

## 大鲵骨酸溶性和胃蛋白酶溶性胶原蛋白的提取与表征

官 萱, 包建强\*, 黄可承, 陈彦婕, 唐嘉诚  
(上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 大鲵为一种珍贵的两栖动物,营养丰富。为了充分且有效利用其加工副产物,分离并表征了来自大鲵骨的酸溶性胶原蛋白(ASC)和胃蛋白酶溶性胶原蛋白(PSC)。大鲵骨 ASC 和 PSC 的产率分别为 10.71%和 13.11%。通过傅里叶红外光谱揭示胶原蛋白稳定的三螺旋结构。SDS-PAGE 电泳图显示两个样品均为 I 型胶原蛋白,同时具有高水平的亚氨基酸(179~187/1 000 个残基)。样品在 pH 6 时溶解度最高。热变性温度(45.78~46.51 °C)显著高于海洋和淡水鱼物种。在 SEM 下,胶原蛋白显示出致密的片状和不规则的孔洞状。这些结果表明大鲵骨胶原蛋白特性与哺乳动物胶原蛋白相似,具有成为其替代品的潜力,为其后续的研究和开发利用提供了基础数据。

**关键词** 大鲵骨; 胶原蛋白; 提取; 表征

**文章编号** 1009-7848(2024)03-0268-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.027

大鲵,又名中国大鲵,是迄今为止发现的最大两栖动物属,野生大鲵自 2006 年起被列入 IUCN 濒危物种红色名录<sup>[1]</sup>。大鲵肉质细嫩,味道鲜美,深受消费者欢迎,其食用和药用价值远高于普通食用肉,具有滋补体质、促进智力发展、增强体质、抗衰老、抗氧化、预防肿瘤等作用<sup>[2]</sup>。作为水中的活人参,它很有名气。随着人们对大鲵认识的逐步加深,强大的市场需求推动了养殖大鲵产业的蓬勃发展。到 2020 年 10 月底,养殖大鲵的批发价格已降至每公斤 19~28 美元。大鲵及其加工产品占有一定的市场份额。在批量加工和生产过程中,由于技术的不成熟和人们认识的不足,大鲵骨骼在加工过程中经常被作为副产品丢弃,造成环境污染和资源浪费<sup>[3]</sup>。迫切需要对其营养成分进行提取和深入研究,了解其理化性质,为合理、充分利用大鲵骨提供参考。

胶原蛋白是自然界中主要存在于动物结缔组织中的一种结构蛋白,以胶原纤维的形式广泛存在于动物皮肤、骨、软骨、肌腱、肌膜和韧带中,是许多哺乳动物中含量最丰富的蛋白质。I 型胶原蛋白的生产成本相对较低,研究最多。近年来,胶原

蛋白因独特的理化性质,自被提取以来,已广泛应用于食品、化妆品、化工等领域,具有预防骨质疏松,美容、抗衰老,抗溃疡,治疗类风湿性关节炎,调节内分泌,促进伤口愈合等生理功能<sup>[4]</sup>。由于口蹄疫(FMD)、传染性海绵状脑病(TSE)和牛海绵状脑病(BSE)等各种疾病的爆发,水源胶原蛋白已逐渐取代陆地胶原蛋白的市场份额<sup>[5]</sup>。与陆生动物相比,水源胶原蛋白具有胶原蛋白含量高、疾病传播风险低、无宗教和伦理冲突、炎症反应低的优点。目前,大鲵骨中胶原蛋白的结构、理化性质和挥发性成分仍不清楚。

本研究从人工养殖的大鲵骨骼中提取酸溶性和胃蛋白酶溶性胶原蛋白,测定并比较这两种胶原蛋白的结构、分子质量、氨基酸组成、微观结构等理化性质。作为加工的副产品,大鲵骨的利用率目前较低。对其胶原蛋白性质的研究,不仅可以充分利用自然资源,缓解过度捕捞造成的生态压力 and 环境污染问题,还可为进一步将大鲵骨和胶原蛋白开发成安全、营养、无味的食品或保健品提供参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料与试剂

试验材料:大鲵骨,购于浙江丽水大鲵养殖基地。

试验试剂:NaOH、异丙醇、EDTA、柠檬酸、盐

收稿日期:2023-03-28

基金项目:水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心项目(ZF1206);上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300)

第一作者:官萱,女,硕士生

通信作者:包建强 E-mail: baojq@shou.edu.cn

酸、冰醋酸、NaCl、均为分析纯,购于国药化学试剂有限公司;胃蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶,购于上海麦克林股份有限公司。

## 1.2 仪器与设备

pH计(Seven2Go),梅特勒仪器(上海)有限公司;鼓风干燥箱(DHG-9070A),上海鳌珍仪器制造有限公司;分析天平(ME204型),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;电热恒温水浴锅(DK-S28),上海精宏实验设备有限公司;热场发射扫描电镜(SU5000型),日本日立公司;差式扫描量热仪(DSC8500型),美国PeekinElmer公司;垂直电泳仪(17-3930型),美国Bio-Rad公司;傅里叶变换红外光谱仪(iS10型),美国Thermo Nicolet公司;超高速氨基酸自动分析仪(LA-8080型),日本日立公司。

## 1.3 大鲵骨的制备

人工养殖大鲵由浙江丽水大鲵养殖基地提供。大鲵屠宰方法符合GB12694-2016《畜禽屠宰加工卫生规范》,储存在-80℃超低温冷冻柜中。

## 1.4 酸溶性和胃蛋白酶溶性胶原蛋白的制备

使用Ahmed等<sup>[6]</sup>的方法提取大鲵骨胶原蛋白,并在此基础上进行了略微改动。将冷冻的大鲵骨流水解冻,添加0.1 mol/L NaOH溶液(固体/溶剂比为1:10),在4℃下浸泡12 h,每6 h更换一次碱溶液。该步骤是去除大鲵骨中的非胶原蛋白。然后用冷冻蒸馏水洗涤,直到pH值达到约7,添加10%异丙醇溶液(固体/溶剂比为1:10),在相同条件下浸泡12 h,以去除多余脂肪。最后,添加0.5 mol/L EDTA溶液(固溶比为1:10)并浸泡48 h,以去除大鲵椎骨中的矿物质。

将预处理后的鱼骨冷冻干燥1 d,用高速粉碎机粉碎,按照1:15(w/v)的比例加入0.5 mol/L乙酸,在4℃条件下不断搅拌48 h,将得到的混合物在4℃下以10 000×g离心15 min,同样的条件再提取一次,收集离心后的上清液并合并两次提取液。在提取液中加入NaCl直至最终浓度为2 mol/L,用4 mol/L的NaOH溶液调pH至7.0,4℃下过夜保存。将提取液在4℃下以10 000×g离心30 min,收集沉淀,溶于最小体积的0.5 mol/L醋酸中,使用截留分子质量为8~14 ku的透析袋在0.1

mol/L乙酸醋酸透析2 d,在纯水中透析2 d以纯化提取到的胶原蛋白。将制备好的样品冷冻干燥后于-80℃超低温冰箱中储存。PSC与ASC提取过程相同,在提取过ASC的样品中提取酶溶性胶原蛋白,在0.5 mol/L乙酸溶液中加入一定量的猪胃蛋白酶(酶活力为20万U/g),使样品中其含量为250 U/mg,其余步骤与提取ASC相同。

## 1.5 胶原蛋白中羟脯氨酸含量的测定

羟脯氨酸含量的测定方法参考ISO3496:1994 Meat and meat products-Determination of hydroxyproline content稍有修改,用3 mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液将4 g的粗胶原蛋白在105℃干燥箱中水解16 h,用滤纸将样液趁热过滤至250 mL容量瓶中,用10 mL硫酸溶液洗涤烧瓶和滤纸,合并至容量瓶中,用水定容。取4 mL样液于比色管中,加入2 mL氯胺T试剂和2 mL显色剂,混合均匀,用铝箔纸封口,在60℃条件下水浴20 min,取出后冷却30 min,使用分光光度计在(558±2) nm处测量样品的吸光度,从标准曲线中查得水解物中羟脯氨酸的含量。

## 1.6 胶原蛋白傅里叶变换红外(FTIR)光谱分析

称取220 mg干燥的KBr固体于研钵中,与1 mg的粗胶原蛋白混合,研磨均匀并压片,利用傅里叶变换红外光谱仪对样品进行扫描,扫描区间范围为4 000~1 000 cm<sup>-1</sup>,分辨率为2 cm<sup>-1</sup>,通过对比光谱图,可得两种胶原蛋白在结构上的差异。

## 1.7 胶原蛋白分子质量和氨基酸组成的测定

根据Laemmli等<sup>[7]</sup>的方法对测定胶原蛋白分子质量的方法,并在此基础上略有改动,正确配置和安装凝胶板,并将粗胶原蛋白溶解在负载缓冲液中,制成8 mg/mL的溶液。将粗胶原蛋白溶于上样缓冲液中,配置成8 mg/mL的溶液。将样品溶液与样品缓冲液(0.5 mol/L Tris-HCl缓冲液,pH 6.8,5% 2-mercaptoethanol,25% glycerol,4 mol/L Urea,0.1% bromophenol blue and 10% SDS solution)混合,加注到聚丙烯酰胺凝胶中,电泳条件设置为120 V 2 h。电泳结束后,将凝胶浸没在考马斯亮蓝R-250溶液中,在摇床上振荡脱色直至蛋白质条带清晰。将其与蛋白质标志物得到的条带进行对比,确定水解物的分子质量。

氨基酸的测定方法参考GB 5009.124-2016

并在此基础上略有改动,称取样品 50 mg 溶于 10 mL 10 mol/L HCL 溶液中,在 110 ℃下水解 22 h,冷却至室温后定容至 50 mL 容量瓶,真空抽滤后注入全自动氨基酸分析仪,对胶原蛋白样品中氨基酸的种类及其含量进行确定和分析。

### 1.8 胶原蛋白溶解度

胶原蛋白在不同 pH 值下的溶解度根据 Liu 等<sup>[8]</sup>的方法稍作修改,将冻干的样品溶解在 0.5 mol/L 乙酸中,制备成 5 mg/mL 的胶原溶液,使用 6 mol/L HCl 或 6 mol/L NaOH 将 pH 值调节到 2~10,置于离心管内,用蒸馏水调节最终体积为 10 mL,将混合溶液在 4 ℃下不断搅拌 30 min,4 ℃ 10 000×g 条件下离心 30 min 收集上清液,使用 Lowry 方法用紫外分光光度计测定蛋白质含量,以牛血清白蛋白为蛋白标品,溶解蛋白质的百分比用于表示相对胶原蛋白溶解度。

### 1.9 胶原蛋白的热稳定性分析

利用差示量热扫描仪可了解水解产物的热稳定性,称取约 6 mg 的样品放置在铝盘中,用压片机进行压片,仪器参数设置为 25 至 250 ℃之间,以 10 ℃/min 的速率进行扫描,测定胶原蛋白的最大转变温度。

### 1.10 胶原蛋白微观形态的表征

使用扫描电子显微镜可观察胶原蛋白样品的微观形貌,同时进行物质微区成分分析。将粗胶原蛋白与体积分数 2%的戊二醛磷酸盐缓冲液混合,并调整 pH 至 7.0,室温下放置 2 h,而后分别用乙醇和丁醇脱水,最后用冻干机进行冻干。将干燥后的样品黏到胶上,在其表面镀一层 99.99%的铂金,使用扫描电子显微镜在 20 kV 的电压下进行观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶原蛋白的产量

从大鲵骨中提取的 ASC 和 PSC 的产量分别为 10.71%和 13.11%(以湿重计)。酶溶性胶原蛋白的产量显著低于酸溶性胶原蛋白,根据以往研究表明,可能是由于在酶消化过程中,胶原蛋白端肽区域中交联的共价键被特异性切割,提取出胶原蛋白<sup>[9]</sup>。因此,胃蛋白酶能够在不改变胶原蛋白构象的前提下提高提取率。对于鱼骨,鲤鱼骨的 ASC

产量为 1.06%<sup>[10]</sup>,西班牙鲭鱼的 ASC 和 PSC 产量为 12.54%和 14.27%<sup>[11]</sup>,安康鱼骨中未经纯化的 PSC 产量为 43.06%,分子质量小于 30 ku 的胶原蛋白占总提取蛋白的 20.65%<sup>[12]</sup>,云南鲢鱼骨的 ASC 产量为 3.15%<sup>[13]</sup>,鱼骨中胶原蛋白产量并不相同,结果会随着鱼种、生存环境、制备条件、生物条件的不同而不同<sup>[14]</sup>。

### 2.2 傅里叶红外光谱分析

通过红外光谱产生的吸收峰信息,可以确定大鲵骨中官能团、化学键以及功能基团,从而判断样品中蛋白结构的稳定性。大鲵骨 ASC 和 PSC 的傅里叶红外光谱如图 1 所示,两种胶原蛋白样品均显现出酰胺 A、B 以及酰胺 I、II、III 峰,酰胺 A 往往出现在 3 400~3 440  $\text{cm}^{-1}$ ,条带是由于带有氢键 N-H 伸缩振动而产生的,两个样品的酰胺 A 条带出现在 3 300  $\text{cm}^{-1}$  左右,是因为骨中提取的胶原蛋白具有更强的氢键,令游离的 NH 在发生伸缩振动时迁移到较低的频率。由于  $\text{CH}_2$  的不对称拉伸产生的酰胺 B 出现在 2 925~2 929  $\text{cm}^{-1}$  处。样品的酰胺 I 峰出现在 1 670  $\text{cm}^{-1}$  处,该峰与蛋白质的二级结构有关,是由于羰基的拉伸振动产生的。样品的酰胺 II 峰分别在 1 567,1 542  $\text{cm}^{-1}$  的波数处被发现,该条带源于 NH 弯曲振动和 CN 伸缩振动耦合,同时在 1 410  $\text{cm}^{-1}$  波长数附近发现了由于 COO-对称拉伸产生的 Amide II,可能是由于胶原蛋白中特殊的氨基酸构成,有助于 1 200~1 400

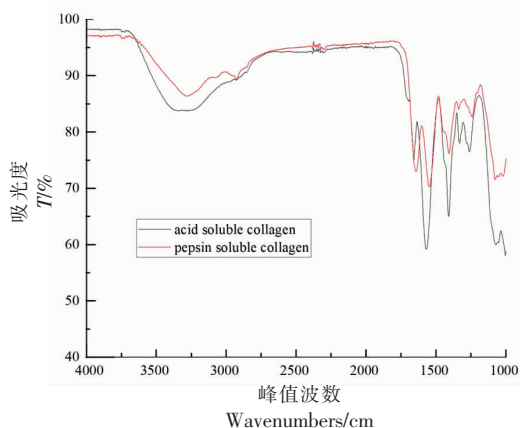


图1 大鲵骨制备的酸溶性和胃蛋白酶溶性胶原蛋白的傅里叶变换红外光谱

Fig.1 Fourier transform infrared spectroscopy of acid soluble and pepsin soluble collagen made from *Andrias davidianus* bone



表 1 从大鲵骨中提取的胶原蛋白的傅里叶红外光谱重要峰位置和分配

Table 1 FTIR spectra important peak locations and assignment for extracted collagens from giant salamander bone				
地区	峰值波数/cm <sup>-1</sup>		任务	参考
	ASC	PSC		
酰胺 A	3 305	3 292	N-H 拉伸与氢键耦合	[15]
酰胺 B	2 925	2 929	CH <sub>2</sub> 不对称拉伸	[16]
	2 851	2 858	CH <sub>2</sub> 对称拉伸	[16]
酰胺 I	1 671	1 667	C=O 拉伸/氢键与 COO-偶联	[17]
酰胺 II	1 567	1 542	NH 弯曲加上 CN 拉伸	[18]
	1 409	1 410	COO 拉伸对称	[19]
酰胺 III	1 259	1 241	NH 弯曲加上 CN 拉伸	[17]

cm<sup>-1</sup> 范围内的峰出现。在 1 240~1 250 cm<sup>-1</sup> 处出现的酰胺 III 峰,与酰胺 II 峰形成条件一致,样品在 1 250 cm<sup>-1</sup> 和 1 400 cm<sup>-1</sup> 波段之间的吸收比约为 1.0,证明两种胶原蛋白的三螺旋结构稳定。

2.3 SDS

从大鲵骨中提取的酸溶性胶原蛋白和酶溶性胶原蛋白电泳图谱如图 2 所示,结果表明,两个胶原蛋白样品均由两条  $\alpha$  链( $\alpha_1$  和  $\alpha_2$ )组成, $\alpha_1$  链与  $\alpha_2$  链的比例约为 2:1,条带处于 135~150 ku 位置处,在 ASC 两组样品中还观察到两条高分子质量组带,约 250 ku,而 PSC 样品图谱中并没有观察到二聚体( $\beta$  链)存在。根据以往研究表明,胃蛋白酶可以将胶原蛋白中的  $\beta$  组分转化为两种  $\alpha$  组分或其他分子质量较低的组分<sup>[20]</sup>,因此图谱中 PSC 样品中的  $\alpha$  链条强度显著高于 ASC 样品。这些综合结果表明,大鲵骨 ASC 和 PSC 胶原蛋白的结构为 I 型胶原蛋白,其电泳图谱与大鲵皮(I 型)<sup>[21]</sup>、大眼金枪鱼骨(I 型)<sup>[6]</sup>、鲢鱼鱼骨(I 型)<sup>[22]</sup>相似。

2.4 氨基酸分析

大鲵骨酸溶性胶原蛋白和胃蛋白酶溶性胶原蛋白的氨基酸组成见表 2,样品中氨基酸主要为甘氨酸,每 1 000 个氨基酸残基中的个数为 179 个和 187 个,显著低于 I 型胶原蛋白的甘氨酸含量,可能是提取过程中有杂质存在和其它蛋白质干扰造成的。其次分别为脯氨酸 (119~122/1 000 个残基)、谷氨酸 (99~97/1 000 个残基)、丙氨酸 (96~92/1 000 个残基),此外,胶原蛋白中特有的亚氨基酸含量为 179~197/1 000 个残基,低于大眼金枪鱼骨<sup>[6]</sup>(226/1 000 个残基)、青蛙皮<sup>[23]</sup>(201/1 000 个残基),与大鲵皮<sup>[21]</sup>(173/1 000 个残基)相

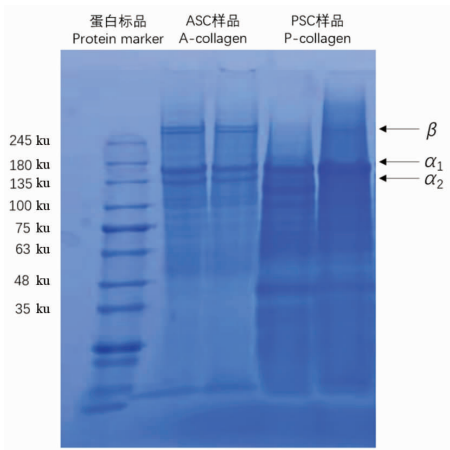


图 2 还原条件下大鲵骨 ASC 和 PSC 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.2 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of ASC and PSC from giant salamander bone under reducing conditions

似, 尽管大鲵骨胶原蛋白中亚氨基酸含量低于鱼类、哺乳类胶原蛋白,但大鲵骨胶原蛋白的变性温度较高,热稳定性较高,根据以往研究表明,变性温度取决于羟脯氨酸含量,大鲵骨中羟脯氨酸含量为 97~98/1 000 个残基,羟脯氨酸可以稳定胶原蛋白的三螺旋结构,热稳定性也可能由胶原蛋白的氨基酸序列和分子构象决定<sup>[24]</sup>。

2.5 溶解度分析

大鲵骨酸溶性胶原蛋白和酶溶性胶原蛋白在 pH 为 2~10 范围内的溶解度如图 3 所示,显然,ACS 和 PSC 两个样品溶解度趋势非常相似,在酸性条件 2~6 下都表示出了高溶解度,在 pH 为 6 时溶解度最高,分别为 94.1%和 98.7%。而后样品的溶解度急剧下降,在 pH 为 7 时显示出了最低

表 2 大鲵骨胶原蛋白与大眼金枪鱼和大鲵皮肤胶原蛋白氨基酸组成的比较

Table 2 Amino acid compositions of collagen from bone of giant salamander compared with those of bigeye tuna and giant salamander skin collagens

氨基酸	残基/1 000 残基			
	ASC	PSC	大眼金枪鱼	大鲵皮
丙氨酸	76.37 ± 3.51	72.37 ± 0.38	91.63	78
精氨酸	60.43 ± 1.36	57.65 ± 0.79	79.28	62
天冬氨酸	41.23 ± 0.38	42.28 ± 0.75	44.48	65
半胱氨酸	0	0.31	2.45	0
谷氨酸	99.76 ± 3.70	97.24 ± 3.58	101.17	110
甘氨酸	290.64 ± 8.75	281 ± 11.31	215.45	275
组氨酸	8.43 ± 1.27	9.37 ± 1.65	9.45	13
异亮氨酸	21.11 ± 1.34	17.36 ± 4.37	14.24	14
亮氨酸	38.17 ± 3.39	32.13 ± 2.18	27.86	30
赖氨酸	33.69 ± 2.72	34.24 ± 1.76	39.34	34
蛋氨酸	10.76 ± 2.46	10.76 ± 1.98	19.12	46
苯丙氨酸	21.26 ± 1.98	24.24 ± 1.49	20.19	30
脯氨酸	119.86 ± 2.10	122.91 ± 2.92	140.28	98
丝氨酸	39.43 ± 1.02	34.24 ± 2.57	38.26	52
苏氨酸	39.36 ± 0.33	31.39 ± 1.69	33.4	16
酪氨酸	18.26 ± 0.37	11.1 ± 0.54	6.43	11
缬氨酸	32.17 ± 1.89	26.42 ± 2.55	24.24	42
亚氨基酸	179.25 ± 1.78	187.28 ± 3.81	226.85	173
羟脯氨酸	97.28 ± 1.32	98.96 ± 2.02	87.22	75

溶解度,分别为 26.3%和 29.9%。在碱性范围内,随着 pH 不断增加,样品的溶解度略有增加。以往研究表明,处于等电点时,蛋白质的溶解度最小,由于疏水-疏水相互作用增加,造成蛋白质的沉淀和聚集<sup>[25]</sup>。表明两种胶原蛋白的等电点约为 6~7,与大眼金枪鱼骨相似。此外,在所有 pH 的测试中,

PSC 样品的溶解度均高于 ASC 样品的,可能是由于 PSC 样品的交联程度较低造成的。

2.6 热稳定性分析

大鲵骨 ASC、PSC 相应变性温度的最高温度 ( $T_{max}$ ) 分别为 45.78,46.51 °C,这一结果与小牛胶原蛋白(40.8 °C)<sup>[26]</sup>、猪皮(40 °C)<sup>[27]</sup>相似,一般温

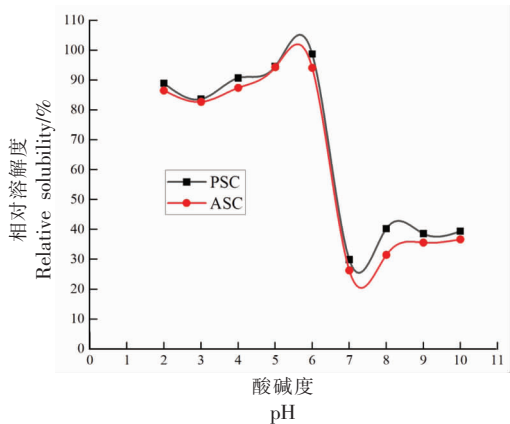


图 3 大鲵骨胶原蛋白在不同 pH 值下的相对溶解度

Fig.3 Relative solubility of the giant salamander bone collagens at different pHs

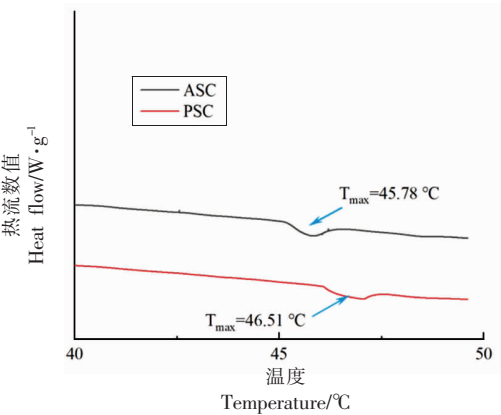


图 4 大鲵骨胶原蛋白的热变性曲线

Fig.4 Temperature curve of thermal denaturation of collagrn in the giant salamander bone

带和冷水鱼类的胶原蛋白变性温度较低,大致在15~25℃范围内,而热带和亚热带鱼类胶原蛋白的变性温度则较高一些,一般在30℃左右<sup>[28]</sup>,以往研究表明,两栖动物的胶原蛋白比某些海洋和淡水物种的胶原蛋白表现出更高的热稳定性。如青蛙ASC(31.5℃)<sup>[22]</sup>、亚洲牛蛙(64.93~110.12℃)<sup>[29]</sup>,胶原蛋白的热稳定性主要由亚氨基酸含量决定,Hyp含量越高,则胶原蛋白热稳定性越好<sup>[30]</sup>,其它因素如提取ASC的乙酸浓度、样品差异、MW交联成分等因素都会影响变性温度<sup>[31]</sup>。

## 2.7 微观结构表征

从大鲵骨中提取的,经过冷冻干燥的ASC和PSC的SEM图像如图5所示,肉眼条件下,观察两个样品质地外观类似于柔软的白色海绵,在SEM下,两个样品都显示出了疏松多孔、不规则的片状结构,两种胶原蛋白的冻干条件完全相同,且提取工艺、条件完全一致。在SEM下,ASC的表面比PSC的表面稍粗糙一点,这是由于在冻干过程中,胶原蛋白中的水分蒸发,会致使胶原蛋白的孔径变大,纤维表面粗糙。结果表明,两种胶原蛋白之间的微观结构还是略有不同的。

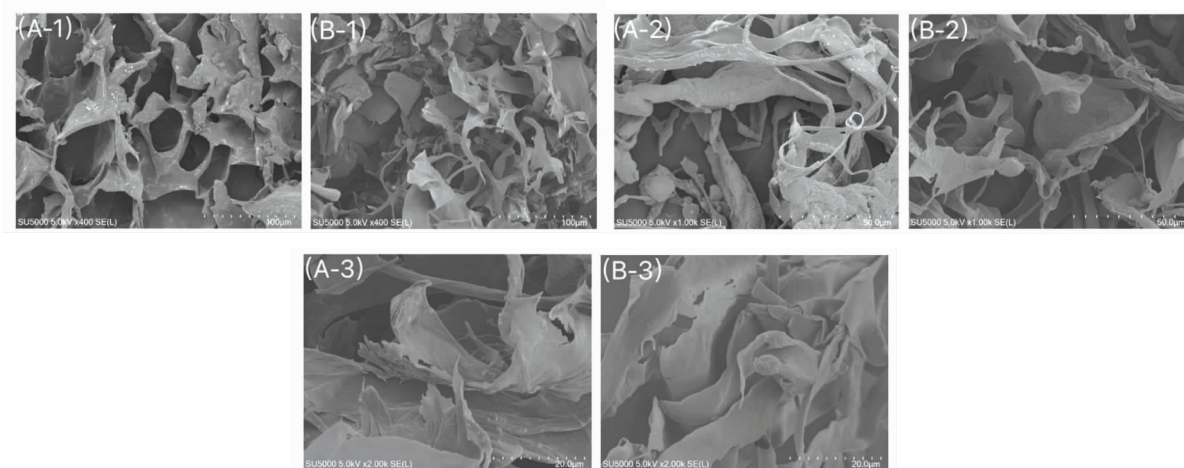


图5 从大鲵分离的ASC(A1-3)和PSC(B1-3)的SEM显微图( $\times 400, \times 1\,000, \times 2\,000$ 倍)

Fig.5 SEM micrographs of ASC(A1-3) and PSC (B1-3) isolated from giant salamander ( $\times 400, \times 1\,000, \times 2\,000$  magnification)

## 3 结论

本文利用0.5 mol/L醋酸和胃蛋白酶从大鲵骨中提取胶原蛋白,PSC产率显著高于ASC,ASC和PSC均为I型胶原蛋白,具有稳定的三螺旋结构,显示出了比海洋和某些陆生动物中提取出的胶原蛋白更好的稳定性。ASC和PSC表面形态相似,特性更接近于哺乳动物胶原蛋白,二者虽在产量、氨基酸含量、溶解度等方面也存在差异,总体而言,是一种提供胶原蛋白的理想候选来源,通过良好的开发研究,可应用于生物医药以及其它领域。

## 参 考 文 献

[1] YAN F, LÜ J, ZHANG B Z, et al. The Chinese

giant salamander exemplifies the hidden extinction of cryptic species[J]. Current Biology, 2018, 28(10): 590-592.

[2] GENG X F, WEI H, SHANG H T, et al. Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. Journal of Proteomics, 2015, 2: 9.

[3] HADFI N H, SARBON N M. Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius* sp.) skin collagen as influenced by acetic acid concentration[J]. Food Research, 2019, 3(6): 783-790.

[4] 于浩. 鹿骨胶原蛋白的制备及抗氧化活性研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2016.

YU H. Preparation and antioxidant of collagen from deer bone[D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2016.

- [5] URIARTE-MONTOYA M H, ARIAS-MOSCOSO J L, PLASCENCIA-JATOMEA M, et al. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 4212-4219.
- [6] AHMED R, HAQ M, CHUN B S. Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 135: 668-676.
- [7] LAEMMLI U K, QUITTNER S F. Maturation of the head of bacteriophage T4. IV. The proteins of the core of the tubular polyheads and *in vitro* cleavage of the head proteins[J]. *Virology*, 1974, 62(2): 483-499.
- [8] LIU W, LI G, MIAO Y, et al. Preparation and characterization of pepsin-solubilized type I collagen from the scales of snakehead (*Ophiocephalus argus*) [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2009, 33(1): 20-37.
- [9] REGENSTEIN J M, ZHOU P. Collagen and gelatin from marine by-products[J]. *Maximising the Value of Marine By-Products*, 2007: 279-303.
- [10] 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*, 2008, 112(3): 702-706.
- [11] LI Z R, WANG B, CHI C F, et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 31(1): 103-113.
- [12] 何云, 赵淑静, 汪有先. 等. 鮫鰾鱼骨胶原蛋白提取工艺[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(5): 185-190.
- HE Y, ZHAO S J, WANG Y X, et al. Extraction technology of collagen in *Lophius litulon* bone[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(5): 185-190.
- [13] 姚行行, 郭妍, 庄永亮. 云南鲢鱼骨胶原蛋白的制备及其理化性质[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 35-40.
- YAO X X, GUO Y, ZHUANG Y L. Preparation and physicochemical properties of collagen from bone of Yunnan bream[J]. *Food Science*, 2018, 39(13): 35-40.
- [14] MUYONGA J H, COLE C, 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.
- [15] DOYLE B B, BENDIT E G, BLOUT E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen like peptides [J]. *Biopolymers*, 2010, 14(5): 937-957.
- [16] ABE Y, KRIMM S. Normal vibrations of crystalline polyglycine I[J]. *Biopolymers*, 1972, 11(9): 1817-1839.
- [17] PAYNE K J, VEIS A. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies [J]. *Biopolymers*, 1988, 27(11): 1749.
- [18] KRIMM S, BANDEKAR J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins[J]. *Adv Protein Chem*, 1986, 38(C): 181-364.
- [19] JACKSON M, CHOO L P, WATSON P H, et al. Beware of connective tissue proteins: Assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1270(1): 1-6.
- [20] ALI A M M, BENJAKUL S, PRODPRAN T, et al. Extraction and characterisation of collagen from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*), a processing by-product[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2018, 9: 783-791.
- [21] CHEN X H, JIN W G, CHEN D J, et al. Collagens made from giant salamander (*Andrias davidianus*) skin and their odorants[J]. *Food Chemistry*, 2021, 361(6): 130061.
- [22] FARALIZADEH S, RAHIMABADI E Z, BAHRAMI S H, et al. Extraction, characterization and biocompatibility evaluation of collagen from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin by-product [J]. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2021, 22: 100454.
- [23] ZHANG J J, DUAN R. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from frog (*Rana nigromaculata*) skin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101: 638-642.
- [24] DI Y U, CHI C F, WANG B, et al. Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*,

- 2014, 12(9): 712–720
- [25] JONGJAREONRAK A, RAWDKUEN S, CHAIJAN M, et al. Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) [J]. LWT – Food Science and Technology, 2010, 43(1): 161–165.
- [26] 沈菊泉, 汤俊, 沈亚领, 等. 酸法制备牛皮胶原蛋白及其结构性质研究[J]. 食品工业, 2009, 30(4): 43–46.
- SHEN J Q, TANG J, SHEN Y L, et al. Study on extraction of bovine collagen by acid method and its physicochemical property and structure [J]. The Food Industry, 2009, 30(4): 43–46.
- [27] 刁雪洋. 猪皮胶原蛋白提取及理化特性的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- DIAO X Y. Study on the extraction of pig skin's collagen and characteristics on physical and chemical [D]. Chongqing: Southwest University, 2010.
- [28] NALINANON S, BENJAKUL S, KISHIMURA H. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 90(9): 1492–1500.
- [29] INDRIANI S, BENJAKUL S, KISHIMURA H, et al. Impact of extraction condition on the yield and molecular characteristics of collagen from Asian bullfrog (*Rana tigerina*) skin [J]. LWT, 2022, 162.
- [30] PETCHARAT T, BENJAKUL S, KARNJANAPRATUM S, et al. Ultrasound - assisted extraction of collagen from clown featherback [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(2): 648–658.
- [31] LIANG Q F, WANG L, SUN W H, et al. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) [J]. Process Biochemistry, 2014, 38: 104–109.

### Extraction and Characterization of Acid-Soluble and Pepsin-Soluble Collagen from Giant Salamander Bone

Gong Xuan, Bao Jianqiang\*, Huang Kecheng, Chen Yanjie, Tang Jiacheng  
(College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** The giant salamander, as a precious amphibian, is rich in nutritional value. To fully and efficiently utilize its processing by-products, acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) from giant salamander bone were isolated and characterized. The yields of salamander bone ASC and PSC were 10.71% and 13.11%, respectively. The stable triple helical structure of collagen was revealed by Fourier transform infrared spectroscopy. SDS-PAGE electropherograms showed that both samples were type I collagen with high levels of imino acids (179–187/1 000 residues). Their solubility was highest at pH 6. The thermal denaturation temperature (45.78–46.51 °C) was significantly higher than that of marine and freshwater fish species. Under SEM, the collagen showed dense flakes and irregular holes. These results show that the characteristics of giant salamander bone collagen are similar to mammalian collagen, and it has the potential to become its substitute, which provides a basis for its subsequent research and development and utilization.

**Keywords** giant salamander bone; collagen; extraction; characterization