

多种酶复合制备鸡皮胶原蛋白短肽

曾庆冉¹, 张 慜^{*1}, 陈世豪²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 广东嘉豪食品股份有限公司, 广东 中山 528447)

摘要:以鸡皮为原料,采用酶法提取胶原蛋白肽。研究了酶的种类、加酶量、酶解时间、酶解温度以及 pH 值对水解度和多肽质量浓度的影响,采用正交实验对酶解条件进行了优化。结果表明,当采用木瓜蛋白酶+胰蛋白酶+风味蛋白酶复合水解,加酶量为 0.9%、酶解时间 3 h、酶解温度 45 ℃及 pH 为 7 时,为酶解最佳条件。

关键词:鸡皮;胶原蛋白肽;水解;优化

中图分类号:Q 516 **文献标志码:**A **文章编号:**1673—1689(2013)02—0129—06

Study on Various Enzymatic Hydrolysis of Chicken Skin for Collagen Peptides

ZENG Qing-ran¹, ZHANG Min^{*1}, CHEN Shi-hao²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Guangdong Jiahao Food Ltd. Co, Zhongshan 528447, China)

Abstract: The collagen peptides from chicken skin has been extracted by using enzyme method. In addition, the effects of enzyme types, enzyme concentration, hydrolysis time, hydrolysis temperature and pH on peptide hydrolysis were studied, and the extraction conditions were optimized by orthogonal experiment. The results shows that the optimum enzyme was papain add trypsin add flavorzyme and the optimum concentration of enzyme was 0.9%, the time of enzyme hydrolysis was 3 hours, the temperature of enzyme hydrolysis was 45 ℃ and pH was 7.

Keywords: chicken skin, collagen peptides, hydrolysis, optimization

胶原蛋白是哺乳动物体内含量最丰富、分布较广的蛋白质之一,其应用领域包括生医材料、化妆品、食品工业等^[1]。对于人体,胶原蛋白的作用可以说毋庸置疑,无论是对于美容保养还是生命健康,胶原蛋白都发挥着重要作用。然而,由于胶原蛋白属大分子级别的蛋白质,具有十分稳定的三股超螺

旋结构,而造成其消化困难,不易被人体充分利用。研究表明,大量氨基酸是以 2~6 个氨基酸组成的寡肽形式被吸收,寡肽有助于肠道吸收。在氨基酸运输系统功能出现障碍的情况下,摄入寡肽却能获得很好的吸收效果。因此需要将胶原蛋白水解为相对分子质量较低的胶原短肽^[2]。目前胶原蛋白水

收稿日期: 2012-02-23

基金项目: 国家“863”计划重点项目(2011AA100802)。

* 通信作者: 张 慜(1962—),男,浙江平湖人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事农产品贮藏与加工方面的研究。

E-mail: min@jiangnan.edu.cn

解方式分为酸法、碱法和酶法。而酶法水解比传统的酸法、碱法水解更加温和、安全、专一性强,并且时间短,无环境污染。

由于胶原蛋白多肽对增强防病抗病能力、延缓衰老等方面都具有深远意义,目前,开发和研究生物活性肽类食品在国际保健品行业中已成为一个焦点。富含胶原蛋白最多的原料是猪皮、牛皮、猪骨头和牛骨头。Siriporn Damrongsakkul 等用木瓜蛋白酶和中性蛋白酶水解牛皮提取胶原蛋白^[3],李兴武、章黎黎等利用猪副产物酶法制备胶原多肽^[4]。然而,由于人们对陆生哺乳动物胶原蛋白及其制品的安全性产生了质疑,因此目前工作就是寻找新的提取胶原多肽的原料来源^[5]。贾冬英等也首次尝试从鲢鱼头及骨中提取胶原蛋白^[6]。然而据了解,目前从鸡皮等禽源性皮中提取胶原蛋白还未见过多报道,而鸡肉在中国已成为仅次于猪肉的第二大肉类消费品。因此研究和开发从鸡皮中提取胶原蛋白不仅可以充分利用鸡皮资源,提高鸡肉产品的附加值,还能保护环境,扩大胶原蛋白的原料来源,同时拓宽了胶原蛋白的应用范围。因此,作者以鸡皮为原料,提取胶原蛋白多肽,旨在为进一步开发利用鸡皮提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鸡皮:取自无锡欧尚超市童子鸡。购买后清洗去皮,将鸡皮沥干后测其基本成分,结果见表1。

表1 原料的基本成分

Table 1 Material's mainly composition

鸡皮	质量分数/%
水分/%	50.58
脂肪/%	37.62
蛋白质/%	11.14
灰分/%	0.45

将沥干后的鸡皮用剪刀剪成小的正方形(1 cm×1 cm),然后将其放入自封袋中于-20℃冷冻保藏,保藏时间不能大于一个月。

1.2 试剂

胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶 Flavourzyme、复合蛋白酶 PROTAMAX、水解蛋白酶 Novozym 37071:诺维信生物技术有限公司。SDS-

PAGE 超低相对分子质量标准品:上海源叶生物科技有限公司(相对分子质量范围3 313~20 100);牛血清白蛋白、SDS、脲、过硫酸铵、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、Tris、Tricine、TEMED、氢氧化钠、氯化钠、正丁醇、盐酸、浓硫酸、硼酸、硫酸钾、硫酸铜、乙醚、三氯乙酸等试剂:均为分析纯。

1.3 仪器与设备

实验室 pH 计 FE20:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;电子天平 PL203:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;CJJ78-1 型磁力加热搅拌器:金坛市大地自动化仪器厂;SIGMA2-16PK 离心机:北京博励行仪器有限公司;HH-S 型水浴锅:郑州长城科工贸有限公司;UV-9100 型紫外可见光谱仪:北京瑞丽产品;U410 超低温冰箱:New BRUNSWICK SCIENTIFIC CO.;冷冻干燥机:作者所在实验室自行设计组装;DYY-8C 型电泳仪:北京市六一仪器厂;氨基酸自动分析仪。

1.4 实验方法

1.4.1 原料预处理 由于鸡皮中含有一定的脂肪和杂蛋白质,因此在水解前需要去除杂蛋白质和脂肪。取剪碎后的鸡皮加入质量浓度为 10 g/dL 的 NaCl 溶液中(料液比为 1:10),4℃搅拌浸提 12 h 去除杂蛋白质,然后用蒸馏水反复清洗至 pH 值接近中性。用两层纱布过滤后加入质量浓度为 10 g/dL 的正丁醇溶液,4℃搅拌浸提 24 h 去除脂肪,用大量蒸馏水反复清洗得脱杂蛋白质和脂肪的鸡皮^[7]。

1.4.2 鸡皮胶原蛋白肽制备工艺 将预处理后的鸡皮按料液比 1:10 的比例加水,在一定条件下酶解,然后于 85℃下灭酶 10 min,灭酶后将酶解液迅速冷却至适温,经 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液浓缩,冷冻干燥后即得鸡皮胶原蛋白多肽^[8-9]。

1.4.3 分析测定方法

1)水解度的测定:采用双指示剂甲醛滴定法^[10]。

2)多肽含量的测定:将 5 mL 10%三氯乙酸溶液添加到 5 mL 待测样品中,于旋涡混合仪上混合均匀,静置 10 min,在 4 000 r/min 下离心 20 min,取上清液用双缩脲法测可溶性氮含量^[11]。

3)氨基酸含量及组成分析:准确量取 5 mL 胶原蛋白多肽溶液于水解管内,并加入 6 mol/L 盐酸 10 mL,抽真空,封口,在 110℃恒温干燥箱内水解 24 h 后取出。冷却后将水解液过滤后转移至 50 mL 容量瓶定容。吸取滤液 1 mL 于 5 mL 容量瓶内,用

真空干燥器在 40~50 ℃干燥,最后蒸干,用 1 mL pH 2.2 的缓冲液溶解后用氨基酸自动分析仪分析测定^[12]。

4) 多肽相对分子质量分布测定:用含脲的 Tricine-SDS-PAGE 方法^[13-15]。

聚丙烯酰胺凝胶制备见表 2。先制备分离胶,聚合后再制备夹层胶,最后制备浓缩胶。三种胶长度比例 4:1:1.5。电泳时电压为 30 V;1 h 后变为 100 V 至结束。将胶在固定液中(0.5%戊二醛、30%乙醇加 ddH₂O 到 100 mL)固定 30 min,再用考马斯亮蓝 G-250 系统染色 30 min,然后用脱色液脱色。

表 2 聚丙烯酰胺凝胶配方

Table 2 Polyacrylamide gel formula

组分	分离胶	夹层胶	浓缩胶
49.5%T 3%C	—	0.407 mL	0.160 mL
49.5%T 5%C	2 mL	—	—
凝胶缓冲液	2 mL	0.667 mL	0.496 mL
脲	2.16 g	—	—
ddH ₂ O	—	0.926 mL	1.344 mL
10%AP	80 μL	20 μL	20 μL
TEMED	10 μL	5 μL	5 μL

2 结果与分析

2.1 酶种类的选择

由于利用复合酶水解,提取率高且平均相对分子质量较小,因此为了能够得到较多相对分子质量较小的多肽,选用三种酶复合对鸡皮水解。选择比较了胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶 Flavourzyme、复合蛋白酶 PROTAMEX、水解蛋白酶 Novozym 37071 的水解效果,以及两个酶复合的水解效果,从而选用 1(木瓜蛋白酶+胰蛋白酶+复合蛋白酶)、2(木瓜蛋白酶+胰蛋白酶+风味蛋白酶)、3(木瓜蛋白酶+风味蛋白酶+复合蛋白酶)、4(Novozyym37071 蛋白酶+木瓜蛋白酶+风味蛋白酶)、5(胰蛋白酶+风味蛋白酶+复合蛋白酶)按 1:1:1 对鸡皮水解。取一定量预处理的鸡皮,按料液比 1:10 加入蒸馏水,按鸡皮质量的 1%加入复合酶,在 50 ℃下酶解 3 h,灭活、离心、冷冻干燥,结果见图 1。由图 1 可知,利用 2(木瓜蛋白酶+胰蛋白酶+风味蛋白酶)复合水解,在相同条件下,水解度和多肽含量最高,故采用木瓜蛋白酶+胰蛋白酶+风味蛋白酶 1:1:1 复合水解。

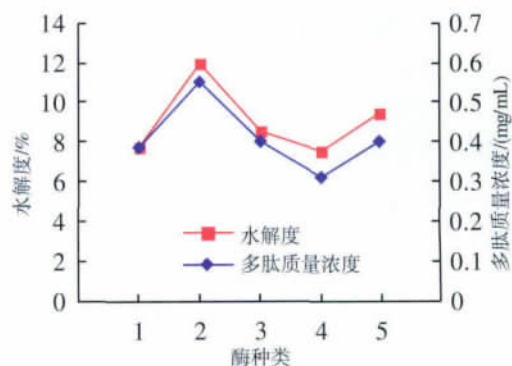


图 1 酶的种类对多肽水解效果的影响

Fig. 1 Effects of enzymatic types on peptide hydrolysis

2.2 pH 值的影响

取一定量的鸡皮,按 1:10 的料液比加入蒸馏水,按鸡皮质量的 1%加入复合酶,在 50 ℃,分别于 pH 5~8.5 下酶解 3 h,考察 pH 值对肽水解效果的影响,结果见图 2。由图 2 可知,在 pH 5~8.5 范围内,随着 pH 的变化,水解度和多肽质量浓度均有所不同,其中在 pH 7 时,多肽质量浓度最高,水解度较高;在 pH 7.5 时水解度最高,而多肽质量浓度有所下降,但下降不是很多。说明在 pH 7~7.5 时,复合酶的活性和稳定性最好,因此最适酶解 pH 为 7~7.5。

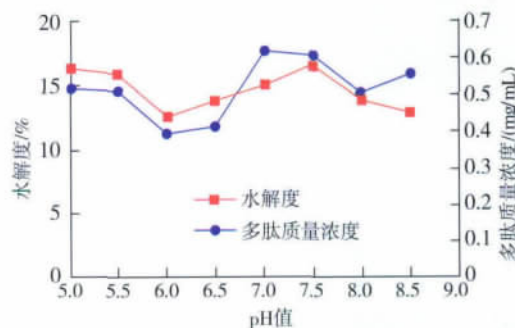


图 2 pH 值对多肽水解效果的影响

Fig. 2 Effects of pH on peptide hydrolysis

2.3 酶解时间的确定

取一定量的鸡皮,按 1:10 的料液比加入蒸馏水,调节 pH 值至 7 左右,按鸡皮质量的 1%加入复合酶,在 50 ℃下进行水解,分别酶解不同时间后,灭酶、离心、冷冻干燥。考察酶解时间对肽水解效果的影响,结果见图 3。由图 3 可知,随着酶解时间的延长,水解度和多肽质量浓度也呈上升趋势,但 3 h 后水解度上升趋势减弱,且多肽质量浓度出现下降,这可能是由于多肽进一步水解为氨基酸的原因^[16]。因此,在对相对分子质量大小影响不大的前提下,为

了获得较多多肽,初步确定酶解时间为 3 h。

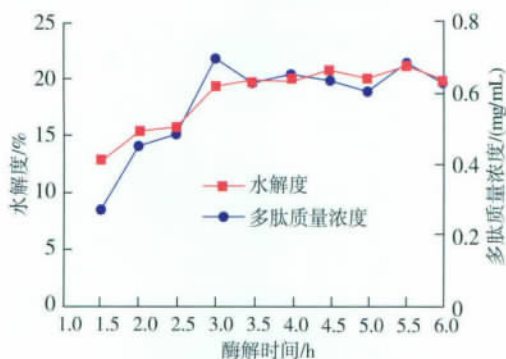


图 3 酶解时间对多肽水解效果的影响

Fig. 3 Effects of hydrolysis time on peptide hydrolysis

2.4 加酶量的确定

取一定量的鸡皮,按 1:10 的料液比加入蒸馏水,调节 pH 值至 7 左右,按鸡皮质量的不同百分比加入复合酶,在 50 ℃下酶解 3 h,灭酶、离心、冷冻干燥。考察加酶量对多肽水解效果的影响,结果见图 4。由图 4 可知,当加酶量较低时,水解度和多肽质量浓度会随加酶量的增加而快速上升,当加酶量为 0.8% 时,多肽质量浓度最大,但是当加酶量大于 0.8% 时,多肽质量浓度会随加酶量的增加而减少,而水解度也没用明显变化,这是因为当酶的浓度相对于底物浓度较低时,加大酶的用量可以有效加快酶解反应速度,但是当酶的浓度相对于底物浓度较高时,反应速率开始由底物浓度控制,所以继续增加酶的用量对水解度的影响不大。而相反,由于酶的浓度相对较大,从而使一部分多肽进一步水解为氨基酸,从而使多肽质量浓度降低。所以最适的加酶量为鸡皮质量的 0.8%。

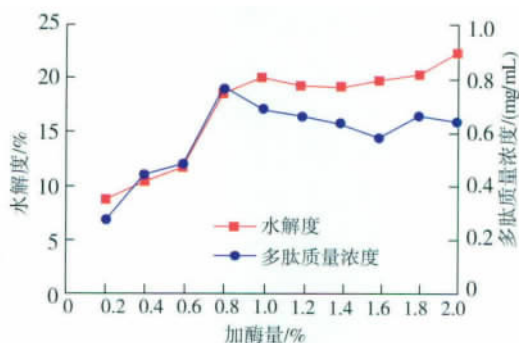


图 4 加酶量对水解效果的影响

Fig. 4 Effects of enzyme concentrations on peptide hydrolysis

2.5 酶解温度的确定

取一定量的鸡皮,按 1:10 的料液比加入蒸馏

水,调节 pH 值至 7 左右,按鸡皮质量的 0.8% 加入复合酶,在不同温度下,酶解 3 h,灭酶、离心、冷冻干燥。考察温度对多肽水解效果的影响,结果见图 5。温度对鸡皮水解反应影响较大,在 35~50 ℃ 时,水解度随着温度升高不断增大,多肽质量浓度也不断增加,在 50 ℃ 时达到最大,当温度高于 50 ℃ 时水解度开始下降,多肽质量浓度降低。这是因为温度对酶解反应速度具有双重影响,升高温度可加快酶解反应速度,同时当温度过高时,酶容易变性,酶活力容易降低,故采用温度为 50 ℃ 进行酶解。

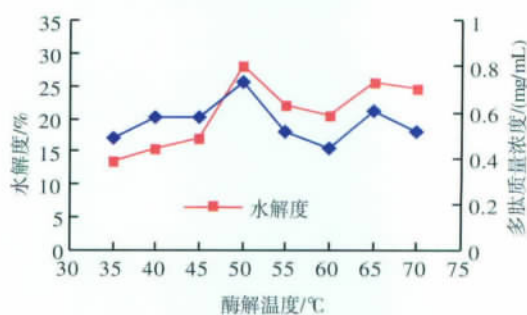


图 5 酶解温度对多肽水解效果的影响

Fig. 5 Effects of hydrolysis temperature on peptide hydrolysis

2.6 最佳酶解条件的确定

在初步确定酶解条件的基础上,选择酶解时间、pH 值、加酶量和温度等因素,并以多肽质量浓度为评判指标进行正交试验,试验安排及结果见表 3。由表 3 可知,各因素对水解效果影响的顺序为温度>加酶量>酶解时间>pH 值,其最佳工艺组合为 pH 7,温度 45 ℃,酶解时间 3 h,加酶量 0.9%。鸡皮在该条件下酶解,其水解液中多肽质量浓度最高,可达 1.32 mg/mL。

2.7 鸡皮胶原蛋白肽的理化分析

2.7.1 多肽氨基酸含量及组成分析 胶原蛋白多肽的氨基酸组成见表 4。从表 4 可以看出,在鸡皮胶原蛋白多肽中共含有 18 种氨基酸,其中甘氨酸所占比例最大,占 21.63%,与脯氨酸比例约 3:1,复合胶原蛋白氨基酸的基本构成。脯氨酸次之,约占 13.17%,而羟脯氨酸是胶原蛋白特有的一种氨基酸,对于稳定胶原蛋白的三螺旋结构起到一定作用。另外,从表 4 中还可以看出,胶原蛋白中不含色氨酸,几乎不含半胱氨酸。说明酶解的胶原蛋白中几乎不含其他型胶原蛋白。而苯丙氨酸、异亮氨酸、组氨酸的质量分数较低,符合胶原蛋白质的性

质^[17]。

表 3 优化酶解条件正交试验设计及结果

Table 3 Design and results of orthogonal experiment for optimization of hydrolysis conditions

试验号	pH 值	温度/℃	酶解时间/h	加酶量/%	多肽质量浓度/(mg/mL)
1	6.5	45	2.5	0.7	0.78
2	6.5	50	3	0.8	0.68
3	6.5	55	3.5	0.9	0.73
4	7	45	3	0.9	1.27
5	7	50	3.5	0.7	0.71
6	7	55	2.5	0.8	0.68
7	7.5	45	3.5	0.8	0.82
8	7.5	50	2.5	0.9	0.68
9	7.5	55	3	0.7	0.68
K_1	0.729	0.956	0.713	0.722	
K_2	0.885	0.688	0.876	0.725	
K_3	0.726	0.697	0.751	0.893	
R	0.159	0.268	0.163	0.171	

2.7.2 多肽相对分子质量测定 胶原蛋白多肽的 SDS-PAGE 电泳图见图 6。M 为超低相对分子质量标准蛋白质和多肽:从下至上分别是 3 313、5 856、7 823、14 400、20 100。Tricine-SDS-PAGE 结果显示:位于 5 856~20 100 之间没有明显条带,而在 3 313~5 856 之间有明显的两条带,在 3 313 稍下部分有一条带,说明酶解多肽的相对分子质量主要集中在 2 000~5 000 之间。

参考文献:

- [1] 李二凤,何小维,罗志刚. 胶原蛋白在食品中的应用[J]. 中国乳品工业,2006(2):50-52.
LI Er-feng, HE Xiao-wei, LUO Zhi-gang. Application of collagen to food industry[J]. **China Dairy Industry**, 2006(2):50-52. (in Chinese)
- [2] 赵利,苏伟,胡火根,等. 胶原蛋白生物活性肽的研究进展[J]. 食品科学,2005(9):578-581.
ZHAO Li, SU Wei, HU Huo-gen, et al. Research progress of collagen peptides [J]. **Food Science**, 2005 (9):578-581. (in Chinese)
- [3] Siriporn Damrongsakkul, Kongpob Ratanathamman, Kittinan Komolpis, et al. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase[J]. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2008(14):202-206.
- [4] 李兴武,章黎黎. 利用猪副产物酶法制备胶原多肽[J]. 肉类研究,2010(5):83-87.
LI Xing-wu, ZHANG Li-li. Preparation of collagen peptide from pig by-products by enzymatic way [J]. **Meat Research**, 2010

表 4 胶原蛋白多肽的氨基酸组成

Table 4 Amino acid composition of collagen polypeptides

氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%
天冬氨酸	7.74	酪氨酸	2.69
谷氨酸	10.07	半胱氨酸	0.05
丝氨酸	2.67	缬氨酸	2.37
组氨酸	2.14	蛋氨酸	0.47
甘氨酸	21.63	苯丙氨酸	1.99
苏氨酸	2.60	异亮氨酸	1.85
精氨酸	8.44	亮氨酸	2.87
丙氨酸	8.45	脯氨酸	8.50
赖氨酸	2.30	羟脯氨酸	13.17

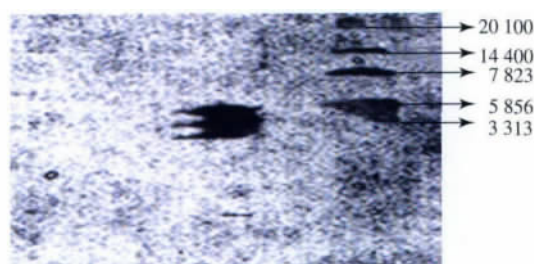


图 6 胶原蛋白多肽的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 6 SDS -PAGE electrophoretogram of collagen polypeptide

3 结 语

以鸡皮为原料,采用酶水解法提取胶原蛋白多肽,并用正交实验对胶原蛋白肽的提取工艺进行优化,并测定了鸡皮的基本组成成分和多肽的氨基酸组成相对分子质量。结果表明,采用木瓜蛋白酶+胰蛋白酶+风味蛋白酶复合水解,当在 pH 为 7,加酶量为 0.9%,酶解温度为 45 ℃,酶解时间 3 h 时,水解度最好,多肽含量最大。

- (5):83-87.(in Chinese)
- [5] M C Gomez-Guillen, B Gimenez. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review [J]. **Food Hydrocolloids**, 2011(25):1813-1827.
- [6] 贾冬英, 赵宏铭. 鲢鱼头及骨中蛋白质的酶解条件优化[J]. 食品科技, 2007(4):243-246.
JIA Dong-ying, ZHAO Hong-ming. Enzymatic extraction of protein from the head and bone of silver carp by papain [J]. **Food Science And Technology**, 2007(4):243-246.(in Chinese)
- [7] Prabjeet Singh, Soottawat Benjakul. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) [J]. **Food Chemistry**, 2011(124):97-105.
- [8] Krzysztof Surowka, M Fik. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: -application of pepsin to the production of protein hydrolysate [J]. **J Sci Food Agric**, 1994(65):289-296.
- [9] 宋芹, 颜军. 酶法制取罗非鱼鱼鳞胶原蛋白寡肽的工艺[J]. 食品研究与开发, 2011(4):39-43.
SONG Qin, YAN Jun. Study on extracion technology of tilapia fish scale collagen oligopeptide [J]. **Food Research And Development**, 2011(4):39-43. (in Chinese)
- [10] 大连轻工业学院, 华南理工大学. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [11] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005(7):169-171.
LU Wei, REN Guo-pu, SONG Jun-mei. Determination of content of peptides in protein hydrolysates [J]. **Food Science**, 2005(7):169-171. (in Chinese)
- [12] Jinhan Shon, Ji-Hyun Eo. Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from skate (*Raja kenoi*) skins [J]. **Food Sci Biotechnol**, 2011(1):99-106.
- [13] 曹佐武. 有效分离 1kDa 小肽的 Tricine-SDS-PAGE 方法[J]. 中国生物工程杂志, 2004(1):74-76.
CAO Zuo-wu. Tricine-SDS-PAGE for the effective separation of 1KDa peptides [J]. **China Biotechnology**, 2004(1):74-76. (in Chinese)
- [14] 王旭, 何冰芳, 李霜, 等. Tricine-SDS-PAGE 电泳分析小分子多肽[J]. 南京工业大学学报, 2003(2):79-81.
WANG Xu, HE Bing-fang, LI Shuang, et al. Tricine-SDS-PAGE electrophoresis analysis of low molecular peptides [J]. **Journal of Nanjing University of Technology**, 2003(2):79-81.(in Chinese)
- [15] 石继红, 赵永同, 张英起, 等. 应用 SDS-PAGE 显示小分子多肽技术的探讨[J]. 生物工程进展, 2001(1):38-41.
SHI Ji-hong, ZHAO Yong-tong, ZHANG Ying-qi, et al. Study on analysing methods of low molecular peptides with SDS-polyacrylamide Gel electrophoresis [J]. **Biological Project Progress**, 2001(1):38-41. (in Chinese)
- [16] 邵伟, 邓院芳, 陈菽. 鲢鱼皮胶原蛋白肽酶解法制备工艺条件研究[J]. 中国酿造, 2010(7):120-122.
SHAO Wei, DENG Yuan-fang, CHEN Shu. Production of collagen peptide from bullhead skin by peptide hydrolase [J]. **China Brewing**, 2010(7):120-122.(in Chinese)
- [17] 梁拥军, 孙向军. 罗非鱼鱼皮胶原蛋白多肽的制备及其理化性质研究[J]. 安徽农业科学, 2009(4):1588-1590.
LIANG Yong-jun, SUN Xiang-jun. Study on the preparation and physicochemical characteristics of bioactive peptides from tilapia skin collagen [J]. **Journal of Anhui Agri Sci**, 2009(4):1588-1590.(in Chinese)