

■ 鱼皮鱼骨胶原肽制备及 生物活性研究 ■

庄永亮 侯虎 林琳◎著



科学出版社

鱼皮鱼骨胶原肽制备及 生物活性研究

庄永亮 侯 虎 林 琳 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

鱼副产品作为水产源胶原蛋白和胶原肽的潜在来源,逐渐受到社会的关注。鱼皮鱼骨胶原蛋白和胶原肽在生物、食品、医学、材料、化学中是一个不断引人入胜的研究课题材料。

本书从鱼皮鱼骨胶原蛋白的提取、结构特点,胶原肽的传统和在线可控制备,胶原肽的精制,胶原肽的生物活性等方面进行了阐述,主要是作者的一些最新研究成果总结,是一部理论性与实用性都较强的书。

本书可作为大专院校、科研机构相关专业的学生及研究人员的参考书,对相关食品企业的产品开发和应用也有一定的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

鱼皮鱼骨胶原肽制备及生物活性研究/庄永亮,侯虎,林琳著. —北京:科学出版社,2014.12

ISBN 978-7-03-042561-4

I. ①鱼… II. ①庄…②侯…③林… III. ①鱼类-胶原蛋白-制备-研究
②鱼类-胶原蛋白-生物活性-研究 IV. ①TS254.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 268483 号

责任编辑:张 析 / 责任校对:韩 杨
责任印制:赵德静 / 封面设计:东方人华

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 1 月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2015 年 1 月第一次印刷 印张:13 1/4

字数:255 000

定价:68.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

近年来,我国水产养殖和加工产业得到迅猛发展,以鱼皮、鱼骨等为主要组成的产业副产品产量越来越大。但是目前我国在水产副产品深加工技术和综合利用水平上与世界先进水平还有很大的差距。研究表明,鱼皮中含有丰富的胶原蛋白,且水产动物胶原蛋白具有低抗原性、低过敏性、分子结构较脆弱、酶解比较容易等优点,这些都给科研和产业带来了新的兴奋点。近几年,我国鱼皮加工产业得到了较好的发展,含有鱼皮胶原蛋白和鱼皮胶原活性肽的产品已经上市,受到了消费者的喜爱。

食源性活性肽具有广泛的药理和生物活性,且安全性极高,尤其是胶原蛋白源的肽类物质,由于具有特有的氨基酸组成,生物活性更加丰富。传统的胶原蛋白制备胶原肽是以水解度为指标进行的,水解过程中不易控制和操作,为进一步对胶原肽的制备实现在线控制,我们采用传感器信号进行控制水解。再者,活性肽进入人体后可能被降解,活性发生改变,因此,制备高抗消化活性肽是十分必要的。

鱼源胶原肽在制备过程中,越来越多的生物功能和生理活性被发现,但由于鱼类原料本身的一些性质和加工制备过程中的一些问题,使鱼皮和鱼骨制备的胶原肽存在盐分较高和苦腥味的问题。这类问题亟需解决。再者,基于蛋白酶解物的组成成分比较复杂,要获得生理活性显著的生物活性肽,需选择有效的手段对其有效成分进行分离。

基于上述问题,我们在国家自然科学基金(项目编号:31401476,31360381,31101392,31000832)等科研项目的资助下进行了相关研究,并将代表性的研究成果汇成本书。本书第1章概述了鱼皮和鱼骨胶原的存在、氨基酸组成、胶原的分类、胶原的结构,胶原肽定义、胶原肽的制备来源和胶原肽的体内转运。第2章讲述了鱼皮和鱼骨胶原、明胶、胶原蛋白的差异,胶原蛋白的提取方法、胶原蛋白的理化性质。第3章讲述了鱼皮和鱼骨胶原肽的制备方法,包括传统的以水解度为指标的水解制备和以传感器为指标的可控在线水解制备,以及体内高抗消化性胶原肽的制备方法,并对胶原肽的物理化学性质及其水合能力进行了评价。第4章讲述了鱼皮和鱼骨胶原肽的精制,主要是讲述对胶原肽的脱盐、感官特性的优化,以及关键活性肽的纯化鉴定思路。第5章讲述了鱼皮和鱼骨胶原肽的生物活性,主

要包括我们研究的体内外抗氧化活性、免疫活性、降压活性、美白功能及抑制皮肤光老化功能。

鱼皮和鱼骨的胶原蛋白和胶原肽是热点研究课题,对其开发和应用研究涉及面广,由于作者水平和精力有限,不足和错误之处,恳请广大读者批评指正。

著 者

2014 年 9 月

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 胶原蛋白	1
1.2 胶原肽	4
参考文献	8
第 2 章 鱼皮和鱼骨胶原蛋白的提取及特性	9
2.1 胶原蛋白的提取	9
2.1.1 酶法提取	9
2.1.2 热水抽提法	10
2.2 胶原蛋白的理化性质	16
2.2.1 蛋白质含量的测定	16
2.2.2 氨基酸组成的测定	16
2.2.3 紫外光谱分析	18
2.2.4 傅里叶变换红外光谱分析	19
2.2.5 分子质量及类型确定	20
2.2.6 热稳定性测定	21
参考文献	23
第 3 章 鱼皮和鱼骨胶原肽的酶解制备及特性	25
3.1 水解度	25
3.1.1 茚三酮比色法	26
3.1.2 甲醛滴定法	27
3.1.3 鱼源胶原蛋白的水解度	28
3.2 直接以水解度为指标的胶原蛋白水解条件优化	28
3.2.1 单因素实验	29
3.2.2 正交试验法	32
3.2.3 响应面优化法	34
3.2.4 复合酶水解法	35
3.3 利用生物传感器控制胶原蛋白水解过程	35
3.3.1 生物传感器简介	36
3.3.2 酶生物传感器	36

3.3.3	Glu 和 Lys 生物传感器评价鳕鱼骨蛋白水解液的制备	37
3.3.4	利用人工神经网络控制胶原蛋白水解	48
3.4	利用黏度定向控制胶原蛋白的水解	65
3.4.1	鳕鱼骨胶原蛋白的分子质量与特征黏度分析	66
3.4.2	鳕鱼骨胶原蛋白的酶法降解特性	66
3.4.3	鳕鱼骨胶原蛋白降解预测模型	67
3.5	利用胃肠道消化模型对胶原蛋白的水解	70
3.5.1	胃蛋白酶-胰蛋白酶的二段式消化	70
3.5.2	全仿生消化模型	71
3.6	胶原肽的理化性质及功能特性	72
3.6.1	蛋白质含量的测定	72
3.6.2	氨基酸的测定	73
3.6.3	分子质量的测定	73
3.6.4	胶原肽的水合性	75
	参考文献	79
第4章	鱼皮和鱼骨胶原肽的精制	81
4.1	鱼皮和鱼骨胶原肽的脱盐	81
4.1.1	透析	81
4.1.2	超滤	82
4.1.3	凝胶柱	82
4.1.4	制备型大孔吸附树脂脱盐	83
4.2	改善鱼皮和鱼骨胶原肽的感官特性	89
4.2.1	控制酶解过程降低苦味	89
4.2.2	利用美拉德反应去除腥味	92
4.3	胶原肽的分离纯化	95
4.3.1	超滤	95
4.3.2	凝胶色谱	96
4.3.3	离子色谱	96
4.3.4	液相色谱	96
4.3.5	质谱	97
4.3.6	鱼源胶原活性肽的完整分离制备	98
	参考文献	106
第5章	鱼皮和鱼骨胶原肽的生物活性	108
5.1	抗氧化活性	108
5.1.1	鱼皮和鱼骨胶原肽的体外抗氧化活性	109

5.1.2 鱼源胶原肽的体内抗氧化活性	131
5.2 免疫活性	137
5.2.1 鳕鱼骨活性肽体外细胞免疫活性	138
5.2.2 鱼骨胶原肽的体内免疫活性	146
5.3 降压活性	154
5.3.1 鱼副产品体外降压活性	155
5.3.2 鱼源胶原肽体内降压作用	167
5.4 美白功能	173
5.4.1 鳕鱼皮胶原及胶原肽美白功能的主要实验方法	174
5.4.2 鳕鱼皮胶原及胶原肽的美白功能效果	175
5.5 抑制光老化功能	179
5.5.1 鱼皮胶原肽的体外细胞活性实验	180
5.5.2 鱼皮胶原肽体内抑制光老化的测定	186
参考文献	198

第 1 章 绪 论

渔业是中国发展最快的产业之一。我国水产资源丰富,产量居世界首位,2013 年我国水产品总量 6172 万吨,其中淡水产品 3032 万吨,海水产品 3139 万吨,两者基本持平。近年,我国水产养殖业和鱼类加工业得到了迅猛的发展,但是水产品的加工技术和综合利用与世界先进水平还有很大的差距。主要表现为:一是加工量偏低,对于水产品的利用,我国还是以传统的新鲜全鱼烹饪食用为主要消费方式,大量的鱼副产品被丢弃,造成了资源浪费和环境压力;二是加工技术落后,在水产品的加工过程中,基本以粗加工为主,例如,鱼类的加工成品基本以鱼片为主,没有高新技术和高附加值产品;三是水产品加工后的下脚料综合利用水平不高。

鱼类产品在加工过程中,会产生大量的下脚料,主要包括头、尾、骨、皮、鳞、内脏及其残留鱼肉,重量约占原料鱼总重的 40%~55%。我国每年鱼的废弃物总量达 200 万吨以上,据 FAO 统计,企业在加工冻罗非鱼片时,出肉率不足 40%,每加工 1 吨罗非鱼片,约产生 2 吨的下脚料。目前,这些废弃物并未被充分利用,而是多用做饲料或肥料,如果不进行有效处理,不仅造成大量的资源浪费,而且对环境造成污染。近几年,鱼皮加工产业得到了较好的发展,如鳕鱼、鲑鱼、鲚鱼、鳗鱼和罗非鱼等,鱼皮中含有丰富的胶原蛋白,含有鱼皮胶原蛋白和鱼皮胶原活性肽的产品逐渐上市,渐渐受到了消费者的喜爱。另外,其他副产品,如头、尾、骨、鳞等也含有丰富的胶原蛋白,因此,具有很好的潜在利用价值。

1.1 胶原蛋白

胶原蛋白是动物体内含量最丰富的蛋白质。所有多细胞生物都含有胶原,哺乳动物身上所有蛋白质中约 30%是胶原蛋白。胶原是皮肤、骨、腱、软骨、血管和牙齿的主要纤维成分,而细胞骨架的重要成分也是胶原;因此,可以说胶原不同程度地存在于一切器官中^[1]。胶原的独特性质是能够形成高强度的不溶性纤维,在成熟的组织中能起结构作用,胶原对发育中的组织有定向作用。

1. 胶原蛋白的分类

胶原蛋白由纤维细胞合成,存在于人体结缔组织、骨骼及软骨中,具有多种形态。目前统计有 16 种(I~XVI)胶原蛋白^[2],前 4 种为主要形态,I 型胶原蛋白:

是纤维形成胶原,是最普遍存在的胶原蛋白,它是多细胞生物细胞外基质的主要结构大分子,能活化上皮细胞,促进上皮细胞增生,也可促进胶原酶生成,使皮肤有张力和弹性,主要存在于成人皮肤和骨组织中。Ⅱ型胶原蛋白:是纤维形成胶原,与一些蛋白聚糖结合,是软骨和玻璃液中的主要胶原,可加强皮肤的保水能力,填补皮肤内胶原纤维之间的空隙,起到保湿和自然美白的作用。Ⅲ型胶原蛋白:属重建型胶原,主要存在于婴幼儿皮肤或血管内膜、肠胃,能够强化微血管强度与弹性,可提供细胞充足的养分,并直接与血管母细胞结合促进新血管形成。Ⅳ型胶原蛋白:是一种非纤维型胶原,主要存在于各组织器官的基底膜、胎盘和晶状体中。

2. 胶原蛋白的结构

胶原蛋白是细胞外基质的结构蛋白,其分子在细胞外基质中聚集为超分子结构。胶原蛋白与其他蛋白质一样,也是由 20 余种不同的 α -氨基酸组成的。胶原蛋白的氨基酸组成有如下特点^[3]:甘氨酸含量几乎占氨基酸总量的 1/3;胶原蛋白中存在羟赖氨酸和羟脯氨酸,而其他蛋白质中不存在羟赖氨酸,也很少有羟脯氨酸;胶原蛋白中脯氨酸和羟脯氨酸的含量是所有蛋白质中最高的;胶原中缺乏色氨酸(Trp),所以它在营养上为不完全蛋白质;另外,胶原蛋白分子中芳香氨基酸和半胱氨酸含量较少。在大多数蛋白质的同一条多肽链中,氨基酸一般不会有周期性的重复序列,但胶原蛋白的胶原域中却有“甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸”、“甘氨酸-脯氨酸-X”和“甘氨酸-X-Y”(X、Y 代表除甘氨酸和脯氨酸以外的任何其他氨基酸残基)这样一些三肽的重复序列存在。

胶原蛋白分子单位称为原胶原(tropocollagen),每个原胶原分子由三条 α -肽链组成, α -肽链自身为 α -螺旋结构(图 1-1),每一条胶原链都是左手螺旋构型,3 条左手螺旋链又相互缠绕成右手螺旋结构。肽链中每三个氨基酸残基中就有一个要经过此三股螺旋中央区,而此处空间十分狭窄,只有甘氨酸适合于此位置,由此可解释其氨基酸组成中每隔两个氨基酸残基出现一个甘氨酸的特点(图 1-2)。三条 α -肽链借范德华力、氢键及共价交联以平行、右手螺旋形式缠绕成“草绳状”三股螺旋结构,使胶原具有很高的拉伸强度。原胶原分子平行排列成束,通过共价交联,可形成稳定的胶原微纤维,进一步聚集成束,形成胶原纤维。胶原分子通过分子内或分子间的交联成为不溶性的纤维。因胶原分子氨基酸组成中缺乏半胱氨酸,其不可能像角蛋白那样以二硫键相联,而是通过组氨酸与赖氨酸间的共价交联,一般发生在胶原分子的 C-末端或 N-末端之间^[4]。

胶原蛋白是糖蛋白的一种,羟赖氨酸残基位点还是潜在的糖基化位点,可以发生半乳糖化或葡萄糖半乳糖化(图 1-3)。不同类型的胶原蛋白分子中羟赖氨酸/赖氨酸比率以及羟赖氨酸位点糖基化的程度不同^[5]。羟脯氨酸借助于水分子形成氢

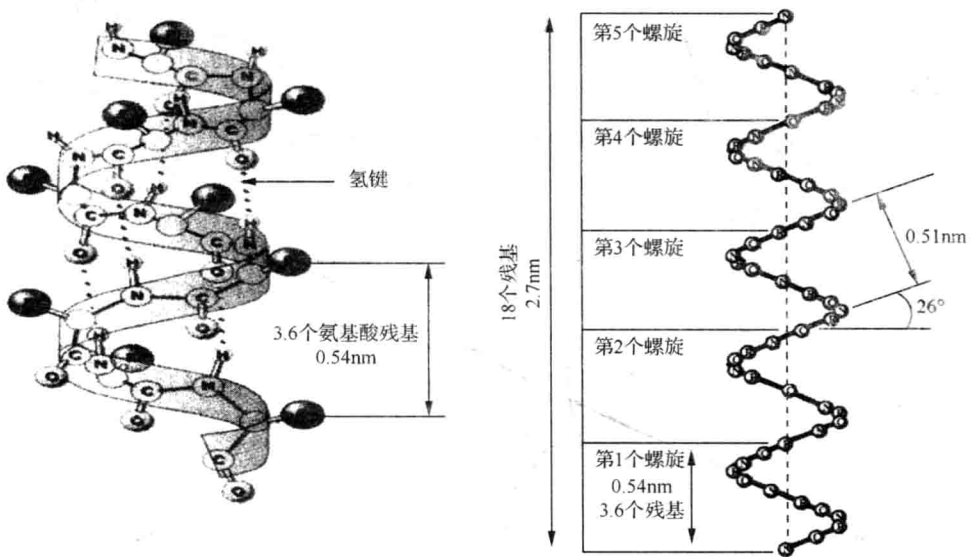


图 1-1 胶原蛋白的螺旋结构

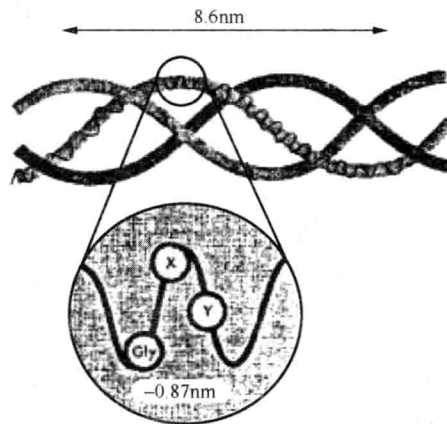


图 1-2 胶原蛋白的三股螺旋中央区图示

键或通过在 3 个氨基酸组内的 1 条链的羧基和另 1 条链的酰胺氢间直接形成氢键来稳定分子。如图 1-4 显示在链 A 的位置 4 的酰胺氢和链 B 的位置 2 的羧基氧间的氢键。当羟脯氨酸存在链 A 的位置 1 的羧基氧和链 B 的位置 2 的酰胺氢间的 A 链的位置 3 上时,将存在 A 的第 2 个水合氢键。

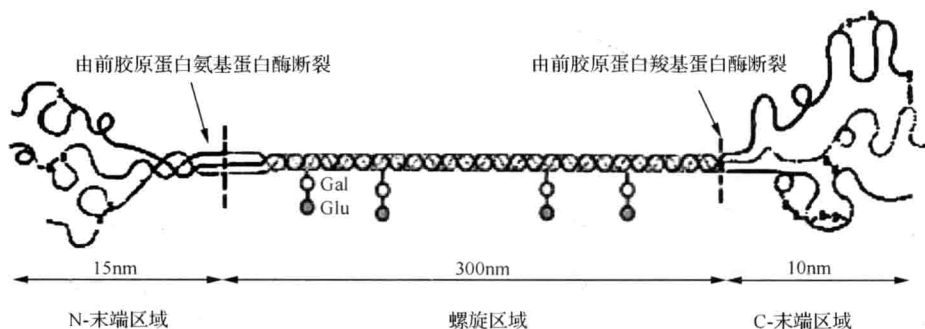


图 1-3 胶原的分子结构图

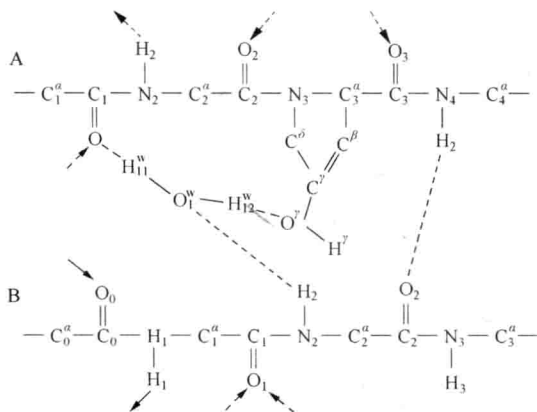


图 1-4 胶原蛋白三螺旋结构的稳定

1.2 胶原肽

肽(peptide)是分子结构介于氨基酸和蛋白质之间的一类化合物,由 2 个或 2 个以上氨基酸分子通过肽键相互连接而成,是蛋白质的结构与功能片段,并使蛋白质具有数以千万计的生理功能,其本身 also 具有很强的生物活性。由 2 个或 3 个氨基酸脱水缩合而成的肽分别成为二肽或三肽,依次类推为四肽、五肽、六肽等。目前来讲,肽和蛋白质之间没有严格的区分,一般将氨基酸的数量作为其划分标准,肽链上氨基酸数量在 10 个以内称为寡肽,10~50 个的为多肽,50 个以上的为蛋白质。人们习惯上将寡肽称为短肽,而对于二、三肽称为小肽。氨基酸的种类和排序影响肽类的生物活性^[6]。

1. 胶原肽的制备

蛋白质水解产生肽,由胶原蛋白水解产生的肽,称为胶原蛋白肽或胶原肽。肽

的水解制备主要包括化学法和酶解法。化学法以酸或碱断开蛋白质肽键,由于反应环境较极端,不利于活性的保持;而酶解蛋白质生产活性肽的安全性很高,能在温和的条件下进行定位水解分裂产生特定的肽^[7],且水解条件易控制,因而近几年报道的活性肽的制备方法均为酶解法。图 1-5 显示蛋白质酶解的过程。

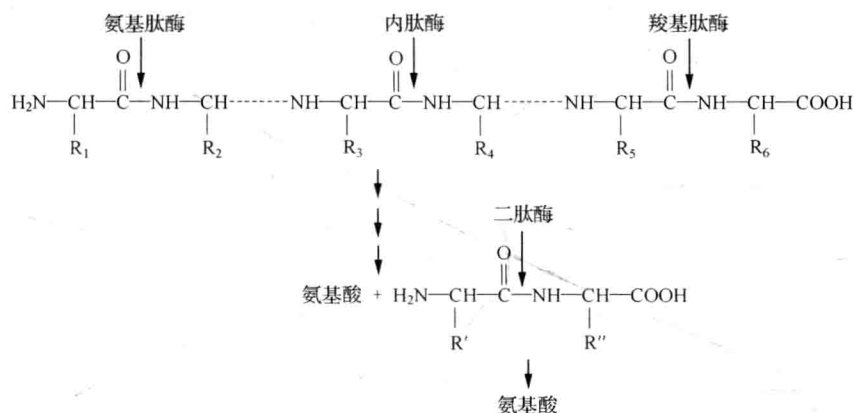


图 1-5 蛋白质水解示意图

对于鱼皮和鱼骨胶原蛋白的水解一般按以下步骤进行(图 1-6):

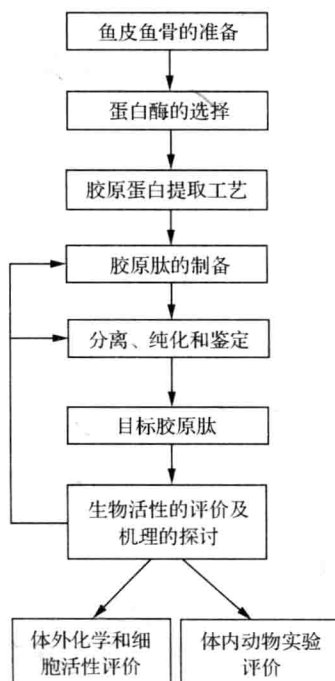


图 1-6 鱼源胶原肽的水解制备过程

由图 1-6 可以看出,酶的选择是酶解法生产活性肽的第一步,也是关键环节之一^[8]。在蛋白质多肽链内部存在着多功能区,这就说明蛋白质是功能性短肽前体,选择合适蛋白酶水解这些多肽链,使功能性肽段释放即可制备出具有各种功能活性的短肽^[9]。蛋白酶根据来源可分为动物源蛋白酶、植物源蛋白酶和微生物源蛋白酶;根据作用形式可分为内切酶和外切酶。不同酶的作用位点、活性部位和化学性质相差较大^[10]。它们能在一定的 pH、温度下内切或外切蛋白质,将其水解成多肽、寡肽或氨基酸。例如胰蛋白酶仅作用于 Arg、Lys 的羧基与其他氨基酸的氨基之间形成的肽键,产生的肽段数目等于多肽链中 Arg 和 Lys 总数加一。糜蛋白酶(专一性不如胰蛋白酶)作用于 Trp、Tyr、Phe 等疏水氨基酸的羧基与其他氨基酸的氨基之间形成的肽键,当疏水氨基酸为 Trp、Tyr、Phe 时水解快,为 Leu、Met、His 时水解稍慢。目前,对鱼源胶原蛋白进行水解经常使用的蛋白酶如表 1-1。

表 1-1 水解鱼皮和鱼骨的主要用酶

酶的名称	温度/℃	pH	作用类型	酶切位点
风味酶	50	7.2	内切+外切	无特异性
碱性蛋白酶	50	11.0	内切	主要断裂疏水氨基酸的 C 末端
胰蛋白酶	50	8.0	内切	水解 Lys-或 Arg-残基
动物水解蛋白酶	50	7.2	内切+外切	无特异性
中性蛋白酶	50	7.0	内切	无特异性
菠萝蛋白酶	45	7.2	内切	无特异性
木瓜蛋白酶	50	7.2	内切	广泛特异性,Arg-,Lys-,Phe-X-
酸性蛋白酶	50	3.0	内切+外切	无特异性
胶原酶	36	7.5	内切	在 P-X-G-P 肽链中 X 之后
胃蛋白酶	36	2.0	内切	芳香族氨基酸或酸性氨基酸的氨基
糜蛋白酶	36	8.0	内切	芳香族氨基酸

为衡量酶切蛋白质的肽键成为小分子肽的情况,水解度(degree of hydrolysis,DH)的概念被提出。水解度是指水解反应过程中蛋白质水解达到平衡时,已经水解的肽分子数与溶液中该蛋白质的分子总数之比。因此,水解度越大,说明肽键的裂解程度越高,肽的分子质量越小。关于水解度的控制范围,报道的数据有很大差别,具体应根据目标活性肽的长度、活性肽产品的风味而定。酶的种类、酶对底物的浓度、底物本身的性质与变性程度、水解系统的 pH 与离子强度、酶反应浓度与时间都会影响水解度的大小^[11],因此,水解过程是一个复杂的过程,水解过程的优化对于目标活性肽的制备具有重要的意义,该内容将在下一章详细的介绍。

2. 活性肽的吸收转运

过去人们认为,动物摄取的蛋白质在消化道内经蛋白酶和肽酶的作用降解为寡肽片断和游离氨基酸,然而只有游离氨基酸能被动物直接吸收利用,寡肽则只有再降解成游离氨基酸才能被利用,直至 20 世纪五六十年代,才由 Neway 和 Smith 首先提出了肽可以完整吸收的证据^[12]。随着血液中小肽的发现以及胃肠道能够吸收小肽的实验结论的不断提出,肽被完整吸收的观点及其生理作用才逐渐被人们重视。人类摄食蛋白质经消化道的酶作用后,大多是以 2~7 个氨基酸组成的寡肽形式被消化吸收,而以游离氨基酸形式吸收的比例很小。

人或单胃动物对蛋白质的吸收存在着游离氨基酸和寡肽两种相对独立的运转机制。寡肽的转运需要载体介导,肽转运蛋白(peptide transporters, PepT)是质子耦联寡肽超级家族的成员,它们在转运过程中需要以 H^+ 作为转运耦联离子,可以逆浓度梯度转运^[13]。

现代研究表明,不同分子质量的肽链进入细胞后,跨膜转运的途径可能是不同的。活性肽跨膜转运的途径主要包括:肽转运蛋白载体主动转运、胞饮、细胞旁路扩散等。目前,研究显示 PepT1 载体主动转运是活性肽跨膜最主要的途径,该转运过程中需要 H^+ 作为转运耦联离子,可以逆浓度梯度转运,主要是针对分子质量小的活性肽^[14];胞饮是活性肽通过囊泡进行跨细胞转运的一种方式,是分子质量较大的活性肽的转运机制;也有研究发现有些肽能够通过细胞旁路扩散进行转运,这样活性肽可能避免氨肽酶和胞内酶水解。

鉴于细胞、消化管和血管的生物膜是类脂质膜,因此,活性肽在体内发挥活性必须要与脂质具有结合性或渗透性。先前的研究一般是通过评价活性肽的疏水性来初步判断活性肽的亲脂性和抑制脂质氧化性。中医药理论表明,以单层脂质体为细胞生物膜模型和固相萃取剂,可提取具有细胞膜亲合性的中药有效成分群^[15]。如果反过来思考,以单层脂质体为生物膜模型,以活性肽与单层脂质体形成结合态或水溶态来定义其结构、与脂质的结合性和生物可给性是可行的,这种单层脂质体体系可对活性肽是否能够跨膜进行初步判定,此方法也能初步揭示其体内的活性分布机制。当然,要进一步分析活性肽在体内的吸收、分布和活性需采用细胞和动物模型。众多的研究表明,不同的肽链进入细胞的转运途径是不同的。活性肽跨膜转运的机制主要是 PepT1 载体主动转运、细胞旁路扩散和胞饮等, PepT1 载体主动转运被认为是最主要的途径;有些肽能够通过细胞旁路进行转运,这样可能避免氨肽酶和胞内酶的水解。先前的研究认为肽的跨膜路径与其分子质量大小有关,但又不是直接的关系,肽的极性是其跨膜转运途径的决定因素之一。

总之,多肽的吸收机制与其他各种物质的吸收机制大不相同。多肽的吸收机

制优于一切物质,因此,结合活性肽的结构特征,系统的研究活性肽在单脂肪膜的结合性和渗透性及在细胞的跨膜途径,对深入理解生物活性肽在体内的作用机制是十分重要的。对人类的生理健康具有极其重要的意义,人类应该利用多肽的吸收机制,把生命健康提高到一个崭新的水平,这也是多肽吸收机制重大发现的意义所在。

参 考 文 献

- [1] 张其清,王彭延,朱明华,等. 胶原材料的生物学评价. 生物医学工程学杂志, 1989, 6(3): 216-218
- [2] 王学川,任龙芳. 胶原蛋白的研究进展及其在化妆品中的应用. 日用化学工业, 2005, 35(6): 388-392
- [3] 鸿巢章二,桥本周久. 水产利用化学. 北京: 中国农业出版社, 1994: 269
- [4] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch(*Lates nilotics*). Food Chem., 2004, 85: 81-89
- [5] 顾其胜,蒋丽霞. 胶原蛋白与临床医学. 上海: 第二军医大学出版社, 2003
- [6] Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory. Trends Food Sci. Tech., 2000, 11: 347-356
- [7] Calderon A M, Ruiz-Salazar R A, Jara-Marini M E. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. J. Food Sci., 2000, 65: 246-251
- [8] Tang C H, Wang X S, Yang X Q. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. Food Chem., 2009, 114: 1484-1490
- [9] 张宇昊,王强. 功能性短肽的研究进展. 中国油脂, 2007, 32: 69-73
- [10] Cornelly V V, Harry G, Dries B A B, et al. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. J. Agric. Food. Chem., 2002, 50: 2938-2946
- [11] Zhuang Y L, Sun L P. Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: Optimization using response surface methodology. J. Food Sci., 2011, 76: C483-C489
- [12] 王岗,卢德勋. 肽吸收的研究进展. 动物营养学报, 1999, 11(12): 69-71
- [13] Gilbert E R, Wang E A, Webb K E J. Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. J. Anim. Sci., 2008, 86: 2135-2155
- [14] 朱宇旌,王秉玉,张勇,等. 小肽转运载体 1 的生物学特性及其功能. 动物营养学报, 2012, 10: 1847-1853
- [15] 林路秀,李顺兴,郑凤英. 应用体外仿生模型分析海藻水煎液中微量金属的形态和生物可给性. 分析化学, 2010, 38: 823-827

第2章 鱼皮和鱼骨胶原蛋白的提取及特性

《英汉化学化工词汇》中将 collagen 翻译为胶原,有时候为了叙述的方便或是强调胶原为蛋白质,也把 collagen 翻译为胶原蛋白。在研究胶原蛋白的过程中,首先要明确胶原、明胶和胶原蛋白的概念。从各种资料上看,胶原和明胶的区别是比较明显的,而对于胶原蛋白这一概念,有的资料将其等同为胶原,而有的资料将胶原蛋白当做胶原、明胶以及其衍生物的统称。针对于鱼皮和鱼骨胶原蛋白的提取,先说一下胶原和明胶的区分,能被称为胶原的,必须是蛋白质没有变性,具有三螺旋结构,并保有大分子的生物活性;而明胶是胶原在酸、碱、酶或高温作用下的变性产物,已经失去其大分子生物活性。胶原总体上是均一的蛋白质,相对分子质量大且恒定,而明胶相对分子质量的分布变宽,而且不规则。

2.1 胶原蛋白的提取

胶原蛋白的提取方法主要有五种:酸法提取、碱法提取、盐法提取、酶法提取和热水抽提法提取。目前来讲,考虑到胶原蛋白的纯度和性质要求,一般采用酶法提取和热水抽提法提取,酶法提取的主要是胶原;热水抽提提取的主要是明胶。当然,从提取过程来看,这两种提取方法也相应地结合了酸法提取、碱法提取和盐法提取的工艺。

2.1.1 酶法提取

酶法制备的鱼源胶原主要是未变性的胶原蛋白,针对于鱼皮和鱼骨胶原的提取,其提取工艺比较固定^[1,2],主要包括以下几个步骤:

- ① 清洗:鱼皮和鱼骨用自来水清洗,除去杂质。
- ② 脱脂:清洗后的产品用 10% 正丁醇 4℃ 萃取 24 h,去除脂肪类物质,用蒸馏水清洗。
- ③ 剪碎:剪成相对较小的碎片。
- ④ 碱洗:放入烧杯中,加入 10 倍体积的 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液,搅拌 3 d 后清洗至中性。
- ⑤ 酸溶性粗胶原的提取:加 10 倍体积的 0.5 mol/L 乙酸溶液,搅拌 2 d,离心(10000 r/min, 1 h),上清液为酸溶性胶原粗制液。