

高压和酶解辅助制备超微骨粉的工艺研究

张崧, 王新惠, 王卫, 张佳敏

(成都大学肉类加工四川省重点实验室, 四川成都 610106)

摘要: 为了提高畜禽骨的粉碎率, 以促进畜禽骨的回收利用效率, 本文以猪骨为原料, 比较了高压处理和酶解次序对猪骨粉碎率的影响, 并对猪骨高压处理后的酶解工艺采用响应面法优化和对所得骨粉的钙、磷营养物质含量进行了测定。结果发现, 猪骨经高压处理后再酶解所得粉碎率较高压处理前酶解所得粉碎率高; 响应面法优化猪骨高压处理后的酶解工艺, 得出酶解温度为 55 °C、酶解时间为 2.01 h、pH 为 7.00、加酶量为 10363 U/g 时所得猪骨的粉碎率最高 (82.0%), 比未优化前提高了 9.45%; 对粉碎前后猪骨中钙磷营养物质含量分析, 得出高压和酶解辅助机械粉碎对猪骨中钙磷损失小。总之, 高压处理后酶解辅助机械破碎法有效提高了猪骨的粉碎率, 所得骨粉的钙磷营养物质与原始猪骨中的钙磷含量相似。

关键词: 骨素; 酶解; 木瓜蛋白酶; 畜禽骨

文章编号: 1673-9078(2014)10-172-175

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.029

High Static Pressure and Enzymatic Hydrolysis-assisted Preparation of Super-fine Bone Powder

ZHANG Yin, WANG Xin-hui, WANG Wei, ZHANG Jia-ming

(Key Laboratory of Meat Processing of Sichuan, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: To optimize the milling ratio, promote recycling and utilization efficiency of livestock and poultry bones, the effect of high static pressure treatment and enzymatic hydrolysis on milling ratio of porcine bones was evaluated in this study. The process of enzymatic hydrolysis was optimized using response surface technology. The calcium and phosphorus content of milled bone powder was measured. The results showed that the milling ratio was higher when the bones were enzymatically hydrolyzed after high static pressure treatment than prior to treatment. Optimization of the enzymatic hydrolysis process using response surface technology showed that the milling ratio reached a maximum of 82.0% with enzymatic hydrolysis at 55 °C for 2.01 h, at pH 7.0 and with enzyme addition of 10,363 U/g. The corresponding milling ratio increased by 9.45% as compared with the non-optimized treatment. Analysis of calcium and phosphorus content in raw bones and milled bone powder indicated that the content of calcium and phosphorus was reduced to a lesser extent by high static pressure and enzymatic hydrolysis-assisted milling. These results suggested that the milling ratio of porcine bone was effectively increased by high static pressure and enzymatic hydrolysis-assisted milling, where the calcium and phosphorus content of milled bone powder were similar to that in raw bone.

Key words: osteoprotegerin; enzymatic hydrolysis; papain; livestock and poultry bones

畜禽骨是畜禽加工最主要的副产物。2013 年我国的肉类总产量 8373 万 t, 位居世界第一。以畜禽骨约占胴体重 10%~30% 计算, 2013 年产生的鲜骨约 837~2512 万 t 左右。畜禽骨的营养丰富, 如果不对这些骨副产物有效利用, 不仅造成资源的极大浪费, 而且还会因为骨头富含营养物质易腐败变质而污染环境^[1]。因此, 回收利用畜禽骨对畜禽加工业高效、可持

收稿日期: 2014-04-10

基金项目: 现代新技术改造传统肉类加工及副产利用研究与应用 (2011GA810017)

作者简介: 张崧 (1981-), 男, 博士, 副教授, 主要从事畜产品加工与保藏研究

通讯作者: 王卫 (1958-), 男, 教授, 研究方向为肉类加工与保鲜贮藏

续发展非常重要。目前, 国内外研究人员开展了很多利用畜禽骨的途径, 如将畜禽骨磨粉制作饲料, 提取骨胶原蛋白等, 但是均因为畜禽骨硬度较高、难粉碎而导致利用率低^[2]。

畜禽骨中含有大量的骨胶原蛋白是导致其难粉碎的主要原因。如果利用化学水解法使骨头软化, 不仅会降低骨头的营养价值, 而且还会造成钙的严重流失。若直接食用, 比如熬骨头汤等, 钙溶出率太低。因此, 在最大程度保留畜禽骨中营养物质的同时将畜禽骨粉碎, 对畜禽骨的回收利用非常急需。研究发现, 酶解法可以使骨中的蛋白质分解, 如 Michel Linder 等人酶解小牛骨回收骨蛋白^[3], Benjakul 利用中性和碱性蛋白酶水解牙鳕的废弃物回收蛋白质^[4], 赵妍嫣等人用胰酶

和木瓜蛋白酶混合酶解猪板骨提高骨的钙溶出率^[5]等。此外, 研究发现高压和热处理可以使蛋白变性和分解^[6-7], 但将酶解和高压处理结合以提高畜禽骨粉碎率的研究较少。牡蛎壳等贝类经粉碎后过 400 目筛可获得超微骨粉颗粒, 此时超微骨粉的消化吸收率得到了很好改善^[8,9]。因此, 本研究以猪骨为原料, 利用酶解和高压辅助机械破碎制备超微骨粉, 以制备超微畜禽骨粉。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜猪脊骨和臀骨购于明蜀新村十陵菜市场。木瓜蛋白酶购于郑州龙生化工产品有限公司, 酶活 50 万 U/g。

1.2 实验方法

1.2.1 超微骨粉制作流程

猪骨→去肉、破碎→高压处理→酶解→胶体磨粉碎处理→分离→干燥→骨粉

1.2.2 猪骨的预处理

将新鲜的猪脊骨和臀骨去肉, 手动剁成约 1 cm×1 cm 的小方块。

1.2.3 高压处理

称取 100 g 骨块加入高压锅, 以骨水比 1:30 (*m/m*) 混合, 高压处理 90 min。高压处理时间以高压锅开始沸腾时计算。

1.2.4 酶解处理

用木瓜蛋白酶对高压处理后的骨水混合液进行酶解, 加酶量、酶解温度、酶解时间及酶解 pH 值见表 1。

1.2.5 胶体磨处理

用 X-250 两级胶体磨对酶解猪骨进行超微粉碎。粉碎时将胶体磨上刻度调至 6, 下刻度调至 5, 循环磨碎 3 次。

1.2.6 分离及干燥

将经过胶体磨处理的骨浆直接过筛, 分样筛的目数依次为 40 目、60 目、100 目、120 目、140 目、160 目、180 目、200 目、250 目、300 目、350 目、400 目, 收集过 400 目筛的样品, 将收集物置于 ZFA-D5140 鼓风干燥箱于 80 °C 干燥至恒重。

1.2.7 粉碎率计算

以通过 400 目筛的骨粉重量占整个骨头重量的百分率评价粉碎程度。粉碎率 η 的计算式如下:

$$\eta = m_{400} / m_{\text{total}} \times 100\%$$

注: m_{400} 指过 400 目筛的骨粉的质量, 单位为克 (g); m_{total}

骨头总重, 单位为克 (g)

1.2.8 猪骨中钙、磷含量测定

猪骨中钙含量测定按照 GB/T 9695.13-2009 中滴定法测定, 磷含量根据 GB/T 9695.4-2009 中分光光度法测定。

1.2.9 响应面设计

采用 5 中心、4 因素、1 相应、21 次试验、Hartley 法设计试验方案, 各因素编码及水平见表 1。

表 1 响应面因素编码及水平

Table 1 Coding and level of response surface factors

	温度 (TEM)/ °C	时间 (TIM)/h	pH	加酶量 (EN)/(U/g)
-1.68179	40.00	2.00	4.00	5000.00
-1	46.08	2.61	4.61	6418.89
0	55.00	3.5	5.50	8500.00
1	63.92	4.39	6.39	10581.11
1.68179	70.00	5.00	7.00	12000.00

1.3 数据处理与分析

用 EXCEL2010 和 SAS9.0 对数据进行统计分析和响应面实验方案设计。

2 结果与讨论

2.1 酶解和高压处理次序对粉碎率的影响

为了分析酶解和高压处理次序对粉碎率的影响, 对猪骨进行高压处理前和高压处理后, 在固定料液比为 1:30 (*m/m*), 加酶量 7500 U/g、酶解温度 55 °C、酶解时间 3 h、pH 7.0 时酶解, 结果发现, 高处理前加木瓜蛋白酶酶解制备的猪骨粉碎率为 67.54%, 高压处理后加木瓜蛋白酶酶解制备的猪骨粉的粉碎率为 72.52%。高压处理后酶解使猪骨的粉碎率提高了 6.86%。由此可知, 高压处理后酶解有利于提高猪骨粉碎率。

高压处理使骨头软化, 骨蛋白变得易于酶解。骨蛋白的酶解导致猪骨的天然结构破坏, 出现微小孔洞, 这使得猪骨易于被胶体磨粉碎。这可能是高压处理后酶解使猪骨的粉碎率提高的主要原因。

酶解过程受酶解温度、酶解时间、加酶量及 pH 影响较大^[4,10]。由于在分析酶解和高压辅助处理次序对猪骨粉碎率影响时, 是在固定的酶解条件下进行的。所以, 有必要研究最优的酶解工艺, 以进一步提高骨粉的粉碎率。

2.2 酶解工艺优化

2.2.1 实验方案

根据文献报道的木瓜蛋白酶酶解猪骨的工艺条件^[11-12],本研究确定酶解温度 40.00~70.00 °C,酶解时间 2.00~5.00 h,酶解 pH4.00~7.00,加酶量 5000~12000 U/g 为猪骨酶解参数的取值范围。由此获得的响应面实验方案见表 2。根据设定的实验方案获得的实验结果见表 3。

表 2 响应面实验方案及实验结果

Table 2 Response surface results

组号	温度 (TEM)/°C	时间 (TIM)/h	pH	加酶量 (EN)/(U/g)	Y ₁
1	-1	-1	-1	1	68.47
2	1	-1	-1	1	71.10
3	-1	1	-1	-1	60.32
4	1	1	-1	-1	75.56
5	-1	-1	1	-1	63.94
6	1	-1	1	-1	71.76
7	-1	1	1	1	69.69
8	1	1	1	1	73.40
9	-1.68179	0	0	0	53.51
10	1.68179	0	0	0	72.49
11	0	-1.68179	0	0	74.61
12	0	1.68179	0	0	76.35
13	0	0	-1.68179	0	74.50
14	0	0	1.68179	0	77.52
15	0	0	0	-1.68179	68.20
16	0	0	0	1.68179	76.65
17	0	0	0	0	75.39
18	0	0	0	0	72.61
19	0	0	0	0	73.50
20	0	0	0	0	72.65
21	0	0	0	0	75.15

注:表中 TEM 代表酶解温度, °C; TIM 代表酶解时间, h; pH 代表酶解液 pH; EN 代表加酶量, U/g; Y₁ 猪骨的粉碎率。

2.2.2 拟合分析

对表 2 中的实验结果进行拟合分析,所得拟合结果的显著性分析见表 3。表 3 中各因素的 P 值显示,酶解温度(P=0.000207<0.05)和加酶量(P=0.028381<0.05)对猪骨粉碎率的影响显著;酶解时间(P=0.575944>0.05)和 pH(P=0.344393>0.05)对猪骨的粉碎率无显著影响。根据各因素的 P 值大小可知,各因素对猪骨粉碎率的影响强弱依次为酶解温度>加酶量>pH>酶解时间。

表3中主模型的P=0.003787<0.05显示,建立的模型具有显著性,结合失拟项P=0.075957>0.05、R²=0.96.23

说明,所得模型能较好的反映粉碎率与酶解温度、酶解时间、pH及加酶量之间的关系。

表 3 各因素及主模型的显著性分析

Table 3 Significance analysis of each factor and main model

分类	自由度	均方差	F 值	P 值
TEM	1	275.3345	63.57866	0.000207
TIM	1	1.513798	0.349558	0.575944
pH	1	4.560191	1.053013	0.344393
EN	1	35.70133	8.243946	0.028381
TEM×TEM	1	262.4548	60.60455	0.000237
TEM×TIM	1	9.03125	2.085444	0.198824
TEM×pH	1	5.02445	1.160217	0.322811
TEM×EN	1	34.9448	8.069252	0.029542
TIM×TIM	1	0.73379	0.169442	0.694908
TIM×pH	1	4.210364	0.972233	0.362201
TIM×EN	1	0.764595	0.176556	0.688982
pH×pH	1	2.499539	0.577179	0.4762
pH×EN	1	0.009953	0.002298	0.963319
EN×EN	1	11.01455	2.543415	0.161866
主模型	14	47.40037	10.94542	0.003787
一次项	4	82.64388	19.08365	0.001463
二次项	4	69.76106	16.10882	0.002315
交互项	6	8.997569	2.077667	0.197574
误差	6	4.330612		
失拟项	2	9.411237	5.256793	0.075957
R ²			0.96.23	

注:表中 TEM 代表酶解温度, °C; TIM 代表酶解时间, h; pH 代表酶解液 pH; EN 代表加酶量, U/g

$$Y_1 = -219.573 + 7.328689 \times TEM + 1.289928 \times TIM + 6.115669 \times pH + 0.011851 \times EN - 0.05267 \times TEM^2 + 0.136131 \times TEM \times TIM - 0.099826 \times TEM \times pH - 0.000113 \times TEM \times EN + 0.289425 \times TIM^2 - 1.447454 \times TIM \times pH - 0.000264 \times TIM \times EN + 0.516316 \times pH^2 - 0.00003 \times pH \times EN - 1.982E-7 \times EN^2 \quad (1)$$

注:式中 TEM 代表酶解温度, °C; TIM 代表酶解时间, h; pH 代表酶解液 pH; EN 代表加酶量, U/g; Y₁ 猪骨的粉碎率。

2.2.3 拟合模型验证

为了进一步确定所得模型的可靠性,对酶解工艺进行随机重复试验,所得实际粉碎率(Y₁)及根据模型计算的粉碎率(Y₂)见表 4。表 4 中相对误差结果显示,模型的预测结果与实测结果的相对误差均小于 5%。由此可见,建立的数学模型很好的反映了酶解温度、酶解时间、加酶量及 pH 与猪骨粉碎率之间的相互关系。因此,所得模型(1)可用于酶解工艺的优化。

2.2.4 酶解工艺优化

根据式(1)对木瓜蛋白酶酶解高压处理后猪骨的

工艺进行优化,得到酶解温度 55 ℃,酶解时间 2.01 h,酶解 pH 7.00,加酶量 10363 U/g 时,猪骨的粉碎率最高。在该工艺条件下,可以使猪骨的粉碎率达到 82.0%。

表 4 拟合模型在预测过 400 目分样筛骨粉百分率的有效性验证
Table 4 Effectiveness validation of fitted model to predict the percentage of bone powder passing through a 400-mesh separation sieve

组号	温度 /℃	时间 /h	pH	加酶量 /(U/g)	Y ₁ /%	Y ₂ /%	相对误差 /%
1	50	2	4.5	7000	65.98	64.08	-2.88075
2	55	3	6	8000	74.47	74.03	-0.59594
3	60	3.5	6.44	10000	77.07	76.50	-0.73691
4	55	5	7	8500	75.05	74.90	-0.20553
5	55	3.5	5.5	8500	74.74	73.97	-1.03425

注:表中 Y₁ 为过 400 目分样筛骨粉百分率的真实值; Y₂ 为过 400 目分样筛骨粉百分率的预测值。

酶解温度、酶解时间、pH 及加酶量对猪骨粉碎率的影响也可以通过响应面图看出(图 1)。图 1 显示,猪骨的粉碎率(Y₁)随酶解温度(TEM)的变化最明显,其次为加酶量(EN);猪骨的粉碎率(Y₁)与酶解时间(TIM)和 pH 的变化较酶解温度和加酶量弱。这与酶解温度、酶解时间、pH 及加酶量对猪骨粉碎率影响显著性分析结果一致。

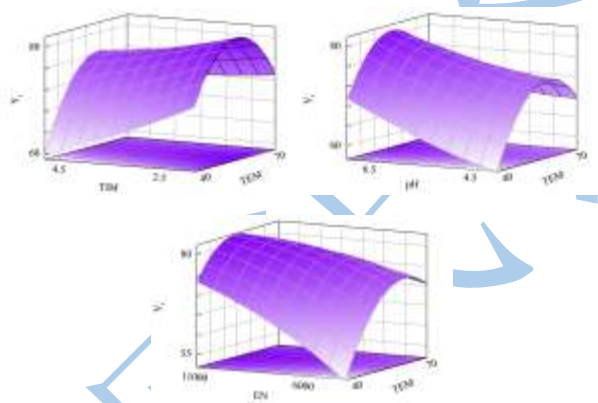


图 1 酶解最优工艺的响应面

Fig.1 Response surfaces with optimal enzymatic hydrolysis

注:图中 TEM 代表酶解温度,℃; TIM 代表酶解时间, h; pH 代表酶解液 pH; EN 代表加酶量, U/g; Y₁ 猪骨的粉碎率。

2.3 骨粉中钙、磷含量比较

为了分析高压和酶解辅助处理对猪骨中钙、磷含量的影响,对新鲜猪骨及制备的猪骨粉中钙、磷含量分别测定,得出新鲜猪骨的钙含量为 14.00%,高压、酶解处理后制备的骨粉的钙含量为 13.60%,辅助处理对猪骨中钙含量的损失率为 2.86%。新鲜猪骨含磷量 7.35%,高压、酶解处理后制备的骨粉含磷量为 7.10%,

辅助处理对猪骨中损失率为 3.40%。

比较新鲜猪骨和辅助处理后骨粉中钙和磷的比值,分别为 1.90 和 1.91,钙磷比约等于 2。由钙和磷的损失率分别为 2.86% 和 3.40%,并结合钙、磷比约等于 2 的结果可知,高压、酶解辅助制备超微骨粉辅助处理能较好地保留新鲜骨粉的钙磷含量。

3 结论

高压处理猪骨后酶解较高压处理前酶解所得骨粉的粉碎率高。对高压处理后酶解工艺采用响应面法优化,得出酶解温度为 55 ℃,酶解时间为 2.01 h,酶解 pH 7.00,加酶量为 10363 U/g 时所得猪骨的粉碎率最高为 82.0%,比未优化前提高了 9.45%。对粉碎前后猪骨中的钙磷含量分析,得出高压和酶解辅助粉碎对猪骨中的钙磷含量损失较小。因此,高压和酶解辅助处理,可有效提高猪骨的粉碎率。

参考文献

- [1] 许雄,柳艳霞,赵改名,等.骨肉酶解工艺条件研究[J].工艺技术,2008,9(29):281-284
XU Xiong, LIU Yan-xia, ZHAO Gai-ming, et al. Study on enzymolysis technology of pork femur bone [J]. Food Science, 2008, 9(29): 281-284
- [2] 陈丽尧.猪骨骼超微粉碎工艺及新产品的开发[D].东北:东北农业大学,2008
CHEN Li-yao. The process of pig bone ultra-micro and its new produce exploration [D]. Dongbei: Northeast Agricultural University, 2008
- [3] Michel Lindere. Protodon recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis [J]. Food Science, 1995, 60: 949-952
- [4] Sootawat Benjakul, Michael T Morrissey. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes [J]. J. Agric. Food Chem., 1997, 45(9): 3423-3430
- [5] 赵妍嫣,胡林林,赵宏伟,等.胰酶和木瓜蛋白酶混合酶解猪板骨工艺条件的研究[J].食品工业科技,2011,4:258-259
ZHAO Yan-yan, HU Lin-lin, ZHAO Hong-wei, et al. Study on enzymolysis of pig bone by trypsin and papain [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 4: 258-259
- [6] Dufour E, Hervé G, Haertle T. Hydrolysis of β -lactoglobulin by thermolysin and pepsin under high hydrostatic pressure [J]. Biopolymers, 2004, 35(5): 475-483
- [7] Messens W, Van Camp J, Huyghebaert A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins [J]. Trends in Food Science & Technology, 1997, 8(4): 107-112
- [8] 张峻,齐崑,韩志慧,等.食品微胶囊、超微粉碎加工技术[M].

- 北京市:化学工业出版社,2005
- ZHANG Jun, QI Wei, HAN Zhi-hui, et al. The microcapsules, superfine grinding technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005
- [9] 刘承初.海洋生物资源利用[M].北京市:化学工业出版社,2006
- LIU Cheng-chu. The use of marine biological resources [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006
- [10] Van Dyk J S, Pletschke B I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1458-1480
- [11] 张崑,王卫,欧全文,等.骨素酶解液喷雾干燥工艺的响应面法优化[J].食品工业科技,2013,34(9):233-237
- ZHANG Yin, WEI Wang, OU Quan-wen, et al. Optimization of spray drying process of bone extract hydrolysate liquid by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(9): 233-237
- [12] 张崑,王卫,张佳敏,等.骨素酶解工艺条件的响应面法优化[J].食品工业,2012,5(33):57-59
- ZHANG Yin, WEI Wang, ZHANG Jia-ming, et al. Application of response surface method to optimizing the hydrolysis processing of pig bone extract by papaya protease [J]. Food Industry, 2012, 5(33): 57-59