

文章编号:1000-0615(2009)01-0139-07

鱿鱼皮胶原蛋白的功能特性

曾庆祝¹, 许庆陵¹, 郭恒斌²

(1. 广州大学化学化工学院, 广东 广州 510006;

2. 广州陆仕水产企业有限公司, 广东 广州 510820)

摘要:测试了鱿鱼皮胶原蛋白的特征吸收光谱和分子量分布,比较了胶原蛋白的溶解性、保水性、湿润性、吸油性、乳化性及乳化稳定性、起泡性及泡沫稳定性等应用功能特性。结果表明:(1)3种方法(热水法、酸法和酶法)提取的鱿鱼皮胶原蛋白均在220 nm处有最大吸收,胶原蛋白的分子量为220 ku左右;(2)热水法和酶法提取的胶原蛋白的溶解性能要好于酸法胶原蛋白;(3)提取的3种胶原蛋白均具有一定的保水性,分别为0.54%、0.52%和0.55%;(4)热水法和酶法提取的胶原蛋白的润湿性较好;(5)3种胶原蛋白均具有良好的吸油性,分别为2.7、3.0和3.3 mL/g;(6)3种胶原蛋白拥有较好的乳化性和乳化稳定性,其中酸法提取的胶原蛋白的即时乳化性最好,但酶法提取的胶原蛋白的乳化稳定性最好;(7)3种胶原蛋白具有良好的起泡性和泡沫稳定性,其中酸法提取的胶原蛋白的起泡性和泡沫稳定性最好,分别为83%和67%。

关键词:鱿鱼皮;胶原蛋白;酶解;功能特性

中图分类号:S 986

文献标识码:A

随着我国远洋鱿钓业的迅速发展,鱿鱼产量迅猛增加,成为我国重要的海洋经济头足类动物和主要的水产品加工原料。鱿鱼在加工成鱿鱼丝、鱿鱼圈、鱿鱼花或调味鱿鱼等产品的过程中,产生了约15%~20%的内脏及表皮等废弃物。这些废弃物被掩埋丢弃,不仅造成资源的极大浪费,更严重的是直接导致环境的污染。鱿鱼在加工过程中产生的废弃物具有较高的利用价值,除含有丰富的蛋白质、脂肪、矿物质及维生素等营养成分外,还有较高含量的胶原蛋白、壳聚糖、黑色素、蛋白多糖等具有美容、抑菌、抗肿瘤等特殊功效的多种生理活性物质^[1-2]。

胶原蛋白的功能特性是指除营养性以外的其它应用特性。主要包括胶原蛋白的氨基酸组成、凝胶强度、形成凝胶的功能特性(包括蛋白质的溶解性、表观粘度、水合能力、乳化能力等)、热变性温度及SDS-PAGE电泳图谱等理化性质的研究^[3-4]。曾名勇等^[5]研究了鲷、鲈、鲫鱼皮胶原蛋

白的氨基酸组成、凝胶强度、热变性温度等理化性质及其影响因素。Gómez-Guillén等^[6]从牙鲆、鳕和鱿鱼皮中提取胶原蛋白,研究了在相同的提取条件下得到的胶原蛋白理化性质的差别,通过SDS-PAGE电泳的方法确定了几种水产动物皮中胶原蛋白的蛋白亚基组成。Nagai等^[7]从乌贼中提取胶原蛋白,并对明胶的理化性质及其功能特性(如溶解性、保水性等)进行了比较研究。

本研究的目的是对鱿鱼皮胶原蛋白的功能特性进行分析测试,为开发胶原蛋白更加广泛和更为重要的应用提供参考,从而寻找水产品加工废弃物的高附加值利用新途径。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

原料 本试验所用的鱿鱼(*Ommastrephes bartrami*)皮胶原蛋白(下文简称胶原蛋白)是热水法提取的胶原蛋白(简称热水法胶原)、酶法提

收稿日期:2008-02-25 修回日期:2008-07-02

资助项目:大连市优秀青年科技人才基金项目(2005J22JH049);广州大学科研启动项目

通讯作者:曾庆祝, Tel:020-31877065, 13668969689, E-mail: qingzhuzeng@yahoo.com.cn

取的胶原蛋白(简称酶法胶原)和酸法提取的胶原蛋白(简称酸法胶原),这三种胶原蛋白均系自制。胶原蛋白的纯化方法是:加入 NaCl 于适量的胶原蛋白溶液中直至溶液最终浓度为 2.6 mol/L,使溶液析出絮状沉淀,然后在 4 ℃、20 000 × g 条件下离心 40 min,所得沉淀物即为盐析后的胶原蛋白。之后将其分别复溶于 10 倍体积的蒸馏水和 0.5 mol/L 乙酸中,装入透析袋在 4 ℃下透析 3 d,透析外液为双蒸水。冷冻干燥后置于 -25 ℃冰箱中储存备用。

主要试剂 羟脯氨酸(中国惠兴生化试剂有限公司)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、巯基乙醇丙烯酰胺(Acr)、N,N'-甲叉双丙稀酰胺(Bis)、溴酚蓝、考马斯亮蓝 R-250、过硫酸铵、TEMED 等为 Sigma 进口分装。其它试剂如氯胺 T、对二甲基氨基苯甲醛、牛血清蛋白、茚三酮等均为国产分析纯。

主要器材 旋转蒸发器,上海市亚荣仪器有限公司;全能台式高速冷冻离心机,科峻仪器公司;HH·S1-6 电热恒温水浴锅,上海跃进医疗器械厂;SHZ-A 水浴恒温振荡器,上海跃进医疗器械厂;LD4-2A 离心机,北京医用离心机厂;PHS-2C 型精密酸度计,上海雷磁仪器厂;DS-1 高速组织捣碎机,上海标本模型厂制造;721 可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;真空冷冻干燥机,西德 Martin Chritat 1050ALPHA1-5;BIO-RAD 电泳仪,大连竞迈生物科技有限公司;JENWAY 6505 紫外-可见光谱仪,英国 JENWAY 公司。

1.2 实验方法

胶原蛋白的吸收光谱 采用 JENWAY 6505 UV/Vis 紫外-可见光谱仪测定。

分子量测定 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)。

水溶性 冷冻干燥后的胶原蛋白溶于双蒸水至最终浓度为 3 mg/mL,分别在 4 ℃和室温下轻轻搅拌使胶原蛋白全部溶解,采用牛血清测蛋白质浓度法测定溶液中蛋白质的浓度^[8]。

酸溶性 冷冻干燥后的胶原蛋白溶于 0.5 mol/L 乙酸最终浓度为 3 mg/mL,分别在 4 ℃下轻轻搅拌使胶原蛋白全部溶解,用 6 mol/L 的 HCl 或 6 mol/L 的 NaOH 调成 pH 为 1~10 的 10 个样,采用牛血清测蛋白质浓度法测定溶液中蛋白质的浓度^[8]。

保水性 保水性是指蛋白质保持水分的能力,通常以每克产品吸附水分的克数或毫升数表示。取 50 mL 塑料离心管,称重(M_1),准确称取 1 mg 胶原蛋白置于离心管,加蒸馏水 30 mL,搅拌使蛋白质溶液分散均匀,测样液的 pH,并调至 7.0,在恒温水浴中,于 60 ℃加热 30 min,然后在冷水中冷却 30 min,离心(18 000 × g,10 min)倾去上清液,称取离心管质量(M_2),计算每毫克胶原蛋白的保水性。保水性 = ($M_2 - M_1$)/胶原蛋白质量 × 100%

湿润性 把 80 mL 蒸馏水倒入一个放有磁力搅拌器的 100 mL 烧杯中,称取 1~2 g 冷冻干燥后的粉末状胶原蛋白,并通过筛网把胶原蛋白分散加入盛有蒸馏水的烧杯中,加入样品后,马上观察水面样品的湿润情况,1.5 h 后,开动磁力搅拌器,使液体形成的涡漩水柱到达烧杯底部,充分搅拌 0.5~1 min。

吸油性 准确量取 2 mL 大豆色拉油,放入 5 mL 的刻度离心管中,分别称取 0.3 g 胶原蛋白样品加入其中,用细玻璃棒搅拌 1 min,静止 30 min 后用 100 × g 的速度离心 25 min,记下游离油的体积,吸油性计算方法为:吸油性(mL/g) = (2 - 游离油的体积)/0.3

乳化性 取 3 g 胶原蛋白溶于 50 mL 蒸馏水中,调节 pH 值到 7.0,加入 50 mL 大豆色拉油,然后在均质机中以 12 000 × g 的速度均质 2 min,溶液分为两份,分别转移于 50 mL 刻度离心管和 50 mL 刻度试管中,将离心管中的样品溶液在 1500 × g 的速度下离心 5 min 以乳化层体积占总体积的比例计算乳化性。乳化性 = 乳化层体积/总体积 × 100%

乳化稳定性 将前述步骤中转移至刻度试管的样品溶液置于 50 ℃的水浴中,每隔 1 小时测一次乳状液的体积,连续测 5 次,以最终乳状液体积占最初乳状液的体积的比率表示:

乳化稳定性 = 最终乳状液体积/最初乳状液体积 × 100%

起泡性和泡沫稳定性 取 25 mL、1.0% 胶原蛋白溶液经高速搅拌(1 000 × g,30 s,连续 3 次),迅速转入 100 mL 带刻度的量筒中,记录泡沫体积 V_1 (mL),与室温下(20 ℃)保持 30 min 后再读取泡沫体积数 V_2 (mL),计算泡沫稳定性,计算方法为^[9]:

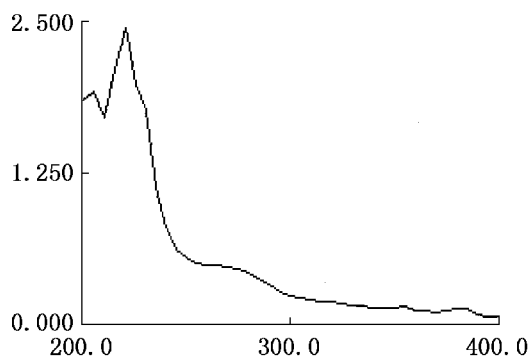
$$\text{起泡性}(\%) = \left[\frac{\text{均质停止时泡沫体积数}}{25} \right] \times 100$$

$$\text{泡沫稳定性}(\%) = \left[\frac{\text{均质停止后 30 min 泡沫体积数}}{\text{均质停止时泡沫体积数}} \right] \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 胶原蛋白基本特性

胶原蛋白的紫外-可见吸收光谱 对三种提取方法所制备的胶原蛋白在 200 ~ 400 nm 的近紫外光区进行宽扫测试,获得的紫外吸收光谱见图 1,2,3 所示。可以看出,3 种方法所提取的胶原蛋白的最大吸收波长均为 220 nm,符合胶原蛋白的特征吸收^[10],这也表明用 3 种方法所提取的胶原蛋白均具有较高的纯度。胶原蛋白只含少量芳香族氨基酸,在 280 nm 处基本没有吸收,而胶原肽链所含有 C-O、-COOH、CO-NH₂ 都是生色基团,可以在 220 nm 附近产生大的光吸收。



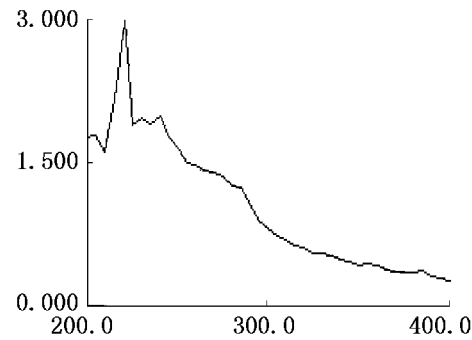
Peak		Valley	
nm	Abs	nm	Abs
220.0	2.447	210.0	1.702

图 1 热水法制备的胶原蛋白的紫外吸收光谱

Fig.1 Ultraviolet absorption spectra of collagen made by hot water methods

胶原蛋白的分子量分布 从图 4 可以看出,3 种方法从鱿鱼皮中提取的胶原蛋白的 SDS-PAGE 电泳图还是有区别的。酶法提取的鱿鱼皮胶原蛋白具有明显的 $\alpha 1$ 链、 $\alpha 2$ 链和 β 链,但也有几条其他的蛋白带,可能是在木瓜蛋白酶的作用下,将多肽链再次水解,断裂为小的分子肽链的缘故。热水法和酸法提取的鱿鱼皮胶原蛋白只有 $\alpha 1$ 链和 β 链, $\alpha 2$ 链没有被分离出来,应该是在提取过程中被破坏了。

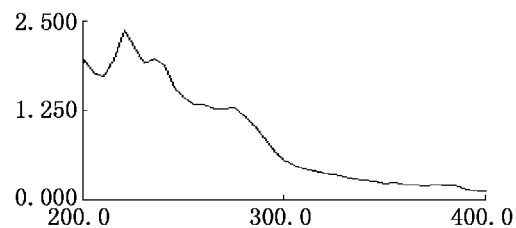
与其他文献报道的电泳图谱对照^[6,11],可以推测鱿鱼皮胶原蛋白可能是由 2 条 $\alpha 1$ 链和 1 条



Peak		Valley	
nm	Abs	nm	Abs
220.0	3.000	210.0	1.624

图 2 酸法制备的胶原蛋白的紫外吸收光谱

Fig.2 Ultraviolet absorption spectra of collagen made by acid methods



Peak		Valley	
nm	Abs	nm	Abs
220.0	2.398	210.0	1.739

图 3 酶法制备的胶原蛋白的紫外吸收光谱

Fig.3 Ultraviolet absorption spectra of collagen made by enzymatic hydrolysis methods

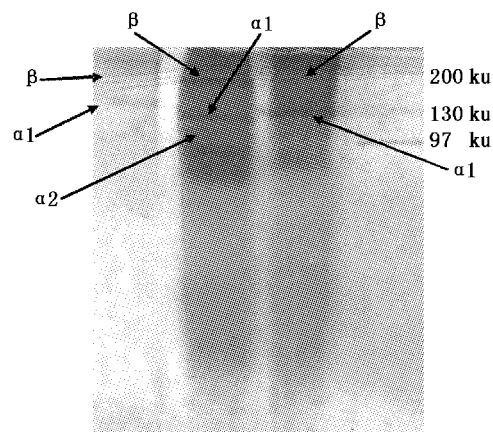


图 4 3 种方法提取的胶原蛋白的电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE of collagen produced by three methods

$\alpha 2$ 链组成的三螺旋结构。但是,由于没有用相应的胶原蛋白标准品作比对,无法对该胶原蛋白的类型做出进一步的判定。

根据待测样品的迁移率测出鱿鱼皮胶原蛋白两条带的分子量介于 100 ~ 120 ku 之间,两条带的分子量总和为 220 ku 左右,与文献报道的相近^[6]。

2.2 胶原蛋白的功能特性

胶原蛋白的溶解度

(1)水溶性,从图 5 可以看出,3 种方法制备的鱿鱼皮胶原蛋白在 4 ℃ 和 20 ℃ 下,在水中的溶解度有所不同。热水法和酶法提取的胶原蛋白其溶解性能要好于酸法提取的胶原蛋白。4 ℃ 和 20 ℃ 下热水法提取的胶原蛋白的溶解度分别为 95.4% 和 100%,酶法提取的胶原蛋白的溶解度分别为 96.2% 和 100%,而酸法提取的胶原蛋白的溶解度只有 7.0% 和 23.7%。从图 6 还可以看出,3 种方法制备的胶原蛋白在 4 ℃ 和 20 ℃ 下的溶解度都是随温度的升高而增大的,可见温度的升高与胶原蛋白的溶解度呈正相关,这与 Noitup 等^[12]对长鳍金枪鱼和点石鲈鱼皮胶原蛋白溶解性的研究结果相一致。

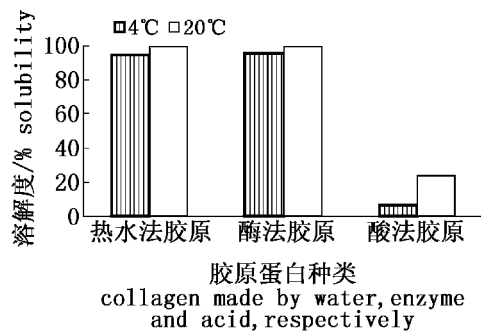


图 5 胶原蛋白在水中的溶解度
Fig. 5 Solubility of collagens in water

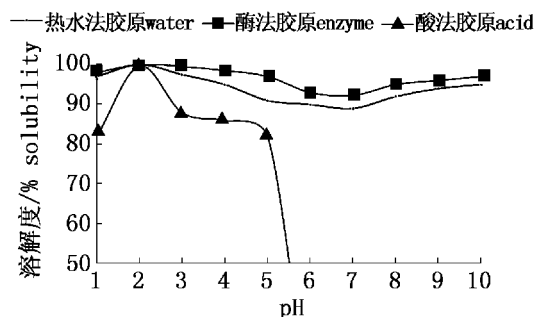


图 6 胶原蛋白在不同 pH 下的溶解度
Fig. 6 Solubility of collagen at different pH

Chobert^[13]和 Slattery 等^[14]认为,随着蛋白质水解度的增加,可离解基团(-COOH、NH₄⁺)数目也增加,表现为蛋白质即使在等电点处的溶解

性也大会幅度提高。

(2)酸溶性,从图 6 可以看出,热水法和酶法提取的胶原蛋白在 pH 1.0 ~ 10.0 内都显示出较高的溶解性,尤其在 pH 2.0 时,两种方法制得的胶原蛋白的溶解度最高,达到 100%。随着 pH 的升高溶解度稍有所下降,在 pH 7.0 时,溶解度最低,分别为 89% 和 92.3%。随着 pH 的继续升高,其溶解度又稍有提高。可见热水法和酶法提取的胶原蛋白在稀酸溶液中具有较好的溶解性。酸溶性胶原蛋白的溶解度在 pH 2.0 时达到最大,为 99.7%,然后随着 pH 的升高溶解度快速下降,当 pH 超过 5.5,其溶解度低于 50%。

胶原蛋白的保水性 试验结果是,酶法提取的胶原蛋白的保水性为 0.55%,热水法的为 0.54%,酸法的为 0.52%。这 3 种方法提取的胶原蛋白均具有一定量的保水性且差异不大,说明胶原蛋白本身的保水性能比较稳定。

鱿鱼皮胶原蛋白的湿润性 对 3 种方法所提取的胶原蛋白分别与水接触后的湿润性进行比较发现,热水法和酶法提取的胶原蛋白能较快分散,而酸法提取的胶原蛋白则不易被分散。可见,热水法和酶法提取的胶原蛋白的润湿性相对较好,酸法提取的润湿性一般。

胶原蛋白的吸油性 图 7 是 3 种方法提取的胶原蛋白的吸油性。可见,3 种方法提取的胶原蛋白具有很好吸附油的能力,这与胶原蛋白固有的分子结构有关,特别是酶法提取的胶原蛋白的吸油性最强,达到 3.3 mL/g。

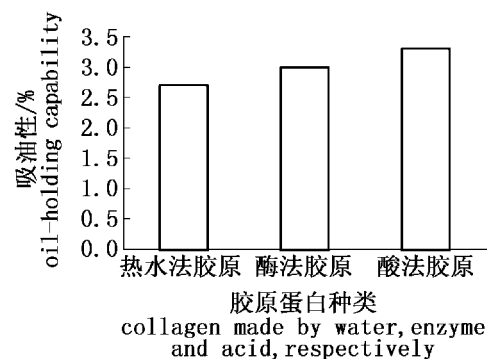


图 7 3 种胶原蛋白吸油性比较
Fig. 7 Oil-holding capability of collagen

胶原蛋白的乳化性及乳化稳定性 乳化性是蛋白质的一种重要功能性质,是指蛋白质能将水和油结合在一起,形成乳状液的能力。乳化稳

定性是指油水乳状液保持稳定的能力,可以决定乳化剂在食品中的适用性。经测定,热水法胶原蛋白的乳化性为54%、酸法胶原蛋白的乳化性为72%、酶法胶原蛋白的乳化性为60%。3种方法提取的胶原蛋白的乳化稳定性见图8所示。

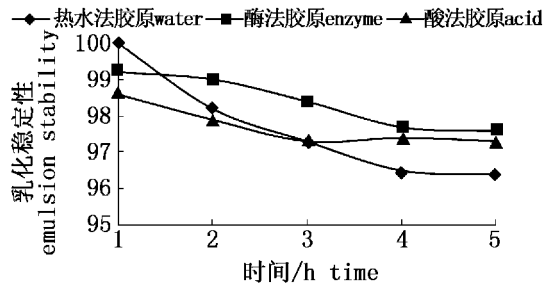


图8 胶原蛋白乳化稳定性

Fig. 8 Emulsion stability of collagen

可以看出,3种胶原蛋白均具有一定的乳化性和乳化稳定性。其中酸法提取的胶原蛋白的即时乳化性最好,酶法胶原蛋白的乳化稳定性最好。蛋白质被水解后,使包埋于内部的疏水性残基暴露,提高了在界面的吸附,形成了内聚性膜,同时,疏水性残基与油相互作用,而亲水性残基则与水相互作用,这些有助于提高蛋白水解物的乳化性。

胶原蛋白的起泡性及泡沫稳定性 起泡性是指蛋白质搅打起泡的能力。泡沫稳定性是指泡沫保持稳定的能力。图9显示了3种胶原蛋白的起泡性和泡沫稳定性。

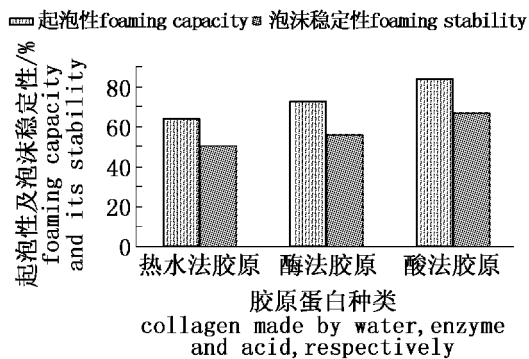


图9 3种胶原蛋白的起泡性及泡沫稳定性

Fig. 9 Foaming capacity and its stability of collagen

从图9可以看出,3种胶原蛋白均具有较好的起泡性和泡沫稳定性。其中,酸法胶原蛋白的起泡性和泡沫稳定性最好,分别为83%和67%。蛋白质良好的起泡性和泡沫稳定性在食品工业上有着重要的作用。

3 结论

3种方法提取的鱿鱼皮胶原蛋白的最大吸收峰均在220 nm处。胶原蛋白两条带的分子量介于100 ~ 120 ku之间,两条带的分子量总和为220 ku左右。3种胶原蛋白在溶解性、保水性、湿润性、吸油性、乳化性及乳化稳定性、起泡性及泡沫稳定性等方面虽有差异,但总体来讲,这些功能特性均属良好。研究结果对鱼皮胶原蛋白的实际应用有参考作用。

参考文献:

- [1] Maria S, Zdzislaw E S. Collagen in the tissue of squid (*Illex argentinus* and *Loligo Patagonica*) content and solubility [J]. Food Biochem, 1987, 11: 109-120.
- [2] Nokos K, Alexis J A, Choristos A A, et al. Chondroitin proteoglycans from squid skin-isolation, characterization and immunological studies [J]. Eur J Biochem, 1990, 192:33-38.
- [3] Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, et al. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 32:199-204.
- [4] Kimura S, Zhu X P, Matsui R, et al. Characterization of fish muscle type I collagen [J]. Journal of Food Science, 1988, 53:1315-1318.
- [5] 曾名勇, 张联英, 刘尊英, 等. 几种鱼皮胶原蛋白的理化特性及其影响因素 [J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(4):608-612.
- [6] Gómez-Guillén M C, Tumayj. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16:25-34.
- [7] Nagai T, Yamashita E, Taniguchi K, et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*) [J]. Food Chemistry, 2001, 72:425-429.
- [8] Montero P, Francisco J C, Borderias J. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin [J]. J Sci Food Agric, 1991, 54:137-146.
- [9] Gbogouri G A, Linder M, Fanni J. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of

- salmon byproducts hydrolysates [J]. J Food Science, 2004, 69(8) :615 -622.
- [10] 崔凤霞, 薛长湖, 李兆杰, 等. 仿刺参胶原蛋白的提取及理化性质 [J]. 水产学报, 2006, 30(4) : 449 -553.
- [11] Kolodziejska I, Sikorski Z E, Niecikowska C. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illes argentinus*) skins [J]. Food Chemistry, 1999, 66:153 -157.
- [12] Noitup P, Garnjanagoonchorn W, Morrissey M T. Fish skin type I collagen: characteristic comparison of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) and silver-line grunt (*Pomadasyys kaakan*) [J]. J Aquatic Food Product Technology, 2005, 14(1) :17 -28.
- [13] Chobert J M. Solubility and emulsifying properties of casein modified emzymatically by staphylococcus aureus V8 protease [J]. Agric Food Chemistry, 1988, (36) :220 -224.
- [14] Slattery H, Fitzgerald R J. Functional properties and betterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a bacillus proteinase [J]. J Food Science, 1998, 63(3) :418 -422.

Properties of collagen from squid (*Ommastrephes bartrami*) skin

ZENG Qing-zhu¹, XU Qing-ling¹, GUO Heng-bin²

(1. Department of Food Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangzhou Lushi Fisheries Ltd., Guangzhou 510820, China)

Abstract: Extraction yield of collagen was regarded as an index to research on preparation of collagen from squid skin by hot water, acid, and enzyme, respectively. The optimum processing conditions of extraction were determined by orthogonal experiment design. The optimum conditions by hot water were temperature of extracting 80 °C, volume of water 20 folds, and time of extracting 12 h. The extraction yield of collagen was 90.26%. The optimum conditions of extraction by acid were temperature of extracting 24 °C, 0.5 mol/L acetic acid, and time of extracting 48 h. The extraction yield of collagen was 95.16%. To hydrolyze the squid skin, trypsin, and papain were chosen to apply in the experiment. The optimum processing conditions of extraction by trypsin were temperature 55 °C, enzyme dosage 1 200 U/g, concentration of substrate 1:20, pH 8.0, and time 4 h, respectively. The extraction yield of collagen was 95.16%. The results of extracting collagen by papain show that the optimal reactive temperature, enzyme dosage, concentration of substrate, pH and time were as follows: 50 °C, 3 200 U/g, 1:20, pH 6.0, and 6 h, respectively. The extraction yield of collagen was 97.56%. The character absorption spectra and molecular weight of extracted collagens were determined by ultraviolet spectrophotometry and SDS-PAGE methods. Functional properties including solubility, water-binding capability, wetting capability, oil-holding capability, emulsifying capability, emulsion stability, foaming capacity and foaming stability of collagen from squid skin were investigated. The results showed that: (1) The maximum absorption wavelength of extracted collagens was 220 nm and the molecular weight of prepared collagen from squid skin was about 220 ku. (2) The water-solubility of extracted collagen by hot water and papain was higher than that by acetic acid. (3) Extracted collagen by hot water, acetic acid and papain has definite water-binding capability, the value was 0.54%, 0.52% and 0.55%, respectively. (4) Wetting capability of extracted collagen by hot water and papain was better than that by acetic acid. (5) Extracted collagens had all excellent oil-holding capability, the value was 2.7 mL/g, 3.0 mL/g and 3.3 mL/g, respectively. (6) Extracted collagen had all excellent emulsifying capability and emulsion stability. Emulsifying capability of extracted collagen by acetic acid was the best, and the value was 72%. Emulsifying stability of extracted collagen by papain was the highest. (7) Extracted collagen had foaming capacity and foaming stability. The strongest foaming capacity and foaming stability of extracted collagen by acetic acid was 83% and 67%, respectively.

Key words: squid skin; collagen; enzymatic hydrolysis; functional properties