

牛骨胶原蛋白酶解工艺优化及结构特性分析

Optimization of Enzymatic hydrolysis process and analysis of structural properties on bovine bone crude collagen

刘丽莉 李 丹 杨陈柳 孟圆圆 代晓凝

LIU Li-li LI Dan YANG Chen-liu MENG Yuan-yuan DAI Xiao-ning

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023)

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要:为研究前期纯化的特异性降解牛骨胶原蛋白的胶原蛋白酶(BSC)对牛骨胶原蛋白的酶解工艺,以水解度为响应值,在单因素试验基础上通过五元二次正交旋转组合试验,确定最佳酶解工艺为:反应温度 46 ℃、牛骨胶原蛋白添加量 5.14 g/100 mL、BSC 添加量 0.42 g/100 mL、反应时间 6 h、pH 6.5,该工艺条件下水解度为 34.98%。采用紫外光谱(UV)、荧光光谱(FS)、傅里叶红外光谱(FT-IR)、扫描电镜(SEM)对牛骨胶原蛋白及其产物进行结构特性分析。通过 UV 分析表明 BSC 酶的降解作用破坏了牛骨胶原蛋白的三股螺旋结构,游离出大量的氨基酸;FS 分析表明牛骨胶原蛋白分子表面 C=O、CONH₂、COOH 逐步增多,胶原蛋白肽中生色基团分布也随之发生变化;FT-IR 分析可知牛骨胶原蛋白经降解后的胶原蛋白肽的肽链上—NH₂⁺—排斥作用逐渐减弱,主要以 β-转角为主;SEM 表明酶破坏了牛骨胶原蛋白的表面分子结构,使其变得疏松。

关键词:牛骨;胶原蛋白;酶解;结构特性

Abstract: In this work, the enzymatic hydrolysis of bovine bone collagen was studied by pre-purified bone-specific collagenase (BSC). As evaluated in terms of degree of hydrolysis. The enzymatic hydrolysis process was studied through single factor and quadratic general rotary unitized design experiments. The results showed that the optimum hydrolysis conditions were as follows: reaction temperature 46 ℃, the amount of bovine bone collagen 5.14 g/100 mL, the amount of BSC enzyme 0.42 g/100 mL, reaction time 6 h, pH 6.5. Under these conditions, the degree of hydrolysis value was 34.98%. The structural properties of bovine bone collagen and its hydrolysate were

characterized by ultraviolet, fluorescence, fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. The UV analysis showed that the BSC degradation enzyme damage the bone collagen three helix structure, a large number of free amino acid; FS analysis showed that the collagen molecular surface C=O, CONH₂ and COOH gradually increased, collagen peptide chromophore distribution also changes; FT-IR analysis showed that the degradation of collagen from bovine bone collagen peptide after the the peptide chain of —NH₂⁺— repulsion effect gradually weakened, mainly in the beta angle; SEM showed that the enzyme damaged the surface of bovine collagen molecular structure, and made it loose.

Keywords: novel collagenase; bovine bone collagen; enzymatic hydrolysis; optimization; structural properties

近年来,随着人们对肉制品需求的增加,其副产物——动物骨骼的加工利用受到研究学者的广泛关注。动物骨骼中含有如蛋白质、氨基酸、矿物质、软骨素、骨胶等具有保健作用的功能物质^[1],其所含的蛋白质中,胶原蛋白占到 90% 以上,能够促进人体皮下组织的代谢功能,还可以延缓衰老^[2]。但胶原蛋白具有特殊的三股螺旋结构,难以被人体消化吸收。而胶原蛋白肽是胶原的三股螺旋结构中分子链被断开形成的小分子蛋白,是一类具有较强的水溶性、蛋白含量高且黏度较低、极易被人体吸收的产物,具有抗氧化、降血压、降血脂的功能特性^[3-5]。

目前多数研究学者将微生物与骨胶原相结合进行发酵降解,如张宇等^[6]的研究表明采用红曲菌与米曲菌复合发酵猪骨能够较好地降解骨胶原,彭慧莉^[7]采用乳酸菌发酵猪骨泥,有效提升了其利用价值。有学者研究发现,与微生物发酵法相比,酶解法降解骨骼时间短,效率高,更适合应用到实际生产,如蔡丽华等^[8]将碱性蛋白酶作用到牛骨来制备降压肽;赵妍嫣等^[9]采用胰蛋白酶作用于骨胶原,结果表明与胶原蛋白相比,酶解后的蛋白肽有更好的乳化性和溶解性;Zhang Yuhao 等^[10]将牛骨胶原通过 6 种常规蛋白酶处理与

基金项目:国家自然科学基金(编号:31401622);公益性行业(农业)科研专项(编号:201303084);河南省重点攻关项目(编号:152102110080);河南省教育厅自然科学研究项目(编号:13A550255);河南省重大专项(编号:161100110900)

作者简介:刘丽莉(1974—),女,河南科技大学副教授,博士。
E-mail: yangliuyilang@126.com

收稿日期:2017—04—11

未处理的进行对比发现,处理后的产物胶原蛋白肽可以降低血压。但这些研究所采用的蛋白酶对骨骼的降解程度仍未达到较佳的工业利用价值。本课题组前期曾纯化出了具有特异性降解牛骨胶原蛋白的胶原蛋白酶(Bone-specific collagenase,BSC),较其他蛋白酶其对牛骨胶原蛋白有更好的降解效果。本研究拟对胶原蛋白酶酶解牛骨胶原蛋白的工艺进行优化,并进行结构特性分析,为今后的工业化生产提供理论依据。

1 材料与设备

1.1 材料与试剂

新鲜牛骨头:购买于河南省洛阳市大张购物中心;
溴化钾、乙醇、3-甲氧基-4'-N,N-二甲氨基黄酮、甲醛:分析纯,天津市德恩化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机:H1650 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;
pH 计:PHS-3C 型,上海精科有限公司;
荧光分光光度计:RF-5301PC 型,日本岛津有限公司;
紫外可见分光光度计:UV2600 型,日本岛津有限公司;
FT-IR 红外光谱仪:Perten DA7200 型,德国 Bruker 公司;
扫描电镜:JSM-IT500 型,日本 Jeol 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 牛骨胶原蛋白的制备 将新鲜采购的牛骨骼除去表面牛肉纤维,在高温高压下蒸煮 20 min 后将其分成颗粒,采用乙醚回流脱脂(40 ℃),0.48%盐酸脱钙,骨粒径为 5 mm×10 mm,提取胶原的介质为 1%柠檬酸和 1%胃蛋白酶复合液。经真空冷冻干燥获得牛骨 I 型胶原蛋白^[11]。

1.3.2 BSC 酶的制备流程

(1) 菌种发酵培养基:蔗糖 1 g/100 mL,胰蛋白胨 2 g/100 mL,氯化钙 0.05 g/100 mL,磷酸二氢钠 0.05 g/100 mL,磷酸氢二钾 0.25 g/100 mL,pH 值 6.6~6.8。
(2) 将活化好的 *B. cereus* MBL13-U 菌株在 35 ℃,160 r/min 的条件下连续发酵 46 h,收集发酵液 12 000 r/min,4 ℃离心 25 min,收集上清液即为 BSC 酶的粗酶液,将其依次通过硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析、Sephadex G-100 凝胶层析,最终得到分子量为 52 kDa 的 BSC 酶。

1.3.3 BSC 酶解牛骨胶原蛋白的酶解工艺 向牛骨胶原蛋白中加入适量的 BSC 酶,调节 pH 值,置于恒温培养摇床中进行酶解反应,反应结束后 90 ℃灭酶 15 min,12 000 r/min 离心 15 min,将上清液干燥后得到胶原蛋白肽。

酶解液中水解度的测定:采用甲醛滴定法^[12]。

1.3.4 BSC 酶解牛骨胶原蛋白的工艺优化

(1) 单因素试验:主要选取影响酶解反应的 5 个因素^[13],反应温度(35,40,45,50,55,65 ℃)、牛骨胶原蛋白添加量(1.5,2.5,3.5,4.5,5.5,6.5,7.5 g/100 mL)、BSC 酶添加量(0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 g/100 mL)、反应时间(1,2,

3,4,5,6,7,8,9 h)、pH 值(4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0)。固定酶解参数为:反应温度 35 ℃、牛骨胶原蛋白添加量 3.5 g/100 mL、BSC 酶添加量 0.4 g/100 mL、反应时间 5 h、pH 值 7.0,分别改变其中一因素,进行单因素试验,研究其对外水解度的影响,得出最佳反应参数。

(2) 响应曲面优化试验:在单因素试验基础上,采用五元二次正交旋转试验组合设计,以反应温度、牛骨胶原蛋白添加量、BSC 酶添加量、反应时间、pH 值为考察因素,以水解度为响应值(Y),得出酶解最适工艺参数组合。

1.3.5 牛骨胶原蛋白及胶原蛋白肽的结构特性

(1) 紫外光谱分析:将酶解 0,2,4,6 h 的胶原蛋白肽液在紫外-可见光分光光度计上进行全波长扫描,波长范围为 215~250 nm。

(2) 荧光光谱分析:将 3-甲氧基-4'-N,N-二甲氨基黄酮溶于乙醇中作为荧光探针,分别加入酶解 0,2,4,6 h 的胶原蛋白肽液中,设置激发波长 380 nm,发射波长 465 nm^[14],分别将其放入荧光分光光度计中进行扫描。

(3) 红外光谱分析:分别将牛骨胶原蛋白和胶原蛋白肽与适量的溴化钾充分混合后压片制样,将其放入 FT-IR 红外光谱仪中在 400~4 000 cm⁻¹波长下进行扫描^[15]。

(4) 扫描电镜分析:分别将酶解 0,2,4,6 h 后的牛骨胶原蛋白真空冷冻干燥后进行喷金处理,再将样品放入扫描电镜下观察表面结构的变化。

1.3.6 数据处理 采用 Origin 8.5、Design Expert 8.0 软件对本试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

不同酶解条件对外水解度的影响见图 1。

由图 1(a)可知,水解度随反应温度的增加先升高后急速下降,在 45 ℃时最大。这是因为随着温度的上升,胶原蛋白的三股螺旋结构逐渐展开,BSC 酶的催化活性增强,但过高的温度会逐渐破坏 BSC 酶的分子结构,活性降低,直到失活,同时也会改变产物的形成方向,导致水解度直线下降。因此,选取最佳反应温度为 45 ℃。

由图 1(b)可知,随着牛骨胶原蛋白添加量的逐渐增加,溶质流动性较好,使牛骨胶原蛋白与 BSC 酶充分结合,水解度逐渐上升,当牛骨胶原蛋白添加量达到 4.5 g/100 mL 时水解度最高,但随其添加量的继续增加,溶液黏度增大,阻碍了反应进行,水解度降低。因此,选取最佳牛骨胶原蛋白添加量为 4.5 g/100 mL。

由图 1(c)可知,水解度的变化随着 BSC 酶添加量的增加先升高后缓慢降低,当 BSC 酶添加量为 0.3 g/100 mL 时水解度最大,认为在牛骨胶原蛋白含量一定时,BSC 酶添加量的增加会加大两者结合程度,使水解度不断上升,但过多 BSC 酶的加入使牛骨胶原蛋白相对不足,导致反应进程减弱,水解度下降^[16]。因此,选取最佳 BSC 酶添加量为 0.3 g/100 mL。

由图 1(d)可知,随反应时间的增加,BSC 酶与牛骨胶原

蛋白的结合作用不断加大,在 6 h 时两者充分作用,水解度最大,若反应时间继续延长,牛骨胶原蛋白浓度逐渐降低,BSC 酶催化位点不断减少,水解度下降^[17]。因此,选取最佳反应时间为 6 h。

由图 1(e)可知,随 pH 值的升高,水解度也逐渐加大,在 pH 7.0 时达到最大,但 pH 值进一步升高水解度快速降低,原因是 pH 值对 BSC 酶活性的相关基团影响较大,环境过酸

或过碱都会破坏其分子构象,活性降低,同时还会影响牛骨胶原蛋白与 BSC 酶在反应中的解离状态,抑制反应的进行。因此,选取最佳 pH 值为 7.0。

2.2 响应曲面优化试验结果分析

在 2.1 得到最佳单因素条件(见表 1)基础上,采用五元二次正交旋转组合试验设计对酶解工艺进行优化,设计方案及结果和方差分析见表 2、3。

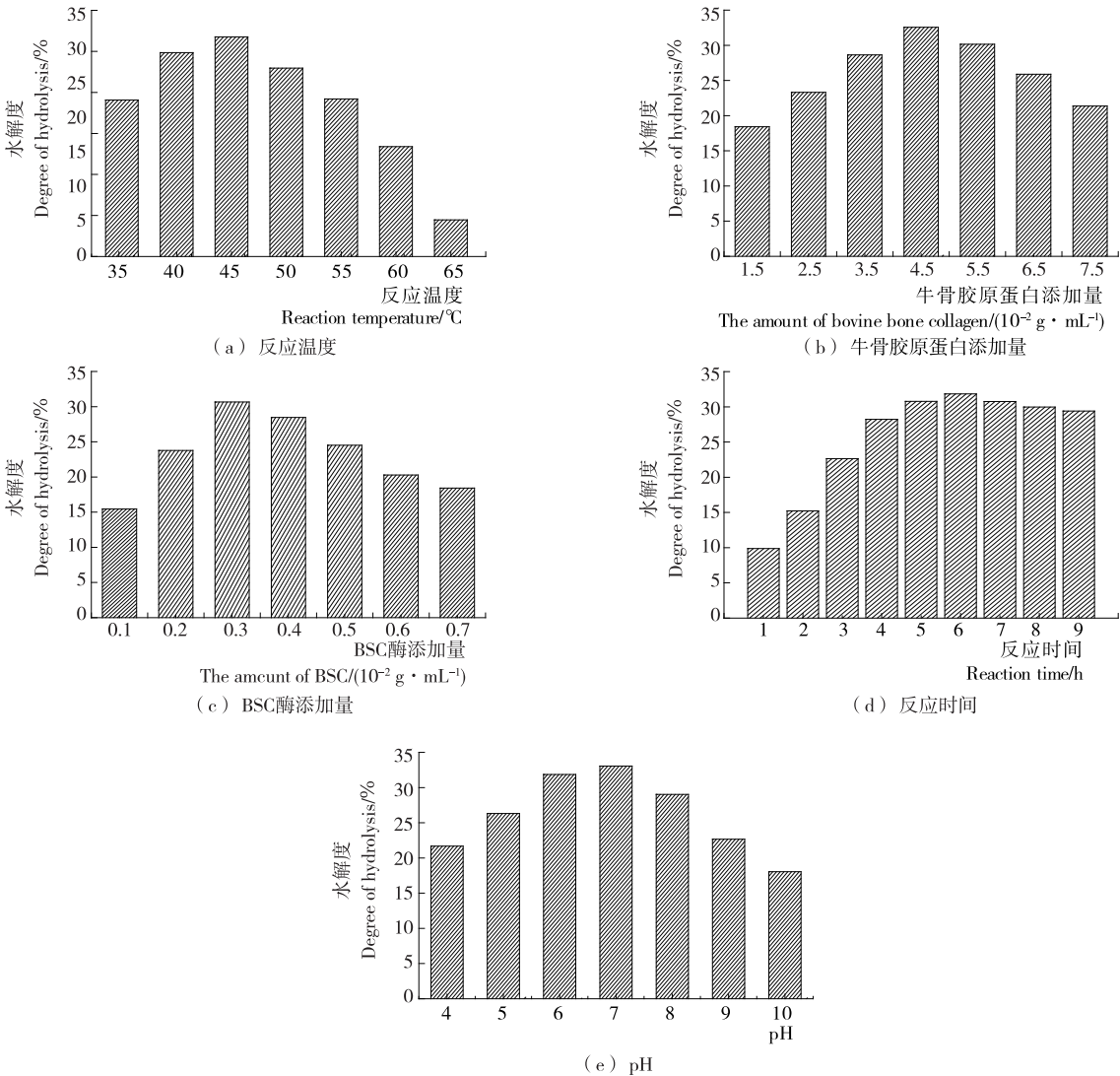


图 1 酶解条件对水解度的影响

Figure 1 The influence of different enzymatic conditions on degree of hydrolysis

表 1 因素水平编码表
Table 1 Factor level table

水平	X ₁ 反应温度/ ℃	X ₂ 牛骨胶原蛋白 添加量/(10 ⁻² g · mL ⁻¹)	X ₃ BSC 酶添加量/ (10 ⁻² g · mL ⁻¹)	X ₄ 反应时间/ h	X ₅ pH 值
-2	35	1.5	0.2	2.0	5.0
-1	40	3.0	0.3	3.5	6.0
0	45	4.5	0.4	5.0	7.0
1	50	6.0	0.5	6.5	8.0
2	55	7.5	0.6	8.0	9.0

表 2 五元二次正交旋转组合试验设计方案及结果

Table 2 Quadratic orthogonal rotary composite experimental design (in coded level of five variables) and experimental result ($n=3$)

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y 水解度/%
1	1	1	1	1	1	25.59
2	1	1	1	-1	-1	24.93
3	1	1	-1	1	-1	29.23
4	1	1	-1	-1	1	18.36
5	1	-1	1	1	-1	24.02
6	1	-1	1	-1	1	16.71
7	1	-1	-1	1	1	22.61
8	1	-1	-1	-1	-1	20.36
9	-1	1	1	1	-1	28.61
10	-1	1	1	-1	1	29.23
11	-1	1	-1	1	1	22.62
12	-1	1	-1	-1	-1	20.28
13	-1	-1	1	1	1	23.76
14	-1	-1	1	-1	-1	17.91
15	-1	-1	-1	1	-1	21.28
16	-1	-1	-1	-1	1	17.25
17	-2	0	0	0	0	21.68
18	2	0	0	0	0	24.49
19	0	-2	0	0	0	18.75
20	0	2	0	0	0	24.05
21	0	0	-2	0	0	17.67
22	0	0	2	0	0	23.56
23	0	0	0	-2	0	23.03
24	0	0	0	2	0	26.99
25	0	0	0	0	-2	25.56
26	0	0	0	0	2	23.28
27	0	0	0	0	0	32.65
28	0	0	0	0	0	32.51
29	0	0	0	0	0	30.08
30	0	0	0	0	0	33.57
31	0	0	0	0	0	28.33
32	0	0	0	0	0	28.86
33	0	0	0	0	0	29.74
34	0	0	0	0	0	33.68
35	0	0	0	0	0	32.19
36	0	0	0	0	0	31.15

采用 Design Expert 8.0 对优化结果进行多元回归拟合，得出回归方程为：

$$Y = -368.287 + 8.769X_1 + 11.402X_2 + 235.956X_3 + 6.911X_4 + 29.911X_5 - 0.051X_1X_2 - 2.174X_1X_3 + 0.079X_1X_4 - 0.251X_1X_5 + 7.071X_2X_3 - 0.172X_2X_4 - 0.167X_2X_5 - 2.621X_3X_4 + 6.331X_3X_5 - 0.276X_4X_5 - 0.070X_1^2 - 0.960X_2^2 - 235.552X_3^2 - 0.559X_4^2 - 1.404X_5^2. \quad (1)$$

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X ₁	1.76	1	1.76	0.43	0.523 1	不显著
X ₂	86.45	1	86.45	21.06	0.000 4	极显著
X ₃	38.89	1	38.89	9.47	0.007 7	极显著
X ₄	68.72	1	68.72	16.74	0.001 0	极显著
X ₅	9.44	1	9.44	2.30	0.150 2	不显著
X ₁ ²	96.66	1	96.66	23.55	0.000 2	极显著
X ₂ ²	149.20	1	149.20	36.35	<0.000 1	极显著
X ₃ ²	177.55	1	177.55	43.26	<0.000 1	极显著
X ₄ ²	50.54	1	50.54	12.31	0.003 2	极显著
X ₅ ²	63.10	1	63.10	15.37	0.001 4	极显著
X ₁ X ₂	2.35	1	2.35	0.57	0.461 1	不显著
X ₁ X ₃	18.90	1	18.90	4.60	0.048 7	显著
X ₁ X ₄	5.63	1	5.63	1.37	0.259 9	不显著
X ₁ X ₅	25.13	1	25.13	6.12	0.025 8	显著
X ₂ X ₃	18.00	1	18.00	4.38	0.053 7	不显著
X ₂ X ₄	2.39	1	2.39	0.58	0.456 8	不显著
X ₂ X ₅	1.01	1	1.01	0.24	0.627 9	不显著
X ₃ X ₄	2.47	1	2.47	0.60	0.449 7	不显著
X ₃ X ₅	6.41	1	6.41	1.56	0.230 4	不显著
X ₄ X ₅	2.75	1	2.75	0.67	0.426 1	不显著
回归	827.34	20	41.37	10.08	<0.000 1	极显著
剩余	61.57	15	4.10			
失拟	27.96	6	4.66	1.25	0.367 1	不显著
误差	33.61	9	3.73			
总和	888.91	35				

表 3 结果表明，拟合的二次回归方程极显著，失拟项 P 值不显著(P=0.367 1>0.05)，决定系数 R² 为 93.07%，模型拟合度较高，证明所建立的模型有效可用。由 F 值高低得五因素对水解度的影响依次为：牛骨胶原蛋白添加量、反应时间、BSC 酶添加量、pH 值、反应温度。

本试验构建的模型在 α=0.05 显著水平下剔除不显著水平后的方程为：

$$Y = -368.287 + 11.402X_2 + 235.956X_3 + 6.911X_4 - 2.174X_1X_3 - 0.251X_1X_5 - 0.070X_1^2 - 0.960X_2^2 - 235.552X_3^2 - 0.559X_4^2 - 1.404X_5^2. \quad (2)$$

2.3 构建模型的等高线与响应面分析

由图 2 可知，在最佳值的范围外响应面比较陡峭，表明当其他 3 因素为定时，水解度对 BSC 酶添加量和反应温度的变化敏感，两者等高线图为椭圆状，表明 BSC 酶添加量和反应温度有较为明显的交互作用^[18]。从等高线图分析表明，当固定牛骨胶原蛋白添加量 5.14 g/100 mL、反应时间 6.06 h、pH 6.57 时，BSC 酶添加量在 0.35~0.50 g/100 mL，反应温度在 40.6~49.2 ℃时，两者交互作用最明显，水解度达到 30%。

图3中反应温度和pH值的响应面图显示，在最佳值的

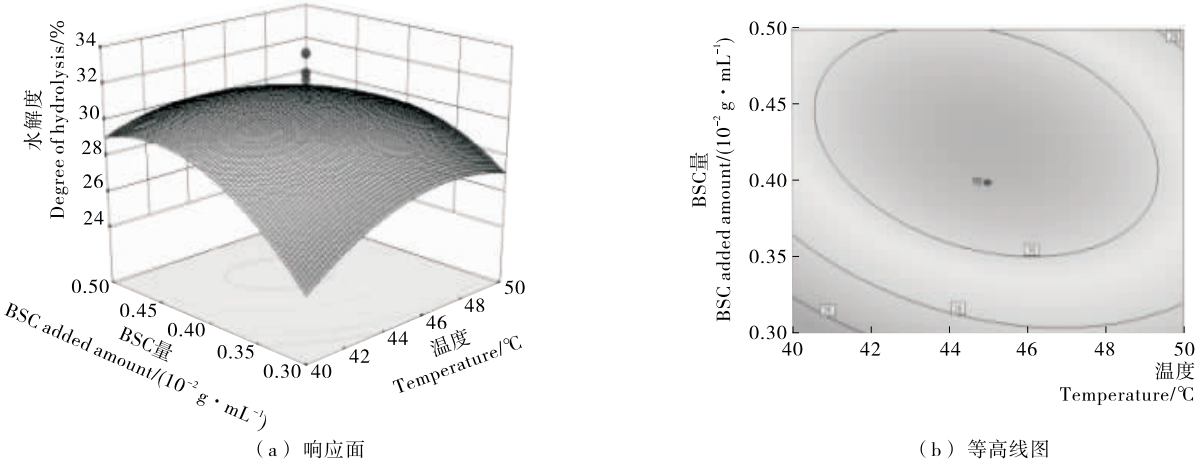


图 2 反应温度和 BSC 酶添加量对水解度影响的响应面和等高线图

Figure 2 The response surface and contour map of influences of reaction temperature and BSC added amount on degree of hydrolysis

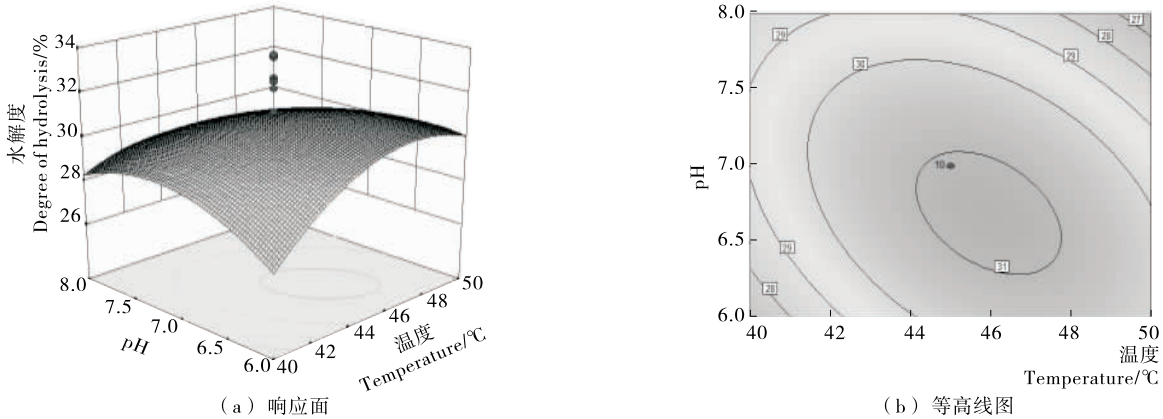


图 3 反应温度和 pH 值对水解度影响的响应面和等高线图

Figure 3 The response surface and contour map of influences of reaction temperature and pH on degree of hydrolysis

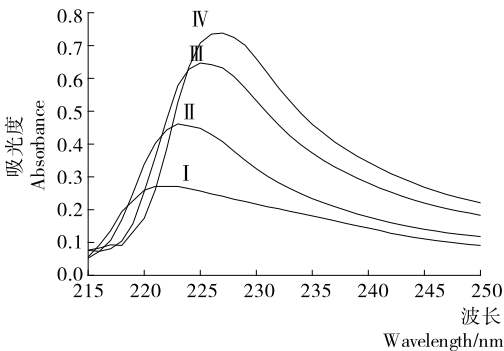
范围外响应面陡峭,表明当其他 3 因素不变时,pH 值和反应温度的变化对水解度影响较大,等高线图呈明显椭圆状反映出两者有较为明显的交互作用。等高线图分析表明,当牛骨胶原蛋白添加量 5.14 g/100 mL、反应时间 6.06 h、BSC 酶添加量 0.42 g/100 mL 时,反应温度在 44.0~47.6 °C,pH 在 6.3~7.1 时交互作用达到最大,水解度在 31% 以上。

2.4 BSC 酶解牛骨胶原蛋白的工艺优化及验证

经五元二次正交旋转试验及响应面优化法,采用 Design Expert 8.0 软件和回归方程分析可得 BSC 酶解牛骨胶原蛋白的最佳工艺为:反应温度 46 °C、牛骨胶原蛋白添加量 5.14 g/100 mL、BSC 酶添加量 0.42 g/100 mL、反应时间 6 h、pH 值为 6.5,对此条件进行验证实验,重复 6 次,得到水解度为 34.98%,与预测值相差 1.15%,误差较小,此条件下试验可行。

2.5 紫外光谱分析

图 4 为不同酶解时间下胶原蛋白肽的紫外光谱扫描图。由图 4 可知,I、II、III、IV 均在 220~230 nm 内出现胶原蛋白及胶原蛋白肽的特征吸收,并且特征吸收峰随着酶解时间的延长发生红移,说明胶原蛋白肽中生色基团的分布有所



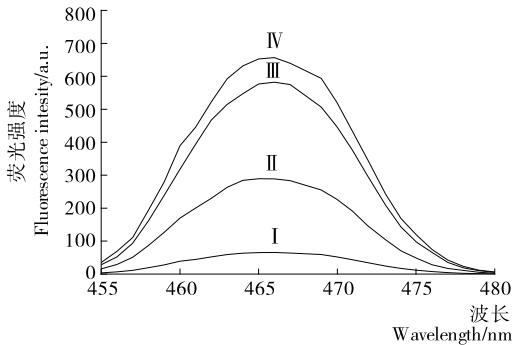
I ~ IV 酶解时间分别为 0.2, 4, 6 h

图 4 不同酶解时间下胶原蛋白肽的紫外光谱图
Figure 4 The UV of collagen peptides in different enzymolysis times

改变,牛骨胶原蛋白在 BSC 酶作用下三股螺旋结构逐渐打开,分子表面 C=O、CONH₂、COOH 等具有紫外吸收的生色基团逐步增多^[19],导致紫外吸光度逐渐增大。

2.6 荧光光谱分析

图 5 为不同酶解时间下胶原蛋白肽的荧光光谱扫描图。



I ~ IV 酶解时间分别为 0, 2, 4, 6 h

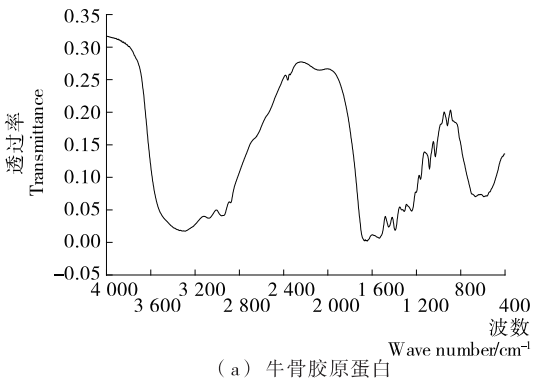
图 5 不同酶解时间下胶原蛋白肽的荧光光谱图

Figure 5 The fluorescence spectroscopy of collagen peptides in different enzymolysis times

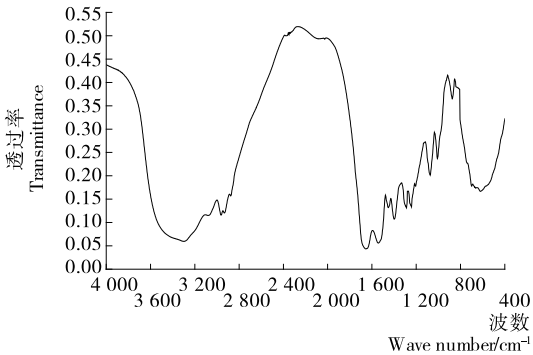
由图 5 可知,荧光探针在 465 nm 处的峰强度随酶解反应进程不断增强,反应 6 h 的胶原蛋白肽与反应 0 h 的牛骨胶原蛋白相比荧光峰明显增强,表明反应结束时荧光探针周围环境极性降低,证明溶液中胶原蛋白肽产生了聚集状态,酶解后的胶原蛋白肽链之间存在疏水区,这是由 BSC 酶解牛骨胶原蛋白过程中三股螺旋结构遭到破坏,产生胶原蛋白肽的肽链上—NH₂⁺—相互排斥逐渐减弱,疏水氨基酸残基作用增强,再加上酶解后的胶原蛋白肽分子内与分子间氢键作用不断增强所导致的^[12]。

2.7 红外光谱分析

图 6 为牛骨胶原蛋白和降解物胶原蛋白肽的红外光谱图。



(a) 牛骨胶原蛋白



(b) 酶解6 h后得到的胶原蛋白肽

图 6 牛骨胶原蛋白和胶原蛋白肽的红外光谱分析

Figure 6 The FT-IR of bovine collagen and collagen peptides

由图 6 可知,牛骨胶原蛋白和胶原蛋白肽分别在 3 312.35, 3 267.96 cm⁻¹ 处呈现明显的吸收峰,这是由 N—H 伸缩振动引起的,是蛋白的特征吸收,经 BSC 酶降解作用,牛骨胶原蛋白的吸收峰发生红移,是酶解后的胶原蛋白肽中 N—H 伸缩振动与氢键形成了缔合体^[20] 所导致的。胶原蛋白肽在 2 922.63 cm⁻¹ 出现强吸收峰,是—CONH—的特征吸收峰,表明酶解产物为胶原多肽。1 360~1 200 cm⁻¹ 为酰胺Ⅲ带,二者在此波数范围内均出现特征吸收,为 C—H 伸缩振动和 N—H 弯曲振动所产生的,但是胶原蛋白肽具有较强的吸收峰,表明在 BSC 酶作用下牛骨胶原蛋白的肽链发生断裂,酶解后的胶原蛋白肽二级结构居多,由图 6(b)可知,经过酶解的胶原蛋白肽在 1 275.75 cm⁻¹ 处出现强吸收峰,是 β -转角伸缩振动引起的,表明胶原蛋白肽结构中以 β -转角为主,可能是酶解过程中有较多的游离脯氨酸,其分子中的环状结构和平面角对 β -转角的形成具有催化作用。

2.8 扫描电镜分析

图 7 为不同酶解时间下牛骨胶原蛋白的扫描电镜图。

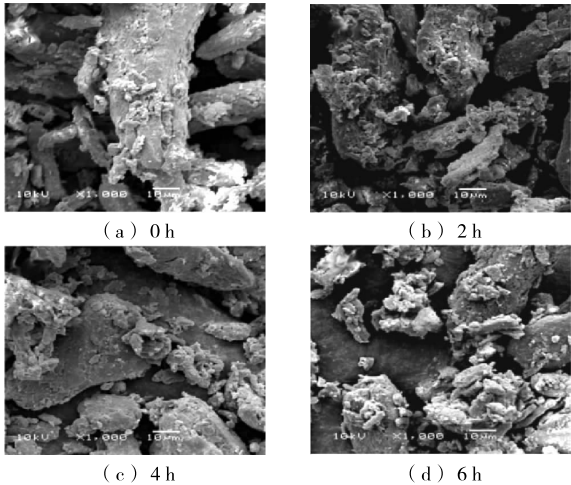


图 7 不同酶解时间下牛骨胶原蛋白的扫描电镜图

Figure 7 The SEM of bovine bone collagen in different enzymolysis times

由图 7 可知,BSC 酶对牛骨胶原蛋白的表面结构影响较大,其中图 7(a)中牛骨胶原蛋白的表面结构为细丝状,但图 7(b)、(c)、(d)显示牛骨胶原蛋白的表面结构随着酶解时间的延长而逐渐被剥离,这是由于 BSC 酶将牛骨胶原蛋白中的 I 型胶原蛋白降解为小分子多肽,破坏了其完整的表面结构,使牛骨胶原蛋白中所含的大分子物质 I 型胶原蛋白越来越多地暴露在表面,加快了 BSC 酶的作用,水解越来越显著,导致紧密结合的细丝状表面结构变得更加疏松。

3 结论

(1) 本试验将前期分离纯化得到的 BSC 酶作用于牛骨胶原蛋白,以水解度为指标,在单因素试验基础上,采用五元二次正交旋转试验和响应面优化法得出酶解的最佳工艺参数为反应温度 46 ℃、牛骨胶原蛋白添加量 5.14 g/100 mL、BSC 酶添加量 0.42 g/100 mL、反应时间 6 h、pH 6.5,在此条件下进行验证实验,得到水解度为 34.98%。

(2) BSC 酶的酶解作用使牛骨胶原蛋白的三股螺旋结构遭到破坏,生色基团分布发生改变,使胶原蛋白肽的肽链上—NH₂⁺—相互排斥减弱,疏水氨基酸残基作用增强,分子内与分子间的氢键作用增加,N—H 伸缩振动与氢键形成了缔合体,并且酶解作用促进 β -转角的产生,同时破坏了牛骨胶原蛋白的表面分子结构,使其变得疏松。本研究为今后牛骨资源的深加工提供了理论指导。

参考文献

[1] 孙蓓,王龙刚. 禽禽骨的综合利用现状及发展前景[J]. 中国调味品, 2011, 36(4): 1-4.

[2] 刁静静,孔保华,陈洪生. 骨蛋白水解物的功能特性及抗氧化性的研究进展[J]. 肉类研究, 2007(6): 26-29.

[3] BANERJEE P, MEHTA A, SHANTHI C. Investigation into the cyto-protective and wound healing properties of cryptic peptides from bovine Achilles tendon collagen [J]. Chemico-Biological Interactions, 2014, 211(229): 1-10.

[4] GÓMEZGUILLÉN M C, GIMÉNEZ B, LÓPEZCABALLERO M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1 813-1 827.

[5] TOOPCHAM T, MES J J, WICHERS H J, et al. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases hydrolyzed tilapia muscle proteins[J]. Food Chemistry, 2017, 220: 190-197.

[6] 张宇,邹应龙,黄祎萌. 单菌和双菌固态发酵猪骨素的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 179-182.

[7] 彭慧莉. 酶解和乳酸菌发酵猪骨的工艺研究[D]. 成都: 西华大

学, 2013: 100-120.

[8] 蔡丽华. 牛骨酶解制备血管紧张素转换酶抑制肽的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 112-135.

[9] 赵妍娟,胡林林,方芳,等. 骨胶原蛋白的酶解工艺条件[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 153-155.

[10] ZHANG Yu-hao, MA Liang, CAI Lu-yun, et al. Effect of combined ultrasonic and alkali pretreatment on enzymatic preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from native collagenous materials [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 36: 88-94.

[11] 刘丽莉,马美湖,杨协力. 牛骨 I 型胶原蛋白提取及结构表征[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 87-91.

[12] 肖岚,李诚,付刚,等. 5 种蛋白酶对猪皮胶原蛋白水解效果的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(17): 10-14.

[13] 李燕,徐静,吴祥庭,等. 卤鸡腿废弃液酶解工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 153-157.

[14] 张小燕. 胶原蛋白肽生物功能材料的研究与开发[D]. 西安: 西北工业大学, 2006: 80-96.

[15] 吴雷,郑娟,刘文涛,等. 鸡关节软骨 II 型胶原蛋白结构及性能表征[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 86-90.

[16] 朱瀛,赵改名,柳艳霞,等. 中性蛋白酶水解鸡骨泥制备短肽工艺优化[J]. 农业工程学报, 2016, 32(12): 309-314.

[17] 石岭,赵利,袁美兰,等. 响应面法优化碱性蛋白酶酶解草鱼蛋白质[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 26-29.

[18] 张丽红,谢三都,徐芳,等. 紫苏叶多糖活性炭脱色工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 224-230.

[19] 杨露,丁利君,蓝德安. 马面鱼骨胶原多肽的理化特性及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 109-112.

[20] 据海燕,刘新华,但卫华,等. 牛跟腱 I 型胶原纤维的微观结构与理化性能分析[J]. 功能材料, 2015(15): 15 031-15 034.

(上接第 34 页)

[6] 郭蓉. 低高级醇刺葡萄酒酵母菌的筛选及应用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013: 8-11.

[7] 欧阳建文,熊兴耀,刘东波,等. 刺葡萄综合开发利用研究[J]. 广西园艺, 2007, 18(2): 29-31.

[8] 鲍端峰,秦丹,唐明,等. 刺葡萄酒香气成分的研究[J]. 酿酒科技, 2010(2): 53-56.

[9] 翁连海,逯家富,王军,等. 进口葡萄酒酿造用活性干酵母在我国山葡萄酒生产中的应用研究[J]. 酿酒, 2006, 33(2): 61-62.

[10] MARO E D, ERCOLINI D, COPPOLA S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(2): 201-210.

[11] BECHER P G, FLICK G, ROZP DOWSKA E, et al. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development[J]. Functional Ecology, 2012, 26(4): 822-828.

[12] 时月. 玫瑰香葡萄酒自然酿造过程和酵母的分离鉴定与特性分析[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2015: 38-40.

[13] 王国平,宋育阳,裴颖芳,等. 宁夏御马葡萄酒厂野生酵母菌株的分离筛选及分子鉴定[J]. 中国酿造, 2009, 28(8): 38-41.

[14] ILIEVA F, KOSTADINOVI V S, DIMOVSKA V, et al. Se-

lection of 80 newly isolated autochthonous yeast strains from the Tikves region of Macedonia and their impact on the quality of red wines produced from Vranec and Cabernet Sauvignon grape varieties.[J]. Food Chemistry, 2017, 216: 309-315.

[15] 杨莹,管敬喜,谢林君,等. 广西毛葡萄产区野生葡萄酒酵母种群分布与系统进化分析[J]. 南方农业学报, 2016, 47(7): 1 123-1 128.

[16] 巴尼特 J A. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿,译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 20-27.

[17] 龚国利,史政豪,张甜,等. 运动发酵单胞菌的筛选与鉴定[J]. 陕西科技大学学报, 2015(6): 138-141.

[18] GUNASEKARAN P, RAJ K C. Ethanol fermentation technology-*Zymomonas mobilis*[J]. Currentence, 1999, 77(1): 56-68.

[19] 祁国振,毛志泉,胡秀娜,等. 苹果根际自毒物质降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 330-342.

[20] 杰伊,罗西里尼,戈尔登,等. 现代食品微生物学: 食品微生物学[M]. 何国庆,丁立孝,宫春波,译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 36-39.

[21] 王染霖,董新平,刘怀锋. 新疆天山北麓赤霞珠干红葡萄酒品质分析[J]. 新疆农垦科技, 2015(6): 66-69.