

# 氨基酸组成及溶剂环境对淡水鱼胶原蛋白热稳定性能的影响

邓明霞<sup>1</sup>, 汪海波<sup>1</sup>, 杨玲<sup>1</sup>, 刘良忠<sup>2</sup>, 黄爱妮<sup>3</sup>, 张含俊<sup>1</sup>

(1. 武汉轻工大学 化学与环境工程学院, 湖北武汉 430023) (2. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023) (3. 武昌工学院食品工程学院, 湖北武汉 430065)

**摘要:** 本文探讨了氨基酸组成、分布以及溶剂环境对鱼源胶原蛋白热稳定性能的影响。利用不同鱼类的胶原蛋白为实验样本, 测定胶原蛋白氨基酸组成和热变性温度, 通过相关性分析明确了影响胶原蛋白热变性温度的主要氨基酸种类和分布指标。结果表明, 胶原蛋白中脯氨酸羟基化率、碱性氨基酸、带电荷极性氨基酸和总极性氨基酸含量与胶原蛋白热变性温度呈正相关, 而亚氨基酸与非极性氨基酸含量与胶原蛋白热变性温度呈负相关 ( $p < 0.01$ )。运用逐步多元回归分析方法, 建立了脯氨酸羟基化率和带电荷极性氨基酸与胶原蛋白热变性温度之间的相关性数学模型, 经验证, 该模型能较好的预测鱼源胶原蛋白的热变性温度。在此基础上, 进一步研究了胶原蛋白所处溶剂环境对其热稳定性能的影响。结果表明, 提高水分子浸润胶原蛋白程度和体系离子强度, 或降低体系 pH 均会显著降低胶原蛋白热稳定性能。

**关键词:** 胶原蛋白; 热稳定性能; 氨基酸; 离子强度

文章编号: 1673-9078(2015)12-111-120

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.017

## Effects of Amino Acid Composition and Solvent Environment on the Thermal Stability of Fish Collagen

DENG Ming-xia<sup>1</sup>, WANG Hai-bo<sup>1</sup>, YANG Ling<sup>1</sup>, LIU Liang-zhong<sup>2</sup>, HUANG Ai-ni<sup>3</sup>, ZHANG Han-jun<sup>1</sup>

(1. Department of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

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

(3. Food Engineering College, Wuchang Institute of Technology, Wuhan 430065, China)

**Abstract:** Collagen was extracted from different species of grass carp and used to study amino acid compositions and thermal stability. The result of a correlation analysis between the amino acid compositions and denaturation temperatures of various collagens showed that the degree of hydroxylation of proline, the content of alkaline amino acids, polar amino acids with charge, and total polar amino acids were positively correlated with the denaturation temperature for collagen. However, the content of imino acids and nonpolar amino acids showed an inverse correlation with the denaturation temperature ( $p < 0.01$ ). The mathematical model of correlation between amino acid distribution and denaturation temperature of collagen was established by step-wise regression analysis using SAS software, which accurately forecasts the denaturation temperature of fish collagen. At the same time, the influence of solvent environment, including infiltration degree of water, pH, ionic strength, and ion species, on the thermal stability of fish collagen was investigated. The results showed that the thermal stability of fish collagen underwent a remarkable decrease with increase in the infiltration degree of water and ionic strength as well as a decrease in pH of the solvent.

**Key words:** collagen; thermal stability; amino acids; ionic strength

淡水鱼加工下脚料(如鱼鳞、鱼皮和鱼骨)中富

收稿日期: 2014-12-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21376183、21076166); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T201208); 湖北省教育厅科学研究计划项目(B2014127)

作者简介: 邓明霞(1990-), 女, 研究生, 研究方向: 天然产物化学

通讯作者: 汪海波(1971-), 男, 教授, 主要从事天然产物化学研究

含的天然胶原蛋白(Collagen)具有良好的生物相容性, 可用于生物医学材料的制造。与哺乳动物胶原蛋白相比, 鱼源胶原蛋白在生物安全性、原料来源的广泛性和制备成本等方面更具优势。因此, 围绕鱼源胶原蛋白的提取及其在生物材料领域中的应用研究逐渐成为研究热点<sup>[1-6]</sup>。I型胶原蛋白是生物体中分布最广泛的胶原蛋白类型<sup>[7]</sup>, 由具有左手螺旋构象的2条

$\alpha 1$  和一条  $\alpha 2$  肽链组成, 三条肽链进一步缠绕形成具有右手螺旋构象的超螺旋分子结构(三螺旋)<sup>[8]</sup>。受热处理后, 胶原蛋白三螺旋结构可发生解离, 即热变性过程。胶原蛋白热变性后, 其所具备的诸多优良生物学性能也随之降低或消失。因此, 胶原蛋白的热稳定性及其影响因素是该领域的重要研究方向之一<sup>[9~14]</sup>。研究发现, 尽管结构特征相似, 不同来源的 I 型胶原蛋白在热稳定性上却往往存在差异, 说明除分子高级构象外, 胶原蛋白化学组成(氨基酸组成)亦是影响其热稳定性的重要因素之一<sup>[15]</sup>。在针对哺乳动物胶原蛋白的研究中, Gustavson 等人首先发现胶原蛋白热变性温度与羟基脯氨酸含量存在正相关性<sup>[16]</sup>。随后, Piez 等人的研究进一步表明, 胶原蛋白的热稳定性与亚氨基酸(脯氨酸+羟基脯氨酸)含量呈正相关性, 这一研究结论被广泛接受并一直沿用至今<sup>[17]</sup>。但是, 其他氨基酸在胶原蛋白结构稳定性中发挥何种作用, 鱼源胶原蛋白热稳定性与氨基酸组成之间存在何种关联性问题尚未被系统阐释。

与哺乳动物不同, 不同鱼类由于品种、习性和生存环境差异, 其氨基酸组成和胶原蛋白热稳定性均表现出明显的不同, 这为开展胶原蛋白热稳定性与氨基酸组成之间的关联性研究提供了良好契机。同时, 鱼类胶原蛋白的热变性温度普遍低于哺乳动物, 很大程度上限制了其在生物医学材料领域中的应用。因此, 系统开展胶原蛋白氨基酸组成以及外界环境因素对鱼源胶原蛋白热稳定性的影响研究对于鱼源胶原蛋白的筛选和应用均具有重要价值。本研究从不同鱼类中分离、纯化胶原蛋白样本, 测定胶原蛋白热变性温度和氨基酸组成, 开展二者的相关性分析并尝试构建数学关联模型, 系统揭示影响鱼源胶原蛋白热稳定性的化学组成“内因”。同时, 研究不同溶剂条件下胶原蛋白热稳定性性能的变化, 探讨影响鱼源胶原蛋白热稳定性性能的主要“外因”, 为天然胶原蛋白特别是鱼胶原蛋白的热稳定性机制提供理论补充。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验原料

选择长江流域中 8 种常见的淡水鱼作为鱼源胶原蛋白的提取原料, 分别为: 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、长吻鮠(又名鮠鱼, *Leiocassis longirostris*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、乌鳢鱼(又名黑鱼或财鱼, *Channa argus*)、刁子鱼(*Diao Ziyu*)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)。选择猪皮作为哺乳动物

胶原蛋白的提取原料。所有新鲜的淡水鱼及新鲜猪皮均购自于武汉市常青花园超市。采用人工方法剥离淡水鱼鱼皮, 细致剔除鱼皮上附着肌肉组织后反复洗涤, 切成 5×5 cm 小片, 低温风干后冻藏备用; 新鲜猪皮人工去除残留的皮毛和皮下脂肪后反复洗涤, 切成小块并风干冻藏备用(方法同上)。

### 1.2 实验试剂与仪器

NaOH、NaCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙酸、盐酸等化学试剂均为国产分析纯; 羟脯氨酸标准品(≥99%)上海康达氨基酸厂; 胃蛋白酶(800~2500 U/mg)购置于丰达生物科技有限公司。

LGJ-10D 冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂; 835-50 氨基酸分析仪, 日本日立公司; J-810 圆二色谱仪 美国 JASCO 公司; Q2000 差示扫描量热仪 美国 TA 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 胶原蛋白的提取、纯化与结构表征

胶原蛋白的提取: 胶原蛋白的所有提取和纯化步骤均在环境温度低于 10 °C 的条件下完成。鱼皮和猪皮原料依次用无水乙醚和 10% 正丁醇溶液浸泡 24 h 脱脂后用去离子水反复洗涤, 沥干, 随后用 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡 48 h 脱杂蛋白, 去离子水洗涤、沥干后用 0.5 mol/L 乙酸溶液摇浴 24 h, 离心分离上清液得到酸溶胶原蛋白(Acid-solubilised collagen, ASC)粗提液。沉淀物继续用含 2% 胃蛋白酶的 0.5 mol/L 乙酸溶液摇浴 24 h, 分离上清液得到酶溶胶原蛋白(Pepsin-solubilised collagen, PSC)粗提液。分别向 ASC 和 PSC 粗提液中添加 NaCl 至 0.9 mol/L, 4 °C 盐析 24 h 后过滤。所获胶原蛋白沉淀用 0.5 mol/L 乙酸溶液复溶, 离心(10000 r/min, 10 min), 上清液再次盐析、乙酸复溶(该操作重复 3 次), 最后得到的离心上清液依次用 0.1 mol/L 的乙酸溶液及蒸馏水透析后冷冻干燥得到纯化的胶原蛋白样品。

SDS-PAGE 分析: 用 0.1 mol/L 醋酸溶液溶解胶原蛋白样品。溶解后的样品溶液与 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 6.8, 含有 5% SDS 和 20% 甘油)按照 1:20 混合, 上样。分离胶和浓缩胶浓度分别为 7.5% 和 4%。凝胶电泳分离后, 用 0.25% 的考马斯亮蓝 R-250 染色过夜, 随后用甲醇-乙酸脱色液(含 40% 的甲醇和 10% 的乙酸)摇床脱色 2~3 次, 直至背景颜色为无色后用凝胶成像系统分析蛋白样品肽链组成。

圆二色谱分析: 胶原样品用 0.1 mol/L 乙酸配置成 0.1 mg/mL 溶液, 圆二色谱测定条件为: 1 mm 比

色皿, 波长扫描范围 190~250 nm, 扫描速度: 50 nm/min, 扫描精度 0.5 nm, 测定温度为 15 °C。

### 1.3.2 氨基酸组成与分布对淡水鱼胶原蛋白热稳定性的影响

#### 1.3.2.1 氨基酸组成分析

胶原蛋白样品在密闭充氮条件下, 用 6 M 盐酸于 110 °C 条件下水解 24 h, 随后用氨基酸自动分析仪测定蛋白质氨基酸组成。所有样品均重复测定 3 次, 取平均值作为最终测定结果。

#### 1.3.2.2 热变性温度测定

采用差式扫描量热仪 (DSC) 测定胶原蛋白样品的吸热曲线, 运用 TA Q-series 2000 分析软件获取各胶原蛋白样品的变性温度 ( $T_d$ ) 参数。测定前先向胶原蛋白样品中按 1:40 (m/V) 比例加入 0.05 mol/L 的乙酸溶液, 4 °C 条件下溶胀 2 d 后测定。测定前仪器用金属铂进行校正, 用空铝盒做对照, 扫描温度范围 20 °C~50 °C; 升温速率 2 °C/min, 样品室氮气流量为 20 mL/min。所有样品均重复测定 3 次, 取平均值作为最终测定结果。

#### 1.3.2.3 数学模型的建立

以 SAS (8.12) 软件为数据分析平台, 开展胶原蛋白氨基酸组成与其热稳定性行为间的相关性分析。

数据源: 利用分离得到的 16 个淡水鱼胶原蛋白样品作为分析样本, 以测定得到胶原蛋白热变性温度  $T_d$  (°C) 作为分析应变变量 ( $y$ ), 以 17 种氨基酸含量 (氨基酸残基数/1000 个残基) 作为氨基酸含量自变量 ( $X_i, i=1, 2, 3, \dots, 17$ )。同时, 在氨基酸含量数据基础之上, 进一步整理、归纳得到氨基酸分布的系列数据, 作为氨基酸分布自变量 ( $X_i, i=18, 19, 20, \dots, 24$ ), 包括: 亚氨基酸含量、酸性氨基酸含量、碱性氨基酸含量、带电荷极性氨基酸含量、不带电荷极性氨基酸含量、极性氨基酸总含量、非极性氨基酸含量 (氨基酸残基数/1000 个残基) 和脯氨酸羟基化率 (%)。

相关性分析: 将胶原蛋白样本的热变性温度  $T_d$  (°C) 对各氨基酸含量和氨基酸分布系列数据逐一开展相关性分析, 考察氨基酸含量和氨基酸分布对胶原蛋白热稳定性的影响情况, 以  $p < 0.01$  作为显著性相关检验标准。

多元回归模型的建立: 采用逐步回归分析方法 (变量进入模型标准 SLE 和变量在模型中保留的标准 SLS 参数均设定为 0.15), 以胶原蛋白样本的热变性温度  $T_d$  (°C) 为应变变量 ( $y$ ), 以各种类型氨基酸分布数据为自变量, 构建基于氨基酸分布与胶原蛋白热变性温度之间的多元回归数据模型。

### 1.3.3 溶剂环境对胶原蛋白热稳定性的影响

为了考察溶剂环境对胶原蛋白热稳定性的影响, 以草鱼 PSC 胶原蛋白样品为测试对象, 采用 DSC 法测定胶原蛋白热变性温度和热变性焓 ( $\Delta H$ ) 参数, 分别改变溶剂溶胀时间、体系 pH、离子强度和离子种类等溶剂环境条件, 研究胶原蛋白的热稳定性。

#### 1.3.3.1 水分子浸润的影响

以去离子水为 DSC 测定前的样品溶胀剂, 向胶原蛋白样品中按 1:40 (m/V) 比例加入去离子水, 分别在 4 °C 条件下溶胀 2、3、4、6 d 后采用 1.3.2.2 方法测定草鱼 PSC 胶原蛋白样品的热变性温度和热变性焓 ( $\Delta H$ ) 参数。同时, 以冻干的草鱼 PSC (水分含量 5.7%, 国标方法 GB 5009.3-2010 测定) 作为不加水溶胀的对照样品, 直接测定 (扫描温度范围 80 °C~200 °C)。

#### 1.3.3.2 体系 pH 的影响

以去离子水为溶胀剂, 以 0.5 mol/L 的盐酸为酸度调节剂, 采用逐步增加盐酸用量的方法调节溶胀剂体系 pH (实际测定溶胀剂体系最终 pH 分别为 1.0、2.4、2.8、3.1、3.4、5.3 和 7.0), 在 4 °C 条件下将胶原蛋白样品溶胀 3 d 后测定热变性温度和热变性焓 ( $\Delta H$ ) 参数。

#### 1.3.3.3 体系离子强度和离子种类的影响

以去离子水为溶胀剂 (pH 7.0), 采用氯化钠作为离子强度调节剂, 调节溶胀剂体系离子强度分别为 0~300 mmol/L, 在 4 °C 条件下将胶原蛋白样品溶胀 3 天后测定热变性温度和热变性焓 ( $\Delta H$ ) 参数。同时, 以磷酸盐缓冲液 (pH 7.0, 离子强度 50 mmol/L) 为溶胀剂, 在相同条件下溶胀胶原蛋白样品后测定热变性温度和热变性焓, 作为不同离子种类的对照样品。

### 1.3.4 数据分析

采用 SAS (8.12) 统计学软件进行数据分析, 计算平均值和标准偏差 (SD), 采用单因素方差分析进行多组间比较,  $p < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胶原蛋白的结构表征

实验提取并分离纯化后共得到 16 个淡水鱼胶原蛋白和 1 个哺乳动物胶原蛋白样品 (猪皮 ASC 提取率极低, 未作为研究对象), 所有冻干样品均为白色多孔的海绵状结构。图 1 是草鱼胶原蛋白 ASC 和 PSC 的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱 (其他胶原蛋白样品的电泳图谱与其基本一致)。其中, 分子量 100~120

ku 的两条肽链分别为  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  肽链,分子量约 200 ku 的是  $\beta$  肽链 ( $\alpha$  肽链的二聚体)。从图谱中可以发现,  $\alpha 1$  肽链的色度明显高于  $\alpha 2$  肽链,表明该蛋白样品由两条  $\alpha 1$  和一条  $\alpha 2$  肽链条带组成,且无其他杂蛋白条带存在,证实所得胶原蛋白均为典型的 I 型胶原蛋白。图 2 是草鱼 PSC 的圆二色谱图(其他胶原蛋白样品的圆二色谱图与其基本一致)。具有三螺旋分子结构的天然胶原蛋白是一种典型的光活性分子,其典型的圆二色图谱特征为:在 220 nm 和 195~200 nm 处各有一最大的正吸收峰和负吸收峰。当胶原蛋白受热变性后,由于分子三螺旋结构破坏,相应的圆二色特征吸收峰也随之消失<sup>[18]</sup>。本次实验制备得到的所有胶原蛋白样品的圆二色图谱均展现为典型的三螺旋结构的分子特征,证实制备所得的胶原蛋白样品均是具有完整三螺旋分子结构的未变性胶原蛋白。

## 2.2 氨基酸组成与分布对淡水鱼胶原蛋白热稳定性的影响

### 2.2.1 氨基酸组成与热变性温度测定

17 个胶原蛋白样品的氨基酸组成、氨基酸分布以及胶原蛋白的热变性温度 ( $T_d$ ) 测定结果如表 1、2 所示。所有胶原蛋白样品的氨基酸组成均符合天然胶原蛋白的氨基酸组成特征,即除含有特征性氨基酸—羟脯氨酸外,还富含甘氨酸、脯氨酸和丙氨酸,其中甘氨酸含量占总氨基酸的 1/3 以上。采用差示扫描量热仪(DSC)测定各胶原蛋白样品的热变性温度,

结果显示,在测试扫描温度范围内,所有胶原蛋白样本均有单一的变性吸热峰,进一步证实胶原蛋白样本为非变性样品。

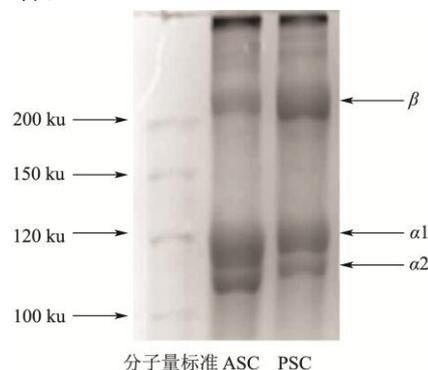


图 1 草鱼 ASC 和 PSC 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of acid-soluble and pepsin-soluble collagen (PSC) from grass carp

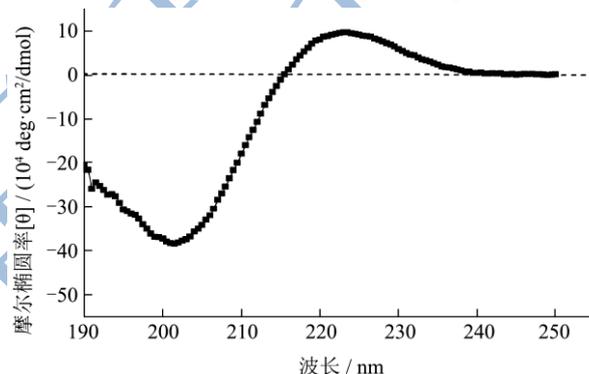


图 2 草鱼 PSC 的 CD 图谱

Fig.2 The circular dichroism curve of PSC from grass carp

表 1 各胶原蛋白样品的氨基酸组成分析(残基数量/1000 个氨基酸残基)

Table 1 Amino acid composition of different collagens (residues per 1000 total amino acid residues)

氨基酸	草鱼 PSC	草鱼 ASC	青鱼 ASC	青鱼 PSC	鳙鱼 ASC	鳙鱼 PSC	长吻鲩 ASC	长吻鲩 PSC
羟脯氨酸	75.8	76.8	58.9	57.6	69.8	70.1	90.3	87.8
天冬氨酸	60.8	56.7	41.9	44.8	43.9	45.7	53	46.9
苏氨酸	28.9	26.9	27.7	22.6	27.3	27.5	24.8	26.9
丝氨酸	32.9	30.7	30.5	25.4	30.8	30.6	27.9	30.3
谷氨酸	75.4	71.9	80.9	76.3	76.2	71.9	65.7	61.8
脯氨酸	78.6	70.6	58.2	60.2	70.9	73.6	95.3	104.5
甘氨酸	379.9	397.6	410.4	412.3	412.7	403.2	369.3	358.5
丙氨酸	121.8	126.9	122.1	134.2	131.6	128	122.7	124.8
缬氨酸	15.1	15.4	15	15.8	14.4	14.6	18.2	19
蛋氨酸	10.6	9.9	10.4	13	11.3	13	8.9	8.9
异亮氨酸	9.2	7.3	7.4	8	3.8	7.4	7.9	9.8
亮氨酸	18.3	17	18.4	19.4	11.2	18.5	15.6	19.3
酪氨酸	1.8	1.2	1.3	0.4	2.3	1.5	1.2	1.5

转下页

接上页

苯丙氨酸	11.8	10.5	12.2	12.1	12	11.1	7.9	11.3	
组氨酸	0	1.9	6	0	4.8	0	5.3	0	
赖氨酸	22.2	22.8	22.6	25.7	21.1	22.7	28.1	23.1	
精氨酸	56.9	55.9	76.1	72.2	55.9	60.6	57.9	65.6	

氨基酸	鲤鱼	鲤鱼	刁子鱼	刁子鱼	乌鳢鱼	乌鳢鱼	鲢鱼	鲢鱼	猪皮
	ASC	PSC	ASC	PSC	ASC	PSC	ASC	PSC	PSC
羟脯氨酸	85.3	112.9	99.4	107.3	105.2	94.6	103.4	105.1	72.1
天冬氨酸	60.7	56.8	51.4	52.4	52.7	58.5	51.4	50.8	58.3
苏氨酸	25	21	23.1	23.1	23.4	23.9	24.5	24.3	22.4
丝氨酸	4	3.6	3.6	3.4	3.7	3.8	3.7	3.7	25.2
谷氨酸	79.2	70.3	68.4	64.6	66.7	69.8	72.9	70.7	67
脯氨酸	118.1	125.4	133.4	134.3	137.8	141	140.2	135.1	92.2
甘氨酸	343.3	329.7	382.5	374.9	376.5	341	350.8	371.9	395
丙氨酸	147.3	140.7	122.8	118.2	120.7	127.6	118.9	121	103
缬氨酸	20.7	27.8	17.3	16.6	16.8	16.2	16.7	15.6	17.2
蛋氨酸	15.1	11.8	12.4	13	12.5	11	14.5	14.1	5.3
异亮氨酸	9.3	9.2	9.3	9.1	8.8	9.6	9.7	9.5	9.2
亮氨酸	25.8	25.2	22.6	20.9	20.1	27.7	22.2	20.8	25.1
酪氨酸	2.3	1.6	1.8	1.8	2	3.3	3.6	1.6	2.1
苯丙氨酸	11.7	10.9	11.9	11.9	12.3	13.9	15.4	12.7	13.3
组氨酸	16.9	16.4	13.7	14.8	12.5	14.5	13.5	12.7	16.2
赖氨酸	27.9	28.8	22.1	23.7	17.5	31.4	26.6	19.3	28.1
精氨酸	7.4	7.9	4.3	10	10.8	12.2	12	11.1	48.3

表 2 各胶原蛋白样本的氨基酸分布数据与热变性温度 (残基数量/1000 个氨基酸残基)

Table 2 Amino acid distribution and denaturation temperature of different collagens (residues per 1000 total amino acid residues)

胶原蛋白 种类	亚氨 基酸	羟基化率 /%	酸性氨 基酸	碱性氨 基酸	带电荷极性 氨基酸	不带电荷极 性氨基酸
	草鱼皮 PSC	154.4	49.1	136.2	79.1	215.3
草鱼皮 ASC	147.3	52.1	128.5	80.6	209.1	145.4
青鱼 ASC	117.1	50.3	122.8	104.7	227.5	128.8
青鱼 PSC	117.8	48.9	121.1	97.9	219	119
鳊鱼 ASC	140.7	49.6	120.1	81.8	201.9	141.5
鳊鱼 PSC	143.7	48.8	117.6	83.3	200.9	142.7
长吻鮠 ASC	185.6	48.6	118.7	91.3	210	153.1
长吻鮠 PSC	192.3	45.6	108.7	88.7	197.4	155.4
鲤鱼 ASC	203.4	41.9	139.9	52.3	192.2	131.7
鲤鱼 PSC	238.3	47.4	127	53.1	180.2	150.8
刁子鱼 ASC	232.8	42.7	119.9	40.1	160	140.3
刁子鱼 PSC	241.6	44.4	117	48.5	165.6	148.6
乌鳢鱼 ASC	242.9	43.3	119.4	40.9	160.2	146.7
乌鳢鱼 PSC	235.6	40.1	128.3	58.1	186.4	136.5
鲢鱼 ASC	243.5	42.4	124.3	52.1	176.4	149.6
鲢鱼 PSC	240.2	43.7	121.5	43	164.5	148.8

转下页

接上页

猪皮 PSC	164.3	43.9	125.3	92.6	217.9	127.1
白种类	总极性氨基酸	非极性氨基酸	变性温度实测值/°C	变性温度计算值/°C	残差/°C	
草鱼皮 PSC	365.3	634.6	35.8	35.6	0.2	
草鱼皮 ASC	354.5	645.1	35.6	35.7	-0.1	
青鱼 ASC	356.3	643.6	35.7	35.9	-0.2	
青鱼 PSC	338	661.9	35.9	35.7	0.2	
鳊鱼 ASC	343.4	656.6	35.9	35.4	0.5	
鳊鱼 PSC	343.6	656.4	35.1	35.3	-0.2	
长吻鮠 ASC	363.1	637	35.3	35.5	-0.2	
长吻鮠 PSC	352.8	647.2	35.2	35	0.2	
鲤鱼 ASC	323.9	676.1	34.7	34.6	0.1	
鲤鱼 PSC	331	669	34.9	34.8	0.1	
刁子鱼 ASC	300.2	699.8	33.9	34	-0.1	
刁子鱼 PSC	314.2	685.8	34	34.3	-0.3	
乌鳢鱼 ASC	306.9	693.1	33.9	34.1	-0.2	
乌鳢鱼 PSC	322.9	677.1	34.1	34.4	-0.3	
鲢鱼 ASC	326	674	34.8	34.3	0.5	
鲢鱼 PSC	313.3	686.7	34.5	34.2	0.3	
猪皮 PSC	345	655	41.6	35.3	6.3	

注：亚氨基酸=脯氨酸+羟脯氨酸（残基数/1000个残基）；羟基化率%=100×羟脯氨酸/亚氨基酸；酸性氨基酸=天冬氨酸+谷氨酸（残基数/1000个残基）；碱性氨基酸=赖氨酸+精氨酸+组氨酸（残基数/1000个残基）；带电荷氨基酸=酸性氨基酸+碱性氨基酸（残基数/1000个残基）；不带电荷极性氨基酸=丝氨酸+苏氨酸+酪氨酸+羟基脯氨酸+蛋氨酸（残基数/1000个残基）；总极性氨基酸=带电荷氨基酸+不带电荷氨基酸（残基数/1000个残基）；非极性氨基酸=甘氨酸+丙氨酸+亮氨酸+异亮氨酸+缬氨酸+脯氨酸+苯丙氨酸（残基数/1000个残基）；变性温度实测值：采用 DSC 方法测定的胶原蛋白变性峰值温度（°C）；变性温度计算值：采用公式 1 计算得到的胶原蛋白变性温度（°C）；残差（°C）=变性温度实测值-变性温度计算值。

### 2.2.2 相关性分析

热变性温度与氨基酸含量的相关性：17种氨基酸含量与胶原蛋白热变性温度的相关性分析结果表明，胶原蛋白热变性温度与天冬氨酸和精氨酸含量呈现显著性相关（ $p < 0.01$ ），其中与精氨酸含量呈正相关，与天冬氨酸含量呈负相关（图3）。在这两种氨基酸中，精氨酸是淡水鱼胶原蛋白中平均含量最高的碱性氨基酸（在16个淡水鱼胶原蛋白样本中平均含量为36.5残基/1000个残基），而天冬氨酸是淡水鱼胶原蛋白中仅有的两种酸性氨基酸之一。值得注意的是，在相关性分析中，胶原蛋白热变性温度与碱性氨基酸均呈现正相关性而与酸性氨基酸呈负相关性（尽管其他几种酸性或碱性氨基酸的相关性分析结果并不显著），结合表2的分析结果可以发现，淡水鱼胶原蛋白中酸性氨基酸的平均含量（123个残基/1000个残基）要远高于碱性氨基酸的平均含量（68个残基/1000个残基）。在胶原蛋白分子肽链间，当肽链所带的正负电荷大致相当时，肽链间能通过电荷吸引的形式结合，而当正负

电荷总量不等时，肽链间则会出现同种电荷的排斥而导致肽链的分离。因此，在相关性分析中，胶原蛋白热变性温度与酸性氨基酸天冬氨酸呈现负相关而与碱性氨基酸精氨酸呈现正相关。该结果说明，肽链间的电荷相互作用是影响胶原蛋白分子三螺旋结构稳定性的重要因素之一。

热变性温度与氨基酸分布的相关性分析：氨基酸分布数据与胶原蛋白热变性温度的相关性分析结果表明，胶原蛋白热变性温度与亚氨基酸、脯氨酸羟基化率、碱性氨基酸、带电荷极性氨基酸、极性氨基酸总含量和非极性氨基酸等指标呈现显著性相关（ $p < 0.01$ ）。其中，胶原蛋白热变性温度与亚氨基酸和非极性氨基酸呈负相关，与其他指标呈正相关（图4）。Piez等人的研究表明，脊椎动物胶原蛋白的热变性温度与亚氨基酸含量（脯氨酸+羟基脯氨酸）呈正相关性，因为脯氨酸中的吡咯环状结构对胶原蛋白分子结构有稳定作用，羟脯氨酸中的羟基可通过肽链间的氢键作用强化三螺旋结构的稳定性<sup>[17]</sup>。但是本次针对鱼源胶原蛋

白分析的结果正好相反(图 4f)。

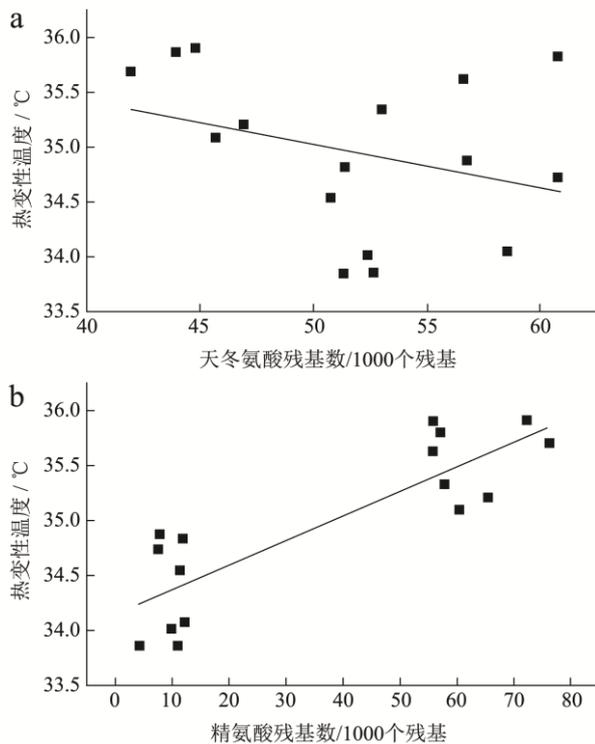


图 3 胶原蛋白氨基酸含量指标与热变性温度的相关性散点图

Fig.3 Correlation scatter diagram of amino acid content and denaturation temperature of collagen

注: a:天冬氨酸; b:精氨酸。

首先,脯氨酸在胶原蛋白分子结构中的作用是通过吡咯环结构对  $\alpha$  肽链自身的左手螺旋起稳定性作用,但是在 3 条肽链之间则由于疏水作用对三螺旋结构的稳定性主要起负面作用。其次,尽管羟基脯氨酸可通过分子间的氢键加强胶原蛋白三螺旋结构的稳定性,但是,多数情况下鱼类胶原蛋白中羟脯氨酸的含量均低于脯氨酸含量,因此,整体上亚氨基酸仍对胶原蛋白热稳定性起负面效应。同时, Piez 等人开展的研究所采用的数据是来自于不同研究者的测定结果,而不同学者在实验的原料来源、测定方法上均存在差异性。胶原蛋白热变性温度与非极性氨基酸呈负相关(图 4c),说明分子内的疏水作用不利于三螺旋结构的稳定性。胶原蛋白热变性温度与碱性氨基酸、带电荷极性氨基酸、极性氨基酸总含量呈正相关(图 4a、b、e),说明胶原蛋白分子内的电荷相互作用和氢键作用是维系三螺旋结构稳定性的重要因素。值得注意的是,在相关性分析中,胶原蛋白热变性温度与羟基脯氨酸含量未表现出显著性相关且与亚氨基酸含量表现显著性负相关,但是其与脯氨酸羟基化率却表现出显著的正相关(图 4d)。在胶原蛋白分子的重复单元 Gly-X-Y 中,脯氨酸高频出现在 X 或 Y 位置,是

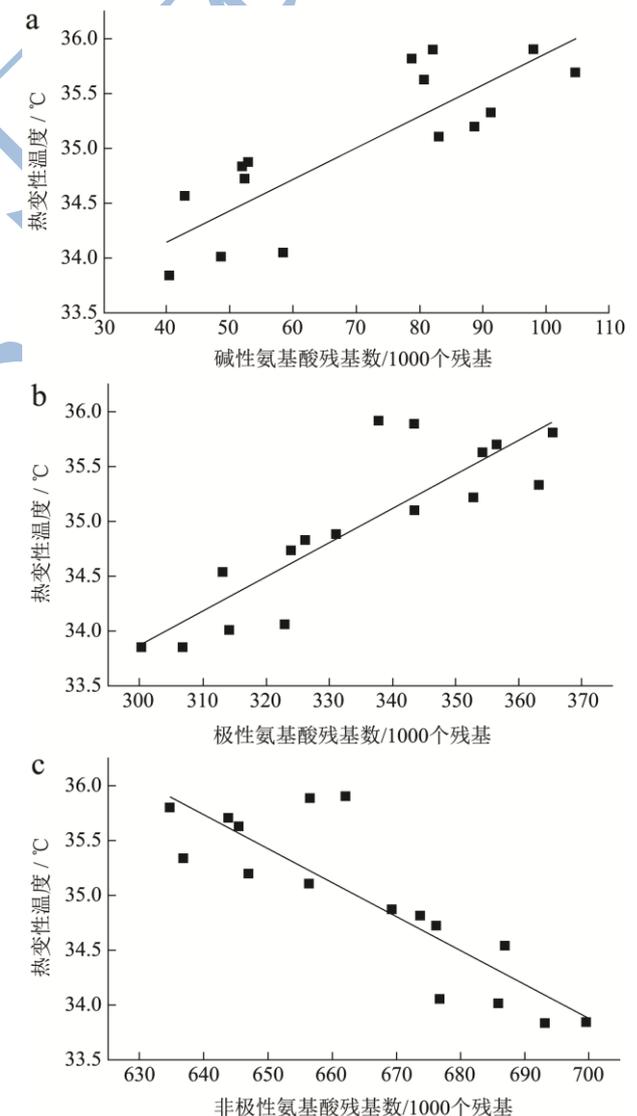
胶原蛋白分子结构中的重要“节点”。在生物体内,脯氨酸可由内源性氧化酶的作用转化为羟基脯氨酸<sup>[19]</sup>。胶原蛋白热变性温度与脯氨酸羟基化率呈正相关的结果表明,脯氨酸或羟基脯氨酸的绝对总量并不影响胶原蛋白热稳定性,但是在“节点”位置上脯氨酸被羟基化的转化程度与胶原蛋白热稳定性有密切关系,因为在重复单元中,每多一个羟基化的脯氨酸,就会对重复单元多一分结构加固并减少脯氨酸的疏水负面作用,而重复单元是胶原蛋白三螺旋结构的基础单元结构。

### 2.2.3 回归数学模型

采用逐步回归分析的方法,建立胶原蛋白热变性温度与氨基酸分布指标间的数学预测模型,得到如下二元回归方程:

$$Y=27.463+0.077X_1+0.0204X_2 \quad (1)$$

其中, Y 为热变性温度  $T_d$ (°C),  $X_1$  为脯氨酸羟基化率(%),  $X_2$  为带电荷极性氨基酸(氨基酸残基数/1000 个残基)。



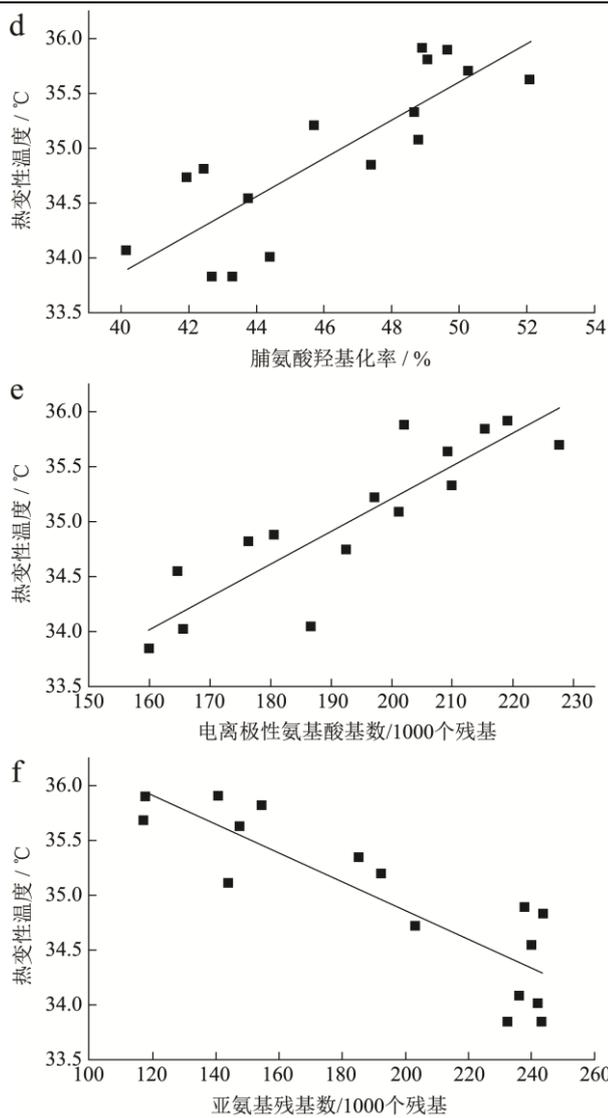


图4 胶原蛋白氨基酸分布指标与热变性温度的相关性散点图

Fig.4 Correlation scatter diagram of amino acid distribution and denaturation temperature of collagen

注: a:碱性氨基酸; b:极性氨基酸; c:非极性氨基酸; d:脯氨酸羟基化率; e:带电荷极性氨基酸; f:亚氨基酸。

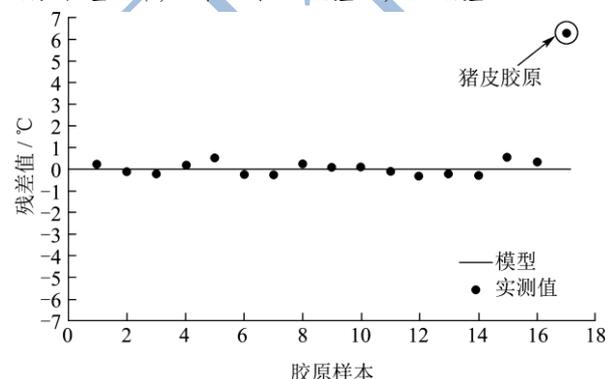


图5 胶原蛋白样本热变性温度实测值与模型预测值的残差图

Fig.5 Residual plot of the measured values and predicted values of denaturation temperatures of collagen

采用数学模型方程(1)计算得到的胶原热变性

温度值与实际测定值的残差分析结果表明(图5、表2),16个鱼类胶原蛋白的热变性温度实测值与模型拟合值之差均小于0.5℃,证实该模型具有较好的预测准确性。相关性分析结果说明电荷作用、氢键、疏水相互作用是胶原蛋白分子三螺旋结构稳定性的主要影响因素。其中,电荷吸引、氢键作用起正效应,电荷排斥、疏水作用起负效应。采用逐步回归分析法能有效避免多变量间互相关性对预测模型的影响。在采用该方法得到的多元回归分析模型中,带电荷极性氨基酸和脯氨酸羟基化率被纳入方程,说明肽链间的氢键作用和离子电荷相互作用是影响胶原蛋白热稳定性的最主要指标。为了考察该模型对哺乳动物胶原蛋白热变性温度的预测能力,将猪皮胶原蛋白的氨基酸指标值代入方程中计算得到其变性温度的预测值为35.3℃,而猪皮胶原蛋白的变性温度实测值为41.6℃,存在较大差距,该结果提示模型可能并不适用于哺乳动物胶原蛋白热变性温度的预测,但这一结论尚需更多的实测数据方能加以验证。

### 2.3 溶剂环境对胶原蛋白热稳定性能的影响

#### 2.3.1 水分子浸润的影响

首先,水分子自身对天然胶原蛋白三螺旋结构稳定性具有重要影响。Simone 等人的研究表明,胶原蛋白分子内的少量水分子可通过“桥键”的形式在三条肽链之间起到氢键纽带作用,从而稳定胶原蛋白分子的三螺旋结构,这部分水亦称为“结合态水”<sup>[20]</sup>。干燥的胶原蛋白样品中由于没有游离态水的介入,因此,胶原蛋白分子间紧密结合,极大的限制了胶原蛋白分子的移动和结构改变能力,从而有效的提升了胶原蛋白三螺旋分子结构的稳定性能。图6a是干燥草鱼PSC胶原蛋白的DSC图谱,显示为两个吸热峰(105.9℃和139.1℃)。其中,105.9℃的吸热峰是胶原蛋白样品中残留的游离水分子的蒸发吸热,139.1℃吸热峰是胶原蛋白分子内结合态水的解离吸热。当胶原蛋白分子内结合态水分子解离后,胶原蛋白分子产生收缩现象,因此该温度也称之为“热收缩温度”(shrinkage temperature)。当胶原蛋白经水溶胀处理后,大量游离水分子进入胶原蛋白样品内部,极大的破坏了胶原蛋白分子间的紧密结合,导致胶原蛋白三螺旋结构稳定性大幅降低。图6b是水溶胀后胶原蛋白的DSC图谱。可以发现,溶胀后,胶原蛋白热变性温度降低至38~40℃,说明游离水分子的浸入将极大的降低胶原蛋白分子结构的热稳定性能。同时,溶胀时间对胶原蛋白热稳定性能也产生影响。水溶胀2d时,胶原蛋白热变性温度测定值为40.6℃,但溶胀3d以上时,

其热变性温度降低且稳定至 38.5 °C。DSC 是测定天然胶原蛋白热变性温度的常规方法。由于胶原蛋白自身不溶于水,因此在测定前需要先将胶原蛋白进行酸或水溶胀成均匀的胶体。本次实验结果提示,溶胀时间对胶原蛋白热变性温度的 DSC 测定值有影响,只有保障充分溶胀时间,才能获得稳定、准确的测定结果。

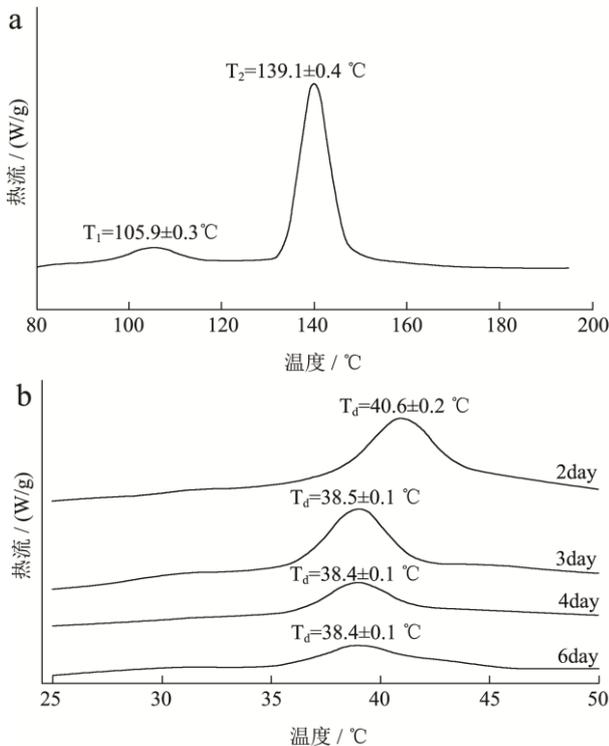


图 6 水分子浸润对草鱼 PSC 热稳定性的影响

Fig.6 Effect of the infiltration degree of water on the thermal stability of grass carp PSC

2.3.2 体系 pH 的影响

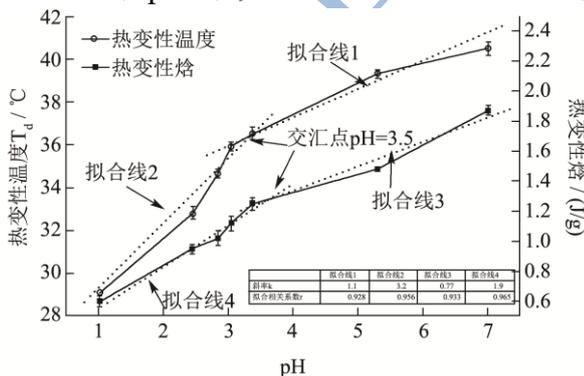


图 7 溶胀体系 pH 对胶原蛋白热稳定性的影响

Fig.7 Effect of solvent pH on the thermal stability of grass carp PSC

草鱼 PSC 胶原蛋白样品在不同 pH 水溶液中溶胀后测定其热变性温度和热变性焓值的变化情况(由于胶原蛋白在碱性条件下不稳定,因此实验中调节 pH 范围为中性至酸性),实验结果如图 7 所示。可以发现,随着溶胀体系 pH 的降低,胶原蛋白热变性温度和热

变性焓值均呈现下降趋势,说明 H<sup>+</sup>对胶原蛋白热稳定性能有负面影响。从图中还可以看到,胶原蛋白热变性温度和热变性焓随 pH 降低而改变的进程均可划分为两个阶段,即在 pH 为 7~3.5 时,胶原蛋白热稳定性性能的下降低过程较为缓慢,而在 pH 小于 3.5 以后,胶原蛋白热稳定性性能迅速降低。在 pH 为 7~3.5 时,H<sup>+</sup>主要通过和胶原蛋白肽链内部的酸性氨基酸竞争,减弱胶原蛋白内肽链间的电荷吸引作用,降低胶原蛋白热稳定性性能,而当 pH 小于 3.5 时,H<sup>+</sup>可破坏三螺旋结构中的氢键从而大幅降低胶原蛋白的热稳定性性能。

2.3.3 体系离子强度和离子种类的影响

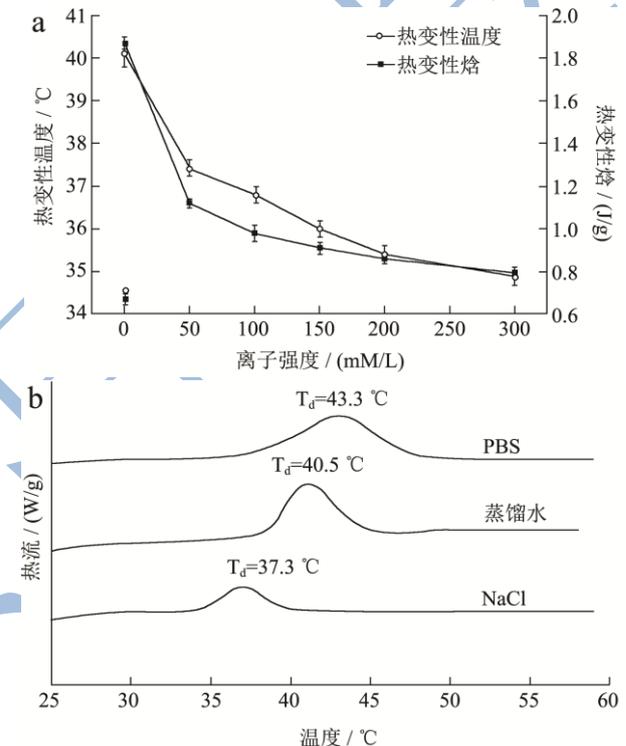


图 8 溶胀体系离子强度和离子种类对胶原蛋白热稳定性性能的影响

Fig.8 Effect of ion strength and type of ions in the solvent on the thermal stability of grass carp PSC

图 8a 是草鱼 PSC 胶原蛋白在水(离子强度为 0)和不同浓度的 NaCl 水溶液(离子强度 0~300 mmol/L)中溶胀后 DSC 的测定结果。实验结果表明,随着溶胀溶剂体系中离子强度的逐渐增加,胶原蛋白热稳定性能随之降低,说明溶剂体系中离子的存在可显著削弱胶原蛋白热稳定性性能,这可能与离子对氢键和电荷相互作用的弱化能力有关。但是,胶原蛋白在相同离子强度(50 mmol/L)的 NaCl 水溶液和 PBS 水溶液中溶胀后却表现出截然相反的热稳定性性能的变化(图 8b)。与水溶胀相比,胶原蛋白在 PBS 中溶胀后,胶原蛋白热变性温度明显提升。与 NaCl 表现出单纯的离子负面作用不同,PBS 中的 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>可通过在相邻肽链间形

成新的电荷配位作用而提高胶原蛋白的热变性温度。

### 3 结论

本研究利用从不同鱼类中获取的天然鱼源胶原蛋白为实验样本,着重探讨了胶原蛋白氨基酸组成、分布对天然胶原蛋白热稳定性能的影响。实验数据表明,脯氨酸羟基化率、碱性氨基酸、带电荷极性氨基酸和极性氨基酸总含量与胶原蛋白热变性温度呈正相关,而亚氨基酸与非极性氨基酸含量与胶原蛋白热变性温度呈负相关。该研究结果说明,胶原蛋白的氨基酸组成和分布是直接影响其热稳定性能的“内因”。这种“内因”通过改变胶原蛋白分子肽链间的电荷相互作用、氢键和疏水作用强弱的方式影响胶原蛋白分子三螺旋结构的稳定性。运用逐步回归分析方法建立的胶原蛋白热变性温度与氨基酸分布指标间的数学模型可以较准确的预测鱼源胶原蛋白的热变性温度。在此基础上,进一步开展了溶剂环境对胶原蛋白热稳定性能影响的系统研究。研究结果表明,水分子的浸润程度、体系 pH、离子强度和离子种类等溶剂环境的改变均会直接影响胶原蛋白的热稳定性能,说明溶剂环境变化是影响胶原蛋白热稳定性能的主要“外因”之一。

### 参考文献

- [1] Liu H Y, Li D, Guo S D. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Food Chemistry, 2007, 101: 621-625
- [2] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89:363-372
- [3] Nagai T, Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins [J]. Food Chemistry, 2000, 68: 277-281
- [4] Nagai T, Worawattanamateekul W, Suzuki N, et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*) [J]. Food Chemistry, 2001, 72: 425-429
- [5] Wang H B, Wang H Y, Liang Y P, et al. The gel properties of collagen from scale of grass carp [J]. Journal of Functional Materials (Chinese), 2012, 43(4): 433-441
- [6] Wang Y, Wang H B, Gui M, et al. Optimization of Extraction Process Parameters of collagens from the scale of Grass Carp [J]. Food Science (Chinese), 2010, 31: 70-76
- [7] Lee C H, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 221: 1-22
- [8] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) [J]. Food Chem., 2010, 119: 1519-1526
- [9] Zhang Z K, Li G Y, Shi B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes [J]. J. Soc. Leather Technol. Chem., 2006, 90: 23-28
- [10] Burjanadze T V, Bezhitadze M O. Presence of a thermostable domain in the helical part of the type I collagen molecule and its role in the mechanism of triple helix folding [J]. Biopolymers, 1992, 32: 951-956
- [11] Privalov P L, Tiktopulo E I. Thermal conformational transformation of tropocollagen. 1. Calorimetric study [J]. Biopolymers, 1970, 9: 127-139
- [12] Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka H, et al. Physical properties of the type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus* [J]. Int. J. Biol. Macromol., 2003, 32: 199-204
- [13] Friess W, Lee G. Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices [J]. Biomaterials, 1996, 17: 2289-2294
- [14] Vyazovkin S, Vincent L, Sbirrazzuoli N. Thermal denaturation of collagen analyzed by isoconversional method [J]. Macromol. Biosci., 2007, 7: 1181-1186
- [15] Lin Y K, Liu D C. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species [J]. Food Chemistry, 2006, 99: 244-254
- [16] Burge R E, Hyness R D. The thermal denaturation of collagen in solution and its structural implications [J]. Journal of Molecular Biology, 1959, 1:155-164
- [17] Piez K A, Gross J, The Amino Acid Composition of Some Fish collagen: The Relation between Composition and Structure [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1960, 235: 995-998
- [18] Mu C, Li D, Lin W, et al. Temperature induced denaturation of collagen in acidic solution [J]. Biopolymers, 2007, 86: 282-287
- [19] Nagai T, Suzuki N, Nagashima T. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) [J]. Food Chemistry, 2008, 111: 296-301
- [20] Simone A D, Vitagliano L, Berisio R. Role of hydration in collagen triple helix stabilization [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 372: 121-125

现代食品科技