

文章编号: 1674-5566(2023)06-1144-11

DOI: 10.12024/jsou.20221104035

日本鳗鱼皮胶原蛋白提取工艺优化及理化性质分析

李晓敏^{1,2}, 杨晨宇^{1,2}, 邓云³, 陶宁萍¹, 李立^{1,2}, 邱伟强¹, 金银哲^{1,2}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 食品热加工工程中心, 上海 201306; 3. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 利用响应面法对日本鳗鱼(*Anguilla japonica*)皮胶原蛋白的提取工艺进行优化, 并对其理化性质和致敏性进行研究。采用酸酶浸提法提取鱼皮胶原蛋白, 基于单因素试验, 以料液比、提取液浓度和提取时间作为考察因素, 以胶原蛋白得率为指标, 得到最佳提取工艺: 料液比 1:30 g/mL, 提取液浓度 0.6 mol/L, 提取时间 48 h, 胶原蛋白得率为 32.89%。将优化后得到的胶原蛋白进行理化性质表征分析, SDS-PAGE 结果表明, 胶原蛋白含有 5 个条带, 属于 I 型胶原蛋白; 必需氨基酸和药用氨基酸占比分别为 19.61% 和 11.04%; 傅里叶红外光谱 (FTIR) 光谱显示其保留了完整的三螺旋结构; 在 230 nm 处有最大的紫外吸收峰; 由扫描电镜 (SEM) 显示胶原蛋白的微观结构呈现出纤维状结构; 胶原蛋白的热转变温度和热变性温度分别为 38.5 和 28.3 °C; 酶联免疫吸附反应 (ELISA) 和模拟胃肠液实验可知胶原蛋白具有一定的致敏原性, 为鳗鱼皮胶原蛋白的进一步研究提供理论基础。

关键词: 日本鳗鱼皮; 胶原蛋白; 酸酶浸提法; 响应面分析; 提取工艺; 理化性质; 致敏性

中图分类号: TS 254.9 **文献标志码:** A

日本鳗鱼 (*Anguilla japonica*) 又称为河鳗、白鳗, 是一种外观类似于长条蛇形, 但无鳞的洄游鱼类, 喜暗怕光, 常隐居于洞穴、泥沙中, 以小鱼、虾等水生生物为食^[1]。根据粮农组织的报告, 世界鳗鱼的产量和出口量已从 1990 年的峰值约 20 万 t, 逐渐下降到 2019 年的 17 万 t。但在过去十年中, 中国一直是鳗鱼的主要出口国, 占有出口的 64%。在过去 10 年中, 日本已成为最大的鳗鱼进口国, 占全球鳗鱼进口量的 70%^[2-3]。目前, 关于鳗鱼的研究主要集中在养殖技术、基础生物学性能等方面, 而关于日本鳗鱼皮中胶原蛋白的提取工艺优化、理化性质及致敏性方面, 还有待进一步的研究。

胶原蛋白是细胞外基质的主要成分, 因其具有许多独特的生理生化特性, 如成纤维性能、营养性、高生物降解性、止血性和良好的生物相容性等, 被广泛应用于生物医学材料、临床治疗、给药载体、组织工程和食品工程等行业^[4-5]。水

产动物, 如富含胶原蛋白的鱼皮、鱼骨、鱼鳞, 正逐渐成为陆生动物胶原蛋白的替代品。温慧芳等^[6]比较了碱法、盐法、热水法、酸法和酶法提取的鲷鱼皮胶原蛋白的理化性质, 发现不同的提取方法对胶原蛋白的氨基酸组成、流变学性质、热变性温度及微观结构有不同的影响。王正云等^[7]利用超声波辅助酶法提取青鱼皮胶原蛋白, 通过正交试验和方差分析对提取工艺进行优化。结果表明, 最佳提取条件下胶原蛋白的提取率达 45.3%。陈丽丽等^[8]利用乙酸、乳酸、柠檬酸提取鲷鱼胶原蛋白, 胶原蛋白提取率影响程度是乙酸 > 乳酸 > 柠檬酸, 乙酸的提取率为 38.44%。GOVINDHARAJ 等^[3]提取海鳗皮衍生的胶原生物材料, 并将其与藻酸盐水凝胶结合用于 3D 打印, 以检查干细胞的生物相容性和增殖, 含有胶原蛋白的支架显示出优异的 3D 打印能力和生物相容性。2001 年, 日本学者 HAMADA 等^[9]提出鱼类胶原蛋白是一种新型的过敏原。罗非鱼皮胶原蛋

收稿日期: 2022-11-30 修回日期: 2023-05-18

基金项目: 东海渔业特色资源加工和生物提取多元高值利用与应用示范项目(2020YFD0900905)

作者简介: 李晓敏(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品热加工。E-mail: xml1117@163.com

通信作者: 金银哲, E-mail: yzjin@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

白及亚基均能与过敏患者血清发生特异性IgE反应^[10]。来自大眼金枪鱼的胶原蛋白通过免疫杂交和抑制性酶联免疫吸附试验(ELISA)被证明是一种鱼类过敏原,也是许多鱼种共同的过敏原^[11]。KOBAYASHI等^[12]认为,胶原蛋白的T细胞表位可能对蛋白分解酶的消化有抵抗力。因此,鳗鱼胶原蛋白可以诱发易过敏个体的过敏反应。

鳗鱼皮中含有的粗蛋白为 $12.49\% \pm 0.86\%$,胶原蛋白含量占总蛋白含量的70%以上,是一种潜在的胶原蛋白资源。从鱼皮中提取胶原蛋白具有以下产业意义:(1)创造就业机会:提取胶原蛋白需要进行多道工序和技术处理,涉及到原料采购、加工、生产等多个环节,因此可以创造相关产业链上的就业机会,促进当地经济发展。(2)提高鱼加工利用率:鱼皮是鱼加工过程中的副产品,提取其中的胶原蛋白可以实现废物资源化利用,提高鳗鱼的加工利用率,减少资源浪费和环境污染。(3)从鳗鱼皮中提取的胶原蛋白可以拓展相关产品的应用领域,增加产品的附加值和市场竞争能力。(4)促进相关产业链协同发展:从鱼皮中提取胶原蛋白需要涉及到多个产业链的企业和机构,如鱼养殖、加工、胶原蛋白提取、产品开发等,可以促进产业链上不同的企业和机构之间的协同发展,推动整个产业的发展。

本研究以日本鳗鱼皮为研究对象,利用响应面对酸酶浸提法提取鳗鱼皮胶原蛋白的工艺进行优化分析,在最佳提取条件下提取鳗鱼皮胶原蛋白后,通过SDS-PAGE、氨基酸含量、FTIR、紫外光谱和SEM对胶原蛋白的结构特性进行表征;通过差式扫描量热(DSC)、黏度和热变性分析表征胶原蛋白的热稳定性;通过酶联免疫吸附实验和模拟胃肠液表征胶原蛋白的致敏性,为鳗鱼皮胶原蛋白的潜在应用提供数据参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

实验用鳗鱼产于浙江绍兴,购买于上海南汇新城镇芦潮港海鲜市场。取样时间为2021年9—12月,共采集鳗鱼样品8尾,平均体质量为 $(1\ 950 \pm 25)$ g,体长为 (72.3 ± 1.3) cm。

主要试剂:氢氧化钠、冰醋酸、氯化钠、胃蛋

白酶(386 U/mg)、正丁醇、乙醇,上海麦克林生物科技有限公司;三色预染蛋白Marker、5×蛋白上样缓冲液(含DTT)、考马斯亮蓝染色液和脱色液、电泳缓冲液(10×)、BeyoGel™ SDS-PAGE预制胶(Tris-Gly,4%~12%,12孔),四川爱奇生物科技有限公司;96孔酶标板、TMB显色剂、羊抗人IgG-HRP、羊抗人IgE和羊抗人IgG二抗,上海赫澎生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

主要仪器与设备:真空冷冻干燥机(Minifast 04),北京松源华兴科技有限公司;日立热场发射扫描电镜(SU5000)、日立全自动氨基酸分析仪(LA8080),日本东京日立制造所;低温离心机(Z326K),德国哈默股份公司;电泳仪(DYCZ-25E),北京市六一仪器厂;傅里叶变换红外光谱仪(Thermo IS 10)、全自动酶标仪(Multiskan Go),美国赛默飞世尔科技有限公司;紫外分光光度计(UV-1800),日本岛津公司;差式扫描量热仪(DSC8500)、pH仪(MP 220),上海梅特勒托利多国际贸易有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酸酶浸提法提取鳗鱼皮胶原蛋白

鳗鱼皮胶原蛋白提取具体操作步骤见图1。

1.3.2 单因素试验

按照1.3.1节描述的方法从鳗鱼皮中提取胶原蛋白。称取4 g鱼皮,以料液比1:30(w/v)、乙酸提取液浓度0.6 mol/L、浸提时间48 h为基本实验条件,测定料液比(1:20、1:25、1:30、1:35和1:40)、提取液浓度(0.2、0.4、0.6、0.8和1 mol/L)和提取时间(24、36、48、60和72 h)对胶原蛋白得率的影响。

1.3.3 响应面试验

根据单因素结果,用Design Expert 8.0.6软件进行响应面分析,对鳗鱼皮胶原蛋白得率进行二次多项式回归拟合,得出鳗鱼皮胶原蛋白的最佳提取工艺。因素水平设计见表1。

1.3.4 胶原蛋白得率计算

鳗鱼皮胶原蛋白得率的计算公式如下:

$$X = M_1 / M_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中: X 为胶原蛋白的得率,%; M_1 为冻干后胶原蛋白的质量,g; M_2 为鳗鱼皮干基的质量,g。

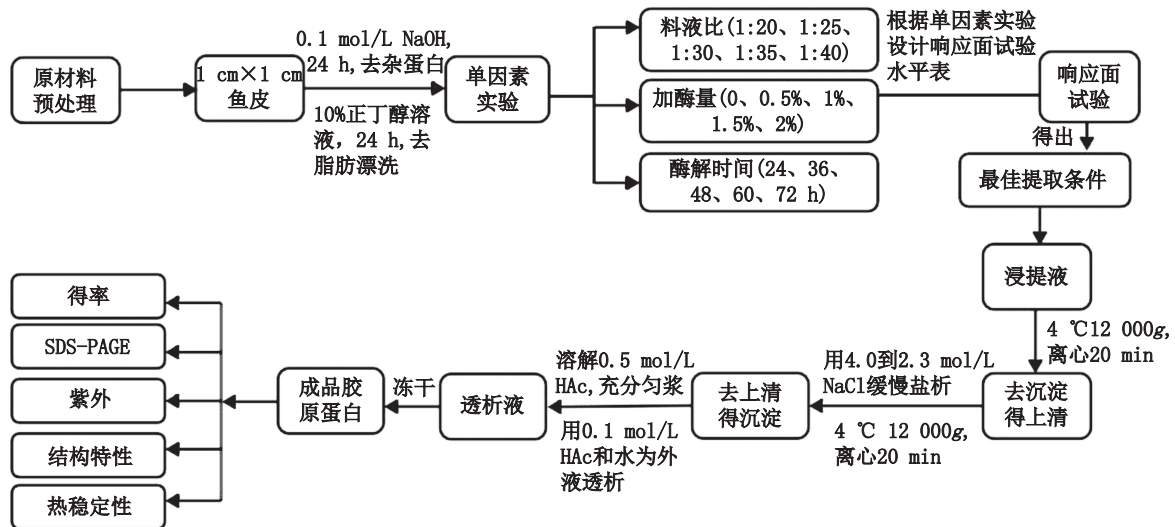


图1 酸酶浸提法提取鳗鱼皮胶原蛋白的工艺优化流程图

Fig. 1 Process optimization flow chart for extracting collagen from eel skin by acid enzyme extraction

表1 Box-Behnken 实验因素水平
Tab. 1 Box-Behnken experimental factor level

水平 Level	因素 Factor		
	A: 料液比(w/v) Material to liquid ratio	B: 提取时间 Extraction time/h	C: 提取液浓度 Extract concentration/ (mol/L)
-1	1:25	36	0.4
0	1:30	48	0.6
1	1:35	60	0.8

1.3.5 SDS-PAGE

取5 mg 胶原蛋白进行预处理,取10 μL 的蛋白溶液上样到预制胶,进行电泳操作前设定参数:前20 min电压为80 V,随后用100 V的电压直到电泳结束。用分子量为20~250 ku的Marker来估计蛋白质的分子量。

1.3.6 氨基酸组成

取5 mg 胶原蛋白加入到水解管中,同时加入15 mL 盐酸溶液和3滴苯酚。水解22 h后,冷却至室温,将水解液过滤到50 mL的容量瓶中。取1 mL加入试管中进行减压干燥,加1 mL蒸馏水,直至蒸发完,干燥后加入柠檬酸钠溶液,通过0.22 μL 的水滤膜后置于进样瓶中,在超高速氨基酸自动分析仪上测量。

1.3.7 傅里叶变换红外光谱

取3 mg 蛋白样品与100 mg 溴化钾研磨成粉末,放入真空模具中,产生1个13 mm \times 1 mm的透明圆盘。在FTIR光谱仪上进行扫描,波长为4 000~500 cm^{-1} ,并使用基线法计算每个峰的吸收强度。

1.3.8 紫外全波长扫描

将2 mg 蛋白样品溶解到0.6 mol/L 乙酸溶液中,常温下用紫外分光光度计进行中速扫描,波长范围为190~400 nm,波长间隔2 nm。

1.3.9 扫描电镜

称量5 mg 胶原蛋白样品,上样在1个标准的SEM样品盘上。使用自动精细镀膜机施加金离子并进行镀膜。所有的照片都是在1 000 \times 和5 000 \times 的放大倍率下获得的。

1.3.10 差示扫描量热仪(DSC)

取6 mg 胶原蛋白精确地称重到1个铝锅中并密封。以空坩埚为对照,样品坩埚保持在10 $^{\circ}\text{C}$ 下1 min,然后在20~50 $^{\circ}\text{C}$ 的基本斜坡速率0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 下扫描测定胶原蛋白变性温度。

1.3.11 黏度和热变性分析

将5 mg 蛋白溶解在0.6 mol/L 乙酸溶液中,在25~50 $^{\circ}\text{C}$ 下测量鳗鱼皮胶原蛋白通过毛细管所需的时间。特性黏度 η_{sp} 和比浓黏度 η_{re} 计算公式^[13]如下:

$$\eta_{\text{sp}} = (t - t_0) / t_0 \quad (2)$$

$$\eta_{\text{re}} = \eta_{\text{sp}} / C \quad (3)$$

式中: t 和 t_0 分别为胶原蛋白溶液和乙酸溶液通过毛细管所需的时间,min; C 为0.01。

1.3.12 酶联免疫吸附实验和模拟胃肠液实验

IgE(免疫球蛋白E)结合能力测定和IgG(免疫球蛋白G)结合能力测定被用来评估和分析胶原蛋白的过敏性^[14]。

(1) IgE 检测

对于IgE测试(使用来自鳗鱼过敏患者的5

份血清样本),一抗和二抗分别为 100 μL 人血清(1:20, v/v PBST 稀释液)和山羊抗人 IgE-HRP(1:2 500, v/v)。

实验过程:使用由 0.29% 的 NaHCO_3 和 0.16% 的 Na_2CO_3 组成的涂层溶液将胶原蛋白(每孔 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)涂在 96 孔聚苯乙烯板。在 4 $^\circ\text{C}$ 下包被过夜后,在洗板机上用 PBST 清洗 3 次。然后用含有 5% 脱脂牛奶的 PBST(每孔 200 μL)在 37 $^\circ\text{C}$ 下阻断非特异性位点 2 h。用 PBST 洗板后,加入 100 μL 人血清,然后在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 2 h。最后,加入 100 μL TMB 试剂进行显色,用 H_2SO_4 停止反应,在 450 nm 处测吸光度值。

(2) IgG 检测

对于 IgG 检测,一抗和二抗分别为 100 μL 人血清(1:10 000 的 PBST 稀释液, v/v)和 100 μL 山羊抗人 IgG-HRP PBST 溶液(1:15 000, v/v)。

SGF 的制备遵循美国药典标准^[15],使用 1 mg/mL 的样品和 0.32 mg/mL 的胃蛋白酶(386 U/mg)溶液。消化反应系统的溶液总体积为 1 mL,胃蛋白酶与胶原蛋白的比例为 1:100(w/w),反应在 37 $^\circ\text{C}$ 下进行。反应前将酶在水浴锅中预热 10 min,加入样品后,然后在 0、1、2、5、15、30、60 和 90 min 取出 100 μL 反应液,加入终止液以终止反应。在体外对胶原蛋白进行 SGF 消化(R-SGF)后,获得水解物用于后续实验。

模拟胃肠液(SIF)是按照美国药典标准^[15]制备的,使用质量浓度为 1 mg/mL 的胶原蛋白和含有 0.1 mg/mL 胰蛋白酶(386 U/mg)的 0.05 mol/L KH_2PO_4 溶液。消化反应体系的溶液总体积为 1 mL,胰蛋白酶与被测蛋白的比例为 1:300(w/w),反应在 37 $^\circ\text{C}$ 下进行。在反应前,将酶预热 10 min。然后在 0、1、2、5、15、30 和 60 min,取出 100 μL 的反应溶液,将其放在沸水中加热 5 min 以终止反应。在对胶原蛋白进行 SIF 消化(R-SIF)后,获得水解物用于后续实验。

1.4 数据分析

采用 Excel 2016、SPSS Statistics 22、Design expert 11.0、Origin 2019b 软件对实验中的相关图表、单因素试验和响应面进行分析。

2 结果与讨论

2.1 鳗鱼皮的基本营养成分

如表 2 所示,鳗鱼皮含有丰富的营养,含量最

丰富的是水分,为 $69.34\% \pm 1.35\%$;其次是粗蛋白质,含量为 $16.61\% \pm 0.63\%$ 。胶原蛋白的含量占粗蛋白含量的 74.8%,因此鳗鱼皮胶原蛋白可作为一种较好的胶原蛋白的来源。

表 2 鳗鱼皮的基本营养成分和胶原蛋白含量
Tab. 2 Basic nutrient and collagen

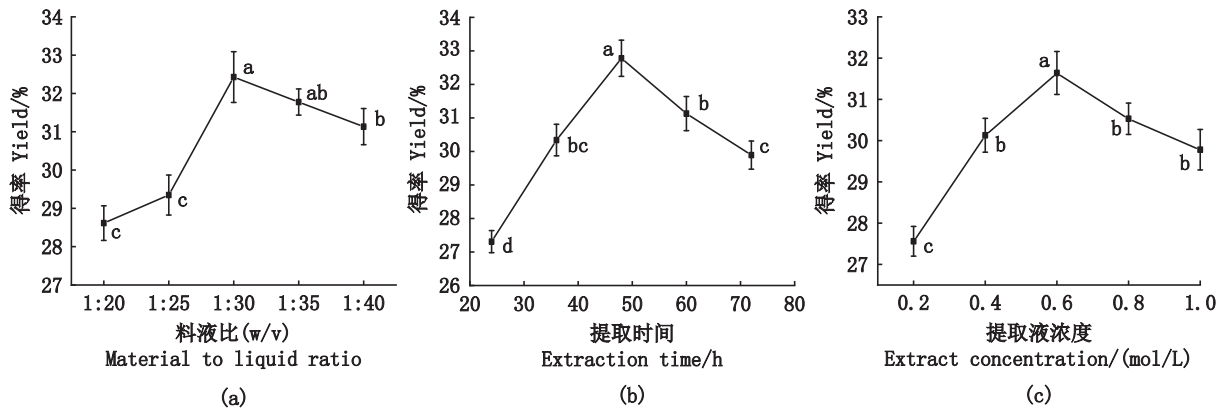
部位 Parts	content of eel skin					%
	水分 Moisture	粗脂肪 Crude fat	粗蛋白 Crude protein	灰分 Ash	胶原蛋白 Collagen	
鳗鱼皮 Eel skin	69.34± 1.30	12.49± 0.86	16.61± 0.60	2.56± 0.14	12.45± 0.31	

2.2 单因素试验提取胶原蛋白

图 2a 显示了不同料液比下胶原蛋白的得率。随着提取溶剂量的增加,溶质不断被溶解,且在料液比为 1:30(w/v)时,胶原蛋白得率有最大程度的提高,最大得率为 32.41%,之后溶剂量继续增加,但胶原蛋白得率反而下降。与淑英等^[16]从鳕鱼皮中提取胶原蛋白的结果类似。因此,在本实验中,选择料液比为 1:30。

胃蛋白酶主要作用于胶原蛋白端肽区的苯丙氨酸和酪氨酸,不破坏胶原蛋白的三螺旋结构。不同提取时间对应的胶原蛋白得率如图 2b 所示。当提取时间较短时,底物相对过剩,导致酶与底物的接触不足,因而提取率低,胶原蛋白不能完全提取而造成损失。随着时间的延长,鱼皮与酶解液进行充分结合,加快了反应速度,使得胶原蛋白得率随酶解时间的延长而提高。但当胶原蛋白得率提高到 32.78% 时,再延长酶解时间,胶原蛋白会被过度酶解而产生短肽,从而破坏三螺旋结构的完整性,使其得率下降,与前人的研究^[17]相似。因此,从鱼皮被充分酶解和节省时间的角度出发,选择提取时间为 48 h。

如图 2c 所示,在 0.6 mol/L 之前,胶原蛋白得率随提取液浓度的增加而增加,最大得率为 31.65%;在 0.6 mol/L 之后,胶原蛋白的得率会随着提取液浓度增加而下降($P < 0.05$)。提取液浓度过高会导致胶原蛋白变性,使其得率降低,与前人的研究^[18]相似。不同物料胶原蛋白的特性不同,结合单因素试验的结果,本实验选择 0.6 mol/L 的提取液浓度作为最佳提取液浓度。



图中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Different letters in the figure indicate significant differences ($P < 0.05$).

图2 不同料液比(a)、提取时间(b)、提取液浓度(c)对鳗鱼皮胶原蛋白得率的影响

Fig. 2 Effects of different material to liquid ratios (a), extraction time (b), and extract concentrations (c) on the yield of collagen from eel skin

2.3 鳗鱼皮胶原蛋白的提取优化实验

2.3.1 响应面优化

根据 Box-Behnken 试验设计方案,将胶原蛋白得率(Y)作为响应值,料液比(A)、提取时间(B)和提取液浓度(C)等3个因素作为自变量,试验设计结果见表3。

表3 响应面试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of response surface experiment

组别 Group	A:料液比 (w/v) Material to liquid ratio	B:提取 时间 Extraction time/h	C:提取液浓度 Extract concentration/ (mol/L)	得率 Yield/%
1	1:25	36	0.6	29.38 ± 0.49
2	1:30	48	0.6	32.42 ± 0.38
3	1:25	48	0.4	28.62 ± 0.74
4	1:30	36	0.8	28.92 ± 0.52
5	1:30	48	0.6	32.89 ± 0.48
6	1:30	48	0.6	32.76 ± 0.59
7	1:35	48	0.4	29.54 ± 0.23
8	1:25	60	0.6	30.75 ± 0.64
9	1:30	48	0.6	32.13 ± 0.53
10	1:30	48	0.6	32.36 ± 0.51
11	1:30	60	0.4	28.45 ± 0.82
12	1:35	48	0.8	31.82 ± 0.35
13	1:25	48	0.8	29.76 ± 0.67
14	1:30	36	0.4	28.02 ± 0.44
15	1:35	60	0.6	31.52 ± 0.57
16	1:30	60	0.8	29.93 ± 0.36
17	1:35	36	0.6	30.45 ± 0.62

2.3.2 实验数据处理分析

对表4中的数据进行拟合得到回归方程: $Y =$

$32.51 + 0.60 A + 0.48 B + 0.73 C - 0.075 AB + 0.29 AC + 0.14 BC - 0.44 A^2 - 1.55 B^2 - 2.14 C^2$ 。对回归模拟方差分析可知 $P < 0.000 1$,表明该模型具有极显著性,即该数学模型能够很好地解释胶原蛋白得率的变化。失拟项不显著($P > 0.05$)和 $R^2 = 0.981 2$,证明回归方程可以很好地考察因子与响应值之间的关系^[19-20]。 A 、 B 、 C 等三因素对鳗鱼皮的得率的影响也是极显著($P < 0.01$),对得率的影响程度为提取液浓度>料液比>提取时间。

2.4 胶原蛋白的理化性质分析

2.4.1 SDS-PAGE

通过 SDS-PAGE 分析日本鳗鱼皮胶原蛋白的分子量。如图3所示,经酸酶浸提法提取、盐析、透析、冻干处理后得到的胶原蛋白含有5条条带,即包括 α_1 、 α_2 、 α_3 、 β 和 γ ,可以初步推断是鳗鱼皮胶原蛋白符合 I 型胶原蛋白的特征。鳗鱼皮胶原蛋白的主要成分是 α_1 ,与文献[21]关于胶原蛋白的研究结果一致。鱼皮被胃蛋白酶处理后,提出的胶原蛋白存在 α 链,说明胃蛋白酶对胶原蛋白作用在非螺旋端肽上且不会破坏胶原蛋白的结构。在图3中可以看到很多条小分子蛋白条带,对应多种小分子蛋白,这是由于在提取过程中,胃蛋白酶将大分子降解成小分子造成的,从而促进胶原蛋白从鱼皮中溶解出来^[22]。

2.4.2 氨基酸组成

如图4a所示,共检测到17种氨基酸,其中甘氨酸(Gly)含量最高,约占氨基酸总量的33.2%,其次是丙氨酸(Ala)和脯氨酸(Pro)。此外,由于酸水解,色氨酸(Trp)和半胱氨酸(Cys)均低于检

出限值,因此未列于表中。各种氨基酸的含量见图 4b,非极性氨基酸含量最高,约为(230.09 ± 10.19) mg/g;其次为总极性氨基酸,约(147.42 ± 5.19) mg/g;人体必需氨基酸和药用氨基酸的含量分别占总氨基酸的 19.61% 和 11.04%。在胶原蛋白所含有的药用氨基酸中,谷氨酰胺(Asp)可

用于治疗心脏病、肝病、高血压以及预防疲劳。赖氨酸(Lys)具有促进人体生长和抵御病毒的作用。异亮氨酸(Ile)可以提高生长激素水平,帮助燃烧脂肪^[23]。这些结果表明,鳗鱼皮胶原蛋白有高百分比的必需氨基酸和药用氨基酸,在生物医学和食品工程应用中具有潜力。

表 4 回归模型方差分析
Tab. 4 Analysis of variance of regression model

来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	42.01	9	4.67	40.61	< 0.000 1	**
A	2.90	1	2.90	25.27	0.001 5	**
B	1.88	1	1.88	16.37	0.004 9	**
C	4.21	1	4.21	36.59	0.000 5	**
AB	0.023	1	0.023	0.20	0.671 5	×
AC	0.32	1	0.32	2.83	0.136 6	×
BC	0.084	1	0.084	0.73	0.420 6	×
A ²	0.82	1	0.82	7.12	0.032 0	*
B ²	10.06	1	10.06	87.56	< 0.000 1	**
C ²	19.21	1	19.21	167.15	< 0.000 1	**
残差 Residual	0.80	7	0.11			
失拟项 Lack of fit	0.42	3	0.14	1.48	0.348 1	×
纯误差 Pure error	0.38	4	0.095			
总误差 Cor total	42.82	16				
回归系数 R ²				0.981 2		

注:*表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$), ×表示差异不显著。

Notes: * indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates highly significant difference ($P < 0.01$), and × indicates insignificant difference.

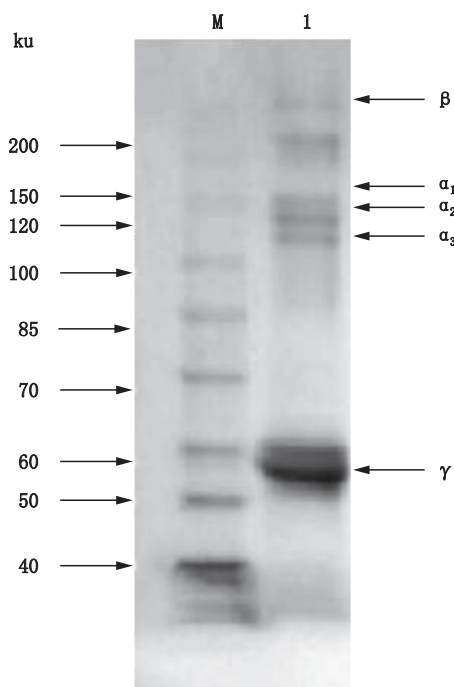


图 3 鳗鱼皮胶原蛋白的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 3 SDS-PAGE profile of collagen from eel skin

2. 4. 3 傅里叶变换红外光谱

如图 5 所示,胶原蛋白的特征吸收峰为酰胺 A、B、I、II 和 III,分别在 3 285、2 925、1 641、1 537 和 1 236 cm^{-1} 处产生,与金枪鱼^[24]和宝刀鱼皮(*Cirocentrus dorab*)^[25]中提取的胶原蛋白相似。

如表 5 和图 5 所示,酰胺 A 由 N-H 基团的伸缩振动,使其在 3 200 和 3 440 cm^{-1} 之间产生吸收峰。当 N-H 基团的肽段参与氢键的形成时, N-H 基团拉伸和氢键形成复合物,导致吸收峰降低约 100 cm^{-1} 。样品在 3 285 cm^{-1} 附近有一个吸收峰,表明鳗鱼皮胶原蛋白中存在氢键。酰胺 B 的存在表明 CH_2 结构没有被破坏,即表明所获得的胶原的三级结构没有被破坏。酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III 反映了蛋白质的肽链骨架结构,与胶原蛋白的三螺旋结构密切相关。蛋白质分子中有大量的肽键, C=O 的伸缩振动会导致酰胺 I 的吸收峰位于 1 600 和 1 700 cm^{-1} 之间。酰胺 III 的吸收峰通常位于 1 200 和 1 300 cm^{-1} 之间,当肽

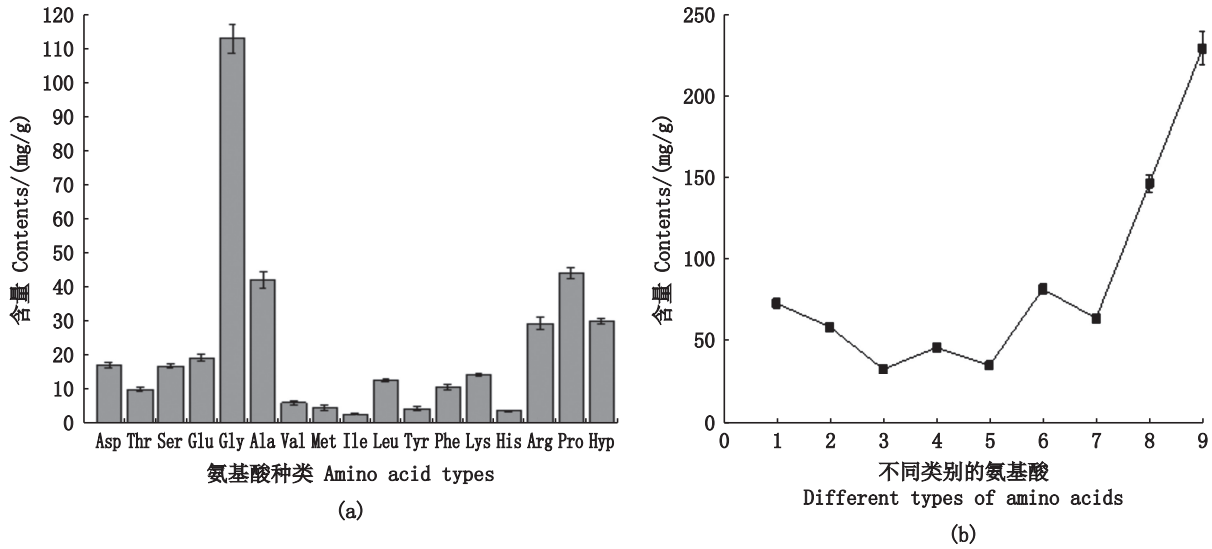


图4 鳗鱼皮胶原蛋白氨基酸图谱
Fig. 4 Amino acid profile of collagen from eel skin

胶Ⅲ带存在时,证明胶原蛋白的三螺旋结构保持完整^[22]。

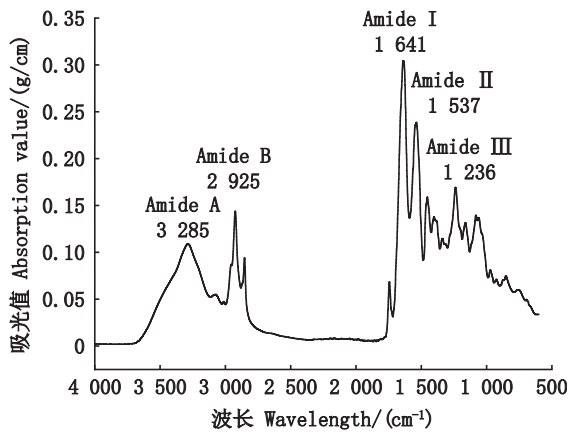


图5 鳗鱼皮胶原蛋白的FTIR谱图
Fig. 5 Fourier infrared spectrum of collagen from eel skin

表5 鳗鱼皮胶原蛋白FTIR特征吸收峰的位置和特征官能团

Tab. 5 Location and characteristic functional groups of FTIR characteristic absorption peaks of eel skin collagen

光谱区	波长 Wavelength/cm ⁻¹	特征官能团 Characteristic functional group
Amide A	3 285	N-H 伸缩振动
Amide B	2 925	CH ₂ 不对称伸缩振动
Amide I	1 641	C=O 键的伸缩振动
Amide II	1 537, 1 451, 1 393	N-H 和 C-N 键的伸缩振动、CH ₂ 不对称伸缩振动、-COO 的伸缩振动、
Amide III	1 236	N-H 伸缩振动和 C-O 键的拉伸振动

2.4.4 紫外全波长扫描

胶原蛋白三螺旋结构的特征吸收峰位于200至400 nm的范围内。对胶原蛋白中苯环共轭π系统有贡献的氨基酸是Phe和Tyr,它们的最大吸收波长分别为257和275 nm。此外,-C=O、-CONH₂的肽键或与胶原蛋白螺旋构象相关的次级键也可以形成吸收峰在210和250 nm之间的共轭体系^[12]。另一个影响吸收峰位置的原因是溶剂,会影响π-电子转化所需的能量。如图6所示,鳗鱼皮中胶原蛋白的最大吸收波长为233 nm,鳗鱼胶原蛋白分别含有12和11 mg/g的Phe和Tyr,故在257和275 nm处会有一些的特征峰显现,且本实验使用的乙酸是一种极性溶剂,也在一定程度影响了鳗鱼皮胶原蛋白紫外吸收峰的位置。与中华鲟^[26]和暗纹东方鲀鱼皮^[22]胶原蛋白的结果一致。

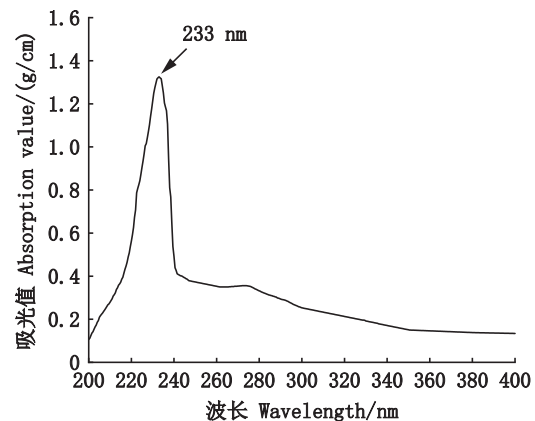
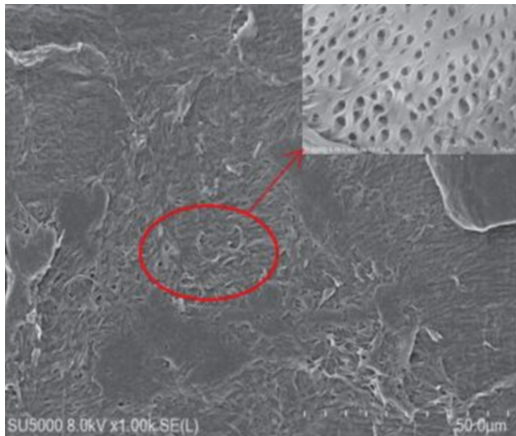


图6 鳗鱼皮胶原蛋白紫外光谱图
Fig. 6 Ultraviolet spectrum of collagen from eel skin

2.4.5 扫描电镜

通过SEM观察鳗鱼皮胶原蛋白的微观结构(图7),鳗鱼皮胶原蛋白表面呈现出多孔的纤维状结构。从海洋鳗鱼皮(*Evenchelys macrura*)^[27]和花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)^[13]中分离出胶原蛋白观察到类似的结构。



大图是1 000×,右上角是5 000×的图。
The large image is 1 000×, and the upper right corner is 5 000×.

图7 鳗鱼皮胶原蛋白的SEM图
Fig. 7 SEM of collagen from eel skin

2.5 胶原蛋白的热稳定性分析

胶原蛋白的热转化被认为是胶原蛋白的三螺旋结构分解为无规则的螺旋,物理性质也随之发生如沉淀、扩散和光散射等变化。DSC和黏度测量通常被用于研究胶原蛋白的热稳定性。前者是用于测量聚合物的转变,后者用于了解胶原蛋白变性引起的加热过程中的黏度损失^[28]。

图8a显示了鳗鱼皮胶原蛋白在0.6 mol/L乙

酸中的热转换曲线,最高温度(T_{max})为38.5 °C。胶原蛋白的热变性曲线如图8b所示。鳗鱼皮胶原蛋白的热变性温度(T_d)为28.3 °C,表明当温度超过28.3 °C,三螺旋结构的稳定性会下降。这接近同样来自淡水鱼的鲫鱼皮胶原蛋白(28.38 °C)和草鱼皮胶原蛋白(24.6 °C)的热变性温度,但高于来自海水的鲳鱼皮胶原蛋白(21.91 °C)的热变性温度。鳗鱼(一种来自热带和温带地区的鱼类)的胶原蛋白 T_d 也高于冷水鱼,如鳕鱼(15 °C)和阿拉斯加狭鳕鱼(16.8 °C)。这些结果也与鱼的亚氨基酸含量相关,亚氨基酸含量的增加会导致胶原蛋白的变性温度增加^[29]。 η_{re} 值随温度升高的趋势如图8b所示。 η_{re} 在30 °C之前变化很小,可视为稳定态;30 ~ 40 °C时, η_{re} 值急剧下降;在40 °C时, η_{re} 值很小,且在45 ~ 50 °C时的变化不大。

2.6 致敏性

鳗鱼皮胶原蛋白作为抗原,将鱼类过敏患者血清作为一抗,非过敏血清作为阴性对照,其与1:2 500稀释的山羊抗人IgE HRP反应,经过TMB显色后的OD₄₅₀值如表6所示。由于缺乏特异性结合胶原蛋白的IgE,普通人的血清在450 nm处显示出低吸光度值,且酶标板中几乎没有颜色变化^[28]。相比之下,鱼类过敏患者的血清在450 nm处的吸光度值是非过敏患者血清的两倍以上,表明鳗鱼皮胶原蛋白与不同阳性血清的IgE发生特异性反应。模拟胃肠液实验的结果也表明IgG结合反应性的趋势与IgE结合反应性一致,消化后IgG结合SGF和SIF水解物的特性进一步表明鳗鱼皮胶原蛋白具有一定的致敏性。

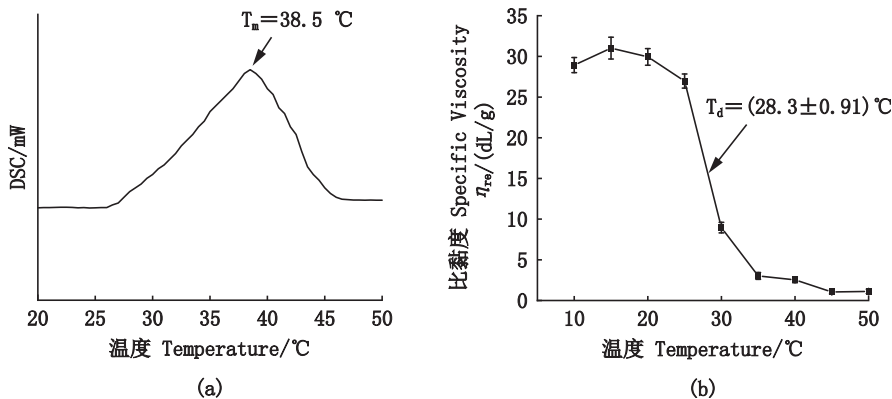


图8 鳗鱼皮的胶原蛋白的热转换曲线(a)和热变性曲线(b)
Fig. 8 Thermal conversion curve (a) and thermal denaturation curve (b) of collagen from eel skin

表6 胶原蛋白与鱼类过敏患者血清的ELISA和模拟胃肠液检测分析
Tab. 6 ELISA and simulated gastrointestinal fluid assay analysis of collagen and fish allergic patient sera

抗原 Antigen	Serum IgE binding					Serum IgG binding		
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	R-SGF	R-SIF
胶原蛋白 Collagen	0.47 ± 0.01	1.32 ± 0.05	1.23 ± 0.03	1.02 ± 0.05	0.99 ± 0.02	1.66 ± 0.04	1.47 ± 0.02	0.79 ± 0.04

注:数值为平均值±标准差; H1.用普通人的血清进行间接ELISA检测; H2~H6.用5个过敏性患者的人血清进行间接ELISA检测; R-SGF.用山羊抗人IgG抗体对模拟胃液消化(SGF)后的水解物进行间接ELISA; R-SIF.用山羊抗人IgG抗体对模拟肠液消化(SIF)后的水解物进行间接ELISA。

Notes: Values were Means ± SD; H1.indirect ELISA with human sera from non-allergic patients; H2~H6. indirect ELISA with human sera from five allergic patients; R-SGF. Indirect ELISA of the hydrolysate after simulated gastric fluid digestion (SGF) with goat anti-human IgG antibody; R-SIF.Indirect ELISA of the hydrolysate after simulated intestinal fluid digestion (SIF) using goat anti-human IgG antibody.

3 结论

本研究采用响应面法优化了鳗鱼皮中提取胶原蛋白的酸酶浸提工艺。单因素试验的结果,表明料液比、提取时间和提取液浓度对胶原蛋白的得率有显著影响($P < 0.01$)。得到了鳗鱼皮胶原蛋白的最佳提取工艺条件:料液比1:30、酶解时间48 h、提取液浓度0.6 mol/L,胶原蛋白的得率为32.89%,与理论值(33.85%)基本相吻合,表明该模型是可靠的。

将最优工艺条件下提取的鳗鱼皮胶原蛋白进行理化性质、热稳定性和致敏性分析。结果表明鳗鱼皮胶原蛋白是典型的I型胶原蛋白;主要由Gly、Ala、Pro组成,未检测到Trp和Cys;具有典型的紫外全波长吸收图像和傅里叶变换红外光谱图像;胶原蛋白表面呈现出相对光滑的片状结构;胶原蛋白的热稳定性与动物的来源和生长环境相关;ELISA、SIF和SGF实验表明,胶原蛋白具有较高的消化稳定性和免疫原性,可能会在不同患者中引发IgE介导的超敏反应。因此,在生产相关产品时,应使用标签标明其致敏性,以避免相关过敏患者摄入。这将为后续深入研究不同加工方法对鳗鱼皮胶原蛋白理化性质和致敏性的影响奠定基础。

参考文献:

- [1] 黎原谷,李慷,刘利平.人工繁殖条件下日本鳗鲡鱼卵营养成分分析及评价[J].上海海洋大学学报,2019,28(2):190-199.
LI Y G, LI K, LIU L P. Nutritional analysis and evaluation of eggs from the artificially induced maturation *Anguilla japonica*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(2): 190-199.
- [2] SHIRAIISHI H, CROOK V. Eel market dynamics: an

analysis of *Anguilla* production, trade and consumption in East Asia[M]. Traffic, Tokyo, Japan, 2015.

- [3] GOVINDHARAJ M, ROOPAVATHU K, RATH S N. Valorization of discarded marine Eel fish skin for collagen extraction as a 3D printable blue biomaterial for tissue engineering [J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 230:412-419.
- [4] 崔浩.基于酶解-膜分离集成的胶原蛋白肽分子量控制技术[D].泰安:山东农业大学,2017.
CUI H. Preparation of collagen peptides with controllable molecular weight range based on enzymatic degradation coupled with membrane separation [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2017.
- [5] 公维洁,卓先勤,许环浪.响应面优化超声波辅助提取马面鱼皮胶原蛋白工艺研究[J].食品工业,2018,39(7):92-96.
GONG W J, ZHUO X Q, XU H L. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of collagen from *Navodon septentionalis* skin by response surface methodology [J]. The Food Industry, 2018, 39(7): 92-96.
- [6] 温慧芳,陈丽丽,白春清,等.基于不同提取方法的鲟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 longsnoutcatfish *Leiocassis longirostris* [J]. Food Science, 2016, 37(1): 74-81.
- [7] 王正云,蒋慧亮.超声波辅助酶法提取青鱼鱼皮胶原蛋白工艺[J].食品研究与开发,2020,41(5):133-137.
WANG Z Y, JIANG H L. Technology of ultrasound-assisted extraction of collagen from black carp skin [J]. Food Research and Development, 2020, 41(5): 133-137.
- [8] 陈丽丽,赵利,刘华,等.有机酸提取鲟鱼皮胶原蛋白的工艺研究[J].食品与机械,2010,26(5):118-121.
CHEN L L, ZHAO L, LIU H, et al. Research on the extraction technology of collagen from *amiurus nebulosus* skin with organic acid [J]. Food & Machinery, 2010, 26(5): 118-121.

- [9] HAMADA Y, NAGASHIMA Y, SHIOMI K. Identification of collagen as a new fish allergen [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65(2): 285-291.
- [10] 潘冰青. 鱼类胶原蛋白的分离纯化及其过敏原性研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2011.
- PAN B Q. Study on the allergenicity of fish collagen [D]. Xiamen: Jimei University, 2011.
- [11] SAKAGUCHI M, TODA M, EBIHARA T, et al. IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, 106(3): 579-584.
- [12] KOBAYASHI Y, AKIYAMA H, HUGE J, et al. Fish collagen is an important panallergen in the Japanese population [J]. *Allergy*, 2016 71(5): 720-723.
- [13] 卢珍华, 郭彩华, 叶鹏, 等. 养殖花鳗鱼皮胶原蛋白的特性分析 [J]. *淡水渔业*, 2019, 49(6): 100-106, 87.
- LU Z H, GUO C H, YE P, et al. Characterisation of fish skin collagen of cultured *Anguilla marmorata* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(6): 100-106, 87.
- [14] JIN Y F, DENG Y, QIAN B J, et al. Allergenic response to squid (*Todarodes pacificus*) tropomyosin *Tod p1* structure modifications induced by high hydrostatic pressure [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 76: 86-93.
- [15] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion [J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(4): 991-1014.
- [16] 淑英, 敖冉, 宋佳, 等. 响应面法优化鳕鱼皮酸性胶原蛋白的提取工艺 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(24): 269-272.
- SHU Y, AO R, SONG J, et al. Optimization of extraction condition of acid-soluble collagen from cod skin by response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(24): 269-272.
- [17] 徐逍, 徐卉, 陶宁萍. 暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的提取工艺优化及其功能特性 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(10): 168-176.
- XU X, XU H, TAO N P. Optimization of preparation process of collagen from *Takifugu obscurus* skin and its functional properties [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(10): 168-176.
- [18] 李航婷, 莫奕雯, 李诺营, 等. 响应面法优化酸性鳗鱼鱼鳔胶原蛋白提取工艺 [J]. *广东海洋大学学报*, 2022, 42(6): 114-121.
- LI H T, MO Y W, LI N Y, et al. Optimized extraction of acid-soluble collagen from eel swim bladder by response surface methodology [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2022, 42(6): 114-121.
- [19] 唐嘉诚, 包建强, 陈彦婕, 等. 大鲵黏液糖蛋白的提取工艺优化及纯化表征 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(21): 252-261.
- TANG J C, BAO J Q, CHEN Y J, et al. Extraction process optimization, purification and characterization analysis of glycoprotein from the mucus of Chinese giant salamander [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(21): 252-261.
- [20] 周瑞, 陈舜胜. 响应面法优化暗纹东方鲀鱼皮冻的制备工艺 [J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(3): 447-456.
- ZHOU R, CHEN S S. Response surface optimization on preparation process of fish jelly from the skin of puffer fish (*Tetrodontiformes fasciatus*) [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(3): 447-456.
- [21] 徐萌. 斑点叉尾鲷鱼皮胶原蛋白的提取与制膜研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- XU M. Isolation of collagen and preparation of edible film from skin of channel catfish [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [22] 周瑞. 暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白理化特性及胶冻加工工艺的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- ZHOU R. Study on the physicochemical properties and fish jelly processing of collagen from the skin of puffer fish (*Tetrodontiformes fasciatus*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [23] BONGIOANNI A, BUENO M S, MEZZANO B A, et al. Amino acids and its pharmaceutical applications: a mini review [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2022, 613: 121375.
- [24] 王聪艳. 金枪鱼鱼皮胶原蛋白的分离制备、性质及应用研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2019.
- WANG C Y. Isolation, preparation, properties and application of collagen from tuna fish skin [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.
- [25] WIJAYA H, PUTRIANI S, SAFITHRI M, et al. Isolation and allergenicity of protein collagen from parang-parang fish skin (*Cirocentrus dorab*) [J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, 411(1): 012054.
- [26] 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.
- [27] VEERURAJ A, ARUMUGAM M, BALASUBRAMANIAN T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*) [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(10): 1592-1602.
- [28] LI X M, DENG Y, QIU W Q, et al. Alteration of collagen thermal denaturation, structural and the abrogation of allergenicity in eel skin induced by ohmic heating [J]. *Food Chemistry*, 2022, 391: 133272.
- [29] TANG LL, CHEN S L, SU W J, et al. Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species [J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(1): 148-155.

Optimization of Japanese eel skin collagen extraction process and analysis of physicochemical properties

LI Xiaomin^{1,2}, YANG Chenyu^{1,2}, DENG Yun³, TAO Ningping¹, LI Li^{1,2}, QIU Weiqiang¹, JIN Yinzhe^{1,2}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Engineering Research Center of Food Thermal-Processing Technology, Shanghai 201306, China; 3. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The extraction process of Japanese eel skin collagen was optimized using response surface methodology, and its physicochemical properties and allergenicity were investigated. Based on the single-factor experiment, the best extraction process was obtained based on the acid-enzymatic extraction method, with the material-liquid ratio, the concentration of extraction solution and the extraction time as the investigating factors and the collagen yield as the index. The results showed that the collagen contained five bands and belonged to type I collagen, and the percentages of essential amino acids and medicinal amino acids were 19.61% and 11.04%, respectively. The thermal transition temperature and thermal denaturation temperature of collagen were 38.5 and 28.3 °C, respectively. The enzyme-linked immunosorbent reaction and simulated gastrointestinal fluid experiments showed that collagen has certain allergenic properties, providing a theoretical basis for further studies on eel skin collagen.

Key words: Japanese eel skin; collagen; acid and enzyme extraction; response surface analysis; extraction process; physicochemical properties; allergenicity