

猪皮胶原粉的制备工艺及功能特性研究

韩德权, 金明姬, 吴桐, 曹相辉
(黑龙江大学, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 本研究在 4℃ 条件下用弱酸加酶法提取可溶性胶原并干燥成粉, 然后对已提取过的猪皮用 60% 乙醇溶液作载体进行胶体研磨, 制备不溶性胶原粉。进一步对其进行胶原含量及功能特性的测定。结果表明: 猪皮胶原粉的最佳制备工艺为: 采用 pH2.0 醋酸 +0.2% 胃蛋白酶、料液比 1:15 条件下提取猪皮 48h, 可溶性胶原溶出率为 0.602%; 剩余猪皮采用 60% 乙醇载体研磨后干燥可制得不溶性胶原粉。所得胶原粉各项功能特性优良, 通过羟脯氨酸含量测定得出可溶性胶原粉胶原纯度为 95.1%, 不溶性胶原粉胶原纯度为 82.9%, 工艺路线易于实现规模化生产。
关键词: 猪皮胶原; 胃蛋白酶; 功能特性

Preparation Techniques of Pigskin Collagen Powder and Its Functional Characteristics

HAN De-quan, JIN Ming-ji, WU Tong, CAO Xiang-hui
(Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: Pigskin soluble collagen was prepared by enzymolysis in addition of weak acid at 4 °C, and then dried into powder, and the remaining pigskin was further grinded in the presence of ethanol to prepare insoluble collagen powder. The extraction technology of soluble collagen was optimized by orthogonal test, and the ethanol concentration for preparing insoluble collagen powder was selected. Besides, the collagen content and functional properties of the two collagen powders were analyzed. Results showed that the addition of acetic acid was able to enhance the swelling of pigskin and the dissolution rate of soluble collagen. The optimal extraction conditions of soluble collagen with pepsin were as follows: enzyme concentration 0.2%, solid to liquid ratio 1:15, pH 2.0 and hydrolysis time 48 h, and under the above conditions the yield of soluble collagen was 0.602%. 60% ethanol was the best for preparing insoluble collagen powder. The collagen contents of obtained soluble collagen powder and insoluble collagen powder were 95.1% and 82.9%, respectively. Both the two collagen powders exhibited good functional characteristics. The results suggested the feasibility of this technology for the production in plant scale.

Key words: pigskin collagen; pepsin; functional properties

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0060-05

我国是世界第一猪饲养大国和消费大国。据不完全统计, 2006 年全国生猪出栏 6.81 亿头, 猪肉产量 5197 万吨, 占胴体重 10% 左右的猪皮作为猪肉加工过程中的副产品, 资源丰富、廉价易得。猪皮中约含有水分 65%、蛋白质 33%、脂肪 1%、矿物质 0.5%^[1]。猪皮中的蛋白质以胶原蛋白为主, 含量为 87.7%, 具有很高的应用价值^[2]。但长期以来, 除少部分用于制革、熬胶外, 大部分猪皮被直接食用或丢弃, 没有得到充分开发和利用, 不但造成资源浪费, 也给环境带来了一定污染^[3]。目前有不少研究猪皮胶原的文献报道, 但大多侧重于胶原的结构和生化性质的研究^[4-5], 在提取工艺

方面多集中在已水解的胶原蛋白或大分子明胶的工艺上^[6]。

本研究以新鲜猪皮为原料, 用酸酶法提取可溶性胶原后, 再对已提取可溶性胶原的猪皮进行不溶性胶原粉的开发研究。主要进行酸酶法提取可溶性胶原的条件优化及不溶性胶原研磨载体选择和两种胶原干燥方法的研究, 并通过对所制备的猪皮胶原粉进行胶原含量及基本功能特性的测定对猪皮胶原未变性进行验证, 由此确定较佳的工艺路线, 为规模化生产提供实验依据。

1 材料与方法

收稿日期: 2008-08-09

基金项目: 黑龙江省科技厅 2006 年攻关项目(GB06B403-2)

作者简介: 韩德权(1960-), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为生物制药、保健食品材料。

E-mail: handequan2003@yahoo.com.cn

1.1 材料、试剂与仪器

新鲜猪皮 市购。

胃蛋白酶(1:10000) TBD 生物中心; 乙醇(95%); NaCl、Na₂CO₃、冰乙酸、乙酸乙酯、异丙醇、L- 羟脯氨酸、氯胺 T、对二甲氨基苯甲醛均为分析纯。

KQ-100DE医用数控超声波清洗器 昆山超声仪器有限公司; pHs-25 型 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; 78-1 磁力加热搅拌器 常州国华电器有限公司; BCD-231WB 冰箱 青岛海尔电器股份有限公司; 新光-50AB 胶体磨 沈阳航天新光超微粉碎机械有限公司; LG-5 真空冷冻干燥机 上海市离心机械研究所; DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; DYF-200 摇摆式高速中药粉碎机 温岭市大德中药机械有限公司; 290 小型喷雾干燥机 瑞士布奇公司; 752 型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司。

1.2 猪皮胶原粉的制备

1.2.1 新鲜猪皮的处理

选用新鲜猪皮, 洗净脱毛, 用刮刀将皮下脂肪剔除, 剪碎成 0.1 × 0.1cm² 的小块, 再用 10% 的 NaCl 溶液浸泡过夜, 以去除盐溶性蛋白和其他可溶性杂质。以 8% Na₂CO₃ 溶液在 30℃ 水浴中脱脂, 再用超声波清洗器振荡, 进一步脱去猪皮毛孔中的油脂, 鼓风干燥成半透明状, 待用。

1.2.2 制备可溶性猪皮胶原粉和不溶性猪皮胶原粉

1.2.2.1 猪皮可溶性胶原粉的制备

经预处理的猪皮采用醋酸、胃蛋白酶相结合的酸酶法提取可溶性胶原, 两层医用纱布过滤, 在滤液中直接加 NaCl 至 2mol/L 进行 48h 盐析, 经 8000r/h、4℃ 离心 15min, 所得沉淀用 0.5mol/L 醋酸溶液溶解, 透析纯化获得较纯的胶原溶液, 干燥得到可溶性胶原粉(含水量小于 8%)。本研究先对醋酸、柠檬酸、乳酸(pH 值均调在 2~2.5 之间)等食品中常用的酸进行提取可溶性胶原能力的对比。之后采用正交试验分别考察了胃蛋白酶浓度(胃蛋白酶质量/酸溶液体积)、酸溶液 pH 值、处理时间、料液比(猪皮:酸溶液)对胶原溶出率的影响。选用 L₉(3⁴) 正交试验表进行试验(表 1)。

表 1 提取条件 L₉(3⁴) 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test on extraction conditions of soluble collagen

水平	A 时间(h)	B 酶浓度(%)	C pH	D 料液比(W/V)
1	24	0.05	2.0	1:15
2	48	0.1	2.3	1:10
3	72	0.2	2.5	1:5

在猪皮胶原中羟脯氨酸的含量约为胶原总质量的 14%^[7](可溶性胶原和不溶性胶原中羟脯氨酸含量差别不

大)。通过测定胶原粉中羟脯氨酸的含量, 可换算成胶原的含量。参照 IS03496(E) 法^[8], 绘制羟脯氨酸标准曲线, 再按下式计算出胶原溶出率。

$$\text{胶原溶出率} = \frac{\rho_0 V}{0.14 W}$$

式中: ρ_0 为标准曲线上相应羟脯氨酸浓度, mg/ml; V 为溶液体积, ml; W 为原生皮重量, g。

1.2.2.2 猪皮不溶性胶原粉的制备

已提取可溶性胶原的猪皮分别以实验室常见的溶剂如水、乙酸乙酯、异丙醇和乙醇等为研磨载体, 用胶体磨进行研磨, 干燥得到不溶性胶原粉(含水量小于 8%)。

1.2.3 猪皮胶原粉胶原含量测定

各称取猪皮可溶性胶原粉和猪皮不溶性胶原粉 0.1g, 置于安瓿瓶中, 加入 6mol/L 盐酸溶液 5ml, 火焰封口, 置于 105℃ 干燥箱中水解 22h。取出水解液过滤到 50ml 容量瓶并定容, 调节 pH 值至 4~6, 取 5ml 于 500ml 容量瓶并定容。测定猪皮胶原粉中羟脯氨酸的含量, 按下式算出胶原纯度。

$$\text{样品中羟脯氨酸含量}^{[9]}: m_1 = C \times F \times 10^{-3}$$

式中: m_1 为提取的羟脯氨酸含量, g; C 为标准曲线上相应的羟脯氨酸浓度, mg/ml; F 为稀释倍数。

$$\text{胶原纯度}(\%) = \frac{m_1}{0.14 m_2} \times 100$$

式中: m_1 为通过标准曲线换算得到的羟脯氨酸含量, g; m_2 为所称取的胶原粉质量, g。

1.2.4 猪皮胶原粉功能特性的测定

蛋白质的功能特性取决于分子的组成与结构, 其功能特性可间接反映出所制备的胶原粉是否变性。本研究以明胶、大豆蛋白作为对照, 参考文献[5]、[10]的方法分别测定胶原粉的水合性、吸油性、乳化性、凝胶性及起泡性, 验证所制备猪皮胶原粉是否变性。

2 结果与分析

2.1 不同酸对提取可溶性胶原的影响

在动物组织中有一部分未能交联或在体内未成熟的胶原可用稀酸溶液溶解而提取出来, 此部分称为可溶性胶原, 又称作酸溶性胶原。

胶原是天然的极性蛋白, 所以酸碱对胶原均有作用。低离子浓度的酸可以破坏分子间盐键和 Schiff 碱, 降解粘多糖, 而引起胶原纤维膨胀、溶解。

本研究对醋酸、柠檬酸、乳酸进行了提取可溶性胶原能力的比较。以猪皮的膨胀倍数和胶原溶出率作为衡量标准研究了不同的酸对提取可溶性胶原的影响。结

果如图 1、2 所示。

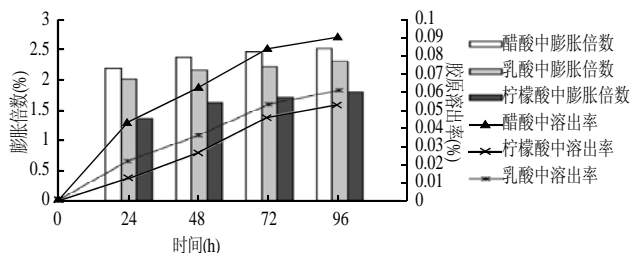


图1 不同酸溶液中的猪皮膨胀倍数和胶原溶出率

Fig.1 Swelling times of pigskin and dissolution rates of collagen in different acid solutions

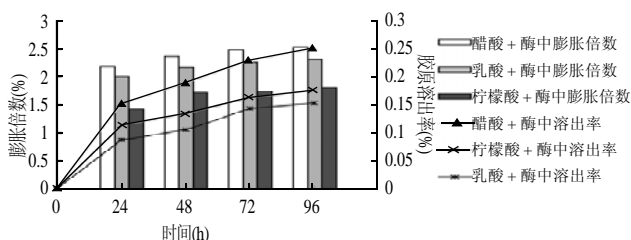


图2 不同酸溶液加胃蛋白酶提取液中的猪皮膨胀倍数和胶原溶出率

Fig.2 Swelling times of pigskin and dissolution rates of collagen in different acid solutions containing pepsin

由图 1、2 可以看出,猪皮膨胀倍数和胶原溶出率均随时间的延长而增加。在前 24h 膨胀倍数和胶原溶出率随时间的增加而迅速上升,之后膨胀倍数几乎不变,胶原溶出率变化逐渐减小,72h 后变得缓慢,但仍有增长。由图 2 可以看出,加酶后膨胀倍数与未加酶时相比变化不大,但加酶后胶原溶出率有显著增加。在初期酸溶液 pH 值较低,膨胀很迅速,但随着时间的增长 pH 值相对升高,并且猪皮本身交联度低的胶原含量少,因此膨胀倍数几乎不变。猪皮在酸溶液中迅速膨胀,胶原分子与进入皮内酸分子结合生成氢键,破坏了胶原肽链原有的氢键而溶出来,需要一定的时间,因此即使膨胀程度变化不大,胶原溶出率也随时间的延长而增长,但超过 72h 之后变化缓慢。

为了可溶性胶原的充分提取和利于后期不溶性胶原粉的制作,在提取可溶性胶原时,猪皮的膨胀程度越大越好。由图 1、2 可知,醋酸溶液对猪皮的膨胀倍数和胶原溶出率较高。

2.2 酸酶法提取条件的优化

对胶原作用的酶大致分为三类:动物胶原酶、作用于胶原非螺旋区的蛋白酶和细菌胶原酶。作用于胶原非螺旋区的蛋白酶包括胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶等,这类酶保留了胶原的三股螺旋区段,使胶原仍具有生物活性,在提取工艺中广泛使用。根据文献报道,胃蛋白酶最适 pH 值在 1.5~2.5 之间,木瓜蛋白酶最适 pH 值为 5.0~5.5 之间,胰蛋白酶最适 pH 值是中性^[11]。目

前在提取工艺研究中最常见、效果最佳的是胃蛋白酶^[12],因此本研究直接选择了醋酸溶液加胃蛋白酶协同作用的提取方案。 $L_9(3^4)$ 正交试验结果如表 2。

表2 正交试验结果

Table 2 Results and range analysis of orthogonal test

试验号	A 时间(h)	B 酶浓度(%)	C pH	D 料液比	溶出率(%)
1	1(24)	1(0.05)	1(2.0)	1(1:15)	0.114
2	1	2(0.1)	2(2.3)	2(1:10)	0.162
3	1	3(0.2)	3(2.5)	3(1:5)	0.267
4	2(48)	1	2	3	0.085
5	2	2	3	1	0.288
6	2	3	1	2	0.532
7	3(72)	1	3	2	0.095
8	3	2	1	3	0.213
9	3	3	2	1	0.577
K_1	0.181	0.098	0.286	0.326	主次顺序:
K_2	0.302	0.221	0.275	0.263	$B > D > A > C$
K_3	0.295	0.459	0.217	0.188	最优组合:
R	0.121	0.361	0.069	0.138	$A_2B_3C_1D_1$

由表 2 可知,影响胶原溶出率的主要因素依次为酶浓度、料液比、提取时间及 pH 值,提取的最优方案为 $A_2B_3C_1D_1$,由验证实验得到在该最优条件下胶原的溶出率为 0.602%。

由于酸溶液和酶的协同作用下提取可溶性胶原时,酶先与底物形成中间复合物,当底物浓度大于酶浓度时,随着酶浓度的增加胶原溶出率增加。仅考虑料液比时,料液比越大,猪皮所处酸环境越浓,对酸溶液的竞争越大,再加上提取一段时间后溶液会变得黏稠,影响胶原的溶出,因此料液比越小越好。

从生产成本考虑,在各个因素上选择了已对胶原溶出率变化不太大的水平作为第 3 水平。由表 2 结果选择了提取时间 48h、酶浓度 0.2%、pH 2.0、料液比 1:15 的提取条件。

2.3 不同载体对不溶性胶原研磨成粉的影响

在动物组织中大部分胶原是以胶原纤维形式存在,彼此互相交叉成网状,用酸酶法很难提取出来,此部分称为不溶性胶原。

不溶性胶原是纤维蛋白质,用组织捣碎机等仪器很难将其微颗粒化。胶体磨是湿式超微粉碎、乳化设备,并且有冷却水循环,温度变化不大。本研究应用胶体磨以各种溶剂作为研磨载体进行了对比研究,结果见表 3。

从表 3 可知,异丙醇和 95% 乙醇作为载体不能使研磨物正常循环;水作为研磨载体能够循环,但研磨后呈浆糊状,干燥后呈薄膜状,粉碎后发飘,得不到胶原粉;乙酸乙酯作为研磨载体能够循环,研磨后呈纤维状,干燥后成块状,粉碎效果良好。但乙酸乙酯气味较大,成本较高,本实验未选用。

表3 各种研磨载体研磨效果的比较

Table 3 Comparison of grinding effects of insoluble collagen among various grinding carriers

研磨载体	循环程度	研磨后状态	干燥后粉碎效果
水	能循环	浆糊状+++++	薄膜状, 不能得粉
乙酸乙酯	能循环	纤维状	块状, 能得粉
异丙醇	不能循环		
95% 乙醇	不能循环		
70% 乙醇	不能循环		
60% 乙醇	能循环	纤维状	块状, 能得粉
50% 乙醇	能循环	纤维状	块状, 能得粉(发飘)
40% 乙醇	能循环	纤维状	块状, 能得粉(发飘)
30% 乙醇	能循环	浆糊状++	薄膜状, 不能得粉
20% 乙醇	能循环	浆糊状+++	薄膜状, 不能得粉
10% 乙醇	能循环	浆糊状++++	薄膜状, 不能得粉

注: “+”表示成浆糊状的程度, “+”越多程度越强。

胶原有吸水性, 水分子可以进入胶原分子结构内, 在机械剪切力的作用下被搅拌、均质、循环, 但由于猪皮吸水后膨胀被搅碎的太彻底, 成浆糊状, 干燥后很难制成粉。如选择有一定水分的有机溶剂作为研磨载体的话, 既能研磨猪皮又能获得胶原纤维, 干燥后可以制得粉状。因此本研究在后续的实验中以不同浓度的乙醇溶液作为研磨载体, 观察了研磨效果和干燥后的成粉性。乙醇浓度越低研磨后的状态越接近水作载体研磨后的浆糊状, 干燥后不能成粉; 乙醇浓度越高循环程度越差, 但研磨效果越好。综合各种因素 60% 乙醇溶液即能够研磨, 且干燥后的粉碎效果良好, 因此选择了 60% 的乙醇溶液作为研磨载体。

2.4 不同干燥方法对胶原成粉的影响

根据文献报道在胶原的提取工艺中最后产品或是处在湿品状态需保存在低温条件下或是通过冷冻干燥法制成胶原海面。这些方法不仅不利于产品的应用而且耗能大、效率低。本研究把已提取的胶原溶液和研磨后的胶原纤维用烘箱干燥法、冷冻干燥法和喷雾干燥法进行了干燥, 干燥后成粉效果见表 4。

表4 干燥方法的比较

Table 4 Comparisons among drying methods for two kinds of collagen

干燥方法	干燥后状态		粉碎效果	
	可溶性胶原	不溶性胶原	可溶性胶原	不溶性胶原
烘箱干燥	薄片状	纤维状	无法粉碎	絮粉
冷冻干燥	海绵状	块状	无法粉碎	无法粉碎
喷雾干燥	细粉	粉状	—	—

从表 4 可知, 可溶性胶原通过烘箱干燥和冷冻干燥后的状态无法进行粉碎, 并且由于可溶性胶原溶出率较低, 耗能很大; 喷雾干燥(进口温度 160℃、出口温度 60℃)虽然是高温, 但是瞬间作用且接受瓶是室温条件, 不会对胶原结构有很大影响。由于不溶性胶原用胶体磨

研磨后有一定的黏度, 很难进行喷雾干燥, 出粉率也很低; 冷冻干燥后就呈海绵状, 无法粉碎; 烘箱干燥后呈纤维状, 再进行粉碎、过筛得到絮粉。

从生产成本和成粉效果综合考虑可溶性胶原选择了喷雾干燥法(进口温度 160℃、出口温度 60℃), 不溶性胶原选择了烘箱干燥(常压、60℃)后粉碎制粉的方法。

2.5 猪皮胶原粉胶原含量

根据生猪的产地、猪的年龄、去皮部位、提取方法等因素会对所制备的成品胶原含量有所影响。本研究通过 NaCl 溶液浸泡除杂蛋白, 通过皂化法除脂肪, 因此所制备成品是较纯的胶原产品, 实验结果如表 5 所示。

表5 猪皮胶原粉胶原含量

Table 5 Collagen contents of two pigskin collagen powders

	OD 值	C(mg/ml)	F(g)	m ₁ (g)	m ₂ (g)	胶原纯度(%)
可溶性胶原粉	0.786	0.0053	2500	0.0133	0.1	95.1
不溶性胶原粉	0.685	0.0046	2500	0.0116	0.1	82.9

由表 5 可知, 可溶性胶原粉的胶原纯度为 95.1%, 不溶性胶原粉的胶原纯度为 82.9%。通过酸酶法提取出来的就是可溶性胶原, 因此可溶性胶原粉的纯度较高, 但通过盐析等操作时少数杂蛋白也会沉淀下来, 可通过反复地盐析、离心、透析获得更高纯度的胶原粉。由于本研究未进行其他杂蛋白的去除, 不溶性胶原粉的纯度较低, 可通过碱溶液中除杂蛋白等操作进一步提高其纯度。

由本工艺所制备的胶原粉质量较好, 保留了猪皮中绝大部分胶原成分, 通过进一步的纯化处理还可以提高其纯度。

2.6 猪皮胶原粉功能特性

罗红平等^[13]曾研究不同分子量分布范围的胶原与其功能特性的关系, 结果表明因分子量的差别, 功能特性有明显不同。高分子量胶原凝胶性、保水性较好, 中分子量和低分子量的胶原多肽有较高的溶解性、起泡性。本研究实验结果如表 6 所示。

表6 猪皮胶原粉功能特性

Table 6 Comparison of functional properties among two pigskin collagen powders, soybean protein and gelatin

指标	可溶性胶原粉	不溶性胶原粉	大豆蛋白	明胶
颜色状态	白色粉状	白色絮粉状	淡黄色细粉状	淡黄色颗粒状
吸水性(g/g)	0.292	0.273	0.340	0.214
保水性 (水分残留率, %)	71	52	48.0	56
吸油性(ml/g)	2.67	2.04	1.74	1.24
乳化性(%)	67	45	50	52
乳化稳定性(%)	16	29	37	49
起泡性(%)	50	不明显	100	145
泡沫稳定性(%)	25	不明显	15	30
凝胶性(%)	2	3	16	13

由表 6 可知, 由本工艺所制备的猪皮胶原粉色泽白、质感细腻。综合各种功能特性, 胶原粉具有很好的凝胶性、吸油性及良好的吸水性、起泡性和泡沫稳定性。由这些功能特性也反映出所制备的胶原粉保持了较大的分子量。

3 结 论

本实验采用在 pH2.0 醋酸、0.2% 胃蛋白酶、料液比 1:15 条件下提取猪皮 48h 可得可溶性胶原, 溶出率为 0.602%, 所制备的可溶性胶原粉胶原含量 95.1%; 剩余猪皮采用 60% 乙醇载体研磨后干燥可制成絮状不溶性胶原粉, 不溶性胶原含量 82.9%。本研究工艺可达到对猪皮的完全利用, 可溶性胶原粉和不溶性胶原粉均保持了良好的功能特性, 易于利用。

参考文献:

- [1] 孙卫青, 刘阳. 食用猪皮加工研究[J]. 肉类工业, 2004(12): 24-27.
- [2] 李开雄, 赵志远. 猪皮中胶原蛋白的提取及其应用[J]. 肉类研究, 1996(4): 43-47.
- [3] 李中东. 浅谈猪皮的组成和利用[J]. 肉类研究, 1995(2): 33-34.
- [4] 李国英. 胶原的类型及其结构特征[J]. 中国皮革, 2002, 31(17): 20-21.
- [5] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [6] 李国英, 张忠楷, 雷苏, 等. 胶原、明胶和水解胶原蛋白的性能差异[J]. 四川大学学报:工程版, 2005, 37(4): 54-58.
- [7] 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.
- [8] ISO349(6E). Meat and meat products. Determination of L-hydroxyproline content[S]. 1994.
- [9] 蓝蔚青, 王川, 李燕, 等. 猪皮中羟脯氨酸含量的测定[J]. 中国食物与营养, 2006(10): 38-40.
- [10] 王洪新, 胡昌云. 茶叶蛋白质的改性及其功能性质研究[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 135-140.
- [11] SCHOMBURG D, SCHOMBURG I. Springer hand-book of enzymes [M]. Berlin: Springer, 2002.
- [12] 王娜, 林炜, 穆畅道. 皮胶原的结构、性质与提取方法[J]. 皮革科学与工程, 2006, 16(2): 42-46.
- [13] 罗红平, 潘志成, 张铭让. 皮边角废料提取胶原蛋白的功能特性[J]. 中国皮革, 2002, 31(15): 13-16.