



酸法和酶法提取鳄鱼皮胶原蛋白及性质研究

包玉龙¹, 陈孙福², 罗永康^{1,*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 广西盟展鳄鱼科技开发有限公司, 广西 南宁 530000)

摘要: 对以鳄鱼皮为原料得到的酸溶性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC)的性质进行比较分析。紫外扫描结果表明所提取出的胶原蛋白在232nm波长处有显著吸收峰; SDS-PAGE结果表明ASC和PSC的肽链组成具有很大的相似性, 均含有两种 α 肽链及其交联链(β 链及 γ 链); 溶解性分析表明鳄鱼皮胶原蛋白的等电点在pH7左右; ASC和PSC的保水性经过6h (25℃)仍然高于85%; ASC的吸油性(24mL/g)和PSC的吸油性(41mL/g)差异较大。根据上述测定结果可知, 鳄鱼皮胶原蛋白ASC和PSC组成类似, 符合I型胶原蛋白的特征, 但二者具体的功能性质略有差异。

关键词: 鳄鱼皮; 酸溶性胶原蛋白; 酶溶性胶原蛋白; SDS-PAGE凝胶电泳

Comparative Studies on Enzymatic and Acidic Extraction and Properties of Collagen from Crocodile Skin

BAO Yu-long¹, CHEN Sun-fu², LUO Yong-kang^{1,*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2. Guangxi Mengzhan of the Crocodile Science and Technology Development Co. Ltd., Nanning 530000, China)

Abstract: Acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) from the skin of crocodile (*Crocodylus*) were prepared and comparatively characterized. Both collagens displayed a distinct absorption peak at 232 nm in their UV absorption spectra. SDS-PAGE analysis showed that the peptide chain composition of ASC and PSC revealed a high similarity, both of which contained $\alpha_1, \alpha_2, \beta$ and γ chains. The solubility test results suggested that the isoelectric point of collagen from crocodile skin was around pH 7. The water-holding capacity of ASC and PSC remained more than 85% after heat treatment for 6 h at 25 °C. A considerable difference in oil-binding capacity was found between ASC (24 mL/g) and PSC (41 mL/g). From the above results, it can be concluded that both collagens from crocodile skin have similar structures and the characteristics of collagen type I despite their differences in functionality.

Key words: crocodile; acid-soluble collagen; pepsin-soluble collagen; SDS-PAGE

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-8123(2012)07-0001-04

鳄鱼具有很高的观赏价值和经济价值, 鳄鱼肉、骨、血、内脏等部位都是珍贵的食材或药材^[1]。近年来, 随着人工养殖技术的日渐成熟, 鳄鱼的商业养殖发展迅速^[2-3], 因而急需进一步解决鳄鱼产品的加工和利用。鳄鱼皮是制作皮革的高档原料^[4], 但由于破损等原因, 有些鳄鱼皮原料不适合做皮革。

胶原蛋白是一类在医药、食品、美容、化工、材料等行业广泛使用的生物性原料。水产胶原蛋白比陆生动物的胶原蛋白具有更高的安全性^[5]。目前国内外对水产胶原蛋白已有一些研究^[6-12], 而鳄鱼胶原蛋白方面的报道还很罕见。

为了更加充分地利用鳄鱼皮资源, 本实验研究从鳄鱼皮中提取胶原蛋白的工艺, 并且将酸法提取产物

ASC和酶法提取产物PSC的性质做比较, 以期为鳄鱼皮的精深加工提供理论依据, 进一步促进鳄鱼养殖产业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

鳄鱼皮由广西盟展鳄鱼科技开发有限公司提供, -20℃冻藏备用。测定前将鳄鱼皮解冻后剪碎(约1cm×1cm), 并进行除杂蛋白和脱脂肪的预处理。

除杂蛋白: 剪碎鳄鱼皮加入到7.5g/100mL的NaCl溶液中, 鳄鱼皮与NaCl溶液比为1:10(m/V), 4℃搅拌12h, 用蒸馏水洗净。

收稿日期: 2012-06-02

作者简介: 包玉龙(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品贮藏及加工。E-mail: baoyulong_cau@sina.com

*通信作者: 罗永康(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品贮藏与加工。E-mail: luoyongkang@263.net

脱脂肪：除杂蛋白之后的鳄鱼皮，加入10%正丁醇溶液(体积比1:10)，4℃搅拌24h脱脂，8h更换一次溶液，最后用蒸馏水洗净鳄鱼皮。

2.2 方法

2.2.1 鳄鱼皮基本成分的测定

水分：直接干燥法，参照GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》；灰分：高温灼烧法，参照GB 5009.4—2010《食品中灰分的测定》；蛋白质：凯氏定氮法，参照GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》；脂肪：索氏抽提法，参照GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》。

2.2.2 酸溶性胶原蛋白(ASC)的制备

将预处理之后的鳄鱼皮置入20倍体积的0.5mol/L的醋酸中提取24h，并不时搅拌，然后分离黏稠的胶状液，残渣在同样条件下提取24h，合并两次的提取液加入一定量的NaCl溶液至最终浓度为0.9mol/L过夜，在4℃、10000×g条件下离心15min，弃去上清，加入10倍体积的0.5mol/L的醋酸中溶解，重复盐析和离心操作一次。在10倍体积的0.1mol/L的醋酸溶液中透析12h，每4h换一次溶液，再用蒸馏水透析至中性，冷冻干燥备用。此时得到的是ASC。

2.2.3 酶溶性胶原蛋白(PSC)的制备

将预处理之后的鳄鱼皮置入20倍体积的0.5mol/L醋酸中，加入鳄鱼皮质量的2%胃蛋白酶，搅拌提取24h，提取液加入一定量的NaCl溶液至最终浓度为0.9mol/L过夜，在4℃条件10000×g离心15min，弃去上清，加入10倍体积的0.5mol/L醋酸中溶解，重复盐析和离心操作一次。在10倍体积的0.1mol/L的醋酸溶液中透析12h，每4h换一次溶液，再用蒸馏水透析至中性，冷冻干燥备用。此时得到的是PSC。

2.2.4 紫外吸收光谱分析

将ASC和PSC样品溶于0.5mol/L的醋酸中，配制成0.35mg/mL的胶原蛋白溶液，以0.5mol/L的醋酸为对照，在200~400nm的波长范围内用紫外-可见扫描仪测定其吸光度，绘制胶原蛋白吸收曲线。

2.2.5 SDS-PAGE凝胶电泳

采用不连续体系SDS-PAGE凝胶电泳，准确称取20mg样品，溶于1mL样品缓冲液，上样前沸水浴煮沸5min。电泳采用含7.5%丙烯酰胺的分离胶和含5%丙烯酰胺的浓缩胶，初始电压为80V，至样品前沿刚好进入分离胶，把电压提高到120V，直至溴酚蓝达到分离胶底部约1cm，停止电泳。

2.2.6 溶解性

将ASC、PSC样品溶解于0.5mol/L醋酸中，配制成5mg/mL的溶液。取5mL胶原蛋白溶液，用6mol/L HCl或NaOH溶液调节到不同pH值，用预先调好pH的蒸馏水定容至10mL，4000×g离心15min，上清液中的蛋白质含量

采用双缩脲法进行测定。将样品溶于0.5mol/L醋酸溶液采用双缩脲法测定样品的总蛋白含量。

$$\text{溶解性}/\% = \frac{\text{上清液蛋白含量}}{\text{总蛋白含量}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.7 吸油性

蛋白质的吸油性以每克蛋白质吸附油脂的量(mL)来表示，用离心法测定：准确量取10mL精炼油，放入离心管中，再分别称取约0.1g ASC、PSC样品加入到离心管中，用细玻璃棒搅拌1min，静置30min，用200r/min的转速离心25min，记录游离油的体积，按公式(2)计算。

$$X = \frac{10.0 - V_f}{m} \quad (2)$$

式中：X为吸油性/(mL/g)； V_f 为游离油的体积/mL；m为样品的实际质量/g。

2.2.8 保水性

保水性是指蛋白质保持水分的能力，采用水分残存率来表示保水性。分别准确称取0.05g ASC和PSC，溶于50mL蒸馏水中，使之充分吸水后，1000×g离心分离5min，去除分离水，将残留物称质量后置于恒温(25℃)恒湿的培养箱中，每隔20min测定一次质量，按公式(3)计算水分残存率。

$$Y/\% = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100 \quad (3)$$

式中：Y为水分残存率/%； m_0 为离心分离后的残留物质量/g；m为一定时间后残留物的质量/g。

2 结果与分析

2.1 鳄鱼皮的基本组成

鳄鱼皮的总蛋白含量为(37.99±2.99)%，粗脂肪含量为(0.58±0.12)%，水分含量为(63.04±0.95)%，灰分含量为(0.21±0.06)%。

2.2 紫外吸收光谱分析

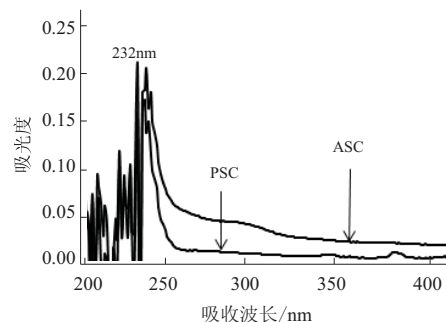


图1 鳄鱼皮ASC和PSC的紫外扫描图谱

Fig.1 Ultraviolet absorption spectra of ASC and PSC from the skin of crocodile

对两种提取方法所制备的胶原蛋白在200~400nm的近紫外光区进行扫描测试,获得的紫外扫描曲线如图1所示。胶原蛋白是一种较为特殊的蛋白,它的氨基酸组成中几乎不含有色氨酸等存在共轭双键的氨基酸,在280nm波长处无吸收峰,反而是在220~230nm波长处有显著吸收峰,所以紫外扫描是鉴定胶原蛋白的简便方法之一^[13]。实验结果在紫外吸收中所测得最大吸收峰在232nm波长处,在280nm波长处未见显著吸收峰,符合胶原蛋白的特征吸收。

2.3 SDS-PAGE凝胶电泳分析

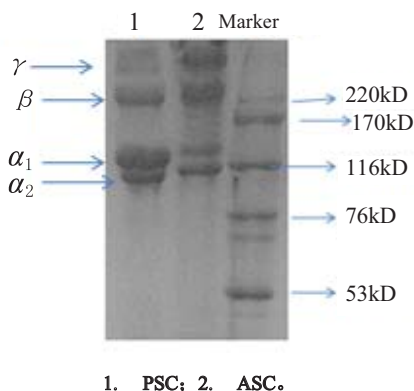


图2 鳄鱼皮ASC和PSC的SDS-PAGE电泳图谱

Fig.2 SDS-PAGE pattern of ASC and PSC from the skin of crocodile

胶原蛋白通常由3条肽链组成,这些肽链被称为 α 链。3条 α 肽链可以都相同,也可以都不同。图2显示了鳄鱼皮ASC和PSC的SDS-PAGE图谱,ASC和PSC样品纯度较高,几乎没有多余条带的出现。二者都至少由两种 α 肽链组成,并且含有它们的交联链(β 和 γ 链),符合I型胶原蛋白的特征,SDS-PAGE结果与鲤鱼鱼皮、黑鳍鲨鱼皮^[14-15]等胶原蛋白相似。ASC和PSC的两条 α 肽链分子质量在116kD左右,且PSC中的两条 α 肽链略低于相应的ASC中两条 α 肽链,这可能是由于原胶原端肽部位被胃蛋白酶轻微水解所致^[15],说明胃蛋白酶并不会破坏胶原蛋白的整体结构。

2.4 溶解性

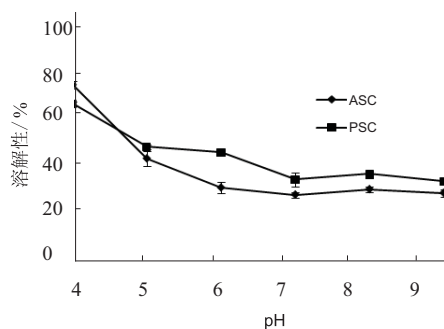


图3 pH值对鳄鱼皮ASC和PSC溶解性的影响

Fig.3 Effect of pH on solubility of ASC and PSC from the skin of crocodile

如图3所示,随着pH值的增加,两种胶原蛋白的溶解性先迅速下降后趋于平稳。pH4时胶原蛋白的溶解性较好,在70%~75%左右,而pH值为7~9时胶原蛋白的溶解性较差,只有30%~40%。胶原蛋白的溶解性与其等电点关系密切,在等电点时,胶原蛋白主要以两性离子状态存在,电荷平衡,静电荷为零,因此溶解度较低。由图可知,鳄鱼皮胶原蛋白等电点在pH7左右,与鲛鱼皮^[16]胶原蛋白一致,但与鲍鱼腹足^[17]PSC稍有差异。

2.5 吸油性

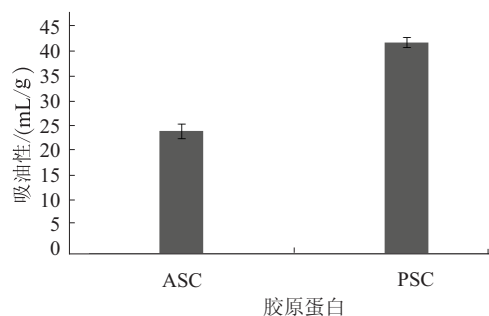


图4 鳄鱼皮ASC和PSC的吸油性

Fig.4 Oil-binding capacity of ASC and PSC from the skin of crocodile

吸油性是表征蛋白质产品吸附油脂能力的物理量,一般用每克蛋白质吸附油的毫升数来表示,一般用离心法测定。影响吸油性的主要因素是蛋白质的种类、蛋白质的组成结构、测定环境等^[18]。不同的研究者,由于所采用油脂、离心时间和速度的不同,对同一产品的测定也可能会得到不同的结果。由图4可知,ASC和PSC的吸油能力分别为24mL/g和41mL/g。PSC的吸油性明显要优于ASC,可能是由于胃蛋白酶的作用暴露出了更多的疏水基团。

2.6 保水性

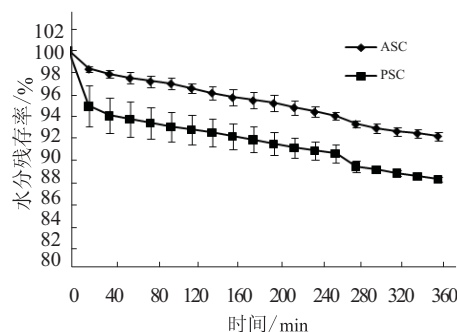


图5 鳄鱼皮ASC和PSC保水性随时间的变化

Fig.5 Change in water-holding capacity of ASC and PSC from the skin of crocodile during heating

保水性是蛋白质产品保持水分的能力,其受浓度、



离子种类、环境因素等影响。鳄鱼皮ASC和PSC在25℃条件下的保水性随时间的变化如图5所示。随着时间的增长,ASC和PSC的保水性持续下降,但PSC较ASC的保水性要差,可能是由于不同的提取方法对亲水基团的影响程度不同,导致暴露的亲水基团含量不同,从而使得二者的保水性存在差异,也可能与产物分子质量大小的差异有关^[19]。经过360min,ASC和PSC的保水性仍然在85%以上,说明制得的ASC和PSC有着很好的保水性。

3 结 论

采用本研究中的提取工艺制得的鳄鱼皮胶原蛋白纯度较高,几乎不含杂蛋白。鳄鱼皮酸溶性胶原蛋白和酶溶胶原蛋白二者均在232nm波长附近有显著吸收,符合胶原蛋白的特征。ASC和PSC都含有两种 α 肽链(α_1 , α_2)和它们的交联链,与I型胶原蛋白相似。ASC和PSC的等电点在pH7左右。ASC和PSC在吸油性和保水性方面存在一定的差异。由于功能性质的差异,鳄鱼皮ASC和PSC可以应用于不同的领域。

参考文献:

- [1] 陈海艳, 张鼎华. 浅谈鳄鱼养殖技术及前景分析[J]. 水产养殖, 2012(12): 10-14.
- [2] 陈献君, 许金旺, 陈海峰. 鳄鱼健康养殖技术研究[J]. 中国水产, 2005(9): 87-89.
- [3] 周敏. 鳄鱼养殖与经营利用产业在我国的发展研究[J]. 福建林业科技, 2002, 29(3): 92-95.
- [4] 屈惠东. 浅谈鳄鱼皮的种类, 结构, 保管及制革工艺[J]. 中国皮革, 2006, 34(23): 3-6.
- [5] 段蕊, 张俊杰, 赵晓庆. 鲤鱼鱼鳞胶原蛋白的理化性质研究[J]. 食品科技, 2006(9): 291-295.
- [6] WANG Lingzhao, YANG Bao, DU Xiuqiao. Extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin[J]. Journal of Food Process Engineering, 2009, 32(5): 743-751.
- [7] ZENG Shaokui, ZHANG Chaohua, LIN Hong, et al. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 879-883.
- [8] LIU Dasong, LIANG Li, REGENSTEIN J M, et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)[J]. Food Chemistry, 2012, 133: 1441-1448.
- [9] 钱曼, 武贤壮, 邱承光, 等. 热力和酶解法提取鱼鳞胶原蛋白的工艺及性质研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(10): 70-72.
- [10] 林家福, 谢福美, 易美华, 等. 热水提取罗非鱼皮胶原蛋白的研究[J]. 中国热带医学, 2008, 8(8): 1317-1318.
- [11] KIM H K, KIM Y H, KIM Y J, et al. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*[J]. Fisheries Science, 2012, 78: 485-490.
- [12] SINGH P, BENJAKUL S, MAQSOOD S, et al. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)[J]. Food Chemistry, 2011, 124: 97-105.
- [13] 辛菲, 李华, 罗星, 等. 鲢鱼皮酸溶性胶原蛋白提取及分子特性的初步研究[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(1): 122-126.
- [14] 段蕊, 张俊杰, 陈玲, 等. 鲤鱼鱼皮和鱼骨酶溶性胶原蛋白的性质比较[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(5): 10-13.
- [15] KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Isolation and properties of acid-and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*)[J]. European Food Research and Technology, 2010, 230(3): 475-483.
- [16] 卓素珍. 鲛鱼皮胶原蛋白的性质, 组成及应用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009.
- [17] 袁起新, 朱蓓薇, 董秀萍, 等. 鲍鱼腹足胶原蛋白的提取及性质研究[J]. 大连工业大学学报, 2012, 31(1): 35-39.
- [18] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 48.
- [19] 王碧, 贾冬英. 皮边角废料提取胶原蛋白的功能特性[J]. 中国皮革,