

不同提取方法对罗非鱼皮胶原蛋白理化特性的影响

郝淑贤, 林婉玲, 李来好, 杨贤庆, 周婉君, 黄 卉, 魏 涯, 岑剑伟, 叶 鸽

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室, 国家水产品加工技术研发中心, 广东 广州 510300)

摘 要: 以罗非鱼皮为研究对象, 分析热水法提取、酸法提取及超声波辅助酶法提取对鱼皮胶原蛋白理化特性的影响。结果表明: 3种提取方法所得胶原蛋白紫外光谱吸收特性峰在220~232 nm之间; 提取方法对羟脯氨酸和脯氨酸含量影响差异不显著, 但热水提取可显著提高鱼皮胶原蛋白的凝胶强度, 酸法提取可显著提高鱼皮胶原蛋白的特性黏度; 3种鱼皮胶原蛋白的变性温度都在31℃附近, 提取方法对变性温度影响差异不显著; 热水法提取胶原蛋白的等电点(pI 5.9)低于其他方法所得胶原蛋白(pI 7附近)。

关键词: 罗非鱼皮; 胶原蛋白; 提取; 理化特性

Effect of Extraction Methods on Physico-chemical Properties of Collagen from Tilapia Skin

HAO Shu-xian, LIN Wan-ling, LI Lai-hao, YANG Xian-qing, ZHOU Wan-jun, HUANG Hui, WEI Ya, CEN Jian-wei, YE Ge
(Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, National R&D Center for Aquatic Product Processing, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The purpose of this work is to compare the physico-chemical properties of collagen extracted from tilapia skin by different methods, hot water extraction, acid extraction and ultrasonic-assisted enzymatic extraction. The collagens exhibited distinctive absorption peaks in the wavelength range of 220–232 nm. There was no significant difference in the contents of hydroxyproline or praline. Gel strength of collagen extracted with hot water was higher than that from other extraction methods, while intrinsic viscosity of collagen extracted with citric acid was the highest. The denaturalization temperature of tilapia skin collagen was about 31℃ regardless of extraction methods. The isoelectric point (pI 5.9) of collagen extracted with hot water was lower than that (pI 7) of collagens extracted by other methods.

Key words: tilapia skin; collagen; extraction; physico-chemical properties

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)15-0059-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201415012

罗非鱼是中国重要的养殖鱼类, 具有繁殖能力强、生长速度快、抗病力强等优点, 近年来随着国际市场需求量的日益增加, 中国罗非鱼养殖规模和养殖产量逐年增加^[1]。在中国, 只有少部分罗非鱼用于鲜食, 绝大部分被加工成冻鱼片出口销售, 加工中产生的鱼头、鱼骨、鱼皮及碎肉等加工副产物约占鱼体总质量的40%~65%, 这些原料通常得不到合理的加工利用, 或被丢弃、掩埋, 或被加工成鱼骨粉作为饲料廉价出售, 不仅导致宝贵资源的大量浪费, 而且造成了严重的环境污染^[2]。因此, 如何有效地利用这部分资源, 已成为罗非鱼产业面临的关键问题。

罗非鱼皮是开发胶原蛋白的重要资源。2010年统计

数据表明, 中国罗非鱼年产量约为 1.2×10^6 t, 其中用于加工的罗非鱼约为 6×10^5 t^[3], 按鱼皮占活体质量的4%计, 每年约有 2.4×10^4 t罗非鱼皮可以被利用。目前, 关于水产动物中胶原蛋白的提取方法的研究报道较多, 其中包括热水浸提、酸法浸提、碱法浸提、盐法浸提与酶法浸提等^[4-5]。这些方法基本都是通过改变蛋白质所在的外界环境, 把胶原蛋白从其他蛋白质中分离出来。由于提取方法对所提取的胶原蛋白理化特性存在不同程度的影响, 本实验重点针对热水浸提、酸法浸提、超声辅助酶法提取等方法对罗非鱼皮胶原蛋白理化特性的影响进行分析, 为实际生产应用提供理论支撑。

收稿日期: 2013-07-11

基金项目: 国家现代农业(罗非鱼)产业技术体系建设专项(CARS-49); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD28B00); 茂名市重大科技专项(2011A01002); 农业部中央级公益性科研院所基本科研项目(2010YD07; 2012TS22); 广西科学研究与技术开发计划项目(11107005-2)

作者简介: 郝淑贤(1972—), 女, 研究员, 博士, 主要从事水产品加工与质量安全研究。E-mail: susanhao2001@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

罗非鱼鱼皮由广东省鹭业水产有限公司提供, 鱼皮用0~4℃冰水清洗后, 去除脂肪等杂物, 切成小块(1 cm×1 cm)于-18℃贮藏备用。

盐酸、乳酸、柠檬酸等化学试剂均为分析纯 广州化学试剂厂; 酪蛋白、R-250考马斯亮蓝 上海普欣生物技术公司; 甘氨酸、十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、Tris-HCl、*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, TEMED)、中高分子质量标准蛋白、30%凝胶贮液 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司; Genesystem5紫外-可见分光光度计 美国Thermo Spectronic公司; QTS-25型质构仪 英国CNS Farnell公司; 乌氏黏度计 上海申立仪器公司; ALPHA1-4冷冻干燥机 德国Christ公司; PHS-2F数字pH计 上海雷磁仪器厂; Akkv-drive电子滴定仪 德国赫施曼公司; PowerPac Basic电泳仪 美国Bio-Rad公司; Tanon-1600凝胶成像系统 上海天能科技公司。

1.3 方法

1.3.1 胶原蛋白提取

1.3.1.1 热水法提取

参考杨贤庆等^[6]的方法, 略有改动。将鱼皮用20倍体积(*m/V*)的0.2 mol/L盐酸于4℃浸泡处理后20 min, 料液比1:20(*m/V*), 浸泡后取出鱼皮用蒸馏水洗涤至pH 5, 沥水后用7倍体积(*m/V*)的蒸馏水浸泡, 于42℃水浴提取12.5 h, 4℃、10 000 r/min冷冻离心20 min后, 上层溶液经冷冻干燥后即得罗非鱼皮胶原蛋白成品。

1.3.1.2 酸法提取

参考傅燕凤等^[7]的方法, 略有改动。将鱼皮用10倍体积(*m/V*)的3% NaCl于4℃条件下浸泡6 h, 用0.1 mol/L柠檬酸浸泡提取48 h, 4℃、10 000 r/min冷冻离心20 min后, 取上层黏稠液用0.9 mol/L NaCl沉淀2 h后, 4℃、10 000 r/min冷冻离心20 min后, 沉淀用蒸馏水复溶后于4℃透析, 直至硝酸银检验无白色沉淀。透析液置于-18℃冰箱中冷冻过夜, 冷干后即得胶原蛋白成品。

1.3.1.3 超声辅助酶法提取

参考杨萌萌等^[8]的方法, 略有改动。鱼皮加入15倍体积0.1 mol/L柠檬酸, 3%胃蛋白酶, 于10℃条件下用90 W超声波进行辅助提取6.5 h, 95℃灭酶5 min后, 4℃、10 000 r/min冷冻离心20 min, 上层溶液经冷冻干燥即得罗非鱼皮胶原蛋白成品。

1.3.2 紫外光谱扫描

参考Caputo等^[9]的方法略有改进。将不同提取方法

所得胶原蛋白配成质量浓度为1 mg/mL溶液(溶剂为0.5 mol/L醋酸), 应用紫外-可见分光光度计对胶原蛋白溶液进行扫描, 扫描范围为200~400 nm, 扫描速率为600 nm/min。

1.3.3 氨基酸组成

参考Su Xiurong等^[10]的方法, 略有改动。将胶原蛋白样品置于水解管中, 加入6 mol/L盐酸, 真空密封, 于130℃水解40 min。水解液用4 mol/L和0.1 mol/L的NaOH中和, 过滤后, 准确吸取滤液2 mL, 过0.25 μm膜后用氨基酸自动分析仪测定样品氨基酸含量。

1.3.4 凝胶强度测定

参考Hao Shuxian等^[11]的方法, 称取胶原蛋白样品用蒸馏水配成质量浓度为6.67 g/100 mL的溶液, 充分溶解后, 取10 mL溶液置于小烧杯, 5℃冰箱冷却过夜后, 用质构仪测定样品凝胶强度, 压头为圆柱形, 直径12.5 mm, 压速30 mm/min, 行进距离10 mm。

1.3.5 特性黏度的测定

参考杨贤庆等^[6]的方法, 将胶原蛋白样品用醋酸溶解, 以0.5 mol/L的醋酸为对照, 于25℃条件下分别测定胶原蛋白质量浓度为1.00、0.83、0.67、0.50、0.33 mg/mL时的黏度, 计算公式为:

$$\text{增比黏度}(\eta_{sp}) = \frac{t}{t_0} - 1 \quad (1)$$

$$\text{特性黏度}([\eta]) = \lim_{\rho \rightarrow 0} \eta_{sp}/\rho \quad (2)$$

式中: t 为样品流出时间; t_0 为醋酸流出时间; ρ 为胶原蛋白样品质量浓度; η_{sp}/ρ 为比浓度黏度; $[\eta]$ 为质量浓度外推到0时的比浓度黏度即特性黏度。

1.3.6 变性温度测定

参考钟朝辉等^[12]的方法, 将胶原蛋白样品用醋酸溶解成质量浓度为1 mg/mL的溶液, 分别测定样品在15~45℃范围内的增比黏度, 各温度点恒温30 min, 不同温度下的流出时间, 以0.5 mol/L为对照。

1.3.7 等电点测定

将几种胶原蛋白用双蒸水配成5 mg/mL溶液, 用0.01 mol/L盐酸和0.01 mol/L氢氧化钠调节溶液pH值, 同时用电导仪测定样品在不同pH值下的电导率, 根据蛋白质在等电点时电导率最低的原理确定溶液的等电点^[13]。

2 结果与分析

2.1 罗非鱼皮胶原蛋白的紫外光谱分析

C=O、COOH和CONH₂基团是胶原蛋白肽链结构中典型的生色基团, 这些基团存在很强的紫外吸收特性, 是判断胶原蛋白类型的重要标志。由图1可知, 热水提取

胶原蛋白、酸法提取胶原蛋白和超声波辅助酶法提取胶原蛋白的最大吸收峰分别为232、222、223 nm, 与I型胶原蛋白特征吸收峰一致。陈善飞等^[14]研究发现鲢鱼皮胶原蛋白紫外最大吸收峰为231 nm, 与实验中的水溶性胶原蛋白紫外吸收特性相似, 但陈善飞等认为不同提取方法对鲢鱼皮胶原蛋白的紫外吸收特性影响无差异。张建忠等^[15]研究表明草鱼皮酸性胶原蛋白的最大吸收峰在222 nm, 酶溶性胶原蛋白的最大吸收峰在223 nm波长处, 与实验结论相一致。

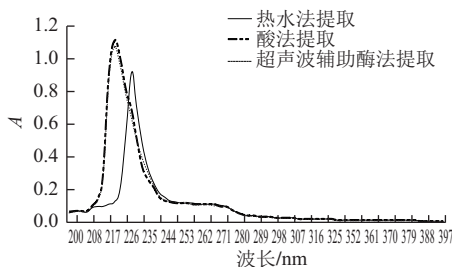


图1 罗非鱼皮胶原蛋白的紫外光谱分析

Fig.1 UV spectra of collagens from tilapia skin

2.2 罗非鱼皮胶原蛋白的凝胶强度和特性黏度

表1 罗非鱼皮胶原蛋白凝胶强度和特性黏度

Table 1 Gel strength and intrinsic viscosity of collagens from tilapia skin

提取方法	热水提取	酸法提取	超声辅助酶法提取
凝胶强度/g	682 ± 31 ^b	300 ± 26 ^a	283 ± 32 ^a
特性黏度/(dL/g)	1.46 ± 0.24 ^a	10.60 ± 1.06 ^c	5.16 ± 0.41 ^b

注: 同行字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

由表1可知, 热水法提取胶原蛋白溶液凝胶强度最高, 约为682 g, 较其他两种方法高出1倍多。导致其他两种处理所得胶原蛋白凝胶强度小于热水提取的原因在于热处理时间不同, 使胶原蛋白形成凝胶过程胶原蛋白的变性程度产生差异。热水法提取胶原蛋白是在42 °C条件下热水提取12.5 h, 而其他两种胶原蛋白只是42 °C热水处理30 min。温度除影响凝胶强度外, 还会影响胶原蛋白的特性黏度, 这是由于胶原蛋白是由多种氨基酸以肽键相连, 热处理过程中, 侧链间的氢键和离子键被破坏, 多聚体变成低聚体, 分子间距增大, 分子的热运动加剧, 使蛋白次级键断裂的同时主链也会有少部分断裂, 长时间的热处理, 会导致胶原蛋白黏度下降。研究结果表明热水法提取的胶原蛋白特性黏度最低, 而酸法提取的胶原蛋白特性黏度最高, 这与Motero等^[16]的研究结果相似。

2.3 罗非鱼皮胶原蛋白的氨基酸组成

由表2可知, 所得几种胶原蛋白氨基酸组成没有明显的差别, 羟脯氨酸和脯氨酸是胶原蛋白的典型氨基酸, 羟脯氨酸含量最高的是超声波辅助酶法提取胶原蛋白, 最低的是热水法提取胶原蛋白。不同提取方法对脯

氨酸和羟脯氨酸含量的影响差异不显著, 3种不同提取方法所得胶原蛋白溶液两种氨基酸含量基本相当, 处于17.64%~18.34%之间, Liu Haiying等^[17]提取鲶鱼皮胶原蛋白中羟脯氨酸和脯氨酸含量约为17%。各胶原蛋白的甘氨酸含量高, 而酪氨酸和苯丙氨酸的含量均很低, 符合胶原蛋白氨基酸组成的甘氨酸的含量和脯氨酸及羟脯氨酸等亚氨基酸含量高, 而芳香族氨基酸和含硫氨基酸含量少的特征。

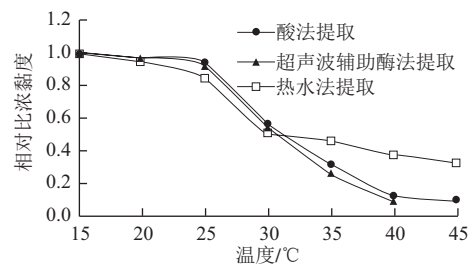
表2 罗非鱼皮胶原蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of collagens from tilapia skin

氨基酸	热水法提取	酸法提取	超声辅助酶法提取
天冬氨酸	4.57	5.12	4.74
苏氨酸	1.85	2.08	1.96
丝氨酸	1.73	1.71	1.70
缬氨酸	1.71	2.41	2.29
谷氨酸	8.03	8.46	8.07
异亮氨酸	0.68	1.34	1.40
甘氨酸	19.17	21.42	21.54
酪氨酸	0.44	0.88	0.57
苯丙氨酸	1.65	2.38	2.26
赖氨酸	2.76	3.26	2.96
丙氨酸	8.44	9.56	9.84
脯氨酸	0.22	0.35	0.32
蛋氨酸	0.97	2.26	2.25
亮氨酸	2.19	2.84	2.61
精氨酸	7.12	7.75	7.55
脯氨酸	11.06	10.27	10.55
组氨酸	0.63	0.62	0.57
羟脯氨酸	6.58	7.50	7.78

2.4 罗非鱼皮胶原蛋白的变性温度

胶原蛋白的热稳定性可以用胶原蛋白在溶液中分子的热变性温度 (T_d) 表示, 即胶原蛋白黏度变化一半时对应的温度。几种胶原蛋白的热变性温度曲线如图2所示。



相对比浓黏度指 T °C 与 15 °C 时的比浓黏度的比值。

图2 胶原蛋白热变性温度

Fig.2 Thermal denaturation temperature curves of collagens from tilapia skin

由图2可知, 热水法提取胶原蛋白、酸法提取胶原蛋白、超声波辅助酶法提取胶原蛋白的热变性温度相近, 都在31 °C附近。Kimura等^[18]认为水产动物胶原蛋白的热

变性温度与其生存的最高环境温度相似,而不受种属影响。从本实验结果来看,罗非鱼皮胶原蛋白的热变性温度基本接近罗非鱼生活环境温度。

2.5 罗非鱼皮胶原蛋白的等电点

等电点是蛋白质极性基团解离的正负离子数相等,静电荷为零时溶液的pH值。蛋白质的等电点与蛋白结构相关,而与环境pH值无关。等电点是蛋白质的一个重要参数,与蛋白质侧链酸性和碱性氨基酸的残基比例相关。胶原蛋白在不同pH值条件下的电导率见图3。

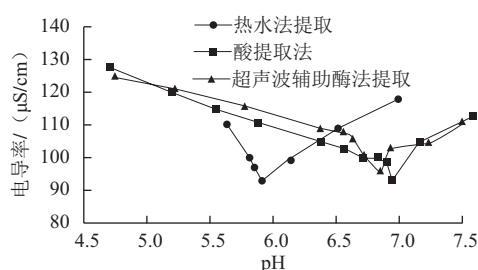


图3 不同pH值条件下提取胶原蛋白的电导率

Fig.3 Electrical conductivity of collagens from tilapia skin at different pH conditions

由图3可知,不同胶原蛋白提取方法得到的胶原蛋白等电点是不同的。酸溶胶原蛋白、超声波辅助提取胶原蛋白、热水提取胶原蛋白的等电点分别为6.9、6.8、5.9。酸法提取及超声波辅助酶法提取胶原蛋白的等电点在中性范围内,说明其侧链氨基酸残基没有被破坏,而热水提取的胶原蛋白等电点为5.9,说明其侧链酰胺基被水解,产生羧基残基,因此,等电点在酸性范围内。Swatschek等^[19]研究海绵胶原蛋白的等电点在6.5~8.5之间, Friess^[20]研究发现牛皮胶原蛋白等电点为7.00±0.09,与本实验结果类似。

3 结论

热水法提取、酸法提取及超声辅助酶法提取胶原蛋白均具有I型胶原蛋白特征,紫外光谱吸收特性峰在220~232 nm之间,变性温度都在31℃附近,特征氨基酸含量差异不显著。热水提取方法所得胶原蛋白凝胶强度增加,黏度下降,等电点降低至酸性范围。

参考文献:

- [1] 马艳平,李嘉彬,郝乐,等.罗非鱼源无乳链球菌S-核糖基高半胱氨酸酶基因(*luxS*)的克隆及其推导蛋白的三维结构预测[J].南方水产科学,2013,9(1):43-47.
- [2] 邓楚津,赖丽芬,曾少葵,等.乳酸菌利用罗非鱼下脚料水解液发酵L-乳酸的探讨[J].南方水产科学,2012,8(1):61-66.
- [3] 刘在军,岑剑伟,李来好,等.罗非鱼血液综合利用的研究思路及展望[J].南方水产科学,2012,8(2):76-80.
- [4] 陈善飞,伍久林,苗静,等.鲢鱼皮胶原蛋白的提取及性质分析[J].食品工业,2012,33(9):10-13.
- [5] WANG Lin, ZOU Yufeng, JIANG Song, et al. Chromatographic separation and physicochemical properties of collagen species in the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*) [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(3): 1134-1138.
- [6] 杨贤庆,张帅,郝淑贤,等.罗非鱼皮胶原蛋白的提取条件优化及性质[J].食品科学,2009,30(16):106-110.
- [7] 傅燕凤,沈月新,杨承刚,等.淡水鱼鱼皮胶原蛋白的提取[J].上海水产大学学报,2004,13(2):146-149.
- [8] 杨萌萌,郭兆斌,余群力,等.超声波辅助法提取胶原蛋白工艺研究[J].甘肃农业大学学报,2013,48(3):121-126.
- [9] CAPUTO I, LEPRETTI M, SCARABINO C, et al. An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains[J]. Analytical Biochemistry, 2012, 421(1): 92-96.
- [10] SU Xiurong, SUN Bei, LI Yanyan, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the coelomic wall of Sipunculida[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(8): 2190-2194.
- [11] HAO Shuxian, LI Laihao, YANG Xianqing, et al. The characteristics of gelatin extracted from sturgeon (*Acipenser baeri*) skin using various pretreatments[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 124-128.
- [12] 钟朝辉,李春美,窦宏亮,等.草鱼鳞酶溶性胶原蛋白黏度特性及变性温度研究[J].食品与发酵工业,2006,32(6):64-68.
- [13] 郭荣荣.甜茅蛋白质组分功能特性评价及对火腿肠质构特性的影响研究[D].武汉:华中农业大学,2007.
- [14] 陈善飞,伍久林,苗静,等.鲢鱼皮胶原蛋白的提取及性质分析[J].食品工业,2012,33(9):10-13.
- [15] 张建忠,安辛欣,王林,等.草鱼皮酸溶性和酶溶性胶原蛋白的提取及性质[J].食品科学,2006,27(12):556-560.
- [16] MOTERO P, GOMEZ-GUILLEN M C. Extracting conditions for Megrim (*Lepidorhombus boseii*) skin collagen affect functional properties of the resulting collagen[J]. Food Science, 2000, 65(2): 1-5.
- [17] LIU Haiying, LI Ding, GUO Shidong. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Food Chemistry, 2007, 101(2): 621-625.
- [18] KIMURA S, MATSUURA F. The chain compositions of several invertebrate collagens[J]. Journal of Biochemistry, 1974, 75: 1231-1240.
- [19] SWATSCHEK D, SCHATTON W, KELLERMANND J, et al. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002, 53(1):107-113.
- [20] FRIESS W. Collagen-biomaterial for drug delivery[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998, 45(2): 113-136.