

# 鱼皮胶原蛋白的纯化及酶解性质的研究

陈申如<sup>1,2</sup>, 蔡扬鹏<sup>2</sup>, 陈清西<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 分别对鲨鱼、鲢鱼、草鱼、罗非鱼鱼皮的胶原蛋白进行提取、纯化并进行 SDS-PAGE 电泳分析, 对它们的酶解性质进行研究. 结果表明, 提取的胶原蛋白有较高纯度, 是典型的 I 型胶原蛋白. 4 种鱼皮胶原蛋白均能被胰蛋白酶和蛋白酶 K 水解, 两种酶酶切位点有差异. 不同鱼种鱼皮胶原蛋白的一级结构不同. 本实验的酶解条件是适宜的.

**关键词:** 鱼皮; 胶原蛋白; 纯化; 酶解性质

**中图分类号:** Q 516

**文献标识码:** A

随着国内水产加工业的发展, 水产加工企业生产过程中产生的下脚料如鱼头、鱼皮、鱼骨、鱼鳍等将逐年增多. 这些下脚料若不加以有效利用, 不仅造成极大的浪费, 而且还会造成环境的污染<sup>[1]</sup>. 鱼皮含有丰富的胶原蛋白. 胶原蛋白可用于食品加工业, 制成有护肤美容、延缓皮肤老化和保持青春活力功能的化妆品和保健食品, 亦可应用于医疗卫生领域, 作为一种新型生物材料, 因此, 胶原蛋白有着广阔的应用前景<sup>[2,3]</sup>. 目前国外对鱼类胶原蛋白的研究较为深入, 有关鱼皮胶原蛋白的研究也有不少报道<sup>[1,2,4~6]</sup>, 但尚未见关于鲢鱼、草鱼、罗非鱼鱼皮胶原蛋白的研究报道. 我国的胶原蛋白产品通常从含有结缔组织的屠宰动物废料中制取, 水产动物皮中胶原蛋白的利用一直是空白的. 水产动物胶原与猪等陆生动物胶原蛋白相比, 胶原蛋白的特性、组成及溶液性质都存在显著不同<sup>[7]</sup>. 本文对几种鱼皮胶原蛋白进行研究, 旨在为鱼皮胶原蛋白的开发及应用提供科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜的鲨鱼、鲢鱼、草鱼、罗非鱼购于厦门集美菜市场. 冰醋酸、氯化钠为国产分析纯试剂. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳用试剂 (SDS、APS、TEMED、蛋白标准品) 均为 Bio-Rad 产品. 猪胰蛋白酶, 蛋白酶 K 为 Finnzymes 产品.

### 1.2 方法

胶原蛋白的提取及纯化: 原料鱼去鳞、取皮, 置 -25 待用. 取出鱼皮, 解冻, 剪碎, 用其质量 20 倍的 0.1 mol/L NaOH 溶液于 4 浸泡 4 h, 以去除非胶原蛋白成分, 然后用蒸馏水反复洗涤, 充分沥干. 加入同量的 10% 异丙醇溶液于 4 浸泡 1 d, 以去除脂肪. 用蒸馏水反复洗涤, 充分沥干, 再加入同量的 0.5 mol/L 乙酸溶液于 4 浸泡 3 d, 4 离心 (20 000 ×g) 30 min, 上清液即为提取的胶原蛋白溶液. 取适量上清液加入 NaCl 至溶液最终浓度为 0.9 mol/L, 析出絮状沉淀, 4 离心 (12 000 ×g) 15 min, 沉淀物即为盐析后的胶原蛋白<sup>[1]</sup>. 置 -25 冰箱待用.

胶原蛋白的酶解: 取恒重纯化后的胶原蛋白, 加入 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 组织捣碎, 取出一定量, 分别用胰蛋白酶在 37 水解 2.5 h 或蛋白酶 K 在 50 水解 2 h, 加入 4 倍体积 SDS 缓冲液, 100 水浴加热 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳.

SDS-PAGE 电泳: 参考文献[8]方法.

收稿日期: 2004-05-09

基金项目: 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放基金资助

作者简介: 陈申如 (1965 - ), 女, 硕士研究生.

\* Corresponding author,

E-mail: chenqx @jingxian. xmu. edu. cn

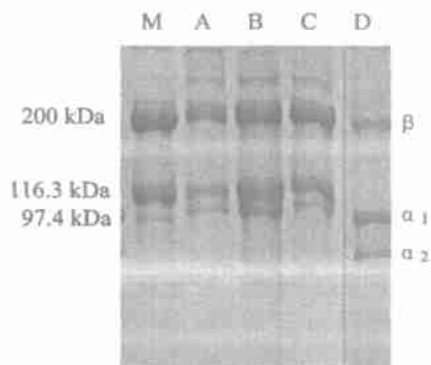


图1 鱼皮胶原蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

M:蛋白标准品;A:鲨鱼;B:鲢鱼;C:草鱼;D:罗非鱼

Fig. 1 SDS-PAGE of fish skin collagens. M:Marker;A:shark;B:silver carp;C:grass carp;D:tilapia

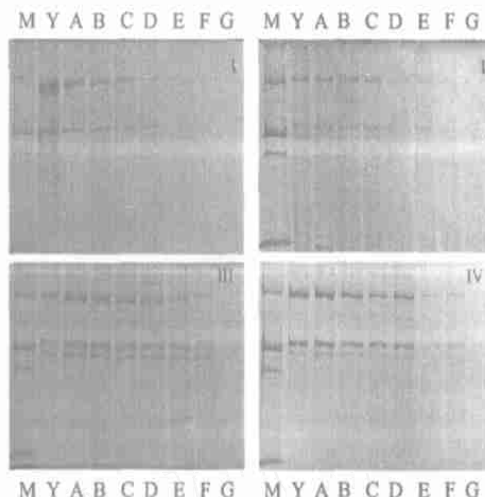


图2 鲨鱼(I)、鲢鱼(II)、草鱼(III)和罗非鱼(IV)的鱼皮胶原蛋白的胰蛋白酶水解液电泳图谱

M:蛋白标准品;Y:对照样;A~G分别为酶浓度0.15,0.3,0.6,1.25,2.5,5.0和10 mg/mL的水解液

Fig. 2 SDS-PAGE of skin collagen degraded by porcine trypsin. I: shark; II: silver carp; III: grass carp; IV: tilapia. M: marker; Y: control; A ~ G: trypsin concentrations were 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5.0 and 10 mg/mL

## 2 实验结果

### 2.1 胶原蛋白的 SDS-PAGE 电泳

对4种鱼鱼皮胶原蛋白进行提取和纯化,电泳结果见图1.4种鱼鱼皮胶原蛋白都由3条多肽链组成,它们的分子大小、亚基构成极相近,都含有大量

肽链,分子量都约为200 kDa;1肽链含量也较高,尤其是草鱼,与2肽链含量相近,比其它3种鱼含量都高,分子量都大于116.3 kDa;2肽链含量较低,但草鱼比其它3种鱼含量高,分子量都约为116 kDa,而鲨鱼的2肽链分子量似乎略小于其它3种鱼.4种鱼鱼皮胶原蛋白纯化结果均较理想,小分子量的杂蛋白几乎看不见,仅有少量大分子量杂蛋白.相比之下,鲨鱼皮胶原蛋白纯度最高.

### 2.2 胶原蛋白的胰蛋白酶水解性质的研究

4种鱼鱼皮胶原蛋白的胰蛋白酶酶解结果见图2.显而易见,每种鱼鱼皮胶原蛋白随着酶液浓度的增加,水解程度也逐渐增加,酶液浓度为10 mg/mL时,每种鱼鱼皮胶原蛋白几乎都彻底水解,说明胰蛋白酶可以水解胶原蛋白,此酶解条件是适宜的.酶液浓度为10 mg/mL时,除鲨鱼鱼皮胶原蛋白还能见到淡淡的1肽链,其它鱼已见不到3条区带.相比之下,草鱼鱼皮胶原蛋白随酶液浓度的增加,水解程度逐渐增加的趋势较不明显,只有到浓度较高时才有明显的水解现象.

### 2.3 胶原蛋白的蛋白酶K水解性质的研究

4种鱼鱼皮胶原蛋白的蛋白酶K酶解结果见图

3.由图可见,每种鱼鱼皮胶原蛋白随着酶液浓度的增加,水解程度也逐渐增加,酶液浓度为0.1 μg/mL时,鲨鱼、鲢鱼、草鱼鱼皮胶原蛋白几乎都彻底水解,说明蛋白酶K可以水解胶原蛋白,此酶解条件是适宜的.在酶液浓度为0.1 μg/mL时,除罗非鱼鱼皮胶原蛋白图谱能看到3个区带外,其它3种鱼的基本看不到.

## 3 讨论

在实验过程中进行 SDS-PAGE 电泳时,曾对加了巯基乙醇和未加巯基乙醇的样品进行对照,电泳结果没有区别,可能是因为胶原蛋白中缺乏半胱氨酸,只有少数胶原蛋白有二硫键.因此,本实验样品进行 SDS 处理时,都未加巯基乙醇.从4种鱼鱼皮胶原蛋白电泳结果来看,3个区带都较清晰,区带之间的距离与文献[1]报道的日本鲈鱼、鲨鱼、鲭鱼鱼皮胶原蛋白相似,看来几种淡水、海水鱼的鱼皮胶原蛋白的亚基构成很相似.据报道,硬骨鱼类中普遍含有3肽链<sup>[6]</sup>,但3肽链在这样的电泳条件下不能与1肽链分开<sup>[1]</sup>,因此,图1的电泳图谱中看不见

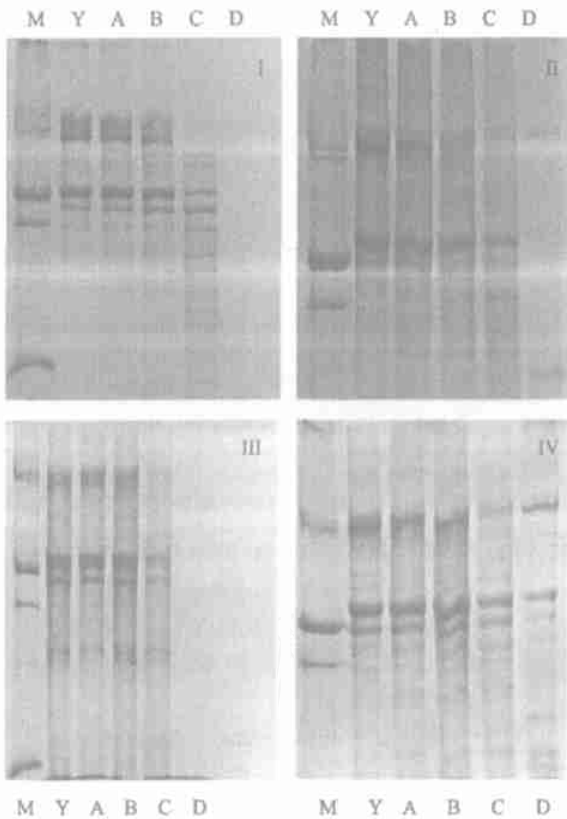


图3 鲨鱼(I)、鲢鱼(II)、草鱼(III)和罗非鱼(IV)的鱼皮胶原蛋白的蛋白酶K水解液电泳图谱  
M:蛋白标准品;Y:对照样;A~D分别为酶浓度0.002、0.005、0.01和0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水解液

Fig. 3 SDS-PAGE of skin collagen degraded by proteinase K. I: shark; II: silver carp; III: grass carp; IV: tilapia M: marker; Y: control; A ~ D: trypsin concentrations were 0.002, 0.005, 0.01 and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$

第4个区带。目前从动物组织提取胶原多采用盐析法,鱼皮中主要含有I型胶原蛋白,采用本实验的提纯方法简便经济,所提的I型胶原蛋白纯度高。另外,要想得到高产率的胶原蛋白,可以增加乙酸的提取次数。

胰蛋白酶的最适pH为7~8,但酶的最适pH不是一个常数,受许多因素的影响,随底物种类和浓度、缓冲液种类和浓度的不同而有所改变<sup>[9]</sup>。因胶原蛋白只能在酸性条件下溶解,所以本实验曾尝试用pH为6的磷酸缓冲液溶解样品后,再用不同酶液浓度的胰蛋白酶酶解,结果发现样品不水解,可见在本实验条件下胰蛋白酶对pH的要求较为严格。后改用pH为7的磷酸缓冲液,样品不溶解,通过组织捣碎机捣碎再水解,结果较理想。

蛋白酶K是一种非特异性的丝氨酸蛋白酶,本研究所用酶制剂是从林伯氏白色念球菌中纯化得到的。该酶有两个 $\text{Ca}^{2+}$ 结合位点,它们离酶的活性中心有一定距离,与催化机理并无直接关系。然而,如果从该酶中除去 $\text{Ca}^{2+}$ ,由于出现远程的结构变化,催化活性将丧失80%左右,但其剩余活力仍然很高,可以降解在一般情况下污染酸制品的蛋白质。不过要消化对蛋白酶K具有较强耐性的蛋白质,则可能需要使用含有1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 的缓冲液。因此,本实验样品中都加了1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 溶液,在pH为7的条件下水解,结果比较理想。

胰蛋白酶和蛋白酶K都属丝氨酸蛋白酶家族,虽然它们来源不同,酶的三维结构完全不同,但它们的催化三联体组成相同,有相似的催化机制<sup>[9]</sup>。尽管它们的催化类型相同,可是催化的专一性却不同,如图2和图3所示,同一种鱼用这两种酶水解,产生的区带有明显不同,说明这两种酶酶切位点有差异。本实验中鱼皮胶原蛋白水解所用的蛋白酶K用量比胰蛋白酶低得多,但水解却很彻底,说明蛋白酶K确是一种高活性的蛋白酶。实验结果还表明,用同一种酶水解不同鱼的胶原蛋白,产生的区带也有明显不同,说明不同鱼种其鱼皮胶原蛋白的一级结构是不同的,这与文献[6]研究的结果一致。

通常人们认为胶原蛋白不易被一般的蛋白酶水解,但能被梭菌或动物的胶原酶断裂<sup>[9]</sup>。但是从本实验结果可得出,鱼皮胶原蛋白可被胰蛋白酶和蛋白酶K水解,至于能否被丝氨酸蛋白酶家族的其它酶水解,还有待进一步探讨。

## 参考文献:

- [1] Takeshi N, Nobutaka S. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins[J]. Food Chemistry, 2000, 68: 277 - 281.
- [2] Li H, Liu B L, Gao L Z, et al. Studies on bullfrog skin collagen[J]. Food Chemistry, 2004, 84: 65 - 69.
- [3] 陈国梁, 贺翠莲. 胶原蛋白的研究进展[J]. 延安大学学报, 2000, 19(2): 78 - 81.
- [4] Rigo C, Hartmann D J, Bairati A. Electrophoretic and immunochemical study of collagens from sepia officinalis Cartilage[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1572: 77 - 84.
- [5] Shoshi M, Shunsuke I, Reiji Y. Existence of two molecular species of collagen in the muscle layer of the ascidian (*Halocynthia roretzi*) [J]. Food Chemistry, 2002, 79: 9 - 13.

- [6] Takeshi N, Yoko A, Nobutaka S. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (Takifugu rubripes) [J]. Food Chemistry, 2002, 78: 173 - 177.
- [7] 秦玉青, 王翥, 刘承初. 鲑鱼皮胶原蛋白的提取利用实验研究[J]. 中医研究, 2000, 15(1): 20 - 21.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [9] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.

## Study on Purification of Fish Skin Collagens and Characters of Their Enzymatic Degradation

CHEN Shen-ru<sup>1,2</sup>, CAI Yang-peng<sup>2</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1</sup>

(1. The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;  
2. School of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Fish skins are potential sources of collagen. Therefore SDS-PAGE analyses and studies on characters of enzymatic degradation were conducted on collagens extracted and purified from shark, silver carp, grass carp and tilapia by using a salt precipitation method. The extraction and purification were carried out by a series of steps involving removing non-collagenous proteins with 0.1 mol/L sodium hydroxide, removing fat with 10% iso-propanol, extracting collagen with 0.5 mol/L acetic acid and salting out with sodium chloride. As a result, four kinds of collagens extracted were highly purified. They were all shown to comprise at least three peptide chains and be similar to each other. It suggested that they belonged to typical collagen I. In addition, four collagens could be all degraded by trypsin and proteinase K, and the methods of enzymatic degradation adopted were effective. The enzyme activity of proteinase K was stronger than that of trypsin. As shown by SDS-PAGE analysis, the bands were different when the same fish skin collagen was degraded by two proteinases respectively. It suggested that split sites of two proteinases were different. On the other hand, it also appeared different bands among different fish skin collagens degraded by the same proteinase, indicating that primary structure of skin collagen differs among species.

**Key words:** fish skin; collagen; purification; enzymatic degradation