

鲨鱼皮胶原蛋白肽的成分分析及对血管紧张素转化酶活力的影响

蒋哲¹, 孟凡国², 陈琼华³, 王勤¹, 柯莉娜¹, 陈清西^{1*}

(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. 浙江清华长三角研究院, 浙江 嘉兴 314100; 3. 厦门市第一医院, 福建 厦门 361004)

摘要: 以鲨鱼皮为原料, 采用现代生物化学技术制备胶原蛋白肽水解液, 经过喷雾干燥, 获得鲨鱼皮胶原蛋白肽干粉。对获得的胶原蛋白肽样品进行成分分析, 测定了粗蛋白、粗脂肪、水分、灰分以及 K、Na、Ca、Fe、Cu、Zn、Pb 等金属元素的含量, 应用氨基酸自动分析仪测定样品的氨基酸组成, 并用化学分析法测定羟脯氨酸含量为 7.08%, 应用 MALDI-TOF 分析胶原蛋白肽分子量的分布, 表明我们得到的鲨鱼皮胶原蛋白的水解产物——胶原蛋白肽的分子量主要分布在 2~3 ku, 为水溶性多肽混合物。研究鲨鱼皮胶原蛋白肽对血管紧张素转化酶(ACE)的抑制效应, 表明该样品对 ACE 有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 为 4.8 mg/mL。本文还探讨了鲨鱼皮胶原蛋白的吸湿性和保湿性。

关键词: 鲨鱼皮; 胶原蛋白肽; 成分分析; 血管紧张素转化酶; 抑制作用

中图分类号: Q 516

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)06-0879-04

胶原蛋白肽是以各种胶原蛋白(动物的皮、骨、鳞等)为原料, 经多种蛋白酶等酶解处理后制得的产物。胶原蛋白肽可完全溶解于水, 水溶液低黏度, 分子量小, 易于被消化吸收, 没有过敏反应, 可应用于开发保健食品。胶原蛋白肽还具有一些生理调节功能, 例如: 具有美容的作用, 可以添加到化妆品中; 保护胃粘膜以及抗溃疡作用; 抑制血压上升作用; 促进骨形成作用; 促进皮肤胶原蛋白代谢作用; 对关节炎等胶原病具有很好的预防及治疗作用^[1]。因此, 胶原蛋白肽在食品及医药等领域将有很大的开发前景。近年来随着疯牛病和口蹄疫的爆发, 引起了人们对哺乳动物为来源的胶原蛋白产品的卫生及安全的关注, 因此开发新型的胶原蛋白原料已成为新的研究课题。血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)可使人体内血压升高^[2], 如果能够抑制 ACE 的活性, 就可以实现降压作用。李朝慧^[3]采用 5.5% 的酶用量对乳清蛋白酶解 6 h, 制备 ACE 抑制肽。为了开发鲨鱼皮下脚料, 我们曾经用胰蛋白酶水解, 制备鲨鱼、鲢鱼、草鱼和罗非鱼的胶原蛋白^[4], 我们摸索、优化蛋白酶酶解鲨鱼皮, 制备胶原蛋白肽的最佳工艺条件, 并对产品的主要成分进行分析测定, 探讨产品对血管紧张素转化酶

(ACE)的抑制效应, 阐明鲨鱼皮胶原蛋白应用于预防高血压疾病的作用, 具有理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灰星鲨(*Mustelus griseus*)皮购自厦门第八菜场。蛋白质水解酶为本实验室开发产品, 血管紧张素转化酶参考吴琼英^[5]的方法从刚屠宰的猪肺分离纯化获得。MALDI-TOF 质谱所用试剂均为布鲁克公司产品。其余试剂均为国产分析纯。所用的蒸馏水为无离子双蒸馏水。

1.2 鲨鱼皮胶原蛋白肽的制备

称取一定量的鲨鱼皮, 应用现代生物化学实验技术, 蛋白质水解酶降解, 获得鲨鱼皮酶解液, 经酶灭活、杀菌、并通过喷雾干燥, 获得鲨鱼皮胶原蛋白肽样品, 以供分析。

1.3 ACE 的分离及纯化

ACE 的分离及纯化参照参考文献[5]的方法进行。以猪肺为提取 ACE 材料, 经硼酸缓冲液(pH 8.3)抽提、硫酸铵分级分离, 获得粗酶制剂。经对 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.3)透析除去硫酸铵后, 进一步通过 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析和 DEAE-32 离子交换凝胶过滤柱层析等纯化步骤, 获得 ACE 部分纯的酶制剂。

1.4 实验方法

收稿日期: 2007-12-01

基金项目: 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放课题(2007108)资助

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

ACE 活力测定参考许庆陵的体外检测法^[6]. 在 37℃, pH 8.3 条件下催化分解血管紧张素 iv 的模拟物 (Hip-His-Leu, HHL) 产生马尿酸, 产物马尿酸在波长 228 nm 处具有特征吸收峰, 根据光密度值的变化计算酶活力. 胶原蛋白肽对 ACE 抑制率(%) 的计算参照许庆陵^[6]的方法, 按下式计算: $I\% = (A - B) / A \times 100\%$, 式中: A 为未加入胶原蛋白肽溶液只加入蒸馏水的吸光度值(对照组); B 为加入胶原蛋白肽溶液后的吸光度值(加样组).

蛋白浓度测定采用 Folin 试剂法^[7]; 粗脂肪含量测定采用 GB/T 5009.6-85 索氏抽提法; 灰分含量测定采用 GB/T 5009.4-85 高温烧法; 金属元素测定采用火焰原子吸收光谱法测定^[8]; 粗蛋白含量测定采用 GB/T 5009.5-85 凯氏定氮法. 氨基酸含量测定酸水解, 用氨基酸自动分析仪测定样品的氨基酸组成. 羟脯氨酸含量测定采用比色法测定^[9].

多肽分子量范围测定采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱法(MALDI-TOF). 配制浓度为 50 μg/mL 的样品溶液, 将其与基质 α-4 氰羟肉桂酸(HCCA) 混匀, 点样, 最后用质谱仪进行分子量检测.

吸湿性和保湿性的测定采用称量法, 精确称量干燥的鲨鱼皮胶原蛋白肽 0.500 0 g, 于称量瓶中, 置于含有饱和碳酸钠溶液(RH=43%) 的干燥器 48 h 后, 称量样品前质量(m_0) 和放置后质量(m_1). 根据下式计算吸湿率: $\text{吸湿率}(\%) = (m_1 - m_0) / m_0 \times 100\%$; 将测定吸湿率后的试样继续放置 48 h, 称取试样质量(m_2), 由继续放置前后试样的质量差, 用下式求出保湿率: $\text{保湿率}(\%) = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \times 100\%$.

2 实验结果与讨论

2.1 胶原蛋白肽的主要成分分析

采用国标法测定鲨鱼皮胶原蛋白肽样品的蛋白质、粗脂肪、灰分和水分百分含量比, 测定结果见表 1. 表明从鲨鱼皮制备的胶原蛋白肽的粗蛋白含量很高, 而粗脂肪和灰分的含量很低, 属于很好的“低脂高蛋白”保健产品.

表 1 胶原蛋白肽的主要成分

Tab. 1 Main components of collagen peptides

成分/ %	含量
蛋白质	87.50 ± 1.50
粗脂肪	0.15 ± 0.05
灰分	1.05 ± 0.05
水分	11.00 ± 0.50

2.2 胶原蛋白肽样品的金属元素成分分析

采用火焰原子吸收光谱法测定鲨鱼皮胶原蛋白肽样品的金属元素含量, 结果见表 2, 样品中含有人体必需的金属元素 Cu、Zn、Fe、Ca、Na、K 等. Pb 的含量太低而无法测出, 说明样品中几乎不含该重金属.

表 2 胶原蛋白肽的金属元素含量
Tab. 2 Metal elements of collagen peptides

成分	含量/ (mg · kg ⁻¹)
Cu	7.89 ± 0.05
Zn	6.02 ± 0.02
Fe	74.29 ± 0.05
Ca	92.26 ± 0.04
Na	1705.00 ± 0.02
K	2368.00 ± 0.02
Pb	< 0.10

表 3 胶原蛋白肽氨基酸含量

Tab. 3 Contents of amino acids in collagen peptides

样品	S1/ %	样品	S1/ %
天冬氨酸	5.81	亮氨酸*	4.24
苏氨酸*	2.32	酪氨酸	1.16
丝氨酸	2.25	苯丙氨酸*	2.38
谷氨酸	12.09	赖氨酸*	4.42
甘氨酸	17.00	组氨酸	1.08
丙氨酸	8.59	精氨酸	7.35
半胱氨酸	0.09	脯氨酸	4.43
缬氨酸*	3.15	羟脯氨酸	7.08
蛋氨酸*	2.02	氨基酸总量	88.34
异亮氨酸*	2.88	必需氨基酸总量	21.41

* 为必需氨基酸.

2.3 胶原蛋白肽的氨基酸组成

采用酸水解, 用氨基酸自动分析仪测定样品的氨基酸组成含量, 结果见表 3, 除色氨酸水解被破坏未能测出外, 共测出 18 种氨基酸, 氨基酸种类齐全、含量都高达 88.34%. 必需氨基酸含量占 21.41%. 从表 3 可见, 鲨鱼皮胶原蛋白肽中甘氨酸含量最高, 这是因为胶原蛋白肽链中含有很多 Gly-x-y 结构, 保证了胶原蛋白分子间及分子内的广泛交联, 从而使胶原具有很强的稳定性. 用此方法研制的胶原蛋白肽中羟脯氨酸(Hyp) 的含量高达 7.08%, Hyp 在其他蛋白中很少发现, 可以说胶原蛋白中含有大量的羟脯氨酸是这类蛋白特有的性质. 补充羟脯氨酸可以增加骨结构性网架

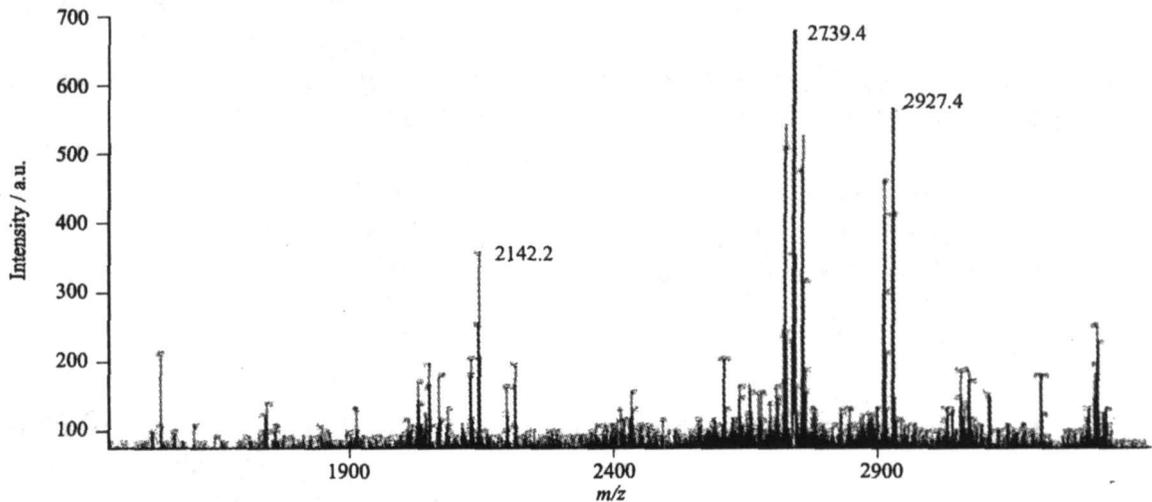


图 1 胶原蛋白肽的质谱分析图

Fig. 1 Mass spectrogram of collagen peptides

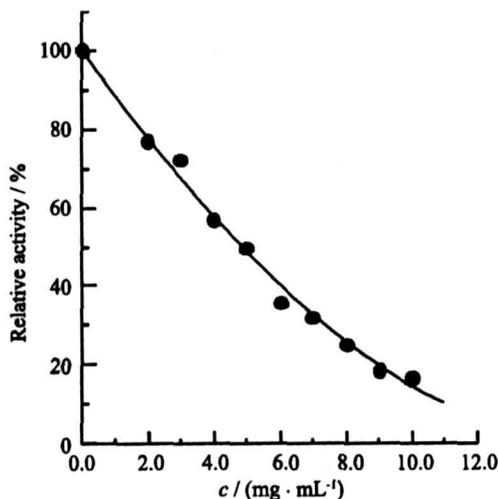


图 2 鲨鱼皮胶原蛋白肽对 ACE 的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of collagen peptides on the activity of ACE

的规则性和牢固性,使机体所吸收的大量钙盐有序沉着,从而真正达到补骨壮骨的目的^[10]。另外,胶原蛋白肽可以在肠道直接被吸收,而且肽类比氨基酸具有更大的吸收量^[11]。由此表明,胶原蛋白肽在食品领域有很好的开发前景。

2.4 鲨鱼皮胶原蛋白肽的分子量分布范围

采用基质辅助激光解吸附飞行时间质谱法(MALDI-TOF)测定样品胶原蛋白多肽的分子量分布范围。结果见图 1,制备的鲨鱼皮胶原蛋白肽分子量分布范围主要在 2~3 ku。

2.5 胶原蛋白肽对 ACE 的抑制作用

以血管紧张素 iv 的模拟物(Hip-His-Leu, HHL)为底物,在 37℃,pH 8.3 条件下测定猪肺血管紧张素转化酶(ACE)活力。在测活体系中,加入不同量的胶

原蛋白肽样品,分析鲨鱼皮胶原蛋白肽对 ACE 活力的影响。结果见图 2,由图可知,鲨鱼皮胶原蛋白肽对 ACE 有较强的抑制作用,随着加入的样品浓度增大,酶的剩余活力呈指数下降,显示抑制作用的浓度效应,测得酶活力下降 50% 所需的抑制剂浓度,IC₅₀ 为 4.8 mg/mL。结果显示,鲨鱼皮胶原蛋白肽可以通过抑制血管紧张素转化酶达到降血压的生理功效。

2.6 鲨鱼皮胶原蛋白肽的吸湿性和保湿性能的测定

为了能将胶原蛋白肽应用于化妆品,我们测定了鲨鱼皮胶原蛋白肽的吸湿和保湿性能,并与常规的保湿剂甘油进行了对比,结果表明,鲨鱼皮胶原蛋白肽的吸湿率为(26.9±0.5)%,保湿率为(133±2.5)%,在同样的条件下,测得甘油的吸湿率为(54.5±1.0)%,保湿率为(135±3.0)%。显示鲨鱼皮胶原蛋白肽的吸湿率比甘油要差一些,但保湿率与甘油的相当,说明鲨鱼皮胶原蛋白肽具有一定的吸湿性和保湿性,以及与生物有机体有较强的亲和力,使其作为保健食品和化妆品原料的开发都具有极大的市场前景。

参考文献:

- [1] 陈胜军,曾名勇,董士远. 水产胶原蛋白及其活性肽的研究进展[J]. 水产科学, 2004, 6(23): 44-46.
- [2] Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, et al. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors[J]. J Hypertens, 1998, 12(2): 2027-2037.
- [3] 李朝慧,罗永康,王全宇. 乳清蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的研究[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(2): 8-11.
- [4] 陈申如,蔡扬鹏,陈清西. 鱼皮胶原蛋白的纯化及酶解性

- 质的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43 (Sup.): 20- 23
- [5] 吴琼英, 马海乐, 崔恒林. 猪肺血管紧张素转化酶的提取纯化及其性质研究[J]. 食品科学, 2004, 25(9): 71- 74.
- [6] 许庆陵, 曾庆祝, 崔铁军, 等. 鲢头酶解物对 ACE 的抑制活性[J]. 大连水产学院学报, 2004, 6(19): 87- 91.
- [7] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265- 275.
- [8] 宁正祥, 彭新湘, 甘霖, 等. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 594- 627.
- [9] 张俊杰, 曾庆孝. 比色法测定鱼鳞中羟脯氨酸的研究[J]. 食品科技, 2004, 4: 83- 85.
- [10] 修海霞, 徐颖, 程显峰. 胶原鹿骨粉中羟脯氨酸含量测定[J]. 中医药信息, 2003, 20(1): 28- 29.
- [11] Adibi A S. Intestinal phase of protein assimilation in man [J]. America Nutrition, 1984, 14: 11- 22.

The Effects of Shark Skin Peptides on ACE and the Analysis of Peptides

JIANG Zhe¹, MENG Fang-guo², CHEN Qiong-hua³,

WANG Qin¹, KE Li-na¹, CHEN Qing-xi^{1*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Zhe Jiang Tsinghua Yangtse Delta Research Institute, Jiading 314100, China;

3. Xiamen First Hospital, Xiamen 361004, China)

Abstract: In this paper, collagen peptide powder from the shark skin was prepared by some biochemistry techniques including proteinase hydrolysis, spray torrefaction. The basic components of the collagen peptide samples were analyzed. The contents of protein, lipid, ash, and the metallic elements such as K, Na, Ca, Fe, Cu, Zn, Pb were mensurated. The amino acid composition and content were determined by automatic amino acid analyzer. The content of hydroxyl praline was tested using the chemistry analytical method. The molecular mass ranges of the collagen peptides were determined by the method of MALDI-TOF. The results showed that the collagen peptide powder, we obtained from the shark skin collagen protein by protease hydrolysis, was water-solubility and the molecular mass ranges of most collagen peptides were between 2 ku and 3 ku. The effect of the collagen peptide powder on the activity of angiotensin converting enzyme (ACE) was studied and the results showed that the collagen peptides had inhibitory effect on ACE, the IC_{50} value was determined to be 4.8 mg/mL. The moisture absorption and maintenance ratio of the collagen peptides was also studied, they were 26.9% and 123%, respectively.

Key words: shark skin; collagen peptides; components analysis; ACE; inhibition