

猪跟腱胶原蛋白海绵的制备

刘迪¹, 王利强^{1,2}, 任莹¹

(1.江南大学, 无锡 214122; 2.江苏省食品先进制造装备技术重点实验室, 无锡 214122)

摘要: **目的** 为了更好利用猪跟腱资源, 提高其附加值及拓宽胶原在包装方面的应用, 探讨猪跟腱胶原蛋白海绵的制备及该海绵对乙醇的吸附作用。**方法** 采用单因素实验考察猪跟腱胶原蛋白浓度、甘油含量、浇注厚度对力学性能的影响, 并考察海绵孔隙率和时间对乙醇吸附性能的影响。**结果** 当胶原的质量分数为1%, 甘油的质量分数为0.6%, 浇注厚度为5 mm时, 制备的海绵抗张强度为210.91 kPa, 断裂伸长率为6.98%, 此工艺条件下制备的海绵孔隙率为91.19%, 30 d乙醇吸附量为416.32 mg/g, 吸附量与海绵的孔隙率成正相关。**结论** 猪跟腱胶原蛋白在此工艺下制备的海绵比其他动物胶原蛋白海绵的抗张强度高, 且对乙醇具有吸附作用。

关键词: 猪跟腱; 胶原蛋白海绵; 气体吸附; 乙醇

中图分类号: TS206 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2017)13-0096-06

Preparation of Collagen Sponge from Pig's Tendon

LIU Di¹, WANG Li-qiang^{1,2}, REN Ying¹

(1.Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2.Jiangsu Key Laboratory of Advanced Food Manufacturing Equipment & Technology, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: The work aims to make better use of the resource of pig's tendons to improve the added value and widen the application of collagen in packaging, and study the preparation of collagen sponge from pig's tendon and its adsorption performance for ethanol. Through the single factor experiment, the effects of concentration of collagen from pig's tendons, glycerol content and casting thickness on the mechanical properties were studied. Then, the effects of sponge porosity and time on the adsorption performance for ethanol were studied. When the mass fractions of collagen and glycerol were respectively 1% and 0.6% and the casting thickness was 5 mm, the tensile strength of sponge prepared was 210.91 kPa and the elongation at break was 6.98%, the porosity of sponge prepared under such technological conditions was 91.19%, and the adsorption quantity for ethanol was 416.32 mg/g at 30 d. Besides, the adsorption quantity was positively correlated with the porosity of the sponge. The tensile strength of collagen sponge from pig's tendon prepared under such technological conditions is higher than that of other animals, and the sponge has the adsorption effect on ethanol.

KEY WORDS: pig's tendon; collagen sponge; gas adsorption; ethanol

哺乳动物体内胶原占蛋白总质量 25%~30%^[1], 蛋白分子主要存在于结缔组织(骨骼、皮肤、肌腱等)中, 起支撑器官、保护基体作用^[2]。胶原蛋白独特的三股螺旋结构使它具有众多优越性能^[3]。国内外有关胶原蛋白海绵工艺的研究其胶原来源大多是牛跟腱^[4]、

牛骨^[5]、鼠尾腱^[6]、鱼类^[7]等, 制备的胶原蛋白海绵力学性能差, 应用范围局限在止血、治愈伤口等医药领域^[8-10], 胶原膜或肠衣已应用在包装材料中^[11]。海绵是一种立体性多孔材料, 且气体吸附性与孔径有关, 目前并无海绵对气体吸附研究的相关报道, 故提高胶原

收稿日期: 2017-01-03

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP21115); 2014 江苏省研究生实践创新项目(1075210232141410); 江苏省 2015 年度普通高校研究生科研创新计划(KYLX15_1186)

作者简介: 刘迪(1990—), 男, 江南大学硕士生, 主攻食品包装技术。

通讯作者: 王利强(1977—), 男, 博士, 江南大学副教授, 主要研究方向为食品包装技术。

蛋白海绵力学性能并研究其气体吸附性是有必要的。胶原分子中含有大量极性键,对乙醇等极性小分子有吸附作用,果蔬贮藏的过程中会产生乙醇,且含量逐渐增加,低含量乙醇对果实具有保鲜作用^[12-13],乙醇含量过量会引起腐败^[14]。文中采用猪跟腱提取的胶原蛋白制备海绵,研究其在果蔬包装中对乙醇的吸附作用。

1 实验

1.1 材料与试剂

材料与试剂:猪跟腱、透析袋(相对分子质量8000~14 000)、乙酸(AR)、甘油(AR)、石油醚(AR, 30~60℃)、胃蛋白酶(BR, 酶活力 ≥ 1200 U/g)。

1.2 仪器与设备

实验仪器:低速台式大容量离心机RJ-TDL-50A(无锡瑞江分析仪器有限公司)、磁力加热搅拌器SZCL-30(上海标本模型厂)、SCIENTZ-50F冷冻干燥机(宁波新芝)、恒温恒湿干燥箱KTHA-015TBS(昆山庆声电子科技有限公司)。分析仪器:布鲁克红外光谱仪ALPHA(布鲁克光谱仪器公司)、万能电子材料实验机LRXplus(英国LLOYD公司)、Q500热重分析仪TGA(美国TA仪器公司)、JSM-5600LV场发射扫描电子显微镜(日本JEOL公司)。

1.3 方法

1.3.1 胶原蛋白海绵制备工艺

提取蛋白,加入一定甘油,磁力搅拌转速为100 r/min,搅拌均匀,浇注进培养皿。置于冷冻干燥机中,在-80℃预冻24 h,设置温度曲线为-80℃,2 h后抽真空,以5℃/h的速率增至35℃,恒温15 h,得胶原蛋白海绵。

1)猪跟腱胶原蛋白提取。猪跟腱颗粒35℃水浴循环脱脂3 h,25℃水浴,加入胃蛋白酶250 μg后,在pH为1.6,料液比(g/mL)为1:20的条件下,提取25 h得胶原粗溶液,经灭酶、透析浓缩、冷冻干燥得蛋白固体粉末。

2)纯胶原蛋白海绵制备。配制质量分数为0.5%,1%,1.5%,2%,2.5%的胶原溶液,浇注厚度为5 mm。

3)胶原蛋白/甘油复合海绵制备。质量分数1%的胶原溶液中加入质量分数0.2%,0.4%,0.6%,0.8%,1%的甘油,浇注厚度为5 mm。

4)不同浇注厚度胶原蛋白/甘油复合海绵制备。在质量分数1%胶原溶液中加入质量分数0.6%甘油,浇注厚度分别为2,4,6,8,10 mm。

1.3.2 I型胶原蛋白鉴定

1)I型胶原蛋白紫外吸收光谱鉴定。将猪跟腱胶原蛋白溶于浓度为0.5 mol/L乙酸溶液,没有添加

猪跟腱胶原蛋白的原乙酸溶液作为空白对照组,波长范围为190~390 nm。

2)I型胶原蛋白傅里叶变换红外图谱。市售Sigma I型蛋白与提取的蛋白样品分别加入适量溴化钾,进行扫描,范围为500~4000 cm⁻¹。

1.3.3 胶原蛋白海绵理化性质

质量分数1%的胶原溶液和质量分数0.6%的甘油,浇注厚度5 mm,制备海绵样品进行理化性质分析。

1)胶原蛋白海绵机械强度测试。制备海绵样品:15 mm×70 mm。测试条件:夹距为50 mm,拉伸速度为10 mm/min,每组试样3个平行。抗张强度可由式(1)计算得出。

$$\sigma = \frac{p}{bd} \times 1000 \quad (1)$$

式中: p 为最大载荷(N); b 为试样宽度(mm); d 为试样厚度(mm); σ 为试样抗张强度(kPa)。

2)孔隙率测定。取50 mL无水乙醇,倒入烧杯中,质量记 m_1 ,称取烘干的海绵,质量记 m_0 ,试样浸于乙醇中,封口静置24 h,将烧杯中50 mL刻度线以上的乙醇吸去,质量记 m_2 ,将海绵取出称量剩余乙醇、烧杯总质量为 m_3 。孔隙率 K 由式(2)计算得出。

$$K = \frac{m_2 - m_3 - m_0}{m_1 - m_3} \times 100\% \quad (2)$$

3)热重分析(TGA)。温度设置为30~500℃,升温速度为20℃/min,氮气流量为40 mL/min。

4)傅里叶变换红外图谱。海绵样品粉末加入适量溴化钾,进行扫描,范围为500~4000 cm⁻¹。

5)扫描电镜测试。将海绵样品固定在导电胶上,喷金后在扫描电镜上进行表面形貌分析。

6)乙醇吸附。将裁剪的海绵置于50℃下干燥至质量不变,并称量干燥后海绵质量。量取25 mL无水乙醇,将试样和乙醇放置于密闭容器中,遮光条件下放入25℃恒温恒湿干燥箱中,固定时间称质量,同时做空白对照实验(相同质量海绵不放乙醇)。吸附量 Q (mg/g)由式(3)计算得出。

$$Q = \frac{m_i - m_0}{m_0} \times 1000 \quad (3)$$

式中: m_i 为第 i 天试样的质量(g), i 为1,2,3,5,10,15,30; m_0 为试样初始质量(g)。

2 结果与讨论

2.1 I型胶原蛋白鉴定

胶原成膜性好,而胶原变性产物其分子的三螺旋结构部分或彻底松开,成膜性差^[1],因此要鉴定提取的蛋白是否为I型胶原。如图1所示,280 nm处无明显吸收峰,220 nm处有最大吸收峰,无杂峰,可初步判定蛋白纯度较高^[15]。图2中蛋白样品红外与标准

蛋白样品红外比较吸收峰基本一致。1203~1381 cm^{-1} 吸收峰表明胶原蛋白螺旋结构完整^[15]。红外特征图谱进一步表明,提取的猪跟腱胶原蛋白为 I 型胶原蛋白,且结构完整。

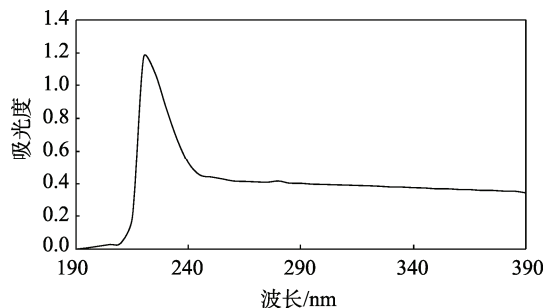


图1 猪跟腱 I 型胶原蛋白紫外吸收光谱

Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum type I collagen from pig's tendon

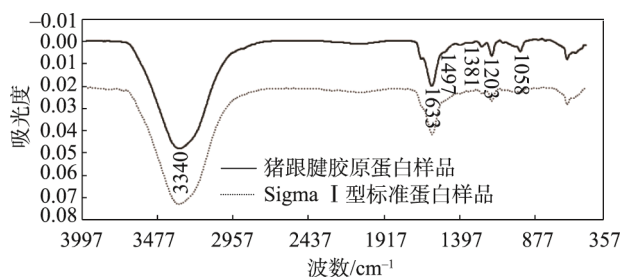


图2 Sigma I 型标准蛋白与胶原蛋白样品红外光谱

Fig.2 Infrared spectra of type I collagen standard (Sigma) and collagen from pig's tendon

2.2 胶原蛋白海绵制备

2.2.1 纯胶原蛋白海绵制备

质量分数为 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% 的蛋白溶液所制备的胶原蛋白海绵见图 3。发现质量分数为 0.5% 时,海绵较脆不能成型;质量分数为 1% 时,表面完整无裂纹、较脆,不能测试其力学性能;质量分数为 1.5, 2%, 2.5% 时都呈现不同程度的裂纹。故选较理想的质量分数为 1% 胶原进行改性。

2.2.2 甘油含量对蛋白海绵力学性能影响

由图 3 可知,纯胶原制备的海绵力学性能差,需加入增塑剂改善,文中选用甘油。图 4 所示添加甘油明显改善了海绵力学性能,甘油质量分数为 0.6% 抗张强度最大。断裂伸率先平缓上升,甘油质量分数为 0.6% 后急剧上升。力学性能在甘油量质量分数大于 0.6% 后转折是因甘油质量分数过高时,海绵有略微粘性导致海绵微湿,且烘不干,拉伸时易拉丝,导致抗张强度减小、断裂伸长率急剧增大。故选择添加质量分数为 0.6% 的甘油。

2.2.3 浇注厚度对胶原蛋白/甘油复合海绵力学性能影响

由图 5 可知,浇注厚度过低,海绵厚度过薄;浇

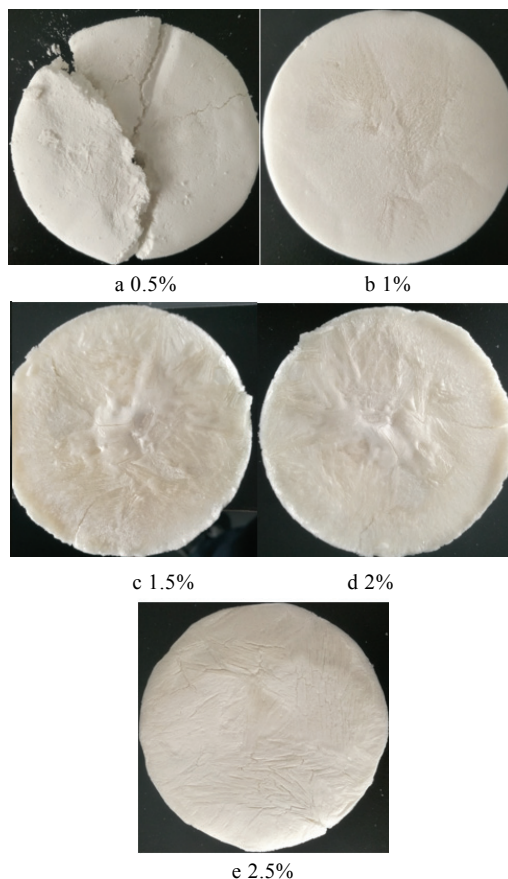


图3 不同浓度胶原蛋白制备海绵

Fig.3 Collagen sponge at different concentrations

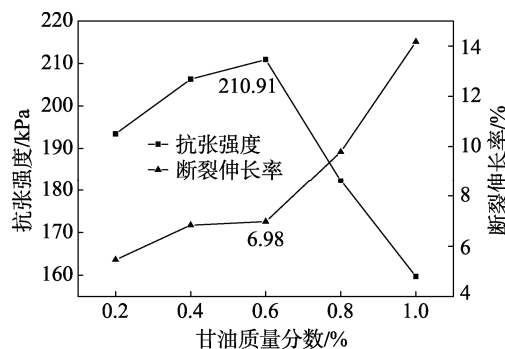


图4 甘油质量分数对海绵力学性能影响

Fig.4 Effect of glycerol contents on mechanical properties of sponge

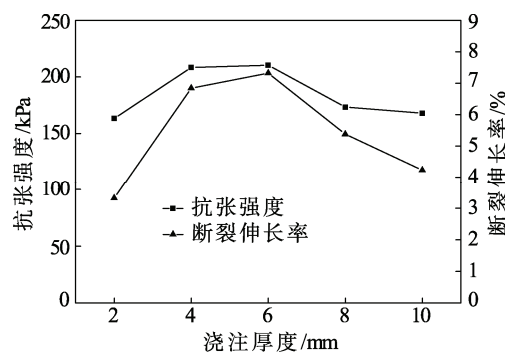


图5 浇注厚度对胶原蛋白/甘油复合海绵力学性能影响

Fig.5 Effect of thickness on mechanical properties of collagen/glycerinum composite sponge

注厚底过高,海绵过于疏松,力学性能均降低。浇注厚度为 4~6 mm 时,力学性能明显增加,故浇注厚度为 4~6 mm 均可。实验采用浇注厚度为 5 mm,结合图 4 可知,较佳工艺条件制备的海绵抗张强度为 210.91 kPa,断裂伸长率为 6.98%。此工艺制备的海绵比何兰^[5]的牛骨胶原海绵、王海波^[16]的草鱼皮胶原海绵抗张强度均高。

2.3 胶原蛋白/甘油复合海绵表征

海绵日常使用时不会超过 100 ℃,通过热重分析,考察应用条件。由图 6 可知,存在 2 次质量损失过程,起初质量损失在 100 ℃ 以下,主要因水分挥发,包括游离水、吸附水、结晶水等。第 2 次质量损失在 320~450 ℃ 时,是材料本身热降解并气化的过程,因此可以在日常环境中进行储存与使用。如图 7 所示,3334 cm^{-1} 出现的吸收峰是酰胺 A 带 N-H 伸缩振动(氢键),表明海绵中胶原分子依旧存在三股螺旋结构^[15],且 1450~1203 cm^{-1} 出现吸收峰表明三股螺旋结构完整,可能是由于甘油及其他物质的混入使得峰值发生了一些偏移。红外光谱表明制备工艺没有破坏分子结构。

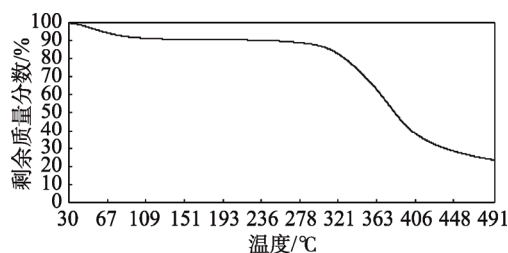


图 6 复合海绵 TG 图

Fig.6 Thermogravimetric analysis of composite sponge

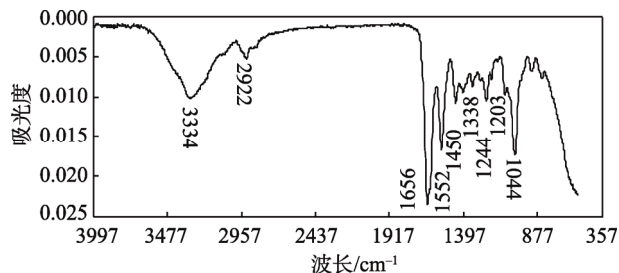


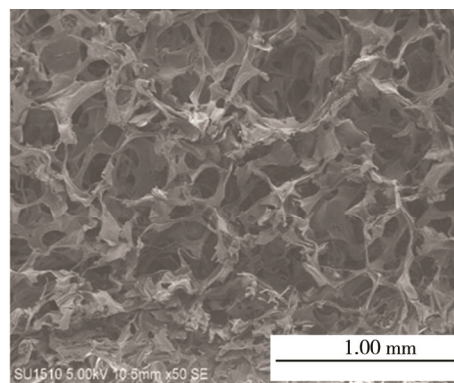
图 7 复合海绵红外光谱

Fig.7 Infrared spectra of composite sponge

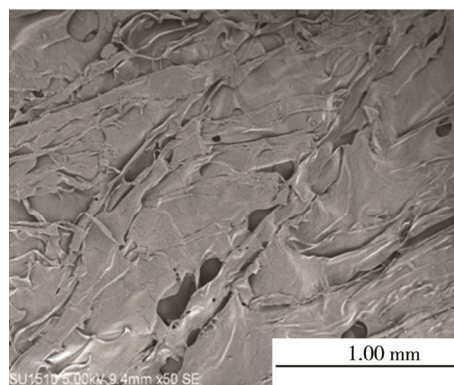
2.4 复合海绵孔隙率对乙醇吸附效果的影响

气体吸附效果与表面极性、孔的结构、孔隙率、孔径大小有关^[17]。胶原是大分子混合物,分子中含大量极性键。海绵的正面开孔图和截面图见图 8a, b。图 8a 表明海绵开孔较多,图 8b 表明海绵具有层层堆积的结构,因此所制备的海绵具有片层堆积交错形成的多孔结构。

如图 9 所示海绵对乙醇有吸附作用,随着时间的增加,吸附量增加,增长率变缓,30 d 饱和吸附量为



a 正面



b 截面

图 8 复合海绵样品 SEM 图

Fig.8 Scanning electron microscopy of composite sponge

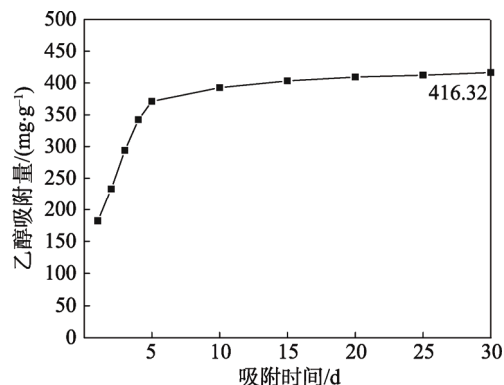


图 9 时间对复合海绵乙醇吸附量的影响

Fig.9 Effect of time on composite sponge's adsorption for ethanol

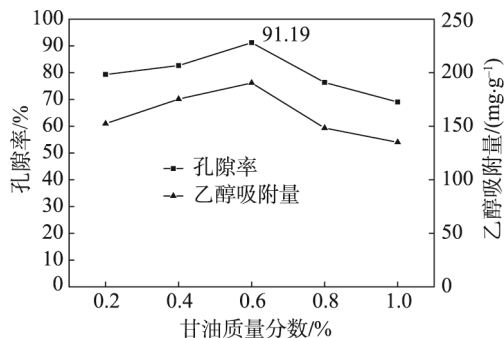


图 10 甘油含量对复合海绵孔隙率和 24 h 乙醇吸附量的影响

Fig.10 Effect of glycerol contents on porosity and 24h ethanol adsorption rate

416.32 mg/g, 相比于活性炭纤维饱和吸附 376 mg/g 更加优良^[18]。由图 10 可知, 随甘油量增加孔隙率先增大后减小, 甘油质量分数为 0.6% 时孔隙率最大为 91.19%。这可能是因为甘油是小分子低挥发性有机物, 开始含量增多时, 冷冻干燥过程中, 甘油挥发量增加, 导致孔隙率增大; 甘油质量分数大于 0.6% 后孔隙率减小。这可能是因为过多的甘油流入较大的孔中, 堵塞了部分孔隙, 同时海绵略粘使得海绵孔径变小, 降低了孔隙率。随着甘油的增加, 24 h 乙醇吸附量先增大后减小。主要是因为甘油量对孔隙率的影响导致吸附量变化, 乙醇吸附量与孔隙率正相关。

3 结语

经猪跟腱胶原蛋白紫外光谱的鉴定, 以及其红外光谱与市售 Sigma I 型胶原红外光谱进行比较后, 证明制得的胶原纯度高、结构完整。单因素实验表明: 不添加其他物质所制备的海绵, 蛋白质量分数为 1% 时表面完整无裂纹; 添加甘油明显改善了海绵的力学性能, 甘油质量分数为 0.6% 时, 海绵抗张强度最大; 甘油质量分数为 0.6% 时, 浇注厚度在 4~6 mm 之间, 海绵的力学性能较好, 浇注厚度低于 4 mm 或高于 6 mm 时力学性能均降低。最终确定制备海绵的较佳工艺条件: 以质量分数为 1% 的猪跟腱胶原, 质量分数 0.6% 的甘油含量为原料, 浇注厚度 5 mm, 经冷冻干燥后, 制得的海绵抗张强度为 210.91 kPa, 断裂伸长率为 6.98%, 热分析数据表明, 所得猪跟腱胶原蛋白海绵可在日常环境中储存与使用。制得的复合海绵对乙醇吸附试验显示, 吸附量与海绵孔隙率成正相关, 经较佳工艺制备的蛋白海绵 30 d 乙醇吸附量达到 416.32 mg/g。电镜图表明, 制得的海绵是片层堆积的立体多孔材料, 孔隙率达到 91.19%。文中所制得的猪跟腱海绵力学性能优良, 且对乙醇有良好的吸附效果, 可为猪跟腱胶原蛋白在包装领域的应用提供前期实验基础与参考。

参考文献:

- [1] 蒋挺大, 张春萍. 胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
JIANG Ting-da, ZHANG Chun-ping. Collagen[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.
- [2] 刘新华, 但年华, 胡杨, 等. 牛肌腱胶原纤维提取条件优化及其结构表征[J]. 功能材料, 2012, 43(8): 136—140.
LIU Xin-hua, DAN Nian-hua, HU Yang, et al. The Optimization of Bovine Tendon Collagen Fiber Extraction Conditions and Structural Characterization of Collagen Fiber[J]. Journal of Functional Materials, 2012, 43(8): 136—140.
- [3] PAWELEC K M, WARDALE R J, BEST S M, et al. The Effects of Scaffold Architecture and Fibrin Gel Addition on Tendon Cell Phenotype[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2015, 26(1): 1—10.
- [4] 琚海燕, 刘新华, 但卫华, 等. 牛跟腱 I 型胶原纤维的微观结构与理化性能分析[J]. 功能材料, 2015(15): 15031—15034.
JU Hai-yan, LIU Xin-hua, DAN Wei-hua, et al. Microstructure and Physicochemical Properties of Type I Collagen Fibrils from Bovine Tendon[J]. Journal of Functional Materials, 2015(15): 15031—15034.
- [5] 何兰. 牛骨胶原蛋白的提取及复合海绵的制备研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
HE Lan. Study on Extract of Bovine Bone Collagen and Preparation of Composite Sponge[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [6] BORDE B, GRUNERT P, HÄRTL R, et al. Injectable, High-Density Collagen Gels for Annulus Fibrosus Repair: An in Vitro Rat Tail Model[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015, 103(8): 2571—2581.
- [7] PAL P, SRIVAS P K, DADHICH P, et al. Accelerating Full Thickness Wound Healing Using Collagen Sponge of Mrigal Fish (Cirrhinus cirrhosus), Scale Origin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 1507—1518.
- [8] MURRAY R C, GORDIN E A, KAPIL S, et al. Reconstruction of the Radial Forearm Free Flap Donor Site Using Integra Artificial Dermis[J]. Microsurgery, 2011, 31(2): 104—108.
- [9] CAVES J M, KUMAR V A, MARTINEZ A W, et al. The Use of Microfiber Composites of Elastin-like Protein Matrix Reinforced with Synthetic Collagen in the Design of Vascular Grafts[J]. Biomaterials, 2010, 31(27): 7175—7182.
- [10] MCLAUGHLIN C R, ACOSTA M C, LUNA C, et al. Regeneration of Functional Nerves Within Full Thickness Collagen-phosphorylcholine Corneal Substitute Implants in Guinea Pigs[J]. Biomaterials, 2010, 31(10): 2770—2778.
- [11] 肖乃玉, 郑万里, 陈少君, 等. 响应面优化罗非鱼胶原蛋白膜的研制[J]. 包装工程, 2013, 34(23): 27—32.
XIAO Nai-yu, ZHENG Wan-li, CHEN Shao-jun, et al. Preparation of Tilapia Collagen Food Packaging Film by Response Surface Methodology Optimization[J]. Packaging Engineering, 2013, 34(23): 27—32.
- [12] 马学芬, 王利强, 刘靖, 等. 乙醇气体发生剂在抗菌包装中的研究进展[J]. 包装工程, 2012, 33(23): 144—149.
MA Xue-fen, WANG Li-qiang, LIU Jing, et al. Research Progress of Ethanol Emitter in Antimicrobial Food Packaging[J]. Packaging Engineering, 2012, 33(23): 144—149.
- [13] 姜璐璐, 朱虹, 焦凤, 等. 乙醇处理对葡萄果实常温保鲜的效果[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 285—289.

- JIANG Lu-lu, ZHU Hong, JIAO Feng, et al. Effect of Ethanol Vapor Treatment on Quality Maintenance of Grape Stored at Normal Temperature[J]. Food Science, 2013, 34(18): 285—289.
- [14] 樊娟, 刘芳春. 红元帅苹果贮藏过程中乙醇含量的测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2012(9): 2061—2062.
- FAN Juan, LIU Fang-chun. Determination of Ethanol Level in Red Delicious Apples During Storage[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012(9): 2061—2062.
- [15] 王月宏, 莎丽娜. 正交试验优化羊肌腱中I型胶原蛋白提取工艺[J]. 肉类研究, 2014, 28(1): 8—11.
- WANG Yue-hong, SHA Li-na. Extraction of Type I Collagen from Sheep Tendon[J]. Meat Research, 2014, 28(1): 8—11.
- [16] 汪海波, 梁艳萍, 李云雁, 等. 交联方法对草鱼皮胶原蛋白海绵性能的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(1): 132—140.
- WANG Hai-bo, LIANG Yan-ping, LI Yun-yan, et al. Effect of Crosslinking Method on Biological Properties of Grass Carp Skin Collagen Sponges[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 132—140.
- [17] 刘峥. 活性炭吸附法净化丙酮和二氧化硫的研究[D]. 湖南: 中南大学, 2014.
- LIU Zheng. Study on Activated Carbon Adsorption Purification of Acetone and Sulfur Dioxide[D]. Hunan: Central South University, 2014.
- [18] 迟广俊, 焦婷婷, 范君, 等. 改性活性炭纤维对含乙醇有机废气的吸附性能研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(12): 166—169.
- CHI Guang-jun, JIAO Ting-ting, FAN Jun, et al. Adsorption of Ethanol Vapor Containing Organic Gases on Modified Activated Carbon Fiber[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 33(12): 166—169.

《水产品保鲜技术》特色栏目征稿函

水产品是人类优质蛋白质的主要来源之一, 富含人体多种必需氨基酸。由于其水分和蛋白质含量高, 组织柔软, 且自身易携带大量细菌, 在贮运、加工与销售过程中, 往往易引起变色、变味, 甚至腐败变质, 大大降低了食用价值。对渔获后的水产品应当及时采取相应的保鲜处理措施, 以延长货架期。目前, 国内外常用的水产品保鲜技术主要有低温保鲜、生物保鲜、气调保鲜、辐照保鲜、超高压保鲜等, 如何更好利用生物保鲜剂进行水产品保鲜已成为国内外专家学者研究的热点。

鉴于此, 本刊拟围绕“水产品保鲜技术”问题这一主线, 作系列的专项报道。编辑部特邀请水产品领域的专家为本栏目撰写稿件, 以期进一步提升本刊的学术质量和影响力。稿件以研究论文为主, 也可为综述性研究, 请通过网站投稿, 编辑部将快速处理并优先发表。

编辑部电话: 023-68792294 网址: www.packjour.com

《包装工程》编辑部