

田永通,沈欢欢,宋 伟,等. 鳖源胶原蛋白的提取工艺优化及结构表征[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):265-269.

# 鳖源胶原蛋白的提取工艺优化及结构表征

田永通,沈欢欢,宋 伟,毛玉婷,周奕如,彭 茜,李彩燕,钱国英

(浙江万里学院生物与环境学院,浙江宁波 315100)

**摘要:**为了研究新型鳖源胶原蛋白的提取方法及结构特征,以中华鳖的裙边为提取材料,比较酸法、碱法和酶法的提取效果,通过单因素正交试验设计优化酶种类、酶解温度、酶用量、底物浓度和提取时间等主要参数,并采用 SDS-PAGE 电泳、HPLC、紫外扫描等方法分析胶原蛋白的生化特征。结果表明,酶法提取中华鳖裙边胶原蛋白的效果最好,提取用酶为胃蛋白酶,最佳提取工艺为温度 40 ℃,酶用量 1 mg/mL,底物浓度 25%,提取时间 20 h,该优化条件下胶原蛋白的提取率高达 75.23%,得到的胶原蛋白为 I 型胶原蛋白,其甘氨酸含量最高,且有特征吸收峰。

**关键词:**中华鳖;裙边;胶原蛋白;提取优化;结构表征

**中图分类号:** TS201.2<sup>+</sup>1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0265-05

胶原蛋白(collagen)是生物体细胞外基质的主要成分,约占胶原纤维固体物的 85%,占动物体内蛋白质总量的 25%~30%,它广泛存在于动物的各种结缔组织中(如软骨、皮肤、键、韧带),对机体和脏器起着支持、保护、结合及形成界隔的作用<sup>[1]</sup>。胶原蛋白能补充机体氨基酸,使皮肤胶原蛋白活性加强,保持角质层水分及纤维结构完整,促进皮肤组织新陈代谢,增强循环,延缓衰老;与周围组织亲和性好,有独特的修复功能;能通过螺旋结构将分子内氢键所结合的水分子紧锁内部,有良好的保湿功效<sup>[2]</sup>。由于胶原蛋白的特殊生理功能,其应用日趋广泛。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,但口蹄疫、疯牛病、禽流感等疾病的暴发,使人们对畜牧胶原制品的安全性产生疑虑;另外,由于宗教和习俗等原因,有些地区不能使用牲畜胶原制品。因此,寻找胶原蛋白的新来源显得愈来愈迫切<sup>[3]</sup>。目前人们普遍利用蛙皮<sup>[4]</sup>、鱼皮<sup>[5]</sup>、鱼鳞<sup>[6]</sup>等水产动物原料提取胶原蛋白,而对于本身就富含胶原蛋白的中华鳖原料研究甚少。

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*),别称水鱼、团鱼、鼋鱼、元鱼、老鳖、王八,自古就是我国传统的营养滋补佳品,具有很高的营养价值和保健功效。现代医学已揭示了中华鳖对机体的抗氧化与增强免疫功效的机理,因而中华鳖在临床上已被推荐为增强机体免疫力的辅助食品,成为我国重要的名特优水产养殖品种之一。当前,鳖类的生理活性物质及抗癌药品、保健食品的开发成为人们研究的热点。中华鳖作为食品,不但味道鲜美、高蛋白、低脂肪,而且含有多种维生素和微量元素,现代医学充分证实了其抗氧化与增强免疫的功效。中华鳖的肌

肉中脂肪酸含量丰富,鳖甲周围的结缔软组织通常被称为“裙边”,胶原蛋白含量十分丰富,超过 60%,是最滋补的部分,具有极高的营养与美容价值<sup>[7]</sup>。

本试验基于新型生物制品的研发及中华鳖的综合开发利用,探讨中华鳖裙边胶原蛋白的提取及工艺优化,采用单因素试验和正交试验设计比较酶种类、酶解温度、酶添加量、底物浓度、酶解时间对胶原蛋白提取率的影响,并分析了胶原蛋白的生化特征,以期中华鳖及其他龟鳖动物胶原多肽的开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 试验所用中华鳖购于宁波当地人工养殖场,体重约 500 g。先将中华鳖放血后致死,再将其裙边、肌肉、皮肤等分离后装入密封袋,于 -20 ℃ 冷藏备用。胃蛋白酶(3 000 U/g)、胰蛋白酶(1 000 U/g)、木瓜蛋白酶(3 500 U/g)、醋酸-柠檬酸缓冲液(pH 值 6.0)、氯胺 T 水溶液、L-羟脯氨酸标准品购于生工生物工程(上海)股份有限公司。氢氧化钠、乙酸、盐酸、异丙醇、对二甲氨基苯甲醛等均作为分析纯。

1.1.2 主要仪器 Eppendorf 5417R 冷冻高速离心机、移液枪(德国艾本德股份公司),EL204 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱、DK-8D 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司),FD-1A-50 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),UV-1600 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),核酸蛋白分析仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),L-8900 氨基酸分析仪(日立有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 中华鳖裙边的前处理 取出裙边解冻并剪碎,用 0.1 mol/L NaOH 溶液(1 g 裙边:20 mL NaOH)于室温下浸泡 4 h,以除去非胶原蛋白成分,然后用蒸馏水反复洗涤,充分沥干后,加入与 NaOH 同量的 10% 异丙醇溶液于室温浸泡 24 h 以去除脂肪,再用蒸馏水反复洗涤,充分沥干后备用<sup>[7-9]</sup>。

收稿日期:2013-05-28

基金项目:浙江省自然科学基金青年基金(编号:LQ13C190001);浙江省农业新品种选育重大专项(编号:2012C12907);浙江省新苗人才计划(编号:2012R419021);浙江省宁波市自然科学基金(编号:2011A610017);浙江省宁波市科技创新团队项目(编号:2012B82016)。

作者简介:田永通(1990—),男,浙江建德人,本科生,研究方向为水产动物营养品质。E-mail:1009467136@qq.com。

通信作者:李彩燕,博士,副教授,研究方向为水产动物营养生理及免疫调控。E-mail:licy@zww.edu.cn。

### 1.2.2 中华鳖裙边胶原蛋白的提取 参考黄文等的方法<sup>[10]</sup>

作适当修改。取预处理后的裙边,加入提取剂进行提取,提取液以 6 000 r/min 在 4 ℃ 下离心 15 min,倾出上清液加入 NaCl 使其终浓度达到 1.0 mol/L,静置过夜后以 10 000 r/min 在 4 ℃ 下离心 15 min,沉淀用少量 0.5 mol/L 乙酸溶解放入透析袋透析,脱盐后冷冻干燥,即得胶原蛋白<sup>[11]</sup>。

### 1.2.3 羟脯氨酸含量的测定方法

羟脯氨酸是胶原蛋白的特征氨基酸,本试验通过测羟脯氨酸的含量间接评价胶原蛋白的提取效果。参考文献[12]的方法,以羟脯氨酸为标准品,用氯胺 T 氧化,以对二甲氨基苯甲醛为显色剂,用比色法定量测定羟脯氨酸含量,测定标准曲线为  $y = 0.1488x + 0.0002$ ,式中: $x$  为羟脯氨酸浓度( $\mu\text{g/mL}$ ); $y$  为 558 nm 处的吸光度, $r^2 = 0.9999$ 。

### 1.2.4 胶原蛋白提取率的测定

参考文献[13-14]方法进行。精确称取 0.1 g 裙边置于安培瓶中,加入 1 mL 浓度为 6 mol/L 的盐酸,封口;在 120 ℃ 烘箱中水解 8 h,水解液以滤纸过滤后用 NaOH 溶液调节 pH 值至 4~6,用蒸馏水定容至 100 mL。取上述溶液 2 mL 加入 2 mL 异丙醇和 1 mL 氧化剂,摇匀,放置 3~5 min,然后加入显色剂 2 mL,摇匀后 60 ℃ 水浴 25 min,冷却后于 558 nm 处测吸光度<sup>[7,12]</sup>。

取 0.5 mL 提取液按上述方法测定提取液中羟脯氨酸的含量,以同量的蒸馏水做空白对照,其余操作同测试样,计算胶原蛋白的提取率。

$$\text{胶原蛋白提取率} = \frac{\text{提取液中胶原蛋白的总量}}{\text{裙边中胶原蛋白的总量}} \times 100\% \quad [14],$$

其胶原蛋白与羟脯氨酸之间的关系为胶原蛋白含量 = 羟脯氨酸含量  $\times 11.1$ <sup>[15]</sup>,式中 11.1 为胶原蛋白水解为羟脯氨酸的系数。

### 1.2.5 单因素试验确定胶原蛋白提取条件

#### 1.2.5.1 提取方法对中华鳖裙边胶原蛋白提取的影响

选择已报道的提取胶原蛋白的 3 种不同方法(酸法<sup>[16-17]</sup>、碱法<sup>[18]</sup>、酶法<sup>[19]</sup>)进行比较。分别称取 1 g 中华鳖裙边,各用 0.5 mol/L NaOH 溶液、0.5 mol/L 乙酸溶液、0.5 mol/L 乙酸溶液含胃蛋白酶(活力 3 000 U/g),于室温下提取 18 h。以羟脯氨酸吸光度确定适合中华鳖裙边胶原蛋白提取的方法。

#### 1.2.5.2 酶法提取胶原蛋白各种因素的影响

采用酶法从中华鳖裙边中提取胶原蛋白,参考文献[20-22]里描述的方法,略作修改,分别优化酶种类、酶解温度、酶添加量、底物浓度和酶解时间。

(1)酶种类。裙边 1 g,以 0.5 mol/L 的乙酸作为缓冲剂,分别加入不同种酶:胃蛋白酶(3 000 U/g)250 mg、木瓜蛋白酶(3 500 U/g)214 mg、胰蛋白酶(1 000 U/g)750 mg,于室温下提取 18 h,按“1.2.4”节方法测定提取液中羟脯氨酸的吸光度,得不同种类酶对中华鳖裙边胶原蛋白提取的影响。

(2)酶解温度。裙边 1 g,酶添加量为 5 mg/mL,分别在 5、15、25、35、45 ℃ 下提取 8 h,按“1.2.4”节方法测定提取液中羟脯氨酸的吸光度,得酶在不同温度下对中华鳖裙边胶原蛋白提取的影响。

(3)酶添加量。裙边 1 g,温度为 35 ℃,分别加酶 0.5、1、2、4、8 mg/mL 提取 8 h,按“1.2.4”节方法测定提取液中羟脯氨酸的吸光度,得不同的酶添加量对中华鳖裙边胶原蛋白提

取的影响。

(4)底物浓度。酶添加量 2 mg/mL,温度为 35 ℃,底物添加量分别为 6%、8%、10%、20%、30%,提取 8 h,按“1.2.4”节方法测定提取液中羟脯氨酸的吸光度,得不同底物浓度对中华鳖裙边胶原蛋白提取的影响。

(5)酶解时间。酶添加量 2 mg/mL,温度为 35 ℃,底物浓度为 20%,分别提取 4、8、12、16、20、24、28 h,按“1.2.4”节方法测定提取液中羟脯氨酸的吸光度,得不同提取时间对中华鳖裙边胶原蛋白提取的影响。

### 1.2.6 正交试验确定酶法提取胶原蛋白最佳条件

通过前期单因素试验,选择最适的温度(A)、酶添加量(B)、底物浓度(C)和提取时间(D)作为试验因子,采用  $L_9(3^4)$  正交试验筛选最佳提取条件,以胶原蛋白提取率作为评价指标。通过测定羟脯氨酸的含量,计算胶原蛋白提取率。

### 1.2.7 胶原蛋白分子量测定

参考文献[7]方法进行,稍作修改,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 5%,100 V 电泳 1 h。

### 1.2.8 胶原蛋白的紫外扫描

纯化后的胶原蛋白样品采用紫外扫描仪进行扫描,波长间隔 1 nm,波长范围为 190~400 nm。

### 1.2.9 胶原蛋白的氨基酸成分分析

主要参考文献[7]方法进行。取 10 mL 纯化后的胶原蛋白样品溶液,加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl,放入安培瓶中,在乙醇喷灯下迅速封管后放入 110 ℃ 烘箱水解 24 h。取出冷却后放入坩埚蒸干,用适量的 0.02 mol/L HCl 溶解,定容至 50 mL。最后用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜抽虑,滤液上样,用 L-8900 氨基酸分析仪进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取方法的确定

由图 1 可以看出,酶法提取中华鳖裙边中胶原蛋白的效果明显好于其他 2 种方法,酶法提取后羟脯氨酸吸光度显著高于碱法和酸法( $P < 0.05$ )。酸法提取对胶原蛋白的损伤严重,难以获得高质量产物。碱法中碱的浓度太低或者浸提时间太短,使溶出的胶原量少<sup>[23]</sup>。酶法的反应速度快,提取效率高,大大缩短了时间,且蛋白酶可以选择性地切除非螺旋的端肽<sup>[24]</sup>。因此,为了提高产量,缩短试验时间,选择酶法作为胶原蛋白的提取方法。

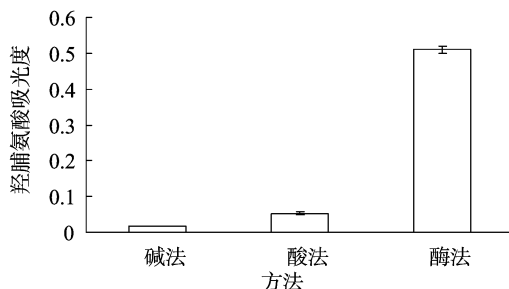


图1 3种不同方法对胶原蛋白提取的影响

### 2.2 酶法提取胶原蛋白最佳条件的确定

#### 2.2.1 酶种类

从图 2 可以看出,胃蛋白酶是最好的胶原解聚酶,能够帮助分解胶原分子中的部分肽键,使胶原溶解出来。胰蛋白酶和胃蛋白酶属于动物蛋白酶,明显要比属于植物蛋白酶的木瓜蛋白酶好,而裙边胶原蛋白又属于动物性蛋

白,因此动物蛋白酶对裙边有很好的分解作用。但胃蛋白酶又明显好于胰蛋白酶,因此试验选用胃蛋白酶作为胶原蛋白的提取用酶。

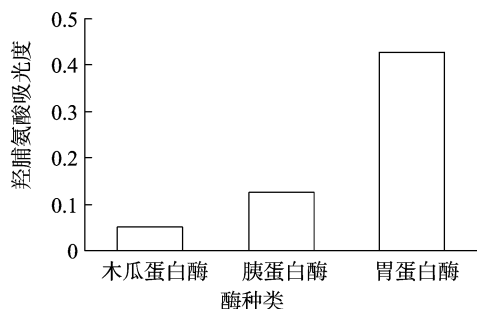


图2 不同蛋白酶对胶原蛋白提取的影响

2.2.2 酶添加量 由图3可以看出,吸光度随着酶添加量的增加而呈现明显的上升趋势,因此胶原蛋白的浓度随着酶添加量的增加而升高。在胃蛋白酶用量较小的情况下,反应速率与酶用量几乎呈正比关系,这是因为低浓度的酶相对于高浓度的底物处于饱和状态,因此当酶浓度增大时,酶解反应速率随之增大。而当酶添加量大于2 mg/mL时吸光度虽仍有上升,但开始变缓。综合考虑成本问题,酶添加量不宜超过2 mg/mL。

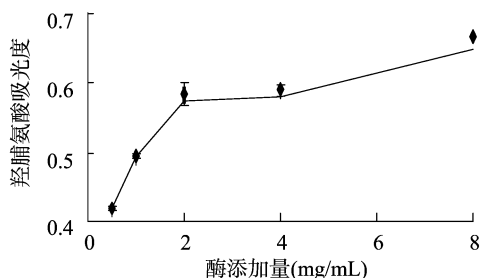


图3 酶添加量对胶原蛋白提取的影响

2.2.3 酶解温度 由于温度对酶的活性影响比较大,酶解温度对胶原蛋白的提取是一个比较重要的因素。由图4可以看出,羧基吸收光度随温度的不同变化趋势明显。在5~15℃范围内吸光度的增加不是很明显,而当温度上升到35℃时,吸光度达到了0.6,是5℃时的2.3倍。但当温度继续升高,超过35℃时,吸光度开始下降,酶在该温度下已失活,提取作用减弱,导致吸光度开始下降,可以推测温度对胶原蛋白的提取影响很大,因此试验提取温度选为35℃。

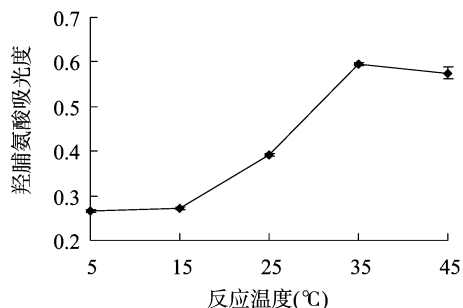


图4 酶解温度对胶原蛋白提取的影响

2.2.4 底物浓度 由图5可以看出,随着底物浓度的升高,羧基吸收光度呈明显的上升趋势,当底物浓度大于20%时,羧基吸收光度虽然还在上升,但上升的趋势开始变

缓,这是因为所有的酶都发挥了最大的效用,底物的量已过剩,因此选择20%的底物浓度较为适合。

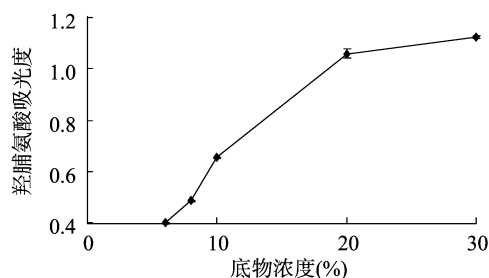


图5 底物浓度对胶原蛋白提取的影响

2.2.5 酶解时间 由图6可以看出,羧基吸收光度随着提取时间的延长呈现上升的趋势,且先快后慢。在16 h之前提取液中羧基吸收光度的含量上升较快,16 h后上升比较平缓,而24 h之后羧基吸收光度的含量反而开始下降。乙酸的溶胀作用及酶的酶解作用可能致使前期羧基吸收光度的含量上升较快;而中期平缓上升的原因可能是胶原蛋白成分已基本从裙边中分离出来,因此即使时间再延长,羧基吸收光度的含量也没有明显的提高;后期下降的原因是酶处理时间过长导致胶原蛋白溶失。因此将试验提取时间控制在20 h左右。

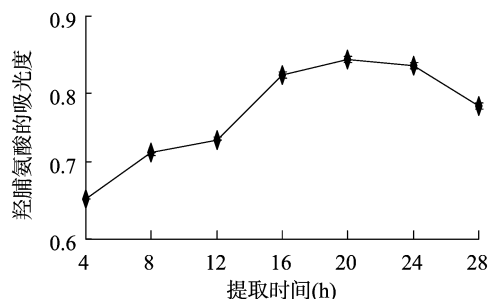


图6 酶解时间对胶原蛋白提取的影响

## 2.3 正交试验确定酶法提取胶原蛋白最佳条件

酶法提取最佳条件正交试验结果见表1。9次试验以第7号试验提取率最高,达75.23%,相应的水平组合( $A_3 = 40^\circ\text{C}$ ,  $B_1 = 1\text{ mg/mL}$ ,  $C_3 = 25\%$ ,  $D_2 = 20\text{ h}$ )是当前最好的组合。对数据的极差 $R$ 分析结查显示,影响提取率的主次因素依次为D(提取时间) > A(温度) > C(底物浓度) > B(酶添

表1 酶法提取中华鳖胶原蛋白正交试验分析

| 试验号   | A:作用温度(℃)  | B:酶添加量(mg/mL) | C:底物浓度(%)  | D:提取时间(h)  | 提取率(%) |
|-------|------------|---------------|------------|------------|--------|
| 1     | $A_1$ (30) | $B_1$ (1)     | $C_1$ (15) | $D_1$ (16) | 22.58  |
| 2     | $A_1$      | $B_2$ (2)     | $C_2$ (20) | $D_2$ (20) | 33.53  |
| 3     | $A_1$      | $B_3$ (3)     | $C_3$ (25) | $D_3$ (24) | 55.10  |
| 4     | $A_2$ (35) | $B_1$         | $C_2$      | $D_3$      | 71.62  |
| 5     | $A_2$      | $B_2$         | $C_3$      | $D_1$      | 47.69  |
| 6     | $A_2$      | $B_3$         | $C_1$      | $D_2$      | 71.33  |
| 7     | $A_3$ (40) | $B_1$         | $C_3$      | $D_2$      | 75.23  |
| 8     | $A_3$      | $B_2$         | $C_1$      | $D_3$      | 73.17  |
| 9     | $A_3$      | $B_3$         | $C_2$      | $D_1$      | 39.19  |
| $k_1$ | 37.07      | 56.48         | 55.69      | 36.49      |        |
| $k_2$ | 63.55      | 51.46         | 48.11      | 60.03      |        |
| $k_3$ | 62.53      | 55.21         | 59.34      | 66.63      |        |
| $R$   | 26.48      | 5.02          | 11.23      | 30.14      |        |

加量)。结合  $k$  值进行分析可知  $A_2B_1C_3D_3$  的组合比较优异,其条件为温度 35 ℃、酶添加量 1 mg/mL、底物浓度 25%、提取时间 24 h。而在 9 个试验中没有这一组合,因此还需进行追加试验,以验证分析结果。补加试验,得到  $A_2B_1C_3D_3$  组合的提取率为 75.70%,可见比正交试验中第 7 组略高一些,但考虑提取时间因素,实际上最佳组合还是  $A_3B_1C_3D_2$ ,即温度 40 ℃,酶添加量 1 mg/mL,底物浓度 25%,提取时间 20 h。

2.4 SDS - PAGE 凝胶电泳

中华鳖裙边胶原蛋白的凝胶电泳结果如图 7 所示。从图 7 可以清晰地看到 3 条染色较深的条带,其中有 2 条相近链的相对分子质量在 110 ~ 120 ku 的范围内,另一条链的相对分子质量在 200 ku 附近。参考陆剑峰等的报道<sup>[7,10]</sup>可知,图 7 所示从上到下依次为  $\beta$  链、 $\alpha_1$  链、 $\alpha_2$  链,为典型 I 型胶原蛋白的结构。

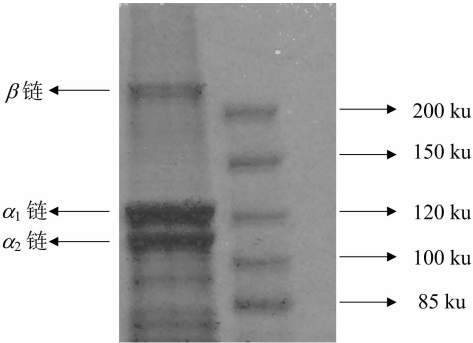


图7 中华鳖裙边胶原蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱

2.5 紫外扫描图谱

中华鳖裙边胶原蛋白样品溶液经紫外光谱扫描(图 8),在 210 ~ 240 nm 之间有强烈的吸收,最大吸收峰在 226 nm 附近,符合胶原蛋白通常的紫外吸收特性,即被检测的样品中存在胶原蛋白的特征吸收峰。

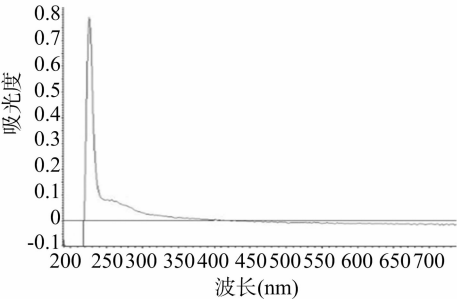


图8 中华鳖裙边胶原蛋白的紫外扫描图谱

2.6 氨基酸分析

由表 2 可知,甘氨酸(Gly)含量最为丰富,接近于氨基酸总量的 1/3;脯氨酸(Pro)次之;丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)、精氨酸(Arg)含量也较高;几乎不含或极少含半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)、组氨酸(His)。氨基酸的组成在一定程度上表明提取的样品为胶原蛋白。

3 讨论

在本试验中笔者对酸法、碱法、酶法这3种不同的方法作

表 2 中华鳖裙边胶原蛋白的氨基酸组成

| 氨基酸种类    | 氨基酸比例(%) |
|----------|----------|
| 天冬氨酸 Asp | 5.07     |
| 苏氨酸 Thr  | 2.38     |
| 丝氨酸 Ser  | 4.35     |
| 谷氨酸 Glu  | 10.66    |
| 甘氨酸 Gly  | 22.81    |
| 丙氨酸 Ala  | 9.13     |
| 半胱氨酸 Cys | 0.00     |
| 缬氨酸 Val  | 1.81     |
| 蛋氨酸 Met  | 0.00     |
| 异亮氨酸 Ile | 1.38     |
| 亮氨酸 Leu  | 2.46     |
| 酪氨酸 Tyr  | 0.00     |
| 苯丙氨酸 Phe | 4.76     |
| 赖氨酸 Lys  | 3.97     |
| 组氨酸 His  | 0.63     |
| 精氨酸 Arg  | 8.05     |
| 脯氨酸 Pro  | 22.53    |

了对比,发现酶法是效果最好的,该方法既能缩短提取时间,又能获得良好生物活性的胶原蛋白,且对环境的污染较小。酸法提取对胶原蛋白的损伤严重,难以获得较高质量的产品,如 Jongjareonrak 等从画眉笛鲷和大眼鲈鱼鱼皮中提取的 ASC 分别为 9% 和 10.94% (以湿基计)<sup>[25]</sup>;Sato 等用乙酸从 22 种鱼肉中提取酸溶性胶原蛋白,得率在 0.34% ~ 2.19% (以湿基计)之间<sup>[26]</sup>。碱法提取胶原蛋白同样含量很少,Sato 等用 0.1 mol/L NaOH 从虹鳟鱼、鲭鱼、鲤鱼、鳙鱼肉中分离制得胶原蛋白,含量分别为 0.47%、0.50%、0.60%、1.99% (以湿基计)<sup>[27]</sup>;Kolodziejaska 等用 NaOH 从鲑鱼皮中提取碱溶性胶原蛋白,得率只有 3% (以湿基计)<sup>[28]</sup>。在酶法基础上又对不同的酶做了对比,得出胃蛋白酶的提取效果要远远好于胰蛋白酶和木瓜蛋白酶,这与程波等的试验结果<sup>[20]</sup>相一致。因而,选用胃蛋白酶提取中华鳖裙边中胶原蛋白。通过正交试验可以看出,影响最大的因素为温度和提取时间,这与孙宪迅等的结果<sup>[29]</sup>相符合。酶解温度和时间是提取过程优先考虑的重要因素,温度过低则酶的作用效果不明显,过高会引起酶的失活或者胶原蛋白的变性;时间过长或过短都会影响提取率。郑森测得中国林蛙皮肤胶原蛋白含量达 26% (以干基计)<sup>[30]</sup>,郭恒斌等用酶法测得鲑鱼皮胶原蛋白含量达 11.08%<sup>[31]</sup>。由此可得出,与其他水产动物相比,中华鳖裙边中胶原蛋白的含量非常丰富。

本研究对鳖源胶原蛋白样品的紫外扫描图谱显示在 226 nm 附近存在 1 个较强的吸收峰,该吸收峰可能是由 C=O 的  $N \rightarrow \pi^*$  和  $N \rightarrow \sigma^*$  跃迁产生的强烈吸收,符合胶原蛋白通常的紫外吸收特性<sup>[7]</sup>。在 260 nm 附近出现 1 个极微弱的吸收峰,可能是由少量的 Phe 所引起的。除此以外,其余波长范围内均没有明显的吸收峰,表明提取的中华鳖裙边胶原蛋白含量较少,纯度较高。SDS - PAGE 凝胶电泳图谱显示,本试验提取的中华鳖裙边胶原蛋白几乎不含杂带,纯度较高,与紫外扫描图谱分析的结果吻合。图谱中显示有 2 条不同  $\alpha$  - 链,分别为  $\alpha_1$  链和  $\alpha_2$  链,另 1 条为  $\beta$  链;此外,在氨基酸组成上,Gly 和 Pro 最为丰富,与已报道的硬骨鱼类鱼皮及龟

鳖动物胶原蛋白的凝胶结果<sup>[7,10,32]</sup>一致,属于典型的 I 型胶原蛋白基本特征。

本研究与陆剑锋等的研究报道<sup>[7]</sup>相比,在中华鳖裙边提取方法中引入了不同方法、不同酶以及酶在不同温度下的对比,更加全面、系统。通常提取胶原蛋白的方法有酸法、碱法、酶法、盐法和热水法,文献报道较多的一般是酸法、碱法和酶法。鳖源胶原蛋白的提取在方法的选择上缺少相关的报道,因此本研究加入了不同方法的对比试验。由于不同酶提取的效果也不同,因此本研究同时也进行了酶种类的对比试验,选择最适的提取用酶。此外,温度是影响酶活性最大的一个因素,因此探讨合适的温度对中华鳖裙边中胶原蛋白的提取也很重要。

#### 4 结论

本研究结果表明用胃蛋白酶作为提取用酶提取中华鳖裙边胶原蛋白的效果最好,经单因素试验和正交试验,提取的最佳工艺条件为提取温度 40 ℃,酶添加量 1 mg/mL,底物浓度 25%,提取时间 20 h,其提取率为 75.23%,最后得出中华鳖裙边中胶原蛋白含量高达 24.5% (湿基),可作为中华鳖胶原蛋白提取的工艺参考。获得的胶原蛋白的生化特征与 I 型胶原蛋白相似,且相对于一些陆生动物(如猪、牛等),中华鳖裙边脂肪含量和杂蛋白少,有利于胶原蛋白的制备,开发利用的潜力巨大。

#### 参考文献:

- [1] 宋 芹,陈封政,颜 军,等. 胶原蛋白研究进展[J]. 成都大学学报:自然科学版,2012,31(1):35-38.
- [2] 陈 华,易湘茜,陈 忻,等. 海洋胶原蛋白肽的制备及生物活性研究进展[J]. 中国食物与营养,2010(8):57-60.
- [3] 张 锐,许永安. 水产胶原蛋白的特性及应用研究进展[J]. 福建水产,2011,33(2):80-83.
- [4] 郑 森,周亚丹,赵 敏. 东北林蛙皮中胶原蛋白含量的测定及提取工艺[J]. 东北林业大学学报,2008,36(7):81-83.
- [5] 俞艺萍,陆利霞,熊晓辉. 鱼皮胶原蛋白提取研究进展[J]. 食品研究与开发,2010,31(12):262-265.
- [6] 胡建平,吴 琦,陈 惠. 鲢鱼鳞胶原蛋白的制备及性质研究[J]. 食品科技,2010,35(1):230-234+238.
- [7] 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,2010,34(6):801-808.
- [8] 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,2007,33(1):113-117.
- [9] 王 燕,付万冬,吴亮亮,等. 鲑鱼皮胶原蛋白提取前处理的条件优化[J]. 饲料工业,2011,32(7):18-20.
- [10] 黄 文,印大中,朱泽瑞. 龟皮胶原蛋白的提取及结构表征(I)[J]. 湖北大学学报:自然科学版,2010,32(4):434-437.
- [11] 涂灿时,李正军. 鱼鳞胶原蛋白的提取技术[J]. 西部皮革,2010,32(19):27-30.
- [12] 翟文慧,苏永恒. 对二甲氨基苯甲醛比色法测定保健食品中胶原蛋白[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(1):99-100.
- [13] 段亩位,申铨日,陈秀明,等. 罗非鱼尾胶原蛋白的提取与鉴定[J]. 食品科学,2012,33(6):59-64.
- [14] 王 艳,汪海波,桂 萌,等. 草鱼鱼鳞中活性胶原蛋白提取工艺及参数优化[J]. 食品科学,2010,31(18):70-76.
- [15] 张俊杰,曾庆孝. 比色法测定鱼鳞中羟脯氨酸的研究[J]. 食品科技,2004(4):83-85.
- [16] Yata M, Yoshida C, Fujisawa S, et al. Identification and characterization of molecular species of collagen in fish skin[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(2):247-251.
- [17] Yoshimura K, Terashima M, Hozan D, et al. Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(3):685-690.
- [18] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3):363-372.
- [19] 任 萌,官新统,赵颂宁,等. 酶法提取鸡蛋壳膜胶原蛋白工艺[J]. 食品科学,2012,33(16):96-99.
- [20] 程 波,吴 杰,张玉蓉,等. 酶法提取人工养殖鲟鱼中胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品研究与开发,2009,30(3):1-4.
- [21] 郝更新,杨 燊,戴燕彬. 海蜇皮营养成分分析及胶原蛋白的提取[J]. 农产品加工·学刊,2011(4):65-69.
- [22] 张百刚,田晓菊,舒宗美,等. 草鱼鱼鳞中胶原蛋白的提取工艺及其功能性研究[J]. 粮油加工,2010,3(3):109-111.
- [23] 吴 缙,陈舜胜. 鱼皮胶原蛋白的制备及性能研究进展[J]. 内陆水产,2008,33(9):34-37.
- [24] 郭玉华,刘扬瑞,李钰金. 鱼类胶原蛋白及胶原活性多肽的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2010(3):175-179.
- [25] 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.
- [26] Sato K, Yoshinaka R, Sato M, et al. Isolation of native acid-soluble collagen from fish muscle[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53(8):1431-1436.
- [27] Sato K, Yoshinaka R, Sato M, et al. A simplified method determining collagen in fish muscle[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1986, 52(5):889-893.
- [28] Kolodziejaska I, Sikorski Z E, Niecikowska C, et al. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illes argentinus*) skins[J]. Food Chemistry, 1999, 66(2):153-157.
- [29] 孙宪迅,孙齐英,韩 雪,等. 罗非鱼鳞胶原蛋白提取工艺研究[J]. 江汉大学学报:自然科学版,2012,40(3):105-107.
- [30] 郑 森. 中国林蛙皮肤胶原蛋白的提取纯化及性质研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2008:16-20.
- [31] 郭恒斌,曾庆祝. 酶法提取鲑鱼皮胶原蛋白工艺条件的研究[J]. 南方水产,2008,4(1):58-63.
- [32] 陈美娟. 大马哈鱼皮胶原蛋白制备和表征[J]. 药物生物技术,2006,13(4):290-292.