

# 胶原明胶化过程中分子结构的变化

王雪蒙<sup>1</sup>, 于玮<sup>1</sup>, 马良<sup>1,2</sup>, 郭雪霞<sup>3</sup>, 周梦柔<sup>1</sup>, 黄丹丹<sup>1</sup>, 张宇昊<sup>1,2</sup>

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715) (2. 西南大学国家食品科学与工程实验教学中心, 重庆 400715)

(3. 农业部规划设计研究院, 北京 100125)

**摘要:** 本试验以猪皮胶原为原料, 研究胶原明胶化过程微观结构的变化规律。研究表明, 8 h 的酸处理诱导下, 胶原明胶化程度较高, 热水提胶后明胶得率可达 83.98%, 随着酸处理时间进一步延长, 明胶得率显著下降; 差示量热扫描 (DSC)、红外光谱 (FTIR) 和圆二色谱 (CD) 研究表明, 随酸处理的进行, 胶原的三螺旋结构逐渐松散, 维系三螺旋结构稳定的价键逐渐被破坏, 酸处理 8 h 后, 胶原三螺旋结构被过度破坏, 是导致明胶得率降低的主要原因。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析显示, 在酸处理的过程中, 胶原肽链的降解始终存在, 且明胶化胶原中所保留的亚基量直接影响明胶中亚基含量。因此, 在明胶化过程中必须在肽链降解和三螺旋结构松散之间寻找平衡点, 以获得高得率和高品质明胶。

**关键词:** 胶原; 明胶; 明胶化; 微观结构

文章编号: 1673-9078(2015)9-98-105

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.017

## Changes in Molecular Structure of Collagen during Gelatinization

WANG Xue-meng<sup>1</sup>, YU Wei<sup>1</sup>, MA Liang<sup>1,2</sup>, GUO Xue-xia<sup>3</sup>, ZHOU Meng-rou<sup>1</sup>, HUANG Dan-dan<sup>1</sup>, ZHANG Yu-hao<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China) (2. National Food Science and Engineering

Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400715, China) (3. Chinese Academy of Agricultural

Engineering, Ministry of Agriculture, Beijing 100125, China)

**Abstract:** The microstructure of collagen from pig skin was studied during gelatinization. The results showed that a relatively high degree of gelatinization of collagen was achieved after 8-h acid treatment and the yield of gelatin reached 83.98% after hot water extraction, while the yield of gelatin dropped significantly with increasing duration of acid treatment. The results from differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and circular dichroism (CD) revealed that the triple-helical structure of collagen became progressively loose and valence bonds stabilizing the triple-helix were gradually destroyed during the process of acid treatment. The triple-helical structure was excessively destroyed after 8-h acid treatment, which could be the main reason for the decrease in gelatin yield. Moreover, the results of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) indicated that collagen peptide chains were degraded during acid treatment and the gelatin subunit content was directly influenced by the amount of subunits that remained after gelatinization. Therefore, during the gelatinization of collagen, a balance between subunit degradation and the loosening of the triple-helical structure is required, in order to obtain high yield of high-quality gelatin.

**Key words:** collagen; gelatin; gelatinization; microstructure

明胶是由动物皮肤、骨、肌膜、肌腱等结缔组织中的胶原部分降解而成, 是非常重要的天然生物高分子材料之一, 已被广泛应用于食品、医药及化工产业<sup>[1]</sup>。从胶原向明胶的转变主要经历两个过程: 一是胶

收稿日期: 2014-12-07

项目基金: 国家自然科学基金项目 (31301425); 中央高校基本科研业务费重点项目 (XDJK2011B001-2362014xk11); 中国博士后科学基金面上项目 (2014M562267); 第四批重庆市高等学校优秀人才支持计划

作者简介: 王雪蒙 (1991-), 女, 研究生, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程

通讯作者: 张宇昊 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白和生物活性肽

原明胶化过程, 二是热水提胶过程<sup>[2-6]</sup>。目前, 胶原明胶化最常用的方法是酸、碱法, 即利用酸 (硫酸等) 或碱 (石灰水等) 与胶原分子的碱性或酸性基团结合, 以断裂分子内或分子间的离子键、氢键, 释放出原胶原分子, 并使原料体积膨胀, 组织松散, 利于热水提胶<sup>[7-8]</sup>。该过程中酸碱处理的程度决定了明胶化过程中胶原微观结构变化的强弱。但目前对于胶原明胶化过程中微观结构变化规律只有一些推测性结论, 尚未见系统报道。因此, 解析胶原明胶化过程中微观结构变化规律对于明胶化工艺参数的合理控制具有重要意义。

近年来, 对于胶原及明胶微观结构方面的研究可

为解析明胶化过程中胶原微观结构变化提供参考。Montero<sup>[9]</sup>、Gekko<sup>[10]</sup>、Kulisiewicz<sup>[11~12]</sup>等对明胶凝胶化过程中微观结构变化进行了研究。结果显示,明胶凝胶过程中亚基分子的聚集和类三螺旋结构的形成是影响其凝胶特性的关键。一些处理(如超高压处理)可使明胶凝胶形成过程中类三螺旋结构更易形成、尺寸更短且数量更多,进而提高了明胶凝胶的特性。胶原明胶化过程中结构变化与明胶凝胶过程相反,因此胶原明胶化微观结构研究对象应当主要集中在胶原三螺旋结构的存在状态以及维系胶原三螺旋结构稳定性的价键存在状况方面。氢键在维系胶原二级、三级结构中均起到重要作用,尤其是 Gly 与 Pro 和 Hyp 形成的氢键,对维系三螺旋结构至关重要<sup>[13]</sup>。胶原的共价交联主要维系其三级结构,主要由  $\epsilon$ -醛赖氨酸参与产生<sup>[14]</sup>。因此,重点对明胶化胶原中三螺旋结构的改变以及氢键、共价交联的存在情况进行研究,即可从微观层面解析明胶化胶原的结构特点。

鉴于以上分析,本研究采用红外光谱、圆二色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳等微观检测手段与热力学手段(差示量热扫描)相结合,解析传统酸法制备明胶前后胶原的三螺旋结构以及维持这些结构稳定的相关价键的变化,阐明胶原明胶化过程中的微观结构变化规律,为明胶产业化生产过程中明胶化工艺的改进和控制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

猪皮,购于重庆市北碚区天生丽街永辉超市,原料获取后洗净,刮去表层脂肪后,切成约 3 mm×3 mm 的小块,真空包装冻藏于冰箱中备用。

胃蛋白酶, Sigma 公司出品;盐酸、氢氧化钠、溴化钾、冰醋酸;成都市科龙化工试剂厂出品;过硫酸铵(APS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、Tris、 $\beta$ -巯基乙醇(2-ME)、四甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝 R-250, BIO BASIC 公司生产;质量分数为 30% 丙烯酰胺,北京索莱宝科技有限公司出品;甘氨酸(Glycine)、溴酚蓝(BPB),生工生物工程(上海)有限公司生产;标准蛋白(分子量 10000~200000 u),加拿大 Fermentas 公司出品。其中 Tris、考马斯亮蓝 R-250、30% 丙烯酰胺为优级纯,其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

电子天平(JA3003B),上海精天电子仪器有限公司;数显酸度计(PHS-25 型),杭州雷磁分析仪器厂;

磁力搅拌器(CJ-78-1),上海将任实验设备有限公司;真空包装机(DZ600/2S),上海人民包装股份有限公司(原上海人民仪表厂);台式高速离心机(5810 型),德国 Eppendorf 公司;电热恒温鼓风干燥箱(101-4-S),上海跃进医疗器械厂;温控水浴锅(8002 型),北京永光明医疗仪器厂;圆二色谱仪(MOS-450),法国 BioLogic 公司;真空冷冻干燥机(FD-1-50),北京博医康实验仪器有限公司;差示量热扫描仪(Pyris4000),美国 PerkinElmer 公司;红外光谱仪(Spectrum100),美国 PerkinElmer 公司;基础电泳仪(Power PacTM),美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统(G:BOX EF 型),英国 Syngene 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 胶原的制备

为了避免其他杂蛋白的影响,更好的了解胶原明胶化过程中的分子变化情况,本试验拟采用较高纯度胶原为明胶化原料,即在酸处理前对猪皮中胶原进行提取,提取工艺流程如下:

猪皮→前处理(修整、脱脂、除杂蛋白)→清洗→酸浸泡→打浆→酶解→盐析→纯化→冻干→胶原

前处理:将新鲜猪皮去毛、刮除皮下脂肪后,洗净并切成约 3 mm×3 mm 的小块,用超声波结合 SDBS 对猪皮进行脱脂处理,其中脱脂工艺参数组合为 0.75% SDBS,超声时间 2 h,料液比 1:2.5<sup>[15]</sup>;再按 1:5 的比例加入 1% (m/V) 的 NaCl 溶液浸泡以去除杂蛋白(浸泡搅拌 6 h,每 2 h 换一次液),浸泡完后用 30 °C 蒸馏水洗涤 3~4 次,真空包装冻藏备用。

酸浸泡、打浆:取一定量皮块,按 1:15 倍 (m/V) 比例加入 pH 2.2 的醋酸溶液,在 4 °C 下浸泡 8~10 h(每隔 1 h 搅拌 1 min),待皮块膨胀均匀后打碎成糊状。

酶解:向打碎的猪皮中继续添加 15 倍体积的醋酸,搅拌成均匀的浆液,并使浆液 pH 控制在 2.2 附近(即加入的醋酸总体积为猪皮质量的 30 倍)。向猪皮浆液中加入皮块质量 1% (m/m) 的胃蛋白酶,于 4 °C 下酶解 18 h,每 1 h 搅拌 5 min。

中和、盐析:酶解液用纱布抽滤,取滤液。向滤液中缓慢滴加浓 NaOH,调节 pH 至 7~8,再边搅拌边缓慢加入一定量 NaCl(使 NaCl 最终浓度为 4~5 mol/L),盐析 12 h,待出现白色絮状沉淀后离心(8000 r/min, 15 min),取沉淀,即得到胶原粗提物。

纯化、冻干:将胶原粗提物以 pH 2.7 的醋酸溶解,离心(6000 r/min, 10 min)除去杂质后灌入透析袋(分子截留量 8000~14000 Mw)中,先以 pH 3.0 的醋酸为透析液透析 3~4 d,再以纯水为透析液透析 2 d,最后

冻干得到纯化的胶原样品。胶原纯度按以下公式计算:

胶原纯度=纯化后的胶原样品测得的羟脯氨酸含量×相应系数(陆生动物系数为 7.1), 其中胶原样品羟脯氨酸含量的测定依据 GB/T9695.23-2008 进行, 经测定, 所提胶原纯度为 (82.50±1.60)%。

### 1.3.2 明胶化胶原的制备

采用传统酸处理方法诱导胶原明胶化, 分别取一定量胶原样品, 撕成薄片, 按固液比 1:250(g/mL)加入质量分数 1%(m/V)的盐酸, 于室温下浸泡不同时间(1、4、8、12、24 h)后, 向溶液中滴加浓氢氧化钠调节 pH 至 6.5~8.5。中和液在 6000 r/min 下离心 5 min, 弃去上清液, 向沉淀物中加入适量纯水重复离心一次以洗去其表面的盐分, 收集沉淀物冻干备用。

### 1.3.3 明胶的提取及其提取率计算

将明胶化胶原加入适量纯水置于摇床上旋转震荡 1.5 h, 温度 45 °C, 转速 200 r/min。胶液在 8500 r/min 下离心 1 min, 上清液倒入胶盘内于 45 °C 下真空干燥后称重, 沉淀物冻干后称重。明胶得率 T1、明胶理论得率 T2 分别按以下公式计算:

(1) 按明胶质量计算 T1

$$T1 = \frac{m_1}{M \times a} \times 100\%$$

式中,  $m_1$ : 明胶质量 (g); M: 胶原用量 (g); a: 胶原样品的纯度 (a=82.5%)。

(2) 按提胶后剩余物质的质量计算 T<sub>2</sub>

$$T_2 = \frac{M \times a - m_2}{M \times a} \times 100\%$$

式中:  $m_2$ : 提胶后剩余物质的质量 (g); M, a: 同上。

### 1.3.4 明胶化胶原的热稳定性分析

采用 DSC 分析仪测定对胶原热稳定性的影响<sup>[16]</sup>。测定方法如下: 称取样品约 3~5 mg, 用铝坩锅封存, 放入 DSC 仪, 在氮气氛围下, 以 5 °C/min 的速率从 -5 °C 升温至 180 °C, 记录吸热曲线。

### 1.3.5 红外光谱分析

红外光谱分析参考照刘苏锐等<sup>[17]</sup>的研究方法。称取 1 mg 样品与 1 g 溴化钾 (KBr) 混合研磨, 于 40 °C 下烘干后压片, 用 Spectrun100 红外光谱仪进行检测。室内温度为 25 °C, 扫描范围: 450~4000  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数: 32, 分辨率: 4  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.3.6 明胶化胶原的圆二色谱分析

圆二色谱参考 Li 等<sup>[18]</sup>的方法进行测定。按 10:1 (mg/mL) 的比例向胶原样品中加入 0.5 M 的醋酸。测定前充分搅拌, 在冰箱内平衡 12 h, 再在室温下放置 2 h。测定波长范围为: 190~240 nm, 比色皿光程: 1 mm, 扫描速度: 1 nm/2s; 测定环境: 25 °C, 氮气。

以 0.5 M 的醋酸溶液为空白对照。

### 1.3.7 胶原、明胶化胶原和明胶的亚基组成及分子量分布

采用 SDS-PAGE 垂直电泳分析胶原的亚基组成, 以 0.25M Tris-HCl 为溶剂配制浓度为 2.0 mg/mL 的胶原(明胶化胶原、明胶)溶液, 按体积比 4:1 添加 5×样品缓冲液(含 250 mmol/L Tris-HCL (pH 6.8)、0.1 g/mL SDS、5 mg/mL BPB、0.5 mL/mL 甘油、0.05 mL/mL 2-ME), 沸水浴 5 min, 冷却后上样, 上样量为 15  $\mu\text{L}$  (Marker 上样量为 10  $\mu\text{L}$ ), 分离胶为质量分数 6%, 浓缩胶质量分数为 5%。15 mA 恒流电泳, 待溴酚蓝跑到分离胶中后, 电流调至 25 mA, 电泳时间约 1 h。考马斯亮蓝染色 2 h 后用脱色液脱色, 直至背景蓝色被脱净, 然后用凝胶成像系统拍摄电泳图谱并分析样品的亚基组成。

高分子量亚基组分含量采用 Phoretix 1D (version 2003.02)软件进行分析<sup>[16]</sup>, 将 Marker 第一条条带(相对分子质量为 200000 u)的含量设为 1, 再分别计算出同块胶中其它样品所含的高分子(分子量大于 100000 u)亚基组分含量总和之比。

### 1.3.8 数据分析

每次试验设置三个平行实验, 数据以平均值±标准偏差表示, 并用统计软件 SPSS17.0 进行显著性分析 (Tukey; P<0.05), 用 Microsoft excel 2010 作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酸处理对明胶提取率的影响

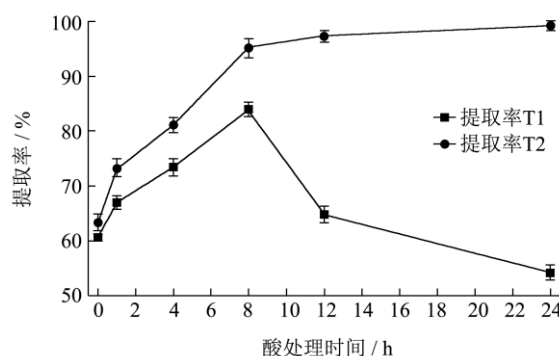


图1 不同酸处理时间对明胶提取率的影响

Fig.1 Effect of different durations of acid treatment on gelatin yield

从图 1、表 1 可见, 未经酸处理的胶原的明胶得率 T1 为 60.61%; 8 h 内随酸处理时间的增加明胶得率 T1 呈上升趋势, 当处理时间达 8 h, T1 达最大值 83.98%; 继续延长处理时间, T1 不断下降。而 T2 则随处理时间的延长 T2 持续上升, 当处理时间达 8 h 以后, 明胶提取率 T2 无显著性差异 (P>0.05), 且 T2

均高于 T1。

胶原明胶化过程中酸处理的目的在于断裂其分子间及分子内的离子键、氢键等非共价交联键，进而破坏胶原的非螺旋结晶区，促进三螺旋结构的松散和亚基的释放。但该过程中胶原的肽键同样可被降解，造成明胶化后清洗过程中小分子物质损失进而导致明胶得率降低<sup>[17,19]</sup>。在实验中直接体现为 T2 与 T1 值之间的差距不断拉大，当酸处理时间大于 8 h，二者差值均在 10% 以上。因此酸处理程度对明胶得率的影响至关重要，适度地松散三螺旋结构不仅利于亚基的释放，还能最大程度地保存亚基分子的完整性，从而提高明胶得率。

表 1 不同酸处理时间所得明胶的提取率表

Table 1 Extraction rate of gelatin with different durations of acid treatment

酸处理时间/h	提取率 T1/%	提取率 T2/%
0(未处理)	60.61±0.61	63.35±1.52 <sup>a</sup>
1	66.99±1.21	73.36±1.63 <sup>b</sup>
4	73.41±1.64	81.10±1.40 <sup>c</sup>
8	83.98±1.35	95.11±1.72 <sup>d</sup>
12	64.77±1.51	97.29±0.06 <sup>d</sup>
24	54.32±1.43	99.19±0.93 <sup>d</sup>

注：采用 Tukey 方法分析，字母 a、b、c、d(同一列不同字母)表示显著性差异 (p<0.05, n=3)。

## 2.2 酸处理对胶原的热稳定性影响分析

热变性温度 (T<sub>m</sub>) 及热焓值 (ΔH) 的变化能反映出胶原热稳定性及其天然螺旋结构的改变。因此采用 DSC 测定不同时间酸处理胶原的 T<sub>m</sub> 和 ΔH，结果如表 1 所示，以未处理的胶原作为对照。

表 2 各酸处理胶原的热变性温度及热焓值表

Table 2 T<sub>m</sub> and pH for collagen with different durations of acid treatment

酸处理时间/h	热变性温度 T <sub>m</sub> /°C	焓值 ΔH/(J/g)
0(未处理)	78.5±1.5 <sup>a</sup>	594.00±31.27 <sup>a</sup>
1	71.8±0.9 <sup>ab</sup>	522.08±28.66 <sup>a</sup>
4	65.3±1.2 <sup>ab</sup>	395.47±21.72 <sup>b</sup>
8	58.4±8.9 <sup>bc</sup>	235.90±34.28 <sup>c</sup>
12	49.2±9.7 <sup>cd</sup>	178.63±32.91 <sup>c</sup>
24	40.1±2.0 <sup>d</sup>	88.10±6.36 <sup>d</sup>

注：采用 Tukey 方法分析，字母 a、b、c、d(同一列不同字母)表示显著性差异 (p<0.05, n=3)。

由表 2 可知，不同时间酸处理胶原的 T<sub>m</sub> 和 ΔH 均低于未处理组，且依次递减，说明随酸处理时间的延长，维系三螺旋结构稳定的价键强度逐渐减弱，胶

原结构松散程度增加，热稳定性随之降低。对各组胶原的 T<sub>m</sub> 和 ΔH 分别进行差异显著性分析，结果表明，酸处理 1 h 对胶原的 T<sub>m</sub> 和 ΔH 影响均不显著 (p>0.05)；当酸处理时间达 8 h 以上，各明胶化胶原的 T<sub>m</sub> 和 ΔH 均与未处理组存在显著差异 (p<0.05)；当酸处理时间达到 24 h 的明胶化胶原的 T<sub>m</sub> 和 ΔH 较 8h 样品具有差异显著 (p<0.05)。由此分析，8 h 的酸处理对于胶原的三螺旋结构以及维系其稳定的价键破坏适度，更利于提高明胶的提取率。

通过 SPSS 软件进行相关性分析，结果显示 T<sub>m</sub> 与 T1 具有显著相关性(p<0.05)，对两变量进行曲线拟合，结果如图 2 所示。曲线回归方程为：Y=-0.07X<sup>2</sup>+8.564X-185.951 (R<sup>2</sup>=0.899)，由此方程得出，T<sub>m</sub> 为 61 °C 时，明胶提取率可达最大值。

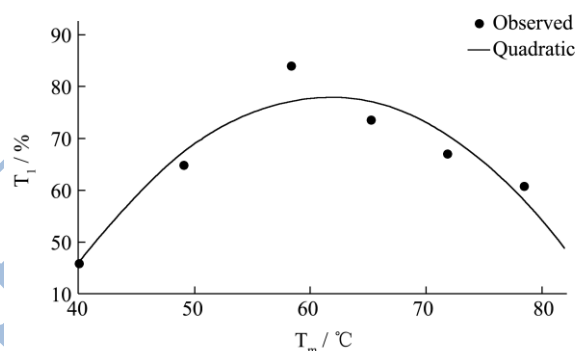


图 2 酸处理组胶原热变性温度与明胶提取率 T1 的回归模型

Fig.2 Regression model for T<sub>m</sub> of acid-treated collagen and gelatin yield

## 2.3 酸处理胶原的红外光谱分析

采用红外光谱分析经不同时间酸处理后的明胶化胶原的结构变化，结果如图 3 所示。酰胺 I 带信号强度及其吸收峰波长位置的改变反映了胶原三螺旋结构的变化<sup>[20-21]</sup>，因此分别列出各组胶原的酰胺 I 带吸收峰位置、吸收面积并作显著性分析，结果如表 2 所示，以未处理的胶原作为对照组。

随着酸处理时间的增加，明胶化胶原的酰胺 B、I、II、III、IV 和 V 带的吸收强度逐渐减弱，且酰胺 I 带吸收峰位置逐渐向短波长移动，这说明胶原的天然构象逐渐被破坏。酸处理 1 h 后，酰胺 B 带信号强度较对照组明显减弱，说明胶原中部分链间氢键发生断裂；1450~1230 cm<sup>-1</sup> 附近吸收峰的尖锐度明显降低，表明胶原三螺旋结构的完整性受到了一定程度的破坏<sup>[20,21,22]</sup>；此外酰胺 I 带吸收峰面积由 110.2141 A×cm<sup>-1</sup> 降至 105.8103 A×cm<sup>-1</sup>，吸收峰对应波长也由 1658.80 cm<sup>-1</sup> 移至 1654.00 cm<sup>-1</sup>，进一步表明了随着酸处理的进行胶原三股肽链间的氢键作用有所减弱，非螺旋区趋

于被破坏,三螺旋结构开始发生解旋,部分肽链趋于伸展。酸处理 4、8 和 12 h 后,上述吸收峰信号强度持续下降,说明三螺旋内和螺旋间的作用不断减弱,越来越多的螺旋单体发生解旋,胶原肽链逐渐由螺旋态向无规则卷曲态转变。当处理时间延至 24 h,酰胺 I 带吸收峰面积达最小,酰胺 B、II、III、IV 带以及表征三螺旋结构完整性的吸收峰完全消失,此时三螺旋结构已完全解旋。

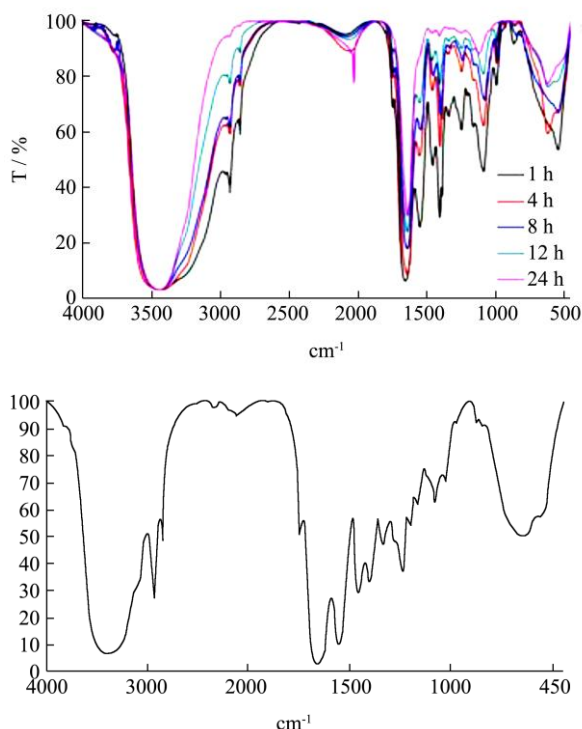


图3 各酸处理组胶原(上)和未处理胶原(下)的红外图谱

Fig.3 Infrared spectra of untreated collagen and acid-treated collagen with different durations of treatment

表3 各酸处理组胶原的酰胺 I 带吸收峰位置及吸收面积表

Table 3 Absorbance band positions and areas of amide I band of acid-treated collagen with different durations of treatment

酸处理 时间/h	酰胺 I 带吸收 峰位置/cm <sup>-1</sup>	酰胺 I 带吸收 峰面积(A×cm <sup>-1</sup> )
0 (对照)	1658.80	110.2141±4.3100 <sup>a</sup>
1	1654.00	105.8103±2.5110 <sup>a</sup>
4	1639.02	89.5497±1.3783 <sup>b</sup>
8	1638.01	67.2900±4.6730 <sup>c</sup>
12	1638.22	49.7295±3.9015 <sup>d</sup>
24	1637.86	43.6761±2.8910 <sup>d</sup>

注:采用 Tukey 方法分析,同一列不同字母(a, b, c, d)表示显著性差异(p<0.05, n=3)。

由表 3 可见,酸处理 1 h 后胶原酰胺 I 带吸收峰面积同未处理组没有显著差异(p>0.05),说明胶原结构的降解作用是有限的,部分三螺旋结构仍保存相对

完整,亚基分子不能充分释放,导致明胶提取率较低;酸处理 4~12 h 过程中,随着酸处理时间的延长,胶原酰胺 I 带吸收峰面积显著下降(p<0.05),说明三螺旋结构的破坏加剧。结合明胶得率分析,酸处理 8h 对胶原降解较为适度,此时胶原非螺旋区基本被破坏,螺旋单体的肽链相互解旋,但可能仍由少数氢键联结,在热力作用下极易分离释放出亚基,同时减少了明胶损失,明胶得率较高;酸处理 24 h 后,胶原酰胺 I 带吸收峰面积同 12 h 无显著差异(p>0.05),说明 12h 后三螺旋完全解旋,后期降解以肽链降解为主,生成大量游小分子多肽和氨基酸,导致明胶损失增大,提取率下降。

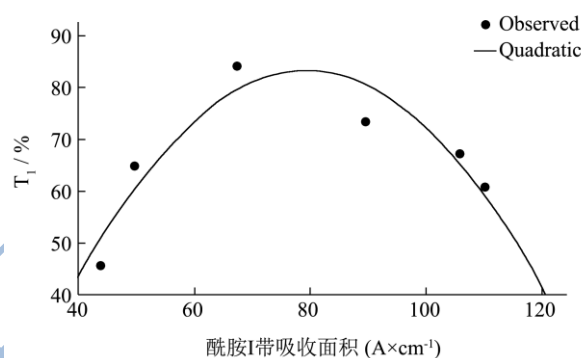


图4 酸处理组胶原酰胺 I 带吸收峰面积与明胶提取率 T1 的回归模型

Fig.4 Regression model for the absorbance peak of amide I band of acid-treated collagen and gelatin yield

由多元回归分析得出,胶原的酰胺 I 带吸收峰面积与其明胶提取率 T1 也呈二次相关,如图 4 所示,回归方程:  $Y = -0.025X^2 + 4.038X - 77.48$ , 回归系数  $R^2 = 0.857$ , 由此方程得出,提取率达最大值时,酰胺 I 带吸收峰面积为  $80.76 A \cdot cm^{-1}$ 。可见,酰胺 I 带吸收面积能在一定程度上评价胶原三螺旋结构的解旋度。

## 2.4 酸处理胶原圆二色谱分析

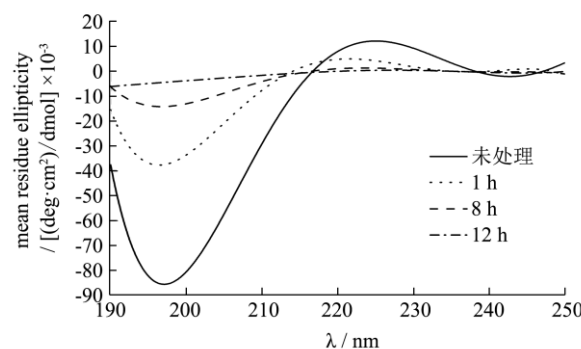


图5 酸处理胶原的圆二色谱图谱

Fig.5 Circular dichroism spectra of collagen after acid treatment  
为进一步测定酸处理对胶原三螺旋结构的影响,

本试验对酸处理 1、8 和 12 h 以及未处理样品进行了圆二色谱分析，图谱如图 5 所示。吸收峰的位置以及参数 Rpn（正、负峰的吸收强度之比）常用于评价胶

原三螺旋结构的完整性，表 3 分别列出了各正、负峰对应的波长和吸收强度及 Rpn 值。

表 4 酸处理胶原的圆二吸收数据

Table 4 Circular dichroism data for collagens after acid treatment

样品编号	正吸收峰 波长/nm	负吸收峰 波长/nm	正吸收峰值 /[(deg×cm <sup>2</sup> /dmol)×10 <sup>-3</sup> ]	负吸收峰值 /[(deg×cm <sup>2</sup> /dmol)×10 <sup>-3</sup> ]	Rpn
未处理组(对照)	223	200	11.9355	-83.0431	-0.1437
1 h	221	198	4.4714	-38.1971	-0.1171
8 h	220	196	0.9180	-15.1966	-0.0604
12 h	-	-	0	0	0

吸收峰的红移或消失、Rpn 值的减小均可反映三螺旋结构的变化<sup>[21,23,24]</sup>，结合图 5 和表 4 可知，酸处理 1 h 后，正、负吸收峰均发生红移，吸收强度明显减小，Rpn 值略有下降，说明胶原发生部分变性，三螺旋结构有一定程度的松散；8 h 后，正、负吸收峰继续红移，吸收强度急剧下降，Rpn 值低至-0.0696，三螺旋结构松散度增加；处理 12 h 后，正、负吸收峰均消失，Rpn=0，此时胶原三螺旋结构被完全破坏，肽链主要以无规则卷曲态存在。

与红外光谱测定结果相比，圆二色谱分析所得各酸处理组（尤其是酸处理 1 h）胶原的变性程度相对更高，这可能是因为前者研究的是固态胶原，后者研究的则是低浓度胶原溶液，而已发生了部分解旋的胶原在溶液状态下更为伸展，有序度更低<sup>[25]</sup>。总体来看，圆二色谱与红外光谱的分析结果基本一致。

### 2.5 酸处理组胶原及明胶亚基组成分析

采用 SDS-PAGE 电泳测定不同时间酸处理后得到的明胶化胶原的亚基组成及高分子量亚基含量，结果如图 6 所示，以未处理的胶原为对照。

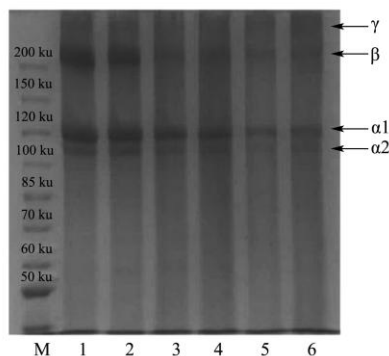


图 6 酸处理组胶原的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.6 SDS-PAGE pattern for acid-treated collagen with different durations of treatment

注：M：标准蛋白；1：未处理组胶原（对照）；2-6：酸处理明胶化胶原（时间依次为 1、4、8、12、24 h）。

由软件分析得到，图 6 中各组胶原主要由 α（α1 和 α2）和 β 亚基组成，其中未处理组及酸处理 1h 组胶原含少量 γ 亚基，但随着处理时间的增加，γ 亚基消失，α 和 β 亚基含量依次递减。各组胶原中相对分子质量大于 100 kDa 的亚基组分含量总和之比为 1.00:0.62:0.48:0.37:0.31:0.28。由此可见，在酸处理的过程中，亚基组分含量不断降低，说明酸对于胶原肽链的降解始终存在，肽链被降解成可溶的小分子短肽，后者在清洗过程中损失。

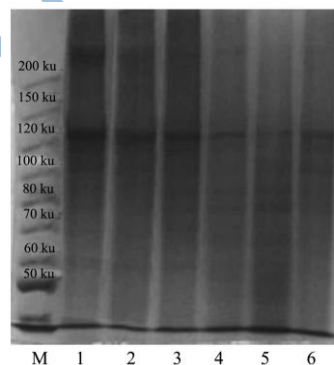


图 7 酸处理组明胶的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.7 SDS-PAGE image of gelatins from acid-treated collagen

注：M：标准蛋白；1：未处理组明胶（对照）；2-6：酸处理组明胶（时间依次为 1、4、12、24、8 h）。

酸处理组明胶由明胶化胶原经过热提、离心得到，见 1.3.3，由从图 7 看出，明胶中高分子亚基含量的变化与胶原相一致，软件分析结果显示，各明胶中高分子亚基含量之比为：未处理组：酸处理 1h：4h：8h：12h：24h =1.00: 0.61: 0.47: 0.27: 0.21: 0.06。即随着酸处理时间的延长，各组明胶的高分子亚基组分逐渐消失，亚基逐渐向低分子量分布。研究表明<sup>[26]</sup>，明胶中高分子亚基含量与其凝胶强度呈正相关，因此酸解时间过长会降低明胶品质。因此，在明胶化过程中必须在肽链降解和三螺旋结构松散之间寻找平衡点，以获得高得率和高品质明胶。

### 3 结论

3.1 酸处理时间在 8 h 以内, T1 随时间的增加持续上升, 且在 8 h 时 T1 达最大值 83.98%; 酸处理 8 h 以上, T1 不断下降。各酸处理组的 T2 均高于 T1, 且随着处理时间的延长 T2 与 T1 值之间差距不断增大, 处理时间大于 8 h, 二者差值均在 10% 以上。

3.2 DSC、FTIR 和 CD 研究表明, 随酸处理的进行, 胶原的三螺旋结构逐渐松散, 维系三螺旋结构稳定的价键逐渐被破坏。酸处理 8 h 后, 胶原三螺旋结构被过度破坏, 导致明胶得率降低。

3.3 对胶原、明胶化胶原和明胶的 SDS-PAGE 分析显示, 在酸处理的过程中, 胶原肽链的降解始终存在, 且明胶化胶原中所保留的亚基含量直接影响明胶中亚基含量。因此, 在明胶化过程中必须在肽链降解和三螺旋结构松散之间寻找平衡点, 以获得高得率和高品质明胶。

### 参考文献

- [1] 周梦柔, 张雨浩, 陈丽清, 等. 基于微观结构的明胶凝胶强度改善研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 395-399  
ZHOU Meng-rou, ZHANG Yu-hao, CHEN Li-qing, et al. Research progress improvement of gel strength of gelatin based on microstructure [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(13): 395-399
- [2] 黄惠君, 程晋生. 胶原与明胶分子的化学基础和明胶的凝胶化[J]. 明胶科学与技术, 2005, 25(2): 82-86  
HUANG Hui-juan, CHENG Jin-sheng. The chemical basis of collagen and gelatin molecules and the gelation of gelatin [J]. The Science and Technology of Gelatin, 2005, 25(2): 82-86
- [3] Karima A, Bhat R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 563-576
- [4] 张宇昊, 马良, 谢祥. 巴沙鱼皮明胶提取工艺及性质研究[J]. 食品科学, 2009, 24: 88-92  
ZHANG Yu-hao, MA Liang, XIE Xiang. Extraction and property of gelatin from basa skin [J]. Food Chemistry, 2009, 24: 88-92
- [5] Gomez-Guillen M C, Turnay M J, Fernandez-Diaz M D, et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(1): 25-34
- [6] 董晨东, 卫士杰, 段子卿, 等. 不同冻力明胶的溶胀动力学和交联稳定性[J]. 中国药科大学学报, 2010, 5: 435-440  
DONG Chen-dong, WEI Shi-jie, DUAN Zi-qing, et al. Swelling kinetics and cross-linking stability of gelatins with different gel strength [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2010, 5: 435-440
- [7] 位绍红, 许永安. 明胶提取工艺及其应用的研究进展[J]. 福建水产, 2007(2): 67-71  
WEI Shao-hong, XU Yong-an. Research progress of extraction and application of gelatins [J]. Journal of Fujian Fisheries, 2007(2): 67-71
- [8] 陈丽清, 马良, 张宇昊. 现代加工技术在明胶制备中的应用展望[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 418-418  
CHEN Li-qing, MA Liang, ZHANG Yu-hao. Prospects for the application of modern processing technology in gelatin preparation [J]. Food Chemistry, 2010, 31(19): 418-418
- [9] Montero P, Fernandez-Diaz M D, Gomez-Guillen M C. Characterization of gelatin gels induced by high pressure [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(3): 197-205
- [10] Gekko K, Fukamizu M. Effect of pressure on the sol-gel transition of gelatin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1991, 13(5): 295-300
- [11] Kulisiewicz L, Baars A, Delgado A. Effect of high hydrostatic pressure on structure of gelatin gels [J]. Technical Sciences, 2007, 55(2): 239-244
- [12] Kulisiewicz L, Delgado A. Network structure of gelatin gel at high pressure determined by rheological measurements [J]. High Pressure Research, 2009, 29(1): 67-71
- [13] Motooka D, Kawahara K, Nakamura S, et al. The triple helical structure and stability of collagen model peptide with (S)-Hydroxypropyl-Pro-Gly units [J]. Biopolymers, 2012, 98(2): 111-21
- [14] CUI Y, LI Y H, DUAN Q. Study of collagen assemble into gel in situ used as tissue engineering scaffold [J]. Advanced Materials Research, 2012, 466: 146-151
- [15] 陈丽清, 陈清, 韩佳冬, 等. 猪皮超声波乳化脱脂工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 265-267  
CHEN Li-qing, CHEN Qing, HAN Jia-dong, et al. Study on ultrasound degreasing of pigskin with emulsifying agents [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(16): 265-267
- [16] CHEN L Q, MA L, ZHOU M R, et al. Effects of pressure on gelatinization of collagen and properties of extracted gelatins [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 36, 316-322.
- [17] 刘苏锐, 王坤余, 琚海燕. 猪皮 I 型胶原蛋白的提取及其结构表征[J]. 中国皮革, 2007, 36(7): 43-46  
LIU Su-rui, WANG Kun-yu, JU Hai-yan. Isolation and characterization of type I collagen from pigskins [J]. China

- Leather, 2007, 36(7): 43-46
- [18] LI D, MU C, CAI S, et al. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(5): 605-609
- [19] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006  
JIANG Ting-da. Collagen and Collagen Peptide [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006
- [20] Muyonga J, Cole C, Duodu K. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study of acid soluble collagen and Gelatin from Skins and Bones of Young and Adult Nile Perch [J]. Food Chemistry, 2004, 86(3): 325-332
- [21] Mori H, Tone Y, Shimizu K, et al. Studies on fish scale collagen of pacific saury [J]. Materials Science and Engineering: C-materials for Biological Applications, 2013, 33(1): 174-181
- [22] 韩应昌, 杨帆. 酶法制取骨明胶理论初探[J]. 山东轻工业学院学报: 自然科学版, 1996, 10(1): 61-64  
HAN Ying-chang, YANG Fan. Preliminary study on the theory of the enzymatic method of preparing gelatin from bones [J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry: Natural Sciences, 1996, 10(1): 61-64
- [23] Gomez-Guillen M C, Turnay M J, Fernandez-Diaz M, et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(1): 25-34
- [24] 钟朝辉, 李春美, 顾海峰, 等. 温度对鱼鳞胶原蛋白二级结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(10): 1970-1976  
ZHONG Zhao-hui, LI Chun-mei, GU Hai-feng, et al. Effect of temperature on the secondary structure of fish scale collagen [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2007, 27(10): 1970-1976
- [25] 张超, 张晖, 赵晓燕, 等. 使用圆二色性光谱和红外光谱研究冬小麦麸皮抗冻蛋白的二级结构[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(7): 1764-1767  
ZHANG Chao, ZHANG Hui, ZHAO Xiao-yan, et al. The secondary structure of winter-wheat-bran antifreeze protein determined by FT-IR and CD spectrum [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(7): 1764-1767
- [26] Gomez-Guillen, Gimenez B, Montero P, et al. Extraction of gelatin from fish skins by high pressure treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(5): 923-928