

Na⁺、Ca²⁺ 和 pH 值对鲸鲨皮胶原蛋白热变性温度的影响

康俊霞¹, 康永锋^{1,2}, 包 斌^{1,2}, 陈志华¹, 谢 晶¹, 吴文惠^{1,2,*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306)

摘 要: 通过差示扫描量热法(DSC)对不同浓度的 Na⁺、Ca²⁺ 和 pH 值对鲸鲨皮 I 型胶原蛋白和鲸鲨皮 II 型胶原蛋白热变性温度的影响进行系统研究。I 型胶原蛋白的特征性紫外吸收波长位于 233.05nm, II 型胶原蛋白的特征性紫外吸收波长位于 232.90nm 和 277.88nm。研究胶原蛋白的聚集动力学曲线, 发现鲸鲨 I 型胶原蛋白和鲸鲨 II 型胶原蛋白浊度随时间变化趋势均呈 S 型, 其聚集过程均可分为初始阶段和生长阶段及趋于稳定阶段。通过高灵敏度差示量热扫描仪对鲸鲨 I 型胶原蛋白和鲸鲨 II 型胶原蛋白的热稳定性进行表征。鲸鲨 I 型胶原蛋白的热变性温度为 40℃, 鲸鲨 II 型胶原蛋白热变性温度为 62℃。较低浓度的 Na⁺、Ca²⁺ 使 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白的热变性温度降低, 这可能是由于金属离子的加入影响了胶原蛋白分子之间带电氨基酸残基的相互排斥作用, 降低了胶原蛋白的热稳定性; 较高浓度的 Na⁺、Ca²⁺ 使 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白的变性温度持续降低, 这可能是由于金属离子与胶原蛋白分子竞争水分子, 从而导致胶原蛋白的不稳定; 继续增加 Na⁺、Ca²⁺ 金属离子的浓度时, I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白的变性温度由于发生盐析而增加。I 型胶原蛋白在强酸强碱处理后, 蛋白的吸热变性峰变小甚至消失。

关键词: 鲸鲨; 胶原蛋白; 热变性温度; 聚集动力学曲线; 差示扫描量热分析

Effects of Metal Ions and pH on Thermal Stability of Whale Sharp (*Rhincodon typus*) Skin Collagen

KANG Jun-xia¹, KANG Yong-feng^{1,2}, BAO Bin^{1,2}, CHEN Zhi-hua¹, XIE Jing¹, WU Wen-hui^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Differential scanning calorimetry (DSC) analysis was used to systematically study the effect of different concentrations of Na⁺, Ca²⁺ and H⁺ on the thermal denaturation temperatures of type I and type II collagens from whale sharp skin. The type I collagen had maximum absorption at 233.05 nm and the type II collagen at 232.90 nm and 277.88 nm. Aggregation dynamic analysis indicated that the turbidity of the type I and II collagens exhibited an S-shaped curve with 3 stages including initial stage, growth stage and stable stage. The thermal stability of the two types of collagens was examined by high-sensitivity differential scanning calorimetry. The thermal denaturation temperatures of the type I and II collagens were at 40 and 62 °C, respectively. Their thermal denaturation temperatures were reduced at low concentrations of Na⁺ and Ca²⁺. These results indicated that metal ions could affect charged residues in native collagen molecules, thus leading to the reduction in thermal denaturation temperature. At intermediate concentrations of Na⁺ and Ca²⁺, the thermal denaturation temperature of type I and II collagens revealed a continuous reduction, which suggested that the loss of thermal stability might be due to the competition for water molecules between metal ions and collagen. High concentrations of Na⁺ and Ca²⁺ resulted in an increase in collagen denaturation temperature due to protein salting out. Extreme pH treatment caused partial denaturation of collagen and the denaturation peak became smaller or even disappeared.

Key words: *Rhincodon typus*; collagen; thermal denaturation; aggregation dynamic curve; differential scanning calorimetry(DSC)

中图分类号: Q518.4; S986.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0066-05

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 上海市自然科学基金项目(10ZR1413800); 上海市重点学科建设项目(J50704)

作者简介: 康俊霞(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋天然产物化学。E-mail: kangkang245683396@126.com

* 通信作者: 吴文惠(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为海洋天然产物化学。E-mail: whwu@shou.edu.cn

胶原蛋白(collagen)主要存在于动物的结缔组织如皮肤、骨、软骨、牙齿、肌腱、韧带而具有一定的结构与机械力学性质如张力强度、拉力、黏弹力等以达到支持、保护等功能,并具有连接各种组织和支撑起人体结构的作用^[1-3]。由于胶原蛋白具有较好的功能性而广泛的被应用于医药、美容、食品、化工、照相、材料、饲料等行业。

近年来,在蛋白质溶液体系热力学参量的测量中差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)的应用十分广泛。von Hippel 等^[4]报道了中等浓度的中性盐对胶原蛋白稳定性的影响,发现变性温度与离子浓度呈线性相关,不同的盐减少或增加胶原蛋白的稳定性与元素在周期表的位置有关。Regina 等^[5]通过高灵敏度差示量热扫描仪对小牛皮 I 型胶原蛋白在 NaCl、NaSCN、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、Na₂SO₄、NH₄Cl、CaCl₂ 等多种盐离子中的变性温度进行了研究,发现在浓度低于 20mmol/L 范围内,这些盐离子都降低小牛皮 I 型胶原蛋白变性温度;约在 20~500mmol/L 范围内,不同的盐减少或增加的胶原蛋白稳定性与元素在周期表的位置有关。钟朝辉等^[6]采用旋转流变仪系统考察了浓度、pH 值、剪切速率、NaCl、CaCl₂、丙三醇、乙醇和保温时间对酶溶分离的草鱼鱼鳞胶原蛋白黏度的影响,并通过黏度变化确定了胶原蛋白的变性温度。Eva 等^[7]用 DSC 的方法研究了环状肠道菌素 As-48 的热变性,发现 As-48 在低的 pH 值及离子强度下有强的热稳定性,即使温度在 100℃ 以上其结构也不会被破坏。Takashi 等^[8]研究了疏水环境对 I 型胶原蛋白稳定性的影响,发现由有机化合物加入而造成的疏水性环境可以增加骨胶原蛋白的稳定性及黏附性。

对海洋生物来源的不同种类的胶原蛋白热稳定性的研究,尤其是通过 DSC 研究离子强度对鲨鱼胶原蛋白的热变性温度的影响,国内外还未见报道。本实验通过 DSC 法对不同浓度的 Na⁺、Ca²⁺ 和 pH 值对鲸鲨皮 I 型胶原蛋白和鲸鲨皮 II 型胶原蛋白热变性温度的影响进行系统地研究,以期对胶原蛋白在组织工程材料中的应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鲸鲨皮 I 型胶原蛋白(*Rhincodon typus* type I collagen)^[9]和鲸鲨皮 II 型胶原蛋白(*Rhincodon typus* type II collagen)^[10]电泳纯,为本实验室制备。

DSC 样品铝皿 梅特勒-托利多公司; Tris-HCl 盐 美国 Sigma 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

DSC823e 差示扫描量热仪(配有 Mettler Toledo Stare

系统) 梅特勒-托利多公司; UV-2450 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; PHS-3C 精密 pH 计 上海精密科学仪器公司。

1.3 胶原蛋白紫外光谱特性的分析方法

将 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白样品溶解于 0.5mol/L 醋酸溶液中,分别配制成 2g/L 胶原溶液。以 0.5mol/L 醋酸溶液为空白在波长 200~400nm 近紫外光区用 UV-2450 紫外分光光度计进行快速扫描。

1.4 胶原蛋白的浊度与聚集特性的分析方法

参照文献^[11]、^[7]的浊度测定方法进行。将胶原蛋白溶于低浓度磷酸缓冲溶液(pH 7.0),使 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白的质量浓度分别为 5mg/mL 和 20mg/mL。置于 30℃ 水浴中,每隔 3h 测其波长 300nm 处吸光度,以表征溶液中胶原蛋白是否聚集。

1.5 胶原蛋白热稳定性的测定

用去离子水配制质量浓度为 20mg/mL 的胶原蛋白溶液,溶液中 NaCl、CaCl₂ 浓度分别为 10、100、200、300、400、1000mmol/L,用 DSC 测定不同浓度的 NaCl 和 CaCl₂ 对 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白热变性温度的影响。配制质量浓度为 20mg/mL 的胶原蛋白溶液,然后用 5mol/L 乙酸及 6mol/L 氢氧化钠调节其 pH 值为 3 和 11,用 DSC 测定 pH 值对 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白热变性温度的影响。

所有样品均是在起始温度为 25℃,终止温度为 125℃,温度变化率为 10℃/min 的条件下进行 DSC 扫描。实验取 T_a 为热变性温度, T_p 为熔融温度。

2 结果与分析

2.1 鲸鲨 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白的紫外光谱特性

蛋白质分子中有生色基团能够吸收一定波长范围的紫外光,胶原蛋白含有酪氨酸和苯丙氨酸,这两种氨基酸具有敏感的发色团,它们的最大紫外吸收波长分别为 283nm 和 251nm^[12]。在 200~400nm 的波长范围内对鲸鲨 I 型胶原蛋白和鲸鲨 II 型胶原蛋白的稀溶液进行了扫描,结果如图 1、2 所示。

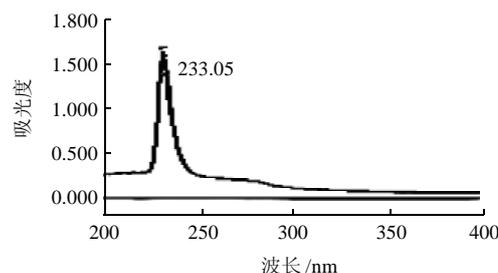


图 1 鲸鲨皮 I 型胶原蛋白的紫外吸收光谱图

Fig.1 UV-visible spectrum of type I collagen from whale shark skin

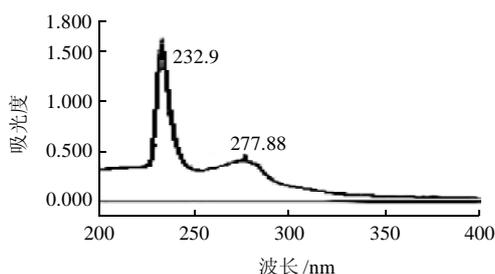


图2 鲸鲨皮II型胶原蛋白的紫外吸收光谱图

Fig.2 UV-visible spectrum of type II collagen from whale sharp skin

从鲸鲨I型和II型胶原蛋白的紫外扫描光谱图可以观察到,其紫外最大吸收波长分别在233.05nm和232.90nm,属于胶原蛋白的典型特征紫外吸收光谱,表明鲸鲨胶原蛋白芳香族氨基酸含量较少。鲸鲨II型胶原蛋白在277.88nm有非常明显的紫外吸收峰,这可能是部分II型胶原蛋白嵌有糖链导致吸收峰部分偏移。

2.2 鲸鲨胶原蛋白的聚集动力学曲线分析

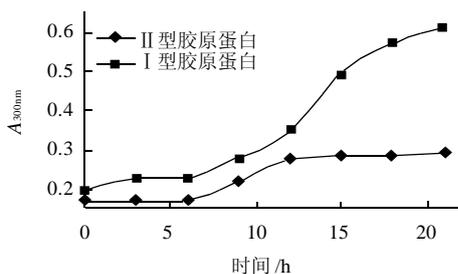


图3 鲸鲨皮胶原蛋白聚集动力学曲线

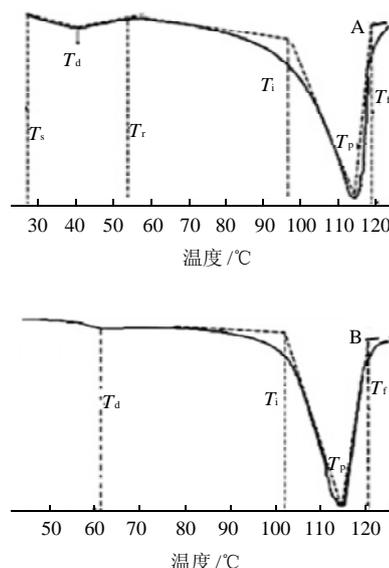
Fig.3 Aggregation kinetic curves of type I and II collagens from whale sharp skin

在蛋白质研究中,浊度常作为蛋白质聚集的指标,蛋白质聚集后颗粒直径变大,浊度升高^[13]。因此测定反应过程中溶液的吸光度可以动态地跟踪聚集过程中聚集体的大小随时间变化趋势。如图3所示,鲸鲨I型胶原蛋白和II型胶原蛋白浊度随时间变化趋势均呈S型,其聚集过程均可分为初始阶段和生长阶段及趋于稳定阶段。这与Sai等^[14]报道的青蛙皮酸溶性胶原蛋白和经胃蛋白酶处理后青蛙皮酸溶性胶原蛋白的聚集特性以及Sivakumar等^[15]报道的鱿鱼和鲨鱼软骨胶原蛋白的聚集动力学曲线相类似。

随着质量浓度的增大,溶液中胶原蛋白分子增多,其分子聚集的机会增多。鲸鲨II型胶原蛋白(20mg/mL)其质量浓度远大于鲸鲨I型胶原蛋白(5mg/mL),继续放置24h后I型胶原蛋白会形成不规则的絮状聚集体,而II型胶原蛋白并未出现。这可能是由于II型胶原蛋白嵌有糖链,阻碍了胶原蛋白分子的进一步聚集。

2.3 鲸鲨I型胶原蛋白和II型胶原蛋白的热变性分析

当温度升高到胶原蛋白的热变性温度以上时,胶原蛋白吸收能量超过分子间作用力时,分子中的氢键结构发生变形,溶剂水分子作为氢键的受体或供体,与蛋白质分子骨架及侧链上的基团竞争形成氢键,最终导致胶原蛋白三股螺旋链被破坏,使得包埋在胶原蛋白结构内部的疏水性基团暴露出来,易于聚集、变性,胶原蛋白链从伸展的纤维状态转变成无规则卷曲状态^[6,16]。



T_s : 变性外推起始温度; T_r : 外推终止温度; T_d : 变性温度; T_i : 熔融外推起始温度; T_f : 熔融外推终止温度; T_p : 熔融的峰温; A. 鲸鲨I型胶原蛋白; B. 鲸鲨II型胶原蛋白。

图4 I型胶原蛋白和II型胶原蛋白的DSC曲线

Fig.4 DSC curves of type I and II collagens from whale sharp skin

从图4可知,在升温过程中鲸鲨I型和II型胶原蛋白均有两个吸热峰,此时 ΔH 为正,对温度敏感。鲸鲨I型胶原蛋白第1个吸热峰位于温度约为40°C处,鲸鲨II型胶原蛋白第1个吸热峰位于温度约为62°C处,这是胶原蛋白的热变性过程。第2个吸热峰鲸鲨I型胶原蛋白位于温度约为114°C处,鲸鲨II型胶原蛋白位于温度约为115°C处,这是热变性后的胶原蛋白进一步升温热降解过程。

从鲸鲨I型胶原蛋白和鲸鲨II型胶原蛋白的DSC曲线可以明显看出,II型胶原蛋白的变性温度要高于I型胶原蛋白。这是由于II型胶原蛋白连接有糖链。II型胶原蛋白通过其糖对多肽链骨架的氢键作用,从而使II型胶原蛋白空间构象更加稳定。这与陈慧等^[17]所报道的氧化乳糖自身的耐热性,在受热时可支撑胶原的组织结构及构象转变,从而使胶原蛋白的耐热稳定性增强的结论相类似。这与蛋白经糖基化其稳定性增强^[12,18]的结论相一致。

2.4 离子强度对鲸鲨胶原蛋白热变性温度的影响

2.4.1 Na⁺ 和 Ca²⁺ 对鲸鲨 I 型和 II 型胶原蛋白热变性温度的影响

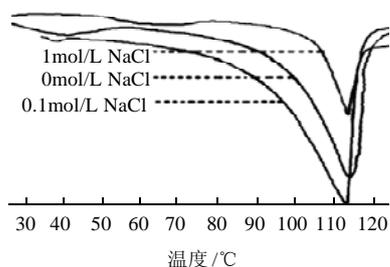


图5 Na⁺ 浓度对 I 型胶原蛋白热变性温度的影响

Fig.5 Effect of NaCl concentration on thermal denaturation temperature of type I collagen from whale sharp skin

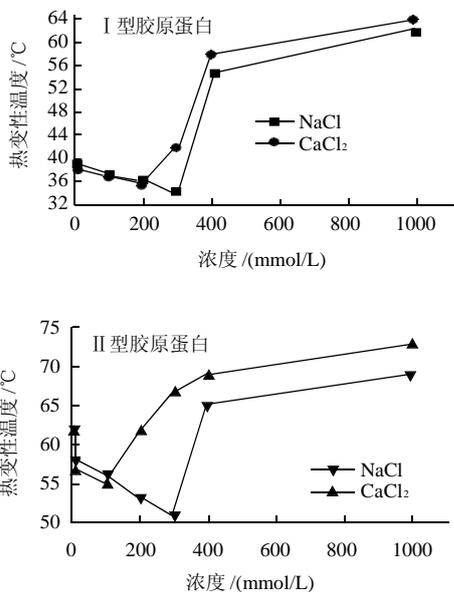


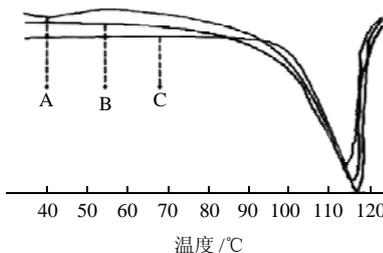
图6 Na⁺ 和 Ca²⁺ 离子强度对胶原蛋白热变性温度的影响

Fig.6 Effect of Na⁺ intensity and Ca²⁺ ion intensity on thermal denaturation temperature of collagen from whale sharp skin

由图 5、6 可知，在相对低浓度 NaCl、CaCl₂ 溶液中 I 型和 II 型胶原蛋白热变性温度均降低，这可能是由于盐离子的加入影响了胶原蛋白分子之间带电氨基酸残基的相互排斥作用，降低了胶原蛋白的热稳定性^[5-6]。当进一步加大 NaCl、CaCl₂ 浓度，I 型和 II 型胶原蛋白的变性温度仍降低，这可能是由于 NaCl、CaCl₂ 与胶原蛋白分子骨架及侧链上的基团竞争水分子形成氢键，这使得胶原蛋白间的氢键易于被破坏。当继续增加盐离子的浓度时胶原蛋白的变性温度会迅速增加，在这个浓度范围内胶原蛋白发生了盐析和聚集，其热稳定性与高稳定性的胶原纤维相类似，要明显高于溶解态的胶原蛋

白。这与 Regina 等^[5]报道的小牛皮胶原蛋白在盐离子中的热稳定性变化及钟朝辉等^[6]所研究的草鱼皮胶原蛋白变性温度受 NaCl、CaCl₂ 浓度的影响相一致。这也证明了 Oobatake 等^[19]所报道的蛋白质和溶剂的相互作用在决定天然蛋白质的构象和稳定性中起重要作用。

2.4.2 pH 值对鲸鲨胶原蛋白热变性温度的影响



A. I 型胶原蛋白的 DSC 曲线; B. pH3 的酸溶液处理后 I 型胶原蛋白的 DSC 曲线; C. pH11 的碱溶液处理后 I 型胶原蛋白的 DSC 曲线。

图7 pH 值对鲸鲨 I 型胶原蛋白 DSC 的影响

Fig.7 Effect of pH on DSC curve of type I collagen from whale sharp skin

差示扫描量热仪通过测量蛋白变性时的热量，直观反映蛋白的变性过程。只要条件一定，蛋白在 DSC 图上有固定的吸热峰^[20]。如果蛋白在测定前已经变性，则在 DSC 图上，蛋白的吸热峰变小、位移或消失。如图 9B、C 所示在加热过程中强酸强碱处理后 I 型胶原蛋白的吸热变性峰消失，其原因可能是在极端 pH 值条件下，胶原蛋白分子表面的负电荷增多，电荷间强烈的排斥作用使得埋藏在胶原蛋白分子内部的疏水基团暴露，最终导致胶原蛋白发生变性。酸碱环境使蛋白的分子结构和功能性性质发生一定变化^[21]。

3 结 论

鲸鲨皮 I 型胶原蛋白和鲸鲨皮 II 型胶原蛋白的紫外最大吸收波长比较接近，分别为 233.05nm 和 232.90nm，鲸鲨 II 型胶原蛋白的特征性吸收峰位于 277.88nm，该吸收峰的形成与 II 型胶原蛋白连接糖链有关。这些特征性吸收峰可作为鉴定 I 型胶原蛋白和 II 型胶原蛋白的指标之一。

鲸鲨 I 型胶原蛋白和鲸鲨 II 型胶原蛋白浊度随时间变化趋势均呈 S 型。鲸鲨 II 型胶原蛋白其浓度远大于 I 型胶原蛋白浓度的情况下，放置一段时间后，鲸鲨 I 型胶原蛋白会形成不规则的絮状聚集体而鲸鲨 II 型胶原蛋白并未出现。推测连接于 II 型胶原蛋白分子结构上的糖链阻碍了分子聚集而使得 II 型胶原蛋白溶液稳定。

胶原蛋白的热变性温度受分子结构和环境条件的影响，连接糖链的鲸鲨 II 型胶原蛋白比不连接糖链的鲸鲨 I 型胶原蛋白和热变性温度高，具有相对稳定的分子结构基础；无论含有糖链或不含有糖链的胶原蛋白其热变

性温度受高价金属离子的影响比低价金属离子的影响大,金属离子对不含有糖链的胶原蛋白的热变性温度的影响比含有糖链的胶原蛋白的影响大;I型胶原蛋白在强酸强碱处理后,蛋白的吸热变性峰变小甚至消失。酸碱环境使蛋白的分子结构和功能性质发生一定变化;外界环境条件对胶原蛋白热变性温度的影响要通过胶原蛋白分子结构的变化发挥作用。

参考文献:

- [1] 鸿巢章二, 桥本用久. 水产利用化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 50.
- [2] 姚理荣, 林红, 陈宇岳. 胶原蛋白纤维的性能与应用[J]. 纺织学报, 2006, 27(9): 106-107.
- [3] 李国英, 张忠楷. 胶原的形态分类及其生理机能[J]. 陕西科技大学学报, 2004, 22(3): 80-83.
- [4] von HIPPEL P H, WONG K Y. The effect of ions on the kinetics of formation and the stability of the collagen-fold[J]. Biochemistry, 1962, 1(4): 664-674.
- [5] REGINA K P, RUMIANA K. Thermal stability of calf skin collagen type I in salt solutions[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1297(2): 171-181.
- [6] 钟朝辉, 李广美. 草鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白粘度特性及变性温度研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 64-67.
- [7] EVA S C, VLADIMIR V F, GÁLVEZ A, et al. The denaturation of circular enterocin AS-48 by urea and guanidinium hydrochloride[J]. Biochimica ET Biophysica Acta, 2002, 1598: 98-107.
- [8] TAKASHI N, TOMOHIRO M, KAORI S, et al. New Index for the stability of a type I collagen affected by hydrophobic environment[J]. Detal Materials, 2007, 26(3): 373-381.
- [9] 吴文惠, 姝亚, 包斌, 等. 温和条件下分离马胶鲨皮胶原蛋白的方法及其部分特性研究[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2007, 14(3): 133-136.
- [10] 王彦宏, 朱平, 冷南, 等. II型胶原蛋白的提取纯化和鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(19): 1820-1821.
- [11] 李卫林, 曹健, 汤克勇. 胶原蛋白结构和稳定性关系研究[J]. 中国皮革, 2005, 34(23): 14-16.
- [12] 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.
- [13] THORARINSDOTTIR K A, ARASON S, GEIRSDOTTIR M B, et al. Changes in myofibrillar proteins dsuring processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry[J]. Food Chemistry, 2002, 77(3): 377-385.
- [14] SAI K P, BABU M. Studies on *Rana tigerina* skin collagen[J]. Comparative Biochemistry and Part and Molecular Biology, 2001, 128: 81-90.
- [15] SIVAKUMAR P, CHANDRAKASAN G. Occurrence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid *Sepia officinalis*: comparison with shark cartilage collagen[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1381(2): 161-169.
- [16] TAKAKI K, DAISUKE LH, SHINICHI A, et al. Self-complementary peptides for the formation of collagen-like triple belical supramolecules [J]. Bioorganic Medicinal Chemistry, 2005, 23(15): 5230-5233.
- [17] 陈慧, 王亚娟, 单志华. 氧化乳糖-金属配合物提高胶原的稳定性[J]. 皮革科学与工程, 2007, 17(5): 81-90.
- [18] 李兴, 林哲甫. 多元醇和糖类对菠萝蛋白酶热稳定性的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(4): 243-244.
- [19] OOBATAKE M, OOI T. Hydration and heat stability effects on protein unfolding[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 59(3): 237-284.
- [20] HORDUR G K, HERBERT O H. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and subsequent refolding [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7187-7196.
- [21] 付湘晋, 许时婴. 酸碱处理对鲢鱼肌原纤维蛋白热变性、聚集、凝胶性质的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 100-103.