# 鸡骨泥的酶解工艺及其酶解液中游离氨基酸和脂肪酸分析的研究

杨铭铎[1]，龙志芳[1,2]，赵 岩[3]，霍德兴[4]
(1. 哈尔滨商业大学中式快餐研究发展中心博士后科研基地，黑龙江 哈尔滨 150076；2. 无锡商业职业技术学院旅游管理系，江苏 无锡 214153；3. 海南大学食品学院，海南 海口 571737；4. 哈尔滨市鸿泽调味品厂，黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要：本实验以美拉德(Maillard)反应产物(MRPs)的风味为判断依据，以水解度(DH)为动物蛋白酶解液(Maillard反应底物之一)的特征性指标，根据MRPs的风味确定动物蛋白水解液的最佳水解度，通过木瓜蛋白酶水解鸡骨泥水解工艺的研究，得出酶解的最佳工艺参数为：温度55℃，pH6.0，时间4h，E/S 为5000U/g。通过氨基酸自动分析仪和GC-MS气相色谱质谱联用仪测定其游离氨基酸和脂肪酸，结果表明：鸡骨泥中含有丰富的钙、铁、锌、硒和一定量的蛋白质，脂肪含量较低。含有17种游离氨基酸，其中人体必需的异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸等8种氨基酸含量较高、比例较适合。含有的5种游离脂肪酸中人体必需的亚油酸、亚麻酸占有一定的比例。

关键词：水解动物蛋白；水解度；Maillard反应；游离氨基酸；游离脂肪酸

## Study on Enzymatic Hydrolysis of Mashed Chicken-bone and Detection of Free Amino-acid and Free Fatty Acid in Its Hyolrolysate

YANG Ming-duo[1], LONG Zhi-fang[1,2], ZHAO Yan[3], HUO De-xing[4]
(1. Postdoctoral Programme Chinese Style Fast Food Research and Development Center, Harbin Commercial University, Harbin 150076, China; 2. Department of Tourism Management, Wuxi Institute of Commence, Wuxi 214153, China; 3. College of Food Science, Hainan University, Haikou 571737, China; 4. Hongze Seasoning Factory of Harbin, Harbin 150030, China)

**Abstract**: In this experiment, enzymatic hydrolysis of animal protein was studied. The main task was to find out the optimal degree of hydrolysis (DH) of hydrolyzed animal protein (HAP) according to the flavor of Maillard reaction products (MRPs) which was used as a standard of estimation with DH as characteristic parameter for HAP, the substrate of Mail lard reaction. And the optimal technological parameters are : papain, temperature 55 ℃, pH 6.0, and 4 hours, E/S 5000 U/g for chicken pone paste. The paper reported the contents of essential nutrients, amino acid and free fatty acid though studies on mashed chicken-bone. By automatic amino acid analyzer and gas chromatograph-mass spectrometer amino acid and fatty acid were detected. As a result, there are affluent calcium, phosphorus, iron, zincum, and some proteins and low-content fats in mashed chicken-bone. It contains seventeen free amino acids and human essential isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, threonine, valine etc. eight amino acid of high content and reasonable proportion, and also it contains five free fatty acids with human essential linolenicacidandlinolicacid.

**Key words**: hydrolyzed animal protein; degree of hydrolysis; Maillard reaction; free amino-acid; free fatty acid
中图分类号：TS201 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)05-0162-05

美国、日本早在20世纪70年代中期就已开发利用动物骨骼，经过超细加工成骨泥，在食品行业中广泛的应用。近年来东南亚一些国家开始应用骨泥肉制成多种骨味系列食品，如骨松、骨味素、骨味汁、骨味

收稿日期：2007-12-10
基金项目：国家人事部留学人员科技活动择优资助项目(国人部200306AD)；
哈尔滨市归国留学人员科学研究基金项目(2005AFLXJ007)
作者简介：杨铭铎(1956-)，男，教授，博士，研究方向为食品科学与中式快餐。E-mail：yangmingduo5663@163.com

肉等。我国对动物骨骼作为食品应用，是近几年才开始的，生产的骨泥仅限于掺加到其他食品中应用[1-2]，如灌香肠、炸丸子、包饺子、做挂面等，有待开发深加工产品。

“中国总膳食研究”公布的资料表明：我国人均钙、锌、钾、$VB_2$及VA摄入量偏低，尤其钙的摄入量严重不足。儿童、老人、孕妇更易发生缺钙，3岁以下儿童佝偻病发病率平均为33.3%。有2亿妇女患有骨质增生，60岁以上脑力劳动者冠心病、高血压和脑血管病患病率分别为21.3%、26.1%和14.2%。钙缺乏的不良影响及防治问题越来越受到人们的重视。随着肉鸡业的发展，鸡腔骨资源变的日益丰富，其开发利用变得日益重要，鸡骨泥就是采用新鲜的鸡骨架，经过超细磨加工而成的。根据有关文献报道[3]，骨钙的吸收率为70%；另据山东省医科大学卫生系营养与食品卫生等教研室的研究[4]，骨钙的利用率为92.97%。在我国人民面临着一个增加膳食中钙含量以补充人体所必需的问题，而开发鸡骨泥将为人类增加钙摄入量提供一个极其丰富的而又价格低廉的食物资源[5-7]。鸡骨泥的水解蛋白液必将会产生巨大的经济效益和社会效益，具有广阔的市场前景。

本实验以哈尔滨工业大学学子食品公司提供的鸡骨泥为研究对象，对其化学成分进行初步的提取和分离，并首先对所含的营养成分进行分析测定。在本实验中主要研究鸡骨泥的酶解工艺参数、酶解液中的氨基酸和游离脂肪酸的含量及种类，为鸡骨泥在学生营养餐和快餐中的应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鸡骨泥由哈尔滨工业大学学子食品公司提供。

木瓜蛋白酶 无锡酶制剂厂。

### 1.2 仪器

磁力搅拌器、PHS-ZC型精密酸度计 上海雷磁仪器厂；CS501型超级水浴器 重庆实验设备厂；凯氏定氮装置KDN-4C 上海贝特仪电设备厂； 恒温箱WMK-02 南京第三仪器厂；Agilent GC6890N-MSD5973N气-质联用仪 安捷伦公司；L8800型氨基酸自动分析仪 日本日立公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 鸡骨泥最佳水解工艺选择

##### 1.3.1.1 酶活的测定

参照GB/T1803－93福林酚法进行。

##### 1.3.1.2 氨基酸态氮的测定

参照GB/T5009.39－96甲醛法进行。

##### 1.3.1.3 水解度(DH)计算

水解度(%)=氨基态氮/总氮×100

#### 1.3.2 鸡骨泥热处理条件确定

##### 1.3.2.1 热处理温度确定

将15%鸡骨泥悬浮液分别在60、70、80、90、100℃水浴加热10min，然后进行酶解，酶解条件为：底物浓度15%，温度55℃，pH值6.0，水解时间3h，酶量与底物浓度比4000U/g。测定其水解度(DH)，确定最佳加热预处理温度。

##### 13.2.2 热处理时间的确定

按以上选定的最佳热预处理温度，将15%鸡骨泥悬浮液分别处理5、10、15、20、25min，在进行酶解，测定水解度与时间的关系，确定最佳加热预处理时间。

#### 1.3.3 木瓜蛋白酶酶解鸡骨泥条件的选择

##### 1.3.3.1 酶解温度的选择

选定底物浓度15%，水解时间3h，酶量与底物浓度比4000U/g。pH值6.0，分别在45、50、55、60、65、70℃条件下水解，分别测定DH，确定最适酶解温度。

##### 1.3.3.2 酶解pH值的选择

选定底物浓度15%，E/S为4000U/g，水解时间3h，温度为所选定的各酶的最佳温度，pH值分别如下：4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0，分别测定其DH，确定其最适pH值。

##### 1.3.3.3 E/S的选择

选定底物浓度15%，水解3h，温度和pH值分别为以上选择的最适值，E/S分别在2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000U/g的条件下，测定其DH，确定最适E/S。

##### 1.3.3.4 底物浓度的选择

选定上述确定的pH值、温度、E/S，底物浓度分别在5%、15%、25%、35%、45%、55%、65%条件下水解3h，测定其DH，确定最佳底物浓度。

##### 1.3.3.5 酶解时间的选择

按选定的最佳参数，酶解时间分别为1、2、3、4、5、6、7h测定其水解度，确定最佳酶解时间。

##### 1.3.3.6 最佳工艺条件的确定

根据单因素试验的结论，选择酶解温度、时间、pH值、酶与底物浓度比四因素，每因素三水平设计正交试验，其因素水平设计见表1。取$L_9(3^4)$正交表，做正交试验。

#### 1.3.4 鸡骨泥酶解的工艺流程图

工艺流程图见图1。

#### 1.3.5 鸡骨泥酶解前后一般营养成分的测定

表1　木瓜蛋白酶的酶解正交试验因素水平表

Table 1　Factors and levels of orthogonal test of enzymolysis condition by papain

| 水平 | 因素 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | A E/S(U/g) | B时间 (h) | C温度(℃) | D pH |
| 1 | 3000 | 3 | 50 | 5.5 |
| 2 | 4000 | 4 | 55 | 6.0 |
| 3 | 5000 | 5 | 60 | 6.5 |

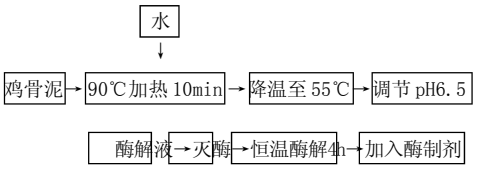



图1　鸡骨泥酶解工艺流程图

Fig.1　Flow chart of enzymatic hydrolysis of mashed chicken-bone

1.3.5.1　脂肪含量的测定

参照GB5009.6－85方法进行。

1.3.5.2　粗蛋白质含量的测定

参照GB5009.5－85方法进行。

1.3.5.3　灰分含量测定

采用灰化法。

1.3.5.4　微量元素的测定

采用火焰原子吸收法。

1.3.6　鸡骨泥酶解前后游离氨基酸含量的测定

参照GB/T5009.124－2003方法进行。

1.3.7　鸡骨泥酶解后游离脂肪酸含量的测定

色谱条件：进样口和检测器温度250℃，柱温采用程序升温，以3℃/min的速度升温至90℃，再次以5℃/min的速度升至240℃；进样量1μl；载气为He，载气流速为1.5ml/min。

质谱条件：传输线温度240℃，EI电子源，电子能量70eV，灯丝发射电流为200μA，离子源温度240℃。

## 2　结果与分析

2.1　鸡骨泥最佳酶解工艺条件的确定

2.1.1　鸡骨泥热处理条件的确定

2.1.1.1　加热预处理温度对鸡骨泥酶解的影响

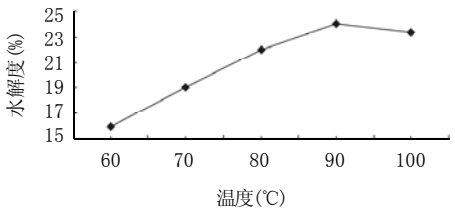



图2　预处理温度的确定

Fig.2　Confirmation of pretreatment temperature

从图2分析可知，在温度60～80℃加热时，水解度增加较快，水解度和预处理温度呈正相关的关系；90℃左右时达到最高，而当温度超过90℃时，蛋白质过度变性，使蛋白质分子过度聚合，导致其水解度下降，故选用90℃为鸡骨泥水解热处理温度。

2.1.1.2　加热预处理时间对鸡骨泥酶解的影响

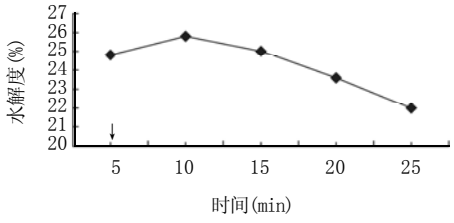



图3　预处理时间的确定

Fig.3　Confirmation of pretreatment time

从图3可以看出，在90℃条件下热处理10min结果较佳。蛋白质受热变性，并依加热温度或时间变化而变化。应防止加热时间过长或温度过高造成过度热变性。因此，采用90℃持续加热10min热变性处理。

2.1.2　木瓜蛋白酶水解鸡骨泥最佳工艺条件的确定

2.1.2.1　酶解最佳温度的确定

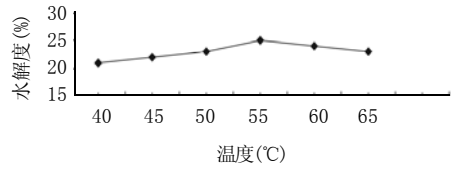



图4　温度对水解度的影响

Fig.4　Effects of temperature on degree of hydrolysis

由图4可以看出，温度开始上升时，水解度也开始上升，但到达一定的温度，再往上升高温度时，水解度却开始下降，所以选择55℃左右作正交试验。

2.1.2.2　酶解pH值的确定

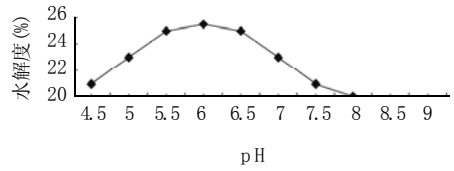



图5　pH对水解度的影响

Fig.5　Effects of pH on degree of hydrolysis

由图5可知，木瓜蛋白酶鸡骨泥在不同的pH下水解时，水解度出现了一个峰值，所以选择的pH值在6.0左右做正交试验。

2.1.2.3 酶量与底物浓度比(E/S)的确定

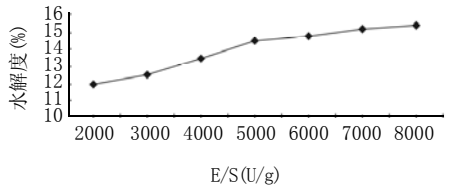



图6 酶量与底物浓度的比对水解度的影响

Fig.6 Effects of ratio between enzyme and concentration of substrate on degree of hydrolysis

由图6可以看出，随着酶量的逐渐加大，各种酶的水解度都有上升的趋势。当用酶量刚开始加大时，水解度增大的较为明显，但当用酶量增大到一定值时，变化和前面相比就不太明显了，所以选择 E/S 为3000U/g左右做正交试验。

2.1.2.4 底物浓度的确定

底物浓度对于反应的速率也起重要的影响作用，其对木瓜蛋白酶影响的关系图如图7所示。

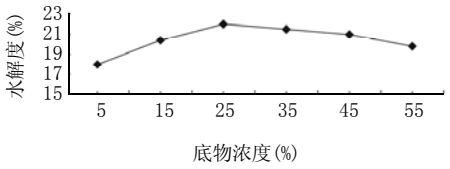



图7 底物浓度对水解度的影响

Fig.7 Effects of concentration of substratea on degree of hydrolysis

由图7可以看出，水解度随着底物浓度的增加而降低，当底物浓度达到25%时，水解度比较合适。而超过这一值时，降低幅度较大，这可能与粘度有关。当底物浓度增大时，粘度也增大，这样不利于酶和底物的充分接触，底物浓度过大时，水解度反而降低。因此选择底物浓度为25%左右做正交试验。

2.1.2.5 酶解时间的确定

由图8可见，酶促化水解的反应速率以水解时间的增长而成相反关系。这是由于在容器内进行反应，开始介质只有酶分子和蛋白质分子，它们的浓度占优势，酶与蛋白质分子活化的比值较高，酶促化水解蛋白质的反应速率较大。当反应进行到一定程度，随着蛋白质分子浓度的减少，活化分子的比值随之减少，生成物分子浓度的增加，有效分子碰撞机会减少，反应速率随着时间的增长，单位时间内速率相应的降低。因此，选择酶解3h左右做正交试验。

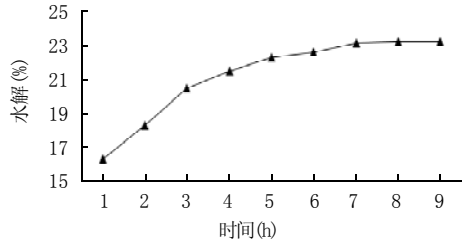



图8 酶解时间对水解度的影响

Fig.8 Effects of enzymolysis time on degree of hydrolysis

2.1.2.6 木瓜蛋白酶水解鸡骨泥最佳工艺的确定

木瓜蛋白酶水解鸡骨泥的正交试验结果见表2，直观图见图9所示。

表2 木瓜蛋白酶酶解鸡骨泥的正交试验结果表

Table 2 Results of orthogonal test on enzymolysis mashed chiken bone by papain

| 试验号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DH(%) | 8.20 | 19.31 | 19.31 | 19.47 | 12.58 | 13.19 | 15.69 | 19.47 | 16.50 |

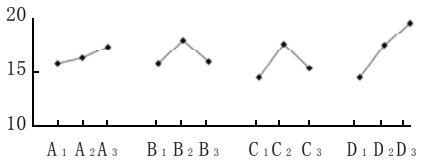



图9 木瓜蛋白酶水解鸡骨泥的直观图

Fig.9 Direct analysis of enzymolysis mashed chicken bone by papain

由图9正交试验的分析结果可知，各因素对酶解影响的次序为：D＞C＞A＞B，即pH值＞温度＞E/S＞时间。鸡骨泥的酶解最优组合为$A_3B_2C_2D_3$，即E/S为5000U/g，酶解时间为4h，温度为55℃，pH值为6.5。

2.2 鸡骨泥酶解前后的一般营养成分分析

100g鸡骨泥酶解前后的一般营养成分见表3。

表3 鸡骨泥酶解前后的一般营养成分表

Table 3 General nutritional ingredient before or after enzymolysis of mashed chicken bone

| 营养成分 | 蛋白质(g) | 脂肪(g) | 灰分(g) | Ca(mg) | Fe(mg) | Zn(mg) | Se(mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 酶解前 | 11.07 | 7.58 | 2.21 | 3440 | 2.31 | 18485 | 4156 |
| 酶解后 | 11.06 | 7.48 | 2.21 | 3450 | 2.32 | 18495 | 4156 |

对比表3的数据可知：由于在实验中的部分损失和测定中出现的一些误差，导致测定的结果略有偏差。总体来讲，鸡骨泥酶解后的一般营养成分与酶解前相比基本无变化。

2.3 鸡骨泥酶解前后氨基酸酸分析测定结果

日立L8800型氨基酸自动分析仪测定的鸡骨泥及其酶解液的游离氨基酸分析图谱如图10和图11所示。

鸡骨泥酶解前后的游离氨基酸的种类及含量分析结果见表4和表5。

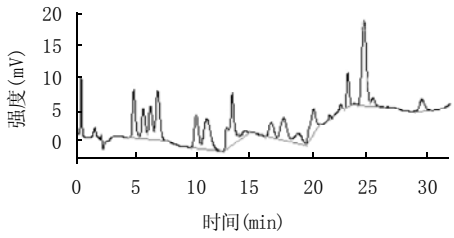



图10 鸡骨泥的氨基酸分析图谱

Fig.10 Amino acid analysis about mashed chicken-bone

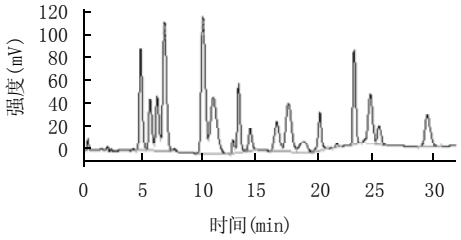



图11 鸡骨泥酶解后的氨基酸分析图谱

Fig.11 Amino acid analysis about enzymolyzed mashed chicken-bone

表4 鸡骨泥酶解前氨基酸含量

Table 4 Amino acid content of mashed chicken-bone

| 检测项目 | 检测结果(%) | 检测项目 | 检测结果(%) | 检测项目 | 检测结果(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 天门冬氨酸 | 0.95 | 胱氨酸 | 0.16 | 苯丙氨酸 | 0.51 |
| 苏氨酸 | 0.45 | 缬氨酸 | 0.49 | 赖氨酸 | 0.80 |
| 丝氨酸 | 0.44 | 蛋氨酸 | 0.26 | 组氨酸 | 0.24 |
| 谷氨酸 | 1.61 | 异亮氨酸 | 0.44 | 精氨酸 | 0.77 |
| 甘氨酸 | 0.96 | 亮氨酸 | 0.80 | 脯氨酸 | 0.74 |
| 丙氨酸 | 0.73 | 酪氨酸 | 0.34 | | |

表5 鸡骨泥酶解后氨基酸含量

Table 5 Amino acid content of mashed chicken-bone after enzymolysis

| 检测项目 | 检测结果(%) | 检测项目 | 检测结果(%) | 检测项目检 | 检测结果(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 天门冬氨酸 | 2.91 | 胱氨酸 | 0.83 | 苯丙氨酸 | 1.70 |
| 苏氨酸 | 1.16 | 缬氨酸 | 1.67 | 赖氨酸 | 2.47 |
| 丝氨酸 | 1.05 | 蛋氨酸 | 0.83 | 组氨酸 | 0.80 |
| 谷氨酸 | 4.12 | 异亮氨酸 | 1.42 | 精氨酸 | 2.35 |
| 甘氨酸 | 2.86 | 亮氨酸 | 2.48 | 脯氨酸 | 2.18 |
| 丙氨酸 | 2.18 | 酪氨酸 | 1.01 | | |

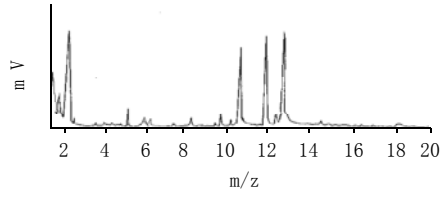



图12 鸡骨泥的脂肪酸质谱图

Fig.12 Mass-spectrogram of fatty acid of mashed chicken-bone

对此表4和表5可得，酶解后的鸡骨泥的游离氨基酸含量比酶解前游离氨基酸的含量增多。氨基酸是维持人体生命活动的重要物质，它不仅具有各种生理作用，还在食品的呈味方面扮演着十分重要的角色。

2.4 鸡骨泥酶解后的游离脂肪酸分析

由于酶具有专一性，木瓜蛋白酶对鸡骨泥进行酶解时，对其游离脂肪酸的影响较小，所以本实验只测定了鸡骨泥酶解液中的游离脂肪酸的含量。由气相色谱－质谱－数据系统联用技术鉴定，得到的气相色谱图见图12。

通过对照标准图谱，利用数据处理机峰面积归一化法测定各成分的相对含量。结果表明有5种成分，其中，豆蔻酸和硬脂酸酸为主要成分(表6)。

表6 鸡骨泥游离脂肪酸分析表

Table 6 Analytical table of free fatty acid in mashed chicken bone

| 序号 | 化学名称 | 分子式 | 含量(%) |
|---|---|---|---|
| 1 | 豆蔻酸 | $C_{14}H_{28}O_2$ | 30.71 |
| 2 | 棕榈酸 | $C_{16}H_{32}O_2$ | 18.27 |
| 3 | 硬脂酸 | $C_{18}H_{36}O_2$ | 32.75 |
| 4 | 亚油酸 | $C_{18}H_{34}O_2$ | 1.09 |
| 5 | 亚麻酸 | $C_{18}H_{30}O_2$ | 0.34 |

## 3 结 论

3.1 鸡骨泥酶解的最佳工艺参数：90℃持续加热10min，酶解时间为4h，温度为55℃，pH值为6.5。

3.2 鸡骨泥酶解前后的一般营养成分基本无变化，每100g鸡骨泥中含有蛋白质11.06～11.07g、脂肪7.48～7.58g、灰分2.21g、Ca 3440～3450mg、Fe 2.31～2.32mg、Zn 18485～18495mg、Se 4156mg。

3.3 鸡骨泥酶解前后氨基酸含量：鸡骨泥中含有17种氨基酸，其中人体必需的异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸等8种氨基酸含量较高、比例较适合；酶解后的鸡骨泥的游离氨基酸含量比酶解增多。

3.4 鸡骨泥酶解液中含有5种脂肪酸中，豆蔻酸和硬脂酸酸为主要成分，人体必需的亚油酸、亚麻酸占有一定的比例，鸡骨泥的酶解液中游离脂肪酸的含量基本无变化。

**参考文献：**

[1] 韩清华, 田红玉. 猪骨泥食品的开发研究[J]. 肉类研究, 2000(3): 44-45.
[2] 郭燕君. 超微细猪骨泥的开发利用[J]. 山东肉类科技, 1998(4): 8-10.
[3] 武汉医. 营养与食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981.
[4] FRONING, G W. Characteristics of bone particles from various poultry meat products[J]. Poultry Science, 1979, 5(8): 1001-1003.
[5] 贺稚非, 李洪军, 何觉义, 等. 骨泥营养食品中钙生物利用的研究[J]. 食品科学, 1994(6): 53-56.
[6] 平波, 窦启平, 毛兴华. 骨泥肉食品对儿童营养状况改善的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 140-143.
[7] 陈锡文, 吴步猛, 金晓冬, 等. 小鼠对鸡骨泥钙质的吸收试验[J]. 温州医学院学报, 2003, 33(5): 348-349.