

# 罗非鱼皮胶原蛋白肽制备的工艺优化

李敏雄<sup>1</sup>, 郭斌<sup>2</sup>, 刘飞<sup>2</sup>, 曹庸<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642)

(2. 广州绿萃生物科技有限公司, 广东广州 510665)

**摘要:**以罗非鱼鱼皮为原料, 研究利用酶法制备胶原蛋白肽制品。测定了罗非鱼皮的基本组成成分, 利用低温连续相变萃取技术进行脱脂处理; 以水解度、水解产物分子量和感官评定为指标, 研究蛋白酶种类对酶解的影响; 以水解度为指标, 研究酶解条件对水解度的影响, 并采用响应面试验对鱼皮胶原肽制备工艺进行优化; 用凝胶过滤色谱法测定酶解液分子质量分布。结果表明: 采用碱性蛋白酶水解鱼皮效果最好, 酶解的最佳工艺条件为: 时间 7 h、加酶量 7%、温度 60 °C、pH 值 10.38, 在此条件下碱性蛋白酶水解罗非鱼皮的水解度最高可达 23.01%。由本法所得胶原肽是以分子质量 180~1000 u 之间的寡肽 (约 2~8 个氨基酸残基) 为主的物质, 具有较好的生理活性, 可作为功能因子广泛应用于保健食品、化妆品、医药等各个行业当中。

**关键词:** 罗非鱼皮; 胶原蛋白肽; 碱性蛋白酶; 水解度; 分子量

文章编号: 1673-9078(2018)07-205-212

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.030

## Study on the Preparation of Collagen Peptide from Tilapia Skin

LI Min-xiong<sup>1</sup>, GUO Bin<sup>2</sup>, LIU Fei<sup>2</sup>, CAO Yong<sup>1</sup>

(1.Engineering Research Center for Natural Actives, College of Food Sciences, South China University of Agriculture, Guangzhou 510642, China)(2.Guangzhou Green Extract Biological Technology Co., Ltd, Guangzhou 510665, China)

**Abstract:** The collagen peptides from tilapia skin has been extracted by using an enzymatic method. The composition of tilapia skin was also analyzed. A novel continuous phase-transition extraction method at low temperature was used to remove fat from tilapia skin. The degree of hydrolysis, molecular weight and organoleptic investigation were used as indicators to study the effects of protease types on the hydrolysis. Response surface experiment was designed to optimize the preparation technology of the collagen peptide. GFC was used to determine the molecular weight distribution of hydrolysates. The results showed that alcalase was the best enzyme for the hydrolysis, and the optimal hydrolysis conditions were determined as follows: enzymolysis time 7 h, alcalase dosage 7%, temperature 60 °C, and the pH 10.38. Under these conditions, the maximum hydrolysis degree was 23.01%. The peptides obtained is mainly composed of peptide with 2 to 8 amino acid residues, and has good physiological activity. It could be widely used as a functional factor in various industries, such as health food, cosmetics, medicine and other industries.

**Key words:** Tilapia skin; collagen peptides; alcalase; degree of hydrolysis; molecular weight

目前胶原蛋白及活性肽被广泛应用于生物、医疗、食品、化妆品、饲料、皮革和影像等诸多领域<sup>[1]</sup>。胶原蛋白肽因其弱的抗原性、低过敏性、易水解、原料廉价易得和良好的生物相容性, 受到众多行业的青睐<sup>[2]</sup>。水产胶原蛋白活性肽具有保护胃粘膜、抗溃疡、抗氧化、抗过敏、抗肿瘤、抗衰老、降血压、降胆固醇、增强骨强度、预防骨质疏松、预防关节炎、促进伤口愈合、促进角膜上皮细胞的修复和生长、促进皮

收稿日期: 2018-03-06

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2013B051000071)

作者简介: 李敏雄 (1992-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 功能食品与配料

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物及功能性食品

肤胶原代谢、免疫调节等多种生理功能<sup>[3]</sup>。相对分子质量低的小肽易被肠道吸收, 且在体内生理功能不易被破坏<sup>[4]</sup>。

罗非鱼是我国养殖量居于第二位的鱼种<sup>[5]</sup>。2016年产量为 186.64 万吨<sup>[6]</sup>。目前, 罗非鱼的生产加工主要以出口冷冻鱼肉片为主, 加工过程产生的下脚料占全鱼重的 60%~70%, 包括鱼皮、鱼头、鱼鳍和鱼骨<sup>[7]</sup>。这些副产物中含有丰富的蛋白质, 其中鱼皮中含有的胶原蛋白最为丰富<sup>[8]</sup>, 但鱼皮副产物大部分作为饲料鱼粉的原料或废料丢弃, 既污染了环境, 又造成了经济上的损失<sup>[9]</sup>。对这些鱼皮进行有效利用, 避免浪费的同时还可减少环境污染<sup>[10]</sup>。长期以来, 胶原主要来源于猪、牛等陆生动物, 但是随着疯牛病、口蹄疫的频发以及宗教和文化的差别, 猪、牛来源胶原的应用

受到了限制<sup>[11]</sup>。在这种背景下,水产胶原的研究和应用逐渐受到科研工作者的重视。由于罗非鱼皮的丰富来源及安全性因素,使得近年来罗非鱼皮成为了新的胶原蛋白来源,从罗非鱼皮中提取胶原蛋白肽已经成为了当前研究的热点<sup>[12]</sup>。因此如何将这些加工过程中产生的鱼皮废弃物变废为宝成为了研究的关键<sup>[13]</sup>。虽然目前已有大量罗非鱼皮制备胶原蛋白肽的报道,但是还存在工艺研究不够系统严谨、方法指标选择不够科学、鱼皮脱脂效果差导致其胶原蛋白肽品质差等问题。为了解决这些问题,本课题在前人的基础上,重点在这些方面进行研究工作。

由于酶水解法相比于热水抽提法、酸水解法、碱水解法条件温和,能在一定条件下进行定位水解分裂产生特定的肽,且氨基酸不会被破坏,构型也不发生变化,所以近年来多被采用于鱼皮的降解中<sup>[14]</sup>。本课题旨在利用沿海地区淡水养殖的罗非鱼加工下脚料-鱼皮为原料,以水解度、水解产物分子量和感官评价为指标,以碱性蛋白酶水解法,通过单因素试验和响应面试验确定富含低分子量的罗非鱼鱼皮胶原蛋白肽制备的新型制备工艺。为生产鱼皮胶原肽产品提出了新的思路,为工业化提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

罗非鱼皮,广东省明基水产品有限公司;碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、和胰蛋白酶,广西南宁庞博生物工程有限公司;胃蛋白酶,广州市齐云生物技术有限公司;邻苯二甲醛(OPA),上海麦克林生化科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

低温连续相变萃取装置,自制;DELTA320型pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;电热恒温数显水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;水浴恒温振荡器,常州国华电器有限公司;UV-1750型紫外可见分光光度计,岛津(中国)有限公司;LC-10A型高效液相色谱仪(配有紫外检测器),日本岛津公司;TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm凝胶柱,东曹(上海)生物科技有限公司;L530台式低速离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 酶解工艺

称取一定量脱脂的干制罗非鱼皮,常温按照 1:20

添加三级水浸泡 2 h,用蒸馏水洗样品并过滤,重复 3 次。置于三角瓶中,按料液比 1:15 加入三级水,料液在酶解前经热处理,即在 85 °C 条件下,热处理 20 min。冷却至室温后,分别在各酶的最适温度下预热 10 min 后,用 5 mol/L HCl 溶液或 5 mol/L NaOH 溶液调节至各酶的最适 pH。然后加入一定量的蛋白酶启动水解反应,置于酶的最适温度下恒温酶解。待酶解反应进行一定时间后,立即将水解混合物从恒温摇床内取出,将水解液的温度升高至 95 °C 并持续加热 20 min 以使酶失活。冷却至室温,然后 4500 r/min 离心 15 min,收集上清液,用水定容。

#### 1.3.2 酶解单因素实验

##### 1.3.2.1 加酶量对酶解反应的影响

固定料液比 1:15、温度 50 °C、pH 8.0、酶解时间 6 h,考察不同加酶量(1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%)对水解度的影响。

##### 1.3.2.2 pH 对酶解反应的影响

固定料液比 1:15、温度 50 °C、加酶量 5%、酶解时间 6 h,考察不同酶解 pH(7.0、8.0、9.0、10.0、11.0)对水解度的影响。

##### 1.3.2.3 温度对酶解反应的影响

固定料液比 1:15、pH 8.0、加酶量 5%、酶解时间 6 h,考察不同酶解温度(45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C)对水解度的影响。

##### 1.3.2.4 时间对酶解反应的影响

固定料液比 1:15、温度 50 °C、pH 8.0、加酶量 5%,考察不同酶解时间(1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、10 h)对水解度的影响。

#### 1.3.3 响应面优化设计

在以上单因素实验基础上,采用 Design-Expert 8.05b 软件中 Box-Behnken 中心组合设计原理进行响应面实验设计,具体选取加酶量、pH、温度及时间四个因素,进行提取工艺优化研究。

#### 1.3.4 分析测定方法

##### 1.3.4.1 罗非鱼鱼皮基本组分的测定

水分:GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》;灰分:GB 5009.4-2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》;总蛋白:GB 5009.5-2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》;脂肪:GB 5009.6-2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》。

##### 1.3.4.2 水解度的测定

水解度的测定采用 OPA 法<sup>[15,16]</sup>。

##### 1.3.4.3 样品分子量分布的测定

参考文献<sup>[17]</sup>,利用高效液相色谱仪进行测定,并

用相关软件进行分析。色谱柱为 TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm, 流动相为水/乙腈/三氟乙酸 (80:20:0.1, V/V/V), 在柱温为室温、流速为 0.5 mL/min 条件下, 以检测波长 220 nm 对样品进行测定。其中绘制分子量标准曲线所选取的蛋白标准品为: 细胞色素 C(12500 u)、胰岛素(5808 u)、杆菌肽(1422 u)、杆菌肽(1422 u)、甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(451 u)、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(189 u)。

#### 1.3.4.4 胶原蛋白肽粉的感官评定

参考文献<sup>[18,19]</sup>, 培养 10 名感觉器官机能良好的检查人员对胶原蛋白肽粉从色泽、腥味以及滋味三方面进行感官评价, 并按照表 1 填写评价表格; 对 10 名检查人员的感官评价作统计并计算分析, 分值越小表明测定结果越好。

表 1 感官评定标准

Table 1 Index of organoleptic investigation

评价指标	程度分值				
色泽	5 深黄	4 黄	3 浅黄	2 乳白	1 白
腥味	5 较重	4 重	3 一般	2 较小	1 无
滋味	5 较咸	4 咸	3 一般	2 淡	1 无

#### 1.3.4.5 统计分析

结果以  $\bar{X} \pm S$  表示。采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理和分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 罗非鱼鱼皮主要成分分析

罗非鱼皮原料冷冻条件下运送至本实验室后, 经过自来水清洗, 沥干后在室外晾晒, 接着低温干燥并粉碎后备用。罗非鱼鱼皮的化学组成见表 2。

表 2 罗非鱼鱼皮的化学组成

Table 2 Nutrient content of tilapia

成分	水分	蛋白质	脂肪	灰分
含量/%	10.25±0.17	76.98±0.19	9.50±0.10	1.22±0.06

从表 2 可以看出, 罗非鱼鱼皮水分含量为 10.25%、蛋白质含量为 76.98%、脂肪含量为 9.50%, 灰分含量为 1.22%。总的来说罗非鱼鱼皮蛋白质含量很高, 很适合高值化利用, 但是鱼类加工下脚料常常不可避免的含有脂肪, 较高的脂肪含量会降低蛋白酶的酶解效果, 同时在酶解过程中脂肪氧化后生成的可溶性小分子醛、酮具有不良气味, 少量的脂肪残留在酶解过滤液中, 会造成产品品质下降<sup>[20]</sup>。

罗非鱼鱼皮脂肪含量偏高, 因此在加工过程中脱脂显得更加关键。本研究采用具有自主知识产权的低

温连续相变提取技术<sup>[21]</sup>对罗非鱼鱼皮油脂进行提取, 参考前期研究得到的最佳提取工艺: 萃取时间 50 min, 萃取温度 50 °C, 萃取压力 0.5 MPa, 解析温度 70 °C, 物料水分为 10.25%, 此时提取率达到 90% 以上, 脱脂后的鱼皮脂肪含量仅为 0.70±0.10%, 为后期制备高品质罗非鱼皮胶原蛋白肽奠定了基础。

### 2.2 水解蛋白酶的选择

分别选取碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶, 按照蛋白酶各自的最适作用温度和 pH 值, 酶解脱脂后的鱼皮原料。不同蛋白酶对罗非鱼鱼皮胶原蛋白肽水解度、分子量及感官的影响见表 3。

从表 3 可以看出, 不同蛋白酶酶解鱼皮后的水解度、分子量分布及感官评价有显著性的差异 ( $p < 0.05$ )。其中风味蛋白酶的水解度最高, 为 27.07±0.11%, 胃蛋白酶的水解度最低, 为 1.40±0.14%, 六种蛋白酶的水解度从高到低排序是风味蛋白酶>木瓜蛋白酶>中性蛋白酶>碱性蛋白酶>胰蛋白酶>胃蛋白酶, 说明风味蛋白酶的水解能力最强, 同时其是外切酶, 故鱼皮蛋白大部分水解成了多肽或者氨基酸。

据相关文献报道, 罗非鱼皮氨基酸组成中相对分子质量最大的氨基酸是酪氨酸 (181 u), 表明相对分子质量在 180~1000 u 之间的物质主要是氨基酸残基在 2~8 个之间的小肽 (寡肽)<sup>[22]</sup>, 与氨基酸、多肽和蛋白质相比, 寡肽更易被机体吸收且具有独特的生物活性<sup>[17]</sup>。木瓜蛋白酶的分子量 180~1000 u 的含量最高, 为 72.23±0.46%, 胃蛋白酶的含量最低, 仅为 9.26±0.42%, 六种蛋白酶的 180~1000 u 的含量从高到低排序是木瓜蛋白酶>中性蛋白酶>碱性蛋白酶>风味蛋白酶>胰蛋白酶>胃蛋白酶, 虽然风味蛋白酶的水解度最高, 但其分子量 180~1000 u 的含量较低, 仅为 54.56±0.43%。

从产品的角度考虑, 不仅水解度要高、分子量分布要合理, 感官品质还要优良。表中不同蛋白酶的色泽没有显著性差异 ( $p > 0.05$ )。腥味是影响品质的关键指标之一, 木瓜蛋白酶的腥味最大, 为 4.74±0.07, 碱性蛋白酶的腥味最小, 为 2.36±0.08, 六种蛋白酶的腥味从大到小排序是木瓜蛋白酶>中性蛋白酶>胃蛋白酶>风味蛋白酶>胰蛋白酶>碱性蛋白酶, 说明木瓜蛋白酶的腥味最重, 但碱性蛋白酶的腥味最小, 感官评价优良。木瓜蛋白酶的滋味最咸, 为 4.60±0.07, 胃蛋白酶的滋味最小, 为 3.07±0.06, 六种蛋白酶的滋味从大到小排序是木瓜蛋白酶>碱性蛋白酶>中性蛋白酶>风味蛋白酶>胰蛋白酶>胃蛋白酶。

综上所述, 最终选择碱性蛋白酶作为最适合的水解用酶, 其水解度为  $18.97 \pm 0.09\%$ , 分子量  $180 \sim 1000$  u

的含量为  $67.74 \pm 0.51\%$ , 色泽为  $2.45 \pm 0.07$ , 腥味为  $2.36 \pm 0.08$ , 滋味为  $4.08 \pm 0.07$ 。

表3 不同蛋白酶对罗非鱼鱼皮胶原蛋白肽水解度、分子量及感官的影响

Table 3 Effect of protease on hydrolysis degree, molecular weight and organoleptic investigation of collagen peptide from tilapia skin

蛋白酶	水解度/%	180~1000 u 分子量/%	感官评定		
			色泽	腥味	滋味
碱性蛋白酶	$18.97 \pm 0.09^c$	$67.74 \pm 0.51^b$	$2.45 \pm 0.07^a$	$2.36 \pm 0.08^c$	$4.08 \pm 0.07^b$
中性蛋白酶	$21.45 \pm 0.15^b$	$68.01 \pm 0.55^b$	$2.44 \pm 0.08^a$	$3.19 \pm 0.06^b$	$4.02 \pm 0.08^b$
木瓜蛋白酶	$22.47 \pm 0.05^b$	$72.23 \pm 0.46^a$	$2.46 \pm 0.05^a$	$4.74 \pm 0.07^a$	$4.60 \pm 0.07^a$
风味蛋白酶	$27.07 \pm 0.11^a$	$54.56 \pm 0.43^c$	$2.49 \pm 0.08^a$	$3.17 \pm 0.05^b$	$3.56 \pm 0.06^c$
胰蛋白酶	$10.98 \pm 0.10^d$	$50.99 \pm 0.25^d$	$2.41 \pm 0.06^a$	$3.11 \pm 0.08^b$	$3.54 \pm 0.08^c$
胃蛋白酶	$1.40 \pm 0.14^e$	$9.26 \pm 0.42^e$	$2.42 \pm 0.08^a$	$3.18 \pm 0.06^b$	$3.07 \pm 0.06^d$

注: 不同小写字母表示同一列比较具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

### 2.3 加酶量对酶解反应的影响

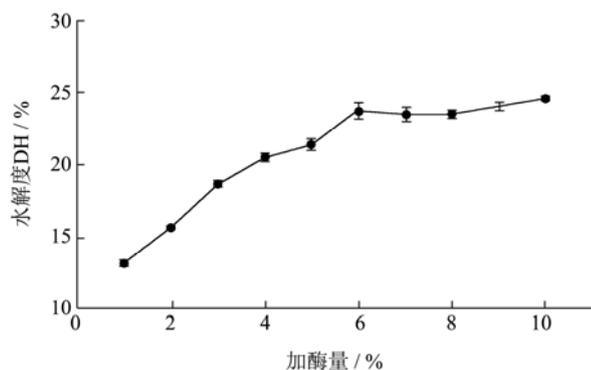


图1 加酶量对水解度的影响

Fig.1 Effect of the enzyme concentration on DH

由图1可知, 在加酶量小于6%时, 水解度随加酶量的增加而增加, 在加酶量达到6%时, 水解度达到最大值, 在加酶量大于6%时, 水解度增加缓慢。碱性蛋白酶水解鱼皮的本质是蛋白酶分子的络合位点与鱼皮蛋白质分子中某些特有的氨基酸残基结合, 其催化位点通过降低反应的活化能而使特有肽键容易断裂和产生。因此, 在加酶量为1%~6%时, 鱼皮过量, 酶不够, 即酶已被底物饱和。此时, 随着酶的增加, 蛋白酶与底物蛋白分子接触并结合形成酶-底物络合物的量也增加, 水解度增加。但当加酶量达到6%时, 底物被酶饱和, 酶促反应速度变缓, 水解度增加变缓。因此, 选定碱性蛋白酶最适加酶量是6%。

### 2.4 pH对酶解反应的影响

由图2可知, pH在5.0~10.0时, 水解度随pH的增加而增大。当pH为10.0时, 水解度达到最大值, 之后继续增大pH, 水解度开始下降。pH在5.0~10.0范围时, pH值的增加可促进碱性蛋白酶和鱼皮蛋白溶解并使其处于一定的解离状态, 它能促进酶与底物蛋

白形成酶-底物络合物以及增强蛋白酶活性, 从而增强酶解反应发生和水解度的增大; 但当pH大于10.0时, 此时蛋白酶和底物蛋白溶解性减弱, 酶与底物蛋白形成的蛋白酶-底物络合物量减少, 蛋白酶甚至变性失活, 酶解反应减弱, 水解度下降。因此, 选定碱性蛋白酶最适水解pH为10.0。

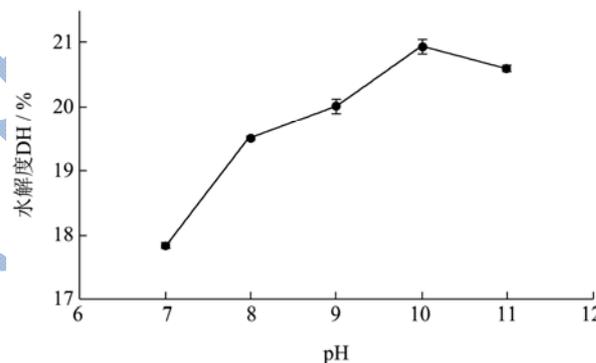


图2 pH对水解度的影响

Fig.2 Effect of the pH value on DH

### 2.5 温度对酶解反应的影响

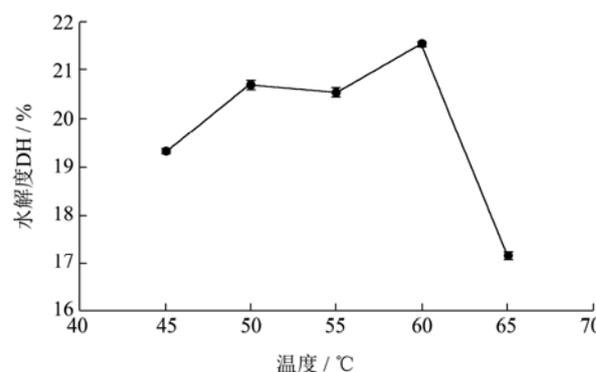


图3 温度对水解度的影响

Fig.3 Effect of the enzymolysis temperature on DH

从图3可知, 在45~60°C内水解度随温度升高变化较快, 当温度进一步升高时水解度不再升高反而有

所下降。在 45~60 °C 范围内, 温度的上升能促进碱性蛋白酶和鱼皮蛋白的溶解, 加强酶与底物的接触, 形成酶-底物络合物。同时, 加热可以降低酶促反应所需的活化能, 促进酶促反应的发生和水解度的增大。当温度高于 60 °C 时, 随着温度的上升酶变性失活及酶总活性下降, 酶与底物蛋白之间的交链聚合也加重, 聚合物不溶于水, 从而削弱底物蛋白的溶解和蛋白酶的活性, 水解度降低。因此, 选定碱性蛋白酶最适水解温度为 60 °C。

### 2.6 时间对酶解反应的影响

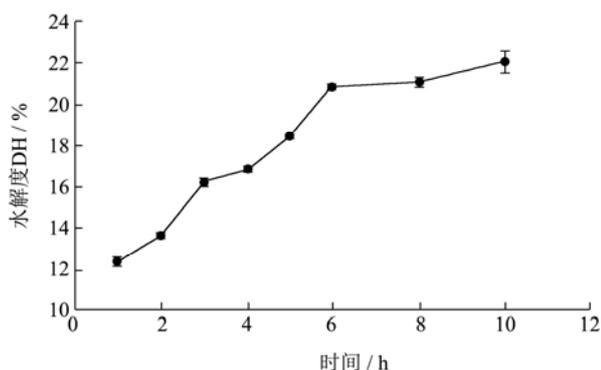


图4 时间对水解度的影响

Fig.4 Effect of the enzymolysis time on DH

由图 4 可知, 在碱性蛋白酶作用下, 最初的 6 h 内水解度增加的幅度较大; 随着水解时间的延长, 水解度不断增大, 到 6 h 时, 水解度趋向稳定。此后, 随时间的延长水解度变化不大。在 6 h 内, 底物含有大量肽键, 产物对酶促反应的抑制作用很小。蛋白酶变性、自溶和(或)“钝化”失活的概率较低, 它可以促进酶-底物络合物的形成和水解度的升高。但是时间超过 6 h 时, 肽键的数目减少, 产物对酶促反应的削弱作用增强, 蛋白酶变性、自溶和(或)“钝化”失活增加, 酶-底物络合物的量减少以及水解度增加缓慢。因此, 选定碱性蛋白酶最适水解时间为 6 h。

### 2.7 响应面实验

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 响应面法的要求, 选取影响胶原蛋白肽水解度的四个因素: 时间、加酶量、温度、pH。采用四因素三水平的响应面分析方法, 利用 Design-Expert 8.05b 软件进行数据拟合, 分析因素与水平设计如表 4 所示。试验结果见表 5。

经过多元回归拟合, 得到回归方程模型:

$$DH=20.95+0.56A+0.77B+0.46C+0.59D+0.51AB+0.19AC-0.07AD+0.01BC+0.08BD-0.12CD-0.29A^2-0.58B^2+0.11C^2-0.65D^2$$

表 4 响应面分析因素与水平

Table 4 Factors and levels of RAS test

水平	因素			
	A(时间)	B(加酶量)	C(温度)	D(pH)
-1	5	5	50	9.0
0	6	6	55	10.0
1	7	7	60	11.0

表 5 响应面分析方案及结果

Table 5 Experiment design and results of response surface

序号	A	B	C	D	DH/%
1	-1	-1	0	0	19.12
2	1	-1	0	0	19.31
3	-1	1	0	0	19.92
4	1	1	0	0	22.17
5	0	0	-1	-1	19.55
6	0	0	1	-1	20.67
7	0	0	-1	1	20.50
8	0	0	1	1	21.14
9	-1	0	0	-1	18.46
10	1	0	0	-1	19.86
11	-1	0	0	1	20.11
12	1	0	0	1	21.23
13	0	-1	-1	0	19.16
14	0	1	-1	0	20.61
15	0	-1	1	0	20.13
16	0	1	1	0	21.62
17	-1	0	-1	0	20.12
18	1	0	-1	0	20.63
19	-1	0	1	0	20.64
20	1	0	1	0	21.89
21	0	-1	0	-1	18.52
22	0	1	0	-1	19.67
23	0	-1	0	1	19.71
24	0	1	0	1	21.18
25	0	0	0	0	21.15
26	0	0	0	0	21.06
27	0	0	0	0	20.95
28	0	0	0	0	20.85
29	0	0	0	0	20.75

由回归模型的方差分析可知(表 6), 该回归模型达到极显著水平( $p < 0.0001$ )。由表中 P 值可知, 4 个因子都对胶原蛋白肽水解度具有显著性影响。逐项显著性结果检验表明: 方程中一次项 A、B、C、D, 二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $D^2$  及交互项 AB 对胶原蛋白肽水解度影响显著, 其余项影响均不显著。该拟合模型相关系数

$R^2=0.9672$ ,说明响应值(水解度 DH)的变化有 96.72% 来源于所选变量,即时间、加酶量、温度、pH 值。失拟项不显著( $P=0.1671$ ),说明该回归方程的拟合度高,可较好地描述各因素与响应值的真实关系。

软件分析,得出最优的碱性蛋白酶水解条件为:

时间 7 h、加酶量 7%、温度 60 °C、pH 值 10.38,在此条件下碱性蛋白酶水解罗非鱼皮的水解度预测值为 22.78%。经试验验证,此最优条件下水解度为 23.01%,与预测值的相对误差在 1.0%左右,证明在实际生产中应用该模型进行预测是可行的。

表 6 二次响应面方差分析

Table 6 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值 Prob>F	显著性
A	3.76	1	3.76	64.65	<0.0001	**
B	7.08	1	7.08	121.69	<0.0001	**
C	2.54	1	2.54	43.62	<0.0001	**
D	4.25	1	4.25	72.98	<0.0001	**
AB	1.06	1	1.06	18.22	0.0008	**
AC	0.14	1	0.14	2.35	0.1474	
AD	0.02	1	0.02	0.34	0.571	
BC	$4.00 \times 10^{-04}$	1	$4.00 \times 10^{-04}$	$6.87 \times 10^{-05}$	0.9351	
BD	0.026	1	0.026	0.44	0.518	
CD	0.058	1	0.058	0.99	0.3368	
A <sup>2</sup>	0.55	1	0.55	9.38	0.0084	**
B <sup>2</sup>	2.2	1	2.2	37.83	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.078	1	0.078	1.34	0.2657	
D <sup>2</sup>	2.72	1	2.72	46.74	<0.0001	**
模型	23.86	14	1.7	29.27	<0.0001	**
失拟	0.71	10	0.071	2.79	0.1671	
误差	0.1	4	0.026			
总和	24.67	28				
R <sup>2</sup>	0.9672					

注: \*\*表示差异极显著( $p<0.01$ )。

## 2.8 最优水解条件的胶原蛋白肽相对分子量的分布

的分布

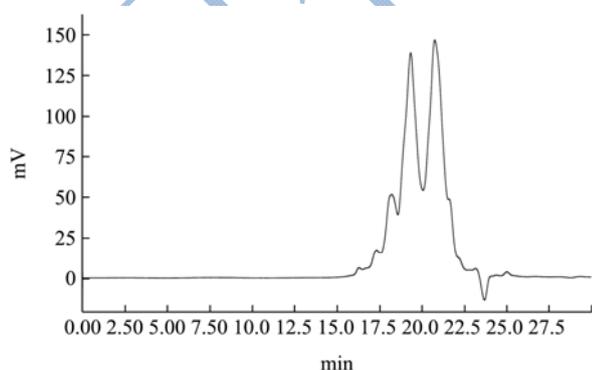


图 5 酶解产物的高效凝胶液相色谱图

Fig.5 The hydrolysates weight chromatography by HPLC

用最优的组合方法酶解鱼皮获取的胶原蛋白肽有轻微腥味和较弱苦涩味的白色粉末,酶解产物相对

分子质量分布曲线如图 5,相对分子质量分布测定结果如表 6。

表 7 酶解液分子质量分布测定结果

Table 7 Determination results for the molecular weight

distribution of the hydrolysates	
分子质量范围	酶解产物/%
<180	9.52
180~500	39.99
500~1000	30.71
1000~2000	13.44
2000~3000	3.57
3000~5000	1.86
>5000	0.91

由表 7 可见,分子质量在 180~1000 u 之间的物质占 70.70%,即表明酶解液中寡肽含量较高,占比为 70.70%,而寡肽具有独特的生理活性且更易被机体吸收。蛋白质及多肽因为理化阻碍和代谢阻碍等原因需

要在胃肠道内被降解为2~5个氨基酸残基小肽或直接降解成为游离氨基酸才能被吸收。寡肽(主要是二肽和三肽)和氨基酸存在两种互相独立的吸收转运系统,短链肽可以通过两类肽运载体直接吸收进入血液,吸收速度快,生物活性显著<sup>[23]</sup>。寡肽比大肽更易吸收,寡肽中的二肽和三肽能被完整的吸收,而肠道对于大于三肽的寡肽的吸收慢于二肽、三肽,且在肠道内进一步水解为二、三肽后才能被人体完整的吸收利用<sup>[24]</sup>。但也有研究发现四肽、五肽甚至六肽都能被吸收<sup>[25]</sup>。有证据表明,含有脯氨酸、羟脯氨酸的寡肽易于被吸收进入门静脉并在血液中以完整的形式出现,这些肽对细胞内肽酶有一定的抵抗力<sup>[26]</sup>。根据日本德国的研究,分子量180~1000 u之间的胶原蛋白肽具有较好的生理活性及能够被人体很好的吸收和利用,因此广泛应用于保健食品、化妆品、医药行业作为功能因子有巨大的开发价值。

### 3 结论

本文以罗非鱼鱼皮为原料,研究利用酶法制备胶原蛋白肽制品。测定了罗非鱼皮的基本组成成分,利用低温连续相变萃取技术对鱼皮进行脱脂处理,脱脂后的鱼皮脂肪含量仅为0.70±0.10%。综合比较水解度,分子量分布及感官评价情况对蛋白酶筛选确定碱性蛋白酶为最适合的水解酶;再通过单因素实验和响应面法对鱼皮胶原肽制备工艺进行优化酶解的最佳工艺条件为:时间7 h、加酶量7%、温度60℃、pH值10.38,在此条件下碱性蛋白酶水解罗非鱼皮的水解度最高可达23.01%。碱性蛋白酶最佳工艺条件生产的胶原蛋白肽经评定小组的感官评定,结果为有轻微腥味和较弱苦涩味的白色粉末。对其分子量进行测定,发现该胶原蛋白肽的分子量分布较好,分子质量180~1000 u之间的寡肽(约2~8个氨基酸残基)占70.70%。因此,本文为生产鱼皮胶原肽产品提出了新的思路,为其工业化提供了理论支持。

### 参考文献

- [1] 俞艺萍,陆利霞,熊晓辉.鱼皮胶原蛋白提取研究进展[J].食品研究与开发,2010,31(12):262-265  
YU Yi-ping, LU Li-xia, XIONG Xiao-hui. Research progress on extracting collagen from fish skin [J]. Food Research and Development, 2010, 31(12): 262-265
- [2] 夏克东,刘振锋,田少君,等.鱿鱼皮胶原蛋白肽生理功能的研究进展[J].食品研究与开发,2015,36(17):163-168  
XIA Ke-dong, LIU Zhen-feng, TIAN Shao-jun, et al. Research progress of the bioactive functions of proteins and peptides from squid skin [J]. Food Research and Development, 2015, 36(17): 163-168
- [3] 陈华,易湘茜,陈忻,等.海洋胶原蛋白肽的制备及生物活性研究进展[J].中国食物与营养,2010,8:57-60  
CHEN Hua, YI Xiang-xi, CHEN Xin, et al. Advancement of the preparation and bioactivities of ocean collagen peptides [J]. Food and Nutrition in China, 2010, 8: 57-60
- [4] Yamazaki K, Takas S, Hara H. Process for producing a low-molecular weight peptide composition and nutrient agent containing the same: Unite State, 4452888 [P] 1984-06
- [5] ZENG Shao-kui, ZHANG Chao-hua, LIN hong, et al. Isolation and characterization of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 879-883
- [6] 农业部渔业局.中国渔业年鉴[M].北京:中国农业出版社,2017  
Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture. China Fisheries Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017
- [7] Evelien Dekkers, Sivakumar Raghavan, Hordur G Kristinsson, et al. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2011, 124(2): 640-645
- [8] Kuochiang H. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product [J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 42-48
- [9] 胡爱军,闫伟,郑捷,等.酶法水解真鲷鱼皮和鱼鳞制取胶原蛋白肽[J].食品工业,2012,33(10):65-68  
HU Ai-jun, YAN Wei, ZHENG Jie, et al. Enzymatic preparation of collagen peptide from the skin and scale of red sea bream [J]. The Food Industry, 2012, 33(10): 65-68
- [10] Liu C M, Liang H Y, Liu W. Study on scavenging efficacy of peptides from *Oreochromis niloticus* skin [J]. Food Research and Development, 2007, 11(11): 148-151
- [11] 闫鸣艳,秦松.聚集条件对罗非鱼皮I型胶原自聚集动力学的影响[J].食品工业科技,2016,37(2):93-97  
YAN Ming-yan, QIN Song. Effect of the aggregation conditions on the kinetic self-assembly of type I collagen from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(2): 93-97
- [12] Gomez-guillen M C, Gimenez B, Lopez-caballero M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 25(8): 1813-1827
- [13] 王国强,何力,贾鲁君,等.长鳍金枪鱼鱼皮胶原蛋白肽制备

- 工艺的研究[J].食品研究与开发,2016,37(7):105-110
- WANG Guo-qiang, HE Li, JIA Lu-jun, et al. Study on the preparation of collagen peptide from albacore tuna skin [J]. Food Research and Development, 2016, 37(7): 105-110
- [14] 黄薇,邓尚贵,唐艳,等.鳕鱼皮复合肽的制备工艺研究[J].浙江海洋学院学报(自然科学版),2011,30(5):401-404
- HUANG Wei, DENG Shang-gui, TANG Yan, et al. Preparation conditions of cod skin peptides by compound enzyme [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2011, 30(5): 401-404
- [15] Khiari Z, Rico D, Martin-diana A B, et al. Structure elucidation of ACE-inhibitory and antithrombotic peptides isolated from mackerel skin gelatine hydrolysates [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(8): 1663-1671
- [16] Cattaneo F, Sayago J E, Alberto M R, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities, functional properties and mutagenicity studies of protein and protein hydrolysate obtained from *Prosopis alba* seed flour [J]. Food Chemistry, 2014, 161(11): 391-399
- [17] Jia J, Zhou Y, Lu J, et al. Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(4): 635-640
- [18] 郭玉华,李钰金,吴新颖,等.鳕鱼皮胶原蛋白肽酶解液脱色脱腥工艺的研究[J].中国食品添加剂,2010,4:125-128
- GUO Yu-hua, LI Yu-jin, WU Xin-ying, et al. Study on decolorizing and deodorization of cod skin enzymolysis collagen peptide liquid [J]. China Food Additives, 2010, 4: 125-128
- [19] 丛瑶,黄婧,阿依夏穆·买买提,等.鱼皮胶原蛋白肽脱腥脱色工艺研究[J].河北农机,2017,7:66-68
- CONG Yao, HUANG Jing, Aishamu Maimaiti, et al. Study on decolorizing and deodorization of collagen peptide from fish skin [J]. Hebei Agricultural Machinery, 2017, 7: 66-68
- [20] 张寒俊,杨国燕,张蕾.碱性蛋白酶水解罗非鱼皮提取胶原蛋白肽的最佳条件研究[J].食品研究与开发,2008,29(9):20-23
- ZHANG Han-jun, YANG Guo-yan, ZHANG Lei. Study on the optimization technology of the extraction of collagen peptides from tilapia skin [J]. Food Research and Development, 2008, 29(9): 20-23
- [21] 曹庸.一种多功能连续相变萃取装置:中国,CN103349849B [P]2014-09-03
- CAO Yong. A multi-function continuous phase transition extraction device: China, CN103349849B [P] 2014-09-03
- [22] 周先艳,樊建,唐远龙,等.罗非鱼皮胶原蛋白水解产物的体外抗氧化活性和体内抗衰老作用[J].食品科学,2016,37(15):221-226
- ZHOU Xian-yan, FAN Jian, TANG Yuan-long, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-aging effect of tilapia skin gelatin hydrolysates [J]. Food Science, 2016, 37(15): 221-226
- [23] Ziv E, Bendayan M. Intestinal absorption of peptides through the enterocytes [J]. Microscopy Research and Technique, 2000, 49(4): 346-352
- [24] 李勇.生物活性肽研究现状和进展[J].食品与发酵工业,2007,33(1):3-9
- LI Yong. Current progress and advances of study on bioactive peptides [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(1): 3-9
- [25] Lei L, Sun H, Liu D, et al. Transport of Val-Leu-Pro-Val-Pro in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cell Monolayers [J]. J Agric Food Chem., 2008, 56(10): 3582-3586
- [26] Bejjani S, Wu J. Transport of IRW, an Ovotransferrin-Derived Antihypertensive Peptide, in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells [J]. J Agric Food Chem., 2013, 61(7): 1487-1492