

中华鳖背甲脱钙工艺优化及其胶原蛋白结构表征

Optimization of calcium removal in the carapace of Chinese soft-shelled turtle and structural characteristics of its collagen

赵琼瑜 胡 鉴 陈雨欣 李彩燕 宋 伟

ZHAO Qiong-yu HU Jian CHEN Yu-xin LI Cai-yan SONG Wei

(浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

摘要:目的:提高中华鳖背甲胶原蛋白的提取率和产品纯度。方法:以脱钙率与胶原蛋白回收率为评价指标,考察盐酸浓度、脱钙时间、脱钙温度和料液比 4 个因素对中华鳖背甲脱钙的影响,应用正交试验对鳖甲钙盐的脱除工艺进行优化,并通过 SDS-PAGE、紫外吸收光谱、红外吸收光谱、氨基酸分析等技术分析相同提取条件下脱钙与未脱钙的鳖甲胶原蛋白结构的变化。结果:最佳脱钙工艺条件为盐酸浓度 0.8 mol/L、脱钙时间 2 h、脱钙温度 28 ℃、料液比 1:25 (g/mL),该条件下脱钙率和胶原蛋白回收率分别为(67.35±0.92)%和(90.77±1.08)%。鳖甲经盐酸脱钙处理后其单位质量样品中胶原蛋白含量和提取率显著增加($P<0.05$),其胶原蛋白结构特征未发生显著变化。结论:盐酸对鳖甲脱钙有较好的脱钙效果,且对其胶原蛋白结构特性无影响。

关键词:中华鳖;背甲;脱钙工艺;胶原蛋白;结构特性

Abstract: Objective: To improve the extraction rate and product purity of Chinese soft-shelled turtle (*pelodiscussinensis*) dorsal collagen. **Methods:** The decalcification rate and collagen recovery rate were used as evaluation indicators to investigate the effects of hydrochloric acid concentration, decalcification time, decalcification temperature and solid-liquid ratio on the decalcification of the carapace of Chinese soft-shelled turtle. The removal process of calcium salts was optimized, and the structural changes of decalcified and non-decalcified turtle carapace collagen were analyzed by SDS-PAGE, ultraviolet absorption spectroscopy, infrared absorption spectroscopy, amino acid anal-

ysis and other techniques under the same extraction conditions.

Results: The optimal decalcification process conditions were hydrochloric acid concentration of 0.8 mol/L, decalcification time of 2 h, decalcification temperature of 28 ℃, and solid-liquid ratio of 1:25 (g/mL). Under these conditions, the decalcification rate and collagen recovery rate were (67.35±0.92)% and (90.77±1.08)%, respectively. The collagen content and extraction rate per unit mass of soft-shelled turtle carapace were significantly increased ($P<0.05$) after decalcification with hydrochloric acid, but the structural characteristics of collagen did not change significantly. **Conclusion:** Hydrochloric acid has a good decalcification effect on the decalcification of turtle carapace, and has no effect on the structural properties of its collagen.

Keywords: Chinese soft-shelled turtle; carapace; decalcification process; collagen; structural characteristics

胶原蛋白是一种最为常见,具有特殊三螺旋结构的细胞外基质蛋白质,主要分布于动物的皮肤、骨和其他器官之中,在维持组织稳态、生物完整性和结构力学中起关键作用^[1]。而其生产来源主要依赖于陆生动物(主要为猪和牛)。由于陆源性胶原蛋白受价格过高、宗教信仰和一些人或者地区的风俗习惯等因素的制约,且水产胶原蛋白因其丰富的来源和相较于陆生动物源胶原蛋白良好的生化性能和独特的优点被广泛研究^[1-3]。

水产品深加工技术的不断发展促进了对胶原蛋白的研究与探索^[4]。水产品加工过程中会产生大量副产物,包括骨头、鳞片和体壁等骨源性副产物,这些副产物富含胶原蛋白,是提取胶原蛋白的优良原材料^[5-7]。目前已从多种水产动物的骨源性材料(如鱼鳞^[8]、鱼骨^[9]和龟甲^[10]等)中提取获得胶原蛋白,但其提取率或得率不高,不能满足产业化需求。这主要由于骨源性材料含有大量的磷酸钙和羟基磷灰石,羟基磷灰石与胶原纤维结合,形成坚硬难溶的骨盐沉积在胶原表面,影响胶原蛋白的溶出^[11]。目前常见的脱钙方法有盐酸法、柠檬酸法和

基金项目:浙江省公益性技术应用研究计划项目(编号:LGN19C190006);浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(编号:2021C02069-8-3);宁波市科技创新重大专项(编号:2021Z009)

作者简介:赵琼瑜,女,浙江万里学院在读硕士研究生。

通信作者:宋伟(1988—),男,浙江万里学院实验师,硕士。

E-mail:sw2014wl@163.com

收稿日期:2021-12-23 **改回日期:**2022-09-26

EDTA 法。EDTA 价格昂贵,无法实现工业化脱钙;柠檬酸的脱钙效果较好,但会导致胶原蛋白易溶出^[12-13]。而盐酸不仅价格便宜,还具有操作简单、脱钙效率高等优点。因此,盐酸常被作为水生动物骨源材料的脱钙试剂^[14-16]。

中华鳖(*Pelodiscussinensis*)是中国重要的淡水经济动物,食药价值高。鳖甲来源于鳖科动物的背甲,含有丰富的胶原蛋白、钙和微量元素等营养成分^[17],是用于提取胶原蛋白的优质来源。鳖甲中胶原蛋白纤维与羟基磷酸钙粘附紧密,胶原蛋白很难溶出,为提高胶原蛋白溶出率需对鳖甲进行脱钙处理。目前大部分的胶原蛋白脱钙研究只是以钙质的去除量为评价指标,无法判定胶原蛋白的损失量,即所得的脱钙工艺具有局限性^[18]。研究拟以鳖甲为原料,采用盐酸脱钙法,综合探究盐酸浓度、料液比、脱钙时间和脱钙温度 4 个因素对中华鳖背甲脱钙率和胶原蛋白迁出率的影响,并通过正交试验对鳖甲脱钙进行优化分析。同时,鳖甲经脱钙处理后,采用乙酸法制备鳖甲胶原蛋白,利用紫外全波长扫描、傅里叶变换红外光谱扫描和圆二色光谱扫描分析胶原蛋白的三螺旋结构,利用 SDS-PAGE 凝胶电泳和氨基酸分析对胶原蛋白的亚基和氨基酸成分进行比较,旨在进一步深入研究和开发中华鳖的鳖甲资源,以期为鳖甲胶原蛋白的提取提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

中华鳖:市售;

SDS-PAGE 试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;

碳酸钙、浓盐酸、硝酸、柠檬酸钠、乙二醇四乙酸二钠、氢氧化钠、无水乙酸钠、氢氧化钠、柠檬酸、钙红指示剂、硫化钠、L-羟脯氨酸标准品、对二甲氨基苯甲醛、氯胺 T 等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

试验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

傅里叶红外扫描仪:VERTEX 70 型,德国 BRUKER OPTICS 公司;

全自动氨基酸分析仪:L8900 型,日本 HITACH 公司;

冷冻干燥机:ALPHA 2-4 LD plus 型,德国 Christ 公司;

紫外分光光度计:Cary-100 型,美国 Agilent Technologies 公司;

精密鼓风干燥箱:BPG-9140A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

电子分析天平:ME204 型,美国 METTLER TOLEDO 公司;

pH 计:S220-K 型,美国 METTLER TOLEDO 公司;

落地大容量离心机:LYNX6000 型,美国 Thermo

Scientific Fisher 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 中华鳖背甲预处理 中华鳖宰杀后,迅速剥离其背甲,精细剔除背甲上的肌肉后,于-20℃冷冻 2 h,粉碎,冷冻干燥,粉碎,4℃保存备用。

1.3.2 鳖甲中总钙含量测定

(1) 钙离子标准曲线绘制:参照侯风萍等^[19]的方法略作改动。精确吸取 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL 钙标准液(100 mg/L 碳酸钙),用蒸馏水定容至 10 mL,用胶头滴管滴加 1 滴硫化钠溶液(10 g/L)和 0.10 mL 柠檬酸钠溶液(0.05 mol/L),用氢氧化钾溶液(1.25 mol/L)调节 pH 值至 12~13,加 3~5 滴钙红指示剂,立即用 EDTA 溶液滴定,直至瓶中溶液由紫红色变为亮蓝色,平行滴定 3 组。以钙离子浓度为纵坐标,EDTA 消耗体积为横坐标,得钙标准曲线方程 $y = 0.044x - 0.0078$, $R^2 = 0.993$ 。

(2) 鳖甲中总钙含量测定:根据 GB 5009.4—2016,并按式(1)计算总钙含量。

$$c_1 = \frac{c_2 \times V_1 \times n_1 \times m_1}{m_2 \times m_3}, \quad (1)$$

式中:

c_1 ——总钙含量,mg/mL;

c_2 ——钙离子质量浓度,mg/mL;

V_1 ——溶解液体积,mL;

n_1 ——稀释倍数;

m_1 ——总灰分质量,g;

m_2 ——灰分质量,g;

m_3 ——样品质量,g。

1.3.3 单因素试验 以盐酸作为溶媒,参照周如意等^[15-16]的方法并略作改动。初设条件为盐酸浓度 0.8 mol/L,温度 25℃,料液比 1:20 (g/mL),脱钙时间 2 h。在此基础上设置不同盐酸浓度(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mol/L)、脱钙时间(1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h)、脱钙温度(5, 10, 15, 25, 30, 35℃)和料液比[1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40 (g/mL)]4 个因素进行优化试验,以脱钙率和胶原蛋白回收率为评价指标。

1.3.4 正交试验设计 根据单因素试验结果和显著性差异分析从脱钙温度、脱钙时间、料液比和盐酸浓度 4 个因素中筛选出显著影响脱钙效果的 3 个因素(盐酸浓度、温度、料液比)作为试验因子,采用 Design-Expert 软件设计 $L_9(3^3)$ 正交试验,以脱钙率和胶原蛋白回收率为评价指标,每组平行 3 次,优化中华鳖背甲脱钙工艺。

1.3.5 脱钙液中钙含量测定 分别精确吸取 1.0 mL 脱钙液样品,用 EDTA 络合滴定法进行钙含量测定,平行滴定 3 组,按式(2)计算脱钙液中钙含量。

$$A = \frac{c_2 \times V_2 \times n_2}{c_1 \times m_4}, \quad (2)$$

式中:

A——脱钙率, %;

V_2 ——脱钙液体积, mL;

n_2 ——滴定稀释倍数;

m_4 ——背甲质量, g。

1.3.6 胶原蛋白含量测定 参照陆剑锋等^[20]的方法并略作改动。精确吸取 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 mL 羟脯氨酸标准应用液(6.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)于 10 mL 具塞比色管中, 分别依次加入蒸馏水 2.50, 2.00, 1.50, 1.00, 0.50, 0.00 mL, 分别加入 2 mL 异丙醇、1 mL 氯胺 T 氧化剂, 摇匀, 放置 4 min。分别依次加入 2 mL 对二甲氨基苯甲醛显色剂(1 g/mL), 加塞摇匀, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min, 冷却, 测定 560 nm 处吸光度, 绘制标准曲线方程为 $y = 0.149 1x - 0.001 8$, $R^2 = 0.995$ 。

精确吸取 5 mL 脱钙液于 25 mL 具塞比色管中, 加入 5 mL 浓盐酸, 氮吹后封口。110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解 24 h, 水解液用 NaOH 溶液调节 pH 至 4~6, 用蒸馏水定容至 25 mL。取上述溶液 2.5 mL 加入 2 mL 异丙醇和 1 mL 氧化剂, 摇匀, 放置 4 min, 加入 2 mL 显色剂, 摇匀, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min, 冷却, 测定 560 nm 处吸光值。按式(3)、式(4)计算脱钙液中胶原蛋白含量和胶原蛋白回收率。

$$G_1 = c_3 \times n_3 \times V_2 \times 11.1 \times 10^6, \quad (3)$$

$$B = \frac{G_1}{G_2} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

G_1 ——脱钙液中胶原蛋白含量, g;

c_3 ——羟脯氨酸质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

n_3 ——胶原测定稀释倍数;

11.1——胶原蛋白水解为羟脯氨酸的系数;

B——胶原蛋白回收率, %;

G_2 ——中华鳖背甲中胶原蛋白含量, g。

1.3.7 鳖甲胶原蛋白的制备 参照张强等^[21]的方法并略作修改。称取一定量中华鳖背甲脱钙样品与未脱钙鳖甲样品, 以料液比 1:10 (g/mL) 加入 0.5 mol/L 的乙酸混匀, 搅拌浸提 24 h, 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液进行透析, 直至样品溶液 pH 为 7, 冻干, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.8 脱钙前后胶原蛋白结构特性测定

(1) SDS-PAGE 分析: 参照张强等^[21-22]的方法稍作修改。分别精确称取一定量的脱钙处理鳖甲胶原蛋白和未脱钙处理鳖甲胶原蛋白, 分别溶于 0.05 mol/L 乙酸溶液中, 制成终质量浓度为 30 mg/mL 胶原蛋白溶解液。以体积比 1:4 与上样缓冲液混合, 沸水浴 5 min, 冷却后短时离心, 收集上清液, 与蛋白 Marker 一同上样, 100 V 恒流下进行电泳。

(2) 紫外全波长扫描(UV)分析: 根据蔡路昀等^[22]的方法略作修改。取适量样品溶解于 0.05 mol/L 乙酸溶液中制成 5 mg/mL 胶原溶液, 以 0.05 mol/L 乙酸溶液作空

白对照, 于 190~400 nm 区间内进行扫描。

(3) 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析: 参照蔡路昀等^[22]的方法, 利用锡探针于 400~4 000 cm^{-1} 区间内进行吸收波谱扫描。

(4) 氨基酸组成分析: 参照张强等^[21]的方法略作修改。准确称取 1 g 样品于 25 mL 具塞比色管中, 加入 10 mL 6 mol/L 优级盐酸, 氮吹后封口, 110 $^{\circ}\text{C}$ 消解 24 h, 过滤, 用去离子水定容, 取 0.2 mL 进行氮吹至干, 加入 0.02 mol/L 的盐酸 2 mL, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 用全自动氨基酸分析仪进行测定。

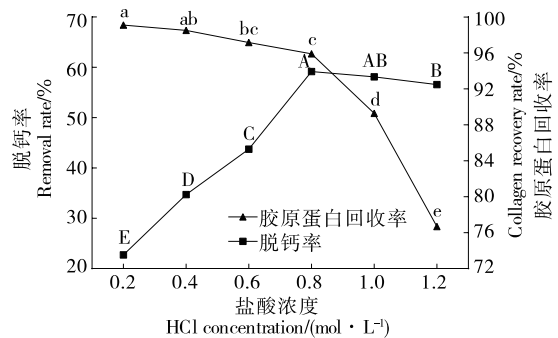
1.3.9 数据统计与分析 试验数据以平均数 \pm 标准差表示。采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA), 用 Duncan 多重比较法进行显著性检验($P < 0.05$); 应用 Graphpad prism 8.0 进行数据整理并作图。

2 结果与分析

2.1 鳖甲脱钙单因素试验

2.1.1 盐酸浓度 由图 1 可知, 随着盐酸浓度的增加, 鳖甲中钙的脱除率呈上升趋势, 胶原蛋白回收率呈下降趋势。当盐酸浓度为 0.8 mol/L 时, 脱钙率最高达 59.16%, 此时胶原蛋白回收率为 95.89%。之后随着盐酸浓度的增加, 脱钙率趋于平缓并略有下降, 胶原蛋白回收率急剧下降($P < 0.05$), 可能是由于加入盐酸, 样品溶胀增强, 结构蓬松程度增加, 利于钙离子的溶出; 而羟基磷灰石的量是一定的, 加入足够多的盐酸相互反应后, 当羟基磷灰石反应基本完全, 再增加盐酸也不能溶出更多的钙^[23]。并且过度地增加酸浓度, 反而会使大分子物质(如胶原蛋白和其他蛋白)溶出增加, 进而影响钙离子的溶出, 同时高浓度盐酸也会破坏胶原蛋白结构^[1]。故选取盐酸浓度为 0.7~0.9 mol/L 用于进一步优化试验。

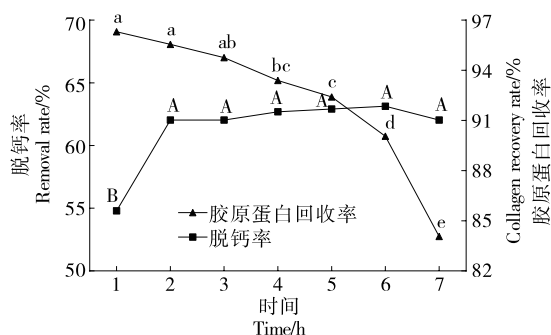
2.1.2 脱钙时间 由图 2 可知, 随着脱钙时间的延长, 鳖甲中钙离子脱除率呈短时间(1.0~2.0 h)上升后趋于平缓的趋势, 胶原蛋白回收率呈下降趋势。当脱钙时间为



小写字母不同代表组间胶原蛋白回收率差异显著($P < 0.05$); 大写字母不同代表组间脱钙率差异显著($P < 0.05$)

图 1 盐酸浓度对中华鳖背甲脱钙效果的影响

Figure 1 Effects of HCl concentration on Ca^{2+} removal rate of the Chinese soft-shelled turtle carapace



小写字母不同代表组间胶原蛋白回收率差异显著 ($P < 0.05$); 大写字母不同代表组间脱钙率差异显著 ($P < 0.05$)

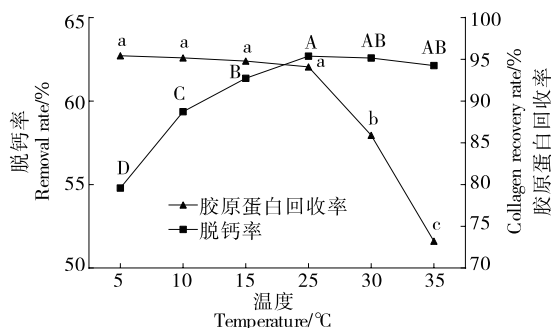
图 2 脱钙时间对中华鳖背甲脱钙效果的影响

Figure 2 Effects of time on Ca^{2+} removal rate of the Chinese soft-shelled turtle carapace

2.0 h 时, 脱钙率达最高为 62.03%, 此时胶原蛋白回收率为 95.55%。之后随着酸泡时间的继续增加, 脱钙率变化不显著。这可能是在进行反应的同时, 盐酸不断地挥发, 导致反应系统中盐酸的实际浓度下降, 不利于可溶性钙的提取^[23]。因此, 选择 2 h 作为中华鳖背甲适宜脱钙时间。

2.1.3 脱钙温度 由图 3 可知, 随着脱钙温度的升高, 鳖甲中钙离子脱除率逐渐增大, 胶原蛋白回收率随脱钙温度的升高呈下降趋势。当脱钙温度为 25 °C 时, 脱钙率达最大值为 62.69%, 此时胶原蛋白回收率为 94.09%。低温时, 钙离子溶解度较低, 渗透性较弱, 胶原蛋白大分子物质更不易渗透。随着脱钙温度的升高, 分子运动加剧, 使其溶解度增大, 但随着脱钙温度的升高, 盐酸挥发, 导致浓度下降, 影响钙的脱除率^[23-24]。因此, 选取脱钙温度为 22~28 °C 用于进一步优化试验。

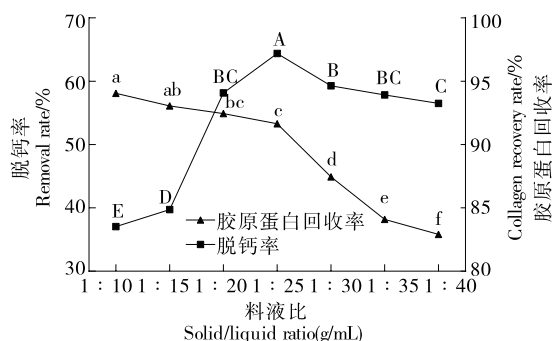
2.1.4 料液比 由图 4 可知, 随着鳖甲与盐酸溶液比例的增大, 钙离子脱除率呈递增的趋势, 胶原蛋白回收率随脱钙温度的升高呈下降趋势。当料液比为 1 : 25 (g/mL) 时, 钙脱除率不再增加, 反而稍有下降, 胶原



小写字母不同代表组间胶原蛋白回收率差异显著 ($P < 0.05$); 大写字母不同代表组间脱钙率差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 脱钙温度对中华鳖背甲脱钙效果的影响

Figure 3 Effects of temperature on Ca^{2+} removal rate of the Chinese soft-shelled turtle carapace



小写字母不同代表组间胶原蛋白回收率差异显著 ($P < 0.05$); 大写字母不同代表组间脱钙率差异显著 ($P < 0.05$)

图 4 料液比对中华鳖背甲脱钙效果的影响

Figure 4 Effects of solid-liquid ratio on Ca^{2+} removal rate of the Chinese soft-shelled turtle carapace

蛋白回收率则大幅下降。一定质量的鳖甲中钙含量是有限的, 盐酸溶液体积的增大利于钙的溶出。当脱钙剂用量继续增加时, 脱钙率略有降低, 表明钙离子已基本从组织中充分溶出。脱钙剂过剩, 不但会影响脱钙效果, 还会导致胶原蛋白的溶出量增加, 回收率降低^[24]。故选择料液比为 1 : 22.5~1 : 27.5 (g/mL) 用于进一步优化试验。

2.2 正交试验

正交试验因素水平见表 1, 正交试验设计及结果见表 2。由表 2、表 3 可知, 各因素对鳖甲脱钙率的影响主次顺序为盐酸浓度 > 脱钙温度 > 料液比。在胶原蛋白回收率方面, 脱钙温度的影响最大, 盐酸浓度的最小。结合 k 值可知, 以脱钙率和胶原蛋白回收率为考察指标的最佳工艺组合分别为 $A_2B_3C_2$ 和 $A_1B_1C_3$ 。根据各因素对脱钙率和胶原蛋白回收率的影响大小, 最后选择 $A_2B_3C_2$ 作为鳖甲脱钙的最佳工艺, 即盐酸浓度 0.8 mol/L、脱钙温度 28 °C、料液比 1 : 25 (g/mL) 和脱钙时间 2 h, 此时脱钙率和胶原蛋白回收率分别为 $(67.35 \pm 0.92)\%$ 和 $(90.77 \pm 1.08)\%$, 说明该正交优化试验所得最佳工艺组合可以有效脱钙, 并且能较大程度地减少胶原蛋白的流失。

2.3 鳖甲胶原蛋白含量与胶原蛋白提取率

由图 5 可知, 未脱钙处理鳖甲和脱钙处理后鳖甲中胶原蛋白含量分别为 62.27, 142.18 mg/g, 脱钙处理后样

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Codes and levels of test factors in orthogonal design

水平	A 盐酸浓度/ (mol · L ⁻¹)	B 脱钙温度/ °C	C 料液比 (g/mL)
1	0.7	22	1 : 22.5
2	0.8	25	1 : 25.0
3	0.9	28	1 : 27.5

表 2 中华鳖背甲脱钙正交试验结果及极差分析
Table 2 L₉ (3³) orthogonal design and statistical analysis

试验号	A	B	C	脱钙率/%	胶原蛋白回收率/%
1	1	1	1	59.57	91.76
2	1	2	2	61.50	89.68
3	1	3	3	61.59	90.87
4	2	2	1	62.51	89.41
5	2	3	2	67.35	90.77
6	2	1	3	62.33	91.24
7	3	3	1	63.71	88.26
8	3	1	2	61.84	92.27
9	3	2	3	65.23	90.93

脱钙率	k ₁	60.887	61.247	61.930	
	k ₂	64.063	63.080	63.563	
	k ₃	63.593	64.217	63.050	
	R	3.176	2.970	1.633	
胶原蛋白回收率	k ₁	90.770	91.757	89.810	
	k ₂	90.743	90.007	90.907	
	k ₃	90.487	89.967	91.013	
	R	0.297	1.790	1.203	

表 3 正交试验结果方差分析
Table 3 Analysis of variance of orthogonal test results

来源	偏差平方和		自由度		均方		F 值	
	脱钙率	胶原蛋白回收率	脱钙率	胶原蛋白回收率	脱钙率	胶原蛋白回收率	脱钙率	胶原蛋白回收率
A	52.914	0.505	2	2	26.457	0.253	63.11	0.349
B	40.422	18.805	2	2	20.211	9.402	48.21	12.978
C	12.557	7.986	2	2	6.279	3.993	14.98	5.512
误差	105.893							

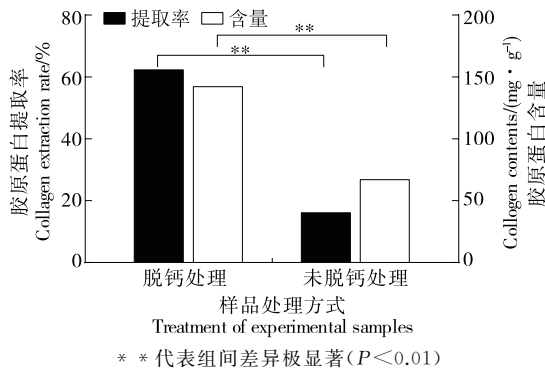


图 5 脱钙处理对鳖甲中胶原蛋白含量和胶原蛋白提取率的影响

Figure 5 Effects of decalcification on collagen contents and extraction yield of collagen in the Chinese soft-shelled turtle carapace

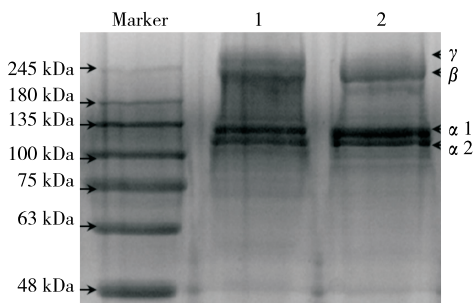
品中的胶原蛋白含量约为未脱钙的 2.3 倍, 差异显著 ($P < 0.05$)。未脱钙处理鳖甲和脱钙处理后鳖甲中胶原蛋白提取率分别为 16.07%, 66.95%, 脱钙处理后样品的

胶原蛋白提取率约为未脱钙的 4.2 倍, 差异显著 ($P < 0.05$), 可能因为鳖甲经脱钙处理后, 钙离子减少, 组织结构疏松, 胶原蛋白表面积增加, 利于胶原蛋白与提取液接触, 增加胶原的溶胀, 进而促使胶原蛋白溶出^[25]。

2.4 鳖甲胶原蛋白结构特性分析

2.4.1 SDS-PAGE 由图 6 可知, 两种胶原蛋白均含有 4 条明显的肽链, 即 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β 和 γ 链, 表明提取的胶原蛋白属于典型的 I 型胶原蛋白。 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 链的相对分子质量在 100~135 kDa, 二聚体 β -链和三聚体 γ -链相对分子质量为 245 kDa 左右, 符合大多数水生胶原蛋白的结构特征^[20-22,26]。

2.4.2 紫外全波长扫描(UV) 由图 7 可知, 脱钙处理与未脱钙处理鳖甲胶原蛋白分别在 214, 215 nm 处有较强的吸收峰, 峰形较为一致。胶原蛋白肽链所含的 C=O、-COOH、CONH₂ 都是生色基团, 分子中的价电子吸收能量发生跃迁, 可在 220 nm 附近产生较强的紫外吸收, 鳖甲胶原蛋白符合 I 型胶原蛋白三股螺旋结构的



1. 未脱钙处理鳖甲胶原蛋白 2. 脱钙处理鳖甲胶原蛋白

图 6 鳖甲胶原蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Figure 6 SDS-PAGE electrophoresis of collagen in the Chinese soft-shelled turtle carapace

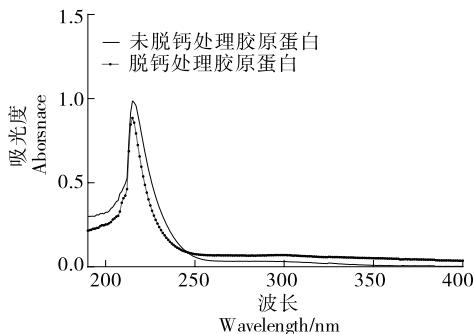
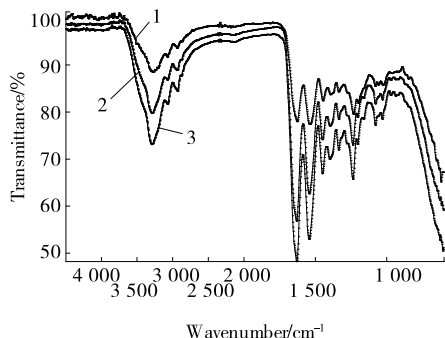


图 7 鳖甲胶原蛋白紫外吸收光谱图

Figure 7 UV absorption spectra of collagen in the Chinese soft-shelled turtle carapace

紫外吸收特征^[22]。特征吸收峰位置发生了位移可能是由于胶原蛋白的氨基酸含量差异所致^[26]，而酸可以破坏部分氨基酸的结构^[27]。

2.4.3 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 由图 8 可知,在酰胺 I(特征吸收范围位于 1 600~1 700 cm⁻¹)、II(特征吸收范围为 1 500~1 600 cm⁻¹)、III(特征吸收范围为 1 200~1 360 cm⁻¹)以及 A(特征吸收范围为 3 200~



1. 胶原蛋白标准品 2. 未脱钙处理鳖甲胶原蛋白 3. 脱钙处理鳖甲胶原蛋白

图 8 鳖甲胶原蛋白红外吸收光谱图

Figure 8 Infrared absorption spectra of collagen in the Chinese soft-shelled turtle carapace

3 400 cm⁻¹)、B带(特征吸收峰位于 2 920 cm⁻¹附近)均可观察到明显的特征峰,符合胶原蛋白的特征吸收峰^[22],说明所提胶原蛋白具有较完整的三螺旋结构。

2.4.4 氨基酸组成 由表 4 可知,鳖甲胶原蛋白中氨基酸种类和含量相对丰富,其中甘氨酸含量最高,占总氨基酸含量的 1/3;其次是亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸),约占总氨基酸含量的 1/5;丙氨酸和谷氨酸含量也较多,约占总氨基酸含量的 1/10;不含色氨酸,只有极少量的苯丙氨酸和半胱氨酸。氨基酸分析结果符合胶原蛋白的氨基酸组成特征^[21,26,28]。两种胶原蛋白的氨基酸种类一致而含量有所差异,与紫外扫描图谱结果分析一致。这可能是由于盐酸破坏了部分氨基酸的结构,使含量发生了变化^[27]。

表 4 鳖甲胶原蛋白氨基酸组成

Table 4 Amino acid compositions of collagen in the Chinese soft-shelled turtle carapaceresidues

氨基酸种类	氨基酸含量(残基/1 000 个残基)	
	脱钙处理	未脱钙处理
天冬氨酸	49.07±0.49	50.03±1.09
苏氨酸	25.58±0.13	26.12±0.73
丝氨酸	42.98±0.44	43.99±1.46
谷氨酸	73.63±0.39	74.66±2.70
甘氨酸	291.71±1.13	288.65±8.48
丙氨酸	135.68±0.39	130.29±1.81
缬氨酸	27.74±0.59	28.02±1.40
蛋氨酸	8.35±0.40	7.54±0.82
异亮氨酸	13.28±0.16	14.20±0.48
亮氨酸	28.24±0.19	24.75±0.96
络氨酸	7.47±0.23	8.59±0.13
苯丙氨酸	0.66±0.04	0.69±0.08
半胱氨酸	0.34±0.02	0.29±0.01
赖氨酸	26.72±0.62	24.68±0.94
组氨酸	13.77±0.19	15.66±1.38
精氨酸	65.35±3.47	66.73±3.01
羟脯氨酸	68.70±1.35	71.55±0.07
脯氨酸	121.04±0.51	123.58±4.31

3 结论

酸法脱除鳖甲中钙的最佳工艺条件为盐酸浓度 0.8 mol/L、料液比 1 : 25 (g/mL)、脱钙温度 28 ℃、脱钙时间 2 h。此条件下脱钙率和胶原蛋白回收率分别为 (67.35±0.92)%和(90.77±1.08)%。相同提取条件下,脱钙处理后的鳖甲样品胶原蛋白含量和提取率显著高于未脱钙鳖甲的,且脱钙处理后制备的鳖甲胶原蛋白提取率高、纯度较高,三螺旋结构完整。后续可进一步通过其他辅助脱钙处理方法提高脱钙率以及降低胶原蛋白损失率。

参考文献

- [1] 赵然, 曹敏杰, 王晶. 水产动物源胶原蛋白的提取及应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8 157-8 165. ZHAO R, CAO M J, WANG J. Research progress on extraction and application of collagen protein from aquatic animals[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2020, 11(22): 8 157-8 165.
- [2] 杨桢楠, 李彩燕, 钱国英. 水产胶原蛋白的提取纯化及理化特性的研究进展[J]. 海洋科学, 2016(1): 138-146. YANG Y N, LI C Y, QIAN G Y. Research progress on extraction, purification and physicochemical properties of aquatic collagen[J]. Ocean Science, 2016(1): 138-146.
- [3] 王明超, 李杰, 秦松, 等. 水产动物源胶原蛋白医学应用研究进展[J]. 海洋科学, 2018, 42(12): 109-117. WANG M C, LI J, QIN S, et al. Research progress on medical application of collagen from aquatic animals[J]. Ocean Science, 2018, 42(12): 109-117.
- [4] PAULY D, ZELLER D. Comments on FAOs state of world fisheries and aquaculture (SOFIA 2016) [J]. Marine Policy, 2017, 77: 176-181.
- [5] 周垚卿, 董静雯, 何强. 鱼类主要副产物的提取与利用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 13(10): 4 284-4 289. ZHOU Y Q, DONG J W, HE Q. Extraction and utilization of main fish by-products[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2019, 13(10): 4 284-4 289.
- [6] 陈弘培, 赵慧, 董诗婷, 等. 鳄鱼综合加工与高值化利用研究进展[J]. 农产品加工(下), 2017(10): 62-67. CHEN H P, ZHAO H, DONG S T, et al. Research progress on comprehensive processing and high-value utilization of crocodile[J]. Agricultural Products Processing (Part II), 2017(10): 62-67.
- [7] FERRARIO C, RUSCONI F, PULAJ A, et al. From food waste to innovative biomaterial: Sea urchin-derived collagen for applications in skin regenerative medicine[J]. Marine Drugs, 2020, 18(8): 414.
- [8] BHAGWAT P K, DANDGE P B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016, 7: 234-240.
- [9] 官萱, 包建强, 黄可承, 等. 鱼骨胶原蛋白提取、纯化工艺及应用的研究进展[J/OL]. 食品与发酵工业. (2022-01-05) [2022-05-27]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029471>. GONG X, BAO J Q, HUANG K C, et al. Research progress on extraction, purification process and application of fish bone collagen[J/OL]. Food and Fermentation Industry. (2022-01-05) [2022-05-27]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029471>.
- [10] 张百刚, 梁海荣, 冯再平, 等. 龟甲胶原蛋白的提取工艺研究[J]. 江西农业学报, 2020, 32(5): 83-87. ZHANG B G, LIANG H R, FENG Z P, et al. Study on the extraction process of tortoise shell collagen[J]. Jiangxi Agricultural Journal, 2020, 32(5): 83-87.
- [11] 李文凤, 王标诗, 余石坚, 等. 响应面法优化黄花鱼鳞脱钙工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 155-160. LI W F, WANG B S, YU S J, et al. Optimization of the decalcification process of yellow croaker scales by response surface methodology[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(4): 155-160.
- [12] 胡爱军, 宋飞莹, 郑捷, 等. 利用柠檬酸脱除鲢鱼鱼鳞中钙的工艺条件优化[J]. 食品研究与开发, 2017(16): 77-81. HU A J, SONG F Y, ZHENG J, et al. Optimization of process conditions for removing calcium from silver carp scales by using citric acid[J]. Food Research and Development, 2017(16): 77-81.
- [13] 严秋萍, 邬应龙, 李月娥, 等. 齐口裂腹鱼骨胶原蛋白超声波辅助提取工艺及其特性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 154-159. YAN Q P, WU Y L, LI Y E, et al. Ultrasonic-assisted extraction process and characteristics of collagen from Schizothorax chinensis[J]. Food & Machinery, 2017, 33(12): 154-159.
- [14] 李晓, 王颖, 李红艳, 等. 多棘海盘车体壁脱钙工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 307-310. LI X, WANG Y, LI H Y, et al. Study on the decalcification process of the carcass of the thorny sea carcass[J]. Food Industry Science and Technology, 2016, 37(10): 307-310.
- [15] 周如意, 刘明华. 草鱼鳞盐酸脱钙工艺研究[J]. 农产品加工(上), 2017(4): 22-25. ZHOU R Y, LIU M H. Study on hydrochloric acid decalcification technology of grass carp scales [J]. Agricultural Products Processing (Part I), 2017(4): 22-25.
- [16] 熊磊, 陈正平, 李敏, 等. 鳊鱼鱼骨脱钙工艺优化及其模型[J]. 南昌大学学报(工科版), 2018, 40(2): 131-136. XIONG L, CHEN Z P, LI M, et al. Optimization and model for decalcification of bighead carp bones[J]. Journal of Nanchang University (Engineering Science), 2018, 40(2): 131-136.
- [17] 王道尊, 汤峥嵘, 谭玉钧. 中华鳖生化组成的分析 II: 背甲、肌肉中矿物元素的组成[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 106-111. WANG D Z, TANG Z R, TAN Y J. Analysis of biochemical composition of Chinese soft-shelled turtle II: Composition of mineral elements in carapace and muscle[J]. Chinese Journal of Aquatic Biology, 1998, 22(2): 106-111.
- [18] 涂宗财, 沙小梅, 王辉, 等. 鳊鱼鱼鳞酸法脱钙[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 106-110. TU Z C, SHA X M, WANG H, et al. Decalcification of bighead carp by acid method[J]. Food and Fermentation Industry, 2012, 38(2): 106-110.
- [19] 侯风萍, 梁莉, 慕艳红, 等. EDTA 络合滴定法测定脑膜炎球菌多糖疫苗原液中的残留钙离子[J]. 微生物学免疫学进展, 2017, 45(5): 25-28. HOU F P, LIANG L, MU Y H, et al. Determination of residual calcium ions in meningococcal polysaccharide vaccine stock solution by EDTA complexometric titration[J]. Advances in Microbiology and Immunology, 2017, 45(5): 25-28.

(下转第 223 页)