

肉鸡鸡骨蛋白质酶法水解研究

何利, 刘学文

(四川大学食品工程系, 四川成都 610065)

摘要: 用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和菠萝蛋白酶对肉鸡骨进行酶解, 得出最优酶为木瓜蛋白酶。然后以木瓜蛋白酶作水解酶, 考察了原料预处理方法、酶用量、料液比、酶解温度及时间对水解度的影响, 并采用正交实验对酶解条件进行了优化。结果表明: 原料经 121 °C 高压蒸煮 15min, 酶用量 2.5%(w/w, 以蛋白质含量计), 料液比约 0.71(5.7, w/v), 酶解温度 57 °C, 酶解时间 7h, 样品的水解度可达 12.16%。在此水解液中加入 1.0%(w/v) 的活性炭脱色脱臭, 于 60 °C 真空干燥后可得到黄色固体蛋白质水解物。

关键词: 鸡骨, 木瓜蛋白酶, 蛋白质水解

Abstract: papain, neutrase and bromelain were used to hydrolyze protein from the bone of chicken, respectively. The results showed that papain was used to consider the effects of pretreatment of raw material, enzyme concentration, substrate concentration, temperature and time on the degree of hydrolysis (DH). And orthogonal experiment was applied to optimize the extraction conditions. The results showed that 12.16% DH could be obtained when the levels were 2.5 % (w/w, based on the protein content), 5:7 (w/v), 57 °C and 7h, respectively, after the raw material was heated at 121 °C for 15 min. Then the yellow hydrolyzate was gained by vacuum desiccate on 60 °C, while the hydrolyzed solution decolorized and deodorized with active carbon.

Key words: chicken bone; papain; hydrolysis protein

中图分类号: TS201.2*5 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)06-0161-04

随着我国肉鸡生产和加工业的快速发展, 肉鸡骨架产量逐年增加。以往的研究基本上是针对鸡骨中钙的利用, 主要产品是骨粉, 大多用作饲料添加剂, 忽视了鸡骨中含有的丰富蛋白质资源。目前, 国内外很多学者对骨蛋白的酶法水解回收进行了研究, 原料骨以牛骨、鱼骨、猪骨为主, 对肉鸡鸡骨的报道较少。本文即是以肉鸡骨为原料, 研究骨蛋白质的酶水解工艺, 对酶种类、原料预处理方法和水解条件进行优选, 以期对肉鸡骨架的深度开发利用提供一

定的实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

肉鸡骨架 市售肉鸡, 实验前去毛、去内脏、去肉, 只留取骨架; 木瓜蛋白酶 食用级(30 万 U/g); 中性蛋白酶 食品级(60 万 U/g); 菠萝蛋白酶 食品级(40 万 U/g); 柠檬酸、甲醛溶液、乙醚等 均为分析纯试剂。

DZF-6030A 型真空干燥箱、DHG-9075A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司; UV-2000 紫外分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 电子恒温水浴锅 北京中兴伟业仪器有限公司; ZFG85A 旋转蒸发器 上海医械专机厂; LD4-2A 离心机 北京医用离心机厂; ZK 高速自控组织捣碎机 江苏盐城市科学仪器厂; 拨式微量凯氏定氮仪, 索氏脂肪抽提器。

1.2 实验方法

1.2.1 鸡骨酶水解工艺 新鲜鸡骨 高压蒸煮 破碎 离心 酶解 灭酶 离心 过滤 脱色脱臭 过滤 真空浓缩 水解蛋白

1.2.2 操作要点 去肉、洗净的鸡骨架经高压蒸煮 15min, 破碎, 离心(4000r/min), 弃去上部脂肪, 脱脂液酶解一定时间后灭酶(置于 100 °C 水浴加热 10min)、于 4000r/min 转速下离心弃去固形物, 过滤后加入活性炭脱色脱臭, 再次过滤后将滤液在旋转蒸发器中真空浓缩, 于 60 °C 真空干燥后得到固体水解蛋白液。

1.2.3 水解度的测定 采用中性甲醛滴定法^[1]。

氨基酸含量(%) = $\frac{(V_2 - V_1) \times C \times 0.014 \times 100\%}{m}$;

DH(水解度) = $\frac{\text{氨基酸态氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100\%$

式中: C- NaOH 标准溶液的浓度, mol/L;

V_1 - 空白耗用 NaOH 标准溶液的体积, mL;

V_2 - 样品耗用 NaOH 标准溶液的体积, mL;

m- 测定用样品溶液相当于样品的质量, g。

1.2.4 原料主要成分的分析 蛋白质含量测定^[1]: 微量

收稿日期: 2006-10-31

作者简介: 何利(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程; 农产品深加工及产业化研究。

表 1 样品中主要成分的含量

成分	水分(%)	蛋白质(%)	灰分(%)	脂肪(%)	游离氨基酸(%)
鸡骨	51.3	16.8	17.5	14.5	0.16
鸡肉	67	17.2	-	15.8	-

表 2 各酶最优水解条件^[4-12]

蛋白酶种类	温度()	时间(h)	酶用量(%)	pH	料液比
木瓜蛋白酶	50	5	1.5	7.0	0.25(1 4)
中性蛋白酶	40	7	2.0	8.0	0.17(1 6)
菠萝蛋白酶	50	6	2.5	7.5	0.33(1 3)

注:酶用量以鸡骨质量百分数计。

凯氏定氮法;水分含量测定^[1]:常压干燥法;脂肪含量测定^[1]:索氏抽提法;游离氨基酸含量测定^[1]:中性甲醛滴定法。

1.2.5 水解过程 分别考察酶用量、料液比、酶解温度、酶解时间等对底物水解度的影响^[1-3],再进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,优化水解条件。

2 结果与讨论

2.1 原料的主要成分

原料主要成分见表 1,鸡骨蛋白质和脂肪含量均比鸡肉低,为使水解能顺利进行,水解前将骨液离心脱脂。

2.2 最优酶的选择

在参考大量文献并查阅大量资料的基础上^[4-12],确定影响酶解的主要因素有:水解温度、水解时间、酶用量、pH 和料液比;经预备实验,所选三种酶的最优水解条件见表 2。

按表 2 进行各酶的水解实验,测定水解液中蛋白质的水解度、水解液的色泽和风味等指标,结果见表 3。由表中可知,用菠萝蛋白酶水解鸡骨所获得的水解度较小,水解液色泽为黄色,且有较重苦味;中性蛋白酶作用的水解液虽然苦味不重,但其颜色较深;木瓜蛋白酶不仅能获得较高水解度,且水解液色泽较浅、无苦味,同时木瓜蛋白酶成本低、来源丰富。此外,鸡骨浆的 pH 为 6.9,在木瓜蛋白酶的最适 pH 范围内,水解前不用调解其 pH,工艺可简化。综合考

表 3 各酶对鸡骨中蛋白质水解结果

蛋白酶种类	水解度(DH %)	水解液色泽	有无苦味
木瓜蛋白酶	15.01	淡黄色	苦味较小
中性蛋白酶	6.78	深黄色	苦味一般
菠萝蛋白酶	8.36	黄色	苦味重

虑上述因素,确定木瓜蛋白酶为水解鸡骨最优酶。

2.3 原料预处理对水解度的影响

不同预处理条件得到的样品水解后的水解度见表 4。从表中可见,121 下蒸煮后的样品,其水解度比 100 下处理的样品的水解度高,很显然 121 蒸煮处理的鸡骨在高温下软化效果更好,经组织捣碎机粉碎后浆液中固体颗粒的粒径更小,在水解反应体系中与酶接触的面积更大,酶解更充分。因此确定原料蒸煮条件为 121 蒸煮 15min。

2.4 酶用量对水解度的影响

保持其他条件不变,考察木瓜蛋白酶用量对蛋白质水解度的影响,结果见图 1。水解度随着酶用量的增加而增加,当酶用量增加到 2%后水解度增加趋于平缓,在酶用量增加到 3%时水解度继续上升,但水解液开始带有苦味,且水解液色泽加深。我们分析,有可能是随着酶用量的增大后,蛋白质水解成大量的寡肽和氨基酸,因而生成了一些苦味肽,使水解液产生苦味,故适宜的酶用量范围为 2%~3%。

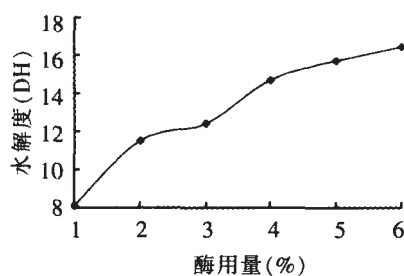


图 1 酶用量对水解度的影响

2.5 料液比对水解度的影响

保持其他条件不变,料液比对水解度的影响见图 2。当料液比小于 0.71(5 7)时,水解度随着料液比

表 4 不同预处理方法下的水解度及水解液的色泽

预处理方法	加酸(pH 4.5)		加碱(pH 9.5)		原样	
	110	121	110	121	110	121
样品质量(g)	5.02	5.05	5.07	5.04	5.06	5.03
水解度(%)	8.61	9.04	6.97	7.51	9.39	10.29
水解液色泽	浅黄色	浅黄色	深黄色	深黄色	浅黄色	浅黄色

的下降而下降,当底物浓度达到一定值后,反应速度的上升不再与底物浓度成正比,而是逐步趋于平衡^[13]。但当浓度上升时,粘度相应上升,酶与底物接触的不均匀,且会增大搅拌动力消耗。因此适宜料液比范围为 0.625~0.71(5.7~5.8, w/v)。

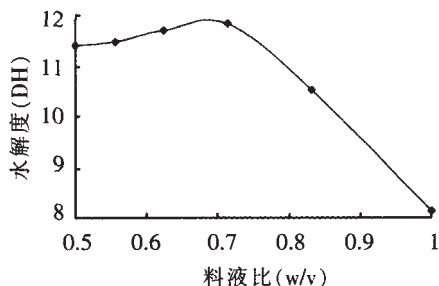


图2 料液比对水解度的影响

2.6 酶解温度对水解度的影响

考虑到温度越高,水解液中美拉德反应越易发生,水解液色泽变黄,因此选择 40~65 作为考察的温度范围。酶解温度对水解度的影响见图 3。当温度上升到 55 后,随着温度升高,水解度增加幅度很小;当温度达到 60 时,水解液色泽加深,苦味出现。故适宜酶解温度范围为 55~60 。

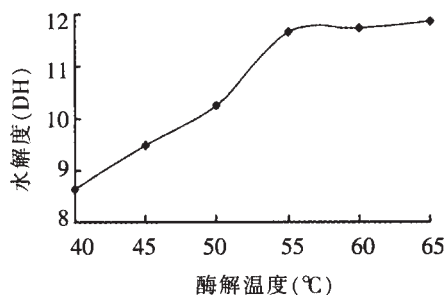


图3 酶解温度对水解度的影响

2.7 酶解时间对水解度的影响

水解时间对水解度的影响见图 4。随着水解时间的延长,水解度增加,但当酶解时间达到 6h 后,水解度随着时间的增加,其增加幅度不大,甚至在水解 6~7h 时水解度大小出现反复。根据资料介绍,这是因为木瓜蛋白酶是一种混合蛋白酶,它对动植物蛋白、多肽、酯、酰胺等有较强的酶解能力,同时还有合成的能力,可以把蛋白质水解物再合成为蛋白质类物质^[14],因此出现水解的波动。当水解时间增加到 7h 时,水解液开始带有苦味,故适宜的水解时间应控制在

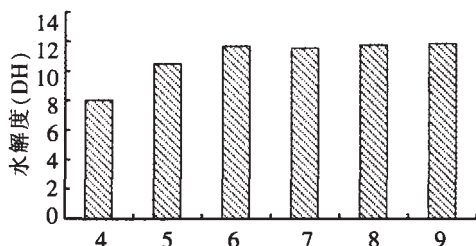


图4 酶解时间对水解度的影响

7h 内。

2.8 正交实验

基于单因素实验的结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验优化酶解反应条件,实验各因素水平见表 5,实验结果见表 6。酶解温度(A)、酶解时间(B)、料液比(C)及酶用量(D)这四个因素对水解度的影响大小顺序为:酶用量>酶解温度>酶解时间>料液比。水解度最大的酶解条件是 $A_3B_3C_2D_3$,但是该条件的酶用量相对较大,使蛋白水解物生产成本增加;酶解温度较高,使得酶解过程中容易发生美拉德反应,使水解物色泽加深;此外该反应条件下得到的水解液带有少许苦味。因此,选择酶解条件 $A_2B_3C_2D_2$ 与 $A_3B_3C_2D_3$ 作对比实验,后者的水解度可以达到 13.04%,水解液颜色为深黄色,且水解液带有较重的苦味,而前者的水解度为 12.16%,水解液呈淡黄色,且水解液无苦味。因此,选择 $A_2B_3C_2D_2$ 作为酶法提取肉鸡骨架中蛋白质的优化条件。

表5 因素水平表

水平	因素			
	A 酶解温度(°C)	B 酶解时间(h)	C 料液比(w/v)	D 酶用量(%)
1	55	5	0.83(5.6)	2
2	57	6	0.71(5.7)	2.5
3	60	7	0.625(5.8)	3

2.9 水解液的脱色脱臭

在优化条件下酶解肉鸡骨浆得到的水解液为混浊、有沉淀的淡黄色非均相液体,色泽、形态及储藏性等均不能达到商业产品的要求。本实验用两种不同粒径的活性炭(粒径分别为 4mm 和 1mm)对过滤后的水解液进行脱色、脱臭,结果表明粒径较小的活性炭脱色、脱臭能力较强。采用 ZFG85A 旋转蒸发器真空浓缩脱色脱臭后的澄清水解液,在 60℃ 下真空干燥可得到黄色固体水解物。

3 结论

肉鸡骨蛋白质的最优水解酶为木瓜蛋白酶;鸡骨的最佳预处理条件:121℃ 高压蒸煮 15min;最佳酶解条件:酶用量 2.5%(w/w,以蛋白质含量计)、料液比 0.71(5.7, w/v),酶解温度 57℃、酶解时间 7h。在最佳水解条件下水解度可达 12.16%;利用木瓜蛋白酶对鸡骨进行酶解,经脱色脱臭后所得水解液风味较佳,无苦味和异味,可用于生产含有丰富氨基酸的动物水解蛋白,制成各种风味的复合调味料或做鸡精产品的添加物。

参考文献:

- [1] 张水华. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,2004,7. 201~205.

表6 正交实验及其数据

实验号	因素				DH(%)	水解液色泽	有无苦味
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	8.00	淡黄色	无苦味
2	1	2	2	2	10.52	淡黄色	无苦味
3	1	3	3	3	11.50	浅黄色	无苦味
4	2	1	2	3	12.09	浅黄色	无苦味
5	2	2	3	1	9.67	浅黄色	无苦味
6	2	3	1	2	11.20	浅黄色	无苦味
7	3	1	3	2	11.08	黄色	苦味较少
8	3	2	1	3	11.77	深黄色	苦味较重
9	3	3	2	1	10.53	黄色	苦味一般
K ₁	31.03	32.18	31.98	29.21			
K ₂	32.96	31.96	33.14	32.80			
K ₃	33.38	33.23	32.25	35.36			
k ₁	10.35	10.74	10.67	9.75			
k ₂	11.00	10.66	11.06	10.94			
k ₃	11.14	11.09	10.76	11.80			
R	0.79	0.43	0.39	2.05			

[2] Stephen Poole, Stuart I West, Clifford L. Walters. Protein-protein interactions: Their importance in the foaming of heterogeneous protein systems [J]. Sci Food Agric, 1984, 35: 70113-70121.

[3] 解蕊,张根生,范俊杰,等. 木瓜蛋白酶水解鸡骨泥工艺条件研究[J]. 食品工业, 2003(1):40-42.

[4] 李建周,倪莉. 酶法制备 HA P 的研究 [J]. 福建轻纺, 2003 (10, 11) :44-47.

[5] 周剑忠,陈晓红. 复合酶水解乳鸽肉的研究[J]. 食品科技, 2003(2) :25-27,33.

[6] 孟祥河,张铁华. 复合酶水解牛肉的研究 [J]. 食品科技, 2002(2) :17-20.

[7] 舒留泉,薛长湖. 缢蛏肉的蛋白酶水解工艺研究 [J]. 水产科学, 2004, 23 (1):36-38.

[8] 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.

[9] Maria Elisabeth M, Pinto E Silva, Rosa N Mazzilli, Fabiana Cusin. Composition of hydrolysates from meat [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 1999(12): 219-225.

[10] Fereidoon Shahidi, Han Xiaoping, Jozef Synowiecki. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*)[J]. Food Chemistry, 1995, 53:285-293.

[11] William J Lahl, Steven D Braum. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use [J]. Food Technology, 1994, 48 (10): 68-71.

[12] Meara G M O, Munro P A. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase [J]. Meat Science, 1984(11) :227-238.

[13] 郭勇. 酶的生产与应用 [M]. 化学工业出版社, 2003, 9.5-6, 166-172.

[14] 王璋,许时婴,汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 9.149-172, 200-212.

(上接第 160 页)

溶剂法提取葡萄籽油时不应超过 80 。

3.3 由实验可以看出, 采用 CO₂ 超临界萃取法所得脂肪酸中不饱和脂肪酸含量高达 70%以上, 明显高于溶剂法提取物中不饱和脂肪酸含量, 所以在条件允许的情况下应尽量采用该方法。

3.4 本实验测定脂肪酸重现性较好, 准确度较高。说明利用气相色谱法在本实验条件下分析测定脂肪酸方法可行。

参与文献:

[1] 于宝成,郎录贤. 葡萄籽油的制取[J]. 中国油脂, 1999,24(2):55.

[2] 张爱军,等. 葡萄籽的开发与利用 [J]. 中国油脂, 2004,29

(3):55-57.

[3] 吴时敏. 功能性油脂 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.41-131.

[4] 吴冀华,袁爱泳. 气相色谱法分析共轭亚油酸异构体[J]. 中国油脂, 2002(1) :65-67.

[5] 潘太安,刘敦华,等. 超临界 CO₂ 萃取枸杞籽油的研究[J]. 宁夏大学学报, 2000,21(2):156-158.

[6] 黄会秋. 气相色谱法测定加碘食盐中盐 [J]. 食品科学, 2002,23(1):122-123.

[7] 黄一石. 仪器分析[M]. 化学工业出版社, 2002.17-61.

[8] 易元芬,余珍. 超临界 CO₂ 萃取葡萄籽油的化学成分[J]. 云南植物研究, 2001,23(2):266-268.

[9] 王肇慈. 粮油食品品质分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.50-51.