

兔皮胶原蛋白的微观结构及不同因素 对其聚集特性的影响

Microstructure of rabbit-skin collagen and influences
of different factors on its aggregation

马明思¹ 张宇昊¹ 马良²

MA Ming-si¹ ZHANG Yu-hao¹ MA Liang²

王雪蒙² 韩霜² 张晓洁²

WANG Xue-meng² HAN Shuang² ZHANG Xiao-jie²

(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)

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

摘要:以兔皮胶原蛋白为原料,通过紫外光谱(UV)、红外光谱(FTIR)和扫描电镜(SEM)对兔皮胶原蛋白的微观结构进行了初步研究,在该基础上进一步研究了温度、胶原蛋白浓度、pH 值和离子强度对其聚集特性的影响。紫外光谱和红外光谱的峰型及对应波长均符合 I 型胶原蛋白的特征,电镜扫描观察到兔皮胶原蛋白为不规则的致密片状膜,部分表面褶皱;聚集特性研究表明,胶原蛋白浓度与测定温度升高,胶原蛋白的聚集速度和聚集程度均增加;在酸性环境中,胶原蛋白聚集时间较长;pH 由 7 增至 8 的过程中,胶原蛋白的聚集程度先增加后降低,在 pH 7.2 时,聚集程度和速度均最高;随着离子浓度的增加,聚集程度和聚集速度先增加后降低,在 NaCl 浓度为 120 mmol/L 时聚集速度最快,且自组装程度最高。

关键词:胶原蛋白;紫外光谱;红外光谱;扫描电镜;聚集特性

Abstract: In this study, UV spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy, were used to study the microstructure of rabbit-skin collagen, respectively. The effects of temperature, collagen concentration, pH value and ionic strength

on aggregation properties of collagen were also studied. The results of UV spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy showed that the absorption peak and the corresponding wavelength in accordance with the characteristics of type I collagen. Moreover, the results of scanning electron microscopy showed that the collagen was irregular dense sheet film, partially wrinkled on the surface. Furthermore, the results of aggregation properties of rabbit-skin collagen indicated that with the increase of temperature and collagen concentration, the aggregation speed of collagen accelerated and the degree of aggregation increased. In acidic environment, the aggregation time was relatively long. When pH increased from 7 to 8, the degree of self-assembly increased first and then decreased. The degree and the speed of self-assembly were the highest at pH 7.2. With the increase of ion concentration, the aggregation rate first increased and then decreased. The collagen reached the fastest aggregation speed and the highest degree of self-assembly in 120 mmol/L NaCl solution.

Keywords: collagen; UV spectroscopy; fourier transform infrared spectroscopy (FTIR); scanning electron microscope; aggregation property

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31301425);中央高校基本科研业务费重大项目(编号:XDJK2015A015);中国博士后科学基金面上项目(编号:2014M562267);中国博士后科学基金特别资助项目(编号:2015T80951);重庆市基础科学与前沿技术研究重点项目(编号:cstc2015jcyjBX0116)

作者简介:马明思,女,西南大学在读硕士研究生。

通信作者:张宇昊(1978—),男,西南大学教授,博士。

E-mail: Zhy1203@163.com

收稿日期:2016—12—23

胶原蛋白作为一种纤维蛋白,广泛分布于结缔组织和骨骼等部位^[1],是体内含量最多的蛋白质^[2-3]。天然胶原是由三条左手 α 螺旋结构通过链间氢键结合成的特殊的三螺旋结构组成^[4]。胶原蛋白因其具有一定的营养与功能特性广泛应用于食品、医药和化妆品等行业中^[5-7]。而这些应用很大程度上依赖于其聚集特性,聚集特性反映着胶原蛋白微观结构上发生的变化,这种性质受温度、浓度、pH 值和离子强

度等多种因素的影响,在胶原蛋白的应用过程中,必须要考虑这些因素对其性质的影响,在最适合的条件下方能制成性能较高的胶原蛋白产品。

胶原蛋白的微观结构及其聚集特性是目前该领域的研究热点。闫鸣艳^[8]64-66 对狭鳕鱼皮胶原蛋白聚集特性进行研究,发现胶原蛋白溶液聚集行为在其质量浓度高于 0.6 g/L 时表现明显;离子强度对胶原蛋白的聚集具有一定的延缓作用,在 pH=7.2 时,胶原蛋白溶液比较容易形成聚集。钟朝辉^[9]、Franz 等^[10]用原子力显微镜对鱼鳞胶原蛋白与牛胶原蛋白的聚集行为进行研究,高清晰的原子力显微镜图显示出了胶原的纤维结构,能够为自组装的形成机制提供动态信息,从而为胶原蛋白的加工应用提供一定的理论基础。

随着生活水平的提高,人们越来越关注肉的营养品质。兔肉因为具有“三高三低”^[11-12](高蛋白质、高矿物质、高消化率,低热量、低脂肪、低胆固醇)的营养特质拥有广泛的市场。2005 年,中国成为世界兔肉生产第一大国,2013 年中国兔肉产量约 80 万 t,约占世界兔肉总生产量的 45%^[13]。近年来,由于产能持续扩大以及食品安全监管日益严格,西南地区大型兔肉加工企业均开始建设自主的肉兔饲养基地,饲养品种以伊拉兔肉为主。一方面,该模式能够很好地保证产品的品质和安全,但同时,自己宰杀兔子会产生大量兔皮,肉兔兔皮附加值较低,因此,如何利用副产物兔皮提高整体产业链的附加值,已经成为目前兔肉加工企业迫切需要解决的问题^[14]。兔皮中胶原蛋白含量高,兔皮胶原蛋白也不存在传统哺乳动物如猪、牛胶原蛋白在宗教和疫病角度的局限,同时在功能性质等方面,兔皮胶原蛋白性质优于水产胶原蛋白^[15]。因此开发兔皮胶原蛋白,有利于增加兔皮的附加值,减少浪费与环境污染,对兔肉加工产业具有重要意义。然而,对于兔皮胶原微观结构及聚集特性方面的研究目前尚未见报道。

本试验拟对兔皮胶原蛋白的微观结构进行研究,在此基础上研究浓度和温度对胶原蛋白聚集特性的影响,然后进一步深入研究 pH 值和离子强度对其聚集特性的影响,以期为兔皮胶原蛋白的后期应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

新鲜伊拉兔皮:胶原蛋白含量为 13.60%,重庆阿兴记食品有限公司;

冰醋酸、NaOH、NaCl、Na₂S、Ca(OH)₂、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠:分析纯,四川成都市科龙化工试剂厂;

胃蛋白酶(1:10 000):酶活 800~2 500 U/mg,北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

紫外可见光分光光度计:752 型,上海菁华科技仪器有限公司;

冷冻离心机:5810R 型,德国 Eppendorf 公司;

真空冷冻干燥机:FD-1-50 型,北京博医康实验仪器有限公司;

公司;

离子溅射仪:HITACHI E1010 型,日本日立公司;

扫描电子显微镜:S-3000N,日本日立公司;

磁力搅拌器:85-2,型金坛市科析仪器有限公司;

酶标仪:Bio Tek 型,美国 Tecan Genios Plus 公司;

红外光谱仪:Spectrun100 型,美国 PerkinElmer 公司。

1.2 方法

1.2.1 兔皮胶原蛋白的制备 兔皮脱毛清洗后剪成小块,用 10 g/100 mL 的 NaCl 溶液去除杂蛋白,采用酸浸和酶解相结合的方式提取胶原蛋白,具体工艺流程参照文献^[15]。

1.2.2 紫外光谱分析 将样品溶于 0.05 mol/L 醋酸溶液中,配制 0.5 mg/mL 的胶原蛋白溶液,以 0.05 mol/L 的醋酸溶液作空白对照,在 190~400 nm 的近紫外光区进行扫描^[16]。

1.2.3 红外光谱分析 样品与溴化钾(KBr)按照 1:400 (g/g)的比例加入玛瑙研钵中进行研磨,后于 40 ℃下烘干 12 h,经压片机压片后放入红外光谱仪中检测,具体参数参照文献^[17]。

1.2.4 扫描电镜 胶原蛋白冷冻干燥后,选取胶原蛋白小块固定到清洁的样品台上,用专用的双面胶固定住,用 HITA-CHI E1010 离子溅射仪镀金膜,扫描电子显微镜观察胶原纤维的微观结构^[18],放大倍数分别为 30,100,200,300 倍。

1.2.5 胶原蛋白的聚集特性 用 0.1 mol/L 的醋酸将样品溶解,配制质量浓度为 3 g/L 的胶原溶液,取上述胶原蛋白溶液与 5 mL 磷酸缓冲液(浓度为 10 mmol/L)在冰浴中进行混合,向溶液中添加一定量的 NaCl,使 NaCl 浓度分别为 0,30,60,90,120,500,1 000 mmol/L,胶原蛋白质量浓度分别为 0.05,0.15,0.30,0.60,1.20 g/L,混合均匀后确定溶液的 pH 分别为 5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,使最终溶液体积为 10 mL。立即吸取溶液滴入酶标板的小孔中,设置保温温度分别为 22,27,32,37 ℃,实时测定胶原溶液在 313 nm 处吸光值的变化,绘制胶原蛋白溶液的浊度变化曲线并以此计算胶原溶液浊度变化的速率曲线。测定的基本条件为:胶原蛋白溶液浓度 0.6 g/L,NaCl 浓度 60 mmol/L,pH 为 7.0,保温温度 37 ℃,在测定其中一个因素对胶原蛋白聚集特性的影响时,其他因素保持在基本测定条件下不变。

1.3 数据处理与amp;统计分析

紫外光谱分析采用 Microsoft excel 2010 和 Origin 8.0 软件,每次试验设置 3 个平行试验,数据以平均值±标准偏差表示;对胶原蛋白聚集特性的测定数据采用 Microsoft excel 2010 和 SPSS 17.0 软件分析,每次试验设置 3 个平行试验,计算数据以平均值±标准偏差表示,并通过 ANOVA 进行统计分析。

2 结果与amp;分析

2.1 胶原蛋白的紫外光谱分析

由图 1 可知,胶原蛋白在 235 nm 波长处有明显的最大吸收峰,这是由肽键 C=O 的 n→π* 跃迁所致^[19],符合 I 型胶原的紫外吸收特征。此外,在 259~280 nm 时有微弱的吸

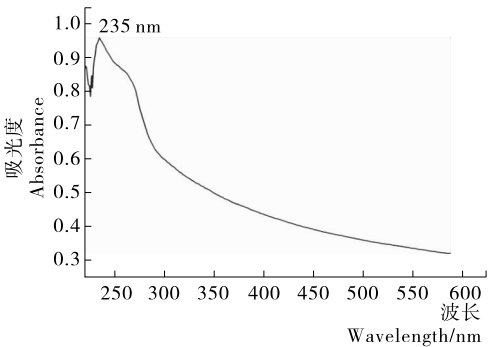


图 1 兔皮胶原蛋白的紫外吸收图谱

Figure 1 The UV spectrogram of rabbit-skin collagen

收峰,与酪氨酸(278 nm)、苯丙氨酸(259 nm)的存在有关,这与其他哺乳动物或鱼类^[20-21]胶原的紫外吸收光谱分析结果一致。

2.2 胶原蛋白的红外光谱分析

对兔皮胶原蛋白进行红外光谱扫描,并对其特征峰位进行归属,结果见图 2 和表 1。图 2 所示的兔皮胶原蛋白的红外光谱峰型与猪皮 I 型胶原蛋白的一致^[22],且各酰胺带的出峰位置均在胶原蛋白特征峰的出峰范围内(见表 1),进一步说明了兔皮胶原蛋白符合 I 型胶原蛋白的结构特征。

2.3 胶原蛋白的扫描电镜分析

由图 3 可知,胶原是不规则致密片状的光滑膜,且部分

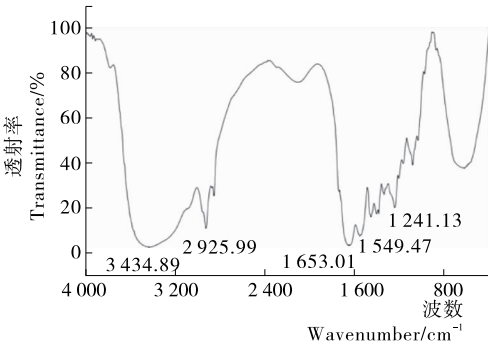


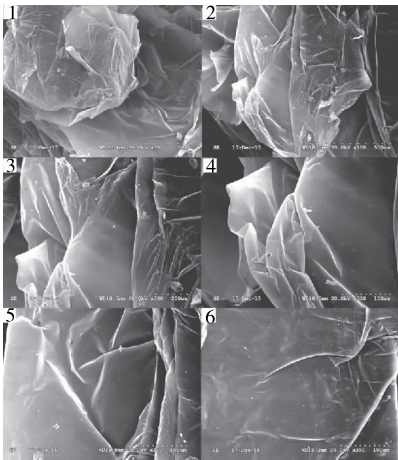
图 2 兔皮胶原蛋白的红外光谱

Figure 2 The infrared spectrogram of rabbit-skin collagen

表 1 兔皮胶原蛋白的酰胺带峰位归属

Table 1 The amide band peak position of rabbit-skin

名称	峰位/ cm ⁻¹	出峰范围/ cm ⁻¹	峰位归属
酰胺 A	3 434.89	3 400~3 500	N—H 伸缩振动 ^[23]
酰胺 B	2 925.99	2 900~3 100	N—H 和 C—H 的伸缩振动,表明肽链间氢键的存在 ^[24]
酰胺 I	1 653.01	1 600~1 700	三股螺旋内氢键的 C=O 基团的伸缩振动峰,表征胶原三螺旋结构的存在 ^[25]
酰胺 II	1 549.47	1 510~1 560	NH 的弯曲振动和 CN 的伸缩振动 ^[26]
酰胺 III	1 241.13	1 200~1 300	NH 的弯曲振动和 CO 的伸缩振动 ^[26]



1~6 分别是放大 30,100,200,300,300,300 倍数的兔皮胶原蛋白微观结构

图 3 兔皮胶原蛋白的扫描电镜图

Figure 3 The scanning electron micrographs of rabbit-skin collagen

表面褶皱,可能是由于冻干过程中脱水所致^[27],表明胶原蛋白保留了较完整的纤维结构,可以将兔皮胶原蛋白应用于生物医药材料的制备,参与膜的形成以及组织支架材料的构建^[28]。

2.4 胶原蛋白的聚集特性

2.4.1 温度对胶原蛋白聚集特性的影响 由图 4 可知,胶原蛋白在 22~37 ℃ 时均可发生聚集,随着时间的延长,胶原蛋白溶液在 313 nm 波长下测得的吸光度值逐渐增加而后保持相对稳定,溶液达到聚集平衡状态。由表 2 可知,随着温度的升高,胶原蛋白溶液的聚集速度加快,聚集程度也随之升高,在 22 ℃ 时,聚集形成时间为 35 min,聚集程度为 0.020 0±0.001 2,在 37 ℃ 时,聚集时间缩短为 25 min,聚集程度增加到 0.050 0±0.001 4(聚集速度为吸光度随时间变化的曲线初始上升段的斜率,溶液的聚集程度为溶液最终达到的平衡吸光度值,即溶液中不溶悬浮粒子的大小和数量)。这可能是温度升高,分子运动加快,疏水相互作用增强,胶原蛋白的肽链间及分子间互相缠结,胶原聚集作用得到增强^[11]。姚攀^[29]^[27]对鳙鱼鱼皮 I 型胶原蛋白聚集行为的研究结果表明,鳙鱼鱼皮胶原蛋白在样品浓度为 1 mg/mL,NaCl 浓度为 100 mmol/L 条件下,23 ℃ 组装达到平衡所用时间大

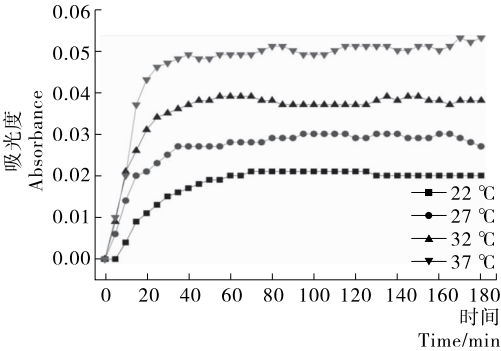


图 4 温度对兔皮胶原蛋白聚集特性的影响

Figure 4 Effect of temperature on the aggregation behavior of rabbit-skin collagen

表 2 不同温度下胶原蛋白溶液的聚集参数

Table 2 Aggregation parameters of collagen solution at different temperatures

温度/℃	聚集形成 时间/min	聚集滞后 时间/min	聚集速度	聚集程度
22	35	0	5.714×10^{-4}	$0.020\ 0\pm0.001\ 2$
27	35	0	8.228×10^{-4}	$0.028\ 8\pm0.001\ 1$
32	25	0	1.508×10^{-3}	$0.037\ 7\pm0.001\ 0$
37	25	0	2.000×10^{-3}	$0.050\ 0\pm0.001\ 4$

概为10 h,而 32 ℃下组装达到平衡时间大概为 1 h。这与本研究的结果趋势一致,说明温度升高增强了胶原蛋白的聚集作用,促进了其自组装进程,但兔皮胶原蛋白的聚集速度远高于鳙鱼鱼皮胶原蛋白,可能与胶原蛋白的来源以及样品浓度和离子强度有关。

2.4.2 胶原蛋白浓度对其聚集特性的影响 由图 5 可知,胶原蛋白浓度为 0.05 g/L 时,胶原溶液的自组装曲线分为 3 个阶段,即迟滞阶段、快速上升阶段和平稳阶段。胶原蛋白浓度 ≥ 0.15 g/L,迟滞阶段消失,直接进入快速上升阶段并最终达到聚集平衡状态。这可能是在低浓度的胶原蛋白溶液中,胶原分子之间存在较大的距离,大分子不易发生缠结,主要以棒状的肽链形式存在,溶液浊度增加缓慢,出现滞后期,随溶液浓度增加,胶原蛋白自发装配形成胶原纤维,滞后期逐渐缩短至消失。闫鸣艳^{[8]64}对狭鳃鱼皮胶原蛋白的聚集特性研究表明,狭鳃鱼皮胶原蛋白在浓度达到 0.3 g/L 时才出现聚集状态,且浓度增加到 2 g/L 仍具有迟滞现象,说明兔皮胶原蛋白与鳃鱼鱼皮胶原蛋白相比,所需要的聚集浓度较低,这可能与兔皮和鱼皮胶原蛋白的氨基酸组成和氢键存在状态有关^{[8]61}。

由表 3 可知,聚集所用时间呈现先增加后降低而后继续增加的趋势,在聚集迟滞现象消失后,0.6 g/L 的胶原蛋白溶液聚集时间最短,原因可能是当胶原蛋白溶液浓度增加至 0.6 g/L 时,单位体积内胶原分子增多,肽链间及分子间易于缠结形成微纤维,微纤维之间通过横向和纵向组装形成纤维,使得浊度增加较快;而当胶原蛋白溶液浓度增至 1.2 g/L 时,溶液中单位体积分子更多,纤维形成所需时间增加,因此溶液聚集达到平衡所用时间增加。综上,兔皮胶原蛋白在浓

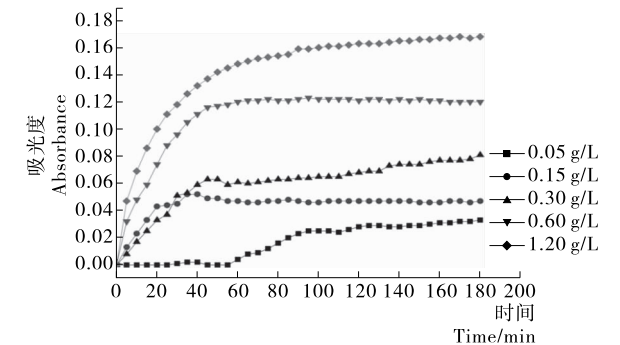


图 5 胶原蛋白浓度对其聚集特性的影响

Figure 5 Effect of concentration of collagen solution on the aggregation behavior

表 3 不同浓度下胶原蛋白溶液的聚集参数

Table 3 Aggregation parameters of different concentrations of collagen solution

质量浓度/ (g·L ⁻¹)	聚集形成所 用时间/min	聚集滞后 时间/min	聚集速度	聚集程度
0.05	45	55	6.444×10^{-4}	$0.028\ 8\pm0.002\ 6$
0.15	60	0	7.833×10^{-4}	$0.046\ 7\pm0.000\ 5$
0.30	65	0	1.061×10^{-3}	$0.069\ 4\pm0.006\ 3$
0.60	50	0	2.420×10^{-3}	$0.121\ 0\pm0.001\ 3$
1.20	75	0	2.187×10^{-3}	$0.164\ 2\pm0.002\ 8$

度为 0.6 g/L 时形成聚集体时间最短,且聚集体最易观察易控制。

2.4.3 pH 值对胶原蛋白聚集特性的影响 不同 pH 值下胶原蛋白溶液的聚集曲线见图 6,聚集参数见表 4。pH 由 5 增至 8 的过程中,胶原蛋白的聚集程度总体上由高到低,聚集速度由慢到快,pH 值为 6 时,聚集速度达到最高,pH 值为 7.5 时,聚集速度最慢。从聚集形成时间上看,pH 值 ≤ 5.5 时,其聚集平衡时间均大于 1 h,且存在聚集滞后时间,原因可能是在 pH 值 ≤ 5.5 的环境中,胶原蛋白的分子构象变化,阻碍胶原分子的聚集^{[29]26},使聚集缓慢进行,表现出一定的滞后时间;而 pH 值 ≥ 6 时,聚集平衡时间较短,说明分子间构象随 pH 值发生变化,使分子能迅速聚集,但是在胶原蛋白的应用过程中不易控制其自组装进程;pH 值为 7~8 时,胶原蛋白的组装平衡时间由快减慢后又增快。因胶原蛋白

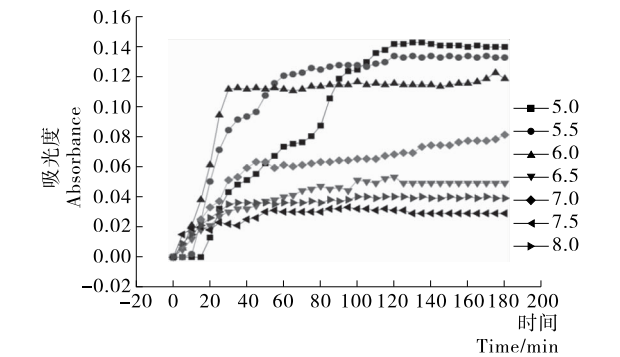


图 6 pH 5~8 条件下胶原蛋白溶液的聚集曲线

Figure 6 Aggregation curve of collagen solution at pH 5~8

表 4 pH 5~8 时胶原蛋白溶液的聚集参数

Table 4 Aggregation parameters of collagen solution at pH 5~8

pH	聚集形成 时间/min	聚集滞后 时间/min	聚集速度	聚集程度
5.0	125	15	1.274×10^{-3}	$0.140\ 2\pm0.001\ 1$
5.5	90	10	1.454×10^{-3}	$0.130\ 8\pm0.002\ 5$
6.0	35	0	3.256×10^{-3}	$0.114\ 0\pm0.002\ 5$
6.5	40	0	1.238×10^{-3}	$0.049\ 5\pm0.001\ 2$
7.0	40	0	1.255×10^{-3}	$0.050\ 2\pm0.001\ 4$
7.5	55	0	5.497×10^{-4}	$0.030\ 2\pm0.001\ 3$
8.0	35	0	1.091×10^{-3}	$0.038\ 2\pm0.001\ 7$

在食品、化妆品和医药领域的应用中,涉及的溶液中性较多,所以进一步考察 pH 值 7~8 时胶原蛋白溶液自组装曲线的细微变化,结果见图 7 和表 5。

由图 7 和表 5 可知, pH 由 7 增至 8 的过程中,胶原蛋白的聚集程度先增加后降低,在 pH 为 7.2 时,聚集程度达到最高,且聚集速度也高于其他组,由此推测 pH 7.2 接近兔皮胶原蛋白的等电点,与狭鳕鱼皮胶原蛋白的等电点接近^{[8]66}。溶液的 pH 影响蛋白质表面的电荷性质,通过改变胶原蛋白表面疏水基团,从而改变胶原蛋白的分子构象。在 pH=7.2 时,胶原蛋白分子净电荷接近零,分子构象发生变化,能够促进其相互靠近形成聚集;当 pH 偏离等电点时,胶原蛋白构象变化导致分子聚集的机会降低,聚集速度和聚集程度均降低。所以,当兔皮胶原蛋白被用来制备生物、医学材料时,要考虑胶原蛋白溶液的 pH,在 pH 为 7.2 时,兔皮胶原蛋白溶液更容易形成聚集。

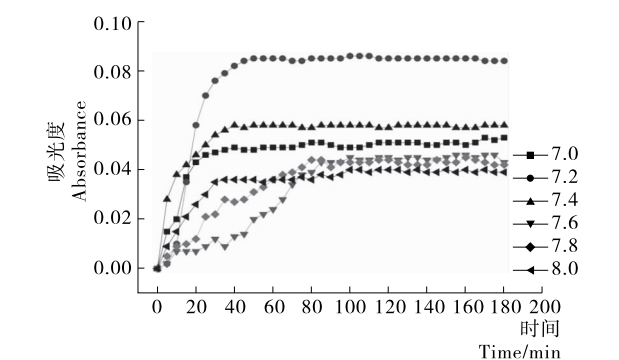


图 7 pH 7~8 条件下胶原蛋白溶液的聚集曲线
Figure 7 Aggregation curve of collagen solution at pH 7~8

表 5 pH 7~8 时胶原蛋白溶液的聚集参数
Table 5 Aggregation parameters of collagen solution at pH 7~8

pH	聚集形成 时间/min	聚集滞后 时间/min	聚集速度	聚集程度
7.0	40	0	1.255×10^{-3}	$0.050\ 2\pm0.001\ 4$
7.2	50	0	1.699×10^{-3}	$0.084\ 9\pm0.000\ 5$
7.4	45	0	1.283×10^{-3}	$0.057\ 7\pm0.000\ 5$
7.6	85	0	5.241×10^{-4}	$0.044\ 6\pm0.001\ 0$
7.8	80	0	5.381×10^{-4}	$0.043\ 0\pm0.001\ 0$
8.0	35	0	1.091×10^{-3}	$0.038\ 2\pm0.001\ 7$

2.4.4 离子强度对胶原蛋白聚集特性的影响 不同离子浓度(NaCl 浓度)下胶原蛋白溶液的聚集曲线见图 8,随着胶原蛋白溶液中离子浓度的增加,胶原蛋白溶液的聚集程度呈现先升高后降低的趋势。由表 6 可知,在聚集速度方面,在较低 NaCl 浓度(<30 mmol/L)时,其聚集速度较慢,随着 NaCl 浓度的增加,聚集速度增加,当其浓度增加至 120 mmol/L 时,聚集速度最大。在聚集时间方面,离子浓度过低和过高时,胶原蛋白溶液的聚集存在一定的滞后时间。NaCl 浓度为 0 时,聚集滞后 20 min;当浓度增至 120 mmol/L,胶原蛋白溶液直接进入快速上升阶段并最终达到聚集状态,不存在

聚集滞后期;当浓度由 500 mmol/L 增至 1 000 mmol/L 时,聚集滞后时间由 10 min 增至 35 min。Zhang 等^[30]研究了 NaCl 浓度对鲟鱼鱼皮、鱼鳔和猪跟腱 3 种来源的 I 型胶原蛋白的聚集特性的影响,表明随 NaCl 浓度由 0 增加到 140 mmol/L 的过程中,三者聚集速度和聚集程度都呈现增加趋势。在 Bae 等^[31]的研究中,红色黄貂鱼鱼皮 I 型胶原和鲑鱼鱼皮 I 型胶原的聚集速率被高 NaCl 浓度抑制。这与本研究的结果类似,说明适当的离子强度有益于 I 型胶原蛋白聚集的形成,离子强度过高对聚集的形成不利。

这可能是较低离子浓度能够使胶原蛋白分子链展开,更多的基团暴露,从而使胶原蛋白更易形成聚集。当溶液中的 NaCl 浓度增加到一定程度可能使胶原蛋白发生脱水,甚至出现盐析时,阻碍了胶原分子与分子之间发生聚集,所以胶原蛋白的聚集速度减缓,自组装行为受到抑制。

综上,NaCl 浓度为 120 mmol/L 的胶原蛋白形成聚集体的聚集速度最快,且自组装程度最高。当兔皮胶原蛋白应用于生物、医药材料的制备时,可以控制溶液离子浓度为 120 mmol/L,保证胶原蛋白快速形成聚集体。

3 结论

对兔皮胶原蛋白进行微观结构分析,紫外光谱和红外光谱扫描的吸收峰形及其对应的吸收波长均符合符合 I 型胶原蛋白的特征,电镜扫描观察为不规则的致密片状膜,且部分表面褶皱,能够应用于膜材料的制备。对兔皮胶原蛋白的

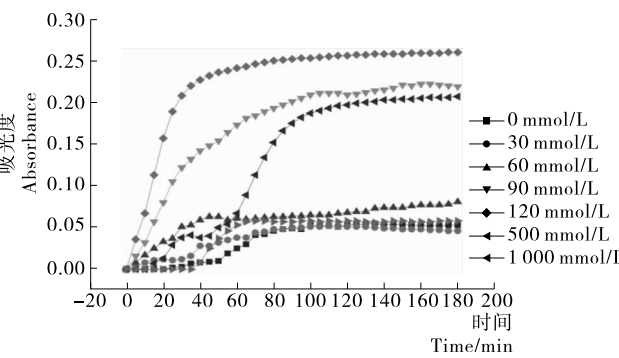


图 8 胶原蛋白溶液中不同离子强度对其聚集特性的影响
Figure 8 Effect of ionic strength in collagen solution on the aggregation behavior

表 6 不同离子强度下胶原蛋白溶液的聚集参数
Table 6 Aggregation parameters of collagen solution at different ionic strengths

离子强度/ (mmol · L ⁻¹)	聚集形成所 用时间/min	滞后时 间/min	聚集速度	聚集程度
0	105	20	6.235×10^{-4}	$0.053\ 0\pm0.001\ 0$
30	95	0	5.181×10^{-4}	$0.049\ 2\pm0.001\ 9$
60	65	0	1.066×10^{-3}	$0.069\ 3\pm0.006\ 1$
90	100	0	2.155×10^{-3}	$0.215\ 5\pm0.004\ 9$
120	85	0	3.019×10^{-3}	$0.256\ 6\pm0.002\ 7$
500	120	10	1.701×10^{-3}	$0.204\ 1\pm0.002\ 2$
1 000	35	35	1.642×10^{-3}	$0.057\ 5\pm0.000\ 6$

聚集特性进行研究,得出随着温度的升高,胶原蛋白的聚集速度和聚集程度增加;低浓度的胶原蛋白的自组装曲线分为三个阶段:滞后期、快速上升期和平稳期,高浓度的胶原蛋白溶液从保温开始即进行聚集,无滞后期,且随着胶原浓度的增加,聚集速度增快,聚集程度增加;在 pH 小于 7 时,胶原蛋白聚集时间较长;pH 由 7 增至 8 过程中,胶原蛋白聚集程度先增加后降低,在 pH 7.2 时,聚集程度最高,聚集速度也最高。随着离子浓度的增加,聚集程度和聚集速度先增加后降低,在 NaCl 浓度为 120 mmol/L 的胶原蛋白形成聚集体的速度最快,且聚集程度最高。本试验对兔皮胶原蛋白的微观结构和不同因素对其聚集特性的影响进行了研究,为兔皮胶原蛋白在材料领域的应用提供了理论依据,但其在材料领域的应用尚需进一步研究。

参考文献

[1] NAKAMURA Y N, IWAMOTO H, ONO Y, et al. Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the M. longissimus thoracis and M. pectoralis profundus from pigs [J]. Meat Science, 2003, 64(1): 43-50.

[2] LIU Da-song, NIKOO M, BORAN G, et al. Collagen and gelatin[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2015, 6(6): 527-557.

[3] WOO Jin-wook, YU Sung-jae, CHO Seung-mock, et al. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (Thunnus albacares) dorsal skin[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(5): 879-887.

[4] KARIM A A, BHAT R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 563-576.

[5] PARENTEAU-BAREIL R, GAUVIN R, BERTHOD F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications [J]. Materials, 2010, 3(3): 1 863-1 887.

[6] 刘少博, 陈复生, 徐卫河, 等. 胶原蛋白的提取及其可食性膜的研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 242-246.

[7] KAWAGUCHI Y, KONDO E, KITAMURA N, et al. In vivo effects of isolated implantation of salmon-derived crosslinked atelocollagen sponge into an osteochondral defect [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2011, 22 (2): 397-404.

[8] 闫鸣艳. 狭鳕鱼皮胶原蛋白结构和物理特性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.

[9] 钟朝辉, 李春美, 顾海峰, 等. 原子力显微镜研究鱼鳞胶原蛋白的溶液聚集行为[J]. 精细化工, 2006, 23(10): 983-987.

[10] FRANZ C M, MULLER D J. Studying collagen self-assembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy [J]. Atomic Force Microscopy in Biomedical Research: Methods and Protocols, 2011, 736(3): 97-107.

[11] 陈丽清, 韩佳冬, 马良, 等. 兔肉品质及其影响因素研究进展 [J]. 食品科学, 2011, 32(19): 298-301.

[12] 何翠, 夏杨毅, 张艳, 等. 腌制条件对兔肉湿腌传质动力的影响 [J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 17-20.

[13] 樊金山. 兔肉加工现状及其发展趋势[J]. 畜牧与饲料科学,

2013, 34(9): 77-78.

[14] 杨佳艺, 李洪军. 我国兔肉加工现状分析[J]. 食品科学, 2010 (17): 429-432.

[15] 王雪蒙, 于玮, 马良, 等. 兔皮胶原蛋白的提取及其结构鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2016(4): 209-213.

[16] 杨玲, 赵燕, 鲁亮, 等. 鲟鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其理化性能分析[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 41-46.

[17] 于玮, 王雪蒙, 马良, 等. 猪皮胶原蛋白提取过程中酶解条件优化及其结构鉴定[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2015(4): 106-113.

[18] 汪海波, 梁艳萍, 汪海婴, 等. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其部分生物学性能[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 553-561.

[19] 侯虎, 孙江, 毛家楠, 等. 海参胶原纤维形态及胶原蛋白理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(7): 1 491-1 495.

[20] 黄亚冬, 邢克智, 刘海学, 等. 点带石斑鱼鱼皮和鳞片胶原蛋白的提取及理化性质的研究[J]. 天津师范大学学报: 自然科学版, 2013, 33(2): 64-69.

[21] 张治国, 肖朝耿, 唐宏刚, 等. 虹鳟鱼皮胶原蛋白提取及其性质研究[J]. 中国食品学报, 2015(8): 148-154.

[22] 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.

[23] WANG Lin, AN Xin-xin, YANG Fang-mei, et al. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (Sebastes mentella) [J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 616-623.

[24] MUYONGA J H, COLE C G B, DUODU K G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (Lates niloticus) [J]. Food Chemistry, 2004, 85(1): 81-89.

[25] KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VIESSAN-GUAN W, et al. Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (Chiloscyllium punctatum) [J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1 519-1 526.

[26] MUYONGA J H, COLE C G B, DUODU K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (Lates niloticus) [J]. Food Chemistry, 2004, 86(3): 325-332.

[27] WANG Lin, LIANG Qiu-fang, CHEN Ting-ting, et al. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (Acipenser schrenckii) [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38(38): 104-109.

[28] 温慧芳, 陈丽丽, 白春清, 等. 基于不同提取方法的鲟鱼皮胶原蛋白理化性质的比较[J]. 食品科学, 2016(1): 74-81.

[29] 姚攀. 鳙鱼皮胶原蛋白的提取, 性能分析及体外自组装行为研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2013.

[30] ZHANG Xi, OOKAWA Mika, TAN Yong-kai, et al. Biochemical characterisation and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted from Bester sturgeon Huso huso× Acipenser ruthenus[J]. Food Chemistry, 2014, 160: 305-312.

[31] BAE I, OSATOMI K, YOSHIDA A, et al. Characteristics of a self-assembled fibrillar gel prepared from red stingray collagen [J]. Fisheries Science, 2009, 75(3): 765-770.