

单环刺螠体壁胶原蛋白的提取及其理化性质

刘志娟, 张朝辉*, 赵雪, 李八方
(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用 0.5 mol/L 醋酸提取, 结合 NaCl 沉淀法从单环刺螠(*Urechis unicinctus*)的体壁中提取酸溶性胶原蛋白(ASC), 并对其理化性质作初步研究。紫外光谱分析表明 ASC 的特征吸收波长位于 228 nm, 初步推断所提取的蛋白为典型的胶原蛋白; 氨基酸组成分析表明 ASC 为典型的 I 型胶原蛋白; 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果表明 ASC 有两条不同的 α 链(α_1 和 α_2 链)、 β 链和 γ 链, 其胶原蛋白中含有二硫键; 傅里叶红外光谱(FTIR)分析表明其存在三螺旋结构; 示差扫描量热仪(DSC)分析表明热变性温度(t_d)和热收缩温度(t_s)分别为 33.6 °C 和 67.5 °C。

关键词: 单环刺螠; 胶原蛋白; 提取; 理化性质

Extraction and Physical and Chemical Properties of Collagen from *Urechis unicinctus*

LIU Zhi-juan, ZHANG Zhao-hui*, ZHAO Xue, LI Ba-fang
(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Acid-soluble collagen (ASC) was prepared from the body wall of *Urechis unicinctus* through extraction with 0.5 mol/L acetic acid followed by precipitation with 0.9 mol/L NaCl and its physical and chemical properties were primarily studied. Ultraviolet spectral analysis showed that the characteristic absorption wavelength of ASC was 228 nm, suggesting that it is a typical collagen. Amino acid composition analysis indicated that ASC was a typical type I collagen. SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) suggested that ASC contained two alpha chains (α_1 and α_2), one β chain and one γ chain. It also contained disulfide bonds. Fourier-transform infrared (FTIR) spectral analysis revealed the existence of helical arrangements in the collagen. The thermal denaturation temperature (t_d) and the thermal shrinkable temperature (t_s) were 33.6 and 67.5 °C, respectively.

Key words: *Urechis unicinctus*; collagen; extraction; characterization

中图分类号: TQ93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0037-04

单环刺螠(*Urechis unicinctus*)俗称“海肠”, 分类上隶属螠虫动物门(Echiurio idea)、螠纲(Echiurida)、无管螠目(Xenopneusta)、刺螠科(Urchidae), 是无管螠目在我国沿海分布的唯一种类。它个体肥大, 肉味鲜美。自古以来, 在我国、日本和朝鲜沿海均作为名贵的海鲜食品, 有较高的经济价值, 是一种极有养殖开发前景的海洋动物资源^[1]。胶原蛋白类型较多, Gelse 等^[2]于 2003 年报道, 发现 21 种不同类型的胶原。水产无脊椎动物的胶原主要可分为两种, 类 I 型及类 V 型^[3]。日本学者对采自日本单环刺螠体壁胶原蛋白进行了分析, 发现其属于 I 型胶原蛋白, 亚基组成可能是(α_1)₂: α_2 ^[4]。而我国海域中产的单环刺螠胶原蛋白的研究尚未见报道。本实验以中国产的单环刺螠为研究对象, 研究其

酸溶性胶原蛋白(acid-soluble collagen, ASC)的提取制备方法及其理化性质, 以期为进一步开发利用单环刺螠提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新鲜海肠购于青岛市南山水产品批发市场。

氢氧化钠 烟台三和化学试剂有限公司; 冰醋酸 天津博迪化工股份有限公司; 乙酸钠 温州市试剂化工厂; 三羟甲基氨基甲烷 南京探求生物技术有限公司; 十二烷基磺酸钠(SDS)、巯基乙醇、丙烯酰胺(Acr)、N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Bis)、溴酚蓝、考马斯亮蓝 R-250、过硫酸铵、TEMED 美国 Sigma 公司。

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 山东省科技攻关计划项目(2008GG10005008); 国家自然科学基金项目(31071631)

作者简介: 刘志娟(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物活性物质及其功能特性。

E-mail: liuzhijuan19860224@163.com

* 通信作者: 张朝辉(1968—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为海洋生物活性物质及其功能特性。

E-mail: zhangzh@ouc.edu.cn

1.2 仪器与设备

BR4i 冷冻离心机 法国 Jouan 公司; 乌氏黏度计 上海玻璃仪器厂; LGJ0-5 冷冻干燥机 北京四环科技仪器厂; UV-2550 紫外分光光度计 日本 Shimadzu 公司; DYY-6C 电泳仪 北京市六一仪器厂; 835-50 氨基酸自动分析仪 日本日立公司; Nicolet-200SXV 傅里叶红外光谱仪 美国 Nicolet 公司; DSC-200PC 示差扫描量热仪 德国 Bavaria 公司。

1.3 方法

1.3.1 单环刺螭体壁胶原蛋白的提取

参照文献[5]的方法, 在 4℃ 条件下进行, 取 100g 海肠体壁加入到 2L 0.1mol/L NaOH 溶液(1:20, *m/V*)中搅拌 2d 以除去非胶原成分, 用蒸馏水洗至样液呈弱碱性; 然后加入到 10% 正丁醇溶液(1:30, *m/V*)中搅拌, 用蒸馏水冲洗除尽正丁醇后; 加入 0.5mol/L 醋酸溶液(1:6, *m/V*)匀浆, 磁力搅拌 2d, 10000r/min 离心 30min, 上清液即为粗胶原蛋白。在上清液中加入 NaCl 至溶液终浓度为 0.9mol/L, 静置过夜。离心, 收集沉淀物, 溶于 0.5mol/L 醋酸溶液, 用 0.1mol/L 醋酸溶液透析 1d(体积比 1:15, 每 4h 换透析外液), 蒸馏水继续透析 2d(体积比 1:15, 每 4h 换透析外液), 真空冷冻干燥, 得酸性胶原蛋白冻干品。

1.3.2 紫外光谱分析

将提取得到的胶原蛋白冻干品溶于 0.5mol/L 醋酸溶液中, 配制成 1g/L 胶原溶液, 用紫外分光光度计在 200~400nm 近紫外光区进行扫描测试。

1.3.3 氨基酸分析

提取得到的胶原蛋白冻干品用 6mol/L 盐酸于 110℃ 水解 24h, 脱酸后, 用水定容至 5mL, 利用氨基酸自动分析仪测定。

1.3.4 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析

将一定量干燥的 KBr 和胶原蛋白冻干品置于玛瑙研钵中, 研磨均匀, 成粉末状, 装样, 手动压片, 取出样品小心放入样品室。采用傅里叶红外光谱仪对样品在 4000~400cm⁻¹ 扫描, 分辨率为 2cm⁻¹。

1.3.5 SDS-PAGE 分析

参照 Laemmli 等^[6]的方法。采用 7.5% 分离胶、5% 浓缩胶。胶原蛋白冻干品 2mg 溶于 0.5mol/L 醋酸溶液中, 调节 pH 值为中性, 加入 1mol/L 的 Tris-HCl 样品缓冲液(pH6.8, 含 10% SDS、β-巯基乙醇、50% 甘油和 1% 的溴酚蓝), 沸水浴 5min, 3000r/min 离心 2min 后取 20 μL 上样。采用直流恒压电源, 电压为 100V, 电泳 2~3h, 用染色液染色 20min 后脱色。

1.3.6 胶原蛋白热收缩温度 *t_s* 的测定

参照 Rochdi 等^[7]的方法。用示差扫描量热仪(DSC)对胶原蛋白 *t_s* 进行测试, 准确称取 3mg 左右的胶原蛋白冻干品于 DSC 坩埚中, 坩埚加盖密封后, 以空坩埚作为参比, 从 20℃ 加热至 150℃, 升温速率为 2℃/min。

1.3.7 胶原蛋白热变性温度(*t_d*)的测定

参照 Zhang Yan 等^[8]的方法。取一定量的胶原蛋白冻干品溶于 0.1mol/L 乙酸 + 0.2mol/L 乙酸钠缓冲液中, 配成质量浓度为 0.03g/100mL 的溶液, 用乌氏黏度计测定溶液在 15~50℃(间隔 5℃)区间内的增比黏度(η_{sp}), 各温度保持恒温 30min。以温度为横坐标, 相对黏度为(η_r)纵坐标作曲线。当相对黏度变化 50% 时所对应的温度即为 *t_d*。

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (1)$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (2)$$

式中: t_0 为待测溶液流出的平均时间 /s; t 为溶剂流出的平均时间 /s; η_r 为待测溶液的相对黏度; η_{sp} 为待测溶液的增比黏度。

2 结果与分析

2.1 胶原蛋白的紫外光谱分析

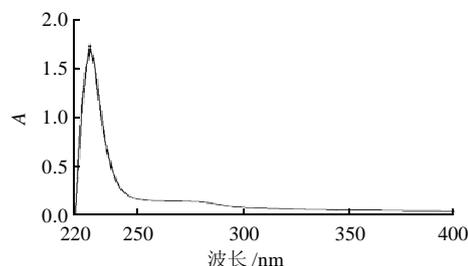


图1 单环刺螭体壁 ASC 的紫外吸收光谱
Fig.1 Ultraviolet spectra of acid-soluble collagen from body wall of Urechis unicinctus

溶液中的蛋白质分子能够吸收一定波长范围的紫外光, 产生紫外吸收光谱。蛋白质分子之所以能够吸收紫外光, 是由于其含有吸收紫外某一波长光的紫外生色基团。蛋白质的紫外吸收光谱, 实际上是各种紫外生色基团加和的结果。由图 1 可知。单环刺螭体壁 ASC 的特征吸收波长位于 228nm 处, 主要是由肽键 C=O 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所贡献^[9]。通常, 蛋白质中酪氨酸、苯丙氨酸的最大紫外吸收分别为 283nm 和 251nm^[10], 但是单环刺螭体壁 ASC 在此吸收较少, 表明胶原蛋白芳香族氨基酸含量较少。所提取的胶原蛋白的紫外吸收光谱特征与已报道的胶原蛋白的紫外吸收特征基本一致^[11], 因此可以初步推断其为典型的胶原蛋白。

2.2 胶原蛋白氨基酸组成

表1 单环刺螭体壁ASC的氨基酸组成

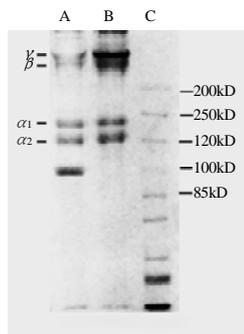
Table 1 Amino acid composition of acid-soluble collagen from body wall of *Urechis unicinctus*

氨基酸	Hyp	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met
残基占氨基酸总残基的比例/%	45	80	31	50	95	298	89	—	62	13
氨基酸	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	Trp	His	Arg	Pro	
残基占氨基酸总残基的比例/%	18	29	9	12	29	—	4	55	81	

注：—采用酸水解法进行氨基酸测定，色氨酸和胱氨酸在酸水解中被破坏。

单环刺螭体壁ASC的氨基酸组成具有典型I型胶原蛋白氨基酸组成特点。由表1可知，单环刺螭体壁ASC中甘氨酸含量最多，约占氨基酸总量的1/3；丙氨酸、脯氨酸、谷氨酸和天门冬氨酸含量较高；而组氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸含量较低。该胶原蛋白中特有的亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)所占的比例为12.6%。脯氨酸的羟基化程度为35.71%，羟脯氨酸与脯氨酸之比为0.56，类似于脊椎动物I型胶原。

2.3 胶原蛋白的SDS-PAGE



A. 酸溶性胶原蛋白(加β-巯基乙醇); B. 酸溶性胶原蛋白(未加β-巯基乙醇); C. 蛋白标准。

图2 单环刺螭体壁ASC的SDS-PAGE电泳图

Fig.2 SDS-PAGE pattern of from body wall of ASC from *Urechis unicinctus*

胶原蛋白由3条多肽链组成，每一条都是左手螺旋结构，3条左手螺旋α链互相缠绕组成右手螺旋结构，即超螺旋结构。由图2可知，单环刺螭体壁ASC有2条α链(α₁和α₂链)、β链和γ链，这是典型的I型胶原蛋白的特征。加β-巯基乙醇的胶原蛋白比未加β-巯基乙醇的多一条带，说明胶原蛋白的三螺旋结构中含有二硫键，而大部分水产动物I型胶原蛋白不含二硫键。单环刺螭体壁ASC亚基组成可能为(α₁)₂α₂。本实验提取的胶原蛋白电泳条带清晰，并无杂带出现，表明提取的胶原蛋白纯度较高。

2.4 胶原蛋白的傅里叶红外光谱分析

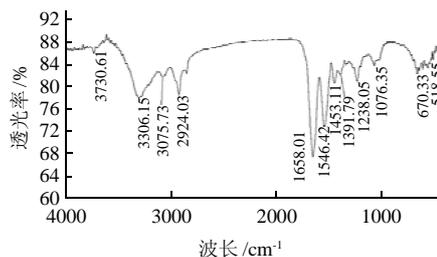


图3 单环刺螭体壁ASC的红外光谱

Fig.3 Fourier-transform infrared spectrum of ASC from body wall of *Urechis unicinctus*

胶原蛋白N—H伸缩振动产生的酰胺A的吸收通常在3400~3440cm⁻¹之间。当多肽中的N—H基团参与形成氢键时，其波数会发生移动，一般在3300cm⁻¹左右^[12]，单环刺螭体壁ASC的红外光谱图与其他胶原蛋白的红外光谱图类似^[13-14]。由图3可知，单环刺螭体壁ASC的酰胺A的吸收在3306cm⁻¹，表明分子中存在氢键。酰胺B谱带是由酰胺A与酰胺II的一次泛频耦合的结果^[15]，酰胺B的吸收在3075cm⁻¹，主要是由分子中CH₂基团的不对称伸缩振动产生的^[13]。在双键区(2000~1500cm⁻¹)，单环刺螭体壁ASC的酰胺I谱带波数在1658cm⁻¹，由C=O振动引起，通常不受肽链侧基影响，振动频率取决于肽链构型，对三螺旋结构的变化非常敏感；酰胺II谱带波数在1546cm⁻¹，主要是由异相N—H面内弯曲振动和C—N(具有双键性质)伸缩振动共同产生的，也不易受肽链侧基影响，但对胶原蛋白的三螺旋结构不敏感^[16]。

2.5 胶原蛋白的热稳定性

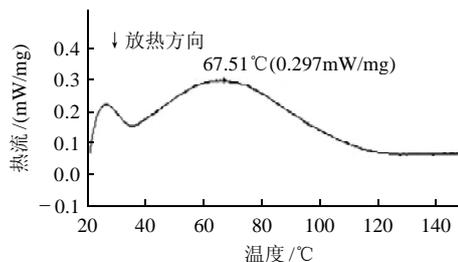


图4 单环刺螭体壁ASC的DSC曲线

Fig.4 DSC curves of ASC from body wall of *Urechis unicinctus*

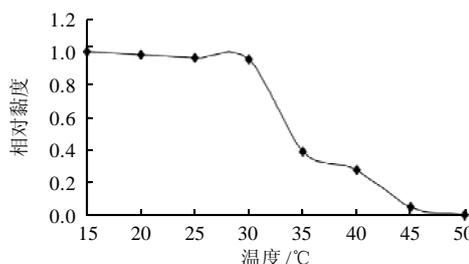


图5 单环刺螭体壁ASC的热变性曲线

Fig.5 Thermal denaturation curve of ASC from body wall of *Urechis unicinctus*

天然状态下的胶原由3条多肽链缠绕而成,加热时氢键断裂,导致胶原分子解缠绕,天然构象被破坏,这些状态的变化过程都伴随着能量的变化。胶原蛋白的热稳定性通常由溶液中热变性温度 t_d 和胶原纤维的热收缩温度 t_s 来表示。 t_d 指50%胶原分子发生变性的温度^[17], t_s 指的是蛋白纤维收缩至1/3长度时的温度^[18]。由图4可知,单环刺螠体壁ASC的 t_s 为67.51℃,比牛皮I型胶原蛋白高5℃。由图5可知,单环刺螠体壁ASC的 t_d 为33.6℃,比猪皮胶原蛋白低了3℃。

3 结 论

本实验以单环刺螠体壁为原料,在低温条件下提取ASC,并对其理化性质进行初步研究。紫外光谱和氨基酸组成确定单环刺螠体壁ASC为I型胶原蛋白,电泳分析确定其三螺旋结构中含有二硫键,而大部分水产动物I型胶原蛋白不含二硫键。其具有类似于猪皮和牛皮胶原蛋白的热稳定性,傅里叶变换红外光谱表明所提取的胶原蛋白较好地保持了螺旋结构。提示,单环刺螠体壁ASC中含有不同于大部分水产动物I型胶原蛋白的二硫键。

参 考 文 献:

- [1] 李诺, 宋淑莲, 唐永政, 等. 单环刺螠[J]. 生物学通报, 1998, 33(8): 12-14.
- [2] GELSE K, POSCHL E, AIGNER T. Collagens-structure, function, and biosynthesis[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55: 1531-1546.
- [3] MIURA S, KIMURA S. Jellyfish mesogloea collagen[J]. Journal of Biological Chemistry, 1985, 260: 15352-15356.
- [4] KIMURA S, TANAKA H, PARK Y H. Annelid skin collagen occurrence of collagen with structure of $(\alpha)_2\alpha_2$ in *Urechis unicinctus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1983, 75(4): 681-684.
- [5] NAGAI T, ARAKI Y, SUZUKI N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*)[J]. Food Chemistry, 2002, 78: 173-177.
- [6] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [7] ROCHDI A, FOUCAT L, RENOUE J P. NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen[J]. Food Chemistry, 2000, 69: 295-299.
- [8] ZHANG Yan, LIU Wentao, LI Guoying, et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Food Chemistry, 2007, 103: 906-912.
- [9] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 40-44.
- [10] LIN Yunkai, LIU Dengcheng. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species[J]. Food Chemistry, 2006, 99: 244-251.
- [11] 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.
- [12] LI He, LIU Bailing, GAO Lizhen, et al. Studies on bullfrog skin collagen [J]. Food Chemistry, 2004, 84: 65-69.
- [13] MUYONGA J H, COLE C G B, DUODU K G. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates nilotics*) [J]. Food Chemistry, 2004, 85: 81-89.
- [14] LIU Haiying, LI Ding, GUO Shidong. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Food Chemistry, 2007, 101: 621-625.
- [15] 陈静涛, 赵玉萍, 徐政, 等. 重组胶原蛋白与牛源I型胶原蛋白红外光谱研究[J]. 材料导报, 2008, 22(3): 119-121.
- [16] DOYLE B B, BENDIT E G, BLOUT E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides[J]. Biopolymers, 1975, 14(5): 937-957.
- [17] 陆璐. I型胶原的提取及其组装和表征[D]. 南京: 东南大学, 2006.
- [18] FATHIMA N N, MADHAN B, RAO J R, et al. Interaction of aldehydes with collagen: effect on thermal, enzymatic and conformational stability[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2004, 34: 241-247.