

鲨鱼软骨胶原蛋白的酶法制备及其稳定性研究

张武^{1,2}, 应顺莉², 何璐瑶², 姜涵², 曹少谦², 杨华², 戚向阳^{1,2*}

(¹上海海洋大学食品学院 上海 201306

²浙江万里学院生物与环境学院 浙江宁波 315100)

摘要 以鲨鱼软骨为原料,通过单因素实验和响应面实验优化酶法制备胶原蛋白的最佳工艺,并分析对胶原蛋白的结构和稳定性。结果表明,胶原蛋白提取的最佳条件为:胃蛋白酶添加量 9 150 U/g、提取时间 39.85 h、pH 1.67 及料液比 1:15(g/mL),此条件下胶原蛋白的提取率为(85.09±0.17)%,所制备的胶原蛋白保留了较为完整的三螺旋结构,符合 II 型胶原蛋白的特征。稳定性研究表明其变性温度为 39.9℃,黏度随温度和盐浓度的升高显著下降,而随 pH 值的不同呈先增后减再增加的趋势,以 pH 7 时黏度最小(4.26 mPa·s)。圆二色谱分析表明,随盐浓度和温度的增加,胶原蛋白的三螺旋结构发生改变,当温度超过变性温度时(39.9℃),三螺旋结构逐渐解旋且变性。本研究为鲨鱼资源的高值化利用提供了理论依据。

关键词 鲨鱼软骨; II 型胶原蛋白; 酶法提取; 结构; 稳定性

文章编号 1009-7848(2024)09-0234-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.09.022

鲨鱼软骨作为水产加工副产物,约占软骨总蛋白含量的 90%~95%,富含胶原蛋白、蛋白多糖、酸性多糖等,是良好的胶原蛋白来源^[1]。Kittiphattabawon 等^[2]采用酸法和酶法从黑鳍鲨和点纹斑竹鲨软骨中提取胶原蛋白,并探讨胶原蛋白的结构和氨基酸组成,结果发现提取的胶原蛋白为 II 型,且酸提和酶提胶原蛋白的傅里叶红外光谱相似,表明酶法提取不影响胶原蛋白的二级结构,尤其是三重螺旋结构。Jeevithan 等^[3]以尖吻鲭鲨为研究对象,酶法提取胶原蛋白(PSC),其变性温度、羟脯氨酸含量及抗氧化活性显著高于酸法(ASC)。相较于酸法和热水法,酶法提取具有得率高、条件温和及易操作等特点^[4]。II 型胶原蛋白主要存在软骨组织,可促进软骨细胞的分化^[5],然而,其三螺旋结构易受胶原蛋白分子间和分子内各种作用的影响而发生变化,使其理化和生物学特性改变并丧失生物活性^[6]。基于此,在酶法提取制备鲨鱼软骨胶原蛋白(PSC)的基础上,对制备的胶原蛋白的结构及稳定性等进行研究,旨在为鲨鱼软骨高值化

利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

长尾鲨鱼软骨,购于宁波水产批发市场;胃蛋白酶(2 000 U/g),国药集团化学试剂有限公司;氯胺 T、异丙醇、乙二醇四乙酸二钠盐、乙酸、氯化钠和氢氧化钠等均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;羟脯氨酸及对二甲氨基苯甲醛,分析纯,上海阿拉丁生化科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

ALPHA2-4 冷冻干燥仪,德国 Christ 公司; VERTEX 70 傅里叶红外光谱仪,德国 BRUKER 公司;DSC2500 差示扫描热量仪,美国 TA 仪器公司;UV1780 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;Chirascan V100 圆二色光谱仪,英国应用光物理公司;5804R 高速离心机,德国 Eppendorf 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 鲨鱼软骨基本成分分析 脂肪、水分、粗蛋白及灰分含量均按 GB 5009-2016 食品安全国家标准方法测定。

1.3.2 鲨鱼软骨胶原蛋白提取率的测定 以胶原蛋白所特有的羟脯氨酸为指标,参照 GB/T 9695.23-2008《肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定》测定样品中羟脯氨酸含量,按下式计算:

收稿日期: 2023-09-23

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGN22C200003);浙江省重点研发项目(2019C02071);浙江省一流学科“生物工程”学生创新项目 (CX2022030)

第一作者: 张武,男,硕士

通信作者: 戚向阳 E-mail: qixiangyang85@sina.com

$$X(\%) = \frac{\omega_0}{\omega} \times 100 \tag{1}$$

式中: X 为胶原蛋白提取率, %; ω_0 为提取液中的羟脯氨酸含量, $\mu\text{g/mL}$; ω 为鲨鱼软骨中的羟脯氨酸含量, $\mu\text{g/mL}$ 。

1.3.3 酶法提取鲨鱼软骨胶原蛋白的单因素试验

鲨鱼软骨原料的预处理: 将鲨鱼软骨解冻后, 洗净去除附着的肉和表面的杂质, 用粉碎机粉碎, 取一定量粉碎后的软骨于 10 倍体积的 0.1 mol/L 的 NaOH (质量体积比 1:10) 中浸泡搅拌 6 h, 每 2 h 换一次 NaOH, 然后用去离子水冲洗至中性。将经过 NaOH 处理的鲨鱼软骨于 10 倍体积的 0.3 mol/L 的 EDTA-2Na (质量体积比为 1:10, pH=7.4) 溶液中浸泡搅拌 48 h, 每 12 h 换一次 EDTA-2Na, 然后用去离子水冲洗至中性。所有操作均在 4 ℃。

鲨鱼软骨胶原蛋白提取单因素试验: 以胶原蛋白提取率为指标, 分别固定温度 30 ℃、样品料液比 1:15 (g/mL)、酶解时间 36 h、pH 1.6 或酶添加量 9 000 U/g 进行单因素实验。分别探究不同提取温度 (4, 10, 15, 20, 25, 30 ℃), 不同酶添加量 (4 000, 5 000, 6 000, 7 000, 8 000, 9 000, 10 000, 11 000, 12 000 U/g), 不同料液比 (1:10, 1:15, 1:20, 1:25 和 1:30), 不同 pH 值 (1.3, 1.6, 1.9, 2.2, 2.5 和 2.8) 以及不同提取时间 (6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h) 对胶原蛋白提取效果的影响。

1.3.4 酶法提取鲨鱼软骨胶原蛋白的响应面试验

根据单因素实验, 确定酶添加量, 提取时间, pH 值自变量水平, 以胶原蛋白提取率为响应值, 采用 Box-Behnken 模型进行旋转正交试验, 各因素水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 因素水平设计表
Table 1 Factor level of BOX-Behnken test

因素	水平		
	-1	0	1
A [酶加量/(U/g)]	8 000	9 000	10 000
B (时间/h)	24	36	48
C (pH 值)	1.3	1.6	1.9

1.3.5 鲨鱼软骨胶原蛋白的特性分析

1.3.5.1 紫外吸收光谱 参考 Li 等^[7]的方法并稍作修改, 称取 10 mg 胶原蛋白样品溶于 0.5 mol/L

的乙酸中, 制得 1 mg/mL 胶原蛋白溶液, 在 200~400 nm 范围进行紫外扫描分析。

1.3.5.2 傅里叶变换红外光谱 参考 Srinivasan 等^[8]的方法并稍作修改, 将 1 mg 样品与 100 mg 左右 KBr 混匀, 在真空压片机中进行压片后采用傅里叶变换红外光谱仪中进行分析, 扫描范围为 4 000~400 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.3.5.3 稳定性研究

1) 鲨鱼软骨胶原蛋白的热稳定性 参考黄可承等^[9]的方法并稍作修改, 将冻干样品以 1:40 (g/mL) 的料液比溶于蒸馏水中, 在 4 ℃下静置 1 d 充分溶胀, 称取 5 mg 样品采用差示扫描热量仪在 N_2 环境进行分析, 扫描温度范围为 10~70 ℃, 升温速率 2 ℃/min。

2) 不同条件对鲨鱼软骨胶原蛋白黏度的影响 用 0.5 mol/L 乙酸配制胶原蛋白溶液, 分析不同 pH 值 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 和 10)、温度 (20, 25, 30, 35, 40, 45 ℃) 和 NaCl 含量 (0%, 1%, 2%, 3%, 4% 和 5%) 对其黏度的影响。

3) 不同条件对鲨鱼软骨胶原蛋白圆二色谱的影响 用 0.5 mol/L 乙酸配制胶原蛋白溶液, 分析不同 pH 值 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 和 10)、温度 (20, 25, 30, 35, 40, 45 ℃) 和 NaCl 浓度 (0%, 1%, 2%, 3%, 4% 和 5%) 对其圆二色谱的影响。扫描条件: 氮气压力 0.4 MPa, 扫描波长为 190~260 nm, 宽带 1 nm, 响应时间 0.5 s。

1.3.6 数据处理与分析 采用 SPSS Statistics 21 软件对结果进行数据处理和统计分析, 运用 Duncan (D) 进行方差分析, 显著性水平为 $P < 0.05$; Design expert 10.0.7 进行旋转正交分析; 数据以平均值 \pm 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 绘图软件为 GraphPad Prism 7。

2 结果与讨论

2.1 鲨鱼软骨基本成分分析

由表 2 可知, 鲨鱼软骨中粗蛋白含量较高, 占干基的 57.1%, 且粗灰分 3.10%, 含量较低, 表明鲨鱼软骨是提取胶原蛋白的良好原料。

2.2 鲨鱼软骨胶原蛋白的提取工艺研究

2.2.1 单因素实验结果 由图 1a 及图 1b 可知, 在实验范围内, 胶原蛋白的提取率随提取温度和

表 2 鲨鱼软骨基本成分分析 (%)

Table 2 Basic components analysis of shark cartilage (%)

样品	水	粗灰分	粗蛋白	粗脂肪
鲨鱼软骨	86.21 ± 0.97	3.10 ± 0.26	8.23 ± 0.18	1.08 ± 0.05

时间的增加而增大,但当提取温度和时间增至 30 ℃和 36 h 时,再增加温度和时间,胶原蛋白的提取率变化不显著。由图 1c 可知,随酶添加量增加,胶原蛋白提取率上升,但当酶添加量增至 9 000 U/g 时,再增加酶量,胶原蛋白提取率变化趋于缓慢且有所降低,这可能是由于过量的酶添加量导致胶

原蛋白的水解。由图 1d 可知,胶原蛋白提取率随 pH 值增加呈先上升后下降趋势,以 pH 1.6 时最佳;而料液比对胶原蛋白提取率影响不显著,但当料液比过高时,导致反应体系中酶与鲨鱼软骨不能充分接触,使提取率有所下降,综合考虑,以 1:15(g/mL)料液比最佳(见图 1e)。

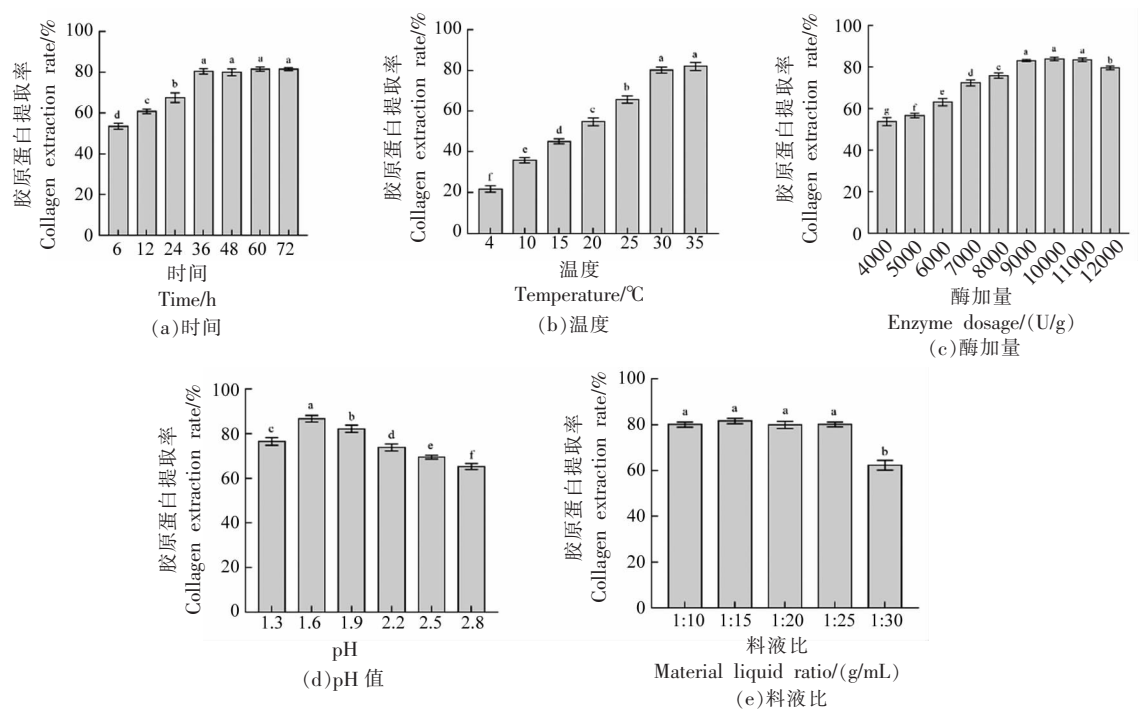


图 1 不同提取条件对胶原蛋白提取效果的影响

Fig.1 Effect of different extraction conditions on collagen extraction rate

2.2.2 响应面优化试验结果及分析 根据单因素实验,选用酶加量(A:8 000,9 000,10 000)、提取时间(B:24,36,48)和 pH 值(C:1.3,1.6,1.9)三因素进行响应面试验,试验结果如表 3 所示,利用 Design Expert 10.0.7 软件对试验数据进行多项式拟合回归,回归方程为:提取率(Y)=82.674+0.89A+5.39B+4.37C+3.29AB+0.71AC+2.61BC-7.47A²-10.08B²-11C²。回归方程的方差分析见表 4,回归模型极显著(P<0.01),失拟值不显著(P=0.4073>0.05),相关

系数 R²=0.9936,矫正系数 R²_{adj}=0.9454,表明模型可靠,能较好预测提取工艺条件对鲨鱼软骨胶原蛋白提取率的影响。此外,F(B)>F(C)>F(A),表明时间对胶原蛋白的提取率的影响最大,其次为 pH 值和酶加量。响应面图可以反映出不同提取条件对提取率的影响,利用 Design Expert 10.0.7 软件绘制不同提取条件两因子交互作用响应面图,考查不同提取条件在两两交互作用下对提取率的影响大小。由图 2 可知,各因素交互作用的三维曲面趋势变

表 3 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 3 Box-Behnken test design and results

试验组	A	B	C	胶原蛋白 提取率/%	试验组	A	B	C	胶原蛋白 提取率/%
1	0	0	0	84.21	10	1	1	0	74.76
2	0	-1	1	58.98	11	0	1	1	74.02
3	-1	0	-1	59.77	12	0	0	0	82.84
4	1	0	-1	60.98	13	1	-1	0	56.44
5	0	0	0	81.9	14	0	0	0	81.09
6	0	-1	-1	54.39	15	0	1	-1	59.01
7	-1	0	1	66.03	16	0	0	0	83.33
8	1	0	1	70.07	17	-1	1	0	67.23
9	-1	-1	0	62.09					

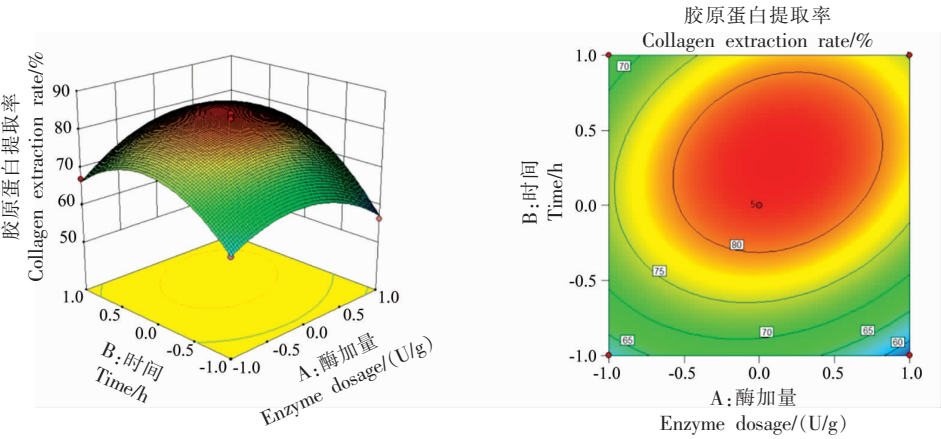
表 4 回归模型方差分析
Table 4 Regression model variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 768.55	9	196.51	120.58	<0.0001	**
A	6.35	1	6.35	3.90	0.0889	
B	232.42	1	232.42	142.62	<0.0001	**
C	152.69	1	152.69	93.69	<0.0001	**
AB	43.43	1	43.43	26.65	0.0013	**
AC	2.00	1	2.00	1.23	0.3043	
BC	27.14	1	27.14	16.66	0.0047	*
A ²	234.68	1	234.68	144.01	<0.0001	**
B ²	427.67	1	427.67	262.42	<0.0001	**
C ²	509.08	1	509.08	312.38	<0.0001	**
残差	11.41	7	1.63			
失拟值	5.48	3	1.83	1.23	0.4073	
净误差	5.93	4	1.48			
总和	1 779.95	16				

注:** 差异极显著($P<0.01$); * 差异显著($P<0.05$)。

化明显,均向下凹陷,存在最大值。随着时间和酶添加量以及 pH 值的提高,胶原蛋白提取率呈现

先增大后减小的趋势且图形陡峭较为明显,表明时间与酶解量和 pH 值的交互作用显著($P<0.05$)。



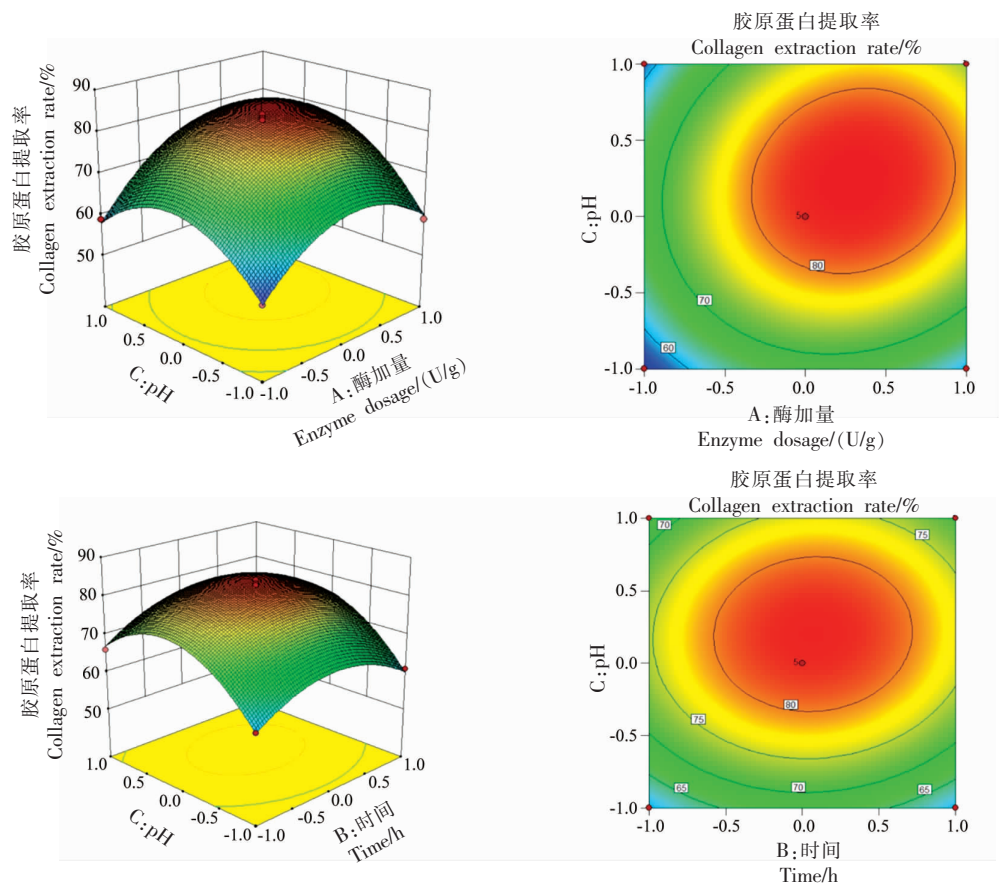


图 2 不同提取条件交互作用的响应面曲面及等高线

Fig.2 Response surface and contour plots of interaction between different extraction conditions

2.2.3 模型验证试验 根据以上分析,最佳提取工艺条件为:酶添加量 9 142 U/g,提取时间 39.852 h,pH 值为 1.6723,料液比 1:15(g/mL),考虑实际操作的可行性,调整工艺条件为:酶添加量 9 150 U/g、提取时间 39.85 h、pH 1.67 及料液比 1:15(g/mL)。在该条件下重复 3 次试验,胶原蛋白的得率为 $(85.09\pm0.17)\%$,与预测值相符 (84.13%) ,表明该模型对鲨鱼软骨胶原蛋白提取工艺的预测有较高的准确度,具有一定的可行性。

2.3 鲨鱼软骨胶原蛋白的特性研究

2.3.1 紫外光谱分析 由图 3 可知,所制备的胶原蛋白在 234 nm 左右有最大吸收峰,这主要是肽键—C=O 的 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁所致,为胶原蛋白三螺旋结构的特征吸收峰。此外,在 250~280 nm 处没有明显吸收峰,说明芳香族氨基酸含量相对较少,表明所制备的胶原蛋白符合 II 型胶原蛋白特征且杂蛋白较少,该结果和 Yu 等^[10]及 Veeruraj 等^[11]的结论一致。

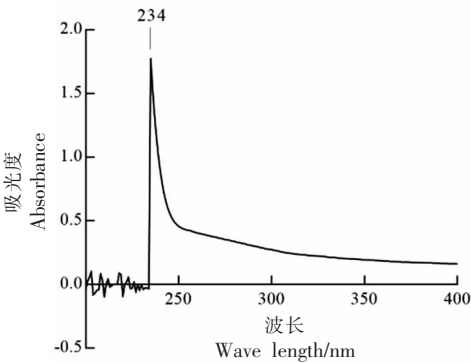


图 3 鲨鱼软骨胶原蛋白的紫外吸收光谱图

Fig.3 Ultraviolet absorption spectrum of shark cartilage collagens

2.3.2 傅里叶红外光谱分析 由图 4 可知,所制备的鲨鱼软骨胶原蛋白显示 5 个胶原蛋白特征吸收峰,分别为酰胺 A、B、I、II 和 III,由 N-H 振动产生的酰胺 A 带的吸收峰通常出现在 $3\ 400\sim3\ 450\text{ cm}^{-1}$ 处,当含 N-H 基团的肽段与氢键缔合时,吸

收峰往往会降低^[12]。图4可看出,酰胺A带位于 $3\ 346\text{ cm}^{-1}$,说明具有氢键;酰胺B带位于 $2\ 927\text{ cm}^{-1}$,是由于 CH_2 基团的不对称伸缩振动,表明三级结构没有被破坏^[13];酰胺I、II、III与蛋白质肽链骨架结构相关,其中酰胺I和酰胺II分别是由 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动和 N-H 弯曲振动及 C-N 伸缩振动引起,主要在 $1\ 600\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$ 及 $1\ 480\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$ 处出现吸收峰,肽链的有序度越高,吸收峰越大^[14]。而酰胺III带是甘氨酸和脯氨酸残基的 $-\text{CH}_2$ 特征振动峰,可以表征胶原蛋白三螺旋结构的完整性^[15]。所制备的胶原蛋白酰胺I、II及III带吸收峰出现在 $1\ 656, 1\ 552, 1\ 240\text{ cm}^{-1}$ 处,表明所制备的胶原蛋白具有典型的胶原蛋白结构,且其三螺旋结构保留完整。

2.3.3 鲨鱼软骨胶原蛋白的稳定性研究

2.3.3.1 热稳定性分析 热变性温度(T_d)通常可以用来反映胶原蛋白的热稳定性,胶原蛋白 T_d 与其Pro和Hyp的含量有关,含量越高,胶原蛋白的热稳定性越高,此外,胶原蛋白热稳定性与原材料的物种、生长环境、年龄等因素有关^[16]。由图5可知,其 T_d 为 $39.9\text{ }^\circ\text{C}$,略高于斑竹鲨和黑鳍鲨的 T_d ($35.98\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $34.56\text{ }^\circ\text{C}$)^[2]。鲨鱼主要生活在 $0\sim 1\ 300\text{ m}$ 的海水域中,其 T_d 略高于深海鱼和冷水鱼,如黄鳍金枪鱼鱼皮胶原蛋白 T_d 为 $27.45\text{ }^\circ\text{C}$ ^[17];比陆生生物如猪骨胶原蛋白 T_d ($45.86\text{ }^\circ\text{C}$)低^[18]。

2.3.3.2 不同条件对鲨鱼软骨胶原蛋白黏度的影响 黏度是II型胶原蛋白的一个重要特性,II型胶原蛋白的黏度与维系三螺旋结构的分子间和分子内的静电作用和氢键有密切联系,在一定程度上可以通过黏度的变化推测其结构以及物理化学性质的变化^[19]。

如图6a所示,pH值对鲨鱼软骨胶原蛋白的黏度影响较大,在pH值为 $2\sim 10$ 范围内,黏度呈先增大后减小再增加的趋势,当pH值为3时黏度最大,pH值为7时黏度最小,这可能是由于在pH值为 $2\sim 3$ 时,溶液呈酸性,此时溶液中正离子较多,分子附带正电荷相互排斥,分子间作用力增大进而加大黏度;当pH值为 $4\sim 7$ 时,电荷逐渐减小,电荷排斥作用力逐渐降低,分子间作用力逐渐降低,导致黏度下降;而pH值为 $7\sim 10$ 时,溶液呈碱性,分子间作用力逐渐增大,同时,在碱性条件,

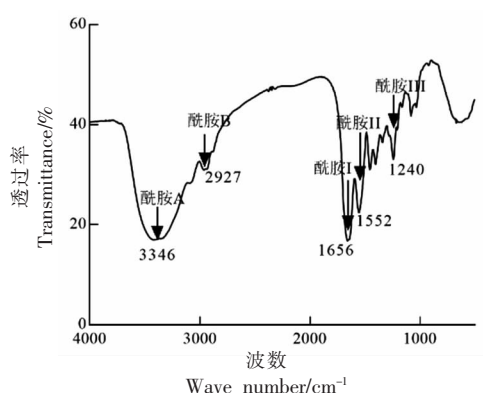


图4 鲨鱼软骨胶原蛋白的红外吸收光谱图

Fig.4 Fourier transform infrared spectrum of shark cartilage collagens

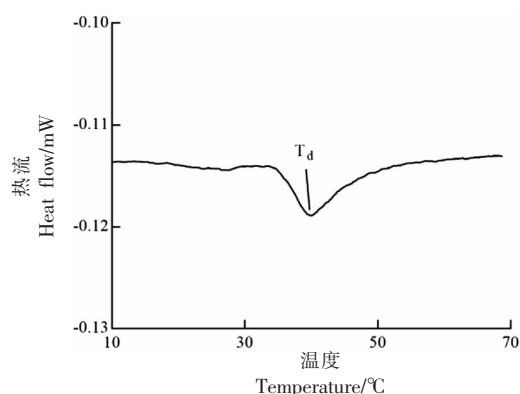


图5 鲨鱼软骨胶原蛋白的DSC曲线

Fig.5 DSC curve of shark cartilage collagens

胶原蛋白中一些键被破坏进而导致三螺旋结构逐渐解旋,蛋白发生变性,也导致黏度逐渐增大,这和冯建慧等^[20]研究的鲢鱼鱼皮和鱼骨的黏度结果相似^[29]。

温度对鲨鱼软骨黏度的影响如图6b所示,随着温度增加,鲨鱼软骨胶原蛋白的变性程度越来越大,三螺旋结构逐渐解旋成无规则卷曲,使得原鲨鱼软骨胶原蛋白的分子内和分子间相互作用力逐渐减弱,进而导致黏度逐渐减小,且当温度越接近胶原蛋白热变性温度时,黏度降低幅度增加;由温度对鲨鱼软骨胶原蛋白黏度的影响也可判断出鲨鱼软骨胶原蛋白的热变性温度在 $35\sim 40\text{ }^\circ\text{C}$ 之间,这和许蓉等^[21]研究结果相符。

盐浓度对鲨鱼软骨胶原蛋白的黏度如图6c所示,当盐浓度增大时,鲨鱼软骨胶原蛋白的黏度逐渐降低,这可能是由于盐离子不仅与胶原蛋白

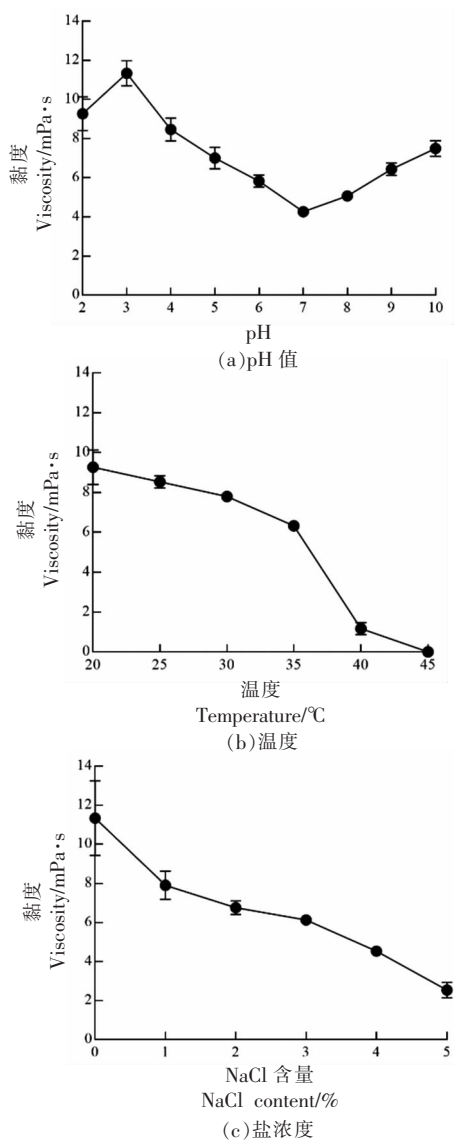


图6 不同条件对鲨鱼软骨胶原蛋白黏度的影响
Fig.6 Effect of different factors on the viscosity of shark cartilage collagens

中带电氨基酸相互作用，而且还与胶原蛋白溶液中的水分子结合，从而导致胶原蛋白溶液黏度降低^[20]。

2.3.3.3 不同条件对鲨鱼软骨胶原蛋白圆二色谱的影响 圆二色谱可以反映胶原蛋白的立体结构信息^[15]，220 nm 附近的正吸收峰由胶原蛋白的左旋聚脯氨酸构型肽链结构产生；而 195 nm 附近的负吸收峰则是胶原蛋白的无规则卷曲结构，这二者的正负吸收峰比值(Rpn)的大小可用来表示胶原蛋白的三螺旋结构的完整性，Rpn 比值越大，

胶原蛋白的三螺旋结构越完整^[22]。当正吸收峰发生红移或者强度下降时，表示胶原蛋白的三螺旋结构逐渐解旋，若正吸收峰强度为 0，说明胶原蛋白完全变性，三螺旋结构完全被破坏。

pH 值对 PSC 的 CD 光谱影响如图 7a 所示，随 pH 值增大，PSC 的 CD 色谱正、负吸收峰逐渐右移，且吸收强度逐渐降低，说明胶原蛋白的三螺旋结构逐渐解旋，根据正吸收峰与负吸收峰的比值可以判断胶原蛋白三螺旋结构的完整性，比值越大，结构越完整，当 pH 值在 2~4 时，胶原蛋白的正吸收峰无明显变化，且负吸收峰变化不大，表

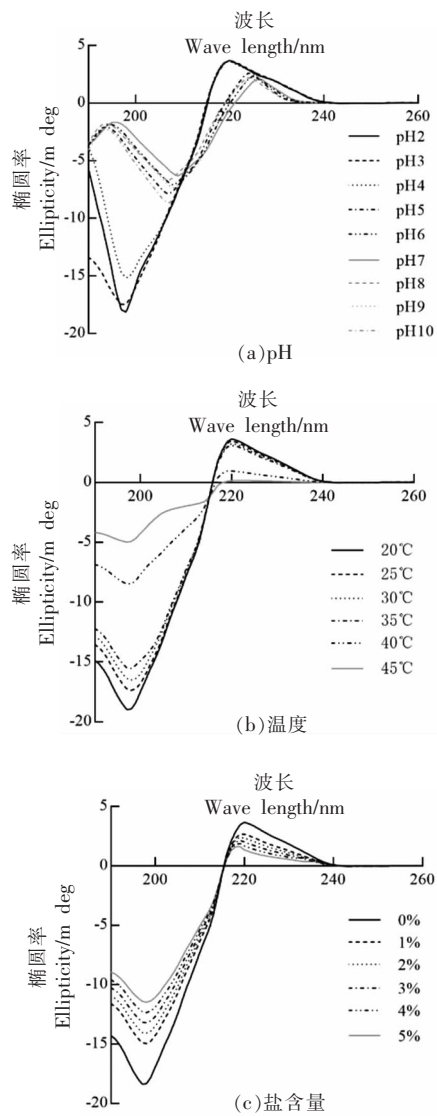


图7 不同条件对鲨鱼软骨胶原蛋白圆二色谱的影响
Fig.7 Effects of different factors on CD spectrum of shark cartilage collagens

明此时的胶原蛋白的三螺旋结构最为完整,当pH值为4~9时,胶原蛋白所处的环境由酸变碱,胶原蛋白的正吸收峰逐渐红移且强度降低,说明胶原蛋白的三螺旋结构逐渐解旋进而逐渐变性,当pH值为10时,正吸收峰强度又明显升高,可能是由于胶原蛋白溶液体系中负电荷增多,使得胶原蛋白分子间作用力增强。

温度对PSC的CD光谱如图7b所示,随温度增大,PSC的CD色谱正吸收峰均逐渐降低,说明胶原蛋白随着温度的升高,胶原蛋白的三螺旋结构逐渐发生解旋进而逐渐变性。当温度为20~35℃时,胶原蛋白的圆二色谱图中正吸收峰强度逐渐降低,说明胶原蛋白三螺旋结构逐渐发生解旋进而逐渐变性,且温度越高,其正负吸收峰强度降低的速率越快,当温度在35~45℃时,正负吸收峰的强度降低逐渐加大,推测PSC的热变性温度为35~45℃,与热稳定性分析结果相符,表明随温度增大,PSC三螺旋结构逐渐解旋并变性。

盐浓度对PSC的CD光谱如图7c所示,随盐浓度增加,PSC的圆二色谱正吸收峰强度降低,这是由于随着盐浓度增大,体系中盐离子与胶原蛋白竞争水分子,使得胶原蛋白与水分子作用力逐渐减弱并且使胶原蛋白暴露更多的疏水位点,导致胶原蛋白分子逐渐收缩呈蜷曲状态,使得胶原蛋白的溶解性逐渐降低且三螺旋结构发生改变,进而导致正吸收峰吸收强度逐渐降低^[23]。

3 结论

本文通过单因素和响应面试验优化了酶法提取胶原蛋白工艺条件,结果表明,在酶添加量9 150 U/g、提取时间39.85 h、pH 1.67和料液比1:15(g/mL)的条件下提取,胶原蛋白的提取率达到(85.09±0.17)%,红外、紫外及DSC分析表明所制备的胶原蛋白保持完整的三螺旋结构,符合II型胶原蛋白的特征,其变性温度为39.9℃。随温度和盐浓度的增加,胶原蛋白的黏度显著下降,在pH值在2~10范围,胶原蛋白的黏度总体呈现先减小后增大的趋势,以pH 7时黏度最小;圆二色谱分析表明,温度的升高对胶原蛋白的结构影响最为显著,随温度升高,三螺旋结构逐渐解旋,当达到变性温度后,胶原蛋白的三螺旋结构解旋并变性;

此外,盐浓度升高也使胶原蛋白的三螺旋结构发生一定变化,以低浓度时较为稳定。

参 考 文 献

- [1] SIVAKUMAR P, CHANDRAKASAN G. Occurrence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid *Sepia officinalis*: comparison with shark cartilage collagen[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1998, 1381(2): 161-169.
- [2] KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISES-SANGUAN W, et al. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*)[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2010, 43(5): 792-800.
- [3] JEEVITHAN E, JINGYI Z, WANG N, et al. Physico-chemical, antioxidant and intestinal absorption properties of whale shark type-II collagen based on its solubility with acid and pepsin[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(3): 463-472.
- [4] HONG H, FAN H B, CHALAMAIAH M, et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives[J]. *Food Chemistry*, 2019, 301(1): 125222.
- [5] 马晨玮, 田晓静, 张凯, 等. 胶原蛋白改善骨关节健康的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(1): 305-312.
- MA C W, TIAN X J, ZHANG K, et al. Research progress in improving bone and joint health with collagen protein[J]. *Food Fermentation and Industry*, 2023, 49(1): 305-312.
- [6] 郭休玉, 何兰, 位晓娟, 等. 鱿鱼软骨II型胶原蛋白提取方法及结构分析[J]. *生物医学工程学进展*, 2016, 37(1): 1-5.
- GUO X Y, HE L, WEI X J, et al. Extraction method and structural analysis of type II collagen from squid cartilage[J]. *Advances in Biomedical Engineering*, 2016, 37(1): 1-5.
- [7] LI P H, LU W C, CHAN Y J, et al. Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics[J]. *Aquaculture*, 2020, 515

- (1): 734590.
- [8] SRINIVASAN S, DURAIRAJ B. Collagen isolation and characterization from *Sardinella longiceps* [J]. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 2021, 8(4): 679–686.
- [9] 黄可承, 包建强, 张星高, 等. 中华鳖粉胶原蛋白不同提取方式的比较与理化表征[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(4): 204–210.
HUANG K C, BAO J Q, ZHANG X G, et al. Comparison and physicochemical characterization of different extraction methods for collagen protein from Chinese soft shelled turtle powder[J]. Food Fermentation and Industry, 2024, 50(4): 204–210.
- [10] YU F M, ZONG C H, JIN S J, et al. Optimization of extraction conditions and characterization of pepsin-solubilised collagen from skin of Giant Croaker (*Nibea japonica*) [J]. Marine Drugs, 2018, 16(1): 28–29.
- [11] 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.
- [12] 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(1): 668–676.
- [13] 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.
- [14] AHMAD M, BENJAKUL S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) [J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 817–824.
- [15] DAI M L, LIU X, WANG N P, et al. Squid type II collagen as a novel biomaterial: Isolation, characterization, immunogenicity and relieving effect on degenerative osteoarthritis via inhibiting STAT1 signaling in pro-inflammatory macrophages [J]. Materials Science and Engineering: C, 2018, 89(1): 283–294.
- [16] THUY L T M, OKAZAKI E, OSAKO K. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam [J]. Food Chemistry, 2014, 149(1): 264–270.
- [17] PEZESHK S, REZAEI M, ABDOLLAHI M. Impact of ultrasound on extractability of native collagen from tuna by-product and its ultrastructure and physicochemical attributes [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 89(1): 106129.
- [18] ZHU L Y, XIE Y Y, WEN B T, et al. Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64(1): 103697.
- [19] 郭文宇, 李俊刚, 罗英. 超声波降解胶原蛋白黏度性能变化的研究 [J]. 中国皮革, 2016, 45(5): 31–35.
GUO W Y, LI J G, LUO Y. Study on the changes in viscosity performance of collagen protein degraded by ultrasound [J]. Chinese Leather, 2016, 45(5): 31–35.
- [20] 冯建慧, 吴晓洒, 蔡路昀, 等. 鲢鱼鱼皮和鱼骨胶原蛋白的提取及理化性质分析 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(7): 102–108.
FENG J H, WU X S, CAI L J, et al. Extraction and physicochemical properties analysis of collagen from silver carp skin and bone [J]. Chinese Journal of Food Science, 2017, 17(7): 102–108.
- [21] 许蓉, 郑淋, 赵谋明. 温度和 pH 值对鸡胸软骨 II 型胶原蛋白的结构、黏度和热稳定性的影响 [J]. 食品科学, 2020, 41(14): 66–71.
XU R, ZHEN L, ZHAO M M. Effects of temperature and pH value on the structure, viscosity, and thermal stability of type II collagen in chicken breast cartilage [J]. Food Science, 2020, 41(14): 66–71.
- [22] 卜永士. II 型胶原蛋白分子结构特征与免疫耐受特性关系的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
PU Y S. Study on the relationship between the molecular structure characteristics of type II collagen protein and immune tolerance characteristics [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [23] 胡建平. 鱼骨胶原蛋白的黏度特性研究 [J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(6): 36–44.
HU J P. Study on the viscosity characteristics of fish bone collagen protein [J]. Food and Fermentation Technology, 2009, 45(6): 36–44.

Study on Enzymatic Preparation and Stability of Shark Cartilage Collagen

Zhang Wu^{1,2}, Ying Sun^{1,2}, He Luyao², Jiang Han², Cao Shaoqian², Yang Hua², Qi Xiangyang^{1,2*}

(¹College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306

²College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang)

Abstract Using shark cartilage as raw material, the optimal enzymatic preparation process of collagen was optimized through single factor and response surface experiments, and the structure and stability of the prepared collagen were analyzed. The results showed that the optimal conditions of extraction collagen were as follows: 9 150 U/g of pepsin, 39.85 hours of extraction time, pH 1.67, and a ratio of 1:15 (g/mL). Under these conditions, the extraction rate of collagen was $(85.09 \pm 0.17)\%$, and the prepared collagen retained a relatively complete triple helix structure, which conforms to the characteristics of type II collagen. The stability study showed that the denaturation temperature of the prepared collagen was $39.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, and its viscosity decreased significantly with the increase of temperature and salt concentration, but there was no linear relationship between the viscosity and pH value, and its viscosity was the smallest at pH 7 ($4.26\text{ mPa}\cdot\text{s}$). Circular dichroism analysis further indicated that with the increase of salt concentration and temperature, the triple helix structure of collagen changed, when the temperature exceed the denaturation temperature of $39.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, the tripartite helix structure gradually unrotated and denatured. This study provides a specific theoretical basis for the high-value utilization of shark resources.

Keywords shark cartilage; type II collagen; enzymatic extraction; structure; stability