

几种酶法从猪皮中提取胶原蛋白的对比研究

王川¹, 李燕², 马志英^{1,*}, 蓝蔚青²

(1. 上海市食品研究所, 上海 200235; 2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要:研究了用胰酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶从猪皮中提取胶原蛋白。研究发现, 猪皮的蛋白质含量约为24.59%, 羟脯氨酸含量为2.3%。猪皮经酶解处理后, 即得到胶原蛋白粗提取液, 粗提液再经过透析、浓缩, 最后进行冷冻干燥, 可得到纯度较高的胶原蛋白制品。研究结果显示: 三种酶处理猪皮, 其中以胰酶提取物得率最高, 但结构破坏较严重, 用胃蛋白酶提取的胶原蛋白制品的结构最完整, 色泽最为洁白, 但得率最低。

关键词: 胶原蛋白; 酶解; 羟脯氨酸; 提取

Comparison Study on Extraction of Collagen from Porcine Skin by Different Enzymes

WANG Chuan¹, LI Yan², MA Zhi-ying^{1,*}, LAN Wei-qing²

(1. Shanghai Food Research Institute, Shanghai 200235, China;

2. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: This paper has studied the extraction of collagen from porcine skin by trypsin, papain and pepsin. There have been found to contain 24.59% protein, and 2.3% hydroxyproline, respectively of porcine skin. Collagen from porcine skin was extracted by three kinds of enzymes. After extraction it was purified further by dialyzing, condensing and lyophilizing. The results showed: Among the collagens extracted by three kinds of enzymes, the extraction rate of trypsin is the highest, but the structure of collagen is severely destroyed, while the structure of collagen by papain is the best, and also the whiteness was the highest among the collagens extracted, but the extraction rate is the lowest.

Key words: collagen; enzymatic hydrolysis; hydroxyproline; extraction

中图分类号: O814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0201-04

胶原蛋白是构成动物支持组织的结构蛋白质, 能有效地增加皮肤组织细胞的储水功能^[1], 增加肌肤弹性, 保持皮肤柔软、细嫩, 也能使人体内的血管和神经保持韧性和弹性, 头发光亮, 对人体抗衰老及美容具有特殊功效^[2]。

从动物组织中提取胶原蛋白, 常用的方法有: 碱法、酸法、酶法和热处理等^[3-6]。利用酶法提取胶原蛋白, 具有较高的回收率, 水解反应速度快, 时间短, 无环境污染等优点。酶法提取的水解胶原蛋白纯度高, 水溶性好, 理化性质稳定。

目前国际上已开发出许多胶原保健品和功能性胶原生物材料。其在胶原蛋白的基础研究上具有一些优势, 拥有一定的国际专利, 并形成部分的市场规模。目前我国的高质量胶原蛋白基础研究还有差距, 有关这方面的核心专利技术不多。就目前的消费趋势来看, 我国胶原蛋白的需求量逐渐增加, 因此市场前景较为广阔。另一方面在肉制品加工过程中含有丰富胶原物质的副产

物(皮、内脏、肉骨头)利用的附加值很低, 既浪费资源又污染环境。利用这些废弃物生产胶原蛋白, 可以实现资源的合理和有价值的利用, 实现经济和社会效益的双赢。

本文分别用胰酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶对猪皮进行胶原蛋白的提取, 并对酶解提取物进行分子量、特性粘度、羟脯氨酸含量测定, 对比其结果, 对酶法提取胶原蛋白进行对比研究, 为进一步对不同用途和性能的胶原蛋白研究提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 原料

选用经检疫合格的生猪, 屠宰后生剥皮。初步处理后, -18℃冻藏备用, 实验时4℃解冻。

1.2 仪器

分光光度计(Unico UV-2000); Christ冻干机(Alph A1-2); Beckman高速离心机(LG10-2.4A); 凯

收稿日期: 2006-09-02

*通讯作者

基金项目: 上海市科委科研项目(03JG05001)

作者简介: 王川(1981-), 男, 学士, 研究方向为功能食品 and 食品生化技术。

氏自动定氮仪(KTJELTEC, Auto1030Analyzer); PHS-3精密数显酸度计;垂直平板电泳仪(DYY-北京六一)。

1.3 试剂

胃蛋白酶 苏州东吴医用生化制药厂;胰酶 苏州东吴医用生化制药厂;木瓜蛋白酶 国药集团化学试剂有限公司;异丙醇(分析纯);正丙醇(分析纯);其它试剂均为分析纯。

1.3 猪皮组分的测定

水分:直接干燥法,采用GB 5009.3-85^[7];粗蛋白:凯氏定氮法^[8];脂质:索氏抽提法,采用GB 5009.6-85^[9];灰分:高温灼烧法,采用GB 5009.4-85^[10]。

1.4 提取过程

碎猪皮 去脂 去杂蛋白 酶提 灭酶 透析、浓缩 冷冻干燥 粗成品

1.5 胶原蛋白的提取

称取去脂、去杂蛋白后的猪皮15g左右,加入去离子水匀浆,加入蛋白酶搅拌均匀,蛋白酶分别选取胰酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶进行酶解,酶解后灭酶,离心后,测上清液体积,上清液一部分作冻干处理,其余的留存备用。酶解条件如表1所示。

表1 三种酶的酶解条件

Table 1 The hydrolyzation condition of three kinds of enzymes

实验号	酶	酶解时间(h)	酶解温度(°C)	酶解pH
1	木瓜蛋白酶	5~6	50	中性
2	胰酶	5~6	50	pH8~9
3	胃蛋白酶	5~6	37	pH2
4	木瓜蛋白酶	12	常温	中性
5	胰酶	12	常温	pH8~9
6	胃蛋白酶	12	常温	pH2

1.6 羟脯氨酸测定

1.6.1 羟脯氨酸标准曲线

称取50mg羟脯氨酸,用少量水溶解于1000ml容量瓶中滴加一滴3mol/L硫酸,定容至刻度(标准储备液:500μg/ml,现配现用)。移取5ml标准储备液于500ml容量瓶中,用水稀释定容。然后移取10、20、30、40ml上述溶液于100ml容量瓶中,定容至刻度,此标准溶液的羟脯氨酸浓度分别是0.5、1、1.5和2μg/ml。其余各步按ISO 3496:1994(E)羟脯氨酸测定法^[11]操作。空白溶液用蒸馏水代替。

1.6.2 酶法提取胶原蛋白的测定

从离心后的上清液中各吸取5.0ml于锥形瓶中,分别加入5.0ml、3mol/L的H₂SO₄用保鲜膜封口,盖上烧杯,放入105℃烘箱中水解16h,将水解液转移至100ml容量瓶定容至刻度;吸取5.0ml母液定容至100ml(稀释液1);再吸取10.0ml稀释液1定容至100ml(稀释液2),其

余各步按ISO 3496:1994(E)羟脯氨酸测定法操作。

1.6.3 回收率测定

分别称取4g新鲜猪皮,各加入40和120mg标准羟脯氨酸,按上述1.6.2步骤进行实验,测定羟脯氨酸含量,计算回收率。每一样品做3次平行实验。

1.7 特性粘度的测定

采用乌式粘度法测定,温度为25±0.05℃,分别称取冻干后的三种胶原蛋白粉末0.5g,溶于水,定容至100ml。测定其1、2/3、1/2浓度时的流出时间,以溶剂水为对照。计算公式^[12]为:增比粘度 $\eta_{sp}/C = t/t_0 - 1$,比浓粘度 η_{sp}/C 外推到浓度为零时的比浓粘度,为特性粘度,即 $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp}/C$ 。式中,t为样品流出时间;t₀为溶剂流出时间;C为样品浓度。

1.8 电泳实验

采用SDS-PAGE电泳法^[13]。分离胶浓度为15%,浓缩胶浓度为3%,电极缓冲液为0.05mol/L Tris-Gly,0.1% SDS,pH8.3。电泳条件:初始电流为15mA,待样品进入分离胶后调整至23mA,直至溴酚蓝染料距凝胶前沿1.5cm时停止电泳,并采用考马斯亮蓝R250染色2h,再脱色至蛋白质区带清晰,计算相对迁移率。采用的标准蛋白为:兔磷酸化酶B(97400);牛血清白蛋白(66200);兔肌动蛋白(43000);牛碳酸酐酶(31000);胰蛋白酶抑制剂(20100);鸡蛋清溶菌酶(14400)。

2 结果与分析

2.1 猪皮的一般组成成分

经测定,猪皮的一般组成成分如表2所示。

表2 猪皮的一般组成成分

Table 2 The composition of fresh porcine skin

水分(%)	灰分(%)	脂肪(%)	蛋白质(%)	总糖(%)
41.64	0.54	29.52	24.59	4.41

经测定,实验用猪皮的一般组成成分如表2所示。李开雄等^[14]测定结果表明,猪皮的蛋白质含量可高达33%,其中胶原蛋白含量为87.8%。因此,将猪皮加工成胶原蛋白应用于生产前景广阔。

2.2 羟脯氨酸标准曲线

绘出羟脯氨酸含量标准曲线,如图1。其线性回归方程为:y=0.2344x,相关系数R²=0.9999,这说明所确立的回归方程是有意义的。

2.3 回收率实验

由表3可知,实验建立的羟脯氨酸含量测定方法,回收率为84.20%~89.10%,平均回收率为85.80%,结果证明了实验的可行性。

2.4 胶原蛋白的提取

在本实验条件下,三种酶的酶提条件不同,酶解

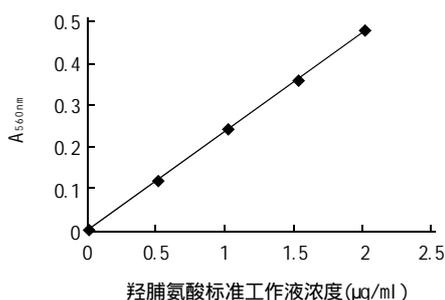


图1 羟脯氨酸的标准曲线

Fig.1 Standard curve of hydroxyproline

表3 猪皮胶原蛋白回收率

Table 3 The recovery of collagen extracted from porcine skin

实验序号	样品质量 (g)	检出量 (10 ⁻³ g)	添加量 (10 ⁻³ g)	样品中含量 (10 ⁻³ g)	回收率 (%)
1	4.019	128.3	39.90	92.73	89.10
2	4.017	127.2	40.30	92.68	85.70
3	4.115	131.5	42.60	94.95	85.80
4	4.095	197.9	120.5	94.47	85.90
5	4.014	194.2	120.6	92.61	84.20
6	3.689	186.7	119.4	85.12	85.10

效果也不一样。匀浆后的猪皮在 pH 2 的缓冲液中呈胶状，灭酶后变成清液。灭酶后需要分离出上清液，采用冷冻离心。离心后，胰酶作用比较完全，残渣较少，且在 4℃ 不凝冻。木瓜蛋白酶和胃蛋白酶则会产生凝冻现象，加热溶解后(30℃ 左右，防止变性)测其上清液体积。上清液的颜色：胃蛋白酶是白色；胰酶和木瓜蛋白酶则偏黄。就可操作性上说，胰酶是三种酶中最方便的。

表4 三种酶提取胶原蛋白的得率

Table 4 The yield ratio of collagen by three kinds of enzymes

种类	猪皮(去脂)质量(g)	提出羟脯氨酸总量(mg)	得率(%)
木瓜蛋白酶	15.7728	198.29	38.3
胰酶	15.1433	278.06	55.9
胃蛋白酶	15.2272	181.19	36.2

三种酶的提取效果有一定差距，胰酶的提取率最高，木瓜蛋白酶与胃蛋白酶较接近(如表4所示)。总的来说，三种酶的酶提效果比预期中的要低许多。

2.5 特性粘度的测定

根据有关文献，三股螺旋结构的胶原蛋白在常温下(即低于其变性温度)时的特性粘度为：12.7^[15]、13.7^[16]、

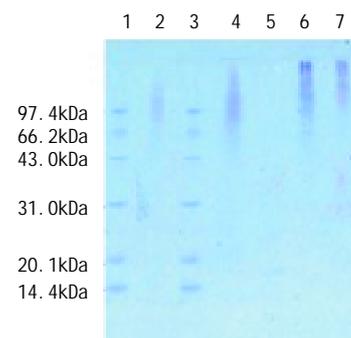
表5 三种酶提取胶原蛋白样品的特性粘度

Table 5 The intrinsic viscosity of collagen extracted by three kinds of enzymes

种类	胶原蛋白溶液浓度(g/ml)	截距 D	特性粘度[η](dl/g)
胰酶	0.005018	0.0445	0.0887
木瓜蛋白酶	0.005255	0.1212	0.2306
胃蛋白酶	0.004451	0.8737	1.9629

12.8dl/g^[17]。同时，无规线形团链分子的特征粘度范围为 0.1~1.5dl/g，压缩的球状粒子的特性粘度范围为 0.05~0.2dl/g。本实验用三种酶提取的胶原制品的特性粘度(如表5所示)分别属于无规线形团链分子——胃蛋白酶，1.9626dl/g；木瓜蛋白酶，0.2306dl/g 和压缩的球状粒子——胰酶，0.0887dl/L，说明提取的胶原蛋白并未保持它原有的三股螺旋结构。

2.6 电泳实验



1、3. 标准分子量蛋白;2. 胃蛋白酶提取的胶原蛋白;4. 木瓜蛋白酶提取的胶原蛋白;5. 胰酶提取的胶原蛋白。

图2 猪皮胶原蛋白电泳结果图谱

Fig.2 SDS-PAGE pattern of collagen extracted from porcine skin

分别进行了胰酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶法提取物电泳实验，分别与标准蛋白对照，结果如图2所示。

胶原蛋白是由三股螺旋组成的，分子量在 30 万 Da 左右，每条亚链的分子量大约为 10 万 Da 左右为 1、2 链^[18]。根据电泳结果，胃蛋白酶和木瓜蛋白酶提出的胶原蛋白样品在该分子量范围内均有谱带显示，且胃蛋白酶提出的胶原蛋白结构相对保持更好，其亚链 1、2 链保持很好的结构，与 Takeshi Nagai 的研究^[19]结果一致。一般来说，胃蛋白酶作用于胶原蛋白的非螺旋端肽，而不直接酶切胶原蛋白，促使胶原蛋白溶解，这可能与胶原蛋白的三螺旋结构有关。胰酶作用下的胶原蛋白样品分子量在 1~7 万 Da 间，说明胰酶的水解力太强，已经把胶原蛋白水解为小分子片段。

为了制成令人满意的胶原蛋白成品，我们从两个方面对酶解方法进行考察和评价——得率和结构。从得率上说，采取测酶解后胶原蛋白溶液中羟脯氨酸含量与猪皮中本身含有的羟脯氨酸相比法计算出得率。实验证明，胰酶提取的胶原蛋白含量是最高的，木瓜蛋白酶与胃蛋白酶相差无几；另一方面，从结构上说，采用测粘度和电泳的方法加以确定。实验结果显示，胃蛋白酶提取的胶原蛋白相对于其他两种提取物结构保持的最为完整。

3 讨论

比较胰酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶对猪皮胶原蛋白的提取效果,胰酶得率最高,可操作性强,但结构破坏较严重,胶原蛋白已水解为小分子物质,冻干后的胶原蛋白样品色泽偏黄。胃蛋白酶的结构保持了最大的完整性,分子量在 10 万 Da 左右,冻干后的样品色泽洁白,但得率却是三种酶中最低的。木瓜蛋白酶的得率和结构都介于两者之间,由于是用水作溶剂,故也是条件最为温和的一种。

参考文献:

- [1] ELSNER P, BERARDESCA E, MAIBACH H. Bioengineering of skin: water and the stratum corneum[M]. CRC Press LLC, Boca Raton, 1994.
- [2] 赵胜年. 酶解鲜猪皮提取水解胶原蛋白的研究[J]. 食品工业科技, 1998(5): 16-17.
- [3] 王伟, 孙家玲, 刘俊龙, 等. 可溶性胶原的制作与临床应用[J]. 生物医学工程学报, 1998, 5(4): 224-227.
- [4] 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, 1997(7): 36-40.
- [5] 侯国泉, 王璋. 酶法从猪皮制备食用明胶工艺的研究[J]. 无锡轻工业学院学报, 1992, 11(1): 10-19.
- [6] 徐润, 梁庆华. 明胶的生产及应用技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 27-83.
- [7] GB5009. 3-85 食品中水分的测定方法[S]. 1985: 17.
- [8] GB5009. 4-85 食品中灰分的测定方法[S]. 1985: 20.
- [9] GB5009. 5-85 食品中蛋白质的测定方法[S]. 1985: 21.
- [10] GB5009. 6-85 食品中脂肪的测定方法[S]. 1985: 23.
- [11] ISO3496 (E). Meat and meat products-determination of (L-)-hydroxyproline content[S]. 1994.
- [12] 金日光, 华幼卿. 高分子物理: 第二版[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 91.
- [13] 李建武, 等. 生物化学实验原理及方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 216-223.
- [14] 李开雄, 赵志远, 刘霞, 等. 猪皮中胶原蛋白的提取及其应用[J]. 肉类研究, 1996, (4): 43-46, 48.
- [15] ROSE C, MANDAL A B. The interaction of sodium dodecyl sulfate and urea with cat-fish collagen solutions in acetate buffer: Hydrodynamic and thermodynamic studies[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1996, 18: 41-53.
- [16] OGAWA M, PORTIER R J, MOODY M W. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 88: 495-501.
- [17] CIARLO A S, PAREDI M E. Isolation of soluble collagen from hake skin (*Merluccius hubbsi*) [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 1997(6): 65-77.
- [18] WONG D W S. Mechanism and theory in food chemistry[M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.
- [19] NAGAI T, SUZUKI N. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, *Linnaeus*) outer skin [J]. Food Chemistry, 2002, 76: 149-153.



纳米反渗透膜在美研制成功

美国加州大学亨利萨缪里工程和应用科学学院近日宣布,成功开发出一种含有纳米复合材料的新型反渗透膜,它能用于海水淡化和废水回收,并有望降低成本。

通常的商业化反渗透膜由致密的高分子薄膜构成,反渗透减少水中盐分的方法是利用高压迫使含盐或污染物的水溶液流向半透膜,膜上的小孔让水分子穿过,留下盐分和杂质,达到海水淡化或污水净化的目的。

该大学土木和环境工厂助理教授埃里克·胡克领导的研究小组,开发的新型反渗透膜采用了独特的、交叉连接的高分子矩阵网和经过工程处理的纳米复合粒子,纳米粒子分散在高分子膜上,形成的分子通道为纳米级微细结构,它不仅能阻挡住杂质让水分子轻易通过,而且还有吸引水分子同时排斥绝大多数污染物的能力。胡克表示,含有纳米复合粒子的新型反渗透膜具有类似海绵的亲水作用,还可以抵制有机物和细菌,不让它们堵塞膜孔。事实上,普通反渗透膜存在的最大问题是膜孔容易遭到堵塞。

同普通的反渗透膜相比,新型反渗透膜允许水溶液的水在相对低的压力下通过,从而节约了能耗。同时,因它能排斥杂质不让其吸附在膜表面,因此被堵塞的速度要比普通膜慢得多。总体来讲,新型反渗透膜具有与普通反渗透膜相同的净水作用,但更节能和更耐用,因而有望大幅度节约开支。初步测试表明,新型反渗透膜具有两倍于普通膜的净水产量(或者说少用 50% 的能源),可将净水的总价格降低 25%。

研究人员目前正在同纳米水公司合作,以便将新的纳米复合材料反渗透膜开发成新一类用于海水淡化和废水回收的低耗能、防堵塞反渗透膜,同时期望新膜能够在未来 1 年至 2 年内实现商品化。