

灰星鲨鱼皮抗氧化多肽的制备及其性能分析

王堡焯¹, 王勤¹, 石艳^{1*}, 吕鹏飞¹, 许新恒¹, 陈清西¹, 王悦²

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361102; 2. 厦门肽王基因科技有限公司, 福建 厦门 361028)

摘要: 灰星鲨 (*Mustelus griseus*) 鱼皮中含有丰富的胶原蛋白, 以灰星鲨鱼皮为原料, 抗氧化能力作为筛选指标, 探讨了木瓜蛋白酶降解鲨鱼皮的最佳工艺条件。结果表明, 制备鲨鱼皮抗氧化多肽的最佳水解条件为: 酶解温度 55 °C, pH 值 4.0, 加酶量 4%, 酶解时间 2 h。对获得的鲨鱼皮抗氧化多肽进行理化性质分析, 结果显示: 其紫外最大吸收峰在 220 nm 和 280 nm 处, 符合多肽的特征; 其具有良好的吸湿性和保湿性, 在湿度为 43% 的条件下, 多肽的吸湿率和保水率分别为 (50.76±0.71) % 和 (85.41±1.33) %; 对 DPPH 自由基及 ABTS 自由基的 IC_{50} 为: 0.55、0.28 mg/mL。利用体外蘑菇酪氨酸酶模型初步探究多肽对黑色素的抑制作用, 并测得其半抑制质量浓度 IC_{50} 为 0.4 mg/mL; 对其生物活性进行分析发现多肽对小鼠 B16F10 细胞的黑色素也具有明显的抑制作用。上述结果可为今后鲨鱼皮多肽在化妆品中的应用提供基础参考。

关键词: 灰星鲨; 鱼皮多肽; 理化性质; 抗氧化能力; 酪氨酸酶; 黑色素

中图分类号: Q 180.17

文献标志码: A

胶原蛋白肽富含人体需要的白氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸等多种氨基酸, 是一种新型胶原蛋白类产品^[1]。目前胶原蛋白肽的制备多以淡水鱼类的皮、鳞、骨或猪、牛、羊等哺乳动物的皮、骨为原料, 通过酶解胶原获得胶原蛋白肽^[2]。胶原蛋白肽具有胶原蛋白的特有氨基酸组成, 分子量较小, 可溶于冷水且极易被人体的皮肤所吸收与利用^[3], 容易通过消化道被消化。

在自然界中, 鲨鱼是极少患恶性肿瘤的动物之一, 国内外对于鲨鱼的研究和开发主要集中于鲨鱼软骨素、鲨鱼鱼肝油等方面^[4, 5]。对鲨鱼皮的研究也集中在工业皮革的制作方面, 而对鲨鱼皮胶原蛋白方面的关注较少^[6]。在现有的提取胶原多肽的方法中, 大多采用酸法、碱法、盐法、酶法和热水抽提法或两种结合使用的方法从哺乳动物或鱼皮中提取出胶原蛋白^[7], 然后再对胶原蛋白进行酶解, 这种方法不仅人为剔除了某些可能具有其他功能的多肽, 减少了氨基酸和各种微量元素的种类, 而且工艺路线长, 操作复杂, 成本高昂, 不适合大规模生产。木瓜蛋白酶属于巯基蛋白酶, 具有较宽的底物特异性, 能作用于蛋白质中的 L-精氨酸、L-赖氨酸、甘氨酸和 L-瓜氨酸残基, 因此对许多蛋白质都有水解作用。此外, 木瓜蛋白酶还是一种内肽酶, 它能切割蛋白质分子内部肽链-CO-NH-, 生成分子量较小的多肽

收稿日期: 2019-01-16 **录用日期:** 2019-04-14

基金项目: 厦门市海洋经济发展专项资金 (17GY011HJ05)

***通信作者:** yshi@xmu.edu.cn

类物质，易于吸收。因此本文选择木瓜蛋白酶为水解酶，通过直接水解灰星鲨鱼皮，保留了其他蛋白多肽，丰富了氨基酸及微量元素，获得了功效良好的混合型多肽，并对其性能进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

灰星鲨鱼皮来源于厦门肽王基因科技有限公司，木瓜蛋白酶购于生工生物工程有限公司，1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 购于 Sigma 公司，蘑菇酪氨酸酶 (酶活力 1000 U/mg) 和 L-3,4-二羟基丙氨酸 (L-DOPA) 购于 Sigma-Aldrich 公司，其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 木瓜蛋白酶 (3500 U/mg) 酶解灰星鲨鱼皮的单因素条件试验

采取渐变式优化法，以水解产物的 DPPH 自由基清除率为指标，分别研究 pH、加酶量、时间、温度对酶解效果的影响。具体实验步骤为：50 g 去除脂肪的灰星鲨鱼皮 (湿重) 加入 20 倍体积超滤水 (1 L)，高温高压处理 30 min，待其冷却至室温，搅碎，加入木瓜蛋白酶酶解。在加酶量 5.0%、温度 55 °C、酶解时间 4 h 的条件下，研究 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0) 对酶解效果的影响；在温度 55 °C、时间 4 h、酶解 pH 5.0 的条件下，研究加酶量 (1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%) 对酶解效果的影响；在加酶量 3.0%、温度 55 °C、酶解 pH 5.0 的条件下，研究时间 (1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h) 对酶解效果的影响；在加酶量 3.0%、时间 3 h、酶解 pH 5.0 的条件下，研究温度 (35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C) 对酶解效果的影响。

1.2.2 正交实验优化及验证

根据单因素实验结果，以 DPPH 清除率为衡量标准，对 pH、加酶量、温度、酶解时间进行 L9 (3⁴) 正交试验，优化鲨鱼皮多肽制备工艺，各因素水平见表 1。并对正交所得的最优条件组合进行比较验证

表 1 正交实验设计因素水平表

Tab.1 Levels and factors of orthogonal designed experiments

水平	时间 (A) /h	pH (B)	加酶量 (C) /%	温度 (D) /°C
1	2	4	2	45
2	3	5	3	50
3	4	6	4	55

1.2.3 灰星鲨鱼皮多肽的紫外分析

将提取到的混合多肽样品溶解于 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中，配成 0.1 g/L 多肽溶液，在 200~400 nm 的近紫外光区进行扫描。

1.2.4 灰星鲨鱼皮多肽的体外吸湿、保湿效果测定

材料在潮湿空气中吸收水分的性质称为吸湿性。根据保湿剂保湿性能的差异，不同浓度保湿剂对水分子的作用力不同，吸收水分和保持水分的能力也不同。

吸湿性的测定^[8]：将实验所需的称量瓶至于 55 °C 烘箱内烘干至恒重，精确称量干燥的样品 0.5 g 左右于称量瓶中，将称量瓶放置于放有饱和碳酸钠溶液（相对湿度 43%）的干燥器，分别称取 48 h 后和 96 h 后的质量，根据下面的计算公式计算吸湿率：

$$\text{吸湿率} = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100\%$$

其中 W_0 为样品的初始质量， W_1 为样品放置 48 h 后和 96 h 后的质量。

保湿性的测定：将干燥器中的饱和碳酸钠溶液取出，将上述吸湿后的样品继续放置 48 h，称取样品质量 W_2 ，由继续放置前后的样品质量差，根据下面的计算公式计算吸湿率：

$$\text{保湿率} = (W_2 - W_0) / W_0 \times 100\%$$

其中 W_0 为吸湿 96 h 后样品质量， W_2 为将干燥器中的饱和碳酸钠溶液取出，将上述吸湿后的样品继续放置 48 h 后的质量。

1.2.5 灰星鲨鱼皮多肽的抗氧化能力测定

1) 灰星鲨鱼皮混合型多肽对 DPPH 自由基的清除能力^[9]

DPPH 法根据 Brand-Williams^[10]等已建立方法的基础上加以改进，取 2 mL 不同浓度的灰星鲨鱼皮多肽，加入 2 mL 0.004% DPPH 乙醇溶液。混合均匀后，室温静置 30 min，在 517 nm 处测定吸光值。空白样品为双蒸水。

$$\text{抑制率} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

其中 A_0 （加 2 mL 双蒸水和 2 mL DPPH 乙醇溶液）为加入样品前的吸光值， A_1 为加入样品后的吸光值。

2) 灰星鲨鱼皮混合型多肽对 ABTS 自由基的清除能力^[11]

将 0.4 mL 不同浓度的灰星鲨混合型多肽，加入 3.6 mL ABTS 工作液（OD734 nm 为 0.700±0.05），混合均匀后，室温下静置 6~10 min，在 734 nm 处测定吸光值。空白样采用双蒸水。

$$\text{抑制率} = [(A_1 - A_0) / A_0] \times 100\%$$

其中 A_0 （加 0.4 mL 双蒸水和 3.6 mL ABTS 工作液）为加入样品前的吸光值， A_1 为加入样品后的吸光值。

3) 灰星鲨鱼皮混合型多肽对 Fe³⁺还原力的影响^[12]

将 0.1 mL 不同浓度的灰星鲨鱼皮多肽，加入 0.5 mL PBS (pH 6.6) 和 0.5 mL 铁氰化钾，50 °C 水浴 20 min。取出加入 0.5 mL 三氯乙酸混匀，再加入 0.5 mL 超滤水和 0.5 mL 三氯化铁，室温静置 10 min，在 700 nm 处测定吸光值。空白样采用双蒸水。

$$\text{还原力} = [(A_1 - A_0) / A_0] \times 100\%$$

其中 A_0 （加 0.1 mL 超滤水、0.5 mL PBS (pH 6.6)、0.5 mL 铁氰化钾、0.5 mL 三氯乙酸、0.5

mL 超滤水和 0.5 mL 三氯化铁) 为加入样品前的吸光值, A_1 为加入样品后的吸光值。

1.2.6 灰星鲨鱼皮多肽对体外蘑菇酪氨酸酶的抑制作用分析

测定灰星鲨鱼皮混合型多肽对酪氨酸酶二酚酶的作用, 研究其半抑制率。测定使用 3 mL 体系^[13, 14]。多肽溶于水, 制成含不同浓度多肽的溶液, 以 1 mg/mL 的 *L*-DOPA 为底物, 0.05 mol/L PBS (pH 6.8) 为缓冲液。在 3 mL 测活体系中, 固定酪氨酸酶的浓度, 加入不同浓度的多肽后, 测定 475 nm 波长的动力学曲线, 根据直线的斜率求得酶活力。以酶活力对多肽浓度作图, 得到多肽抑制酪氨酸酶的浓度效应曲线。

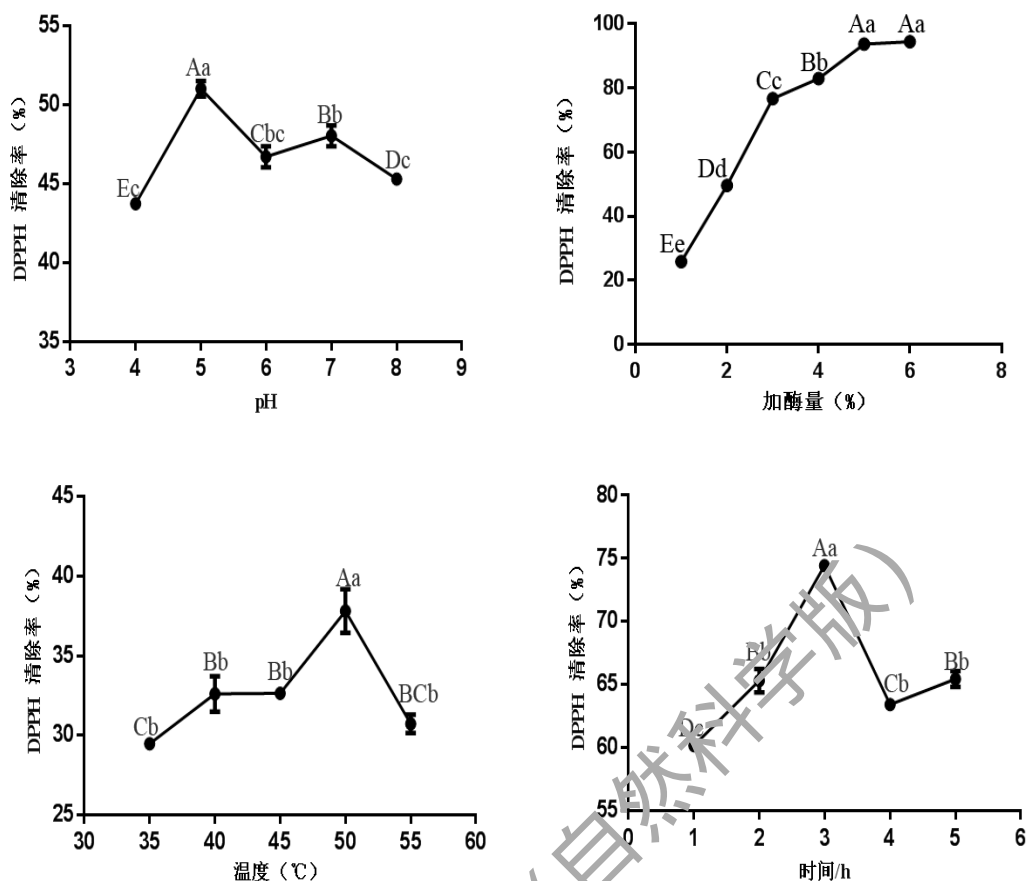
1.2.7 灰星鲨多肽对小鼠 B16F10 黑色素瘤细胞黑色素含量的影响分析

采用 RPMI-1640 培养基, 在 CO₂ 孵箱 37 °C, CO₂ 体积分数为 5% 的饱和湿度条件下复苏 B16F10^[15-17] 细胞。待细胞生长至近融合状态, 经 0.25% 胰蛋白酶消化, 传代, 并将培养基换成 DMEM。待细胞生长至近融合状态, 胰酶消化收集并调整细胞浓度, 于 6 孔板中培养, 并继续用 DMEM 培养^[18] 24 h, 贴壁后, 弃培养液。同时加入含不同浓度灰星鲨多肽的 DMEM 培养液, 再继续培养 2~3 d。此时显微镜下可明显观察到细胞内的黑色素, 离心, 收集细胞。

2 结果与分析

2.1 木瓜蛋白酶水解的单因素实验

本文选择了木瓜蛋白酶作为灰星鲨鱼皮的水解酶。以酶解产物的 DPPH 清除率为纵坐标, 酶解 pH、加酶量、温度和时间为横坐标。结果如图 1 所示: 随着 pH 值的增加, 水解液的抗氧化能力呈现先上升后下降的趋势, pH 为 5.0 时, 其抗氧化能力最强。当加酶量较少时, 水解液的抗氧化能力较低, 增大加酶量, 可以有效提高其抗氧化能力。加酶量从 1% 增加到 3%, 水解液的抗氧化能力增加的趋势明显, 加酶量对抗氧化能力的影响极显著 ($p < 0.01$)。而加酶量从 3% 增加到 6%, 抗氧化能力增加的趋势明显放缓, 加酶量 5% 的水解液抗氧化能力与加酶量 6% 的相比, 差异并不显著。因此, 考虑到成本方面, 选择 3% 的加酶量水解鲨鱼皮。当温度较低时, 水解液的抗氧化能力低, 随着温度的上升, 水解液的抗氧化能力也逐步增加, 50 °C 时, 水解液的抗氧化能力最强, 随后温度的提高影响了酶的活力, 因此抗氧化能力开始下降。当酶解 3 h 时, 多肽水解液的抗氧化能力最强, 低于 3 h 或高于 3 h, 抗氧化能力均有所下降。所以, 最终选择 pH 5.0, 3% 的加酶量, 温度 50 °C, 酶解 3 h 作为正交实验的基础。



大写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)，小写字母不同表示差异极显著 ($p < 0.01$)。

图1 不同因素对木瓜蛋白酶水解鲨鱼皮产物的DPPH清除能力的影响

Fig. 1 DPPH radical scavenging activity of Shark skin hydrolysates at different hydrolysis conditions of papain

2.2 木瓜蛋白酶水解的正交实验

由单因素实验得到木瓜蛋白酶水解鲨鱼皮多肽的条件为：酶解时间 3 h、pH 5.0、酶质量分数 3% (3500 U/mg)、温度 55 °C。根据单因素结果设置正交实验，以优化提取多肽条件。

由表2分析可知，各因素对木瓜蛋白酶水解鲨鱼皮多肽还原力的影响次序为C>B>A>D，即加酶量>pH>时间>酶解温度。通过极差分析得到最优水平为C3B1A1D1，即酶解时间2 h，加酶量4%，pH 4.0，酶解温度55 °C。

表2 鲨鱼皮多肽酶解反应正交实验分析

Tab. 2 Orthogonal array experimental results of enzymatic hydrolysis reaction of peptides from shark's skin

试验号	A (时间/h)	B (pH)	C (加酶量/%)	D (温度/°C)	DPPH清除率
1	2	4	2	45	0.508
2	2	5	3	50	0.586

3	2	6	4	55	0.647
4	3	4	3	55	0.579
5	3	5	4	45	0.640
6	3	6	2	50	0.401
7	4	4	4	50	0.625
8	4	5	2	55	0.454
9	4	6	3	45	0.512
k_1	1.741	1.712	1.363	1.660	
k_2	1.620	1.680	1.677	1.612	
k_3	1.591	1.560	1.912	1.680	
k_4	0.580	0.571	0.454	0.553	
k_5	0.540	0.560	0.559	0.537	
k_6	0.530	0.520	0.637	0.560	
R	0.050	0.051	0.183	0.023	

2.3 验证实验

为了验证优化的工艺条件，我们将表 2 中 DPPH 清除率较高的组合方案（A2B2C3D1、A1B3C3D3、A3B1C3D2）与正交实验得到的最优条件（A1B1C3D3）进行比较。结果如下：A2B2C3D1、A1B3C3D3、A3B1C3D2 的 DPPH 清除率分别为：0.575，0.563，0.486，而 A1B1C3D3 的清除率为 0.581。清除率较高的是 A1B1C3D3，因此，选定最终的酶解条件为：加酶量 4%，pH 4.0，温度 55℃，酶解时间 2 h。

2.4 鲨鱼皮多肽水解液的紫外分析

在 20 种氨基酸中，Trp 在 280 nm 处有很强的紫外吸收，因此大多数的蛋白质在 280 nm 处有最大吸收峰。根据文献报道，胶原蛋白中几乎不含 Trp，其最大吸收峰的位置在 225 nm 处^[19,20]。从图 2 可以看到，灰星鲨混合型多肽的水溶液经紫外全波长扫描后在 220 nm 处左右有最大吸收峰，这是胶原蛋白的特征吸收峰。而在 280 nm 处也观察到了其他蛋白的吸收峰，这符合混合型多肽的要求。

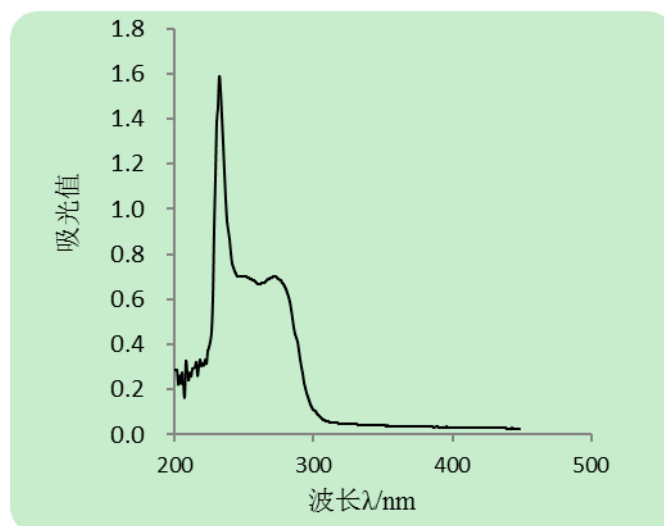


图2 鲨鱼皮多肽的紫外吸收光谱

Fig. 2 The ultraviolet absorption spectrum of Shark skin peptides

2.5 鲨鱼皮多肽的吸湿性和保湿性

甘油和大豆分离蛋白由于其良好的吸湿性及保湿性,因此常被用作一些护肤用品的添加剂^[21]。本文中以大豆分离蛋白和甘油作为阳性对照,发现灰星鲨鱼皮混合多肽的吸湿率和保湿率虽然都低于甘油,但与大豆分离蛋白相比,明显高于大豆分离蛋白。这说明了提取的多肽具有良好的吸湿保湿效果,为化妆品的添加剂提供了理论基础。

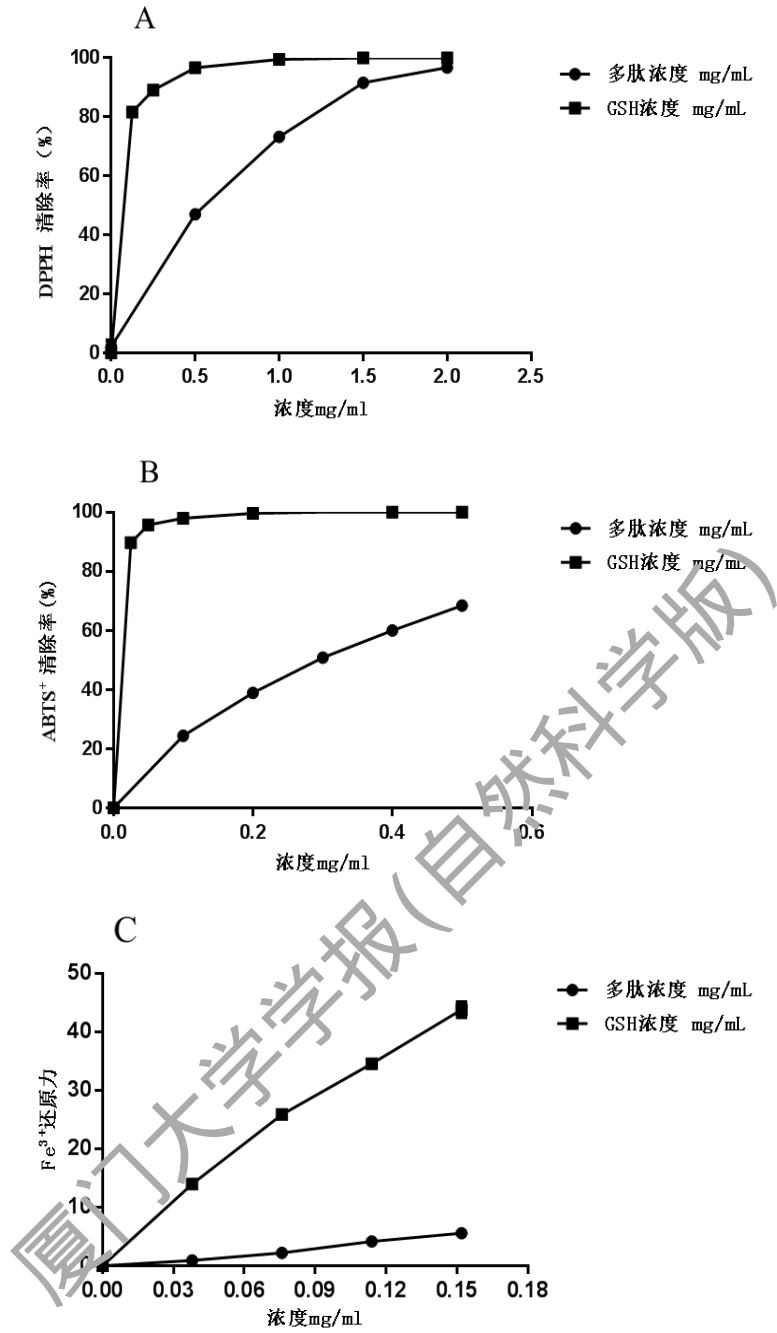
表3 多肽的保湿性和吸湿性

Tab.3 The moisturizing and hygroscopic properties of polypeptides

样品	48 h 吸湿率/%	96 h 吸湿率/%	48 h 保湿率/%
灰星鲨鱼皮多肽	32.55±1.04	50.76±0.71	85.41±1.33
大豆分离蛋白	15.19±0.17	22.45±0.81	77.51±3.25
甘油	70.21±2.57	92.20±1.91	92.24±0.56

2.6 鲨鱼皮多肽的抗氧化能力

DPPH、ABTS 自由基清除以及 Fe^{3+} 还原力实验表明,随着多肽浓度的增加,其抗氧化能力越强。图3结果表明,鲨鱼皮多肽对 Fe^{3+} 具有较强的还原力,且对 DPPH 和 ABTS 的 IC_{50} 为: 0.55、0.28 mg/mL。而根据文献报道^[22],罗非鱼皮胶原蛋白肽对 DPPH 自由基、ABTS 自由基的 IC_{50} 分别为 56.31、2.51 mg/mL,其功效浓度明显低于鲨鱼皮多肽。上述结果为鲨鱼皮多肽在抗氧化活性方面的应用提供了依据。



(A)DPPH 自由基清除能力; (B)ABTS⁺自由基清除能力; (C)FRAP 铁离子还原能力。

图 3 鲨鱼皮多肽的抗氧化能力

Fig. 3 The antioxidant capacity of Shark skin peptides

2.7 鲨鱼皮多肽对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

以 *L*-DOPA 为底物, 测定提取的鲨鱼多肽对酪氨酸酶活力的影响。在测活力的反应体系中分别加入不同浓度的多肽, 研究酶的剩余活力与效应物的浓度依赖关系, 结果见图 4。结果表明多肽提取物对酪氨酸酶的二酚酶活力有抑制作用。测定导致其酶活力下降一半的抑制剂质量浓度 (IC_{50}) 为 0.4 mg/mL。

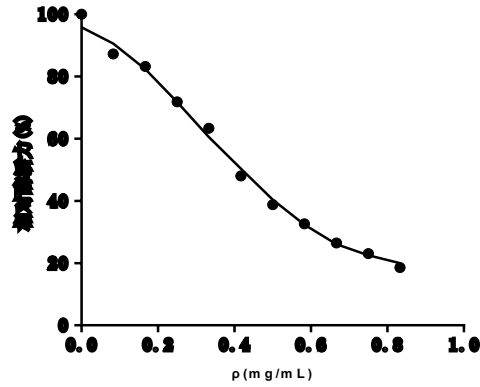


图4 鲨鱼皮多肽对蘑菇酪氨酸酶活力的影响

Fig.4 The effects of Shark skin peptides on the activity of tyrosinase of mushroom

2.8 鲨鱼皮多肽对 B16F10 细胞黑色素生成的影响

B16F10 细胞常被作为研究黑色素的优良模型^[23]。本文中以 B16F10 为研究对象，用 0~1280 $\mu\text{g/mL}$ 的多肽与 B16F10 细胞共培养 48 h，观察黑色素的生成情况，并通过 MTT 法测定了细胞的增殖情况。结果如图 5 所示：随着多肽浓度的增加，黑色素的积累逐渐下降，且细胞的增殖情况没有受到影响。这些结果表明了此多肽对黑色素合成具有一定的抑制作用，且呈浓度依赖性。

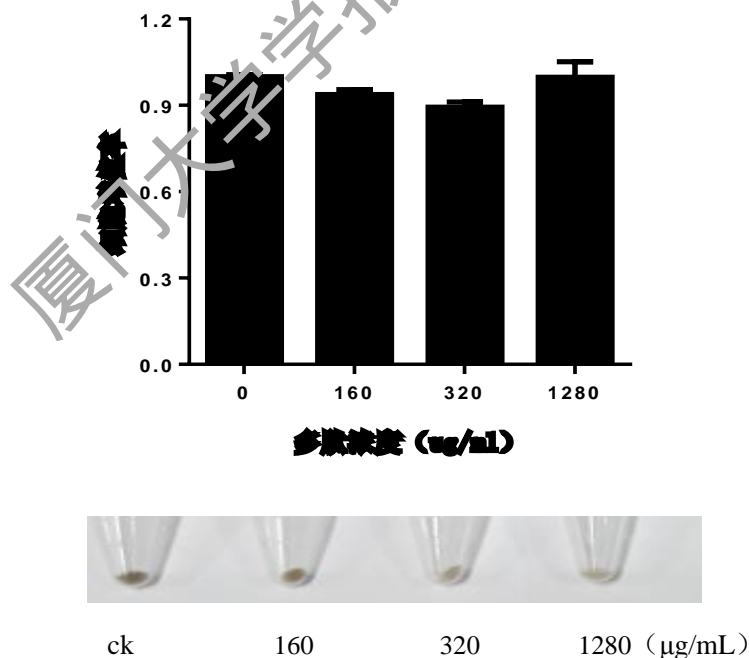


图5 鲨鱼皮多肽对 B16F10 细胞增殖情况及黑色素含量的影响

Fig5 The effects of shark skin peptides on cell proliferation and the content of melanin in B16F10

3 结 论

本研究通过现代酶学技术,直接对原料进行处理,跳过了从原料中提取胶原蛋白的方法,通过单因素和正交实验,确定了制备具有高抗氧化能力的鲨鱼皮混合多肽的最佳酶解工艺条件:木瓜蛋白酶为水解酶, pH 值 4.0, 加酶量 4%, 酶解温度 55 °C, 酶解时间 2 h。鲨鱼皮酶解后得到的具有抗氧化能力的多肽产物是包含胶原蛋白和其他蛋白的混合型多肽。此混合型多肽不仅具有胶原多肽的功能,而且还保留了其他功能性的多肽,扩大了混合多肽的应用。

实验表明,本文中提取的鲨鱼皮混合型多肽在抗氧化、体外保湿方面有显著效果。对 DPPH 自由基及 ABTS 自由基的 IC_{50} 为 0.55 和 0.28 mg/mL。多肽中富含氨基、羟基、羧基等亲水基团,因此具有较强的吸湿、保湿作用。以大豆分离蛋白和甘油作为阳性对照,在室温相对湿度为 43% 的情况下,发现多肽的保湿功能接近于甘油,表现出良好的保湿性,这为将来用于化妆品的添加剂提供理论基础。

同时,本研究以蘑菇酪氨酸酶作为筛选黑色素抑制剂的一种酶,建立了一种体外筛选抑制剂的模型。体外筛选实验表明,灰星鲨鱼皮多肽对蘑菇酪氨酸酶的活性具有明显的抑制作用, IC_{50} 为 0.4 mg/mL, 挖掘了它在美白方面的潜在功能。在以小鼠 B16F10 黑色素瘤细胞为产黑色素建模细胞的实验中,发现了多肽对细胞的产黑色素能力具有明显的抑制作用。综上,本研究制备的鲨鱼皮抗氧化多肽作为黑色素抑制剂具有一定的可行性,但是其具体机制还需进一步深入探究。

参考文献:

- [1] 万春燕, 王英华, 邬元娟, 等. 胶原蛋白在食品中的应用现状及其发展前景[J]. 中国食物与营养, 2008 (9): 24-26.
- [2] 江洪有, 谷峰, 鉏晓艳, 等. 水产胶原蛋白的制备、性能及应用综述[J]. 湖北农业科学, 2015, 54 (14): 3329-3334.
- [3] 翟逸, 刘孟刚, 刘艳艳, 等. 鱼胶原蛋白肽功能活性研究进展[J]. 食品安全导刊, 2018 (21): 133.
- [4] 朱宝芹, 郭斌, 韩冠英. 鲨鱼软骨素对 Lewis 肺癌转移的影响[J]. 中华中医药学刊, 2006, 24(6): 1090-1092.
- [5] 郭正霞. 鲨鱼肝油中烷氧基甘油的分析检测及富集工艺研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [6] 陈秀丽. 鲨鱼皮胶原蛋白防海水浸泡生物医用材料研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- [7] 俞艺萍, 陆利霞, 熊晓辉. 鱼皮胶原蛋白提取研究进展[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(12): 262-265.
- [8] 李幸. 鳕鱼皮胶原肽保湿护肤效果的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [9] 胡喜兰, 韩照祥, 陶莹, 等. DPPH 法测定 17 种植物的抗氧化活性[J]. 食品科技, 2006, 31 (10): 264-268.
- [10] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. LWT - Food Science and Technology, 1995, 28(1): 25-30.
- [11] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, MIRALLES B, AMIGO L, et al. Identification of antioxidant and

- ACE-inhibitory peptides in fermented milk[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(6): 1041-1048.
- [12] LIN S Y, JIN Y, LIU M Y, et al. Research on the preparation of antioxidant peptides derived from egg white with assisting of high-intensity pulsed electric field[J]. Food chemistry, 2013, 139(1/2/3/4): 300-306.
- [13] 郑成己, 郭云集, 梁戈, 等. 苯丙酸对蘑菇酪氨酸酶活力的抑制作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2012, 51(1): 117-120.
- [14] 宋康康. 抑制剂对酪氨酸酶的效应及其对黑色素生成调控的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [15] FENG L, SHI N N, CAI S S, et al. De novo molecular design of a novel octapeptide that inhibits in vivo melanogenesis and has great transdermal ability[J]. Med Chem, 2018, 61(15): 6846-6857.
- [16] PHANUWAT P, NINNAJ C, PAPASSARA S, et al. Inhibitory activities of protein hydrolysates from spotted babylon snails on tyrosinase and melanogenesis[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2018, 27(7): 811-829.
- [17] SUPATCHA K, CHOCKCHAI T, REED R L, et al. Isolation and identification of tyrosinase-inhibitory and copper-chelating peptides from hydrolyzed rice-bran-derived albumin[J]. Agric Food Chem, 2018, 66(31): 8346-8354.
- [18] LEHRAIKI A, ABBE P, CERESO M, et al. Inhibition of melanogenesis by the antidiabetic metformin[J]. Invest Dermatol, 2014, 134(10): 2589-2597.
- [19] 李继城, 孔松芝, 李东东, 等. 罗非鱼皮胶原蛋白肽在润肤霜中的应用及性能评价[J]. 食品工业科技, 2018, 39(05): p. 23-29.
- [20] 叶忱. 罗非鱼鳞胶原蛋白基抗菌凝胶的研究及在三文鱼保鲜中的应用[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [21] 吴卫炜. 化妆品常用保湿剂保湿吸湿性能研究[J]. 化工管理, 2018 (5): 241-242.
- [22] 盛周煌, 贾盟盟, 朱良, 等. 罗非鱼皮胶原蛋白多肽的体外抗氧化活性[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 274-278.
- [23] SU T R. Inhibition of melanogenesis by gallic acid: possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/beta-catenin signaling pathways in B16F10 cells[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 20443-20458.

Study on the extraction and function of antioxidant peptides from skin of *Mustelus griseus*

WANG Baoxuan¹, WANG Qin¹, SHI Yan^{1*}, LÜ Pengfei¹, XU Xinheng¹,
CHEN Qingxi¹, WANG Yue²

(1. College of life sciences, Xiamen University, Xiamen, 361102, China;

2. Xiamen Tekwon Genetic Technologies Ltd, Xiamen, 361028, China)

Abstract: The skin of *Mustelus griseus* contains abundant collagen. In this study, We treat shark skin with papain, taking the antioxidant capacity as the index to choose optimum technological conditions. In the end the optimum hydrolysis conditions of antioxidant hybrid peptides: enzyme solution temperature 55°C, pH 4.0, the amount of enzyme 4%, enzymolysis time 2 h. Then, we analyzed the physical and chemical properties of the antioxidant peptides. The ultraviolet absorption peak was at 220 nm and 280 nm, which was consistent with the characteristics of peptides. And it has good moisture absorption and moisture retention, which were (50.76±0.71)% and (85.41±1.33)%, when there's 43% water in the air. The IC_{50} of DPPH radical and ABTS radical were 0.55 and 0.28 mg/mL. Mushroom tyrosinase was used to explore the inhibition effect of peptides on melanin, the IC_{50} of which was 0.4 mg/mL. It was found that the peptides also have an obvious inhibitory effect on the melanin of B16F10. These results provide a theoretical and practical basis for the application of shark skin peptides in cosmetics in the future.

Keywords: *Mustelus griseus*; skin peptides; physicochemical property; antioxidant capacity; tyrosinase; melanin