

鸡关节软骨 II 型胶原的制备

曹 慧, 许时婴*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本文以鸡关节软骨为原料制备 II 型胶原。在酸性条件下添加不同浓度的胃蛋白酶酶解鸡关节软骨 II 型胶原三股螺旋链的端肽, 使 II 型胶原由不溶性转变为可溶性, 研究底物粘度随酶解时间的变化, 确定最佳的酶浓度及酶解时间。采用 DEAE-Sephalyse CL 6B 离子交换柱和去离子水重复洗涤两种方法对酶解样品进行纯化制得 II 型胶原。研究表明, 胃蛋白酶最适添加浓度 1% (W/W), 最佳酶解时间 24h。两种纯化方法的 II 型胶原提取率分别为 67% 和 81%。SDS-PAGE 电泳、高效液相色谱、氨基酸成分分析及紫外吸收光谱测定结果证实了由鸡关节软骨所制备的 II 型胶原具有较高纯度。

关键词: II 型胶原; 制备; 鸡关节软骨

Preparation of Pure Type II Collagen from Chicken Articular Cartilage

CAO Hui, XU Shi-ying*

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: This paper reported the preparation of the type II collagen from chicken articular cartilage. The type II collagen was digested by various pepsin concentrations in acid solution. By investigating viscosity changes of type II collagen, the optimal pepsin concentration and digestion time have been obtained in this process. To get the purer type II collagen, DEAE-sephalyse CL 6B column chromatographer was applied and repeatedly deionized in water elution. The results suggested that the optimal digestion conditions are 1% pepsin for 24 h. The extracton rate of type II collagen by two methods are 67% and 81% respectively. Analysis results of SDS-PAGE electrophoresis, RP-HPLC, amino acid components and violet chromatography showed that the prepared type II collagen by this method is a high purity product.

收稿日期 2006-04-30

*通讯作者

作者简介: 曹慧(1976-), 女, 博士研究生, 研究方向为功能性食品。

当前, 对紫背天葵的抗氧化活性的研究尚未见报道, 本文的研究结果为紫背天葵的进一步开发利用提供基础依据。

3 结 论

本实验测得紫背天葵中总黄酮的含量 0.93%。

实验获得紫背天葵总黄酮的最佳提取工艺流程及提取条件为: 70% 的乙醇溶液按料液比 1:25, 在 50℃ 的水浴中先预热浸提 30min, 然后再在 600W 的微波条件下处理 120s, 在此条件下得到紫背天葵中总黄酮提取率为 59.7%。

对紫背天葵提取液中总黄酮的抗氧化性研究表明, 提取液对 DPPH 自由基有较强的清除作用, 清除效果随提取液浓度的不同而变化, 在样品液黄酮浓度为 0.66mg/ml 时的清除效果最好, 抑制率达到 91.2%。此外, 紫背天葵提取液有一定的抗脂质氧化能力, 样品

液黄酮浓度为 1.32mg/ml 时, 抑制率为 14.4%。

参考文献:

- [1] 张菊平, 张兴志, 肖涛. 紫背天葵的营养保健作用[J]. 蔬菜, 2003(2): 41-42.
- [2] 张林和, 屠春燕, 于文涛, 等. 紫背天葵中营养成分及总黄酮分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(3): 3-5.
- [3] 郭长江. 食物类黄酮物质的营养学意义[J]. 中国食物与营养, 2004(3): 38-40.
- [4] 张德权, 台建祥, 付勤. 生物类黄酮的研究及应用概况[J]. 食品与发酵工程, 1999, 25(6): 52-57.
- [5] 张国辉, 马辰. 黄酮类化合物药动力学研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(5): 582-585.
- [6] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 等. 关于 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 97-99.
- [7] 丰永红, 于淑娟, 李国基, 等. DPPH 法测甘蔗提取物抗氧化活性研究[J]. 甘蔗糖业, 2003(1): 31-33, 50.
- [8] 王继锋, 王石泉, 汤国枝, 等. 山楂原花色苷抗氧化作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 13(2): 34-36.
- [9] 杨荣华, 田迪英. 10 种花色苷果蔬抗氧化活性的比较[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 5-7.

Key words type II collagen; preparation; chicken articular cartilage

中图分类号: TS251.94

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0148-05

胶原蛋白是具有独特结构的一类蛋白质,广泛存在于动物组织中,其中II型胶原蛋白主要由三条相同的 α_1 (II)链以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强度的功能^[1]。II型胶原蛋白特有的结构和化学组成使其在生物医学材料、药物输送载体、组织工程、化妆品及食品等领域得到了广泛应用,近年来的研究表明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)^[2]。RA是一种常见的以关节组织慢性炎症病变为主要表现的全身性疾病,其病因主要是由T细胞因子引起的关节组织内对特异性隐蔽抗原的自身免疫反应,而作为关节软骨主要成分的II型胶原是RA发病发展过程中最可能的自身抗原之一,因此可通过口服II型胶原产生免疫耐受防治RA^[5]。鸡关节软骨中含有丰富的胶原蛋白,其中II型胶原占胶原蛋白的80%~90%,因此本文以鸡关节软骨作为原料制备高纯度II型胶原。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜鸡关节软骨 大江集团;II型胶原标准品、胃蛋白酶(11:10000) Sigma公司;其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

HP-1100型高效液相色谱仪、HP-1100高效氨基酸分析仪(11:10000) Agilent公司;NDJ-79型旋转式粘度计 同济大学机械厂;UV1100型紫外-可见光分光光度计 Unico(上海)仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 关节软骨基本成分分析

羟脯氨酸测定^[3]:将样品置于水解管中,加入6mol/L盐酸真空封管,110℃水解24h,蒸干盐酸,稀释,定容得水解液,采用Woessner I法测定水解液中羟脯氨酸含量。

胶原含量(%)=(羟脯氨酸含量/14.4)×100^[3]

总糖含量:采用苯酚-硫酸法测定。

1.3.2 II型胶原粗制品的制备

从鸡关节软骨表面剔除残肉、鸡皮、鸡腱及其它非软骨成分,脱脂,冷冻粉碎。将样品混悬在1mol/L NaCl 0.05mol/L Tris-HCl中缓慢搅拌12h,以8000转4℃离心20min,弃去上清液。取等量沉淀混悬于0.5mol/L HAc中,分别加入质量分数为2%、1%、0.5%及0.3%的胃蛋白酶,4℃下酶解48h,间隔取样测其粘度,酶

解后10000转4℃离心20min,取上清液,用0.9mol/L的NaCl盐析,所得沉淀用0.5mol/L的HAc透析,冷冻干燥后即得II型胶原粗制品。

1.3.3 II型胶原的纯化

1.3.3.1 离子交换色谱法

将II型胶原粗制品溶解于0.5mol/L的HAc中,用2mol/L的NaOH调节pH到7.5,在0.2mol/L NaCl 0.05mol/L Tris-HCl的初始缓冲液中透析平衡,经过离子交换色谱柱。色谱柱尺寸20cm×1cm;色谱柱填充料:DEAE-Sepharose CL-6B; pH7.6;上样体积:5ml;流速0.6ml/min;检测波长280nm。洗脱方式:先采用0.2mol/L NaCl/0.05mol/L Tris-HCl洗脱,待到没有紫外吸收时,再换用1mol/L NaCl 0.05mol/L Tris-HCl洗脱。经过上述条件洗脱后收集到两个洗脱峰,分别检测这两个洗脱峰的羟脯氨酸含量,取含羟脯氨酸的第一个洗脱峰用3mol/L的NaCl盐析,透析,冷冻干燥。

1.3.3.2 水洗法

将II型胶原粗制品置于去离子水中,缓慢搅拌3h,以10000转4℃下离心20min,重复三次,取沉淀溶于0.5mol/L的HAc中,透析,冷冻干燥。

1.3.4 纯度鉴定

1.3.4.1 SDS-PAGE电泳

采用Tris-甘氨酸不连续分离系统。分离胶浓度为8%(W/V)、浓缩胶浓度为5%(W/V)。

1.3.4.2 RP-HPLC色谱

将纯化后的II型胶原溶解在0.5mol/L的HAc中,过0.45μm的微滤膜。色谱柱条件:色谱柱,ZORBAX 300 SB(4.6×250mm);流动相A为5%乙腈、0.05% TFA, B为80%乙腈(V/V);采用线性梯度洗脱;检测波长220nm;流速1ml/min。

1.3.5 氨基酸组成分析

将纯化后II型胶原溶解在6mol/L盐酸中,110℃水解24h,蒸干盐酸,定容得水解液。采用Agilent1100高效液相色谱仪分析水解液中氨基酸组成。

1.3.6 紫外光谱分析

将纯化后的II型胶原溶解在0.5mol/L HAc中,在200~300nm范围内进行紫外扫描。

1.3.7 II型胶原提取率和纯度的计算:

$$\text{II型胶原提取率(\%)} = \frac{\text{粗制品中II型胶原含量}}{\text{原料中胶原的含量}} \times 100$$

$$\text{II 型胶原纯度 (\%)} = \frac{\text{II型胶原含量}}{\text{总蛋白含量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 鸡关节软骨成分分析

鸡关节软骨中含有丰富的胶原蛋白, 其中 II 型胶原占胶原蛋白的 80%~90%^[7]。由表 1 可见通过测定羟脯氨酸的含量计算得到胶原蛋白为 73.4% (W/W), 总糖和脂肪的含量则相对偏低。因此, 鸡关节软骨是提取 II 型胶原蛋白理想的原料。

表 1 鸡关节软骨的主要组成
Table 1 Main components of chicken articular cartilage

	羟脯氨酸	胶原蛋白	总糖	脂肪
鸡关节软骨 (% , W/W 干基)	10.58	73.5	0.26	0.81

2.2 II 型胶原粗制品提取

天然的 II 型胶原是不可溶的, 在提取过程中必须使用胃蛋白酶切除三股螺旋链两端的端肽, II 型胶原才能由不溶性转变为可溶性。Hsiu 等使用了 2% 的胃蛋白酶在 1℃ 下酶解 16h^[8], Vasantha 等使用了 0.3% 的胃蛋白酶在 20℃ 下酶解 5d 提取 II 型胶原^[9]。本文首先设计了单因素实验, 选用粘度为评定指标, 研究底物粘度随酶解时间的变化, 从而确定 II 型胶原的酶解时间及酶的最佳添加量。结果表明, 随着酶解时间的增加, 底物粘度呈逐渐上升趋势, 并慢慢到达一个恒定值 (见图 1), 但达到最大粘度值的各个酶解产物中胶原蛋白的含量和提取率没有显著差异 (见表 2), 这表明到达最大粘度时在

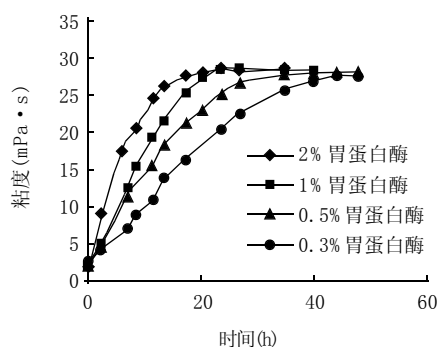


图 1 胃蛋白酶浓度对 II 型胶原粘度的影响

Fig.1 Effects of concentration of pepsin on viscosity of type II collagen

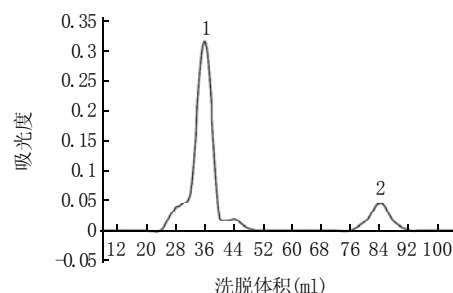
表 2 胃蛋白酶浓度对 II 型胶原的提取率和纯度的影响

Table 2 Effects of concentration of pepsin on extraction rate and purity of type II collagen

胃蛋白酶浓度 (% , W/W)	2	1	0.5	0.3
提取率 (%)	54.3	55.6	54.8	52.6
II 型胶原蛋白含量 (% , W/W)	89.8	89.0	90.3	87.4

同酶解条件下胶原蛋白酶解都已完成。由图 1 可见, 当酶的添加量为 2% (W/W) 和 1% (W/W) 时, 到达最大粘度值的时间差异并不显著, 约在 20~24h。当酶的添加量为 0.5% (W/W) 时, 到达最大粘度值需 36h。当酶添加量为 0.3% (W/W) 时, 完成酶解所需的时间最长, 约 48h。因此, 从生产成本和时间考虑, 酶的最佳添加量为 1% (W/W), 酶解时间为 24h, 胶原蛋白提取率为 55.6%, 胶原蛋白含量为 89.8%。

2.3 II 型胶原蛋白的纯化



第 1 个峰为 II 型胶原峰; 第 2 个峰为蛋白多糖峰。

图 2 DEAE-sepharose CL 6B 分离 II 型胶原的洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of separation of type II collagen on DEAE-sepharose CL 6B chromatography column

表 3 两种纯化方法对 II 型胶原提取率及纯度的影响

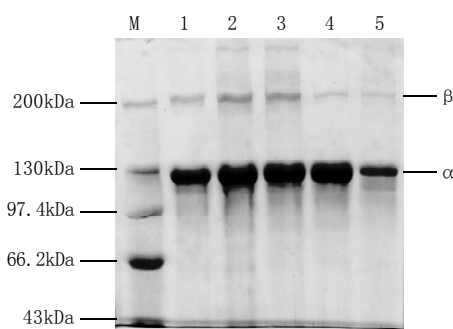
Table 3 Effect of two methods on extraction rate and purity of type II collagen

	提取率 (%)	纯度 (%)
色谱分离法	67	97
水洗法	81	93.4

由图 2 可见, 采用 DEAE-sepharose CL 6B 离子交换色谱能很好的分离 II 型胶原与蛋白多糖^[4-6], 但提取率较低仅为 67% (见表 3), 这与经离子交换色谱柱纯化之前易导致 II 型胶原变性的前处理步骤有关, 这种方法还具有代价昂贵、耗时长的缺点。因此, 根据 II 型胶原不溶于去离子水的性质将 II 型胶原在去离子水中重复洗涤除去杂质。结果表明 II 型胶原经过重复洗涤后, 提取率可以达到 81%, 比离子交换色谱法提高了 14% (见表 3)。此法简单易行, 提取率也较高, 可以应用于工业化生产。

2.4 II 型胶原的纯度鉴定

本实验采用了 SDS-PAGE 电泳与高效液相色谱两种方法鉴定 II 型胶原的纯度, 从图 3 可见分别经过离子交换色谱及水洗的 II 型胶原与 Sigma 公司标准品相比均具有很高的纯度, 三个样品都出现了 2 个条带, II 型胶原是由三条相同的 α 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。从高效液相色谱图进一步可知 (见图 4), 本实验提取的 II 型胶原色谱图与 Sigma 对照品相似, 其保留时间分别为 10.233 及 10.300min (在



M: 分子量标准蛋白; 1: Sigma 标准品; 2、3、4: 不同批次经过离子交换色谱纯化的样品; 5: 经过去离子水反复洗涤的样品。

图3 II型胶原的SDS-PAGE电泳图谱

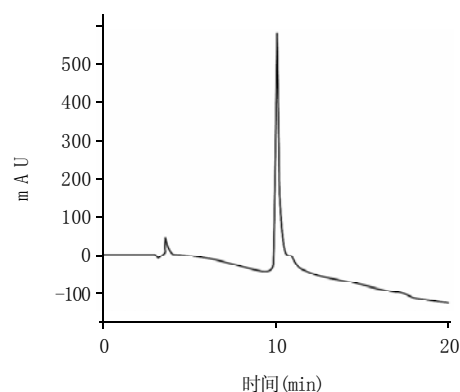
Fig.3 SDS-PAGE electrophoretogram of type II collagen

允许误差范围内), 通过峰面积积分算出的纯度分别为97%、95%。SDS-PAGE电泳和RP-HPLC的鉴定结果表明通过本文的纯化方法可以制备高纯度的II型胶原。

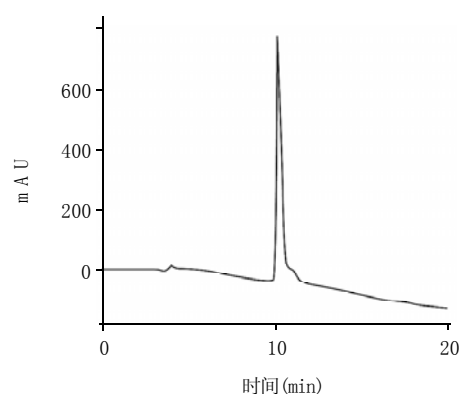
2.5 II型胶原的氨基酸组成及紫外光谱

由表4可见, 从关节软骨提取出来的II型胶原氨基酸组成与Sigma公司的对照品非常接近, 其中甘氨酸约占总氨基酸的1/3, 脯氨酸和羟脯氨酸约占1/4, 此外还含有较多的丙氨酸, 酪氨酸、组氨酸和蛋氨酸含量低, 缺乏色氨酸, 为典型动物胶原的氨基酸组成。

II型胶原在221nm波长产生特征吸收峰(见图5), 这与II型胶原特殊的结构及氨基酸组成有关。



a. 经过离子交换色谱纯化的样品



b. Sigma标准样品

图4 II型胶原的RP-HPLC图谱

Fig.4 RP-HPLC spectrum of type II collagen

3 结论

鸡关节软骨是提取II型胶原比较理想的原料, II型

胶原粗制品提取的最适胃蛋白酶添加量为1%, 最佳酶解时间为24h, 采用DEAE-Sephadex CL 6B离子交换柱

表4 II型胶原的氨基酸组成
Table 4 Amino acid composition of type II collagen

	Sigma对照品		经离子交换色谱纯化样品	
	质量百分含量(% W/W)	摩尔比(个/1000个)	质量百分含量(% W/W)	摩尔比(个/1000个)
天冬氨酸*	5.59	47	5.29	45
谷氨酸**	12.31	94	11.67	88
丝氨酸	2.32	25	2.23	24
组氨酸	0.34	4	0.48	4
甘氨酸	21.18	313	20.82	309
苏氨酸	3.09	30	3.25	31
丙氨酸	8.07	102	7.87	99
精氨酸	8.14	53	7.69	50
酪氨酸	0.66	5	0.48	4
胱氨酸	3.49	17	3.68	18
缬氨酸	2.20	22	1.94	19
蛋氨酸	0.12	2	0.94	8
苯丙氨酸	2.08	15	1.88	14
异亮氨酸	1.34	13	1.09	10
亮氨酸	3.49	31	3.17	28
赖氨酸	1.89	15	1.48	12
脯氨酸	9.57	94	11.89	116
羟脯氨酸	13.88	118	14.17	121

注: *: 天冬氨酸包括天冬氨酸+天冬酰胺; **: 谷氨酸包括谷氨酸+谷氨酰胺。

琯溪蜜柚中主要苦味物的丙酮提取工艺研究

胡 阳¹, 倪 辉², 邬应龙¹, 蔡慧农^{2,*}, 吴光斌²

(1. 四川农业大学信息与工程技术学院食品科学与工程系, 四川 雅安 625014

2. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘 要: 目的: 探讨琯溪蜜柚中主要苦味物(柚皮苷、柠碱和诺米林)的丙酮提取最佳工艺条件。方法: 考察果实不同组织作提取原料、原料脱脂与否、脱脂溶剂的选择对提取率的影响, 并运用正交试验考察丙酮用量(体积/质量)、提取时间、提取温度和 pH 值对提取率的影响。结果: 琯溪蜜柚中主要苦味物提取的最佳工艺条件为 20 倍原料重的丙酮、40℃、pH7.0 条件下水浴浸提 15h。结论: 采用本实验所确定的提取方法可将蜜柚中的三种主要苦味物同时提取出来。

关键词: 苦味物; 柚皮苷; 柠碱; 诺米林; 提取; 优化

Study on Extraction Process of Bitterness from Guanxi Pomelo

HU Yang¹, NI Hui², WU Ying-long¹, CAI Hui-nong^{2,*}, WU Guang-bin²

(1. Department of Food Science and Engineering, College of Information and Engineering Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China 2. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Objective: To optimize the acetone extraction processing for bitterness such as naringin, limonin and nomilin in

收稿日期: 2006-04-11

*通讯作者

基金项目: 厦门市科技计划项目(3502Z20063016); 福建省自然科学基金项目(2006J0076); 集美大学优秀青年骨干教师基金资助项目; 集美大学科研基金项目

作者简介: 胡阳(1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品微生物与发酵工程方面的研究。

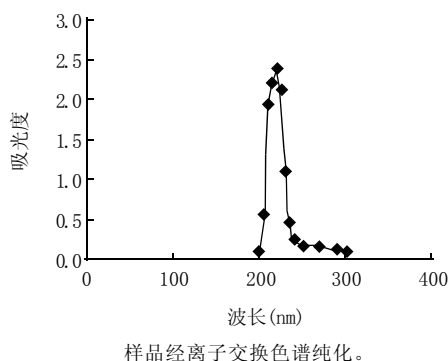


图5 II型胶原的紫外吸收光谱图

Fig.5 UV absorbance spectrogram of type II collagen

和去离子水反复洗涤使 II 型胶原提取率分别达到 67% 和 81%。SDS-PAGE 电泳、高效液相色谱、氨基酸成分分析及紫外最大吸收光谱测定结果证实了本实验所提取的 II 型胶原具有较高纯度。由于鸡关节软骨来源丰富, 成本低, 而我国又是养鸡大国, 鸡软骨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, 因此开发利用鸡软骨资源用以生产 II 型胶原, 提高其附加性具

有重大经济意义。

参考文献:

- [1] 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: 60-67.
- [2] 杨晓红, 彭燕豪, 邹海燕, 等. 高纯度猪软骨 II 型胶原的制备与检测[J]. 生物医学工程杂志, 2001, 18(4): 592-594.
- [3] 冯志明, 徐衡. 动物组织中羟脯氨酸测定方法的建立及初步应用[J]. 南京铁道医学院学报, 1999, 18: 168-170.
- [4] EDWARD J M. Isolation and characterization of a collagen from chick cartilage containing three identical chains[J]. Biochemistry, 1971(9): 1652-1658.
- [5] DAVID E T, ROSELYNN A. Effects of oral administration of type II collagen on Rheumatoid Arthritis[J]. Science, 1993, 24: 1727-1729.
- [6] EDWARD J M. Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptide from the chain of bovine and human cartilage collagen[J]. Biochemistry, 1973, 17: 3153-3159.
- [7] PIEPER J S, VAN DER KRAAN P M. Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering[J]. Biomaterials, 2002, 23: 3183-3192.
- [8] HO Hsiu-o, LIN Lun-huei, SHEU Ming-thau. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as a drug carrier[J]. Journal of Controlled Release, 1997, 44: 103-112.
- [9] VASANTHA, SEHGAL P K, RAO K P. Collagen ophthalmic inserts for pilocarpine drug delivery system[J]. Int J Pharm, 1988, 47: 95-102.