DOI:10.12441/spyswjs.20240911001 [文章编号] 1673-1689(2025)10-0152-11

超声联合酶法对龟甲胶原蛋白结构特征和理化特性的影响

贺 雄[1] 李荣杏[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. 农产品现代加工安徽省重点实验室,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:【目的】分析不同提取方法对龟甲胶原蛋白得率、纯度、结构特征和理化特性的影响。**【方法】**采用超声联合酶法、酸法、酶法提取龟甲胶原蛋白。**【结果】**超声联合酶法提取的龟甲胶原蛋白的得率和纯度分别为2.29%和85.65%,显著高于酸法(0.78%、73.15%)和酶法(1.77%、75.63%)。紫外吸收光谱、红外吸收光谱、圆二色谱和电泳图谱显示,3种方法提取的龟甲胶原蛋白均为I型胶原蛋白,具有较完整的三螺旋结构。X射线衍射图谱表明,超声联合酶法提取的龟甲胶原蛋白的分子结构更为紧凑、有序度更高。超声联合酶法和酶法提取的龟甲胶原蛋白的粒径均分布在340 nm左右,但超声联合酶法提取的龟甲胶原蛋白的粒径分布集中度更低。3种方法提取的龟甲胶原蛋白的热变性温度(T_d)均为44 ℃,扫描电子显微镜结果显示,超声联合酶法提取的龟甲胶原蛋白的微观结构更加均匀、规则。**【结论】**该研究利用的超声联合酶法为龟甲胶原蛋白的提取提供了新思路。与常规的酸法和酶法相比,超声联合酶法提取的龟甲胶原蛋白的得率和纯度均较高,表明该方法具有广阔的应用前景。

关键词:龟甲;超声;胶原蛋白;理化性质

Effects of Ultrasound-assisted Enzymatic Extraction on the Physical and Chemical Properties of Tortoise Shell Collagen

HE Xiong[1] *LI Rongxing*[1] *JIANG Shaotong*[1,2] *LU Jianfeng*[1,2,3] *LIN Lin*[1,2,3*]

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. Anhui Province Key Laboratory of Agricultural Products Modern Processing, Hefei 230601, China; 3. Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei 230601, China)

Abstract: [**Objective**] The effects of different extraction methods on the yield, purity, structural characteristics, and physicochemical properties of tortoise shell collagen were investigated. [**Method**] The ultrasound-assisted enzymatic method, acid method, and enzymatic method were used to extract collagen from tortoise shell powder. [**Result**] The yield and purity of tortoise shell collagen extracted by ultrasound-assisted enzymatic method were 2.29% and 85.65%, respectively, significantly higher than those extracted by acid method (0.78% and 73.15%) and enzymatic method (1.77% and 75.63%). Ultraviolet absorption spectroscopy, infrared absorption spectroscopy, circular dichroism spectroscopy, and electrophoresis profiles showed that collagens extracted from tortoise shell by three methods were all type I collagen and retained intact triple helix structures. X-ray diffraction patterns revealed that the molecular structure of tortoise shell collagen treated with ultrasound-assisted enzymatic

基金项目:安徽现代农业产业技术体系项目(AARS-08)。

通信作者:林琳(1978—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事水产品贮藏及加工、水产品加工副产物综合利用研究。E-mail: linlin@hfut.edu.cn

收稿日期:2024-09-11 **修回日期:**2024-12-18

method was more compact, with a higher degree of order. The particle sizes of tortoise shell collagens extracted by ultrasound-assisted enzymatic method and enzymatic method were both distributed around 340 nm, while tortoise shell collagen extracted by ultrasound-assisted enzymatic method exhibited a lower particle size distribution. The thermal denaturation temperatures (T_d) of the tortoise shell collagens extracted by the three methods were all 44 ℃. Scanning electron microscopy results showed that the microstructure of tortoise shell collagen extracted by ultrasound-assisted enzymatic method was more uniform and regular. [**Conclusion**] The combination of ultrasound treatment and enzymatic methods provide a new perspective for the extraction of collagen from tortoise shell. Compared with the conventional acid method and enzymatic method, the ultrasound-assisted enzymatic extraction method shows improvements in the yield and purity of tortoise shell collagen, thus demonstrating a broad application prospect.

Keywords: tortoise shell; ultrasound; collagen; physicochemical property

人和动物体内的结构蛋白主要是胶原蛋白，其干质量约占总蛋白质的1/3[1]。胶原蛋白包含3条左手螺旋的α链超螺旋结构，在目前研究发现的29种胶原蛋白中，I型胶原蛋白占所有胶原蛋白的90%，其主要存在于动物的骨骼、皮肤以及鱼皮、鱼鳞等部位[2-3]。胶原蛋白具有可降解、生物相容性高、抗原性低等优势，在食品、医药等领域应用广泛[4]。然而，胶原蛋白产业的发展仍然存在一些问题，如目前已商业化应用的胶原蛋白产品主要从猪皮、牛皮及哺乳动物的骨头中提取，而在提取源中存在的口蹄疫、疯牛病等传染病风险以及伊斯兰教等宗教信仰问题大大限制了此类胶原蛋白的应用[5]。因此，从水生生物及两栖动物中寻找并开发新的胶原蛋白来源已成为研究热点。

中华草龟（*Chincmys reevesii*），即乌龟，是我国一种古老的龟种。其环境适应性强，易于养殖，在我国分布广泛[6]。龟甲作为一味中药，富含甾体、多酚类物质、脂肪酸、胶原蛋白等营养成分，具有提升免疫力、滋阴潜阳、养血补心等药理功效[7]。龟甲常被用于制备龟甲胶，龟甲胶具有促进软骨细胞增殖、抗衰老、抗肿瘤等功效，其主要成分为胶原蛋白[8]。研究发现，龟甲中含有30.42%~33.18%的蛋白质，可以作为提取胶原蛋白的原材料[9]。近年来，我国的乌龟养殖规模迅速扩大，随着龟肉加工的发展，龟甲作为加工副产物，其产量也随之增加。目前龟甲除了部分被用作中药材外，还有很大一部分被废弃，因此从龟甲中提取胶原蛋白可显著提高其利用价值。

提取胶原蛋白的常见方法有酸法、酶法以及热水提取法等[3]，但酸法和酶法用于提取骨肉、鱼鳞、龟鳖壳等钙含量高的原料中的胶原蛋白时，提取效率较低。Li等[10]从鳖甲中提取的酸溶性胶原蛋白和酶溶性胶原蛋白的得率分别为1.00%和2.80%。Duan等[11]从鲤鱼骨中提取的酸溶性胶原蛋白的得率为1.06%。而热水提取法会使胶原蛋白变性为明胶，导致其品质降低。因此，寻找新的提取方法来提高骨胶原蛋白的得率至关重要。超声波的空化效应和机械作用可以提高分子的运动频率，增加胶原蛋白的溶出，提高得率的同时不会影响其活性[2]。赵改名等[12]使用超声辅助酶法提取了牛皮胶原蛋白，得率达到了63.77%。Zou等[13]利用超声辅助酸法提取了鳖裙边胶原蛋白，其得率与传统提取方法相比提高了16.3%。目前，利用超声技术提取龟甲胶原蛋白的研究较少。因此，该研究利用超声联合酶法、酶法和酸法提取龟甲胶原蛋白，对比分析3种胶原蛋白的得率、结构特点及理化性质，以期为后续研发高附加值的龟甲胶原蛋白产品提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龟甲：取自中华草龟，安徽蓝田农业集团有限公司。中华草龟在“室温+外塘”模式下人工养殖3年，平均体质量0.75 kg，龟甲为冷冻龟肉的加工副产物。

异丙醇、NaOH、EDTA-2Na（分析纯）：国药集团化学试剂有限公司；胃蛋白酶（3 000 NFU/g）：北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

三频数控超声波清洗机：KQ-300VDE型，昆山

市超声仪器有限公司；紫外可见近红外分光光度计：CARY 5000型，美国安捷伦公司；傅里叶变换红外光谱仪：Nicolet IS50 iN10型，美国Thermo Fisher Scientific公司；扫描电子显微镜：EM-30AX型，韩国库塞姆公司；差示扫描量热仪（differential scanning calorimeter，DSC）：Q200型，美国TA公司；纳米粒度分析仪：Zetasizer Nano-ZSE型，英国马尔文仪器公司；X射线衍射仪：Smartlab X型，日本理学株式会社；圆二色光谱仪：J-1700型，日本分光株式会社。

1.3 方法

1.3.1 龟甲的预处理

龟甲反复用水冲洗干净，晾晒干燥后用切割机切成小块，然后用粉碎机磨成粉末，将龟甲粉过100目筛，把筛选后的龟甲粉收集到密封袋里，储存在4 ℃的冰箱以备后续使用。

参照Li等[10]的方法对龟甲粉进行预处理。为除去龟甲粉中的盐溶性蛋白质，按料液比1 g∶10 mL将龟甲粉浸泡于0.1 mol/L的NaOH溶液中，持续搅拌24 h，按料液比1 g∶10 mL用体积分数10%的异丙醇进行脱脂处理，持续搅拌24 h，并且每8 h换液1次。脱脂后的龟甲粉用蒸馏水反复冲洗至无异丙醇残留，按料液比1 g∶15 mL用0.25 mol/L的EDTA-2Na进行脱钙处理，持续搅拌24 h，每8 h换液1次，收集过滤后的龟甲粉。

1.3.2 龟甲胶原蛋白的提取

1）酸法：所有提取过程均在4 ℃条件下进行。按料液比1 g∶10 mL在预处理过的龟甲粉中加入0.5 mol/L醋酸溶液，持续搅拌24 h进行提取。随后用200目筛子除去滤渣，在滤液中添加NaCl至终浓度为2.5 mol/L，静置20 min后于8 000 r/min离心20 min，用0.5 mol/L醋酸溶液溶解沉淀。用0.1 mol/L醋酸溶液透析24 h，每8 h换液1次，再用蒸馏水透析48 h，每12 h换液1次。将透析后的液体进行冷冻干燥得到酸溶性龟甲胶原蛋白，将该龟甲胶原蛋白定义为ASC组。

2）酶法：所有提取过程均在4 ℃条件下进行。按料液比1 g∶10 mL在预处理过的龟甲粉中加入含5 g/L胃蛋白酶的0.5 mol/L醋酸溶液，持续搅拌24 h，然后进行过滤、盐析、离心、透析和冷冻干燥，操作步骤与酸法一致，得到酶溶性龟甲胶原蛋白，将该龟甲胶原蛋白定义为PSC组。

3）超声联合酶法：参考刘学敏[2]的方法并稍加修改，按料液比1 g∶10 mL在预处理过的龟甲粉中加入0.5 mol/L醋酸溶液，随后超声（200 W）处理20 min，向溶液中添加5 g/L胃蛋白酶，于4 ℃下持续搅拌24 h，然后进行过滤、盐析、离心、透析和冷冻干燥，操作步骤与酸法一致，得到超声联合酶法提取的龟甲胶原蛋白，将该龟甲胶原蛋白定义为UPSC组。

1.3.3 得率与纯度的计算

根据式（1）计算龟甲胶原蛋白的得率[14]。

$$Y=\frac{m_2}{m_1}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

Y——龟甲胶原蛋白的得率，%；

m_1——龟甲粉干质量，g；

m_2——龟甲胶原蛋白质量，g。

按照GB/T 9695.23—2008的方法测定龟甲胶原蛋白中的羟脯氨酸质量，参照保毅等[15]的方法并稍加修改，按照式（2）计算龟甲胶原蛋白的纯度。

$$P=\frac{m_3\times 11.1}{m_2}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

P——龟甲胶原蛋白的纯度，%；

m_2——龟甲胶原蛋白质量，g；

m_3——龟甲胶原蛋白中羟脯氨酸的质量，g；

11.1——羟脯氨酸换算系数。

1.3.4 紫外吸收光谱分析

参照郑清瑶等[3]的方法并稍加修改，将1 mg/mL的龟甲胶原蛋白溶液于4 ℃静置1 h，取上清液进行测定。于190~400 nm处进行扫描，速度为2 nm/s，以0.5 mol/L醋酸溶液作为空白对照。

1.3.5 红外吸收光谱分析

参照周瑞等[16]的方法对龟甲胶原蛋白进行红外吸收光谱分析。

1.3.6 圆二色谱分析

参照那治国等[17]的方法对龟甲胶原蛋白进行圆二色谱分析。

1.3.7 X射线衍射分析

参照窦容容等[1]的方法并稍加修改，取适量龟甲胶原蛋白黏附在测试台上，在40 kV、40 mA条件下进行扫描，衍射角（2θ）范围5°~40°，扫描速

度5（°）/min。

1.3.8　聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析

参照Ahmad等[18]的方法对龟甲胶原蛋白进行SDS-PAGE分析。

1.3.9　氨基酸组成分析

参照GB 5009.124—2016的方法，测定龟甲胶原蛋白的氨基酸组成。

1.3.10　粒径分布

参照杨恒等[19]的方法并稍加修改，将1 mg/mL的龟甲胶原蛋白溶液静置10 min后，取上清液，用纳米粒度分析仪进行扫描。

1.3.11　DSC分析

将10 mg龟甲胶原蛋白装入固体坩埚中，压封后放入DSC中，在0~200 ℃内以5 ℃/min的升温速率进行扫描，样品室的氮气流量维持在50 mL/min。

1.3.12　扫描电子显微镜分析

将龟甲胶原蛋白溶解于0.5 mol/L醋酸溶液中，至终质量浓度为8 mg/mL，并将其移至培养皿中，重新冷冻干燥。冻干后的样品被分割为薄片，通过导电胶黏贴在铝台表面，用离子溅射仪喷金镀膜，加速电压设置为8 kV，在200倍下观察龟甲胶原蛋白的结构。

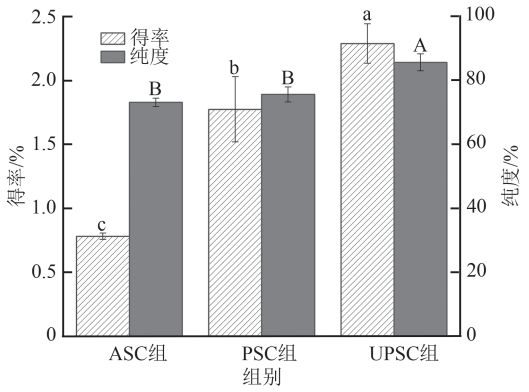
1.3.13　数据分析

所有样品均测定3次，取平均值，以平均值±标准差的形式表示。采用SPSS Statistic 24软件进行方差分析和显著性检验，$P<0.05$表示存在显著性差异。

2　结果与讨论

2.1　得率与纯度

如图1所示，ASC组的得率为0.78%，低于PSC组（1.77%）。这是由于龟甲中的羟基磷灰石与胶原纤维结合紧密，脱钙处理无法将其完全去除，从而阻碍了醋酸对胶原蛋白的溶胀作用[3]，不利于胶原蛋白的提取。而胃蛋白酶能够水解胶原蛋白的端肽，减少分子间的共价交联，从而提高胶原蛋白得率[20]。ASC组和PSC组的纯度分别为73.15%和75.63%，而经超声联合酶法处理后，龟甲胶原蛋白的得率和纯度均显著提高，分别为2.29%和85.65%。这可能是由超声波的空化效应造成的，空穴破裂所产生的高剪切力会进一步粉碎龟甲[21]。此外，当空化造成的气泡破碎时，其周围极小范围内会产生物化相互作用及特殊物理作用，这为超声增强酶解效果奠定了基础[22]。



不同小写字母代表不同组别的得率差异显著（$P<0.05$）；
不同大写字母代表不同组别的纯度差异显著（$P<0.05$）。

图1　3种龟甲胶原蛋白的得率和纯度

Fig. 1　Yields and purity of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

2.2　紫外吸收光谱分析结果

由于胶原蛋白的特殊三螺旋结构中包含—C═O、—COOH和CO—NH_2等发色基团，因此可通过紫外吸收光谱鉴别胶原蛋白的纯度[23]。如图2所示，3种龟甲胶原蛋白均在231 nm处出现了明显吸收峰。研究表明，来源于牛骨[24]、鳙鱼鱼鳞[25]、鳖皮[26]等材料的胶原蛋白的吸收峰均出现在220~230 nm处，此位置的吸收峰归因于胶原蛋白中存在大量的羟脯氨酸、脯氨酸和甘氨酸[27]。通常，蛋白质中的芳香族氨基酸的吸收峰会出现在250 nm或280 nm处，而胶原蛋白中芳香族氨基酸极少，因此不会出现明显吸收峰[28]，这使得胶原蛋白与非胶原蛋白可以被有效区分。图中3种龟甲胶原蛋白在这2处都没有明显吸收峰，表明3种提取方式都没有增加杂蛋白质的污染。

2.3　红外吸收光谱分析结果

3种龟甲胶原蛋白的红外吸收光谱见图3（a）。3种龟甲胶原蛋白的红外吸收光谱极为相近，出峰位置一致，峰强度略有变化，都具有I型胶原蛋白的特征吸收峰：酰胺A、酰胺B、酰胺I、酰胺II和酰胺III，鸡骨[29]、鳖甲[30]、鱼鳔[31]等不同来源的胶原蛋白中均表现出了同样的红外光谱趋势。酰胺A带（3 440~3 400 cm^{-1}）是由N—H基团的伸缩振动引起的，3种龟甲胶原蛋白的酰胺A均在3 312 cm^{-1}处出现，可能是因为N—H基团的肽段参与氢键的形成导致酰胺A的出峰位置朝低频偏移[32]。3种龟甲胶原蛋白的酰胺B均位于2 925 cm^{-1}处，这主

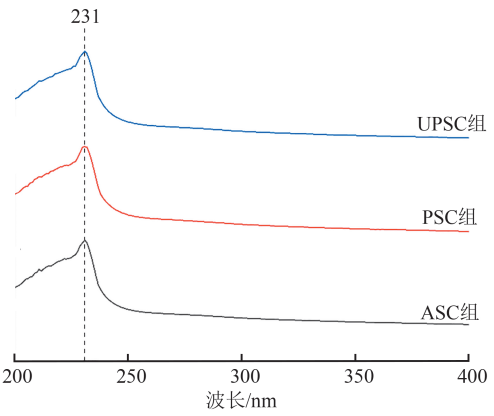


图 2　3 种龟甲胶原蛋白的紫外吸收光谱

Fig. 2　Ultraviolet absorption spectra of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

要是由胶原蛋白特征基团 CH_2 的不对称伸缩振动造成的[33]。3 种龟甲胶原蛋白的酰胺I带出现在 1 638 cm^{-1} 处，符合正常出峰位置（1 700~1 600 cm^{-1}）。酰胺I带是由 C═O 的伸缩振动引起的，可作为肽二级结构的标识[16]。3 种龟甲胶原蛋白的酰胺II带位于 1 548 cm^{-1} 处，这主要是由 N—H 弯曲振动与 C—N 伸缩振动共同引起的[34]。酰胺III带与胶原蛋白结构的完整性有关，是三螺旋结构的敏感区域，具有多种形变和振动模式[35]，3 种龟甲胶原蛋白的酰胺III带位于 1 236 cm^{-1} 处，表明它们都保留了相对完好的三螺旋结构。

3 种龟甲胶原蛋白各二级结构占比见图 3（b）。对酰胺I带进行去卷积处理并利用二阶导数多次拟合后，可以将龟甲胶原蛋白的不同二级结构占比呈现出来[3]。超声处理后龟甲胶原蛋白的 α 螺旋和 β 折叠占比降低，β 转角和无规卷曲占比上升，这可能是由于超声对龟甲胶原蛋白中的分子间作用力、二硫键以及氢键产生破坏，α 螺旋和 β 折叠也受到影响，进而转变为了 β 转角和无规卷曲[28]。黄丹丹等[36]对鱼皮进行超声处理后也发现胶原蛋白中的 α 螺旋会向 β 转角和无规卷曲转变。

2.4　圆二色谱分析结果

圆二色谱能够有效地展现出蛋白质二级结构，可用来分析蛋白质构象。胶原蛋白具有特别的三螺旋结构，因此其圆二色谱图通常在 200 nm 左右出现负峰，220~230 nm 处会出现正峰[37]，而当胶原蛋白变性，三螺旋结构被破坏时正峰会消失，负峰向低波长处移动[21]。如图 4 所示，ASC 组、PSC 组和 UPSC 组分别在 223、223、221 nm 处出现正峰，该峰为左旋聚脯氨酸特征吸收峰，由 β 折叠和无规卷曲引起[38]。ASC 组、PSC 组和 UPSC 组的负峰分别出现在 197、198、198 nm 处，与来源于刺参[3]、河豚[39]的胶原蛋白的圆二色谱出峰位置一致。正峰与负峰的比值（R_{pn}）可作为衡量胶原蛋白三螺旋结构完整性的指标，R_{pn} 越大表明结构越

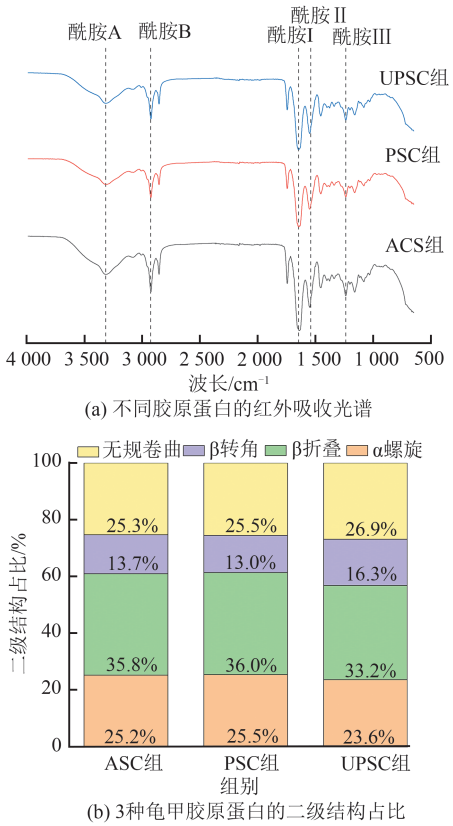


图 3　不同胶原蛋白的红外吸收光谱及各二级结构占比

Fig. 3　Infrared absorption spectra and secondary structural element proportions of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

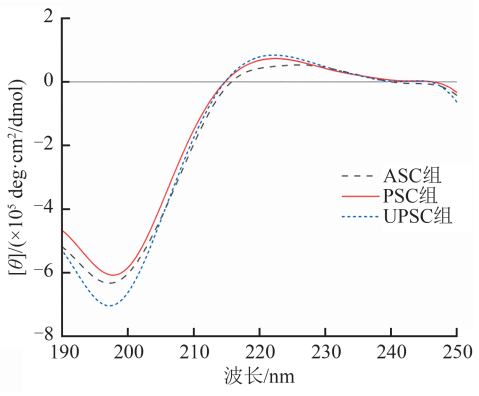


图 4　3 种龟甲胶原蛋白的圆二色谱图

Fig. 4　Circular dichroism patterns of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

完整[40]。UPSC组的R_{pn}（0.105）与PSC组（0.108）相近，表明超声联合酶法保留了龟甲胶原蛋白的三螺旋结构，超声处理并没有破坏其结构完整性。

2.5　X射线衍射分析结果

X射线衍射图对于胶原纤维的结构特征的分析至关重要[41]。由图5可知，3种龟甲胶原蛋白的X射线衍射图显示了胶原蛋白常见的3个特征峰（C峰、A_1峰、A_2峰）[42]。其中，C峰的衍射角通常出现在5°~10°，胶原蛋白的三螺旋结构受此峰影响[1]。A_1峰是由胶原纤维中不同构造层次引起的漫反射造成的，通常在20°附近出现[43]。A_2峰反映了胶原蛋白三螺旋结构中与中心轴相邻氨基酸残基的距离[41]。除了这3个特征峰外，X射线衍射图中还出现了一些杂峰，这可能是因为龟甲胶原蛋白中存在未完全除去的氯化钠等杂质。

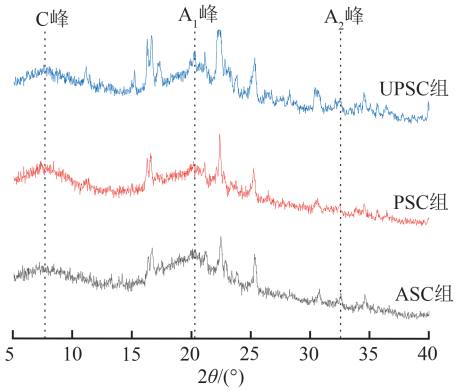


图5　3种龟甲胶原蛋白的X射线衍射图

Fig. 5　X-ray diffraction patterns of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

不同特征峰相应d值可由布拉格方程$2d\sin\theta=\lambda$得出，C峰、A_1峰和A_2峰的d值分别反映了胶原蛋白分子链间距、单个左手螺旋链的直径以及三螺旋结构中相邻氨基酸残基的距离[42-43]。3种龟甲胶原蛋白特征峰的衍射角及d值见表1。3种龟甲胶原蛋白的特征峰出现位置一致，表明超声处理未破坏胶原蛋白的三螺旋结构。但UPSC组C峰的d值与其他组相比较小，说明UPSC组分子链间的距离略微缩短，结构更为紧凑，这可能是由超声的机械效应造成的。窦容容等[1]的研究也证实，超声辅助酸法提取得到的胶原蛋白有序度更高。

表1　3种龟甲胶原蛋白的特征峰衍射角及d值

Table 1　Characteristic peak diffraction angles and d values of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

组别	C峰		A_1峰		A_2峰	
	2θ/(°)	d值/nm	2θ/(°)	d值/nm	2θ/(°)	d值/nm
ASC组	7.29	1.21	20.37	0.18	32.60	0.27
PSC组	7.33	1.20	20.21	0.18	32.50	0.28
UPSC组	7.53	1.17	20.33	0.18	32.50	0.28

2.6　SDS-PAGE分析结果

由图6可知，3种龟甲胶原蛋白均出现了5个条带（γ、β_1、β_2、α_1、α_2），与刺参[3]、鳖甲[30]等来源的胶原蛋白的SDS-PAGE结果一致。3种龟甲胶原蛋白α_1、α_2的相对分子质量均在160 000和135 000左右，并且α_1与α_2的光密度比约为2∶1，这表明3种龟甲胶原蛋白的亚基组成大概率为$(\alpha_1)_2\alpha_2$，与I型胶原蛋白的结构特征相对应[3]。β_1、β_2是$\alpha_1\alpha_1$与$\alpha_1\alpha_2$两种单链组合的二聚体，而γ则是I型胶原蛋白完整的三聚体。与PSC组和UPSC组相比，ASC组的5个条带光密度均更低，尤其是γ，这是由ASC组溶解性极低引起的。同时，PSC组和UPSC组中5个条带对应的蛋白质的相对分子质量均略有降低，这主要由于胃蛋白酶会水解胶原蛋白的端肽，使胶原蛋白的分子链缩短，导致相对分子质量降低。PSC组和UPSC组的SDS-PAGE图谱没

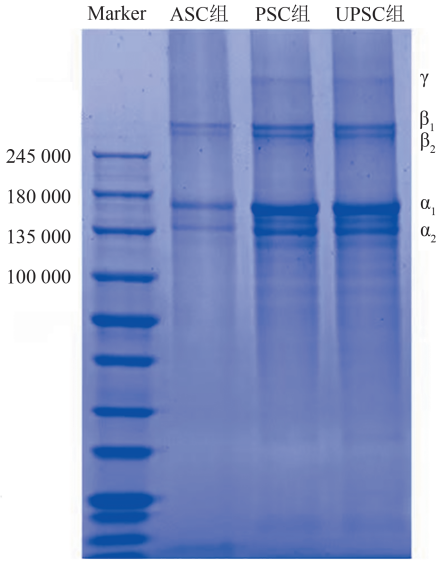


图6　3种龟甲胶原蛋白的SDS-PAGE分析

Fig. 6　SDS-PAGE analysis of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

有明显差异，这说明超声处理不会影响龟甲胶原蛋白的亚基组成。

2.7 氨基酸组成分析结果

由表2可知，3种龟甲胶原蛋白中质量分数最高的均为甘氨酸（22.31%~23.70%），这是由胶原蛋白的特殊三螺旋结构决定的。由于甘氨酸侧链仅含一个氢原子，它可以占据三螺旋结构内部空间，因此胶原蛋白α链的螺旋区域都是由甘氨酸-X-Y三肽重复序列组成，其中X大多是脯氨酸，Y通常为羟脯氨酸，正是这样规则的氨基酸序列维持了胶原蛋白的三螺旋结构并使其具有稳定性[44-45]。同时，3种龟甲胶原蛋白中均含有一定质量分数（1.69%~4.78%）的羟赖氨酸，羟赖氨酸能够参与胶原蛋白端肽的形成和稳定，PSC组和UPSC组中的羟赖氨酸质量分数低于ASC组，这可能是由于胃蛋白酶对端肽的水解造成了羟赖氨酸的流失[46]。

3种龟甲胶原蛋白中均未检出酪氨酸，且甲硫氨酸（0.91%~1.20%）和组氨酸（0.82%~0.89%）的质量分数也较低，这与紫外吸收光谱结果一致。胶原蛋白里的独特成分是亚氨基酸（如羟脯氨酸、脯氨酸），这些亚氨基酸起到稳定胶原蛋白结构的作用[47]。羟脯氨酸和脯氨酸的吡咯烷环通过约束多肽链的构象可提高胶原蛋白的三螺旋稳定性[48]，所以富含亚氨基酸的胶原蛋白的结构更加稳定，通常其含量还会影响胶原蛋白的热稳定性，但热稳定性还会受到氨基酸序列和构象的影响。3种龟甲胶原蛋白的亚氨基酸质量分数（羟脯氨酸和脯氨酸质量分数之和）（23.76%~25.53%）变化较小，且均高于鸡肺胶原蛋白[20]（19.74%~22.28%）和牛骨胶原蛋白[49]（19.47%~20.29%）。此外，3种龟甲胶原蛋白中均未检出半胱氨酸，这与鳖甲胶原蛋白的情况类似[10]。总体而言，3种龟甲胶原蛋白的氨基酸组成相近，说明超声处理并未破坏龟甲胶原蛋白的氨基酸序列，且3种方法均能获得高纯度的龟甲胶原蛋白。

表2 3种龟甲胶原蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

组别	氨基酸质量分数/%																		
	天冬氨酸	苏氨酸	丝氨酸	谷氨酸	甘氨酸	丙氨酸	缬氨酸	半胱氨酸	甲硫氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	酪氨酸	苯丙氨酸	羟赖氨酸	赖氨酸	组氨酸	精氨酸	羟脯氨酸	脯氨酸
UPSC组	6.36	1.70	2.42	10.39	22.31	10.22	6.60	—	1.20	1.54	3.09	—	3.03	1.69	3.61	0.89	0.86	7.22	16.87
PSC组	5.97	1.67	2.48	10.12	23.70	10.47	5.87	—	1.13	1.30	2.56	—	2.47	1.74	3.39	0.88	0.72	8.97	16.56
ASC组	6.12	1.67	2.24	10.52	23.55	10.19	5.33	—	0.91	1.27	2.70	—	2.55	4.78	3.51	0.82	0.08	7.89	15.87

注：“—”表示未检出。

2.8 粒径分布结果

不同胶原蛋白在醋酸溶液中的粒径分布见图7。可以看出，ASC组的粒径主要分布在400 nm左右，UPSC组和PSC组的粒径分布在340 nm左右，粒径的减小可能是由于胃蛋白酶剪切端肽，从而导致胶原蛋白的分子间作用力减弱，聚集程度降低。UPSC组粒径分布的集中度与PSC组相比较低，且在40 nm左右出现了一个小的粒径分布峰，这可能是因为超声作用的空化效应与机械效应导致胶原蛋白中原本以氢键相连的大分子发生断裂，进而分解为小分子，随后这些小分子又借助氢键重新组合在一起，使得粒径分布变得分散，同时部分小分子间未能重新形成氢键[20]。胶原蛋白的粒径大小与其功能特性密切相关，张素风等[50]研究发现，胶原蛋白粒径越小，其制备纸张的力学和抗水性能越好。

2.9 DSC分析结果

DSC图可以反映胶原蛋白的热稳定性。如图8所示，3种龟甲胶原蛋白均出现了4个峰。第1个峰为胶原蛋白的T_d[10]，3种龟甲胶原蛋白的T_d均为44 ℃。第2个峰是胶原蛋白的热收缩温度（T_s），它是胶原纤维受热失水，收缩为原本1/3时的温度[38]。ASC组、PSC组和UPSC组的T_s分别为110、94、91 ℃，胃蛋白酶的切割使得胶原蛋白的T_s降低，但联合超声处理并未进一步加剧该降低趋势。第3个峰可能与胶原蛋白中α螺旋结构的破坏有关，酶法联合超声处理后，UPSC组的此峰对应的温度从114 ℃上升到137 ℃，说明超声处理可能有利于增强α螺旋的稳定性。第4个峰是胶原蛋白的熔融温度（T_m），此时胶原蛋白分

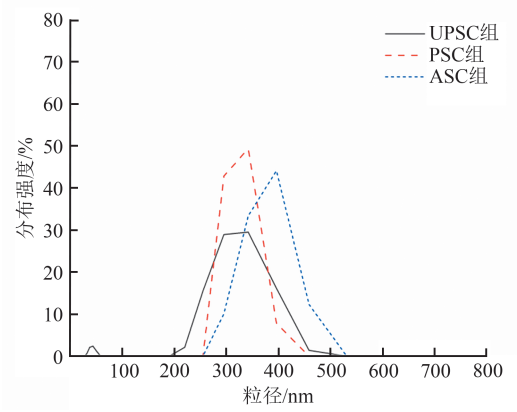


图 7　3 种龟甲胶原蛋白的粒径分布

Fig. 7　Particle size distribution of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

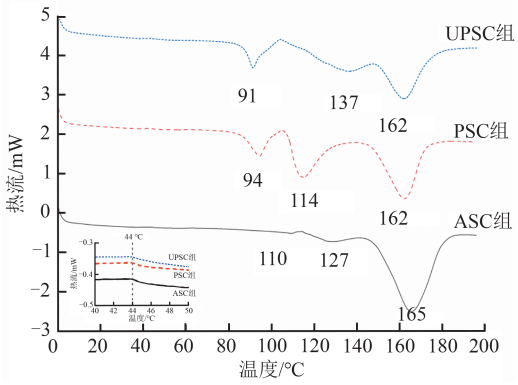


图 8　3 种龟甲胶原蛋白的 DSC 图

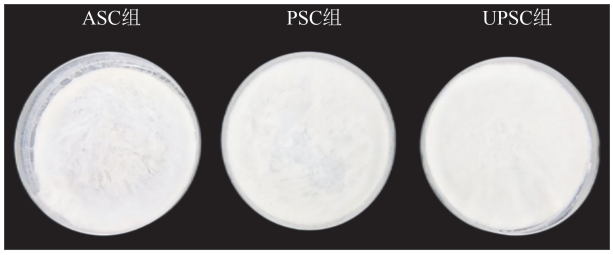
Fig.　DSC profiles of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

子的氢键、离子键等被破坏，三螺旋结构解开，变为无规卷曲[51]。ASC 组、PSC 组和 UPSC 组的 T_m 分别为 165、162、162 ℃，超声对 T_m 没有显著影响。综上所述，3 种方式提取的龟甲胶原蛋白的 T_d 均高于人体温度，具备成为生物医学材料的潜力。

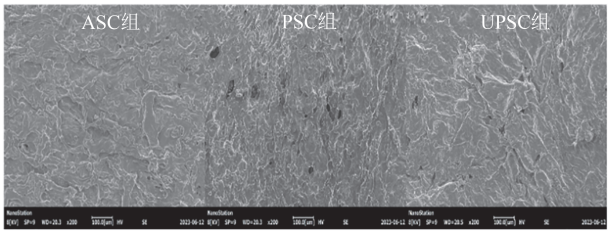
2.10　表观形貌与微观结构

3 种龟甲胶原蛋白在质量浓度 8 mg/mL 条件下重新冻干后的表观形貌见图 9(a)。3 种龟甲胶原蛋白均呈洁白、规则、蓬松的海绵状形貌。其中 ASC 组和 PSC 组的表面均出现了凹凸不平的部分，而 UPSC 组的表面则更为均一、平滑。同时，UPSC 组的颜色也更加亮白，这可能是由于 UPSC 组的内部结构更加均匀，使其对光的反射性更好。

3 种龟甲胶原蛋白在扫描电子显微镜(200×)下的微观结构见图 9(b)。3 种龟甲胶原蛋白的微观结构相似，均呈不规则的片层结构。ASC 组结构致密而不平整，表面几乎没有孔洞，但有部分束状凸起。而 PSC 组表面有大量不规则的束状凸起和许多孔洞，这可能是由于胃蛋白酶对端肽的水解使得龟甲胶原蛋白分子间作用力变弱，使其结构规则程度降低。UPSC 组表面凹凸不平并伴有少量孔洞，但没有出现束状凸起，整体较 ASC 组和 PSC 组更加规则，这可能是由于超声的空化效应和机械作用。总体而言，UPSC 组的表观形貌和微观结构更佳，这种均匀、规则的结构可能会赋予其良好的机械强度。



(a) 3种龟甲胶原蛋白的表观形貌



(b) 3种龟甲胶原蛋白的扫描电子显微镜图

图 9　3 种龟甲胶原蛋白的表观形貌和扫描电子显微镜图

Fig. 9　Apparent morphology and scanning electron microscopy images of collagens extracted from tortoise shell *via* three methods

3　结论

以龟甲为原料，采用酸法、酶法和超声联合酶法提取龟甲胶原蛋白，对龟甲胶原蛋白的性质进行分析与比较。结果表明，3 种方法提取到的龟甲胶原蛋白均为I型胶原蛋白，保留了较完整的三螺旋结构。相较于酸法和酶法，超声联合酶法可显著提高龟甲胶原蛋白的得率和纯度($P<0.05$)。超声处理不会破坏龟甲胶原蛋白的三螺旋结构、亚基组成和热稳定性，但超声波的空化效应和机械作用可能会使龟甲胶原蛋白二级结构中的 α 螺旋、β 折叠向 β 转角和无规卷曲转变。此外，相较于酸法和酶法，超声处理后的胶原蛋

白分子链间距缩短，结构更加紧凑，粒径分布集中度也降低，这使得龟甲胶原蛋白的微观结构和表观形貌更加均匀、规则。综上，超声联合酶法可有效提升龟甲胶原蛋白的得率和品质。

参考文献

[1] 窦容容，赵春青，颜子恒，等. 超声波对鲟鱼皮酸溶性胶原蛋白提取及理化特性的影响[J]. 中国食品学报，2023，23(10)：125-135.
DOU R R，ZHAO C Q，YAN Z H，et al. Effect of ultrasonication on extraction and physico-chemical properties of acid soluble collagens from the skin of sturgeon[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2023，23(10)：125-135.(in Chinese)

[2] 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，2022.

[3] 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.
ZHENG Q Y，CAO W H，HAN Y L，et al. Characteristics of collagens from body wall of *Stichopus horrens* prepared by different extraction methods[J]. Food and Fermentation Industries，2023，49(15)：145-152.(in Chinese)

[4] 辛菲. 鲅鱼皮胶原蛋白的提取及分子特性的初步研究[D]. 乌鲁木齐：新疆农业大学，2012.

[5] SIONKOWSKA A，ADAMIAK K，MUSIAŁ K，et al. Collagen based materials in cosmetic applications：a review[J]. Materials，2020，13(19)：4217.

[6] 鲁晓蓉，吴凡，喻亚丽，等. 乌龟蛋营养成分分析及品质评价[J]. 甘肃农业大学学报，2025，60(3)：291-299.
LU X R，WU F，YU Y L，et al. Analysis of the nutrient composition and quality evaluation of turtle eggs (*Chinemys Reevesii*)[J]. Journal of Gansu Agricultural University，2025，60(3)：291-299.(in Chinese)

[7] 李晴，朱香梅，石雨荷，等. 龟甲胶研究发展探析[J]. 河南中医，2023，43(6)：968-972.
LI Q，ZHU X M，SHI Y H，et al. Probe into research and development of turtle shell glue[J]. Henan Traditional Chinese Medicine，2023，43(6)：968-972.(in Chinese)

[8] 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.

[9] 农业农村部渔业渔政管理局，全国水产技术推广总站，中国水产学会. 2023中国渔业统计年鉴[M]. 北京：中国农业出版社，2023.

[10] 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.

[11] DUAN R，ZHANG J J，DU X Q，et al. Properties of collagen from skin，scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Food Chemistry，2009，112(3)：702-706.

[12] 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.
ZHAO G M，WANG Z Z，ZHU C Z，et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and structural characterization of cowhide collagen[J]. Science and Technology of Food Industry，2023，44(9)：190-199.(in Chinese)

[13] 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，2017，105：1602-1610.

[14] KAEWBANGKERD K，HAMZEH A，YONGSAWATDIGUL J. Ultrasound-assisted extraction of collagen from broiler chicken trachea and its biochemical characterization[J]. Ultrasonics Sonochemistry，2023，95：106372.

[15] 保毅，胡蕴玉，毕龙，等. 从四种生物原料中制备高纯度I型胶原的比较[J]. 中国矫形外科杂志，2008，16(6)：455-458.
BAO Y，HU Y Y，BI L，et al. Comparison of the preparation of high purity collagen type I from four biomaterials[J]. Orthopedic Journal of China，2008，16(6)：455-458.(in Chinese)

[16] 周瑞，李若男，周丽莎，等. 暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的提取及其特性[J]. 水产学报，2020，44(8)：1349-1359.
ZHOU R，LI R N，ZHOU L S，et al. Extraction and characteristics of collagens from the skin of puffer Fish (*Tetrodontiformes fasciatus*)[J]. Journal of Fisheries of China，2020，44(8)：1349-1359.(in Chinese)

[17] 那治国，贺鑫，孟桥，等. 黑木耳胶原蛋白结构性质研究[J]. 中国食品添加剂，2023，34(1)：145-151.
NA Z G，HE X，MENG Q，et al. Study on structure properties of *Auricularia auricula* collagen[J]. China Food Additives，2023，34(1)：145-151.(in Chinese)

[18] AHMAD M，BENJAKUL S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monocerous*)[J]. Food Chemistry，2010，120(3)：817-824.

[19] 杨恒，陈银基，邹烨，等. 两种方法提取的鸡肺胶原蛋白性质及保湿性研究[J]. 食品工业科技，2020，41(17)：

1-8.
YANG H，CHEN Y J，ZOU Y，et al. Properties and moisture retention of chicken lung collagen by two extraction methods[J]. Science and Technology of Food Industry，2020，41(17)：1-8.(in Chinese)

[20] 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.

[21] ALI A M M，KISHIMURA H，BENJAKUL S. 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.

[22] 张超，韩畅，冯敏，等. 多模式超声波预处理促进克氏原螯虾酶解效果的优化[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(10)：51-62.
ZHANG C，HAN C，FENG M，et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of *Procambarus clarkii via* multi-mode ultrasonic pretreatment [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42 (10)：51-62.(in Chinese)

[23] 王越，程宽，易一帆，等. 真海鞘中胶原的提取及理化性质研究[J]. 食品科技，2023，48(9)：210-216.
WANG Y，CHENG K，YI Y F，et al. Extraction and characterization of collagen from *Halocynthia roretzi*[J]. Food Science and Technology，2023，48(9)：210-216.(in Chinese)

[24] 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.
REN G Y，MA X L，PAN L，et al. Structural characteristics of bovine bone collagen under different extraction processes [J]. Science and Technology of Food Industry，2022，43(14)：27-33.(in Chinese)

[25] 黄宇玫，李敏，曾芳，等. 酸提和酶解两步法连续提取鳙鱼鱼鳞胶原蛋白工艺研究[J]. 食品科技，2019，44(2)：152-158.
HUANG Y M，LI M，ZENG F，et al. Extraction process of bighead fish scale collagen by two-step method of acid extraction and enzymatic hydrolysis [J]. Food Science and Technology，2019，44(2)：152-158.(in Chinese)

[26] YANG Y N，LI C Y，SONG W，et al. Purification，optimization and physicochemical properties of collagen from soft-shelled turtle calipash[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2016，89：344-352.

[27] HE L，LAN W T，WANG Y，et al. Extraction and characterization of self-assembled collagen isolated from grass carp and crucian carp[J]. Foods，2019，8(9)：396.

[28] 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.

[29] CAO C W，WANG H L，ZHANG J Y，et al. Effects of extraction methods on the characteristics，physicochemical properties and sensory quality of collagen from spent-hens bones [J]. Foods，2023，12 (1)：202.

[30] 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.
ZHAO Q Y，HU J，CHEN Y X，et al. Optimization of calcium removal in the carapace of Chinese soft-shelled turtle and structural characteristics of its collagen [J]. Food and Machinery，2022，38 (10)：151-157，223.(in Chinese)

[31] XIAO L F，LV J H，LIANG Y J，et al. Structural，physicochemical properties and function of swim bladder collagen in promoting fibroblasts viability and collagen synthesis[J]. LWT-Food Science and Technology，2023，173：114294.

[32] KITTIPHATTANABAWON P，NALINANON S，BENJAKUL S，et al. Characteristics of pepsin-solubilised collagen from the skin of splendid squid (*Loligo formosana*)[J]. Journal of Chemistry，2015，2015(1)：482354.

[33] 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.

[34] KRIMM S，BANDEKAR J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides，polypeptides，and proteins [J]. Advances in Protein Chemistry，1986，38：181-364.

[35] 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.

[36] 黄丹丹，马良，韩霜，等. 超声预处理影响金枪鱼皮胶原酶解工艺及机理初探[J]. 食品与发酵工业，2017，43(4)：141-146.
HUANG D D，MA L，HAN S，et al. The effect of ultrasonic pretreatment on hydrolysate of tuna skin and study on its mechanism [J]. Food and Fermentation Industries，2017，43(4)：141-146.(in Chinese)

[37] CRUZ-LÓPEZ H, RODRÍGUEZ-MORALES S, ENRÍQUEZ-PAREDES L M, et al. Comparison of collagen characteristic from the skin and swim bladder of gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*)[J]. Tissue and Cell, 2021, 72: 101593.

[38] 张强, 黄鑫, 符安卫, 等. 中华鳖裙边胶原蛋白的提取、鉴定及其理化性质[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(12): 176-182.
ZHANG Q, HUANG X, FU A W, et al. Extraction and characterization of collagens in Chinese sturgeon calipash [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(12): 176-182.(in Chinese)

[39] CHEN J D, LI M, YI R Z, et al. Electrodialysis extraction of pufferfish skin (*Takifugu flavidus*): a promising source of collagen[J]. Marine Drugs, 2019, 17(1): 25.

[40] 邹明晖, 周建良, 陈义初, 等. 枝化状聚乙二醇对牛跟腱I型胶原结构与构象稳定性的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(6): 973-975.
ZOU M H, ZHOU J L, CHEN Y C, et al. Effects of branched polyethylene glycol derivative crosslinking on the structure and conformation stability of bovine tendon type I collagen[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2011, 28(6): 973-975.(in Chinese)

[41] YAN M Y, QIN S, LI B F. Purification and structural aspects of type I collagen from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2017, 26(10): 1166-1174.

[42] 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.

[43] ZHU L L, LI J W, WANG Y C, et al. Structural feature and self-assembly properties of type II collagens from the cartilages of skate and sturgeon[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127340.

[44] LIU A, ZHANG Z H, HOU H, et al. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the cuticle of *Perinereis nuntia* (Savigny)[J]. Food Biophysics, 2018, 13(3): 274-283.

[45] WANG J, 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.

[46] MORENO H M, MONTERO M P, GÓMEZ-GUILLÉN M C, et al. Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture [J]. Food Chemistry, 2012, 134(2): 678-685.

[47] YOUSEFI M, ARIFFIN F, HUDA N. An alternative source of type I collagen based on by-product with higher thermal stability [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 372-382.

[48] NALINANON S, BENJAKUL S, KISHIMURA H, et al. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): characteristics and effect of pepsin hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 500-507.

[49] 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.

[50] 张素风, 王群, 王学川, 等. 超声优化水解胶原蛋白粒径对合成施胶剂性能影响[J]. 功能材料, 2015, 46(12): 12034-12038.
ZHANG S F, WANG Q, WANG X C, et al. The impact on sizing agent performance prepared by hydrolyzed collagen with ultrasound optimized its size[J]. Journal of Functional Materials, 2015, 46(12): 12034-12038.(in Chinese)

[51] 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.

(责任编辑: 闫林红)