

超声辅助酶解制备草鱼鳞胶原肽及其理化特性评价

赵钰¹, 余小月¹, 熊喆¹, 秦子波¹, 王希搏², 荣建华^{1,2}, 熊善柏^{1,2}, 胡杨^{1,2*}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心, 湖北武汉 430070)

(2. 生物活性肽技术湖北省工程研究中心, 湖北荆州 434000)

摘要:以草鱼鳞为原料, 基于研究室原有工艺条件, 在酶解过程中施加超声, 研究超声功率(0~600 W)和超声时间(0~40 min)对胶原肽得率及理化特性的影响。结果表明, 超声对产物得率影响显著。单酶酶解使用碱性蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶。超声条件增加, 水解度和氮收率先升高后降低; 在碱性蛋白酶酶解时施加 300 W、20 min 超声, 水解度从 5.37% 升到 7.27%; 分步酶解使用碱性蛋白酶和风味酶, 在每步酶解各施加 300 W、10 min 超声时, 水解度从 9.26% 升到 11.05%。超声对产物分子量和氨基酸含量有一定影响, 产物分子量集中在 500 u~1 ku, 单酶酶解胶原肽在该段分布从 24.26% 升至 33.99%, 分步酶解胶原肽在该段分布从 31.99% 升至 39.28%; 单酶酶解氨基酸含量从 66.30 g/100 g 升至 73.75 g/100 g; 分步酶解从 66.05 g/100 g 升至 70.70 g/100 g。超声对产物乳化性、起泡性和泡沫稳定性影响显著。综上, 单酶酶解最佳工艺为碱性蛋白酶酶解中施加 300 W、20 min 超声; 分步酶解最佳工艺为在每步酶解中各施加功率 300 W、时间 10 min 的超声。

关键词: 草鱼鳞; 超声; 水解度; 氮收率; 胶原肽; 理化特性

文章编号: 1673-9078(2022)09-159-170

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1227

Grass Carp Scale Collagen Peptide Preparation by Ultrasound-assisted Enzymatic Hydrolysis and Their Physicochemical Property Evaluation

ZHAO Yu¹, YU Xiaoyue¹, XIONG Zhe¹, QIN Zibo¹, WANG Xibo², RONG Jianhua^{1,2}, XIONG Shanbai^{1,2}, HU Yang^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, The Sub Center (Wuhan) of National Technology and R&D of Staple Freshwater Fish Processing, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

(2. Bioactive Peptide Technology Hubei Engineering Research Center, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Collagen peptides were extracted from grass carp scales by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis to explore the effects of ultrasonic power (0~600 W) and duration (0~40 min) on the yield, degree of hydrolysis, and physicochemical properties of the collagen peptides obtained. Alkaline proteinase, compound proteinase, and neutral protease were used during single-enzyme enzymatic hydrolysis. Ultrasound treatment significantly influenced the yield. However, the degree of hydrolysis and nitrogen yield initially increased and then decreased upon ultrasound application. In particular, 300 W ultrasound treatment for 20 min during alkaline protease-mediated hydrolysis increased the degree of hydrolysis from 5.37% to 7.27%. In addition, a 10 min 300 W ultrasound treatment during step-wise enzymatic hydrolysis with alkaline protease and flavourzyme, increased the degree of hydrolysis from 9.26% to 11.05%. Ultrasound also influences the molecular weight distribution and amino acid composition of the products. The molecular weight of the products was mainly within 500 and 1000 u. The content of collagen peptides extracted by single-enzyme enzymatic hydrolysis increased from 24.26% to 33.99%, while the content of collagen peptides prepared by step-by-step enzymolysis increased from 31.99% to 39.28%. Meanwhile, the amino acid content of products from single-enzyme enzymatic

引文格式:

赵钰,余小月,熊喆,等.超声辅助酶解制备草鱼鳞胶原肽及其理化特性评价[J].现代食品科技,2022,38(9):159-170

ZHAO Yu, YU Xiaoyue, XIONG Zhe, et al. Grass carp scale collagen peptide preparation by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis and their physicochemical property evaluation [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 159-170

收稿日期: 2021-11-04

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-45-28); 高蛋白桑树草本化栽培及桑叶肽产品研发关键技术研究示范 (2021BBA089)

作者简介: 赵钰 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 淡水鱼加工副产物高值化利用, E-mail: Zhaoyuzy1997@163.com

通讯作者: 胡杨 (1987-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工及副产物综合利用, E-mail: huyang@mail.hzau.edu.cn

hydrolysis and step-by-step enzymolysis increased from 66.30 g/100 g to 73.75 g/100 g and 66.05 g/100 g to 70.70 g/100 g, respectively. Furthermore, ultrasound treatment also significantly affected the emulsification performance, foaming capability, and foam stability of the products. To sum up, single-enzyme hydrolysis can be optimized by 20 min 300 W ultrasound treatment during alkaline protease hydrolysis, while step-by-step enzymolysis can be optimized by 10 min 300 W ultrasound treatment during alkaline protease hydrolysis and another 10 min 300 W treatment during flavourzyme hydrolysis.

Key words: grass carp scales; ultrasound; degree of hydrolysis; nitrogen yield; collagen peptides; physicochemical properties

草鱼作为四大家鱼之一,是我国主要的淡水养殖经济鱼种,2020年我国淡水养殖草鱼产量为 5.57×10^6 t,位于四大家鱼之首^[1]。在草鱼加工过程中,会产生大量的加工副产物,这些加工副产物除了少部分被制成了鱼粉或一些低附加值的产品外,绝大多数被掩埋或者丢弃,同时也导致了环境污染的问题。草鱼鳞含有丰富的蛋白质,是一种良好的胶原肽制备原料。胶原肽是胶原经适度水解后得到的单条肽链组成在两个氨基酸以上,且90%以上的分子量小于10 000 u的产品,其在医药、食品、化妆品等领域均有着广阔的应用前景。

酶解法因具有安全、环保、易控制等优点,是制备草鱼鳞胶原肽的主流方法^[2,3]。目前已有不少学者通过单酶酶解^[4]或多酶酶解^[5]的方法酶解青鱼鱼鳞、罗非鱼鱼鳞、草鱼鱼鳞等制备了一系列鱼鳞胶原肽产品^[6-8]。当前为了进一步提高酶解效果,加快酶解进程,利用一些物理化学的加工手段辅助酶解受到了很多研究学者的关注。其中,超声处理是一种行之有效的催化方法和技术手段,由于其具有环保和操作方便的特点,被广泛用于食品中蛋白质或多糖的分离提取^[9,10]。一般超声辅助酶解的作用模式可以分为超声对原料改性模式、超声对酶改性模式和超声作用酶解过程模式。目前大部分的超声辅助酶解工艺中,采用的模式多为超声对原料改性模式,即超声仅作为一种预处理的方式。也有学者通过这种超声预处理的方式制备了草鱼鳞胶原肽^[11]。然而采用超声作用酶解过程的模式,使超声同时作用于原料底物和酶以及酶解过程,并考察处理条件对产品得率及品质影响的研究缺乏深入探索。

本课题旨在以草鱼鳞为原料,基于实验室的基础工艺条件^[12],在碱性蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶三种单酶酶解以及碱性蛋白酶、风味酶分步酶解的过程中施加超声,其中超声以短时(10 min)多次的形式分布在酶解过程中,探究超声时间和超声功率对酶解效果的影响。以水解度和氮收率为指标,确定不同的单酶以及分步酶解制备胶原肽的最佳工艺条件,并对产品品质进行评价,为生产鱼鳞胶原肽产品提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

草鱼鳞,于华中农业大学菜市场收集。碱性蛋白酶(200 U/mg)、复合蛋白酶(120 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、风味酶(20 U/mg)等,上海源叶生物科技有限公司。甲醛、氢氧化钠、硫酸铜、硫酸钾、甲酸、乙二胺四乙酸二钠、辛酸、碳酸氢钠、乙酸镁、十二烷基磺酸钠等为分析纯,乙腈、三氟乙酸为色谱纯,国药化学试剂有限公司。大豆油,华中农业大学中百超市。

1.2 仪器与设备

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市科瑞仪器有限公司;KDE-08 型定氮仪,上海精隆科学仪器有限公司;超声细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;818 型 pH 计,ORINO 公司;IKA2000 型高速分散均质机,德国 IKA 公司;搅拌式超滤杯,美国密理博公司;A300 型氨基酸分析仪,德国曼默博尔公司;18 角度激光光散射仪,美国怀雅特技术公司。

1.3 鱼鳞基本成分测定

参考国标 GB 5009.3-2016^[13],采用直接干燥法测定草鱼鳞中水分含量。

参考国标 GB 5009.6-2016^[14],采用索氏抽提法测定草鱼鳞中脂肪含量。

参考国标 GB 5009.5-2016^[15],采用凯氏定氮法测定草鱼鳞中粗蛋白含量。

参考国标 GB 5009.4-2016^[16],测定草鱼鳞中总灰分含量。

1.4 鱼鳞的预处理

参照吴潇扬等^[17]的方法,取烘干后的草鱼鳞 200 g,加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液(料液比为 1:10),在室温下搅拌 4 h 后用蒸馏水洗至中性。随后加入 0.5 mol/L 盐酸溶液,在同样液比下室温脱钙 1.5 h,再用蒸馏水冲洗至中性。最后,采用 0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液,于室温下脱脂 8 h(料液比为 1:10),并用蒸馏

水冲洗至中性备用。酶解前将鱼鳞在 85 °C 的热水中浸泡 1.5 h, 并用料理机搅碎^[12]。

1.5 草鱼鱼鳞胶原肽的制备工艺

准确称取一定质量预处理过的草鱼鳞, 加入蒸馏水调节底物浓度, 用 1 mol/L 磷酸或 2 g/L 氢氧化钙调节起始 pH 值, 加酶后混匀并在磁力搅拌器中水解一定时间, 取出后高温水浴灭酶, 离心, 取上清液过 3 000 u 超滤膜, 收集滤液真空浓缩后经喷雾干燥得到胶原肽。喷雾干燥条件为进风温度 200 °C, 出风温度 90 °C, 进样量 200 mL/h。

参考本研究室前期基础工艺^[12], 分别采用碱性蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶和分步酶解的方式制备胶原肽, 料液比均为 1:17。其中, 碱性蛋白酶用量为 420 U/g, 酶解温度为 60 °C, 初始 pH 值为 8.0~8.5, 酶解时间为 4 h; 复合蛋白酶和中性蛋白酶用量均为 450 U/g, 酶解温度为 50 °C, 初始 pH 值为 7.0~7.5, 酶解时间为 4 h; 分步酶解过程中, 第一步酶解的碱性蛋白酶用量为 420 U/g, 酶解温度为 60 °C, 初始 pH 值为 8.0~8.5, 酶解时间为 3 h, 第二步酶解的风味酶用量为 420 U/g, 酶解温度为 50 °C, 酶解时间为 2 h。在单酶酶解过程中施加不同条件的超声处理, 超声处理时间范围为 0~40 min、超声功率为 0~600 W。分步酶解过程中施加超声的功率为 300 W, 时间为 20 min。

1.6 草鱼鳞水解产物的指标测定

采用甲醛滴定法^[18]测定水解液的水解度。

采用凯氏定氮法^[19]测定水解液的氮收率。

1.7 草鱼鳞胶原肽的功能特性

1.7.1 乳化性

将 10.0 mL 质量分数为 1.0% 的胶原肽溶液中加入 4.0 mL 精制大豆油, 在室温下用均质机 10 000 r/min 高速均质 1 min, 然后用涡旋振荡器震荡 10 s, 从底部取样 0.1 mL 加入到 20 mL 0.1% (m/V) 的十二烷基磺酸钠 (SDS) 溶液中^[20]。以 0.1% SDS 溶液为空白, 测定 500 nm 处的吸光度 A_{500} , 以乳化活力指数表示乳化性。

1.7.2 起泡性和泡沫稳定性

取 1.0% (m/V) 的胶原肽溶液 25 mL, 高速均质 1 min, 记录均质停止时和 10 min 后泡沫的体积, 用于表征起泡性和泡沫稳定性。

$$F_1 = \frac{V_1}{25} \times 100\% \quad (1)$$

$$F_2 = \frac{V_2}{25} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

F_1 —起泡性, %;

F_2 —泡沫稳定性, %

V_1 —均质停止时泡沫体积, mL;

V_2 —10 min 后泡沫体积, mL。

1.8 草鱼鳞胶原肽的分子量分布

参照 GB 31645-2018 中的方法^[21], 采用高效液相排阻色谱法测定, 并略做修改。根据标准品 (四聚甘氨酸, Gly-Gly-Tyr-Arg, 血管紧张素 II, 蜂毒明肽, 甘丙肽) 保留时间与分子量对数关系做出标准曲线, 标准曲线为: $y = -0.1598x + 4.6484$ ($R^2 = 0.9967$)。标准品的上样浓度为 2 mg/mL, 样品的上样浓度为 5 mg/mL。根据样品出峰时间和标准曲线, 计算样品分子量分布。

1.9 草鱼鳞胶原肽的氨基酸组成

参考 GB 5009.124-2016 中的方法^[22]。

1.10 羟脯氨酸含量测定

参考国标 GB/T 9696.23-2008 中的方法^[23], 并略做修改。称取 0.1 g 胶原肽, 放入具塞试管中, 加入 6 mol/L HCl 10 mL, 于 105 °C 烘箱中水解 16 h。趁热过滤, 将水解产物过滤至 250 mL 容量瓶中, 用蒸馏水冲洗具塞试管、滤纸 3 次, 定容。吸取 10 mL 上述水解产物于 250 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容。取 4 mL 水解液于 10 mL 试管中, 加入 2 mL 氯胺 T 溶液, 混合后于 25 °C 放置 20 min, 加入 2 mL 显色剂, 混合后, 于 60 °C 避光水浴 30 min, 同时用 4 mL 蒸馏水代替工作液, 重复上述步骤。于 560 nm 处测定吸光值。胶原蛋白含量 (记为 P) 和羟脯氨酸含量 (记为 S) 的换算系数为 11.1, 计算公式如下:

$$P = S \times 11.1 \quad (3)$$

1.11 数据分析

试验数据用 SPSS 软件进行分析处理, 使用 Origin 2017 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 鱼鳞基本成分分析

由表 1 中可知, 草鱼鳞的主要成分为蛋白质和灰分, 含量分别为 62.30% 和 32.23%, 经过预处理后, 蛋白含量可达 97.43%, 脱灰率可达 95.72%, 表明前处理效果良好。

表1 预处理前后草鱼鳞的基本成分表

Table 1 Basic components of grass carp scales before and after pretreatment

基本成分	水分/%	蛋白质/%	脂肪/%	灰分/%
预处理前	14.57±0.09	62.30±3.68	5.44±0.42	32.23±0.05
预处理后	1.87±0.21	97.43±0.45	1.16±0.02	1.38±0.03

注：蛋白质、脂肪、灰分以干基计。

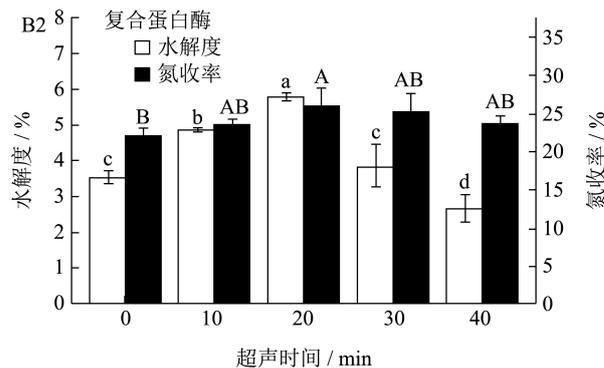
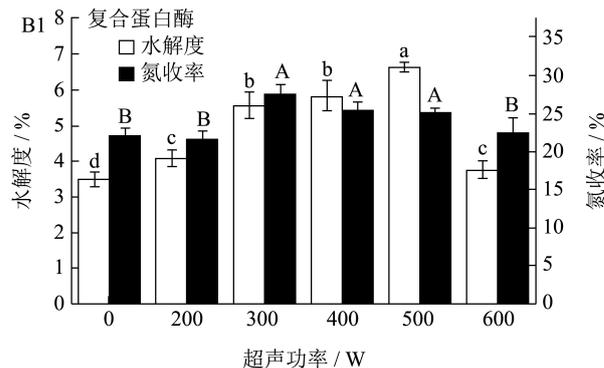
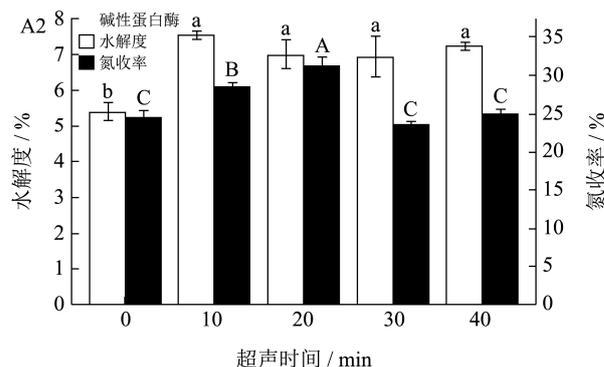
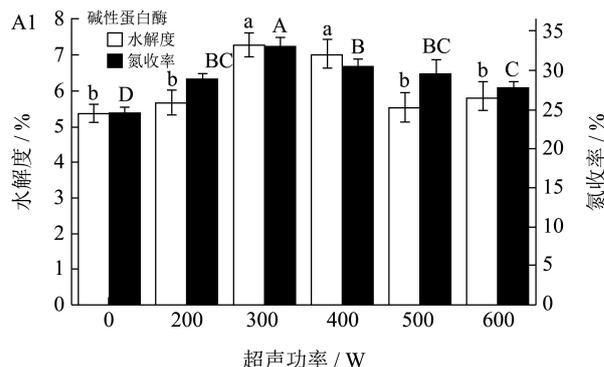
2.2 超声辅助酶解制备草鱼鳞胶原肽的工艺

条件比较

由图1可知，酶解液的水解度和氮收率在一定范围内与超声功率或超声时间成正比。其中碱性蛋白酶酶解在超声条件为功率300 W、时间20 min时酶解液的水解度达到最大值7.27%，氮收率达到最大值33.09%；复合蛋白酶酶解在超声条件为功率500 W、时间20 min时酶解液的水解度达到最大值6.65%，此时的氮收率为25.14%；中性蛋白酶在超声条件为功率500 W、时间20 min时酶解液的水解度达到最大值4.85%、此时的氮收率为27.49%；对于分步酶解，超声时间分布的不同会对草鱼鳞酶解液的水解度和氮收率产生显著的影响($p < 0.05$)。当超声方式为J10时，酶解液的水解度和氮收率会同时达到最大值，此时的水解度为11.05%，氮收率为31.69%，显著高于其它组别($p < 0.05$)。采用碱性蛋白酶水解鱼鳞得到的酶解液的水解度最大，复合蛋白酶次之，中性蛋白酶最小。该结果与已有文献报道^[24]结果一致。这可能是酶作用的特异性所致。

对于三种单酶酶解进程，在一定的超声条件范围内，水解度和氮收率均与超声条件成正比，即超声的确可以在一定程度上提高酶解效率，但并非超声功率越大或者超声时间越长越好。这或许可以从超声对原料中蛋白质结构和酶活的影响两个层面进行解释。对于原料而言，超声波的空化效应、热效应和机械作用会改变或者破坏原料中蛋白质的大分子结构，暴露出更多的疏水活性中心，进而改变其与酶的接触机率，提高酶解效率^[25]，若超声功率过低，或者时间过短时，超声提供的空化能量不足以使蛋白质充分展开，则不利于酶解效果的提升。但当超声强度过大时，蛋白质的酶切位点可能会被包埋，这是因为结构已展开的蛋白质分子可能会重新聚集形成较大的聚集体，此时蛋白质与酶的接触机会也随之降低^[26]。另一方面，当超声强度不太高时，酶会表现出较高的催化活性，这可能是因为此时酶

分子能量增加、结构更具有柔性。当超声功率过高或者时间过长时，酶的活力会下降，这是因为此时超声产生的瞬态空化作用，会释放出高温高压气流或者强大冲击波，从而导致酶分子结构改变，影响酶的催化活性^[27]。值得关注的是，分步酶解的水解度显著大于单酶酶解的组别，这是因为分步酶解过程中，第二步酶解可以进一步减小肽链的长度，提高水解度。



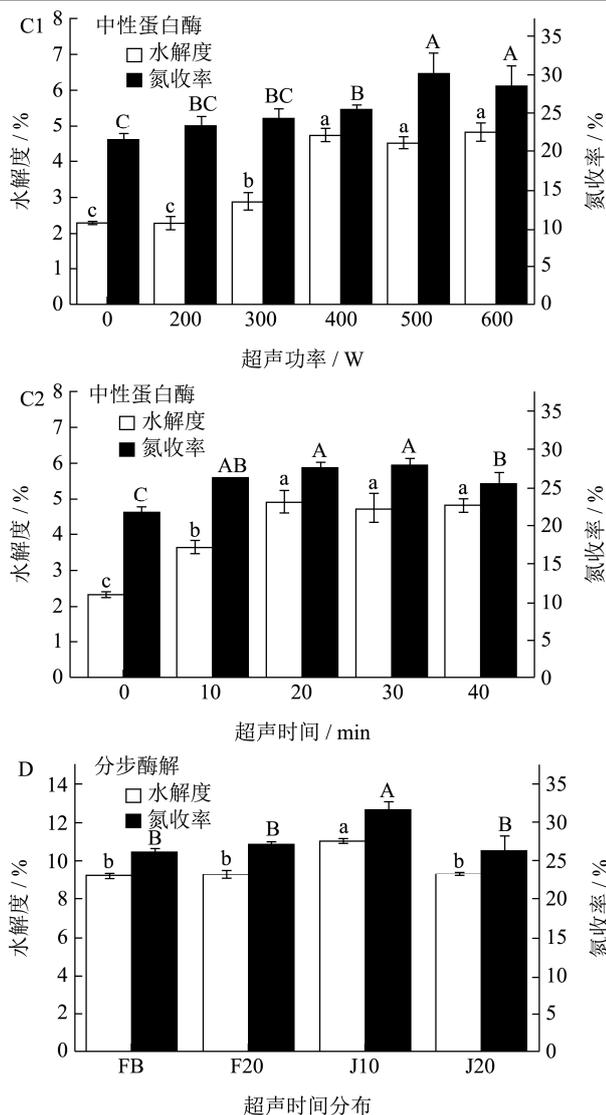


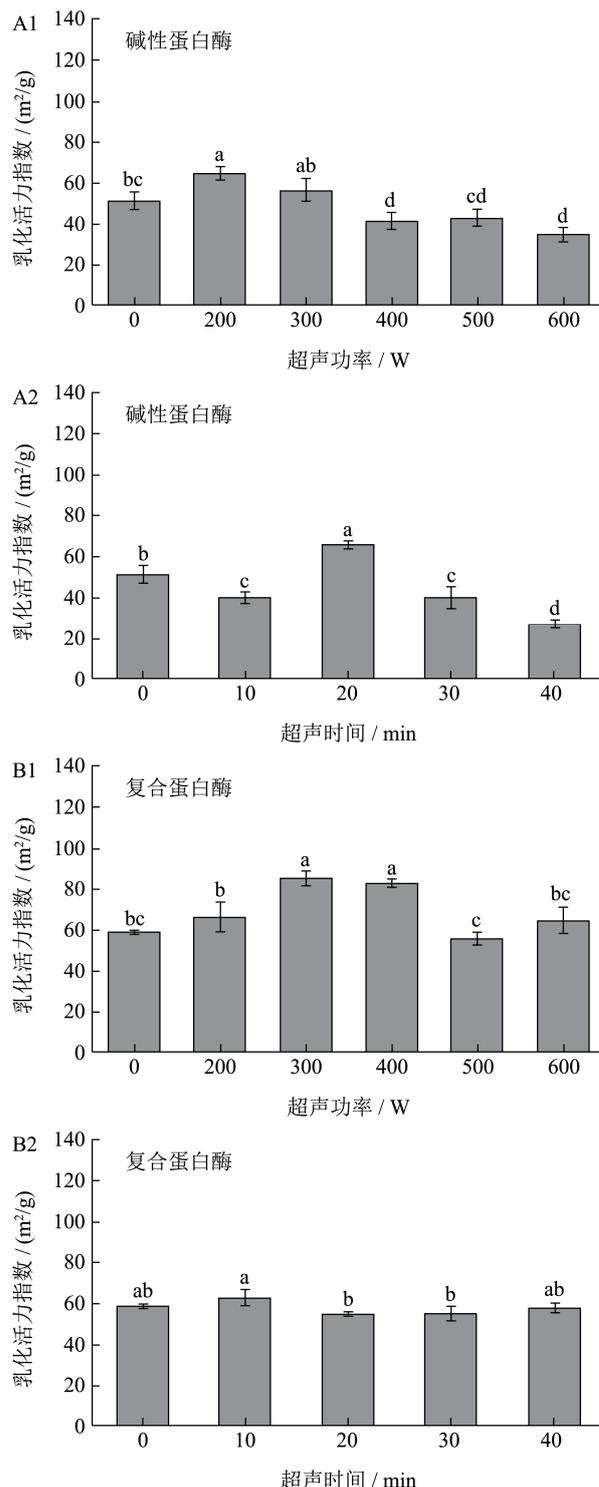
图1 不同超声条件对草鱼鳞酶解液水解度和氮收率的影响
Fig.1 Effects of different ultrasonic conditions on the hydrolysis and nitrogen yield of grass carp scales enzymatic solution

注: FB: 指传统的分步酶解; F20: 指在第二步酶解过程中施加 20 min 超声; J10: 在第一步酶解过程中施加 10 min 超声并在第二步酶解过程中施加 10 min 超声; J20: 指在第一步酶解过程中施加 20 min 超声。不同字母表示组内存在显著性差异 ($p < 0.05$), 下同。

2.3 胶原肽的乳化性

由图2可知,在一定的超声功率或超声时间范围内,胶原肽的乳化性与超声功率或超声时间成正比。其中碱性蛋白酶酶解在超声条件为功率 300 W、时间 20 min 时胶原肽的乳化活力指数达到最大值 65.74 m^2/g ; 复合蛋白酶酶解在超声条件为功率 300 W、时间 20 min 时胶原肽的乳化活力指数达到最大值 84.98 m^2/g ; 中性蛋白酶在超声条件为功率 500 W、时间 30 min 时胶原肽的乳化活力指数达到最大值 118.93 m^2/g 。对于分步酶

解,超声时间分布的不同会对草鱼鳞胶原肽的乳化活力指数产生显著的影响 ($p < 0.05$)。当超声方式为 F20 时,胶原肽的乳化性达到最大值 60.55 m^2/g ,显著高于其它组别 ($p < 0.05$)。采用中性蛋白酶水解鱼鳞得到胶原肽的乳化性最大,复合蛋白酶次之,碱性蛋白酶最小。即水解度不同,胶原肽的乳化性也存在差异,这与张继磊等^[28]分析不同蛋白酶酶解鱼蛋白乳化性的结果一致。



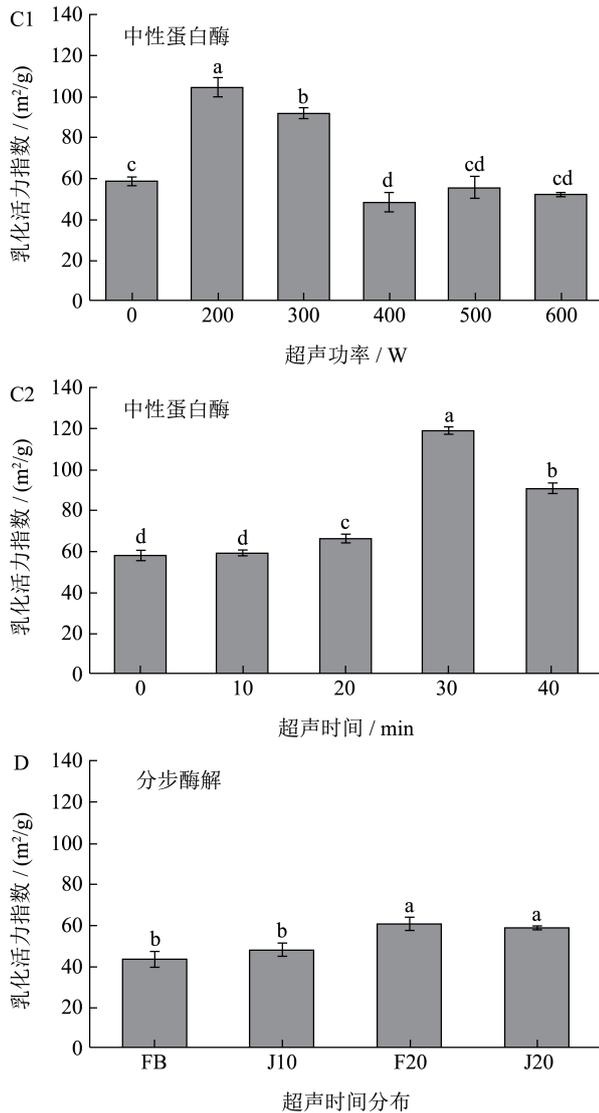


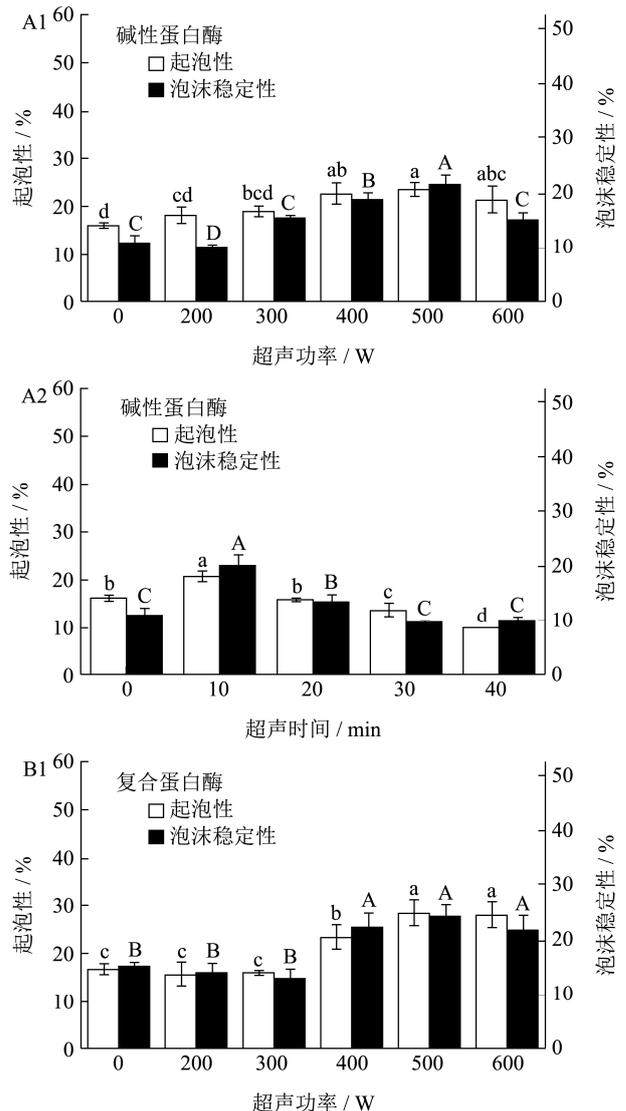
图2 不同超声条件对草鱼鳞胶原肽乳化性的影响

Fig.2 Effects of different ultrasonic conditions on the emulsification of grass carp scales peptides

乳化性是指蛋白质与油和水作用形成乳浊液的能力，蛋白质的乳化性取决于亲水和亲油之间的平衡。研究表明适宜的超声条件可以在一定程度上提高胶原肽的乳化性。蛋白质表面基团和水解度均会对其乳化性产生影响。不同的超声功率或者超声时间处理后所制得的胶原肽的表面基团不同，其乳化性也存在差异。随着超声条件的增强，蛋白质先展开后聚集，表面基团不同，因此乳化性也存在差异。对比不同的工艺条件，分步酶解的乳化性要低于单酶酶解的乳化性。这可能是因为胶原肽的乳化性质还与水解度有关，一般随着水解度的增加，乳化性先升高后降低^[29]，在合适的水解度范围内，蛋白质表面的疏水基团暴露，有利于乳化性，但当水解度较高时，蛋白质的分子量降低，此时肽分子不能像完整蛋白质分子一样在界面展开和定向，无法减少界面张力，乳化能力下降^[12]。

2.4 胶原肽的起泡性和泡沫稳定性

由图3可知，在一定的超声功率和超声时间范围内，酶解液的起泡性和泡沫稳定性与超声时间和超声功率成正比。其中碱性蛋白酶酶解在超声条件为功率500 W、时间20 min时胶原肽的起泡性达到最大值23.50%，泡沫稳定性达到最大值21.60%；复合蛋白酶酶解在超声条件为功率500 W、时间20 min时胶原肽的起泡性达到最大值28.33%，泡沫稳定性达到最大值24.33%；中性蛋白酶在超声条件为功率600 W、时间20 min时酶解液的起泡性达到最大值51.33%、泡沫稳定性达到最大值43.33%；对于分步酶解，超声时间分布的不同会对草鱼鳞酶解液的起泡性和泡沫稳定性产生显著的影响 ($p < 0.05$)。当超声方式为F20时，胶原肽的起泡性和泡沫稳定性会同时达到最大值，此时的起泡性为28.33%，泡沫稳定性为19.17%。采用中性蛋白酶水解鱼鳞得到胶原肽的起泡性和泡沫稳定性最大，复合蛋白酶次之，碱性蛋白酶最小。



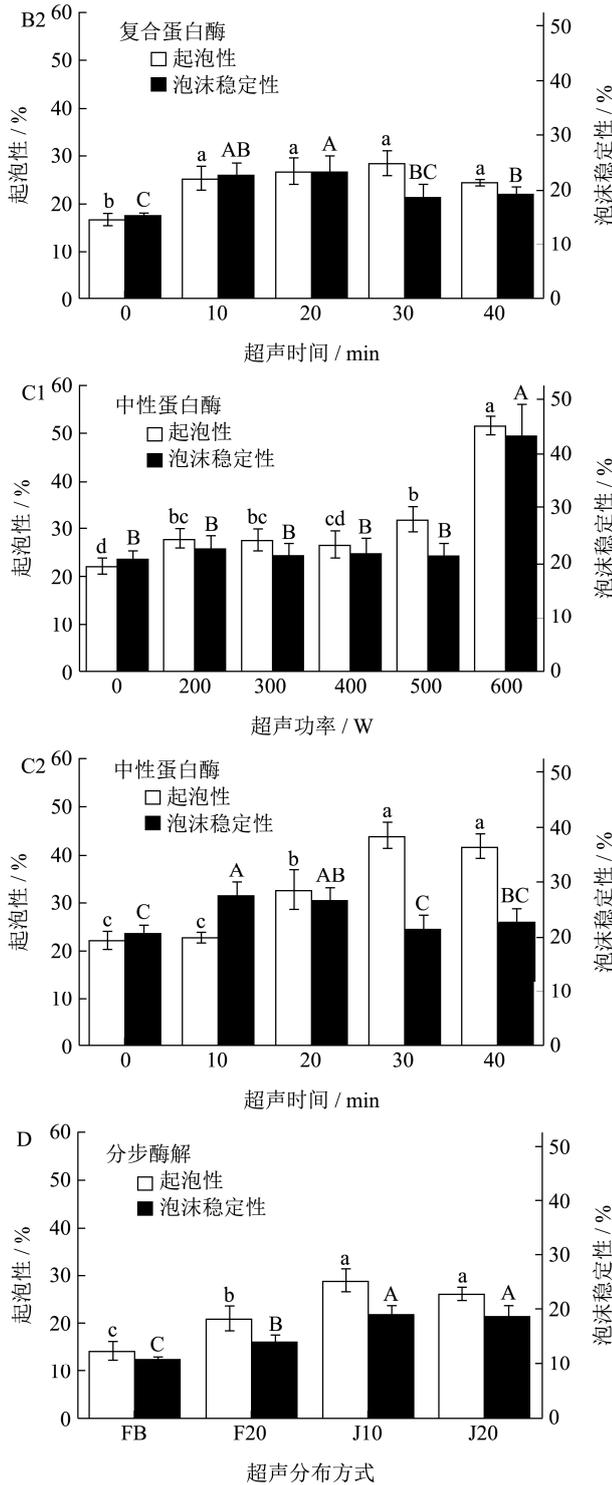


图3 不同超声条件对草鱼鳞胶原肽起泡性和泡沫稳定性的影响
Fig.3 Effects of different ultrasonic conditions on the foaming property and foam stability of grass carp scales peptides

起泡性是指搅打蛋白质产品时捕捉气体形成泡沫的能力，泡沫稳定性是指泡沫间液膜保持液体不析出的能力。超声作为一种对蛋白质进行改性处理的方式，可以作为一种辅助手段用于在实际生产中改善蛋白质的起泡性。从本研究中可以看出，适宜的超声条件可以提高胶原肽的起泡性和泡沫稳定性。这可能是由于

在超声的作用下，蛋白质的结构变得松散，更多的疏水基团会暴露出来，继而有利于蛋白质在界面上的扩散和聚集。而当超声功率过大或者超声时间过长时，分散的蛋白质又会重新聚集，暴露的疏水基团又会被重新掩埋，这不利于蛋白质在界面上的扩散和聚集^[30]。

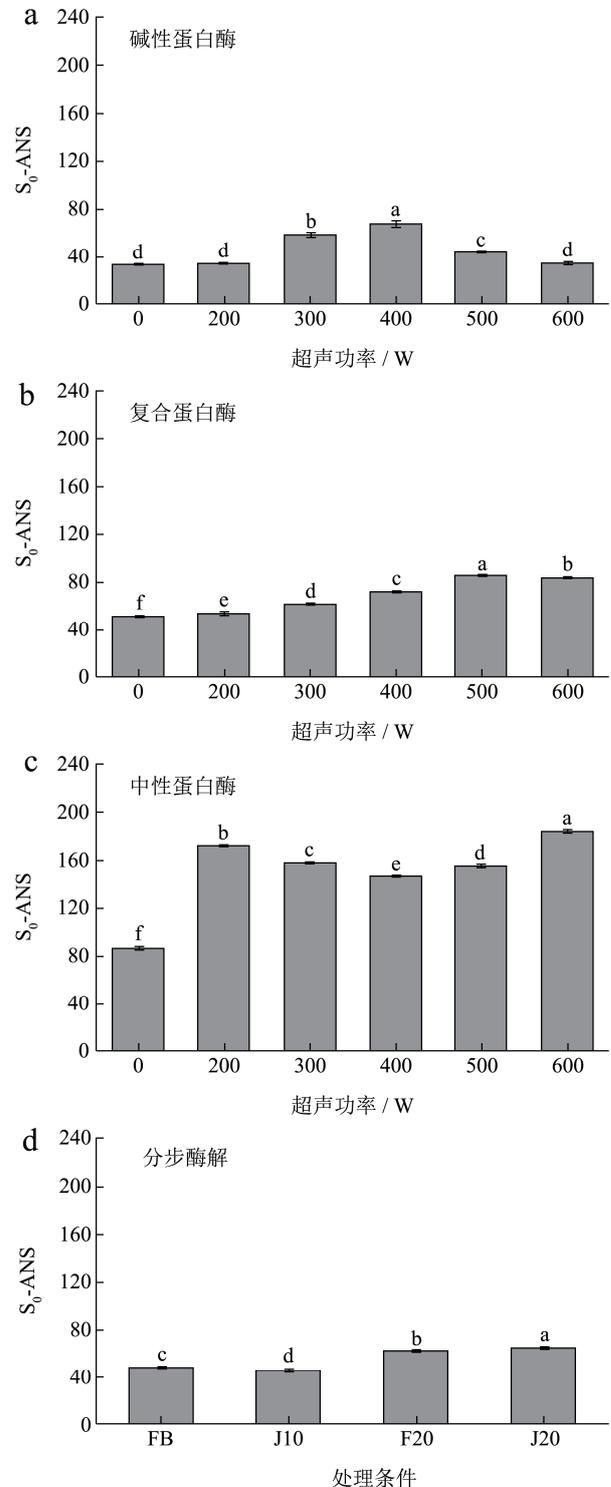


图4 不同超声功率对胶原肽表面疏水性的影响
Fig.4 Effect of different ultrasonic power on the surface hydrophobicity of peptides

从图4中可以看出随着超声功率的增加,胶原肽的表面疏水性先增加后减小,这与起泡性和泡沫稳定性的变化趋势大体相当,且可以看出在单酶酶解组别中,表面疏水性最大的中性蛋白酶酶解组的起泡性和泡沫稳定性最高。对不同酶解工艺的起泡性和泡沫稳定性进行比较可知分步酶解的起泡能力与单酶酶解相比较差,这可能是因为水解程度也会对起泡性产生一定的影响^[31]。酶解的过程可以使蛋白质中被掩埋的疏水基团暴露出来,增强蛋白质对气液界面处的吸附,降低表面张力,从而改善起泡性。但起泡能力并不是随着水解程度的增加而持续增加,因为当水解程度过大时肽链会逐渐变短或者会生成氨基酸,而这不利于气液界面形成稳定的薄膜,对起泡性存在负面影响。

2.5 胶原肽的氨基酸组成

由表2可知,不同的酶解条件下制备的胶原肽的氨基酸含量存在一定差别,其中碱性蛋白酶酶解制备的胶原肽的总氨基酸含量最高,其次是分步酶解制备的胶原肽,中性蛋白酶酶解和复合蛋白酶酶解组的氨基酸含量差异不大。对超声后的组别进行比较,可以

看出超声辅助碱性蛋白酶制备的胶原肽总氨基酸含量最高,超声辅助分步酶解次之,超声辅助复合蛋白酶酶解的含量最低。总体看来,无论是每种氨基酸的含量还是总氨基酸含量,超声后的胶原肽均略高于未超声的组别。超声前后碱性蛋白酶酶解制备的胶原肽的氨基酸含量分别为66.30 g/100 g和73.75 g/100 g;超声前后复合蛋白酶酶解的氨基酸含量分别为64.00 g/100 g和65.65 g/100 g;超声前后中性蛋白酶酶解的氨基酸含量分别为61.50 g/100 g和65.90 g/100 g;超声前后分步酶解的氨基酸含量分别为66.05 g/100 g和70.70 g/100 g。胶原的氨基酸种类和含量与其他的蛋白质相比存在一定的差异。胶原中具有绝大多数蛋白质中不具有的羟脯氨酸,同时羟脯氨酸也是胶原的特征氨基酸。在胶原蛋白中甘氨酸、羟脯氨酸、脯氨酸的含量较高,其中甘氨酸的含量最高,且胶原蛋白中芳香族氨基酸和半胱氨酸含量较少^[32]。由表2可知,在所有的胶原肽中含量最高的氨基酸均为甘氨酸。在所有的胶原肽中谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、精氨酸的含量较高,而组氨酸、酪氨酸的含量较低,且都含有胶原的特征氨基酸羟脯氨酸,符合胶原蛋白的氨基酸特征。

表2 鱼鳞胶原肽的氨基酸组成表

Table 2 Amino acid composition of grass carp scale collagen peptides

氨基酸名称	氨基酸组成/(g/100 g)							
	J0	J300	F0	F500	Z0	Z500	FB	J10
天冬氨酸	2.10±0.10 ^{bc}	2.30±0.00 ^a	1.95±0.05 ^{cd}	1.90±0.00 ^{de}	1.75±0.05 ^e	2.00±0.00 ^{cd}	2.05±0.05 ^{bcd}	2.20±0.00 ^{ab}
苏氨酸	3.70±0.20 ^b	4.10±0.10 ^a	3.45±0.05 ^b	3.45±0.05 ^{bc}	3.15±0.15 ^c	3.45±0.05 ^{bc}	3.70±0.00 ^b	3.85±0.05 ^{ab}
丝氨酸	5.55±0.25 ^{bc}	6.15±0.20 ^a	5.10±0.10 ^{cd}	5.15±0.05 ^{cd}	4.65±0.25 ^d	5.20±0.10 ^c	5.55±0.05 ^{bc}	5.80±0.10 ^{ab}
谷氨酸	5.75±0.35 ^{bc}	6.70±0.10 ^a	5.80±0.20 ^{bc}	6.60±0.10 ^{ab}	7.00±0.10 ^a	6.45±0.05 ^{ab}	5.55±0.05 ^c	6.15±0.15 ^{abc}
甘氨酸	8.40±0.60 ^b	9.95±0.05 ^a	9.45±0.45 ^a	9.70±0.05 ^a	9.45±0.15 ^a	9.80±0.00 ^a	9.65±0.15 ^a	10.00±0.00 ^a
丙氨酸	6.00±0.30 ^{bc}	6.70±0.10 ^a	5.60±0.10 ^{cd}	5.65±0.05 ^{cd}	5.15±0.25 ^d	5.70±0.00 ^c	6.05±0.05 ^{bc}	6.40±0.10 ^{ab}
缬氨酸	1.70±0.10 ^c	1.95±0.05 ^{ab}	1.65±0.05 ^c	1.70±0.00 ^c	1.65±0.05 ^c	1.80±0.00 ^{bc}	1.90±0.00 ^{ab}	2.05±0.05 ^a
蛋氨酸	5.15±0.35 ^{bc}	5.65±0.21 ^a	4.60±0.14 ^d	4.85±0.07 ^{cd}	4.40±0.28 ^d	4.85±0.07 ^{cd}	5.10±0.00 ^{bc}	5.45±0.07 ^{ab}
异亮氨酸	1.50±0.10 ^b	1.70±0.00 ^a	1.45±0.05 ^b	1.40±0.00 ^b	1.35±0.05 ^b	1.50±0.00 ^b	1.75±0.05 ^a	1.75±0.05 ^a
亮氨酸	2.45±0.15 ^{bcd}	2.75±0.05 ^a	2.35±0.05 ^{cd}	2.30±0.00 ^{cd}	2.20±0.10 ^d	2.40±0.00 ^{bcd}	2.50±0.10 ^{abc}	2.65±0.05 ^{ab}
酪氨酸	1.00±0.10 ^{ab}	1.05±0.05 ^a	0.90±0.00 ^{ab}	0.90±0.00 ^{ab}	0.85±0.05 ^b	0.95±0.05 ^{ab}	1.00±0.00 ^{ab}	1.05±0.05 ^a
苯丙氨酸	1.80±0.10 ^{bc}	2.05±0.05 ^a	1.70±0.00 ^{bd}	1.70±0.00 ^{bd}	1.55±0.05 ^d	1.70±0.00 ^{bd}	1.85±0.05 ^{bc}	1.95±0.05 ^{ab}
组氨酸	1.30±0.10 ^b	1.50±0.00 ^a	1.35±0.05 ^{ab}	1.30±0.00 ^b	1.25±0.05 ^b	1.30±0.00 ^b	1.40±0.00 ^{ab}	1.50±0.00 ^a
赖氨酸	2.65±0.15 ^{bc}	2.95±0.05 ^a	2.45±0.05 ^{cd}	2.50±0.00 ^{cd}	2.35±0.05 ^d	2.60±0.00 ^{bc}	2.65±0.05 ^{bc}	2.75±0.05 ^{ab}
精氨酸	7.35±0.45 ^{ab}	7.85±0.05 ^a	6.25±0.15 ^{de}	6.65±0.05 ^{cd}	5.80±0.10 ^e	6.40±0.10 ^{de}	6.20±0.10 ^{de}	7.15±0.15 ^{bc}
脯氨酸	3.95±0.15 ^{de}	5.15±0.15 ^a	4.20±0.20 ^{bcd}	4.30±0.10 ^{bcd}	3.40±0.30 ^e	4.15±0.15 ^{cd}	4.60±0.00 ^{abc}	4.80±0.20 ^{ab}
羟脯氨酸	5.95±0.15 ^a	5.25±0.11 ^{cd}	5.50±0.10 ^{bcd}	5.60±0.12 ^b	5.55±0.05 ^{bc}	5.65±0.02 ^b	4.55±0.10 ^e	5.20±0.11 ^d
总计	66.30±3.60 ^{bc}	73.75±1.05 ^a	64.00±1.80 ^c	65.65±0.05 ^{bc}	61.50±1.80 ^c	65.90±0.10 ^{bc}	66.05±0.55 ^{bc}	70.70±1.00 ^{ab}

注: J0: 碱性蛋白酶酶解; J300: 超声辅助碱性蛋白酶酶解的最佳工艺; F0: 复合蛋白酶酶解; F500: 超声辅助复合蛋白酶酶解的最佳工艺; Z0: 中性蛋白酶酶解; Z500: 超声辅助中性蛋白酶酶解的最佳工艺; FB: 分步酶解; J10: 超声辅助分步酶解的最佳工艺。不同字母表示组间存在显著性差异 ($p < 0.05$)

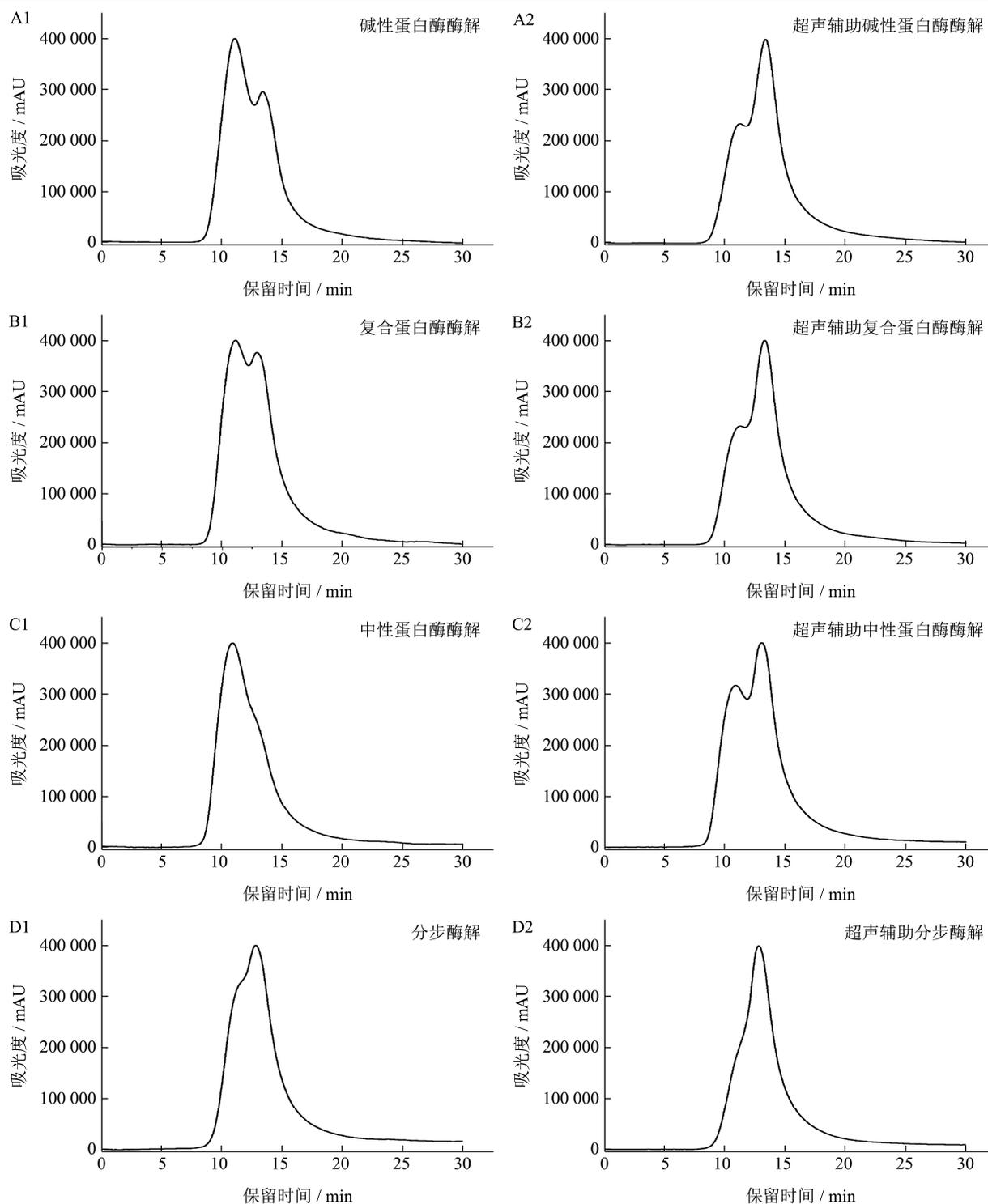


图5 鱼鳞胶原肽的分子量分布图谱

Fig.5 Molecular weight distribution of grass carp scales peptides

2.6 胶原肽的分子量分布

由图5可知，不同的鱼鳞胶原肽的峰形没有太大的差异，但是出峰时间存在差异。分步酶解的胶原肽的出峰时间要晚于单酶酶解的胶原肽，这是因为在超声和第二步酶解的双重作用下酶解过程中生成了更多的小分子肽段；由超声辅助酶解制得的胶原肽的出峰

时间要晚于传统的酶解方式制得的样品，这是因为在超声的作用下酶解过程中生成了更多的小分子肽段。无论超声与否，所有蛋白酶水解产物分子量均呈现为连续分布，且较为集中。

由图6可知，不同蛋白酶的水解产物的分子量分布存在着一定的差异。因为超滤膜的截留率并不能达到100%，故虽然酶解液均通过了3000u的超滤膜，

但水解产物还是有小部分大于 3 000 u, 且所有水解产物的分子量分布主要集中在 500 u~1 ku 之间。同时可以看出经过超声处理后, 胶原肽的分子量分布会向小分子量的范围偏移。对于碱性蛋白酶, 其分子量在 500 u~1 ku 的范围内占比为 24.26%, 经过超声处理后该范围内的含量为 33.99%; 对于复合蛋白酶; 其分子量在 500 u~1 ku 的范围内占比为 28.39%, 经过超声处理后该范围内的含量为 32.98%; 对于中性蛋白酶; 其分子量在 500 u~1 ku 的范围内占比为 20.73%, 经过超声处理后该范围内的含量为 29.22%; 对于分步酶解, 其分子量在 500 u~1 ku 的范围内占比为 31.99%, 经过超声处理后, 该范围内的含量为 39.28%。这与张杰等^[33]研究超声对木瓜蛋白酶酶解产物分子量分布的影响的结果一致, 即超声后, 肽段中小分子量段比例增加。

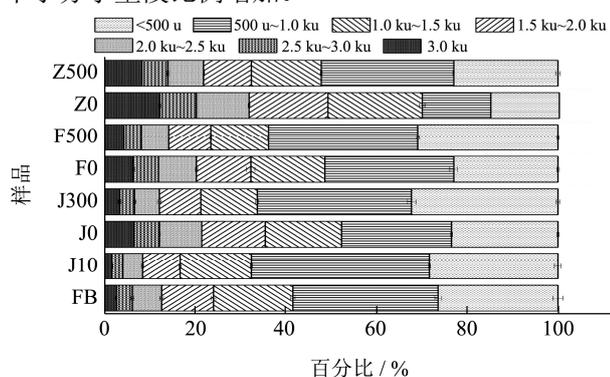


图6 鱼鳞胶原肽的分子量分布范围

Fig.6 The molecular weight distribution range of grass carp scale peptides

注: J0: 碱性蛋白酶酶解; J300: 超声辅助碱性蛋白酶酶解的最佳工艺; F0: 复合蛋白酶酶解; F500: 超声辅助复合蛋白酶酶解的最佳工艺; Z0: 中性蛋白酶酶解; Z500: 超声辅助中性蛋白酶酶解的最佳工艺; FB: 分步酶解; J10: 超声辅助分步酶解的最佳工艺。

分子量分布是衡量胶原肽品质的一个重要特性指标^[34]。可以看出, 不同的酶的种类以及超声与否均会对胶原肽的分子量分布产生一定的影响。因为在酶法水解蛋白质的过程中, 酶的作用位点, 会影响水解产物分子量的分布范围, 故不同酶解方法制得的胶原肽的分子量分布存在一定的差异。同时有研究表明, 酶解液的水解度与其分子量分布相关^[35], 水解度越高, 产物小分子量范围占比越高。在本研究中, 分步酶解的水解度最高, 碱性蛋白酶次之, 中性蛋白酶酶解最低, 这与胶原肽分子量分布的范围基本一致。由于超声的空化作用可以提高酶解过程的效率, 进而提高水解度, 故超声辅助酶解制得的胶原肽在小分子量范围内的含量会略高于传统酶解方法制得的胶原肽。

3 结论

超声功率和超声时间均是超声辅助酶解制备胶原肽时的重要参数。本研究采用超声辅助酶解法制备草鱼鳞胶原肽, 确定了最佳工艺条件并对所制备的胶原肽的理化特性进行了系统的研究。

超声可以通过对原料结构和酶活的影响进而影响产物得率以及理化特性。超声辅助单酶酶解的最佳工艺为碱性蛋白酶酶解过程中施加功率 300 W, 时间 20 min 的超声; 超声辅助分步酶解的最佳工艺条件为在碱性蛋白酶酶解过程中施加功率 300 W、时间 10 min 的超声; 在风味酶酶解过程中施加的功率 300 W、时间 10 min 的超声。

超声后胶原肽的分子量分布会向小分子量的范围偏移, 且分子量主要集中在 500 u~1 ku。超声后胶原肽的总氨基酸含量略有提高, 同时超声对胶原肽的起泡性、泡沫稳定性和乳化性影响显著。

超声辅助酶解法可以提高酶解效率, 改善胶原肽产品的品质, 具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021
Ministry of Agriculture and the Rural Fisheries fisheries authority. China Fishery Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021
- [2] Hui H, Fan H B, Chalamaiah M, et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives [J]. Food Chemistry, 2019, 301: 1-9
- [3] Marcet I, Alvarez C, Paredes B, et al. The use of sub-critical water hydrolysis for the recovery of peptides and free amino acids from food processing wastes. Review of sources and main parameters [J]. Waste Management, 2016, 49: 364-371
- [4] Yesim A, Mauricio M, Begoña G, et al. Sea bream bones and scales as a source of gelatin and ACE inhibitory peptides [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 55(2): 579-585
- [5] 宋芹, 颜军, 郭晓强, 等. 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, 32(4): 39-43
SONG Qin, YAN Jun, GUO Xiaoqiang, et al. Study on extracion technology of tilapia fish scale collagen oligopeptide [J]. Food Research and Development, 2011, 32(4): 39-43
- [6] 朱俊颖, 王耀松, 赵黎明, 等. 复合酶法制备高纯度鱼基质胶原蛋白肽[J]. 中国食品学报, 2015, 15(12): 47-54

- ZHU Junying, WANG Yaosong, ZHAO Liming, et al. Production of high quality collagen peptides derived from scales of herring fish by combined enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(12): 47-54
- [7] Sierra L, Fan H B, Zapata J, et al. Antioxidant peptides derived from hydrolysates of red tilapia (*Oreochromis sp.*) scale [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 146: 16-31
- [8] Zhang F X, Zhang W, Shiyang X. Macroporous resin purification of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) scale peptides with *in vitro* angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory ability [J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 387-392
- [9] Sun L H, Yu F, Wang Y Y, et al. Effects of ultrasound extraction on the physicochemical and emulsifying properties of rice bran protein [J]. International Journal of Food Engineering, 2021, 17(5): 327-335
- [10] 孟永海,孟祥瑛,付敬菊,等.超声波协同酶解法提取白术总多糖工艺优化[J].化学工程师,2020,34(3):18-21
MENG Yongmei, MENG Xiangying, FU Jingju, et al. Optimization of ultrasonic assisted enzymatic extraction of total polysaccharide from *Atractylodes macrocephala* [J]. Chemical Engineer, 2020, 34(3): 18-21
- [11] 林艳云,吾惠婷.超声辅助酶法制备草鱼鱼鳞胶原蛋白肽[J].安徽农学通报,2021,27(20):65-68
LIN Yangyun, WU Huiting. Preparation of collagen peptide from grass carp scales by ultrasonic-assisted enzymatic method [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2021, 27(20): 65-68
- [12] 杨莉莉.鱼鳞胶原肽的分步酶解法制备及其特性研究[D].武汉:华中农业大学,2011
YANG Lili. Step-step enzymatic hydrolysis and characterization of collagen peptide from fish scales [D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2011
- [13] GB 5009.3-2016,食品中水分的测定[S]
GB 5009.3-2016, Determination of Moisture Content in Foods [S]
- [14] GB 5009.6-2016,食品中脂肪的测定[S]
GB 5009.6-2016, Determination of Fat in Foods [S]
- [15] GB 5009.5-2016,食品中蛋白质的测定[S]
GB 5009.5-2016, Determination of Protein in Food [S]
- [16] GB 5009.4-2016,食品中灰分的测定[S]
GB 5009.4-2016, Determination of Ash in Food [S]
- [17] 吴潇扬,熊善柏,尤娟,等.采用“梯度升温法”提取鱼鳞明胶及其理化特性的研究[J].现代食品科技,2019,35(2):118-125
WU Xiaoyang, XIONG Shanbai, YOU Juan, et al. Study on fish scale gelatin extracted by gradient increasing temperature and its physicochemical properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(2): 118-125
- [18] 黄晓钰,刘邻渭.食品化学综合实验[M].北京:中国农业出版社,2002
HUANG Xiaoyu, LIU Lingwei. Comprehensive Food Chemistry Experiment [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002
- [19] Pimentel F B, Rita C A, Anabela S G, et al. Phenylketonuria: Protein content and amino acids profile of dishes for phenylketonuric patients: The relevance of phenylalanine [J]. Food Chemistry, 2014, 149: 144-150
- [20] Fernandez-Quintelaq A, Macarulla M T, Del Barrio A S, et al. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 1997, 51(4): 331-342
- [21] GB 31645-2018,食品安全国家标准胶原蛋白肽[S]
GB 31645-2018, National Standard for Food Safety Collagen Peptides [S]
- [22] GB 5009.124-2016,食品中氨基酸的测定[S]
GB 5009.124-2016, Determination of Amino Acids in Food [S]
- [23] GB/T 9696.23-2008,肉与肉制品羟脯氨酸含量测定[S]
GB/T 9696.23-2008, Determination of Hydroxyproline Content in Meat and Meat Products [S]
- [24] 郭浩楠,杨荣华,袁晓晴,等.鲢鱼蛋白的酶解及其酶解物功能性质的研究[J].中国食品学报,2010,10(4):106-112
GUO Haonan, YANG Ronghua, YUAN Xiaoqin, et al. Studies on the enzymatic hydrolysis of silver carp meat protein and functional properties of its hydrolysates [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(4): 106-112
- [25] 李素云.超声和超声协同碱预处理对大米蛋白酶解效果影响及过程模拟研究[D].苏州:江苏大学,2017
LI Suyun. Effects and process simulation for ultrasound and ultrasound-assisted alkali pretreatment to rice protein on enzymolysis [D]. Suzhou: Jiangsu University, 2017
- [26] Wang Z B, Lin X M, Li P P, et al. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment [J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 222-227
- [27] 秦倩倩.超声波预处理对草鱼皮胶原蛋白特性和酶解产物活性的影响[D].镇江:江苏科技大学,2019
QIN Qianqian. Effects of ultrasound pretreatment on

- properties of collagen from grass carp skin and activities of its hydrolysates [D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2019
- [28] 张继磊,周欢,曾小红,等.蛋白酶解对鲢鱼肉乳化特性的改善[J].浙江农业学报,2020,32(1):160-167
ZHANG Jilei, ZHOU Huan, ZENG Xiaohong, et al. Improvement of emulsifying properties of skipjack tuna protein by enzymatic hydrolysis [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 23(1): 160-167
- [29] 孙乐常,刘伟峰,林怡晨,等.碱性蛋白酶限制性酶解对蓝圆鲹分离蛋白功能特性的影响[J].食品科学,2021,42(2):23-29
SUN Lechang, LIU Weifeng, LIN Yichen, et al. Effect of limited alcalase hydrolysis on functional properties of blue round scad (*Decapterus maruadsi*) protein isolate [J]. Food Science, 2021, 42(2): 23-29
- [30] Chen Y X, Ma M H. Foam and conformational changes of egg white as affected by ultrasonic pretreatment and phenolic binding at neutral pH [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 102: 55-68
- [31] Upasama M, Ranendra K, Biswajit M, et al. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita* [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(11): 49-58
- [32] Sinthusamran S, Sootawat B, Hideki K. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*) [J]. Food Chemistry, 2013,138(4): 35-41
- [33] 张杰,丁琳,白鸽,等.超声对木瓜蛋白酶酶解产物分子量分布的影响[J].食品工业科技,2017,38(14):116-120
ZHANG Jie, DING Lin, BAI Ge, et al. Effect of ultrasonic on molecular weight distribution of papain hydrolyzate [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(14): 116-120
- [34] 卢韵君.鱼源胶原蛋白白肽酶解工艺及其分子量检测方法研究[D].广州:华南理工大学,2016
LU Yunjun. Enzymatic hydrolysis and molecular weight detection method of fish collagen peptide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [35] 刘健敏,钟芳,麻建国.大豆生理活性肽的研究(II)-抗氧化性和 ACE 抑制活性的初步研究[J].无锡轻工大学学报,2004,4:50-55
LIU Jianmin, ZHONG Fang, MA Jianguo. Soybean bioactive peptides (II) - Antioxidant activity and ACE inhibitory activity of the hydrolysates [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2004, 4: 50-55

(上接第 142 页)

- [31] 孙焯,李英浩,Wulandari,等.超声波预处理对玉米醇溶蛋白结构及其 Pickering 乳液稳定性的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(1):97-106
SUN Ye, LI Yinghao, Wulandari, et al. Effect of ultrasonic pretreatment on the structure of zein and the stability of Pickering emulsion [J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(1): 97-106
- [32] Chen Y, Tu Z, Wang H, et al. Glycation of β -lactoglobulin under dynamic high pressure microfluidization treatment: Effects on IgE-binding capacity and conformation [J]. Food Research International, 2016, 89: 882-888
- [33] 朱颖,赵思明,王冬梅,等.乳液中柔性界面蛋白构效关系研究[J].农业机械学报,2021,52(3):341-349
ZHU Ying, ZHAO Siming, WANG Dongmei, et al. Study on structure-activity relationship of flexible interfacial proteins in emulsion [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2021, 52(3): 341-349
- [34] 王琳,周国卫,于志超,等.pH 值偏移处理对油莎豆蛋白结构及乳化性质的影响[J].食品科学,2020,35(22):43-50
WANG Lin, ZHOU Guowei, YU Zhichao, et al. Effect of pH offset treatment on structure and emulsifying properties of *Cyperus esculentus* protein [J]. Food Science, 2020, 35(22): 43-50
- [35] Zhong D G, Jiao Y P, Zhang Y, et al. Effects of the gene carrier polyethyleneimines on structure and function of blood components [J]. Biomaterials, 2013, 34(1): 294-305
- [36] Ren X F, Wei X, Ma H, et al. Effects of a dual-frequency frequency-sweeping ultrasound treatment on the properties and structure of the zein protein [J]. Cereal Chemistry Journal, 2015, 92(2): 193-197
- [37] 康雪帆,李海明,陈丹洁,等.糖接枝玉米醇溶蛋白包埋虾青素[J].食品科学,2018,39(7):168-173
KANG Xuefan, LI Haiming, CHEN Danjie, et al. Embedding astaxanthin with sugar grafted zein [J]. Food Science, 2018, 39(7): 168-173
- [38] Qi P X, Onwulata C I. Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion moisture content [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(5): 2231-2244