

T/CASME

中国中小商业企业协会团体标准

T/CASME XXX—2024

I 型及 V 型胶原蛋白制备技术规范

Technical specifications for the preparation of type I and type V collagen

（征求意见稿）

2024 - XX - XX 发布

2024 - XX - XX 实施

中国中小商业企业协会 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 总体要求 1

5 制备技术 2

6 记录 4

附录 A（资料性） 鱼皮 I 型和 V 型胶原蛋白 SDS-PAGE 图谱 5

参考文献 6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由杭州纽曲星生物科技有限公司提出。

本文件由中国中小商业企业协会归口。

本文件起草单位：杭州纽曲星生物科技有限公司……

本文件主要起草人：……

I 型及 V 型胶原蛋白制备技术规范

1 范围

本文件规定了 I 型及 V 型胶原蛋白制备的总体要求、制备技术和记录。
本文件适用于以鱼皮为原料制备 I 型及 V 型胶原蛋白。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB 1886.10 食品安全国家标准 食品添加剂 冰乙酸（又名冰醋酸）
- GB 1886.20 食品安全国家标准 食品添加剂 氢氧化钠
- GB 1886.174 食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂
- GB 2721 食品安全国家标准 食用盐
- GB 2733 食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范
- GB/T 27304 食品安全管理体系 水产品加工企业要求
- 中华人民共和国药典（2020年版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

胶原蛋白 collagen

以纯化的（非交联的）I 型胶原蛋白为原料制备的左手螺旋的重复 Gly-X-Y 序列的 3 条肽链相互盘绕成右手超螺旋结构特征的结构蛋白。

注：Gly 是甘氨酸，X 通常是脯氨酸，Y 通常是羟脯氨酸或羟赖氨酸。

[来源：GB/T 38482—2021，3.1]

3.2

I 型胶原蛋白 type I collagen

由 2 条 $\alpha 1$ 链和 1 条 $\alpha 2$ 肽链组成的具有完整三螺旋结构的胶原蛋白。

[来源：GB/T 38482—2021，3.2]

3.3

V 型胶原蛋白 type V collagen

由 1 条 $\alpha 1$ 链、1 条 $\alpha 2$ 和 1 条 $\alpha 3$ 肽链组成的具有完整三螺旋结构的胶原蛋白。

4 总体要求

4.1 选址

选址符合下列要求：

- a) 宜靠近有加工副产物的水产品加工生产区；
- b) 所在地应有工业废水集中排放的处理区；
- c) 周围环境不应影响或污染产品；
- d) 有充足的电力供应。

4.2 设施和生产人员

应符合GB 14881的要求。

4.3 安全管理

应符合GB/T 27304的要求。

4.4 容器和设备

4.4.1 直接接触原料、半成品、成品的器具应由无毒耐腐蚀的材料制成，易清洗。

4.4.2 至少应配有以下设备：

- a) 烘干机；
- b) 粉碎机；
- c) 搅拌设备；
- d) 离心机。

4.4.3 所有电气设备的控制器应组装在一起，由一个主控制箱操纵，且远离排水区。

4.4.4 设备应保持完好、清洁、确保正常运转，定期检查和维护保养。

4.5 质量检验室

应建有相应的质量检验室，至少应配备恒压或恒流电源、垂直板电泳槽和制胶模具及相关技术人员。

4.6 原辅料要求

4.6.1 鱼皮应符合 GB 2733 的规定。

4.6.2 水应符合 GB 5749 的规定。

4.6.3 氢氧化钠应符合 GB 1886.20 的规定。

4.6.4 氯化钠应符合 GB 2721 的规定。

4.6.5 冰乙酸应符合 GB 1886.10 的规定。

4.6.6 胃蛋白酶应符合 GB 1886.174 的规定。

5 制备技术

5.1 工艺流程

I 型及 V 型胶原蛋白制备工艺流程见图1。

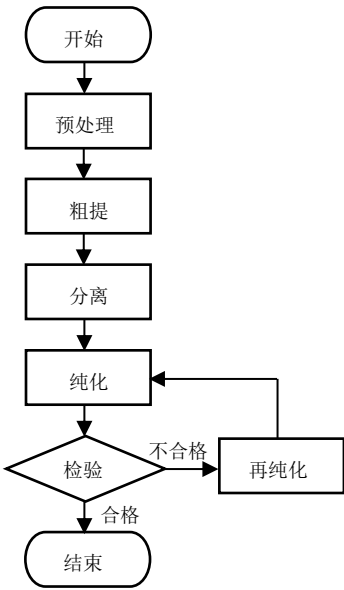


图1 I 型及 V 型胶原蛋白制备工艺流程图

5.2 预处理

5.2.1 使用温度不高于 20℃ 的水清洗鱼皮，除去夹杂的头、鳍、鱼肉、内脏和其它附于表面的血污、泥沙等杂质，并剔除鱼鳞。

5.2.2 沥干，剪碎至 $(1\text{ cm}\pm0.2\text{ cm})\times(1\text{ cm}\pm0.2\text{ cm})$ ，于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}\pm5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干 2h，粉碎至 50 目，按 200g 鱼皮 15L0.1mol/L 氢氧化钠溶液的比例浸泡 30h，期间持续搅拌，于 2500g 离心 10min 取沉淀，用水冲洗至 pH 为 7.0，于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}\pm5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干 2h。

5.3 粗提

在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下进行粗提，按 100g 鱼皮、10L $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水、150mL 冰乙酸、10g 胃蛋白酶的比例混合，连续搅拌 42h 后，100 000 g 离心 60 min 取上清液，缓慢加入氯化钠粉末至混合液中氯化钠浓度为 2.0 mol/L，盐析过夜，100 000 g 离心 15 min，取白色沉淀，为胶原蛋白粗品。

5.4 分离

在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下进行分离，将胶原蛋白粗品溶解于含有 1.0 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液中 (pH 7.5)，100 000 g 离心 60 min 取上清液，缓慢加入氯化钠粉末至混合液中氯化钠浓度为 2.4 mol/L，盐析过夜，100 000 g 离心 15 min，分别收集沉淀和上清液。

5.5 纯化

5.5.1 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下进行纯化。

5.5.2 将沉淀溶解于 0.25 mol/L 冰乙酸中，装入截留分子量为 10 kDa 的透析袋，用 0.025 mol/L 冰乙酸溶液透析 60 h，真空冷冻干燥，所得无臭无味白色海绵状固体即为 I 型胶原蛋白。

5.5.3 向上清液中缓慢加入氯化钠粉末至混合液中氯化钠浓度为 4.0 mol/L，盐析过夜，100 000 g 离心 15 min，同 5.5.1 操作，所得无臭无味白色海绵状固体即为 V 型胶原蛋白。

5.6 检验

按《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0541中规定的第五法SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE法）进行测定。I型、V型胶原蛋白纯度应不低于95%，典型的I型和V型胶原蛋白电泳图谱见附录A。

5.7 再纯化

若达不到5.6要求，可将5.5所得I型/V型胶原蛋白再次溶解于预冷至 $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的0.5mol/L冰乙酸（1:100，w/v）中，100000g离心60min，缓慢加入氯化钠粉末至混合液中氯化钠浓度为2.4mol/L，盐析过夜，100000g离心15min，分别收集沉淀和上清液。按5.5再纯化后，按5.6检验。

6 记录

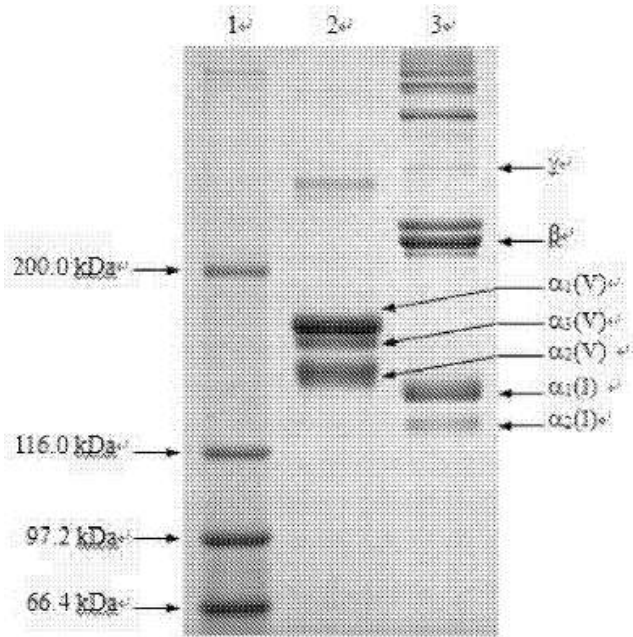
制备过程中应记录并保存以下内容：

- a) 执行各阶段操作人员的姓名；
- b) 操作时间、地点；
- c) 执行的具体操作内容；
- d) 操作结果或观察到的现象；
- e) 其他。

附 录 A
(资料性)

鱼皮 I 型和 V 型胶原蛋白 SDS-PAGE 图谱

鱼皮 I 型和 V 型胶原蛋白 SDS-PAGE 图谱见图1。



说明：
泳道1——蛋白质分子量标准；
泳道2——V 型胶原蛋白；
泳道3—— I 型胶原蛋白。

图A. 1 鱼皮 I 型和 V 型胶原蛋白 SDS-PAGE 图谱

参 考 文 献

- [1] GB/T 38482—2021 动物源性I型胶原蛋白成分测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳法
-