

鲤鱼鱼皮和鱼骨酶溶性胶原蛋白的性质比较*

段蕊^{1,2}, 张俊杰², 陈玲², 叶超², 今野久仁彦³

1(江苏省海洋生物重点实验室, 江苏连云港, 222005) 2(淮海工学院海洋学院, 江苏连云港, 222005)

3(北海道大学水产学部, 日本函馆, 041-8611)

摘 要 以鲤鱼鱼皮和鱼骨为原料提取得到酶溶性胶原蛋白(PSC), 对鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的性质进行比较。电泳结果表明, 鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 都属于 I 型胶原; 2 种胶原蛋白中, 脯氨酸和羟脯氨酸含量均低于牛皮胶原蛋白; 粘度测定的结果显示, 鱼皮 PSC 的变性温度为 28.1℃, 鱼骨 PSC 的变性温度为 30.0℃; 差热分析的结果说明, 鱼骨 PSC 的热稳定性高于鱼皮 PSC, 这与氨基酸分析和粘度分析的结果相一致; 傅立叶红外光谱分析结果显示, 鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 结构具有很大的相似性。

关键词 酶溶性胶原蛋白(PSC), 鱼皮, 鱼骨, 鲤鱼, 性质分析

胶原蛋白是具有独特结构的一类蛋白质, 在生物医学材料、药物输送载体、组织工程、化妆品和食品等领域得到了广泛应用^[1,2]。随着水产品加工业的快速发展, 产生了大量的鱼皮、鱼鳞、鱼骨等废弃物, 如不加以充分利用, 不仅会污染环境, 而且浪费了资源。由于来源于牲畜的胶原蛋白在信仰伊斯兰教、回教等地区的应用受到限制, 以及近年来疯牛病、口蹄疫等传染性疾病的发生和流行, 使人们对来源于牲畜的胶原蛋白的安全性发生了怀疑。

另一方面, 我国是世界上惟一的淡水鱼产量超过海水鱼的国家, 充分发掘淡水鱼资源, 提高淡水鱼加工的附加值, 将促进淡水养殖业的进一步发展。因此, 研究和开发从鱼皮、鱼鳞、鱼骨等水产加工废弃物中制取胶原蛋白逐渐受到人们的重视。本研究以鲤鱼鱼皮和鱼骨为原料提取得到酶溶性胶原蛋白(PSC), 并对鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的性质进行比较, 了解它们的异同, 为以后可能的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活鲤鱼宰杀后取鱼皮、鱼骨, 装在聚乙烯密实袋中, 置于-25℃冰箱保存。

胃蛋白酶(1:10000), Sigma 公司; 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺, 日本和光纯药株式会社; 乙酸、NaOH、SDS、Tris、甘氨酸等均为分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 鲤鱼鱼皮胶原蛋白的提取

第一作者: 在读博士, 副教授。

* 江苏省海洋生物重点实验室基金资助项目(2006HS016)

收稿日期: 2007-11-19

所有操作均在 4℃ 下进行。

原料处理→自来水洗涤→去除杂蛋白(0.1 mol/L NaOH)→去脂肪→0.5 mol/L 乙酸提取 24 h→低温离心→沉淀→加入 0.5 mol/L 乙酸→加入 0.2% (w/w) 胃蛋白酶提取 72 h→离心→胶原蛋白溶液→盐析→透析(0.1 mol/L 乙酸)→透析(蒸馏水透析至无氯离子检出)→冷冻干燥→保存

1.2.2 鱼骨中胶原蛋白的提取

原料处理→自来水洗涤→去杂蛋白(0.1 mol/L NaOH)→洗涤→0.5 mol/L EDTA 溶液脱钙 48 h→10% 异丙醇洗涤→去脂肪→0.5 mol/L 乙酸提取→低温离心→沉淀→加入 0.5 mol/L 乙酸→加入 0.2% (w/w) 胃蛋白酶→离心→胶原蛋白溶液→盐析→透析(0.1 mol/L 乙酸)→透析(蒸馏水透析至无 Cl⁻ 检出)→冷冻干燥→保存

1.3 变性温度的测定

取 75 mg 胶原蛋白溶于 4℃ 10 mL 0.1 mol/L 乙酸溶液中, 用旋转粘度计(NDJ79, 同济大学机电厂)在不同温度下测定粘度值, 以粘度值降低 50% 所对应的温度为变性温度。

1.4 氨基酸分析

将胶原蛋白样品用 6 mol/L HCl 于 110℃ 水解 20 h, 用氨基酸自动分析仪(日立 835-50, 日本日立公司)进行测定。

1.5 SDS-PAGE 电泳^[9]

取 5 mg 胶原蛋白于 4℃ 0.1 mol/L 乙酸溶液中溶胀分散, 取 0.1 mL 胶原溶液与 0.1 mL SDS 样品处理液混合后, 沸水浴加热 2 min 点样, 开始电泳。电流开始为 7 mA, 至浓缩胶与分离胶界限处调整电流为 15 mA, 电泳结束, 固定液固定 30 min, 染色 1 h,

脱色直到无底色。

1.6 差热分析

将胶原蛋白冻干样品 2 mg 盛装于差热分析仪 (DSC Q200 V23.10 Build 79) 的样品池中, 在 50~150 ℃ 以 10.00 ℃/min 速度加热, 得到最大转变温度 (T_{max}), 总的变性焓值 (ΔH) 由峰面积计算得到。

1.7 鲤鱼鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的傅立叶红外光谱分析

取胶原蛋白在红外光谱分析仪 (NEXUS470 型, 美国尼高力公司) 进行测定。

2 结果与讨论

2.1 变性温度的测定

由受热引起的胶原蛋白的变性与胶原蛋白溶液黏度的变化有关^[4,5]。实验中采用旋转粘度计对鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的粘度进行测定, 将胶原蛋白分散于 0.1 mol/L 的乙酸溶液中, 从 14 ℃ 加热至 40 ℃, 并在每一温度下停留 30 min 后测定, 以最大粘度值的 50% 的值所对应的温度为变性温度。由图 1 可知, 鱼皮 PSC 的变性温度为 28.1 ℃, 鱼骨 PSC 的变性温度为 30.0 ℃。鱼骨 PSC 的变性温度稍高于鱼皮 PSC, 这一点可能和鱼体组织有关, 鱼皮所处的水环境一般比鱼体温度稍低, 这一点与以往研究相似, 生活温度越高, 变性温度也越高, 而且相当的明显。另外, Wong 报道了变性温度与脯氨酸和羟脯氨酸的含量有关, 脯氨酸和羟脯氨酸的含量越高, 胶原蛋白的三螺旋结构越稳定, 胶原蛋白的变性温度也越高^[6]。

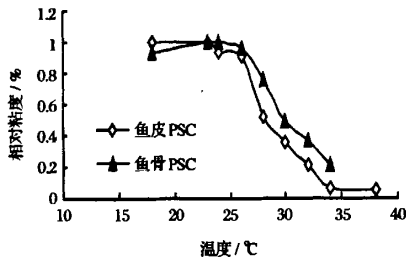


图 1 鲤鱼鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 粘度变化曲线

2.2 氨基酸分析

氨基酸的组成以 1 000 个氨基酸残基中所含氨基酸的数量表示, 表 1 的结果显示, 鲤鱼鱼皮和鱼骨酶溶性胶原蛋白组成中不含有胱氨酸和色氨酸, 甘氨酸的含量约占到总的氨基酸含量的 1/3, 符合胶原蛋白的一般性质。鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 中亚氨酸 (羟

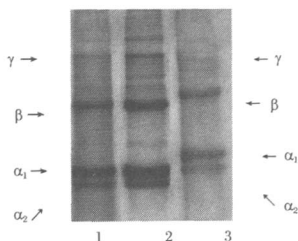
脯氨酸与脯氨酸) 含量分别为 194 个和 204 个, 低于牛皮胶原蛋白中亚氨酸含量 (215 个), 这与 Foegeding 等人的研究结果一致^[7]。亚氨酸的含量与胶原蛋白的热稳定性相关^[8], 也就是与来自哺乳动物胶原蛋白中亚氨酸水平相比, 鲤鱼胶原蛋白中亚氨酸含量偏低, 这可能使鲤鱼胶原蛋白的热稳定性相对较低的原因, 与粘度测定结果一致, 鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的变性温度均低于牛皮的变性温度。同时鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 亚氨酸含量的差异与二者变性温度的差异相一致。

表 1 鲤鱼鱼皮和鱼骨酶溶性胶原蛋白氨基酸组成 个

氨基酸	牛皮胶原蛋白 ^[10]	鲤鱼鱼皮 PSC	鲤鱼鱼骨 PSC
HYP 羟脯氨酸	94	78	86
ASP 天门冬氨酸	45	53	51
THR 苏氨酸	18	24	21
SER 丝氨酸	39	38	34
GLU 谷氨酸	75	77	75
GLY 甘氨酸	330	325	326
ALA 丙氨酸	119	110	112
CYS 胱氨酸	0	0	0
VAL 缬氨酸	21	21	19
MET 蛋氨酸	6	11	10
ILE 异亮氨酸	11	13	11
LEU 亮氨酸	23	29	28
TYR 酪氨酸	3	3	3
PHE 苯丙氨酸	3	13	14
LYS 赖氨酸	26	30	33
HIS 组氨酸	5	7	6
ARG 精氨酸	50	51	50
TRP 色氨酸	0	0	0
PRO 脯氨酸	121	116	118
总计	1 000	1 000	1 000

2.3 SDS-PAGE 电泳

胶原蛋白呈三股螺旋结构, 由 3 条多肽链组成, 每一条胶原链都是左手螺旋构型, 3 条左手螺旋 α 链又互相缠成右手螺旋结构, 即超螺旋结构。图 2 电泳的结果显示, 鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 都至少由 2 种 α 链, $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 组成。2 种胶原蛋白的 β 链含量都较高, 结果说明, 鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 都属于 I 型胶原。对于鱼骨 PSC, 其中含有更多的 γ 链以及更高分子量的多倍体, 可能分子间存在更多的交联。对于牛皮胶原蛋白, β 链与 2 种 α 链的位置与鱼皮、鱼骨有一定的差异, 说明虽然他们都属于胶原蛋白, 但不同来源的胶原蛋白在分子质量方面还是有一定差异的, 鱼皮和鱼骨 PSC 的 2 种 α 链的分子质量小于牛皮胶原蛋白的 2 种对应 α 链, 由 2 种 α 链聚合成的 β 链也是牛皮大于鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC。牛皮 ASC 中, γ 聚合链的含量要少于鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 中 γ 链含量。



样品 1—鱼皮 PSC；2—鱼骨 PSC；3—牛皮 ASC

图 2 鲤鱼鱼皮鱼骨胶原蛋白的 SDS-PAGE 电泳

2.4 差热分析结果

差热分析 DSC 测量的是材料内部与热转变相关的温度、热流的关系,反应了原料本身的特性,如玻璃化转变温度、相转变、冷结晶等。为了解鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 性质的差异,以 1.6 方法进行测定。从图 3 的 DSC 扫描的结果看出,鲤鱼鱼皮 PSC 的最大转变温度(T_{max})为 104.97 °C,而鱼骨 PSC 的最大转变温度(T_{max})为 113.34 °C,说明鱼骨 PSC 的热稳定性高于鱼皮 PSC。该结果与粘度测定的变性温度的差异相一致。

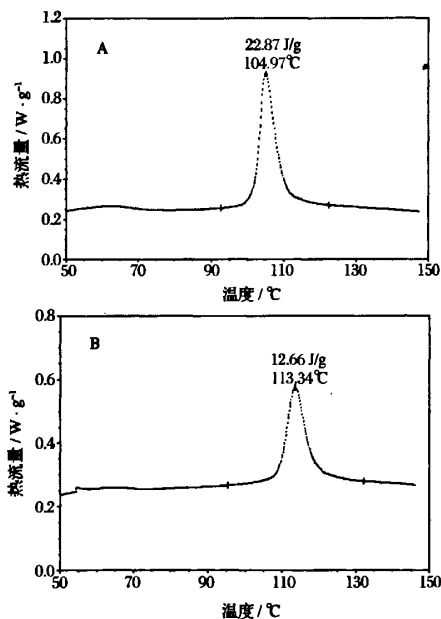


图 3 鲤鱼鱼皮(A)鱼骨(B)胶原蛋白差热图

2.5 鲤鱼鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的傅立叶红外光谱分析

N-H 伸缩振动产生的范围通常在 3 400~3 440 cm^{-1} ,当含有 NH 基团的分子肽段涉及氢键时,N-H 的伸缩振动会向低频率移动,通常在 3 300 cm^{-1} 左

右^[10]。由图 4 的红外谱图可以得到,鲤鱼鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 分别在 3 313.40 cm^{-1} 和 3 312.86 cm^{-1} 有 N-H 伸缩振动,这说明其分子中存在氢键。酰胺 I 带的吸收一般在 1 625~1 690 cm^{-1} ,鱼皮 PSC 在 1 651.13 cm^{-1} 有吸收峰,鱼骨 PSC 的吸收在 1 650.53 cm^{-1} ,符合酰胺 I 带的出峰位置。鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的酰胺 II 带的吸收分别在 1 541.10 cm^{-1} 和在 1 540.47 cm^{-1} 。2 种胶原蛋白的图谱都显示了在 1 235 cm^{-1} (酰胺 III 带)和 1 450 cm^{-1} 均有吸收,这表明鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的螺旋结构保持较好。这 2 种胶原都是加入胃蛋白酶提取得到的,红外谱图的结果也进一步证明了在提取过程中胃蛋白酶仅水解胶原的非螺旋区,对螺旋区没有破坏作用。另外,两种胶原在 2 854 cm^{-1} 和 1 745 cm^{-1} 都有较强的 C-H 伸缩振动。上述结果显示,鲤鱼鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 的结构具有很大的相似性。

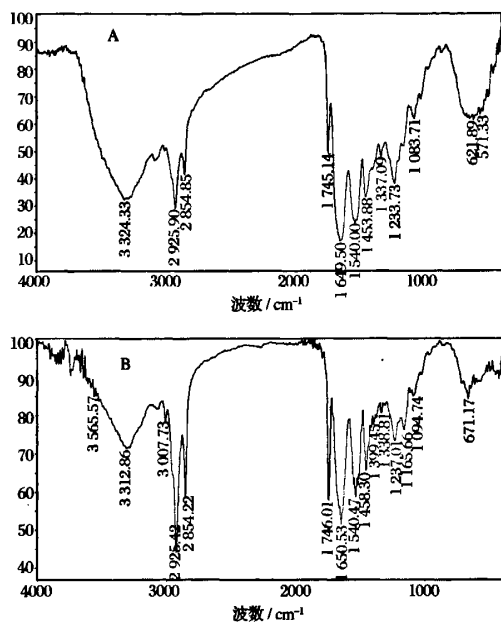


图 4 鲤鱼鱼皮(A)鱼骨(B)傅立叶红外光谱图

3 结 论

粘度测定的结果显示,鱼皮 PSC 的变性温度为 28.1 °C,鱼骨 PSC 的变性温度为 30.0 °C;2 种胶原蛋白中脯氨酸和羟脯氨酸含量均低于牛皮酸性胶原蛋白;差热分析的结果说明鱼、骨 PSC 的热稳定性高于鱼皮 PSC,这与氨基酸分析和粘度分析的结果相一致。电泳以及傅立叶红外光谱分析结果显示,鱼皮 PSC 和鱼骨 PSC 结构具有很大的相似性。

致谢:本研究得到了江苏省海洋生物重点实验室和日本学术振兴会(JSPS)的资助,在此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- 1 任俊莉,付丽红,邱化玉. 胶原蛋白的应用及其发展前景(续)[J]. 中国皮革,2004;33(1):36~38
- 2 张慧君,罗仓学,张新申,等. 胶原蛋白的应用[J]. 皮革科学与工程,2003,13(6):37~41
- 3 Phanat Kittiphattanabawon, Soottawat Benjakul, Wonnop Visessanguan, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)[J]. Food Chemistry, 2005, (89):363~372
- 4 Nagai T, Ogawa T, Nakamura T, et al. Collagen of edible jellyfish exumbrella[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79:855~858
- 5 Nagai T, Suzuki N. Preparation and characterization of several fish bone collagens[J]. Journal of Food Biochemistry, 2000, 68:277~281
- 6 Wong D W S. Mechanism and theory in food chemistry [M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989
- 7 Foegeding E A, Lanier T C, Hultin H O, Characteristics of Edible Muscle Tissue[J]. Food Chemistry, 1996(3):902~906
- 8 Piez K A, Gross J. The amino acid composition of some fish collagens; The relation between composition and structure[J]. Journal of Biological Chemistry, 1960, 235(4):995~999
- 9 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, (227):680~685
- 10 Li H, Liu B L, Gao L Z, et al. Studies on bullfrog skin collagen[J]. Food Chemistry, 2004, (84): 65~69
- 11 宁正祥主编. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998
- 12 沈同,王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 1994
- 13 [美] O·R·菲尼马著,王璋等编译. 食品化学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1991
- 14 陈国梁,贺翠莲. 胶原蛋白的研究进展[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2000, 19(2):78~81
- 15 李彦春,程宝箴,靳立强. 胶原蛋白的应用[J]. 皮革化工, 2001, 19(3):10~14

Characteristics Comparison of Pepsin-soluble Collagen from Skin and Bone of Carp (*Cyprinus Carpio*)

Duan Rui^{1,2}, Zhang Junjie², Chen Ling², Ye Chao², Kunihiko Konno³

1(The Key Lab of Marine Biotechnology of Jiangsu Province, Lianyungang 222005, China)

2(School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

3(Faculty of Fisheries Science, Hokkaido university, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan)

ABSTRACT The compositions and certain properties of pepsin-soluble collagens (PSC) of the skin and bone of carp (*Cyprinus Carpio*) were studied. The denaturation temperature (T_d) of collagens were researched by viscosity of collagen solution. The T_d of PSC from carp skin and bone were 28.1°C and 30.0°C, respectively. Electrophoretic patterns of collagens from skin and bone were very similar, while the pattern of bone collagen showed more cross-linking components. The results of differential scanning calorimetry (DSC) indicated PSC from bone had higher maximum transition temperature (T_{max}) than PSC from skin, which was in accordance with the results of composition analysis and Td. FTIR spectra showed the structures of the collagens were similar.

Key words pepsin-soluble collagen, skin, bone, carp, properties

5 项饮料新国标正式发布

2008年4月21日,《碳酸饮料(汽水)》、《浓缩橙汁》、《橙汁及橙汁饮料》、《含乳饮料》、《茶饮料》5项国家标准由国家标准化管理委员会正式发布(2008年第6号公告),国标号分别为:GB/T10792-2008?;GB/T21730-2008;GB/T21731-2008?;GB/T21732-2008;GB/T21733-2008。5项标准将于2008年11月1日正式实施。标准文本将由中国标准出版社发行。