

不同水解程度丝素肽对黑色素生成抑制能力的研究

陈芳艳¹, 纪平雄¹, 王林川², 彭文芳¹

(1 华南农业大学艺术设计学院, 广东 广州510642; 2 华南农业大学兽医学院, 广东 广州510642)

摘要: 探讨了脱胶丝素经盐溶解后进行碱水解时, 不同条件对丝素水解程度及不同水解程度丝素肽对蚕血黑色素生成的抑制能力的影响. 结果发现, 温度对丝素的水解程度影响最大, 时间其次, 浓度的影响最小; 丝素蛋白液未水解时, 其对黑色素抑制率很低, 只有 28.34%, 而丝素水解后, 抑制率迅速提高到 48.95%, 并且随着水解程度的加深不断提高, 当氨基氮浓度达 $0.476\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其对黑色素生成抑制率达最高值 67.14%; 之后, 随着水解程度的增加, 其黑色素生成抑制率反而下降.

关键词: 丝素肽; 碱水解; 氨基氮; 黑色素生成抑制率

中图分类号: S886.9

文献标识码: A

随着科学技术的不断进步, 人们对蚕丝的研究越来越深入, 蚕丝在非服用性能方面的优越性也越来越引人注目, 如丝素中的丙氨酸对体内大量摄取的酒精有明显的分解效果, 而甘氨酸可抑制血液中的胆固醇合成^[1], 故有丝素在化妆品、食品及医学用品等领域中广泛应用的设想. 但由于丝素蛋白其 α -螺旋和 β -折叠的组成结构及相对分子质量过大(几万至几百万)的缘故而不能直接作为化妆品、食品及医学用品的原料, 故丝素处理而得到的各种小分子丝素肽的应用成为这一领域的研究热点. 有研究表明, 由丝素处理得到的相对分子质量在 10 000 以上的丝素肽成膜性好, 可以制成丝素蛋白膜; 相对分子质量在 1 000~10 000 之间时, 可保护皮肤和头发; 相对分子质量在 300~800 时, 可作为化妆品及口服液的原料^[2]. 目前测定水解丝素蛋白相对分子质量的主要方法有: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[3] 和葡聚糖凝胶柱层析法^[4-5] 等. 然而经水解法获得的丝素肽其相对分子质量范围通常很宽, 采用这两种方法测定, 不仅难以得到理想的结果, 而且价格昂贵. 本研究通过控制丝素肽的水解程度来获取能够较好地抑制黑色素生成的丝素肽, 并探讨获取丝素肽的最佳条件.

1 材料与方法

1.1 材料

茧壳、活蚕由华南农业大学艺术设计学院提供.

1.2 方法

1.2.1 丝素的溶解、透析和脱盐 取一定量的脱胶丝素, 加入预热 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 $\text{CaCl}_2\cdot\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{H}_2\text{O}=1:2:$

8(物质的量比)的溶液中溶解, 按 1 g 脱胶丝素加入 10 mL 溶解液溶解 1 h. 待丝素溶液冷却后, 装入事先用蒸馏水煮过的透析袋中, 用自来水透析 3 d, 再用双蒸水透析 12 h, 取出离心或过滤去除沉淀及杂质. 丝素溶液蛋白质含量用紫外吸收法来测定.

1.2.2 丝素蛋白液的碱水解 将 NaOH 溶液加入浓度为 56 mg/mL 的丝素溶液中, 调节 NaOH 终浓度分别为 0.05、0.10、0.15 mol/L, 丝素蛋白溶液终浓度为 40 mg/mL, 控制温度分别为: 常温(25)、50、70 $^{\circ}\text{C}$, 处理时间分别为: 2、4、6 h. 反应结束后立即用稀酸调节 pH 值至中性.

1.2.3 氨基氮测定 采用中性甲醛滴定法测定氨基氮含量. 分别取各个不同水解条件的丝素蛋白液 1 mL 于三角瓶中, 分别加入 2 mL 蒸馏水及 1 mL 中性甲醛、3 滴酚酞试剂, 用已标定的 0.02 mol/L 的 NaOH 溶液滴定, 每个样品做 2 个重复, 取平均值. 氨基氮含量按下式计算^[6-7]:

$$\rho_{\text{氨基氮}}(\text{g/L})=[N\times(V_2-V_1)\times E]/V$$

N —氢氧化钠的浓度(mol/L); E —氮的物质的量(14); V —被滴定样品的体积(mL); V_2 、 V_1 —滴定样品及空白试验分别消耗的氢氧化钠体积(mL).

1.2.4 抑制黑色素生成的试验 取蒸馏水 50 mL, 加入新鲜蚕血 100 mL, 搅拌均匀, 离心(3 000 r/min, 10 min, 0 $^{\circ}\text{C}$), 取上层清液为淡黄色透明蚕血血清稀溶液, 取 10 支试管各加入 2.5 mL 蚕血稀溶液, 各管中分别加入浓度为 40 g/L 的丝素蛋白液和不同水解程度的丝素肽 2.5 mL. 在 1 支试管中加入 2.5 mL 蒸馏水作为基准溶液, 在阳光下放置 2 h, 各试管溶液变为颜色深浅不一的黑色溶液, 在 640 nm 波长下测

定各溶液的吸光度，计算不同水解程度的丝素肽对黑色素生成的抑制率^[4]。

对黑色素生成的抑制率=[(基准溶液吸光度－被测溶液吸光度)/基准溶液吸光度]×100%

2 结果与分析

2.1 丝素蛋白液的碱水解

采用碱水解法对丝素蛋白液在不同浓度、不同时间、不同温度的条件下进行水解，并计算氨基氮含量，结果见表 1。

表 1 不同碱水解条件对丝素肽水解程度的影响

Tab. 1 Effect of different condition of alkali hydrolysis on the hydrdlytic degree of the silk fibroin peptide

序号 No.	c (NaOH) /(mol·L ⁻¹)	t/h	温度 temperature/℃	ρ(氨基氮 amino nitrogen)/(g·L ⁻¹)
1	0.1	2	常温	0.040 9
2	0.1	4	50	0.130 5
3	0.1	6	70	0.696 9
4	0.2	2	50	0.157 1
5	0.2	4	70	0.476 5
6	0.2	6	常温	0.193 3
7	0.3	2	70	0.442 7
8	0.3	4	常温	0.134 2
9	0.3	6	50	0.494 1

将表达式的数据输入 SAS 软件进行处理分析。结果(表 2)表明,NaOH 水解丝素时,温度对丝素水解程度的影响最显著,随着反应温度的升高,丝素蛋白水解程度极大地提高,即获得的丝素肽的相对分子质量越小;时间对水解程度的影响次之,处理时间越长,水解程度越强;NaOH 浓度对水解程度影响不大,提高浓度,其水解程度增加不大,但增加了丝素肽的含盐量。本试验表明,当 NaOH 浓度为 0.1 mol/L、处理时间 6 h、温度 70 ℃时,丝素肽的氨基氮含量最大达 0.696 8 g·L⁻¹,此时水解程度最强。

表 2 不同反应条件对丝素蛋白液水解程度影响的方差分析

Tab. 2 Variance of different reaction condition on the hydrolytic degree of the silk fibroin

方差来源 resource	自由度 DF	平方和 sum of squares	均方 mean square	F 值 F value	Pr> F
浓度 concentration	2	113.827	56.913	0.93	0.517 3
时间 time	2	1 084.881	542.441	8.89	0.101 1
温度 temperature	2	2 692.707	1 346.354	22.07	0.043 3

2.2 丝素抑制蚕血黑色素生成能力的测定

为观察丝素肽抑制黑色素生成的影响,实验中以蚕血清稀溶液为基准溶液,加入不同水解程度的丝素肽溶液,从溶液中生成黑色素的多寡,来估测它对黑色素生成的抑制率。蚕血中含有酪氨酸和酪氨酸酶,当淡黄色蚕血从蚕体流出时,在日光作用下很快生成黑色素^[8],这一作用可以认为与皮肤中黑色素生成相类似。

由图 1 可知,丝素蛋白液(图中第 1 点所示)未水解时,对黑色素抑制率很低,只有 28.34%,而丝素水解后,抑制率迅速提高到 48.95%,并且随着水解程度的增加不断提高,当氨基氮含量为 0.476 5 g·L⁻¹时,其对黑色素生成抑制率达最高 67.14%。之后,随着水解程度的增加,对黑色素生成抑制率反而下降。这可能是因为丝素蛋白液水解程度低时,其相对分子质量相对较大,如用作化妆品的基材则不理想;但是随着水解程度的增加,丝素蛋白水解为氨基酸的比例加大,氨基酸可能发生消旋,也会使抑制黑色素生成能力降低。只有适当的水解度,才能形成相对分子质量较小的丝素肽,从而提高抑制黑色素生成能力。

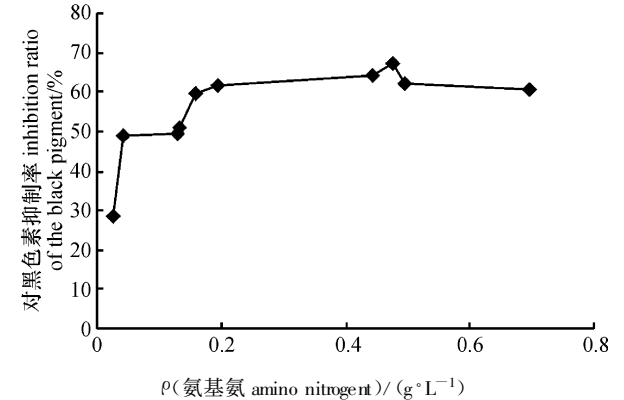


图 1 不同水解程度丝素蛋白液对黑色素生成抑制率的影响
Fig. 1 Effect of the different hydrolytic degree silk fibroin on the inhibition ratio of black pigment

3 结论与讨论

本实验结果表明,温度的高低对丝素水解程度的影响最显著;时间对水解程度的影响次之;NaOH 浓度对水解程度影响最小。当 NaOH 浓度为 0.1 mol/L、处理时间 6 h、温度 70 ℃时,丝素肽的水解程度最强。通过丝素肽氨基氮含量与其抑制黑色素生成能力的关系,可间接地了解到水解后丝素肽的相对分子质量大小。本实验的方法简便,可操作性强;水解后的丝素肽能很好的抑制蚕血黑色素的氧化。在实践中若将其应用于化妆品,则可能对皮肤起到

很好的防晒增白效果.

本试验结果还表明,采用碱水解丝素,可获得具有活性的丝素肽.一些资料认为,采用碱水解丝蛋白,易使氨基酸发生旋光异构作用,从而破坏掉它的营养价值^[9],因而建议丝素采用酸水解.但酸水解要求反应温度较高,作用时间长,酸反应浓度高,故丝素肽中的含盐量高,不利于丝素肽的终端使用.而丝素的等电点为 3.8~4.5,具有耐酸不耐碱的特点;采用碱水解时,较低的浓度就可获得水解程度高的丝素肽,含盐量低,丝素肽的纯度较高,反应条件更为温和,有利于丝素肽的开发利用.

参考文献:

[1] 刘朝良. 丝素的食用研究[J]. 安徽农业大学学报, 1995, 22(2): 173—176.
[2] 谢德松, 李秀艳, 陈国定, 等. 桑蚕丝肽的提取及在化

妆品中的应用[J]. 蚕桑通报, 1991, 22(1): 61—64.
[3] 吴斗思, 卢淑琴. 用 SDS(十二烷基磺酸钠)凝胶电泳法测定水解丝蛋白的分子量[J]. 精细化工, 1997, 14(2): 42—44.
[4] 盛家镛. 丝素肽在化妆品中的应用研究[J]. 苏州丝绸工学院学报, 1990, 10(4): 47—45.
[5] 松井建次, 安藤裕. 可溶化シルクペプチドの製造法及び可溶化シルクペプチド含有皮膚化粧料[P]. 昭 57—3827. 1982—01—09.
[6] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1980. 93—94.
[7] 朱 俭, 曹凯鸣, 周润琦, 等. 生物化学实验[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 61—63.
[8] 吴载德, 徐俊良, 周明哲, 等. 蚕体解剖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1980. 75.
[9] 张洪渊. 生物化学教程[M]. 成都: 四川大学出版社, 1994. 48—49.

Study on the Inhibiting-Ability of the Black Pigment Formation with Different Hydrolytic Degree of Silk Fibroin Peptide

CHEN Fang-yan¹, JI Ping-xiong¹, WANG Lin-chuan², PENG Wen-fang¹
(1 College of Art Design, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The affection of different factors on the hydrolytic degree of silk fibroin peptide and the inhibiting-ability formation of block pigment of silkworm blood were studied while the silkworm cocoon was treated by gegumming, salt dissolution and alkali hydrolysis. The result showed that temperature had the most greatly influence to the hydrolytic degree of silk fibroin peptide, second factor was time, the concentration had the least influence. The inhibition ratio was only 28.34% when the silk protein was unhydrolytic, but it could rapidly reach to 48.95% when the silk fibroin was hydrolyzed. The highest value of the inhibition ability ratio for the formation of the black pigment was 67.14% while the hydrolytic degree of silk fibroin peptide was 0.476 5 g/L. Then, the inhibition ratio of the formation of the black pigment was reduced with the increase of the hydrolytic degree of silk fibroin peptide.

Key words: peptide of silk fibroin; alkali hydrolysis; amino nitrogen; inhibition ratio of the formation of the black pigment
【责任编辑 周志红】