



鳙鱼头骨胶原多肽的制备及理化性质

杨勤子^{1,2}, 陈丽丽^{1,2}, 张照森^{1,2}, 吴思雨^{1,2}, 汪冰涛^{1,2}, 赵利^{1,2*}

(1. 江西科技师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330013;

2. 江西科技师范大学, 国家淡水鱼加工技术研发分中心, 江西 南昌 330013)

摘要: 为提高鳙鱼骨的高值化利用, 实验以鳙鱼头骨粉为原料, 胶原多肽得率为指标, 筛选最佳水解蛋白酶, 进行鳙鱼头骨胶原多肽的工艺优化, 并对骨胶原多肽的氨基酸组成、相对分子质量、粒径、电位、显微结构等理化性质进行分析。结果显示, 胰蛋白酶为最佳水解酶, 骨胶原多肽的最佳酶解工艺为: 初始 pH 8, 酶添加量 2.5%, 酶解时间 5 h, 酶解温度 50 °C, 料液比 1 : 10 (g/mL), 胶原多肽得率为 52.19%。骨胶原多肽水解后含有 17 种氨基酸, 总含量为 76.15 g/100 g, 其中酸性氨基酸含量较高。鳙鱼头骨胶原多肽相对分子质量主要在 5 000 u 以下, 占比高达 97.81%, 表明主要为小分子肽, 其平均 Z-粒径为 (399.90±2.70) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.40±0.01, 表明物质分布较均匀, 并且骨胶原多肽粒子表面呈负电荷状态, 具有疏松多孔的结构。研究表明, 鳙鱼头骨胶原多肽营养物质较丰富, 其小分子肽易于人体吸收, 疏松多孔的结构也有利于肽钙螯合物的制备。本研究不仅为鳙鱼骨类产品的精深加工提供理论依据, 也为新型钙制剂的制备提供优良原料。

关键词: 鳙; 鱼骨; 胶原多肽; 氨基酸; 显微结构

中图分类号: S 985.1; TS 254.9*3

文献标志码: A

据统计, 2022 年全国大宗淡水鱼养殖产量约为 2 026 万 t, 占全国淡水养殖总量的 62%, 其中, 鳙的养殖产量稳居前三, 达到 327 万 t, 且整体呈增长趋势^[1-2]。随着鳙产量的增加, 其加工副产物也随之增多, 若直接丢弃不仅会导致环境问题, 还会造成营养物质的浪费^[3]。因鱼骨含有丰富的胶原蛋白、钙、磷等营养成分, 对其进行合理开发, 不仅有利于提高鱼类资源的加工利用率、为社会供给丰富的廉价优质产品, 还有助于实现鱼类加工产业的绿色升级发展。

将动物的皮、骨或明胶通过水解降解为小分子肽段, 其单条肽链的组成大于 2 个氨基酸, 而

相对分子质量小于 10 ku 时, 被称为胶原肽^[4]。胶原多肽的制备方法主要分为化学水解法 (主要为酸法和碱法), 微生物发酵法和酶法。相对于化学水解法, 较为极端的反应条件及废液易污染环境, 并且微生物发酵法可能产生有毒物质、目标活性肽难分离、安全性不稳定等问题, 酶法的作用条件温和、提取率较高、无污染且不易破坏胶原蛋白的三螺旋结构, 成为制备胶原肽最常用的方法^[5-7]。

研究表明, 胶原肽不仅营养价值较高, 而且具备多种生物活性, 被广泛应用于各个领域。刘春雨^[8]采用复合蛋白酶酶解牦牛骨蛋白制备牦牛骨胶原蛋白肽 (YBCP), 通过高脂饮食构建小鼠

收稿日期: 2024-01-11 修回日期: 2024-04-04

资助项目: 江西省现代农业产业技术体系建设专项 (JXARS-03-2023); 江西省水产品加工及安全控制工程研究中心开放课题 (2022KFJJ016); 江西科技师范大学横向课题 (H20230911155618000007, H20230214110039000002)

第一作者: 杨勤子 (照片), 从事食物资源利用研究, E-mail: 13693971367@163.com

通信作者: 赵利, 从事食物资源开发与利用研究, E-mail: 13970892565@126.com



(*Mus musculus*) 肥胖模型, 连续 12 周灌胃 YBCP 进行饮食干预, 证实 YBCP 可有效抑制小鼠因高脂饮食所导致的体重快速增长, 其原因可能是 YBCP 通过影响肠道菌群氨基酸的代谢来调节脂质代谢。董焯等^[3]以水解度 (DH) 为指标, 采用复合蛋白酶酶解汽爆鳙 (*Aristichthys nobilis*) 鱼骨, 当 DH 为 10% 时, 其酶解物的 ABTS 自由基、羟基自由基、DPPH 自由基的清除率均大于 DH 为 5% 和 15% 时, IC_{50} 值分别为 0.99、4.91 和 2.85 mg/mL, 并且不同 DH 的酶解物, 其抗氧化性与酶解物浓度呈现量效关系。钱跃威等^[9]将鳙胶原蛋白肽 (EBCP) 与 $CaCl_2$ 进行螯合制备鳙骨胶原蛋白肽结合钙 (EBCP-Ca), 采用 Caco-2 细胞实验研究 EBCP-Ca 在体外的钙摄取率, 证实 EBCP-Ca 组的钙摄取率显著高于造模组、 $CaCl_2$ 组和对照组, 且 EBCP-Ca 可提高 AKP (碱性磷酸酶) 活性水平, 利于人体胃肠道对钙的吸收, 具备开发为新型钙制剂的潜力。近些年, 国内外关于骨胶原肽的研究发展较迅猛, 其在食品、医疗、美容、化工中的利用率不断升高^[4]。目前, 肽钙螯合物的来源有陆生动物来源、植物来源和水生生物来源 3 种; 相对于前二者, 水生生物不仅物种丰富, 同时具有低抗原性、低过敏性等优点, 而且原料易得, 成本较低^[10], 因此, 不少学者开始研发以低值淡水鱼副产物鱼骨为来源的骨胶原肽, 现有的研究也已证明, 水产蛋白是制备新型肽钙螯合物的优质潜在来源。目前, 关于淡水鱼鳙鱼头骨胶原多肽的加工制备及其理化性质的研究并未见报道。

本研究以鳙鱼头骨粉为原料, 采用胰蛋白酶进行酶解, 通过单因素实验和正交实验确定制备鳙鱼头骨胶原多肽的最佳工艺参数; 同时, 通过对鳙鱼头骨胶原多肽的氨基酸组成、相对分子质量分布、粒径与电位及显微结构的测定, 为制备出易于人体吸收且具备胶原与钙双补功能的新颖钙制剂的相关应用产品提供理论数据支持, 进而提升水产品生产的附加值。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

鳙鱼头购自进贤县沿湖特种水产开发有限公司。福林酚-试剂、酒石酸钾钠、硫酸铜、碳酸钠、氢氧化钠、盐酸购自广东西陇科学股份有限公司。胰蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、动物蛋白水解专用复合酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜

蛋白酶、牛血清白蛋白购自北京索莱宝科技有限公司。本研究获得了江西科技师范大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守江西科技师范大学伦理规范, 并按照江西科技师范大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 实验仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪 [沃特世科技 (上海) 有限公司], 919SZ 纳米粒度和 Zeta 电位分析仪 [澳谱特科技 (上海) 有限公司], L-8900 氨基酸分析仪 (HITACHI, 日本), EM-30 plus 扫描电子显微镜 (COXEM, 韩国), 722 型可见分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司), BM20 行星式球磨机 (北京格瑞德曼仪器设备有限公司), LGJ-12A 真空冷冻干燥机 (北京四环起航科技有限公司)

1.3 实验方法

鳙鱼头骨粉的制备 鳙鱼头→解冻→沸水煮 10 min→剔除鱼肉和膜性组织→冲洗→高压蒸煮 (121 °C, 1 h)→冲洗→用 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡鱼骨, 每隔 2 小时更换 1 次浸泡液, 浸泡 4 h 后将鱼骨洗至中性 (脱脂)→烘干→球磨粉碎, 取小部分干燥的鱼骨粉用于基本营养成分测定, 其他于 -20 °C 备用。

鳙鱼头骨粉基本成分测定 水分参照 GB 5009.3—2016《食品中水分的测定》中的直接干燥法测定; 粗蛋白质参照 GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法测定; 粗脂肪参照 GB 5009.6—2016《食品中脂肪的测定》中的索氏抽提法测定; 灰分参照 GB 5009.4—2016《食品中灰分的测定》中的灼烧称重法测定。

鳙鱼头骨粉酶解及其骨胶原多肽冻干粉的制备 鱼骨粉→加水溶解→调节初始 pH, 加酶→水浴酶解→灭酶活→离心→取上清液 (测定鳙鱼头骨胶原多肽得率)→冷冻干燥 (于鳙鱼头骨粉最佳酶解工艺下制备)→鳙鱼头骨胶原多肽冻干粉 (以下简称骨胶原多肽)→于 -20 °C 密封保存 (用于后续鳙鱼头骨胶原多肽理化性质的测定)。

骨胶原多肽得率的测定 参考李军^[11]测定骨胶原多肽的方法: 采用福林-酚法测定胶原多肽含量, 配制碱性铜溶液, 分为 A 液和 B 液, 现用现混合 (A 液 : B 液 = 50 : 1, 体积比); 采用不同质量浓度的牛血清白蛋白 (BSA) 制作标准曲线, 横坐标为 BSA 质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), 纵坐标为 $OD_{650\text{nm}}$ 值, 标准曲线: $Y=0.0019X (R^2=0.9991)$, 用于胶

原多肽含量的计算。样品的测定：鳙鱼头骨粉酶解液先灭活 10 min，再 8 000 r/min 离心 10 min 取上清液，最后稀释 100 倍。取 1 mL 稀释后的酶解液于试管中，加入 5 mL 碱性铜溶液，振荡摇匀后静置 10 min，加入 1 mL 1 mol/mL 的福林-酚试剂，振荡摇匀后静置 30 min，测定其在 650 nm 处的吸光值，根据标准曲线计算胶原多肽得率。

胶原多肽得率 (%) = 酶解液中胶原多肽含量 / 总蛋白含量 × 100%

筛选最佳水解酶 称取鳙鱼头骨粉 3.0 g，加入 30 mL 去离子水，分别添加 2.0% 的酶量^[3, 10]，具体酶解条件见表 1。酶解过后，沸水浴灭酶活 10 min，8 000 r/min 离心 10 min，取上清液测其胶原多肽得率。

表 1 7 种蛋白酶的酶解条件

Tab. 1 Enzymatic hydrolysis conditions of 7 proteases

蛋白酶种类 protease type	酶解温度/°C enzymatic hydrolysis temperature	初始pH initial pH	酶添加量/% enzyme addition	料液比/(g/mL) solid-liquid ratio	酶解时间/h enzymatic hydrolysis time
木瓜蛋白酶 papain	50	7.0	2.0	1 : 10	5
胰蛋白酶 trypsin	50	8.0	2.0	1 : 10	5
动物蛋白酶 animal protease	50	7.5	2.0	1 : 10	5
风味蛋白酶 flavor protease	50	7.0	2.0	1 : 10	5
复合蛋白酶 complex protease	50	7.0	2.0	1 : 10	5
中性蛋白酶 neutral protease	50	7.0	2.0	1 : 10	5
碱性蛋白酶 alkaline protease	50	8.0	2.0	1 : 10	5

单因素实验 固定酶解温度 50 °C，反应时间 5 h，酶添加量 2.0%，料液比 1 : 10 (g/mL)，初始 pH 8。分别固定其他因素，依次考察初始 pH (5、6、7、8、9、10)、酶添加量 (1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%)、酶解温度 (30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C)、酶解时间 (2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h)、料液比

(g/mL) (1 : 6、1 : 8、1 : 10、1 : 12、1 : 15、1 : 20) 对鳙鱼头骨粉酶解效果的影响。

正交实验 在单因素实验基础上，进行五因素四水平正交实验，考察初始 pH、酶添加量、酶解时间、料液比、酶解温度对胶原多肽得率的影响，具体实验条件见表 2。

表 2 骨胶原多肽正交实验因素水平表

Tab. 2 Level of factors in orthogonal experiment of collagen polypeptide

水平 level	初始pH initial pH	酶添加量/% enzyme addition	酶解时间/h enzymatic hydrolysis time	料液比/(g/mL) solid-liquid ratio	酶解温度/°C enzymatic hydrolysis temperature
1	6	1.5	3	1 : 8	30
2	7	2.0	4	1 : 10	40
3	8	2.5	5	1 : 12	50
4	9	3.0	6	1 : 15	60

骨胶原多肽氨基酸组成的测定 参考周名洋等^[12]测定氨基酸组成的方法：称取 1.0 g 的骨胶原多肽于试管内，加入 10~15 mL 6 mol/L HCl 溶液，试管抽真空封口，置于 110 °C 恒温干燥箱内水解 24 h，将溶液超声 40 min，5000 r/min 离心 10 min，取上清液，之后过 0.45 μm 滤膜备用，用氨基酸自动分析仪进行氨基酸组成测定。

骨胶原多肽相对分子质量的测定 采用

高效液相色谱 (HPLC) 进行相对分子质量分布的测定，测定条件参考邹文昊天^[13]的方法并稍作修改，取骨胶原多肽于 10 mL 容量瓶中，用流动相稀释至刻度，超声 5 min，离心后使用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤，过滤后用于进样。色谱条件：色谱柱 TSK gel 2000 SW，300 mm×7.8 mm。流动相：乙腈/水/三氟乙酸，400 : 600 : 1 (体积比)，检测条件：UV 220 nm，流速 0.5 m/min，柱温 30 °C。

标准品: 细胞色素 C (相对分子质量 12 384)、抑肽酶 (MW 6 500)、杆菌肽 (MW 1 422)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW 451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW189)。

骨胶原多肽粒径与电位的测定 取适量骨胶原多肽溶于去离子水中, 采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪进行测定。

骨胶原多肽扫描电镜的检测 取适量骨胶原多肽均匀分散于导电胶上, 喷金、抽真空, 在放大 3 k 倍的扫描电镜下拍照观察, 电压为 15 kV。

统计与分析 所有测定重复 3 次, 实验结果均表示为平均值±标准差 (mean±SD)。采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行数据分析, 以不同的小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 同时采用 Origin 2021 软件进行绘图。

2 结果

2.1 鳙鱼头骨粉基本营养成分分析

鳙鱼头骨粉的基本营养成分组成结果显示, 因鱼骨中主要的无机成分是以羟基磷灰石的形式存在, 因此烘干后鳙鱼头骨粉中水分含量为 $6.33\% \pm 0.05\%$; 灰分含量最高, 为 $54.96\% \pm 0.05\%$; 其次是粗蛋白, 为 $22.64\% \pm 0.22\%$; 因鱼骨经 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡脱脂过, 所以其粗脂肪含量

很低, 为 $0.25\% \pm 0.01\%$ 。表明鳙鱼头骨粉富含蛋白质、无机盐等, 是一种优良的营养食物资源。

2.2 最佳水解用酶的筛选

选用 7 种不同的蛋白酶, 分别在各自最适条件下酶解鳙鱼头骨粉, 以胶原多肽得率为指标, 对蛋白酶进行筛选。7 种蛋白酶中, 胰蛋白酶胶原多肽得率显著高于其他蛋白酶类 ($P<0.05$), 可达 46.49%, 其次为中性蛋白酶 (43.78%)、碱性蛋白酶 (42.69%) (图 1-a)。选择这 3 种蛋白酶, 三三组合, 对鳙鱼头骨粉进行酶解, 结果表明, 复合酶组合的酶解效果低于单酶胰蛋白酶 (图 1-b), 因此, 本实验选用胰蛋白酶进行后续实验。

2.3 单因素实验结果

初始 pH 对胶原多肽得率的影响 随着初始 pH 的不断升高 (pH 5~8), 胶原多肽得率不断升高, 在 pH 8 时达到最大值 42.85%, 再继续升高时溶液的初始 pH 值则会导致胶原多肽得率下降, 当初始 pH 为 8 时, 胶原多肽得率达到最大值且与其他初始 pH 值之间具有显著差异 ($P<0.05$) (图 2-a), 因此, 本实验选取酶解初始 pH 值为 8。

酶添加量对胶原多肽得率的影响 随酶添加量的增多, 胶原多肽得率呈现先升高后降低的趋势 (图 2-b), 但当酶添加量为 2.0%、3.0% 和

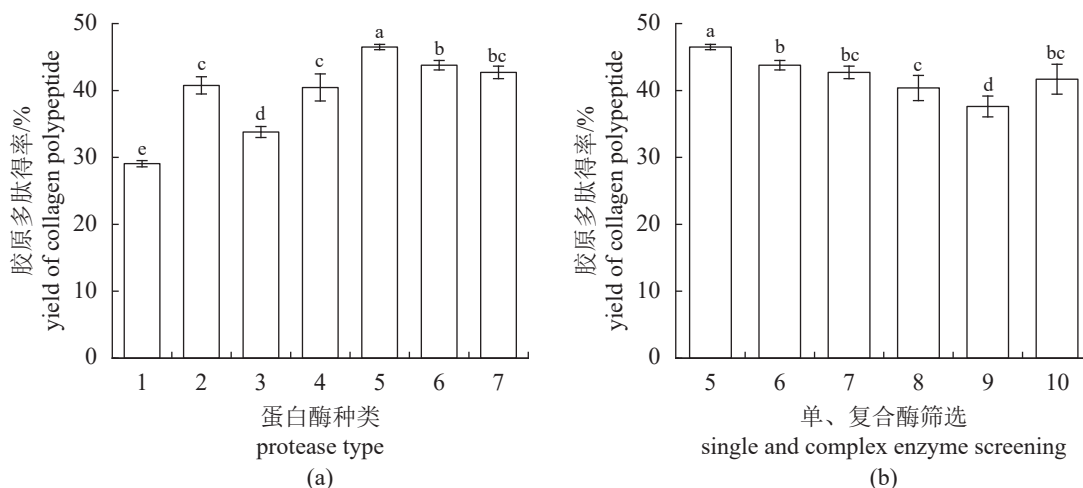


图 1 骨胶原多肽水解用酶的筛选

1-7 分别代表木瓜蛋白酶、动物蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶; 8-10 分别代表添加胰蛋白酶: 中性蛋白酶: 碱性蛋白酶的比例分别为 1:2:1, 2:1:1, 1:1:2; 图中不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Fig. 1 Screening of enzymes for hydrolysis of collagen polypeptide

1-7 represents papain, animal protease, flavor protease, complex protease, trypsin, neutral protease and alkaline protease respectively; the ratio of 8-10 respectively represents the addition of trypsin: neutral protease: basic protease is 1:2:1, 2:1:1, 1:1:2; different lowercase letters in the figure indicate significant differences ($P<0.05$), the same below.

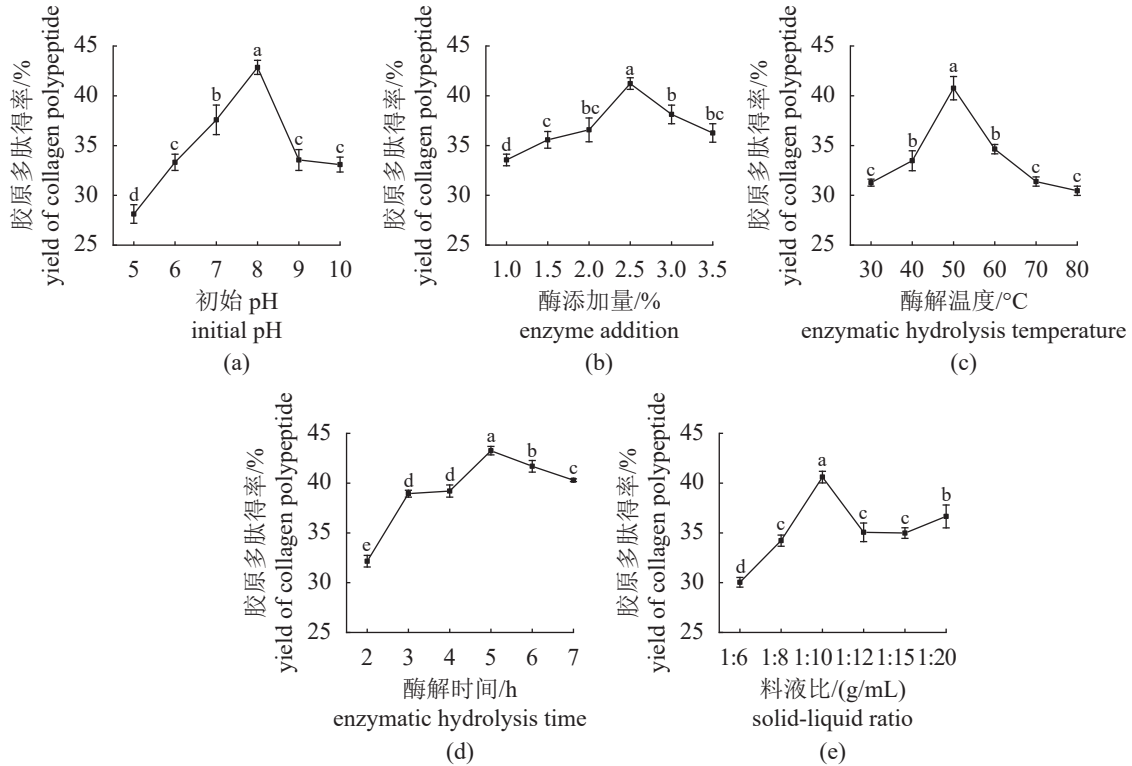


图 2 初始 pH (a)、酶添加量 (b)、酶解温度 (c)、酶解时间 (d) 及料液比 (e) 对胶原多肽得率的影响

Fig. 2 Effects of initial pH (a), enzyme addition amount (b), enzymolysis temperature (c), enzymolysis time (d) and solid-liquid ratio (e) on the yield of collagen polypeptide

3.5% 时, 三者之间无显著差异 ($P>0.05$); 酶添加量为 1.5%、2.0% 和 3.5% 时, 三者之间也无显著差异 ($P>0.05$); 当酶添加量为 2.5% 时, 胶原多肽得率最高, 为 41.22%, 此时酶与底物的结合位点已经达到饱和状态, 且与其他组酶添加量之间有显著差异 ($P<0.05$), 故 2.5% 为最适酶添加量。

酶解温度对胶原多肽得率的影响 胶原多肽得率随酶解温度的升高呈现先升高后降低的趋势 (图 2-c), 酶解温度为 30、70 和 80 °C 时, 三者之间无显著差异 ($P>0.05$); 酶解温度为 40 和 60 °C 时, 二者之间也无显著差异 ($P>0.05$)。骨胶原多肽得率在 50 °C 时达到最高, 为 40.76%, 且与其他组之间有显著差异 ($P<0.05$), 因此确定最适酶解温度为 50 °C。

酶解时间对胶原多肽得率的影响 胶原多肽得率随酶解时间增加而升高, 但在 3 h 和 4 h 之间, 胶原多肽得率无显著差异 ($P>0.05$) (图 2-d); 5 h 之后, 胶原多肽得率呈下降趋势, 在 5 h 时胶原多肽得率最高, 为 43.26%, 且与其他组之间有显著差异 ($P<0.05$), 因此最佳酶解时间为 5 h。

料液比对胶原多肽得率的影响 胶原多

肽得率随料液比的增大先升高后降低 (图 2-e), 随后在 1 : 20 (g/mL) 时又缓慢升高, 虽然 1 : 20 (g/mL) 的胶原多肽得率高于 1 : 8、1 : 12 和 1 : 15 (g/mL), 且具有显著差异 ($P<0.05$), 但 1 : 10 与 1 : 20 (g/mL) 之间也具有显著差异 ($P<0.05$), 并且 1 : 10 (g/mL) 的胶原多肽得率最高, 为 40.61%, 因此选择 1 : 10 (g/mL) 为最适料液比。

2.4 正交实验结果

采用极差分析法对表 3 正交实验结果进行分析, 得出各因素对胶原多肽得率的影响顺序依次为: 初始 pH > 酶添加量 > 酶解温度 > 酶解时间 > 料液比, 最优组合: 初始 pH 8, 酶添加量 2.5%, 酶解时间 5 h, 酶解温度 50 °C, 料液比 1 : 10 (g/mL)。对最优组合进行验证, 测定的胶原多肽得率为 52.19%, 均高于其他组合, 可确定该组合为制备骨胶原多肽的最佳组合。

2.5 骨胶原多肽氨基酸组成分析

骨胶原多肽水解后含有 17 种氨基酸, 甘氨酸、脯氨酸、谷氨酸、丙氨酸含量较多, 分别为 (18.68±0.22)、(10.06±0.09)、(8.94±0.13) 和 (8.01±

表 3 骨胶原多肽正交实验结果

Tab. 3 Orthogonal experiment results of collagen polypeptide

编号 no.	初始pH initial pH	酶添加量/% enzyme addition	酶解时间/h enzymatic hydrolysis time	料液比/(g/mL) solid-liquid ratio	酶解温度/°C enzymatic hydrolysis temperature	胶原多肽得率/% yield of collagen polypeptide
1	1	1	1	1	1	29.38
2	1	2	2	2	2	35.79
3	1	3	3	3	3	37.94
4	1	4	4	4	4	33.98
5	2	1	2	3	4	39.08
6	2	2	1	4	3	44.30
7	2	3	4	1	2	42.82
8	2	4	3	2	1	41.67
9	3	1	3	4	2	42.19
10	3	2	4	3	1	41.91
11	3	3	1	2	4	47.66
12	3	4	2	1	3	43.25
13	4	1	4	2	3	40.44
14	4	2	3	1	4	45.03
15	4	3	2	4	1	41.68
16	4	4	1	3	2	44.77
k ₁	34.27	37.77	41.53	40.12	38.66	
k ₂	41.96	41.76	39.95	41.39	41.39	
k ₃	43.75	42.52	41.71	40.93	41.48	
k ₄	42.98	40.92	39.79	40.54	41.44	
R极差 R-range	9.48	4.75	1.92	1.27	2.82	

注: k₁、k₂、k₃、k₄分别为水平1、2、3、4的4次胶原多肽得率的平均值。
Notes: k₁, k₂, k₃, k₄ were the average of the 4 collagen polypeptide yields of 1, 2, 3, 4, respectively.

0.12) g/100 g。酸性氨基酸含量为 14.15 g/100 g, 碱性氨基酸含量为 10.30 g/100 g, 必需氨基酸含量为 14.25 g/100 g, 芳香族氨基酸含量为 2.81 g/100 g, 疏水性氨基酸含量为 17.47 g/100 g, 亲水性氨基酸含量为 29.94 g/100 g (表 4)。

表 4 骨胶原多肽的氨基酸组成
Tab. 4 Amino acid composition of collagen polypeptide

氨基酸种类 amino acid species	骨胶原多肽 collagen polypeptide	氨基酸种类 amino acid species	骨胶原多肽 collagen polypeptide
天冬氨酸 Asp	5.21±0.08	苯丙氨酸 Phe	1.98±0.02
苏氨酸 Thr	2.57±0.04	赖氨酸 Lys	3.05±0.06
丝氨酸 Ser	2.85±0.05	组氨酸 His	0.67±0.02
谷氨酸 Glu	8.94±0.13	精氨酸 Arg	6.58±0.10
甘氨酸 Gly	18.68±0.22	脯氨酸 Pro	10.06±0.09
丙氨酸 Ala	8.01±0.12	酸性氨基酸 acid amino acid	14.15
半胱氨酸 Cys	0.07±0.03	碱性氨基酸 basic amino acid	10.30
缬氨酸 Val	1.30±1.11	必需氨基酸 essential amino acid	14.25
甲硫氨酸 Met	1.56±0.10	芳香族氨基酸 aromatic amino acids	2.81
异亮氨酸 Ile	1.29±0.03	疏水性氨基酸 hydrophobic amino acid	17.47
亮氨酸 Leu	2.50±0.04	亲水性氨基酸 hydrophilic amino acid	29.94
酪氨酸 Tyr	0.83±0.01	氨基酸总量 total amino acid	76.15

2.6 骨胶原多肽相对分子质量分布情况分析

通过凝胶色谱柱的出峰时间可以区分样品分子质量的大小, 如图 3-a 所示, 分子质量大的出峰早, 分子质量越小出峰时间越晚, 并且由图 3-b 可知, 骨胶原多肽相对分子质量几乎全在 10 ku 以下。样品分子质量为 <180 u、500~180 u、1 000~500 u、2 000~1 000 u、3 000~2 000 u、5 000~3 000 u 所占比例分别为 2.26%、21.04%、44.40%、22.02%、4.86%、3.23%, 样品分子质量为 <5 000 u 以下占比高达 97.81%。

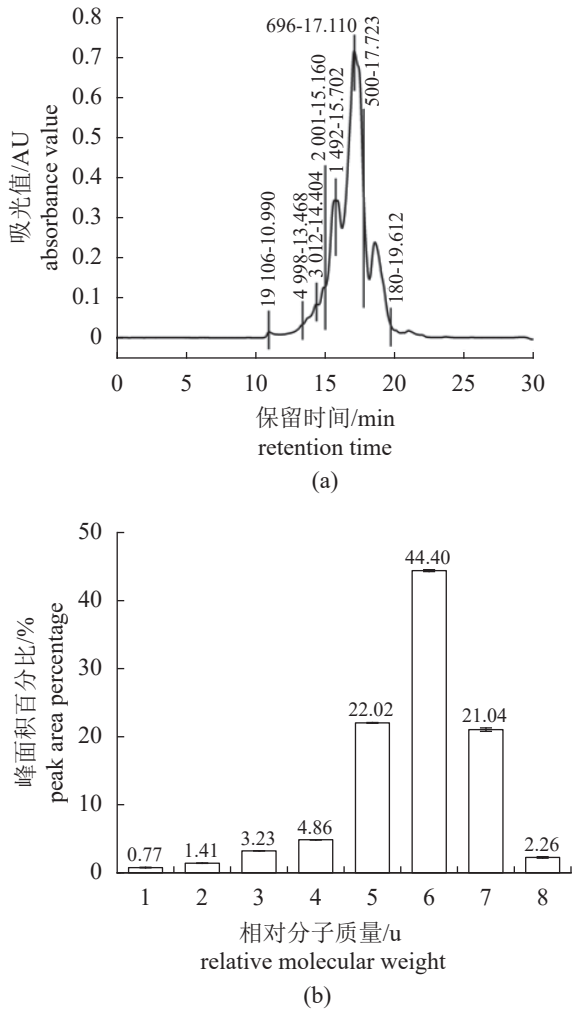


图 3 骨胶原多肽保留时间图 (a) 与相对分子质量占比图 (b)

Fig. 3 Retention time (a) and relative molecular weight ratio (b) of collagen polypeptide

1. >10 000 u, 2. 10 000-5 000 u, 3. 5 000-3 000 u, 4. 3 000-2 000 u, 5. 2 000-1 000 u, 6. 1 000-500 u, 7. 500-180 u, 8. <180 u.

2.7 骨胶原多肽粒径与电位分析

骨胶原多肽的粒径分布呈现近似正态分布

(图 4), 截距为 0.95 ± 0.01 , 粒径分布集中在小于 1 000 nm 的峰上, Z-均粒径为 (399.90 ± 2.70) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.40 ± 0.01 , 介于单分散体系和中分散体系之间 (0.30~0.50), Zeta 电位为 (-2.64 ± 0.20) mV。

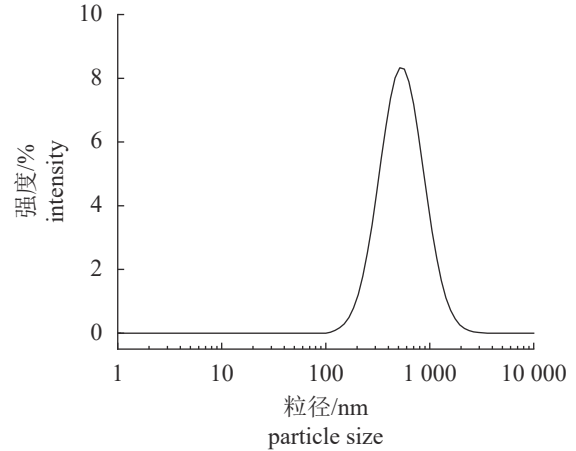


图 4 骨胶原多肽的粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of collagen polypeptides

2.8 骨胶原多肽扫描电镜结果分析

在放大 3 000 倍的扫描电镜 (SEM) 下对骨胶原多肽的微观结构进行观察, 由图 5 可知, 骨胶原多肽结构疏松, 多孔隙且大小不均一, 呈片状结构。酶解过程中释放的游离 Ca^{2+} 可能附着在骨胶原多肽表面, 如图中白色箭头所指。

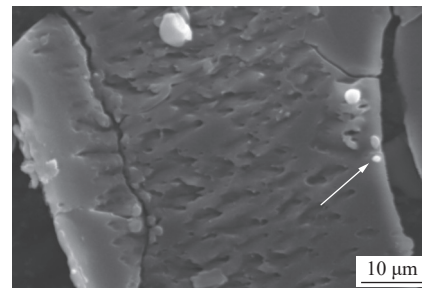


图 5 骨胶原多肽的扫描电镜图

图中白色箭头所指为游离的 Ca^{2+} 。

Fig. 5 Scanning electron microscopy of collagen polypeptide

The white arrow in the figure indicates free Ca^{2+} .

3 讨论

3.1 单因素实验和正交实验

不同的工艺条件, 例如初始 pH、酶添加量、酶解温度、酶解时间和料液比等因素皆会影响骨胶原多肽的得率。pH 过酸或过碱会使酶本身变性

失活, 影响酶活性, 改变酶的空间结构, 导致底物和酶的结合能力降低, 从而影响胶原多肽得率^[14]。酶添加量不断增多, 可以促进底物与酶充分结合, 但当酶与底物的结合位点达到饱和状态时, 再增加酶量则会导致其水解成为游离氨基酸, 造成酶的浪费及胶原多肽得率的降低, 舒聪涵^[10]采用动物蛋白酶水解制备金枪鱼骨胶原肽, 发现酶添加量在 0.5%~2.0% 时, 水解度随酶量增加而逐渐升高, 产物也逐渐增加, 但当酶添加量超过 2.0% 时, 水解度下降, 中间产物逐渐增多, 胶原多肽含量下降, 与本研究结果一致。适当升高温度, 可以提高酶与底物发生碰撞的频率, 提升催化效率, 但温度过高会破坏酶结构, 使酶分子发生变性, 底物与酶无法结合或者催化效率降低。张周莉等^[15]采用风味蛋白酶制备猪肩胛骨胶原肽发现, 随着酶解温度升高, 酶解效率升高, 但当酶解温度超过 55 °C 时, 酶解效率降低, 与本研究具有相似的结果。胶原多肽得率随酶解时间延长先升高后降低, 表明随着反应时间的延长, 酶与底物的结合达到饱和状态, 再继续延长时间, 则会因酶解产物浓度增加到一定量产生竞争性抑制作用, 进而抑制胰蛋白酶的活性, 导致胶原多肽得率下降^[16]。料液比主要影响底物的质量浓度, 当底物质量浓度较小时, 溶质会比较黏稠, 流动性差, 影响酶与底物的结合, 适当升高料液比, 胶原多肽得率随之升高, 但当料液比过大时, 溶质流动性变强, 酶与底物的接触几率降低, 进而导致催化效率降低^[17]。通过正交实验得出最佳酶解条件: 初始 pH 8, 酶添加量 2.5%, 酶解时间 5 h, 酶解温度 50 °C, 料液比 1 : 10 (g/mL), 胶原多肽得率为 52.19%。

3.2 骨胶原多肽氨基酸组成

骨胶原多肽氨基酸组成种类丰富, 含有较多的甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸, 符合胶原蛋白氨基酸的典型组成特征^[18]。Lin 等^[19]研究发现, Gly 和 Pro 具高比例含量, 表明胶原蛋白肽序列高度重复。Choi 等^[20]研究发现, 鱼骨中含有 Glu、Asp、Lys, 它们可能是与 Ca²⁺结合的主要氨基酸, 因此推测, 通过酶解获得的鳙鱼头骨胶原多肽可能具有较强的钙结合能力, 可进一步用作制备肽钙螯合物。在钙的吸收过程中多肽也能被吸收利用, 同时还能够进行一些必需氨基酸的补充, 表明骨胶原多肽既具

备良好的钙螯合能力, 同时具有一定的营养价值, 是一种良好的钙制剂原料。

3.3 骨胶原多肽相对分子质量分布

酶解产物的相对分子质量在小于 10 ku 的肽组分中所占比例较高, 表明其水解度较高^[21]。由图 3-b 可知, 骨胶原多肽的相对分子质量几乎全在 10 ku 以内, 表明酶解过程水解度较高, 且骨胶原多肽的相对分子质量主要在 5 000 u 以下, 占比高达 97.81%, 表明鳙鱼头骨粉经酶解后产物主要为小分子肽, 而小分子肽能够直接穿过肠道屏障, 具有易吸收、吸收过程不需要额外能量、对肠胃亲和性高等特性^[22-23], 具有良好的生物活性。并且已有研究表明, 分子质量小于 5 ku 的可溶性骨胶原肽具备较高的钙结合能力^[24]。此外还有研究发现, 其他相对分子质量低的分子肽, 如麦胚多肽 (180~1 000 u)^[25] 和裂殖壶菌水解蛋白 (<2 000 u)^[26] 也已被证实具有较高的钙亲和力, 因此骨胶原多肽与合适的钙源进行复合, 具备开发为易被人体吸收且胶原与钙双补的新型钙制剂的潜力。

3.4 骨胶原多肽粒径与电位分析

粒径大小是确定材料物理性能的重要参数之一^[20]。由图 4 可知, 骨胶原多肽的粒径分布集中在小于 1 000 nm 的峰上, 多分散指数介于单分散体系和中分散体系之间, 表明物质分布较均匀, 同时截距接近于 1, 表明其粒度分布曲线拟合性较好。电位表示悬液中固体颗粒和液体剪切面之间的电位差, 是衡量胶体分散系稳定性的重要指标^[27]。有研究表明, 蛋白质表面电荷与多肽链中不同氨基酸残基的电离有关^[28]。酸性氨基酸 (Asp、Glu) 的存在可以增加多肽表面的负电荷^[29]。由骨胶原多肽的氨基酸组成可知, 酸性氨基酸含量为 14.15 g/100 g, 整体占比较高。

3.5 骨胶原多肽扫描电镜分析

对物体表面进行高能光束扫描, 会使物质和电子相互作用, 产生和激发样品本身的各种理化性质的信息, 例如, 样品的外貌、组成信息以及晶体结构等, 从而达到对样品进行表征的作用^[11]。毕景硕^[30]通过观察鹿骨多肽的显微结构发现, 鹿骨多肽结构松散且具有许多大小不规则的小孔, 与本研究的结果相似。翟晓瑞^[31]观察鹿茸根部骨化组织多肽的微观结构发现, 其表面光滑且有颗粒状物质附着在多肽表面, 可能是在酶解鹿茸根

部骨化组织的过程中有游离的 Ca^{2+} 吸附在上面, 与本实验所观察到的现象一致。

本实验以鳙鱼头骨粉为原料, 从 7 种蛋白酶中筛选出胰蛋白酶为制备骨胶原多肽的最佳水解用酶, 并通过单因素实验和正交实验得出最佳酶解条件: 初始 pH 8, 酶添加量 2.5%, 酶解时间 5 h, 酶解温度 50 °C, 料液比 1 : 10 (g/mL), 胶原多肽得率为 52.19%。骨胶原多肽氨基酸组成种类丰富, 既含有必需氨基酸, 又有酸性氨基酸, 推测骨胶原多肽可能具有较强的钙结合能力, 不仅多肽能被吸收利用, 提供营养, 而且是一种良好的钙制剂原料。骨胶原多肽的相对分子质量在 5 000 u 以下的占比高达 97.81%, 表明其主要为小分子肽, 既易于人体吸收, 又具备开发为新型钙制剂的潜力。骨胶原多肽粒径较小, 分布均一, 表面呈负电荷, 并且具有疏松多孔的结构, 有利于与钙源进行复合成为新型钙制剂。该研究有望提高鳙鱼骨的资源利用率, 并为其成为新型钙制剂的原料提供理论参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 王建军, 徐思雨, 赵文武, 等. 大食物观背景下中国淡水养殖业高质量发展的挑战与对策 [J]. 水产学报, 2023, 47(11): 119605.
Wang J J, Xu S Y, Zhao W W, *et al.* Challenges and countermeasures for the high quality development of China's freshwater aquaculture industry under the background of the integrated food security thought[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(11): 119605 (in Chinese).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2001-2023 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001-2023.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of Fisheries Administration, National Fisheries Technology Extension Station, Chinese Fisheries Society. China fishery statistical yearbook 2001-2023[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001-2023 (in Chinese).
- [3] 董焯, 张益奇, 姚洪正, 等. 鳙鱼骨酶解产物的抗氧化活性及相对分子质量分布 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 281-287.
Dong Y, Zhang Y Q, Yao H Z, *et al.* Antioxidant activity and relative molecular weight distribution of enzymatic hydrolysates of bighead carp bone[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9): 281-287 (in Chinese).
- [4] 刘海英. 胶原肽及其产业发展 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 391-394, 399.
Liu H Y. Progress in collagen peptide and its applications[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(12): 391-394, 399 (in Chinese).
- [5] 许书敏. 狭鳕鱼皮、鱼骨胶原蛋白肽的提取与活性验证 [D]. 烟台: 烟台大学, 2024.
Xu S M. Extraction and activity verification of collagen peptides from the skin and bones of pollock[D]. Yantai: Yantai University, 2024 (in Chinese).
- [6] Cruz-Casas D E, Aguilar C N, Ascacio-Valdés J A, *et al.* Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: the most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2021, 3: 100047.
- [7] 宫萱. 大鲵骨胶原蛋白的纯化、表征、抗氧化活性的研究以及休闲食品的开发利用 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
Gong X. Purification, characterization and antioxidant activity of giant salamander bone collagen, and development and utilization of snack foods[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [8] 刘春雨. 牦牛骨胶原蛋白肽调节肠道菌群及改善脂质代谢的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2023.
Liu C Y. Study on regulation of intestinal microflora and lipid metabolism by yak bone collagen peptide[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [9] 钱跃威, 徐瀚麟, 吕奇晏, 等. 鳙鱼骨胶原肽钙螯合物的制备及其稳定性和 Caco-2 吸收特性 [J]. 食品科学, 2020, 41(24): 1-8.
Qian Y W, Xu H L, Lü Q Y, *et al.* Preparation and stability of calcium-chelating peptide and its absorption characteristics in Caco-2 cells[J]. Food Science, 2020, 41(24): 1-8 (in Chinese).
- [10] 舒聪涵. 金枪鱼骨胶原肽及其钙螯合物对成骨细胞的活性影响研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.
Shu C H. Effect of tuna bone collagen peptides and its calcium chelates on osteoblasts activity[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022 (in Chinese).
- [11] 李军. 鲢鱼骨胶原多肽的制备及其抗氧化、钙螯合活

- 性的研究 [D]. 南昌: 江西师范大学, 2020.
- Li J. Study on the preparation and antioxidant, calcium chelating activities of collagen polypeptides from silver carp bone[D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2020 (in Chinese).
- [12] 周名洋, 何雨欣, 孙杨赢, 等. 鹅骨胶原蛋白钙螯合肽的分离纯化及结构鉴定 [J]. *食品科学*, 2020, 41(22): 8-14. Zhou M Y, He Y X, Sun Y Y, *et al.* Isolation, purification and structural identification of calcium-chelating peptides from goose bone collagen hydrolysate[J]. *Food Science*, 2020, 41(22): 8-14 (in Chinese).
- [13] 邹文昊天. 大豆肽锌和 大豆肽亚铁螯合物的制备及其特性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023. Zou W H T. Preparation and properties of soybean peptide zinc chelate and soybean peptide ferrous chelate[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023 (in Chinese).
- [14] 刘萍, 陈黎斌, 杨严俊. 酶解玉米蛋白制备降血压肽的研究 [J]. *食品工业科技*, 2006(5): 117-119,122. Liu P, Chen L B, Yang Y J. The study of antihypertensive peptides from corn gluten meal by enzymatic hydrolysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006(5): 117-119,122 (in Chinese).
- [15] 张周莉, 李诚, 刘爱平, 等. 响应面优化酶解法制备猪肩胛骨抗氧化肽工艺 [J]. *核农学报*, 2017, 31(12): 2358-2366. Zhang Z L, Li C, Liu A P, *et al.* Study on the optimization of enzymatic hydrolysis conditions for antioxidant peptide from porcine scapula protein by response surface methodology[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31(12): 2358-2366 (in Chinese).
- [16] Pagán J, Ibarz A, Falguera V, *et al.* Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones[J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 119(3): 655-659.
- [17] 高郡焕, 李学鹏, 刘裕, 等. 响应面试验优化四角蛤蜊调味料风味前体物质酶解制备工艺 [J]. *食品科学*, 2015, 36(14): 17-23. Gao J H, Li X P, Liu Y, *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis of *Macra quadrangularis* to prepare seasoning flavor precursors by response surface methodology[J]. *Food Science*, 2015, 36(14): 17-23 (in Chinese).
- [18] 刘玉玉. 鲢鱼皮胶原肽钙螯合物的制备及其促钙吸收作用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020: 21-22. Liu Y Y. Study on preparation of silver carp skin collagen peptides-calcium chelate and its effect on promoting calcium absorption[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020: 21-22 (in Chinese).
- [19] Lin Y L, Cai X X, Wu X P, *et al.* Fabrication of snapper fish scales protein hydrolysate-calcium complex and the promotion in calcium cellular uptake[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 65: 103717.
- [20] Choi D W, Lee J H, Chun H H, *et al.* Isolation of a calcium-binding peptide from bovine serum protein hydrolysates[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(6): 1663-1667.
- [21] 高敏. 牛骨酶解多肽螯合物的制备研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2020. Gao M. Preparation of bovine bone enzymatic polypeptide chelate[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2020 (in Chinese).
- [22] Wang C, Wang B, Li B. Bioavailability of peptides from casein hydrolysate *in vitro*: amino acid compositions of peptides affect the antioxidant efficacy and resistance to intestinal peptidases[J]. *Food Research International*, 2016, 81: 188-196.
- [23] Wang Z J, Zhang X W. Isolation and identification of anti-proliferative peptides from *Spirulina platensis* using three-step hydrolysis[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(3): 918-922.
- [24] Jin Y G, Fu W W, Ma M H. Preparation and structure characterization of soluble bone collagen peptide chelating calcium[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(50): 10204-10211.
- [25] Liu F R, Wang L, Wang R, *et al.* Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide-calcium complex[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(31): 7537-7544.
- [26] Lin J P, Cai X X, Tang M R, *et al.* Preparation and evaluation of the chelating nanocomposite fabricated with marine algae *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate and calcium[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(44): 9704-9714.
- [27] Gallardo V, Morales M E, Ruiz M A, *et al.* An experimental investigation of the stability of ethylcellulose latex: correlation between zeta potential and sedimentation[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 26(2): 170-175.

- [28] Kamshad M, Talab M J, Beigoli S, *et al.* Use of spectroscopic and zeta potential techniques to study the interaction between lysozyme and curcumin in the presence of silver nanoparticles at different sizes[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019, 37(8): 2030-2040.
- [29] Athira S, Mann B, Sharma R, *et al.* Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: an alternative approach for chemical iron fortification[J]. *Food Research International*, 2021, 141: 110133.
- [30] 毕景硕. 鹿骨多肽螯合钙的制备方法与吸收的特性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- Bi J S. Study on the preparation of deer bone peptide-chelated calcium and its effect on promoting calcium absorption[D]. Changchun: Jilin University, 2019 (in Chinese).
- [31] 翟晓瑞. 鹿茸根部骨化组织肽钙螯合物的制备、表征及结合机制的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- Zhai X R. Preparation, characterization of peptide-calcium chelate from antler bone and the study on its chelation mode[D]. Changchun: Jilin University, 2023 (in Chinese).

Preparation and physicochemical properties of *Aristichthys nobilis* bone collagen polypeptide

YANG Qinzi^{1,2}, CHEN Lili^{1,2}, ZHANG Zhaosen^{1,2}, WU Siyu^{1,2}, WANG Bingtao^{1,2}, ZHAO Li^{1,2*}

(1. College of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China;

2. National Freshwater Fish Processing Technology Research and Development Center, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Abstract: Collagen is an important biomass resource, which has the characteristics of low antigenicity, hypoallergenicity, biodegradability, excellent biocompatibility and promoting cell proliferation and differentiation. Collagen peptides are generally composed of short sequences of 2 to 20 amino acid residues with a relative molecular mass of less than 10 ku. Through hydrolysis of macromolecule collagen, small molecule peptides are generated, which not only contain all amino acids of collagen, but also have better absorbability and processing characteristics than collagen, and are easier to be absorbed and utilized by the human body. In recent years, a variety of bioactive peptides have been isolated and identified from collagen peptides, such as antioxidant peptides, antihypertensive peptides, antibacterial peptides and so on. China is not only rich in aquatic resources, but also a big consumer of aquatic products. According to statistics, in 2022, the output of large-scale freshwater fish aquaculture in China is about 20.26 million tons, accounting for 62% of the total freshwater aquaculture in the country, of which the output of bighead fish aquaculture is firmly in the top three, reaching 3.27 million tons, and shows an overall growing trend, while the processing by-products of aquatic products are also increasing. In order to improve the high value utilization of *Aristichthys nobilis* bone, the best hydrolysis protease was selected with the *A. nobilis* head bone meal as raw material and the yield of collagen polypeptide as index, and the process of *A. nobilis* head bone collagen polypeptide was optimized. The amino acid composition, relative molecular weight, particle size, potential and microstructure of *A. nobilis* head bone collagen polypeptide were analyzed. The results showed that trypsin was the best hydrolysis enzyme for *A. nobilis* head bone meal, and the optimal hydrolysis process of bone collagen polypeptide was as follows: initial pH 8, enzyme dosage 2.5%, enzymolysis time 5 h, enzymolysis temperature 50 °C, solid-liquid ratio 1 : 10 (g/mL). At this time, the yield of bone collagen polypeptide was 52.19%. The hydrolyzed polypeptide of *A. nobilis* head bone collagen contained 17 kinds of amino acids, among which the contents of glycine, proline, glutamic acid and alanine were (18.68±0.22), (10.06±0.09), (8.94±0.13) and (8.01±0.12) g/100 g, respectively. In line with the typical composition characteristics of collagen amino acids, the acidic amino acid

content was 14.15 g/100 g, which had a high content and strong calcium binding ability. The relative molecular weight of *A. nobilis* head head collagen polypeptide was < 180 u, 500-180 u, 1 000-500 u, 2 000-1 000 u, 3 000-2 000 u and 5 000-3 000 u. The proportion of u was 2.26%, 21.04%, 44.40%, 22.02%, 4.86% and 3.23%, respectively, and the proportion of peptides below 5 000 u was as high as 97.81%, indicating that the products of enzymatic hydrolysis were mainly small molecular peptides with high absorption rate and high affinity for stomach and intestines. The average Z-particle size of *A. nobilis* head bone collagen polypeptide was (399.90±2.70) nm, and the polydispersion index (PDI) was 0.40±0.01, which was between monodisperse system and medium disperse system (0.30-0.50), indicating that the substance distribution was uniform, and the intercept was close to 1, indicating that the particle size distribution curve was well fitted. The surface of *A. nobilis* head bone collagen polypeptide particles was negatively charged. The *A. nobilis* head bone collagen polypeptide is loose in structure, porous and uneven in size, and has a lamellar structure. Studies have shown that *A. nobilis* head bone collagen polypeptide is rich in nutrients, its small molecule peptide is easy to be absorbed by the human body, and its loose porous structure is also conducive to the preparation of peptide calcium chelates. This study not only provides theoretical basis for the intensive processing of *A. nobilis* bone products, but also provides excellent raw materials for the preparation of new calcium preparations.

Key words: *Aristichthys nobilis*; fishbone; collagen polypeptide; amino acids; microstructure

Corresponding author: ZHAO Li. E-mail: 13970892565@126.com

Funding projects: Jiangxi Province Modern Agricultural Industrial Technology System Construction Project (JXARS-03-2023); Open Project of Jiangxi Province Aquatic Product Processing and Safety Control Engineering Research Center (2022KFJJ016); Jiangxi Science and Technology Normal University Horizontal Project (H20230911155618000007, H20230214110039000002)