

## 有机酸种类对罗非鱼皮酸溶性胶原提取和性质的影响

韩耀辉, 田浩浩, 石林凡, 任中阳, 翁武银

### Effects of Organic Acids on the Extraction and Properties of Acid-soluble Collagen from Tilapia Skin

HAN Yaohui, TIAN Haohao, SHI Linfan, REN Zhongyang, and WENG Wuyin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023010156>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 罗非鱼皮胶原蛋白肽在润肤霜中的应用及性能评价

Application and properties of collagen peptide from tilapia skin in moisturizing cream

食品工业科技. 2018, 39(5): 23-29 <https://doi.org/>

#### 两种鱼皮胶原蛋白的比较及其降解物中多肽的识别

Comparison of two kinds of fish skin collagen and characterization of peptides from the digested collagen

食品工业科技. 2018, 39(5): 7-12 <https://doi.org/>

#### 鱼胶原蛋白肽对 $\alpha$ -乳白蛋白和表没食子儿茶素没食子酸酯聚集行为的影响及所形成三元复合物的热稳定性

Inhibition of the Aggregation of  $\alpha$ -Lactalbumin and(-)-Epigallocatechin Gallate in the Presence of Collagen Peptide and the Thermal Stability of the Ternary Complexes Formed

食品工业科技. 2018, 39(14): 55-60 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.14.011>

#### 罗非鱼皮明胶酶解物及其模拟消化产物的抗氧化活性

Antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin hydrolysates and its simulated digestive products

食品工业科技. 2017(24): 20-26 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.24.005>

#### 鲨鱼单域抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的表达及热稳定性分析

Expression and Thermal Stability Analysis of Shark Single Domain Antibody-Alkaline Phosphatase Fusion Protein

食品工业科技. 2020, 41(21): 110-115 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020051>

#### 金鲳鱼鱼皮酶溶性胶原蛋白的提取工艺优化及基本特性

Optimization of extraction process and basic properties for pepsin-soluble collagen from Golden pompano skin

食品工业科技. 2017(19): 142-147 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.027>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

韩耀辉, 田浩浩, 石林凡, 等. 有机酸种类对罗非鱼皮酸溶性胶原提取和性质的影响 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 169-175. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010156

HAN Yaohui, TIAN Haohao, SHI Linfan, et al. Effects of Organic Acids on the Extraction and Properties of Acid-soluble Collagen from Tilapia Skin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 169-175. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010156

· 工艺技术 ·

# 有机酸种类对罗非鱼皮酸溶性胶原提取和性质的影响

韩耀辉, 田浩浩, 石林凡, 任中阳, 翁武银\*

(集美大学海洋食品与生物工程学院, 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建厦门 361021)

**摘要:** 本文比较了醋酸 (AA)、酒石酸 (TA)、柠檬酸 (CA) 提取的罗非鱼皮酸溶性胶原 (ASC) 的结构和性质。利用圆二色光谱 (CD) 仪和傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 仪分析胶原的二级结构, 利用差式扫描量热 (DSC) 仪测定胶原的热稳定性, 并比较分析 ASC 的成纤维能力。结果表明, AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的提取率分别为 15.87%、17.69% 和 28.63%。CD 结果表明 AA-ASC 和 CA-ASC 的三螺旋构象含量接近, 高于 TA-ASC。FTIR 数据表明 AA-ASC 的氢键含量最多, 其次是 CA-ASC 和 TA-ASC。根据 DSC 结果, 发现三种胶原热转变温度 ( $T_m$ ) 没有明显的差异, 但 AA-ASC、TA-ASC 和 CA-ASC 的焓值分别为 1.18、0.73 和 0.35 J/g。根据成纤维实验结果, 发现 AA-ASC 的成纤维速率和吸光度值最大, 其次是 CA-ASC 和 TA-ASC。研究结果表明, 有机酸种类对胶原的提取和性质影响可能与羧酸数目和解离常数密切相关。

**关键词:** 酸溶性胶原, 罗非鱼皮, 三螺旋构象, 成纤维能力, 热稳定性

中图分类号: TS254.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)22-0169-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010156



本文网刊:

## Effects of Organic Acids on the Extraction and Properties of Acid-soluble Collagen from Tilapia Skin

HAN Yaohui, TIAN Haohao, SHI Linfan, REN Zhongyang, WENG Wuyin\*

(College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Key Laboratory of Marine Functional Food in Xiamen, Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The effects of three organic acids, namely, acetic acid (AA), tartaric acid (TA), and citric acid (CA), on the structure and properties of acid-soluble collagen (ASC) from tilapia skin were compared in this study. The secondary structure of the collagen samples was analyzed by circular dichroism (CD) spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The thermal stability of the collagen samples was determined by differential scanning calorimetry (DSC), and the fibroblast ability of ASC was analyzed. Results showed that, the extraction yields of AA-ASC, TA-ASC and CA-ASC were 15.87%, 17.69%, and 28.63%, respectively. The content of triple helical conformation of AA-ASC was similar to that of CA-ASC, which was higher than that of TA-ASC. The FTIR data showed that AA-ASC had the highest hydrogen bond content, followed by CA-ASC and TA-ASC. No significant difference was found in the thermal transition temperature ( $T_m$ ) of the extracted three collagens, but the enthalpy values of AA-ASC, TA-ASC, and CA-ASC were 1.18, 0.73, and 0.35 J/g, respectively. The fibrogenesis experiment revealed that AA-ASC had the highest fibril-forming rate and absorbance, followed by CA-ASC and TA-ASC. The results of this study suggest that the number and dissociation constant of carboxylic acids may play an important role in the effect of organic acids on the extraction and properties of collagen from tilapia skin.

收稿日期: 2023-02-01

基金项目: 国家自然科学基金 (32272266); 福建省种业创新与产业工程项目 (2021FJSCZY01); 厦门市科技计划项目 (2022CX0312)。

作者简介: 韩耀辉 (2002-), 男, 大学本科, 研究方向: 水产品加工与综合利用, E-mail: 893924670@qq.com。

\* 通信作者: 翁武银 (1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质化学和水产加工, E-mail: wwymail@jmu.edu.cn。

**Key words:** acid-soluble collagen; tilapia skin; triple helix structure; fibrogenesis ability; thermal stability

胶原是由三条  $\alpha$  肽链通过-COOH 和-NH<sub>2</sub> 基团之间的共价键、氢键和范德华力结合而成的天然蛋白,约占动物体总蛋白的 30%,具有亲水性、生物相容性、低免疫原性等优点,是生物医学应用的理想材料<sup>[1-3]</sup>。海洋动物源胶原蛋白具有高得率、低免疫原性和低炎症性<sup>[4]</sup>。罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是世界上第二大养殖鱼类<sup>[5]</sup>。2021年罗非鱼全国年产量约达 166 万吨<sup>[6]</sup>。在罗非鱼片等产品生产加工过程中会产生鱼鳞、鱼皮等大量富含胶原蛋白的副产物,它们却没有全部得到高值化利用<sup>[7-9]</sup>。因此,利用罗非鱼鱼皮、鱼鳞提取胶原,不仅可以提高罗非鱼的利用率和附加值,还可以减少环境污染。

酸的种类、浓度、液/固比、温度和时间等因素对胶原提取率有很大影响<sup>[1,4,10]</sup>。Bhuimbar 等<sup>[7]</sup>研究了酸的种类对水母胶原提取率的影响,结果表明乳酸对胶原的提取率最高,其次是甲酸、酒石酸(tartaric acid, TA)、乙酸(acetic acid, AA)和柠檬酸(citric acid, CA)等。Skierka 等<sup>[11]</sup>研究了 AA、TA、乳酸和盐酸等酸种类对鳕鱼皮胶原提取率的影响,结果显示 AA 和乳酸对鱼皮胶原的提取率高于其他酸。这些结果表明,酸的种类对鱼皮胶原的提取具有一定的影响,但关于有机酸种类对罗非鱼皮胶原提取和性质的影响却未见报道。AA、TA、CA 分别为一元、二元、三元羧酸,通过研究它们对罗非鱼胶原的提取和理化性质的影响,将为有机酸种类对鱼类胶原的提取机制提供一定的理论依据。

因此,本研究利用 AA、TA 和 CA 提取罗非鱼皮酸溶性胶原(acid-soluble collagen, ASC),通过 ASC 的提取率测定、紫外光谱分析、圆二色光谱(CD)分析、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析、傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析、热稳定性测定和成纤维能力分析,探究有机酸种类对提取胶原理化性质的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

冷冻罗非鱼皮 宁德市夏威食品有限公司提供;TA、AA、CA 分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

UV-8000A 紫外-可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;CD 光谱仪 英国 Applied Photophysics 公司;Aglient 1200 高效液相色谱仪 美国 Aglient 公司;Tensor 27 ATR-FTIR 光谱仪 德国 Bruker 光谱仪器公司;Q2000 差示扫描量热(DSC)仪 美国 TA 仪器有限公司;TA-XT Plus 质构仪 英国 Stable Micro System 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 罗非鱼皮 ASC 的提取 罗非鱼皮 ASC 的提取根据 Shi 等<sup>[12]</sup>报道的方法,提取过程在 4 °C 下完

成。将解冻的鱼皮放在 0.1 mol/L NaOH 溶液(w/v, 1:10)中浸泡 36 h,然后用蒸馏水冲洗至中性。将漂洗好的鱼皮以 1:10 比例依次浸入 10%(v/v)正丁醇和 25%(v/v)乙醇,浸泡 24 h 后用蒸馏水冲洗。漂洗好的鱼皮以 1:30(w/v)的比例分别放在 0.5 mol/L AA、TA 和 CA 中浸泡萃取 48 h,萃取液用 NaCl 盐析后再通过透析、冻干得到纯化的 AA-ASC、TA-ASC 和 CA-ASC。胶原的提取率通过如下公式进行计算<sup>[13]</sup>:

$$\text{提取率}(\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

式中:m 表示冻干胶原的质量,g;M 表示干鱼皮的质量,g。

### 1.2.2 ASC 理化性质测定

1.2.2.1 紫外吸收光谱 胶原紫外吸收光谱参考 Meng 等<sup>[14]</sup>报道的方法进行测定。称取适量冻干的胶原溶于 10 mmol/L HCl(pH3.0)溶液中得到终浓度为 0.2 mg/mL 的胶原溶液。以 10 mmol/L HCl 溶液作为空白对照,利用紫外-可见分光光度计在 190~400 nm 波长范围内进行扫描。

1.2.2.2 CD 分析 胶原 CD 光谱参考寇慧芝等<sup>[15]</sup>报道的方法进行测定。称取适量冻干的胶原溶于 10 mmol/L HCl 溶液中得到 0.1 mg/mL 的胶原溶液,在 25 °C 下利用 CD 光谱仪在 260~190 nm 波长范围内进行扫描,扫描速度为 1 nm/min。

1.2.2.3 氨基酸组成分析 胶原溶解在含有 0.1% 苯酚的 6 mol/L HCl 溶液后,放在 110 °C 下消化水解 22 h。利用旋转蒸发器在 60 °C 反复旋蒸去除盐酸,再用 0.02 mol/L HCl 溶解,过 0.22  $\mu\text{m}$  水系膜后,用 OPA/FMOC 进行衍生,利用高效液相色谱仪进行测定氨基酸组成。

1.2.2.4 SDS-PAGE 分析 将冻干的胶原溶解在 8 mol/L 尿素-2% SDS-20 mmol/L Tris-HCl(pH8.8)溶液后,采用 4% 浓缩凝胶和 6% 分离凝胶在 8 mA 电流下进行 SDS-PAGE 分析。然后按照冯玲玲等<sup>[16]</sup>的方法对凝胶进行染色和脱色,利用凝胶成像仪拍照保存。

1.2.2.5 FTIR 分析 参照郑清瑶等<sup>[17]</sup>报道的方法,利用衰减全反射-FTIR 光谱仪在室温下对胶原进行测定。取适量冻干的胶原样品放置在单反射锗晶体池上,在 4000~1000  $\text{cm}^{-1}$  范围内进行扫描,并在 32 次扫描中以 4  $\text{cm}^{-1}$  的分辨率采集信号。

1.2.2.6 胶原热稳定性测定 参考 Liu 等<sup>[18]</sup>报道的方法,利用 DSC 测定胶原蛋白的热稳定性,并通过设备配套软件计算玻璃化转变温度( $T_m$ )和热变性焓值( $\Delta H$ )。将冻干的胶原以 1:40(w:v)比例溶于 10 mmol/L HCl 溶液后,准确称取 5 mg 左右样品于

铝坩埚中,以空的坩埚作对照。扫描温度范围为 10~50 °C,升温速率为 5 °C/min。

1.2.2.7 成纤维能力测定 胶原成纤维度的测定根据 Meng 等<sup>[14]</sup> 报道的方法并稍作修改。参考 Tang 等<sup>[19]</sup> 报道的方法,将胶原溶于 10 mmol/L HCl 溶液中得到 0.5 mg/mL 的胶原溶液。利用缓冲液在 4 °C 对胶原溶液透析 12 h,期间每 3 h 更换一次透析液<sup>[19]</sup>。将透析好的胶原溶液置于 25 °C 下孵育 30 min 后,通过 15000×g、20 °C 下离心 20 min 后,利用 Lowry 法测定上清液的蛋白含量。胶原成纤维度定义为离心后上清液中胶原质量减少的百分比,按如下公式进行计算:

$$Y(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

式中: Y 是胶原的成纤维度,%;  $C_0$  是胶原的初始浓度,mg/mL; C 是离心后上清的蛋白浓度,mg/mL。

### 1.3 数据处理

实验数据结果用平均值±标准差表示。数据处理软件为 Excel 16,图形绘制软件为 Origin 2019,采用 SPSS 18.0 软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA),并通过 Duncan 多重比较进行显著性检验,显著水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同有机酸对罗非鱼皮酸溶性胶原提取效果

图 1 显示了罗非鱼皮 AA-ASC、TA-ASC 和 CA-ASC 的提取率。由图可知,AA-ASC 和 TA-ASC 的提取率分别为 15.87% 和 17.69%,显著低于 CA-ASC 的提取率 28.63% ( $P < 0.05$ ),均高于报道的罗非鱼皮 AA-ASC 提取率(11.70%)<sup>[20]</sup>。三种有机酸下的胶原提取率不同可能是因为 AA、TA、CA 分别为一元、二元、三元羧酸,在相同摩尔浓度下 CA 中的多个羧基不断解离<sup>[21]</sup>,与胶原的肽链竞争性结合<sup>[22]</sup>,促进胶原溶胀溶解。另一方面,浸提溶液的 pH 通过调节电荷密度影响胶原的静电相互作用和结构<sup>[1]</sup>,pH 太低会引起胶原在提取过程中发生变性<sup>[23]</sup>,进而影响胶原在鱼皮中的溶解度和提取率。在相同摩尔浓度下

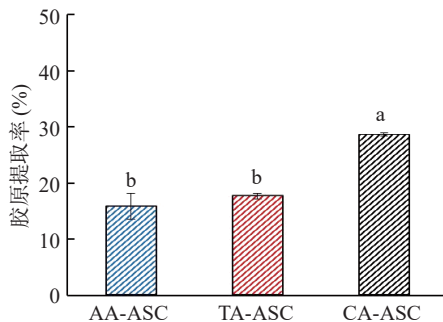


图 1 罗非鱼皮酸溶性胶原提取率

Fig.1 Yields of ASCs extracted from tilapia skin

注: AA-ASC: 醋酸提取的酸溶性胶原; TA-ASC: 酒石酸提取的酸溶性胶原; CA-ASC: 柠檬酸提取的酸溶性胶原; 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

TA 的 pH 最低,可能由于鱼皮胶原在提取过程中发生部分变性,结果导致 TA-ASC 的提取率接近 AA-ASC。

### 2.2 不同有机酸对罗非鱼皮酸溶性胶原紫外吸收的影响

AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 分别在 223、221、219 nm 出现最大吸收峰(图 2),这归因于胶原三螺旋肽链的  $-C=O$ 、 $-COOH$  和  $-CONH_2$  等生色基团的  $n \rightarrow \pi^*$  跃迁<sup>[24]</sup>。通常,胶原蛋白中酪氨酸和苯丙氨酸等芳香族生色氨基酸含量很少,在 280 nm 处无明显吸收峰<sup>[25]</sup>。因此,AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 在 280 nm 处的吸收峰均不明显,表明提取的胶原中杂蛋白含量少,纯度高。这类似于报道的暗纹东方鲑鱼皮胶原蛋白的研究结果<sup>[25]</sup>。

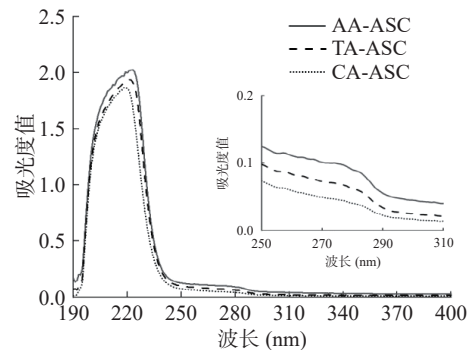


图 2 罗非鱼皮酸溶性胶原紫外吸收光谱

Fig.2 UV spectra of ASCs extracted from tilapia skin

### 2.3 不同有机酸对罗非鱼皮酸溶性胶原三螺旋结构的影响

通常,天然胶原蛋白的 CD 光谱有一个正吸收峰(220 nm)和一个负吸收峰(195~198 nm),分别来自蛋白多肽链的  $n \rightarrow \pi^*$  电跃迁和  $\pi \rightarrow \pi^*$  磁跃迁<sup>[26-27]</sup>。罗非鱼皮 AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的最大正吸收峰和最大负吸收峰分别在 220 和 197 nm 左右(图 3),图谱与横坐标轴的交叉点分别在 213、216 和 213 nm,具有典型的三螺旋结构<sup>[28]</sup>。在相同浓度(0.1 mg/L)下,AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的 CD 光谱强度依次减弱,表明不同有机酸提取的胶原二级结构存在差异<sup>[29]</sup>。CD 光谱中正负峰强度绝对值的比值(Rpn)用来反映胶原分子的三螺旋程度。非变性胶原的 Rpn 值一般为 0.12,当胶原发生部分变性时,Rpn 值降低,图谱与横坐标轴的交叉点红移,胶原的三螺旋构象含量降低<sup>[23,30]</sup>。AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的 Rpn 值分别为 0.12、0.05、0.11,而且 TA-ASC 的图谱与横坐标轴的交叉点相对 AA-ASC 和 CA-ASC 发生了红移(图 3)。这些结果表明 AA-ASC 和 CA-ASC 的完整性较好、三螺旋构象含量较高,而 TA-ASC 发生了部分变性。酸的解离常数( $K_a$ )越高、pH 越低,胶原的溶胀性能就越强,但是有机酸会破坏胶原三螺旋结构的酰胺键、端肽的不稳定交联以及分子内/间的非共价键<sup>[31]</sup>。极低 pH 的破

坏作用可能会增强,从而导致胶原在提取过程中发生变性<sup>[22,31]</sup>。本实验中 AA( $K_a=1.7\times 10^{-5}$ )、TA( $K_{a1}=1.0\times 10^{-3}$ ,  $K_{a2}=4.6\times 10^{-5}$ )和 CA( $K_{a1}=7.4\times 10^{-4}$ ,  $K_{a2}=1.7\times 10^{-5}$ ,  $K_{a3}=4.0\times 10^{-7}$ )分别为一元、二元和三元羧酸,一级解离常数( $K_{a1}$ )大小为:TA>CA>AA。TA-ASC 变性可能是因为 TA 的  $K_{a1}$  值最大、酸性最强。

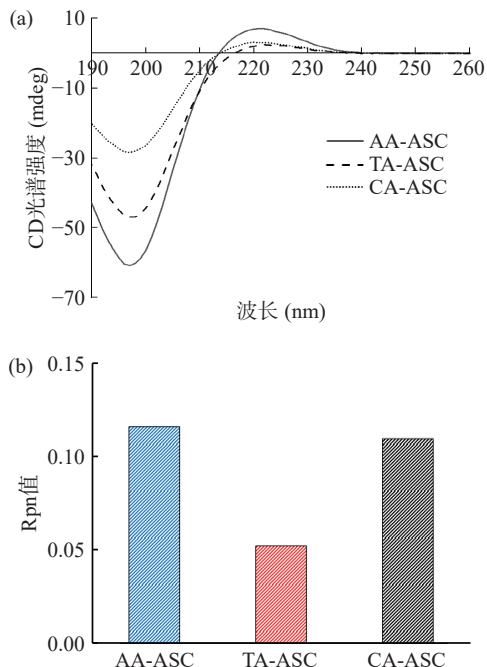


图3 罗非鱼皮酸性胶原 CD 光谱(a)和 Rpn 值(b)  
Fig.3 CD spectrum (a) and Rpn ratio (b) of ASCs extracted from tilapia skin

### 2.4 不同有机酸对罗非鱼皮酸性胶原氨基酸组成的影响

罗非鱼皮 AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的氨基酸组成测定结果如表 1 所示。由表可知,AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 均富含甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)和羟脯氨酸(Hyp)等胶原蛋白的特征氨基酸,同时组氨酸(His)、酪氨酸(Tyr)和赖氨酸(Lys)3 种非胶原特征氨基酸均未检出,表明 AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 均为高纯度胶原。Gly 的含量最高,约占总氨基酸残基的三分之一,这是因为除了 C-端的前 10 个氨基酸残基和 N-端的后 14 个氨基酸残基,胶原三螺旋区域的肽段均以 Gly-X-Y 的重复序列进行分布<sup>[32]</sup>。AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的 Hyp 含量逐渐减少,表明胶原含量依次降低,可能也会影响胶原的热稳定性。

### 2.5 不同有机酸对罗非鱼皮酸性胶原分子量的影响

罗非鱼皮胶原的电泳图谱如图 4 所示。由图可知,AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 均由  $\alpha$ ( $\alpha_1$  和  $\alpha_2$ ) 亚基、二聚体  $\beta$  亚基、三聚体  $\gamma$  亚基和少量高分子组分(HMWF)组成,三种胶原的  $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  谱带的强度比约为 2:1。这些结果表明 AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 均为典型的 I 型胶原<sup>[33]</sup>。且胶原的亚基组成不受有机酸种类的影响。

表 1 罗非鱼皮酸性胶原氨基酸组成(残基数量/1000 个氨基酸残基)

Table 1 Amino acid compositions of ASCs extracted from tilapia skin (residues per 1000 total amino acid residues)

氨基酸	AA-ASC	TA-ASC	CA-ASC
Asp	47.57±1.31 <sup>b</sup>	49.32±1.96 <sup>a</sup>	50.72±0.40 <sup>a</sup>
Glu	88.61±4.07 <sup>b</sup>	94.55±6.57 <sup>ab</sup>	97.89±0.74 <sup>a</sup>
Ser	39.18±0.29 <sup>b</sup>	42.98±0.38 <sup>a</sup>	42.87±1.66 <sup>a</sup>
His	0	0	0
Gly	344.50±7.27 <sup>a</sup>	335.05±15.9 <sup>a</sup>	344.77±2.58 <sup>a</sup>
Thr	12.48±0.01 <sup>a</sup>	12.24±0.77 <sup>a</sup>	12.53±0.13 <sup>a</sup>
Arg	59.00±1.76 <sup>a</sup>	57.49±0.16 <sup>b</sup>	58.89±0.49 <sup>a</sup>
Ala	132.54±2.66 <sup>a</sup>	131.35±0.35 <sup>a</sup>	132.44±0.31 <sup>a</sup>
Tyr	0	0	0
Cys	25.93±0.98 <sup>a</sup>	28.66±3.92 <sup>a</sup>	24.87±0.19 <sup>a</sup>
Val	18.30±0.93 <sup>a</sup>	19.76±0.05 <sup>a</sup>	19.39±0.51 <sup>a</sup>
Met	9.38±1.05 <sup>a</sup>	8.71±0.10 <sup>a</sup>	8.69±0.09 <sup>a</sup>
Phe	6.72±0.67 <sup>b</sup>	8.85±0.91 <sup>a</sup>	8.42±0.86 <sup>a</sup>
Ile	19.60±0.55 <sup>ab</sup>	18.32±0.54 <sup>b</sup>	20.08±0.21 <sup>a</sup>
Leu	38.30±0.69 <sup>a</sup>	32.75±3.32 <sup>b</sup>	33.18±0.63 <sup>b</sup>
Lys	0	0	0
Hyp	63.88±2.46 <sup>a</sup>	57.48±0.82 <sup>b</sup>	49.83±1.93 <sup>c</sup>
Pro	94.01±2.85 <sup>a</sup>	102.49±7.39 <sup>a</sup>	95.44±3.69 <sup>a</sup>
Total	1000	1000	1000

注:同行不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

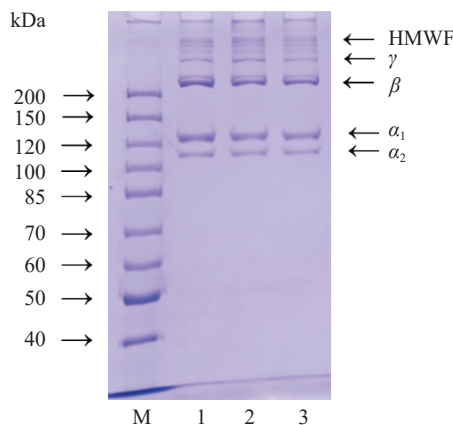


图4 罗非鱼皮酸性胶原 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE patterns of ASCs extracted from tilapia skin  
注: M: 标准蛋白; 1: AA-ASC; 2: TA-ASC; 3: CA-ASC; HMWF: 高分子组分。

### 2.6 不同有机酸对罗非鱼皮酸性胶原红外光谱的影响

胶原的 FTIR 光谱通过一组酰胺吸收区域进行表征,这些由基团振动产生的酰胺带提供了多肽链的二级结构信息<sup>[17]</sup>。罗非鱼皮 AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的 FTIR 光谱如图 5 所示。由图可知,AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的酰胺 A 吸收峰分别在 3293、3305、3300  $\text{cm}^{-1}$ 。酰胺 A 主要与 N-H 基团的伸缩振动有关,当 N-H 基团参与形成氢键时,酰胺 A 峰向低波数移动<sup>[17]</sup>。因此,AA-ASC 的 N-H 基团参与形成的氢键最多,其次是 CA-ASC 和 TA-ASC。AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的酰胺 I 分别在 1629、

1640、1633  $\text{cm}^{-1}$ , 酰胺 II 分别在 1540、1546、1544  $\text{cm}^{-1}$  (图 5), 意味着胶原中 C=O 和 C-N 参与维持胶原的三螺旋结构的氢键含量增加<sup>[17,34]</sup>。

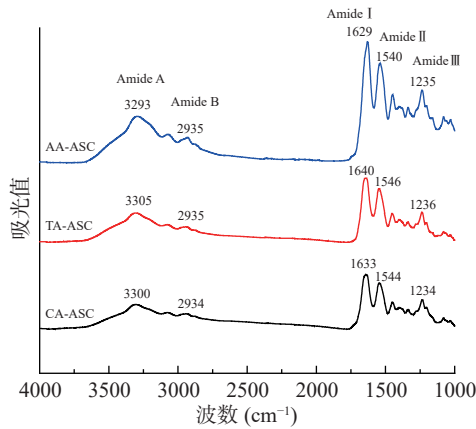


图 5 罗非鱼皮酸溶性胶原的红外图谱

Fig.5 FTIR spectra of ASCs extracted from tilapia skin

## 2.7 不同有机酸对罗非鱼皮酸溶性胶原热稳定性的影响

罗非鱼皮 AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的 DSC 曲线如图 6 所示。AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的热转变温度( $T_m$ )均在 32  $^{\circ}\text{C}$  左右, 这与 Yan 等<sup>[35]</sup> 报道的 AA 提取的罗非鱼皮胶原的  $T_m$  (31.85  $^{\circ}\text{C}$ ) 一致。图 6 的结果表明有机酸提取不会影响罗非鱼皮 ASC 的  $T_m$ 。另一方面, 变性焓( $\Delta H$ )与胶原分子周围形成的水化网络结构的氢键数量相关<sup>[36]</sup>。AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的  $\Delta H$  分别为 1.18、0.73、0.35 J/g, 表明三者的热稳定性依次降低。这可能是因为 AA-ASC 的亚氨基酸和氢键含量最高, TA-ASC 的氢键含量低于 CA-ASC, 但亚氨基酸含量显著高于 CA-ASC(表 1 和图 5)。邓明霞等<sup>[37]</sup> 通过相关性数学模型分析, 也表明了氢键和亚氨基酸含量会影响淡水鱼胶原的热稳定性。

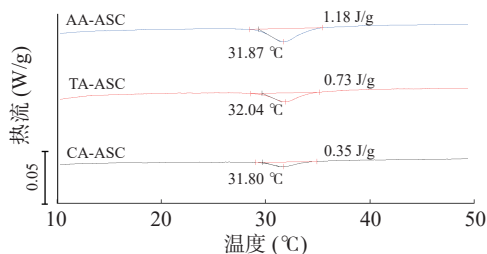


图 6 罗非鱼皮酸溶性胶原 DSC 曲线

Fig.6 DSC thermograms of ASCs extracted from tilapia skin

## 2.8 不同有机酸对罗非鱼皮酸溶性胶原成纤维能力的影响

罗非鱼皮 AA-ASC、TA-ASC、CA-ASC 的浊度-时间曲线和动力学常数如图 7 所示。胶原自组装成纤维过程一般分为迟滞期(吸光度值保持不变)、增长期(吸光度值快速增大)和稳定期(吸光度值达到最大并保持稳定状态)。AA-ASC、TA-ASC、CA-

ASC 的迟滞时间分别为 6、21、19 min(图 7a)。研究表明, 胶原三螺旋构象含量降低会导致自组装时间(迟滞期和增长期)延长<sup>[38]</sup>。在本研究中, AA-ASC 的三螺旋构象含量与 CA-ASC 接近且均高于 TA-ASC(图 3b), 这可能导致 TA-ASC 的迟滞期和自组装时间最长。由图 7 可知, 稳定期的吸光度值和动力学常数大小顺序依次为 AA-ASC>CA-ASC>TA-ASC。这与胶原三螺旋构象含量(图 3b)和氢键含量(图 5)的变化趋势一致。这个结果表明自组装成纤维过程可能受胶原分子的三螺旋结构和氢键等因素的影响。

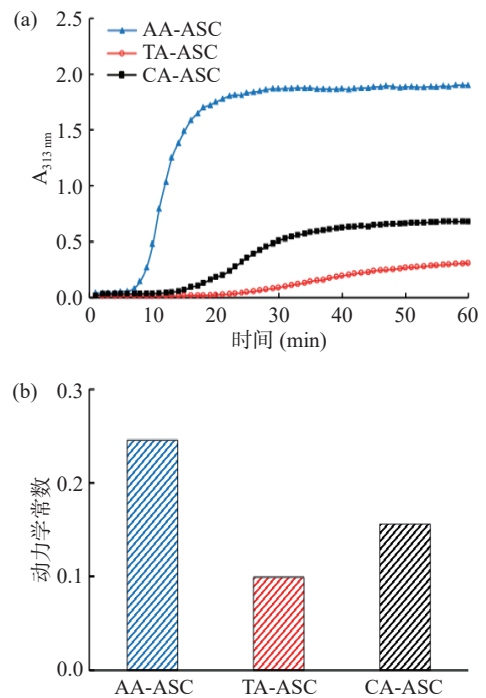


图 7 罗非鱼皮酸溶性胶原的浊度-时间曲线(a)和动力学常数(b)

Fig.7 Turbidity-time curves (a) and kinetic constants (b) of ASCs extracted from tilapia skin

## 3 结论

本研究揭示了醋酸、酒石酸和柠檬酸三种有机酸对罗非鱼胶原提取和性质的影响。醋酸对罗非鱼胶原提取率明显低于其他有机酸, 但提取的胶原其三螺旋构象含量和热变性焓值均最高。研究结果表明有机酸的种类会影响酸对胶原三螺旋结构和氢键的破坏, 进而影响胶原的提取率、氨基酸组成、热稳定性和成纤维能力。胶原的成纤维速率主要受三螺旋构象含量的影响, 三螺旋构象含量越高, 成纤维速率越大。本研究为有机酸种类对罗非鱼皮酸溶性胶原提取和性质的影响机制提供了一定的理论基础。

### 参考文献

- [1] LIU D S, WEI G M, LI T C, et al. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 836–843.
- [2] 徐道, 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.]
- [3] SUBHAN F, HUSSAIN Z, TAUSEEF I, et al. A review on recent advances and applications of fish collagen[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(6): 1027-1037.
- [4] AHMED M, VERMA A K, PATEL R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review[J]. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2020, 18: 100315.
- [5] YAN M Y, JIANG X J, WANG G C, et al. Preparation of self-assembled collagen fibrillar gel from tilapia skin and its formation in presence of acidic polysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 233: 115831.
- [6] 王丹, 吴反修, 宋丹丹等. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 21-38. [WANG D, WU F X, SONG D D, et al. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 21-38.]
- [7] BHUIMBAR M V, BHAGWAT P K, DANDGE P B. Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2019, 7(2): 102983.
- [8] CHEN J D, LI L, YI R Z, et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 66: 453-459.
- [9] CHUAYCHAN S, BENJAKUL S, KISHIMURA H. Characteristics of acid-and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*) [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 63(1): 71-76.
- [10] 曾少葵. 罗非鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其功能特性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007. [ZENG S K. Study on isolation and characterization of collagens from the skin of *Oreochromis niloticus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007.]
- [11] SKIERKA E, SADOWSKA M. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(3): 1302-1306.
- [12] SHI L F, TIAN H H, WANG Y X, et al. Effect of pH on properties of golden pompano skin collagen-based fibril gels by self-assembly *in vitro* [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(13): 4801-4807.
- [13] JOHNY L C, KUDRE T G, PV S. Acid and pepsin soluble collagens from skin by-product of red-bellied pacu (*Piaractus brachypomus*): Extraction and comparative characterizations towards finding substitute to bovine and porcine collagen [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2021, 30(3): 364-376.
- [14] MENG D W, LI W, URA K, et al. Effects of phosphate ion concentration on *in-vitro* fibrillogenesis of sturgeon type I collagen [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 148: 182-191.
- [15] 寇慧芝, 张惠惠, 韩庆秋, 等. 氨基酸组成对胶原与整合素  $\alpha 2\beta 1$  结合能力的影响 [J]. 食品科学, 2023, 44(6): 143-150. [KOU H Z, ZHANG H H, HAN Q Q, et al. Effects of amino acid composition on the binding ability of collagen to integrin  $\alpha 2\beta 1$  [J]. Food Science, 2023, 44(6): 143-150.]
- [16] 冯玲玲, 冯进, 李春阳. 海蜇 I 型胶原蛋白的提取及结构特性研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 15-21. [FENG L L, FENG J, LI C Y. Extraction and structural characteristics of type I collagen from *Rhopilema esculenta* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 15-21.]
- [17] 郑清瑶, 曹文红, 韩昱梁, 等. 几种提取方法制备的糙刺参体壁胶原蛋白的特性分析 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(15): 145-152. [ZHENG Q Y, CAO W H, HAN Y L, et al. Characteristics of collagens from the body wall of *Stichopus horrens* prepared by several extraction methods [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(15): 145-152.]
- [18] LIU D S, ZHOU P, LI T C, et al. Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 41: 290-297.
- [19] TANG L L, 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.
- [20] BI C H, LI X H, XIN Q, et al. Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(2): 234-240.
- [21] NIU L H, ZHOU X, YUAN C Q, et al. Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin extracted with alkaline and different acid pretreatments [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 33(2): 336-341.
- [22] GÓMEZ-GUILOEN M C, MONTERO P. Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus boscii*) skins with several organic acids [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(2): 213-216.
- [23] CHENG F Y, HSU F W, CHANG H S, et al. Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(2): 563-567.
- [24] RAN Y Q, SU W, MA L, et al. Insight into the effect of sulfonated chitosan on the structure, rheology and fibrillogenesis of collagen [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 1480-1490.
- [25] 周瑞, 李若男, 周丽莎, 等. 暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的提取及其特性 [J]. 水产学报, 2020, 44(8): 1349-1359. [ZHOU R, LI R N, ZHOU L S, et al. Extraction and characteristics of collagens from the skin of puffer fish (*Tetradontiformes fasciatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(8): 1349-1359.]
- [26] 汤俊, 魏东芝, 张国钧, 等. 胶原蛋白的高效制备及与明胶的鉴别 [J]. 食品科学, 2010, 31(7): 54-60. [TANG J, WEI D Z, ZHANG G J, et al. Development of efficient preparation and identification methods for bovine collagen [J]. Food Science, 2010, 31(7): 54-60.]
- [27] FERRARO V, GAILLARD-MARTINIE B, SAYD T, et al. Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 97: 55-66.
- [28] 张金伟, 曹念, 陈武勇. 微波辐照对胶原蛋白三股螺旋结构的影响 [J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(5): 1353-1357. [ZHANG J W, CAO N, CHEN W Y. Influence of microwave irradiation on collagen triple helix structure [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(5): 1353-1357.]
- [29] GUO M H, LIU S C, ISMAIL M, et al. Changes in the myosin secondary structure and shrimp surimi gel strength induced

by dense phase carbon dioxide[J]. *Food Chemistry*, 2017, 227: 219–226.

[ 30 ] HE L, YANG J, XU C Z, et al. Effect of pre-shearing treatment on the molecular structure, fibrillogenesis behavior and gel properties of collagen[J]. *New Journal of Chemistry*, 2020, 44(17): 6760–6770.

[ 31 ] NIKOO M, BENJAKUL S, BASHARI M, et al. Physico-chemical properties of skin gelatin from farmed Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) as influenced by acid pretreatment[J]. *Food Bioscience*, 2014, 5: 19–26.

[ 32 ] LIU D S, LI L, REGENSTEIN J M, et al. Extraction and characterisation 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.

[ 33 ] 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.

[ 34 ] MUYONGA J H, COLE C G B, DUODU K G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile

perch (*Lates niloticus*) [J]. *Food Chemistry*, 2004, 85(1): 81–89.

[ 35 ] YAN M Y, QIN S, LI J. Study on the self-assembly property of type I collagen prepared from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin by different extraction methods[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 50(9): 2088–2096.

[ 36 ] SALVATORE L, GALLO N, AIELLO D, et al. An insight on type I collagen from horse tendon for the manufacture of implantable devices[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 291–306.

[ 37 ] 邓明霞, 汪海波, 杨玲, 等. 氨基酸组成及溶剂环境对淡水鱼胶原蛋白热稳定性能的影响[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(12): 111–120. [ DENG M X, WANG H B, YANG L, et al. Effects of amino acid composition and solvent environment on the thermal stability of fish collagen[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(12): 111–120. ]

[ 38 ] THUANTHONG M, SIRINUPONG N, YOURAVONG W. Triple helical structure of acid-soluble collagen derived from Nile tilapia skin as affected by extraction temperature[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(11): 3795–3800.