

鲟鱼鱼皮胶原的提取及性质研究

鲍士宝¹, 王 璋², 许时婴²

1(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122) 2(江南大学食品学院, 江苏 无锡, 214122)

摘 要 利用醋酸及胃蛋白酶从鲟鱼鱼皮中提取了胶原, 并对其物理与化学特性进行了探讨研究。结果表明: 提取的胶原属于典型的 I 型胶原, 胶原的三股螺旋分子组成为 $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$ 。氨基酸组成及变性温度的分析说明提取的鲟鱼皮胶原由于其自身亚氨基酸含量的特征, 使得它的稳定性远远高于其他鱼类的皮胶原, 但仍然比大多数哺乳类动物皮胶原稳定性要弱。紫外扫描光谱、傅立叶红外光谱及圆二色性研究结果证明提取的胶原三股螺旋结构保持完整。

关键词 鲟鱼鱼皮, 胶原, 提取, 性质

胶原是自然界普遍存在的一类蛋白质, 是结缔组织的重要结构蛋白, 起着支撑器官、保护机体的功能^[1,2]。同时作为动物体内含量最多、分布最广的一类蛋白质, 它们被广泛应用于食品、化妆品及制药工业^[3~6]。随着胶原需求量的越来越大及食品安全等因素, 传统的从牛、猪等哺乳类动物获取的胶原已经不能满足人们的需要, 近年来, 对水产动物胶原的研究越来越引起人们的关注。鱼类的皮、骨、鳞等部位含有丰富的胶原蛋白, 而在鱼产品加工生产过程中会产生大量的皮、骨及鳞等下脚料, 从这些下脚料中提取胶原加以利用, 既可以提高鱼产品加工业的经济效益, 又可以减少下脚料废弃物造成的环境污染。

斑点叉尾鲟鱼是大型的淡水鱼类, 我国于 1986 年由湖北省从美国引进并养殖成功。近几年中国斑点叉尾鲟鱼养殖产量急剧上升, 但国际市场上斑点叉尾鲟鱼加工产品仍然供不应求, 2007 年 1~4 月份, 仅美国从中国进口的斑点叉尾鲟鱼就已达到 6 856 t, 随着国内养殖产量的继续攀升, 加工中将会产生大量的皮、骨、鳞等下脚料。本文以斑点叉尾鲟鱼鱼皮为原料, 采用酸溶与酶促溶的方法提取鱼皮胶原并对其性质进行了研究, 旨在为鲟鱼鱼皮的利用提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

斑点叉尾鲟鱼鱼皮由武汉德炎水产品有限公司提供, -20℃ 保存; 胃蛋白酶(1:10 000, Sigma 公司), 牛跟腱 I 型胶原蛋白标准品(上海博蕴生物科技

有限公司), 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝及过硫酸铵都是电泳纯, 冰乙酸、无水乙醚、盐酸、乙二醇甲醚及氯胺 T 等化学试剂均为分析纯。

JB300-D 型强力电动搅拌机(上海标本模型厂), DDS-11C 电导率仪(上海精密科学仪器有限公司), 4K15 型冷冻离心机(sigma 公司), LGJ-10 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂), 垂直板电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), HP1100 氨基酸分析仪(美国 Agilent 公司), PYRIS-1 型差示扫描量热仪(英国 Perkin Elmer 公司), UV-1100 型紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), Nexus 型傅立叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Electron 公司), J715 型圆二色光谱仪(日本 JAS-CO 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 原料的预处理

解冻鱼皮用刀刮去表皮粘质及残留碎肉, 然后用冷水冲洗干净, 放入绞肉机中绞成约 0.2 cm×0.2 cm 的碎块。用无水乙醚: 鱼皮(mL:g)=10:1 于 4℃ 条件下冷浸脱脂 48 h, 再用冷水冲洗干净。取 10 g 脱脂后的皮块用 100 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液在 4℃ 下浸泡 3 h, 搅拌, 脱去杂蛋白等非胶原物质, 去杂蛋白结束后用去离子水反复冲洗, 去除皮块表面残留碱液。

1.2.2 胶原提取

将预处理过的 10 g 鲟鱼鱼皮浸于 200 mL 0.5 mol/L 醋酸溶液中, 4℃ 条件下搅拌提取可溶性胶原, 提取 24 h 后, 用纱布过滤, 滤液在 10 000 g、4℃ 条件下冷冻离心。过滤及离心所得残渣用 0.5 mol/L 醋酸溶液在相同条件下再提取 12 h, 提取结束后于 10 000 g、4℃ 条件下冷冻离心。合并 2 次离心清液,

第一作者: 博士研究生(王璋教授为通讯作者)。

收稿日期: 2008-05-14, 改回日期: 2008-07-11

用浓 NaOH 溶液盐析沉淀胶原;沉淀出的胶原复溶于 0.5 mol/L 醋酸溶液中,冷冻离心,弃去不溶物,上清液用质量分数 30% 的 NaOH 溶液盐析沉淀;以上操作重复至沉淀出的胶原能够完全溶解于 0.5 mol/L 醋酸溶液中为止,得到的最后沉淀物用去离子水在 4℃ 透析,直至用电导率仪检测透析外液的电导率接近去离子水的电导率时透析结束,透析后的胶原样品冷冻干燥即为酸溶胶原(ASC)。2 次酸提取后的离心残渣悬浮于适量 0.5 mol/L 醋酸溶液中,加入 0.1% 的胃蛋白酶于 4℃ 作用 24 h,其后操作步骤与酸提取操作相同,所得的胶原即为酶促溶胶原(PSC)。

1.2.3 常规成分分析

蛋白含量测定:GB/T 5009.5—2003;脂肪含量测定:GB/T 5009.6—2003;灰分测定:GB/T 5009.4—2003;糖含量测定:GB/T 5009.7—2003。羟脯氨酸含量测定:将样品置于水解管中,加入 6 mL 6 mol/L 盐酸,真空封管,110℃ 水解 24 h,蒸干盐酸,稀释,定容得水解液,采用 Wossener I 法^[7]测定水解液中羟脯氨酸含量。

$$\text{胶原含量}/\% = (\text{羟脯氨酸含量}/14.3) \times 100$$

1.2.4 SDS-PAGE 电泳

采用 Tris-SDS-PAGE 不连续电泳系统,分离胶浓度 8%,浓缩胶浓度 5%,胶厚 0.7 mm,电泳条件 10mA^[8]。

1.2.5 氨基酸组成分析

取适量提取胶原用 6 mol/L HCl,110℃ 真空水解 24 h,蒸干 HCl,定容得水解液。采用 Agilent1100 高效液相色谱仪分析氨基酸组成。高效液相色谱仪条件: C₁₈ 柱,4.0 mm × 125 mm;柱温,40℃;流速,1.0 mL/min;检测波长,338 nm,262 nm(Pro);流动相 A:20 mmol 醋酸钠液,B:20 mmol V(醋酸钠液):V(甲醇):V(乙腈)=1:2:2。

1.2.6 变性温度测定

将冷冻干燥的样品溶于 0.5 mol/mL 醋酸中制成 0.3 g/mL 的胶原溶液,取 10 μL 密封于液体坩锅内,置于差示扫描量热仪内,在 20~50℃ 温度范围内扫描,升温速度 1℃/min。

1.2.7 紫外扫描

将适量的冷冻干燥样品溶于 0.5 mol/mL 醋酸中,在 200~400 nm 波长范围内进行紫外扫描,分辨率 0.5 nm。

1.2.8 傅立叶变换红外扫描

将冷冻干燥的 1 mg 样品与 100 mg 纯 KBr 粉末研磨均匀,置于模具中,在油压机上压片,采用傅立叶红外变换光谱仪在 4 000 ~ 400 cm⁻¹ 波数范围内测定吸收光谱,扫描次数 32 次,分辨率 4 cm⁻¹。

1.2.9 圆二色性

将冷冻干燥的样品溶于 0.001 mol/mL 醋酸中配制成 20 mg/L 的胶原溶液,温度 25℃,比色皿光径 1 mm,分辨率 1.0 nm,扫描速率 100 nm/min,扫描 5 次,测定 250~190 nm 范围的圆二色光谱图。

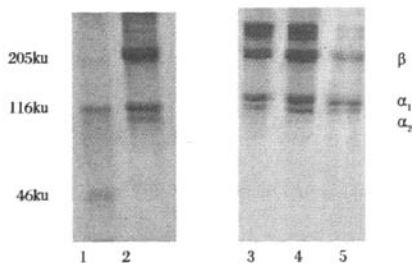
2 结果与讨论

2.1 胶原的提取率及常规成分分析

脱脂去杂后的鱼皮脂肪含量低于 1%,杂蛋白含量低于 8%,胶原损失率低于 2%。两步酸法提取的胶原量占到总胶原量的 20%,而后继步骤中利用胃蛋白酶可以完全促溶酸提后的鱼皮残渣,使难溶于稀醋酸溶液的胶原全部溶出。冷冻干燥后的最终胶原样品中,ASC 与 PSC 的胶原纯度分别达到 92% 和 96%,常规成分分析结果为:脂肪含量 1%,总糖含量 1.8%,灰分 0.6%,总蛋白含量 96.6%。

2.2 SDS-PAGE 电泳分析胶原分子量分布

ASC 与 PSC 的 SDS-PAGE 电泳图显示,2 种方法提取的胶原与 I 型胶原标准品出带一致,至少存在 2 条不同的 α 链,其中 1 条 α 链分子质量略高于 116 ku,另 1 条 α 链的分子量在 90~110 ku;在 β 区有 1 条带出现,可能是其中 2 条 α 链的聚合物,分子量约为 200 ku。另外,从图 1 中 α₁ 链与的 α₂ 链泳带的光密度可以发现,前者约是后者的 2 倍,根据已报道的对 I 型胶原分子结构的描述^[9~11],推断 ASC 与 PSC 的分子组成应为 [α₁(I)]₂α₂(I)。



(1 为高分子量标准蛋白,2,4 为 PSC,3 为 ASC,5 为牛跟腱 I 型胶原标准品)

图 1 ASC 与 PSC 的 SDS-PAGE 电泳图谱

2.3 胶原的氨基酸组成分析

表 1 ASC 与 PSC 的氨基酸组成(残基数/1000)

氨基酸	猪皮胶原	草鱼皮胶原	ASC	PSC
天冬氨酸	44	42	47	45
谷氨酸	72	61	73	72
丝氨酸	33	39	37	37
组氨酸	5	5	6	7
甘氨酸	341	334	320	326
苏氨酸	16	24	24	22
精氨酸	48	57	54	50
丙氨酸	115	135	118	115
酪氨酸	1	2	2	1
胱氨酸	0	4	5	5
缬氨酸	22	31	27	26
蛋氨酸	6	10	3	2
苯丙氨酸	12	17	12	11
异亮氨酸	10	10	12	12
亮氨酸	22	22	21	21
赖氨酸	27	23	32	34
羟赖氨酸	7	8	0	0
羟脯氨酸	97	65	101	105
脯氨酸	123	121	106	109
亚氨基酸总量	220	186	207	214

ASC 与 PSC 的氨基酸组成分析结果见表 1, 其中含量最高的甘氨酸分别占到 32% 和 32.6%; 丙氨酸含量较高, 分别占到 11.8% 和 11.5%; 而作为胶原的特征氨基酸的亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)总量分别占 20.7% 和 21.4%, 低于猪皮胶原中的亚氨基酸含量, 但比草鱼鱼皮胶原中的含量高^[12,13]。ASC、PSC 中脯氨酸的羟化度分别为 48.8% 和 49%, 低于猪皮胶原中脯氨酸的羟化度 55.9%, 但又远高于草鱼鱼皮胶原中脯氨酸的羟化度 34.9%。胶原氨基酸组成的另一大特点是芳香族氨基酸含量较少, ASC 与 PSC 中芳香族氨基酸含量总和低于 1.5%, 且没有检出色氨酸。不同胶原氨基酸组成上的差别归因于胶原的来源、组织、生长环境以及生长年龄等因素的差异, 而这种组成上的差别将会使得它们的某些物理化学性质产生变化, 例如, 胶原纤维的致密度、胶原的热稳定性、胶原的相对分子质量等。

2.4 胶原的热稳定性分析

图 2 是 ASC 的差示量热扫描(DSC)扫描图, 从图 2 中可以看出, ASC 的变性温度为 34.3℃, 高于一般鱼类皮胶原的变性温度, 而仅比猪皮胶原的变性温度低 4℃^[14~16]。PSC 的 DSC 扫描图与 ASC 的结果一致。胶原分子的 3 股螺旋结构主要由氢键维持, 这些氢键主要由甘氨酸、脯氨酸及羟脯氨酸参与形成, 而其中脯氨酸、羟脯氨酸参与形成的氢键对维持三股螺旋结构的贡献最大^[17~19], 所以氨基酸组成中亚氨

基酸含量及脯氨酸羟化度将决定胶原分子的稳定性。ASC、PSC、猪皮胶原以及草鱼鱼皮胶原的热稳定性与它们各自的氨基酸组成相符合。

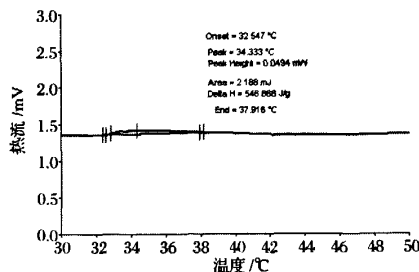


图 2 ASC 的差示扫描量热图

2.5 胶原的紫外吸收特性

图 3 是 PSC 的紫外扫描图, ASC 的扫描结果与之基本相同。由于蛋白质分子中含有能吸收一定波长紫外光的生色基团, 如芳香族氨基酸酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸基团等, 各种紫外生色基团的紫外吸收加和使得蛋白质溶液在紫外区存在着一定的吸收。芳香族氨基酸在 250~290 nm 范围内有最大吸收, 但 PSC 与 ASC 中芳香族氨基酸含量很少, 所以吸收并不明显; 从图 3 上可见, PSC 和 ASC 在 200~280 nm 范围内都有一定的吸收, 但在 233 nm 处有最大吸收, 这是胶原的特征吸收峰, 主要是由肽键 C=O 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所致^[1,9]。

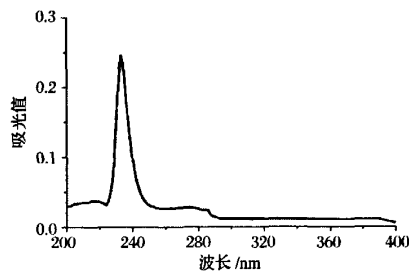


图 3 ASC 的紫外扫描图

2.6 胶原的二级分子构象分析

2.6.1 红外光谱分析

图 4 是 ASC 与 PSC 的傅立叶变化红外扫描图谱, 两者的各特征吸收频率几乎完全一样, 仅仅在某些特征频率上存在吸收强度的差别。其主要吸收带为酰胺 A (3 316.85 cm^{-1})、酰胺 I (1 653.15 cm^{-1})、酰胺 II (1 557.30 cm^{-1}) 和酰胺 III (1 241.06 cm^{-1}), 分别反映了 N-H 的伸缩振动、C=O 的伸缩振动、N-H 的弯曲振动和 C-H 的伸缩振动^[20]。在 3 080~3 100 cm^{-1} 范围内没有出现酰胺 II 的费米共振即

酰胺 B 特征吸收,但在 $2\,926.64\text{ cm}^{-1}$ 存在着 ν_{as} (CH_2) 的特征吸收,这是胶原分子不同于其他一般蛋白质分子的特异之处。由于 N-H 基团与其他基团形成的氢键的影响,使得胶原的酰胺 A 带出现在 $3\,316.85\text{ cm}^{-1}$,较一般蛋白质的 $3\,400\sim 3\,450\text{ cm}^{-1}$ 发生了移动;酰胺 II 带位置出现在 $1\,557.30\text{ cm}^{-1}$,可能是水分子的影响,使得其在 $1\,530\text{ cm}^{-1}\sim 1\,570\text{ cm}^{-1}$ 范围内移动^[21,22]。酰胺 I 带与酰胺 III 带与蛋白质的二级结构密切相关,实验制取的 ASC 与 PSC 的 FT-IR 图谱与其它报道的胶原的 FTIR 图谱相比较,可以证明 ASC 与 PSC 保存有比较完整的三股螺旋结构^[9,10,23]。

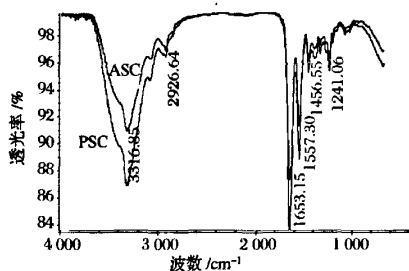


图 4 ASC 与 PSC 的傅立叶变换红外扫描图谱

2.6.2 圆二色光谱分析

图 5 是 ASC 与 PSC 的圆二色光谱图。由图 5 可见,ASC 与 PSC 在 221 nm 都存在最大的正 Cotton 效应(蛋白质分子对左、右圆偏正光吸收的差值),在 198 nm 都存在最大的负 Cotton 效应,这是胶原三股螺旋分子的特征谱图^[13,24,25]。ASC 与 PSC 相比,负的 Cotton 效应要大,这可能与其末端非螺旋区占得比重重大有关。表 2 是圆二色分析仪给出的 ASC 与 PSC 二级结构中 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无归卷曲所占的摩尔百分比以及 Rpn 值(正 Cotton 效应与负 Cotton 效应的比值,反映了胶原分子中螺旋区域与非螺旋区域的相对含量)^[25]。由表 2 的结果,可以看出 ASC 与 PSC 的二级结构相似,但由于 PSC 末端

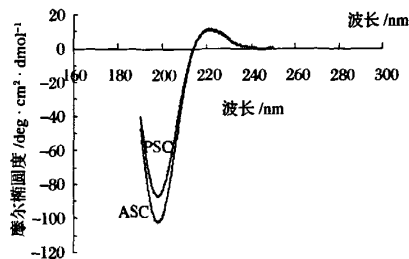


图 5 ASC 与 PSC 的原二色光谱图

肽非螺旋区被胃蛋白酶水解切去从而使得其 Rpn 值较 ASC 的要大。ASC 与 PSC 的圆二色光谱证明了 2 种方法提取的胶原具有 3 股螺旋结构的明显特征。

表 2 ASC 与 PSC 中各构象摩尔百分比及 Rpn 值

构 象	ASC	PSC
α 螺旋	0	0
β 折叠	48.2	45.1
β 转角	0	0
无归卷曲	51.8	54.9
Rpn	0.105 6	0.124 4

3 结 论

利用 0.5 mol/L 醋酸和胃蛋白酶从斑点叉尾鲷鱼鱼皮中提取了酸溶胶原(ASC)与酶促溶胶原(PSC)。SDS-PAGE 电泳结果表明,ASC 与 PSC 是典型的 I 型胶原,其分子至少含有 2 种不同的 α 链,分子组成可能为 $[\alpha_1(\text{I})]_2\alpha_2(\text{I})$,分子质量约为 300 ku 。氨基酸分析结果显示,ASC 与 PSC 含有丰富的甘氨酸,其次是丙氨酸,而芳香族氨基酸含量较少;亚氨基酸含量分别为 20.7% 和 21.4% ,脯氨酸的羟化度分别为 48.8% 和 49% ,均低于猪皮胶原中亚氨基酸含量和脯氨酸的羟化度,但远高于草鱼鱼皮胶原中亚氨基酸含量和脯氨酸的羟化度。胶原的氨基酸组成决定了其分子的热稳定性,从它们的热变性温度可以看出,胶原分子 3 股螺旋结构的稳定性与亚氨基酸的含量及羟化度有强的相关性。ASC 与 PSC 的变性温度在 34.3°C ,低于猪皮胶原的变性温度和牛皮胶原的变性温度,但高于大多数鱼类皮胶原的变性温度。

利用紫外扫描、傅立叶变换红外扫描、圆二色光谱扫描研究了 ASC 与 PSC 的分子结构,结果显示实验制取的 ASC 与 PSC 具有明显的胶原 3 股螺旋的结构特征,说明了在制备的 ASC 与 PSC 中 3 股螺旋结构得到了很好地保存。

以上结果说明了鲷鱼皮胶原在鱼类来源的胶原中具有接近哺乳类胶原的物理化学性质,如氨基酸组成、热稳定性;而其作为鱼类来源的胶原又具有优于哺乳类胶原的应用安全性及广泛可接受性,这使得鲷鱼鱼皮胶原可以作为哺乳类胶原在某些应用上的很好的替代品。

参 考 文 献

- 1 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京:化学工业出版社, 2006. 1~4
- 2 Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins

- [J]. The FASEB Journal, 1991, 5: 2 814~2 823
- 3 Cavallaro J F, Kemp P D, Kraus K H. Collagen fabrics as biomaterials [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 43: 781~791
 - 4 Gudmundsson M, Hafsteinsson H. Gelation from cod skins as affected by chemical treatments [J]. Journal of Food Science, 1997, 62: 37~42
 - 5 Hickman D, Sims T, Miles C A, et al. Isinglass/collagen: denaturation and functionality [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 79: 245~257
 - 6 Kimura S, Miura S, Park Y H. Collagen as the major edible component of jellyfish (*Stomolophus nomurai*) [J]. Journal of Food Science, 1983, 48: 1 758~1 760
 - 7 Woessner J F. The determination of hydroxyproline in tissue and protean samples containing small properties of this imino acid [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1961, 93: 440~447
 - 8 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680~685
 - 9 Li H, Liu B L, Gao H, et al. Studies on bullfrog skin collagen [J]. Food Chemistry, 2004, 84: 65~69
 - 10 Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 85: 81~89
 - 11 张达江, 王 亮. I 型胶原蛋白的结构、功能及其应用研究的现状与前景 [J]. 生物技术通讯, 2006, 17: 265~269
 - 12 Zhang Y, Liu W T, Li G Y, et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2007, 103: 906~912
 - 13 Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, et al. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 32: 199~204
 - 14 Rigby B J. Amino-acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish [J]. Nature, 1968, 219: 166~167
 - 15 Nagai T, Worawattanamatekul W, Suzuki N, et al. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*) [J]. Food Chemistry, 2000, 70: 205~208
 - 16 Nagai T, Araki Y, Suzuki N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Taki fugu rubripes*) [J]. Food Chemistry, 2002, 78: 173~177
 - 17 Brodsky B, Ramshaw John A M. The collagen triple-helix structure [J]. Matrix Biology, 1997, 15: 545~554
 - 18 Bella J, Brodsky H, & Berman H M. Hydration structure of a collagen peptide [J]. Structure, 1995, 3: 893~906
 - 19 Burjandze T V. Hydroxy-proline content and location in relation to collagen thermal stability [J]. Biopolymers, 1979, 18: 931~936
 - 20 阎隆飞, 孙之荣. 蛋白质分子结构 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1999. 178~179
 - 21 Payne K J, Veis A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies [J]. Biopolymers, 1988, 27: 1 749~1 760
 - 22 Ramachandran G X, Chandrasekharan R. Interchain hydrogen bonds via bound water molecules in the collagen triple helix [J]. Biopolymers, 1968, 6(11): 1 649~1 658
 - 23 Surewicz W K, Mantsch H H. New insight into protein secondary structure from resolution enhanced infrared spectra [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1988, 952: 115~130
 - 24 Usha R, Ramsaami T. Structure and conformation of intramolecularly cross-linked collagen [J]. Colloids and Surfaces B, 2005, 41: 21~24
 - 25 Fathima N N, Bose M C, Rao J R, et al. Stabilization of type I collagen against collagenases (type I) and thermal degradation using iron complex [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006, 100: 1 774~1 780

Extraction and Characterization of Collagen from Channel Catfish Skin

Bao Shibao¹, Wang Zhang², Xu Shiying²

1(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University Wuxi, 214122, China)

2(School of Food Science and Technology, Jiang nan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) were obtained from channel catfish skin and partially characterized. The collagen from the skin of channel catfish had special amino acid composition, which make it much more stable than any other fish skin collagen. SDS-PAGE, CD, UV-Vis and FTIR spectra of channel catfish skin collagen were carried out and the results suggested that ASC and PSC were typical type I collagen with integrality of triple-helix.

Key words channel catfish skin, collagen, extraction, characterization