

超声波辅助提取骆驼皮胶原蛋白的工艺及结构表征

史睿¹, 何静¹, 吉日木图^{1,2*}

(¹内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018

²内蒙古骆驼研究院 内蒙古阿拉善 750306)

摘要 以骆驼皮为原料,研究超声波辅助提取胶原蛋白的最优工艺,并对提取得到的胶原蛋白进行表征。以胶原蛋白的提取率为指标,探讨酶添加量、料液比、超声波功率、超声波处理时间及总提取时间 5 个因素对骆驼皮胶原蛋白的影响,确定超声波功率后,在单因素实验的基础上,结合响应曲面分析法得到最佳提取条件为:酶添加量 4.5%、料液比 1:23、超声波处理时间 20 min、总提取时间 51 h,胶原蛋白的实际提取率为(41.99±1.57)%。SDS-PAGE 图谱上呈现 3 条 I 型胶原蛋白的特征条带,通过紫外光谱分析推断为典型 I 型胶原蛋白,经红外光谱分析证实胶原蛋白具有完整的三螺旋结构,扫描电子显微镜观察发现提取的胶原蛋白呈相互缠绕的纤维状结构。测定 pH 2~9 胶原蛋白的 Zeta 电位,在此范围电位值呈下降趋势,并确定其等电点为 6.7。

关键词 骆驼皮; 胶原蛋白; 超声波辅助提取; 响应曲面法; 结构表征

文章编号 1009-7848(2022)02-0213-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.023

胶原蛋白是动物体内丰富的蛋白质之一,在所有脊椎动物和无脊椎动物的细胞外基质中起着关键作用,其自身组装成横纹原纤维,为细胞生长提供支持,并影响结缔组织的机械弹性^[1-2]。胶原蛋白主要存在于动物的皮、骨、软骨及肌腱等结缔组织中,约占动物总蛋白的 30%^[3]。它被广泛用于食品、化妆品(皮肤植入物)、生物学及细胞培养等多个领域^[4-7]。胶原蛋白作为一种安全的有效成分应用于产品加工中,可以从肉类加工行业的原材料中有效回收^[8]。

内蒙古自地区拥有丰富的骆驼资源,然而牧区交通不便且条件有限,牧民屠宰骆驼后,只注重食肉,许多骆驼皮被弃置,未能充分发挥皮张价值。研究表明,骆驼皮的脂腺远不如猪皮发达,也比牛皮弱,骆驼皮中油脂含量低于猪皮、牛皮^[9],可将骆驼皮作为提取胶原蛋白的优质原料。通常,将富含胶原纤维的皮肤或肌腱等组织通过中性盐、酸、碱和蛋白酶处理来提取胶原蛋白,相比之下,在 0.5 mol/L 乙酸中使用胃蛋白酶提取胶原蛋白可以获得更高的产量。虽然在酶的作用下胶原蛋

白的端肽被水解切割,但是其三螺旋结构基本保持完整^[10-11]。这些常规的提取方法效率不高,且在提取过程中会造成大量的胶原组织残留物^[12]。目前,低强度的超声波作为一种非破坏性^[13]、安全高效的辅助提取方式被广泛应用在食品加工、蛋白质等物质的提取及改性中^[14]。本试验通过低强度超声波辅助的方式,从骆驼皮中提取胶原蛋白,促进骆驼源胶原蛋白的工业化生产,增加骆驼副产品的附加值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

骆驼皮,内蒙古骆驼研究院。

胃蛋白酶(1:10 000),北京索莱宝科技有限公司;中性蛋白酶(1398),山东龙元生物工程有限公司;羟脯氨酸(碱水法)试剂盒,南京建成生物工程研究所;其它主要试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

JY 88-IIIN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;JJ-2 型组织捣碎机,常州赛普实验仪器厂;XK78-2 型磁力加热搅拌器,江苏新康医疗器械有限公司;LAMBDA 365 紫外-可见分光光度计,PerkinElmer 股份有限公司;Thermo Scientific Nicolet iS10 傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技公司;TM4000 台式扫描电子显微

收稿日期: 2021-02-21

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFE0203300);

关键技术攻关计划项目(2019GG359)

作者简介: 史睿(1994—),女,硕士生

通信作者: 吉日木图 E-mail: yelutuo1999@vip.163.com

镜,日立高新技术公司;Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度电位仪,英国马尔文仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 胶原蛋白含量的测定 参照朱敏^[15]的方法,使用羟脯氨酸(碱水法)试剂盒测定羟脯氨酸质量分数。胶原蛋白质量分数(%)=羟脯氨酸质量分数×7.1。

通常,羟脯氨酸占胶原蛋白干重的14%左右,然而组织来源、部位甚至测定方法的不同,其含量也会随改变,如在软骨中约占10%左右。人们常用11.1作为水生动物换算系数,陆生动物则多采用7.1^[16]。

1.3.2 胶原蛋白提取率的计算 胶原蛋白的提取率按下式计算:

胶原蛋白提取率(%)=

$$\frac{\text{提取液中胶原蛋白质量分数}}{\text{预处理后骆驼皮中胶原蛋白质量分数}} \times 100$$

1.3.3 提取工艺流程 骆驼皮→修剪、浸泡→去毛→脱脂→去除盐溶性非胶原成分→超声波辅助提取→盐析、纯化→冷冻干燥

1.3.4 骆驼皮的预处理

1) 浸泡 冷冻的骆驼皮在4℃解冻后,用蒸馏水冲洗干净。将骆驼皮切分为5 cm×5 cm块状,盆中加入0.5% Na₂CO₃浸泡数小时后,蒸馏水洗净备用。

2) 去毛 浸泡后的原料皮中加入不同质量浓度(2,4,6,8,10 mg/mL)的1398中性蛋白酶,温度控制在25℃,保温去毛4 h,根据去毛效果选择最优去毛工艺。

3) 脱脂 将脱毛后的骆驼皮切分为0.5 cm×0.5 cm小块,称取适量样品按料液比1:10加入5% Na₂CO₃,搅拌脱脂18 h,蒸馏水洗净。

4) 去除盐溶性非胶原成分 脱脂后的原料按料液比1:10加入2% NaCl搅拌18 h,蒸馏水洗净。

以上操作均在低温下进行,将预处理后的骆驼皮储存在-20℃备用。

1.3.5 匀浆液的制备 称取一定质量预处理后的骆驼皮加入适量蒸馏水,使用组织捣碎机间隙工作,控制物料温度不超过25℃,捣碎后离心去除多余水分。将捣碎后样品加入到0.5 mol/L乙酸介

质中,料液比为1:10,继续使用组织捣碎机匀浆,使其充分混匀搅碎。

1.3.6 超声波辅助提取骆驼皮胶原蛋白 将胃蛋白酶溶解于0.5 mol/L乙酸溶液中,称取一定质量的上述匀浆液,二者混匀后进行超声波处理,搅拌提取48 h后,于8 000 r/min离心20 min,分离上清液和沉淀,保留上清液,得到骆驼皮胶原蛋白提取液。所有操作,均在低温下进行。

1.3.7 胶原蛋白的盐析纯化 在提取液中加入NaCl至浓度为0.9 mol/L后盐析24 h,10 000 r/min离心10 min,沉淀加入0.5 mol/L乙酸溶液,搅拌充分溶解。完全溶解后用0.1 mol/L乙酸透析24 h,再用蒸馏水透析24 h,经冷冻干燥得到超声波辅助提取的骆驼皮胶原蛋白(UPSC)。所有操作,均在低温下进行。

1.3.8 超声波辅助提取骆驼皮胶原蛋白工艺的优化

1.3.8.1 单因素实验 在前期试验的基础上,固定酶添加量4%、料液比1:20、超声波处理时间20 min、超声波功率200 W、总提取时间48 h条件,分别考察酶添加量(0.5%,1.0%,2%,4%,8%)、料液比(1:5,1:10,1:20,1:30,1:40)、超声波处理时间(5,10,15,20,25,30 min)、超声波功率(50,100,150,200,250 W)及总提取时间(12,24,36,48,60 h)对骆驼皮胶原蛋白提取率的影响。

1.3.8.2 响应面优化试验 在单因素实验结果的基础上,依据Box-Behnken中心组合试验设计原理,以胶原蛋白提取率为响应值,选取酶添加量、料液比、超声波处理时间和总提取时间4个影响显著的因素,进行四因素三水平的组合试验,使用DesignExpert 8.0.6.1软件进行响应面分析。因素水平及编码见表1。

表1 骆驼皮胶原蛋白提取试验因素及水平
Table 1 Factors and levels of collagen extraction from camel skin

试验因素	水平		
	-1	0	1
酶添加量(A)/%	2	4	6
料液比(B)	1:10	1:20	1:30
超声波提取时间(C)/min	15	20	25
总提取时间(D)/h	36	48	60

1.3.9 胶原蛋白的结构表征

1.3.9.1 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 利用 SDS-PAGE 凝胶电泳分析法分析 UPSC, 采用 5% 浓缩胶和 8% 分离胶体系进行电泳分离, 用 0.5 mol/L 乙酸将样品配置成 0.5 mg/mL 的胶原蛋白溶液, 上样量为 5 μ L。分别采用浓缩胶电压 80 V、分离胶电压 100 V 进行电泳。电泳结束后, 用考马斯亮蓝 R-250 染色胶片, 并用乙醇-乙酸脱色液进行脱色, 最后使用凝胶成像仪观察分析。

1.3.9.2 紫外光谱分析 将提取得到的 UPSC 置于 0.5 mol/L 乙酸溶液中, 配制成 0.5 mg/mL 的溶液, 稀释 10 倍后利用紫外-可见分光光度计上机测试, 在 200~400 nm 近紫外光区对胶原蛋白溶液进行扫描。

1.3.9.3 傅里叶变换红外光谱分析 分别称取适量 UPSC 冻干样品与 KBr 按一定的比例混合研磨, 置于压片机上压片, 使用傅里叶变换红外光谱仪在 4 000~500 cm^{-1} 波数范围对样品进行扫描测定, 分辨率为 2 cm^{-1} 。

1.3.9.4 扫描电子显微镜观察 将 UPSC 剪成小块, 固定在载物片上, 然后用扫描电子显微镜观察其形态特性。使用 10 kV 的加速电压, 以 200 \times 倍的倍率采集图像。

1.3.9.5 Zeta 电位测定 将 UPSC 用 0.5 mol/L 乙

酸溶解, 低温下搅拌 6 h, 使其最终质量浓度为 0.5 mg/mL。用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH, 分别测定不同 pH 值(2~9)下 UPSC 的 Zeta 电位。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度的中性蛋白酶(1398)对去毛效果的影响

不同质量浓度的中性蛋白酶(1398)对骆驼皮的去毛效果不同。从图 1 中可以看出, 使用质量浓度为 2 mg/mL 中性蛋白酶处理骆驼皮, 去毛效果较差, 有些区域不能完全将毛去除干净; 酶的质量浓度 4~6 mg/mL 范围可达到较好的去毛效果, 使用 6 mg/mL 酶处理后的皮张色泽较白, 皮质较为柔软。研究表明, 酶可以使皮的内容物溶解出来, 改变皮表面的折光性能, 使颜色变白, 同时, 酶具有松散胶原纤维的作用, 使皮张变得柔软^[7]。随着酶质量浓度的增加, 皮质发生变化, 使用质量浓度为 8 mg/mL 的中性蛋白酶处理时, 局部区域颜色开始变黄且毛孔粗大, 使用 10 mg/mL 蛋白酶处理后, 皮质过度松软, 颜色发黄, 胶原纤维被高浓度的酶破坏, 所以选择 6 mg/mL 的酶质量浓度以达到最佳去毛效果。

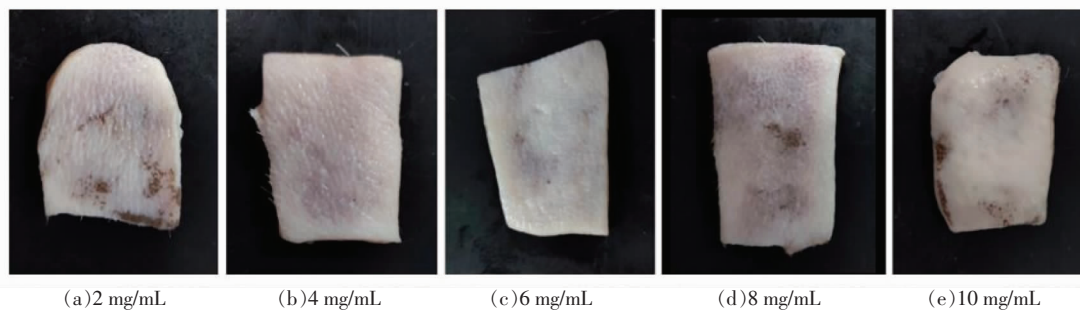


图 1 不同质量浓度的中性蛋白酶(1398)对骆驼皮去毛效果的影响

Fig.1 The effects of different mass concentrations of neutral protease (1398) on the hair removal of camel skin

2.2 超声波辅助提取骆驼皮胶原蛋白的单因素实验

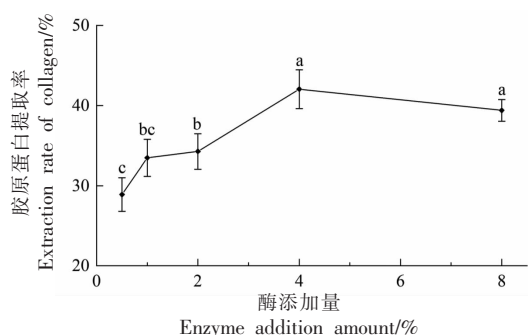
2.2.1 酶添加量对骆驼皮胶原蛋白提取率的影响

由图 2 可知, 随着酶添加量的增加, 提取率随之升高。当酶量增加时, 更多的底物可以与酶充分结合, 增加提取率。当酶添加量为 4% 时, 此时提取率

为 $(42.05 \pm 2.42)\%$, 达到最高水平。当酶量继续增大时, 酶对胶原蛋白非螺旋区域的反应过度, 使其组织结构遭到破坏, 导致胶原蛋白浓度下降, 提取率降低。因此, 初步确定最佳酶添加量为 4%。

2.2.2 料液比对骆驼皮胶原蛋白提取率的影响

图 3 表明, 随着液料比的增大, 提取率呈先增加后



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

图2 酶添加量对提取率的影响

Fig.2 Effects of enzyme addition amount on extraction rate

降低趋势。当料液比较小时,预处理后的原料在乙酸溶液中会发生溶胀现象,导致体系中黏度较高,酶与底物不能充分结合,且不利于超声波空化作用的传导^[18],影响酶解进程,使提取率较低。增加乙酸溶液的体积,降低了体系的黏度,超声波可充

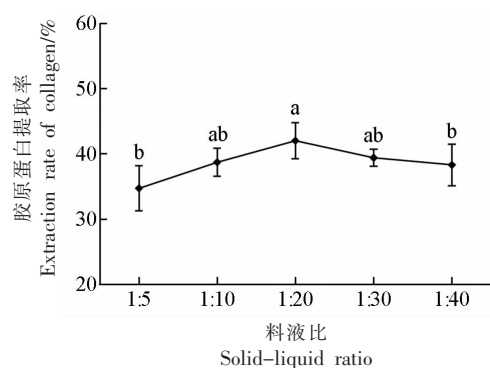


图3 料液比对提取率的影响

Fig.3 Effects of solid-liquid ratio on extraction rate

2.2.4 超声波功率对骆驼皮胶原蛋白提取率的影响 由图5可知,在料液比为1:20,超声波处理20 min,总提取时间48 h的条件下,随着超声功率的提高整体提取率先上升,功率达到200 W时胶原蛋白提取率最高,骆驼皮中的胶原蛋白大部分已溶出,随着超声波功率的增加,胶原蛋白提取率呈平稳趋势,变化不显著。有研究表明,当超声波功率过大时,会增加散射衰减,形成声屏障,影响提取效果^[19]。因此,为避免过分超声处理影响胶原蛋白的组织结构,选择200 W为提取胶原蛋白的最优超声波功率。

超声波产生的微声流能加快传质扩散,产生

分发挥空化作用且震动强度增加,打散胶原纤维,有利于更多胶原蛋白的溶出,从而使提取率增高。同时,各体系中酶制剂用量是相同的,料液比增加会使酶浓度降低,可以酶解的骆驼皮的质量有限,导致提取率逐渐下降。因此,确定最适料液比为1:20,此时提取率可达 $(42.02\pm 2.78)\%$ 。

2.2.3 超声波处理时间对骆驼皮胶原蛋白提取率的影响 由图4可知,胶原蛋白提取率呈先增加后降低的趋势。超声时间在5~25 min内胶原蛋白的提取率显著增加,说明超声波可增加提取率,缩短提取时间,在超声波处理20 min时提取率达到最大,此时原料中胶原蛋白基本溶出;然而随着超声波处理时间加长,其产生的空化效应和机械作用增强,在局部的高温高压作用下,会加速提取到的胶原蛋白发生降解^[19],破坏胶原蛋白结构,使得提取率开始下降。因此,初步选择超声波处理时间为15~25 min。

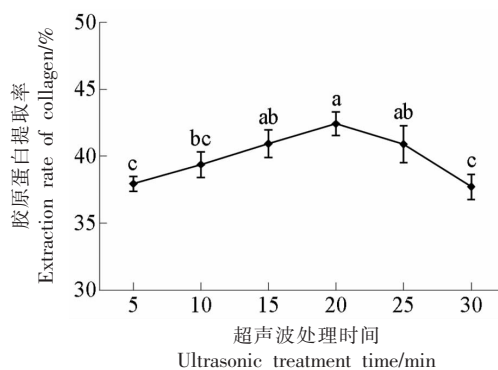


图4 超声波处理时间对提取率的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic treatment time on extraction rate

空化、震荡效应,活化酶分子构象及催化部位^[20]。然而超声波处理的一个主要缺点是其产生的空化效应会在介质内部引起高温、高剪切力以及高压^[21],同时它还可以破坏多肽链上的氢键和范德华相互作用,导致蛋白质或酶发生变性^[12]。本试验采用冰浴的方式来消除热效应,并选择适当的超声波功率及处理时间,在保正其完整结构及生理活性的基础上,以温和的超声波辅助方式高效提取胶原蛋白。

2.2.5 总提取时间对骆驼皮胶原蛋白提取率的影响 图6表明,随着总提取时间的增加,胶原蛋白的提取率呈先升高后降低的趋势。胶原蛋白溶出

的过程是固体溶质向溶剂传递的过程^[22],在其二者未达平衡前,随着提取时间的延长,胃蛋白酶促使胶原蛋白不断释放到提取液中,提取率逐渐增加。在 48 h 处,胶原蛋白提取率达最高值为

(42.48±1.35)%。然而随着时间的继续增加,其有下降趋势,部分胶原蛋白发生了水解,使得提取率下降。综上,初步选择酶提取时间为 36~60 h。

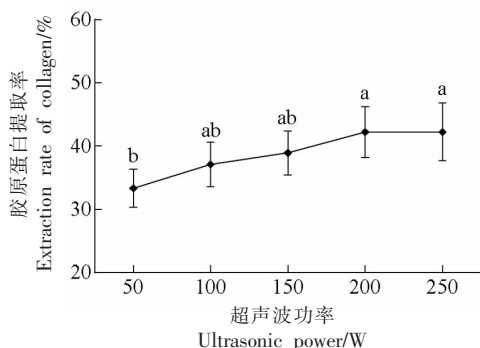


图 5 超声波功率对提取率的影响

Fig.5 Effects of ultrasonic power on extraction rate

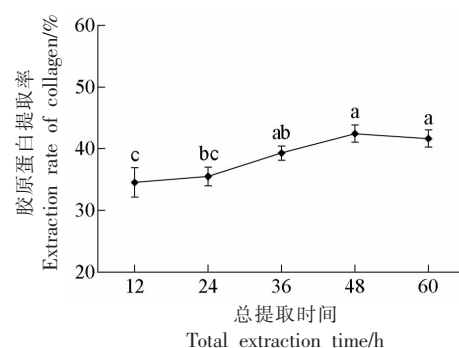


图 6 总提取时间对提取率的影响

Fig.6 Effects of total extraction time on extraction rate

2.3 响应曲面法对超声波辅助提取骆驼皮胶原蛋白工艺的优化

在单因素实验的基础上,根据 Box-Behnken 原理,以骆驼皮胶原蛋白提取率为响应值,设计四

因素三水平响应曲面分析试验,使用 DesignExpert8.0.6.1 软件进行数据分析。表 2 为骆驼皮胶原蛋白提取工艺响应曲面设计试验设计及结果。

表 2 骆驼皮胶原蛋白提取工艺响应曲面设计试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of collagen extraction from camel skin for response surface analysis

试验号	酶添加量(A) /%	料液比(B)	超声波处理时间(C)/min	总提取时间(D) /h	提取率/%	试验号	酶添加量(A) /%	料液比(B)	超声波处理时间(C)/min	总提取时间(D) /h	提取率/%
1	4	1:20	20	48	39.80	16	4	1:10	20	60	34.73
2	6	1:20	25	48	36.65	17	4	1:20	15	60	39.10
3	4	1:30	25	48	38.97	18	6	1:30	20	48	36.89
4	2	1:30	20	48	32.53	19	4	1:10	15	48	33.48
5	6	1:20	20	36	34.86	20	4	1:20	20	48	40.36
6	4	1:20	20	48	42.51	21	4	1:20	25	36	37.50
7	4	1:20	25	60	38.30	22	2	1:20	20	60	30.23
8	6	1:20	15	48	35.09	23	2	1:20	25	48	31.75
9	4	1:30	20	60	38.10	24	4	1:30	15	48	35.30
10	2	1:20	20	36	30.50	25	4	1:20	15	36	33.50
11	4	1:10	25	48	33.20	26	4	1:20	20	48	41.79
12	2	1:10	20	48	28.95	27	4	1:20	20	48	40.10
13	4	1:10	20	36	33.01	28	4	1:30	20	36	37.57
14	2	1:20	15	48	29.48	29	6	1:20	20	60	39.00
15	6	1:10	20	48	33.99						

2.3.1 回归模型的方差分析 通过对响应曲面试验结果进行拟合回归分析,得到骆驼皮胶原蛋白提取率与各因素变量的二次多项回归方程为: $y=40.91+2.75A+1.83B+0.87C+1.04D-0.17AB-0.18AC+1.10AD+0.99BC-0.30BD-1.20CD-5.16A^2-3.06B^2-2.36C^2-1.85D^2$ 。

对二次多项回归模型进行方差分析,结果如表3所示。模型 $F=32.01, P<0.0001$,意味该回归模型显著性极高,具有统计学意义,可以用模型分析预测骆驼皮胶原蛋白提取率的结果。失拟项 $F=0.46, P=0.8557>0.05$,失拟项不显著,可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。决定

系数 $R^2=0.9697$,校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9394$,说明回归模型与实际试验拟合程度较高,可以模拟93.94%的响应值变化,只有6.06%的变异不能由此模型解释,进一步说明模型拟合程度较好,能够用于骆驼皮胶原蛋白提取率的理论预测。

根据表3可知,模型中 $A、B、C、D、A^2、B^2、C^2、D^2$ 对响应值影响极显著($P<0.01$), $AD、BC、CD$ 对响应值影响显著($P<0.05$)。 F 检验可以反映回归模型的有效性, F 值越大,说明此因素对胶原蛋白提取率的影响越显著^[9],因此,4个因素对胶原蛋白提取率的影响顺序为:酶添加量(A)>料液比(B)>总提取时间(D)>超声波提取时间(C)。

表3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance for the regression model

方差来源	平方和	自由度	方差	F值	P值	
模型	379.31	14	27.09	32.01	< 0.0001	显著
A	90.97	1	90.97	107.47	< 0.0001	**
B	40.33	1	40.33	47.65	< 0.0001	**
C	9.05	1	9.05	10.69	0.0056	**
D	13.06	1	13.06	15.43	0.0015	**
AB	0.12	1	0.12	0.14	0.7172	
AC	0.13	1	0.13	0.15	0.7054	
AD	4.86	1	4.86	5.74	0.0311	*
BC	3.90	1	3.90	4.61	0.0498	*
BD	0.35	1	0.35	0.42	0.5283	
CD	5.76	1	5.76	6.80	0.0206	*
A ²	172.77	1	172.77	204.11	< 0.0001	**
B ²	60.78	1	60.78	71.80	< 0.0001	**
C ²	36.16	1	36.16	42.72	< 0.0001	**
D ²	22.22	1	22.22	26.26	0.0002	**
残差	11.85	14	0.85			
失拟项	6.33	10	0.63	0.46	0.8557	不显著
纯误差	5.53	4	1.38			
校正总变异	391.16	28				

注:“*”表示有显著差异($P<0.05$);“**”表示有极显著差异($P<0.01$)。

2.3.2 过程变量的交互作用 图7中的响应曲面图和等高线图直观反映了酶添加量(A)、料液比(B)、超声波提取时间(C)及总提取时间(D)各因素间的交互作用对骆驼皮胶原蛋白提取率的影响。

通过观察图7中各响应曲面的陡峭程度及等

高线图的疏密程度,可以看出4个因素中酶添加量与总提取时间、料液比与超声波提取时间、超声波提取时间与总提取时间的交互作用显著,对胶原蛋白提取率的影响较大,其它因素间的交互作用不显著,这与方差分析的结果一致。

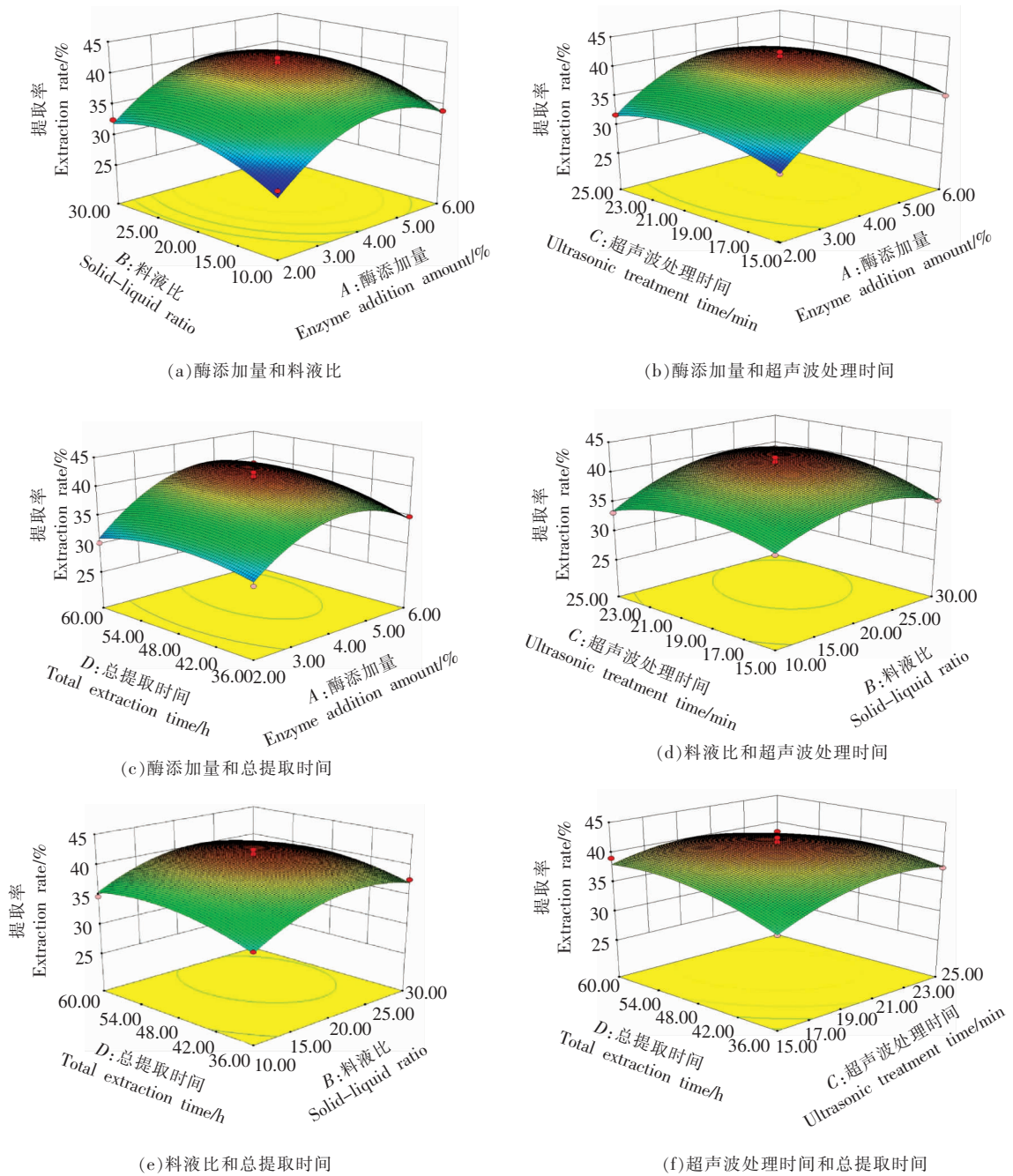


图 7 过程变量的响应曲面图

Fig.7 Response surface diagram of process variables

2.3.3 最优提取条件的确定与验证 通过模型计算分析得到理论上的最佳提取条件为：酶添加量 4.58%、料液比 1:23.03、超声波提取时间 20.81 min、总提取时间 51.49 h，提取率可达 (41.81 ± 1.89)%。考虑实际操作情况，将优化条件整合为：酶添加量 4.5%、料液比 1:23、超声波处理时间 20 min、总提取时间 51 h，在此条件下进行 3 次平行

试验进行验证，得到胶原蛋白提取率为 (41.99 ± 1.57)%，与拟合模型的预测值接近，说明该模型合理，参数可靠，可以用来预测提取骆驼皮的最优工艺条件。

2.4 骆驼皮胶原蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳对 UPSC 的分子质

量进行测定,分析其亚基组成。如图8所示,UPSC是由 α 链(α_1 和 α_2)、 β 链及 γ 链组成。在135 ku处有两条谱带,较粗的一条是由两条 α_1 肽链重叠构成的,另一条是单条的 α_2 肽链;在245 ku处是 α 链二聚体,即 β 链;高于245 ku处的条带是I型胶原蛋白 α 链的三聚体,即 γ 链。此结构与刘雯恩等^[23]研究一致。因此,可初步判断提取出的UPSC为结构完整的I型胶原蛋白。

2.5 骆驼皮胶原蛋白紫外光谱分析结果

胶原蛋白的近紫外吸收光谱可判断其酪氨酸含量和非螺旋端肽的完整性^[18]。图9中UPSC的最大吸收峰在218 nm处,与Lin等^[24]的研究结果一致,这是由于C=O的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所致。同时,在280 nm处无吸收峰出现,说明芳香族氨基酸含量较少,提取得到的胶原蛋白纯度较高^[16]。

2.6 骆驼皮胶原蛋白傅里叶变换红外光谱分析结果

由图10可知,UPSC具有I型胶原蛋白红外光谱特征吸收峰,即酰胺A、B和酰胺I、II、III。酰胺A带主要是由N-H键的伸缩振动引起,自由N-H伸缩振动发生的范围是3400~3450 cm^{-1} ,然而当N-H基团参与氢键形成时,其振动频率会偏低,通常为3300 cm^{-1} 左右^[25]。UPSC的酰胺A带在3301.32 cm^{-1} ,说明UPSC中有较多的N-H键参与肽链的形成。在2922.03 cm^{-1} 附近为酰胺B带,这是由 $-\text{CH}_2$ 基团的不对称伸缩振动产生的,反映了酰胺A与酰胺II带之间的相互作用^[26]。酰胺I带的范围一般在1625~1690 cm^{-1} 之间,酰胺II带的范围一般在1550~1600 cm^{-1} 之间。观察到UPSC的酰胺I带在1630.46 cm^{-1} 左右,酰胺II带在1543.98 cm^{-1} ,移动到了更低的频率,进一步说明胶原蛋白中氢键的存在。在1236.46 cm^{-1} 处存在的吸收峰是由N-H键平面弯曲形成的酰胺III带特征频率。酰胺II和酰胺III带可确定胶原蛋白螺旋结构的存在。综上,UPSC保有较完整的三螺旋结构。

2.7 骆驼皮胶原蛋白扫描电子显微镜观察结果

通过肉眼和扫描电子显微镜观察冻干后的UPSC,并对其形态进行分析。图11a为肉眼观察下的UPSC形态,质轻且柔软,呈乳白色的海绵状态,表面可见有一定的孔隙;图11b为扫描电子

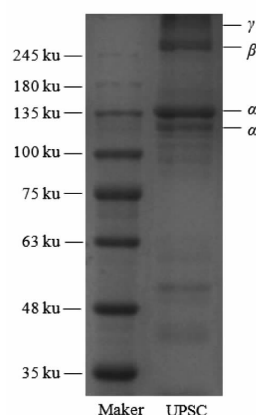


图8 骆驼皮胶原蛋白的SDS-PAGE图谱
Fig.8 SDS-PAGE patterns of collagen extracted from camel skin

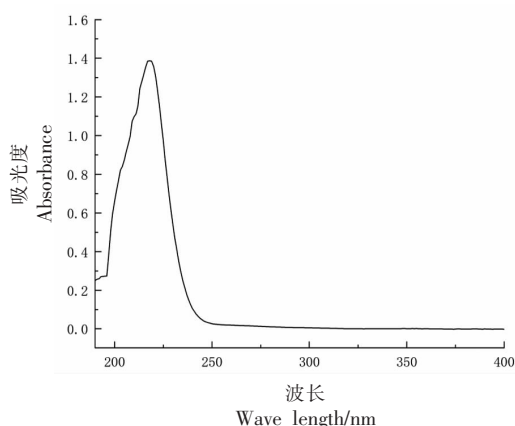


图9 骆驼皮胶原蛋白的紫外吸收光谱图
Fig.9 Ultraviolet absorption spectrum of collagen extracted from camel skin

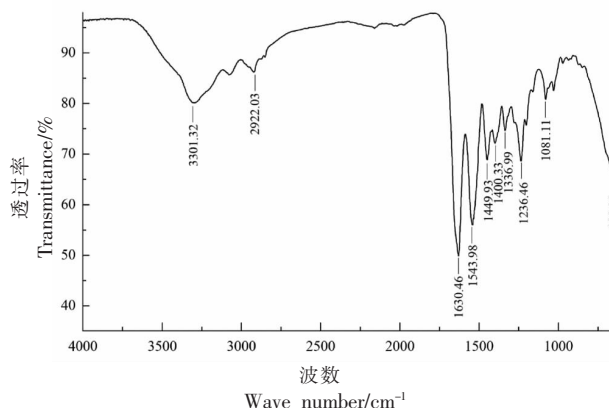


图10 骆驼皮胶原蛋白的傅里叶红外光谱图
Fig.10 Fourier transform infrared spectroscopy of collagen extracted from camel skin

显微镜下 UPSC 的微观结构,更清楚的显示出大量多孔、疏松的横截面,呈现相互缠绕的卷曲状结构,由此表明 UPSC 具有胶原的纤维特性^[27]。

2.8 骆驼皮胶原蛋白 Zeta 电位分析结果

胶原蛋白表面的净电荷数量会影响其稳定

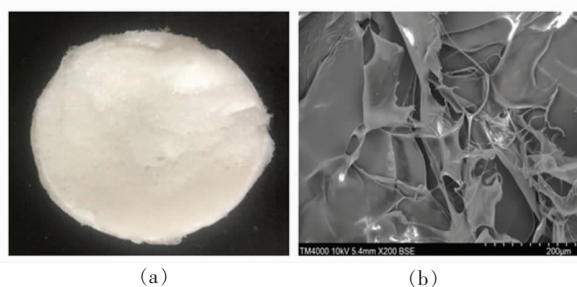


图 11 骆驼皮胶原蛋白肉眼观察图(a)及扫描电子显微镜观察图(b)

Fig.11 Camel skin collagen as viewed in naked eye (a) and SEM micrograph (b)

3 结论

为节约成本,提高提取效率,本试验采用超声波辅助法提取骆驼皮中的胶原蛋白,确定了最优工艺:使用质量浓度为 6 mg/mL 的中性蛋白酶(1398)对骆驼皮进行去毛,将预处理后的骆驼皮进行单因素实验,确定提取超声波功率为 200 W,在此基础上,结合响应曲面分析法得到最佳提取条件为:酶添加量 4.5%、料液比 1:23、超声波提取时间 20 min、总提取时间 51 h,胶原蛋白的实际提取率为 $(41.99 \pm 1.57)\%$,与模型预测拟合较好,证明该模型能够用于骆驼皮胶原蛋白提取率的理论预测。

从骆驼皮中提取到的胶原蛋白为 I 型胶原蛋白,由 α 链(α_1 和 α_2)、 β 链及 γ 链组成。紫外光谱分析进一步推断 UPSC 为典型 I 型胶原蛋白,经红外光谱分析证实 UPSC 具有完整的三螺旋结构,通过扫描电子显微镜观察到胶原纤维的存在。同时测定 UPSC 在 pH 2~9 的 Zeta 电位,确定其等电点为 6.7。

参 考 文 献

[1] SORUSHANOVA A, DELGADO L M, WU Z, et

性,因此测定了不同 pH 值(2~9)UPSC 的 Zeta 电位值。如图 12 所示,UPSC 在 pH 2~6.7 范围时带正电荷,在 pH 6.7~9 范围时带负电荷。蛋白质水溶液在其等电点(PI)处净电荷为零^[28]。由图可知 UPSC 的等电点为 6.7。

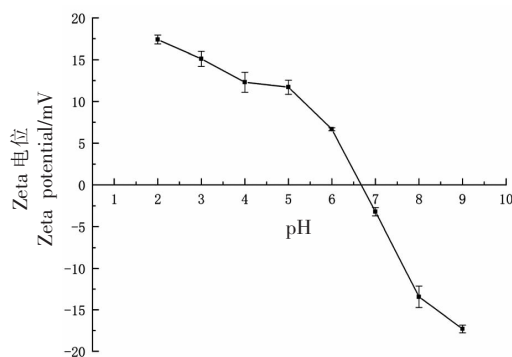


图 12 不同 pH 值下骆驼皮胶原蛋白 Zeta 电位数据
Fig.12 Zeta potential of collagen extracted from camel skin at different pH values

al. The collagen suprafamily: From biosynthesis to advanced biomaterial development[J]. *Advanced Materials* (Deerfield Beach, Fla.), 2019, 31(1): 1801651.

- [2] RAMSHAW J A M. Biomedical applications of collagens[J]. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 2016, 104(4): 665-675.
- [3] SINTHUSAMRAN S, BENJAKUL S, KISHIMURA H. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*) [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(4): 2435-2441.
- [4] 白海英, 柯蕾芬. 胶原蛋白应用的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2013, 34(2): 133-135.
BAI H Y, KE L F. Research progress of collagen application[J]. *Journal of Jilin Medical College*, 2013, 34(2): 133-135.
- [5] SONG H D, ZHANG L, LUO Y K, et al. Effects of collagen peptides intake on skin ageing and platelet release in chronologically aged mice revealed by cytokine array analysis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, 22(1): 277-288.
- [6] SIONKOWSKA A, SKRZYŃSKI S, ŚMIECHOWSKI K, et al. The review of versatile application of collagen[J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2017,

- 28(1): 4-9.
- [7] DILAN RASIKA D M, SENAKA RANADHEERA C, IDANARACHCHI J K V. Applications of marine-derived peptides and proteins in the food industry[M] //KIM S K. Marine Proteins and Peptides. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2013: 545-587.
- [8] SIMÕES G S, SILVEIRA E T F, DE OLIVEIRA S R, et al. Optimum conditions for extracting collagen from the tunica albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated collagen[J]. Meat Science, 2014, 96(4): 1460-1468.
- [9] 常新华, 张梅香, 卢荣, 等. 我国骆驼皮组织结构研究[J]. 中国皮革, 1986(1): 6-8.
CHANG X H, ZHANG M X, LU R, et al. Study on the tissue structure of camel skin in China[J]. China Leather, 1986(1): 6-8.
- [10] 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): 200-212.
GAO L L, HOU C L, GAO Y, et al. Research advances of thermal stability of collagen[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(5): 200-212.
- [11] WEI P, ZHENG H, SHI Z Y, 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.
- [12] LI D F, MU C D, CAI S M, et al. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen[J]. Ultrasonics sonochemistry, 2009, 16(5): 605-609.
- [13] JAYASOORIYA S D, BHANDARI B R, TORLEY P, et al. Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: A review[J]. International Journal of Food Properties, 2004, 7(2): 301-319.
- [14] 吴倩, 张丽芬, 陈复生. 超声波对蛋白质提取及改性影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 261-264.
WU Q, ZHANG L F, CHEN F S. Research progress of ultrasonic effect on protein extraction and modification[J]. Food & Machinery, 2015, 31(4): 261-264.
- [15] 朱敏. 瘤背石磺肌肉胶原蛋白提取工艺优化、结构特征及其抗氧化活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
ZHU M. Extraction process optimization, structure characteristics and antioxidant activity of collagen from muscle of sea slug *Onchidium struma*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [16] 刁雪洋. 猪皮胶原蛋白提取及理化特性的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
DIAO X Y. Study on the extraction of pig skin's collagen and characteristics on physical and chemical[D]. Chongqing: Southwest University, 2010.
- [17] 杜敏, 南庆贤. 猪皮胶原蛋白的制备及在食品中的应用[J]. 食品科学, 1994, 15(7): 36-40.
DU M, NAN Q X. Preparation of pig skin collagen and its application in food[J]. Food Science, 1994, 15(7): 36-40.
- [18] 张晓洁, 张宇昊, 马良, 等. 超声辅助提取兔皮胶原蛋白及其理化特性[J]. 食品与机械, 2017, 33(1): 167-171.
ZHANG X J, ZHANG Y H, MA L, et al. Ultrasonic-assisted extraction and physicochemical characteristics of collagen from rabbit-skin[J]. Food & Machinery, 2017, 33(1): 167-171.
- [19] 赵丹. 鲤鱼鱼鳞中胶原蛋白的超声波提取工艺条件研究[J]. 饲料广角, 2016(1): 41-44.
ZHAO D. Study on ultrasonic extraction technology conditions of collagen from carp scales[J]. Feed China, 2016(1): 41-44.
- [20] 王希, 钟耀广, 市川寿. 响应面优化超声波快速提取鳕鱼皮中胶原蛋白的工艺研究[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(7): 117-123.
WANG X, ZHONG Y G, HISASHI I. Optimization of cod skin collagen extracting conditions by ultrasonic response surface methodology [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2014, 45(7): 117-123.
- [21] TIAN Z M, WAN M X, WANG S P, et al. Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2004, 11(6): 399-404.
- [22] 于浩. 鹿骨胶原蛋白的制备及抗氧化活性研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2016.
YU H. Preparation and antioxidant of collagen from deer bone[D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2016.
- [23] 刘雯恩, 甘兵, 范志强, 等. 优化 I 型胶原蛋白的纯化工艺[J]. 精细化工, 2019, 36(5): 11-19.
LIU W E, GAN B, FAN Z Q, et al. Optimization of purification process of collagen type I [J]. Fine

- Chemicals, 2019, 36(5): 11–19.
- [24] 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.
- [25] LI H, LIU B L, GAO L Z, et al. Studies on bull-frog skin collagen[J]. Food Chemistry, 2004, 84(1): 65–69.
- [26] 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.
WANG S S. Extracted collagen protein and collagen peptide preparation from the yak skin[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2018.
- [27] ARUMUGAM G K S, SHARMA D, BALAKRISHNAN R M, et al. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2018, 9: 19–26.
- [28] 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 Chemistry, 2011, 129(3): 1179–1186.

Ultrasonic-assisted Extraction and Structure Characterization of Collagen from Camel Skin

Shi Rui¹, He Jing¹, Jirimutu^{1,2*}

¹College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018

²Camel Research Institute of Inner Mongolia, Alex 750306, Inner Mongolia)

Abstract The objective of this study was to obtain the optimal technology of ultrasonic-assisted extraction of collagen from camel skin, and the extracted collagen was characterized and analyzed. In the experiment, the extraction rate of collagen was used as an indicator to explore the effects of enzyme loading, solid–liquid ratio, ultrasonic power, ultrasonic treatment time and total extraction time on camel skin collagen. After determining the ultrasonic power, on the basis of one–factor–at–a–time method, combined with response surface analysis, the best extraction conditions: enzyme loading of 4.5%, solid–liquid ratio of 1:23, ultrasonic treatment time of 20 min, total extraction time of 51 h, and the actual extraction rate of collagen was (41.99±1.57)%. The SDS–PAGE analysis suggested that the extracted collagen contained three characteristic chains of type I collagen. Ultraviolet spectroscopy analysis was further inferred to be a typical type I collagen. The Fourier transform infrared spectroscopy analysis confirmed that collagen had a complete triple helix structure. Scanning electron microscopy observation revealed that the extracted collagen was in the form of fibrous with intertwined structure. Meanwhile, the Zeta potential of pH 2~9 of collagen was measured, and the potential value showed a downward trend in this range. The isoelectric point was 6.7.

Keywords camel skin; collagen; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology; structure characterization