

# 微波辅助酶解前处理对鱼鳞胶原蛋白肽粉品质的影响

王 溢, 盛彩虹, 袁宏丽, 陈栋梁

(1. 武汉天天好生物制品有限公司, 湖北武汉 430090;

2. 湖北省肽类物质工程技术研究中心, 湖北武汉 430090)

**摘要:**为了在兼顾成本的情况下制取较高品质的胶原蛋白肽粉, 采用微波辅助水提法作为酶解前处理鱼鳞的方式, 并酶解制取鱼鳞胶原蛋白低聚肽粉。经对微波辅助水提法与无微波辅助水提法制取的胶原蛋白肽粉的得率及品质进行分析。结果表明, 鱼鳞在功率为10kW的微波干燥机中处理15s的条件下, 胶原蛋白肽粉收率最高达57.8%, 分子量小于1000u的胶原蛋白肽比例占87.84%, 感官值为9, 均高于非微波处理条件下制取的胶原蛋白肽; 但是在此条件下, 澄清度未表现出明显的差异性。

**关键词:**微波, 鱼鳞, 胶原蛋白低聚肽粉, 得率, 品质

## Effect of microwave assisted enzymatic hydrolysis methods on the quality of fish scale collagen peptide

WANG Yi, SHENG Cai-hong, YUAN Hong-li, CHEN Dong-liang

(1. Wuhan Tallyho Biological Products Co., Ltd., Wuhan 430090, China;

2. Hubei Peptide Material Engineering Technology Research Center, Wuhan 430090, China)

**Abstract:** In order to obtain high quality collagen peptide with low cost, collagen was extracted by two different methods that were microwave assisting with water extraction and without microwave water extraction, and fish scale collagen low poly peptide was obtained by enzymolysis. The rates and qualities of collagen peptide obtained by the two methods were analyzed respectively. The results showed that the rate and quality attained utilizing 10kW microwave assisting with 15s was higher than water extraction method. The highest yield of the collagen peptide up to 57.8%, the proportion of the collagen peptide which molecular weight were less than 1000u collagen accounted for 87.84%, and the sensory value was 9. However, the clarity had no significant differences between the treats methods.

**Key words:** microwave; fish scales; collagen low poly peptide powder; yield; quality

中图分类号: TS254

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)20-0170-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.20.028

近年来, 随着我国渔业的生产发展迅猛, 在鱼类加工过程中产生了大量鱼鳞下角料<sup>[1-2]</sup>。而鱼鳞中含有丰富的胶原蛋白<sup>[3]</sup>, 经酶作用后得到由许多分子链长度不等的胶原蛋白低聚肽。胶原蛋白肽因其具有良好的乳化性、胶凝性、成膜性和增稠等功能特性及特殊的生理活性, 已广泛应用于食品、医疗、保健及美容等行业<sup>[4]</sup>, 具有较高的经济价值。

自海洋鱼低聚肽粉GB/T 22729-2008及淡水鱼胶原肽行业标准SB/T 10634-2011出台以来, 鱼胶原肽整个行业得到了飞速的发展, 胶原肽的品质也成为了行业市场竞争的法宝, 高收率、高品质的胶原蛋白肽粉制取工艺成为了人们研究的热点。目前国内

市场上鱼鳞胶原蛋白肽的产业化基本上都是以酶解法作为主要的制备手段, 其中主要的工艺路线: 鱼鳞脱灰→酶解前处理→酶解→酶解后处理→胶原蛋白肽粉成品, 整个工艺中鱼鳞脱灰、酶解及酶解后处理等工艺在行业内已基本成为通式; 因此, 鱼鳞不同的酶解前处理方法将成为整个工艺中的决定性环节, 它将对鱼鳞胶原蛋白肽粉的得率及品质产生重要的作用。鉴于微波提取技术在蛋白质提取中已有诸多应用, 利用微波处理提高蛋白质得率的优越性已在许多研究结果中得到支持<sup>[5-6]</sup>。因此, 本实验选取罗非鱼鱼鳞为原料, 采用微波辅助水提法作为酶解前处理鱼鳞的方式酶解制取胶原蛋白多肽粉, 并通过微波辅助水提法与无微波辅助水提法制取的胶原蛋白低聚肽粉的收率、分子量、透光率、感官品质4个因素进行分析, 初步为微波辅助水提法规模化制取高品质的鱼鳞胶原蛋白肽奠定了基础。

收稿日期: 2013-12-17

作者简介: 王溢(1986-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品原料开发与应用。

## 1 材料与方

### 1.1 材料与仪器

罗非鱼鱼鳞 取自汉南农贸市场;碱性蛋白酶 Alcalase 3.0T(酶活:3.0AU/g) 诺维信酶制剂有限公司;三氟乙酸、乙腈 美国TEDIA公司,色谱纯;活性炭 温县伟业活性炭厂;细胞色素C(MW:1258u)、杆菌肽(1423u)、四肽甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(451u)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(189u) 美国SIGMA公司;其他试剂 均为国产分析纯。

电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;分析天平(感量0.0001g) 沈阳龙腾电子有限公司;COWB-SD型微波干燥杀菌设备 江阴辰欧微波能系统设备有限公司;LPG型高速离心喷雾干燥机 常州市博大制粒干燥设备有限公司;紫外可见分光光度计 优尼科(上海)仪器有限公司;Agilent 1100型液相色谱仪 美国Agilent公司,配有GPC数据处理软件的色谱工作站、流动相真空抽滤脱气装置;其他常规仪器。

### 1.2 实验方法

1.2.1 鱼鳞的脱脂脱灰处理 将新鲜的鱼鳞用清水洗净,0.1mol/L NaOH浸泡24h<sup>[7]</sup>,用水反复洗至中性。然后用0.6mol/L HCl浸泡24h,用水反复洗至中性,36℃干燥后储存备用<sup>[8]</sup>。

1.2.2 脱灰鱼鳞基本组成成分测定<sup>[9]</sup> 水分含量测定:直接干燥法,GB/T 26626-2011;蛋白质含量测定:半微量凯式定氮法,GB 5009.5-2010;粗脂肪含量测定:索氏提取法,GB/T 5009.6-2003;灰分测定:GB/T 5009.4-2010。

1.2.3 水提法酶解前处理 取一定重量脱脂脱灰鱼鳞置于烧杯中,按照料液比1:10的比例加入蒸馏水,在100℃下蒸煮2h,得粗提的鱼鳞胶原蛋白粗提液,按1:10的料液比补足水备用。

1.2.4 微波辅助处理 取一定重量脱脂脱灰鱼鳞,放入COWB-SD型微波干燥机中,在功率10kW的条件下处理。将微波处理后的鱼鳞置于烧杯中,按照料液比1:10的比例加入蒸馏水,在100℃下蒸煮2h,得粗提的鱼鳞胶原蛋白粗提液,然后再按1:10的料液比补足水备用。

1.2.5 鱼鳞胶原蛋白肽粉的制取 工艺流程:脱灰鱼鳞→酶解前处理→酶解→灭酶→脱色脱味→浓缩→喷雾干燥→胶原蛋白低聚肽粉。

1.2.6 鱼鳞胶原蛋白低聚肽粉收率的测定 测定公式如下:

$$\text{收率}(\%) = (M_2/M_1) \times 100$$

式中:  $M_1$ 为酶解处理前称取的脱灰鱼鳞重量, g;  $M_2$ 为相应的胶原蛋白肽粉成品的质量, g。

1.2.7 鱼鳞胶原蛋白低聚肽粉分子量分布的测定 选用细胞色素C(MW:1258u)、杆菌肽(1423u)、四肽甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(451u)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(189u)为标准品,胶原蛋白肽的相对分子量分布及所占比例采用高效凝胶过滤色谱法测定。即以多孔性填料为固定相,依据样品组分分子体积大小的差别进行分离,在肽键的紫外吸收波长

220nm下进行检测,使用凝胶色谱测定相对分子量分布的专用数据处理软件,对色谱图及数据进行处理,计算得到蛋白质水解物的相对分子量大小及分布范围。检测波长为220nm,流速为0.5mL/min,柱温为30℃,进样体积10 $\mu$ L,流动相(乙腈:水:三氟乙酸为45:55:0.1),色谱柱为TSKgelG2000 SWXL 300mm $\times$ 7.8mm的凝胶柱;具体操作为:先用肽标准品制作相对分子量校正曲线,得到相对分子量校正曲线及方程。然后称取样品20.0mg于10mL容量瓶中,用流动相定容至刻度,10kW超声振荡10min,使样品充分溶解混匀,用孔径为0.2 $\mu$ m,到0.5 $\mu$ m尼龙过滤膜过滤后,上机进样,在上述色谱条件下分析。然后用GPC数据处理软件,将样品的色谱数据代入校正曲线方程中进行计算,即可得到样品中肽的相对分子量及其分布范围。用峰面积归一法计算各分子量范围相对分子质量的多肽所占比例。

1.2.8 透射比的测定 参考QB/2732-2005;将制取的胶原蛋白肽粉按照6.67%配成水溶液,恒温至48℃,将溶液倒入10mm比色皿,用蒸馏水作基准。用分光光度法测定胶原蛋白肽水溶液在波长450nm和620nm下的透射比。

1.2.9 感官鉴定方法 将喷雾干燥出来的粉末,按照10%含量进行冲水溶解。固定10个人对水解液的颜色、气味、口感进行综合评价,并按1~9(9表示最好,1表示最差)等级进行分类评比,感官鉴定值为10人评定小组的平均得分<sup>[10]</sup>。

表1 感官评分标准

Table 1 Sensory evaluation judgment

分值	感官评价指标
1	颜色为深黄色,溶液十分浑浊,腥味很重
2	颜色为深黄,溶液浑浊,腥味很重
3	颜色为深黄色,溶液较浑浊,腥味重
4	颜色为深黄色,溶液比较澄清透明,腥味一般
5	颜色为黄色,溶液比较澄清透明,腥味一般
6	颜色为黄色,溶液比较澄清透明,腥味小
7	颜色为淡黄色,溶液比较澄清透明,腥味较小
8	颜色无色或淡黄色,溶液澄清透明,腥味较小
9	颜色为无色或淡黄色,溶液澄清透明,几乎无腥味

## 2 结果与分析

### 2.1 脱灰鱼鳞基本组成成分

将脱灰鱼鳞干燥后进行水分、灰分、蛋白含量及脂肪含量的测定结果如表2所示。实验表明,将鱼鳞进行脱脂脱灰处理后,蛋白质含量丰富、脂肪、灰分

表2 脱灰鱼鳞基本成分

Table 2 The basic components of fish scales from removal of ash

成分	含量(%)
水分	18.50
灰分	0.21
蛋白含量(干基)	96.75
脂肪(干基)	0.37

含量较低。鱼鳞中主要含有胶原和羟基磷灰石,经酸碱处理的鱼鳞灰分含量很低,羟基磷灰石成分已经基本被脱除,便于胶原蛋白的提取及胶原蛋白多肽粉的制取。

## 2.2 微波处理时间对胶原蛋白肽粉得率的影响

将脱灰鱼鳞置于功率为10kW的微波干燥机中进行微波处理,处理的时间分别为0、5、10、15、20、25s几个梯度,然后将微波处理的鱼鳞通过水提法提取胶原蛋白,并酶解制取胶原蛋白肽粉,经对胶原蛋白肽粉的收率进行测定如图1所示。实验结果表明,在功率为10kW的微波干燥机处理15s的条件下,鱼鳞胶原蛋白低聚肽粉收率最高达57.8%,随着处理时间的延长,收率反而逐渐降低,而无微波处理的方式的制取的胶原蛋白多肽粉收率为54.3%。将微波辅助处理15s条件下的胶原蛋白低聚肽粉收率与无微波处理方式进行对比,经单因素显著性分析显示,适当的微波处理(10kW,15s)对胶原蛋白多肽粉的收率有提高的作用( $p < 0.05$ )。其原因可能是由于鱼鳞中的胶原蛋白主要是I型胶原蛋白,它是由3条左手螺旋结构的肽链以共价键、氢键、范德华力相互结合而形成右手超螺旋结构<sup>[11]</sup>,水提法的热水处理并不能完全使胶原稳固的三维螺旋变得松散,而使胶原不能完全提取出来,使得最终的酶解胶原蛋白肽粉得率相对较低。而微波能够对鱼鳞短时间的高温处理,可能使胶原三维螺旋结构变得疏散,这样在水提处理的过程中胶原更容易溶解出来,使得最终得率更高,结果与张联英利用微波提取水产胶原蛋白的得率较水提法的高这个现象相一致<sup>[9]</sup>。而随着这种大功率微波干燥设备对鱼鳞处理的时间延长,高温使鱼鳞的水分迅速蒸发,鱼鳞迅速被膨化乃至烧糊,损失了其中的有效蛋白成分,使得最终的胶原蛋白肽粉的得率降低。

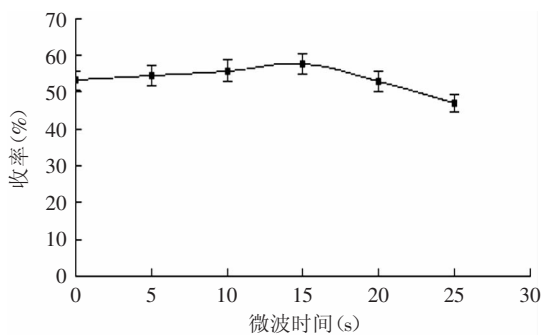


图1 微波处理时间对胶原蛋白肽粉得率的影响

Fig.1 Effect of microwave treatment time on extraction rate of collagen peptide

## 2.3 两种不同方式对制取胶原蛋白肽粉分子量的影响

以细胞色素C(MW:1258u)、杆菌肽(1423u)、四肽甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(451u)和甘氨酸-甘氨酸(189u)为标准品,分别将两种不同方式制取的胶原蛋白多肽粉分别采用高效凝胶过滤色谱法对其相对分子量分布及其含量进行测定。标

准品的凝胶过滤色谱图见图2,两种胶原蛋白肽凝胶过滤色谱图的比较见图3。

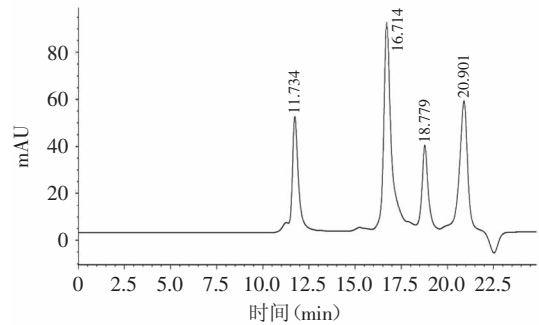


图2 标准样品的凝胶过滤色谱图

Fig.2 Gel filtration chromatography map of sample

图2中分子量大的标准品保留时间短,出峰早,其中出峰时间在11.734min的是杆菌肽(1423u)、16.714min的是细胞色素C(1258u)、18.779min的是四肽甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(451u)、20.901min的是甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(189u)。

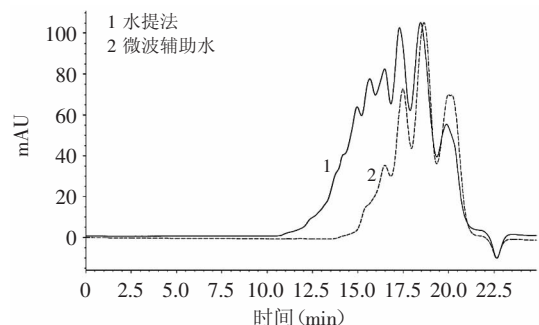


图3 两种胶原蛋白肽凝胶过滤色谱图的比较

Fig.3 Comparison of gel filtration chromatography map of two collagen peptide

图3是两种不同提取法制取胶原蛋白多肽粉样品色谱图的比较。由图3可知,两组样品的出峰时间略有差异,各个组分分子量的含量所占比例也不同。由于胶原肽本身就是混合物,所以出现的峰比较杂,分别选取两个样品中五个较为突出的峰作为主要产物进行研究。

用GPC数据处理软件,将样品的色谱数据代入校正曲线方程中进行计算,得到样品中肽的相对分子量及其分布范围,用峰面积归一法计算各分子量范围相对分子质量的多肽所占比例。结果如表3所示,微波辅助粉碎法制取胶原肽的分子量较水提法小,小于1000u的比例占87.84%,在相同酶解的工艺条件下,微波辅助粉碎法制取的鱼鳞胶原蛋白肽粉更易达到GB/T22729-2008所要求的小于1000u的含量不低于85%的这项指标。出现这种现象的原因可能是由于微波的温度过高而导致胶原纤维变性,有的甚至断裂,从而产生了更多小的肽链,这个和李兴武利用微波在猪皮胶原的处理上结果一致<sup>[12]</sup>。另外再加上物理粉碎使得鱼鳞在酶解前借助物理的作

用,使大分子的胶原蛋白的酶切位点更多的暴露出来,从而使得在相同的时间里更容易获得酶解度更高的小分子鱼鳞胶原蛋白低聚肽。

表3 两种胶原蛋白肽分子量分布结果

Table 3 The range of molecular weight of two collagen peptide

水提法		微波辅助水提法	
分子量分布(u)	所占比例(%)	分子量分布(u)	所占比例(%)
>2000	5.04	>2000	3.40
2000~1000	13.93	2000~1000	8.76
1000~550	29.08	1000~590	34.56
550~190	46.53	590~190	48.27
<190	6.31	<190	5.01

## 2.4 两种不同方式对制取胶原蛋白肽粉透光率的影响

将两种不同方式制取的胶原蛋白肽粉按照6.67%溶解,在48℃下,分别测定在450nm和620nm波长下的透射比。结果如表4所示,两种方式所提取的胶原蛋白肽粉溶液透射比均符合淡水鱼胶原肽行业标准SB/T 10634-2011,但经单因素显著性分析显示,微波辅助水提法和水提法两种不同方式制取的胶原蛋白肽粉的透射比无明显差异( $p>0.05$ )。

表4 两种不同的胶原蛋白提取方式制取胶原蛋白肽粉的透射比

Table 4 Transmittance of collagen peptide from two different ways of extraction

处理方法	透射比( $T_{450nm}$ )	透射比( $T_{620nm}$ )
微波辅助水提法	96.58	101.90
水提法	96.21	102.78

## 2.5 两种不同方式对制取胶原蛋白肽粉感官的影响

固定10个人对两种不同方式制取的10%胶原蛋白肽粉水溶液进行颜色、气味、口感的感官分析。结果表明,由水提法制取的胶原蛋白多肽粉的感官值为8,而微波辅助水提法制取的胶原蛋白多肽粉感官值为9,微波辅助水提法制取的胶原蛋白多肽水溶液基本无味,而水提法制取的则有较小的鱼腥味。大量研究表明,水产品中的挥发性物质主要包括醇类、醛类、酮类、烃类、土腥味类物质(多见于淡水水产品中)及少量的呋喃、硫醚、萜类等物质,这些化合物一起构成了水产品的腥味<sup>[13]</sup>。而在本实验中的微波处理环节产生瞬间的高温,对挥发性的腥味物质有一定的去除的作用,所以使得最终的胶原蛋白低聚肽水溶液气味比水提法效果好。而这个原理与Ming Zhu<sup>[14]</sup>和Steven W Lloyd等<sup>[15]</sup>用微波蒸馏萃取鲶鱼中腥味物质土臭素和二甲基异冰片的原理相一致,从而达到将腥味物质脱离鱼鳞的效果。

## 3 结论

微波是一种频率在 $3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{11}$ Hz间的电磁波,它加热速度快、加热均匀、节能高效、安全无害、易瞬时控制,而微波法萃取法是近年在此基础上发展起来的一种新型提取技术,具有选择性高、萃取效率

高、节约能源等优点<sup>[15,16]</sup>。本实验分别采用微波辅助水提法和无微波水提法对脱灰罗非鱼鱼鳞进行酶解前处理,并酶解制得鱼鳞胶原蛋白低聚肽粉。通过对两种不同酶解前处理方式制取胶原蛋白多肽粉的比较,结果表明,在相同酶解及后处理条件下,微波辅助水提法制取的鱼鳞胶原蛋白多肽粉收率更高,在分子量小于1000u的低聚肽含量上更容易达到海洋鱼低聚肽粉GB/T 22729-2008及淡水鱼胶原肽行业标准SB/T 10634-2011的指标。同时,在感官评价上,微波辅助水提法制取的鱼鳞胶原蛋白多肽粉在色泽和气味上更优,因此更有利于在工业化大生产中带来良好的经济效益。在今后的实验中还可以通过不同的微波设备结合工业化生产线去作处理条件的优化,以便将收率和品质达到最优。

## 参考文献

- [1] 袁妍,唐艳,邓尚贵. 鱼品加工下脚料的再利用研究[J]. 科学养鱼,2010(3):69-70.
- [2] Huang Yicheng, Hsiao Peichi, Chai Hueyjine. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells [J]. Ceramics International, 2011, 37(6): 1825-1831.
- [3] Holá M, Kalvoda J, Nováková H, et al. Possibilities of LA-ICP-MS technique for the spatial elemental analysis of the recent fish scales: Line scan vs depth profiling [J]. Applied Surface Science, 2011, 257(6): 1932-1940.
- [4] 周光朝,刘良忠,万茜,等. 高水解度草鱼鱼鳞胶原蛋白肽的研究[J]. 粮食科技与经济, 2011, 36(2): 52-55.
- [5] 段振华,孙小苓. 微波技术在鱼鳞蛋白提取中的应用[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 149-152.
- [6] 张联英,曾名勇. 微波技术在水产胶原蛋白提取中的应用[J]. 北京水产, 2005(6): 40-42.
- [7] 曾嵘,杨忠华,王玉,等. 水产废弃物胶原蛋白的提取[J]. 生物加工过程, 2008, 6(5): 27-30.
- [8] 张俊杰,段蕊,杜修桥. 鱼鳞胶原蛋白的提取及其性质研究[J]. 中国水产, 2006(10): 68-69.
- [9] 陆红佳,郑龙辉,刘雄. 超声波辅助酶结合碱法提取薯渣纤维素的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(1): 234-237.
- [10] 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.
- [11] 顾杨娟,李杰,李富威,等. 鱼鳞有效成分的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 415-419.
- [12] 李兴武,李洪军. 微波辅助提取猪皮胶原蛋白工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(6): 11-14.
- [13] 王国超,李来好. 水产品腥味物质形成机理及相关检测分析技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 401-409.
- [14] Ming Z, Francisco J A, Eric D C, et al. Microwave mediated distillation with solid phase microextraction: determination of off-flavors, geosmin and methylisoborneol, in catfish tissue [J]. Journal of Chromatography A, 1999(833): 223-230.
- [15] Steven W L, Casey C G. Analysis of 2-methylisoborneol and geosmin in catfish by microwave mistillation solid-phase microextraction [J]. Agric Food Chem, 1999(47): 164-169.
- [16] 袁园,胡建平. 微波法提取鱼鳞胶原蛋白及其性质研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(3): 663-664.