

3种方法制备的龟甲胶的理化与结构特性比较

于梦洁¹, 南海军^{1*}, 张业辉^{2,3*}, 赵甜甜^{2,3}, 焦文娟^{2,3}, 杨春丽^{2,3}, 陈晓瑛⁴

(1. 广东药科大学中药学院, 广东广州 510006) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (3. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东广州 510642) (4. 广东省农业科学院水产研究所, 广东广州 510645)

摘要: 以石金钱龟龟甲为原料, 采用冷凝回流法 (RTSG)、高温高压法 (HTSG)、酶法联合高温高压 (ETSG) 处理三种不同方法制备龟甲胶, 对所得龟甲胶的氨基酸组成、等电点、凝胶强度、流变学特性、红外光谱、微观结构等理化性质进行表征。结果表明, RTSG、HTSG 和 ETSG 的得率分别为 8.69%、12.28% 和 12.80%, 蛋白含量分别为 59.53%、74.45% 和 77.57%; RTSG 的凝胶特性最好 (93.29 g); RTSG、HTSG、ETSG 的凝胶点分别为 5.56、4.76、5.47 °C, 融化点分别为 14.86、14.33、14.71 °C, 提取温度高, 胶原亚基组分被分解, 亚氨基酸含量低, 对流变性能产生影响; 氨基酸分析结果表明, 不同方法提取的龟甲胶具有相似的氨基酸组成; FT-IR 光谱显示不同方法提取的龟甲胶在酰胺区都具有胶原蛋白的特征振动模式, 具有微小的差异; 扫描电镜显示 RTSG、HTSG、ETSG 都表现为多孔网络状结构, RTSG 有更小和更少的空隙, 有更好的凝胶网络。由此可见, 不同提取方法通过改变龟甲胶的蛋白含量及氨基酸的多少影响龟甲胶的内部结构, 进而影响龟甲胶的凝胶强度、流变学特性等理化性质, 该研究旨在为龟甲胶开发利用提供理论支撑。

关键词: 龟甲胶; 胶原蛋白; 理化性质; 提取方法

文章编号: 1673-9078(2023)08-77-84

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.1103

Physicochemical and Structural Characteristics of Turtle Shell Glue

Prepared Using Three Methods

YU Mengjie¹, NAN Haijun^{1*}, ZHANG Yehui^{2,3*}, ZHAO Tiantian^{2,3}, JIAO Wenjuan^{2,3}, YANG Chunli^{2,3}, CHEN Xiaoying⁴

(1.College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

(2.Sericulture & Agri-food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing Processing, Guangzhou 510610, China)

(3.Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China)

(4.Institute of Fisheries, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510645, China)

Abstract: Three different methods, namely the condensation reflux method (RTSG), the high temperature and high pressure method (HTSG), and the enzymatic method combined with high temperature and high pressure (ETSG) were used to prepare turtle shell glue from the shells of *Mauremys mutica*. The amino acid composition, isoelectric point, gel strength, rheological properties, infrared spectrum, and microstructure of the turtle shell glues were analyzed. The results showed that the yields of RTSG, HTSG, and ETSG were 8.69%, 12.28%, and 12.80%; and the protein contents were 59.53%,

引文格式:

于梦洁,南海军,张业辉,等.3种方法制备的龟甲胶的理化与结构特性比较[J].现代食品科技,2023,39(8):77-84

YU Mengjie, NAN Haijun, ZHANG Yehui, et al. Physicochemical and structural characteristics of turtle shell glue prepared using three methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 77-84

收稿日期: 2022-09-01

基金项目: 岭南重点实验室项目 (NZ2021033); 广东省重点研发计划项目 (2021B0202060001); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (2023KJ1117); 广东省农业科学院协同创新中心 (XT202303); 揭阳市科技计划项目 (2022DZX018)

作者简介: 于梦洁 (1997-), 女, 在读硕士, 研究方向: 中药学, E-mail: 18735643121@163.com

通讯作者: 南海军 (1976-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药学, E-mail: swunan@163.com; 共同通讯作者: 张业辉 (1979-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: zhangyehui@163.com

74.45%, and 77.57%, respectively. RTSG had the best gelatinization property of 93.29 g. The gelatinization points of the gels obtained using the three methods were 5.56 °C, 4.76 °C, and 5.47 °C, and their melting points were 14.86 °C, 14.33 °C, and 14.71 °C, respectively. At high extraction temperatures, the collagen subunits were decomposed, and the amino acid content was low, thereby affecting rheological properties. Amino acid analysis results revealed that the turtle shell glues extracted using the different methods had similar amino acid compositions. FTIR spectra showed that the turtle shell glues extracted using the different methods exhibited the characteristic vibration mode of collagens in the amide region, with slight differences. SEM results suggested that RTSG, HTSG, and ETSG all exhibit porous network structures, and RTSG has smaller and fewer voids, indicating a superior gel network. Therefore, different extraction methods affect the internal structure of the turtle shell glue by changing the protein and amino acid content, thereby affecting the gel strength, rheological properties, and other physical and chemical properties of the glue. The aim of this study was to provide a theoretical reference for the development and utilization of turtle shell glue.

Key words: turtle shell glue; collagen; physicochemical properties; extraction method

明胶 (Glutin) 是一种通过水解动物皮肤、软骨骨骼和肌腱中胶原蛋白得到的水溶性天然高分子聚合物。明胶提取通常包括两个步骤,即明胶化和热提取,胶原明胶化是指通过一定的作用力破坏胶原稳定的三螺旋结构,明胶化程度对明胶的物理和化学结构有很大的影响^[1]。在胶原蛋白转化为明胶时,胶原蛋白分子间和分子内键、肽键被破坏,提取条件越剧烈,多肽键的水解度就越大^[2]。明胶溶于热水,冷却后可形成凝胶,提取明胶的凝胶特性不同的原因是脯氨酸和羟脯氨酸含量的不同。我国明胶生产采用的主要方法有酸碱法和酶法。酸碱法需要排放大量废水污染物,污染环境。于淑池等^[3]利用酶法从金鲳鱼鱼骨中提取明胶,通过正交试验确定了最佳提取工艺,其中酶解温度 45 °C、酶解 pH 值 6.5、加酶量 4.0%,此法提取率为 21.87%。曾小芳等^[4]利用超声辅助酶法从猪骨中提取骨明胶,明胶得率显著提高。胶原是一种结构蛋白,只有高温、酸、碱或胶原酶才能使胶原发生分子内分解。胶原间的交联都是在胶原分子末端的 1/4 处,而木瓜蛋白酶的作用位点也在这一位置^[5]。

石金钱龟,又名黄喉拟水龟、黄板龟等,是传统的药用、食用品种,广东省内多地有养殖。龟甲,为龟的干燥腹甲及背甲,是传统的名贵中药材,含有丰富的胶原蛋白。龟甲胶是一种类似于明胶的块状制品,由龟甲经过前处理后,经煎煮、过滤、浓缩和干燥后得到的胶块,其主要成分也是胶原蛋白。龟甲胶性凉,味咸、甘,具有滋阴潜阳、益肾健骨、养血补心、补血活血的功效^[6]。龟甲胶多用于食品,其传统的提取工艺提取率低且耗时较长。一些研究改常压提取为高温高压提取,有利于胶原蛋白的提取,出胶率高于传统工艺^[7]。龟甲胶的产品性质和其他明胶相比有很大的差别,目前,关于龟甲胶的凝胶强度、流变学特性等方面也少有研究。因此,本研究从龟甲胶性质出发,探究冷凝回流法、高温高压法、酶法联合高温高压处理三种提取方式对龟甲胶蛋白含量、色泽、氨基酸组

成、凝胶强度、流变学特性等理化性质的影响,旨在为龟甲胶产业开发利用提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

龟甲,购自于广东云浮市完璧金钱龟养殖有限公司;木瓜蛋白酶 (2 000 U/mg),购自于生工生物工程有限公司;硫酸、盐酸等其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Kjeltec 8400 全自动凯氏定氮仪,福斯 (FOSS) 分析仪器公司;AR-1500 EX 流变仪,美国 TA 公司;TA-XT Plus 物性分析仪,英国 Stable Micro Systems 公司;Nicolet IS50-Nicolet Continuum 傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技公司;S-3400N 扫描电子显微镜,日本 Hitachi 公司;L-8900 全自动氨基酸分析仪,日本 Hitachi 公司;PB-10 台式 pH 计,德国 Sartorius 公司;Zeta 电位仪 (Zetasizer Nano ZSE),英国马尔文帕纳科公司;CR-400 手持式色差仪,日本 Konica-Minolta 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 龟甲胶的制备

1.3.1.1 高温高压煎煮制备

将粉碎后的龟甲精密称取 100 g,固定料液比为 1:5 (龟甲重量与水体积比为 1:5),使用高压锅进行煎煮,煎煮两次,每次 3 h,趁热过滤分离,真空抽滤得到滤液,收集等待浓缩。将收集的滤液加热浓缩,期间不断搅拌,防止焦化,然后将胶液倒入事先称重过的凝胶盘内,在烘箱内干燥 24 h,温度设为 60 °C,再于干燥器内放置两天,即得高温高压法制备的龟甲胶 (Tortoise Shell Glue Prepared By High Temperature And High Pressure Method, HTSG)。

1.3.1.2 冷凝回流制备

将粉碎后的龟甲精密称取 100 g, 固定料液比为 1:5 (龟甲质量与水体积比为 1:5), 100 °C 加热冷凝回流提取两次, 每次 3 h, 达到时间后停止加热, 倒出提取液, 后续操作同 1.3.1.1, 即得回流法制备的龟甲胶 (Tortoise Shell Glue Prepared By Condensation Reflux Method, RTSG)。

1.3.1.3 酶法联合高温高压处理制备

将粉碎后的龟甲精密称取 100 g, 根据 4 000 U/g 加入木瓜蛋白酶, 固定料液比为 1:5 (龟甲质量与水体积比为 1:5), 在 50 °C、pH 值为 7 的条件下酶解 1.5 h, 然后将酶解产物转入高压锅中进行煎煮, 煎煮两次, 每次 3 h, 趁热过滤分离, 后续操作同 1.3.1.1, 即得酶法制备的龟甲胶 (Enzymatic Tortoise Shell Glue Prepared by the Combination of Enzymatic as Well as High Temperature and High Pressure Method, ETSG)。

1.3.2 龟甲胶得率及蛋白含量测定

龟甲胶得率计算见下式:

$$Y = \frac{m_1}{m_0} \times 100\%$$

式中:

Y——龟甲胶得率, %;

m_1 ——龟甲胶干质量, g;

m_0 ——龟甲粉质量, g。

参考 GB 5009.5-2016, 胶原蛋白含量采用凯式定氮法测定, 称取固体样品 0.1 g 至消化管中, 依次加入 10 mL 硫酸、消化片, 置于消化炉进行消化, 升温至 420 °C 后, 消化 2.5 h, 待其冷却于蛋白质分析仪上测定。

1.3.3 龟甲胶氨基酸组成分析

参考 GB 5009.124-2016, 称取 20 mg 龟甲胶样品于水解管中, 加入 6 mol/L 的盐酸溶液 5 mL, 充氮后封管。在 110 °C 油浴中水解 22 h, 拿出冷却到室温, 过滤, 取 1 mL 滤液 60 °C 油浴脱酸, 再加入 1 mL 超纯水油浴蒸干两次, 加入缓冲液稀释 10 倍, 混合均匀后用针管吸取少量, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤, 全自动氨基酸分析仪检测。

1.3.4 龟甲胶色度的测定

配制 6.67% (m/V) 的龟甲胶溶液, 使用手持式色差仪测定龟甲胶的色泽。

1.3.5 龟甲胶 Zeta 电位的测量

参考杜翰^[8]的方法, 每组分别制备 5 mg/mL 的龟甲胶溶液, 并用蒸馏水稀释至 0.5 mg/mL, 使用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 溶液将 pH 值调节为 3.0、5.0、7.0 和 9.0, 然后将样品加到毛细管 Zeta 池中, 使用 Zeta 电位仪测其 Zeta 电位。

1.3.6 龟甲胶凝胶强度测定

配制 6.67% 的龟甲胶溶液, 在室温下充分溶胀 1 h, 60 °C 水浴加热 30 min 至完全溶解, 冷却后放入 4 °C 冰箱, 并在此温度保持 16~18 h, 立即取出测定其凝胶强度。选用 P05 的探头, 触发点负载为 5 g, 下压速率 1 mm/s, 下压距离 4 mm, 测后速率 2 mm/s, 测定三次, 计算平均值。

1.3.7 龟甲胶流变性质的测定

1.3.7.1 粘弹性

参考 Abdelmalek 等^[9]的方法, 配制质量分数为 6.67% 的龟甲胶溶液, 使用 40 mm 平板夹具, 在 25 °C, 剪切速率 0.1~100 rad/s, 应变 0.5% 的条件下进行动态频率扫描。

1.3.7.2 表观粘度

参考 Huang 等^[10]的方法, 使用 40 mm 平板夹具, 在 25 °C, 剪切速率为 0.01~100 rad/s 的条件下进行表观粘度的测定。

1.3.7.3 温度扫描

参考 Sha 等^[11]的方法, 使用流变仪温度扫描模式测定龟甲胶的胶凝温度和融化温度。温度变化分为三个部分, 分别为降温、恒温 and 升温, 其中降温阶段为 40~4 °C, 在 4 °C 保持 5 min, 升温阶段为 4~40 °C, 频率为 1 Hz, 应变为 3 Pa, 冷却和加热速率为 2 °C/min。绘制储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 随温度变化的曲线。

1.3.8 傅里叶变换红外光谱

取适量样品, 在干燥灯下与 KBr 充分研磨成粉末状, 在压片机中手动压片, 将压片后样品置于样品室内测定分析。扫描范围为 4 000~500 cm^{-1} , 分辨率为 2 cm^{-1} 。

1.3.9 扫描电镜观察

将冻干后的龟甲胶样品粘于导电胶上, 二氧化碳干燥, 离子喷射仪喷金, 扫描电子显微镜在 15 kV 的加速电压下观察样品微观结构。

1.3.10 数据分析

采用 SPSS 24 对数据进行数据处理, 结果以平均值±标准偏差的形式表示, 采用 Duncan 多重检验法进行显著性分析, 使用 Origin 2021 进行分析和绘图。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法对龟甲胶得率及蛋白含量的影响

如图 1 所示, RTSG、HTSG 和 ETSG 的得率分别为 8.69%、12.28% 和 12.80%, 蛋白含量分别为 59.53%、

74.45%和 77.57% (wt%)。与 RTSG 相比, HTSG 和 ETSG 的得率及蛋白含量显著增大 ($P<0.05$), 表明高温高压法比冷凝回流法得到的龟甲胶得率和蛋白含量高; 与 HTSG 相比, ETSG 蛋白含量也显著增大 ($P<0.05$), 这可能是由于胶原蛋白分子连接紧密, 木瓜蛋白酶可以切除胶原分子末端肽, 导致胶原蛋白的三螺旋结构被破坏, 有利于胶原蛋白的提取^[12]。在郑洁^[13]的研究中, 龟甲胶对照药材的胶原蛋白含量为 79.62%, HTSG、ETSG 的蛋白含量与之接近, 而 RTSG 偏低, 这可能是由于回流法提取不彻底, 可增加提取时间使龟甲胶提取完全。

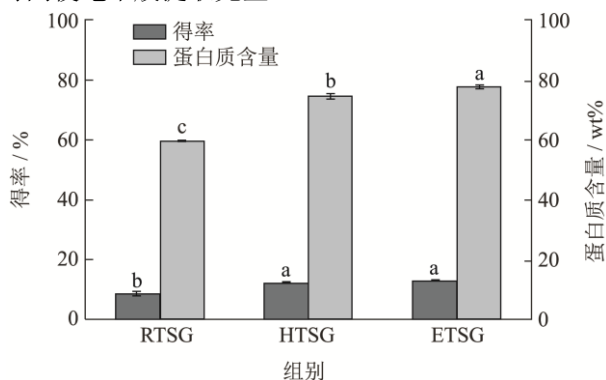


图 1 不同提取方法对龟甲胶得率及蛋白含量的影响

Fig.1 Effects of different extraction methods on the protein content and yield of tortoise shell glue

注: 不同小写字母表示同一列比较具有显著性差异 ($P<0.05$)。图 3 同。

2.2 不同提取方法对龟甲胶水解氨基酸组成的影响

三种方法提取的龟甲胶氨基酸组成分析见表 1。由表 1 可知, 三种方法提取的龟甲胶有着极为相似的氨基酸组成, 甘氨酸的含量最高, 这是因为龟甲胶来源于胶原蛋白, 甘氨酸存在于其三螺旋结构序列的每三个残基^[14]。此外龟甲胶的氨基酸组成有一个特点, 即含有脯氨酸和羟脯氨酸(亚氨基酸), 羟脯氨酸和脯氨酸是胶原蛋白独有的^[15], 脯氨酸是仅次于甘氨酸的第二丰富的氨基酸, 羟脯氨酸经盐酸水解后转变为脯氨酸, 因此结果中显示的脯氨酸即为亚氨基酸含量^[16]。高温提取会导致胶原蛋白分子的部分氨基酸被水解, 酶解也会切除胶原蛋白末端肽, 导致亚氨基酸含量降低^[17]。亚氨基酸含量较高的龟甲胶表现出更好的粘弹性和更强的凝胶结构^[18]。

2.3 不同提取方法对龟甲胶色泽的影响

龟甲胶的色度分析结果如表 2 所示, L^* 表示样品

亮度, a^* 表示红绿色差, b^* 表示蓝黄色差, RTSG 与 HTSG 的 L^* 值显著高于 ETSG ($P<0.05$), 表明与 ETSG 相比, RTSG 和 HTSG 的颜色偏亮、偏白, ETSG 相比 RTSG 和 HTSG 有更低的 b^* 值, 表明其颜色为偏黄^[19], 与所测结果一致。

表 2 不同方法提取对龟甲胶氨基酸的影响

Table 2 Effects of different extraction methods on amino acids of tortoiseshell glue

氨基酸	含量/(g/kg)		
	RTSG	HTSG	ETSG
天冬氨酸	54.39±0.49	51.54±0.62	48.42±0.44
苏氨酸	21.75±0.77	21.70±0.95	21.32±0.95
丝氨酸	46.22±0.83	44.39±0.74	40.77±0.10
谷氨酸	97.92±1.21	92.56±1.22	84.29±1.21
脯氨酸	99.43±1.31	95.33±1.66	91.78±1.14
甘氨酸	220.47±2.15	212.24±4.60	196.87±2.26
丙氨酸	95.47±1.23	91.20±2.57	83.75±1.02
半胱氨酸	1.70±0.01	1.65±0.04	1.48±0.05
缬氨酸	16.75±0.55	16.98±0.32	16.34±1.30
甲硫氨酸	0.43±0.01	0.63±0.03	0.84±0.03
异亮氨酸	11.15±1.47	11.22±1.43	10.82±1.45
亮氨酸	28.72±0.50	28.69±0.62	26.67±0.68
酪氨酸	5.96±0.27	7.01±0.41	7.94±0.61
苯丙氨酸	24.73±0.24	24.27±0.48	23.71±0.89
赖氨酸	35.23±0.22	34.00±0.60	34.11±1.24
组氨酸	8.13±0.15	8.58±0.20	9.85±1.51
精氨酸	77.11±1.23	72.59±1.61	69.17±1.63

表 2 不同方法提取对龟甲胶色度的影响

Table 2 Effects of different extraction methods on the color of tortoiseshell glue

项目	L^*	a^*	b^*	ΔE
RTSG	46.81±0.05 ^a	-1.6±0.01 ^b	9.37±0.01 ^a	46.64±0.06 ^b
HTSG	46.62±0.42 ^a	-0.79±0.09 ^a	6.06±0.12 ^b	46.53±0.43 ^b
ETSG	41.39±0.04 ^b	-0.63±0.03 ^a	3.61±0.02 ^c	51.70±0.04 ^a

注: 不同小写字母表示同一列比较具有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.4 不同提取方法对龟甲胶 Zeta 电位的影响

不同方法提取的龟甲胶的 Zeta 电位随 pH 值的变化如图 2 所示, 龟甲胶溶液在其等电点处净电荷为零^[20]。由结果可知, RTSG、HTSG、ETSG 的等电点分别为 4.8、4.7、4.6。在低于等电点的 pH 值下, 所有龟甲胶样品都被质子化, 这导致龟甲胶产生净正电荷, 另一方面, 龟甲胶分子去质子化并在高于其等电点的 pH 值时带负电^[21]。RTSG、HTSG、ETSG 的等

电点处于酸性 pH 值, 这可能是谷氨酸和天冬氨酸导致的, 谷氨酸和天冬氨酸在高温下由谷氨酰胺和天冬酰胺分别水解而来, 所以等电点值降低^[22]。

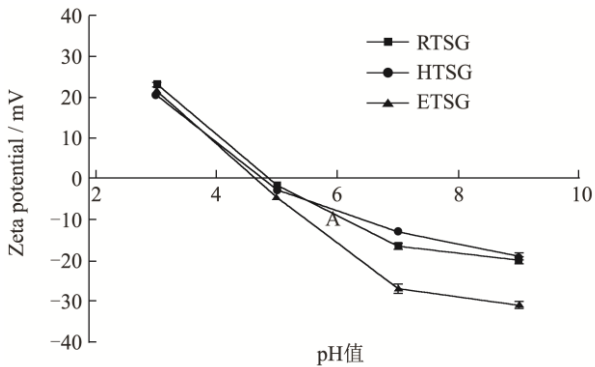


图2 不同提取方法对龟甲胶 Zeta 电位的影响

Fig.2 Effects of different extraction methods on Zeta potential of tortoise shell glue

2.5 不同提取方法对龟甲胶凝胶强度的影响

凝胶强度是评价明胶的重要指标, 提取温度对明胶的凝胶强度有显著影响, 提取温度越高, 胶原亚组分被分解, 凝胶强度就会降低^[23]。龟甲胶样品的凝胶强度如图 3 所示, RTSG 凝胶强度达到最大值 93.29 g, 这可能是因为高温高压法比冷凝回流法提取的温度高, 随着温度的升高, 龟甲胶分子发生降解, 分子链变短, 所以 HTSG、ETSG 的凝胶体系内部作用力变小, 凝胶强度降低^[24]。ETSG 凝胶强度最低, 这可能是由于木瓜蛋白酶破坏了胶原蛋白的非螺旋区, 导致三螺旋结构松散, 小分子成分含量高, 凝胶强度低^[25]。

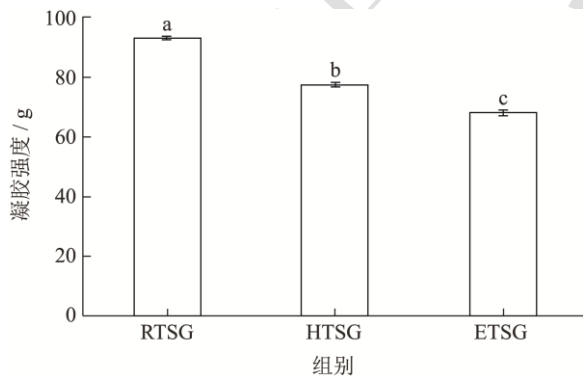


图3 不同提取方法对龟甲胶凝胶强度的影响

Fig.3 Effects of different extraction methods on the gel strength of tortoise shell glue

2.6 不同提取方法对龟甲胶流变学特性的影响

2.6.1 不同提取方法对龟甲胶粘弹性的影响

龟甲胶溶液具有一定的粘弹性, G' 表示储能模量, G'' 表示损耗模量。如图 4 所示, 随着频率的增大, 三

种龟甲胶的 G' 和 G'' 都呈上升的趋势, 与 HTSG、ETSG 相比, RTSG 的 G' 和 G'' 较高, 这可能是由于提取温度高, 反应条件剧烈, 导致凝胶网络的内部交联度降低, G' 和 G'' 降低, 所以 HTSG 和 ETSG 的 G' 和 G'' 较低, 说明龟甲胶的内部交联强, 凝胶稳定性好^[26]。

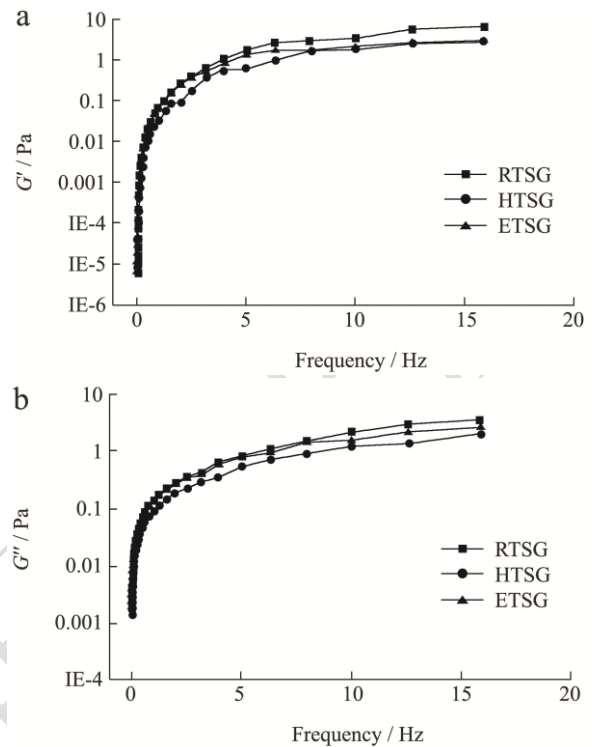


图4 不同提取方法对龟甲胶粘弹性的影响

Fig.4 Effects of different extraction methods on the viscoelasticity of tortoise shell glue

2.6.2 不同提取方法对龟甲胶表观粘度的影响

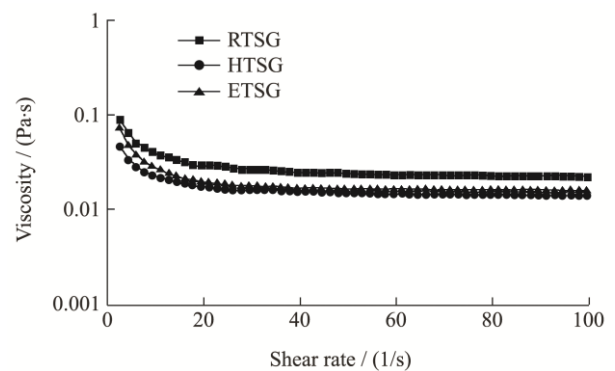


图5 不同提取方法对龟甲胶表观粘度的影响

Fig.5 Effects of different extraction methods on the apparent viscosity of tortoise shell glue

粘度是明胶的第二个重要的物理特性, 受肽的分子量和分散性控制, 较高的分子量会增加粘度^[27]。粘度的变化反映了蛋白质分子间力的变化, 分子引力越大, 蛋白质的粘度越高。由图 5 可知, 三种样品的粘度一直处于较低的状态, 这是典型的剪切稀化行为, 说明该明胶体系为假塑性流体。与 RTSG 相比, HTSG

和 ETSG 粘度较低, 这可能是因为随着剪切频率的变化, 聚合物链将在剪切流的方向上对齐, 含有低分子量肽的龟甲胶可以很容易地排列并表现出较低的粘度^[28], Jamilah^[27]等的研究同样表明粘度部分受肽的分子量和多分散性控制, 较高的分子量会增加粘度。

2.6.3 不同提取方法对龟甲胶降温 and 升温过程中 G' 和 G'' 的影响

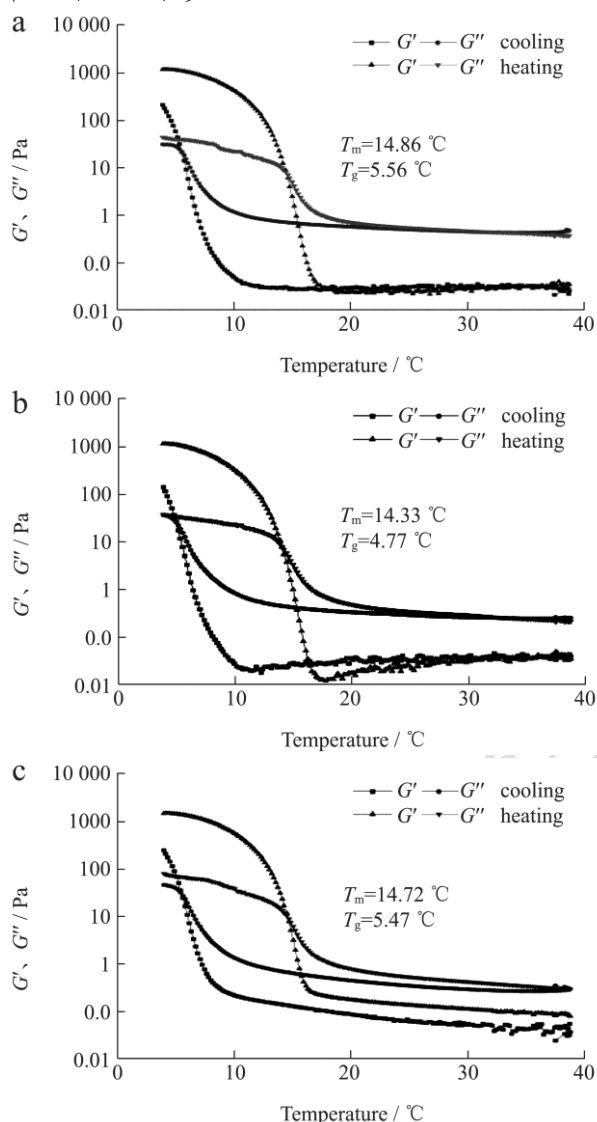


图6 不同提取方法对龟甲胶降温和升温过程中 G' 和 G'' 的影响

Fig.6 Effects of different extraction methods on G' and G'' during cooling and heating of tortoiseshell gum

注: (a)RTSG 温度扫描, (b)HTSG 温度扫描, (c)ETSG 温度扫描。

图 6 中显示了在加热和冷却过程中 G' 和 G'' 的变化趋势, G' 和 G'' 均在降温过程中增大, 在加热过程中减小。这与 Norziah 等^[29]的研究结果相同。随着温度的降低, G' 和 G'' 逐渐增加, 这个过程表明凝胶正在形成。在升温过程中, G' 和 G'' 逐渐降低, 当温度升高至一定温度时, G' 和 G'' 出现交点, 凝胶开始融化。当温

度较高时, 龟甲胶的储能模量低于损耗模量, 此时龟甲胶处于液态, 说明龟甲胶分子为单链。

以上结果表明, 龟甲胶为热可逆凝胶, 凝胶和溶胶的过程就是 α 链从单链组成螺旋结构以及从螺旋结构解旋成单链的过程^[30]。我们通常把温度变化过程中 G' 和 G'' 的交点当作凝胶点和融化点。如图 6 所示, RTSG 凝胶点为 $5.56\text{ }^\circ\text{C}$, 融化点 $14.86\text{ }^\circ\text{C}$; HTSG 凝胶点为 $4.76\text{ }^\circ\text{C}$, 融化点 $14.33\text{ }^\circ\text{C}$; ETSG 凝胶点为 $5.47\text{ }^\circ\text{C}$, 融化点 $14.71\text{ }^\circ\text{C}$ 。与凝胶强度相似, 胶凝温度和熔化温度同样与亚氨基酸含量和分子量有关^[31], RTSG 的胶凝点和融化点略高于 HTSG 和 ETSG, 但差异不显著, 这可能是由于 RTSG 的亚氨基酸组成较高, 增加了亚氨基酸残基和水分子结合形成的氢键, 从而生成更稳定的分子间结构, 更容易形成凝胶^[15]。

2.7 不同提取方法对龟甲胶红外光谱的影响

由图 7 可知, 三种方法提取的龟甲胶的光谱图类似, 但它们的峰值位置和幅度略有不同, 都具有胶原蛋白的特征振动模式。

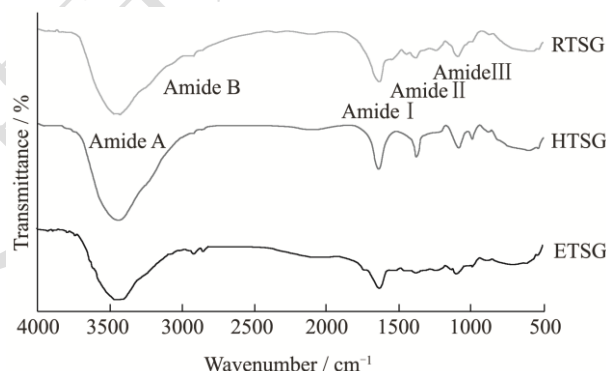


图7 不同提取方法对龟甲胶红外光谱的影响

Fig.7 Effect of different extraction methods on the infrared spectrum of tortoise shell glue

酰胺 A 是一个宽吸收带, 通常出现在 $3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$ 之间, 它是由 N-H 伸缩振动产生的, 当酰胺 A 参与氢键的形成时, 可能会往低波数移动^[32]。RTSG、HTSG、ETSG 的酰胺 A 带位置分别位于 3431 、 3444 和 3435 cm^{-1} 。随着提取温度升高, 反应条件剧烈, 酰胺 A 带发生蓝移, 说明提取温度升高会在一定程度上破坏龟甲胶分子间的氢键^[33]。酰胺 B 带是由 C-H 的不对称收缩振动引起的。

一般而言, 酰胺 I 带应该出现在 $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ 之间, 主要与 C=O 的伸缩振动有关^[34]。它可能是反映龟甲胶二级结构的主要区域, 因为酰胺 I 的位置说明了氢键和蛋白质的结构构象。酰胺 I 带与蛋白肽链骨架的有序程度密切相关, 有序度越高, 则酰胺 I 带的波数越大^[35]。RTSG、HTSG、ETSG 的酰胺 I 带位

置分别位于 1 641、1 639 和 1 639 cm^{-1} ，表明 RTSG 分子更加有序。酰胺 II 带由 N-H 和 C-N 基团的伸缩振动产生^[22]，酰胺 III 带代表 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动，以及甘氨酸主链和脯氨酸侧链的 CH_2 振动^[32]。

RTSG、HTSG、ETSG 的酰胺 III 带分别位于 1 242、1 249 和 1 244 cm^{-1} ，这说明与 RTSG 相比，HTSG、ETSG 的三螺旋结构被破坏更严重^[36]。

2.8 不同提取方法对龟甲胶微观结构的影响

通过扫描电子显微镜观察到三种龟甲胶的微观结构，结果如图 8 所示。HTSG 和 ETSG 都呈现多孔网络状结构，ETSG 孔径较多，且大小不一呈不均匀分散，表明酶可能使胶原蛋白的部分结构发生了变化，但网络结构还得以保持^[37]。RTSG 有更小和更少的空隙，也就是说具有较高凝胶强度的龟甲胶具有更小和更少的空隙，表明有更好的凝胶网络^[15]，类似的结果也被 Kaewruang 等^[38]报道，他指出随着提取时间和温度的增加，明胶的凝胶网络变得更粗糙，具有更大的空隙。

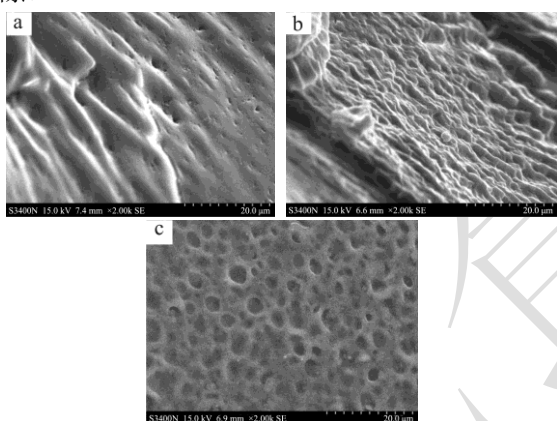


图 8 不同提取方法龟甲胶的电镜扫描图

Fig.8 SEM images of tortoise shell glue with different extraction methods

注：(a)RTSG 电镜图，(b)HTSG 电镜图，(c)ETSG 电镜图。

3 结论

本研究分析对比了不同提取方法对龟甲胶理化性质的影响。RTSG 具有较高的凝胶特性，氨基酸组成分析刚好与之对应，龟甲胶中亚氨基酸含量较低，所以胶凝温度和融化温度较低。红外光谱图显示，不同方法提取的龟甲胶在酰胺区都具有胶原蛋白的特征振动模式。三种方法提取的龟甲胶呈多孔网络状结构，具有较高凝胶强度的 RTSG 有更小和更少的空隙，表明有更好的凝胶网络。不同提取方法通过改变龟甲胶的蛋白含量及氨基酸的多少影响龟甲胶的内部结构，进而影响龟甲胶的凝胶强度、流变学特性等理化性质，

综上所述 RTSG 具有较好的性质，本研究结果可为龟甲胶质量标准控制提供参考。

参考文献

- [1] 何龙.黄明胶快速制备及成胶过程中胶体理化特性的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2020.
- [2] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18(4): 581-592.
- [3] 于淑池,赖卓慧.金鲳鱼骨明胶的提取工艺及性质研究[J].食品研究与开发,2020,41(3):159-165.
- [4] 曾小芳,赵伟,杨瑞金,等.超声波辅助酶法提取骨明胶研究[J].食品工业科技,2017,38(14):167-170,180.
- [5] 林月华,刘海英,过世东.酶法制备明胶提胶前处理条件[J].食品与生物技术学报,2013,32(2):189-194.
- [6] 左蕴泽,王卓,周厚江,等.一种龟甲抗肝癌药理作用机制的网络药理学研究[J].亚太传统医药,2021,17(2):136-140.
- [7] 唐宇,肖丹,刘子毓,等.龟甲胶的研究现状及展望[J].中华中医药杂志, 2019,34(6):2593-2598.
- [8] 杜瀚.大黄鱼鱼骨明胶/多糖复合体系流变学特性研究[D].厦门:集美大学,2021.
- [9] Abdelmalek B E, Gómez-Estaca J, Sila A, et al. Characteristics and functional properties of gelatin extracted from squid (*Loligo vulgaris*) skin [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 65: 924-931.
- [10] Huang T, Tu Z C, Shangguan X, et al. Rheological behavior, emulsifying properties and structural characterization of phosphorylated fish gelatin [J]. Food Chemistry, 2018, 246: 428-436.
- [11] Sha X M, Hu Z Z, Ye Y H, et al. Effect of extraction temperature on the gelling properties and identification of porcine gelatin [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 92: 163-172.
- [12] 石维焕.酶法制备罗非鱼鱼鳞明胶的工艺研究[D].福州:福建农林大学,2012.
- [13] 郑洁.胶类中药蛋白质的分析及鉴定研究[D].镇江:江苏大学,2017.
- [14] Bae I, Osatomi K, Yoshida A, et al. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes [J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 49-54.
- [15] Chen T, Song Z, Liu H, et al. Physicochemical properties of gelatin produced from Nile tilapia skin using chemical and fermentation pretreatments [J]. Food Bioscience, 2022, 47: 101650.
- [16] 汲聪玲.白鲢鱼皮明胶理化特性研究及其性能改进[D].合

- 肥:合肥工业大学,2016.
- [17] 温慧芳,陈丽丽,白春清,等.基于不同提取方法的鲷鱼皮胶原蛋白理化性质的比较研究[J].食品科学,2016,37(1):74-81.
- [18] Benjakul S, Oungbho K, Visessanguan W, et al. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus* [J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 445-451.
- [19] Cheow C S, Norziah M S, Kyaw Z Y, et al. Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) [J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 386-391.
- [20] Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, et al. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*) [J]. Food Chem, 2011, 129(3): 1179-1186.
- [21] Tan C C, Karim A A, Uthumporn U, et al. Effect extraction temperature on the emulsifying properties of gelatin from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) skin [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106024.
- [22] Nagarajan M, Benjakul S, Prodpran T, et al. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(2): 389-397.
- [23] Kaewruang P, Benjakul S, Prodpran T. Molecular and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket as affected by extracting temperatures [J]. Food Chem, 2013, 138(2-3): 1431-1437.
- [24] 汲聪玲,陆剑锋,吕顺,等.不同提取温度对白鲢鱼皮明胶理化性质的影响[J].食品科学,2016,37(9):117-122.
- [25] 杜杰,刘廷薇,马良,等.微波-快速冻融耦合鱼皮明胶理化性质分析[J].食品科学,2021,42(11):108-115.
- [26] 刘淑慧,夏光华,李川,等.提取温度对罗非鱼皮明胶理化性质的影响[J].食品工业科技,2018,39(23):37-41,49.
- [27] Jamilah B, Tan K W, Umi Hartina M R, et al. Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1256-1260.
- [28] Bhat R, Karim A A. Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1160-1164.
- [29] Norziah M H, Al-Hassan A, Khairulnizam A B, et al. Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(6): 1610-1616.
- [30] 高玲玲,侯成立,高远,等.胶原蛋白热稳定性研究进展[J].中国食品学报,2018,18(5):195-207.
- [31] 韩霜,马良,杨晖,等.大目金枪鱼皮明胶的理化性质及结构分析[J].食品科学,2018,39(10):40-45.
- [32] Casanova F, Mohammadifar M A, Jahromi M, et al. Physico-chemical, structural and techno-functional properties of gelatin from saithe (*Pollachius virens*) skin [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 156: 918-927.
- [33] Wei P, Zheng H, Shi Z, et al. Isolation and characterization of acid-soluble collagen and pepsin-soluble collagen from the skin of hybrid sturgeon [J]. Journal of Wuhan University of Technology-Mater Sci Ed, 2019, 34(4): 950-959.
- [34] Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*) [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 708-716.
- [35] 杨玲,赵燕,鲁亮,等.鲟鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其理化性能分析[J].食品科学,2013,34(23):41-46.
- [36] Cao S, Wang Y, Xing L, et al. Structure and physical properties of gelatin from bovine bone collagen influenced by acid pretreatment and pepsin [J]. Food and Bioproducts Processing, 2020, 121: 213-223.
- [37] 王晓军,吴婷,贾伟,等.酸法和酶法提取牦牛骨胶原蛋白的特性分析[J].食品科学,2018,39(12):101-106.
- [38] Kaewruang P, Benjakul S, Prodpran T, et al. Physicochemical and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as affected by extraction conditions [J]. Food Bioscience, 2013, 2: 1-9.