

微波辅助提取猪皮胶原蛋白工艺优化

李兴武, 李洪军 *

(西南大学食品科学学院, 重庆 400716)

摘要: 为了保持胶原蛋白的生物活性、提高得率, 采用微波技术提取猪皮胶原蛋白。通过单因素试验研究微波处理温度、微波处理时间、固液比、提取时间 4 个因素对胶原蛋白提取率的影响, 确定微波辅助提取胶原蛋白的最佳工艺条件。结果表明: 微波时间 2min、微波温度 25℃、固液比 1:30(g/mL)、提取时间 35h 条件下, 猪皮胶原蛋白的提取率为 76.72%。

关键词: 微波处理; 猪皮; 胶原蛋白

Optimization of Microwave-assisted Extraction Process for Collagen from Pigskin

LI Xing-wu, LI Hong-jun*

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: In order to maintain the bioactivity and improve the extraction rate of collagen, microwave technique was used to extract collagen from pigskin. Using one-factor-at-a-time combined with orthogonal array design method, the extraction rate of collagen was investigated with respect to temperature, microwave treatment time, material/liquid ratio and extraction time. The optimal extraction conditions were obtained as follows: microwave treatment time 2 min, temperature 25 °C, material/liquid ratio 1:30 (g/mL), and extraction time 35 h. Under these conditions, the extraction rate of collagen from pigskin was up to 76.72%.

Key words: microwave treatment; pigskin; collagen

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)06-0011-04

胶原蛋白是一种细胞外基质, 属于结构蛋白质, 约占哺乳动物蛋白质总质量的 30%, 是构成皮肤、韧带、软骨、肌腱等结缔组织或器官的主要成分。胶原具有独特的理化性质、优良的生物相容性、可降解性、低免疫原性以及止血功能等性能^[1-2]。

目前, 提取胶原蛋白的传统方法主要有酸碱法提取、中性盐提取、酶法提取等^[3]。传统的提取方法虽然有些已经很成熟, 但是提取率低, 且提取时间较长, 易造成胶原蛋白的水解、结构的破坏和生物活性的降低^[4]。据报道, 微波提取技术在蛋白质提取中已有诸多应用, 利用微波处理缩短提取时间, 提高蛋白质得率的优越性已在许多研究结果中得到支持^[5-6], 但关于微波处理在猪皮胶原蛋白提取中的应用研究却罕见报道。

本实验选取新鲜猪皮为原料, 采用微波处理方法提取胶原蛋白, 分别考察微波处理温度、微波处理时间、固液比和提取时间 4 个因素对胶原蛋白提取率的影响, 并采用正交试验对最佳工艺条件进行优化。拟在缩短提

取时间、降低能耗、保存胶原蛋白活性的同时, 提高胶原蛋白的提取率, 为该资源的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪皮为荣昌成猪背皮; 透析袋(14000kD); 试剂(均为分析纯) 国药集团。

1.2 仪器与设备

4K-15 型冷冻离心机 德国 Sigma 公司; MAS- II 微波快速制样系统 上海新仪公司; UV-2450 紫外分光光度计 日本岛津公司; Spectrun100 红外光谱仪 美国 Perkin Elmer 公司; BA400 显微影像系统 中国 Motic 公司。

1.3 方法

1.3.1 提取工艺

工艺流程: 猪皮→剔脂→洗涤→切碎→脱脂→除杂蛋白→微波处理→加酶→灭酶→盐析→透析→冷冻干燥→猪皮胶原蛋白。

收稿日期: 2010-12-30

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200903012)

作者简介: 李兴武(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: lixing_555@163.com

* 通信作者: 李洪军(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为肉类科学与酶工程技术。

E-mail: hongjunli1961@yahoo.com.cn

操作要点：取新鲜的猪皮用自来水洗去表面的污迹，剔去皮下脂肪，切成 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 的小块，放入三氯甲烷-无水乙醇(2:1, V/V)溶液脱去脂肪，再将其放入 1mol/L 的 NaCl 溶液中除去盐溶性杂蛋白，经过微波处理后放入 pH 在 $6.0 \sim 7.0$ 之间的 Tis-HCl 缓冲液中加入木瓜蛋白酶提取，提取液再经过 3 次反复的盐析，离心，透析，最后冷冻干燥得到猪皮胶原蛋白。

试验设计：分别考察微波处理温度、微波处理时间、固液比和提取时间 4 个因素对胶原蛋白提取率的影响，并采用正交试验对最佳工艺条件进行优化。

1.3.2 猪皮胶原蛋白含量的测定

羟脯氨酸大部分存在于胶原蛋白中，其在胶原蛋白中的含量为胶原蛋白氨基酸总质量的 10% 。因而可通过测定猪皮中羟脯氨酸的含量来确定胶原蛋白的质量。羟脯氨酸的质量乘以换算系数 10 可以得到胶原蛋白的质量^[7]。羟脯氨酸质量测定参考肉与肉制品中羟脯氨酸含量测定^[8]。

1.3.3 微波处理后猪皮胶原纤维石蜡切片的显微镜观察

分别取未经微波处理和微波处理(微波温度 10°C , 3min)后的皮块($1\text{cm} \times 1\text{cm}$)，用 $10\%(m/m)$ 甲醛溶液固定，经过常规脱水、浸蜡、包埋、切片($10\mu\text{m}$)，参照 Van Gieson 染色法^[9]染色，然后放在光学显微镜下观察猪皮胶原纤维的分散情况。

1.3.4 提取率的计算

$$\text{提取率}/\% = \frac{G}{G_0} \times 100$$

式中： G 为冷冻干燥后胶原蛋白质量/g； G_0 为猪皮胶原蛋白质量/g。

1.3.5 胶原蛋白的紫外分光吸收测定

胶原肽链结构中含有 $\text{C}=\text{O}$ 、 COOH 和 CONH_2 都是生色基团，可以产生吸收^[10]。参考项智锋等^[11]的方法略有改进，取一定量的胶原蛋白，配制成质量浓度 1mg/mL 的胶原蛋白溶液(溶剂为 0.5mol/L 的醋酸)，分别加入到 1cm 的石英比色皿中进行紫外分光光度测定，另取 0.5mol/L 的醋酸溶液作对照试验。试验采用紫外分光光度计在 $200 \sim 400\text{nm}$ 处进行检测。

1.3.6 胶原蛋白的傅里叶变换红外图谱

FTIR 可以表征胶原蛋白的三股螺旋结构^[12]。参考周文常等^[13]的方法，在 25°C 条件下，将少量胶原蛋白样品放入研钵中，然后加入适量 KBr 一起研磨，再利用压片机压成薄片。利用红外光谱对胶原蛋白 KBr 压片进行扫描，扫描范围为 $450 \sim 4000\text{cm}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 猪皮石蜡切片的显微形态观察

猪皮石蜡切片经过染色后，胶原纤维呈品红色。然后利用光学显微镜观察微波处理前后猪皮胶原纤维的分散情况。图 1、2 表明：猪皮微波处理后胶原纤维走向更加清晰，部分胶原纤维缩短变粗，且胶原纤维被分散开，表明微波对胶原纤维有较强的分散作用。胶原纤维越分散就越有利于和酶的结合，提高胶原的溶出率，从而提高产量。

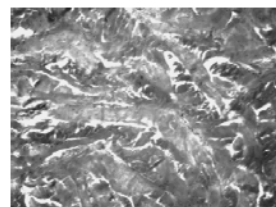


图 1 未经微波处理的猪皮胶原纤维的显微形态特征($\times 100$)
Fig.1 Micromorphological characteristics of pigskin collagen fibers before microwave treatment ($\times 100$)

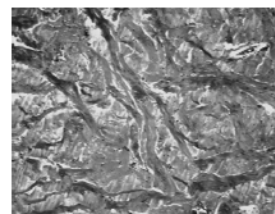


图 2 微波处理的猪皮胶原纤维的显微形态特征
(10°C 、 3min ， $\times 100$)

Fig.2 Micromorphological characteristics of pigskin collagen fibers after microwave treatment at 10°C for 3min ($\times 100$)

2.2 微波提取的单因素试验

称取一定量的猪皮，分别研究微波温度、微波时间、固液比和提取时间对猪皮胶原蛋白提取率的影响。

2.2.1 微波温度对胶原提取率的影响

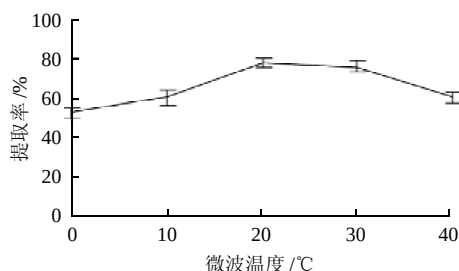


图 3 微波处理温度对胶原蛋白提取率的影响
Fig.3 Effect of temperature on extraction rate of collagen

选取新鲜的猪皮，分别在 0 、 10 、 20 、 30 、 40°C 条件下微波辐照 3min ，固液比 $1:30$ ，提取 24h ，测得胶原蛋白提取率。

由图 3 可知，当温度较低时提取率随微波温度的升高而增加；当微波温度在 25°C 时提取率最高；此后提取率将随温度的升高而开始下降。出现这种现象的原因可能是温度过高导致胶原纤维变性，有的甚至断裂，从

而产生了更多小的肽链,使得提取率降低。

2.2.2 微波时间对胶原蛋白提取率的影响

选取猪皮分别在 10℃、固液比 1:30 条件下,微波辐照 1~5min,提取 24h,测得胶原蛋白的提取率。

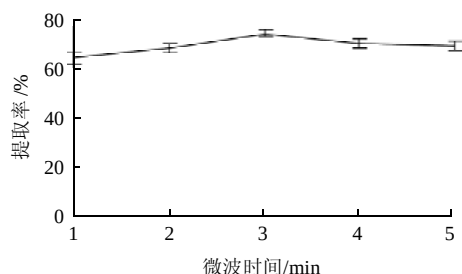


图4 微波处理时间对胶原蛋白提取率的影响

Fig.4 Effect of microwave treatment time on extraction rate of collagen

由图4可知,胶原蛋白的提取率随微波处理时间的延长而逐渐升高,在1~4min之间提取率增加,4min以后提取率有所下降。微波处理的时间越长,固液中的组织细胞破碎的程度越大,胶原纤维成分溶出得越多。当微波处理时间超过4min时,由于微波能量的积累导致温度过高,加快胶原纤维成分的溶出,同时也使部分胶原蛋白变性而降解,再综合考虑微波处理时间延长会增大能耗。因此,微波时间选取3min较合适。

2.2.3 固液比对提取率的影响

选取猪皮分别在固液比 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g/mL)条件下,微波温度 10℃,辐照 3min,提取 24h,测得胶原蛋白的提取率。

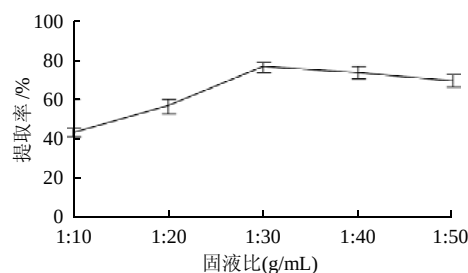


图5 固液比对胶原蛋白提取率的影响

Fig.5 Effect of material/liquid ratio on extraction rate of collagen

由图5可知,当固液比值较高时,胶原蛋白的提取率随着固液比的减小而增大,在1:30出现最大值,此后提取率随比值继续减小呈现下降的趋势。在固液比值较小时,可能液体量较多,猪皮受微波辐射机率减小,因此提取率下降;而当固液比值过大时,溶剂的量低,使胶原纤维的溶出量低,导致胶原蛋白提取率不高。因此,选择固液比 1:30 最适宜。

2.2.4 提取时间对胶原蛋白提取率的影响

选取猪皮分别在 10℃、固液比 1:30 条件下微波辐照

3min,提取 12、24、36、48、60h,测得胶原蛋白的提取率。

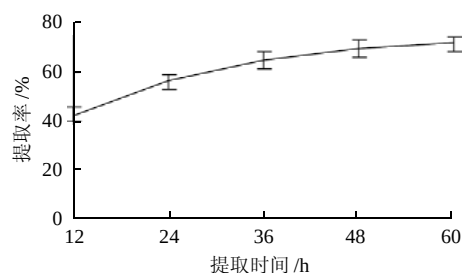


图6 提取时间对胶原蛋白提取率的影响

Fig.6 Effect of extraction time on extraction rate of collagen

由图6可知,随着提取时间的延长,胶原蛋白提取率均有不同程度的增加,说明时间的延长,有利于更多胶原蛋白的溶出,12~48h增加得较快,为胶原蛋白高提取率阶段,48~60h增加速度变慢。因此,综合经济效益和生产管理考虑,选择提取时间为36h最适宜。

2.2.5 微波提取胶原蛋白工艺正交试验优化

根据微波辅助提取的单因素试验结果,以提取率为目标参数,分别对微波处理温度、微波处理时间、固液比和提取时间四因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。因素水平设计见表1,结果见表2。同时选取未经微波处理的猪皮,在其他因素和微波处理组相同的条件下做对照试验。

表1 微波提取的原蛋白正交试验因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding real values of the optimization parameters used in orthogonal array design

水平	因素			
	A 微波时间/min	B 微波温度/℃	C 固液比(g/mL)	D 提取时间/h
1	2.0	20	1:20	30
2	2.5	25	1:25	35
3	3.0	30	1:30	40

表2 微波提取胶原蛋白工艺正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal array design and results

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	70.52
2	1	2	2	2	77.43
3	1	3	3	3	75.87
4	2	1	2	3	69.25
5	2	2	3	1	78.59
6	2	3	1	2	74.17
7	3	1	3	2	72.28
8	3	2	1	3	77.52
9	3	3	2	1	70.28
k_1	74.607	70.683	74.070	73.130	
k_2	74.003	77.847	72.320	74.627	
k_3	73.360	73.4405	75.580	74.213	
R	1.893	1.246	3.602	2.231	

由表2可知,4因素对胶原蛋白提取率影响的主次顺序为 $C > D > A > B$,即固液比>提取时间>微波时

间>微波温度。最优水平为 $A_1B_2C_3D_2$, 即微波时间 2min、微波温度 25℃、固液比 1:30、提取时间 35h。在该试验条件下, 通过验证实验得出胶原蛋白的提取率为 76.72%。而未经过微波处理的对照组在固液比 1:30、提取时间 35h 的条件下提取率为 51.24%。相较这两种方法, 前者能较大程度的提高胶原蛋白的提取率。因此, 微波处理应用于猪皮胶原蛋白的提取有良好的应用前景。

2.3 紫外光谱分析

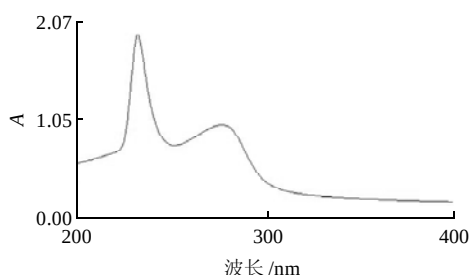


图7 猪皮胶原蛋白紫外扫描图

Fig.7 UV scanning spectrum of collagen from pigskin

由图7可知, 本实验所得胶原蛋白产品紫外吸收光谱在 225nm 波长处有最大吸收峰。胶原蛋白含有酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸, 有报道表明在近紫外光区域只有含苯环共轭双键系统酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸有吸收光的能力, 因此胶原蛋白在近紫外区域应该存在最大吸收^[14]。本研究中经微波处理后提取的胶原蛋白与刘苏锐等^[10]报道猪皮 I 型胶原蛋白的最大吸收峰一致, 符合胶原蛋白的特性。

2.4 红外光谱分析

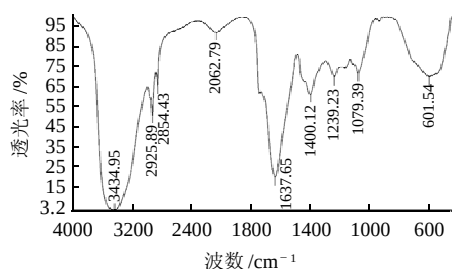


图8 猪皮胶原蛋白红外扫描图

Fig.8 FT-IR spectrum of collagen from pigskin

由图8可知, 本实验所得胶原蛋白产品红外光谱在 3434.95cm^{-1} 附近存在的是酰胺 A 带 N—H 伸缩振动, 是胶原蛋白肽链间氢键^[15]; 在 2925.89cm^{-1} 附近存在的是酰胺 B 带的 C—H 伸缩振动; 在 1637.65cm^{-1} 处出现酰胺 I 带的 C=O 伸缩强振动峰, 即是形成三股螺旋内氢键的 C=O 基团的振动峰; 在 $1079\sim 1400\text{cm}^{-1}$ 处存在 N—H 弯曲振动, 表明了胶原蛋白三股螺旋结构的完整性^[12]。由此可知本实验经微波处理后提取的胶原蛋白样品具有

较完整的三股螺旋结构, 基本保留了天然胶原蛋白的形态, 并说明了微波处理应用于猪皮胶原蛋白提取方法的可行性。

3 结论

3.1 微波处理可以用于猪皮胶原蛋白的提取, 微波温度、微波时间和固液比是影响微波提取胶原蛋白的重要因素, 控制好这些因素, 可以提高猪皮胶原蛋白的提取率。通过单因素试验和正交试验确定微波提取猪皮胶原蛋白的最佳工艺为微波时间 2min、微波温度 25℃、固液比 1:30、提取时间 35h, 此条件下的提取率为 76.72%。

3.2 微波处理后胶原蛋白的提取率与相同条件下未经微波处理的胶原蛋白提取率有较大幅度的提高, 且通过紫外光谱和红外光谱分析, 经微波处理后的胶原蛋白仍保持了完整的三股螺旋的活性结构。因此, 微波处理用于胶原蛋白的提取可以明显减少提取时间, 提高生产效率, 具有良好的经济效益。

参考文献:

- [1] GELSE K, POSCHLB E, AIGNER T. Collagens-structure, function, and biosynthesis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(12): 1531-1546.
- [2] URIARTE-MONTOYA M H, ARIAS-MOSCOSO J L, PLASCENCIA-JATOMEA M, et al. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: extraction, characterization and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 4212-4219.
- [3] 宋晓燕, 高彦祥, 袁芳. 水解胶原蛋白的研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2008(2): 32-34.
- [4] 王川, 李燕, 马志英, 等. 几种酶法从猪皮中提取胶原蛋白的对比研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 201-204.
- [5] 段振华, 孙小冬, 汪菊兰. 微波技术在鱼鳔蛋白提取中的应用[J]. *食品科学*, 2009, 30(16): 149-152.
- [6] 张联英, 曾名勇. 微波技术在水产胶原蛋白提取中的应用[J]. *北京水产*, 2005(6): 40-42.
- [7] 永井裕, 藤本大三郎. 胶原蛋白实验方法[M]. 刘平, 译. 上海: 上海中医学院出版社, 1992: 50-51.
- [8] 全国肉禽蛋制品标准化技术委员会. GB/T 9695.23—2008 肉与肉制品羟脯氨酸含量测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [9] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 138-139.
- [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): 43-45.
- [11] 项智锋, 谢红兵. 不同酶法对猪皮中提取胶原蛋白的紫外线吸收对比分析[J]. *光谱实验室*, 2008, 25(6): 1250-1253.
- [12] PLEPIS A M G, DAS-GUPTA D K, GOISSIS G. Pyroelectric properties of anionic collagen and anionic collagen: P(VDE/TRFE) composites [C]. *International Symposium on Electrets*, 1999: 233-236.
- [13] 周文常, 廖隆理, 等. 猪皮胶原的提取及其结构表征[J]. *中国皮革*, 2004, 33(13): 36-38.
- [14] 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: 52-53.
- [15] DOYLE B B, BENDIT E G, BLOUT E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides[J]. *Biopolymers*, 1975, 14(5): 937-957.