

齐口裂腹鱼骨胶原蛋白超声波辅助提取工艺 及其特性研究

Ultrasonic-assisted extraction process and characteristics analysis of
collagen from *Schizothorax prenanti* bone

严秋萍 邬应龙 李月娥 蒋艳 郭玉春 秦涛

YAN Qiu-ping WU Ying-long LI Yue-e JIANG Yan GUO Yu-chun QIN Tao

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

摘要:为提高鱼骨胶原蛋白提取效率,在超声波辅助酸法的工艺条件下,采用单因素及正交试验研究齐口裂腹鱼骨胶原蛋白提取方法;采用 SDS-PAGE 电泳、紫外扫描、氨基酸分析、热变性温度测定分析分离纯化后的胶原蛋白。结果表明,超声波预处理显著提高了齐口裂腹鱼骨胶原蛋白提取率,最优条件为:提取温度 30 ℃,液料比 75:1 (mL/g),超声波预处理时间 20 min,提取时间 48 h,该条件下胶原蛋白得率为 6.91%,纯度为 89.74%;SDS-PAGE 结果显示,齐口裂腹鱼骨胶原蛋白由 α_1 、 α_2 和 β 链组成,属 I 型胶原蛋白的特征;紫外扫描结果显示,最大吸收峰的波长在 220~232 nm;齐口裂腹鱼骨胶原蛋白主要由甘氨酸组成,占总氨基酸含量的 31.21%,热变性温度为 31.4 ℃。

关键词:鱼骨;胶原蛋白;超声波;酸法;特性

Abstract: The ultrasonic-assisted acid extraction technology of collagen from *Schizothorax prenanti* bone was studied using univariate analysis and orthogonal test to improve the extraction rate. The purified collagen was analyzed by the methods of polyacrylamide gel electrophoresis, ultraviolet spectroscopy, amino acid and denaturation temperature analysis. The results showed that ultrasonic pretreatment increased the collagen extraction rate significantly. The optimal extracting conditions were as followed: extracting temperature 30 ℃, ratio of, liquid-solid 75:1 (mL/g), time for pre-treating by the ultrasonic 20 min, and extracted time. In the conditions, the collagen extraction ratio was 6.91% and the purity reached 89.74%. In addition, SDS-PAGE results suggested that the collagen was com-

prised of α_1 , α_2 and β chain, which might be classified as type I collagen. Maximum UV absorption wavelength of collagen was between 220~232 nm. *Schizothorax prenanti* bone collagen contained high percentages of Gly (31.21% of total amino acid), and its denaturation temperature was 31.4 ℃.

Keywords: fishbone; collagen; ultrasonic; acid method; characteristics

胶原蛋白是动物的主要结构蛋白,具有支撑器官、保护机体的作用^[1]。胶原蛋白右旋三股超螺旋结构使其具有较强的拉伸强度^[2],其功能具有多样性和复杂性^[3]。胶原蛋白主要分布在动物的骨、软骨和皮肤等组织中^[4],从水产动物中提取的胶原蛋白比陆生动物性胶原蛋白更安全,具有广阔的开发前景^[5],可广泛应用于食品、化妆品及生物制品的生产中^[6-8]。齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)属鲤形目,鲤科,裂腹鱼亚科,裂腹鱼属,裂腹鱼亚属,主要分布于长江上游、大渡河、青衣江和汉江的上游,是产区名贵的经济鱼类^[9]。齐口裂腹鱼肉质细嫩,肉色雪白,味道鲜美,颇受大众消费者的喜爱^[10]。但目前对其鱼骨的应用还鲜有报道,如不加以有效的利用将会造成资源的浪费和环境的污染。

研究^[11]发现,一定浓度的酸液可破坏蛋白质分子之间的氢键,引起胶原纤维膨胀、溶解,使胶原蛋白从原料中释放出来,常用来提取胶原蛋白的酸有柠檬酸、盐酸、乙酸、乳酸等。刘娟等^[12]研究发现以浓度为 0.54 mol/L 的乙酸为提取剂,在温度 36.4 ℃,液料比 51:1 (mL/g)条件下提取齐口裂腹鱼皮中的胶原蛋白 36 h,提取率可达 67.26%。吴缙等^[13]分别用柠檬酸与乙酸作为提取剂提取斑点叉尾鲷鱼骨胶原蛋白,结果显示 2 种方法提取的胶原蛋白提取率无显著差异,但乙酸提取的胶原蛋白具有刺鼻的酸味。王林等^[14]采用超声波辅助提取深海红鱼胶原蛋白,结果表明胶原蛋白的提取时间缩短了 30 h。

基金项目:四川农业大学“211”工程双支计划(2016)(编号:03571003)

作者简介:严秋萍,女,四川农业大学在读硕士研究生。

通信作者:邬应龙(1963—),男,四川农业大学教授,博士。

E-mail: wuyinglong99@163.com

收稿日期:2017-10-08

目前,中国对冷水鱼胶原蛋白提取方法的研究较少,主要是借鉴陆生动物胶原蛋白的提取方法^[15],如酸法提取和酶法提取,提取效率低且受环境因素影响较大。超声提取技术是通过机械破碎和空化作用促进浸提物向提取剂中扩散,具有能耗低、提取率高等优点^[16]。本试验拟采用超声波辅助的方法以柠檬酸作为提取剂,探讨齐口裂腹鱼骨胶原蛋白的提取方法,并对纯化的鱼骨胶原蛋白特性进行分析,为鱼骨胶原蛋白的提取和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

齐口裂腹鱼:购买于雅安市天全县齐口裂腹鱼养殖场,体重为 (80.58 ± 3.06) g,取其脊椎骨作为试验材料,放入保鲜袋, -20°C 冻藏贮存,备用。

1.2 试剂及仪器

L-羟脯氨酸标准品:含量 $\geq 99\%$,美国 Sigma 公司;

浓盐酸、柠檬酸、柠檬酸钠、高氯酸、对二氨基苯甲醛、氯胺 T、氢氧化钠、尿素、硫脲、EDTA(乙二胺四乙酸)、 β -巯基乙醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、Tris 碱、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等;分析纯;

pH 计:PHS-3C 型,上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂;

摇床:TS-2000A 型,海门市麒麟医用仪器厂;

紫外-可见分光光度计:UV-2102PCS 型,上海尤尼柯仪器有限公司;

垂直电泳仪:Mini-PROTEAN Tetra System 型,美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像仪:GelDoc2000 型,美国 Bio-Rad 公司;

高速氨基酸分析仪:835-50 型,日本日立公司;

乌氏黏度计:227 型,内径 $0.5 \sim 0.6$ mm,上海申谊玻璃制品有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 羟脯氨酸标准曲线的绘制 精确称取羟脯氨酸 0.1 g,用 0.001 mol/L 的盐酸溶解,配制 1 g/L 羟脯氨酸贮存液,将贮存液稀释成不同浓度的羟脯氨酸标准液;取 1 mL 标准溶液于试管中,以 0.001 mol/L 的盐酸作空白液,向标准液和空白液中加入 2 mL 氯胺 T 溶液,室温静置 20 min;加入 2 mL 高氯酸,混匀后室温静置 5 min,再加入 2 mL 显色液 60°C 水浴 15 min;流水冷却后,以空白液调零, 560 nm 下测定吸光值^[17]。以羟脯氨酸浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制羟脯氨酸标准曲线,得回归方程为: $Y = 0.0075x - 0.0008$, 相关系数 $R^2 = 0.9991$ 。

1.3.2 齐口裂腹鱼鱼骨的预处理 鱼骨充分剁碎后,用其质量 10 倍的 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡 4 h^[18],再用 2.5% NaCl 浸泡 4 h^[19],去除非胶原蛋白成分及防止内源性蛋白酶对胶原蛋白的影响;鱼骨用蒸馏水反复洗涤沥干,用其质量 5 倍的 0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 7.4)于 4°C 下浸泡 5 d,每天更换 1 次 EDTA 溶液以脱去钙质;用蒸馏水反复洗涤后沥

干^[20],加入其质量 20 倍的 10% 异丙醇溶液于 4°C 下浸泡 1 d 以去除脂肪;用蒸馏水冲洗鱼骨至中性,沥干,贮存于 -20°C 冰箱中备用。

1.3.3 胶原蛋白提取率的计算 取胶原蛋白提取液 1 mL,加入 3 mL 6 mol/L 的盐酸, 105°C 条件下水解 5 h;水解液用超纯水分次转移至 50 mL 容量瓶定容,取 1 mL 溶液于试管中,按 1.3.1 羟脯氨酸标准曲线的绘制方法测定吸光值,按式(1)计算胶原蛋白提取率^[21-22]。

$$c = \frac{m_1 \times 11.1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——胶原蛋白提取率, %;

m_1 ——羟脯氨酸的质量, g;

m_2 ——鱼骨总质量, g。

1.3.4 鱼骨胶原蛋白的提取方法优化

(1) 液料比对胶原蛋白提取率的影响:选取 $25:1$, $50:1$, $75:1$, $100:1$, $125:1$ (mL/g) 的液料比, 0.5 mol/L 柠檬酸为提取剂,超声波功率 300 W,超声波预处理时间 20 min,提取温度 30°C ,提取时间 48 h,以胶原蛋白提取率为评价指标确定料液比。

(2) 超声波预处理时间对胶原蛋白提取率的影响:选取 $0, 10, 20, 30, 40$ min 的超声波预处理时间, 0.5 mol/L 柠檬酸为提取剂,超声波功率 300 W,液料比 $75:1$ (mL/g),提取温度 30°C ,提取时间 48 h,以胶原蛋白提取率为评价指标确定超声波预处理时间。

(3) 提取温度对胶原蛋白提取率的影响:选取 $20, 25, 30, 35, 40^{\circ}\text{C}$ 的提取温度, 0.5 mol/L 柠檬酸为提取剂,超声波功率 300 W,液料比 $75:1$ (mL/g),超声波预处理时间 20 min,提取时间 48 h,以胶原蛋白提取率为评价指标确定提取温度。

(4) 提取时间对胶原蛋白提取率的影响:选取 $24, 36, 48, 60, 72$ h 的提取时间, 0.5 mol/L 柠檬酸为提取剂,超声波功率 300 W,液料比 $75:1$ (mL/g),超声波预处理时间 20 min,提取温度 30°C ,以胶原蛋白提取率为评价指标确定提取时间。

(5) 正交试验设计:在单因素试验基础上以液料比、超声波预处理时间、提取温度、提取时间作为影响因素,各取 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,研究齐口裂腹鱼骨胶原蛋白提取最优条件并对该条件进行验证。

1.3.5 鱼骨胶原蛋白的纯化方法 鱼骨胶原蛋白提取液过滤后向滤液中加入 NaCl 至最终浓度为 0.9 mol/L 盐析过夜;于 4°C 、 $10\,000$ r/min 离心 15 min,收集沉淀,用 10 倍体积的 0.5 mol/L 柠檬酸溶解沉淀,重复盐析和溶解^[23];将鱼骨胶原蛋白溶液转入透析袋于超纯水中透析 3 d,每天更换超纯水 $2 \sim 3$ 次;将透析袋中的胶原蛋白溶液真空冷冻干燥后得到鱼骨胶原蛋白成品。

1.3.6 鱼骨胶原蛋白特性分析

(1) 紫外光谱扫描:精确称取骨胶原蛋白成品 0.005 g

溶于 5 mL 0.5 mol/L 的柠檬酸中,振荡使其全部溶解,样品经 4 ℃ 离心(10 000 r/min, 5 min)后取上清液在波长 200~400 nm 进行紫外光谱扫描^[24]。

(2) SDS-PAGE 电泳及纯度测定:聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度 8%,浓缩胶浓度 4%,上样量 10 μ L。采用恒压电泳跑胶,样品在浓缩胶时电压保持在 80 V,当样品进入分离胶后保持电压 120 V,在样品快接近分离胶底部时,终止电泳^[25]。电泳结束后将凝胶放入含 1 g/L 考马斯亮蓝 R-250、45% 甲醇和 10% 冰醋酸的染色液中染色 2~3 h,用 10% 甲醇和 10% 冰醋酸脱色,中途更换脱色液,直至条带清晰。

精确称取 0.005 g 样品溶于 5 mL 6 mol/L 盐酸中,在 105 ℃ 条件下水解 24 h,在 40 ℃ 条件下旋转蒸发去除盐酸,用超纯水定容至 50 mL。吸取 1 mL 样液,按标准曲线的绘制方法测定吸光值,根据待测样品羟脯氨酸浓度按式(2)计算胶原蛋白纯度。

$$w = \frac{C \times V \times F}{m \times 1\,000} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

w ——胶原蛋白纯度, %;

C ——羟脯氨酸质量浓度, μ g/mL;

m ——样品质量, mg;

V ——样品总体积, mL;

F ——换算系数 11.1。

(3) 氨基酸组成测定:根据 Li 等^[26]的测定方法修改如下:取齐口裂腹鱼骨胶原蛋白样品 0.005 g 在 110 ℃ 条件下经 5 mL 6 mol/L 盐酸水解 24 h 后,用氨基酸分析仪进行氨基酸组成的分析。

(4) 热变性温度测定:根据刘庆慧等^[27]和钟朝辉等^[28]的测定方法修改如下:取适量齐口裂腹鱼骨胶原蛋白溶于 10 mL 0.5 mol/L 柠檬酸,采用乌氏黏度计测定样品在毛细管中的流出时间 t ,每个温度重复测定 3 次,以 0.5 mol/L 柠檬酸作为空白液,测定值为 t_0 (控制 t/t_0 在 1.2~2.0 为宜)。在 15~40 ℃ 内测定胶原蛋白溶液的分数的黏度,每个温度水平恒温 30 min 后测定。根据样品的流出时间及空白液流出时间计算样品的分数黏度,并以温度为横坐标、分数黏度为纵坐标制图,以分数黏度变化一半时所对应的温度为胶原蛋白热变性温度。计算公式:

$$\eta_r = t/t_0, \quad (3)$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1, \quad (4)$$

$$\eta_0 = \frac{\eta_{sp}(T) - \eta_{sp}(40\text{ }^\circ\text{C})}{\eta_{sp}(15\text{ }^\circ\text{C}) - \eta_{sp}(40\text{ }^\circ\text{C})}, \quad (5)$$

式中:

η_r ——相对黏度;

η_{sp} ——增比黏度;

η_0 ——分数黏度;

t ——样品流出时间, s;

t_0 ——柠檬酸流出时间, s;

T ——测定温度, ℃。

2 结果与分析

2.1 胶原蛋白提取条件的选择

2.1.1 液料比对胶原蛋白提取得率的影响 由图 1 可知,液料比在较低范围内,鱼骨不能充分浸泡使得提取效果较差,随着液料比的提高鱼骨与提取剂充分接触,柠檬酸通过破坏蛋白质分子之间的氢键,胶原蛋白从原料鱼骨中释放使得提取得率显著升高($P < 0.05$),液料比为 75:1 (mL/g)时胶原蛋白提取得率最高。随着液料比的继续增加,鱼骨中胶原蛋白基本释放完全,提取得率趋于平稳($P > 0.05$)。液料比的继续增加会降低胶原蛋白在提取液中的浓度,增大胶原蛋白分离纯化的难度,遵循经济方便的原则确定最佳液料比为 75:1 (mL/g)。

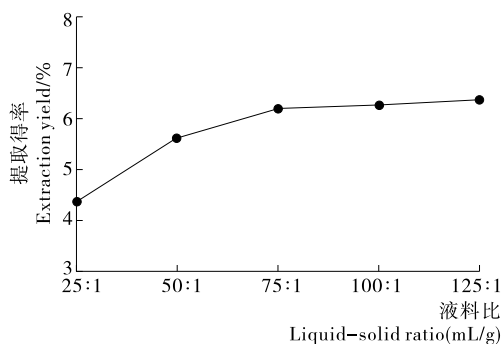


图 1 液料比对胶原蛋白提取得率的影响

Figure 1 Effect of liquid-solid ratio on collagen extraction yield

2.1.2 超声波预处理时间对胶原蛋白提取得率的影响 由图 2 可知,随超声波预处理时间的延长,齐口裂腹鱼胶原蛋白提取得率不断增大,经超声波预处理的鱼骨胶原蛋白提取得率显著高于未处理组($P < 0.05$),说明超声波辅助可提高鱼骨胶原蛋白提取得率。当超声波预处理时间超过 20 min 后,胶原蛋白提取得率呈下降趋势($P > 0.05$),可能是超声波具有的机械剪切作用和空化效应使提取液中胶原蛋白发生部分分解。故确定超声波预处理时间为 20 min。

2.1.3 提取温度对胶原蛋白提取得率的影响 由图 3 可知,提取温度对齐口裂腹鱼胶原蛋白提取得率的影响较大,随着提取温度的上升胶原蛋白提取得率显著升高($P < 0.05$),温

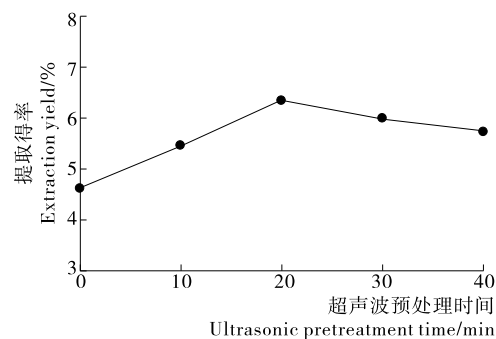


图 2 超声波预处理时间对胶原蛋白提取得率影响

Figure 2 Effect of ultrasonic pretreatment time on collagen extraction yield

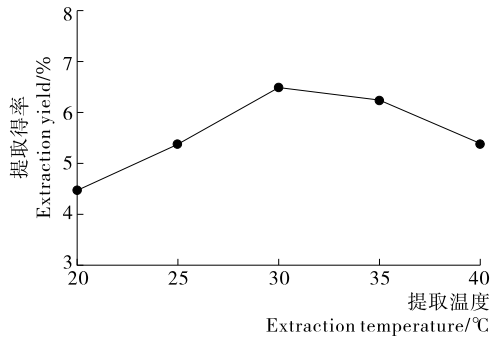


图3 提取温度对胶原蛋白提取得率的影响
Figure 3 Effect of extraction temperature on collagen extraction yield

度为 30 ℃ 时胶原蛋白提取得率最高。当提取温度超过 35 ℃ 时,提取得率显著下降($P<0.05$),可能是胶原蛋白稳定性较差,提取温度过高导致胶原蛋白转化为明胶等物质或者是破坏其结构使其分解^[29]。故选择 30 ℃ 为最佳提取温度。

2.1.4 提取时间对胶原蛋白提取得率的影响 胶原蛋白从原料骨中释放是一个缓慢的过程,由图 4 可知,提取时间为 24 h 鱼骨中胶原蛋白提取得率较低,随着提取时间的延长胶原蛋白提取得率呈上升趋势,提取时间为 48 h 胶原蛋白提取得率达到最大值。由于胶原蛋白长时间处于酸性环境中会发生部分变性,导致提取液中胶原蛋白含量减少,提取得率呈下降趋势($P>0.05$)。为提高提取效率、缩短周期,故确定最佳提取时间为 48 h。

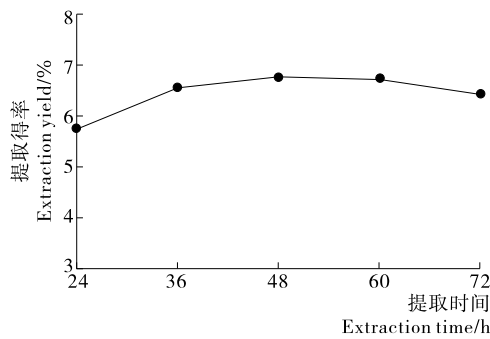


图4 提取时间对胶原蛋白提取得率的影响
Figure 4 Effect of extraction time on collagen extraction yield

2.1.5 正交试验 在单因素试验结果的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计确定胶原蛋白的最优提取参数。正交试验因素及水平见表 1,正交试验结果见表 2。

由表 2 可知,根据极差分析各因素对胶原蛋白提取得率的影响次序为: $A>C>B>D$,最优组合为 $A_2B_2C_2D_3$,结合胶原蛋白的提取得率及单因素的结果,考虑实际操作的方便及经济原则^[30],修正齐口裂腹鱼骨胶原蛋白提取方法为 $A_2B_2C_2D_2$,即提取温度 30 ℃、超声波预处理时间 20 min、提取时间 48 h、液料比 75 : 1 (mL/g),在该条件下进行验证实验,重复 3 次,结果显示,胶原蛋白的提取得率为 6.91%,优

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平
Table 1 The factor levels table of orthogonal experiment for $L_9(3^4)$

水平	A 提取温度/ ℃	B 提取时间/ h	C 超声波预处理 时间/min	D 液料比 (mL/g)
1	25	36	10	50 : 1
2	30	48	20	75 : 1
3	35	60	30	100 : 1

表 2 正交试验结果
Table 2 The orthogonal test results

序号	A	B	C	D	提取得率/%
1	1	1	1	1	4.62
2	1	2	2	2	5.00
3	1	3	3	3	5.25
4	2	1	2	3	6.12
5	2	2	3	1	5.96
6	2	3	1	2	5.75
7	3	1	3	2	5.62
8	3	2	1	3	5.50
9	3	3	2	1	5.37
k_1	5.25	5.75	5.41	5.73	
k_2	6.28	5.82	6.20	5.75	
k_3	5.75	5.70	5.65	5.79	
R	1.03	0.11	0.79	0.05	

于正交试验中最大值,因此,此条件可用于齐口裂腹鱼骨胶原蛋白的提取。

2.2 胶原蛋白特性分析

2.2.1 紫外光谱扫描 胶原蛋白与大多数蛋白质的区别在于几乎不含色氨酸,因此,在 280 nm 处不会有紫外吸收峰的出现,可作为一种鉴定胶原蛋白纯度的方法。由图 5 可知,齐口裂腹鱼骨胶原蛋白溶液在紫外光谱 220~232 nm 范围内有一个较强的吸收峰,在 257,275,280 nm 处有较弱的吸收峰,表明苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸在胶原蛋白一级结构中含量较低,其紫外吸收峰特性与黄石溪^[31] 酸法提取的草

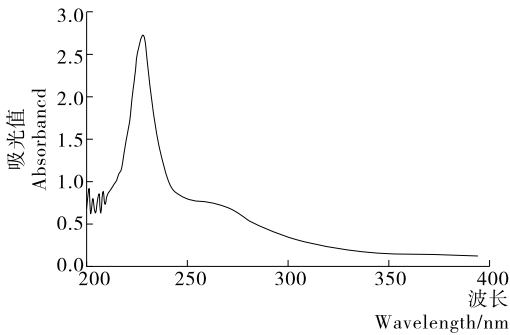


图5 齐口裂腹鱼骨胶原蛋白的紫外吸收光谱
Figure 5 UV absorption spectra of collagen in the *Schizothorax prenanti* bone

鱼骨胶原蛋白紫外扫描 220~230 nm 内有一个尖锐的吸收峰的结果相似,说明在该试验条件下提取的鱼骨胶原蛋白纯度较高,且符合 I 型胶原蛋白的紫外吸收特征。胶原蛋白在紫外光谱 200~220 nm 范围内有微弱的峰,可能是由于胶原蛋白溶液中柠檬酸的影响。

2.2.2 SDS-PAGE 电泳 在 SDS-PAGE 电泳中胶原蛋白的电泳迁移率只取决于相对分子量大小,因此,此方法可用于胶原蛋白样品的分子组成及分子质量分析(结果见图 6)。齐口裂腹鱼骨胶原蛋白由两条 α 链(α_1 链和 α_2 链)和一条 β 链组成, β 链的分子量约为 200 kDa, α_1 链与 α_2 链分子量在 110~130 kDa,而且 α_1 链的条带比 α_2 链的要深,说明 α_1 链在胶原蛋白中的含量高于 α_2 链。同时,图谱上几乎不含其他的杂带,说明提取的齐口裂腹鱼骨胶原蛋白纯度较高,通过测定样品的吸光值按回归方程计算得胶原蛋白纯度为 89.74%。

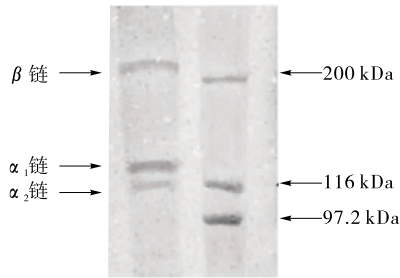


图 6 齐口裂腹鱼骨胶原蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 6 SDS-PAGE analysis of collagen in the *Schizothorax prenanti* bone

SDS-PAGE 电泳结果与陈申如等^[32]对淡水鱼鱼骨胶原蛋白特性研究中 β 肽链分子量约为 200 kDa, α_1 肽链分子量约为 130 kDa,且 α_2 肽链含量相对较低的结果相似。此外,叶韬等^[33]研究发现罗非鱼骨胶原蛋白中 α_1 链的相对分子质量约为 120 kDa, α_2 链的相对分子质量在 100~120 kDa, β 链的相对分子质量略大于 200 kDa, α_1 链的含量最高,其次是 α_2 链,而 β 链含量最低。经纯度分析,胶原蛋白样品纯度为 89.74%,符合 SDS-PAGE 电泳中条带单一的结果。

2.2.3 氨基酸组成 由表 3 可知,齐口裂腹鱼骨胶原蛋白中各种氨基酸含量相对丰富,其中甘氨酸含量最高,占总氨基酸含量的 31.21%;亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)含量较多,占总氨基酸含量的 20.66%;其次是丙氨酸和谷氨酸,分别占总氨基酸含量的 10.18% 和 7.31%;组氨酸和酪氨酸含量较少,不含色氨酸,只有极少量的半胱氨酸。氨基酸分析结果符合胶原蛋白的氨基酸组成特征,与紫外扫描图谱结果分析一致,说明采用超声波辅助提取可保持胶原蛋白的完整性。

2.2.4 热变性温度 由图 7 可知,温度为 25℃ 时分数黏度值呈下降的趋势,说明胶原蛋白开始发生部分变性,当温度为 31.4℃ 时,分数黏度值为最大值的一半,此温度即为齐口裂腹鱼骨胶原蛋白热变性温度,与鲤鱼骨胶原蛋白热变性温度 30℃ 接近^[34]。同时也说明正交试验中胶原蛋白最佳提取温度确定为 30℃ 是合理的。

表 3 齐口裂腹鱼骨胶原蛋白氨基酸组成

Table 3 The composition of amino acids in collagen from *Schizothorax prenanti* bone %

氨基酸	含量	氨基酸	含量
天冬氨酸 Asp	4.83	异亮氨酸 Ile	1.09
苏氨酸 Thr	2.35	亮氨酸 Leu	2.23
丝氨酸 Ser	6.11	酪氨酸 Tyr	0.51
谷氨酸 Glu	7.31	苯丙氨酸 Phe	1.50
甘氨酸 Gly	31.21	赖氨酸 Lys	2.91
丙氨酸 Ala	10.18	组氨酸 His	0.69
半胱氨酸 Cys	0.03	精氨酸 Arg	5.71
缬氨酸 Val	2.33	脯氨酸 Pro	10.95
蛋氨酸 Met	0.34	羟脯氨酸 Hyp	9.71

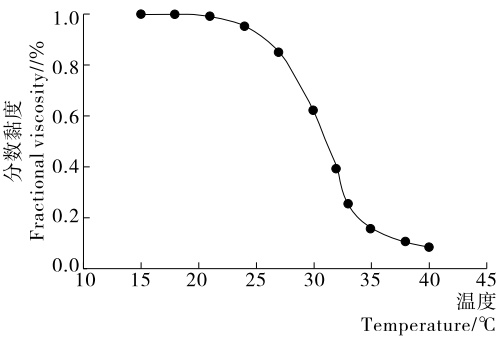


图 7 齐口裂腹鱼骨胶原蛋白热变性温度曲线

Figure 7 Temperature curve of thermal denaturation of collagen in the *Schizothorax prenanti* bone

研究表明,胶原蛋白的热变性温度与亚氨基酸的含量正相关,主要是由于亚氨基酸中的吡咯环与羟脯氨酸的羟基所形成的氢键增强了胶原蛋白结构的稳定性^[35],与上述齐口裂腹鱼骨胶原蛋白氨基酸分析结果一致;相关研究还表明:鱼类胶原蛋白的热变性温度与其生活环境的水温也存在一定的相关性,大致与其最高水温相等^[36],吴青等^[37]研究发现齐口裂腹鱼幼鱼在水温 30℃ 时已经出现呼吸频率加快,不摄食现象,生存的临界温度上限为 33.5℃,与齐口裂腹鱼骨胶原蛋白变性温度 31.4℃ 接近。

3 结论

本研究结果表明,齐口裂腹鱼骨中的胶原蛋白最优提取条件为:提取温度 30℃、超声波预处理时间 20 min、提取时间 48 h、液料比 75:1(mL/g),胶原蛋白提取得率可达 6.91%。齐口裂腹鱼骨胶原蛋白为 I 型胶原蛋白,采用超声波技术与柠檬酸结合应用于齐口裂腹鱼骨胶原蛋白提取可提高产品得率,保持胶原蛋白的完整性且纯度较高,但提取时间较长。如何将超声波技术与其他提取方法结合最大限度缩短提取时间并提高产品得率和纯度,还有待研究。近年来,水产胶原蛋白的相关研究越来越多,同时水产动物原料的低脂高蛋白的特性非常适用于胶原产品的制备^[38],从宗教信仰,节约资源,保护环境方面考虑,鱼骨胶原蛋白的进一步研究一定具有重要的科学意义和 market 价值。

参考文献

- [1] LIU Da-song, LI Liang, 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(4): 1 441-1 448.
- [2] LI Zhong-rui, WANG Bin, CHI Chang-feng, 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.
- [3] 高晶晶. 鲑鱼胶原蛋白在食品加工中的应用[J]. 农产品加工: 学刊, 2014(20): 79-80.
- [4] YAN Ming-yan, LI Ba-fang, ZHAO Xue, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1 581-1 586.
- [5] 戴丽琼, 梁树华, 卢福燊. 鱼胶原蛋白的开发和应用[J]. 企业科技与发展, 2014(7): 30-31.
- [6] 赵玲, 李亚, 刘淇, 等. 鲑鱼骨胶原蛋白肽的抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2013(4): 425-429.
- [7] LI H, LIU B L, GAO L Z, et al. Studies on bullfrog skin collagen [J]. Food Chemistry, 2004, 84(1): 65-69.
- [8] 陈丽丽, 赵利, 刘华, 等. 有机酸提取鲑鱼皮胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(5): 118-121.
- [9] 张金平, 刘远高, 冯德品, 等. 神农架齐口裂腹鱼繁殖生物学特征与人工繁殖技术[J]. 淡水渔业, 2015(3): 52-56.
- [10] 范林君, 李志琼, 杜宗君. 特色经济鱼类“齐口裂腹鱼”[J]. 农村百事通, 2006(14): 44-45.
- [11] WANG Li-hong, JIANG Xiao-ting, TAN Feng-tian, et al. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9(4): 604-607.
- [12] 刘娟, 苏联解, 张焯, 等. 乙酸提取齐口裂腹鱼皮胶原蛋白工艺优化[J]. 食品科技, 2015(7): 257-262.
- [13] 吴缙, 陈舜胜. 斑点叉尾鲷鱼骨制取胶原蛋白和骨粉的试验研究[J]. 南方水产, 2009(3): 36-40.
- [14] 王林, 梁秋芳, 王振斌, 等. 深海红鱼胶原蛋白的超声波辅助提取及其理化特性[J]. 食品研究与开发, 2014(9): 18-22.
- [15] 李杰, 闫鸣艳, 刘均洪, 等. 鱼胶原蛋白的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015(10): 3 941-3 946.
- [16] 陆晨, 邹雨虹, 张士康, 等. 响应面法优化超声辅助提取茶渣蛋白质的工艺条件[J]. 食品与生物技术学报, 2012(3): 319-325.
- [17] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 9695.23—2008 肉与肉制品. 羧脯氨酸含量测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-4.
- [18] MINH Thuy L T, OKAZAKI E, OSAKO K. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam [J]. Food Chemistry, 2014, 149: 264-270.
- [19] 周爱梅, 张培丽, 刘欣, 等. 淡水鱼皮胶原蛋白提取优化工艺研究(Ⅱ)[J]. 食品与发酵工业, 2007(1): 113-117.
- [20] 陈申如, 蔡扬鹏, 周琼, 等. 鲨鱼鱼皮、鱼骨胶原蛋白的纯化及其特性的初步研究[J]. 中国食品学报, 2006(1): 173-178.
- [21] 张敏. 酸法和酶法提取齐口裂腹鱼皮胶原蛋白及鉴定性质研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014: 12-13.
- [22] 程波, 吴洁, 张玉蓉, 等. 酶法提取人工养殖鲟鱼皮中胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2009(3): 1-4.
- [23] 钟朝辉, 李春美, 梁晋鄂, 等. 鱼鳞胶原蛋白提取工艺的优化[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 162-166.
- [24] 郝淑贤, 林婉玲, 李来好, 等. 不同提取方法对罗非鱼皮胶原蛋白理化特性的影响[J]. 食品科学, 2014(15): 59-62.
- [25] 瞿朝霞, 刘焱, 罗灿, 等. 草鱼鱼鳞、鱼皮和鱼骨酸溶性胶原蛋白特性对比研究[J]. 中国酿造, 2014(5): 116-119.
- [26] LI Xiao-dong, NIU Zhi-xia, ZHANG Bai-ling. Various methods available for the determination of hydrolyzed degree of whey protein [J]. China Dairy Industry, 2006, 34(10): 59-62.
- [27] 钟朝辉, 李春美, 窦宏亮, 等. 草鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白粘度特性及变性温度研究[J]. 食品与发酵工业, 2006(6): 64-68.
- [28] 刘庆慧, 王彩理, 刘丛力. 鱼鳞胶原蛋白研究[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(3): 57-61.
- [29] 王哲平, 刘淇, 曹荣, 等. 温度对刺参胶原蛋白结构和分子量变化的影响[J]. 渔业科学进展, 2011(6): 80-84.
- [30] 梅鑫东, 曾江南, 蒋柏泉. 酶法提取鱼鳞胶原蛋白的工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 156-159.
- [31] 黄石溪. 草鱼不同部位胶原蛋白的提取及特性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013: 35-36.
- [32] 陈申如, 蔡扬鹏, 周琼, 等. 鱼骨胶原蛋白的纯化及其特性的初步研究[J]. 食品科学, 2006(11): 177-181.
- [33] 叶韬, 林琳, 张晓霞, 等. 罗非鱼骨胶原蛋白的提取及其性质[J]. 食品与生物技术学报, 2015(3): 302-310.
- [34] 张俊杰, 段蕊, 刘佳梅, 等. 鲤鱼鱼皮和鱼骨酶溶性胶原蛋白性质异同的分析[J]. 食品科学, 2008(12): 128-131.
- [35] PATI F, ADHIKARI B, DHARA S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(10): 3 737-3 742.
- [36] 陆剑锋, 万全, 殷章敏, 等. 中华鳖裙边胶原蛋白的提取及其特征[J]. 水产学报, 2010(6): 981-988.
- [37] 吴青, 蔡礼明, 陆建平, 等. 齐口裂腹鱼幼鱼对水温 and 溶解氧的耐受力研究[J]. 四川畜牧兽医学院学报, 2001(3): 20-22.
- [38] 焦道龙, 陆剑锋, 张伟伟, 等. 水产动物胶原蛋白的研究现状及发展趋势[J]. 食品科学, 2009(17): 334-338.