

# 鸡胸软骨糖/肽水解物的结构表征及其抗炎活性

王瑞琦<sup>1,2</sup>, 郭玉杰<sup>2,3</sup>, 沈青山<sup>2</sup>, 刘云鹤<sup>2</sup>, 刘济千<sup>2</sup>, 张志强<sup>4</sup>, 张春晖<sup>2</sup>

(1. 宁夏大学食品与葡萄酒学院, 宁夏银川 750021)

(2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农产品加工综合性重点实验室, 北京 100193)

(3. 新疆泰昆集团股份有限公司, 新疆昌吉 831100) (4. 山东海钰生物技术股份有限公司, 山东济宁 272000)

**摘要:** 本研究从鸡胸软骨水解物中分离得到胶原蛋白肽和硫酸软骨素并对其进行了结构表征和抗炎活性研究。胶原蛋白肽和硫酸软骨素得率分别为 68.32% 和 18.82% (以干重计)。氨基酸分析表明胶原蛋白肽中甘氨酸含量最高, 达 14.05 mg/g, 其次为谷氨酸 (9.09 mg/g) 和脯氨酸 (7.44 mg/g); 紫外光谱分析与圆二色性结果显示所提取样品符合胶原蛋白肽的典型特征; 通过高效液相色谱分析发现 92.38% 的胶原蛋白肽分子量小于 1000 u。傅里叶红外光谱、琼脂糖凝胶电泳、二糖组成分析结果表明提取的硫酸软骨素主要由硫酸软骨素 A 组成, 相对纯度为 91.87%。通过建立关节炎大鼠模型并检测糖/肽水解物对炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平影响, 与模型组相比 (TNF- $\alpha$  39.90 pg/mL, IL-1 $\beta$  22.38 pg/mL, PGE-2 89.41 pg/mL), 灌胃软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素能显著降低关节炎大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平 ( $p < 0.05$ )。本实验结果表明, 使用软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素能够抑制炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平, 减轻关节炎大鼠炎症反应。

**关键词:** 软骨水解物; 胶原蛋白肽; 硫酸软骨素; 抗炎活性

文章编号: 1673-9078(2021)08-44-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.1148

## Structural Characterization and Anti-inflammatory Activity of Chicken

### Breast Cartilage Polysaccharide/Peptide Hydrolysate

WANG Rui-qi<sup>1,2</sup>, GUO Yu-jie<sup>2,3</sup>, SHEN Qing-shan<sup>2</sup>, LIU Yun-he<sup>2</sup>, LIU Ji-qian<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-qiang<sup>4</sup>,  
ZHANG Chun-hui<sup>2</sup>

(1. College of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021, China) (2. Comprehensive Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China) (3. Xinjiang Taikun Group Co. Ltd., Changji 831100, China)  
(4. Shandong Haiyu Biotechnology Co. Ltd., Jining 272000, China)

**Abstract:** The collagen peptides and chondroitin sulfate were isolated from chicken breast cartilage hydrolysate, and their structures and anti-inflammatory activities were investigated in this study. The yields of collagen peptide and chondroitin sulfate were 68.32% and 18.82% (dry weight basis). The amino acid analysis showed that the content of glycine in the collagen peptide was the highest (14.05 mg/g), followed by glutamate (9.09 mg/g) and proline (7.44 mg/g); The results of UV spectroscopy and circular dichroism analyses showed that the extracted samples were conformed to the typical characteristics of collagen peptide; Analysis by high performance liquid chromatography revealed that 92.38% of collagen peptides had a molecular weight smaller than 1000 u. Fourier infrared spectroscopy, agarose gel electrophoresis and disaccharide composition analysis showed that the extracted chondroitin sulfate was mainly composed of chondroitin sulfate A, with a relative purity of 91.87%. By establishing a rat model of arthritis, the effects of polysaccharide/peptide hydrolysate on the levels of inflammatory factors,

引文格式:

王瑞琦, 郭玉杰, 沈青山, 等. 鸡胸软骨糖/肽水解物的结构表征及其抗炎活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 44-52, +207

WANG Rui-qi, GUO Yu-jie, SHEN Qing-shan, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of chicken breast cartilage polysaccharide/peptide hydrolysate [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 44-52, +207

收稿日期: 2020-12-11

基金项目: 国家农业科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP)

作者简介: 王瑞琦 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 功能性骨源食品

通讯作者: 张春晖 (1971-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 功能性骨源食品

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE-2 in rats with arthritis were examined, compared with the model group (TNF- $\alpha$  39.90 pg/mL, IL-1 $\beta$  22.38 pg/mL, PGE-2 89.41 pg/mL), intragastric cartilage hydrolysate, collagen peptide and chondroitin sulfate could significantly reduce the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PGE-2 in arthritic rats ( $p < 0.05$ ). The results of this experiment showed that cartilage hydrolysate, collagen peptides and chondroitin sulfate can be used to inhibit the levels of inflammatory factors, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PGE-2, and reduce the inflammatory response in arthritic rats.

**Key words:** cartilage hydrolysate; collagen peptide; chondroitin sulfate; anti-inflammatory activity

骨关节炎 (Osteoarthritis, OA) 又称退行性骨关节病, 是一种以关节软骨变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节疾病<sup>[1]</sup>。目前临床上对骨关节炎的治疗还未找到较好的方法, 大多通过非甾体药物来减轻疼痛, 延缓病情发展, 改善患者生活质量。硫酸软骨素 (Chondroitin sulfate, CS) 作为改变骨关节炎症状的慢作用药物, 对慢性骨关节炎具有良好的治疗效果<sup>[2]</sup>。在欧洲、美国等发达国家, 已作为药品和膳食补充剂的重要原料用于减少骨关节患者疼痛、改善关节功能<sup>[3]</sup>。除硫酸软骨素外, 骨胶原蛋白肽也能起到缓解骨关节炎的作用。Fanny<sup>[4]</sup>等研究发现骨胶原蛋白肽不仅能增加机体骨骼的稳定性和坚固性, 还能刺激机体软骨细胞合成 II 型胶原蛋白, 缓解骨关节炎。一些以 II 型胶原蛋白为主的软骨组织经酶解制备的软骨胶原蛋白肽能使机体产生免疫耐受, 能有效地抑制关节组织内部的自身免疫反应, 对骨关节炎有明显的防治功效<sup>[5]</sup>。动物的软骨组织中富含胶原蛋白、硫酸软骨素和矿物质元素等生物活性物质<sup>[6]</sup>。这些活性成分对关节炎、骨质疏松等退行性骨关节疾病具有潜在改善和治疗作用, 是制备骨健康类功能食品的重要原料。

我国肉鸡产业发达, 2019 年鸡肉产量高达 1380 万 t, 位居世界第二<sup>[7]</sup>。肉鸡在加工过程中产生大量的骨副产物, 这些副产物并没有被合理利用, 大多被当作废弃物直接丢弃或用于饲料生产, 造成了严重的环境污染和资源浪费。因此, 鸡骨副产物的高值化加工利用意义重大。鸡胸软骨作为肉鸡加工的主要副产品之一, 其水解物对大鼠骨关节炎具有显著免疫调节作用<sup>[8]</sup>, 但是软骨水解物中包含了骨多肽、骨多糖和硫酸软骨素等组分, 具体哪些功能物质发挥了主要抗炎活性尚无明确定论。

本研究以鸡胸软骨为原料, 通过制备鸡胸软骨水解物、鸡胸软骨胶原蛋白肽和硫酸软骨素对其进行结构表征。并以碘乙酸钠诱导关节炎大鼠为动物模型, 通过斜坡实验探究了鸡胸软骨水解物对大鼠关节炎的缓解作用。并通过对关节炎大鼠中三种主要炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 的分泌影响, 进一步分析鸡胸软骨水解物中 II 型胶原蛋白肽和硫酸软骨素在抗炎活性中发挥的作用, 明确鸡胸软骨水解物中抗炎活性成分, 为抗骨关节炎活性功能性食品开发提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鸡胸软骨, 来自 42 日龄成年白羽鸡, 由河南 PROTIL 生物技术有限公司提供, 将剔除肉和筋膜的鸡胸软骨保存于 -20 °C 冰箱备用。硫酸软骨素 A 标准品和硫酸软骨素 ABC 酶 (50~250 U/mg), 美国 Sigma 公司。硫酸皮肤素和肝素, 美国 Medchem 公司。木瓜蛋白酶 (800 U/mg) 和胰蛋白酶 (1:250), 北京 Solarbio 科技有限公司。软骨类不饱和二糖标准品  $\Delta$ Di0 S ( $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc),  $\Delta$ Di4 S ( $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc-4 S),  $\Delta$ Di6 S ( $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc-6 S),  $\Delta$ Di2,4 diS ( $\Delta$ Di-dis B,  $\Delta$ UA-2 S-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc-4 S),  $\Delta$ Di2,6 diS ( $\Delta$ Di-dis D,  $\Delta$ UA-2 S-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc-6 S),  $\Delta$ Di4,6 diS ( $\Delta$ Didis,  $\Delta$ UA-4 S-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc-6 S),  $\Delta$ Di2,4,6 triS ( $\Delta$ Di tris,  $\Delta$ UA-2 S-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc-4 S,6 S), 英国 Iduron 公司。IL-1 $\beta$  Elisa 试剂盒、TNF- $\alpha$  Elisa 试剂盒、PGE-2 Elisa 试剂盒, 南京建成生物有限公司。

实验动物: 47 只 SD 健康雄性大鼠 (许可证号: SYXK(京)2018-0033), 由北京福纳康生物技术有限公司提供, 5~6 周龄, 体重 125 g~150 g, 按照标准饲养条件饲养, 室内温度 22 °C~25 °C, 湿度为 50%~60%, 光照为每 12 h 昼夜交替, 饮用纯净水, 使用标准饲料适应性饲养 2 周后, 再进行实验。本文研究所做动物实验均获得伦理委员会批准。

### 1.2 仪器与设备

Agilent1100 氨基酸分析仪, 美国安捷伦公司。TENSOR27 傅立叶红外光谱仪, 瑞士 Bruker 公司。ICS-300 高效液相色谱仪, 美国戴安公司。FD-1A-50 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司。MOS-450 圆二色光谱仪, 法国 Biologic 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 鸡胸软骨水解物活性成分的制备

软骨解冻后放入烧杯中, 烧杯中加入蒸馏水, 软骨与蒸馏水的固液比为 1:2.5 (W/V)。在 120 °C (0.1

MPa) 条件下热压处理 90 min。将热压后的软骨液化液在 1200 r/min 条件下匀质 20 s, 并用六层纱布进行过滤除去残渣。向滤液中加入蒸馏水, 调节可溶性固形物含量至 2.0, 加入胰蛋白酶 (0.13%), 60 °C 条件下酶解 2 h。加入木瓜蛋白酶 (0.1%), 60 °C 条件下继续酶解 2 h。反应结束后, 沸水加热 5 min, 进行灭酶处理。将酶解后的软骨液化液用离心机离心, 取上层清液。将离心后的上层清液放入冷冻干燥机中, 冻干后的样品即为软骨水解物样品。

参照沈青山<sup>[9]</sup>的方法, 将酶解后的上层清液用 0.45 μm 的微滤膜进行过滤, 得到第一截留物和第一滤液, 将第一滤液加入等量蒸馏水, 在 10 ku 的超滤膜条件下, 进行六次循环过滤, 蠕动泵转速设置为 100 r/min, 得到第二截留物和第二滤液。将第一截留物与第二滤液进行合并后用冷冻干燥机进行冻干, 即为胶原蛋白肽样品。将第二截留物用冷冻干燥机进行干燥即为硫酸软骨素样品。

### 1.3.2 提取率计算

胶原蛋白肽提取率=冻干所得的胶原蛋白肽质量/鸡胸软骨质量(干重)×100%

硫酸软骨素提取率=冻干所得的硫酸软骨素质量/鸡胸软骨质量(干重)×100%

### 1.3.3 扫描电镜

将软骨水解物, 胶原蛋白肽和硫酸软骨素样品在 2.5%戊二醛中室温下固定 4 h, 再用 1%锇酸固定 2 h, 蒸馏水除去锇酸。用乙醇进行分级脱水(30%~100%), 样品用临界点进行干燥。将所有样品固定在铝制短管上, 涂上金。在 10 kV 加速电压下观察样品微观结构, 放大倍数为 150×和 2000×<sup>[10]</sup>。

### 1.3.4 傅里叶红外光谱

将软骨水解物、胶原蛋白肽、硫酸软骨素样品与硫酸软骨素 A 标准品分别与 KBr 固体 (1:200) 充分混匀研磨后, 进行压片, 使用傅里叶变换红外光谱仪, 在 4000~400 cm<sup>-1</sup> 范围内, 分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>, 频率为 16 次条件下进行扫描<sup>[11]</sup>。

### 1.3.5 氨基酸分析

分别称取 100 mg 软骨水解物和胶原蛋白肽样品, 溶于 10 mL 的 6 mol/L HCl 中, 充氮气 3 min, 微沸状态时密封, 110 °C 水解 24 h, 加入 5 mL 10 mol/L NaOH 进行中和, 定容后用双层滤纸过滤, 15000 r/min 条件下离心 10 min 后取上清液于氨基酸自动分析仪分析<sup>[12]</sup>。

### 1.3.6 肽分子量分布

参考叶燕军<sup>[13]</sup>的方法, 用安捷伦液相色谱仪(安捷伦 HPLC1260-II) 测定软骨水解物和胶原蛋白

肽样品的肽分子量分布, 色谱柱 TSK gel G2000 SWXL (7.8×300 mm, TOSOH, Tokyo, Japan), 在 214 nm 处检测。流动相为乙腈/水/三氟乙酸(45/55/0.1, V/V/V), 流速为 0.5 mL/min。柱温为 40 °C, 进样体积为 10 μL。以细胞色素 C (12384 u)、抑肽酶 (6495 u)、杆菌肽 (1421 u)、四肽 (451 u) 和二肽 (146 u) 为标准品, 分子量校准曲线 ( $y=-3.904x+27.693$ ,  $R^2=0.9832$ )。

### 1.3.7 胶原蛋白肽样品紫外光谱与圆二色性分析

将胶原蛋白肽样品溶于 0.05 mol/L 醋酸 (HAc) 溶液中, 配制成浓度为 0.3 mg/mL 的溶液。以 0.05 mol/L 的 HAc 溶液作为空白, 在 190~500 nm 波长下进行紫外光谱检测<sup>[14]</sup>。

将胶原蛋白肽样品溶于 0.05 mol/L 醋酸 (HAc) 溶液, 配成浓度为 0.3 mg/mL 的溶液, 在 190~250 nm 波长下平均扫描 3 次<sup>[15]</sup>。

### 1.3.8 硫酸软骨素样品琼脂糖凝胶电泳

参考 Volpi N<sup>[16]</sup>的方法, 对所提硫酸软骨素样品进行琼脂糖凝胶电泳分析。首先配制硫酸软骨素 ABC 酶缓冲液 (33 mM Tris-HCl、pH=6.2、33 mM 醋酸钠和 1 mU 软骨素 ABC 酶), 保存备用。将硫酸软骨素样品, 硫酸软骨素 A 标准品, 硫酸皮肤素和肝素溶于硫酸软骨素 ABC 酶缓冲液中, 配置为 5 mg/mL 的样品, 在 37 °C 下酶解 12 h。将 20 μL 硫酸软骨素 ABC 酶处理前后的硫酸软骨素样品, 硫酸软骨素 A 标准品, 硫酸皮肤素和肝素进行琼脂糖凝胶电泳。电泳结束后在 0.1%十六烷基三甲基溴化铵溶液中浸泡 6 h 后用甲苯胺蓝染色 6 h。背景用蒸馏水淡去后进行观察分析。

### 1.3.9 二糖组成分析及蛋白含量测定

参考 Maccrri F<sup>[17]</sup>的方法, 将提取的硫酸软骨素样品加入硫酸软骨素 ABC 酶缓冲液中, 配置为 5 mg/mL 的样品, 37 °C 条件下酶解 12 h, 酶解后在 100 °C 条件下 5 min 使酶失活, 冷却至室温后 13000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 冷冻备用。酶解后样品采用 HPLC 法进行二糖组成分析, 色谱柱为 Ultimate SAX 型色谱柱; 检测波长为 232 nm; 柱温为 40 °C; 流速为 0.75 mL/min; 流动相 A 为 1 M 的氯化钠 (pH 4), 流动相 B 为 50 mM (pH 4), 洗脱程序在 0~5 min, A 保持 0%; 在 5~35 min, 进行梯度洗脱。进样量为 10 μL, 用标准双糖进行定性定量分析。

采用 Lowry 法对硫酸软骨素样品中蛋白含量进行测定<sup>[18]</sup>。

### 1.3.10 鸡胸软骨活性成分的抗炎活性试验

将 SD 大鼠随机分为正常组 (7 只) 和关节炎组

(40 只)。动物造模采用碘乙酸钠诱导,以观察到大鼠关节肿胀为建模成功标准,最终判定建模成功 35 只,将 35 只建模成功的骨关节炎大鼠随机分为 5 个实验组,每组 7 只,具体分组及饲料配置如下:模型组,以灌胃方式给予生理盐水。阳性对照组,灌胃双醋瑞因胶囊 8.0 mg/(kg·d)。软骨水解物处理组,灌胃软骨水解物剂量为 500 mg/(kg·d)。胶原蛋白肽处理组,灌胃胶原蛋白肽剂量为 365 mg/(kg·d)。硫酸软骨素处理组,灌胃硫酸软骨素剂量为 100 mg/(kg·d)。从建模成功后第 1 d 开始连续给药 28 d,每日 1 次,上述药品溶于生理盐水中进行灌胃。模型组和空白对照组通过灌胃给予相同体积的生理盐水,同样连续 28 d,每日 1 次。

(1)斜板实验:在建模后灌胃第 0 d(灌胃前 1 d)、7 d、14 d、21 d、28 d,每组取 5 只大鼠置于 25°斜面上适应 1 min,之后逐渐增加斜板的角。当大鼠可在一定角度坚持 5 s 且不滑落,则继续增加角度,直至无法在该斜板上坚持 5 s。记录大鼠所能坚持的最大角度。每只测量 3 次,取平均值。

(2)在第 28 d,将各组大鼠麻醉后摘眼球取血,静置 1 h 后在 4℃,3500 r/min 条件下离心 15 min。取上清液按照 ELISA 试剂盒说明书进行血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PGE-2 的含量测定。

### 1.3.11 数据处理及分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,试验设 3 个平行,用 Origin 8.0 软件对分析数据作图,采用 SPSS 19.0 软件,对数据进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶原蛋白肽和硫酸软骨素的得率

干燥软骨的主要成分是蛋白质(71.74%)和碳水化合物(21.70%),其次为脂肪(0.24%)和灰分(6.32%),表明鸡胸软骨可用于分离胶原蛋白肽和硫酸软骨素。取 50 g 鸡胸软骨(以干重计),提取可得胶原蛋白肽 34.28 g(以干重计),硫酸软骨素 9.41 g(以干重计)。经计算,鸡胸软骨胶原蛋白肽的提取率为 68.32%(以干重计)。硫酸软骨素的得率为 18.82%(以干重计)。

### 2.2 鸡胸软骨水解物的表征分析

#### 2.2.1 微观结构观察

通过扫描电镜对软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素样品微观结构进行观察,结果如图 1 所示,冻干后的软骨水解物样品为小片鳞片状,大小不均匀,

表面光滑。胶原蛋白肽样品呈棒状分布,大小均匀,表面有凸起。硫酸软骨素样品呈薄片树叶状分布,大小均匀,表面不光滑。该结果与 Zhou<sup>[19]</sup>等、Barkat<sup>[20]</sup>等研究结果一致。

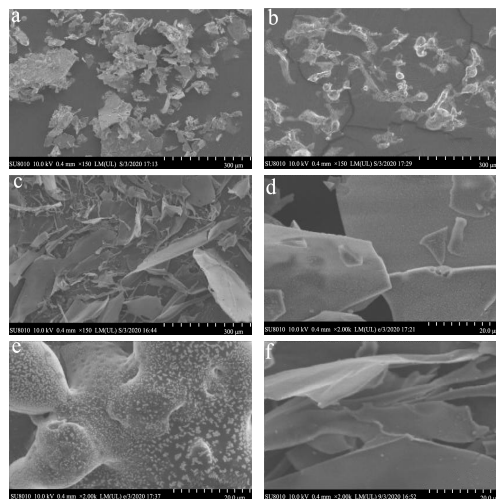


图 1 扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron microscope diagram

注: a、d: 软骨水解物; b、e: 胶原蛋白肽; c、f: 硫酸软骨素。a~c 放大倍数:  $\times 150$ ; d~f 放大倍数:  $\times 2000$ 。

#### 2.2.2 傅里叶红外光谱

由图 2 可知,软骨水解物样品中特征吸收带酰胺 A 带、酰胺 B 带、酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带都能被检测到。根据 Muyonga<sup>[21]</sup>报道,酰胺 A 带与 N-H 伸缩振动和氢键有关,软骨水解物样品的酰胺 A 带位于 3363  $\text{cm}^{-1}$  波长处,表明 N-H 基团参与了氢键形成。酰胺 B 带位于 2980  $\text{cm}^{-1}$  波长处,这是由于  $-\text{CH}_2$  伸缩振动产生的。酰胺 I 带位于 1658 波长处,这是由于 C=O 键的伸缩振动引起的。酰胺 II 带位于 1554  $\text{cm}^{-1}$  波长处,这是由于 N-H 键的弯曲振动和 C-H 键的伸缩振动引起的。酰胺 III 带位于 1253  $\text{cm}^{-1}$  波长处,通常由 N-H 弯曲振动和 C=N 伸缩振动有关<sup>[22]</sup>。与硫酸软骨素样品的红外图谱相比,软骨水解物图谱在 1658  $\text{cm}^{-1}$  和 1554  $\text{cm}^{-1}$  处出现了新的吸收峰<sup>[23]</sup>,它们分别归属于酰胺 I 带和酰胺 II 带。

由图 2 可以看出,试验中所制得的硫酸软骨素样品与硫酸软骨素 A 标准品的红外光谱图基本一致。硫酸软骨素样品和硫酸软骨素 A 标准品分别在 3350  $\text{cm}^{-1}$  和 3371  $\text{cm}^{-1}$  处出现了一个较宽的吸收峰,表明组中含有硫酸软骨素的羟基结构<sup>[24]</sup>。在 2930  $\text{cm}^{-1}$  附近出现较弱的吸收峰,这与  $\text{CH}_2$  或  $\text{CH}_3$  的 C-H 伸缩振动有关。在 1550  $\text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰表明样品中有羰基( $-\text{C}=\text{O}-$ )和 N-H 键的存在,表明各组中存在乙酰氨基结构。在 1251  $\text{cm}^{-1}$  和 1045  $\text{cm}^{-1}$  处产生的吸收峰是由于 S-O 和 -C-O-S 的伸缩振动产生的。以上光

谱特征与文献报道一致,周斯仪<sup>[25]</sup>等报道指出, A 型 CS (CSA) 的硫酸基在 C4 位,产生的轴向伸缩振动峰在 850 cm<sup>-1</sup> 附近。王俊<sup>[24]</sup>等报道指出, 850 cm<sup>-1</sup> 的峰可以被认为软骨素-4-硫酸盐, 820 cm<sup>-1</sup> 的峰值表示软骨素-6-硫酸盐。本试验中硫酸软骨素样品的峰值在 852 cm<sup>-1</sup> 和 827 cm<sup>-1</sup> 处,表明样品主要由硫酸软骨素 A 组成。

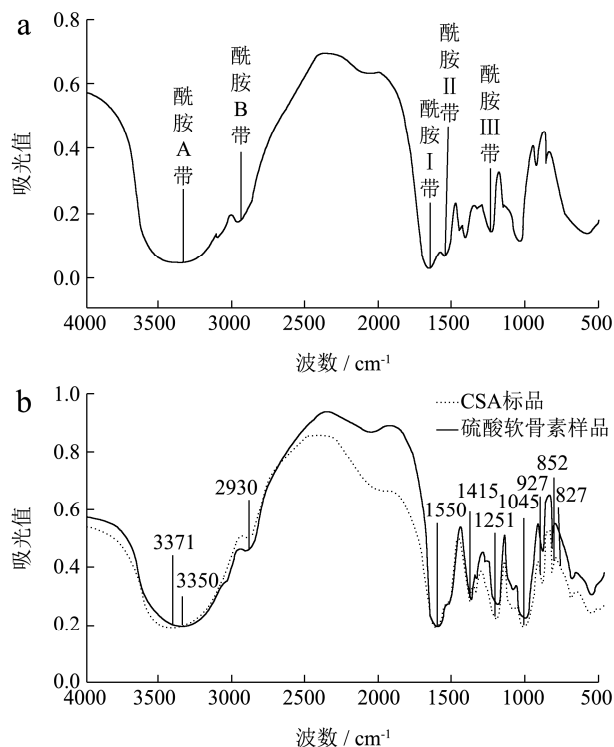


图2 傅里叶红外光谱图

Fig.2 Fourier infrared spectrum

注: a: 软骨水解物; b: 硫酸软骨素和硫酸软骨素 A 标准品。

### 2.2.3 氨基酸分析

通过氨基酸分析仪对软骨水解物和胶原蛋白肽样品进行分析,结果如表 1 所示,软骨水解物样品氨基酸含量与胶原蛋白肽样品差异性显著 ( $p < 0.05$ ),且明显低于胶原蛋白肽样品。软骨水解物和胶原蛋白肽样品中氨基酸含量较高的为甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、脯氨酸(Pro)、精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)和天冬氨酸(Asp),其中胶原蛋白肽样品中甘氨酸含量最高,可达 14.05 mg/g,其次为谷氨酸 9.09 mg/g 和脯氨酸 7.44 mg/g。

酸 7.44 mg/g。

表 1 软骨水解物和胶原蛋白肽样品的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of cartilage hydrolysates and collagen peptide samples

氨基酸	含量/(mg/g)	
	软骨水解物	胶原蛋白肽
天冬氨酸(Asp)	3.11±0.04 <sup>c</sup>	4.64±0.11 <sup>a</sup>
苏氨酸(Thr)	1.54±0.02 <sup>c</sup>	2.22±0.02 <sup>a</sup>
丝氨酸(Ser)	1.33±0.01 <sup>d</sup>	1.92±0.02 <sup>a</sup>
谷氨酸(Glu)	6.02±0.04 <sup>c</sup>	9.09±0.04 <sup>a</sup>
甘氨酸(Gly)	9.34±0.01 <sup>d</sup>	14.05±0.08 <sup>a</sup>
丙氨酸(Ala)	3.70±0.01 <sup>d</sup>	5.52±0.01 <sup>a</sup>
半胱氨酸(Cys)	0.15±0.01 <sup>d</sup>	0.20±0.01 <sup>b</sup>
缬氨酸(Val)	1.40±0.01 <sup>c</sup>	2.01±0.01 <sup>a</sup>
甲硫氨酸(Met)	0.73±0.02 <sup>d</sup>	1.26±0.02 <sup>a</sup>
异亮氨酸(Ile)	1.44±0.01 <sup>b</sup>	1.38±0.02 <sup>c</sup>
亮氨酸(Leu)	2.59±0.03 <sup>c</sup>	3.17±0.02 <sup>b</sup>
酪氨酸(Tyr)	0.30±0.01 <sup>c</sup>	0.83±0.01 <sup>a</sup>
苯丙氨酸(Phe)	1.56±0.01 <sup>c</sup>	2.23±0.02 <sup>a</sup>
赖氨酸(Lys)	1.52±0.01 <sup>c</sup>	2.03±0.02 <sup>a</sup>
组氨酸(His)	0.58±0.01 <sup>c</sup>	0.69±0.01 <sup>b</sup>
精氨酸(Arg)	3.71±0.02 <sup>c</sup>	5.15±0.06 <sup>a</sup>
脯氨酸(Pro)	5.07±0.09 <sup>d</sup>	7.44±0.10 <sup>a</sup>

注: 数据均为差±标准差,不同字母表示差异性显著 ( $p < 0.05$ ); 相同字母表示差异性不显著 ( $p > 0.05$ )。表 2、4、5 同。

### 2.2.4 肽分子量分布

利用高效液相色谱测得软骨水解物和胶原蛋白肽样品的肽分子量分布。由表 2 可知,软骨水解物与胶原蛋白肽样品中肽分子量分布差异性显著,两种样品中肽分子量分布大多集中于 1000 u 以下,其中胶原蛋白肽样品中肽分子量在 1000 u 以下的占了 92.38%, 500 u 以下的占 73.85%,表明胶原蛋白肽样品中主要为小分子肽。张江涛<sup>[26]</sup>等研究发现相对分子质量的大小,直接决定肽的吸收速率,分子量 1000 u 以下的肽转运吸收存在独立的系统以及相应的载体,各种肽之间转运无竞争性与抑制性等特点。因此,这种寡肽具有很大的潜力作为生物活性肽使用。

表 2 软骨水解物和胶原蛋白肽样品的肽分子量含量

Table 2 Peptide content of cartilage hydrolysates and collagen peptide samples

样品	<500 u	500~1000 u	1000~2000 u	>2000 u
软骨水解物	59.32±0.61 <sup>b</sup>	23.05±0.60 <sup>a</sup>	13.57±0.20 <sup>a</sup>	4.06±0.13 <sup>b</sup>
胶原蛋白肽	73.85±1.27 <sup>a</sup>	18.53±0.19 <sup>b</sup>	4.77±0.08 <sup>b</sup>	2.85±0.02 <sup>c</sup>

2.2.5 胶原蛋白肽样品紫外光谱和圆二色光谱

胶原蛋白肽样品的紫外吸收光谱图显示其在 230 nm 处有一个较高的吸收峰，这与肽链中含有羰基 C=O、羧基 COOH、酰胺基 CONH<sub>2</sub> 等发色基团有关<sup>[27]</sup>。有研究表明，波长在 185~245 nm 称为远紫外区，245~320 nm 称为近紫外区。远紫外区为蛋白质肽链的吸收峰，反映了主链的构象<sup>[28]</sup>。胶原蛋白肽样品的圆二色谱图显示其在 197 nm 处存在一个负峰，在 223 nm 处存在一个正峰，表明所提取的样品符合胶原蛋白肽的典型特征。

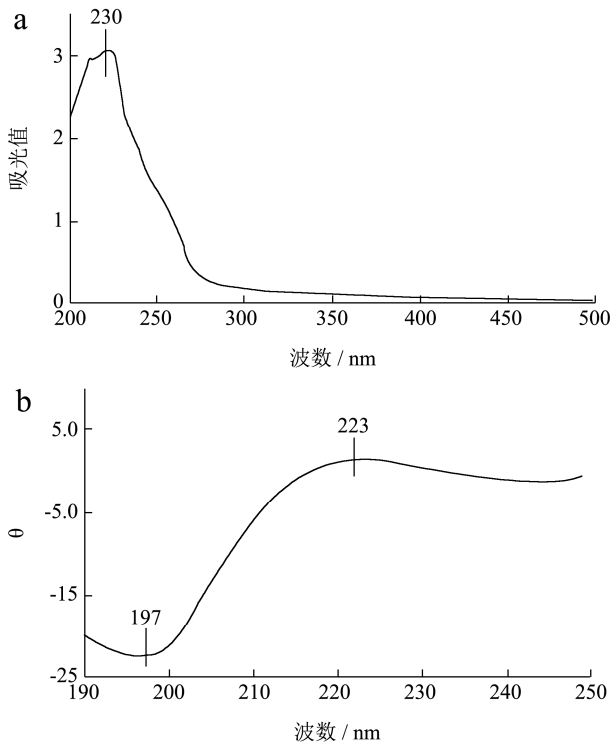


图3 胶原蛋白肽样品紫外光谱和圆二色光谱

Fig.3 UV spectra and CD spectra of collagen peptide samples

注：a：紫外光谱图；b：圆二色光谱图。

2.2.6 硫酸软骨素样品琼脂糖凝胶电泳、二糖组成分析及蛋白含量测定

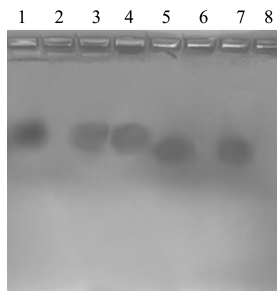


图4 琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose-gel electrophoresis

注：1：硫酸皮肤素；2：硫酸皮肤素+硫酸软骨素 ABC 酶；3：肝素；4：肝素+硫酸软骨素 ABC 酶；5：硫酸软骨素 A 标准品；6：硫酸软骨素 A 标准品+硫酸软骨素 ABC 酶；7：硫

尿酸软骨素样品；8：硫酸软骨素样品+硫酸软骨素 ABC 酶。

对提取的硫酸软骨素样品进行琼脂糖凝胶电泳分析，图4为硫酸皮肤素、肝素、硫酸软骨素 A 标准品和硫酸软骨素样品及其相对应的硫酸软骨素 ABC 酶酶解产物的电泳图。由图可知硫酸软骨素 ABC 酶可以水解硫酸软骨素样品，硫酸软骨素 A 标准品和硫酸皮肤素，但不能水解肝素。硫酸软骨素样品与硫酸软骨素 A 标准品迁移速率大致相同，且迁移速率大于硫酸皮肤素和肝素，初步说明试验所得样品为硫酸软骨素。

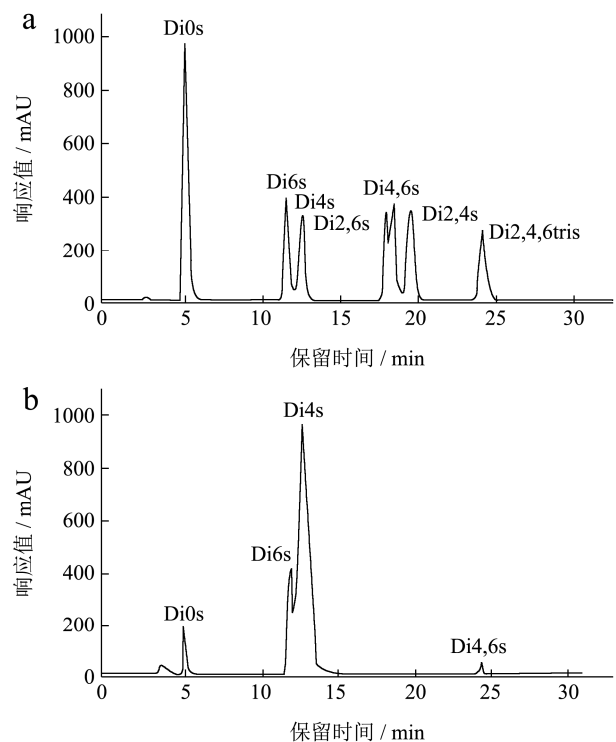


图5 二糖标准品和硫酸软骨素样品的高效液相色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of disaccharide standard and chondroitin sulfate sample

注：a：二糖标准品；b：硫酸软骨素样品。

表3 硫酸软骨素样品的二糖组成及蛋白含量

Table 3 Composition and protein content of disaccharide in chondroitin sulfate sample

Parameters	二糖样品
$\Delta$ Di0s ( $\Delta$ UA-GalNAc)/%	5.80±0.09
$\Delta$ Di6s ( $\Delta$ UA-GalNAc,6s)/%	18.89±1.61
$\Delta$ Di4s ( $\Delta$ UA-GalNAc,4s)/%	74.62±2.01
$\Delta$ Di2,6dis ( $\Delta$ UA2s-GalNAc,6s)/%	-
$\Delta$ Di4,6dis ( $\Delta$ UA4s-GalNAc6s)/%	0.69±0.03
$\Delta$ Di2,4dis ( $\Delta$ UA2s-GalNAc4s)/%	-
$\Delta$ Di2,4,6tris ( $\Delta$ UA2s-GalNAc4s,6s)/%	-
4s/6s	4.03±0.39
蛋白含量/%	8.13±0.36

表4 各组大鼠斜板支持角度

Table 4 Support angle of oblique plates in each group

组别	斜板角度/°				
	第 0 d	第 7 d	第 14 d	第 21 d	第 28 d
正常组	53.8±0.8 <sup>a</sup>	53.9±0.7 <sup>a</sup>	54.2±0.7 <sup>a</sup>	54.1±0.7 <sup>a</sup>	54.3±0.8 <sup>a</sup>
模型组	35.0±0.9 <sup>b</sup>	35.0±0.7 <sup>d</sup>	35.6±1.0 <sup>e</sup>	36.0±0.7 <sup>e</sup>	36.5±0.7 <sup>f</sup>
鸡胸软骨水解物组	35.8±0.6 <sup>b</sup>	39.8±0.6 <sup>bc</sup>	43.4±0.5 <sup>c</sup>	47.6±0.6 <sup>c</sup>	49.0±0.9 <sup>c</sup>
胶原蛋白肽组	35.9±0.7 <sup>b</sup>	39.2±1.2 <sup>bc</sup>	41.7±0.9 <sup>d</sup>	44.0±0.7 <sup>d</sup>	45.8±0.7 <sup>e</sup>
硫酸软骨素组	35.7±0.6 <sup>b</sup>	38.4±1.2 <sup>c</sup>	41.7±1.0 <sup>d</sup>	44.2±1.5 <sup>d</sup>	47.3±0.6 <sup>d</sup>
阳性组	35.7±0.8 <sup>b</sup>	40.7±1.0 <sup>b</sup>	46.4±0.5 <sup>b</sup>	50.2±1.3 <sup>b</sup>	52.2±0.9 <sup>b</sup>

表5 大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平的比较Table 5 Comparison of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PGE-2 levels in rats of each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数(n)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	PG-E2/(pg/mL)
正常组	7	9.68±3.62 <sup>c</sup>	11.16±4.42 <sup>c</sup>	40.09±6.11 <sup>d</sup>
模型组	7	39.90±9.64 <sup>a</sup>	22.38±4.12 <sup>a</sup>	89.41±8.86 <sup>a</sup>
鸡胸软骨水解物组	7	11.71±2.97 <sup>c</sup>	17.75±2.07 <sup>b</sup>	54.19±9.86 <sup>c</sup>
胶原蛋白肽组	7	21.42±4.47 <sup>b</sup>	19.31±2.28 <sup>ab</sup>	73.41±9.88 <sup>b</sup>
硫酸软骨素组	7	19.02±3.04 <sup>b</sup>	16.97±1.51 <sup>b</sup>	67.11±7.37 <sup>b</sup>
阳性组	7	10.14±2.44 <sup>c</sup>	16.32±2.98 <sup>b</sup>	48.96±7.15 <sup>cd</sup>

通过高效液相色谱法对硫酸软骨素样品中二糖组进行测定,图5为二糖标准品和硫酸软骨素样品的高效液相色谱图。由表3可知,硫酸软骨素样品主要由单硫酸基二糖  $\Delta$ Di4s 和  $\Delta$ Di6s 构成,非磺化二糖  $\Delta$ Di0s 含量为 5.80%,二硫酸基二糖  $\Delta$ Di4,6dis 的含量为 0.69%,其他二硫酸基二糖  $\Delta$ Di2,6dis 和  $\Delta$ Di2,4dis 和三硫酸基二糖  $\Delta$ Di2,4,6tris 含量极微,低于 0.01%。样品中 4s/6s 值为 4.03,这与傅里叶红外光谱结果一致,表明样品主要由硫酸软骨素 A 组成。这与文献研究结果一致,周斯仪<sup>[24]</sup>等研究表明,F4 组分中不含  $\Delta$ UA2s,且主要的二糖单位为  $\Delta$ Di4s,表明组分 F4 主要为硫酸软骨素 A。通过 Lowery 法获得蛋白质标准曲线方程为  $y=0.0004x+0.0624$ ,  $R^2=0.9915$ 。经计算得到硫酸软骨素样品中蛋白含量为 8.13%,表明硫酸软骨素样品的相对纯度为 91.87%。

## 2.3 鸡胸软骨水解物的抗炎活性研究

### 2.3.1 斜板实验

与正常组大鼠斜板支持角度 53.8°相比,造模后各组大鼠的斜板支持角度显著降低,差异具有统计学意义 ( $p<0.05$ )。使用鸡胸软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素进行干预后,大鼠斜板支持角度逐渐增大。表明使用鸡胸软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素可增加大鼠斜板支撑角度,减轻大鼠的关节炎症反应。Sun Y<sup>[33]</sup>等研究发现使用鲟鱼骨硫酸软骨素对骨性关节炎大鼠的下肢力量恢复有一定的治疗效果。在第 28

d,鸡胸软骨水解物组大鼠斜板支持角度为 49.0°,明显大于胶原蛋白肽组 45.8°和硫酸软骨素组 47.3°,差异具有统计学意义 ( $p<0.05$ )。硫酸软骨素组大鼠支持角度为 47.3°显著大于胶原蛋白肽组 45.8°,差异具有统计学意义 ( $p<0.05$ )。这一结果表明,鸡胸软骨水解物中胶原蛋白肽与硫酸软骨素联用可能具有更好的抗炎效果,且鸡胸软骨水解物中硫酸软骨素对碘乙酸诱导的关节炎症具有较好的缓解作用。

### 2.3.2 大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平的比较

类风湿性关节炎症状的发生发展与机体炎症反应密切相关。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  在关节炎的发生和发展中起重要作用, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  和其他炎症因子有协同作用,可以抑制软骨细胞 II 型胶原的形成<sup>[29]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种具有多种生物学效应的细胞因子,能够促使 T 细胞产生各种炎症因子,与关节炎和滑膜细胞的增殖密切相关<sup>[30]</sup>。IL-1 $\beta$  是一种重要的细胞因子,与滑膜炎和介导关节软骨破坏有关。PGE-2 是细胞生长的重要调节因子,也是滑膜和关节疼痛的直接原因之一<sup>[31]</sup>。如表 5 所示,模型组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平分别为 39.90 pg/mL、22.38 pg/mL、89.41 pg/mL,均高于正常组,差异具有统计学意义 ( $p<0.05$ );软骨水解物组、胶原蛋白肽组和硫酸软骨素组的关节炎模型大鼠中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平出现明显的下调,均低于模型组,差异具有统计学意义 ( $p<0.05$ )。说明使用软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素对关节炎模型大鼠进行干预,能够下调炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、



PGE-2 的水平,减轻关节炎大鼠炎症反应,从而起到抗炎作用。曹慧<sup>[32]</sup>等研究发现使用鸡胸软骨酶解产物能够降低炎症因子 TNF- $\alpha$  水平,提示其治疗作用机理可能与抑制炎症因子的分泌有关。Sun Y<sup>[33]</sup>等研究发现使用鲟鱼骨硫酸软骨素能够抑制碘乙酸钠所致的大鼠关节炎中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 的水平,减轻关节炎大鼠的疼痛反应。本文还发现软骨水解物组大鼠 TNF- $\alpha$ 、PGE-2 水平分别为 11.71 pg/mL、54.19 pg/mL,均低于胶原蛋白肽和硫酸软骨素组,差异具有统计学意义 ( $p < 0.05$ ),说明鸡胸软骨水解物中胶原蛋白肽和硫酸软骨素可能起到协同抗炎作用。使用软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素对大鼠 IL-1 $\beta$  水平影响差异不显著,考虑可能是由于胶原蛋白肽和硫酸软骨素的比例问题,具体原因需要进一步的探究。

### 3 结论

3.1 鸡胸软骨胶原蛋白肽和硫酸软骨素的得率分别为 68.32% (以干重计) 和 18.82% (以干重计)。软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素扫描电镜结果显示三者的微观结构存在明显差异。傅里叶红外光谱结果表明,软骨水解物中特征吸收带酰胺 A 带、酰胺 B 带、酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带都能被检测到,硫酸软骨素样品中含有软骨素-4-硫酸盐和软骨素-6-硫酸盐的典型特征,表明硫酸软骨素样品主要由硫酸软骨素 A 组成。氨基酸分析结果表明胶原蛋白肽中甘氨酸含量最高,可达 14.05 mg/g,其次为谷氨酸(9.09 mg/g)和脯氨酸(7.44 mg/g)。紫外光谱图与圆二色性结果共同验证了所提取的样品具有胶原蛋白肽的典型特征,通过高效液相色谱测得胶原蛋白肽中肽分子量在 1000 u 以下的占 92.38%,表明胶原蛋白肽样品中主要为小分子肽。琼脂糖凝胶电泳、二糖组成分析结果再次表明硫酸软骨素样品主要由硫酸软骨素 A 组成。通过 Lowery 法计算得到所提取的硫酸软骨素样品相对纯度为 91.87%。

3.2 鸡胸软骨水解物对大鼠骨关节炎具有调节作用,迄今还未有文献报道其抗炎活性。本研究以碘乙酸钠诱导的关节炎大鼠为模型,通过斜板实验结果显示,使用鸡胸软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素可增加大鼠斜板支撑角度,减轻大鼠的关节炎炎症反应。胶原蛋白肽和硫酸软骨素可能起到协同抗炎效果,且鸡胸软骨水解物中硫酸软骨素对碘乙酸钠诱导的关节炎炎症有较好的缓解作用。通过探讨对大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平的比较,表明使用软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素对关节炎模型大鼠进行干预后, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 水平出现明显的下调,说

明使用软骨水解物、胶原蛋白肽和硫酸软骨素能够下调炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 的水平,减轻关节炎大鼠炎症反应,从而起到抗炎作用,为进一步探究胶原蛋白肽和硫酸软骨素的协同抗炎效果提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 王海燕,孙君社,刘爱青,等.非变性 II 型胶原蛋白改善骨关节炎的研究进展[J].食品工业科技,2019,40(15):329-332  
WANG Hai-yan, Sun Jun-she, LIU Ai-qing, et al. Advances in the improvement of osteoarthritis by non-denatured type II collagen [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(15): 329-332
- [2] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55(12): 1531-1536
- [3] 刘爱青,梁建,王海燕,等. II 型胶原蛋白工业化生产工艺及产品技术指标分析[J].肉类工业,2016,2:31-34  
LIU Ai-qing, LIANG Jian, WANG Hai-yan, et al. Analysis on industrial production technology and technical index of collagen type II [J]. Meat Industry, 2016, 2: 31-34
- [4] Guzman F, Marshall S, Cardenas C, et al. Antibacterial activity of short cationic model peptides [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 9(5): 253
- [5] 王池丽.酸酶两步法提取鸡胸软骨胶原蛋白的研究[J].食品工业,2014,1:65-68  
WANG Chi-li. Study on extraction of collagen from chicken breast cartilage by acid enzyme two-step method [J]. Food Industry, 2014, 1: 65-68
- [6] Yamada S, Sugahara K. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate [J]. Current Drug Discovery Technologies, 2008, 5(4): 289-301
- [7] 文杰.2019 年肉鸡产业形势分析、未来展望与对策建议[J].中国畜牧杂志,2020,3:17-21  
WEN Jie. Analysis, future prospect and countermeasures of broiler industry in 2019 [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry, 2020, 3: 17-21
- [8] 刘露露,曹慧,徐斐,等.鸡胸软骨 II 型胶原免疫活性肽的制备及其性质[J].食品科学,2015,36:84-88  
LIU Lu-lu, CAO Hui, XU Fei, et al. Preparation and properties of immunoactive peptide of type II collagen of chicken chest cartilage [J]. Food Science, 2015, 36: 84-88
- [9] Shen Q S, Zhang C H, Jia W, et al. Co-production of chondroitin sulfate and peptide from liquefied chicken sternal cartilage by hot-pressure [J]. Carbohydrate Polymers, 2019,



- 222: 115
- [10] 刘文颖,鲁军,宋莎莎,等.乌鸡低聚肽亚铁螯合物的分离纯化与结构鉴定[J].现代食品科技,2017,33(8):95-102  
LIU Wen-ying, LU Jun, SONG Sha-sha, et al. Isolation, purification and structural identification of oligopeptide ferrous chelates from black chicken [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 95-102
- [11] 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  
WEN Hui-fang, CHEN Li-li, BAI Chun-qing, et al. A comparative study on the physicochemical properties of gelatin from the different extraction methods [J]. Food Science, 2016, 37(1): 74-81
- [12] 张巧智,毕爽,马文君,等.水酶法水解液中大豆多肽的吸附纯化及其氨基酸组成分析[J].食品科学,2019,S1:426-434  
ZHANG Qiao-zhi, BI Shuang, MA Wen-jun, et al. Adsorption and purification of soybean polypeptide and analysis of amino acid composition in water enzymatic hydrolysis solution [J]. Food Science, 2019, S1: 426-434
- [13] 叶燕军,陈俊,翁武银.超滤膜分离鲍鱼内脏酶解物及其体外抗氧化活性的研究[J].现代食品科技,2015,5:130-136  
YE Yan-jun, CHEN Jun, WENG Wu-yin. Study on the isolation and antioxidant activity of abalone viscera by ultrafiltration membrane [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 5: 130-136
- [14] 刘良禹,朱慧颖,赵雪,等.鲛鳔鱼加工下脚料中胶原蛋白和硫酸软骨素综合提取及结构分析[J].食品科技,2018,43(12):148-153  
LIU Liang-yu, ZHU Hui-ying, ZHAO Xue, et al. Comprehensive extraction and structure analysis of collagen and chondroitin sulfate from the scrap of pomfret processing [J]. Food Technology, 2018, 43(12): 148-153
- [15] 张艳艳,刘海英.鸡胸软骨胶原的提取及其结构表征[J].安徽农业科学,2018,46(15):155-157,207  
ZHANG Yan-yan, LIU Hai-ying. Extraction and structural characterization of collagen from chicken thoracic cartilage [J]. Anhui Agricultural Science, 2018, 46(15): 155-157, 207
- [16] Volpi N, Maccari F. Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and stains-all [J]. Electrophoresis, 2002, 23(24), 4060-4066
- [17] Maccari F, Galeotti F, Volpi N. Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 129: 143-147
- [18] 王中江,江连洲,魏冬旭,等.pH 对大豆分离蛋白构象及表面疏水性的影响[J].食品科学,2012,33(11)  
WANG Zhong-jiang, JIANG Lian-zhou, WEI Dong-xu, et al. Effects of pH on conformation and surface hydrophobicity of soybean protein isolate [J]. Food Science, 2012, 33(11)
- [19] Zhou C, Li Y, Yu X, et al. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 74: 145-153
- [20] Barkat K, Ahmad M, Minhas M U, et al. Chondroitin sulfate-based smart hydrogels for targeted delivery of oxaliplatin in colorectal cancer: preparation, characterization and toxicity evaluation [J]. Polymer Bulletin, 2019
- [21] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 86(3): 325-332
- [22] Sugahara K, Mikami T, Uyama T, et al. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2003, 13(5): 612-620
- [23] Jahandideh F, Liu P, Wu J. Purification and identification of adipogenic-differentiating peptides from egg white hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2018, 259(SEP.1): 25
- [24] 王俊,张扬星,熊光权,等.鲟鱼软骨硫酸软骨素降解产物的结构分析[J].现代食品科技,2019,244(12):108-117  
WANG Jun, ZHANG Yang-xing, XIONG Guang-quan, et al. Structural analysis of chondroitin sulfate degradation products in sturgeon [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 244(12): 108-117
- [25] 周斯仪,钟赛意,苏伟明,等.鱼鳔类肝素的分离纯化与结构鉴定[J].食品科学,2019,40(15):84-91  
ZHOU Si-yi, ZHONG Sai-yi, SU Wei-ming, et al. Isolation, purification and structural identification of filiparin [J]. Food Science, 2019, 40(15): 84-91
- [26] 张江涛,王越群,毕园,等.三文鱼骨胶原低聚肽钙增加SD大鼠的骨密度[J].现代食品科技,2020,246(2):185-191  
ZHANG Jiang-tao, WANG Yue-qun, BI Yuan, et al. Bone mineral density (BMD) in rats SD increased by calcium oligopeptide in salmon bone collagen [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 246(2): 185-191

(下转第 207 页)