

多棘海盘车体壁胶原蛋白的研究

郝林华

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

李八方

(青岛海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘要 采用两种不同的方法从海盘车体壁中提取出酸溶性胶原蛋白(ASC)和胃蛋白酶促溶的胶原蛋白(PSC), 得率分别为10.90%、61.43%。将ASC、PSC的氨基酸组成、理化性质与脊椎动物及其它无脊椎动物胶原蛋白进行比较, 结果表明, ASC、PSC是典型的胶原蛋白。在此基础上对ASC、PSC进行了SDS-PAGE电泳, 进一步表明制品的纯度较高, 并且它们在分子大小、构型及性质上没有显著差异。

关键词 多棘海盘车, 体壁, 胶原蛋白

海星, 属海洋棘皮动物, 资源丰富, 种类繁多, 在我国有100多种。海星的体壁很厚, 韧性极强, 含有丰富的胶原蛋白^[1~2]。近年来对海星体壁胶原蛋白的应用研究, 获得了符合食用和药用标准的海星明胶和海星胶代血浆^[3~5]。国外对鱼类胶原蛋白的研究较深入^[6~8], 有关无脊椎动物胶原蛋白的研究也有不少报道^[9~11], 但尚未见关于海星胶原蛋白研究的报道。

多棘海盘车(*Asterias amurensis*)属海星纲的海盘车科, 是我国黄海沿岸一种极为普通的海星, 可食用。本文对其体壁胶原蛋白进行了探索性的研究, 从而为海星胶原蛋白的开发利用提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

透析袋(内径16 mm, 上海华美生化试剂公司)。胃蛋白酶(1:3 000比活力, 上海生化研究所)。SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)用试剂。新鲜多棘海盘车(简称海盘车, 由青岛海洋大学太平角养殖试验场提供)用水冲洗泥砂, 冷冻备用。

1.2 主要仪器与设备

HGJ型冷冻干燥器; LG10-3型高速冷冻离心机; WZZ-1型自动指示旋光仪。

恒温水槽(直径30 cm, 高40 cm, 附有电动搅拌器与电热装置); 乌式粘度计及聚丙烯酰胺垂直板型电泳装置。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理 将冷冻的海盘车浸泡于2%盐酸溶液中, 搅拌, 2 d后取出, 除去内脏, 再浸泡于同样酸液中, 搅拌, 隔日更换酸液1次, 约4~5次, 至海盘车体壁变软为止, 用清水漂洗至pH 4.0左右。将漂洗后的海盘车体壁浸泡于0.03%石灰水中, 搅拌, 隔日更换石灰水1次, 约4~5次, 再投入8%的NaOH溶液中, 搅动10 min(以不破碎为度), 用水冲洗至pH 7~8。然后用高速组织捣碎机捣碎匀浆, 于45℃下真空干燥。

1.3.2 胶原蛋白的提取 取经过上述处理的原料, 加10倍体积的0.5 mol/L乙酸-乙酸钠(1+1, v/v)溶液, 于5℃搅拌浸提2 d。10 000 r/min, 离心1 h。再用同样的溶媒重复提取2次, 合并上清液, 得酸溶性胶原蛋白(ASC)又称作可溶性胶原蛋白粗制液。将沉淀悬浮于0.1 mol/L乙酸溶液中, 加入质量分数为1%的胃蛋白酶(pepsin), 于17~18℃搅拌、消化2 d。10 000 r/min离心1 h。沉淀再重复操作2次, 合并上清液, 得胃蛋白酶促溶的胶原蛋白(PSC)又称作不溶性胶原蛋白粗制液。

1.3.3 胶原蛋白的纯化 将ASC和PSC粗制液分别注入透析袋, 于5℃下对0.02 mol/L的

收稿日期: 1997-05-19

Na_2HPO_4 溶液透析,透析时内外液均应不时搅动,每隔 6 h 换 1 次溶液,透析 3 d。透析液 10 000 r/min 离心 20 min。所得沉淀再用 0.1 mol/L 乙酸溶液洗 2 遍,冷冻干燥,得 ASC 和 PSC 制品。

1.3.4 胶原蛋白的分析测定

(1)氨基酸组成 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪。恒重样品用 6 mol/L 盐酸于 110℃ 水解 24 h,脱酸后,用水定容至 5 ml,上机测定。

(2)己糖含量和氨基己糖含量 取恒重样品,加蒽酮试剂,置具塞试管中,于沸水浴上加热 15 min,冷却,按蒽酮比色法测定,纯葡萄糖为标准品。恒重样品用 4 mol/L 盐酸于 100℃ 加热水解 14 h,真空干燥,用水定容至 10 ml,按 Belcher 比色法测定,纯氨基葡萄糖作标准品。

(3)特性粘度 η 和比旋光度 采用乌式粘度法测样品特性粘度,温度 $(20 \pm 0.02)^\circ\text{C}$;采用 WZZ-1 型自动指示旋光仪测比旋光度。样品浓度均为 0.03%,0.1 mol/L 乙酸溶液作溶剂。

(4)热变温度(t_d)和热收缩温度(t_s) 用乌式粘度计测定 15~40℃(间隔 5℃)范围内的增比粘度(η_{sp}/c),样品浓度 0.03%,溶剂同上,各温度保持恒温 30 min。以 $(\eta_{sp}/c)_t/(\eta_{sp}/c)_{20^\circ\text{C}} - t$ 作图,增比粘度变化 50% 时所对应的温度,即为 t_d 。将样品适量悬浮于水中,加热,测定体积开始收缩时的温度即为 t_s 。

(5)SDS-PAGE 采用聚丙烯酰胺垂直板型电泳装置。凝胶浓度为 3.5% (含有 0.1% SDS, 3.5 mol/L 尿素)。电极缓冲液:0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.2。样品溶解液:0.02 mol/L, pH 7.2 磷酸盐缓冲液(内含 1% SDS, 3.5 mol/L 尿素, 0.02% 溴酚蓝, 20% 甘油, 1% 巯基乙醇)。染色液:0.25% 考马斯亮蓝 R-250 溶液。脱色液:75 ml 冰乙酸 + 50 ml 甲醇 + 875 ml 蒸馏水混合。直流稳压电源:电流 50 mA,电压 250V。电泳时间 4~5 h。

2 结果与讨论

2.1 原料的预处理

因海盘车体壁的灰分含量相当高,几乎占干品总量的 1/2,对提取胶原蛋白十分不利。另据报道^[3]海盘车体壁结缔组织中除胶原蛋白外,还有一些弹性蛋白、粘蛋白、球蛋白、白蛋白及粘多糖等物质的存在,也会影响提胶。因此在提取胶原蛋白以前必须对原料进行一定的预处理。作者采用先酸后

碱处理法。先除去 CaCO_3 和 MgCO_3 等盐类,使体壁软化;再除去杂蛋白,同时还可皂化脂肪。

这样处理的海盘车,体壁得到最充分的溶胀,外观呈半透明状,很象市场上泡发的海蜇。250 g 鲜海盘车处理后的体壁为 75.30 g,得率 30.12%;真空干燥后干品为 7.57 g,得率 3.03%。

2.2 制备方法的探讨

大部分胶原蛋白都是以胶原纤维形式存在,彼此相互交叉而成网状,成为难溶性胶原蛋白。可先用胃蛋白酶消化水解去末端(非螺旋型区域),然后用稀醋酸溶液提取溶出,因此也称作胃蛋白酶促溶的胶原蛋白(PSC)^[12,13]。

在这里胃蛋白酶的作用显然不同于能水解胶原蛋白的胶原酶,使之成为小分子肽类及游离氨基酸;胃蛋白酶只对胶原 α -肽链的末端区水解,并不破坏肽链中形成三联螺旋体的区域^[12,13]。

对 ASC 和 PSC 粗制液透析纯化,不仅能脱盐,除去小分子糖类及其它杂质,还能沉淀胶原蛋白。

2.3 海盘车体壁胶原蛋白的分析测定

试验制备的 ASC 和 PSC 呈疏松的絮状或纤维状,白色(略带黄色),有光泽,不溶于水,溶于稀醋酸溶液,有轻微腥气。

2.3.1 得率 ASC 和 PSC 制品的干重分别为 0.825 g 和 4.650 g,前者 ASC 得率仅为 10.90% (相对于酸碱处理后的体壁干重),后者 PSC 经胃蛋白酶消化促溶后,得率相对较高,为 61.43%,二者总得率为 72.33%。

2.3.2 氨基酸组成 ASC 和 PSC 制品有着典型胶原蛋白氨基酸的组成(见表 1)。其中 Gly 含量最高,约占氨基酸总和的 1/3;Ala 次之,约占 1/9;Pro 及 HyPro 共占 1/6,这 4 种氨基酸占氨基酸总和的 60% 左右。Glu、Asp、Arg、Ser 共占氨基酸总和的 27%,而 His、Tyr、Met、Lys、HyLys 等的含量较低,仅含微量的 Cys(half)。氨基酸的这种组成形式,在一定程度上表明了制品的纯度较高。

ASC 和 PSC 在氨基酸组成上富含 Ala,但 HyLys 的含量较低,与已报道的脊椎动物胶原蛋白^[6]相似。而大多数无脊椎动物胶原蛋白中 Ala 含量低得多,而 HyLys 的含量相对较高^[9]。据最新报道^[14,15],棘皮动物在系统发生上属于以脊椎动物为代表的后口动物。这一推论有利于解释海盘车体壁胶原蛋白的氨基酸组成与脊椎动物相似的原因。

表 1 ASC 和 PSC 制品的氨基酸组成(干基)

Table 1 The composition of amino acids from ASC and PSC(dry material)							g/100g	
氨基酸 amino acid	ASC	PSC	氨基酸 amino acid	ASC	PSC	氨基酸 amino acid	ASC	PSC
Asp	5.90	5.97	Val	2.22	2.47	Amide(NH ₂)	0.67	0.75
Thr	2.53	2.30	Met	1.03	0.97	His	0.25	0.44
Ser	6.09	5.44	Ile	1.70	1.65	Arg	5.55	5.92
Glu	9.66	9.45	Leu	1.78	1.98	Pro	9.47	10.14
Gly	32.43	30.60	Tyr	0.50	0.65	HyPro	6.00	6.40
Ala	11.00	11.30	Phe	0.38	0.50	HyLys	0.50	0.45
(half)Cys	0.02	0.04	Lys	1.40	1.46	总和 total	99.08	98.88

2.3.3 热稳定性 胶原蛋白的热稳定性是由其在水系中纤维的热收缩温度(t_s)和溶液中分子的热变性温度(t_d)所表达的^[14,15]。而 t_d 又是通过胶原蛋白的热变曲线($\eta_{sp}/c-t$)反映出来的, t_d 也表示了胶原蛋白螺旋被破坏时的温度, 与水产动物可能生息的最高环境温度大致相等^[9]。

计算公式: $\eta_r = t/t_0$, $\eta_{sp} = \eta_r^{-1}$

t - 乌式粘度计中待测溶液流出的平均时间

t_0 - 乌式粘度计中溶剂流出的平均时间

温度与 ASC、PSC 增比粘度的关系见表 2, 由表中的数据作胶原蛋白的热变曲线(图 1), 从曲线上可查知两种制品的 t_d 值。作者测得 ASC 和 PSC 制品的 t_s 值分别为 54℃、52℃, t_d 值分别为 32℃、29℃。据报道, 水产动物胶原蛋白的 t_s 与 t_d 值之差不受种属影响, 大致恒定(20~25℃)^[15]。海盘车体壁胶原蛋白显然附合这一特点。

表 2 不同温度对 ASC 和 PSC 制品增比粘度的影响

Table 2 Effect of different temp. on η_{sp}/c of ASC and PSC

$t/^\circ\text{C}$	15	20	25	30	35	40
t_0/s	166.0	144.5	131.7	124.8	117.4	98.8
t/s	252.8	220.0	190.6	164.2	131.0	110.1
η_r	1.523	1.522	1.447	1.316	1.116	1.114
ASC $(\eta_{sp}/c)/$ $(10^2 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1})$	17.43	17.43	14.89	10.52	3.85	3.80
$(\eta_{sp}/c)_t$ $(\eta_{sp}/c)_{20^\circ\text{C}}$	1.001	1.000	0.855	0.604	0.221	0.218
t_0/s	166.0	144.5	131.7	124.8	117.4	98.8
t/s	251.3	218.6	182.1	154.0	130.5	109.7
η_r	1.514	1.513	1.383	1.234	1.112	1.110
PSC $(\eta_{sp}/c)/$ $(10^2 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1})$	17.13	17.09	12.78	7.79	3.72	3.68
$(\eta_{sp}/c)_t$ $(\eta_{sp}/c)_{20^\circ\text{C}}$	1.002	1.000	0.748	0.456	0.218	0.215

注: $c = 3 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ 。

2.4.3 特性粘度和比旋光度 ASC 和 PSC 制品的特性粘度分别为 14.0×10^2 、 $13.8 \times 10^2 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$,

20℃ 时的比旋光度分别为 -392° 、 -386° 。与所报道过的其它无脊椎动物胶原蛋白^[9~11]在特性粘度和比旋光度等物性上没有显著差异。

2.3.5 含糖量 据报道, 胶原蛋白中的糖类主要是中性己糖如葡萄糖、半乳糖, 氨基己糖的含量则较低。胶原蛋白中的糖类并不是游离的, 而是与 HyLys 的羟基以糖甙键紧密结合的, 即使用胃蛋白

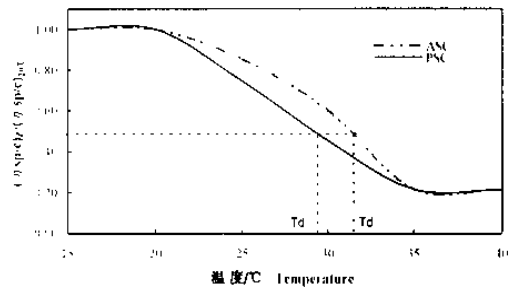


图 1 ASC 和 PSC 制品的热变曲线

Fig.1 The thermal change curve of ASC and PSC

酶处理, 也不能分离出来^[11,14]。一般说来, 脊椎动物的胶原蛋白含糖量较低, 约为 0.6%~2.0%, 而无脊椎动物胶原蛋白含糖量较高, 约为 2.1%~7.0%^[10,11,14]。作者测得 ASC 的己糖和氨基己糖含量分别为 0.56%、0.08%, PSC 为 0.52%、0.03%, 与脊椎动物胶原蛋白含糖量相似, 而比报道过的其它无脊椎动物胶原蛋白都要低得多, 这与其氨基酸组成中 HyLys 的含量低是相一致的。

2.3.6 SDS-PAGE 图 2 清楚地显示了在 ASC、PSC 相应的位置上各有两条区带, 距离较近, 比较清晰, 作者认为可能是胶原蛋白不同 α -肽链的区带。从电泳谱图也可以看出, 两种胶原蛋白制品的纯度比较高, 它们的分子大小、构型没有显著差异。但因



图2 海盘车体壁 ASC、PSC 的电泳图谱

Fig.2 The electrophoresis

spectra of ASC and PSC

表明两种胶原蛋白的分子大小、构型没有显著差异。

没有相应的胶原蛋白标准品作对照,无法对其构型作进一步确定。

3 结论

(1)多棘海盘车体壁中含有丰富的胶原蛋白,通过酸溶法和酶促溶法提取得到了两种胶原蛋白 ASC 和 PSC。

(2)通过与脊椎动物和其它无脊椎动物胶原蛋白比较,表明两种胶原蛋白的氨基酸组成、理化性质符合典型胶原蛋白的特点,并且没有显著差异。

(3)通过电泳分析进一步

参 考 文 献

- 1 郭承华. 海星资源的开发利用. 生物学通报, 1989, 11: 7
- 2 谢宗堃. 海洋水产品营养与保健. 青岛海洋大学出版社, 1990
- 3 廖玉麟. 等. 用海星提取明胶的初步试验. 动物学杂志, 1977, 2: 22 ~ 23
- 4 方子季. 等. 罗氏海盘车明胶代血浆的实验研究. 海洋药物, 1982, 1 (1): 13
- 5 方子季. 等. 罗氏海盘车明胶代血浆临床应用小结. 海洋药物, 1986, 17(1): 48
- 6 Kenji Sato, et al. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. Bull Japan Soc Sci Fish, 1986, 52(9): 1 595 ~ 1 600
- 7 P Motero, et al. Characterization of Hake and Trout collagen. J Agric Food Chem, 1990, 38(3): 604 ~ 609
- 8 Kenji Sato, et al. Biochemical characterization of collagen in myocommata and endomysium fractions of Carp and spotted Mackerel muscle. J Food Sci, 1989, 54(6): 1 511 ~ 1 514
- 9 S Kirmura, et al. Studies of marine invertebrate collagen. Bull Japan Soc Fish, 1969, 35(8): 743 ~ 748
- 10 S Kirmura, H Tanaka. Partial characterization of muscle collagen from prawns and lobster. J Food Sci, 1986, 51(2): 330 ~ 339
- 11 S Kirmura, et al. Collagen as the major edible component of jellyfish. Comp Biochem Physiol, 1989, 94B: 349
- 12 A Asghar, R L Henrickson. Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food system. In: Chickester C O, Mrata E M, Schweigert B S. Eds. Advances in food research. London: Academic Press, 1982, 28: 237 ~ 273
- 13 G N Ramachandran. Stereochemistry of collagen. J Peptide protein Res, 1988, 31: 1 ~ 16
- 14 张豁中, 温玉麟. 动物活性成分化学. 天津科学技术出版社, 1995
- 15 鸿巢章二, 桥本周久. 水产利用化学. 郭晓风, 邹胜祥, 译. 北京: 中国农业出版社, 1992

Extraction of collagen from body wall of *Asterias amurensis*

Hao Linhua

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Li Bafang

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

Abstract Acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-solubilized collagen (PSC) were obtained with 2 different means. The yields of ASC and PSC were 10.90% and 61.43% (g/g dry material). The amino acid composition and partial physical and chemical properties of ASC and PSC were described and compared with some other vertebrate and invertebrate animal collagens. It is concluded that ASC and PSC are typical collagen. Based on SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the result shows that the purities of ASC and PSC are higher and there is no obvious difference between them.

Key words *Asterias amurensis*, body wall, collagen