

分步酶解猪骨粉提取猪骨素的工艺研究

白艳红¹, 张相生², 赵电波¹, 陈茜¹

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450002) (2. 河南大用实业有限公司, 河南鹤壁 410600)

摘要: 本文以三氯乙酸可溶性氮 (SN-TCA) 的含量与水解度 (DH) 为测定指标, 研究了中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶复配后与风味蛋白酶分步酶解猪骨粉的工艺, 优化了复合酶的最佳配比和酶解工艺参数。研究表明, 第一步酶解三种酶的最佳配比为中性蛋白酶添加量 5000 U/g、胰蛋白酶添加量 4420 U/g 和木瓜蛋白酶添加量 3000 U/g, 此时所得 SN-TCA 的最大含量为 52.6%; 复合酶最优的酶解工艺参数为酶解温度 43.4 °C、酶解时间 6 h、pH 7.6、加酶量 0.31%、料液比 1:5.4, 此时 SN-TCA 含量最高为 55.42%; 第一步酶解液灭酶后进行第二步酶解, 保持体系料液比和 pH 不变, 加入风味酶酶解温度为 45 °C、酶解时间为 4 h、加酶量为 0.4%, 此时酶解效果最好, 水解度可达到 13.71%。

关键词: 复合酶; 风味蛋白酶; 分步酶解; 猪骨素

文章编号: 1673-9078(2012)12-1696-1699

Preparation of Pork Bone Extracts by Two-step Enzymolysis with Compound Enzyme and Flavourzyme

BAI Yan-hong¹, ZHANG Xiang-sheng², ZHAO Dian-bo¹, CHEN Xi¹

(1. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

(2. Henan Doyoo Industriatl Co., Ltd, Hebi 410600, China)

Abstract: Pork bones extracts were prepared by enzymolysis with the mixed enzymes of neutral protease, trypsin and papain, and then further hydrolysis by flavourzyme. The content of trichloroacetic acid-soluble nitrogen (SN-TCA, %) and the degree of hydrolysis (DH, %) were used as determination indexes. The results showed that the optimum proportions of neutral protease, trypsin and papain, in the mixed enzymes were 5000 U/g, 4420 U/g and 3000 U/g, respectively, with which the content of SN-TCA was 52.6%. The optimum enzymolysis conditions were as follows: hydrolyzing temperature 43.4 °C, hydrolyzing time 6 h, pH 7.6, enzyme dosage 0.31% and material ratio 1:5.4, under which the maximum content of SN-TCA was 55.42%. After inactivation of the compound enzyme, the pH and material ratio of the reaction system remained unchanged and the hydrolysis were further carried out by addition of Flavourzyme. The optimum conditions for Flavourzyme-catalyzed hydrolysis were as follows: hydrolyzing temperature 45 °C, hydrolyzing time 4h and the additive flavourzyme dosage 0.4%, under which the DH was 13.71%.

Key words: compound enzyme; flavourzyme; stepping enzymolysis; essence of pork bones

我国是畜牧业大国, 每年全国的肉类总产量可达 7000 万 t, 产生的各类畜骨约 1700 万 t, 骨头资源极为丰富^[1]。但是, 大量的畜禽骨骼资源得不到充分的利用, 既浪费了营养丰富且比例合理的资源, 又在骨处理的问题上污染环境, 带来一定的环境问题^[2]。国外利用酶法水解畜骨已较为普遍, Chambers 等对骨骼中提取的胶原蛋白进行了酶解研究^[3]; Surowka 等利用中性蛋白酶解鸡骨胶原蛋白, 并确定了最佳酶解条件^[4]。与化学法水解蛋白质相比, 酶解反应条件温和,

无污染, 酶解过程可控, 无有害物质的产生, 且原料中有效成分保留完全, 因此酶解是一条优化利用骨蛋白的有效途径。

目前, 我国对骨的研究主要集中在利用酶法回收骨蛋白方面, 便于充分利用骨中的营养物质^[5-8]。但由于技术、设备及消费者认识等因素, 我国骨产品的开发利用还处在一个相对落后的水平, 如何发展具有更高附加值和科技含量的骨产品, 已成为畜骨综合利用与开发的重点。

本研究以猪骨为原料, 在前期胃蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶单因素试验结果基础上选取中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶进行复配, 利用 Box-Behnken 实验设计对三种酶的

收稿日期: 2012-06-06

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (09210211031)

作者简介: 白艳红 (1975-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事畜产品加工与质量控制方面的研究工作

配比进行研究, 确定最佳的复配比, 分别以均匀实验和正交实验对复配酶与风味蛋白酶分步酶解猪骨的工艺参数进行了优化, 为提取猪骨素的研究提供理论依据, 为实际生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜猪腿骨, 购于当地冷鲜肉连锁店, 买回后放入冰箱中冻藏备用。

1.2 试剂

胰蛋白酶(上海生工生物工程有限公司, 活力为 15000 U/g), 中性蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司, 活力为 45000 U/g), 木瓜蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司, 活力为 67000 U/g), 风味蛋白酶(上海工硕生物技术有限公司, 活力为 40000 U/g)。

1.3 主要仪器设备

AL240 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; HH-W420 恒温水浴锅, 江苏金坛宏华仪器厂; DELTA320 酸度计, 上海精密仪器仪表厂; ZDX-3581 座式自动电热压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; K-424 型半微量凯氏定氮仪, 瑞士 BUCHI 有限公司; SGJ 粉碎机, 廊坊市惠友机械有限公司。

1.4 方法

1.4.1 酶解工艺流程

将新鲜猪骨经 0.1 MPa、121 °C 高压蒸煮 60 min 预处理后烘干, 粉碎制成 400 目骨粉; 实验时取一定量的骨粉, 再经 0.1 MPa、121 °C 高压蒸煮 30 min 预处理后加入一定量的复配酶, 在一定条件下酶解一段时间后灭酶, 保持料液比与 pH 值不变, 加入风味蛋白酶继续酶解。测定三氯乙酸可溶性氮(SN-TCA)的含量与水解度(DH) [9-11]。

SN-TCA 含量=样品中 10% 三氯乙酸可溶性氮含量/样品中的总氮含量×100%

水解度(DH)=酶解液中游离氨态氮的含量/酶解液中氮的含量×100%

1.4.2 复合酶最佳配比的优化

表 1 Box-Behnken 因素水平编码表

水平	因素		
	N1[中性蛋白酶 添加量/(U/g)]	N2[胰蛋白酶 添加量/(U/g)]	N3[木瓜蛋白酶 添加量/(U/g)]
-1	3000	3000	3000
0	4000	4000	4000
1	5000	5000	5000

将三种酶按不同的配比混合均匀后, 在酶解温度

为 45 °C、pH 为 7.5、酶解时间为 6 h、复配酶的加酶量为 0.4%、料液比为 1:10 的条件下酶解, 以 SN-TCA 的含量为指标, 采用 Box-Behnken 实验设计进行最佳配比的优化, 其因素水平编码见表 1。利用 Design Expert 7.1.4 软件对实验数据进行回归分析, 建立数学模型。

1.4.3 复合酶水解猪骨条件的优化

以酶解温度 X₁、酶解时间 X₂、pH (X₃)、加酶量 (X₄) 和料液比 (X₅) 为因素, 水解度为测定指标, 选用 U*₁₀ (10⁸) 均匀实验优化复配酶水解猪骨的最佳工艺条件, 实验因素水平见表 2。

表 2 U*₁₀ (10⁸) 均匀实验因素水平表

Table 2 Factors and levels in the U*₁₀ (10⁸) uniform array design

序号	X ₁ /°C	X ₂ /h	X ₃ /pH	X ₄ /%	X ₅ /(1:X)
1	35	2	6.8	0.1	5
2	40	3	7.0	0.2	10
3	45	4	7.2	0.3	15
4	50	5	7.4	0.4	20
5	55	6	7.6	0.5	25

1.4.4 风味蛋白酶酶解条件的优化

将复配酶解的酶解液灭酶后, 保持料液比、pH 不变, 加入风味酶继续水解。以风味酶的酶解温度、酶解时间及风味酶的添加量为因素, 采用 L₉(3⁴) 正交实验设计优化风味蛋白酶继续酶解猪骨工艺条件, 实验因素水平见表 3。

表 3 L₉(3⁴) 正交实验因素水平表

Table 3 Factors and levels in the L₉(3⁴) orthogonal array design

序号	因素		
	A (酶解温度/°C)	B (酶解时间/h)	C (加酶量/%)
1	45	2	0.3
2	50	3	0.4
3	55	4	0.5

2 结果与分析

2.1 复合酶最佳配比的优化

中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶不同配比酶解猪骨后酶解液中 SN-TCA 含量如表 4。根据表 4 的测定结果, 利用 Design Expert 7.1.4 软件进行回归分析, 实验结果的回归方程为: Y₁=46.44+1.42N₁+0.51N₂-1.30N₃+0.54N₁N₂-3.30N₁N₃+0.36N₂N₃-0.96N₁²-0.81N₂²+0.98N₃²

式中, Y₁ 为 SN-TCA 的含量 (%), N₁ 为中性蛋白酶的添加量, N₂ 为胰蛋白酶的添加量, N₃ 为木瓜蛋白酶的添加量。

表 4 三种酶的不同配比对 SN-TCA 含量的影响

Table 4 The effect of different proportions of enzymes on content of SN-TCA

序号	N ₁	N ₂	N ₃	Y
1	0	0	0	46.83±0.24
2	0	1	1	46.55±0.33
3	-1	1	0	43.48±0.42
4	0	0	0	46.16±0.25
5	0	0	0	46.30±0.19
6	-1	0	-1	43.19±0.33
7	-1	0	1	46.38±0.17
8	-1	-1	0	43.48±0.30
9	1	-1	0	44.76±0.43
10	0	1	-1	47.62±0.19
11	0	-1	1	44.86±0.26
12	1	0	1	43.11±0.20
13	0	-1	-1	47.37±0.15
14	1	0	-1	53.10±0.27
15	0	0	0	46.00±0.21
16	1	1	0	46.90±0.13
17	0	0	0	46.90±0.23

表 5 回归模型的方差分析

Table 5 Regression model analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	87.08	9	9.68	27.91	0.0001	**
N ₁	16.07	1	16.07	46.37	0.0003	**
N ₂	2.08	1	2.08	6.00	0.0441	*
N ₃	13.47	1	13.47	38.85	0.0004	**
N ₁ N ₂	1.14	1	1.14	3.30	0.1120	
N ₁ N ₃	43.43	1	43.43	125.27	<0.0001	**
N ₂ N ₃	0.52	1	0.52	1.50	0.2610	
N ₁ ²	3.95	1	3.95	11.40	0.0118	*
N ₂ ²	2.79	1	2.79	8.05	0.0252	*
N ₃ ²	4.01	1	4.01	11.57	0.0114	*
失拟性	1.77	3	0.59	3.60	0.1237	

经方差分析（见表 5），模型的显著性检验 $p=0.0001 < 0.01$ ，表明模型极显著；模型的失拟性检验 $p=0.1237 > 0.05$ ，模型的失拟性不显著。这表明该模型可以准确地模拟三种酶不同配比对 SN-TCA 含量的影响。一次项 N_1 ($p=0.0003$)、 N_3 ($p=0.0004$) 对响应值的影响极显著， N_2 ($p=0.0441$) 对响应值的影响显著；交互项 N_1N_3 ($p < 0.0001$) 对响应值的影响极显著， N_1N_2 ($p=0.1120$) 及 N_2N_3 ($p=0.2610$) 对响应值的影响均不显著；二次项 N_1^2 ($p=0.0118$)、 N_2^2 ($p=0.0252$) 及 N_3^2 ($p=0.0114$) 对响应值的影响均显著。这表明中

性蛋白酶、木瓜蛋白酶及其交互作用对 SN-TCA 的含量影响极显著，胰蛋白酶的影响显著。回归方程的相关系数 $R^2=0.9729$ ，表明该回归方程对实际实验结果拟合情况良好，可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系，可以用于复合酶提取猪骨素工艺实验的预测。

由回归方程可得三种酶复合的最佳配比为：中性蛋白酶添加量 5000 U/g，胰蛋白酶添加量 4420 U/g，木瓜蛋白酶添加量 3000 U/g，此时所得 SN-TCA 的最大含量为 52.6%；通过验证实验，实际测定 SN-TCA 含量为 50.71%，误差为 3.72%。

2.2 复合酶最佳配比模型的响应面分析

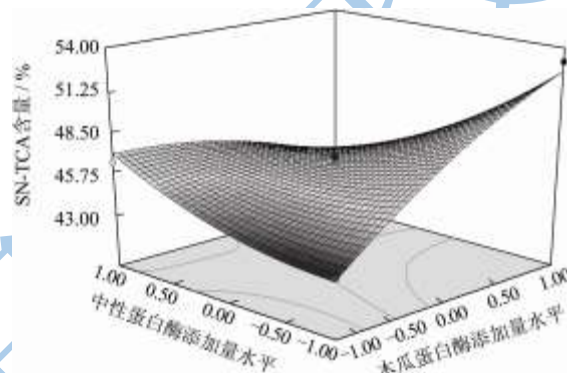


图 1 中性蛋白酶与木瓜蛋白酶交互作用对 SN-TCA 含量影响
Fig.1 Response surface diagram of interaction between Neutral protease and papain of contentment of SN-TCA

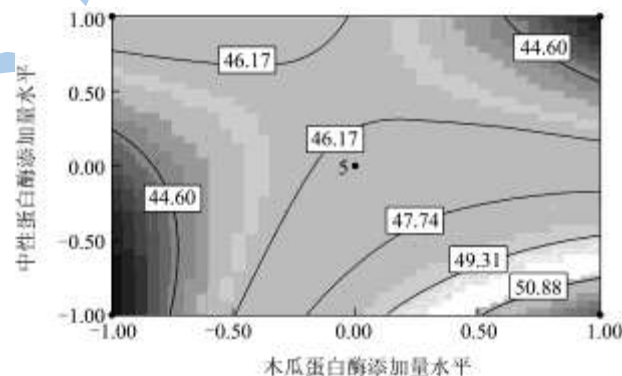


图 2 中性蛋白酶与木瓜蛋白酶交互作用对 SN-TCA 含量影响的等高线图
Fig.2 Contour diagram of of interaction between Neutral protease and papain of contentment of SN-TCA

由图 1 可知，随着中性蛋白酶和木瓜蛋白酶添加量的逐渐增加，酶解液中 SN-TCA 的含量也逐渐增大。但若是保持一种酶的添加量不变，而只增加另一种酶的添加量，酶解液中 SN-TCA 的含量增加缓慢，甚至呈下降趋势，这说明了这两者之间存在着协同增效作用。SN-TCA 含量下降可能是因为两种酶的酶切位点不同，若只增加一种酶的添加量，则底物被酶解成短肽的含量有所增加，但由于另一种酶的添加量保持不

变,使得这些短肽无法再被水解成分子量更小的肽段,从而降低了酶解液中小分子肽的总含量,使酶解液的SN-TCA含量降低。只有同时增加两种酶的含量,才能使酶解后的短肽再被另一种酶水解成更短的肽链,增加酶解液中SN-TCA的含量。在图2等高线47.74包括的扇形区域内,SN-TCA的含量增加明显,此时中性蛋白酶添加量的范围为3000 U/g~3800 U/g,木瓜蛋白酶添加量的范围为3800 U/g~5000 U/g。

2.3 复配酶酶解猪骨工艺条件的优化

利用 $U^{*}_{10}(10^8)$ 均匀实验,不同因素组合酶解猪骨后酶解液中SN-TCA含量见表6。利用软件DPS7.05对表6中实验结果进行分析,得到的回归方程如下:

$$Y_2 = -16.37 + 2.38X_1 + 0.14X_2^2 - 7.63X_4^2 - 0.34X_1X_2 - 0.15X_1X_3 + 2.22X_2X_3 + 0.56X_4X_5$$

其中: Y_2 为SN-TCA含量(%), X_1 为酶解温度($^{\circ}C$), X_2 为酶解时间(h), X_3 为pH值, X_4 为加酶量(%), X_5 为料液比(1:X)。

表6 $U^{*}_{10}(10^8)$ 均匀实验结果

Table 6 Results of the $U^{*}_{10}(10^8)$ uniform array design experiments

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Y_1
1	1	1	2	3	5	42.86±0.23
2	1	2	4	5	4	45.51±0.15
3	2	3	1	2	3	46.9±0.38
4	2	4	3	5	2	52.82±0.17
5	3	5	5	2	1	54.46±0.42
6	3	1	1	4	5	49.27±0.22
7	4	2	3	1	4	47.24±0.31
8	4	3	5	4	3	50.65±0.12
9	5	4	2	1	2	46.15±0.27
10	5	5	4	3	1	44.02±0.19

方程的相关系数 $R^2=0.9664$, 表明该回归方程对实验结果的拟合情况较好。由此回归方程可以看出,酶解温度对SN-TCA含量的影响显著,且各因素之间存在着交互作用。由方程可得SN-TCA含量最高时各个因素的最优组合为:酶解温度 $43.4^{\circ}C$ 、酶解时间6 h、pH 7.6、加酶量0.31%,料液比1:5.4,此时SN-TCA含量最高为55.42%。经验证可得此条件下SN-TCA含量为52.96%,误差为2.46%。

2.4 风味蛋白酶酶解猪骨工艺条件的优化

由表7可以看出,3个因素对酶解效果的影响次序依次为:酶解时间>酶解温度>加酶量。利用SPSS17.0软件方差分析得(表8),酶解时间与酶解温度对水解度的影响极显著($p<0.01$),加酶量对水解度的影响显著($p<0.05$)。最佳的酶解反应组合为 $A_1B_3C_2$,

即酶解温度为 $45^{\circ}C$ 、酶解时间为4 h、加酶量为0.4%,此时酶解效果最好。复合酶与风味蛋白酶在最优条件下分步酶解猪骨测得的水解度为13.71%。

表7 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 7 Results and analysis of the $L_9(3^4)$ orthogonal array design experiments

序号	A	B	C	水解度/%
1	1	1	1	11.01±0.15
2	1	2	2	12.63±0.28
3	1	3	3	13.99±0.33
4	2	1	2	11.31±0.19
5	2	2	3	12.31±0.25
6	2	3	1	13.91±0.13
7	3	1	3	8.61±0.11
8	3	2	1	10.03±0.22
9	3	3	2	11.84±0.17
k_1	12.543	10.310	11.650	
k_2	12.510	11.657	11.927	
k_3	10.160	13.247	11.637	
R	2.383	2.937	0.290	

表8 $L_9(3^4)$ 正交实验方差分析

Table 8 Analysis of variance for DH

变异来源	平方和	自由度	均方	F	Sig.	显著性
A	11.204	2	5.602	1642.264	0.001	**
B	12.966	2	6.483	1900.498	0.001	**
C	0.161	2	0.08	23.573	0.041	*

3 结论

3.1 选择中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶进行复配,复合酶最佳配比为:中性蛋白酶添加量5000 U/g、胰蛋白酶添加量4420 U/g和木瓜蛋白酶添加量3000 U/g。中性蛋白酶与木瓜蛋白酶之间存在着协同增效作用,当中性蛋白酶添加量的范围为3000 U/g~3800 U/g,木瓜蛋白酶添加量的范围为3800 U/g~5000 U/g时,SN-TCA的含量显著增加。

3.2 采用复合酶与风味蛋白酶分步酶解猪骨,其最佳工艺为复配酶酶解温度 $43.4^{\circ}C$ 、酶解时间6 h、pH 7.6、加酶量0.31% (m/m)和料液比1:5.4 (m/V),此时SN-TCA含量最高为55.42%;灭酶后维持pH与料液比不变,加入风味蛋白酶,在酶解温度为 $45^{\circ}C$ 、加酶量为0.4%和酶解时间4 h,水解度可达到13.71%。将此条件下的酶解液浓缩、干燥后,即得到猪骨素。

参考文献

- [1] 谢静,李宗军. Protamex 复合蛋白酶酶解猪骨粉最佳条件研究[J].食品工业科技,2009,30(6):196-198
- [2] 郑捷,刘安军,何立蓉,等.牛骨酶解制备牛肉香精及气质联用分析[J].现代食品科技,2010,26(3):206-310
- [3] Chambers J Rasmussen. Enzymatic treatment of bones [J]. *Sci Food Agric*, 1998, 42: 87-94
- [4] Krzysztof Surowka, Mirosław Fik. Studies on the Recovery of Proteinaceous Substance from Chicken Heads [J]. *Food Sci Technol*, 1992, 27: 9-12
- [5] 孙卫青,马丽珍.酶法水解鲜羊骨骼的研究[J].肉类研究, 2007,4:26-29
- [6] 刁静静,孔保华,陈洪生.具有抗氧化活性的骨蛋白肽水解条件优化的研究[J].食品工业科技,2008,29(6):177-181
- [7] 张永秀,王世平,周若兰.Flavourzyme 蛋白酶酶解牛骨制备低聚肽的处理条件研究[J].食品工业科技,2006,27(7):141-143
- [8] 李作为,张立彦,芮汉明,等.蛋白酶处理对鸡骨泥营养组成的影响[J].现代食品科技,2011,27(6):618-621
- [9] De-qing Shi, Zhi-min He, Wei Qi. Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1943-1949
- [10] Silverstre M P G. Review of Methods for the Analysis of Protein Hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 1997, 60 (2): 263-273
- [11] Rasa Slizyte, Egidijus Dauksas, Eva Falch et al. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 2021-2033