

草鱼鱼鳞胶原蛋白体外自组装行为的研究

梁艳萍, 王 艳, 汪海波*, 张寒俊, 周 坚, 刘良忠

(武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

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)和胃蛋白酶溶性胶原蛋白(PSC), 在对胶原蛋白分子结构表征的基础上, 开展鱼鳞胶原蛋白体外自组装行为的研究, 并与哺乳动物来源的猪皮胶原(PC)相比较。结果表明: 制备所得的3种胶原蛋白均为典型的I型胶原, 3种胶原蛋白的分子质量和二级结构较为相似, 但氨基酸组成存在一定差异。采用浊度实验的方法观察胶原蛋白的体外自组装行为, 结果表明: 在合适的温度和pH值条件下, 3种胶原蛋白均可产生体外自组装行为, 其自组装进程可划分为迟滞段、快速上升段和平稳段3个阶段, 其出现时间受溶液pH值的影响; 在相同条件下, PC的体外自组装程度最高, 其次为鱼鳞PSC和ASC; 环境温度、胶原蛋白质量浓度以及蛋白的热变性处理均会不同程度的影响胶原蛋白的体外自组装行为。

关键词: 草鱼; 鱼鳞; 胶原蛋白; 自组装

An Investigation into the Self-assembly Behavior of Collagens from Grass Carp Scale

LIANG Yan-ping, WANG Yan, WANG Hai-bo*, ZHANG Han-jun, ZHOU Jian, LIU Liang-zhong

(College of Food Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In this study, acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) were extracted from grass carp scale and molecularly characterized. Meanwhile, a preliminary investigation into their self-assembly behavior *in vitro* was carried out along with a comparison with porcine skin collagen(PC). ASC, PSC and porcine skin collagen were all type I collagens and showed a high similarity in molecular weight and secondary structure but a difference in amino acid composition. The results of turbidity tests indicated that all the collagens exhibited behavior *in vitro* under the appropriate temperature and pH. The process of self-assembly consisted of lag, rapid rise and plateau phases and their occurrence times were affected by medium pH. Under the same conditions, the self-assembly degree of porcine skin collagen was highest, followed by PSC and ASC. Environmental temperature, collagen concentration and thermal denaturation temperature had different effects on the self-assembly behavior *in vitro* of PSC.

Key words: grass carp; fish scale; collagen; self-assembly

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0015-06

胶原蛋白的高分子结构及其在溶液中的分子构象行为与其在生物机体内展现的功能有着密切的关联。在活性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^[1]。在溶液pH值、环境温度以及胶原浓度合适的条件下, 原胶原分子(pre collagen)可以通过分子间的相互作用而自组装形成大的纤维丝(fibrillar), 纤维丝可以进一步组装形成更大尺寸的胶原纤维(fibril)和胶原纤维束(fibril bundles)^[2]。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。此外, 胶原分子的体外自组装也被应用于胶原生物材料的制备中。研究表明, 胶原分子经适度定向自组装后形成的生物材料在机械力学性能和降解行为上均有不同程度的改变^[3-4]。近年来, 随着天然胶原在医学组织工程等领域中应用的日益广泛, 传统的胶原蛋白来源(人体胚胎、陆生动物的结缔组织和皮肤等)已不能满足正常需要, 特别是由于疯

收稿日期: 2011-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(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)

作者简介: 梁艳萍(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: lyp10291986@163.com

* 通信作者: 汪海波(1971—), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: wanghaibo@whpu.edu.cn

牛病、口蹄疫等疾病的流行,陆生动物为来源的胶原蛋白的安全性受到质疑。为此,世界各国都开始关注水生动物中胶原蛋白资源的开发。国内外学者针对不同来源的水生动物胶原蛋白开展了大量研究工作,但多数研究主要集中在蛋白的提取、结构鉴定和基本理化性质等方面,而对于水生动物来源胶原蛋白分子的溶液行为,特别是体外自组装行为的研究尚鲜有报道^[5-9]。为此,本研究以草鱼鱼鳞为原料,分别提取酸溶性胶原蛋白(acid-soluble collagen, ASC)和酶溶性胶原蛋白(pepsin-soluble collagen, PSC),在对胶原蛋白分子结构表征的基础上,开展鱼鳞胶原蛋白体外自组装行为的初步研究,并与哺乳动物来源的猪皮胶原(porcine skin collagen, PC)相比较,力图揭示淡水鱼胶原分子在体外自组装行为方面与哺乳动物胶原相比所具备的共性和差异性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

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℃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℃条件下冷藏备用。

1.2 仪器与设备

胃蛋白酶(800~2500U/mg) 丰达生物科技有限公司; NaOH、NaCl、Na₂CO₃、EDTA、乙酸、盐酸等(均为国产分析纯) 湖北医药集团有限公司。

GZX-9070MBE数显鼓风恒温干燥箱 英峪予华仪器厂; PHS-3C pH计 杭州东星仪器设备厂; Cary-50紫外-可见分光光度计、Varian 高效液相色谱仪 美国Varian公司; HSSH-2电热恒温水浴锅 北京长安科学仪器厂; 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。

1.3 方法

1.3.1 胶原蛋白的提取与纯化^[10-11]

草鱼鱼鳞中胶原蛋白的提取与纯化:风干的草鱼鱼鳞依次用0.5mol/L的Na₂CO₃溶液和0.3mol/L的EDTA溶液浸泡脱除杂蛋白、色素和矿物质等成分,随后用0.5mol/L的乙酸溶液(1:40, *m/V*)搅拌提取,重复提取2次,每次24h,分离并合并上清液得到酸溶性胶原蛋白(ASC)粗提液。提取残渣继续用含有2g/100mL胃蛋白酶的0.5mol/L乙酸溶液提取(1:40, *m/V*),重复提取2次,每次24h,过滤并合并上清液,得到酶溶性胶原蛋白(PSC)粗提液。分别向ASC和PSC粗提液中添加NaCl至盐浓度为0.9mol/L,静置盐析24h后过滤,胶

原蛋白沉淀用0.5mol/L的乙酸溶液复溶后依次对0.1mol/L的乙酸和蒸馏水透析,最后冷冻干燥得到草鱼鱼鳞ASC、PSC样品。

猪皮胶原蛋白的提取与纯化: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24h,低温风干后用10g/100mL NaCl溶液浸提脱除盐溶性杂蛋白,随后用含有2g/100mL胃蛋白酶的0.5mol/L乙酸溶液提取猪皮胶原蛋白(1:40, *m/V*),提取、纯化方法同草鱼鱼鳞PSC,冻干后得到猪皮胶原蛋白(PC)样品。

1.3.2 胶原蛋白的结构表征

1.3.2.1 氨基酸组成分析^[12]

胶原蛋白样品经盐酸水解后采用高效液相色谱法测定其氨基酸组成。测定条件: Soplum Amino Acid Analysis 色谱柱,线性梯度洗脱, A相为0.2mol/L柠檬酸钠水溶液pH3.00, B相为0.2mol/L硼酸钠水溶液pH9.80,洗脱液流速为0.4mL/min,柱温为65℃。

1.3.2.2 傅里叶变换红外光谱分析^[13]

胶原蛋白样品研磨成细粉后,取样约5mg与150mg KBr充分混匀,压片,放入样品室。测定扫描范围为4000~400cm⁻¹,分辨率4cm⁻¹,扫描次数为4次。

1.3.2.3 SDS-PAGE分析^[14]

采用SDS-PAGE垂直电泳,样品缓冲液为60mmol/L Tris-HCl (pH6.8, 含25%甘油、2% SDS、14.4mmol/L β-巯基乙醇、0.1%溴酚蓝),染色液为0.1%考马斯亮蓝R-250甲醇水染色液,脱色液为酸甲醇水脱色液(含10%乙酸、10%甲醇),12%分离胶,5%堆积胶,电泳缓冲液为Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.3, 0.1% SDS)。

1.3.3 胶原蛋白分子的体外自组装行为观察

1.3.3.1 胶原蛋白分子体外自组装观察方法的建立

参考文献[15-16]方法并稍加改进,采用浊度实验监测胶原蛋白分子的体外自组装行为。以PSC为研究对象,用0.012mol/L的盐酸配制2mg/mL的胶原蛋白溶液,随后将该溶液转移至透析袋(截留分子量>14000D)中,在25℃水浴中对蒸馏水透析,分别用酸度计和分光光度计实时监测透析袋中溶液的pH值和400nm波长处吸光度随时间的变化,得到胶原蛋白的自组装曲线和溶液pH值变化曲线。

1.3.3.2 鱼鳞ASC、PSC以及PC自组装行为的比较

以鱼鳞ASC、PSC和PC为测试样品,按照1.3.3.1节的方法测定,绘制胶原蛋白溶液的pH值变化曲线和自组装曲线,比较3种胶原蛋白分子自组装行为的差异性。

1.3.3.3 环境温度对胶原蛋白体外自组装行为的影响

选取鱼鳞 PSC 为测定样品, 分别在 4、25℃ 和 35℃ 的水浴条件下对蒸馏水透析, 绘制胶原溶液的 pH 值变化曲线和自组装曲线。

1.3.3.4 胶原蛋白质量浓度对其自组装行为的影响

选取鱼鳞 PSC 为测定样品, 分别配制 0.5、1.0、2.0mg/mL 的胶原蛋白溶液。绘制胶原溶液的 pH 值变化曲线和自组装曲线。

1.3.3.5 pH 值对胶原蛋白分子体外自组装行为的影响

选取鱼鳞 PSC 为测定样品, 分别用 0.02mol/L 的盐酸溶液和 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液调节透析外液 pH 值至 6 和 9, 绘制胶原蛋白溶液的 pH 值变化曲线和自组装曲线, 考察 pH 值对胶原蛋白体外自组装行为的影响。

1.3.3.6 胶原蛋白的热变性前处理对其自组装行为的影响

选取鱼鳞 PSC 为测定样品, 在进行自组装测定前, 先将胶原蛋白样品溶液在水浴条件下进行不同程度的热变性预处理(35℃、1h; 35℃、3h; 50℃、1h), 绘制胶原蛋白溶液的 pH 值变化曲线和自组装曲线, 考察热变性前处理对胶原蛋白分子体外自组装行为的影响。

2 结果与分析

2.1 氨基酸组成分析

胶原蛋白的基本结构单位是由 3 条肽链(2 条 α_1 链和 1 条 α_2 链)盘绕形成的 3 股螺旋结构分子, 原胶原蛋白分子以重复的(Gly-X-Y) 序列为主要特点^[17]。草鱼鱼鳞 ASC、PSC 和 PC 的氨基酸组成见表 1。

表 1 ASC、PSC 和 PC 的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of ASC, PSC, and porcine skin collagen(PC)

氨基酸	ASC	PSC	PC
Hyp	84.1	106.8	99.7
Asp	29.4	37.9	37.0
Thr	10.9	12.1	10.0
Ser	12.4	13.7	11.5
Glu	57.8	66.1	62.5
Pro	125	124.0	149
Gly	326	351.0	334
Ala	104	108.0	94.9
Cys	0.0	0.0	0.0
Val	12.6	13.0	16.4
Met	3.6	4.0	1.8
Ile	58.0	9.1	7.4
Leu	43.7	29.6	33.2
Tyr	1.2	0.1	0.0
Phe	7.1	6.0	7.8
His	27.4	27.7	32.1
Lys	44.6	38.3	45.9
Arg	51.8	52.6	56.8

注: 表中数据为 1000 个氨基酸中氨基酸残基数量所占的比例/%。

由表 1 可知, 草鱼鱼鳞 ASC、PSC 和 PC 都具有天然胶原蛋白共同的氨基酸组成特征, 即甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸含量很高, 含硫氨基酸(胱氨酸、蛋氨酸)含量低。此外, 3 种胶原蛋白的氨基酸组成仍存在明显差异。如, PC 中的脯氨酸含量明显高于草鱼鱼鳞 ASC 和 PSC; 酸法提取的 ASC 与酶法提取 PSC 及 PC 相比, ASC 中的异亮氨酸、亮氨酸和酪氨酸含量显著高于 PSC 和 PC, 该结果提示胶原蛋白的来源以及提取方法对其氨基酸组成均有不同程度的影响。

2.2 红外光谱分析

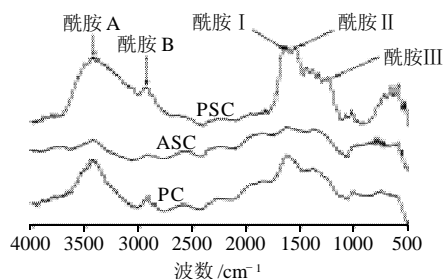
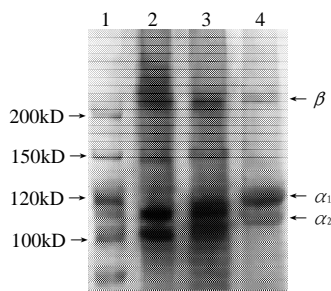


图 1 ASC、PSC 和 PC 的红外吸收光谱

Fig.1 FIRT spectra of ASC, PSC, and porcine skin collagen

由图 1 可知, 草鱼鱼鳞胶原 ASC、PSC 和哺乳动物来源 PC 的红外光谱特征基本一致, 均具有天然 I 型 3 螺旋结构胶原蛋白的特征吸收带。它们的酰胺 A 带出现在 3360cm⁻¹ 附近, 归属于蛋白肽链中游离的 N—H 伸缩振动^[18]; 酰胺 B 带出现在 2935cm⁻¹ 附近, 归属于—CH₂ 的不对称伸缩振动; 酰胺 I 带在 1640cm⁻¹ 处, 与 C=O 的伸缩振动有关; 酰胺 II 和 III 带出现在 1540cm⁻¹ 和 1245cm⁻¹ 附近, 归属于蛋白肽链的 N—H 弯曲振动和 C—N 的伸缩振动。红外光谱分析结果提示, 尽管 3 种胶原蛋白的来源和提取方法不相同, 但他们却具有相似的二级结构。

2.3 SDS-PAGE 分析



1. Maker; 2. PC; 3. ASC; 4. PSC。

图 2 ASC、PSC 和 PC 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE of ASC, PSC, and porcine skin collagen

由图2可知,3种胶原蛋白都至少含有两种 α 肽链(α_1 和 α_2),属于典型的I型胶原蛋白。3个样品的电泳图中均含有未完全破坏的二聚体结构,即 β 肽链,其分子质量约为200kD;PC的电泳图中还可以看到少量分子质量大于 β 肽链的蛋白条带,而ASC、PSC中几乎没有,该结果说明,在SDS强极性剂破坏下,PC中仍残留有部分完整的3螺旋结构的胶原分子。PC和ASC的 α_1 肽链分子质量均为110kD,PSC的 α_1 肽链分子质量约120kD;PC和ASC的 α_2 肽链的分子质量均为100kD,而PSC的 α_2 肽链的分子质量略高,约为110kD。ASC、PSC和PC的分子质量分别约为320、350kD和320kD,与文献报道的结果基本一致^[19]。

2.4 胶原蛋白的体外自组装观测

2.4.1 胶原蛋白分子体外自组装观察方法的建立

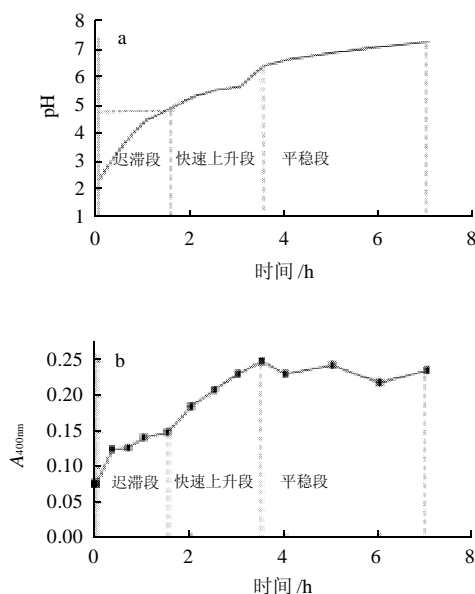


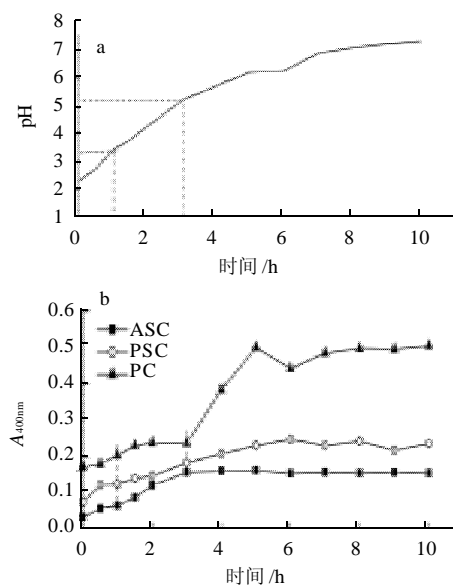
图3 PSC的体外自组装行为

Fig.3 *in vitro* self-assembly behavior of ASC

采用浊度实验的方法观察胶原蛋白在溶液中的体外自组装行为。图3是草鱼鱼鳞PSC的自组装曲线。PSC的自组装曲线可以划分为3个典型阶段,即迟滞阶段、快速上升阶段和平稳阶段。在迟滞阶段,原胶原分子以氢键等形式相互作用形成胶原微纤维(纤维丝),表现为吸光度的缓慢上升;在快速上升阶段,胶原蛋白分子以胶原微纤维为核,继续组装形成更大尺寸的胶原纤维,表现为吸光度的快速上升。胶原分子的体外自组装与溶液环境的pH值变化密切相关。在 H^+ 浓度较高的条件下,胶原分子内肽键的酰胺基能和溶液中的 H^+ 形成 $-NH_2^+$,由于电荷排斥作用,胶原分

子多以线性单分子或小的聚集体形式存在,较难形成大的分子聚集体。随着pH值的增大,胶原蛋白分子间电荷排斥作用下降,分子间聚集程度增加,有助于大的纤维聚集体形成。草鱼鱼鳞PSC自组装的快速上升阶段的起始pH值约为5左右,接近胶原分子的等电点pH值^[20]。

2.4.2 草鱼鱼鳞ASC、PSC以及哺乳动物PC体外自组装行为的比较



3种胶原蛋白自组装过程中溶液pH值的变化一致,图中只显示一条pH值随时间的变化曲线。

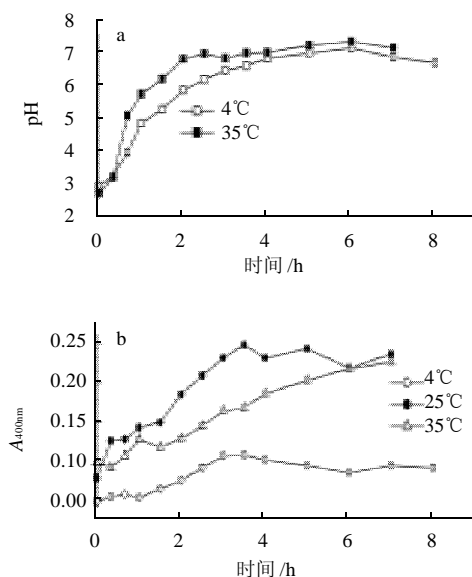
图4 ASC、PSC与PC体外自组装行为的比较

Fig.4 Comparison of self-assembly behavior *in vitro* among ASC, PSC, and porcine skin collagen

草鱼鱼鳞ASC、PSC和PC胶原蛋白25℃条件下的体外自组装行为如图4所示。在相同条件下,草鱼鱼鳞ASC、PSC和PC自组装程度表现出较大差异,PC自组装程度最高,其次为PSC,而ASC的自组装能力最弱。ASC是酸直接提取的鱼鳞中游离状态的胶原分子,在分子结构中保留有完整的C端和N端结构,分子间电荷排斥作用强,这将在很大程度上抑制其自组装行为。而PSC和PC均是经过胃蛋白酶水解后的提取的胶原分子,其肽链分子中的C端和N端被酶的水解作用去除,因而分子间电荷排斥作用相对较小,自组装程度也相应较高。尽管如此,同样作为酶法提取的胶原蛋白,哺乳动物PC的自组装程度仍明显好于鱼鳞PSC,说明淡水鱼胶原和哺乳动物胶原在分子结构、分子行为以及由此导致的分子自组装中仍存在一定的差异。此外,3种胶原分子自组装快速上升阶段的起始pH值也有所差异。

PC 和 PSC 快速上升阶段的起始 pH 值在 5~6 的范围, 而 ASC 快速上升阶段起始 pH 值出现在 3~4 左右, 说明 pH 值对不同胶原蛋白自组装行为的影响也各不相同。

2.4.3 环境温度对胶原体外自组装行为的影响



4℃和 25℃时, 胶原蛋白溶液的 pH 值随时间的变化趋势基本一致, 所以只用一条 pH 值变化曲线表示。

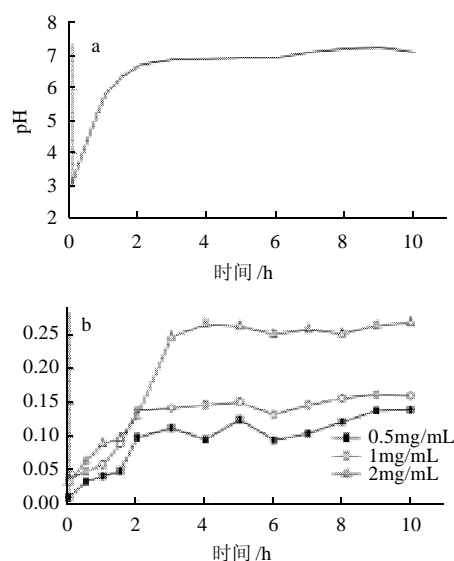
图 5 环境温度对 PSC 自组装行为的影响

Fig.5 Effect of temperature on the self-assembly behavior *in vitro* of PSC

如图 5 所示, 环境温度对胶原蛋白自组装影响显著。草鱼鱼鳞 PSC 在 25℃ 条件下的自组装程度最高, 其次为 35℃, 而在 4℃ 条件下仅表现出微弱的自组装行为, 该结果提示, 在最接近淡水鱼生活环境的温度条件下(约 25℃ 左右), 其胶原蛋白自组装效果最好, 而低温条件会明显抑制其分子的自组装行为。在 3 个实验温度条件下, PSC 自组装的快速上升阶段均发生在 pH 值为 4~5 的范围内, 说明 pH 值仍是决定自组装阶段的主要因素。

2.4.4 胶原蛋白质量浓度对其自组装行为的影响

图 6 是不同质量浓度条件下 PSC 的体外自组装曲线。随着胶原蛋白溶液质量浓度的升高, 蛋白溶液的吸光度也随之增大, 即胶原蛋白自组装程度增加, 但胶原蛋白自组装达到稳定的时间也相应延长, 在 2mg/mL 质量浓度条件下, 其自组装行为在 3h 可达到稳定, 而 0.5mg/mL 和 1mg/mL 质量浓度条件下 2h 即可达到自组装的稳定。该实验结果提示, 随着胶原质量浓度的提高, 胶原分子的自组装程度也随之增加, 但胶原蛋白的自组装过程是一个有序排列的过程, 因此, 质量浓度越大, 混乱度也越大, 达到有序结构的时间也相对延长。



3 种质量浓度条件下胶原蛋白自组装过程中溶液 pH 值的变化一致, 图中只显示一条 pH 值随时间的变化曲线。

图 6 不同质量浓度条件下 PSC 的体外自组装行为

Fig.6 Effect of collagen concentration on the self-assembly behavior *in vitro* of PSC

2.4.5 环境 pH 值对胶原蛋白体外自组装行为的影响

分别在透析外液 pH 值为 6 和 9 的条件下进行 PSC 的自组装实验, 与中性(pH7.47)透析条件下 PSC 的自组装行为进行比较, 考察 pH 值对胶原蛋白自组装的影响, 结果如图 7 所示。在不同 pH 值环境下, 胶原蛋白的体外自组装行为展现出较大差异。在实验选择的 3 个 pH 值条件下, pH 值为 6 时胶原蛋白 PSC 自组装效果最好, 其次为 pH 值为 9 和 7.47。该结果说明, 环境 pH 值不仅决定胶原蛋白体外自组装的起始阶段, 同时也对其自组装程度产生影响。

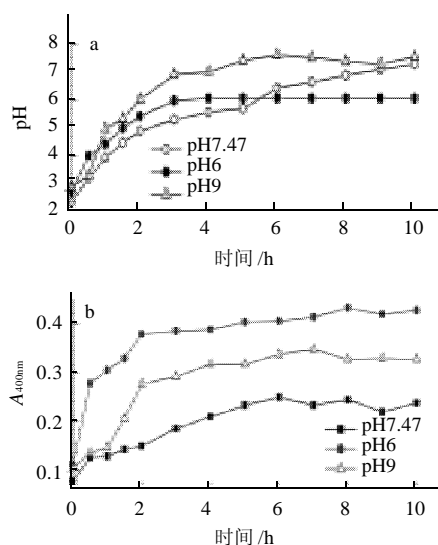
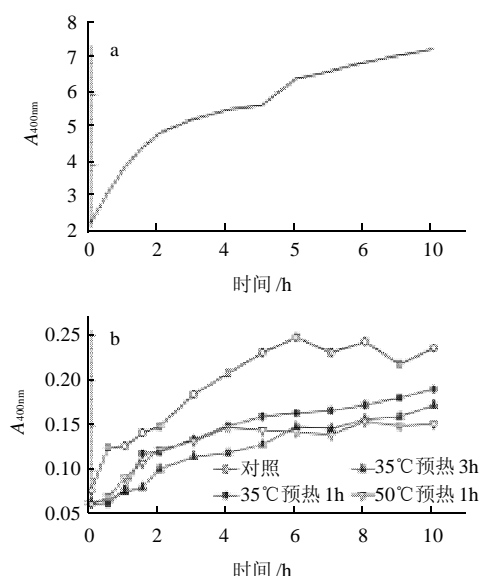


图 7 不同 pH 值条件下 PSC 的体外自组装行为

Fig.7 Effect of pH on the self-assembly behavior *in vitro* of PSC

2.4.6 热变性处理对胶原蛋白体外自组装行为的影响



3 种热处理条件下胶原蛋白自组装过程中溶液 pH 值的变化一致, 图中只显示一条 pH 值随时间的变化曲线。

图 8 热处理对 PSC 体外自组装行为的影响

Fig.8 Effect of heat treatment on the self-assembly behavior *in vitro* of PSC

在自组装实验前, 对 PSC 分别进行不同程度的热处理(35℃、1h, 35℃、3h, 50℃、1h), 考察热处理对胶原蛋白自组装行为的影响, 结果如图 8 所示。完整的 3 螺旋分子结构是胶原蛋白产生分子间自组装的前提条件, 当胶原分子经热变性处理后, 由于其 3 螺旋结构被部分或完全破坏, 导致多肽链的解离, 大量疏水基团暴露, 从而会严重抑制其分子间的聚集和组装。结果表明, 在高于胶原蛋白变性温度条件下(草鱼胶原蛋白的变性温度为 34~35℃^[19])对胶原蛋白进行热处理后, 胶原蛋白的体外自组装行为受到明显的抑制, 且热处理时间越长、热处理温度越高, 抑制作用越大。该结果提示, 胶原蛋白分子结构的改变对其体外自组装行为有重要影响。

3 结 论

以草鱼鱼鳞为原料, 分别提取鱼鳞中的酸溶性胶原蛋白(ASC)和胃蛋白酶溶性胶原蛋白(PSC), 在对胶原蛋白分子结构表征的基础上, 开展鱼鳞胶原蛋白体外自组装行为的初步研究, 并与哺乳动物来源的猪皮胶原蛋白(PC)相比较。结果表明: 制备所得的 3 种胶原蛋白均为典型的 I 型胶原, 3 种胶原蛋白的分子质量和二级结构较为相似, 但氨基酸组成存在一定差异。采用浊度实验的方法观察胶原蛋白的体外自组装行为, 结果表明: 在合适的温度和 pH 值条件下, 3 种胶原蛋白均可产生体外自组装行为, 其自组装进程可划分为迟滞段、快速

上升段和平稳段 3 个阶段, 其出现时间受溶液 pH 值的影响; 在相同条件下, PC 的体外自组装程度最高, 其次为鱼鳞 PSC 和 ASC; 环境温度、胶原蛋白质量浓度以及蛋白的热变性处理均会不同程度地影响胶原蛋白的体外自组装行为。该研究结果对解析淡水鱼胶原蛋白分子的溶液行为及其与哺乳动物胶原的差异具有理论意义。

参考文献:

- [1] JIANG Fengzi, HORBER H, HOWARD J, et al. Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes[J]. *Journal of Structural Biology*, 2004, 148: 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: 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: 2164-2172.
- [4] GUO C, KAUFMAN L J. Flow and magnetic field induced collagen alignment[J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 1105-1114.
- [5] KITTIPIHATTANABAWON 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: 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: 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, 桂萌, 等. 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] ZHANG J, DUAN R, TIAN Y, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. *Food Chemistry*, 2009, 116: 318-322.
- [11] 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 sea-bream[J]. *Food Chemistry*, 2004, 88: 495-501.
- [12] KITTIPIHATTANABAWON 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: 792-800.
- [13] LIN Y, LIU D. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species[J]. *Food Chemistry*, 2006, 99: 244-251.
- [14] LI Fan, JIA Dongying, YAO Kai. Amino acid composition and functional properties of collagen polypeptide from Yak (*Bos grunniens*) bone [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42: 945-949.
- [15] LI Yuping, ASADI A, MONROE M R, et al. pH effects on collagen fibrillogenesis *in vitro*: electrostatic interactions and phosphate binding [J]. *Materials Science and Engineering*, 2009, 29: 1643-1649.
- [16] GOBEAUX F, MOSSER G, ANGLO A, et al. Fibrillogenesis in dense collagen solutions: a physicochemical study[J]. *J Mol Biol*, 2008, 376: 1509-1522.
- [17] GELSE K, POSCHL E, AIGNER T. Collagens-structure, function, and biosynthesis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55: 1531-1546.
- [18] WANG Lin, AN Xinxin, YANG Fangmei, et al. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*)[J]. *Food Chemistry*, 2008, 108: 616-623.
- [19] 张建忠, 安欣欣, 王林, 等. 草鱼皮酸溶性和酶溶性胶原蛋白的提取及性质[J]. *食品科学*, 2006, 27(12): 556-559.
- [20] 温祖谋. 胶原的两性及其等电点[J]. *中国皮革*, 1980(4): 32-37.