

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.03.021

鸡皮胶原蛋白多肽锌螯合物结构表征及生物利用率评价

刘腾飞, 邹莉芳, 吴磊, 韦田, 高燕, 肖桂然

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:文章制备鸡皮胶原蛋白多肽锌螯合物(chicken collagen peptide-zinc, CCP-Zn), 通过紫外光谱、红外光谱研究 CCP-Zn 理化性质, 并利用果蝇模型评价 CCP-Zn 的体内补锌效果。结果表明锌离子通过与多肽酰胺 I 带上的羧基进行配位, 肽锌结合能力达到 152.8 mg/g。膳食添加 ZnSO₄、CCP-Zn, 结果显示与 ZnSO₄ 添加组相比, CCP-Zn 添加能显著提高果蝇体内锌水平, 说明该研究开发的 CCP-Zn 可以提高锌的吸收利用率, 具有良好的补锌效果。

关键词:鸡皮; 胶原蛋白多肽; 结构表征; 补锌; 果蝇

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2023)03-0415-05

Structure characterization and bioavailability evaluation of chicken skin collagen peptide-zinc chelate

LIU Tengfei, ZOU Lifang, WU Lei, WEI Tian, GAO Yan, XIAO Guiran

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Chicken collagen peptide-zinc (CCP-Zn) was prepared. The physical and chemical properties of CCP-Zn were investigated by UV and IR spectra, and the zinc supplement effect of CCP-Zn *in vivo* was evaluated by *Drosophila melanogaster* model. The results showed that the zinc ion coordinated with the carboxyl group on the peptide amide I band, and the ability of zinc binding to peptide was 152.8 mg/g. ZnSO₄ and CCP-Zn were added to the diet. The results showed that the addition of CCP-Zn could significantly improve the zinc level in *Drosophila melanogaster* compared with the addition of ZnSO₄, which indicated that the CCP-Zn developed in this research could improve the absorption and utilization rate of zinc and had good zinc supplement effect.

Key words: chicken skin; collagen polypeptide; structure characterization; zinc supplement; *Drosophila melanogaster*

锌作为人体营养中必需的微量元素, 对细胞代谢起着至关重要的作用。此外, 锌还参与细胞介导的免疫和 DNA 合成。缺锌可导致显著的生理问题, 包括生长迟缓、免疫功能失调、皮肤病变和其他慢性疾病^[1]。中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所的最新调查结果表明, 中国少年儿童儿童的缺锌率高达 60%, 这些儿童每日锌摄入量不足世卫组织推荐量的 1/2。而作为人体必需微

量元素的锌却不能体内合成, 补锌只能靠食物来供给^[2]。然而由于中国饮食习惯, 主食以大米或面食为主, 蔬菜以高温炒制为主, 锌不耐高温, 这样的饮食习惯成为缺锌的原因之一。锌的吸收不良也是缺锌的主要原因, 以往的补锌剂, 补锌效率低、合成复杂并且会伴有轻度恶心、呕吐、便秘等不良反应^[3]。近年来, 生产一款锌含量高、稳定性好、补锌效率高并且具有生物活性的新型补锌

收稿日期: 2021-03-08; 修回日期: 2021-04-20

基金项目: 安徽省科协人才托举计划资助项目(RCTJ202001)

作者简介: 刘腾飞(1994—), 男, 安徽阜阳人, 合肥工业大学硕士生;

肖桂然(1988—), 女, 山东邹城人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师。

剂受到了国内外学者的广泛关注。

目前补锌剂已经发展到第 3 阶段,第 3 阶段补锌剂是以氨基酸或多肽为配体、以锌离子为中心原子,经配位键连接而成的螯合锌^[3]。此类补锌剂具有化学稳定性好、安全无毒、有利于肠胃的吸收、生物利用率高等优点^[4]。目前肽-锌螯合物的研究大多集中在水产动物蛋白与锌的螯合物上^[5-7],但是对鸡皮胶原肽螯合锌的研究并不多。鸡肉在中国已成为仅次于猪肉的第二大肉类消费品。在生产加工鸡肉制品时,会产生大量无用的鸡皮,这些鸡皮利用率低,其大多加工生产成饲料或低档肉糜制品,经济价值不高^[8-9]。使用鸡皮提取胶原蛋白多肽,并且与锌螯合加工成补锌剂,不仅可以提高鸡皮的利用率,而且为多肽锌补锌剂的研究提供新的借鉴。

果蝇是遗传学和发育生物学中最重要的模式生物之一,具有体积小、生命周期短(大约 12 d)、大量的后代、易于培养等特点^[10]。果蝇与人和哺乳动物相比,具有较高的保守性,果蝇具有与哺乳动物类似相对应的组织和器官结构^[11]。果蝇已被成功地用于金属研究,如铜离子^[12-13]、铁离子^[14],果蝇用于锌离子的研究在近年来取得了巨大的进展^[15-16]。此外,果蝇金属硫蛋白(Mtn)可以较紧密地与锌离子结合,细胞中约 20%的锌是以与 Mtn 结合的形式存在^[17]。由于金属硫蛋白可以在转录水平上受到金属相应的转录因子的调节,因此当锌浓度上升时,Mtn 的表达量也会增加。

本研究以果蝇为模型,通过检测果蝇肠道中 Mtnb(果蝇基因组编码了 4 种 Mtn 蛋白,其中 Mtnb 可反映锌离子水平)的表达水平来探讨鸡皮胶原蛋白多肽锌螯合物(chicken collagen peptide-zinc,CCP-Zn)的补锌效果。为今后研究多肽锌螯合物的体内吸收提供借鉴,并且 CCP-Zn 的研究也为开发新型补锌剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜鸡皮(山东太合食品有限公司);菠萝蛋白酶、风味酶、牛血清白蛋白(上海源叶生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

傅里叶变换红外(Fouier transform infrared, FTIR)光谱仪(美国 Thermo Nicolet);酶标仪(澳大利亚 INFINITE M NANO);倒置荧光 DIC 显

微镜(日本 Nikon);超敏化学发光成像系统(美国 Proteinsimple);MS 2000 激光粒度分析仪;S-4300D 氨基酸分析仪(德国)。

1.3 样品制备

1.3.1 鸡皮酶解肽制备

取鸡皮,洗净,除脂,除杂蛋白,绞碎,以水解度和多肽摩尔分数为指标,将预处理的鸡皮按料液质量比 1:10 的比例加水,调节 pH 值至 6.5,加入质量分数 2.5%的菠萝蛋白酶于 55 °C 反应 5 h,酶解结束后 85 °C 灭酶 10 min。酶解液冷却至室温后,再加入质量分数 3%的风味蛋白酶于 60 °C 反应 5 h,酶解结束后 85 °C 灭酶 10 min。6 000 r/min、4 °C 条件下离心 15 min,取上清液浓缩,将浓缩液冷冻干燥后得到鸡皮胶原蛋白多肽。

1.3.2 多肽锌螯合物制备

将冷冻干燥的多肽溶于超纯水配置成 5%的多肽溶液,以螯合率为指标,将多肽与 ZnSO₄ 按 3:2 的质量比加入,于 pH 值 6.5、温度 50 °C 条件下反应 40 min。反应结束后加入 4 倍体积的无水乙醇除去游离的锌离子,浓缩,真空冷冻干燥得到 CCP-Zn。

1.4 分析测定方法

1.4.1 水解度的测定

参考文献[18],采用双指示剂甲醛滴定法测定可溶性氮质量,采用凯氏定氮法测定总氮质量。

1.4.2 多肽摩尔分数的测定

将 10 mL 10%三氯乙酸溶液添加到 10 mL 待测样品中,经混匀、静置、离心后,取上清液,使用 Folin-酚法测定可溶性氮含量^[19],将测定的结果代入方程计算出多肽的摩尔分数。

1.4.3 螯合率的测定

多肽与 ZnSO₄ 反应后,参考文献[20-21]方法,使用乙二胺四乙酸(EDTA)络合滴定法测定螯合率。

1.5 动物实验

1.5.1 加药

将果蝇亲本喂养在正常食物(normal food, NF)、加 ZnSO₄ 食物(3 mmol/L)以及 CPP-Zn 食物中,当果蝇幼虫成长到游荡期时,获取样本进行实验。

1.5.2 Mtnb 水平检测

解剖游荡期时的果蝇幼虫,取其中肠,使用 4%多聚甲醛固定 30 min,磷酸缓冲液清洗 3 次,封片,使用倒置荧光显微镜拍照。

1.6 数据分析

利用 Image J 软件统计荧光强度,SPSS 19.0 软件处理实验数据,实验中 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 鸡皮胶原蛋白肽成分分析

2.1.1 多肽氨基酸组成及其摩尔分数分析

鸡皮胶原蛋白多肽的氨基酸组成见表 1 所列。由表 1 可知,组成鸡皮胶原蛋白多肽主要为脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸,符合胶原蛋白的基本构成,总氨基酸浓度为 6 473.512 $\mu\text{mol/L}$ 。其中,必需氨基酸的摩尔分数高达 23.27%,脯氨酸占 34.18%,而羟脯氨酸作为构成胶原蛋白的主要氨基酸是脯氨酸羟基化后的产物,因此可知本实验得到的主要为胶原蛋白多肽。

氨基酸	c	氨基酸	c
天冬氨酸	144.198	异亮氨酸	216.769
苏氨酸	227.868	亮氨酸	359.752
丝氨酸	342.405	络氨酸	123.985
谷氨酸	173.431	苯丙氨酸	94.474
甘氨酸	551.621	三组氨酸	162.071
丙氨酸	813.935	赖氨酸	288.571
半胱氨酸	25.271	精氨酸	264.619
缬氨酸	318.836	脯氨酸	2 212.534
蛋氨酸	153.164	谷氨酰胺	—
天冬酰胺	—	色氨酸	—

另外还有谷氨酰胺、天冬氨酸和色氨酸未被检测出,这是由于胶原蛋白是一种不含有色氨酸的非完整蛋白,而另外 2 种蛋白可能是由于本身摩尔分数较低或在酶解和分离过程中被破坏掉了。

2.1.2 多肽相对分子量测定

鸡皮胶原蛋白多肽分子量分布如图 1 所示。

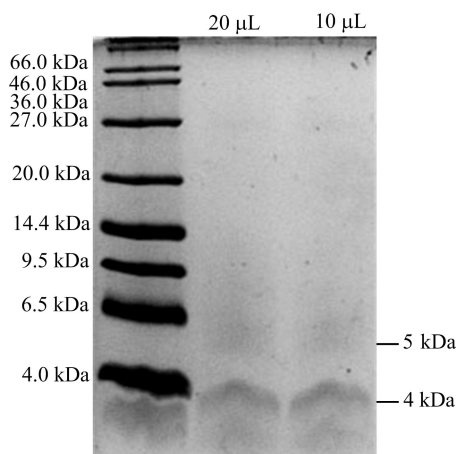


图 1 多肽 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

图 1 中,样品条带从左到右分别为 20、10 μL 上样体积。由图 1 可知,经菠萝蛋白酶、风味蛋白酶双酶解的鸡皮胶原蛋白多肽,其多肽相对分子量主要分布在 4.1 kDa 左右。

2.2 多肽和 CCP-Zn 结构表征

2.2.1 紫外光谱分析

研究发现,肽与微量元素螯合后,螯合物的内部原子空间结构会发生改变,导致吸收的紫外光波长也会不同,胶原蛋白多肽^[22]与锌离子结合后相应原子的价电子跳跃不同。多肽和 CCP-Zn 的紫外光谱图如图 2 所示,由图 2 可知,鸡皮胶原蛋白多肽的特征吸收峰在 220 nm 左右,发生螯合反应后,螯合物的最大紫外吸收波长发生了红移,说明胶原蛋白多肽与锌离子之间发生了配位螯合反应,形成多肽锌螯合物。

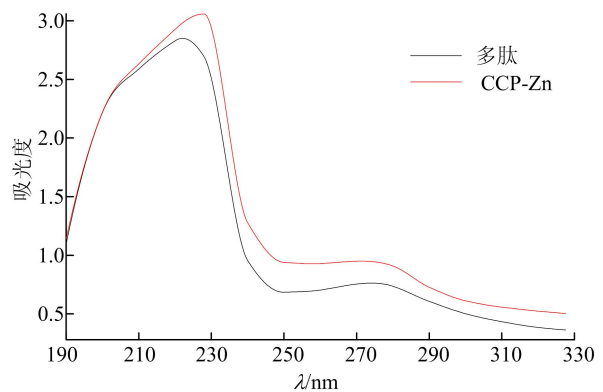


图 2 多肽和 CCP-Zn 的紫外光谱

2.2.2 FTIR 分析

样品在 4 000~500 cm^{-1} 未经处理的 FTIR 谱图如图 3 所示。

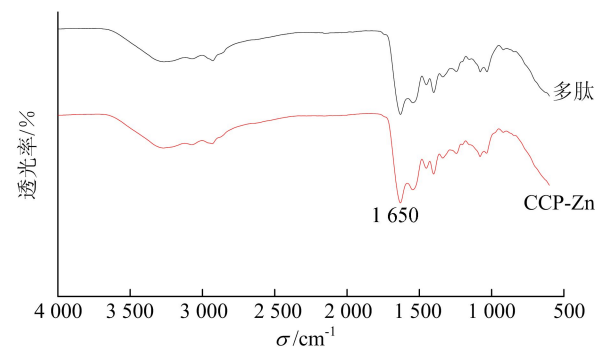


图 3 多肽和 CCP-Zn 的 FTIR 谱图

从图 3 可以看出,鸡皮胶原蛋白多肽发生螯合反应前后图谱形状的变化不大,只是经过螯合反应后的样品在 1 650 cm^{-1} 附近的红外吸收量有所变化,1 650 cm^{-1} 附近为酰胺 I 带 C=O 伸缩振动的特征吸收峰,由此可以推测,多肽上的羧基

与锌离子发生结合。

2.2.3 粒径分析

多肽和 CCP-Zn 的粒径分布如图 4 所示,由图 4 可知,多肽粒径分布在 $0.363\sim 138.030\ \mu\text{m}$, 主要分布在 $2.180\sim 7.580\ \mu\text{m}$, CCP-Zn 相比于多肽的整体粒径有所增大。

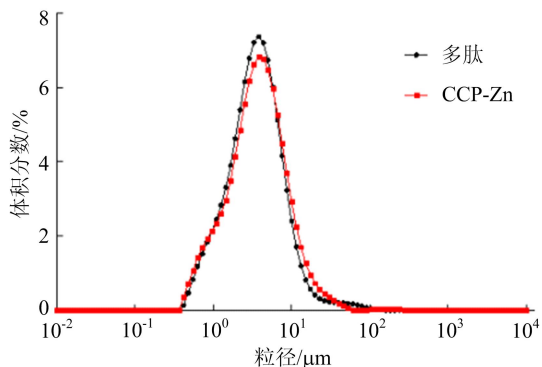


图 4 多肽和多肽锌复合物的粒径分布

2.2.4 DSC 分析

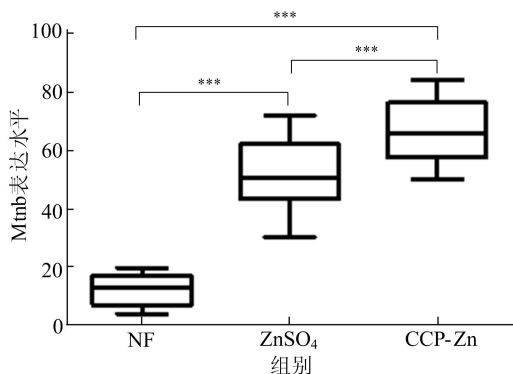
当多肽与锌离子发生螯合反应以后,多肽、CCP-Zn 的峰值分别为 172.8 、 $179.4\ ^\circ\text{C}$ 。因此可以看出多肽与锌离子螯合后能使其热稳定性提高。

2.3 CCP-Zn 的生物利用率

为了检测 CCP-Zn 生物利用率,使用 Mtnb-EY-FP 果蝇来检测 CCP-Zn 的吸收效果,如图 5 所示。



(a) Mtnb 表达水平



(b) Mtnb 表达水平量化图

图 5 不同锌源补充下肠道中 Mtnb 的表达水平

由图 5 可知,与喂养 ZnSO_4 的果蝇相比,喂养 CCP-Zn 的果蝇肠道内 Mtnb(图 5a 中黑色箭头所指)表达水平提高了约 22%,说明 CCP-Zn 有着更高的生物利用率,可以显著提高锌的吸收。

3 结 论

以鸡皮为原材料,使用菠萝蛋白酶和风味酶双酶法酶解鸡皮胶原蛋白,获得胶原蛋白多肽,然后将多肽与 ZnSO_4 配合形成 CCP-Zn。通过氨基酸分析以及相对分子量测定,得知本研究获得了相对分子量主要分布在 $4.1\ \text{kDa}$ 左右的鸡皮胶原蛋白多肽。通过对 CCP-Zn 结构进行分析得出,锌离子主要通过多肽上的羧基进行配位,并且相比于多肽,CCP-Zn 的粒径变大,热稳定性略微提高。以果蝇模型评价 CCP-Zn 的补锌效果,发现 CCP-Zn 的补锌效果优于 ZnSO_4 ,说明 CCP-Zn 有着更高的生物利用率,可能成为潜在的优质补锌剂。

[参 考 文 献]

- [1] CHASAPIS C T, NTOUPA P S A, SPILIOPOULOU C A, et al. Recent aspects of the effects of zinc on human health [J]. Archives of Toxicology, 2020, 94(5): 1443-1460.
- [2] 黄慧, 李国慧, 李贵霞, 等. 健康儿童血清中钙、镁、铁、锌、铜、铅、镉 7 种元素检测结果研究 [J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(3): 127-129.
- [3] 李晨, 陈复生, 布冠好. 肽锌螯合物研究进展 [J]. 食品工业, 2020, 41(2): 217-220.
- [4] 李钰金, 赵元晖, 解万翠, 等. 食源性促锌吸收肽研究进展 [J]. 食品科技, 2019, 44(11): 62-67.
- [5] 王再扬, 曹玉惠, 赵元晖, 等. 类蛋白反应修饰的牡蛎肽锌结合物的生物利用性 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 46-51.
- [6] 马婷, 吴谦, 申铨日. 珍珠贝外套膜胶原蛋白肽及其锌复合物的体外抑制骨质疏松作用 [J]. 肉类研究, 2018, 32(2): 8-14.
- [7] 刘晶晶, 周一渊, 徐华亭, 等. 河蚬抗氧化肽锌制剂口服液的制备及抗氧化活性研究 [J]. 常熟理工学院学报, 2020, 34(5): 91-96.
- [8] 应月, 王琴, 区子弁, 等. 肉鸡加工副产物的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 361-365.
- [9] 张兰, 苏良华. 鸡皮的加工利用研究进展 [J]. 山东畜牧兽医, 2014, 35(7): 69-70.
- [10] XIAO G R, ZHOU B. What can flies tell us about zinc homeostasis? [J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 611: 134-141.
- [11] 万永奇, 谢维. 生命科学与人类疾病研究的重要模型: 果蝇 [J]. 生命科学, 2006, 18(5): 425-429.
- [12] TABUCHI K, SAWAMOTO K, SUZUKI E, et al. GAL4/UAS-WGA system as a powerful tool for tracing Drosophila transsynaptic neural pathways [J]. Journal of Neuroscience Research, 2015, 59(1): 94-99.

(下转第 432 页)

[参 考 文 献]

- [1] BRACKBILL J U, KOTHE D B, ZEMACH C. A continuum method for modeling surface tension[J]. *Journal of Computational Physics*, 1992, 100(2): 335-354.
- [2] MORRIS J P. Simulating surface tension with smoothed particle hydrodynamics [J]. *International Journal for Numerical Methods in Fluids*, 2000, 33(3): 333-353.
- [3] HU X Y, ADAMS N A. A multi-phase SPH method for macroscopic and mesoscopic flows[J]. *Journal of Computational Physics*, 2006, 213(2): 844-861.
- [4] 强洪夫, 陈福振, 高巍然. 修正表面张力算法的 SPH 方法及其实现[J]. *计算物理*, 2011, 28(3): 375-384.
- [5] BREINLINGER T, POLFER P, HASHIBON A, et al. Surface tension and wetting effects with smoothed particle hydrodynamics[J]. *Journal of Computational Physics*, 2013, 243: 14-27.
- [6] 汪欢欢, 朱晓临, 殷竞存. 改进的 CSF 流体表面张力模型[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2019, 42(1): 141-144.
- [7] TARTAKOVSKY A, MEAKIN P. Modeling of surface tension and contact angles with smoothed particle hydrodynamics[J]. *Physical Review E Statistical Nonlinear & Soft Matter Physics*, 2005, 72(2): 026301.
- [8] BECKER M, TESCHNER M. Weakly compressible SPH for free surface flows[C]//ACM SIGGRAPH/Enrographics Symposium on Computer Animation. Aire-la-ville: Eurographics Association, 2007: 209-217.
- [9] AKINCI N, AKINCI G, TESCHNER M. Versatile surface tension and adhesion for SPH fluids[J]. *ACM Transactions on Graphics*, 2013, 32(6): 1-8.
- [10] HE X W, WANG H M, ZHANG F J, et al. Robust simulation of sparsely sampled thin features in SPH-based free surface flows[J]. *ACM Transactions on Graphic*, 2014, 3434(1): 1-9.
- [11] 殷竞存, 朱晓临, 郭清伟, 等. 基于分子间作用力改进的液体表面张力处理算法[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2018, 41(11): 1574-1578.
- [12] WANG X K, XU Y R, BAN X J, et al. Fast and stable surface feature simulation for particle-based fluids[J]. *Journal of Beijing Institute of Technology*, 2019, 28(1): 57-66.
- [13] KOSHIZUKA S, OKA Y. Moving-particle semi-implicit method for fragmentation of incompressible fluid[J]. *Nuclear Science & Engineering*, 1996, 123(3): 421-434.
- [14] TANAKA M, MASUNAGA T. Stabilization and smoothing of pressure in MPS method by quasi-compressibility [J]. *Journal of Computational Physics*, 2010, 229(11): 4279-4290.
- [15] MARRONE S, COLAGROSSI A, TOUZÉ D L, et al. Fast free-surface detection and level-set function definition in SPH solvers[J]. *Journal of Computational Physics*, 2010, 229(10): 3652-3663.
- [16] 孙晨, 姜胜耀, 段日强. 适用于粒子法的精准连续表面力模型[J]. *清华大学学报(自然科学版)*, 2018, 58(2): 181-187.
- [17] 朱晓临, 张义群, 郭清伟. 对称区域边界处理方法及基于表面粒子提取的表面张力计算[J]. *图学学报*, 2020, 41(1): 10-17.
- [18] RANGLES P W, LIBERSKY L D. Smoothed particle hydrodynamics: some recent improvements and applications [J]. *Computer Methods in Applied Mechanics & Engineering*, 1996, 139(1/2/3/4): 375-408.
- [19] LIU M, MEAKIN P, HUANG H. Dissipative particle dynamics with attractive and repulsive particle-particle interactions[J]. *Physics of Fluids*, 2006, 18(1): 017101.

(责任编辑 张 镛)

(上接第 418 页)

- [13] AYTUN S, LEI P, BUSH A I. Biomaterials and their therapeutic implications in Alzheimer's disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2015, 12(1): 109-120.
- [14] TANG X N, ZHOU B. Iron homeostasis in insects: insights from *Drosophila* studies [J]. *Iubmb Life*, 2013, 65(10): 863-872.
- [15] PABLO C Q, GONZALEZ F J, SEBASTIA O N, et al. *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7): 1456.
- [16] RICHARDS C D, WARR C G, BURKE R. A role for dZIP89B in *Drosophila* dietary zinc uptake reveals additional complexity in the zinc absorption process[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 69: 11-19.
- [17] STEFANIDOU M, MARAVELIAS C, DONA A, et al. Zinc: a multipurpose trace element[J]. *Archives of Toxicology*, 2006, 80(1): 1-9.
- [18] 杨文博, 张英华. 蛋白质水解度的测定方法研究[J]. *中国调味品*, 2014, 39(3): 88-90.
- [19] 黄敬, 倪方慧. 福林酚法测定软胶囊中肽含量[J]. *江西医学检验*, 2004(3): 260-266.
- [20] 杨林, 杨海鹏, 钱沁, 等. 羟基蛋氨酸铁铜锰锌整合率的测定[J]. *饲料工业*, 2003(6): 34-36.
- [21] 胡亮, 乐国伟, 施用晖. 微波固相合成蛋氨酸锌工艺的研究[J]. *食品工业科技*, 2007(1): 193-195.
- [22] RANGANATHAN S, LAKSHMI K V, REDDY V. Trial of ferrous glycine sulphate in the fortification of common salt with iron[J]. *Food Chemistry*, 1996, 57(2): 311-315.

(责任编辑 闫杏丽)