

三种方法提取龟甲胶原蛋白的理化特性比较

贺雄¹, 於增岩¹, 姜绍通^{1,2}, 陆剑锋^{1,2,3}, 林琳^{1,2,3*}

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230601) (2. 安徽省农产品精深加工重点实验室, 安徽合肥 230601) (3. 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽合肥 230601)

摘要: 该文检测了中华草龟腹甲和背甲的基本成分和矿物质组成, 并利用酸法、酶法和热水辅助酶法从中提取胶原蛋白(分别为ASC、PSC和H-PSG), 然后通过紫外光谱、红外光谱、SDS-PAGE电泳、氨基酸分析和扫描电镜等方法对胶原蛋白的理化特性进行表征。结果表明, 龟甲中含有大量蛋白质(22.06%~22.50%)、钙(16 004.25~16 592.50 mg/100 g)、磷(6 014.25~6 188.25 mg/100 g)。三种方法提取胶原蛋白的得率依次为0.45%~0.51%(ASC), 4.38%~4.75%(H-PSG)和1.47%~1.56%(PSC)。6种胶原蛋白的最大紫外吸收峰均出现在220~226 nm, 红外图谱和SDS电泳图谱显示ASC和PSC均为I型胶原蛋白, 拥有较高的纯度保留了较为完整的三螺旋结构, 但H-PSG已变性为明胶并部分水解为胶原蛋白肽。6种胶原蛋白氨基酸组成基本一致, 拥有丰富的甘氨酸(18.19%~24.10%)和脯氨酸(12.52%~15.05%)。从微观结构上看, ASC拥有更好的三维网状结构。综上所述, 中华草龟腹甲和背甲胶原蛋白在组成与性质方面没有显著差异, 不同的提取方法对龟甲胶原蛋白得率、组成和结构方面有一定的影响。

关键词: 中华草龟; 背甲; 腹甲; 胶原蛋白; 提取

文章编号: 1673-9078(2024)10-191-199

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1066

Comparison of the Physical and Chemical Properties of Collagens Extracted from Tortoise Shell using Three Methods

HE Xiong¹, YU Zengyan¹, JIANG Shaotong^{1,2}, LU Jianfeng^{1,2,3}, LIN Lin^{1,2,3*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

(2. Key Laboratory for Agriculture Products Processing of Anhui Province, Hefei 230601, China)

(3. Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei 230601, China)

Abstract: The basic and mineral compositions of the ventral and dorsal shells of tortoise (*Chinemys reevesii*) were analyzed, and collagens (ASC, PSC, and H-PSG) were extracted from shell samples using acid, enzymatic, and hot-water assisted enzymatic methods. Subsequently, the physical and chemical properties of the extracted collagens were characterized through ultraviolet spectrometry, infrared spectrometry, SDS-PAGE, amino acid analysis, and scanning electron microscopy. The results indicated that tortoise shells had high protein (22.06%~22.50%), calcium (16 004.25~16 592.50 mg/100 g), and

引文格式:

贺雄, 於增岩, 姜绍通, 等. 三种方法提取龟甲胶原蛋白的理化特性比较[J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 191-199.

HE Xiong, YU Zengyan, JIANG Shaotong, et al. Comparison of the physical and chemical properties of collagens extracted from tortoise shell using three methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 191-199.

收稿日期: 2023-09-07

基金项目: 财政部和农业部: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-48); 安徽现代农业产业技术体系项目(AARS-08)

作者简介: 贺雄(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工副产物综合利用, E-mail: 1628021324@qq.com; 共同第一作者: 於增岩(2000-), 男, 本科生, 研究方向: 水产品加工副产物综合利用, E-mail: 2868202799@qq.com

通讯作者: 林琳(1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: linlin@hfut.edu.cn

phosphorus (6 014.25~6 188.25 mg/100 g) contents. ASC, H-PSG, and PSC yields were 0.45%~0.51%, 4.38%~4.75%, and 1.47%~1.56%, respectively. The maximum absorption peaks of ASC, H-PSG, and PSC extracted from ventral and dorsal shell samples appeared at 220~226 nm. The infrared spectra and SDS-PAGE patterns showed that ASC and PSC were both type I collagen with high purity and a relatively intact triple-helix structure, but H-PSG had degenerated into gelatin and had been partially hydrolyzed to collagen peptide. ASC, H-PSG, and PSC extracted from the ventral and dorsal shell samples had essentially the same amino acid composition, with abundant glycine (18.19%~24.10%) and proline (12.52%~15.05%). In terms of microstructure, ASC exhibited a superior three-dimensional network structure compared to H-PSG and PSC. In conclusion, the collagens extracted from the ventral and dorsal shells of tortoise using the same methods showed no significant difference in composition or properties; however, different extraction methods affected the yield, composition, and structure of collagens extracted from tortoise shells.

Key words: *Chinemys reevesii*; ventral shell; dorsal shell; collagen; extraction

胶原蛋白是各种陆生动物与海洋动物体内常见的蛋白质，是结缔组织的主要结构蛋白，其特有的三螺旋结构在维持组织稳态、生物完整性中起着重要作用^[1]。基于其独特的生物相容性、可降解性等性质，科学家们对胶原蛋白钟爱有加。随着对胶原蛋白性质和价值的深入研究，如今胶原蛋白已在日常生活中得到广泛的应用。在材料领域，胶原蛋白是用于制造人工植入物的生物材料^[2]；在医学领域，胶原蛋白肽对治疗高血压、肥胖症和糖尿病发挥着重要作用，同时因其抗衰老能力，胶原蛋白肽也常被添加在化妆品中^[3,4]；此外，胶原蛋白还可添加在食品中作为稳定剂和发泡剂，现今许多学者也开始了胶原蛋白复合饮品的研制^[5,6]。然而，目前市面上的胶原蛋白产品大多源于猪皮或牛跟腱，哺乳动物自身的传染病风险以及宗教信仰问题极大地限制了胶原蛋白的应用市场^[7]。因此，寻找胶原蛋白的新来源就成了当下的重要课题。

中华草龟 (*Chinemys reevesii*) 又称乌龟，是中国养殖历史悠久的经济物种，其龟甲中含有丰富的氨基酸、脂肪酸、酚类、甾体类等活性物质^[8]，是提取活性成分的良好原料。但目前多数国家对龟甲的研究了解还不够深入，龟甲作为龟科动物的主要副产品，常被视为废弃物，加之随着全球龟科动物的市场规模日益扩大，一定程度造成龟甲资源浪费和环境问题。据研究，龟甲中含有 30.42%~33.18% 的蛋白质^[9]，因此从龟甲中提取胶原蛋白具有极高的经济前景。

国内关于龟甲胶原蛋白提取的研究仍处在探索阶段，龟甲本身的坚硬程度及高钙含量造成了胶原蛋白提取的困难，传统的提取方法可能对龟甲的效果不佳，同时，自汉代以来龟甲便因滋阴潜阳、益

肾健骨、养血补心等功效得以入药，但元代以后古人只取腹甲入药，背甲则被废弃^[10]。现代研究还发现，龟甲具有改善软骨终板退变、骨质疏松、促进生发等作用^[11-13]。目前的研究通常不会将龟背甲和腹甲区分开来，因此本研究分别以中华草龟的腹甲和背甲为原料，通过酸法、酶法和热水辅助酶法三种不同的方法从龟壳中提取胶原蛋白 (ASC、PSC、H-PSG)，并对三种不同提取方法得到的胶原蛋白样品的结构特性与组成进行比较，以期为后续开发高值化龟甲胶原蛋白产品提供研究数据和依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

中华草龟龟甲 (背甲和腹甲)，为冷冻龟肉加工副产物，由安徽蓝田特种龟鳖集团有限公司提供。

乙二酸四乙酸、硫酸、盐酸、硝酸、乙酸、氢氧化钠等，分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司；胃蛋白酶 (3 000 NFU/g)，购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

FD-1B-50 冷冻干燥机，北京博医康实验仪器有限公司；Nicolet IS50 iN10 傅里叶变换红外光谱仪，美国 Thermo Fisher 公司；CARY 5000 紫外可见近红外分光光度计，美国安捷伦公司；K9840 凯式定氮仪，济南海能仪器股份有限公司；SOX406 全自动索式抽提机，济南海能仪器股份有限公司；CT-15RT 台式高速冷冻离心机，上海天美生化仪器与设备工程有限公司；3500 凝胶图像分析系统，上海天能科技有限公司；L-8900 氨基酸全自动分析仪，

日本 HITACHI 公司；IRIS Intrepid II 电感耦合等离子体发射光谱仪，美国 Thermo Elctron 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 龟甲基本成分测定

水分测定：参照 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定直接干燥法》；灰分测定：参照 GB 5009.4-2016《食品中灰分的测定高温灼烧法》；粗蛋白测定：参照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定凯氏定氮法》；粗脂肪测定：参照 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定索氏抽提法》。

1.3.2 龟甲矿物质成分测定

称取 0.1 g 干燥龟壳粉样品置于烧杯中，依次加入浓硝酸 12 mL、高氯酸 6 mol，加热消化至烧杯内溶液澄清透明，无明显黑色团块。待液体冷却后用超纯水定容至 25 mL，震荡摇匀，取出 5 mL，用电感耦合等离子体发射光谱仪测定样品中各种矿物质的浓度^[14]。

1.3.3 龟甲粉的预处理

参照黄可承等^[15]的方法并对龟甲粉进行预处理，将中华草龟的背甲和腹甲分别研磨成粉，过 80 目筛，制成龟甲粉，于 4 °C 中保存备用。称取一定量的龟甲粉，浸泡于 2% (*m/V*) NaCl 溶液中，料液比 1:10 (*m/V*)，连续搅拌 24 h，去除其中的盐溶性蛋白；离心后将上清液倒掉，再加入 10% (*V/V*) 的异丙醇，料液比 1:10 (*m/V*)，连续搅拌 24 h，去除其中的脂肪；再次离心后倒掉上清液，将沉淀物浸泡于 0.1 mol/L 的乙二酸四乙酸二钠溶液中，料液比为 1:15 (*m/V*)，连续搅拌 36 h，期间每 12 h 换液一次，去除其中的矿物质。离心后所得沉淀置于 4 °C 环境下等待提取。

1.3.4 龟甲胶原蛋白的提取

(1) 酸法提取：向预处理后的样品中加入 0.5 mol/L 乙酸，料液比为 1:15 (*m/V*)，在 4 °C 下搅拌 48 h，随后于离心力 11 378 g 下离心 20 min，取上清液加入 NaCl 至溶液浓度为 1 mol/L，静置等候胶原蛋白盐析上浮。再次离心去除上清液，取出管壁上附着的胶原蛋白，溶解至 0.5 mol/L 乙酸，随后用 0.3 mol/L 乙酸透析 48 h，期间每 12 h 更换一次透析液。随后在蒸馏水中再透析 24 h，利用冷冻干燥机对样品进行冻干处理，得到酸溶性胶原蛋白 (Acid-soluble Collagen, ASC)。

(2) 酶法提取：将预处理后的样品浸泡在 0.5 mol/L 的乙酸中，料液比为 1:15 (*m/V*)，同时加入 1% (*m/m*)，每 100 g 脱脂龟甲粉添加 1 g 胃蛋白酶) 的胃蛋白酶，在 4 °C 下磁力搅拌 36 h。随后处理方法与酸法提取相同，得到酶溶性胶原蛋白 (Pepsin-Soluble Collagen, PSC)。

(3) 热水辅助酶法提取：将预处理后的样品置于 40 °C 纯水中，料液比为 1:10 (*m/V*)。加入质量分数为 0.5% (*m/m*) 的胃蛋白酶，并置于 40 °C 恒温水浴中磁力搅拌 2 h，过滤出滤液备用，滤渣用纯水冲洗后，重复上述操作 3 次。随后依次离心、盐析、透析，后续处理方法与酸法提取相同，得到热水辅助提取的酶溶性明胶 (Hot-water Assisted Extraction of Pepsin-Soluble Gelatin, H-PSG)。

1.3.5 紫外吸收光谱分析

参照郑清瑶等^[16]的方法并适当修改，取冷冻干燥后的胶原蛋白样品溶解于 0.05 mol/L 的乙酸当中，配置成胶原蛋白质量浓度为 1 mg/mL 的溶液并置于 4 °C 环境下平衡浓度 24 h。随后以 0.05 mol/L 的乙酸溶液为空白对照，在 190~400 nm 范围内进行扫描，数据采集速率为 2 nm/s，得到 6 种胶原蛋白的紫外吸收曲线。

1.3.6 傅里叶变换红外光谱分析

参照赵琼瑜等^[17]的方法，取冻干的胶原蛋白样品 2 mg，使用傅里叶变换红外光谱仪的 ATR 模式进行吸收波谱扫描。光谱扫描范围设置为 650~4 000 cm^{-1} ，扫描分辨率为 1 cm^{-1} ，依次绘制得到 6 种胶原蛋白的红外光谱图。

1.3.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 (SDS-PAGE)

将冻干的胶原蛋白样品用 5% (*m/V*) 的 SDS 溶解至终质量浓度为 2 mg/mL，在 85 °C 下恒温水浴 1 h，接着在 4 000 g 离心 10 min 以除去未溶解部分，取上清液与 2X 上样缓冲液按 1:1 (*V/V*) 的比例混合，置于沸水中加热 15 min。将制备好的样品与 Marker 和牛肌腱胶原蛋白标准品一起注入电泳凝胶 (4% 浓缩胶和 15% 分离胶) 孔槽中，80 V 电泳 1 h 左右。电泳完成后将凝胶片用预先配制好的染色溶液 [0.1% (*m/V*) 考马斯亮蓝 R-250、10% (*V/V*) 冰醋酸、50% (*V/V*) 甲醇] 染色约 30 min。染色完成后，蒸馏水脱色过夜直至条带清晰易辨，最后使用凝胶图像专用分析软件进行拍照并分析^[18]。

1.3.8 氨基酸分析

精密称取经冷冻干燥后的样品 15 mg, 移至安瓿瓶中, 加入 5 mL 6 mol/L 盐酸, 用氮气充满安瓿瓶, 在酒精喷灯下快速融化玻璃密封瓶口。密封完成后放入 130 °C 烘箱中, 水解 7 h 至无成块黑色沉淀。冷却后将瓶中液体转移到 100 mL 容量瓶中, 然后用超纯水定容至 100 mL。摇匀后取 1 mL 水解液进行冷冻干燥, 加入 1 mL 0.02 mol/L 的 HCl (色谱纯) 溶解, 静置 10 min, 然后用微孔滤膜过滤溶解液, 滤液备用, 采用氨基酸全自动分析仪分析滤液中氨基酸组成情况^[19]。

1.3.9 扫描电子显微镜 (SEM) 分析

使用导电胶带将大小为 3 mm×3 mm 的冻干胶原蛋白薄片固定在样品台上, 开启离子溅射仪使表面样品镀上金膜, 加速电压设置 7.0 kV。在 500 放大倍数下观察 6 种胶原蛋白的典型微观结构。

1.3.10 数据分析

实验数据取 3 次实验结果平均值, 表示为平均值 ± 标准偏差。使用 Origin 2018 软件处理实验数据及图表制作, 采用 SPSS statistic 24 软件对数据进行方差分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 龟甲基本成分分析

表 1 中华草龟背甲和腹甲的基本成分含量 (%)

Table 1 Basic components of the dorsal and ventral shell of

<i>Chincmys reevesii</i>				
项目	灰分	粗蛋白	水分	粗脂肪
背甲	54.17 ± 1.16 ^a	22.06 ± 0.51 ^a	7.58 ± 0.04 ^a	7.47 ± 0.01 ^a
腹甲	50.59 ± 0.64 ^b	22.50 ± 0.85 ^a	7.13 ± 0.04 ^a	5.03 ± 0.07 ^b

注: 不同小写字母代表背甲与腹甲差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

中华草龟龟甲基本成分的测定结果如表 1 所示。由表 1 可知, 龟甲中的灰分含量最高^[20], 背甲和腹甲中灰分分别占比 54.17% 和 50.59%, 其次是粗蛋白, 在背甲和腹甲中的含量分别为 22.06% 和 22.50%, 要低于海龟壳^[21]的 39.6% 和羊骨^[22]的 26.12%。水分与粗脂肪含量较低, 背甲中分别为 7.58% 和 7.47%, 而在腹甲中分别为 7.13% 和 5.03%。对比草龟壳背甲和腹甲的基本成分, 背甲具有更高的灰分及粗脂肪含量, 但二者的水分和粗蛋白含量无显著差异。由结果可知, 中华草龟的背甲和腹甲

中都含有较高比例的蛋白质, 而骨骼中的蛋白质主要为胶原蛋白, 因此龟甲可作为胶原蛋白提取的良好原料。

2.2 龟甲矿物质组成分析

表 2 中列出了龟甲中含量较高的九种矿物质元素。结果显示, 龟甲中含量最高的矿物质元素为 Ca, 背甲和腹甲中的含量分别为 16 004.25 mg/100 g 和 16 592.50 mg/100 g, 与 Serajul 等^[20]的结果大致相同, 但 Na 和 K 的含量分别只有 475.54、501.50 mg/100 g 和 110.25、94.75 mg/100 g, 低于 Serajul 等^[20]的结果 (25 858.80 mg/100 g 和 2 383.06 mg/100 g)。P 的含量分别为 6 014.25 mg/100 g 和 6 188.25 mg/100 g, 达到了总矿物质含量的 23%。龟甲中的矿物质存在形式主要为磷酸钙以及羟基磷灰石, 其中羟基磷灰石能够与胶原纤维结合生成难溶的骨盐, 骨盐沉积在胶原表面使得龟甲中的胶原蛋白难以被酸提取出来, 因此在提取胶原蛋白之前一定要对龟甲进行脱钙处理^[23]。重金属离子含量是评判胶原蛋白能否应用在化妆品和生物医学领域中标准之一, 龟甲中 Cu、Fe 等金属元素含量微小, 因此提取到的龟甲胶原蛋白具有在化妆品和生物医学等领域应用的潜力^[24]。除 K 和 Li 外, 背甲和腹甲中矿物质元素组成无显著差异, 再次验证了背甲和腹甲组成的一致。

表 2 中华草龟背甲和腹甲中矿物质成分含量 (mg/100 g)

Table 2 Mineral content in the dorsal and ventral shell of

<i>Chincmys reevesii</i>		
项目	背甲	腹甲
Ca	16 004.25 ± 136.34 ^a	16 592.5 ± 65.31 ^a
P	6 014.25 ± 21.94 ^a	6 188.25 ± 17.92 ^a
Na	475.5 ± 14.04 ^a	501.5 ± 6.39 ^a
Mg	245.25 ± 10.42 ^a	242.25 ± 3.12 ^a
K	110.25 ± 16.37 ^a	94.75 ± 0.17 ^b
Li	17.50 ± 0.72 ^b	22.40 ± 0.88 ^a
Fe	11.34 ± 1.29 ^a	10.91 ± 0.06 ^a
Cu	0.62 ± 0.09 ^a	0.57 ± 0.04 ^a
As	0.35 ± 0.14 ^a	0.77 ± 0.31 ^a

2.3 胶原蛋白得率

三种方法提取背甲和腹甲胶原蛋白得率如图 1 所示。从图中可看出, 三种提取方法下背甲和腹甲的得率没有明显差异, ASC、H-PSG 和 PSC 的得率分别为 0.45%~0.51%、4.38%~4.75%、1.47%~1.56%, 远低于草鱼鱼鳔^[25]ASC (39.2%), 但高于金鲤鱼^[26]ASC

(0.42%)，通常从高钙含量的原材料中提取胶原蛋白都极为困难。酸法提取的得率最低，这是由于前处理很难将龟甲中的钙完全脱去，仍有部分羟基磷灰石与胶原纤维紧密结合，阻碍了醋酸对胶原蛋白的溶胀，使得其提取效率大大降低，同时，端肽的存在会使胶原蛋白分子间形成共价交联，进一步阻碍醋酸进入胶原蛋白分子^[16]。加入胃蛋白酶后，胶原蛋白得率显著提高，这是由于胃蛋白酶在酸性条件下可以使胶原蛋白的末端肽链水解断裂，减少分子间的共价交联，进而提高得率^[27]。热水辅助酶法提取胶原蛋白的得率远高于酸法与酶法提取，这是由于40℃接近胃蛋白酶的最适温度，此时胃蛋白酶的活性很高，水解作用更强，同时热水可能使胶原蛋白变性，变性后的胶原蛋白更容易被胃蛋白酶水解为肽段，从而提高得率^[28]。有研究显示鳖甲胶原蛋白的热变性温度接近40℃，而龟甲与鳖甲结构和组成相似，可以推测龟甲胶原蛋白也拥有较高的热稳定性，相较于鱼类明胶，高热稳定性能让H-PSG保留更多 α 链和 β 链不被分解为肽段，从而使明胶拥有较好的乳化稳定性和凝胶强度^[29,30]。

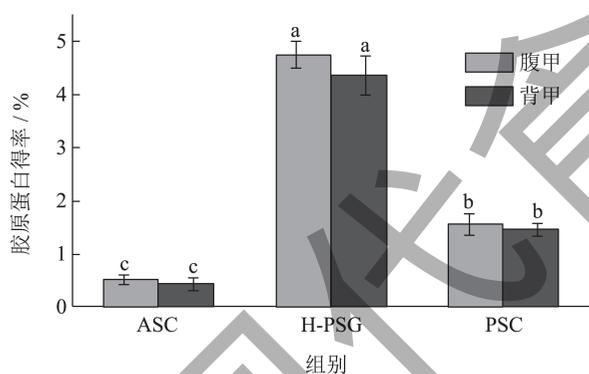


图1 龟甲胶原蛋白得率

Fig.1 Yield of tortoise shell collagen

注：不同小写字母代表具有显著差异 ($P < 0.05$)，下同。

2.4 紫外吸收光谱分析

三种方法提取背甲和腹甲胶原蛋白的紫外吸收光谱如图2所示。6种胶原蛋白的最大吸收峰均出现在220~226 nm之间，与牛骨^[31]、鳖甲^[32]胶原蛋白的紫外光谱相似，符合I型胶原蛋白的紫外吸收特征^[33]。由图2，PSC和H-PSG的紫外吸收峰发生红移，这可能是胃蛋白酶水解使得胶原蛋白中亮氨酸、异亮氨酸等疏水氨基酸含量减少，更多的亲水基团暴露，溶液极性增大导致的。通常，蛋白质中含有苯环共轭双键的芳香族氨基酸会使紫外吸收

光谱在250和280 nm处出现显著吸收，而六种样品在这两处附近均没有出现明显吸收峰，说明提取出的样品中基本不含有芳香族氨基酸，或者含量极低^[34]。这与I型胶原蛋白几乎不含芳香族氨基酸的特性一致，结合SDS-PAGE图以及氨基酸组成中不含色氨酸和半胱氨酸的特点，可以推测三种方法所提取出的胶原蛋白样品都具有较高的纯度，几乎不含杂蛋白。

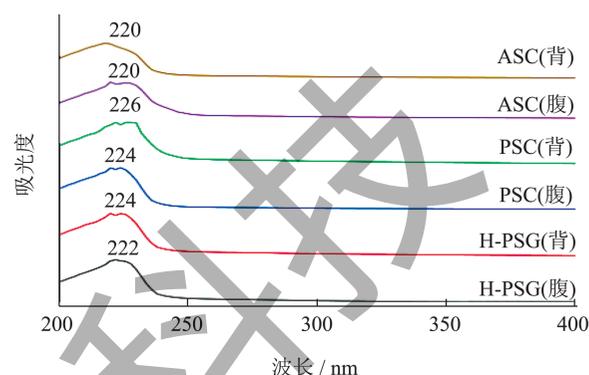


图2 龟甲胶原蛋白紫外光谱图

Fig.2 Ultraviolet spectrum of tortoise shell collagen

2.5 傅里叶变换红外光谱分析

三种方法提取背甲和腹甲胶原蛋白的红外吸收光谱如图3所示。从图3可以看出，6种胶原蛋白的红外光谱趋势基本一致，证明其二级结构与基团组成具有相似性。虽然不同提取方法得到的样品波形有细微的差别，但是同种提取方法从背甲和腹甲中提取出的胶原蛋白样品的红外吸收波形吻合程度极高，因此可以得出腹甲和背甲中的胶原蛋白在二级结构基本上是一致的。

图3中6种胶原蛋白均显示了胶原蛋白的五个特征吸收峰，从右往左分别是酰胺A、酰胺B、酰胺I、酰胺II、酰胺III。N-H伸缩振动是酰胺A带存在的主要原因，通常在 $3400\sim 3440\text{ cm}^{-1}$ 左右出现，图中6种胶原蛋白的酰胺A位置向低波数移动了 100 cm^{-1} ，出现在 3310 cm^{-1} 左右，这是因为部分酰胺A参与了形成氢键，因此振动频率较正常情况下偏低^[35]；酰胺B带的出现主要与 CH_2 的不对称伸缩振动有关，而 CH_2 是I型胶原蛋白特征基团之一^[36]；酰胺I带可以看作是肽二级结构标识，此处波峰因C=O伸缩振动而存在，与二级结构的 α -螺旋有关，通常出现在 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 之间^[37]；酰胺II带的特征吸收峰在 1500 cm^{-1} 左右，由N-H弯曲振动与C-N伸缩振动共同引起^[38]；酰胺III带是胶原蛋白三螺旋结构的敏感区域，因此可以

体现出胶原蛋白的完整性,具有多种形变和振动模式^[39],图3中6种胶原蛋白的吸收峰出现位置基本相同,但ASC、PSC、H-PSG的酰胺A强度依次增加,酰胺B强度依次减小,这可能是由于胃蛋白酶的添加,导致在水解作用下胶原蛋白的二级结构发生了改变,部分螺旋结构向片层转化,而当温度升到40℃后,胃蛋白酶活性更高,变化更加明显。总的来说,6种龟甲胶原蛋白的五条酰胺带出峰位置与之前报道的鳖甲胶原蛋白^[32]保持一致,证明提取到的都是I型胶原蛋白,但峰强度的变化说明提取方法对结构造成了一定影响,尤其是H-PSG,三螺旋结构遭到了破坏,胶原蛋白已变性为明胶。

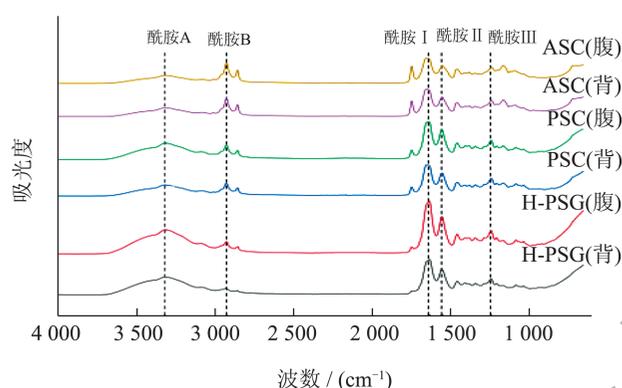


图3 龟甲胶原蛋白红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrum of tortoise shell collagen

2.6 SDS-PAGE电泳分析

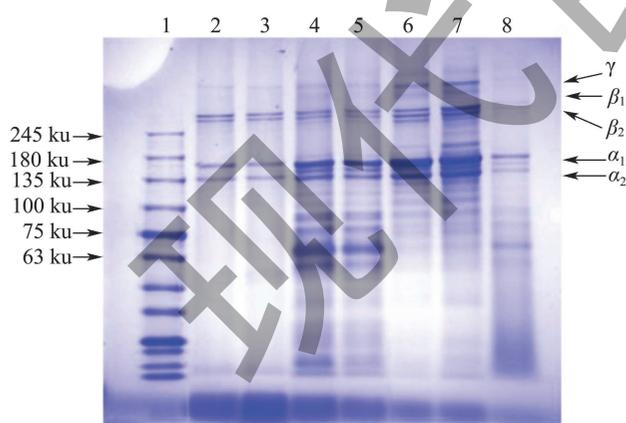


图4 龟甲胶原蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE electrophoretic image of tortoise shell collagen

注:泳道:1-marker;2-ASC(腹甲);3-ASC(背甲);4-H-PSG(腹甲);5-H-PSG(背甲);6-PSC(腹甲);7-PSC(背甲);8-牛肌腱胶原蛋白标品。

三种方法分别从龟壳的背甲和腹甲中提取的胶

原蛋白样品的 SDS-PAGE 结果如图4所示。从电泳图谱中可以看出,ASC和PSC中出现了较为明显的五个条带,分别是 γ 、 β_1 、 β_2 、 α_1 、 α_2 ,与前人所做的刺参壁胶原蛋白^[16]、牛皮胶原蛋白^[36]的电泳结果相似。而H-PSG中除这五个条带外还出现了较多100ku以下的条带。位于245ku上方的 γ 条带是典型的I型胶原蛋白的三聚体,其下方是胶原蛋白二聚体结构,即为 β_1 和 β_2 链,不同的二聚体可能是 $\alpha_1\alpha_1$ 与 $\alpha_1\alpha_2$ 两种单链组合。这几条链的相对分子质量均大于245ku,证明不同方法提取到的龟甲胶原蛋白中均存在交联作用。 α_1 与 α_2 的相对分子质量分别在160ku和135ku左右。酸法提取得到的龟壳胶原蛋白样品的电泳条带较为清晰,而酶法提取得到的样品则出现了一定的拖带现象,这可能是胃蛋白酶水解端肽使得胶原链分子量减小导致的。在4~7泳道中, α_1 与 α_2 之间出现了一条较浅的条带,这可能是由于 α_1 的端肽被蛋白酶水解使得链变短、分子量降低所导致的,H-PSG水解程度更高,这条链也更加清晰。热水辅助酶提取物中明显发生了较强的水解,说明提取物由胶原蛋白转变为了明胶。热水不仅能加强胃蛋白酶活性,也能将胶原蛋白热变性,进一步降低水解难度,而明胶的水解程度是影响其物理性质的关键因素^[30]。

2.7 氨基酸组成分析

三种方法提取背甲和腹甲胶原蛋白的氨基酸组成见表3。从表中可以看出,龟甲胶原蛋白中甘氨酸的含量最高(17.52%~23.56%),其次是脯氨酸(10.29%~12.25%)和谷氨酸(10.37%~11.47%),这是由于胶原蛋白 α 链的螺旋区由Gly-X-Y三肽重复序列组成,其中X通常为脯氨酸^[40]。同时龟甲胶原蛋白中不含半胱氨酸和色氨酸,而甲硫氨酸只在背甲H-PSG和腹甲PSC中检出,这与鳖甲胶原蛋白不含甲硫氨酸类似^[28]。除腹甲H-PSG中的丙氨酸显著高于背甲H-PSG外,腹甲与背甲中其他氨基酸组成均无显著性差异,而不同方法提取的胶原蛋白氨基酸组成略有不同。其中,ASC的甘氨酸、丙氨酸和精氨酸含量占比显著低于H-PSG和PSC,但拥有更高的异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸和酪氨酸含量,这是由于胃蛋白酶对胶原蛋白端肽的水解,导致氨基酸组成的轻微变化^[41]。同时,异亮氨酸、亮氨酸等疏水氨基酸含量的降低可能会造成胶原蛋白溶解度的提高^[42]。

表 3 龟甲胶原蛋白的氨基酸组成 (%)

Table 3 Amino acid composition of tortoise shell collagen (%)

氨基酸种类	ASC		H-PSG		PSC	
	腹甲	背甲	腹甲	背甲	腹甲	背甲
天冬氨酸 Asp [#]	6.03 ± 0.15 ^a	5.74 ± 0.32 ^a	6.08 ± 0.10 ^a	5.81 ± 0.09 ^a	6.01 ± 0.15 ^a	6.03 ± 0.28 ^a
苏氨酸 Thr [*]	2.60 ± 0.20 ^a	2.53 ± 0.28 ^a	2.62 ± 0.07 ^a	2.52 ± 0.04 ^a	2.62 ± 0.11 ^a	2.63 ± .12 ^a
丝氨酸 Ser	3.66 ± 0.40 ^a	3.75 ± 0.46 ^a	3.84 ± 0.13 ^a	3.89 ± 0.02 ^a	4.06 ± 0.18 ^a	4.15 ± 0.19 ^a
谷氨酸 Glu [#]	10.86 ± 1.60 ^a	10.37 ± 1.16 ^a	11.47 ± 0.24 ^a	11.01 ± 0.12 ^a	11.42 ± 0.38 ^a	11.39 ± 0.38 ^a
甘氨酸 Gly [#]	17.52 ± 0.63 ^b	18.78 ± 0.43 ^b	23.56 ± 0.38 ^a	23.21 ± 0.42 ^a	23.06 ± 0.31 ^a	23.22 ± 0.45 ^a
丙氨酸 Ala [#]	8.13 ± 0.45 ^c	7.99 ± 0.15 ^c	10.53 ± 0.14 ^a	9.72 ± 0.37 ^b	9.63 ± 0.19 ^b	9.79 ± 0.23 ^b
半胱氨酸 Cys	—	—	—	—	—	—
缬氨酸 Val [*]	4.92 ± 0.27 ^a	5.51 ± 0.80 ^a	2.90 ± 0.24 ^b	3.27 ± 0.15 ^b	3.52 ± 0.59 ^b	3.25 ± 0.19 ^b
甲硫氨酸 Met [*]	—	—	—	0.29 ± 0.12 ^a	0.18 ± 0.21 ^a	—
异亮氨酸 Ile [*]	2.12 ± 0.05 ^a	2.11 ± 0.09 ^a	1.67 ± 0.05 ^b	1.64 ± 0.08 ^b	1.75 ± 0.12 ^b	1.77 ± 0.09 ^b
亮氨酸 Leu [*]	4.65 ± 0.30 ^a	4.63 ± 0.27 ^a	3.59 ± 0.13 ^b	3.59 ± 0.06 ^b	3.79 ± 0.05 ^b	3.77 ± 0.21 ^b
酪氨酸 Tyr [#]	2.93 ± 0.95 ^{ab}	3.82 ± 1.00 ^a	1.16 ± 0.70 ^c	1.56 ± 0.14 ^{bc}	1.55 ± 0.79 ^{bc}	1.05 ± 1.11 ^c
苯丙氨酸 Phe ^{#*}	4.05 ± 1.36 ^a	3.22 ± 0.58 ^{ab}	2.39 ± 0.71 ^b	3.15 ± 0.15 ^{ab}	3.05 ± 0.57 ^{ab}	2.93 ± 1.08 ^{ab}
脯氨酸 Pro	12.25 ± 2.76 ^a	11.99 ± 1.88 ^a	10.47 ± 0.34 ^a	10.29 ± 0.22 ^a	11.25 ± 0.57 ^a	11.57 ± 0.71 ^a
赖氨酸 Lys [*]	11.58 ± 1.52 ^a	10.73 ± 0.48 ^{ab}	9.74 ± 1.41 ^{ab}	9.85 ± 0.61 ^{ab}	8.33 ± 1.50 ^b	8.90 ± 0.76 ^{ab}
组氨酸 His [*]	1.75 ± 0.25 ^a	1.64 ± 0.36 ^{ab}	1.12 ± 0.20 ^{ab}	1.54 ± 0.05 ^{ab}	1.29 ± 0.36 ^{ab}	1.01 ± 0.03 ^b
精氨酸 Arg	6.49 ± 0.39 ^b	6.79 ± 0.19 ^b	8.38 ± 0.26 ^a	8.16 ± 0.27 ^a	8.05 ± 0.21 ^a	8.07 ± 0.16 ^a

注: —表示未检出; #为呈味氨基酸; *为必需氨基酸。

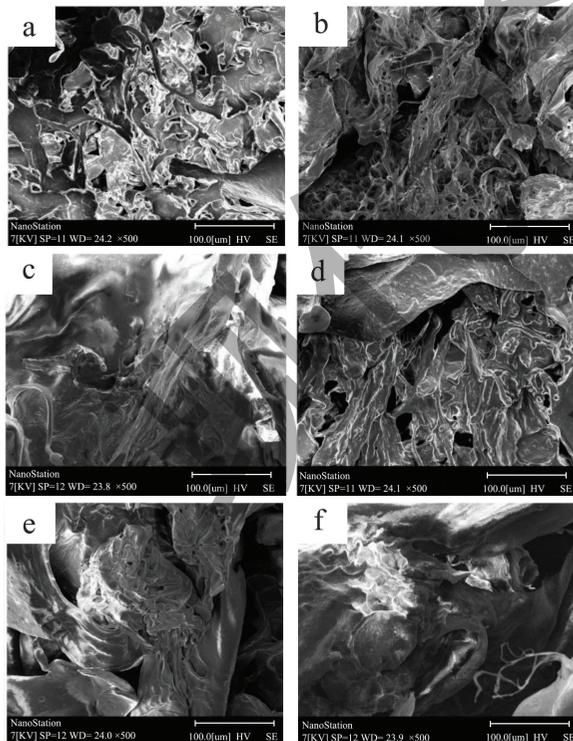


图 5 龟甲胶原蛋白的扫描电镜图 (×500)

Fig.5 SEM of tortoise shell collagen (×500)

注: a为ASC(腹甲), b为H-PSG(腹甲), c为PSC(腹甲), d为ASC(背甲), e为H-PSG(背甲), f为PSC(背甲)。

2.8 扫描电镜分析

冻干后的6种胶原蛋白表现均为疏松柔软的乳白色海绵状结构。为进一步分析不同样品微观结构特征的差异,对6种胶原蛋白进行了扫描电镜分析,如图5所示。ASC呈现出规则束状,粗细不一的束状交错缠绕形成了立体网络,表面出现许多小孔隙;PSC表现为重叠的片层结构,表面相对光滑平整,连续且没有细小孔洞,但有部分丝状突出。H-PSG既有相对大块的片状结构,部分片层呈褶皱状,又夹杂着三维网状部分,并且网状部分孔隙比ASC更小更密集。现如今生物医学领域内对应用型胶原蛋白的期望通常是尽可能呈现均匀的网络结构,以孔隙大小、孔隙度等参数作为其评价指标^[43],从此方面来看,ASC的三维网状结构更有利于孔隙的形成,相较于其他两种方法得到的胶原蛋白在生物医学领域具有更好的应用前景。

3 结论

本研究分析了中华草龟背甲和腹甲的基本成分并对比了不同提取方法对龟甲胶原蛋白理化性质的影响。结果显示,龟甲具有高蛋白和高钙含量的特

点。紫外光谱、红外光谱和 SDS-PAGE 图谱表明提取物为水解程度不同的 I 型胶原蛋白, 背甲和腹甲胶原蛋白在得率、组成和结构上几乎没有差异。三种提取方法中, 热水辅助酶法的提取得率最高, 但胶原蛋白严重水解, 已变性为明胶。提取方法会对胶原蛋白氨基酸组成造成一定影响, 酶法提取会使疏水氨基酸含量减少。酸法提取的胶原蛋白(ASC)拥有更好的三维网状结构。龟甲不仅具有药用价值, 其中的龟甲胶原蛋白在医药、化妆、食品等方面也有较大的应用潜力, 且背甲和腹甲在提取胶原蛋白方面拥有同样的高利用价值, 但由于龟甲中的钙含量较高, 采用传统胶原蛋白提取方法的提取难度大, 其提取方法和工艺还需进一步的探索和优化。本研究可为龟甲的高值化利用提供参考。

参考文献

- [1] GE B L, HOU C Y, BAO B, et al. Comparison of physicochemical and structural properties of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from blacktip reef shark skin [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(6): 376.
- [2] AYAKO S, YOSHIHIRO K, KEITO M, et al. Manufacturing micropatterned collagen scaffolds with chemical-crosslinking for development of biomimetic tissue-engineered oral mucosa [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 22192.
- [3] YE S L, YE J O, SEON Y H, et al. Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(8): 467.
- [4] GU L S, SHAN T T, MA Y X, et al. Novel biomedical applications of crosslinked collagen [J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(5): 464-491.
- [5] CAO J, DUAN Q F, LIU X R, et al. Extraction and physicochemical characterization of pepsin soluble collagens from golden pompano (*Trachinotus blochii*) skin and bone [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2019, 28(8): 837-847.
- [6] 王姿惠. 超声波辅助酶法提取梅花鹿皮胶原蛋白及其复合饮品研制[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2023.
- [7] ALINA S, KATARZYNA A, KATARZYNA M, et al. Collagen based materials in cosmetic applications: a review [J]. *Materials*, 2020, 13(19): 4217.
- [8] 杜沛霖, 周雨晴, 朱华. 龟甲的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(32): 11319-11320, 11338.
- [9] 黄文. 乌龟(*Chinemys reevesii*) 潜水呼吸代谢及龟皮胶原蛋白成分的分析研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2006.
- [10] 陈前进, 余东方, 冯淡开. 龟甲现代研究概况[J]. *海峡药学*, 2009, 21(6): 105-106.
- [11] 何嘉辉, 甘延池, 龚焱, 等. 龟板通过抑制炎症反应改善小鼠软骨终板退变[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(7): 949-952, 959.
- [12] 余翔, 任辉, 沈耿杨, 等. 龟板调控BMSCs增殖、迁移和成骨分化及其抗骨质疏松症的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(12): 1847-1851.
- [13] 钟淑贤, 石雨晴, 杨亚兰, 等. 龟板有效成分对小鼠毛囊生长和毛发生长周期的影响[J]. *中国美容医学*, 2019, 28(10): 96-98.
- [14] 王福田, 李正荣, 赖年悦, 等. 中华草龟龟肠和龟胃的营养品质分析[J]. *肉类工业*, 2020, 468(4): 20-25.
- [15] 黄可承, 包建强, 张星高, 等. 中华鳖粉胶原蛋白不同提取方式的比较与理化表征[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(4): 204-210.
- [16] 郑清瑶, 曹文红, 韩昱梁, 等. 几种提取方法制备的糙刺参体壁胶原蛋白的特性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(15): 145-152.
- [17] 赵琼瑜, 胡鉴, 陈雨欣, 等. 中华鳖背甲脱钙工艺优化及其胶原蛋白结构表征[J]. *食品与机械*, 2022, 38(10): 151-157, 223.
- [18] MEHRAJ A, SOOTTAWAT B. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(3): 817-824.
- [19] 王艳梅. 黄缘盒龟肉酶解产物抗氧化活性及其分离纯化的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013.
- [20] MD S I, WANG H X, AMER A M, et al. Comparison of nutritional composition, physicochemical and antioxidant properties of muscle, liver, and shell from Grass Turtle (*Chinemys reevesii*) [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2021, 19(1): 304-315.
- [21] ELLEN K, GERALDINE K, PETRA K, et al. Chemical composition of turtles and tortoises [J]. *The Journal of Nutrition*, 2006, 136(7): 2053S-2054S.
- [22] 刘学敏. 羊骨胶原蛋白的提取工艺优化及其特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- [23] 李文凤, 王标诗, 余石坚, 等. 响应面法优化黄花鱼鱼鳞脱钙工艺[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(4): 155-160.
- [24] 周舒瑶, 李桂芳, 冯如意, 等. 大目金枪鱼鱼皮酸溶性胶原蛋白的提取及其特性[J]. *食品工业*, 2022, 43(2): 167-170.
- [25] LI Y S, YANG L H, WU S J, et al. Structural, functional, rheological, and biological properties of the swim bladder collagen extracted from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *LWT*, 2022, 153: 112518.
- [26] ALI M M A, SOOTTAWAT B, HIDEKI K. Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales of golden carp (*Probarbus jullieni*) [J]. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2017, 29(6): 450-457.
- [27] KANOKWAN M, SOOTTAWAT B, THUMMANOON P,

- et al. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 1179-1186.
- [28] LI C Y, SONG W, WU J P, et al. Thermal stable characteristics of acid-and pepsin-soluble collagens from the carapace tissue of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. Tissue and Cell, 2020, 67: 101424.
- [29] 梁健华, 赖俏荣, 梁杏. 酶法提取对牛胶原蛋白性质及端肽切除的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(10): 166-173.
- [30] 史倩茜. 鱼鳞明胶脱色、酶解、干燥工艺及其饮料应用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [31] 任戈一, 马雪莲, 潘丽, 等. 不同提取工艺下牛骨胶原蛋白的结构特性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 27-33.
- [32] 赵琼瑜, 胡鉴, 李彩燕, 等. 超声波辅助鳖甲脱钙工艺优化及其对胶原蛋白生化特征的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 39-51.
- [33] LIN Y K, LIU D C. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species [J]. Food Chemistry, 2006, 99(2): 244-251.
- [34] HU G H, LI X T, SU R N, et al. Effects of ultrasound on the structural and functional properties of sheep bone collagen [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 95: 106366.
- [35] PHANAT K, SITTHIPONG N, SOOTTAWAT B, et al. Characteristics of pepsin-solubilised collagen from the skin of splendid squid (*Loligo formosana*) [J]. Journal of Chemistry, 2015, 2015: 482354.
- [36] 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.
- [37] 赵改名, 王壮壮, 祝超智, 等. 超声波辅助酶法提取牛皮胶原蛋白及其结构表征[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 190-199.
- [38] SAMUEL S, JAGDEESH B. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins [J]. Advances in Protein Chemistry, 1986, 38: 181-364.
- [39] TANG Y P, JIN S J, LI X Y, et al. Physicochemical properties and biocompatibility evaluation of collagen from the skin of giant croaker (*Nibea japonica*) [J]. Marine Drugs, 2018, 16 (7): 222-230.
- [40] JING W, PEI X L, LIU H Y, et al. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 544-550.
- [41] ALI M M A, HIDEKI K, SOOTTAWAT B. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication [J]. Process Biochemistry, 2018, 66: 237-244.
- [42] ZOU Y, WANG L, CAI P P, et al. Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(3): 1602-1610.
- [43] 周丹, 沈艳琴, 武海良, 等. 胶原蛋白的应用研究现状[J]. 合成纤维, 2022, 51(8): 5-8.