



## 暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的提取及其特性

周 瑞<sup>1,2</sup>, 李若男<sup>1,2</sup>, 周丽莎<sup>1,2</sup>, 邱婷婷<sup>1,2</sup>,  
王静玉<sup>1,2</sup>, 谭 啸<sup>1,2</sup>, 陈舜胜<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为增加暗纹东方鲀附加值, 考察不同处理方法对提取暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的影响, 实验以暗纹东方鲀鱼皮为对象, 通过热水法、酸法和胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶处理鱼皮提取胶原蛋白。通过对不同胶原蛋白的提取率、氨基酸组成、傅里叶红外光谱 (FTIR)、紫外光谱 (UV)、扫描电镜、十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行研究, 对暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白特性进行表征和比较。结果显示, 用胃蛋白酶得到的胶原蛋白提取率最高; 氨基酸组成相似但含量不同; 3种酶制备的胶原蛋白中, 脯氨酸含量显著低于酸和热水制备的胶原蛋白; FTIR 扫描结果表明, 5种处理方法得到的胶原蛋白都存在 Amide A、Amide B、Amide I、Amide II 和 Amide III, 均保持了胶原蛋白三螺旋结构; 紫外光谱显示在 235 nm 左右有强吸收峰, 结合 FTIR 确定其为典型的胶原蛋白, 经过 SDS-PAGE 分析, 确定暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白为 I 型胶原蛋白。酸法和胃蛋白酶较好地保留了胶原蛋白的  $\beta$ 、 $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  链, 木瓜蛋白酶作用化学键比其他酶广泛, 得到小分子量的胶原蛋白分子; 扫描电镜结果显示, 酸法提取的胶原蛋白最适合应用在生物医学材料上运载药物。由此可见, 不同处理方法提取的胶原蛋白理化特性存在一定差异, 不同的酶制备的胶原蛋白分子量分布会产生明显差别, 可根据研究需要选用不同处理方法开发胶原蛋白产品。

**关键词:** 暗纹东方鲀; 鱼皮; 胶原蛋白; 处理方法; 理化性质

中图分类号: S 986.1

文献标志码: A

胶原蛋白或称胶原 (collagen) 是动物体内含量最丰富且分布最广的一种糖蛋白<sup>[1]</sup>。是由 3 条  $\alpha$ -肽链相互缠绕而形成的螺旋结构纤维状蛋白<sup>[2]</sup>, 在生物体内, 胶原蛋白与聚多糖等成分形成精密有序的细胞间网络结构——细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 对机体细胞和组织有重要作用。目前已知的胶原蛋白有 29 种, 分别被命名为 I~X IX 型<sup>[3]</sup>, 其中最多的是 I 型胶原蛋白<sup>[4]</sup>。胶原蛋白具有抗氧化、抗肿瘤、降血压、促进伤口愈合以及美容等功效, 已被广泛用于

食品、化妆品和医药行业。目前, 以猪、牛等哺乳动物为来源的胶原蛋白受到口蹄疫 (FMD)、牛海绵状脑病 (BSE)、传染性海绵状脑病 (TSE) 等多种感染性疾病的威胁<sup>[5]</sup>, 水产动物的皮、鳞中的胶原蛋白是哺乳动物源胶原蛋白的较好替代品。

河鲀在受到刺激时身体会膨胀成球形而不破裂, 这是由于胶原蛋白和乳胶的含量高<sup>[6]</sup>。人们对河鲀毒素的研究较深入, 却忽略了河鲀其他方面的价值。随着人工养殖无毒河鲀产业的发展, 河鲀需求逐渐增加, 根据中国渔业统计

收稿日期: 2019-09-03 修回日期: 2020-02-26

资助项目: 国家自然科学基金 (31471685)

通信作者: 陈舜胜, E-mail: sschen@shou.edu.cn

年鉴<sup>[7]</sup>, 2018年河鲀淡水养殖产量为12 710 t, 是2017年的2倍多, 河鲀年出口率占产量的90%以上<sup>[8]</sup>, 现已成为国外河鲀供给的主要来源。在食用时, 消费者反映河鲀鱼皮上小棘刺使喉咙产生不适感, 所以河鲀在加工时会产生大量的鱼皮等下脚料, 造成了资源的极大浪费和环境污染。为了最大化利用河鲀, 增加附加值, 本研究选用养殖暗纹东方鲀(*Tetrodontiformes fasciatus*)进行研究, 对其鱼皮中含量丰富、营养价值高的胶原蛋白进行制备和表征, 为暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜暗纹东方鲀鱼皮由江苏中洋集团股份有限公司提供, 冷藏状态转运回实验室, 在-20℃下冷藏以备用; 胃蛋白酶(活性 $\geq 1\ 200\ \text{U/g}$ ), 国药集团化学试剂有限公司; 无花果蛋白酶(活性 $2\ 000\ 000\ \text{U/g}$ )、木瓜蛋白酶(活性 $500\ 000\ \text{U/g}$ ), 无锡亨捷未央贸易有限公司; L-羟脯氨酸标准品、对二甲氨基苯甲醛、柠檬酸、氯仿 T、NaOH 等试剂均为国产分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 实验用水为去离子水。

### 1.2 实验仪器

AUW320 电子分析天平, 日本岛津公司; H1850R 台式高速冷冻离心机, 上海沪粤明科学仪器有限公司; L-8800 日立氨基酸自动分析仪, 日本日立公司; FD-A10N-50 真空冷冻干燥机, 冠森生物科技(上海)有限公司; T6 新世纪紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 傅里叶变换红外光谱仪, 铂金埃尔默公司, 配备衰减全反射(ATR)附件; PHS-3C pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 上海天能科技有限公司; S-3400N 扫描电子显微镜, 日本日立公司。

### 1.3 鱼皮的预处理

取一定量的暗纹东方鲀鱼皮, 流水解冻, 去离子水冲洗皮上杂质。剪成 $0.5\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 规格,  $4\ ^\circ\text{C}$ 下, 以料液比(1:10, *M/V*)加入 $0.1\ \text{mol/L}$  NaOH, 搅拌浸泡24 h(NaOH 溶液每6 h 更换1次), 除去非胶原蛋白和色素, 水冲洗至中性, 充分沥干后, 以料液比(1:30, *M/V*)加入10% 正丁醇搅拌浸泡24 h(正丁醇溶液每6 h 更换1次), 除去脂肪, 水冲洗至中性, 充分沥干后

备用。

### 1.4 胶原蛋白的提取

**热水法提取胶原蛋白** 将预处理好的暗纹东方鲀鱼皮与水以1:13(*M/V*)混合, 在 $80\ ^\circ\text{C}$ 条件下提取6 h<sup>[9]</sup>, 此时鱼皮已被处理的只剩自身携带的棘刺。在 $10\ 000\ \text{r/min}$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$ 的条件下离心20 min, 冻干即得水溶性胶原蛋白。

**酸法提取胶原蛋白** 参考 Kaewdang 等<sup>[10]</sup>的方法, 处理后的暗纹东方鲀鱼皮浸泡于 $0.5\ \text{mol/L}$  乙酸溶液(1:20, *M/V*)中48 h 以提取胶原蛋白, 用2层纱布过滤, 将未提取彻底的皮再次用等量的 $0.5\ \text{mol/L}$  乙酸溶液提取, 共提取3次, 混合上清液, 盐析至终浓度为 $0.9\ \text{mol/L}$  后静置过夜, 液体中的胶原蛋白沉淀。溶解液在 $10\ 000\ \text{r/min}$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$ 的条件下离心20 min, 收集沉淀; 收集的沉淀完全溶于 $0.5\ \text{mol/L}$  的乙酸溶液, 在 $0.1\ \text{mol/L}$  的乙酸溶液(1:50, *V/V*)中透析24 h, 随后去离子水中透析。当透析液中不存在 $\text{Ag}^+$ 时, 停止透析, 冻干, 所有的操作均在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下进行。

**酶法提取胶原蛋白** 参考 Nagai 等<sup>[11]</sup>的方法并略作修改。预处理后的暗纹东方鲀鱼皮浸泡在含有 $1\ \text{g}/100\ \text{mL}$  酶的 $0.5\ \text{mol/L}$  乙酸溶液(1:20, *M/V*)中48 h 以提取胶原蛋白, 用2层纱布过滤, 将未提取彻底的皮再次用等量的含有 $1\ \text{g}/100\ \text{mL}$  酶的 $0.5\ \text{mol/L}$  乙酸溶液中提取, 上清液混合, 盐析至终浓度为 $0.9\ \text{mol/L}$  后静置过夜, 液体中的胶原蛋白沉淀, 在 $10\ 000\ \text{r/min}$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$ 的条件下离心20 min, 收集沉淀; 收集的沉淀完全溶于 $0.5\ \text{mol/L}$  的乙酸溶液, 在 $0.1\ \text{mol/L}$  的乙酸溶液(1:50, *V/V*)中透析24 h, 随后在去离子水中透析。当透析液中不存在 $\text{Ag}^+$ 时, 停止透析, 冻干, 所有的操作均在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下进行。其中添加的酶分别为胃蛋白酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶, 分别对应3种酶处理方法。

### 1.5 胶原蛋白提取率的测定方法

**羟脯氨酸标准曲线的绘制** 称取 $100.0\ \text{mg}$  L-羟脯氨酸, 用少量 $0.01\ \text{mol/L}$  盐酸溶液溶解, 定容至 $100\ \text{mL}$ 。吸取上述溶液 $5.00\ \text{mL}$  定容至 $500\ \text{mL}$ , 得到 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$  羟脯氨酸标准工作液。再分别吸取上述标准工作液0、5、10、15、20、25、30 mL, 定容至 $100\ \text{mL}$ 。后各移取 $4.00\ \text{mL}$  于具塞试管中, 加入 $2\ \text{mL}$  氯胺 T, 室温氧化30 min, 加入对二甲氨基苯甲醛显色剂, 迅速混匀,

并在 60 °C 水浴中保温 20 min, 染色完成后置于冰水中 1 min, 取出后室温放置 5 min, 在 560 nm 处测定其吸光度<sup>[12]</sup>。

绘制标准曲线, 得曲线方程:

$$y = 0.196 3x - 0.020 4$$

式中,  $R^2=0.980 2$ ,  $y$  为 560 nm 处测定的吸光度值,  $x$  为羟脯氨酸含量。

**胶原蛋白提取率** 称取鱼皮或胶原样品 10 mg 左右于具塞试管中, 加入 10 mL 浓盐酸溶解后放入 130 °C 烘箱中, 水解 3 h。取出后冷却至室温, 调至中性, 转移至 100 mL 容量瓶中并定容。精确吸取 1 mL 的水解液及 3 mL 去离子水、2 mL 氯胺 T 于具塞试管中, 氧化 30 min, 加入显色剂(对二甲氨基苯甲醛), 迅速混匀, 并在 60 °C 下水浴 20 min, 染色完成流水冷却 1 min, 放置试管于室温 5 min 后, 在 560 nm 处测其吸光度, 由标准曲线得出羟脯氨酸浓度。计算暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白提取率公式:

$$\begin{aligned} \text{胶原蛋白提取量(g)} &= \text{羟脯氨酸浓度} \times \\ &\text{稀释倍数} \times \text{体积} \times 11.1 \\ \text{胶原蛋白提取率(\%)} &= \\ &\frac{\text{样品中胶原蛋白提取量(g)}}{\text{鱼皮中胶原蛋白的含量(g)}} \times 100\% \end{aligned}$$

### 1.6 胶原蛋白理化性质的测定

**氨基酸组成测定** 参照 Su 等<sup>[13]</sup>的方法, 并略作改动。将样品置于水解管中, 加入 6 mol/L 盐酸 2 mL, 真空密封, 于 130 °C 水解 3 h。水解液用 4 和 0.1 mol/L 的 NaOH 中和至 pH 为 2.2, 离心取上清液后, 用 0.02 mol/mL HCl 定容至 50 mL, 吸取滤液, 过 0.22 μm 滤膜后用氨基酸自动分析仪测定样品氨基酸含量。

**傅里叶红外光谱扫描** 参照 Kaewdang 等<sup>[9]</sup>的方法, 并略作改动。取适量冻干的胶原蛋白样品, 在支架 ATR 上扫描, 设置波长范围为 4 000~500  $\text{cm}^{-1}$ , 采集速率为 2  $\text{cm}^{-1}$ 。

**紫外光谱扫描** 参照 Jeevithan 等<sup>[14]</sup>的方法, 并略作改动。分别取适量冻干的样品溶于 0.5 mol/L 乙酸溶液中, 配制成 0.5 mg/mL 的胶原蛋白溶液, 以 0.5 mol/L 乙酸溶液作空白对照。在 190~400 nm 处以 2 nm/s 的速度对胶原蛋白溶液进行扫描, 采集速率为 0.5 nm。

**SDS-PAGE 分析** 将冻干样品溶解于去离子水中, 配置成质量浓度为 10 mg/mL 的胶原

蛋白溶解液, 在 60 °C 的水浴中保持 20 min, 离心, 收集上清液, 以体积比 (1 : 1,  $V/V$ ) 与上样缓冲液混合, 沸水浴 3 min, 与蛋白 Marker 一起上样, 在 120 V 的恒流下进行电泳, 结束后转移电泳胶到染色液 (0.25% 考马斯亮蓝 +10% 乙酸+40% 甲醇) 中染色 1.5 h, 随后转移到脱色液 (75% 乙酸+50% 甲醇) 中脱色过夜。

**扫描电镜观察** 将冻干的样品固定在导电胶上, 经真空喷金处理后, 用扫描电子显微镜观察胶原蛋白的微观结构, 观察不同放大倍数下胶原薄片的形态特征。

### 1.7 数据分析

实验结果使用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 在单因素方差分析的基础上, 采用 Duncan 氏多重比较法进行分析, 重复 3 次, 统计值为 mean±SD, 显著性水平为  $P=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 胶原蛋白的提取效果

不同方法提取胶原蛋白前, 对暗纹东方鲀鱼皮进行预处理, 处理方式如“鱼皮的预处理”中所述, 其中去除杂蛋白和脂肪的方法和预处理中的方法相同, 经提取得到暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白, 图 1 显示了 5 种处理方法对暗纹东方鲀

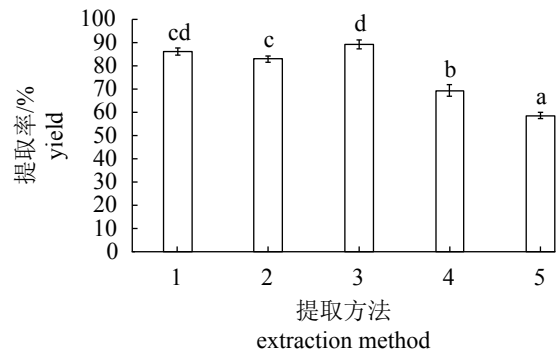


图 1 不同处理方法提取暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的结果

图中不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ); 1. 无花果蛋白酶提取; 2. 木瓜蛋白酶提取; 3. 胃蛋白酶提取; 4. 热水法提取; 5. 酸法提取

Fig. 1 Results of extraction of collagens from *T. fasciatus* skin by different extraction methods

Values with different small letter superscripts mean significant differences ( $P<0.05$ ); 1. ficin extraction; 2. papain extraction; 3. pepsin extraction; 4. hot water extraction; 5. acid extraction

鱼皮胶原蛋白的提取率，酶处理的提取率明显高于热水和酸处理，胶原蛋白提取率的差异通常由不同物种和不同处理方法所导致。热水法处理得到的胶原蛋白变性成为明胶，采用此方法时常常需要考虑利用方向和耗能；酸处理的提取率低于酶处理是因为胶原蛋白端肽链的交联使其在酸性条件下的溶解度降低<sup>[15]</sup>。经过酶处理，裂解了端肽结构，提高了胶原蛋白在酸性条件下的溶解度，所以用酶处理可以提高胶原蛋白的提取率。酶处理法中，木瓜蛋白酶作用化学键较广泛，所以提取率显著低于胃蛋白酶。

热水法提取的胶原蛋白色泽微黄，结构微蓬松，呈紧密棉絮状；酸法提取的胶原蛋白色泽洁白，结构蓬松状、棉絮状；酶法提取的胶原蛋白，提取率高，提取完全，所得结构最蓬松，分层，色泽灰黄，加入活性炭进行吸附可

得到色泽更好的样品。

## 2.2 胶原蛋白的氨基酸组成

氨基酸组成分析是研究胶原蛋白结构的重要方法。5种处理方法提取的胶原蛋白均具有天然胶原蛋白氨基酸组成的基本特征<sup>[16]</sup>，即甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸含量较高，其中甘氨酸含量均最高(表1)，这是因为胶原蛋白多肽链中很长的区段序列是由 Gly-X-Y 氨基酸序列重复而成。作为胶原蛋白中的特征氨基酸，羟脯氨酸能够促进肽链间氢键的形成，氢键能够维持胶原蛋白三螺旋结构的稳定性，与胶原蛋白的热稳定性相关<sup>[17-18]</sup>。羟脯氨酸是由脯氨酸的酶催化生成，与脯氨酸合称亚氨基酸。

5种方法处理得到的暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的氨基酸组成显示出高度的一致性(表1)，说

表1 不同处理方法提取暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的氨基酸含量与组成

Tab. 1 Amino acid composition of collagens from *T. fasciatus* skin by different extraction methods

氨基酸种类 amino acid	酸法提取 acid extraction	热水法提取 hot water extraction	胃蛋白酶提取 pepsin extraction	无花果蛋白酶提取 ficin extraction	木瓜蛋白酶提取 papain extraction
天冬氨酸 Asp	62.21±0.03 <sup>b</sup>	61.87±0.34 <sup>b</sup>	58.27±0.19 <sup>a</sup>	60.95±1.49 <sup>b</sup>	64.63±1.18 <sup>c</sup>
甘氨酸 Gly	222.70±0.35 <sup>c</sup>	221.96±1.13 <sup>c</sup>	204.35±0.19 <sup>b</sup>	221.66±5.21 <sup>c</sup>	172.18±2.69 <sup>a</sup>
谷氨酸 Glu	99.11±0.22 <sup>a</sup>	96.09±0.06 <sup>a</sup>	89.73±0.10 <sup>a</sup>	112.51±23.35 <sup>a</sup>	94.22±1.35 <sup>a</sup>
丙氨酸 Ala	131.16±0.19 <sup>a</sup>	131.32±0.89 <sup>a</sup>	173.91±2.06 <sup>b</sup>	132±2.91 <sup>a</sup>	181.19±2.58 <sup>c</sup>
赖氨酸 Lys	36.65±0.01 <sup>a</sup>	35.90±0.27 <sup>b</sup>	31.27±0.06 <sup>a</sup>	35.99±0.89 <sup>b</sup>	50.49±1.40 <sup>c</sup>
亮氨酸 Leu	26.71±0.04 <sup>b</sup>	26.37±0.75 <sup>b</sup>	23.98±0.03 <sup>a</sup>	25.16±0.66 <sup>ab</sup>	32.59±1.43 <sup>c</sup>
苏氨酸 Thr	26.29±0.03 <sup>a</sup>	25.23±0.51 <sup>a</sup>	25.97±0.02 <sup>a</sup>	25.42±0.76 <sup>a</sup>	30.53±1.56 <sup>b</sup>
缬氨酸 Val	22.23±0.30 <sup>a</sup>	21.44±0.39 <sup>a</sup>	21.49±0.18 <sup>a</sup>	22.50±0.79 <sup>a</sup>	25.34±1.27 <sup>b</sup>
苯丙氨酸 Phe	23.34±0.44 <sup>bc</sup>	23.57±0.51 <sup>c</sup>	20.82±0.24 <sup>a</sup>	22.54±0.37 <sup>b</sup>	24.62±0.10 <sup>d</sup>
异亮氨酸 Ile	9.68±0.19 <sup>ab</sup>	9.21±0.28 <sup>a</sup>	10.33±0.02 <sup>ab</sup>	9.51±0.41 <sup>a</sup>	12.22±2.11 <sup>b</sup>
蛋氨酸 Met	12.72±0.67 <sup>ab</sup>	20.17±0.16 <sup>c</sup>	14.38±0.69 <sup>b</sup>	11.00±0.64 <sup>a</sup>	10.21±1.90 <sup>a</sup>
色氨酸 Trp	-	-	-	-	-
半胱氨酸 Cys	0	0	0	0	0
酪氨酸 Tyr	8.47±0.26 <sup>ab</sup>	9.38±0.70 <sup>b</sup>	8.54±0.01 <sup>ab</sup>	7.53±0.44 <sup>a</sup>	26.91±1.08 <sup>c</sup>
精氨酸 Arg	79.49±0.22 <sup>c</sup>	77.64±0.51 <sup>c</sup>	69.75±0.23 <sup>b</sup>	78.23±1.53 <sup>c</sup>	67.11±1.10 <sup>a</sup>
丝氨酸 Ser	42.51±0.20 <sup>b</sup>	42.45±0.04 <sup>b</sup>	42.38±0.04 <sup>b</sup>	41.27±0.91 <sup>a</sup>	45.69±0.13 <sup>c</sup>
组氨酸 His	9.32±0.07 <sup>b</sup>	8.70±0.10 <sup>ab</sup>	9.21±0.09 <sup>ab</sup>	8.36±0.24 <sup>a</sup>	11.29±0.70 <sup>c</sup>
脯氨酸 pro	116.94±0.12 <sup>c</sup>	117.89±1.19 <sup>c</sup>	96.39±0.96 <sup>b</sup>	113.88±4.39 <sup>c</sup>	81.01±0.82 <sup>a</sup>
羟脯氨酸 Hyp	70.48±0.39 <sup>a</sup>	70.85±0.34 <sup>a</sup>	99.24±1.40 <sup>b</sup>	71.49±1.70 <sup>a</sup>	69.77±2.62 <sup>a</sup>

注：表中数据表示氨基酸残基数占1 000个氨基酸残基数的比例；同行肩标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )；色氨酸在酸水解下被破坏，“-”表示没有色氨酸数值；半胱氨酸含量低，“0”表示其含量低于检出限

Notes: in the table, expressed as residues per 1 000 total amino acid residues; in the same row, values with different small letter superscripts mean significant differences ( $P<0.05$ ), Trp is destroyed by acid hydrolysis, "-" means no Trp value; low content of Cys, "0" means below detection limit

明处理方法对胶原蛋白氨基酸组成并无显著影响。但不同的处理方法对胶原蛋白结构的影响程度不同。热水处理会使胶原蛋白分子中的部分氨基酸被水解, 但对氨基酸含量影响较小, 其中甘氨酸占比为 22.20%, 低于猪、牛皮胶原蛋白甘氨酸 (30%) 的含量, 远低于黑鳃兔头鲀 (*Lagocephalus inermis*)<sup>[5]</sup>(33.4%), 与斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)<sup>[19]</sup> 相似。而酶解会使酶溶性胶原蛋白失去端肽, 切断胶原肽链间的共价交联键, 导致其脯氨酸的含量也低于其他胶原蛋白。酸和热水法处理的结果显著高于酶法处理, 胃蛋白酶处理得到的酶溶性胶原蛋白亚氨基酸含量最高 (195.6/1 000 个残基), 同时 5 种处理方法得到的暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白中未发现 Cys 和 Trp, Met、Tyr、His 和 Ile 含量很低。

### 2.3 胶原蛋白的红外分析

不同处理方法所得的暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的红外光谱图表明, 5 种处理方法所得胶原

蛋白的结构相似, 但不完全相同 (图 2, 表 2), 说明次生结构存在一定差异。所有胶原蛋白样品均具有胶原蛋白红外光谱的特征吸收峰, 即 Amide A、B、I、II 和 III 吸收峰, 与尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)<sup>[20]</sup>、施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*)<sup>[21]</sup> 的研究结果极为相似。

Amide A 产生的吸收峰在 3 400~3 440  $\text{cm}^{-1}$ , 是由 N-H 基团伸缩振动产生。当 N-H 基团的肽段参与氢键的形成, N-H 基团伸缩与氢键形成缔合体时, 会使吸收峰降低 100  $\text{cm}^{-1}$  左右<sup>[9]</sup>。5 种样品在 3 300  $\text{cm}^{-1}$  附近有吸收峰 (表 2, 图 2), 说明 5 种胶原蛋白均有氢键存在。Amide B 的存在说明  $\text{CH}_2$  结构没有被破坏,  $\text{CH}_2$  是三级结构的特征基团, 说明得到的胶原蛋白的三级结构均没有被破坏。

Amide I、Amide II 和 Amide III 带与胶原蛋白的三股螺旋结构紧密相关, 反映出蛋白质肽链骨架结构的重要吸收峰。蛋白质分子内存在大量的肽键, C=O 的伸缩振动会使 Amide I 的

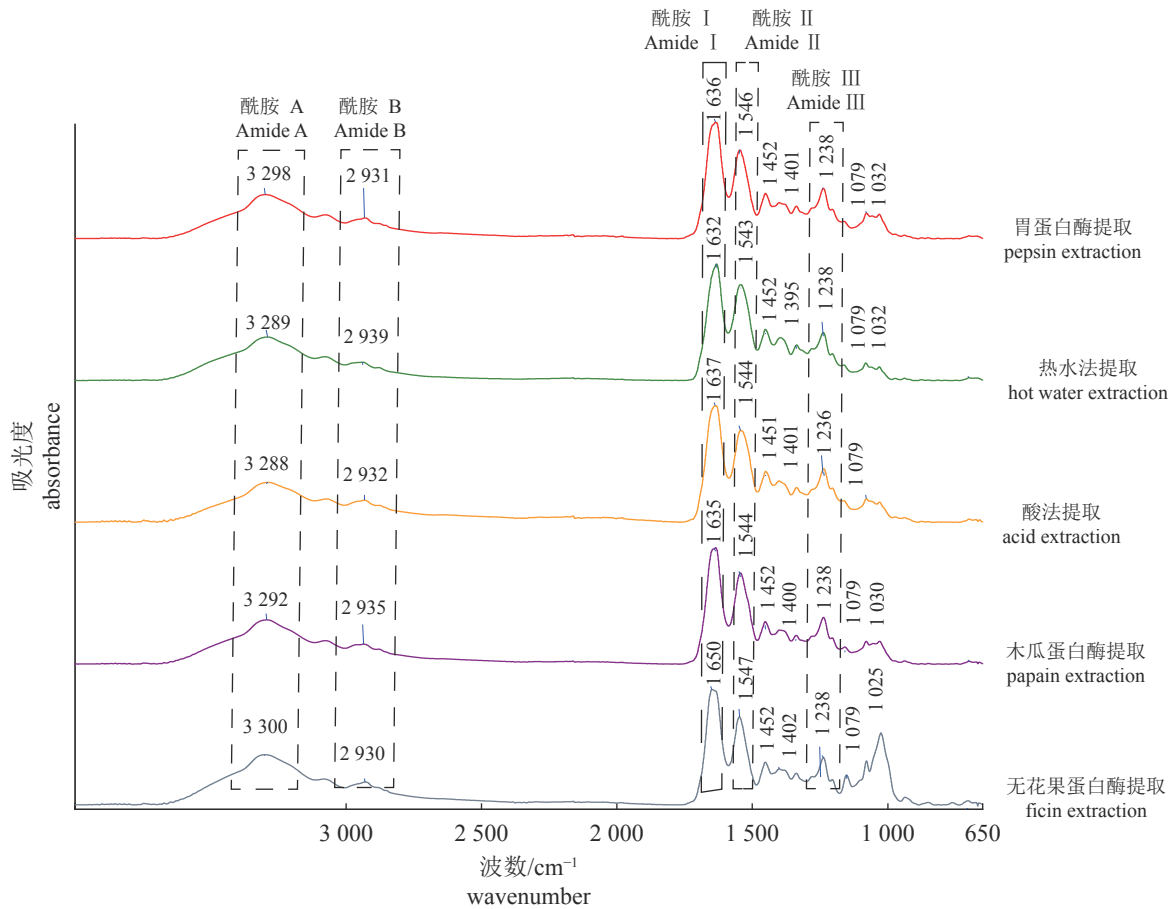


图 2 不同处理方法提取暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectra of collagens from *T. fasciatus* skin by different extraction methods

表 2 不同处理方法提取的暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白红外光谱特征吸收峰的位置和说明

Tab. 2 FTIR spectra peak locations and their assignments of collagens from *T. fasciatus* skin by different extraction methods

光谱区 regions	波数/cm <sup>-1</sup> peak wavenumber					特征基团 assignment
	酸法提取 acid extraction	热水法提取 hot water extraction	胃蛋白酶提取 pepsin extraction	无花果蛋 白酶提取 ficin extraction	木瓜蛋白酶提取 papain extraction	
酰胺A Amide A	3 288	3 289	3 298	3 292	3 300	N—H与氢键缔和
酰胺B Amide B	2 932	2 939	2 931	2 935	2 930	CH <sub>2</sub> 不对称伸缩振动
酰胺 I Amide I	1 637	1 632	1 636	1 635	1 650	C=O伸缩振动
酰胺 II Amide II	1 544	1 543	1 546	1 544	1 547	N—H带结合C—N伸缩振动
	1 451	1 452	1 452	1 452	1 452	CH <sub>2</sub> 弯曲振动
	1 401	1 395	1 401	1 400	1 402	COO—对称伸缩振动
酰胺 III Amide III	1 236	1 238	1 238	1 238	1 238	N—H和C—H弯曲振动, Gly 和Pro残基的—CH <sub>2</sub> 特征振动
	1 079	1 079	1 079	1 079	1 079	C—O伸缩振动
		1 032	1 032	1 030	1 025	

特征吸收峰位于 1 700~1 600 cm<sup>-1</sup> 处<sup>[22]</sup>; Amide II 的吸收峰通常位于 1 600~1 500 cm<sup>-1</sup><sup>[23]</sup>; Amide III 的吸收峰通常位于 1 300~1 200 cm<sup>-1</sup>, Amide III 带的存在可以证明胶原蛋白的三螺旋结构是否保持完整<sup>[24]</sup>。可以看出, 5 种处理方法得到的胶原蛋白均保留了完整的三螺旋结构, 酶处理没有破坏胶原蛋白中具有的三股螺旋结构。无花果蛋白酶处理得到的胶原蛋白的 Amide I、Amide II 和 Amide III 波数均大于其他 4 种处理方法(表 2), 表明其分子规整度高于其他 4 种处理方法得到的胶原蛋白; 热水法得到的胶原蛋白的 Amide I (1 632 cm<sup>-1</sup>) 波数最小, 说明蛋白分子规整度最低。

#### 2.4 胶原蛋白的紫外分析

生色基团—COOH、—CONH<sub>2</sub> 和—C=O 存在于胶原蛋白中, 有很强的紫外吸收特性, 紫外吸收光谱实际上是蛋白质分子各种紫外生色基团加和的结果, 是判断胶原蛋白类型的一个重要标志。I 型胶原蛋白中具有苯环结构的羟脯氨酸和脯氨酸, 使得其中最大紫外吸收峰在 235 nm 附近。

5 种处理方法得到的胶原蛋白均在 235 nm 附近有明显的吸收峰, 符合 I 型胶原蛋白的紫外吸收, 波长均位于 230 nm 左右(图 3), 主要是由肽键—C=O 的 n→π\* 跃迁所贡献, 这是胶原蛋白三螺旋结构的特征吸收峰, 与黑鳃兔头鲀<sup>[5]</sup>、长吻鲀(*Leiocassis longirostris*)<sup>[9]</sup>、中华鲟(*A. sinensis*)<sup>[16]</sup>和鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[25]</sup> 胶原蛋白的研究结果一致。由于胶原蛋白中含有少量的酪氨酸和苯丙

氨酸, 可以在 280 nm 波长处吸收紫外线(表 1), 其中木瓜蛋白酶处理得到的鱼皮胶原蛋白在 280 nm 波长处有比较明显的吸收, 与表 1 中木瓜蛋白酶处理后的氨基酸结果一致, 酪氨酸 (15.53 mg/g) 含量明显高于其他 4 种处理方法。其他 4 种处理方法除了 230 nm 附近的吸收峰外, 无明显吸收峰, 也可说明提取的胶原蛋白含杂蛋白少, 纯度较高<sup>[16]</sup>。图 3 显示, 木瓜蛋白酶、胃蛋白酶和无花果蛋白酶处理得到的胶原蛋白吸光度比酸和热水法处理的高, 说明酶处理能提高胶原蛋白的紫外吸收能力, 且酶解没有破坏其中具有紫外吸收特征的结构。

#### 2.5 胶原蛋白的 SDS-PAGE 分析

暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的 SDS-PAGE 结果中, 可以看到 1 条 β 链和 2 条 α 链(图 4), 可以初步判断暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白属于典型的 I 型胶原蛋白<sup>[26]</sup>, 即包含 α1、α2 和 β 链, 与黑鳃兔头鲀<sup>[5]</sup>、红鳍东方鲀(*T. rubripes*)<sup>[27]</sup> 的结果一致。

经过不同处理方法得到的胶原蛋白分子量分布不同, 热水法处理的鱼皮, 在温度较高的条件下, 胶原蛋白和其他物质可能产生结合, 对蛋白产生了修饰或降解, 形成了弥散的条带, 但和木瓜蛋白酶处理的相比, 未降解成小分子胶原蛋白; 酸法处理和胃蛋白酶处理得到的暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白存在 β 链, β 链是 α 肽链的二聚体, 表示 I 型胶原蛋白的结构保存较完

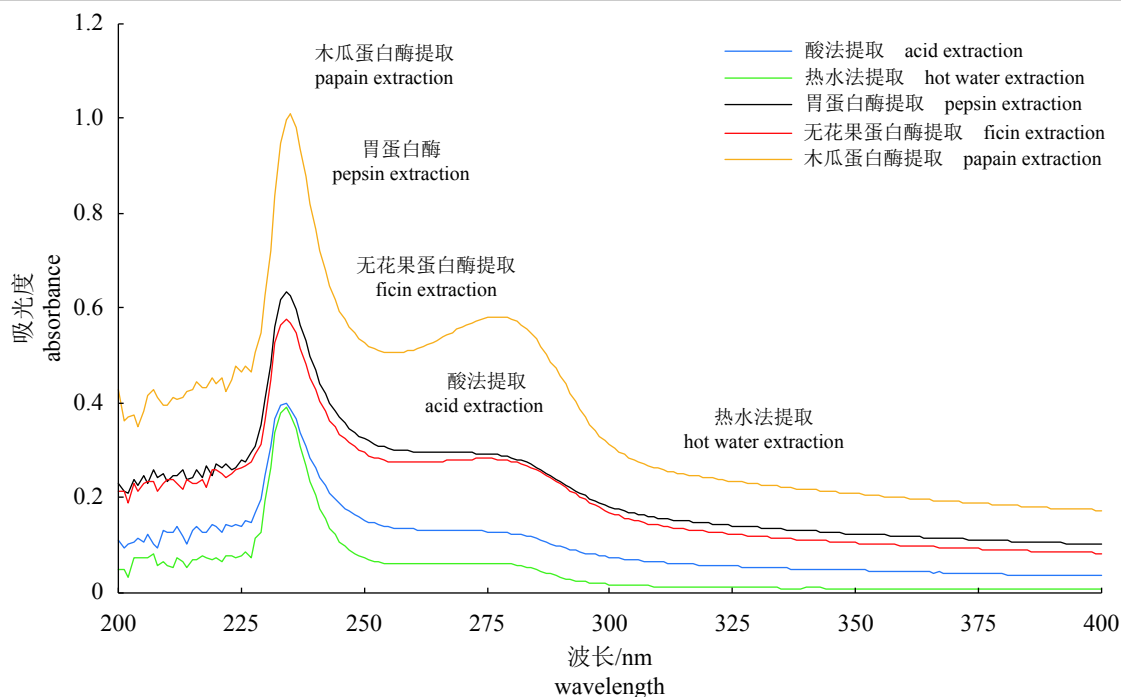


图 3 不同处理方法提取的暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白紫外吸收光谱图

Fig. 3 UV spectra of collagens from *T. fasciatus* skin by different extraction methods

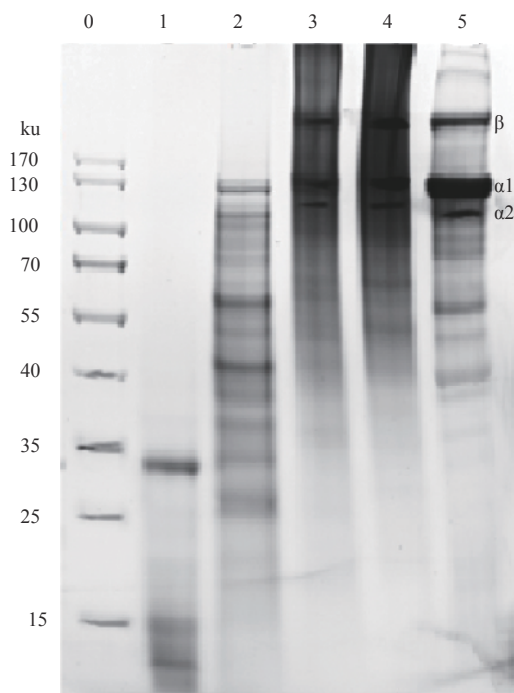


图 4 不同处理方法提取的暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白 SDS-PAGE 图

0. Marker; 1. 木瓜蛋白酶提取; 2. 无花果蛋白酶提取; 3. 酸法提取; 4. 热水法提取; 5. 胃蛋白酶提取

Fig. 4 SDS-PAGE of collagens from *T. fasciatus* skin by different extraction methods

0. Marker; 1. papain extraction; 2. ficin extraction; 3. acid extraction; 4. hot water extraction; 5. pepsin extraction

整; 胃蛋白酶存在  $\alpha$  链, 说明胃蛋白酶作用于胶原蛋白的非螺旋端肽, 而不破坏胶原蛋白结构, 仅促进胶原蛋白从鱼皮中溶解出<sup>[28]</sup>, 3 种酶处理在谱图上有多条小分子蛋白条带, 对应多种小分子蛋白, 是酶在处理过程中使大分子降解成小分子的组分造成的。木瓜蛋白酶处理后得到的胶原蛋白分子较小, 对胶原蛋白影响最大, 呈现出胶原蛋白肽的特性; 红外显示木瓜蛋白酶未破坏胶原蛋白中具有三螺旋结构(图 2), 但条带 1 的分子量明显变小, 说明酶解过程为横向水解暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白并形成胶原蛋白肽。无花果蛋白酶使高分子量的  $\gamma$  链和  $\beta$  链含量大大降低, 产生比胃蛋白酶多的低分子量肽, 说明不同的蛋白酶的作用域可能不同或交联<sup>[23]</sup>。相对于另外两种酶, 胃蛋白酶处理对暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白影响最小, 说明胃蛋白酶是提取酶溶性胶原蛋白的较好选择。

## 2.6 胶原蛋白的扫描电镜分析

将 5 种不同方法所提取的胶原蛋白分别放大 100、250、500 倍观察, 它们的微观结构存在一定的差异(图 5), 但都保留了较完整的纤维结构。物质的空隙率、孔径大小、网络结构以及表面积等, 是其应用于药物输送等生物医学材料的重要参数<sup>[9, 29]</sup>。通过对 5 种不同处理方法得

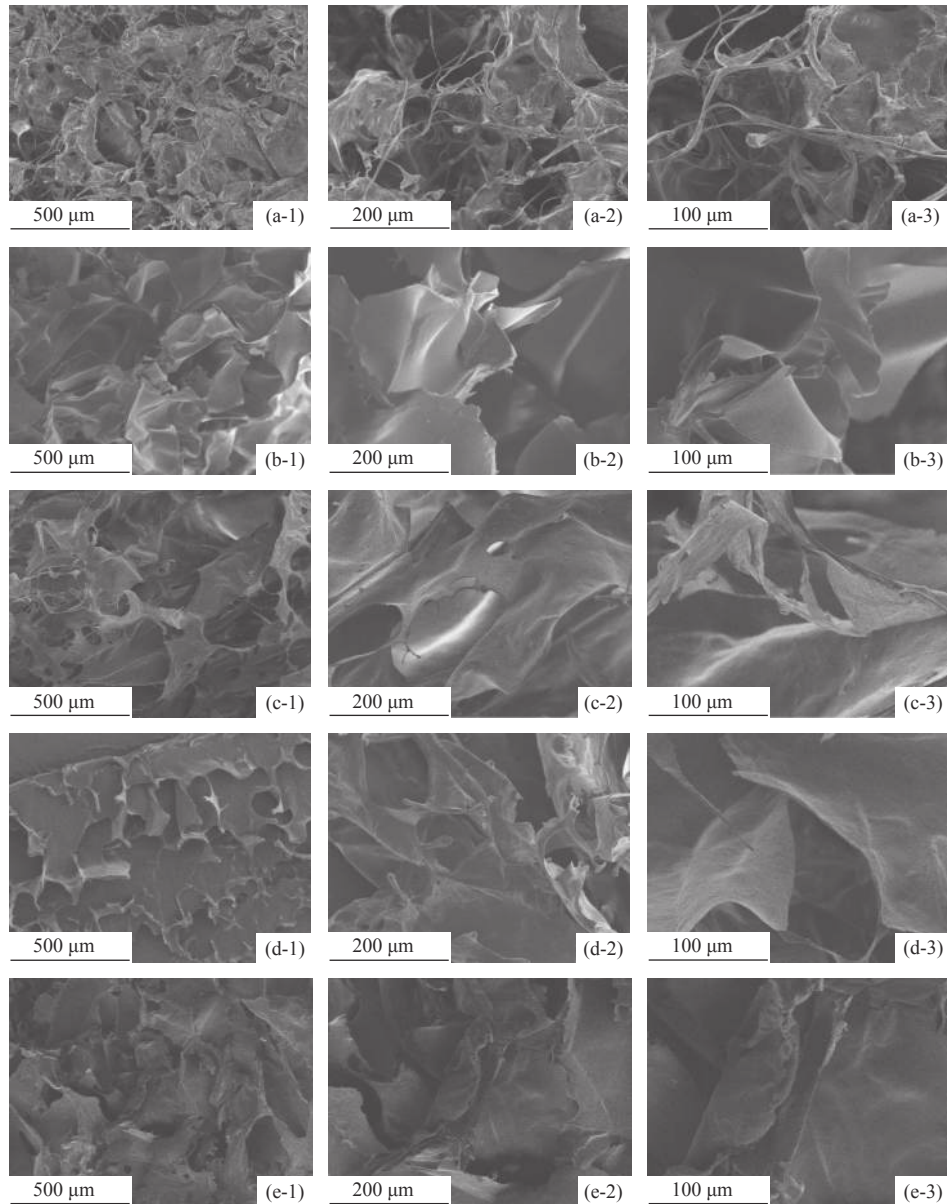


图 5 不同处理方法提取的暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白扫描电镜图

(a) 酸处理; (b) 热水处理; (c) 胃蛋白酶处理; (d) 无花果蛋白酶处理; (e) 木瓜蛋白酶处理

Fig. 5 SEM images of collagens from *T. fasciatus* skin

(a) acid extraction; (b) hot water extraction; (c) pepsin extraction; (d) ficin extraction; (e) papain extraction

到的胶原蛋白的扫描电镜图进行分析, 其中孔径大小的不同可能是由于冻干前浓度不同所导致。酸法处理得到的胶原蛋白, 不显示层状, 连续的很紧密, 呈现出多孔的网状组织, 排列较不规则, 呈复杂纤维状, 表明暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白有很好的保湿性<sup>[29]</sup>; 热水法提取的胶原蛋白, 基本成薄片状结构, 说明热水处理已使胶原蛋白发生变性和交联, 呈现出明胶的凝胶特性<sup>[26]</sup>; 胃蛋白酶提取的胶原蛋白显示网状结构分布不均匀, 同时存在薄片状, 孔径相对酸

法处理大小不一且分布不均, 说明对胶原蛋白的结构有一定的改变; 无花果蛋白酶提取的胶原蛋白显示出排列有序的薄片, 层与层之间比较疏松; 木瓜蛋白酶提取的胶原蛋白呈现出不规则且褶皱的堆积, 对胶原蛋白结构有一定改变, 胶原蛋白的薄片部分被破坏; 5种电镜图对比结果显示, 酸法处理的胶原蛋白的纤维网状结构保留较完整, 较适合作为生物医学材料, 热水处理使胶原蛋白呈现明胶的性质, 3种蛋白酶处理均对暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白结构有一



定的影响。

### 3 讨论

本研究以新鲜暗纹东方鲀鱼皮为对象, 分别采用酸、热水、3 种蛋白酶提取其中的胶原蛋白, 并研究了其胶原蛋白的部分理化特性。酶处理提取率显著高于酸和热水, 其中胃蛋白酶效果最佳, 根据暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白紫外吸收的特征峰和 SDS-PAGE 结果, 初步确认暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白为 I 型胶原蛋白, 得到的胶原蛋白在 235 nm 左右有明显的吸收峰。不同的酶因其作用位点不同, 因此对鱼皮中胶原蛋白的提取有不同的影响。酸法和胃蛋白酶处理的胶原蛋白纯度较高, 热水法处理的胶原蛋白呈现明胶的性质。红外光谱显示, 5 种方法处理后, 都出现了 Amide A、B、I、II 和 III 特征吸收峰, 说明都存在三螺旋结构; 扫描电镜结果显示, 酸法处理的胶原蛋白的纤维网状结构保留较完整, 比较适合作为生物医学的运载材料。

综上所述, 暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白为 I 型胶原蛋白, 酸法和胃蛋白酶提取效果最佳, 酸法对鱼皮的胶原蛋白结构保留最完整, 但提取率低于酶法。酶法选用的不同酶有不同的酶切位点, 产生的降解效果不同, 胃蛋白酶对其胶原蛋白结构保留较完整, 优于木瓜蛋白酶和无花果蛋白酶, 木瓜蛋白酶处理后得到具有三股螺旋结构的小分子胶原蛋白分子。5 种处理方法得到的胶原蛋白的结构特征和功能性质各有差异, 可为高值化利用暗纹东方鲀, 同时为胶原蛋白新产品的开发提供理论依据。

#### 参考文献 (References):

- [1] 蔡路昀, 马帅, 曹爱玲, 等. 不同部位鳎鱼皮酸溶性胶原蛋白的提取及其特性[J]. *食品科学*, 2017, 38(11): 52-58.
- Cai L Y, Ma S, Cao A L, *et al.* Extraction and characterization of collagens from different skins of flounder (*Pleuronichthys cornutus*)[J]. *Food Science*, 2017, 38(11): 52-58(in Chinese).
- [2] Wu X S, Cai L Y, Cao A L, *et al.* Comparative study on acid-soluble and pepsin-soluble collagens from skin and swim bladder of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(3): 815-821.
- [3] Sinthusamran S, Benjakul S, Kishimura H. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*)[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(4): 2435-2441.
- [4] Wang J, Pei X L, Liu H Y, *et al.* Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 544-550.
- [5] Iswariya S, Velswamy P, Uma T S, *et al.* Isolation and characterization of biocompatible collagen from the skin of puffer fish (*Lagocephalus inermis*)[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2018, 26(5): 2086-2095.
- [6] 郭芮, 张晓梅, 苏红, 等. 河豚鱼的营养价值及副产物可利用性的研究现状[J]. *食品科技*, 2018, 43(3): 113-116.
- Guo R, Zhang X M, Su H, *et al.* The research status of nutrition value and by-products utilization of puffer fish[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(3): 113-116(in Chinese).
- [7] 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. 2018 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- Fishery Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China. National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical book 2018[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019(in Chinese).
- [8] 任俊凤, 任婷婷, 朱薇薇. 河豚鱼皮胶原蛋白肽的提取及其抗氧化活性的研究[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(1): 77-83.
- Ren J F, Ren T T, Zhu B W. Studies on the extraction and antioxidant activity of the collagen peptide from pufferfish (*Fugu rubripes*) skin[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2009, 9(1): 77-83(in Chinese).
- [9] 温慧芳, 陈丽丽, 白春清, 等. 基于不同提取方法的鲷鱼皮胶原蛋白理化性质的比较研究[J]. *食品科学*, 2016, 37(1): 74-81.
- Wen H F, Chen L L, Bai C Q, *et al.* Comparative study on physical and chemical properties of collagens obtained by different extraction methods from the skin of the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris*[J]. *Food Science*, 2016, 37(1): 74-81(in Chinese).

- [10] Kaewdang O, Benjakul S, Kaewmanee T, *et al.* Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)[J]. *Food Chemistry*, 2014, 155: 264-270.
- [11] Nagai T, Araki Y, Suzuki N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*)[J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(2): 173-177.
- [12] 从浩. 利用罗非鱼和鲶鱼及其副产物加工鱼糜凝胶食品的技术研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.  
Cong H. Research on processing surimi gel food using tilapia, channel catfish and their by-products[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2012(in Chinese).
- [13] Su X R, Sun B, Li Y Y, *et al.* Characterization of acid-soluble collagen from the coelomic wall of *Sipunculida*[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(8): 2190-2194.
- [14] Jeevithan E, Wu W H, Wang N P, *et al.* Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(10): 1767-1777.
- [15] Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85(7): 1203-1210.
- [16] 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.  
Yang L, Zhao Y, Lu L, *et al.* Isolation and characterization of collagens from the skin of sturgeon[J]. *Food Science*, 2013, 34(23): 41-46(in Chinese).
- [17] Shoulders M D, Raines R T. Collagen structure and stability[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(1): 929-958.
- [18] Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, *et al.* Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): characteristics and effect of pepsin hydrolysis[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(2): 500-507.
- [19] 吴缙, 陈舜胜. 选择不同提取剂制备斑点叉尾鲶鱼皮胶原蛋白的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(9): 321-325.  
Wu T, Chen S S. Study on different extraction methods of collagen from channel catfish skin with different solutions[J]. *Food Science*, 2008, 29(9): 321-325(in Chinese).
- [20] 廖伟, 夏光华, 李川, 等. 尖吻鲈鱼鳞和鱼皮胶原蛋白的提取及其理化特性分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(1): 36-41.  
Liao W, Xia G H, Li C, *et al.* Extraction and characterization of collagen from scales and skin of Asian seabass[J]. *Food Science*, 2018, 39(1): 36-41(in Chinese).
- [21] Wang L, Liang Q F, Chen T T, *et al.* Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 38: 104-109.
- [22] Zhu B W, Dong X P, Zhou D Y, *et al.* Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from sea cucumber *Stichopus japonicus*[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 28(1): 182-188.
- [23] Ahmad M, Benjakul S. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*)[J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(3): 817-824.
- [24] Liu D S, Liang L, Regenstein J M, *et al.* Extraction and characterization 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.
- [25] 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.
- [26] 张强, 王倩倩, 陆剑锋, 等. 不同方法提取鲢鱼皮胶原蛋白的理化特性比较[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(5): 104-110.  
Zhang Q, Wang Q Q, Lu J F, *et al.* Comparison of physical and chemical characteristics of collagen from silver carp skin using different extraction methods[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 104-110(in Chinese).
- [27] 万刚涛, 程民杰, 黄亚东, 等. 红鳍东方鲀鱼皮胶原蛋白的提取及主要理化性质的研究[J]. *天津农学院学报*, 2015, 22(2): 6-10.  
Wan G T, Cheng M J, Huang Y D, *et al.* Extraction and physicochemical characteristics of collagen from skin of *Takifugu rubripes*[J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2015, 22(2): 6-10(in Chinese).
- [28] 王川, 李燕, 马志英, 等. 几种酶法从猪皮中提取胶原蛋白的对比研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 201-204.  
Wang C, Li Y, Ma Z Y, *et al.* Comparison study on Chinese water products association sponsored by China Society of Fisheries

- extraction of collagen from porcine skin by different enzymes[J]. *Food Science*, 2007, 28(1): 201-204(in Chinese).
- [29] Tamilmozhi S, Veeruraj A, Arumugam M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*)[J]. *Food Research International*, 2013, 54(2): 1499-1505.

## Extraction and characteristics of collagens from the skin of puffer fish (*Tetrodontiformes fasciatus*)

ZHOU Rui<sup>1,2</sup>, LI Ruonan<sup>1,2</sup>, ZHOU Lisha<sup>1,2</sup>, QIU Tingting<sup>1,2</sup>,  
WANG Jingyu<sup>1,2</sup>, TAN Xiao<sup>1,2</sup>, CHEN Shunsheng<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-product Processing & Preservation,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to enhance the added value of *Tetrodontiformes fasciatus* and investigate the effects of different preparations on the extracted collagen from skin of *T. fasciatus*, collagens extracted from the skin of *T. fasciatus* by acid, hot water, pepsin, papain, and ficin were used to evaluate chemical and structural properties, respectively. In this study, characterization of collagen from *T. fasciatus* skin in term of the extraction yield, amino acid composition, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, ultraviolet spectroscopy(UV), scanning electron microscopy(SEM) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was studied. Results showed that the extraction yield of collagen obtained by pepsin was the highest, the amino acid compositions were similar and the contents were different; the content of proline in collagen extracted by 3 enzymes is significantly lower than that of collagen extracted by acid and hot water. FTIR showed collagen obtained by the five extraction methods had Amide A, Amide B, Amide I, Amide II and III, and confirmed the triple helical structure of the collagens. UV showed a strong absorption peak around 235 nm, indicating a typical collagen when combined with FTIR. SDS -PAGE analysis confirmed that collagen in skin of *T. fasciatus* was type I collagen, and preparations by acid and pepsin retained  $\beta$ ,  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains of collagen, while papain disassociate collagen and obtained protein with low molecular mass; SEM showed that extracted collagen by acid was most suitable for biomedical materials. Therefore, different extraction methods resulted in different chemical and structural properties of fish skin collagens. The molecular weight distribution of collagen extracted by different enzymes had obvious differences. According to research needs, different preparations can be selected to develop collagen products.

**Key words:** *Tetrodontiformes fasciatus*; skin; collagen; extraction; physicochemical properties

**Corresponding author:** CHEN Shunsheng. E-mail: sschen@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31471685)