

猪皮胶原蛋白提取工艺的研究与活性检测

张伟杰*, 闫金鑫, 孙萌, 赵磊, 王小春

兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050

摘要: 胶原具有广泛的来源和较高的应用价值, 已成为生物医用材料的研究中心。本文研究了不同工艺提取的胶原蛋白的特性及其活性, 筛选出提取猪皮中胶原蛋白的最佳工艺方法: 8% Na_2CO_3 溶液脱脂, 脱脂率高达 30.9% 以上; 胰蛋白酶的提取率最高, 可达到 60% 左右; 活性检测柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液提取的胶原具有促进细胞生长作用。

关键词: 胶原蛋白; 胰蛋白酶; 促细胞生长; 提取率

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.022

Extraction and Activity Detection of Pig Skin Collagen

ZHANG Wei-jie*, YAN Jin-xin, SUN Meng, ZHAO Lei, WANG Xiao-chun

Lanzhou University of Technology, College of life science and engineering, Lanzhou 730050, China

Abstract: because of a wide range of sources and high application value, collagen has become a remarkable biomedical materials. In this paper, the properties and activities of collagen extracted from different processes were studied. The optimal method for extracting collagen from pig skin was screened: 8% Na_2CO_3 solution was degreased and the degreasing rate was over 30.9%. The extraction rate of trypsin was the highest and achieved to about 60%; activity of citric acid-collagen extracted in sodium citrate buffer has the effect to promote cell growth.

Key words: collagen; trypsin; promote cell growth; skim rate

胶原主要存在于动物的皮、骨、软骨、牙齿、肌腱、韧带和血管中, 是结缔组织极重要的结构蛋白, 起着支撑器官、保护机体的功能。胶原蛋白富含除色氨酸和半胱氨酸外的 18 种氨基酸, 其中维持人体生长所必需的氨基酸有 7 种。胶原蛋白中的甘氨酸占 30%, 脯氨酸和羟脯氨酸共占约 25%, 是各种蛋白质中含量最高的。同时还含有在一般蛋白中少见的羟脯氨酸和焦谷氨酸及羟基赖氨酸, 所以胶原蛋白具有很高的营养价值。

本实验通过对猪皮中的胶原蛋白进行提取, 分析了不同脱脂剂对胰蛋白酶提取猪皮中胶原蛋白的提取率的影响。研究了六种不同工艺提取的猪皮胶原蛋白的等电点、提取率、促细胞生长等特性。为其在生医材料、化妆品、食品工业等领域的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜猪皮(甘肃省兰州市七里河区兰工坪)。

1.2 实验方法

1.2.1 不同脱脂^[1]方法对猪皮中胶原蛋白提取率的影响

1.2.1.1 无水乙醇脱脂法: 剔除皮下脂肪, 切成 10 mm × 10 mm 的小块, 用 35 °C 的清水洗 2 次后用无水乙醇浸泡碎皮块, 振荡约 10 h, 弃去有机溶剂。将脱脂后的猪皮用蒸馏水冲洗, 用胰蛋白酶法提取胶原蛋白。

1.2.1.2 异丙醇脱脂法: 处理方法同上(用 35 °C 的清水清洗 2 次后用异丙醇溶液浸泡碎皮块)。

1.2.1.3 8% Na_2CO_3 溶液: 小块猪皮用 35 °C 的清水洗 2 次, 用 4 ~ 5 倍 40 °C 温水和 8% Na_2CO_3 溶液脱脂(V: V = 2: 1), 清洗, 10 min 过滤, 重复一次, 最后用清水清洗 2 次, 用胰蛋白酶法提取胶原蛋白。

1.2.1.4 10% Na_2CO_3 溶液: 方法同上, 脱脂液浓度换成 10% Na_2CO_3 即可。

1.2.1.5 4% 醋酸溶液: 处理好的猪皮用 35 °C 的清水清洗 2 次, 用 4% 的醋酸溶液处理 2 h, 最后用胰蛋白酶提取胶原蛋白。

1.2.2 不同方法提取猪皮中的胶原蛋白

1.2.2.1 NaCl/Tris-HCl 缓冲液提取: 先按 $C_{(\text{Tris})} =$

0.05 mol/L 计算并量取 Tris 溶液,将其溶于蒸馏水(占总体积的 80%)中,加入 NaCl,待 NaCl 完全溶解后用 4.0 mol/L HCl 调至 pH = 7.5,最后用蒸馏水补足体积,置于 4 °C 保存备用。

将处理好的猪皮用刀切割成 2.0 mm × 2.0 mm × 0.5 mm 的薄片。将其浸入 0.45 mol/L NaCl/Tris-HCl 缓冲液 [$m_{(\text{猪皮})} : m_{(\text{缓冲液})} = 1 : 50$] 中,4 °C 放置 48 h,其间用磁力搅拌器间歇搅拌(每 8 h 一次,5 min/次)。然后用离心机离心分离(3000 rpm、15 min,下同),取上清液,置于 4 °C 保存。称量沉淀物,浸入 1.00 mol/L NaCl/Tris-HCl 缓冲液中,重复上述操作过程,合并上清液,记录体积,加入 0.5 mol/L 冰醋酸(调 pH = 2.5-3.0),加入 NaCl 使其最终浓度为 1.0 mol/L,4 °C 搅拌(60 rpm)12 h,离心,弃上清液,称量沉淀物,用 $C_{(\text{醋酸})} = 0.5 \text{ mol/L}$ 的冰醋酸 [$m_{(\text{沉淀物})} : m_{(\text{冰醋酸})} = 1 : 50$] 溶解,离心,去除不溶物。

上清液中加入 NaOH 使其最终浓度为 0.5 mol/L,加入 4.4 mol/L NaCl,4 °C 搅拌(60 rpm)12 h,离心,弃上清,得沉淀物。沉淀物用蒸馏水 [$m_{(\text{沉淀物})} : m_{(\text{蒸馏水})} = 1 : 100$] 浸泡 12 h,离心,沉淀物于 4 °C 真空干燥后称量。

1.2.1.2 0.1 mol/L 乙酸提取:将新鲜的猪皮去毛、去脂肪,切成小块用 8% Na_2CO_3 溶液脱脂,蒸馏水冲洗,于 0.1 mol/L 乙酸中长时间浸泡,冷冻干燥得到未变性胶原。

1.2.1.3 pH = 4.0 的柠檬酸提取:配置 pH = 4.0 的柠檬酸溶液 100 mL,将 8.01g 脱脂的猪皮浸入其中,在 80 °C 下加热提取 2.5 h。

1.2.1.4 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液提取:将处理好的猪皮切成约 1~3 cm 左右不等的条形,在 35 °C 温水中清洗两次。将组织放入烧杯中,加 4~5 倍量 40 °C 温水,加入 8% Na_2CO_3 ,充分搅拌 10 min,过滤。重复 2 次,最后用清水漂洗两次。取与组织等

量的饱和盐水于 60 °C 恒温条件下处理 3 h,搅拌,使猪皮受热均匀。取与猪皮等量的柠檬酸缓冲液于 60 °C 恒温条件下处理 7 h,方法同盐提,过滤,滤液用冷冻干燥机冻干。

1.2.1.5 pH = 2.5 的盐酸提取:将新鲜的猪皮去毛、去脂肪,切成小块用 8% Na_2CO_3 脱脂,冲洗,于 0.1 mol/L 乙酸长时间浸泡^[2],冷冻干燥得到未变性胶原。

1.2.1.6 胰蛋白酶提取:称取 10 g 猪皮,按 1:3 加入 30 mL Hanks 缓冲液,用组织匀浆机匀浆后加入 0.23 g 胰蛋白酶^[3],在 45 °C 下酶解 4 h 后沸水浴灭酶。最后用 5000 rpm 离心 10min,取上清液用冷冻干燥机冻干。

1.3 胶原蛋白活性检测

按不同肿瘤细胞生长速率,将一定数量处于对数生长期的永生生化胚肾 293 细胞(6000 个/孔)接种于 96 孔培养板内,培养 24 h 加入药液(10 μL /孔),对每个细胞株,每个浓度均为三个复孔。另设无细胞调零孔、如果药物有颜色要做相应药物浓度无细胞调零孔。肿瘤细胞在 37 °C、5% CO_2 条件下培养 48 h 后,加 5 mg/mL MTT(Sigma)液,用生理盐水配制 20 mL/孔;继续培养 4 h 后,加入三联液(10% SDS-5% 异丁醇-0.01 mol/L HCl)50 μL /孔,于 CO_2 培养箱中过夜。然后用酶标仪测 OD_{570} 值。按下列公式计算被测物对癌细胞生长的抑制率,半数抑制量 IC_{50} 值采用 Logit 法计算:肿瘤抑制率(%) = (对照组 OD -治疗组 OD) / 对照组 OD × 100%

3 结果与分析

3.1 脱脂方法对酶法提猪皮胶原蛋白提取率的影响

根据表 1 可以看出,不同脱脂方法对猪皮中胶原蛋白提取率的影响较大,在所选的五种脱脂剂中,8% Na_2CO_3 溶液的脱脂后胶原蛋白的提取率最高,因此在比较提取工艺时都用 8% Na_2CO_3 溶液脱脂。

表 1 不同脱脂方法对猪皮胶原蛋白的提取率的影响

Table 1 Effect of different degreasing methods on the extraction rate of collagen in pig skin

| 编号 No. | 脱脂剂 Degreasing agent | 猪皮量 Pigskin content (g) | 胶原量 Collagen content (g) | 提取率 Extraction rate (%) |
|-----------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1 | 无水乙醚 | 10 | 1.58 | 54.6 |
| 2 | 异丙醇 | 10 | 1.66 | 57.3 |
| 3 | 8% Na_2CO_3 | 10 | 1.80 | 62.4 |
| 4 | 10% Na_2CO_3 | 10 | 1.79 | 61.8 |
| 5 | 4% 醋酸 | 10 | 1.73 | 60.0 |

3.2 不同提取工艺下的胶原蛋白性状比较

3.2.1 等电点

将不同方法下提取的胶原蛋白溶于 10 mL 0.5 mol/L 的醋酸溶液中,用 6 mol/L NaOH 溶液滴定,至胶原溶液出现沉淀,且沉淀不再溶解,测定此时的 PH,重复测定三次取平均值,即为胶原蛋白的等电点^[4]。测得六种方法提取的胶原蛋白的等电

点都在 4.9 左右。

3.2.2 不同提取工艺下的胶原蛋白性状比较

结果表明(表 2、3):用 NaCl/Tris-HCl 缓冲液、0.1 mol/L 乙酸、pH=4.0 柠檬酸、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、pH=2.5 的盐酸和胰蛋白酶六种方法提取胶原蛋白的性状不一。

表 2 不同 PH 下的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液对猪皮胶原蛋白提取率的影响

Table 2 Effect of citric acid-sodium citrate buffer at different pH on extraction rate of collagen in pig skin

| pH | 0.1mol/L 柠檬 0.1mol/L lemon (mL) | 0.1mol/L 柠檬酸 0.1mol/L citric acid (mL) | 猪皮 Pigskin (g) | 胶原 Collagen(g) | 提取率 Extraction rate (%) |
|-----|---------------------------------------|--|-------------------|-------------------|----------------------------|
| 3 | 18.6 | 1.4 | 8 | 1.18 | 51.1 |
| 3.4 | 16 | 4 | 8 | 1.22 | 52.3 |
| 3.6 | 14.9 | 5.1 | 8 | 1.19 | 51.6 |
| 6.4 | 2 | 18 | 8 | 1.16 | 50.3 |
| 6.6 | 1.4 | 18.6 | 8 | 1.13 | 48.9 |

表 3 不同提取工艺下的胶原蛋白性状比较

Table 3 Comparison of collagen properties under different extraction techniques

| 提取方法 Extraction method | 胶原提取液 Collagen extract | 胶原色泽 Collagen color | 胶原形状 Collagen shape |
|---------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| NaCl/Tris-HCl 缓冲液 | 有絮状物,搅拌下沉淀 | 乳白色 | 粉末 |
| 0.1mol/L 乙酸 | 无色澄清 | 黄色 | 网状物 |
| PH=4.0 柠檬酸 | 透明胶状物 | 白色 | 泡沫物 |
| 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 | 淡黄胶状物 | 黄色 | 片状物 |
| pH=2.5 的盐酸 | 无色澄清 | 暗黄色 | 网状物 |
| 胰蛋白酶 | 透明且粘性很大 | 白色偏黄 | 片状物 |

3.2.3 紫外分光光度法测最大吸收峰

将冻干的胶原溶于 0.5 mol/L 醋酸中,配置质量分数为 0.05% 的胶原溶液。以 0.5 mol/L 醋酸溶液做空白对照,用紫外分光光度计测定其吸收光谱。

胶原中含有酪氨酸和苯丙氨酸,这两种氨基酸具有敏感性的发色团,在 300 nm 以下波长存在最大吸收(图 1)。本实验从猪皮中提取的胶原蛋白最大紫外吸收峰在 300 nm 以下,符合胶原的性质。因实验条件的因素,提取的胶原含有的杂蛋白较多。

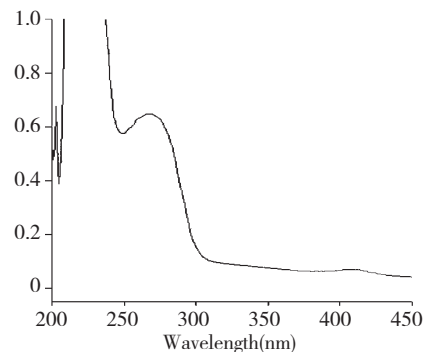


图 1 胶原蛋白的紫外吸收

Fig. 1 UV spectrum of collagen

3.3 提取率及活性分析

3.3.1 胶原蛋白的提取率^[5]

由表 4 可知:NaCl/Tris-HCl 缓冲液提取的胶原蛋白的提取率最少,提取率为 23.5%,胰蛋白酶提取胶原蛋白的量最多,提取率达 61.3%。

3.3.2 活性测定^[6-9]及分析

用酶标仪在 570nm 波长处检测 96 孔平板中每孔细胞的光密度值(OD 值),得到药物对肿瘤的抑

表4 各种不同方法提取猪皮中胶原蛋白的提取率
Table 4 Extraction of collagen in pigs by different methods

| 编号 No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|
| 猪皮 Pigskin (g) | 50 | 15 | 8.2 | 10.4 | 6.8 | 12 |
| 胶原蛋白 Collagen(g) | 3.39 | 1.25 | 1.14 | 11.6 | 0.44 | 2.13 |
| 提取率 Extraction rate (%) | 23.5 | 28.9 | 48.1 | 48.1 | 26.2 | 61.3 |

制率。计算不同药物浓度下的肿瘤抑制率及半数抑制量时的药物浓度 IC_{50} 值^[10]。

无效: $2 \text{ mg/mL} < 85\%$; 弱效: $2 \text{ mg/mL} (85\% \text{ 或 } 1 \text{ mg/mL}) > 50\%$; 强效: $1 \text{ mg/mL} (85\% \text{ 或 } 0.5 \text{ mg/mL}) > 50\%$ 。

在质量浓度分别为 2.5、0.25、0.025、0.0025、0.00025、0.000025 mg/mL 的六个浓度梯度下不同提取方法提取的胶原蛋白的活力如图2所示。柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和胰蛋白酶提取的胶原蛋白有促进细胞生长的作用,其活性都大于1且比较稳定。

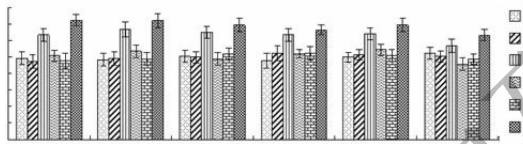


图2 不同浓度下胶原蛋白的活性

Fig. 2 Activity of collagen at different concentrations

4 结论

本实验通过五种脱脂剂,对等量的处理条件相同的猪皮进行脱脂,再酶提法进行提取,通过计算提取率,确定 $8\% \text{ Na}_2\text{CO}_3$ 溶液为最佳脱脂剂。通过比较六种工艺提取猪皮胶原蛋白,得出胰蛋白酶法的提取率最高。测定了胶原的等电点、最大紫外吸收峰和活性,胰蛋白酶和柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液提取的胶原蛋白具有促进细胞生长的作用。

参考文献

- Zhao S(赵帅),Gong X(巩旭),Li GY(李国英). Effects of different degreasing methods on the extraction rate of collagen. *Chin Leather*(中国皮革)2007,36(9):33-36.
- Fan DD(范代娣). One kind of collagen-like and a method to produce it. CN01106757.8,2001.02-21.
- Li KX(李开雄),Zhao ZY(赵志远),Liu X(刘霞). Extraction and application of collagen in pig skin. *Meat Res*(肉类研究),1996,4:43-47.
- Luo YK(罗永康),Pan DD(潘道东),Shen HX(沈慧星) et al. Effects of protein C concentration, pH and ionic strength on muscle fibrin viscosity of silver carp. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业),2004,30(7):52-54.
- Lee CH, Singls A, Lee YY. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*,2001,221:1-22.
- Qi YT(齐玉堂). Study on preparation technology of low-fat collagen. *Meat Ind*(肉类工业),2004,5:28-30.
- Liu BL(刘白玲). Application of collagen in biomedical field. *Leather Sci Eng*(皮革科学与工程),1999,9(3):35-42.
- Li JW(李建武),Yu RY(余瑞元),Yuan MX(袁明秀), et al. Principles and Methods of Biochemistry Experiment. Beijing: Peking University Press,1994. 106-176.
- Chen GL(陈国梁),He CL(贺翠连). Research progress of collagen. *J Yan'an Univ*(延安大学学报),2000,19(2):78-81.
- Kucharz EJ. The Collagen: Biochemistry and Pathophysiology. Berlin: Springer-Verlag, 1992.