

鸡肉蛋白热处理与酶解特性的关系研究

赵谋明, 周雪松, 林伟锋, 王 炜

(华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640)

摘要: 为阐明酶解前热处理对鸡肉蛋白酶解性质的影响, 采用差示扫描量热法分析鸡肉蛋白的热性质, 研究热处理温度对鸡肉蛋白巯基(SH)、二硫键(S-S)含量以及碱性蛋白酶(Alcalase)、木瓜蛋白酶(Papain)酶解过程中氨基酸、肽释放的影响。结果表明: 鸡肉蛋白有 4 个吸热峰, 对应温度为 63.7℃、67.6℃、74.3℃和 77.9℃; 热处理温度增加, 鸡肉蛋白中 SH 含量逐渐降低, 而 S-S 含量逐渐增加, 游离 SH 与 S-S 还原折算的 SH 量之和在 80℃前无明显变化, 80℃后下降; 酶解前热处理不利于鸡肉蛋白酶解过程中游离氨基酸、小分子量肽的释放和可溶性氮的回收, 但有利于大分子量肽的生成, 因此可根据酶解产物的应用目的选择热处理参数。

关键词: 鸡肉蛋白; 热处理; 酶解; 巯基; 二硫键

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2006)06-0169-04

赵谋明, 周雪松, 林伟锋, 等. 鸡肉蛋白热处理与酶解特性的关系研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(6): 169-172.

Zhao Mouming, Zhou Xuesong, Lin Weifeng, et al. Effect of heating treatment on the properties of enzymatic hydrolysis of chicken protein[J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(6): 169-172. (in Chinese with English abstract)

0 引言

发展鸡肉深加工是鸡肉加工业的必然趋势^[1], 采用酶解技术将鸡肉蛋白改造成食品工业的营养基料、调味基料和功能基料是提高其附加值的有效途径之一。影响蛋白质酶解的因素很多, 目前国内外对鸡肉蛋白酶解的研究主要集中在水解工艺条件(包括酶的选择及用量、温度、pH 值、离子强度、固液比、搅拌速度以及水解时间等)的摸索方面, 如曹东旭等以水解度为指标筛选出鸡肉水解的较优单酶是胰蛋白酶、木瓜蛋白酶, 较优双酶是胰蛋白酶与酸性蛋白酶的组^[2]; 谢永洪等确定了木瓜蛋白酶酶解鸡肉的优化条件^[3]; Fonkwe 等采用中性蛋白酶(Neutrase)、木瓜蛋白酶(Papain)酶解鸡肉分割副产品一碎肉, 研究其蛋白回收率及酶解产物的加工功能性^[4]。相对而言, 对蛋白质酶解的内在影响因素(如蛋白质的组成结构特性、变性时空间结构改变、变性形成的聚集体结构与状态等)的研究却很少。同一蛋白在不同的变性条件下以及不同蛋白在同一变性条件下其变性程度差异也很大, 这也是导致酶解后产物复杂多样、易变的重要原因之一。变性对蛋白质结构的影响在植物蛋白(如大豆、小麦蛋白)、海洋生物蛋白(如鱼类蛋白)以及酪蛋白等方面已有研究^[5-7], 而鸡肉以及其他禽类蛋白的变性过程以及变性蛋白的最终结构对酶解特性的影响研究尚未见报道。本文以鸡肉蛋白为研究对象, 分析其热性质, 研究热处理对其结构性质(主要考察巯基和二硫键含量)以及酶解性质影响, 为建立酶解技术在鸡肉深加工中应用的合理工艺提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验原料

鸡胸肉(白鸡, 2 月龄)购于广州市五山胜佳超市(冻藏), 切碎、绞成肉糜(2 次), 装袋, 置于-18℃冰箱中冷冻, 试验前从冰箱中取出在流动的自来水中缓化解冻, 备用。碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L 由丹麦诺维信公司提供, 木瓜蛋白酶 Papain 由广州裕立宝国际有限公司提供。

1.2 主要仪器及试剂

DSC-2C 型 ERKIN-ELMER 热分析仪(美国 Perkin-Elmer 公司); Sartorius BP211D 分析天平($d=0.01$ mg, 德国 Sartorius 公司); DS-1 高速组织捣碎机(上海标本模型厂); GL-21M 高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); UV-754 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); SHA-C 水浴恒温振荡器(江苏金坛市恒农仪器厂); KDN-2C 型定氮仪(上海纤检仪器有限公司)。

三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、乙二胺四乙酸二钠、5,5'-二硫双-2-硝基苯甲酸(DTNB)、尿素、 β -巯基乙醇、三氯乙酸。

1.3 试验方法

1.3.1 鸡肉蛋白差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)分析

取解冻后的鸡肉 15.37 mg 装入样品池, 密封后放入仪器中。用蒸馏水作为参比物, 保护气体为氮气, 升温速率为 10℃/min。通过 Thermal analysis system 软件进行数据记录和处理得到 DSC 曲线, 获得变性温度和变性热焓值。

1.3.2 鸡肉蛋白中巯基/二硫键(SH/S-S)含量分析

参照 Beveridge 等分析方法^[8]。

1.3.3 酶解产物中氮含量测定方法

可溶性氮含量测定采用微量凯氏定氮法^[9]; 氨基氮

收稿日期: 2005-08-01 修订日期: 2006-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20276022); 广东省科技计划项目(2004A20302003)

作者简介: 赵谋明(1964-), 男, 湖南安化人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事蛋白质化学与工程、食品生物技术研究。广州 华南理工大学轻工与食品学院, 510640。Email: femmzhao@scut.edu.cn

含量测定采用甲醛滴定法^[10]; 肽基氮含量为可溶性氮含量与氨基氮含量之差。

1.3.4 肽分子量分布分析

采用凝胶色谱法。色谱条件如下: Amersham 蛋白质分析纯化系统, Superdex_peptide_10/300_GL 玻璃柱, 洗脱液为 0.25 mol/L NaCl, pH 7.2 磷酸盐缓冲液, 流速 0.5 mL/min。标准肽样品为 Globin III(分子量为 2512), Globin II(分子量为 6214), Globin I(分子量为 8519), Globin I + III(分子量为 10700), Globin I + II(分子量为 14404), Globin(分子量为 16949), 由 Amersham 公司提供。标准肽样品与洗脱体积拟合直线方程为

$$y = -0.0578x + 4.6289 \quad (R^2 = 0.99)$$

式中 y ——标准肽分子量的对数; x ——洗脱体积。

1.3.5 鸡肉热处理及酶解方法

取鸡肉糜 50 g, 加 100 g 蒸馏水匀浆 1 min, 直接酶解或分别在 60°C、70°C、80°C、90°C、100°C 加热 20 min 后冷却到各酶作用温度, 然后按照各酶作用条件酶解, 酶解过程中保证恒温搅拌, 酶解 10 h 后将酶解液于沸水中灭酶 20 min, 离心(4800 r/min, 20 min) 过滤, 所得滤液为酶解产物。酶解产物定容至 200 mL 用于分析。

各酶作用条件如下: 碱性蛋白酶: pH 值 8.0, 温度 50°C, 加酶量为鸡肉蛋白质量的 7.0%, 肉水比 1:2 (w/v); 木瓜蛋白酶: pH 值 7.0, 温度 55°C, 加酶量为鸡肉蛋白质量的 7.0%, 肉水比 1:2 (w/v)。

2 结果与分析

2.1 鸡肉蛋白 DSC 分析

鸡肉蛋白的 DSC 分析结果见图 1。

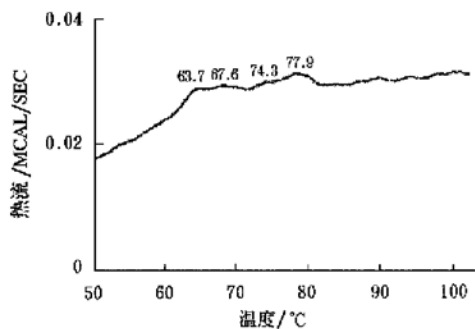


图 1 鸡肉蛋白 DSC 分析

Fig. 1 DSC analysis of chicken protein

由图 1 可见, 鸡肉蛋白热分析图谱中有 4 个吸热峰, 对应温度分别为 63.7°C、67.6°C、74.3°C、77.9°C, 软件计算变性热焓为 14.9 J/g。Kijowski 等采用 DSC 法研究鸡胸肉热特性, 获得的 DSC 图谱中显示有 5 个吸热峰, 其对应的温度分别是 57°C、63°C、67°C、73°C、78°C, 变性热焓为 15.1 J/g, 进一步分离蛋白组分研究其热曲线表明鸡胸肉的热变性值与肌球蛋白、肌浆蛋白、胶原蛋白和 F-肌动蛋白变性值相对应^[11], 这一结果与本文 DSC 图谱结果类似, 存在的差异可能是鸡肉品种或年龄等方面因素导致。

2.2 热处理温度对鸡肉蛋白中巯基/二硫键含量影响

鸡肉蛋白经不同温度热处理 20 min 后, 分析其 SH、S-S 以及总 SH 含量(游离 SH 和 S-S 还原折算的 SH 量之和), 结果见图 2。

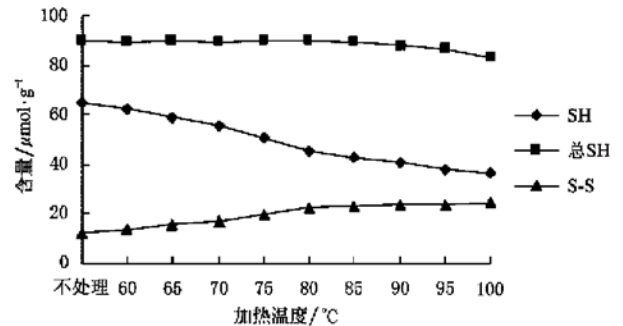


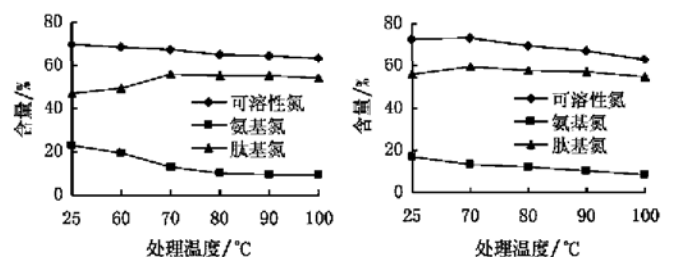
图 2 热处理温度对鸡肉蛋白中 SH、S-S 及总 SH 含量影响

Fig. 2 Effect of heating temperature on the content of SH, S-S and total SH in chicken protein

由图 2 可见, 鸡肉蛋白初始 SH 含量为 65.06 $\mu\text{mol/g}$, 而 S-S 含量为 12.29 $\mu\text{mol/g}$, 可见鸡肉蛋白中硫主要以 SH 存在。随着热处理温度的增加, 鸡肉蛋白中 SH 含量逐渐降低, 100°C 处理 20 min 后 SH 含量减少 44%, 而 S-S 含量逐渐增加, 由原料蛋白中 12.29 $\mu\text{mol/g}$ 增至 24.11 $\mu\text{mol/g}$, 约增加 1 倍, 这是由于鸡肉蛋白中 SH 氧化生成 S-S。鸡肉蛋白中总 SH 含量在 80°C 前没有明显变化, 80~90°C 间略有下降, 90°C 后下降显著, 这是因为高温下鸡肉蛋白急剧变性, 产生一些挥发性的硫化物(包括硫化氢等), 导致蛋白中总 SH 含量减少。Opstvedt, Synowiecki 等研究热处理对太平洋鲑鱼、阿拉斯加鳕鱼、格陵兰海豹肉中 SH、S-S 含量的影响, 获得的 SH、S-S 含量变化规律与本文研究结果类似, 但总 SH 含量规律略有差异, 两种鱼在温度超过 95°C(加热 20 min)后, 总 SH 含量明显下降^[6], 而海豹肉经 99°C 处理 40 min 后其总 SH 含量仍无明显变化^[12]。可见热处理对蛋白中 SH、S-S 含量影响不仅取决于热处理条件, 还与蛋白质本身的结构特性有关。

2.3 热处理温度对酶解产物中氮存在形式的影响

鸡肉蛋白热处理后, 分析 Alcalase、Papain 酶解产物中可溶性氮、氨基氮以及肽基氮含量, 结果见图 3。



a. 鸡肉蛋白Alcalase酶解产物

b. 鸡肉蛋白Papain酶解产物

图 3 热处理温度对鸡肉蛋白酶解产物中氮存在形式的影响

Fig. 3 Effect of heating temperature on N-forms in chicken protein hydrolysates

由图 3 可以发现, 除 70℃ 处理后的 Papain 酶解产物中可溶性氮含量略高于未经热处理(常温 25℃)的鸡肉蛋白酶解产物外, 其它经热处理后的酶解产物中可溶性氮、氨基氮含量均低于未经热处理的鸡肉蛋白酶解产物, 且随着热处理温度的增加, 鸡肉蛋白各酶水解产物中可溶性氮、氨基氮含量呈降低趋势, 即热变性温度愈高, 鸡肉蛋白消化率愈低, 温度超过 70℃ 后这种趋势更为明显。传统观点认为蛋白质分子致密的立体结构有碍于蛋白酶与底物的结合, 热处理使其成为松散的结构, 暴露原来包埋于内部的作用位点, 从而加快水解速率^[13]。本试验结果与这一观点不一致, 其主要原因是蛋白质热变性对其结构影响存在两个方面: 一是引起活性基团暴露, 增加蛋白质与酶之间的交互作用; 二是因疏水相互作用或 SH 氧化生成 S-S 导致致密的网状结构形成, 酶催化的位点反而被包埋, 因此热处理对蛋白酶解性质的影响是变性引起肽键的暴露与聚合引起肽键的掩蔽的综合作用的结果。动物蛋白(肌球蛋白、肌动蛋白)富含 SH 基, 热处理往往导致 SH 基破坏, 形成更稳定的 S-S 键, 阻碍了水解酶的攻击, 引起蛋白消化性下降^[14]。Opstvedt 等研究发现以热烘干的太平洋鲑鱼、阿拉斯加鳕鱼饲喂虹鳟鱼, 其蛋白、氨基酸消化性与新鲜原料相比降低^[6]; 段振华等也发现热处理鳙鱼蛋白不利于酶解^[15]; 这些研究与本试验结论一致。两种酶水解产物中肽含量均在 70℃ 时达到最大值, 同样的热处理条件后不同的酶解产物中可溶性氮、氨基氮、肽基氮含量不同, 其变化规律也不同, 这与各酶的作用特性有关。

2.4 热处理温度对酶解产物中肽分布影响

鸡肉蛋白热处理后, 分析 Alcalase、Papain 酶解产物中肽分子量分布, 热处理温度对酶解产物中肽分子量

分布影响见图 4, 其中纵坐标表示酶解产物中各肽在波长 $\lambda = 214 \text{ nm}$ 处的吸光值; 不同温度热处理后酶解产物中各肽段占总肽量的比值见表 1、表 2。

表 1 热处理温度对鸡肉蛋白 Alcalase 酶解产物中不同分子量的肽含量影响

Table 1 Effect of heating temperature on the content of peptide with different molecular weight in chicken protein-alcalase hydrolysates %

热处理温度/℃	分子量范围/Da					
	> 10000	10000~4500	4500~3500	3500~2640	2640~2000	< 2000
25(不处理)	0.15	41.91	26.93	11.42	7.71	11.88
60	0.09	45.45	36.83	7.25	4.42	5.96
70	0	51.68	39.63	1.51	2.54	4.64
80	0	57.15	35.96	2.93	2.11	1.85
90	0	57.38	36.40	2.87	2.09	1.36
100	0	57.44	37.00	2.92	2.02	0.62

表 2 热处理温度对鸡肉蛋白 Papain 酶解产物中不同分子量的肽含量影响

Table 2 Effect of heating temperature on the content of peptide with different molecular weight in chicken protein-papain hydrolysates %

热处理温度/℃	分子量范围/Da					
	> 10000	10000~4500	4500~3500	3500~2640	2640~2000	< 2000
25(不处理)	0	52.27	24.78	9.28	6.27	7.40
70	0	60.69	25.28	6.58	4.75	2.70
80	0	60.80	27.17	5.83	3.76	2.44
90	0	61.99	27.95	4.95	3.46	1.65
100	0	64.65	29.56	2.87	2.32	0.60

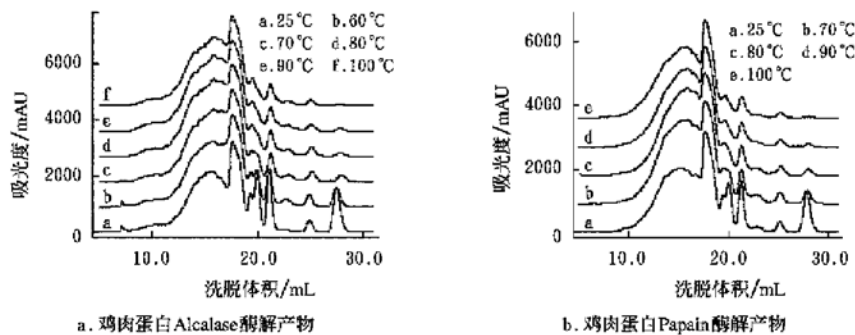


图 4 热处理温度对鸡肉蛋白酶解产物中肽分布影响

Fig. 4 Effect of heating temperature on the molecular weight distribution of peptide in chicken protein hydrolysates

根据图 4 可知, 随着热处理温度的升高, 两种酶解产物中大分子量肽占总肽量比值不断增加, 而小分子量肽占总肽量比值不断减少; 热处理温度低于 80℃, 肽分子量分布图谱变化显著, 超过 80℃ 后, 肽分子量分布图谱变化不大, 这表明热变性处理温度达到 80℃ 后, 鸡肉蛋白完全变性, 再增加温度对其影响不大, 与鸡肉蛋白 DSC 扫描图谱结论吻合。由表 1、表 2 两种酶解产物中不同分子量肽段占总肽量的比例看, 热变性处理后, 两种酶解产物中各肽段变化趋势类似, 分子量范围在

10000~ 4500 Da、4500~ 3500 Da 间肽段随热处理温度增加而增加, 分子量范围在 2640~ 2000 Da 间以及 2000 Da 以下肽段随热处理温度增加而降低, 这是因为热处理导致蛋白质凝聚或沉淀, 酶消化蛋白质能力下降, 与未经处理样相比, 相同酶解时间内, 热处理样中酶降解凝聚或变性蛋白, 主要生成相对大分子量肽, 小分子量肽以及氨基酸释放少; 两组酶解产物中分子量范围在 3500~ 2640 Da 间以及 10000 Da 以上肽段随热处理温度变化规律存在一定差异, 这主要是由两种酶的作用

性质不同引起的。Iung 等研究胰酶水解 β -乳球蛋白时发现,天然状态的 β -乳球蛋白经胰酶水解后产生小肽多,热处理 β -乳球蛋白后再酶解有利于相对分子量较大的肽生成^[16]。这与本试验获得的结果一致。

3 结 论

1) 差示扫描量热法分析表明鸡肉蛋白有 4 个吸热峰,对应温度分别为 63.7℃、67.6℃、74.3℃、77.9℃,变性热焓为 14.9 J/g。

2) 鸡肉蛋白中 SH、S-S 含量分别为 65.06、12.29 $\mu\text{mol/g}$,热处理温度增加,SH 含量逐渐降低,而 S-S 含量逐渐增加,鸡肉蛋白中总 SH 含量在 80℃前没有明显变化,80~90℃间略有下降,90℃后显著下降。

3) 热处理不利于鸡肉蛋白酶解,热处理的鸡肉蛋白经 Alcalase、Papain 酶解后产物中游离氨基酸、可溶性氮含量明显低于未处理样酶解产物,随热处理温度增加,这种趋势更为明显,这由鸡肉蛋白的结构特性决定。

4) 热处理温度升高,产物中大分子量肽占总肽量比值不断增加,而小分子量肽占总肽量比值不断减少,热处理温度达到 80℃以后,增加温度对酶解产物中肽分子量分布影响不显著。

可见,酶解前热处理不利于鸡肉蛋白酶解过程中游离氨基酸和小分子量肽的释放,但有利于大分子量肽的生成,因此可根据酶解产物的应用目的选择合适的热处理工艺。

[参 考 文 献]

- [1] 王文贤,刘学文. 加入 WTO 对我国鸡肉加工业的影响与对策[J]. 食品科技, 2001, (6): 3- 5.
- [2] 曹东旭,姚秀玲,陈惠娟,等. 鸡肉蛋白水解液的研究[J]. 天津轻工业学院学报, 2002, (3): 11- 13.
- [3] 谢永洪,刘学文,王文贤,等. 鸡肉蛋白酶水解工艺条件的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(5): 207- 210.

- [4] Fonkwe L G, Singh R K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 1996, 31(6): 605- 616.
- [5] Yamauchi F. Molecular understanding of heat induced phenomena of soybean protein[J]. Food Reviews International, 1991, 7(3): 283- 322.
- [6] Opstvedt J, Miller R, Hardy R W, et al. Heat induced changes in sulfhydryl groups and disulfide bonds in fish protein and their effect on protein and amino acid digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. J Agric Food Chem, 1984, 32: 929- 935.
- [7] 刘通讯,赵谋明. β -乳球蛋白热变性可逆性的研究[J]. 食品科学, 1995, (1): 13- 17.
- [8] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. Journal of Food Science, 1974, 39: 49- 51.
- [9] 杨慧芬,李明元,沈文. 食品卫生理化检验标准手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 1998: 48- 50.
- [10] 黄伟坤,唐英章,黄焕昌. 食品检验与分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989: 57.
- [11] Kijowski J M, Mast M G. Thermal properties of proteins in chicken broiler tissues[J]. J Food Sci, 1988, 53(2): 363 - 366.
- [12] Synowiecki J, Shahidi F. Heat-induced changes in sulfhydryl groups of harp seal muscle proteins[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39: 2006- 2009.
- [13] 沈同. 生物化学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 167- 169.
- [14] Friedman M, Grosjean O K, Zahnley J C. Inactivation of soya bean trypsin inhibitors by thiols[J]. J Sci Food Agric, 1982, 33: 165- 172.
- [15] 段振华,张敏,汤坚,等. 酶法水解鳙鱼下脚料及其降苦机理研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(5): 19- 22.
- [16] Iung C, Paquet D, Linden G. Traitements de dénaturation appliqués à la β -lactoglobulin avant hydrolyse trypsique[J]. Lait, 1991, 71: 385- 394.

Effect of heating treatment on the properties of enzymatic hydrolysis of chicken protein

Zhao Mouming, Zhou Xuesong, Lin Weifeng, Wang Wei

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to analyze the effect of heating treatment on the hydrolytic properties of chicken protein, the thermal behavior of chicken protein was investigated by differential scanning calorimetry(DSC), and the effect of heating temperature on the content of sulfhydryl(SH) groups, disulfide(S-S) bonds in chicken protein and the release of amino acids and peptides during the enzymatic hydrolysis of chicken protein by Alcalase and Papain was determined. Results show that chicken protein exhibits a thermal curve with four endothermic transitions at 63.7℃, 67.6℃, 74.3℃ and 77.9℃. Increasing of heating temperature result in a concomitant decrease in the content of SH groups and a steady increase in the content of S-S bonds, while the content of SH groups plus reduced S-S bonds remained unchang below 80℃, and decrease above 80℃. Heating treatment before hydrolysis decrease the release of amino acids and low-molecular-weight peptides, and the recovery of soluble nitrogen, but increase the release of large-molecular-weight peptides during the enzymatic hydrolysis of chicken protein. It is suggested that heat treatment parameters could be chose according to the application aim of hydrolysate.

Key words: chicken protein; heating treatment; enzymatic hydrolysis; sulfhydryl groups; disulfide bonds