温度对鱼鳞胶原蛋白二级结构的影响

钟朝辉,李春美*,顾海峰,窦宏亮,周丽明

华中农业大学食品科技学院,湖北武汉 430070

摘要 从草鱼鱼鳞中提取酶溶性胶原蛋白(PSC),通过 SDS-PA GE 电泳分析为典型 型胶原蛋白且达到 电泳纯。在此基础上利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)、拉曼光谱(Raman)和圆二色谱(CD)研究了温度对鱼 鳞胶原蛋白二级结构的影响。FTIR 分析表明:鱼鳞胶原蛋白具有典型的胶原蛋白特征吸收带,酰胺、酰 胺和酰胺 带的特征吸收频率分别出现在1658,1552和1238 cm⁻¹处。随温度升高,酰胺A和酰胺B峰 位向低波数移动,1658 cm⁻¹处吸收峰裂解成多个吸收峰;1552 cm⁻¹处的吸收峰在35 微略红移,随后发 生明显蓝移;1238 cm⁻¹处吸收峰随温度升高向低波数移动。在拉曼光谱中,胶原蛋白的酰胺 、酰胺 和 酰胺 带的特征吸收频率分别出现在1669,1557和1245 cm⁻¹处,都较红外光谱的波数高;此外,921和 855 cm⁻¹处脯氨酸的特征谱峰在拉曼光谱中体现出来。圆二色谱分析表明,胶原蛋白冻干品的 FTIR 光谱 和 Raman 谱线大都在35~60 时发生波数和强度改变,而胶原蛋白乙酸溶液的 CD 谱线在20~35 之间 发生剧烈改变。由此可以判断胶原蛋白在固态和溶液状态下,变性温度存在一定差异,胶原蛋白冻干品比其 乙酸溶液更稳定。

关键词	PSC;温度;F1	ГIR; Raman; CD; 🗆	二级结构	
中图分类	と号:0518.1	文献标识码:A	文章编号:	1000-0593 (2007) 10-1970-07

引 言

胶原蛋白是哺乳动物体内最丰富且独有的一种蛋白质, 其提取物已广泛运用于保健食品、化妆品、生物材料等众多 领域。由于疯牛病、口蹄疫等疾病的流行,以牛、猪等陆生 动物皮为原料所得胶原蛋白的安全性被质疑,世界各国都将 其目光转向水产品胶原蛋白的研究。近几年来国内外对水产 品胶原蛋白的研究主要集中于海洋鱼体,对鱼鳞等副产物中 胶原蛋白的提取和性质的研究国内外报道并不多见,且都局 限于海洋鱼鱼鳞[1-4]。关于淡水鱼鱼鳞胶原蛋白的研究,仅有 Kimura 等^[5]对鲤鱼鱼鳞的提取及肽链组成进行了研究,而 对其他淡水鱼鱼鳞胶原蛋白的组成、结构及温度效应还未见 研究报道。胶原蛋白分子特殊的结构和胶原纤维的超分子结 构,使之成为研制生物功能材料的理想材料,但温度是影响 作为生物材料的胶原蛋白的变性的一个关键因素。目前,用 于研究蛋白质结构分析的常用方法有:傅里叶变换红外光 谱、拉曼光谱、圆二色谱、X射线衍射、核磁共振技术、荧光 和紫外光谱等。董瑞新¹⁶¹等利用激光显微共聚焦拉曼光谱从 分子水平研究了 Sigma 公司 型胶原蛋白的温度特性,讨论 了谱线强度随温度的变化关系。肖和兰^[7]等利用红外光谱研 究了温度对乳鼠皮肤胶原蛋白结构的影响。Ikoma^[3]等利用 圆二色谱研究了真鲷和尼罗罗非鱼鱼鳞胶原蛋白结构的温度 效应。但不同的分析方法都有一定局限性,傅里叶变换红外 光谱检测分子振动时产生的偶极矩变化,它对极性基团敏 感;而拉曼光谱对分子的形态及极化度的变化较为敏感,因 此适合于检测非极性基团;圆二色谱只能用来分析很窄范围 内的澄清溶液,因此单一的表征往往不能全面系统地解析温 度对胶原蛋白结构的影响。本文利用傅里叶变换红外光谱、 拉曼光谱和圆二色谱等多种手段相结合,系统研究温度对草 鱼鱼鳞胶原蛋白二级结构的影响,旨在为淡水鱼鱼鳞胶原蛋 白制品的开发提供有力的理论依据。

- 1 材料和方法
- 1.1 实验材料

草鱼鱼鳞胶原蛋白,依 Nagai^[4]等的方法提取和纯化。

1.2 主要仪器和试剂

收稿日期: 2006-06-12,修订日期: 2006-10-27

基金项目:湖北省"十一五"科技攻关重大专项和农产品加工关键技术研究与开发项目(N-16-2)资助 作者简介:钟朝辉,女,1978年生,华中农业大学食品科技学院硕士研究生 *通讯联系人 e-mail:lichmyl@126.com

1.2.1 主要仪器

Nexus 傅里叶变换红外光谱仪:美国 Nicolet 公司, in-Via 激光拉曼光谱仪:英国 Renishaw 公司, JASCO J-810 圆 二色谱仪: JASCO 公司。

1.2.2 主要试剂

甲叉双丙烯酰胺: Fluka 分装,小牛腱 型胶原蛋白: Sigma 公司,考马斯亮兰 R-250: Sigma 公司,次高分子量蛋 白质标准品:上海伯奥生物科技有限公司,其他试剂均为分 析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 SDS-PAGE 凝胶电泳

采用 SDS-PAGE 垂直电泳,7.5%的分离胶;5%的浓缩 胶;电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH & 3,含 0.1% SDS);样品缓冲液为0.05 mol·L⁻¹pH & 0 Tris HCL 缓冲 液(含 2% SDS,5% -ME、10%甘油和0.02%的溴酚兰); 0.25%的考马斯亮兰 R-250甲醇水染色液;酸甲醇水脱色液 (7.5%的甲醇、5%的冰醋酸)^[8.9]。

取冷冻干燥样品 5 mg 溶于 10 mL 样品缓冲液, 100 加热 5 min, 10 000 r ·min ⁻¹离心 5 min 后上样。采用直流恒 压电源:浓缩胶电压为 100 V,分离胶电压为 160 V,电泳时 间 3~4 h。

1.3.2 傅里叶红外分析

取鱼鳞胶原蛋白冻干品(约 2 mg)与 KBr 压片, 取出样 品置于红外光谱仪的变温附件中。红外光谱仪为美国 Nicolet 公司的 Nexus 傅里叶红外光谱仪, 扫描范围为 400~4 000 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹。采用仪器的变温附件和控温装置, 扫描温度点为 20, 35, 60, 90, 110 , 每个温度点保温 20 min, 对前三个温度点扫描信号累加 200 次。

1.3.3 激光拉曼光谱分析

拉曼光谱仪采用英国 Renishaw 公司的 inVia 激光拉曼 光谱仪, 仪器分辨率 1 cm⁻¹, 激光光源为波长 785 nm、功率 300 mW 的二极管激光器, 取微量(约 10 mg) 鱼鳞胶原蛋白 冻干品置于控温台内, 在 20, 35, 60, 90, 110 各个温度点 保温 10 min。测量拉曼谱范围为 600~1 800 cm⁻¹, 扫描 50 次, 采集时间 10 s。

1.3.4 圆二色谱分析

准确称取一定量鱼鳞胶原蛋白冻干品,用0.01 mol · L⁻¹乙酸配成浓度为0.5 mg ·mL⁻¹的蛋白溶液,将其注入 1 mm 光径的石英池,采用 J A SCO J-810 (J A SCO 公司) 圆二 色谱仪对样品在 190~250 nm 进行扫描,实验设定五个温度 点 20,35,60,80,90 ,利用恒温水浴附件对每个温度点 保温 10 min,扫描速率为 100 nm ·min⁻¹,扫描次数为 3 次。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 凝胶电泳

水产胶原蛋白主要由两条 链(1和 2)或两条 1 链和 一条 2 链,3 链也被报道存在于不少鱼类胶原蛋白 中^[5,10,11]。由 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱可见:草鱼鱼鳞 PSC 由三条不同的肽链 1,2,3 组成,不过 3 链在本实验条件 下没有能很好地与 1 链分开,这与国外报道的舡鱼、棕斑兔 头髓、鲶鱼鱼皮胶原蛋白的电泳模型是一致的^[12:14]。鱼鳞胶 原蛋白的 链、1(3)链、2 链的相对分子量分别为 211.1, 117.9,107.2 KD。且由图 1 可见鱼鳞胶原蛋白样品与牛腱 型胶原蛋白的电泳谱带基本一致,因此可以确定所提蛋白 为 I 型胶原蛋白。由于胶原蛋白标准品和样品的原料来源的

差异其分子量大小存在一定的差异。图谱上无其他杂带,说 明所提胶原蛋白纯度高。 1 2 3



Fig. 1 Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis

High molecular weight marker; 2: Calf tendon type collagen;
3: PSC from fish scale of grass carp

2.2 傅里叶红外光谱

鱼鳞胶原蛋白在 20 下的红外吸收谱图见图 2, 谱峰指 认见表 1。



7

Table 1 FTIR Band assignments of PSC at 20

Region	W/ cm $^{-1}$	Characteristic
Amide A	3 323	N-H stretch, coupled with hydrogen bonding
Amide B	3 084	C—N stretch
	2 941	CH ₂ asymmetric stretch
	2 877	CH ₂ symmetric stretch
Amide	1 658	C=O stretch, coupled with hydrogen bonding
Amide	1 560	C00 -
	1 552	N-H bend coupled with C-N stretch
	1 452	CH ₂ bend
	1 402	COO ⁻ symmetric stretch
	1 381	CH3 symmetric bend
Amide	1 338	CH ₂ wagging of proline
	1 281	N-H bend
	1 238	N-H bend
	1 203	Hyp, Tyr
	1 082	C-O stretch/C-N-C stretch
	1 032	Phe
	874	C-C stretch of Hyp ring

根据 Doyle^[15] 描叙: N →H 伸缩振动的吸收峰出现在 3 400~3 440 cm⁻¹, 但它与氢键缔合后, 将向低波数发生位 移。由图 2 和表 1 可见, 草鱼鱼鳞胶原蛋白的酰胺 A 出现在 3 323 cm⁻¹处, 表明其 N →H 伸缩振动与氢键形成了缔合 体。3 084 cm⁻¹处的弱吸收是由酰胺 B 带的 C →N 伸缩振动 产生的。1 658 cm⁻¹处归属于酰胺 带的 C → N 伸缩振动 产生的。1 658 cm⁻¹处归属于酰胺 带的 C → N 伸缩振动 的 + 200 和 mm + 200 mm

鱼鳞胶原蛋白在 20~110 下的红外吸收光谱(400~4000 cm⁻¹)见图 3 所示。由图 3 可见,随着温度升高,酰胺 A 和酰胺 B 谱线都向低波数移动(红移),同时两吸收峰的相 对强度都呈渐进式减弱,且酰胺 A 改变明显大于酰胺 B,表明 分子内和分子间缔合氢键减少。2 877 和 2 941 cm⁻¹处分别 为 CH₂ 对称和不对称伸缩振动产生,两者也都表现为随温 度升高向低波数发生位移。





 $1: 20 \quad ; \ 2: \ 35 \quad ; \ 3: \ 60 \quad ; \ 4: \ 90 \quad ; \ 5: \ 110$



图 4 给出了鱼鳞胶原蛋白在 1 100 ~ 1 700 cm⁻¹范围内 、酰胺 、酰胺 和 Hyp 吸收峰波数及主要峰强度变化见 就胺 、酰胺 和酰胺 在不同温度下的红外图谱, 酰胺 表 2。酰胺 带的特征吸收频率位于 1 600 ~ 1 700 cm⁻¹之

间,是由蛋白多肽骨架的 C=O 伸缩振动引起的,为蛋白质 二级结构变化的敏感区域,且其吸收最强,常被用于蛋白质 的二级结构分析。蛋白质的酰胺 带由三个典型的羰基伸缩 波段1630~1640 cm⁻¹,1650~1660 cm⁻¹和1680~1700 cm⁻¹组成。鱼鳞胶原蛋白的酰胺 带出现在1658 cm⁻¹处, 较其他来源的胶原蛋白1650~1655 cm⁻¹高,这可能与胶原 蛋白分子的有序程度有关^[16]。温度升至60 时,酰胺 带 峰形发生明显改变,1658 cm⁻¹处的主峰裂分成多个吸收峰, 1651 cm⁻¹处对应的 -螺旋结构减少,1643 cm⁻¹处对应的 无规结构出现,1668,1662,1689 cm⁻¹处对应的转角和 1657,1680 和1672 cm⁻¹处对应的折叠结构增加,表明温 度升高使维系胶原蛋白三螺旋结构的氢键被破坏,逐渐解螺旋,螺旋结构向无规、转角和折叠结构转变。1 500~1 600 cm⁻¹处为酰胺 带的特征吸收频率,主要为胶原蛋白的 C—N伸缩振动与 N—H 弯曲振动的反映,它和酰胺 一样 复杂,为 -螺旋、-折叠、转角和无规卷曲叠加的吸收带。此 外 Arg, Asp, Gu 和 Tyr 的侧链在此区域也有吸收^[17]。由表 2可见: 1 552 cm⁻¹处的强吸收峰归属于鱼鳞胶原蛋白酰 胺 带的 -螺旋结构,当温度上升至 35 时,1 552 cm⁻¹处的强吸收峰强度减弱,且其波数移至 1 550 cm⁻¹,当温度达到 110 ,吸收峰消失,表明 -螺旋结构被破坏。

Table 2 Characteristics of the amide I and amide of (collagen at	different temp	eratures
---	-------------	----------------	----------

T/	酰胺		酰胺		酰胺		Нур 带	
	W/ cm ⁻¹		W/ cm $^{-1}$		W/ cm ^{- 1}		W/ cm ^{- 1}	
20	1 651	0. 394 9	1 552	0. 372 6	1 338	0. 288 2	874	0.215 8
	1 658	0.4004			1 238	0. 316 3		
35	1 651	0. 391 0	1 550	0. 370 4	1 338	0. 288 1	874	0.213 3
	1 658	0. 397 4			1 238	0.3154		
60	1 653	0. 398 5	1 554	0. 373 9	1 338	0. 291 6	874	0.212 8
	1 657	0. 398 6			1 236	0. 314 7		
	1 666	0. 398 7						
90	1 651	0.4009	1 556	0.374 0	1 338	0. 294 2	874	0.213 3
	1 668	0. 399 3			1 234	0. 312 8		
	1 680	0. 391 8						
110	1 643	0.3574			1 336	0. 291 2	874	0.212 6
	1 662	0.3784			1 232	0.3106		
	1 672	0. 362 9						
	1 689	0.347 0						

由于胶原蛋白的甘氨酸和特征氨基酸羟脯氨酸和脯氨酸 含量高(分别为 39%, 8.75%和 9.98%, 其氨基酸分析已于 其他文章中报道),且形成独特(Gly-Pro-Hyp)n序列,这使 得胶原蛋白在1200~1400 cm⁻¹光谱范围内具有其他蛋白 质所没有的红外光谱特征。1 200~1 360 cm⁻¹间的谱带归属 于酰胺 ,是由 C---N 伸缩振动和 N----H 弯曲振动引起的, 归属于 Gly 骨架和 Pro 侧链的 CH₂ 摇摆振动峰也在此区域 得到体现^[18]。由表1可见,1203,1238,1281 cm⁻¹的不连 续吸收为 Gy 骨架和 Pro 侧链引起的^[17]。由表 2 可知, 酰胺 带 1 238 cm⁻¹处的特征吸收在温度从 20 上升至 35 过程 中保持稳定,仅强度微弱降低;随着温度进一步升高,吸收 峰明显红移,同时吸收强度呈线性下降,说明当温度上升至 时,胶原蛋白的二级结构已发生明显改变。1 338 cm⁻¹ 60 为脯氨酸侧链 CH_2 摇摆振动的特征频率^[17], 在 20~35 温 度范围内相当稳定,而当温度超过35 时,随温度升高,吸 收峰位置不变,但峰吸收明显增强,当温度升至110 时, 此峰红移;同时峰强度显著下降,表明胶原蛋白的二级结构 已被破坏。874 cm⁻¹处羟脯氨酸环状 C--C 伸缩振动的特征 吸收,在温度变化的过程中,峰强度稍有波动,但峰位置非 常稳定,不易受温度的影响。

2.3 拉曼光谱

图 5 为鱼鳞胶原蛋白在 600~1 800 cm⁻¹范围内不同温 度的激光拉曼光谱图,对应各温度下的谱峰及谱峰指认见 表 3。由图 5 和表 3 可见: 1 669 和 1 637 cm⁻¹处所对应的吸 收峰归属于酰胺 的 C=O 伸缩振动,其波数都在温度高 于 35 时发生轻微蓝移,而当温度超过 90 时红移。归属 于酰胺 的 1 557 cm⁻¹处的 N—H 弯曲振动与 C—N 伸缩振



-	Temperature				A	
	20	35	60	90	110	Assignment
	1 669	1 670	1 670	1 670	1 667	C=O stretch
	1 637	1 639	1 643	1 639	1 638	C=O stretch
	1 605	1 607	1 607	1 607	-	Phe, Tyr
	1 586	1 587	1 587	1 587	-	Pro , Hyp
	1 557	1 557	1 557	1 557	1 557	N—H bend coupled with C—N stretch
	1 451	1 452	1 452	1 452	1 450	CH ₂ bend
W/ cm ^{- 1}	1 343	1 343	1 340	1 345	1 344	CH ₂ wagging of proline
	1 267	1 267	1 267	1 264	1 265	N—H bend
	1 245	1 245	1 247	1 242	-	N—H bend
	1 100	1 100	1 095	1 091	-	C—N stretch
	1 031	1 034	1 037	1 032	-	Phe
	1 004	1 004	1 003	1 001	1 001	C—N stretch of Phe
	940	937	938	937	- 6	C-C stretch of collagen backbone
	921	924	919	919	- \\	C-C stretch of Pro ring
	855	858	855	856	49	C-C stretch of Pro ring

Table 3 Raman lines and their assignments of collagen from 600 to 1 800 cm⁻¹ at different temperatures

动对温度非常稳定,在升温过程中,波数和半峰高宽基本不 变,不易受温度影响。酰胺 的 N — H 弯曲振动谱线在1 267 和 1 245 cm⁻¹处,在温度升高过程中,前者谱线在 90 发生 红移;后者在 60 时蓝移,90 又红移,110 时谱峰基本 消失。由苯丙氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸的芳香基团引起的强 拉曼光谱吸收主要体现于 800~1 100 cm⁻¹。苯丙氨酸的特 征吸收频率为 1 004,1 033^[3],而 1 004 cm⁻¹处 C — N 伸缩 振动当温度达到 60 时即发生红移,此后随着温度升高进 一步向低波数移动。921 和 855 cm⁻¹处的脯氨酸谱峰为C — C 伸缩振动的特征吸收^[3],对温度相当敏感,当温度升至 35

时,发生明显蓝移,110 谱线基本消失。除1669 cm⁻¹ 处的酰胺 带的 C=O 伸缩振动的峰相对强度是以60 为 拐点先增后减外,鱼鳞胶原蛋白的所有其他拉曼谱线的强度 都是35 较20 略有下降后,60 时陡然增强达到最大, 同时1670 cm⁻¹处对应的-折叠,1267 cm⁻¹处对应的 -螺 旋明显增强,1451 cm⁻¹处对应的甲基和亚甲基的振动和 855 cm⁻¹处脯氨酸的 C-C 伸缩振动特征吸收均增强,这表 明此时鱼鳞 PSC 分子内和分子间的氢键被破坏,PSC 的三 螺旋结构变松散,肽链伸展,其二级结构暴露出来,使各谱 峰吸收强度增加。在温度达到90 时,底线荧光增强,信噪 比减小,所有谱线强度都急剧下降,110 时,谱线强度继 续下降,除1557,1343,1004和812 cm⁻¹外,大多谱线基 本消失,表明胶原蛋白的二级结构完全被破坏。

2.4 圆二色谱

1974

鱼鳞胶原蛋白溶液在 190~250 nm 的不同温度保温前后 的圆二色谱见图 6。

在蛋白质或多肽中主要的光活性基团是肽链骨架中的肽 键、芳香氨基酸残基及二硫键。当平面圆偏振光通过这些光 活性基团时,光活性中心对平面圆偏振光中的左、右圆偏振 光的吸收不相同,产生吸收差值,由于这种吸收差的存在, 造成了偏振光矢量的振幅差,圆偏振光变成了椭圆偏振光, 这就是蛋白质的圆二色性。远紫外区圆二光谱在肽键吸收峰





范围内,反映了主链构象。胶原由三条-肽链组成,-肽链 自身为 螺旋结构, 三条 -肽链则以平行、右手螺旋形式缠 绕成"草绳状"三股螺旋结构。鱼鳞胶原蛋白在远紫外区 (190~250 nm) 的圆二色谱由图 6 显示,在 221.6 nm 处有一 个正峰,在 204.4 nm 处存在一负槽,具有典型胶原蛋白三 股螺旋结构的特征圆二色谱峰型[3]。圆二色谱图中负峰出现 在 204.4 nm 处, 而文献报道其他来源的胶原蛋白负峰一般 在 198 nm 附近^[2,3],这可能是由于草鱼鱼鳞 PSC 的三螺旋 结构较其他鱼类胶原蛋白更紧密。胶原蛋白圆二色谱谱峰正 峰强度与负峰强度的比值(Rpn)通常被用来确定胶原蛋白的 溶液构象。正负峰强度比值的变化在一定程度上能够反映胶 原蛋白结构的变化,一般而言,当胶原蛋白的三螺旋结构被 完全破坏时,正峰会完全消失,而负峰会明显红移,而部分 变性的蛋白质正峰会红移,强度明显下降,同时 Rpn 值明显 下降^[19]。图 6 (a) 可知, 20 时, 其正负峰强度的比值为 0.33, 而当温度升至35 时, 圆二色谱峰发生强烈改变, 正 峰和负峰强度都急剧减小,其比值降低至0.03,同时峰位发 生轻微位移,表明此时胶原蛋白三股螺旋立体结构被破坏, 胶原蛋白发生部分变性。随温度进一步升高,60、时谱图上 正峰消失, 而负峰峰谷位移至 198.6 nm 处, 表明胶原蛋白 的三螺旋结构被完全破坏。通过比较图 6(b) 和(a) 可知, 20

保温前后,胶原蛋白溶液的圆二色谱图基本没有发生改 变,表明此时胶原蛋白溶液处于生理温度范围内,胶原蛋白 非常稳定;而温度升至35 时,保温前色谱峰强度与20 时相比,仅发生轻微减小,但保温10 min后,鱼鳞胶原蛋白 的圆二色谱图发生了显著地改变,这说明在变性温度临界点 范围内,温度所致的胶原蛋白结构改变需要一个时间过程。

3 讨 论

草鱼鱼鳞含有约40%的胶原蛋白,但鱼鳞胶原蛋白较其 他来源的胶原蛋白对温度更为敏感。目前,国内外对淡水鱼 鱼鳞胶原蛋白的结构性质及其与温度的关系的研究还处于空 白,对其他来源的胶原蛋白的结构及其温度效应的研究虽有 少许的报道,但大都采用单一的手段进行表征,不能全面反 映胶原蛋白结构的温度效应。

傅里叶红外光谱适于因分子振动产生的偶极矩变化的检测,它对极性基团敏感;而拉曼光谱对分子的形态及极化度的变化较为敏感,是检测非极性基团的很好的探针^[20];圆二光谱只能用来分析很窄范围内的澄清溶液,因此,多种分析 手段结合起来分析对胶原蛋白的二级结构的确定将更为有效。

由胶原蛋白的红外图谱(图 2)和拉曼图谱(图 5)可见: 胶原蛋白的某些谱带在两种图谱中都可以找到,但较多的谱 带是各自独有的,这将大大增加识别和解析其二级结构的信 息来源。只是傅里叶红外和拉曼光谱在表现同样吸收的峰 上,谱峰波数存在一定差异:拉曼光谱中,酰胺、酰胺 和酰胺 的特征谱线分别为 1 669, 1 557, 1 245 cm⁻¹处, 其 波数都高于红外光谱中,1451 cm⁻¹处的 CH₂ 伸缩振动峰和 1 031 cm⁻¹处苯丙氨酸的特征吸收, 波数都略低于红外光谱 中。胶原蛋白的酰胺 和酰胺 都有 -螺旋、-折叠、转角 和无规卷曲叠加的结果,随温度升高,维系三螺旋结构的氢 键被破坏,折叠、转角和无序结构增加,各叠加特征峰逐步 表现出来; 拉曼光谱则主要体现了 1 669, 1 637, 1 605, 1 586和 1 557 cm⁻¹等特征峰在温度变化中的峰位置和相对 强度变化,而没有吸收峰的增加。拉曼光谱和红外光谱在表 征脯氨酸和羟脯氨酸的结构上各有千秋。874 cm⁻¹处羟脯氨 酸环状 C---C 伸缩振动的特征谱峰在红外光谱中表征出来, 而在拉曼光谱中没有其吸收峰。由于拉曼光谱对非极性基团 敏感, 而红外光谱对极性基团敏感。归属于脯氨酸 C---C 伸 缩振动的 921 和 855 cm⁻¹处的特性谱峰,由于其弱偶极矩变 化,只在拉曼光谱中表征出来。脯氨酸 CH2 摇摆振动特征谱 线在红外光谱中波数为1 338 cm⁻¹, 而在拉曼光谱中其波数 1 343 cm⁻¹, 稍高于红外光谱中, 但两者随温度变化的趋势 一致。不管是傅里叶红外光谱还是拉曼光谱, 谱线的峰位移 基本都发生在 35~60 ,且此时吸收峰强度改变较大,这可 能是由于胶原蛋白在此温度区发生了变性,其三股螺旋结构 被破坏。在温度达到 90 时,所有谱线强度都急剧下降, 110 时拉曼谱线基本消失, 胶原蛋白的二级结构被完全破 坏。

采用傅里叶红外和拉曼光谱对草鱼鱼鳞 PSC 冻干品的 结构分析表明, PSC 的变性温度在 35~60 之间, 然而圆 二色谱分析显示: PSC 的变性温度在 35 以下, 这说明 PSC 冻干品比酸性环境中 PSC 溶液具有更高的稳定性。这进一步 验证了 DSC 和乌氏黏度计的测定结果。

本论文结合使用傅里叶红外光谱、拉曼光谱和圆二色谱 研究鱼鳞胶原蛋白的二级结构,克服了单一分析方法的局限 性,较全面地表征了鱼鳞胶原蛋白二级结构的温度效应,这 为淡水鱼鱼鳞胶原蛋白的开发利用提供了有力的理论依据。

4 结 论

(1) SDS-PAGE电泳分析结果表明:草鱼鱼鳞胶原蛋白为型胶原蛋白且纯度高。

(2)利用傅里叶红外光谱和拉曼光谱结合分析胶原蛋白 冻干品的二级结构的温度效应,结果显示:胶原蛋白的红外 和拉曼谱峰峰波数和峰强度基本都在35~60 发生较大改 变,这可能是由于胶原蛋白在此温度区发生了变性,其三股 螺旋结构被破坏。运用圆二色谱分析温度对胶原蛋白溶液的 结构影响,结果表明:在20~35 间,鱼鳞胶原蛋白三股螺 旋立体结构被破坏,胶原蛋白发生变性(与采用乌氏粘度计 所测变性温度32.5 左右相吻合)。以上分析结果说明胶原 蛋白冻干品比胶原蛋白溶液具有更高的稳定性。

参考文献

- [1] Nomura Y, Sakai H, Ishii Y, et al. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1996, 60: 2092.
- [2] Ogawa M, Portier RJ, Moody MW, et al. Food Chemistry, 2004, 88(4): 495.
- [3] Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, et al., International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 32(3-5): 199.
- [4] Nagai T, Izumi M, Ishii M. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39: 239.
- [5] Kimura S, Zhu X, Matsui R, et al. Journal of Food Science, 1988, 23: 1315.
- [6] DONG Rui-xin, YAN Xun-ling, JIANG Shan (董瑞新, 闫循领, 江山). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 1367.
- [7] XIAO He-lan, SUN Su-qin, ZHOU Qun(肖和兰, 孙素琴, 周 群). J. of Atom. and Molec. Phys. (原子与分子物理学报), 2003, 20 (2): 211.
- [8] LIU Qing-hui, WANG Cai-li, LIU Cong-li(刘庆慧, 王彩理, 刘丛力). Marine Fisheries Research (海洋水产研究), 2000, 21(3): 57.
- [9] WANGJia-zheng, FAN Ming(汪家政,范明). The Handbook of Protein Technology(蛋白质技术手册). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2000.
- [10] Saito M, Takenouchi Y, Kunisaki Y, et al. European Journal of Biochemistry, 2001, 268: 2817.
- [11] Yoshida C, Fujisawa S, Mizuta S, et al. Journal of Food Science, 2001, 66: 247.
- [12] Nagai T, Suzuki N. Food Chemistry, 2000, 68: 277.
- [13] Senaratne L S, Park P J, Kim S K. Bioresource Technololy, 2006, 97: 191.
- [14] Sivakumar P, Arichandran A, Suguna L, et al. Journal of Fish Biology, 2000, 56: 999.
- [15] Doyle B B. Biopolymers, 1975, 14(5): 937.
- [16] Chang Myung Chul, Tanaka Junzo. Biomaterials, 2002, 23: 4811.
- [17] Jackson M, Lin-Ping Choo, Watson P H, et al. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1270(1):1.
- [18] Li He, Chen Hua Lin, Luo Rong. Macromol. Bioscience, 2003, 3(7): 344.
- [19] Usha R, Ramasami T. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 41: 21.
- [20] ZHANG Shu-liang, YI Da-nian, WU Tian-ming(张叔良, 易大年, 吴天明). The New Technology and FTIR Spectra Analysis(红外光谱 分析与新技术). Beijing: Science and Technology Press of Chinese Medicine(北京:中国医药科技出版社), 1993. 243.

Effect of Temperature on the Secondary Structure of Fish Scale Collagen

ZHONG Zhao-hui, LI Chun-mei^{*}, GU Hai-feng, DOU Hong-liang, ZHOU Li-ming

College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China

Pepsin-soluble collagen (PSC) was extracted from fish scale of grass carp and was analyzed by SDS PAGE, which Abstract confirmed that PSC are typical type collagen and reach electrophoretic purity. Effect of temperature on the secondary structure of collagen was studied by FTIR, Raman and CD. FTIR indicated that the fish scale PSC had typically characteristic absorptions of collagen, and 1 659, 1 552 and 1 238 cm⁻¹ were assigned to be amide , and respectively. When the temperature increased, amide A and amide B shifted to low frequency, the absorption of 1 658 cm⁻¹ split into several absorption peaks, the absorption at 1 552 cm⁻¹ had a slight red shift followed by a distinct blue shift, and the frequency of 1 238 cm⁻¹ declined. Raman appeared at 1 669, 1 557 and 1 245 cm⁻¹ respectively, spectra showed that the absorptions of amide , amide and amide which were higher than those in FTIR spectra. Furthermore, the characteristic absorptions of proline at 921 and 855 cm⁻¹ only appeared in Raman spectra. CD spectra demonstrated a rotatory maximum at 221. 6 nm and a negative peak at 204. 4 nm of PSC solution, which were typical spectral characteristics of the collagen triple helix structure. The structure changes of the lyophilized PSC appeared mainly between 35 and 60 in FTIR and Raman spectra, yet CD spectra demonstrated that the configurational changes of PSC in acidic solution appeared in the range of 20 to 35 , indicating that the lyophilized PSC was more stable than the acidic solution of PSC.

Keywords PSC; Temperature; FTIR; Raman; CD; Secondary structure

(Received Jun. 12, 2006; accepted Oct. 27, 2006)