

斑点叉尾鲷鱼骨制取胶原蛋白和骨粉的试验研究

吴 缙, 陈舜胜

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 鱼骨中蛋白质的存在会影响骨钙的吸收, 将鱼骨中的蛋白提取出来加以利用, 钙质保留在骨中, 既充分利用了鱼骨中的蛋白质成分, 又使高钙成分利于吸收, 可以实现资源利用的“零废弃”。试验在 4℃ 条件下, 斑点叉尾鲷 (长吻鲷, *Ictalurus punctatus*) 鱼骨先用 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 浸泡 6 h, 再用 2.5% NaCl 浸泡 6 h 去除杂蛋白, 用 10% 的异丙醇溶液去除脂肪, 0.1 mol·L⁻¹ 的柠檬酸浸提 3 d 能较好的提取胶原蛋白, 无色无味, 提取率可达 11.87%。粗提液再经盐析、透析可得到纯度较高的胶原蛋白制品。鱼骨胶原蛋白溶液的粘度随着蛋白浓度的增大而增大, 其变性温度为 33.9℃。SDS-PAGE 试验结果表明, 提取的鲷鱼骨胶原具有较高的纯度, 含有 2 条 α 链, β 链含量较高。提取胶原后的鲷鱼骨粉钙含量可达 60%, 作为钙添加剂加到饼干中, 不会对饼干的口感和味道造成显著性差异, 是良好的钙添加剂, 可用于食品再加工。

关键词: 斑点叉尾鲷; 鱼骨; 胶原蛋白; 提取工艺

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2009)03-0036-05

Study on the extraction of collagen from channel catfish bone and bone meal

WU Ti, CHEN Shunsheng

(College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Protein in fish bones will affect the absorption of calcium. If protein was extracted from fish bones and calcium was retained in the bones, not only the protein can be used separately, but also the high calcium can be more easily absorbed. So we can achieve the vision of "zero waste" in the use of resources. In this paper we chose different reagents to extract collagen from channel catfish *Ictalurus punctatus* bones and partially characterized the collagen. The results showed that under the condition of 4℃, non-collagens could be removed completely from fish bones by soaking in 0.1 M NaOH for 6 hours followed by 2.5% NaCl for 6 hours; lipids could be removed by soaking with 10% butyl alcohol. Then colorless and tasteless collagens were extracted with 0.1 M citric acid for 3 days, and the extraction ratio was 11.87%. The extracts were purified further by salting-out and dialyzing. The viscosity of collagen increased as the concentration was condensed and the temperature for denaturation was 33.9℃. SDS-PAGE showed that the collagens were composed of two α chains and one β chain. The content of Ca in bone was high up to 60%. The bone meal with protein free was added in biscuits and didn't cause taste and smell difference. So it could be used in food processing as a good calcium additive.

Key words: channel catfish (*Ictalurus punctatus*); bone; collagen; extraction technology

淡水鱼由于骨骼含量较高 (鱼头、骨约占全鱼的 40% 左右), 骨刺细小, 且这部分常被废弃或

加工成附加值很低的产品, 成为影响其加工利用率的重要原因之一。随着生物化学的发展, 人们对胶

收稿日期: 2008-08-21; 修回日期: 2008-12-11

资助项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD05A18)

作者简介: 吴 缙 (1984-), 女, 硕士研究生, 从事生物资源利用及其化学研究。E-mail: tiwu@stmail.shou.edu.cn

通讯作者: 陈舜胜, E-mail: sschen@shou.edu.cn

原蛋白的认识逐渐提高,从动物不同组织中提取不同类型的胶原蛋白,其功能和作用也不同^[1]。胶原蛋白和免疫球蛋白一样,富有多多样性和组织分布特异性,是与各组织、器官机能有关的功能性蛋白^[2]。鱼骨中蛋白质含量约为15%,且生物学效用较高。然而人体不易吸收骨中胶原蛋白,水解可将骨胶原蛋白提取出来,大大提高其营养价值。

此外,鱼骨中大量蛋白质的存在会影响钙质的吸收,提取骨胶原蛋白时往往先去除钙质再水解胶原,以制备较纯的胶原蛋白。然而,目前对鱼骨的利用主要是加工成鱼骨粉,以利用骨中的钙质为主。因此,在提取胶原时若先去除钙质同样会造成资源的浪费,采用先提取鱼骨中的蛋白并将钙质滞留于骨中再纯化胶原加工骨粉的方法,充分利用了鱼骨中的2大营养成分,真正实现资源利用的“零废弃”。

斑点叉尾鲷(长吻鲷, *Ictalurus punctatus*)是大型的淡水鱼类,原产于北美洲,中国于1984年由湖北省首次从美国引进养殖。对斑点叉尾鲷一般加工成鱼片出口,生产过程产生的下脚料如鱼头、鱼皮、鱼骨等逐渐增多,如果对废弃物加以利用不仅可提高鱼类加工的附加值,同时可减少环境污染^[3],获得良好的经济效益与社会效益。

1 材料与方法

1.1 材料

斑点叉尾鲷加工鱼片的废弃鱼骨,粘连鱼肉刮擦除去放入保鲜袋, -20℃冻藏备用。

NaCl、NaOH、异丙醇、乙酸、柠檬酸、乳酸和L-羟脯氨酸等,均为市售分析纯或生化级试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 鱼骨胶原蛋白的提取和纯化 (1) 鱼骨杂蛋白的去除。鱼骨先用0.1 mol·L⁻¹的NaOH浸泡6 h,再用2.5% NaCl浸泡6 h,其中鱼骨和2种处理剂的料液比均为1:30 (W:V)^[3-6], 4℃操作去除杂蛋白,用脱脂棉过滤,鱼骨用蒸馏水反复洗涤,充分沥干。(2) 鱼骨脂肪的去除。鱼骨中加入其质量30倍的10%异丙醇溶液^[3-5] (料液比1:30, W:V)于4℃浸泡12 h后换液再浸泡12 h,以去除脂肪,用蒸馏水反复洗涤,充分沥干。(3) 鱼骨胶原蛋白的提取。采用有机酸法提取胶原蛋白,选取乙酸和柠檬酸为提取剂,设定

α、β、γ 3种不同的方法将过滤后的鱼骨进行提取^[3-6]: ①α 柠檬酸法。0.1 mol·L⁻¹的柠檬酸,料液比1:30 (W:V),于4℃浸泡3 d, 4℃离心(8 000 rpm, 10 min),上清液即得到鱼骨胶原蛋白的酸粗提液; ②β 乙酸法。0.5 mol·L⁻¹的乙酸,料液比1:30 (W:V),于4℃浸泡3 d, 4℃离心(8 000 rpm, 10 min),上清液即得到鱼骨胶原蛋白的酸粗提液; ③γ 柠檬酸脱钙法。鱼骨用其质量5倍的0.5 mol·L⁻¹的EDTA溶液于4℃浸泡5 d,每天更换一次EDTA溶液以起到脱钙作用,并用蒸馏水反复洗涤,沥干后用0.1 mol·L⁻¹的柠檬酸,料液比1:30 (W:V),于4℃浸泡3 d, 4℃离心(8 000 rpm, 10 min),上清液即得到鱼骨胶原蛋白的酸粗提液; 测粗提液的羟脯氨酸含量。(4) 鱼骨胶原蛋白的提纯。粗提液真空抽滤,去除色素细胞^[4],将滤液中加入固体NaCl至溶液最终浓度为0.9 mol·L⁻¹^[5],搅拌盐析,析出絮状沉淀,4℃离心(6 000 rpm, 10 min),沉淀即为盐析后的胶原蛋白,脱脂棉纱过滤后,将得到的沉淀复溶于酸中使之全部溶解,将溶解液装入透析袋中,4℃透析,透析外液为蒸馏水,至用0.1 M的AgNO₃检验外液中无Cl⁻时终止透析(约3 d)。

1.2.2 鱼骨胶原蛋白含量的测定 鱼骨中的胶原蛋白提取后,按照GB9695.23-90^[7]的方法,测定其羟脯氨酸含量,再乘以羟脯氨酸和胶原蛋白的换算系数11.1即得胶原蛋白含量。

1.2.3 SDS-PAGE电泳 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[8],用7.5%的分离胶和4.5%的浓缩胶^[9],进行10 μL。

1.2.4 鱼骨胶原特性粘度的测定 取一定量不同浓度的胶原样品用乌氏粘度计按一点法测定,温度为20±0.5℃,保持恒温30 min,测定溶液通过毛细管所用的时间。以 $\eta_{sp}/$ 浓度作图。

计算公式: $\eta_r = t/t_0$; $\eta_{sp} = \eta_r - 1$

其中 t 为待测样品流出的时间(s); t_0 为溶剂流出的时间(s); η_r 为待测样品的相对粘度; η_{sp} 为待测样品的增比粘度。

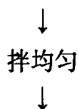
1.2.5 鱼骨胶原的变性温度测定 采用DSC822差示扫描量热仪扫描鱼骨胶原蛋白的变性温度。

1.2.6 鱼骨粉的制备 提取胶原后的鱼骨→清洗→121℃高压杀菌3次(20 min·次⁻¹)→洗涤→干燥→高压粉碎→鱼骨粉

1.2.7 钙含量的测定 采用 GB12398-90 食物中钙的测定方法^[10]的方法进行测定。

1.2.8 钙强化饼干的制作

糖、油、蛋、小苏打、发粉、水



面粉→过筛→调粉→分剂→制坯→装盘→烘烤
→成品

2 结果和分析

2.1 有机酸提取剂的选择

胶原蛋白的制备方法根据不同的原料而多种多样。水产动物中胶原蛋白的提取方法可以大致分为4种：热水浸提、酸法浸提、碱法浸提与酶法浸提等。其基本的原理都是根据胶原蛋白的特性改变蛋白质所在的外界环境，把胶原蛋白从其他蛋白质中分离出来。

一定浓度的酸液可以使胶原蛋白发生部分降解，然后释放到溶剂中。试验分别采用乙酸、柠檬酸2种酸为提取剂，试验结果见图1。

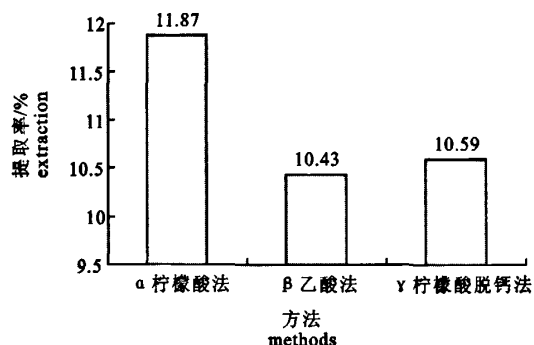


图1 提取剂对胶原蛋白提取率的影响

Fig.1 Effects of different organic acids on extraction of collagen

鲮鱼鱼骨分别用乙酸、柠檬酸作为提取剂，柠檬酸的提取率最高，比乙酸高出0.14倍左右。乙酸具有刺鼻的酸味，而柠檬酸无色无味，因此，采用柠檬酸提取的胶原蛋白更适合用于食品及化妆品等领域。EDTA脱钙对胶原蛋白的提取率影响不大，在脱钙的同时胶原蛋白的提取率略有损失，但是钙质的存在可能会影响胶原蛋白的纯度以及其他理化指标，可通过盐析纯化的方法精制胶原提高其

质量。同时未经脱钙的鱼骨中会滞留大量的钙质，可成为良好的钙添加剂进一步加工利用。综上所述，先用0.1 M NaOH浸泡6 h，再用2.5% NaCl浸泡6 h，用0.1 M 柠檬酸提取3 d能较好提取鲮鱼鱼骨中的胶原蛋白，无色无味，提取率可达11.87%。

2.2 胶原蛋白的SDS-PAGE分析

对鲮鱼鱼骨的酸溶性胶原蛋白进行提取和纯化，SDS-PAGE结果见图2。鱼骨胶原蛋白纯度较高，含有大量的β肽链，其分子量均大于205 ku，约为210 ku。鱼骨胶原蛋白至少含有2种α肽链(α1和α2)组成，α1肽链含量较高，分子质量约为130 ku，α2肽链含量较低，分子质量约为110 ku。骨胶原的β、α1和α2肽链相对分子质量略小于鱼皮。此外，由图2可见，没有经过脱钙处理也没有纯化的鱼骨胶原E纯度较差，先用EDTA脱钙再用柠檬酸提取的鱼骨胶原蛋白C纯度较高，小分子量的杂蛋白几乎看不见。未经脱钙但使用纯化处理的骨胶原D质量较高，纯度和经脱钙处理的骨胶原相当。综上所述，通过盐析纯化骨胶原的方法精制胶原提高其质量，再将未经脱钙的鱼骨加工成高钙粉进一步利用。这样则可以做到鱼骨的胶原蛋白和钙质双利用，真正实现资源利用上的“零废弃”。

2.3 胶原蛋白的粘度

胶原蛋白的物理化学性质之一就是高粘度，图3显示鱼骨胶原蛋白溶液的粘度随浓度增大而增大的变化趋势，在胶原蛋白浓度相同时，鱼骨胶原蛋白溶液的粘度低于鱼皮粘度。

胶原蛋白溶液的粘度主要受其氨基酸组成、分子量以及蛋白分子的多分散性等因素的影响。胶原蛋白中含有较多的羟脯氨酸时，其粘度较大^[11]。高分子量胶原蛋白溶液的粘度随浓度增加呈指数上升，而低分子量胶原蛋白溶液的粘度则随浓度增加近似直线上升。

2.4 胶原蛋白的变性温度

采用DSC822差示扫描量热仪扫描鱼骨胶原，其热量随温度的变化情况见图4。斑点叉尾鲮鱼骨胶原变性温度为33.9℃，低于鲮鱼皮胶原的变性温度50.2℃，可见鱼骨胶原的热稳定性不及鱼皮。

2.5 鲮鱼骨粉的钙含量

鲮鱼骨粉含有大量人体必需的常量元素，经测

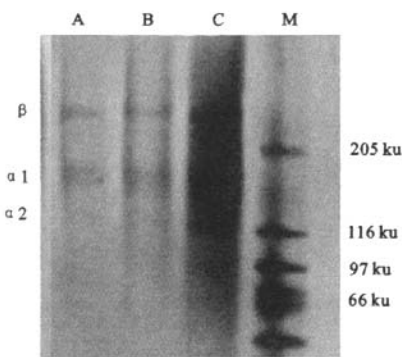


图2 鱼骨原的SDS-PAGE图谱

A. 柠檬酸脱钙法鱼骨胶原（未纯化）；B. 纯化后的柠檬酸法鱼骨胶原（未脱钙）；C. 未脱钙、未纯化柠檬酸法鱼骨胶原；M. 蛋白标准品

Fig. 2 SDS-PAGE of fish bone collagen extracted with citric acid

A. decalcified collagens without purification; B. purified collagens without decalcification; C. collagens without purification and decalcification; M. standard

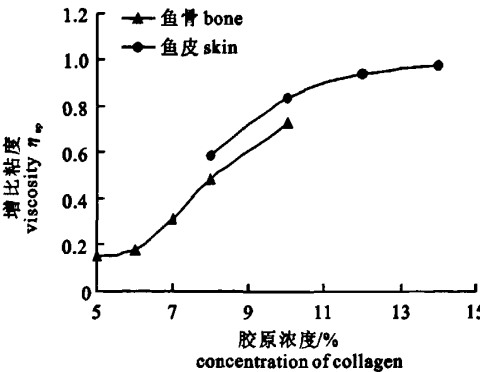


图3 胶原蛋白浓度对粘度的影响

Fig. 3 Effects of concentration of collagens on viscosity

定，骨粉中钙含量约为 $6.09 \times 10^4 \text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ，即为鱼骨粉的60%，骨粉中富含的钙可弥补人体缺钙的状况。经高温杀菌干燥后的鱼骨粉为白色粉末状，无腥味，略溶于水，在pH 2~3条件下全溶，易被人体胃部吸收。

2.6 钙强化饼干产品分析

2.6.1 感官分析 以饼干的口感和口味为指标，通过二点检验法检定产品与市售钙强化饼干的差别，结果是在1%显著水平2个样品间没有差异。

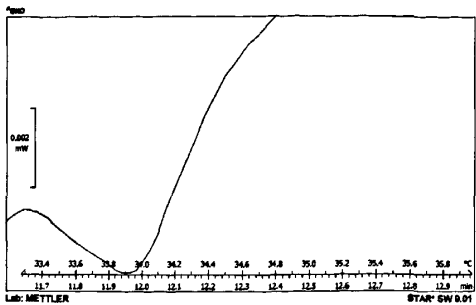


图4 热变性扫描图

Fig. 4 Thermal denaturation of collagen

表1 钙强化饼干感官分析

Tab. 1 The sensory analysis of calcium-fortified biscuits

指标 indicators	感官性状 sensory characters
规格形状 specifications	扁圆形，块型整齐，中间略高，四边稍薄
表面色泽 color	表面乳黄色，没有过白和焦边现象，表面平滑，无裂纹
口味口感 taste	无异味，酥松利口，无杂质感，油润不腻，口味香甜
内部组织 organization	具有小蜂窝，剖面呈细密微孔，不含杂质

口感上无异味，与市售饼干相比无杂质。感官评价总结见表1。

2.6.2 营养评价 人体钙日需要量以轻体力成人计600 mg，钙强化饼干中所添加的骨粉100 g含钙量为 $6.09324 \times 10^4 \text{mg}$ ，若一人一日食用100 g，以吸收率为50%计则为30.5 g，相当于100 mL鲜牛奶的35倍。此外，该骨粉在pH 2~3条件下全溶，利于人体吸收利用。

3 结论

研究结果表明，斑点叉尾鲷鱼骨中存在胶原蛋白，鲷鱼骨先用0.1 M NaOH浸泡6 h，后用2.5% NaCl浸泡6 h去除杂蛋白，再用10%异丙醇去除脂肪，采用0.1 M柠檬酸浸提3 d能较好的提取胶原蛋白，提取率可达11.87%。未经脱钙但使用纯化处理的骨胶原质量较高，纯度和经脱钙处理的骨胶原相当。通过盐析纯化骨胶原的方法精制胶原提高其质量，再将未经脱钙的鱼骨加工成高钙粉进一

步利用。这样则可以做到鱼骨的胶原蛋白和钙质的双利用。采用此种工艺提取的胶原蛋白无色无味, 适合用于食品及化妆品领域。鱼骨中的胶原蛋白含量远低于鱼皮中的胶原含量 (34.67%)。

电泳结果表明, 斑点叉尾鲷鱼骨胶原分子含有2种不同的 α 链, β 链含量较高。3个区带都较清晰, 相对分子质量略低于鱼皮胶原。

斑点叉尾鲷鱼骨胶原蛋白具有较高的粘度, 其随胶原浓度的增大而增大。鲷鱼骨胶原的变性温度为33.9℃, 低于其鱼皮变性温度 (50.2℃), 低于猪皮的变性温度 (37℃), 热稳定性不及鱼皮胶原, 这主要是由于斑点叉尾鲷鱼骨胶原羟脯氨酸含量比明显低于猪皮的缘故。

以上结果表明, 斑点叉尾鲷鱼骨胶原在一些重要指标上低于其鱼皮胶原。如今人们对鱼骨胶原的利用局限于软骨鱼类, 此研究结果旨在为硬骨鱼类骨胶原的开发提供理论依据。此外提取胶原后的鲷鱼骨粉富钙, 作为钙添加剂用于高钙饼干加工, 没有对其口感和口味造成差异影响, 可供开发较理想的营养保健食品。该技术可行合理, 随着推广应用, 不仅能为推进淡水鱼深加工和综合利用开辟一条新路, 通过加工增值, 变废为宝, 减少环境污染, 还可以让人们在日常饮食中补钙, 真正实现了资源利用的“零废弃”。

参考文献:

- [1] 蒋挺大, 张春萍. 胶原蛋白 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [2] 王学川, 任龙芳, 强涛涛, 等. 胶原蛋白的研究进展及其在化妆品中的应用 [J]. 日用化学工业, 2005, 35 (6): 78-81.
- [3] TAKESHI N, NOBUTAKA S. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins [J]. Food Chem, 2000, 68 (3): 277-281.
- [4] 陈申如, 蔡扬鹏, 周琼, 等. 鱼骨胶原蛋白的纯化及其特性的初步的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27 (11): 177-181.
- [5] 陈申如, 蔡扬鹏, 周琼, 等. 鲨鱼鱼皮、鱼骨胶原蛋白的纯化及其特性的初步的研究 [J]. 中国食品学报, 2006, 6 (1): 173-177.
- [6] 张培丽, 周爱梅, 刘欣, 等. 淡水鱼皮胶原蛋白提取工艺研究 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32 (12): 150-153.
- [7] 中华人民共和国国家技术监督局. 肉与肉制品 L(-)-羟脯氨酸含量测定 (GB9695.23-90) [S]. 1990-11-15.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄语堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227 (5 259): 680-685.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 食物中钙的测定方法 (GB12398-90) [S]. 1990-12-01.
- [11] LEUENBERGER B H. Investigations of viscosity and gelatin properties of different mammalian and fish gelatins [J]. Food Hydrocolloids, 1991, 5 (4): 353-361.