

骨蛋白水解物功能性质的研究

刁静静¹, 刁新平², 孔保华¹, 陈洪生³

(1.东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030; 2.东北农业大学动物科技学院 哈尔滨 150030;
3.黑龙江八一农垦大学食品学院 大庆 163319)

摘要: 将骨蛋白利用碱性蛋白酶进行水解来达到改善骨蛋白的功能性质, 以便于扩大骨蛋白在食品工业中的应用。本试验将制备的骨蛋白用碱性蛋白酶水解不同时间, 用 pH-Stat 法测定其水解度, 并测定不同时间的水解产物的持水性和持油性, 并测定在不同的 pH 条件下的乳化性及乳化稳定性、起泡性以及起泡稳定性。试验结果表明, 骨蛋白的水解物具有较好的持油性、乳化性及起泡性, 尤其是 3h 的水解产物, 但是乳化稳定性和起泡稳定性差。
关键词: 骨蛋白; 水解; 水解物; 功能性质

Functional Property of Bone Protein Hydrolysates

Diao Jing-jing¹, Diao Xin-ping^{2*}, Kong Bao-hua¹, Chen Hong-sheng³

(1.College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030;
2.College of Animal Science, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030;
3.College of Food Science, Heilongjiang August First Land Reclamation university, Daqing, 163319)

Abstract: In order to improve the functional properties of bone protein and extend its application in food industry, bone protein was hydrolyzed by alcalase for different times. Degree of hydrolysis was determined using pH-State method, and water-holding capacity, oil-holding capacity, emulsification, foaming and foaming stability of bone protein hydrolysates were determined. The results showed that the oil-holding capacity, emulsification and foaming activity of bone protein hydrolysates increased gradually with the increase of degree of hydrolysis, especially for 3h hydrolysate. However emulsification stability and foaming stability of the hydrolysates reduced at a certain extent.

Key words: Bone protein; Hydrolysis; Hydrolysates; Functional property

中图分类号: TS251.19 文献标志码: A 文章编号: 1001-8123 (2008)03-0021-04

畜禽骨是肉制品加工过程中的副产物, 骨头本身含有 11%~15% 的蛋白质, 骨骼中的蛋白质中 90% 为胶原、骨胶原及软骨素(酸性粘多糖), 骨中的胶原蛋白是一种结构蛋白, 呈纤维状, 它是动物体内含量最丰富的蛋白质, 占动物体内总蛋白的

25%~30%^[1]。目前蛋白质水解物的生产方式分为化学降解法和酶降解法。化学法是利用酸碱水解蛋白, 反应条件剧烈, 生产过程中氨基酸受损严重。酶法水解与化学法相比, 可以减少营养物质的损失。酶工程属现代生物技术, 酶法水解骨蛋白属高

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目资助 (GB06B403)

作者简介: 刁静静 (1981-), 女, 硕士, 研究方向肉品科学。

新技术范畴。而且酶水解蛋白的产物主要是多肽和游离氨基酸^[2]。通过酶解可有效利用骨中的胶原蛋白,将其水解成胶原多肽及氨基酸,将更易于人体消化吸收,发挥出独特的营养功效,同时还可提高其功能特性。本文将骨中提取的骨蛋白利用碱性蛋白酶进行水解,分析其持水性、持油性、乳化性及乳化稳定性、起泡性及起泡稳定性,综合分析酶法对于骨蛋白功能性质的影响,为以后骨蛋白的更好利用提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备

猪腿骨 购于哈尔滨市北大荒肉业有限公司,Alcalase 购于丹麦 Novo 公司,大豆色拉油购于家乐福超市;氢氧化钠、氢氧化钙、盐酸等为分析纯购于哈尔滨市万太生物药品公司。

主要仪器 DK-S24 型电热恒温水浴锅,上海森信实验仪器有限公司;LNK-871 型凯氏定氮仪,江苏省宜兴市科教仪器研究所;AL104 精密电子天平、DELTA 320 pH 计,梅特勒-托利多仪器有限公司;LGJ-1 冷冻干燥机,上海医用分析仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 骨蛋白的制备

剔除猪腿骨上的肉、皮、骨膜等非骨物质,将其粉碎,碎骨 1~2cm²,将骨碎片在室温下用 0.6N HCl 浸泡 24h 以去除钙、磷等非有机成分,料液比为 10%,而后用自来水反复洗涤以除去骨髓以及一些非有机成分,重复几次,将盐酸浸泡过的骨碎片移入浓度为 0.1% 的 Ca(OH)₂ 中浸泡 24h,待骨块呈现洁白时,用稀盐酸调节骨碎片的 pH 到 7,再用清水洗净,除掉杂质,而后将处理后的骨碎片(骨:水=1:5)在 90℃ 下进行煮制 5~6h,过筛,得到骨胶溶液^[3]。将骨胶溶液冷冻干燥,得到骨蛋白粉,采用凯氏定氮法测定其蛋白含量。

1.2.2 骨蛋白的酶水解反应

将骨蛋白粉与适量的水混合,配制成浓度为 7% 的骨蛋白溶液,用 1mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 值,加入一定量的蛋白酶,于一定温度水浴下振荡水解,反应过程中不断加入 1mol/L 的 NaOH,使 pH 保持恒定,记录耗碱量(mL),用于计算水解度(degree of hydrolysis, DH)。待水解结束后调节 pH 到 7.0,并在搅拌条件下迅速升温至 95℃,保

持 10min 使酶灭活。酶水解液冷冻干燥,保存备用。

1.2.3 水解度 (Degree of hydrolysis, DH) 的测定 水解度的测定采用 pH-Stat 法^[4],水解度的计算公式按下式计算:

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

$$h = B \times N_b \times 1 / \alpha \times 1 / MP$$

式中: h = 单位质量蛋白质中被水解的肽键的量 (mmol/g); h_{tot} = 单位质量蛋白质中肽键的总量 (mmol/g), 骨蛋白 h_{tot} = 11.1 mmol/g; B = 水解过程中所消耗的碱量 (ml); N_b = 碱液的浓度 (mol/l); MP = 水解液中蛋白质的质量 (g); 1/α —— 校正系数 (碱性蛋白酶的 1/α = 1.01)。

1.2.4 功能性质的测定

1.2.4.1 持水性、持油性的测定

参照 Bouchat^[5]的方法。持水性: 0.5g 样品与 5ml 去离子水于离心管中混匀,室温下静置 30min 后,2000r 离心 30min,测定上清液体积,体积前后差值即为样品吸水量。持水性以每克样品吸附水的毫升数表示。

持油性: 0.5g 样品与 5ml 大豆色拉油于离心管中混匀后,2000r 离心 30min,测定上清液的体积,体积前后差值即为样品吸油量。持油性以每克样品吸附油的毫升数表示。

1.2.4.2 乳化性的测定

参照 Pearce and Kinsella^[6]的方法,并做适当修改。24ml 0.1% (W/V) 样品溶液用 0.1mol/L HCl 或 0.1mol/L NaOH 分别调 pH 至 3.0、5.0、7.0、9.0 后,加入 8ml 大豆色拉油,剪切乳化仪 10000r/min 搅打 1min 后立即于容器底部取样 100ul,用 0.1% 的 SDS 溶液稀释 100 倍,混匀后于 500nm 处测定吸光值,以 SDS 溶液作为空白。室温放置 10min 后再次取样测定其乳化稳定性 (ESI)。乳化活性 (EAI) 和乳化稳定性 (ESI) 按下式计算:

$$EAI(m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A_{500} \times N) / (C \phi L \times 10^4)$$

$$ESI(\text{min}) = (A_0 \times 10) / (A_0 - A_{10})$$

式中 C — 样品浓度, g/ml; φ — 乳化液中油相的比例, 0.25; L — 比色杯的光径; N — 稀释倍数; A₀ — 初始乳化液的吸光值; A₁₀ — 10min 后的吸光值。

1.2.4.3 起泡性的测定

参照 Waniska and Kinsella^[7]的方法。40ml 2%

(W/V) 的蛋白溶液用 0.1mol/LHCl 或 0.1mol/LNaOH 分别调 pH 至 3.0、5.0、7.0、9.0 后, 在高速搅拌器中以 10000r/min 搅打 3min, 测量搅打停止时的泡沫及液体总体积 V_0 和搅打 30min、60min 后的泡沫及液体总体积 V_1 , 起泡性和泡沫稳定性表示如下:

$$\text{起泡性} = (V_0 - 20) / 20 \times 100\%$$

$$\text{泡沫稳定性} = (V_1 - 20) / (V_0 - 20) \times 100\%$$

1.2.5 数据处理

所得数据均为三次重复的平均值, 用 Statistix 8(分析软件, St Paul, MN) 进行数据分析, 平均数之间显著性差异 ($P < 0.05$) 通过 Turkey HSD 进行, 用 Sigmaplot 9.0 软件作图。

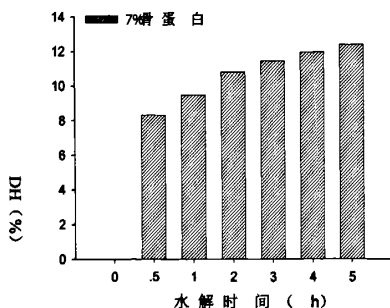
2 结果与分析

2.1 碱性蛋白酶水解骨蛋白的水解度

图 1 反映了碱性蛋白酶水解骨蛋白的水解程度。随着水解时间的增加, 水解度也在持续增加。在 0.5h 时, 骨蛋白的水解度增加显著 ($P < 0.05$), 而在 0.5h 后, 水解度的增加很缓慢。这可能是由于: 蛋白分子中能被水解的特异性肽键数目不断减少; 酶在反应体系中的活性逐渐降低; 底物和水解产物之间的竞争性抑制作用引起的^[8]。

图 1 碱性蛋白酶水解骨蛋白的水解度

Fig.1 Degree of hydrolysis of alcalase-hydrolyzed bone protein



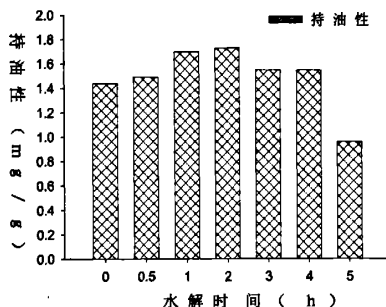
2.2 持水性和持油性

酶解主要引起蛋白质以下几方面的变化: 蛋白质分子致密的空间结构受到破坏; 多肽链分子量减小; 酶解产物的极性基团 ($-\text{NH}_3^+$ 、 $-\text{COO}^-$) 数目增加, 削弱了蛋白质-蛋白质之间的疏水相互作用, 同时蛋白质-水的作用得以增强。这三方面都增强了蛋白质的溶解性。由试验得出骨蛋白水解物具有较高的溶解性, 在测定溶解性时, 骨蛋白水解物在 10min 后全部溶解, 所以持水能力无法测定。

由表 2 可知不同时间的骨蛋白水解产物的持油性。2h 时, 骨蛋白水解产物的持油性达到了较高的程度, 随着水解时间的增加, 其持油的能力逐渐降低。Kinsella^[9]指出蛋白质的吸油能力主要是蛋白颗粒对油脂的物理截留作用造成的, 微粒越大, 总表面积越小, 在宏观上表现为样品的容积密度越大, 持油能力就越小。从微观角度来讲, 蛋白质的持油性与其分子表面亲脂基团的性质有关。而骨蛋白水解物具有较高的持油性, 可能是由于水解后的分子结构发生了变化, 使亲脂基团暴露出来, 从而具有较高的持油能力。

图 2 不同时间的骨蛋白水解产物的持油性

Fig. 2 Oil holding capacity of alcalase-hydrolyzed bone protein with different time



2.3 乳化性和乳化稳定性

骨蛋白经过碱性蛋白酶水解后, 酶解产物的乳化活性在所有 pH 条件下均有所增加。由表 1 可知, 在骨蛋白的等电点 ($\text{pH}=5.0$) 时, 其乳化效果最差, 在偏离等电点的 pH 条件下的乳化活性较高 ($P < 0.05$)。而且骨蛋白水解物的乳化活性显著高于未水解物的, 尤其是 3h 的骨蛋白水解物, 显示出了较高的乳化活性。而水解 4-5h 的产物则没有水解 3h 的乳化活性高。这是由于蛋白质溶解性的提高和疏水性的增强。一方面, 骨蛋白属于可溶性蛋白, 具有较高的溶解性, 而蛋白质的可溶性是蛋白质具有乳化特性的先决条件, 只有可溶性的蛋白质才能对乳化作用做出贡献, 蛋白质的乳化能力与溶解度呈正相关。另一方面, 酶水解能造成蛋白分子致密的空间结构的破坏, 使部分包埋在分子内部的疏水基团暴露出来, 促进了分子亲水、疏水性质的平衡, 从而提高了乳化活性。

由表 2 可知, 骨蛋白水解产物的乳化稳定性在等电点处效果很差, 而且水解时间为 3h 的产物显示出了较高的乳化稳定性, 而随着水解时间的增加, 其稳定性在减小。这可能是由于长时间的酶解

蛋白质分子水解物为较小的肽和氨基酸,由于他们的分子结构较小,他们在油状微粒周围形成的蛋白质层更不稳定,因此不能有效地防止油滴的聚集,从而稳定性降低^[6]。

表1 不同时间的骨蛋白水解产物

在不同 pH 条件下的乳化能力

Table 1 Emulsifying activity index of alcalase-hydrolyzed bone protein

	with different time at different pH.			
	3.0	5.0	7.0	9.0
0h	89.72±18.21 ^{ac}	16.40±3.21 ^a	56.81±4.46 ^b	136.83±7.32 ^{ab}
1h	116.50±11.63 ^a	116.50±11.63 ^a	107.47±1.12 ^d	120.98±26.33 ^b
2h	70.53±0.57 ^{ab}	93.65±1.92 ^{bc}	119.88±1.43 ^{ab}	224.96±11.10 ^{ab}
3h	70.50±0.57 ^{ab}	93.65±1.92 ^{bc}	119.88±1.43 ^{ab}	224.9±11.10 ^{ab}
4h	63.69±1.92 ^d	70.01±8.33 ^{cd}	143.05±4.93 ^a	184.73±5.61 ^{bc}
5h	87.70±0.81 ^{ad}	54.29±4.61 ^d	130.50±5.10 ^b	161.64±3.06 ^{cd}

表2 不同时间的骨蛋白水解产物

在不同 pH 条件下的乳化稳定性

Table. 2 Emulsifying stability index of alcalase-hydrolyzed bone

	protein with different time at different pH			
	3.0	5.0	7.0	9.0
0h	72.99±10.89	23.52±7.91	82.87±3.60	109.83±25.28
1h	88.15±17.93	28.83±2.64	58.06±1.68	125.43±13.11
2h	87.34±5.21	36.53±18.73	124.00±22.18	152.47±23.77
3h	48.49±4.60	72.97±5.71	126.13±14.80	135.40±19.59
4h	53.93±6.42	47.00±11.90	86.73±14.29	113.58±5.18
5h	67.50±14.57	37.96±4.17	100.09±9.50	146.59±16.70

2.4 起泡性和起泡稳定性

骨蛋白水解物的起泡性如表3所示。在骨蛋白的等电点(pH5.0)处,骨蛋白的起泡能力最小。在强酸强碱的pH条件下骨蛋白的起泡能力较强,在中性条件下起泡能力则小于强酸强碱条件下的能力,但大于等电点处的起泡能力($P < 0.05$)。而且碱性蛋白酶的水解产物的起泡能力都大于未水解的骨蛋白,尤其是3h的水解产物,具有较高的起泡能力。这与管晓关于燕麦麸分离蛋白的酶解物的起泡性研究结论一致^[10]。蛋白分子在酸性或碱性条件下带净正或净负电荷,导致分子间静电斥力增加并削弱了分子的疏水相互作用,分子柔性增大,有利于其更快地吸附至气液界面从而增强了起泡能力;但是蛋白质-蛋白质分子间相互作用的减少又不利于界面上稳定的蛋白质膜的形成,因此同时降低了其起泡稳定性。而在起泡能力的测定试验中,骨蛋白水解物的起泡能力较强,但是起泡稳定性则很差,试验中5min后泡沫全部消失,所以其起泡稳定性很难测定。

3 结论

从结果来看,利用碱性蛋白酶对骨蛋白的功能性质的改变效果很明显。在实际生产中可以针对

对产品的特定需要来对骨蛋白进行有目的的改性。骨蛋白水解物具有较高的乳化性,在实际生产中可以作为一种乳化剂应用于肉制品加工中。综上所述,骨蛋白水解物的乳化性、起泡性、持油性有显著增加,而乳化稳定性、起泡稳定性有所下降。

表3 不同时间的骨蛋白水解产物

在不同 pH 条件下的起泡性

Table 3 Foaming activity index of alcalase-hydrolyzed bone protein

	with different time at different pH			
	3.0	5.0	7.0	9.0
0h	101.66±3.47 ^a	95.94±3.73 ^b	100.96±2.02 ^b	112.42±6.76 ^a
0.5h	106.12±1.67 ^{ab}	96.93±1.62 ^b	108.39±3.27 ^{ab}	111.88±5.87 ^a
1h	109.04±5.56 ^{ab}	96.72±3.51 ^b	100.54±1.50 ^b	114.42±3.83 ^a
2h	114.05±4.41 ^a	98.72±2.96 ^b	113.78±3.97 ^a	107.83±3.87 ^a
3h	112.12±5.73 ^{ab}	99.84±1.21 ^b	102.52±2.33 ^b	118.93±3.88 ^a
4h	107.89±4.29 ^{ab}	103.35±2.92 ^{ab}	104.21±3.79 ^b	116.68±4.97 ^a
5h	109.19±1.84 ^{ab}	105.00±2.00 ^a	112.55±2.26 ^a	113.56±5.72 ^a

参考文献

- [1] 郭明勋,史玉敏.骨的成分与胶原蛋白[J].明胶科学与技术,2001,21(4):204-209.
- [2] 刁静静.骨蛋白水解物的功能特性及抗氧化性的研究进展[J].肉类研究,2007,6:26-29.
- [3] 张根生.火鸡骨胶原蛋白口服液的研究[J].食品科学,2005,26(8),563-567.
- [4] Alder-Nissen J.Enzymic hydrolysis of Food protein [D].Elsevier Applied Science;London,U.K.1986.
- [5] Beuchat,I.R.Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins[J].J.Agric.Food Chem.1977,25:258-263.
- [6] Pearce,K.N.;Kinsella,J.E.Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J].J.Agric.Food Chem.1978,26(3):716-723.
- [7] Wamiska,R.D.;Kinsella,J.E.Foaming properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J].J.Food Sci.1979,44:1398-1403.
- [8] Kim,S.Y.;Park,P.S.W.;Rhee,K.C.Functional Properties of Proteolytic Enzyme Modified Soy Protein Isolate. J.Agric.Food Chem.1990,38,651-656.
- [9] Kinsella,J.E.Functional properties of proteins in foods:a survey.CRC Critical reviews of food science and nutrition.1976,7:219-280.
- [10] 管晓,姚惠源,张鸣楠.燕麦麸分离蛋白的酶解对其功能性质的影响,2006,22(11),217-222.