

甘薯天蛾虫蛹蛋白水解特性 及其氨基酸营养液的制作工艺研究^①

陈绍军 柯范生

(福建农业大学)

提 要 甘薯天蛾虫蛹用远天23和远天12蛋白酶水解, 当底物鲜虫蛹液12 mL (浓度为20 % , W/V), 添加1 % 酶液1 mL, 其适宜的水解条件: pH 6~ 7, 50 水解120 min 并加热至70 继续水解30 min; 远天23的酶解效果优于远天12, 添加磷酸(钠)盐和EDTA 2 Na 可增加可溶性含氮物总量, 添加Vc 则无效; 底物粗蛋白的提取率为81. 2 %。文章对虫蛹氨基酸营养液的制作工艺、配方及产品质量要求等亦做了介绍。

关键词 甘薯天蛾 木瓜蛋白酶 氨基酸 营养液

Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Sweet Potato Sphinx Pupa Protein and the Processing Technique of Amino Acids Nutrition Liquid

Chen Shao-jun Ke Fan-sheng

(Fujian Agricultural University, Fuzhou)

Abstract The proteins of sweet potato-sphinx pupa were hydrolyzed by the proteinases of YT (Yuan-tian) 23 and YT 12. Its optimum hydrolysis condition was that pH 6~ 7, at 70 for 30 min after hydrolysed at 50 for 120 min, with the substrate concentration of fresh pupa 12 mL (20 % , W/V) and 1 % proteinase liquid 1 mL. The proteinase YT 23 showed a higher hydrolysis rate than that of YT 12. An extract rate of soluble nitrogens from total clude protein was 81. 2 % when hydrolyzed. Adding the EDTA 2 Na and phosphate can increase the output of soluble nitrogens but not for the Vc. The processing technique of amino acids nutritious liquid of the pupa, fomula and quality standard of product was reported in the article.

Key words Sweet potato sphinx Papain Amino acids Nutritious liquid

甘薯天蛾(*Herse convolvuli* L.) 是鳞翅目天蛾科中一种常见昆虫, 以甘薯叶片为主食, 其作为食品开发, 特点是个体大(每只4~ 5 g), 没有肠道组织, 干净卫生, 营养丰富; 干天蛾虫蛹蛋白质含量55 % 左右, 蛋白质中必需氨基酸(包括酪氨酸、胱氨酸、组氨酸)占总氨基酸的52. 67 % , 半必需氨基酸(组氨酸、精氨酸)达20. 78 % ; 油脂中不饱和脂肪酸占68. 14 % , 其中亚麻酸高达48. 96 % , 因此是极好的优质食物资源。甘薯天蛾已在我校生物

① 收稿日期: 1996- 03- 13

陈绍军, 副教授, 福州市 福建农业大学食品科学系, 350002

防治研究所人工饲养成功,为提高其养殖的经济效益,也设想能象养鳗一样成为一种新兴产业,我们对天蛾虫蛹蛋白的酶解特性及其营养液的生产工艺进行了实验研究,主要结果如下。

1 试验材料及预处理

甘薯天蛾虫蛹由我校生物防治研究所提供。活虫蛹蒸汽蒸8 min 钝化酶,将虫蛹制备成20%虫蛹液(W/V——重量体积比,即100 mL 虫蛹液含20 g 虫蛹。),用微量凯氏定N法^[1]测得虫液粗蛋白含量为2.65 g/100 mL。

试验用酶远天12(木瓜蛋白酶)和远天23(木瓜酶为主的复合蛋白酶),为广州远天酶制剂厂生产的专用于水解动植物蛋白质的商品酶制剂。称低温真空干燥恒重的两种酶粉各1 g,加重蒸水20 mL 匀浆,然后定容至100 mL 备用。

蔗糖、蜂蜜、蔗糖脂、天然稳定剂、磷酸盐、乙二胺四乙酸二钠(EDTA 2Na)和维生素C(Vc)等均为福州市售商品。

2 试验及结果分析

2.1 虫蛹蛋白的水解条件

2.1.1 pH 值

将pH 4~8分作5种处理,每处理两次重复,用3 mol/L NaOH 和3 mol/L HCl 调制不同pH 值(用PHs-2型酸度计测定)的20% (W/V) 鲜虫蛹水解底物,按设计各取10 mL 移入20支试管,放入50℃ 恒温水浴保温5 min,加酶液1.0 mL,混匀后50℃ 水浴水解60 min,取出迅速在电炉上加热至98℃ 灭酶,酶解液用滤纸过滤,滤液中的氨基酸用茚三酮显色法^[1]在751分光光度计570 nm 波长处测其消光值(OD_{570} 值,下同)。另取2支试管,加同样量底物与1.0 mL 同浓度热失活酶液为对照。

从图1可看出,远天23和远天12的适宜pH 均在6~7范围。两种酶在扣除水解前氨基酸含量差异后,经成对数据显著性测验($t=4.905$, $t_{0.01}=4.104$),差异极显著。

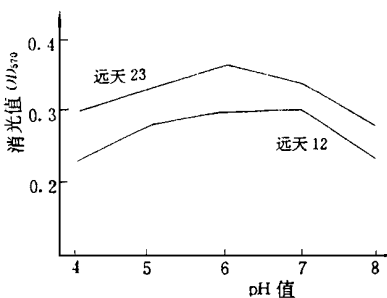


图1 不同pH 值处理

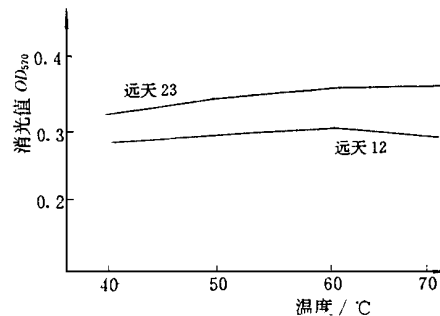


图2 不同温度处理

2.1.2 水解温度

设40、50、60 和70℃ 四种不同温度处理,两次重复,同样浓度底物虫液10 mL,

pH 6.8, 加酶液1.0 mL, 水解60 min, 其它试验处理同上, 结果如图2。

从图2看出, 两种酶处理, 在40~70 范围内, 温度升高, 产物有少量增加, 但差异不大, 两种酶的耐热性均较强。

2.1.3 水解时间

为获较高的蛋白水解率, 在预先小试基础上, 设置8种不同水解时间的处理, 同样底物浓度虫液10 mL, 两次重复, 加酶液1 mL, 其它处理条件同上(图3)。

图3结果表明, 开始的12 min 内, 产物氨基酸总量迅速上升, 12 min 后上升缓慢, 至60 min 后则趋于平稳。两种酶处理扣除原始酶解液中的 OD_{570} 值差异后, 经 t 测验, $t = 4.196$, $t_{0.01} = 3.707$, 差异极显著。

2.1.4 底物浓度

为探讨虫蛹底物与酶的适宜添加量, 在底物浓度不同的情况下, 研究固定酶量对底物水解速率的影响。

取24支试管, 设三次重复, 分别加0~15 mL 的8种不同底物量的虫蛹液, 每试管分别补充重蒸水至15 mL, 分别加远天23酶液1.0 mL (共16 mL), 混匀, 于50 水解60 min, 其它处理同上(图4)。

从图4看出, 虫蛹蛋白加酶水解60 min 后, 底物量在0~12 mL 范围内, 随浓度增加产物氨基酸总量直线上升, 进一步增加底物量, 产物量增加不明显。

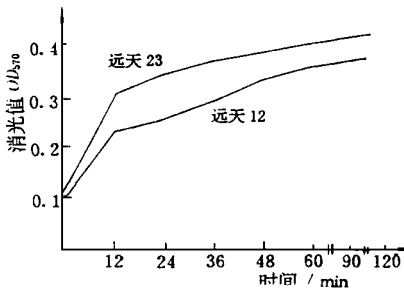


图3 不同时间处理

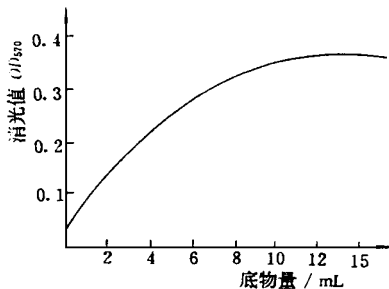


图4 不同底物浓度处理

3 虫蛹口服液制备

3.1 虫蛹酶解液制备试验

根据以上试验结果及木瓜蛋白酶的一些特性(本文“讨论”部分), 采用添加磷酸盐、EDTA 2Na和抗坏血酸, 分别作为金属离子螯合剂和还原剂, 以探讨如何提高虫蛹蛋白水解度。

从不同底物浓度试验结果与添加酶活性促进剂后底物用量也应该相应提高考虑, 取虫蛹液12 mL, 为测定有关数据加倍至24 mL, 移入18支刻度试管, 设6个处理三次重复; 按表1要求加入总酶解液量0.01%、0.02%和0.03%的EDTA 2Na及0.1%磷酸盐, 统一补充水至25 mL, 取出12.5 mL 测虫液pH值和可溶性含氮物量(凯氏法), 其余一半加1%远天23酶液1 mL, 50 水解, 按时取样(先用旋涡混合器混匀)3 mL, 加2 mL 10%三氯醋酸终止酶活性, 因虫蛹营养液生产的目的是获得较高的可溶性含氮物, 由此酶解液经滤纸过滤

后用凯氏法^[1]测可溶性含氮物总量(表1)。

从表1可知1) 虫蛹底物pH 值与底物可溶性含氮物量表现显著正相关($r=0.813$, $t_{0.05}=2.776 < t=2.794$), 但与可溶性含氮物获得量不相关($r=0.109$)。这表明虫蛹蛋白在高pH 值下可溶度增加, 而水解过程又与磷酸盐和EDTA 2Na 有关; 2) 水解体系中添加0.025% EDTA 2Na 或0.1% 磷酸盐(国标最大允许量^[2]), 都可较有效提高可溶性含氮物总量(处理1~3间比较); 3) 磷酸盐0.1% 时, 随着EDTA 2Na 量的增大, 可溶性含氮物获得率也明显增加(处理3~6间比较)。

表1 磷酸盐与EDTA 2Na 对虫蛹蛋白水解效果的影响

处理	磷酸盐 /%	EDTA 2Na /%	pH 值	底物可溶 含氮物原始量 /g·(100 mL) ⁻¹	水解60 min 可溶含氮物 /g·(100 mL) ⁻¹	水解120 min 可溶含氮物 /g·(100 mL) ⁻¹	可溶含氮物 获得量 /g·(100 mL) ⁻¹
1	0.0	0.00	6.71	0.183	1.311	1.435	1.252
2	0.0	0.025	6.12	0.168	1.297	1.495	1.327
3	0.1	0.00	7.05	0.211	1.483	1.521	1.310
4	0.1	0.01	6.95	0.233	1.590	1.621	1.389
5	0.1	0.02	6.85	0.193	1.770	1.787	1.594
6	0.1	0.03	6.72	0.195	1.829	1.954	1.759

在表1试验基础上, 各取虫蛹液24 mL 移入12支试管, 做表2三种处理四次重复的试验; 加添加物后统一补充重蒸水至25 mL, 最后加酶液2 mL, 50℃ 水浴水解, 120 min 后取出一半在70℃ 水浴中继续水解30 min, 以不加添加物为对照, 其它方法同上。对结果资料进行方差分析, 按Duncan 氏新复极差法做多重比较(表2)。

表2 不同添加物处理虫蛹蛋白水解液可溶性含氮物之差异

处 理	pH 值	底物 /g ·(100 mL) ⁻¹	水解120 min/g· (100 mL) ⁻¹	水解120 min 加热至70 30 min /g·(100 mL) ⁻¹	四个重复可溶 含氮物获得量 /g·(100 mL) ⁻¹	平均获 得量 /g·(100 mL) ⁻¹	差异 显著 性
0.1% 磷酸盐							
0.025% EDTA 2Na	6.90	0.196	1.877	2.053	1.811 1.894 1.828 1.896	1.857	a
0.1% V _C	6.02	0.163	1.712	1.821	1.683 1.638 1.663 1.650	1.658	b
对照	6.81	0.175	1.738	1.819	1.653 1.670 1.626 1.630	1.644	b

表2结果表明: 1) 加总酶解液0.1% 磷酸盐和0.025% EDTA 2Na 的处理, 可溶性含氮物平均获得率与另两种处理差异极显著(平均获得率之差0.670-0.446=0.224 > L_{SR0.01}即0.03), 加0.1% V_C 处理与对照差异不显著(0.446-0.427=0.019 < L_{SR0.05}即0.021); 2) 水解120 min 后, 将酶解液于70℃ 保持30 min, 可明显提高虫蛹蛋白水解率; 3) 底物粗蛋白质含量2.528 g/100 mL (经重蒸水和酶液稀释), 最终水解2.5 h 后可溶性含

氮物 2.053 g / 100 mL, 则底物蛋白质提取率为 81.2 %。

3.2 虫蛹口服液调配

取虫蛹蛋白酶澄清液 10 kg, 调入 20 % 蔗糖、10 % 蜂蜜, 加热至 95 ℃, 为防止出现浮油层与沉淀, 添加适量蔗糖酯和复合稳定剂, 用柠檬酸调至 pH 4.3 左右, 然后经板框过滤机过滤并均质, 按 $\frac{5-15-8}{100}$ 的杀菌式蒸汽杀菌并冷却, 即为产品。

3.3 产品质量指标

其产品质量指标初定为: 1) 产品感官指标为淡黄色, 有虫蛹的特殊香味, 口感甜酸, 无异味, 允许有极少量沉淀。2) 理化指标, 产品可溶性固形物(折光计)不低于 20 %; 总含氮不低于 1.500 mg / 100 mL; 其它食品添加剂等按国家有关标准执行。每 1 kg 营养液砷(A s)不超过 0.5 mg, 铅(Pb)不超过 1.0 mg, 铜(Cu)不超过 10 mg。3) 卫生指标, 细菌总数每 1 mL 不超过 100 个, 大肠菌群每 100 mL 不超过 6 个, 致病菌不得检出。

4 讨论

按厂家所寄酶样与使用说明, 远天 12 是纯木瓜蛋白酶, 远天 23 是种以木瓜酶为主(90 %)的复合酶, 其酶解效果优于远天 12, 且价格便宜。木瓜蛋白酶酶解温度范围直至 90 ℃ 时, 该酶仍不完全失活^[3]。可利用此特性, 在 50 ℃ 下初酶解以节约能源, 然后逐步升高温度至 70 ℃ 继续酶解, 这样即可提高原料蛋白水解率和抑制微生物过多繁殖, 又可降低生产成本和改善产品质量。此外, 木瓜蛋白酶对酯和酰胺类底物也有很高的活力^[4,5], 因此用于对整个虫蛹的水解是可行的。

蛋白类食品的酶解生产中, 存在多底物与众多的促进或抑制因子, 且常用二种以上的复合酶, 对此复杂的酶解体系, 其酶反应动力学按经典的米氏方程式, 目前是难以解释清楚的。

据有关资料报道, 木瓜蛋白酶是种内切酶, 其酶的活性主要特点有: 1) 巯基试剂是其抑制剂; 2) 至少有 4 个氨基酸残基即 Cys 25、His 159、Asp 158 和 Trp 177^[4,5] 存在于酶的活性部位, 当 Cys 25 被氧化剂氧化时, 酶的活性被抑制; 3) 还原剂如半胱氨酸、亚硫酸钠等或 EDTA 能恢复酶活性^[4,6]; 4) 能被金属离子 Cu、Hg、Pb、Zn 和 Fe 等所抑制^[4]; 5) 半胱氨酸影响到组氨酸残基的 PKa 值^[5]。针对木瓜蛋白酶的上述诸特性, 考虑到虫蛹蛋白中半胱氨酸(Cys)和组氨酸(His)含量比鸡蛋、牛奶和大豆等高出 2~9 倍不等, Fe、Zn 等矿物质含量也高出 1 倍以上。因此, 采用添加磷酸盐与 EDTA (作为金属离子整合剂) 和抗坏血酸(作为还原剂)的办法来探讨是否能提高虫蛹蛋白水解得率, 同时, 也注意到添加后的 pH 值变化。其结果是: 添加磷酸盐 0.1 % 和 EDTA 2 Na 0.025 % 可增加虫蛹蛋白水解得率, 添加 Vc 则无效。看来维持水解液偏中性 pH 值是必要, Brocklehurst 也意识到在中性 pH 时木瓜酶活性部位可能呈裂口的开放状态, 而有利于保持木瓜酶活性的稳定^[7]; 磷酸盐和 EDTA 2 Na 估计即起 pH 值的调节(缓冲)作用又起对金属离子的螯合作用。Vc 降低水解液 pH 值, 达不到预期的效果。

有关昆虫虫蛹蛋白饮品的制作工艺研究, 何德硕曾用柞蚕蛹渣制备复合氨基酸营养液^[8], 白虹、熊勇华和杨铁等也分别对有关蚕蛹蛋白酶解制备营养液方面做了报道^[9-11]。虫

蛹蛋白的酶解工艺, 在特定 pH 值下, 柞蚕蛹是用3942中性蛋白酶47 水解48 h, 蛋白质利用率为80 % 以上^[8]; 干蚕蛹是用木瓜蛋白酶、胰蛋白酶在50 双酶水解共300 min^[9], 或用1398中性蛋白酶、胰蛋白酶50 下双酶水解共5 h^[10]。本研究采用远天23商品复合蛋白酶, 添加适量的磷酸盐和 EDTA 2Na 50 下水解2 h, 再70 继续水解30 min 左右, 其蛋白质利用率可达81.2 %, 且水解时间较短, 因此其工艺是可行的。其中升温继续水解增加产物总量, 可能是水解一定时间后加热激发了酶的水解活性, 加快反应速度, 降低水解液粘度, 增加反应物溶解度, 使底物分子更松散和易于被水解。甘薯天蛾虫蛹水解液营养丰富, 带有一种特殊香味, 没有柞蚕蛹和蚕蛹水解液所带有的异味^[12, 13], 因此水解后作为营养液开发是适宜的。

参 考 文 献

- 1 蔡成武, 袁厚积主编 生物物质常用化学分析法 北京: 科学出版社, 1982 52
- 2 中华人民共和国卫生部 食品卫生国家标准汇编 食品添加剂使用卫生标准 GB 2760- 86 北京: 中国标准出版社, 1988 63
- 3 [英]G G 伯奇主编 酶与食品加工 郑寿亭等译 北京: 轻工业出版社, 1981 203
- 4 王 璋编 食品酶学 北京: 中国轻工业出版社, 1994 185~ 186
- 5 Riccardo A A, M uzzarelli M acro tom asetti and pierluca ilari Depdym erization of Chito san W ith the A id of Papain Enzym eM icrob Technol, 1994(16); 110
- 6 谭辉玲. 木瓜蛋白酶在飘珠上固定化和红外活化 生物技术, 1993, 3(5): 17~ 20
- 7 Brocklehurst K A sound basis for pH - dependent kinetic studies on enzymes Protein Engineering, 1994, 7(3): 291
- 8 何德硕, 赵姝华, 何 平等. 利用柞蚕蛹渣制备复合氨基酸营养物的研究 氨基酸杂志, 1989(1): 22~ 24
- 9 白 虹, 刘德富, 张保华. 蛋白酶水解法在蚕蛹蛋白食品加工中的应用 食品科学, 1994(5): 25~ 27
- 10 熊勇华, 钱利群. 蚕蛹氨基酸口服液蛋白水解条件的研究 广州食品工业科技, 1994(2): 19~ 21
- 11 杨 铁, 周丛照. 蚕蛹的综合利用 食品科学, 1993(12): 31~ 33
- 12 朱 珠, 包雁梅. 利用柞蚕鲜蛹制高蛋白营养液 食品科学, 1995(7): 45~ 47
- 13 夏邦旗. 蚕蛹复合氨基酸生产中异味物质脱除方法探讨 食品科学, 1994(5): 31~ 32