

文章编号:1000-0615(2012)04-0553-09

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27700

草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其部分生物学性能

汪海波^{1*}, 梁艳萍¹, 汪海婴², 周坚¹, 张寒俊¹

(1. 武汉工业学院食品学院, 湖北 武汉 430023;

2. 华中科技大学同济医学院 湖北 武汉 430030)

摘要: 以草鱼鱼鳞为原料, 分别提取鱼鳞中的酸溶性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC), 着重开展了其包括热稳定性、体外酶降解性以及胶原海绵材料特性在内的相关研究, 并与哺乳动物来源的猪皮胶原(PC)相比较。实验结果表明, 制备所得的3种胶原蛋白均为典型的I型胶原并具有完整的三螺旋结构; PC的热变性温度(41.6 °C)明显高于ASC(34.8 °C)和PSC(35.2 °C); 3种胶原蛋白的体外酶降解性能受水解酶的种类、胶原蛋白提取方法、胶原蛋白来源、胶原蛋白受热历史以及蛋白的自组装程度影响。胶原蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶对淡水鱼胶原均具有不同程度的降解能力, 但胶原蛋白酶的降解能力最强; 相同条件下, 3种胶原蛋白体外酶降解率依次为ASC>PSC>PC; 经热变性处理后胶原蛋白的体外酶降解率明显提高而经体外自组装处理后其体外酶降解率均出现不同程度的降低; 3种胶原样品冻干后得到的胶原海绵材料具有不同的机械性能和组织结构, ASC和PSC海绵是一种多孔但拉伸承受力较弱的海绵材料, 而PC则与之相反。

关键词: 草鱼; 鱼鳞; 胶原蛋白; 生物学性能

中图分类号: TS 254.4

文献标志码: A

胶原蛋白(collagen)是一类在生物体中广泛存在的纤维状结构蛋白质, 根据其分子结构的差异, 可分为I、II、III等多种类型, 其中I型胶原蛋白是生物体中最主要的存在形式, 其结构特征是由两条 $\alpha 1$ 和一条 $\alpha 2$ 肽链形成的三螺旋结构。由于胶原蛋白具有良好的生物相容性、加工适应性和低免疫排斥性, 近年来其作为医学组织工程的主要生物材料在人造皮肤、人造血管、创伤修复等领域均得到了广泛的应用^[1-4]。作为医学生物材料的胶原蛋白, 其生物功能主要表现: 通过自组装形成以胶原纤维为主体的多孔网格结构, 能为细胞的生长、发育提供三维空间和力学支撑, 从而实现促进自体细胞的快速生长、伤口愈合以及组织工程的皮肤再造等功能。因此, 理想的胶原材料应具有合适的降

解性能、良好的机械力学性能和多孔渗透性能。目前, 国内外学者围绕胶原蛋白生物材料的构建已开展了大量工作, 但几乎所有的研究都集中在哺乳动物来源的胶原蛋白上, 而基于淡水鱼来源的胶原蛋白的研究工作仍停留在蛋白的提取、纯化、结构鉴定和基本理化性质分析等方面^[5-9], 针对淡水鱼胶原蛋白的生物学性能特别是与其在生物医学材料领域中应用最为密切相关的降解性能、材料生物力学性能等方面的相关研究尚鲜有报道。为此, 本研究以草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼鳞为原料, 提取并制备酸溶性和酶溶性胶原蛋白, 重点开展鱼鳞胶原蛋白包括热稳定性、体外酶降解特性和胶原海绵材料机械力学特性在内的相关生物学性能研究, 并与哺乳动物来源的猪皮胶原相比较, 试图

收稿日期: 2011-08-25 修回日期: 2011-11-01

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(21076166); 武汉市科技局科技攻关计划项目(200920137006); 武汉市农副资源循环利用与新产品开发工程技术中心资助项目(201120637175); 湖北省自然科学基金重点项目(2009CDA117); 武汉工业学院研究生创新计划项目(09cx013)

通讯作者: 汪海波, E-mail: wanghaibo@whpu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

揭示淡水鱼胶原与哺乳动物胶原在生物学性能上的共性与差异性,为基于淡水鱼来源的胶原材料构建及其在医学组织工程领域中的应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂和仪器

原材料 新鲜草鱼鱼鳞、猪皮均购于武汉市常青花园超市。鱼鳞经反复冲洗后,低温风干并在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冷藏备用;猪皮洗净、脱毛并去除皮下脂肪后切碎,低温风干,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冷藏备用。

试剂和仪器 NaOH、NaCl、 Na_2CO_3 、EDTA、乙酸、盐酸等化学试剂均为国产分析纯;羟脯氨酸标准品($\geq 99\%$)上海康达氨基酸厂;胃蛋白酶(800~2 500 U/mg)、木瓜蛋白酶(400 U/mg)购置于丰达生物科技有限公司;胶原蛋白酶(125 U/mg)和胰蛋白酶(250 U/mg)购置于杰诺生物酶有限公司。

AR500 动态流变仪(美国TA公司); Cary-50紫外可见分光光度计(美国Varian 公司); V-1100可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); LGJ-10D冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂); NEXUS傅里叶红外光谱分析仪(美国Thermo Nicolet公司); J-810圆二色谱仪(美国JASCO公司); Q20差示扫描量热仪(美国TA公司); Gemini 2380型快速比表面积测定仪(美国麦克公司); 5848 Micro Tester微力材料试验机(美国Instron公司); S-3000N扫描电子显微镜(日本HITACHI公司)。

1.2 实验方法

胶原蛋白的提取、纯化 草鱼鱼鳞中胶原蛋白的提取参考文献[10-11]的方法,风干的草鱼鱼鳞依次用0.5 mol/L的 Na_2CO_3 溶液和0.3 mol/L的EDTA溶液浸泡脱除杂蛋白、色素和矿物质等成分,随后用0.5 mol/L的乙酸溶液(1:40, w/v)搅拌提取,重复提取2次,每次24 h,分离并合并上清液得到酸溶性胶原蛋白(acid-solubilised collagen, ASC)粗提液。提取残渣继续用含有2%胃蛋白酶的0.5 mol/L乙酸溶液(1:40, w/v)提取,重复提取2次,每次24 h,过滤并合并上清液,得到酶溶性胶原蛋白(pepsinsolubilised collagen, PSC)粗提液。分别向ASC和PSC粗提液中添加NaCl至盐浓度为0.9 mol/L,静置盐析24 h后过滤,胶原蛋白沉淀用0.5 mol/L的乙酸溶液复溶后依次对0.1 mol/L的乙酸和蒸馏水透析,最后冷冻干燥得到草鱼鱼鳞ASC

和PSC胶原蛋白样品。

猪皮胶原蛋白的提取:新鲜猪皮去除皮下脂肪,清水洗净并切碎,低温晾干后用无水乙醚脱脂24 h,低温风干后用10% NaCl溶液浸提脱除盐溶性杂蛋白,随后用含有2%胃蛋白酶的0.5 mol/L乙酸溶液(1:40, w/v)提取猪皮胶原蛋白,提取、纯化方法同草鱼鱼鳞PSC,冻干后得到猪皮胶原蛋白样品(pig skin collagen, PC)。

以上所有操作均在低于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下完成。

胶原蛋白样品的热稳定性分析

(1) DSC 分析

采用差式扫描量热仪测定样品变性温度。测定前仪器用金属钢进行校正,用空铝盒做对照,扫描温度范围 $20\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$;升温速率 $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,样品室氮气流量为 $20\text{ mL}/\text{min}$ 。

(2) 粘度分析

用0.05 mol/L乙酸配置0.5%的胶原蛋白溶液,用AR-500动态流变仪测定溶液黏度随温度的变化曲线。测定条件:椎板 40 mm , 2° ,测定为流体模式,数据获取为温度递增模式,扫描范围从 $10\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$,在10 min内完成,采集50个变量点,控制变量为剪切速率(100 s^{-1})。

(3) 圆二色谱(CD)分析

用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预冷处理的0.012 mol/L盐酸配制0.1 mg/mL的PSC、ASC和PC溶液并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存至测定。

圆二色谱测定条件:1 mm比色皿,波长 220 nm ,升温速率 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,温度扫描范围: $15\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$,控温精度 $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$,每 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 采集一个数据点。

胶原蛋白样品的体外酶降解性能评价

(1) 羟脯氨酸和胶原蛋白含量的定量测定

采用分光光度法方法定量测定羟脯氨酸含量^[12],测定标准曲线为 $Y=0.1106X+0.0193$ ($R^2=0.9998$, X代表羟脯氨酸的质量浓度, Y代表吸光值)。在羟脯氨酸定量测定的基础上,分别测定不同质量胶原蛋白样品中羟脯氨酸的含量,通过线性拟合,建立草鱼鱼鳞胶原ASC、PSC和猪皮胶原蛋白PC样品质量与羟脯氨酸含量间的换算方程,分别为

$$\text{ASC: } Y=13.184X-3.1743, R^2=0.9902$$

$$\text{PSC: } Y=13.504X-5.7874, R^2=0.9973$$

$$\text{PC: } Y=12.808X-3.3282, R^2=0.9958$$

式中, X为羟脯氨酸的质量, mg; Y为胶原蛋白的质

量, mg。

(2) 不同种类的酶对胶原降解能力的比较^[13]

在本研究中, 采用如下方法测定胶原蛋白的体外酶降解性能: 用0.02 mol/L的盐酸配置2 mg/mL的胶原酸溶液, 置于透析袋中(截留分子量>14 000 u)对水透析至中性(为防止在该过程中胶原的自然降解, 该实验步骤的操作温度控制在4 ℃以下), 并实时监测透析外液在230 nm处的紫外吸收(实验结果表明, 在该条件下透析, 透析外液230 nm处的紫外吸收值始终为0, 提示在该过程中没有胶原的自然降解现象产生), 随后向透析袋中准确添加总活力为200单位的水解酶, 并将其转移至250 mL 烧杯中, 向烧杯中准确添加200 mL蒸馏水作为透析外液, 水浴控温25 ℃, 实时测定透析外液中羟脯氨酸总含量并绘制胶原蛋白样品的体外酶降解曲线, 用“羟脯氨酸和胶原蛋白含量的定量测定”中建立的关系方程换算水解平衡时(100 h)降解出透析袋的胶原蛋白总质量, 计算胶原蛋白降解率。

$$\text{降解率(\%)} = \frac{\text{透析外液中总胶原蛋白质量}}{\text{初始胶原蛋白总质量}} \times 100$$

分别选择胶原蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶作为水解用酶, 以草鱼鱼鳞胶原PSC为测试对象, 比较不同酶对胶原蛋白的降解能力, 并筛选效果最好的酶作为后续测定用酶。

(3) 草鱼鱼鳞胶原ASC、PSC和猪皮PC体外酶降解性能的比较

按上述测定方法, 以胶原蛋白酶为水解用酶, 分别绘制草鱼鱼鳞胶原ASC、PSC和猪皮胶原PC的体外酶降解曲线, 计算蛋白降解率, 比较几种胶原的体外酶降解性能。

(4) 热变性预处理对胶原体外降解性能的影响

选择草鱼鱼鳞PSC为测试对象, 用0.02 mol/L的盐酸配制20 mL浓度为2 mg/mL的胶原溶液, 分别置于不同条件下进行热变性预处理(37 ℃, 2 h; 80 ℃, 2 h), 然后按上述方法透析并测定胶原降解性能, 以不进行热变性预处理的胶原作为空白对照, 考察热变性处理对胶原体外降解性能的影响。

(5) 自组装处理对胶原降解的影响

以PSC、ASC和猪皮胶原PC为研究对象, 将胶原分别溶解在20 mL的0.02 mol/L的盐酸中, 配制成为2 mg/mL的溶液, 然后置于25 ℃下透析至中性并保持24 h(促进胶原的体外自组装进程), 空白对

照样品置于0 ℃条件下透析至中性, 然后按照“不同种类的酶对胶原降解能力的比较”中的方法加入胶原酶, 并在25 ℃条件下开展酶降解实验。

胶原海绵样品的制备及其性能评价

(1) 胶原蛋白海绵样品的制备

用0.5 mol/L的乙酸准确配置5 mg/mL的胶原酸溶液, 置于透析袋中4 ℃条件下对水透析至中性, 将透析好的胶原溶胶小心转移至不锈钢圆盘(直径25 cm)中, -45 ℃条件下冻干, 得到厚度约为10 mm的胶原海绵样品。

(2) 机械性能测试

参考文献 [14]的方法, 采用电子万能材料试验机测定3种胶原海绵材料的力学拉伸性能, 具体测定方法: 将胶原海绵剪成100 mm×10 mm尺寸, 厚10 mm 的纺锤形, 固定于试验机拉伸夹具上, 进行拉伸实验, 测试温度为室温。

(3) 比表面积测定

采用Gemini 2380型快速比表面积测定仪测试胶原海绵样品的比表面积。测试温度为液氮饱和温度(77.4 K), 吸附介质为高纯氮气(99.99%), 吸附相对压力 p/p_0 (p , p_0 分别为氮低温吸附的平衡压力及饱和压力)为0.050~0.986。根据BET法和低压下测得的吸附量计算胶原海绵样品的比表面积。

(4) 扫描电镜观察

采用草鱼鱼鳞胶原蛋白ASC、PSC和猪皮胶原蛋白PC的海绵材料作为研究对象, 将样品裁剪成直径4 mm厚2 mm大小的小片, 真空喷金后, 扫描电镜观察样品表面结构。

2 结果

2.1 草鱼鱼鳞和猪皮中胶原蛋白的提取

采用“胶原蛋白的提取, 纯化”中的方法提取并分离纯化得到的3种胶原蛋白的冻干产物均为白色、蓬松的海绵状样品; 经SDS-PAGE凝胶电泳分析, ASC、PSC和PC均属典型的I型胶原蛋白, 其中PC分子量为320 ku 而ASC和PSC分子量分别为350和320 ku。国外学者曾采用类似方法从鱿鱼(*Dosidicus gigas*)鱼皮^[15]以及黑鼓鱼(*Pogonia cromis*)鱼鳞^[10]中提取酸溶性胶原蛋白(ASC)并测定其分子量分别为320 和370 ku, 该结果提示不同来源的鱼类胶原蛋白在分子结构和分子量大小上存在差异。红外光谱分析表明, ASC、PSC和PC均具有

天然 I 型胶原蛋白的特征吸收带, 其在 1245 cm^{-1} 和 1454 cm^{-1} 处吸收比值分别为 0.98、0.93 和 1.02, 说明 3 种胶原蛋白样品均保留有完整的三螺旋分子结构^[16]。

2.2 胶原蛋白样品的热稳定性分析

DSC 扫描、动态粘度分析和圆二色谱(CD)扫描是测定胶原蛋白热变性温度的 3 种常用手段, 但 3 种方法测定结果的差异性尚未见相关的比较研究。本实验分别采用上述 3 种方法测定胶原蛋白样品 ASC、PSC 和 PC 的热变性温度(图 1), 在 3 种测定方法的实验结果中, 猪皮胶原(PC)的热变性温度均明显高于鱼鳞胶原(ASC 和 PSC), 显示出哺乳动物来源的胶原蛋白与淡水鱼来源的胶原蛋白在热稳定性上存在比较明显的差异性; 与酶溶性胶原蛋白(PSC)相比, 鱼鳞酸溶性胶原蛋白(ASC)的变性起始温度略高, 但变性终点温度基本一致。3 种胶原蛋白热变性焓大小依次为 $PC > PSC > ASC$, 反映了破坏其三螺旋分子结构的难易程度(表 1)。曾名勇等^[17]采用粘度法测定了鳙(*Aristichthys nobilis*)、鲈(*Lateolabrax japonicus*)

和鲫(*Carassius auratus gibelio*) 鱼皮酸溶性胶原蛋白的热变性温度分别为 30、25 和 27 °C, 其中鳙鱼皮酸溶性胶原蛋白的热变性温度与本次测定的草鱼鱼鳞 ASC 较为接近 32 °C。与之相对应的是, 草鱼和鳙的栖息水温(25~32 °C)略高于鲈和鲫(25~29 °C)^[18], 该实验结果与 Kimura 等^[19]的研究结论相吻合, 即水产动物胶原的热变性温度与其栖息的环境温度相关。

在实验所选择的 3 种分析方法中, 粘度法测定的变性起始温度和终点温度均低于 DSC 和 CD 法, 说明粘度测定法能更敏锐地监测出胶原分子热变性导致的粘度变化, 但在热变性后期胶原分子结构的变化对其粘度值的影响较小; CD 法测定得到的热变性起始温度和终点温度值均明显高于 DSC 和粘度法的测定结果, 这可能与 CD 测定法的测定原理以及胶原蛋白测定浓度(0.1 mg/mL)较低有关。同时, 从 CD 图谱中可以看到 ASC、PSC 和 PC 均表现为两个阶段的变性过程(表现为突变阶段斜率的差异), 第一阶段的变性温度范围分别为 33~36 °C, 32~35 °C 和 40~42 °C, 第二阶段的变性

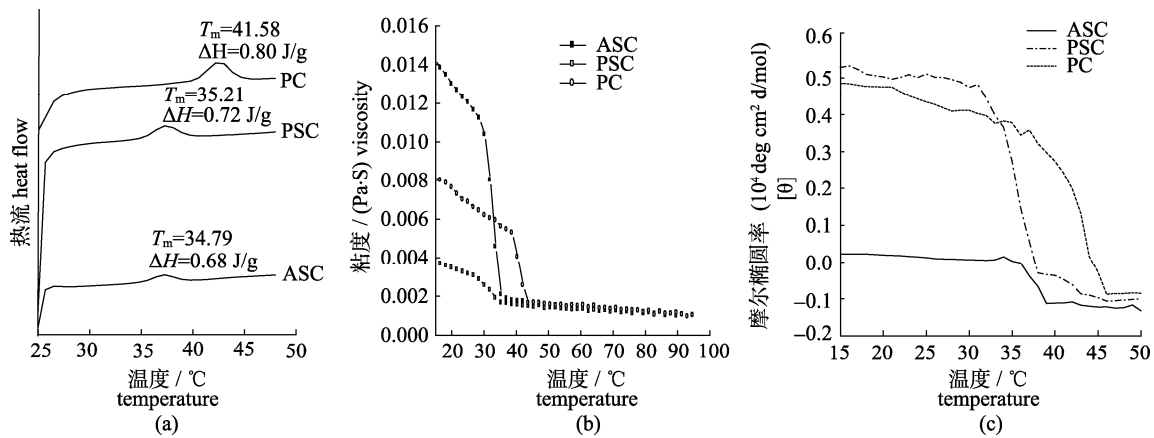


图 1 胶原蛋白样品的热稳定性分析

(a) DSC 扫描; (b) 粘度分析; (c) CD 扫描

Fig. 1 The thermal behavior of collagens by different methods

(a) DSC thermograms; (b) Viscosity curve; (c) CD spectra

表 1 胶原蛋白样品热变性温度测定参数

Tab.1 The parameters of thermal transition measurement

样品 samples	变性起始温度/°C onset transition temperature			变性终点温度/°C terminal transition temperature			变性峰值温度/°C maximum transition temperature	变性焓/(J/g) transition enthalpy (DSC)
	DSC	CD	粘度测定 viscosity	DSC	CD	粘度测定 viscosity		
PSC	31.7	32.2	31.2	37.5	38.2	35.2	35.2	0.72
PC	38.9	40.6	38.8	44.5	46.9	44.3	41.6	0.80

温度范围分别为36~38 ℃, 35~38 ℃和42~47 ℃, 说明3种胶原蛋白分子中均存在两种结构域, 并具有不同的热稳定性^[10], 该结果提示, CD测定法能更精确地观测胶原蛋白热变性的动态过程。

2.3 胶原蛋白样品的体外酶降解性能评价

不同种类蛋白酶对胶原蛋白样品降解能力的比较 以草鱼鱼鳞PSC为测试对象, 以胶原蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶为水解酶, 比较不同酶对PSC的降解能力(图2), 结果表明, 所选择的3种蛋白酶对草鱼鱼鳞PSC 均具有不同程度的降解能力, 但胶原蛋白酶的降解能力最强, 可以在最短的时间内产生最大的降解效果(酶降解至平衡时, PSC蛋白的降解率达70.5%), 其次为胰蛋白酶(56.4%)和木瓜蛋白酶(37.4%), 这可能与胶原蛋白酶是一种特异性的胶原蛋白内切酶有关。根据实验结果, 优选胶原蛋白酶作为后续研究用酶。

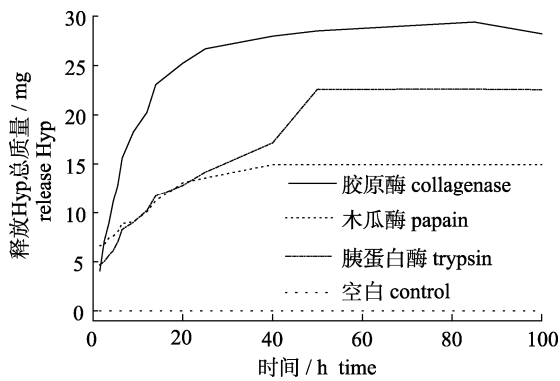


图2 不同种类酶对PSC的降解曲线
Fig. 2 The degradation curve of PSC by different enzymes

草鱼鱼鳞胶原ASC、PSC和猪皮PC体外酶降解性能的比较 以胶原蛋白酶作为水解用酶, 在相同条件下, 分别对草鱼鱼鳞ASC、PSC和猪皮胶原PC开展体外酶降解试验(图3)。结果表明, 在胶原蛋白酶的作用下, 所有胶原样品均在40 h左右即达到最大蛋白降解率; 降解至平衡时(100 h), 3个胶原样品蛋白降解率大小依次为草鱼鱼鳞ASC(90.60%)>PSC(74.65%)>PC(70.45%), 在相同条件下, 酸法提取的ASC蛋白降解率远高于酶法提取的PSC和PC, 说明胶原蛋白提取方法对胶原样品的体外酶降解性能有显著影响; 此外, PSC的蛋白降解率大于PC, 提示淡水鱼来源的胶原蛋白比哺乳动物来源的胶原更容易被降解。Lin等^[20]分别从猪皮、牛皮、青蛙皮和鲨鱼皮中提取酶溶性胶原蛋白并比较了其在

胶原蛋白酶溶液中的降解性能, 结果表明, 在相同降解条件下, 猪皮和牛皮胶原蛋白的体外酶降解速率明显低于青蛙皮和鲨鱼皮胶原, 说明哺乳动物胶原蛋白比水生动物具有更好的酶解稳定性, 本次实验结果与其研究结论相一致。

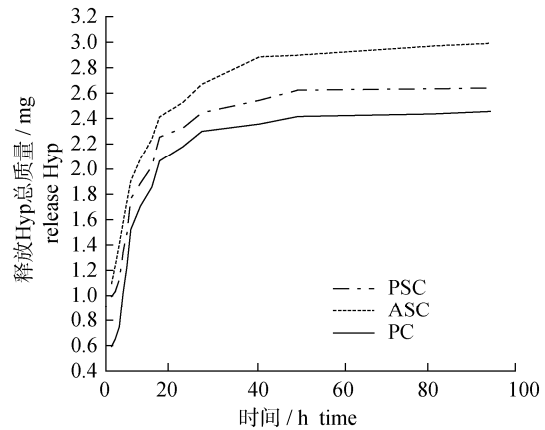


图3 3种胶原样品体外酶降解性能的比较
Fig. 3 The in vitro degradation behavior of different collagens

热变性预处理对胶原体外降解性能的影响 以PSC为测试样品, 以胶原蛋白酶为水解用酶, 分别比较了热变性蛋白样品和空白对照样品的体外酶降解性能(图4), 结果表明, 热变性处理前后, PSC的蛋白降解率分别由74.65%提高到78.02% (37 ℃, 2 h)和88.15%(80 ℃, 2 h), 说明经过热变性处理后, 胶原蛋白的酶敏感性增强, 且热处理温度越高, 蛋白降解率越大。由于热变性处理主要导致胶原蛋白三螺旋结构的破坏, 由此说明, 胶原蛋白三螺旋结构及其完整性是影响其体外酶降解性能的重要因素之一。

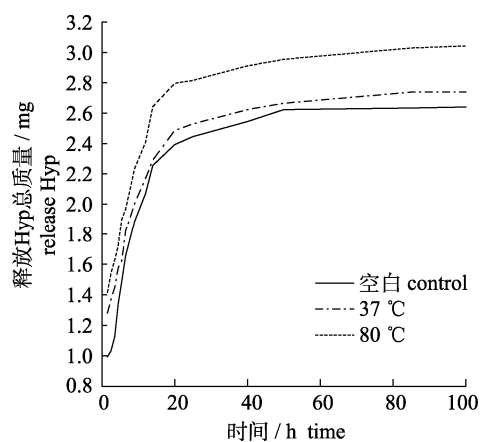


图4 热处理对胶原(PSC)体外降解性能的影响
Fig. 4 The effect of thermal treatment on the degradation behavior of PSC

自组装处理对胶原降解的影响 在胶原分子的诸多溶液行为中,分子间的自组装是最重要的行为特征之一。当溶液pH、环境温度以及胶原浓度合适的条件下,原胶原分子(precollagen)可以通过分子间的相互作用而自组装形成大的纤维丝(fibrillar),纤维丝进一步可以组装形成更大尺寸的胶原纤维(fibril)和胶原纤维束(fibril bundles)^[21]。在生物体中,天然胶原分子正是通过这种自组装行为最终形成各种具有完整结构的机体组织并提供生物功能。淡水鱼胶原ASC、PSC以及猪皮胶原PC在25℃条件下能较好的完成分子间的体外自组装。根据该实验结果,本实验将3种胶原蛋白样品置于25℃水浴中透析至中性并促进其分子间自组装地完成,然后开展酶

降解实验,并与0℃条件下透析(可以有效抑制分子间自组装行为)样品的体外酶降解性能相比较,考察体外自组装对胶原降解性能的影响。结果表明,经过自组装处理后,3种胶原蛋白样品的酶敏感性均有不同程度的下降,ASC蛋白降解率从90.61%下降至86.66%,PSC蛋白降解率从74.65%下降至70.60%,PC蛋白降解率从70.45%降低到66.29%(图5)。由于自组装是胶原分子通过氢键相互缔合形成大的胶原纤维和胶原束的分子有序聚集过程,因此通过该过程可以有效掩盖胶原酶的水解点位,从而降低了其酶作用效率。在3种胶原样品中,猪皮胶原PC自组装后蛋白降解率下降最为显著(下降率达5.9%),提示PC蛋白的自组装行为更为充分。

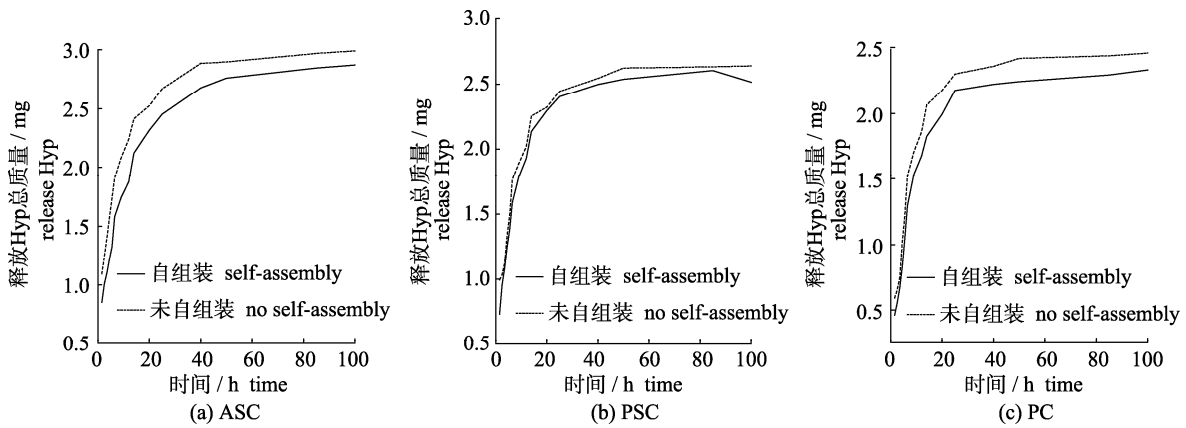


图5 自组装对胶原蛋白体外降解性能的影响
Fig. 5 The effect of self-assembly on the degradation behavior of collagens

2.4 胶原海绵样品的制备及其性能评价

在相同条件下,实验制备得到的3种海绵材料中,哺乳动物来源的PC的材料拉伸性能显著好于淡水鱼来源的ASC和PSC(图6),其最大拉力值和拉伸延伸率均是ASC和PSC的2倍以上(表2),说明PC的材料力学性能明显优于ASC和PSC,这可能与PC分子的氨基酸组成和分子间的自组装程度有关。对于淡水鱼来源的ASC和PSC胶原海绵材料,两者的拉伸延伸率基本一致,而ASC的最大拉伸力大于PSC(表2),说明胶原蛋白提取方法对胶原海绵的拉伸力学性能有一定的影响。海绵材料比表面积测定结果表明(表2),在3种胶原海绵材料中,PSC的比表面积最大,其次是ASC,而PC海绵的比表面积最小,说明PC海绵比较致密而ASC和PSC海绵材料则更为疏松。

SEM扫描表明(图7),3种海绵材料中的胶原蛋白分子均呈纤维状和多孔结构,是组织工程中

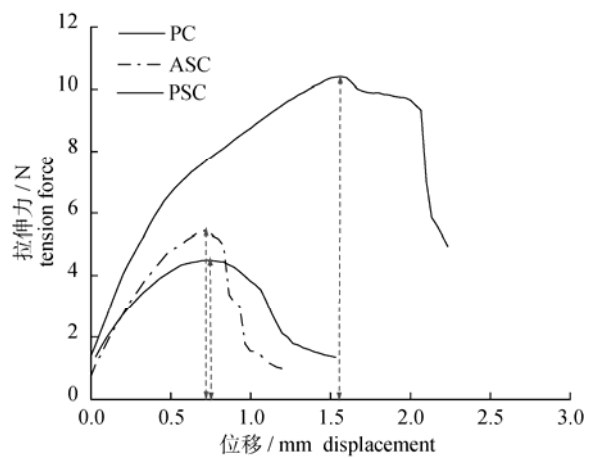


图6 胶原蛋白应力—应变曲线
Fig. 6 The stress-strain curve of collagens

表 2 3 种胶原蛋白海绵的性能指标
Tab. 2 The capability parameters of three collagen sponges

指标 item	ASC	PSC	PC
断裂时所受的最大力/N maximum break force	5.486	4.492	10.404
拉伸延伸率/% Percentage of elongation	0.733	0.730	1.566
比表面积/(m ² /g) BET surface area	3.82 ± 0.08	4.34 ± 0.12	3.24 ± 0.17

注: 拉伸延伸率(%) = $\frac{\text{断裂时的位移}}{\text{材料长度}} \times 100$

Notes: percentage of elongation(%) = $\frac{\text{displacement at break}}{\text{material length}} \times 100$

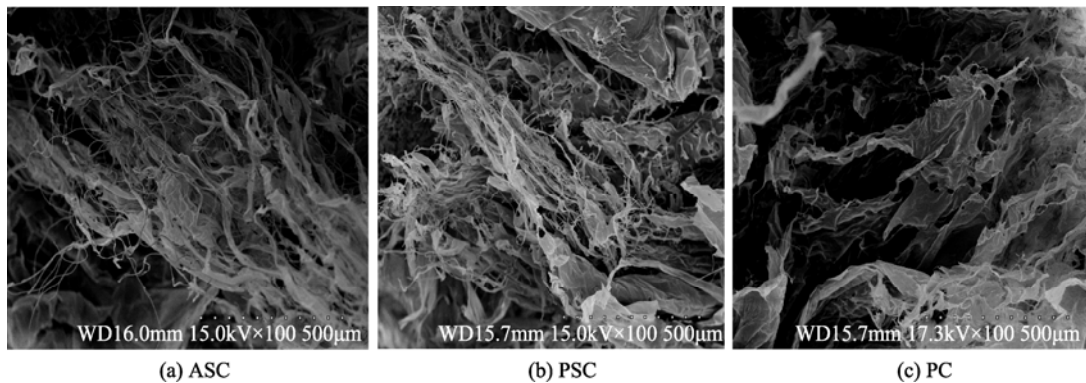


图 7 3 种胶原海绵材料的 SEM 扫描图谱(×300)
Fig. 7 Scanning electron micrograph of three collagen sponges

提取并纯化酸溶性胶原蛋白(ASC)和酶溶性胶原蛋白(PSC), 着重开展了鱼鳞胶原蛋白包括热稳定性、体外酶降解特性和胶原海绵材料机械力学特性在内的生物学性能, 并与哺乳动物来源的猪皮胶原(PC)相比较, 试图阐明淡水鱼胶原与哺乳动物胶原在生物学性能上的共性与差异性。实验结果表明, 猪皮胶原PC的热稳定性明显优于草鱼鱼鳞胶原ASC和PSC; 在胶原蛋白酶的作用下, 猪皮胶原PC和鱼鳞胶原ASC、PSC表现出相似的体外降解行为, 但PC的降解速率明显低于ASC和PSC, 说明哺乳动物胶原具有更好的酶降解稳定性。淡水鱼胶原蛋白的体外酶降解性能受蛋白提取方法、胶原分子受热历史及其自组装程度等因素的影响。热变性处理能显著提高胶原分子体外酶降解率, 而胶原分子经自组装历程后其酶敏感性会出现不同程度的降低; 胶原海绵材料性能分析结果表明, ASC和PSC海绵是一种多孔但拉伸承受力较弱的海绵材料, 而PC则与之相反。本次研究的结果表明, 尽管猪皮胶原PC和草鱼鱼鳞胶原ASC、PSC均属典型的

生物支架材料的理想结构形式, 其中ASC和PSC海绵是一种疏松、丝带状的多孔组织, 而PC海绵则是一种连续的带状多孔组织。结合拉伸力学性能的测定结果, 说明ASC和PSC海绵是一种多孔但拉伸承受力较弱的海绵材料, 而PC则与之相反。该结果提示, 淡水鱼来源和哺乳动物来源的胶原材料具备不同的材料特性, 适用于不同要求的组织工程支架材料的制备。

3 结论

本研究分别采用酸法和酸-酶法从草鱼鱼鳞中

I 型胶原, 但其在分子热稳定性、体外酶降解特性以及材料机械力学特性等方面仍存在较为明显的差异, 预示淡水鱼胶原与哺乳动物胶原在生物材料领域具有不同的利用形式与途径。

参考文献:

- [1] Jiang F Z, Horber H, Howard J, *et al.* Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes[J]. *Journal of Structural Biology*, 2004, 148(3): 268–278.
- [2] Parkinson J, Kadler K E, Brass A. Simple physical model of collagen fibrillogenesis based on diffusion limited aggregation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 247(4): 823–831.
- [3] Pins G D, Christiansen D L, Patel R, *et al.* Self-assembly of collagen fibers influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties[J]. *Biophysical Journal*, 1997, 73(4): 2164–2172.
- [4] Guo C, Kaufman L J. Flow and magnetic field induced collagen alignment[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(6): 1105–1114.
- [5] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.*

- Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of big-eye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 363–372.
- [6] Nagai T, Yamashita E, Taniguchi K, *et al.* Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish [J]. Food Chemistry, 2001, 72(4): 425–429.
- [7] Nagai T, Suzuki N, Nagashima T. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu [J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 296–301.
- [8] Woo J W, Yu S J, Cho S M, *et al.* Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(5): 879–887.
- [9] 王艳, 汪海波. 草鱼鱼鳞中活性胶原蛋白提取工艺及参数优化[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 70–76.
- [10] Ogawa M, Portier R J, Moody M W, *et al.* Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream(*Archosargus probatocephalus*)[J]. Food Chemistry, 2004, 88(4): 495–501.
- [11] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) [J]. LWT–Food Science and Technology, 2010, 43(5): 792–800.
- [12] 郭恒斌, 曾庆祝, 闫磊. 分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量[J]. 现代食品科技, 2007, 23(7): 81–83
- [13] Olde Damink L H H, Dijkstra P J, van Luyn M J A , *et al.* *In vitro* degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water soluble carbodiimide [J]. Biomaterials, 1996, 17(7): 679–684.
- [14] Kiyoshi Y, Nobuyuki T, Ayako K, *et al.* Films of collagen crosslinked by s-s bonds: preparation and characterization [J]. Biomaterials, 2001, 22(8): 855–863.
- [15] Uriarte-Montoya M H, Arias-Moscoso J L, Plascencia-Jatomea M. Jumbo squid(*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms [J]. Bioresource Technology, 2010,101 (11): 4212–4219
- [16] Plepis A M D G , Goissis G , Das-Gupta D K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen[J]. Polymer Engineering and Science, 36(24): 2932–2938
- [17] 曾名勇, 张联英, 刘尊英, 等. 几种鱼皮胶原蛋白的理化特性及其影响因素[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(4): 608–612
- [18] 刘焕亮. 水产养殖学概论 [M]. 青岛: 青岛出版社, 2000: 230.
- [19] Kimura S. Studies of marine in vertebrate collagens[J] Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography, 1969, 35(8): 743–748.
- [20] Lin Y K, Liu D C. Comparison of pPhysical-chemical properties of type I collagen from different species [J]. Food Chemistry, 2006, 99(2): 244–251
- [21] Li Y P, Asadi A, Monroe M R, *et al.* pH effects on collagen fibrillogenesis *in vitro*: Electrostatic interactions and phosphate binding[J]. Materials Science and Engineering C, 2009, 29(5): 1643–1649

Isolation and partial biological properties of scale collagens from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

WANG Hai-bo^{1*}, LIANG Yan-ping¹, WANG Hai-ying², ZHOU Jian¹, ZHANG Han-jun¹

(1. College of Food Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: In this study, the acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) were extracted from scale of grass carp by the methods of acid and acid-pepsin. The partial biological properties of these collagens were researched and compared with pig skin collagen (PC). Experiment results indicate that the ASC, PSC and PC were type I collagen and the triple helical structure in the three collagen samples. The thermal transition temperature of PC(41.6 °C) was obviously higher than that of ASC(34.8 °C) and PSC(35.2 °C). The *in vitro* enzyme degradation properties of collagens were influenced by many factors, such as the enzyme variety, the isolation methods of collagen, the collagen sources, the thermal treatment and self-assembly degree of collagens. PSC can be degraded by collagenase, trypsin and papain, but the degradability of collagenase is the most notable. In the same conditions, the order of *in vitro* enzyme degradation ratio of these collagens were ASC>PSC>PC. The enzyme degradation ratio of these collagens could be increased after thermal treatment and could be decreased after self-assembly processing. The collagen sponges of ASC, PSC and PC have different structural and mechanical characterization. Sponges of ASC and PSC were porous and had low mechanical strength but the sponge of PC was the other way round.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; fish scale; collagen; biological properties

Corresponding author: WANG Hai-bo. E-mail: wanghaibo@whpu.edu.cn