

羧甲基果聚糖的胶原肽修饰 及其活性研究

曾 艳 张 颖 门 燕 孙媛霞*

(中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

摘 要: 为考察羧甲基果聚糖及其衍生物在功能性食品、生物医学及化妆品方面的应用可行性, 通过羧基与氨基的交联反应制备了胶原肽修饰的羧甲基果聚糖, 并测试了产物的抗氧化、吸湿保湿活性以及其对入皮角质 HaCaT 细胞生长增殖的影响。发现羧甲基果聚糖经胶原肽修饰后抗氧化性明显提高, 25 mg/mL 时的 ABTS⁺·清除率为 62.31%, 比修饰前提高了 6.11 倍。尽管胶原肽的引入会对吸湿保湿性造成影响, 修饰后的羧甲基果聚糖仍然保留良好的吸湿保湿性能。在相对湿度 43% 和 81% 中放置 72 h 的吸湿率分别为 11.96% 和 21.54%, 在干燥硅胶环境中放置 72 h 的保湿率为 60.48%。此外, 修饰产物在 0~1 mg/mL 的浓度范围内无细胞毒性, 可以促进 HaCaT 细胞增殖。HaCaT 细胞在 0.5 mg/mL 修饰产物刺激下的存活率为 124.2%。胶原肽修饰能提高羧甲基果聚糖的生物活性, 拓展其在功能性食品、医药制品和化妆品上的应用潜力。

关键词: 羧甲基果聚糖; 胶原肽; 化学修饰; 抗氧化性; 吸湿保湿活性; 细胞增殖

Preparation and characterization of carboxymethylated levan modified with collagen peptides

ZENG Yan, ZHANG Ying, MEN Yan, SUN Yuan-xia*

(Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: To investigate the possible application of carboxymethylated levan and its derivative on functional food, cosmetics and medicine, collagen peptides were used to modify carboxymethylated levan through the cross-linking reaction between carboxyl group and amino group. Moreover, the antioxidant activity and the moisture absorption and retention capacities of the modified product, as well as its effect on the viability of human skin keratinocyte cells (HaCaT cells) were evaluated. After modified with collagen peptides, the antioxidant activity of carboxymethylated levan was obviously improved. The scavenging rate of the product on ABTS⁺· was 6.11 times higher than that before modification, with the scavenging rate of 62.31% at 25 mg/mL. Though collagen peptides had some negative effect on the moisture absorption and retention capacities of the product, its modified carboxymethylated levan still had good moisture absorption and retention capacities. The moisture-absorbing rate of the product under the relative humidity of 43% and 81% was 11.96% and 21.54% at 72 h, respectively. The moisture retention capacity after desiccation in the silica gel chamber for 72 h was 60.48%. Furthermore, carboxymethylated levan modified with collagen peptides showed no cytotoxicity in the concentration of 0~1 mg/mL and could promote the proliferation of HaCaT cells. Under the stimulation of the modified product at 0.5 mg/mL, the cell viability of HaCaT cells reached 124.2%. The results showed that the modification with collagen peptides could improve the bioactivity of carboxymethylated levan, and extend its potential application on functional food, medicine and cosmetics.

Key words: carboxymethylated levan; collagen peptides; chemical modification; antioxidant activity; moisture absorption and retention capacities; cell viability

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)09-0049-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.001

由于多糖的活性直接或间接地受其分子结构影响, 而化学官能团在糖链上的引入, 对多糖的生物活性与理化功能提升具有积极作用, 因此, 化学修饰是

多糖构效关系研究和多糖类药物研制的重要手段^[1]。其中, 羧甲基化修饰不仅能有效改善多糖的水溶性、乳化性、抗氧化性和抗肿瘤能力等理化性质, 还具有

收稿日期: 2016-12-08

作者简介: 曾艳 (1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然功能活性物质开发, E-mail: zeng_y@tib.cas.cn。

* 通讯作者: 孙媛霞 (1963-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 功能糖与天然活性物质, E-mail: sun_yx@tib.cas.cn。

基金项目: 863 计划 (2013AA102105; 2014AA022108)。

成本低、操作简单及生成物毒性小等优点,在多糖的化学修饰中得到广泛应用,如羧甲基纤维素已作为增稠剂用于食品和药剂配方中^[2]。

作为胶原蛋白的酶解产物,胶原肽在保留胶原蛋白有关特性如参与细胞迁移分化增殖、生物相容性良好等的同时,还兼具分子量小、更容易被人体吸收的优点^[3]。国外期刊报道表明,通过共价键在多糖骨架上引入胶原肽形成的交联产物,其水溶性、抗氧化性、吸湿保湿性良好,能促进皮肤成纤维细胞增殖,在保健食品、化妆品、医药卫生等领域显现出良好的应用潜力^[4-6]。然而,关于胶原肽修饰多糖的国内研究报道甚少,相关工作有待进一步深入。

本实验以解淀粉芽孢杆菌 PB6 高产胞外果聚糖^[7]为原料,通过羧基化修饰在果聚糖骨架上引入羧基后,进一步借助羧基与氨基的交联反应,制备胶原肽修饰的羧甲基果聚糖;并对胶原肽修饰的羧甲基果聚糖的抗氧化、保湿吸湿活性以及其对皮肤角质细胞增殖影响进行测试,探讨其在功能性食品、医药制品和化妆品方面的应用可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基硫代琥珀酰亚胺钠盐(NHS)、2-吗啉乙磺酸(MES) 分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;氢氧化钠、氯乙酸、碳酸钾、硫酸铵、荧光素钠、硫酸亚铁二甲基亚砷(DMSO) 分析纯,国药试剂化学试剂有限公司;2,2'-联氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic Acid) Diammonium Salt, ABTS)、2,2'-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH)、2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪(2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ) 分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;胶原肽 以鳕鱼皮为原料实验室自制^[8],分子量分布 400~1500 Da;果聚糖 由实验室借助解淀粉芽孢杆菌发酵生产自制^[7];人皮肤永生化角质细胞(HaCaT 细胞;KCB200442YJ) 北京北纳创联生物技术有限公司;双抗(Penicillin/Streptomycin)、0.25% 胰蛋白酶 美国 Corning 公司;DMEM 高糖基础培养基、胎牛血清(FBS) 美国 Gibco 公司。

UV-1800 紫外分光光度计 日本岛津公司;Spectra Max M5 多功能酶标仪 美国 Molecular Devices 公司;Sorvall Evolution RC 高速落地离心机 美国 Thermo Scientific 公司;IKA RV10 旋转蒸发仪 德国 IKA 集团;SHZ-D(III) 循环水式真空泵 河南省予华仪器有限公司;FD-1-50 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;VERTEX70 型傅里叶变换红外光谱仪 德国 Bruker 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 羧甲基果聚糖的制备 参考 Liu 等的方法^[9],取 2 g 果聚糖溶于 80 mL 异丙醇中,逐步滴入 30 mL 的 20% NaOH 溶液,常温搅拌 1 h 后加入 4 g 氯乙

酸 60 °C 下搅拌 4 h,调 pH 至中性,将混合物转移到 8000~10000 Da 的透析袋中,去离子水透析 4 d 后,收集透析液,冷冻干燥后得到白色固体,即为羧甲基果聚糖。

1.2.2 羧甲基果聚糖的胶原肽修饰 取 1.2 g 羧甲基果聚糖溶于 0.2 mol/L 的 MES 缓冲液(100 mL, pH 6.5) 中,加入 0.76 g 的 EDC 试剂和 0.24 g 的 NHS 试剂,常温搅拌 20 h 后,迅速加入 0.9 g 胶原肽,继续搅拌 10 min,调节体系 pH 到 6,透析 72 h,浓缩冷冻干燥。得到的白色固体即为胶原肽修饰的羧甲基果聚糖。

1.2.3 取代度测试 根据 Fan 等方法计算取代度,其中取代度定义为羧甲基果聚糖中每个重复结构单元中羧甲基被胶原肽取代的数目^[10]。在 1~30 mg/L 浓度下,胶原肽在 200 nm 的紫外吸收值与其浓度成正比,其浓度-紫外吸收标准曲线见式(1)。以羧甲基果聚糖为空白对照,测定 30 mg/L 胶原肽修饰羧甲基果聚糖产物在 200 nm 的紫外吸收,通过式(1)计算折算其胶原肽的当量浓度,再根据式(2)计算取代度 DS。

$$A = 38.03C - 0.0007 \quad \text{式(1)}$$

$$R^2 = 0.9994 \quad DS = \frac{44000C}{800 - 78200C} \quad \text{式(2)}$$

1.2.4 红外光谱检测 称取干燥后的样品 2 mg 与 150 mg 的 KBr 混合研磨后压片,上机扫描分析,扫描范围 400~4000 cm^{-1} 。

1.2.5 抗氧化性测试 通过 ABTS⁺·清除能力、氧自由基清除能力和铁还原能力实验测试抗氧化性。

1.2.5.1 ABTS⁺·清除能力测定 采用张焕等^[11]的方法测定样品对 ABTS⁺·的清除能力。将 ABTS⁺·(7 mmol/L, 5 mL) 和过硫酸钾溶液(140 mmol/L, 88 μL) 混合,室温避光反应 12~16 h,制备 ABTS⁺·储备液。使用磷酸盐缓冲液(10 mmol/L, pH 7.4) 将储备液稀释至其在 734 nm 波长处吸光度(A)为 0.70 ± 0.02。取 100 μL 不同质量浓度(0~25 mg/mL) 的待测样品水溶液,加入 3 mL 的 ABTS⁺·溶液,避光反应 6 min,记录其在 734 nm 波长处的吸光度为 $A_{\text{样品}}$ 。以 100 μL 纯水代替样品,相同操作,记录其在 734 nm 波长处的吸光度为 $A_{\text{空白}}$ 。按式(3)计算样品清除 ABTS⁺·的清除率。

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.5.2 氧自由基清除能力测定(oxygen radical absorbance capacity, ORAC) 采用 Yan Zeng 等^[12]的方法,使用 Spectra Max M5 多功能酶标仪进行测试。于 96 孔板微孔中加入荧光素钠盐(70 nmol/L, 120 μL) 和 20 μL 待测样品,在 37 °C 条件下孵育 10 min,迅速加入 AAPH(12.8 mmol/L, 60 μL) 后,每隔 1 min 测量样品在 485 nm 激发条件下,528 nm 处荧光发射的强度变化。以水溶性的 V_E 衍生物 Trolox(终浓度:1~8 $\mu\text{mol/L}$) 替代不同质量浓度(0.5~10 mg/mL) 的样品水溶液,同板同时操作,用于绘制标准曲线。测定时间为 90 min,各样品不同时间的荧光强度分别记为 F_0 、 F_1 、 F_2 ... F_{90} 。其中 F_0 为 0 min

时的荧光值 F_n 为第 n min 的荧光值。按式 (4) 计算样品荧光变化零阶矩曲线下面积 (area under curve, AUC)。

$$AUC = 0.5 + \frac{F_1}{F_0} + \frac{F_2}{F_0} + \frac{F_3}{F_0} + \cdots + \frac{F_n}{F_0} \quad \text{式(4)}$$

根据标准曲线方程式 (5) 计算样品对应的 Trolox 浓度, 即 ORAC 值, 以 mmol Trolox/g 表示。

$$AUC = 5.298C + 30.291 \quad R^2 = 0.9984 \quad \text{式(5)}$$

式 (5) 中 C 为 Trolox 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)。

1.2.5.3 铁离子还原能力测定 (ferric reducing antioxidant power, FRAP) 采用张颖等^[1]的方法测试铁离子还原能力。配制新鲜 FRAP 反应液: 300 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH3.6), 10 mmol/L 的 TPTZ 溶液 (40 mmol/L HCl 为溶剂) 以及 20 mmol/L 的 FeCl_3 溶液, 三者以体积比 10:1:1 混合后, 于 37 °C 水浴保温。取 100 μL 样品溶液与 3 mL 铁还原 (FRAP) 试剂混匀后于 37 °C 水浴中反应 5 min, 测定体系在 593 nm 的吸光值 A 。同时取浓度 0 ~ 1.0 mmol/L 的 FeSO_4 溶液替代样品反应绘制标准曲线。通过标准曲线方程式 (6) 计算样品对应的 FeSO_4 浓度, 即 FRAP 值, 以 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ 表示。

$$A = 0.4148C + 0.0489 \quad R^2 = 0.9995 \quad \text{式(6)}$$

式 (6) 中 C 为 Fe^{2+} 浓度 (mmol/L)。

1.2.6 吸湿保湿性测试 参考 Ping Shao 等^[13]的方法, 在室温 20 °C 下进行吸湿保湿性测定。

1.2.6.1 吸湿性测试 准确称取 0.5 g 在 100 °C 下干燥 4 h 的样品, 分别置于以碳酸钾饱和溶液维持相对湿度 43% 和以硫酸铵饱和溶液维持相对湿度 81% 的干燥器中, 间隔一定时间称量放置前的样品质量 (W_0) 和放置后的样品质量 (W_n), 根据式 (7) 计算吸湿率:

$$\text{吸湿率}(\%) = \frac{W_n - W_0}{W_0} \times 100 \quad \text{式(7)}$$

1.2.6.2 保湿性测试 准确称取 0.5 g 在 100 °C 下干燥 4 h 的样品, 加入样品 10% 质量分数的水分, 置于装有干燥变色硅胶的干燥器中, 间隔一定时间称量样品放置前的水分质量 (H_0) 和放置后的水分质量 (H_n), 根据式 (8) 计算保湿率:

$$\text{保湿率}(\%) = \frac{H_0 - H_n}{H_0} \times 100 \quad \text{式(8)}$$

1.2.7 皮肤成纤维细胞生长增殖测试 参考陈俊等^[14]的方法, 进行皮肤成纤维细胞生长和增殖测试实验。

1.2.7.1 细胞培养 人皮角质 HaCaT 细胞置于 DMEM 培养液 (含 10% FBS 与 1% 双抗) 中, 于 37 °C、5% CO_2 饱和湿度孵育箱培养, 每隔 2~3 d 换一次培养液, 待细胞融合率达 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 并进行传代培养, 取对数期生长状态良好的细胞进行细胞活力测试。

1.2.7.2 细胞活力测试 HaCaT 细胞以 6×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO_2 饱和湿度孵育箱培养 24 h 后, 使用含 0、0.05、0.1、0.5、1.0 mg/mL 样品的 DMEM 培养液 (含 10% FBS 与 1% 双抗) 等体积地取代原培养液 (200 μL), 继续培养 48 h。弃

去培养液, 每孔加入 10 μL 的 MTT 溶液 (终浓度为 0.5 mg/mL), 继续孵育 4 h 后, 4500 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 加入 150 μL DMSO 溶解活细胞与 MTT 生成的甲臍, 震荡 10 min, 利用酶标仪测试各孔在 490 nm 的吸光值 A 。按式 (9) 计算细胞活力:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad \text{式(9)}$$

1.2.8 数据处理方法 测试结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 并采用 SPSS 19.0 统计学软件进行单因素方差两两比较分析, $p < 0.05$ 时有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 结构表征

胶原肽 (COP)、羧甲基果聚糖 (CP) 和胶原肽修饰的羧甲基果聚糖 (COP-CP) 的红外光谱见图 1。羧甲基果聚糖 CP 除具有多糖类的红外特征吸收峰 (如 3421 cm^{-1} 的 O-H 伸缩振动吸收峰与 2937 cm^{-1} 的 C-H 伸缩振动吸收峰) 外, 还在 1601 cm^{-1} 出现羧基基团的 C=O 伸缩振动吸收峰, 在 1412 cm^{-1} 处出现与羧基相连的 $-\text{CH}_2-$ 的剪式振动吸收峰, 说明 $-\text{CH}_2\text{COO}-$ 基团被成功引入到果聚糖上^[15]。而胶原肽修饰羧甲基果聚糖的产物, 在保有羧甲基果聚糖的红外特征吸收峰外, 还出现了可在胶原肽红外光谱中观察到的 1654 cm^{-1} 与 1546 cm^{-1} 处酰胺基和伯胺基伸展振动峰, 这一结果与 Fan 等报道一致^[10], 说明羧甲基果聚糖被胶原肽成功修饰。

电位滴定实验^[16]测定羧甲基果聚糖中的羧甲基取代度为 0.289。通过测试羧甲基果聚糖在胶原肽修饰前后的 200 nm 紫外吸收变化, 计算出胶原肽在羧甲基果聚糖修饰中的取代度为 0.0374, 这说明有 12.94% 的羧甲基官能团被胶原肽完全取代。考虑到不同多糖在同一反应条件下的化学修饰程度不同, 虽然实验中的羧甲基果聚糖制备及后续的胶原肽修饰均参考相关文献的最优条件进行, 推测反应参数的后期优化仍然可以调整修饰产物中胶原肽取代羧甲基的比例, 从而对修饰后的羧甲基果聚糖的功能活性造成影响。

2.2 抗氧化性

作为多糖的重要生物学活性之一, 多糖的抗氧化性及其作用机理在功能食品与药品开发上倍受关注, 相关研究日趋广泛和深入。有研究表明羧甲基化修饰不能确保多糖的抗氧化性提高, 甚至可能造成相反效果^[17]。与此报道结果类似, 本实验中的解淀粉芽孢杆菌果聚糖经羧甲基化修饰后, 抗氧化能力基本没有变化 (果聚糖数据未给出)。而胶原肽的引入会明显提高羧甲基果聚糖的抗氧化能力。

如图 2 所示, 随样品浓度的增加, 胶原肽修饰的羧甲基果聚糖对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的清除能力也在不断增强, 两者呈剂量关系。在 25 mg/mL 下, 胶原肽修饰的羧甲基果聚糖对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的清除率为 62.31%, 比修饰前提高了 6.11 倍。除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的清除能力有显著提高 ($p < 0.05$) 外, 胶原肽修饰后的羧甲基果聚糖氧自由基清除能力 ORAC 值与铁离子还原能力 FRAP 值也显著提高, 分别增长了 3.02 倍和 40% ($p < 0.05$)。不

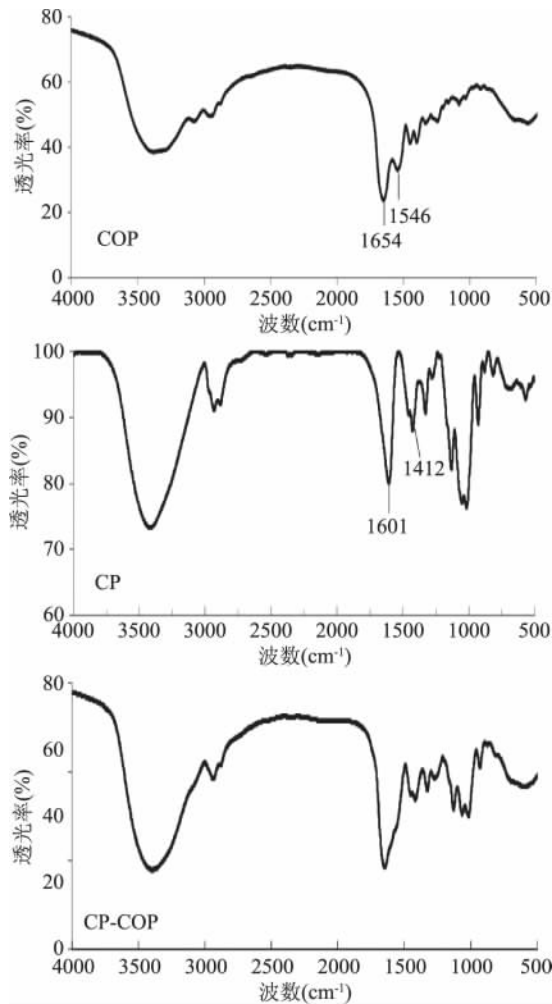


图1 胶原肽修饰羧甲基果聚糖的傅里叶红外光谱表征

Fig.1 FT-IR analysis of carboxymethylated dextran modified with collagen peptides

同来源胶原肽的抗氧化活性有所不同。如贾建萍等报道鳕鱼皮胶原肽具有较强的清除 $ABTS^+ \cdot$ 的能力,而驴皮胶原肽具有较强的还原力^[18]。由于本实验中的胶原肽来源于鳕鱼皮,因此其提高羧甲基果聚糖的铁还原能力效果有限。后期可以针对羧甲基果聚糖修饰产物的抗氧化性具体要求,对不同来源的胶原肽进行筛选,从中选择合适的原料修饰羧甲基果聚糖。

2.3 吸湿保湿性

由于吸湿保湿剂具有防止水分损失的作用,经常用于果饅和焙烤食品中。除此之外,吸湿保湿剂还有助于皮肤角质层在干燥的空气中保持正常水分(质量分数为:10%~20%),防止皮肤因水分不足而产生皱裂、粗糙等。本实验以甘油(glycerol)为对照,

表1 胶原肽修饰羧甲基果聚糖的氧自由基清除能力ORAC值与铁离子还原能力FRAP值

Table 1 The oxygen radical absorbance capacity (ORAC value) and ferric reducing ability (FRAP value) of carboxymethylated dextran modified with collagen peptides

指标	COP	CP	CP-COP
ORAC 值 (mmol Tolox/g)	186.66 ± 6.46 ^a	10.68 ± 1.47 ^c	42.93 ± 2.16 ^b
FRAP 值 (μmol Fe ²⁺ /g)	5.99 ± 0.25 ^a	2.19 ± 0.04 ^c	3.07 ± 0.24 ^b

注:使用不同小写字母标记测试值的显著差异($p < 0.05$)。

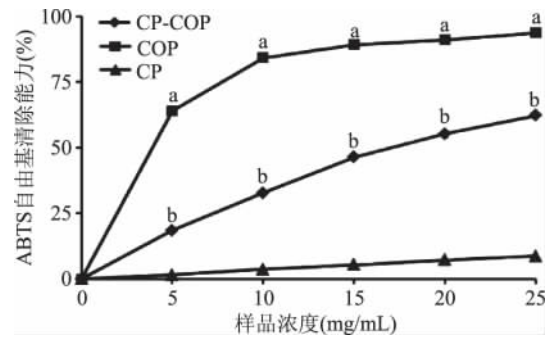
图2 胶原肽修饰羧甲基果聚糖产物对 $ABTS^+ \cdot$ 的清除率

Fig.2 $ABTS^+ \cdot$ radical scavenging ability of carboxymethylated dextran modified with collagen peptides

注:使用不同小写字母标记同一浓度下

不同样品测试值的显著差异($p < 0.05$)。图4同。

测试了胶原肽(COP)、羧甲基果聚糖(CP)和胶原肽修饰的羧甲基果聚糖(CP-COP)的吸湿和保湿能力。

如图3a所示,在饱和 K_2CO_3 (相对湿度43%) 低湿环境下,COP、CP-COP、CP和glycerol在实验24 h的吸湿率分别为9.37%、11.03%、14.24%和15.71%,各样品吸湿率的差异显著($p < 0.05$)。之后,除对照glycerol的吸湿能力随时间延长继续增强外,其余样品的吸湿率几乎保持不变。样品的吸湿性大小顺序为: glycerol > CP > CP-COP > COP,其中CP-COP在放置72 h的吸湿率为11.96%。但值得注意的是,在测试前期12 h内CP的吸湿速率和效果均要优于glycerol,而CP-COP的吸湿速效与glycerol持衡。样品在饱和 $(NH_4)_2SO_4$ (相对湿度81%) 高湿环境中的吸湿率变化如图3b所示,随时间延长,COP、CP和CP-COP的吸湿率增大,在36 h基本达到平台期。而对照glycerol的吸湿率在测试时间内一直保持稳定增加。样品在36 h的吸湿性大小顺序依旧为: glycerol (36.16%) > CP (24.08%) > CP-COP (21.35%) > COP (21.22%)。然而CP-COP与CP、COP在吸湿率上的差异并不显著($p > 0.05$),其中CP-COP在放置72 h的吸湿率为21.54%。说明与低湿环境相比,CP、CP-COP和COP三者在高湿环境中的吸湿能力差异变小。此外,COP、CP和CP-COP的在低湿与高湿环境下的吸湿能力均高于报道的拟目乌贼生肌腺碱提多糖以及常规保湿剂聚乙二醇6000、壳聚糖^[19]。

在变色硅胶维持的无水干燥条件下,各样品的保湿率均有减小(图3c)。其中,COP、CP和CP-COP的保湿率下降趋势在36 h后趋于饱和,而对照glycerol的保湿率仍随时间延长明显降低。在72 h时glycerol、COP、CP-COP和CP的保湿率分别为

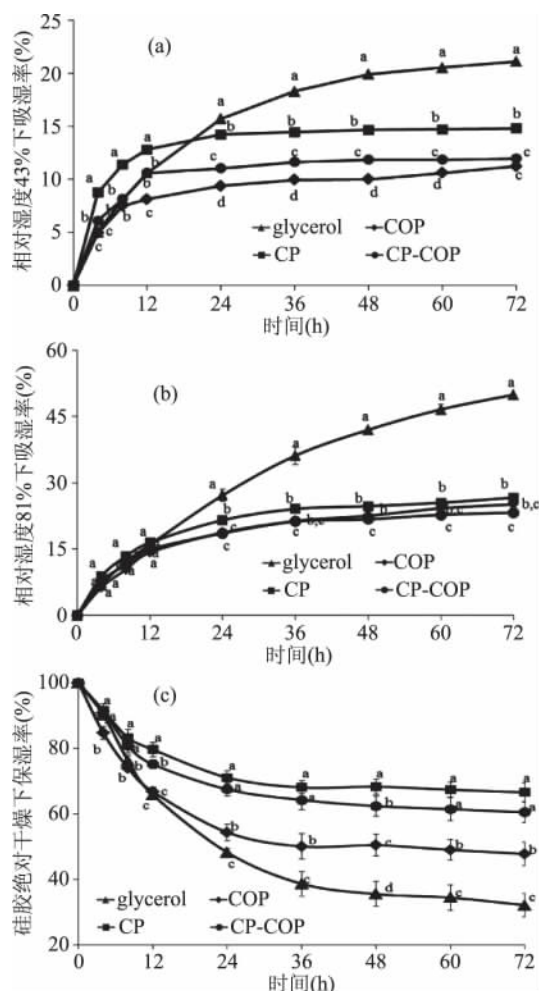


图3 胶原肽修饰羧甲基果聚糖产物在不同湿度环境下的吸湿保湿性能

Fig.3 The moisture absorption and moisture retention abilities of carboxymethylated chitosan modified with collagen peptides under different humidity environment

注: (a) RH 43% 湿度环境, (b) RH 81% 湿度环境, (c) 干燥环境; 使用不同小写字母标记同一时间下不同样品测试值的显著差异 ($p < 0.05$)。

32.09%、47.76%、60.48% 和 66.55%, 其中, CP-COP 与 CP 的保湿率无显著差异 ($p > 0.05$)。这说明胶原肽(COP)、羧甲基果聚糖(CP)和胶原肽修饰的羧甲基果聚糖(CP-COP)均具有较强的保湿能力,其保湿效果不仅优于对照甘油,也高于报道的罗耳阿太菌胞外多糖^[20]和红枣水解多糖^[21]。

羧甲基果聚糖经胶原肽修饰后,虽然抗氧化能力明显提高,但吸湿、保湿性能有所下降。这是因为被胶原肽修饰后,羧甲基果聚糖中能与水形成氢键、稳定结合的极性羧基官能团的数目在减少。实验中胶原肽对羧甲基官能团的取代度为 12.94%,其相应修饰产物在吸湿、保湿性能上的变化明显小于在抗氧化性上的变化。说明胶原肽修饰对羧甲基果聚糖的影响主要表现在抗氧化性上,而通过控制胶原肽修饰的反应条件,可以调控羧甲基果聚糖衍生产物在抗氧化性与吸湿、保湿性能之间的协调关系。

2.4 对皮肤成纤维细胞生长和增殖影响

角质细胞作为真皮内主要的修复细胞,对皮肤适度的自我代谢有重要作用,其增殖生长对于维持皮肤的正常结构和生理功能具有重要意义。如白晓智等发现,白芷活性提取物浓度为 0.05~0.5 mg/mL 时,均能促进人角质形成 HaCaT 细胞增殖,抑制其凋亡,有利于皮肤创面愈合^[22]。本实验使用 MTT 法考察胶原肽(COP)、羧甲基果聚糖(CP)和胶原肽修饰的羧甲基果聚糖(CP-COP)对人皮肤角质细胞(HaCaT 细胞)生长影响,结果如图 4 所示。在 0~1 mg/mL 浓度范围内,CP-COP 不仅无明显毒性,还可以促进 HaCaT 细胞增殖,具有较好的生物相容性。其中,CP-COP 在 0~0.5 mg/mL 的促进细胞增殖能力与其浓度呈剂量关系。在 0.5 mg/mL 下,CP-COP 两者与 CP 的促增殖效果存在显著差异 ($p < 0.05$),三者作用下的 HaCaT 细胞存活率分别为 128.7%、124.2% 与 111.9%。说明胶原肽修饰能增强羧甲基果聚糖促进人皮肤角质细胞增殖的效果,更有利于其在皮肤修复方面的生物活性提升。此外,本实验中胶原肽修饰羧甲基果聚糖对 HaCaT 细胞增殖的促进效果与张鑫等报道类似。其发现林蛙皮多肽质量浓度为 50~3000 mg/L 时,对 HaCaT 细胞均有显著性促进增殖的作用。在 50~800 mg/L 范围内,随着多肽质量浓度的升高,活性多肽对 HaCaT 细胞的促进增殖作用呈现剂量依赖效应^[23]。

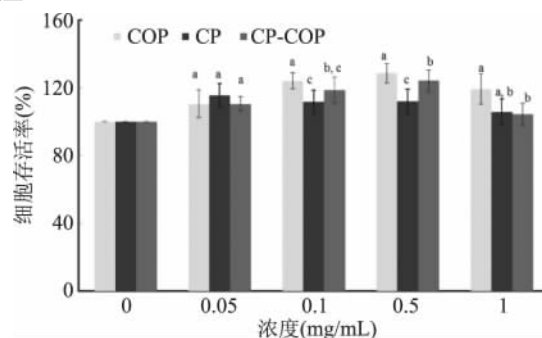


图4 胶原肽修饰羧甲基果聚糖产物对 HaCat 细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of carboxymethylated chitosan modified with collagen peptides on the proliferation of HaCat cells

3 结论

胶原肽对羧甲基果聚糖的修饰,能大幅度提高羧甲基果聚糖的抗氧化性。不仅如此,修饰产物还保留了良好的保湿吸湿活性,与皮肤亲合性好,对细胞无毒性,能有效促进人皮角质细胞增殖。基于上述特性,胶原肽修饰能提高羧甲基果聚糖应用于功能性食品、医药制品和化妆品上的潜力。

参考文献

- [1] 张颖, 曾艳, 张丽姣, 等. 解淀粉芽孢杆菌果聚糖的化学修饰与抗氧化、抗肿瘤活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(13): 96-100.
- [2] 陈慧, 陈义勇. 白背毛木耳多糖 APP3a 羧甲基化修饰工艺

研究[J].食品工业科技 2016 37(1):258-262.

[3] M C Gómez-Guillén, B Giménez, M E López-Caballero, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1813-1827.

[4] Lewis A. Reis, Loraine L. Y. Chiu, Yan Liang, et al. A peptide-modified chitosan-collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery [J]. Acta Biomaterialia, 2012, 8(3): 1022-1036.

[5] Lihong Fan, Mi Cao, Song Gao, et al. Preparation and characterization of sodium alginate modified with collagen peptides [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(2): 380-385.

[6] Lihong Fan, Mi Cao, Song Gao, et al. Modification of carboxymethyl cellulose grafted with collagen peptide and its antioxidant activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 112(4): 32-38.

[7] 张丽姣, 曾艳, 张颖, 等. 解淀粉芽孢杆菌胞外多糖发酵条件的优化[J]. 食品工业科技 2015 36(9): 214-219.

[8] 李星硕, 朱玥明, 管于平, 等. 产胶原酶菌株的筛选鉴定、发酵优化及胶原酶纯化[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1034-1043.

[9] Xiao-xiao Liu, Zhen-jiang Wan, Lin Shi, et al. Preparation and antihyperlipidemic activities of chemically modified polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneura* Hua [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 737-742.

[10] Lihong Fan, Jun Tong, Chang Tang, et al. Preparation and characterization of carboxymethylated carrageenan modified with collagen peptides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 790-797.

[11] 张换, 曾艳, 管于平, 等. 响应面法优化海带多糖的酶法提取工艺及其抗氧化研究[J]. 食品科技, 2013, 38(5): 197-202.

[12] Yan Zeng, Xiaoxi Zhang, Yuping Guan, et al. Characteristics

and Antioxidant activity of Maillard reaction products from psicose-lysine and fructose-lysine model systems [J]. Journal of Food Science, 2006, 76(3): 398-403.

[13] Ping Shao, Xiaoxiao Chen, Peilong Sun. Improvement of antioxidant and moisture-preserving activities of *Sargassum horneri* polysaccharide enzymatic hydrolyzates [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74: 420-427.

[14] 陈俊, 叶燕军, 王宝周, 等. 鱼皮胶原肽对人皮肤角质细胞生长的影响[J]. 现代食品科技 2015 31(3): 55-59.

[15] V Pushpamalar, S J Langford, M Ahmad, et al. Optimization of reaction conditions for preparing carboxymethyl cellulose from sago waste [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 64(2): 312-318.

[16] A Comparison of some methods for the determination of the degree of substitution of carboxymethyl starch [J]. Starch-Starke, 2005, 57(2): 79-83.

[17] 曹刚, 李大为, 任锦, 等. 羧甲基琼脂糖多糖的制备及其抗氧化活性研究[J]. 化学与生物工程 2010 27(10): 33-36.

[18] 贾建萍, 鲁健章, 周彦钢, 等. 不同来源胶原肽的抗氧化活性及吸湿保湿性能[J]. 食品科学 2010 31(21): 169-172.

[19] 戴宏杰, 孙玉林, 杨梅语, 等. 拟目乌贼生殖腺碱提多糖的抗氧化及吸湿保湿特性[J]. 食品科学 2016 37(2): 31-38.

[20] 魏明, 李鸿梅, 马艳秋, 等. 响应面优化罗耳阿太菌胞外多糖提取工艺及其保湿、黏度特性分析[J]. 食品科学 2015, 36(8): 67-73.

[21] 纵伟, 付玉洁, 张康逸, 等. 红枣多糖水解工艺优化及其产物吸湿性能、保湿性能研究[J]. 轻工学报, 2016, 31(1): 23-28.

[22] 白晓智, 胡大海, 王耀军, 等. 白芷活性提取物对人角质形成细胞生物学特性的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, 26(3): 322-325.

[23] 张鑫, 李思明, 邓晨, 等. 林蛙皮多肽对 HaCaT 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(6): 946-954.