

# 乌贼皮胶原蛋白特性与抗氧化能力研究

宋正规, 雷 静, 薛张芝, 张洪超, 李和生\*, 王鸿飞, 付晶晶

宁波大学海洋学院, 宁波 315211

**摘要:**为提高乌贼综合利用率,采用乌贼皮为主要原料,对胃蛋白酶和酒石酸复合提取胶原蛋白的特性与抗氧化性进行综合研究。研究表明:所提取的乌贼皮胶原蛋白溶解性受 pH 和 NaCl 浓度影响显著,pH 为 5 时溶解度最小,降低 46%;NaCl 浓度由 0 mol/L 增至 1.2 mol/L,溶解度逐渐降低 80%。黏度受样品浓度、pH、离子强度、贮存时间影响明显,随着样品浓度的增高,黏度逐渐增大;同一浓度,在 pH3 处黏度取得最大值;随着 NaCl 浓度的增高,黏度逐渐降低;贮存 24 h ~ 48 h,黏度保持最大。抗氧化能力随胶原样品浓度的增加呈上升趋势,DPPH 清除率在 5 mg/mL 时达到最大值 49.66%;样品浓度大于 10 mg/mL 后,还原能力明显增加;胶原样品浓度 10 mg/mL 时·OH 清除率达到最大为 95.66%。实验为乌贼皮胶原蛋白的开发利用提供了理论基础。

**关键词:**乌贼皮胶原蛋白;溶解度;黏度;抗氧化性

中图分类号:TS254.9;Q58

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.2.019

## Characteristics and antioxidant ability of squid skin collagen

SONG Zheng-gui, LEI Jing, XUE Zhang-zhi, ZHANG Hong-chao,

LI He-sheng\*, WANG Hong-fei, FU Jing-jing

*Ocean College of Ningbo University, NingBo 315211, China*

**Abstract:** In order to improve the comprehensive utilization rate of squid, squid-skin were used as the main raw materials to extract collagen, then the characteristics of collagen extracted from tartaric acid were comprehensively evaluated. The results showed that the collagen had a high solubility, There were a minimum solubility of collagen at the pH of 5, decreased by 46%. When the concentration of NaCl was greater than 0 mol/L, the solubility of collagen decreased as the salt concentration increased. And while the concentration of NaCl increased to 1.2 mol/L, the solubility of collagen decreased by 80%. The collagen concentration, pH, ionic strength and storage time have an effect on viscosity. The viscosity gradually increased with the increased of collagen concentration. The viscosity peaked at pH3. With the increase of NaCl concentration, the viscosity decreases gradually. With the prolonging of the storage time, the viscosity presented a trend of decrease after the first increase, and the viscosity of 24-48 h was the largest. The antioxidant capacity increased with the increase of collagen concentration. Increased collagen concentration, the eliminating ratio of increased gradually, which is 5mg/mL when the maximum file size is reached, 49.66%. Within the range of 2 mg/mL-10 mg/mL, little change in reducing capacity, After more than 10 mg/mL, itsignificantly increased, but still relatively low. With the increase of collagen concentration, the eliminating ratio of hydroxyl radical increased, At 10 mg/mL, the removal rate reached a maximum of 95.66%. This paper supplied the theoretical basis for making full use of the squid-skin collagen.

**Key words:** protein of collagen from cuttlefish skin; collagen; solubility; viscosity; antioxidant capacity

乌贼皮胶原蛋白是利用乌贼加工过程中的废弃鱼皮为原料,采用酶法-酸法相结合的方法对乌贼皮进行提取所得的一种天然高分子化合物。相比其他来源提取的胶原蛋白,乌贼生活深海环境较为干净,生命周期短,体内所含毒害物质较少,另外海水含盐

量高,不适宜大量微生物繁殖,更加安全。乌贼皮中胶原蛋白含量丰富,约占鱼皮湿重的 15%,所提乌贼皮胶原蛋白可被广泛应用于食品、医药、化妆品等领域,经济效益可观<sup>[1]</sup>。

从文献中可以看出鮫鱼、鲑鱼、鲑鱼和狭鳕鱼等水产品的鱼皮胶原蛋白提取工艺和特性已有报道,但作为东海四大鱼类的乌贼鱼皮胶原蛋白的特性和抗氧化性鲜有报道<sup>[2-12]</sup>。本文选用东海四大支柱海产品之一的曼氏无针乌贼为胶原蛋白提取原

收稿日期:2017-09-26 接受日期:2017-12-04

基金项目:浙江省科技厅重大科技专项(2009C03017-3)

\* 通信作者 Tel:86-532-88963253; E-mail:lihesheng@nbu.edu.cn

料,对 4 ℃ 下利用胃蛋白酶和酒石酸复合提取的乌贼胶原蛋白进行特性研究。文章主要研究了胶原蛋白的氨基酸组成,溶解性,黏度,抗氧化性,为胶原蛋白的开发利用提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

曼氏无针乌贼(购与宁波市庄市市场)。无水乙醇、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、四氟乙烯、酒石酸、邻二氯菲、磷酸氢二钠、考马斯亮蓝、磷酸二氢钠、硫酸亚铁、过氧化氢、抗坏血酸、铁氰化钾、氯化钠、三氯乙酸、三氯化铁、明胶、戊巴比妥钠等皆为 AR 级,购自宁波奥博科学仪器有限公司。

乌贼皮胶原蛋白的制备:实验选取浙江省宁波市庄市菜市场水产品区活体冻干乌贼为原料,采取胃蛋白酶和酒石酸复合提取乌贼皮中胶原蛋白。通过单因素及正交实验,得出最优提取条件,提取过程为:称取自然晾干乌贼皮 100 g,添加 0.1 mol/L 氯化钠 3 L,浸泡 3 h,换浸泡液继续浸泡 3 h,基本除去蛋白多糖、糖蛋白等杂质。取出乌贼皮,去离子水淋洗后,用含有 1%  $H_2O_2$  的 0.01 mol/L NaOH 溶液,4 ℃ 下浸泡 12 h 脱色处理。因乌贼皮含脂量只有干重的 0.9% 左右,固未进行脱脂处理。取出脱色后的乌贼皮后,淋洗干净,依次添加 1.0 mol/L 酒石酸 2 L,胃蛋白酶 140000 U,4 ℃ 提取 18 h。添加 104.5 g NaCl,4 ℃ 盐析 16 h,倒去上清液,对下层含有絮状物液体过滤,用 500 mL 去离子水冲洗絮状物,挑取絮状物冻干。所提乌贼皮胶原蛋白结构鉴定已做研究<sup>[1]</sup>。

### 1.2 仪器设备

pHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);J-1 旋转黏度计(上海精密科学有限公司);XHF-D 内切式匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);6-新锐可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);H-1650 高速台式离心机(长沙湘仪离心机设备有限公司);Agilent1200 液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 胶原蛋白氨基酸组成测定

采用高效液相色谱仪来测定乌贼皮氨基酸的组成及含量。胶原蛋白干样(粉末)经 6 mol/L HCL 消解,采用高效液相色谱法测定其氨基酸组成。

分析条件:A 相为 0.2 mol/L 柠檬酸钠水溶液(pH3.0),B 相为 0.2 mol/L 硼酸钠水溶液(pH9.8),Hypersil AA-ODS 2.1 × 200 mm × 5 μm 氨

基酸柱,进样量为 2 μL,流速为 0.45 mL/min,紫外检测器波长为 338 nm,柱温为 40 ℃,运行时间为 2 min。

#### 1.3.2 胶原蛋白的溶解性测定

参考张虹等人<sup>[13]</sup>方法略作修改,将胶原蛋白干样(粉末)溶于 0.1 mol/L 酒石酸中,4 ℃ 下轻轻搅拌直至胶原蛋白完全溶解,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

##### 1.3.2.1 pH 对胶原蛋白溶解性的影响

用 6 mol/mL HCL 和 6 mol/mL NaOH 调节 5 mL 10 mg/mL 的胶原蛋白溶液 pH 至 2-10(间隔为 1.0),并定容至 10 mL,用同样 pH 值的蒸馏水加至 10 mL 刻度,搅拌离心(5439 g,15 min,4 ℃),取上清液用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。各 pH 点的蛋白含量与最高蛋白含量相除获得相对溶解度。

##### 1.3.2.2 盐浓度对胶原蛋白溶解性的影响

取 5 mL 浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mol/L 的冷 NaCl 溶液加入 5 mL 10 mg/mL 的胶原蛋白溶液,得到 NaCl 最终浓度分别为 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 mol/L。搅拌离心(5439 g,15 min,4 ℃),取上清液用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。相对溶解度计算同上。

#### 1.3.3 胶原蛋白的黏度测定

采用旋转黏度计测定乌贼皮胶原蛋白的黏度<sup>[14]</sup>,胶原蛋白干样(粉末)用 0.1 mol/mL 酒石酸溶解,轻轻搅拌,选择 J-1 旋转黏度计 1 号转子维持在 60 rpm,溶液保持 25 ℃,示数稳定后进行读数。

##### 1.3.3.1 单因素分析

试验选取样品浓度、pH、盐浓度、存贮时间四个单因素,分析各因素对乌贼皮胶原蛋白黏度的影响。

##### 1.3.3.2 正交分析

选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表,对样品浓度、pH、离子强度,贮存时间进行正交试验,综合单因素试验结果进行实验设计,分析乌贼皮胶原蛋白黏度影响因素。

#### 1.3.4 胶原蛋白抗氧化性的测定

##### 1.3.4.1 清除 DPPH 能力的测定

抗氧化活性以清除 DPPH 自由基能力大小表示。按照 Yen G G 测定方法<sup>[15]</sup>,使用酶标仪在 517 nm 处测定 DPPH 和胶原蛋白反应溶液的吸光值。

##### 1.3.4.2 还原能力的测定

参考张强<sup>[16]</sup>等的方法测定胶原的还原能力。

##### 1.3.4.3 清除 ·OH 能力的测定

配制不同浓度的胶原蛋白溶液,按照楚水晶测

定方法<sup>[5]</sup>,根据酶标仪在 536 nm 处测定·OH 和胶原蛋白反应溶液的吸光度,表征胶原蛋白对·OH 的清除率。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶原蛋白氨基酸组成分析

不同蛋白质氨基酸的种类和数量存在明显差异。因此研究氨基酸组成对分析胶原蛋白有重要意义。对乌贼皮胶原蛋白的氨基酸组成分析见表 1 所示。

表 1 乌贼皮胶原蛋白的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of collagen from cuttlefish skin

氨基酸组成 Amino acid composition	质量分数 Mass fraction (g/100g)	比例 Proportion (%)	氨基酸组成 Amino acid composition	质量分数 Mass fraction (g/100g)	比例 Proportion (%)
天门冬氨酸 Asp	2.02	3.17	酪氨酸 Tyr	0.44	0.70
谷氨酸 Glu	11.13	17.48	胱氨酸 Cys	0.13	0.20
(天冬酰胺) Asn	-	-	* 缬氨酸 Val	0.38	0.60
丝氨酸 Ser	1.39	2.18	* 甲硫氨酸 Met	-	-
(谷氨酰胺) Gln	-	-	* 色氨酸 Trp	-	-
组氨酸 His	0.20	0.32	* 苯丙氨酸 Phe	0.48	0.75
甘氨酸 Gly	21.71	34.12	* 异亮氨酸 Ile	0.36	0.57
* 苏氨酸 Thr	0.71	1.12	* 亮氨酸 Leu	1.28	2.01
(瓜氨酸) Cit	3.08	4.84	* 赖氨酸 Lys	0.58	0.92
精氨酸 Arg	6.56	10.32	羟脯氨酸 Hyp	3.92	6.17
丙氨酸 Ala	4.16	6.53	脯氨酸 Pro	5.10	8.01
必需氨基酸总量	3.79	5.96	总计	63.63	

注: \* 表示必需氨基酸, - 表示未检出。

Note: \* indicated the required amino acids, - indicated that is not detected.

从表 1 可知本实验对乌贼皮胶原蛋白经过重复检测,检测出 18 种氨基酸,与相关文献理论一致<sup>[17]</sup>。I 胶原蛋白的胶原区域由 Gly-Pro-Hyp、Gly-Pro-Y 和甘氨酸-X-Y(X、Y 代表除甘氨酸和脯氨酸以外的其他任何氨基酸残基)这样的三肽结构重复出现<sup>[18-21]</sup>,可知 Gly 占胶原蛋白比重约 1/3,同时含有大量的 Pro 和 Hyp,其中 Pro 含量一般应高于 Hyp 含量,大部分胶原蛋白特征芳香氨基酸(Tyr、Phe)和胱氨酸含量较少。所测结果显示乌贼皮胶原蛋白中 Gly 含量最高,约占氨基酸总量的 1/3;Glu、Arg、Pro、Ala、Hyp 含量较高,Tyr、His、Cys 含量较低,不含 Trp,亚氨基酸(Pro + Hyp)含量为 9.02%,占氨基酸总量的 14.18%,Hyp 与 Pro 之比为 0.77,符合水产胶原蛋白的特征。所测乌贼皮胶原蛋白的氨基酸组成与草鱼皮胶原蛋白<sup>[22]</sup>、军曹鱼皮胶原蛋白<sup>[23]</sup>、牛皮胶原蛋白<sup>[24]</sup>等类似,有着典型胶原蛋白的氨基酸组成特点。

### 2.2 胶原蛋白溶解性分析

胶原蛋白的溶解性是其基本物理性质之一,会影响胶原蛋白的其他功能性质和实际应用价值。溶

解度数据对天然来源胶原蛋白的提取、纯化和分离条件的确定至关重要,为胶原蛋白的应用提供了指标<sup>[25]</sup>。

#### 2.2.1 pH 对胶原蛋白溶解性的影响

溶解性主要受亲水疏水基团相互作用和离子相互作用的影响。在研究同一种乌贼胶原蛋白时,亲水基团、疏水基团变成了不变因素,因此胶原蛋白溶解性主要是带电离子相互作用的影响。实验研究了 pH 对溶解度的影响,其结果见图 1。

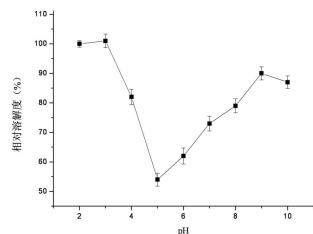


图 1 不同 pH 值下乌贼皮胶原蛋白的溶解度

Fig. 1 Protein concentrations of collagen from cuttlefish skin at different pHs

由图 1 可知乌贼皮胶原蛋白分别在 pH2 和 pH3 时溶解度最大,在 pH3 ~ pH5 范围内,随着 pH 值的

增加,胶原蛋白溶解度降低,在 pH5 和 pH6 之间(即等电点附近)溶解度最低,此后随着 pH 值的升高,相对溶解度也升高;当 pH9 时溶解度逐渐趋缓。这与大眼鲷皮和骨胶原蛋白<sup>[26]</sup>、红鳍笛鲷鱼皮胶原蛋白<sup>[27]</sup>、鲑鱼肌肉和皮胶原蛋白<sup>[28]</sup>等相似。

### 2.2.2 NaCl 浓度对胶原蛋白溶解性的影响

电解质离子水中电离后与胶原蛋白结合,改变胶原蛋白电荷情况,从而影响胶原蛋白彼此间相互作用实验研究了 NaCl 浓度对胶原蛋白溶解性的影响,结果见图 2。

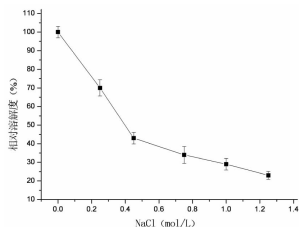


图 2 不同盐浓度下乌贼皮胶原蛋白的溶解度

Fig. 2 Protein concentrations of collagen from cuttlefish skin with different NaCl concentrations

图 2 表示胶原蛋白溶解度随 NaCl 浓度的变化。在 NaCl 浓度较低时,胶原蛋白溶解度较高,主要是有两方面的原因决定的:一方面由于胶原蛋白本身暴露出的-COOH, -NH<sub>2</sub> 电离后使胶原蛋白本身带上了电荷,从而部分溶解在水中。另一方面主要在低浓度时,钠离子可与胶原蛋白结合,使胶原蛋白所带正电荷增加,蛋白质分子间相互排斥,分散性好,稳定了蛋白质的结构,溶解度较大<sup>[29]</sup>。随 NaCl 浓度的升高胶原蛋白溶解度逐渐降低,浓度在 0 ~ 0.6 mol/L 时,胶原蛋白的溶解度下降明显,这是因为随着 NaCl 浓度的升高,中性盐对水的亲和力大于蛋白质对水的亲和力,使本来围绕在蛋白质亲水基团的水逐渐转移到 Na<sup>+</sup> 和 Cl<sup>-</sup> 的周围。从而使蛋白质亲水基团暴露出来,蛋白质溶出,溶解度降低。在较高的浓度时, 0.7 mol/L 左右,盐离子与周围水分子结合形成水化膜,使蛋白质脱水发生盐析效应而析出,导致溶解度的降低,发生盐析现象<sup>[30]</sup>。

## 2.3 胶原蛋白黏度分析

黏度是胶原蛋白的一个重要理化指标,它影响胶原蛋白的优劣,很大程度上决定了产品的质量,实验研究了胶原蛋白溶液的黏度受样品浓度、pH、离子强度,贮存时间等因素影响作用。

### 2.3.1 单因素分析

#### 2.3.1.1 样品浓度对胶原蛋白黏度的影响

不同样品浓度可溶性胶原蛋白含量不同,胶原蛋白溶解量对胶原蛋白黏度有重大影响。实验研究了不同样品浓度下的黏度变化,结果如图 3。

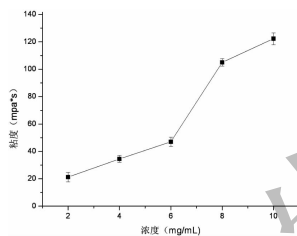


图 3 浓度对胶原蛋白黏度的影响

Fig. 3 Effect of different concentration on the viscosity of collagen

由图 3 可知,乌贼皮胶原蛋白溶液的黏度随浓度的增加而增加。胶原蛋白溶液黏度主要受氨基酸组成、分子质量、对称性和蛋白分子的多分散性因素的影响。蛋白质分子是一种高分子化合物,相对分子质量较大,利用胃蛋白酶复合酒石酸提取后,胶原蛋白空间螺旋结构打开,水解为 3 条单链,胶原蛋白对称系数越大,相对的黏度就越大,球形胶原蛋白分子的不对称系数看为 1,则线状分子的不对称系数为无穷大,黏度变得极大<sup>[31]</sup>。

#### 2.3.1.2 pH 对胶原蛋白黏度的影响

pH 因对胶原蛋白溶解度影响有所变化,进而影响胶原蛋白黏度的因素。实验研究了 pH 对胶原蛋白黏度的影响,结果如图 4。

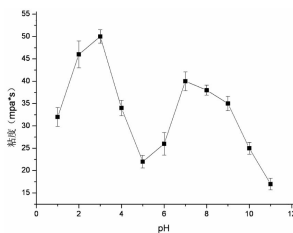


图 4 pH 对胶原蛋白黏度的影响

Fig. 4 Effect of different pH on the viscosity of collagen

如图 4, pH 对乌贼皮胶原蛋白溶液黏度的影响比较复杂,胶原蛋白黏度在 pH1-pH3 之间逐渐升高, pH3-pH5 时黏度降低,在等电点附近达到最小值,等电点后重新升高,在 pH 大于 7 以后,黏度值又随 pH 的增加而降低,这与 Cofrades 和罗永康所测结果一样<sup>[32]</sup>。胶原蛋白等电点为 5.46,胶原蛋白分子的带电状态影响了其分子形状,当处于等电点附近时,由于整个分子几乎成电中性,分子的形状趋向于紧缩卷曲状,氢键等引起的分子间作用力最小,

分子间的运动阻力也比较小,故表观黏度最小<sup>[33,34]</sup>,对应图中 pH 为 5-6 时的黏度。当  $7 > \text{pH} > 3$  时,随着 pH 靠近等电点,胶原蛋白的溶解性逐渐降低,溶液中长链分子不断减少,故在靠近等电点过程中,胶原蛋白黏度不断降低, $\text{pH} < 3$  和  $\text{pH} > 7$  时,溶液中同种电荷离子过多,虽然胶原蛋白溶解性很大,蛋白单链和  $\text{H}^+$  或  $\text{OH}^-$  所带电荷一致,同种电荷相互排斥,不能凝聚成大型聚合体,各胶原蛋白单链相互排斥,多以胶原蛋白小分子单链存在,离子浓度与黏度呈负相关,故胶原蛋白黏度逐渐降低。

### 2.3.1.3 NaCl 浓度对胶原蛋白黏度的影响

离子强度影响胶原蛋白黏度主要是通过两方面:一方面,通过影响胶原蛋白溶解度。另一方面,作用氨基酸残基,影响胶原蛋白凝聚成大的基团。实验研究了 NaCl 浓度对胶原蛋白黏度的影响,结果如图 5。

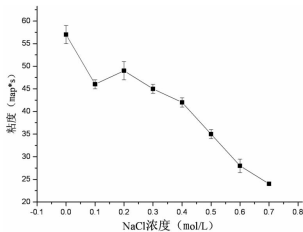


图 5 NaCl 浓度对胶原蛋白黏度的影响

Fig. 5 Effect of different NaCl concentrations on the viscosity of collagen

由图 5 知,随着 NaCl 浓度的增加,胶原蛋白黏度逐渐下降。加入  $0.1 \text{ mol/L}$  NaCl 后,胶原蛋白黏度有较大下降,可能是因为,加入 NaCl 后, $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  分散在溶液之中,溶液中离子浓度和整体电荷量增加,氨基酸残基和  $\text{Na}^+$  或  $\text{Cl}^-$  吸引作用,降低了胶原蛋白氨基酸残基和氨基酸残基之间的相互作用,使各胶原蛋白相互独立,不能形成更大分子胶原蛋白基团,黏度降低。NaCl 浓度在  $0.1 \text{ mol/L}$ - $0.3 \text{ mol/L}$  范围时,胶原蛋白黏度变化不大。进一步增大 NaCl 浓度, $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  周围聚集更多的水分子,胶原蛋白氨基酸残基亲水性基团水分子流失,胶原蛋白间氢键破坏,黏度降低。当 NaCl 浓度达到  $0.7 \text{ mol/L}$  左右时,胶原蛋白发生盐析,旋转黏度计无法检测其黏度。

### 2.3.1.4 存贮时间对胶原蛋白黏度的影响

随着贮存时间的延长,胶原蛋白分子内部开始断裂,长链开始分解,胶原蛋白氨基酸链的长短对黏

度影响较大<sup>[35]</sup>。实验研究了存贮一周,胶原蛋白黏度的变化,结果如图 6。

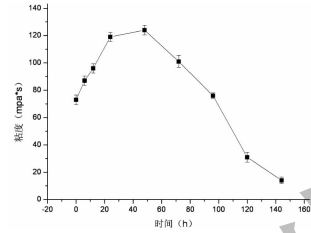


图 6 存贮时间对胶原蛋白黏度的影响

Fig. 6 Effect of stored time on the viscosity of collagen

从图 6 中可以看出存放时间对胶原蛋白溶液黏度的影响,前 48 h 内,随着时间的增加,溶液的黏度也相应增加;存放 48 h 之后,胶原蛋白溶液黏度开始下降,96 h 后急剧下降,这与王晨等<sup>[34]</sup>人的报道相似。

胶原蛋白的黏度与其分子结构有关,胶原蛋白分子链在溶液中较为伸展时,随着静置时间的延长,胶原内部结构的刚性逐渐增加,分子链间相互作用增强,溶液黏度逐渐增大,如果此时溶液的浓度达到一定程度,则有形成凝胶的趋势<sup>[34]</sup>。但是胶原溶液存放时间过长,会使已增长的刚性链结构稳定性下降,有的链还可能会断裂,同时外界细菌很容易作用于胶原蛋白,这些都会导致胶原蛋白黏度的下降<sup>[35]</sup>。

### 2.3.2 多因素分析

选用  $L_9(3^4)$  正交表,对样品浓度、pH、离子强度,贮存时间进行正交试验,优化黏度条件,正交试验结果见下表。

在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下,样品浓度分别为 7、8、9 mg/mL; pH 分别为 2、3、4; NaCl 浓度分别为 0、0.1、0.2 mol/L; 贮存时间分别为 40、50、60 h。

实验结果,根据极差分析,影响黏度的因素为样品浓度  $>$  pH  $>$  离子强度  $>$  贮存时间,由表中可以直接看出组合条件  $A_2B_2C_3D_1$  粘度最大。

### 2.4 胶原蛋白抗氧化性的测定

胶原蛋白残基能够直接作用在自由基,或是间接消耗掉容易生成自由基的物质,防止进一步反应,从而延缓衰老、预防疾病,本实验利用胶原蛋白在体外清除自由基的能力反应其抗氧化性。

#### 2.4.1 清除 DPPH 能力的测定

DPPH 自由基是人体衰老的主要因素,对人类细胞膜造成破坏,使酶失去活性,导致细胞变异等。实验对胶原蛋白清除 DPPH 能力进行了测定,结果如图 7。

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号 No.	A 样品浓度 mg/mL	B pH	C 离子强度 Ionic strength	D 贮存时间 h	黏度 mpa * s
1	1(7)	1(2)	1(0)	1(40)	73
2	1	2(3)	2(0.1)	2(50)	84
3	1	3(4)	3(0.2)	3(60)	80
4	2(8)	1	2	3	84
5	2	2	3	1	90
6	2	3	1	2	87
7	3(9)	1	3	2	81
8	3	2	1	3	79
9	3	3	2	1	84
K1	237	238	239	247	
K2	261	253	252	252	
K3	244	251	251	243	
k1	79	79.333	79.667	82.333	
k2	87	84.333	84	84	
k3	81.333	83.667	83.667	81	
R	8	5	4.333	3	

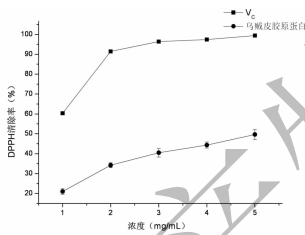


图7 乌贼皮胶原蛋白溶液对 DPPH 的清除效果

Fig. 7 Scavenging effects of collagen at different concentrations on DPPH free radical

有图7知,在1~5 mg/mL 浓度范围内,随着胶原样品浓度的增加,可提供的电子逐渐增多,DPPH清除率逐渐升高,在5 mg/mL 时清除率最大为49.66%,总体上乌贼皮胶原蛋白清除 DPPH 的能力较好,胶原蛋白对清除自由基效果显著,但 DPPH 清除率明显低于维生素 C。

#### 2.4.2 还原能力的测定

还原力的测用来评价抗氧化剂活性的常用方法,实验测定了不同浓度下胶原蛋白的还原能力,结果如图8。

在2~10 mg/mL 范围内,吸光度变化不大;大于10 mg/mL 后,随着样品浓度的增加,吸光度明显

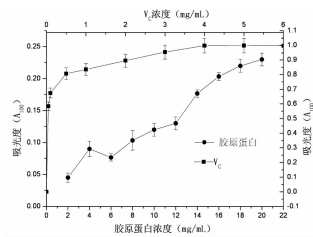


图8 乌贼皮胶原蛋白溶液的还原能力

Fig. 8 Reduction ability of collagen at different concentrations

增加。胶原蛋白还原能力的测定是对其清除自由基能力的辅助研究,主要是测定胶原蛋白提供电子能力大小,进而验证清除自由基结论。有图可知,随着胶原样品浓度的增加,胶原蛋白还原力逐渐提高,与此同时,清除 DPPH 自由基的能力不断升高。主要原因是胶原样品浓度提高,可提供的电子数量不断增加。相同条件下测定,4 mg/mL Vc 溶液的吸光度为0.998,而20 mg/mL 胶原溶液的吸光度仅为0.208。整体来说,乌贼皮胶原蛋白的还原能力偏低,还原能力远远弱于维生素 C。

#### 2.4.3 清除·OH 能力的测定

图9 为乌贼皮胶原蛋白对·OH 清除作用。

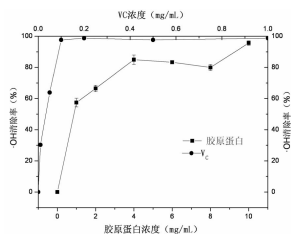


图9 乌贼皮胶原蛋白溶液对·OH的清除效果

Fig. 9 Scavenging effects of collagen at different concentrations on ·OH free radical

如图9所示,在2~10 mg/mL浓度范围内,随着胶原样品浓度的增加,·OH清除率逐渐升高,在10 mg/mL时清除率最大为95.66%,总体上乌贼皮胶原蛋白清除·OH的能力较好。相同条件下测定,1.5 mg/mL Vc溶液的·OH清除率已达100%,而4 mg/mL胶原溶液的·OH清除率为84.57%。

主要原因可能是胶原蛋白分子量过大,乌贼皮胶原蛋白主要是I型胶原蛋白,胶原蛋白大部分水解为了 $\alpha$ 、 $\beta$ 以及少量的 $\gamma$ 链, $\alpha$ 链的分子量在110-130 KD之间, $\beta$ 、 $\gamma$ 链的分子量在200 KD以上,分子量过大,羟自由基清除能力较弱<sup>[26]</sup>。这可能是氨基酸长链过长,内部氨基酸片段不易形成活性中心,或与其他活性物质相互作用降低活性。对于多肽片段活性明显高于氨基酸长链,多肽片段氨基酸短程相互作用,构建空穴,形成可以清除羟自由基·OH的活性中心,相比氨基酸长链,多肽链更易形成活性中心,与自由基相互接触可能性更大。同时氨基酸种类和数量也会影响羟自由基·OH清除效果,这可能是氨基酸暴露基团与羟自由基·OH相互作用的效果。甘氨酸,脯氨酸,谷氨酸,蛋氨酸,苯丙氨酸,赖氨酸对羟自由基·OH都有明显清除效果<sup>[36]</sup>。

### 3 结论

本实验研究了所提乌贼皮胶原蛋白特性与抗氧化能力。所提胶原蛋白氨基酸种类和比例符合I型胶原蛋白特性。在酸性和碱性条件下都有较好的溶解性,等电点附近溶解性较差,相对溶解度只有54%。溶解度随NaCl浓度增加,逐渐降低,达到0.7 mol/L左右,胶原蛋白发生盐析。影响黏度的因素依次为样品浓度>pH>离子强度>贮存时间。抗氧化能力指标不如Vc,但相比从植物果实或复杂微生物发酵生产过程制备Vc<sup>[37,38]</sup>,乌贼皮胶原蛋白在废料利用方面依然具有独特的优势。

### 参考文献

- 1 Lei J(雷静), Li HS(李和生), Zhang LY(张丽媛), et al. Extraction and Characterization of Collagen from Skin of *Sepia esculenta* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 575-580.
- 2 Benjakul S, Thiansilakul Y. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper [J]. *J Sci Food Agricu*, 2010, 90: 132-135.
- 3 Cao SQ(曹少谦), Xia SS(夏珊珊). Extraction and Characterization of Collagen from *Navodon septentrionalis* Skin [J]. *J Chin Institute Food Sci Technology* (中国食品学报), 2014, 14: 117-123.
- 4 Nalinanon S, Benjakul S. 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]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90: 1492-1498.
- 5 Chu SJ(楚水晶). Research on preparation and characteristic of collagen from *Navodon modestus* skins [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2010.
- 6 Diao XY(刁雪洋). Study on the extraction of pig skin's collagen and characteristics on physical and chemical [D]. Chongqing: Southwest University, 2010.
- 7 Yang SQ(杨树奇). Analysis of Proximate and Amino Acid Composition of Three Fish Skins [J]. *J Zhanjiang Ocean Univer* (广东海洋大学学报), 2010, 30(1): 97-1.
- 8 Gong ZH(宫子慧). Studies on extraction, characterization and bioactivity of channel catfish skin collagen [D]. Hefei: HeFei University of Technology, 2010.
- 9 Zhuo SZ(卓素珍). Studies on characteritic, composition and application of the collagen from anglefish shin [D]. Zhejiang: Zhejiang Gongshang University, 2009.
- 10 Xin F(辛菲). The primary study on extraction and molecular characteristics of collagen from shin of *scomberomorus niphonius* [D]. Xinjiang: Xinjiang Agricultural University, 2012.
- 11 Huang W(黄雯). Isolation and characterization of collagen from skin of channel catfish and spotted mackere [D] I. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- 12 Yan MY(严鸣艳). Study on the structure and physical properties of collagen from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin [D]. Dalian: Ocean University of China, 2009.
- 13 Zhang H(张虹), Zhuo SZ(卓素珍), Dai ZY(戴志远). Extraction and Characterization of Collagen from Anglerfish (*Lophius litulon*) Skin [J]. *J Chin Institute Food Sci Technol* (中国食品学报), 2009, 9(6): 34-40.

- 14 Liu L(刘磊). Study on extraction and purification and the physical-chemical property of Collagen from rhopilema esculentum[D]. Wuxi:Jiangnan University,2009.
- 15 Yen GG, Hsieh PP. Antioxidative activity and scavenging effects on xylose-lysine Maillard reaction products[J]. *J Sci Food Agric*,1995,67:415-420.
- 16 Zhang Q(张强), Zhou ZY(周正义). Study on separation and purification of rice bran antioxidant peptide[J]. *J Anhui Sci Technol Univer(安徽科技学院学报)*,2008,22(1):29-33.
- 17 Wu SJ(吴少杰), Zhang JJ(张俊杰), Yao XC(姚兴存), et al. Status and Prospect of Squid Comprehensive Utilization in China[J]. *Food Res Dev(食品研究与开发)*. 2011,32:154-155.
- 18 Yang L(杨玲), Zhao Y(赵燕). Isolation and Characterization of Collagens from the Skin of Sturgeon[J]. *Food Sci(食品科学)*,2013,34(23):41-46.
- 19 Liang JH(梁健华). Effects of Ultrasound-Aided Extraction Tilapia (O. Niloticus) Fish Skin Collagen: Functional and Structural Properties [D]. South China University of Technology,2015.
- 20 Jiang TD(蒋挺大), Zhang CP(张春萍) et al. Research progress on the extraction of fish skin collagen[M]. Beijing: Chem Industry Press(化学工业出版社). 2001:1-60.
- 21 Liao YY(廖艳阳). Application of collagen in food[J]. *J Huanggang Nor Univer(黄冈师范学院学报)*,2009,29(3):53-57.
- 22 Zhang JZ(张建忠). Research on preparation and characterization of collagen from skin of grass carp[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University,2007.
- 23 Yang SQ(杨树奇). Study on isolation and functional properties of collagens from the skin of cobia [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University,2010.
- 24 Li LL(刘丽莉), Mei MH(马美湖), Yang XL(杨协力). Extraction and Characterization of Type I Collagen from Bovine Bone[J]. *Food Sci(食品科学)*,2010,2:87-92.
- 25 Mo ZW(莫重文). Food protein chemistry and technology [M]. Chem Industry Press(化学工业出版社),2007. 87-88,91.
- 26 Kittiphattanabawon P, Benjakul S, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper [J]. *Food Chem*,2005,89:355-362.
- 27 Akkasit J, Soottawat B, et al. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brown stripe red snapper [J]. *Food Chem*,2005,93:475-484.
- 28 Montero P, Jimenez F. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout muscle and skin. *Sci. Food. Agric*,1991,54:137-146.
- 29 Yan MY(闫鸣艳). Study on the structure and physical properties of collagen from walleye pollock (Theragra chalcogramma) skin. Dalian:Dalian Ocean University,2009.
- 30 Nalinanon S, Benjakul S. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (Pricanthus tayenus) [J]. *Food Chem*,2007,104:593-601.
- 31 Yan ZN(颜振宇). Study on the volume and viscosity properties of amino acids in aqueous solutions of protein denaturant [D]. Tianjin:Tianjin University,1999.
- 32 Luo YK(罗永康), Pan DD(潘道东). Effects of Protein Content, pH, Ionic Strength on the Viscosity of Silver Carp Myofibrillar Protein [J]. *Food Fermentation Industry(食品与发酵工业)*,2004,30(7):52-54.
- 33 Liu L(刘磊). Study on extraction and purification and the physican-chemincal property of collagen from rhopilema esculentum[D]. Wuxi:Jiangnan University,2009.
- 34 Wang C(王晨). Enzymatic preparation of Ox Bone Collagen Peptide and its Free Radicals Scavenging Activity [M]. Guangzhou:South China University of Technology,2010.
- 35 Lin W(林旺), An Xin(安辛), et al. Isolation and characterisation of collagen from the skin, scale and bone of deep-sea red fish (Sebastes mentella) [J]. *Food Chem*,2008,108:616-623.
- 36 Zhang XQ(张小强). Study of Scavenging Effect on OH Radical, Separation and Purification of Gelatin Antioxidant Peptides[J]. *Food Res Dev(食品研究与开发)*,2014(10):9-12.
- 37 Long Y(龙勇), Sun Q(孙谦). Advances in improving the vitamin C content of fruits and vegetables[J]. *Sci Technology Food Ind(食品工业科技)*. 2014,35:385-389.
- 38 Zhang J(张静), Liu LM(刘立明). Progress in Biotechnological Production of Vitamin C[J]. *J Food Sci Biotechnology(食品与生物技术学报)*. 2008,27(5):1-7.