

文章编号: 1004-7271(2000)03-0219-07

## 鲨鱼鳍软骨的胰蛋白酶水解 及其“蜂窝式”降解机制

肖凯军, 郭祀远, 李琳, 陈健, 蔡妙颜, 官家伦

(华南理工大学轻化工所, 广东 广州, 510641)

**摘 要:**研究了胰蛋白酶水解鲨鱼鳍软骨的水解提取液中蛋白质含量、粘多糖含量和硫酸基含量的变化规律, 并采用扫描电子显微镜分析了鲨鱼鳍软骨在降解过程中的结构变化, 探讨了胰蛋白酶水解鲨鱼鳍软骨的主要过程和机理, 首次提出了鲨鱼鳍软骨降解过程的“蜂窝式”降解理论。

**关键词:**鲨鱼鳍软骨; 胰蛋白酶; 水解; 显微结构; “蜂窝式”降解

**中图分类号:** S985      **文献标识码:** A

## Hydrolysis of shark fin cartilage with trypsin and its “alveolus-type” degradation model

XIAO Kai-jun, GUO Si-yuan, LI Lin, CHEN Jian, CAI Miao-yan, GUAN Jia-lun

(*Light Industry & Chemical Engineering Research Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*)

**Abstract:** The changes in contents of proteins, mucopolysaccharides and sulfate in the supernatant of shark fin cartilage hydrolyzed with trypsin was investigated. Moreover, the microstructures of shark fin cartilage during its degradation were also observed by means of scanning electric microscope. An “alveolus-type” model of degradation of shark fin cartilage is firstly suggested on the basis of analysis of its main degradation process. The results showed that the disruption of the compact structures is the basis of its degradation. The degradation process of the cartilage hydrolyzed with trypsin were divided into three periods: the initial, the fast and the slow.

**Key words:** shark fin cartilage; trypsin; hydrolysis; microstructure; “alveolus-type” degradation mechanism

鲨鱼是我国海水经济鱼类之一,也是软骨鱼类最重要的一类。鲨鱼骨为软骨,鲨鱼鳍软骨中含有透明质酸、硫酸软骨素、硫酸角质素、皮肤素和肝素等多种粘多糖,具有抗凝血、降血脂、抗病毒和抗肿瘤等重要生理作用。美国、古巴从鲨鱼鳍软骨提取物中发现了抗癌特效因子(CDI),对骨髓瘤、大肠癌和乳腺癌治疗效果显著<sup>[1-3]</sup>。但由于鲨鱼鳍软骨成分和结构的复杂性,对于鲨鱼鳍软骨蛋白酶降解过程及其显微结构的变化及其降解过程的机理缺乏研究,因此从鲨鱼鳍软骨中提取生理活性成分及其结构分析,成为国内外研究的热门课题<sup>[4-6]</sup>。本文以鲨鱼鳍软骨为原料,通过胰蛋白酶水解软骨中的蛋白质来降解软骨,并研究水解提取液中蛋白质含量、粘多糖含量和硫酸基含量的变化,采取电子显微技术观察鲨

收稿日期: 2000-04-21

项目基金: 国家教育部重点科技资助项目(C1-321-359)

作者简介: 肖凯军(1969-),男,湖南省洞口县人。现任华南理工大学食品与生物工程学院讲师,博士。研究方向:生物分离与纯化技术。

鱼鳍软骨结构的变化,探讨鲨鱼鳍软骨降解规律,并建立软骨降解机制的物理模型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

鲨鱼鳍软骨粉由深圳水产公司提供。

### 1.2 主要实验仪器与试剂

#### 1.2.1 主要实验仪器

恒定 pH 恒温反应器(自制),HH-511-2 恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂),751 紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂),pHS-25 酸度计(上海雷磁仪器厂),S-510 扫描电子显微镜(日本 Hitachi)。

#### 1.2.2 主要实验试剂

胰蛋白酶(1:250,上海生化试剂厂),标准葡萄糖(AR 级),考马斯亮蓝 G250(Sera),标准牛血清蛋白(Sigma),氯化钡,明胶,苯酚,硫酸钾等(均为 AR 级)。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 鲨鱼鳍软骨的酶水解

称 20g 鲨鱼鳍软骨粉置于 200mL pH 8.0 的磷酸缓冲液中,首先进行 100℃ 加热预处理 60min,冷却至 50℃,加入 250mg 胰蛋白酶,在此温度下于恒温水浴反应装置中进行酶解反应,用 0.05mol/L NaOH 溶液滴定维持 pH 值变动范围为(0.2)。酶解反应完毕后,以 5000r/min 离心 20min 得上清液,然后测定上清提取液中的蛋白含量、多糖含量和硫酸基含量。剩余软骨粉残渣,冷冻升华干燥后供扫描电子显微观察用。

#### 1.3.2 蛋白质的测定

参照 Bradford 法进行测定,见文献[7]。

#### 1.3.3 多糖的测定

按照苯酚-硫酸法进行测定,见文献[8]。

#### 1.3.4 硫酸基团的测定

按 Dodgson-Price 比浊法测定,见文献[9]。

#### 1.3.5 扫描电子显微镜观察

取酶解后剩余的冷冻升华干燥的鲨鱼鳍软骨粉,进行抽真空,然后喷金,在 S-510 扫描电子显微镜(日本 Hitachi)下,以 2.5kHz 频率进行电子扫描观察并成像。

## 2 结果与讨论

### 2.1 鲨鱼鳍软骨降解过程中蛋白质含量的变化

由图 1 可知,总的趋势是:随着水解反应的进行,提取液中的蛋白质不断增加,提取液中蛋白质含量的变化可分为三个阶段,即 OA 段、AB 段和 BC 段,可分别称之为引发期、快速期和缓慢期。在 OA 段,即在开始水解的 1.5h 内,曲线呈平缓上升,水解速度较慢,提取液中的蛋白质含量的增加较缓慢;在 AB 段,即在 1.5h-10h 反应时间,提取液中的蛋白质含量迅速提高,水解速度大大增加,曲线呈陡峭上升;在 BC 段,即 10h 至反应结束,水解反应又变得缓慢,相对于 OA 段,曲线呈更加水平。

### 2.2 鲨鱼鳍软骨降解过程中多糖含量的变化

在鲨鱼鳍软骨中,蛋白聚糖分子中的粘多糖通过共价键和蛋白部分结合,还通过静电效应或立体化学效应与其他蛋白成分发生专一性程度不一的结合。鲨鱼鳍软骨粘多糖主要是硫酸软骨素和硫酸角质素等,它们的组成通过一个三糖单位以-糖苷键与蛋白质肽键中的丝氨酸相连(GAG-半乳糖-半乳

糖-木糖-丝氨酸)<sup>[10]</sup>。胰蛋白酶通过水解鲨鱼鳍软骨中的蛋白质,使粘多糖释放出来。由图2可知,软骨提取液中多糖含量和硫酸基含量随着时间的变化趋势和蛋白质含量的变化趋势基本相似,也存在三个阶段,即引发期、快速期和缓慢期,由此可见,软骨的提取液中粘多糖的含量和软骨中蛋白质的水解有着密切联系,鲨鱼鳍软骨中的粘多糖主要是含硫酸基的粘多糖。

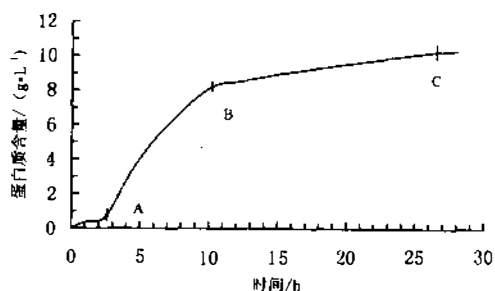


图1 鲨鱼鳍软骨的蛋白酶水解过程中水解液中蛋白质含量变化

Fig.1 The change of protein in the extracts of shark fin cartilage digested with trypsin

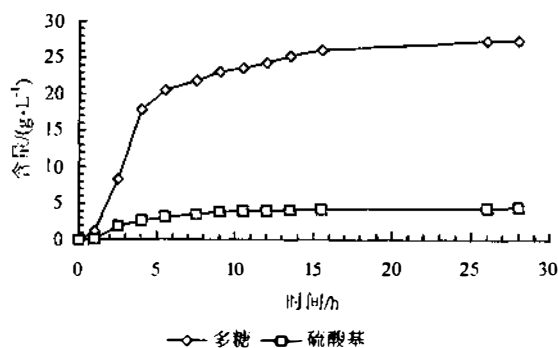


图2 鲨鱼鳍软骨的蛋白酶水解过程中水解液中多糖含量变化

Fig.2 The change of mucopolysaccharides in the extracts of shark fin cartilage digested with trypsin

## 2.3 鲨鱼鳍软骨的电子显微分析

### 2.3.1 加热预处理的鲨鱼鳍软骨电子显微分析

采用扫描电子显微镜观察未处理鲨鱼鳍软骨粉和加热预处理鲨鱼鳍软骨粉的显微结构(见图3、图4),发现未处理的鲨鱼鳍软骨粉表面比较平整和紧凑,结构细致有规则,呈龟裂的块状,裂缝的宽度一般

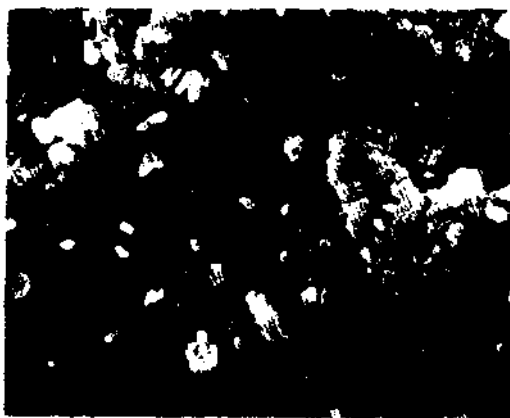


图3 未处理软骨电子显微照片  
( $\times 1500$ )

Fig.3 Micro-structure of untreated cartilage ( $\times 1500$ )



图4 加热预处理软骨电子显微照片  
( $100^{\circ}\text{C}$ 热水浴中处理1h,  $\times 1500$ )

Fig.4 Micro-structure of preheated cartilage  
( $100^{\circ}\text{C}$  water for 1h,  $\times 1500$ )

小于 $4\mu\text{m}$ ,并且表面附着少量直径小于 $5\mu\text{m}$ 的圆形小颗粒,这些小颗粒很有可能是未除去干净的鱼肉组织;加热预处理后的鲨鱼鳍软骨表面变得凹凸不平,在表层形成光滑、胶稠、不规则的大块团状结构,促使原有的裂缝增大,并生成许多新的沟壑和孔穴。造成以上现象的原因,可能是因为:在鲨鱼鳍软骨中,蛋白聚糖有很强的亲水性,这些大的多聚负离子与水 and 正离子结合,能使组织占较大的体积<sup>[10]</sup>。鲨鱼

鳍软骨在制作软骨粉的脱水过程中,主要是和大量水结合的蛋白聚糖脱水造成鲨鱼鳍软骨粉的显微结构呈现致密和平整的块状龟裂结构;在加热预处理时,由于水分子作用,减弱了软骨构成组分中的分子之间的静电和氢键相互作用,而软骨中胶原纤维的收缩温度低于70℃,胶原纤维的高度有序的结构随温度上升发生急剧变化,导致维持其原有空间的加强键断裂,有序的立体结构变得松弛和无规则,原胶原分子也逐渐失去杆状外形,三股螺旋结构被破坏而形成无规则的线团结构<sup>[11]</sup>。同时,软骨中蛋白多糖的聚集体通过次级键(氢键、盐键等)形成,水浴加热能破坏蛋白多糖的聚集体的次级键而断裂形成蛋白多糖单体,并且使维持蛋白多糖单体的立体结构的次级键也被破坏。因此经过加热预处理后,鲨鱼鳍软骨粉中胶原蛋白的有序纤维结构和蛋白聚糖的立体结构被破坏,促使胶原蛋白暴露在软骨粉表面并且互相粘连,在表面形成光滑、胶稠和不规则形状的团状结构和沟壑,并且在水分子的作用下形成小洞穴,表面变得凸凹不平,更有利于胰蛋白酶的作用。

### 2.3.2 胰蛋白酶水解鳍软骨的电子显微结构分析

图5、图6和图7分别是胰蛋白酶水解鲨鱼鳍软骨1h、5h和26h后的软骨表面的电子显微照片。图

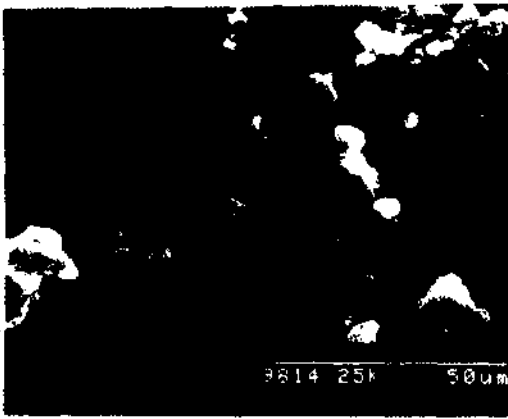


图5 酶解1h后软骨显微照片(×1500)

Fig.5 Micro-structure of cartilage digested with trypsin for 1h(×1500)

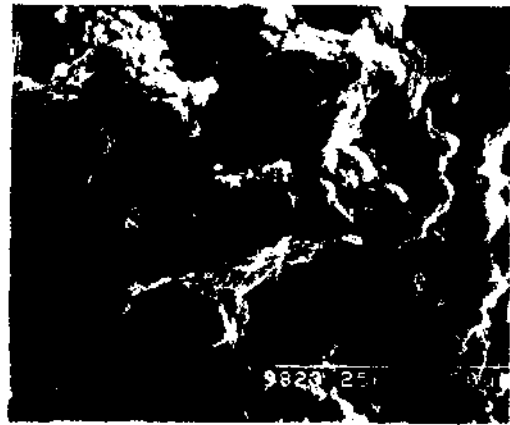


图6 酶解5h后软骨显微照片(×1500)

Fig.6 Micro-structure of cartilage digested with trypsin for 5h(×1500)

5表明,鲨鱼鳍软骨酶水解1h后,加热预处理生成的粘稠的光滑物质基本完全消失,表层的大块团状物质变成较小的突起,在软骨表面生成许多很浅的小孔穴,并且未处理对照软骨表面的龟裂状结构仍然清晰可见,软骨结构显得较坚实;鲨鱼鳍软骨经过胰蛋白酶水解5h后(图6),软骨表面更加凹凸不平,小孔穴变成大孔穴,更加深入到内部并且孔穴之间开始连通,形成了许多大小不一的球状颗粒,整个软骨结构变得酥脆;软骨水解26h后(图7),表面几乎呈蜂窝状结构,孔穴与孔穴互相交错连通,表层堆积着许多大小约5μm的比较有规则的小球状物质,其中很多小球状物质即将软骨表面,使整个软骨颗粒变得更加松散和不牢固。



图7 酶解26h后软骨显微照片(×1500)

Fig.7 Micro-structure of cartilage digested with trypsin for 26h(×1500)

图8和图9分别是胰蛋白酶水解鲨鱼鳍软骨1h、5h后的软骨表面的孔穴细微结构照片。由图8,

水解 1h 后, 软骨表面的孔穴较深, 孔穴周围有大块状结构, 但孔穴内部表面较平滑, 存在裂缝; 经过 5h 水解后, 可以明显观察到孔穴向周围延伸, 孔穴间互相连通, 软骨结构被分割成许多块状结构, 洞穴内部变得松散和不规则。



图 8 酶解 1h 后软骨孔穴显微照片 (×1500)

Fig. 8 Micro-structure of cartilage cavity digested with trypsin for 1h (×1500)

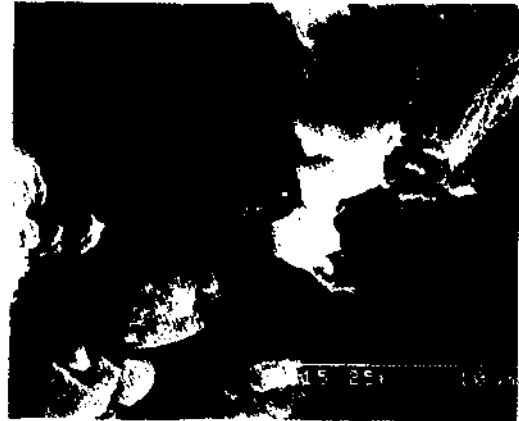


图 9 酶解 5h 后软骨孔穴显微照片 (×1500)

Fig. 9 Micro-structure of cartilage cavity digested with trypsin for 5h (×1500)

## 2.4 鲨鱼鳍软骨分解方式及降解机制

在以上鲨鱼鳍软骨分解的显微结构探讨之上, 并结合胰蛋白酶作用特征和鲨鱼鳍软骨组成特点的分析, 阐述了鲨鱼鳍软骨的胰蛋白酶分解蛋白质主要过程和方式, 并建立了“蜂窝式”降解机制的理论。具体观点阐述如下:

(1) 鲨鱼鳍软骨的高度致密和牢固结构的破坏并形成紊乱无序的结构, 是胰蛋白酶对软骨蛋白质进行分解和软骨降解的基础。经过预加热处理过程, 维持软骨结构的加强键和次级键断裂, 原来有序的立体结构变得松弛和无规则, 胶原蛋白纤维结构变成杂乱无章的团状结构, 并且, 通过水分子的作用, 蛋白聚糖集合体有可能解聚和单体变得松散和杂乱。预加热处理的结果表现为: 胶原蛋白暴露在软骨粉表面并且互相粘连, 形成光滑、胶稠和不规则形状的团状结构, 并且在水分子的作用下形成小洞穴, 使表面变得凸凹不平。总之, 这种无规则、松散、紊乱的结构为胰蛋白酶和反应物水分子的自由进入, 并且和底物蛋白质的结合提供了良好的反应环境。

(2) 软骨的降解首先是“表层式”降解阶段, 代表软骨中蛋白质分解的“引发”期开始 (见图 1)。胰蛋白酶最先分解的是表层的胶原蛋白, 促使粘多糖和软骨分离, 并且初步在表面形成浅的小“孔穴”。

鲨鱼鳍软骨主要由纤维状的胶原蛋白和非纤维状的蛋白聚糖等构成, 粘多糖是蛋白聚糖整体结构中的“含糖片段”。胰蛋白酶是相当专一的蛋白酶: 只在赖氨酸和精氨酸残基的羧基断裂肽键<sup>[10]</sup>, 和带大量负电荷的蛋白聚糖结合的机会相对于胶原蛋白来说要小得多。这是因为粘多糖是多聚阴离子, 带大量负电荷, 而胰蛋白酶是属于丝氨酸蛋白酶, 活性部位含有丝氨酸残基, 丝氨酸的羟基是亲和核基团, 存在一个电荷接力网络, 并含有一个氧负离子穴。如图 10 所示, 胰蛋白酶的结部位含有 Gly-216 和 Gly-225, 结合底物的“口袋”显得十分敞开, 于是体积较大的氨基酸残基的侧链能进入这个“口袋”, “口袋”的底部含有带负电荷的 Asp-189, 与底物赖氨酸 ε 的氨基的正电荷之间形成静电相互作用<sup>[12]</sup>。而在鲨鱼鳍软骨胶原蛋白分子中, 主要由甘氨酸、羧基脯氨酸和羧基赖氨酸组成, 其中, 赖氨酸是胶原纤维重要构成部分, 胶原纤维在分子内交联是从赖氨酸的侧链引出的, 另外, 胶原含有糖链单位, 它们也通过共价键结合在胶原的羧基赖氨酸残基上<sup>[11]</sup>, 故经过加热预处理后的鲨鱼鳍软骨在胰蛋白酶作用下, 先

是水解位于软骨表面团状结构的胶原蛋白上的赖氨酸部分,然后水解表层深处的胶原蛋白和蛋白聚糖中的蛋白部分,并在软骨表面“钻出”孔穴来,表现为:预加热处理后软骨表面粘稠的团状结构消失,内层较坚实结构暴露出来,未处理对照软骨表面的龟裂状结构仍然清晰可见并且生成许多很浅的小孔穴。

(3)鲨鱼鳍软骨的“孔穴式”降解阶段,代表软骨中蛋白质分解反应的“快速”期,此阶段软骨降解主要通过“孔穴式”降解方式进行快速降解,对软骨的降解起着决定性作用。相对于软骨表面来说,孔穴的存在有利于酶和蛋白结合,即孔穴的存在有利于形成酶和底物作用的“微环境”。胰蛋白酶首先和底物生成共价中间物,然后在亲核试剂(水)参与下被水解<sup>[10]</sup>,在孔穴的“微环境”中,酶和底物结合形成酶-底物复合体的几率更大,促进了反应的进行。

在另一方面,孔穴的形成促使蛋白酶和软骨作用的表面积增大,也提高了软骨降解速度。在此阶段,胰蛋白酶水解孔穴周围的蛋白质,在软骨内部使孔穴向横向和纵向发展,孔穴进一步变大,促使孔穴与孔穴之间互相贯通,并在表面形成了许多大小不一的球状颗粒,软骨结构变得更加松散易碎。因此,在这个阶段,鲨鱼鳍软骨的降解实际上是通过“孔穴式”和“表面式”两种降解方式进行的,但以“孔穴式”为主,因为“孔穴式”降解方式比“表面式”降解方式更加有效,更加迅速。

(4)鲨鱼鳍软骨的“蜂窝式”降解阶段,表示软骨中蛋白质分解反应的“缓慢”期(见图1),大的软骨颗粒断裂成更小的颗粒。

在此阶段,随着反应的进行,软骨表面几乎呈蜂窝状结构,孔穴与孔穴互相交错连通,洞穴内部变得松散和不规则。立体结构无规则和紊乱的底物蛋白质被蛋白酶分解后,变性程度不大而结构较牢固蛋白质不容易被蛋白酶作用,导致蛋白质分解反应的降低。另一方面,底物蛋白质数目的减少而反应产物增加和蛋白质水解速度的降低有关。在软骨的“蜂窝式”降解阶段,表现出来的现象是:软骨表面呈蜂窝状结构,内部存在许多孔穴,并且孔穴与孔穴互相交错连通,整个结构变得松散,软骨组织以圆球形状态脱离原“母体”,形成更小的软骨颗粒。

### 3 结论

(1)胰蛋白酶水解软骨中蛋白质反应中,上清提取液中蛋白质含量变化可分为三个阶段,即引发期、快速期和缓慢期。

(2)随着水解软骨中蛋白质反应的进行,上清提取液中的粘多糖含量和硫酸基含量也逐渐增加并且变化趋势和蛋白质含量变化基本一致;鲨鱼鳍软骨粘多糖主要为含硫酸基含量的粘多糖。

(3)鲨鱼鳍软骨的降解主要是通过“蜂窝式”降解机制进行的。主要观点有:鲨鱼鳍软骨的高度致密和牢固结构的破坏并形成紊乱无序的结构,是胰蛋白酶对软骨蛋白质进行分解和软骨降解的基础;软骨的降解第一阶段是“表层”降解阶段,代表软骨中蛋白质分解的“引发”期;鲨鱼鳍软骨降解的第二阶段是“孔穴”降解阶段,代表软骨中蛋白质分解反应的“快速”阶段,是对软骨的降解主要方式;鲨鱼鳍软骨降解的第三阶段进入“蜂窝式”降解阶段,表示软骨中蛋白质分解反应的“缓慢”阶段,大的软骨颗粒断裂成更小的颗粒,并脱离软骨“母体”。

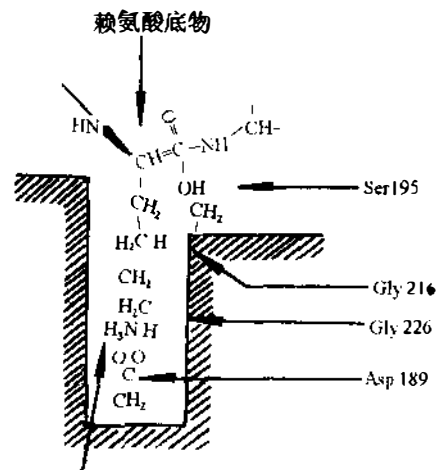


图10 胰蛋白酶和底物结合部位

Fig. 10 The linkage of trypsin and substrate

**参考文献:**

- [1] Ellich J, Mathews K. Sharks still intrigue cancer researchers[J]. J Pharm Sci. 1973, 62:18-19.
- [2] 傅德华,何志坚,李领华,等. 鲨酸性粘多糖抗栓作用的研究[J]. 中国海洋药物. 1992,43(3):18-19.
- [3] 杜晓东,张亭广,王 军,等. 鲨鱼酸性粘多糖中的中性糖鉴别[J]. 中国海洋药物,1991,39(3):16-19.
- [4] 肖凯军,银玉睿,郭祀远,等. 鲨鱼软骨溶解性及其差示扫描量热分析的研究[J]. 食品科学. 1997,18(11):13-17.
- [5] 郝秀兰,叶淑芳,吴钟高,等. 鲨鱼粘多糖抗凝血作用[J]. 中国海洋药物. 1992,44(4):17-22.
- [6] Martinadale L. The Extra Phannacopeia[M]. London: The Pharmaceutical Press. 1972,2006.
- [7] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Bioch. 1976, 72:248.
- [8] 张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987,6-7.
- [9] Hodgson K S. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides[J]. Biochem J. 1962 (84),110.
- [10] 樊绘曾. 粘多糖及其提取分离. 海洋药物,1983,5(1):40-55.
- [11] 唐有祺,张惠珠,吴香钰,等(译). 生物化学[M]. 北京:北京大学出版社,1990. 142-157.
- [12] 王 璋编. 食品酶学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1990,60-185.

---

## 2001 年度《中国水产文摘》征订启事

本刊系我国水产系统唯一的 1 本全面报道国内水产科技文献的综合性检索期刊,由中国水产科学研究院渔业综合信息研究中心主办。其宗旨是全面、及时地报道全国各地公开发行的水产科技文献,为读者快速、方便地检索国内水产科技文献服务。本刊为全国优秀水产刊物,并 1 次获得全国科技文献检索期刊二等奖,3 次获得全国科技文献检索期刊三等奖,2 次获全国水产优秀期刊一等奖。现已被“万方数据”(ChinaInfo)系统科技期刊群(《电子期刊》)全文收录,本刊《中国水产文献数据库》也已加入 ChinaInfo 网。

本刊所收录的文献类型有期刊、专著、汇编、会议录、科技报告、技术标准等。按以下主要类目编排:(1)水产总论;(2)水产基础科学;(3)水产资源和环境保护;(4)水产捕捞;(5)海水养殖;(6)淡水养殖;(7)水产生物病害及防治;(8)饲料和肥料;(9)水产品保鲜及加工;(10)渔业机械仪器和渔船;(11)渔业经济。年报道量 3000 条以上。每年第 1 期刊登本刊引用主要期刊一览表。年终编辑出版本年度主题索引、著者索引。本刊还有自 1985 年创刊以来的数据和各年及 1999 年的最新数据的《中国水产文献数据库》光盘和软盘,有意者来函联系。

本刊为双月刊,逢双月底出版,国内外公开发行,国内统一刊号:CN 11-2813/F,国际标准连续出版物号:ISSN 1002-1612。每期定价 12.00 元,全年 6 期共 72.00 元。邮发代号:18-126,国外代号:BM 4104,请广大老订户和新读者及时到当地邮局办理订阅手续。如在当地邮局订阅不便,可向本刊编辑部办理邮购。

**编辑部地址:**北京市永定路南青塔村 150 号,邮政编码:100039,联系电话:(010)68673921。