

外切型蛋白酶法制备高档医用骨明胶工艺研究^{*}

张海林 朱友双 张玉然[△] 仇艳新 吴 红 杨志茹
(济宁医学院生物科学学院,日照 276826)

摘 要 **目的** 探讨外切型蛋白酶法制备骨明胶的可行性及其制备条件的优化。**方法** 以骨明胶的黏度、冻力、提胶率为参考指标,分别对浸酸终点 pH、复合蛋白酶配方、酶解时间等参数进行优化,确定骨明胶最佳制备条件。**结果** 最佳条件下,浸酸终点 pH 2.0,风味蛋白酶与 2709 蛋白酶质量比 8:2,酶解时间 20 h 时,所获骨明胶平均冻力为 337 Bloom·g,黏度为 6.52 mPa·S,提胶率为 15.3%。**结论** 该法酶解终点易判断,节省了制备时间,同时大幅提高明胶黏度及冻力,可获得符合国家标准的高档医用骨明胶,为后续生物酶法制备高档骨明胶的工业化应用奠定基础。

关键词 骨明胶;优化;复合蛋白酶;提取

中图分类号:Q63 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)12-381-04

Study on extraction of high-grade medical bone gelatin by circumscribed protease

ZHANG Hailin, ZHU Youshuang, ZHANG Yuran[△], QIU Yanxin, WU Hong, YANG Zhiru
(College of Biological Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To optimize extraction conditions for high-grade medical gelatin by circumscribed protease. **Methods** In order to obtain the optimal viscosity, gel strength and yield, the composition of protease, pH and enzymolysis time for gelatin preparation were optimized. **Results** Optimum variables were the weight ratio of 8:2 between flavourzyme and 2709 protease, pH of 2.0 and enzymolysis time of 20 h. Under this condition, the average gel strength, viscosity and yield were 337 Bloom·g, 6.52 mPa·S and 15.3%, respectively. **Conclusion** The end point of this protocol was easily identified. Moreover, the viscosity and gel strength were significantly improved. This protocol will lay the foundation for the industrial application.

Keywords: Bone Gelatin; Optimization; Compound protease; Extraction

骨明胶是一种高分子量的聚合物,主要从部分水解的骨头胶原物质中提取获得^[1-2],广泛应用于食品及医药行业,可用于心脏瓣膜、角膜、肌腱等软组织的替代物^[3-4]。目前骨明胶的制备工艺主要有传统的浸灰工艺和现代生物酶法工艺。传统的浸灰工艺因存在好胶率低、能耗大、耗水量大等缺点,逐渐被淘汰^[5]。与传统浸灰工艺相比,生物酶法工艺因具有明胶质量高、生产周期短(2~3d)、吨

明胶耗水量低等优势,备受青睐^[6]。

影响生物酶法制备骨明胶的关键因素为生物酶的种类,已报道的生物酶法工艺中多采用内切型蛋白酶^[7-8]。但该酶作用于骨素(骨粉浸酸脱除矿物质后的物质)时,酶解速度过快,酶解终点不易判定,导致所获骨明胶黏度较低^[9]。

本文拟采用以外切型蛋白酶为主的复合型蛋白酶对骨粉进行酶解,并对骨明胶制备过程中的浸酸终点 pH、复合酶蛋白酶配方、酶解时间进行优化,确定优质骨明胶的制备方法,以期解决生物酶法制备骨明胶过程中存在的缺陷和不足,实现高档医用骨明胶的清洁生产。

^{*} [基金项目] 山东省自然科学基金博士基金项目(ZR2017BC044);山东省中医药科技发展计划项目(2017-270);国家自然(社会)科学基金培育项目(600327002)

[△] [通信作者] 张玉然, E-mail: todrzhang666@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 原料与试剂 30~150 目骨粉购于漯河市五龙明胶有限公司;外切型蛋白酶(风味蛋白酶,2 万 U/g)购于诺维信(中国)生物技术有限公司;内切型蛋白酶(2709 蛋白酶,2 万 U/g)购于无锡杰仁生物科技有限公司。

1.1.2 仪器 搅拌器(上海析域仪器设备有限公司);明胶冻力测试仪(天津创兴电子设备制造有限公司);明胶勃式黏度测试仪(天津创兴电子设备制造有限公司);明胶透明度测试仪(天津创兴电子设备制造有限公司);LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司);TSK-GEL G2000 SWXL 色谱柱(300mm×7.8mm,5 μ m)(上海东曹生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 骨粉浸酸终点 pH 优化 骨粉与水按质量比 1:5 混合,搅拌至悬浮状态,将质量分数为 15% 的盐酸以缓慢滴加的方式加入骨粉悬浊液中。第 1 次浸酸,pH 控制在 3.5~4.0,浸酸后清洗;第 2 次浸酸,pH 控制在 3.0~3.5,浸酸后清洗;第 3 次浸酸 pH(浸酸终点)分别控制在 pH 0.5(3% HCl)、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0,测定 Ca^{2+} 残留率和明胶黏度,优化浸酸终点 pH 控制。整个梯段滴滤浸酸过程中,水温控制为 20℃。对照组亦为 3 次浸酸,每次按骨粉与 3% 盐酸质量比 1:5 混合,搅拌作用 2 h 后清洗,再进行下一次浸酸。

1.2.2 复合蛋白酶配方优化 将骨素(浸酸脱矿后的骨粉)按照质量比 1:2 加水,调节 pH 10.0,分别加入 0.2% 的不同组分的复合蛋白酶(风味蛋白酶、2709 蛋白酶质量比分别为 9:1、8:2、7:3),于 22℃ 酶解 22 h,后调节 pH 2.0,维持 3h 完成灭酶。清洗后按照质量比 1:2 加水,70℃ 水浴提胶 3 h,测定所获骨明胶的黏度、冻力、提交率。

1.2.3 酶解时间优化 将浸酸脱矿后的骨粉按照质量比 1:2 加水,调节 pH 10.0,添加 0.2% 优化后的最佳复合蛋白酶,于 22℃ 分别酶解 16、18、20、22、14、30、36 h,后调节 pH 2.0,维持 3h 完成灭酶。清洗后按照质量比 1:2 加水,70℃ 水浴提胶 3 h,测定所获骨明胶的黏度、冻力、提交率。

1.2.4 明胶的絮凝澄清 在连续搅拌的条件下,将 0.1% 阳离子聚丙烯酰胺溶液加入至(65±

1)℃ 的明胶溶液中,直至明胶溶液清澈。

1.2.5 干明胶的制备 将明胶溶液置于 4℃ 冰箱,待其凝固成型后,切成细条状,于 -20℃ 冷冻过夜,后将其浸没于 95% 乙醇溶液中,30 min 后取出拧干,转移至 30℃ 烘箱内干燥 5~6 h,得到水分小于 14% 的干明胶。

$$\text{提胶率} = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%$$

m_1 为干明胶质量; m_2 为骨粉的总质量。

1.2.6 分析方法 1) 明胶相对分子质量测定。色谱柱 TSK-GEL G2000 SWXL(300 mm×7.8 mm, 5 μ m);流动相为乙腈、水和三氟乙酸(15:85:0.1, V/V);流速 0.6 ml/min;柱温 30℃;进样体积 20 μ l;检测波长 220 nm。2) 明胶冻力、勃式黏度、透明度测定参照医用明胶轻工部行业标准(QB2354-2005)。3) 酶解中氨基酸测定^[10]。4) Ca^{2+} 残余率的测定。分别称取一定质量的骨粉和完成梯度滴滤浸酸的骨粉,清洗数次,按照重量 1:5 加入 10% 浓盐酸,浸泡 24 h,按 GB/T 7476-1987 钙离子 EDTA 滴定法测定溶液中 Ca^{2+} 的浓度,并计算 Ca^{2+} 的残余率。

$$\text{Ca}^{2+} \text{ 残余率} = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%$$

m_1 为完成浸酸后骨粉含有的 Ca^{2+} 的质量; m_2 为浸酸前骨粉含有的 Ca^{2+} 的质量。

2 结果和讨论

2.1 梯度滴滤浸酸终点 pH 对骨粉脱矿效果以及明胶黏度的影响

采用骨粉替代 2~5cm 骨粒,结合梯度滴滤浸酸的工艺,探讨较高 pH 环境下是否可以完成骨粉的浸酸脱矿物质(Ca^{2+}),以期减少低 pH 条件下对骨粉中胶原分子的破坏,提高明胶黏度。

对照组中骨素 Ca^{2+} 残余率为 4.94%;梯度滴滤浸酸终点 pH<2.0 时,骨素中 Ca^{2+} 残余率随浸酸终点 pH 变化较小;梯度滴滤浸酸终点 pH>2.0 时,骨素中 Ca^{2+} 残余率则大幅增加。对不同 pH 下浸酸获得的骨素进行酶解后提胶,浸酸终点 pH<2.0 时,明胶黏度随浸酸终点 pH 的升高而大幅提高;浸酸终点 pH>2.0 时,明胶黏度随着浸酸终点 pH 的升高而差异较小。综合考虑骨粉脱矿效率及所提明胶黏度差异,选择梯度滴滤浸酸最佳终点 pH2.0。见图 1。

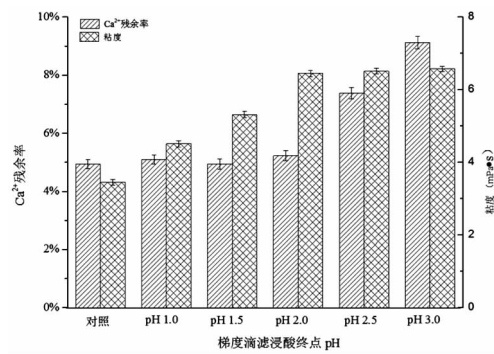


图 1 浸酸终点 pH 对骨粉脱矿效率及明胶黏度的影响

2.2 不同组分的复合蛋白酶对明胶质量的影响

使用外切型风味蛋白酶对骨素进行酶解,测定酶解过程中氨基酸含量和 pH 值的变化。见图 2。

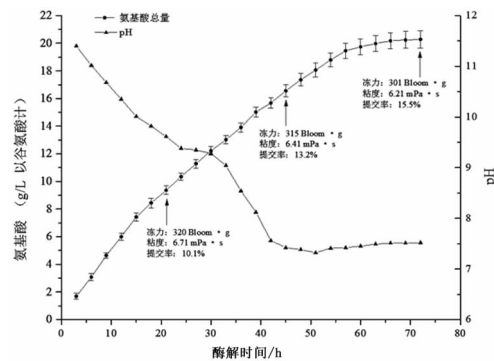


图 2 酶解过程中 pH 和氨基酸含量变化过程

随着酶解的进行,溶液中氨基酸总量不断增加,当氨基酸含量达到最大值时,提胶率达到最高,酶解液中氨基酸的含量可作为判断酶解程度的重要依据(图 2)。单纯采用风味蛋白酶酶解骨素,酶解速度较慢,耗时较长(约 70 h)。同时,当酶解至 30 h 时,酶解液中开始滋生微生物,有异味,酶解液 pH 随之急剧下降。而通过增加风味蛋白酶的用量并不能有效地缩短酶解时间。见图 3。

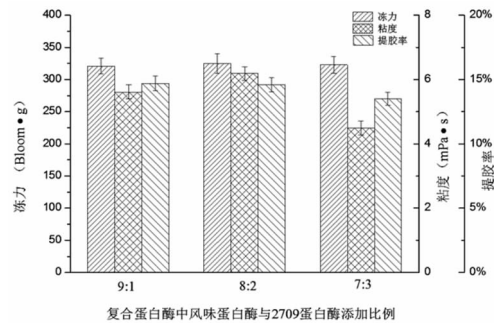


图 3 不同组分的复合蛋白酶对明胶提取质量的影响

风味蛋白酶中添加少量内切型 2709 蛋白酶构

成复合型蛋白酶,于 22 ℃ 酶解骨素 22 h。随着 2709 蛋白酶添加比例的增加,制备的明胶冻力差别较小,提胶率小幅降低,而明胶黏度显著降低,风味蛋白酶与 2709 蛋白酶质量比为 8:2 时所提明胶的综合质量最佳,该条件下所提明胶的冻力和黏度均不低于单独使用外切型风味蛋白酶时的结果,且酶解时间由原来的 70h 缩短为 22h。见图 3。

2.3 酶解时间对明胶质量的影响

测定不同酶解时间下所提明胶的冻力、黏度、提胶率。见表 1。

表 1 酶解时间对明胶质量的影响				
酶解时间 /h	氨基酸含量 /g · L ⁻¹	冻力 /Bloom · g	黏度 /mPa · s	提胶率 /%
16	18.52 ± 0.51	331 ± 4	6.57 ± 0.31	12.8
18	20.22 ± 0.56	333 ± 3	6.49 ± 0.42	14.7
20	21.01 ± 0.57	337 ± 3	6.52 ± 0.47	15.3
22	21.23 ± 0.49	330 ± 3	6.48 ± 0.36	15.7
24	21.31 ± 0.63	335 ± 4	6.47 ± 0.49	15.4
30	22.15 ± 0.71	327 ± 2	6.01 ± 0.42	15.2
36	22.78 ± 0.65	325 ± 3	5.52 ± 0.33	15.1

酶解 20 h 时,明胶的冻力、黏度最佳;酶解 24 h 时,明胶的冻力、黏度降幅均在 1% 以内,差异不大。20 h 时的提胶率也仅比 22 h 最高时降低 2.5%。酶解时间超过 30 h 时,明胶的冻力、黏度及提胶率均降低。综合考虑明胶质量及生产成本因素,后续实验选择酶解时间为 20 h。

2.4 所提明胶的相对分子质量分布

经工艺优化后,所提明胶的透明度 > 400mm,对其相对分子质量分布进行测定。见表 2。

表 2 所提明胶的相对分子质量分布			
组分	相对分子质量分布 (Da/万)	保留时间 /min	峰面积 /%
Microgel 组分	> 30	11.342	16.83
Gamma 组分	20 ~ 30	13.050	22.74
Beta 组分	10 ~ 20	13.264	13.00
Alpha 组分	5 ~ 10	15.230	32.35
亚 Alpha 组分	2 ~ 5	16.596	6.67
小分子短肽	≤ 2	19.704	8.09

实验结果显示,所制备的明胶分子中 Alpha 组分占 32.35%,为主要组分。相对分子质量 > 10 万的组分,占 52.57%,而相对分子质量 < 5 万的亚 Alpha 和小分子短肽组分比例较小,仅占 14.76%。由此可知,该法制备明胶的过程中,复合蛋白酶没有过度降解骨素,克服了所提明(下转第 387 页)

- [4] 赵肖通,解军波,潘炳成,等. 响应面分析法优化姬松茸多糖的脱色工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9):207-212. DOI: 10. 13386/j. issn1002-0306. 2016. 09. 032.
- [5] 龚敏,赵德前,孙慧洁. 大孔吸附树脂对药桑多糖的脱色及抗氧化活性影响[J]. 中国农学通报, 2016, 32(33):147-150.
- [6] 蒋俊,杨焱,乔彦茹. 猴头菌多糖脱色前后理化性质

及生物活性的研究[J]. 菌物学报, 2014, 33(1):78-86. DOI:10. 13346/j. mycosystema. 120274.

- [7] 肖平,陈建伟,陈亚运,等. 板蓝根多糖活性炭脱色工艺及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(12):2041-2045. DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2014. 12. 028.

(收稿日期 2017-12-1)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 383 页)胶相对分子质量偏低、黏度不高的缺陷。

3 结论

外切型蛋白酶从胶原纤维肽链外端逐一切除氨基酸,在具备较强的水解胶原纤维之间交联键能力的同时,对胶原纤维内部纤维肽键的损伤亦较小,可弥补内切型蛋白酶酶解速度过快而导致所提骨明胶黏度低的难题。本文采用骨粉代替骨粒进行梯度滴滤浸酸,能有效地将浸酸终点 pH 提高至 2.0,所提骨明胶的黏度提高了 90.4%,避免了低 pH 对胶原的破坏。组合使用外切型风味蛋白酶与内切型 2709 蛋白酶酶解骨素,在可保持明胶高黏度的条件下,有效地将酶解时间缩短为 20 h。最佳工艺条件下,所提明胶的冻力 337 Bloom · g,黏度 6.52 mPa · S,提交率为 15.3%,透明度 >400 mm,相对分子质量 >10 万的组分占 52.57%,明胶质量达到高档医用骨明胶国家标准,为后续生物酶法制备高档骨明胶的工业化应用奠定基础。

参考文献:

- [1] Duan R, Zhang J, Liu L, et al. The functional properties and application of gelatin derived from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Food Chem, 2018, 239:464-469. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2017. 06. 145.
- [2] Sompie M, Surtijono SE, Pontoh JHW, et al. The effects of acetic acid concentration and extraction temperature on physical and chemical properties of pigskin gelatin [J]. Procedia Food Sci, 2015, 3(3):383-388. DOI: 10. 1016/j. profoo. 2015. 01. 042

- [3] Tu ZC, Huang T, Wang H, et al. Physico-chemical properties of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scales by ultrasound-assisted extraction [J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(4):2166-2174. DOI: 10. 1007/s13197-013-1239-9.

- [4] Sinthusamran S, Benjakul S, Kishimura H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions [J]. Food Chem, 2014, 152:276-284. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2013. 11. 109.

- [5] 吕林刚. 骨制磷酸氢钙的生产[J]. 明胶科学与技术, 2008(1):9-11.

- [6] Zhang F, Xu S, Wang Z. Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales [J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(3):185-193. DOI: 10. 1016/j. flbp. 2010. 05. 003.

- [7] Fan H, Dumont MJ, Simpson BK. Extraction of gelatin from salmon (*Salmo salar*) fish skin using trypsin-aided process: optimization by Plackett-Burman and response surface methodological approaches [J]. J Food Sci Technol, 2017, 54(12):4000-4008. DOI: 10. 1007/s13197-017-2864-5.

- [8] 张锋,施辉阳,张鹏. 酶法制备明胶的新工艺研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2003, 30(1):9-12.

- [9] 张兵,史京京,王颖,等. 酸预处理对酶法骨明胶功能性质和分子质量分布的影响[J]. 影像科学与光化学, 2012, 30(2):102-109.

- [10] 杨远帆,倪辉,吴黎明. 茚三酮法测定蜂蜜及果葡糖浆中的氨基酸含量[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2):171-176.

(收稿日期 2018-06-05)

(本文编辑:石俊强)