

鸡胸软骨胶原的提取及其结构表征

张艳艳, 刘海英* (江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要 [目的]提取鸡胸软骨中的胶原,并对其进行检测。[方法]以鸡胸软骨为原料,采用酶法提取其中的胶原,并进行紫外光谱检测、傅里叶变换红外光谱检测、SDS-PAGE、氨基酸分析、圆二色谱检测及肽指纹图谱检测。[结果]胶原的提取率是0.11% (以湿重计),紫外最大吸收波长为217 nm;SDS-PAGE显示,胶原含有一条较粗的 α 带和一条较细的 β 带;氨基酸分析显示,羟脯氨酸为99残基/1 000氨基酸残基。[结论]该方法提取得到的胶原是典型的II型胶原,且很好地保持了其天然结构,具有较高的纯度。

关键词 胶原;鸡胸软骨;II型胶原;提取;结构表征

中图分类号 S879;TS251.92 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)15-0155-03

Extraction and Structural Characterization of Collagen in Chicken Sternal Cartilage

ZHANG Yan-yan, LIU Hai-ying (School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract [Objective]The research aimed to extract collagen from chicken sternal cartilage and detected it. [Methods]Using chicken sternal cartilage as raw material, the collagen was extracted by enzymatic method and detected by ultraviolet spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, SDS-PAGE, amino acid analysis, circular dichroism detection and peptide fingerprint detection. [Result]The extraction rate of collagen is 0.11%, based on the wet weight of chicken sternal cartilage. Ultraviolet spectral analysis showed that the characteristic absorption wavelength of collagen was 217 nm. Analysis results of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that there was a heavy α -chain and a light β -chain. Amino acid components showed that hydroxyproline was 99 imino acid residues/1 000 residues. [Conclusion]The collagen extracted by this method is a typical type II collagen, and its natural structure is well maintained with high purity and the product has a high purity.

Key words Collagen; Chicken sternal cartilage; Type II collagen; Extraction; Structural characterization

胶原是一类具有独特结构的蛋白质,广泛存在于动物组织中,是哺乳动物细胞中最丰富的蛋白质,约占整个细胞总蛋白的1/4^[1]。II型胶原主要存在于动物的白色结缔组织中^[2],由3条相同的 $\alpha 1$ (II)链以超螺旋的方式构成软骨的基本结构,具有维持关节软骨的形态结构和抗张力学度的功能^[3]。II型胶原特有的结构和化学组成使其在生物医学材料、化妆品及食品等领域得到了广泛应用。近年来研究表明,II型胶原还可以作为药物和保健品来防治类风湿性关节炎(RA)。

我国禽肉加工产量较高,每年在禽类加工过程中都会产生大量的鸡胸软骨等副产品。以往鸡胸软骨大多被当作废弃物直接丢弃或用作饲料生产,造成了环境污染和大量的资源浪费。II型胶原是鸡胸软骨中的主要成分。笔者以鸡胸软骨为原料,采用酶法提取II型胶原并对其结构和性质进行研究,旨在为充分利用鸡骨资源、减少环境污染、解决禽类加工资源综合利用等问题,并获得一种具有高附加值的生物活性物质提供依据,具有重要的理论意义和实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 鸡胸软骨,市场购买;SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,北京博特森生物技术有限公司;标准蛋白(分子量6.5~270.0 kDa),上海碧云天生物技术有限公司;SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X),上海碧云天生物技术有限公司;胃蛋白酶(1 200 U/g),国药化学试剂有限公司;透析袋(8 000~140 000 Da);考马斯亮蓝 G250、甲醇、甘氨酸、十二烷基硫酸钠、乙酸、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris)等,均为

分析纯。

1.2 主要仪器 Agilent1100 氨基酸分析仪,美国安捷伦公司;UV-1800 紫外可见分光光度计,日本岛津公司;IS10 傅立叶红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;1658001 Bio-Rad 伯乐 Mini-PROTEAN Tetra 小型垂直电泳槽,美国 Bio-Rad 公司;UltrafleXtreme 基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱仪,布鲁克·道尔顿公司;MOS-450 圆二色谱仪,法国 Biologic 公司;77530-30LABCONCO6L 冻干机,照生有限公司;5424 Eppendorf 台式高速离心机,德国 Eppendorf 艾本德股份有限公司;电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;恒温水浴锅,江苏金怡仪器科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 胶原提取工艺流程。鸡胸软骨→清洗→去骨膜→切碎→脱脂→冻干→浸提→盐析→透析→冻干→成品。

1.3.2 胶原提取步骤。

1.3.2.1 鸡胸软骨的预处理。将冷冻的鸡胸软骨,用蒸馏水清洗干净,去除骨膜,切成约2 mm×2 mm×2 mm的小块,混悬于10%正乙烷中,搅拌,每8 h更换1次,连续浸泡24 h去脂。蒸馏水冲洗数次后,预冻,真空冷冻干燥48 h,-20℃保存备用。

1.3.2.2 胶原的提取。所有操作均在4℃条件下进行。将冻干的鸡胸软骨,浸泡于含有1%(W/V)胃蛋白酶、料液比为1:20的0.5 mol/L HAc溶液24 h^[4],用滴管逐滴加入溶解完全的NaCl溶液^[5],使NaCl最终浓度为0.9 mol/L,盐析出絮状物,4 000 r/min,10 min,弃去上清液体,沉淀即为粗制II型胶原。将沉淀溶解于0.5 mol/L HAc溶液中,如此重复盐析、沉淀、离心纯化3次,使用分子截留量为8 000~14 000 Da的透析袋,用0.5 mol/L HAC透析72 h后,预冻,真空冷冻干燥后即纯化后的II型胶原。将冻干的样品保存在-20℃下

作者简介 张艳艳(1991—),女,河南三门峡人,硕士研究生,研究方向:食品资源综合利用。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事食品资源综合利用研究。

收稿日期 2018-03-06

备用。

1.3.2.3 提取率计算。胶原提取率 = 冻干所得的胶原质量/鸡胸软骨质量 $\times 100\%$ 。

1.3.3 胶原的检测与结构表征。

1.3.3.1 紫外光谱 (UV) 检测法。将样品溶于 0.05 mol/L HAc 溶液中,配制成浓度为 0.3 mg/mL 的胶原溶液。以 0.05 mol/L 的 HAc 溶液作为空白,在 190~400 nm 波长下进行紫外光谱检测。

1.3.3.2 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 检测法。将样品与 KBr 固体 (1:100) 混匀,研磨,压片,使用傅里叶变换红外光谱仪,于 4 000~400 cm^{-1} 进行扫描,分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描频率为 16 次。

1.3.3.3 SDS-PAGE 凝胶电泳。按照 Laemmli^[6] 将样品溶于适量上样缓冲液,配制成 10 mg/mL 的胶原溶液,煮沸 3 min,自然冷却,4 000 r/min 离心 10 min。采用标准蛋白标记,分离胶和浓缩胶分别为 6% 和 5%,上样量为 4 μL 。先于 80 V 电压下电泳 30 min,后于 120 V 下电泳 100 min。电泳结束后,凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min,脱色液脱色 3~4 次,每次 30~40 min。

1.3.3.4 肽指纹图谱。按照“1.3.3.3”所述制备电泳凝胶。电泳结果表明,鸡胸软骨中胶原主要由一条较粗的 α 带和一条较细的 β 带构成。为了进一步证实胶原为 II 型胶原,切除 α 亚基,经脱色、酶解、萃取、点样后,通过质谱测定出各片段的准确质量,然后将获得的数据在蛋白质数据库中进行搜寻、鉴定^[7]。

1.3.3.5 氨基酸分析。称取 100 mg 样品,溶于 8 mL 的 6 mol/L HCl 中,充氮气 3 min,溶液呈微沸状态,密封,120 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解 22 h,加 4.8 mL 10 mol/L NaOH 中和,定容,双层滤纸过滤,15 000 r/min,离心 10 min,取上清液于氨基酸自动分析仪分析。

1.3.3.6 圆二色谱。将样品溶于 0.05 mol/L HAc 溶液,配成浓度为 0.3 mg/mL 胶原溶液,在 190~250 nm 波长下平均扫描 3 次;并在 218 nm 处对胶原溶液进行温度扫描,温度为 19~50 $^{\circ}\text{C}$,获得胶原溶液的变性曲线,变性温度即为变化率一半时所对应的温度。

2 结果与分析

2.1 鸡胸软骨胶原的提取率 经计算,鸡胸软骨胶原的提取率为 0.11% (以湿重计)。

2.2 胶原的检测与结构表征

2.2.1 UV 检测法。鸡胸软骨的紫外吸收光谱如图 1 所示。胶原的肽链中含有 C=O、COOH、CONH₂ 等生色基团,可以在近紫外区检测到吸收峰。从图 1 可以看出,在 217 nm 处有一个最大吸收峰,与 II 型胶原的紫外特征吸收峰较吻合。

2.2.2 FTIR 检测法。图 2 是鸡胸软骨中所提取的 II 型胶原的傅里叶红外光谱图。由图 2 可知,II 型胶原的红外图谱有 4 个特征吸收峰,分别为 3 370、2 930、1 640 和 1 540 cm^{-1} ,分别命名为酰胺 A 带、酰胺 B 带、酰胺 I 带和酰胺 II 带。一般

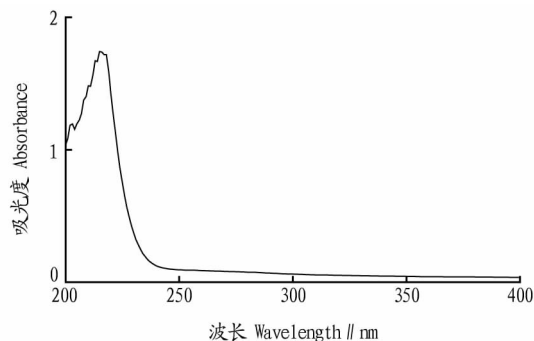


图 1 鸡胸软骨胶原紫外光谱

Fig. 1 UV spectra of collagen extracted from chicken sternal cartilage

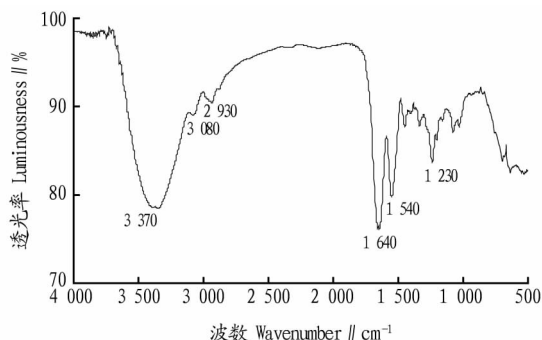


图 2 鸡胸软骨胶原红外光谱

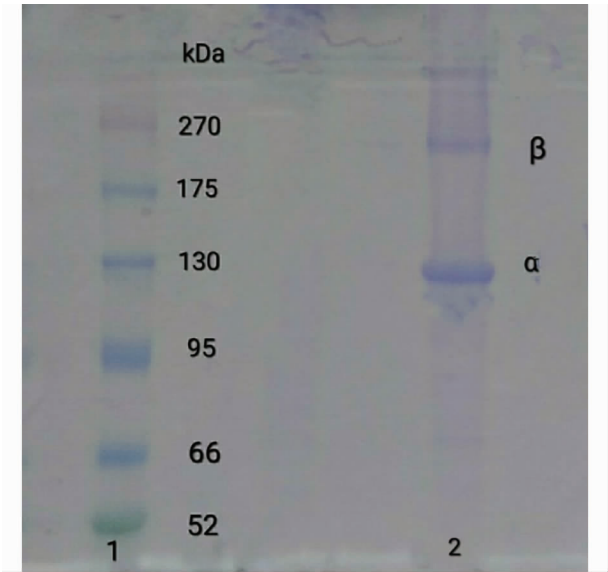
Fig. 2 FTIR spectra of collagen extracted from chicken sternal cartilage

情况下,酰胺 A 带和酰胺 B 带主要是 N-H 的伸缩振动,酰胺 I 带是 C=O 的伸缩振动和 N-H 的弯曲振动,酰胺 II 带是 N-H 的弯曲振动和 C-N 的伸缩振动。将该红外吸收图谱与文献[8]中报道的天然 II 型胶原的图谱对照,该图中的波数和吸收峰位置与其基本一致,说明该研究中的提取工艺没有破坏 II 型胶原的天然结构。

2.2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳法。根据鸡胸软骨胶原的电泳结果(图 3),该试验提取的胶原样品的谱带显示,与曹慧等^[4]的电泳图谱结果一致。图中,样品出现 2 个条带,由于 II 型胶原主要由 3 条相同的 $\alpha 1(\text{II})$ 链构成,所以电泳图谱中出现一条含量较高的 α 带和少量的 β 二聚体,二者的分子量分别位于 130 和 250 kDa 的位置。

2.2.4 肽指纹图谱。鸡胸软骨胶原的肽指纹质谱结果显示,鉴定了胶原的 α 条带,获得注册号为 gi31340542,分子量/PI 为 120043/7.22,得到 1% 的重叠范围,总评分为 63 分,一共有 1 个肽段相匹配。通过 MALDI-TOF/TOF 质谱法分析了鸡胸软骨胶原的 α 条带,结果中的分数 > 61 表示同一性或广泛同源性 ($P < 0.05$),结果可信。

2.2.5 氨基酸分析。从鸡胸软骨胶原氨基酸组成(表 1)可以看出,主要氨基酸是甘氨酸(250 残基/1 000 氨基酸残基),其次为谷氨酸(128 残基/1 000 氨基酸残基)、丙氨酸(101 残基/1 000 氨基酸残基)、羟脯氨酸(99 残基/1 000 氨基酸残基),符合 II 型胶原的特征^[9]。



注:1. Marker;2. 鸡胸软骨胶原

Note:1. Marker; 2. Collagen extracted from chicken sternal cartilage

图3 鸡胸软骨胶原电泳结果图谱

Fig.3 SDS - PAGE pattern of collagen extracted from chicken sternal cartilage

表2 鸡胸软骨胶原氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of collagen extracted from chicken sternal cartilage

序号 No.	氨基酸 Amino acid	质量百分含量 Percentage of mass//%	摩尔比 Molar ratio 个/1 000 个
1	天冬氨酸(Asp)	6.04	60
2	谷氨酸(Glu)	12.77	128
3	丝氨酸(Ser)	2.71	27
4	组氨酸(His)	0.60	6
5	甘氨酸(Gly)	25.06	250
6	苏氨酸(Thr)	2.06	21
7	精氨酸(Arg)	8.90	89
8	丙氨酸(Ala)	10.10	101
9	酪氨酸(Tyr)	0.26	3
10	半胱氨酸(Cys - s)	2.12	21
11	缬氨酸(Val)	2.60	26
12	甲硫氨酸(Met)	0.16	2
13	苯丙氨酸(Phe)	2.14	21
14	异亮氨酸(Ile)	1.44	14
15	亮氨酸(Leu)	3.28	33
16	赖氨酸(Lys)	3.80	38
17	脯氨酸(Pro)	6.08	61
18	羟脯氨酸(Hyp)	9.88	99
合计 Total		100	1 000

2.2.6 圆二色谱。圆二色谱是研究稀溶液中蛋白质结构的一种快速、简单的方法^[10]。蛋白质中氨基酸的α-碳原子是不对称的,具有光学活性;蛋白质的肽链走向也是不对称的,也具有光学活性。当平面偏振光通过这些光活性的生色基团时,光活性中心对平面圆偏振光中的左右圆偏振光的吸收不相同,产生了吸收差值,由于这种吸收差的存在,造成了偏振光矢量的振幅差,圆偏振光变成了椭圆偏振光,这就是蛋

白质的圆二色性。一般蛋白质的圆二色光谱分成两段,波长在185~245 nm 称为远紫外区,245~320 nm 称为近紫外区。远紫外区是蛋白质肽链的吸收峰,反映了主链的构象。

鸡胸软骨中提取的胶原在远紫外区的圆二色谱如图4所示,197 nm 处存在一个负峰,223 nm 处存在一个正峰,说明胶原三股螺旋保持较好,符合胶原三股螺旋典型特征的圆二色谱峰型。

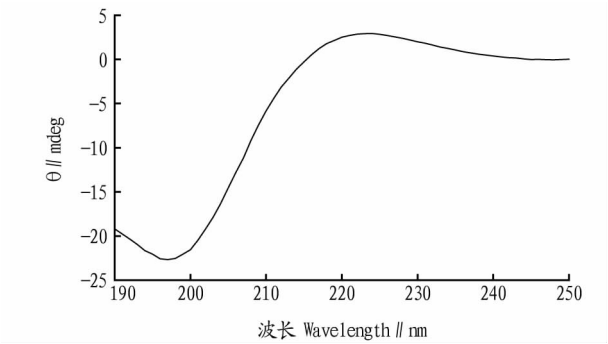


图4 鸡胸软骨胶原的圆二色光谱

Fig.4 CD spectra of collagen extracted from chicken sternal cartilage

物质在温度变化过程中,往往伴随着微观结构、宏观的物理和化学性质等变化。胶原的热变性温度(Ts)是反映其天然螺旋结构的重要指标之一。当体系的温度达到Ts时,胶原分子从伸展的纤维态转变为无规卷曲状,即胶原变性为明胶。图5是鸡胸软骨胶原的变性曲线,由图可见,变性温度为39℃。

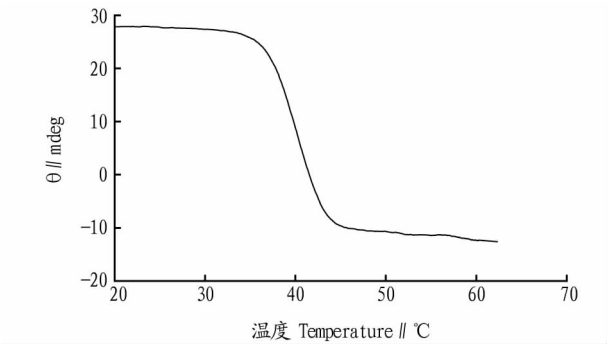


图5 鸡胸软骨胶原变性曲线

Fig.5 Denaturation curve of collagen extracted from chicken sternal cartilage

3 结论

Ⅱ型胶原分子间通过交联键相连使各分子间相互聚合成大分子稳定结构,所以,Ⅱ型胶原是一种难溶性蛋白。这种特性阻碍了胶原的提取。鉴于以上情况,试验选用酸溶液-胃蛋白酶体系,使之成为可溶性并保持胶原分子的完整性。该试验采用酶法对鸡胸软骨胶原进行提取,并对其进行UV、FTIR、SDS-PAGE 和 CD 等检测,证明所提胶原为Ⅱ型胶原。我国是养鸡大国,鸡胸软骨产量较大,但作为禽产品加工的主要副产物并没有得到充分的开发和利用,因此开发利用鸡胸软骨资源用以生产Ⅱ型胶原,提高其附加值,具有

(下转第207页)

来、农民富起来、农村美起来、建设美丽中国 and 美丽乡村中的重大作用,进一步提高思想认识,完善政策措施,加大工作力度,切实推动休闲农业的发展^[9]。

政府作为经济调控的主导部门对现代农业园的健康发展具有重要的促进作用。在北大荒现代农业园发展过程中,政府应该将休闲农业视为促进增收的一个新经济增长点,明确自身的定位,解决“管什么、如何管”的问题,以期促进休闲农业的健康持续发展。政府要给予一定的财政拨款和优惠政策,出台利于北大荒现代农业园以及黑龙江省休闲农业的投资、融资和招商、开发的相关条例,营造出良好的政策环境,铸就良好的发展格局。

4.2 通过产学研合作的方式增强科技投入保障准公益性发展 现代农业园不断创新的内容、独特的展品是农业园吸引公众的力量源泉。创新是农业园的生命和灵魂,没有创新,农业园的准公益性就不能永续。要保障北大荒现代农业园准公益性发展,就要做好人才培养工作。对于黑龙江省休闲农业的发展,就政府而言,应从科技水平、创新能力、经营管理和专业素养等方面建立休闲农业人才培养新模式,哈尔滨与农业园相关的高校有东北农业大学、东北林业大学等,可实行院校、企业、政府三者联合的多层次教育培训体系,培养成一批符合休闲农业综合性要求的高素质人才。而就本园区企业自己,也应建立起相配套的农业人才储备体系,以此来真正地留住人才,保证园区的持续稳定发展。农业园研发人员要挖掘资源优势,开发出具有原创性的展品和展项,突破大众对农业古板的认知。提高大众对农业生产的关心与期待同时,可以引进高校专家和科学家进行展品新项目的设计和研发,还可以引进企业、科研院所的科研成果,比如运用电子商务环境下供应链利益补偿协调激励机制研究农业园休闲产品突破外部性的成果^[10],从而鼓励并引导企业、科研院所将最新的科研成果和即将市场化产品带入农业园展示,以进一步体现农业园的准公益性、前沿与特色^[11]。

4.3 抓住和利用“互联网+”促进准公益性发展 面对“互联网+”的冲击和现代农业园的多层次目标客源,采取有针对性的线上营销手段。首先,丰富北大荒现代农业园的网站内容,通过网页全面宣传园区的产品及服务,并为游客提供实时网上咨询。其次,充分利用新闻、广播、电视、互联网等媒体的作用,努力加强农业园的产业宣传。通过策划、组织

和包装有计划、有重点地对农业园进行宣传推广,提升园区的知名度和影响力,多借用微博、微信等新媒体方式,增加项目园区的影响力和亲和力。最后,通过“美团,大众点评,百度糯米”等软件,丰富现代农业园的营销策略,抓住“互联网+”的优势,努力做到线上交流、线下互动。

5 结论

北大荒现代农业园是以农业观光、农产品加工和游憩服务业三级产业相结合具有极强的准公益性的农业企业,体现生产、生活和生态“三生”一体的先进的农业经营方式,具有很明显的准公益性,对哈尔滨市的可持续发展来说具有深远的影响,其先进的技术能力、北方庄园体验南方种植知识等方面对于哈尔滨市来说是创新且不可或缺的。

哈尔滨市给予有利于北大荒现代农业园发展的政策资金支持,一方面是落实国家政策,另一方面北大荒现代农业园的准公益性可以有效地促进哈尔滨市政治、经济、文化等方面更好更快地可持续发展。但现代农业园自身需提高经营效率的同时,政府相关项目的资金、政策支持才是重中之重,强化政府公共文化服务的主体地位,从而健全服务项目、提升服务能力、提高服务质量,是进一步落实和支持北大荒现代农业园发展的关键。因此,北大荒现代农业园的准公益性特征,需要政府对其准公益性部分承担责任,或者政府给予农业园经济政策的补偿。

参考文献

- [1] 农业部、农垦局. 国家旅游局农业部关于组织开展国家现代农业庄园创建工作的通知[A]. 2016-11-25.
- [2] 罗士刚. 外部性理论价值功能的重塑:从外部性理论遭受质疑和批判谈起[J]. 当代经济科学, 2011, 33(2): 27-33.
- [3] 杨轶. 政府投资公益性项目招投标现存问题及对策研究[D]. 长春:吉林大学, 2010.
- [4] 陈丁楷, 石龙宇, 李宇亮, 等. 城市可持续发展能力的评价系统设计 with 实现[J]. 环境科学与技术, 2015, 38(S1): 508-513.
- [5] 檀学文. 城市农业与可持续城市化[J]. 世界农业, 2001(3): 21-23.
- [6] 哈尔滨市统计局. 哈尔滨市 2016 年国民经济和社会发展统计公报[R]. 2017-04-14.
- [7] 郑宣卿, 郑巧彬. 我国休闲观光农业发展策略及前景展望[J]. 农业展望, 2008(11): 19-21.
- [8] 刘丽伟, 高中理. “互联网+”促进农业经济发展方式转变的路径研究: 基于农业产业链视角[J]. 世界农业, 2015(12): 18-22.
- [9] 农业部. 关于积极开发农业多功能大力促进休闲农业发展的通知[A]. 2015-09-28.
- [10] 冷志杰, 刘永悦. 粮食供应链利益补偿协调机制优化研究[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [11] 文素婷, 程杨. 科技馆免费开放对我国科技馆事业的影响[J]. 科技管理研究, 2014(3): 192-196.

(上接第 157 页)

极大的经济意义。

参考文献

- [1] 张达江, 王亮. I 型胶原蛋白的结构、功能及其应用研究的现状与前景[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(2): 265-269.
- [2] 莎丽娜, 李振飞, 韩天翔. 羊软骨 II 型胶原蛋白提取中脱钙、脱脂工艺的改进[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2012, 33(4): 136-139.
- [3] 顾其胜, 蒋丽霞. 胶原蛋白与临床医学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2003.
- [4] 曹慧, 许时婴. 鸡关节软骨 II 型胶原的制备[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 148-152.

- [5] MILLER E J, GAY S. Collagen: An overview[J]. Methods in enzymology, 1982, 11(82 Pt A): 3-32.
- [6] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [7] DALLUGE J J. Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS)[J]. Anal Bioanal Chem, 2002, 372: 18-19.
- [8] CAO H, XU S Y. Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage[J]. Food chemistry, 2008, 108(2): 439-445.
- [9] 姜旭淦, 陈盛霞, 王卉放, 等. 可溶性 II 型胶原蛋白提取纯化条件的研究[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(6): 418-421.
- [10] 段蕊, 叶超, 邢芳芳, 等. 采用圆二色谱法研究冬夏鲢鱼鳞胶原蛋白的稳定性[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 73-76.