

鸡肉蛋白酶水解工艺条件的研究

谢永洪, 刘学文, 王文贤, 冉旭

(四川大学食品工程系, 成都 610065)

摘要: 为探索鸡肉酶水解工艺条件及其动力学特性, 分别采用木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶对鸡肉进行了水解试验, 得出最优酶为木瓜蛋白酶; 由此选用木瓜蛋白酶做正交试验, 考察水解温度、时间、加酶量、pH值和固液比5个因素对酶水解的影响, 并确定出最优水解条件为温度50℃, 时间7h, 加酶量2.4% (以鸡肉的质量百分数计), pH7.0, 固液比1:4; 在此条件下, 水解度可达26.07%。在此基础上由试验数据推导出描述木瓜蛋白酶水解鸡肉的动力学方程, 可为鸡肉酶解生化反应器的设计和鸡肉水解蛋白液或蛋白粉的开发提供一定的理论依据。

关键词: 鸡肉; 酶水解; 木瓜蛋白酶; 动力学方程

中图分类号: TS201.2; S251.5⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)05-0207-04

0 引言

肉鸡(broiler)是中国市场上的主要鸡种, 具产肉性能好、生长速度快、能适应现代化大型养殖生产等特点。但由于其肉含水率高, 香味较淡, 口感较差等原因, 销售价格一直较低, 有逐渐被市场淘汰的趋势。因此, 进一步开发鸡肉深加工产品的研究势在必行^[1-3]。

鸡肉水解蛋白液和蛋白粉是近年来出现的一种新型鸡肉深加工产品, 可用于生产复合调味料、酱包、鸡精、膨化食品和一些功能食品等^[4,5], 以鸡肉为原料制作水解蛋白液或蛋白粉可充分提高鸡肉产品的附加值, 也是鸡肉开发利用和发展的一条新出路。在动物蛋白水解方面, 周剑忠^[6]、梦祥河^[7]、杨东^[8]、舒留泉^[9]等人分别对乳鸽、牛肉、鱼以及一些海产动物如缢蛏肉等的酶解进行了研究。此外, 熊善柏^[10]等对乌鸡肉酶解及水解液澄清进行了研究; 国外 Maria^[11]、Fereidoon^[12]和 William^[13]对动物水解蛋白的特性和应用进行阐述。C. M. O. Meara 和 P. A. Munro^[14,15]以米氏方程和兰格缪尔等温吸附模型为基础, 研究了瘦肉的酶解动力, 并对酶解反应的影响因素进行了研究。但针对鸡肉水解蛋白液或蛋白粉制取过程中的酶水解及其动力学研究很少。

因此, 本文根据酶水解原理及酶促动力学理论对鸡肉酶水解工艺进行了研究, 对酶种类和水解条件进行了优选, 在此基础上拟合了最优酶——木瓜蛋白酶的动力学方程, 力图为鸡肉酶解生化反应器的设计和鸡肉水解蛋白液或蛋白粉的开发提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及仪器

1.1.1 主要材料

木瓜蛋白酶: 食品级, 80万U/g, 北京酶制剂厂; 中性蛋白酶: 食品级, 60万U/g, 北京酶制剂厂; 菠萝蛋白酶: 食品级, 40万U/g, 北京酶制剂厂; 胃蛋白酶: 生物

级, 3000U/g, 广州华美酶制剂厂; 新鲜鸡肉脯: 市售。

1.1.2 主要仪器

PHSJ-4A型实验室pH计: 上海精科雷磁; 78HW-1恒温磁力搅拌器: 金坛市正基仪器有限公司; ZK高速自控组织捣碎机: 江苏省盐城市科学仪器厂; KXS自控恒温水浴锅: 成都科析仪器成套公司; JA1203型电子天平: 上海精科天平。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺流程

新鲜鸡肉脯 预处理 冻藏 捣碎 加蒸馏水 调节pH值 加酶恒温水解 85℃ 灭酶 15min 过滤 鸡肉水解蛋白液

1.2.2 水解度的测定^[16]

1.2.3 原料预处理

从市场上购得鸡脯肉, 清水洗净后, 用小刀精心去除脂肪, 并把鸡肉放置于自来水龙头下冲洗, 去血1h后, 冷冻保藏, 一段时间后取出并切成颗粒状, 然后用组织捣碎机捣成泥状, 放入冰箱冻藏备用。

1.2.4 水解过程

按表1、3进行试验, 取一定量解冻好的鸡肉泥于100mL烧杯中, 而后加入酶、蒸馏水并调节pH值, 放入恒温水浴锅水解一定时间后取出, 于100mL容量瓶定容后过滤, 按电位滴定法测定水解液中的氨基酸。

2 结果与讨论

2.1 最优酶的选择

在参考大量文献并查阅大量资料^[5-14]的基础上, 确定影响酶解的主要因素有: 水解温度、水解时间、加酶量、水解pH值和固液比; 经预备试验, 初步确定备选各种酶的最优水解条件如表1所示。

按表1进行各酶的水解试验, 测定了水解液中蛋白质的水解度、水解液的风味等指标, 结果见表2。

由表2可知, 4种蛋白酶对鸡肉蛋白质的水解效率差别较大。采用菠萝蛋白酶水解鸡肉, 获得的水解度小,

收稿日期: 2003-08-12 修订日期: 2004-07-02

作者简介: 谢永洪(1980-), 女, 四川泸县人。

通讯作者: 刘学文, 教授, 成都市 四川大学食品工程系, 610065

表 1 各酶粗略最优水解条件

Table 1 Glancing optimum hydrolysis conditions of each protease

蛋白酶种类	温度/	时间/h	加酶量/%	pH 值	固液比
木瓜蛋白酶	50	5	1.5	7.0	1.4
菠萝蛋白酶	50	6	2.5	7.5	1.3
中性蛋白酶	40	7	2.0	8.0	1.6
胃蛋白酶	29	6	1.5	1.6	1.6

注: 加酶量以鸡肉的质量百分数计。

表 2 各酶对鸡肉蛋白质水解结果

Table 2 Hydrolysis results of each protease on meat protein

蛋白酶种类	水解度DH/%	水解液风味	水解液澄清状况
木瓜蛋白酶	24.93	无苦味	澄清
菠萝蛋白酶	8.36	无苦味	浑浊
中性蛋白酶	6.78	苦味强	澄清
胃蛋白酶	19.86	苦味强	浑浊

水解液浑浊, 无苦味; 采用中性蛋白酶时, 虽然水解液澄清, 但水解度更低, 水解液苦味强; 采用胃蛋白酶能得到较高的水解度, 但水解液浑浊且苦味强; 采用木瓜蛋白酶时, 不但能获得较高的水解度, 而且水解液色泽金黄, 无苦味, 有很好的鸡肉香味, 不需要进行澄清处理; 另一方面, 木瓜蛋白酶成本低, 来源丰富, 水解度控制适度还会有鲜味肽产生。综合考虑上述试验结果和 4 种蛋白酶的最优水解温度和 pH 值, 筛选出木瓜蛋白酶为水解鸡肉的最优酶, 再做正交试验, 得出木瓜蛋白酶水解鸡肉的最优条件, 并在该条件下对鸡肉酶解动力学特性进行考察研究。

2.2 木瓜蛋白酶最优水解工艺条件的选择

水解温度、水解时间、加酶量、水解 pH 值和固液比是蛋白质水解的主要影响因素。试验中, 以水解度为考察指标, 对鸡肉蛋白质的木瓜蛋白酶水解条件作优化试验以确定水解最优条件。由于本试验确定的主要影响因素有 5 个, 所以采用 5 因素 4 水平, 试验设计如表 3 所示, 所得的试验结果见表 4。

表 3 试验因素与水平表

Table 3 Factors and levels of the orthogonal experiment

因素	符号	单位	水 平			
			1	2	3	4
温度	A		55	40	50	45
时间	B	h	4	3	6	5
加酶量	C	%	1.0	1.5	2.0	0.5
pH 值	D	-	6.0	7.5	7.0	6.5
固液比	E	-	1.4	1.3	1.5	1.2

注: 1. 加酶量以鸡肉的质量百分数计;

2. 以上因素的各水平按照随机抽取的方法确定。

由表 4 可知, 5 个因素极差 R 的大小顺序为 A > C > D > E > B, 由此可得, 木瓜蛋白酶水解鸡肉的影响因素主次顺序为 A > C > D > E > B, 即温度的影响极大, 加酶量次之, 而后是 pH 值, 固液比的影响较小, 时间的影响最小。

表 4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal experiment

试验号	温度(A)	时间(B)	加酶量(C)	pH 值(D)	固液比(E)	水解度/%
1	1	1	1	1	1	7.79
2	1	2	2	2	2	12.03
3	1	3	3	3	3	17.61
4	1	4	4	4	4	6.39
5	2	1	2	3	4	6.42
6	2	2	1	4	3	4.16
7	2	3	4	1	2	3.30
8	2	4	3	2	1	13.12
9	3	1	3	4	2	19.39
10	3	2	4	3	1	15.45
11	3	3	1	2	4	13.62
12	3	4	2	1	3	13.47
13	4	1	4	2	3	8.75
14	4	2	3	1	4	9.85
15	4	3	2	4	1	12.94
16	4	4	1	3	2	11.42
I/4	10.96	10.59	9.25	8.60	12.33	
II/4	6.75	10.37	11.22	11.88	11.29	
III/4	15.48	11.87	14.99	12.73	11.54	
IV/4	10.74	11.10	8.47	10.72	9.07	
R	8.73	1.50	6.52	4.13	3.26	

注: 加酶量以鸡肉的质量百分数计。

由各列的 I/4、II/4、III/4、IV/4 值可知: 对于温度因素, 当温度从 40 增加到 50, 水解度升高, 且上升了近 3 倍; 而当温度从 50 增加到 55, 水解度却急剧下降。这一现象与酶促反应的普遍规律相吻合。即, 温度升高时, 反应速度加快, 但随着温度的升高, 酶蛋白逐渐变性, 反应速度反而降低。由此可确定出木瓜蛋白酶水解鸡肉的最优温度为 50。观察 pH 值对水解度的影响, 当 pH 值从 6.0 增加到 7.0, 水解度急剧上升; 当 pH 值从 7.0 变到 7.5, 水解度降低。这一现象符合酶促反应规律, 即, 在一定 pH 值下酶表现最大活力, 过高过低的 pH 值会改变酶的活性中心构像, 或甚至改变整个酶分子的结构使其变性失活, 从而反应速度下降。由此确定木瓜蛋白酶水解鸡肉的最优 pH 值为 7.0。对于固液比, 当水解的固液比从 1.2 变到 1.4, 水解度上升; 但当固液比从 1.4 变到 1.5, 水解度降低。由此可见木瓜蛋白酶水解鸡肉的最优固液比为 1.4。对于时间因素, 注意到, 当时间从 3 h 增加到 6 h, 水解度不断升高, 且还有升高的趋势。但由于在设计正交试验时, 时间水平只取到 6 h, 因而还不能确定木瓜蛋白酶水解鸡肉的最优时间, 在后一步工作中, 继续做了时间影响因素的补充优化试验。对于加酶量, 当加酶量从 0.5% 增加到 2.0%, 水解度升高, 根据正交水平设计安排, 仍不能确定木瓜蛋白酶水解鸡肉的最优加酶量, 也必须对加酶量做进一步的优化补充考察试验。

2.3 木瓜蛋白酶水解时间和加酶量的优化补充试验

根据以上正交试验的结果, 最优水解时间和最优加酶量还应进一步做补充试验确定。对这两个因素补做了优化试验, 试验结果见图 1 和图 2。

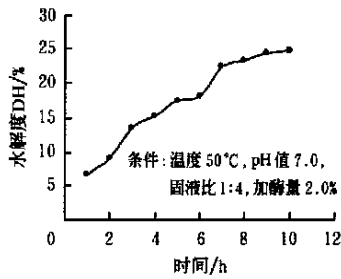


图 1 时间对水解度的影响曲线

Fig 1 Effects of time on degree of hydrolysis (DH)

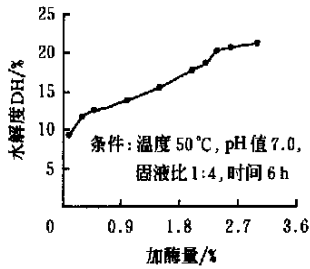


图 2 加酶量对水解度的影响曲线

Fig 2 Effects of enzyme amount on degree of hydrolysis (DH)

由图 1 可知, 随着水解时间的推移, 水解度逐渐升高。当时间由 7 h 增加到 10 h 时, 水解度上升已非常缓慢。考虑到时间太长不利于工业应用, 水解度增加也不显著。因此, 木瓜蛋白酶水解鸡肉时间以 7 h 为宜。

由图 2 可知, 随着加酶量的增加, 水解度逐渐升高。当加酶量从 2.4% 增加到 3.0% 时, 水解度上升缓慢。在水解度受影响不大的情况下为尽量节约酶制剂量和降低生产成本, 根据试验结果可确定木瓜蛋白酶水解鸡肉最优加酶量为 2.4%。

2.4 木瓜蛋白酶水解鸡肉的动力学特性研究

木瓜蛋白酶为专一性酶, 根据中间产物理论, 酶促

反应可按下列两步进行: $E + S \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} E + P$, 式中 E 为酶, S 为底物, P 为产物。由于 $P + E$ 形成 ES 的速度极小, 故 k_4 可忽略不计。根据质量守恒定律可推导出木瓜蛋白酶水解鸡肉的数学模型: $v = v_{max}C_s / (K_m + C_s)$, 即米氏 (Michaelis-Menten) 方程^[17], 式中 v 为反应速度, C_s 为底物浓度, K_m 为米氏常数。

为确定数学模型中的相关参数, 在木瓜蛋白酶的最优水解条件下, 改变鸡肉浓度, 进行水解试验, 并测定各试验水解度; 同时, 把加酶量单位换算为 g/L (每升溶液中含有的酶量), 以便于试验数据的处理。数据处理后的试验结果见表 7。

根据表 7 数据, 用 $1/v$ 对 $1/C_s$ 作图(图 3), 拟合出米氏方程的推导式 Lineweaver Burk 方程为: $\frac{1}{v} = 35.873 \frac{1}{C_s} + 0.2047$, 即 $K_m/v_{max} = 35.873$, $1/v_{max} = 0.2047$, 得 $K_m = 175.247 g/L$, $v_{max} = 4.8852 mmol/L \cdot h$ 。米氏方

$$程为: v = \frac{v_{max}C_s}{K_m + C_s} = \frac{4.8852 \times C_s}{175.247 + C_s}$$

表 7 不同鸡肉浓度条件下的酶反应速度

Table 7 Enzymatic reaction velocities at different chicken concentrations

底物浓度 C_s / $g \cdot L^{-1}$	时间 /h	温度 /	加酶量 / $g \cdot L^{-1}$	pH 值	反应速度 v / $mmol \cdot (L \cdot h)^{-1}$
12.3	7	50	4.84	7.0	0.3320
24.4	7	50	4.84	7.0	0.5345
47.7	7	50	4.84	7.0	1.0611
70.0	7	50	4.84	7.0	1.1565
91.3	7	50	4.84	7.0	1.6240
111.7	7	50	4.84	7.0	1.9572
131.2	7	50	4.84	7.0	1.7387
149.9	7	50	4.84	7.0	2.4412
167.9	7	50	4.84	7.0	2.8245
185.2	7	50	4.84	7.0	3.0634
201.8	7	50	4.84	7.0	3.0351
217.8	7	50	4.84	7.0	3.1769
233.2	7	50	4.84	7.0	3.0593

注: 反应速度= 产物浓度 ÷ 水解时间。

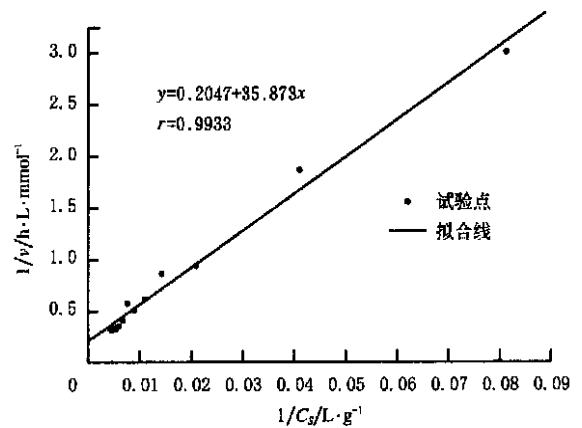


图 3 Lineweaver Burk 方程 $1/v$ 对 $1/C_s$ 作图

Fig 3 Lineweaver Burk equation curve

根据已得的米氏方程, 作出木瓜蛋白酶水解鸡肉反应的速度与底物浓度关系图, 如图 4 所示。

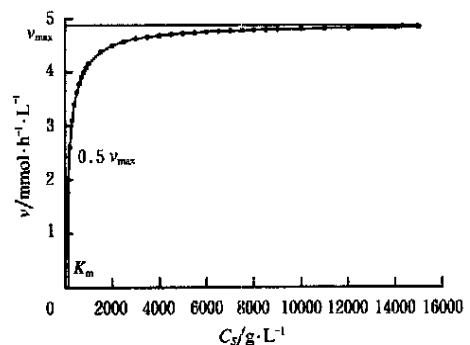


图 4 反应速度与鸡肉浓度关系图

Fig 4 Relationship between reaction velocity and chicken concentration

由图 4 可知, 当其它条件不变, 酶浓度固定为 $4.48 g/L$ 的情况下, 木瓜蛋白酶所催化的化学反应速度与底

物浓度有如下规律: 在鸡肉浓度很低时, 反应速度随底物浓度的增加而急剧增加, 反应速度与底物浓度呈正比, 表现为一级反应; 当鸡肉浓度较高时增加底物浓度, 反应速度随之增加, 但增加的程度不如鸡肉浓度较低时显著, 即反应速度不再与鸡肉浓度呈正比, 表现为混合级反应; 当鸡肉浓度达到某一定值后, 再增加底物浓度, 反应速度也不在明显增加, 而趋于恒定, 表现为零级反应, 此时的速度为木瓜蛋白酶水解鸡肉的最大反应速度; 当鸡肉的浓度 $C_s = K_m$ 时, 反应的速度为最大反应速度的 $1/2$ 。由此可见, 根据 K_m 值, 可以判断木瓜蛋白酶与底物鸡肉的亲合力, 即 K_m 值越小, 亲合力越大, 越有利于鸡肉的水解。由此可以根据 K_m 值的大小来确定反应的其它条件以保持反应在最佳状态下进行。同时, 由 K_m 和米氏方程可决定在所要求的反应速度下应保持的底物浓度, 或根据已知浓度求出该反应条件下的反应速度, 因而可为鸡肉深加工中蛋白质酶解生化反应器的设计提供理论参考依据。

3 结 论

1) 在鸡肉酶水解试验中, 木瓜蛋白酶水解鸡肉的效果明显优于菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和胃蛋白酶。

2) 木瓜蛋白酶水解鸡肉的最优水解条件为: 温度 50°C , 时间 7 h , 加酶量 2.4% (以鸡肉的质量百分数计), $\text{pH } 7.0$, 固液比 $1:4$ 。

3) 由试验数据推导出描述木瓜蛋白酶水解鸡肉的动力学方程, 该方程可为鸡肉酶解生化反应器的设计和鸡肉水解蛋白液或蛋白粉的开发提供一定的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 黄诗铿 禽类深加工的若干问题[J]. 中国食物与营养, 1999, (5): 34- 35
- [2] 王文贤, 刘学文 加入WTO 对中国鸡肉加工业的影响及对策[J]. 食品科技, 2001, (6): 3- 5
- [3] 黄诗铿 发展禽肉深加工是家禽业发展的必然趋势[J]. 中国禽业导刊, 2000, 17(23): 15
- [4] 赵胜年, 翟俊杰 水解动物蛋白(HAP)成分与特性研究

- [J]. 中国调味品, 1996, (6): 17- 18
- [5] 李建周, 倪 莉 酶法制备 HAP 的研究[J]. 福建轻纺, 2003, (10, 11): 44- 47.
- [6] 周剑忠, 陈晓红 复合酶水解乳鸽肉的研究[J]. 食品科技, 2003, (2): 25- 27, 33
- [7] 孟祥河, 张铁华 复合酶水解牛肉的研究[J]. 食品科技, 2002, (2): 17- 20
- [8] 杨 东, 王 皓 水解鱼蛋白及其功能特性的研究[J]. 食品科学, 1999, (11): 24- 26
- [9] 舒留泉, 薛长湖 缙蛭肉的蛋白酶水解工艺研究[J]. 水产科学, 2004, 23(1): 36- 38
- [10] 熊善柏, 赵 山, 启 明 木瓜蛋白酶在乌鸡肉蛋白质分步酶解中的应用研究[J]. 食品科学, 2000, 21(12): 26- 29
- [11] Maria Elisabeth M, Pinto E Silva, Rosa N Mazzilli, Fabiana Cusin Composition of hydrolysates from meat [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 1999, (12): 219- 225
- [12] Fereidoon Shahidi, Han Xiaoqing, Jozef Synowiecki Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*) [J]. Food Chemistry, 1995, (53): 285- 293
- [13] William J Lahl, Steven D Braum. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use[J]. Food Technology, 1994, 48(10): 68- 71.
- [14] Meara G M O, Munro P A. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase[J]. Meat Science, 1984, 11: 227- 238
- [15] Meara G M O, Munro P A. Kinetics of the hydrolysis of lean meat protein by alcalase: derivation of two alternative rate equation and their fit to experimental data[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1985, 26: 861- 869
- [16] 赵新淮, 冯志彪 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, (11): 65- 67.
- [17] 刘 峰, 叶 峰, 欧志敏 蛋白质酶法有限水解过程反应机理和动力学特性[J]. 化工学报, 2002, 53(2): 199- 202

Technological conditions for enzymatic hydrolysis of chicken protein

Xie Yonghong, Liu Xuewen, Wang Wenxian, Ran Xu

(Department of Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract To study enzymatic hydrolysis conditions and kinetic characterization in chicken processing, papain, pepsin, neutrase and bromelain were used to hydrolyze fresh chicken, respectively. The results showed that papain was the optimal protease. So papain was adopted to do orthogonal experiment, and the effects of temperature, time, enzyme amount, pH value and solid-liquid ratio on hydrolysis were analyzed. Through the analysis of experimental data, the optimal conditions of papain were determined, i.e. temperature 50°C , time 7 h , $\text{pH } 7.0$, enzyme amount 2.4% ($2.4\text{ gram papain per } 100\text{ gram chicken}$), solid-liquid ratio $1:4$. The degree of hydrolysis was up to 26.07% . Based on this approach and experimental data, a kinetic model equation simulating the enzymatic hydrolysis of chicken was obtained and it could provide basic theoretics for design of biochemical reactors of chicken hydrolysis and development of chicken protein hydrolysis liquid and powder.

Key words: chicken; protease hydrolysis; papain; kinetic equation