

中华鳖裙边胶原蛋白的提取及其特征

陆剑锋^{1*}, 万全², 殷章敏¹, 林琳¹, 翁世兵¹, 叶应旺¹, 姜绍通¹

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009;

2. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: 胶原蛋白是生物体内一种重要的蛋白质,也是结缔组织的主要蛋白成分。与陆生动物(如猪、牛等)比较,水生动物胶原蛋白具有优良的理化性质和生理活性功能,已引起人们的广泛关注。中华鳖是我国传统的名贵水产品,其裙边胶原蛋白含量丰富,具有极高的药用价值和营养价值。采用胃蛋白酶酶解法在酸性条件下提取中华鳖裙边胶原蛋白,研究酶添加量、底物浓度、提取时间对提取效果的影响,确定了制备裙边胶原蛋白的最适条件为:酶添加量 4 mg/mL,底物浓度 4%,提取时间 14 h。粗提胶原蛋白通过盐析、透析等纯化步骤,再经 SDS-PAGE 电泳、热变性温度测定、紫外及傅立叶变换红外扫描等技术方法分析了胶原蛋白的生化特征,结果显示提取到的裙边胶原蛋白具有较高的纯度,含有两条 α 链和 1 条 β 链,属于典型的 I 型胶原蛋白。研究表明:中华鳖裙边胶原蛋白可以作为猪皮、牛皮胶原蛋白的有效替代品,这为今后进一步综合开发利用鳖类裙边胶原多肽提供了科学的理论依据。

关键词: 中华鳖; 裙边; 胶原蛋白; 提取; 纯化

中图分类号: TS 254.4

文献标识码: A

胶原(collagen)是细胞外基质的一种结构蛋白质,它含有一个或几个由 α -链组成的三螺旋结构的区域,即胶原域^[1]。胶原具有保护机体和支撑器官的作用,主要存在于动物肌腱、韧带、软骨、血管壁、皮肤及结缔组织中,占哺乳动物体内蛋白质总量的 25%~30%^[2]。胶原蛋白及其水解得到的多肽产物不仅具有良好的消化吸收特性,而且还具有许多重要的生理活性功能^[3-4],在生物制药(或医学)、医疗保健、食品工业、皮革产业、感光材料、美容化妆品行业等方面都已得到广泛应用。

长期以来,工业胶原蛋白的来源仅限于猪、牛等陆生动物,但随着疯牛病(bovine spongiform encephalopathy, BSE)、口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)、禽流感(avian Influenza, AI)及其它一些人畜共患病(zoonosis)的爆发和盛行,人们逐渐对牲畜等胶原制品的安全性产生了质疑。此外由于宗教、习惯等原因,有些地区也不能使用

来源于牲畜的胶原蛋白制品,因此寻找新的胶原蛋白来源显得愈来愈迫切^[5-6]。而以水产动物为原料制备的胶原产品是近年来被世界公认的一种安全性较高的胶原蛋白来源,备受国内外消费市场的青睐。

中华鳖(*Pelodiscus sinensis* Wiegmann)是我国传统的名贵水产品,俗称甲鱼、团鱼、水鱼、王八、神守等,隶属爬行纲(Reptilia)、鱼鳖目(Testudinata)、鳖科(Tironychidae)、鳖属(*Pelodiscus*)^[7]。鳖类的生理活性物质及其抗癌药品、保健食品的开发是研究的热点。中医药认为鳖类有活血消淤,滋补强身的功效,可作为重病或手术后身体虚弱者的保健食品^[8]。鳖甲周围的结缔软组织通常被称为“裙边”,裙边胶原蛋白含量丰富,是最具滋补的部分,具有极高的药用价值和营养价值^[7-8]。目前对鱼类等水产动物胶原蛋白(如鱼皮、鱼骨、鱼鳞、鱼鳍或鱼翅^[9-10])的研究有很多,但有关鳖类裙边胶原蛋白方面的报道较少。对裙边胶原蛋白采用水解

收稿日期:2010-01-14 修回日期:2010-03-23

资助项目:安徽省重大科技攻关项目(08010301078);合肥工业大学学生创新基金资助项目(113-060110)

通讯作者:陆剑锋, E-mail: lujf@sibs.ac.cn

技术等加工处理,将有助于找到一些具有独特生理功能的活性肽。本实验通过生物酶法研究中华鳖裙边胶原蛋白的提取、纯化条件,并分析了裙边胶原蛋白的基本特征,旨在为今后进一步综合开发利用有关鳖类的裙边胶原多肽提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华鳖购于合肥马鞍山路周谷堆农贸批发市场,选用2~3年生长期的中华鳖,体重范围为550~600 g。先将中华鳖去头(放血)后致死,然后将其肌肉、裙边等分割后装入密封保鲜袋中,于-20℃下冷藏备用。所用试剂均为分析纯,胃蛋白酶活力为1 200 IU/g。

1.2 中华鳖裙边基本营养成分测定

水分的测定采用直接干燥法(GB/T 5009.3-2003);粗蛋白含量的测定采用凯氏定氮法(GB/T 5009.5-2003);粗脂肪含量的测定采用索氏抽提法(GB/T 5009.6-2003);灰分的测定采用干法灰化法(GB/T 5009.4-2003)。

1.3 中华鳖裙边胶原蛋白的提取工艺

中华鳖裙边原料预处理→去除非胶原蛋白→去除脂肪→胃蛋白酶提取→盐析、透析纯化→低温冷冻干燥→胶原蛋白。

1.4 L-羟脯氨酸标准曲线的绘制

称取50.0 mg L-羟脯氨酸用少量水溶解,加一滴6 mol/L盐酸,定容至100 mL容量瓶中,吸取该溶液1.00 mL于100 mL容量瓶中定容,获得浓度为5 μg/mL羟脯氨酸标准工作液。分别吸取上述标准工作液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μg/mL的羟脯氨酸标准溶液。6种不同浓度的羟脯氨酸标准溶液经过氯胺T氧化,生成含有吡咯环的氧化物,以对二甲基氨基苯甲醛进行显色,在558 nm处比色测定吸光度,并绘制相应的标准曲线(GB 9695 23-1990)。

1.5 裙边非胶原蛋白成分的去除

取出中华鳖裙边解冻,称取10 g后,用2.5%的NaCl溶液(1:30 W/V,下同)于20℃下连续磁力搅拌24 h,以去除水溶性和盐溶性杂蛋白(非胶原蛋白成分),然后用蒸馏水反复洗涤,充分沥干后备用。再加入与NaCl溶液同量的10%异丙醇溶液于20℃浸泡24 h,以去除脂肪,然后用蒸

馏水反复洗涤,充分沥干后备用。

1.6 裙边胶原蛋白的提取

胃蛋白酶只对胶原蛋白的非螺旋区域起作用,对螺旋区不进行水解,采用胃蛋白酶制备胶原蛋白是目前应用效果比较好的一种方法^[11]。由于胃蛋白酶的最适pH为2~3,需在酸性环境下才能提取,因此本实验采用1%柠檬酸作为酶解提取介质,它除了有助于提取酸溶性胶原外,还可使裙边变得更加溶胀(或使其结构更加蓬松),更有利于蛋白酶的水解提取。本实验考察了酶添加量、底物浓度、酶解时间对胶原蛋白提取的影响(测定水解液中羟脯氨酸含量,以羟脯氨酸含量较高为好),并在单因素的基础进行正交优化实验,进一步确定了裙边胶原蛋白最佳提取工艺。

1.7 提取液中裙边胶原蛋白含量的测定

羟脯氨酸是胶原蛋白中一种特征氨基酸,在其它蛋白质中含量较少,它是由相应的脯氨酸残基经羟基化反应生成的,因此通过羟脯氨酸的测定可确定胶原蛋白的含量^[12]。吸取0.5 mL裙边胶原蛋白粗提液放入安瓿瓶中,加入1 mL 6 mol/L的HCl,在酒精喷灯上迅速封管,置于130℃的烘箱中水解3 h,水解后的液体经稀释后,移入100 mL容量瓶中定容。取4 mL滤液,按羟脯氨酸标准曲线法(GB 9695 23-1990)测定水解液中的羟脯氨酸含量。

1.8 裙边胶原蛋白的纯化

用最优方案提取胶原蛋白,溶出物经过滤后以6 000 r/min、4℃冷冻离心20 min,倾出上清液,加NaCl至其最终浓度为0.9 mol/L,4℃盐析过夜;盐析后再以6 000 r/min、4℃冷冻离心20 min,沉淀用0.5 mol/L乙酸溶解,重复盐析和溶解操作1次,将得到的蛋白液移入透析袋,用蒸馏水透析3 d,每天更换透析水2~3次,透析后进行真空冷冻干燥(FD-1型真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司)。

1.9 胶原蛋白的紫外扫描

纯化的胶原蛋白样品溶液采用紫外分光光度计(UV-1600全波段紫外扫描分光光度计,北京瑞利分析仪器有限公司)进行扫描,波长间隔1 nm,波长范围为190~400 nm。

1.10 胶原蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参照Laemmi^[13]电泳系统对纯化的胶原蛋白

样品溶液进行 SDS-PAGE 垂直电泳(DYY-11 型电泳仪,北京市六一仪器厂)。分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 4%,200 V 电泳 30 min,用考马斯亮蓝 R-250 染色液(考马斯亮蓝 R-250 0.5 g,甲醇 225 mL,蒸馏水 225 mL,冰醋酸 50 mL)染色 15 min,脱色液(甲醇 100 mL,冰醋酸 100 mL,蒸馏水 800 mL)脱色并拍照。

1.11 裙边胶原蛋白的氨基酸(AA)测定

称取冷冻干燥后的纯化样品 1 mg 放入安瓿瓶中,加 2 mL 6 mol/L HCl(色氨酸测定采用 KOH 水解),并充入少量氮气,在酒精喷灯下迅速封管后置于 110 °C 烘箱中水解 24 h。水解结束冷却后移至坩埚,在 70 °C 水浴锅中挥发剩余盐酸,再加入少量双蒸水蒸干,重复 3 次,用适量 pH 2.20 的缓冲液溶解后定容,最后用 0.22 μm 微孔滤膜抽滤,滤液采用氨基酸全自动分析仪(HITACH L8800,日本 HITACH 公司)进行测定。

1.12 胶原蛋白的热变性温度测定

样品制备参照 Kittiphattanabawon 等^[14]的方法。将冷冻干燥后的纯化样品用 50 mmol/L 的乙酸溶解进行复水化,样品和溶剂的比率为 1:40 (W/V)。采用差示扫描量热仪(DSC 821°,梅特勒-托利多仪器有限公司)测定热变性温度,使用铟和锡作为标准物对仪器进行温度和焓值的校准。测定时精确称量 5~10 mg 样品溶液放入铝坩埚后密封,扫描温度范围为 20~50 °C,升温速率为 1 °C/min,并用空气压缩机进行冷却,以一个空的铝坩埚作为空白对照。

1.13 胶原蛋白的傅立叶变换红外扫描(FT-IR)

称取冷冻干燥后的纯化样品约 1~2 mg,与一定量干燥好的 KBr 混合置于玛瑙研钵中,研磨均匀(尽量成细微粉末状)后装样,手动压片,采用傅立叶变换红外扫描仪(Nicolet 5700,美国 Thermo 公司)在 400~4 000 cm⁻¹ 区间内进行吸收波谱扫描。

2 结果与分析

2.1 中华鳖的裙边基本营养成分

由表 1 可知,中华鳖裙边粗蛋白含量明显高于肌肉粗蛋白含量,干物质占 28% 左右,粗蛋白达到干物质总量的 88.71%,可见中华鳖裙边是良好的蛋白质来源。此外,裙边脂肪、灰分含量均较低,有利于胶原蛋白的提取和纯化。

表 1 中华鳖的基本营养成分(以湿基计)
Tab. 1 Content of basic nutrition in *Pelodiscus sinensis* (on wet basis) $\bar{X} \pm SD$

基本营养成分(%) basic nutrition content	裙边 calipash	肌肉 muscle
粗蛋白 crude protein	26.60 ± 3.04	16.76 ± 1.25
粗脂肪 crude fat	0.11 ± 0.01	0.21 ± 0.04
水分 moisture	71.60 ± 4.23	81.05 ± 0.86
灰分 ash	0.71 ± 0.06	1.06 ± 0.04

2.2 羟脯氨酸标准曲线及胶原蛋白的测定

以吸光度值为纵坐标,L-羟脯氨酸质量浓度为横坐标绘制标准曲线(图 1),计算其回归方程为: $y=0.2205x-0.0005$,变异系数 $R^2=0.9998$ 。

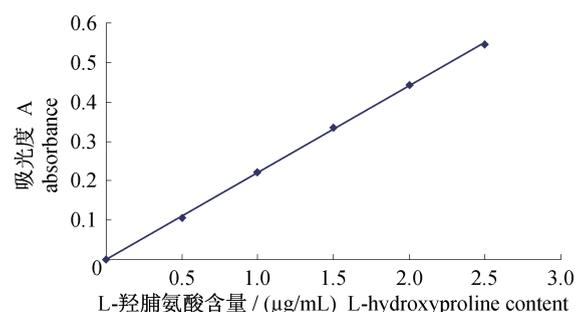


图 1 L-羟脯氨酸标准曲线

Fig. 1 Standard curve of L-hydroxyproline

由标准曲线或回归方程可得出相应吸光度的羟脯氨酸含量,胶原蛋白含量 = 羟脯氨酸含量 × 换算系数 11.1^[12]。经实验测定,中华鳖的裙边胶原蛋白含量达到 60.87% (干基)。

2.3 胶原蛋白提取中酶添加量的确定

底物浓度为 2%,添加不同酶量(1 mg/mL, 3 mg/mL, 5 mg/mL, 7 mg/mL, 9 mg/mL),反应 3 h,取 0.5 mL 样品置于安瓿瓶中,加 1 mL 6 mol/L HCl,在 130 °C 下水解 3 h,水解液稀释 100 倍后测定 Hyp 吸光度值(图 2)。结果显示随着酶添加量的不断上升,溶出的 L-羟脯氨酸含量也越来越高,但达到 5 mg/mL 以后,L-羟脯氨酸含量增加变缓,同时也增加了蛋白酶的消耗量,综合考虑成本问题,酶添加量不宜超过 5 mg/mL。

2.4 胶原蛋白提取中底物浓度的确定

酶添加量为 5 mg/mL,底物浓度分别为 1%、2%、4%、6%、8%,20 °C 反应 3 h,取 0.5 mL 加 1 mL 6 mol/L HCl 在 130 °C 下水解 3 h,水解液稀释 100 倍后测定 Hyp 吸光度值(图 3)。结果显示:溶出的 L-羟脯氨酸含量与底物浓度呈现出正相关,当底物浓度高于 4% 时,胶原蛋白提取率

虽仍有一定上升趋势,但影响程度明显减弱,故选择 4% 左右的底物浓度较为合适。

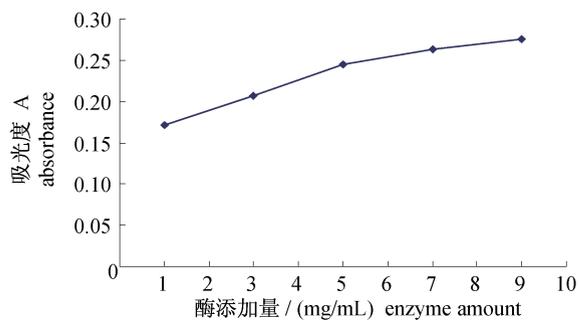


图 2 酶添加量对吸光度的影响

Fig. 2 Relation between enzyme amount and absorbance

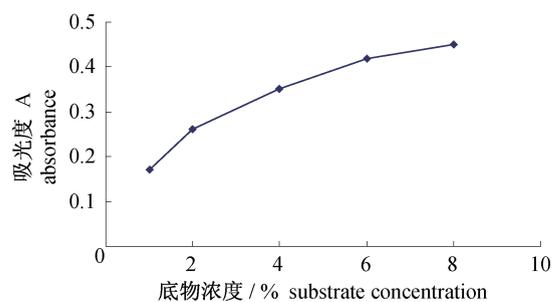


图 3 底物浓度对吸光度的影响

Fig. 3 Relation between the substrate concentration and absorbance

2.5 胶原蛋白提取中酶解时间的确定

酶添加量为 5 mg/mL, 底物浓度为 4%, 20 °C 反应, 每隔 4 小时取样 0.5 mL 置于 1~5 号安瓿瓶中, 加 1 mL 6 mol/L HCl, 在 130 °C 下水解 3 h, 水解液稀释 100 倍后测定 Hyp。由图 4 可知, 随着时间的延长, 水解液的吸光度值依次增加, 表明溶出的胶原蛋白含量在不断增加, 12 h 后的吸光度增幅明显减缓, 从节能上考虑, 提取时间可定为 12 h 左右。

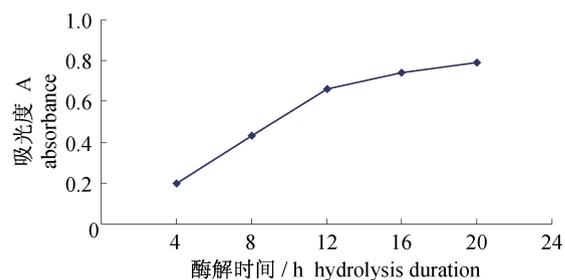


图 4 酶解时间对吸光度的影响

Fig. 4 Relation between the hydrolysis duration and absorbance

2.6 酶水解条件的优化

依据单因素试验初步确定的酶解条件(表 2), 选择酶解时间(A)、加酶量(B)与底物浓度(C)作为试验因子, 以溶出 L-羟脯氨酸含量为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 对裙边的酶解条件进行优化。不同因素水平组合的正交试验设计方案与试验结果见表 3。

表 2 正交试验设计表
Tab. 2 Orthogonal design of experiment

水平 level	A 酶添加量 (mg/mL) enzyme amount	B 底物浓度 (%) substrate concentration	C 酶解时间 (h) hydrolysis duration
1	6	5	12
2	4	4	14
3	5	6	10

由极差分析结果可知, 影响裙边胶原蛋白提取率的主次因素为 $C > B > A$; 最佳因素水平组合为 $C_2 B_2 A_2$, 即酶添加量为 4 mg/mL, 底物浓度 4%, 酶解时间为 14 h。经重复验证, 该方案可行。

2.7 紫外扫描图谱

裙边胶原蛋白样品溶液经紫外波谱扫描(图 5), 在 200~230 nm 之间有强烈的吸收, 最大吸收峰为 226 nm, 符合胶原蛋白通常的紫外吸收特性, 即存在胶原蛋白的特征吸收峰。

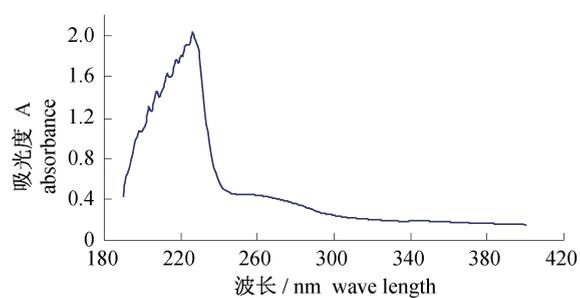


图 5 裙边胶原蛋白的紫外扫描图谱

Fig. 5 UV scanning spectra of calipash collagen

2.8 SDS-PAGE 凝胶电泳

裙边胶原蛋白的凝胶电泳结果见图 6 所示。从凝胶电泳图谱上可以清晰地看到有染色较深的 3 条带(左右为同一样品), 几乎不含其它杂带, 表明所提取的裙边胶原蛋白得到了高度纯化, 从上到下依次为: β 链, $\alpha 1$ 链, $\alpha 2$ 链。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交分析
Tab.3 $L_9(3^4)$ analysis

试验号 test number	A	B	空列 blank	C	提取率(%) extraction rate
1	1(6)	1(5)	1	1(12)	84.980 1
2	1	2(4)	2	2(14)	94.858 1
3	1	3(6)	3	3(10)	76.853 1
4	2(4)	1	2	3	83.777 1
5	2	2	3	1	92.314 6
6	2	3	1	2	87.010 9
7	3(5)	1	3	2	87.443 0
8	3	2	1	3	79.688 3
9	3	3	2	1	88.449 3
K_1	256.691 3	256.200 2	251.679 3	265.744 0	
K_2	263.102 6	266.861 0	267.084 5	269.312 0	
K_3	255.580 6	252.313 3	256.610 7	240.318 5	
k_1	85.563 8	85.400 1	83.893 1	88.581 3	
k_2	87.700 9	88.953 7	89.028 2	89.770 7	
k_3	85.193 5	84.104 4	85.536 9	80.106 2	
极差 range	2.507 4	4.849 3	5.135 1	9.664 5	
因素 主→次 major→minor order				CBA	
优方案 optimal program				$C_2B_2A_2$	

注:提取率(%) = $\frac{\text{提取胶原蛋白质量}}{\text{裙边胶原蛋白总质量}} \times 100$ 。

Notes: extraction rate(%) = $\frac{\text{weight of extracted collagen protein}}{\text{total weight of calipash collagen protein}} \times 100$ 。

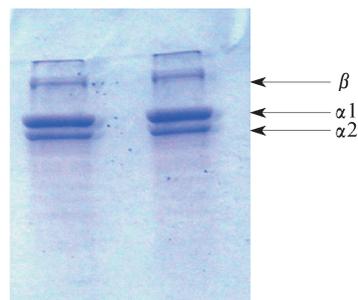


图 6 裙边胶原蛋白的电泳图谱

Fig.6 SDS-PAGE pattern of calipash collagen

2.9 氨基酸分析

裙边胶原蛋白的氨基酸组成见表 4 所示。其中甘氨酸(Gly)含量最为丰富,高达 26.25%,亚氨基酸包括羟脯氨酸(Hyp)和脯氨酸(Pro)总含量为 21.25%,Pro 的羟基化程度接近 35%,谷氨酸(Glu)、丙氨酸(Ala)和精氨酸(Arg)含量也较高,几乎不含或仅含极少量的酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)、组氨酸(His)、蛋氨酸(Met)、半胱氨酸(Cys)。

2.10 热变性温度的测定

裙边胶原蛋白差示扫描量热(DSC)结果见图 7 所示。通常当达到蛋白质热变性温度时,在

热分析图谱上会出现一个吸热峰,这个峰值对应的温度即为该样品的热变性温度(T_d)^[15]。由图 7 可知,裙边胶原蛋白的热变性温度(T_d)为 32.33 °C。

表 4 裙边胶原蛋白的氨基酸组成

Tab.4 Amino acid composition of calipash collagen

氨基酸种类 kinds of amino acids	氨基酸比例(%) percentage
天冬氨酸 Asp	5.18
苏氨酸 Thr	2.27
丝氨酸 Ser	3.76
谷氨酸 Glu	9.27
甘氨酸 Gly	26.25
丙氨酸 Ala	8.36
半胱氨酸 Cys	1.35
缬氨酸 Val	3.95
蛋氨酸 Met	1.84
异亮氨酸 Ile	1.51
亮氨酸 Leu	2.80
酪氨酸 Tyr	0.00
苯丙氨酸 Phe	2.91
赖氨酸 Lys	3.02
组氨酸 His	0.75
精氨酸 Arg	7.85
脯氨酸 Pro	13.95
色氨酸 Trp	0.29
羟脯氨酸 Hyp	7.30

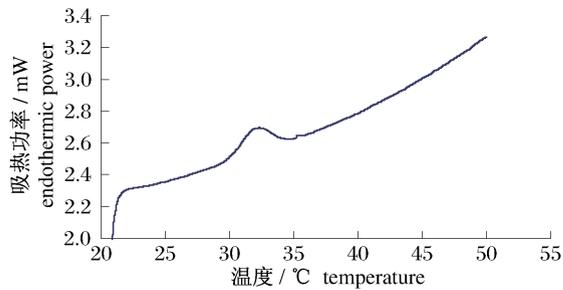


图7 裙边胶原蛋白热变性曲线

Fig. 7 Thermal denaturation curve of calipash collagen

2.11 傅立叶变换红外扫描图谱

裙边胶原蛋白的傅立叶变换红外扫描(FT-IR)结果见图8所示。根据已报道的资料^[10],我们可以推知:3 334.32 cm^{-1} 处的强吸收是由酰胺 A 的 N—H 伸缩振动引起的,N—H 伸缩振动的吸收峰通常出现在 3 400 ~ 3 450 cm^{-1} ,但其形成氢键后,吸收峰对应的波数会下降,实验表明存在 N—H 伸缩振动与氢键的缔合体;酰胺 B 出现在 3 087.48 cm^{-1} ,这个弱吸收峰是由 C—N 伸缩振动引起的特征吸收峰,这也是酰胺 B 在红外波谱扫描中常出现的波长;酰胺 I 带出现在 1 660.41 cm^{-1} 处,它是由蛋白质多肽骨架中的 C=O 伸缩振动引起的,其吸收峰最强;1 558.20 cm^{-1} 是酰胺 II 带的特征吸收峰,它是由 C—N 伸缩振动与 N—H 弯曲振动引起的;酰胺 III 带出现在 1 240.00 cm^{-1} ,它是由 N—H 弯曲振动引起的特征吸收峰。酰胺 I 带和蛋白质的二级结构有关,而酰胺 III 带证明了提取的裙边胶原蛋白存在完整的三螺旋结构^[16]。

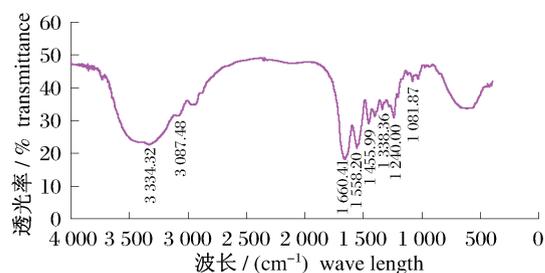


图8 裙边胶原蛋白的傅立叶红外转换扫描图谱

Fig. 8 Fourier transform infrared spectrum of calipash collagen

3 讨论

本文检测了中华鳖的基本营养成分,裙边胶原蛋白含量高达 60.87% (干基)。秦玉青等^[17]测定了鲑鱼皮的胶原蛋白,其含量达到 36.7%,

占总蛋白的 48% 以上;Takeshi 等^[9]报道了日本鲈鱼鱼皮、鱼骨、鱼鳍等废弃物中的胶原蛋白含量,分别为 51.4%、49.8%、41.6%。与鱼类胶原蛋白相比较,中华鳖的裙边胶原蛋白含量非常丰富,今后可开发利用的潜力巨大。本实验表明,在酸性条件,胃蛋白酶添加量为 4 mg/mL,底物浓度为 4%,提取时间为 14 h,中华鳖裙边胶原蛋白提取率可达到最高。

对裙边胶原蛋白样品的紫外扫描图谱检测,显示其在 226 nm 处存在一个很强的吸收峰,符合胶原蛋白通常的紫外吸收特性,这个吸收峰主要是由 C=O 的 $\text{N} \rightarrow \pi^*$ 和 $\text{N} \rightarrow \sigma^*$ 跃迁产生的强吸收^[18]。一般具有共轭双键的物质都具有紫外吸收特性,在 20 种常见的基本氨基酸中,芳香族氨基酸 Phe、Tyr、Trp 和杂环族氨基酸 His 均含有共轭双键,它们在 250 ~ 290 nm 的波长范围存在明显的紫外吸收峰^[2]。其中 Trp 在 280 nm 处的紫外吸收能力最强,所以多数蛋白质在 280 nm 处有一个强吸收峰,因此测量 280 nm 处的紫外吸光度,可对蛋白质溶液进行定量分析;但由于胶原蛋白中几乎不含 Trp,所以在 280 nm 处不会出现强吸收峰,这已成为鉴定胶原蛋白纯度的一种方法^[19]。在本实验中,除了存在胶原蛋白的特征吸收峰外,仅在 260 ~ 280 nm 处出现一个极微弱的峰(可能是由少量的 Phe 所引起),其余波长范围均没有明显的吸收峰,因此裙边胶原蛋白的紫外扫描图谱表明其杂蛋白含量较少,纯度极高。

胶原蛋白通常由 3 条多肽链组成(呈三螺旋结构),这些链被称为 α -链。有的胶原蛋白分子中的 α -链都相同;有的 2 条链相同,另 1 条链不同;而有的 3 条 α -链都不同^[1-2]。从 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱可知,裙边胶原蛋白几乎不含杂带,纯度极高(与紫外扫描图谱分析的结果十分吻合),至少含有两条不同的 α -链,分别为 $\alpha 1$ -链和 $\alpha 2$ -链,另一条为 β 链,这与已报道的硬骨鱼类鱼皮 I 型胶原蛋白的凝胶电泳结果一致^[20-21],因此中华鳖裙边胶原蛋白也属于典型的 I 型胶原蛋白。Takeshi 等^[22]认为某些硬骨鱼类鱼皮的 I 型胶原蛋白中可能还含有 $\alpha 3$ 链,但电泳时 $\alpha 3$ 链通常不能(或很难)与 $\alpha 1$ 链分开,本实验也未观察到有类似的 $\alpha 3$ 链条带出现。此外通过 FT-IR 图谱分析,进一步证明纯化后的裙边胶原蛋白保存有完整的三螺旋结构。

由裙边胶原蛋白的氨基酸组成分析可知,裙边胶原蛋白中 Gly 含量最为丰富,其次为亚氨基酸(包括 Hyp 和 Pro),但几乎不含或含极少量的 Trp、Tyr、Cys、His 等,以上这些基本特征均符合典型的 I 型胶原蛋白^[21,23]。而裙边胶原蛋白的氨基酸组成特征也与其紫外扫描图谱分析的结果非常吻合。

目前,对淡水生物胶原蛋白的热稳定性方面研究较少,仅限于部分淡水鱼类,如 Liu 等^[16]测定斑点叉尾鮰酸溶胶原蛋白的热变性温度(T_d)为 32.5 °C。通常情况下,鱼类胶原蛋白的热变性温度与其生息环境的最高水温大致相等^[24]。通过 DSC 图谱分析,显示中华鳖裙边胶原蛋白的 T_d 为 32.33 °C,与大部分淡水鱼类的热变性温度接近。中华鳖是一种水生爬行动物,虽不属于淡水鱼类,但由于其常年生活在水环境中,与鱼类的栖息环境几乎相同,故推测其裙边胶原蛋白的热变性温度可能与鱼类存在一定的相似性。

水产动物原料通常具有高蛋白、低脂肪的特点,非常适宜于制备胶原产品^[6]。本研究表明,中华鳖裙边不仅具有高蛋白、低脂肪的特点,而且其灰分含量也较低,有利于胶原蛋白的提取和纯化,因此中华鳖裙边是制备水产动物胶原蛋白的良好来源。此外,中华鳖裙边 I 型胶原蛋白的生化特征与陆生动物(如猪、牛等^[5]) I 型胶原蛋白非常相似,它可以作为猪皮、牛皮胶原蛋白的有效替代品。

参考文献:

- [1] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2003, 55:1531-1546.
- [2] 将挺大,张春平. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京:化学工业出版社,2001.
- [3] Lee C H, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen[J]. *Int J Pharm*, 2001, 221:1-22.
- [4] 吴耀松,廖艳阳,印大中. 胶原蛋白在美容中的应用及皮肤衰老机制研究进展[J]. *中华现代皮肤科学杂志*, 2004, 1(3):219-224
- [5] 郭文宇,代敏,杨丽红,等. 水生动物与陆生动物胶原蛋白特性及应用前景[J]. *中国皮革*, 2007, 36(17):55-58.
- [6] 焦道龙,陆剑锋,张伟伟,等. 水产动物胶原蛋白的研究现状及发展趋势[J]. *食品科学*, 2009, 30(17):334-338.
- [7] 方燕,过世东. 中华鳖肌肉和裙边基本品质的研究[J]. *食品工业科技*, 2007, (7):194-202.
- [8] 伍惠生. 鳖的营养价值与抗癌作用[J]. *河南水产*, 2002, (2):21-24.
- [9] Takeshi N, Nobutaka S. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins [J]. *Food Chem*, 2000, 68:277-281.
- [10] Woo J W, Yu S J, Kim S B, et al. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin [J]. *Food Hydrocolloid*, 2008, 22:879-887.
- [11] Hickman D, Sima T J, Miles C A. Ising-lass/collagen: denaturation and functionality [J]. *J Biotechnol*, 2000, 79:245-257.
- [12] Etherington D J, Sims T J. Detection and estimation of collagen[J]. *J Sci Food Agric*, 1981, 32:539-546.
- [13] Laemmi U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ [J]. *Nature*, 1970, 227:680-685.
- [14] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of big eye snapper (*Priacanthus tayennus*) [J]. *Food Chem*, 2005, 89:363-372.
- [15] 李永明,徐子伟. 差示扫描量热法(DSC)评定豆粕产品质量初探[J]. *中国粮油学报*, 2003, 18(5):82-84.
- [16] Liu H Y, Li D, Guo S D. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Food Chem*, 2007, 101:621-625.
- [17] 秦玉青,刘承初,王慥. 鲑鱼皮胶原蛋白的测定与回收[J]. *上海水产大学学报*, 2002, 11(2):138-144.
- [18] 永井裕,藤本大三郎. 胶原蛋白实验方法[M]. 上海:上海中医学院出版社,1992.
- [19] 张俊杰,段蕊,刘佳梅,等. 鲤鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其性质研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2008, 30(1):18-21.
- [20] 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.
- [21] Bae I, Osatomi K, Yoshida A. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes[J]. *Food Chem*, 2008, 108:49-54.
- [22] Takeshi N, Yoko A, Nobutaka S. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*) [J]. *Food Chem*, 2002, 78:173-177.
- [23] 赵海英,梁程超,缪锦来,等. 鳕鱼皮胶原蛋白的制备及其成分分析[J]. *中国海洋药物杂志*, 24(5):30-32.
- [24] 鸿巢章二. 水产利用化学[M]. 北京:中国农业出版社,1992.

Extraction and characterization of collagen from calipash of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)

LU Jian-feng^{1*}, WAN Quan², YIN Zhang-min¹, LIN Lin¹,
WENG Shi-bing¹, YE Ying-wang¹, JIANG Shao-tong¹

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Collagen is one of the predominant proteins in the living body, and the essential protein component in connective tissue. Compared with collagen from land animals (such as pig, cow), aquatic collagen has drawn extensive attention for its excellent physiochemical properties and physiologically active functions. Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) is a rare and precious traditional aquatic animal in China. It has a high medicinal and nutritional value with plenty of calipash collagen. The collagen from calipash of *P. sinensis* was extracted by pepsin digestion under acid condition. The effects of pepsin addition, substrate concentration and extraction time on yield of collagen were investigated. 5 mg/mL pepsin addition, 4% substrate concentration and 14 hours extraction time were established as optimal conditions for preparing calipash collagen. The extracted crude collagen was purified by salt precipitation and dialysis, and then its biochemical characterization was determined by the methods of SDS-PAGE, DSC, UV and FT-IR scanning. The result indicated that the extracted calipash collagen was of high purity and belonged to typical collagen I with two α and one β chains. It can be assumed that the calipash collagen of *P. sinensis* might be a useful substitute for porcine and bovine collagens. This study laid a scientific foundation for further exploitation and utilization of the calipash collagen polypeptide of Chinese soft-shelled turtle.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; calipash; collagen; extraction; purification

Corresponding author: LU Jian-feng. E-mail: lujf@sibs.ac.cn

· 会讯 ·

关于召开 2010 年中国水产学会学术年会的预备通知

农渔学[2010]29 号

各有关单位、学会各分支机构:

为加强全国水产科技工作者的学术交流,促进渔业和谐、健康发展,我会定于 2010 年 10 月 20 日-22 日在陕西省西安市唐城宾馆召开 2010 年中国水产学会学术年会。现将有关事项通知如下:

一、年会主题: 低碳 责任 科技推动产业转型升级

二、年会安排: 开幕式邀请著名专家做大会主题报告。大会报告后分分会场进行专题报告及交流。

三、论文征集:

1、征集范围: 水产及水产相关的研究、生产及应用领域的论文。范围包括水产养殖技术与品种繁育、水产动物营养与饲料、水产病害与防控、渔业资源与渔业管理、渔业行为与生态变化、水族观赏与休闲渔业、水产品加工与制冷、渔业机械与工程、渔业经济与信息、渔业科研、教育、生产与行政管理等。

2、论文所反映的信息和学术成果须是 2007 年-2010 年完成的,请作者确保论文内容的真实性和客观性,文责自负。

3、论文一律由年会网站(www.csfish.org.cn/.nianhui2010)提交,上传提交截止时间为 2010 年 9 月 10 日。

中国水产学会
二〇一〇年五月十六日