

鲟鱼皮 GPC 的制备及其对 PC12 细胞的保护作用

耿铭阳, 马思沅, 迟艺璇, 姚思羽, 刘秦豪, 王震宇, 孙黎明*

(大连工业大学食品学院 国家海洋食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034)

摘要 目的:对比热解和酶解法所得明胶-肽复合物(GPC)的制备效率和活性。方法:以鲟鱼皮为原料,以 GPC 得率为指标,优化鲟鱼皮预处理条件及热解法制备 GPC 的条件。以热解法所得最大分子质量的 GPC 为底物,以三氯乙酸可溶性寡肽(TCA-SP)为指标,研究几种蛋白酶对该底物的水解效率。比较 TCA-SP 得率最高的热解法和酶解法制备 GPC 对正常和 D-半乳糖致氧化损伤 PC12 细胞活力的影响。结果:碱处理对鲟鱼皮 GPC 提取无明显贡献,酸处理对 GPC 提取率影响较大,最适条件为 0.25 mol/L HCl 处理鲟鱼皮 6 h。高温热解法制备 GPC 的最适条件为 100 ℃提取 2 h,此时 GPC 和 TCA-SP 得率最高,分别为 34.72%,31.22%。低温热解法以 60 ℃提取 1 h 所得 GPC 的黏度最大,TCA-SP 最低,提示该产物分子质量最大,结构最完整。以 GPC-60 ℃-1 h 为底物,分别用几种蛋白酶单独水解,其中中性蛋白酶水解 0.5 h 所得 GPC 中的 TCA-SP 含量最高(28.74%)。GPC-100 ℃-2 h 和 GPC-N-0.5 h 底物在质量浓度为 50~1 000 μg/mL 范围,对正常 PC12 细胞活力均无影响。在质量浓度为 12.5~200 μg/mL 范围对 D-半乳糖所致 PC12 细胞氧化损伤均有一定的保护作用,且两者间无明显差异。结论:高温热解法和中性蛋白酶水解法所得 GPC 中的 TCA-SP 含量及对 PC12 的保护作用相近。

关键词 鲟鱼皮; 胶原-肽复合物; 热解法; 酶解法; 细胞保护作用

文章编号 1009-7848(2024)10-0271-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.025

随着鲟鱼经济产业链的不断完善、发展,我国鲟鱼养殖企业的数量增多,养殖规模逐年扩大,鲟鱼养殖总产量连续多年位居世界第一。与其它大宗淡水鱼不同的是,鲟鱼肉块大且无肌间刺,是加工各种鱼肉产品的良好食材。“鲟鱼扒”是鲟鱼养殖、加工企业的主打产品之一。大型养殖企业加工的鲟鱼年龄基本在七八年以上,在加工鲟鱼扒的过程中,必须剔去厚实且坚硬的鲟鱼皮。大张的鲟鱼皮为“鲟鱼扒”的加工副产物。

众所周知,鱼皮中胶原蛋白几乎占鱼皮中总蛋白的 70%以上。鱼皮一直以来都是制备胶原、明胶及胶原肽的良好材料。鲟鱼皮中粗蛋白占干基的 95.51%,其中胶原蛋白占总蛋白的 79.42%^[1]。从鲟鱼皮中提取明胶或胶原肽(或明胶肽)是鲟鱼皮最合理的加工方式之一,能够大幅度提升鲟鱼皮的附加值。早些年,国内鲟鱼皮销往欧洲用于皮包加工,然而由于皮内骨板的存在,使得制革成本较高,近几年,国内鲟鱼皮资源几乎全部回归食品领域。目前,市场上流通的鱼类明胶和胶原肽产品大

多来源于海水鳕鱼皮和淡水罗非鱼皮。虽然有研究报道鲟鱼皮明胶的抗氧化^[2]、胶原肽的降血糖^[3-4]和抗冻^[5]等活性,但是国内市场鲟鱼皮胶原肽产品少有人问津,这与产品明确的功效以及价格等因素密切相关。鲟鱼皮的厚度和硬度远超过市场上常见鱼皮,且鲟鱼皮上还带着不少碎肉和大量细鳞片,这使得鲟鱼皮明胶和胶原肽制备工艺具有一定的特殊性。绿色、高效率地从鲟鱼皮中获得有生物活性的明胶及明胶肽产品,还需进行工艺优化和功效评价。

明胶以及胶原肽产品是市场上常见的食品辅料和功能食品基料。在胶原肽制备方法上,有研究先制备胶原蛋白,再用蛋白酶水解制备多肽^[6]。这种方法制得的胶原和多肽的得率一般比较低^[7],无法用于大规模生产。多肽生产企业追求高出成率,用最简单的方法进行最大限度的原料“肽化”,不仅是多肽生产者的追求,也是产业可持续发展的需要。作者前期研究发现,在鲟鱼皮加热提取明胶过程中,有胶原肽生成。本文称加热法制备的鲟鱼皮明胶为明胶-肽复合物(Gelatin-peptide complex, GPC)。目前,产业界基本使用酶解法制备胶原肽。这 2 种方法哪个得率更高、产品生物活性更好,未见相关报道。

收稿日期: 2023-10-15

基金项目: 辽宁省农业重大专项(2020JH1/10200001)

第一作者: 耿铭阳,女,硕士

通信作者: 孙黎明 E-mail: sunlm1974@163.com

本文以 GPC 得率为指标,优化鲟鱼皮前处理条件以及加热提取 GPC 的条件。以热解法所得最大分子质量的 GPC 为底物,以三氯乙酸可溶性寡肽(TCA-SP)为指标,优化酶解法的最适蛋白酶。以TCA-SP得率最高的热解法和酶解法所得 GPC 为对象,研究两者对正常和 *D*-半乳糖所致氧化损伤 PC12 细胞活力的影响,为鲟鱼皮胶原肽产品的高效制备提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷冻杂交鲟鱼皮,浙江鲟龙水产食品科技有限公司(衢州)。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株(PC12 细胞株),实验室冻存。*L*-羟脯氨酸、异丙醇、三氯乙酸(TCA)、*D*-半乳糖,麦克林生化有限公司;氯氨 T、对二甲基氨基苯甲醛,天津市傲然精细研究所;高氯酸,大连博诺有限公司;酪氨酸(181.18 u),Sigma 公司;八肽、抑肽酶(1 072.047, 6 511.44 u),北京索莱宝科技有限公司;细胞色素 C(12 384 u),上海生工生物工程有限公司;胃蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、纳豆激酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶,北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清,上海康朗生物科技有限公司;0.25%胰酶-EDTA,美国赛默飞世尔科技;噻唑蓝(MTT),天津大茂化学试剂厂;RPMI 1640 培养基,赛默飞世尔科技有限公司;其它试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

M200 型酶标定量测定仪,瑞士 Tecan Infinite 公司;CF16RXII 高速冷冻离心机,日立 HITACHI 公司;SCIENTZ-III 数控层析冷柜,宁波新芝生物科技有限公司;LC-20AD 高效液相色谱仪,日本岛津公司;YXQ-LS-50SII 立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司;SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;FE28 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;UV-5200 紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,常州智博瑞仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 鱼皮前处理 取冷冻鲟鱼皮,流水解冻 30 min 后,除去鱼皮附着的鱼肉、皮下脂肪、污渍、黏液、皮内的骨片后,将鱼皮清洗干净,沥干并切成

0.5 cm×0.5 cm 的小块,-20 ℃保存备用。

1.3.2 鲟鱼皮 GPC 的提取工艺 鲟鱼皮→流水解冻→清洗除杂→剪碎→NaOH 处理→水洗至中性→HCl 处理→水洗至中性→沥干→热水浸提→离心取上清→冷冻干燥→GPC 成品。

1.3.3 鲟鱼皮的预处理

1) NaOH 处理对 GPC 提取的影响 称取适量鲟鱼皮,按料液比 1:10 加入 NaOH 溶液,磁力搅拌 24 h,水洗至中性后,在 90 ℃分别提取 1,2,3,5 h,考察 GPC 提取率。

2) NaOH 和 HCl 处理对 GPC 提取的影响 称取适量鲟鱼皮,按料液比 1:10,首先加入 0.1 mol/L NaOH 溶液,磁力搅拌 24 h,水洗至中性后,再采用 0.1 mol/L HCl 溶液磁力搅拌 24 h,水洗至中性,在 90 ℃分别提取 1,2,3,5 h,考察 GPC 提取。

3) HCl 浓度和处理时间对 GPC 提取的影响 基本过程同上,HCl 浓度分别为 0.05,0.1,0.15,0.2,0.25,0.3,0.35,0.4,0.45,0.5 mol/L,根据 GPC 提取率,确定最适 HCl 浓度,在此基础上进一步优化 HCl 处理时间(分别为 0,2,4,6,12,18,24,30,36 h),考察 GPC 提取率。

1.3.4 鲟鱼皮 GPC 的热解法制备

1) 热水浸提温度对 GPC 得率、黏度的影响 称取适量鲟鱼皮,按照料液比 1:10 加入 0.25 mol/L HCl 溶液,磁力搅拌 6 h,分别在 60,70,80,90,100 ℃提取 5 h,考察 GPC 提取率。

2) 热水浸提时间对 GPC 得率、黏度、分子量分布的影响 料液比 1:10,0.25 mol/L HCl 溶液磁力搅拌 6 h,提取温度为 60 ℃和 100 ℃。热水浸提时间分别为 1,2,3,4,5,6,7 h,考察 GPC 提取率。

1.3.5 鲟鱼皮 GPC 的酶解法制备 取 60 ℃,提取 1 h 的 GPC 冻干粉 5 g,以料液比 1:20 加入 100 mL 去离子水,在 60 ℃水浴锅中温孵 30 min,使 GPC 溶解;按照 2 500 U/g 加入蛋白酶,分别是碱性蛋白酶、胃蛋白酶、纳豆激酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶、模拟消化(胃蛋白酶+胰蛋白酶),分别在酶解 0.5,1,3,5,7,9 h 取样 3 mL;在沸水浴中灭酶 20 min,调节 pH 7,10 000 r/min,离心 20 min 后取上清,测定其中 TCA-SP 得率。对于模拟消化组,先加入胃蛋白酶,酶解 2 h 后,再加

入胰蛋白酶,每隔 0.5 h 取样 3 mL,后续处理同上述其它蛋白酶的处理。

1.3.6 GPC 提取率的测定 参照 Woessner^[8]的方法,先测定热解和酶解产物中的羟脯氨酸含量,乘以换算系数,即为 GPC 的含量。鲟鱼皮中羟脯氨酸与胶原蛋白间的换算系数为 14.113^[9]。先建立羟脯氨酸标准曲线。称取 0.01 g L-羟脯氨酸,用 0.01 mol/L HCl 配制质量浓度为 100 μg/mL 的储备液,4 ℃保存使用。配制 0.1~10 μg/mL 的羟脯氨酸标准梯度溶液 1 mL(空白组用 1 mL 去离子水)后,加入 1 mL 柠檬酸缓冲液,1 mL 氯胺 T,振荡混匀,室温下氧化 10 min,再加入 1 mL 3.5 mol/L 高氯酸反应 10 min 后,加入 1 mL 发色剂,振荡混匀,65 ℃水浴中显色 20 min,室温下冷却 30 min,在波长 560 nm 处测定吸光值,以 L-羟脯氨酸浓度为横坐标,OD_{560nm} 为纵坐标,绘制标曲。

取热解或酶解法制备的 GPC 溶液 1 mL,加入 6 mol/L HCl 共 5 mL,酒精喷灯封口后,110 ℃烘箱水解 4 h,8 000 r/min 离心 20 min 后,取上清液按照上述方法测定其中羟脯氨酸含量。GPC 提取率(%) = 热解或酶解法制备的 GPC 溶液中所含胶原蛋白总量/鱼皮干基×100。

1.3.7 黏度的测定 采用布氏粘度计进行测定。将 GPC 溶液冻干后,配制成质量浓度为 66.7 g/L 的溶液,选择 CPA-52Z 转子,调节转速为 30 r/min,每次在转子中加入 2 mL 明胶溶液,避免出现气泡,待旋转平衡且读数稳定后,读取黏度值。

1.3.8 TCA-SP 得率的测定 采用 TCA 沉淀法与 Folin-酚法测定发酵液中 TCA 可溶性寡肽的含量。取 GPC 溶液 0.5 mL,加入 20%TCA 0.5 mL,静置 20 min 后,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,适当稀释后,加入 Folin-甲液 500 μL,混匀静置 10 min 后;再加入 Folin-乙液 50 μL,混匀后于 37 ℃水浴中静置 30 min,在波长 500 nm 处测定吸光值。根据已经建立的牛血清白蛋白标准曲线,计算 TCA-SP 含量和 TCA-SP 得率。TCA-SP 得率(%) = TCA-SP 含量/原料量×100。

1.3.9 分子质量分布的测定 参考《海洋鱼低聚肽粉》(GB/T 22729-2008)中所述方法^[10]。准确称取 GPC 冻干粉 5 mg,溶于 1 mL 流动相中,过 0.22 μm 水系滤膜,将样品用液相测定。采用的色谱柱

为 TSKgel G2000SWXL,流动相为 45%乙腈溶液(其中含有 0.1%三氟乙酸水溶液),柱温为 25 ℃,流速为 0.5 mL/min,进样量为 20 mL,检测波长为 214 nm。所用标准品为酪氨酸、八肽、抑肽酶、细胞色素 C。分子质量分布的标准曲线为 $y = -0.2235x + 6.7479$, $R^2 = 0.9628$,式中: y 为分子质量的对数; x 为保留时间, min。根据标准曲线,通过面积归一化法计算 GPC 溶液不同分子质量肽段分布比例。

1.4 数据统计分析

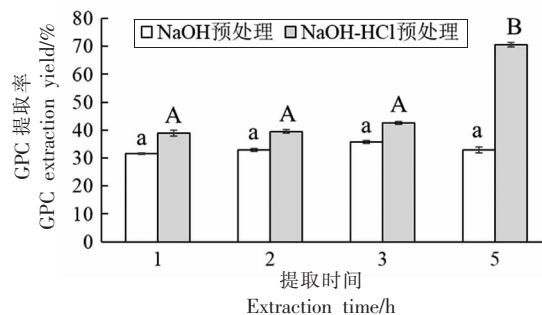
所有试验均进行 3 次重复,测定数据以“平均值±标准差”表示,使用 SPSS 软件采用单因素方差分析(ANOVA)进行数据统计分析,以 $P < 0.05$ 为显著性检验标准。

2 结果与分析

2.1 预处理方法对 GPC 得率的影响

图 1 显示,单独采用 0.1 mol/L NaOH 对鲟鱼皮进行预处理后,于 90 ℃加热 1~4 h 提取 GPC, GPC 提取率未见明显变化,均在 31.50%~35.65% 左右。先用 0.1 mol/L NaOH 再用 0.1 mol/L HCl 处理鲟鱼皮, GPC 提取率均高于单独碱处理,提取 5 h 所得 GPC 的提取率显著提高至 70.54%。由此可见,单独稀碱处理对 GPC 提取率的贡献不明显。因此可以略去碱处理步骤,只用稀 HCl 对鲟鱼皮进行预处理,这样能够提高工作效率,降低碱液带来的腐蚀和相关安全问题。

大量研究表明,鱼皮前处理方法对明胶提取



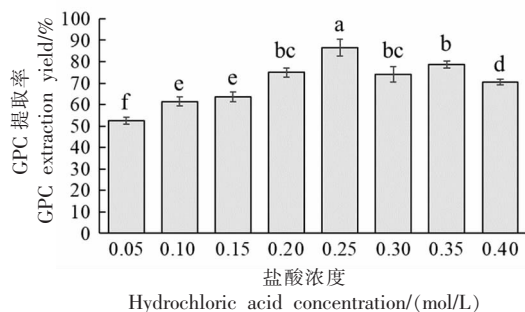
注:不同小写字母表示 NaOH 组提取率有显著差异 ($P < 0.05$),不同大写字母表示 NaOH-HCl 组提取率有显著差异 ($P < 0.05$)。

图 1 碱、碱-酸预处理对鲟鱼皮 GPC 提取率的影响
Fig.1 Effect of alkali and alkali-acid pretreatment on the yield of GPC from sturgeon skin

率、品质影响很大。采用酸碱对鱼皮进行预处理、促进胶原明胶化已经形成了鱼皮前处理的固有模式^[11-12]。不同种类鱼皮原料特性不同,对酸碱处理的响应程度不同。如果预处理最后一步为酸或碱处理,得到明胶分别称为酸法或碱法明胶,也称为A型或B型明胶,酶法处理则称为E型明胶^[13-14]。不同前处理方法所得明胶在理化性质和功能上各具不同。Meng等^[15]比较了碱法前处理对鱼皮胶原提取率和提取速度的影响,与未处理鱼皮比较,碱处理后所得胶原的提取率有所下降。孙艺等^[11]也发现碱处理对大目金枪鱼皮明胶提取无明显贡献,而且碱液质量分数增至1.3%后,明胶提取率反倒剧烈下降。孙乐常等^[16]也发现酸处理组鱼皮比碱处理组具有更高的明胶得率。也有相反的报道,Hao等^[12]发现未处理鱼皮明胶得率低于碱处理组,而二者都高于酸处理组。蔡成魁等^[17]认为适度的碱处理有利于胶原螺旋结构的解体和保持松散,而碱处理不足或过度都会影响明胶的产量和质量。一般来讲,碱处理的主要作用是除去鱼皮中的非胶原可溶性蛋白、部分鱼皮色素及脂肪^[11]。不少研究显示酸处理能够有效渗透进入鱼皮,使鱼皮溶胀促进胶原明胶化^[11,18]。

本研究中,鲟鱼皮只用碱处理后,对GPC提取无明显影响,很可能是由于本试验所用杂交鲟鱼皮过于坚硬,碱液无法渗透进入鱼皮内部溶胀胶原纤维。鲟鱼皮在厚度和质地上都与常见淡水、海水鱼皮有很大不同,预处理需要重点考虑成本、安全、效率等因素,上述数据提示单独使用稀酸浸泡是更为绿色、高效的鲟鱼皮预处理方法。

2.2 盐酸浓度对 GPC 得率的影响



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

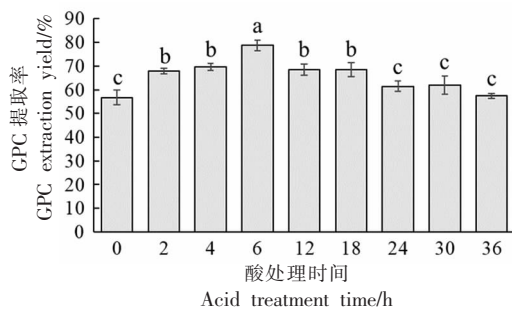
图2 预处理用盐酸浓度对鲟鱼皮 GPC 提取率的影响

Fig.2 Effect of HCl concentration used for pretreatment on the yield of GPC from sturgeon skin

在确定了只用盐酸对鲟鱼皮进行预处理后,进一步优化了盐酸的最适预处理浓度,结果如图2所示。随着盐酸浓度从0.05 mol/L升高至0.25 mol/L, GPC提取率从52.51%升至峰值86.49%,之后随着盐酸浓度的升高, GPC提取率反而有所下降。一般来说,酸的渗透力较强,酸处理能够破坏对酸敏感的端肽区交联、三螺旋之间的酰胺键以及胶原分子内和分子间各种非共价分子间相互作用力^[19-20],因此酸的类型、浓度和处理时间都对明胶的提取率和功能特性有很大影响^[21]。然而,酸处理时间过长,可能会使部分胶原蛋白被水解,并因酸处理后的水洗过程流失,导致明胶提取率有所降低。孙艺等^[11]发现当酸液质量分数大于1.5%时,明胶提取率从最高值14.55%下降至12.7%左右。Nikoo等^[22]研究发现酸浓度在0.1 mol/L时,明胶提取率达到最高24.11%,而浓度增至0.2 mol/L时提取率明显下降。本研究结果显示,预处理用的酸浓度大于0.25 mol/L后, GPC提取率开始明显下降,很可能是由于较高的酸浓度造成胶原分子水解,发生流失。Zhou等^[23]也发现盐酸预处理造成了胶原流失。考虑到较高浓度盐酸对环境污染、器具腐蚀和安全等因素,确定盐酸预处理鲟鱼皮的最适浓度为0.25 mol/L。

2.3 酸处理时间对 GPC 得率的影响

图3显示,用0.25 mol/L对鲟鱼皮预处理6 h后, GPC的提取率达到最高值78.70%,进一步延长浸泡时间, GPC提取率反而呈现明显下降趋势。Hao等^[12]也发现在鲟鱼明胶制备过程中,酸处理时间过长则出现胶原流失。因此,当酸处理时间适宜,鲟鱼皮既获得充分溶胀,而且酸溶或酸水解效



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

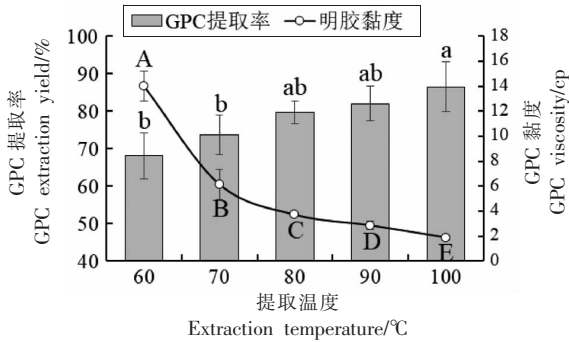
图3 酸处理时间对鲟鱼皮 GPC 提取率的影响

Fig.3 Effect of acid treating time on the yield of GPC from sturgeon skin

应又最低,流失蛋白最少,本文确定盐酸预处理的最适时间为 6 h。

2.4 提取温度对 GPC 得率的影响

除了预处理条件,提取温度也是影响 GPC 热提取效率的另一个重要因素。图 4 显示,提取时间均为 5 h,随着提取温度从 60 ℃升高至 100 ℃, GPC 得率逐渐从 68.11%升高至 86.54%。黏度数据显示,当提取温度从 60 ℃升高到 70 ℃,所得 GPC 的黏度降低了 56.12%,之后随着温度升高,黏度下降幅度虽然有所减缓,但仍持续降低,100 ℃提取所得 GPC 的黏度为 60 ℃的 13.48%,可见提取温度对 GPC 得率的影响很大,对 GPC 黏度的影响更大。黏度是 GPC 的重要特性之一, GPC 的黏度主要受分子质量分布的影响,与分子质量呈正相关^[24-25]。由此推测,60~100 ℃所得 GPC 的分子质量很可能持续降低。图 4 提示,提高加热提温度,虽然促进更多 GPC 的溶出,但是加速了已溶出 GPC 的降解。



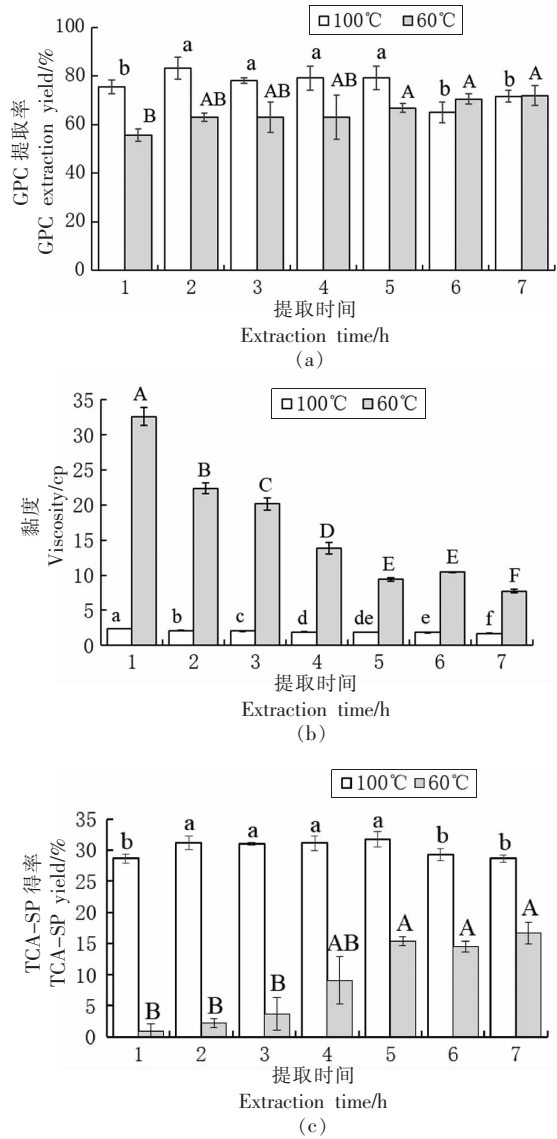
注:不同小写字母表示提取率有显著差异($P<0.05$),不同大写字母表示黏度有显著差异($P<0.05$)。

图 4 提取温度对鲟鱼皮 GPC 提取率和黏度的影响
Fig.4 Effect of extraction temperature on yield and viscosity of the obtained GPC from sturgeon skin

2.5 高温和低温不同提取时间对 GPC 得率、黏度和 TCA-SP 含量的影响

胶原的三螺旋立体结构主要由氢键、范德华力、疏水作用、静电作用等弱相互以及共价键二硫键来维持。加热很容易破坏这些作用力,从而导致胶原降解。由于 60 ℃和 100 ℃所得 GPC 的分子质量相对最大、最小,因此以这 2 个温度所得 GPC 为研究对象,比较提取时间对 GPC 得率、黏度和 TCA-SP 含量的影响,结果见图 5。100 ℃条件下,

虽然在提取 2 h 后出现一个小峰值,但前 5 h 的 GPC 提取率都维持在 30%~35%之间。当提取时间进一步延长, GPC 得率反而稍微下降(图 5a)。60 ℃条件下,提取率则从 1 h 的 23.26%升至 7 h 的 30.02%。图 5b 显示,与 60 ℃提取 1 h 的产物相比,100 ℃提取 1 h 所得 GPC 的黏度已经很低,在 60 ℃和 100 ℃延时提取过程中,所得 GPC 的黏度



注:不同小写字母表示 100 ℃组间有显著差异($P<0.05$),不同大写字母表示 60 ℃组间有显著差异($P<0.05$)。

图 5 高温和低温热解法提取时间对 GPC 提取率(a)、黏度(b)和 TCA-SP 得率(c)的影响

Fig.5 Effect of extraction time on GPC yield (a), viscosity (b) and TCA-SP yield (c) of the product obtained by high and low temperature pyrolysis

均随提取时间的延长而逐渐降低。对比 GPC 得率和黏度的数据,可以看出,即无论是高温 100 ℃ 还是低温 60 ℃ 提取,延长加热时间或提取温度,对 GPC 提取率的贡献相对较小,而对于降低产物分子质量的贡献很大。图 5c 显示,100 ℃ 加热过程中 TCA-SP 的变化较小,从 1 h 的 28.63% 上升至 2 h 的 31.22%,之后一直到 5 h, TCA-SP 提取率均维持稳定。结合图 5a,提示 100 ℃ 提取 2 h, GPC 提取率和 TCA-SP 含量均达到最大,再延长加热时间,不利于提取率的提升,反而有增加能耗、降低提取率等副作用。而 60 ℃ 提取 1 h, 所得 GPC 产物中多肽含量只有 0.95%, 提示该产物几乎全是由大分子明胶片段构成的。随着提取时间的延长, TCA-SP 明显由 1 h 的 0.95% 上升到 7 h 的 16.61%, 提高了 17.48 倍,结合图 5a,提示即使在低温 60 ℃ 延时提取过程中, GPC 分子也会发生明显热降解。

2.6 酶解对 TCA-SP 得率的影响

为比较热解法和酶解法所得 GPC 中多肽含量的差异,以 60 ℃ 提取 1 h 所得分子质量最大的 GPC (60 ℃-1 h) 为底物,考察 7 种蛋白酶水解对 TCA-SP 得率的影响,结果见图 6。其中,中性蛋白酶在 pH 7 水解 0.5 h 时,肽得率最高达到 28.74%。纳豆激酶和碱性蛋白酶也在水解 0.5 h 达到水解度峰值,胃蛋白酶在 9 h 达到峰值,均低于中性蛋白酶。

目前所报道的鲟鱼皮多肽的制备研究中,大部分用蛋白酶水解法制备,例如风味蛋白酶^[26]、碱性蛋白酶^[18]和胃蛋白酶^[27]。Gui 等^[26]以鲟鱼皮蛋白提取物为底物,发现风味蛋白酶水解 1 h 所得产物的抗氧化活性最强。刘培勇等^[18]结合酸前处理及碱性蛋白酶辅助,从鲟鱼皮中获得胶原多肽,以 TCP-SP 短肽得率为指标,发现短肽得率可达到 55.84%,水解度比不经酸处理的要高出 23.08%。同理,廖涛等^[27]以 0.5 mol/L 乙酸为酶解缓冲液,辅以胃蛋白酶,鲟鱼皮胶原蛋白多肽(非 TCA-SP)得率为 78.86%。由此可见,酶法制备鲟鱼皮 GPC 众多研究结果各具不同,这与鱼皮原料、鱼皮前处理方法以及测定和计算方法都有关。图 6 显示,中性蛋白酶的水解效率最快, TCA-SP 得率相对最高,后续需要在此基础上进一步优化酶解条件,以提

高寡肽得率。以提取率为导向,还需兼顾生物活性,才能真正满足特色产品开发的需要。

2.7 高温热解和酶解法所得 GPC 的分子质量分布

TCA-SP 数据反映的是 GPC 中小分子质量寡肽的含量,然而其不能体现 GPC 中总肽含量。采用液相色谱测定 100 ℃ 加热提取 1~7 h 所得 GPC 和中性蛋白酶水解 0.5 h (N-0.5 h) 所得 GPC 的分子质量分布,结果见图 7。以 10 ku 为多肽分子质量上限,可以看到 100 ℃ 加热 1~7 h 产物中的多肽含量从 74.17% 升至 92.47%,而 N-0.5 h 中 10 ku 以下组分则占到 95.94%。由此可见,虽然图 5c 和图 6 中 TCA-SP 得率都较低,但热解法和酶解法制备鲟鱼皮多肽的实际效率都很高,两种方法均

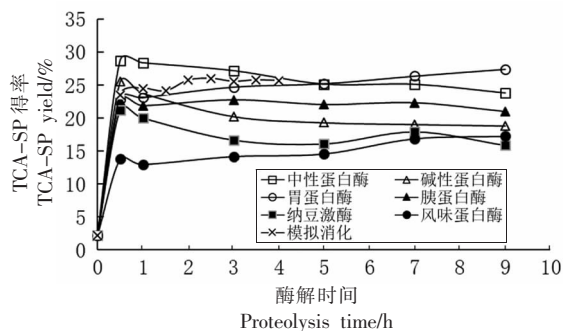


图 6 蛋白酶类型和酶水解时间对鲟鱼皮 TCA-SP 得率的影响

Fig.6 Effect of protease kind and hydrolysis time on the yield of TCA-SP from sturgeon skin

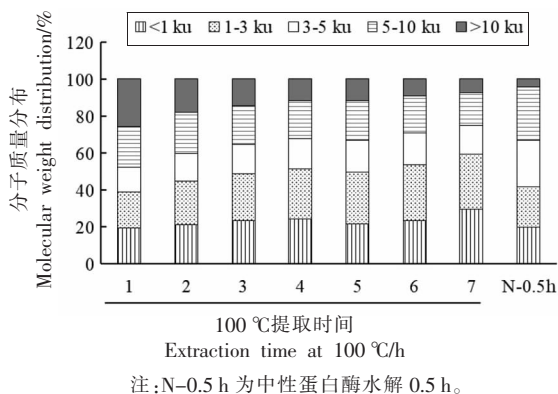


图 7 高温热解和中性蛋白酶酶解法所制 GPC 的分子质量分布

Fig.7 Molecular weight distribution of the GPC obtained by high temperature pyrolysis and enzymatic hydrolysis

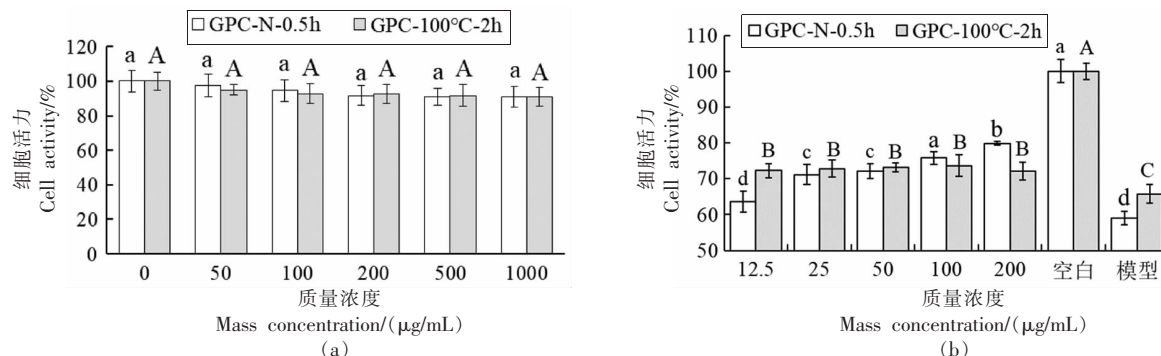
适于家庭烹饪也适合工业化大规模制备。因此,如何将热解法和酶解法有机结合,以提高 GPC 中小分子多肽的含量,是下一步需要优化的内容。

2.8 GPC-100 °C-2 h 和 GPC-N-0.5 h 对正常 PC12 细胞增殖的影响

由于中性蛋白酶水解 0.5 h 和 100 °C 加热 2 h 所得产物的 TCA-SP 得率最接近,因此对比了这两个产物对正常 PC12 细胞活力的影响,结果见图 8。在 50~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内,细胞活力均大于 90%,提示两种产物对正常 PC12 细胞均无毒性作用,且两种方法所制 GPC 之间无明显差异。

正常 PC12 细胞与 300 mmol/L 的半乳糖孵育后,细胞活力明显下降,表明 PC12 细胞受到较为严重的氧化损伤。在加入 *D*-半乳糖之前,用 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 的 GPC 与细胞共同孵育 24 h,然后再加入 *D*-半乳糖,可以看到细胞活力随着 GPC 质量浓度的上升而提高。GPC-N-0.5 h 在 25~200 $\mu\text{g/mL}$, GPC-100 °C-2 h 在 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内均显示出明显的抗细胞氧化损伤的

保护作用。已有一些研究人员报道了鲟鱼肽的抗氧化活性。Islam 等^[28]发现鲟鱼皮多肽、鲟鱼皮胶原肽以及鲟鱼头多肽都具有清除 ROS 自由基的作用,且都能够对 H_2O_2 造成的 L929 成纤维细胞氧化损伤有一定的保护作用。Gui 等^[26]发现鲟鱼皮胶原的风味蛋白酶水解物具有较高的抗氧化活性。Noman 等^[29-30]也发现鲟鱼蛋白的木瓜酶、碱性蛋白酶^[29]和菠萝蛋白酶^[30]水解物都具有抗氧化活性。另外,Sheng 等^[31]也发现鲟鱼软骨胶原肽对 H_2O_2 导致的人脐静脉内皮细胞氧化损伤具有一定的保护作用。几乎所有的鲟鱼多肽都是用蛋白酶水解法制备的,未见热解法。因此,本研究以抗氧化活性为标准,比较了热解法与酶解法所得多肽的抗氧化活性,期望指导消费者和生产厂家在鲟鱼皮以及其它鱼皮资源的利用方面,提供可以选择的多种合理方式。研究表明,热解法和酶解法的水解效率均较高,且抗氧化活性相似,至于其动物体内活性以及其它生物活性是否有差异,还有待结合动物实验进行深入研究。



注:不同小写字母表示 GPC-N-0.5 h 组不同剂量之间差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示 GPC-100 °C-2 h 组不同剂量之间有显著差异($P<0.05$)。

图 8 高温热解和中性蛋白酶酶解法所制 GPC 对正常(a)和 *D*-半乳糖致氧化损伤(b)PC12 细胞活性的影响
Fig.8 Effect of GPC produced by high temperature pyrolysis and neutral protease hydrolysis on normal (a) and *D*-galactose-induced oxidative damaged (b) PC12 cells

3 结论

以提高鲟鱼皮明胶-肽复合物(GPC)得率为目标,对热解法进行较为系统的条件优化,结果发现一直以来家庭和工业界经常使用的碱处理对 GPC 的获得几乎无贡献。因此,弃去碱处理环节,优化了鲟鱼皮的酸处理条件以及热提取条件。研究发现高热(100 °C)提取 1 h 以上则能够获得提

取率超过 75.66% 的 GPC,而且其中多肽含量和 TCA-SP 含量分别占 74.17%,28.63%以上,提取时间越长多肽含量越高,而 TCA-SP 含量不升高。同时,对比酶解法所得 GPC 的效率和抗氧化活性。以分子质量最大、结构相对最完整的 GPC-60 °C-1 h 为底物,中性蛋白酶的水解效率最高,水解产物中多肽含量和 TCA-SP 含量分别达到 95.94%

和 28.73%。高温热解产物和中性蛋白酶水解产物都能够对 *D*-半乳糖致氧化损伤 PC12 细胞具有一定的保护作用,且两者的活性相近。上述工作将为鲟鱼皮胶原的更高效、合理利用提供支撑。

参 考 文 献

- [1] 王雅菲, 祁立波, 白帆, 等. 熬胶工艺对鲟鱼鱼皮胶冻品质的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(9): 137-146.
- WANG Y F, QI L B, BAI F, et al. Effect of processing to the quality of sturgeon's skin edible gelatin products[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(9): 137-146.
- [2] NIKOO M, BENJAKUL S, XU X M. Antioxidant and cryoprotective effects of amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince[J]. Food Chemistry, 2015, 181: 295-303.
- [3] SASAOKA Y, KISHIMURA H, ADACHI S, et al. Collagen peptides derived from the triple helical region of sturgeon collagen improve glucose tolerance in normal mice[J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(2): e12478.
- [4] SASAOKA Y, TAKAGI T, MICHIBA S, et al. Study on the mechanism of the blood-glucose lowering effect of collagen peptides from sturgeon by-products[J]. Marine Drugs, 2021, 19(10): 584.
- [5] NIKOO M, BENJAKUL S, EHSANI A, et al. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7(1): 609-620.
- [6] SUN S S, GAO Y H, CHEN J D, et al. Identification and release kinetics of peptides from tilapia skin collagen during alcalase hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2022, 378: 132089.
- [7] WEI P, ZHENG H, SHI Z Y, et al. Isolation and characterization of acid-soluble collagen and pepsin-soluble collagen from the skin of hybrid sturgeon[J]. Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition, 2019, 34(4): 950-959.
- [8] WOESSNER J J. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1961, 93(2): 440-447.
- [9] KOŁODZIEJSKA I, SIKORSKI Z E, NIECIKOWSKA C. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins[J]. Food Chemistry, 1999, 66(2): 153-157.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋鱼低聚肽粉: GB/T 22729-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China & Standardization Administration of China. Marine fish oligopeptide powder: GB/T 22729-2008 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [11] 孙艺, 韩霜, 马良, 等. 大目金枪鱼皮胶原明胶化过程中酸碱浓度对明胶理化性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 73-81.
- SUN Y, HAN S, MA L, et al. Effect of acid and alkali concentration on the extracting process of big-eye tuna skin gelatin[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(4): 73-81.
- [12] HAO S X, LI L H, YANG X Q, et al. The characteristics of gelatin extracted from sturgeon (*Acipenser baeri*) skin using various pretreatments[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 124-128.
- [13] 韦俐霞, 荀京天, 仇丹, 等. 金枪鱼明胶的制备及其性能研究[J]. 宁波工程学院学报, 2022, 34(2): 1-8.
- WEI L X, XUN J T, QIU D, et al. Preparation and properties of tuna gelatin[J]. Journal of Ningbo University of Technology, 2022, 34(2): 1-8.
- [14] GOMEZ-GUILLEN M C, GIMENEZ B, LOPEZ-CABALLERO M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review[J]. Food Hydrocoll, 2011, 25(8): 1813-1827.
- [15] MENG D W, TANAKA H, KOBAYASHI T, et al. The effect of alkaline pretreatment on the biochemical characteristics and fibril-forming abilities of types I and II collagen extracted from bester sturgeon by-products[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 572-580.
- [16] 孙乐常, 赵阿云, 杜瀚, 等. 酸/碱预处理对美洲鳗鲡 (*Anguilla rostrata*) 鱼骨明胶理化性质与凝胶特性的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 71-78.
- SUN L C, ZHAO A Y, DU H, et al. Effects of acidic/alkali pretreatment on physicochemical properties and gelation characteristics of bone gelatin from

- american eel (*Anguilla rostrata*) [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 71–78.
- [17] 蔡成魁, 滕军. 明胶浸灰促进剂对浸灰周期的影响[J]. 明胶科学与技术, 1999(4): 205–208.
- CAI C K, TENG J. Effect of gelatin impregnation accelerator on ash leaching cycle[J]. Gelatin Science and Technology, 1999(4): 205–208.
- [18] 刘培勇, 李丁宁, 刘亮, 等. 酸处理对酶法提取鲟鱼皮胶原多肽的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 237–240.
- LIU P Y, LI D N, LIU L, et al. Effect of acid treatment on extracting collagen peptide from sturgeon skin by enzymatic hydrolysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 237–240.
- [19] GIMÉNEZ B, TURNAY J, LIZARBE M, et al. Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin[J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(6): 941–950.
- [20] BENJAKUL S, OUNGBHO K, VISESSANGUAN W, et al. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthustayenus* and *Priacanthus macracanthus* [J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 445–451.
- [21] BORAN G, REGENSTEIN J M. Optimization of gelatin extraction from silver carp skin[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(8): E432–E441.
- [22] NIKOO M, BENJAKUL S, BASHARI M, et al. Physicochemical properties of skin gelatin from farmed Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) as influenced by acid pretreatment[J]. Food Bioscience, 2014, 5: 19–26.
- [23] ZHOU P, REGENSTEIN J M. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(6): 392–396.
- [24] GUDMUNDSSON M, HAFSTEINSSON H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments[J]. Journal of Food Science, 1997, 62(1): 37–39.
- [25] LIU H Y, LI D, GUO S D. Extraction and properties of gelatin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin[J]. LWT—Food Science and Technology, 2008, 41(3): 414–419.
- [26] GUI M, GAO L, RAO L, et al. Bioactive peptides identified from enzymatic hydrolysates of sturgeon skin[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(5): 1948–1957.
- [27] 廖涛, 黄晨曦, 江洪有, 等. 响应面法优化鲟鱼皮胶原蛋白多肽的酶解工艺[J]. 食品科技, 2018, 43(1): 141–147.
- LIAO T, HUANG C X, JIANG H Y. Optimization extraction of enzyme soluble collagen peptides from sturgeon by response surface methodology [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(1): 141–147.
- [28] ISLAM M R, LI W, OGATA Y, et al. Production and antioxidant activity of peptides from sturgeon head[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2023, 31: 100944.
- [29] NOMAN A, WANG Y X, ZHANG C, et al. Fractionation and purification of antioxidant peptides from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) protein hydrolysates prepared using papain and alcalase 2.4 L[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2022, 15(12): 104368.
- [30] NOMAN A, WANG Y X, ZHANG C, et al. Antioxidant activity of Hybrid Sturgeon (*Huso dauricus* × *Acipenser schrenckii*) protein hydrolysate prepared using bromelain, its fractions and purified peptides [J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2022, 72(1): 79–89.
- [31] SHENG Y, QIU Y T, WANG Y M, et al. Novel antioxidant collagen peptides of siberian sturgeon (*Acipenserbaerii*) cartilages: The preparation, characterization, and cytoprotection of H₂O₂ -damaged human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)[J]. Marine Drugs, 2022, 20(5): 325.

Preparation GPC from Sturgeon Skin and Its Protective Effect on PC12 Cells

Geng Mingyang, Ma Siyuan, Chi Yixuan, Yao Siyu, Liu Qin hao, Wang Zhenyu, Sun Liming*
(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract Objective: To guide the rational use of sturgeon skin resources, this study aimed to compare the production

efficiency and bioactivity between the gelatin-peptide complex (GPC) made from sturgeon skin by the method of pyrolysis and enzymatic hydrolysis, respectively. Methods: Using sturgeon skin as raw material and GPC yield as an indicator, pretreatment condition of sturgeon skin and the preparation of GPC by pyrolysis were optimized. On the other side, using the GPC with given maximum molecular weight as substrate, and trichloroacetic acid soluble oligopeptide (TCA-SP) was used as an index, the enzymatic hydrolysis efficiency of several kinds of protease on this substrate was investigated. Finally, the effects of GPCs prepared by pyrolysis and protease hydrolysis, with the highest TCA-SP yield, on the viability of normal and *D*-galactose-induced oxidative damage PC12 cells was compared. Results: Alkali treatment did not contribute significantly to the extraction of GPC from sturgeon skin, while acid treatment did. The optimized condition for acid treatment was incubating the sturgeon skin at 0.25 mol/L HCl for 6 h. The most suitable conditions for GPC preparation by high-temperature pyrolysis were found at 100 °C for 2 h, with a highest GPC and TCA-SP yield of 34.72% and 31.22%, respectively. The GPC obtained by low-temperature pyrolysis at 60 °C for 1 h had the highest viscosity and the lowest TCA-SP, suggesting it had maximum molecular weight and relatively complete structure. GPC-60 °C-1 h was then used as the substrate to be hydrolyzed by several proteases respectively. A highest TCA-SP content of 28.74% was observed in the hydrolysate of neutral protease for 0.5 h. GPC-100 °C-2 h and GPC-N-0.5 h had no cytotoxic effect on normal PC12 cell viability at 50–1 000 µg/mL. And both had a certain protective effect on PC12 cells against *D*-galactose-induced oxidative damage at 12.5–200 µg/mL, and there seemed no significant difference between them. Conclusion: The TCA-SP content in the GPC obtained by high-temperature pyrolysis was similar to that prepared by neutral enzymatic hydrolysis, and their protective effect on PC12 was also similar.

Keywords sturgeon skin; gelatin-peptide complex; pyrolysis; enzymatic hydrolysis; cell protection activity