

双酶水解鸡骨泥的工艺优化

The study on the enzymatic hydrolysis process on chicken bone paste with double enzyme combination

丁小燕^{1,2,3} 张雯^{1,2} 倪莉^{1,2} 刘志彬^{1,2}

DING Xiao-yan^{1,2,3} ZHANG Wen^{1,2} NI Li^{1,2} LIU Zhi-bin^{1,2}

(1. 福州大学食品科学技术研究所, 福建 福州 350108; 2. 福建省食品生物技术创新工程技术研究中心, 福建 福州 350108; 3. 百威英博投资〔中国〕有限公司, 湖北 武汉 430050)

(1. Institute of Food Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China;

2. Fujian Center of Excellence for Food Biotechnology, Fuzhou, Fujian 350108, China;

3. Budweiser InBev Investment〔China〕Co., Ltd., Wuhan, Hubei 430050, China)

摘要:对鸡骨泥进行酶水解,经筛选确定中性蛋白酶和 Flavourzyme 复合风味酶的组合能有效酶解鸡骨泥。经正交试验分析,确定酶解的最佳工艺为:酶解温度 50 ℃、pH 值 8.5、中性蛋白酶和 Flavourzyme 复合风味酶的添加量分别为 0.75% 和 1.50%、底物浓度 5%、水解时间 2.5 h。在该条件下酶解效率最高,水解度和氮收率分别为 37.11% 和 92.50%,酶解产物澄清无苦味及腥味,且游离氨基酸含量显著增加。

关键词:鸡骨泥;双酶复合水解;游离氨基酸

Abstract: Chicken bone contains plenty of various nutrition, however the efficiency of direct use is relatively low. The enzymatic hydrolysis with protease can significantly increase the efficiency. In the present study, an enzymatic hydrolysis process on chicken bone paste with double-enzyme combination was developed. By the orthogonal test analysis, the optimal process parameters were as follows. The amounts of the neutral protease and Flavourzyme complex flavored enzyme was 0.75% and 1.50%, respectively, and the substrate concentration was 5%, hydrolyzed at was 50 ℃ and pH 8.5 for 2.5 h. Under these conditions, degree of hydrolysis (DH) and nitrogen recovery of the hydrolysates were 37.11% and 92.5%, respectively. The hydrolysate had no significant bitter taste or strange odor, with the significant increase of the amount of the free amino acids.

Keywords: chicken bone paste; double-enzymatic hydrolysis; free amino acid

中国是禽肉生产的大国,鸡骨作为鸡肉加工过程中的副产品,其产量逐年上升。鸡骨中含有丰富的蛋白质、脂肪、矿物质、软骨素、酸性黏多糖和维生素 A、B₁、B₂ 等多种营养素^[1]。其中,鸡骨的蛋白质含量可达 16.3%,与等量鸡肉相似,并且氨基酸含量高,比例均衡,生物价高,是优质的蛋白源^[2]。因此,鸡骨具有很高的市场利用价值。

但由于鸡骨无法直接食用,目前鸡骨资源开发利用效率较低,主要被加工为骨粉作为动物饲料使用,产品附加值低^[3]。利用蛋白酶适度水解,可改善其溶解性、乳化性、起泡性及持水性,从而提高其利用效率。目前已有多篇文献^[4-6]报道了鸡骨泥的蛋白酶水解研究,但水解效率有待提高。另一方面,酶法水解动物蛋白产物容易产生苦味、腥味等不良风味^[7],需进一步改进鸡骨泥的水解工艺。本试验拟以鸡肉加工的副产品鸡骨泥为原料,通过双酶协同作用对原料进行充分水解以提高原料的综合利用率,并降低产品的腥味和苦味以提高产品品质。旨在为提高鸡骨的综合利用率提供试验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

Flavourzyme 复合风味酶(酶活力 2.7×10⁴ U/g)、Protamex 复合蛋白酶(酶活力 2.0×10⁵ U/g)、Alcalase 水解蛋白酶(酶活力 3.5×10⁵ U/g):丹麦诺维信公司;

AS.1398 中性蛋白酶:酶活力 6.0×10⁴ U/g,无锡星达生物有限公司;

胰蛋白酶(酶活力 7.4×10⁴ U/g)、木瓜蛋白酶(酶活力 8.0×10⁴ U/g):北京华美公司;

中性蛋白酶:酶活力 2.7×10⁴ U/g,浙江大学食品工程系提供;

新鲜鸡腿骨:福建圣农集团有限公司;

基金项目:福建省科技厅引导项目(编号:2015N005)

作者简介:丁小燕,女,硕士。

通信作者:刘志彬(1982—),男,福州大学讲师,硕士。

E-mail: liuzhibin@fzu.edu.cn

收稿日期:2017-09-08

其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

高效液相色谱仪:L-2000型,配置L-2455型二极管阵列检测器,日本日立公司;

电子天平:TE601-L型,德国赛多利斯公司;

高速冷冻离心机:CF16RX II型,日本日立公司;

数显恒温水浴锅:HH-6型,上海申腾科技有限公司;

pH计:868型,美国Orion Research公司。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程 新鲜鸡腿骨经清水清洗后剔除腿骨肉,使用粉碎机将其粉碎至约80目形成鸡骨泥,然后90℃水浴30min,经冷却后将鸡骨泥pH调至各蛋白酶的最适pH。添加酶液在最适反应温度下水解一定时间,然后85℃水浴20min灭酶,最后使用双层纱布滤去不溶性成分,获得鸡骨泥的酶解液。

1.3.2 酶解液的分析 采用SB/T 10317-1999《蛋白酶活力测定法》测定蛋白酶的活力;采用甲醛电位滴定法测定样品的氨态氮,并计算氮回收率^[8];采用Alder-Nissen法计算水解度(DH)和平均肽链长度^[9];采用Waters AccQ-Tag衍生法进行氨基酸组分的分析^[10]。

1.3.3 鸡骨泥水解蛋白酶的筛选 选用Flavourzyme复合风味酶、Protamex复合蛋白酶、Alcalase水解蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、AS.1398中性蛋白酶和木瓜蛋白酶7种蛋白酶,在其各自的最适条件下对鸡骨泥进行水解,测定水解

液中蛋白质水解度、氮收率、水解液的风味以及水解液澄清情况,从而初步筛选适当鸡骨泥水解蛋白酶。在此基础上,选择恰当的双酶组合对鸡骨泥进行水解,以鸡骨泥水解度(DH)为指标筛选最佳的双酶组合。

1.3.4 鸡骨泥水解工艺的优化 在确定最佳双酶组合后,以鸡骨泥水解度(DH)为指标,对比分步水解(酶分先后加入)和同步水解(酶同时加入)两种酶添加方式,确定该双酶组合的最佳复合方式。最后采用四因素四水平正交试验^[11]考察温度、pH、酶解时间和酶添加量对鸡骨泥水解度(DH)的影响,优化鸡骨泥的水解工艺。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶的初步筛选

由表1可知,7种蛋白酶对鸡骨泥的水解效果不同,采用AS.1398中性蛋白酶、中性蛋白酶、Alcalase、Protamex和胰蛋白酶水解鸡骨蛋白时,水解度、氮收率较高,但苦味重,水解液较浑浊。采用木瓜蛋白酶和Flavourzyme复合风味酶时,虽然氮收率较低,但水解液苦味弱,且易于澄清处理。为了提高酶解效率,并提升产品风味,将水解效率较高的3种蛋白酶(AS.1398中性蛋白酶、中性蛋白酶和Alcalase)与产品风味较好的2种蛋白酶(木瓜蛋白酶和Flavourzyme复合风味酶)结合,进行双酶水解鸡骨泥。为了简化试验,选择4种组合方式:①中性蛋白酶+Flavourzyme;②AS.1398中性蛋白酶+Flavourzyme;③Alcalase+Flavourzyme;④中性蛋白酶+木瓜蛋白酶。

表1 各蛋白酶对鸡骨泥的水解效果

Table 1 The effect of protease types on the hydrolysis of chicken bone paste

蛋白酶种类	水解度/%	氮收率/%	水解液风味	水解液澄清情况
Flavourzyme	23.21	69.98	无苦味	澄清
Alcalase	16.78	76.35	苦味强	浑浊
Protamex	16.56	76.49	苦味强	浑浊
中性蛋白酶	25.51	84.73	苦味强	浑浊
胰蛋白酶	17.01	72.56	苦味强	浑浊
AS.1398中性蛋白酶	24.01	86.03	苦味强	较清
木瓜蛋白酶	16.30	59.25	苦味弱	较清

2.2 最佳双酶组合的筛选

反应温度、pH、底物浓度、加酶量和反应时间是蛋白质酶解的重要工艺参数,参考预备试验的数据(表2)分别在中性蛋白酶、AS.1398中性蛋白酶、Alcalase反应1h的基础上加入Flavourzyme复合风味酶或木瓜蛋白酶进行水解试验,以水解度(DH)为指标筛选最佳的双酶组合,结果见图1。

由图1可知,除中性蛋白酶+木瓜蛋白酶组合外,其它组合鸡骨泥分别经Alcalase、中性蛋白酶、AS.1398中性蛋白酶水解1h后再加入Flavourzyme复合风味酶,水解效果有明显改善,较单酶水解的显著提高。其中水解度高低顺序排列为:中性蛋白酶+Flavourzyme > AS.1398中性蛋白酶+Flavourzyme > Alcalase+Flavourzyme > 中性蛋白酶+木瓜蛋白酶。经测定,中性蛋白酶+Flavourzyme的双酶组合水解度可达40%,氮回收率约为90%,而且所得酶解液澄清、

无苦味和异味,因此选择该组合进行后续试验。

2.3 双酶水解工艺的优化

2.3.1 双酶复合方式的确定 用中性蛋白酶与Flavourzyme复合风味酶对鸡骨蛋白进行复合水解,分步水解时,控制反

表2 蛋白酶的最佳反应条件

Table 2 The optimum enzymolysis conditions of each protease

酶种类	最适温度/℃	最适pH	时间/h	酶底比/%
中性蛋白酶	50	8.5	1	0.75
AS.1398中性蛋白酶	55	7.5	1	2.00
Alcalase	60	8.5	1	0.50
Flavourzyme	50	7.0	—	2.00
木瓜蛋白酶	65	6.5	—	1.50

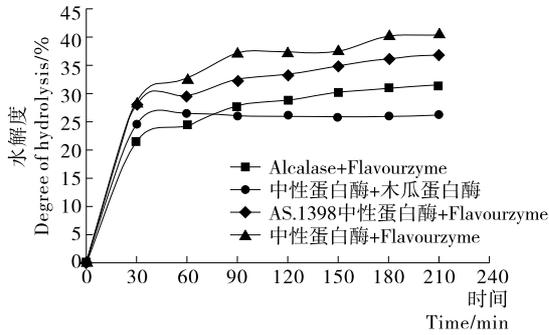


图 1 双酶组合对鸡骨泥的水解效果

Figure 1 The degree of hydrolysis on chicken bone paste with binary protease combination

应体系的温度为 50 °C, pH 为 8.5, 加入中性蛋白酶, 反应 1 h 后调整反应体系的 pH 为 7.0, 再加入 Flavourzyme 进行水解; 同步水解时, 控制反应体系的温度为 50 °C, pH 为 8.5, 将中性蛋白酶与 Flavourzyme 共同加入反应体系进行水解。对比两种水解方式的效率, 结果见图 2。

由图 2 可知, 分步水解时, 中性蛋白酶水解 1 h 后加入 Flavourzyme, 水解度明显增大, 与同步水解相比, 两种工艺对于反应体系的影响并不显著, 为了简化试验工艺, 采用同步水解的工艺进行水解。

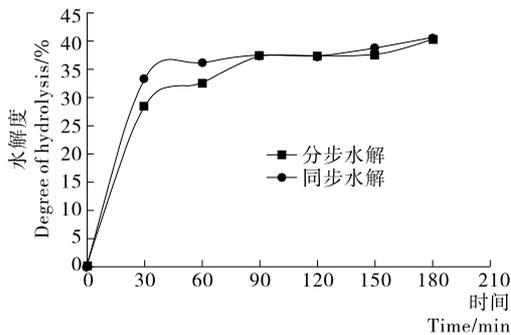


图 2 中性蛋白酶与 Flavourzyme 的添加方式对鸡骨泥的水解效果

Figure 2 The degree of hydrolysis on chicken bone paste with neutral protease and Flavourzyme under different addition methods

2.3.2 酶解条件的优化 在确定双酶复合方式后, 进一步通过正交试验优化酶解条件。参考中性蛋白酶和 Flavourzyme 单酶水解时的各因素(包括温度、pH、时间和加酶量)参数, 从而确定复合酶解时每个因素的条件区间, 再进行正交试验。正交试验因素水平取值见表 3, 结果见表 4。

表 3 正交因素水平表[†]

Table 3 Orthogonal factor level

水平	A 温度/°C	B pH	C 时间/h	D 加酶量/%
1	40	7.0	60	0.75+0.50
2	50	7.5	90	0.75+1.00
3	55	8.0	120	0.75+1.50
4	60	8.5	150	0.75+2.00

[†] 加酶量占底物的质量分数。

表 4 L₁₆(4⁵) 正交设计方案及试验结果

Table 4 The L₁₆(4⁵) orthogonal design and results

试验号	A	B	C	D	水解度/%
1	1	1	1	1	22.39
2	2	2	2	2	29.07
3	3	3	3	3	33.22
4	4	4	4	4	34.65
5	1	2	3	4	30.63
6	2	1	4	3	32.05
7	3	4	1	2	31.08
8	4	3	2	1	30.04
9	1	3	4	2	31.27
10	2	4	3	1	29.46
11	3	1	2	4	31.47
12	4	2	1	3	30.04
13	1	4	2	3	31.53
14	2	3	1	4	30.17
15	3	2	4	1	31.28
16	4	1	3	2	30.89
<hr/>					
K ₁	115.82	116.80	113.68	113.70	
K ₂	120.75	121.02	122.11	122.31	
K ₃	127.05	124.70	124.20	126.84	
K ₄	125.62	126.72	129.25	126.92	
R	2.81	2.48	3.89	3.31	

从正交试验极差结果显示, 各因素的影响次序为 C>D>A>B, 最适宜的工艺参数为 A₃B₁C₄D₁ 或 A₃B₁C₄D₃, 即温度为 50 °C, pH 值为 8.5, 水解时间 2.5 h, 中性蛋白酶与 Flavourzyme 的酶底比分别为 0.75%, 2.00% 或 0.75%, 1.50%。考虑到实际生产的成本和能源消耗, 确定最佳工艺条件为 A₃B₁C₄D₃, 即温度 50 °C, pH 8.5, 中性蛋白酶与 Flavourzyme 的酶底比为 0.75%, 1.50%, 底物浓度 5%, 水解时间为 2.5 h。通过验证, 酶鸡骨泥的水解度达 38.96%。该酶解度显著优于汪兰等^[5]所报道的使用木瓜蛋白酶与风味蛋白酶水解鸡骨泥所获得的水解度(16.5%); 也优于马亚萍等^[6]所报道的使用复合蛋白酶水解鸡骨渣所获得的水解度(25.88%)。经分析, 酶解产物的平均肽链长度为 2.57, 产品多为短肽和游离氨基酸, 易于人体消化吸收。

2.4 鸡骨泥及其酶解液游离氨基酸成分分析

对比分析水解前后鸡骨泥的游离氨基酸组成, 结果见图 3。

由图 3 可知, 酶解液中共检测到 18 种游离氨基酸, 其中必需氨基酸含量为 53%。游离氨基酸总量达 3 936.70 mg/L, 是酶解前的 2 倍, 尤其是亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)、酪氨酸(Tyr)等的含量显著增加。

3 结论

本试验对比了 7 种蛋白酶及其双酶组合对鸡骨泥的水解效果, 确定中性蛋白酶与 Flavourzyme 复合风味酶的组

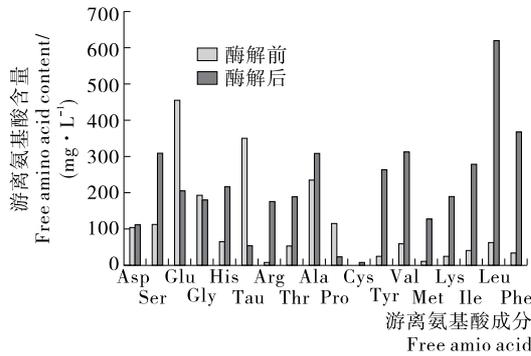


图3 酶解后游离氨基酸组成的变化

Figure 3 The changes of free amino acid before and after enzymatic hydrolysis

水解效果最佳。还通过正交试验优化了酶解工艺,结果发现在酶解温度 50 ℃、pH 值 8.5、中性蛋白酶和 Flavourzyme 的加酶量分别为 0.75% 和 1.50%、底物浓度 5%、水解时间 2.5 h 条件下酶解效率最高,水解度和氮收率分别为 37.11% 和 92.5%,酶解产物澄清无苦味及腥味。经酶解后,鸡骨泥的游离氨基酸含量显著增加,尤其是亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸等含量显著提高。本试验所开发的双酶水解鸡骨泥工艺对提高鸡骨利用效率有一定的应用价值。

参考文献

[1] 赵霞, 马丽珍. 骨的综合利用[J]. 食品科技, 2003(4): 87-90.
 [2] 曹雁平. 我国禽畜骨综合加工利用的现状[J]. 粮油加工与食品机械, 2001(9): 6-8.
 [3] 李睿, 王海燕, 尚永彪. 鸡骨的综合利用研究进展[J]. 肉类工业, 2010(11): 54-57.
 [4] 丁小燕, 张雯, 陈延锋, 等. 复合风味蛋白酶水解鸡骨泥工艺条件的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 88-92.
 [5] 汪兰, 吴文锦, 李新, 等. 复合酶解鸡骨泥工艺[J]. 食品工业, 2015, 36(7): 4-8.
 [6] 马亚萍, 白腾辉, 康壮丽, 等. 响应面法优化鸡骨蛋白酶解工艺条件[J]. 食品工业科技, 2015, 36(19): 219-223.
 [7] 张楨, 马海霞, 杨贤庆, 等. 罗非鱼下脚料酶解液脱腥去苦的研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 27-30.
 [8] 张恒, 邹应龙. 鸡骨的酶解及酶解液的电泳分析[J]. 食品与发酵工业, 2010(9): 102-105.
 [9] ALDER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food protein[M]. London, UK: Elsevier Applied Science, 1986: 110-131.
 [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.124—2016 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
 [11] 吴贵生. 试验设计与数据处理[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1997: 76-107.

(上接第 53 页)

[12] INAZU T, IWASAKI K I, FURUTA T. Effect of temperature and relative humidity on drying kinetics of fresh Japanese noodle (udon) [J]. Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie, 2002, 35(8): 649-655.
 [13] 王杰, 张影全, 刘锐, 等. 挂面干燥工艺研究及其关键参数分析[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(10): 88-93.
 [14] 武亮, 刘锐, 张波, 等. 干燥条件对挂面干燥脱水过程的影响[J]. 现代食品科技, 2015(9): 191-197.
 [15] LIU Yun-hong, SUN Yue, MIAO Shuai, et al. Drying characteristics of ultrasound assisted hot air drying of Flos Lonicerae [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(8): 4 955-4 964.

[16] SHI Qi-long, XUE Chang-hu, ZHAO Ya, et al. Drying characteristics of horse mackerel (Trachurus japonicus) dried in a heat pump dehumidifier [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 84(1): 12-20.
 [17] 李叶贝, 任广跃, 屈展平, 等. 不同粒度马铃薯全粉对复合面条品质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 55-60.
 [18] 杨玲. 甘蓝型油菜籽热风干燥传热传质特性及模型研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014: 40-51.
 [19] 孟岳成, 王君, 房升, 等. 熟化红薯热风干燥特性及数学模型适用性[J]. 农业工程学报, 2011, 27(7): 387-392.
 [20] 孟岳成, 王雷, 陈杰, 等. 姜片热风干燥模型适用性及色泽变化[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 100-105.

(上接第 83 页)

[6] FARMAKIS L, KOLIADIMA A, KARAIKAKIS G, et al. Study of the influence of surfactants on the size distribution and mass ratio of wheat starch granules by sedimentation/steric field-flow fractionation [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(6): 961-972.
 [7] 蒋明虎. 旋流分离技术研究及其应用[J]. 大庆石油学院学报, 2010, 34(5): 101-109.
 [8] 曹仲文, 袁惠新. 旋流器中分散相颗粒动力学分析[J]. 食品与机械, 2006, 22(5): 74-76, 92.
 [9] ABDOLLAHZADEH L, HABIBIAN M, ETEZAZIAN R, et al. Study of particle's shape factor, inlet velocity and feed concentra-

tion on mini-hydrocyclone classification and fishhook effect[J]. Powder Technology, 2015, 283: 294-301.
 [10] 黄圣鹏. 液-液分离旋流器数值模拟及应用研究[D]. 重庆: 后勤工程学院, 2008: 1-2.
 [11] 牛伟. 溢流管直径对旋流器分离效率影响的数值模拟[J]. 化工技术与开发, 2015, 44(1): 45-48.
 [12] 王福军. 计算流体动力学分析: CFD 软件原理与应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 132-137.
 [13] 曾兴钢, 邓松圣, 肖玉林, 等. 油-水旋流器颗粒体积分数及粒级效率数值模拟[J]. 后勤工程学院学报, 2013, 29(1): 16-20.
 [14] 俞建峰, 傅剑, 谢耀聪, 等. 淀粉分离用超重力微旋流装置分离性能研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(9): 99-103.