

海参多肽的制备工艺优化及其抗氧化测定

苏永昌, 刘淑集, 吴成业

(福建省水产研究所, 福建 厦门 361012)

摘要: 本文对海参酶解工艺条件进行优化, 提取液经超滤和冷冻干燥获得海参多肽, 并测定其组成及抗氧化活性。结果显示, 中性蛋白酶对海参最佳的酶解工艺为: 加酶量 1800U/g, 酶解温度为 55℃, 酶解 pH 值为 7.5, 酶解时间为 3h。经超滤与冷冻干燥后, 多肽得率为 6.9%, 蛋白质含量达 94.9%。且在抗氧化方面具有较好的清除羟自由基和超氧自由基能力。

关键词: 海参; 酶解; 多肽; 抗氧化

海参为棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothurioider) 动物的总称。我国有海参约 140 多种, 其中有 20 多种海参可供食用^[1]。海参是典型的高蛋白、低脂肪、低胆固醇、富含矿物质和维生素的优质食品^[2]。近年来, 人们发现海参中含有许多具有重要生物学活性的物质, 如海参多肽、多糖、皂苷等。海参含有丰富的蛋白质, 是制备生物活性多肽的理想原料^[3]。海参多肽具有良好的溶解性和稳定性的特点, 易消化吸收, 食用安全, 而且具有降血压、预防心脑血管疾病、抗疲劳、提高免疫力、抗肿瘤、抗氧化、延缓衰老等生物活性^[4,5]。地瓜参 (*Acaudina molpadioides*) 是海参属动物, 主要分布在我国沿海海域, 资源丰富。与高档海参相比, 其品质滋味较差, 但营养价值上并不低于高档海参, 而且价格较低廉, 因此地瓜参具有很大的开发潜力^[6,7]。本研究以地瓜参作原料, 通过对酶解工艺条件的优化, 制备获得海参多肽, 并对其抗氧化能力进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与试剂

新鲜地瓜参, 产自宁德, 冰冻保存; 原料解

冻并去除内脏后, 绞碎备用。

AS. 1398 中性蛋白酶, 无锡酶制剂公司 (酶活力为 1.3×10^5 U/g)。

1.1.2 主要仪器

PB-10pH 计: 德国赛多利斯科学仪器有限公司; DKB-8A 电热恒温水槽: 上海精宏实验设备有限公司; 大容量离心机: 上海安亭科学仪器厂; 实验用膜分离装置: 上海摩速科学器材有限公司; scientz-12B 普通型冷冻干燥机: 宁波新芝生物科技有限公司; SP-75 紫外分光光度计: 上海光谱仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 多肽制备工艺流程

海参 → 酶解 → 过滤离心 → 超滤 → 浓缩 → 冷冻干燥 → 海参小分子多肽

1.2.2 酶解条件优化

单因素实验: 取 50g 海参, 用 AS. 1398 中性蛋白酶进行酶解, 以水解度为指标, 分别对海参酶解时间、加酶量、加水量、酶解 pH 值、酶解温度五个因素进行优化。

正交实验: 在单因素实验的基础上, 选取了酶解时间、加酶量、酶解 pH 值、酶解温度进行四因素, 三水平的正交试验, 如表 1 所示:

表1 海参酶解工艺因素水平

因素	A	B	C	D
水平	温度(°C)	时间(h)	pH值	加酶量(U/g)
1	50	1	6.5	600
2	55	2	7.0	1200
3	60	3	7.5	1800

1.2.3 多肽制备

酶解液离心过滤后，除去杂质，上清液经截留分子量10000的中空纤维素膜在0.2Mpa压力下进行超滤，渗透液即为多肽液。多肽液浓缩后，进行冷冻干燥，得到固体多肽，粉碎后干燥保存。

多肽得率(%) = 干燥后固体质量/海参重量(湿重) × 100

1.2.4 测试指标及分析测定方法

总蛋白质含量测定：微量凯氏定氮法^[8]；

氨基态氮的测定：甲醛滴定法^[8]；

多糖的测定：苯酚硫酸法^[9]；

清除羟自由基测定方法：Fenton体系法^[10]；

清除超氧自由基测定方法：邻苯三酚自氧化法^[11]；

水解度(DH,%) = 水解液中总氨基态氮含量/所加底物的总氮含量^[12]。

2 结果与分析

2.1 地瓜参基本成分测定

经过测定，地瓜参含水量达87.4%，其粗蛋白占海参参干重的74.6%，并含有少量脂肪和多糖，说明地瓜参是一种高蛋白低脂肪的海产品(见表2)。

表2 地瓜参中各种成分占干重的含量

成分	蛋白质	粗脂肪	多糖	灰分
含量(%)	74.6	3.3	4.6	3.0

2.2 单因素实验

2.2.1 加酶量对水解度的影响

取海参50g，加入100mL水，调pH值至7.0，酶解温度为55°C，酶解时间2h，加酶量分别为600U/g、1200U/g、2400U/g、3600U/g、4800U/g、6000U/g进行酶解。结果如图1所示，加酶量从600U/g上升到1200U/g时，水解度有较大的提高，从8.2%上升到10.9%，随着加酶量的增加，

水解度缓慢提高，当加酶量为6000U/g时，水解度上升至14.1%，是加酶量600U/g水解度的1.7倍。加酶量的增大能够提高海参蛋白的酶解效率，从而提高水解度。但考虑到生产成本，加酶量需控制在适宜的范围内。在后续的正交实验中选取600U/g、1200U/g、1800U/g三水平进行实验。

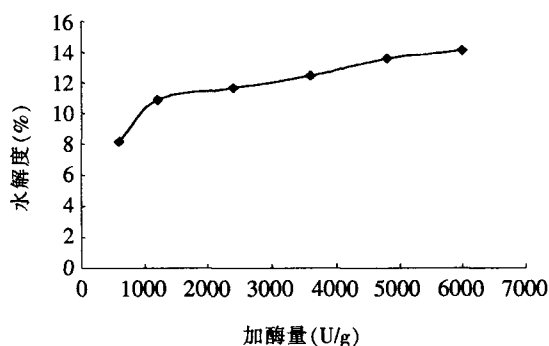


图1 加酶量对酶解水解度的影响

2.2.2 加水量对水解度的影响

取海参50g，调pH值至7.0，加酶量为1200U/g，酶解温度为55°C，酶解时间2h，加水量分别为50mL、100mL、150mL、200mL、250mL、300mL进行酶解。结果如图2所示，

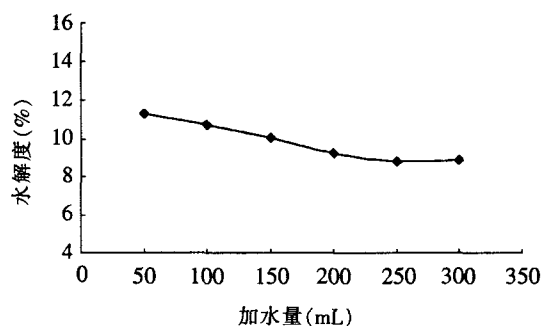


图2 加水量对酶解水解度的影响

加水量增加时，水解度下降，其中加水量50ml(即加水量与原料重1:1)时，水解度最大。可能是加水量增加后，酶浓度被稀释，反而降低了水解度。在水解过程中，加水量过少，酶解体系过于粘稠，可能导致酶解反应不充分，而加水量过多，则会增加后续处理的成本。因此选用100mL(即加水量与原料重2:1)为宜。

2.2.3 温度对水解度的影响

取海参50g，调pH值至7.0，加酶量为1200U/g，加水量为100mL，酶解时间2h，酶解温度分别为25°C、35°C、45°C、55°C、65°C、75°C。其酶解结果如图3所示，随着温度的上

升, 水解度逐渐增加, 在 50℃ ~ 55℃ 范围内水解度达到最大, 之后水解度随着温度的升高而下降。在 75℃ 水解度又小幅提高, 可能是温度过高引起蛋白自身水解, 导致水解度升高。实验表明, 中性蛋白酶的最佳水解温度在 50 ~ 60℃ 间。

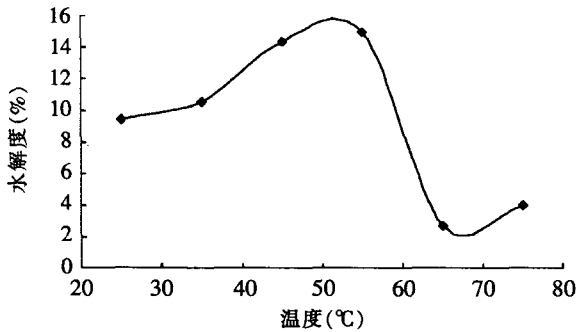


图 3 酶解温度对酶解水解度的影响

2.2.4 pH 值对水解度的影响

取海参 50g, 酶解温度 55℃, 加酶量为 1200U/g, 加水量为 100mL, 酶解时间 2h, 酶解 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。酶解结果如图 4 所示, 水解度在 pH6.5 开始上升, 到 pH 值为 7.0 时, 水解度达到最高。实验表明, 中性蛋白酶水解海参的最佳酶解 pH 值在 6.5 ~ 7.5 之间。

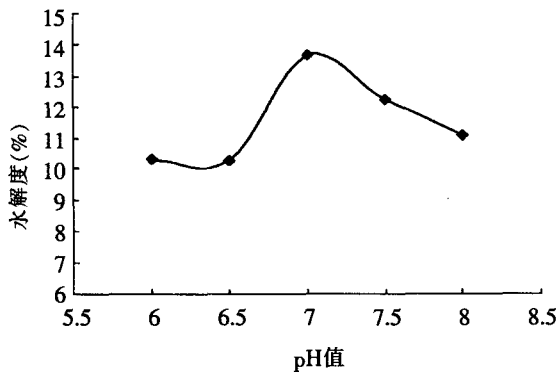


图 4 pH 值对酶解水解度的影响

2.2.5 酶解时间对水解度的影响

取海参 50g, 酶解温度 55℃, 加酶量为 1200U/g, 加水量为 100mL, 酶解 pH 值为 7.0, 酶解时间分别为 0.5h、1h、2h、3h、4h、5h。酶解结果如图 5 所示, 水解在 1h 前有较大的提高, 1h 后水解度则缓慢增加。实验表明, 海参在前 1h 内酶解速度最快, 之后酶解速度降低, 表现为平缓的上升趋势。由于酶解时间过长造成生产的成本增加, 因此选择 1h、2h、3h 等 3 个

酶解时间进行正交实验的优化。

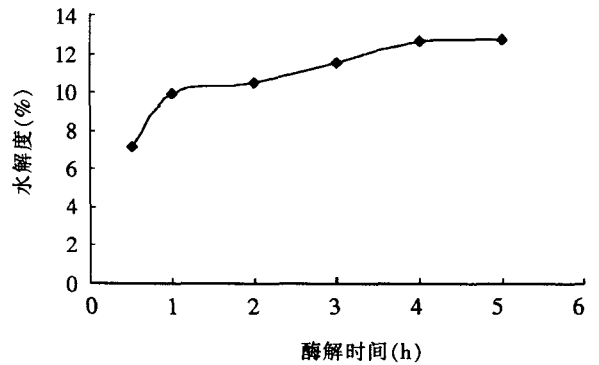


图 5 酶解时间对酶解水解度的影响

2.3 正交实验优化酶解工艺

如表 1 设计的正交表进行正交实验, 以水解度为指标进行正交分析, 结果如表 3 所示, 9 个处理中, 处理 1#水解度最小, 为 8.5%, 处理 8 #中水解度 17.4%, 达到最大值, 是处理 1#的 2.0 倍, 是 9 个处理均值的 1.4 倍。正交分析显示, 本实验最佳的酶解工艺为: A₃B₂C₃D₃, 即加酶量 1800U/g, 温度为 55℃, pH 值为 7.5, 时间为 3h。极差分析显示, 各因素对酶解反应影响大小为: 酶解时间 > 温度 > 加酶量 > pH。方差分析显示, 各因素差异达到极显著水平。按最佳工艺进行海参酶解后, 水解度达 17.9%, 比处理 8 水解度提高了 2.9%。

表 3 正交实验分析表

处理	A 酶用量(U)	B 温度(°C)	C pH 值	D 时间(h)	水解度 (%)
1	1	1	1	1	8.5
2	1	2	2	2	12.9
3	1	3	3	3	12.6
4	2	1	2	3	14.2
5	2	2	3	1	12.5
6	2	3	1	2	9.2
7	3	1	3	2	14.6
8	3	2	1	3	17.4
9	3	3	2	1	10.3
K ₁	34.0	37.3	35.1	31.3	
K ₂	35.9	42.8	37.4	36.7	
K ₃	42.3	32.1	39.7	44.2	
k ₁	11.3	12.4	11.7	10.4	
k ₂	12.0	14.3	12.5	12.2	
k ₃	14.1	10.7	13.2	14.7	
R	2.8	3.6	1.5	4.3	
影响因素	D>B>A>C				

表4 正交试验方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	显著水平
加酶量	25.77	2	12.88	79.70	**
温度	38.17	2	19.09	118.06	**
pH值	6.90	2	3.45	21.35	**
时间	56.32	2	28.16	174.20	**
误差	1.46	9	0.16		

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

2.4 超滤分离多肽

酶解液离心过滤后, 上清液经过截留分子量10000的中空纤维素膜超滤后, 冷冻干燥制备获得小分子多肽粉末。酶解200.0g海参, 可获得海参多肽13.8g, 多肽提取率为6.9%。对其主要成分进行测定, 结果表明, 多肽中蛋白质含量高达94.9%, 氨基态氮含量达2.5%, 多糖含量1.7%, 说明海参多肽可以作为很好的蛋白质和氨基酸的补充剂。

2.5 多肽抗氧化能力测定

2.5.1 多肽清除羟自由基能力测定

将多肽稀释不同倍数进行羟自由基能力测定, 结果如图6所示, 多肽对羟自由基具有良好的清除能力。随着多肽浓度的增加, 多肽对羟自由基的清除能力迅速上升; 当多肽浓度大于20mg/mL, 多肽清除羟自由基能力则表现为平缓的上升趋势。经过测定, 多肽清除羟自由基 IC_{50} 为12.5mg/mL。

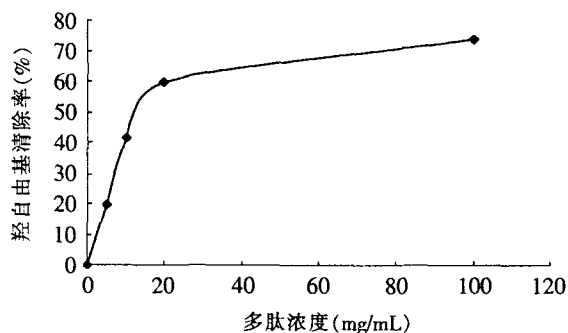


图6 多肽对羟自由基的清除能力测定

2.5.2 多肽清除超氧自由基能力测定

将多肽稀释不同倍数进行超氧自由基能力测定, 结果如图7所示, 多肽对超氧自由基具有良好的清除能力。随着多肽浓度的增加, 多肽对超氧自由基的清除能力逐渐上升。经过测定, 多肽清除超氧自由基的 IC_{50} 为23.6mg/mL。

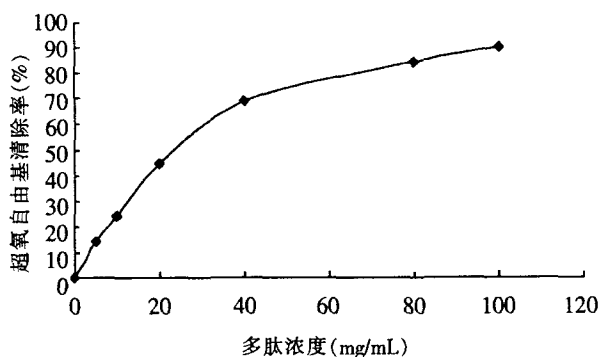


图7 多肽对超氧自由基的清除能力测定

3 小结

本研究对海参多肽制备工艺条件进行了优化。通过单因素实验研究了加酶量、温度、加水量、pH值和时间的因素对水解度的影响, 并通过正交试验确定了中性蛋白酶对海参最佳的酶解工艺: 加酶量1800U/g, 温度为55℃, pH值为7.5, 时间为3h。海参酶解液经超滤与冷冻干燥后获得多肽固体, 多肽得率为6.9%, 其蛋白质含量达94.9%。海参多肽具有较好的清除自由基的能力, 其清除羟自由基和超氧自由基的 IC_{50} 分别为12.5mg/mL、23.6mg/mL。因此, 海参多肽不仅可以加工成营养补充剂, 而且也可以作为制备抗氧化, 抗衰老的保健品或化妆品的原料, 具备良好的开发利用潜力^[14]。

参考文献

- [1] 姜健, 杨宝灵, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究 [J]. 生物技术通讯, 2004, 15 (5): 537-540.
- [2] 张或, 徐龙权, 徐龙权, 等. 海参蛋白酶解工艺条件的优化 [J]. 大连轻工业学院学报, 2001, 20 (2): 105-108.
- [3] 刘程惠, 朱蓓薇, 董秀萍, 等. 海参酶解产物的分离及其体外抗氧化作用的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33 (9): 50-53.
- [4] 赵兴坤. 海参肽的功能特性及其应用 [J]. 中国食物与营养, 2003, (12): 31-33.
- [5] 李艳菊, 刘辉, 郭月秋. 海参免疫调节作用的实验研究 [J]. 中国海洋药物, 2006, 25 (6): 49-50.
- [6] 伏纬华, 杨敏. 海地瓜的研究 I—海地瓜与海参

- 营养成分的比较 [J]. 中国海洋药物, 1991, 10 (2): 31-32.
- [7] 伏纬华, 夏元初. 海地瓜的研究 II—海地瓜与黄玉海参营养成分的比较 [J]. 中国海洋药物, 1994, 13 (3): 28-30.
- [8] 宁正祥. 食品成分分析手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [9] 王远红, 吕志华, 姜廷福, 等. 梅花参中多糖提取工艺及含量测定的研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35 (6): 987-990.
- [10] 许庆陵, 曾庆祝, 朱莉娜, 等. 鲑酶解物对羟自由基的清除作用 [J]. 水产学报, 2004, 28 (1): 93-99.
- [11] 刘成梅, 梁汉紫, 刘 伟. 罗非鱼鱼皮多肽 (TSP-1) 抗氧化活性的研究 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28 (11): 148-151.
- [12] 赵 梅, 吴成业. 罗非鱼下脚料酶解工艺的响应面法优化 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28 (5): 48-53.
- [13] 李圣明, 孙天学, 姜枫勤. 海参生物活性成分功能研究 [J]. 中国保健食品, 2004, (9): 6-7.

Optimization of the Preparation Procedure and the Antioxidant Activity of Polypeptide from Sea Cucumber

SU Yong-chang, LIU Shu-ji, WU Cheng-ye

(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China)

Abstract: The enzymolysis technology for preparation of polypeptide from sea cucumber was optimized. The polypeptide was prepared by the methods of ultrafiltration and lyophilization, and the antioxidant activity had been measured. The results showed that the optimum hydrolytic conditions utilizing neutral protease A. S1398 was determined; protease addition 1800U/g, temperature 55°C, pH 7.5 and hydrolysis time 3 h. Under these conditions, the yield rate of polypeptide was 6.9%, and the protein content was up to 94.9%. As the data showed, polypeptide exhibited effective antioxidant activities on both hydroxyl and superoxide anion radicals.

Keywords: Sea cucumber; Enzymatic hydrolysis; Polypeptide; Antioxidant activity