

牛筋膜胶原蛋白的提取及功能特性与结构分析

迪娜拉·海拉提¹, 杨尚霖², 任秀梅³, 陈炼红^{1*}

(1. 西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 6100041) (2. 阿坝职业学院畜牧与动物医学学院, 四川阿坝 623200) (3. 四川省甘孜藏族自治州畜牧业科学研究所, 四川甘孜 626099)

摘要: 该试验以牛筋膜为原料提取胶原蛋白并优化提取工艺, 测定其吸水性、吸油性、溶解性、乳化性、起泡性等特性, 并通过电子显微镜、紫外光谱、傅里叶变换红外光谱、氨基酸自动分析仪分析牛筋膜胶原蛋白的结构特征。结果表明: 牛筋膜最佳工艺为料液比 1:25、温度 80 °C、提取时间 12 h; 牛筋膜胶原蛋白的吸水性为 2.11 mL/g; 吸油性在 60 °C 达到最高 15.6 mL/g; 溶解性在 pH 值 10.0 时最高为 98.47%; 乳化性在 pH 值 2.0 时最高为 17.8 mL/g, 乳化稳定性在 pH 值 6.0 时最高为 88.9%; 起泡性、起泡稳定性均在 pH 值 6.0 时达到最高为 16.46%、74.2%。电子显微镜结果表明, 胶原蛋白呈现相互缠绕的曲状结构, 具有胶原的纤维特性; 紫外光谱结果表明: 牛筋膜胶原蛋白于 230 nm 附近有明显的吸收峰; 傅里叶变换红外光谱结果表明: 胶原蛋白存在酰胺 A、酰胺 B、酰胺 I、酰胺 II、酰胺 III, 具有完整的三螺旋结构; 氨基酸结果表明: 优化工艺后提取的蛋白符合胶原蛋白 Gly-Xaa-Yaa 的氨基酸组成特征。以上结果表明, 热水法提取胶原蛋白为结构完整的 I 型胶原蛋白, 该实验可为牛筋膜资源的进一步开发利用提供科学依据。

关键词: 牛筋膜; 胶原蛋白; 提取; 结构鉴定; 理化特性

文章编号: 1673-9078(2024)09-307-315

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0883

Extraction and Functional Characterisation and Structural Analysis of the Collagen from Bovine Fascia

DI NALA·Hailati¹, YANG Shanglin², REN Xiumei³, CHEN Lianhong^{1*}

(1.College of Food Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(2.Aba Vocational College, Faculty of Animal Husbandry and Animal Medicine, Aba 623200, China)

(3.Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture Institute of Animal Husbandry Science, Ganzi 626099, China)

Abstract: In this experiment, collagen was extracted from the raw material, bovine fascia, and the extraction process was optimized, the functional properties such as water absorption, oil absorption, solubility, emulsify capacity and foaming capacity were determined, and the structural characteristics of bovine fascia collagen were analyzed by electron microscopy, ultraviolet spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, and amino acid auto-analyser. The results showed that the optimal process of bovine fascia was 1:25 material-liquid ratio, 80 °C, and extraction time of 12 h; the water-absorbing capacity of bovine fascia collagen was 2.11 mL/g; the oil-absorbing capacity reached a maximum of 15.6 mL/g at 60 °C; the solubility reached a maximum of 98.47%

引文格式:

迪娜拉·海拉提, 杨尚霖, 任秀梅, 等. 牛筋膜胶原蛋白的提取及功能特性与结构分析[J]. 现代食品科技, 2024, 40(9):307-315.

DI NALA·Hailati, YANG Shanglin, REN Xiumei, et al. Extraction and functional characterisation and structural analysis of the collagen from bovine fascia [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 307-315.

收稿日期: 2023-07-21

作者简介: 迪娜拉·海拉提 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: 1727270622@qq.com

通讯作者: 陈炼红 (1967-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 民族食品资源开发, E-mail: lianhong_chen@163.com

at pH value 10.0; the emulsify capacity reached a maximum of 17.8 m²/g at pH value 2.0, and the emulsion stability was 88.9% at pH value 6.0; the foaming capacity and foam stability were 16.46% and 74.2% at pH value 6.0. The results of electron microscopy showed that the collagen had an intertwined and curved structure, exhibiting the fibrous characteristics of collagen; the results of ultraviolet spectroscopy showed that the collagen of bovine fascia had obvious absorption peaks near 230 nm; the results of Fourier transform infrared spectroscopy showed that the collagen contained amide A, amide B, amide I, amide II and amide III, with a complete triple-helical structure; The amino acid results showed that the protein extracted through the optimised process conformed to the amino acid composition characteristics of collagen, Gly-Xaa-Yaa. The above results show that the collagen extracted by the hot water method is a structurally complete type I collagen. This experiment can provide a scientific basis for further development and utilisation of the resources of bovine fascia resources.

Key words: bovine fascia; collagen; extraction; structural identification; physicochemical properties

胶原蛋白是动物体内非常重要的一类功能性蛋白质, 由三条 α - 肽链互相缠绕而成的螺旋结构纤维状蛋白^[1]。在动物体内含量丰富、分布最广, 占蛋白总量的 25%~30%^[2,3]。胶原蛋白特有的三螺旋结构和氨基酸组成, 使其具有乳化、凝胶、起泡等功能特性, 同时还具备生物兼容性、可降解性以及低抗原性等生物活性, 被广泛应用于食品、美容、医学等领域^[4]。

国内胶原蛋白的提取材料主要以海产类、动物骨皮为主。李洁^[5]从龙头鱼骨中提取胶原蛋白, 制成的胶原蛋白肽具有维持肝脏和胰腺结构完整性; Miguel 等^[6]从兔皮中提取胶原蛋白, 可作为 I 型胶原蛋白的新替代品; Liu 等^[7]采用碱性蛋白酶从牛皮中分离出高纯度的 I 型胶原蛋白, 可应用于组织工程和生物医学。李红霞等^[8]采用超高压和生物酶解从猪腿骨提取胶原蛋白, 为快速高效提取蛋白提供新的方法。其中, 由于宗教的原因, 部分人拒绝使用从猪身上提取制备的胶原蛋白制品, 这使得胶原蛋白的传统来源受到限制。肉品加工过程中由于脂肪与肌肉组织之间存在大量紧密排列的结缔组织(即筋膜), 高速剪切无法切断, 导致大量筋膜没有被开发利用。近年来, 随着牛肉消费量的不断提高, 牛筋、牛筋膜常作为废弃物丢弃。已有研究表明牛筋膜含有丰富的胶原蛋白, 丁盛^[9]从小牛筋膜中提取 I 型胶原蛋白, 通过冻干技术将其制成多孔疏松的胶原膜片。利用牛筋膜中的胶原蛋白生产更有经济价值的功能性产品, 可以实现对畜体废弃物的二次利用^[10], 同时为提取胶原蛋白提供了新来源。目前, 尚未发表有关牛筋膜胶原蛋白的提取和特性相关的研究报道。

因此, 本研究以牛筋膜为原料, 采用热水法提取胶原蛋白并优化提取工艺, 分析其理化特性与结

构性质, 旨在为牛筋膜胶原蛋白的开发及牛副产物的转化利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

母牛后腿肉, 成都市中豪清真牛羊肉店; 牛筋膜, 由实验室自剔; 丙酮、氢氧化钠、乙酸、盐酸、氢氧化钠、乙醇、磷酸、考马斯亮蓝 G 250, 天津化学有限公司; 十二烷基硫酸钠, 成都市科龙化工试剂厂。

1.2 仪器与设备

RE-52 AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; PHS-3C 型冷冻干燥机, 德国 Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen 公司; HC-120A 电动绞肉机, 中山市小浣熊电器有限公司; DHG-9030A 型恒温水浴锅, 国华电器有限公司; PL303 型分析天平, 梅特勒托利多仪器有限公司; 5805R 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 数显高速均质机, 杭州齐威仪器有限公司; UV-6100 分光光度计, 上海美普达公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; A360 紫外分光光度计, 翱艺仪器有限公司; FT-IR 傅里叶变换红外吸收光谱仪, 珀金埃尔默仪器有限公司。

1.3 牛筋膜的预处理

参照 Zhang 等^[11]、Takeshi 等^[11]、杨萌萌等^[11]方法并加以修改, 将牛筋膜切成 5 mm 以下的小块, 以 1:15 (m/V) 比例加入 $\varphi=10\%$ 丙酮溶液浸泡脱脂 18 h, 每隔 6 h 更换丙酮溶液, 经纱布过滤得脱脂牛筋膜, 蒸馏水漂洗至无异味后, 以 1:15 (m/V) 比例加入 0.1 mol/L 氢氧化钠, 慢速搅拌 18 h, 用纱

布过滤得到无杂蛋白脱脂牛筋膜，再用蒸馏水反复冲洗至中性备用。

1.4 热水法提取

参考林家福^[14]的方法，称取预处理后的牛筋膜，在不同的料液比、温度和时间条件下，水浴加热进行提取。将收集的全部滤液倒入旋转蒸发仪 60 °C 下进行浓缩，于 -55 °C 0.08 MPa 条件下冷冻干燥 30 h，提取出的牛筋膜胶原蛋白于 4 °C 下保存。

1.5 正交试验

在实验室前期单因素实验的基础上，选择对胶原蛋白提取影响最大的料液比、温度、时间 3 个因素，以牛筋膜胶原蛋白的得率作为评价指标，设计正交试验 L₉ (3³) 如表 1 所示。

表 1 热水法提取牛筋膜胶原蛋白因素水平表

Table 1 Factors of extracting collagen from bovine fascia by hot water method

水平	试验因素		
	料液比	提取温度/°C	提取时间/h
1	1:15	80	12
2	1:20	85	15
3	1:25	90	18

1.6 牛筋膜胶原蛋白得率的计算

提取胶原蛋白粗品的质量与筋膜原料质量的比值即为胶原蛋白得率。计算公式如下：

$$Y = \frac{M}{M_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

Y——牛筋膜胶原蛋白得率，%；

M₁——胶原蛋白冻干样品的质量，g；

M——原料的质量，g。

1.7 牛筋膜胶原蛋白理化分析

1.7.1 胶原蛋白吸水性的测定

参照史睿^[15]方法并修改，称取胶原蛋白样品 20 mg，置于 10 mL 离心管内，加入 5 mL 蒸馏水，充分混合后室温静置 1 h，4 °C、8 000 r/min 离心 30 min，准确记录上清液体积。吸水性计算公式如下：

$$Y_1 = \frac{V_0 - V_t}{W_0} \quad (2)$$

式中：

Y₁——吸水性，mL/g；

V₀——蒸馏水的体积，mL；

V_t——游离水的体积，mL；

W₀——样品初始质量，g。

1.7.2 胶原蛋白吸油性的测定

参照王杉杉^[16]方法并修改，称取牛筋膜胶原蛋白样品 0.1 g 于 50 mL 离心管中，加入 2 mL 大豆油，25 °C 涡旋 2 min，分别于 20、30、40、50、60 °C 水浴中保温 30 min，4 000 r/min 离心 30 min，记录游离油的体积。吸油性计算公式如下：

$$Y_2 = \frac{V_0 - V}{m} \quad (3)$$

式中：

Y₂——吸油性，mL/g；

V₀——植物油体积，mL；

V——游离油体积，mL；

m——胶原蛋白的质量，g。

1.7.3 胶原蛋白溶解度的测定

参照蔡盼盼^[17]的方法并稍作修改，准确称取 10 mg 胶原蛋白样品于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 蒸馏水，得 0.5 mg/mL 胶原蛋白溶液，将其 pH 值调至 5、6、7、8、9、10，涡旋 5 min，4 °C、8 000 r/min 离心 10 min，用考马斯亮蓝测定上清液蛋白质含量。胶原蛋白相对溶解度计算公式如下：

$$Y_3 = \frac{Y_4}{Y_5} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

Y₃——相对溶解度，%；

Y₄——各 pH 值的蛋白质质量；

Y₅——最高的蛋白质质量。

1.7.4 胶原蛋白乳化性和乳化稳定性的测定

参照张鑫^[18]方法并稍作修改，分别称取 50 mg 胶原蛋白冻干样品分散于 50 mL 0.5 mol/L 乙酸中，将胶原蛋白分散液 pH 值调节为 2、4、6、8、10。取 15 mL 胶原蛋白溶液加入 5 mL 植物油，均质机 10 000 r/min 分散 90 s，从溶液底部吸取 100 μL 于 10 mL 0.1 wt.% SDS 溶液中，将所得溶液稀释，测量它们在 500 nm 处的吸光值，用相同方法测试样 10 min 吸光度值。胶原蛋白乳化性及乳化稳定性计算公式如下：

$$E = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times D_F}{C \times \Phi \times 1\,000} \quad (5)$$

$$E' = \frac{E_{10\min}}{E_{0\min}} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

E —乳化性 (EAI), m^2/g ;

E' —乳化稳定性 (ESI), %;

A_0 —0 min 稀释的乳状液的吸光值;

Φ —乳状液中油的体积;

C —胶原蛋白浓度;

D_F —稀释倍数, 100。

1.7.5 胶原蛋白起泡性和起泡稳定性的测定

参照 Malomo 等^[18]的方法并稍作修改, 将胶原蛋白冻干粉分散在 50 mL 0.5 mol/L 乙酸中, 调节溶液 pH 值至 2、4、6、8、10, 10 000 r/min 的转速均质 2 min, 测量起泡在 0 min 和 30 min 时的体积。胶原蛋白起泡性和起泡稳定性计算公式如下:

$$F_C = \frac{V_0}{V} \times 100\% \quad (7)$$

$$F_S = \frac{V_1}{V} \times 100\% \quad (8)$$

式中:

F_C —起泡性;

F_S —起泡稳定性;

V_0 —在 0 min 时气泡体积;

V_1 —在 30 min 时气泡体积;

V —溶液初始体积。

1.8 牛筋膜胶原蛋白结构分析

1.8.1 微观结构测定

将牛筋膜胶原蛋白的微结构喷涂并镀金, SEM 在 10 kV 的加速电压下观察样品。

1.8.2 紫外光谱分析

参照 Caputo 等^[20]方法略加改动, 冻干胶原蛋白样品添加 0.5 mol/L 乙酸溶液, 制备成 0.5 mg/mL 的胶原蛋白溶液, 稀释 10 倍后, 在 190~400 nm 近紫外光区扫描。数据间隔为 0.5 nm, 狭缝宽度为 5 nm。

1.8.3 红外光谱分析

参考廖伟等^[21]方法并加以修改, 取 15 mg 胶原蛋白样品用研钵将其研磨至粉, 然后将样品置于样品室内待测定。红外光谱扫描范围为 500~4 000 cm^{-1} , 分辨率 2 cm^{-1} 。

1.8.4 氨基酸组成测定

参考顾赛麒等^[22]方法并加以修改, 取冻干的胶

原蛋白样品, 加入 6 mol/L HCl 后真空封管, 置于 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱水解 24 h。水解样品使用氨基酸自动分析仪进行测定。

1.9 数据处理

试验数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示, Minitab Statistical Software 统计软件对正交试验进行极差与方差分析, Origin 2021 软件进行作图, SPSS 23 统计数据, 采用 Duncan 进行显著性分析, 每项试验作 3 次重复, 显著差异水平取为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

热水法提取牛筋膜胶原蛋白的正交结果见表 2 和表 3。

表 2 热水法提取胶原蛋白正交极差分析表

Table 2 Orthogonal polar analysis table for collagen extraction by hot water method

试验编号	因素			得率/%
	A 料液比	B 温度/ $^{\circ}\text{C}$	C 时间/h	
1	1	1	1	3.50
2	1	2	2	3.00
3	1	3	3	2.49
4	2	1	2	3.20
5	2	2	3	2.92
6	2	3	1	2.50
7	3	1	3	3.63
8	3	2	1	3.14
9	3	3	2	2.41
K1	29.53	30.73	29.59	
K2	29.12	29.67	29.17	
K3	19.59	27.84	29.48	
k1	3.023	3.443	3.047	
k2	2.873	3.047	2.897	
k3	3.06	2.467	3.013	
极差 R	0.187	0.977	0.15	

根据表 2 所示, 三个因素对提取效果的影响顺序为: $B > A > C$, 即: 提取温度 $>$ 料液比 $>$ 提取时间。最佳提取工艺为 $A_3B_1C_1$, 即料液比 1:25, 提取温度 80 $^{\circ}\text{C}$, 提取时间 12 h, 此水平下胶原蛋白得率最高 3.63%。由表 3 可知, 温度是最重要的影响因素, 温度、提取时间对牛筋膜胶原蛋白提取率影

响极显著 ($P < 0.01$), 料液比对牛筋膜胶原蛋白提取率影响显著 ($P < 0.05$)。

表 3 热水法提取胶原蛋白正交试验方差分析表

Table 3 Analysis of variance of orthogonal test for extracting collagen by hot water method

来源	自由度	Adj SS	Adj MS	F 值	P 值
料液比	2	0.176 07	0.088 03	6.37	0.007
温度/°C	2	4.342 87	2.171 43	157.2	0.000
时间/h	2	0.111 67	0.055 83	4.04	0.034
误差	20	0.276 27	0.013 81		
失拟	2	0.092 627	0.048 13	4.81	0.021
纯误差	18	0.180 00	0.010 00		
合计	26	4.906 87			

2.2 牛筋膜胶原蛋白功能特性

2.2.1 胶原蛋白吸水性的测定

吸水性是指其对水分的吸附或吸收的能力, 以每克蛋白质的吸水量表示, 是胶原蛋白重要功能特性之一, 与产品质构有关。检测结果表明牛筋膜胶原蛋白吸水性为 2.11 mL/g, 与韩玮等^[23]使用热水法提取罗非鱼胶原蛋白吸水性为 4 mL/g 相比, 牛筋膜胶原蛋白吸水性略低, 可能是因为牛筋膜胶原蛋白含有较少的亲水基团导致的。

2.2.2 胶原蛋白吸油性的测定

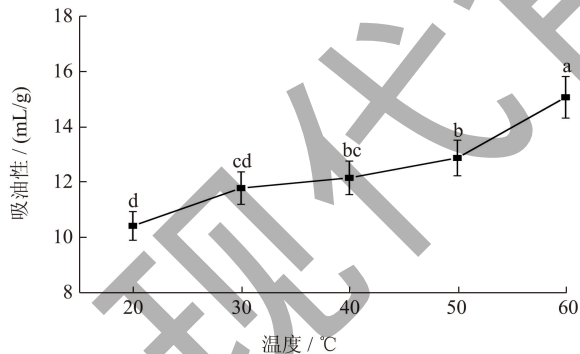


图 1 温度对牛筋膜胶原蛋白吸油性的影响

Fig.1 Effect of temperature on the oil absorption of collagen from bovine tendon membranes

注: 图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

吸油性是指每克胶原蛋白吸收油的毫升数, 可反映蛋白质分子在外力作用下, 维持和脂肪结合状态的能力, 即吸油性越强, 食品在贮藏期间越能维持较好的风味和稳定。由图 1 可知, 胶原蛋白的吸油性随温度升高呈增长趋势。在 20 °C 时, 胶原蛋白吸油性最低为 10.88 mL/g, 当温度升至 60 °C,

胶原蛋白吸油性达到最大值 15.6 mL/g 且差异显著 ($P < 0.05$)。胶原蛋白经高温处理后, 加快了在溶液中的扩散速度, 大量疏水基团的暴露促使胶原蛋白与油的结合, 从而增强胶原蛋白吸油性^[24]。牛筋膜胶原蛋白的吸油性 (15.6 mL/g) 高于牦牛皮胶原蛋白 (1.72 mL/g)、驼掌胶原蛋白 (6.22 mL/g)^[25], 说明牛筋膜胶原蛋白具有良好的吸油性, 在食品方面有开发价值。

2.2.3 胶原蛋白溶解性的测定

胶原蛋白溶解性是指胶原蛋白能被溶液溶解的最大限度, 是胶原蛋白功能性质及其它加工性质的先决条件与基础^[26]。由图 2 可知, 牛筋膜胶原蛋白溶解性随 pH 值的增加呈先下降后上升的趋势, pH 值在 5.0~10.0 时溶解性最高为 98.47%, 最低为 72.13%。因为胶原蛋白是两性电解质, 远离等电点时, 净电荷增加, 分子间排斥力增大, 分子的分散性变好, 因此表现出较高溶解性^[27]。靠近等电点时, 胶原蛋白携带净电荷减少分子间排斥力亦随之降低, 致使蛋白聚集, 沉淀变多, 此时溶解性低^[28]。

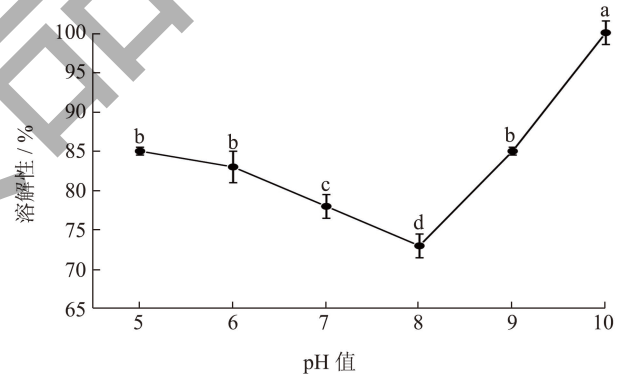


图 2 pH 值对牛筋膜胶原蛋白溶解性的影响

Fig.2 Effect of pH on the solubility of collagen from bovine tendon membranes

2.2.4 胶原蛋白乳化性及乳化稳定性的测定

乳化性 (EAI) 是蛋白质促使水油相聚产生乳化液的能力, 主要与蛋白来源、分子质量、溶液的 pH 值有关。由图 3 可知, 当 pH 值从 2.0 增加到 8.0 时, 胶原蛋白的乳化性呈现下降趋势由 17.8 m²/g 降到 4.33 m²/g; 当 pH 值从 8.0 增到 10.0 时, 乳化性呈迅速增长趋势由 4.33 m²/g 增加到 16.05 m²/g, 最高为 17.8 m²/g, 最低为 4.33 m²/g。pH 值对牛筋膜胶原蛋白溶解性和乳化性影响曲线相似, 这表明胶原蛋白溶解性的变化影响着乳化性能^[29]。这是因为等电点 (pH 值 8.0) 附近, 胶原蛋白溶解性差、分子分散性差, 导致胶原蛋白无法快速固定在油-

水界面。牛筋膜胶原蛋白乳化性高于鸡肺胶原蛋白 ($4.35 \text{ m}^2/\text{g}$)^[30], 可以应用于酸奶、鲜牛奶等奶制品, 此外通过向烘焙食物中添加胶原蛋白, 可提高食品的生产率。

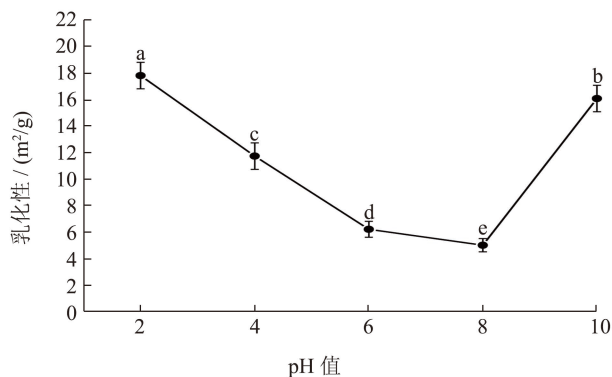


图 3 pH 值对牛筋膜胶原蛋白乳化性的影响

Fig.3 Effect of pH on the emulsifying properties of bovine tendon collagen

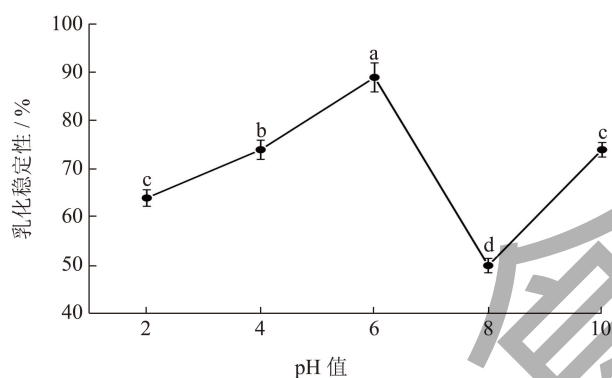


图 4 pH 值对牛筋膜胶原蛋白乳化稳定性性的影响

Fig.4 Effect of pH on the emulsification stability of bovine tendon collagen

乳化稳定性 (ESI) 是指油水混合乳状液体系保持稳定的能力^[31,32], 由图 4 可知, pH 值从 2.0 增到 6.0 时, 胶原蛋白乳化稳定性较好呈缓慢增长趋势; 在 pH 值从 6.0 增到 8.0, 乳化稳定性下降; 在 pH 值 8.0 到 10.0, 乳化稳定呈迅速增长趋势。当 pH 值 8 时, 牛筋膜胶原蛋白乳化稳定性达到最低, 为 49.9%; 在 pH 值 6 时, 牛筋膜胶原蛋白乳化稳定性达到最高, 为 88.9%。当 pH 值 10 时, 胶原蛋白被分解, 其中亲水性基团与水结合, 疏水基团与油结合, 促进油-水界面的乳化稳定性。总的来说, 牛筋膜胶原蛋白具有良好的乳化性能, 可作为乳化剂应用奶制品。

2.2.5 胶原蛋白起泡性及起泡稳定性的测定

起泡性是指在搅打过程中蛋白质产生泡沫的能力。起泡性与泡沫稳定性是胶原蛋白的最主要的功

能特性, 它与蛋白质浓度、蛋白质的相对分子质量、溶液 pH 值以及温度之间存在着一定的联系^[33], 常用于改善食品的组织、质构和外观。由图 5 可知, 牛筋膜胶原蛋白起泡性呈先上升后降低的趋势, 在 pH 值 6 时最高为 16.46%, pH 值 8.0 时最低为 9.43%。pH 值 8 等电点附近溶解在水中的蛋白质浓度小, 气-液界面能吸附的蛋白质少, 因此起泡性较差。远离等电点, 起泡性呈上升趋势, 从而使其在气-液界面上吸附更多的蛋白质^[34]。牛筋膜胶原蛋白的起泡性与马面鲀鱼^[35]的相似, 比骆驼皮胶原蛋白 (32%) 及鳕鱼鱼皮胶原蛋白 (18%) 低^[36]。

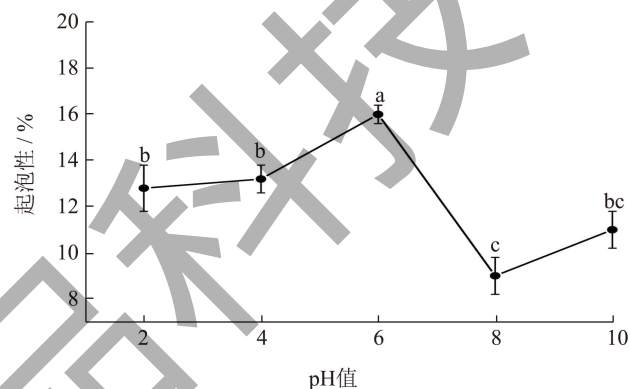


图 5 pH 值对牛筋膜胶原蛋白起泡性的影响

Fig.5 Effect of pH on the foaming properties of collagen from bovine tendon membranes

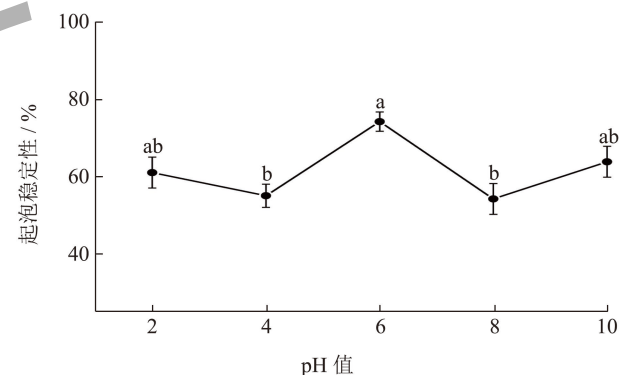


图 6 pH 值对牛筋膜胶原蛋白起泡稳定性的影响

Fig.6 Effect of pH on the foaming stability of collagen from bovine tendon membranes

起泡稳定性指泡沫保持稳定的能力。由图 6 可知, 牛筋膜胶原蛋白起泡稳定性呈 W 型, 在 pH 值 6 时最高为 74.2%, pH 值 8.0 时最低为 54.18%, 与牛肌腱胶原蛋白的起泡稳定性相似^[37]。在偏碱性或偏酸性环境下胶原蛋白胶原蛋白的泡沫稳定性变的很弱, 这可能等电点附近致使蛋白大量聚集沉淀, 无法吸附至气-液界面。

2.3 牛筋膜胶原蛋白结构表征

2.3.1 牛筋膜胶原蛋白微观结构分析

扫描电镜 (SEM) 是介于透射电镜 (TEM) 与光学显微镜 (OM) 之间一种新的观测手段, 通过对试样表面进行分析从而显微成像。由图 7 可知, 牛筋膜胶原蛋白是丝状和薄片状的纤维相互缠绕的曲状结构, 放大后呈三维立体结构, 显示出大量多孔、疏松的横截面。这表明热水法提取牛筋膜胶原蛋白较好地保留了纤维网络结构^[38]。

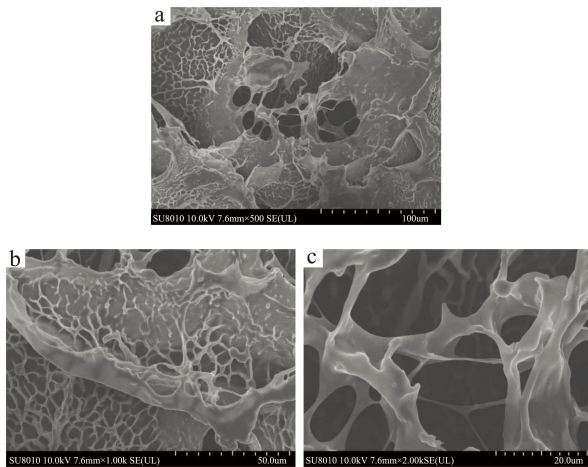


图 7 牛筋膜胶原蛋白扫描电镜图

Fig.7 Scanning electron micrograph of bovine fascia collagen

注: (a) 放大倍数: 500 × ; (b) 放大倍数: 1 000 × ; (c) 放大倍数: 2 000 × 。

2.3.2 牛筋膜胶原蛋白紫外光谱分析

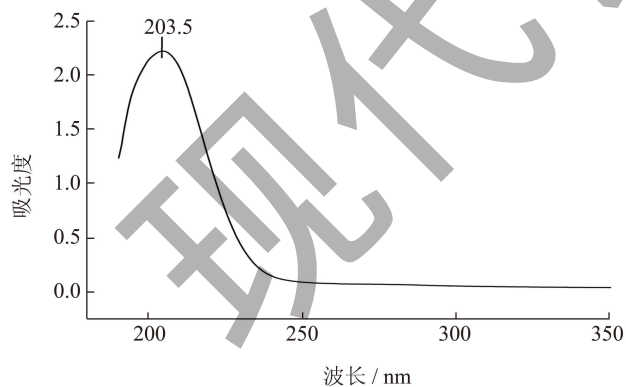


图 8 牛筋膜胶原蛋白紫外光谱图

Fig.8 Ultraviolet spectrogram of bovine tendon collagen

蛋白质中紫外生色基团是引起蛋白质紫外光谱吸收的主要原因, 也是判断胶原蛋白类型的一个重要标志。由图 8 可知, 牛筋膜胶原蛋白的最大吸收峰出现在 203.5 nm, 而波长 280 nm 时无吸收峰出现, 符合胶原蛋白一级结构缺少酪氨酸、苯丙氨酸等芳

香族氨基酸, 因此, 可以从紫外波长 280 nm 是否出现吸收峰来验证胶原蛋白的纯度^[40]。牛筋膜胶原蛋白与猪皮胶原蛋白^[40](吸收峰 230 nm)、牦牛骨胶原蛋白^[40](吸收峰 234 nm) 研究结果一致, 符合 I 型胶原蛋白的紫外吸收。

2.3.3 牛筋膜胶原蛋白红外光谱分析

研究表明^[42], 酰胺 A 带吸收峰通常出现在 3 400~3 450 cm^{-1} , 这是 N-H 的伸缩振动导致的。当氢键形成时, N-H 基团的伸缩振动会向低波数移动 100 cm^{-1} 左右。由图 9 可知, 牛筋膜胶原蛋白酰胺 A 带吸收峰位于 3 284 cm^{-1} 处, 说明牛筋膜胶原蛋白中的 N-H 参与了氢键形成, 相较于鲟鱼软骨胶原蛋白 (3 435.42 cm^{-1}) 存在更多氢键^[43]; 在酰胺 B 带 (3 080~3 100 cm^{-1}), 胶原蛋白吸收峰在 2 924.5 cm^{-1} , 这是 $-\text{CH}_2$ 不对称的伸缩振动造成的^[44]。胶原蛋白的酰胺 I、II 和 III 带与胶原蛋白的三股螺旋结构密切相关, 酰胺 I 带 (1 625~1 690 cm^{-1}) 代表着三螺旋结构中氢键的 C=O 基团的伸缩振动峰, 酰胺 II 带 (1 550~1 600 cm^{-1}) 为 N-H 弯曲和 C-N 伸缩振动峰, 酰胺 III 带 (1 200~1 360 cm^{-1}) 为 N-H 变形和 N-H 振动的结合峰。

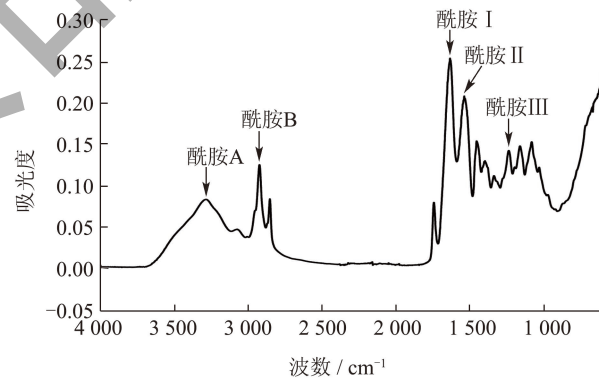


图 9 牛筋膜胶原蛋白红外光谱图

Fig.9 Infrared spectra of bovine tendon collagen

表 4 牛筋膜胶原蛋白红外光谱峰位置和分配

Table 4 Position and distribution of infrared spectrum peak of bovine fascia collagen

结构	波数/ cm^{-1}	分配
酰胺 A	3 284.5	NH 拉伸和氢键结合
酰胺 B	2 924.5	CH_2 不对称拉伸
酰胺 I	1 635	C=O 拉伸或氢键结合 COO-
酰胺 II	1 542	NH 拉伸和 CN 拉伸
酰胺 III	1 238	NH 拉伸 CN 拉伸

表 5 牛筋膜胶原蛋白酰胺I带二级结构含量 (%)

Table 5 Bovine gluten membrane collagen amide I band secondary structure content

α -螺旋	β -折叠	β -转角
30.98	58.12	10.89

如表 4 可知, 该牛筋膜 I 型胶原蛋白有 5 个吸收峰, 分别位于 3 284.5、2 924.5、1 635、1 542、1 238 cm^{-1} 处, 即酰胺 A 带、酰胺 B 带、酰胺 I 带、酰胺 II 和酰胺 III 带。一般认为酰胺 III 带与 1 450 cm^{-1} 附近吸收峰强度之比愈趋近于 1, 表明提取牛筋膜胶原蛋白的三股螺旋结构愈完整^[45]。本研究所胶原蛋白所提取胶原在 1 238 cm^{-1} 与 1 450 cm^{-1} 附近吸收峰的吸光度比值为 0.853 7, 较接近 I 型胶原特征值 1.0, 由此可见, 胶原蛋白的二级结构基本保持完整。由表 5 可知, 胶原蛋白在酰胺 II 带 α -螺旋含 30.98%, β -折叠含 58.12%, β -转角含 10.89% 且不存在无规则卷曲, 说明热水提取胶原蛋白的三螺旋结构保存完整, 破坏较小^[46]。

2.3.4 牛筋膜胶原蛋白氨基酸分析

表 6 牛筋膜胶原蛋白氨基酸组成表

Table 6 Amino acid composition of bovine tendon collagen

氨基酸名称	含量/%
甘氨酸	31.10
谷氨酸	8.35
脯氨酸	7.02
羟脯氨酸	6.16
精氨酸	5.62
天冬氨酸	5.45
丙氨酸	5.18
赖氨酸	4.21
异亮氨酸	3.94
亮氨酸	3.84
丝氨酸	3.32
蛋氨酸	3.17
苏氨酸	2.86
苯丙氨酸	2.52
缬氨酸	2.40
酪氨酸	1.87
胱氨酸	1.50
组氨酸	1.47

胶原蛋白一般由 18 种氨基酸组成。从表 6 可知, 牛筋膜胶原蛋白必需氨基酸有 6 种, 占总氨基

酸含量的 19%, 甘氨酸的含量约占所有氨基酸含量的 31%, 符合胶原蛋白 Gly-Xaa-Yaa 的氨基酸组成特征; 其中羟脯氨酸含量为 6%, 羟脯氨酸是一种独特的氨基酸, 由脯氨酸羟化酶的催化氧化而形成, 具有稳定胶原蛋白三螺旋结构的作用^[47]; 酪氨酸、胱氨酸和苯丙氨酸 (Phe) 等芳香族残基含量较低, 这与紫外吸收光谱测定结果中在 280 nm 处无吸收峰的结果相应证。

3 结论

本研究以新鲜牛筋膜为原料, 研究其理化特性及结构特性。通过试验优化提取最佳条件为料液比 1:25, 提取温度 80 $^{\circ}\text{C}$, 提取时间 12 h。在此条件下, 牛筋膜胶原蛋白吸水性为 2.11%; 吸油性随温度升高而增大, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 达最高值 15.6 mL/g; 溶解性与乳化性随 pH 值的增加呈先降低后上升, 分别在在 pH 值 10.0 和 2.0 达到最高为 98.47% 和 17.8 m^2/g ; 乳化稳定性、起泡性、起泡稳定性均在 pH 值 6.0 时达到最高为 88.9%、16.46%、74.2%。对所提取胶原蛋白进行微观结构、氨基酸组成及紫外和红外光谱分析, 结果表明牛筋膜胶原蛋白呈相互缠绕的三维立体结构, 且氨基酸组成丰富, 紫外最大吸收峰位于 203.5 nm 处, 在 3 284.5、2 924.5、1 635、1 542、1 238 cm^{-1} 出现酰胺 A、B、I、II、III 带, 含有 α 、 β 链, 符合 I 型胶原蛋白特征, 保留了完整的三螺旋结构。综上所述, 牛筋膜是胶原蛋白提取潜在的新资源, 本研究可提高牛副产品的附加值, 为牛筋膜胶原蛋白的提取提供理论依据。

参考文献

- [1] WU X S, CAI L Y, CAO A L, et al. Comparative study on acid-soluble and pepsin-soluble collagens from skin and swim bladder of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(3): 815-821.
- [2] 刘振锋, 吕卫金, 戴圣佳, 等. 胶原蛋白的提取、改性及应用研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16(6): 443-447.
- [3] 周婷, 杨恒, 王鑫, 等. 酶解技术提取动物组织中的胶原蛋白及其肽的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 332-338.
- [4] 杨向阳, 欧思琳, 朱晋辉, 等. 猪源纤维蛋白贴生物相容性初步研究[J]. 今日药学, 2020, 30(8): 525-529.
- [5] 李洁. 龙头鱼骨胶原蛋白肽的制备及其对糖尿病防治的分子机制研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.
- [6] MARTINEZ-ORTIZ M A, HERNÁNDEZ-FUENTES A D, PIMENTEL-GONZÁLEZ D J, et al. Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial

- characterization [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2015, 13(2): 253-258.
- [7] LIU H, LI X M, TANG K Y, et al. Efficient and clean preparation of pure collagen fiber woven materials from bovine hides using alkali-activated alkaline protease [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(2): 107205.
- [8] 李红霞,王安琪,杨德庆,等.超高压酶解提取猪腿骨胶原蛋白[J].*皮革科学与工程*,2016,26(4):20-25.
- [9] 丁盛.BCL-2转染的ADSCs结合3D胶原支架促进糖尿病小鼠溃疡愈合的研究[D].南京:南京大学,2016.
- [10] 王娟娟,刘勋,周学,等.胶原蛋白的研究进展及其应用[J].*中国皮革*,2022,51(7):1-7.
- [11] ZHANG J J, DUAN R, TIAN Y Y, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116: 318-322.
- [12] TAKESH N, ELJI Y, KEI T, et al. Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*) [J]. *Food Chemistry*, 2001, 72: 425-429.
- [13] 杨萌萌,郭兆斌,余群力.超声波辅助法提取胶原蛋白工艺研究[J].*甘肃农业大学学报*,2013,48(3):121-126.
- [14] 林家福,谢福美,易美华,等.热水提取罗非鱼鱼皮胶原蛋白的研究[J].*中国热带医学*,2008,8:1317-1318,1328.
- [15] 史睿.超声波辅助提取骆驼皮胶原蛋白及其性质研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2021.
- [16] 王杉杉.牦牛皮胶原蛋白的提取及其活性肽的制备[D].绵阳:西南科技大学,2018.
- [17] 蔡盼盼.超声辅助酸提甲鱼裙边胶原蛋白及其理化功能特性的研究[D].南京:南京师范大学,2017.
- [18] 张鑫.牛胶原蛋白的功能特性及多肽的抗氧化活性研究[D].济南:齐鲁工业大学,2021.
- [19] MALOMO S A, ALUKO R E. Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2015, 31: 151-159.
- [20] IVANA C, MARILENA L, CARLA S, et al. An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains [J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 421(1): 92-96.
- [21] 廖伟,夏光华,李川,等.尖吻鲈鱼鳞和鱼皮胶原蛋白的提取及其理化特性分析[J].*食品科学*,2018,39(1):36-41.
- [22] 顾赛麒,李莉,王锡昌,等.人工养殖大鲵皮胶原蛋白的性质研究[J].*食品科学*,2014,35(9):74-79.
- [23] 韩玮,邢瀚文,施文正,等.罗非鱼胶原蛋白4种制备方法比较研究[J].*河南农业大学学报*,2020,54(1):102-108.
- [24] 陈甜.热辅助离子液体调控鱼鳞胶原蛋白聚集行为及功能特性研究[D].镇江:江苏大学,2020.
- [25] 宋乐.驼掌胶原蛋白的提取及其理化性质研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2020.
- [26] 窦容容,赵春青,李桂敏,等.鱼皮胶原蛋白的提取、特性及其应用研究进展[J].*食品研究与开发*,2022,43(9):212-218.
- [27] 刘海英.斑点叉尾鮰(*Channel catfish*)鱼皮胶原蛋白及胶原蛋白多肽的研究[D].无锡:江南大学,2007.
- [28] 刘志娟.单环刺螈体壁胶原蛋白结构和性质的研究[D].青岛:中国海洋大学,2012.
- [29] DAS D, MIR NA, CHANDLA NK, et al. Combined effect of pH treatment and the extraction pH on the physicochemical, functional and rheological characteristics of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed protein isolates-ScienceDirect [J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129466.
- [30] 杨恒,时海波,邹焯,等.超声波辅助酸提鸡肺胶原蛋白的持油性和乳化性[J].*江苏农业学报*,2019,35(4):940-947.
- [31] 黄声芳,杜研学,熊华,等.复合酶解米渣制备蛋白肽的理化与功能性质研究[J].*食品工业科技*,2012,33(7):75-79.
- [32] 周婷,吴瑀婕,卢方云,等.超声辅助碱性蛋白酶提取鸡爪胶原蛋白理化性质及功能特性[J].*肉类研究*,2021, 35(10):8-12.
- [33] 陈日春,郑宝东.鲢鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白理化特性研究[J].*中国食品学报*,2013,13(12):83-88.
- [34] 张立娟,孔保华,刘骞.环境条件对猪血浆蛋白功能性质的影响[J].*食品科学*,2009,30(11):37-42.
- [35] 吴坤远.马面鲀鱼皮胶原结构、功能及流变性能的研究[D].福州:福建农林大学,2020.
- [36] 马帅.鳊鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其理化和功能特性的研究[D].锦州:渤海大学,2020.
- [37] 梁迎晨.牛腱脱细胞基质材料中蛋白组分的分离及特征研究[D].济南:济南大学,2020.
- [38] 陈凯丽.罗非鱼胶原蛋白粉剂的低温制备工艺及促伤口愈合性能研究与评价[D].烟台:烟台大学,2022.
- [39] 陶宇,李志皓,侯虎,等.不同方法提取沙海蜃皮胶原蛋白的对比分析[J].*食品工业科技*,2012,33(14):310-312,326.
- [40] 梁敬林.猪皮胶原蛋白的提取及其结构表征[D].佛山:佛山科学技术学院,2020.
- [41] 叶孟亮.牦牛骨胶原蛋白肽抗骨质疏松作用机制研究[D].北京:中国农业科学院,2019.
- [42] DOYLE B B, BENDIT E G, BLOUT E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides [J]. *Biopolymers*, 1975, 14(5): 937-957.
- [43] 吴雷,郑娟,刘文涛,等.鸡关节软骨 II 型胶原蛋白结构及性能表征[J].*食品与发酵工业*,2016,42(11):86-90.
- [44] MUYONGA J H, COLE C G B, DUODU K G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. *Food Chemistry*, 2004, 85(1): 81-89.
- [45] 娜荷芽.马骨胶原蛋白肽制备及组织结构分析[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2022.
- [46] 耿嘉宝.牦牛头蹄脱毛工艺及其胶原蛋白的初步研究[D].兰州:兰州理工大学,2021.
- [47] 姚行行,郭妍,庄永亮.云南鲟鱼骨胶原蛋白的制备及其理化性质[J].*食品科学*,2018,39(13):35-40.