

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201014001

http://www.yykxjz.cn/

李婉春, 吴光斌, 陈发河. 双螺杆挤压对低值海参多肽提取率及抗氧化活性的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 142-150
LI W C, WU G B, CHEN F H. Effect of twin-screw extrusion on the extraction rate and antioxidant activity of low-value sea cucumber polypeptides. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 142-150

双螺杆挤压对低值海参多肽提取率及 抗氧化活性的影响*

李婉春 吴光斌 陈发河^①

(集美大学食品与生物工程学院 福建 厦门 361021)

摘要 海地瓜(*Acaudina molpadioides*)属低值海参产品,为了提高其使用价值,本研究以海地瓜为原料,利用双螺杆挤压辅助不同浓度亚硫酸钠(Na_2SO_3)处理,并对挤出物多肽提取率、游离巯基含量和蛋白质溶解度进行测定;利用 DA201-C 型大孔吸附树脂对挤出物多肽进行分离纯化,并对多肽纯化组分的分子量分布和抗氧化能力进行测定。结果显示,双螺杆挤压辅助 3.0% Na_2SO_3 处理组多肽提取率、游离巯基含量和蛋白质溶解度分别为(57.12±0.62)%、(110.32±0.07)%和(28.72±0.13)%,较空白对照组(control check, CK)分别显著提升(7.66±0.35)%、(105.32±0.01)%和(4.91±0.15)% ($P<0.05$);粗肽经纯化得到纯化组分 I (1000~3000 u)和纯化组分 II (<1000 u)。CK 组、双螺杆挤压辅助 3.0% Na_2SO_3 处理组及其经分离纯化后得到的纯化组分 I、II 海地瓜多肽的 DPPH 自由基清除率的 IC_{50} 值分别为 25.51、12.72、6.58 和 9.02 mg/mL,对超氧阴离子自由基清除率的 IC_{50} 值分别为 25.56、13.51、11.87 和 8.44 mg/mL。纯化组分 I 在浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,人正常肝细胞(human normal liver cell, LO₂)细胞存活率较损伤组最大提高(20.33±0.41)%;纯化组分 II 在浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,LO₂ 细胞存活率较损伤组最大提高(17.07±1.18)%。综上所述,双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理海地瓜提高了多肽的提取率,并增强了海地瓜多肽抗氧化活性。

关键词 低值海参;挤压加工;多肽;抗氧化

中图分类号 TS254.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0142-09

我国大约有 140 多种海参,在辽宁、山东、福建省有丰富的资源(王丽丽等, 2019),可食用的种类有 20 多种,其中,在黄海和渤海区域的刺参食用品质及营养价值最高(李忠清等, 2016)。海地瓜(*Acaudina molpadioides*)是海参的一个种类,属棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、芋参目(Molpadida)、海地瓜属(*Acaudina*),因其外观形似地瓜,故被称为海地瓜;其体壁纤维粗壮,食用品质较

差,被列为中国海参市场上的低值海参(赵丽等, 2019)。海地瓜营养成分不亚于刺参(*Stichopus japonicus*)(伏纬华等, 1991),其含有蛋白质、多糖、皂苷等多种生物活性物质(王方国等, 1998)。海参胶原肽是海参胶原蛋白在一定条件下螺旋结构发生分解后的产物,通常采用酶法制备(王晴等, 2020),具有抗氧化、抗炎、降血压和降糖等功效(Ratih *et al*, 2018)。

* 厦门南方海洋研究中心科技项目(14GZP007NF07)和福建省食品微生物与酶工程重点实验室开放基金(B18097-2)共同资助 [This work was supported by Science and Technology Project of Xiamen Southern Oceanographic Center (14GZP007NF07), and Open Fund of Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering (B18097-2)]. 李婉春, E-mail: 1135663452@qq.com

^① 通讯作者: 陈发河, 教授, E-mail: fhchen@jmu.edu.cn

收稿日期: 2020-10-14, 收修改稿日期: 2020-12-18

双螺杆挤压技术是一种高温高压加工技术,通过螺杆转动,推动挤出物料,在摩擦力和剪切力的作用下,物料发生破碎、捏合、混炼、杀菌、成型等物理和生化反应,最后通过不同的模口形成不同形态的“熔化物”(刘鹏等,2018;王旭等,2020)。研究表明,挤压加工使蛋白质的酶作用位点暴露,多肽得率有所提升(张旭娜等,2017),提高多肽的生物活性(王瑞斌等,2019)。侯殿志等(2020)研究发现,挤压小米多肽与发酵小米多肽相比有更强的血管紧张素转换酶(angiotensin-I-converting enzyme, ACE)抑制活性和抗氧化能力,并能提高蛋白质消化率。齐宝坤等(2016)利用双螺杆挤压膨化预处理制备豆粕多肽,制得的多肽抗氧化能力得到提升。Ralston 等(2008)利用亚硫酸钠(Na_2SO_3)和半胱氨酸处理蛋白质,使其二硫键断裂,可提高溶解度。苏笑芳(2018)通过 Na_2SO_3 诱导大豆分离蛋白原料并进行双螺杆挤压,使蛋白原料中的二硫键断裂,游离巯基含量增多,蛋白质聚集程度降低。目前,尚未见利用双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理技术制备海洋动物蛋白多肽的研究报道。

为解决海地瓜利用率低、肽提取率低的问题,本文以海地瓜为原料,研究了双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理对海地瓜多肽提取率和抗氧化活性的影响,以期对海地瓜开发利用及其多肽加工新工艺提供参考。

1 实验与方法

1.1 材料与试剂

海地瓜干品(山东帆歌海洋食品有限公司);亚硫酸钠、乙腈和三氟乙酸(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇(分析纯,广东西陇化工股份有限公司);牛血清白蛋白生化试剂(沪试级 BR)、福林酚(分析纯)、胰蛋白酶和 DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)(北京索莱宝科技有限公司);大孔吸附树脂(DA201-C)(河南郑州勤实科技有限公司);超氧阴离子试剂盒(南京建成生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

G32 型双螺杆挤压机(山东济南盛润机械公司);DFY-500D 高速粉碎机(浙江温岭市林大机械有限公司);DHG-9146 鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);HH-4 恒温水浴锅(江苏金坛市科析仪器有限公司);GL-20G-II-D 台式高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Ultimate 3000 高效液相色谱仪(DIONEX 公司,美国);T6 新世纪-H 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理 将海地瓜干品充分泡发,洗净去泥沙,剪成 1 cm^3 左右的碎块,于 70°C 的干燥箱中烘干至恒重,取出,用粉碎机粉碎成大小均匀的粉末,过 60 目筛,装入密封袋中于 -20°C 中冷藏备用。以该方法制备的海地瓜干粉作为空白对照,记为 CK 组。

1.3.2 双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理海地瓜工艺

参考苏笑芳(2018)方法略作修改,以 1.3.1 制备的海地瓜干粉为原料,分别用 $0\text{ g}/100\text{ g}$ 、 $1.5\text{ g}/100\text{ g}$ 、 $3.0\text{ g}/100\text{ g}$ 干基原料的亚硫酸钠溶于去离子水,调节海地瓜干粉水分含量至 50%,并于 4°C 条件下平衡水分,过夜。设置螺杆转速为 34 Hz,机筒温度为 140°C ,喂料速度为 18 Hz,进行挤压加工,挤出物二次烘干并粉碎过筛,装袋备用。以该方法制备的海地瓜干粉为双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理组。

1.3.3 海地瓜多肽制备工艺 CK 组和双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理海地瓜多肽制备工艺:以制备的海地瓜干粉 \rightarrow 酶解 \rightarrow 醇沉除多糖 \rightarrow 旋蒸浓缩 \rightarrow 冷冻干燥备用。酶解工艺条件:选用胰蛋白酶, pH 值为 8,酶解温度为 37°C ,酶解时间为 4 h,加酶量为 $10,000\text{ U/g}$,料液比 1:120。

1.3.4 多肽提取率的测定 参考 Lowry 等(1951)的方法,取适量酶解液,加入 10% 的三氯乙酸(檀志芬等,2005),使大分子蛋白质沉淀,离心后取上清液,稀释一定倍数,取 1 mL 按制作标准曲线方法操作,于 640 nm 处测定 OD 值,根据标准曲线和以下公式计算多肽提取率。

$$\text{多肽提取率}(\%) = \frac{C \times V \times d}{m} \times 100 \quad (1)$$

式中, C 为测定样品的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); V 为测定时取用的体积(mL); d 为稀释倍数; m 为样品质量(g)。

1.3.5 游离巯基含量的测定 参考 Anderson 等(2000)的方法,准确称取 30 mg 样品,加入 1.0 mL A 液(pH 为 8.0 的 0.2 mol/L Tris-HCl, 8 mol/L 的尿素, 1% SDS 和 3 mmol/L EDTA),迅速混匀, 25°C 振荡水浴 1 h,加入 0.1 mL B 液(pH 8.0 的 0.2 mol/L Tris-HCl 和 10 mmol/L DTNB),继续 25°C 振荡水浴 1 h, $12,000\text{ r/min}$ 离心 15 min,取上清液,于 412 nm 处测定 OD 值,并作空白对照。

1.3.6 蛋白质溶解度的测定 参考 Wu 等(2012)的方法,称取 1 g 样品,加 20 mL 蒸馏水,振荡混匀, 95°C 水浴 20 min,取出后补蒸馏水至液面线位置,冷却, 4500 r/min 离心 20 min,福林酚法测定上清液中蛋白质含量。根据公式计算出样品的蛋白质溶解度,计算公式如下:

$$\text{蛋白质溶解度}(\%) = \frac{m_{\text{测}}}{m} \times 100 \quad (2)$$

式中, $m_{\text{测}}$ 为上清液中蛋白质含量(mg); m 为样品中总蛋白质含量(mg)。

1.3.7 海地瓜多肽的分离纯化方法 参照孟春英(2016)和王颖(2015)的方法, 选择 DA201-C 型大孔吸附树脂纯化双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理海地瓜多肽粗提物。实验条件: 柱规格为 1.5 cm×30.0 cm, 样品浓度为 10 mg/mL, 上样量为 10 mL, 洗脱速度为 4 mL/min, 用 25%、50%、75%和 95%的乙醇进行梯度洗脱, 于 220 nm 处测定 OD 值, 收集洗脱峰旋转浓缩, 冻干备用。

1.3.8 海地瓜多肽分子量的测定 参照朱翰林等(2020)的方法, 色谱柱选用 TSK-GEL G2000SW_{XL} (7.8 mm×300.0 mm, 5 μm), 流动相为乙腈:超纯水:三氟乙酸(35:65:0.1), 流速为 0.8 mL/min, 进样量为 10 μL, 样品浓度为 2 mg/mL, 检测波长为 220 nm。制作标准曲线的标准品: 细胞色素 C (12,400 Da), 抑肽酶(6500 Da), 维生素 B₁₂ (1355 Da), 谷胱甘肽(613 Da)和 L-精氨酸(174 Da), 以洗脱体积和相对分子质量的对数(lg MW)作图得到的相对分子质量校正曲线及方程: $y = -0.2685x + 5.6416$, $R^2 = 0.9996$ 。

1.3.9 海地瓜多肽 DPPH 自由基清除率的测定

参照赵梦倩等(2020)的方法, 取各浓度的样品 2.0 mL, 加入 2.0 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液, 漩涡振荡混匀, 室温条件下避光反应 30 min, 于 517 nm 处测定 OD 值, 记为 A_s 。取各浓度的样品 2.0 mL, 加入 2.0 mL 的无水乙醇, 记为 A 。取 2.0 mL 无水乙醇, 加入 2.0 mL 的 DPPH 溶液, 记为 A_0 。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A}{A_0} \right) \quad (3)$$

1.3.10 海地瓜多肽超氧阴离子自由基清除率的测定

根据南京建成超氧阴离子试剂盒的说明书, 对纯化海地瓜多肽超氧阴离子自由基清除率进行测定。

1.3.11 不同纯化组分海地瓜多肽对 LO₂ 细胞存活率的影响 参照霍嘉颖等(2018)的方法, 采用 MTT 法测定纯化组分 I 和纯化组分 II 海地瓜多肽对人正常肝细胞(human normal liver cell, LO₂)细胞存活率的影响。取对数生长期细胞, 以 1.5×10^4 cells/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 于培养箱中培养 24 h 后加入不同浓度的纯化组分 I 和纯化组分 II 海地瓜多肽, 空白对照组不作处理。培养箱中继续培养 24 h 后弃去培养液, 每孔加入 100 μL 的 0.5 mg/mL MTT 溶液, 孵育 4 h 后避光加入 150 μL 的 DMSO 溶液,

振荡 10 min, 在酶标仪上测定 490 nm 吸光值, 其中, 空白对照组记为 OD_0 , 样品组为 OD_1 , 按以下公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{OD_1}{OD_0} \times 100 \quad (4)$$

1.3.12 H₂O₂ 诱导 LO₂ 细胞氧化损伤模型的建立

按照 1.3.11 方法培养细胞, 设空白对照组(不做任何处理), 损伤组(不同浓度的 H₂O₂ 溶液处理)于培养箱中培养 4 h 后弃去培养液, 每孔加入 100 μL 的 0.5 mg/mL MTT 溶液, 孵育 4 h 后避光加入 150 μL 的 DMSO 溶液, 振荡 10 min, 在酶标仪上测定 490 nm 处吸光值, 按公式(1~4)计算细胞存活率。

1.3.13 不同纯化组分海地瓜多肽对 LO₂ 细胞氧化损伤保护作用 按照 1.3.11 方法培养细胞, 设空白对照组(不做任何处理), 损伤组(H₂O₂ 处理)和样品组(不同浓度的纯化组分 I 溶液或纯化组分 II 溶液+H₂O₂), 于培养箱中培养 24 h 后, 加入终浓度为 80 μmol/L 的 H₂O₂, 于培养箱中继续培养 4 h, 弃去培养液, 加入 100 μL 的 0.5 mg/mL MTT 溶液, 孵育 4 h 后避光加入 150 μL 的 DMSO 溶液, 振荡 10 min, 在酶标仪上测定 490 nm 处吸光值, 按公式(1~4)计算细胞存活率。

1.4 数据处理

每个实验均独立重复 3 次以上, 使用 Microsoft Excel 2016 和 Statistics 17 等软件对数据进行处理, 使用 Adobe Photoshop 软件对图像进行处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 差异表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理对海地瓜多肽提取率、游离巯基含量和蛋白质溶解度的影响

海地瓜的多肽提取率、蛋白质溶解度和游离巯基含量见表 1, CK 组多肽提取率为(49.47±0.26)%, 游离巯基含量为(5.00±0.05)%, 蛋白质溶解度为(23.81±0.28)%。在双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理组中, 当 Na₂SO₃ 添加量为 0 时, 与 CK 组相比, 多肽提取率显著增加了(2.52±0.01)% ($P < 0.05$), 游离巯基含量增加了(7.15±0.05)%, 蛋白质溶解度增加了(1.41±1.06)%; 当 Na₂SO₃ 添加量为 1.5%时, 与 CK 组相比, 多肽提取率显著增加了(4.24±0.48)% ($P < 0.05$), 游离巯基含量显著增加了(21.64±0.03)% ($P < 0.05$), 蛋白质溶解度增加了(1.96±1.25)%; 当 Na₂SO₃ 添加量为 3.0%时, 与 CK 组相比, 多肽提取率显著增加了(7.65±0.35)%, 游离巯基含量显著增加了(105.32±0.01)%, 蛋白质溶

表 1 双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理对海地瓜多肽提取率、游离巯基含量和蛋白质溶解度的测定
Tab.1 Determination of the extraction rate of polypeptide, free sulfhydryl content and protein solubility from *A. molpadioides* by twin-screw extrusion assisted sodium sulfite treatment

组别 Group	挤压条件 Extrusion conditions	调节剂 Modifier	多肽提取率 Extraction rate of polypeptides /%	游离巯基含量 Free sulfhydryl content /%	蛋白质溶解度 Protein solubility /%
CK 组 Control group	无 None	无 None	49.47±0.264 ^d	5.00±0.05 ^c	23.81±0.28 ^b
双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理组 Twin-screw extrusion assisted sodium sulfite treatment group	140℃, 喂料 18 Hz, 转速 34 Hz 140℃, feeding 18 Hz, rotating speed 34 Hz	0% 亚硫酸钠 0% sodium sulfite	51.99±0.28 ^c	12.15±0.004 ^c	25.22±1.34 ^b
	140℃, 喂料 18 Hz, 转速 34 Hz 140℃, feeding 18 Hz, rotating speed 34 Hz	1.5% 亚硫酸钠 1.5% sodium sulfite	53.71±0.74 ^b	26.64±0.02 ^b	25.77±1.53 ^b
	140℃, 喂料 18 Hz, 转速 34 Hz 140℃, feeding 18 Hz, rotating speed 34 Hz	3.0% 亚硫酸钠 3.0% sodium sulfite	57.12±0.62 ^a	110.32±0.07 ^a	28.72±0.13 ^a

注: 字母不同表示有显著差异, $P < 0.05$

Note: Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$

解度显著增加了(4.91±0.15)%。

双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理提高了海地瓜多肽提取率, 可能是海地瓜胶原蛋白在 Na_2SO_3 作用下蛋白质二硫键断裂并发生解聚, 游离巯基含量增多, 使得蛋白质溶解度提高, 再经过双螺杆挤压, 海地瓜胶原蛋白在剪切力和摩擦力的作用下, 蛋白质分子展现出更多的酶作用位点, 使得酶能充分作用于底物, 进而加强酶解效果, 从而使多肽提取率得到提升。根据上述结果, 双螺杆挤压辅助 3.0% Na_2SO_3 处理组的多肽提取率最高, 选用该组进行后续分离纯化实验。

2.2 双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理海地瓜多肽的分离纯化

海地瓜粗肽的分离纯化结果见图 1, 样品经 25%、50%、75%和 95%乙醇梯度洗脱后得到 2 个组分, 经 25%乙醇洗脱得到的组分命名为纯化组分 I, 经 50%乙醇洗脱得到的组分命名为纯化组分 II。以上 2 个组分海地瓜多肽分别经旋蒸浓缩后冻干备用。

2.3 纯化海地瓜多肽相对分子质量的分布分析

纯化组分 I 和纯化组分 II 的高效液相色谱图见图 2, 根据纯化组分 I 和纯化组分 II 的保留时间, 由相对分子质量校正曲线的回归方程 $y = -0.2685x + 5.6416$, $R^2 = 0.9996$ 计算得出, 纯化组分 I 中相对分子质量在 1000~3000 u 范围内的多肽占相对含量的(61.97±1.71)%, 相对分子质量在 1000 u 以内的多肽占相对含量的(37.49±2.67)%; 纯化组分 II 中的多肽相对分子质量大多在 1000 u 以内。

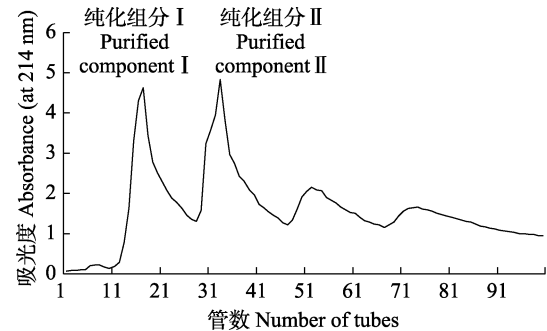


图 1 双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理海地瓜多肽的分离纯化
Fig.1 The separation and purification of polypeptides from *A. molpadioides* treated with sodium sulfite assisted by twin-screw extrusion

2.4 海地瓜多肽体外抗氧化能力分析

2.4.1 海地瓜多肽 DPPH 自由基清除率的分析 对 CK 组、双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理组及其分离纯化后制得的纯化组分 I 和纯化组分 II 的 DPPH 自由基清除率进行测定。如图 3 所示, 随着样品浓度的增加, 4 种海地瓜多肽对 DPPH 自由基的清除均呈上升趋势, IC_{50} 值分别为 25.51、12.72、6.58 和 9.02 mg/mL。与 CK 组相比, 原料经处理后制得的海地瓜多肽抗氧化活性得到提升, 其中, 纯化组分 I 的 DPPH 自由基的清除效果最好。

2.4.2 海地瓜多肽对超氧阴离子自由基清除率的分析 对 CK 组、双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理组及其分离纯化后制得的纯化组分 I 和纯化组分 II 的超氧阴离子自由基清除率进行测定。如图 4 所示, 随着样品浓度的增加, 4 种海地瓜多肽对超氧阴离子自由

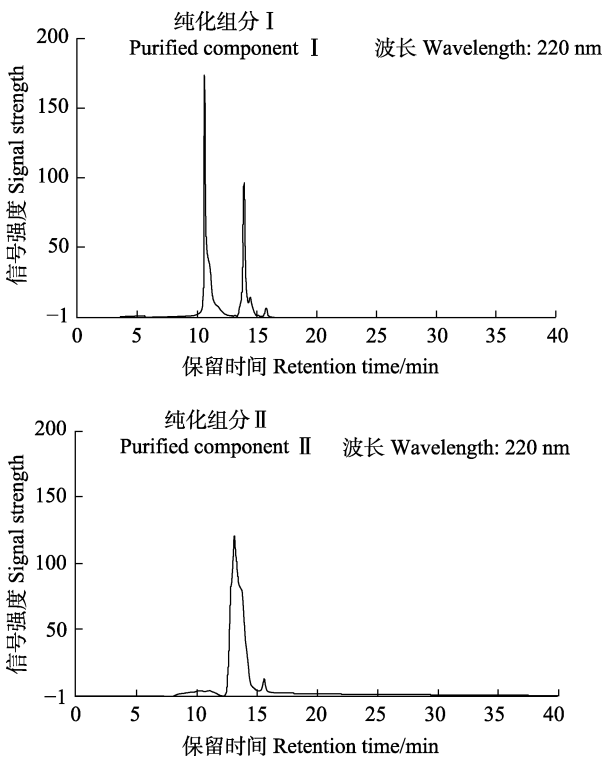


图2 纯化组分 I 和纯化组分 II 海地瓜多肽的相对分子量分布

Fig.2 Relative molecular weight distribution of purified component I and purified component II of polypeptides from *A. molpadioides*

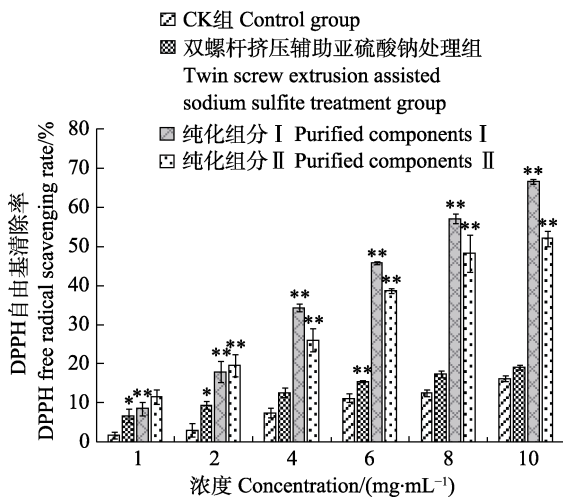


图3 4种海地瓜多肽 DPPH 自由基的清除率分析

Fig.3 Analysis of the scavenging rate of DPPH free radicals of four polypeptides from *A. molpadioides*

*代表与 CK 组相比差异显著($P<0.05$), **代表与 CK 相比差异极显著($P<0.01$). 下同
* means significant difference compared with CK group ($P<0.05$), ** means extremely significant difference compared with CK ($P<0.01$). The same as below

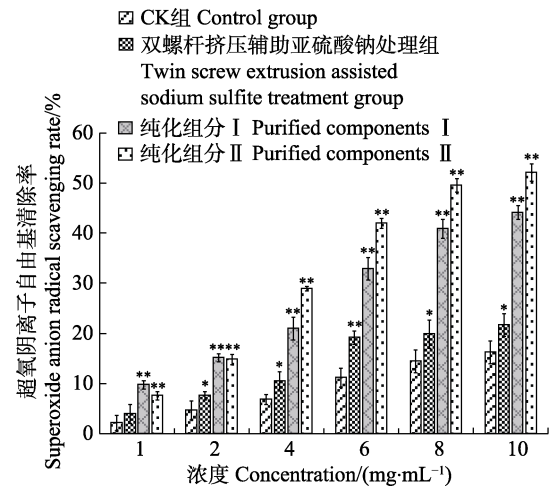


图4 4种海地瓜多肽超氧阴离子自由基清除率分析

Fig.4 Analysis of the scavenging rate of superoxide anion free radicals of four polypeptides from *A. molpadioides*

基的清除均呈上升趋势, IC_{50} 值分别为 25.56、13.51、11.87 和 8.44 mg/mL。与 CK 组相比, 原料经处理后制得的海地瓜多肽抗氧化活性得到提升, 其中, 纯化组分 II 的超氧阴离子自由基的清除效果最好。

这可能是由于原料经双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理后酶解制得的海地瓜与未处理原料制得的海地瓜多肽相比, 在多肽的氨基酸序列和相对含量等方面会有所改变, 从而影响了多肽的抗氧化活性。关于本研究中海地瓜多肽的氨基酸序列和相对含量与抗氧化活性之间的关系, 还有待进一步研究。

2.5 不同纯化组分海地瓜多肽对 LO_2 细胞氧化损伤的保护作用

2.5.1 不同纯化组分海地瓜多肽对 LO_2 细胞存活率的影响 不同纯化组分海地瓜多肽对 LO_2 细胞存活率的影响见图 5。纯化组分 I 浓度在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 内, 能提高 LO_2 细胞存活率, 其中, 浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时, LO_2 细胞存活率达到最大值[(126.25±5.63)%]。纯化组分 II 在 0~40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率提高, 在浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率达到最大值[(112.84±2.53)%], 浓度>40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率开始下降。

2.5.2 H_2O_2 诱导 LO_2 细胞氧化损伤模型的建立 H_2O_2 处理后细胞存活率见图 6。与对照组相比, 在 H_2O_2 作用浓度小于 60 $\mu\text{mol/L}$ 时, LO_2 细胞存活率没有显著变化; 浓度 $\geq 80 \mu\text{mol/L}$ 时, 存活率开始下降, 开始对细胞具有刺激作用($P<0.05$), 此时, 细胞受到一定程度的氧化应激, 但还未达到不可逆转的状态。随着 H_2O_2 浓度的增大, 细胞受到刺激的程度加深, 对应

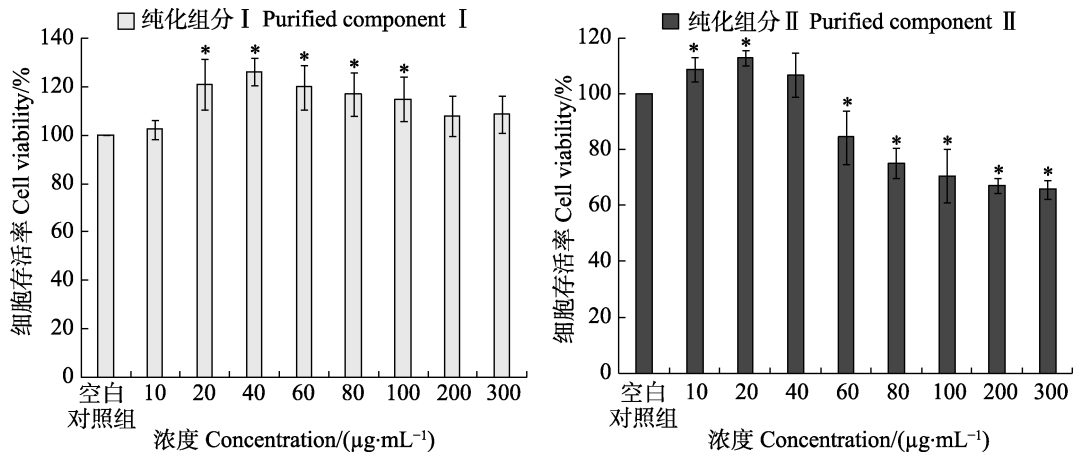


图 5 纯化组分 I 和纯化组分 II 海地瓜多肽对 LO₂ 细胞存活率的影响
 Fig.5 The effect of purified component I and purified component II of polypeptides from *A. molpadioides* on the survival rate of LO₂ cells

* 代表与空白对照组相比差异显著($P < 0.05$)。下同
 * means significant difference compared with the CK group ($P < 0.05$). The same as below

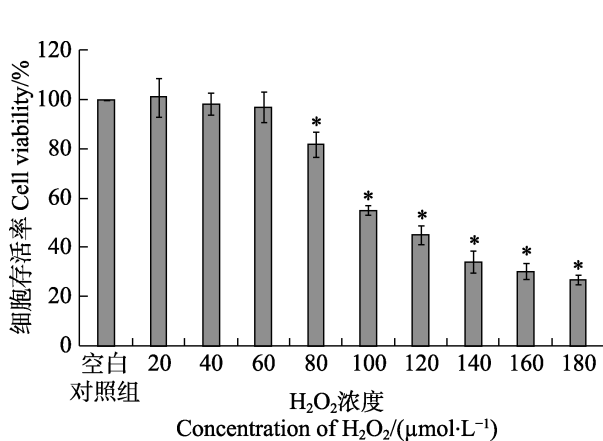


图 6 不同浓度 H₂O₂ 对 LO₂ 细胞存活率的影响
 Fig.6 The effect of different concentrations of H₂O₂ on the survival rate of LO₂ cells

的细胞存活率越低。因此, 选择浓度为 80 µmol/L 的 H₂O₂ 进行后续实验。

2.5.3 不同纯化组分海地瓜多肽对 LO₂ 细胞氧化损伤的保护作用 不同纯化组分海地瓜多肽对 LO₂ 氧化损伤细胞的保护作用见图 7。经 80 µmol/L H₂O₂ 处理后, 细胞存活率显著降低, 说明模型构建成功。经浓度为 60~300 µg/mL 的纯化组分 I 预处理后, 细胞存活率显著上升, 且在浓度为 80 µg/mL 时, 细胞存活率较损伤组最大提高(20.33±0.41)%。纯化组分 II 在 20~50 µg/mL 内能显著提高细胞存活率, 在浓度为 20 µg/mL 时, 细胞存活率较损伤组最大提高(17.06±1.18)%。说明纯化组分 I 和 II 均对氧化损伤的 LO₂ 细胞具有保护作用。

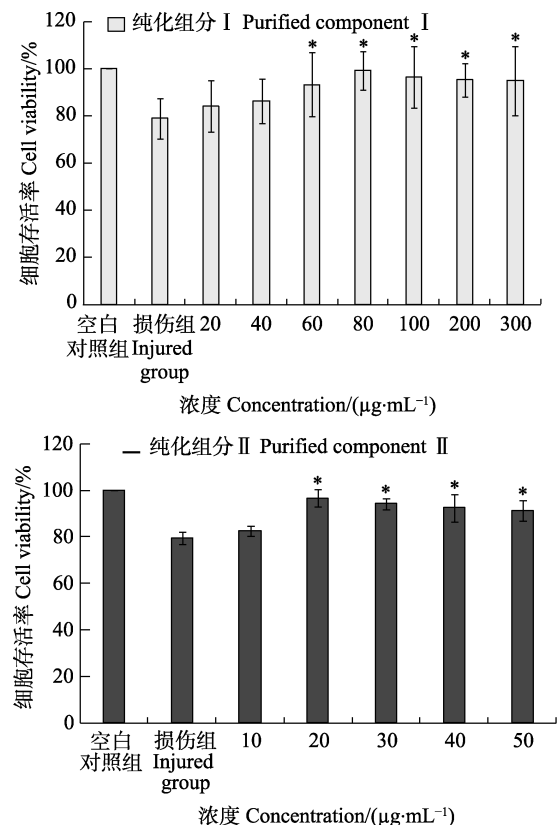


图 7 纯化组分 I 和纯化组分 II 海地瓜多肽对氧化损伤 LO₂ 细胞存活率的影响
 Fig.7 The effect of purified component I and purified component II of polypeptides from *A. molpadioides* on the survival rate of oxidatively damaged LO₂ cells

* 代表与损伤组相比差异显著($P < 0.05$)
 * represents a significant difference compared with the injured group ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 双螺杆挤压辅助亚硫酸处理海地瓜对多肽提取率的提升作用

双螺杆挤压技术主要应用于以淀粉和蛋白质为原料的食品加工领域(涂德星等, 2020; 赵贵兴等, 2017)。在辅助制备植物多肽中有一些报道, 陈盛楠等(2012)利用双螺杆挤压膨化高温豆粕酶解制备豆粕肽的得率得到明显提高。相关研究表明, 亚硫酸钠处理蛋白可使聚集蛋白质解聚, 二硫键断裂, 从而提高蛋白质溶解度(Tsen, 1969)。将双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理技术用于海地瓜胶原蛋白多肽制备目前尚未见研究报道。本研究通过双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理海地瓜酶解制备多肽, 使海地瓜胶原蛋白中的二硫键断裂, 多肽提取率为(57.12±0.62)%, 较CK组显著提升(7.66±0.35)% ($P<0.05$), 游离巯基含量显著提升(105.32±0.01)% ($P<0.05$), 蛋白质溶解度显著提升(4.91±0.15)% ($P<0.05$)。童静静(2014)利用蛋白酶酶解方法对海地瓜胶原蛋白进行水解, 得到的海地瓜多肽提取率为52.63%。陈超(2014)利用胰蛋白酶对海地瓜胶原蛋白进行水解, 在最优工艺条件下多肽提取率为(42.66±1.51)%。说明双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理联合酶解技术与普通酶解方法相比, 能有效提高海地瓜胶原蛋白的多肽提取率, 使海地瓜的使用价值得到提升。

3.2 双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理对海地瓜多肽抗氧化活性的提升作用

近年来, 大量研究表明, 海参胶原蛋白经酶解后产生的多肽对DPPH自由基、超氧阴离子自由基和羟自由基等有清除作用(Zhou *et al.*, 2012)。曹亚兰等(2011)研究表明, 挤压预处理技术可提高蛋白酶解产物的抗氧化活性。本研究表明, CK组、双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理组及纯化组分I(1000~3000 u)和纯化组分II(<1000 u)的DPPH自由基清除率 IC_{50} 值分别为25.51、12.72、6.58和9.02 mg/mL; 超氧阴离子自由基清除率 IC_{50} 值分别为25.56、13.51、11.87和8.44 mg/mL, 经双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理的海地瓜多肽的抗氧化能力与申彩红(2015)研究结果相似。李真(2015)研究发现, 相对分子质量在1000~5000 Da海地瓜多肽对DPPH自由基清除能力较好, 而<1000 Da的海地瓜清除效果次之, 本研究结果与上述一致。但不同分子量范围的海参多肽清除氧自由基的能力存在差异, 抗氧化活性与分子量并不是简单的线性关系, 多肽的抗氧化性还取决于组成多肽的氨基酸组成

和序列。当短肽中能与自由基发生反应的供氢基团充分暴露时, 此时才具有较强的抗氧化性(王静等, 2010)。经 H_2O_2 诱导建立 LO_2 细胞氧化损伤模型, 纯化组分I在浓度为80 $\mu\text{g/mL}$ 时, LO_2 细胞存活率较损伤组显著提高(20.33±0.41)% ($P<0.05$), 纯化组分II在浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 时, LO_2 细胞存活率较损伤组显著提高(17.07±1.18)% ($P<0.05$), 这表明低分子量的海地瓜多肽具有较强的抗氧化活性, 这与王天明等(2014)的研究结果相一致。综上所述, 海地瓜胶原蛋白经双螺杆挤压和亚硫酸钠处理后制得的多肽分子量较小, 抗氧化能力得到提升, 对氧化损伤细胞有较好的保护作用。

4 小结

本研究利用双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理结合酶解技术制备海地瓜多肽, 海地瓜胶原蛋白中游离巯基含量、蛋白质溶解度和多肽提取率得到提升。与CK组相比, 双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理组及其纯化组分抗氧化能力得到提升。同时, 2个纯化组分对氧化损伤的 LO_2 细胞有较好的保护作用。综上所述, 双螺杆挤压辅助亚硫酸钠处理技术能提升海地瓜多肽提取率和抗氧化能力, 该方法可为海地瓜多肽的制备新工艺提供新思路。

参 考 文 献

- ANDERSON A K, NG P K W. Changes in disulfide and sulfhydryl contents and electrophoretic patterns of extruded wheat flour proteins. *Cereal Chemistry*, 2000, 77(3): 354-359
- CAO Y L, REN J Y, ZHAO M M. Study on the preparation of soybean antioxidative peptide by enzymatic hydrolysis combined with pretreatment of extrusion. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(6): 222-225 [曹亚兰, 任娇艳, 赵谋明. 挤压预处理结合可控酶解制备抗氧化大豆肽的研究. *食品工业科技*, 2011, 32(6): 222-225]
- CHEN C. Study on preparation and antioxidant activity of collagen peptide from sea cucumber. Master's Thesis of Jimei University, 2014 [陈超. 海参胶原蛋白的制备及抗氧化活性研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2014]
- CHEN S N, JIANG L Z, LI Y, *et al.* Study on the effect of extrusion on peptide yield of enzymatic high denatured soybean meal. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(17): 252-254 [陈盛楠, 江连洲, 李扬, 等. 挤压膨化对酶解高温豆粕肽得率的影响研究. *食品工业科技*, 2012, 33(17): 252-254]
- FU W H, WU F W, QI B F, *et al.* Comparison of the nutritional components of *Acaudina molpadioides* and sea cucumber. *Modern Applied Pharmacy*, 1991(3): 46-47 [伏纬华, 吴凤梧, 戚宝凤, 等. 海地瓜与海参营养成分的比较. *现代应用药学*, 1991(3): 46-47]

- HOU D Z, CHEN J, SHEN Q. The effect of extrusion and fermentation on the ACE inhibitory activity and antioxidant effect of millet peptides. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(5): 174–180 [侯殿志, 陈静, 沈群. 挤压和发酵对小米多肽 ACE 抑制活性及抗氧化作用的影响. *中国食品学报*, 2020, 20(5): 174–180]
- HUO J Y, SUN B G, ZHENG F P, *et al.* Identification of a tripeptide Arg-Asn-His from Chinese Baijiu and its antioxidant activity. *Food Science*, 2018, 39(23): 126–133 [霍嘉颖, 孙宝国, 郑福平, 等. 白酒中一种三肽 Arg-Asn-His 的鉴定及其细胞内抗氧化活性. *食品科学*, 2018, 39(23): 126–133]
- LI Z Q, XIA B, WANG J Y, *et al.* Comparative study on nutrient composition of body walls of green and white sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 101–107 [李忠清, 夏斌, 王际英, 等. 青、白刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁营养成分的比较分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 101–107]
- LI Z. Combination preparation and antioxidant activity of Haitian melon polysaccharides and peptides. Master's Thesis of Jimei University, 2015 [李真. 海地瓜多糖和多肽联合制备及抗氧化活性研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2015]
- LIU P, WANG S R, LIU Y Q, *et al.* Research progress for effect of extrusion processing on nutrients in foods. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2018, 33(6): 127–132 [刘鹏, 王世让, 刘艳秋, 等. 挤压加工对食品中营养物质的影响研究进展. *中国粮油学报*, 2018, 33(6): 127–132]
- LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265–275
- MENG C Y. Isolation and purification of the peptides from *Apostichopus japonicus* and evaluation of its antibacterial and antitumor activities. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [孟春英. 仿刺参体壁中抗菌肽的分离纯化及抗菌活性研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- QI B K, SUI X N, MA W J, *et al.* Effect of extrusion degreasing process on antioxidative activity of peptides prepared by high temperature soybean meal. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2016, 31(12): 51–56 [齐宝坤, 隋晓楠, 马文君, 等. 挤压膨化脱脂处理对高温豆粕制备蛋白多肽抗氧化性的影响. *中国粮油学报*, 2016, 31(12): 51–56]
- RALSTON B E, OSSWALD T A. Viscosity of soy protein plastics determined by screw-drive capillary rheometry. *Journal of Polymers and the Environment*, 2008, 16(3): 169–176
- RATIH P, ZAINAL A. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2018, 8(3): 341–351
- SHEN C H. Enzymatic preparation of sea cucumber peptides and their antioxidant and anti-fatigue activities. Master's Thesis of Huaqiao University, 2015 [申彩虹. 海参肽的酶法制备及其抗氧化、抗疲劳活性研究. 华侨大学硕士研究生学位论文, 2015]
- SU X F. Study on the physical and chemical properties of extruded textured protein materials. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 [苏笑芳. 挤压组织化蛋白原料的理化特性研究. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2018]
- TAN Z F, SHENG Q H, QIU Q R, *et al.* The methods for the analysis of degree of hydrolysis of protein. *Science and Technology of Food Industry*, 2005(7): 174–175, 178 [檀志芬, 生庆海, 邱泉若, 等. 蛋白质水解度的测定方法. *食品工业科技*, 2005(7): 174–175, 178]
- TONG J J. Study on the enzymatic extraction and refining of *Acaudina leucoprocta* protein peptide. Master's Thesis of Zhejiang University, 2014 [童静静. 东海乌参蛋白肽的酶法制取及精制研究. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2014]
- TSEN C C. Effects of oxidizing and reducing agents on changes of flour proteins during dough mixing. *Cereal Chemistry*, 1969, 46: 435–442
- TU D X, JIAO Y P, HOU Y J, *et al.* Processing technology of buckwheat extruded food. *Food Industry*, 2020, 41(1): 124–127 [涂德星, 焦云鹏, 侯亚君, 等. 荞麦挤压膨化食品的加工工艺. *食品工业*, 2020, 41(1): 124–127]
- WANG F G, ZHANG H S, ZHOU H Y. Nutrient composition of Haitian melon and its development and utilization ideas. *China Marine Medicine*, 1998(2): 3–5 [王方国, 张海生, 周怀阳. 海地瓜的营养成分及其开发利用设想. *中国海洋药物*, 1998(2): 3–5]
- WANG J, ZHANG J L, WANG D X, *et al.* Antioxidant activity of peptide fractions from sea cucumber protein hydrolysates. *Food and Machinery*, 2010, 26(2): 67–71 [王静, 张京楼, 王铎喜, 等. 海参多肽的抗氧化性能研究. *食品与机械*, 2010, 26(2): 67–71]
- WANG L L, LI B S, WANG J Y, *et al.* Effects of vitamin D₃ on growth, body composition and antioxidant capacity of juvenile sea cucumbers. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 110–118 [王丽丽, 李宝山, 王际英, 等. 维生素 D₃ 对仿刺参幼参生长、体组成及抗氧化能力的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 110–118]
- WANG Q, CAO W G, QIAN Y M, *et al.* Preparation and antioxidant activity of different enzymatic collagen peptides. *Journal of Luoyang Normal University*, 2020, 39(2): 18–21, 31 [王晴, 曹稳根, 钱玉梅, 等. 不同酶解胶原肽的制备及抗氧化活性研究. *洛阳师范学院学报*, 2020, 39(2): 18–21, 31]
- WANG R B, LI M, SU X F, *et al.* Studies on physicochemical properties of extruded buckwheat puffing products. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(9): 83–92 [王瑞斌, 李明, 苏笑芳, 等. 荞麦挤压膨化产品的理化特性研究. *中国食品学报*, 2019, 19(9): 83–92]
- WANG T M, SU Y G, MA Y J, *et al.* Separation and antioxidant activity evaluation of *Acaudina molpadioides* peptide. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 75–81, 166 [王天明, 苏意钢, 马永钧, 等. 海地瓜多肽分离及抗氧化活性研究. *现代食品科技*, 2014, 30(5): 75–81, 166]
- WANG X, YU H S, DAI W C. Research progress on the extrusion texturization of soybean protein. *Cereals and Oils*, 2020, 33(4): 7–9 [王旭, 于寒松, 代伟长. 大豆蛋白挤压组织化的研究进展. *粮食与油脂*, 2020, 33(4): 7–9]
- WANG Y. Preparation and antioxidant activity of intestinal tissue polypeptide of simulated sea cucumber. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [王颖. 仿刺参肠道组织多肽的制备及抗氧化活性研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]

- 生学位论文, 2015]
- WU G C, ZHANG M, WANG Y Q, *et al.* Production of silver carp bone powder using superfine grinding technology: Suitable production parameters and its properties. *Journal of Food Engineering*, 2012, 109(4): 730–735
- ZHANG X N, YAO Y, CUI B, *et al.* Research advance on the influence of extrusion on functional activity of protein. *Cereals and Oils*, 2017, 30(12): 11–13 [张旭娜, 么杨, 崔波, 等. 挤压对蛋白功能活性影响研究进展. *粮食与油脂*, 2017, 30(12): 11–13]
- ZHAO G X, ZHANG G, BI W W, *et al.* Optimization of composite extrusion process parameters of soybean protein and fish. *China Oils and Fats*, 2017, 42(1): 99–103 [赵贵兴, 张光, 毕伟伟, 等. 大豆蛋白和鱼肉复合挤压工艺参数的优化研究. *中国油脂*, 2017, 42(1): 99–103]
- ZHAO L, WU G B, CHEN F H. Research progress on extraction, purification and biological activity of sea cucumber peptide. *Food Industry*, 2019, 40(2): 252–256 [赵丽, 吴光斌, 陈发河. 海参多肽提取纯化及其生物活性研究进展. *食品工业*, 2019, 40(2): 252–256]
- ZHAO M Q, ZHANG Y D, WANG Y X, *et al.* Controlled release and maintained antibacterial and antioxidant effects of thyme essential oil encapsulated in self-assembled peptide hydrogel. *Food Science*, 2020, 41(15): 8–14 [赵梦倩, 张雅丹, 王迎香, 等. 自组装多肽水凝胶对百里香精油的控释作用、抑菌和抗氧化效果的延长作用. *食品科学*, 2020, 41(15): 8–14]
- ZHOU X Q, WANG C H, JIANG A L. Antioxidant peptides isolated from sea cucumber *Stichopus japonicus*. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(3): 441–447
- ZHU H L, LIU Q, ZHENG S Y, *et al.* Enzymatic hydrolysis, antioxidant activity and relative molecular mass distribution of oyster peptides. *Food Science and Technology*, 2020, 45(6): 142–149 [朱翰林, 刘茜, 郑思瑶, 等. 牡蛎多肽的酶解工艺及抗氧化活性与相对分子质量分布研究. *食品科技*, 2020, 45(6): 142–149]

(编辑 陈 辉)

Effect of Twin-Screw Extrusion on the Extraction Rate and Antioxidant Activity of Low-Value Sea Cucumber Polypeptides

LI Wanchun, WU Guangbin, CHEN Fahe^①

(College of Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract The sea cucumber *Acaudina molpadioides* is a low-value aquatic product of the ocean. To increase its value, in this study, dried body walls of low-value *A. molpadioides* were selected as research material, from which the polypeptides were extracted by employing twin-screw extrusion with sodium sulfite-assisted treatment. The extraction rate of polypeptides and free sulfhydryl groups, and protein solubility from extrudate of *A. molpadioides* were determined. Polypeptides were separated from the extrudate and purified with DA201-C type microporous adsorption resin, and the molecular weight distribution and antioxidant ability of the purified components were determined. The results showed that for the *A. molpadioides* treated with twin-screw extrusion-assisted 3.0% sodium sulfite, the polypeptide extraction rate, free sulfhydryl content, and protein solubility were (57.12±0.62)%, (110.32±0.07)%, and (28.72±0.13)%, respectively, which were significantly higher ($P<0.05$) by (7.66±0.35)%, (105.32±0.01)% and (4.91±0.15)%, respectively, compared with those of the control check (CK). Moreover, the molecular weights of the purified polypeptides component I and II were 1000~3000 u and <1000 u, respectively. Additionally, comparing the *A. molpadioides* polypeptides with those in the CK group, twin-screw extrusion-assisted 3.0% sodium sulfite extraction group, purified component I, and purified component II, the IC₅₀ values of DPPH radical scavenging rate were 25.51 mg/mL, 12.72 mg/mL, 6.58 mg/mL, and 9.02 mg/mL, respectively, and the IC₅₀ values of the superoxide anion radicals scavenging rate were 25.56 mg/mL, 13.51 mg/mL, 11.87 mg/mL and 8.44 mg/mL, respectively. The results of oxidation damage protection test suggested that for purified component I, the optimal concentration for the survival rate of LO₂ cells was 80 μg/mL, with (20.33±0.41)% increase compared with that in the injured group; as for the purified component II, it was 20 μg/mL with (17.07±1.18)% increase than that in the injured group. In summary, the twin-screw extrusion-assisted sodium sulfite treatment on *A. molpadioides* improved the extraction rate of polypeptide and the extracted polypeptide possessed enhanced antioxidant activity.

Key words Low-value sea cucumber; Extrusion processing; Polypeptide; Anti-oxidation

① Corresponding author: CHEN Fahe, E-mail: fhchen@jmu.edu.cn