

酶解牦牛肉粉的制备工艺研究

谢贞建^{1,3},唐远谋²,王超³,张坤琼³,唐仁勇¹,王卫^{1,3,*}

(1.成都大学肉类加工四川省重点实验室,四川成都 610106;

2.成都大学金牛校区管委会,四川成都 610083;

3.成都大学生物产业学院,四川成都 610106)

摘要:目的:研究牦牛肉酶解工艺最佳参数,制备牦牛肉蛋白粉。方法:在单因素实验基础上,运用响应面设计对牦牛肉酶解工艺参数进行优化。结果:最佳酶解工艺为酶浓度1600IU/g、料液比1:6(g:mL)、pH9、温度55℃,水解5h。在此条件下水解度达19.01%,水解液经喷雾干燥得到香味浓郁的浅黄色粉末。结论:响应面法确定的酶解条件合理,实验验证值与预测值接近,该工艺条件可用于酶解牦牛肉粉的制备。

关键词:酶解,牦牛肉粉,水解度,响应面设计

Study on preparation of enzymatic hydrolysis Yak meat powder

XIE Zhen-jian^{1,3}, TANG Yuan-mou², WANG Chao³, ZHANG Kun-qiong³, TANG Ren-yong¹, WANG Wei^{1,3,*}

(1. Meat Processing Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610106, China;

2. Jinniu District Governing Board of Chengdu University, Chengdu 610083, China;

3. Faculty of Biotechnology Industry of Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: Object: To study the optimal conditions of enzymatic hydrolysis Yak meat and prepare the Yak meat powder. Methods: The optimal ranges of independent variables were selected on the basis of single-factor tests. Response surface methodology was adopted to evaluate the effects of reaction variables on the degree of hydrolysis. Results: The results showed that the optimal conditions for enzymatic hydrolysis were enzyme dosage 1600IU/g, the ratio of substrate to water 1:6(g:mL), the pH value 9, the reaction temperature 55℃, and reaction time of 5h. The actual degree of hydrolysis was 19.01%. The Yak meat powder was light yellow with the technology of spray drying. Conclusion: The obtained model was credible and could be used for the preparation of enzymatic hydrolysis Yak meat powder.

Key words: enzymatic hydrolysis; yak meat powder; degree of hydrolysis; response surface design

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)12-0188-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.12.032

牦牛(*Bos grunniens*),是一种生活在青藏高原的长毛的牛属动物,与北极熊、企鹅共称为“世界三大高寒动物”,具有极强的抗逆力、抗病能力、耐受性和适应性。我国是世界上拥有牦牛头数最多的国家,约占全世界的90%^[1]。《吕氏春秋》载“肉之美者,牦象之肉”,牦牛肉被誉为“牛肉之冠”,属半野生天然绿色食品,富含蛋白质和氨基酸,铁、钙等微量元素。目前人们对牦牛肉的利用还主要局限于制作牦牛肉干等肉制品,对其进行深加工还亟待加强。

酶解动物蛋白水解后生成许多小肽和氨基酸,有利于人体吸收,提高蛋白质的生物利用率,而且小肽具有许多保健功能^[2],同时也是现代肉味香精制造

的关键技术^[3]。对于水解动物蛋白制备高附加值生物产品一直受到科研工作者的关注。动物蛋白水解通过美拉德反应得到独特的风味,制造肉味香精是众多学者研究的热点^[4]。近年来,利用动物蛋白酶解制备活性多肽受到越来越多学者的关注。对乌贼^[5]、紫河车^[6]、扇贝^[7]、鲨鱼、毛虾^[8]等动物蛋白酶解液的研究显示其具有较强的抗氧化、清除自由基的功能。本文通过选择合适的酶,对牦牛肉酶解工艺进行研究,水解液经喷雾干燥制得牦牛肉粉,为牦牛肉的深加工提供新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

牦牛肉 购于四川省阿坝州;木瓜蛋白酶(1000IU/mg,批号:126928)、碱性蛋白酶(100IU/mg,批号:12122) 如吉生物科技;酸性蛋白酶(50000IU/mg,批号:01-121) 北京奥博星生物;枯草杆菌蛋白酶(1500IU/mg,批号:M0036) kayon生物;其余试剂均为国产分析纯;所用蒸馏水 无离子双蒸馏水。

AA-6800原子吸收分光光度计 日本岛津;分

收稿日期:2013-09-02 * 通讯联系人

作者简介:谢贞建(1982-),男,博士,讲师,研究方向:食品营养与安全。

基金项目:肉类加工四川省重点实验室开放基金项目(13-R12);成都大学2013年校青年基金项目(2013XJZ13);成都大学2013年创新性实验计划(CDU_CX_201301137);成都大学2013年科创杯实验项目(2013-KC-ZRKX-24)。

析天平 北京赛多利斯天平有限公司; B-290喷雾干燥设备 瑞士BUCHI mini spray dryer; TH2-C恒温振荡器 江苏太仓实验设备厂; CT14D台式离心机 天美科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 牦牛肉原料一般营养成分分析 水分采用GB 5009.3-2010《食品安全国家标准食品中水分的测定》中直接干燥法^[9]; 蛋白质采用GB 5009.5-2010《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法^[10]; 脂肪采用GB/T 9695.7-2008《肉与肉制品总脂肪含量测定》索氏抽提法^[11]; 总糖采用GB/T 9695.31-2008《肉制品 总糖含量测定》中直接滴定法^[12]; 铁、锌的测定采用原子吸收分光光度法^[13-14]。

1.2.2 酶解工艺 牦牛肉→清洗绞碎→匀浆→调节pH→加蛋白酶保温酶解→90℃水浴10min灭酶→冷却至室温→3000r/min离心10min→喷雾干燥→酶解牦牛肉粉。

1.2.3 蛋白酶的选择 选用木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶作为牦牛肉水解用酶, 各酶用量均为1000IU/g原料, 料液比1:5 (g:mL), 分别在pH6.0、10.0、3.0、7.5下55℃水解5h。

1.2.4 单因素实验设计 在pH=10, 料液比1:5 (g:mL), 55℃水解5h条件下, 测定加酶量分别为800、1000、1200、1600、2000、2400IU/g时的水解度以确定最佳酶浓度;

在pH=10, 酶浓度2000IU/g, 55℃水解5h条件下, 测定料液比分别为1:3、1:4、1:5、1:6、1:7 (g:mL) 下测定水解度以确定最佳料液比;

在酶浓度2000IU/g, 料液比1:5 (g:mL), pH=10, 55℃条件下水解1、2、3、4、5、6h, 分别测定水解度以确定最佳酶解时间;

在酶浓度2000IU/g, 料液比1:5 (g:mL), 55℃条件下水解5h, 分别测定pH为8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0时的水解度以确定最佳pH;

在酶浓度2000IU/g, 料液比1:5 (g:mL), pH=10条件下水解5h, 分别测定45、50、55、60、65℃时的水解度, 以确定最佳反应温度。

1.2.5 响应面实验设计 在单因素实验结果的基础上, 选取酶浓度、料液比、初始pH、反应温度四个因素进行四因素三水平的响应面设计, 因素水平编码见表1, 反应时间定为5h。

表1 Box-Behnken实验设计因素水平编码表
Table 1 Factors and code levels of Box-Behnken experimental design

水平	实验因素			
	A 酶浓度 (IU/g)	B 料液比 (g:mL)	C pH	D 温度 (°C)
-1	1600	1:4	9	45
0	2000	1:5	10	50
1	2400	1:6	11	55

1.2.6 分析检测 氨基酸态氮的测定: 采用甲醛电位滴定法^[15]。水解度公式如下:

$$DH(\%) = \frac{h_2 - h_1}{h_0 - h_1} \times 100$$

式中: DH—水解度, %; h_0 —样品总氮含量, g/100g;

h_1 —水解前氨基酸态氮的含量, g/100g; h_2 —水解后氨基酸态氮的含量, g/100g。

1.2.7 喷雾干燥^[16] 将酶解液在3000r/min, 10min条件下离心, 取上清液。直接加热浓缩到固形物含量在12.0%左右, 进行喷雾干燥, 进样温度为160℃, 出口温度为85℃, 蒸发容量为1.0L/h (以H₂O计)。制备出干燥的酶解牦牛肉粉, 用保鲜袋包装, 密封好, 冷冻保藏。

1.3 数据分析

响应面实验设计、数据分析及模型建立皆由Design-expert (version 7.0.0 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) 辅助完成。图表制作由GraphPad Prism 5完成。

2 结果与分析

2.1 牦牛肉原料一般成分分析

牦牛肉的一般营养成分见表2, 由表2可以看出, 牦牛肉粗蛋白含量高达23.4%, 脂肪和总糖含量较低。铁含量较高, 达34.5mg/kg, 这可能跟牦牛为适应高海拔缺氧的生活环境有关, 体内含有大量含Fe肌红蛋白以贮存O₂。锌是人体必需的微量元素之一, 在体内具有多种生理功能, 人体每日所需锌含量为12~16mg^[17], 牦牛肉含锌达39.7mg/kg, 是良好的锌补充来源。综上, 牦牛肉是一类高蛋白、低脂肪、低糖, 富含铁、锌等微量元素的优质动物蛋白原料, 符合现代营养健康理念。

表2 牦牛肉原料一般营养成分

Table 2 The common nutritional ingredient of yak meat raw material

水分 (%)	脂肪 (%)	粗蛋白 (%)	总糖 (g/kg)	铁 (mg/kg)	锌 (mg/kg)
73.5	3.8	23.4	0.02	34.5	39.7

2.2 水解蛋白酶的选择

酶解结果表明 (图1), 碱性蛋白酶的水解效果最好, 水解度达到13.02%, 确定用碱性蛋白酶作为水解用酶。

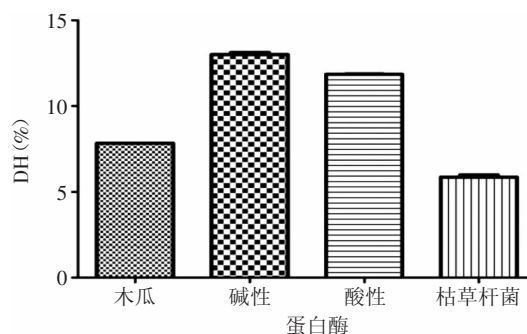


图1 水解蛋白酶的选择

Fig.1 The selection of proteinase

2.3 单因素酶解条件的选择

2.3.1 酶浓度的选择 由图2可以看出, 随着酶浓度的增加水解度呈增长的趋势, 当达到2000IU/g后有下降趋势。表明在2000IU/g的酶用量将可切割肽键

基本酶解完毕,继续增加酶用量并不能显著提高水解度。

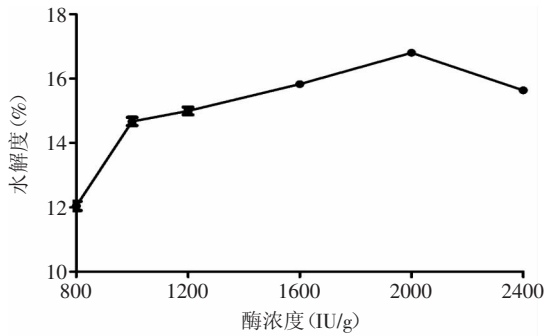


图2 酶浓度对水解度的影响

Fig.2 Effect of enzyme dosage on degree of hydrolysis

2.3.2 料液比的选择 由图3可以看出料液比在1:5 (g:mL)的时候水解度明显高于其他比例,此比例下牛肉浆流动性好,利于酶与底物的充分结合。

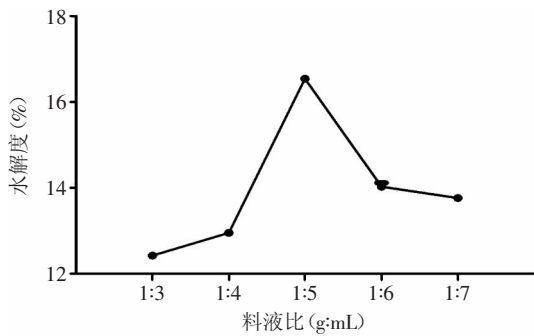


图3 料液比对水解度的影响

Fig.3 Effect of ratio of substrate to water on degree of hydrolysis

2.3.3 水解时间的选择 由图4可以看出,随着时间的增加,水解度逐渐增大,水解至5h时增长缓慢。

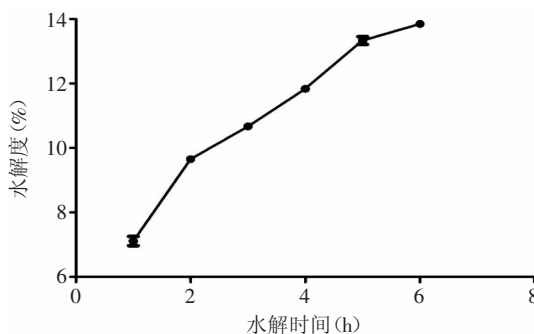


图4 水解时间对水解度的影响

Fig.4 Effect of time on degree of hydrolysis

2.3.4 pH的选择 由图5可以看出,pH对酶的影响是很大的,当pH=10时,水解度较高。

2.3.5 反应温度的选择 由图6可以发现温度对反应的影响很大,50℃以后随着温度的上升,水解度有明显下降的趋势,酶蛋白结构和活性可能受到破坏,导致水解度下降,50℃为该体系最适宜温度。

2.4 响应面设计及分析

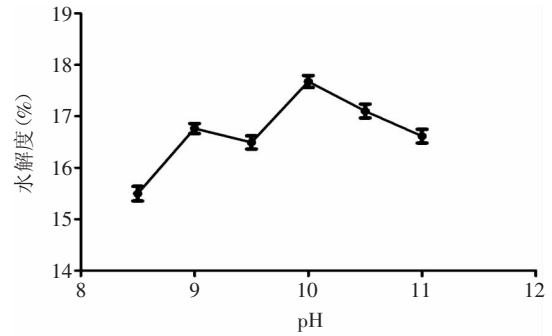


图5 pH值对水解度的影响

Fig.5 Effect of pH value on degree of hydrolysis

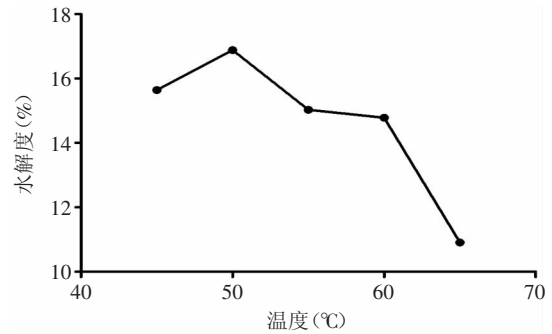


图6 温度对水解度的影响

Fig.6 Effect of temperature on degree of hydrolysis

相较于单因素实验,响应面设计可以通过较少实验次数,有效建立连续变量与指标之间的关系,同时可以考察单独变量、变量相互之间的影响^[18-19]。实验设计及结果见表3。

对表3数据进行多元回归拟合,修正得到水解度(Y)对酶浓度(A)、料液比(B)、pH(C)和温度(D)的二次多项回归模型为:

$$Y=14.22+0.093A+0.70B+0.51C+0.17D-0.70CD+1.34A^2+1.35B^2+0.97C^2+1.21D^2。$$

模型的方差分析见表4,由表4可知,回归模型的 $F=19.10$, $p<0.0001$,表明模型极显著。失拟项 $F=4.86$, $p=0.0685>0.05$,说明失拟项不显著,表明本实验无其他因素的显著影响,所选的模型是适合的。决定系数 $R^2=0.9005$,表明实测值与模型预测值之间具有良好的拟合度,模型能够很好地对实验进行预测。校正决定系数 $R^2_{adj}=0.8533$,说明该模型能说明85.33%的响应值^[20-21]。离散系数(CV)表示实验的精确度,其值越大,精确度越低,本实验 $CV=2.84\%$,在可接受范围,该模型可用于碱性蛋白酶水解牛肉水解度的分析与预测。

从表4可知,一次项B极显著、C高度显著,其余两项不显著;交互项CD项高度显著;所有的二次项均极显著。由F值可知4个因素对水解度影响大小依次为: B>C>D>A,即料液比>pH>温度>酶浓度。

回归模型中交互项CD的等高线图如图7所示,此等高线图呈椭圆形,表明初始pH(C)与反应温度(D)之间交互效应显著^[22]。沿pH轴向变化等高线变化密集,说明pH对水解度的影响比温度的影响显著,水解度对pH的变化比对温度的变化敏感。

表3 响应面实验因素水平及结果

Table 3 Factors, levels and results of Response Surface Method (RSM) analysis

实验号	A	B	C	D	水解度(%)	
					实测值	预测值
1	-1	-1	0	0	15.62	16.12
2	1	-1	0	0	16.39	16.31
3	-1	1	0	0	17.20	17.52
4	1	1	0	0	17.68	17.71
5	0	0	-1	-1	14.16	15.02
6	0	0	1	-1	17.41	17.44
7	0	0	-1	1	16.41	16.77
8	0	0	1	1	16.86	16.38
9	-1	0	0	-1	17.43	16.51
10	1	0	0	-1	16.93	16.69
11	-1	0	0	1	16.80	16.85
12	1	0	0	0	16.49	17.04
13	0	-1	-1	0	15.92	15.34
14	0	1	-1	0	16.58	16.74
15	0	-1	1	0	16.36	16.35
16	0	1	1	0	17.88	17.75
17	-1	0	-1	0	16.24	15.94
18	1	0	-1	0	16.61	16.12
19	-1	0	1	0	16.60	16.95
20	1	0	1	0	16.90	17.13
21	0	-1	0	-1	15.76	15.91
22	0	1	0	-1	17.19	17.31
23	0	-1	0	1	16.24	16.25
24	0	1	0	1	18.14	17.65
25	0	0	0	0	14.56	14.22
26	0	0	0	0	13.96	14.22
27	0	0	0	0	14.12	14.22
28	0	0	0	0	14.33	14.22
29	0	0	0	0	14.15	14.22

通过模型方程及响应面的分析,优化得到最佳酶解工艺为:酶浓度1600IU/g、料液比1:6、pH9、温度55℃,水解5h,预测在此条件下水解度达20.1%。经三次验证实验得水解度的平均值为19.01%。水解液经喷雾干燥,得浅黄色粉末。

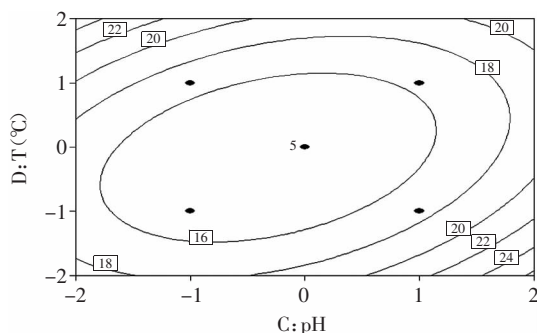


图7 温度与pH交互作用对牦牛肉水解度影响的等高线图
Fig.7 Contour plot to study the effect of temperature and pH value on the degree of hydrolysis

表4 响应面模型方差分析

Table 4 ANOVA for response surface model

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	p值	显著性
模型	9	36.63	4.07	19.10	<0.0001	***
A	1	0.10	0.10	0.48	0.4960	
B	1	5.85	5.85	27.47	<0.0001	***
C	1	3.09	3.09	14.51	0.0012	**
D	1	0.35	0.35	1.66	0.2131	
CD	1	1.96	1.96	9.20	0.0068	**
A ²	1	11.66	11.66	54.74	<0.0001	***
B ²	1	11.82	11.82	55.46	<0.0001	***
C ²	1	6.11	6.11	28.70	<0.0001	***
D ²	1	9.45	9.45	44.36	<0.0001	***
残差	19	4.04	0.21			
失拟项	15	3.83	0.26	4.86	0.0685	
纯误差	4	0.21	0.053			
总和	28	40.67				

$R^2=0.9005$ $R_{adj}^2=0.8533$ C.V.%=2.84

注:***:极显著($p<0.001$);** :高度显著($p<0.01$)。

3 结论与讨论

3.1 牦牛肉原料的一般营养成分:牦牛肉含水分73.5%、脂肪3.8%、蛋白质23.4%、总糖0.02g/kg、铁34.5mg/kg、锌39.7mg/kg,是一种高蛋白、低脂肪、低糖,富含铁、锌等微量元素的优质动物蛋白。

3.2 在单因素基础上,利用响应面设计对牦牛肉酶解工艺进行优化,建立关于水解度与酶浓度、料液比、pH、温度四个因素的回归模型,经验证实验证明该模型可行。4个因素对水解度影响大小依次为:料液比>pH>温度>酶浓度。最佳酶解工艺为:酶浓度1600IU/g、料液比1:6(g:mL)、pH9、温度55℃,水解5h,在此条件下,水解度为19.01%。

3.3 在最佳酶解工艺条件下水解后,水解液经喷雾干燥得香味浓郁的浅黄色粉末,蛋白质被分解为小分子多肽或游离氨基酸,有利于人体吸收。本文为牦牛肉资源深加工提供了新的思路。

参考文献

[1]《中国畜禽遗传资源状况》编委会. 中国畜禽遗传资源状况[M]. 北京:中国农业出版社,2004:18.
 [2] 张惠恩,金祥,王江强. 花蛤酶解工艺的研究[J]. 农产品加工·学刊,2012(10):37-39.
 [3] 孙宝国. 肉味香精的制造理念与核心技术[J]. 中国食品学报,2007,7(5):1-5.
 [4] 宋焕禄,廖国洪. 动物蛋白酶解研究(I)[J]. 食品科学,2001,22(5):21-26.
 [5] RAJAPAKSEN, MENDISE, BYUNH G, *et al.* Purification and *in vitro* anti-oxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems[J]. Nutr Biochem, 2005, 16(9):562-569.
 [6] TOGASHI S I, TAKAHASHI IN, IWAMA M, *et al.* Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract[J].

(下转第196页)

中含有HEMF。图8为未添加固定化酵母细胞的酱油挥发成气相色谱图,在HEMF标准品保留时间附近未出现峰,说明此样品中不含有HEMF。说明添加固定化的莫格球拟酵母细胞可以有效的增加酱油的香气。

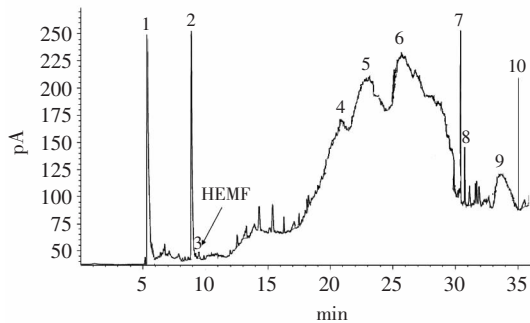


图7 添加固定化酵母细胞的酱油挥发成气相色谱图
Fig.7 GC of soy sauce evaporate by adding immobilized yeast cells

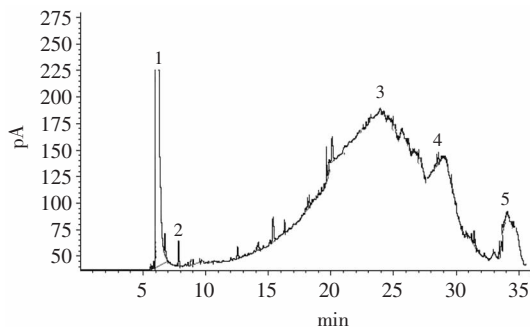


图8 未添加固定化酵母细胞的酱油挥发成气相色谱图
Fig.8 GC of soy sauce evaporate by not adding immobilized yeast cells

3 结论

将固定化细胞应用于酱油的酿造过程中,最佳条件为温度为28.5℃,食盐含量为8%,pH为6.57,还

原糖含量为3.27g/mL。通过气相色谱分析,固定化酵母细胞所发酵的酱油有HEMF生成,氨基酸态氮含量也高于未添加固定化酵母细胞的酱油,说明添加固定化酵母细胞可以有效的增加酱油的香气,提高酱油的品质。

参考文献

- [1] 鲁肇元,唐娟娟.传统工艺与酱油行业的发展[J].中国酿造,2009(11):5-10.
- [2] 李大锦,王汝珍.提高低盐固态发酵法酱油风味的实用技术(上)[J].中国调味品,2006(7):35-37.
- [3] 徐鑫煤,陈英文,沈树宝.壳聚糖固定化酶和细胞研究新进展[J].化工科技,2006,14(1):54-57.
- [4] 石小霞,褚可成,陈志梅,等.固定化细胞技术及应用[J].食品工业科技,2010,31(12):380-383.
- [5] 李超敏,韩梅,张良,等.细胞固定化技术-海藻酸钠包埋法的研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(7):1281-1282.
- [6] Kevin J Possman Verstrepn. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28:1515-1525.
- [7] 王健,冯玉杰.壳聚糖磁性微球的制备和工艺参数的优化[J].磁性材料及器材,2008,39(6):45-46.
- [8] Emir Baki Denkbaz,Ebru Kilicay,Cengiz Birlikseven. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization [J]. Reactive and Functional Polymers 2002, 50:225-232.
- [9] 王健,冯玉杰.磁性壳聚糖微球固定化酵母细胞及其用于发酵生产酒精的研究[J].化学与生物工程,2008,25(8):67-69.
- [10] Ehab T,Mansoor A. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-sell microcapsules [J]. Biomaterials, 2004, 25: 1937-1945.
- [11] Montgomery D C.实验设计与分析[M].北京:人民邮电出版社,2009:589-592.
- [12] 李云雁,胡传荣.实验设计与数据处理[M].北京:化学工业出版社,2009:82-109.
- [17] Anon G. Report on revised standard for metals in food. Appendix IV[M]. Common Wealth Government Printer, 1979:60.
- [18] SHIEH C, CHANG S W. Optimized synthesis of lipase-catalyzed hexyl acetate in n-hexane by response surface methodology[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(3):1203-1207.
- [19] KIM B H, AKOH C C. Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosteryl esters of oleic acid by response surface methodology[J]. Food Chem, 2007, 102(1):336-342.
- [20] FORDE A, FITZGERALD G F. Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavor[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11(5):484-489.
- [21] ADHIKARI K, HEYMANN H, HUFF H. Textural characteristics of low fat, full fat and smoked cheeses: sensory and instrumental approaches[J]. Food Quality and Preference, 2003, 14(3):211-218.

(上接第191页)

Placenta, 2002, 23(6):497-502.

- [7] 曾庆祝,许庆陵,林鲁萍.扇贝边酶解物抗氧化作用研究[J].中国生化药物杂志,2005,26(2):86-89.
- [8] 吴继卫,何海伦,路敬涛.海洋生物蛋白的酶解及酶解产物的抗氧化活性[J].海洋科学,2005,29(3):76-80.
- [9] GB 5009.3-2010食品安全国家标准食品中水分的测定[S].
- [10] GB 5009.5-2010食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S].
- [11] GB/T 9695.7-2008肉与肉制品总脂肪含量测定[S].
- [12] GB/T 9695.31-2008肉制品总糖含量测定[S].
- [13] GB/T 9695.3-2009肉与肉制品铁含量测定[S].
- [14] GB/T 9695.20-2008肉与肉制品锌的测定[S].
- [15] 迟原龙,文振华,崔敏,等.胶原水解度的测定[J].中国皮革,2010,39(19):13-16.
- [16] 潘兆广,陈中,林伟锋,等.鸡肉抗疲劳蛋白肽粉的制备研究[J].现代食品科技,2009,25(5):494-497.

- [17] Anon G. Report on revised standard for metals in food. Appendix IV[M]. Common Wealth Government Printer, 1979:60.
- [18] SHIEH C, CHANG S W. Optimized synthesis of lipase-catalyzed hexyl acetate in n-hexane by response surface methodology[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(3):1203-1207.
- [19] KIM B H, AKOH C C. Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosteryl esters of oleic acid by response surface methodology[J]. Food Chem, 2007, 102(1):336-342.
- [20] FORDE A, FITZGERALD G F. Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavor[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11(5):484-489.
- [21] ADHIKARI K, HEYMANN H, HUFF H. Textural characteristics of low fat, full fat and smoked cheeses: sensory and instrumental approaches[J]. Food Quality and Preference, 2003, 14(3):211-218.