

海蜇酶解多肽分离纯化及其抗氧化活性研究

龙吟¹, 杨永芳¹, 甄茹¹, 陈鹏¹, 申林¹, 严容芳¹, 郑玉寅¹, 李丽², 丁国芳^{1*}

(1. 浙江海洋学院·食品与药学学院, 浙江舟山 316004;

2. 浙江国际海运职业技术学院, 浙江舟山 316000)

摘要:目的 研究海蜇酶解多肽的抗氧化活性。方法 采用碱性蛋白酶酶解提取海蜇多肽,用超滤方法获得不同分子量的酶解液,从还原体系、羟自由基清除体系和 DPPH 自由基清除体系 3 方面,研究海蜇酶解液抗氧化肽的活性。结果 不同分子量的海蜇酶解物具有较强还原性,对羟自由基、DPPH 自由基清除作用均较强,且抗氧化活性随着浓度的增加而明显增加。从分子量来看,小于 3KDa 组分抗氧化活性最强,当浓度为 15 mg/ml 时,其对羟自由基和 DPPH 自由基的清除率分别为 62.27% 和 78.25%。结论 海蜇酶解物具有抗氧化活性,且小分子肽的抗氧化活性最强。

关键词:海蜇; 酶解; 抗氧化; 活性肽

DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2012.08.045

中图分类号:R284.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1008-0805(2012)08-1948-02

海蜇 *Rhopilema esculentum*, 隶属于钵水母纲、根口水母目、海蜇属的种类,为我国沿海大型水生生物之一,是一种重要的水产资源。海蜇不仅是美味佳肴,也是治病良药。海蜇对高血压、慢性气管炎、哮喘、热痰咳嗽、胃溃疡、单纯性甲状腺肿和颈淋巴结肿大等有一定疗效。此外,其对防治动脉粥样硬化及痛风也都有有一定疗效^[1-4]。Hsieh Y-H 等^[5]在实验中发现,用低剂量海蜇胶原蛋白喂养实验鼠可显著减少抗原引起的关节炎发生和减轻症状。海蜇作为一种医食兼用的海洋生物,其营养与药效功能已被大量文献记载。但是,国内外有关于海蜇的抗氧化物制备与抗氧化活性研究尚未见报道。本文应用碱性蛋白酶,将海蜇蛋白质进行酶解,并对酶解产物进行抗氧化活性研究,为海蜇保健食品、功能食品及海洋药物的深度研发提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料 海蜇购自舟山市场,用温水浸泡洗涤以除去明矾和盐分并沥干,切成条状,于水中浸泡 12 h,取出沥干,放入 DS-1 高速组织捣碎机中捣碎匀浆, -20℃ 冷藏备用;碱性蛋白酶购自北京亚太恒信生物科技有限公司,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 BSA124S 型电子天平(Sartorius AG 公司);DS-1 型高速组织捣碎机(上海标本模型厂);CF16RXII 高速冷冻离心机(日立 HITACHI 公司);SSW 型微电脑电热恒温槽(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);722S 可见分光光度计(上海恒平科学仪器有限公司);PHS-25C 酸度计(上海理达仪器厂);85-2 恒温磁力搅拌器(常州国华电器有限公司);MSC300 超滤杯(超滤膜:3 KDa,5KDa 和 10KDa,上海摩速科学器材有限公司)。

2 方法

2.1 碱性蛋白酶酶解条件的优化 以酶解温度 A(35℃、45℃、55℃)、料水比 B(1:2、1:3、1:4)、加酶量 C(600U/g,800U/g,1000 U/g)、时间 D(3,4,5 h)为因素,设计 L₉(3⁴) 正交实验,使

收稿日期:2012-02-23; 修订日期:2012-05-26

基金项目:浙江省科技厅优先主题重大专项(No.2010C13009; 2011C02003);

浙江省社会公益类项目(No.2011C33014);

浙江省新苗人才计划项目(No.2008R40G2110028)

作者简介:龙吟(1989-),女(汉族),四川达州人,现为浙江海洋学院学生。

*通讯作者简介:丁国芳(1958-),男(汉族),浙江舟山人,现任浙江海洋学院食品与药学学院、浙江海洋生物医用制品重点工程技术研究中心教授,硕士研究生导师,学士学位,主要从事海洋生物制品、海洋药物研究工作。

用甲醛滴定法^[9]测定氨基氮含量,通过实验数据确定最佳酶解条件。

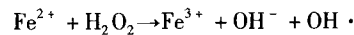
2.2 超滤膜分离 将酶解液通过 3KDa、5KDa、10KDa 的 3 种膜进行超滤,得到 4 种不同分子量的酶解液,即: >10KDa、10KDa~5KDa、5KDa~3KDa 和 <3KDa。将各组分冷冻干燥为海蜇活性肽粉末。

为了达到横向(多肽浓度不同)以及纵向(多肽分子量不同)双向对比,对每个组分进行不同倍数的稀释,将其多肽浓度稀释为 1,5,10,15 mg/ml 四个梯度,进而进行体外抗氧化性测定并设 3 个平行组。

2.3 酶解产物的抗氧化活性测定

2.3.1 还原力测定^[6] 取酶解待测液 1 ml,然后加入 2.5 ml,0.2 mol/L PBS(pH6.6)和 2.5 ml 的 1% 的铁氰化钾溶液于试管中混匀。混合物在 50℃ 水浴中反应 20 min 后,迅速冷却并加入 2.5 ml,10% 的 TCA,混匀后以 3 000 r/min 离心 10 min。取 1 ml 上清液加入 1 ml,0.1% 的三氯化铁溶液混匀,再加入 5 ml 蒸馏水摇匀,以蒸馏水调零,在 700 nm 波长处测定吸光度。吸光度越高,说明反应混合物还原性越强。

2.3.2 对羟自由基清除能力的测定^[7] H₂O₂/Fe 体系可通过 Fenton 反应产生羟自由基,总反应可用下式表示:



氮菲-Fe²⁺ 水溶液被羟自由基氧化为邻二氮菲-Fe³⁺ 后,其波长 536 nm 最大吸收峰消失。根据上述原理,以 A536 变化反映羟自由基的氧化作用。取浓度为 0.75 mmol/L 邻二氮菲 1 ml 于试管中,依次加入 PBS(pH 为 7.4)2 ml,蒸馏水 1 ml,充分混匀后,加入浓度为 0.75 mmol 硫酸亚铁 1 ml,混匀,加质量分数为 0.12% 的 H₂O₂ 1 ml,于 37℃ 水浴 90 min,于 536 nm 处测其吸光度为 A_p,用 1 ml 蒸馏水代替 1 ml H₂O₂ 测定吸光度为 A_b。用样品代替 1 ml 蒸馏水测定吸光度为 A_s,清除率计算如下:

$$\text{清除率}(\%) = (\text{A}_s - \text{A}_p) / (\text{A}_b - \text{A}_p) \times 100\%$$

2.3.3 对 DPPH 自由基清除能力的测定^[8] DPPH 浓度 0.1 mmol/L(无水乙醇溶解)避光保存,方法:2 ml 样品 + 2 ml DPPH 剧烈震荡,避光保存 20 min,517 nm 处测吸光值,空白组以等体积无水乙醇代替 DPPH 溶液,对照组以等体积蒸馏水代替样品溶液,设 3 个平行组。

3 结果

3.1 碱性蛋白酶的酶解结果 碱性蛋白酶对海蜇进行酶解的影响因素顺序为:温度 > 时间 > 料水比 > 加酶量,最佳的酶解条件为:温度为 55℃,料水比为 1:2,加酶量为 1 000 U/g,时间为 4h 时,对海蜇的水解程度最大,此时,每 100 ml 的水解液中的

氨基酸含量为 41.3 mg。

将 500 g 海蜇用最佳酶解条件进行酶解,用 3KDa、5KDa、10KDa 的 3 种膜进行超滤,得到 >10KDa、10KDa~5KDa、5KDa~3KDa 和 <3KDa 4 种不同分子量的酶解液,然后进行冷冻干燥,各组分的重量分别为:5.06,2.62,2.67 g 和 5.58 g;最终的产率分别为:1.01%,0.52%,0.53% 和 1.12%。

3.2 酶解液各不同分子量组分的还原能力比较 海蜇酶解液各不同分子量组分的还原力实验结果见图 1。

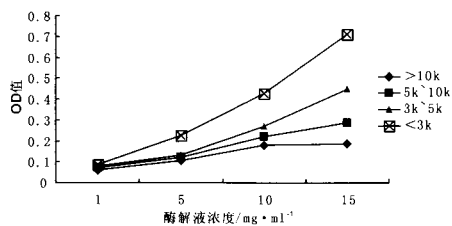


图 1 碱性蛋白酶酶解的还原力

从图 1 数据可以看出,不同分子量的海蜇酶解液都具有一定的还原力,横向来看,在某一特定分子量时,吸光度值随着浓度的增加而有明显增加,除了分子量 >10KDa 的组分增加较缓慢,其余组分的增加幅度均较大,说明酶解液是一种良好的抗氧化剂。而从纵向来看,在相同浓度下,各组分的还原力排序为:(<3KDa) > (3KDa ~ 5KDa) > (5KDa ~ 10KDa) > (>10KDa),各组分间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.3 酶解液各相对分子量组分对羟自由基的清除作用比较 将不同组分的海蜇酶解液在 1,5,10,15 mg/ml 4 个浓度梯度上进行羟自由基清除实验。结果见图 2。

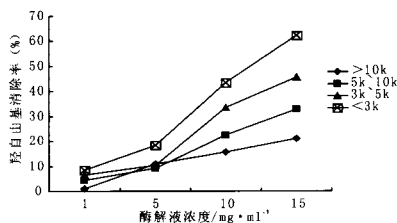


图 2 碱性蛋白酶酶解液对羟自由基的清除率

由上图可以看出,不同浓度不同分子量组分的海蜇多肽提取液都具有不同程度清除羟自由基的能力。各组分对羟自由基的清除能力与浓度呈明显的量效关系,即随着浓度的增加而增加,对羟自由基的清除率越高,且增加幅度较大,当分子量 <3KDa 的多肽组分的浓度为 15 mg/ml 时,清除率为最大值 62.27%。各组分对羟自由基的清除能力排序为:(<3KDa) > (3KDa ~ 5KDa) > (5KDa ~ 10KDa) > (>10KDa) > 空白。分子量 <3KDa 的多肽组分对羟自由基清除率最高,各组分间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.4 酶解液各不同分子量组分对 DPPH 自由基的清除作用比较 同样将不同组分的海蜇酶解液在 1,5,10,15 mg/ml 4 个浓度梯度上进行 DPPH 自由基清除实验。结果见图 3。

由实验数据发现,酶解液对 DPPH 自由基的清除率高于羟自由基,在分子量 <3KDa 的多肽组分浓度为 15 mg/ml 时,清除率

为最大值 78.25%,同时酶解液对 DPPH 自由基的清除率也随着浓度升高而增大,同样呈现出明显的量效依赖关系。

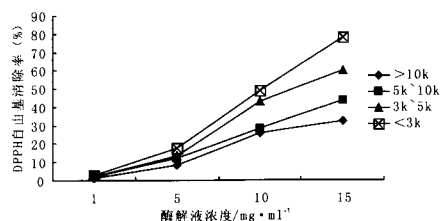


图 3 碱性蛋白酶酶解液对 DPPH 自由基的清除率

4 讨论

本研究以海蜇为研究对象,对其碱性蛋白酶解多肽进行了粗品提取及初步纯化,分别从还原体系、羟自由基清除体系和 DPPH 自由基清除体系三方面对海蜇酶解多肽的抗氧化活性进行了评价。从实验结果发现,用超滤膜截取胰蛋白酶酶解液得到 4 个不同分子量的组分具有一定还原力,并且具有清除羟自由基和 DPPH 自由基作用,并且随着酶解液分子量减小和酶解液增加而增强。超滤原液中分子量 <3KDa 的组分体外铁还原力,清除羟自由基和 DPPH 自由基的能力远远大于其他组分,分子量 >10KDa 的组分体外抗氧化活性最差。由石康宁以及 Yamaguchi 等^[9,10]的研究中均发现,大豆的小分子肽比分子量大的抗氧化性强。另外,杨永芳等^[11]从菲律宾蛤仔酶解液中获得不同分子多肽,将其进行比较,也发现小分子肽抗氧化活性最强。

由各超滤组分的体外抗氧化活性可知,海蜇小分子肽的抗氧化性与其分子量大小密切相关,小分子量短肽的抗氧化性比较明显。另外,小分子量肽抗氧化性更强,在水解时应尽可能提高水解度,以提高小肽含量。但是本研究仅仅考查了酶解寡肽的体外抗氧化活性,因此,进一步研究酶解寡肽对体内各种自由基的清除能力,对于将其开发成新型抗氧化产品十分必要。

参考文献:

- [1] 郑 蓓. 海蜇皮外治痛风 1 例[J]. 中医外治杂志,2003,12(4):48.
- [2] 人 珊. 海蜇:医食兼优[J]. 医药与健康,1995,5:40.
- [3] 邢湘臣. 保健佳品海蜇[J]. 医药与健康杂志,2003,6:52.
- [4] 彭才国. 话说海蜇[J]. 中国检验检疫,1996,2:46.
- [5] Hsieh Y-H P, Leong F M, Rudloe. Jellyfish as food[J]. Hydrobiologia, 2001,451:11.
- [6] 殷红玲,马 媛,王 璐. 虾夷扇贝内脏多糖的提取及清除羟基自由基作用的研究[J]. 水产科学,2007,26(5):255.
- [7] 曾庆祝,许庆陵,林鲁萍. 扇贝边酶解物抗氧化作用的研究[J]. 中国生化药物杂志,2005,26(2):86.
- [8] 张尊听,杨伯伦,刘谦光,等. 野葛根异黄酮成分的超声萃取及抗氧化作用[J]. 食品科学,2002,23(5):31.
- [9] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidative properties of histidine containing peptides designed from peptide fragment found in the digests of a soybean protein[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1998,46:49.
- [10] 石康宁,石 晓. 大豆活性肽抗氧化力与其分子量关系的研究[J]. 食品工业,2008,(6):1.
- [11] 杨永芳,杨素素,丁国芳,等. 菲律宾蛤仔酶解寡肽的分离及体外抗氧化作用研究[J]. 中华中医药学刊,2011,28(5):1069.