

# 离子强度对乌鳢胶原蛋白短肽聚集结构及理化特性的作用

刘炜熹<sup>1,2</sup>, 孙卫东<sup>2</sup>, 张业辉<sup>1</sup>, 张友胜<sup>1</sup>, 焦文娟<sup>1</sup>, 黄利华<sup>3</sup>

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

(3. 广州城市职业学院食品系, 广东广州 510405)

**摘要:** 为了研究乌鳢胶原肽在 6 种不同离子强度诱导下聚集的结构与特性的变化规律, 对聚集体变化过程中的内源荧光、浊度、微观结构、粒径、黏度及其二级结构进行测定。结果表明, 在 0~500 mM 的 NaCl 范围内, 离子强度具有促进胶原蛋白肽自组装聚集的效果, 且聚集速率随离子强度的增大而增加。在 0~150 mM 范围内, 胶原蛋白肽聚集的三维网络紧密性增加, 聚集体平均粒径增大 74.42%, 最大剪切黏度增加 487.67%。当离子强度在 150~500 mM 范围时, 胶原蛋白肽三维网络紧密性降低, 聚集体平均粒径下降, 最大剪切黏度降低 21.39%。胶原蛋白肽聚集体的二级结构并没有随离子强度变化而发生明显变化。因此, 适度的增大样品离子强度可促进胶原肽的自组装聚集, 改善其凝胶的三维网络结构和理化特性, 为胶原蛋白肽进一步应用于制备药物载体的研究提供参考。

**关键词:** 胶原蛋白肽; 离子强度; 自组装; 微观结构; 理化特性

文章编号: 1673-9078(2020)08-65-72

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0117

## Effect of Ionic Strength on Aggregation Structure and Physicochemical Properties of Collagen Peptide of *Channa argus*

LIU Wei-xi<sup>1,2</sup>, SUN Wei-dong<sup>2</sup>, ZHANG Ye-hui<sup>1</sup>, ZHANG You-sheng<sup>1</sup>, JIAO Wen-juan<sup>1</sup>, HUANG Li-hua<sup>3</sup>

(1. Sericulture & Agri-food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (2. Institute of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China) (3. Guangzhou City Vocational College Food Department, Guangzhou 510405, China)

**Abstract:** In order to determine the effect of *Channa argus* collagen peptide (CP) of self-assemble aggregation on the change of structure and characteristics at 6 different ionic strengths, the intrinsic fluorescence, turbidity, microstructure, diameter, viscosity and secondary structure of the aggregate were measured. The results showed that the self-assembly and aggregation of CP can be promoted by ionic strength at the range of 0~500 mM, and the aggregation rate was increased with the increasing ionic strength. The three-dimensional network compactness of CP self-assembly increased, and the average particle size of the aggregate increased by 74.42%, and the maximum shear viscosity increased at the range of 0~150 mM. The three-dimensional network compactness of CP decreased, the average particle size of the aggregate decreased, and the

引文格式:

刘炜熹, 孙卫东, 张业辉, 等. 离子强度对乌鳢胶原蛋白短肽聚集结构及理化特性的作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 65-72

LIU Wei-xi, SUN Wei-dong, ZHANG Ye-hui, et al. Effect of ionic strength on aggregation structure and physicochemical properties of collagen peptide of *Channa argus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 65-72

收稿日期: 2020-02-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972021), 广东省自然科学基金重点项目 (2018B0303110006), 广东省国际合作项目 (2018A050506048), 广东省重点研发项目 (2019B020212003), 广东省促进经济高质量发展专项 (MEPP[2019]A38), 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (2019KJ117), 广东省农科院人才项目 (R2018PY-JX002), 广东省教育厅科技项目 (2017GKSCX057)

作者简介: 刘炜熹 (1994-), 男, 在读硕士, 研究方向: 制糖工程

通讯作者: 张业辉 (1979-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品科学与农产品加工

maximum shear viscosity decreased by 21.39% at the range of 150~500 mM of ionic strength. However, the secondary structure of CP had not changed significantly. In conclusion, the self-assembly process of CP can be promoted and its structure and physicochemical properties can be effectively improved when the ionic strength of samples was moderately increased. The results of this study can provide a reference for the further application of CP in the preparation of drug carriers.

**Key words:** collagen peptide; ionic strength; self-assembly; microstructure; physicochemical properties

我国是世界第一的水产大国, 2018 年水产品产量约 6400 多万 t, 其中淡水水产品产量约占总产量的 49%<sup>[1]</sup>。乌鳢 (*Channa argus*) 俗称黑鱼、生鱼, 作为一种肉食性淡水鱼类, 繁殖能力强, 且具有极强的生命力及环境适应能力, 离水可生存约 3 d, 是我国淡水鱼养殖的主要品种之一。乌鳢除了鲜活销售外, 其加工模式主要集中于生鱼肉和冻鱼片; 鱼骨、鱼皮等副产物常作为饲料或废弃物, 对于其中的生物活性成分没有有效开发利用。副产物利用率低、利用价值低以及副产物加工产品价值低是当前水产业面临的主要问题之一。因此, 对鱼皮胶原蛋白的研究有助于提高淡水产业加工副产物的应用价值, 对产业发展具有促进的效果。

胶原蛋白肽来源丰富, 营养价值高, 具有良好的生物相容性和低抗原性, 且在低温条件下具有良好的生物活性。目前, 已有不少研究者对胶原蛋白自组装进行了相关的研究。如 Yan 等<sup>[2]</sup>通过采用荧光探针 ThT 研究了罗非鱼皮胶原的动态自组装行为, 研究发现胶原通过一个或两个活性单体形成的微核进行自组装, 而不同的 pH 值和离子强度并不改变胶原蛋白的自组装机制。Kathryn 等<sup>[3]</sup>将甲基丙烯酸酯基团的赖氨酸残基上的游离胺引入胶原蛋白, 使其保留原有的自组装性、生物降解性和天然活性的同时, 具有一定的光活性。Zhang 等<sup>[4]</sup>制备出丙烯酸接枝胶原 (AA-g-Col), 探讨得出过高的接枝密度会削弱胶原蛋白的自组装性能, 且胶原的基质力学性能及细胞相容性也随之降低。但就目前关于胶原蛋白肽自组装相关的研究较为鲜见。本文以乌鳢鱼皮作为原材料, 对处于不同离子强度条件下的酶解胶原蛋白肽的自组装行为及微观机构和理化特性的影响进行研究, 以期在水产鱼皮胶原蛋白进一步研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜乌鳢 (体重 510±200 g), 购于广州天河北华润万家超市; 胃蛋白酶, 阿拉丁公司; NaOH、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (均为分析纯), 福建化学试剂有限公司; NaCl、戊二醛 (分析纯), 天津市大茂化学试剂厂;

正丁醇、冰乙酸、无水乙醇 (分析纯), 天津市富宇精细化工有限公司。

### 1.2 仪器与设备

UV-1800 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; Cary Eclipse 型分子荧光分光光度计, 美国 Varian 公司; ST85B3-1 型真空冷冻干燥机, 美国 Milirock 公司; JascoJ-815 型圆二色谱仪, 日本分光公司; WJL-628 激光粒度仪; 上海仪电物理光学仪器公司; S-3400N 型扫描电子显微镜, 日本 Olympus 公司; 流变仪 (AR-1500 EX), 美国 TA 公司; 电子显微镜 (Olympus CX31RTSF), 日本 Olympus 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 乌鳢鱼皮胶原蛋白肽的制备

从新鲜乌鳢肉中切下鱼皮, 去除残肉, 洗净, 用剪刀将鱼皮尽量剪碎, 称重, 以液料比 1:10 (g/mL), 将 0.1 mol/L 的 NaOH 加入鱼皮中, 浸泡 24 h 后除去非胶原蛋白成分中的杂蛋白和色素, 然后使用去离子水将鱼皮洗至中性, 沥干。将鱼皮浸泡于 10% 正丁醇溶液 (1:10, *m/V*) 中脱脂 24 h, 然后用去离子水冲洗鱼皮至中性 pH 值, 沥干。处理后的鱼皮残留物用 0.5 mol/L 乙酸溶液 (1:10, *m/V*) 中 48 h 提取胶原蛋白, 随后溶解液在 10000 转, 4 °C 的条件下离心 20 min 后取上清液, 加入 NaCl 盐析, 8000 转, 4 °C 的条件下离心 10 min 后取固体, 在通过 0.1 mol/L 的乙酸复溶, 随后于去离子水 (1:50, *V/V*) 中透析 24 h, 随后冻干获得胶原蛋白, 胶原蛋白复溶于乙酸后使用胃蛋白酶酶解 2 h 后获得胶原蛋白肽。

#### 1.3.2 荧光光谱测定

利用胶原蛋白肽内源性酪氨酸残基作为荧光标记, 使用 Cary Eclipse 型分子荧光分光光度计在 24 °C 条件下不同离子强度的胶原蛋白肽自组装 5 min 后立即进行荧光光谱扫描, 激发波长设定为 280 nm, 发射波长为 290~500 nm, 激发与发射光谱狭缝为 5 nm<sup>[5]</sup>。

#### 1.3.3 表观变化观测

将同一浓度的胶原蛋白肽溶液 10 mL 加入透明的西林瓶中, 分别加入不同含量的 NaCl 使得各胶原蛋白肽溶液离子强度为 (0、50、100、150、200、

500 mM), 置于常温条件下, 于不同时间点观测胶原蛋白肽溶液的变化情况。

### 1.3.4 浊度测定

使用 UV-1800 型紫外分光光度计测定不同离子强度条件下胶原蛋白肽自组装过程中吸光度的变化来监测胶原蛋白肽自组装过程, 温度  $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 波长  $\lambda=313\text{ nm}$ , 将胶原蛋白肽样品置于比色皿中进行自组装, 每隔 30 s 测定吸光度, 采集数据, 绘制自组装曲线。

### 1.3.5 显微镜观察

使用配备有放大 1000 倍的 Olympus DP-71 相机的 Olympus 显微镜 (Olympus X51, Japan) 观察样品的结构, 放大倍数为 100 倍观测不同离子强度条件下自组装后样品的上清液进行观测。

### 1.3.6 扫描电镜观察

参考 Chen 等<sup>[6]</sup>的方法并略作修改, 采用 S-3400N 型扫描电子显微镜 (SEM) 观察胶原蛋白肽自组装凝胶的形貌与微观结构。将  $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}\times 2\text{ mm}$  块状样品于体积分数为 2.5% 戊二醛溶液 (0.2 mol/L, 磷酸盐缓冲液 pH 7.2) 中在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下固定 24 h, 然后使用磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH 7.2) 漂洗 3 次, 15 min/次, 接着依次使用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 乙醇进行梯度脱水, 15 min/处理, 100% 乙醇脱水 3 次, 20 min/次, 再经二氧化碳临界点干燥, 将干样品用离子溅射仪镀金后, 加速电压为 5 kV 进行扫描电镜观察。

### 1.3.7 粒径测定

取胶原蛋白肽自组装后样品的上清液于 SZ-100Z 纳米颗粒分析仪中测定样品的粒径分布及大小。

### 1.3.8 黏度测定

采用 AR-500 流变仪测定胶原蛋白肽凝胶的黏度 (剪切应力) 曲线。测定条件条件设置为温度  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 平板 40 mm, 剪切速率范围为  $0.01\sim 0.1\text{ s}^{-1}$ , 进行变剪切速率扫描, 以测定样品的动态黏度变化规律, 重复两遍实验<sup>[7]</sup>。

### 1.3.9 圆二色谱测定

分别移取  $300\text{ }\mu\text{L}$  不同离子强度条件下的胶原蛋白肽溶液于光程为 1 mm 的比色皿中, 在波长为 190~260 nm, 持续通入氮气的条件下, 进行样品的圆二图谱扫描, 每个样品重复两遍。

## 1.4 数据分析

测定和分析结果采用 Origin 9.0、SPSSV 26.0 和 Excel 软件进行数据处理和图形绘制, 采用 Prodata 和 CDNN 软件处理圆二图谱数据, 所有结果采用平均值

$\pm$ 标准偏差表示。指标内的均值比较, 采用单因素方差分析, 多重比较采用 Duncan's 法, 95% 置信度 ( $p<0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 离子强度对胶原蛋白肽内源荧光猝灭的影响

色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸三种蛋白质基本氨基酸因其含有苯环或共轭双键可产生特征性内源荧光, 可用于蛋白质结构的变化分析<sup>[8]</sup>。以 280 nm 作为激发波长, 色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸的发射波长的最高荧光强度分别为 348 nm、305 nm 和 282 nm<sup>[9]</sup>。在胶原蛋白中, 色氨酸的含量很低<sup>[10]</sup>, 因此选择酪氨酸作为内源荧光进行胶原蛋白肽的荧光光谱测定。

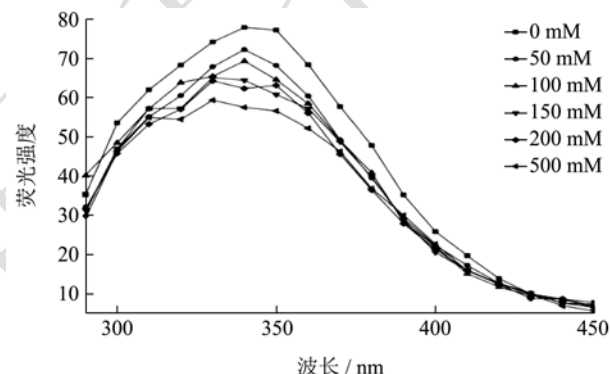


图 1 离子强度对胶原蛋白肽内源荧光猝灭的影响

Fig.1 Effects of ionic strength on intrinsic fluorescence quenching of collagen peptide

图 1 为乌鳢胶原蛋白肽不同离子强度条件下的荧光光谱扫描, 由图可知, 0 mM 自组装 5 min 的乌鳢胶原蛋白肽的最大荧光强度波长显著高于鲫鱼胶原蛋白的最大荧光波长<sup>[5]</sup>, 可能由于乌鳢胶原蛋白经胃蛋白酶的酶解后, 暴露出更多的酪氨酸残基, 使得更多的被激发的酪氨酸残基相互接近相互作用的结果<sup>[10-12]</sup>。此外, 随着离子强度的增加 (0~500 mM), 胶原蛋白肽不断发生荧光猝灭现象, 其最大荧光强度下降。且当离子强度从 0 mM 增加到 500 mM, 胶原蛋白肽的最大发射波长蓝移 12 nm, 说明胶原肽色氨酸残基附近结合腔的极性随离子强度的增加逐渐降低, 亲水性也随之降低, 表面疏水性增强, 胶原蛋白分子逐渐聚集<sup>[13]</sup>, 从而导致酪氨酸在自组装过程中被包合于聚合体内部, 从而导致荧光猝灭现象, 而胶原蛋白肽的荧光猝灭强度随离子强度的增加而增强, 表明高离子强度具有促进胶原蛋白肽自组装体形成的效果。

## 2.2 胶原蛋白肽自组装前后外观与浊度的变化

图 2a 为不同离子强度下,胶原蛋白肽在常温下进行自组装的外观图。可以很明显的看出胶原蛋白肽溶液在常温在不同离子强度条件下的变化过程,其变化都经历了“溶液-浊液-凝胶”的过程,不同离子强度条件处理的胶原蛋白肽溶液最终形成凝胶。此外,离子强度对自组装速率有一定的影响,随着离子强度的增大,胶原蛋白肽自组装形成凝胶的时间越短,说明适量增加离子强度对胶原蛋白肽自组装具有促进作用。

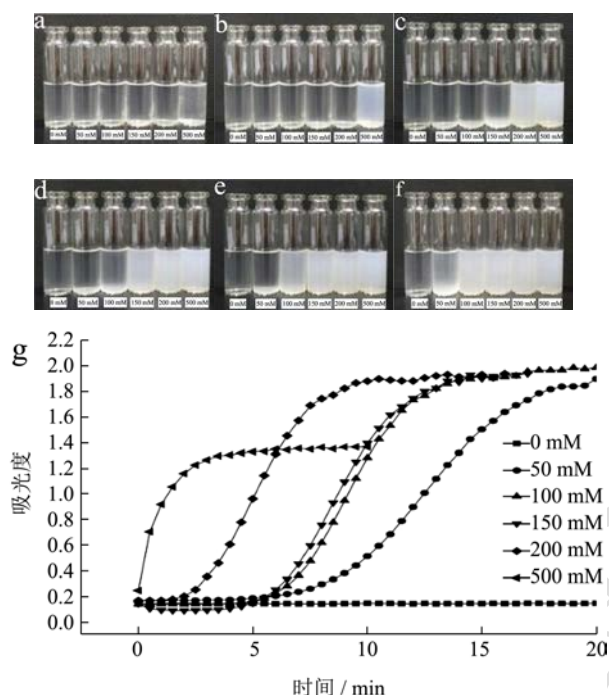


图 2 不同离子强度的胶原蛋白肽自组装外观变化(a~f)及浊度变化图(g)

Fig.2 The visual appearance (a~f) and turbidity (g) of collagen peptides in different ionic strength

注: a: 0 min; b: 5 min; c: 28 min; d: 44 min; e: 56 min;

f: 92 min。

通过紫外分光光度计测定不同离子条件下胶原蛋白肽自组装动力学曲线,由图 4 可知,胶原蛋白肽自组装动力学曲线呈现 S 型,其自组装过程可分为 3 个阶段,分别为:成核期、生长期和平衡期,与纯胶原蛋白自组装趋势基本一致<sup>[14]</sup>。自组装初期,胶原蛋白肽的吸光值处于缓慢增加,主要由于胶原蛋白肽缓慢聚集,形成较小的微核;随着自组装的持续,胶原蛋白肽自组装进入生成期,微核逐渐靠拢形成较长的纤维,导致吸光值快速增加;生长期过后自组装出现平衡期,胶原蛋白肽自组装基本完成,吸光值保持不变。

由图 2b 可知,随着离子强度的增加,胶原蛋白肽的成核期逐渐变短,其生长期斜率增大。离子的添加

具有屏蔽胶原蛋白肽链上的电荷作用,降低了胶原蛋白肽分子间的斥力,从而起到促进胶原蛋白肽分子的自组装的作用<sup>[15]</sup>。从 0~200 mM 样品中可以看出,其平衡期胶原蛋白肽凝胶的吸光值趋于稳定,而 500 mM 离子强度下胶原蛋白肽处于平衡期的自组装吸光值低于前 5 个样品平衡阶段的吸光值,可见,过高的离子强度最终会减小平衡期胶原蛋白凝胶的吸光值<sup>[16]</sup>。虽然适量的盐离子的加入可以起到屏蔽胶原蛋白肽链上的电荷作用,但当胶原肽自组装进程达到一定程度后,盐离子的加速组装的效果便不再明显,离子的过量加入引入了静电斥力,且溶液中的正负离子分布并非完全均匀,静电斥力阻隔了胶原蛋白肽分子之间进一步缔合,从而形成较为松散的胶原蛋白肽凝胶结构,因此降低了平衡阶段的吸光值<sup>[16]</sup>。

## 2.3 不同离子强度条件下胶原蛋白肽自组装

### 显微镜观察

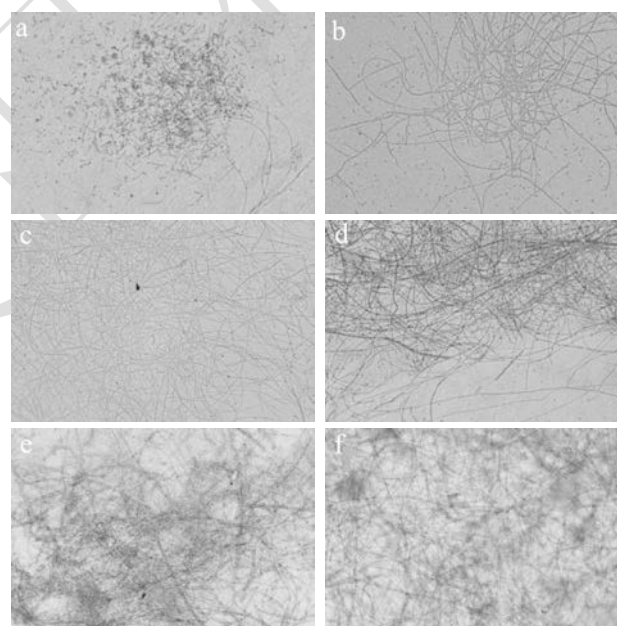


图 3 不同离子强度条件下胶原蛋白肽聚集体光学显微镜观测图

Fig.3 The optical microscopes of collagen peptide polymer in different ionic strength

注: a: 0 mM; b: 50 mM; c: 100 mM; d: 150 mM; e: 200 mM; f: 500 mM。

采用光学显微镜对胶原蛋白自组装后对其形貌进行初步的观察,结果如图 3 所示。从图中可以看出,酶解后的胶原蛋白肽倾向于形成纤维网络结构,不同离子强度条件下,胶原蛋白肽自组装形成的结构最终形貌上存在一定的差异,低浓度的离子强度条件下的胶原蛋白肽形成的自组装结构较为分散,从未加 NaCl



的胶原蛋白肽进行显微镜观察，可以看出胶原蛋白肽自组装先生成较小的颗粒状结构，在通过进一步的聚集形成有序的纤维网络结构，而 0 mM 离子条件下，胶原蛋白肽存在较多的未形成纤维网络结构的颗粒，可能由于其聚集动力的不足，而溶液中离子强度的增强可以起到破坏蛋白质表面的水化层，屏蔽肽链上的电荷的作用，降低分子间的斥力<sup>[17]</sup>，所以随着离子强度的增加，胶原蛋白肽形成网络结构交织先变得紧密，而当离子强度的继续增强到 200 mM 时，其纤维网络结构的间隙增大，紧密性有所降低。胶原肽分子间存在着静电吸引和静电斥力，而过量的 NaCl 加入可能使得胶原蛋白肽分子间的斥力增加。

## 2.4 不同离子强度条件下胶原蛋白肽自组装

### SEM 分析

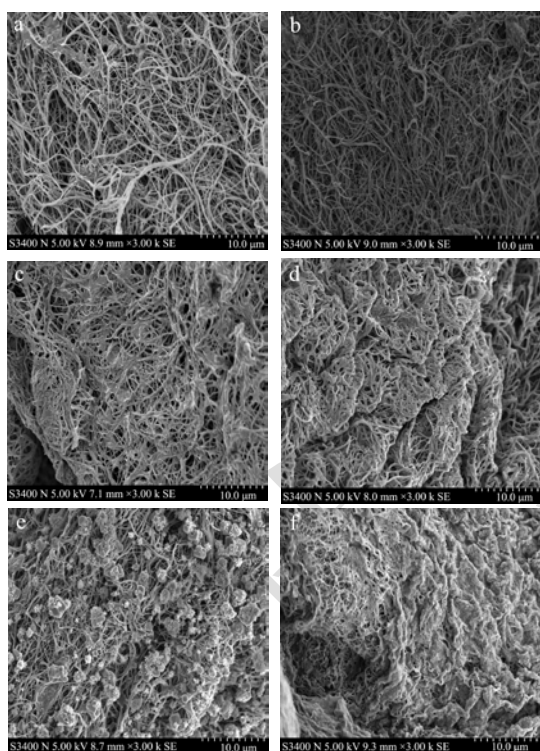


图 4 不同离子强度条件下胶原蛋白肽聚合物扫描电镜观测图

Fig.4 The SEM of collagen peptide polymer in different ionic strength

注：a：0 mM；b：50 mM；c：100 mM；d：150 mM；e：200 mM；f：500 mM。

采用扫描电镜对胶原蛋白肽凝胶微观结构进行进一步的观察。由图 4 可知，经酶解后的胶原蛋白肽仍具备具有形成三维网络纤维结构的特性，其形成的凝胶纤维结构孔隙较大，紧密性较低；在 0~150 mM 离子强度范围内，随着 NaCl 的增加，纤维与纤维之间结合更为紧密，孔隙变小。0 mM 凝胶三维纤维网络

分布均匀，但随着离子强度的增加，纤维的分布形态变差，纤维表面变粗糙，纤维直径增大，密集程度增加，纤维排序从较为有序排列变得折叠卷曲，使得其空间结构更为紧密。这与离子强度对乳清蛋白自组装聚集体的结构影响基本一致<sup>[18]</sup>，使用不同的离子强度可以改变蛋白质凝胶网络结构的紧密性。然而，当个离子强度超过 150 mM 时，胶原蛋白肽凝胶纤维网络紧密性发生降低，200 mM 条件下，可以很明显的看出晶体在纤维上析出，当离子强度增到到 500 mM 时，胶原蛋白肽凝胶其纤维细小且表面明显附着着一层粉末状晶体，说明胶原蛋白肽自组装过程中 NaCl 析出与纤维表面，进一步证实了过高的离子强度对胶原蛋白肽的自组装存在抑制作用。可能由于过量的 NaCl 的加入使得离子附着于自组装胶原蛋白肽纤维上，从而阻碍了纤维间氢键、二硫键等次级结构的进一步形成，导致其凝胶三维纤维网络结构的紧密性降低。

## 2.5 离子强度对胶原蛋白肽聚集体粒径分布

### 的影响

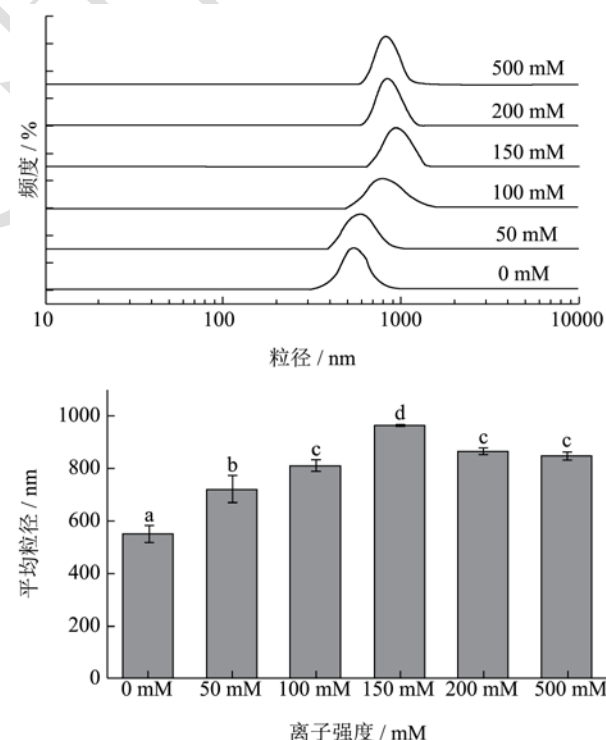


图 5 不同离子强度对胶原蛋白肽聚集体粒径分布及平均粒径的影响

Fig.5 Effects of collagen peptide of different ionic strength on particle size distribution and average particle size

注：不同小写字母表示具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

图 5 为胶原蛋白肽自组装体的粒径图，由图可知，离子强度对胶原蛋白肽自组装形成物质的大小具有一

定的影响,随着离子强度的增加,胶原蛋白肽聚集体整体粒径变化呈现先增加后降低的趋势,在 150 mM 离子强度条件下平均粒径达到最大值,但总体而言,离子强度的增加,促进了胶原蛋白肽聚集的形成。因此,适量增加样品溶液中的离子强度有助于胶原蛋白肽的自组装。但离子强度的添加与胶原蛋白肽自组装聚集形成结构的粒径大小并非完全正相关,当离子强度达到 200 mM 时,其平均粒径(860.39 nm)显著低于 ( $p < 0.05$ ) 只有 150 mM NaCl 的胶原蛋白肽(961.33 nm),该结果与微观结构观察结果一致,适量增大离子强度有利于胶原蛋白肽的自组装,粒径也随着离子强度的增大而增加,但由于过量的 NaCl 的添加使得胶原蛋白肽自组装产生一定的静电排斥,从而使得自组装体的粒径发生降低<sup>[19]</sup>。

## 2.6 离子强度对胶原蛋白肽自组装聚集体表观黏度的影响

### 观黏度的影响

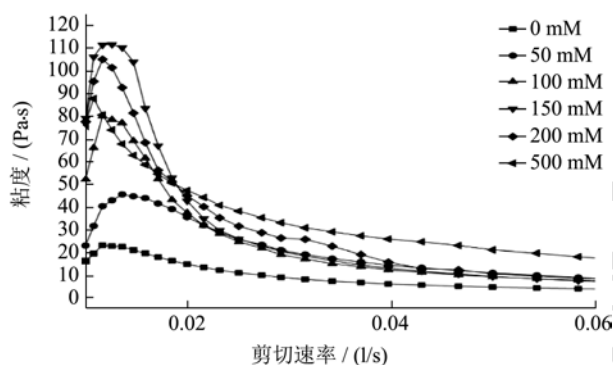


图 6 不同离子强度条件下对胶原蛋白肽自组装聚集体表观黏度的影响

Fig.6 Effects of collagen peptide of different ionic strength treatments on visior

图 6 为不同离子强度(0~500 mM)条件下,乌鳢胶原蛋白肽自组装体的剪切黏度变化图。当剪切速率

低于 0.02 1/s 时,胶原蛋白肽凝胶黏度迅速下降,而当剪切速率较高时,下降速率变缓,胶原蛋白肽凝胶的剪切黏度在流变学中称为剪切稀释,表明不同离子条件下形成的胶原蛋白肽凝胶均为假塑性流体<sup>[20]</sup>。由图可知,随着剪切速率的增大,不同离子强度条件下的胶原蛋白肽自组装凝胶的黏度随着剪切速率的增加,均出现先增后降的趋势,这与乳清蛋白凝胶<sup>[21]</sup>黏度随剪切速率变化趋势一致,AE 等<sup>[22]</sup>认为剪切增稠行为是颗粒聚集和/或颗粒通过其表面的物理接触的结果。由于胶原蛋白肽自组装形成较为有序的三维纤维网络结构,随着剪切速率的增加,纤维结构先从有序变为无序状态,纤维与纤维间相互缠结,其缠结点生成速率大于断裂速率,使得其黏度值出现短暂的增加<sup>[23]</sup>。当剪切速率达到一定程度时,纤维间的缠结点发生断裂速率大于生成速率,其黏度值不断下降,于是出现剪切稀释的现象。

此外,不同离子强度条件下形成的胶原蛋白肽凝胶其初始黏度及最大剪切黏度值有所不同,但变化趋势一致。随着离子强度的增加,胶原蛋白肽的初始黏度和剪切黏度都呈现先增加后减少的趋势,可能由于适量离子强度在胶原蛋白肽自组装过程中起到屏蔽电荷作用,使得胶原蛋白肽自组装体结合更为紧密,在剪切的过程中,结合更为紧密的纤维缠结产生更大的黏度值<sup>[24]</sup>,但过度的离子加入会降低其纤维之间的结合程度,凝胶结构的紧密性降低同时使得胶原蛋白肽剪切阻力降低,黏度变小。

## 2.7 离子强度对胶原蛋白肽聚集体二级结构的影响

通过 Prodata 和 CDNN 软件处理圆二图谱计算得到乌鳢胶原蛋白肽不同离子强度条件下二级结构的变化。

表 1 离子强度对胶原蛋白肽聚集体二级结构的影响

Table 1 Effect of collagen peptide polymer of ionic strength on secondary structure

离子强度	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -折叠/%	$\beta$ -转角/%	无规则卷曲/%
CK	15.54±0.17 <sup>a</sup>	27.02±2.07 <sup>a</sup>	14.18±0.32 <sup>a</sup>	43.26±1.58 <sup>a</sup>
0 mM	13.00±0.77 <sup>b</sup>	41.42±1.75 <sup>b</sup>	15.73±0.26 <sup>ab</sup>	2.83±0.31 <sup>b</sup>
50 mM	12.52±0.75 <sup>b</sup>	43.29±1.10 <sup>b</sup>	15.72±0.51 <sup>ab</sup>	30.84±1.41 <sup>b</sup>
100 mM	12.52±0.39 <sup>b</sup>	43.81±0.86 <sup>b</sup>	15.79±0.88 <sup>b</sup>	30.55±1.16 <sup>b</sup>
150 mM	12.21±0.53 <sup>b</sup>	43.73±1.12 <sup>b</sup>	15.69±0.29 <sup>ab</sup>	31.15±1.66 <sup>b</sup>
200 mM	12.44±0.68 <sup>b</sup>	42.32±1.69 <sup>b</sup>	15.57±0.22 <sup>ab</sup>	31.96±0.58 <sup>b</sup>
500 mM	12.60±0.46 <sup>b</sup>	42.30±0.73 <sup>b</sup>	15.68±0.17 <sup>a</sup>	32.25±1.27 <sup>b</sup>

注:不同小写字母表示同一列比较具有显著性差异( $p < 0.05$ )。

由表 1 可知,胶原蛋白肽自组装前后二级结构发

生了较大的变化,与未处理样品(CK)相比,0 mM

的胶原蛋白肽  $\beta$ -折叠含量增加,  $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲分别减少,  $\beta$ -转角未发生显著变化 ( $p>0.05$ )。胶原蛋白肽自组装聚集后, 有大部分的无规则卷曲转变为  $\beta$ -折叠, 蛋白质结构由无序状态转变为有序的结构, 说明胶原蛋白肽凝胶网络的形成。而目前关于多肽自组装研究中<sup>[25]-[27]</sup>,  $\beta$ -折叠是多肽自组装纳米纤维的重要组成部分, 而  $\beta$ -折叠含量的增加更有助于纳米纤维的构筑<sup>[28]</sup>。然而不同离子强度条件在自组装结束后胶原蛋白肽的二级结构变化影响并不明显, 各二级结构  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角以及无规则卷曲均无显著变化 ( $p>0.05$ ), 该结果与 Shen 等<sup>[29]</sup>和 Luo 等<sup>[30]</sup>研究中不同离子强度条件下分别对胶原蛋白和两亲性双尾肽 AXG 的二级结构的影响的变化趋势一致, 盐的主要作用是屏蔽蛋白及肽结构之间的静电斥力的作用, 可以起到促进自组装的效果, 更多影响分子之间的非共价键, 但对聚集体的二级结构影响不大。

### 3 结论

本文研究表明, 在 0~500 mM NaCl 条件下, 胶原蛋白肽自组装速率与离子强度呈正相关, 可以通过增加离子强度调节胶原蛋白肽的自组装速率。但胶原蛋白肽聚合体的紧密程度并非简单正相关关系, 其聚合体三维网络结构紧密程度随离子强度的增强先增加后减小, 而与粒径和黏度随离子强度的变化趋势与胶原蛋白肽紧密程度程度变化相一致, 进一步证实了离子强度对胶原肽聚集体的物理特性的影响; 而在对胶原蛋白肽二级结构测定中发现, 离子强度对胶原蛋白肽聚集体的二级结构变化影响并不明显。因此, 可以通过改变离子强度的方式提高自组装效率, 同时调节胶原蛋白肽聚集体结合的紧密程度, 且因其良好的生物相容性及低敏性使其在药物缓释方面具有一定的研究前景。

### 参考文献

- [1] 毛盛勇. 中国统计年鉴[M]. 北京: 国家统计局, 2019: 398-399  
MAO Sheng-yong. China Statistical Yearbook [M]. Beijing: National Bureau of Statistics, 2019: 398-399
- [2] Mingyan Y, Xinping W. Study on the kinetic self-assembly of type I collagen from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin using the fluorescence probe thioflavin T [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 203: 342-347
- [3] Drzewiecki K E, Parmar A S, Gaudet I D, et al. Methacrylation induces rapid, temperature-dependent, reversible self-assembly of type-I collagen [J]. Langmuir, 2014, 30(37): 11204-11211
- [4] Zhang J, Tu X, Wang W, et al. Insight into the role of grafting density in the self-assembly of acrylic acid-grafted-collagen [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 885-892
- [5] 贾俊强, 孙晟源, 周晓瑞, 等. 超声处理对鲫鱼皮胶原蛋白的自组装行为和理化性质影响[J]. 食品科学: 1-11[2020-01-09]  
JIA Jun-qiang, SUN Sheng-yuan, ZHOU Xiao-rui, et al. Effect of ultrasonic treatment on self-assembly behavior and physicochemical properties of collagen from Carassius auratus skin [J]. Food Science, 1-11[2020-01-09]
- [6] Chen S, Hirota N, Okuda M, et al. Microstructures and rheological properties of tilapia fish-scale collagen hydrogels with aligned fibrils fabricated under magnetic fields [J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(2): 644-652
- [7] 李思佳, 孙卫东, 张业辉, 等. 微射流-酶处理对罗非鱼皮胶原蛋白结构和理化特性的影响[J]. 现代食品科技, 2019, 7: 24-29  
LI Si-jia, SUN Wei-dong, ZHANG Ye-hui, et al. Effect of microfluidization-enzyme treatment on structure and physicochemical properties of collagen from tilapia skin [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 7: 24-29
- [8] Mohammadi F, Moeeni M. Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine  $\alpha$ -lactalbumin [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 458-467
- [9] Biswas A, Swarnkar R K, Hussain B, et al. Fluorescence quenching studies of  $\gamma$ -butyrolactone binding protein (*CprB*) from *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118(34): 10035-10042
- [10] Yan M, Li B, Zhao X, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1581-1586
- [11] Li J, Li G. The thermal behavior of collagen in solution: Effect of glycerol and 2-propanol [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(2): 364-368
- [12] Menter J M, Williamson G D, Carlyle K, et al. Photochemistry of type I acid-soluble calf skin collagen: dependence on excitation wavelength [J]. Photochemistry and Photobiology, 1995, 62(3): 402-408
- [13] Callis P R. 1La and 1Lb Transitions of Tryptophan: Applications of Theory and Experimental Observations to Fluorescence of Proteins [M]. Methods in Enzymology. Academic Press, 1997, 278: 113-150

- [14] Leo L, Bridelli M G, Polverini E. Insight on collagen self-assembly mechanisms by coupling molecular dynamics and UV spectroscopy techniques [J]. *Biophysical Chemistry*, 2019, 253: 106224
- [15] 闫婷婷. 胶原自组装行为的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2017  
YAN Ting-ting. Study on the self-assembly behavior of collagen [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017
- [16] Li Y, Douglas E P. Effects of various salts on structural polymorphism of reconstituted type I collagen fibrils [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 112: 42-50
- [17] Yan M, Li B, Zhao X, et al. Effect of concentration, pH and ionic strength on the kinetic self-assembly of acid-soluble collagen from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 29(1): 199-204
- [18] He J S, Azuma N, Yang H. Effects of pH and ionic strength on the rheology and microstructure of a pressure-induced whey protein gel [J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(2): 89-95
- [19] Sriprabhom J, Luangpituksa P, Wongkongkatep J, et al. Influence of pH and ionic strength on the physical and rheological properties and stability of whey protein stabilized o/w emulsions containing xanthan gum [J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 242: 141-152
- [20] Rasheeda K, Nishad F N. Trigonelline hydrochloride: a promising inhibitor for type I collagen fibrillation [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 170: 273-279
- [21] Moakes R J A, Sullo A, Norton I T. Preparation and characterisation of whey protein fluid gels: the effects of shear and thermal history [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 45: 227-235
- [22] Ince-Coskun A E, Ozdestan-Ocak O. Effects of salt ions and heating on the behaviour of whey protein particle dispersions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105433
- [23] 朱亮, 闻获江. 壳聚糖/胶原蛋白共混溶液的流变性能研究 [J]. *中国皮革*, 2009, 3: 16-18, 30  
ZHU Liang, WEN Di-jiang. Rheological behavior of chitosan/collagen blends [J]. *China Leather*, 2009, 3: 16-18, 30
- [24] Zhang S, Holmes M, Ettelaie R, et al. Pea protein microgel particles as Pickering stabilisers of oil-in-water emulsions: responsiveness to pH and ionic strength [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 102: 105583
- [25] Zhao Y, Tanaka M, Kinoshita T, et al. Nanofibrous scaffold from self-assembly of  $\beta$ -sheet peptides containing phenylalanine for controlled release [J]. *Journal of Controlled Release*, 2010, 142(3): 354-360
- [26] Deng L, Xu H. Hierarchical processes in  $\beta$ -sheet peptide self-assembly from the microscopic to the mesoscopic level [J]. *Chinese Physics B*, 2016, 25(1): 018701
- [27] Tan H L, Shamsudeen H, So'aib M S. Effects of electric field on  $\beta$ -sheet propensity self-assembled amphiphile peptides [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2018, 5: S143-S148
- [28] 陈启航, 孙丽颖, 董维兵.  $\beta$ -折叠肽自组装在生物医学方面的应用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2017, 8: 443-445  
CHEN Qi-hang, SUN Li-ying, DONG Wei-bing. Application of  $\beta$ -Folding peptide self-assembly in biomedicine [J]. *Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals*, 2017, 8: 443-445
- [29] Shen L, Bu H, Yang H, et al. Investigation on the behavior of collagen self-assembly in vitro via adding sodium silicate [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 115: 635-642
- [30] Luo Z, Åkerman B, Zhang S, et al. Structures of self-assembled amphiphilic peptide-heterodimers: effects of concentration, pH, temperature and ionic strength [J]. *Soft Matter*, 2010, 6(10): 2260-2270

---

(上接第 324 页)

- [18] 姜同强, 莫名垚, 任钊, 等. 贝叶斯网络及其在白酒安全预警中的应用 [J]. *现代食品科技*, 2018, 34(6): 288-292  
JIANG Tong-qiang, MO Ming-yao, REN Zhao, et al. Bayesian network and its application in liquor safety early warning [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(6): 288-292
- [19] Sharma S, Goen A. Review on digital filter design using artificial neural network [J]. *Journal of Communication Engineering & Systems*, 2019, 6(2): 9-15
- [20] Kingma D P, Ba J. Adam: a method for stochastic optimization [J]. *Computer Ence*, 2014, 21: 165