

两种来源酶多种方式水解牛骨蛋白

万婷婷¹, 罗爱平^{1,*}, 何光中², 李丽¹, 陈明¹

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省畜牧兽医科学研究所, 贵州 贵阳 550000)

摘要: 选用两种不同来源的枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶, 以水解度为特征性指标, 采用 5 种不同水解方式水解牛骨蛋白。结果表明: 枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同步水解, 效果优于木瓜蛋白酶与枯草杆菌中性蛋白酶分步水解两种方式, 最佳酶体系反应条件为 pH7.05、温度 51℃、加酶总量 7000U/g(枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶用量比 1:1)、150r/min 振荡水解 6h, 水解度可达 27.54%。

关键词: 牛骨蛋白; 水解; 木瓜蛋白酶; 枯草杆菌中性蛋白酶; 水解度

Dual-enzyme Hydrolysis of Bovine Bone Protein Using Different Methods

WAN Ting-ting¹, LUO Ai-ping^{1,*}, HE Guang-zhong², LI Li¹, CHEN Ming¹

(1. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary Science Institute of Guizhou Province, Guiyang 550000, China)

Abstract: Two proteases including *Bacillus subtilis* neutral protease and papain are used to hydrolyze bovine bone protein by five hydrolysis methods. The optimal dual-enzyme hydrolysis conditions of bone protein were explored for maximizing hydrolysis efficiency. The results indicated that synchronous hydrolysis of bone protein exhibited a higher hydrolysis efficiency when compared with the sequential hydrolysis by papain first and then *Bacillus* protease or *Bacillus* protease first and then papain. The optimal hydrolysis conditions were total enzyme amount of 7000 U/g at papain-neutral protease ratio of 1:1, oscillation hydrolysis time of 6 h, oscillation speed of 150 r/min, hydrolysis temperature of 51 °C, hydrolysis pH of 7.05 and substrate concentration of 10%. Under the optimal hydrolysis conditions, the degree of hydrolysis was up to 27.54%.

Key words: bone protein; hydrolysis; *Bacillus* protease; papain; degree of hydrolysis

中图分类号: TS251.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0119-05

我国蛋白质资源紧缺, 大力开发和合理利用蛋白质资源显得非常必要。目前, 蛋白质水解主要有酸法、碱法和酶法^[1]。酸、碱法由于条件苛刻而趋于淘汰, 酶法具有定向、易控、温和等优点, 因此, 现在较多采用酶法。

蛋白酶按其来源分为植物蛋白酶、动物蛋白酶及微生物蛋白酶 3 类^[2]。综合考虑酶的来源、价格、水解效果及反应条件^[3], 试验选用木瓜蛋白酶与枯草杆菌中性蛋白酶。木瓜蛋白酶可作用于蛋白质中的甘氨酸及赖氨酸等残基参与形成的肽键, 枯草杆菌中性蛋白酶专一性广泛, 肽键的一侧含有疏水性氨基酸的肽键均可被其水解^[4]。

单一酶的作用范围小, 水解度不高, 所得的酶解产物多为多肽, 且分子质量较大^[5]。利用不同性质不同

水解位点的两种或两种以上酶水解, 根据水解底物的方式不同实现对底物的深度水解。枯草杆菌中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的反应条件相当, 两者的最适 pH 值接近中性, 且两种酶的专一性底物又具有一定的互补性。

本研究以牛骨粉为水解反应底物, 选择植物蛋白酶与微生物蛋白酶两种不同来源的酶, 采用不同水解方式水解牛骨蛋白, 以期达到较高的水解度。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛骨粉(粒度 200 目)为贵州大学动物性食品综合实验室自制^[6]。

枯草杆菌中性蛋白酶(10 万 U/g)、木瓜蛋白酶(10 万 U/g) 南宁庞博生物工程有限公司。

收稿日期: 2011-04-27

基金项目: 贵州省科技厅资助项目(黔科合 NY 字[2007]3021 号); 贵州省农业委员会资助项目(GZCYTX-0301-03);

贵州大学研究生创新基金项目(校研农 2011021)

作者简介: 万婷婷(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药食资源利用。E-mail: wan_tingting_hi@126.com ;

* 通信作者: 罗爱平(1958—), 女, 教授, 学士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: luoaiping58@126.com

1.2 仪器与设备

LD4-2 型离心机 北京医用离心机厂; HI98128 型 pH 计 北京惠通卓越科技发展有限公司; FW-80 型高速万能粉碎机 东莞市创瑞工业试验设备有限公司; THZ-98A 恒温振荡培养箱 上海一恒科技有限公司; YX-280B 型蒸汽灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司。

1.3 方法

1.3.1 牛骨蛋白水解工艺

工艺流程: 牛骨粉→加水→调节 pH 值→水解→灭酶→冷却→离心→取上清液→测定水解度及氮收率。

操作要点: 牛骨粉加适量蒸馏水充分混匀后, 按照设计方案置恒温振荡培养箱 150r/min 振荡水解, 水解完毕后于 85~90℃灭酶 10min, 冷却至常温, 4000r/min 离心 10min, 取上清液测定水解度及氮收率。

1.3.2 牛骨蛋白水解体系条件优化

1.3.2.1 水解方式确定

固定牛骨粉质量分数 10%^[7]、pH7、水解温度 50℃、加酶总量 4000U/g、枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶复合水解时的酶用量比 1:1 为酶反应体系, 以水解度和氮收率为指标, 研究不同水解方式对目标值的影响。分别选取 5 种水解方式: I: 木瓜蛋白酶单酶振荡水解 6h; II: 枯草杆菌中性蛋白酶单酶振荡水解 6h; III: 枯草杆菌中性蛋白酶先振荡水解 3h 灭酶后, 加入木瓜蛋白酶振荡水解 3h; IV: 木瓜蛋白酶先振荡水解 3h 灭酶后, 加入枯草杆菌中性蛋白酶振荡水解 3h; V: 枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同时振荡水解 6h。确定最佳水解方式。

1.3.2.2 水解时间的确定

在酶反应体系及评价指标不变的条件下, 设定水解时间分别为 4、5、6、7、8h, 确定最适宜的水解时间。

1.3.2.3 枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶用量比的确定

设定枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶用量比为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3(m/m), 在其他酶反应体系及评价指标不变的条件下, 振荡水解 6h。确定最佳酶用量比。

1.3.2.4 二次正交旋转组合试验设计

在单因素试验基础上, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理^[8-10], 以水解度为响应值, 设计三因素三水平二次正交旋转组合试验, 对牛骨蛋白水解体系条件进行优化。

1.3.3 指标测定

水分测定: 参照 GB 5009.3—2010《食品中水分的测定: 直接干燥法》; 灰分测定: 参照 GB 5009.4—

2010《食品中灰分的测定: 灼烧称重法》; 脂肪测定: 参照 GB/T 22223—2008《食品中脂肪的测定: 索氏抽提法》; 蛋白质、总氮量测定: 参照 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定: 微量凯氏定氮法》; 钙测定: 参照 GB/T9695.13—2009《食品中钙的测定: 高锰酸钾滴定法》; 游离氨基氮测定: 参照 GB/T5009.39—2003《酱油卫生标准的分析方法: 甲醛电位滴定法》; pH 值测定: 采用 pH 测定仪测定; 水解度测定: 参照文献[11]方法; 氮收率的测定: 参照文献[12]方法。

$$\text{水解度}/\% = \frac{\text{水解液中游离氨基酸态氮}}{\text{水解液中总氮}} \times 100$$

$$\text{氮收率}/\% = \frac{\text{水解液中氮含量}}{\text{原料中总氮含量}} \times 100$$

1.3.4 数据处理

每组数据平行测定 3 次, 采用 Design Expert 7.1.6 软件进行响应面设计, 并对数据分析处理。

2 结果与分析

2.1 原料基本成分

表 1 牛骨及牛骨粉的基本营养成分

Table 1 Basic nutritional components in bovine bone and bone powder

成分	水分	蛋白质	脂肪	钙	灰分
牛骨	59.72	11.13	8.77	5.4	15.67
牛骨粉	4.95	23.30	4.08	11.2	34.30

将新鲜牛骨制备成牛骨粉, 蛋白质暴露面积增加, 有利于其水解。由表 1 可知, 原料牛骨经处理加工为牛骨粉后, 蛋白质占总量的 23.30%, 表明试验用的底物蛋白质含量高。

2.2 不同水解方式水解牛骨蛋白的结果

表 2 不同水解方式水解牛骨蛋白结果

Table 2 Effect of dual-enzyme hydrolysis method on the degree of hydrolysis

水解方式	水解度/%	氮收率/%
I	12.82 ± 0.11 ^a	47.78 ± 0.12 ^a
II	15.83 ± 0.13 ^b	58.13 ± 0.11 ^b
III	16.31 ± 0.14 ^c	60.14 ± 0.02 ^c
IV	17.79 ± 0.14 ^d	62.05 ± 0.11 ^d
V	18.69 ± 0.19 ^e	65.62 ± 0.14 ^e

注: 同列数据肩标字母不同者表示差异显著($P < 0.05$)。

衡量蛋白质的水解效果常用两个指标, 即氮收率与水解度。氮收率一般用水解后得到的可溶性氮占总氮的

比例表示,水解度是基于蛋白质被裂解的肽键数目来衡量水解效果^[13]。由表2可知,V组的水解度与氮收率分别为18.69%、65.62%,比III组分别提高5.06%、5.75%,差异显著($P < 0.05$)。比IV组分别提高12.73%、9.11%,差异显著($P < 0.05$)。同步水解期间不需加热灭酶,操作简单,在实际生产中可操作性强。从实际生产和发挥两种酶最大活力考虑,确定V组即枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同步水解的方式水解牛骨蛋白。

V组的水解度与氮收率比I组分别提高45.79%、37.34%,差异显著($P < 0.05$),比II组分别提高18.07%、12.88%,差异显著($P < 0.05$),故利用两种酶不同水解位点的性质可提高牛骨蛋白的水解度。

2.3 水解时间对牛骨蛋白水解效果的影响

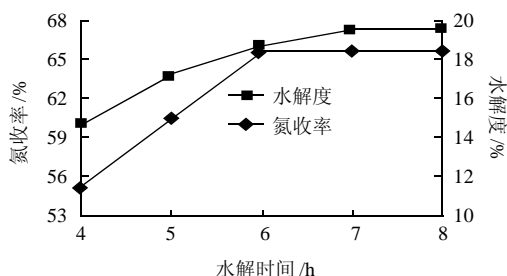


图1 水解时间对水解效果的影响

Fig.1 Effect of hydrolysis time on the hydrolysis efficiency

由图1可知,水解度与氮收率在4~6h呈上升趋势,分别达18.69%、73.06%,在6~8h其值趋于平缓。反应时间过长,增加经济成本,因美拉德反应会影响酶解物的外观颜色,还会产生一些短肽类的苦味物质^[14-17]。综合考虑酶解时间以6h为宜。

2.4 枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶用量比对牛骨蛋白水解效果的影响

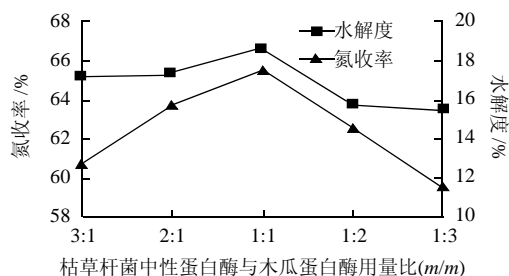


图2 枯草杆菌中性蛋白与木瓜蛋白酶用量比对水解效果的影响

Fig.2 Effect of papain-neutral protease ratio on hydrolysis efficiency

由图2可知,随着枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶用量比的变化,氮收率呈先上升后下降的趋势,而水解度变化平缓,其机理有待进一步研究。枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶用量比为1:1时,氮收率与水解度均达最大值,分别为73.06%、18.69%。故确定枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶用量比为1:1。

2.5 二次正交旋转组合试验设计优化两种酶同步水解牛骨蛋白工艺条件

氮收率一般用水解后得到的可溶性氮占总氮的比例表示,由于蛋白质水解到一定程度后肽分子在水中已经得到很好的溶解,更程度的水解不会从氮收率上进一步表现,所以对于水解程度较大的产物不能反映实际水解情况。水解度是从蛋白质水解时断裂的肽键数上来定义蛋白质水解程度,所以水解度可以最准确地反映出蛋白质水解程度的大小^[13],故以水解度为响应值,优化两种酶同步水解牛骨蛋白的体系条件,因素水平设计见表3,结果见表4。

表3 两种酶同步水解牛骨蛋白二次正交旋转组合试验设计因素水平表

Table 3 Factors and levels of orthogonal tests for optimizing dual-enzyme hydrolysis process

因素	编号	水平		
		-1	0	1
加酶总量/(U/g)	A	5000	6000	7000
pH	B	6.5	7.0	7.5
温度/℃	C	45	50	55

表4 两种酶同步水解牛骨蛋白二次正交旋转组合试验结果

Table 4 Design and results of orthogonal tests for optimizing dual-enzyme hydrolysis process

试验号	A	B	C	水解度/%		
				实际值	预计值	差值
1	0	0	0	24.99	24.99	0.00
2	1	1	0	21.73	20.94	0.79
3	0	-1	-1	8.71	9.85	-1.14
4	-1	-1	0	7.02	7.81	-0.79
5	0	-1	1	13.31	13.16	0.15
6	0	0	0	24.99	24.99	0.00
7	0	1	1	18.36	17.22	1.14
8	-1	0	-1	16.67	14.74	1.93
9	1	-1	0	18.90	17.12	1.78
10	0	1	-1	15.00	15.15	-0.15
11	1	0	1	23.95	25.88	-1.93
12	-1	0	1	18.97	18.33	0.64
13	0	0	0	24.99	24.99	0.00
14	0	0	0	24.99	24.99	0.00
15	0	0	0	24.99	24.99	0.00
16	-1	1	0	11.58	13.36	-1.78
17	1	0	-1	23.45	24.09	-0.64

采用 Design Expert 7.1.6 软件对表 4 数据进行二次多项式回归拟合, 得到二次多元回归方程: $Y = 24.99 + 4.22A + 2.34B + 1.35C - 0.43AB - 0.45AC - 0.31BC - 1.63A^2 - 8.55B^2 - 2.60C^2$ 。结果方程分析见表 5。

表 5 二次正交旋转组合试验回归分析表
Table 5 Variance analysis for the regression model

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	571.37	9	63.49	24.07	0.0002	**
A	142.72	1	142.72	54.11	0.0002	**
B	43.85	1	43.85	16.63	0.0047	*
C	14.47	1	14.47	5.49	0.0517	
AB	0.75	1	0.75	0.28	0.6108	
AC	0.81	1	0.81	0.31	0.5967	
BC	0.38	1	0.38	0.15	0.7140	
A ²	11.24	1	11.24	4.26	0.0779	
B ²	307.71	1	307.71	116.67	< 0.0001	**
C ²	28.38	1	28.38	10.76	0.0135	*
残差	18.46	7	2.64			
失拟项	18.46	3	6.15	1241.45	0.2625	
纯误差	0.00	4	0.00			
总离差	589.84	16				

注: *.差异显著($P < 0.05$); **.差异极显著($P < 0.001$)。

由表 5 可知, 模型极显著($P = 0.0002$), 失拟项不显著, 表明回归方程与实际数据之间具有非常好的拟合性。方程中 A、B 的 P 值均小于 0.05, 表明酶用量、pH 值对水解度影响显著, 温度对水解度影响不显著, 其中加酶总量影响最大, pH 值影响次之, 温度对水解度影响最小。交互项对水解度影响均不显著, pH 值及温度的二次项对水解度影响显著。

图 3 中每个响应面分别代表着两个独立变量之间的相互作用, 此时另外两个变量保持在最佳水平。

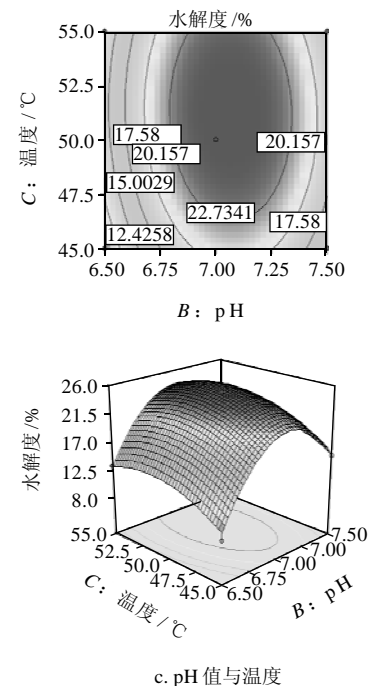
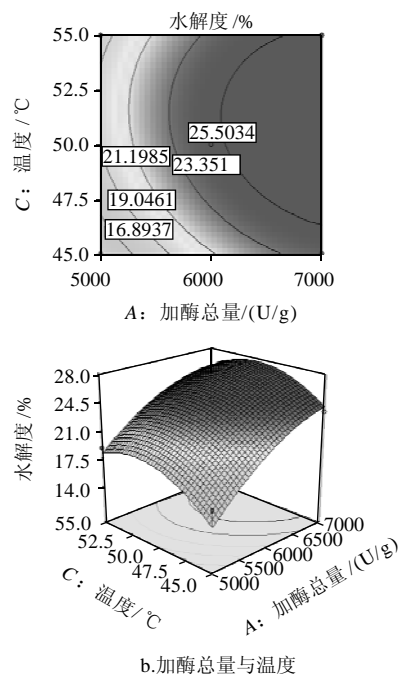
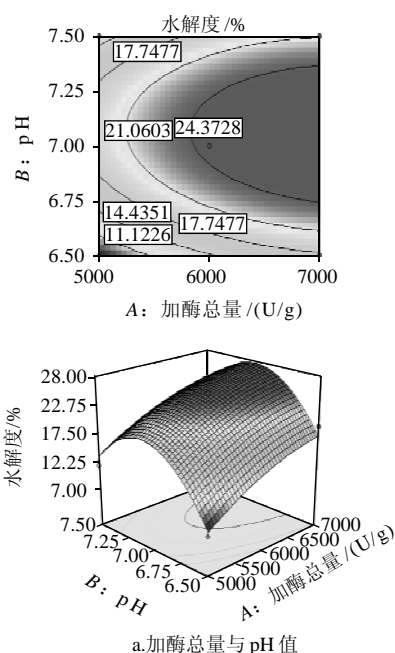


图 3 各两因素交互作用的响应面及等高线图

Fig.3 Response surface and contour plots for the effects of cross-interactions among factors on hydrolysis efficiency

由图 3a 可知, 水解度随 pH 值的升高和加酶总量的增加呈先上升后下降的趋势。因为酶对底物 pH 值比较敏感, pH 值过高或过低都会降低酶解效果。由图 3b 可知, 水解度随温度的升高和加酶总量的增加呈先上升后下降的趋势。加酶总量过高时, 由于酶本身的相互水解作用加强, 会阻碍酶对底物的酶解^[18]。由图 3c 可知,

水解度随 pH 值和温度的升高呈先上升后下降的趋势。温度是影响酶活力的重要因素之一, 温度过高或过低均影响酶活力。

极值条件应在等高线的椭圆圆心处^[19]。为得到水解度最佳条件, 令回归方程一阶偏倒数等于零, 整理得到方程组, 解方程组即为 3 因素的最佳水平代码值, 即加酶总量 7000U/g、pH7.05、温度 50.83℃。计算结果表明加酶量、pH 值及温度均在试验设计范围内。考虑生产实际及应用方便, 校正温度 51℃。按最佳条件进行 3 次验证实验, 水解度的平均值为 27.54%, 比理论值 27.76% 低 0.79%。比吴敏等^[14]报道水解度 18.34% 提高 50.16%, 可能与选择酶的种类及试验设计方法有关。

3 结 论

3.1 采用枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶同步水解, 其水解效果优于先木瓜蛋白酶后枯草杆菌中性蛋白酶及先枯草杆菌中性蛋白酶后木瓜蛋白酶。蛋白质水解度分别为 18.69%、17.79%、16.31%, 差异显著($P < 0.05$)。

3.2 两种酶同步水解的水解度与氮收率分别为 18.69%、65.62%, 比枯草杆菌中性蛋白酶单酶水解分别提高 18.07%、12.88%, 差异显著($P < 0.05$), 比木瓜蛋白酶单酶水解分别提高 45.79%、37.34%, 差异显著($P < 0.05$)。故利用两种酶不同水解位点的性质可提高牛骨蛋白的水解度。

3.3 采用二次正交旋转组合试验设计优化水解牛骨蛋白最佳酶解体系反应条件为 pH7.05、温度 51℃、酶总量 7000U/g(枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶酶用量比 1:1), 在 150r/min 振荡水解 6h, 水解度可达 27.54%。

参考文献:

[1] 王龙. 罗非鱼加工副产物水解蛋白的酶法制备工艺[D]. 广州: 中山大学, 2006.

- [2] 何国庆, 丁立孝. 食品酶学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 114-115.
- [3] ALDER-NISSEN J. Enzymatic hydrolysis of food protein[M]. London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd., 1986: 25-40.
- [4] 孙卫青, 马丽珍. 酶法水解鲜羊骨骼的研究[J]. 肉类工业, 2007(4): 26-29.
- [5] 房新平, 生庆海, 王玉良, 等. 酶法水解牛胎盘下脚料[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(3): 35-53.
- [6] 吴敏, 罗爱平, 尹彦洋, 等. 天然促生长因子促进益生菌发酵牛骨粉钙转化的工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 222-225.
- [7] 尹彦洋, 罗爱平, 伍贤位, 等. 柠檬酸与胃蛋白酶协同水解牛骨粉的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2010(3): 248-251.
- [8] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 91-94.
- [9] LIU Jing, GUAN Xiao, ZHU Daqi, et al. Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(10): 1913-1918.
- [10] LIANG R J. Optimization of extraction process of *Glycyrrhiza glabra* polysaccharides by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74: 858-861.
- [11] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 15(11): 65-67.
- [12] 谭贝妮, 马美湖, 魏涛. 牛骨蛋白酶解工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 20-25.
- [13] 赵新淮. 食品化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 144-145.
- [14] 吴敏, 尹彦洋, 罗爱平, 等. 双酶分步水解牛骨蛋白工艺的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 223-226.
- [15] 何慧, 王进, 裴凡, 等. 蛋白水解物与苦味的构效关系及脱苦研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 571-574.
- [16] NISHIWAKI T, YOSHIMIZU S, FURUTA M, et al. Debitting of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(1): 60-63.
- [17] 张永秀. 牛骨蛋白的酶解及产物抗氧化活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [18] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Food Sci, 2001, 66(5): 642-646.
- [19] 尹彦洋, 罗爱平, 李施, 等. 两种乳杆菌协同发酵牛骨粉促钙转化的工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 178-183.