

绿鳍马面鲀(*Navodon septentrionalis*)鱼皮胶原蛋白的分离纯化及理化性质研究*

郁迪 丁冬各 王斌

(浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心 浙江海洋大学食品与医药学院 舟山 316022)

摘要 利用酸溶法和酶溶法分离纯化绿鳍马面鲀(*Navodon septentrionalis*)鱼皮酸性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC),并对所得的ASC和PSC的氨基酸组成、亚基组成、红外光谱(FTIR)、黏度和热变性温度,以及溶解度等性质进行系统分析。研究表明:马面鲀鱼皮酸性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC)的得率分别为 $0.87\% \pm 0.15\%$ 和 $9.52\% \pm 0.41\%$ (按鱼皮干重计算)。ASC和PSC中含有的主要氨基酸为甘氨酸(Gly),含量分别为323.3残基/1000残基和321.7残基/1000残基;二者中所含的亚氨基酸含量分别为191.1/1000残基和183.4/1000残基。氨基酸组成分析、SDS-PAGE和FTIR证实马面鲀鱼皮酸性胶原蛋白(ASC)为I型胶原蛋白,且其SDS-PAGE图中的亚基组成($\alpha 1$ -肽链和 $\alpha 2$ -肽链)、氨基酸序列,以及胶原蛋白构型与PSC明显不同。ASC和PSC的热变性温度(T_d)分别为 21.5°C 和 18.9°C ,显著低于哺乳动物来源的胶原蛋白。ASC和PSC的最大溶解度出现在pH 2—3时,当NaCl的浓度低于2%时,二者的溶解度就开始急剧下降。此外,冻干的胶原蛋白显示出疏松多孔的超微结构。综上,相对于哺乳动物类胶原蛋白,马面鲀鱼皮ASC和PSC的亚氨基酸含量和热变性温度较低,结构稳定性差,易于降解,可作为胶原蛋白肽的制备原料进行开发利用。

关键词 绿鳍马面鲀; 鱼皮; 酸性胶原蛋白(ASC); 酶溶性胶原蛋白(PSC)

中图分类号 R285 doi: 10.11693/hyhz20160600129

胶原蛋白广泛分布于皮肤、骨骼、肌腱、血管系统和结缔组织中,约占动物体内总蛋白的30%(Chen *et al*, 2016)。目前,已发现的胶原蛋白种类有29种(类型I—XXIX),且每种胶原蛋白都具有独特的结构和生理功能(Matmaroh *et al*, 2011)。传统上,胶原蛋白主要来自于陆地动物如牛、猪和家禽的加工副产物(Yang *et al*, 2016),被广泛应用于生物医学材料、药品、食品添加剂和化妆品等领域(Li *et al*, 2013a; Liu *et al*, 2015)。然而,疯牛病(BSE)和口蹄疫(FMD)等病毒性疾病的发生致使人们对陆源胶原蛋白的安全性产生疑虑(张雪等, 2015; Chuaychan *et al*, 2015)。此外,宗教等原因也限制了胶原蛋白的应用范围(Veeruraj

et al, 2015)。因此,寻找陆源胶原蛋白的替代资源成为研究热点。

据联合国粮食及农业组织(FAO)报道,全球每年鱼捕获量约有1.5亿吨,加工过程中产生占捕获量30%以上的加工下脚料,多数未得到有效利用,既浪费了宝贵的资源,也给环境造成了较大压力(Yu *et al*, 2014; Wu *et al*, 2015)。现有研究表明,水产加工下脚料,特别是鱼皮、鱼骨、鱼鳞和鱼头中富含胶原蛋白(Subhan *et al*, 2015),且已从鲑鱼皮(张雪等, 2015)、金枪鱼鱼骨(Yu *et al*, 2014)、海参体壁(Cui *et al*, 2007)、大黄鱼和小黄鱼鱼鳞(Wu *et al*, 2015)、鳕鱼鱼骨(Żelechowska *et al*, 2010)和罗非鱼鱼皮(Zeng *et al*,

* 浙江省公益性项目(2014C33034)。郁迪, 实验师, E-mail: yudi@zjou.edu.cn

通讯作者: 王斌, E-mail: wangbin4159@hotmail.com

收稿日期: 2016-06-20, 收修改稿日期: 2016-07-07

2009)中制备得到胶原蛋白,并对其性质进行了系统研究,为水产胶原蛋白的开发利用奠定了基础。另外,现有研究证明源于海洋生物的胶原蛋白具有低抗原性、低过敏性等特性,较陆源胶原蛋白具有更广泛的用途(Li *et al.*, 2013b)。因此,以水产加工下脚料进行胶原蛋白的开发利用既能保护环境,又可以增加水产加工附加值。

绿鳍马面鲀(*Navodon septentrionalis*)属于单角鲀科,俗名剥皮鱼、皮匠鱼、橡皮鱼等,在我国主要产于东海及黄海、渤海,是我国重要的海产经济鱼类之一。我国马面鲀的年加工数量约为 20 万吨,产生 10 万吨左右的副产物,而其皮肤强韧,利用价值较低,常作为废料丢弃。基于此,本论文以绿鳍马面鲀鱼皮为原料,从中制备酸溶性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC),并对其性质进行了系统研究,为马面鲀加工下脚料的后续开发利用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

绿鳍马面鲀(*Navodon septentrionalis*)购于浙江省舟山市丰茂菜市场,种属由浙江海洋大学海洋科学与技术学院赵盛龙教授鉴定,标本于-20℃存放于浙江海洋大学食品与医药学院药学实验室。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂为 Bio-Rad 产品,牛胰蛋白酶(Trypsin, 1:250)、猪胃蛋白酶(Pepsin, 160000U/g)和牛皮胶原蛋白标准品(CSC)为 Sigma 产品。其它试剂均为国产分析纯,购买于上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ASC 和 PSC 的提取 手工剥取绿鳍马面鲀鱼皮,用冷蒸馏水洗净,然后用剪刀切成小块后组织捣碎机破碎,按照料液比 1:15(*W/V*)加入 0.1mol/L NaOH 溶液于 4℃下搅拌浸泡 24h(每 6h 换液一次),9000g 离心 20min,沉淀物用冷水洗至中性;充分沥干后,按料液比 1:20(*V/V*)加入 15%正丁醇溶液搅拌浸泡 48h(每 12h 更换一次)除去残留的脂肪,脱脂鱼皮用蒸馏水洗净。

脱脂鱼皮按料液比 1:15(*W/V*)浸泡于 0.5mol/L 的乙酸中 24h,混合物以 9000g 离心 20min,上清液装入截留分子量为 3500Da 的透析袋,于 NaCl 浓度为 2.6mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(0.05mol/L, pH7.5)中透析 24h,于 20000g 离心 15min,沉淀物用乙酸溶液(0.5mol/L)复溶后依次用乙酸溶液(0.1mol/L)和蒸馏

水透析 24h 和 36h,最后透析液冻干得酸溶性胶原蛋白(ASC)。

将 ASC 提取后的残渣按照料液比 1:15(*W/V*)置于 0.5mol/L 乙酸溶液,加入 3%猪胃蛋白酶后在 4℃下搅拌提取 48h,于 20000g 离心 30min 后得上清液,将上清液装入截留分子量为 3500Da 的透析袋,于 NaCl 浓度为 2.6mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(0.05mol/L, pH 7.5)中透析 24h,于 20000g 离心 15min 得沉淀物,沉淀物用 0.5mol/L 的乙酸溶液复溶后依次用 0.1mol/L 的乙酸和蒸馏水透析 24h 和 36h,透析液冷冻干燥得酶溶性胶原蛋白(PSC)。

ASC 和 PSC 的得率按照下面公式计算:

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{冷冻干燥胶原蛋白重量}(\text{g}) / \text{鱼皮干重}(\text{g}) \times 100}{}$$

1.2.2 基本成分和氨基酸组成分析 水分、灰分、脂肪和蛋白质的测定分别按照 AOAC(2003)中的 950.46B、920.153、960.39(a)和 928.08 方法进行分析。氨基酸组成分析参考赵等(2015)方法进行。

1.2.3 SDS-PAGE ASC 和 PSC 的电泳根据 Chi 等(2014)的方法略作修改。分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 4%。样品(6.0mg/mL, 20μL)与上样缓冲液(60mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 包含 25%甘油, 2% SDS, 0.1%溴酚蓝)按 4:1(*V/V*)置于 β-巯基乙醇中,然后将样品、CSC 和蛋白标准品分别加入样品槽中,以 100V 恒定电压电泳大约 4h 后,用考马斯亮蓝 R-250 染色液(考马斯亮蓝 0.5g, 甲醇 225mL, 蒸馏水 225mL, 冰醋酸 50mL)染色 15min,脱色液(甲醇 100mL, 冰醋酸 100mL, 蒸馏水 800mL)脱色并拍照分析。

1.2.4 ASC 和 PSC 的肽谱 胶原蛋白样品溶解于 0.5mol/L 乙酸中配成浓度为 3.5mg/mL 的溶液,按照酶/胶原蛋白 1:20(*W/W*)比例加入胰蛋白酶于 37℃下酶解 3h,加入 SDS-PAGE 样品缓冲液于沸水中保温 5min 终止酶解反应。其它胶原蛋白样品的酶解时间调整为 3min。然后所有样品用 12.0%的分离胶电泳。

1.2.5 傅里叶变换红外光谱(FTIR) 称取充分干燥后的胶原蛋白样品 1—2mg 按照质量比 1:100 与干燥 KBr 充分混合,手动压片,采用傅里叶变换红外光谱仪对样品在 450—4000cm⁻¹ 区间内进行吸收波谱扫描。

1.2.6 黏度测定 黏度的测定按照赵玉勤等(2015)方法进行。ASC 和 PSC 水溶液(0.6%)的温度按 4℃/min 的速度从 4℃上升到 40℃。相对黏度为测定时的黏度与 4℃黏度的比值。 T_d 定义为相对黏度降低

50%时的温度。黏度分数按照下列公式计算:

$$\text{黏度分数} = (\text{最大黏度} - \text{测量黏度}) / (\text{最大黏度} - \text{最小黏度})$$

1.2.7 溶解度测定

1.2.7.1 pH 值对溶解度的影响 取 ASC 和 PSC 溶液(3mg/mL, 8mL)分别加入到 50mL 离心管中, 用 6mol/L 的 NaOH/HCl 溶液调节溶液 pH 值从 1—11。用相同 pH 的 NaOH/HCl 溶液将体积补足至 10mL, 4°C 下轻轻搅拌 30min 后, 于 4°C、15000g 离心 60min。离心得到的上清液, 测定其蛋白质的含量。

相对溶解度按照下列公式计算:

$$\text{相对溶解度} = \text{当前 pH 值下蛋白浓度} / \text{最大溶解度的 pH 值下的蛋白浓度}$$

1.2.7.2 氯化钠浓度对溶解度的影响 分别向 ASC 和 PSC 溶液(6mol/L, 5mL)中加入 5mL 的 0.5mol/L 的乙酸溶液, 按质量体积比向溶液中加入 NaCl, 使 NaCl 最终浓度分别达到 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%和 6%。将调好浓度的溶液于 4°C 下轻轻搅拌 30min, 于 4°C、15000g 离心 60min, 测定上清液的蛋白质含量。相对溶解度按照下列公式计算:

$$\text{相对溶解度} = \text{当前 NaCl 浓度下蛋白浓度} / \text{最大溶解度的 NaCl 浓度下的蛋白浓度}$$

1.2.8 超微结构观察 ASC 和 PSC 溶解于 0.5mol/L 乙酸中配制成浓度为 5%(W/V)溶液, 用 25 倍体积的蒸馏水透析 24h 后冻干, 用 JEOL JFC-1200 精细镀膜仪镀金 90s, 电子显微镜下观察超微结构。

2 结果与讨论

2.1 ASC 和 PSC 的得率

绿鳍马面鲈鱼皮中酸溶性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC)的得率分别为 0.87%±0.15%和 9.52%±0.41%(按鱼皮干重计算)。酸法提取是采用低离子浓度酸性条件破坏分子间盐键和希夫碱, 引起胶原纤维膨胀、溶解, 可将没有交联的胶原分子或者含有醛胺类交联键的胶原纤维释放到溶剂中。但是, 由于部分胶原在体内通过末端肽里的赖氨酸(Lys)或羟赖氨酸形成的共价键交联结合, 难于溶解到酸性溶液中。而蛋白酶可以将胶原末端肽切除, 导致三螺旋结构的主体部分溶于稀有机酸而被提取出来, 提高胶原蛋白的产率。因此, 蛋白酶(如胃蛋白酶、胶原酶和木瓜蛋白酶等)可以作为胶原蛋白提取的辅助工具显著提高胶原蛋白的得率(Liu *et al*, 2012; Mohammadi *et al*, 2016)。

2.2 基本成分分析

绿鳍马面鲈鱼皮、ASC 和 PSC 的基本成分组成如表 1 所示。鱼皮的水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分含量分别为 62.12%±2.93%、19.83%±0.76%、3.08%±0.11%和 14.32%±0.24%。与鱼皮原料相比, 胶原蛋白提取过程中已经除去绝大部分杂质, ASC 和 PSC 的蛋白质含量分别为 97.93%±0.54%和 97.97%±0.38%, 而脂质(ASC: 0.47%±0.12%, PSC: 0.51%±0.09%), 灰分(ASC: 1.29%±0.11%, PSC: 1.42%±0.37%)和水分含量(ASC: 0.18%±0.04%, PSC: 0.16%±0.01%)则显著降低。

表 1 绿鳍马面鲈鱼皮、ASC 和 PSC 中营养成分分析(n=3)
Tab.1 Composition of bluefin leatherjacket skin, ASC and PSC (n=3)

成分	鱼皮(%)	ASC(%)	PSC(%)
水分	62.12 ± 2.93	0.18 ± 0.04	0.16 ± 0.01
灰分	14.32 ± 0.24	1.29 ± 0.11	1.42 ± 0.37
脂肪	3.08 ± 0.11	0.47 ± 0.12	0.51 ± 0.09
蛋白质	19.83 ± 0.76	97.93 ± 0.54	97.97 ± 0.38

2.3 氨基酸组成分析

绿鳍马面鲈鱼皮中 ASC 和 PSC 的氨基酸组成如表 2 所示。结果表明: ASC 和 PSC 具有类似的氨基酸组成, 含量最高的是氨基酸为 Gly, 含量分别为 323.3 残基/1000 残基和 321.7 残基/1000 残基; 其次是 Ala、Pro 和 Hyp。根据文献报道(Chi *et al*, 2013; Li *et al*, 2013a, b), 除了 N-端的 14 个氨基酸残基和 C-端 10 个氨基酸残基外, 胶原蛋白都是由重复的 Gly 三肽(Gly-X-Y)参与的三重螺旋形成, 其中 X 一般是 Pro, Y 主要是 Hyp。另外, 绿鳍马面鲈鱼皮中 ASC 和 PSC 的 Gly 含量明显低于刺河豚鱼皮中得到的 ASC(353 残基/1000 残基)和 PSC(340 残基/1000 残基)(Huang *et al*, 2011), 而略高于从条纹鲈鱼鱼皮中得到的 ASC(309 残基/1000 残基)和 PSC(317 残基/1000 残基)(Singh *et al*, 2011)。

此外, Chi 等(2013)报道亚氨基酸(Pro 和 Hyp)对胶原蛋白结构的完整性至关重要, 吡咯烷环的 Pro 和 Hyp 限制多肽链的构象, 并可在它们富集区域形成氢键, 从而稳定胶原蛋白的结构。因此, 亚氨基酸的含量有利于提高胶原蛋白螺旋结构的热稳定性。绿鳍马面鲈鱼皮 ASC 和 PSC 的亚氨基酸含量分别为 191.1 残基/1000 残基和 183.4 残基/1000 残基, 低于 CSC(215 残基/1000 残基), 说明绿鳍马面鲈鱼皮 ASC 和 PSC 的螺旋结构的稳定性弱于哺乳动物胶原蛋白。

表 2 绿鳍马面鲷鱼皮 ASC、PSC 和 CSC 的氨基酸组成及含量(残基/1000 残基)($n=3$)

Tab.2 Amino acids compositions of ASC, PSC and CSC (residues/1000 residues) ($n=3$)

氨基酸	ASC	PSC	CSC
Hyp	75.4	72.6	94
Asp	47.5	46.3	45
Thr	19.8	21.9	18
Ser	33.7	34.6	33
Glu	70.9	67.8	75
Pro	115.7	110.8	121
Gly	323.3	321.7	330
Ala	129.1	131.4	119
Cys	2.5	2.8	0
Val	27.6	23.7	21
Met	11.5	12.4	6
Ile	13.9	13.8	11
Leu	24.2	24.9	23
Tyr	3.7	3.8	3
Phe	15.8	16.9	3
Hyl	5.4	5.6	7
Lys	22.5	26.7	26
His	5.9	7.1	5
Arg	51.6	55.2	50
Total	1000	1000	1000
Imino acid	191.1	183.4	215

2.4 SDS-PAGE 和肽谱

现有研究证明:除了氨基酸组成外,分子量分

布、亚基种类和比例也对胶原蛋白结构产生较大影响。如图 1 所示,使用 7.5%分离胶对 ASC、PSC 和 CSC 进行 SDS-PAGE 分析。结果表明绿鳍马面鲷鱼皮中的 ASC 含有两种 α 肽链(α_1 和 α_2),其中, α_1 肽链的分子量约为 130kDa,含量较高, α_2 肽链的分子量约为 110kDa,含量较低;除 α 肽链外,ASC 和 PSC 尚含有大量 β 肽链(α 肽链二聚体),其分子质量约为 200kDa。另外,在 β 肽链上方还存在一条高分量的条带,为 γ 肽链(α 肽链三聚体),相对分子质量约为 300kDa。SDS-PAGE 结果表明 ASC 电泳图谱与 CSC(图 1)、大黄鱼鱼鳞 ASC(Wu *et al.*, 2015)、金枪鱼鱼骨 ASC(Yu *et al.*, 2014)、灰星鲨鱼皮 ASC(Chi *et al.*, 2014),以及马鲛鱼鱼皮和鱼骨 ASC(Li *et al.*, 2013a, b)类似,属于 I 型胶原蛋白。然而, PSC 的 SDS-PAGE 图谱和 ASC 和 CSC 明显不同。胰蛋白酶处理后,高分子量的亚基成分,包括 α 、 β 和 γ -肽链裂解成 70-110kDa 的低分子量片段。

在 pH 值为 2.5 和 7.8 条件下,利用胰蛋白酶分别对 ASC 和 PSC 进行酶解,使用 12%分离胶对酶解物进行电泳分析,结果如图 1B 所示:经胰蛋白酶在 pH 为 2.5、37 °C 处理 3 h 后,ASC 的 β 和 γ 等高分子量肽链几乎完全消失,而低于 130.0kDa 的片段显著增多;PSC 未酶解时主要组成片段集中在 66—100kDa 之间,而胰蛋白酶酶解后,大于 66kDa 的片段基本消失,低于 66.0kDa 的片段显著增多。另外,随着 pH 值从 2.5 调整到胰蛋白酶最佳 pH 7.8,ASC 和 PSC 的水解程度都显著增加。

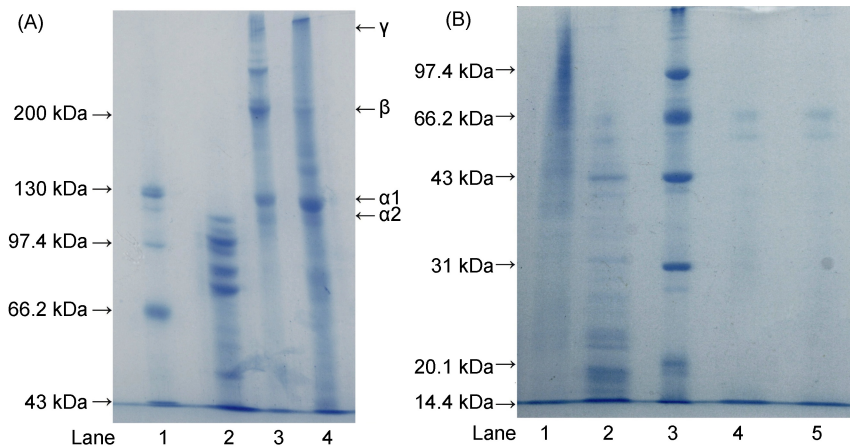


图 1 马面鲷鱼皮 ASC 和 PSC 的 SDS-PAGE 图谱(A)和肽谱(B)

Fig.1 SDS-PAGE pattern (A) and peptide mapping (B) of ASC and PSC from skin of bluefin leatherjacket

注: A. 1: 高分子量蛋白标准品; 2: PSC; 3: ASC; 4: CSC; B. 1: 胰蛋白酶在 pH 2.5 降解的 ASC 片段; 2: 胰蛋白酶在 pH 2.5 降解的 PSC 片段; 3: 蛋白标准品; 4: 胰蛋白酶在 pH 7.8 降解的 ASC 片段; 5: 胰蛋白酶在 pH 7.8 降解的 PSC 片段

ASC 和 PSC 的 SDS-PAGE 图谱和肽谱说明: ASC 和 PSC 的蛋白质一级结构、亚基、水解产物和氨基酸序列存在较大差别, ASC 组成亚基分子量更大, 更难酶解。

2.5 FTIR

绿鳍马面鲷鱼皮 ASC 和 PSC 的 FTIR 如图 2 所示。结果表明: ASC 和 PSC 的 FTIR 具有显著的胶原蛋白特征, 且类似于大黄鱼鱼鳞(Wu *et al.*, 2015)、金枪鱼鱼骨(Yu *et al.*, 2014)、灰星鲨鱼皮(Chi *et al.*, 2014), 以及马鲛鱼鱼皮和鱼骨(Li *et al.*, 2013a, b)等鱼类来源的胶原蛋白。

酰胺 A 带与 N-H 伸缩频率有关, 3400cm^{-1} 附近是 N-H 伸缩振动峰, 当肽的 N-H 基团中包含氢键时, 振动转向低频率。ASC 和 PSC 的酰胺 A 带都在 3432cm^{-1} , 表明 ASC 和 PSC 的 N-H 基团中氢键含量较少。ASC 和 PSC 的酰胺 B 带的波数分别为 2925cm^{-1} 和 2926cm^{-1} , 代表了 C-H 伸缩振动峰。酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带的伸缩振动与胶原蛋白的成分有直接关系(Heu *et al.*, 2010)。酰胺 I 带在 $1600\text{--}1700\text{cm}^{-1}$ 范围有很强的吸光度, 这主要与多肽链的 C=O 的伸缩振动相关, 能作为多肽二级结构的标记。ASC 和 PSC 酰胺 I 带的波数分别为 1640cm^{-1} 和 1642cm^{-1} 。由于 C-N 的伸缩振动与 N-H 的弯曲振动相耦合, 酰胺 II 带通常出现在 $1550\text{--}1600\text{cm}^{-1}$, 当有氢键存在时转向低波数, ASC 和 PSC 的酰胺 II 带波数为 1548cm^{-1} 和 1549cm^{-1} , 该数据进一步证实绿鳍马面鲷鱼皮 ASC 和 PSC 中存在少量氢键。此外, 酰胺 III 带($1220\text{--}1320\text{cm}^{-1}$)与 N-H 变形和 C-N 伸缩频率有关。ASC 和 PSC 的酰胺 III 带波数为 1240cm^{-1} , 其峰面积与 1452cm^{-1} 峰面积之比约等于 1 证明 ASC 和 PSC 存在 3 股螺旋结构(Heu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013a, b)。

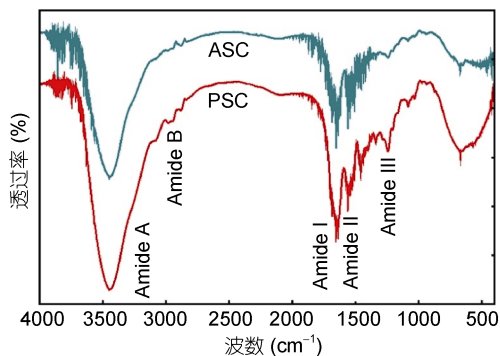


图 2 马面鲷鱼皮 ASC 和 PSC 的红外光谱(FTIR)
Fig.2 FTIR spectra of ASC and PSC from skin of bluefin leatherjacket

2.6 ASC 和 PSC 溶液的黏度

随着温度的升高, 胶原蛋白的分子内氢键会逐渐断裂, 由氢键维系的胶原蛋白三螺旋结构转化为无规则卷曲状态, 并伴随着物理性质, 如黏度、溶解度、沉降、扩散、光散射和光学活动等变化(Chi *et al.*, 2014)。如图 3 所示, ASC 和 PSC 从 4°C (ASC: $7453.33\pm 27.92\text{mPa}\cdot\text{s}$, PSC: $7332.30\pm 4318.13\text{mPa}\cdot\text{s}$)加热至 32°C (ASC: $361.27\pm 11.95\text{mPa}\cdot\text{s}$, PSC: $233.67\pm 9.28\text{mPa}\cdot\text{s}$), 黏度快速下降, 在 32°C 以上黏度的变化很小。

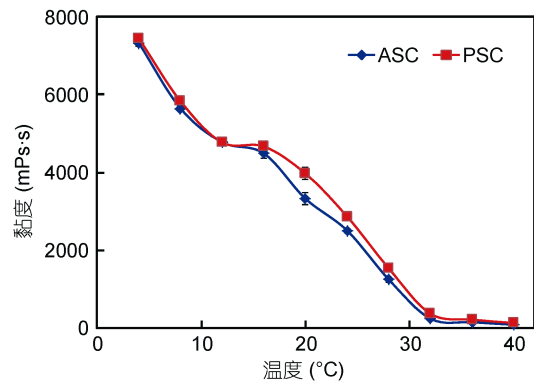


图 3 温度对马面鲷鱼皮 ASC 和 PSC 黏度的影响($n=3$)
Fig.3 Thermal behaviours of ASC and PSC from skin of bluefin leatherjacket ($n=3$)

变性温度(T_d)为相对黏度降低 50%时的温度。ASC 和 PSC 的 T_d 分别为 21.5°C 和 18.9°C 。PSC 的 T_d 值略低于 ASC, 该结果表明胃蛋白酶的酶解破坏了胶原蛋白分子的部分氢键, 造成胶原蛋白分子量降低, 稳定性减弱。绿鳍马面鲷生活在温度为 $13\text{--}20^\circ\text{C}$ 的海洋, 其鱼皮胶原蛋白的变性温度比阿根廷鳕鱼(10.0°C)、波罗海鳕鱼(15.0°C)和阿拉斯加狭鳕(16.8°C)等冷水鱼高, 并低于热带鱼类, 如常见的鲭鱼(26.1°C)、鳗鱼(29.3°C)、七星鲈鱼(26.5°C)、鲤鱼(29.7°C)、香鱼(29.7°C)、澳洲乌鲂(28.4°C)和尼罗河鲈鱼(36.5°C)(Li *et al.*, 2013a, b; Sionkowska *et al.*, 2015)。该结果与 Zeng 等(2009)报告相一致, 即: 环境和机体温度与胶原蛋白的热稳定性有关。此外, T_d 结果进一步证实亚氨基酸含量较低会影响胶原蛋白的热稳定性。

另一方面, 绿鳍马面鲷鱼皮的 ASC 和 PSC 的变性温度低于牛皮和猪皮胶原蛋白的变性温度(37°C)(Huang *et al.*, 2011), 该数据表明绿鳍马面鲷鱼皮中的胶原蛋白的稳定性弱于哺乳动物胶原蛋白, 更适合作为胶原肽的制备原料。

2.7 溶解度

2.7.1 NaCl 浓度对胶原蛋白溶解度的影响 图4(A)表明当 NaCl 浓度从 0 上升至 6%(W/V)时, 绿鳍马面鲷鱼皮 ASC 和 PSC 的溶解度变化曲线略有不同。当 NaCl 浓度到达 2%(W/V)时, ASC 的溶解度高(90%以上), 当 NaCl 浓度为 2%—4%(W/V)时溶解度大幅下降, 之后当 NaCl 浓度为 4%—6%(W/V)时降幅减小。当 NaCl 浓度为 6%(W/V)时溶解度仅为 $20.0\% \pm 1.2\%$ 。该结果与 NaCl 浓度对金枪鱼鱼骨、赤魴软骨、孔鳐软骨、灰星鲨鱼皮和软骨、条纹鲶鱼鱼皮胶原蛋白溶解度的影响类似(Chi *et al*, 2013; Li *et al*, 2013a, b; Matmaroh *et al*, 2011; Singh *et al*, 2011)。胶原蛋白在水溶液中的溶解度由其周围亲水基团与水形成水化膜的程度, 以及所带电荷的情况决定。随着 NaCl 浓度的增加, NaCl 对水分子的亲和力大于胶原蛋白, 于是胶原蛋白分子周围的水化膜层减弱乃至消失。同时, NaCl 加入溶液后, 离子强度发生改变, 蛋白质表面电荷大量被中和, 进而导致胶原蛋白溶解度降低, 使胶原蛋白分子之间聚集而沉淀。

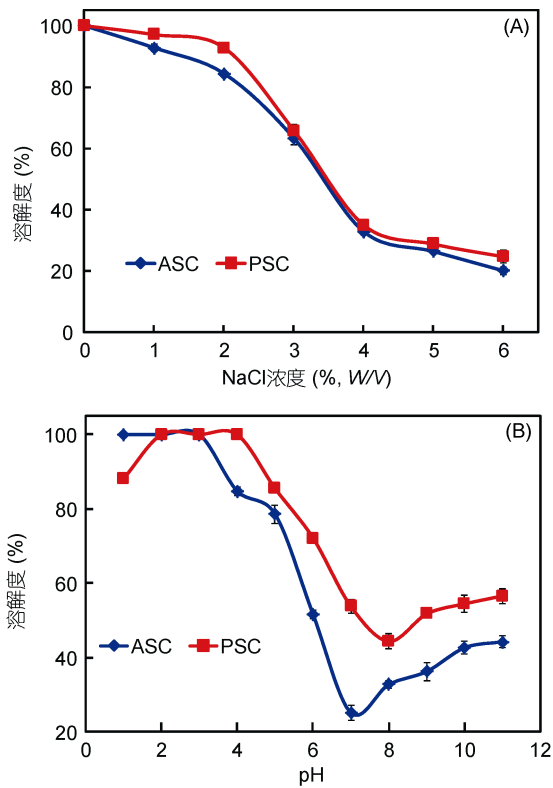


图4 NaCl 浓度(A)和 pH(B)对马面鲷鱼皮 ASC 和 PSC 溶解度的影响($n=3$)

Fig.4 Solubility of ASC and PSC from skin of bluefin leatherjacket at different pH (A) and NaCl concentrations (B) ($n=3$)

与 ASC 溶解度图相比, 当 NaCl 浓度到达 2%(W/V)时 PSC 的溶解度显著下降, 但在相同的 NaCl 浓度下 PSC 比 ASC 表现出更大的溶解度, 主要因为经胃蛋白酶酶解后, PSC 的分子量显著低于 ASC, 亲水性更强, 从而溶解度更大。

2.7.2 pH 值对胶原蛋白溶解度的影响 pH 值对 ASC 和 PSC 溶解度的影响如图 4(B)所示。ASC 和 PSC 的溶解度在酸性 pH 值介于 1—3 时最大, 当 pH 上升至 3—7 时溶解度显著降低, 当 pH 为 7—8 时 ASC 和 PSC 的溶解度达到最小值, 分别为 $25.2\% \pm 1.9\%$ 和 $44.4\% \pm 2.0\%$ 。文献报道, 当 pH 值低于或高于蛋白等电点(pI), 蛋白质分子的负电荷或正电荷会随之增加, 相互之间的排斥力变大, 溶解度升高; 相反, 等电点时蛋白质之间排斥力最小, 则沉淀析出。所以, ASC 和 PSC 的等电点分别为 pH 值 7 和 8, 与已有报道胶原蛋白的等电点在 6—9 之间相一致(Huang *et al*, 2011; Chi *et al*, 2013; 赵玉勤等, 2015)。

2.8 超微结构

图 5 结果表明: 冻干的绿鳍马面鲷鱼皮 ASC 呈现片状结果, 而相同处理下的 PSC 呈现疏松片状和多孔结构。ASC 与 PSC 超微结构的差异主要由于其分子量差异导致溶解度的不同, 进而在溶液中 PSC 分布更加均匀。但是 ASC 和 PSC 均显示出良好的成膜性能, 可以作为药物载体进行开发。同时本研究结果说明分子量和溶解度对胶原蛋白的超微结构均有一定影响, 后续研究可以根据需求调整胶原蛋白的分子量和溶解度来制备所需的生物材料(Mohammadi *et al*, 2016)。

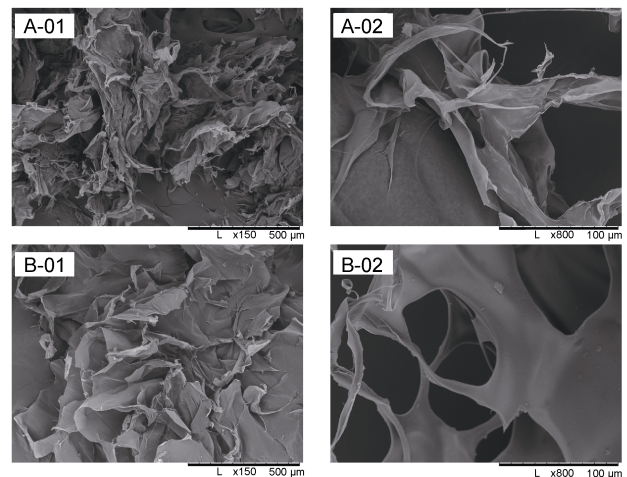


图5 马面鲷鱼皮 ASC(A)和 PSC(B)的超微结构图
Fig.5 SEM images of ASC (A) and PSC (B) from skin of bluefin leatherjacket

3 结论

本实验利用酸提法和酶提法从绿鳍马面鲈鱼皮中制备了两种胶原蛋白, 成分分析和 SDS-PAGE 电泳结果表明, 提取的酸溶性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC)具有较高的纯度; 氨基酸组成分析、SDS-PAGE 和 FTIR 证实 ASC 属于 I 型胶原蛋白, 但是 PSC 在亚基组成和分子量等方面与 ASC 存在一定差异; ASC 和 PSC 的变性温度低于热带鱼类和哺乳动物来源的胶原蛋白, 适合作为胶原肽的制备原料进行开发利用; 超微结构揭示可以根据需求调整马面鲈鱼皮胶原蛋白的分子量和溶解度, 进行生物材料开发。因此, 本研究为绿鳍马面鲈鱼皮的高值化利用提供了一种新的思路, 也为马面鲈鱼皮胶原蛋白应用于食品和生物医药行业提供理论依据。

参 考 文 献

- 张 雪, 令狐青青, 董晓倩等, 2015. 响应面法优化鲑鱼 (*Ommastrephes bartrami*)皮胶原蛋白提取液脱色工艺. 海洋与湖沼, 46(1): 221—227
- 赵玉勤, 王玉梅, 王 斌等, 2015. 绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*)鱼头酸溶性与酶溶性胶原蛋白的分离纯化及理化性质研究. 海洋与湖沼, 46(3): 703—709
- Chen S J, Chen H, Xie Q N *et al*, 2016. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). Food Hydrocolloid, 52: 468—477
- Chi C F, Wang B, Li Z R *et al*, 2013. Characterization of acid-soluble collagens from the cartilages of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*), red stingray (*Dasyatis akajei*), and skate (*Raja porosa*). Food Sci Biotechnol, 22(4): 909—916
- Chi C F, Wang B, Li Z R *et al*, 2014. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). J Food Biochem, 38(2): 236—247
- Chuaychan S, Benjakul S, Kishimura H *et al*, 2015. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). LWT-Food Sci Technol, 63(1): 71—76
- Cui F X, Xue C H, Li Z J *et al*, 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. Food Chem, 100(3): 1120—1125
- Heu M S, Lee J H, Kim H J, *et al*, 2010. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from flatfish skin. Food Sci Biotechnol, 19(1): 27—33
- Huang Y R, Shiao C Y, Chen H H *et al*, 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). Food Hydrocolloid, 25(6): 1507—1513
- Li Z R, Wang B, Chi C F, *et al*, 2013a. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). Food Hydrocolloid, 31(1): 103—113
- Li Z R, Wang B, Chi C F, *et al*, 2013b. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. Food Res Int, 51(1): 283—293
- Liu D S, Liang L, Regenstein J M *et al*, 2012. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). Food Chem, 133(4): 1441—1448
- Liu D S, Zhang X, Li T C *et al*, 2015. Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food Biosci, 9: 68—74
- Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T *et al*, 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). Food Chem, 129(3): 1179—1186
- Mohammadi R, Mohammadifar M A, Mortazavian A M *et al*, 2016. Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM). Food Chem, 190: 186—193
- Singh P, Benjakul S, Maqsood S *et al*, 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chem, 124(1): 97—105
- Sionkowska A, Kozłowska J, Skorupska M *et al*, 2015. Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. Int J Biol Macromol, 80: 605—609
- Subhan F, Ikram M, Shehzad A *et al*, 2015. Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. J Food Sci Technol, 52(8): 4703—4707
- Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, *et al*, 2015. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). Food Hydrocolloid, 43: 708—716
- Wu Q Q, Li T, Wang B *et al*, 2015. Preparation and characterization of acid and pepsin-soluble collagens from scales of croceine and redlip croakers. Food Sci Biotechnol, 24(6): 2003—2010
- Yang Y N, Li C Y, Song W *et al*, 2016. Purification, optimization and physicochemical properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. Int J Biol Macromol, 89: 344—352
- Yu D, Chi C F, Wang B *et al*, 2014. Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Chin J Nat Med, 12(9): 712—720
- Żelechowska E, Sadowska M, Turk M, 2010. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Hydrocolloid, 24(4): 325—329

Zeng S K, Zhang C H, Lin H *et al*, 2009. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Food Chem, 116(4): 879—883

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGENS FROM SKIN OF BLUEFIN LEATHERJACKET (*NAVODON SEPTENTRIONALIS*)

YU Di, DING Dong-Ge, WANG Bin

(Zhejiang Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract Commercial fish production and seafood processing generate large quantities of by-products, accounting for about 50% of the original raw material, which create burdensome disposal problems and environmental concerns. However, these by-products contain several biomass materials, such as chitin, collagen, and polyunsaturated fatty acids, which can be biotechnologically exploited for the production of useful marketable products. Recently, some researches have focused on isolation and characterization of collagens from aquatic by-products. In the experiment, acid- (ASC) and pepsin-solubilized collagen (PSC) were extracted from the skin of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) with yields of $0.87\% \pm 0.15\%$ and $9.52\% \pm 0.41\%$ on dry weight basis. ASC and PSC had glycine as the major amino acid with the contents of 323.3 residues/1000 residues and 321.7 residues/1000 residues, and contained imino acid of 191.1 residues/1000 residues and 183.4 residues/1000 residues, respectively. ASC was classified as type I collagen and was differences with PSC on subunit components, amino acid sequences and collagen conformation on electrophoretic pattern and peptide maps. FTIR investigations showed the existence of helical arrangements of ASC and PSC. The denaturation temperatures (T_d) of the ASC and PSC were 21.5°C and 18.9°C , which were lower than the T_d s of calf and pig skin collagens (37°C), and the data further proved that the helices of collagens from the skin of bluefin leatherjacket were less stable than those of mammalian collagens. The maximum solubility of ASC and PSC was appeared at pH 2—3, and a sharp decrease in solubility was observed when NaCl concentration was above 2%. In addition, the lyophilized collagens displayed loose and porous ultrastructures, which might have good properties for distribution of the drugs as carriers. Thus, this study provided a theoretical basis for collagen modification and utilization, and collagen from the skin of bluefin leatherjacket could serve as an alternative source of collagen for further application in food and biomedical industries.

Key words bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*); skin; acid-solubilized collagen (ASC); pepsin-solubilized collagen (PSC)