

林述荣 陈 贝 王 勤 等. 胶原特性及其制备方法研究进展[J]. 渔业研究 2018 40(5):399-407.

胶原特性及其制备方法研究进展

林述荣¹, 陈 贝², 王 勤¹, 吴靖娜², 苏永昌², 许 旻²,
陈清西^{1*}, 刘智禹^{2*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361102;

2. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室,
福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361013)

摘要: 本文阐述了胶原、明胶和胶原多肽三者的概念和不同点, 介绍了胶原的结构以及 I 型胶原和 II 型胶原的差异, 总结了胶原的七种制备方法, 并对各种制备方法的优缺点进行分析, 为水产动物资源制备胶原提供参考。

关键词: 胶原; 制备方法; 明胶; 胶原多肽

中图分类号: TS254.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5601(2018)05-0399-09

胶原作为人体内含量丰富的一种蛋白质, 在医药、食品、美容和化妆品等领域上都有广泛的应用。随着社会的发展, 胶原需求量急剧上升, 胶原安全性问题越来越引起人们的重视, 其中胶原制备方法备受关注。人们对胶原的结构探索和认识经历了从浅到深的过程。由于胶原极难溶解, 致使长期以来人们都未能制备得到胶原。直到 1900 年法国研究人员发现胶原可以溶于稀醋酸中, 从此拉开了胶原制备历史序幕。本文详细介绍了胶原的七种制备方法, 通过对比, 明确了每种制备方法的优缺点。为了提高胶原的提取率, 通常可以将几种方法相结合。目前, 全世界对于胶原研究的重心逐渐从陆生生物转移到了海洋生物, 这对提高我国水产品加工利用率和水产品加工技术水平具有重要意义。

1 胶原、明胶及胶原多肽的区别

胶原、明胶、胶原多肽是三个极易混淆的名词, 三者均可从动物的皮肤、骨骼、筋腱等组织中提取制备。胶原是存在于动物组织器官中的一类具有生物活性的三股螺旋结构的天然大分子蛋白^[1-3]。在动物体内, 胶原含量尤其丰富。作为一种重要的结构蛋白, 胶原占人体总蛋白的四分之一以上, 占皮肤干重的四分之三, 也是细胞质基质 (ECM) 中最主要的成分之一^[4]。胶原主要作用是支撑器官、保护机体。除此之外, 很多动物体内的蛋白质都含有胶原结构域^[5-6]。胶原只能被胶原酶酶解, 其他蛋白酶对胶原均无作用。胶原不溶于水, 稳定性较差, 极易受 pH、温度和一些变性剂的影响^[7]。从结构上看, 胶原是三条 α 肽链以共价键连接的大分子蛋白质。

收稿日期: 2018-07-25

基金项目: 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室 (361013); 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心 (361013)

作者简介: 林述荣 (1992-), 男, 福建福清, 硕士研究生, 研究方向为生物学, Tel: 15705958085. E-mail: 569612496@qq.com

通讯作者: 刘智禹 (1972-), 男, 教授级高级工程师, 博士, 研究方向为水产品加工及其综合利用. Tel: 13906008638. E-mail: 272132622@qq.com

陈清西 (1959-), 男, 教授, 博士, 研究方向为分子酶学. Tel: 13459256685. E-mail: chenqx@xmu.edu.cn

而从性能上,胶原能成膜,具有优良的柔韧性和机械强度,具有其他材料无法比拟的生物活性、生物相容性和可降解性^[8]。

明胶是胶原在剧烈的外部因素作用下,造成胶原的共价键和氢键断裂,空间结构中三股螺旋解旋变成的无规则卷曲的变性产物^[9],如高温、酸和碱等均会使得胶原变性成明胶。明胶的氨基酸组成和胶原是相同的,由 18 种氨基酸组成,其中脯氨酸和羟脯氨酸的含量占大部分,同样具有良好的生物相容性。但明胶已经没有了棒状三螺旋空间结构,只剩下类三螺旋结构,依赖分子内氢键和氢键水合维持,丧失了生物活性,能被蛋白酶所酶解。明胶的相对分子质量分布比胶原更宽,一般为 15 000 ~ 250 000 Da。干燥明胶具有很强的吸水性,会吸水溶胀,因此储存时要格外注意防潮。明胶不溶于冷水,但加热可使其溶解,是一类热可溶的蛋白质混合物。待冷却后,明胶水溶液会形成凝胶,成网状结构。从结构上看,明胶是共价键几乎全被打断,只剩下一些次级键;而从性能上,明胶也能成膜、成冻,但膜性脆,强度比胶原膜差^[10]。

胶原多肽是胶原在水解过程中,三螺旋结构被彻底打开,形成三条独立的肽链,并降解成相对分子质量从几千到几万成分复杂的多肽混合物^[11]。胶原多肽分子量分布范围比明胶更广,同时也不具有生物活性,可溶于冷水或热水,拥有良好的吸湿性和保水性,能被蛋白酶所酶解,消化吸收性好^[12]。广泛意义上,明胶也属于胶原多肽,但是胶原多肽分子量低于明胶,肽链之间也缺少某些氢键。从结构上来看,胶原多肽已经完全不被共价键和次级键束缚,而从性能上,胶原多肽无法成膜。

2 胶原的结构

1940 年, Astbury 和 Bell 提出胶原分子是由一个单一的多肽链延伸与酰胺键的顺式构象。1951 年,美国国家科学院学报发布了胶原研究的新发现,胶原主要由 α 螺旋和 β 折叠组成,随后 Pauling 和 Corey 两位科学家很快就发现了胶原之间的三条多肽链是通过氢键连接在一起的,并且相互拧成空间螺旋结构^[13]。在 1954 年, Ramachandran 和 Kartha 发现胶原是由左手

PPII 螺旋和三交错的右旋三螺旋结构所构成^[14]。直到 1955 年, Rich、Crick、North 提出了目前公认的胶原结构,即为 3 条左手螺旋的 α 肽链以氢键结合形成牢固而稳定的右手超螺旋结构^[15-16]。

胶原一级结构的特点是肽链上每隔两个氨基酸就有一个甘氨酸出现,具体可表示成 Gly - Pro - HyP、Gly - Pro - X 和 Gly - Y - X (X、Y 为其他氨基酸),三肽重复性排列形成肽链^[17-18]。一般情况下,随着胶原结构中羟脯氨酸含量的增加,胶原的三螺旋空间结构也更稳定^[19]。多肽主链骨架的一些肽段通过有规律的排列形成了胶原特有、紧密的右手螺旋,即胶原的二级结构。胶原以共价交联的方式形成胶原微纤维。肽链上 X 残基的 O - H 基团与甘氨酸中的 N - H 基形成稳定的氢键,促进了胶原三级结构的稳定性^[20]。胶原中具有三级空间结构的多肽按照一定的方式相互接触形成更高层次的立体蛋白质分子,这就是所谓的胶原四级结构。胶原之所以具有很强的抗张强度和韧性主要是由于胶原氨基酸组成的独特性以及肽键之间特殊的作用^[21],这些良好的性质使得胶原在多个领域具有举足轻重的作用。

脊椎动物体内含有至少 46 种不同肽链组成的胶原,胶原的种类共 28 种,包括 I 型、II 型、III 型胶原等。不同类型胶原的主要区别在于分子中非螺旋部位的范围和分布,这些结构差异造就了不同类型胶原易变性和生物物理特性的差异^[22]。胶原通常由 3 条 α 肽链组成,而这 3 条 α - 链并不全是相同的。例如, I 型与 II 型在亚单位组成上是不同的, I 型胶原组成为 $[\alpha_1 (I)]_2\alpha_2 (I)$,还有少数为 $[\alpha_1 (I)]_3$,而 II 型胶原组成为 $[\alpha_1 (II)]_3$,并且二者在氨基酸的组成上也略有差异,二者赖氨酸和羟赖氨酸含量之和是相当的,但 II 型胶原的羟赖氨酸含量比 I 型胶原更高,这是由于 II 型胶原的含糖量是 I 型胶原的十倍,而胶原中赖氨酸羟基化是其糖化的先决条件。在众多胶原中,只有十分之一的胶原属于非成纤维胶原,其余的胶原都属于成纤维胶原。成纤维胶原主要参与构成细胞外基质的纤维成分,例如 I 型胶原是成纤维胶原,主要分布于皮肤、肌腱、骨、牙等部位,起维持皮肤弹性和骨结构完整等作用。II 型胶原是成纤维胶

原, 分布于软骨、玻璃体、椎间盘和髓核等, 具有保湿、美白的功效。Ⅲ型胶原是成纤维胶原, 主要分布于血管、皮肤、肌肉和胚胎真皮等, 对维持血管的强度和弹性具有重要作用^[23]。

3 胶原的制备方法

由于胶原是一种纤维状蛋白, 并能与体内的蛋白多糖、糖蛋白等成分结合, 这些都使得胶原很难溶解于一般的溶液。早期学者把胶原定义为一种不溶性蛋白, 直到1990年法国研究人员发现胶原可以溶于稀醋酸。胶原的制备原理均是通过改变胶原所在的环境, 利用胶原与其他蛋白质的不同特性进行分离。根据制备胶原的介质不同, 制备方法大致分为以下几大类: 酸制备法、酶制备法、碱制备法、热水制备法、中性盐制备法、微波制备法和超声制备法^[24]。可是每种方法均存在一定的缺陷。酸制备法能较好地保留胶原的空间三螺旋结构, 但所需时间长, 效率低, 在大量生产时产生的废液对环境将造成严重的污染。酶制备法提取率高, 但酶制备法的蛋白酶会切断胶原的非螺旋端肽, 这必然对一些胶原的结构产生影响。碱制备法虽然效率高, 但可能会产生消旋作用, 导致结构变异, 得到旋光性化合物, 而且胶原的肽键和氢键水解, 最终得到的不是完整的胶原分子。热水制备法由于本身温度高, 可能会致使部分胶原变性。中性盐制备法会对胶原的稳定性产生一定的影响, 后期除盐将会导致胶原大量损失。微波制备法会使得胶原结构变得松散, 也会导致部分胶原变性成胶原多肽。超声制备法在溶液中产生的自由基对于胶原纤维结构具有严重的破坏作用。酸制备法和酶制备法对胶原的影响最小, 也是最常用的两种方法^[25]。要克服其中某种方法的缺陷, 胶原的制备通常是将几种方法相结合。

3.1 酸制备法

酸制备法是利用低离子浓度酸性条件破坏胶原分子间的盐键和希夫键以及不同蛋白质分子之间的氢键, 使得胶原膨胀、溶解, 使未交联的胶原溶解于溶液中^[26]。盐酸、乙酸、柠檬酸和甲酸等都是常见的制备介质, 其中最常用和有效的介质为乙酸^[27]。通常在4℃低温环境下将原料浸泡于0.5 mol/L的乙酸环境中进行持续搅拌制

备。利用酸制备法提取的胶原通常称为酸溶性胶原 (Acid-solubilized collagen, ASC)^[28]。由于酸制备法提取的过程并没有经历剧烈的变化, 外部环境一直相对温和, 因此得到的酸溶性胶原在最大程度上保留了天然三螺旋结构。张凤春等^[29]采用酸制备法从林蛙皮中制备胶原, 结合Design Expert软件分析预测和实际提取优化, 确定了最佳工艺: 时间300 min, 盐酸浓度0.16 mol/L, 料液比1:18, 并发现林蛙皮的胶原稳定性更好, 其变性温度要高于猪皮胶原和牛皮胶原Lodhi^[30]等从鹿的皮肤中制备酸溶性胶原和胃蛋白酶溶性胶原, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、氨基酸组成分析、肽水解模式、热变性温度、差示扫描量热法、傅立叶变换红外光谱和核磁共振成像对两种胶原进行表征, 胃蛋白酶溶性胶原(9.62%)的产率略高于酸溶性胶原(2.24%) (胶原干基/鹿皮干基), 但二者在结构、热稳定性等理化指标方面都极其相似。Veeruraj等^[31]用酸制备法从鲑鱼皮中制备胶原, 得率为56.80% (胶原干基/鲑鱼皮干基), 通过紫外表征和红外表征, 验证了所提取的酸溶性胶原完整保留了胶原的天然结构, 并用SDS-PAGE电泳验证了所提取的胶原为标准I型胶原。

3.2 酶解制备法

酶解制备法利用蛋白酶对胶原进行限制性酶解。胶原分子末端的赖氨酸或羟赖氨酸相互作用形成胶原肽链间的共价交联键, 当蛋白酶将胶原端肽切断后, 胶原主体仍相互连接, 此时胶原可溶解于低浓度有机酸或者中性溶液中^[32]。由于蛋白酶具有专一性和高效性, 使得酶制备法成为目前使用最为广泛的胶原制备方法。为了提高胶原的得率, 一般先利用酸制备法制备可溶性胶原, 而后再用酶制备法进一步制备非可溶性胶原。通常使用的酶包括胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶等^[33], 其中胃蛋白酶最为常用。胃蛋白酶具有水解速度快, 且制备的胶原纯度高、更易溶解和理化性质稳定等特点, 但制备过程需在低温环境中, 在一定程度上降低了酶的活力。胃蛋白酶只对非螺旋区催化水解, 对螺旋区并不会产生任何作用, 因而得到的胶原将会保持完整的三螺旋结构^[34],

但是抗原性会有所降低,因此其更多用作医用生物材料及原料。刘迪等^[35]采用正交试验法优化酶制备法提取猪跟腱胶原工艺,发现在最佳工艺条件下,每百克脱脂猪跟腱可获得 45.8 g 胶原,为猪跟腱胶原进一步的应用提供基础与理论依据。Tan 等^[36]采用酸提取法、匀浆辅助法和胃蛋白酶辅助提取法三种方法制备鲰鱼鱼皮中的胶原,其中胃蛋白酶辅助提取法获得的蛋白质回收率 64.19% (蛋白质干基重量/鲰鱼鱼皮干基重量)最高,且胃蛋白酶辅助提取法在时间和溶剂的用量更少,对食品工业经济的发展更为实用。Mohammadi 等^[37]采用响应面法研究提取工艺参数对蛋壳膜胃蛋白酶溶性胶原的影响,在最优提取工艺条件下,胶原的提取率为 30.049% (胶原干基重量/蛋壳膜干基重量)。

3.3 碱制备法

碱制备法是利用氢氧化钙、氢氧化钠等碱性试剂在特定的外界环境条件下制备胶原。刘小岭等^[38]采用氢氧化钠溶液从榆耳中提取胶原,并测定其乳化能力指数、乳化稳定指数、吸水性、保水性、吸油性等食品功能特性。当胶原处于碱性环境下时,易造成胶原的肽键和氢键水解,羧基以及巯基的氨基酸成分被破坏,致使三股螺旋结构遭到破坏^[39],因此得到的碱性水解产物分子量低,而且这个过程会产生 DL-型氨基酸消旋混合物,即旋光性化合物^[26]。这是因为不对称碳原子经过对称状态中间阶段就会产生消旋现象,并转变为 L-型和 D-型等摩尔混合物。众所周知,部分 D-型氨基酸具有毒性,并可能有致畸和致突变等负面作用。而且若 L-型氨基酸含量低于 D-型氨基酸, D-型氨基酸则会抑制 L-型氨基酸的吸收^[40]。因此碱法制备胶原副产物较多,胶原的纯度较低。温慧芳等^[41]研究了料液比、温度和时间对鲰鱼皮制备胶原效果的影响,并与正交设计相结合,优化了碱法制备胶原的最佳工艺,最终胶原的提取率为 79.67% (胶原干基含量/鱼皮中干基胶原含量);并利用 HPLC 证实了该法制备的是胶原多肽。目前有关单独采用碱法制备胶原的报道较少,通常只是用碱法对鱼皮进行前期处理以除去杂蛋白。

3.4 热水制备法

胶原不溶于冷水,但加热会增加其溶解性。

热水制备法是鱼皮经过前期处理去除脂肪和杂蛋白后,在特定的环境下用热水抽提得到水溶性胶原的方法。热水法具有操作快速、简单和乳化稳定性好等特点^[42]。赵睿等^[43]用热水法从鲰鱼皮中制备胶原,由响应面法得到最优制备工艺:温度 42℃、时间 25.72 h、pH 值 5,最终提取率高达 83.75% (胶原质量分数/鱼皮中蛋白质总质量分数)。为了弥补制备方法的不足,热水抽提法一般会与其他方法相互结合使用。如与酸制备法相结合,通过酸的处理,原料中的胶原纤维会溶胀,此时再加热抽提,胶原得率将会大幅度提高,克服了酸制备法提取时间长和得率不高的问题^[44]。但热水法可能会破坏胶原分子的部分酰胺键,并将胶原分子间和分子内的氢键以及部分共价键断开,使得胶原转化为无规则卷曲状态,不再具有三螺旋空间结构,致使产物中部分胶原变成胶原多肽或明胶。所得产物的分子量分布范围在 10~1 000 000 Da,具有较高的溶解性,但不再具备胶原的功能,因此不能应用于生物医学材料。黄雯^[45]利用 Box-Behnken 模型对热水法抽提斑点叉尾鮰鱼鱼皮胶原的制备工艺进行了优化,最佳工艺为温度 100℃、pH 6、料水比 1:10,胶原得率提高到 17.59% (胶原干基/鱼皮干基),最后证实所提取的胶原实际已变性为明胶了。实际中,若需要对胶原进行酶解得到小分子量胶原多肽混合物,可优先用热水法制备,再用蛋白酶进行酶解,可最大程度提高效率。

3.5 中性盐制备法

中性盐制备法是通过在溶液中加入一定的盐,使得环境条件达到足够的中性盐浓度,原料中的盐溶性胶原便可溶解。所使用的盐主要有氯化钠、氯化钾、乙酸钠、Tris-HCl、柠檬酸盐、盐酸-三羟甲基胺基甲烷等^[46]。其中某些盐对胶原的稳定性有促进作用,而有些盐则会使胶原的稳定性下降,这将不利于天然胶原的制备。Elstow 等^[47]用中性盐溶液从胎牛皮肤中制备得到胶原,并证实其为 V 型胶原。最常用中性盐为氯化钠,一般浓度为 0.15~1.00 mol/L。若盐浓度太低,胶原的溶解性较差。但过高的盐浓度,不利于胶原分子保持完整的空间结构以及其构象的稳定性,而且在后期除盐过程中将损失大量的胶原^[48]。胶原的交联度越低,用中性盐溶

液制备得到的胶原量越多。因此一般用中性盐制备动物组织中新生成的胶原,而不会用该方法对成年动物高交联度的组织进行提取^[49]。Gross^[50]研究发现在生长、哺乳期豚鼠皮肤中,中性盐可提取的胶原总量约占真皮胶原的10%。由于胶原也属于蛋白质,在制备过程易造成其变性,因此通常在低温环境中制备胶原,对于不同类型的胶原,可通过不同盐浓度将其分离制备^[51]。曹慧等^[52]采用响应面分析法对酶解液中Ⅱ型胶原的盐析条件进行优化,最终确定最优工艺:温度22.3℃、时间31.08 h, NaCl 浓度3.5 mol/L,最后Ⅱ型胶原回收率为90.88% (盐析后Ⅱ型胶原干基质量/盐析前Ⅱ型胶原干基质量)。

3.6 微波制备法

微波具有一定的破壁功效,加之较强的局部热处理将胶原的三维螺旋结构松散化,从而使胶原更易溶解出来。结构松散化也为酶解反应提供了更多的酶解位点,使酶解效率提高。冯远^[53]采用微波辅助酶解法制备鱼鳞中的胶原,发现微波预处理40 s效果最好,胶原提取率比未经微波处理的酶解组提高了15.6%。短时间低温微波处理可减少溶剂的使用量,提高分离效率,而长时间微波处理会导致部分有效蛋白质损失。闵瑞^[54]发现微波辅助酶解对于提高胶原的水解效率具有十分显著的作用,与常规单独酶解方法相比,微波辅助酶解反应时间缩短了约50%,但微波辅助酶解使胶原肽相对分子质量小于1 kDa的比例增加了。当从动物皮中制备胶原时,即使是在低温环境下制备,在微波处理结束后动物皮表面也会出现失水收缩现象,这是由于水分的散失致使胶原分子肽链间氢键断裂。此时胶原就变性成可溶性胶原多肽。因此再用其他方法制备胶原,必将造成大量胶原的损失,而胶原得率也将大大降低。故到目前为止,很少有人利用微波来制备胶原。

3.7 超声制备法

超声的空化效应和微射流效应对于原料和溶液之间的充分接触有促进作用,同时超声波在溶液中产生的自由基对于胶原纤维结构具有严重的破坏作用,使胶原三维螺旋结构不再紧凑,成为松散的状态,有利于胶原的溶解^[55]。短暂的低温超声不影响胶原的热稳定性和物理化学性

质,但超声时间过长将会严重影响胶原的生物活性^[56]。邹焯等^[57]发明公开了一种超声波酶法从中华鳖裙边中制备胶原的方法,通过超声波促进Ⅰ型胶原的提取,大大缩短了提取时间,降低了能量消耗。张晓洁等^[58]采用超声辅助从兔皮肤中制备胃蛋白酶溶性胶原,结果表明,超声辅助提取的胶原得率为 $(83.69 \pm 0.51)\%$ (胶原干基/兔皮干基),比对照组提高了25%;傅立叶变换红外光谱显示部分氢键被破坏,但胶原的三螺旋结构在超声后仍然保持完整。

4 胶原制备研究方向发展趋势

胶原的制备通常是从一些廉价的动物皮肤中提取,例如猪皮、牛皮等。由于陆生动物皮更易获得,价格也更加廉价,所以目前陆生哺乳动物仍是制备胶原最为主要的来源。但由于陆生动物来源胶原的安全性问题以及为了拓宽胶原来源渠道等原因,全球都将目标瞄准了两栖水生动物胶原和水产动物胶原^[59]。

海洋生物胶原是一个重要的胶原替代来源^[60-61]。海洋生物来源广、价格低,没有宗教信仰的限制,传染性疾病风险低,具有许多陆生哺乳动物不具备的优点^[62]。众所周知,胶原主要来自动物皮肤,而在某些鱼类中,鱼皮甚至能占到鱼类总体重的20%^[63]。鱼皮蛋白在鱼类机体中含量最为丰富,其中80%以上的蛋白为胶原,主要以纤维状胶原为主,含有少量的球蛋白、弹性蛋白等^[64]。这些蛋白具有高度分散性、吸水性、凝胶性等特点^[65]。世界上每年无法加工成食品鱼类废弃物达到万吨,所以世界各国对于利用鱼类废弃物进行生产胶原的研究早在20世纪中旬就已经开始了。我国近年来对鱼类胶原制备也进行了更加深入的研究。李杰等^[66]探究了鱼皮胶原纤维重组构建纳吸棉的工艺条件,通过单因素试验和正交试验优化得到的纤维重组率高达68.6%,在此基础上制备的纳吸棉具有细线状纤维构成的多孔网状结构,是一种性能优良的腔内止血材料。Chen等^[67]采用超滤分离从红鼓鱼鳞片制备Ⅰ型胃蛋白酶溶性胶原的方法较传统透析盐析法的效果更为灵活、高效,满足了食品和保健品行业大规模生产的需要。综合利用水产品加工废弃物,制备海洋源胶原,不

仅可克服陆生动物胶原的缺陷,而且能够充分利用资源,这对我国实现水产动物资源的高值化利用,促进渔业长足发展具有重大的战略意义。

参考文献:

- [1] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [2] 蒋升, 蔚一博, 徐晓刚. 海洋胶原蛋白的提取及在组织工程学中的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2017, (2): 180-184.
- [3] 怡静. 胶原纤维——新型天然纤维 [J]. 纺织装饰科技, 2012, (3): 12-13.
- [4] Wilson S L, Sulésuso J, Sockalingum G D, et al. The effect of collagen ageing on its structure and cellular behavior [J]. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, 2012, 8222: 822210.
- [5] Li D, Xu R, Huang F, et al. A novel missense mutation in collagenous domain of EDA gene in a Chinese family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia [J]. Journal of Genetics, 2015, 94 (1): 1-5.
- [6] Takuwa A, Yoshida T, Maruno T, et al. Ordered self-assembly of the collagenous domain of adiponectin with noncovalent interactions via glycosylated lysine residues [J]. Febs Letters, 2016, 590 (2): 195.
- [7] 刘丽莉, 尹光俊, 康怀彬, 等. 氨基酸及溶剂环境对牛骨胶原热稳定性的影响 [J]. 河南科技大学学报 (自然科学版), 2016, 37 (3): 73-77.
- [8] 迟妍妍, 乐尧金, 刘旭昭, 等. 胶原蛋白海绵的生物特性及体内降解吸收 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18 (34): 5515-5519.
- [9] Duconseille A, Astruc T, Quintana N, et al. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43 (43): 360-376.
- [10] 汲聪玲. 白鲢鱼皮明胶理化特性研究及其性能改进 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016.
- [11] 薄士儒. 梅花鹿茸脂溶性成分、胶原蛋白及胶原多肽的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [12] 梁飞, 左红梅. 胶原蛋白肽的性质、应用及发展前景的研究综述 [J]. 明胶科学与技术, 2014, 34 (3): 109-115.
- [13] Täljedal I B. Publish and Perish: A note on a collapsing academic authorship [M]. Springer Netherlands: Transformations in Research, Higher Education and the Academic Market, 2013: 145-153.
- [14] Umashankara M, Sonar M V, Bansode N D, et al. Orchestration of structural, stereoelectronic and h-bonding effects in stabilizing triplexes from engineered chimeric collagen peptides (ProX-ProY-Gly)_n incorporating 4(R/S)-aminoproline [J]. Journal of Organic Chemistry, 2015, 80 (17): 8552-8560.
- [15] 柳林. 产胶原酶微生物的分离鉴定及其培养优化研究 [D]. 烟台: 鲁东大学, 2016.
- [16] Rudick J G. Nanomechanical function arising from the complex architecture of dendronized helical polymers [M]. Springer International Publishing: Hierarchical Macromolecular Structures: 60 Years after the Staudinger Nobel Prize II, 2013: 345-362.
- [17] Sontakke S B, Jung J, Zhe P, et al. Orally available collagen tripeptide: Enzymatic stability, intestinal permeability, and absorption of Gly-Pro-Hyp and Pro-Hyp [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2016, 64 (38): 7127.
- [18] Uchida A, Sasaki S, Shimatani A, et al. Method for producing collagen-like polypeptide: US, 8969522 [P]. 2015-03-03.
- [19] Sitthipong N, Soottawat B, Hideki K, et al. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipeterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis [J]. Food Chemistry, 2011, 125 (2): 500-507.
- [20] 宋瑞瑞, 包斌, 卜永士, 等. II型胶原蛋白的热稳定性、圆二色性和红外光谱研究 [J]. 中国海洋药物, 2013, 32 (1): 55-62.
- [21] Osidak M S, Osidak E O, Akhmanova M A, et al. Fibrillar, fibril-associated and basement membrane collagens of the arterial wall: architecture, elasticity and remodeling under stress [J]. Current Pharmaceutical Design, 2015, 21 (9): 1124.
- [22] Varma S, Orgel J P, Schieber J D. Nanomechanics of type I collagen [J]. Biophysical Journal, 2016, 111 (1): 50-56.
- [23] Cipriani C, Pascarella S, Errante F, et al. Serpin A1 and the modulation of type I collagen turnover: effect of the C-terminal peptide 409-418 (SA1-III) in human dermal fibroblasts [J]. Cell Biology International, 42 (10): 1340-1348.
- [24] Yang H, Shu Z. The extraction of collagen protein from pigskin [J]. Journal of Chemical and Pharma-

- ceutical Research, 2014, 6 (2): 683-687.
- [25] 胡杨, 朱士臣, 熊善柏, 等. 鱼类加工副产物中胶原提取技术与性质分析 [J]. 渔业现代化, 2016, 43 (4): 44-50.
- [26] 王译伟, 陈治梁. 胶原蛋白提取工艺和临床应用进展 [J]. 绿色科技, 2016, (2): 180-182.
- [27] 胡建平. 鱼鳞胶原蛋白的酸法提取及性质研究 [J]. 粮食科技与经济, 2012, (3): 141-148.
- [28] 蔡路昀, 马帅, 曹爱玲, 等. 不同部位鲮鱼皮酸性胶原蛋白的提取及其特性 [J]. 食品科学, 2017, 38 (11): 52-58.
- [29] 张凤春, 费英敏, 黄巧莉. 林蛙皮胶原蛋白酸法提取工艺及性质研究 [J]. 中国林副特产, 2017, (3): 1-4.
- [30] Lodhi G, Kim Y S, Kim E K, et al. Isolation and characterisation of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of Cervus korean TEMMINCK var. mantchuricus Swinhoe [J]. Animal Production Science, 2018, 58 (3): 585-594.
- [31] Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*) [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 708-716.
- [32] 俞芝萍, 陆利霞, 熊晓辉. 鱼皮胶原蛋白提取研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31 (12): 262-265.
- [33] 肖岚, 李诚, 付刚, 等. 5种蛋白酶对猪皮胶原蛋白水解效果的比较研究 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36 (17): 10-14.
- [34] Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, et al. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*) [J]. Food Chemistry, 2011, 129 (3): 1179-86.
- [35] 刘迪, 王利强, 任莹. 猪跟腱胶原蛋白酶法提取工艺的研究 [J]. 食品工业, 2017, 38 (10): 72-77.
- [36] Tan Y, Chang S. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin [J]. Food Chemistry, 2018, 242: 147-155.
- [37] Mohammadi R, Mohammadifar M A, Mortazavian A M, et al. Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM) [J]. Food Chemistry, 2016, 190: 186-193.
- [38] 刘小岭, 卞利权, 常桂英. 榆耳胶原蛋白分离纯化及食品功能特性研究 [J]. 吉林农业科技学报, 2013, 22 (2): 8-10.
- [39] 温慧芳, 陈丽丽, 白春清, 等. 基于不同提取方法的鲷鱼皮胶原蛋白理化性质的比较研究 [J]. 食品科学, 2016, 37 (1): 74-81.
- [40] 张志昆. 食品中手性D-氨基酸分析及其毒理性的研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2015.
- [41] 温慧芳, 赵利, 陈丽丽, 等. 碱法提取(鲷)鱼皮胶原蛋白工艺优化的研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36 (19): 233-236.
- [42] 艾超, 黄灿灿, 李致瑜, 等. 鱼皮胶原蛋白提取工艺的研究进展 [J]. 农产品加工(学刊), 2012 (5): 93-94.
- [43] 赵睿, 王晓丹, 祖国仁, 等. 热水法抽提鳕鱼皮胶原蛋白条件的响应面分析 [J]. 大连工业大学学报, 2011, 30 (2): 98-100.
- [44] 朱伟, 张歆, 黄山凌子. 鱼鳞胶原蛋白提取及抗氧化活性初探 [J]. 食品科技, 2012, 37 (10): 204-206.
- [45] 黄雯. 鲷鱼鱼皮和鲑鱼鱼皮胶原蛋白的提取与性质研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- [46] Cherim M, Sirbu R, Erimia C L, et al. Obtaining of collagen biomaterials and their use in the medical field [J]. Ejis European Journal of Interdisciplinary Studies Articles, 2016, 4 (2): 31-38.
- [47] Elstow S F, Weiss J B. Extraction, isolation and characterization of neutral salt soluble type V collagen from fetal calf skin [J]. Collagen & Related Research, 1983, 3 (3): 181-193.
- [48] 刁雪洋. 猪皮胶原蛋白提取及理化特性的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [49] 李宇龙. 盐对胶原溶液粘度行为的影响 [D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2013.
- [50] Gross J. Studies on the formation of collagen II. The influence of growth rate on neutral salt extracts of guinea pig dermis [J]. Journal of Experimental Medicine, 1958, 107 (2): 265-277.
- [51] Jamilah B, Umi Hartina M R, Hashim D M, et al. Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin [J]. International Food Research Journal, 2013, 20 (2): 835-842.
- [52] 曹慧, 许时婴. NaCl盐析提取酶解液中II型胶原的工艺 [J]. 生物加工过程, 2010, 8 (4): 22-26.
- [53] 冯远. 微波辅助酶解法提取草鱼鱼鳞胶原蛋白工

- 艺研究 [J]. 饲料广角, 2016, (10): 37-41.
- [54] 闵瑞. 微波辅助酶解提取硫酸软骨素下脚料中胶原蛋白肽的工艺研究 [J]. 粮食与食品工业, 2016, 23 (3): 51-54.
- [55] Kim H K, Kim Y H, Park H J, et al. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus* [J]. Fisheries Science, 2013, 79 (5): 849-856.
- [56] 梁健华. 超声波辅助提取罗非鱼皮胶原蛋白及其功能结构性质的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [57] 邹焯, 王道营, 唐先锋, 等. 超声酶提制备胶原蛋白的方法: CN, 106674345A [P]. 2017-05-17.
- [58] 张晓洁, 张宇昊, 马良, 等. 超声辅助提取兔皮胶原蛋白及其理化特性 [J]. 食品与机械, 2017, 33 (1): 167-171.
- [59] Song W. Extraction optimization and characterization of collagen from the lung of soft-shelled turtle *Pelodiscus Sinensis* [J]. International Journal of Nutrition and Food Sciences, 2014, 3 (4): 270-278.
- [60] Subhan F, Ikram M, Shehzad A, et al. Marine collagen: an emerging player in biomedical applications [J]. Journal of Food Science & Technology, 2015, 52 (8): 1-5.
- [61] Ferrario C, Leggio L, Leone R, et al. Marine-derived collagen biomaterials from echinoderm connective tissues [J]. Marine Environmental Research, 2016, 128: 46-57.
- [62] 李杰, 闫鸣艳, 刘均洪, 等. 鱼胶原蛋白的研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6 (10): 3941-3946.
- [63] Sanchez A, Blanco M, Correa B, et al. Effect of fish collagen hydrolysates on type I collagen mRNA levels of human dermal fibroblast culture [J]. Marine Drugs, 2018, 16 (5): 144-154.
- [64] 卢玉坤. 鳕鱼皮胶原蛋白肽的促钙吸收作用研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [65] Arfat Y A, Benjakul S, Prodpran T, et al. Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41 (20): 265-273.
- [66] 李杰, 刘东艳, 秦松. 鱼皮胶原纤维重组构建纳吸棉的工艺特征 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21 (10): 1532-1538.
- [67] Chen S, Chen H, Xie Q, et al. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*) [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52: 468-477.

Research progress in collagen characteristics and its preparation methods

LIN Shurong¹ , CHEN Bei² , WANG Qin¹ , WU Jingna² ,
SU Yongchang² , XU Min² , CHEN Qingxi^{1*} , LIU Zhiyu^{2*}

(1. School of Life Sciences , Xiamen University , Xiamen 361102 , China;

2. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources ,
Key Laboratory of Cultivation and High - value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province ,
Fisheries Research Institute of Fujian , Xiamen 361013 , China)

Abstract: In this paper , the concepts and differences of collagen , gelatin and collagen polypeptide were expounded. The structure of collagen and the differences between collagen type I and collagen type II were introduced , too. Seven preparation methods of collagen were summarized , while the advantages and disadvantages of each preparation method were analyzed to provide reference for the preparation of collagen from aquatic animal resources.

Key words: collagen; preparation method; gelatin; collagen polypeptide