

金枪鱼鱼骨胶原肽的制备及抗氧化活性研究

谭洪亮, 郁迪, 王斌*, 胡发远, 马剑茵

(浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江舟山 316022)

摘要: 为制备金枪鱼鱼骨胶原肽, 并对其抗氧化活性进行研究, 利用酶解、超滤、凝胶色谱和反相高效液相色谱制备抗氧化胶原肽, 采用氨基酸序列分析仪测定其氨基酸序列, 利用质谱 (ESI-MS) 确定其分子量, 采用羟自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基和超氧阴离子自由基清除实验和脂质过氧化抑制实验对胶原肽抗氧化能力进行评价。结果显示, 金枪鱼鱼骨胶原蛋白经胃蛋白酶和胰蛋白酶 2 步酶解和分离纯化得到 1 个十肽 (TFCH-P2), 经氨基酸序列分析和质谱 (ESI-MS) 确定其氨基酸序列为 Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Gln-Gly (GPAGPAGQEG), 分子量为 839.87 u ($[M+H]^+$ 840.68 u)。体外抗氧化实验结果表明, GPAGPAGQEG 对羟自由基 (EC_{50} 0.18 mg/mL)、DPPH 自由基 (EC_{50} 0.97 mg/mL)、ABTS 自由基 (EC_{50} 0.52 mg/mL) 和超氧阴离子自由基 (EC_{50} 0.38 mg/mL) 具有良好的清除作用; GPAGPAGQEG 亦显示出良好的脂质过氧化抑制作用。研究表明, 胶原肽 GPAGPAGQEG 抗氧化活性良好, 可以用于抗氧化相关的功能食品、药物或者食品添加剂。

关键词: 金枪鱼; 鱼骨; 多肽; 抗氧化活性

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

胶原蛋白是动物体内含量最多的蛋白质, 广泛存在于动物骨骼、肌腱、软骨、皮肤及其它结缔组织中, 约占哺乳动物总蛋白的 30%^[1]。目前, 已知有 29 种不同的具有三重螺旋结构的胶原蛋白^[2]。胶原蛋白具有很强的生物活性及生物功能, 能参与细胞的迁移、分化和增殖, 使骨髓、软骨和皮肤具有一定的机械强度, 因其具有较弱的抗原性和良好的生物相容性, 在烧伤、创伤、眼角膜疾病、美容、硬组织修复、创面止血等医药卫生领域用途广泛^[3-4]。然而, 胶原蛋白的分子量大, 难以被人体直接吸收, 必须酶解成小分子肽和氨基酸, 才能被吸收利用, 再经过复杂的生物化学反应, 最后合成满足各器官结缔组织所需的胶原蛋白。胶原蛋白肽 (胶原肽) 是胶原蛋白经过降解 (化学降解或者酶解) 所得到的介于氨基酸和蛋白质之间的一类化合物, 虽然其与胶原蛋白只有肽链长短之别, 但是其除保存了胶原蛋白本身特性之外, 还具有了更显著的生理活性,

其中胶原肽的抗氧化性受到普遍关注, 已被应用于医药、保健、食品加工、化妆品等众多领域, 制成具有护肤美容和延缓皮肤老化功能的化妆品和保健食品^[5-6]。

据联合国粮农组织统计, 金枪鱼年捕获量超过 6×10^6 万 t, 占公海渔业总产量的 70% 以上, 是世界远洋渔业的重要作业鱼种之一^[7]。在金枪鱼加工过程中产生占总重量 50%~70% 的下脚料, 其中 20% 下脚料为鱼骨。然而, 鱼骨并未得到有效利用, 主要作为低值饲料、肥料出售, 甚至随意丢弃, 既浪费了宝贵的远洋资源, 又污染环境。因此, 金枪鱼鱼骨的高值化利用对于金枪鱼产业的发展 and 环境保护具有重要意义。本研究以金枪鱼鱼骨为原料, 利用酸提法制备其胶原蛋白, 并以此为材料, 通过蛋白酶酶解、膜超滤、凝胶色谱和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 从中制备高活性抗氧化肽, 利用氨基酸

收稿日期: 2013-08-10 修回日期: 2013-11-16

资助项目: “十二五” 国家科技支撑计划 (2012BAD29B06); 浙江省重大科技专项 (2011C02003); 浙江省自然科学基金项目 (Y2110636)

通信作者: 王斌, E-mail: wangbin4159@hotmail.com

序列分析仪和质谱确定胶原肽的氨基酸序列和分子量,采用羟自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基和超氧阴离子自由基清除实验和脂质过氧化实验评价多肽的抗氧化活性,为其后续开发利用提供数据支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

DPPH、胃蛋白酶、胰蛋白酶、BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)为上海源聚生物科技有限公司进口分装;葡聚糖凝胶 G-15 为 Pharmacia 进口分装;乙腈为 Fluka 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

金枪鱼(skipjack tuna)经鉴定为鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*),金枪鱼鱼骨由宁波丰盛食品有限公司提供。

1.2 实验方法

金枪鱼鱼骨酸溶性胶原蛋白及其酶解物的制备 金枪鱼鱼骨中胶原蛋白的提取参考文献[8-10]的方法,金枪鱼鱼骨粉末依次用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液和 0.5 mol/L 的 EDTA-Na₂ (pH 7.4)溶液浸泡脱除杂蛋白、色素和矿物质等成分,然后按料液比 1:20(W/V)加入 0.5 mol/L 的乙酸溶液搅拌提取 24 h,4 500 r/min 离心 15 min,取上清液,残渣重复上述过程,合并 2 次提取液,即为粗胶原蛋白。取适量粗胶原蛋白加入 NaCl 至溶液终浓度为 2.5 mol/L,同时析出絮状沉淀,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min 得沉淀物即为盐析后的酸溶性胶原蛋白(acid-solubilised collagen, ASC),得率为 2.47%。

胶原蛋白酶解物的制备参照文献[11]的方法,按料液比 1:2(W/V)将金枪鱼鱼骨胶原蛋白加入到甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.0, 0.05 mol/L),按照酶/底物比(E/S)为 2% 加入胃蛋白酶,在 37 ℃ 条件下酶解 3 h 后,酶解液用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 8.0,于 37 ℃ 按照酶/底物比(E/S)为 2% 加入胰蛋白酶酶解 3 h,酶解液加热至 95 ℃ 恒温保持 10 min 灭酶,离心取上清液,经 D101 大孔树脂脱盐、真空干燥,得金枪鱼鱼骨胶原蛋白酶解物(TFCH),-20 ℃ 条件下冷冻保存。

TFCH 的超滤分级 将 TFCH 粉末配成 25.0 mg/mL 的溶液用截留分子量为 5 和 1 ku 的超滤膜进行分级,按分子量大小得到 TFCH-I (MW > 5 ku)、TFCH-II (1 ku < MW < 5 ku) 和

TFCH-III (MW < 1 ku) 3 个组分,浓缩冷冻干燥后测定所得组分的抗氧化活性,选择羟自由基清除活性最高的组分进行下一步分离。

Sephadex G-15 凝胶层析 将羟自由基清除活性最强的超滤组分 TFCH-III 配成 10.0 mg/mL 的溶液,取 5 mL 加入到预先处理好的 Sephadex G-15 层析柱(2.0 cm × 160 cm),用超纯水洗脱,流速为 1.0 mL/min,自动部分收集器每 5 min 收集一管,于 220 nm 检测吸光度并绘制吸光度曲线,按照吸光度曲线合并各洗脱峰,冷冻干燥得组分 TFCH-III-1、TFCH-III-2 和 TFCH-III-3。测定冻干后的各组分的羟自由基清除率,大量收集清除率最高的洗脱峰并浓缩冷冻干燥,-20 ℃ 条件下保存、备用。

反相高效液相色谱 将 TFCH-III-3 配成 100.0 μg/mL 的溶液,利用反相高效液相色谱纯化,色谱条件为高效液相色谱仪:Agilent 1260;色谱柱:Zorbax C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:25 ℃;流动相:30% 乙腈(含 0.1% 三氟乙酸);洗脱速度 1.0 mL/min;检测波长 220 nm。

TFCH 的氨基酸(AA)组成分析 氨基酸(AA)组成分析参照陆剑锋等^[3]方法进行。称取 1 mg 冷冻干燥的 TFCH 放入安瓿瓶中,加入 2 mL HCl(6 mol/L)(色氨酸测定采用 KOH 水解),并充入少量 N₂,在酒精喷灯下迅速封管,110 ℃ 条件下水解 24 h。水解结束后,冷却水解物,移至坩埚,在 70 ℃ 水浴锅中挥发剩余盐酸,再加入少量双蒸水蒸干,重复 3 次。用适量 pH 2.20 的缓冲液溶解后定容,并用 0.22 μm 微孔滤膜除杂,滤液用 HITACH L8800 氨基酸全自动分析仪进行测定。

多肽的氨基酸序列检测和分子量测定 多肽的氨基酸序列分析采用 N-端分析法,利用 ABI 494 蛋白/多肽测序仪进行测定。分子量采用 ESI-MS 进行测定。

抗氧化实验 羟自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基和超氧阴离子自由基清除率实验,以及脂质过氧化实验参照文献[12]的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 TFCH 的氨基酸组成分析

TFCH 中甘氨酸含量最高(337.3 残基/1000 残基),丙氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸的含量相对较高,而半胱氨酸、组氨酸和酪氨酸的

含量相对较少(表1)。因此,TFCH符合典型的胶原蛋白氨基酸组成特征^[3,13]。

表1 金枪鱼鱼骨酸溶性胶原蛋白酶解物(TFCH)的氨基酸组成分析(残基/1000残基)

Tab.1 Amino acid compositions of collagen hydrolysate of skipjack tuna fishbone(TFCH) (residues/1000 residues)

氨基酸 amino acid	含量 content	氨基酸 amino acid	含量 content
Hyp	73.8	Met	14.2
Asp	45.3	Ile	16.3
Thr	25.9	Leu	28.5
Ser	32.7	Tyr	4.2
Glu	65.7	Phe	16.7
Pro	103.8	Hyl	3.8
Gly	337.3	Lys	31.2
Ala	128.1	His	4.1
Cys	0.8	Arg	41.9
Val	25.7	total	1 000

2.2 TFCH的超滤分级

TFCH、TFCH-I、TFCH-II和TFCH-III在所测浓度范围内,对羟自由基清除率呈现出量效关系,且TFCH-III(EC_{50} 1.17 mg/mL)的活性最强,说明该组分中含有抗氧化活性较强的多肽(图1)。已有报道证明:酶解多肽的抗氧化活性与其分子量成负相关^[6]。TFCH-III在测定活性的4个组分中,分子量最小,该结果与已有的报道相一致^[6,12]。

2.3 TFCH-III的凝胶色谱分离纯化

TFCH-III经过Sephadex G-15凝胶柱层析后

获得4个主要组分:TFCH-III-A、TFCH-III-B、TFCH-III-C和TFCH-III-D(图2)。抗氧化活性显示,TFCH-III-C活性最强, EC_{50} 为0.491 mg/mL,显著高于TFCH(EC_{50} 2.45 mg/mL)和TFCH-III(EC_{50} 1.17 mg/mL)(图3)。

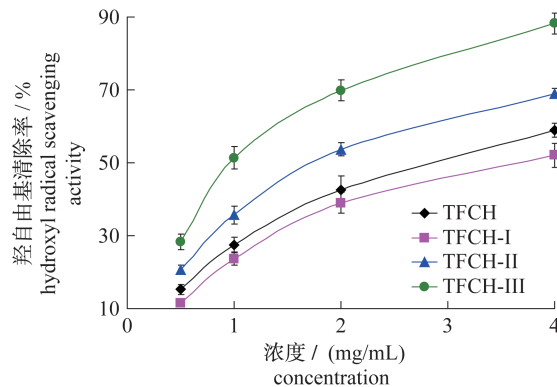


图1 TFCH及其超滤分级组分的羟自由基清除活性
Fig.1 Hydroxyl radical scavenging activity of TFCH and its fractions by ultrafiltration

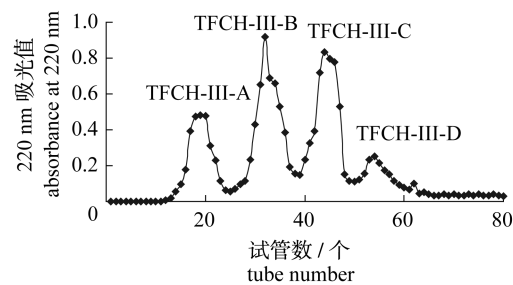


图2 TFCH-III的葡聚糖凝胶G-15柱层析曲线图
Fig.2 Gel filtration chromatography of TFCH-III on a Sephadex-15 column

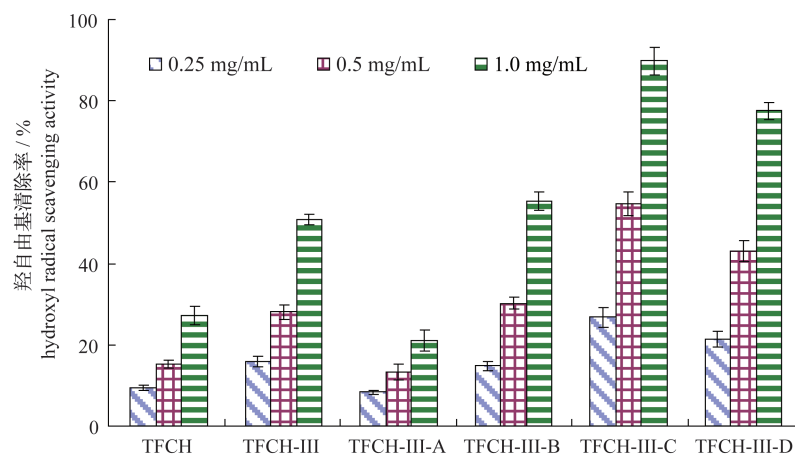


图3 TFCH-III及其凝胶过滤组分的羟自由基清除活性

Fig.3 Hydroxyl radical scavenging activity of TFCH-III and its fractions by gel filtration chromatography

2.4 TFCH-III-3 的 RP-HPLC 分离纯化

TFCH-III-C 经 C18 RP-HPLC 分离纯化,获得 2 个量较大的组分 TFCH-P1 和 TFCH-P2(图 4)。TFCH-P1 和 TFCH-P2 在 0.25 mg/mL 浓度下对羟基自由基清除率为 $53.71\% \pm 3.21\%$ 和 $70.43\% \pm 2.07\%$, TFCH-P2 显示出较强的羟自由基清除活性。

2.5 TFCH-P2 的氨基酸序列分析和分子量测定

TFCH-P2 经高效液相色谱检测基本为单一峰,纯度达到序列分析要求。利用 Edman 降解法经蛋白质序列分析仪测定氨基酸序列为 Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Gln-Gly(GPAGPAGQEG),ESI-MS

检测分子量为 $839.87 \text{ u} ([M+H]^+ 840.68 \text{ u})$ (图 5),与理论分子量 839.85 u 基本吻合。

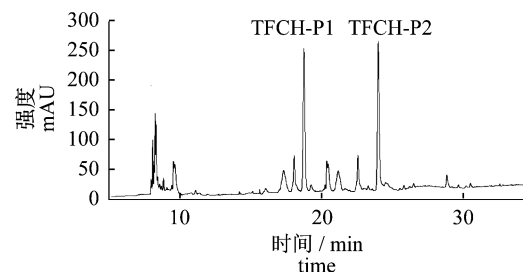


图 4 TFCH-III-C 的 C18 RP-HPLC 图

Fig. 4 C18 RP-HPLC chromatogram of TFCH-III-C

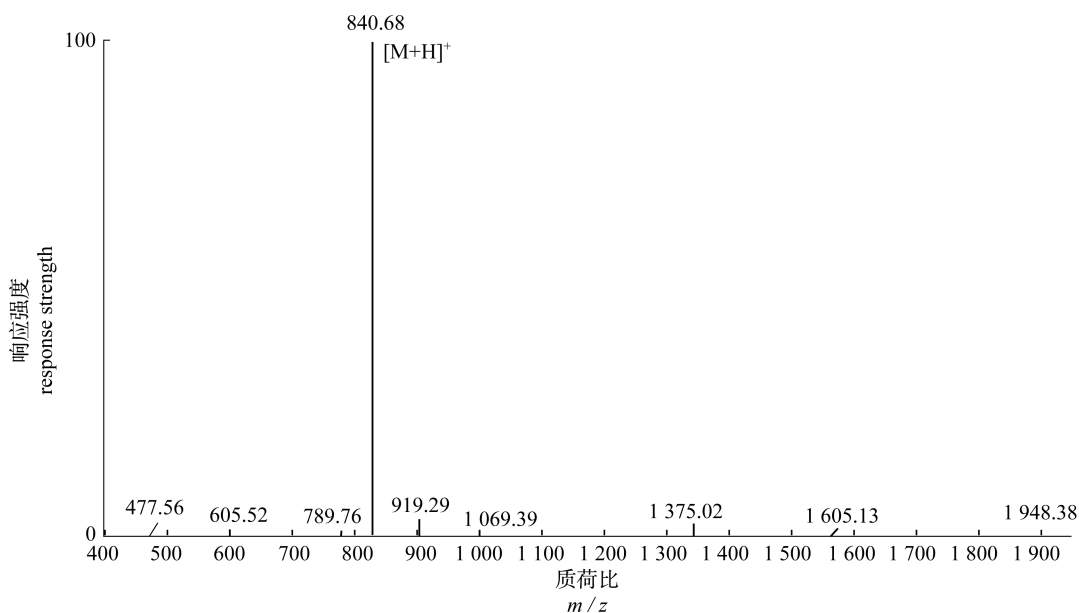


图 5 TFCH-P2 的质谱图

Fig. 5 Mass spectrogram of TFCH-P2

2.6 TFCH-P2 的抗氧化活性评价

TFCH-P2 的自由基清除活性 TFCH-P2 对羟自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基、超氧阴离子自由基具有较好的清除作用, EC_{50} 分别为 0.18、0.97、0.52 和 0.38 mg/mL(表 2)。与文献 [11-12, 14-16] 对照发现, TFCH-P2 的活性与已知多肽 WDR、PYFNK 和 LDK 相类似,但是显著低于 EGL、YGDEY、LEELEEELEGCE 和 LGLNGDDVN。

TFCH-P2 的抗脂质过氧化能力 空白组在 500 nm 的吸光度最高,表明该组氧化程度最高;而 BHT 阳性对照组吸光值最低,亦表明该组氧化程度最低,抗氧化的能力最强。活性肽

TFCH-P2 的吸光值略高于 BHT,但明显低于空白组(图 6),说明 TFCH-P2 亦具有较好的抗脂质过氧化能力,其与 WDR^[12]、PYFNK^[12] 和 LDK^[14] 具有相类似的抗脂质过氧化能力。

3 结论

已有的研究表明:分子量大小和氨基酸组成是影响多肽活性的最重要的 2 个因素^[17],寡肽较其蛋白、多聚肽和单个氨基酸具有更强的生物活性,同时多肽序列中含有 Tyr、Trp、His、Pro、Met、Lys、Gly 和 Trp 等疏水性氨基酸或芳香族氨基酸亦可增强多肽的活性^[18-19]。TFCH-P2 为十肽化合物,且氨基酸序列中含有疏水性氨基酸 Gly、

表2 胶原蛋白肽 TFCH-P2 与已知抗氧化肽的活性比较

Tab.2 Comparative analysis of antioxidant activity between TFCH-P2 and known peptides

多肽序列 peptide sequence	EC ₅₀			
	羟自由基 hydroxyl radical	DPPH 自由基 DPPH radical	ABTS 自由基 ABTS radical	超氧阴离子自由基 superoxide anion radical
GPAGPAGQEG (TFCH-P2)	0.18 mg/mL	0.97 mg/mL	0.52 mg/mL	0.38 mg/mL
EGL ^[11]	4.61 μg/mL	-	-	-
YGDEY ^[11]	6.45 μg/mL	-	-	-
WDR ^[12]	0.15 mg/mL	3.63 mg/mL	0.34 mg/mL	0.09 mg/mL
PYFNK ^[12]	0.24 mg/mL	4.11 mg/mL	0.12 mg/mL	0.11 mg/mL
LDK ^[14]	0.17 mg/mL	3.06 mg/mL	0.19 mg/mL	0.12 mg/mL
LEEEEELEGCE ^[15]	0.019 mg/mL	0.024 mg/mL	-	0.051 mg/mL
LGLNGDDVN ^[16]	0.069 mg/mL	-	-	-

注: - 未检测

Notes: - not detected

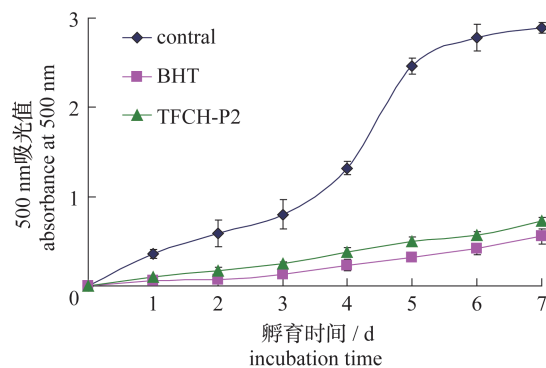


图6 TFCH-P2 的脂质过氧化抑制试验

Fig.6 Lipid peroxidation inhibition of TFCH-P2

Pro 和 Ala, 对其抗氧化能力起到了重要作用。另外, TFCH-P2 的抗氧化活性低于阳性对照 BHT, 但是 TFCH-P2 来源于食源蛋白, 其安全性要显著高于化学合成抗氧化剂。因此, 可以通过增加剂量的方式来弥补抗氧化能力的不足。本实验从金枪鱼鱼骨酸溶性胶原蛋白酶解物中制备了抗氧化活性显著的十肽 (GPAGPAGQEG), 该研究结果对于金枪鱼以及其他海洋生物下脚料胶原蛋白的高值化开发具有借鉴的意义; 同时, 制备的胶原肽可以用于与抗氧化相关的功能食品、药物或者食品添加剂的开发。

参考文献:

- [1] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 85(1): 81-89.
- [2] Li Z R, Wang B, Chi C F, et al. Isolation and

characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(1): 103-113.

- [3] Lu J F, Wan Q, Yin Z M, et al. Extraction and characterization of collagen from calipash of Chinese soft shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(6): 801-808. [陆剑锋, 万全, 殷章敏, 等. 中华鳖裙边胶原蛋白的提取及其特征. 水产学报, 2010, 34(6): 801-808.]
- [4] Wang H B, Liang Y P, Wang H Y, et al. Isolation and partial biological properties of scale collagens from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 553-561. [汪海波, 梁艳萍, 汪海婴, 等. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其部分生物学性能. 水产学报, 2012, 36(4): 553-561.]
- [5] Du Y J, Zhao Y Q, Li N N. Enzymatic preparation and hydroxyl free radical scavenging activity of polypeptides from grass carp scales [J]. Food Science, 2010, 31(7): 168-172. [杜云建, 赵玉巧, 李念念. 酶解法制备草鱼鱼鳞多肽及其清除羟自由基的研究. 食品科学, 2010, 31(7): 168-172.]
- [6] Li Z R, Wang B, Chi C F, et al. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa* [J]. Food Research International, 2013, 51(1): 283-293.
- [7] Hsu K C. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product [J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 42-48.

- [8] Żelechowska E, Sadowska M, Turk M. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*) [J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(4) : 325 - 329.
- [9] Wang H B, Liang Y P, Wang H Y, *et al.* Isolation and partial biological properties of scale collagens from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4) : 553 - 561. [汪海波, 梁艳萍, 汪海婴, 等. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其部分生物学性能. 水产学报, 2012, 36(4) : 553 - 561.]
- [10] Chen S R, Cai Y P, Zhou Q, *et al.* Study on collagen from shark skin and bone [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, 6(1) : 173 - 178. [陈申如, 蔡扬鹏, 周琼, 等. 鲨鱼鱼皮、鱼骨胶原蛋白的纯化及其特性的初步研究. 中国食品学报, 2006, 6(1) : 173 - 178.]
- [11] Zhang Y, Duan X, Zhuang Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin [J]. Peptides, 2012, 38(1) : 13 - 21.
- [12] Wang B, Li Z R, Chi C F, *et al.* Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle [J]. Peptides, 2012, 36(2) : 240 - 250.
- [13] Bae I, Osatomi K, Yoshida A, *et al.* Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of under utilised fishes [J]. Food Chemistry, 2008, 108(1) : 49 - 54.
- [14] Luo H Y, Wang B, Li Z R, *et al.* Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle protein [J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 51(1) : 281 - 288.
- [15] 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]. Bioresource Technology, 2008, 99(6) : 1690 - 1698.
- [16] Ranathunga S, Rajapakse N, Kim S K. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*) [J]. European Food Research and Technology, 2006, 222(3-4) : 310 - 315.
- [17] Samaranyaka A G P, Li-Chan E C Y. Food-derived peptidic antioxidants; a review of their production, assessment, and potential applications [J]. Journal of Functional Foods, 2011, 3(4) : 229 - 254.
- [18] Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1) : 238 - 245.
- [19] Saito K, Jin D H, Ogawa T, *et al.* Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12) : 3668 - 3674.

Preparation and evaluation of an antioxidant peptide from collagen hydrolysate of skipjack tuna fishbone

TAN Hongliang, YU Di, WANG Bin*, HU Fayuan, MA Jianyin

(School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: In the current research, acid soluble collagen (ASC) from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) fishbone was successfully isolated with the yield of 2.47% (dry weight basis). The antioxidant hydrolysate of ASC (TFCH) was prepared through a two-stage *in vitro* digestion (3-h pepsin followed by 3-h trypsin), and one new antioxidant peptide (TFCH-P2) was further isolated from TFCH using ultrafiltration, gel chromatography, and RP-HPLC. The amino acid sequence of TFCH-P2 was identified as Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Gln-Gly (GPAGPAGQEG) with molecular weight of 839.87 u ($[M + H]^+$ 840.68 u). TFCH-P2 exhibited good scavenging activity on DPPH radical, hydroxyl radical, ABTS radical and superoxide anion radical with EC_{50} of 0.18, 0.97, 0.52 and 0.38 mg/mL, respectively. TFCH-P2 was also effectively against lipid peroxidation in a linoleic acid model system. The antioxidant activity of TFCH-P2 was due to the presence of hydrophobic amino acid residues within the peptide sequence. The result suggested that TFCH-P2 could be used as natural antioxidant in enhancing antioxidant properties of functional foods and in preventing oxidation reactions in food processing.

Key words: *Katsuwonus pelamis*; fishbone; peptide; antioxidant activity

Corresponding author: WANG Bin. E-mail: wangbin4159@hotmail.com