

超高压诱导胶原蛋白明胶化机制研究进展

周梦柔¹, 马良^{1,2,3}, 张宇昊^{1,2,3*}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400716; 2. 西南大学国家食品科学与工程实验教学中心, 重庆 400716;
3. 农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 重庆 400716)

摘要: 明胶由胶原蛋白部分水解而成, 是非常重要的天然生物高分子材料之一。由于传统的明胶提取工艺存在生产周期长、效率低、耗能大、污染环境等缺点, 近年来对于绿色、高效的胶原蛋白明胶化新技术的探索已成为研究热点。本文对超高压法制备明胶及其对胶原类物质结构影响的相关研究进行了综述, 并对未来的研究重点及发展方向进行了分析与展望, 以期超高压技术在明胶产业化生产中的应用提供理论依据。

关键词: 超高压; 胶原蛋白; 明胶; 机制

Progress of research on mechanism of gelatinization of collagen induced by ultra-high pressure

ZHOU Meng-Rou¹, MA Liang^{1, 2, 3}, ZHANG Yu-Hao^{1,2,3*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China;
2. National Food Science and Engineering Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400716, China;
3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products on Storage and Preservation (Chongqing),
Ministry of Agriculture, Chongqing 400716, China)

ABSTRACT: Gelatin is the partial hydrolysis of collagen, and it is one of the important natural biopolymer materials. Traditional extraction process of gelatin exists long production cycle, low efficiency, energy consumption, environmental pollution and other shortcomings. In recent years, the development of environment-friendly and efficient new extraction methods becomes the core research field. This paper summarized the researches on extraction of gelatin by ultra-high pressure and the changes of collagen structure during extraction process, analyzed the research focus and development direction in the future, so as to establish the theoretical references for the application of ultra-high pressure technique in the gelatin industry.

KEY WORDS: ultra-high pressure; collagen; gelatin; mechanism

明胶是目前应用最为广泛的天然生物高分子之一, 被广泛应用于食品、医药及化工产业^[1]。近年来, 我国明胶产业飞速发展, 2011年产量约5万吨, 占世界明胶总产量的15.6%, 并以约6%年增长率递增。明胶是胶原蛋白不可逆降解产物, 其生产原料主要

源于动物性食品加工副产物, 如动物的皮、骨、肌膜、肌腱、鱼鳞等。这些副产物在我国利用率仍然偏低, 因此从这些低值产物中提取具有高附加值的高质量明胶是提高食品工业效益的重要途径。

胶原蛋白是由原胶原聚合而成的不溶性蛋白,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301425)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31301425)

*通讯作者: 张宇昊, 副教授, 主要研究方向为蛋白和生物活性肽。E-mail: zhy1203@tom.com

*Corresponding author: ZHANG Yu-Hao, Associate Professor, College of Food Science, Southwest University, No.2, Tiansheng Road, Beibei, Chongqing 400716, China. E-mail: zhy1203@tom.com

每个原胶原分子由3条长度相等且各自成左手螺旋的 α -肽链通过氢键沿公共轴线相互缠绕成右手超螺旋,形成“三螺旋结构”^[1,2]。明胶制备过程主要包括胶原蛋白明胶化和热处理两个步骤。胶原蛋白明胶化是指破坏维系和稳定胶原三螺旋结构的非共价键和共价交联,松散胶原的三螺旋结构、破坏非螺旋结晶区,以利于后期热处理过程中胶原亚基分子的释放^[3,4]。

目前应用较多的明胶化方法主要包括酸碱法、改良酸碱法、生物酶解法,其差别在于诱导胶原蛋白明胶化的介质不同^[5]。其中可大规模应用于生产的只有传统的酸碱法。然而传统的酸碱法具有生产周期长、效率低、耗能大、污染严重等问题^[5];此外,酸碱处理会造成胶原分子肽键的非正常断裂,破坏胶原亚基的完整性,进而影响成品明胶的品质。因此,探索新的胶原蛋白明胶化诱导方法,建立绿色清洁高效的高品质明胶制备新技术对明胶产业的健康发展具有重大现实意义。有研究表明^[5,6],超高压技术的应用可有效提高明胶得率和品质,并大大缩短提胶时间,但其诱导胶原蛋白明胶化的微观机制尚未明确,尤其是该过程中胶原蛋白变化的动态特性和分子机制尚需进行研究与解析。本文对超高压法制备明胶及其对胶原类物质结构影响的国内外研究现状进行总结,并对其研究的发展方向进行分析与展望。

1 超高压诱导胶原蛋白明胶化的理论基础

在胶原蛋白明胶化过程中,破坏胶原蛋白中非共价键和共价交联,是促使胶原蛋白明胶化的关键所在;此外,高品质明胶成分应该是胶原中的亚基组分,这就要求在诱导胶原明胶化过程中尽量少破坏胶原蛋白的肽键,以保持亚基组分的完整性。

超高压技术近年来被广泛应用于蛋白改性,Romuald等^[7-9]认为一定的超高压作用可破坏蛋白的三级和四级结构,打断其疏水键和离子键等非共价键,使蛋白肽链伸展,立体结构松散。Renata等^[10]研究发现超过150 MPa的高压可破坏蛋白的非共价键平衡。Elena等^[11,12]则证明超高压可使蛋白的水化作用增强,促使其溶解性得到改善。

由此可见,超高压作用主要破坏蛋白的非共价键结构,这与酸碱作用于胶原的目的之一致。相对于酸碱处理,超高压作用不会破坏胶原蛋白的共价键,更利于保持胶原中亚基的完整性,从而更利于高品质明胶的生产制备。此外超高压作用可增加蛋白的水化

作用,会更有利于热提胶过程中热力的作用。因此,超高压替代酸碱处理胶原蛋白具备理论可行性。

2 超高压技术在明胶制备中的应用

目前对于超高压诱导胶原蛋白明胶化制备明胶方面已有报道。Gómez-Guillén等^[6]曾采用超高压制备鱼皮明胶,以50 mmol/L醋酸预处理胶原3 h后,进行超高压处理,最后进行热水提胶。结果显示250 MPa超高压预处理可增加产品得率,400 MPa压力下明胶得率会有所降低;但400 MPa处理更利于得到具有较高凝胶强度及熔融/冻融温度的明胶;对于相关机制未做进一步报道。

本课题组曾对超高压制备鱼皮明胶工艺进行了研究^[13,14],结果显示,作用压力300 MPa,超高压时间10 min条件下明胶得率最高,达到75.03%,高于传统工艺的66.13%;产品凝胶强度可达274 g,优于传统工艺的234 g。

在此基础上,本课题组又在超高压制备猪皮明胶方面进行了进一步研究^[5],结果显示由于猪皮结构含有更多的共价交联,相对于传统的酸处理法,单纯的超高压处理无法有效提高猪皮明胶的得率。而采用超高压协同低浓度HCl则可有效诱导猪皮胶原明胶化,在压力250 MPa、超高压时间10 min、HCl质量分数0.75%条件下,猪皮明胶提取率高达88.62%,凝胶强度可达384.43 g。同传统方法相比,所用酸浓度有所降低,预处理时间大大缩短,从产业角度考虑,采用超高压法取代酸碱,可有效降低明胶生产过程造成的环境污染,节约生产时间,提高生产效率。SDS-PAGE电泳分析结果表明酸/超高压组明胶的 α 、 β 、 γ 等亚基组分含量较高,从微观角度证明了其具有良好的凝胶特性。这说明采用超高压协同特定液体环境可有效诱导胶原明胶化,且对明胶的凝胶过程产生了有利影响。

由此可见,无论是水产原料还是哺乳动物原料,超高压技术均可应用于明胶制备,且产品具有突出的凝胶特性。但对于超高压法诱导胶原蛋白明胶化微观机制尚未见报道,尤其是该过程中胶原蛋白变化的动态特性和分子机制尚需进行研究与解析。

3 超高压诱导胶原蛋白明胶化研究方法分析

3.1 超高压对胶原类物质结构以及热力学特性的影响

研究证明超高压作用后,胶原蛋白的热溶解性

有所提高, Kwiatkowska 等^[15]和 Ichinoseki 等^[16]研究证明 100 ~ 500 MPa 范围内超高压处理后, 可以小幅提高胶原的热溶性, 但 300 MPa 以内超高压处理效果更为显著。

Dufour 等^[17]研究了超高压作用下胶原蛋白被胶原蛋白酶和组织蛋白酶 B 降解的情况, 结果显示, 胶原蛋白的水解率较常压下有所下降, 并推断在维持 100 ~ 300 MPa 超高压条件下, 不利于蛋白酶攻击胶原的三螺旋区域。

综合以上研究结果可见, 维持 300 MPa 以内压力条件下, 胶原蛋白稳定性有所提高, 而在 300 MPa 以内压力作用后卸压放置一段时间, 胶原蛋白的热稳定性下降, 热溶解性提高。这是因为在卸压以后蛋白质会发生部分复性现象, 其构象会发生改变。本课题组曾采用酶学手段研究了超高压后胶原蛋白复性过程, 结果表明, 卸压 3 h 后胶原蛋白构象基本不再改变^[2]。

鉴于超高压作用后胶原蛋白还需经过清洗等处理, 实验室操作通常是超高压作用后第二天才进入提胶工序, 因此研究超高压诱导胶原蛋白明胶化过程应当考虑超高压过程以及超高压结束后明胶提取前的胶原复性过程。

Montero^[18], Gekko^[19], Kulisiewicz^[20,21]等在超高压对于明胶结构的影响方面进行了研究。结果显示超高压作用可以改善明胶的凝胶特性, 其原因在于超高压可促使明胶内形成大量氢键, 利于凝胶过程中亚基分子的聚集和类三螺旋结构的形成, 使凝胶过程中类三螺旋结构更易形成、尺寸更短且数量更多, 进而提高明胶凝胶的特性。胶原蛋白明胶化过程中结构变化与明胶凝胶过程相反, 理想状态的明胶化胶原中三螺旋结构等立体空间结构应该基本被破坏, 胶原亚基组分被释放, 可以直接溶解在温水中。因此, 胶原明胶化微观研究中研究对象与明胶凝胶过程中的类似, 应当主要集中在胶原二、三级结构的存在状态, 以及维系胶原三螺旋结构稳定性的价键存在状况方面。胶原蛋白的二级结构与其他蛋白类似, 主要包括 α -螺旋、 β -折叠、无规则卷曲等; 胶原蛋白的三级结构是指二级结构元件在氢键和共价交联的作用下形成稳定的三螺旋结构^[22], 因此对胶原三级结构的研究可以着重于评价三螺旋结构的存在状况。维系胶原蛋白三螺旋结构的价键主要是氢键和共价交联^[23]。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^[24]。胶原蛋白的共价交联主要维系其三级结构, 主要由 ϵ -醛赖氨酸参与产生^[25]。因此, 重点对明胶化胶原中二、三级结构以及氢键、共价交联的情况进行研究, 可从微观层面解析明胶化胶原的结构特点。

热力学分析法近年来逐渐被应用于胶原蛋白结构变化过程的研究。对于超高压过程中胶原蛋白结构变化热力学分析方面也有报道。Potekhin^[26]等从热力学角度评价了维持超高压条件下, 胶原蛋白结构稳定性的变化, 研究结果显示压力维持在 324 MPa 以下压力时, 胶原更加稳定, 并认为 324 MPa 以下的压力利于蛋白与水之间形成氢键水合, 进而稳定胶原构象。该结论与 Dufour 等^[17]的研究结果相一致。

由此可见, 测定超高压诱导胶原蛋白明胶化过程中热力学参数, 同结构测定相结合进行热力学分析, 可以更全面的解析胶原蛋白的结构变化情况。

总结相关研究进展, 对于胶原蛋白明胶化的研究应该考虑超高压处理后胶原蛋白的复性过程, 对于蛋白结构的评价目前主要包括热力学层面评价和微观结构层面评价, 结合两个层面结果可有效评价明胶化胶原结构变化情况。

3.2 分子模拟技术在胶原蛋白动态结构变化研究中的应用

结构测定和热力学分析只能揭示比较不同固定状态下胶原蛋白结构的差别, 不足以完全揭示该过程的动态特性。分子模拟法可用于超高压过程中蛋白结构动态特性研究。

分子模拟主要用于探索研究具有三维结构的分子结构和性能, 尤其可用于非常规条件下(如超高压下)动态特性和分子结构的变化研究。蒲尚志等^[27]采用分子模拟的方法验证了氨基酸序列对胶原蛋白热稳定性的影响, 其结论与常规方法测定一致, 证明了该法在胶原蛋白结构研究中的可行性。Streeter 等^[28]采用经典力学模拟的方法对不同溶液体系下胶原蛋白分子相互作用过程中非共价键、二三级结构的变化情况进行了研究, 并总结了其相互的分子动力学机制。由此可见, 分子模拟可以用于研究超高压诱导胶原蛋白明胶化过程。

综上所述, 解析超高压诱导胶原蛋白明胶化机制, 应当从热力学和微观结构两个层面分析明胶化

胶原的结构特点,并在此基础上解析超高压诱导胶原蛋白明胶化全过程中动态特性与分子机制。

4 总结与展望

明胶作为一种非常重要的天然生物高分子材料,被广泛应用于食品、医药、照相等领域。传统的明胶生产工艺存在耗时长、效率低、污染环境等缺点,严重阻碍了明胶的产业化发展。因此改进传统明胶化工艺,建立新型明胶制备技术是未来明胶产业发展的重要方向。

近几年超高压技术在明胶生产工艺中的应用逐渐受到关注,研究证明以超高压代替传统酸碱法诱导胶原蛋白明胶化是可行的。经过一定范围内的超高压处理后,胶原蛋白的热溶解性有一定程度的增加,与传统方法相比明胶得率及品质均有所提高,处理时间大大缩短,可见超高压技术在明胶产业化生产中具有十分广阔的发展前景。

目前在超高压作用对胶原的热溶解性及明胶凝胶特性影响方面已有一些初步探索,但针对超高压诱导胶原蛋白明胶化机制的系统研究尚无报道。胶原蛋白的微观结构较为复杂,通过单一的检测手段无法全面准确地反映并分析其相关结构和价键在明胶化过程中的变化情况,因此如何全面解析胶原微观结构是开展机制研究需要突破的一大难点。此外,卸压后可能发生的胶原蛋白复性是研究工作中需要考虑的另一问题。

综合分析相关研究,在今后的工作中,需重点关注明胶化过程中胶原蛋白的二、三级结构(尤其是三螺旋结构)以及维持这些结构稳定的相关价键的存在状况,同时将热力学等手段与微观结构检测相结合,并在此基础上借助分子模拟技术全面解析此过程中胶原蛋白结构变化的动态特性与分子机制,以进一步明确超高压诱导胶原蛋白明胶化的作用机制,为超高压技术制备明胶产业化的实施乃至改善明胶产业高污染现状提供理论依据。

参考文献

- [1] 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, (2): 82-86.
Huang HJ, Cheng JS. The chemical basis of collagen and gelatin molecules and gelation of gelatin [J]. The Sci Technol Gelatin, 2005, (2): 82-86.
- [2] Zhang YH, Olsen K, Grossi A, *et al.* Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides [J]. Food Chem, 2013, 141(3): 2343-2354.
- [3] Kolodziejska I, Skierka E, Sadowska M, *et al.* Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal [J]. Food Chem, 2008, 107(2): 700-706.
- [4] 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 MR, Zhang YH, Chen LQ, *et al.* Research progress in improvement of gel strength of gelatin based on microstructure [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(13): 395-399.
- [5] 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, (19): 418-421.
Chen LQ, Ma L, Zhang YH. Prospects for the application of modern processing technology in gelatin preparation [J]. Food Sci, 2010, (19): 418-421.
- [6] Gómez-Guillén MC, Gimnez B, Montero P. Extraction of gelatin from fish skins by high pressure treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19: 923-928.
- [7] Romuald C, Christine DL, Marie LA. High-pressure effects on the proteolytic enzymes of sea bass (*dicentrarchus labrax* L) fillets [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(10): 3969-3973.
- [8] Su D, Li S, Laurie HM, *et al.* Effects of high hydrostatic pressure on in vitro digestion of soy protein [J]. Int Agric Eng J, 2010, 19(1): 49-58.
- [9] Collins MD, Kim CU, Gruner SM. High-Pressure Protein Crystallography and NMR to Explore Protein Conformations [J]. Ann Rev Biophys, 2011, 40: 81-89.
- [10] Renata T, Whye PT, Alan EB. Effects of high pressure on functional properties of soy protein [J]. Food Chem, 2007, 104(1): 140-147.
- [11] Penas E, Préstamo G, Gomez R. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins [J]. Food Chem, 2004, 85(4): 641-648.
- [12] Fujiwara T, Suzuki Y, Sasaki G, *et al.* Solubility measurements of protein crystals under high pressure by in situ observation of steps on crystal surfaces [J]. J Phys: Conf Ser, 2010, 215(1): 67-73.
- [13] 张宇昊,马良,师萱. 鱼皮明胶的超高压辅助提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 99-103.
Zhang YH, Ma L, Shi X. Ultra-high pressure-assisted extraction of gelatin from fish skin [J]. Food Sci, 2011, 32(6): 99-103.
- [14] 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, 30(24): 88-92.
Zhang YH, Ma L, Xie X. Extraction and property of gelatin from

- BaSa skin [J]. Food Sci, 2009, 30(24): 88–92.
- [15] Kwiatkowska A, Jankowska B, Korzeniowski W. Changes in solubility of the bovine semitendinosus muscle collagen under the influence of high pressure [J]. Polish J Food Nutr Sci, 2001, 51(4): 35–39.
- [16] Ichinoseki S, Nishiumi T, Suzuki A. Tenderizing effect of high hydrostatic pressure on bovine intramuscular connective tissue [J]. J Food Sci, 2006, 71(6): 276–281.
- [17] Dufour E, Dalgalarondo M, Herve G, *et al.* Proteolysis of type collagen by collagenase and cathepsin B under high hydrostatic pressure [J]. Meat Sci, 1996, 42(3): 261–269.
- [18] Montero P, Fernandez-Diaz, Gómez-Guillén MC. Characterization of gelatin gels induced by high pressure [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16: 197–205.
- [19] Gekko K, Fukamizu M. Effect of pressure on the sol-gel transition of gelatin [J]. Int J Biol Macromol, 1991, 13: 295–300.
- [20] Kulisiewicz L, Delgado A. Network structure of gelatin gel at high pressure determined by rheological measurements [J]. High Press Res, 2009, 29(1): 67–71.
- [21] Kulisiewicz L, Baars A, Delgado A. Effect of high hydrostatic pressure on structure of gelatin gels [J]. Bull Polish Acad Sci: Tech Sci, 2007, 55(2): 239–244.
- [22] Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, *et al.* collagen for bone tissue regeneration [J]. Acta Biomaterialia, 2012, 8(9): 3191–3200.
- [23] Pradhan SM, Katti KS, Katti DR. Structural hierarchy controls deformation behavior of collagen [J]. Biomacromolecules, 2012, 13(8): 2562–2569.
- [24] Daisuke M, Kazuki K, Shota N. The triple helical structure and stability of collagen model peptide with 4(s)-hydroxyprolyl-pro-gly units [J]. Pept Sci, 2012, 98(2): 111–121.
- [25] Wu JH, Zhao MT, Wu B. Study of collagen assemble into gel in situ used as tissue engineering scaffold [J]. Adv Mater Res, 2012, 466–467: 146–151.
- [26] Potekhin SA, Senin AA, Abdurakhmanov NN, *et al.* High pressure stabilization of collagen structure [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1794: 1151–1158.
- [27] 蒲尚志, 张文华. 分子动力学模拟氨基酸序列对胶原蛋白热稳定性的影响[J]. 中国科技论文在线, www.paper.edu.cn/download/downPaper/200905-480.
Pu SZ, Zhang WH. Molecular dynamics simulation study on the effect of amino acid sequence on the thermal stability of collagen-like peptide [J]. www.paper.edu.cn/download/downPaper/200905-480.
- [28] Ian S, Nora H, De L. A molecular dynamics study of the inter-protein interactions in collagen fibrils [J]. Soft Matter, 2011, 7: 3373–3382.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



周梦柔, 硕士研究生, 主要研究方向为食品化学与营养学。
E-mail: mengrou82@163.com



张宇昊, 副教授, 主要研究方向为蛋白和生物活性肽。
E-mail: zhy1203@tom.com