

# 活性炭脱除猪血红蛋白酶解液色泽的技术研究

姚成虎, 王志耕<sup>\*</sup>, 许飞, 董娟娟

(安徽农业大学畜产品加工研究所, 安徽合肥 230036)

**摘要:** 采用正交实验法, 比较研究用量、pH、温度和时间 4 因素对活性炭脱除猪血红蛋白酶解液色泽效果的影响。结果表明: 活性炭的添加量为 1%, pH 为 4.0 温度为 80℃, 时间为 40min 时, 猪血红蛋白酶解液脱色效果明显, 蛋白质损失较少。

**关键词:** 猪血红蛋白, 活性炭, 脱色

**Abstract** The effects of the quantity of activated carbon, pH temperatures and time on decoloration of porcine hemoglobin hydrolysa te by enzyme were studied. The results showed that obvious decoloration and lower loss rate of protein were obtained under the following conditions: the quantity of activated carbon 1%, pH4.0 temperature 80℃ and time 40 minutes.

**Keywords** porcine hemoglobin, activated carbon, decoloration

中图分类号: TS201.2<sup>+</sup>1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)09-0107-03

猪血是一种含有较高营养价值的食品工业副产品, 蛋白质含量高达 18.9%, 其中含有 18 种氨基酸, 8 种必需氨基酸含量占 44.3%<sup>[1]</sup>。猪血蛋白大部分为血红蛋白 (Hemoglobin, Hb), 存在于红血球中, 占总蛋白质的 80%。血红蛋白由血红素和珠蛋白组成, 在酶解过程中释放大量的血色素, 同时血色素中的二价铁可迅速被氧化成三价铁, 使酶解液呈现出深褐色, 影响产品的纯度和呈色, 使其用途受到限制。因此, 脱色是猪血红蛋白有效利用的关键技术之一。国外最早是用酸性丙酮<sup>[2]</sup>对血红蛋白进行脱色, 由于

丙酮消耗量大, 血液蛋白中的溶剂残留难处理, 不宜工业化应用。Auto<sup>[3]</sup> 直接使用吸附剂羧甲基纤维素对牛血红蛋白进行脱色, 结果仍有大约 20% 的血红素铁没有被脱除。目前, 用活性炭对酶解液进行吸附脱色在鱼肉、低聚糖脱色研究中已取得了满意的效果<sup>[4,6]</sup>。利用活性炭对猪血红蛋白酶解液进行脱色, 具有酶用量少, 成本低, 副产物少, 易进行规模化生产, 无二次污染等优点。得到的水解蛋白具有优良的起泡性和乳化性, 能够广泛应用于食品工业。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

新鲜猪血 来自合肥市四河屠宰场; AS1398 中性蛋白酶 无锡市博立生物制品有限公司; 粉末活性炭 食品糖用级; 柠檬酸钠 分析纯。

BS-210S 电子天平, pHS-3B 精密 pH 计, 电热 HH-S 恒温水浴锅, TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, DT-51 离心机, QL-901 旋涡混合器等。

### 1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程 新鲜猪血 → 纱布过滤 → 离心去血清 (4000r/min, 15min) → 加水溶血 → 蛋白酶解 (酶解条件: pH 为 7.5, 温度为 55℃, 酶量为 5000U/g, 时间为 4h) → 灭酶 → 离心取上清液 (4000r/min, 15min) → 脱色 → 离心 (5000r/min, 10min) → 上清液 → 指标测定

#### 1.2.2 测定方法

1.2.2.1 色素测定 用 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计在 250nm 到 450nm 波长之间对酶解液进行扫描, 得到两个特征峰 OD<sub>280</sub> 和 OD<sub>410</sub>, OD<sub>280</sub> 为蛋白质的特征峰; OD<sub>410</sub> 为色素的特征峰。对于浓度较高的溶液, 因色素含量较高, 可以采用示差法<sup>[7]</sup>进行测定。按下式计算脱色率:

$$\text{脱色率} = (A_s - A_0) / A_s \times 100\%$$

收稿日期: 2007-01-29 \* 通讯联系人

作者简介: 姚成虎 (1982-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 畜产品品质与加工。

[8] 张强, 阚国仕, 陈红漫, 刘剑利. 酶解玉米蛋白粉制备抗氧化肽 [J]. 食品工业科技, 2006 26(6): 109-111.

[9] 薛照辉, 尉万聪, 严奉伟, 吴谋成, 周志江. 菜籽肽抗氧化

活性的研究 [J]. 中国油脂, 2006 31(8): 48-50.

[10] 吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究 [D]. 华南理工大学学位论文, 2003.

式中  $A_s$ 、 $A_0$  分别表示在蛋白质浓度一定条件下, 酶解液脱色前后在  $OD_{410}$  的吸光度值。

1.2.2.2 蛋白质含量的测定<sup>[8]</sup> 经酶解后生成的氨基酸和小肽类物质在脱色过程中的损失趋势可以通过蛋白质的损失趋势来反映。本实验用紫外分光光度计测定在  $OD_{280}$  和  $OD_{260}$  吸光度值, 来计算蛋白质的含量。

$$\text{蛋白质含量 (mg/mL)} = F \times 1/D \times OD_{280} \times N$$

式中  $F$ : 校正因子, 通过  $OD_{280}/OD_{260}$  的值查表得到;  $D$ : 石英比色皿的厚度, 本实验比色皿厚度为 1cm;  $N$ : 稀释倍数;  $OD_{280}$ : 酶解液在 280nm 处的吸光度值。

1.2.3 活性炭脱色条件的优化 选择适当的水平, 对活性炭用量、pH、温度和时间进行单因子筛选实验。根据单因素实验结果, 设计四因素三水平的正交实验, 对脱色效果和蛋白质损失率进行条件优化。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 活性炭用量对脱色的影响 将酶解液的 pH 调至 4.0 添加活性炭量分别为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%, 在 55°C 下脱色 40min 后, 离心测定上清液的 OD 值, 实验结果见表 1 和图 1。

表 1 活性炭用量对脱色效果和蛋白质损失的影响

活性炭用量 (%)	0.5	1	1.5	2	2.5	3
脱色率 (%)	51.76	75.16	88.03	94.04	95.64	96.76
蛋白质损失 (%)	16.93	32.02	40.43	50.76	56.15	60.87
颜色	棕红	棕黄	浅黄	浅黄	浅黄	亮清

由图 1 可以看出, 随着活性炭添加量的增加, 脱色率上升, 同时蛋白质的损失率也随之增大。在 0.5%~2% 的活性炭添加量时, 脱色效果增加显著, 蛋白质的损失率也显著增大。在 2%~3% 的活性炭用量时, 脱色效果较好, 酶解液由淡黄色逐渐变亮清, 此时的蛋白质损失率增幅不大。

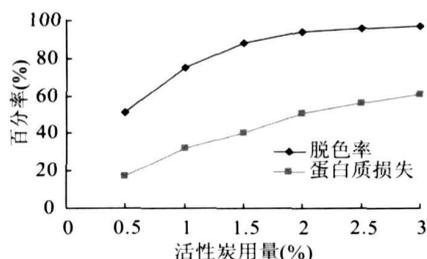


图 1 活性炭用量对脱色的影响

2.1.2 pH 对脱色的影响 将酶解液的 pH 分别调制 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 添加 2% 的活性炭在 55°C 下脱色 40min 后, 离心测定上清液的 OD 值, 实验结果见表 2 和图 2。

由图 2 可以看出, pH 对猪血红蛋白酶解液脱色的效果和蛋白质损失率影响都比较显著。在 pH 4.0~6.0 时, 脱色效果较好; 而在 pH 5.0 时, 脱色效果达到最佳, 但同时蛋白质损失较大。比较而言, pH 4.0 为适宜的脱色处理 pH。

表 2 pH 对脱色效果和蛋白质损失的影响

pH	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
脱色率 (%)	76.01	68.24	73.63	88.83	96.19	91.78
蛋白质损失 (%)	51.89	47.32	43.86	48.96	59.35	60.38
颜色	棕红	棕红	棕黄	浅黄	亮清	浅黄

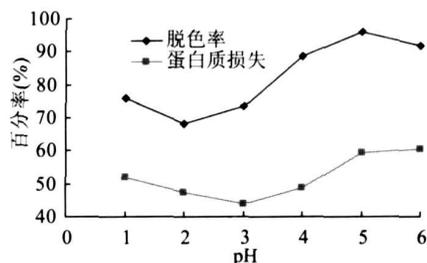


图 2 pH 对脱色效果的影响

2.1.3 温度对脱色的影响 将酶解液的 pH 调至 4.0 在温度分别为 25 35 45 55 65 75°C 的条件下, 添加 2% 的活性炭脱色 40min 后, 离心测定上清液的 OD 值, 实验结果见表 3 和图 3。

表 3 温度对脱色效果和蛋白质损失的影响

温度 (°C)	25	35	45	55	65	75
脱色率 (%)	68.46	79.10	85.16	92.55	96.70	97.61
蛋白质损失 (%)	47.51	50.46	51.36	51.51	51.81	52.11
颜色	棕红	棕黄	棕黄	浅黄	浅黄	亮清

由图 3 可以看出, 温度对酶解液的脱色效果影响非常显著, 随着温度的升高, 脱色效果显著增加, 而对蛋白质的损失率影响不大。从工业生产成本考虑, 55°C 为适宜处理温度。

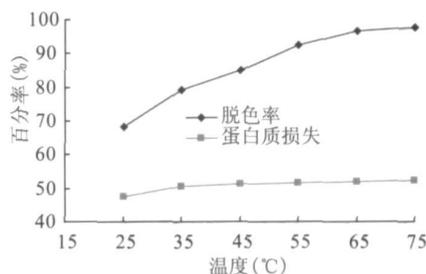


图 3 温度对脱色效果的影响

2.1.4 时间对脱色效果的影响 将酶解液的 pH 调至 4.0 添加 2% 的活性炭, 在 55°C 下分别脱色 20 30 40 50 60 70min 后, 离心测定上清液的 OD 值, 实验结果见表 4 和图 4。

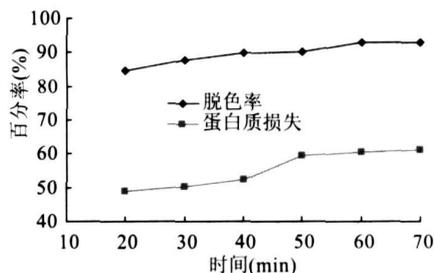


图 4 时间对脱色的影响

表 6 正交实验结果分析表

实验号	因素				脱色率 (%)	蛋白质损失率 (%)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	55.31	35.10
2	1	2	2	2	75.90	33.07
3	1	3	3	3	91.04	42.85
4	2	1	2	3	89.77	51.44
5	2	2	3	1	96.74	51.17
6	2	3	1	2	78.01	61.01
7	3	1	3	2	97.46	60.73
8	3	2	1	3	88.41	62.91
9	3	3	2	1	97.06	72.90
K <sub>1</sub>	222.25	242.54	221.73	249.11		
K <sub>2</sub>	264.52	261.05	262.73	251.37		
K <sub>3</sub>	282.93	266.11	285.24	269.22		
R	60.68	23.57	63.51	20.11		
脱色率						
K <sub>1</sub> '	111.02	147.27	159.02	159.17		
K <sub>2</sub> '	163.62	147.15	157.41	154.81		
K <sub>3</sub> '	196.54	176.76	154.75	157.20		
R	85.52	29.61	4.27	4.36		
蛋白质损失率						

表 4 时间对脱色效果和蛋白质损失的影响

时间 (m in)	20	30	40	50	60	70
脱色率 (%)	84.63	87.66	89.63	90.11	92.71	92.77
蛋白质损失 (%)	48.81	50.16	52.11	59.59	60.49	61.09
颜色	棕黄	棕黄	棕黄	浅黄	浅黄	浅黄

由图 4 可以看出,随着脱色时间的延长,酶解液的脱色率和蛋白质损失率都随之增加,在 40~50m in 时,蛋白质损失率增幅较明显,而脱色效果增幅不大,为此,确定 40m in 为适宜脱色处理时间。

## 2.2 正交实验结果分析

根据单因素实验结果,用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验进行条件优化,水平设计及实验结果分析分别见表 5 和表 6。

表 5 活性炭脱色因素水平表

水平	A 添加量 (%)	B pH	C 温度 (°C)	D 时间 (m in)
1	1	2.0	30	25
2	2	4.0	55	40
3	3	6.0	80	55

从正交结果分析表可以看出,以脱色率为评定指标时,对脱色效果的影响大小为:温度 > 活性炭添加量 > pH > 时间,最佳脱色效果工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即活性炭用量为 3%,pH 6.0 80°C 下脱色吸附 55m in 以蛋白质损失率为指标时,对蛋白质损失率的影响大小为:活性炭添加量 > pH > 时间 > 温度,蛋白质损失率最小的脱色工艺为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即活性炭用量为 1%,pH 4.0 80°C 下脱色吸附 40m in。综合两项评定指标,分析结果可知:温度对脱色效果影响最大,但对蛋白质损失率影响最小,以选用 80°C 为好;随着活性炭用量的增加,脱色效果明显增加,但造成蛋白质的损失率较大,生产成本也随之提高,在实际生产中宜采用 1% 添加量;虽然 pH 6.0 脱色效果较好,但 pH 6.0 时对蛋白质的损失率影响比较大,从单因素实

验也可以看出, pH 6.0 相对 pH 4.0 时蛋白质损失率较大,而脱色效果影响不大,所以 pH 4.0 为适宜 pH; 时间对脱色效果影响比较小,考虑随脱色时间的增长,蛋白质损失率和能源消耗增大,以 40m in 为宜。

## 3 结论

根据紫外分光光度法测定血红蛋白酶解液的光度值,来确定脱色率和蛋白质损失率的方法快速简便,对比明显。综合考虑两项指标和在实际生产中的成本及应用,确定实验以 1% 活性炭用量,在 pH 4.0, 80°C 条件下脱色吸附 40m in 为活性炭处理猪血红蛋白最佳脱色工艺,其酶解液脱色率为 87.68%,蛋白质损失率为 37.83%。

## 参考文献:

- [1] 冯来坤,杨洪兴,江文正,等. 猪胸腺肽对人红细胞免疫功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(2): 86-86
- [2] Jope ZM, Jope H M, Obrien JR P. Crystallizable recombinant hemoglobin from human red cell hemoglobin[J]. Nature 1949, 164: 622-625.
- [3] Sato Y, Hayakawa S, Hayakawa M. Preparation of bovine hemoglobin through carboxymethyl cellulose chromatography[J]. Food Technol 1981, 16: 81-89.
- [4] 施文正,汪之和,林争艳,等. 白鲢鱼蛋白水解液脱腥脱苦的研究[J]. 海洋水产研究, 2004(3): 28-32
- [5] 郑桂富,徐振相. 鲢鱼蛋白水解液脱色效果的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(9): 25-27.
- [6] 赵一凡,谷克仁,黄贤校. 大豆低聚糖活性炭脱色实验[J]. 粮油加工, 2006(8): 59-60.
- [7] 刘灿明,王日. 无机及分析化学[M]. 中国农业出版社, 1999.
- [8] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 科学技术出版社, 2003.