超声波对鱼皮中杂蛋白的除去效果及对鱼皮中纤维结构的影响

梁健华，朱志伟，陈竹兵

（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：为避免传统搅拌除杂蛋白方法的高耗能、高耗溶剂、高耗时等缺陷，本研究探究了一种超声波辅助分离鱼皮中杂蛋白的方法。采用杂蛋白的溶出量、胶原蛋白的迁出量、鱼皮中的纤维结构和后续胶原蛋白的得率及其结构等手段来表征不同超声波脉冲间歇方式对鱼皮分离杂蛋白效果及对鱼皮胶原纤维结构及的影响。试验结果表明，采用超声工作 3 s，2 s 间歇的超声波脉冲方式（$HIU^{3\,s\,on}_{2\,s\,off}$），在 60 min 内，鱼皮中粗蛋白的溶出量为 37.37 mg/g，而胶原蛋白的迁出量为 0.63 mg/g。SEM 图像观察，经 $HIU^{3\,s\,on}_{2\,s\,off}$脉冲方式处理后，鱼皮内部结构松散，鱼皮胶原纤维充分伸展，利于后续胶原蛋白的快速提取；且 FT-IR 图像表明，鱼皮胶原纤维的酰胺键的位置保持不变；经后续提取，胶原蛋白的得率最高，且其一级结构保持完整。

关键词：超声波；胶原蛋白；除杂处理；结构

文章篇号：1673-9078(2016)11-155-161 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.024

Effects of HIU-aided Pretreatment of Crude Protein in Fish Skin: Separation and Structure

LIANG Jian-hua, ZHU Zhi-wei, CHEN Zhu-bing

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Due to the larger consumption of energy, solvent, and pretreatment period during the conventional separation of crude protein in fish skin, a method of HIU-aided pretreatment of fish skin was provided. In order to reveal the effects of different ultrasonic pulses ways on fish skin and the structure of fish collagen fiber, five following parameters were investigated: total content of proteins removed, loss of collagen during the HIU pretreatment, structure of collagen fiber after the HIU pretreatment, subsequent extraction yield of collagen and SDS-PAGE patterns of collagen. After pretreatment by the way of $HIU^{3\,s\,on}_{2\,s\,off}$ for 60 min, the content of protein in fish skin removed was 37.37 mg/g without significant loss of collagen (0.63 mg/g). SEM figures showed that, the loose of fish skin and the sufficient extension of collagen fiber were convenient for the subsequent collagen extraction after pretreatment by the way of $HIU^{3\,s\,on}_{2\,s\,off}$. FT-IR spectra obtained for fish collagen fiber confirmed the integrated conformation of fish skin collagen. Furthermore, collagen with structural integrity well maintained yielded the highest.

Key words: HIU; collagen; crude protein pretreatment; structure

为了充分利用水产加工中产生的鱼废弃物，越来越多水产加工企业利用这些下脚料-鱼皮，提取胶原蛋白。鱼皮中除富含胶原蛋白（约占鱼皮总量的 25%）外，还含有约 2%的杂蛋白，为了使胶原蛋白能满足不同领域的要求，在鱼皮胶原蛋白提取前需对原料鱼皮进行除杂处理-杂蛋白的除去。常规的除杂蛋白的方法是长时间搅拌浸泡处理，这不仅耗时、耗能、耗溶剂、生产成本高、除杂不完全、且产生大量的废水，造成资源的浪费及环境的污染；且长时间的浸泡处理会造成胶原蛋白的变性，导致其热稳定性变差，致使胶原蛋白的失活，限制胶原蛋白的应用。目前关于胶原蛋白提取前处理的报道较少，因此有必要提出一种省时、环境友好且不影响提取后胶原蛋白结构的除杂方法。

超声波辅助分离技术目前已经广泛运用到许多领域上，一方面，超声波的物理作用，如空化效应以及微射流效应能促进溶剂与物料的充分接触，加快传质作用；另一方面，超声波的化学效应-溶液中产生的自由基能够断裂物质的网络状结构，促进物料的溶解[1]。而杂蛋白主要存在于鱼皮的表面上，在低温下超声波

收稿日期：2015-12-10

基金项目：中央农业科技专项，海洋渔业科技专项（A2013003）

作者简介：梁健华（1991-），女，硕士研究生，主要从事食品工程，冷冻冷链技术方面研究

通讯作者：朱志伟（1974-），男，博士，主要从事食品工程，冷冻冷链技术方面研究

辅助碱液分离方法能促进鱼皮表面上的杂蛋白快速有效地分离出，达到鱼皮除杂的效果。超声波辅助分离不仅能缩短鱼皮除杂分离的时间、减少溶剂的使用量、提高分离效率；且低温短时间的超声分离并不会对后续胶原蛋白的热稳定性、物理化学性质产生影响，胶原蛋白的生物活性保持不变。

声波是以纵波的方式传递，是一种疏密波[2]。超声波辅助提取的方式主要有脉冲间歇方式和连续超声的方式。与脉冲间歇的超声方式相比较，连续的超声方式容易造成超声探头的空化侵蚀，且能耗高。Pan 等报道，使用连续的及间歇的超声方式从石榴皮中提取抗氧化物质，结果发现连续的超声和脉冲间歇的超声方式抗氧化物的提取率相似[3]。而不同的脉冲间歇超声方式下，超声波作用于溶液中物质的效果存在差异，较短时间的超声脉冲处理会使溶液中物质超声作用效果不明显，而较长时间的超声脉冲处理可能会导致物质的结构发生变化，因此有必要寻找一个符合鱼皮中杂蛋白除去的超声波脉冲方式。

胶原蛋白的提取前鱼皮的预处理仍然是一个集科学与经济的问题。本研究主要采用超声波辅助碱液对鱼皮中的杂蛋白进行处理，研究了不同超声波辅助脉冲方式对鱼皮杂蛋白处理的效果、鱼皮胶原纤维结构的影响，并分析了除杂后鱼皮胶原蛋白提取的得率及结构性质。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

新芝 JN-IIIN 型探头超声发生器，湘仪 H2050 高速冷冻离心机，分光光度计，JSM-6360 扫描电镜，德国 Bruker 公司 VERTEX70 红外光谱仪，Invirtrogen 立式微量电泳槽。

1.2 原料处理

将罗非鱼皮表面的鱼鳞和多余的鱼肉除去；用流动的水清洗鱼皮，再用蒸馏水清洗一遍。将鱼皮剪成 0.5 cm×0.5 cm 大小的片状分装于小聚乙烯袋中，储藏于-40 ℃冰箱中，待用时取出（3 个月内）。

1.3 不同超声脉冲方式辅助分离鱼皮中杂蛋白

超声波辅助分离鱼皮中杂蛋白的流程如图 1 所示。鱼皮与 0.1 M NaOH 溶液混匀后，经 13.2 W/cm^2 的波声波辅助分离 0~100 min，控制温度为 4 ℃。每隔 20 min 测定分离后上清液中蛋白质的溶出量及胶原蛋白的迁出量，确定除杂蛋白的最佳方式（辅助分离的时间及超声脉冲方式的确定）。其中，超声脉冲时间采用如下几种方式：$HIU^{1\,s\,on}_{4s\ off}$、$HIU^{2\,s\,on}_{3s\ off}$、$HIU^{3s\,on}_{2s\,off}$和 $HIU^{4s\ on}_{1s\ off}$，如表 1 所示。传统搅拌处理 24 h（S）作为超声波辅助分离除杂蛋白的对照样品。为了比较不同超声脉冲方式对后续胶原蛋白得率及结构的影响，将处理后的鱼皮除粗脂肪后浸泡于 1:20（*m/V*）的 0.5 M 醋酸溶液中，4 ℃搅拌提取胶原蛋白。

表 1 超声脉冲方式的处理

Table 1 Treatment of different pulse ways of HIU

编号	标示	处理方法
1	S	传统搅拌处理 24 h
2	$HIU^{1\,s\,on}_{4s\,off}$	5 s 一个工作循环周期，超声工作 1 s，间歇 4 s
3	$HIU^{2s\,on}_{3\,s\,off}$	5 s 一个工作循环周期，超声工作 2 s，间歇 3 s
4	$HIU^{3s\,on}_{2\,s\,off}$	5 s 一个工作循环周期，超声工作 3 s，间歇 2 s
5	$HIU^{4s\,on}_{1\,s\,off}$	5 s 一个工作循环周期，超声工作 4 s，间歇 1 s

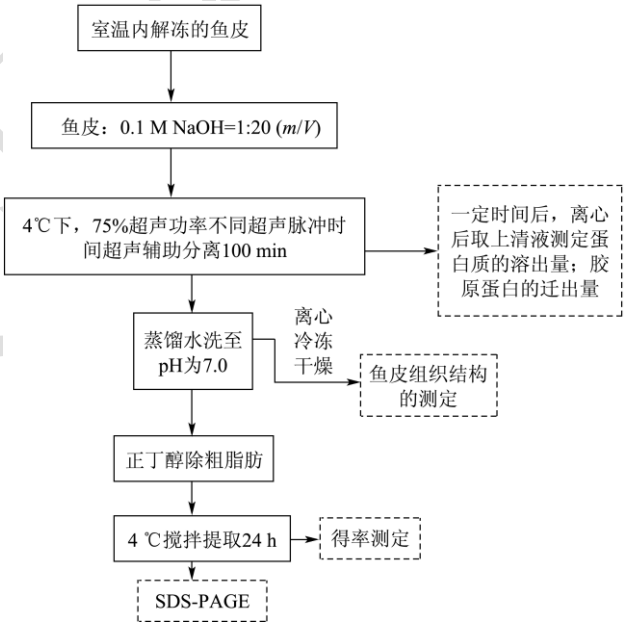


图 1 不同超声脉冲方式辅助鱼皮中杂蛋白的流程图

Fig.1 Scheme of different pulse ways of HIU-aided separation of fish skin crude protein

1.4 溶液中蛋白质溶出量的测定

溶液中蛋白质浓度的测定均采用 Lowry（1951）法[4]，根据 10 μg/mL~100 μg/mL 浓度范围内牛血清蛋白溶液在 650 nm 下的吸光值绘制的标准曲线，以吸光值（A）为纵坐标，蛋白质的浓度（c）为横坐标，绘制标准曲线为 A=0.0015c+0.0031（R^2=0.9996）。鱼皮中粗蛋白的溶出量表示为：

$$G=\frac{c\times V}{W\times 1000} \quad (1)$$

其中，G（mg/g 湿鱼皮）表示鱼皮中粗蛋白的溶出量；c 表示上清液蛋白质的浓度；V 表示上清液蛋白质的体积；W 表示湿鱼皮的质量。

鱼皮胶原蛋白提取后的得率，按照以下公式进行计算：

$$Y=\frac{c\times V}{W\times 10000} \quad (2)$$

其中，Y（%）表示鱼皮提取后胶原蛋白的得率，c 表示上清液蛋白质的浓度，V 表示上清液蛋白质的体积，W 表示湿鱼皮的质量。

1.5 溶液中胶原蛋白迁出量的测定

溶液中胶原蛋白的迁出量的测定采用 Gabor Huszar 的羟脯氨酸法[5]：配制浓度为 0.5 μg/mL~10 μg/mL 的羟脯氨酸标准溶液，取 100 μL 羟脯氨酸标准工作液加入 1 mL 氯胺 T 溶液，混合均匀后室温下放置 20 min；再加入 1 mL 高氯酸溶液，65 ℃下恒温 15 min，在 550 nm 下测定其吸光值绘制标准曲线。以吸光值（A）为纵坐标，羟脯氨酸的浓度（c）为横坐标，绘制标准曲线为 A=0.0193c+0.0016（R^2=0.9994）。样品溶液的水解：取一定量的蛋白样品溶液，加入氢氧化钠至其浓度为 4 M，于 100 ℃下水解 90 min；取出冷却后，取一定量的水解液加入等量的 1.4 M 柠檬酸溶液至溶液 pH 值为 6.0，按照标准曲线的方法测定其吸光值，通过标准曲线换算出样品中羟脯氨酸的含量，乘以 11.07[6]（羟脯氨酸与胶原蛋白的换算系数）最终换算为胶原蛋白的含量。

1.6 红外吸收光谱法检测鱼皮表面结构

除杂蛋白后的鱼皮用蒸馏水反复清洗 3~4 遍，至蒸馏水的 pH 为 7.0，取一定量的鱼皮于冷冻干燥机中冷冻干燥 24 h，得到冷冻干燥的鱼皮，使用红外光谱仪在 4000 到 400 cm^{-1} 处对冷冻干燥后的鱼皮下表面进行扫描，每个样品各扫描三次，结果取平均值，最终得到鱼皮下表面的红外吸收光谱图。

1.7 扫描电镜(SEM)法分析鱼皮胶原纤维的分布

除杂蛋白后的鱼皮用蒸馏水反复清洗 3~4 遍，至蒸馏水的 pH 为 7.0，弃除鱼皮表面水分，将鱼皮浸泡与 2.5%戊二醛固定液中在 4 ℃下固定 48 h。再将已固定的鱼皮在 4 ℃下浸泡在 0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液（PPS）中，每 40 min 换一次 PPS，共清洗 3 次；接着于 1%的锇酸溶液中浸泡 2.5 h；再用 0.1 mol/L 的 PPS 在 4 ℃下浸泡 3 次，每 10 min 换一次 PPS；然后分别在 30%、50%、70%、80%、90%的乙醇中各浸泡 20 min，控制温度为 4 ℃；接着用 100%乙醇浸泡 3 次，每次 20 min；最后用叔丁醇浸泡 20 min 后于-20 ℃下保存，冷冻干燥，待干燥结束后使用 JFC-1600 自动喷料器喷金，于扫描电镜下观察。

1.8 十二烷基磺酸钠-凝胶电泳分析(SDS-PAGE)

胶原蛋白的凝胶电泳实验分析依据 Laemmli（1970）[7]和 NuPAGE®产品的方法。样品的制备：提取后的胶原蛋白溶解于 0.1 M 醋酸溶液中，用 pH 为 8.0 的尿素缓冲溶液（8 M 尿素，20 mM Tris，2%的 SDS 及 3%的巯基乙醇）震荡 4 h 后，于 70 ℃下加热 3 min，在 5000 g 离心力下离心 5 min。凝胶电泳每个泳道的上样量为 20 μg。使用 NuPAGE®产品下的 8%的分离胶，3%的浓缩胶。

1.9 数据分析

实验数据使用 SPSS 分析软件，采用 Tukey 法对不同样品平均值进行方差分析，求出显著性差异，方差分析置信度为 95%。

2 结果与讨论

2.1 超声脉冲方式对鱼皮中杂蛋白分离效果的影响

分析罗非鱼皮的基本成分可知，鱼皮中总蛋白含量为 26.34%，而胶原蛋白的含量为 22.77%，因此，罗非鱼皮中约含有 3.57%的杂蛋白（这部分数据并未给出）。图 2 是不同超声脉冲方式分离后蛋白质的溶出量。在相同的超声脉冲方式下，随着超声波辅助分离时间的增加，蛋白质的溶出量也增加。而在一定时间的超声波辅助分离下，$HIU^{3s\ on}_{2s\ off}$ 该脉冲方式处理的鱼皮，杂蛋白的溶出量最大；且当辅助分离时间为 60 min 时，蛋白质的溶出量达到最大值，为 37.37 mg/g。常规搅拌处理 24 h 后鱼皮中蛋白质的溶出量为 38.53 mg/g，这表明，使用 $HIU^{3s\ on}_{2s\ off}$ 该超声脉冲方式辅助分离 60 min 基本能将鱼皮上的杂蛋白除去。有研究指出，随着总超声波辅助时间的增多，反应体系中物质的得率越高[8]。但在本研究 5 s 的一个循环周期中，并不是超声波辅助作用的时间越长，蛋白质的溶出量越多，当采用 $HIU^{4s\ on}_{1s\ off}$ 该种超声脉冲辅助分离时，杂蛋白的溶出量不及 $HIU^{3s\ on}_{2s\ off}$ 该脉冲方式，这可能是因为，在一定

的超声波功率及作用时间下，超声波作用的效果会达到一个临界点，即超声作用的效果达到一个最大值。超声波在传播过程中所产生的空化效应是超声波辅助提取的一个重要理论基础，而超声波的空化作用受超声脉冲宽度所影响。为了获得稳定的空化强度，需要一定的脉冲宽度，在此宽度下，超声空化作用呈现最大的效果。在本实验的设计下，HIU$^{3s\ on}_{2s\ off}$此种超声脉冲方式对鱼皮中杂蛋白的除去作用效果最好。

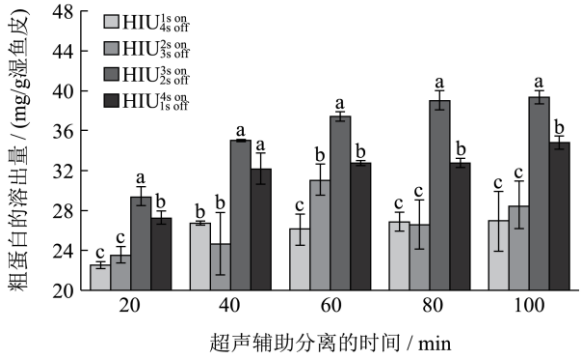


图 2 超声脉冲辅助分离后鱼皮中蛋白质的溶出量

Fig.2 Total content of proteins removed during pulse HIU-aided pretreatment

注：相同时间下的不同字母表示两者有显著性关系 p<0.05。

2.2 超声脉冲方式对鱼皮中胶原蛋白迁出量的影响

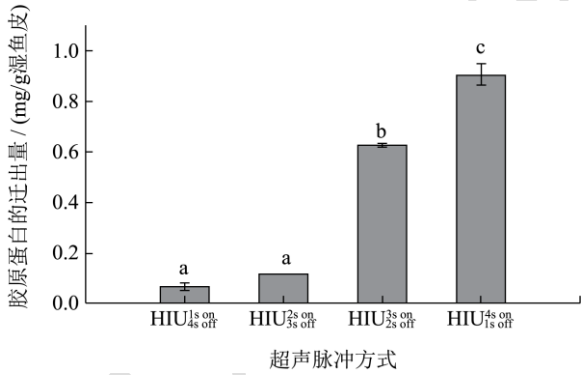


图 3 超声脉冲辅助分离后鱼皮中胶原蛋白的迁出量

Fig.3 Content of collagen removed during pulse HIU-aided pretreatment

注：不同字母表示两者有显著性关系 p<0.05。

图 3 是超声波辅助处理 60 min 后，鱼皮中胶原蛋白的迁出量示意图。随着超声波工作时间的增加，胶原蛋白的迁出量也增加：HIU$^{4s\ on}_{1s\ off}$该脉冲方式下胶原蛋白的迁出量为 0.90 mg/g；而 HIU$^{3s\ on}_{2s\ off}$该超声脉冲方式下为 0.63 mg/g，相对较少。这是因为在 0.1 M NaOH 溶液中，胶原蛋白的溶解度较低，且鱼皮中的胶原蛋白主要是以胶原纤维束的形式存在，超声波作用于鱼皮中的胶原纤维，并不能将胶原纤维完全打断使之分散于溶液中。综合图 2 及图 3，超声波辅助处理分离鱼皮中杂蛋白时，鱼皮中胶原蛋白的迁出量并不明显，而当超声脉冲方式为 HIU$^{3s\ on}_{2s\ off}$时，鱼皮中杂蛋白的分离效果最理想。

2.3 超声脉冲方式对鱼皮组织结构影响

不同超声脉冲方式处理的鱼皮，其截面 SEM 图如图 4、5 和 6 所示。从图中可发现，未经处理的鱼皮其胶原纤维束紧密，纤维之间的空隙最小；而搅拌处理 24 h 后鱼皮中胶原纤维间出现了一定缝隙，但胶原纤维并未发生显著的膨胀现象。观察图可知，随着超声脉冲作用时间的加长，胶原纤维束的间距渐大，且胶原纤维膨胀的程度也变大；当使用 HIU$^{2s\ on}_{3s\ off}$和 HIU$^{3s\ on}_{2s\ off}$两种超声脉冲方式处理时，鱼皮胶原纤维疏松程度较大。但是采用 HIU$^{1s\ on}_{4s\ off}$该超声脉冲方式处理，鱼皮中纤维的松散程度较小，胶原纤维排列也较密集；在 HIU$^{4s\ on}_{1soff}$该超声脉冲方式处理下，鱼皮中胶原纤维束发生一定程度的展开，且接近鱼皮表面的胶原纤维其展开程度较大，鱼皮表面的胶原纤维部分发生断裂，但鱼皮中间部分的纤维束较密集。根据图中可得到以下推测：①常规搅拌处理的鱼皮，由于长时间的搅拌作用鱼皮胶原纤维有一定的展开，但这种方式传质作用较慢，因而溶剂进入鱼皮的内部效果不明显；②当采用 HIU$^{1s\ on}_{4s\ off}$该超声脉冲方式处理鱼皮时，由于总的超声作用时间较短，导致溶剂进入鱼皮内部的速率变慢，溶剂作用于鱼皮胶原纤维时间较短，胶原纤维也难以在短时间内得以伸展；③由于超声波作用时间长，HIU$^{4s\ on}_{1s\ off}$该超声脉冲方式处理下，溶剂与鱼皮胶原纤维间的传质作用也增大，因而鱼皮表面的胶原纤维较松散；但由于脉冲作用时间的加长，可能导致鱼皮超声作用的效果不均匀，即出现“内小外大”的效果，使鱼皮组织内部的胶原纤维与溶剂的接触不充分，而鱼皮表面处的纤维发生断裂；④当使用 HIU$^{2s\ on}_{3s\ off}$和 HIU$^{3s\ on}_{2s\ off}$此两种超声脉冲方式处理，鱼皮展开的程度较均匀，这可能是因为当超声波作用于鱼皮后，间歇的时间赋予溶剂渗透于鱼皮内部，从而使鱼皮胶原纤维束最大程度、最均匀的展开。综上所述，使用超声波辅助鱼皮除杂过程中，超声波的作用效果存在一个最佳值，在本试验条件下，当超声脉冲方式为 HIU$^{2s\ on}_{3s\ off}$和 HIU$^{3s\ on}_{2s\ off}$时，鱼皮中胶原纤维的展开程度最好。综合鱼皮中杂蛋白的溶出量及胶原蛋白的迁出量的数据，当使用 HIU$^{3s\ on}_{2s\ off}$该脉冲超声方式时，鱼皮除杂蛋白效果及内部胶原纤维展开的程度最好。

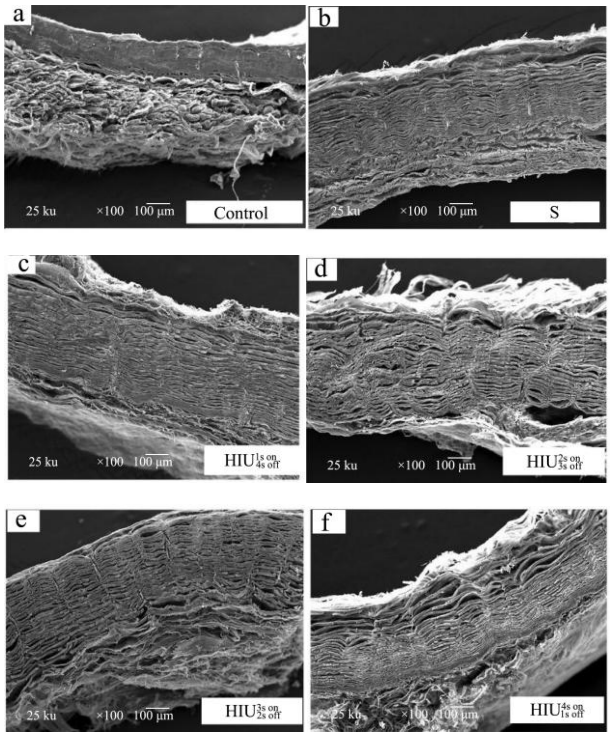


图 4 超声脉冲辅助分离后鱼皮的截面环境扫描电镜图（100×）

Fig.4 Scanning electron micrographs (100 ×)

注: 其中图 4-a 表示的是未经除杂蛋白处理的鱼皮，图 4-b 到 4-f 鱼皮的处理与表 1 鱼皮的处理方式相对应。

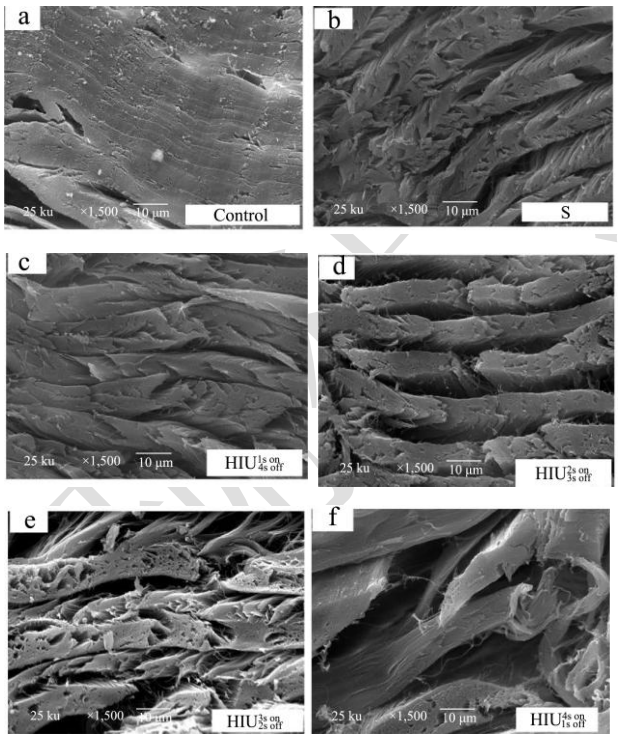


图 5 超声脉冲辅助分离后鱼皮的截面环境扫描电镜图（1500×）

Fig.5 Scanning electron micrographs (1500×)

注: 其中图 5-a 表示的是未经除杂蛋白处理的鱼皮，图 5-b 到 5-f 鱼皮的处理与表 1 鱼皮的处理方式相对应。

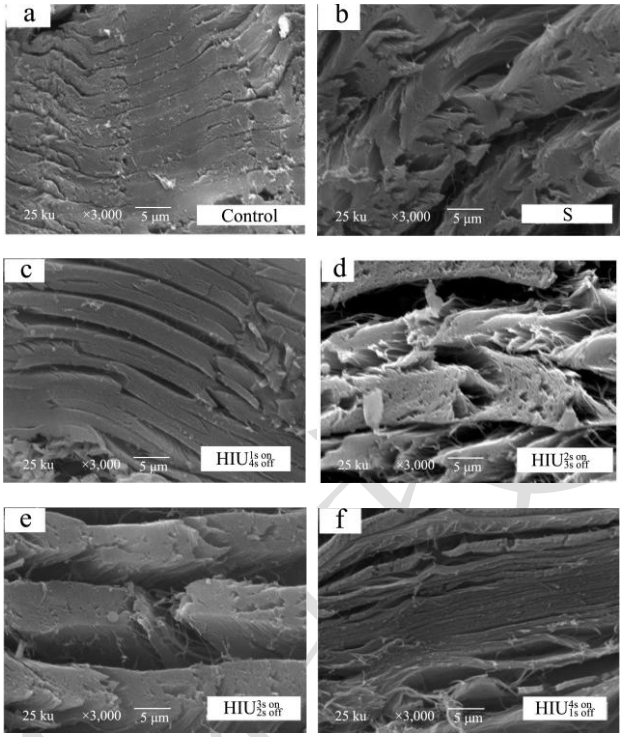


图 6 超声脉冲辅助分离后鱼皮的截面环境扫描电镜图（3000×）

Fig.6 Scanning electron micrographs (3000×)

注: 其中图 6-a 表示的是未经除杂蛋白处理的鱼皮，图 6-b 到 6-f 鱼皮的处理与表 1 鱼皮的处理方式相对应。

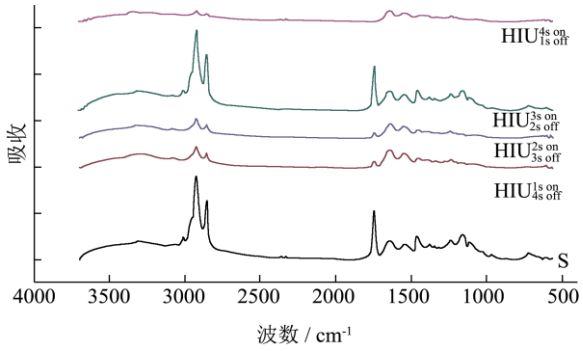


图 7 超声脉冲辅助分离后鱼皮下表面的红外吸收光谱图

Fig.7 FT-IR spectra of fish skin after pulse HIU aided pretreatment

经除杂蛋白并冷冻干燥后的鱼皮下表面的红外吸收光谱如图 7 所示，对应的吸收峰值如表 2 所示，这与典型的胶原蛋白红外吸收光谱图相似[9]。由图可知，常规搅拌处理及不同超声脉冲方式处理后的鱼皮其酰胺键的吸收均存在，这表明，超声波辅助作用并不能破坏鱼皮中胶原蛋白的结构。但 $HIU^{3s\ on}_{2s\ off}$ 该种超声脉冲方式辅助处理的鱼皮，鱼皮下表面酰胺键的红外吸收峰的强度较其他处理方式的高，这可能是因为，该条件下的超声波辅助分离方式能将鱼皮中胶原纤维部分打断，导致基团的暴露，因此吸收强度变大。而

$HIU^{4s\ on}_{1s\ off}$该脉冲方式下，各酰胺键的吸收均较弱，这可能是因为长时间的超声波辅助作用，水分子进入鱼皮胶原纤维的间隙，致使鱼皮表面的胶原纤维与水分子形成氢键，鱼皮结构疏松，且鱼皮表面的酰胺基团被其他基团所隐藏，因而此处的吸收较少。综上所述，不同超声脉冲方式处理，鱼皮中胶原纤维的结构仍保持稳定，但在$HIU^{3s\ on}_{2s\ off}$该种方式下，鱼皮胶原纤维展开的程度最明显，利于后续胶原蛋白的快速提取。

表 2 超声脉冲辅助分离后鱼皮下表面的红外吸收峰

Table 2 FT-IR spectra peak position offish skin after pulse HIU aided pretreatment

	特征峰波数/cm^{-1}			
样品	酰胺 B	酰胺I	酰胺II	酰胺III
S	2925	1643	1546	1241
$HIU^{1s\ on}_{4s\ off}$	2921	1639	1545	1237
$HIU^{2s\ on}_{3s\ off}$	2925	1631	1547	1239
$HIU^{3s\ on}_{2s\ off}$	2924	1638	1544	1235
$HIU^{4s\ on}_{1s\ off}$	2918	1630	1545	1235

2.4 超声脉冲方式处理的鱼皮对后续提取的胶原蛋白的影响

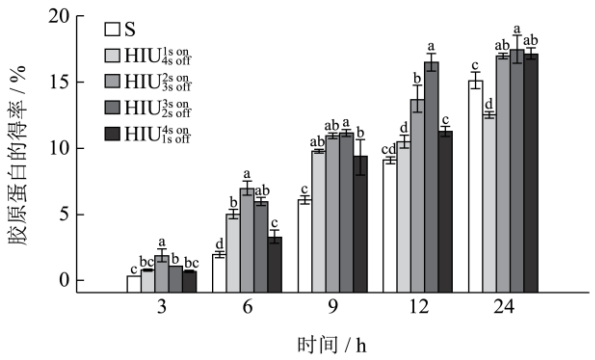


图 8 不同提取时间下胶原蛋白的得率

Fig.8 Effects of extraction time on the yield of collagen

注：相同时间下的不同字母表示两者有显著性关系 $p<0.05$。

经不同超声脉冲方式除杂蛋白后的鱼皮在醋酸溶液中搅拌提取 3~24 h，胶原蛋白的得率如图 8 表示。在相同的提取时间下，经常规搅拌除杂蛋白的鱼皮，胶原蛋白的得率最低，这与除杂蛋白后鱼皮中胶原纤维束分布的疏松紧密程度相对应。当鱼皮中的胶原纤维分布较紧密，醋酸溶液进入胶原纤维间隙中将胶原纤维溶出来的速度将变慢，因而提取后胶原蛋白的得率最低。在一定的提取时间下，$HIU^{4s\ on}_{1s\ off}$和$HIU^{3s\ on}_{2s\ off}$两种超声脉冲处理的鱼皮，胶原蛋白的得率最高，这是因为，经超声波辅助处理后的鱼皮，鱼皮中胶原纤维束的结构较疏松，醋酸溶液与鱼皮的传质作用显著，胶原蛋白溶解的速度较快，得率增大。但是短时间的超声作用（$HIU^{1s\ on}_{4s\ off}$），鱼皮表面纤维结构疏松程度不明显，在搅拌提取下，醋酸溶液与鱼皮间的传质作用较小，因此胶原蛋白的得率偏低。

2.5 胶原蛋白的凝胶电泳图分析

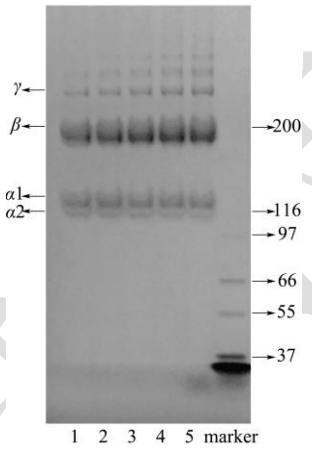


图 9 胶原蛋白的凝胶电泳图

Fig.9 SDS-PAGE patterns of collagen

注: 图中 1~5 鱼皮的处理方式与表 1 鱼皮的处理方式相对应。

图 9 是经过不同除杂蛋白方式处理的鱼皮提取后，胶原蛋白的凝胶电泳图。罗非鱼皮胶原蛋白属于 I 型胶原蛋白，含有 β、$\alpha1$ 和 $\alpha2$ 链，且有少量的多聚肽链-γ 链。观察图所知，5 种不同的除杂蛋白方式对后续提取得到的胶原蛋白的一级结构并不存在显著的影响：电泳条带较为清晰，胶原蛋白的 β、$\alpha1$ 和 $\alpha2$ 链并没有发生降解。这表明，使用超声波辅助鱼皮前处理的过程并不会对后续提取的胶原蛋白的三螺旋结构造成影响。此外，不同脉冲超声方式下，由于超声波直接作用于鱼皮表面上的杂蛋白和胶原纤维，而对胶原纤维中的胶原蛋白分子并不造成影响，因此提取后的胶原蛋白分子仍然保持其结构稳定性。因此，相对于传统搅拌除杂处理手段，超声波辅助除杂蛋白是一种有效的方法。

3 结论

超声波辅助作用能够显著提高鱼皮中杂蛋白的分离效率。当碱液的浓度为0.1 M，超声波的功率为75%，超声脉冲方式为 $HIU^{3\ s\ on}_{2\ s\ off}$时，超声波处理时间为 60 min，杂蛋白溶出量为 37.37 mg/g，胶原蛋白的迁出量最少，为 0.63 mg/g，具有较优的选择性除去杂蛋白效果。不同超声脉冲方式对鱼皮中胶原纤维的结构影响不同，$HIU^{1s\ on}_{4s\ off}$脉冲方式处理鱼皮时，鱼皮胶原纤维结

构展开不充分；而 $HIU^{3\,s\,on}_{2\,s\,off}$脉冲方式处理后，鱼皮内部胶原纤维的结构更加松散，且部分发生断裂；当使用 $HIU^{4\,s\,on}_{1\,s\,off}$脉冲方式处理时，鱼皮组织内部的胶原纤维与溶剂的接触不充分，胶原纤维未充分展开，但是鱼皮表面处的纤维却发生断裂。超声波辅助处理后的鱼皮，其下表面的酰胺键位置不变。超声波辅助处理后的鱼皮，后续胶原蛋白的得率增大，特别是经过 $HIU^{3\,s\,on}_{2\,s\,off}$该脉冲方式处理的鱼皮，由于组织内部胶原纤维的充分展开，显著的加快后续提取的效率。此外，鱼皮提取后胶原蛋白的结构不发生改变，仍然保持其生物活性功能。

参考文献

[1] Yaldagard M, Mortazavi S A, Tabatabaie F. The effect of ultrasound in combination with thermal treatment on the germinated barley's alpha-amylase activity [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2008, 25(3): 517-523

[2] 甲子乃人.超声设备使用入门[M].北京市:人民军医出版社,2013
Jiazinairen. Basic of ultrasound diagnostic system and technology [M]. Beijing City: People's military medical press, 2013

[3] Pan Z, Qu W, Ma H, et al. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel [J]. Ultrasonics Sonochemistry, Elsevier B.V., 2012, 19(2): 365-72

[4] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J. biol. Chem., 1951, 193(1): 265-275

[5] Huszar G, Maiocco J, Naftolin F. Monitoring of collagen and collagen fragments in chromatography of protein mixtures [J]. Analytical Biochemistry, 1980, 105(1): 424-429

[6] Da Trindade Alfaro A, Fonseca G G, Balbinot E, et al. Characterization of wami tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) skin gelatin: microbiological, rheological and structural properties [J]. Food Science and Technology International, 2013, 20(5): 373-381

[7] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-5

[8] Dekerckheer C, Bartik K, Lecomte J P, et al. Pulsed sonochemistry [J]. The Journal of Physical Chemistry A, 1998, 102(46): 9177-9182

[9] Li Z, Wang B, Chi C, et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*) [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(1): 103-113

现代食品科技