

不同分子质量段猪皮胶原蛋白酶解物乳化性质

余东华^{1,2}, 徐志宏^{2,*}, 魏振承², 张业辉², 周玲玲^{1,2}, 王 崇^{1,2}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070;

2. 广东省农科院生物技术研究所, 农业部功能食品开放重点实验室, 广东 广州 510610)

摘 要: 采用超滤分离得到3种不同分子质量段的猪皮胶原蛋白酶解物(PCH 1、PCH 2、PCH 3), 并以比色法研究3种酶解物在不同pH值、可溶性蛋白质量浓度和用油量体积分数3个条件下的乳化能力和乳化稳定性。结果表明: pH值、可溶性蛋白质量浓度和用油量体积分数均能显著影响PCH 1、PCH 2、PCH 3的乳化能力和乳化稳定性($P < 0.05$), 且以可溶性蛋白质量浓度对乳化能力的影响最大。PCH 2和PCH 3的乳化能力显著大于PCH 1($P < 0.05$)。分子质量分析结果表明分子质量较小的多肽溶液乳化性质较好。

关键词: 猪皮; 酶解物; 乳化活力; 乳化稳定性

Emulsifying Properties of Pigskin Collagen Peptides with Different Molecular Weights

YU Dong-hua^{1,2}, XU Zhi-hong^{2,*}, WEI Zhen-cheng², ZHANG Ye-hui², ZHOU Ling-ling^{1,2}, WANG Chong^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture, Bio-technology Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Ultra-filtration was used to separate pigskin collagen hydrolysate prepared by sequential hydrolysis with alcalase followed by papain and three peptide fractions including PCH1, PCH2 and PCH3 were obtained. Colorimetry was used to determinate the emulsifying capacity and emulsion stability of PCH1, PCH2 and PCH3 under various conditions of pH, soluble protein concentration and oil amount. The results showed that the emulsifying capacity and emulsion stability of PCH1, PCH2 and PCH3 could be greatly affected by pH, soluble protein concentration and oil amount ($P < 0.05$). Soluble protein concentration was found to be the most obvious affecting factor. In addition, PCH2 and PCH3 had stronger emulsifying capacity than PCH1 ($P < 0.05$). PCH peptide having better emulsifying properties was determined to have a lower molecular weight.

Key words: pigskin; hydrolysate; emulsifying activity; emulsion stability

中图分类号: TS251.92

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0010-04

猪皮作为优质的动物蛋白来源, 蛋白质高达33%。胶原蛋白是猪皮蛋白质主要成分, 约占真皮干物质的98%^[1]。我国乃至亚洲猪皮资源丰富, 目前, 猪皮应用领域遍及医药、化妆品、食品以及保健品等诸多行业^[2-6]。在我国, 猪皮主要应用于制革行业, 加工利用单一, 利用价值较低, 造成大量优质资源的浪费。由于猪皮蛋白致密的三维结构, 分子质量大, 很难被人体直接吸收, 也限制了其在行业内的应用。因此, 众多学者从化学、物理、微生物和酶等多方面着力于蛋白的改性研究^[7-9], 而提高猪皮蛋白的功能性质, 无疑是拓宽资源利用领域, 提高资源综合利用产值的重要途径之一。

蛋白的功能性质主要包括溶解性、持水性、乳化性、起泡性、凝胶性、吸油性、黏弹性等。这些都是影响现代食品加工的重要因素。乳化性质是蛋白主要的加工性能之一, 蛋白质溶解性、表面疏水性和分子质量分布对乳化能力的大小有着重要影响^[10-13]。而猪皮胶原蛋白作为一种优质的蛋白目前研究主要集中于医药、化妆品和功能性食品领域。1978年, Sully等^[14]就利用低压干燥的猪皮治疗烧伤。Freeman等^[15]用猪皮为底物做培养基, 培养了多种类型的上皮细胞, 该方法的主要优点是很好地抑制成纤维细胞的副产物。而在化妆品行业, 胶原富含羟基、氨基等亲水基团使其具有

收稿日期: 2010-10-15

基金项目: 广东省科技攻关计划项目(2009A080209001; 2009A020101002)

作者简介: 余东华(1984—), 男, 硕士, 研究方向为蛋白质资源综合利用。E-mail: ydh841008@yahoo.com.cn

*通信作者: 徐志宏(1965—), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为农产品加工和临床营养。E-mail: zhihongxup@yahoo.com.cn

良好的保水保湿性能而倍受青睐。除此之外,大量研究表明胶原多肽具有易消化、保护胃黏膜以及抗溃疡、促进骨形成、促进皮肤胶原代谢、预防及治疗关节炎、抑制血管紧张素转移酶、抗氧化、抑制血小板凝结和抗肿瘤活性等多方面的生理功能^[16-17]。然而,将猪皮胶原多肽作为乳化剂的研究未见报道。

为此,本实验使用更高效、安全的酶法改性处理猪皮蛋白,将猪皮脱脂蛋白利用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶分步酶解后,得到分子质量较小的蛋白多肽,通过对水解物乳化性质的研究,旨在找到具有良好的乳化能力的蛋白肽,为新的乳化剂的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪皮脱脂蛋白粉,以剔除皮下脂肪的干燥猪皮打粉,过60目筛,经30~60℃沸程石油醚搅拌浸泡脱脂^[18]后制得,蛋白含量90.7%、脂肪含量0.95%、水分含量5.16%和其他含量3.19%。

Alcalase 碱性蛋白酶 丹麦Novo公司;木瓜蛋白酶 广州酶制剂有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

中空纤维膜 广州洁圣膜技术有限公司;均质机 宁波新芝生物科技股份有限公司;酸度计 上海虹益仪器仪表有限公司;分光光度计 日本岛津公司;高效液相 美国安捷伦公司;蛋白分离纯化系统 美国Amersham公司。

1.3 方法

1.3.1 不同分子质量段酶解物的制备

脱脂猪皮蛋白粉→加水(底物质量浓度60g/L)→匀浆,95℃左右水浴加热5min→调pH 9.5、温度55℃,加Alcalase碱性蛋白酶25μL/g底物(以底物质量计)→水解5h后→调pH 5.5,温度50℃,加木瓜蛋白酶0.9%((以底物质量计))→水解4h后→酶解产物100℃灭酶10min→4000×g离心10min→上清液→浓缩→定溶(备用)

利用截留分子质量6000D和3000D中空纤维膜,将水解液分成分子质量小于6000D(PCH 2)和小于3000D(PCH 3)两个组分,将未经超滤分离的水解液命名PCH 1。

1.3.2 酶解物可溶性蛋白质量浓度的测定

采用双缩脲法测定^[19]。

1.3.3 猪皮蛋白水解液乳化性质测定

乳化活力测定方法^[20-21]具体步骤如下:配制质量浓度1g/100mL的各组分溶液,用0.5mol/L HCl或NaOH调至不同pH值,取8mL蛋白溶液至50mL离心管,再加入终体积分数为20%纯大豆油,在23000×g匀浆60s,取下层乳化液50μL,加入0.1g/100mL SDS溶液5.0mL,

在500nm波长处测定吸光度 A_0 。

乳化能力大小用乳化活力指数(emulsifying activity index, 简称EAI)表示,按照公式(1)计算。

$$EAI/(m^2/g) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0}{d \times C \times \varphi} \quad (1)$$

式中: d 为透光直径0.01m; C 为蛋白质量浓度/(g/mL); φ 为大豆油用量体积分数/%。

乳化稳定性(emulsion stability index, ESI)的测定参考Agyare等^[22]的方法。按照公式(2)计算。

$$ESI/\% = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_{10} 是乳化液放置10min后在500nm波长处的吸光度。

1.3.4 不同条件对猪皮蛋白水解液乳化性质影响的单因素试验

1.3.4.1 pH值

配制质量浓度1g/100mL的各组分溶液,用0.5mol/L HCl或NaOH调pH 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,取8mL蛋白溶液至50mL离心管,再加入2mL纯大豆油,在23000×g匀浆60s,取下层乳化液50μL,加入0.1g/100mL SDS溶液5.0mL,在500nm波长处测定吸光度 A_0 。

1.3.4.2 可溶性蛋白质量浓度

配制不同质量浓度0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0g/100mL的各组分溶液,用0.5mol/L HCl或NaOH调至不同pH值,取8mL蛋白溶液至50mL离心管,再加入2mL的纯大豆油,后续操作同1.3.4.1节。

1.3.4.3 油用量体积分数

配制质量浓度为1.0g/100mL的各组分溶液,用0.5mol/L HCl或NaOH调pH 8.0,分别取9、8、7、6、5mL至50mL离心管,再加入不同体积(1、2、3、4、5mL)的纯大豆油,后续操作同1.3.4.1节。

1.3.5 分子质量的测定

采用高效液相凝胶色谱,采用Amersham蛋白质分析纯化系统,分析柱为Superdex-peptide-10/300-GL玻璃柱,进样体积为40μL,流速0.5mL/min,检测波长为214nm。

1.4 数据处理

利用Excel 2003和SPSS 11.7进行方差分析处理并作图。

2 结果与分析

2.1 猪皮蛋白水解液乳化性质的单因素试验

2.1.1 pH 值

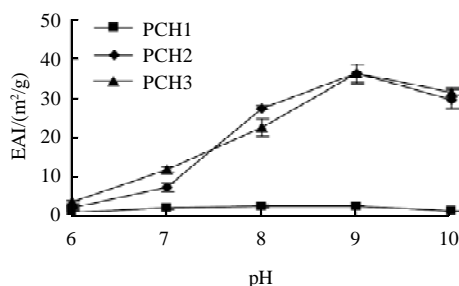


图1 不同 pH 值条件下 3 组分乳化活力指数比较

Fig.1 Emulsifying activity index of three fractions under varying conditions of pH

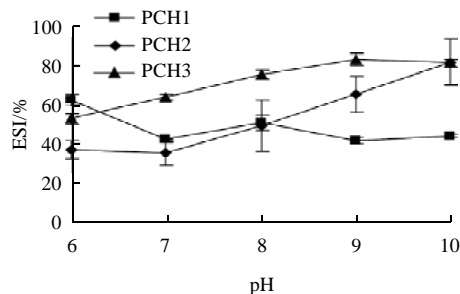


图2 不同 pH 值条件下 3 组分乳化稳定性指数比较

Fig.2 Emulsion stability index of three fractions under varying conditions of pH

由图1可知, PCH2和PCH3的乳化能力随着pH值的增大显著($P < 0.05$)增大, 到pH9时达到最大值。而PCH1乳化能力随pH值的变化程度很小。在pH7~10之间, PCH2和PCH3的乳化能力显著($P < 0.05$)大于PCH1。由图2可知, PCH2和PCH3的乳化稳定性随pH值的增大而增大, 最后趋于稳定。但是, PCH1是先降后增再降且在碱性环境下(pH 9~10)乳化稳定性显著($P < 0.05$)小于PCH2和PCH3。

2.1.2 可溶性蛋白质质量浓度

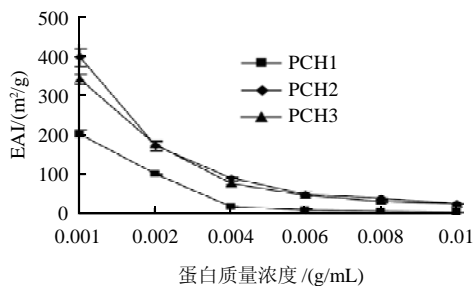


图3 不同可溶性蛋白质质量浓度条件下 3 组分乳化活力指数比较

Fig.3 Emulsifying activity index of three fractions under varying conditions of soluble protein concentration

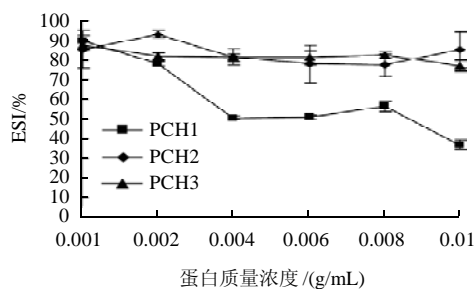


图4 不同可溶性蛋白质质量浓度条件下 3 组分乳化稳定性指数比较

Fig.4 Emulsion stability index of three fractions under varying conditions of soluble protein concentration

由图3可知, 不同可溶性蛋白质质量浓度下, PCH2和PCH3的乳化能力显著大于PCH1, 并随着质量浓度的增大而显著($P < 0.05$)减小, 三者的乳化性质与可溶性蛋白质质量浓度非线性相关, 前两者在质量浓度2.00~10.00mg/mL之间, 乳化能力无显著差异($P > 0.05$)。图4显示, PCH2和PCH3的乳化稳定性在质量浓度达到2.00mg/mL后要显著($P < 0.05$)大于PCH1, 且稳定性较好, 而PCH1乳化稳定性呈下降趋势。

2.1.3 油用量体积分数

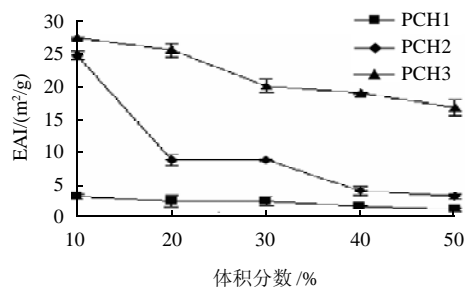


图5 不同用油体积分数条件下 3 组分乳化活力指数

Fig.5 Emulsifying activity index of three fractions under varying conditions of oil amount

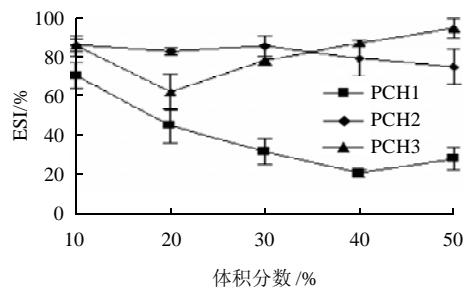


图6 不同用油体积分数条件下 3 组分乳化稳定性指数

Fig.6 Emulsion stability index of three fractions under varying conditions of oil amount

由图5可知, PCH1、PCH2、PCH3的乳化能力随着油用量体积分数的增加而减小, PCH3的乳化能力最

大, PCH1 的最小。图 6 则显示出 PCH2 和 PCH3 的乳化稳定性显著($P < 0.05$)高于 PCH1, 且 PCH2 的呈缓慢下降趋势, 而 PCH3 的在体积分数为 20% 时达到最小值, 然后开始升高。PCH1 的在体积分数为 40% 时达到最小值后开始增加。

2.2 3 个组分分子质量的比较

表 1 3 组分分子质量分布分析结果

Table 1 Molecular weight profiles of three fractions

编号	>1000D	1000~6000D	6000~3000D	3000~1000D	< 1000D
PCH 1	1.89%	2.59%	21.28%	61.78%	12.46%
PCH 2	0.05%	0.25%	10.68%	70.31%	18.71%
PCH 3	0.01%	0.01%	4.11%	68.66%	27.21%

由表 1 可知, 水解物的分子质量主要集中在 6000D 以下, 所占比例都在 95% 以上。PCH1 非全溶性多肽, 其乳化性质与 PCH2 和 PCH3 两个全溶性多肽相比, 较差的原因可能与其中部分溶解性小的大分子蛋白有关。另外, PCH2 和 PCH3 在 3000D 以下所占的比例高于 PCH1, 有研究表明, 分子质量越小, 蛋白结构越伸展, 所暴露的疏水性基团越多, 从而使其疏水端更好的指向油相, 提高乳化能力^[23]。

3 结论与讨论

研究表明, 通过改变蛋白的空间结构, 使其疏水端暴露并有效指向油相, 能有效改变蛋白的乳化能力。在实际加工过程中蛋白的乳化性质受 pH 值的影响较大, 特别是在碱性条件下乳化能力最好, 这极可能是由于在碱性条件下, 无规则卷曲结构增加, 蛋白柔韧性良好, 从而使其具有好的乳化性质^[23-26]。还有研究显示, 蛋白乳化能力的大小与其溶解度有关^[13], 特别是在等电点的乳化性质最差, 其主要原因是此时蛋白的溶解性最差。除此之外, 蛋白质量浓度与用油量对乳化性质也有着重要影响, 特别是对乳化液滴尺寸的大小的影响^[27-28]。

比较 3 组分的乳化性质发现, 4 个因素都对三者的乳化性质有显著影响($P < 0.05$)。分子质量小于 6000D 和小于 3000D 猪皮胶原多肽的乳化能力和乳化稳定性都要好于酶解粗液, 前两者可以尝试作为乳化剂应用于食品中。

参考文献:

[1] 周光敏. 猪皮、猪蹄、猪血作为高蛋白食品在美容保健领域的探索研究[J]. 资源节约与综合利用, 1997, 6(2): 49-50.
[2] 陆胜麟. 重视猪皮资源的开发利用[J]. 食品研究与开发, 1995, 16(2): 5-8.
[3] 祝伟建, 潘银根. 医用猪皮在烧伤治疗中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2001, 10(13): 1255-1257.
[4] 袁玉超, 李群英, 李和平. 乳化猪皮的制备及在盐水火腿中的应用[J]. 现代食品科技, 2009, 25(7): 816-818.

[5] 李卫林, 赵升云. 胶原蛋白水解物在化妆品中的功能特性[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30 (4): 10-12.
[6] 朱夕波, 周培根, 李燕, 等. 猪皮胶原蛋白水解产物中的抗氧化活性肽的分离及其氨基酸组分[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(1): 122-124; 182.
[7] 叶易春, 但卫华, 曾睿, 等. 酸法提取猪皮胶原的工艺条件与分子质量及其分布的关系[J]. 中国皮革, 2006, 15(35): 15-17.
[8] 唐琳, 李春保, 胡玉香, 等. 工艺条件对猪皮提取物质构和微观结构影响的初步研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(12): 269-274.
[9] 王川, 李艳, 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.
[10] 殷军. 高浓度大豆蛋白体系乳化性能及其和结构的关系[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
[11] INYANG U E, IDUH A O. Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996, 73: 1663-1667.
[12] RAGAB D D M, BABIKER E E, ELTINAY A H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Viagna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration[J]. Food Chemistry, 2004, 84 (2): 207-212
[13] EI NASRI N A, EI TINAY A H. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate[J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 582-589.
[14] SULLY L, BAILEY B N. Lyophilized pigskin in the treatment of superficial and deep dermal burns[J]. Burns, 1978, 4(4): 271-276.
[15] FREEMAN A E, YOSHIDA Y, HILBORN V, et al. Culturing epithelial cell types on a pigskin substrate[J]. Methods in Cell Science, 1979, 5: 1181-1183.
[16] 赵利, 苏伟, 胡火根, 等. 胶原蛋白生物活性肽的研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 578-581.
[17] 施辉阳, 张鹏. 酶法提取生猪皮胶原工艺条件的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(7): 93-95.
[18] 王桂林, 张桂珍, 陈智平, 等. 蚕蛹蛋白的提取及应用研究[J]. 南昌大学学报, 1994, 16(2): 33-37.
[19] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.
[20] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3):716-723.
[21] ZHANG Tao, JIANG Bo, MENG Muwan, et al. Emulsifying properties of chickpea protein isolates: influence of pH and NaCl[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(1): 146-152.
[22] AGYARE K K, ADDO K, XIONG Youling. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(1): 72-81.
[23] 齐军茹, 彭志英. 蛋白乳化活性与分子结构的关系[J]. 中国食品添加剂, 2004(2): 52-55.
[24] KIM S H, KINSELLA J E. Effects of reduction with dithiothreitol on some molecular properties of soy glycinin[J]. J Agric Food Chemistry, 1986, 34: 623-627.
[25] KATO A, TANIMOTO S, MURSKI Y, et al. Relationships between conformational stabilities and surface functional properties of mutant hen egg white lysozymes constructed by genetic engineering[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 227-230.
[26] DICHINSON E. Proteins at interfaces and in emulsions stability, rheology and interactions[J]. J Chem Soc Faraday Trans, 1998, 94: 1657-1669.
[27] HUNG S C, ZAYAS J F. Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(5): 1216-1218.
[28] GUO Q, MUT H. Emulsifying properties of sweet potato protein: effect of protein concentration and oil volume fraction[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(1): 98-106.