

云南鲢鱼骨胶原蛋白的制备及其理化性质

姚行行, 郭妍, 庄永亮*

(昆明理工大学 云南省食品安全研究院, 云南 昆明 650500)

摘要: 以云南鲢鱼骨为原料, 采用低温酸法提取制备鱼骨中的酸溶性胶原蛋白 (acid-soluble collagen, ASC), 并对ASC的氨基酸组成、亚基组成、红外吸收、紫外吸收、热稳定性、X射线衍射、微观结构、多肽片段以及溶解性进行了全面的分析。氨基酸组成表明ASC主要含甘氨酸、脯氨酸和丙氨酸, 而酪氨酸、蛋氨酸和半胱氨酸含量较低; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示ASC为I型胶原蛋白; ASC在230 nm波长处有最大紫外吸收峰; 傅里叶变换红外光谱和X射线衍射图谱表明ASC分子排列紧凑, 保持了其原有的三螺旋结构; 差示扫描量热分析结果显示ASC的变性温度分别为86.5 °C和226.2 °C, 有较好的热稳定性; 扫描电子显微镜显示ASC分子分布均匀、表面光滑呈三维立体结构; 多肽片段分析结果显示鱼骨胶原的氨基酸构成主要为Gly-X-Y, 符合胶原蛋白的一级结构的特点; 在pH值小于4的条件下, ASC溶解度较高, 当NaCl质量分数大于4%时, ASC溶解度剧烈下降。

关键词: 鲢鱼骨; 胶原蛋白; 结构; 肽片段; 溶解度

Preparation and Physicochemical Properties of Collagen from Bone of Yunnan Bream

YAO Hanghang, GUO Yan, ZHUANG Yongliang*

(Yunnan Institute of Food Safety, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Acid-soluble collagen (ASC) was extracted from the bone of Yunnan bream using cold acetic acid, and its amino acid composition, subunit composition, Fourier transform infrared (FTIR) and UV absorption characteristics, thermal stability and X-ray diffraction (XRD) characteristics, microstructure, peptide fragments and solubility were analyzed. Amino acid analysis showed that ASC mainly consisted of Gly, Pro and Ala, as well as lesser amounts of Tyr, Met, and Cys. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis confirmed ASC to be typical I collagen. The maximum absorption peak of ASC appeared at 230 nm. The FTIR and XRD spectra proved that the helical structure of ASC remained intact. Differential scanning calorimetry showed that ASC had two denaturation temperatures of 86.5 and 226.2 °C indicating high thermal stability. Scanning electron microscopy showed that the microstructure of ASC was homogenous with a smooth surface. Peptide analysis showed that amino acid sequence of ASC was Gly-X-Y, which was in agreement with the primary structure characteristics of collagen. The solubility of ASC was relatively high under acidic conditions (pH < 4), whereas it dropped sharply when NaCl concentration was higher than 4%.

Keywords: bream bone; collagen; structure; peptide fragments; solubility

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201813006

中图分类号: TS254.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 13-0035-06

引文格式:

姚行行, 郭妍, 庄永亮. 云南鲢鱼骨胶原蛋白的制备及其理化性质[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 35-40. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201813006. <http://www.spkx.net.cn>

YAO Hanghang, GUO Yan, ZHUANG Yongliang. Preparation and physicochemical properties of collagen from bone of Yunnan bream[J]. Food Science, 2018, 39(13): 35-40. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201813006. <http://www.spkx.net.cn>

胶原蛋白是动物体内含量丰富的蛋白质, 所有多细胞动物都含有胶原蛋白^[1]。胶原蛋白具有良好的生物相

容性、生物降解性以及弱抗原性^[2], 被广泛应用于皮革工业、制药业、生物医学以及食品工业等行业, 如制备

收稿日期: 2017-02-16

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31360381)

第一作者简介: 姚行行 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与安全控制。E-mail: 15085465130@163.com

*通信作者简介: 庄永亮 (1981—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品加工与安全控制。E-mail: kmlyzhuang@163.com

生物材料和人造皮肤^[3-4]、可食性或可生物降解的胶原膜^[5]，促进肌肉组织愈合的伤口敷料^[6]以及降解制备生物活性因子和保健食品等。近年来，我国水产养殖和加工产业得到迅猛发展，鱼类加工下脚料等为主要组成的产业副产品产量越来越大^[1]。研究表明，鱼加工下脚料，特别是鱼皮、鱼骨，富含胶原蛋白，是非常丰富的胶原蛋白潜在资源。

胶原蛋白是细胞外基质的结构蛋白，呈纤维状，在水溶液中的溶解性较差，但易溶于酸性介质，因此在制备过程中经常使用低温酸溶液提取法。Chuaychan^[7]和Hu Jinhua^[8]等以有机酸为溶剂分别制备了鱼源酸溶性胶原蛋白。此外，研究表明，有机酸低温提取能够最大程度上保留胶原三螺旋结构及其生物活性^[1]。

云南深水鲢鱼养殖是云南高原特色水产养殖的龙头产业。云南鲢鱼是海水红鲢与淡水尼罗非鱼的杂交品种，一般生活在深淡水中，据统计，云南省2016年云南鲢鱼总产量为24.5万t，其中加工处理6.3万t。目前，云南鲢鱼的加工主要以制作生鱼片为主，从而产生了大量的下脚料，主要包括鱼头、尾、骨、皮、鳞、内脏及其残留鱼肉^[9]。本实验主要从云南鲢鱼加工下脚料鱼骨中低温提取制备酸溶性胶原蛋白（acid-soluble collagen，ASC），并研究分析其理化性质，以期为云南鲢鱼骨的综合利用和精深加工提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

云南鲢鱼骨由云南海王水产有限公司提供，用刀剔除残留鱼肉，自来水清洗干净后切成小块，-25℃存储备用。

蛋白Marker 大连宝生物工程有限公司；胰蛋白酶 上海源叶生物科技有限公司；乙腈（色谱级）德国默克公司。

1.2 仪器与设备

TU-1901紫外-可见光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司；Q Exactive Focus高分辨质谱仪 美国Thermo Fisher公司；L-8900氨基酸分析仪、S-4800型电子显微镜 日本日立公司；DYCZ-25E型电泳仪 北京六一生物科技有限公司；DSC 214 Polyma型差示扫描量热仪 德国耐驰公司；傅里叶变换红外光谱仪 美国布鲁克光学公司。

1.3 方法

1.3.1 ASC的制备

鱼骨ASC的提取参考文献[10]并稍作修改。按1:20（m/V，下同）将鲢鱼骨置于0.1 mol/L NaOH溶液中搅拌除去非胶原物质（2 d，每隔12 h换液），清洗至中性，按1:20加入0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐（pH 7.5）搅

拌进行脱钙处理（5 d，每隔24 h换液），然后按料液比1:20加入体积分数10%正丁醇溶液搅拌除去鱼骨中的脂肪（2 d，每隔24 h换液），最后按1:40加入0.5 mol/L pH 2.6乙酸溶液搅拌3 d，提取鱼骨胶原蛋白，提取结束后，过滤，按料液比1:40向残渣中加入0.5 mol/L乙酸溶液，搅拌1 d进行二次提取，两次滤液合并，4℃、13 000×g离心1 h，上清液用0.9 mol/L NaCl盐析，搅拌过夜，4℃、13 000×g离心15 min，沉淀溶于0.5 mol/L乙酸，转入透析袋用去离子水透析2 d，冷冻干燥，制备鲢鱼ASC，称质量，计算ASC的得率，结果表示为g/100 g鱼骨。

1.3.2 氨基酸组成测定

称取0.1 g ASC于玻璃水解管中，加入6 mL 6 mol/L盐酸溶液，110℃水解22 h。采用L-8900氨基酸分析仪测定水解氨基酸组成。

1.3.3 SDS-PAGE分析

参照Laemmli^[11]的方法对ASC进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）分析。将ASC置于含有1% SDS和3.5 mol/L的磷酸盐缓冲液（pH 7.5）中，100℃加热5 min使其溶解，离心，取上清液以4:1（V/V）的比例与缓冲液（0.5 mol/L Tris-HCl、4% SDS、20%甘油、含或不含10% β-巯基乙醇，pH 6.8）混合，沸水浴5 min后上样。采用7.5%的分离胶和5.0%的浓缩胶。

1.3.4 傅里叶变换红外光谱测定

参考Tamilmozhi等^[12]的方法对ASC进行傅里叶变换红外光谱分析。准确称取1 mg样品与100 mg KBr混合碾磨，压片后置于样品架上进行光谱扫描，扫描范围400~4 000 cm⁻¹。

1.3.5 紫外光谱吸收测定

取150 mg ASC溶于50 mL 0.5 mol/L乙酸中，用0.5 mol/L的乙酸为对照进行紫外光谱扫描，扫描范围190~400 nm。

1.3.6 热特性测定

称取一定量ASC于坩埚中，密封，在0~250℃范围内测定其差示扫描量热图谱，升温速率为10℃/min，以空坩埚作为参照。

1.3.7 X射线衍射

使用Empyrean型X射线衍射仪对ASC进行X射线衍射图谱分析。采用Cu靶Kα射线，λ=0.154 nm。扫描2θ为5°~40°。

1.3.8 微观结构测定

S-4800型扫描电子显微镜观察ASC的显微结构，倍数分别采用200×、500×和2 000×。

1.3.9 胶原的肽段组成测定

称取2 g ASC溶于150 mL磷酸盐缓冲液中（0.05 mol/L，

pH 7.5), 按酶与底物质量比为1:25加入胰蛋白酶, 37 °C水解30 min, 沸水浴15 min终止反应, 6 000×g离心20 min, 透析脱盐, 冷冻干燥。水解液的肽片段利用Q Exactive Focus质谱仪进行高分辨质谱分析, 分析方法同先前研究^[13], 从http://www.uniprot.org/网站下载“fish collagen”数据库, 利用MaxQuant Server (Version 1.5.3.28) 软件对ASC水解肽的质谱信息与“fish collagen”数据库进行比对分析。

1.3.10 pH值对相对溶解度影响的测定

将ASC溶解于0.5 mol/L乙酸中, 制备3 mg/mL ASC溶液, 6 mol/L HCl溶液或6 mol/L NaOH溶液调节pH 1~10, 4 °C振荡30 min, 4 °C、13 000×g离心20 min。用双缩脲法测定上清液中蛋白质的含量, 计算ASC的相对溶解度, 以pH值为横坐标作溶解性曲线。

1.3.11 NaCl质量分数对溶解度影响的测定

将ASC溶解于0.5 mol/L乙酸中, 制备6 mg/mL ASC溶液, 加入NaCl溶液, 最终ASC溶液中NaCl质量分数分别为0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%, 4 °C振荡30 min, 4 °C、13 000×g离心20 min, 测定上清液蛋白含量, 计算ASC的相对溶解度, 以NaCl质量分数为横坐标作溶解性曲线。

1.4 数据统计分析

实验数据用Origin 8.5软件进行数据处理以及作图, 数据为3次实验的平均值。

2 结果与分析

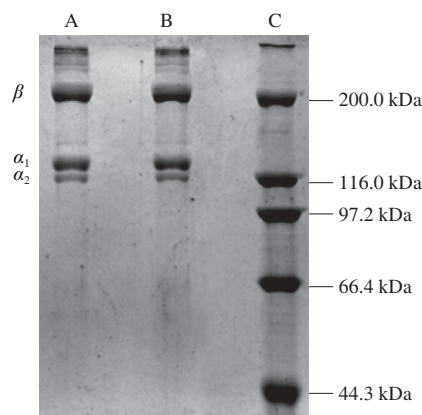
2.1 鲮鱼ASC制备及氨基酸组成

表1 鲮鱼ASC的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of ASC

氨基酸名称	天冬氨酸	苏氨酸	丝氨酸	谷氨酸	甘氨酸	丙氨酸	半胱氨酸	缬氨酸	蛋氨酸
含量/%	4.58	2.61	3.69	7.18	35.04	12.26	0.00	1.86	0.52
氨基酸名称	异亮氨酸	亮氨酸	酪氨酸	苯丙氨酸	赖氨酸	组氨酸	精氨酸	脯氨酸	羟脯氨酸
含量/%	0.85	2.24	0.30	1.45	2.70	0.74	5.44	11.66	6.90

采用低温乙酸提取鲮鱼ASC, 鲮鱼骨中ASC的得率为3.15 g/100 g鱼骨。由表1可知, 鲮鱼骨ASC具有天然胶原蛋白氨基酸组成的基本特征, 即以甘氨酸为主要组成氨基酸, 占总数的35.04%; 其次是丙氨酸和脯氨酸含量较高, 分别占12.26%和11.66%。羟脯氨酸是胶原蛋白中的特征氨基酸, 它由脯氨酸经脯氨酸羟化酶催化氧化而成, 具有稳定胶原蛋白三螺旋结构的作用^[14], 结果表明ASC中的羟脯氨酸含量为6.90%, 羟化率为37.18%。这一结果与深海红鱼骨胶原蛋白的结果相似^[15]。此外, ASC中蛋氨酸, 异亮氨酸, 酪氨酸和组氨酸含量较低, 而半胱氨酸未检测到。

2.2 鲮鱼ASC的SDS-PAGE分析



A. 添加β-巯基乙醇; B. 未添加β-巯基乙醇; C. 蛋白质Marker。

图1 鲮鱼ASC的SDS-PAGE图谱

Fig. 1 SDS-PAGE patterns of ASC

胶原蛋白分子呈三螺旋结构, 由3条α多肽链相互缠绕而成。由图1的电泳结果显示, ASC中含有1条β链和至少2条α链, 即α₁和α₂链。α₁链含量较高, 分子质量约为130 kDa, 由于α₁和α₃在单相垂直电泳中无法分离, 因此, α₁链中可能含有α₃^[16]; α₂链含量较少, 分子质量约为110 kDa。鱼骨ASC中还含有大量β链, 分子质量约为200 kDa。在β链的上方还检测到一些相对分子质量较高的电泳带, 可能是ASC的γ成分, γ链应是α链通过架桥结合而形成的高分子质量成分。此外, 是否添加β-巯基乙醇, ASC电泳图谱未见差异, 表明ASC分子中不含二硫键, 这与氨基酸组成中不含半胱氨酸结果相吻合。云南鲮鱼骨ASC的电泳图谱与鲤鱼^[17]、鲮鱼^[18]以及虹鳉鱼皮^[19]等多种水产动物胶原蛋白的电泳图谱相似。综上所述可推断ASC为I型胶原蛋白。

2.3 鲮鱼ASC的傅里叶变换红外光谱特征

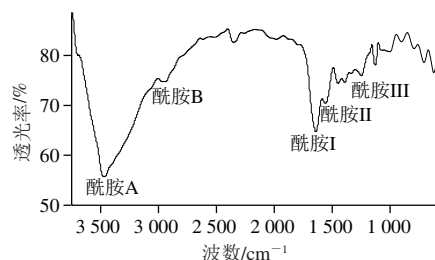


图2 鲮鱼ASC的傅里叶变换红外光谱

Fig. 2 Fourier transform infrared spectrum of ASC

傅里叶变换红外光谱是研究胶原蛋白结构的重要方法之一。如图2所示, ASC具有典型的胶原蛋白傅里叶变换红外光谱特征吸收峰, 即含有酰胺A、B及I、II和III带。酰胺A带与N—H基团的伸缩振动有关, 游离酰胺A带的吸收峰出现在3 400~3 440 cm⁻¹, 当含有N—H基团的分子肽段参与氢键键合时, 其吸收峰将发生蓝移。鲮

鱼ASC的吸收峰为 $3\,442\text{ cm}^{-1}$, 这一结果表明ASC中没有或仅有很少的N—H基团参与了氢键的键合。酰胺B带是由于 $-\text{CH}_2-$ 不对称的伸缩振动引起的, 由图2可知, 鲮鱼骨ASC的酰胺B带的吸收峰为 $2\,915\text{ cm}^{-1}$ 。

酰胺 I、II 和 III 带与胶原蛋白分子的结构相关, 是反映蛋白质肽链骨架结构的最重要吸收峰。其中, 酰胺 I 带归属于多肽链上 $-\text{C}=\text{O}$ 键的伸缩振动吸收峰, 为蛋白质二级结构变化的敏感区, 常被用来分析蛋白质的二级结构; 酰胺 II 带归属于 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲的扭转振动峰; 酰胺 III 带归属于甘氨酸和脯氨酸残基的 $-\text{CH}_2-$ 特征振动峰, 它的存在可以说明ASC三维螺旋结构的完整性。由图2中可知, ASC含有酰胺 I、II 和 III 带的特征吸收峰, 分别在 $1\,631$ 、 $1\,540$ 、 $1\,240\text{ cm}^{-1}$ 处。以上结果表明, 低温酸法提取云南鲮鱼骨ASC较好的保持了其三维结构的完整性。

2.4 鲮鱼ASC紫外吸收特征

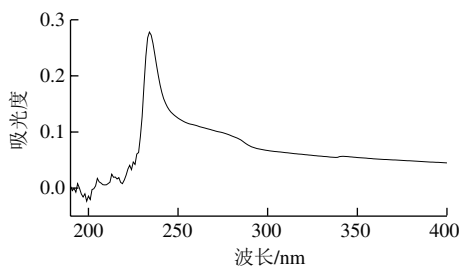


图3 鲮鱼ASC紫外扫描图谱
Fig. 3 UV spectrum of ASC

由于羰基、羧基和酰胺基等发色基团的存在, 胶原蛋白分子能够吸收一定波长的紫外光线。如图3所示, ASC的最大吸收峰出现在 230 nm , 而在 $260\sim 280\text{ nm}$ 范围内没有明显的光吸收, 这是因为ASC中芳香族氨基酸, 如酪氨酸和苯丙氨酸等含量较低产生的^[18]。鲮鱼骨ASC的紫外吸收图谱与文献[20-21]报道的水产动物胶原蛋白结果一致, 符合 I 型胶原蛋白紫外吸收特征。

2.5 鲮鱼ASC热稳定性分析

差示扫描量热法是一种热分析技术, 通过测定样品热焓的变化来研究物质结构变化, 被大量应用于蛋白质热变性研究领域^[22]。鲮鱼骨ASC的差示扫描量热图谱如图4所示, 在 $0\sim 250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内, ASC有2个热吸收峰(T_1 和 T_2)。 T_1 与释放束缚在胶原分子的水以及胶原蛋白三螺旋结构的降解有关; T_2 指的是胶原蛋白交联部分的熔融温度^[23]。鲮鱼骨ASC的热变性温度 T_1 和 T_2 分别为 $86.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $226.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 略高于北梭鱼胶原的热变性温度($T_1=80.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $T_2=203.1\text{ }^{\circ}\text{C}$)^[24], 表明ASC有较好的热稳定性。胶原蛋白的热转变或变性温度不同主要是由于胶原间蛋白水分含量、氨基酸组成、胶原蛋白提取方法以及栖息地的温度差异引起的^[24]。

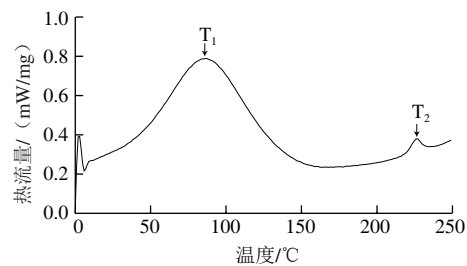


图4 鲮鱼ASC的差示扫描量热图谱
Fig. 4 Differential scanning calorimetry thermogram of ASC

2.6 鲮鱼ASC的X射线衍射特征

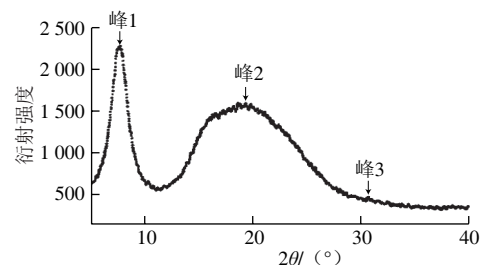


图5 鲮鱼ASC的X射线衍射图谱
Fig. 5 X-ray diffraction diagram of ASC

如图5所示, ASC有3个衍射峰。峰1出现在 $5^{\circ}\sim 10^{\circ}$ 之间, 该峰峰型尖锐, 反映了胶原纤维分子链之间的距离; 峰2出现在 20° 附近, 为一个宽且大的衍射峰, 是由ASC分子内部复杂的结构层次引起的漫散射产生的; 峰3出现在 $30^{\circ}\sim 35^{\circ}$ 之间, 峰型小而尖锐, 该峰反映了胶原蛋白三螺旋结构上相邻氨基酸残基之间的距离^[25]。

根据布拉格方程 $2d\sin\theta=\lambda$, 计算ASC中各个衍射峰的 d 值(X射线的波长为 0.154 nm)。计算结果如表2。

表2 鲮鱼ASC X射线衍射峰对应 d 值
Table 2 d values for X-ray diffraction peaks of ASC

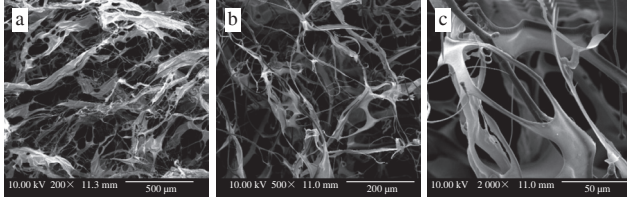
参数	峰1	峰2	峰3
$2\theta/(^{\circ})$	7.686	19.320	30.660
d/nm	1.15	0.46	0.29

由表2可知, 鲮鱼骨胶原纤维分子链之间的距离为 1.15 nm , 略小于比目鱼皮胶原纤维分子链之间的距离^[26], 说明鲮鱼骨胶原分子排列较为整齐紧凑, 分子链间的距离较小。峰2衍射峰对应的 d 值比罗非鱼鳞胶原的略大^[25]。在胶原蛋白的螺旋结构中, 每圈螺旋含有3.3个氨基酸残基, 螺距为 0.96 nm , 沿着螺旋中心轴, 相邻氨基酸残基间的距离为 0.29 nm , 这与研究结果峰3的 d 值一致。以上结果表明, 低温酸法提取后鲮鱼骨ASC很好地保持了其原有的结构。

2.7 鲮鱼ASC的显微结构

胶原蛋白的显微结构是胶原实际应用的重要参数之一^[27]。由图6a、b可知, ASC经放大后呈三维立体的空间

结构,由丝状和薄片状的纤维相互交联而成,分布规则且均匀;由图6c可知,ASC表面细腻光滑,无折叠褶皱现象,这与Li Zhongrui等^[10]研究的马鲛鱼骨胶原显微结构类似,说明ASC在提取过程中基本保持了其原有的纤维结构,比较适合作为食品、药品、化妆品、保健品以及生物医学材料的基料。



a. $\times 200$; b. $\times 500$; c. $\times 2\,000$ 。

图6 鲮鱼ASC的扫描电子显微镜图像

Fig. 6 Scanning electron microscopic images of ASC

2.8 鲮鱼ASC多肽片段分析

表3 鲮鱼ASC胰蛋白酶水解肽段及氨基酸组成

Table 3 Amino acid composition of peptide fragments from ASC digested by trypsin

多肽长度	多肽氨基酸组成
6~8	GLMGPR
	GPMGPR
	GPEGPPGK
	VATVSLPR
	GAAGEGK
	GYTGLDGR
	GFSGLDGAK
	GPAGPQGR
	GAPGPAGPR
	GATGAAGPR
10~12	GFSGLDGAK
	GASGPAGPR
	GFSGLDGAK
	AGATGAAGAR
	GPAGPHGPVGK
	GPAGPHGPVGK
	GADGTPGKDAGPR
	GEAGAVGVAGPSGPR
	GNPGAAGSAGPQPIGPR
	GETGPAGPAGAAGPAGPR
15~18	GNNGDPGPSGPKGEPGAK
	GFSGLDGAKGDSGPAGPK
	GFSGLDGAKGDTGPAGPK
	GDQGPKGADGTPGKDAGPR
	TGDRGETGPAGPAGAAGPAGPR
	GDNGEPGGKVDGAPGKDAGPR
	GEPGAAGAPGALGAPGMQMPGER
>20	GLAGPAGPPGPTGANGDKGEGGSFGPAGPAGPR
	GFSGLDGAKGDTGPAGPKGAGTPEGNGTPGAMGPR

鲮鱼骨ASC的胰蛋白酶水解产物用高分辨质谱进行分析,结合MaxQuant软件对比蛋白肽氨基酸序列组成。

对照UNIPROT中“fish collagen”数据库检测到ASC肽段可信度高于80%的有92条,高于90%的有29条多肽链(表3)。由表3可知,ASC肽段中C端主要的氨基酸为赖氨酸和精氨酸,这符合胰蛋白酶的水解特征。多肽片段的氨基酸构成主要为Gly-X-Y,符合胶原蛋白的一级结构的特点^[28]。该结果为进一步研究鲮鱼骨ASC的一级结构和生理活性提供了基础数据。

2.9 鲮鱼ASC的溶解性质

2.9.1 pH值对ASC相对溶解度的影响

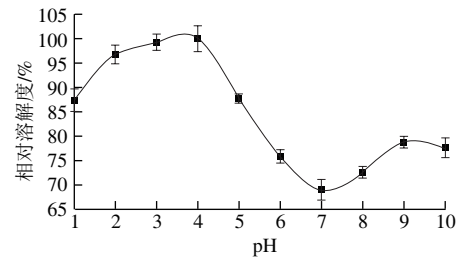


图7 pH值对云南鲮鱼ASC相对溶解度的影响

Fig. 7 Effect of pH on the relative solubility of ASC

如图7所示,随着pH值的升高,ASC的相对溶解度呈先升高后下降再略有回升的趋势。在酸性条件下,胶原溶解度较大,在pH 4时达到最大值。ASC为典型的两性聚电解质溶解性,它的溶解性与等电点密切相关。在等电点附近,胶原蛋白静电荷较小,因而溶解度较小;偏离等电点,胶原蛋白静电荷较大,分子分散性较好,溶解度较大^[29]。由图7可知,鲮鱼ASC等电点在pH 7附近,这与Li Zhongrui等^[10]报道的胶原蛋白的等电点为pH 6~9的结果一致。上述胶原蛋白溶解性特点在许多水产动物的胶原中都有报道^[14,30]。

2.9.2 NaCl质量分数对ASC相对溶解度的影响

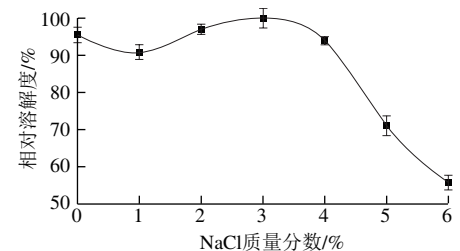


图8 NaCl质量分数对鲮鱼ASC相对溶解度的影响

Fig. 8 Effect of NaCl concentration on the relative solubility of ASC

如图8所示,ASC的相对溶解度在NaCl质量分数在0%~4%之间相对稳定,仅有微小的波动,当NaCl质量分数大于4%以后,相对溶解度随NaCl质量分数的增大而剧烈下降。盐离子通常以两种方式影响蛋白质的溶解性。在低质量分数时,盐离子能和胶原蛋白结合,使胶原蛋白所带正电荷增加,分子间相互排斥,因而分散性

好, 相对溶解度也越大; 在盐离子质量分数较高时, 盐离子可与周围水分子结合形成水化膜, 使蛋白质脱水而盐析, 导致溶解度的降低^[31]。

3 结 论

本实验对云南鲷鱼ASC进行提取并分析了其理化性质。测定了ASC的得率及氨基酸组成, SDS-PAGE测定了其分子质量的大小及胶原蛋白类型, 傅里叶变换红外光谱、紫外光谱和X射线衍射分析其胶原分子的结构特征, 差示热量扫描法分析其热变性温度, 肽段序列分析其酶解特性和一级结构, 扫描电子显微镜显示ASC分子分布及立体结构。ASC溶解性研究显示其在pH 4以及NaCl质量分数为4%时达到最大溶解度。综上结果表明, ASC适合用于食品、药品和保健品等行业的需求, 本实验为云南鲷鱼骨综合利用提供了理论依据和数据支持。

参考文献:

- [1] 庄永亮, 侯虎, 林琳. 鱼皮鱼骨胶原肽制备及生物活性研究[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 1.
- [2] ZHANG Q, WANG Q Q, LÜ S, et al. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Food Bioscience, 2016, 13: 41-48. DOI:10.1016/j.foodb.2015.12.005.
- [3] RAFTERY R M, WOODS B, MARQUES A L P, et al. Multifunctional biomaterials from the sea: assessing the effects of chitosan incorporation into collagen scaffolds on mechanical and biological functionality[J]. Acta Biomaterialia, 2016, 43: 160-169. DOI:10.1016/j.actbio.2016.07.009.
- [4] BROHEM C A, CARDEAL L B, TIAGO M, et al. Artificial skin in perspective: concepts and applications[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2011, 24(1): 35-50. DOI:10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x.
- [5] LÓPEZ D, MÁRQUEZ A, GUTIÉRREZ-CUTIÑO M, et al. Edible film with antioxidant capacity based on salmon gelatin and boldine[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 77: 160-169. DOI:10.1016/j.lwt.2016.11.039.
- [6] TUMMALAPALLI M, BERTHET M, VERRIER B, et al. Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2016, 505(1/2): 234-245. DOI:10.1016/j.ijpharm.2016.04.007.
- [7] CHUAYCHAN S, BENJAKUL S, KISHIMURA H. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 71-76. DOI:10.1016/j.lwt.2015.03.002.
- [8] HU Jinhua, LI Tiancheng, LIU Xiaoyong, et al. Seasonal variation of acid-soluble collagens extracted from the swim bladders and skins of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Food Bioscience, 2016, 15: 27-33. DOI:10.1016/j.foodb.2016.04.006.
- [9] LIU D S, ZHOU P, LI T C, et al. Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41: 290-297. DOI:10.1016/j.foodhyd.2014.04.030.
- [10] LI Zhongrui, WANG Bin, CHI Changfeng, et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*)[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(1): 103-113. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.10.001.
- [11] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685. DOI:10.1038/227680a0.
- [12] TAMILMOZHI S, VEERURAJ A, ARUMUGAM M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*)[J]. Food Research International, 2013, 54(2): 1499-1505. DOI:10.1016/j.foodres.2013.10.002.
- [13] SUN L P, CHANG W D, MA Q Y, et al. Purification of antioxidant peptides by high resolution mass spectrometry from simulated gastrointestinal digestion hydrolysates of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) skin collagen[J]. Marine Drugs, 2016, 14(10): 186-199. DOI:10.3390/md14100186.
- [14] KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)[J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 363-372. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.02.042.
- [15] WANG L, AN X X, YANG F M, et al. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*)[J]. Food Chemistry, 2008, 108: 616-623. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.11.017.
- [16] JONGJAREONRAK A, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*)[J]. Food Chemistry, 2005, 93(3): 475-484. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.10.026.
- [17] RUI D, ZHANG J J, DU X Q, et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 702-706. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.06.020.
- [18] 温慧芳, 陈丽丽, 白春清, 等. 基于不同提取方法的鲷鱼皮胶原蛋白理化性质的比较研究[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 74-81. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201601014.
- [19] 张治国, 肖朝耿, 唐宏刚, 等. 虹鳟鱼皮胶原蛋白提取及其性质研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(8): 148-154. DOI:10.16429/j.1009-7848.2015.08.022.
- [20] ZHANG M, LIU W T, LI G Y. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largemouth bass (*Micropterus macrochirus*)[J]. Food Chemistry, 2009, 115(3): 826-831. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.01.006.
- [21] 杨玲, 赵燕, 鲁亮, 等. 鲟鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其理化性能分析[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 41-46. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201323010.
- [22] 于源, 张敏, 邵弘. 差示扫描量热法在大豆蛋白产品品质检测中的应用[J]. 大豆通报, 2008(1): 26-28; 36. DOI:10.3969/J.ISSN.1674-3547.2008.01.013.
- [23] SIONKOWSKA A, KOZŁOWSKA J, SKORUPSKA M, et al. Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 80: 605-609. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.07.032.
- [24] KOZŁOWSKA J, SIONKOWSKA A, SKOPINSKA-WISNIEWSKA J, et al. Northern pike (*Esox lucius*) collagen: extraction, characterization and potential application[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 220-227. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.08.002.
- [25] CHEN J D, LI L, YI R Z, et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 66: 453-459. DOI:10.1016/j.lwt.2015.10.070.
- [26] GIRAUD-GUILLE M M, BESSEAU L, CHOPIN C, et al. Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states[J]. Biomaterials, 2000, 21(9): 899-906. DOI:10.1016/S0142-9612(99)00244-6.
- [27] 蔡路昀, 马帅, 曹爱玲, 等. 不同部位鳕鱼皮酸性可溶性胶原蛋白的提取及其特性[J]. 食品科学, 2017, 38(11): 52-58. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201711009.
- [28] 李卫林, 曹健, 汤克勇, 等. 胶原蛋白结构和稳定性关系研究[J]. 中国皮革, 2005, 34(23): 14-16. DOI:10.3969/j.issn.1001-6813.2005.23.010.
- [29] WOO J K, YU S J, CHO S M, et al. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(5): 879-887. DOI:10.1016/j.foodhyd.2007.04.015.
- [30] VEERURAJ A, ARUMUGAM M, BALASUBRAMANIAN T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Enchelys macrura*)[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(10): 1592-1602. DOI:10.1016/j.procbio.2013.07.011.
- [31] NALINANON S, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)[J]. Food Chemistry, 2007, 104(2): 593-601. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.12.035.