

# 双酶法水解猪皮工艺的优化\*

巫亮

(华南理工大学轻工与食品学院,广东 广州,510640)

**摘 要** 以猪皮为原料,以水解度(DH)为评价指标,在用 Flavourzyme, Protamex, Neutrase, Alcalase, Papain 进行单酶、双酶水解的基础上,筛选出了 Flavourzyme 和 Protamex 两种水解效果较好的酶,并采用 Box-Behnken 响应面分析法,设计了 3 因素 3 水平实验,得到了双酶法水解猪皮的优化条件为:pH5.85,温度 48.37℃,加酶量 2.61%,底物浓度 15%,时间 6h,在此条件下,猪皮水解度最高,可达到 19.25%。

**关键词** 双酶法,猪皮,水解度(DH),优化

我国是生猪饲养和消费大国,每年都要屠宰大量的猪,下脚料猪皮大多用于制革工业,而近年来制革工业中使用的猪皮量逐年下降,造成猪皮大量积压。

猪皮占猪胴体重的 10%<sup>[1]</sup>,主要成分是水、蛋白质以及脂肪,还有少量的纤维素和矿物质。猪皮中的蛋白质以胶原蛋白为主,约占 80% 以上,同时还含有少量白蛋白、球蛋白和弹性蛋白<sup>[2]</sup>,因此,将猪皮酶

解,可以获得胶原蛋白、胶原多肽等高附加值产品,所得的水解液可用于食品、生物、医学、材料、化妆品等领域<sup>[3]</sup>,具有广阔的应用前景。

## 1 实验原料

猪皮(市售),各种酶制剂见表 1,其他试剂均为分析纯试剂。

表 1 各种蛋白酶的特性

酶类	作用特性	最适 pH 值	最适温度/℃	标注活力	生产厂家
Flavourzyme	内肽酶 + 外肽酶	5.0 - 7.0(6.0)	40 - 55(50)	500LAPU/g	诺维信
Alcalase	内肽酶	7.0 - 9.0(8.0)	40 - 65(55)	5.8 万 DU/g	无锡酶制剂厂
Protamex	内肽酶	5.5 - 7.5(6.0)	35 - 60(50)	1.5 万 U/g	诺维信
Neutrase	内肽酶	6.0 - 8.0(6.5)	40 - 60(50)	1 600AU/g	无锡酶制剂厂
Papain	内肽酶	5.0 - 7.5(6.5)	50 - 70(60)	9 万 U/g	南宁庞博

## 2 实验仪器

DS-1 高速组织捣碎机,FA1104 数显电子天平,320-S 型 pH 计,81.2 型磁力恒温搅拌器,DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡器,LXJ-II 离心沉淀机。

## 3 实验方法

### 3.1 蛋白质水解度(HD)的测定

TNBS 法<sup>[4]</sup>。

### 3.2 酶解液的制备

将新鲜猪皮刮脂、洗净、绞碎,加入一定量的水,控制底物浓度为 15%(料水质量比),调节 pH 和温度至各种酶的最适值,加入 2% 的酶(相对于猪皮的质量分数),水解结束后,水解液经过高温灭活(95℃

加热 5 min),在 4 000 r/min 下离心 10 min,取适量上清液供分析用,以水解度来考察酶解效果。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 单酶对水解的影响(图 1)

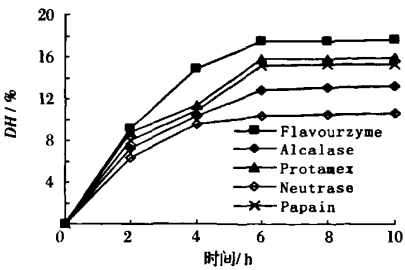


图 1 单酶水解中蛋白质水解度变化曲线

从图 1 可以看到,随时间延长水解度逐渐增加,水解时间超过 6 h,水解度增加得非常缓慢,且不同酶的水解效果不同,Flavourzyme 的水解度明显高于另外 4 种,Protamex 和 Papain 的比较接近,且高于 Alcalase,Neutrase 水解度明显低于前 4 者。

第一作者:硕士研究生。

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 29772009)

收稿日期:2009-02-20,改回日期:2009-03-16

3.3.2 复合酶对水解的影响

将水解效果最好的 Flavourzyme 与其他 4 种酶按 1 : 1 的比例进行两两组合,在相同的条件下做双酶水解猪皮实验,即 pH6.0, 50℃,底物浓度(S) 15%,总加酶量(E)2%,实验结果如图 2 所示。

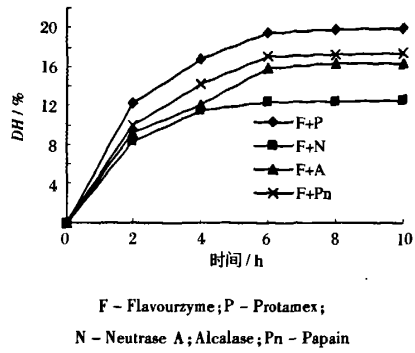


图 2 双酶水解中蛋白质水解度变化曲线

从图 2 可以看到,Flavourzyme 与 Neutrase 的复合效果最差,Flavourzyme 与 Alcalase 和 Papain 的复合、Flavourzyme 与 Protamex 的复合效果较好,结合图 1,说明这 2 种酶对猪皮的水解效果较好。所以,选择 Flavourzyme 与 Protamex 的复合。

3.3.3 响应面实验<sup>[5]</sup>

3.3.3.1 响应面因素的确定

将 Flavourzyme 与 Protamex 的比例控制在 1 : 1,底物浓度控制在 15%,时间定为 6 h,因此,以对水解度影响最大的 3 个因素 pH、温度和总加酶量来设计 3 因素 3 水平实验,表 2 为响应面试验设计表,响应面分析试验数据列于表 3。

表 2 响应面三因素三水平试验设计

因素		水平		
		-1	0	+1
$X_1$	pH	5.5	6	6.5
$X_2$	温度/℃	45	50	55
$X_3$	酶用量/%	1	2	3

采用 Box-Benhknken 进行统计分析,得到猪皮水解度与酶处理各因素变量间的函数关系为:  $Y = 18.46 - 0.50X_1 - 0.90X_2 + 2.79X_3 - 1.10X_1^2 - 1.72X_2^2 - 2.40X_3^2 + 0.20X_1X_2 - 0.15X_1X_3 - 0.27X_2X_3$

3.3.3.2 模型的回归分析和方程分析

为了说明回归方程的有效性及各因素对水解度的影响程度,进行回归分析和方差分析,结果分别见表 4 和表 5。

表 3 响应面分析试验及结果

试验号	因素			水解度/%
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	6	50	2	17.68
2	7	50	2	15.49
3	6	60	2	15.41
4	7	60	2	14.01
5	6	55	1	12.1
6	7	55	1	12.17
7	6	55	3	18.05
8	7	55	3	17.54
9	6.5	50	1	12.19
10	6.5	50	1	10.98
11	6.5	50	3	18.23
12	6.5	50	3	15.96
13	6.5	55	2	18.76
14	6.5	55	2	18.45
15	6.5	55	2	18.18

表 4 模型可信度分析的统计检验结果

Mean(均值)	15.68
R - square(复相关系数的平方) /%	98.64%
Adj R - square(复相关系数) /%	96.20%
RMS E(模型误差的平方根)	0.53
CV(变异系数)	3.41

表 5 回归方程的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
$X_1$	1	2.03	2.03	7.10	0.044 6
$X_2$	1	6.53	6.53	22.86	0.005 0
$X_3$	1	62.38	62.38	218.26	< 0.000 1
$X_1^2$	1	4.43	4.43	15.50	0.011 0
$X_2^2$	1	10.93	10.93	38.23	0.001 6
$X_3^2$	1	21.32	21.32	74.59	0.000 3
$X_1X_2$	1	0.16	0.16	0.55	0.493 2
$X_1X_3$	1	0.084	0.084	0.29	0.610 8
$X_2X_3$	1	0.28	0.28	0.98	0.367 0
一次项	3	70.95	23.65	7.56	0.005 1
二次相	3	0.52	0.17	0.041	0.988 1
交互项	3	32.47	10.82	37.87	0.000 7
模型	9	103.94	11.55	40.41	0.000 4
失拟	3	1.26	0.42	4.99	0.171 5
随机误差	2	0.17	0.084		
总残差	5	1.43	0.29		
总和	14	105.37			

表 3 复相相关系数的平方分别为 98.64% 及 96.20%,说明方程的因变量与全体自变量之间的回归效果显著,同时水解度的误差平方根为 0.53,说明回归方程拟合程度较好。

由方差分析结果可知:失拟不显著( $P = 0.171 5 > 0.05$ ),而回归方程达到了极显著( $P = 0.000 4 < 0.01$ );加酶量对酶解效果的影响最大,温度其次,pH 的影响最小,且 3 个因素之间存在显著的交互作用,

其在水解度的影响如图3-图5所示。

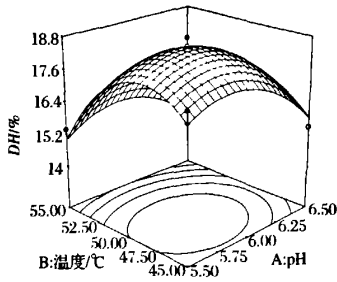


图3 pH和温度对水解度的响应面图

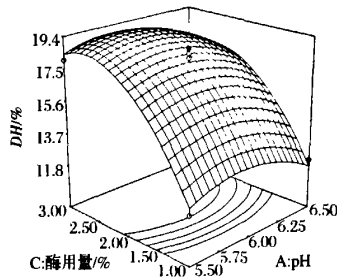


图4 pH和酶用量对水解度的响应面图

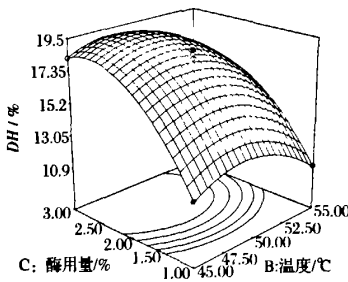


图5 温度和酶用量对水解度的响应面图

### 3.3.3.3 水解度响应曲面的分析

从图3可以看出,随着温度的升高和pH值的增加,水解度先增加而后又缓慢下降,当温度在48.4℃、pH值为5.8附近时,水解度达到最大值;水解度对温度的变化比对pH值的变化敏感。从图4可以看出,当温度一定时,随加酶量增加,水解度呈上升趋势,但加酶量处于较高水平时,水解度曲面趋于

平缓,此外,在同一加酶量时,随着pH值的增加,水解度先增加而后又缓慢下降。在48.4℃、加酶量为2.6%附近时,DH达最大值,DH对加酶量的变化远比对pH值的变化敏感。从图5可以看出,当pH值一定时,随加酶量增加,DH呈上升趋势,但加酶量处于较高水平时,水解度曲面趋于平缓,这说明,酶与底物已经完全反应,因此加酶量继续增大也不会使DH升高。此外,在同一加酶量时,随着温度的升高,DH先增加而后又缓慢下降。

用计算机对回归方程在试验范围内提取最佳方案,得: $X_1 = -0.2985$ ;  $X_2 = -0.3268$ ;  $X_3 = -0.6090$ ,即pH5.85、温度48.37℃,加酶量2.61%,此条件下的理论水解度为19.54%,在此条件下进行3次平行实验,平均值为19.25%,高于表3中的任一试验组合,证明了用响应面分析法得到的最佳工艺条件的可靠性。

## 4 结论

Flavourzyme和Protamex复合酶水解猪皮的优化条件为pH5.85、48.37℃,加酶量2.61%,底物浓度15%,时间6h,在此条件下,猪皮水解度最高,可达到19.25%。此时猪皮蛋白,尤其是胶原蛋白的溶解量明显增加。因此,可以用酶解猪皮的方法制备胶原蛋白和胶原多肽,为猪皮的深加工提供了新的思路,为猪皮蛋白的利用提供一定的试验依据。

## 参考文献

- [1] 李中东. 浅谈猪皮的组成和利用[J]. 肉类研究,1995(2):33-34.
- [2] 毛皮生产技术编写组. 毛皮生产技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1976:57-59.
- [3] 施辉阳. 酶法提取生猪皮胶原的研究[D]. 北京:北京化工大学,2004.
- [4] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1256-1262.
- [5] Giovinni M. Response surface methodology and product optimization[J]. J Food Technology, 1983, 37(11): 41-45.

## Optimization of the Bi-enzyme Hydrolysis of Pigskin

Wu Liang

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**ABSTRACT** Pigskin was taken as raw materials, hydrolysis degree as evaluation index, Flavourzyme and Protamex were selected among Flavourzyme, Protamex, Neutrase, Alcalase, Papain based on single enzyme and double enzymes test. The three-factor and three-level test were designed with Box-Behnken response surface methodology. The optimum process parameters of pigskin enzymatic hydrolysis were set as the following: pH is 5.85, temperature is 48.37℃, the content of enzyme is 2.61%, substrate concentration is 15.0%, hydrolysis time is 6 hours, and the hydrolysis degree was 19.25%.

**Key words** bi-enzyme, pigskin, hydrolysis degree, optimization