

# 金鲳鱼鱼皮酶溶性胶原蛋白的提取工艺优化及基本特性

廖伟,夏光华,王佳媚,杨晋坤,李永成,申铨日\*  
(海南大学食品学院,海南海口 570228)

**摘要:**为提高金鲳鱼加工副产物——鱼皮的利用率,本研究在前期单因素实验的基础上,以加酶量、液料比和提取时间三个单因素建立模型,采用响应面法 Box-Behnken 设计实验,优化了胃蛋白酶法提取金鲳鱼鱼皮酶溶性胶原蛋白(PSC)的提取工艺,并与酸溶性胶原蛋白(ASC)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、傅里叶变换红外光谱和差示扫描量热仪等基本理化特性的对比研究。结果表明,金鲳鱼鱼皮胶原蛋白的最佳提取工艺为:加酶量 1.5%、液料比 23:1 mL/g、酶解时间 27.5 h。此条件下通过实验验证得出,金鲳鱼鱼皮胶原蛋白实际提取率为 64.68%,与响应面模型理论预测值 65.17% 基本一致;此外,本实验提取的 PSC 有较高热变性温度(30.44 °C),与金鲳鱼皮 ASC 有相似的电泳性质和红外峰型,初步鉴定为 I 型胶原蛋白。该实验为金鲳鱼鱼皮酶溶性胶原的提取提供了理论参考。

**关键词:**金鲳鱼鱼皮,胶原蛋白,响应面法,提取工艺

## Optimization of extraction process and basic properties for pepsin-soluble collagen from *Golden pompano* skin

LIAO Wei, XIA Guang-hua, WANG Jia-mei, YANG Jin-kun, LI Yong-cheng, SHEN Xuan-ri\*

(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** To improve the utilization rate of fish skin in processing by-product of *Golden pompano*, this paper used the response surface Box-Behnken method to optimize the extraction process of pepsin-soluble collagen (PSC) from the skin of *Golden pompano*. Based on the previous single factor experiment, the model was established by three factors (enzyme concentration, liquid-to-solid ratio and extraction time). In addition, the basic properties of PSC were characterized and compared with acid-soluble collagen (ASC) by Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and Differential Scanning Calorimeter (DSC). The results showed that the optimum extraction conditions were 1.5% enzyme concentration, 23:1 mL/g liquid-to-solid ratio, and 27.5 h extraction time. Under this condition, the actual yield of collagen of *Golden pompano* skin was 64.68%, which was close to the predicted value (65.17%). Moreover, the PSC obtained in this experiment had higher denaturation temperature (30.44 °C) and preliminarily identified as type I collagen, which was similar to the electrophoretic and infrared peaks of ASC. The technical reference for the extraction of PSC from *Golden pompano* skin was given in this research.

**Key words:** *Golden pompano* skin; collagen; response surface methodology; extraction process

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)19-0142-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.027

胶原蛋白(collagen)是动物结缔组织中最常见的不溶性纤维蛋白,约占蛋白总量的 33%<sup>[1]</sup>,广泛分布在动物的皮肤、骨骼与肌腱等组织中。到目前为止,部分研究人员已从众多原料中提取并鉴定了至少 27 种不同类型的胶原蛋白(Type I-XXIX),每种类型的胶原在其结构与功能上有显著不同<sup>[2]</sup>。其中,研究学者对 I 型胶原研究较多,该型胶原蛋白现已广泛应用于食品、医药、皮革、影像和化妆品工业

中<sup>[3-4]</sup>。鱼皮是生产胶原蛋白的重要原料,具有价格低廉、来源丰富、安全性高等优点,现已逐渐成为陆生动物胶原蛋白的有效替代品<sup>[5]</sup>。

金鲳鱼(*Trachinotus ovatus*)学名卵形鲳鲹,体型较大,肉质细嫩,养殖成活率高,一般可达 90% 以上,是近年来中国华南沿海地区代表性海水养殖品种之一<sup>[6]</sup>。然而,其鱼皮较硬,加工过程中通常剥除丢弃或用作动物饲料。随着金鲳鱼养殖量的不断增大,

收稿日期:2017-03-29

作者简介:廖伟(1993-),男,硕士研究生,研究方向:农产品加工及贮藏,E-mail:wei\_food@163.com。

\* 通讯作者:申铨日(1968-),男,博士,教授,研究方向:食品科学和水产品精深加工等领域,E-mail:shenxuanri2009@163.com。

基金项目:海南省自然科学基金(317038);海南省重点研发计划(ZDYF2017104);海南大学科研启动基金资助项目(kyqd1662)。

大量副产物鱼皮未能得到高值化利用,且关于金鲷鱼鱼皮胶原蛋白的提取工艺、理化特性少有研究。传统提取胶原蛋白工艺包括热水浸提、碱法、酸法等,采用这些方法提取胶原蛋白均有不同程度的缺陷,如提取的胶原蛋白不稳定易发生降解、提取周期长、提取率低等<sup>[7]</sup>。与上述几种方法相比,酶法提取胶原蛋白具有提取率高、周期短和胶原蛋白性质稳定等优点,能有效增加经济效益<sup>[8]</sup>。研究者已通过响应面法优化了鲛鳔鱼皮、鳕鱼皮、罗非鱼鳞等酶溶性胶原提取工艺,探明了除酶种类外,加酶量、提取时间、液料比、酶解温度等因素也会对提取率造成影响,但当酶解温度过高时,胶原蛋白易发生降解<sup>[5,9-10]</sup>。因此,本实验在低温弱酸条件下,选取加酶量、提取时间、液料比三个单因素,采用响应面模型优化金鲷鱼鱼皮酶溶性胶原提取过程,并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、红外光谱(ATR-FTIR)与差示扫描量热仪(DSC)等技术手段对金鲷鱼皮胶原的理化性质进行了对比分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

新鲜金鲷鱼鱼皮 海南祥泰渔业股份有限公司提供,冷藏状态转运回实验室,去肉洗净在-20℃下冷藏以备用;羟脯氨酸标准品 上海信裕生物科技有限公司;胃蛋白酶(活性800~2500 U/mg) Sigma公司;I型猪皮胶原蛋白 四川铭让生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯;实验室用水均为去离子水。

Stratos 高速冷冻离心机 美国赛默飞公司;Eyl4 冷冻干燥机 日本 Tokyo Rikakikai 公司;Dycz-24dn 垂直电泳系统 北京市六一仪器厂;Tensor27 傅里叶变换红外光谱仪 德国 Bruker 公司;DSC131EV 差示扫描热量仪 法国塞塔拉姆仪器公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 基本成分分析 水分含量测定参考 GB/T 5009.3-2010<sup>[11]</sup>,采用105℃常压干燥法;蛋白质含量测定参考 GB/T 5009.5-2010<sup>[12]</sup>,采用凯氏定氮法;灰分含量测定参考 GB/T 5009.4-2010<sup>[13]</sup>,采用高温灼烧法;脂肪含量测定参考 GB/T 5009.6-2003<sup>[14]</sup>,采用索氏抽提法。

1.2.2 羟脯氨酸含量测定 羟脯氨酸是胶原所特有的氨基酸,通过测定羟脯氨酸的含量,乘以相应的系数即可得到样品中胶原蛋白含量<sup>[15]</sup>。绘制羟脯氨酸标准曲线:吸取不同浓度的羟脯氨酸标准液1 mL加入150 mL 柠檬酸缓冲液和250 mL 氯胺 T 溶液混合均匀,经25℃恒温氧化后加入1 mL 高氯酸(3.5 mol/L);10 min后加入1 mL 对二甲苯甲醛显色试剂,在65℃水浴显色,冷却后在560 nm处测定吸光值。以羟脯氨酸质量浓度(x)和对应的吸光度(y)绘制标准曲线,拟合回归方程。

样品中胶原蛋白含量(%) = 羟脯氨酸含量(%) × 11.1 式(1)

1.2.3 鱼皮胶原蛋白的分离与提取 参考 Duan<sup>[16]</sup>的

方法略有修改,所有操作均在4℃下进行。将新鲜金鲷鱼皮剪成小块,浸泡在0.1 mol/L的NaOH溶液中36 h,以除去杂蛋白和灰分;处理后的鱼皮反复冲洗至中性,随后浸泡在10%的正丁醇溶液中24 h以脱脂;将脱脂后的样品溶于0.5 mol/L乙酸中,根据实验设计的料液比、胃蛋白酶、时间进行浸提;浸提后用两层纱布过滤,滤液于12000 × g下低温离心15 min以去除不溶物,收集上清液,添加NaCl盐析至终浓度0.9 mol/L;在10000 × g下低温离心15 min,收集沉淀后溶于乙酸;收集后的样品液依次用0.1 mol/L的乙酸和蒸馏水为外液各透析24 h,随后在真空冷冻干燥机下冷冻干燥即为酶溶性胶原蛋白(PSC)。酸溶性胶原蛋白(ASC)采用相同的方法在不添加胃蛋白酶的情况下进行提取,同时用作实验对照。

胶原蛋白提取率(%) = 提取液中胶原蛋白含量(g)/样品中胶原蛋白的含量(g) × 100 式(2)

1.2.4 单因素实验 根据前期实验结果和相关文献[9,17-18],选取胶原蛋白溶解过程中的三个关键因素(加酶量、液料比和提取时间)。设定加酶量1.5%、液料比20:1、提取时间24 h,进行单因素实验,考察加酶量0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%;液料比10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 mL/g;提取时间12、18、24、30、36 h对金鲷鱼鱼皮酶溶性胶原提取率的影响。

1.2.5 响应面优化实验 在单因素实验基础上,采用响应面 Box-Behnken 设计三因素三水平的实验方案。实验因素与水平设计见表1。

表1 响应面实验因素及水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A 加酶量(%)	1	1.5	2
B 液料比(mL/g)	15:1	20:1	25:1
C 提取时间(h)	18	24	30

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 先配制胶原蛋白水溶液(2.5, w/v),随后与试样处理液均匀混合(1:1, v/v),沸水浴5~10 min制样,冷却以备用。根据 Laemmli<sup>[19]</sup>的方法,采用不连续的三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸电泳系统,在7.5%的分离胶和4%的浓缩胶,80 V 稳流电压的条件下进行。市售 I 型猪皮胶原蛋白作为对照

1.2.7 傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)分析 取适量胶原样品,与KBr粉末在干燥灯下充分研磨,压片。随后将片状样品置于样品室内测定。光谱扫描范围为4000~500 cm<sup>-1</sup>,分辨率2 cm<sup>-1</sup>,扫描次数为4次。

1.2.8 差示扫描量热(DSC)分析 参考杨玲等<sup>[20]</sup>法,胶原样品溶于水中(1:40, w/v),静置24 h以混匀。随后称取样品溶液9~15 mg于铝锅中,加盖密封,置于样品槽中待测定。设置扫描温度为15~50℃,扫描速度为2℃/min。

表2 金鲳鱼鱼皮基本成分(湿重)

Table 2 General composition of the skin of *Golden pompano* (wet weight)

指标	水分	灰分	脂肪	蛋白质
含量(%)	65.14 ± 1.17	1.36 ± 0.13	8.02 ± 0.32	23.48 ± 1.44

### 1.3 数据处理

每个样品实验复3次,数据通过 SPSS 17.0 分析处理,用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 金鲳鱼鱼皮成分分析

表2列出了金鲳鱼鱼皮的基本化学成分,数据显示其含水量为65.14%;干物质含量为34.56%,其中干物质主要为蛋白质,约占总质量的23.48%,高于已经报道的经济养殖鱼草鱼(16.56%)和美国红鱼(19.46%)<sup>[21-22]</sup>,因此金鲳鱼鱼皮可看作是较好的蛋白质来源。此外,金鲳鱼鱼皮中含有8.02%的脂肪和1.36%的灰分,说明鱼皮胶原的提取也需要经历脱脂和脱灰等过程。

### 2.2 标准曲线绘制

根据测定的数值,得到羟脯氨酸回归方程  $y = 0.094x + 0.0087$ ,  $R^2 = 0.9973$  (图1)。通过标准曲线计算得到金鲳鱼皮的羟脯氨酸含量为1.78%,乘以换算系数11.1<sup>[15]</sup>,得出胶原蛋白含量为19.57% ± 1.37%,占鱼皮粗蛋白含量的83.33%,进一步说明金鲳鱼鱼皮富含胶原蛋白。

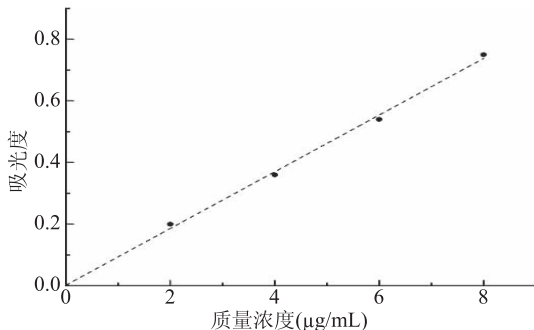


图1 羟脯氨酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of L-hydroxyproline

### 2.3 单因素实验

**2.3.1 加酶量对胶原蛋白提取率的影响** 加酶量对金鲳鱼鱼皮胶原蛋白提取率的影响如图2所示,在加酶量0.5%~1.0%之间,胶原蛋白提取率随着加酶量的增加而显著增加 ( $p < 0.05$ ),但当加酶量达到1.5%后开始下降,这与王珮等<sup>[5]</sup>的研究报道相似,这可能由于底物的量是一定的,酶与底物结合已达到饱和,而过量的酶会导致胶原蛋白降解,因此选择加酶量1.5%作为较优水平。

**2.3.2 液料比对胶原蛋白提取率的影响** 液料比对金鲳鱼鱼皮胶原蛋白提取率的影响如图3所示,胶原蛋白提取率随液料比的增大先呈增加趋势,至20:1 mL/g处达到最大后呈减小趋势。结果表明:当液料比较低时 (<15:1 mL/g),金鲳鱼皮不能完全溶解,所以提取率低,而当液料比较高时可能造成蛋白分离纯化过程中损失增大,所以提取率也低;而在

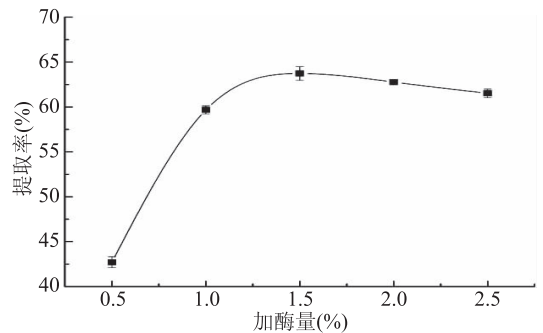


图2 加酶量对金鲳鱼鱼皮胶原蛋白提取率的影响

Fig.2 Effect of enzyme concentration on collagen yield from skin of *Golden pompano*

20:1 mL/g处鱼皮可完全溶解且提取率达到最大,因此选择20:1 mL/g作为较优水平。

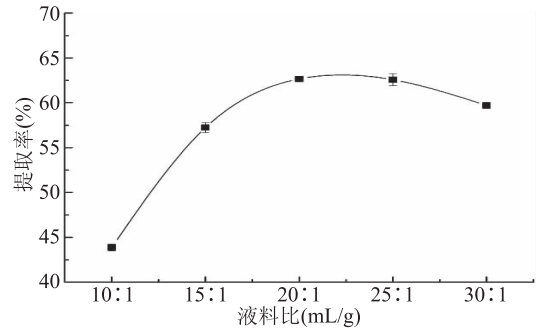


图3 液料比对金鲳鱼鱼皮胶原蛋白提取率的影响

Fig.3 Effect of water/solid ratio on collagen yield from skin of *Golden pompano*

**2.3.3 提取时间对胶原蛋白提取率的影响** 提取时间对金鲳鱼鱼皮胶原蛋白提取率的影响如图4所示,在提取时间12~24 h,胶原蛋白提取率随着时间的延长而显著提高 ( $p < 0.05$ ),但当提取时间超过24 h后,提取率再无显著变化 ( $p > 0.05$ ),考虑到提取成本、结合工业生产实际需要,选择24 h为较优水平。

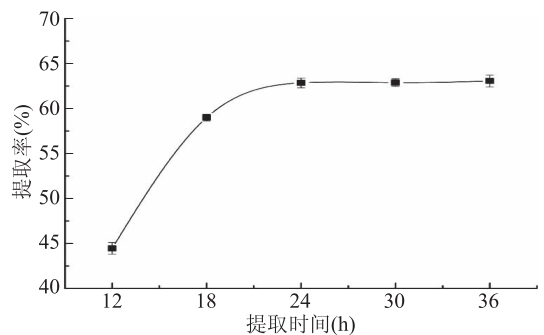


图4 提取时间对金鲳鱼鱼皮胶原蛋白提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on collagen yield from skin of *Golden pompano*

### 2.4 响应面实验

响应面实验设计方案和实验结果如表3所示。

表3 响应面实验设计方案及结果

Table 3 Experimental design and results of response surface

实验号	A	B	C	Y 提取率 (%)
1	0	0	0	58.26
2	0	1	1	63.31
3	-1	0	1	46.88
4	1	0	1	52.89
5	0	0	0	58.17
6	0	0	0	61.66
7	0	-1	-1	19.40
8	0	1	-1	48.38
9	1	1	0	55.98
10	0	0	0	63.97
11	-1	0	-1	39.00
12	-1	1	0	51.03
13	1	-1	0	35.14
14	0	-1	1	39.53
15	0	0	0	63.80
16	1	0	-1	48.68
17	-1	-1	0	21.36

2.4.1 方差分析 对响应面结果进行多元回归分析,得到回归模型方差分析结果如表4所示。从结果可知,加酶量、液料比和提取时间的一次项、二次项影响显著,交互项影响不明显,说明各因素对金鲟鱼鱼皮胶原蛋白提取率不是简单的线性影响。响应面回归方程如下:  $Y = 60.62 + 5.16A + 12.15B + 6C - 3.18AB - 1.66AC - 0.76BC - 7.92A^2 - 10.85B^2 - 6.58C^2$ ,  $R^2 = 9.72$ ,整体模型的 Prob > F 值小于 0.05,并且失拟项不显著,因此该回归方程显著,说明该响应面实验方案设计可靠。

2.4.2 响应面分析 由图5a可知,提取时间固定不变,随着A(加酶量)的增加,胶原蛋白提取率呈先增后减的趋势,这说明过量的酶可能会使胶原蛋白发生降解。从等高线分析,当加酶量较低时等高线较

密,说明在开始阶段加酶量对提取率影响显著。图5b可知,加酶量固定不变,随着B(料液比)的增加,提取率先增后减的趋势,另外从等高线密度可知,料液比对提取率的影响逐渐递减。由图5c可知,液料比固定不变,随着C(提取时间)的不断增加,胶原蛋白提取率呈先增后趋平稳的趋势,这可能是因为乙酸对胶原蛋白的溶解已达到饱和。综上所述,实验设计的三个单因素两两交互作用均有最大值,表明该响应面优化方案合理,能较好地反映三个因素对金鲟鱼鱼皮胶原蛋白提取率的影响。

2.4.3 提取工艺确定分析 求解回归方程,得到酶法提取金鲟鱼皮胶原蛋白的最佳工艺条件为:加酶量 1.53%、液料比 23.15:1 mL/g、提取时间 27.60 h。在此条件下金鲟鱼胶原蛋白提取率可达 65.17%。考虑工业利用的方便,将最优条件修改为加酶量 1.5%、液料比 23:1 mL/g、提取时间 27.5 h。在此条件下验证胶原蛋白实际提取率为 64.68%,与理论值的误差为 0.49%,证明该响应面模型合理可靠。并且,酶法提取胶原蛋白过程中所用的试剂均价格低廉,且胃蛋白酶使用量低,从成本角度考虑此方法可实现金鲟鱼鱼皮的高价值化利用。

2.5 基本特性研究

2.5.1 SDS-PAGE 电泳分析 图6为金鲟鱼鱼皮PSC与ASC电泳图,与市售I型猪皮胶原蛋白作对照。

从图6中观察,金鲟鱼鱼皮PSC和ASC均有两条 $\alpha$ 链( $\alpha_1$ 和 $\alpha_2$ )、一条 $\beta$ 链,其中 $\alpha_1$ 链条带色度接近于 $\alpha_2$ 链的两倍,这与大鲵皮和鲟鱼鱼皮胶原电泳结果相似<sup>[7,20]</sup>。通过对比标准品计算可得,金鲟鱼鱼皮PSC和ASC $\alpha_1$ 链分子量约为118 kDa和120 kDa, $\alpha_2$ 链分子量约为115 kDa和116 kDa,与对照组I型猪皮胶原无明显差异。此外,鱼皮PSC的分子量相比ASC稍低,这可能是胃蛋白对PSC端肽区域进行了部分切割所导致的<sup>[23]</sup>。综上,此实验分离提取的

表4 回归模型方差分析结果

Table 4 The results of variance analysis for the regression model

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值
模型	9.00	2781.29	309.03	27.16	0.0001
A	1.00	213.11	213.11	18.73	0.0034
B	1.00	1181.22	1181.22	103.82	<0.0001
C	1.00	287.52	287.52	25.27	0.0015
AB	1.00	40.51	40.51	3.56	0.1011
AC	1.00	11.02	11.02	0.97	0.3578
BC	1.00	2.31	2.31	0.20	0.6659
A <sup>2</sup>	1.00	264.13	264.13	23.21	0.0019
B <sup>2</sup>	1.00	495.24	495.24	43.53	0.0003
C <sup>2</sup>	1.00	182.18	182.18	16.01	0.0052
残差	7.00	79.64	11.38		
失拟项	3.00	43.74	14.58	1.62	0.3177
纯误差	4.00	35.90	8.97		
总和	16.00	2860.93			

注:p < 0.01,差异极显著;p < 0.05,差异显著。



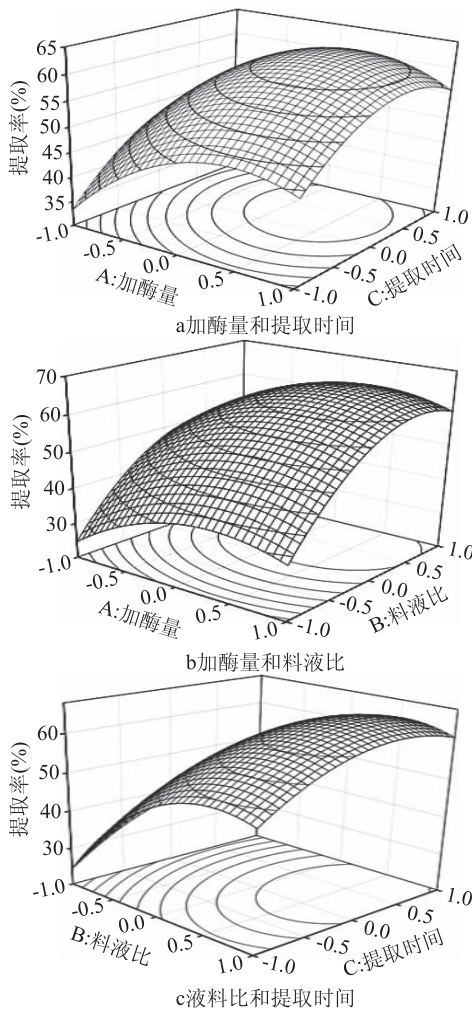


图5 各两因素交互作用对金鲳鱼鱼皮胶原蛋白提取率影响的响应面图

Fig.5 Response surface showing the effects of various operating parameters on collagen yield from skin of *Golden pompano*

金鲳鱼鱼皮 PSC 初步鉴定为 I 型胶原, 并且胶原的主要结构未受到胃蛋白酶的影响。

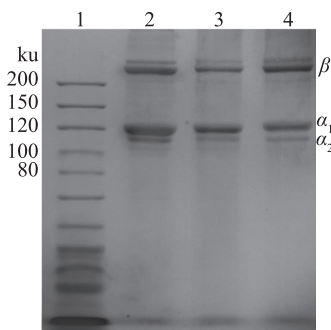


图6 金鲳鱼鱼皮 PSC 和 ASC 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE of PSC and ASC from skin of *Golden pompano*  
注:1.Markers;2.金鲳鱼鱼皮 PSC;3.金鲳鱼鱼皮 ASC;4.猪皮 PSC。

2.5.2 FT-IR 红外光谱与 ATR-FTIR 结果分析 如图 7 所示。图中观察到的酰胺 A 带是由 N-H 伸缩振动产生, 其吸收峰一般出现在 3400~3440  $\text{cm}^{-1}$ , 而本实验中金鲳鱼鱼皮 PSC 和 ASC 的吸收峰则出现在

稍低的位置 3330.8 和 3392.5  $\text{cm}^{-1}$ , 这可能因为 N-H 基团与肽链侧基缩合形成氢键使得对应的酰胺 A 带吸收峰发生了蓝移<sup>[24]</sup>。PSC 和 ASC 的酰胺 B 带吸收峰分别出现在 2927.7 和 2933.5  $\text{cm}^{-1}$ , 是由 =C-H 和  $-\text{NH}_3^+$  的不对称拉升引起。研究报道酰胺 B 峰向较高的位置偏移与赖氨酸端肽游离的  $-\text{NH}_3^+$  密切相关<sup>[25]</sup>, PSC 由于胃蛋白酶的作用其端肽被部分切除, 因此 PSC 的酰胺 B 吸收波数比 ASC 稍低。

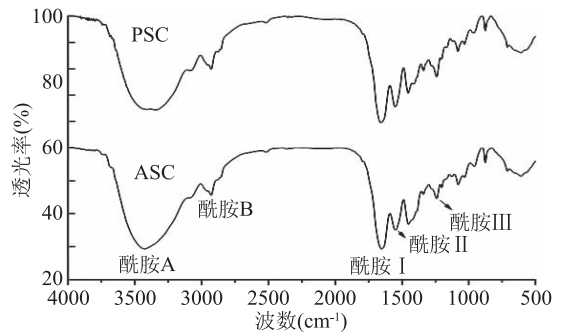


图7 金鲳鱼鱼皮 PSC 和 ASC 红外光谱图

Fig.7 IR spectra of PSC and ASC from skin of *Golden pompano*

金鲳鱼鱼皮 PSC 和 ASC 酰胺 I 带吸收峰出现在 1650.4 和 1651.2  $\text{cm}^{-1}$ , 是由 C=O 伸缩振动引起, 酰胺 I 带与胶原蛋白的二级结构密切相关, 是因为 C=O 不受肽链侧基的影响, 只取决于肽链的构型<sup>[26]</sup>。PSC 和 ASC 酰胺 II 带吸收峰出现在 1547.4 和 1548.3  $\text{cm}^{-1}$ , 是由 N-H 弯曲和 C-N 伸缩振动引起。研究报道  $\alpha$  链上的 N-H 与氢键缩合会使酰胺 II 带吸收峰向波数降低的方向偏移<sup>[27]</sup>, 这说明 PSC 中相邻  $\alpha$  链之间存在更多的氢键。酰胺 III 峰通常比较微弱, 其与 N-H 弯曲, C-N 拉伸和来自酰胺键的 N-H 弯曲振动有关<sup>[28]</sup>。本实验中, 鱼皮 PSC 和 ASC 的酰胺 III 带吸收峰都出现在 1238.0  $\text{cm}^{-1}$  处。

以上结果表明, 本实验酶法提取的金鲳鱼皮胶原 (PSC) 与传统酸法提取的胶原 (ASC) 均较好的保持了三股螺旋结构, 且结构基本相似。

2.5.3 DSC 分析结果 热稳定性一直是 I 型胶原在工业应用中最有价值的指标之一, DSC 为评价胶原蛋白热稳定性提供了可靠的信息, 结果如图 8 所示。

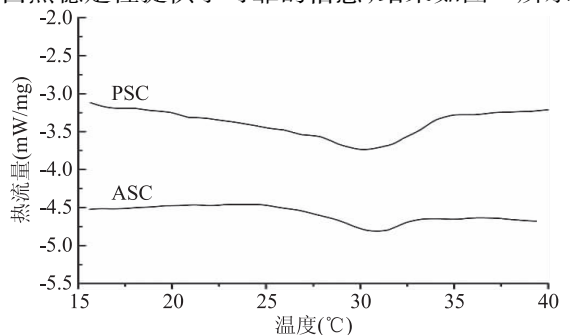


图8 金鲳鱼鱼皮 PSC 和 ASC 的热变性曲线

Fig.8 Thermal denaturation curves of PSC and ASC from scales and skin of *Golden pompano*

金鲳鱼鱼皮 PSC 和 ASC 的变性温度分别为 30.44  $^{\circ}\text{C}$  和 31.12  $^{\circ}\text{C}$ , 热焓值分别为 0.72 和 0.91 J/g,

说明金鲳鱼鱼皮 PSC 热稳定性稍低于 ASC, 这可能与胃蛋白酶作用于 PSC 端肽有关<sup>[29]</sup>。金鲳鱼鱼皮 PSC 和 ASC 变性温度高于大鲵皮 PSC (26.5 °C) 和 ASC (23.5 °C)、鲤鱼鱼皮 PSC (28.1 °C)<sup>[7,30]</sup>, 低于哺乳动物猪皮 PSC (38.0 °C) 和牛皮 ASC (43.8 °C)<sup>[31-32]</sup>。较高的变性温度说明金鲳鱼鱼皮 PSC 的主要螺旋结构保持完整, 也为其工业利用提供了有力依据。

### 3 结论

采用响应面法优化金鲳鱼鱼皮酶溶性胶原蛋白的提取工艺, 最优提取条件为加酶量 1.5%、液料比 23 mL/g、提取时间 27.5 h。按照上述条件验证, 实验结果 (64.68%) 和响应面理论值 (65.17%) 基本一致, 说明本实验方案合理可靠。同时, 通过 SDS-PAGE 电泳和红外光谱分析实验, 金鲳鱼鱼皮 PSC 初步鉴定为 I 型胶原, 较好的保持了其三股螺旋结构, 且与传统酸法提取的 ASC 有相似的电泳性质和红外峰型。

### 参考文献

- [1] Zhang M, Liu W, Li G. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(3): 826-831.
- [2] Mohammadi R, Mohammadifar M A, Mortazavian A M, et al. Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM) [J]. *Food Chemistry*, 2016, 190(1): 86-93.
- [3] Singh P, Benjakul S, Maqsood S, et al. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(1): 97-105.
- [4] Liu D, Liang L, 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): 1441-1448.
- [5] 王珮, 苏秀榕, 张永飞, 等. 鲮鱼皮胶原蛋白酶提取最优工艺研究与结构表征 [J]. *食品科学*, 2013, 34(7): 217-222.
- [6] 刘贤敏, 刘晋, 刘康, 等. 2010 年华南地区金鲳鱼养殖报告 [J]. *当代水产*, 2011(2): 27-28.
- [7] 顾赛麒, 李莉, 王锡昌, 等. 人工养殖大鲵皮胶原蛋白的性质研究 [J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 74-79.
- [8] Chen S J, Chen H, Xie Q N, et al. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*) [J]. *Food Hydrocolloid*, 2016, 52(4): 68-77.
- [9] 马俐, 王晓丹, 程贺, 等. 响应面法优化酶法提取鳊鱼皮中胶原蛋白条件 [J]. *中国酿造*, 2010, 29(9): 83-85.
- [10] 严子军, 纪洁清, 刘永. 响应面优化酶溶性罗非鱼鳞胶原蛋白的提取工艺 [J]. *广东农业科学*, 2013, 40(18): 86-88.
- [11] GB 5009.3-2010 食品中水分的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [12] GB/T 5009.5-2010 食品中蛋白质的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [13] GB 5009.4-2010 食品中灰分的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [14] GB/T 5009.6-2003 食品中脂肪的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [15] Nagai T, Araki Y, Suzuki N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*) [J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(2): 173-177.
- [16] 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.
- [17] Feng W, Zhao T, Zhou Y, et al. Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of collagen from Chinese sturgeon (*Acipenser sturio* Linnaeus) skin [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2013, 9(1): 32-37.
- [18] 任国艳, 詹永献, 郭金英, 等. 响应面优化草鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白的提取工艺 [J]. *食品科学*, 2012(22): 154-157.
- [19] Laemmli U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [20] 杨玲, 赵燕, 鲁亮, 等. 鲟鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其理化性能分析 [J]. *食品科学*, 2013, 34(23): 41-46.
- [21] 程汉良, 蒋飞, 彭永兴, 等. 野生与养殖草鱼肌肉营养成分比较分析 [J]. *食品科学*, 2013, 34(13): 266-270.
- [22] 刘世禄, 王波, 张锡烈, 等. 美国红鱼的营养成分分析与评价 [J]. *渔业科学进展*, 2002, 23(2): 25-32.
- [23] Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(9): 1492-1500.
- [24] Yan M, Li B, Zhao X, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(4): 1581-1586.
- [25] Doyle B B, Bendit E G, Blout E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides [J]. *Biopolymers*, 1975, 14(5): 937-957.
- [26] Muyonga J H, Cgb C, Duodu K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. *Food Chemistry*, 2004, 86(3): 325-332.
- [27] Jackson M, Choo L P I, Watson P H, et al. Beware of connective tissue proteins: Assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1995, 1270(1): 1-6.
- [28] Yousefi M, Ariffin F, Huda N. An alternative source of type I collagen based on by-product with higher thermal stability [J]. *Food Hydrocolloid*, 2017, 63(3): 72-82.
- [29] Chuaychan S, Benjakul S, Kishimura H. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*) [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 63(1): 71-76.
- [30] 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, 29(12): 128-131.
- [31] 沈菊泉, 汤俊, 沈亚领, 等. 酸法制备牛皮胶原蛋白及其结构性质研究 [J]. *食品工业*, 2009(4): 43-46.
- [32] 张玲, 芮汉明, 张立彦. 酶法提取猪皮胶原及产物性质分析 [J]. *食品科学*, 2013, 34(19): 123-127.