

采用木瓜蛋白酶 制备乌鸡蛋白肽的研究

龙彪¹, 彭志英¹, 陈中¹, 邱礼平², 陈勇根²

(1. 华南理工大学食品与生物工程学院 广东广州 510640 2. 深圳市生物谷科技投资有限公司 广东深圳 518026)

摘要:探讨了各单因子对木瓜蛋白酶酶解乌鸡蛋白质的影响及水解度与肽得率、总氮得率之间的关系。结果表明 pH 变化对肽得率影响很小, 随着时间延长, 水解度和总氮得率不断升高, 肽得率 3h 后达到平衡阶段; 温度 < 70℃, 随着温度的提高、酶用量的增加, 水解度、肽得率和总氮得率均增加, 但总氮得率增加明显, 随着底物浓度的减少, 水解度几乎不变, 而肽得率和总氮得率均增加。综合考虑, 最佳水解条件为温度 70℃, 酶用量 [E/S] 4000U/g, 底物浓度 7%。酶解 3h 后, 酶解液中必需氨基酸 37.41%, 氨基酸总量 61.01mg/mL, 其中游离氨基酸 9.89%, 肽含量 90.11%。

关键词: 乌鸡, 木瓜蛋白酶, 水解度, 肽得率, 总氮得率

Abstract: This paper investigates the factors' affecting hydrolysis of Gallus Demesticus Brosson with papain and the relationship between degree of hydrolysis, ratio of peptide recovery and total nitrogen recovery. The results indicated that change of pH had little effect on peptide recovery ratio. When temperature was lower than 70℃, with increase of temperature, enzyme dosage and hydrolysis duration, degree of hydrolysis, ratio of peptide recovery and total nitrogen recovery climbed up gradually, and peptide recovery ratio reached plateau-stage after 3h. With decrease of substrate concentration, degree of hydrolysis didn't change, but ratio of peptides recovery and total nitrogen recovery rose slowly. The optimum conditions were established as follows: hydrolyzing temperature (70℃), enzyme concentration (4000U/g) and substrate concentration (7.0%). After hydrolysis for 3h, the essential and total concentration of amino acids were 37.41% and 61.01mg/mL, the content of free amino acids and peptides were 9.89% and 90.11%.

Key words: Gallus Demesticus Brosson; papain; degree of hydrolysis; peptide recovery ratio; total nitrogen recovery ratio

中图分类号: TS201.2*5 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2005)06-0135-04

乌鸡 (*Gallus Demesticus Brosson*) 是我国的一种特有鸡种, 含有丰富的人体所需的营养成分, 其中蛋

白质比普通大黄鸡高 1.52 倍, 必须氨基酸齐全, 且第一、二、三限制性氨基酸含量较高^[1]。近年来, 随着人工驯养、大量繁殖成功, 乌鸡产量大增, 人们对开发和利用乌鸡越来越重视。生物活性肽通常是指由几个或十几个氨基酸分子结合形成的肽链, 可在人体小肠内直接吸收, 具有多种生理功能, 如能降低血液中胆固醇, 降低血压, 增强机体免疫能力等^[2-4]。因此, 用酶法将乌鸡蛋白质中具有生理功能的肽段释放出来制备成具有生理功能的生物活性肽, 对乌鸡的精深加工有着重要的意义。

本研究就以木瓜蛋白酶酶解乌鸡蛋白质制备短肽, 探讨了酶反应各因子及水解程度与肽得率、总氮得率之间的关系, 旨在为深入研究与利用乌鸡生物活性肽奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乌鸡 市售, 具有“十全”特征, 个体重 1.0kg 左右, 测定乌鸡肉糜中水分 73.45%、蛋白质 20.01%、脂肪 4.65%; 木瓜蛋白酶 活力 4×10^5 U/g, 广州裕立宝生物科技有限公司; NaOH、HCl、浓硫酸、甲醛、H₂SO₄ 等均为化学纯。

R20B2 型高速冷冻离心机 日立; Alpha-4 真空冷冻干燥装置 德国; Waters 高效液相色谱仪 美国; Buchi 全自动凯氏定氮仪 瑞士; JB-2 型恒温磁力搅拌器 上海雷磁仪器厂; HHS-2D 电热恒温水浴锅 上海医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解工艺流程 乌鸡 → 绞碎成肉糜 (含骨、去内脏) → 加水打浆 → 70℃ 预热 10min → 加木瓜蛋白酶酶解 → 沸水中保温 20min 灭酶 → 水解度测定 → 4000r/min, 离心 15min → 硅藻土过滤 → 清液 → 指标测定 → 冷冻干燥

1.2.2 水解度 (DH) 测定 甲醛滴定法^[5] DH 值 = $\frac{h}{h_{100}} \times 100\%$ 。

收稿日期: 2004-11-18

作者简介: 龙彪 (1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

1.2.3 肽得率与总氮得率的测定 TCA 沉淀法^[6]。

1.2.4 酶活力测定 紫外分光光度法^[7]。

1.2.5 氨基酸组成分析 酶解液经 6mol/L HCl 水解后,用 Waters 高效液相色谱仪进行总氨基酸组成分析,另取样用 5mol/L NaOH 水解后,同机测定色氨酸含量,游离氨基酸组成分析直接用酶解液进行。

2 结果与讨论

2.1 酶解单因子影响的研究

2.1.1 酶解时间和体系 pH 在试验中,选取底物浓度 7.0%,酶用量[E/S]4000U/g,温度 60℃对乌鸡蛋白质进行酶解,研究酶解时间及是否加碱恒定体系 pH 对酶解的影响,结果见图 1~图 3。

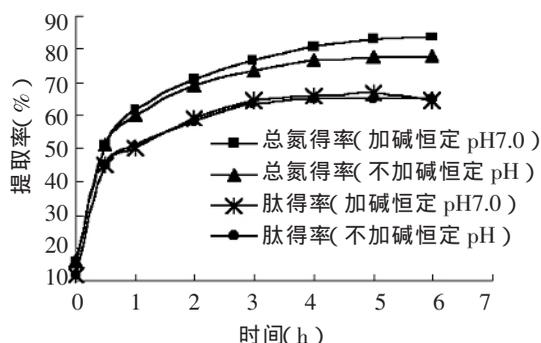


图 1 体系 pH 恒定与否对肽得率和总氮得率的影响

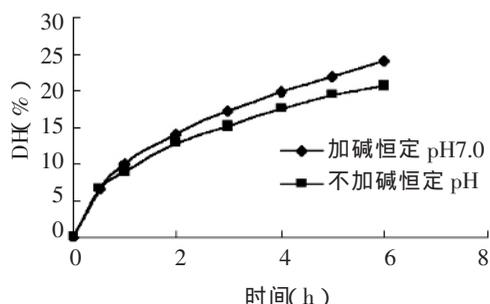


图 2 体系 pH 恒定与否对 DH 的影响

由图 1、图 2 可知,最初 1h 内,水解迅速,肽得率、总氮得率都升高很快,随后水解变慢,肽得率和总氮得率上升也变慢。3h 后,总氮得率和 DH 继续缓慢上升,而肽得率则达到平衡状态,6h 后反而有所降低。故为了得到较多的肽量,时间不能过长也不能过

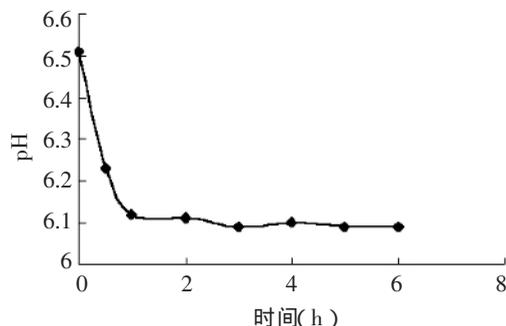


图 3 不加碱体系 pH 变化曲线

短,因此认为 3~5h 为木瓜蛋白酶酶解乌鸡蛋白质的最适时间。

从图 1、图 2 可知,加碱恒定体系 pH 对 DH 和总氮得率有利,当水解时间超过 3h 后,两者 DH、总氮得率的差距逐步拉大,到 6h 时,DH 相差约 1.5%,总氮得率相差约 5%,而肽得率则相差不大,两条曲线几乎重合。另从图 3 可知,酶解时不加碱恒定体系 pH,pH 由刚开始的 6.51 在 1h 内迅速下降至 6.10 后就几乎不再变化,但从图 2 可知,酶解仍在进行。另外由于在水解过程中加碱恒定体系 pH 将导致水解产物中盐分含量的增加,需增加后续脱盐工序,不利于降低产品成本和提高产品纯度^[8],故选用在不加碱恒定 pH 条件下研究木瓜蛋白酶酶解乌鸡蛋白质的工艺条件。

2.1.2 温度 木瓜蛋白酶的最适温度一般在 50~80℃之间,随着底物不同而有差异,故选用 50、60、70、75、80℃五水平做实验,结果见表 1。

由表 1 可知,在酶解温度 50~70℃时,随着温度的上升,DH、肽得率以及总氮得率都不断升高,而且升高很快;当温度超过 75℃,DH、总氮得率和肽得率迅速下降,主要是因为温度过高,导致酶的迅速失活。故认为 70℃为最适反应温度。

2.1.3 酶用量 在酶解时间、pH、温度确定后,酶用量也是一个很重要的影响因素,本文研究在底物浓度 7.0%、温度 70℃下不同酶用量对酶解的影响,结果见表 2。

由表 2 可见,在酶用量达到 3000U/g 前,随着酶

表 1 反应温度对酶解效果的影响

温度(℃)	50	60	70	75	80
DH(%)	10.27	15.89	19.12	19.01	15.21
肽得率(%)	59.21	63.45	68.45	67.5	64.00
总氮得率(%)	65.80	73.21	79.64	79.53	73.27

表 2 酶用量对酶解效果的影响

酶用量[E/S](U/g)	0	2000	3000	4000	5000	6000
DH(%)	3.41	13.91	17.52	19.12	20.38	21.03
肽得率(%)	20.87	54.80	64.93	68.45	69.90	70.50
总氮得率(%)	30.21	63.01	75.27	79.64	82.71	84.79

表3 底物浓度对酶解的影响

底物浓度(%)	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	10.0
DH(%)	19.13	19.12	19.13	19.12	18.02	12.01
肽得率(%)	70.63	70.60	69.55	68.45	67.78	60.27
总氮得率(%)	82.75	82.33	81.02	79.64	78.27	70.57

用量的增加,酶解速度加快,肽得率和总氮得率急剧升高,但当酶用量从3000U/g增到6000U/g时,虽然酶用量增加2倍,但总氮得率仅增加12.65%,肽得率增加8.58%,肽得率在酶用量到达4000U/g后增幅不大。因此,综合考虑,选择酶用量4000U/g较合理。

2.1.4 底物浓度 选用的底物浓度分别为4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、10.0%,在70℃、酶用量[E/S]4000U/g条件下对乌鸡蛋白质进行酶解,结果见表3。

由表3可知,当底物浓度为4.0%~7.0%时,DH几乎不变,肽得率和总氮得率随着底物浓度减少而缓慢上升,不过上升幅度逐步降低,但当底物浓度由7%增到10%时,DH值下降37.2%,总氮得率下降12.5%,肽得率下降12.0%,这说明一方面,体系中底物浓度过高,体系有效水浓度过低,降低了底物蛋白分子和酶分子的扩散和运动,从而降低了底物与酶分子的碰撞几率,使反应速度降低;另一方面,体系中高浓度的底物蛋白可能集聚于蛋白酶的活性部位,形成无活性的中间产物,抑制水解反应。同时,加水量的增加也给后续工序,如浓缩增加负荷。故选择底物浓度7.0%为最佳。

2.2 DH与肽得率、总氮得率之间的关系

前面结果显示,在不同单因子条件下,DH与总氮得率及肽得率关系不同。根据图1、图2结果,以DH对总氮得率和肽得率作图,结果见图4。

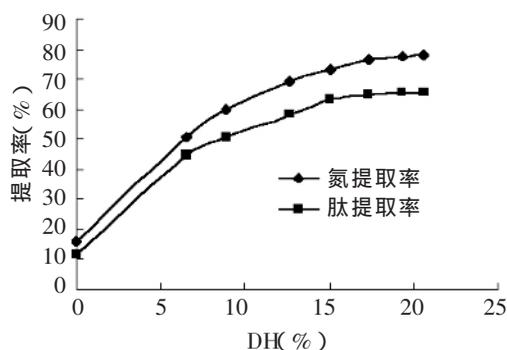


图4 DH值与氮提取率和肽得率之间的关系

由图4可知,总氮得率和肽得率都随着DH的增加而增加,其中总氮得率增幅要比肽得率大。当DH大于15%以后,总氮得率继续缓慢上升,而肽得率则达到平衡阶段,不再上升。体系DH的上升,表明水解体系中仍存在着肽键被断裂的情况,肽得率的恒定主要是基于蛋白质自身水解产生肽类速度与肽类被水解成氨基酸的速度接近,而且肽类物质自身水解

成分子量更小的肽分子的过程对肽得率的增长基本没有贡献。由表1可知,随着温度提高,酶解反应加速,总氮得率在单位DH内的增幅要大于肽得率,主要因为生成的肽部分被降解成氨基酸,使肽得率增加较慢。由表2可知,在酶用量4000~6000U/g内时,平均每增加1000U/g,DH分别增加6.6%和3.2%,总氮得率增加3.9%和2.5%,而肽得率仅增加2.1%和0.9%,说明当酶用量达到一定程度后,再增加酶用量,酶解反应加速不明显,更多的酶作用于肽类生成更小的肽及氨基酸。从表3可得,当底物浓度从7%下降到6%、5%、4%,其DH变化不大,肽得率分别增加1.6%、3.1%、3.2%,总氮得率分别增加0.5%、2.1%、2.6%,其中肽得率增幅要大于总氮得率,主要是因为加水量的增加只是使底物蛋白溶解度增加的结果^[9]。

2.3 酶解液氨基酸分析结果

用优化后的工艺条件对乌鸡蛋白质进行酶解,酶解3h后所得酶解液利用Waters高效液相色谱仪进行氨基酸分析,得总氨基酸组成及游离氨基酸组成,结果见表4。

表4 乌鸡蛋白质水解液的总氨基酸及游离氨基酸分析结果(mg/100mL)

氨基酸(AA)	AA含量	游离AA含量
天冬氨酸 Asp	471.87	30.99
谷氨酸 Glu	862.79	77.19
丝氨酸 Ser	231.24	9.56
甘氨酸 Gly	395.35	20.96
组氨酸 His	400.34	3.83
精氨酸 Arg	461.33	92.18
苏氨酸 Thr	245.05	/
丙氨酸 Ala	430.66	40.45
脯氨酸 Pro	320.14	26.49
酪氨酸 Tyr	220.99	42.92
缬氨酸 Val	253.59	17.51
蛋氨酸 Met	143.52	25.23
半胱氨酸 Cys	23.87	8.74
异亮氨酸 Ile	205.09	6.98
亮氨酸 Leu	403.47	65.88
色氨酸 Trp	346.73	48.06
苯丙氨酸 Phe	228.79	32.31
赖氨酸 Lys	456.02	53.78
总量	6100.80	603.07

由表4可见,可控酶解乌鸡蛋白质所得的酶解液由18种氨基酸组成,氨基酸总量61.01mg/mL,必需氨基酸37.41%,游离氨基酸9.89%,肽含量90.11%,其中谷氨酸含量最高(14.29%),其次是天门冬氨酸和赖氨酸(分别为8.02%和7.32%),由此可

2.3.1 光照实验 将本品置于光强为 $4500 \pm 500 \text{Lx}$ 的光照试验箱中 10d, 于 0、1、5、10d 各取样一次, 分别考察其外观、硬度、脆碎率、水分、含钙量的变化情况。结果表明, 本品对光较稳定。

2.3.2 高温实验 将本品置于温度为 40、60℃ 的恒温箱中 10d, 于 0、1、5、10d 各取样一次, 分别考察其外观、硬度、脆碎率、含钙量的变化情况。结果表明, 本品在 60℃ 以下较为稳定。

2.3.3 高湿实验 将本品置于相对湿度为 75% 和 92.5% 的恒湿器中 10d, 于 0、1、5、10d 各取样一次, 分别考察其外观、硬度、脆碎率、含钙量的变化情况。结果表明, 本品在这两个湿度条件下均有吸潮现象。因此, 本品应在干燥条件或密闭条件下贮存。

3 产品质量标准

3.1 感官指标

本品为白色片状, 外观圆整光洁, 色泽均匀, 边缘整齐; 口感细腻、酸甜可口、入口有凉爽感, 无异味。

3.2 理化指标

水分 $\leq 2.0\%$, 脆碎度 $\leq 0.6\%$, 钙含量为标示量的 90%~110%, $\text{As} < 0.5 \text{mg/kg}$, $\text{Pb} < 10 \text{mg/kg}$ 。

3.3 卫生指标

细菌总数 ≤ 5000 个/g, 大肠菌群 ≤ 60 个/100g, 致病菌不得检出。

4 结论

(上接第 137 页) 见, 该乌鸡蛋白质酶解液肽含量高, 营养价值丰富, 可作为各种功能食品的基料。

3 结论

3.1 木瓜蛋白酶可控酶解制备乌鸡肽时, 保持 pH 恒定只对水解度和总氮得率提高有利, 对肽得率影响不大。刚开始 1h 内, 酶解反应加剧, 总氮得率和肽得率迅速上升, 但很快就趋于平缓, 肽得率 3h 后达到平衡, 6h 后有所下降。

3.2 温度小于 70℃, 随温度的提高、酶用量的增加, 水解度、肽得率和总氮得率均增加, 但总氮得率增幅要比肽得率明显, 主要因为更多的肽被降解成更小的肽和氨基酸。

3.3 随着底物浓度的减少, 水解度几乎不变, 而肽得率和总氮得率均增加, 其中肽得率增幅要大于总氮得率, 主要是因为加水量的增加只是使底物蛋白溶解度增加的结果。

3.4 最佳酶解条件为: 温度 70℃, 酶用量 4000U/g, 底物浓度 7.0%, 酶解时不加碱恒定 pH, 在此条件下酶解 3h, 水解度可达 19.12%, 总氮得率为 79.64%, 乌鸡肽得率为 68.45%。分析氨基酸组成可知, 必须氨基酸占总氨基酸的 37.41%, 总氨基酸为 61.01mg/mL, 其中游离氨基酸 6.03mg/mL, 肽含量占 90.11%。

4.1 以 CCM 制备咀嚼片在国内外尚未见报道。本研究利用废弃蛋壳为原料制备高吸收的补钙制剂——柠檬酸-苹果酸复合钙(CCM)咀嚼片, 既为蛋壳的综合利用开辟了一条新的途径, 又为人体补钙增加了一个新品种, 具有极大的社会效益和经济效益。

4.2 研究表明, 柠檬酸-苹果酸复合钙(CCM)咀嚼片制备工艺稳定、可靠。本品对光及温度较稳定, 在高湿条件下吸湿, 应于干燥条件下贮存。

4.3 采用(CCM)制成的柠檬酸-苹果酸复合钙咀嚼片具有口味好、携带及服用方便、人体易吸收等特点, 特别适合于儿童及吞咽片剂困难的人群服用。

参考文献:

- [1] 徐瑞美. 口服补钙剂的合理选择及应用[J]. 中国误诊学杂志, 2002, 2(7): 1103.
- [2] 江伟强. 麦胚钙片的研制[J]. 食品工业科技, 2000, 21(6): 51~53.
- [3] 高宪枫, 郑建仙. 论钙的营养与强化[J]. 食品与发酵工业, 1999(4): 48~52.
- [4] 段惠敏, 李淑芳, 郭光美, 等. 补钙与钙营养强化剂[J]. 食品科技, 2002(1): 64~65.
- [5] 段惠敏, 郭光美, 王云清, 等. 利用蛋壳制备柠檬酸-苹果酸钙(CCM)的生产工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(3): 51~53.
- [6] 张汝华. 工业药剂学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999, 3.315.

参考文献:

- [1] 房兴堂, 薛忠, 王庆林, 等. 乌骨鸡的研究进展及产品开[J]. 经济动物学报, 2001, 5(2): 52~58.
- [2] D A Clare, H E Swaisgood. Bioactive milk peptides: A prospectus[J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83: 1187~1195.
- [3] Carmen, Maria, Aranzazu, et al. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers[J]. Journal of Controlled Release, 2004, 95: 27~49.
- [4] Am'elie Mercier, Sylvie F Gauthier, Ismail Fliss. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests[J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 175~183.
- [5] 赵新淮. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994(11): 65~67.
- [6] 赵亚丽. 可控酶解酪氨酸钠制备小分子肽的研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士论文, 2003. 11~12.
- [7] 方焕, 生吉萍, 吴显荣. 工业生产中木瓜蛋白酶的活性检测方法比较[J]. 食品与机械, 2000, 80(6): 27~29.
- [8] 林伟锋. 可控酶解从海洋鱼蛋白中制备生物活性肽的研究[D]. 广州: 华南理工大学博士论文, 2003. 36~39.
- [9] 杨萍, 邓尚贵, 吴玉廉, 等. 木瓜蛋白酶在制取青鳞鱼可溶性蛋白中的应用[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(3): 38~41.