

酶解鸡骨架制备热反应底物的研究

赵永珍¹, 张 慜^{*1}, 陈志雄²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 广东嘉豪食品股份有限公司, 广东 中山 528447)

摘要: 鸡骨中含有丰富的营养物质, 对鸡骨进行深加工, 能有效提高蛋白质的综合利用率。作者通过比较采用 Flavourzyme 与 Protamex 以 2:1 复配对鸡骨进行水解。以水解度(DH)为特征指标, 对酶解鸡骨架的工艺进行优化, 结果表明, 最佳的工艺参数为: 温度 55 ℃, pH 6.5, 时间 5 h, 酶用量为质量分数 0.8%, 料液质量比为 1 g:2 mL, 在此条件下水解度为 23.69%。所得酶解液用于对不同水解度的蛋白质酶解液对美拉德反应的影响进行分析。

关键词: 鸡骨架; 水解度; 复合蛋白酶; 风味蛋白酶

中图分类号: TS 251.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)01—0056—06

Sudy on Enzymatic Hydrolysis of Chicken Bone as Substrate of Maillard Reaction

ZHAO Yong-zhen¹, ZHANG Min^{*1}, CHEN Zhi-xiong²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Guangdong Jiahao Food Co. Ltd., Zhongshan 528447, China)

Abstract: The deep processing of Chicken bone which is rich in nutrients can improve comprehensive utilization of protein. In this article, chicken bone was hydrolyzed by Flavourzyme and Protamex which ratio is 2:1, which is determined by the comparison different hydrolysates. The result showed that optimal conditions for hydrolysis were: temperature 55 ℃, pH 6.5, and 5 hours, enzyme dosage 0.8%, solid-liquid ratio 1:2. Under these optimal hydrolysis conditions the hydrolysis degree was 23.69%. The protein hydrolysates will be used for the analysis of the effect of different hydrolysis degree on the Maillard reaction.

Keywords: chicken bone, hydrolysis degree, flavourzyme, protame

鸡肉香味鲜美, 风味怡人, 深受人们的喜爱。为此, 人们希望能给一些食品赋予鸡肉香味, 由此促进了人们对鸡肉香精的研究。鸡汁调味料是以磨碎的鸡肉和鸡骨或其浓缩提取物以及其他辅料等为

原料, 添加或不添加香辛料和(或)食用香料等增香剂加工而成, 具有鸡的浓郁鲜味和香味的汁状复合调味料。热反应产生的鸡肉香精由于香气强烈、逼真度高、抗氧化性好受到研究人员的重视。近年来,

收稿日期: 2012-04-12

基金项目: 国家 863 计划重点项目(2011AA100802)。

* 通信作者: 张 慜(1962—), 男, 浙江平湖人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事农产品贮藏与加工研究。

E-mail: min@jiangnan.edu.cn

国外对热反应鸡肉香精的研究较为活跃,而国内在这方面的研究还相对薄弱和滞后,到目前为止,关于如何生产鸡肉香精的有关信息还较少^[1]。

水解蛋白由于富含氨基酸、氨基酸钠盐与多肽,其通常可作为鲜味料或通过与还原糖发生美拉德反应制备热加工肉类香精。Spanier 的研究表明:多肽在牛肉加工、水解植物蛋白、烤可可与咖啡的风味形成过程中起着非常重要的作用,不同的多肽序列作为前体物质将产生不同的食品风味。因此,当通过美拉德褐变生产特定风味化合物时,水解蛋白的游离氨基酸的组成与含量、相对分子质量分布、多肽的组成及化学构型等对美拉德反应中形成的风味物质的种类等具有非常重要的影响^[2-3]。

目前肉味香精发展于近 30 年,其主流是酶解技术用于水解氮源物质,用水解动物蛋白(HAP)、水解植物蛋白(HVP)作为肉味香料的前体物,再配合以氨基酸、酵母膏、还原糖和脂肪等物质,经美拉德反应形成香气浓郁圆润、口感醇厚逼真的肉味香精^[4]。

作者以鸡骨架为底物,通过酶法水解制备鸡骨架蛋白水解物,作为 Maillard 的反应物,用以对不同水解度的酶解产物对美拉德产物风味形成的影响进行探讨。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

冻藏鸡骨架:购于无锡市滨湖区欧尚超市;Flavourzyme 风味蛋白酶,Protamex 复合蛋白酶,木瓜蛋白酶,Novozym37071 酶:广州明耀商贸有限公司提供。

1.2 主要仪器与设备

恒温水浴锅,立式高压蒸汽灭菌锅,精密酸度计,绞肉机,消化炉,改良式凯氏定氮装置,电子天平,冷冻离心机,马弗炉,电热恒温鼓风干燥箱。

1.3 测定方法

1.3.1 酶解工艺的研究方法

1)酶的选择实验:采用风味蛋白酶和复合蛋白酶(F:P),风味蛋白酶和木瓜蛋白酶(F:PP)以及风味蛋白酶和 Novozym37071 酶(F:N)3 种不同复配酶进行水解,对酶解液的水解度及感官进行比较,选择最佳复配酶。复配酶的两种酶质量比为 1:1,酶用量为 0.4%,料液质量体积比为 1 g:2 mL,在各自的适宜水解条件下水解。

酶适宜作用条件根据酶生产厂家提供的资料和预试验确定:风味蛋白酶和复合蛋白酶适宜温度为 55 ℃,pH 为 6.0;风味蛋白酶和木瓜蛋白酶的适宜温度 55 ℃,pH 6.5;料液比 1 g:2 mL,Novozym 37071 酶和风味蛋白酶的适宜温度 55 ℃,pH 为 6.5。

2)酶配比的选择:用以上所确定的最佳酶组合,选择不同的双酶组合比例,以水解度和蛋白质回收率为考察指标,选择最优配比。

3)酶用量的选择:选定料液比为 1 g:2 mL,水解时间 3 h,酶用量 0.2%~1.0%,pH 值 6.8,水解时间 3 h,测定其 DH,确定最适酶用量。

4)料液比的选择:选定 pH 值 6.8、温度 55 ℃、上述确定的酶用量料液质量体积比分别在 1 g:1 mL~1 g:5 mL 条件下水解 3 h,分别测定其 DH,确定最佳料液比。

5)酶解温度的选择:选定水解时间 3 h,pH 值 6.8,上述确定的酶用量,料液质量体积比,分别在 45~65 ℃条件下水解,分别测定 DH,确定最适酶解温度。

6)酶解 pH 值的选择:选定水解时间 3 h,上述所确定的酶用量、温度,及料液质量体积比,pH 值为 5.5~7.5,分别测定其 DH,确定其最适 pH 值。

7)酶解时间的选择:按选定的最佳参数,酶解时间分别为 1~7 h 测定其水解度,确定最佳酶解时间。

8)最佳工艺条件的确定:根据单因素试验的结论,选择酶解温度、时间、pH 值、加酶量 4 因素,每因素三水平设计正交试验,其因素水平设计见表 1。取 $L_9(3^4)$ 正交表,做正交试验。

表 1 复合蛋白酶和风味蛋白酶的酶解正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test of enzymolysis condition by Flavourzyme and Protamex

水平	因素			
	酶用量 A/%	温度 B/℃	pH C	时间 D/h
1	0.4	50	6.0	3
2	0.6	55	6.5	4
3	0.8	60	7.0	5

1.3.2 鸡骨架酶解的工艺流程 鸡骨架→预处理→高温蒸煮(120 ℃,1 h)→粉碎→加去离子水→调节 pH 值→加酶恒温水解→100 ℃灭酶 15 min→4 800 r/min 离心 20 min→过滤→鸡骨架水解蛋白液。

1.3.3 检验方法 蛋白质质量分数的测定:凯氏定氮法:GB/T5009.5-2003;水解度的测定:参照参考文献[5]

水解度/%=

$$\frac{(\text{酶解后氨基酸氮}-\text{酶解前氨基酸态氮})}{(\text{酶解后总氮}-\text{酶解前氨基酸态氮})} \times 100\%$$

氨基酸态氮的测定:甲醛滴定法,参照国家标准 GB/T5009.39-2003。蛋白质利用率的测定:按以下公式计算。

蛋白质利用率=(酶解上清液中总氮质量分数/原料中总氮质量分数)×100%

产品感官品评^[6]:就样品的嗅感、口味、色泽、外观等方面评价产品的质量,各指标按很弱(---)、弱(--)、较弱(-)、稍弱(-)、一般/不存在(0/x)、稍好(+)、较好(++)、好(+++)、很好(++++)、由5人组成感官评价小组,对不同工艺的产品进行对比鉴评,根据可接受性进行综合评价。

2 结果与讨论

2.1 原料的预处理

首先是对冻藏的鸡架进行解冻,然后对原料进行清洗、去杂,特别是鸡架,还有一些内脏残留物要去除;另外是汆汤,主要目的是去血去异味,因为血污都含有不同的腥味,如果直接蒸煮,会使汤液带腥且混浊,影响风味及色泽,所以必须经过汆烫,让残留的血凝固,经过冲洗后以除去血及一些异味且经过汆汤后所得鸡汤较清澈。在工业化生产中不能像传统方法那样,边熬煮边撇去浮沫,可将粉碎后的骨头用冷水浸泡20 min是骨头中的血液渗透到水中,这样就可以把浮沫的问题解决好^[7]。

另外,为了增加骨内含物与水的交流,有必要对骨头适当破碎和加压处理,便于呈味物质的溶出。利用高压处理可分解胶原蛋白为可溶性水解物,让人们容易吸收这些小分子营养物,且高压把骨渣充分预处理,骨头变酥更易于酶与底物的接触,酶解主要作用于肌肉纤维中的蛋白和部分已经溶出的胶原蛋白,这样可以提高原料的利用率。作者采用120℃蒸煮1 h,时间小于1 h时尚有骨头没有充分变酥,大于1 h时,蒸煮液的蒸煮味严重,故选择1 h为宜。

2.2 酶的选择

2.2.1 酶的种类选择 酶法水解的动物蛋白有一

定的苦味,NEYKH^[8]等曾研究表明蛋白质水解产物的苦味和蛋白质的疏水性值有关。当蛋白质疏水值较大时,用不含端肽酶的蛋白酶水解就会产生较强的苦味。苦味肽的端基多为疏水氨基酸,如果用外切酶切除此类疏水氨基酸,游离出的疏水氨基酸与原苦味肽相比苦味要低的多。风味蛋白酶既是内切酶也是外切酶,因此风味蛋白酶在一定程度上能有效脱苦。所以采用木瓜蛋白酶、复合蛋白酶以及Novozym37071酶这3种内切蛋白酶和风味蛋白酶按质量比1:1复配后,在各自适宜的条件下对鸡骨蛋白的酶解效果进行比较。结果如图1。

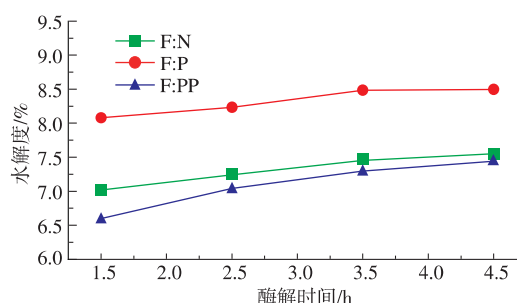


图1 不同酶对水解度影响

Fig. 1 Effect of enzyme on degree of hydrolysis

表2 F:P酶解不同时间对感官指标的影响

Table 2 Effects of enzymolysis time onSensory indexes by Flavourzyme and Protamex

评价内容	不同酶解时间/h			
	1.5	2.5	3.5	4.5
鸡脂香	+	+	++	++
鸡肉香	+	+	++	++
鲜味	+	++	++	+++
苦味	-	×	×	×
色泽	黄褐色	淡黄色	淡黄色	淡黄色

表3 F:PP酶解不同时间对感官指标的影响

Table 3 Effects of enzymolysis time onSensory indexes by Flavourzyme and Papain

评价内容	不同酶解时间/h			
	1.5	2.5	3.5	4.5
鸡脂香	+	+	+	++
鸡肉香	+	+	++	++
鲜味	+	+	+	+
苦味	-	+	++	++
色泽	淡褐色	淡黄色	淡黄色	淡黄色

表 4 F:N 酶解不同时间对感官指标的影响

Table 4 Effects of enzymolysis time on Sensory indexes by Flavourzyme and Novozym37071

评价内容	不同酶解时间/h			
	1.5	2.5	3.5	4.5
鸡脂香	—	+	+	++
鸡肉香	+	+	++	++
鲜味	+	++	++	+
苦味	—	+	+	++
色泽	淡褐色	淡黄色	淡黄色	淡黄色

通过比较发现利用风味蛋白酶和复合蛋白酶复配进行酶解所得的酶解液水解度最高,且总体风味最好,故以下实验采用风味蛋白酶和复合蛋白酶复配酶解制取鸡骨蛋白酶解液。

2.2.2 酶的配比选择 由图 2 可知,当风味蛋白酶用量逐渐增多,复合蛋白酶所占比例变小时,水解度不断增加,而蛋白质的利用率却在减小。在比例为 1:2 时,水解度与蛋白质回收率相对较高。因此,从酶解效果和经济角度考虑,复合蛋白酶和风味蛋白酶的酶配比为 1:2 时为最佳方案。有关酶解的研究表明,复合蛋白酶的内肽酶较强,总体的水解力较强,但水解程度不够彻底;而风味蛋白酶的端肽酶较强,能更彻底地将蛋白质和肽水解成为氨基酸,这可能是导致当风味蛋白酶的比例增加时水解度增加而蛋白质利用率下降的原因^[9]。

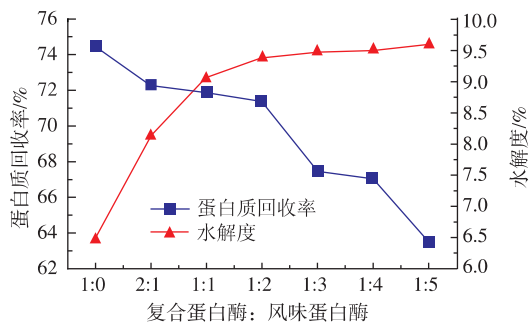


图 2 复合蛋白酶与风味蛋白酶的配比对水解度及蛋白质回收率的影响

Fig. 2 Effect of ratio of Flavourzyme and Protamex on degree of hydrolysis and Protein recovery

2.3 单因素结果分析

2.3.1 酶质量分数的选择 当料液比一定,增加的酶量又未使底物浓度饱和时,加酶量越大,反应速

度也越快,蛋白质的水解度也越高。但当继续增加加酶量,生产成本也相应提高,同时,也有可能酶自身相互水解,使酶活力降低,实验结果如图 3 所示。由图 3 可知,水解度随加酶量的增大而增加,但加酶量大于质量分数 0.8% 时,酶解度增加减缓,考虑到生产成本问题,选择加酶量 0.8% 较为合适。

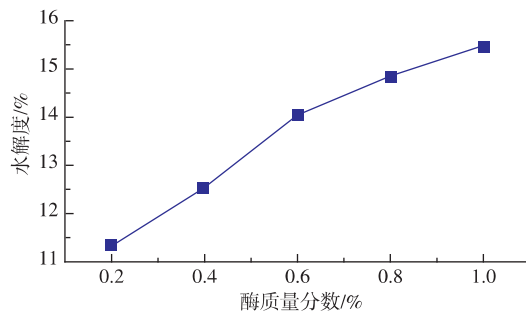


图 3 加酶量对水解度的影响

Fig. 3 Effect of enzyme dosage on degree of hydrolysis

2.3.2 料液比的选择 料液比对水解反应效果有影响,主要是因为料液质量体积比的变化会引起酶反应体系中底物和酶质量分数的变化。由图 4 可知,随着料液质量体积比的增加,水解度不断增加。而实际生产中,水分过多,浓度则越稀,作为商品,仍需要浓缩,耗能大。综合考虑,确定料液质量体积比为 1 g:2 mL。

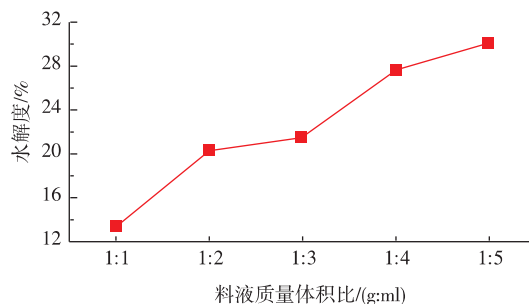


图 4 料液比对水解度的影响

Fig. 4 Effect of solid liquid ratio on degree of hydrolysis

2.3.3 酶解温度的选择 由图 5 可知,在一定的温度范围内随着反应温度的升高,水解度不断增加但超过一定温度后,水解度会随着温度的升高而降低。这是因为在一定范围内升高温度,反应速度加快,酶解效率也相应提高,但温度过高,酶蛋白变性,酶的稳定性下降,酶解效率随之降低。所以,最适温度为 55 ℃。

2.3.4 酶解 pH 值的选择 pH 值影响酶的稳定性,所以 pH 值对水解反应影响很大。各种酶都有各自

的最适 pH 值范围, 由图 6 可知, pH 6.5 左右时, 水解度最大, 所以复合蛋白酶和风味蛋白酶复合的最适 pH 值取 6.5。

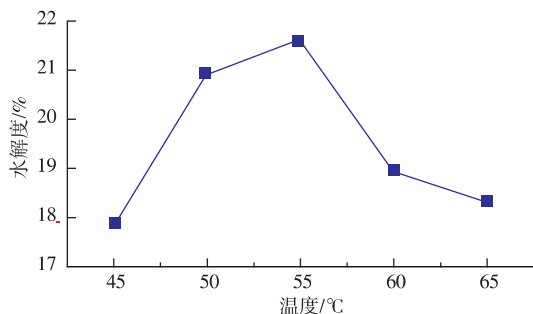


图 5 温度对水解度的影响

Fig. 5 Effects of temperature on degree of hydrolysis

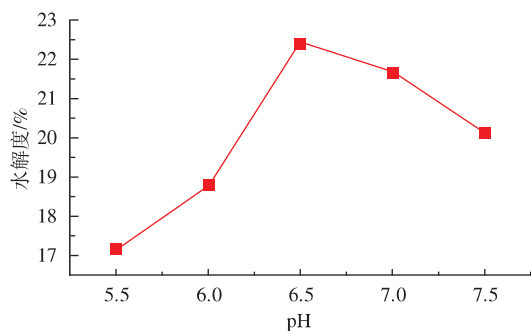


图 6 pH 对水解度的影响

Fig. 6 Effects of pH on degree of hydrolysis

2.3.5 酶解时间的选择 由图 7 可知, 随着时间的增加, 水解度不断增加, 当增加到一定程度, 时间为 3 h 的时候, 增加的速度开始变慢, 综合考虑效率及成本的问题, 单因素水解时间最优选 4 h。

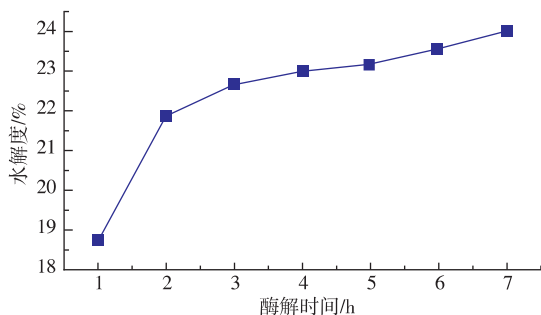


图 7 酶解时间对水解度的影响

Fig. 7 Effects of enzymolysis time on degree of hydrolysis

2.4 最佳工艺条件的确定

通过酶解单因素试验选择最佳的条件, 根据 $L_9(3^4)$ 正交表对其进行正交试验优化, 结果见表 5, 趋势图见图 8。由表 5 和图 8 可以看出, 各因素影响的

主次关系为 $D > C > B > A$ 即酶用量 > 酶解时间 > 酶解温度 > 酶解 pH。各因素的最优水平组合为 $D_3C_3B_2A_2$ 即酶用量为 8‰, 酶解温度为 55 °C, 酶解时间为 5 h, 酶解 pH 值为 6.5。

表 5 酶解正交试验设计方案及结果

Table 5 Design and results of orthogonal test for enzymolysis

实验号	酶解 A pH	酶解温 度 B/°C	酶解时 间 C/h	酶用量 D/‰	水解度/ %
1	1(6.0)	1(50)	1(3)	1(0.4)	16.72
2	1	2(55)	2(4)	2(0.6)	21.73
3	1	3(60)	3(5)	3(0.8)	22.88
4	2(6.5)	1	2	3	23.53
5	2	2	3	1	19.80
6	2	3	1	2	18.67
7	3(7.0)	1	3	2	21.37
8	3	2	1	3	20.73
9	3	3	2	1	17.74
K_1	61.329	61.620	56.121	54.261	
K_2	62.001	62.259	63.000	61.770	
K_3	59.841	59.289	64.050	67.14	
R	0.72	0.99	2.643	4.293	
最优水平	A_2	B_2	C_3	D_3	

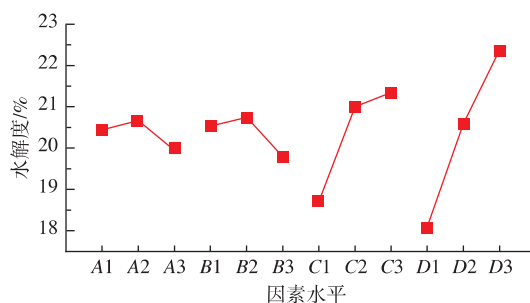


图 8 酶解正交试验因素趋势图

Fig. 8 Statistic curve of orthogonal factors during enzymolysis

3 结 语

作者通过对不同种类的酶水解所得的酶解液的感官品评及水解度的比较, 筛选出最佳的酶组合为复合蛋白酶和风味蛋白酶, 当两者以 1:2 的质量比复配时, 蛋白质回收率及水解度都相对较高。并在一系列的单因素基础上, 以水解度为特征指标,

通过 4 因素 3 水平正交实验对复合蛋白酶与风味蛋白酶的复配水解鸡骨架工艺条件进行优化,得出最佳酶解工艺条件为温度 55 ℃,pH 值 6.5,加酶量 0.8%,水解时间 5 h。此时酶水解鸡骨泥的水解度为

23.69%。在后续的研究中,可以在以上优化条件下改变水解时间,获得不同相对分子质量的多肽和氨基酸的酶解液,以研究不同水解度的蛋白质水解液对美拉德反应的影响。

参考文献:

- [1] 黄师荣,宋焕禄. 热反应鸡肉香精的制备研究[J]. 北京工商大学学报,2001,19(3):9-10.
HUANG Shi-rong, SONG Huan-lu. Study on production of chicken essence by Maillard reaction [J]. **Journal of Beijing Technology and Business University**, 2001, 19(3): 9-10. (in Chinese)
- [2] M Qi, N S Hettiarachchy, U Kalapathy. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin [J]. **J Food Sci**, 1997, 62(6): 1110-1114.
- [3] ZHANG Yuan-gang, B Dorjpalam, Chi-Tang Ho. Contribution of peptide to volatile formation in the Maillard reaction of Casein hydrolyzate with glucose [J]. **J Agric Food Chem**, 1992, 40: 2467-2471.
- [4] 朱凯, 王玉. 蛋白水解制备肉味香精的研究概况[J]. 化学工业与工程技术, 2007, 28(6): 1-4.
ZHU Kai, WANG YU. Research situation of meat flavor using protein hydrolysis [J]. **Chemical Industry and Engineering Technology**, 2007, 28(6): 1-4. (in Chinese)
- [5] 卢晓蕊, 欧阳杰, 鲁军, 等. 采用二次回归法确定鸡肉蛋白酶法水解条件[J]. 生产与科研经验, 2007, 33(7): 85-86.
LU Xiao-rui, OUYANG Jie, LU Jun, et al. Using quadratic regression method to determine the enzymatic hydrolysis conditions of the chicken protein [J]. **Production and Scientific Research Experience**, 2007, 33(7): 85-86. (in Chinese)
- [6] 蔡凤英, 王金水, 史军, 等. 鸡肉蛋白酶解物制备天然调味基料的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 191-192.
CAI Feng-ying, WANG Jin-shui, JUN Shi, et al. Study on producing natural flavoring using chicken protease solution [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2007, 28(8): 191-192. (in Chinese)
- [7] 吕永林, 张留安. 骨类高汤应用问题的产生机理及解决措施探讨[J]. 肉类工业, 2008, 331(11): 25-26.
LV Yong-lin, ZHENG Liu-an. Discussing the mechanism and solving measures of the problem happening in the application of bone stock [J]. **Meat Industry**, 2008, 331(11): 25-26. (in Chinese)
- [8] NEY K H. Hydrolysis of deliberated proteins [J]. **J Food Sci**, 2002, 24(3): 87-89.
- [9] 赵霞, 马丽珍. 酶解利用骨蛋白的研究进展[J]. 肉类工业, 2003, 28(6): 32-36.
ZHAO Xia, MA Li-zhen. Research progress of bone protein using enzyme [J]. **Meat Industry**, 2003, 28(6): 32-36. (in Chinese)