

温度对刺参胶原蛋白结构和分子量变化的影响

王哲平 刘 淇* 曹 荣 殷邦忠

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 国家海参加工技术研发分中心, 青岛 266071)

摘 要 采用胃蛋白酶在酸性条件下酶解提取刺参体壁胶原蛋白并对其分离纯化, 然后将胶原蛋白分别在不同温度下进行热处理, 经 SDS-PAGE 电泳和傅立叶变换红外扫描等方法分析热处理前后胶原蛋白的生化特征。结果显示, 提取的胶原蛋白具有较高的纯度, 且存在完整的三股螺旋结构; 胶原蛋白在 40 °C 热处理条件下不仅二级结构被破坏, 一级结构也被部分破坏, α 链和 β 链条带消失, 分子量降低($<100\text{kDa}$); 70 °C 达到了各种肽链叠加所表现出的热收缩温度, 肽链发生聚集、收缩, 分子量开始升高; 80 °C 加热条件下, 肽链进一步收缩, 分子量达到 120kDa 左右, 而且仍保持一定量的二级结构; 当温度超过 100 °C 时, 胶原蛋白一级结构被严重破坏。

关键词 刺参 胶原蛋白 温度 分子量 结构

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2011)06-0080-05

Effect of temperature on the changes of structure and molecular weight of *Apostichopus japonicus* collagen

WANG Zhe-ping LIU Qi* CAO Rong YIN Bang-zhong

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, National R&D Branch Center for Sea Cucumber Processing, Qingdao 266071)

ABSTRACT The collagen from sea cucumber *Apostichopus japonicus* body wall was extracted by pepsin digestion under acidic condition. After separation and purification, the collagen was heated at varied temperatures, and then the biochemical characteristics were determined by the methods of SDS-PAGE and FT-IR scanning. The result indicated that the extracted collagen was of high purity and with integrated triple-helix structure; After being heated at 40 °C, the secondary structure of the collagen was destroyed, while some primary structure was partially destroyed, with disappearance of α chain and β chain, and the molecular weight of peptide chains reduced($<100\text{kDa}$); At 70 °C, the peptide chains began to aggregate and shrink, and the molecular weight increased; Up to 80 °C, the peptide chains further contracted with 120kDa MW but still maintained some secondary structure; When heated at above 100 °C, the primary structure of the collagen was destroyed seriously.

中央级公益性科研院所专项资金项目资助

* 通讯作者。E-mail: liuqi@ysfri. ac. cn

收稿日期: 2011-03-09; 接受日期: 2011-03-31

作者简介: 王哲平(1983-), 女, 硕士, 主要从事水产品加工与保藏研究。E-mail: wangzheping1@126. com, Tel: (0532) 85830760

KEY WORDS *Apostichopus japonicus* Collagen Temperature Molecular weight Structure

刺参 *Apostichopus japonicus* 隶属于棘皮动物门 Echinodermata、海参纲 Holothurioider、木盾手目 Aspidochirota。研究发现,刺参体壁真皮结缔组织、体腔、内线管及内脏均含有生物活性物质,并具有药理活性,包括抗凝血、抗血栓、降血脂、降低血粘度、抗肿瘤和免疫调节等作用(Chen *et al.* 2011;胡晓倩等 2009;Kumar *et al.* 2007;李冰等 2010),深受人们的喜爱。

刺参体壁是刺参主要的食用或药用部位,主要构成为上皮组织和真皮结缔组织,刺参真皮结缔组织的细胞间充填着胶原等纤维成分和蛋白聚糖(肖枫等 2005;张春云等 2004),胶原蛋白是由细胞合成的一种生物高分子,是胶原纤维的基本单位,对刺参体壁起着很重要的支撑作用(肖和兰等 2003)。同时研究发现,刺参的很多加工特性都与体壁胶原蛋白密不可分(姜丹等 2009),其胶原蛋白的变化又与货架寿命密切相关。如即食海参在加工过程中高温处理后容易造成胶原蛋白变性、组织软化和肌肉纤维小片化(汤志旭等 2007),而这是缩短货架期的主要原因。刺参胶原蛋白受热后其结构性质会发生很大的变化,而目前国内外还没有这方面的研究报道,因此本研究首先从鲜活刺参体壁中提取未变性胶原蛋白,然后在不同温度热处理后,通过傅立叶变换红外扫描和 SDS-PAGE 电泳等方法分析胶原蛋白的结构和分子量分布,为刺参加工和储藏提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

刺参于 2010 年 10 月 14 日购自青岛市南山水产品市场;胃蛋白酶(1:10 000 比活力),Solarbio;十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺(Acr)、N,N'-甲叉双丙稀酰胺(Bis)、溴酚蓝、考马斯亮蓝 R-250、阿利新蓝染料、过硫酸铵、TEMED 等为 Sigma 进口分装。其他试剂为国产分析纯。

傅立叶红外光谱仪(Nicolet Nexus 470),NICOLET;冷冻干燥机,SCANVAC;高压蒸汽灭菌器,SANYO;高速冷冻离心机(5804R),EPPENDORF;紫外/可见分光光度计(2802),尤尼柯(上海)仪器有限公司;数显恒温水浴锅,上海精宏试验设备有限公司;层析柜,北京博医康实验仪器有限公司;凝胶成像分析仪,TANON;垂直板电泳仪(DYY-11),北京市六一仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 刺参体壁胶原蛋白的提取

参考 Cui 等(2007)的提取方法并稍加改进。把鲜活刺参除去内脏,用剪刀剔除内壁肌肉层,剩余刺参体壁用刀切成碎块(湿重约 50 g),于 500 ml 蒸馏水中搅拌 30 min,用纱布滤出,加入 500 ml 蒸馏水重洗 1 次,然后将刺参碎块放于 500 ml 的 4 mmol/L EDTA,0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液中,搅拌过夜。用纱布过滤后,再用蒸馏水洗两次,置于 500 ml 蒸馏水中搅拌过夜,溶液中即充满絮状胶原纤维。用纱布滤出未解离的刺参块,将溶液以 10 000 g 转速离心 30 min。所得胶原纤维沉淀加入 25 倍体积的 0.1 mol/L NaOH,搅拌 2 d。10 000 g 离心 30 min,沉淀水洗至中性,加入 25 倍体积的 0.5 mol/L 乙酸,加入 0.5% 的胃蛋白酶,搅拌、消化 2 d。11 000g 离心 30 min,上清液缓慢加入研磨精细的 NaCl(终浓度为 0.9 mol/L),搅拌过夜。10 000 g 离心 30 min,去上清液,沉淀加入少许 0.5 mol/L 乙酸溶解,转入透析袋内对 0.1 mol/L 乙酸透析 2 d,再用蒸馏水透析 2 d,冷冻干燥后即得胃蛋白酶促溶的酸溶性胶原(Pepsin-soluble collagen,PSC)。以上所有操作均在 4 °C 下进行。

1.2.2 胶原蛋白的紫外光谱

将提取到的胶原蛋白样品溶解于 0.5 mol/L 醋酸溶液中,配成 2.5 mg/ml 的胶原溶液,在 190~400 nm 的近紫外光区进行扫描。

1.2.3 胶原蛋白 SDS-PAGE 电泳

采用 Laemmi 等(1970)电泳系统对胶原蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-

PAGE)。分离胶浓度 7.5% 和 12%，浓缩胶浓度 5%，电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 8.3, 含 0.1% SDS 和 0.192 mol/l Gly)，样品缓冲液为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.8, 含 1% SDS、1% β -ME、10% 甘油和 0.02% 的溴酚兰)，染色液 (考马斯亮蓝 R250 0.25g, 水 40 ml, 甲醇 50 ml, 冰醋酸 10 ml)，脱色液 (水 80 ml, 甲醇 20 ml, 冰醋酸 10 ml) 脱色并拍照。

取冷冻干燥样品溶解于蒸馏水/0.1 mol/L Na_3PO_4 (pH 7.2) 缓冲液中, 过夜, 离心, 取 5 μl 上清液, 加入 20 μl 样品缓冲液, 沸水浴煮沸 3~5 min, 采用直流恒压电源, 电压为 80 V, 电泳 5 h。用染色液染色 1 h 后脱色。

1.2.4 温度对胶原蛋白溶解度的影响

精密称取 10 份 0.010 g PSC, 各加入 4 ml 蒸馏水分别在 30、40、50、60、70、80、90、100、110、121 $^{\circ}\text{C}$ 下热处理 10 min, 室温冷却后离心, 上清液在 220 nm 处测吸光度值。

1.2.5 温度对胶原蛋白分子量分布的影响

将 1.2.4 中不同温度热处理的 PSC 溶液冻干后加入 1.5 ml 蒸馏水溶解 (30 $^{\circ}\text{C}$ 处理的样品采用 pH7.2 0.1 mol/L Na_3PO_4 缓冲液溶解), 按方法 1.2.3 进行分子量测定。

1.2.6 胶原蛋白的傅立叶变换红外扫描 (FT-IR)

称取冷冻干燥后的纯化样品约 1~2 mg, 与一定量干燥好的 KBr 混合置于玛瑙研钵中, 研磨均匀 (尽量成细粉末状) 后装样, 手动压片, 采用傅立叶变换红外扫描仪在 400~4 000/ cm 区间内进行吸收波谱扫描。

2 结果与分析

2.1 胶原蛋白的紫外光谱分析

刺参酸溶性胶原蛋白样品经紫外波谱扫描 (图 1), 在 220 nm 左右有强烈的吸收, 符合胶原蛋白通常的紫外吸收特性, 即存在胶原蛋白的特征吸收峰。

2.2 SDS-PAGE 凝胶电泳

刺参胶原蛋白的凝胶电泳结果如图 2 所示。从图 2 可以清晰的看到有两条染色较深的条带, 分别为 α 链和 β 链 (Cui *et al.* 2007), 不含其他杂带, 结合图 1 表明所提取的胶原蛋白纯度较高。

2.3 温度对胶原蛋白溶解度的影响

刺参胶原纤维具有广泛的交联作用, 因此刺参中的胶原是胶原分子高度交联的聚合物, 在没有对其肽键处理时只有很少的胶原能够溶解 (肖枫等 2005), 而这一部分主要是未共价交联和体内未成熟的胶原。从图 3 可以看出, 30 $^{\circ}\text{C}$ 加热条件下有少量胶原溶解, 这主要是未共价交联和体内未成熟的胶原, 胶原纤维并未解聚; 当温度升高到 40 $^{\circ}\text{C}$ 以上时吸光度值达到最高且保持不变, 这说明胶原纤维在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下解聚后全部溶解。

2.4 温度对胶原蛋白分子量分布的影响

刺参胶原蛋白在不同加热温度条件下加热 10 min 的分子量分布如图 4 所示。由图 4 可以看出, 不同加热温度条件下刺参胶原蛋白的分子量分布有显著不同。

30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热的样品, 其分子量分布与 4 $^{\circ}\text{C}$ 的样

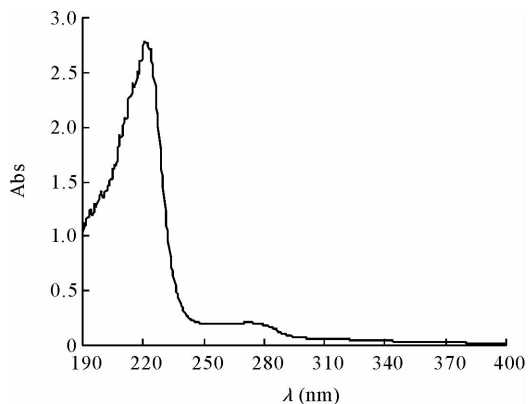


图 1 刺参酸溶性胶原蛋白紫外吸收
Fig. 1 The ultraviolet absorption spectrum of PSC from Sea cucumber *A. japonicus*

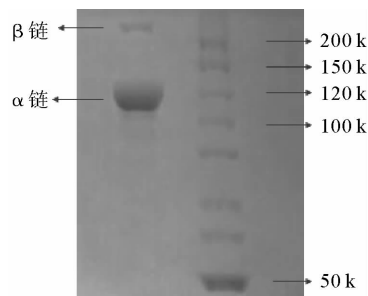


图 2 刺参胶原蛋白的电泳
Fig. 2 SDS-PAGE patterns of PSC and protein markers

品相同,能清晰测到 β 链和 α 链,且无低分子量条带,结合图 3 说明,30 °C 条件下胶原蛋白未变性;当温度升高到 40 °C 时, β 链和 α 链的条带消失,分子量降低,从 25~100 kDa 之间均有分布,且主要集中在 40~100kDa 之间,这说明在 40 °C 条件下,刺参胶原蛋白不仅三级螺旋结构打开,二级结构被破坏,一级结构也已经发生了变化, α 链和 β 链发生降解,形成不同分子量的多肽链;50 °C 和 60 °C 加热条件下的分子量分布与 40 °C 的相同;当加热温度达到 70 °C 时,仅存在 3 条清楚的条带,40kDa 的条带消失,分子量为 100kDa 的条带加粗,同时在 50k 左右出现了两条带。说明 70 °C 达到了各种肽链叠加所表现出的热收缩温度,各种肽链发生聚集和收缩,且这种作用力不会被 SDS 破坏;在 80 °C 和 90 °C 加热条件下胶原蛋白的分子量又开始增加,主要集中在 90、120kDa 左右,90kDa 以下几乎不存在条带,说明随着加热温度的升高,肽链进一步聚集、收缩;而在 100 °C 加热条件下,分子量在 90kDa 左右的条带开始模糊,且低分子量条带的颜色加深,说明当温度达到 100 °C 时,肽链开始解聚;当温度升高到 110 °C 时,120kDa 左右的条带完全消失,分子量低于 90kDa 且条带模糊不清,当温度达到 121 °C 时,几乎看不清任何条带,分子量在 20kDa 以内,说明当温度超过 100 °C 时,胶原蛋白的一级结构被严重破坏。

2.5 胶原蛋白的傅立叶变换红外扫描

图 5 为刺参酸溶性胶原蛋白的红外图谱,这与其他胶原蛋白的图谱类似(Liu *et al.* 2007; 陆剑锋等 2010),据已报道的资料(Muyonga *et al.* 2004; Yan *et al.* 2008)可以推知,N—H 伸缩振动产生的酰胺 A 的吸收通常在 3 400~3 440/cm,当含有 N—H 基团的分子肽段参与氢键的形成时,N—H 的伸缩振动会向低频率移动,通常在 3 300/cm 左右,由图 5 可以看到刺参酸溶性胶原蛋白酰胺 A 的吸收在 3 309/cm,表明分子中存在氢键;2 927/cm 附近是酰胺 B 带的 C—H 伸缩振动引起的特征吸收频率;酰胺 I 带吸收波数在 1 652/cm 处,它是由蛋白质多肽骨架中的 C=O 伸缩振动产生,其吸收峰最强,为蛋白质二级结构变化的敏感区;1 541/cm 是酰胺 II 带的特征吸收频率,它是由 C—N 伸缩振动与 N—H 弯曲振动引起的,为 α 螺旋、 β -折叠、转角和无规卷曲叠加产生的吸收带;酰胺 III 带出现在 1 237/cm,它是由 N—H 弯曲振动引起的特征吸收峰。因此 FTIR 图谱证明了提取的刺参胶原蛋白存在完整的三螺旋结构。

图 6 为刺参胶原蛋白在 40、80 °C 加热后的红外图谱。结合图 5 可以看出:刺参胶原蛋白在 40 °C 加热条件下酰胺 A 和酰胺 B 的吸收峰消失,酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带的吸收峰大幅减弱,表明维持胶原蛋白三级螺旋结构的氢键减弱,二级结构被破坏;当温度升高到 80 °C,酰胺 III 带 N-H 弯曲振动的特征吸收峰完全消失,其他吸收曲线与 40 °C 加热条件下的基本相似,酰胺 I 带和酰胺 II 带仍存在吸收峰,表明在 80 °C 条件下,胶原蛋白的二级结构虽然被进一步破坏,但仍保持一定量的二级结构。

3 结论

本实验提取的刺参体壁胶原蛋白具有较高的纯度,且存在完整的三股螺旋结构。SDS-PAGE 电泳和傅立叶红外光谱提供了由温度变化引起的胶原蛋白分子量和结构变化的微观信息。在对胶原蛋白从 30~121 °C 升

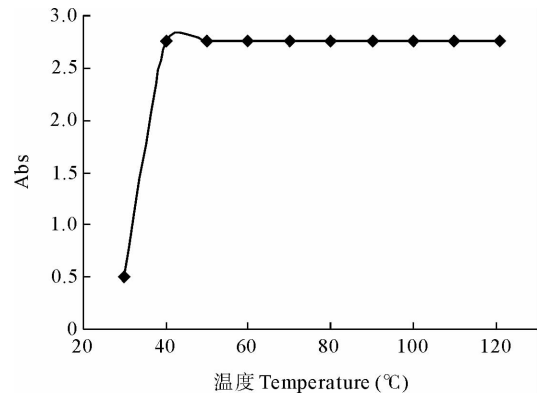
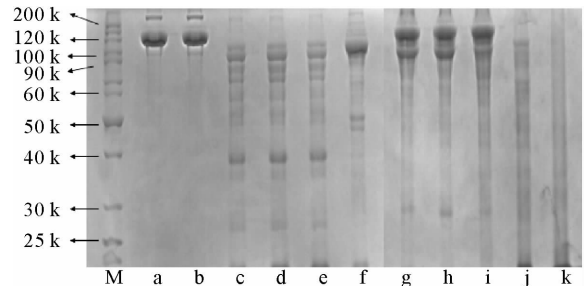


图 3 温度对胶原蛋白溶解度的影响

Fig. 3 Effect of temperature on solubility of PSC



M. Marker; a. 4 °C; b. 30 °C; c. 40 °C; d. 50 °C; e. 60 °C; f. 70 °C; g. 80 °C; h. 90 °C; i. 100 °C; j. 110 °C; k. 121 °C

图 4 30~121 °C 加热条件下的刺参胶原蛋白分子量分布
Fig. 4 The PSC molecular weight distribution after heating at 30~121 °C

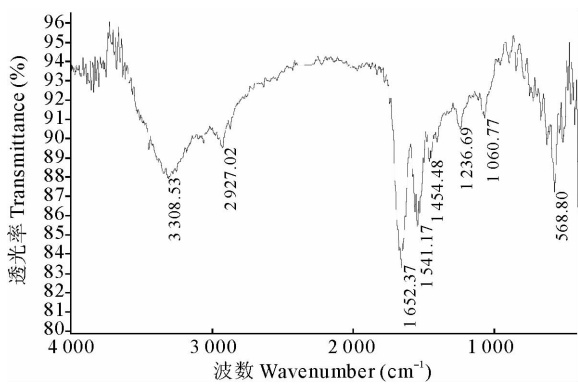


图5 刺参胶原蛋白的傅立叶红外转换

Fig. 5 FTIR spectrum of PSC

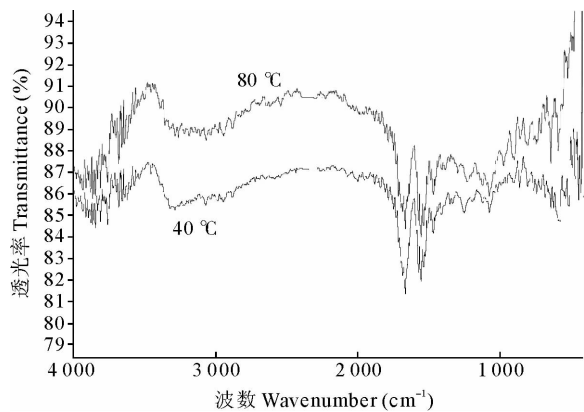


图6 40 °C和80 °C加热温度下刺参胶原蛋白的傅立叶红外转换

Fig. 6 FTIR spectra of PSC at 40 °C and 80 °C

温过程中发现胶原蛋白的二级结构和一级结构逐渐被破坏,肽链先降解后聚合再降解,尤其当温度超过100 °C时胶原蛋白的一级结构被严重破坏,对刺参的加工和保藏性能产生了显著影响。

参 考 文 献

- 李冰,王静凤,傅佳,李晓林,李辉,赵芹,薛长湖. 2010. 刺参对运动小鼠抗疲劳作用的研究. 食品科学, 31(15): 244~247
- 汤志旭,薛冬梅,徐凤香,贺庆梅,张亚琦. 2007. 即食海参质构及流变学特征的研究. 食品工业科技, 28(10): 57~60
- 肖和兰,孙素琴,周群,庞小峰,蔡国平. 2003. 温度对胶原蛋白结构影响的二维红外相关光谱的研究. 原子与分子物理学报, 20(2): 211~218
- 肖枫,曾名勇,董士远,刘尊英. 2005. 海参胶原蛋白的研究进展. 水产科学, 24(6): 39~41
- 张春云,王印庚,荣小军,孙慧玲,董树刚. 2004. 国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题. 海洋水产研究, 25(3): 89~97
- 陆剑锋,万全,殷章敏,林琳,翁世兵,叶应旺,姜绍通. 2010. 中华鳖裙边胶原蛋白的提取及其特征. 水产学报, 34(6): 981~987
- 姜丹,董秀萍,朱蓓薇,赵兴坤,肖桂华,陈雪娇. 2009. 海参体壁明胶的提取及性质研究. 食品与发酵工业, 35(3): 183~186
- 胡晓倩,王玉明,任兵兴,常耀光,王静凤,薛长湖. 2009. 海参主要活性成分对大鼠脂质代谢影响的比较研究. 食品科学, 30(23): 393~396
- Chen, S. G., Xue, C. H., Yin, L. A., Tang, Q. J., Yu, G. L., and Chai, W. G. 2011. Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. J. Carbohydr. Polym. 83: 688~696
- Cui, F. X., Xue, C. H., Li, Z. J., Zhang, Y. Q., Dong, P., Fu, X. Y., and Gao, X. 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. J. Food Chem. 100: 1120~1125
- Kumar, R., Chaturvedi, A. K., Shukla, P. K., and Lakshmi, V. 2007. Antifungal activity in triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinopyga lecanora*. J. Carbohydr. Polym. 17(15): 4387~4391
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. J. Nature, 227: 680~685
- Liu, H. Y., Li, D., and Guo, S. D. 2007. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Food Chem. 101:621~625
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., and Duodu, K. G. 2004. Fourier transform infrared(FTIR)spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch(*Lates niloticus*). J. Food Chem. 86:325~332
- Yan, M. Y., Li, B. F., Zhao, X., Ren, G. Y., Zhuang, Y. L., Hou, H., Zhang, X. K., Chen, L., and Fan, Y. 2008. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock(*Theragra chalcogramma*). J. Food Chem. 107:1581~1586