

琥珀酰化改性鱼胶原的制备及性质研究

刘文涛^{1,2}, 向莎¹, 白聪¹

(1. 皮革化学与工程教育部重点实验室(四川大学), 四川 成都 610065;

2. 制革清洁技术国家工程研究中心(四川大学), 四川 成都 610065)

摘要:为了拓展鱼胶原的应用范围,研究了采用琥珀酸酐酰化改性制备水溶性鱼胶原,并结合氨基酰化率测定、凝胶电泳、红外光谱、差示扫描量热、表面张力分析、等电点和溶解性测试等手段考察了改性对鱼胶原结构性质的影响。结果表明:当琥珀酸酐的用量为0.2(质量比)时,胶原的氨基酰化率达到约80%,之后酰化率增长缓慢;随着胶原酰化程度的提高,改性胶原的相对分子质量增加,但其热稳定性和等电点逐渐降低;改性前后胶原的红外光谱与表面活性都没有明显变化;当酰化率大于70%时,改性鱼胶原的等电点约为4,在中性条件下具有良好的水溶性。

关键词:鱼胶原;琥珀酰化;水溶性;等电点;热稳定性

中图分类号 TS 51 文献标识码 A DOI:10.13536/j.cnki.issn1001-6813.2020-012-001

Preparation of succinylated fish collagen and its properties

LIU Wentao^{1,2}, XIANG Sha¹, BAI Cong¹

(1. The Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering of Ministry of

Education, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. National Engineering Research

Center of Clean Technology in Leather Industry, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In order to expand the application range of fish collagen, water-soluble fish collagen was prepared by succinic anhydride acylation and the effects of modification on the structure and properties of fish collagen were investigated by aminoacylation rate determination, gel electrophoresis, infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, surface tension analysis, and isoelectric point and solubility tests. The results show that when the dosage of succinic anhydride is 0.2 (w/w), the amino acylation rate of collagen reaches about 80%, and then the acylation rate increases slowly. With the increase of the degree of acylation of collagen, the molecular weight of succinylated collagen increases, while its thermal stability and isoelectric point gradually decreases. The infrared spectra and surface activity of the succinylated collagen does not change significantly. When the acylation rate is more than 70%, the isoelectric point of the succinylated fish collagen is about 4, and it has good water solubility under neutral conditions.

Key words: fish collagen; succinylation; water solubility; isoelectric point; thermal stability

前言

胶原既是动物细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要结构成分,也是一种具有优良综合性能

的生物材料,已广泛用于化妆品、药物递送、组织工程等领域^[1-2]。目前,胶原基生物材料产品主要来源于牛、猪等哺乳动物的富含胶原的结缔组织(皮、腱

收稿日期:2020-10-25;修订日期:2020-11-09

基金项目:国家自然科学基金(22078209,21606156)

第一作者简介:刘文涛(1982-),男,博士,副教授,liuwt@scu.edu.cn,主要从事胶原基功能材料研究

等),但是由于人畜共患病在世界范围内的频繁爆发,导致哺乳动物胶原及其制品存在重大的生物安全风险^[3-5]。为此,中国明文规定不予受理含有来自于发生疯牛病疫情国家或地区的牛、羊源性材料的植入医疗器械注册申请(国食药监械[2006]407号)。事实上,21世纪肆虐全球的多种人畜共患病都与陆生哺乳动物有关,包括非典(SARS)、甲型H1N1流感(“猪流感”)以及当前正在全世界蔓延的“新冠肺炎”,而且病毒传播途径不明确、基因变异与进化等因素更加剧了病毒跨物种感染人类的风险。陆生哺乳动物与人类在胶原编码基因及氨基酸序列上具有较高的同源性,由此引起的免疫交叉反应可能是导致哺乳动物胶原存在生物安全隐患的重要原因。相对而言,从鱼皮、鱼鳞等鱼加工下脚料中提取的鱼胶原,具有免疫原性低、安全性好等优点,而且其来源丰富、价格低廉、无宗教禁忌,因而近年来围绕鱼胶原的制备、改性及应用的研究方兴未艾^[3-7]。

基于传统的醋酸/胃蛋白酶法提取的胶原,其等电点约为7,因而往往先将胶原在弱酸性条件下溶解再进行应用,这极大限制了胶原材料产品在生理pH溶液中的应用(如化妆品、可注射生物材料)^[1]。为了赋予胶原在中性条件下良好的溶解性,研究人员采用琥珀酸酐等试剂对胶原进行改性,通过在消耗氨基的同时引入羧基,以此改变胶原分子侧链的电荷性质,从而降低胶原的等电点并实现其在生理环境下的水溶性^[8-16]。据报道,琥珀酰化改性胶原可用于制备眼科植入材料^[9-10]、高分子表面活性剂^[12]、化妆品^[13]、功能界面涂层^[17]、药物控释载体^[18-20]等。然而,现有相关研究报道基本上都是针对哺乳动物胶原,而关于琥珀酰化改性对鱼胶原结构性能的影响尚不清楚。因此,本文以黑鱼鱼皮胶原为原料,制备具有不同琥珀酰化改性率的鱼胶原,并借助电泳、热分析、等电点测定等手段研究考察琥珀酰化改性程度对鱼胶原性质的调控规律,为拓宽鱼胶原的应用范围提供基础数据,以期加快鱼加工副产物鱼皮的“变废为宝”转化利用进程,同时促进渔业和胶原基生物材料产业的可持续发展^[3-7,21-22]。

1 试验

1.1 主要材料与仪器

1.1.1 主要材料

鱼皮 I 型胶原冻干海绵,参照实验室方法制备^[4],新鲜黑鱼购自成都郭家桥水产市场;

冰醋酸、氯化钠、氢氧化钠、盐酸、异丙醇、过氧化氢、琥珀酸酐、二甲亚砷,均为分析纯,成都科龙化工试剂厂;

高分子质量标准蛋白为电泳级,美国 BIO-RAD 公司;

胃蛋白酶,生化试剂,上海如吉生物科技有限公司;

三硝基苯磺酸(TNBS),美国 Sigma 公司;

其他化学试剂均为国产分析纯;

去离子水,实验室自制。

1.1.2 主要仪器

3700 高速冷冻离心机,日本 KUBOTA 公司;

FD-1 冷冻真空干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;

pHS-3C 型 pH 计,上海精密科学仪器有限公司;

Mini-PROTEAN 3 Cell 电泳仪,美国 BIO-RAD 公司;

DSC 200PC 差示扫描量热仪,德国 NETZSCH 公司;

Lambda 25 紫外/可见分光光度计、Spectrum One 红外光谱仪,美国 Perkin-Elmer 公司;Model ZEN 3600 纳米粒度及电位分析仪,英国马尔文公司;

OCA-H200 光学接触角测量仪,德国 Dataphysics 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 琥珀酰化改性鱼胶原的制备

将冻干的鱼胶原海绵(Col)溶于 0.1 mol/L 醋酸,配制浓度为 4 mg/mL 的胶原溶液,用 1 mol/L 氢氧化钠将胶原溶液的 pH 值调至 9。将琥珀酸酐用二甲亚砷溶解,按照表 1 所示的琥珀酸酐用量分别对鱼胶原进行酰化改性,持续搅拌并用氢氧化钠维持改性溶液的 pH 值为 9,直至溶液 pH 没有变化即为改性结束。分别将改性胶原溶液用去离子水透析 3 d,冻干得到琥珀酰化改性鱼胶原样品 SC1、SC2、SC3、SC4、SC5 和 SC6。

1.2.2 胶原氨基酰化率测定

参照文献报道的 TNBS 法^[8]测定胶原的氨基酰

化率。将改性前后的胶原样品溶于 0.1 mol/L 醋酸或去离子水制备 4 mg/mL 胶原溶液,分别加入一定量的硼砂缓冲液和 TNBS 溶液,置于 50 ℃ 水浴避光反应 60 min,用盐酸终止反应,冷却,在 340 nm 波长下测胶原样品的吸光度。以未改性胶原作为对比样,每个胶原样品测 3 次,结果取平均值。

1.2.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

参照 SDS-PAGE 方法^[4]考察不同胶原样品的结构组成特征。将改性前后的鱼胶原样品分别用电泳处理液稀释至 1 mg/mL,在沸水中煮 5 min 后冷却,备用。采用 7.5% 的分离胶和 4% 的积层胶进行电泳,接着用考马斯亮蓝 R-250 对凝胶染色,最后用 7.5% 醋酸和 5% 甲醇溶液脱色。

1.2.4 红外光谱分析

采用 KBr 压片法对改性前后的鱼胶原样品进行红外光谱分析。分别取胶原样品与 KBr 按 1/100 (质量比)充分混匀,用压片机制备 KBr 薄圆片,之后采用红外光谱仪收集数据。扫描波数范围为 450~4 000 cm^{-1} ,分辨率为 2 cm^{-1} 。

1.2.5 差示扫描量热 (DSC) 分析

分别取改性前后的鱼胶原海绵样品,用差示扫描量热仪进行热分析测试。以空坩埚作为参比,用氮气 (60 mL/min) 作保护气,基于 5 ℃/min 的升温速率扫描记录 DSC 曲线,考察温度区间为 4~80 ℃。

1.2.6 胶原溶液表面张力测定

分别取改性前后的鱼胶原海绵样品,通过溶解、稀释制备得到浓度为 0.000 5、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007 和 0.008 mg/mL 的系列胶原样品溶液,采用光学接触角测量仪考察溶液的表面张力。测试温度为 25 ℃,每个样品测 3 次,结果取平均值。

1.2.7 胶原的等电点测定

将改性前后的胶原样品溶于 0.1 mol/L 醋酸或去离子水配制 0.4 mg/mL 胶原溶液,分别用盐酸或氢

氧化钠调节溶液 pH,制备得到 pH 值分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0 的系列胶原样品溶液,采用纳米粒度及电位分析仪测定胶原溶液的 Zeta 电位,每个值测 3 次,结果取平均值。以 Zeta 电位值为纵坐标、pH 为横坐标绘制曲线图,当 Zeta 电位为零时所对应的 pH 即为胶原的等电点。

1.2.8 胶原溶解性测试

将改性前后的胶原样品溶于 0.1 mol/L 醋酸或去离子水配制 0.4 mg/mL 的胶原溶液,采用盐酸或氢氧化钠调节溶液 pH 值分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0,在调节 pH 的过程中分析总结胶原的溶解/沉淀情况。

2 结果与讨论

2.1 鱼胶原的氨基酰化改性率

关于采用 TNBS 法测定改性胶原的氨基酰化率,胶原的自由氨基含量与样品的吸光度呈线性关系,故可利用测得的吸光度值进行计算:氨基酰化率 (%) = (吸光度_{Col} - 吸光度_{SC}) / 吸光度_{Col}。琥珀酰化改性鱼胶原的氨基酰化率如表 1 所示。

表 1 不同鱼胶原样品的氨基酰化率

Table 1 Aminoacylation rate of different fish collagen samples

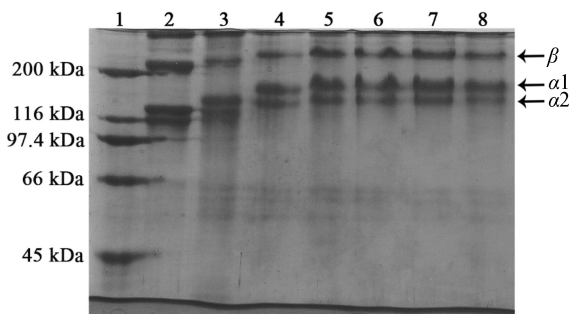
胶原样品	琥珀酸酐/胶原(质量比)	氨基酰化率/%
Col	0	0
SC1	0.025	42.6
SC2	0.1	70.6
SC3	0.2	82.4
SC4	0.3	76.5
SC5	0.4	80.9
SC6	0.5	85.3

由表 1 可知,随着琥珀酸酐的用量增加,改性鱼胶原的氨基酰化率增大,其中 SC1 样品的氨基酰化率最小,SC2 次之,SC3~SC6 4 个样品的氨基酰化率在一定范围内波动,这说明当琥珀酸酐的用量为 0.2

(质量比)时就已经达到了较高的胶原氨基酰化率,而 SC3~SC6 的改性率差异可能跟酰化改性过程控制及 TNBS 法测试的误差有关。据报道^[8],当琥珀酸酐的用量为 0.5(质量比)时,牛皮胶原的酰化改性率可达 90%以上。

2.2 琥珀酰化改性对鱼胶原结构的影响

通过电泳手段可考察胶原分子的亚基组成特征以及胶原三股螺旋结构的完整程度^[4-5]。图 1 为琥珀酰化改性前后胶原样品的电泳图谱。由图 1 可知,所有胶原样品都包含两条 α 链和一条 β 链(α 链的二聚体),与未改性胶原相比,改性胶原的 α 链和 β 链条带均呈现更大的相对分子质量,其中 SC1、SC2 和 SC3 样品条带的相对分子质量依次增大,而 SC3~SC6 4 个样品的电泳条带几乎具有相同的分子质量分布特征。琥珀酸酐与胶原氨基反应后,在胶原分子链引入“NHCO(CH₂)₂COOH”^[8],因而改性胶原的相对分子质量与酰化改性率正相关,由此表明改性胶原的酰化率顺序为 SC1 < SC2 < SC3 \approx SC4 \approx SC5 \approx SC6,这与上述胶原氨基酰化率测定结果一致。此外,从电泳图谱未发现明显的胶原分子链降解现象,说明琥珀酰化改性过程没有破坏胶原的一级结构。



1:标准蛋白;2:未改性胶原;3:改性胶原 SC1;4:改性胶原 SC2;5:改性胶原 SC3;6:改性胶原 SC4;7:改性胶原 SC5;8:改性胶原 SC6

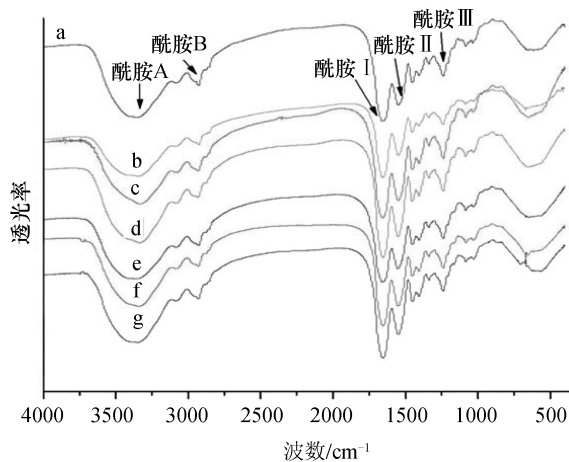
图 1 不同鱼胶原样品的 SDS-PAGE 电泳图谱

1:Standard protein marker;2:Col;3:SC1;4:SC2;5:SC3;6:SC4;7:SC5;8:SC6

Fig. 1 SDS-PAGE patterns of different fish collagen samples

红外光谱是表征胶原结构的常用手段,通过胶原红外光谱峰的位移及相对强度大小可以考察胶原二级结构的变化情况^[4,12,16]。图 2 为琥珀酰化改性前后胶原样品的红外光谱。由图 2 可知,整体而言,所有

样品都呈现胶原的特征红外吸收峰:酰胺 A、酰胺 B、酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III,它们的形状与位置(见表 2)几乎没有变化或仅存在细微的差别,这表明改性过程对胶原的三股螺旋结构未产生显著影响。然而,一维红外谱图的分辨率较低,为了深入理解琥珀酰化改性对鱼胶原结构的影响,需要采用二维红外^[1]或热分析手段进一步探索研究。



a:未改性胶原;b:改性胶原 SC1;c:改性胶原 SC2;d:改性胶原 SC3;e:改性胶原 SC4;f:改性胶原 SC5;g:改性胶原 SC6

图 2 不同鱼胶原样品的红外光谱图

a:Col;b:SC1;c:SC2;d:SC3;e:SC4;f:SC5;g:SC6

Fig. 2 The infrared spectra of different fish collagen samples

表 2 不同鱼胶原样品的特征红外光谱峰位置

Table 2 The characteristic infrared spectra peak position for different fish collagen samples

胶原样品	吸收峰波数/cm ⁻¹				
	酰胺 A	酰胺 B	酰胺 I	酰胺 II	酰胺 III
Col	3 340	2 930	1 660	1 550	1 240
SC1	3 340	2 930	1 660	1 550	1 240
SC2	3 320	2 930	1 660	1 550	1 240
SC3	3 330	2 930	1 650	1 550	1 240
SC4	3 350	2 930	1 660	1 550	1 240
SC5	3 330	2 930	1 650	1 550	1 240
SC6	3 340	2 930	1 650	1 550	1 240

2.3 琥珀酰化改性对鱼胶原热稳定性的影响

热稳定性是胶原蛋白基材料的重要性能之一,而且鱼胶原的热变性温度较哺乳动物胶原更低^[1,3]。图 3 为琥珀酰化改性前后鱼胶原的热变性 DSC 曲线。由图 3 可知,未改性胶原、SC1、SC2 和 SC6 的 DSC 峰值温度分别约为 43、40、38 和 35 °C,即鱼胶原的热变性温度随琥珀酰化改性程度的增加而逐渐降低,这可能是由于:(1)酰化改性反应消耗了部分氨基,导致氢键作用削弱;(2)酰化引入的大量羧基阴离子在肽链之间产生排斥,从而致使胶原分子的三股螺旋结构受到破坏。据报道,牛皮和猪皮胶原的热变性温度在琥珀酰化改性后都有一定幅度的降低^[8,15],因此在鱼胶原的应用过程中有必要平衡琥珀酰化改性对胶原热稳定性的负面影响。

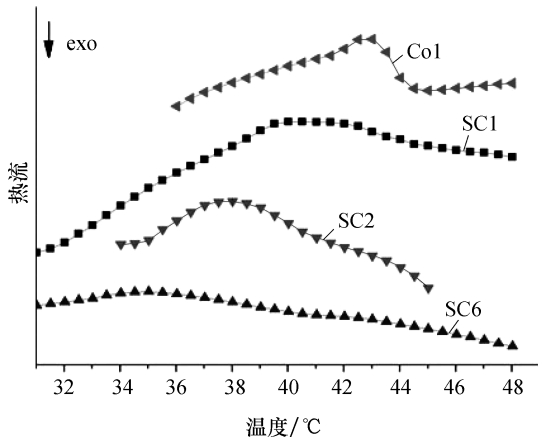


图 3 改性前后鱼胶原样品的 DSC 曲线

Fig. 3 DSC curves of fish collagen samples before and after modification

2.4 改性前后鱼胶原溶液的表面张力分析

由于琥珀酰化改性导致了胶原更好的亲水性,可能会对胶原分子的亲水/疏水平衡以及表面活性产生影响,因此考察改性前后鱼胶原溶液的表面张力(如表 3 所示)。由表 3 可知,未改性胶原、SC1、SC2 和 SC6 在不同胶原浓度下的溶液表面张力没有显著变化,说明基于本文的琥珀酰化改性条件未能赋予鱼胶原一定的表面活性。研究表明,对牛皮胶原进行琥珀酰化改性的同时,采用月桂酰氯向胶原分子中引入疏水长链能明显降低胶原溶液的表面张力(55.92 mN/m)^[12],这为鱼胶原在表面活性剂领域应用的功能化

改性指明了方向。

表 3 鱼胶原溶液的表面张力分析

Table 3 Surface tension analysis of fish collagen solutions

胶原浓度/ (mg · mL ⁻¹)	胶原溶液的表面张力/(mN · m ⁻¹)			
	Co1	SC1	SC2	SC6
0.000 5	72.45	72.34	72.33	72.23
0.001	71.70	72.18	71.86	72.16
0.002	71.60	71.89	71.72	71.92
0.003	72.20	71.35	71.93	71.93
0.004	72.01	71.42	71.78	71.85
0.005	71.45	71.36	71.68	71.92
0.006	72.05	71.09	71.43	71.46
0.007	71.31	71.22	71.97	71.27
0.008	71.39	71.13	71.70	71.73

2.5 琥珀酰化改性对鱼胶原溶解性的影响

胶原作为一种蛋白质,等电点是决定其在水溶液中溶解性好坏的重要指标。图 4 为琥珀酰化改性前后鱼胶原的 Zeta-pH 曲线。从图 4 可看出,随着琥珀酰化改性程度的增加,胶原的等电点逐渐降低,这主要是由于琥珀酰化反应引入的大量羧基促使胶原的整体电荷性质向阴性偏移。此外,通过观察胶原在不同 pH 条件下的溶解现象,进一步验证琥珀酰化改性对鱼胶原水溶性的影响(如表 4 所示),结果表明当酰化率达到 70% 以上时,改性鱼胶原在中性环境下能够完全溶解。

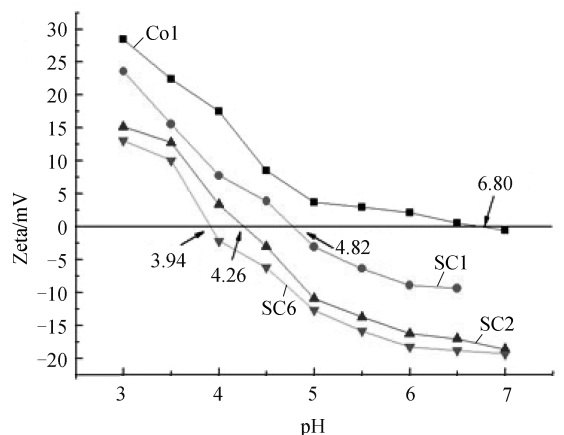


图 4 改性前后鱼胶原样品的 Zeta-pH 曲线

Fig. 4 Zeta-pH curves of fish collagen samples before and after modification

表 4 不同 pH 值条件下鱼胶原样品的溶解性

Table 4 Solubility of fish collagen samples at different pH values

pH	Col	SC2	SC6
3.0	+++	+++	+++
3.5	+++	+++	+
4.0	+++	—	—
4.5	+++	+	++
5.0	+++	+++	+++
5.5	++	+++	+++
6.0	+	+++	+++
6.5	—	+++	+++
7.0	—	+++	+++
7.5	—	+++	+++
8.0	+	+++	+++

注：“+”代表胶原溶解性，其数量越多表明胶原溶解性越好；“—”代表胶原几乎不溶解，呈现为絮状沉淀。

Note “+” represents the solubility of collagen, the more it is, the better the solubility of collagen is; “—” means that the collagen is almost insoluble and presents flocculent precipitate.

3 结论

琥珀酰化改性可作为拓宽鱼胶原在生理环境中应用的有力手段。随着酰化改性率的提高，鱼胶原的相对分子质量增加，然而热变性温度有所降低，说明尽管胶原的一级结构未受影响，但其二级结构的稳定性却遭到一定程度的破坏，因而在实际应用中需要对鱼胶原的功能性与稳定性进行权衡。虽然琥珀酰化改性鱼胶原具有良好的水溶性，但没有呈现表面活性，未来可结合疏水改性优化鱼胶原的表面活性功能性质，以更好地用于化妆品、药物载体等领域。

参考文献

[1] 李国英, 刘文涛. 胶原化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013.
Li G Y, Liu W T. Collagen Chemistry[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2013.

[2] Lin K, Zhang D W, Macedo M, et al. Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine [J]. Advanced Functional Materials, 2019, 1804943.

[3] Liu W, Tian Z, Li C, et al. Thermal denaturation of fish collagen in solution; A calorimetric and kinetic analysis [J]. Ther-

mochimica Acta, 2014, 581: 32-40.

[4] Liu W, Zhang Y, Cui N, et al. Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from snakehead (Channa argus) skin: Effects of hydrogen peroxide pretreatments and pepsin hydrolysis strategies [J]. Process Biochemistry, 2019, 76: 194-202.

[5] 刘文涛, 龚丽珂, 郭正国. 胶原静电纺丝用水性溶剂体系对鱼胶原结构的影响[J]. 皮革科学与工程, 2019, 29(6): 5-10.
Liu W T, Gong L K, Guo Z G. Effect of aqueous solvent system for collagen electrospinning on the structure of fish collagen[J]. Leather Science and Engineering, 2019, 29(6): 5-10.

[6] 孔丽丽, 巩凡, Plavan V, 等. 酸酶复合法提取鲢鱼鱼鳞胶原蛋白的工艺研究[J]. 皮革科学与工程, 2014, 24(4): 11-15.
Kong L L, Gong F, Plavan V, et al. Study on extraction of collagen from silver carp scales by acid enzyme complex method [J]. Leather Science and Engineering, 2014, 24(4): 11-15.

[7] 李卫林, 洪洪, 汤克勇. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取研究[J]. 中国皮革, 2016, 45(3): 55-57.
Li W L, Hong H, Tang K Y. Extraction of collagen from grass carp scale[J]. China Leather, 2016, 45(3): 55-57.

[8] Zhang Z, Liu W, Li D, et al. Physicochemical properties of succinylated calfskin pepsin-solubilized collagen [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(8): 2 057-2 060.

[9] Sripriya R, Kumar R, Balaji S, et al. Characterizations of polyanionic collagen prepared by linking additional carboxylic groups [J]. Reactive & Functional Polymers, 2011, 71: 62-69.

[10] Kumar R, Sripriya R, Balaji S, et al. Physical characterization of succinylated type I collagen by Raman spectra and MALDI-TOF/MS and in vitro evaluation for biomedical applications [J]. Journal of Molecular Structure, 2011, 994: 117-124.

[11] 李兴武. 猪皮胶原蛋白的提取及琥珀酰化改性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
Li X W. Study on extraction and succinylation of collagen from pigskin[D]. Chongqing: Southwest University, 2011.

[12] Li C, Tian H, Duan L, et al. Characterization of acylated pepsin-solubilized collagen with better surface activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 57: 92-98.

[13] Zhang M, Ding C, Yang J, et al. Study of interaction between water-soluble collagen and carboxymethyl cellulose in neutral aqueous solution [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 137: 410-417.

(下转第 35 页)

