

骨肉酶解工艺条件研究

许雄¹, 柳艳霞¹, 赵改名^{1,*}, 孙伟强¹, 张春晖², 蔡根旺¹

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002; 2. 双汇集团技术中心, 河南 漯河 462000)

摘 要: 为了进行猪骨的综合利用, 本实验以猪骨为原料, 研究木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶的水解效果以及最适蛋白酶的酶解温度、pH、酶用量、料液比和酶解时间对骨肉蛋白水解度和总氮回收率的影响。结果表明: 胰蛋白酶为最佳骨肉水解酶, 胰蛋白酶水解猪骨的最佳工艺参数为: 酶解时间为 5h、酶解温度 60℃、pH8、酶用量 5000U/g 原料、料液比为 1:5。

关键词: 骨肉; 胰蛋白酶; 酶解

Study on Enzymolysis Technology of Pork Femur Bone

XU Xiong¹, LIU Yan-xia¹, ZHAO Gai-ming^{1,*}, SUN Wei-qiang¹, ZHANG Chun-hui², CAI Gen-wang¹

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Technical Center of Shineway Group, Luohe 462000, China)

Abstract: Enzymolysis effects of papain, neutral protease and trypsin on pork femur bone were compared, and effects of enzyme concentration, substrate concentration, enzymatic hydrolysis temperature, time and pH on the degree of hydrolysis (DH) and total nitrogen recovery for the optimal protease were also discussed. The results showed that trypsin is the optimal protease to hydrolyze pork femur bone, and its best hydrolysis parameters are time 5 h, temperature 60 °C, pH 8, enzyme concentration 5000 U/g raw material and substrate concentration 1:5.

Key words: pork femur bone; trypsin; enzymatic hydrolysis

中图分类号: TS251.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0281-04

我国是世界第一肉类生产大国, 2006 年我国肉类总产量为 8051 万吨。畜骨约占胴体重的 10%~30%, 年产鲜骨约 1800 万吨左右, 但其中被深加工的不足 2%, 造成极大的浪费^[1]。鲜骨肉是一种营养价值非常高的肉类加工副产品, 蛋白质、脂肪的含量与等量鲜肉相似, 而 Ca、P、Fe、Zn 等矿质元素是鲜肉的数倍, 且比例适宜, 具有很好的医疗保健作用^[2]。然而, 这些副产品往往被视为低价值产品, 有些被当作动物饲料廉价出售或是加工成附加值很低的产品, 对骨中的蛋白及其他营养成分并未充分利用, 造成了巨大的资源浪费和环境污染。因此, 加强畜禽骨肉的合理加工和充分利用, 是迫切需要解决的问题。

将酶工程技术应用于骨蛋白食品中, 制备功能性肉类提取物, 并进一步添加于肉制品中改善肉制品的质量, 从而提高加工副产品的附加值是解决这一问题的主要途径^[3-4]。如丹麦 Srensen NH 等^[5]用中性蛋白酶在 58~62℃下处理骨骼和碎肉, 生产出高品质骨肉蛋白粉; 赵

胜年等^[6]采用胰蛋白酶进行水解鲜牛骨的研究。酶解利用鸡骨蛋白的研究较多^[7-10], 且大多数是对骨肉原料进行高压蒸煮后超微粉后的原料进行酶解。而直接对猪骨肉的酶解利用报道很少。本实验以猪骨肉为原料, 通过研究酶解条件对氮回收率的影响, 确定最佳的酶解条件, 以期对酶解骨肉的利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜股骨头为市售, 初步破碎处理后备用。

中性蛋白酶(6 万 U/g) 北京索莱宝生物科技有限公司; 胰蛋白酶(20 万 U/g) 美国 Amresco 公司; 木瓜蛋白酶(60 万 U/g) 南宁庞博生物工程有限公司; 其余均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

T25 basic 型高速分散器 德国 IKA 公司; WK-400B 型高速粉碎机 山东省青州市精诚机械有限公司;

收稿日期: 2008-05-18

作者简介: 许雄(1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事肉品科学研究。E-mail: xu07003@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 赵改名(1965-), 男, 副教授, 博士, 主要从事肉品质量控制与加工技术研究。E-mail: gmzhao@126.com

SHA-6 型水浴恒温振荡器 江苏金坛中大仪器厂；ADL-5-A 型低速台式离心机 上海安亭科学仪器厂；PHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

将新鲜的股骨放进高速粉碎机粉碎至均匀的骨泥状，取捣匀后的样品 10g(精确至 0.0001g)于 250ml 离心杯中，加入适量 0.02mol/L 的磷酸缓冲液 pH6.5~8.5，冰浴匀浆 (20000r/min, 20s/次)3 次，在 30~65℃ 下预热 10min，加入酶(3000~8000U/g 原料)，用缓冲液调节料液比，用酸碱溶液调节 pH 至所需值，水浴 1~6h。低温(0~2℃)抑酶。然后在 4000 × g 下离心 15min，用布氏漏斗双层中速滤纸过滤，将滤液完全转入 100ml 容量瓶中定容。取上清液 5ml，立即消化处理，测可溶性总氮；取上清液 5ml，加水 60ml，滴加 0.02 mol/L NaOH 至 pH 8.2，加 10ml 20% pH7.5 的甲醛，继续滴加 0.02mol/L NaOH 至 pH9.2，测定游离氨基酸含量；取上清液 10ml，加入 10ml 10%TCA，0~2℃放置 17h 后取出 4000 × g 离心 15min，取上清液 10ml 立即消化处理，测定非蛋白氮。

1.3.2 酶的筛选

参考文献[7~12]，对中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶三种蛋白酶在各自最适的酶解温度、酶解时间、pH 值和设定的酶用量、料液比下进行水解，水解条件见表 1，选用水解度、三氯乙酸氮溶解指数为评价指标，筛选最佳用酶。

表 1 蛋白酶的水解条件

种类	温度(℃)	酶用量(U/g原料)	水解时间(h)	pH	料液比(W/V)
中性蛋白酶	50	5000	5	7	1:5
胰蛋白酶	55	5000	5	8	1:5
木瓜蛋白酶	60	5000	5	7	1:5

1.3.3 试验设计

结合酶的筛选实验结果，对选定的酶进行单因素试验，根据酶的性质和对酶解环境的要求，设定温度 30~65℃，每隔 5℃为一个级差；加酶量 3000~8000U/g 原料，每隔 1000U/g 原料为一个级差；时间 1~6h，每隔 1h 为一个级差；pH6.5~8.5，每隔 0.5 为一个级差；料液比 1:2.5~1:12.5，每隔 2.5 为一个级差，进行全因子试验。

1.3.4 测定方法

总氮：GB/T 5009.5—2003 法；氨基酸态氮的测定：中性甲醛电位滴定法；水解度：表示蛋白质被酶催化水解的程度^[13]；SN-TCA 指数：表示水解产物的溶解性能和物质的量的分布情况，在一定程度上也是蛋白质水解程度的一种表征，用加入 TCA 反应后上清液中

可溶性蛋白量和样品中蛋白总量的比例表示；总氮回收率：表示水解液中可溶性氮的含量，以可溶性总氮量与样品中总氮量的比例表示。

2 结果与分析

2.1 骨肉水解酶的筛选

三种蛋白酶酶解实验结果见表 2。由表 2 可以看出，无论水解度 DH 还是三氯乙酸氮溶解指数 TCA-NSI，胰蛋白酶的水解效果均明显高于中性蛋白酶和木瓜蛋白酶，并且胰蛋白酶水解上清液的风味较好且清亮，易于在食品加工中得以应用。综合考虑上述因素，确定胰蛋白酶为水解猪骨效果最佳的蛋白酶。

表 2 蛋白酶的水解结果

Table 2 Hydrolysis results of three proteases

酶种类	DH(%)	TCA-NSI(%)
中性蛋白酶	8.97	80.13
胰蛋白酶	10.51	87.23
木瓜蛋白酶	7.46	76.52

2.2 酶解条件对水解度和总氮回收率的影响

2.2.1 酶解时间对水解度及总氮回收率的影响

不同酶解时间对水解度、总氮回收率和酶解 SN-TCA 指数的影响如图 1 所示。

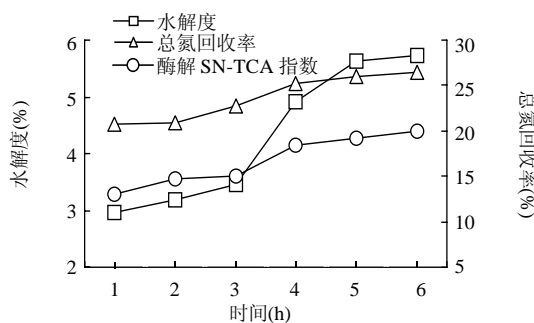


图 1 时间对水解度和总氮回收率的影响

Fig.1 Effects of time on degree of hydrolysis and total nitrogen recovery

由图 1 可以看出，酶解 SN-TCA 指数、水解度和总氮回收率均随着酶解时间的延长而增加。在 1~3h 内，水解度增加缓慢。在 3~5h 内，水解度增加迅速。但当酶解时间达到 5h 后，水解度随着时间的增加，其增加幅度不大。这与丁晓燕^[8]、王朝旭等^[12]对于水解度的结论基本一致，但是由于实验用酶和酶解对象不同，在增长趋势变平缓的时间上稍有差异。这可能是由胰蛋白酶选择性地水解蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链，消化溶解变性蛋白质，而对未变性的蛋白质作用较差导致。总氮回收率在 2~4h 内增加趋势明显，4~6h 内趋势平缓。酶解 SN-TCA 指数的趋势与水

解度相同。因此,初步确定水解时间为5 h。

2.2.2 酶解温度对水解度及总氮回收率的影响

不同酶解温度对水解度、总氮回收率和酶解 SN-TCA 指数的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出,低于 60℃时,水解度随温度的上升而升高,30~35℃上升趋势平缓,35~60℃急剧上升,60℃时达到最大值,超过 60℃后就开始急剧下降。这与丁晓燕^[9]对于水解度的结论基本一致,总氮回收率在 45~60℃有一个大的飞跃,急剧上升,总氮回收率极大值在 60℃左右,然后总氮回收率又有一个很明显的下降趋势。这是因为在蛋白质酶解过程中,在一定范围内升高温度,底物转变成产物的速度加快,酶解效率也相应提高。温度过高,蛋白酶变性,酶的稳定性下降,酶解效率随之降低,而胰蛋白酶的最适温度在 60℃左右,此时胰蛋白酶的活性最大。酶解 SN-TCA 指数的趋势与总氮回收率相同。

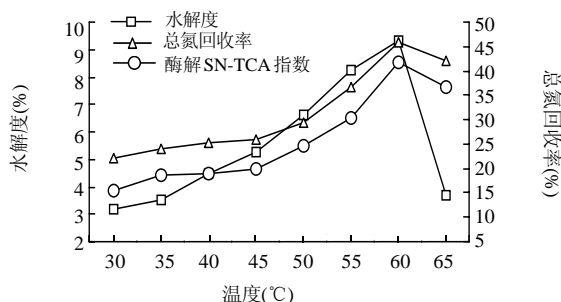


图 2 温度对水解度和总氮回收率的影响

Fig.2 Effects of temperature on degree of hydrolysis and total nitrogen recovery

2.2.3 pH 值对水解度及总氮回收率的影响

不同 pH 对水解度、总氮回收率和酶解 SN-TCA 指数的影响如图 3 所示。

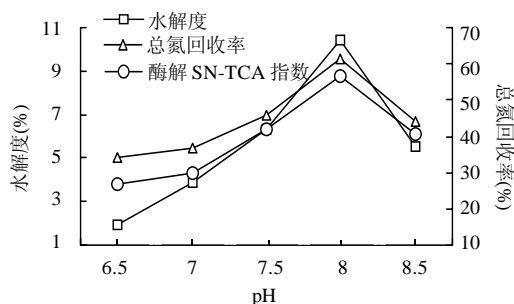


图 3 pH 值对水解度和对总氮回收率的影响

Fig.3 Effects of pH value on degree of hydrolysis and total nitrogen recovery

由图 3 可以看出,在 pH6.5~8.5 间,水解度、总氮回收率和酶解 SN-TCA 指数均呈现先上升后下降的趋势。溶液 pH 值在 6.5~8.0 间,水解度呈急剧上升趋势,当 pH 值为 8 时,水解度达到最大值。这与张勤^[14]的结论一致。

总氮回收率在 pH 6.5~7.0 间上升缓慢,在 pH7.0~8.0 间才开始明显上升,极大值出现在 pH 值为 8 时,随着 pH 值继续升高,水解度和回收率均呈明显下降的趋势,水解度的下降速度要大于总氮回收率。酶解 SN-TCA 指数的趋势和总氮回收率相同。产生这一现象的原因是酶的活力受其环境 pH 值的影响,在一定的 pH 值下,酶反应具有最大活性,该 pH 是酶的最适 pH 值,最适 pH 值会由于实验原料和底物浓度的不同而稍有不同。胰蛋白酶的最适 pH 值在 8 左右,远高于或低于此值,酶的活性都会受到抑制。

2.2.4 加酶量对水解度及总氮回收率的影响

不同加酶量对水解度、总氮回收率和酶解 SN-TCA 指数的影响如图 4 所示。由图 4 可以看出,加酶量在 3000~6000U/g 原料之间,水解度上升趋势明显;加酶量在 6000~8000U/g 原料之间,无论是水解度上升趋势平缓。这与何利^[10]、张勤^[14]、丁晓燕^[9]的结论一致。酶解 SN-TCA 指数和总氮回收率在 4000~5000U/g 原料之间上升速度快,随着加酶量的继续增大,上升趋势变平缓。这可能是由于加酶量在 3000~6000U/g 原料阶段,在底物浓度一定的情况下,增加的酶量未使底物浓度饱和,随着加酶量的增大,反应速度越快,蛋白质水解率也越高。但加酶量超过 6000U/g 原料后,过量的酶抑制了反应的进行,同时也有可能酶自身相互水解,使酶活力降低。所以确定加酶量为 5000U/g。

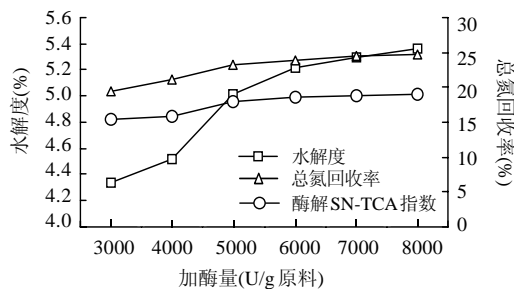


图 4 加酶量对水解度和总氮回收率的影响

Fig.4 Effects of enzyme concentration on degree of hydrolysis and total nitrogen recovery

2.2.5 料液比对水解度以及总氮回收率的影响

料液比对水解度、总氮回收率和酶解 SN-TCA 指数的影响如图 5 所示。由图 5 可以看出,料液比在 1:2.5~1:12.5 间,水解度、总氮回收率和 SN-TCA 指数的整体趋势均是先上升后下降。料液比在 1:2.5~1:5 间,水解度、总氮回收率和 SN-TCA 指数呈明显的上升趋势;料液比在 1:5~1:7.5 间,水解度下降但变化不明显,急剧下降出现在料液比 1:7.5~1:12.5 间;总氮回收率和酶解 SN-TCA 指数在 1:5~1:12.5 间呈急剧下降的趋势,但酶解 SN-TCA 指数下降幅度比总氮回收率的下降幅度大;

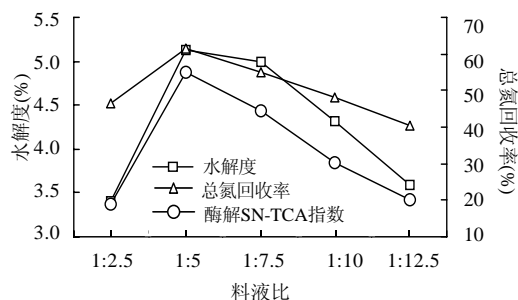


图5 料液比对水解度和总氮回收率的影响

Fig.5 Effects of substrate concentration on degree of hydrolysis and total nitrogen recovery

无论是水解度、总氮回收率还是酶解 SN-TCA 指数的最大值都出现在料液比为 1:5 时。这可能是料液比大, 酶与底物接触不均匀, 反应不完全, 蛋白质提取率低; 料液比小, 稀释了酶的浓度, 影响了酶解反应。与其他酶解骨蛋白研究^[6-7, 9]不同的是本实验对骨肉的处理没有采用蒸煮脱脂, 最适料液比与其他报道不一致, 但考虑到实际生产中后续加工处理中浓缩酶解液时耗能大, 因而在保证高度水解的情况下, 选用料液比为 1:5。

3 结论

采用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶及胰蛋白酶对猪骨肉水解, 结果显示胰蛋白酶水解效果最好, 为酶解猪骨肉最佳用酶。

对胰蛋白酶进行单因素试验, 结果显示其酶解猪

骨肉最佳水解条件为: 时间 5h、温度 60℃、pH8.00、加酶量 5000U/g 原料、料液比为 1:5。

参考文献:

- [1] 邓富江. 中国肉类工业发展的现状与前景[EB/OL]. (2007-09-17)[2008-05-18]. http://www.sdxm.gov.cn/art/2007/9/17/art_191_47998.html.
- [2] 孙卫青, 马丽珍, 王芳. 骨食品开发研究前景广阔[J]. 肉类工业, 2001 (1): 12-45.
- [3] ZARKADAS C G, YU Z, ZARKADAS G C, et al. Assessment of the protein quality of bone isolates for using an ingredient in meal and poultry products[J]. J Agri Food Chem, 1995, 43: 77-83.
- [4] MICHEL L, JACQUES F, MICHEL P, et al. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis[J]. Food Sci, 1995, 60(5): 949-958.
- [5] SRENSSEN N H, 马丽珍. 酶清理骨骼和碎肉利用[J]. 肉类工业, 1992 (8): 41-43.
- [6] 赵胜年. 酶法水解鲜牛骨骼的研究[J]. 食品科学, 1995, 16(10): 38-40.
- [7] 熊善柏, 赵山, 启明. 木瓜蛋白酶在乌鸡肉蛋白质分步酶解中的应用研究[J]. 食品科学, 2000, 21(12): 26-29.
- [8] 丁晓燕. 鸡骨泥的酶法水解及其产物的应用研究[D]. 福州: 福州大学, 2006.
- [9] 徐德峰, 张卫明, 孙晓明, 等. 响应曲面法在鸡骨架蛋白酶解工艺中的应用[J]. 食品发酵与工业, 2007(4): 54-58.
- [10] 何利. 肉鸡鸡骨蛋白质酶法水解研究[J]. 食品工业科技, 2006 (6): 161-163.
- [11] 赵霞, 马丽珍. 酶解骨蛋白的研究[J]. 食品科技, 2003(7): 99-101.
- [12] 王朝旭, 赵丹, 王小雪. 酶法水解骨蛋白最佳条件的研究[J]. 食品科学, 2001(2): 48-49.
- [13] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 15 (11): 65-67.
- [14] 张勤. 酶法从鲜猪皮中提取生物活性肽[D]. 西安: 西北大学, 2005.