

离子强度和 pH 值对胶原纤维膜性能的影响

马云昊¹, 程珊¹, 滕安国¹, 张凯¹, 王稳航^{1,2}

(1. 天津科技大学新农村发展研究院, 天津 300457)

(2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 胶原纤维膜是一种重要的可食性蛋白膜, 但其性能受到多种外界因素的影响。为了提高胶原蛋白膜的性能, 使其能更好的应用于食品包装等, 本实验研究了不同 pH 值 (2、3、5、7、11) 和不同离子强度 (0.1、0.2、0.3 mol/L) 对胶原纤维膜机械强度和微结构的影响。实验表明, pH 值对胶原纤维膜的厚度无显著性影响, 但膜的拉伸强度和断裂延伸率随 pH 值增大而明显表现为 V 型变化, 且在 pH=2 时膜的拉伸强度达到最大值 67.67 ± 2.57 MPa, 此时膜表面较光滑, 质地均匀; 随着离子强度的增加, 膜的厚度逐渐增加, 机械性能显著降低, 膜表面粗糙度程度增加, 并扰乱了纤维之间排列; 与干膜相比, 湿膜的拉伸强度发生较大下降, 而断裂延伸率却大幅度增加。此外, 随离子强度增加以及成膜液的 pH 偏离胶原纤维的等电点, 膜的膨胀性能增加。

关键词: 胶原纤维膜; 机械性能; 微结构; 干膜; 湿膜

文章编号: 1673-9078(2018)08-105-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.016

Effects of Ionic Strength and pH on the Properties of Collagen Fiber Film

MA Yun-hao¹, CHENG Shan¹, TENG An-guo¹, ZHANG Kai¹, WANG Wen-hang^{1,2}

(1. Tianjin University of Science and Technology, Institute for New Rural Development, Tianjin 300457, China)

(2. College of Food Engineering and Biotechnology Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Collagen fiber film is one of the important edible protein films, but its performance is affected by a variety of external factors. In order to improve the performance of collagen film and make it more suitable for food packaging, this study investigated the effects of different pH values (2, 3, 5, 7, 11) and different ionic strengths (0.1, 0.2, 0.3 mol/L) on the mechanical strength and microstructure of collagen fiber film. The experimental results showed that the pH had no significant impact on film thickness, whilst the tensile strength and elongation at break of the films exhibited a V-shaped change with increasing pH, with the highest tensile strength of 67.67 ± 2.57 MPa occurring at pH 2 (where smooth and uniform film surface was observed). With the increase of ionic strength, film thickness and roughness increased whilst the mechanical strength decreased significantly, along with a disrupted fiber arrangement. Compared with the dry film, the tensile strength of the wet film reduced greatly whilst the elongation at break increased considerably. In addition, the swellability of the film increased, as the ionic strength rose and the pH of the film-forming solution deviated from the isoelectric point of the collagen fiber.

Key words: collagen fiber film; mechanical properties; microstructure; dry film; wet film

胶原是细胞外基质中含量最多、分布最广且既有公共特点又有差异的一组结构蛋白质, 在结缔组织中起到支撑和保护机体的作用^[1]。胶原分子为细棒状, 在显微镜下观察胶原由原胶原按照规则平行排列成束, 形成胶原纤维, 并进一步聚集成束组成粗细不等的胶原纤维^[2]。

胶原蛋白分子由于天然紧密的分子排列以及高的

长径比 (约 200) 而具有高弹性模量和强柔韧度, 从而使胶原蛋白成为制备既有优良的机械强度又有足够延展性的生物材料的重要原料^[3]。凭借着其优良的成膜特性, 胶原纤维既能用作人工皮肤等医用膜, 也能够作为可食食品包装膜, 如可广泛应用于肉制品、油炸食品、烟熏食品、酸奶及食品配料等食品包装上^[4]。其中, 邵东旭等利用鱼鳞提取的胶原蛋白制备了复合抗菌膜并研究了其保鲜性能^[5]; 加拿大的 Barbut^[6,7]研究团队对胶原蛋白肠衣的性能进行了全面评价; 巴西研究人员以胶原纤维和胶原粉为原料成功制备了胶原蛋白膜并评价了其性能^[8]; 德国的 Oechsle^[9]等人率先研究了胶原纤维的酸溶胀机制, 以及胶原与其它蛋白的相互作用。

就理化性质而言, 胶原蛋白为聚两性电解质^[10]。

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (317719942); 天津市科技重大专项与工程项目 (17ZXHLC00010)

作者简介: 马云昊 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 动物资源开发与功能食品

通讯作者: 王稳航 (1977-), 男, 博士, 研究员, 主要从事畜、禽、水产源性蛋白质的综合利用与肉制品加工, 食品胶体与可食膜

在等电点时, 胶原蛋白分子间疏水相互作用增大, 其黏度、溶解度、电导率及膨胀作用都达到最低值; 当溶液 pH 偏离等电点时, 蛋白质分子上的正电荷或者负电荷基团将增多, 这使胶原蛋白间发生相互排斥从而增大胶原蛋白的溶解度^[11]。对于不溶性的胶原纤维, 其表现为酸碱膨胀现象, 实质为胶原肽链间的氢键、离子键以及共价键在酸碱的作用下发生破坏, 使胶原结构疏松。pH 和离子强度不同带来的溶解度以及膨胀性能的变化可能会引起膜性能改变, 从而给胶原纤维膜的实际应用带来影响。这些因素具体的影响效果与相关机制, 以及如何利用或避免这些外界条件的影响, 需要进行深入研究。

本文以牛二层皮来源的胶原纤维为成膜基料, 通过配制不同 pH 和离子强度的胶原纤维成膜液, 探讨 pH 值和离子强度对胶原纤维膜性能的影响, 同时本文也对干膜湿膜的机械性能进行比较, 以期对胶原蛋白膜的性能改善以及其应用 (如生产胶原蛋白肠衣) 提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛二层皮 (置于浓度为 10 wt% 的碱石灰中浸泡 30 d) 购于山东省淄博龙宝生物有限公司; 氯化钠、盐酸 (均为分析纯), 天津市江天化工技术有限公司; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分析纯), 天津市化学试剂三厂。

1.2 仪器与设备

测厚仪 (CH-1-ST), 上海六菱仪器厂; 紫外可见分光光度计 (SP-2102), 上海光谱仪器有限公司; 质构仪 (TA.XT.Plus), Stable Micro System, UK; 扫描电子显微镜 (SU 1510), Hitachi, Japan; 酸度计 (PH-3CW), 上海理达仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 牛皮胶原纤维的提取及其悬浮液的制备

牛皮为经碱石灰处理后的二层皮, pH 值为 12。将买回来的整张牛皮剪成 10 cm×10 cm 小块, 在蒸馏水中浸泡, 每隔 2 h 换一次水, 浸泡至 pH 为中性, 然后取出沥干浸没在 0.01 mol/L 的盐酸中, 牛皮:盐酸=1:3 (m/V), 于 20 °C 下进行充分酸溶胀 24 h。溶胀后的牛皮用镊子轻轻刮取其胶原纤维, 然后测定胶原纤维的水分含量为 94%, 即刮取的胶原纤维干物质含量为 6%。将刮取的胶原纤维用研钵磨碎, 均匀地分散在蒸馏水中, 配置成 1 wt% 的胶原纤维悬浮液, 再用

打浆机将悬浮液剪切混匀, 形成均匀的 1 wt% 悬浮液, 然后利用盐酸调节悬浮液的 pH 为 2, 并于 4 °C 冰箱中储存, 以备后期使用。

1.3.2 不同 pH 的胶原纤维膜的制备

将配制好的 1 wt% 的胶原纤维成膜液倒入聚四氟乙烯 (PFTE) 平板 (15 cm×15 cm) 进行铺膜, 随后将平板置于盛有浓度为 0.1 M 的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的密封箱中, 利用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的挥发性调节胶原纤维成膜液的 pH 值, 分别得到 pH 为 2、3、5、7、11 的成膜液。随后将不同 pH 值的成膜液置于 35 °C 鼓风干燥箱中干燥 8 h, 后将烘干后的膜从 PFTE 板中慢慢揭下, 在相对湿度为 50±1% 的干燥箱中放置 7 d 后再进行膜的性能检测。

1.3.3 不同离子强度的胶原纤维膜的制备

将 1 wt% 胶原纤维悬浮液搅拌 5 min 后, 倒入平板中进行铺膜, 置于 35 °C 鼓风干燥箱中烘干 8 h, 将样品膜从平板上慢慢揭下, 随后将干膜完全浸泡到浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液中, 10 min 后将膜轻轻取出, 烘干后检测干膜的性能。用 NaCl 处理后的干膜于室温下在蒸馏水中浸泡 20 min 后, 再进行湿膜性能的检测。

1.3.4 膜性能的测定

1.3.4.1 膜厚度

选取膜上的 4 个边缘处和中心点处, 利用测厚仪测量膜厚, 测厚仪的灵敏度为 0.003 mm, 测量范围为 0~1 mm。测量三次, 选取平均值作为膜的厚度值。

1.3.4.2 机械性能

使用质构仪检测复合膜的拉伸强度 (TS) 和断裂延伸率 (E%)。实验步骤参照了 ASTM D-882^[12] 的方法, 将膜裁剪成 6.0 cm×2.5 cm 的矩形条状, 测试参数为: 探头: A/TG; 测试速度: 1 mm/s; 初始夹距为 30 mm。每组重复三次。计算公式如下:

$$TS = \frac{F}{S} \quad (1)$$

式中: F-膜断裂时承受的最大拉力, N; S-膜的横截面积, mm^2 ; TS-拉伸强度, MPa。

$$E\% = \frac{L_1 - L_0}{L_0} * 100\% \quad (2)$$

式中: E-膜的断裂延伸率, %; L_1 -膜断裂时受力部分的长度, mm; L_0 -膜的原长, mm。

1.3.4.3 微观结构

利用电子扫描电镜 (SEM) 观察复合膜的表面和断面结构, 实验方法参照 Chen Ye^[13] 并稍作修改。加速电压为 15 kV。观察膜的横截面时, 样品膜置于液氮中进行脆断, 裁剪成 0.5 cm×0.5 cm 小块, 粘贴在导

电胶带上。所有样品膜进行喷金后在电镜下观察其微观结构。

1.3.4.4 膨胀动力学性能

根据 Wang 等人^[3]的方法检测膜的膨胀性能, 计算样品膜在室温下于蒸馏水中浸泡 1/12、1/2、1、2、3、6 h 前后膜的质量。样品膜裁剪为 5 cm×2 cm, 并称其重量为 M_w , 随后浸于蒸馏水中, 然后利用滤纸将膜表面擦干, 立即称其重量为 M_0 。每组样品重复三次。样品膜的平衡溶胀率 (ESR) 计算公式如下:

$$ESR(\%) = \frac{M_w - M_0}{M_0} * 100\% \quad (3)$$

式中: ESR-平衡溶胀率, %; M_w -浸泡前膜重量, g; M_0 -浸泡后膜重量, g。

1.3.5 统计分析

文中所有实验数据表示为“ $\bar{x} \pm s$ ”的形式。实验数据均服从显著性水平下 (P -value<0.05) 的方差分析 (ANOVA) 和平均值分析。利用统计软件 SPSS 17 进行分析。

2 结果与分析

2.1 厚度的测定

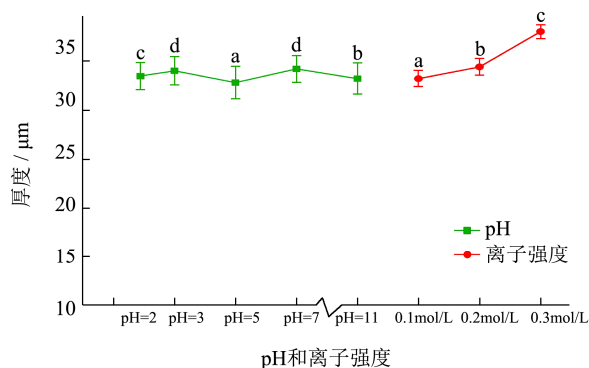


图1 不同 pH 和离子强度下胶原纤维膜的厚度

Fig.1 Thickness of collagen fiber film under various pH and ionic strength

注: a~d 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

从图 1 中可以看出, 经不同 pH 处理后的胶原纤维膜的厚度没有明显变化 ($p > 0.05$), 厚度值在 32.8±1.69~34.2±1.39 μm 之间。当 pH=2 时, 胶原纤维膜的厚度达到最大值 33.4±1.37 μm。同时, 随着离子强度的增加 (0.1~0.3 mol/L), 膜的厚度显著增加, 最高值为 38.0±0.71 μm, 这主要是因为盐浓度过高会引起盐效应作用, 部分盐离子在膜表面, 致使电解质对胶原纤维-胶原纤维间产生了电荷屏蔽作用, 从而扰乱了胶原纤维之间的有序性^[14], 从而使膜表面的粗糙度增加, 影响膜厚度。

2.2 机械性能

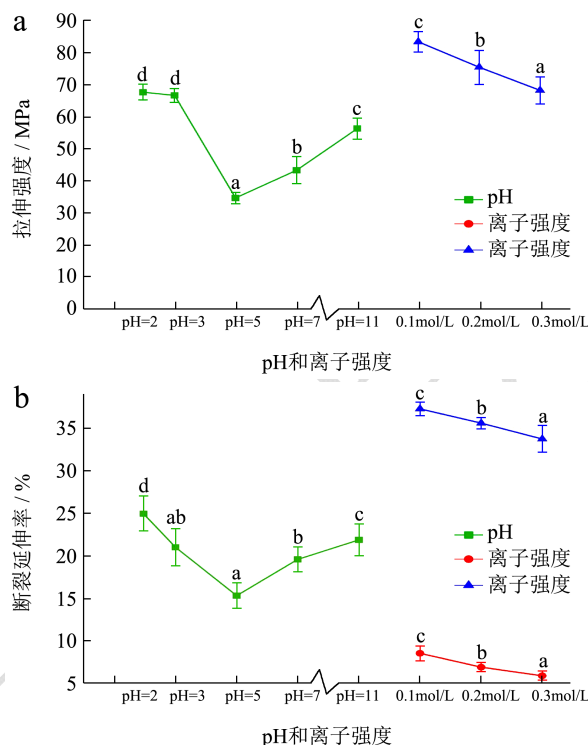


图2 不同 pH 和离子强度胶原纤维膜的拉伸强度和断裂延伸率
Fig.2 Tensile strength and elongation at break of collagen fiber film under various pH and ionic strength

注: a~d 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

从图 2 中 (a) 可以看出, 当 pH 值为 2~3 时, 胶原纤维膜的拉伸强度没有显著变化, 当 pH 为 3~5 时膜的拉伸强度显著降低 ($p < 0.05$), 最低达到 15.43±1.47 MPa; 此后随着 pH 值的增加, 拉伸强度显著性增加。值得注意的是, 当 pH=2 时, 胶原纤维的拉伸强度达到最大, 但是我们并没有选取更低 pH 成膜液进行测试, 这是因为当 pH 小于 2 时, 胶原纤维极易降解, 所成膜的稳定性得不到保障, 这对于实际应用与科学研究的意义不大。此外, 随着离子强度增加, 胶原纤维干膜和湿膜的拉伸强度均显著降低 ($p < 0.05$): 当盐浓度为 0.1 mol/L 时, 膜的拉伸强度达到最大为 83.40±3.11 MPa, 随着离子强度的增加二者均显著性下降。同时, 由图 (b) 可知, pH 对胶原纤维膜断裂延伸率的影响和其对拉伸强度的影响趋势相似, 而随着离子强度的增加干膜和湿膜断裂延伸率均显著性降低。此外, 从图 2 可以看出, 胶原纤维干膜经蒸馏水浸泡 20 min 后, 得到湿膜的拉伸强度与断裂延伸率显著性增加 ($p < 0.05$)。

这种现象可以解释为: (1) pH 影响蛋白质的结构及分子间相互作用。从牛皮中提取的胶原纤维的等电点约为 5.0~7.5^[15], 当胶原纤维处于等电点时, 整个分

子为电中性,其分子结构呈现卷曲状态,纤维之间作用力减少,此时胶原纤维膜的拉伸强度和断裂延伸率较低;当 pH 高于或低于等电点时,因胶原纤维之间的静电斥力,使分子伸展,内部基团暴露,增加分子之间交联度,促进胶原纤维膜网络结构的形成,致使拉伸强度和断裂延伸率增加。

(2) 电解质的加入增强了胶原之间的静电斥力,分子链中的基团暴露,增强了胶原纤维之间的交联作用。此外,胶原基团还会与中性盐离子结合形成离子键,增强了分子间的作用力^[16];而盐离子浓度过高,盐效应起主要作用,电解质对胶原纤维产生屏蔽作用,使纤维间的作用力降低。(3) 经蒸馏水浸泡后,胶原纤维自身含有亲水性基团(如-COOH)与水分子的作用增强,破坏了纤维与纤维之间的氢键,导致胶原纤维分子间的作用力减弱,相互之间的交联作用降低,致使湿膜与干膜相比,断裂延伸率与拉伸强度均降低。

2.3 微观结构

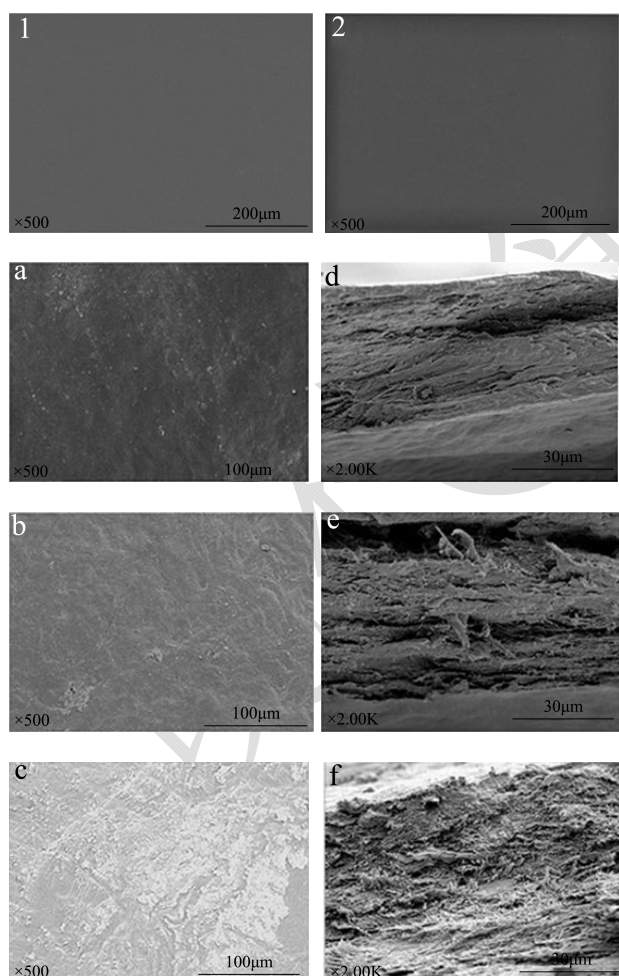


图3 胶原纤维膜表面和横断面的 SEM 图

Fig.3 SEM images of surface and cross section of collagen fibers film under different pH and ionic strength

注: 1. 为纯胶原纤维膜; 2. 为 pH=2 的胶原纤维膜; a~c 和 d~f 分别代表离子强度为 0.1, 0.2, 0.3 mol/L 的胶原纤维膜。

如图 3 所示, 纯胶原纤维膜和 pH=2 时的胶原纤维膜表面相对光滑, 质地均一, 这主要是由于胶原纤维处于等电点时, 纤维呈现出卷曲状态, 而偏离等电点时, 由于静电斥力的作用使纤维之间交联作用增强, 分子之间交织排列整齐有序。a~c 和 d~f 显示了不同钠离子强度对胶原纤维膜的表面和相应横断面微观结构的影响。从图 a~c 中可以看出, 随着钠离子强度增加, 膜表面的粗糙度显著增加。当离子强度为 0.1 mol/L 时, 膜的表面(a)光滑, 对应的横截面(d)比较致密, 胶原纤维之间相互交织排列有序; 而后随着盐离子浓度的增加, 膜表面出现凸起的纤维丝, 导致表面粗糙度增加; 当离子强度为 0.3 mol/L 时, 膜表面出现了盐析现象, 这主要是因为盐离子浓度过高 (≥ 0.2 mol/L) 时, 电解质对胶原纤维产生了电荷屏蔽作用, 导致纤维与纤维之间的静电斥力减弱, 纤维之间的相互作用力降低, 从而影响了纤维的稳定性, 纤维之间形成杂乱无序的结构(如图 f)。这也充分说明了当离子强度过高时纤维间内部结构的稳定性被破坏, 此结果也与机械强度的测定结果一致。

2.4 膨胀动力学性能

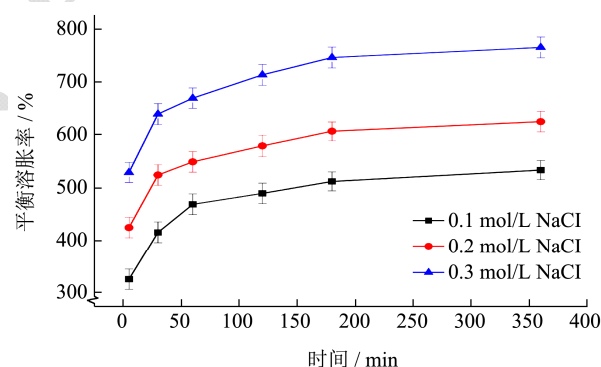


图4 离子强度对胶原纤维膜的膨胀动力学性能的影响

Fig.4 Influence of ionic strength on the swelling kinetics properties of collagen films

为了进一步研究盐浓度和成膜液的 pH 对胶原纤维膜的性能的影响, 分析了不同离子强度与不同 pH 下生成的胶原纤维膜在蒸馏水中浸泡不同时间(5、30、60、120、180 和 360 min)前后的质量比, 计算出胶原纤维膜的平衡溶胀率(ESR)。如图 4、图 5 所示, 所有的膜在蒸馏水中浸泡 30 min 内快速吸水, 膜的平衡溶胀率显著性增加, 此后吸水能力增加缓慢, 直到 360 min 后溶胀率达到平衡。

从图 4 可以看出, 随离子强度的升高, 膜的膨胀性能逐渐升高; 由图 5 可以看出, 当成膜液的 pH 在

胶原纤维等电点附近时,胶原纤维的膨胀性较小,而随着偏离等电点,胶原纤维的膨胀性逐渐升高。实际上,膜在水溶液中的膨胀性能主要依靠其分子内部的亲水基团和膜的有效交联度^[3]。当处于等电点时,胶原纤维之间分子间作用力较大,有相互聚集的趋势,所以此时膜的膨胀率相对较低;此外,在盐溶液中胶原肽链间的离子键被打开,从而吸水膨胀,致使胶原纤维与水分子间的作用力增大,导致胶原纤维间的分子作用力减少,膜的机械性能也会因此降低。这些结果与机械性能测定的结果一致。

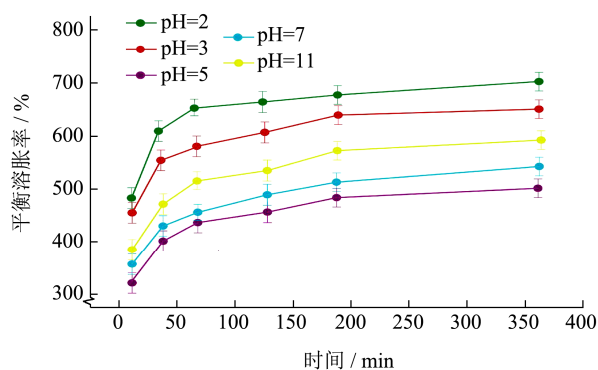


图5 成膜液 pH 对胶原纤维膜的膨胀动力学性能的影响

Fig.5 Influence of the pH of the film forming solution on the swelling kinetics properties of collagen films

3 结论

本文研究了 pH 和离子强度对胶原纤维膜性能影响。研究表明,在酸性及低离子强度条件下胶原纤维膜展现出较好机械性能。pH 对胶原纤维膜厚度没有显著影响,当 pH 值偏离等电点越远,膜的机械性能越高,微观结构显示等电点时膜表面光滑,高于或低于等电点时膜比较粗糙。随着离子强度增加,膜的厚度显著性增加,且无论干膜还是湿膜,膜机械性能均随着离子强度增加而显著降低,与干膜相比,所有湿膜的拉伸强度均发生巨大降低,而断裂延伸率却大幅度增加;此外,膨胀性能随离子强度及成膜液偏离等电点程度增加而增加。综上所述,适当低成膜液离子强度以及低 pH 有利胶原纤维膜性能增强,这于胶原纤维膜在食品可食性包装等方面的应用具有指导作用。

参考文献

- [1] Zhang M, Wang J, Xu W, et al. The mechanical property of Rana chensinensis skin collagen/poly(L-lactide) fibrous membrane [J]. Materials Letters, 2015, 139: 467-70
- [2] 柯蕾芬,白海英.鹿茸多肽药理作用的研究进展[J].吉林医药学院学报,2013,34(2):138-140
KE Lei-fen, BAI Hai-ying. Research progress of

- pharmacological action of antler polypeptide [J]. Journal of Jilin Medical College, 2013, 34(2): 138-140
- [3] Wang W, Zhang Y, Ye R, et al. Physical crosslinkings of edible collagen casing [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 920
- [4] 陈达佳.胶原蛋白-壳聚糖可食用复合膜的制备、改性及应用[D].南昌:江西科技师范大学,2014
CHEN Da-jia. Preparation, modification and application of collagen-chitosan edible composite membrane [D]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Normal University, 2014
- [5] 邵东旭,王卉,裴志胜,等.鱼鳞胶原蛋白复合抗菌膜对罗非鱼肉的保鲜效果[J].包装工程,2016,23:73-77
SHAO Dong-xu, WANG Hui, PEI Zhi-sheng, et al. Tilapia preservation by composite antibacterial film with fish-scale collagen [J]. Packaging Engineering, 2016, 23: 73-77
- [6] Harper B A, Barbut S, Lim L T, et al. Microstructural and textural investigation of various manufactured collagen sausage casings [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 494-500
- [7] Barbut S, Wood J, Marangoni A. Potential use of organogels to replace animal fat in comminuted meat products [J]. Meat Science, 2016, 122: 155-162
- [8] Wolf K L, Sobral P J A, Telis V R N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(7): 1886-1894
- [9] Oechsle A M, Häupler M, Weigel F, et al. Modulation of extruded collagen films by the addition of co-gelling proteins [J]. Journal of Food Engineering, 2016, 171: 164-73
- [10] 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 [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006
- [11] Benmouna F, Johannsmann D. Viscoelasticity of gelatin surfaces probed by AFM noise analysis [J]. Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids, 2004, 20(1): 188-193
- [12] Kanmani P, Rhim J W. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35(3): 644-652
- [13] Chen Y, Ye R, Luo Y, et al. Novel blasting extrusion processing improved the physicochemical properties of soluble dietary fiber from soybean residue and *in vivo* evaluation [J]. Journal of Food Engineering, 2014, 120(1): 1-8

- [14] Dong X M, Kimura T, Revol J F, et al. Effects of ionic strength on the isotropic-chiral nematic phase transition of suspensions of cellulose crystallites [J]. *Langmuir*, 1996, 12(8): 2076-2082
- [15] 程海明,王磊,王睿,等.Zeta 电位法测定胶原及其降解物的等电点[J].*皮革科学与工程*,2006,16(6):40-43
CHENG Hai-ming, WANG Lei, WANG Rui, et al. Determination of isoelectric point of collagen and its degradation products by Zeta potential method [J]. *Leather Science and Engineering*, 2006, 16(6): 40-43
- [16] Sagou J P, Ahualli S, Thomas F, et al. Influence of ionic strength and polyelectrolyte concentration on the electrical conductivity of suspensions of soft colloidal polysaccharides [J]. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2015, 59: 212