

陈铭泽,王艳珍,冯晨,等.微波辅助硫酸水解肉骨粉的工艺条件优化[J].华中农业大学学报,2022,41(4):28-35.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.04.004

微波辅助硫酸水解肉骨粉的工艺条件优化

陈铭泽^{1,2},王艳珍^{1,2},冯晨¹,蔡奥¹,曹芸芸¹,周文兵^{1,2},肖乃东^{1,2}

1. 华中农业大学资源与环境学院,武汉 430070; 2. 生猪健康养殖省部共建协同创新中心,武汉 430070

摘要 为充分利用病死动物尸体资源,以病死畜禽经高温发酵法无害化所得肉骨粉为原料,经萃取剂去除油脂后,分别在无微波和有微波辅助下经硫酸水解获得含氨基酸水解液,筛选水解最优条件,并进行最优条件下水解前后物料中大中微量植物营养元素及重金属元素的物料平衡及其在水解产物中的分布分析。结果显示:最佳萃取剂为正己烷,在固液比1:10,油脂萃取率达100%,萃取剂回收率达97.06%;常规硫酸水解肉骨粉最佳条件为:硫酸浓度5 mol/L、固液比1:4、温度90℃、水解时间7 h,此时水解液中总氮的转化率为93.42%,氨基酸态氮转化率为42.63%;微波辅助硫酸水解肉骨粉的最佳条件为:微波功率550 W、硫酸浓度5.0 mol/L、水解时间60 min,此时水解液中总氮的转化率为90.12%,氨基酸态氮转化率为82.13%;2种工艺在最佳条件下,各元素在水解液相和固相残渣的分布差异不大,其中N、P、K、Fe、Cu、Zn元素有66%~93%分布在水解液中,Ca、Mg、Mn元素32%以上分布在残渣中,而重金属元素Pb、Cr、Cd超过58%进入水解液,但未超出相关肥料产品农业行业标准限值。结果表明,微波辅助显著提高水解液中氨基酸态氮转化率并缩短水解时间,大、中、微量植物营养元素大部分进入液相,在制作氨基酸水解液方面具有明显的优越性。

关键词 病死动物;肉骨粉;水解;微波辅助;物料平衡;氨基酸液体肥料

中图分类号 S851.2⁺3; X713 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)04-0028-08

病死动物是一种含有大量蛋白质的生物质资源^[1],以猪为例,猪的病死亡率约8%~12%^[2],据国家统计局发布的2020年生猪出栏量52 704.1万头^[3],这意味着每年产生数千万头病死猪,而烈性传染病非洲猪瘟的肆虐,带来的经济损失更为严重^[4],对病死动物进行无害化处理和资源化利用,对保证人类健康、促进养殖业健康可持续发展具有重要意义。

针对病死动物尸体的处置方法众多,2017年农业农村部(原农业部)发布了《病死及病害动物无害化处理技术规范》(http://www.moa.gov.cn/nybgb/2017/dqq/201801/t20180103_6133924.htm),介绍了焚烧法、化制法、高温法、深埋法、化学处理法的无害化处理方式,其中化学法中的酸水解是制备氨基酸肥料、实现高值化利用的可靠手段。微波辅助水解法具有快速、高效和无污染的特点,近年来利用此法处理动物材料制备氨基酸产品越来越普遍,已受到相关领域研究人员的青睐。王玉珍^[5]使用微波辅助

HCl水解羽毛,反应时间需30 min,复合氨基酸态氮转化率可达82.10%。Lopez等^[6]优化微波辅助酸水解的方法,克服硒氨基酸氧化和蛋白质不完全水解的问题,用于测定奶粉中与蛋白质结合的硒氨基酸,该法经济且有效。Hall等^[7]利用微波与酶水解相结合方法从蟋蟀蛋白中生产生物活性肽,微波在加速水解反应、生产高二肽基肽酶-IV(DPP-IV)和高血管紧张素转换酶(ACE)抑制能力的肽方面显示出优越性。Li等^[8]在酸性离子液体[PSmim]HSO₄环境中辅以微波水解羊毛,高效膨胀和水解羊毛角蛋白,可将其降解为短肽和游离氨基酸,水解率达98%以上,与传统的HCl水解法相比,该法在较温和条件下带来更高的水解率,在工业上制备角蛋白衍生产品具有更好的应用潜力。总之,微波辅助水解法环保、高效,是提高水解效率的有效途径。

目前,微波辅助水解蛋白质制备氨基酸多用语畜禽毛发或蛋白质产品的测定,对病死畜禽及其相关产品方面研究较少,而动物尸体无害化产物肉骨

收稿日期:2022-04-05

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0800804-01);中央高校基本科研业务费专项(2662017JC018)

陈铭泽,E-mail: wy1668393284@163.com

通信作者:周文兵,E-mail: zhouwb@mail.hzau.edu.cn

粉含有大量蛋白质,用其制备氨基酸液体肥料是其高值化利用的重要途径。本研究针对动物尸体和小麦麸皮发酵所得肉骨粉进行硫酸水解,制作高品质的氨基酸水解液,分别筛选无微波(常规)和有微波辅助下水解的最优条件,并比较2种最优工艺下大、中、微量植物营养元素及重金属元素在水解液和固相残渣中的分布,评价微波辅助硫酸水解工艺的优势及水解产物的安全性,为氨基酸液体肥料的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用材料取自生猪健康养殖省部共建协同创新中心。该中心将实验用染疫或未染疫动物尸体或动物组织与小麦麸皮按质量比10:3,在专用微生物发酵菌剂作用下,经90℃下发酵48~72 h,得到发酵产物,该发酵产物经烘干并去除动物骨头等粗大杂质后即为本试验所用肉骨粉。

经检测,该肉骨粉营养成分如下:粗蛋白48.70%、粗脂肪14.10%、氮10.44%、磷2.20%、钾0.42%、钙1.44%、铁197.57 mg/kg、锌120.26 mg/kg、铜12.89 mg/kg。

1.2 检测方法

肉骨粉经萃取剂萃取(筛选萃取剂种类、固液比)后得到去油肉骨粉,经烘干后,采用常规和微波辅助硫酸水解(筛选硫酸浓度、固液比、水解时间、水解温度、微波功率),离心,进行固液分离,取液相水解液和固相残渣分别进行相关指标测定。

氨基酸态氮测定采用甲醛滴定法^[9];总氮测定采用浓硫酸消煮法和凯氏定氮法^[10];总磷测定采用钼钒黄比色法^[10];总钾测定采用火焰光度法^[10];钙、镁、铁、锰、铜、锌、铅、铬、镉测定采用原子吸收光谱法^[10]。

1.3 去除肉骨粉油脂的萃取剂种类及固液比筛选

通过课题组前期试验发现,影响肉骨粉中油脂萃取效率的主要因素是萃取剂种类、固液比(肉骨粉质量与萃取剂体积的比例),因此对2种条件进行筛选。萃取动物油脂的萃取剂一般有乙醚、石油醚、正己烷、柴油等,本试验选取乙醚、石油醚、正己烷为备选萃取剂,肉骨粉和萃取剂的固液比选取1:5和1:10。肉骨粉和3种萃取剂分别按2种固液比在室温条件下萃取,称量并测定动物油脂的萃取率和萃

取剂回收率。

油脂萃取率=萃取后萃取剂中油脂质量/肉骨粉原料中油脂质量×100%;

萃取剂回收率=萃取后萃取剂质量/萃取前萃取剂质量×100%。

1.4 常规硫酸水解条件的单因素试验

在常规硫酸水解肉骨粉的工艺条件优化中,分别选择硫酸浓度、固液比(去油肉骨粉质量与硫酸体积的比例)、水解时间和水解温度进行单因素试验,具体操作如下:

1)硫酸浓度的确定。称取(5.000±0.001) g的去油肉骨粉,分别加入4、5、6、7 mol/L的硫酸25 mL,在水浴温度90℃下水解7 h。

2)固液比的确定。称取(5.000±0.001) g的去油肉骨粉,分别加入20、25、30、35 mL 5 mol/L的硫酸,在水浴温度90℃下水解7 h。

3)水解时间的确定。称取(5.000±0.001) g的去油肉骨粉,加入20 mL 5 mol/L的硫酸,在水浴温度90℃下,分别水解3、5、7、9 h。

4)水解温度的确定。称取(5.000±0.001) g的去油肉骨粉,加入20 mL 5 mol/L的硫酸,分别在水浴温度70、80、90、100℃下水解7 h。

分别以水解液中总氮转化率和氨基酸态氮转化率为考察指标。计算公式如下:

水解液中总氮转化率=水解液中总氮质量/去油肉骨粉中总氮质量×100%;

水解液中氨基酸态氮转化率=水解液中氨基酸态氮质量/去油肉骨粉中总氮质量×100%。

1.5 微波辅助硫酸水解条件的正交试验

在单因素试验结果基础上,以微波功率、硫酸浓度、水解时间为影响因素,设计三因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验(表1),试验中固液比固定为1:4,以水解液中总氮的转化率和氨基酸态氮转化率为考察指标,优化微波辅助硫酸水解肉骨粉最佳条件。

1.6 水解产物中营养元素及重金属元素的测定

经过2种水解工艺条件筛选,在最优条件下对去油肉骨粉进行水解,收集液相水解液和固相残渣,分别进行大、中、微量植物营养元素和重金属元素的含量测定,检验水解前后各元素的物料平衡,并计算不同工艺下这些元素在液相中的占比,即液相水解液中某元素的质量在水解原料去油肉骨粉质量的占比,从而分析其资源化率。

表1 微波辅助下硫酸水解去油肉骨粉正交试验设计

Table 1 Factor and level design for hydrolysis of degreased meat and bone meal by sulfuric acid with microwave aid

水平 Level	A	B	C
	微波功率/W Microwave power	硫酸浓度/(mol/L) Sulfuric acid concentration	水解时间/min Hydrolysis time
1	220	4	30
2	440	5	45
3	550	6	60

1.7 数据处理

本试验中萃取率、总氮和氨基酸态氮测定均重复3次,取平均值,试验所测定的数据用Excel 2016软件进行处理,用SPSS 20.0软件进行统计分析,采

表2 不同萃取剂及固液比下肉骨粉油脂的萃取效果

Table 2 Extraction effect of grease from meat and bone meal under the conditions of different extractants and ratios of solid to liquid

萃取剂 Extracting agent	油脂萃取率 Extraction rate of grease		萃取剂回收率 Recovery of extractants	
	1:5	1:10	1:5	1:10
乙醚 Ether	66.86	98.75	62.32	60.38
石油醚 Petroleum ether	99.42	100.00	78.14	79.23
正己烷 <i>n</i> -Hexane	85.22	100.00	98.55	97.06

2.2 常规条件下硫酸水解去油肉骨粉的单因素试验

常规(无微波)条件下,不同硫酸浓度、固液比、水解时间和水解温度下水解液中不同形态氮的质量浓度见图1。由图1A可知,随着硫酸浓度的增加,总氮(total nitrogen, TN)质量浓度呈现先增加,然后逐渐下降趋势,而氨基酸态氮(amino acid-nitrogen, AAN)质量浓度则呈现缓慢增加趋势。在硫酸浓度为5 mol/L时,水解液中总氮质量浓度最高,为21.28 g/L,更高浓度的6和7 mol/L的硫酸并不能使水解液中总氮质量浓度进一步提高。虽然随着硫酸浓度的增加,水解液中氨基酸态氮质量浓度有所增加,但综合考虑水解过程的成本投入,以及总氮中非氨基酸如小肽和多肽,也可作为氮素的特殊形态被作物吸收利用,发挥其调节植物生长、改善作物品质、增强作物免疫力、提高肥料利用率的作用^[11],选取5 mol/L作为最佳的硫酸浓度。

如图1B所示,当固液比从1:4至1:7的变化过程中,总氮和氨基酸态氮含量均呈下降趋势。在固液比为1:4时,水解液中总氮和氨基酸态氮质量浓度

用Origin 2018软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 去除肉骨粉油脂的萃取剂种类及固液比的筛选

不同萃取剂及固液比下肉骨粉油脂的萃取率及萃取剂回收率见表2。可见不同萃取剂对肉骨粉的萃取效果不同,在固液比为1:5时,石油醚对油脂的萃取效果最佳,达到了99.42%,但石油醚易挥发,造成石油醚的回收率较低;正己烷虽然萃取效果不及石油醚,在固液比为1:10时才能完全萃取肉骨粉中的油脂,但其回收率比石油醚高,不易造成物料损失。实际应用中可考虑用正己烷萃取,既有不错的萃取效果,也能减少有机萃取剂的损耗。因此,本试验选取正己烷为萃取剂,固液比为1:10。

均为最高,分别为28.70和12.33 g/L。因此,固液比选用1:4。

如图1C所示,当水解时间从3 h分别增加为5、7、9 h时,水解液中总氮质量浓度呈先增加后下降趋势,7 h时达到最高的28.70 g/L;氨基酸态氮质量浓度先增加,在7 h后保持不变,表明在水解7 h时,水溶性蛋白质水解成氨基酸和小分子多肽的含量达到最大值,而水解7 h后,时间已不是制约蛋白质水解的主要因素。因此,最佳水解时间选择7 h。

如图1D所示,当温度升高,水解液中蛋白质含量随之增加,氨基酸态氮质量浓度也随之增加。这说明随着温度升高,肉骨粉中越来越多的固体蛋白质转变为可溶性蛋白质,进一步水解为氨基酸的程度也同时增大。当温度升高至90℃,总氮、氨基酸态氮的质量浓度分别为28.70、12.95 g/L,均达到最高,继续升温两者均略微降低。因此,最佳水解温度为90℃。

综上,常规条件下硫酸水解的单因素最佳条件为:固液比1:4、硫酸浓度5 mol/L、水解温度90℃、水解时间7 h,在此条件下进行验证试验,总

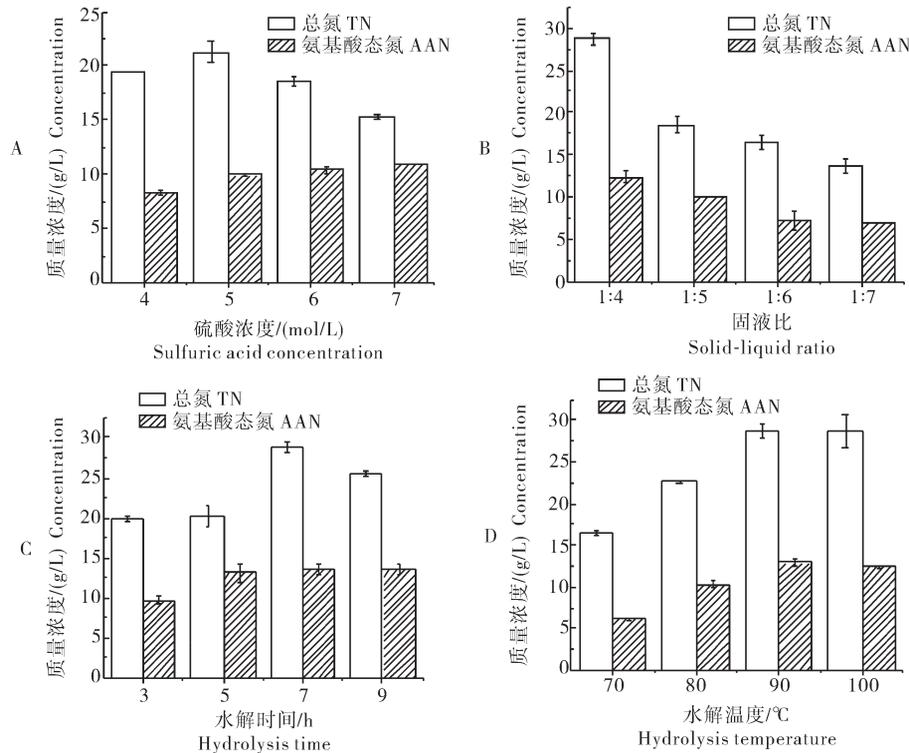


图1 不同硫酸浓度(A)、固液比(B)、水解时间(C)和水解温度(D)下水解液中不同形态氮的含量

Fig. 1 The content of nitrogen in different forms in sulfuric acid hydrolysate under different sulfuric acid concentrations (A), ratios of solid to liquid (B), hydrolysis time (C) and hydrolysis temperature (D)

氮质量浓度为28.70 g/L,氨基酸态氮质量浓度为12.95 g/L,其转化率分别为93.42%和42.63%,达到最高。

2.3 微波辅助硫酸水解去油肉骨粉的正交试验

表3中各因素的极值R的大小顺序为 $R_1 > R_2 > R_3$,说明各因素对氨基酸态氮转化率影响的主次顺序为微波功率>硫酸浓度>水解时间,在可选因素水平范围内,其最优组合为 $A_3B_2C_3$,即在微波功率550 W、硫酸浓度5 mol/L、水解时间60 min条件下氨基酸态氮的转化率最高,经过验证试验,在此最佳组合条件下,水解液总氮27.38 g/L,氨基酸态氮24.95 g/L;水解液总氮转化率为90.12%,氨基酸态氮转化率达到82.13%。

微波辅助下硫酸水解去油肉骨粉水解液中氨基酸态氮转化率的方差分析见表4。对微波功率、水解时间、硫酸浓度建立单因素主效应模型,得到模型 $R^2=0.995$ (调整 $R^2=0.982$),微波功率对氨基酸态氮转化率的影响极显著;硫酸浓度和水解时间对氨基酸态氮转化率的影响显著,且不同因素对氨基酸态氮转化率影响的主次顺序为:微波功率>硫酸浓度>水解时间,与表3极差分析结果一致。

表3 微波辅助硫酸水解去油肉骨粉的正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results of degreased meat and bone meal hydrolyzed by sulfuric acid with microwave aid

试验号 No.	A	B	C	氨基酸态氮转化率/% Amino acid-nitrogen conversion rate
1	1	1	1	43.44
2	1	2	2	58.27
3	1	3	3	61.26
4	2	1	2	51.15
5	2	2	3	72.66
6	2	3	1	63.56
7	3	1	3	68.24
8	3	2	1	73.60
9	3	3	2	70.35
k_1	54.32	54.28	60.20	
k_2	62.64	68.36	59.92	
k_3	70.73	65.06	67.57	
极差R	16.41	14.08	7.65	
主序 Range	A>B>C			
优组合 Optimal combination	$A_3B_2C_3$			

表4 氨基酸态氮转化率的方差分析

Table 4 Variance analysis of conversion rate of amino acid

变异来源 Sources	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean of square	F	P
A	397.232	2	198.616	106.081	**
B	314.650	2	157.325	84.027	*
C	109.304	2	54.652	29.190	*
误差 Error	3.745	2	1.872		
校正的总计 A total of correction	824.931	8			

$R^2 = 0.995$ (调整 $R^2 = 0.982$)

注 Note: ** $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.4 2种水解条件下水解产物中养分及重金属元素的物料衡算与液相占比分析

实际操作中,每40.0 g去油肉骨粉在最佳常规硫酸水解条件下得到水解液160 mL和14.0 g残渣;在最佳微波辅助硫酸水解条件下得到水解液160 mL和13.2 g残渣。

将液固两相各元素质量之和与去油肉骨粉中各元素质量进行比较,以评判其是否符合物料平衡。表5、6结果表明,所测原料中各元素的质量与水解后固液两相质量之和基本相等,符合物料平衡;比较几种元素在液相中的占比,在2种工艺下各元素占比均无明显差异。

表5显示,在2种工艺的最佳条件下,TN在水解液中比例均达到90%以上,但前文中常规条件下水解液中氨基酸态氮质量浓度远低于微波辅助水解条件下的,说明常规条件下大量蛋白质溶解而未被水解,而微波辅助条件下大量蛋白质可水解为氨基酸,表明微波辅助条件显著提高了蛋白质的水解效率。由此可知,微波辅助硫酸水解蛋白质可节约大量水解时间,并且提高了蛋白质的水解程度。表5还显示,原料中85%的钾分布在水解液中,65%以上的磷留在液相中。结果表明,2种工艺条件下大量营养元素(N、P、K)多数被水解进入水解液中,而微波辅助水解作为氨基酸液体肥料的生产工艺优势明显。

在表5中,一个特殊的情况是钙的分布问题,即不论是常规水解还是微波辅助水解,都有95%以上的钙分布于残渣中,这可能是由于使用硫酸水解肉骨粉,钙离子易与硫酸根离子形成硫酸钙沉淀,致使钙离子大量保留于残渣中;此外,镁在2种工艺条件下有超过50%分布在水解液中,未水解部分可能以磷酸镁形式留在残渣中。2种中量植物营养元

素(Ca、Mg)在2种硫酸水解工艺下均大量损失在固相残渣中,在水解液中占比较低,这是2种工艺的共同不足之处。

由表6中微量元素在液相中占比可知,去油肉骨粉中Fe、Cu、Zn的71%~87%分布在水解液中,可作为有效养分为植物生长提供营养;Mn只有25.84%(常规水解)、32.58%(微波辅助水解)分布于水解液中,这可能是由于锰(Mn)以磷酸锰沉淀的形式存在,而这也可能是磷的水解率明显低于氮和钾的水解率的重要原因。总体来看,肉骨粉中的大部分微量元素可进入液相水解液中,具有利用价值。

表6中的重金属元素Pb、Cr、Cd在水解液中占比较高,均超过了58%。按农业行业标准NY 1110—2010《水溶肥料汞、砷、镉、铅、铬的限量要求》中,铅、铬、镉的限量标准分别为50、50、10 mg/kg,2种水解液中重金属元素也可认为符合该水溶肥料的要求。相比常规硫酸水解条件,在微波辅助硫酸水解条件下,Pb、Cd在水解液中占比小幅降低,Cr在水解液中占比略有升高,总体差异不大。

3 讨论

常规条件下硫酸水解去油肉骨粉,肉骨粉蛋白质的肽键会被 H^+ 打破,可完全水解为氨基酸,因此硫酸浓度是决定水解效果的关键影响因素,但随着硫酸浓度的升高,溶液黏稠度增加,固态蛋白质更难溶解,导致液相中氮含量逐步下降。沈其荣等^[12]对病死猪瘦肉硫酸水解获得的最优条件为:固液比1:1.5、硫酸浓度5 mol/L、温度80℃、水解时间6 h,总氮质量浓度为10.33 g/L,游离氨基酸、可溶性多肽及可溶性蛋白氮为9.53 g/L。本研究与其所用硫

表5 最佳条件下硫酸水解去油肉骨粉中大、中量元素的物料衡算
Table 5 Material balance of macro and medium elements in degreased meat and bone meal hydrolyzed by sulfuric acid under the optimum conditions

物料 Material	原料 Raw material		常规水解(工艺1) Conventional hydrolysis				微波辅助水解(工艺2) Microwave assisted hydrolysis					
	含量/% Content	质量/g Amount	溶液Solution		残渣Residue		溶液Solution		残渣Residue		合计Sum 质量/g Amount	元素在液相占 比/% Proportion
			含量/(mg/L) Content	质量/g Amount	含量/% Content	质量/g Amount	含量/(mg/L) Content	质量/g Amount	含量/% Content	质量/g Amount		
TN	12.15	4.86	2.84×10 ⁴	4.54	1.97	0.27	4.81	2.74×10 ⁴	4.38	3.46	0.46	90.12
TP	2.56	1.02	4.18×10 ³	0.67	2.38	0.33	1.00	4.81×10 ³	0.77	2.69	0.36	75.49
TK	0.49	0.2	1.09×10 ³	0.17	0.12	0.02	0.19	1.10×10 ³	0.18	0.15	0.02	90.00
Ca	1.68	0.67	1.85×10 ²	0.03	4.47	0.62	0.65	0.89×10 ²	0.01	4.82	0.64	1.49
Mg	0.16	0.06	2.43×10 ²	0.04	0.24	0.04	0.07	2.10×10 ²	0.03	0.28	0.04	50.00

注：以40 g去油肉骨粉为基准，表中每个值均为重复2次试验的平均值，标准偏差均在平均值的5%以内。下表同。Note: Based on 40 g of oiled meat and bone meal, each value in the table is the mean of two repeated tests, and the standard deviation is within 5% of the mean. The same as below.

表6 最佳条件下硫酸水解去油肉骨粉中微量元素和重金属元素的物料衡算
Table 6 Material balance of micro and heavy metal elements in degreased meat and bone meal hydrolyzed by sulfuric acid under the optimum conditions

物料 Material	原料 Raw material		常规水解(工艺1) Conventional hydrolysis				微波辅助水解(工艺2) Microwave assisted hydrolysis					
	含量/(mg/kg) Content	质量/mg Amount	溶液Solution		残渣Residue		溶液Solution		残渣Residue		合计Sum 质量/mg Amount	元素在液相占 比/% Proportion
			含量/(mg/L) Content	质量/mg Amount	含量/(mg/kg) Content	质量/mg Amount	含量/(mg/L) Content	质量/mg Amount	含量/(mg/kg) Content	质量/mg Amount		
Fe	997.00	39.90	1.91×10 ²	30.60	6.10×10 ²	8.52	39.12	1.78×10 ²	28.50	8.30×10 ²	10.90	71.43
Mn	44.50	1.78	2.90	0.46	96.00	1.34	1.80	3.60	0.58	98.20	1.31	32.58
Cu	17.00	0.68	3.66	0.59	7.45	0.10	0.69	3.47	0.59	5.97	0.09	86.76
Zn	122.00	4.89	26.80	4.29	40.20	0.56	4.85	26.47	4.24	48.11	0.64	86.71
Pb	37.10	1.48	7.65	1.22	17.70	0.25	1.47	6.85	1.09	28.62	0.38	73.65
Cr	32.95	1.32	4.80	0.77	36.40	0.51	1.28	5.65	0.91	30.71	0.41	68.94
Cd	0.28	0.11	0.63	0.10	0.50	0.01	0.11	0.52	0.08	1.99	0.03	72.73

酸浓度一致,但肉骨粉硫酸水解液在氮含量上有明显优势,主要原因是肉骨粉水解使用的硫酸体积更大(固液比1:4 vs 1:1.5),较小的固液比有利于溶解更多氨基酸,水解反应更充分,水解效果更好;此外,水解时间是影响蛋白质水解为氨基酸的重要因素,需严格控制水解时间,避免氨基酸被分解破坏;水解温度影响蛋白质中肽键的稳定性,根据肽键的断裂热力学分析,温度越高越有利于肽键的断裂,但温度过高同样会加快氨基酸的分解^[13]。因此,需要考虑增强水解反应强度带来的成本与效益问题,依此原则本研究得到常规水解的最佳水解条件。

在单因素试验基础上,设计正交试验筛选微波辅助硫酸水解的最佳条件,水解时间缩短为常规水解的1/7(1 h vs 7 h),氨基酸态氮转化率明显提高(82.13% vs 42.63%)。这是由于微波辅助蛋白质水解存在水分子和蛋白质分子吸收微波,迅速升温的热效应和影响蛋白质的折叠、展开的非热效应^[14],因此微波辅助促进蛋白质结构破坏,使复杂的蛋白质大分子更易水解为氨基酸小分子,既缩短了水解时间,又提高了氨基酸态氮转化率。同时,在微波辅助硫酸水解实验中,微波功率极显著影响氨基酸态氮转化率,是提高微波酸水解效率的关键。

在2种工艺条件下,去油肉骨粉含有的大、中、微量植物营养元素和重金属元素均大量水解进入液相,两者差异不大,说明微波辅助对水解液中各元素总含量差异影响较小,但微波辅助下硫酸水解由于产生了更多的氨基酸,会使微量元素及重金属元素更多以氨基酸-金属离子络合态存在,从而使2种工艺下这些元素在水解液中化学状态存在一定差异,其作物营养效应的差异值得更进一步探究。

本研究结果表明,微波辅助硫酸水解是一种高效的水解蛋白质为氨基酸的手段,实现了高蛋白废弃物肉骨粉的高值化利用,但同时也存在能耗较大的问题,在实际生产应用中需协调好成本和效益关系。另一方面,本研究仅获得了水解液,可用作制备氨基酸液体肥料的原料,后续肥料配制及其肥效尚需进一步研究。此外,无论有无微波下的硫酸水解,肉骨粉水解后都会剩余约占原固相质量三分之一的残渣,这些残渣损失了原料中部分营养元素且需后续进行专门的处理。总体来看,微波辅助硫酸水解肉骨粉制备氨基酸水解液工艺优势突出,在蛋白质废弃物资源化应用方面有巨大潜力。

参考文献 References

- [1] 王金泽,邵敬爱,张雄,等.典型病死畜禽水热转化特性研究[J].可再生能源,2019,37(1):7-12. WANG J Z, SHAO J A, ZHANG X, et al. Study on the characteristics of hydrothermal transformation of dead livestock carcasses [J]. Renewable energy resources, 2019, 37(1):7-12(in Chinese with English abstract).
- [2] 王兴平.病死动物尸体处理的技术与政策探讨[J].甘肃畜牧兽医,2011,41(6):26-29. WANG X P. Discussion on technology and policy of treating dead animal bodies [J]. Gansu animal and veterinary sciences, 2011, 41(6):26-29(in Chinese).
- [3] 中华人民共和国统计局.中国统计年鉴[M].北京:中国统计出版社,2021. National Bureau of Statistics of the People Republic of China. China Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Statistics Press, 2021(in Chinese).
- [4] CHEN W Y, ZHAO D M, HE X J, et al. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs [J]. Science China life sciences, 2020, 63(5):623-634.
- [5] 王玉珍.羽毛绿色水解制备复合氨基酸的研究[D].重庆:重庆大学,2010. WANG Y Z. Study on preparation of compound amino acids by green hydrolysis of feather [D]. Chongqing: Chongqing University, 2010(in Chinese with English abstract).
- [6] LOPEZ R, ESCUDERO L, D'AMATO R, et al. Optimisation of microwave-assisted acid hydrolysis for the determination of seleno-amino acids bound to proteins in powdered milk, lyophilized milk and infant formula [J]. Journal of food composition and analysis, 2019, 79:128-133.
- [7] HALL F, LICEAGA A. Effect of microwave-assisted enzymatic hydrolysis of cricket (*Gryllosid sigillatus*) protein on ACE and DPP-IV inhibition and tropomyosin-IgG binding [J/OL]. Journal of functional foods, 2020, 64: 103634 [2022-04-05]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103634>.
- [8] LI X L, GUO Z X, LI J, et al. Swelling and microwave-assisted hydrolysis of animal keratin in ionic liquids [J/OL]. Journal of molecular liquids, 2021, 341: 117306 [2022-04-05]. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117306>.
- [9] AL-MASRI M R, AL-BACHIR M. Microbial load, acidity, lipid oxidation and volatile basic nitrogen of irradiated fish and meat-bone meals [J]. Bioresource technology, 2007, 98(6):1163-1166.
- [10] 鲍士旦.土壤农化分析[M].3版.北京:中国农业出版社,2000. BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000(in Chinese).
- [11] 张书强,许孝瑞,王萌.多肽在作物生长发育中的作用与展望[J].中国农业信息,2014(1):288. ZHANG S Q, XU X R, WANG M. Role and prospect of polypeptide in crop growth and development [J]. China agricultural information, 2014(1):288(in Chinese).
- [12] 沈其荣,李荣,刘红军,等.一种利用病死猪蛋白生产的液体氨基酸复合物及其应用:CN103804032 A [P]. 2014-05-21. A use of a liquid protein production of amino acid complex and its appli-

- cation:CN103804032 A[P].2014-05-21(in Chinese).
- [13] 庞兴军,苏兴建,曹丽伟,等.动物毛发酸水解工艺和生态环境保护剂的研究[J].广州化工,2016,44(22):50-52,83.PANG X J,SU X J,CAO L W,et al.Hydrolysis of animal hair using HCl and study on ecological environmental protection agent [J].Guangzhou chemical industry, 2016, 44(22): 50-52, 83(in Chinese with English abstract).
- [14] 马申嫣,范大明,赵建新,等.微波辅助技术在大分子蛋白质研究中的应用[J].食品工业科技,2012,33(5):384-388.MA S Y,FAN D M,ZHAO J X,et al.Applications of microwave assisted technique in protein research[J].Science and technology of food industry, 2012,33(5):384-388(in Chinese with English abstract).

Optimizing process conditions for sulfuric acid hydrolysis of meat and bone meal with microwave assistance

CHEN Mingze^{1,2}, WANG Yanzhen^{1,2}, FENG Chen¹, CAI Ao¹,
CAO Yunyun¹, ZHOU Wenbing^{1,2}, XIAO Naidong^{1,2}

1. College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production Co-Sponsored by Province and Ministry, Wuhan 430070, China

Abstract The meat and bone meal obtained from the harmless high-temperature fermentation of sick and dead livestock and poultry was used to develop and utilize the resources of sick and dead animal carcasses. After the oil was removed by the extractant, the amino acid-containing hydrolyzed liquid was obtained by sulfuric acid hydrolysis without or with the assistance of microwave, and the conditions for hydrolysis were optimized. The material balance of macro, medium and micro plant nutrients and heavy metal elements in the materials before and after hydrolysis and their distribution in the hydrolysis products under optimal conditions were analyzed. The results showed that the optimal extractant was *n*-hexane, with the oil extraction rate of 100% and the recovery of extraction agent of 97.06% at the ratio of solid to liquid 1:10. The optimal sulfuric acid hydrolysis conditions for degreased meat and bone meal without microwave assistance (conventional) were as follows: sulfuric acid concentration of 5 mol/L, solid-liquid ratio of 1:4, temperature of 90 °C, hydrolysis time of 7 h under which the conversion rates of total nitrogen and amino acid-nitrogen in hydrolysate were 93.42% and 42.63%, respectively. The optimal sulfuric acid hydrolysis conditions for degreased meat and bone meal with microwave assistance were as follows: microwave power 550 W, sulfuric acid concentration of 5.0 mol/L, hydrolysis time of 60 min. Under these conditions, the conversion rates of total nitrogen and amino acid-nitrogen in hydrolysate were 90.12% and 82.13%, respectively. Under the optimal conditions of the two processes, there was little difference in the distribution of each element in the liquid phase of hydrolysate and the solid phase of residue. Among them, 66%-93% of elements of N, P, K, Fe, Cu and Zn in the feedstock were distributed in the hydrolysate, more than 32% of the elements of Ca, Mg and Mn were distributed in the residue, and more than 58% of the heavy metal elements, Pb, Cr and Cd, entered into the hydrolysate, but did not exceed the limit of agricultural industry standard of related products. It is indicated that microwave assisted hydrolysis significantly increased the conversion rate of amino acids and decreased the hydrolysis time. Most of the medium and micro nutrient elements entered the liquid phase, which had obvious advantages in the preparation of amino acid hydrolysate. It will provide basis for the subsequent preparation of amino acid liquid fertilizer.

Keywords sick and dead animal; meat and bone meal; hydrolysis; microwave assistance; material balance; amino acid liquid fertilizer

(责任编辑:赵琳琳)