

鲑鱼皮明胶的提取及胶原蛋白肽的制备

孔 惠¹, 邢晓平², 曹玉华^{*1}, 曹光群¹

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 盐城工学院 化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224051)

摘要: 以鲑鱼皮为原料, 采用酸浸-水提法提取明胶, 通过氨基酸分析以及紫外吸收光谱等方法分析明胶的理化性质。结果显示: 明胶提取率为 60.46%, 纯度为 83.92%, 紫外最大吸收波长为 233 nm, 氨基酸组成符合明胶的特性。为得到低相对分子质量胶原蛋白肽, 选用木瓜蛋白酶对明胶进行水解, 系统考察水解时间、加酶量(质量分数)、底物质量分数、pH、温度对水解率的影响, 并通过正交实验对各影响因素进行优化, 确定最优酶解条件。结果表明: 水解时间 2.5 h, 加酶量 7%, 底物质量分数 10%, 酶解温度 55 ℃, pH 8.0, 该工艺条件下水解度为 12.65%。制备的胶原蛋白肽相对分子质量小, 其中低于 1 000 的占 91.5%。

关键词: 鲑鱼皮; 明胶; 酶解; 胶原蛋白肽; 相对分子质量

中图分类号: TS 254.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)10-1042-06

Preparation of Gelatin and Collagen Peptides from Salmon Skin

KONG Hui¹, XING Xiaoping², CAO Yuhua^{*1}, CAO Guangqun¹

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122 China; 2. School of Chemical and Biotechnology, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China)

Abstract: Gelatin was extracted from salmon skin by acid leaching and water extraction. Ultraviolet spectrum with the maximum absorption wavelength was 233 nm, and amino acid composition testified that the extract conformed to the characteristics of gelatin. The gelatin extract rate was 60.46%, and the gelatin content in the extract was 83.92%. Papain was used for enzyme hydrolysis of gelatin to become collagen peptides which were low molecular weight. The effects of hydrolysis time, amount of enzyme, substrate concentration, pH and temperature on hydrolysis rate were investigated systematically. By orthogonal designed experiments, results showed that the optimal conditions of enzymatic hydrolysis was hydrolysis time 2.5 h at 55 ℃, amount of enzyme 7%, substrate concentration 10%, pH 8.0. At the optimum conditions, the hydrolysis degree was 12.65%. The collagen peptides from salmon skin had low molecular weight, whose molecular weight less than 1000 Da accounted for 91.5%.

Keywords: salmon skin, gelatin, enzymatic hydrolysis, collagen peptides, molecular weight

收稿日期: 2016-08-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(21405133)。

* 通信作者: 曹玉华(1964—), 女, 江苏南通人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然产物活性成分分析及分离技术研究。

E-mail: yuhua64@gmail.com

引用本文: 孔惠, 邢晓平, 曹玉华, 等. 鲑鱼皮明胶的提取及胶原蛋白肽的制备[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(10): 1042-1047.

胶原蛋白作为细胞外基质的重要组成部分,是哺乳动物体内含量最丰富、分布最广的蛋白质^[1-3]。明胶是以胶原蛋白为原料,通过不可逆转的热变性部分水解得到的一种可溶性蛋白质^[4],相对分子质量分布在几万至几百万之间,不能被人体直接吸收。胶原蛋白肽作为胶原蛋白或明胶的酶解产物,相对分子质量低于 10 000,具有特殊的生理活性,尤其以小分子的胶原蛋白肽更易被人体吸收。

市面上的胶原蛋白产品多从猪和牛的皮、骨中提取^[5]。近年来海洋生物胶原蛋白的开发受到广泛关注,深海鱼类胶原蛋白最易被人体吸收^[6]。鱼类加工过程中产生大量废弃物,如鱼皮、鱼鳞和鳍,可成为新的胶原蛋白资源,既降低了生产成本,又减少了环境污染^[7]。而鱼皮中胶原含量比其它部位高很多,最高可超过其蛋白质总量的 80%^[8-9]。近年来,平鳍旗鱼^[10]、阿拉斯加鳕鱼^[11]、海鳗^[12]、红鳍东方鲀^[13]等海洋鱼类的鱼皮相继被用来提取胶原蛋白。

鲑鱼被称为“水中至尊”,鱼皮中存在大量胶原蛋白,作者以鲑鱼皮为原料提取明胶,进一步采用木瓜蛋白酶酶解明胶制备低相对分子质量胶原蛋白肽,并通过单因素实验及正交试验对酶解工艺进行优化^[14]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干鲑鱼皮:北海斯麦儿贸易有限公司产品;木瓜蛋白酶(酶活 1.23×10^5 U/g 生化试剂):上海蓝季科技发展有限公司产品;其余试剂均为分析纯;国药集团化学试剂有限公司产品。

Free-Zone 型真空冷冻干燥机:美国 LABCONCO 公司产品;TU-1901 型紫外分光光度计:北京普析通用仪器有限公司产品;高效液相色谱 Agilent 1100:美国安捷伦公司产品;高效液相色谱 Waters1525 及紫外检测器 Waters2487:美国 Waters 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 鱼皮前处理 干鲑鱼皮切成 $0.4 \text{ cm} \times 0.4 \text{ cm}$ 碎块,清洗, 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡 12 h,水洗至中性,正己烷浸泡 24 h,去离子水冲洗干净。

1.2.2 明胶的提取及纯化 参考文献[15],稍作改动。取适量处理后的鲑鱼皮,加入 6 倍体积质量分数为 0.2% 的 H_2SO_4 以 200 r/min 的转速搅拌 40

min,去离子水冲洗至中性,再加入 6 倍体积质量分数为 1.0% 的柠檬酸同一转速搅拌 40 min,去离子水冲洗至中性,最后加入 10 倍体积去离子水, 45°C 恒温水浴搅拌过夜,先用 2 层纱布过滤,再将滤液以 6 000 r/min 离心 20 min。上层清液中加入 NaCl 盐析 48 h, 8 000 r/min 离心 15 min,沉淀溶于 0.5 mol/L 醋酸溶液中, 0.1 mol/L 醋酸溶液透析 24 h,再用去离子水透析 48 h,每 12 h 换一次透析液,真空冷冻干燥后得到纯度较高的鲑鱼皮明胶。

1.2.3 明胶质量分数的测定 根据 GB/T 9695.23-2008^[16],采用分光光度法,通过测定样品中羟脯氨酸质量分数,将羟脯氨酸含量乘以系数 11.1^[17],即得到原料鲑鱼皮中明胶的质量分数。

1.2.4 紫外光谱扫描 将明胶样品溶解于 0.5 mol/L 醋酸溶液中,配成 1 mg/mL 溶液,在 190~400 nm 波长范围内进行扫描。

1.2.5 氨基酸组成分析 称 120 mg 明胶,加入 8 mL 6 mol/L HCl 溶液,真空封管, 110°C 水解 22 h,水解液定容,过滤,移取 1 mL 滤液放入真空干燥器内过夜干燥。加入 1 mL 0.02 mol/L HCl 溶液,静置 1 h 后, 10 000 r/min 离心 10 min,取 0.4 mL 上清液进行氨基酸组成分析。

1.2.6 木瓜蛋白酶水解明胶的单因素实验 酶解初始条件为底物浓度质量分数 8%,加酶量 5%,温度 55°C , pH 7.0,水解时间 2.5 h。水解过程中采用 pH-stat 法测定酶解液的水解度^[18],通过加入已知浓度的 NaOH 溶液保持酶解液 pH 不变,记录碱消耗量,计算水解度(DH)^[19]。

1.2.7 胶原蛋白肽制备的正交实验设计 在单因素实验结果的基础上,以水解度为指标,按照 $L_9(3^4)$ 正交实验表综合考虑蛋白酶最适 pH、最适温度、加酶量以及底物质量分数对胶原蛋白水解度的影响,结果见表 1。

表 1 正交实验设计因素水平表

Table 1 Levels and factors of orthogonal designed experiments

水平	加酶量 A/ %	底物质量 分数 B/%	酶解温度 C/ $^\circ\text{C}$	pH D
1	6	6	50	7.5
2	7	8	55	8.0
3	8	10	60	8.5

1.2.8 相对分子质量分布 将上述制备的明胶和

肽溶于超纯水中,得到质量浓度 1 mg/mL 的试液,过膜。分析仪器:Waters 1525;色谱柱 TSK-gel G2000SWXL,流动相: $V(\text{三氟乙酸}):V(\text{乙腈}):V(\text{水})=0.1:40:60$;流量:0.5 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL 。检测波长 220 nm。

2 结果与讨论

2.1 明胶提取率及纯度分析

由分光光度法得到羟脯氨酸回归方程:

$$A=0.1901C-0.0118$$

式中: A 为吸光值; C 为羟脯氨酸质量分数;相关系数为 $R^2=0.9958$,相关性良好。由此得到鲑鱼皮中羟脯氨酸质量分数为 4.19%,乘以换算系数 11.1,得到鲑鱼皮中明胶总质量分数为 46.51%。粗提物得率为 28.12%,明胶提取率为 60.46%。粗明胶中羟脯氨酸质量分数为 7.56%,由此得明胶质量分数为 83.92%。

2.2 紫外光谱分析

蛋白质分子含有能够吸收某一波长光的紫外生色基团,各种紫外生色基团的加和使蛋白质分子有一定的紫外吸收^[20]。由图 1 可见,得到的鲑鱼鱼皮提取液的紫外最大吸收峰在 233 nm,符合明胶的紫外吸收特征,主要是肽键 $\text{C}=\text{O}$ 电子 $n\rightarrow\pi^*$ 和 $n\rightarrow\sigma^*$ 跃迁产生的强吸收。鲍士宝等研究鲑鱼皮胶原蛋白的紫外最大吸收峰为 233 nm^[21],与作者提取得到的明胶紫外最大吸收峰结果相似。而芳香族氨基酸色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)中含有共轭双键,其中 Trp 和 Tyr 在 280 nm 附近有紫外吸收,Phe 在 257 nm 处有紫外吸收^[22],而 Trp 在 280 nm 处的紫外吸收最强,但明胶中几乎不含 Trp,所以在

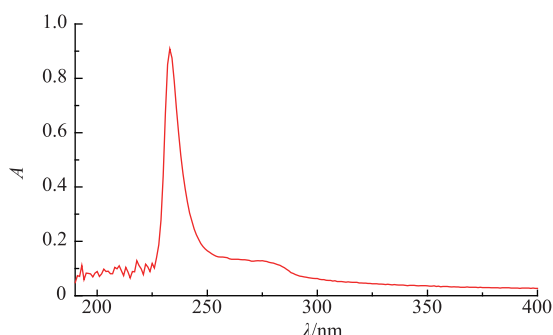


图 1 鲑鱼皮明胶紫外吸收光谱

Fig. 1 UV absorption spectrum of the gelatin from salmon skin

280 nm 处无强吸收峰。本实验中的明胶在 250~280 nm 处有极弱的紫外吸收峰,说明含有少量的 Phe 等芳香族氨基酸,与表 2 中氨基酸分析结果一致。因此,紫外吸收光谱表明经酸浸-水提法得到纯度较高的鲑鱼皮明胶。

表 2 鲑鱼皮明胶的常规氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of gelatin from salmon skin

氨基酸种类	氨基酸质量分数/%
天冬氨酸(Asp)	4.95
谷氨酸(Glu)	7.76
丝氨酸(Ser)	2.95
组氨酸(His)	0.86
甘氨酸(Gly)	34.4
苏氨酸(Thr)	2.26
精氨酸(Arg)	5.34
丙氨酸(Ala)	13.01
酪氨酸(Tyr)	0.33
半胱氨酸(Cys-s)	0.09
缬氨酸(Val)	2.45
甲硫氨酸(Met)	1.53
苯丙氨酸(Phe)	1.45
异亮氨酸(Ile)	1.08
亮氨酸(Leu)	1.82
赖氨酸(Lys)	3.05
脯氨酸(Pro)	11.57
羟脯氨酸(Hyp)	5.10

2.3 氨基酸组分分析

明胶的氨基酸组成有其特点,甘氨酸约占氨基酸总质量的 30%,亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)含量较高,其中脯氨酸约占氨基酸总质量的 10%,而羟脯氨酸作为明胶的特征氨基酸含量较高,并且明胶不含或含极少量的半胱氨酸和色氨酸,对于绝大多数的蛋白质而言,脯氨酸的质量分数相对较少,目前只有胶原蛋白的脯氨酸质量分数超过 10%^[23]。

表 2 中列出了鲑鱼皮明胶的氨基酸质量分数,甘氨酸质量分数最高,为 34.4%,其次为丙氨酸和脯氨酸,质量分数分别为 13.01%、11.57%,亚氨基酸总含量为 16.67%,甘氨酸和亚氨基酸质量分数约占总氨基酸的 50%。芳香族氨基酸及含硫氨基酸质量分数极少。因此,通过对表 2 中氨基酸组成的分析可知,实验得到的是纯度较高的鲑鱼皮明胶。宋芹等^[24]研究罗非鱼皮胶原蛋白中甘氨酸质量分数最高,为

32.28%, 丙氨酸及脯氨酸质量分数分别为 12.36%、11.74%, 羟脯氨酸质量分数为 8.17%, 与鲑鱼皮明胶相比略有差异。

2.4 木瓜蛋白酶水解明胶的单因素实验

作者考察了酶解时间、底物质量分数、加酶量、pH、温度对木瓜蛋白酶水解鲑鱼皮明胶反应的影响。

由图 2(a)可知,反应一开始,水解度随时间变化很快。1 h 后,水解速度减慢,水解度变化也趋于平缓。2.5 h 后,水解度几乎不随时间的变化而变化,水解反应及其缓慢,故水解时间选定为 2.5 h。

由图 2(b)可以看出,底物浓度与水解度呈正相关性,当底物质量分数为 8%时达到最大值,当底物质量分数大于 8%时,水解度呈下降趋势。这是因为,底物质量分数低会降低底物与酶分子结合机率,影响酶促反应的速率,底物浓度增大使得酶作用点增加,水解度增大。而继续增大底物质量分数,使得水解液过于黏稠,酶无法在水解液中完全扩散,酶解效率降低,水解度下降。所以底物质量分数选定为 8%。

由图 2(c)可以看出,加酶量增大,水解度随之增大,当加酶量为质量分数 7%时,酶解速度开始变慢。因为酶具有专一性,只能打开相应位点上的肽键,当加酶量继续增加,所有肽键均被打开后,水解度基本不会再变化。所以加酶量选定为质量分数 7%。

由图 2(d)可知,pH 作为酶解反应的主要因素,水解度随着 pH 值的增大而增大,当 pH 为 8.0 时水解度最大,继续增大 pH,水解度呈现下降的趋势。主要是因为 pH 过高或过低都可能使酶分子变性。另外,在酶解反应过程中,酶解液 pH 的变化会影响酶的活性部位及其附近的解离基团与底物的结合,同时底物的解离也受 pH 变化的影响,因此确定适宜 pH 值为 8.0。

温度是影响酶解反应的主要因素。由图 2(e)可知,温度与水解度也呈正相关性,水解温度达到 55 ℃时,水解度最大,此后继续升高温度,水解度开始降低。这是因为低温使酶与底物的碰撞机率降低,高温使酶失去活性。所以水解温度选定为 55 ℃。

由单因素实验得到木瓜蛋白酶水解鲑鱼皮胶原蛋白的最优条件为:酶解时间 2.5 h、底物质量分数 8%、酶质量分数 7% (8 610 U/g)、pH 8.0、温度 55 ℃,该条件下水解度为 12.27%。

2.5 正交试验结果与分析

由表 3 分析可知,各因素对木瓜蛋白酶水解明胶制备胶原蛋白肽水解率的影响次序为 $A > C > D > B$,即加酶量>酶解温度> pH > 底物质量分数。通过极差分析得到最优水平为 $A_2B_3C_3D_3$,即酶解时间 2.5 h,加酶量 7%,底物质量分数 10%,酶解温度 60 ℃,pH 8.5。而根据水解度数据分析得到较优的组

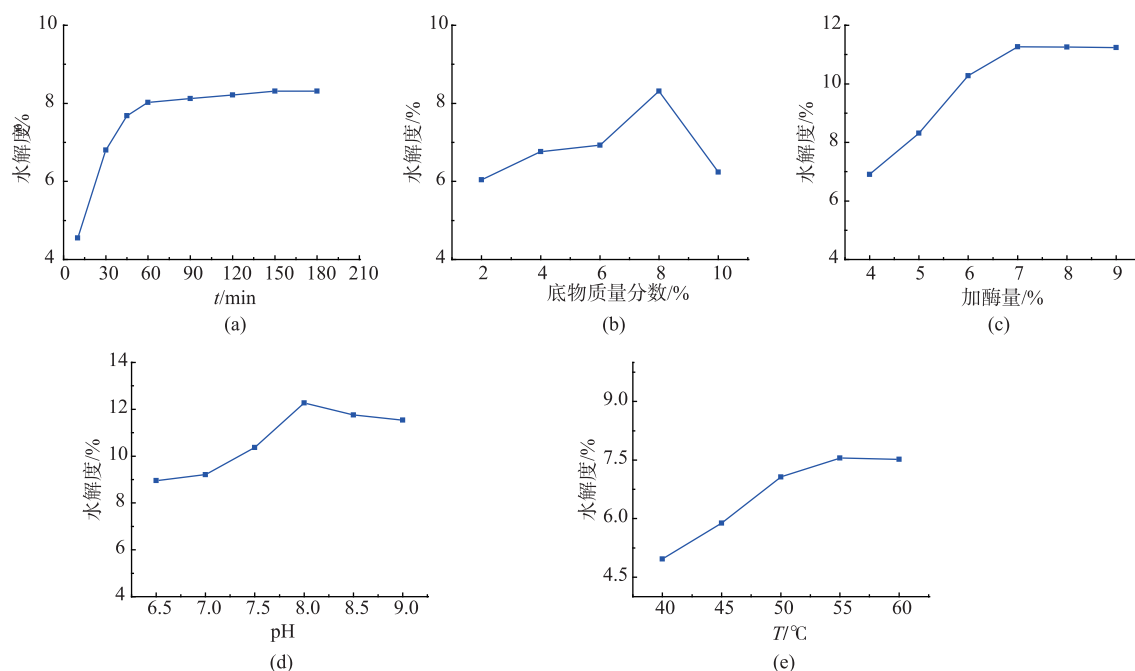


图 2 木瓜蛋白酶水解鲑鱼皮明胶的单因素实验

Fig. 2 Optimization of reaction conditions of enzyme hydrolysis of gelatin from salmon skin

合为 $A_2B_3C_2D_2$ 。以上 2 种水平组合分别进行 3 次平行实验,平均水解度分别为 12.53%和 12.65%。水解度较高的是 $A_2B_3C_2D_2$,即酶解时间 2.5 h,加酶量 7%,底物质量分数 10%,酶解温度 55 ℃,pH 8.0。

表 3 鲑鱼皮明胶酶解反应正交实验分析

Table 3 Orthogonal array experimental results of enzymatic hydrolysis reaction of gelatin from salmon skin

实验号	A	B	C	D	水解度/%
1	1(6)	1(6)	3(60)	2(8.0)	10.16
2	2(7)	1	1(50)	1(7.5)	9.58
3	3(8)	1	2(55)	3(8.5)	11.62
4	1	2(8)	2	1	9.56
5	2	2	3	3	12.45
6	3	2	1	2	10.68
7	1	3(10)	1	3	10.22
8	2	3	2	2	12.58
9	3	3	3	1	11.82
k_1	29.94	31.36	30.48	30.96	
k_2	34.61	32.69	33.76	33.42	
k_3	34.12	34.62	34.43	34.29	
R	4.67	3.26	3.95	3.33	

2.6 鱼皮胶原蛋白肽相对分子质量分布

图 3 和表 4 反映了酸浸-水提法提取的鲑鱼皮明胶相对分子质量情况,相对分子质量大于 10 000 的占 96.7%,主要集中在 25 000,还有少部分成为游离氨基酸。图 4 和表 5 反映了木瓜蛋白酶水解鲑鱼皮明胶得到的胶原蛋白肽的相对分子质量分布情况,相对分子质量在 3 000 以下的占 99.73%,并且主要集中在 1 000 以下,约占 91.5%。

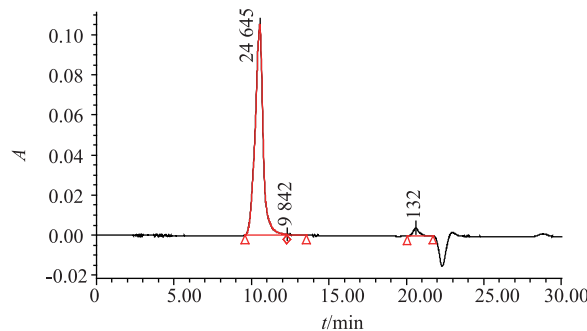


图 3 鲑鱼皮明胶相对分子质量分布图

Fig. 3 Molecular weight distribution profile of gelatins from salmon skin

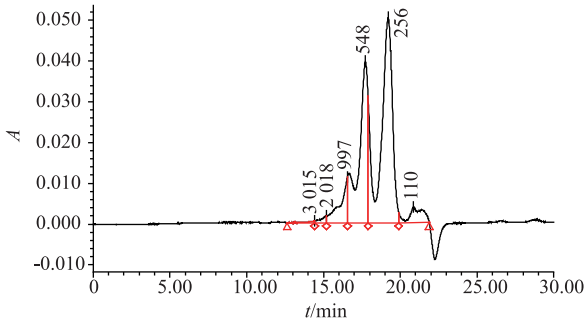


图 4 鲑鱼皮胶原蛋白肽相对分子质量分布图

Fig. 4 Molecular weight distribution profile of collagen peptides from salmon skin

表 4 鲑鱼皮明胶的相对分子质量分布

Table 4 Molecular range of gelatin from salmon skin

相对分子质量	保留时间/min	M_n	M_w	MP	质量分数/%
>10 000	10.550	24 375	24 978	24 645	96.71
10 000~5 000	12.319	8 044	8 256	9 842	0.42
<180	20.626	129	131	132	2.87

表 5 鲑鱼皮胶原蛋白肽的相对分子质量分布

Table 5 Molecular range of collagen peptides from salmon skin

相对分子质量	保留时间/min	M_n	M_w	MP	质量分数/%
5 000~3 000	14.400	3679	3793	3015	0.27
3 000~2 000	15.182	2329	2358	2018	0.88
2 000~1 000	16.555	1255	1303	997	7.34
1 000~500	17.722	627	651	548	32.21
500~180	19.202	278	295	256	54.26
<180	20.854	98	104	110	5.03

3 结 语

以鲑鱼皮为原料通过酸浸-热水抽提法提取得到明胶,提取率为 60.46%,明胶纯度为83.92%。经紫外光谱扫描确定最大吸收波长为 233 nm,并通过氨基酸分析进一步确定提取物为纯度较高的明胶,符合明胶的理化特征。选用木瓜蛋白酶对明胶进行水解,并通过单因素实验及正交实验优化实验条件,确定最优酶解条件为:水解时间 2.5 h,加酶量 7%,底物质量分数 10%,酶解温度 55 ℃,pH8.0,该条件下水解度为 12.65%。制备的胶原蛋白肽相对分子质量主要集中在 1 000 以下,占到 91.5%,属小相对分子质量胶原蛋白肽。

参考文献:

- [1] DUAN R,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.
- [2] WANG Xuechuan. REN Longfang,QIANG Taotao,et al. Progress in collagen preparation and its applications in cosmetics[J]. **China Surfactant Detergent & Cosmetics**,2005,35(6):388-392.(in Chinese)
- [3] MORENO H M,MONTERO M P,GOMEZ G M C,et al. Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture[J]. **Food Chemistry**,2012,134(2):678-685.
- [4] FOEGEDING E A,LANIER T C,HULTIN H O. Food Chemistry[M]. New York;Marcel Dekker,1996.
- [5] GILSENAN P M,ROSS M S B. Shear creep of gelatin gels from mammalian and piscine collagens [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2001,29(1):53-61.
- [6] GUO Yao,ZENG Mingyong,CUI Wenxuan. Aquatic collagen and active polypeptide [J]. **Fisheries Science**,2006,25(2):101-104.(in Chinese)
- [7] YE Tao,LIN Lin,ZHANG Xiaoxia,et al. Extraction and characterization of collagen from tilapia bone [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(3):302-310.(in Chinese)
- [8] ZHANG M,LIU W T,LI G Y. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (Mystus macropterus)[J]. **Food Chemistry**,2009,115(3):826-831.
- [9] OGAWA M,MOODY M W,PORTIER R J. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2003,51(27):8088-8092.
- [10] 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.
- [11] GUO L D,HOU H,LI B F. Preparation,isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin [J]. **Process Biochemistry**,2013,48(5-6):988-993.
- [12] VEERURAJ A,ARUMUGAM M,BALASUBRAMANIAN T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*)[J]. **Process Biochemistry**,2013,48(10):1592-1602.
- [13] NAGAIA T,ARAKIB Y,SUZUKI N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*)[J]. 2002,78(2):173-177.
- [14] ZHANG Yan,WU Yanyan,LI Laihao,et al. Review on research progresses in bioactive peptides from marine protein by enzyme [J]. **Biotechnology Bulletin**,2012(3):42-48.(in Chinese)
- [15] Grossman S,Bergman M,Process for the production of gelatin from fish skins;US,33859589A[P],1992-03-03.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 9695.23-2008,肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [17] 日本食品工业学会食品分析法编辑委员会. 食品分析方法(下)[M]. 重庆:四川科学技术出版社,1986.
- [18] ADLER N J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London:Elsevier Applied Science Publishers Ltd,1986.
- [19] 吴蕾. 胶原蛋白肽螯合钙的制备研究[D]. 武汉:武汉工业学院,2012.
- [20] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
- [21] BAO Shibao,WANG Zhang,XU Shiying. Extraction and characterization of collagen from channel catfish skin [J]. **Food and fermentation industries**,2008,34(9):84-88.(in Chinese)
- [22] LI Bafang,GUO Ming,HOU Hu,et al. Physicochemical Properties of acid-soluble collagen from skin of clarias fuscus [J]. **Modern Food Science & Technology**,2013,19(11):2580-2584.(in Chinese)
- [23] WANG Lin,LIU Yu,WEI Han. Study on preparation of type I collagen with HPLC and its characterization [J]. **Amino Acids & Biotic Resources**,2004,26(2):35-37.(in Chinese)
- [24] SONG Qin,DONG Xiaoping,YU Xiaobing. Comparison of components and contents of collagen amino acids in some mammal and fishes[J]. **Modern Food Science and Technology**,2008,24(12):1239-1242.(in Chinese)