

鱼鳞胶原蛋白提取过程中 脱脂工艺的优化

吴琴琴¹ 杨丽虹¹ 唐旭^{2,*} 徐长安² 何建林² 张怡评² 易瑞灶²

(1.厦门大学海洋系 福建厦门 361005;

2.国家海洋局第三海洋研究所 福建厦门 361005)

摘要:研究了鱼鳞胶原蛋白提取过程中的脱脂工艺条件。采用 $L_9(3^3)$ 正交实验,考察了碱浓度、温度、时间等因素对鱼鳞脱脂工艺的影响,并使用离子色谱检测了脱脂溶液中羟脯氨酸的含量,以考察各种条件对鱼鳞胶原蛋白在脱脂工艺过程中溶出的影响。确定了鱼鳞胶原蛋白提取过程中的脱脂优化工艺,即温度 18°C ,碱浓度 0.5mol/L ,时间 8h 。放大实验至原料 2kg ,得脱脂率为 92% ,适合规模化生产。

关键词:鱼鳞,胶原蛋白,脱脂

Optimization of degrease process during extracting collagen from sea-fish scales

WU Qin-qin¹, YANG Li-hong¹, TANG Xu^{2,*}, XU Chang-an², HE Jian-lin², ZHANG Yi-ping², YI Rui-zao²

(1. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: Degreasing process during collagen extraction from sea-fish scales was explored. The effect of base concentration, temperature and time on degreasing were investigated with the orthogonal method. Ion chromatography was applied to observe the effects of factors on the dissolution of collagen from scales while degreasing. The optimum parameters were: temperature 18°C , base concentration 0.5mol/L and degreasing time 8h . The process was carried out at large scale well with degrease rate at 92% , which indicated that the process could be performed for plant-scale production.

Key words: sea-fish scales; collagen; degrease

中图分类号: TS254.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2011)12-0273-03

胶原蛋白是结缔组织中极其重要的一种结构蛋白,广泛存在于动物的骨、腱、肌鞘、韧带、肌膜、软骨和皮肤等组织中。其提取制品已广泛应用于医药、保健、食品加工、化妆品等众多领域^[1-3]。目前生产的胶原蛋白制品的原料主要来源是猪或牛等陆生哺乳动物的皮、骨和肌腱,但随着近年来全球生态环境恶化导致疯牛病、口蹄疫等许多流行病的发生,使得从陆生动物皮、骨中提取胶原蛋白的危险性提高^[4]。因此,人们开始寻求从水产动物中提取胶原蛋白,从水生动物鱼体废弃物中提取安全、卫生、无害的胶原蛋白已成为当前国内外业内人士研发的一个热门课题。我国拥有丰富的水产资源,其中鱼鳞废弃物约占 $1\% \sim 5\%$ 。为了更有效地促进淡水鱼加工废弃物的

综合利用,可将鱼鳞资源开发成新型胶原蛋白资源,用以生产治疗皮肤损伤、美容整形等药物^[5]和多种含有生理活性肽^[6-8]的水解胶原蛋白保健品。鱼鳞含有丰富的蛋白质和钙、磷等矿物质,主要由蛋白质和羟基磷灰石组成。其中蛋白质占鱼鳞总重的 $50\% \sim 70\%$,主要为胶原蛋白和角蛋白^[9],其中含有 30% 左右的甘氨酸和 $8\% \sim 10\%$ 左右胶原蛋白特有的羟脯氨酸,同时还含有 $0.3\% \sim 1\%$ 不等的少量脂肪杂质。如果不脱除脂肪杂质,将影响胶原蛋白的质量。同时也有文献报道^[10],碱性物质可以起疏松胶原纤维致密结构的作用,增大胶原蛋白的提取率。因此,本文考察了碱浓度、温度、时间等因素对鱼鳞脱脂实验的影响,以检测脱脂溶液中羟脯氨酸的含量为考察指标,优化了鱼鳞胶原蛋白提取过程中的脱脂工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

美国红鱼鱼鳞 购自福建漳州,经洗涤、干燥备用; NaHCO_3 食用级 汕头西陇化工厂有限公司; 其他

收稿日期: 2011-08-22 * 通讯联系人

作者简介: 吴琴琴(1989-),女,本科生,研究方向: 海洋化学。

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所科研基本业务费(海三科2009006); 国家科技支撑计划(2007BAB26B03)。

化学试剂 均为分析纯 汕头西陇化工厂有限公司。

电子天平 AL104 型,瑞士梅特勒公司;离子色谱 ICS-3000 型,配有在线脱气装置的四元梯度泵,自动进样器,积分脉冲安培检测器和 Chromeleon 6.80 色谱工作站,美国 Dionex 公司;色谱柱 氨基酸分析柱(Dionex Aminopac PA-10 2m×250mm),氨基酸保护柱(AminoPac PA-10 2mm×50mm)。

1.2 实验方法

1.2.1 脱脂方法 取洗涤干燥备用的鱼鳞 50g 置于 1000mL 烧杯中,按料液比 1:10 加入 500mL 水;加入 NaHCO_3 [11],在不同实验温度下搅拌;反应结束后,取样待测,清水洗涤 10 次,晾干;再置于 27℃ 下真空干燥 24h 称重。

1.2.2 脂肪测定方法 采用索氏提取法 [12]。将待测鱼鳞和滤纸筒一同干燥至恒重并称重,置于干燥的索氏提取器中,加入接收瓶 2/3 体积的无水乙醚,顶端接入氮气球,加热回流 8~10h,结束后取出鱼鳞和滤纸筒,干燥至恒重并称重。

1.2.3 脂肪含量与脱脂率计算 计算公式如下:

$$\text{脂肪含量}(\%) = (W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$$

$$\text{脱脂率}(\%) = (G_1 - G_2) / G_1 \times 100\%$$

式中: W_1 为乙醚提取前鱼鳞重量, W_2 为乙醚提取后鱼鳞重量, G_1 为脱脂前鱼鳞脂肪重量, G_2 为脱脂后鱼鳞脂肪重量。

1.2.4 正交实验 在鱼鳞脱脂工艺中,有诸多影响因素。选定温度、碱浓度和时间为主要影响因素,通过 $L_9(3^3)$ 正交实验,确定最佳鱼鳞脱脂工艺。具体影响因素及实验水平见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素		
	A 温度(℃)	B 碱浓度(mol/L)	C 时间(h)
1	4	0.3	8
2	18	0.5	12
3	30	0.8	24

1.2.5 脱脂液中羟脯氨酸含量测定 为考察脱脂条件对鱼鳞胶原蛋白溶出的影响,取离心后的鱼鳞脱脂液 1mL,加入 6mol/L 盐酸 9mL,置于 110℃ 烘箱中水解 12h,稀释 200 倍后,参考文献方法 [13],使用离子色谱检测脱脂水解液中羟脯氨酸的含量。

离子色谱条件 [14]: 流动相: 0.25mol/L NaOH 溶液-1mol/L 醋酸钠溶液-水 梯度洗脱。

2 结果与讨论

2.1 正交实验设计

2.1.1 温度 根据鱼鳞胶原蛋白变性温度的测试知道,鱼鳞胶原蛋白的变性温度在 28℃ 左右 [15]。因此,以 18℃ 为中心,选取 4、18、30℃ 三种温度,考察不同温度状态对鱼鳞脱脂的影响。

2.1.2 碱浓度 脱脂工艺通常使用碱进行皂化反应,但如果碱性过强,也会对鱼鳞胶原造成破坏 [16],本文采用食品级 NaHCO_3 为脱脂皂化试剂,综合文献报道 [15, 17-18],选择 0.3、0.5、0.8mol/L 三种碱浓度,考察使用不同碱浓度对鱼鳞脱脂反应的影响。

2.1.3 时间 通过调整文献报道 [10] 的条件,设计了

8、12 和 24h 三种脱脂时间,考察时间对脱脂反应的影响。

2.2 正交实验结果

按照 2.1 脱脂实验影响因素和水平的设计进行正交实验,结果见表 2。

表 2 脱脂正交实验结果

实验号	A	B	C	脱脂率(%)
1	1	1	1	48.2
2	1	2	2	66.0
3	1	3	3	60.0
4	2	1	2	69.0
5	2	2	3	84.0
6	2	3	1	83.5
7	3	1	3	65.2
8	3	2	1	86.1
9	3	3	2	82.6
k_1	58.067	60.800	72.600	
k_2	78.833	78.700	72.533	
k_3	77.967	75.367	69.733	
R	20.766	17.900	2.867	

由表 2 中的结果可以看出,温度、碱浓度对鱼鳞脱脂影响较大。极差最大的因素是温度,最小的因素是时间,即对鱼鳞脱脂工艺影响程度大小的顺序为温度 > 碱浓度 > 时间。极差分析表明,最优组合为 $A_2B_2C_1$,即温度 18℃,碱浓度 0.5mol/L,时间 8h,该组合条件下脱脂率为 89.4%。

2.3 离子色谱检测

为考察不同条件是否会引起鱼鳞脱脂过程中胶原蛋白的析出,使用离子色谱对 6mol/L 盐酸水解后的脱脂液进行检测,结果均未发现有羟脯氨酸的离子色谱峰出现,说明鱼鳞在表 2 中的正交实验条件下脱脂,均不会造成胶原蛋白的析出。

2.4 规模放大实验

按表 2 正交实验的结果,将鱼鳞脱脂实验规模放大至总体积 15L,经最终脂肪含量检测得知,在 2.2 中优化的脱脂组合条件下,所得脱脂率为 92%,脱脂液中未检测到羟脯氨酸。结果表明,该脱脂条件较为优良,适合规模化生产。

3 结论

鱼鳞中存在少量的脂肪,可以与 NaHCO_3 作用将其脱除,该步骤不但可以提高后续过程中胶原的质量,而且经过碱处理,鱼鳞致密的结构会变得较为疏松,有利于胶原提取过程中胶原蛋白的溶出。经过正交实验获得优化的脱脂条件,即温度 18℃,碱浓度 0.5mol/L,脱脂时间 8h。放大实验所得的结果说明,该脱脂条件较为优良,适合规模化的工业生产。

参考文献

- [1]王南平,郭鹏达等.鱼鳞胶原的研制[J].水产科技情报,2005,22(5):1004-1006.
- [2]唐传核,彭志英.胶原的开发及利用[J].肉类研究,2000(3):41-43.
- [3]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):388-391.

[4]曾名勇,张联英,刘尊英,等.几种鱼皮胶原蛋白的理化特性及其影响因素[J].中国海洋大学学报,2005,35(4):608-612.

[5]李小勇,李洪军,杜红霞,等.胶原蛋白的最新研究及应用进展[J].食品科技,2006(7):12-15.

[6]Falguni Pati,BasudamAdhikari,Santanu Dhara.Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability[J].Bioresource Technology,2009,133(12):1-6.

[7]Masahiro Ogawa,Ralph Portier,Michael Moody,et al. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum(*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream(*Archosargus probatocephalus*) [J]. Food Chemistry, 2004,88:495-501.

[8]Wang Lin,An Xinxin,Yang Fengmei,et al. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish(*Sebastesmentella*) [J]. Food Chemistry, 2008,108:616-623.

[9]钟朝辉,李春美,梁晋鄂,等.鱼鳞胶原蛋白提取工艺的优化[J].食品科学,2006,27(7):162-166.

[10]张俊杰,段蕊,陈璐.鲤鱼鳞酸性胶原蛋白提取的研究[J].水产科学,2006,25(12):640-643.

[11]威海市宇王水产有限公司.鱼鳞胶原蛋白的生产方法

[P].中国:ZL200310114500.X,2011-08-19,http://search.cnpat.com.cn/Search/CN/.

[12]大连轻工业学院,华南理工大学,郑州轻工业学院,等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2006:139-141.

[13]Hong Dai,Zongcai Zhang,Subo Fan,et al. Analysis of hydroxyproline in collagen of pig skin tissue by low pressure ion chromatography separation and conductivity detection[J].Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists,2005,89(4):145-148.

[14]张怡评,易瑞灶,陈晖,等.离子色谱法测定鱼鳞胶原蛋白中羟脯氨酸含量方法的研究[J].中国海洋药物杂志,2011,30(4):45-48.

[15]Takeshi Nagai,Masami Izumi,Masahide Ishii. Fish Scale collagen.Preparation and partial Characterization[J].International Journal of Food Science and Technology,2004,39(3):239-244.

[16]潘杨,许学勤.酸碱法提取鱼鳞胶的工艺研究[J].食品科技,2008(3):183-186.

[17]张俊杰,段蕊,刘佳梅,等.鲤鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其性质研究[J].氨基酸和生物资源,2008,30(1):18-21.

[18]刘庆慧,王彩理,刘丛力.鱼鳞胶原蛋白研究[J].海洋水产研究,2000,21(3):57-61.

(上接第269页)

酯含量比传统法略低,但苯乙醇、乙酸乙酯、己酸乙酯的含量相比传统法略高一点。

3 结论

实验结果表明,离心法对黄酒的理化指标、氨基酸影响较大,挤压法对黄酒的理化指标、氨基酸态氮含量影响较小。同时,离心法酿造还降低了黄酒的风味物质含量,而挤压法对风味物质含量影响不大。挤压法酿造黄酒既能保持黄酒的理化指标,风味物质基本不变,还能明显改善黄酒口味。

参考文献

[1]汪建国.黄酒中色、香、味、体的构成和来源浅析[J].中国酿造,2004(4):6-10.

[2]李新榜,查巧玲,朱虹,等.酵母自溶及其对葡萄酒感官质

量的影响[J].中外葡萄与葡萄酒,2008(4):42-45.

[3]张秋汀,魏桃英.改良型黄酒工艺初探[J].酿酒科技,2007(1):71-72.

[4]郭新光,许荣年,胡志明,等.GB/T-2008 黄酒 13662[S].

[5]蔡定域.酿酒工业分析手册[M].第二版.北京:中国轻工业出版社,1998:587-588.

[6]管敦仪.啤酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998:378-380.

[7]朱显峰,杨生玉,张彭湃.高效液相色谱法测定江米甜酒中游离氨基酸的含量[J].食品科技,2005(1):77-80.

[8]李家寿.黄酒色、香、味成分来源浅析[J].酿酒科技,2001(3):48-50.

[9]周建弟.浅谈黄酒中的氨基酸及其含量的控制[J].酿酒科技,2002(4):73-74.

(上接第272页)

and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines [J]. Future Microbiology, 2007, 2(6):605-618.

[12]Borić M,Danevčić T,Stopar D.Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; a new UV-protective pigment[J].Microbial Ecology, 2011,62(3):528-536.

[13]Haddix PL, Jones S, Patel P, et al. Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens* [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(22):7453.

[14]Starić N, Danevčić T, Stopar D. *Vibrio* sp. DSM 14379

pigment production—a competitive advantage in the environment? [J]. Microbial Ecology, 2010, 60(3):592-598.

[15]Khanafari A, Assadi MM, Fakhr FA. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens* [J]. Online Journal of Biological Sciences, 2006, 6(1):1-13.

[16]Pérez-Tomás R, Viñas M. New insights on the antitumoral properties of prodiginines [J]. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(21):2222-2231.

[17]王飞,石晓,刘畅,等.一株细菌产紫红色素的稳定性研究[J].食品工业科技,2009,30(12):332-335.