

肉杂鸡鸡骨架酶解工艺优化及其分析评价

侯钰柯, 陆逸峰, 蒋宇飞, 康明丽, 韩敏义, 徐幸莲

Optimization and Evaluation of Enzymatic Hydrolysis Process of Hybrid Broilers Skeleton

HOU Yuke, LU Yifeng, JIANG Yufei, KANG Mingli, HAN Minyi, and XU Xinglian

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100097>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

响应面法优化鲢鱼肽的复合酶酶解工艺及氨基酸评价

Optimization Process Condition using Response Surface for Bi-enzymatic of *Katsuwonus pelamis* Peptides and Amino Acid Evaluation

食品工业科技. 2021, 42(4): 121-127

响应面法优化腊肉酶解工艺条件

Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for bacon by response surface method

食品工业科技. 2017(21): 209-215

响应面优化庸鲈鱼骨酶解条件及其酶解物氨基酸组成分析

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions by Response Surface and Analysis of Amino Acid Composition of Enzymatic Hydrolysate from *Hippoglossus hippoglossus* Bone

食品工业科技. 2019, 40(22): 175-180,186

响应面法优化大黄花鱼肉蛋白水解工艺及多肽抗氧化性研究

Optimization of the Protein Hydrolysis Process by Response Surface Method and the Antioxidant Properties of Polypeptides in Large Yellow Croaker

食品工业科技. 2020, 41(13): 219-226

红岛蛤蜊肉酶解工艺优化及其产物降血压功能研究

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Hongdao Clam and Anti-hypertensive Activity of the Resulted Products

食品工业科技. 2021, 42(7): 216-222

盐鸡卤汁酶解工艺优化及氨基酸组成分析

Optimization of enzymatic hydrolysis of water-boiled salted chicken marinade and analysis of amino acid composition

食品工业科技. 2018, 39(9): 295-300



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

侯钰柯, 陆逸峰, 蒋宇飞, 等. 肉杂鸡鸡骨架酶解工艺优化及其分析评价 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 232–242. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100097

HOU Yuke, LU Yifeng, JIANG Yufei, et al. Optimization and Evaluation of Enzymatic Hydrolysis Process of Hybrid Broilers Skeleton[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 232–242. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100097

· 工艺技术 ·

肉杂鸡鸡骨架酶解工艺优化及其分析评价

侯钰柯^{1,2}, 陆逸峰^{1,2}, 蒋宇飞³, 康明丽⁴, 韩敏义^{1,2,3,*}, 徐幸莲^{1,2}

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095;

2.农业部肉品加工重点实验室, 江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心, 江苏南京 210095;

3.温氏食品集团股份有限公司, 广东云浮 527400;

4.河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018)

摘要:以肉杂鸡鸡骨架为原料, 测定其基本成分和氨基酸组成, 对蛋白质进行营养评价, 发现鸡骨架是进行酶解的良好原料。从碱性蛋白酶、风味蛋白酶、胰酶和复合蛋白酶中筛选出鸡骨架酶解的最佳用酶, 利用单因素实验和响应面法优化了鸡骨架酶解的工艺条件。结果表明: 在温度 50 ℃、pH7.0、酶添加量 7000 U/g 的条件下酶解 4 h, 酶解效率最高, 水解度和氮回收率分别为 (33.54%±0.02%) 和 (96.20%±0.03%), 与响应面优化试验回归模型的预测值基本一致。在此基础上制备鸡骨架酶解液, 对酶解液氨基酸含量和肽的分子量分布进行检测, 发现分子量 <1000 Da 的肽段占比最高, 达到 83.25%; 必需氨基酸含量高, 占氨基酸总量的 54.27%, 营养价值高, 且含有丰富的鲜味氨基酸。由氨基酸滋味活性值 (Taste activity value, TAV) 可知酶解前的样品口感以甜味、鲜味为主, 酶解后以苦味、鲜味为主。该研究可为鸡骨架的高值化利用提供理论依据和数据支持。

关键词:鸡骨架, 营养成分, 酶解, 响应面法, 肽分子量分布, 氨基酸评价

中图分类号: TS251.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)09-0232-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100097



本文网刊:

Optimization and Evaluation of Enzymatic Hydrolysis Process of Hybrid Broilers Skeleton

HOU Yuke^{1,2}, LU Yifeng^{1,2}, JIANG Yufei³, KANG Mingli⁴, HAN Minyi^{1,2,3,*}, XU Xinglian^{1,2}

(1.College of Food Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2.Key Laboratory of Meat Products Processing, Ministry of Agriculture, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing, Quality and Safety Control, Nanjing 210095, China;

3.Wens Food Group Co., Ltd., Yunfu 527400, China;

4.College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: The basic composition and amino acid composition of hybrid broilers skeleton were determined, and the nutritional evaluation of protein was carried out. Hybrid broilers skeleton was found to be a good raw material for enzymatic hydrolysis. The optimum enzyme for hybrid broilers skeleton enzymatic hydrolysis was selected from alkaline protease, flavor protease, trypsin and compound protease. The single factor test and response surface methodology were used to optimize the technological conditions of chicken skeleton enzymatic hydrolysis. The results revealed that under the conditions of temperature 50 ℃, pH7.0 and enzyme dosage 7000 U/g for 4 h, the hydrolysis degree and nitrogen recovery were (33.54%±0.02%) and (96.20%±0.03%), respectively, which were basically consistent with the predicted values of the

收稿日期: 2021-10-13

基金项目: 国家重点研发计划资助 (2019YFC1606200); 温氏股份科技重大专项 (WENS-2020-1-ZDZX-007); 国家自然科学基金: 肌原纤维蛋白糖基化对类 PSE 肉凝胶品质改善机理研究 (31571854)。

作者简介: 侯钰柯 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肉品加工与质量控制, E-mail: h13949090361@163.com。

* 通信作者: 韩敏义 (1975-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 肉品加工与质量控制, E-mail: myhan@njau.edu.cn。

regression model of response surface optimization test. On this basis, the chicken skeleton hydrolysate was prepared, and the amino acid content and molecular weight distribution of peptide were detected. The proportion of peptides with molecular weight <1000 Da was the highest, reaching 83.25%. The content of essential amino acids was high, accounting for 54.27% of the total amino acids, with high nutritional value, and rich in umami amino acids. According to the TAV value of amino acid, the taste perception of samples before enzymatic hydrolysis was mainly sweet and umami, while after enzymatic hydrolysis, it was mainly bitter and umami. This investigation could provide theoretical references and data support for the high value utilization of chicken skeleton.

Key words: hybrid broilers skeleton; nutritional ingredient; enzymatic hydrolysis; response surface method; molecular weight distribution of peptide; amino acid evaluation

近年来,我国肉类消费量呈不断增长趋势,鸡肉作为人们日常饮食的重要组成部分,因其滋味鲜美、营养丰富在全球食品市场上占据重要地位。根据美国农业部(USDA)的数据,2020 年全球肉鸡总产量达到 1.01 亿吨^[1],鸡肉产量增加的同时也产生了大量的副产物——鸡骨架。鸡骨架是分割鸡肉生产的主要副产物,由鸡骨、鸡肉和鸡皮组成,新鲜鸡骨架中水分含量约 65%、蛋白质 16%、脂肪 14%,同时呈味氨基酸含量高于鸡肉,有较高的营养价值,具有作为风味基料的潜力^[2]。

近年来陆续有研究学者以畜禽骨架为原料,通过酶解反应制备热反应鸡肉香精的前体物质。赵永珍等^[3]利用风味蛋白酶和复合蛋白酶复合水解,探究了酶解液的最佳工艺参数和不同酶解液对美拉德反应的影响。郑红^[4]研究了酶种类和酶解工艺对鸡骨架蛋白水解度和风味的影响。刘贺等^[5]对酶解工艺进行了优化,并对酶解液的游离氨基酸含量进行了测定。这些通过酶解反应制备的鸡肉香精的前体物质被广泛应用于调味品、速冻食品和方便面等食品工业化加香产品的生产中^[6]。肉杂鸡是优秀的肉鸡和生产性能先进的蛋鸡杂交产生的,生长速度快、抗病力强、肉质好,有不可替代的特点和优势。有研究将其与进口商品肉鸡和淘汰蛋鸡相比,发现肉杂鸡具有更优质的蛋白质(22.36 g/100 g)、更高的微量元素(6.83 mg/100 g)、必需氨基酸含量(36.26 g/100 g)和胶原蛋白含量(3.14 mg/g)以及更低的肌肉脂肪含量(1.12 g/100 g),表现出了较强的优势^[7],顺应了部分消费和食品加工的需求,当前在鸡肉占比中,肉杂鸡比重持续增加。目前,用于酶解制备热反应鸡肉香精前体物质的原料大多为白羽肉鸡^[8-10],对于肉杂鸡的报道较少。

本文以肉杂鸡鸡骨架为原料,分析了肉杂鸡鸡骨架的基本营养成分和游离氨基酸含量,根据 FAO/WHO 推荐成人模式,以氨基酸评分标准模式(AAS)为参考量,对肉杂鸡鸡骨架蛋白质进行营养评价。以氮回收率和水解度为指标,从碱性蛋白酶、风味蛋白酶、胰酶和复合蛋白酶四种酶中筛选出酶解鸡骨架的最佳用酶,通过单因素实验和响应面法优化酶解条件,对最优酶解条件的氨基酸组成和肽分子量分布进行分析,采用氨基酸 TAV 值分析酶解前后味感,为鸡骨架酶解深加工利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

肉杂鸡鸡骨架 取自新兴县温氏佳丰食品有限公司鸡肉分割生产线,品种为 818 肉杂鸡,日龄 52 d 左右,母鸡,宰后成熟时间约 1~2 h;胰酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶(几种酶的最适 pH、温度和酶活力见表 1) 金克隆生物技术有限公司;氢氧化钠、盐酸、浓硫酸、溴甲酚绿、甲基红、甲醛、三乙胺、甲醇、异硫氰酸苯酯 分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;细胞色素 C(MW12384)、抑肽酶(MW6500)、杆菌肽(MW1422)、乙氨酸—乙氨酸—酪氨酸—精氨酸(MW451)、乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸(MW189) 标准品, Sigma 公司。

表 1 不同蛋白酶最适 pH 和温度
Table 1 Optimal pH and temperature of various proteases

酶的种类	最适pH	最适温度(℃)	酶活力(U/g)
EZ0770 胰酶	8.0	50	4000
EZ1370 碱性蛋白酶	10.5	50	20000
EZ0420 风味蛋白酶	7.0	50	30000
EZ1330 复合蛋白酶	7.5	50	10000

FOSS Kjelttec8400 凯氏定氮仪 丹麦福斯集团公司; CHJR-100 绞肉机 诸城市春晖机械有限公司; HWS-26 电热恒温水浴锅 上海齐欣科学仪器有限公司; S2-Food Kit 型 pH 计 瑞士梅特勒托得多公司; PD500 高速均质机 普律玛仪器(上海)有限公司; UGC-24C 氮吹仪 北京优晟联合科技有限公司; LC-20AT 高效液相色谱仪 岛津公司; E-816ECE 索氏抽提装置 瑞士步琪有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鸡骨架营养成分测定 含水量: 参照 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》; 总蛋白: 参照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》; 脂肪: 参照 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》; 灰分: 参照 GB 5009.4-2016《食品中灰分的测定》; 钙: 参照 GB 5009.92-2016《食品中钙的测定》; 游离氨基酸: 参照 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》。

1.2.2 酶解液的制备 参考张恒等^[8]的方法并做适当修改。将鸡骨架洗净、沥干后剪去大体积脂肪块, 冲洗 3 次以去除表面杂质, 绞碎成鸡骨泥, 加入一定

量的去离子水调节蛋白浓度为 5%(蛋白质浓度用凯氏定氮法测量),用匀浆机匀浆(10000 r/min, 20 s×3),在 90 ℃ 条件下加热预处理 10 min,加入酶,调节 pH,置于恒温水浴中酶解。酶解过程中不断调节 pH,酶解结束后沸水浴 10 min 灭酶,冷却至室温后离心(3580 r/min, 10 min),上清液即为酶解液,放置 10 min 后撇去浮油(目的是去除部分脂肪),测定水解度和氮回收率。

1.2.3 蛋白酶制剂的筛选 根据前期预实验结果,在酶解程度较为完全的情况下,将四种酶分别在各自最适 pH 和温度下加入 6000 U/g 酶酶解 4 h,以水解度和氮回收率为评价指标,确定最佳酶。

1.2.4 酶解工艺优化

1.2.4.1 酶解温度 鸡骨架底物浓度为 5%,酶添加量为 6000 U/g, pH 调为 7.0,分别在 40、45、50、55、60 ℃ 条件下水解,恒温反应 4 h 后,测定水解度及氮回收率,探讨温度对风味蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.4.2 酶解 pH 用选定的最佳温度,其他条件不变, pH 分别在 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 条件下酶解 4 h,测定水解度及氮回收率,探讨 pH 对风味蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.4.3 酶添加量 用选定的最佳温度和 pH,其他条件不变,酶添加量分别在 2000、4000、6000、8000、10000 U/g 条件下酶解 4 h,测定水解度及氮回收率,探讨酶添加量对风味蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.4.4 酶解时间 用选定的最佳温度、pH、酶添加量,其他条件不变,酶解时间分别为 2、3、4、5、6 h,测定水解度及氮回收率,探讨酶解时间对风味蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.5 响应曲面法试验设计 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单因素的实验结果,以水解度(Y_1)和氮回收率(Y_2)为响应值,选取温度(A)、pH(B)、酶解时间(C)、酶添加量(D)4个因素。利用统计软件 Design Expert 8.0.6 对试验数据进行回归分析,获得二次多元回归模型,对模型进行方差分析,用模型对鸡骨架酶解的水解度和氮回收率进行分析和预测,得出最佳的酶解条件。响应面设计中因素及水平见表 2。

表 2 响应面设计因素及水平
Table 2 Response surface design factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A 温度(℃)	45	50	55
B pH	6.0	7.0	8.0
C 酶解时间(h)	3	4	5
D 酶添加量(U/g)	6000	8000	10000

1.2.6 水解度(DH)的测定

1.2.6.1 氨基态氮的测定 参考徐兆刚^[11]的方法。在烧杯中加入 5 mL 酶解液和 25 mL 蒸馏水,开动磁

力搅拌器,用 NaOH 标准溶液将 pH 调至 8.2,加入 10 mL 甲醛溶液后将 pH 调至 9.2,记录 pH 从 8.2 到 9.2 加入 NaOH 的体积。同时取 30 mL 水做空白试验。氨基态氮计算公式如下:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.014 \times 100}{5}$$

式中: X 为样品氨基态氮的含量(g/100 mL); V_1 为样品加入甲醛后消耗氢氧化钠标准液的体积(mL); V_2 为空白实验加入甲醛后消耗氢氧化钠标准液的体积(mL); C 为氢氧化钠标准液的浓度(mol/L),取值为 0.05 mol/L; 5 是酶解液的取用量(mL); 0.014 是氮的毫克当量。

1.2.6.2 水解度的测定 酶切断蛋白质肽键使其成为小分子肽的情况可用水解度(DH)表示。参考田刚^[12]的方法,采用甲醛滴定法,计算公式如下:

$$\text{水解度}(\%) = \frac{(\text{水解产物中氨基态氮} - \text{水解前溶液中氨基态氮})}{\text{水解前溶液中总氮}} \times 100$$

1.2.7 氮回收率的测定 取 10 mL 酶解液,用凯氏定氮法消化、定氮,测得酶解液中的氮含量,氮回收率(Nitrogen recovery, NR)计算公式如下^[13]:

$$\text{氮回收率}(\%) = \frac{\text{酶解液总氮}}{\text{原料总氮}} \times 100$$

1.2.8 氨基酸分析 参考姚佳等^[14]的方法并做适当修改。取 10 μ L 样品放置于离心管中,氮吹仪 45 ℃ 流下吹干,加入 10 μ L 干燥剂(200 μ L 甲醇、200 μ L 水、100 μ L 三乙胺),氮气流吹干,加入 20 μ L 衍生剂(100 μ L 水、700 μ L 甲醇、100 μ L 三乙胺、100 μ L 异硫氰酸苯酯)密闭衍生 30 min,氮气流下吹干,加入稀释剂(pH7.4 的磷酸氢二钠溶液)200 μ L,上机测定。其中,酶解前鸡骨架泥匀浆处理后离心(3580 r/min, 10 min)取上清液,酶解后酶解液离心取上清液进行测定。

1.2.9 肽分子量测定 采用 LC-20AT 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 Empower 工作站 GPC 软件)测定酶解液的肽分子量分布^[14-15]。酶解液经过 0.22 μ m 滤膜过滤,注入配备 TSKgel 凝胶色谱柱(2000 SWXL 300 mm×7.8 mm)的高效液相色谱进行分离。流动相:乙腈:水:三氟乙酸=40:60:0.1(v:v:v),流速 0.5 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 10 μ L,检测波长为 220 nm。以细胞色素 C(MW12384),抑肽酶(Mw6500),杆菌肽(MW1422),乙氨酸—乙氨酸—酪氨酸—精氨酸(MW451),乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸(MW189)为标准品绘制分子量标准曲线,以洗脱体积 x 为横坐标,相对分子质量的对数 y 为纵坐标,绘制相对分子质量校正曲线并得到方程 $y = -0.239x + 7.01$, $R^2 = 0.987$ 。

1.3 数据处理

数据用平均值±标准差表示(n=3),用 IBM SPSS Statistics 25 软件(IBM, USA)进行单因素方差分析

(ANOVA), 用 Duncan's 方法进行多重比较, 显著水平设为 $P < 0.05$ 。响应曲面试验用 Design-Expert 8.0.6(Stat-Ease, USA)软件进行设计和结果统计分析, 用 Origin 2018(OriginLab Co, Northampton, MA, USA)软件绘图。

2 结果与分析

2.1 基本化学组成分析

鸡骨架基本化学成分见表 3, 由表可知, 鸡骨架中含有丰富的蛋白质, 含量达到 17.02 g/100 g, 脂肪含量为 16.04 g/100 g, 高于文献报道白羽肉鸡中的含量(10.41 g/100 g)^[2], 灰分含量较低, 为 3.01 g/100 g, 蛋白质含量比鸭骨架(15.23 g/100 g)含量高, 且灰分含量低于鸭骨架(8.62 g/100 g)^[16], 相较于鸭骨架而言是进行酶解的良好原料。

表 3 鸡骨架基本化学成分
Table 3 Basic chemical constituents of chicken skeleton

基本成分	含量(g/100 g)
水分	64.98±0.64
蛋白质	17.02±0.02
脂肪	16.04±0.25
灰分	3.01±0.06
钙	0.85±0.034

鸡骨架氨基酸组成见表 4(色氨酸未检出), 蛋白质中的氨基酸含量, 尤其是必需氨基酸是反映蛋白质质量的重要指标, 由表 4 可知, 鸡骨架中必需氨基酸含量高达 35.26%, 鲜味氨基酸含量高达 21.83%, 可

表 4 鸡骨架氨基酸组成

Table 4 Amino acid composition of chicken skeleton

氨基酸种类	游离氨基酸(mg/100 g)	占总氨基酸比例(%)
天冬氨酸(Asp)	978.97±11.30	6.98
谷氨酸(Glu)	2081.05±18.91	14.85
丝氨酸(Ser)	580.26±12.65	4.14
甘氨酸(Gly)	1610.30±117.92	11.49
组氨酸(His)*	476.53±8.07	3.40
精氨酸(Arg)	1130.45±42.48	8.06
苏氨酸(Thr)*	532.81±12.68	3.80
丙氨酸(Ala)	1048.96±52.98	7.48
脯氨酸(Pro)	1217.09±67.78	8.68
酪氨酸(Tyr)	361.67±4.44	2.58
缬氨酸(Val)*	591.90±15.43	4.22
蛋氨酸(Met)*	300.15±3.29	2.14
半胱氨酸(Cys)	66.87±15.25	0.48
异亮氨酸(Ile)*	522.28±1.82	3.73
亮氨酸(Leu)*	995.54±16.37	7.10
苯丙氨酸(Phe)*	500.07±13.32	3.57
赖氨酸(Lys)*	1022.71±11.95	7.30
必需氨基酸	4941.99±61.02	35.26
鲜味氨基酸	3060.02±35.75	21.83
含硫氨基酸	367.02±12.28	2.62
总量	14017.63±342.57	

注: *表示必需氨基酸; 鲜味氨基酸含量是指天冬氨酸和谷氨酸; 含硫氨基酸含量是指半胱氨酸和蛋氨酸。

见鸡骨架是优质的蛋白质, 氨基酸的组成和比例较为合理, 综合了鸡骨和鸡骨肉的特点, 这也是鸡骨架味道鲜美的原因之一。

肉杂鸡鸡骨架蛋白质营养评价见表 5, 由表可知, 当以氨基酸评分标准模式(AAS)为参考量时, 蛋氨酸和半胱氨酸是第一限制氨基酸, 异亮氨酸、苏氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸+酪氨酸的氨基酸分接近 FAO/WHO 推荐成人模式, 赖氨酸含量显著高于评分标准模式, 赖氨酸是长期摄入谷物类食品人群的第一限制性氨基酸, 作为必需氨基酸之一, 既可以增强人体免疫力, 又能促进发育。鸡骨架与缺乏赖氨酸的食物搭配食用可促进氨基酸的摄入均衡^[17]。另外, 鸡骨架中胶原蛋白含量高达 35%~45%, 此外, 还有肌球蛋白、酶类、磷蛋白等多种蛋白质^[16], 是进行酶解的良好原料。

表 5 鸡骨架蛋白质营养评价

Table 5 Nutritional evaluation of chicken skeleton protein

氨基酸(mg·g ⁻¹)	FAO/WHO推荐成人模式	组成	氨基酸评分标准模式(AAS)
赖氨酸(Lys)	55	72.59	1.33
蛋氨酸(Met)+半胱氨酸(Cys)	35	26.06	0.63
缬氨酸(Val)	50	42.01	0.84
苯丙氨酸(Phe)+酪氨酸(Tyr)	60	61.17	1.02
亮氨酸(Leu)	70	70.67	1.01
异亮氨酸(Ile)	40	37.07	0.93
苏氨酸(Thr)	40	37.82	0.95
总计	360	352.6	
占总量(%)	36	35.26	

注: AAS指Amino acid score, 即氨基酸分; 划线的数据为鸡骨架蛋白的氨基酸分; 即鸡骨架蛋白的第一限制性氨基酸的含量与参考蛋白中该氨基酸含量的比值。

2.2 蛋白酶制剂的筛选

不同酶的酶切位点不同, 产生的氨基酸种类不同, 对酶解液的风味、水解度、物理化学特性有很重要的影响^[4], 因此, 选择合适的蛋白酶对鸡骨架进行酶解至关重要。本试验选取了具有代表性的四种酶: 风味蛋白酶、胰酶、复合蛋白酶和碱性蛋白酶。由图 1 可知, 四种蛋白酶分别在其最适条件下酶解, 水解度由大到小分别是: 风味蛋白酶>胰酶>复合蛋白酶>碱性蛋白酶, 其中, 风味蛋白酶的水解度显著高于其他三种酶类($P < 0.05$), 达到 32.14%, 熊善柏等^[18]用 6 种酶对乌鸡蛋白质进行酶解测定水解度, 也得到了同样的结论。氮回收率由大到小分别是: 胰酶>风味蛋白酶>碱性蛋白酶>复合蛋白酶, 胰酶的氮回收率最高, 为 90.94%; 用胰酶水解后, 氮回收率最高, 但是水解液浑浊, 苦味重, 不利于后处理。风味蛋白酶具有外切酶和内切酶两种活性, 能较大程度地将具有暴露在外部的疏水基团降解为氨基酸, 同时使一些风味前体物发生水解, 提高酶解液的风味^[19]。CHIANG 等^[20]研究了酶解处理对牛骨提取物化性质的影响, 发现在不添加其他酶的情况下, 风味蛋白酶可以增加低分子

量肽的含量,降低粘度,改善酶解液的风味。本实验用风味蛋白酶水解后,水解液较澄清,有良好的鸡肉香味。综合考虑,选择风味蛋白酶为后续实验用酶。

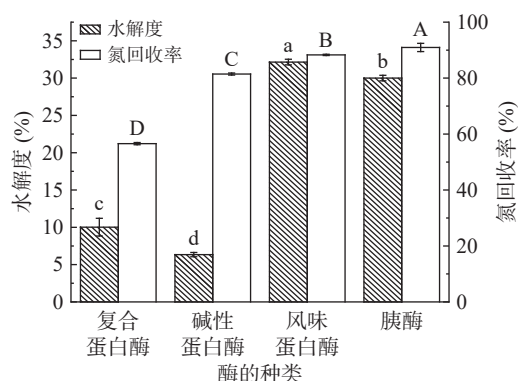


图1 不同蛋白酶酶解对酶解液水解度和氮回收率的影响
Fig.1 Effects of different proteases on hydrolysis degree and nitrogen recovery of hydrolysate

注:不同字母表示同一指标各组间差异显著($P<0.05$);图2~图5同。

2.3 酶解工艺优化

2.3.1 酶解温度 在酶解过程中,温度主要从两个方面影响酶解效率。一方面,酶的本质是蛋白质,空间结构受温度影响,引起活性变化,温度过高,酶变性,稳定性下降,进而导致酶解效率降低。另一方面,升高温度使底物转变成产物的速度加快,提高酶解效率。本文分别在40、45、50、55、60℃条件下进行水解,测定水解度和氮回收率,结果如图2所示。

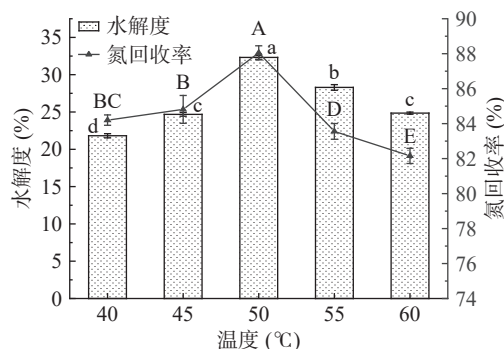


图2 不同温度对水解度和氮回收率的影响
Fig.2 Effect of different temperature on degree of hydrolysis and nitrogen recovery

由结果可知,温度在50℃时有最高的水解度和氮回收率,分别是32.31%和88.05%。可能是由于反应初期,酶促反应速率随着温度的升高而增加,50℃后,风味蛋白酶的酶蛋白变性导致酶活力丧失,酶促反应受到抑制,故用风味蛋白酶酶解鸡骨架时,选择50℃较为适宜。

2.3.2 酶解 pH pH对酶的活性具有很大的影响,根据以往的研究,pH主要从三个方面影响酶的活性^[21]:一是过酸或过碱都能使酶失活,影响酶活力稳定性;二是酸或碱对底物的解离状态产生影响,使得酶与底物不能结合或结合后不能生成产物;三是氢离子和氢

氧根离子通过结合或催化基团的解离状态控制了酶的活性中心,分别使得底物不能与酶结合或底物不能被酶催化生成产物。本研究分别在pH为5.0、6.0、7.0、8.0和9.0的条件下对鸡骨架进行酶解,测定其水解度和氮回收率,结果如图3所示。

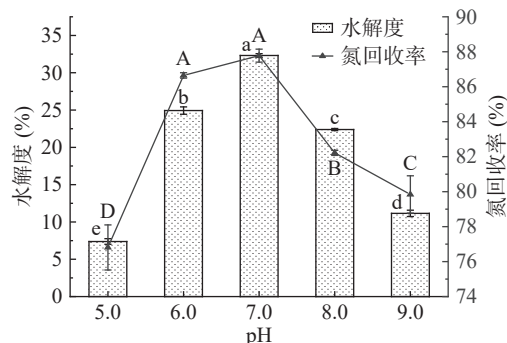


图3 不同pH对水解度和氮回收率的影响
Fig.3 Effect of different pH on degree of hydrolysis and nitrogen recovery

由图3可知,初始pH与水解度和氮回收率的关系图类似钟型。在pH为7.0时,水解效果最好,水解度和氮回收率分别达到32.23%和87.78%,与pH7.0相比,初始pH处于两个极端时的水解度和氮回收率均显著降低($P<0.05$)。主要原因可能是风味蛋白酶的最适pH在7.0左右,pH过高或过低引起空间构象的改变导致酶失活,同时影响酶与底物的结合。因此,在对鸡骨架进行酶解时,调整体系pH为7.0时酶解效果较好。

2.3.3 酶添加量 当底物浓度一定时,酶添加量越大,酶解速率越高,水解度和氮回收率也就越高。但是当酶添加量达到一定程度时,酶与底物充分结合达到饱和,水解程度平缓,同时可能由于酶作为蛋白质自身发生水解,酶活力降低。酶添加量过高时,肽链进一步被水解,释放出具有苦味的小肽^[22],因此,选择合适的酶添加量至关重要。分别在酶添加量为2000、4000、6000、8000和10000 U/g时对鸡骨架进行酶解,结果如图4所示。

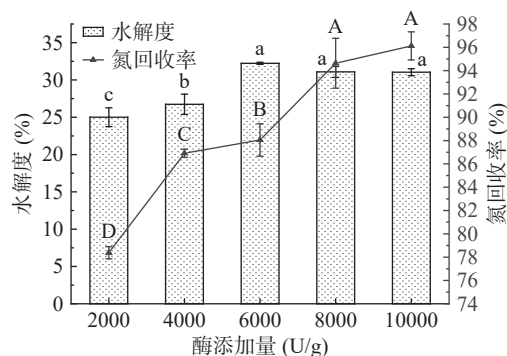


图4 不同酶添加量对水解度和氮回收率的影响
Fig.4 Effects of different enzyme dosage on degree of hydrolysis and nitrogen recovery

由图4可知,随着酶添加量的增加,氮回收率逐渐增加,到8000 U/g时增加量趋于平缓,氮回收率和水解度与10000 U/g时无显著性差异($P>0.05$),可能

是因为酶添加量的增加导致更多的酶作用于蛋白质, 产生了更多的肽链^[23]。当酶添加量大于 6000 U/g 时, 水解度略有降低, 但与 6000 U/g 无显著差异($P>0.05$), 考虑到成本问题, 选择酶添加量为 8000 U/g。

2.3.4 酶解时间 酶解时间与产量、能耗以及设备利用率密切相关, 本试验探讨了在 2、3、4、5 和 6 h 的酶解过程中, 水解度和氮回收率的变化, 试验结果见图 5。

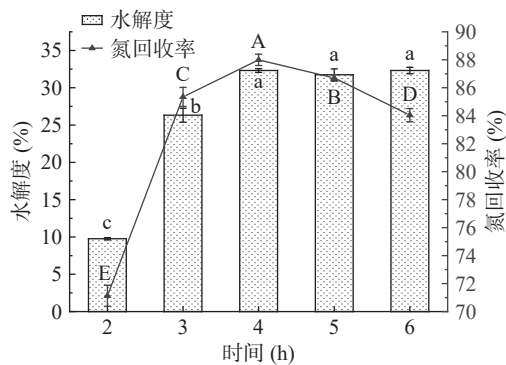


图 5 不同时间对水解度和氮回收率的影响
Fig.5 Effect of different time on degree of hydrolysis and nitrogen recovery

如图 5 所示, 在 2~6 h 内, 氮回收率先增大后减小, 在 4 h 达到最大, 为 88%。水解度在 2~4 h 呈上升趋势, 之后变化不大, 可能是由于随着时间的延长, 底物与酶结合较充分, 呈现饱和状态, 随着时间的延长, 底物被消耗, 酶分子的有效含量降低, 酶解速率降低, 使得水解度呈现缓慢上升趋势。综合考虑, 鸡骨架酶解时间选择 4 h 较为合适。

2.4 响应面试验结果及分析

2.4.1 回归模型的建立和方差分析 利用 Design Expert 软件对温度、pH、酶添加量、酶解时间进行四因素三水平 BoxBehnken 试验, 响应面试验设计及结果如表 6 所示。对实验结果进行方差分析, 对数据进行多元回归拟合, 得到水解度(Y_1)与氮回收率(Y_2)对温度(A)、pH(B)、酶解时间(C)、酶添加量(D)的二次响应曲面回归方程如下:

$$Y_1=0.33+0.018A-0.026B+0.026C-0.023D-2.574\times10^{-3}AB+8.730\times10^{-3}AC-4.686\times10^{-3}AD-0.021BC-0.020BD-8.764\times10^{-3}CD-0.042A^2-0.096B^2-0.049C^2-0.032D^2$$

$$Y_2=0.95-2.105\times10^{-3}A-0.026B-0.020C-0.058D-7.018\times10^{-4}AB+2.983\times10^{-3}AC+3.597\times10^{-3}AD-0.036BC-0.060BD-0.015CD-0.060A^2-0.099B^2-0.111C^2-0.062D^2$$

酶解产物对水解度的回归方程方差分析见表 7。结果显示, 模型整体 $P<0.0001$, 说明该模型极显著。根据回归方程中一次项的均方可知, 影响酶解过程中产物对水解度的因素重要性排序为: 酶解时间(C)>pH(B)>酶添加量(D)>温度(A), 且这四个因素均对模型具有极显著影响($P<0.01$)。失拟项 $P=0.2281>$

表 6 响应曲面试验设计与结果

Table 6 Design and experimental results of response surface methodology(RSM)

试验号	编码				Y_1 水解度 (%)	Y_2 氮回收率 (%)
	A 温度	B pH	C 酶解时间	D 酶添加量		
1	0	-1	0	-1	25.30±0.05	80.71±0.01
2	-1	0	0	1	22.18±0.05	79.44±0.00
3	-1	0	1	0	23.03±0.04	74.40±0.00
4	0	0	-1	1	20.84±0.01	74.16±0.01
5	1	1	0	0	20.12±0.00	78.60±0.01
6	0	1	-1	0	15.55±0.01	76.56±0.01
7	1	0	1	0	28.98±0.00	76.07±0.01
8	0	0	0	0	34.07±0.01	93.19±0.02
9	0	-1	-1	0	15.31±0.00	74.82±0.00
10	0	-1	0	1	23.12±0.01	80.79±0.01
11	0	0	1	-1	31.94±0.01	86.21±0.02
12	0	0	0	0	32.57±0.03	93.47±0.01
13	0	-1	1	0	23.70±0.01	75.95±0.01
14	0	0	-1	-1	23.79±0.02	85.33±0.01
15	0	0	0	0	30.82±0.01	97.12±0.03
16	-1	0	-1	0	19.77±0.00	78.63±0.01
17	0	1	0	-1	20.35±0.01	88.25±0.01
18	1	0	-1	0	22.23±0.01	79.11±0.01
19	1	-1	0	0	23.52±0.01	84.21±0.01
20	1	0	0	1	23.87±0.01	75.75±0.01
21	-1	1	0	0	16.66±0.01	76.67±0.02
22	0	0	0	0	32.82±0.03	96.00±0.03
23	0	1	1	0	15.72±0.01	63.44±0.01
24	-1	-1	0	0	19.03±0.01	82.00±0.01
25	0	0	0	0	33.57±0.04	95.32±0.01
26	1	0	0	0	28.25±0.01	83.65±0.01
27	0	1	0	1	10.66±0.00	64.19±0.01
28	0	0	1	1	25.49±0.01	68.99±0.01
29	-1	0	0	-1	24.69±0.01	88.77±0.02

表 7 水解度试验结果方差分析

Table 7 ANOVA of hydrolysis degree test results

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.099	14	7.101×10^{-3}	24.49	<0.0001**
A-温度	3.896×10^{-3}	1	3.896×10^{-3}	13.43	0.0025**
B-pH	7.805×10^{-3}	1	7.805×10^{-3}	26.91	0.0001**
C-酶解时间	8.201×10^{-3}	1	8.201×10^{-3}	28.28	0.0001**
D-酶添加量	6.471×10^{-3}	1	6.471×10^{-3}	22.31	0.0003**
AB	2.650×10^{-5}	1	2.650×10^{-5}	0.091	0.7669
AC	3.049×10^{-4}	1	3.049×10^{-4}	1.05	0.3226
AD	8.784×10^{-5}	1	8.784×10^{-5}	0.30	0.5907
BC	1.692×10^{-3}	1	1.692×10^{-3}	5.84	0.0300*
BD	1.523×10^{-3}	1	1.523×10^{-3}	5.25	0.0380*
CD	3.072×10^{-4}	1	3.072×10^{-4}	1.06	0.3208
A ²	0.011	1	0.011	38.92	<0.0001**
B ²	0.060	1	0.060	206.87	<0.0001**
C ²	0.016	1	0.016	54.07	<0.0001**
D ²	6.589×10^{-3}	1	6.589×10^{-3}	22.72	0.0003**
残差	4.060×10^{-3}	14	2.900×10^{-4}		
失拟	3.443×10^{-3}	10	3.443×10^{-4}	2.23	0.2281
纯误差	$6.169E\times10^{-4}$	4	1.542×10^{-4}		
总变异	0.10	28			

注: *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$); 表8同。

0.05, 失拟不显著, 表明未知因素对试验结果的影响较小, 残差主要来自于随机误差。模型的调整确定系

数 $R^2_{Adj}=0.9215$, 说明该模型能够解释 92.15% 的响应值变化。因此, 该模型拟合程度良好, 可以用此模型对鸡骨架酶解的水解度进行分析和预测。

图 6 能比较直观的表示出当固定 1 个因素为中心点水平时, 其他各因素交互作用对水解度的影响, 由图中可以看出, 当固定一个因素, 随着另一因素水平的升高, 响应值均是先增大后减小, 在中间出现极大值, 与单因素实验结果一致。

酶解产物对氮回收率的回归方程方差分析见表 8。结果显示模型整体 $P<0.0001$, 说明该模型极显著。根据回归方程中一次项的均方可知, 影响酶解过程中产物对水解度的因素重要性排序为: 酶添加量(D)>pH(B)>酶解时间(C)>温度(A), 且酶解时间对模型具有显著影响($P<0.05$), pH 和酶添加量对模型具有极显著影响($P<0.01$)。失拟项 $P=0.1949>0.05$, 失拟不显著, 表明未知因素对试验结果的影响较小, 残差主要来自于随机误差。模型的调整确定系数 $R^2_{Adj}=0.9249$, 说明该模型能够解释 92.49% 的响应值变化。因此, 该模型拟合程度良好, 可以用此模型对鸡骨架酶解的氮回收率进行分析和预测。

表 8 氮回收率试验结果方差分析

Table 8 ANOVA of nitrogen recovery test results

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.21	14	0.015	25.65	<0.0001**
A-温度	5.319×10^{-5}	1	5.319×10^{-5}	0.092	0.7667
B-pH	7.893×10^{-3}	1	7.893×10^{-3}	13.58	0.0024**
C-酶解时间	4.623×10^{-3}	1	4.623×10^{-3}	7.96	0.0136*
D-酶添加量	0.040	1	0.040	69.45	<0.0001**
AB	1.970×10^{-6}	1	1.970×10^{-6}	3.390×10^{-3}	0.9544
AC	3.558×10^{-5}	1	3.558×10^{-5}	0.061	0.8082
AD	5.174×10^{-5}	1	5.174×10^{-5}	0.089	0.7698
BC	5.073×10^{-3}	1	5.073×10^{-3}	8.73	0.0104*
BD	0.015	1	0.015	25.06	0.0002**
CD	9.137×10^{-4}	1	9.137×10^{-4}	1.57	0.2304
A ²	0.024	1	0.024	40.77	<0.0001**
B ²	0.064	1	0.064	110.15	<0.0001**
C ²	0.086	1	0.086	147.54	<0.0001**
D ²	0.025	1	0.025	42.58	<0.0001**
残差	8.136×10^{-3}	14	5.811×10^{-4}		
失拟	7.016×10^{-3}	10	7.016×10^{-4}	2.51	0.1949
纯误差	1.120×10^{-3}	4	2.800×10^{-4}		
总变异	0.22	28			

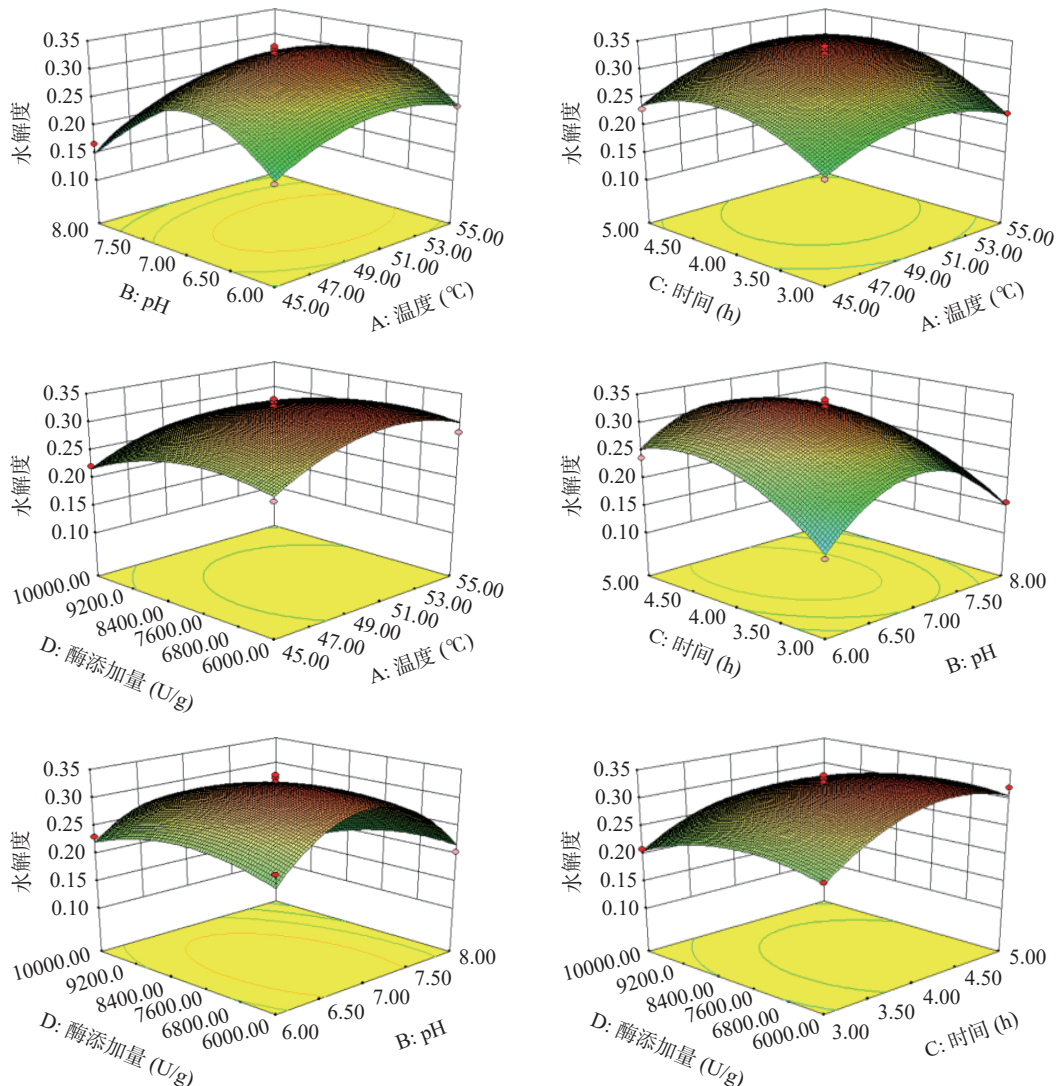


图 6 水解度模型中各因素交互响应面图

Fig.6 Interaction response surface diagram of various factors in hydrolysis degree model

图 7 能比较直观地表示出当固定 1 个因素为中心点水平时, 其他各因素交互作用对氮回收率的影响, 由图中可以看出, 当固定一个因素, 随着另一因素水平的升高, 响应值均是先增大后减小, 在中间出现极大值, 与单因素实验结果一致。

2.4.2 工艺优化与结果验证 结合响应曲面进行优化分析, 以水解度和氮回收率作为响应值, 响应值最大时, 拟合得到鸡骨架酶解的最优酶解工艺为 pH6.93, 温度 50.55 °C, 酶添加量 7179.42 U/g, 时间 4.09 h, 在此条件下, 酶解水解度和氮回收率的预测值为 33.69% 和 96%。为方便操作, 将其修正为 pH7.0, 温度 50 °C, 酶添加量 7000 U/g, 时间 4 h, 得出实验结果为水解度 ($33.54\% \pm 0.02\%$), 氮回收率 ($96.20\% \pm 0.03\%$), 与预测值接近, 表明预测值与实际值拟合较好, 模型可行。

2.5 氨基酸组成分析

酶解液中的游离氨基酸能赋予食物特定的味觉, 为美拉德反应制备热反应型肉类香精提供丰富的底物。根据前面实验优化得出的条件, 将风味蛋白酶

在 50 °C 条件下酶解 4 h, 对酶解液进行氨基酸分析, 结果见表 9。蛋白质和氨基酸的含量是评判食品营养价值的高低重要的指标, 特别是人体必需的氨基酸的含量和组成。酶解前必需氨基酸含量达到 92.20 mg/100 mL, 酶解后必需氨基酸含量达到 694.30 mg/100 mL, 酶解后必需氨基酸含量显著增加 ($P < 0.05$), 是酶解前的 7.04 倍。含硫氨基酸是产生肉香味的主要来源^[24], 酶解液前样品中不存在含硫氨基酸, 酶解后比酶解前显著增加 ($P < 0.05$), 为 67.72 mg/100 mL。氨基酸作为食品中一种重要的呈味物质, 其中鲜味氨基酸对产品的鲜味有主要作用, 由表 9 可以看出, 酶解液中鲜味氨基酸含量达到 229.16 mg/100 mL, 而酶解前鲜味氨基酸含量仅为 19.40 mg/100 mL, 反应后其含量显著增加 ($P < 0.05$), 使鲜味增加。酶解液的氨基酸组成丰富, 为之后的美拉德反应提供了丰富的风味基料。

YANG 等^[25] 根据氨基酸的呈味特性将氨基酸分为 4 种: 鲜味、甜味、苦味和无味。鲜味氨基酸: Asp、Glu; 甜味氨基酸: Ser、Gly、Thr、Ala、Pro; 苦味

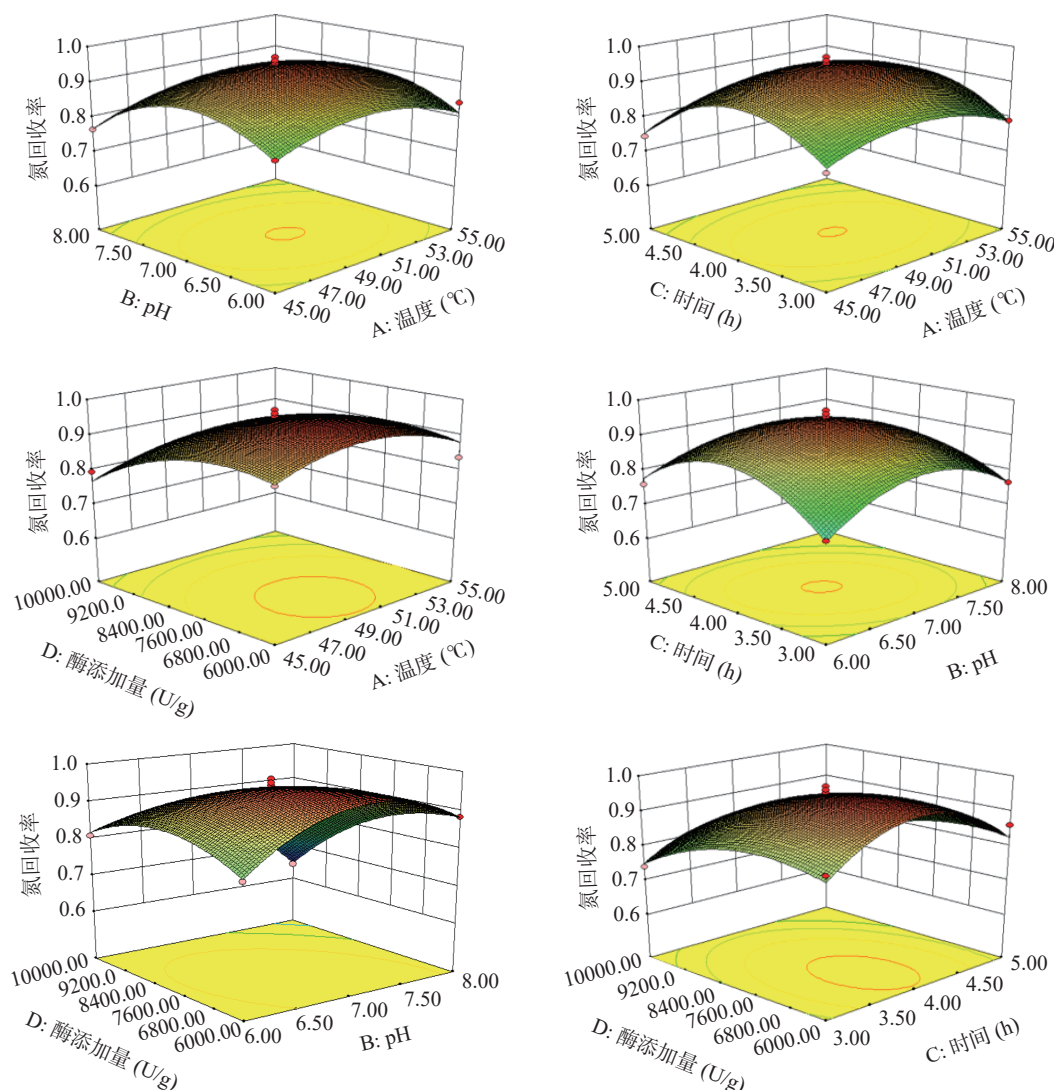


图 7 氮回收率模型中各因素交互响应面图

Fig.7 Interaction response surface diagram of various factors in nitrogen recovery model

表 9 酶解前后样品氨基酸组成

Table 9 Amino acid composition of samples before and after enzymatic hydrolysis

氨基酸名称	酶解前		酶解后	
	游离氨基酸 (mg/100 mL)	占总氨基酸 比例(%)	游离氨基酸 (mg/100 mL)	占总氨基酸 比例(%)
天冬氨酸(Asp)	8.17±0.15	4.80	65.57±5.10*	5.13
谷氨酸(Glu)	11.23±8.26	6.61	163.59±5.56*	12.79
丝氨酸(Ser)	6.60±0.10	3.88	9.14±1.48*	0.71
甘氨酸(Gly)	18.00±1.00	10.59	42.53±6.58*	3.32
组氨酸(His)	Nd	0.00	45.31±5.03*	3.54
精氨酸(Arg)	Nd	0.00	32.19±6.98*	2.52
苏氨酸(Thr)	6.63±0.06	3.90	66.35±5.52*	5.19
丙氨酸(Ala)	19.33±0.58	11.37	124.54±5.06*	9.73
脯氨酸(Pro)	Nd	0.00	55.24±5.02*	4.32
酪氨酸(Tyr)	Nd	0.00	72.23±6.93*	5.65
缬氨酸(Val)	Nd	0.00	87.68±6.82*	6.85
蛋氨酸(Met)	Nd	0.00	47.65±6.78*	3.72
半胱氨酸(Cys)	Nd	0.00	20.07±0.12*	1.57
异亮氨酸(Ile)	9.23±0.06	5.43	95.76±5.17*	7.48
亮氨酸(Leu)	19.33±0.58	9.61	139.99±1.00*	10.94
苯丙氨酸(Phe)	Nd	0.00	75.28±5.02*	5.88
赖氨酸(Lys)	60.00±10.00	35.29	136.28±5.47*	10.65
总量	155.53±5.14		1279.41±92.65*	
必需氨基酸	92.20±10.69		694.30±26.71*	
鲜味氨基酸	19.40±8.41		229.16±10.10*	
含硫氨基酸	Nd		67.72±6.87*	
甜味氨基酸	50.57±1.74		297.81±20.36*	
苦味氨基酸	25.57±0.64		523.86±16.13*	
无味氨基酸	60.00±10.00		228.58±2.46*	

注: Nd表示未检出; *表示差异显著($P<0.05$)。

氨基酸: Val、Met、Ile、Leu、Phe、His、Arg; 无味氨基酸: Cys、Tyr、Lys。采用 TAV^[26] 评价呈味物质呈味贡献,从表 10 可以看出,反应前后鲜味、苦味和甜味氨基酸对味感都有一定的贡献,酶解前的样品味感以甜味为主,甜味 TAV 值为 0.53,其次是鲜味,仅次于甜味,达到 0.45。酶解后苦味氨基酸含量增加,TAV 值最高,对苦味贡献最大的是组氨酸,鲜味氨基酸含量也较高。酶解前后 TAV 值最高的都是谷氨酸,分别为 0.37 和 5.45,是主要的呈味贡献游离氨基酸。

2.6 肽分子量分布

肽分子量分布是 Maillard 反应的重要表征指标之一,酶解液的营养特性,呈味特性与其所含的小分子肽具有密切关系^[27],因此,探究酶解液的肽分子量分布对了解其组成和分布具有重要意义。目前,常用的表征肽分子量分布的方法有十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和凝胶色谱,但是,SDS-PAGE 反映的是蛋白质亚基的分子信息,用凝胶色谱法能较为完整的表征肽分子量分布^[28]。

研究表明,分子质量低于 1000 Da 的二肽、三肽等寡肽有更高的营养价值,可以直接被人体吸收^[29]。TOELSTEDE 等^[30]提出寡肽能更好的与呈味物质发生协同作用,赋予肉品滋味,使口感适宜。刘建彬^[31]

表 10 酶解前后游离氨基酸 TAV 值

Table 10 TAV values of free amino acids before and after enzymatic hydrolysis

呈味特性	游离氨基酸	阈值(mg/g)	TAV	
			酶解前	酶解后
鲜味	天冬氨酸(Asp)	1.0	0.08	0.66
	谷氨酸(Glu)	0.3	0.37	5.45
总和			0.45	6.11
甜味	苏氨酸(Thr)	2.6	0.03	0.26
	丝氨酸(Ser)	1.5	0.04	0.06
	甘氨酸(Gly)	1.3	0.14	0.33
	丙氨酸(Ala)	0.6	0.32	2.08
	脯氨酸(Pro)	3.0	0	0.18
总和			0.53	2.91
苦味	缬氨酸(Val)	0.4	0	2.19
	蛋氨酸(Met)	0.3	0	1.59
	异亮氨酸(Ile)	0.9	0.10	1.06
	亮氨酸(Leu)	1.9	0.10	0.74
	苯丙氨酸(Phe)	0.9	0	0.84
	组氨酸(His)	0.2	0	2.27
	精氨酸(Arg)	0.5	0	0.64
总和			0.20	9.33

利用超滤、凝胶色谱对鸡肉肽中具有美拉德反应活性的肽进行分离纯化,结果表明,<1000 Da 肽段的美拉德反应活性最强。因此,分子量<1000 Da 含量较高的酶解液可能具有更多的呈味物质^[32]。TOEL-STEDE^[30]的研究也发现分子量在 200~1000 Da 的寡肽有独特的增味作用。风味蛋白酶酶解液的凝胶色谱图见图 8,肽分子量分布情况见表 11,<1000 Da 的分子量占比例最大,达到 83.25%,表明水解程度较高,酶解效果好,为之后的美拉德反应提供丰富的物质基础。

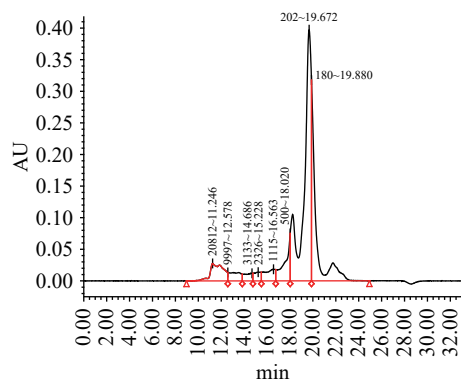


图 8 酶解液的凝胶色谱图

Fig.8 The gel chromatogram of the hydrolysate

3 结论

本试验采用风味蛋白酶对肉杂鸡鸡骨架进行酶解,考察其对酶解液氮回收率和水解度的影响。结果表明在 50 ℃,pH 为 7,酶添加量为 7000 U/g 时酶解 4 h,水解度和氮回收率均最高,分别为(33.54%±0.02%)和(96.20%±0.03%)。在此条件下制备鸡骨架酶解液,对酶解液肽的分子量分布和氨基酸含量进行检

表 11 酶解液肽分子量分布

Table 11 Molecular weight distribution of peptide in enzymatic hydrolysate

分子量(Da)	肽分子量分布(%)
>10000	6.43±0.42
10000~5000	2.96±0.01
5000~3000	1.91±0.01
3000~2000	1.81±0.01
2000~1000	3.64±0.02
1000~500	6.75±0.04
500~180	52.38±0.26
<180	24.12±0.13
合计	
>5000	9.39±0.42
1000~5000	7.36±0.04
<1000	83.25±0.38

注: 分子量10000、5000、3000、2000、1000、500和180 Da相对应的保留时间分别为12.578、14.686、15.228、16.563、18.020、19.672和19.880 min。

测,发现分子量<1000 Da的肽段占比最高,达到83.25%,表明水解程度较高,酶解效果好。酶解液中必需氨基酸含量高,占氨基酸总量的54.27%,营养价值高,且含有丰富的鲜味氨基酸,风味鲜美。该研究可以为鸡骨架的高值化利用提供基础。

参考文献

- [1] United States Department of Agriculture. Livestock and poultry: World markets and trade[R]. Washington: USDA, 2021.
- [2] 曾晓房. 鸡骨架酶解及其产物制备鸡肉香精研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2007. [ZENG X F. Enzymatic hydrolysis characteristics of chicken bone and chicken process flavor preparation of its hydrolysate[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2007.]
- [3] 赵永珍, 张懿, 陈志雄. 酶解鸡骨架制备热反应底物的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(1): 56-61. [ZHAO Y Z, ZHANG M, CHEN Z X. Study on enzymatic hydrolysis of chicken bone as substrate of maillard reaction[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(1): 56-61.]
- [4] 郑红. 组合酶水解鸡骨架蛋白的工艺条件研究[J]. 农产品加工(学刊), 2011(12): 63-65, 88. [ZHENG H. Hydrolysis technology of chicken bone by combination of enzymes hydrolysis[J]. Agricultural Processing (Journal), 2011(12): 63-65, 88.]
- [5] 刘贺, 肖隽霏, 周晨晨, 等. 热反应骨汤风味猪肉香精酶解工艺的优化[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 272-280. [LIU H, XIAO J F, ZHOU C C, et al. Enzymatic hydrolysis process optimization of sparerib soup flavor pork flavoring[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(2): 272-280.]
- [6] 李耀, 刘湾, 徐义斌. 纯鸡肉膏在肉制品、调味品及方便食品中的应用[J]. 中国调味品, 2016, 41(7): 147-149. [LI Y, LIU W, XU Y B. Application of pure chicken paste in meat product, condiment and fast food[J]. China Condiment, 2016, 41(7): 147-149.]
- [7] CHEN Y, QIAO Y, XIAO Y, et al. Differences in physicochemical and nutritional properties of breast and thigh meat from crossbred chickens, commercial broilers, and spent hens[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2016, 29(6): 855-864.
- [8] 张恒, 鄢应龙. 鸡骨的酶解及酶解液的电泳分析[J]. 食品与

发酵工业, 2010, 36(9): 102-105. [ZHANG H, WU Y L. Enzymolysis of chicken bone and electrophoretic analysis of enzymolysis solution[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(9): 102-105.]

[9] 许丹. 鸡骨蛋白酶解液美拉德产物的制备及其抗氧化性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2016. [XU D. Preparation and antioxidant activity of maillard products from proteolytic solution of chicken bone[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2016.]

[10] 万婕, 张懿, 刘亚萍. 超声波对鸡骨蛋白酶解产物的影响及机理研究[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(1): 46-53. [WAN J, ZHANG M, LIU Y P. Effect of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis on hydrolysate from chicken bone and study on its mechanism[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(1): 46-53.]

[11] 徐兆刚. 河蚌抗氧化肽的制备及其特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016. [XU Z G. Research on the preparation and properties of antioxidant peptides from mussel[D]. Changchun: Jilin University, 2016.]

[12] 田刚. 鸡骨蛋白粉的超声波辅助酶法制备及特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018. [TIAN G. Study on preparation and characteristics of chicken bone protein powder by ultrasonic assisted enzymatic method[D]. Changchun: Jilin University, 2018.]

[13] 赵培城, 唐连祥, 袁剑, 等. 超声辅助酶解加工副产物制备蛋白肽[J]. 水产学报, 2017, 41(6): 919-927. [ZHAO P C, TANG L X, YUAN J, et al. Preparation of peptone by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of bonito by-products[J]. Journal of Fisheries, 2017, 41(6): 919-927.]

[14] 姚佳, 陈开琴, 何志云, 等. 野生甜茶中氨基酸成分分析及营养评价[J]. 生物化工, 2021, 7(4): 78-81. [YAO J, CHEN K Q, HE Z Y, et al. Amino acid analysis and nutritional evaluation for wild sweet tea[J]. Biological Chemical Engineering, 2021, 7(4): 78-81.]

[15] CHIANG J H, EYRES G T, SILCOCK P J, et al. Changes in the physicochemical properties and flavour compounds of beef bone hydrolysates after Maillard reaction[J]. Food Research International, 2019, 123: 642-649.

[16] KIJOWSKI J, NIEWIAROWICZ A. A method of protein extraction from chicken bone residue and the chemical and electrophoretic characteristics of the extract[J]. International Journal of Food Science & Technology, 1985, 20(1): 43-49.

[17] 王淑慧. 鸭骨架酶解及其产物制备鸭肉香精的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2013. [WANG S H. Enzymatic hydrolysis characteristics of duck bone and duck flavor preparation of its hydrolysate[D]. Ningbo: Ningbo University, 2013.]

[18] 熊善柏, 王启明, 赵山. 乌鸡肉蛋白质分步酶解工艺与水解液澄清方法研究[J]. 食品工业科技, 2000(4): 17-19. [XIONG S B, WANG Q M, ZHAO S. Study on the enzymatic hydrolysis process and hydrolysate clarification method of black chicken protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2000(4): 17-19.]

[19] 姜森, 李欣怡, 宋志远, 等. 酶法联合 Plastein 反应制备海参肠调味料[J]. 中国调味品, 2020, 45(4): 107-114. [JIANG M, LI

- X Y, SONG Z Y, et al. Preparation of sea cucumber intestinal seasoning by enzymatic hydrolysis coupled with plastein reaction [J]. *China Condiment*, 2020, 45(4): 107-114.]
- [20] CHIANG J H, LOVEDAY S M, HARDACRE A K, et al. Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and exoproteases [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2019, 54(1): 111-120.
- [21] 王尚豪. 酶法制备热反应虾味香精的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012. [WANG S H. Study on the thermal reaction shrimp flavoring with enzymolysis method [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.]
- [22] 侯钰柯, 石金明, 曾宪明, 等. 类蛋白反应及其在肉类中的应用 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(8): 261-267. [HOU Y K, SHI J M, ZENG X M, et al. Plastein reactions and its application in meat [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(8): 261-267.]
- [23] 丁小燕, 张雯, 陈延锋, 等. 复合风味蛋白酶水解鸡骨泥工艺条件的研究 [J]. *中国食品学报*, 2006(1): 88-92. [DING X Y, ZHANG W, CHEN Y F, et al. Study on hydrolysis process of chicken bone mud by compound flavoring protease [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2006(1): 88-92.]
- [24] GOH K M, LAI O M, ABAS F, et al. Effects of sonication on the extraction of free-amino acids from moromi and application to the laboratory scale rapid fermentation of soy sauce [J]. *Food Chemistry*, 2017, 215: 200-208.
- [25] YANG J H, LIN H C, MAU J L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms [J]. *Food Chemistry*, 2001, 72(4): 465-471.
- [26] 田霄艳, 郑斐庭, 冯涛, 等. 大豆蛋白水解物苦味评价方法研究 [J]. *食品科学*, 2021: 1-18. [TIAN A Y, FENG F T, FENG T, et al. Study on bitter evaluation method of soybean protein hydrolysate [J]. *Food Science*, 2021: 1-18.]
- [27] OGASAWARA M, KATSUMATA T, EGI M. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide [J]. *Food Chemistry*, 2006, 99: 600-604.
- [28] BLACKSHEAR P J. Systems for polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Methods in Enzymology*, 1984, 104: 237-255.
- [29] MAEBUCHI M, SAMOTO M, KOHNO M, et al. Improvement in the intestinal absorption of soy protein by enzymatic digestion to oligopeptide in healthy adult men [J]. *Food Science and Technology Research*, 2007, 13(1): 45-53.
- [30] TOELSTEDE S, DUNKEL A, HOFMANN T. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(4): 1440-1448.
- [31] 刘建彬. 鸡肉肽参与美拉德反应的机理及其反应产物风味特性研究 [D]. 北京: 北京工商大学, 2015. [LIU J B. The mechanism of chicken peptide in flavor generation via maillard reaction [D]. Beijing: Beijing Technology and Business University, 2015.]
- [32] 唐霄, 孙杨赢, 江雪婷, 等. 不同蛋白酶制备鹅肉呈味肽的对比分析 [J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 141-146. [TANG X, SUN Y Y, JIANG X T, et al. Comparative analysis of flavor peptides prepared by enzymatic hydrolysis of goose meat with different proteases [J]. *Food Science*, 2019, 40(22): 141-146.]