

文章编号: 1004-4353(2013)03-0202-04

冰乙酸和胃蛋白酶依次提取新鲜林蛙皮胶原蛋白

朱瑞霞, 施溯筠*

(延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 采用冰乙酸和胃蛋白酶依次对新鲜林蛙皮胶原蛋白进行提取. 在冰乙酸提取过程中, 首先通过控制单一因素变量对料液比、pH 值、冰乙酸浓度、酸解时间和温度等 5 个因素对新鲜林蛙皮胶原蛋白提取率的影响进行研究, 并采用正交实验考察林蛙皮胶原蛋白酸解提取的最佳工艺; 其次, 在冰乙酸提取的最优条件下, 利用胃蛋白酶将酸解后的残余物进行再次酶解提取. 实验结果表明, 最佳酸解的工艺条件是: 料液比为 1 : 30, pH 为 7.5, 酸解时间为 48 h, 酸解温度为 4 ℃, 冰乙酸浓度为 0.5 mol/L. 在此工艺条件下, 胶原蛋白的提取率为 11.85%, 胃蛋白酶对蛙皮残渣的提取率为 5.25%, 所得胶原蛋白的纯度为 64.70%.

关键词: 新鲜林蛙皮; 胶原蛋白; 胃蛋白酶; 冰乙酸

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Collagen extracted from fresh skin of *Rana chensinensis* by acetic acid and pepsin successively

ZHU Ruixia, SHI Suyun*

(College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: Collagen is extracted from the fresh skin of *Rana chensinensis* by acetic acid and pepsin successively. First, the solid-liquid ratio, pH value, acid concentration, acid hydrolysis time and temperature in acetic acid extraction process are investigated. Orthogonal experiment is used to inspect the optimal extraction technology. Then, the residue of acid hydrolysis is extracted by pepsin. The results indicate that acetic acid optimum condition are the ratio of solid to liquid is 1 : 30, pH is 7.5, acid hydrolysis time is 48 h, acid hydrolysis temperature is 4 ℃ and acetic acid concentration is 0.5 mol/L. Its extraction yield is 11.85%, extraction yield of skin residue of *Rana chensinensis* is 5.25% for pepsin extract. The purity of the collagen is 64.70% in the optimal condition.

Key words: fresh skin of *Rana chensinensis*; collagen; pepsin; acetic acid

中国林蛙 (*Rana chensinensis*) 又称哈什蟆, 为国家二级保护动物^[1]. 目前, 随着人们对林蛙药用价值研究的深入, 林蛙皮的药用价值也得到了人们的关注. 例如: 文献[2-3]研究了林蛙皮胶原蛋白和保湿因子的提取; 袁德云等^[4]从林蛙皮中分离出了抗菌肽; 王战勇等^[5]探讨了林蛙皮抗菌肽对革兰氏阳性、阴性细菌和真菌的抗菌作用; 薛

冰等^[6]研究了林蛙皮的抗氧化性; 崔贤淑等^[7]研究发现, 林蛙皮甲醇提取物对小鼠无水乙醇型胃溃疡有保护作用; 郑森等^[8]研究了林蛙皮中胶原蛋白含量的测定及提取工艺. 程波等^[9]研究发现, 胶原蛋白(collagen)具有较好的生物相容性和生物可降解性的结构蛋白, 可促进细胞生长; 刘朝霞等^[10]研究发现, 含胶原蛋白的食物能有效增加皮

收稿日期: 2013-04-07

* 通信作者: 施溯筠(1972—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为天然生物资源的开发与利用.

肤组织细胞的储水能力,增强和维持肌肤良好的弹性,强化肌肤的韧性,延缓机体的衰老.此外,胶原蛋白还可作为表皮细胞的迁移、增殖支架等,为细胞增殖提供良好的营养环境,促进皮肤细胞的增生修复和愈合^[10].目前,胶原蛋白的提取方法主要有酸碱提取法和酶提取法^[11],其中酶提取法的产率高于酸碱法^[12],但其成本相对较高.林蛙皮占林蛙总重量的 30%左右,皮中含有较为丰富的胶原蛋白,但在以往的林蛙利用过程中林蛙皮往往被作为废弃物,使得林蛙资源未能充分利用.近年来,活体取蛙油技术的应用,不仅能够获取良好品质的林蛙油,还能最大限度地保持林蛙活体各部位的生物活性,这为新鲜林蛙皮的开发和利用提供了良好的基础.本文采用冰乙酸和胃蛋白酶依次对林蛙皮胶原蛋白进行提取,为林蛙皮的开发和利用提供实验基础.

1 试剂与仪器

试剂有:胃蛋白酶,比活力为 1:250;透析袋,截留分子量为 1 000(上海绿鸟科技发展有限公司);羟脯氨酸标准品(批号:40173260)和艾氏剂溶液(国药集团化学试剂有限公司);Tris-HCl (Sigma 公司);盐酸、冰乙酸、碳酸钠、对二甲氨基苯甲醛、氯胺 T 等试剂均为分析纯.

仪器有:U-1900 紫外分光光度计(Hitachi High-Technologies Corporation),DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司),HH-6 型数显恒温水浴锅(金坛市科技仪器有限公司),WD-9405b 型水平摇床(北京市六一仪器厂),FA2004 电子天平(上海精天电子仪器有限公司),Z-36HK 高速台式离心机(天津市医疗器械厂).

2 实验方法

2.1 林蛙皮胶原蛋白的提取

2.1.1 酸解提取 称取 2.0 g 新鲜林蛙皮(购于长白山辉煌生物科技有限公司),经 10%碳酸钠(W/V,40 mL)浸泡 4 h 进行预处理后,按照 Soot-tawat Benjakul^[13]的方法进行冰乙酸提取,并分别以 pH 值、酸解时间、酸解温度、料液比和冰乙酸浓度 5 个因素做单因素实验,实验重复 3 次,并

取均值进行数据分析.根据单因素实验结果,选取对提取林蛙皮胶原蛋白影响较大的 3 个因素即料液比(A)、酸解时间(B)、酸解温度(C)为实验因子,以胶原蛋白提取率为指标,采用正交实验设计,相互作用进行考察(见表 1).

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素		
	料液比(A)	酸解时间(B)/h	酸解温度(C)/℃
1	1:15	24	4
2	1:30	48	20
3	1:45	72	37

2.1.2 酶解提取^[14] 将酸解提取后的残渣用蒸馏水漂洗后加入 2 倍体积的冰乙酸(0.5 mol/L)和胃蛋白酶(W/V=1/100)浸泡 48 h,在 20 000 r/min 条件下离心 1 h;再于 10 倍体积磷酸钠缓冲液(0.02 mol/L,pH=7.2)中透析 24 h,然后在同样条件下离心;将沉淀溶解在 10 倍体积的冰乙酸溶液(0.5 mol/L)中,用分子量为 1 000 透析袋透析(在 0.05 mol/L Tris-HCl, pH=7.5 溶液中加氯化钠至最终浓度为 2.6 mol/L)后,再次在同样条件下离心;将所得沉淀溶于 10 倍体积冰乙酸(0.5 mol/L)中,最后透析于蒸馏水中至中性;透析后的溶液转移至表面皿中,真空冷冻干燥.

2.2 林蛙皮胶原蛋白的纯度测定

称取 12 mg 林蛙皮胶原蛋白提取物,加入 600 μ L 0.1 mol/L 的盐酸于 120 $^{\circ}$ C 消解 8 h,冷却后加氧化剂氧化,加艾氏剂显色;取 500 μ L 上清液,用 1 cm 比色皿,以蒸馏水作参比液,在 560 nm 处测吸光度,并以试剂空白校正,测定林蛙皮胶原蛋白的含量^[15].

3 实验结果

3.1 酸解单因素实验

3.1.1 温度对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响

在料液比为 1:20、Tris-HCl 缓冲液 pH 值为 7.5、冰乙酸浓度为 0.5 mol/L、浸泡时间为 24 h 的条件下,将温度设为 0,4,20,37,45 $^{\circ}$ C 5 个梯度进行提取.实验结果如图 1 所示,当温度为 4 $^{\circ}$ C 时,胶原蛋白的提取率最高.

3.1.2 pH 值对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响

在料液比为 1:20、温度为 4 $^{\circ}$ C、冰乙酸浓度

为 0.5 mol/L、浸泡时间为 24 h 的条件下,将 Tris-HCl 缓冲液的 pH 值设为 5 个梯度(6, 6.5, 7, 7.5, 8)进行提取. 实验结果如图 2 所示,当 pH 值为 7.5 时,胶原蛋白的提取率最高.

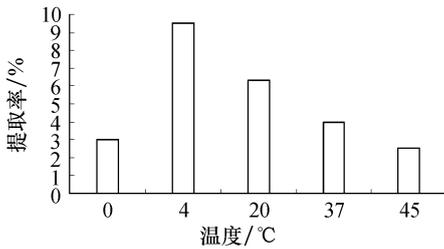


图 1 酸解温度对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响

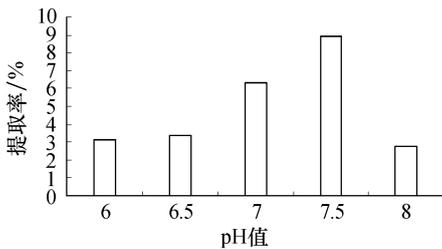


图 2 酸解 pH 值对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响

3.1.3 酸解料液比对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响 在 Tris-HCl 缓冲液 pH 值为 7.5、温度为 4 ℃、冰乙酸浓度为 0.5 mol/L、浸泡时间为 24 h 的条件下,将料液比分别定为 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 进行提取. 实验结果如图 3 所示,当料液比为 1:30 时,胶原蛋白的提取率最高.

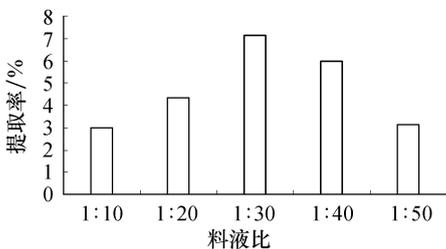


图 3 酸解料液比对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响

3.1.4 冰乙酸浓度对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响 在料液比为 1:30、温度为 4 ℃、Tris-HCl 缓冲液 pH 值为 7.5、浸泡时间为 24 h 的条件下,将冰乙酸浓度设为 5 个梯度(0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mol/L)进行提取. 实验结果如图 4 所示,当冰乙酸浓度为 0.5 mol/L 时,胶原蛋白的提取率最高.

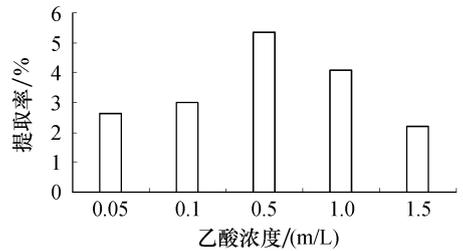


图 4 酸解浓度对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响

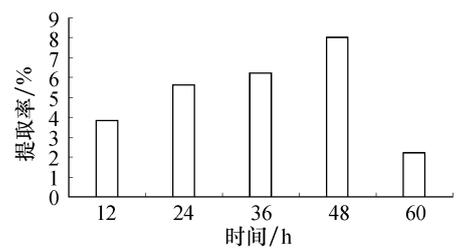


图 5 酸解时间对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响

3.2 酸解提取正交实验

由正交试验数据(表 2)可知, $A_2 > A_1 > A_3$, $B_2 > B_1 > B_3$, $C_1 > C_3 > C_2$. 因此,在 $A_2 B_2 C_1$ 的条件下,即料液比为 1:30、酸解时间为 48 h、酸解温度为 4 ℃的条件下,胶原蛋白的提取率最高. 从表 2 还可以看出,3 个因素对胶原蛋白提取的影响大小依次为 A, B, C, 即料液比 > 提取时间 > 提取温度. 依照最佳提取工艺方案重复三次,所得酸解提取胶原蛋白的提取率为 11.85%.

表 2 酸解提取胶原蛋白正交实验结果

列号	A	B	C	提取率/%
1	1	1	1	7.23
2	1	2	2	8.35
3	1	3	3	6.25
4	2	1	2	7.96
5	2	2	3	9.53
6	2	3	1	9.58
7	3	1	3	6.82
8	3	2	1	5.97
9	3	3	2	4.24
I	21.83	22.01	22.78	
II	27.07	23.85	20.55	
III	17.03	20.07	22.6	
极差	10.04	3.78	2.23	

3.1.5 浸泡时间对林蛙皮胶原蛋白提取率的影响 在料液比为 1:30、Tris-HCl 缓冲液 pH 值

3.3 酶解提取胶原蛋白

按照 2.1.2 的酶解条件,依据文献[16]的研究结果,采用胃蛋白酶在酸解后的残渣中进一步提取胶原蛋白,提取率为 5.25%。合并酸解和酶解的胶原蛋白粗品,经检测其纯度为 64.70%。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:第1部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:179.

[2] 李琳琳,鲍成伟,杨翔华,等. 中国林蛙皮中胶原蛋白的提取研究[J]. 食品科技,2012,37(2):265-268.

[3] 王大为,张艳荣,沙坤. 中国林蛙皮多糖类天然保湿因子的提取与鉴定[J]. 吉林农业大学学报,2002,24(6):99-102.

[4] 袁德云,王立梅,胡耀辉. 林蛙皮抗菌肽的提取及其某些特性的测定[J]. 吉林农业大学学报,2001,23(2):113-116.

[5] 王战勇,井静,苏婷婷. 中国林蛙皮抗菌肽的提取及其抗菌活性的研究[J]. 食品科技,2010,35(6):235-238.

[6] 薛冰,金在久,施溯筠. 林蛙皮的抗氧化性研究[J]. 华西药学杂志,2010,25(4):431-433.

[7] 崔贤淑,金在久,肖悦梅,等. 林蛙皮甲醇提取物对小鼠无水乙醇型胃溃疡的保护作用[J]. 延边大学医学学报,2011,34(1):15-17.

[8] 郑森,周亚丹,赵敏. 东北林蛙皮中胶原蛋白含量的测定及提取工艺[J]. 东北林业大学学报,2008,36(7):81-83.

[9] 程波,吴杰,张玉蓉,等. 酶法提取人工养殖鲟鱼皮中胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品研究与开发,2009,30(3):1-4.

[10] 刘朝霞,陈海光,黄东雨. 鱼皮胶原蛋白的提取及其应用[J]. 广东农业科学,2011,38(20):100-102.

[11] 王丽娜,黄素珍. 胶原蛋白的研究进展[J]. 肉类研究,2010,131(1):16-22.

[12] 郑森. 中国林蛙皮肤胶原蛋白的提取纯化及性质研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2008:14-21.

[13] Akkasit J, Soottawat B, Wonnop V, et al. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of *Brownstripe red snapper (Lutjanus vitta)* [J]. Food Chemistry, 2005,93(3):475-484.

[14] Li H, Liu B L, Gao L Z, et al. Studies on bullfrog skin collagen[J]. Food Chemistry, 2004,84:65-69.

[15] Takeshi Nagai, Nobutaka Suzuki. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins [J]. Food Chemistry, 2000,68:277-281.

[16] 吕玲玲,金香淑,施溯筠. 林蛙皮胶原蛋白的提取及抗氧化性[J]. 食品研究与开发,2013,34(10):20-22.

科技信息

我国 CCM 型膜电极研究取得重大进展

科技部门户网站报道(2013-07-24)膜电极是质子交换膜燃料电池(PEMFC)的核心部件,直接影响电池输出性能和反应效率,开发低铂(Pt)担量、高反应效率的 CCM(催化剂制备到膜上)型薄催化层膜电极是目前质子交换膜燃料电池开发的一个重要技术方向。在“863 计划”电动汽车重大项目支持下,大连化物所承担的“下一代燃料电池系统研究与开发”课题目前取得重大突破和阶段性成果。

课题组开发了静电喷涂制备 CCM 型膜电极的制备工艺,在改善催化层效率的同时能有效降低铂担量。利用静电喷涂工艺制备的膜电极组装了燃料电池短堆,控制电极铂用量在 0.6 毫克/厘米²,测试结果表明,该电堆性能与商业化传统 GDE(催化层制备到扩散层上)型电极的电堆(铂担量 1 毫克/厘米²)相当甚至更优。“氢-空”(H²/Air)燃料电池平均性能常压 1 安/厘米² 电流密度时达到 0.67 伏,加压达到 0.70 伏,与国际先进水平相当;在 1.5 安/厘米² 电流密度峰值功率输出时,电堆铂用量为 0.65 克/千瓦,比“十一五”末降低了约 40%。

此外,课题组正在研究利用 TiO₂(二氧化钛)纳米管有序阵列开发具有有序结构的膜电极,有序化电极结构是开发超低铂膜电极的一个重要研究方向。