

海参水煮液酶解多肽的抗氧化活性

赵玲¹ 耿晓晓^{1,2} 刘淇^{1*} 殷邦忠¹ 曹荣¹ 李志超¹

(¹ 国家海参加工技术研发分中心 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(² 青岛大学生物系, 266071)

摘要 以海参水煮液的冻干粉为原料, 选取中性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶分别酶解制备多肽, 测定其对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 $\text{DPPH} \cdot$ 自由基的清除能力, 并与合成抗氧化剂 TBHQ 对比。结果表明, 3 种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 $\text{DPPH} \cdot$ 自由基的清除能力均随样品质量浓度的升高而增强; 其中, 中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 $\text{DPPH} \cdot$ 自由基的 IC_{50} 值依次为 8.565、6.658 和 2.015 mg/ml, 其对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除能力优于 TBHQ。经液相色谱法测定, 中性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分子量分别分布在 $<2\ 500$ 、 $<3\ 500$ 和 $<1\ 000\ \text{D}$ 的小分子肽中。

关键词 海参水煮液 多肽 自由基 抗氧化活性 分子量

中图分类号 S985.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)05-0069-05

Antioxidant activity of polypeptide from sea cucumber cooking water

ZHAO Ling¹ GENG Xiao-xiao^{1,2} LIU Qi^{1*} YIN Bang-zhong¹
CAO Rong¹ LI Zhi-chao¹

(¹ National R&D Branch Center for Sea Cucumber Processing, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Biological Department, Qingdao University, 266071)

ABSTRACT Polypeptides from sea cucumber cooking water were prepared by neutral protease, pepsin and trypsin, and the antioxidant activity of the polypeptides was compared with synthetic antioxidant TBHQ by measuring the scavenging capacities to $\text{DPPH} \cdot$, $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^- \cdot$, and the relative molecular mass was assayed. The results showed that scavenging capacities of TBHQ and polypeptides prepared by three proteases on free radicals were enhanced with the increase of sample concentration. The corresponding IC_{50} values of polypeptide from sea cucumber cooking water prepared by neutral protease to $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^- \cdot$ and $\text{DPPH} \cdot$ free radicals were 8.565 mg/ml, 6.658 mg/ml and 2.015 mg/ml respectively, and it had better scavenging ability to $\text{O}_2^- \cdot$ than TBHQ. The molecular weight of polypeptides from sea cucumber cooking water prepared by neutral protease, pepsin and trypsin was respectively less than 2 500, 3 500 and

公益性行业(农业)科研专项(201303121)和山东省科技发展计划项目(2012GGF01024)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-10-23; 接受日期: 2012-11-21

作者简介: 赵玲(1985-), 女, 硕士, 主要从事水产品加工与综合利用研究。E-mail: zhaoling1985@126.com

1 000D, analyzed by liquid chromatography.

KEY WORDS Sea cucumber cooking water Polypeptide Free radical
Antioxidant activity Molecular weight

一些活性氧自由基如 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 等是新陈代谢反应的副产物,若人体内自由基的数量过多,就会破坏细胞结构、干扰正常的生理代谢进而引起疾病。因而,如何清除体内过多的自由基,防止脂质过氧化、延缓衰老等问题受到高度关注。近代研究结果表明,蛋白质在人体内消化后大都是以寡肽的形式吸收;且活性肽比蛋白质、氨基酸具有更多的生理活性(丁利君等 2009)。据报道,海洋生物蛋白经酶解处理后会具有抗氧化功能的活性肽。迄今为止,国内外对海洋生物抗氧化肽的研究已经相当广泛(Amarowicz *et al.* 1997; Kim *et al.* 2001; 姜威等 2012; 曹文红等 2009; 庄永亮等 2009; 姚兴存等 2012)。多肽的功能特性与其分子量大小密切相关,不同分子量的抗氧化肽表现出的抗氧化性能也不同。邓成萍等(2006)研究不同分子量段大豆多肽的功能特性时发现,大多数的强抗氧化肽主要集中在分子量小于5 000 D的小肽中。

海参是一种高蛋白、低脂肪、营养价值丰富的海洋无脊椎动物,其药用价值极高,有提高机体免疫力、抗肿瘤、抗凝血、抗衰老等功效(赵芹等 2008; 刘小芳等 2011),因而深受人们的青睐。近年来,在海参抗氧化肽方面已有一定的研究报道(陈卉卉等 2010; 王静等 2010; 赵玲等 2012; 郑杰等 2011)。据报道,海参加工过程中产生的水煮液,含有丰富的蛋白质、多糖和皂苷等(赵前程等 2010; 焦健等 2010)营养物质,但有关海参水煮液酶解多肽的抗氧化活性研究未见报道。本研究以海参水煮液冻干粉为原料,采用3种蛋白酶酶解制备多肽并研究其抗氧化性能,旨在为海参加工副产物的开发利用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

海参水煮液冻干粉(主要成分:蛋白质 59.10%,灰分 15.61%,粘多糖 0.95%,水分 10.22%),鲜活刺参 *Apostichopus japonicus* 水煮过程中产生的水煮液经去杂质、脱盐、浓缩后冻干而成,2012年5月由山东青岛佳日隆海洋食品有限公司提供。

二苯代苦味肼基自由基(DPPH \cdot)标准品,美国Sigma公司;特丁基对苯二酚(TBHQ),国药集团化学试剂有限公司;胃蛋白酶($\geq 1.2 \times 10^3$ U/g),国药集团化学试剂有限公司;中性蛋白酶(1.3×10^5 U/g),吉宝(青岛)生物科技有限公司;胰蛋白酶($> 2.5 \times 10^5$ U/g),北京索莱宝科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;真空冷冻干燥机,丹麦Scanlaf公司;pH计,上海精密科学仪器有限公司;数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;冷冻离心机,德国Eppendorf公司;LC1200型高效液相色谱,安捷伦科技有限公司。

1.3 实验方法

海参水煮液酶解多肽的制备工艺流程:

海参水煮液冻干粉 \rightarrow 溶解(料液比为1:2 w/v) \rightarrow 调pH \rightarrow 酶解 \rightarrow 灭酶(100 $^{\circ}\text{C}$, 5min) \rightarrow 离心(8 000r/min, 30min) \rightarrow 取上清液 \rightarrow 冷冻干燥。

多肽及TBHQ对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的测定参照文献(徐文汇等 2009)方法测定。多肽及TBHQ对 O_2^- 清除能力的测定参照文献(尹蕾等 2010)方法测定。多肽及TBHQ对DPPH \cdot 清除能力的测定参照文献(刘蕾等 2010)方法测定。相对分子质量的测定参照文献(赵玲等 2011),采用液相色谱法进行测定,记录样品出峰时间,根据标准曲线求出海参水煮液酶解多肽的相对分子质量分布。

表1 不同蛋白酶的水解条件

Table 1 Hydrolytic condition for different enzymes

酶种类 Protease	加酶量 Enzyme concentration(%)	温度 Temperature(°C)	pH	酶解时间 Time(h)
中性蛋白酶 Neutral protease	2.5	50	7.0	4
胃蛋白酶 Pepsin	2.5	37	2.0	4
胰蛋白酶 Trypsin	2.5	50	8.0	4

2 结果与分析

2.1 3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对·OH的清除效果

3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对·OH的清除能力见图1。由图1可知,3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽对·OH均有一定的清除能力,但在受试浓度范围内其清除率均低于TBHQ。当多肽浓度在0.5~4.0 mg/ml时,3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽对·OH的清除能力比较接近;当多肽浓度大于4.0 mg/ml时,中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽对·OH的清除率相对较高($P < 0.05$),当多肽浓度为6.0 mg/ml时,中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽其清除率达45.3%,经计算得,其清除·OH的 IC_{50} 值为8.565 mg/ml,明显优于苏永昌等(2009)利用中性蛋白酶制备的地瓜参多肽($IC_{50} = 12.5$ mg/ml)以及陈卉卉等(2010)研究的东海海参多肽($IC_{50} = 27.8$ mg/ml),这种差别可能与海参种类有关。

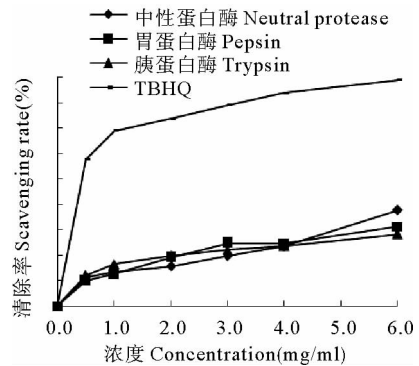


图1 3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对·OH的清除能力

Fig.1 The ·OH scavenging capability of TBHQ and three enzymatic hydrolysates from sea cucumber cooking water

2.2 3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对 $O_2^-·$ 的清除效果

3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对 $O_2^-·$ 的清除能力见图2。由图2可知,3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽对 $O_2^-·$ 的清除能力均随着样品质量浓度的升高而逐渐增强;其中,中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽的清除效果最好。当多肽浓度小于5.0 mg/ml时,中性蛋白酶和胰蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽其清除率均高于相同浓度的TBHQ;当浓度大于5.0 mg/ml时,仅中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽其清除率高于TBHQ。中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽其清除 $O_2^-·$ 的 IC_{50} 值为6.658 mg/ml,明显优于苏永昌等(2009)采用中性蛋白酶酶解制备的地瓜参多肽(IC_{50} 值为23.6 mg/ml)。

2.3 3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对DPPH·的清除效果

3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对DPPH·的清除能力见图3。如图3所示,3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽对DPPH·的清除能力与浓度呈较好的量效关系,且随着样品质量浓度的增大,其清除能力也逐渐增强;其中,中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽对DPPH·的清除效果最好。当多肽浓度为0.5~4.0 mg/ml时,3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽对DPPH·的清除能力随着浓度的增加呈较快的增长趋势,但均低于TBHQ;当多肽浓度大于4.0 mg/ml时,上升趋势趋于平缓;多肽浓度为6.0 mg/ml时,中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽与TBHQ对DPPH·的清除率相近(分别为87.31%和87.37%)。经计算得,中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽清除DPPH·的 IC_{50} 值为2.015 mg/ml,胰蛋白酶酶解制得

的海参水煮液多肽的 IC_{50} 值为 2.314 mg/ml, 该结果明显优于郑杰等(2011)研究的海参肠自溶水解物($IC_{50} = 4.04$ mg/ml), 但低于刘程惠等(2007)采用胰蛋白酶酶解制备的分子质量范围为 1 000~3 000D 的海参多肽($IC_{50} = 1.27 \pm 0.09$ mg/ml)。

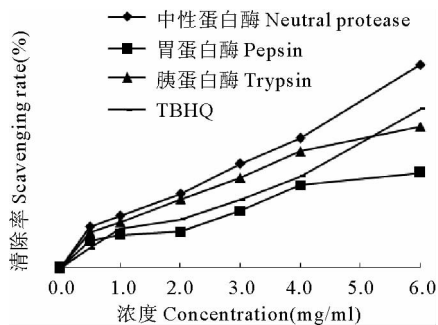


图2 3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对 $O_2 \cdot^-$ 的清除能力

Fig. 2 The $O_2 \cdot^-$ scavenging capability of TBHQ and three enzymatic hydrolysates from sea cucumber cooking water

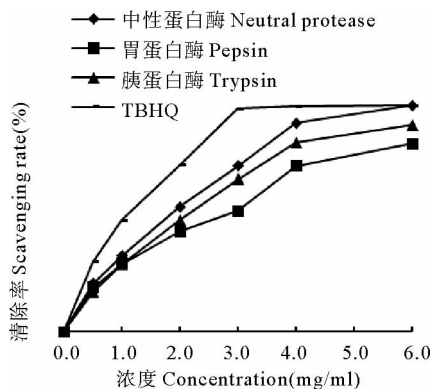


图3 3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽及TBHQ对DPPH·的清除能力

Fig. 3 The DPPH· scavenging capability of TBHQ and three enzymatic hydrolysates from sea cucumber cooking water

2.4 相对分子质量测定结果

胃蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分子量分布液相色谱图分别见图4、图5、图6。经计算得,胃蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分子量主要分布在小于2 500D的小肽中,其中分子量在1 604~2 453 D的组分占29%,峰值在779 D左右的组分占43%,分子量小于192 D的组分占28%;胰蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分子量主要分布在小于3 500D的小肽中,其中分子量在510~3 445D的组分占65%,分子量小于102D的组分占35%;中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分子量主要分布在小于1 000D的小肽中,其中分子量在630~848D的组分占91%,分子量小于209D的组分占9%;此结果与邓成萍等(2006)研究大豆多肽时发现的“大多数强抗氧化肽主要集中在分子量小于5 000D的小肽”结论一致。

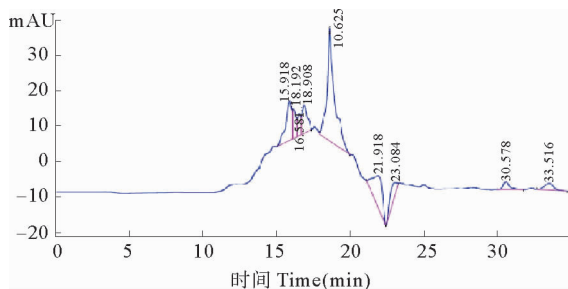


图4 胃蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分子量分布液相色谱

Fig. 4 The liquid chromatography of molecular weight distribution for pepsin enzymatic hydrolysate from sea cucumber cooking water

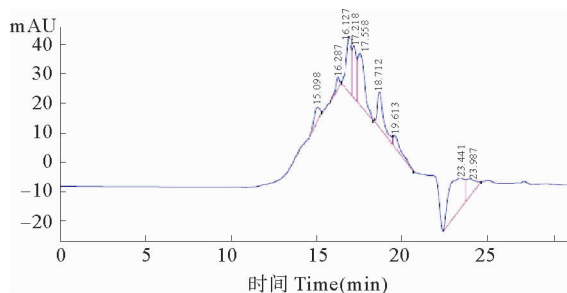


图5 胰蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分子量分布液相色谱

Fig. 5 The liquid chromatography of molecular weight distribution for trypsin enzymatic hydrolysate from sea cucumber cooking water

3 结论

以海参水煮液冻干粉为研究对象,通过测定中性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 和DPPH \cdot 自由基的清除率发现,3种蛋白酶酶解制得的海参水煮液酶解多肽对3种自由基均有清除作用,且清除能力均随样品质量浓度的升高而增强。

研究表明,中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽有较强的抗氧化活性,对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 自由基清除能力明显优于其他两种蛋白酶制得的多肽,且其对 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除能力优于TBHQ;其清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 和DPPH \cdot 自由基的 IC_{50} 值分别为8.565、6.658和2.015 mg/ml。

通过液相色谱法测定分子量分布,试验结果显示胃蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分别是分子量 $<2\ 500$ 、 $<3\ 500$ 和 $<1\ 000\ \text{D}$ 的小分子肽。

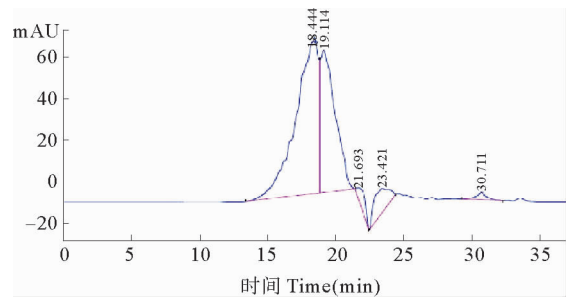


图6 中性蛋白酶酶解制得的海参水煮液多肽分子量分布液相色谱

Fig. 6 The liquid chromatography of molecular weight distribution for neutral protease enzymatic hydrolysate from sea cucumber cooking water

参 考 文 献

- 丁利君,何颖基,梁燕. 2009. 非洲鲫鱼蛋白酶解物的抗氧化研究. 食品研究与开发, 30(11):1-5
- 王静,张京楼,王铎喜,河鍾明,金海珠. 2010. 海参多肽的抗氧化性能研究. 食品与机械, 26(2):67-71
- 尹蕾,尚小玉,张泽生,孙利娜. 2010. 虾青素体外清除自由基活性的研究. 食品科技, 35(4):232-234
- 邓成萍,薛文通,孙晓琳,全明海. 2006. 不同分子量段大豆多肽功能特性的研究. 食品科学, 27(5):109-112
- 庄永亮,李八方,赵雪,闫鸣艳,任国艳. 2009. 酶解海蜇胶原蛋白制备抗氧化肽工艺. 农业工程学报, 25(S1):129-133
- 刘小芳,薛长湖,王玉明,李红艳. 2011. 乳山刺参体壁和内脏营养成分比较分析. 水产学报, 35(4):587-593
- 刘程惠,朱蓓薇,董秀萍,陈立国. 2007. 海参酶解产物的分离及其体外抗氧化作用的研究. 食品与发酵产业, 33(9):50-53
- 刘蕾,魏玉西,王长云,郭奇,万慧一,赵玲. 2010. 侧扁软珊瑚(*Subergorgia suberosa*)乙醇提取物抗氧化和抑菌活性研究. 海洋科技, 34(9):19-22
- 苏永昌,刘淑集,吴成业. 2009. 海参多肽的制备工艺优化及其抗氧化测定. 福建水产, (2):6-10
- 陈卉卉,于平,励建荣. 2010. 东海海参胶原蛋白多肽的制备及清除自由基功能研究. 中国食品学报, 10(1):19-25
- 郑杰,吴海涛,朱蓓薇,董秀萍. 2011. 海参肠自溶水解物抗氧化活性的研究. 大连工业大学学报, 30(5):313-317
- 赵芹,王静凤,薛勇,王奕,高森,雷敏,薛长湖. 2008. 3种海参的主要活性成分和免疫调节作用的比较研究. 中国水产科学, 15(1):154-159
- 赵玲,殷邦忠,刘淇,曹荣,魏玉西. 2012. 4种海参多肽抗氧化活性的比较研究. 中国海洋药物, 31(2):19-24
- 赵玲,曹荣,刘淇,魏玉西,薛勇. 2011. 南极磷虾酶解多肽的抑菌活性. 渔业科学进展, 32(4):113-116
- 赵前程,刘先琳,李智博,何云海,李伟,汪秋宽. 2010. 海参加工废弃液中多糖及其组分的分析与回收. 大连海洋大学学报, 25(5):434-438
- 姜威,李智博,赵前程,左海娇,朱艳. 2012. 象拔蚌酶解制备抗氧化肽的工艺研究. 安徽农业科学, 40(7):3976-3979
- 姚兴存,陆海侠,舒留泉,盘赛昆. 2012. 缢蛭蛋白肽制备工艺优化及其清除羟自由基作用. 渔业科学进展, 33(3):88-93
- 徐文汇,魏玉西,郭奇. 2009. 剑麻花提取物的抗氧化活性研究. 食品科学, 30(9):47-50
- 焦健,康海燕. 2010. 海刺参在传统加工过程中部分功能成分流失的实验研究. 中国海洋药物, 29(4):46-49
- 曹文红,章超群,吴红棉,李志伟,李观成,徐炳华. 2009. 几种南海贝类酶解产物的生物活性及其分子量分布研究. 食品与机械, 25(2):52-57
- Amarowicz R, Shahidi F. 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. Food Chemistry 58(4):355-359
- Kim SK, Kim YT, Byun HG and 3 others. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. J Agric Food Chem 49(4):1984-1989