

猪皮胶原蛋白提取过程中酶解 条件优化及其结构鉴定^①

于 玮¹, 王雪蒙¹, 马 良^{1,2},
周梦柔¹, 张宇昊^{1,2}

1. 西南大学 食品科学学院/国家食品科学与工程实验教学中心, 重庆 400716;
2. 农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 重庆 400716

摘要: 采用酶法从猪皮中提取胶原蛋白, 以胶原蛋白的提取率为评价指标, 对工艺中的酶解 pH, 酶解时间和胃蛋白酶用量 3 个因素进行优化, 实验结果表明, 酶解液 pH 2.2, 酶解时间 18 h, 酶用量 1% 为最佳工艺组合, 在此条件下胶原蛋白提取率可达 $84.35\% \pm 0.33\%$, 纯度为 $82.5\% \pm 1.6\%$; 所得胶原主要由 α , β 和 γ 3 种亚基组分组成, 具有较高的热稳定性; 红外光谱和圆二色谱测定结果显示, 其具备典型的胶原蛋白吸收特征, 证明胶原天然三螺旋结构保存完整。

关键词: 猪皮; 胶原蛋白; 酶法; 结构鉴定

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)04-0106-08

我国是猪肉生产大国, 2013 年猪肉产量约 54 000 kt, 其中猪皮是猪肉生产的主要副产品之一, 约占猪体总质量的 10%, 按此计算每年有近 5 400 kt 猪皮产生, 但这些猪皮中除部分用于皮革生产外, 大部分被废弃, 不能充分发挥其价值所在. 猪皮中的蛋白质含量高达 33%, 其中胶原蛋白含量为 87.8%^[1]. 因此, 以猪皮为原料, 提取胶原蛋白并加以利用可极大提高其附加值, 减少资源浪费。

胶原蛋白的提取有酸法、碱法、酶法等, 酸法提取胶原蛋白纯度高, 但酸法会使色氨酸全部被破坏, 丝氨酸和酪氨酸部分破坏, 且提取率低^[2-3], 酸法提取率仅为 44.9%; 碱法提取会破坏含有羟基和巯基的氨基酸且产生消旋, 三螺旋结构被严重破坏^[4], 研究发现碱法产生的副产物 D 型氨基酸有致畸、致癌作用^[5]. 酶法目前应用较多, 以胃蛋白酶应用最为广泛, 原因在于胃蛋白酶只作用胶原的非螺旋端肽, 不会改变胶原的三股螺旋结构, 引起 α_1 和 α_2 链伸展^[6]. 胡二坤^[7]等研究发现酶可提高胶原蛋白的提取率, 但研究得出猪皮胶原蛋白水抽提法最优工艺提取率为 70.54%, 远高于酸碱法. 但酶法处理过程中对温度, pH 等条件要求严格, 工艺的控制不当会影响产品得率并破坏胶原天然结构, 使其丧失功能活性. 因此对其工艺进行系统优化研究, 以通过准确控制工艺参数获得高得率, 并保持良好天然结构的胶原蛋白至关重要。

本研究采用酶法从猪皮中提取胶原蛋白, 对酶法提取酶解工艺条件进行优化, 通过差示量热扫描 (DSC)、红外光谱、圆二色谱、SDS-PAGE 电泳等分析手段对胶原蛋白三螺旋结构完整性进行了鉴定. 旨在保持胶原蛋白完整天然结构的前提下, 提高猪皮胶原的提取率, 为胶原蛋白产业化生产过程中工艺优化改进提供实验依据。

① 收稿日期: 2014-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(31301425); 中央高校基本科研业务费重点项目(XDJK2011B001).

作者简介: 于 玮(1989-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事食品化学与营养学的研究.

通信作者: 张宇昊, 副教授, 博士, 硕士研究生导师.

1 实验材料及仪器

1.1 原料与试剂

猪皮(8个月左右的长白猪),购于重庆市北碚区天生丽街永辉超市,原料获取后洗净,刮去表层脂肪后,切成约3 mm×3 mm的小块,真空包装冻藏于冰箱中备用。

十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、氯化钠、冰醋酸、硫酸、一水柠檬酸、无水乙酸钠、三水·N-对甲苯磺酰胺钠盐(氯胺 T)、对二甲氨基苯甲醛、高氯酸、正丙醇、异丙醇、甲醇、氢氧化钠、溴化钾,成都市科龙化工试剂厂;羟脯氨酸,上海楷洋生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS)、Tris、过硫酸铵(APS)、 β -巯基乙醇(2-ME)、四甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝 R-250, BIO BASIC 公司;质量分数为 30% 丙烯酰胺(丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺质量比为 29:1),北京索莱宝科技有限公司;甘氨酸(Glycine)、溴酚蓝(BPB),生工生物工程(上海)有限公司;胃蛋白酶(1:10 000),北京 Solarbio;标准蛋白(分子量 10~200 kDa),加拿大 Fermentas 公司。Tris,考马斯亮蓝 R-250,30% 丙烯酰胺为优级纯,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

JA3003B 电子天平,上海精天电子仪器有限公司;DZ600/2S 真空包装机,上海人民包装股份有限公司;FYL-C022 料理机,九阳股份有限公司;抽滤装置,重庆龙迎化工有限公司;透析袋(MD:34,分子截留量:8 000~14 000 mw),北京 Solarbio 公司;pHS-25 型数显酸度计,杭州雷磁分析仪器厂;CJ-78-1 磁力搅拌器,上海将任实验设备有限公司;5810 型台式高速离心机,德国 Eppendorf 公司;101-4-S 电热恒温鼓风干燥箱,上海跃进医疗器械厂;QL 901 Vortex 旋涡混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;8002 型温控水浴锅,北京永光明医疗仪器厂;752 紫外可见分光光度计,上海菁华科技有限公司;MOS-450 圆二色谱仪,法国 BioLogic 公司;FD-1-50 真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;Pyris4000 差示量热扫描仪,美国 PerkinElmer 公司;Spectrun100 红外光谱仪,美国 PerkinElmer;Power PacTM 基础电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;G:BOX EF 型凝胶成像系统,英国 Syngene 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 猪皮胶原蛋白提取工艺流程

采用胃蛋白酶法从猪皮中提取胶原蛋白,具体工艺流程如下:

猪皮→前处理(修整、脱脂、除杂蛋白)→清洗→酸浸泡→打浆→酶解→盐析→纯化→冻干→胶原蛋白

1.3.1.1 前处理

将新鲜猪皮去毛、刮除皮下脂肪后,洗净并切成约 3 mm×3 mm 的小块,按照陈丽清等^[8]的方法对猪皮进行脱脂处理;再按 1:5 的比例加入 1%(w/v)的 NaCl 溶液浸泡以去除杂蛋白(浸泡搅拌 6 h,每 2 h 换 1 次液),浸泡完后用 30 °C 蒸馏水洗涤 3~4 次,真空包装冻藏备用。

1.3.1.2 酸浸泡、打浆

取一定量皮块,按 1:15 倍(w/v)比例加入 pH 2.2 的醋酸溶液,在 4 °C 下浸泡 8~10 h(每隔 1 h 搅拌 1 min),待皮块膨胀均匀后打碎成糊状。

1.3.1.3 酶解

向打碎的猪皮中继续添加 15 倍体积的醋酸(即加入的醋酸总体积为猪皮质量的 30 倍),搅拌均匀的浆液,并调节浆液 pH 至适宜。向猪皮浆液中加入适量的胃蛋白酶,于 4 °C 下酶解一段时间,每 1 h 搅拌 5 min(酸度计精确调控 pH,偏离值超过 0.02 加醋酸调节)。

1.3.1.4 中和、盐析

酶解液用纱布抽滤,取滤液。向滤液中缓慢滴加浓 NaOH,调节 pH 至 7~8,再边搅拌边缓慢加入一定量 NaCl(使 NaCl 最终浓度为 4~5 mol/L),盐析 12 h,待出现白色絮状沉淀后离心(8 000 r/min, 15 min),取沉淀,即得到胶原蛋白粗提物。

1.3.1.5 纯化、冻干

将胶原蛋白粗提物以 pH 2.7 的醋酸溶解,离心(6 000 r/min, 10 min)除去杂质后灌入透析袋(分子截

留量 8 000~14 000 mw)中,先以 pH 3.0 的醋酸为透析液透析 3~4 d,再以纯水为透析液透析 2 d,最后冻干得到纯化的胶原蛋白样品。

1.3.2 猪皮胶原蛋白的提取率、纯度的测定和计算

1.3.2.1 胶原蛋白提取率

$$\text{胶原蛋白提取率}/\% = \frac{\text{胶原蛋白粗提物中胶原蛋白质量分数}(\%)}{\text{猪皮中胶原蛋白的质量分数}(\%)} \times 100$$

其中胶原蛋白的质量分数=羟脯氨酸质量分数 $\times 10$ 。经测定猪皮中胶原蛋白的质量分数为 19.24%。

羟脯氨酸质量分数测定方法:参照 GB/T 9695.

23-2008/ISO3496:1994 肉与肉制品羟脯氨酸含量测定进行,先在(558 \pm 2) nm 波长下进行比色,以羟脯氨酸为标准液,绘制标准曲线,如图 1 所示,再测定各样品的吸光度,计算出羟脯氨酸质量分数。

1.3.2.2 胶原蛋白样品纯度

按照 1.3.2.1 的方法先测定样品中羟脯氨酸质量分数,再转换为胶原蛋白质量分数(即胶原蛋白纯度)。

1.3.3 猪皮胶原蛋白提取工艺优化

针对猪皮胶原蛋白提取工艺中的酶解液 pH,酶解时间和胃蛋白酶用量这 3 个因素进行参数优化。

1.3.3.1 猪皮胶原蛋白提取工艺优化的单因素试验

猪皮胶原蛋白提取工艺优化的单因素试验基本条件为酶解液 pH 2.1,酶解时间 18 h,酶用量为 1% (w/w)。改变其中 1 个条件,固定其余条件以分析酶解液 pH,酶解时间,酶用量对胶原蛋白提取率的影响。各因素水平分别为酶解液 pH: 1.7, 1.9, 2.1, 2.3, 2.5; 酶解时间: 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h; 酶用量: 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%。每个因素重复试验 3 次,数据采用 SPSS 17.0 进行分析。

1.3.3.2 猪皮胶原蛋白提取工艺优化的正交试验及胶原蛋白纯度的测定

通过单因素试验确定酶解液 pH,酶解时间和酶用量 3 个因素的水平范围(见表 1),以胶原蛋白提取率为评价指标进行正交试验,每个条件重复试验 3 次,数据采用 SPSS 17.0 进行分析。对最优工艺条件下提取的胶原蛋白粗提物先后进行透析、冻干处理得到纯化的胶原蛋白样品,并计算胶原蛋白的纯度。

表 1 正交试验的因素水平设计

水平	A	B	C
	酶解液 pH	酶解时间/h	酶用量/%
1	2.2	15	0.75
2	2.3	18	1.0
3	2.4	21	1.25

1.3.4 猪皮胶原蛋白结构鉴定

通过差示量热扫描(DSC)、红外光谱、圆二色谱、SDS-PAGE 电泳等分析手段对纯化后的胶原蛋白样品进行结构鉴定。

1.3.4.1 胶原蛋白的热稳定分析

采用 DSC 分析仪测定对胶原热稳定性的影响。测定方法如下:称取样品约 3~5 mg,用铝坩锅封存,放入 DSC 仪,在氮气气氛下,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率从 -5 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 180 $^{\circ}\text{C}$,记录吸热曲线。

1.3.4.2 胶原蛋白的红外光谱分析

红外光谱是分析胶原蛋白中特殊基团的一种重要手段^[9-10]。称取 1 mg 样品与 1 g 溴化钾(KBr)混合研磨,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干后压片,用 Spectrun100 红外光谱仪进行检测。室内温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,扫描范围:450~4 000 cm^{-1} ,扫描次数:32,分辨率 4 cm^{-1} 。

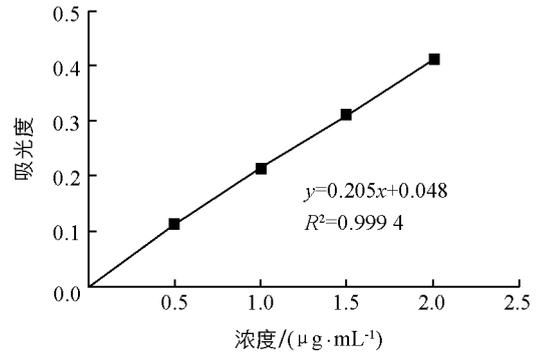


图 1 羟脯氨酸标准曲线

1.3.4.3 胶原蛋白的圆二色谱分析

参照 Li 等^[11]的方法进行测定. 按 10 : 1(mg/mL)的比例向胶原蛋白样品中加入 0.5 mol/L 的醋酸. 测定前充分搅拌, 在冰箱内平衡 12 h, 再在室温下放置 2 h. 测定波长范围: 190~240 nm, 比色皿光程: 1 mm, 扫描速度: 0.5 nm/s; 测定环境: 25 °C, 氮气. 以 0.5 mol/L 的醋酸溶液为空白对照.

1.3.4.4 胶原蛋白的亚基组成

采用 SDS-PAGE 垂直电泳分析胶原蛋白的亚基组成, 相关溶液配制及具体操作参照陈丽清等^[12]的方法进行. 以 0.25 mol/L Tris-HCl 为溶剂, 配制 1.0 mg/mL 的胶原蛋白溶液, 按体积比 4 : 1 添加 5×样品缓冲液, 沸水浴 5 min, 冷却后上样, 上样量为 15 μL(Marker 上样量为 10 μL), 分离胶为质量分数 6%, 浓缩胶质量分数为 5%. 15 mA 恒流电泳, 待溴酚蓝跑到分离胶中后, 电流调至 25 mA, 电泳时间约 1 h. 考马斯亮蓝染色 2 h 后用脱色液脱色, 直至背景蓝色被脱净, 然后用凝胶成像系统拍摄电泳图谱并分析样品的亚基组成.

2 实验结果分析

2.1 酶解液 pH 对猪皮胶原蛋白提取率的影响

酶解液 pH 对猪皮胶原蛋白提取率的影响如图 2 所示. 随酶解液 pH 值的升高, 胶原蛋白提取率先升高后下降, 在 pH 为 2.3 时提取率达最大值 78.45% ± 1.87%. pH 在 1.7~2.5 下, 胃蛋白酶主要破坏胶原纤维的非螺旋结晶区, 以利于酸对胶原结构的进一步降解, 释放出胶原分子. 当 pH 过低, 酸对胶原内部三螺旋结构的降解作用增强, 导致胶原肽链降解, 损失增大, 胶原提取率随之降低; 当 pH 升至 2.5, 酸的破坏力减弱, 不利于胶原的释放, 提取率有所下降. 综上所述, 在 pH 为 2.3 时进行酶解较为合适.

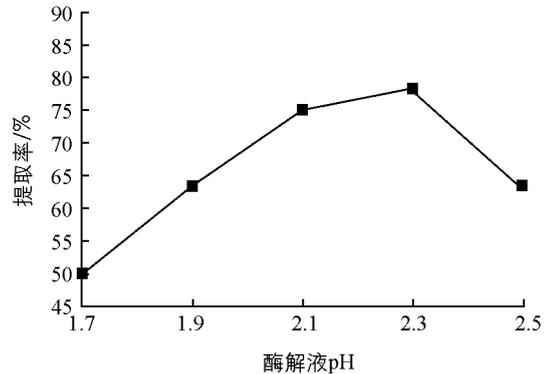


图 2 酶解液 pH 对胶原蛋白提取率的影响

2.2 酶解时间对猪皮胶原蛋白提取率的影响

酶解时间对猪皮胶原蛋白提取率的影响如图 3 所示. 酶解时间为 18 h 时猪皮胶原蛋白提取率最高, 达 75.18% ± 1.87%, 时间少于或多于 18 h, 提取率均有所降低. 这是由于酶解时间过短, 酸无法充分断裂胶原纤维间的共价交联键, 胶原分子的溶出量有限; 若酶处理时间过长, 酸作用导致胶原蛋白螺旋区被破坏, 降低胶原蛋白提取率. 综上所述, 确定较适酶解时间为 18 h.

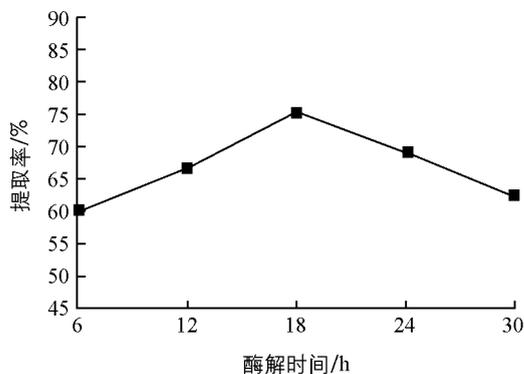


图 3 酶解时间对胶原蛋白提取率的影响

2.3 酶用量对猪皮胶原蛋白提取率的影响

酶用量对猪皮胶原蛋白提取率的影响如图 4 所示.

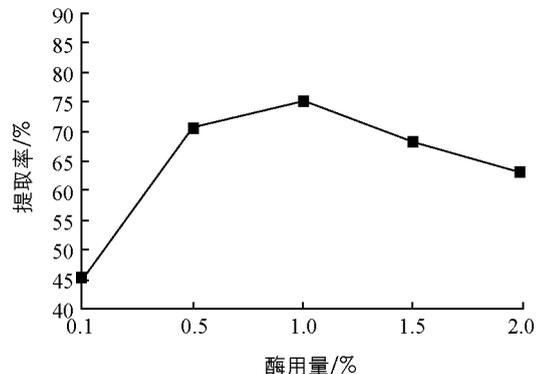


图 4 酶用量对胶原蛋白提取率的影响

酶用量由 0.1% 到 1%, 胶原蛋白提取率持续升高, 说明胃蛋白酶逐渐与猪皮胶原的非螺旋区特定位点相结合, 切除非螺旋的端肽, 瓦解胶原纤维, 促使酸对胶原纤维间共价交联键的破坏, 胶原蛋白释放量增加^[13-16]; 当酶用量从 1% 增加到 2%, 胶原蛋白提取率逐渐下降, 这可能是由于酶用量过大, 对

胶原非螺旋结晶区的破坏更快,从而导致酸对胶原结构的过度降解^[10, 17]. 综上所述,添加猪皮质量1%的胃蛋白酶较为合适.

2.4 猪皮胶原蛋白提取工艺参数的优化

在单因素试验结果的基础上,进行酶解液 pH, 酶解时间和酶用量的 3 因素 3 水平正交试验, 结果如表 2 所示.

表 2 正交试验结果

试验号	A 酶解液 pH	B 酶解时间/h	C 酶用量/%	ω 总提取率/%
1	1	1	1	79.56±1.47
2	1	2	2	84.35±1.84
3	1	3	3	76.00±0.91
4	2	1	2	71.19±1.63
5	2	2	3	68.21±2.05
6	2	3	1	64.64±0.79
7	3	1	3	60.70±2.51
8	3	2	1	63.39±1.59
9	3	3	2	65.46±1.77
K_w 1	242.01 ^a	211.45 ^b	207.59 ^b	
K_w 2	204.04 ^b	215.95 ^a	221.00 ^a	
K_w 3	189.55 ^c	206.10 ^c	204.91 ^c	
R_w	52.46	9.85	16.09	

注: 同列数据小写字母不同代表差异有统计学意义($p < 0.05$).

由极差分析结果可知, 酶解液 pH 对胶原蛋白提取率的影响最为显著, 酶用量次之, 酶解时间最小. 方差分析结果表明, 在本实验正交范围内, 酶解液 pH, 酶解时间和酶用量这 3 个因素的胶原蛋白提取率均值间均存在显著差异($p < 0.05$). 在酶解液 pH 2.2, 酶解时间 18 h 和酶用量 1% 的条件下胶原蛋白的提取率达最大值 84.35%±0.33%, 高于胡二坤等^[7]研究的猪皮胶原蛋白水抽提法最优工艺提取率(70.54%). 因此确定胶原蛋白提取的最优工艺参数为酶解液 pH 2.2, 酶解时间 18 h, 酶用量 1%.

以上最优工艺条件提取出的胶原蛋白粗提物经过透析、冻干处理后得到纯化的白色海绵状胶原蛋白样品(如图 5 所示). 经测定样品中胶原蛋白纯度为 82.5%±1.6%.

2.5 猪皮胶原蛋白的结构鉴定

2.5.1 胶原蛋白的热稳定分析

采用差示量热扫描(DSC)检测优化工艺下提取的胶原蛋白的热变性温度(T_m)及热焓值(ΔH), 结果如图 6 所示.

从图 6 看出, 在检测温度范围内出现一个吸热峰, 通过 Pyris4000 软件分析得, 峰值对应温度(即胶原蛋白热变性温度 T_m)为 77.27 °C, ΔH 为 537.766 6 J/g.

在胶原蛋白分子中, 三股 α -肽链主要通过氢键相互聚合成规则的三螺旋结构单元(即原胶原分子), 三螺旋结构单元间再借助氢键和共价交联作用, 相互交错连接形成稳定的胶原纤维, 三螺旋结构间氢键的作用力弱于三螺旋内氢键, 后者的断裂会引起胶原蛋白的变性^[1, 18]. 升温过程中胶原蛋白不断吸热, 稳定胶原纤维的三螺旋间氢键、离子键等非共价交联键首先发生断裂; 当体系温度达到 T_m 后, 三螺旋内氢键相继被破坏、螺旋结构松散, 肽链由有序螺旋态转变为无规则卷曲态, 胶原变性^[1, 19-20]. 变性温度和热焓值越高, 说明维系胶原纤维结构稳定的分子间作用力(氢键、离子键、共价交联等)越大, 胶原聚合度越高, 胶原蛋白的热稳定性越强及其天然螺旋结构越完整. 本实验提取的胶原蛋白的热变性温度较刘苏锐^[10]等采用



图 5 猪皮胶原蛋白

酸膨胀-胃蛋白酶降解法提取的猪皮胶原蛋白高出约 9 °C。综上所述,本实验在优化条件下提取的猪皮胶原蛋白的热稳定较高,天然结构保存较为完整。

2.5.2 胶原蛋白的红外光谱分析

采用傅里叶红外光谱(FTIR)分析优化工艺下提取的胶原蛋白的二级结构及特殊基团,结果见图 7。

如图 7 所示, $3\ 426.69\ \text{cm}^{-1}$ 处是酰胺 A 带的 $\nu\text{N-H}$ 或 $\nu\text{O-H}$ 伸缩振动吸收峰; $2\ 926.00\ \text{cm}^{-1}$ 处是酰胺 B 带 $\nu\text{N-H}$ 和 $\nu\text{C-H}$ 伸缩振动吸收峰,二者表明肽链间氢键的存在^[11, 17]。 $1\ 654.40\ \text{cm}^{-1}$ 为酰胺 I 带,是形成三股螺旋内氢链的 C=O 基团的伸缩振动吸收峰,表征胶原三螺旋结构的存在。

$1\ 553.94\ \text{cm}^{-1}$ 为酰胺 II 带的 $\nu\text{N-H}$ 弯曲振动和 $\nu\text{C-N}$ 伸缩振动吸收峰。 $1\ 455.71\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰表征肽键的顺式构型^[18],说明胶原蛋白分子中含有大量脯氨酸和羟脯氨酸,因为除了脯氨酸残基的肽单位之外,多肽链中绝大多数肽单位的 N-H 与 C=O 均为反式排列。 $1\ 240.45\ \text{cm}^{-1}$ 处为酰胺 III 带的 $\nu\text{N-H}$ 变形峰,其强度与三螺旋结构有关。 $1\ 337.37\ \text{cm}^{-1}$ 是酰胺 IV 带 $\nu\text{C-H}$ 伸缩, $\nu\text{N-H}$ 变形或 νNH_2 摇摆峰。 $1\ 081.54\ \text{cm}^{-1}$ 是 $\nu\text{C-O}$ 或 $\nu\text{C-H-C}$ 伸缩振动峰。 $655.99\ \text{cm}^{-1}$ 是酰胺 V 带,即顺式 $-\text{CH}-$ 摇摆和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 摇摆吸收峰。其中 $1\ 450\sim 1\ 230\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰的存在表明了胶原蛋白三股螺旋结构的完整性^[19, 10]。

总之,图谱中红外吸收峰的峰形及其对应的吸收波长均符合胶原蛋白的红外吸收特征,因此可以证明本实验的优化提取工艺较好地保留了胶原三螺旋结构的完整性。

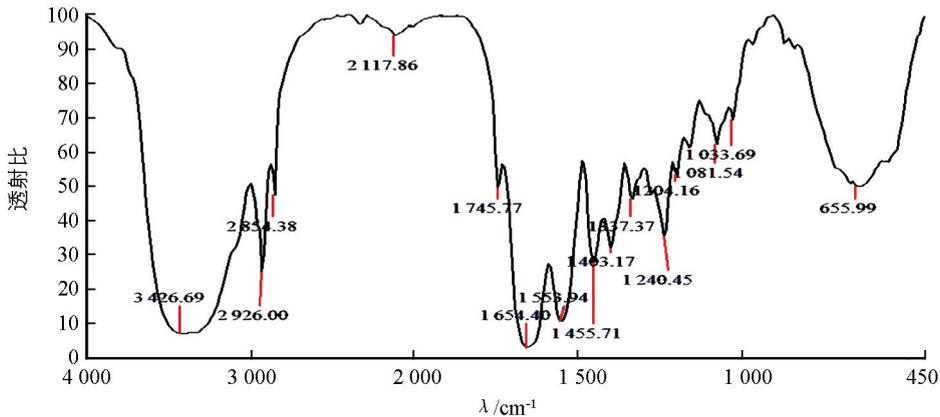


图 7 猪皮胶原蛋白的红外光谱图谱

2.5.3 胶原蛋白的圆二色谱分析

由于 FTIR 主要检测的是分子振动时产生的偶极矩的变化,其对极性基团比较敏感^[20],而 $190\sim 250\ \text{nm}$ 的远紫外区圆二吸收可反映出蛋白质的主链构象^[21],因此本实验又进行了猪皮胶原蛋白的圆二色谱(Circular Dichroism, CD)分析,以进一步确定其三螺旋结构的完整性,试验结果如图 8 所示。

胶原蛋白肽链骨架中的肽键及少量芳香氨基酸残基均具有旋光活性,当平面圆偏振光透过以上光活性基团时,不同手性的两种构型对平面偏振光所分解成的左旋和右旋圆偏振光吸收不同,从而产生吸收差。

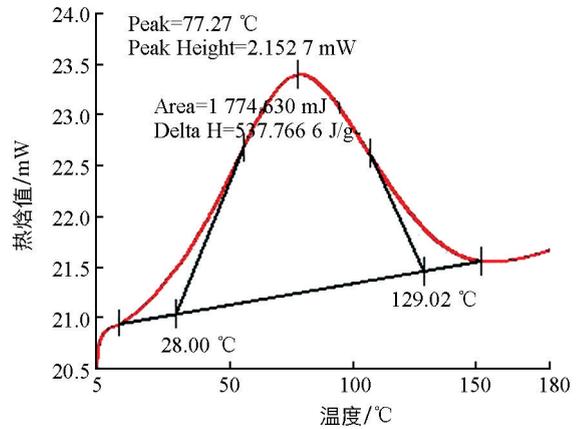


图 6 猪皮胶原蛋白的 DSC 图谱

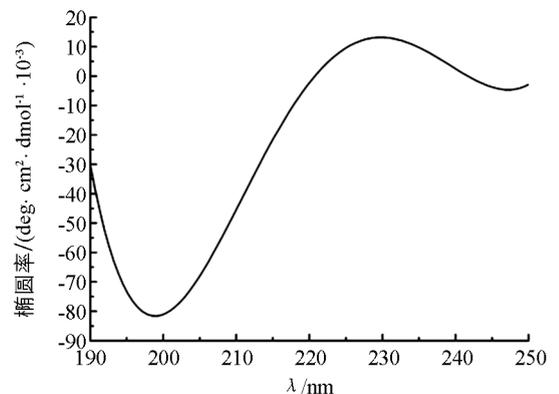


图 8 猪皮胶原蛋白的圆二色谱图谱

吸收差的存在产生了偏振光矢量的振幅差,圆偏振光变为椭圆偏振光,这就是圆二色性^[20]。图8显示,胶原蛋白的圆二吸收不同于一般蛋白质,其在200 nm附近存在负吸收峰,220 nm处存在正吸收峰,是典型聚(L-脯氨酸)Ⅱ型螺旋结构的圆二吸收特征,而胶原三螺旋结构与聚(L-脯氨酸)Ⅱ型螺旋结构的圆二吸收特征相同^[21-22];此外,正、负峰的吸收强度分别为11.935 5, -83.043 1 deg·cm²·dmol⁻¹·10⁻³,与Li^[11],钟韩辉^[20]等报道的较为接近,因此本试验优化条件下提取的胶原蛋白具有完整的三螺旋结构。

2.5.4 胶原蛋白的亚基组成

采用SDS-PAGE电泳检测优化工艺下提取的胶原蛋白的亚基组成,结果如图9所示。

从图9看出,本试验优化工艺下提取的胶原蛋白具有明显的 α 、 β 和 γ 组分,在相对分子质量120 kDa附近的两个条带分别为 α_1 和 α_2 链;200 kDa附近的条带为 β 链(α 链的二聚体);200 kDa以上的为 γ 链(α 链的三聚体)^[10,16]。在 α_2 链以下未发现其他电泳条带,说明在此提取过程中,胶原蛋白的基本结构得以保存,没有生成小分子水解胶原及多肽^[10]。

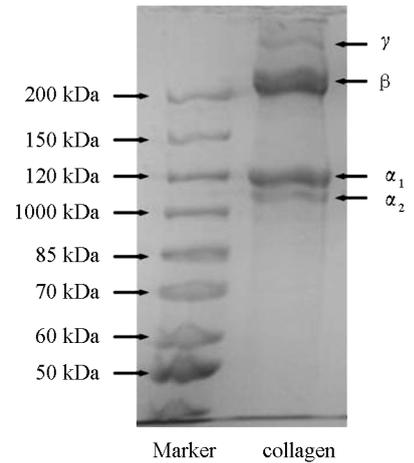


图9 猪皮胶原蛋白的SDS电泳图谱

3 结论

1) 通过单因素和正交试验得到,胃蛋白酶法制备猪皮胶原蛋白的最优工艺组合为酶解液pH 2.2,酶解时间18 h,酶用量1%,在此条件下,胶原蛋白提取率可达84.35%±0.33%;纯化冻干后的胶原蛋白样品呈白色海绵状,其纯度为82.5%±1.6%。

2) DSC, FTIR, CD和SDS-PAGE电泳的检测结果显示,最优工艺提取的胶原蛋白样品具有较高的热稳定性, T_m 为77.27℃,符合标准胶原蛋白的红外、圆二色谱吸收特征,其由 α 、 β 和 γ 3种亚基组分组成,且没有生成小分子水解胶原及多肽,说明胃蛋白酶主要与猪皮胶原非螺旋区特定位点结合,不仅利于胶原蛋白的充分提取,同时较好地保存了胶原天然三螺旋结构的完整性。

参考文献:

- [1] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 3-45.
- [2] 施辉阳. 酶法提取生猪皮胶原的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2004.
- [3] 陈丽清. 超高压技术制备高品质明胶及其机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [4] 李兴武. 猪皮胶原蛋白的提取及琥珀酰化改性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [5] 李彦春, 靳立强. 酶法提取牛皮胶原蛋白的研究[J]. 中国皮革, 2002, 31(23): 6-9.
- [6] 胡胜, 李志强. 皮胶原蛋白的酶法提取及在高附加值领域的应用[J]. 皮革科学与工程: 自然科学版, 2002, 12(5): 38-43.
- [7] 胡二坤, 郭兴凤, 谭凤艳, 等. 猪皮中胶原蛋白的提取[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2006, 27(1): 50-53.
- [8] 陈丽清, 陈清, 韩佳冬, 等. 猪皮超声波乳化脱脂工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 265-267.
- [9] 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.
- [10] 刘苏锐, 王坤余, 琚海燕. 猪皮I型胶原蛋白的提取及其结构表征[J]. 中国皮革, 2007, 36(7): 43-46.
- [11] LI D, MU C, CAI S, et al. Ultrasonic Irradiation in the Enzymatic Extraction of Collagen[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(5): 605-609.
- [12] 陈丽清, 张宇昊, 周梦柔, 等. 猪皮明胶提取过程中的超高压预处理工艺优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(19): 262-269.
- [13] 林海, 但卫华, 曾睿, 等. 胃蛋白酶提取猪皮胶原蛋白的工艺优化与过程模拟[J]. 中国皮革, 2006, 35(5): 19-26.
- [14] MU C, LI D, LIN W, et al. Temperature Induced Denaturation of Collagen in Acidic Solution[J]. Biopolymers, 2007, 86(4): 282-287.
- [15] 刘小玲. 鸡骨明胶的制备、结构及功能性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.

- [16] 周玉惠, 叶正涛, 肖立芳, 等. 猪皮胶原蛋白的提取及其结构表征 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2008, 30(3): 287—289.
- [17] MUYONGA J, COLE C, DUODU K. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Acid Soluble Collagen and Gelatin from Skins and Bones of Young and Adult Nile Perch (*Lates Niloticus*) [J]. *Food Chemistry*, 2004, 86(3): 325—332.
- [18] 荆煦瑛, 陈式隶. 红外光谱使用指南 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992.
- [19] ARNESEN J A, GILDBERG A. Preparation and Characterisation of Gelatine from the Skin of Harp Seal (*Phoca Groenlandica*) [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82(2): 191—194.
- [20] 钟朝辉, 李春美, 顾海峰, 等. 温度对鱼鳞胶原蛋白二级结构的影响 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(10): 1970—1976.
- [21] 张忠楷. 胶原、明胶和胶原水解物的物理化学性能及护肤功能的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [22] FENG Y, MELACINI G, TAULANE J P, et al. Acetyl-Terminated and Template-Assembled Collagen-Based Polypeptides Composed of Gly-Pro-Hyp Sequences. 2. Synthesis and Conformational Analysis by Circular Dichroism, Ultraviolet Absorbance, and Optical Rotation [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(43): 10351—10358.

Optimization of Enzymolysis Conditions for Pigskin Collagen and Identification of Its Structure

YU Wei¹, WANG Xue-meng¹, MA Liang^{1,2},
ZHOU Meng-rou¹, ZHANG Yu-hao^{1,2}

1. School of Food Science, National Food Science and Engineering Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products on Storage and Preservation (Chongqing), Ministry of Agriculture, Chongqing 400716, China

Abstract: Collagen in porcine skin was extracted with pepsin. With collagen extraction rate as the evaluation indicator, 3 factors (enzyme solution pH, enzymolysis time and dosage of pepsin) of the extraction technology were optimized. The best processing combination was enzyme solution pH 2.2 + enzymolysis time 18 h + enzyme dosage 1%. Under such conditions, a collagen extraction rate of $84.35\% \pm 0.33\%$ was achieved, with a collagen purity of $82.5\% \pm 1.6\%$. The collagen thus obtained was shown to compose mainly of α , β and γ subunits and to have fairly high thermal stability. Infrared spectroscopy and circular dichroism determination showed that it had the typical absorption characteristics of natural collagen, and that its natural triple helix structure remained intact.

Key words: pig skin; collagen; enzymatic method; structure identification

责任编辑 周仁惠

