

## 温度对牛胶原聚集态的影响

王香梅<sup>1\*</sup>, 高建峰<sup>2</sup>, 蔡中婷<sup>1</sup>

(1. 中北大学化工与环境学院, 太原 030051; 2. 中北大学理学院, 太原 030051)

**摘要:**本研究采用酶解法制备了牛胶原。分别用粘度法、紫外分光光度计、红外光谱和原子力显微镜分析方法,考察了不同温度下胶原的物理化学特性。实验结果表明:粘度法和紫外分光光度计测定的胶原溶液的变性温度约为 38;红外光谱测定表明,随着温度的提高,胶原膜在  $1650\text{cm}^{-1}$  的吸收峰减弱;原子力显微镜实验表明了,在 40 时牛胶原分子由螺旋结构的长链断裂为小链段和一些小碎片,说明此方法制备的胶原在 40 以上其三股螺旋结构将被破坏。

**关键词:**胶原溶液; 变性温度; 聚集态

### 引言

胶原作为一种重要的天然高分子生物材料,在药理学、创伤及组织修复、美容、矫形等领域得到广泛应用<sup>[1,2]</sup>。对于胶原而言,真正可发挥其生物功能和力学性能的必须是由三条缠绕的直链组成三股螺旋结构,若三股螺旋链的立体结构破坏,则成为一般俗称的明胶。胶原的三股螺旋结构主要与分子链中氨基酸间和肽键间氢键作用引起的聚集行为有关,当外界条件变化(温度、胶原溶液浓度、pH 和光照射等)对胶原特性有影响。蔡基业等<sup>[3,4]</sup>应用原子力显微镜,研究了 UV-B 对 I 型胶原结构影响,结果表明紫外辐射能引起胶原纤维交联。另外,研究表明来自猪和牛的 I 型胶原在浓度为  $32\mu\text{g}/\text{mL}$  时以单体形式和聚集体形式混合存在;在浓度为  $4\text{mg}/\text{mL}$  时这两种胶原自发组装成胶原纤维。史向阳等<sup>[2]</sup>用荧光探针法研究证明胶原在水溶液中随浓度增大有明显的聚集行为。钟朝辉等<sup>[5]</sup>用原子力显微镜(AFM)考察了质量浓度、溶液 pH 及温度对鱼鳞胶原溶液聚集态的影响。结果表明,相对于酸性,在碱性条件下,低质量浓度下鱼鳞胶原蛋白也能自组装成不规则的片状聚集态,并随着质量浓度的增大,纤维直径和高度明显增加,当在 40 处理 1h,其聚集态由线性变为球状;但当温度升至 80 时,其三股螺旋结构基本被破坏。张小燕等<sup>[6]</sup>结果表明在长纤维胶原蛋白形成过程中存在明显中间体。

本文通过考察温度对牛胶原聚集态结构的影响,对探讨牛胶原热作用机理、牛胶原药物及美容用品研发等方面很有意义。

## 1 实验部分

### 1.1 主要原料、试剂及仪器

PHS-2 数显 pH 计:上海精科雷磁仪器厂;乌氏粘度计(0.5mm):上海玻璃仪器厂;LH586-2A 超级恒温水槽:上海实验仪器总厂。牛胶原的制备:新鲜牛筋腱为原料,采用胃蛋白酶-酸体系的方法制备胶原。将胶原溶于  $6\text{mol}/\text{L}$  的 HCl 溶液中,在 110 下水解 12h。用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪测定胶原的氨基酸组成,见表 1。

胶原蛋白中甘氨酸约占氨基酸残基总数的三分之一,羟脯氨酸约占氨基酸总数的 10%。I 型胶原中氨基酸的顺序是“ $\text{Gly} + X + Y$ ”, Gly 代表甘氨酸, X 常为脯氨酸, Y 为羟脯氨酸或羟赖氨酸, I 型胶原中羟脯氨酸与脯氨酸之比约为 0.7~0.8。从表 1 氨基酸分析结果看出,甘氨酸约占氨基酸残基总数的三分

基金项目:山西省教育厅项目;

\*通讯作者, E-mail: wangxiangmei@nue.edu.cn.

之一,羟脯氨酸约占氨基酸总数的 10%。另外,羟脯氨酸与脯氨酸之比约为 0.8,且样品中不含色氨酸,证明本胶原提取物氨基酸组成符合 I 型胶原的组成特征<sup>[7]</sup>。

表 1 胶原中各氨基酸的组成成分

Table 1 Amino acid composition of collagen

Amino acid residue		Content (g/ 100g sample)	
甘氨酸	Glycine	Gly	24.98
羟脯氨酸	Hydroxyproline	Hypro	9.74
赖氨酸	Lysine	Lys	3.23
脯氨酸	Proline	Pro	13.95
羟赖氨酸	Hydroxylysine	Hylys	1.30
门冬氨酸	Aspartic acid/ asparagines	Asp	6.82
苏氨酸	Threonine	Thr	2.33
丝氨酸	Serine	Ser	2.29
谷氨酸	Glutamic acid/ glutamine	Glu	11.46
胱氨酸	Cysteine	Cys	0.45
甲硫氨酸	Methionine	Met	0.79
缬氨酸	Valine	Val	3.20
丙氨酸	Alanine	Ala	0.94
异亮氨酸	Lsoleucine	Ile	1.89
酪氨酸	Tyrosine	Tyr	1.52
亮氨酸	Leucine	Leu	3.89
苯丙氨酸	Phenylalanine	Rhe	2.71
组氨酸	Histidine	His	0.82
精氨酸	Arginine	Arg	8.30

将提取的胶原制备成 0.15mol/L 的胶原溶液(pH = 4.5),进行分析。

## 1.2 粘度法测定胶原变性温度

胶原变性温度( $T_d$ )的测定:参考 Pitchumani 等<sup>[8]</sup>的方法,测定不同温度下胶原溶液粘度变化,绘制热变性曲线。以  $\eta_{sp}/c$  作图,当增比粘度变化 50%时所对应的温度即为变性温度  $T_d$ 。

计算公式<sup>[9]</sup>:

$$\begin{aligned} r &= t/t_0; \\ &= (r - 1) * c; \end{aligned}$$

$t_0$ —待测溶液流出的平均时间;

$t$ —溶剂流出的平均时间;

$r$ —待测溶液的相对粘度;

—待测溶液的粘度。

$c$ —待测溶液的浓度。

## 1.3 紫外分光吸光度的测定

取胶原溶液分别置于 30、35、40、50、60 温度下恒温处理 5h,然后在室温下用紫外分光光度计测定在 278nm 处的吸光度。

## 1.4 红外光谱法测定

取胶原溶液分别置于 30、35、40、50 的水浴中热处理 5h,取出后干燥后制备成一定厚度的胶原薄膜,用 Perkin - Elmer1700 傅立叶红外光谱仪(瑞士)测定。

## 1.5 原子力显微镜法测定

取胶原溶液在 35、40、50 温度下恒温处理 5h 后,滴于载玻片上,室温下在空气中自然干燥,形成胶原吸附层,用 CSPM3400 扫描探针显微镜(中国科学院化学研究所本原纳米仪器有限公司) 结构分析。

## 2 结果与讨论

蛋白质存在变性问题。胶原的变性过程可分两个阶段<sup>[10]</sup>,第一阶段是当外部条件改变,胶原分子的三股螺旋结构被破坏,表现为旋光度、比粘度及光散射角依赖性的迅速下降。当这个变化在较温和的条件得到控制时,除去外部条件后即可部分恢复胶原分子的构象;第二阶段,三股螺旋结构进一步分离成小分子,胶原溶液发生凝固沉淀现象,此阶段的变化不可恢复。利用胶原溶液的性质发生突变,可表征胶原的变性。

### 2.1 粘度法和吸光度法测定胶原的热变性温度

热变性温度 ( $T_d$ ) 的测定是在温和加热条件下发生,当温度不再继续上升时,溶液的性能还会恢复<sup>[11]</sup>。

胶原溶液样品的粘度随温度变化如图 1 所示。紫外吸光度测定结果如图 2 所示。

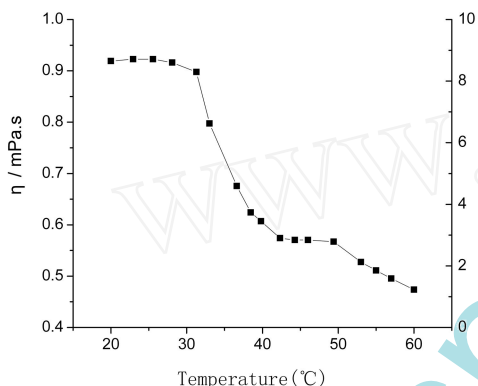


图 1 胶原溶液的温度与粘度变化图

Figure 1 Denaturation curve vs. temperature of the collagen solution

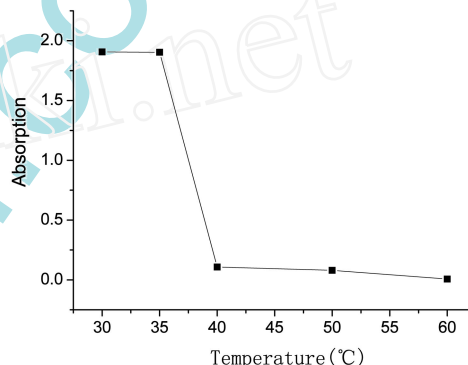


图 2 胶原溶液的温度与紫外吸光度关系 UV  
Figure 2 UV absorption spectrophotometer of the collagen solution varied with temperature

图 1 可看出,牛胶原溶液的粘度从 35 ~ 42 温度范围内,大幅度下降,而小于 35 或大于 42 其粘度基本不变;另外,由紫外吸收光谱图 2 可知,温度在 35 ~ 40 时牛胶原的吸光度大幅度下降。因为胶原中酪氨酸残基的苯环含有共轭双键,在 278nm 处具有一个吸收紫外吸收高峰。当温度达到胶原的变性温度时,胶原蛋白的结构发生变化,其酪氨酸的含量会减少,吸光度相应会变小。因此从图 1 和图 2 可知,此胶原的变性温度为 38 左右。

### 2.2 红外光谱图分析

胶原溶液在 30、35、40、50 下成膜后的红外光谱图为 3 所示。

图 3 可看出不同温度下处理的胶原膜在  $1650\text{cm}^{-1}$  的吸收峰强弱不一样,当温度由 30 变为 35 时,该吸收峰强度略为变弱;当温度变为 40 和 50 时  $1650\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰将变得更弱。

蛋白质在  $1650\text{cm}^{-1}$  处有 N-H 伸缩链段的特征吸收峰<sup>[23]</sup>,胶原蛋白的三股螺旋结构完整,在此处的吸收峰强,当温度升高到 35 时,胶原的螺旋结构有部分解体,N-H 伸缩链段被破坏,理论上  $1650\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰会有变化,但图中却无明显变化,说明胶原蛋白由 30 变为 35 再冷却到 30 的过程是个可逆变性过程,被破坏的 N-H 伸缩链段又大部分恢复。当温度变为 40 时大部分 N-H 伸缩链段被破坏,因此在  $1650\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰会变弱,到 50 时吸收峰更弱。本结果与文献 12 结果相似,为了进一步说明胶原蛋白的三股螺旋结构 40 后为不可逆破坏,本实验用原子力显微镜对其结构进行了分析。

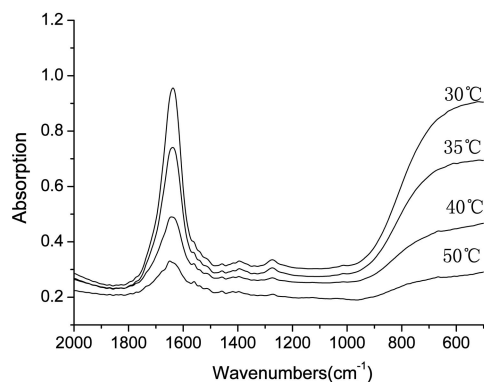


图 3 不同温度下所得的胶原膜的红外光谱图

Figure 3 FTIR spectrograms of the collagen membrane at different temperatures

### 2.3 原子力显微镜结构分析

35、40、50 处理后所得的胶原膜的原子显微镜结构如图 4 所示。

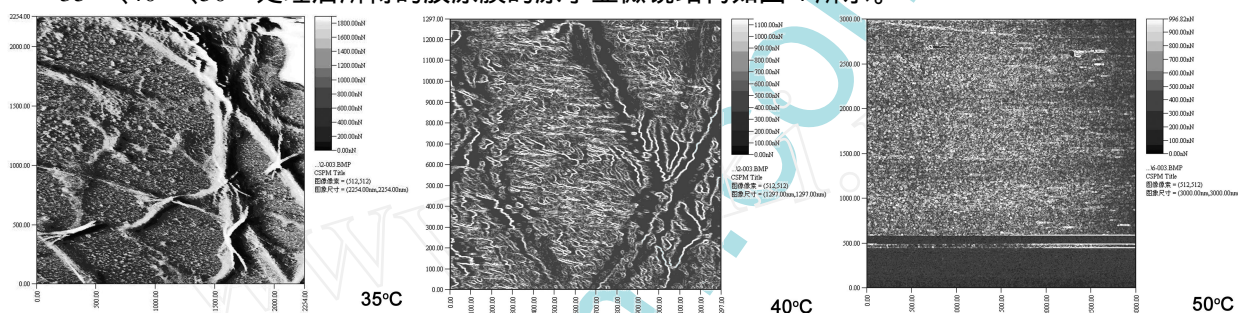


图 4 不同温度下所得的胶原膜的原子显微镜结构图

Figure 4 Fabric pictures of the collagen under atomic force microscope at different temperatures

从图 4 可知,在 35 下所得的胶原膜图像中有比较明显的纤维细丝,经测量其长度和直径均大于胶原蛋白单分子的尺寸(115nm × 300nm),这说明在 35 下胶原蛋白自发组装形成小聚集体,能保持胶原蛋白分子的三维螺旋结构。相对与 35,在 40 下所得的胶原膜图像,纤维细丝消失,出现了碎片,说明胶原分子的规则链段有断裂。而进一步提高成膜温度,50 下所得的胶原膜,断裂的规则链段变为了小碎片,链段结构完全消失。可以判断 40 为变性前后胶原分子内部的结构变化,此温度为胶原的变性温度。

## 3 结论

为了发挥胶原的生物功能和力学性能,必须保持其三股螺旋结构不被破坏,本研究用牛跟腱为原料,采用酶解法制备了胶原,考察了不同温度下胶原的物理化学特性。实验结果表明:粘度法和紫外分光光度计测定的胶原溶液的变性温度约为 38;红外光谱测定表明,随着温度的提高,胶原膜在 1650cm<sup>-1</sup> 的吸收峰减弱;原子力显微镜实验表明了,在 40 时牛胶原分子由螺旋结构的长链断裂为小链段和一些小碎片。实验证明牛胶原的变性温度为 40,即此方法制备的胶原在 40 以上,三股螺旋结构将被破坏。

### 参考文献:

- [1] Ogawa M, Moody M W, Portier R J, et al. J Agric Food Chem, 2003, 51, 8088 ~ 8092.
- [2] 史向阳,吴世康,孙曹民. 高分子学报, 1998, (4): 407 ~ 411.
- [3] 梁志红,周长忍,蔡基业,王小燕. 激光生物学报, 2004, (3): 207 ~ 209.
- [4] 王小燕,蔡基业,梁志红,赵涛. 电子显微学报, 2003, (2): 120 ~ 124.
- [5] 钟朝辉,李春美,顾海峰,等. 精细化工, 2006, (10): 983 ~ 987.

- [ 6 ] 张小燕,范晓东,高新,等. 高分子学报,2006,(8):959~963.
- [ 7 ] Wagner J R, Sorgentini D A, Maria C A. J Agric Food Chem,1996, 44(7): 1881~1889.
- [ 8 ] Pitchumani S, Lonchin S, Gowri C. ScyllaserrataI Comp Biochem Physiol, Part B,2000,125: 555~562.
- [ 9 ] 曾名勇,张联英,刘尊英,等. 中国海洋大学学报,2005,(4):608~612.
- [ 10 ] 戴岚,宋白薇. 日用化学品科学,2005,29(4):22~25.
- [ 11 ] 王碧,王坤余,等. 中国皮革,2003,(11):26~27.
- [ 12 ] Wolfgang F,Monika S. Eur J Pharm Biopharm,2001,51(3): 259~265.

## Effects of Temperature on the Aggregate of Bovine Collagen

WANG Xiang-mei<sup>1</sup>, GAO Jian-feng<sup>2</sup>, CAI Zhong-ting<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Engineering and Environment, North University of China, Taiyuan 030051, China;

2. College of Science, North University of China, Taiyuan 030051, China)

**Abstract:** To investigate the effects of the temperature on the collagen, which was prepared from bovine tendon by enzyme solubilization technique, the collagen was characterized by viscosity measurement, UV absorption spectrophotometer, FTIR spectroscopy and atomic force microscopy at different temperatures. Viscosity measurement and UV absorption spectrophotometer indicated that denaturation temperature of collagen solution is about 38°. FTIR spectroscopy showed that characteristic absorption peak at 1650cm<sup>-1</sup> is decreased with temperature increasing. It was observed under atomic force microscope that the triple helical structure of the collagen molecules ruptured at 40° and the molecular chains changed to chain segments and fractionlets. Through the investigations, it can be concluded that the triple helical structure of the prepared collagen is broken at the temperature 40° and above 40°.

**Key words:** Collagen solution; Denaturation temperature; Aggregate