

· 论著 ·

水母胶原蛋白的提取及性能研究

仇雷雷, 王 博, 邹帅军, 王倩倩, 张黎明 (海军军医大学海军特色医学中心海洋生物医药与极地医学研究室, 上海 200433)

[摘要] 目的 优化越前水母 (*Nemopilema nomurai*) 胶原蛋白提取工艺, 并探究其性能。方法 利用乙酸和胃蛋白酶提取胶原蛋白, 通过盐析和超滤纯化水母胶原蛋白粗提物, 并对水母胶原蛋白进行表征和性能分析。结果 水母胶原蛋白纯度 97%, 得率 33% (干重); X 射线衍射、紫外光谱和傅里叶变换红外光谱检测结果表明, 水母胶原蛋白在提取和纯化过程中保持了胶原蛋白三螺旋结构; 氨基酸组成和凝胶电泳分析提示, 水母胶原蛋白符合 I 型胶原蛋白特征。溶解度实验表明, 水母胶原蛋白在 pH 3 ~ 5, NaCl 浓度小于 0.9 mol/L 的条件下都具有良好的溶解性。结论 所得水母胶原蛋白与牛 I 型胶原蛋白特征相似, 有望成为新的胶原蛋白资源。

[关键词] 越前水母; 水母; 胶原蛋白; 提取; 纯化

[中图分类号] R94

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)06-0509-07

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202008078

Isolation and characterization of collagen from the jellyfish *Nemopilema nomurai*

QIU Leilei, WANG Bo, ZOU Shuaijun, WANG Qianqian, ZHANG Liming (Department of Marine Biomedicine and Polar Medicine, Naval Characteristic Medical Center, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction process of collagen from the jellyfish (*Nemopilema nomurai*) and explore its characters. **Methods** The collagen was extracted with acetic acid and pepsin from jellyfish. The crude jellyfish collagen was purified by salting out and ultrafiltration. The purified collagen was characterized and analyzed by XRD (X-ray diffraction), UV (ultraviolet spectroscopy) and FTIR (fourier transform infrared spectroscopy). **Results** The purity of jellyfish collagen was 97%, the yield was 33% (dry weight). The jellyfish collagen maintained its triple helix structure during the extraction and purification process. Jellyfish collagen conformed to the characteristics of type I collagen according to amino acid composition and gel electrophoresis analysis. The jellyfish collagen exhibited a good solubility under the conditions of pH 3-5 and less than 0.9 mol/L of NaCl. **Conclusion** The extracted jellyfish collagen exhibited similar characteristics with bovine type I collagen and was a potential new source of collagen.

[Key words] *Nemopilema nomurai*; jellyfish; collagen; extraction; purification

0 引言

胶原蛋白主要存在于动物皮肤、骨骼和结缔组织中, 是主要的结构蛋白质。胶原蛋白具有较低的免疫原性、较好的生物相容性、良好的生物降解性等生物学优点, 广泛应用于生物制药、医疗保健、组织工程、食品加工、美容化妆品等领域。目前胶

原蛋白主要来源于陆生牲畜(牛、羊和猪等), 但某些疾病(口蹄疫、疯牛病)以及宗教相关问题, 使得这些牲畜来源的胶原蛋白应用受到一定约束^[1]。海洋来源的胶原蛋白资源丰富, 且不存在传染性病菌和伦理等问题, 因而, 对海洋生物来源的胶原蛋白进行开发利用具有良好的应用前景^[2]。

目前, 从海洋生物提取胶原蛋白的研究主要集中在鳕鱼、罗非鱼、海参以及水母等, 这些海洋生物的皮肤、肌肉、软骨组织及中胶层等部位中含有丰富的胶原蛋白^[3]。水母是一类胶质状的浮游生物, 属刺胞动物门, 种类多, 分布广, 我国近海海域水母资源丰富。大型水母伞部直径可达 2 m, 中胶层非常厚实, 其中胶原蛋白(122.64 ~ 693.92 mg/g,

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81974496)

[作者简介] 仇雷雷, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物活性物质, Email: qiuileismmu@163.com

[通信作者] 王倩倩, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋生物活性物质, Email: abc_w@163.com; 张黎明, 教授, 博士生导师, 研究方向: 海洋生物活性物质及海洋生物防治, Email: lmzhang@smmu.edu.cn

干重)约占总蛋白含量的50%^[4]。本研究选用青岛海域采集的越前水母(*Nemopilema nomurai*),对其伞部胶原蛋白进行分离纯化和表征,为水母胶原蛋白的开发应用提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 仪器

SCIENTZ-12N 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);LA8080 氨基酸自动分析仪(日本株式会社日立高新技术科学);Nicolet iS50 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Scientific 公司);X'Pert3 Powder X 射线衍射仪(荷兰帕纳科公司);VARIOSKAN LUX 多功能酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);Mini-PROTEAN Tetra System 垂直电泳系统(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 试剂

越前水母样品采集于青岛海域,腌制后于-20℃保存;牛 I 型胶原蛋白标准品(河北考力森公司);胃蛋白酶(上海生工生物工程公司);标准蛋白 Marker(日本 TaKaRa 公司);其余试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 胶原蛋白的提取与纯化

提取:经腌制的水母样品用自来水清洗,去除表面盐分,4℃下用去离子水浸泡、洗净后,再用异丙醇去除脂肪、NaOH 去除杂蛋白、过氧化氢去除色素。称取去杂水母伞盖样品,组织匀浆后加入相应体积不同浓度(0.3~0.6 mol/L)的乙酸溶液,胃蛋白酶的添加量为水母伞盖质量的0.1%~0.5%,酶消化时间为24~96 h,反应后的液体使用200目网过滤,离心(4℃,10000 r/min)30 min 取上清即得粗提液。

纯化:①超滤:分别取粗提液5 ml 至分子量10万和5万的超滤管中,4℃离心(4000 r/min,30 min),收集滤液进行 SDS-PAGE 分析。②透析:分别取粗提液5 ml 到分子量5万和10万的透析袋中,4℃透析3 d,每8 h 换一次透析液,取样进行电泳分析。③盐析:取粗提液5 ml,添加 NaCl 至浓度为0.9 mol/L,4℃下10000 r/min 离心10 min,收集沉淀,复溶于0.5 mol/L 乙酸溶液,重复上述过程2次,取溶液进行电泳分析。仅改变 NaCl 浓度(0.9 mol/L→0.9 mol/L→2.0 mol/L 或 2.0 mol/L→0.9 mol/L→0.9 mol/L),重复实验。

粗提液纯化后,在-80℃冷冻干燥得水母酶溶

性胶原蛋白(PSC)。

2.2 单因素分析和正交实验设计

以水母胶原蛋白得率(冻干胶原蛋白质量/水母干重)为指标,确定基本反应条件(乙酸浓度、料液比、胃蛋白酶用量、提取时间),每次改变其中一个条件进行水母胶原蛋白提取的单因素实验。

获得单因素数据后,设计正交实验(表1)来获取最佳的实验方案。

表1 水母胶原蛋白提取正交实验因素水平表

水平	因素			
	A加酶量(%)	B乙酸浓度(mol/L)	C料液比	D反应时间(h)
1	0.1	0.3	1:1	24
2	0.2	0.4	1:2	48
3	0.3	0.5	1:3	72

2.3 天狼星红法测定胶原蛋白浓度

参照 Coentro 等^[5]的方法检测胶原蛋白浓度,将100 μl 胶原蛋白溶液添加至1 ml 天狼星红色染料中静置30 min,然后以12000 r/min 离心30 min。去除上清,沉淀用碱性试剂溶解30 min,取200 μl 胶原蛋白液于540 nm 处读数。

2.4 X 射线衍射

用 X 射线衍射仪分析胶原蛋白样品的晶体结构,X 射线源为 Cu 靶 Ka 辐射($\lambda=0.154$ nm),电流为40 mA,电压为40 kV。扫描角度 2θ 为5°~40°,扫描速率为3.6°/min,并根据公式 $\lambda=2d \sin\theta$,计算 d 值。

2.5 紫外光谱分析

胶原蛋白溶解于0.5 mol/L 乙酸中,用多功能酶标仪检测其紫外光谱。扫描波段为200~400 nm,波长间隔为1 nm。以0.5 mol/L 乙酸溶液作为空白对照。

2.6 傅里叶变换红外光谱分析

取胶原蛋白5 mg 和适量 KBr 置于研钵中,研磨均匀。取适量的混合样品于压片磨具中,用压片机制成试样薄片。将压片放入傅里叶变换红外光谱仪内进行扫描(500~4000 cm^{-1} ,分辨率2 cm^{-1})。

2.7 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

胶原蛋白溶液和上样缓冲液混匀后水浴(100℃)加热5 min,取15 μl 上样,使用8%的分离胶和5%的浓缩胶,80 V 电泳100 min。

2.8 氨基酸组成分析

胶原蛋白样品在110℃下盐酸水解24 h,水

解产物 12000 r/min 离心 20 min, 上清液用氨基酸自动分析仪进行氨基酸含量测定。

2.9 胶原蛋白的溶解性

将胶原蛋白样品溶于 0.5 mol/L 乙酸溶液中, 配成 1 mg/ml 的胶原蛋白溶液, 分别取 10 ml 溶液调配成不同 pH 值(3~9 共 7 个梯度)和 NaCl 浓度(0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1 mol/L), 10000 r/min 离心, 取上清液进行胶原蛋白浓度测定, 并绘制变化曲线。

2.10 数据处理

数据采用($\bar{x}\pm s$)表示, 用 GraphPad Prism 8.0.2 作图并对各组进行方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 胶原蛋白提取的单因素结果

从图 1A 可见, 当酶的用量从 0.1% 升到 0.3% 时, 胶原蛋白得率逐渐增高并达到最大值。继续增加酶使用量, 胶原蛋白得率反而减少, 可能是过量酶对胶原蛋白具有一定破坏作用。从图 1B 可见, 当乙酸浓度为 0.4 mol/L 时, 胶原蛋白的得率最高。而乙酸过量, 会破坏已生成胶原蛋白。从图 1C 可见, 料液比在 1:2 g/ml 时, 水母胶原蛋白的得率最大。可能是料液比低于 1:2 g/ml 时, 胶原溶胀不充分, 而料液比继续增加并没有多余胶原以供溶

胀。从图 1D 可见, 随着时间推移, 胶原蛋白的得率先升高再下降: 48 h 和 24 h 相比, 增加了 8.8%; 72 h 和 48 h 相比, 增加了 15.9%; 96 h 和 72 h 相比, 得率反而下降, 说明 72 h 是胶原蛋白提取的最佳时间点。

3.2 胶原蛋白提取的正交实验

表 2 正交实验极差 R 分析中, $R_A>R_D>R_C>R_B$, 即在胶原蛋白提取中, 酶的使用量起着最关键的作用, 提取时间排第二, 料液比和乙酸浓度的影响比较小。综合这 9 组数据, 确定最优理论水平为 $A_3B_2C_2D_3$, 即乙酸(0.4 mol/L)、料液比(1:2 g/ml)、胃蛋白酶(0.3%), 提取 72 h, 此时的得率为(33±0.63)%。

3.3 胶原蛋白的纯化

图 2 中水母胶原蛋白粗提物(泳道 8)在分子量 13 万处含有大量的目标胶原蛋白, 分子量 10 万以下有杂条带。不同规格透析袋处理(泳道 1、2)后, 分子量 10 万以下的杂蛋白部分去除; 盐析结果显示, 0.9 mol/L→0.9 mol/L→2.0 mol/L NaCl 的盐析(泳道 4)可以去除大量杂蛋白, 但目标蛋白损失较多, 而 0.9 mol/L→0.9 mol/L→0.9 mol/L NaCl(泳道 3)处理既可以保留目标蛋白又能够去除部分杂蛋白。最后超滤结果显示, 分子量 10 万(泳道 6)的超滤管可以明显减少杂蛋白含量。

3.4 SDS-PAGE 电泳分析

纯化实验结果提示, 单一纯化方法不能完全去

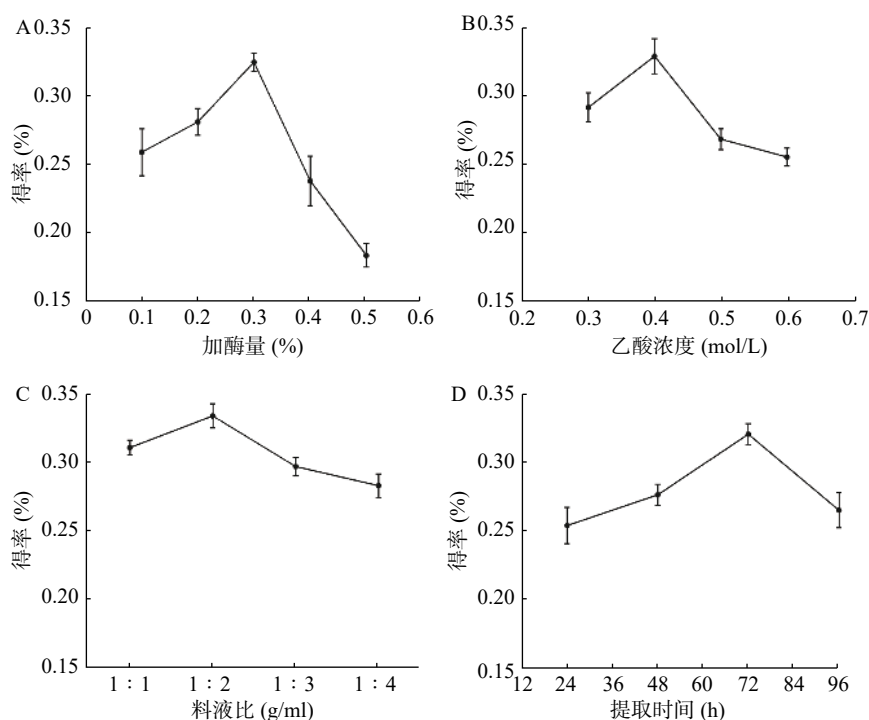


图 1 水母胶原蛋白提取的单因素分析

A.加酶量; B.乙酸浓度 C.料液比; D.提取时间

表2 水母胶原蛋白提取正交实验结果

水平	因素					胶原蛋白得率 (%)
	A 加酶量 (%)	B 乙酸浓度 (mol/L)	C 料液比 (g/ml)	D 时间 (h)	胶原蛋白得率 (%)	
实验1	0.1	0.3	1:1	24	17.8±0.66	
实验2	0.1	0.4	1:2	48	23.2±0.94	
实验3	0.1	0.5	1:3	72	21.7±0.85	
实验4	0.2	0.3	1:2	72	26.7±0.58	
实验5	0.2	0.4	1:3	24	19.0±0.86	
实验6	0.2	0.5	1:1	48	24.2±0.76	
实验7	0.3	0.3	1:3	48	26.9±0.61	
实验8	0.3	0.4	1:1	72	31.1±0.50	
实验9	0.3	0.5	1:2	24	24.3±0.75	
K1	20.9	23.8	24.3	20.4		
K2	23.3	24.4	24.7	24.8		
K3	27.4	23.4	22.5	26.5		
R	6.53	1.03	2.20	6.13		
因素主次	A>D>C>B					
最佳组合	A ₃ B ₂ C ₂ D ₃					

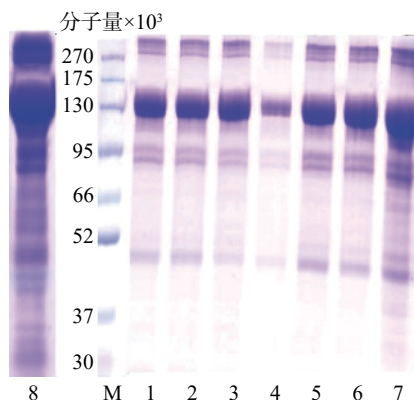


图2 水母胶原蛋白纯化过程 SDS-PAGE 电泳图

M. 蛋白 Marker; 1~2. 分子量分别是 5 万、10 万透析袋处理; 3~5. 分别是 0.9 mol/L→0.9 mol/L→0.9 mol/L, 0.9 mol/L→0.9 mol/L→2.0 mol/L, 2.0 mol/L→0.9 mol/L→0.9 mol/L NaCl 的盐析处理; 6~7. 分子量分别是 10 万和 5 万的超滤处理; 8. 水母胶原蛋白粗提物

除杂蛋白, 传统透析处理耗时长, 而反复盐析会增加胶原蛋白溶液 NaCl 含量。综合权衡后确定纯化条件为 0.9 mol/L→0.9 mol/L→0.9 mol/L NaCl 盐析和 100 kDa 超滤组合。图 3 是组合纯化后胶原蛋白电泳图: 泳道 b 为牛 I 型胶原蛋白标准品, 在分子量 13 万左右有 α_1 、 α_2 链, 而 β 链 γ 链的分子量都在 20 万以上。本实验提取的水母胶原蛋白(泳道 a), 分子量 10 万下基本没有杂蛋白, 但 α 链只发现了一条, 其分子可能是 (α_1)₃^[6-7], 分子量在 13 万左右, 符合 I 型胶原蛋白的特征。

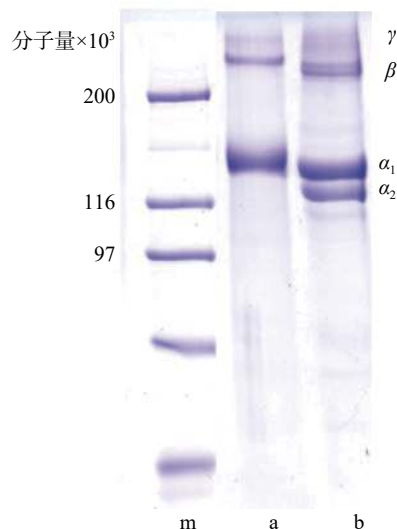


图3 纯化后水母胶原蛋白 SDS-PAGE 电泳图
m. 蛋白 Marker; a. 纯化后的水母胶原蛋白; b. 牛胶原蛋白

3.5 胶原蛋白的 X 射线衍射图

胶原蛋白 X 射线衍射分析结果如图 4、表 3 所示。水母胶原蛋白和牛胶原蛋白都有 3 个衍射峰。峰 1 形状尖锐与胶原蛋白三螺旋结构有关, d 值反映胶原蛋白分子链间距离^[8], 水母和牛胶原蛋白的 d_1 值分别为 1.244 nm 和 1.226 nm。在 20°附近出现一个宽大峰(峰 2), 代表胶原蛋白纤维内部众多结构层次所引起的漫散射^[9]。在 30°附近出现了第 3 个峰(峰 3), 该峰较小, 其 d 值显示三股螺旋结构中沿螺旋中心轴相邻氨基酸残基之间的距离^[10], 水母和牛胶原蛋白峰 3 的 d_3 值分别为 0.295 nm 和 0.296 nm, 极为接近。说明水母胶原蛋白和牛胶原蛋白标准品一样, 保持了完整的三股螺旋结构。

3.6 胶原蛋白的紫外吸收光谱

蛋白通常含有芳香族氨基酸酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸, 这些氨基酸含有苯环共轭双键系统, 在特定波长(280 nm 和 251 nm)处有最大吸收峰。但在胶原蛋白中这些氨基酸含量少, 其紫外吸收峰主要集中在 220~230 nm, 主要是由羰基 C=O 的 $n \rightarrow \pi$ 跃迁所致。水母胶原蛋白的紫外光谱如图 5 所示, 其最强吸收峰在 220 nm 处, 与牛胶原蛋白吸收峰出现的位置类似, 接近 Ab Aziz 等^[11]报道的水母 *Rhopilema hispidum* 胶原蛋白紫外吸收峰(218 nm), 提示本实验中提取的水母胶原蛋白纯度较高。

3.7 胶原蛋白的傅里叶变换红外光谱

从图 6 可见, 水母胶原蛋白酰胺 A 吸收峰为 3288 cm^{-1} , 和 Rastian 等^[12]检测的酰胺 A(3292 cm^{-1}) 吸收峰接近, 表明氢键存在于胶原蛋白结构中。胶

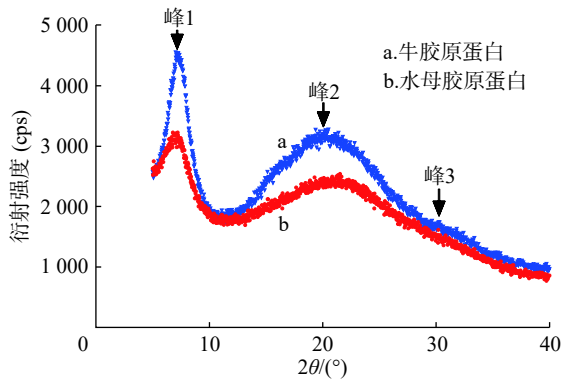


图4 胶原蛋白的X射线衍射图谱
a.牛胶原蛋白; b.水母胶原蛋白

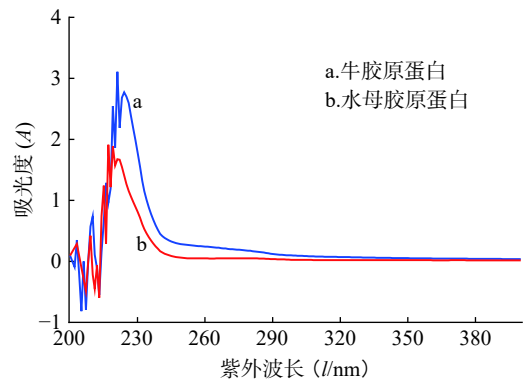


图5 胶原蛋白紫外光谱
a.牛胶原蛋白; b.水母胶原蛋白

表3 胶原蛋白X射线衍射峰对应的d值

组别	衍射峰	2θ(°)	d值(nm)
水母胶原蛋白	峰1	7.1	1.244
	峰2	21.3	0.418
	峰3	30.2	0.295
牛胶原蛋白	峰1	7.2	1.226
	峰2	20.3	0.437
	峰3	30.1	0.296

原蛋白分子中 CH_2 基团的不对称伸缩振动产生了酰胺 B 特征吸收峰^[13-14], 水母胶原蛋白的酰胺 B 在 2933 cm^{-1} 处, 和牛胶原蛋白的酰胺 B (2936 cm^{-1}) 吸收峰类似。作为蛋白质二级结构变化的特征区域——酰胺 I 带 ($1625 \sim 1690\text{ cm}^{-1}$), 是由蛋白质肽链骨架的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动产生^[15], 水母胶原蛋白的酰胺 I 带出现在 1641 cm^{-1} 。水母胶原蛋白酰胺 II 带吸收峰出现在 1543 cm^{-1} , 在胶原蛋白酰胺 II 带 ($1500 \sim 1600\text{ cm}^{-1}$) 的范围内, 可能是 $\text{C}-\text{N}$ 键的伸缩振动和 $\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动产生。水母胶原蛋白酰胺 III 位于 1236 cm^{-1} 处, 主要是脯氨酸侧链和甘氨酸骨架的 $-\text{CH}_2$ 摇摆振动产生, 提示所提取的水母胶原蛋白三螺旋结构完整性较好。

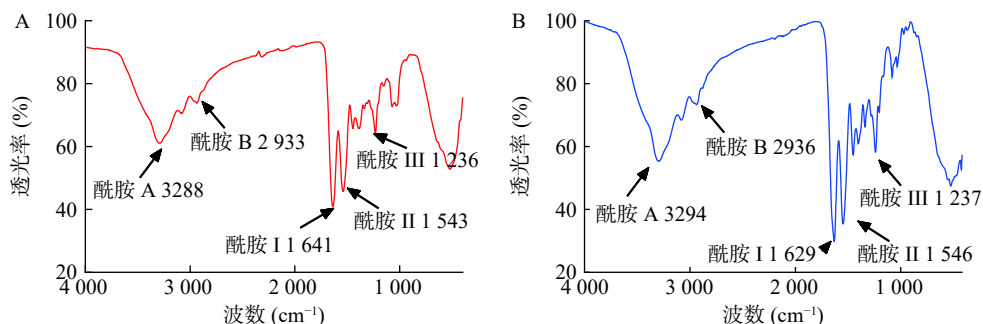


图6 胶原蛋白的红外光谱
A.水母胶原蛋白; B.牛胶原蛋白

3.8 天狼星红法检测胶原蛋白

电泳图谱表明提取的水母胶原蛋白达到电泳纯(95%)。文献报道^[16-18]天狼星红染料与胶原蛋白中的特征性结构 Gly-X-Y 结合, 可以使用天狼星红染料对胶原蛋白进行快速检测。本实验测得每 100 mg 冻干的水母胶原蛋白样品中含有胶原蛋白 96.85 mg, 其纯度为 96.85%。

3.9 氨基酸组成分析

如表 4 所示, 水母胶原蛋白的氨基酸组成中, 甘氨酸占 34.8%, 与云南深水鲷鱼皮胶原蛋白甘氨酸含量(35%)接近, 比热带淡水鲤鱼鳞中胶原蛋白甘氨酸含量(30.6%)高^[19]。水母的胶原蛋白中羟脯氨酸占 6.3%, 脯氨酸占 8.2%, 亚氨酸比例为 14.5%。其脯氨酸羟基化度(羟脯氨酸含量/亚氨酸含量)为 43.68%, 比牛胶原蛋白标准品的羟基化度(39.92%)和 Zhang 等^[7]提取的水母胶原蛋白的羟基化度(32.2%)都高。据文献报道^[20], 羟基化度越高, 胶原蛋白的三螺旋结构越稳定。检测结果中还发现蛋氨酸、酪氨酸和组氨酸的含量比较低, 缺乏色氨酸, 这些都符合 I 型胶原蛋白的特点^[21]。

3.10 胶原蛋白的溶解性

从图 7A 可见, 当 NaCl 浓度在 $0.5 \sim 0.8\text{ mol/L}$

表4 二种胶原蛋白中不同氨基酸组分的百分比

氨基酸名称	氨基酸占比(%)	
	水母胶原蛋白	牛胶原蛋白
天冬氨酸Asp	7.83	4.57
苏氨酸Thr	3.55	1.73
丝氨酸Ser	4.89	3.19
谷氨酸Glu	9.98	7.27
甘氨酸Gly	34.82	34.37
丙氨酸Ala	8.36	12.46
缬氨酸Val	2.74	2.27
蛋氨酸Met	0.21	0.01
异亮氨酸Ile	1.88	1.22
亮氨酸Leu	3.09	2.64
酪氨酸Tyr	0.11	0.27
苯丙氨酸Phe	0.9	1.38
赖氨酸Lys	2.96	2.15
组氨酸His	0.29	0.48
精氨酸Arg	3.87	5.3
脯氨酸Pro	8.16	12.43
羟脯氨酸Hyp	6.33	8.26
合计	100	100

注:氨基酸分析采用氨基酸残基数占100个氨基酸残基的比例

时,水母胶原蛋白相对溶解度比较稳定,保持着最大值。其原因可能是低浓度的盐离子可以与胶原蛋白分子结合,使得胶原蛋白分子带有更多的电荷,相互排斥,溶解度较大。当NaCl浓度达到0.9 mol/L时,水母胶原蛋白的溶解度急剧下降,相对溶解度不到23%,当NaCl浓度超过1.0 mol/L后,其相对溶解度在15%左右。可能因为NaCl的浓度较高时,极性较强的盐离子夺走了胶原蛋白结合的水分子,破坏了其周围的水化膜,盐析作用显现出来,溶解度下降。

从图7B可见,当溶液的pH在3~5时,水母胶原蛋白的相对溶解度比较大,维持在80%左右。其中pH为4时,溶解度最大,与海参胶原蛋白的溶解性类似^[3]。当pH在6~8时,胶原蛋白的相对溶解度维持在较低值,尤以pH7时溶解度最小,此时就是胶原蛋白的等电点。当pH超过8后,胶原蛋白溶液的溶解度又有所上升。

4 讨论

本实验通过单因素分析和正交实验优化了水母胶原蛋白的提取条件,确定最适条件为:乙酸0.4 mol/L、料液比1:2 g/mL、胃蛋白酶0.3%、反

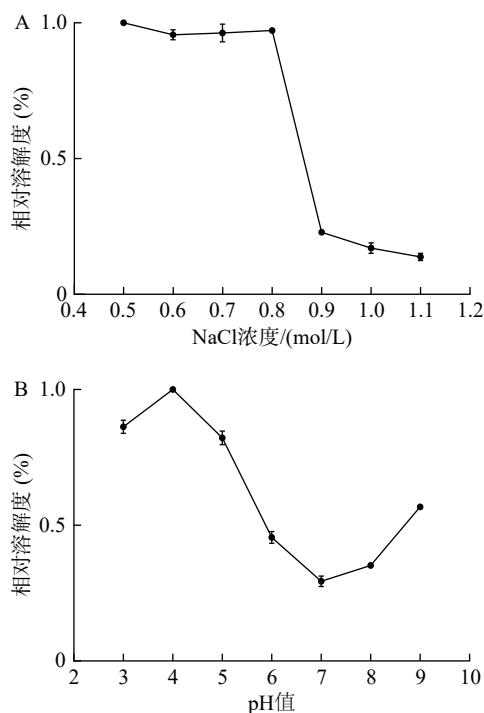


图7 水母胶原蛋白在不同pH值及NaCl浓度条件下溶解度特性

A.NaCl浓度对溶解度的影响; B.pH值对溶解度的影响

应72 h。水母胶原蛋白的纯化方法优化为0.9 mol/L-0.9 mol/L NaCl盐析和分子量10万超滤的组合方法。相比阳离子交换层析法和Sephacryl S-100凝胶过滤纯化方法,超滤不仅可以去除盐分和杂蛋白,还能快速富集胶原蛋白,缩短提取时间。

纯化的水母胶原蛋白通过天狼星红法检测其纯度为97%,高于从其他多种海洋生物提取的I型胶原蛋白纯度^[22-23]。本实验中越前水母胶原蛋白干重得率为33%左右,相比于水母*Chrysaora quinquecirrha*胶原蛋白提取得率(1.2%干重)显著提高^[24]。凝胶电泳显示提取的水母胶原蛋白构型可能是 $(\alpha_1)_3$, α_1 链分子量约为13万和10万以下基本没有杂条带,比Jankangram等^[25]提取的水母胶原蛋白纯度更高。在氨基酸组成分析中,越前水母胶原蛋白甘氨酸占34.82%,羟脯氨酸占6.33%,脯氨酸占8.16%,没有检测到色氨酸。以上结果均表明水母胶原蛋白符合I型胶原蛋白的特点。光谱分析发现,分离纯化过程中水母胶原蛋白三螺旋结构保存较好。溶解度试验表明其在pH=4时溶解性最佳,当NaCl浓度升高至0.9 mol/L时溶解度快速下降。

总之,本研究通过优化提取纯化过程,缩短了水母胶原蛋白制备时间,提高了所得胶原蛋白的纯度,且水母胶原蛋白三螺旋结构保持完整,与牛

I型胶原蛋白特征相似度很高,提示水母胶原蛋白可望成为哺乳动物胶原蛋白的替代品。鉴于水母胶原蛋白具有资源丰富、提取方便、生物相容性好等优点,可望成为生物医药、食品、化妆品等多领域的理想生物材料,具有良好的应用前景。

【参考文献】

- [1] WIDDOWSON J P, PICTON A J, VINCE V, et al. In vivo comparison of jellyfish and bovine collagen sponges as prototype medical devices[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018, 106(4): 1524-1533.
- [2] SILVA T H, MOREIRA-SILVA J, MARQUES A L, et al. Marine origin collagens and its potential applications[J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(12): 5881-5901.
- [3] LI P H, LU W C, CHAN Y J, et al. Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics[J]. *Aquaculture*, 2020, 515: 734590.
- [4] KHONG N M, YUSOFF F M, JAMILAH B, et al. Nutritional composition and total collagen content of three commercially important edible jellyfish[J]. *Food Chem*, 2016, 196: 953-960.
- [5] COENTRO J Q, CAPELLA-MONSONÍS H, GRACEFFA V, et al. Collagen quantification in tissue specimens[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627: 341-350.
- [6] 李玉芬, 郑明星, 朱凡, 等. 海蜇胶原蛋白的制备及理化性质研究[J]. *福州大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(2): 286-294.
- [7] ZHANG J J, DUAN R, HUANG L, et al. Characterization of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii* Kishinouye)[J]. *Food Chem*, 2014, 150: 22-26.
- [8] SUN L L, LI B F, SONG W K, et al. Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material[J]. *Process Biochem*, 2017, 63: 229-235.
- [9] 姚行行, 郭妍, 庄永亮. 云南鲟鱼骨胶原蛋白的制备及其理化性质[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 35-40.
- [10] DE CHEN J, LI L, YI R Z, et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *LWT - Food Sci Technol*, 2016, 66: 453-459.
- [11] AB AZIZ N A, SALIM N, ZAREI M, et al. Extraction, anti-tyrosinase, and antioxidant activities of the collagen hydrolysate derived from *Rhopilema hispidum*[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2020: 1-10.
- [12] RASTIAN Z, PUTZ S, WANG Y, et al. Type I collagen from jellyfish *Catostylus mosaicus* for biomaterial applications[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4(6): 2115-2125.
- [13] NOORZAI S, VERBEEK C J R, LAY M C, et al. Collagen extraction from various waste bovine hide sources[J]. *Waste Biomass Valor*, 2020, 11(11): 5687-5698.
- [14] LIN X H, CHEN Y Y, JIN H X, et al. Collagen extracted from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) skin by isoelectric precipitation: physicochemical properties, proliferation, and migration activities[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(5): E261.
- [15] SONG W K, LIU D, SUN L L, et al. Physicochemical and biocompatibility properties of type I collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for biomedical applications[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(3): E137.
- [16] ZHANG X, CHEN Y R, ZHAO Y L, et al. Type I collagen or gelatin stimulates mouse peritoneal macrophages to aggregate and produce pro-inflammatory molecules through upregulated ROS levels[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105845.
- [17] RODRÍGUEZ F, MORÁN L, GONZÁLEZ G, et al. Collagen extraction from mussel byssus: a new marine collagen source with physicochemical properties of industrial interest[J]. *J Food Sci Technol*, 2017, 54(5): 1228-1238.
- [18] WALTER M N, DEHSORKHI A, HAMLEY I W, et al. Supramolecular assembly of a lumican-derived peptide amphiphile enhances its collagen-stimulating activity[J]. *Biomater Sci*, 2016, 4(2): 346-354.
- [19] CHINH N T, MANH V Q, TRUNG V Q, et al. Characterization of collagen derived from tropical freshwater carp fish scale wastes and its amino acid sequence[J]. *Nat Prod Commun*, 2019, 14(7): 1-12.
- [20] BOU-GHARIOS G, ABRAHAM D, DE CROMBRUGHE B. Type I collagen structure, synthesis, and regulation[M]//Principles of Bone Biology. Amsterdam: Elsevier, 2020: 295-337.
- [21] ASADUZZAMAN A K M, GETACHEW A T, CHO Y J, et al. Characterization of pepsin-solubilised collagen recovered from mackerel (*Scomber japonicus*) bone and skin using subcritical water hydrolysis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 148: 1290-1297.
- [22] ELANGO J, LEE J W, WANG S J, et al. Evaluation of differentiated bone cells proliferation by blue shark skin collagen via biochemical for bone tissue engineering[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(10): E350.
- [23] COELHO R C G, MARQUES A L P, OLIVEIRA S M, et al. Extraction and characterization of collagen from Antarctic and Sub-Antarctic squid and its potential application in hybrid scaffolds for tissue engineering[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 78: 787-795.
- [24] KRISHNAN S, PERUMAL P. Preparation and biomedical characterization of jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha*) collagen from Southeast Coast of India[J]. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2013, 5(3): 698-701.
- [25] WICHUDA J, SUNTHORN C, BUSARAKUM P. Comparison of the properties of collagen extracted from dried jellyfish and dried squid[J]. *Afr J Biotechnol*, 2016, 15(16): 642-648.

[收稿日期] 2020-08-19 [修回日期] 2020-10-16

[本文编辑] 陈盛新