

· 基础研究 ·

猪皮胶原肽的抗氧化活性研究[△]

李婷, 于海涛, 金玉翠, 刘晓美, 李圆圆, 王常晔, 吴明泽, 代龙, 高鹏
(山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355)

[摘要] 目的: 研究不同分子量猪皮胶原肽的抗氧化特性, 筛选出抗氧化活性较强的组分。方法: 采用仿生酶解技术酶解新鲜猪皮得到酶解原液, 酶解原液经超滤得到 $M < 1$ kDa、 $1 \text{ kDa} < M < 3$ kDa、 $M > 3$ kDa 3 个不同分子量肽段, 猪皮经水提取得到猪皮水提液, 上述 5 组分分别冻干, 得到冻干粉。对不同分子量范围的猪皮胶原肽 5 组分进行肽含量测定和抗氧化性研究, 包括对 DPPH· 自由基、 $O_2^{\cdot -}$ · 自由基及·OH 自由基的清除实验。结果: 各组分的肽含量分别为酶解原液组分 64.62%、 $1 \sim 3$ kDa 组分 62.63%、大于 3 kDa 组分 62.13%、水提液组分 60.57%、小于 1 kDa 组分 59.75%。各组分清除 DPPH· 自由基能力顺序为: 小于 1 kDa 组分 $> 1 \sim 3$ kDa 组分 $>$ 酶解原液组分 $>$ 水提液组分 $>$ 大于 3 kDa 组分; 各组分清除 $O_2^{\cdot -}$ · 自由基能力顺序为: 小于 1 kDa 组分 $>$ 酶解原液组分 $> 1 \sim 3$ kDa 组分 $>$ 大于 3 kDa 组分 $>$ 水提液组分; 各组分清除·OH 自由基能力顺序为: 小于 1 kDa 组分 $> 1 \sim 3$ kDa 组分 $>$ 酶解原液组分 $>$ 大于 3 kDa 组分 $>$ 水提液组分。结论: 不同分子量的猪皮胶原肽组分均有一定的抗氧化活性, 其中 $M < 1$ kDa 组分具有较强的自由基清除能力。

[关键词] 猪皮胶原肽; 抗氧化; 自由基清除

Study on Antioxidative Effect of Porcine Collagen Peptide

LI Ting, YU Hai-tao, JIN Yu-cui, LIU Xiao-mei, LI Yuan-yuan, WANG Chang-lin,

WU Ming-ze, DAI Long, GAO Peng

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidative properties of collagen peptides with different molecular weights and screen out the components with the highest antioxidative activity. **Methods:** Fresh pigskin was digested by biomimetic enzymolysis to obtain the enzymatic hydrolyzate solution. Three different molecular weight peptides of $M < 1$ kDa, $1 \text{ kDa} < M < 3$ kDa, $M > 3$ kDa were obtained by ultrafiltration. The pigskin was extracted by water pig skin water extract, the above five components were lyophilized to obtain lyophilized powder. The peptide content and antioxidative activity of porcine skin peptide 5 components in different molecular weight range were studied, including the scavenging experiments of DPPH· free radical, $O_2^{\cdot -}$ · radical and·OH radical. **Results:** the peptide content of each component was the original enzyme solution: 64.62%, 1-3 kDa component: 62.63%, than 3kDa component: 62.13%, water extract component: 60.57%, less than the 1 kDa component: 59.75%; The order of scavenging DPPH· free radical of each component was: 1 kDa component $> 1 \sim 3$ kDa component $>$ enzymatic hydrolyzate component $>$ aqueous extract component $>$ more than 3kDa component; The order of scavenging $O_2^{\cdot -}$ · free radical capacity was: less than 1 kDa component $>$ digestive juice component $> 1 \sim 3$ kDa component $>$ more than 3 kDa component $>$ water extract component; ability to eliminate·OH radical of each component in order of: less than 1 kDa component $> 1 \sim 3$ kDa component $>$ enzymatic solution component $>$ more than 3 kDa component $>$ aqueous extract component. **Conclusion:** The porcine skin peptides with different molecular weights all have certain antioxidant activity, and $M < 1$ kDa has strong free radical scavenging ability.

[Keywords] Porcine collagen peptide; antioxidant; free radical scavenging

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171130001

[△] [基金项目] 山东省重点研发计划项目(2015GSF119012)

* [通信作者] 高鹏, 副教授, 研究方向: 中药制剂新技术、新剂型; E-mail: 48395504@qq.com

氧化是所有生物体中必不可少的反应,氧化代谢过程中自由基的形成也是不可避免的。几种慢性疾病如糖尿病、心血管疾病、神经变性疾病和癌症的发生或进展可能与自由基的过量生成有关^[1-2]。目前,许多蛋白质水解物及其分离的肽,如大豆蛋白^[3]、牛蛙皮^[4]、鱼皮明胶^[5]、鸡蛋蛋白^[6]、水稻胚乳蛋白和油菜籽蛋白^[7]等均已被发现具有抗氧化活性。抗氧化肽可以有效清除机体过剩的自由基,保护细胞和线粒体的正常结构和功能,在预防和治疗自由基诱发的一些慢性疾病和抗衰老方面有广泛的应用前景^[8]。

猪皮中胶原蛋白含量达到29%^[9]。通过酶解猪皮胶原蛋白得到的酶解产物中具有多种生理活性的肽,其中抗氧化活性多肽由于安全、高效等特点,被用于食品及化妆品中^[10]。因此进行猪皮胶原肽抗氧化性的研究具有重要的现实意义。目前,从猪皮中提取猪皮胶原的方法已十分成熟,常用提取方法包括碱提取、酸提取、酶解提取、热水提取^[11]。本研究直接以本实验室前期优化的酶解条件^[12]进行提取,对其进行超滤分离纯化,得到不同分子量肽段的胶原肽酶解液,浓缩冷冻干燥得到冻干粉,上述各组分与热水提取得到的胶原蛋白进行抗氧化能力比较,为从猪皮中提取抗氧化肽提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

新鲜猪皮(购于济南家家悦超市),胃蛋白酶(批号:090505,酶活力:3000 U·mg⁻¹,上海蓝季科技发展有限公司);胰蛋白酶(批号:091105,酶活力:1500 U·mg⁻¹,上海蓝季科技发展有限公司);牛血清白蛋白(批号:140626-200608,中国食品药品检定研究院)。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,批号:G1612053)、抗血酸(Vc,批号:A103537)均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;焦性没食子酸、氢氧化钠、无水碳酸钠、硫酸铜、酒石酸钾钠、钨酸钠、钼酸钠、硫酸锂、盐酸均为分析纯。

1.2 仪器

卷式超滤膜(1 kDa、3 kDa,北京市旭邦膜设备有限责任公司);FA2204B 万分之一电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司);BT300-2J 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);真空冷冻干燥机(北京博医康

实验仪器有限公司);HH-S4 数显恒温水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司);UV-1800 紫外可见分光光度计[岛津仪器(苏州)有限公司];电渗析器(沧州市众邦水处理技术有限公司);高速离心机(上海精密仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 不同分子量猪皮胶原肽的制备

取鲜猪皮,刮去脂肪层及血、肉等杂质,以剪刀剪成直径小于2 mm、长度小于2 cm的碎块,先用8倍量2%碳酸钠溶液脱脂4 h,滤去碱液,水洗至中性,加8倍量水加热煮沸15 min,匀浆3 min,待冷至约40℃,以25%盐酸调pH至1.5~2.0,加入1.5%胃蛋白酶(3000 U·g⁻¹),40℃保温酶解2 h,以25%氢氧化钠溶液调pH至7.5~8.0,加入2%胰蛋白酶(1000~1500 U·g⁻¹),40℃保温酶解4 h,酶解液加热煮沸15 min,冰箱冷藏过夜,离心,取上清液,控制操作电压为30 V,上样流速为50 L·h⁻¹进行电渗析脱盐处理。取部分脱盐后的酶解液减压浓缩(60~65℃, -0.07~-0.08 MPa)至相对密度为1.10~1.15(60℃),冷冻干燥后即得猪皮酶解原液冻干粉;将剩余脱盐后酶解液先后用不同分子截留量(3、1 kDa)的超滤膜进行分离,分别得到M>3 kDa组分、1 kDa<M<3 kDa组分、M<1 kDa组分,按上述条件减压浓缩,冷冻干燥,即得M>3 kDa、1 kDa<M<3 kDa、M<1 kDa冻干粉。

另取鲜猪皮,切成碎块,脱脂后,加10倍量水煎煮提取2 h,过滤,取上清液,按上述条件冷冻干燥,得到猪皮水提液冻干粉。

2.2 各组分肽含量的测定

2.2.1 溶液的配制 碱性铜的制备:取氢氧化钠1 g,碳酸钠5 g,加水40 mL使溶解,作为甲液;取酒石酸钾0.5 g,加水50 mL使溶解,另取硫酸铜0.25 g,加水30 mL使溶解,将两液混合作为乙液。临用前,取甲液40 mL、乙液8 mL,并加水至50 mL。

对照品溶液的制备:取牛血清白蛋白对照品适量,精密称定,加水制成每1 mL含0.2 mg的溶液,即得。

供试品溶液的制备:分别精密量取2.1项下各组分冻干粉50 mg,置100 mL量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 标准曲线的制备 精密量取牛血清白蛋白对

照品溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置 10 mL 试管中, 各加水至 1.0 mL, 分别加入碱性铜试液 1.0 mL, 摇匀, 再分别加入福林酚试液(取储备液稀释 16 倍)4.0 mL, 立即混匀, 置 55 ℃ 水浴中反应 5 min, 取出, 置冷水浴中冷却 10 min, 照紫外-可见分光光度法, 以 0 号管为空白, 在 650 nm 波长处测定吸光度。以牛血清白蛋白含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 并计算线性回归方程为 $Y = 2.4901X + 0.0385$, $r = 0.9995$ 。

2.2.3 供试品测定 精密量取供试品溶液 1.0 mL, 照标准曲线的制备项下自“加入碱性铜试液 1.0 mL”起操作, 依法测定吸光度, 从回归方程中计算各组分总肽的含量。猪皮各组分肽含量测定结果见表 1。

表 1 猪皮胶原肽各组分含量测定结果

猪皮胶原肽组分	质量分数(%)
M < 1 kDa 冻干粉	59.75
1 kDa < M < 3 kDa 冻干粉	62.63
M > 3 kDa 冻干粉	62.13
酶解原液冻干粉	64.62
水提液冻干粉	60.57

2.3 不同分子量猪皮胶原肽体外抗氧化能力的测定

蛋白水解产物的分子量大小对其生理活性具有重要的意义, 将 2.1 项下制备的样品分别配制成质量分数 1%、0.8%、0.6%、0.4%、0.2%、0.1% 的溶液, 采用不同氧化机制测定不同分子量猪皮胶原肽的抗氧化能力, 包括清除 DPPH· 活性、清除·OH 活性、清除 O_2^- · 活性, 分析抗氧化活性与分子量大小的关系。

2.3.1 不同分子量猪皮胶原肽组分对 DPPH 自由基清除能力测定 精确称量 4.10 mg DPPH, 溶解到 100 mL 无水乙醇中, 配制成浓度为 $6.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 乙醇溶液。分别吸取 2 mL 样液与 2 mL DPPH 的无水乙醇溶液置于试管中, 摇匀, 在室温反应 30 min 后在波长 517 nm 处测定吸光度(A_i); 分别吸取 2 mL 样液和无水乙醇于试管中, 摇匀, 室温反应 30 min 后在 517 nm 波长处测定吸光度(A_j); 最后分别吸取 2 mL DPPH 无水乙醇溶液与无水乙醇于试管中, 摇匀, 在室温反应 30 min 后在 517 nm 波长处测定吸光度(A_c)^[13]。按公式(1)计算 DPPH 自由基清除率, 结果如图 1、2 所示。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100\% \quad (1)$$

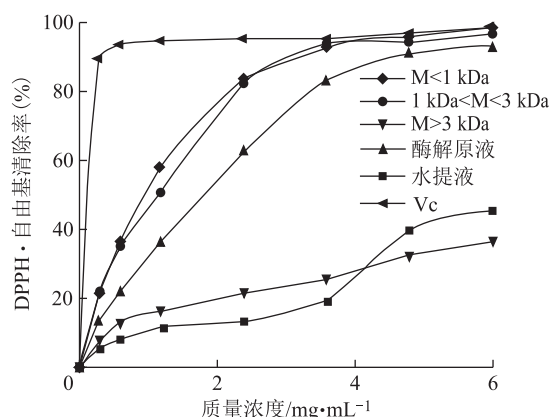


图 1 猪皮胶原肽各组分 DPPH· 自由基清除作用比较

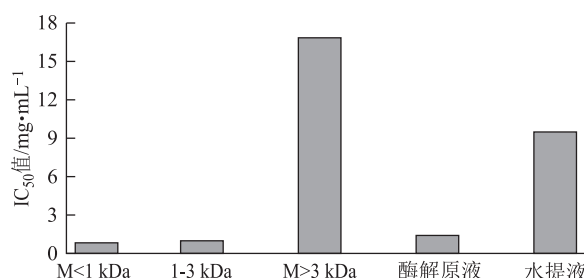


图 2 猪皮胶原肽各组分清除 DPPH· 自由基能力的比较

从图 1 不同分子量猪皮胶原肽对 DPPH· 自由基的清除率趋势可以看出, 在实验范围内(0.3 ~ 6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 不同分子量猪皮胶原肽对 DPPH· 自由基都有一定的清除作用, 且随猪皮胶原肽质量浓度的增加, 各组分对 DPPH· 自由基的清除率不断增加, 表明不同分子量猪皮胶原肽对 DPPH· 自由基的清除率具有量效关系; 随分子量增加猪皮胶原肽清除 DPPH· 自由基效果呈下降趋势, 通过比较 IC_{50} , 各组分清除 DPPH· 自由基能力顺序为: 小于 1 kDa 组分 > 1 kDa ~ 3 kDa 组分 > 酶解原液组分 > 水提液组分 > 大于 3 kDa 组分, 小于 1 kDa 组分对 DPPH· 自由基清除率最高, 其 IC_{50} 值为 $0.836 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 当质量浓度增加到一定量时, 清除 DPPH· 自由基能力接近 Vc。起作用的主要是一些小分子量的肽, 可能是由于许多功能性小肽多集中在这部分, 这与一些文献报道一致^[14], 说明超滤处理能够富集猪皮胶原肽中对 DPPH· 自由基清除活性强的组分。

2.3.2 不同分子量猪皮胶原肽组分对 O_2^- · 活性清除能力测定

2.3.2.1 邻苯三酚自氧化速率的测定 取 4.5 mL 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 8.2)、加 4.2 mL

蒸馏水于 10 mL 试管中,混匀后在 37 ℃ 水浴中保温 20 min,取出后立即加入 0.3 mL 在 37 ℃ 预热过的 $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻苯三酚,空白管用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸代替邻苯三酚的盐酸溶液,迅速混匀后倒入比色皿中,322 nm 下每隔 30 s 测定吸光度,连续记录 4 min 内吸光度的增加,以 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液配制空白管作为对照,记录结果^[15]。

2.3.2.2 不同分子量猪皮胶原肽抑制邻苯三酚自氧化速率的测定 按上述步骤加入 pH = 8.2 缓冲液 4.7 mL,然后分别加入肽质量浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的猪皮胶原肽溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2 mL,蒸馏水补至 4.2 mL,加入 0.3 mL 邻苯三酚迅速摇匀,同样以 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液作为空白管,同上测定。按公式(2)计算加入猪皮胶原肽后邻苯三酚的自氧化速率,按公式(3)计算清除率。

$$\Delta A_0 = \left(\frac{A_4 - A_3}{3} \right) \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\Delta A}{\Delta A_0} \right) \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_3 为 30 s 时的吸光度; A_4 为 4 min 时的吸光度; ΔA_0 为邻苯三酚自氧化速率, ΔA 为加入猪皮胶原肽溶液后邻苯三酚的自氧化速率。

不同分子量猪皮胶原肽对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除作用见图 3、4。在实验范围内($0.1 \sim 1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),不同分子量猪皮胶原肽对 $\text{O}_2^- \cdot$ 均有一定清除作用,与未酶解的水提胶原肽相比,猪皮胶原蛋白酶解物具有较高的清除 $\text{O}_2^- \cdot$ 的能力,随着猪皮胶原肽质量浓度的增加,对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除率不断增加,通过比较 IC_{50} 值,各组分清除能力顺序为:小于 1 kDa 组分 > 酶解原液组分 > 1 kDa ~ 3 kDa 组分 > 大于 3 kDa 组分 > 水提液组分,结果显示小于 1 kDa 组分对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除力最强,其 IC_{50} 值为 $0.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 不同分子量猪皮胶原肽组分对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力测定 精密量取 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH = 7.4 磷酸盐缓冲液 2.0 mL、 $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻二氮菲 0.2 mL、 $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁溶液 0.2 mL、不同猪皮胶原肽组分试样 0.4 mL、蒸馏水 0.8 mL、体积分数 0.1% 过氧化氢 0.4 mL 于试管中,混匀做试样组,将各试管同时于 37 ℃ 恒温放置 1 h,在 536 nm 处测定吸光度。空白组以蒸馏水代替样品,其余步骤同试样组;空白对照组以蒸馏水分别代替试样和双氧

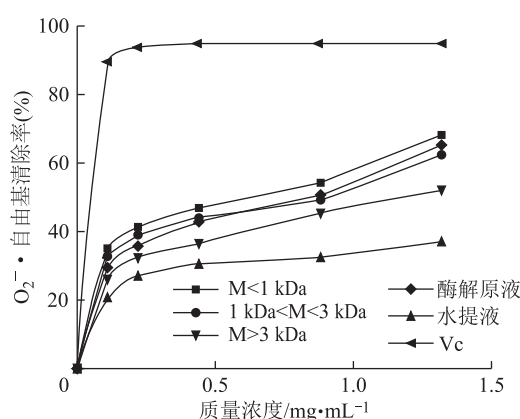


图3 猪皮胶原肽各组分对 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除作用比较

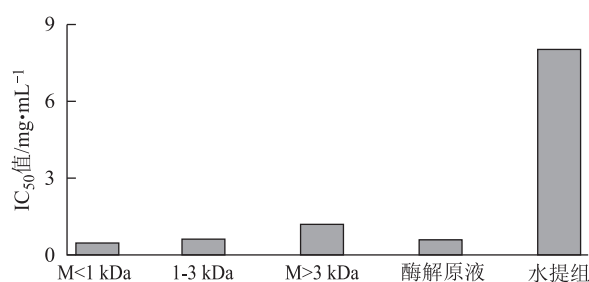


图4 猪皮胶原肽各组分清除 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基能力比较

水,其余步骤同试样组,按公式(4)计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \left(\frac{A_{\text{试样}} - A_0}{A_{\text{空白对照}} - A_0} \right) \times 100\% \quad (4)$$

式中: $A_{\text{试样}}$ 为试样组的吸光度值, A_0 为空白组的吸光度值, $A_{\text{空白对照}}$ 为空白对照组的吸光度值。

猪皮胶原肽不同分子量组分对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用见图 5、6。在实验范围内($0.3 \sim 6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),不同分子量猪皮胶原肽酶解组分对 $\cdot\text{OH}$ 均有一定清除作用,且随浓度的增加清除能力也增加,不同分子量猪皮胶原蛋白肽组分对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力不同,通过比较 IC_{50} ,各组分清除能力顺序为:小于 1 kDa 组分 > 1 kDa ~ 3 kDa 组分 > 酶解原液组分 > 大于 3 kDa 组分 > 水提液组分,结果显示小于 1 kDa 组分对 $\cdot\text{OH}$ 的清除力最强,其 IC_{50} 值为 $2.195 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

本实验采用仿生酶解技术酶解新鲜猪皮得到酶解原液,酶解原液经超滤得到 $M < 1 \text{ kDa}$ 、 $1 \text{ kDa} < M < 3 \text{ kDa}$ 、 $M > 3 \text{ kDa}$ 3 个不同分子量肽段,猪皮经水提取得到猪皮水提液,上述 5 组分分别冻干,得到冻干粉。对猪皮胶原肽 5 组分进行抗氧化性研究,包

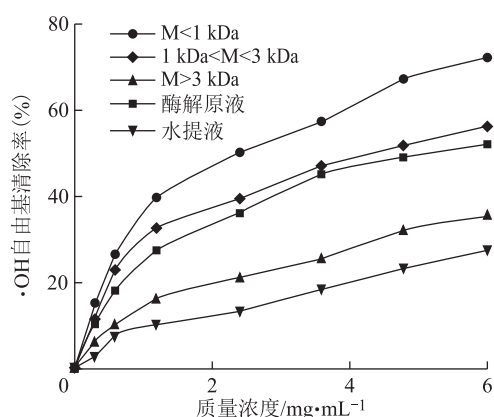


图5 猪皮胶原肽各组对·OH清除作用比较

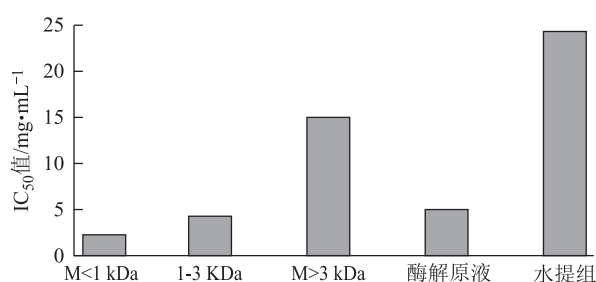


图6 猪皮胶原肽各组分清除·OH自由基能力比较

括对 DPPH· 自由基、 $O_2^{\cdot-}$ 自由基及·OH 自由基的清除实验。结果表明,不同分子量的猪皮胶原肽组分均有一定的抗氧化活性,其中 $M < 1$ kDa 组分的清除活性最强,这一结果印证了 Guillen 等^[16] 研究得出的分子量大小也会影响肽抗氧化活性的结论。

参考文献

- [1] Bidchol A M, Wilfred A, Abhijna P, et al. Free radical scavenging activity of aqueous ethanolic extract of *Brassica oleracea* L. var. italica[J]. Food Bioprocess Tech, 2011, 4(7): 1137-1143.
- [2] Butterfield D A, Castenga A, Pocernich C B, et al. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's diseases[J]. Nutr Biochem, 2002, 13: 444-461.
- [3] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. Agric Food Chem, 1996, 44: 2619-2623.
- [4] Qian Z J, Jung W K, Kim S K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw[J]. Biore-source Tech, 2008, 99: 1690-1698.
- [5] Sampath Kumar N S, Nazeer R A, Jaiganesh R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*) [J]. Amino Acids, 2012, 42(5): 1641-1649.
- [6] Davalos A, Miguel M, Bartolome B, et al. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis[J]. Food Protect, 2004, 67: 1939-1944.
- [7] Chen C, Chi Y J, Zhao M Y, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate[J]. Amino Acids, 2012, 43: 457-466.
- [8] 张昊,任发政.天然抗氧化肽的研究进展[J].食品科学, 2008, 29(1): 443-447.
- [9] 赵胜年.酶解鲜猪皮提取水解胶原蛋白的研究[J].食品工业科技, 1998, 19(5): 16-17.
- [10] 张忠楷.胶原、明胶和胶原水解物的物理化学性能及护肤功能的研究[D].成都:四川大学, 2006.
- [11] 于玮,王雪蒙,马良,等.猪皮胶原蛋白提取过程中酶解条件优化及其结构鉴定[J].西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(4): 106-113.
- [12] 刘长龙.猪皮促创面愈合活性肽的制备分离及鉴定研究[D].济南:山东中医药大学, 2013.
- [13] 宁杰,岳峰,巴媛媛,等.甜菊叶提取物清除 DPPH 能力的研究[J].中国食品学报, 2011, 11(6): 27-34.
- [14] 朱洪珍.海地瓜胶原蛋白多肽的提取及其在化妆品中的应用[D].福州:福建农林大学, 2011.
- [15] 玄红专,桑青,麻建军.邻苯三酚自氧化法测定不同蜂产品抗氧化活性的研究[J].食品科技, 2008(4): 137-139.
- [16] Guillen E, Abeijon C, Hirschberg C B. The genes for the Golgi apparatus N-acetylglucosaminyl transferase and the UDP-N-acetylglucosamine transporter are contiguous in *Kluyveromyces lactis* [J]. J Biol Chem, 1999, 274(10): 6641-6646.

(收稿日期 2017-11-30)