

高电压脉冲电场下的牛骨胶原蛋白酶法提取*

赫桂丹¹ 殷涌光¹ 孟立² 闫琳娜¹ 于庆宇¹

(1. 吉林大学生物与农业工程学院, 长春 130025; 2. 嘉利达明胶有限公司, 辽源 136200)

【摘要】 将高电压脉冲电场(PEF)技术用于牛骨胶原蛋白的提取,通过单因素试验和 Box-Behnken 中心设计法得出提取牛骨胶原蛋白的最佳工艺参数为:底物质量浓度 1.0 g/(100 mL)、胃蛋白酶添加量 3%、pH 值 2.5、场强 21.98 kV/cm、脉冲数 7,在此条件下,可溶性蛋白质量浓度高达 16.21 mg/mL,通过紫外光谱鉴定了所提取的样品为纯胶原蛋白而不含其他杂蛋白。

关键词: 牛骨 胶原蛋白 高电压脉冲电场 酶法 提取

中图分类号: TS251.94 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2010)11-0124-05

Enzymic Method Extraction of Collagen from Bovine Bone by High Intensity Pulsed Electric Fields

He Guidan¹ Yin Yongguang¹ Meng Li² Yan Linna¹ Yu Qingyu¹

(1. College of Biological & Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130025, China

2. Gelita Liaoyuan Gelatine Co., Ltd., Liaoyuan 136200, China)

Abstract

Bovine bone was used as the raw material to extract collagen by the high-intensity pulsed electric fields. The optimal processing conditions were acquired by the single-factor experiments and the Box-Behnken experiment. The most yield of dissoluble collagen 16.21 mg/mL was achieved under the following conditions: substrate concentration 1.0 g/(100 mL), pepsin concentration 3%, pH value 2.5, electric field intensity 21.98 kV/cm, electric pulse number 7. The extracted collagen was identified by UV spectra that it was the pure collagen protein and did not contain other miscellaneous proteins.

Key words Bovine bone, Collagen, High-intensity pulsed electric fields (PEF), Enzymic method, Extraction

引言

胶原蛋白是一种重要的结构蛋白和细胞外基质成分,主要存在于动物组织中^[1]。胶原蛋白在组织工程领域有着比较广泛的应用^[2~3]。

畜骨中含有丰富的骨胶原,是一种较为全价的可溶性蛋白质,生物学效价非常高,属优质蛋白^[4~5]。因此,骨胶原蛋白的提取研究具有很高的实践和理论价值。

目前胶原提取方法主要为直接酸溶或酶促溶,存在着提取时间长、提取率不高等问题^[6~8]。本文以牛骨为原料,将高电压脉冲电场(PEF)技术用于胶原蛋白的提取,对 PEF 下酶法制取胶原蛋白的工艺进行探讨,以确定最佳工艺参数。

1 材料和方法

1.1 材料

牛骨:由长春市皓月清真肉业股份有限公司提

收稿日期: 2009-12-22 修回日期: 2010-01-15

* “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2007BAD55B06)、长春市科技攻关计划资助项目(06GG139)、长春市科技成果转化百亿增值工程项目(2007CZ14)和吉林省科技厅科技发展计划资助项目(20060216)

作者简介: 赫桂丹,工程师,主要从事农产品加工及设备研究, E-mail: hgd@jlu.edu.cn

通讯作者: 殷涌光,教授,博士生导师,主要从事农产品加工及设备研究, E-mail: biofood@jlu.edu.cn

供。脱钙处理^[9]后得到骨泥,备用。

1.2 试剂和仪器

试剂:胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、考马斯亮蓝、牛血清蛋白、乙醇和磷酸。

仪器:自行设计的高电压脉冲电场装置;高速离心机(4 000 ~ 40 000 r/min);JA10002 型电子天平;UV-VIS8500 型紫外分光光度计。

1.3 PEF 装置的设计

高压脉冲电场的设置^[10](图 1)采用的是流动式装置。脉冲电源的波形为三角波,其输出电压的实际数值可由示波器直接读出,频率 1 000 ~ 3 000 Hz,整个管道处理室的容量为 120 mL。用泵来抽取样品溶液,使其流经处理装置,接受电场的处理。

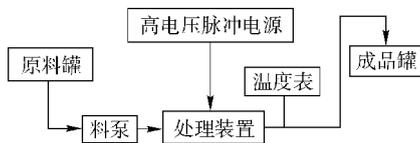


图 1 高压脉冲电场处理设备装置原理框图

Fig. 1 Schematic diagram of high intensity pulsed electric field processing apparatus

1.4 试验方法

1.4.1 单因素试验

酶种类的选择:胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶。优选酶添加量的确定(1%、2%、3%、4%、5%);优选酶最适作用条件的选择:包括 pH 值(1.5、2.0、2.5、3.0、3.5),底物质量浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/(100 mL));PEF 最适作用条件的选择:脉冲数(2、4、6、8、10、12),场强(5、10、15、20、25 kV/cm)。所有试验均进行 3 次取其平均值。

1.4.2 Box-Behnken 中心设计及响应面法优化

在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,采用响应面法对影响 PEF 酶解胶原蛋白工艺的参数进行了四因素三水平中心组合设计,得出最佳工艺条件。所有试验均进行 3 次取其平均值

1.4.3 牛骨胶原蛋白的结构分析

由于大多数蛋白质在 280 nm 附近有一个吸收峰,这是由于蛋白质中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸存在的缘故,色氨酸和酪氨酸在 280 nm 附近有一个吸收峰,苯丙氨酸在 257 nm 有一个吸收峰。此外,所有的蛋白质在 230 nm 以下都有强吸收,这是由于肽键存在的缘故^[11]。由于胶原蛋白不含色氨酸,苯丙氨酸、酪氨酸的含量也很少,因此根据此原理,纯胶原蛋白溶液的紫外扫描特征应该是在 250 ~ 290 nm 基本无吸收峰,同时在 230 nm 以下有强吸收。

2 结果与讨论

2.1 酶制剂的种类

分别选用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶进行牛骨酶解研究^[12]。不同蛋白酶的酶解最适条件见表 1。

表 1 不同蛋白酶最适条件

Tab. 1 Optimum condition of different proteases

种类	温度/°C	pH 值	时间/h
胰蛋白酶	45	8	6
木瓜蛋白酶	50	7	6
胃蛋白酶	4	2	24

准确称取骨泥样品配成 1% 的溶解液,磁力搅拌器搅拌均匀,加入占总提取液质量分数 1% 的酶液,分别在 PEF 下酶解,场强 10 kV/cm,脉冲数 6,同时在每种酶的最适条件下酶解进行对比试验,试验结果见表 2。

表 2 酶制剂的种类对酶解效果的影响

Tab. 2 Effect of protease on enzymolysis

种类	可溶性蛋白质量浓度/mg·mL ⁻¹	
	无 PEF	PEF
胰蛋白酶	3.42	3.23
木瓜蛋白酶	3.15	2.84
胃蛋白酶	4.24	8.15

由表 2 中可知,在各种酶的最适条件下酶解,即无 PEF 作用下,胃蛋白酶的酶解效果最好。而在 PEF 作用下,不同酶制剂的作用效果区别非常明显,PEF 对胃蛋白酶有激活作用,可溶性蛋白质量浓度提高 92.22%,而 PEF 对胰蛋白酶和木瓜蛋白酶均有抑制作用,分别降低 5.56% 和 9.84%,故选择胃蛋白酶作为牛骨酶解胶原蛋白的优选酶。

2.2 底物质量浓度

准确称取骨泥样品分别配成 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/(100 mL) 溶解液,磁力搅拌器搅拌均匀,加入占总提取液质量分数 1% 的胃蛋白酶,用冰醋酸调 pH 值至 2.0,PEF 下酶解,场强 10 kV/cm,脉冲数 6。试验结果见图 2。

从图 2 中可以看到,可溶性蛋白的质量浓度随着底物浓度的增加而增大,当底物质量浓度大于 1.0 g/(100 mL) 时,可溶性蛋白的质量浓度增加趋势趋于平缓,这可能是由于酶在底物表面的吸附作用已达到饱和,从优化利用牛骨资源的角度出发,选择 1.0 g/(100 mL) 的底物质量浓度作为 PEF 下胃蛋白酶酶解的最适浓度。

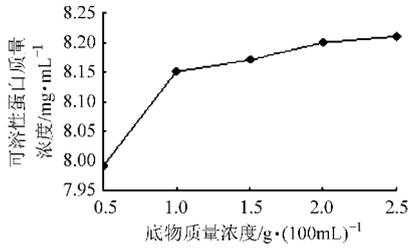


图2 底物质量浓度对 PEF 下胃蛋白酶酶解效果的影响

Fig. 2 Effect of substrate concentration on pepsin enzymolysis by PEF

2.3 胃蛋白酶添加量

准确称取骨泥样品配成 1% 的溶解液,磁力搅拌器搅拌均匀,用冰醋酸调节 pH 值至 2.0,分别加入占总提取液质量分数的 1%、2%、3%、4%、5% 的胃蛋白酶,在 PEF 下酶解,场强 10 kV/cm,脉冲数 6。试验结果见图 3。

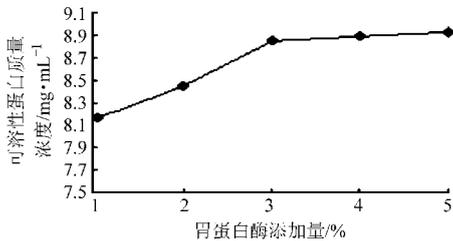


图3 胃蛋白酶添加量对 PEF 下酶解效果的影响

Fig. 3 Effect of pepsin concentration on enzymolysis by PEF

由图 3 可知,当胃蛋白酶添加量达到 3% 时,继续增加蛋白酶的添加量,可溶性蛋白的质量浓度增加趋于平缓,而且造成了酶制剂的浪费,从经济的角度出发,选择胃蛋白酶添加量在 3% ~ 4% 较为合适。

2.4 pH 值

准确称取骨泥样品配成 1% 的溶解液,磁力搅拌器搅拌均匀,加入占总提取液质量分数 1% 的胃蛋白酶,分别用冰醋酸调节 pH 值至 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5,在 PEF 下酶解,场强 10 kV/cm,脉冲数 6。试验结果见图 4。

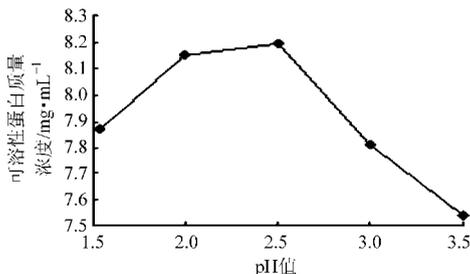


图4 pH 值对 PEF 下胃蛋白酶酶解效果的影响

Fig. 4 Effect of pH on pepsin enzymolysis by PEF

从图 4 中可以看出,可溶性蛋白的质量浓度随着 pH 值的升高先升后降,即存在着一个最佳的 pH

值,胃蛋白酶是一种酸性蛋白酶,一般来说在适宜酸性条件下,底物和蛋白酶的构象最有利于它们之间的诱导契合,所以在最佳 pH 值范围内酶的活性最高。但是当体系的 pH 值进一步增加时,超出了胃蛋白酶的适应范围,会导致酶结构破坏,活性下降。所以,本文选择 2.0 ~ 2.5 为最适宜 pH 值调控范围。

2.5 电场强度

准确称取骨泥样品配成 1% 的溶解液,磁力搅拌器搅拌均匀,加入占总提取液质量分数 1% 的胃蛋白酶,用冰醋酸调节 pH 值至 2.0,在 PEF 下酶解,固定脉冲数 6,通过调节高压脉冲电场的电压以调整电场强度,测定可溶性蛋白质量浓度,试验结果见图 5。

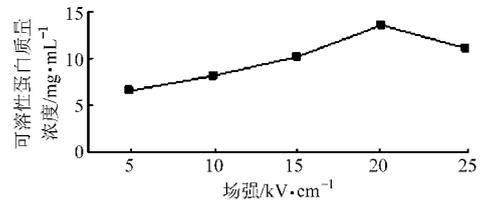


图5 电场强度对胃蛋白酶酶解效果的影响

Fig. 5 Effect of field strength on pepsin enzymolysis by PEF

由图 5 可以明显看出,电场强度在 20 kV/cm 时,可溶性蛋白质量浓度达到最大 13.57 mg/mL,所以场强选择 20 kV/cm 最佳。

2.6 脉冲数

准确称取骨泥样品配成 1% 的溶解液,磁力搅拌器搅拌均匀,加入占总提取液质量分数 1% 的胃蛋白酶,用冰醋酸调节 pH 值至 2.0,在 PEF 下酶解,固定脉电场强度 10 kV/cm,通过调节 PEF 脉冲频率以调整脉冲数,测定可溶性蛋白质量浓度和胃蛋白酶活性,试验结果见图 6。

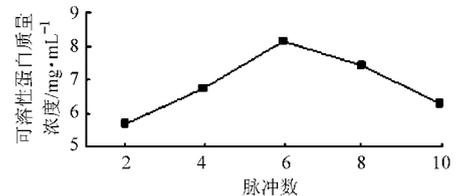


图6 脉冲数对胃蛋白酶酶解效果的影响

Fig. 6 Effect of pulses number on pepsin enzymolysis by PEF

由图 6 可知,脉冲数为 6 时,可溶性蛋白的含量最大,故脉冲数选择 6 为最佳。

2.7 Box-Behnken 中心设计优化 PEF 酶解胶原蛋白工艺

综合单因素试验结果及全面考虑,对影响 PEF 酶解胶原蛋白工艺的电场强度、脉冲数、胃蛋白酶添

加量和 pH 值 4 个因素进行优化,以可溶性蛋白质质量浓度为响应值,设计了四因素三水平中心组合设计,共计有 27 个试验点,其中 24 个为分析因子,3 个为零点,零点试验进行 3 次以估计误差。试验因素设计及结果见表 3。

表 3 PEF 下胃蛋白酶 Box-Behnken 设计试验因素水平及其编码

Tab. 3 Box-Behnken design test factors, levels and coding table of pepsin enzymolysis by PEF

编码	因素			
	电场强度 x_1 /kV·cm ⁻¹	脉冲数 x_2	胃蛋白酶添加量 x_3 /%	pH 值 x_4
-1	18	5	3.0	2.00
0	20	6	3.5	2.25
1	22	7	4.0	2.50

2.7.1 模型分析

以 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 为自变量,由 Box-Behnken 中心设计方案所设计的 27 个试验结果分析,建立数学模型,试验结果见表 4。

以可溶性蛋白质质量浓度为指标 (Y),利用 Design Exper 7.1 分析软件对表 3 的试验结果进行回归模型的方差分析,得出:回归模型达到极显著水平 ($P < 0.01$), $R^2 = 0.9370$,说明该方程的拟合度较高,可以用该模型来对酶解效果进行分析和预测。同时误差项不显著,说明试验误差小,回归方程与实际吻合较好。在 PEF 下,对胃蛋白酶酶解效果影响最大的为电场强度,影响极显著 ($P < 0.01$),其次为脉冲数和 pH 值,影响显著 ($P < 0.05$),最后为胃蛋白酶添加量,影响不显著。各个因素与可溶性蛋白质质量浓度之间的回归方程为

$$Y = 11.96 + 1.3808X_1 + 0.36X_2 - 0.26X_3 + 0.2925X_4 + 0.0425X_1X_2 - 0.01X_1X_3 + 0.025X_1X_4 - 0.0525X_2X_3 + 0.4X_2X_4 - 0.6975X_3X_4 + 0.6083X_1^2 - 0.0304X_2^2 + 0.1096X_3^2 + 0.1533X_4^2$$

由回归方程可知,电场强度、脉冲数和 pH 值对酶解效果有正影响,胃蛋白酶添加量对酶解效果有负影响,回归模型也显示了多项交互作用,其中作用极显著的是 X_1 、 X_3X_4 、 X_1^2 ($P < 0.01$),因此,在一定范围内调节电场强度、脉冲数、胃蛋白酶添加量和 pH 值的关系,可使酶解效果达到最佳。

2.7.2 响应面优化法最佳工艺条件及验证试验

在 DPS 数据处理平台上,建立非线性规划模型的要点,输入非线性回归方程、约束条件及初始值,得出可溶性蛋白质质量浓度最大值为 16.29 mg/mL,

此时 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 分别为 0.99、0.99、-1.00、1.00,通过因子编码公式进行计算得出最佳参数组合为:场强 21.98 kV/cm,脉冲数 6.99,胃蛋白酶添加量 3%,pH 值 2.5,根据 PEF 实际操作条件,脉冲数优选为 7,为了检验模型预测的准确性,在最佳参数条件下进行验证性试验,平均试验 3 次,测得可溶性蛋白质质量浓度均值 16.21 mg/mL,与理论预测值相比相对误差为 0.49%,与理论值非常接近,也进一步验证了数学回归模型的适合性,可见该模型能较好地模拟和预测 PEF 酶解效果。

表 4 PEF 下酶解 Box-Behnken 设计试验及结果

Tab. 4 Box-Behnken design test results of pepsin enzymolysis by PEF

试验序号	X_1	X_2	X_3	X_4	可溶性蛋白质质量浓度 Y /mg·mL ⁻¹
1	1	0	0	-1	13.98
2	1	-1	0	0	13.87
3	-1	0	1	0	11.37
4	0	-1	1	0	11.42
5	0	0	-1	1	14.00
6	1	0	0	1	14.17
7	0	1	0	-1	11.82
8	1	0	-1	0	14.05
9	0	0	-1	-1	11.84
10	0	1	1	0	12.34
11	-1	0	-1	0	11.30
12	0	-1	0	1	11.59
13	0	0	0	0	11.95
14	0	1	-1	0	12.69
15	0	0	0	0	11.96
16	-1	0	0	1	11.34
17	0	-1	-1	0	11.56
18	-1	0	0	-1	11.25
19	1	1	0	0	14.01
20	0	-1	0	-1	11.54
21	0	0	1	-1	11.87
22	-1	-1	0	0	11.18
23	0	1	0	1	13.47
24	1	0	1	0	14.08
25	-1	1	0	0	11.15
26	0	0	1	1	11.24
27	0	0	0	0	11.97

2.8 牛骨胶原蛋白的结构

将所提取的胶原蛋白和纯品胶原蛋白置于紫外光谱中扫描,根据紫外扫描特征判定胶原蛋白纯度。扫描图谱见图 7。

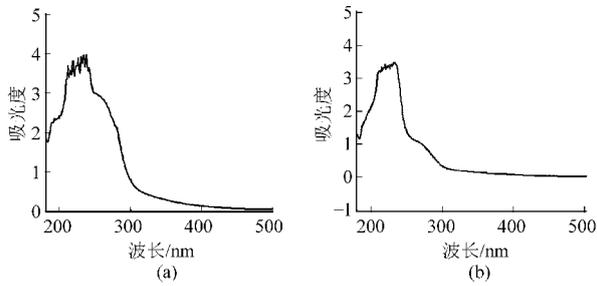


图7 胶原蛋白紫外扫描图

Fig.7 Spectrums of collagen

(a) 牛骨胶原蛋白 (b) 纯品胶原蛋白

从图7中可以看出,胶原蛋白纯品和所提取的牛骨胶原蛋白的紫外扫描图谱呈现出了相似的特征,在250~500 nm之间均无吸收峰,同时在180~240 nm之间有强吸收。所提取的胶原蛋白样品在波长280 nm附近无吸收峰,表明不含杂蛋白;而在230 nm及以下存在强烈的吸收峰,这是胶原蛋白的羰基及肽键的特征吸收峰,呈现了蛋白的特征吸收,排除了杂蛋白存在的可能性,可推断此存在的蛋白

为胶原蛋白。因此,可认为所提取的样品中所含的蛋白为胶原蛋白,不存在杂蛋白,所提取的胶原蛋白纯度较高。

3 结论

(1) PEF对胃蛋白酶有激活作用,可溶性蛋白质量浓度提高92.22%,而PEF对胰蛋白酶和木瓜蛋白酶均有抑制作用,分别降低5.56%和9.84%,故选择胃蛋白酶作为牛骨酶解胶原多肽的优选酶。

(2) 通过单因素试验、Box-Behnken中心设计及响应面法优化对PEF酶解胶原多肽工艺进行研究,得出最佳工艺条件:底物质量浓度1.0 g/(100 mL)、胃蛋白酶添加量3%、pH值2.5、场强21.98 kV/cm、脉冲数7。在此条件下,可溶性蛋白质量浓度高达16.21 mg/mL。

(3) 通过紫外光谱对所提取的胶原蛋白样品结构进行了检测,得出所提取的胶原蛋白为纯胶原蛋白而不含其他杂蛋白。

参 考 文 献

- 蒋挺大,张春萍. 胶原蛋白[M]. 北京:化学工业出版社,2001.
- James T L, Christina J L, Stacey F B, et al. Thin collagen film scaffolds for retinal epithelial cell culture[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(8): 1486~1494.
- Yvonne S, Kirstin S, Cornelia K, et al. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering[J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2006, 57(4): 305~311.
- 孙卫青. 骨食品开发研究前景广阔[J]. *肉类工业*, 2001(1): 43~44.
Sun Weiqing. Wide prospect: bone utilization in food[J]. *Meat Research*, 2001(1): 43~44. (in Chinese)
- Myllyharju J, Kivirikko K I. Collagens modifying enzymes and their mutations in humans files and worms[J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20(1): 33~43.
- Elzbieta S, Sadowska M. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(3): 1302~1306.
- Maria S, Ilona K, Celina N. Isolation of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Food Chemistry*, 2003, 81(2): 257~262.
- Liu H Y, Li D, Guo S D. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(2): 621~625.
- 殷涌光,赫桂丹. 用高电压脉冲电场促进牛骨可溶性钙快速溶出[J]. *吉林大学学报:工学版*, 2009, 39(1): 249~253.
Yin Yongguang, He Guidan. Fast dissolution of dissoluble calcium from bovine bone treated by high intensity pulsed electric fields[J]. *Journal of Jilin University: Engineering and Technology Edition*, 2009, 39(1): 249~253. (in Chinese)
- 赵武奇,殷涌光,关伟,等. 高压脉冲电场杀菌系统设计与试验[J]. *农业机械学报*, 2002, 33(3): 67~69.
Zhao Wuqi, Yin Yongguang, Guan Wei, et al. Experimental study on a food pasteurization system by using a high voltage pulsed field[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2002, 33(3): 67~69. (in Chinese)
- 傅燕凤. 淡水鱼鱼皮胶原蛋白的提取利用研究[D]. 上海:上海水产大学, 2004:19.
Fu Yanfeng. Studies on isolation and utilization of collagen from fresh water fish skins[D]. Shanghai: Shanghai Fisheries University, 2004:19. (in Chinese)
- Yan M Y, Li B F, Zhao X, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(4): 1581~1586.