

高压脉冲电场提取猪皮胶原蛋白^{*}

Extracting Collagen from Pigskin by PEF

韦汉昌^{1,2}, 韦群兰², 韦善清³

WEI Han-chang^{1,2}, WEI Qun-lan², WEI Shan-qing³

(1. 广西师范大学, 广西桂林 541004; 2. 南宁地区教育学院, 广西南宁 530001; 3. 广西大学, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China; 2. Nanning Prefecture Education College, Nanning, Guangxi, 530001, China; 3. Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要: 为了研究高压脉冲电场(PEF)对提取猪皮胶原蛋白的影响,在料液比1:10、枯草杆菌中性蛋白酶用量400U/g、酶解温度40℃、pH值6.5的条件下,分别改变电场强度、脉冲频率和酶解时间,用考马斯亮兰法测定胶原蛋白的浓度并计算其溶出率。结果表明,最适电场强度为25kV·cm⁻¹、脉冲频率为40Hz、脉冲时间1s、酶解时间为30min,此条件下胶原蛋白溶出率可达81.3%。经高压脉冲电场处理的猪皮,其胶原蛋白溶出率远高于未经高压脉冲电场处理的猪皮,而且酶解所用的时间比较短。

关键词: 胶原蛋白 猪皮 提取 高压脉冲电场

中图分类号: TS251.94 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)03-0235-03

Abstract: The effect of PEF on the yield of extracting collagen from pigskin was studied. The experimental processes were that preprocessed pigskin was treated by PEF at first, hydrolyzed by bacillus subtilis neutral proteinase followed, and the dissolution ratio of collagen was tested by Bradford Method at last. The results showed that the dissolution ratio of the extracting method preprocessed by PEF could be more higher than that of un-preprocessed one, and the preprocessed method could save more enzymolysis time. The dissolution ratio could reach to 81.3% under optimum conditions of material to liquid ratio of 1:10, enzymes usage of 400U/g, temperature at 40℃, pH value of 6.5, electric field intensity at 25kV·cm⁻¹, pulsing frequency of 40Hz, pulsing time of 1s and enzymolysis time of 30min.

Key words: collagen, pigskin, extraction, PEF

胶原蛋白是一种白色、不透明、无支链的纤维蛋白质,具有良好的物理性能和生物学特性,在化工、食品、美容化妆品、医学、生物材料以及农业等领域有广泛的应用。猪皮中蛋白质的含量高达33%^[1],是一种提取胶原蛋白的重要原料。提取胶原蛋白的方法有酸水解法、碱水解法以及酶水解法^[2,3]。酸水解法迅速而且彻底,但是色氨酸全部被破坏,丝氨酸和酪氨酸部分被破坏,产品得率低;碱水解法也迅速而且彻底,但是含羟基和巯基的氨基酸全部被破坏并

且产生消旋作用。另外,酸水解法和碱水解法对设备的腐蚀比较严重,还会产生二次污染;酶水解法对胶原蛋白的破坏性小,能更好、更完全地得到活性蛋白。因此,目前基本上都是采用酶水解法提取胶原蛋白。但是酶水解法也有自身的不足,该法水解不够彻底而且速度比较慢。

应用高压脉冲电场(PEF)辅助提取天然物质是近几年发展起来的一种新的非热提取技术,它源于非热灭菌,其原理是高压脉冲电场可以在瞬间使细胞壁和细胞膜电位混乱,改变其通透性,并可以击破细胞壁和细胞膜,使它们发生不可逆破坏,造成细胞新陈代谢紊乱、细胞生长的必须组分流,从而有助于对天然物质的提取。此方法由于提取温度低,天然物质

收稿日期: 2011-02-21

作者简介: 韦汉昌(1963-),男,副教授,主要从事天然物质提取的研究。

* 广西自然科学基金项目(桂科基 0575055)资助。

的分子结构不容易被破坏,基本能保持其色、香、味等性质,而且省时、高效、低能耗,也容易实现连续化操作,具有良好的应用前景。近几年,对利用高压脉冲电场辅助提取天然物质的研究取得了一些进展^[4]。本文研究使用高压脉冲电场辅助枯草杆菌中性蛋白酶从猪皮提取胶原蛋白。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜猪皮(市售),枯草杆菌中性蛋白酶(南宁东恒华道生物科技有限责任公司), Na_2CO_3 (AR), NaCl (AR),盐酸(AR), NaOH (AR),考马斯亮兰 G-250(Sigma 公司),牛血清蛋白(Sigma 公司),乙醇(AR), H_3PO_4 (AR)。

1.2 主要仪器设备

IHV-30 高压电场脉冲发生器(成都英特罗克科技有限公司),自制静态处理池,PHS-3C 精密 pH 计,UV-1700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),TD5A-WS 离心机(湘仪离心机仪器有限公司),DWF-100 型电动粉碎机(河北省黄骅县科研器械厂),RE201C 旋转蒸发器(爱博特科技发展有限公司),BS124S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),D60-2F 电动搅拌机,DZKW-6 电子恒温水浴锅。

1.3 方法

1.3.1 猪皮的预处理

将猪皮皮下脂肪剔除,切成 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 左右的小块,用 35°C 的清水洗 2 次,再用 5 倍 40°C 的温水和脱脂液($8\%\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液)($2:1, \text{V}:\text{V}$)洗 2 次,每次洗涤 10min,最后用清水再洗 2 次后粉碎成泥。

1.3.2 猪皮胶原蛋白的提取

本试验基于用枯草杆菌中性蛋白酶提取猪皮胶原蛋白。根据文献资料,用枯草杆菌中性蛋白酶提取猪皮胶原蛋白的适宜条件为料液比 $1:10$ 、酶用量 400U/g 、酶解温度 40°C 、pH 值 6.5、酶提时间 2h ^[9]。为了考查高压脉冲电场对提取猪皮胶原蛋白的影响,本研究在上述条件下改变电场强度、脉冲频率、酶解时间等因素,比较胶原蛋白的溶出率。

每次试验均称取 10.0g 预处理的猪皮泥,加 100ml 蒸馏水,搅匀后放入耐高压绝缘袋,经高压脉冲电场处理后, 40°C 酶解,高速离心分离残渣,取 1ml 提取液,用考马斯亮兰法(Bradford 法)测定提取液中胶原蛋白的浓度^[9],计算胶原蛋白的溶出率。剩余的提取液用含 NaCl 的稀盐酸溶液灭活^[7],残存酶全部

失活后,调整 pH 值至中性,低温浓缩,加入 NaCl 固体至其浓度达到 $4\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,进行盐析,得粗胶原蛋白沉淀。

2 结果与分析

2.1 电场强度对胶原蛋白溶出率的影响

在酶用量 400U/g 、温度 40°C 、pH 值 6.5、脉冲时间 1s 、脉冲频率 30Hz 、酶解时间 30min 时,改变电场强度。发现当电场强度低于 $15\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 时,胶原蛋白溶出率较低;当电场强度在 $15 \sim 25\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的范围时,胶原蛋白溶出率显著提高,即此时细胞膜、细胞壁被击穿的孔数大幅增加,导致更多的胞内物质渗出;当电场强度超过 $25\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 时,胶原蛋白溶出率平稳(图 1),即此时膜孔不能再封闭,已经造成不可逆击穿,渗出的物质较为恒定。因此电场强度选 $25\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 较为适宜。

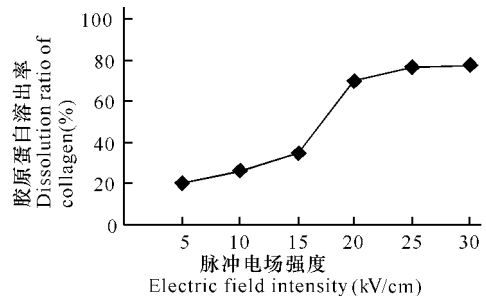


图 1 电场强度对胶原蛋白溶出率的影响

Fig. 1 Effect of electric field intensity on dissolution ratio of collagen

2.2 脉冲频率对胶原蛋白溶出率的影响

电场强度 $25\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, 改变脉冲频率,其它因素不变时,发现脉冲频率超过 40Hz 后,胶原蛋白溶出率的增幅不大(图 2),因此脉冲频率选择 40Hz 较为适宜。

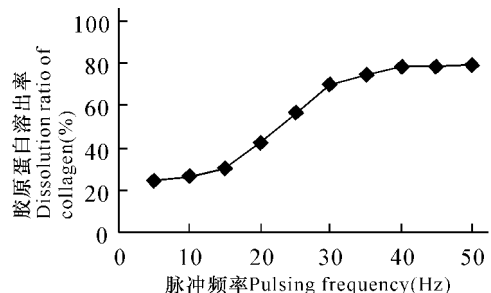


图 2 脉冲频率对胶原蛋白溶出率的影响

Fig. 2 Effect of pulsing frequency on dissolution ratio of collagen

2.3 酶解时间对胶原蛋白溶出率的影响

脉冲频率 40 次/秒,改变酶解时间,其它因素不变时,发现酶解时间 $30 \sim 40\text{min}$ 时,胶原蛋白溶出率最高。继续酶解之后,胶原蛋白溶出率略有下降(图

3), 这可能是溶出的部分胶原蛋白被进一步降解。因此酶解时间过长或过短, 都会影响胶原蛋白的提取率, 酶解时间控制在 30min。

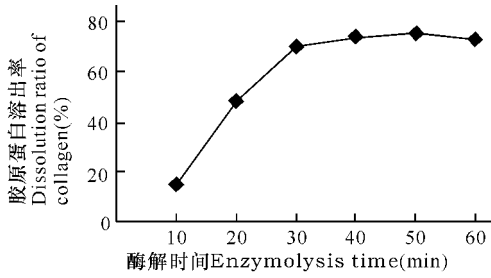


图 3 酶解时间对胶原蛋白溶出率的影响

Fig. 3 Effect of enzymolysis time on dissolution ratio of collagen

3 结论

本研究发现, 高压脉冲电场对胶原蛋白的提取有较大影响, 较为适宜的提取条件为电场强度 25kV · cm⁻¹、脉冲频率 40Hz、脉冲时间 1s、酶用量 400U/g、温度 40℃、pH 值 6.5、液料比 1 : 10、酶解时间 30min。在此条件下进行三次平行试验, 胶原蛋白平

均溶出率为 81.3%, 与文献[5] 酶解时间 2h、胶原蛋白溶出率 70.54%相比, 提取效果更好, 酶解时间更短。

参考文献:

- [1] 李开雄, 赵志远, 刘霞. 猪皮中胶原蛋白的提取及其应用 [J]. 肉类研究, 1996(04): 43-48.
- [2] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 98-102.
- [3] 李贺. 酶法提取猪皮胶原及其结构表征 [J]. 中国皮革, 2002, 31(23): 14-16.
- [4] 吴小辉, 龚雪梅, 贺苏岚, 等. 高压脉冲电场在食品加工及天然产物提取中的研究现状和前景展望 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(24): 24-26.
- [5] 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(01): 50-53.
- [6] 李宁. 几种蛋白质测定方法的比较 [J]. 山西农业大学学报, 2006, 2: 132-134.
- [7] 胡胜, 李志强, 陈敏. 猪皮残存 AsL 398 酶活力的酸性抑制 [J]. 中国皮革, 2001, 30(21): 13-15.

(责任编辑: 陈小玲)

(上接第 234 页 Continue from page 234)

表 3 稳定性试验结果

Table 3 Stability test table

| 样品名称 Sample name | 含量 Contents (%) | | | 14d 分解率 Decomposition rate after 14d (%) |
|--|--------------------|-------|-------|---|
| | 0d | 7d | 14d | |
| 阿维菌素原粉 Abamectin Tech | 82.60 | 81.52 | 80.73 | 2.26 |
| 阿维菌素-环己酮溶液 Abamectin-Cyclohexanone Solution | 24.34 | 21.72 | 19.15 | 21.32 |
| 阿维菌素-氯仿溶液 Abamectin-Chloroform Solution | 11.09 | 10.57 | 9.98 | 10.01 |
| 阿维菌素乳油 (配方 1) Abamectin Ec (Formulation 1) | 1.83 | 1.78 | 1.75 | 4.37 |
| 阿维菌素乳油 (配方 2, 添加稳定剂) Abamectin Ec (Formulation 2) | 2.15 | 2.15 | 2.14 | 0.47 |
| 阿维菌素微胶囊水悬浮剂 Abamectin Cs | 2.14 | 2.13 | 2.13 | 0.48 |

制备阿维菌素微胶囊。通过正交试验筛选出最佳工

艺条件为: 搅拌速度 150 r/min, pH 值 4.5, 体系浓度 2.0%, 芯材比为 1.1, 制得包囊率 > 95%, 平均粒径 ≤ 20μm 的圆整阿维菌素微胶囊。制得的微胶囊粒径分布均匀, 贮存稳定性合格。本试验方法过程简单, 反应易于控制, 所需时间短, 最重要的是整个过程对阿维菌素稳定性无影响, 完全适用于制备阿维菌素微胶囊。

参考文献:

- [1] 樊玉松, 康占海, 赤国彤. 阿维菌素微胶囊剂的制备 [J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(2): 97-101.
- [2] 韩志任, 杜有辰, 李刚, 等. 阿维菌素脲醛树脂微胶囊的制备及其缓释性能 [J]. 农药学报, 2007, 9(4): 405-410.
- [3] 马丽杰, 赵静. 壳聚糖/木质素磺酸钠复凝聚法制备生物农药微胶囊 [J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(6): 51-56.
- [4] 华乃震. 农药微胶囊剂的加工和进展 (I) [J]. 现代农药, 2010, 9(3): 10-13.
- [5] 宋建, 陈磊, 李效军. 微胶囊化技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [6] 赖开平, 廖沛峰, 莫友彬, 等. 0.8% 阿维菌素微胶囊悬浮剂对蔬菜几种主要害虫的毒力和田间药效 [J]. 植物保护, 2011, 37(1): 157-160.

(责任编辑: 邓大玉)