	281
9 = $A_3B_3C_2$	3(4.0)	3(60)	2(0.5)	293	299

## 2.2.1 各因素对试验指标的影响程度

试验中仍采用 F 测验研究各因素对试验指标的影响程度(表 5)。

表 5 F 测验结果

Table 5 The result of F tests

变异来源	DF	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
重复间	1	156.1	5.0	4.96	10.04	
A	2	2060.1	1030.1	32.7	4.10	7.56
B	2	278.8	139.4	4.4	4.10	7.56
C	2	192.1	96.1	3.1	4.10	7.56
误差	10	314.5	31.5			
总变异	17	3001.6				

由表 5 看出, A 因素对试验结果有极显著影响, B 因素对实验结果有显著影响, C 因素对试验结果没有显著影响。这说明试验中起决定作用的因素是 A 因素即 pH。A、B、C 三因素对试验指标影响的主次关系是  $A > B > C$ 。重复间没有极显著差异。

## 2.2.2 水解最佳条件的确定

胃蛋白酶水解的最佳条件的确定仍采用最小显著极差法中的 q 值法。

表 6 不同因素水平间的差异显著性

Table 6 The significantly different of factor levels

因素水平	A			B			C		
	3	2	1	3	2	1	2	3	1
氨基氮含量	1718	1657	1562	1668	1656	1613	1672	1641	1625
差异显著性 $\alpha=0.05$	A	B	C	A	AB	B	A	A	A
$\alpha=0.01$	a	a	b	a	a	a	a	a	a

从表 6 可以看出,  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  之间均有显著差异, 但  $A_3$  与  $A_2$  无显著差异, 故以  $A_3$  较优,  $A_2$  次之, 即最适 pH 为 3.5~4.0。从生产角度考虑宜选择  $A_2$ , 即 pH 为 4.0。 $B_3$  与  $B_2$  没有显著差异, 但与  $B_1$  有显著差异,  $B_2$  与  $B_1$  没有显著差异。故以  $B_3$  较优,  $B_2$  次之, 即最适温度为 55~60°C, 从节约能源的角度考虑, 宜选择  $B_2$ , 即 55°C。 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$  之间均无显著差异, 这说明酶浓度 0.2%~0.8% 范围内水解效果几乎没有差异。从生产成

本上考虑,宜选择  $C_1$ ,即 0.2%。

### 3 贻贝水解(转化)率

鲜贻贝肉中粗蛋白含量经分析测定为 11.29%,贻贝肉按上述最佳条件水解后,水解液 I 中的  $\alpha$ -氨基氮为 178 mg/100mL,水解液 II 中的  $\alpha$ -氨基氮为 295 mg/100mL,因此,枯草杆菌中性蛋白酶水解贻贝的水解率为 49%,胃蛋白酶为 33%。

### 4 结束语

运用正交试验选择最佳水解工艺条件,可以得到较为合理、可靠的结果,为扩大试验乃至生产提供依据,同时可以大大减少试验次数,节约人力和物力。

本试验制得的水解液 I,因是不完全水解,故水解液中存在着较多的游离氨基酸和蛋白质,因此,水解液 I 可能比贻贝肉更易被人体消化吸收。它可以用来作为其它食品的辅料,提高营养价值。如将水解液 I 加入面粉中制作海鲜挂面,可以提高挂面的营养价值和经济价值,也可以直接干燥制成高消化率的贻贝粉,还可以在水解液 I 中加入一些调味料和香料(如葱、蒜、姜、辣椒等),经干燥后制作方便食品(如快餐面)的海鲜调味料。

水解液 II 由于水解较为彻底,贻贝肉中的蛋白质基本转化为氨基酸。因此,可以利用水解液 II 制作水产调味料。目前,我们已以水解液 II 为基础,分别加入蒜、辣椒和香油等辅助料制作了海鲜味突出的蒜蓉贻贝油和香辣贻贝油,以满足海内外市场对海鲜调味品的需求。此外,可以以水解液 II 为基础,添加化学蚝粉制作低成本的蚝油,以提高蚝油生产厂家的经济效益。还可以将水解液 II 经过滤、脱腥等加工过程制成海产保健型、营养型饮料,以填补目前未用海产品作饮料的空白,为饮料工业的发展开辟新的途径。

### 参 考 文 献

- 王如才主编.1988.中国水生贝类原色图鉴.杭州:浙江科学技术出版社.
- 郑海燕.1987.正交试验在酱油菌种筛选中的运用.中国调味品,(8):1~6.
- 赵洪根等主编.1987.水产品检验.天津:天津科学技术出版社.161~166.
- 南京农业大学主编.1979.田间试验及统计方法.北京:农业出版社.182~191.
- 黄炎标等.1994.翡翠贻贝单体速冻加工试验总结.水产科技,(5~6):44.