

海参胶原蛋白的提取及其理化性质

罗臻, 黄静敏, 陈血建, 赖心田, 兰全学, 杨国武* (深圳市计量质量检测研究院, 广东深圳 518000)

摘要 胶原蛋白(PSC)是海参蛋白的主要组成, 研究其理化性质为海参的进一步利用提供理论基础。以格皮氏海参为原料, 采用胃蛋白酶促溶法提取海参胶原蛋白, 并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳、氨基酸分析以及傅立叶红外光谱对其理化性质进行研究。结果表明, 海参胶原蛋白分子组成为 $(\alpha_1)_3$, α_1 的分子量约为150 kD; 氨基酸组成以甘氨酸含量最高(6.01%), 脯氨酸与羟脯氨酸含量为6.14%, 符合水产胶原蛋白特征; 傅立叶红外光谱分析结果表明其保持三螺旋结构。

关键词 胶原蛋白; 海参; 提取; 理化性质

中图分类号 S986.1; O657.7⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)03-145-02

Extraction and Physico-chemical Properties of Pepsin-solubilized Collagen from Sea Cucumber

LUO Zhen, HUANG Jing-min, CHEN Xue-jian, YANG Guo-wu* et al (Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen, Guangdong 518000)

Abstract Pepsin-solubilized collagen (PSC) is the main component of sea cucumber protein, and the study of its physico-chemical properties will provide theoretical basis for taking better advantage of sea cucumber. PSC was extracted by pepsin-solution method from sea cucumber (*Pearsonothuria graeffei*) and analyzed through SDS-PAGE, amino acid composition analysis and FT-IR. The results of SDS-PAGE suggested the structure of PSC Was $(\alpha_1)_3$ and the molecular weight of α_1 chain was about 150 kD. Amino acid composition analysis showed that the content of glycine was high(6.01%), and the level of proline and hydroxyproline was 6.14%, in accordance with the aquatic collagen characteristics. FT-IR spectrogram indicated the existence of triplehelix structure.

Key words Collagen; Sea cucumber; Extraction; Physicochemical property

海参属于无脊椎棘皮动物们, 具有较高的营养价值与药学价值, 是我国重要的食药两用保健品^[1]。海参体内含有蛋白质、脂肪、维生素、多种微量元素、胶质、海参、海参皂甙和酸性粘多糖等成分, 但不含有胆固醇^[2]。胶原蛋白是海参蛋白的主体, 是海参体内含量最为丰富的一种生物活性成分。由多糖蛋白分子组成的独特结构使胶原蛋白具有合成高分子所无可比拟的生物相容性、生物降解性和低抗原性, 具有一系列重要的生物学功能^[3]。胶原蛋白的提取方法有很多, 其基本原理都是根据胶原蛋白的特性来改变蛋白质所在的外界环境, 从其他蛋白质中分离出来, 在实际提取过程中不同方法往往相互结合^[4]。笔者以海参为原料, 通过酸、酶结合法提取胶原蛋白, 使海参资源得以合理开发与利用, 从而利于提高其加工的综合效益及经济附加值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 格皮氏干海参; 胃蛋白酶(Sigama公司); 醋酸、氢氧化钠(分析纯, 天津市红岩化学试剂厂); 磷酸氢二钠(分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 氯化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); EDTA、TRIS(分析纯, 深圳新拓生物科技有限责任公司); β -巯基乙醇(北京鼎国生物技术有限责任公司); 十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵(Biosharp 生物科技有限责任公司); 甘氨酸(美国 Amresco 公司); 30% 丙烯酰胺(美国 Biorad 公司)。

1.2 试剂配制 配制含0.5 mol/L NaCl、50 mmol/L EDTA、0.2 mol/L β -巯基乙醇、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 的海参提取液1 000 ml 待用。

1.3 仪器 GL 加热磁力搅拌器(海门市其林贝尔仪器制造

有限公司); T25 高速组织捣碎机(德国 IKA 公司); pH 计、高速冷冻离心机(Beckman Coulter 公司); U410 超低温冷冻贮存箱(B 德国 Eppendorf 公司); BT 224S 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); ALPHA 1-2 真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司); SDS-PAGE 电泳仪(美国 Biorad 公司)。

1.4 试验方法

1.4.1 胶原蛋白的提取^[5]。将去除内脏的海参原材料粉碎后, 称取100 g 组织碎片, 加入1 000 ml 提取液浸泡, 置于4℃中搅拌72 h, 纱布过滤后取滤液离心(7 500 g, 30 min), 将沉淀物用双蒸水洗至中性, 置于冷冻干燥机中进行冷冻干燥; 称取1 g 干燥物, 加入1 000 ml 0.1 mol/L NaOH 浸泡, 4℃搅拌24 h, 离心(7 500 g, 30 min)后沉淀水洗至中性, 冻干; 重悬浮于500 ml 0.5 mol/L 乙酸中, 按干重比100:6加入胃蛋白酶充分搅拌, 4℃下提取48 h 后离心(7 500 g, 1 h), 取上清液加入NaCl 至终浓度为0.8 mol/L 进行盐析, 离心(9 000 g, 1 h), 沉淀重悬浮于0.5 mol/L 乙酸, 于0.02 mol/L 磷酸氢二钠(pH 8.0)中透析48 h, 每隔3 h 更换透析液, 离心后取沉淀再溶于0.5 mol/L 乙酸, 在0.1 mol/L 乙酸中透析48 h, 冷冻干燥即得胃蛋白酶促溶胶原蛋白制品(PSC)。

1.4.2 SDS-PAGE 分析。采用SDS-PAGE 垂直电泳, 分离胶浓度为10%, 浓缩胶浓度为5%, Tris-甘氨酸缓冲系统。电泳缓冲液为Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3, 含0.1% SDS), 4×样品缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 20% 甘油, 4% SDS、200 mmol/L β -巯基乙醇、0.2% 溴酚蓝), 染色液为0.1%的考马斯亮蓝 R250-甲醇-冰醋酸(9:9:2, V/V/V); 脱色液为水-甲醇-冰醋酸(8:1:1, V/V/V)。取PSC 1 mg 溶于0.5 mol/L 的醋酸溶液中, 调节pH 为中性, 加入样品缓冲液, 沸水浴煮沸5 min, 5 000 r/min 离心5 min 取20 μ l 上样。采用直流恒压电源, 电压为100 V, 凝胶成像系统分析^[6-7]。

作者简介 罗臻(1988-), 男, 广东清远人, 硕士研究生, 研究方向: 应用微生物。* 通讯作者, 高级工程师, 从事生物化学方面的研究。

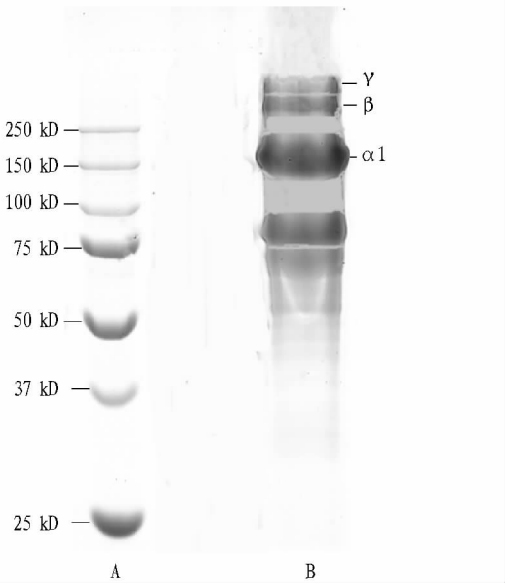
收稿日期 2014-11-20

1.4.3 氨基酸分析。参照 GB/T5009.124-2003 的方法,精确称取 10 mgPSC,使用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪对其主要氨基酸组成进行分析。

1.4.4 红外光谱分析。利用胶原蛋白肽键中分子结构与红外吸收带的波长位置与吸收谱带的吸收强度相对应的特点,采用傅立叶变换红外光谱对冻干的胶原蛋白进行投射扫描。参照 GB/T6040-2002 的方法,在红外灯照射下将适量样品和 KBr 混匀研成粉末状。取样品压片,将样品放入样品室。用傅立叶变换红外光谱仪在 400~4 000 cm⁻¹ 区间扫描,分辨率设置为 2 cm⁻¹。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 电泳分析 从图 1 可以看出,提取的 PSC 的电泳图由 α、β、γ 3 条链组成,与文献报道的结果一致^[8]。α₁ 链的分子量约为 150 kD,未见 α₂ 链,因此 PSC 分子组成可能为(α₁)₃。β、γ 链的分子量在 250 kD 以上。



注:A.次高分子量标准;B.海参PSC。

图1 海参胶原蛋白的SDS-PAGE电泳图谱

2.2 氨基酸分析 由表 1 可知,PSC 所含氨基酸种类齐全,具有典型胶原蛋白的组成。氨基酸总量达 PSC 的 33.07%。其中,必需氨基酸总量达 PSC 的 5.29%,占氨基酸总量的 16%;鲜味氨基酸总量达 PSC 的 19.04%;药效氨基酸总量达 PSC 的 17.69%,结果表明海参胶原在医学和营养学上具有一定的营养价值。在氨基酸中 Gly 含量最高,约占氨基酸总量的 1/5;Glu、Ala、Pro 和 Asp 含量较高,而 Met、Tyr 和 Val 含量较低,但未检测到 Trp 和 Cys。PSC 的亚氨基酸(脯氨酸+羟脯氨酸)含量为 6.14%,羟脯氨酸与脯氨酸之比约为 0.8,二者符合水产胶原蛋白的特征^[9]。氨基酸的这种组成形式,表明胶原蛋白为海参蛋白的主要组成成分。

Hyp 是胶原蛋白的特征氨基酸,一般通过测定其含量可确定胶原蛋白的含量^[10]。从表 1 可以看出,提取的 PSC 中 Hyp 含量较低,这可能是由于海参皮中含有较多即原纤维蛋白和肌浆蛋白,且大部分为碱性蛋白^[4]。由于酶法提取破坏了胶原蛋白的空间结构,提高了胶原蛋白得率的同时也造成

了肌原纤维蛋白和肌浆蛋白的溶出,影响了所提取的胶原蛋白的纯度。此外,由于胃蛋白酶和酸溶液的影响,在提取过程中可能造成胶原蛋白分子一定程度上的降解。

表1 PSC的氨基酸组成

胶原蛋白		胶原蛋白	
氨基酸种类	含量//%	氨基酸种类	含量//%
天冬氨酸 Asp ^{2,3}	2.86	苯丙氨酸 Phe ^{1,3}	0.64
苏氨酸 Thr ¹	1.65	赖氨酸 Lys ^{1,3}	0.99
丝氨酸 Ser	1.17	组氨酸 His	1.28
谷氨酸 Glu ^{2,3}	4.51	精氨酸 Arg ^{2,3}	2.49
甘氨酸 Gly ^{2,3}	6.01	脯氨酸 Pro	3.31
丙氨酸 Ala ²	3.17	羟脯氨酸 Hyp	2.83
缬氨酸 Val ¹	0.79	必需氨基酸总量	5.29
蛋氨酸 Met ^{1,3}	0.04	鲜味氨基酸	19.04
异亮氨酸 Ile ¹	0.44	药效氨基酸总量	17.69
亮氨酸 Leu ¹	0.74	氨基酸总量	33.07
酪氨酸 Tyr ³	0.15		

注:1.必需氨基酸;2.鲜味氨基酸;3.药效氨基酸。

2.3 红外光谱分析 从图 2 可以看出,PSC 的酰胺 A 吸收峰为 3 464 cm⁻¹,酰胺 B 吸收峰在 2 924 cm⁻¹,酰胺 I 带的吸收峰为 1 647 cm⁻¹。酰胺 I 带的特征吸收波数通常在 1 630~1 680 cm⁻¹,是由蛋白质多肽骨架的 C=O 伸缩振动产生,为蛋白质二级结构变化的敏感区,常被用于蛋白质的二级结构分析^[11]。该研究中提取的 PSC 符合酰胺 I 带的出峰位置。胶原蛋白酰胺 II 带的吸收在 1 500~1 600 cm⁻¹,该研究中 PSC 酰胺 II 带的吸收频率为 1 552 cm⁻¹。PSC 在 1 212 cm⁻¹(酰胺 III 带)和 1 458 cm⁻¹均有吸收,表明海参胶原蛋白的螺旋结构保持较好^[12]。红外谱图分析结果表明在提取过程中胃蛋白酶仅水解胶原的非螺旋区,对螺旋区没有破坏。

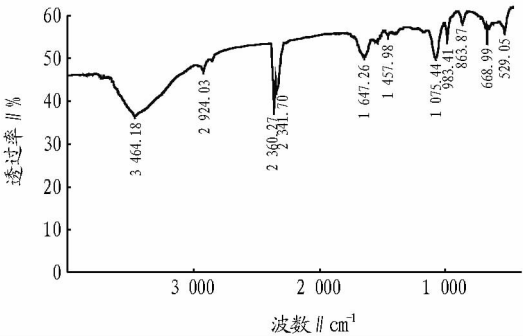


图2 PSC的红外扫描图谱

3 小结

从海参中提取胶原蛋白及其水解物的方法有酸法、碱法、酶法、酸与酶的结合、碱与酶的结合。酸解法通常需要 0.1 mol/L 醋酸长时间浸泡,溶解量少,与胃蛋白酶联合使用,能提高溶解量,且蛋白酶水解胶原作用条件温和,所需设备简单,反应速率快,提取的水解胶原蛋白纯度高,水溶性好,理化性质稳定,所以该试验用碱-酶结合法提取蛋白质。

经胃蛋白酶消化法从海参中提取胶原蛋白,通过 SDS-PAGE 电泳分析、氨基酸分析和红外谱图分析,所提取物为胶原蛋白,与文献报道相一致。

(下转第 150 页)

表 10 形态性状对壳重的决定系数

形态性状	SH	SW
SH	0.464	0.222
SW		0.085

注:对角线上为单一性状自身的决定系数,对角线上方为这一性状通过另一性状对壳重的间接决定系数。

2.5.3 对软体重决定系数的分析。从表 11 可以看出,决定系数总和为 0.625,与多元回归方程的 R^2 数值相等,说明这 3 个形态性状均是影响软体重的主要性状。就直接决定系数而言,从大到小依次为壳高(0.178) > 壳宽(0.080) > CD 距离(0.055);就间接决定系数而言,壳宽通过壳高的间接决定系数最大,为 0.132。如果从形态性状对东极厚壳贻贝软体重进行选育时,在优先考虑壳高的同时应注意壳宽进行协同选择将取得更高的收益。

表 11 形态性状对软体重的决定系数

形态性状	SH	SW	CD
SH	0.178	0.132	0.111
SW		0.080	0.070
CD			0.055

注:对角线上为单一性状自身的决定系数,对角线上方为这一性状通过另一性状对软体重的间接决定系数。

3 讨论

3.1 影响东极养殖区厚壳贻贝主要形态性状的确定 相关分析、多元回归分析、通径分析以及决定系数分析表明,所测量的形态性状均与重量性状(总体重、壳重和软体重)均达到显著相关($P < 0.05$),壳高、壳宽均是这 3 个重量性状的共同影响因子,并且壳高的影响都是最主要的,壳宽通过壳高的间接决定系数也都达到最高。因此,可以为东极养殖区的厚壳贻贝的人工选育可供了理论参考,以壳高为选择目标,并且重视对壳宽的协同选择。

3.2 相关分析、多元回归分析以及通径分析在贝类形态性状研究中的应用 在贝类的选择育种中,总体重和软体重这

2 个产量性状一直良种选育中最直接的目标,也是经济价值的直接反映;壳重作为海洋碳汇中重要的碳泵,对于缓解全球变暖和保持地球生态环境和谐可持续发展具有重要意义。然而,这些重量性状尤其是软体重、壳重同形态性状相比时,具有不直观性,且操作难度较大。另外,贝类的重量性状与其形态性状之间均具有一定的相关性,可以少量的形态性状就可以对重量性状产生最主要的影响。因此,通过相关分析、多元回归分析以及通径分析可以分析出哪些形态性状对重量性状产生最重要、最具有决定性的作用,并且通过这些形态性状的选择就可以达到提高产量的目的。

参考文献

[1] 叶莹莹,徐海英,郭宝英,等.厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)4 个群体遗传多样性的 ISSR 分析[J].海洋与湖沼,2012,43(1):113-119.
[2] 刘慧,唐启升.国际海洋生物碳汇研究进展[J].中国水产科学,2011,18(3):695-702.
[3] 许冬兰.蓝色碳汇:海洋低碳经济新思路[J].中国渔业经济,2011,6(6):44-49.
[4] 殷建平,王友绍,徐继荣,等.海洋碳循环研究进展[J].生态学报,2006,26(2):566-575.
[5] 孙泽伟,郑怀平,杨彦鸿,等.近江牡蛎养殖群体数量性状间的相关及通径分析[J].中国农学通报,2010,26(6):332-336.
[6] 刘小林,常亚青,相建海,等.栉孔扇贝壳尺寸性状对活体重的影响效果分析[J].海洋与湖沼,2002,33(6):673-678.
[7] 刘文广,林坚士,何毛贤.不同贝龄华贵栉孔扇贝数量性状的通径分析[J].南方水产科学,2012,8(1):43-48.
[8] 郑怀平,孙泽伟,张涛,等.华贵栉孔扇贝 1 龄贝数量性状的相关性及通径分析[J].中国农学通报,2009,25(20):322-326.
[9] 李朝霞,王春德.海湾扇贝自交与杂交子代的生长比较和通径分析[J].中国农学通报,2009,36(8):282-285.
[10] 李建立,王春德,李朝霞,等.紫扇贝和海湾扇贝杂交家系的生长和通径分析[J].海洋科学,2012,25(8):15-20.
[11] 王雨,叶乐,陈旭,等.海南野生长肋日月贝形态性状与重量性状的通径分析[J].安徽农业科学,2009,37(8):3570-3572.
[12] 刘志刚,王辉,孙小真,等.马氏珠母贝经济性状对体重决定效应分析[J].广东海洋大学学报,2007,27(4):15-20.
[13] 高玮玮,袁媛,潘宝平,等.青蛤(*Cyclina sinensis*)贝壳形态性状对软体部重的影响分析[J].海洋与湖沼,2009,7(2):166-169.
[14] 李朝霞.紫石房蛤形态性状对体重的影响效果分析[J].中国农学通报,2009,25(5):279-282.
[15] 付英杰.两种养殖模式下枸杞岛紫贻贝的生长特征及其对水域水质的影响[D].舟山:浙江海洋学院,2014:31-32.

(上接第 146 页)

参考文献

[1] 刘昌衡,王小军,袁文鹏,等.复方海参口服液的抗疲劳和免疫功能的研究[J].现代食品科技,2009,25(10):1115-1119.
[2] 肖枫,曾名勇,董士远,等.海参胶原蛋白的研究进展[J].水产科学,2005(6):39-41.
[3] 毕琳.刺参(*Stichopus japonicus*)体壁胶原蛋白理化性质和生物活性研究[D].青岛:中国海洋大学,2006:12-13.
[4] 陶宇,李志皓,侯虎,等.不同方法提取沙海蜇皮胶原蛋白的对比分析[J].食品工业科技,2012,33(14):310-311.
[5] 叶继锋,陈秀美,戴伟伟,等.海参胶原蛋白的提取及其基本成分的分析[J].光谱实验室,2011,28(6):3195-3199.
[6] YAN M, LI B, ZHAO X, et al. Characterization of acid-soluble collagen

from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1581-1586.
[7] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
[8] 崔凤霞,薛长湖,李兆杰,等.仿刺参胶原蛋白的提取及理化性质[J].水产学报,2006,30(4):549-553.
[9] CUI F X, XUE C H, LI Z J, et al. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Food Chem, 2007, 100: 1120-1125.
[10] 蒋挺大.胶原与胶原蛋白[M].北京:化学工业出版社,2006.
[11] 侯虎,孙江,毛家楠,等.海参胶原纤维形态及胶原蛋白理化性质研究[J].现代食品科技,2013,29(7):1493-1494.
[12] 段蕊,张俊杰,陈玲,等.鲤鱼鱼皮和鱼骨酶溶性胶原蛋白的性质比较[J].食品与发酵工业,2008,34(5):10-13.