

酶法提取鱿鱼皮胶原蛋白工艺条件的研究

郭恒斌¹, 曾庆祝²

(1. 广州陆仕水产企业有限公司, 广东 广州 510820; 2. 广州大学食品工程系, 广东 广州 510006)

摘要: 研究了酶法提取鱿鱼皮胶原蛋白的工艺条件。根据5种蛋白酶水解液中羟脯氨酸(HYP)的含量, 确定了胰蛋白酶和木瓜蛋白酶这2种提取率高的酶为水解用酶, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验确定了这2种酶水解鱿鱼皮以制备胶原蛋白的最佳酶解条件。结果表明, 胰蛋白酶和木瓜蛋白酶水解鱿鱼皮以制备胶原蛋白的最佳温度、加酶量、底物浓度、pH、时间分别为55℃、1 200 U·g⁻¹、1:20、pH 8.0、4 h和50℃、3 200 U·g⁻¹、1:20、pH 6.0、6 h。2种蛋白酶提取的胶原蛋白含量分别为11.08%和11.36%, 提取率分别为95.16%和97.56%。

关键词: 鱿鱼皮; 胶原蛋白; 蛋白酶; 水解

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2008)01-0058-06

Study on hydrolytic technics of collagen from squid skin by protease

GUO Hengbin¹, ZENG Qingzhu²

(1. Guangzhou Luxe Seafood Enterprises Ltd., Guangzhou 510820, China;

2. Department of Food Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Hydrolytic technics of collagen from squid skin by protease was studied. Based on the content of hydroxyproline of five kinds of enzymic hydrolysates, trypsin and papain were chose to apply in the experiment. By $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment design, the optimum processing conditions of extraction by trypsin and papain were determined. Results of extracting collagen show that the optimal conditions of trypsin and papain were temperature 55℃, enzyme dosage 1 200 U·g⁻¹, concentration of substrate 1:20, pH 8.0, time 4 h, and temperature 50℃, enzyme dosage 3 200 U·g⁻¹, concentration of substrate 1:20, pH 6.0, time 6 h, respectively. The content of collagen was 11.08% and 11.36%, respectively. Extraction yield of collagen was 95.16% and 97.56%, respectively.

Key words: squid skin; collagen; protease; hydrolysis

我国是一个渔业大国, 渔业资源极其丰富。近几年我国鱿鱼年产量达12万t以上, 鱿鱼在加工成鱿鱼丝、鱿鱼圈、鱿鱼花或调味鱿鱼产品的过程中, 产生了约15%~20%的内脏及表皮等废弃物, 尽管这些废弃物也具有很高的营养价值, 但只有少数工厂将其提取鱿鱼油或制成鱼粉作为水产饲料使用, 而大多数工厂均采用掩埋丢弃的方法, 不仅造

成了资源的极大浪费, 更严重的是导致环境的污染。鱼皮中含有大量的蛋白质, 其中含量最多的为I型胶原蛋白, 最高可超过其蛋白质总量的80%, 较鱼体的其他部位要高许多, 有研究报道真鲷(*Pagrus major*)鱼皮中胶原蛋白含量占粗蛋白的80.5%, 鳗鲡(*Anguilla japonica*)则高达87.3%^[1]。目前, 胶原蛋白在食品业、生物医学

原料、制药业、皮革业、影像业和化妆品工业中都有广泛的应用^[2]。文章研究了酶法制备鱿鱼皮中胶原蛋白的方案,通过正交试验确定了最佳的酶解工艺条件,为水产品加工废弃物的高附加值利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鱿鱼 (*Ommastrephes bartrami*) 皮由大连金山水产品有限公司提供。将鱼皮上残余的鱼肉去除,用剪刀剪成小片 (约 1 cm × 1 cm), 用自来水反复清洗后放入 PE 食品保鲜袋中于 -20℃ 下冻藏备用。

胃蛋白酶 (北京奥博星生物技术责任有限公司)、枯草杆菌中性蛋白酶、碱性蛋白酶 (广西南宁庞博生物工程有限公司)、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶 [中国医药 (集团) 上海化学试剂公司]。

1.2 实验方法

1.2.1 鱿鱼皮基本成分测定 水分、灰分、粗脂肪和粗蛋白按常规方法进行测定^[3], 总糖采用苯酚硫酸法进行测定^[4]。

1.2.2 原料的预处理 将鱼皮解冻后放入 0.1 M NaOH (1:30, W/V) 中 (4℃ 下), 轻轻搅拌 6 h, 每隔 2 h 更换 1 次溶液, 之后用蒸馏水洗涤至中性, 沥干, 以去除非胶原蛋白。随后将鱼皮放到 10% (V/V) 丁醇 (1:30, W/V) 中 (4℃ 下), 轻轻搅拌 24 h, 每隔 8 h 更换 1 次溶液, 之后用蒸馏水洗涤至中性, 沥干, 以去除脂肪。

1.2.3 蛋白酶活力测定 采用福林酚法进行测定^[5]。

1.2.4 胶原蛋白含量的测定 [以羟脯氨酸 (HYP) 计]

(1) 原料中胶原蛋白含量的测定。按照参考文献 [6] 的方法进行测定。(2) 提取液中胶原蛋白含量的测定。取酶解后制取的上清液 5 mL, 加入 5 mL 6N 的盐酸, 置于 130℃ 烘箱中水解 4 h。取 1 mL 水解液用蒸馏水定容至 100 mL, 取其中的 1 mL 溶液于试管中, 按照参考文献 [6] 的方法进行测定。(3) 胶原蛋白提取率的计算。

提取率 (%) = $\frac{\text{提取的胶原蛋白含量}}{\text{原料中胶原蛋白含量}} \times 100\%$ 。其中

胶原蛋白含量 (%) = HYP 含量 (%) × 系数, 由于 HYP 含量与胶原蛋白的含量是呈正相关性, 将测定的 HYP 含量乘以相应的系数即可得出胶原蛋白的含量^[6]。

1.2.5 酶水解试验方法 (1) 单酶水解试验。

选用胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、枯草杆菌中性蛋白酶和碱性蛋白酶对鱿鱼皮进行单酶水解试验。将底物与水 1:10 (W/W) 的比例于酶解反应器中, 调温度和 pH 至酶最适反应条件, 然后将酶按酶量 1 200 U·g⁻¹ 加入反应器中反应。在酶解过程中, 保证恒定的温度和 pH, 酶解完成后在沸水浴中灭活 10 min, 冷却后用 0.1 M NaOH 调 pH 至 7.0, 离心 (20 000 g, 4℃, 40 min), 上清液用于 HYP 含量的测定。试验条件如表 1 所示。(2) 蛋白酶酶解条件的优化。根据单酶水解的试验结果, 选定胰蛋白酶和木瓜蛋白酶作为目标酶, 选择温度、pH、酶/底物、时间和底物浓度为因素, 每个因素确定 4 个水平, 按 L₁₆(4⁵) 正交表进行正交试验。2 种蛋白酶正交试验因素及其水平分别如表 2、表 3 所示。

表 1 5 种蛋白酶的适宜酶解条件

Tab. 1 The suitable hydrolysis condition of five kinds of enzyme

酶的种类 kinds of enzyme	pH	温度/℃ temperature	酶/底物/U·g ⁻¹ enzyme/substrate	时间/h time
胃蛋白酶 pepsin	2.0	37	1 200	8
胰蛋白酶 trypsin	8.0	50		
木瓜蛋白酶 papain	7.0	55		
枯草中性蛋白酶 neutral subtilisin	7.0	50		
碱性蛋白酶 alkali protease	8.0	55		

表 2 胰蛋白酶的正交试验因素与水平
Tab. 2 Factors and levels of trypsin

因素 factor 水平 level	温度/℃ temperature	pH	酶/底物/U·g ⁻¹ enzyme/substrate	时间/h time	底物浓度 substrate concentration
	A	B	C	D	E
1	45	7.0	1 200	2	1 : 5
2	50	7.5	3 200	4	1 : 10
3	55	8.0	5 200	6	1 : 15
4	60	8.5	7 200	8	1 : 20

注：底物浓度（原料/水，W/W），下同
Note: substrate concentration (raw material/water, W/W), same as below.

表 3 木瓜蛋白酶的正交试验因素与水平
Tab. 3 Factors and levels of papain

因素 factor 水平 level	温度/℃ temperature	pH	酶/底物/U·g ⁻¹ enzyme/substrate	时间/h time	底物浓度 substrate concentration
	A	B	C	D	E
1	45	6.0	1 200	2	1 : 5
2	50	6.5	3 200	4	1 : 10
3	55	7.0	5 200	6	1 : 15
4	60	7.5	7 200	8	1 : 20

2 结果与讨论

2.1 鱿鱼皮的一般组成成分

从表 4 可以看出，鱿鱼皮虽然是水产品加工的废弃物，但是其中含有丰富的蛋白质，粗蛋白含量达 16.26%，占鱿鱼皮干重的 75.35%。经测定，鱿鱼皮中 HYP 含量为 0.82%，换成干重含量为 3.80%，由于 HYP 含量与胶原蛋白的含量是呈正相关性，所以乘以系数 14.2^[7]得到鱿鱼皮中胶原蛋白的含量为 53.96%（干基），占总蛋白质的 71.61%。因此，研究从鱿鱼皮中提取胶原蛋白是非常必要的。

表 4 鱿鱼皮基本组成成分
Tab. 4 Proximate analyses content of squid skin %

成分 component	含量 content
水分 moisture	78.42 ± 0.77
灰分 ash	0.48 ± 0.04
粗蛋白 crude protein	16.26 ± 0.32
脂肪 fat	1.9 ± 0.07
总糖 polysaccharide	2.26 ± 0.03
羟脯氨酸 HYP	0.82 ± 0.03

2.2 5 种蛋白酶的酶活力

经测定 5 种蛋白酶的酶活力如表 5 所示。

表 5 5 种蛋白酶的酶活力
Tab. 5 The enzymatic activity of five kinds of enzyme U·g⁻¹

酶的种类 kinds of enzyme	酶活力 enzymatic activity
胃蛋白酶 pepsin	35 737
枯草杆菌中性蛋白酶 neutral subtilisin	111 636
木瓜蛋白酶 papain	32 778
胰蛋白酶 trypsin	20 799
碱性蛋白酶 alkali protease	249 494

2.3 5 种蛋白酶单酶水解效果的比较

以 HYP 含量为指标，比较不同蛋白酶的水解效果。5 种蛋白酶单酶水解所得到的酶解液中 HYP 含量如表 6 所示。从表 6 中可以看出，5 种蛋白酶中胰蛋白酶和木瓜蛋白酶所制得的胶原蛋白的含量最高，因此，选定胰蛋白酶和木瓜蛋白酶作为目标酶，对其试验条件进行优化。

2.4 胰蛋白酶最适水解条件

根据单酶水解的试验结果，选择温度、pH、

酶/底物、时间、底物浓度为因素，每个因素确定 4 个水平，按 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行正交试验，对其酶解条件进行优化。测定了 16 组胰蛋白酶水解液的 HYP 含量，结果如表 7 所示。

表 6 5 种蛋白酶水解液中 HYP 含量
Tab. 6 HYP content of five kinds of enzyme %

酶的种类 kinds of enzyme	羟脯氨酸含量 HYP content
胃蛋白酶 pepsin	0.66
枯草杆菌中性蛋白酶 neutral subtilisin	0.67
木瓜蛋白酶 papain	0.77
胰蛋白酶 trypsin	0.75
碱性蛋白酶 alkali protease	0.66

由表 7 得出试验极差因素 $E > A > C > B > D$ ，说明影响因素排列依次为底物浓度 > 温度 > 加酶量 > pH > 时间。在正交试验中最佳作用条件为底物浓度 1 : 20，温度为 55℃、加酶量 1 200 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、pH 为 8.0、时间 4 h，即 $E_4 A_3 C_1 B_3 D_2$ 。通过极差分析得到提取效果最好的试验组为 $E_3 A_3 C_1 B_1 D_2$ ，与试验得到的效果最好的组不一致，随后进行验证，得到 $E_3 A_3 C_1 B_1 D_2$ 条件下提取的 HYP 的含量为 0.77%，小于试验组 $E_4 A_3 C_1 B_3 D_2$ 条件下提取的 HYP 含量 0.78%。所以，胰蛋白酶提取鱿鱼皮胶原蛋白效果最佳条件为底物浓度 1 : 20，温度为 55℃、加酶量 1 200 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、pH 为 8.0、时间 4 h。

表 7 胰蛋白酶正交试验结果

Tab. 7 Orthogonal test and results

	A	B	C	D	E	羟脯氨酸/% HYP	提取率/% isolation rate
1	1	1	1	1	1	0.25	30.49
2	1	2	2	2	2	0.31	37.80
3	1	3	3	3	3	0.46	56.10
4	1	4	4	4	4	0.33	40.24
5	2	1	2	3	4	0.63	76.83
6	2	2	1	4	3	0.65	79.27
7	2	3	4	1	2	0.35	42.68
8	2	4	3	2	1	0.24	29.27
9	3	1	3	4	2	0.67	81.71
10	3	2	4	3	1	0.20	24.39
11	3	3	1	2	4	0.78	95.12
12	3	4	2	1	3	0.72	87.80
13	4	1	4	2	3	0.73	89.02
14	4	2	3	1	4	0.70	85.37
15	4	3	2	4	1	0.31	37.80
16	4	4	1	3	2	0.54	65.85
K_1	1.35	2.28	2.22	2.02	1.00		
K_2	1.87	1.86	1.97	2.06	1.87		
K_3	2.37	1.90	2.07	1.83	2.56		
K_4	2.28	1.83	1.61	1.96	2.44		
k_1	0.34	0.57	0.56	0.51	0.25		
k_2	0.47	0.47	0.49	0.52	0.47		
k_3	0.59	0.48	0.52	0.46	0.64		
k_4	0.57	0.46	0.40	0.49	0.61		
R	0.25	0.11	0.16	0.06	0.39		

注：A. 温度；B. pH；C. 酶/底物；D. 时间 (h)；E. 底物浓度

Note: A. temperature; B. pH; C enzyme/substrate; D. time (h); E. substrate concentration

2.5 木瓜蛋白酶最适水解条件

根据单酶水解的试验结果，选择温度、pH、酶/底物、时间、底物浓度为因素，每个因素确定 4 个水平，按 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行正交试验，对其酶解条件进行优化。测定了 16 组木瓜蛋白酶水解液的 HYP 含量，结果如表 8 所示。

由表 8 得出试验极差因素 $E > A > B > C > D$ ，说明影响因素排列依次为底物浓度 > 温度 > pH > 加酶量 > 时间。在正交试验中最佳作用条件为底物

浓度 1 : 20，温度为 50℃、pH 为 6.0、加酶量 3 200 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、时间 6 h，即 $E_4 A_2 B_1 C_2 D_3$ 。通过极差分析得到提取效果最好的试验组为 $E_4 A_2 B_1 C_1 D_3$ ，与试验得到的效果最好的组不一致，随后进行验证，得到 $E_4 A_2 B_1 C_1 D_3$ 条件下提取的 HYP 含量为 0.78%，小于试验组 $E_4 A_2 B_1 C_2 D_3$ 条件下提取的 HYP 含量 0.80%。所以，木瓜蛋白酶提取鱿鱼皮胶原蛋白效果最佳条件为底物浓度 1 : 20，温度为 50℃、pH 为 6.0、加酶量 3 200 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、时间 6 h。

表 8 木瓜蛋白酶正交试验结果
Tab. 8 Orthogonal test and results

	A	B	C	D	E	羟脯氨酸/% HYP	提取率/% isolation rate
1	1	1	1	1	1	0.32	39.02
2	1	2	2	2	2	0.43	52.44
3	1	3	3	3	3	0.52	63.41
4	1	4	4	4	4	0.58	70.73
5	2	1	2	3	4	0.80	97.56
6	2	2	1	4	3	0.73	89.02
7	2	3	4	1	2	0.64	78.05
8	2	4	3	2	1	0.46	56.10
9	3	1	3	4	2	0.66	80.49
10	3	2	4	3	1	0.44	53.66
11	3	3	1	2	4	0.74	90.24
12	3	4	2	1	3	0.70	85.37
13	4	1	4	2	3	0.72	87.80
14	4	2	3	1	4	0.75	91.46
15	4	3	2	4	1	0.42	51.22
16	4	4	1	3	2	0.69	84.15
K_1	1.85	2.50	2.48	2.41	1.64		
K_2	2.63	2.35	2.35	2.35	2.42		
K_3	2.54	2.32	2.39	2.45	2.67		
K_4	2.58	2.43	2.38	2.39	2.87		
k_1	0.46	0.63	0.62	0.60	0.41		
k_2	0.66	0.59	0.59	0.59	0.61		
k_3	0.64	0.58	0.60	0.61	0.67		
k_4	0.65	0.61	0.60	0.60	0.72		
R	0.2	0.05	0.03	0.02	0.31		

注：A. 温度；B. pH；C. 酶/底物；D. 时间 (h)；E. 底物浓度
Note: A. temperature; B. pH; C enzyme/substrate; D. time (h); E. substrate concentration

3 结论

(1) 鱿鱼皮中含有丰富的胶原蛋白，其含量为 53.96% (干基)，占总蛋白质的 71.61%。目前鱼皮的加工并未受到重视，多数作为下脚料处理，极大地浪费了资源。鱼皮胶原蛋白的开发很值得进一步的研究，使其在食品、医药、化妆品、饲料、肥料等工业中得到更加广泛的应用。

(2) 影响胰蛋白酶提取胶原蛋白的因素主要是底物浓度、温度、加酶量、pH 和时间，通过正交试验胰蛋白酶提取鱿鱼皮胶原蛋白最佳工艺条件为温度 55℃、加酶量 $1\ 200\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 、底物浓度 1:20、pH 8.0、时间 4 h，此时得到的胶原蛋白含量为 11.08%，提取率为 95.16%。

(3) 影响木瓜蛋白酶提取胶原蛋白的因素主要是底物浓度、温度、pH、加酶量和时间，通过正交试验木瓜蛋白酶提取鱿鱼皮胶原蛋白最佳工艺条件为温度 50℃、加酶量 $3\ 200\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 、底物浓度 1:20、pH 6.0、时间 6 h，此时得到的胶原蛋

白含量为 11.36%，提取率为 97.56%。

参考文献：

- [1] 鸿巢章二，桥本周久. 水产利用化学 [M]. 北京：中国农业出版社，1994：269.
- [2] KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chem, 2005, 89 (3): 363–372.
- [3] 大连轻工业学院. 食品分析 [M]. 北京：中国轻工业出版社，1994：98–235.
- [4] 林颖，吴毓敏，吴雯，等. 天然产物的糖含量测定方法正确性的研究 [J]. 天然产物研究与开发，1996, 8 (3): 5–9.
- [5] 曾庆祝，汪涛，叶于明. 扇贝边酶解技术研究 [J]. 中国水产科学，2001, 8 (1): 64–68.
- [6] 郭恒斌，曾庆祝，闫磊，等. 分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量 [J]. 现代食品科技，2007, 23 (7): 81–83.
- [7] KOŁODZIEJSKA I, SIKORSKI Z E, NIECIKOWSKA C. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illes argentinus*) skins [J]. Food Chem, 1999, 66 (2): 153–157.