

海蜇伞部不溶性胶原纤维及酶促溶性胶原蛋白的热稳定性对比研究

王煦松¹, 杨祺福¹, 孙睿¹, 张玉莹¹, 李冬梅^{1,2}, 董秀萍^{1,2}, 朱蓓薇^{1,2}, 秦磊^{1,2}

(1.大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034) (2.国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁大连 116034)

摘要: 海蜇 (*Rhopilema esculentum*) 是我国传统渔业生产的重要大型经济水母, 其伞部胶原蛋白含量丰富, 但胶原蛋白对热敏感, 对其热稳定性进行研究对海蜇资源的开发利用至关重要。本论文从海蜇伞部提取得到不溶性胶原纤维 (ICF) 及酶促溶性胶原蛋白 (PSC), 并对其热稳定性进行对比分析。结果表明, 海蜇伞部 ICF 与 PSC 的氨基酸组成及分子量类似于 I 型胶原蛋白, 其高级结构差异亦造成热稳定性的不同。傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 研究发现, 在加热至 36 °C 时, PSC 的酰胺 I 带红外吸收骤然降低, 结构发生明显变化, 而 ICF 温度升高至 50 °C 时, 酰胺 I 带红外吸收才开始略有变化, ICF 热稳定性优于 PSC。二维红外分析研究发现, PSC 中 3_{10} -螺旋结构与 ICF 中 β -折叠结构 (低频率) 对温度变化最为敏感, 除自动峰外, PSC 与 ICF 均存在若干交叉峰, 说明热处理过程中各个结构之间存在着分子内和分子间的相互作用。本研究为海蜇胶原蛋白的开发利用提供了一定的理论基础。

关键词: 海蜇; 不溶性胶原纤维; 胶原蛋白; 二维红外光谱; 热稳定性

文章编号: 1673-9078(2016)6-110-117

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.018

Thermal Stability of Insoluble Collagen Fibrils and Pepsin-Solubilized Collagen from *Rhopilema esculentum* Umbrellas

WANG Xu-song¹, YANG Qi-fu¹, SUN Rui¹, ZHANG Yu-ying¹, LI Dong-mei^{1,2}, DONG Xiu-ping^{1,2}, ZHU Bei-wei^{1,2}, QIN Lei^{1,2}

(1.School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

(2.National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, China)

Abstract: *Rhopilema esculentum*, a large jellyfish, is one of the most economically important traditional fishery products in China. The umbrellas of jellyfish are rich in collagen. Since collagen is temperature-sensitive, it is important to study its thermal stability for the development and utilization of jellyfish resources. In this study, insoluble collagen fibrils (ICFs) and pepsin-solubilized collagen (PSC) were extracted from umbrellas of *Rhopilema esculentum*, and their thermostability was compared. The results indicated that the amino acid compositions and molecular weights of the ICF and PSC were similar to those of type I collagen, and the differences in the higher-order structure of ICF and PSC led to their different thermal stabilities. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis showed that the intensity of the amide I band in the infrared absorption of PSC decreased rapidly, and apparent structural changes occurred when the sample was heated to 36 °C. When the temperature was raised to 50 °C, the intensity of the amide I band of ICF changed only slightly, suggesting that thermal stability of ICF is superior to that of PSC. Two-dimensional infrared analysis revealed that 3_{10} -helical structures in PSC and β -sheets (low frequency) in ICF were sensitive to temperature changes. In addition to the automatic peak, there were a number of overlapping peaks, revealing that there were some intramolecular and intermolecular interactions among different higher-order structures during the heating process. This study provides a theoretical basis for the development and utilization of jellyfish collagen.

Key words: *Rhopilema esculentum*; insoluble collagen fibril (ICF); pepsin-solubilized collagen (PSC); two-dimensional Fourier transform infrared spectroscopy (2D-FTIR); thermal stability

收稿日期: 2015-08-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31401519, 31401520); 辽宁省高等学校优秀科技人才支持计划项目 (LJQ2013061)

作者简介: 王煦松 (1989-), 女, 硕士研究生在读, 水产品加工理论与技术

通讯作者: 秦磊 (1984-), 男, 讲师, 水产品加工理论与技术

海蜇 (*Rhopilema esculentum*) 属于腔肠软体动物, 广泛分布于我国沿海近岸, 是我国传统渔业生产的主要大型经济水母。近年来由于海洋环境的变化, 在特定时期内, 海洋水文、水流形成了一种适宜状态, 使浮游生物数量激增, 加之海蜇天敌数量减少, 海蜇种

群极易出现泛滥。海蜇主要的形态结构分为伞部和腕部两部分,伞部呈近半球形,伞径一般为 300~450 mm,最大的可达 1 m,胶质比较坚硬,一般为青蓝色。经过研究发现,海蜇伞部含水量高达 96%^[1],但干基中蛋白质含量很高,并且以对结构起支撑作用的胶原蛋白为主^[2]。胶原蛋白是由 3 条多肽链组成的呈三股螺旋结构的蛋白质,作为一种天然的高分子化合物,其特有的结构和化学组成使其具有其他合成材料无法比拟的生物相容性、可生物降解性以及生物活性^[3]。

胶原分子结构单位是原胶原,原胶原通过赖氨酸侧链基团的氧化交联,头尾相连形成胶原原纤维,蛋白聚糖覆盖于胶原原纤维表面,组装形成超分子结构的胶原纤维。根据胶原蛋白的不同应用目的,主要以原胶原及胶原纤维原料为主。胶原蛋白对热敏感,在受热变性后其优良特性都将消失。从动物组织中提取胶原,不同原料所用的提取方法不同,即使是相同的原料,有时也需要不同的提取方法。2010 年单继航^[1]对胶原蛋白提取方法对比研究中,发现酶法提取产率较高且较好的保持了完整的三螺旋结构,而且发现胶原蛋白对温度变化敏感,升温易造成其特殊结构的变化。为进一步研究蛋白的热稳定性,Saguer^[4]等进行热诱导血浆蛋白凝胶形成的研究中发现,在 pH 7.5~6.0 范围内,温度升高(30~90 °C,增量为 5 °C), α -螺旋结构的减少在 β -折叠结构减少之前发生;2010 年,Popescu^[5]等通过二维相关红外光谱发现随着温度变化,可溶性弹性蛋白在 3800~2700 cm^{-1} 和 1800~800 cm^{-1} 的光谱区发生了显著地改变。

目前对海蜇伞部提取胶原蛋白的研究较少,且由于提取方法的不同,使 ICF 与 PSC 结构存在明显差异,但鲜有对二者理化性质及热稳定性的对比研究。本文通过新的提取方法得到了不溶性胶原纤维(ICF)及酶促溶性胶原蛋白(PSC),并对二者理化性质及热稳定性进行了对比分析,以期海蜇活性胶原蛋白产品的开发提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

新鲜海蜇(*Rhopilema esculentum*)捕捞于辽宁营口辽东湾海域,将伞部割下,海水洗净,加冰于当日运回实验室;牛跟腱胶原购自 Sigma 公司;胃蛋白酶购自上海生工生物工程有限公司。氢氧化钠、氯化钠、盐酸、乙酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、Tris 碱、重水等均为市售分析纯。

TH-100 梯度混合器,上海沪西分析仪器厂有限公

司;UV-2100 型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;Frontier FT-IR/FIR Spectrometers,美国珀金埃尔默公司;Udsc3 差示扫描量热仪,法国塞塔拉姆仪器;CF16RX II 冷冻离心机,日本 Hitachi 公司;电泳仪、MF-ChemBIS 2.0 凝胶成像仪,日本 ATTO 公司;高效液相色谱仪,大连依利特;2KBTES-55 型真空冷冻干燥机, Virtis 等。

1.2 不溶性胶原纤维及酶促溶性胶原蛋白的制备

1.2.1 不溶性胶原纤维的制备

取新鲜海蜇伞部去除海蜇伞部红衣及外伞得到中胶层,并切割成 1 cm×1 cm 的小块,加等量去离子水,放置于搅拌器上搅拌 10 min 后纱布过滤,重复多次,直至滤液透彻为止。加入 100 倍(*m/V*) 0.1 mol/L 的 NaOH,搅拌 72 h(其间每隔 24 h 更换一次溶液)。之后向沉淀中加入等量去离子水放入打浆机打碎,离心(9470 r/min, 10 min)弃去上清液。将沉淀加去离子水反复清洗,至中性后将离心所得沉淀加入 1 L Tris-HCl(0.1 mol/L, pH 8.0, 含 5 mmol EDTA, 0.5 mol/L NaCl)缓冲液搅拌过夜,离心(9490 r/min, 10 min),弃去上清液。沉淀经去离子水反复清洗,至中性后,再加入 1 L 去离子水,搅拌过夜。离心(9770 r/min, 10 min)得沉淀,将沉淀加冷冻干燥得到 ICF。以上所有操作除特殊注明外,均在 4 °C 下进行。

1.2.2 酶促溶性胶原蛋白的制备

将冻干的 ICF 溶于 0.5 mol/L 的乙酸溶液(*m/V* 1:500)中,加入胃蛋白酶(酶活力为 13274 u/g,加酶量为底物质量的 2%),搅拌 72 h。离心(9770 r/min, 30 min)取上清液。向上清液中缓慢加入 4 mol/L NaCl,直至浓度为 1.2 mol/L,搅拌 20 min,静置过夜。离心(9430 r/min, 5 min)取沉淀。将沉淀溶于少量 0.5 mol/L 乙酸中,搅拌至完全溶解。将其装入透析袋中,置于透析液中进行透析。采用 0.02 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 透析液,透析 48 h,离心(9430 r/min, 20 min)取沉淀,将沉淀溶解于 0.1 mol/L 乙酸并采用 0.1 mol/L 乙酸透析液,透析 48 h(透析液均每 24 h 更换一次)。再用去离子水进行透析 24 h,取出冷冻干燥得到 PSC。以上所有操作除特殊注明外,均在 4 °C 下进行。

1.3 分析与测定

1.3.1 氨基酸分析

称取 25 mg 样品,加入 5 mL 安瓿瓶中,加入 3 mL

6 mol/L 盐酸或加入 3 mL mol/L NaOH (碱水解法用来检测色氨酸); 酒精喷灯高温拉丝封口; 放入烘箱中 110 °C 水解 24 h。将水解后的样品从安瓿瓶中转入蒸发皿, 用水多次洗涤安瓿瓶, 洗液一并转入蒸发皿中, 于 80 °C 水浴蒸干。用衍生缓冲溶液多次洗涤蒸发皿, 洗液转入 25 mL 的容量瓶中, 并用衍生缓冲溶液定容; 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 备用。

取已过滤的样品液 5 mL 移至 25 mL 的棕色容量瓶中, 加入 2.5 mL 2,4-二硝基氟苯衍生试剂, 混匀。置于 60 °C 水浴中, 暗处反应 60 min。反应完毕, 取出冷却至室温, 加入平衡缓冲溶液稀释到刻度, 静置片刻, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取 10 μL 进样, 采用依利特 P1201 型高效液相色谱仪对 20 种氨基酸进行分析。将 20 种氨基酸标准品配制不同浓度梯度进行测定, 制得不同氨基酸各自峰面积与浓度的标准曲线, 采用外标法计算样品中不同氨基酸含量。

1.3.2 紫外分析

将提取得到的样品溶解于 0.1 mol/L 乙酸溶液中, 配成 1 mg/mL 的胶原溶液, 以 0.1 mol/L 乙酸溶液作空白对照, 通过 Perkin Elmer Lambda 35 全波长扫描仪在 200~400 nm 的近紫外光区进行扫描。

1.3.3 PAGE-SDS 电泳分析

称取适量样品加入 500 μL 样品缓冲液 (60 mmol/L Tris-HCl 缓冲液、25% 甘油、2% SDS、14.4 mmol/L 巯基乙醇、0.1% 溴酚蓝、8 mol/L 尿素) 震荡摇匀。通过 ATTO AE-8135 垂直电泳, 采用浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 8%, SDS-Tris-甘氨酸系统电极缓冲液进行 SDS-PAGE 垂直板电泳。

1.3.4 热变性温度测定

取 ICF 和 PSC 冻干样品适量, 用纯净水配置成 1% (m/V) 的溶液, 以等量纯净水做参比, 应用法国塞塔拉姆公司 μ-DSC 对其变性温度进行测定, 升温速率为 1 °C/min, 升温区间为 5~70 °C。

1.3.5 傅立叶变换红外光谱分析

取适量 ICF 及 PSC 冻干样品, 经 KBr 压片, 采用 Perkin Elmer 公司 Frontier 傅立叶变换红外光谱仪对样品在 400~4000 cm⁻¹ 扫描, 累积量 128, 分辨率 2 cm⁻¹[6]。

另取适量 ICF 及 PSC 冻干样品, 用 D₂O 溶解, 以 5 °C 为初始温度, 以 1 °C/min 的速度逐步加热至 50 °C (PSC) 和 70 °C (ICF), 每隔 5 °C 恒温 10 min, 进行红外光谱数据采集 (分辨率为 2 cm⁻¹, 累积量 128, 通过高纯氮连续吹送的方式净化红外测样区), 通过 OMNIC 8.0 软件对 1700 cm⁻¹~1600 cm⁻¹ 的红外光谱进行去卷积处理。二维红外光谱分析采用 2D shige

软件, 参照 Sauer^[4,7] 方法进行。

1.3.6 数据统计分析

用 SPSS 软件对数据进行统计分析, 使用单向方差分析, $p < 0.05$ 被认为是显著。

2 结果与讨论

2.1 海蜇伞部胶原蛋白的提取

海蜇伞部胶原纤维有着规则且复杂的片层及网状结构, 为了提取得到结构完整、纯度较高的胶原蛋白, 整个提取过程均在 4 °C 下进行。新鲜海蜇伞部经水洗除去了部分水溶性杂蛋白及部分矿物质, 经碱处理, 大部分杂蛋白被碱液溶解出来, 使用 Tris-HCl 缓冲液处理, 溶解出部分糖蛋白, 由于胶原纤维网状结构的存 在, 部分杂蛋白虽已解离, 但被纤维网状结构截留, 通过水溶液进行溶胀, 胶原粗纤维结构逐渐蓬松, 部分附着在网状结构的非胶原蛋白蛋白被溶解出来^[9], 进而得到纯度较高的 ICF; ICF 存在着大量三螺旋结构, 分子间存在交联作用使得其很难溶解, 经过胃蛋白酶酶的酶解作用, 胶原纤维的非三螺旋结构的末端肽被水解掉, 含有三螺旋结构的主体溶解到提取介质中, 从而得到 PSC。

2.2 氨基酸组成

根据 Brodsky 等^[8] 的研究结果, 胶原蛋白的典型氨基酸序列中重复出现 Gly-X-Y 三肽段, 连续的 Gly-X-Y 重复序列是构成高度有序的胶原原纤维的基础, 同时也是原纤维胶原蛋白区别于非原纤维胶原蛋白的重要特征, 其中 Gly 代表甘氨酸, X 常为脯氨酸, Y 常为羟脯氨酸或羟赖氨酸。如表 1, 海蜇伞部甘氨酸及羟脯氨酸含量分别为 28.72% 和 4.12%, 而由伞部提取得到的 ICF、PSC 中甘氨酸及羟脯氨酸含量分别为 35.63%、5.57% 和 35.06%、5.32%, 由此表明海蜇伞部蛋白中胶原蛋白比例相对较高。ICF 及 PSC 中甘氨酸含量约占总氨基酸含量的三分之一, 同时谷氨酸、脯氨酸以及丙氨酸含量也较高, 在 ICF 中分别占总氨基酸的 10.24%、6.99%、8.28%, 而在 PSC 中分别占总氨基酸的 10.35%、7.43%、8.41%, 并且 ICF、PSC 中脯氨酸和羟脯氨酸含量之和分别占总氨基酸的 12.56% 和 12.75%。此结果与 2009 年庄永亮^[9] 研究的结果相似, 但脯氨酸和羟脯氨酸含量比文献报道结果略高, 可能是由于实验所用海蜇的族群和生活环境不同导致其体内氨基酸组成以及含量有所差异。此外, 牛跟腱胶原的脯氨酸及羟脯氨酸含量明显高于 ICF 和 PSC 中两种氨基酸含量, 这可能与胶原来源不同有关,

并且这种不同符合水产动物与陆生动物胶原组成特征 白的组成特征。
差异。氨基酸组成结果表明, ICF 与 PSC 符合胶原蛋

表 1 海蜇伞部组织、ICF、PSC 及牛跟腱胶原氨基酸分析 (残基数/1000 残基)

Table 1 Amino acid composition, ICF, PSC, and bovine Achilles collagen (residues/1000 residues) of *Rhopilema esculentum umbrella*

氨基酸	含量/%			
	PSC	ICF	海蜇伞部组织	牛跟腱胶原
Asp	78.65±1.50 ^{ab}	77.12±1.80 ^b	82.10±3.01 ^a	47.52±1.84 ^c
Glu	103.48±2.00 ^a	102.44±1.97 ^a	106.34±3.42 ^a	76.56±3.29 ^b
Hyp	53.16±1.00 ^b	55.66±1.12 ^b	41.22±1.66 ^c	89.62±3.92 ^a
Ser	46.26±0.93 ^a	46.93±0.70 ^a	45.93±1.91 ^a	34.68±0.48 ^b
Arg	56.56±0.84 ^a	57.38±1.06 ^a	52.44±1.08 ^b	53.12±1.27 ^b
Gly	350.63±6.52 ^a	356.34±6.43 ^a	287.19±9.14 ^b	344.90±8.85 ^a
Thr	31.67±0.63 ^b	29.53±0.79 ^c	45.43±1.82 ^a	17.12±0.76 ^d
Pro	74.33±3.83 ^b	69.90±2.72 ^b	75.38±4.22 ^b	114.33±13.00 ^a
Ala	84.13±1.72 ^a	82.79±1.35 ^a	89.73±3.90 ^a	89.09±10.30 ^a
Val	26.20±0.80 ^b	25.23±0.44 ^b	43.65±1.33 ^a	25.71±0.89 ^b
Met	2.58±0.84 ^b	4.89±0.38 ^b	8.17±2.33 ^a	5.20±0.76 ^b
Ile	20.76±0.47 ^b	19.46±2.22 ^b	24.23±0.84 ^a	13.66±0.80 ^c
Leu	33.52±1.15 ^b	32.30±1.41 ^b	36.06±1.22 ^a	29.90±1.08 ^c
Phe	9.25±0.47 ^b	8.54±0.18 ^b	13.82±0.91 ^a	14.38±0.42 ^a
His	3.18±1.83 ^b	2.67±0.11 ^b	5.94±1.05 ^a	5.18±0.40 ^a
Lys	33.26±1.77 ^a	22.72±1.00 ^a	30.28±2.50 ^a	33.79±1.66 ^a
Tyr	5.31±0.74 ^b	6.09±0.66 ^b	8.18±1.01 ^a	5.23±0.55 ^b
总计	1000	1000	1000	1000

注: 海蜇伞为海蜇伞部冻干粉; 不同字母代表具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.3 紫外-可见吸收光谱

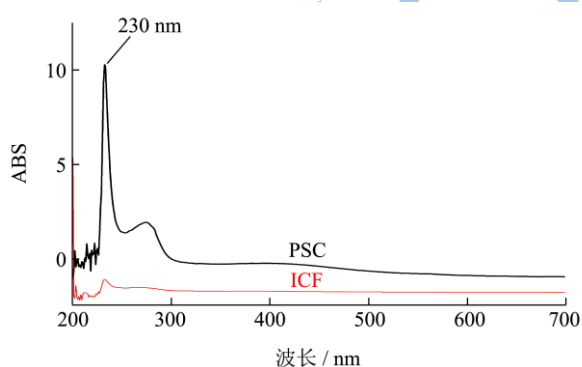


图 1 海蜇伞部 ICF 和 PSC 的紫外吸收图谱

Fig.1 UV absorption spectra of ICF and PSC

组成胶原的 20 多种氨基酸, 在可见光区域都没有光吸收, 但在远紫外区(< 220 nm)均有光吸收。部分氨基酸残基侧链能够吸收一定波长的紫外线, 其紫外吸收光谱实际上是各种紫外生色基团加和的结果。ICF 与 PSC 配制成 1 mg/mL 的溶液在 200~400 nm 的紫外-可见光区进行扫描, 由图 1 所示, ICF 与 PSC 的最大吸收波长约为 230 nm 附近, 此处吸收峰主要是

由肽键 C=O 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所致^[10]。由于 ICF 此处峰值较低, 表明 ICF 溶解性较 PSC 差, 只有少部分未交联或未成熟的胶原片段被乙酸溶液解离下来。

2.4 SDS-PAGE 电泳分析

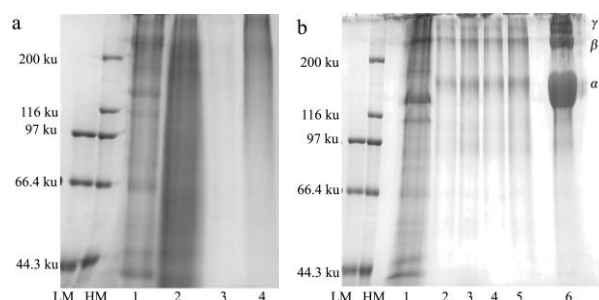


图 2 不溶性胶原纤维及胶原蛋白电泳图谱

Fig.2 SDS-PAGE images of ICF and PSC

注: a: 1.原料 2.碱处理后上清 3.Tris-HCl 处理后上清 4.水处理后上清, b: 1.原料 2.碱处理后沉淀 3.Tris-HCl 处理后沉淀 4.水处理后沉淀 5.不溶性胶原纤维 6.酶促溶性胶原蛋白, LM: 预混小分子蛋白标记 HM: 预混大分子蛋白标记。

分别将 ICF 与 PSC 制备过程中, 水提、碱处理、Tris-HCl 处理后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分

析。结果表明,在提取过程中,碱处理离心后能够在上清液中除去大量杂蛋白(图 2a),且经过 Tris-HCl 缓冲液处理后离心,上清液中未有新的杂蛋白溶出(图 2a)。并且发现经过较长时间的 Tris-HCl 处理,能够使 ICF 的网状空间结构会变得更加松弛,有利于胃蛋白酶的水解,进而提高 PSC 的提取效率。经胃蛋白酶处理后 PSC 在 SDS-PAGE 电泳上出现了明显的三个条带,每条胶原 α 链的相对分子质量约为 130 ku,两条 α 链聚集形成了 β 链,三条 α 链聚集形成 γ 链(图 2b),且无小分子蛋白条带,与庄永亮等^[9]结论相似,表明提取出来的 ICF 及 PSC 纯度较高。

2.5 热变性温度测定

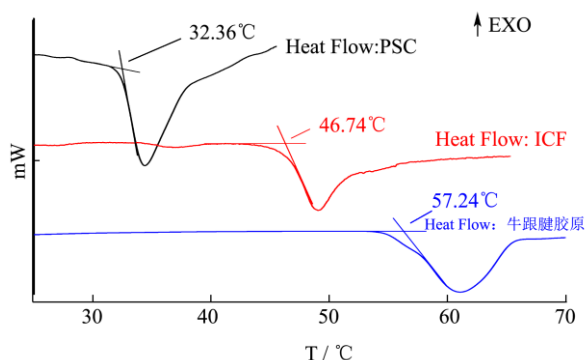


图3 海蜇伞部 ICF、PSC 及牛跟腱胶原的 μ -DSC 结果

Fig.3 μ -DSC results of ICF, PSC, and bovine Achilles collagen

完整的胶原蛋白是由 3 条多肽链相互缠绕形成,在受热过程中,氢键发生断裂,导致胶原分子解缠绕,天然构象被破坏,这一变化过程会一直伴随着能量的变化。采用 μ -DSC 仪对海蜇伞部 ICF 和 PSC 的变性温度 (T_d) 进行测定。如图 3 所示,ICF 的变性温度为 46.74 $^{\circ}\text{C}$,PSC 的变性温度为 32.36 $^{\circ}\text{C}$,牛跟腱胶原的变性温度则为 57.24 $^{\circ}\text{C}$ 。由于亚氨基酸的吡咯环可以固化二级结构,由羟脯氨酸的羟基所形成的氢键可以稳定胶原的螺旋结构,因而胶原蛋白中总亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)的含量越高,其热稳定性越好。结合氨基酸分析结果,牛跟腱胶原的脯氨酸及羟脯氨酸含量明显高于 ICF 和 PSC 中两种氨基酸含量,因而具有较强的热稳定性。ICF 与 PSC 总亚氨基酸含量无明显差别,由 3 条 α 多肽链组成三股螺旋结构的 PSC,通过赖氨酸侧链基团的氧化交联头尾相连形成胶原原纤维,胶原原纤维与蛋白聚糖相结合形成 ICF。因而 ICF 与 PSC 相比,具有更强的热稳定性。

2.6 红外光谱分析

应用傅里叶红外光谱 (FT-IR) 仪对海蜇伞部 ICF 与 PSC 进行 KBr 压片考察其红外光谱图,结果如图 4

所示,二者的图谱大致相同并符合胶原蛋白红外图谱特点。图中 3305 cm^{-1} 处的吸收峰是酰胺 A 带的 $\nu\text{N-H}$ 伸缩(氢键),3082 cm^{-1} 附近的吸收峰是酰胺 B 带的 $\nu\text{N-H}$ 伸缩,1658 cm^{-1} 主要为酰胺 I 带中 C=O 伸缩振动和 N-H 弯曲振动,1559 cm^{-1} 处吸收对应的是酰胺 II 带 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动,酰胺 III (1242 cm^{-1}) 主要为 N-H 官能团弯曲振动^[11],ICF 与 PSC 的红外吸收光谱较为相近。

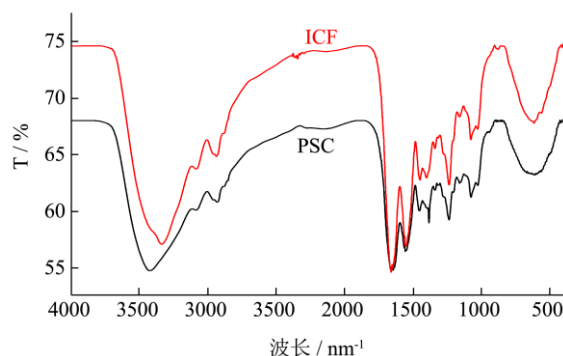


图4 海蜇伞部 ICF 和 PSC 的红外光谱图

Fig.4 FT-IR spectra of ICF and PSC from the umbrella of jellyfish

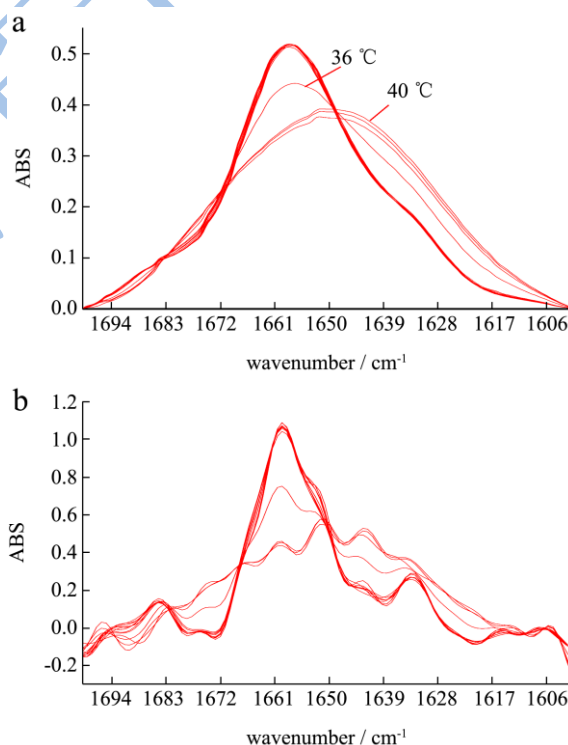


图5 海蜇 PSC 在连续升温过程中红外光谱酰胺 I 带变化趋势图

Fig.5 Infrared spectra of the amide I band of PSC in a continuous heating process

注: a: original spectrum of PSC; b: fourier selfdeconvolution of PSC.

海蜇胶原蛋白属于 I 型胶原蛋白,其主要是由 3 条 α 链组成。胶原蛋白红外谱图中酰胺 I 带处的变化

可以很好地表现其二级结构中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规则卷曲及其特征结构-三螺旋结构的变化情况。由于 H_2O 溶液在酰胺 I 带 ($1700\text{ cm}^{-1}\sim 1600\text{ cm}^{-1}$) 有较强吸收峰, 而 D_2O 溶液对酰胺 I 带影响较小, 因此通过考察 D_2O 中 PSC 红外图谱酰胺 I 带的变化, 进而推测在加热过程中胶原蛋白分子各二级结构的转变情况。

由多个氨基酸残基重叠所形成的海蜇胶原特征结构酰胺 I 带为宽峰, 所处峰值为 1656 cm^{-1} , 图 5 中显示了 PSC 酰胺 I 带 ($1700\text{ cm}^{-1}\sim 1600\text{ cm}^{-1}$) 在加热升温过程的变化趋势。图中酰胺 I 带的红外吸收随加热温度的增大先是基本稳定不变, 当温度高至 36°C 时, 吸收骤然降低, 其中在 1665 cm^{-1} 及 1655 cm^{-1} 处降低最为剧烈, 即 β -转角与 α -螺旋结构, 而在 1676 cm^{-1} 及 1645 cm^{-1} 处吸收却出现明显的升高, 推测 β -折叠、无规则卷曲结构增多。当温度高至 40°C 时, 红外吸收变得更加平缓且发生明显红移, 因此推测随着温度的升高, PSC 的酰胺 I 带结构遭到破坏, 并且可能发生 β -转角与 α -螺旋转化为 β -折叠与无规则卷曲结构。

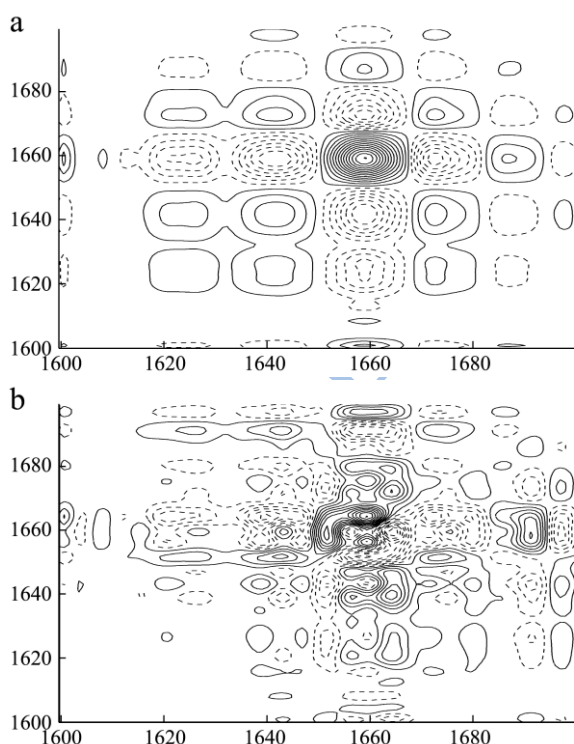


图 6 连续加热过程中海蜇 PSC 的 2D 红外光谱谱图

Fig.6 2D-infrared spectroscopy spectra of PSC during continuous heating

注: 波数范围: $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$; 实线为正, 虚线为负;

a: 升温过程 ($5\sim 50^\circ\text{C}$) 同步相关谱图; b: 升温过程 ($5\sim 50^\circ\text{C}$) 异步相关谱图。

二维相关红外光谱法能够体现海蜇伞部胶原蛋白热处理过程中引起的细微特征的光谱变化。分辨率提

高后的二维光谱能够区分出在一维光谱上被覆盖的小峰和弱峰, 且简化含有许多重叠峰的复杂光谱。通过选择相应波段的光谱信号对同步交叉峰和异步交叉峰进行仔细分析, 可以判断出各个基团相对于特定外扰的一个运动次序, 鉴别和研究分子内和分子间的相互作用。根据海蜇 PSC 连续升温过程 ($5\sim 50^\circ\text{C}$) 以温度为维度绘制的 2D 谱图如图 6 所示。其中图 6-a 为 PSC 升温同步相关谱图, 图 6-b 为 PSC 升温异步相关谱图。

表 2 海蜇 PSC 升温过程 2D 红外图谱读图结果

Table 2 2D-IR spectral results of PSC during the heating process

		β -Turn 1687 cm^{-1}	β -sheet 1673 cm^{-1}	β -Turn 1659 cm^{-1}	3_{10} -Helix 1642 cm^{-1}
β -sheet	1624 cm^{-1}	+ - ←	- + ←	+ - ←	+ + →
3_{10} -Helix	1642 cm^{-1}	+ - ←	- + ←	+ - ←	
β -Turn	1659 cm^{-1}	- + ←	+ - ←		
β -sheet	1673 cm^{-1}	+ - ←			

注: 表中数据区域的每一个格中, 第一个值为异步相关峰判断值 Ψ , 第二个值为同步相关峰判断值 Φ ; “-”表示负值, “+”表示正值, “→”表示横坐标波数先于纵坐标波数变化(即 $v_1 > v_2$), “←”表示横坐标波数后于纵坐标波数变化(即 $v_2 > v_1$)。

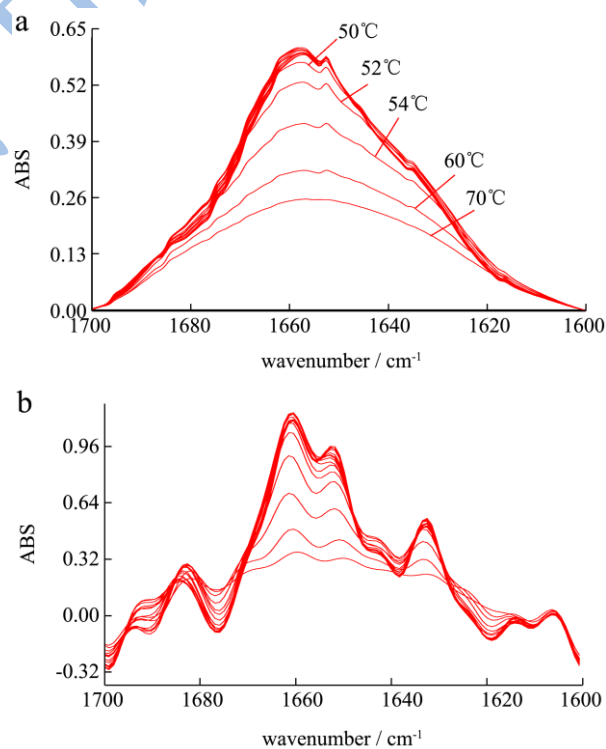


图 7 海蜇 ICF 在连续升温过程中红外光谱酰胺 I 带变化趋势图

Fig.7 Infrared spectra of the Amide I band of ICF during continuous heating

注: a: ICF 红外光谱酰胺 I 带原始光谱 b: 经过去卷积的 ICF 红外光谱酰胺 I 带。

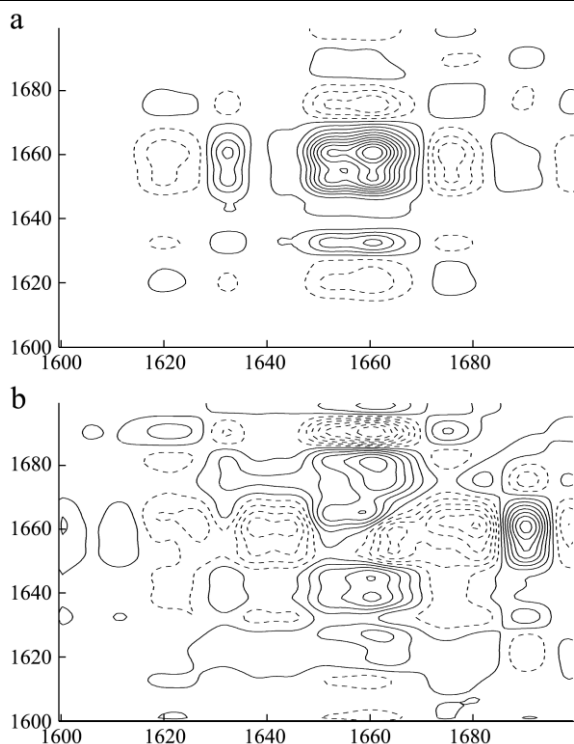


图 8 连续加热过程中海蜇 ICF 的 2D 红外光谱谱图
Fig 8 2D-infrared spectroscopy spectra of ICF during continuous heating

注：波数范围：1700~1600 cm⁻¹；实线为正，虚线为负，
a: 升温过程(5~70 °C)同步相关谱图；b: 升温过程(5~70 °C)

表 3 海蜇 ICF 升温过程 2D 红外谱图读图结果

Table 3 2D-IR spectral results of ICF during the heating process

		β -Turn	β -sheet	β -Turn	α -Helix	β -sheet
		1690 cm ⁻¹	1676 cm ⁻¹	1661 cm ⁻¹	1652 cm ⁻¹	1632 cm ⁻¹
β -sheet	1620 cm ⁻¹	+ - ←	- + ←	- - →	- - →	- - →
β -sheet	1632 cm ⁻¹	- + ←	+ - ←	- + ←	- + ←	
α -Helix	1652 cm ⁻¹	- + ←	+ - ←	+ + →		
β -Turn	1661 cm ⁻¹	- + ←	+ - ←			
β -sheet	1676 cm ⁻¹	+ - ←				

注：表中数据区域的每一个格中，第一个值为异步相关峰判断值 Ψ ，第二个值为同步相关峰判断值 Φ ；“-”表示负值，“+”表示正值，“→”表示纵坐标波数先于横坐标波数变化（即 $\nu_1 > \nu_2$ ），“←”表示横坐标波数先于纵坐标波数变化（即 $\nu_2 > \nu_1$ ）。

图 8-a 为 ICF 升温同步相关谱图，存在六个自动峰，分别位于 1620 cm⁻¹、1632 cm⁻¹、1652 cm⁻¹、1661 cm⁻¹、1676 cm⁻¹ 和 1690 cm⁻¹。这六个峰分别代表了 β -折叠（低频率）、 β -折叠（低频率）、 α -螺旋、 β -转角（低频率）、 β -折叠（高频率）和 β -转角（高频率）。其中 1652 cm⁻¹、1661 cm⁻¹ 处响应值最为强烈，推测 ICF 中， α -螺旋、 β -转角（低频率）结构对温度变化较为敏感。除此之外，还存在若干交叉峰，表明各个结构之间可能存在着分子内和分子间的相互作用。结合 Noda^[12] 读谱规则制得表 3，发现在 ICF 升温过程中各二级结

异步相关谱图。

同步图中，存在五个自动峰，分别位于 1624 cm⁻¹、1642 cm⁻¹、1659 cm⁻¹、1673 cm⁻¹ 和 1687 cm⁻¹。这五个峰分别代表了 β -折叠（低频率）、 3_{10} -螺旋、 β -转角（低频率）、 β -折叠（高频率）、 β -转角（高频率）结构。其中 1642 cm⁻¹、1659 cm⁻¹、1673 cm⁻¹ 处响应值最为强烈，推测 PSC 中， 3_{10} -螺旋、 β -转角（低频率）、 β -折叠（高频率）这三种结构对温度变化较为敏感。除此之外，还存在若干交叉峰，表明各个结构之间可能存在着分子内和分子间的相互作用。结合 Noda^[12] 读谱规则制得表 2，发现在 PSC 升温过程中各二级结构的变化先后顺序为： β -转角（高频率）< β -折叠（高频率）< β -转角（低频率）< β -折叠（低频率）< 3_{10} -螺旋。

海蜇 ICF 根据连续升温过程(5~70 °C)如图 7 所示，酰胺 I 带的红外吸收随加热温度的增大先是基本稳定不变，当温度高至 50 °C 时，吸收开始略有变化，并且随着温度的继续升高这种变化越剧烈，并且同样在 1665 cm⁻¹ 及 1655 cm⁻¹ 处吸收降低最为剧烈，即 β -转角与 α -螺旋结构，而 1624 cm⁻¹ 处，即 β -折叠则有略微的升高。但在温度高至 70 °C 的过程中红外吸收峰除了变得更加平缓外并未发生峰型偏移，因此推测随着温度的升高，ICF 的酰胺 I 带结构遭到破坏，但 ICF 的热稳定性要强于 PSC，在此过程中 PSC 的关键可能发生了不同程度的断裂和重组^[13]。

构的变化先后顺序为： β -转角（高频率）< β -折叠（高频率）< β -折叠（低频率）< α -螺旋< β -转角（低频率）< β -折叠（低频率）。Saguer^[4,14] 在对猪血浆、血清、血清白蛋白和血红蛋白组分等相似原料的研究中发现，相似原料间的差异及不同 pH 条件均对热处理过程中二级结构变化的先后顺序产生影响。其中 α -螺旋结构、 β -转角、 β -折叠等结构均可能发生最先变化。海蜇 ICF 由胶原原纤维与蛋白聚糖相结合形成，因而 PSC 与 ICF 在热处理过程中二级结构变化存在一定差异。相比于 PSC，ICF 稳定性较好，热处理过程中 α -螺旋结

尚未发生最先变化。又由于基本组成结构相同, PSC 与 ICF 二级结构变化亦呈现一定的规律性, β -转角(高频率)与 β -折叠(高频率)结构稳定性相对较好。

3 结论

3.1 通过新的方法提取得到的不溶性胶原纤维(ICF)及酶促溶性胶原蛋白(PSC)均保持着较为完整的胶原三螺旋结构。海蜇伞部ICF及PSC中,甘氨酸含量最高,约占1/3; SDS-PAGE、FT-IR图谱及紫外光谱图证明两者拥有特殊的三螺旋结构。ICF的变性温度(Td)远大于PSC,这与各自的二级结构组成有直接的关系。

3.2 海蜇伞部 ICF 及 PSC 热变性过程存在差异,在加热至 36℃时, PSC 峰高骤然变低,结构即发生明显变化,而 ICF 温度高至 50℃时,红外吸收强度才开始略有变化,随着温度的继续升高这种变化变得剧烈。对比热处理过程中 PSC 和 ICF 二级结构变化, β -转角(高频率)与 β -折叠(高频率)结构稳定性相对较好, PSC 中 3_{10} -螺旋结构对温度变化最为敏感, ICF 中低频率 β -折叠、 β -转角及 α -螺旋结构热稳定性较差。除自动峰外, PSC 与 ICF 均存在若干交叉峰,表明热处理过程中各个结构之间存在着分子内和分子间的相互作用。

参考文献

- [1] 单继航.影响即食海蜇品质因素的研究[D].无锡:江南大学,2010
SHAN Ji-hang. Research of the factors that affecting the qualities of jellyfish [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010
- [2] Xuezheng Wang, Huiliang Wang, et al. Jellyfish gel and its hybrid hydrogels with high mechanical strength [J]. The Royal Society of Chemistry, 2011, 211(7): 211-219
- [3] 周倩, 罗志刚, 何小维. 胶原蛋白的应用研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(3): 286-290
ZHOU Qian, LUO Zhi-gang, HE Xiao-wei. Progress of collagen application [J]. Modern Food Science & Technology, 2008, 24(3): 286-290
- [4] Saguer E, P Alvarez, J Sedman. Heat-induced gel formation of plasma proteins: New insights by FT-IR 2D correlation spectroscopy [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 874-879
- [5] Popescu M C, C Vasile, O Craciunescu. Structural analysis of some soluble elastins by means of FT - IR and 2D IR correlation spectroscopy [J]. Biopolymers, 2010, 93(12): 1072- 1084
- [6] Bryan M A, J W Brauner, G Anderle, et al. FT-IR studies of collagen model peptides: Complementary experimental and simulation approaches to conformation and unfolding [J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(25): 7877- 7884
- [7] Petibois C, G Gouspillou, K Wehbe, et al. Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. 386(7-8): 1961-1966
- [8] Brodsky B. Triple-helical peptides: an approach to collagen conformation, stability, and self-association [J]. Biopolymers, 2008, 89(5): 345-353
- [9] 庄永亮.海蜇胶原蛋白理化性质及其胶原肽的护肤活性研究[D].青岛:中国海洋大学,2009
ZHUANG Yong-liang. Study on the biochemical characterization of collagen and skin-care activity of collagen peptides extracted from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009
- [10] Trotter J A, T J Koob. Biochemical characterization of fibrillar collagen from the mutable spine ligament of the sea-urchin *Eucidaris tribuloides* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1994. 107(1): 125-134
- [11] 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: 879-887
- [12] Noda I, Chapter 13 - Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy, in *Frontiers of Molecular Spectroscopy*, J. Laane, Editor 2009, Elsevier: Amsterdam. 367-381
- [13] Cruzeiro L, H Freedman. The temperature dependent amide I band of crystalline acetanilide [J]. Physics Letters A, 2013. 377(25): 1593-1596
- [14] Saguer E, Alvarez P A, Sedman J, et al. Study of the denaturation/aggregation behaviour of whole porcine plasma and its protein fractions during heating under acidic pH by variable-temperature FT-IR spectroscopy [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 33(2): 402-414