

狮子鱼皮胶原蛋白的提取 及理化性质研究

易继兵, 李八方*, 赵 雪, 闫鸣艳, 庄永亮

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

摘 要:利用酸提法从狮子鱼(*Pterois anennata*)的鱼皮中提取了酸溶性胶原蛋白(ASC),并对其理化性质作了研究。其氨基酸组成和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)均符合I型胶原蛋白的特征。傅氏红外光谱(FTIR)表明其中存在三螺旋的结构。由乌氏黏度法测定它的变性温度(T_d)是34.1℃,差示量热扫描法(DSC)测定它的热稳定性温度(T_s)为66.7℃,它的 T_d 明显高于阿拉斯加狭鳕(T_d ,24.6℃)、马哈鱼(T_d ,19.4℃)、刀鱼(T_d ,23.0℃)等一些常见的鱼皮胶原蛋白的变性温度。

关键词:狮子鱼,胶原蛋白,热稳定性

Extraction and the physical and chemical characterization of collagen in snailfish

YI Ji-bing, LI Ba-fang*, ZHAO Xue, YAN Ming-yan, ZHUANG Yong-liang

(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Acid-soluble collagen (ASC) was extracted from the skin of snailfish (*Pterois anennata*), and its physical and chemical characterization were studied. Amino acid composition and SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) suggests that the collagen might be classified as type I collagen. Fourier-transform infrared (FTIR) investigation showed the existence of helical arrangements of collagen. The denaturation temperature (T_d , 34.1℃) and shrinkage temperature (T_s , 66.7℃), which are measured by Ubbelohde viscometer and differential scanning calorimetry (DSC), is much higher than walleye Pollock (T_d , 24.6℃), mackerel (T_d , 23.0℃), salmon (T_d , 19.4℃) and some common collagen of fish skin.

Key words: snailfish; collagen; thermal stability

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)03-0065-04

胶原蛋白是动物结缔组织中的主要成分,占动物体内蛋白质含量的30%左右^[1]。在脊椎动物中,它广泛分布于皮肤、骨头、软骨、腱、韧带、血管壁、角膜以及其它的一些器官中。在皮革工业、影像业、制药业、糖果生产、生物医学原料和食品工业中有广泛的应用。长期以来,人们都是使用猪、牛的皮和骨提取胶原蛋白和明胶。但因疯牛病、口蹄疫等疾病的爆发,使人们对牲畜胶原制品安全性产生疑虑。另外,由于宗教和习俗等原因,有些地区也不能使用牲畜胶原蛋白制品。因此,寻找胶原蛋白的新来源显得愈来愈迫切^[2]。水产动物尤其是其加工废弃物—皮、骨、鳞中含有丰富的胶原蛋白,具有开发利用价

值。由于鱼类生活环境的差异,从热水鱼中提取的胶原蛋白的热稳定性比从冷水鱼中提取的胶原蛋白热稳定性高很多^[1]。因此,本文以生活在热水中的狮子鱼为研究对象,对从其鱼皮中提取的胶原蛋白的理化性质做了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

狮子鱼皮 山东东方海洋科技股份有限公司提供;氢氧化钠、醋酸、氯化钠 均为分析纯。

CN66M233256 型乌氏黏度计 北京科思佳科技有限责任公司;DYY-6C 型电泳仪 北京六一仪器厂;200-PC 型差示扫描量热仪 耐驰仪器(上海)有限公司;200SXV 型傅立叶红外光谱仪 美国尼高力仪器公司;835-50 型氨基酸自动分析仪 日立公司;BR4i 型冷冻离心机 法国捷安公司。

1.2 实验方法

1.2.1 胶原蛋白的提取 按照文献[3]的方法,并进

收稿日期:2009-04-07 * 通讯联系人

作者简介:易继兵(1983-),硕士研究生,研究方向:海洋生物活性物质及其功能特性研究。

基金项目:国家自然科学基金(30871943);国家高技术研究发展计划(2006AA09Z438)。

行改进。将经过预处理(去鳞、去肉、去鳍)的鱼皮用 0.1mol/L 的 NaOH($w/v = 1:20$) 4℃ 浸泡 2h,使鱼皮充分溶胀,以部分去除其中的非胶原蛋白成分和钝化鱼皮中的蛋白酶,然后将鱼皮水洗至中性。取水洗后的鱼皮,沥干水分,加入 0.5mol/L 的冰醋酸溶液($w/v = 1:6$)匀浆,将匀浆后的液体置 4℃ 冰箱内磁力搅拌提取 2d,2d 后 10000r/min 低温离心 30min,以去除不溶解的碎片,取上清液,向上清液中加入 NaCl 至最终浓度为 0.9mol/L,4℃ 静置过夜,胶原蛋白即以白色絮状沉淀析出,10000r/min 低温离心 30min,弃去上清液,将胶原蛋白再次溶解于 0.5mol/L 冰醋酸中,用 0.1mol/L 冰醋酸溶液透析 1d,再用蒸馏水透析 2d,每天换透析液两次,得到的是纯度较高的胶原蛋白的溶液,真空冷冻干燥。

1.2.2 氨基酸分析 将胶原蛋白样品用 $6\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸在 110℃ 水解 24h,将水解产物用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

1.2.3 SDS-PAGE 分析 参照 Laemmli^[4] 的电泳方法进行垂直板电泳,配制 7.5% 分离胶、5% 的浓缩胶,将蛋白质用 0.1% (w/v) 的考马斯亮蓝染液(水:甲醇:醋酸 = 9:9:2, $v/v/v$) 染色 20min,然后在考马斯亮蓝脱色液(水:甲醇:醋酸 = 8:1:1, $v/v/v$) 中脱色。

1.2.4 红外光谱分析 在干燥条件下,将 0.2mg 的冻干样品与大约 10mg 的 KBr 充分研磨混合,用红外光谱仪对样品进行红外扫描,扫描范围为 $4000 \sim 500\text{cm}^{-1}$,将结果用 Omnic 6.0 软件进行分析。

1.2.5 胶原蛋白的热变性温度(T_d) 用乌式粘度计测定 20 ~ 50℃ (间隔 5℃) 范围内的增比粘度(η_{sp}/c),样品浓度为 0.1%,溶于 0.1mol/L 乙酸 + 0.2mol/L 乙酸钠缓冲液中,各温度保持恒温 30min。以 $(\eta_{sp}/c)_t/(\eta_{sp}/c)_{20}$ 作图,增比粘度变化 50% 时所对应的温度即为 T_d 。计算公式:

$$\eta_r = t/t_0$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

其中: t_0 —待测溶液流出的平均时间(s); t —溶剂流出的平均时间(s); η_r —待测溶液的相对粘度; η_{sp} —待测溶液的增比粘度。

1.2.6 热稳定性温度(T_s)测定 采用差示量热扫描法测定:精确称量 4mg 左右的样品置于 Al 坩埚中,封好,以空白的坩埚作为参比,加热温度范围为 20~110℃,升温速率为 5K/min。从得到的 DSC 谱图中得到的峰值即为该胶原蛋白的热稳定温度。

2 结果与讨论

2.1 氨基酸组成

狮子鱼皮的酸溶性胶原蛋白氨基酸组成见表 1。由表 1 可知,甘氨酸是最主要的氨基酸,其所占总氨基酸的比例为 22.4%,但是明显低于河豚鱼^[5]、大眼鲷^[6]等,与尼罗河鲈鱼^[1]、斑点叉尾鮰^[7]相似,并且酪氨酸、组氨酸的含量较低,半胱氨酸没有被检出。胶原蛋白内特有的亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)所占的比例为 14.5%。脯氨酸的羟基化程度为 42.06%,明显高于狭鳕的 37.5%^[8]、河豚鱼的

39%^[5],与鲈鱼的 43%^[7]相近。其中氨基酸的组成与用酸提法从鲈鱼提取的胶原蛋白的氨基酸组成^[7]类似,表明本文用酸法从狮子鱼中提取的胶原蛋白比较符合 I 型胶原的特征。

表 1 狮子鱼皮酸溶性胶原蛋白的氨基酸组成

氨基酸	残基/1000 个氨基酸总残基
羟脯氨酸(Hpro)	61
天冬氨酸(Asp)	61
苏氨酸(Thr)	30
丝氨酸(Ser)	56
谷氨酸(Glu)	98
甘氨酸(Gly)	224
丙氨酸(Ala)	94
半胱氨酸(Cys)	0
缬氨酸(Val)	51
蛋氨酸(Met)	20
异亮氨酸(Ile)	14
亮氨酸(Leu)	28
酪氨酸(Tyr)	13
苯丙氨酸(Phe)	23
赖氨酸(Lys)	31
组氨酸(His)	11
精氨酸(Arg)	79
脯氨酸(Pro)	84

2.2 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 的分析结果见图 1。从图 1 的电泳图谱可以看出,ASC 的电泳图谱由三条链组成,即 α_1 、 α_2 、 β 以及少量的 γ ,表现出典型的 I 型胶原蛋白的特征,表明提取出来的胶原蛋白主要是 I 型胶原蛋白。比较图 1 中的蛋白样品 A 与 B 的电泳图谱发现,两个样品的电泳图谱完全一致,巯基乙醇的添加对胶原蛋白的提取无影响,说明在 ASC 的三螺旋区缺乏二硫键,这与胶原蛋白缺乏半胱氨酸的结论是一致的^[1]。

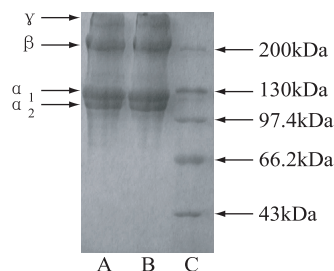


图 1 狮子鱼皮 ASC 的电泳图

注:A泳道:样品溶液中没有 β 巯基乙醇;

B泳道:样品溶液中有 β 巯基乙醇;C泳道:Marker 蛋白。

2.3 红外光谱分析

图 2 为狮子鱼皮胶原蛋白的红外光谱图,与其它胶原蛋白的红外光谱图^[1]类似。酰胺 A 对胶原蛋白三螺旋结构很敏感,主要是由 N-H 的伸缩振动引起的,而自由的 N-H 键的伸缩振动,其振动的波数在 $3400 \sim 3440\text{cm}^{-1}$ 之间,当多肽中的 N-H 基团参与形成氢键时,其波数会发生蓝移,一般在 3300cm^{-1} 左右^[9],由图 2 可知,狮子鱼皮的胶原蛋白的酰胺 A 波数在 3315cm^{-1} 。酰胺 B 谱带是由酰胺 A 与酰胺 II 的一次泛频耦合的结果(费米共振)^[10],ASC 的酰胺 B

谱带波数在 3077cm^{-1} 。

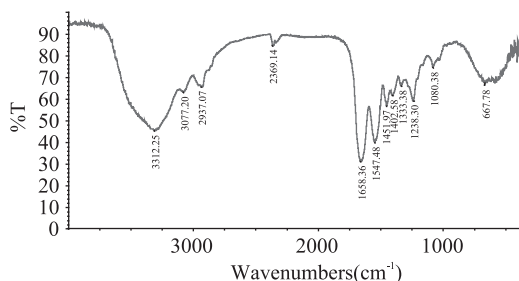


图2 狮子鱼皮 ASC 的红外光谱图

在双键区 ($2000\sim 1500\text{cm}^{-1}$), 酰胺 I 谱带由 C=O 振动引起, 通常不受肽链侧基影响, 振动频率取决于肽链构型, 对三螺旋结构的变化非常敏感, 酰胺 II 谱带主要是由异相 N-H 面内弯曲振动和 C-N (具有双键性质) 伸缩振动共同产生的。与酰胺 I 谱带相同, 酰胺 II 谱带也不易受肽链侧基影响, 但对胶原蛋白的三螺旋结构不敏感^[11]。狮子鱼皮的胶原蛋白酰胺 I 谱带波数在 1658cm^{-1} , 酰胺 II 谱带波数在 1547cm^{-1} 。

同时, 狮子鱼皮的胶原蛋白在波数为 2369cm^{-1} 处有红外吸收峰的形成, 与 Lin Wang 等^[12] 从红鱼中所提取的胶原蛋白的红外光谱相似, 与 Yan Mingyan 等^[8] 从狭鳕中提取的胶原蛋白的红外光谱不同, 可能是由于提取的胶原蛋白中所含的色素杂质造成的。

2.4 热稳定性

胶原蛋白的热稳定性通常由在溶液中变性温度 T_d 和蛋白纤维的收缩温度 T_s 来表示, 图 3 的热变性曲线表明, 狮子鱼皮胶原蛋白的变性温度为 34.1°C 。蛋白质的收缩温度 T_s 指的是蛋白纤维收缩至 1/3 的长度时的温度^[13]。在收缩的过程中, 由规则的三螺旋结构向无序的卷曲的转变过程中, 发生了相的转变。图 4 显示出狮子鱼皮胶原蛋白的 T_s 是 66.7°C 。这些结果表明, 它的热稳定性要高于狭鳕 (T_d , 24.6°C)^[8]、马哈鱼 (T_d , 19.4°C)、和刀鱼 (T_d , 23.0°C)^[14] 的鱼皮胶原蛋白。热稳定性主要由其中的亚氨基酸的含量来决定, 亚氨基酸的含量越高, 其三螺旋的胶原蛋白结构越稳定。这主要与脯氨酸和羟脯氨酸的吡咯环对其三级结构的限制以及羟脯氨酸的羟基所形成的氢键来稳定其三级结构有关^[15]。

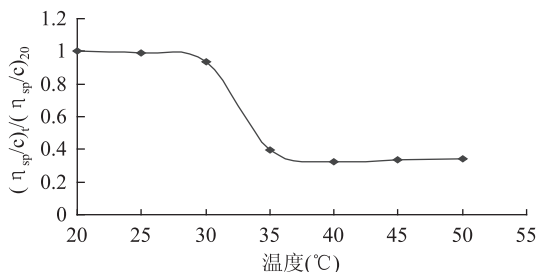


图3 狮子鱼皮 ASC 的热变性曲线

3 结论

3.1 从狮子鱼皮中提取的胶原蛋白是 I 型胶原蛋白, 该胶原蛋白中特有的亚氨基酸 (脯氨酸和羟脯氨酸) 所占的比例为 14.5%。脯氨酸的羟基化程度为

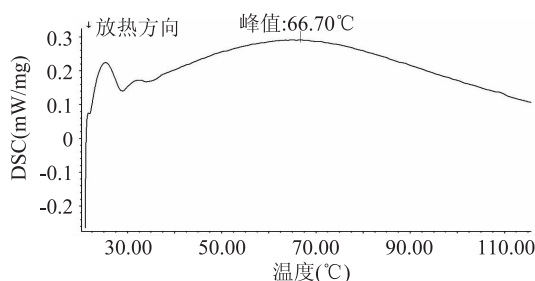


图4 狮子鱼皮 ASC 的 DSC 吸收曲线

42.06%, 两者符合常见海洋胶原蛋白的特征^[16]。

3.2 狮子鱼皮 ASC 的红外光谱图表明, 其酰胺 A、酰胺 B 谱带、酰胺 I 谱带等主要的吸收峰与没有变性的胶原蛋白的红外吸收峰一致^[10], 表明 ASC 具有胶原蛋白特有的三螺旋结构。

3.3 从图 4 可以看出, 在 $20\sim 35^\circ\text{C}$ 之间存在两个小的吸热峰, 这与 Yan Mingyan^[8] 等和 Cui 等^[16] 的 DSC 图形类似, 对于前面的一个吸热峰, 有人认为这与蛋白的氧化或者存在的蛋白碎片有关, 后面的吸热峰主要与蛋白在受热时开始变性有关^[17]。因此推测在 35°C 左右, 狮子鱼皮的 ASC 空间结构有部分被破坏。相比于其它鱼皮胶原蛋白来说, 它的变性温度较高 (T_d 为 34.1°C , T_s 为 66.7°C)。

参考文献

- [1] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 85: 81-89.
- [2] Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Isolation and characterization of acid and pepsin-soluble collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*) [J]. Food Chemistry, 2005, 93: 475-484.
- [3] Nagai T, Araki Y, Suzuki N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*) [J]. Food Chemistry, 2002, 78: 173-177.
- [4] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [5] TaKeshi Nagai, Yoko Araki, Nobutaka Suzuki. Collagen of the skin of ocellate puffer fish [J]. Food Chemistry, 2002, 78: 173-177.
- [6] Phanat Kittiphattanabawon, Sootawat 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.
- [7] Liu H Y, Li D, Guo S D. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Food Chemistry, 2007, 101: 621-625.
- [8] Yan Mingyan, Li Bafang, Zhao Xue, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) [J]. Food Chemistry, 2008, 107: 1581-1586.
- [9] Li H, Liu B L, Gao L Z, et al. Studies on bullfrog skin collagen [J]. Food Chemistry, 2004, 84: 65-69.

(下转第 70 页)

但是在本实验中,石榴皮的黄酮含量在6月份底有一个高峰,若要利用石榴皮总黄酮,此时段的黄酮量最高。因此,石榴皮很具有深入研究的价值,今后将继续进行黄酮类成分单体化合物的分离及抗氧化性的实验研究探索。讨论其原因:随果实成熟,石榴皮的营养成分逐步向果粒转移,导致石榴皮的总黄酮含量下降,并且石榴皮有变薄的趋势,当果实达到一定的成熟度的时候,石榴皮的总黄酮含量和石榴籽粒的黄酮相当,但一般情况下经采摘储藏以后,石榴皮的总黄酮含量比石榴果汁的要高。

石榴叶的总黄酮含量的变化大体趋于平缓,这与程水源、王燕等在《银杏叶黄酮含量变化及其分布规律的研究》的结果基本相似,后者描述银杏叶黄酮有两个高峰值,一个在6月份,一个在10月份,且10月份的值是6月份值的3倍之多,而且的峰值明显^[15]。但刘景东等在国槐叶不同生长时间总黄酮的含量变化研究中描述为,国槐叶虽然也有两个高峰期,但是最高峰在5月,随后含量下降,虽在9月份有上升,但上升的值较小^[17]。石榴叶的总黄酮大体变化较小,可能与不同部位光照强度有关,并且生长势、树龄、繁殖的方式、叶片发育进程、树体的大小、营养水平与缓冲能力不同,以及是否有挂果、挂果的多少等因素综合影响所致^[19]。

石榴愈伤组织的总黄酮含量与石榴皮的平均水平持平,但是要高于自然情况下的石榴叶的总黄酮含量,并且明显高于银杏叶黄酮和山楂叶黄酮,对于用生物技术研究、生产和开发生物总黄酮有一定的实际应用价值。对石榴细胞培养生产黄酮有一定的指导意义。

总之,石榴皮、叶、愈伤的总黄酮含量的高低不仅与遗传因素有密切关系,而且与所生存的环境、气候条件等生态因子有着很大的关系,环境及其环境应力的改变也会影响总黄酮的合成与积累。

4 结论

石榴皮的总黄酮含量在6月份有最高值,总黄酮含量能达到12.47mg/g,在其后黄酮含量下降。石榴叶总黄酮含量明显低于石榴皮总黄酮,而且在随时间变化量较小,在果实采摘后有一个相对的高峰

值。石榴愈伤的总黄酮高于石榴叶,和石榴皮总黄酮含量相当,能达到7.31mg/g。作为天然植物,我国石榴资源丰富,如能把石榴相关组织大量开发利用,不但可以提高经济效益,而且对于利用、开发保健制品具有参考价值。

参考文献

- [1] 江苏医学院. 中药大辞典(上)[M]. 上海: 科学技术出版社, 1986: 619.
- [2] 李海霞, 王钊, 刘延泽, 等. 石榴科植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(8): 765-768.
- [3] 武云亮. 石榴资源的开发利用与产业化发展. 资源开发与市场[J]. 1999, 15(4): 208-209.
- [4] Chidambare Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts using in vitro models[J]. Phytochemistry, 2004, 65(2): 233-241.
- [5] 李云峰, 郭长江, 杨继军, 等. 石榴皮抗氧化物质提取及其体外抗氧化作用研究[J]. 营养学报, 2004, 26(2): 144-147.
- [6] 林佳, 李琰, 徐丽珍. 石榴叶的化学成分研究[J]. Central South Pharmacy April, 2005, 3(2): 70-73.
- [7] Lin J, Li D, Xu L Z. Chemical constituents from leaves of *Punica granatum* L[J]. Central South Pharmacy April, 2005, 3(2): 70-72.
- [8] 王选东, 刘利林, 许宗运. 正交设计研究石榴皮总黄酮提取工艺[J]. 塔里木农垦大学学报, 2003, 15(2): 11-16.
- [9] 刘姗. 正交法优选石榴皮中黄酮类化合物的提取工艺[J]. 广州化工, 2008, 36(3): 22-23.
- [10] Hussein SAM, Barakat HH, Irmgard Merfort, et al. Tannins from the leaves of *Punica Granatum* [J]. Phytochemistry, 1997, 45(4): 819-820.
- [11] Li H X, Wang Z, Liu YZ. Progress in studies on chemical constituents and pharmacological effects of Punicaceae [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2002, 33(8): 765-767.
- [12] 陈红梅, 丁之恩. 石榴皮黄酮类化合物的最佳提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 263-264.
- [13] 许宗运, 蒋慧, 吴静, 等. 石榴皮和石榴渣总黄酮含量的测定[J]. 中国农学通报, 2003, 19(3): 73-75.
- [14] Kimura S, Zhu X P, Matsui R, et al. Characterization of fish muscle type I collagen[J]. Journal of Food Science, 1988, 53(5): 1315-1318.
- [15] Zhang Y, Liu W T, Li G Y, et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2007, 103: 906-912.
- [16] Cui F X, Xue C H, Li Z J, et al. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1120-1125.
- [17] Komsa-Penkova R, Koynova R, Kostov G, et al. Thermal stability of calf skin collagen type I in salt solution[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1297: 171-181.

(上接第67页)

- [10] 陈静涛, 赵玉萍, 徐政, 等. 重组胶原蛋白与牛源I型胶原蛋白红外光谱研究[J]. 材料导报, 2008, 22(3): 119-121.
- [11] Barbara Brodsky Doyle Egberb. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides[J]. Biopolymers, 1975, 14(5): 937.
- [12] Lin Wang, Xinxin An, Fangmei Yang, et al. Isolation and characterisation of collagen from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*) [J]. Food chemistry, 2008, 108: 616-623.
- [13] Fathima N N, Madhan B, Rao J R, et al. Interaction of aldehydes with collagen: effect on thermal, enzymatic and conformational stability [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2004, 34: 241-247.