

鹿龟酒鹿骨胶酶水解工艺条件的研究

罗惠波,李再新,赵金松

四川理工学院生物工程系,四川 自贡 643000)

摘要: 用胰蛋白酶和中性蛋白酶复合水解鹿骨胶,考察 pH 值、酶水解温度、酶用量 (g/S)、底物浓度对水解的影响。结果表明,鹿骨胶酶水解的最佳工艺条件为 酶解温度 50 ℃,pH 值为 7.5,鹿骨胶浓度 20 %,酶用量 8 %,酶解时间 8 h。 (孙悟)

关键词: 保健酒; 鹿骨胶; 酶水解; 工艺条件

中图分类号 TS262.91;TS261.4 文献标识码 B 文章编号 1001-9286 (2005)10-0079-02

Research on Technical Conditions of Enzymatic Hydrolysis of Deer Bone Glue

LUO Hui-bo, LI Zai-xin and ZHAO Jin-song

Bioengineering Department of Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan, 643000, China)

Abstract: Deer bone glue was hydrolyzed by trypsin and neutral protease to investigate the effects of pH value, enzymatic hydrolysis temperature, the ratio of enzyme to substrate (g/S) and substrate concentration on hydrolysis. The results suggested the best technical conditions for hydrolysis: enzymatic hydrolysis temperature at 50 ℃, pH value as 7.5, deer bone glue concentration as 20 %, 8 % enzyme use level, and 8 h enzymolysis time. (Tran. by YUE Yang)

Key words: health liquor; deer bone glue; enzymatic hydrolysis, technical conditions

鹿骨营养成分丰富,含有相当高的蛋白质、骨胶原、磷脂质、磷蛋白、软骨素、维生素等,还含有多种矿物质元素。这些物质具有重要的生理功能和多种活性^[1]。鹿骨胶是我国生产传统药酒组方中的重要成分之一。

鹿骨胶是由国产鹿的骨骼经科学熬制,过滤、去脂、脱水浓缩而成的胶状淡黄色至棕黄色的粘稠半固体物质,其基本成分为大分子的骨胶原蛋白,分子量一般在 20 万道尔顿左右^[2]。研究表明,将鹿骨胶酶解成鹿骨肽等肽类物质,溶于酒后会使不好的性状能够得到较大的改善,这不仅改善酒的外观品质,提升酒的品格,而且肽在生物体内作为载体和运输工具,将人们平常所食的营养输送到人体各个部位,充分发挥其功能。本研究采用胰蛋白酶与中性蛋白酶复合,将鹿骨胶水解为多肽。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器

鹿骨胶:市售;胰蛋白酶:无锡市酶制剂厂生产;中性蛋白酶:无锡市酶制剂厂生产;浓硫酸、氢氧化钠、甲基红、甲醛、硫酸铜、硫酸钾等试剂均为分析纯。

恒温水浴锅:TAD-8002,余姚市东方电工仪器厂生产;电子分析天平:BS 系列,上海精密仪器厂生产;磁力加热搅拌器:95-2,上海志威电器有限公司生产;精密酸度计:pHs-3c,梅特勒-托利多;自动凯氏定氮仪:国产。

1.2 实验方法

收稿日期:2005-07-11

作者简介:罗惠波(1969-),男,四川荣县人,副教授,长期从事酒类研究工作,发表论文 20 余篇。

1.2.1 氨基酸态氮的测定

中性甲醛滴定法测定^[3]。

1.2.2 总氮的测定

凯氏定氮法测定^[4]。

1.2.3 水解度的计算

水解度 (%) = 氨基酸态氮 / 样品中的总氮量 × 100 %

1.2.4 鹿骨胶酶水解工艺

鹿骨胶 → 溶液煮沸溶解 → 加水调底物浓度 → 加酶 → 混合均匀 → 调 pH、保温 → 酶解

操作要点:分别称取试验量的鹿骨胶,加入适量蒸馏水,配成所需浓度,溶解到 250 mL 三角瓶中,将鹿骨胶煮沸溶解,然后冷却到相应的酶解温度后,用盐酸或氢氧化钠溶液调节至要求的 pH 值。将调好 pH 的溶液放入相应的酶解温度的恒温水浴锅中保温。在一定条件下水解,水解过程中要缓慢搅拌,一般搅拌 10~20 次/min 为宜,并及时滴加标准氢氧化钠溶液来维持其 pH 值。酶解完成后,停止搅拌,直接加热至 85 ℃,保持 5 min,即可得到水解蛋白。

2 结果与讨论

2.1 酶用量的选择

在鹿骨胶底物浓度 20 %,pH 7.0,温度 50 ℃条件下,酶用量分别为 (g/S) 4 %,6 %,8 %,10 %,12 %,水解 6 h 后灭酶测其氨基氮的含量,测得水解率结果见表 1。

表 1 酶用量和水解率的关系 (%)

酶用量(E/S)	4	6	8	10	12
水解率(%)	15.23	16.42	17.96	18.21	18.30

由表 1 可知,随着酶用量的增大,水解率上升,当酶用量刚开始加大时,水解率增大较为明显;当酶用量超过 8 % 时,上升趋势不明显。从经济和食用的角度考虑,选择酶用量为 8 % 较好。

2.2 温度的选择

鹿骨胶底物浓度为 20 %,酶用量为 8 %,pH 7.0,分别在 40 ℃,45 ℃,50 ℃,55 ℃,60 ℃ 下水解 6 h 后灭酶,测其氨基氮,得水解率,结果见表 2。

表 2 温度和水解率的关系

温度(℃)	40	45	50	55	60
水解率(%)	16.21	17.43	22.36	21.42	20.18

由表 2 可知,在一定温度范围内,温度对复合酶的影响不是很明显,而每一种酶都有其最适温度^[5]。由试验结果可知,随着温度的上升,水解率增大;当温度达到 50 ℃ 后再升高,水解率反而开始下降。因此,选择水解最适温度为 50 ℃。

2.3 初始 pH 的选择

鹿骨胶底物浓度为 20 %,酶用量 8 %,温度 50 ℃,分别在 pH 6.0,6.5,7.0,7.5,8.0 下酶解 6 h,测其酶解液的氨基氮,计算水解率,结果见表 3。

表 3 pH 和水解率的关系

pH	6	6.5	7	7.5	8
水解率(%)	16.41	19.34	21.18	20.08	19.58

由表 3 可知,初始 pH 值对蛋白酶水解速度的影响较明显。环境 pH 会影响酶分子的构象和酶分子及底物的解离状态,从而影响酶的活性和酶促反应速度,pH 过高、过低均不利酶促反应,以初始 pH 为 7.0 较好。

2.4 底物浓度的选择

在水解温度为 50 ℃,酶用量为 8 %,pH 为 7.0 时,分别取底物浓度为 10 %,15 %,20 %,25 %,30 % 进行水解,6 h 后灭酶测液态氨基氮,计算水解率,结果见表 4。

表 4 底物浓度与水解率的关系

底物浓度(%)	10	15	20	25	30
水解率(%)	17.83	18.23	24.48	22.60	20.46

由表 4 可知,底物浓度低时,水解率不高,随着底物浓度的增加,水解率逐渐上升,底物浓度达到 20 %~25 % 时水解率趋于稳定,当底物浓度再增加时,水解率反而下降。因此,底物浓度为 20 %~25 % 较好。

2.5 水解时间的选择

在 pH 7.0,温度 50 ℃,酶用量 8 %,底物浓度 20 %,分别进行 2 h,3 h,4 h,5 h,6 h,7 h,8 h,9 h,10 h 的水解试验。结果表明,水解率随时间的延长而增加,但 8 h 后上升趋势减慢并开始下降。综合能耗、生产周期、经济效益等因素考虑,选择水解时间为 8 h 较好。

2.6 正交试验及数据处理

在考虑胰蛋白酶、中性蛋白酶最适条件下,通过单因素实验和数据分析,制订以底物浓度、酶用量 (E/S)、酶解温度、起始 pH 值为考察因素,每个因素各取 4 个水平,以水解度为考察指标,按 $L_{16}(4^5)$ 试验 (见表 5)。

表 5 正交实验结果

试验号	因素				
	A 底物浓度(%)	B 酶用量(E/S)	C 酶解温度(℃)	D 起始 pH 值	水解度 DH (%)
1	1(10)	1(4)	1(50)	1(6.5)	16.281
2	1	2(6)	2(45)	2(7.0)	24.259
3	1	3(8)	3(55)	3(7.5)	18.301
4	1	4(10)	4(60)	4(8.0)	17.321
5	2(15)	1	2	3	19.488
6	2	2	1	4	15.594
7	2	3	4	1	16.892
8	2	4	3	2	18.035
9	3(20)	1	3	4	19.006
10	3	2	4	3	20.932
11	3	3	1	2	18.215
12	3	4	2	1	18.568
13	4(25)	1	4	2	15.748
14	4	2	3	1	15.241
15	4	3	2	4	16.247
16	4	4	1	3	17.975
K ₁	70.523	70.060	77.960	65.916	T=288.103
K ₂	69.655	65.090	71.495	77.323	
K ₃	76.026	76.670	68.211	75.560	
K ₄	71.899	76.283	70.437	69.304	
k ₁	17.631	17.515	19.490	16.479	
k ₂	17.414	16.273	17.874	19.331	
k ₃	19.007	19.168	17.053	18.890	
k ₄	17.975	19.071	17.609	17.326	
R	1.593	2.895	2.437	2.852	

以水解率为考察指标,从表 5 中极差 R 值可以看出,各因素对鹿骨胶酶水解影响程度依次为 B>D>C>A,酶用量 (E/S) 影响很大,是优化条件中影响最大的因素,底物浓度在所考察的范围内影响最小。由直观分析可看出,最佳酶解工艺条件为 $A_3B_3C_1D_2$,即 pH 7.0,水解温度 50 ℃,酶用量 8 %,水解时间 8 h。

3 结论

用胰蛋白酶和中性蛋白酶对鹿骨胶进行酶水解,工艺简单,能有效地降低鹿骨胶原蛋白分子量,增加其在酒中的溶解性能。从而有效地解决了鹿骨胶长期以来没有解决的浑浊沉淀问题。鹿骨胶酶水解的最佳工艺条件为:酶解温度 50 ℃,pH 值为 7.5,鹿骨胶浓度 20 %,酶用量 8 %,酶解时间 8 h。

参考文献:

- [1] 卢加保,卢红,郭艳军.鹿骨胶酶法水解试验研究报告[J].四川食品与发酵,2001,(2):6-10.
- [2] 张敏,陈晓燕.鹿骨粉制作工艺及营养成分分析[J].食品科技,2004,(1):95-97.
- [3] 黄伟坤.食品分析与检验[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [4] 天津轻工业学院,大连轻工业学院,等.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1980.
- [5] 张树政.酶制剂工业[M].北京:科学出版社,1984.