

风味蛋白酶水解羊骨粉 制备胶原多肽的工艺研究

程稚玲¹,甄守艳¹,姚 薇¹,王钰慧¹,韩克光²,霍乃蕊^{2,*}

(1.山西农业大学食品科学与工程学院,山西晋中 030801;

2.山西农业大学动物科技学院,山西晋中 030801)

摘要:利用风味蛋白酶水解羊骨粉,并对4个水解指标做相关性分析。各指标之间均显著相关,与水解度的相关性依次为短肽得率(0.926) > 多肽生成量(0.805) > 氨基酸态氮(0.680)。响应面优化羊骨粉水解工艺时,以水解度为指标,得出最优水解条件,即料水比为3:25(W/V)、水解温度为55℃、水解时间为315 min、加酶量为3.48%(E/S)、pH为7.5,在此条件下水解度为20.38%,与预测值(20.72%)相比,相对误差较小,响应面法所得的优化工艺参数准确可靠,具有实用价值。

关键词:羊骨,风味蛋白酶,水解度,胶原多肽

Preparation of collagen polypeptide from sheep bone by the flavor protease

CHENG Zhi-ling¹, ZHEN Shou-yan¹, YAO Wei¹, WANG Yu-hui¹, HAN Ke-guang², HUO Nai-rui^{2,*}

(1. Shanxi Agricultural University, College of Food Science & Engineering, Jinzhong 030801, China;

2. College of Animal Science, Jinzhong 030801, China)

Abstract: Using flavourzyme enzyme solution of sheep bone meal, and the hydrolysis index correlation analysis. Results of correlation analysis indicated that 4 indicators were significantly correlated with each other. The correlation with the indicator of degree of hydrolysis was obtaining rate of short peptides (0.926) > polypeptides amount (0.805) > amino acid nitrogen (0.680). So in using response surface optimization of sheep bone enzymolysis, DH or the obtaining rate of short peptides were the first indicators to select. It was concluded that the optimal hydrolysis conditions, ratio of material to liquid was 3:25 (W/V), hydrolysis temperature for 55 °C, hydrolysis time was 315 min, added enzyme quantity was 3.48% (E/s), pH 7.5. This condition hydrolysis degree of 20.38%, the relative error was less than the predicted value (20.72%), and the optimized parameters obtained by the response surface method were accurate and reliable, which had practical value.

Key words: sheep bone; flavor protease; degree of hydrolyzing; collagen polypeptides

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)14-0214-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.14.035

骨中钙和磷相对含量较高且比例适合人体吸收^[1],胶原蛋白是骨中含量最多的物质,可以促进皮下细胞新陈代谢,延缓机体衰老^[2]。目前人们对骨中有价值成分还未能充分利用,尚处于起步阶段^[3]。

酶解是目前生产活性肽的主要方法,具有效率高、反应条件温和、几乎不破坏氨基酸结构、安全无污染等优点^[4]。实验室前期研究结果表明碱性蛋白酶、复合蛋白酶和风味蛋白酶是对羊骨粉水解效果最好的3种酶,优于木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶和胃蛋白酶。

风味蛋白酶是一种微酸性或中性条件下能水解蛋白质的蛋白酶,可脱除低水解度产物的苦味,改善水解物的风味^[5]。目前针对畜骨的水解多利用碱性蛋白酶。陈新峰^[6]等以水解度为指标,用正交实验优化风味蛋白酶水解猪皮提取胶原蛋白的工艺,但没有考虑氨基酸态氮含量、多肽生成量、短肽得率与水解度之间的关系。本文以水解度、氨基酸态氮含量、多肽生成量和短肽得率为指标,分析它们之间的相关性,并以水解度为响应值,通过响应面法获得回归模型并优化水解工艺,以期提高羊骨蛋白利用率,具

收稿日期: 2015-11-09

作者简介:程稚玲(1990-),女,在读硕士研究生,研究方向:食品生物技术,E-mail:chengzhiling111@163.com。

*通讯作者:霍乃蕊(1972-),女,博士,教授,主要从事生物技术与食品安全方面的研究,E-mail:tgnrhao@163.com。

基金项目:国家自然科学基金(31201347);山西省回国留学人员项目(2014-042)。

有实际应用价值和广阔的发展前景。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜羊骨 购于山西太谷县屠宰场,实验室 -20 ℃ 贮存;风味蛋白酶(酶活 ≥ 20 U/mg) 厂家: Solarbio; 甲醛、三乙醇胺、铬黑 T、对苯二甲醛(OPA)、三氯乙酸、氢氧化钠、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、福林酚 均为分析纯。

722G 型可见分光光度计 上海精密仪器有限公司; 高速万能粉碎机 广州雷迈机械; 802 型索式抽提器 天津市玻璃仪器厂; Neofuge23R 型台式高速冷冻离心机 上海力申科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 骨粉制备工艺流程 羊骨 121 ℃ 高压蒸煮 30 min → 脱脂(室温, 无水乙醇脱脂 24 h) → 真空冷冻干燥(-25 ℃ 预冻, 工作压力 85~95 Pa, 升华温度 50~55 ℃) → 粉碎 → 过 80 目筛 → 骨粉

1.2.2 骨粉水解工艺 羊骨粉 → 骨泥 → 杀菌(90 ℃, 15 min) → 调 pH → 加酶 → 酶解 → 灭酶 → 冷却 → 离心(5000 r/min, 15 min) → 取上清液 → 指标测定

1.2.3 指标与测定方法 氨基酸态氮测定采用中性甲醛滴定法^[7]; 水解度测定采用邻苯二甲醛法^[8]; TCA 可溶性总氮含量采用福林-酚法^[9]测定; 多肽生成量按 $N = (N_{TCA} - N_{AA}) \times 6.25$, $W = N/G$ 计算^[10], 式中 N 为多肽生成总质量(mg), N_{TCA} 为 TCA 可溶性总氮含量(mg), N_{AA} 为游离氨基酸态氮含量(mg), W 为多肽生成量(mg/g), G 为骨粉的质量(g); 短肽得率按^[11] $TCA-NSI(\%) = \frac{N_1}{N_2} \times 100$ 计算, 式中 TCA-NSI

表示三氯乙酸可溶性氮得率(%), N_1 表示 15% TCA 中可溶性总氮含量(mg), N_2 为骨粉中总氮(mg)。

1.2.4 单因素实验

1.2.4.1 料水比对羊骨粉水解效果的影响 分别称取 4、6、8、10、12 g 羊骨粉与 100 mL 的蒸馏水混合, pH6.5, 酶添加量为 4%, 50 ℃ 酶解 5 h 后, 高温加热灭酶 15 min 终止反应, 5000 r/min 离心 15 min, 取上清液测定水解度、氨基酸态氮含量、多肽生成量、短肽得率。

1.2.4.2 pH 对羊骨粉水解效果的影响 在确定料水比 1:10 的基础上, 依次调节 pH6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 酶添加量为 4%, 50 ℃ 酶解 5 h 后, 高温加热终止反应, 离心, 取上清液测定骨蛋白的水解度、氨基酸态氮含量、多肽生成量、短肽得率。

1.2.4.3 温度对羊骨粉水解效果的影响 在确定料水比 1:10、pH7.5 的基础上, 酶添加量为 4%, 依次调节水解温度 40、45、50、55 ℃, 酶解 5 h 后, 高温加热终止反应, 离心, 取上清液测定骨蛋白的水解度、氨基酸态氮含量、多肽生成量、短肽得率。

1.2.4.4 酶添加量对羊骨粉水解效果的影响 在确定料水比 1:10、pH7.5、温度 50 ℃ 的基础上, 依次调节酶添加量 E/S 为 2%、3%、4%、5%, 酶解 5 h 后, 高温加热终止反应, 离心, 取上清液测定骨蛋白的水解度、氨基酸态氮含量、多肽生成量、短肽得率。

1.2.4.5 水解时间对羊骨粉水解效果的影响 在确定料水比 1:10、pH7.5、温度 50 ℃、酶添加量 4% 的基础上, 依次调节水解时间为 3、4、5、6 h, 高温加热终止反应, 离心, 取上清液测定骨蛋白的水解度、氨基酸态氮含量、多肽生成量、短肽得率。

1.2.5 响应面实验 在单因素的基础上, 以水解度为响应值, 运用 Design-Expert 软件, 对水解条件进行优化, 实验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面实验因素水平

水平	因素			
	A 料水比	B 温度(℃)	C 水解时间(h)	D 加酶量(%)
-1	2:25	45	4	3
0	1:10	50	5	4
+1	3:25	55	6	5

1.3 数据处理

采用 SigmaPlot 10 软件进行单因素分析、采用 IBM SPSS statistics v 21.0 软件对水解程度各指标间相关性进行分析、Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 料水比对骨粉水解指标的影响 由图 1 可知, 水解度、多肽生成量、短肽生成量、氨基酸态氮含量均随料水比的增大呈先增大后降低的趋势, 料水比为 1:10 时达到最大值, 之后随着料水比的增大, 呈缓慢下降趋势。因为底物浓度较低的时候, 反应速度随着底物浓度增大而增大, 当底物浓度达到一定值后, 随着产物浓度的升高, 会抑制酶的活性, 水解反应逐步趋于平衡。所以实验选择料水比 1:10。

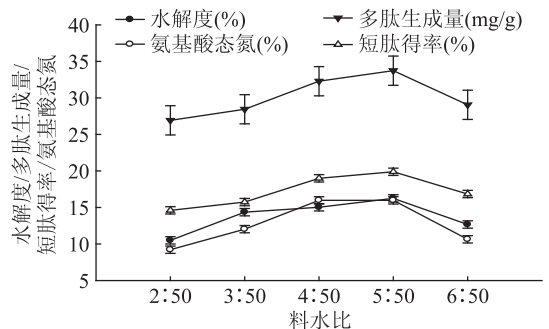


图 1 料水比对骨粉水解指标的影响
Fig.1 Effect of the amount bone powder on the hydrolysis related indices

2.1.2 pH 对骨粉水解指标的影响 由图 2 可知, 水解度、多肽生成量、短肽生成量、氨基酸态氮含量均先随着 pH 的增大而升高, 在 pH7.5 的时候水解度达到最大, 多肽生成量和短肽生成量在 pH7 的时候达到最大, 随后便开始出现明显的下降趋势。随着反应的进行, 水解产物会改变体系的 pH, pH 的变化会影响酶的活性, 当 pH 升高至一定水平时, 酶的活性降低, 酶解率也随之降低。

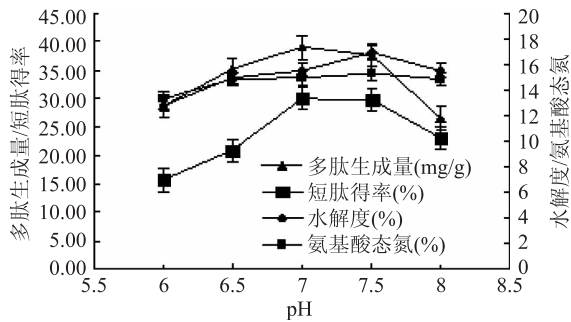


图2 pH对骨粉水解指标的影响

Fig.2 Effect of pH value on the hydrolysis related indices

2.1.3 温度对骨粉水解指标的影响 由图3可知,不同的酶解温度得到的水解度也不相同,50℃时水解度达到最高,水解度、多肽生成量、短肽生成量、氨基酸态氮含量随温度的升高呈先上升后下降的趋势。在一定范围内随温度升高,反应速度会加快,超过一定温度后,会使蛋白酶活性降低甚至丧失活性,从而影响反应速度。

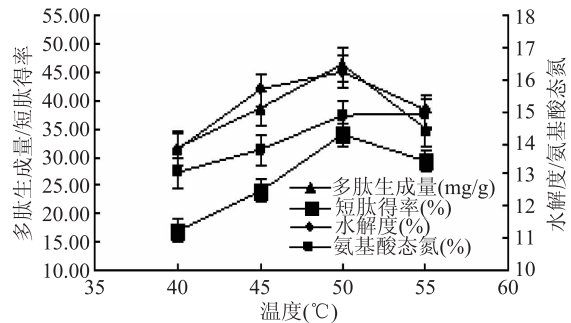


图3 温度对骨粉水解指标的影响

Fig.3 Effect of temperature on the hydrolysis related indices

2.1.4 加酶量对骨粉水解指标的影响 由图4可知,在加酶量小于4%时,随着加酶量的增加,水解度随着增加,当加酶量到达4%时,水解度的增加趋于平缓,这是由于随着加酶量的增加,酶浓度抑制了酶解反应的进行。在水解度上升的同时,多肽生成量、短肽生成量、氨基酸态氮含量也在不断上升,从经济角度来看,选加酶量为4%较佳。

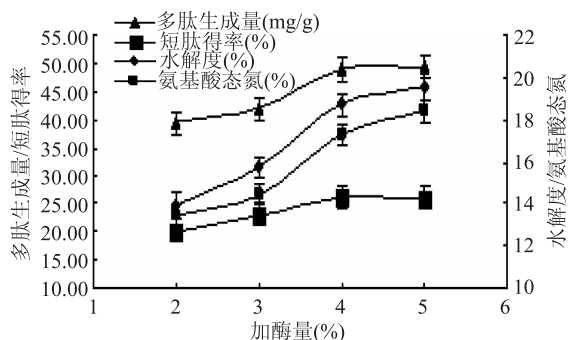


图4 加酶量对骨粉水解指标的影响

Fig.4 Effect of the amount of enzyme added on the hydrolysis related indices

2.1.5 时间对骨粉水解指标的影响 由图5可知,5h时,水解度、多肽生成量、短肽生成量、氨基酸态氮均达到最大值,随反应的进行有下降趋势。这是

因为酶的催化速度会受到产物的影响,反应初期,产物的抑制作用小,随着时间的延长,酶活力逐渐下降,游离的小肽和氨基酸增多,产物的抑制作用增加。因此选择5h为最佳酶解时间。

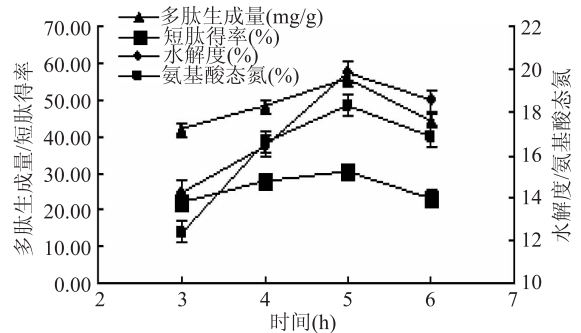


图5 时间对骨粉水解指标的影响

Fig.5 Effect of time on the hydrolysis related indices

2.2 各指标相关性分析

蛋白质水解过程的水解度(DH)、短肽得率、游离氨基酸态氮等参数,是相互关联的,它们分别从不同的方面反映了蛋白质的水解度。随着水解的进行,蛋白质肽链断裂,游离氨基酸逐渐增多,即游离氨基中氮元素占总氮元素的比值不断变化,因此选用水解度作为主要的实验指标^[12]。本文采用IBM SPSS statistics v 21.0软件对水解程度各指标间相关性进行分析,得出各指标之间的相关性均极显著($p < 0.01$),说明它们均可判断水解程度。其中短肽得率和水解度之间的相关性最强, $r = 0.926$,因此可用这两个指标进行响应面实验对水解条件进行进一步优化。

表2 4个指标间的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of 4 indicators

风味蛋白酶	水解度	短肽得率	多肽生成量	氨基酸态氮
水解度	1	0.926**	0.805**	0.680**
短肽得率	0.926**	1	0.718**	0.637**
多肽生成量	0.805**	0.718**	1	0.716**
氨基酸态氮	0.680**	0.637**	0.716**	1

注:**表示在0.01水平上显著($p < 0.01$)。

2.3 响应面实验

响应面法的实验设计及结果见表3。运用Minitab 16数据统计分析软件对实验数据进行多元回归拟合,回归模型系数及显著性检验结果见表3。

得到料水比(A)、水解温度(B)、水解时间(C)、加酶量(D)与水解度(Y)的二次多项回归模型为:

$$Y = 19.30 + 1.40A + 2.11B + 0.21C + 0.88D - 0.45AB + 2.22AC - 0.055AD - 0.10BC - 1.63BD + 0.10CD - 0.99A^2 - 1.26B^2 - 3.71C^2 - 0.74D^2$$

回归模型的相关系数 $R^2 = 0.9889$,表明响应值的实际值与预测值之间有很好的拟合度,可以较好的反映响应变量与水解度之间的关系;模型调整相关系数 $R_{adj}^2 = 0.9745$,表明模型可以说明97.45%的响应值变化。模型极显著($p < 0.01$),表明回归模型具有显著性;失拟项不显著($p > 0.05$),故可用此

表3 风味蛋白酶水解羊骨粉条件优化实验设计与结果

Table 3 Design and results of RSM tests on hydrolysis conditions of sheep bon collagen with flavourzyme

实验号	A	B	C	D	水解度 (%)	实验号	A	B	C	D	水解度 (%)
1	0	-1	-1	0	11.37	16	0	0	-1	-1	15.57
2	-1	0	-1	0	14.50	17	0	0	0	0	17.46
3	0	1	-1	0	16.60	18	0	0	-1	1	14.44
4	0	0	0	0	19.90	19	1	0	-1	0	13.78
5	-1	-1	0	0	13.47	20	0	0	0	0	20.32
6	0	-1	0	-1	11.96	21	1	-1	0	0	17.44
7	0	0	1	1	16.05	22	-1	0	0	-1	15.10
8	1	0	0	1	18.65	23	0	0	1	-1	16.77
9	0	-1	1	0	10.98	24	0	1	0	-1	17.91
10	0	-1	0	1	19.50	25	-1	0	0	1	17.11
11	-1	0	1	0	10.54	26	1	0	1	0	18.68
12	0	1	0	1	18.94	27	-1	1	0	0	19.30
13	0	1	1	0	15.80	28	0	0	0	0	20.02
14	1	0	0	-1	16.86	29	0	0	0	0	18.78
15	1	1	0	0	21.46						

表4 回归方程的方差分析

Table 4 Variance analysis of the regression equation

方差来源	平方和	自由度	均分	F 值	p	显著性
模型	209.62	14	14.97	5.74	0.0012	**
A	23.66	1	23.66	9.07	0.0093	**
B	53.30	1	53.30	20.44	0.0005	**
C	0.55	1	0.55	0.21	0.6543	
D	9.22	1	9.22	3.54	0.0810	
AB	0.82	1	0.82	0.31	0.5841	
AC	19.62	1	19.62	7.52	0.0159	*
AD	0.012	1	0.012	4.639E-003	0.9467	
BC	0.042	1	0.042	0.016	0.9008	
BD	10.60	1	10.60	4.06	0.0635	
CD	0.042	1	0.042	0.016	0.9008	
A ²	6.31	1	6.31	2.42	0.1423	
B ²	10.23	1	10.23	3.92	0.0676	
C ²	89.38	1	89.38	34.27	<0.0001	**
D ²	3.55	1	3.55	1.36	0.2629	
残差	36.51	14	2.61			
失拟值	30.94	10	3.09	2.22	0.2298	
纯误差	5.57	4	1.39			
总和	246.13	28				

注: ** , $p < 0.01$; * , $p < 0.05$ 。

模型来分析和预测酶水解羊骨粉制备骨多肽的工艺结果。

由表4 回归模型系数显著性检验结果可知,模型的一次项 A、B 和二次项 C² 极显著及交互项 AC 显著,其他项不显著,表明各因素对于水解度的影响不是简单的线性关系。

2.4 响应面图分析

通过上述二次项回归方程所作的料水比与水解时间的响应面图见图6。

通过等高线形状得出,料水比和水解时间的交互作用显著。从图6 可以看出,水解度随着料水比增加和水解时间的延长先增后降。由于底物浓度较

低时,酶催化反应的速度与底物浓度成正比,当底物浓度达到一定值后,酶被底物饱和,因此反应速度逐步趋于平衡。

2.5 工艺参数优化及验证实验

2.5.1 数学模型的优化 利用 Design-Expert 8.0.6 软件寻优,得到风味蛋白酶最优水解条件为料水比 2.88:25 (W/V)、水解温度 55 °C、水解时间 313.8 min、加酶量 3.48%,此条件下预测水解度 20.72%。

2.5.2 验证实验 考虑到实际操作,将风味蛋白酶水解工艺调整为:料水比为 3:25 (W/V)、水解温度为 55 °C、水解时间为 315 min、加酶量为 3.48% (E/S)、pH7.5,在此条件下实际水解度为 20.38%,与

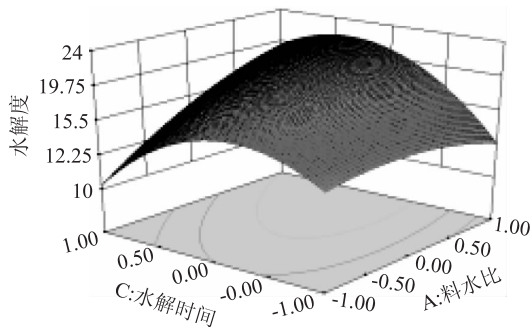


图6 料水比、水解时间及其交互作用对水解度影响的响应面图

Fig.6 Response surface plot for effects of liquid-solid ration enzymolysis time and their mutual interaction on the degree of hydrolysis

预测值相比,相对误差较小。相对于林波等^[13]通过正交实验确定最佳工艺,本文选用的响应面法在各因素对水解度影响程度及显著性的分析上都具有优势^[14]。因此,基于响应面法所得的优化工艺参数准确可靠,具有实用价值。

3 结论

4个水解指标(水解度、短肽得率、氨基酸态氮、多肽生成量)之间均显著相关,其中短肽得率和水解度相关性最强。通过响应面优化实验得出最佳水解工艺条件为:料水比为3:25(W/V)、水解温度为55℃、水解时间为315min、加酶量为3.48%(E/S)、pH7.5,水解度为20.38%。

参考文献

[1] 吴敏,尹彦洋,罗爱平,等.双酶分步水解牛骨蛋白工艺的

优化[J].食品科学,2009,30(20):223-226.

[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] 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.

[4] 甄守艳.羊骨胶原肽的酶法制备及肽钙整合研究[D].晋中:山西农业大学,2015.

[5] 肖明礼,杨庆,林锐峰,等.风味蛋白酶提升烟叶抽吸品质的研究[J].浙江农业学报,2014,26(1):181-185.

[6] 陈新峰,张治国,王君虹,等.风味蛋白酶水解畜产胶原蛋白的工艺[J].浙江农业科学,2011(2):352-354.

[7] 史智佳,成晓瑜,陈文华,等.牛骨蛋白酶解制备呈味肽工艺优化[J].肉类研究,2010(2):37-38.

[8] 林虬,黄薇,宋永康,等.棉籽蛋白水解物水解度3种测定方法的比较[J].福建农业学报,2011,26(6):1077-1080.

[9] Kamarudin MS, Jones DA, VayLL, et al. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of macrobrachium rosenberii [J]. Aquaculture, 1994 (123): 320-324.

[10] 李珂,杨秀华,扈麟,等.响应曲面法骨胶原蛋白酶解条件的优化[J].食品科学,2001,30(7):136-140.

[11] 王玉霞,张得权,饶伟丽,等.鸡骨蛋白肽酶解工艺参数优化[J].食品研究与开发,2011,32(10):16-19.

[12] 张杰.骨素精粉的制备及其补钙效果的研究[D].长春:吉林大学,2011.

[13] 林波,于秀玲,王欣,等.双酶酶解制备羊骨多肽工艺研究[J].食品科技,2014,39(10):147-150.

[14] 张峯,王卫,张佳敏,等.响应面法和正交实验对骨素酶解工艺优化的比较[J].食品研究与开发,2012,33(7):53-56.

(上接第209页)

[15] 梁璋成,何志刚,任香芸,等.MLF植物乳杆菌R23培养基优化[J].福建农业学报,2009,24(6):570-574.

[16] Jurado - Gámez H, Ramírez C, Aguirre D. Fermentation kinetics of *Lactobacillus plantarum* at a rich culture medium as a potential probiotic [J]. Veterinariay Zootecnia, 2013, 7 (2):

37-53.

[17] 贡汉生.植物乳杆菌KLDS 1.0391所产细菌素的分离纯化与部分特性[D].哈尔滨:东北农业大学,2009.

[18] 李二卫.食品卫生微生物学检验菌落总数测定方法的探讨[J].中国卫生检验杂志,2010(8):1940-1941.

(上接第213页)

[14] Kim S G, Choi A, Ahn C Y, et al. Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular floatation and growth stage determination [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 40(3): 190-194.

[15] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学(下册)[M].第三版.北京:高等教育出版社,2002:201-202.

[16] 张静,韦玉春,王国祥,等.太湖水体中藻蓝蛋白的紫外-可见吸收光谱特征分析[J].光谱学与光谱分析,2014,34(5):1297-1301.

[17] 尹兴娟,唐建国,刘继究,等.藻蓝素的提取及其光学性质研究[J].应用化工,2010,39(4):484-490.

[18] 周昌芳,吴国荣,陆长梅,等.铅污染对钝顶螺旋藻生长及其某些生理性状的影响[J].湖泊科学,1999,11(2):135-140.

[19] 于小华,刘晓华,李纯球,等. β -胡萝卜素口服液的稳定性研究[J].海峡药学,2009,21(8):23-25.

[20] Britton G. UV/visibles PeetroseoPy [M]. Blrkhsr, 1995.

[21] 高德江.蛋白质的光谱法研究[D].长春:吉林大学,2008:124.

[22] 张学成,薛命雄.我国螺旋藻产业的现状和发展潜力[J].生物产业技术,2012,2(3):47-53.