

低分子量骨胶原肽酶解制备工艺优化和特性分析

姚玉梅 袁湘汝 韩鲁佳 杨增玲 刘 贤

(中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 酶解工艺参数不仅会影响畜禽骨蛋白的酶解效率,而且会改变骨胶原肽产物的肽分子量分布、氨基酸组成和微结构性能,从而影响其高值高效化利用。以制备均一性低分子量骨胶原肽为目的,以牛骨粉为研究对象,以水解度为主要评价指标,考察碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶和风味蛋白酶对牛骨粉的酶解效果,探究双酶分步酶解工艺、脂肪酶预处理的单独与组合应用对酶解效果的提升作用,选定最优的低分子量骨胶原肽制备工艺;结合酶解过程中各项指标的变化、产物表征分析和 Person 相关系数法分析不同复合酶解工艺对产物特性的影响及作用机制。研究发现:经脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-复合蛋白酶酶解工艺制备的骨胶原肽产物具有最佳的理化性质,优化的工艺参数为:底物质量浓度为 0.09 g/mL、初始 pH 值 7.5 的牛骨粉溶液加入碱性脂肪酶(加酶量 0.08%)在 40℃ 下反应 4 h,再加入碱性蛋白酶(加酶量 0.36 U/g)在 60℃ 下反应 5 h 后,最后加入复合蛋白酶(加酶量 0.36 U/g)在 55℃ 下反应 5 h,此时,水解度可达 16.12%,总游离氨基酸含量可达 171.571 mg/g,其 M_w/M_n 和 M_z/M_w 分别为 883 Da、9.73 和 7.91。然而,经脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解工艺处理后,其水解度和总游离氨基酸含量达到更高,分别为 19.02%、257.760 mg/g,且在骨胶原肽产物的理化性质差异不大的情况下,成本投入更少。

关键词: 牛骨粉; 骨胶原肽; 工艺优化; 特性分析

中图分类号: S879.9; X713

文献标识码: A

文章编号: 1000-1298(2022)04-0386-08

OSID:



Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process for Ossein Peptide with Low Molecular Weight and Its Characteristics Analysis

YAO Yumei YUAN Xiangru HAN Lujia YANG Zengling LIU Xian

(College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: As a high-quality renewable protein source, the deep processing utilization of bone protein is beneficial to the consummation of the efficient utilization of animal bone resources, the increase of the processing by-products value-added, and the solution of serious environmental issues owing to the improper handling. However, due to the complex enzymolysis processes, the ossein peptides often suffer from poor dimension uniformity and poor performance stability of raw material, which will limit their materialized utilization. Therefore, it is of great significance to explore the effects of different enzymatic hydrolysis processes on the material properties of ossein peptides. The effects of different kinds of proteases, mainly including alkaline lipase, flavorzyme, protamex, neutral protease, and alkaline protease on the enzymolysis efficiency of bovine waste proteins were investigated, with the degree of hydrolysis (DH) as the response variable. The optimum enzymolysis process for ossein peptide with low molecular weight was determined by systematically analyzing the improvement of enzymatic hydrolysis of different kinds of proteases. Furthermore, the mechanisms were explored by analyzing the changes of various properties of the products in the enzymatic hydrolysis. It was found that the ossein peptides prepared by the process of lipase pretreatment-alkaline protease-protamex had the best overall performance. The enzymatic hydrolysis process was optimal as follows, at 0.09 g/mL substrate mass concentration and initial pH value 7.5, with 0.08% lipase, followed by 4 h incubation at 40℃, followed

收稿日期: 2021-03-15 修回日期: 2021-04-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0112800)和教育部创新团队发展计划项目(IRT-17R105)

作者简介: 姚玉梅(1992—),女,博士生,主要从事生物质资源与利用研究,E-mail: Yaoao@cau.edu.cn

通信作者: 刘贤(1979—),女,副教授,博士生导师,主要从事生物质资源与利用研究,E-mail: lx@cau.edu.cn

by alkaline protease (addition of enzyme was 0.36 U/g) at 60℃ for 5 h, and finally, protamex (addition of enzyme was 0.36 U/g) was incubation at 55℃ for 5 h. The DH reached 16.12%, and the content of total amino acids (TAA) reached 171.571 mg/g. Meanwhile, the value of M_w , M_w/M_n , and the M_z/M_w was 883 Da, 9.73 and 7.91, respectively. However, after the process of lipase pretreatment-alkaline protease-flavorzyme, the DH and FAA reached the maximum of 19.02% and 257.760 mg/g. In addition, the cost input was the least when the physicochemical properties and molecular weight distributions (MWD) of ossein peptide samples were not significantly different from other samples. The results showed that finding the equilibrium point between the DH and the physicochemical properties of ossein peptides was conducive to the economy of protein recycling, cleaner production, and the security and stability of the new composites.

Key words: bovine bone powder; ossein peptides; process optimization; characteristics analysis

0 引言

目前,环保型胶黏剂主要包括蛋白胶、淀粉胶、木质素胶、单宁胶等^[1]。其中,基于蛋白质及其蛋白质水解产物衍生的蛋白基胶黏剂因其特有的高固含量、无毒无害、优异的热塑性和易降解性受到了国内外研究者的关注。

我国动物蛋白质产品总产量稳居世界首位,据统计,2019年我国肉类产量达7 758.8万t^[2]。作为畜禽屠宰的副产物,畜禽骨骼占胴体的20%~30%,年产量约为2 000万t。畜禽骨骼中富含脂质、蛋白质骨胶原、软骨素和矿物元素等营养成分,可作为一种优质的蛋白质资源和脂质来源,对其开展深度综合利用和高值高效转化对环境保护和资源循环利用具有实际意义。受限于动物骨骼独特的组成结构和组成成分,动物骨骼中的胶原蛋白常经水解工艺制备骨胶原肽,后与其它化学交联剂制备骨蛋白基胶黏剂^[3-5],其化学式为 $C_{102}H_{151}O_{39}N_{31}$,现已应用为生物质燃料胶黏剂、铸造胶黏剂、纸塑胶黏剂、标签胶黏剂^[6]。

骨胶原肽的分子量分布对骨胶原肽基复合材料的性能和微结构影响显著,即在一定的骨胶原肽分子量区间内,其材料化开发的结构与性能最优^[7-9],更利于骨胶原肽基材料的增值增效与应用推广。当分子量分布较广或较窄时,易导致复合材料的防潮性差、初黏性低、力学性能差等问题^[9],这是由于蛋白质的水解程度不仅影响了骨胶原肽分子量分布,还间接影响了其理化性能,如溶解度、胶凝能力、起泡性和稳定性^[10-11]。一般而言,水解度与蛋白酶解产物的分子量及分布呈负相关,即水解度较低时,分子量较大且分布区间较宽;水解度较高时,分子量变小、分布区间较窄,而产物的分子量越接近中心值,分子量分布区间越小,分子量的均一性就越好。而骨粉的粒径、脂肪含量、蛋白质含量和酶解工艺都会影响骨蛋白的水解效率^[5,12-13]。为寻求水解度与

骨胶原肽材料特性的最佳平衡点,制备均一性的低分子量骨胶原肽,国内外研究学者展开了深入的探讨,前期研究结果表明:脂肪酶预处理可以通过去除骨粉蛋白上的脂质、暴露骨蛋白来改善蛋白质的酶解敏感性^[11],有利于降低骨胶原肽的分子量分布区间;而双酶分步酶解工艺可以显著提高蛋白的水解效率来降低骨胶原肽的分子量^[8,14],但是探讨两者复合使用对酶解效果和酶解产物特性的影响鲜有报道。

本文考察不同种类蛋白酶对牛骨粉的酶解效果,并筛选和优化低分子量骨胶原肽制备工艺;结合酶解过程中各项指标的变化、产物表征分析和Person相关系数法考察不同酶解工艺对产物特性的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

实验材料:取自北京福成屠宰场的牛骨,经去离子水清洗干净后,剔除可见残肉和骨髓,于-40℃、0.1 MPa下冷冻干燥72 h后,粉碎过0.5 mm筛,于-20℃冰箱密封储存。脂肪酶P1000,购自深圳绿微康生物工程有限公司,标称酶活为100 000 U/g;风味蛋白酶500 MG,复合蛋白酶Protamex 1.6,中性蛋白酶0.8 L,碱性蛋白酶2.4 L,均购自丹麦Novozym公司,标称酶活分别为500 LAPU/g,1.5 AU/g,0.8 AU/g,2.4 AU/g。甲醛溶液,十二水合磷酸氢二钠,二水合磷酸二氢钠,分析纯,西陇化工股份有限公司;考马斯亮蓝G250,分析纯,成都西亚化工股份有限公司。

实验设备:XS105型分析天平(Mettler Toledo公司,瑞士);Research plus型微量可调移液器(Eppendorf公司,德国);TCYQ型水浴恒温振荡器(苏州市培英实验设备有限公司);PHG-9123A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);TW20型恒温水浴锅(JULABO公司,德国);

SevenEasy 型实验室 pH 计(Mettler Toledo 公司,瑞士);ZDJ-4A 型自动电位滴定仪(上海精密科学仪器有限公司);UV-2550 型紫外-可见分光光度计(Shimadzu 公司,日本);Pulverisette 15 型粉碎机(Fritsch 公司,德国);ST85B3-I 型冷冻干燥机(Millrock 公司,美国);Spectrum400 型傅里叶变换红外光谱仪(PerkinElmer 公司,美国);RID-20 型示差折光检测器(Shimadzu 公司,日本);D8 Advance 型X 射线衍射仪(Bruker 公司,德国);SDT Q600 型热重分析仪(TA 公司,美国);岛津高效液相色谱仪(Shimadzu 公司,日本)。

1.2 双酶分步酶解工艺设计

将骨粉用一定 pH 值的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液溶解,配置成一定质量浓度的骨粉溶液。参考 4 种蛋白酶的酶解工艺参数^[14],分别调节骨粉溶液的初始 pH 值,进行 4 种蛋白酶的酶解实验,具体工艺参数如表 1 所示。蛋白酶解过程后,于 90℃ 下酶失活 10 min。对不同酶解工艺处理后的酶解产物在离心速率 4 000 r/min 下离心 20 min,收集上清液于 4℃ 保存,取部分上清液测定其水解度;去离子水反复洗涤后收集酶解残渣,用于后续的化学和结构分析。酶解反应均设 3 组平行实验。评估 4 种蛋白酶的酶解效果,充分考虑不同种类蛋白酶最适酶解工艺参数的差异性,设计双酶分步酶解工艺,考察其酶解效率,从而制定两种效率最佳的双酶分步酶解工艺。

表 1 4 种蛋白酶的酶解工艺参数

Tab.1 Enzymatic hydrolysis conditions of four proteases

种类	底物质量浓度/(g·mL ⁻¹)	加酶量/(U·g ⁻¹)	起始 pH 值	最适温度/℃	时间/h
碱性蛋白酶	0.09	0.36	8.0	60	5
中性蛋白酶	0.09	0.36	6.5	55	5
复合蛋白酶	0.09	0.36	7.5	55	5
风味蛋白酶	0.09	50	7.0	50	5

1.3 不同骨胶原肽制备工艺设计

参考前期研究结果,选定脂肪酶预处理工艺参数为:底物质量浓度 0.09 g/mL、初始 pH 值 7.5,加酶量为 0.08%、反应温度 40℃、反应时间 4 h^[11]。采用无预处理+双酶分步酶解工艺、预处理+双酶分步酶解工艺制定 4 种复合酶解工艺,开展低分子量骨胶原肽制备实验。每组制备工艺均设 3 组平行实验。

1.4 酶解效果评价指标测定

1.4.1 水解度

采用甲醛电位滴定法测定水解度^[15]。取 5 mL 酶解上清液于烧杯中,加入 60 mL 蒸馏水,启动磁力

搅拌器,用 0.05 mol/L 标准滴定溶液滴定至 pH 计指示 pH 值 8.2,记录消耗的 NaOH 溶液体积。然后加入 10 mL 甲醛溶液至烧杯中,混匀后再用上述 NaOH 溶液继续滴定至 pH 值 9.2,记录消耗的 NaOH 溶液体积,记为 V_1 。同时记录空白试验组的 NaOH 消耗体积,记为 V_2 。水解度计算公式为

$$D = \frac{0.014(V_1 - V_2)cV}{5Nm} \times 100$$

(1)

式中 c ——NaOH 标准溶液浓度, mol/L
 V ——酶解液总体积, mL
 N ——样品总氮质量分数, %
 m ——测定样品初始质量, g

1.4.2 可溶性蛋白含量

采用紫外分光光度计测定可溶性蛋白含量(质量比)^[16]。以牛血清蛋白为标准蛋白液,在 595 nm 波长处测定其吸光度,绘制标准曲线后测定水溶性蛋白样品的蛋白质含量。可溶性蛋白含量计算公式为

$$S = \frac{C_p V}{1\,000V_s m}$$

(2)

式中 S ——可溶性蛋白含量, mg/g
 C_p ——标准曲线反映的蛋白质量, mg
 V_s ——测定时使用体积, mL

1.4.3 残渣量

残渣量是指酶解后剩余残渣占酶解样品的质量分数,该指标在一定程度上反映了骨蛋白的回收效率^[17-18]。经不同蛋白酶工艺后的剩余固体残渣于 25℃ 自然晾干后称量,即为残渣的质量。残渣量计算公式为

$$R = \frac{m_1}{m} \times 100\%$$

(3)

式中 m_1 ——酶解后的残渣质量, g

1.4.4 pH 值

初始 pH 值将显著影响脂肪酶和蛋白酶的活力,适宜 pH 值条件下酶分子结构/活性稳定使得酶解效率较高^[19]。参考 GB/T 22592—2008,测定 pH 值方法如下:取 10 mL 酶解上清液于小烧杯中,将电极浸入试样中,小心摇动或进行搅拌,读数稳定时记下 pH 值,准确值 0.01。每个试样进行 3 次测定,取均值作为该试样的 pH 值。

1.5 骨胶原肽产物特性分析

采用分子量排阻的高效液相色谱的方法(SE-HPLC),使用岛津高效液相色谱仪分析牛骨蛋白水解物的分子量分布,操作步骤参考文献[12]略有改动。试样液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。采用 TSKgel GMPWXL 型水相凝胶柱(日本 TOSOH 公司),柱温为 35℃,进样量为 20 μL,洗脱液是

0.1 mol/L NaNO₃ + 0.06 % NaN₃ 水溶液,流速为 0.6 mL/min。使用窄分布聚乙二醇(PEO)标样组(日本 TOSOH 公司)作为分子量标样,采用 HW-2000 GPC 型色谱工作站计算物质的统计分子量、分子量分布宽度指数。

采用高效液相色谱分析牛骨蛋白水解物的氨基酸组成,操作步骤参考文献[20-21],略有改动。采用 C18 型色谱柱(5 μm,4.6 × 250 mm),柱温为 40℃,进样量为 10 μL,检测波长为 254 nm,流动相 A 是体积比为 93:7 的 pH 值 6.50 的 0.1 mol/L 醋酸钠溶液和乙腈溶液,流动相 B 为体积比为 20:80 的水和乙腈溶液,流速 1.0 mL/min。

在-48℃真空条件下干燥 48 h 的 4 种骨胶原肽作为试样进行热稳定性分析,参照文献[22],略有改动。操作条件如下:称取 5~6 mg 试样,以氮气为载气,流速为 100 mL/min,以 10℃/min 的升温速率升温到 700℃。

对试样进行官能团特征分析,采用 KBr 压片法,以 1:100 质量比混匀,检测时红外分析扫描范围为 400~4 000 cm⁻¹,扫描次数为 32 次,分辨率为 4 cm⁻¹[22]。

一般情况下,结晶度越高,熔点越高,韧性越差,透光性越差。获取试样的 X 射线衍射图谱,具体参数设置如下:在 CuKα 射线下,X 光管电压 40 kV,管电流 40 mA,5°~60°范围内,扫描频率为 2(°)/min,扫描步宽为 0.02°,叠扫 3 次,测定 X 射线衍射图谱[22]。

1.6 数据分析

采用 Origin 8.5 制图(OriginLab 公司,美国)。

数据均采用 SPSS V20.0 软件(IBM 公司,美国)进行单因素方差分析,采用 LSD 检验对数据进行显著性差异分析,在 95% 置信区间被认为具有统计学意义($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 双酶分步酶解工艺对酶解效果的影响

2.1.1 不同种类蛋白酶的酶解效果

参照表 1 中各蛋白酶的最佳酶解工艺参数进行牛骨粉的酶解试验,其酶解效果及过程变量数据见表 2。由表 2 可知,4 种蛋白酶酶解能力各不相同,这是由于不同蛋白酶的作用位点具有特异性,即使同一底物原料也会有不同的水解能力。其中,采用碱性蛋白酶得到最高水解度,高达 8.81%,这可能是由于在碱性条件下,骨蛋白质更易于展开,且碱性蛋白酶本身的水解位点选择性较为宽泛^[23],除水解疏水性氨基酸外,还可以水解色氨酸和丙氨酸形成的肽键,同时具有酯酶的活力^[24]。可溶性蛋白含量可作为反映酶解过程中蛋白质变性和降解等多方面信息的特征参数,在 4 种蛋白酶解液中具有显著性差异。酶解后的残渣量没有显著性差异,且与水解度无明显规律性,这可能是酶解过程中不同种类的蛋白酶附着在骨粉样品上造成的。酶解液 pH 值变化值表明酶解液 pH 值变化较小,均在初始 pH 值处波动,但是整体在向中性靠近,这可能是由于随着酶解反应的进行,酶解液中的含氨基或含羧基的游离氨基酸与缓冲液中的磷酸根离子发生取代反应,从而中和了酶解液。

表 2 4 种蛋白酶的酶解效果分析

Tab.2 Effects of four proteases on enzymatic hydrolysis

样品	水解度/%	可溶性蛋白含量/(mg·g ⁻¹)	残渣量/%	pH 值变化值
碱性蛋白酶组	(8.81 ± 0.83) ^a	(2.27 ± 0.30) ^c	(90.11 ± 0.26) ^a	(-0.11 ± 0.61) ^a
中性蛋白酶组	(8.70 ± 0.77) ^a	(3.43 ± 0.51) ^a	(92.19 ± 2.26) ^a	(0.11 ± 0.01) ^a
复合蛋白酶组	(7.42 ± 0.64) ^b	(0.56 ± 0.15) ^d	(91.40 ± 1.89) ^a	(-0.06 ± 0.05) ^a
风味蛋白酶组	(6.36 ± 0.47) ^c	(3.01 ± 0.16) ^b	(88.44 ± 1.71) ^a	(0.08 ± 0.01) ^a

注:同列数据不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$),下同。

2.1.2 双酶分步酶解工艺的酶解效果

蛋白酶解过程中为避免过多的盐类添加,常以 pH 值的变化趋势来制定双酶分步酶解工艺,即碱性—中性—酸性^[8]。此外,蛋白酶的分步加入可使两种蛋白酶的酶活分别达到最高值,且消除两种蛋白酶同时加入存在互为底物的干扰。为进一步探究两种蛋白酶的复合应用对牛骨蛋白酶解反应的影响,对酶解过程中各指标的变化趋势进行了统计分析,结果如表 3 所示。以经单一碱性蛋白酶处理的骨粉溶液作为双酶分步酶解对照

组。由表 3 可知,在经碱性蛋白酶酶解后再加入第 2 类蛋白酶处理将会明显提升酶解效率,其水解度从大到小依次为:碱性蛋白酶-风味蛋白酶组、碱性蛋白酶-复合蛋白酶组、碱性蛋白酶-中性蛋白酶组、双酶分步酶解对照组,水解度分别为 14.09%、11.09%、10.18%、8.81%。碱性蛋白酶-风味蛋白酶组的水解度最高的原因可能是碱性蛋白酶先将蛋白质分子的内部肽链裂开使其暴露,风味蛋白酶作为内切酶和外切酶,会从肽链末端将氨基酸水解下来。碱性蛋白酶-风味蛋白酶

组的可溶性蛋白含量也佐证了这一推断。此外,由表 1 可知,风味蛋白酶、中性蛋白酶和复合蛋白酶的最适宜 pH 值分别为 7、7.5、6.5,结合表 3 中

酶解液 pH 值的变化,选择风味蛋白酶、复合蛋白酶作为第 2 步酶解蛋白酶时,无需人工调节 pH 值,即可避免引入新的杂质。

表 3 双酶分步酶解的酶解效果统计分析

Tab.3 Effects of double-enzyme stepwise hydrolysis on enzymatic hydrolysis			
样品	水解度/%	可溶性蛋白含量/(mg·g ⁻¹)	酶解液 pH 值
碱性蛋白酶组	(8.81 ± 0.30) ^d	(2.27 ± 0.01) ^b	(7.89 ± 0.01) ^a
碱性蛋白酶-中性蛋白酶组	(10.18 ± 0.24) ^c	(2.01 ± 0.19) ^c	(7.37 ± 0.02) ^d
碱性蛋白酶-复合蛋白酶组	(11.09 ± 0.69) ^b	(1.99 ± 0.20) ^c	(7.47 ± 0.01) ^c
碱性蛋白酶-风味蛋白酶组	(14.09 ± 0.04) ^a	(3.08 ± 0.11) ^a	(7.62 ± 0.03) ^b

2.2 不同酶解工艺对骨蛋白酶解效率的影响

图 1(图中 K1 组为碱性蛋白酶酶解工艺;A 组为碱性蛋白酶-复合蛋白酶酶解工艺;B 组为碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解工艺;C 组为脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-复合蛋白酶酶解工艺;D 组为脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解工艺)展示了碱性蛋白酶-复合蛋白酶酶解工艺、碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解工艺、脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-复合蛋白酶酶解工艺、脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解工艺的 4 种复合酶解工艺对牛骨粉的酶解效果,水解度从大到小依次为:D 组、C 组、B 组、A 组,分别为 19.02 %、16.12 %、14.09 %、11.09 %。由图 1 可知,采用双酶分步酶解工艺、脂肪酶+双酶分步酶解工艺对骨蛋白的酶解反应具有积极的促进作用;脂肪酶预处理对水解度具有积极的促进作用,水解度提高了近 5 个百分点,进一步证实脂肪酶预处理可显著提升酶解效率,与先前的研究结果一致^[11]。

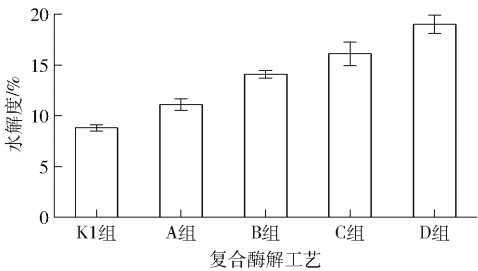


图 1 4 种复合酶解工艺对水解度的影响

Fig.1 Effects of four prepared progresses of ossein peptides on DH

2.3 骨胶原肽的理化性质分析

2.3.1 肽分子量分布

由 3~9 个氨基酸残基组成的短链肽被称为低聚肽,其分子量范围为 180~1 000 Da。一般而言,水解度越高,低聚肽占比越高,分子量越小,分布区间越窄^[25]。通过凝胶色谱柱的出峰时间来区分样品分子量的大小,分子量大的较早出峰,分子量越小出峰时间越晚。由于采用的统计平均方式不

同,便得到不同的平均分子量,即最常用的数均分子量 M_n 、重均分子量 M_w 、z 均分子量 M_z 和粘均分子量 M_{z+1} ,其中 M_n 、 M_w 均有明确的物理意义,而 M_z 、 M_{z+1} 只是一种统计平均的方法,无明确的物理意义^[12]。而肽分子量的分布系数 M_w/M_n 和分子量分散度 M_z/M_w 常作为衡量分子量均一性的指标,其数值越大,表明分子链长短分布越不均、越不集中,分子量均一性越差。分别将 A、B、C、D 组 4 种复合酶解工艺下制备的骨胶原肽编号为 OP1、OP2、OP3、OP4。由图 2 可知,4 种骨胶原肽的淋出时间和信号强度上具有较大差异,随着水解度的增加,淋出时间前移;相较于 OP3,样品 OP1、OP2、OP4 的洗脱峰都相对较宽,说明其分子量分布较广,不均一;且样品 OP1 和 OP4 中出现肩峰(图 2a 和图 2d),说明在该淋出时间下分子量相近,所占比重较高。从谱图上看,4 种骨胶原肽样品的分子量差异较小,分子量分布呈先集中后分散的趋势。由表 4 可知,4 种骨胶原肽的 M_w 分别为 947、1 021、883、866 Da,进一步佐证了脂肪酶预处理对降低骨胶原肽分子量的积极促进作用。结合水解度和 M_w 数据分析可知,相较于其它 3 组,采用脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-复合蛋白酶酶解工艺获得的骨胶原肽的肽分子量分布具有一定的优越性。这一结果也表明,片面提升水解度不一定会获得优质的骨胶原肽,寻求水解度、肽分子量分布、骨胶原肽材料特性间的平衡关系的相关研究具有重要的探讨意义。

在本研究中使用的碱性脂肪酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶单价分别为 500、1 000、1 000、1 000 元/kg,参考表 1 中各蛋白酶的酶解工艺参数可知,每处理 1 kg 牛骨粉样品所需蛋白酶理论添加量分别为 7.40 g、42.3 mL、67.68 g、28.2 g,折合成本增加 3.7、42.3、67.68、28.2 元/kg。而在水解度和肽分子量相差无明显差异的情况下,脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解工艺具有更好的经济可行性。

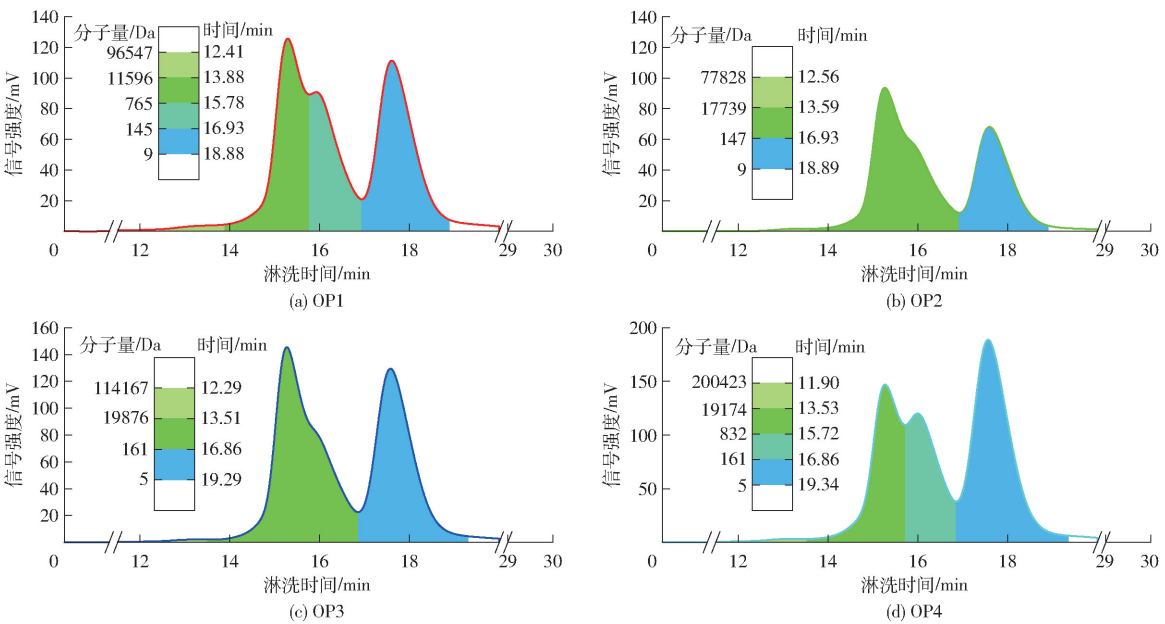


图 2 4 种骨胶原肽的淋洗时间-信号强度曲线
Fig. 2 Relation between leaching time and signal strength curves of four ossein peptide samples

表 4 4 种骨胶原肽的平均分子量

Tab. 4 Average molecular weight of four kinds of ossein peptide samples

样品	M_n /Da	M_w /Da	M_z /Da	M_{z+1} /Da	M_w/M_n	M_z/M_w
OP1	(100.00 ± 1.53) ^b	(947.00 ± 17.50) ^b	(8 048.00 ± 53.31) ^b	(35 154.00 ± 635.01) ^c	(9.46 ± 0.02) ^c	(8.50 ± 0.13) ^b
OP2	(108.00 ± 0.58) ^a	(1 021.00 ± 18.04) ^a	(7 270.00 ± 179.65) ^c	(31 977.00 ± 593.09) ^d	(9.44 ± 0.12) ^c	(7.12 ± 0.02) ^d
OP3	(91.00 ± 0.76) ^c	(883.00 ± 13.50) ^c	(6 988.00 ± 121.99) ^d	(39 314.00 ± 506.51) ^b	(9.73 ± 0.01) ^b	(7.91 ± 0.09) ^c
OP4	(85.00 ± 0.58) ^d	(866.00 ± 7.64) ^c	(12 178.00 ± 123.65) ^a	(56 930.00 ± 1 069.45) ^a	(10.14 ± 0.03) ^a	(14.06 ± 0.24) ^a

2.3.2 氨基酸组成

通过 HPLC 对 4 种骨胶原肽样品的氨基酸组成定性分析可知,4 种骨胶原肽样品中含有丰富的游离氨基酸,其中谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸和赖氨酸含量较高。由图 3 可知,OP4 的总游离氨基酸含量最高,可达 257.760 mg/g;OP2 次之,为 204.848 mg/g,这可能是由于作为内切酶和外切酶的风味蛋白酶有利于游离氨基酸的释放。此外,经脂肪酶预处理后的 OP3 和 OP4 样品的氨基酸含量也明显增加。

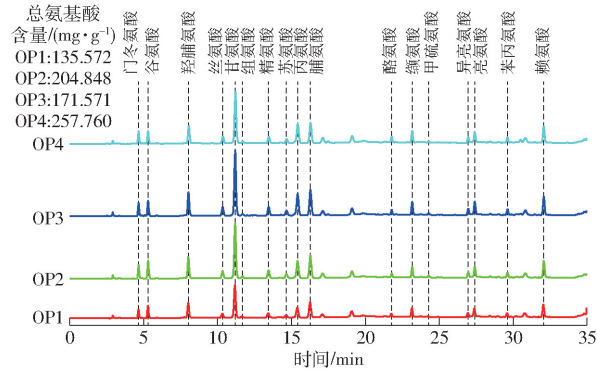


图 3 4 种骨胶原肽的氨基酸组成谱图

Fig. 3 Chromatograms of amino acid composition of four kinds of ossein peptide samples

2.3.3 热重分析

图 4 为 4 种骨胶原肽样品的热重分析结果。试样在升温开始阶段 50 ~ 150℃ 范围有一个较大的失重峰,这明显是样品中水分的蒸发过程;150 ~ 350℃ 范围样品的失重速率明显提高,并达到峰值。从图 4 中发现,4 种骨胶原肽样品的失重曲线相差不大,均在 90、200、370℃ 发生明显失重,其中样品 OP1 和 OP3 的质量损失率最高,为 48.61% 和 47.38%。4 种骨胶原肽样品的失重速率曲线具有明显差异,随着水解度的升高,样品的最大降解温度向左偏移,热稳定性呈降低趋势。在 90℃ 附近,样品 OP3 和 OP4 的失重速率明显高于其它两种,这是因为随着分子量的减小,防潮性变差导致样品中的含水率较高;在 200 ~ 500℃ 附近,OP1 和 OP2 样品的失重速率明显高于 OP3 和 OP4,这是因为 270 ~ 350℃ 和 350 ~ 460℃ 分别是蛋白质和脂质的特征分解温度区间^[26],样品中混合着的不同含量的蛋白酶与脂质引起了此差异,如,经脂肪酶预处理的 OP3 和 OP4 样品中含有一定的脂肪酶(本质属于蛋白质),故在 300℃ 附近的蛋白质峰处失重速率较高,而未经脂肪酶预处理的 OP1 和 OP2 样品中脂质含量较多,故在 350℃ 附近的脂质峰处失重速率较高。

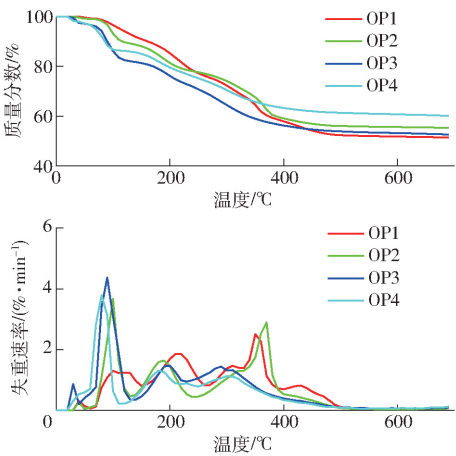


图 4 4 种骨胶原肽样品的热重分析

Fig.4 Pyrolysis characteristics of four kinds of ossein peptide samples

2.3.4 红外谱图分析

骨胶原肽分子上主要有烷基、氨基、羧基、咪唑基、硫醚基、羟基及吡啶基等侧链基团^[27],其中 3 326 cm⁻¹附近处为—NH₂的吸收峰,1 659 cm⁻¹附近处为 C=O 的吸收峰,1 407 cm⁻¹附近处为—COO—的吸收峰。如图 5 所示,4 种骨胶原肽的羧基结构、胺基结构和含氧官能团的结构成分吸收频率几乎一致,但吸收峰的强度却不相同,这可能是因为水解程度不同使得其组成结构相同,所含伯胺和羧基等氨基酸数量不同^[28],此外,在 1 659 cm⁻¹处 C=O 伸缩振动峰强度的增加是碱性水解的缘故^[29]。

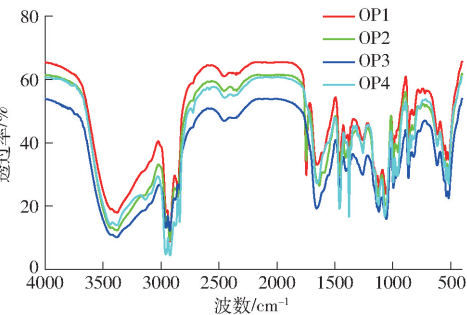


图 5 4 种骨胶原肽样品红外谱图

Fig.5 FT-IR spectra of four kinds of ossein peptide samples

2.3.5 X 射线衍射谱图分析

由图 6 可以看出,4 种骨胶原肽样品在 2θ 为 10°和 20°附近处分别出现了衍射峰,而这两个衍射峰是胶原蛋白的特征衍射峰^[30]。其中,在 2θ=8°处的比较尖锐的衍射峰可以反映骨胶原肽分子量间的距离,在 2θ=20°处的较宽的衍射峰是骨胶原肽内部结构引起的漫散射。此外,2θ=31°处的衍射峰可以反映胶原蛋白中三股螺旋结构单元的组成^[31]。而 4 种骨胶原肽在此处的实测衍射强度具有较大的差异,衍射峰强度较高的原因可能是骨胶原肽中含有部分未分离出的蛋白酶或是脂肪蛋白酶。而 OP3

在 2θ=31°处的衍射峰明显低于其它 3 种,这可能是由于随着水解度的提高,产物中肽分子量分布更加均匀集中,结晶度在一定程度上呈降低趋势,其中,OP3 样品中大部分三股螺旋结构已被破坏,衍射峰强随之降低。

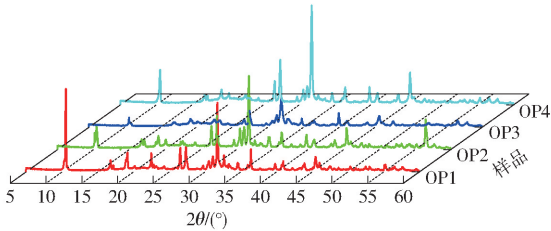


图 6 4 种骨胶原肽的 XRD 谱图

Fig.6 XRD spectra of four kinds of ossein peptide samples

2.4 Person 相关系数

采用 Person 相关系数法对 4 种复合酶解工艺中牛骨粉酶解反应的过程变量进行分析,探究水解度与骨胶原肽产物特性间的关系,结果如图 7 所示。以显著性水平进行显著性标记来绘制图形,以红色标记表示正相关,以蓝色标记表示负相关,显著相关以“*”标记表示。一般而言,相关系数越大,颜色越深,关系越强。由图 7 可知,水解度与 M_n、M_w呈负相关关系,与 M_z、M_{z+1}、M_w/M_n、M_z/M_w及总游离氨基酸含量呈正相关关系,这表明随着水解度的提高,骨胶原肽的分子量在降低,但是自身黏性增加,分子量分布发散度呈变大的趋势。此外,除 M_n外,M_w与其它指标呈负相关关系;总游离氨基酸含量与 M_n、M_w呈负相关,即肽分子量越大,氨基酸含量越低,这表明了水解度程度较低会影响氨基酸从肽链上脱离,进一步佐证了上述推断。

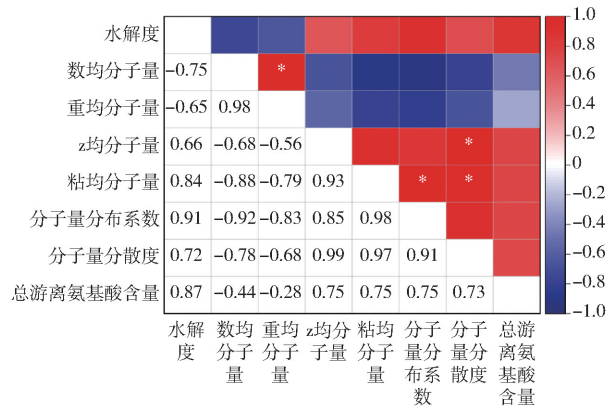


图 7 牛骨蛋白酶解效率和过程变量的相关性分析

Fig.7 Correlations between enzymolysis efficiency and various properties of ossein peptide samples

3 结束语

以前期研究结果证实的骨胶原肽高值高效材料转化利用所需的材料特性为导向,本文以制备均一

性的低分子量骨胶原肽为研究目标,考察脂肪酶预处理、多酶分步酶解工艺以及两者的复合应用对牛骨粉酶解效果的影响,筛选出最佳的均一性低分子量骨胶原肽制备工艺;并对4种骨胶原肽样品的理化性质进行系统分析,进一步探究不同复合酶解工艺下制备的骨胶原肽的产物特性。研究发现,脂肪酶预处理与双酶分步酶解工艺的复合应用可以显著提升水解度,改善酶解产物的分子量分布和氨基酸组成。其中,采用脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-复合蛋白酶的酶解工艺制备的低分子量骨胶原肽性能综合表现最优,其重均分子量、分子量分布系数和分散

度分别为883 Da、9.73和7.91,水解度为16.12%;而采用脂肪酶预处理-碱性蛋白酶-风味蛋白酶酶解工艺的水解度、总游离氨基酸含量最高,分别为19.02%、257.76 mg/g,骨胶原肽产物特性也表现优异。此外,随着水解度的提高,骨胶原肽的肽分子量分布系数降低,骨胶原肽的热稳定、结晶度也出现轻微降低,这是由胶原蛋白的三股螺旋结构被破坏引起的,而这些结构和组成的变化都将在一定程度上利于骨胶原肽的材料增值转化,故寻求水解度与材料特性的最佳平衡点可以兼容蛋白回收的经济性、生产工艺的清洁高效、新型材料性能的安全稳定性。

参 考 文 献

- [1] LIU Y, LI K. Development and characterization of adhesives from soy protein for bonding wood[J]. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2007, 27(1): 59–67.
- [2] 国家统计局. 中国统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2020.
- [3] SARTORE L, SCHETTINI E, DE PALMA L, et al. Effect of hydrolyzed protein-based mulching coatings on the soil properties and productivity in a tunnel greenhouse crop system[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 645(3): 1221–1229.
- [4] PIAZZA G J, GARCIA R A. Proteolysis of meat and bone meal to increase utilisation[J]. *Animal Production Science*, 2014, 54(2): 200–206.
- [5] MEKONNEN T, MUSSONE P, KHALIL H, et al. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2013, 1(43): 13379–13398.
- [6] ADHIKARI B B, CHAE M, ZHU C, et al. Pelletization of torrefied wood using a proteinaceous binder developed from hydrolyzed specified risk materials[J]. *Processes*, 2019, 7(4): 229.
- [7] 姚玉梅, 袁湘汝, 韩鲁佳, 等. 不同分子质量牛骨胶原多肽制备复合膜特性研究[J]. *农业机械学报*, 2020, 51(6): 318–325.
YAO Yumei, YUAN Xiangru, HAN Lujia, et al. Microstructures and properties of bovine bone collagen polypeptide composite films with different molecular weight distributions[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2020, 51(6): 318–325. (in Chinese)
- [8] 宋育璇. 低分子量胶原多肽的制备及其抗氧化活性研究[D]. 太原: 山西大学, 2009.
SONG Yuxuan. Study on preparation and antioxidation of low molecular peptides from collagen[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2009. (in Chinese)
- [9] MEKONNEN T, MUSSONE P, EL-THAHER N, et al. Thermosetting proteinaceous plastics from hydrolyzed specified risk material[J]. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2013, 298(12): 1294–1303.
- [10] ESSANDOH M, GARCIA R A, NIEMAN C M, et al. Practical limitations of the dilute acid hydrolysis method for solubilizing meat and bone meal protein[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(12): 11652–11659.
- [11] YAO Y, WANG M, LIU Y, et al. Insights into the improvement of the enzymatic hydrolysis of bovine bone protein using lipase pretreatment[J]. *Food Chemistry*, 2020, 302: 125199.
- [12] SONG S, LI S, FAN L, et al. A novel method for beef bone protein extraction by lipase-pretreatment and its application in the Maillard reaction[J]. *Food Chemistry*, 2016, 208: 81–88.
- [13] MEKONNEN T H, MUSSONE P G, EL-THAHER N, et al. Subcritical hydrolysis and characterization of waste proteinaceous biomass for value added applications[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015, 90(3): 476–483.
- [14] 张永秀. 牛骨蛋白的酶解及产物抗氧化活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
ZHANG Yongxiu. Studies on the hydrolysis of veal bone protein and its antioxidative activity of its hydrolysate[D]. Beijing: China Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [15] SONG N, TAN C, HUANG M, et al. Transglutaminase cross-linking effect on sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from soybean protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(1): 144–151.
- [16] SEDMAK J J, GROSSBERG S E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250[J]. *Analytical Biochemistry*, 1977, 79(1–2): 544–552.
- [17] 朱瀛. 酶法制备鸡骨渣短肽及其抗氧化活性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2017.
ZHU Ying. The research of antioxidant activity of chicken bone residue hydrolyzed by enzyme[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [18] 张建威, 李苗云, 赵改名, 等. 木瓜蛋白酶酶解鸡骨渣的工艺条件优化[J]. *河南农业大学学报*, 2012, 46(3): 322–327.
ZHANG Jianwei, LI Miaoyun, ZHAO Gaiming, et al. Optimization of hydrolysis conditions for chicken bone residues with papain protease[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2012, 46(3): 322–327. (in Chinese)
- [19] BORNSCHEUER U T, BESSLER C, SRINIVAS R, et al. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(10): 433–437.