

## 菲律宾蛤仔酶解寡肽的分离及体外抗氧化作用研究

杨永芳, 杨最素, 丁国芳, 郁迪, 黄芳芳

(浙江海洋学院食品与药学院, 浙江 舟山 316004)

**摘要:**目的: 研究菲律宾蛤仔酶解寡肽的制备方法及其抗氧化活性。方法: 选用胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶等4种蛋白酶分别对菲律宾蛤仔进行酶解, 通过对羟自由基的清除作用来考查各酶解物的抗氧化活性; 经超滤、DEAE-SephroseFF阴离子交换、反相高效液相色谱C18分离制备寡肽, 并测定其羟自由基清除率和氧化还原力。结果: 胰蛋白酶酶解寡肽清除羟自由基能力最强; 经超滤后, 3KDa以下的组分羟自由基清除率最高; 将该组分纯化后, 最终得到1个寡肽, 该肽的分子量为607.6KDa, 氨基酸序列为: Asp-Trp-Pro-His。在2.5mg/mL时的羟自由基清除率、DPPH自由基清除率和还原力均高于Vit C。结论: 菲律宾蛤仔酶解寡肽具有抗氧化活性, 经超滤、阴离子交换和反相高效液相色谱可以对该肽进行纯化。

**关键词:** 菲律宾蛤仔; 酶解; 抗氧化活性; 寡肽

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1673-7717(2011)05-1069-04

### Study of the Isolation and Purification of Antioxidative Peptides from Short Necked Clam, *Ruditapes Philippinarum*

YANG Yong-fang, YANG Zui-su, DING Guo-fang, YU Di, HUANG Fang-fang

(School of Food Science and Pharmacy of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, Zhejiang, China)

**Abstract:** Objective: In order to get products with antioxidant activity from *Ruditapes philippinarum*. Methods: Four proteases ( pepsin, trypsin, papain, alcalase) were applied to hydrolyze the *R. philippinarum*. The antioxidative activity of the fractions against the hydroxyl radical produced by  $H_2O_2/Fe^{2+}$  was determined in vitro. Ultrafiltration and anion-exchange chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) were performed to separate and purify the antioxidative peptides. Results: Hydrolysate with trypsin had the highest antioxidant activity and was fractionated by ultrafiltration. Three fractions (<3KDa, 3~5KDa, and >5KDa) were separated. Below 3KDa fraction, which exhibited the highest antioxidative activity, was further purified using anion-exchange and reverse phase high performance liquid chromatography. An antioxidative peptide was isolated and its clearance rate of hydroxyl radical and reducing power were higher than vitamin C. The purified peptide sequences with a molecular weight of 607.6Da was identified as Asp-Trp-Pro-His. Conclusion: Products hydrolyzed by trypsin from *R. philippinarum* exhibited the best antioxidant activity among all proteases selected, and could be isolated and purified by the methods of ultrafiltration and anion-exchange chromatography and RP-HPLC.

**Key words:** *Ruditapes philippinarum*; hydrolysate; antioxidative activity; peptide

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*), 隶属于软体动物门 (Mollusca)、双壳纲 (Bivalvia)、帘蛤科 (Veneridae) 的海洋生物, 俗称花蛤, 是我国四大养殖贝类之一。花蛤肉组织蛋白含量高, 脂肪含量低, 并含有丰富的维生素和微量元素, 具有良好的营养保健功能。中医认为, 蛤肉有滋阴明目、软坚化痰之功效。近代研究证明, 菲律宾蛤仔提取物具

有提高免疫力、抑制细胞微核形成、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗菌等作用<sup>[1-6]</sup>。大量研究已证实, 机体代谢所产生的超氧化物阴离子 ( $O_2^{\cdot-}$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ )、过氧化自由基 (ROO) 和羟自由基 ( $\cdot OH$ ) 等自由基可以造成细胞膜、DNA 和蛋白活性的损伤, 并与动脉硬化、脑卒中、阿尔茨海默病、肥胖、白内障以及肝脏疾病等多种人类疾病相关<sup>[7-11]</sup>。因此, 近些年来, 对于抗氧化活性物质的分离提取及作用机理成为研究热点。饮食中的蛋白质在肠道主要以多肽和氨基酸形式被吸收, 其中多肽在机体抗氧化过程中起着重要的作用<sup>[10]</sup>。截止目前, 利用酶解方法从陆地生物蛋白中获取了大量的抗氧化活性肽, 而对于酶解海洋生物蛋白得到抗氧化寡肽的报道相对较少, 其中, 对菲律宾蛤仔肉蛋白进行酶解提取抗氧化寡肽的研究尚为见报道。本研究选用4种蛋白酶对菲律宾蛤仔进行酶解, 通过分析这4种蛋白酶酶解物清除羟自由基的能力, 确定能够产生较高抗氧化活性酶解物的蛋白酶。经过超滤法、凝胶层

收稿日期: 2010-12-25

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y3100129); 浙江省教育厅和浙江省财政厅研究生创新科研项目 (YK2008072); 浙江省教育厅资助项目 (Y200907990); 舟山市科技计划项目 (092016)

作者简介: 杨永芳 (1984-), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋功能食品、海洋药物。

通讯作者: 丁国芳 (1958-), 男, 浙江舟山人, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 海洋功能食品、海洋药物。

析方法及反相高效液相色谱等技术分离纯化出具有抗氧化功能的活性肽,并对该寡肽的抗氧化性进行效果评价。

## 1 材料

### 1.1 动物与试剂

菲律宾蛤仔购自舟山市场(经浙江海洋学院赵盛龙教授鉴定),去壳后,-20℃冷藏备用;Folin 试剂,酪氨酸购自上海如吉生物科技有限公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、酪蛋白和 DEAE SepharoseFF 阴离子交换柱均购自于北京亚太恒信生物科技有限公司;反相高效液相色谱柱 C<sub>18</sub>(10mm×250 mm, 填料为 ODS) 由 Kromasil 公司生产;其余试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

BSA124S 型电子天平(德国,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)、U2800 型紫外可见分光光度计(日本,HITACHI 公司);自动部分收集器(BSZ-40-LCD)、蛋白检测仪(HD-21-88)(上海琪特分析仪器有限公司);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);依利特 P1201 型高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司);MSC300 超滤杯(超滤膜:3 KDa 和 5 KDa)(上海摩速科学器材有限公司);PPSQ-31A 氨基酸测序仪(Shimadzu Corporation, 日本)。

## 2 方法

### 2.1 酶解工艺流程

取-20℃冷藏的菲律宾蛤仔肉组织放入30℃水浴锅中解冻,匀浆,将匀浆液加3倍体积蒸馏水,木瓜蛋白酶 pH 为 5,温度为 50℃,加酶量为 1200u/g;胰蛋白酶 pH 为 7.8,温度为 37℃,加酶量为 1200u/g;胃蛋白酶 pH 为 2.4,温度为 37℃,加酶量为 1200u/g;碱性蛋白酶 pH 为 8.5,温度为 45℃,加酶量为 1200u/g;分别保温酶解 24h,90℃灭酶 15min,4℃下 8500 r/min 离心 15min,取上清液。

### 2.2 水解度测定

水解度的测定参照赵新准等<sup>[12]</sup>方法,并稍作修改。取 20mL 酶解溶液置于烧杯中,加水 60mL,开动磁力搅拌器,用 0.05mol/L 氢氧化钠标准液滴定至 pH 为 8.2。加入 10mL 甲醛溶液混匀,再用 0.05mol/L 氢氧化钠溶液继续滴定至 pH 为 9.2,记下消耗氢氧化钠标准的毫升数,同时取水 80mL 做试剂空白试验。按下列公式计算氨基氮(ANN)含量,氨基氮含量与水解度成正相关。

$$X = (V_1 - V_2) \times C \times 0.014 \times 100 / (5 \times V)$$

式中,X 为样品中氨基氮的含量(g/100mL);V<sub>1</sub>为测定用样品加入甲醛稀释后消耗氢氧化钠标准液(mL);V<sub>2</sub>为试剂空白试验加入甲醛后消耗氢氧化钠标准溶液的体积(mL);V 为样品液取用量(mL);C 为氢氧化钠标准液的浓度(mol/L);0.014 为氮的毫摩尔质量(g/mmol)。

### 2.3 抗氧化活性的测定

2.3.1 羟自由基清除率的测定 参考金鸣等<sup>[13]</sup>所述方法,并做适当调整。取浓度为 0.75mmol/L 邻二氮菲 1mL 于试管于,依次加入 pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液 2 mL,样品液 1 mL,充分混匀,然后加入浓度为 0.75mol/L 的硫酸亚铁 1mL,混匀,加入 0.12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mL,37℃水浴 90min,于

536nm 处测其吸光度,为 A<sub>s</sub>;用 1mL 蒸馏水代替 1mLH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,为 A<sub>b</sub>;用 1 mL 蒸馏水代替 1 mL 样品液,为 A<sub>p</sub>。

$$\text{清除率}(\%) = (A_s - A_p) / (A_b - A_p) \times 100\%$$

2.3.2 还原力的测定 参照 Oyaizu<sup>[14]</sup>方法并略有改动。取样品溶液 2mL 加入到 2mL 0.2mol/L (PH6.6) 磷酸盐缓冲液和 2mL 1% 的铁氰化钾中充分混合,50℃保温 20min 后加入 2mL 10% 的三氯乙酸混合,加入 2mL 蒸馏水和 0.4mL 0.1% 的三氯化铁,反应 10min 后,在 700nm 处测定吸光值,吸光值高表明还原力高。同时测定不同浓度 Vit C 的还原力作为对比。

2.3.3 DPPH 自由基清除能力的测定 取样品液 2mL 及 1×10<sup>-4</sup>mol/L DPPH 溶液 2mL 加入一具塞试管中摇匀,在室温下闭光反应 30min,用纯溶剂作参比,于 517nm 波长下测定吸光度。根据下列公式计算清除率:清除率 = [1 - (A<sub>s</sub> - A<sub>SB</sub>) / A<sub>C</sub>] × 100%。

其中:A<sub>s</sub>为加样品液后 DPPH 溶液的吸光度;A<sub>SB</sub>为样品液的吸光度;A<sub>C</sub>为未加样品液时 DPPH 溶液的吸光度。测定抗氧化剂 Vit C 对 DPPH 自由基的清除率作为对比。

### 2.4 抗氧化寡肽的制备

2.4.1 酶解物按分子量大小分级分离 取 400g 花蛤肉经胰蛋白酶酶解,离心后取上清液,使用超滤杯及截取分子量分别为 3KDa 和 5KDa 的超滤膜,在 20℃环境中将上清液分别超滤 11h,截取获得 3KDa 以下、3~5KDa 和 5KDa 以上分子量的酶解液,冷冻干燥后分别测抗氧化活性。

2.4.2 DEAE SepharoseFF 阴离子交 对抗氧化活性最强的组分用 DEAE SepharoseFF 阴离子交换柱洗脱,柱型:2.6×50cm,上样体积 3mL,分别用磷酸缓冲液、0.1mol/L、0.3 mol/L、0.5mol/L 的 NaCl 溶液进行阶段洗脱,洗脱速度为 1mL/min,于 280nm 进行紫外监测,自动部分收集器每管 4mL 进行收集,将不同肽峰分别收集冷冻干燥后贮存备用。

2.4.3 反相高效液相色谱(RT-HPLC) RT-HPLC 进行纯化。色谱条件:C<sub>18</sub>反相柱,填料:ODS;柱型:10×250mm;乙腈/水为流动相,流速为 0.8mL/min,上样体积为 20μL,检测波长 220nm。洗脱条件:乙腈浓度为 15%,洗脱 20 min,重复上样。

### 2.5 氨基酸序列检测

目标肽氨基酸序列分析采用 N 末端降解检测方法,氨基酸测序仪进行测定。

### 2.6 数据处理

各组实验数据测定均做 3 个平行实验,结果取其平均值。各组数据之间采用单因素方差分析,用 t 检验进行组间均数的比较,使用 SPSS 13.0 进行数据分析。

## 3 结果

### 3.1 水解度及抗氧化活性

胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶分别对菲律宾蛤仔肉酶解后,每克肉可得到的氨基氮依次为 6.2418、6.3648、5.2637、7.4562 mg(图 1);当浓度为 2.5 mg/mL 时,各酶解物对羟自由基的清除率分别为 46.55%、65.43%、34.31% 和 57.27%,而经典抗氧化剂维生素 C 的羟自由基清除率为 72.04%,各数据间差异显著(P < 0.05)(图 2)。由于胰蛋白酶酶解物清除羟自由基能力最强,故对其进行分离纯化。

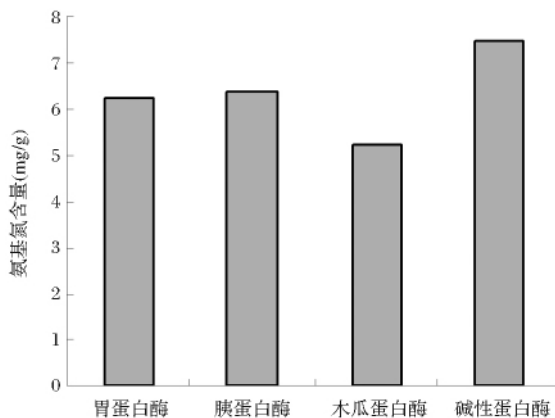


图1 4种蛋白酶解物的氨基氮含量

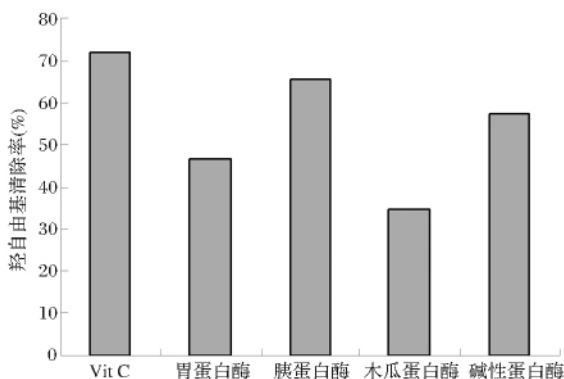


图2 羟自由基清除率

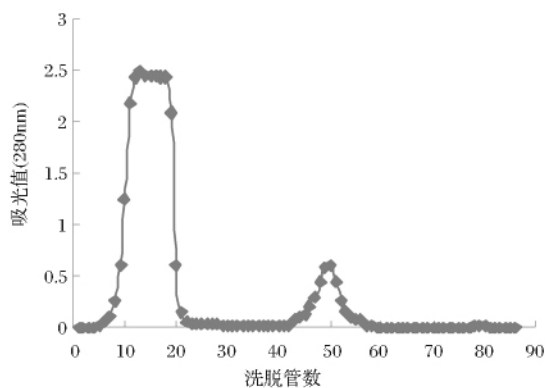


图3 DEAE-sepharoseFF 阴离子交换洗脱图谱

3.2 抗氧化寡肽分离

胰蛋白酶酶解液经超滤后,得到3个组分,即3 KDa以下(I<sub>1</sub>)、3~5 KDa(I<sub>2</sub>)、5 KDa以上(I<sub>3</sub>),冷冻干燥后分别得到3.9g、2.8g和3.2g淡黄色粉末状样品,得率分别为0.7%、1.0%和0.8%。测定I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub>和I<sub>3</sub>的抗氧化活性,当浓度为1mg/mL时,它们对羟自由基的清除率分别为49.36%、41.65%和29.44%,具有显著性差异(P < 0.05)。对抗氧化活性较强的I<sub>1</sub>经DEAE SepharoseFF柱洗脱后,出现2个峰,即峰1(II<sub>1</sub>)和峰2(II<sub>2</sub>) (图3),分别为缓冲液和0.1 mol/L NaCl溶液的洗脱组分,0.3 mol/L和0.5 mol/L的NaCl溶液没有明显的洗脱峰。

收集II<sub>1</sub>和II<sub>2</sub>,冷冻干燥后分别得到1.3g和0.9g干燥样品,得率分别为0.33%和0.23%。设置0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.8 mg/mL、1.6 mg/mL和3.2 mg/mL共5个

浓度组测定II<sub>1</sub>和II<sub>2</sub>的羟自由基清除率(表1)。根据表1分析,II<sub>1</sub>与II<sub>2</sub>均有较强清除羟自由基的能力,且随着浓度增加,二者羟自由基清除率也增加。在各个浓度组,II<sub>1</sub>对羟自由基的清除率大于II<sub>2</sub>。

表1 DEAE-sepharoseFF洗脱峰中II<sub>1</sub>和II<sub>2</sub>组分对羟自由基的清除率

样品浓度(mg/mL)	II <sub>1</sub> 清除率(%)	II <sub>2</sub> 清除率(%)
0.2	20.38	19.62
0.4	32.21	22.13
0.8	45.01	27.76
1.6	56.19	35.98
3.2	72.25	53.76

3.3 RT-HPLC洗脱结果

将II<sub>1</sub>经反相高效液相色谱柱洗脱(图4),在保留时间约为4.5min时,出现一主峰(峰4),峰高为1021.8,峰面积为5190.1,收集该峰,冷冻干燥后得到0.37g样品III,得率为0.1%,该目标肽的分子量为607.6KDa,氨基酸序列为:Asp-Trp-Pro-His。

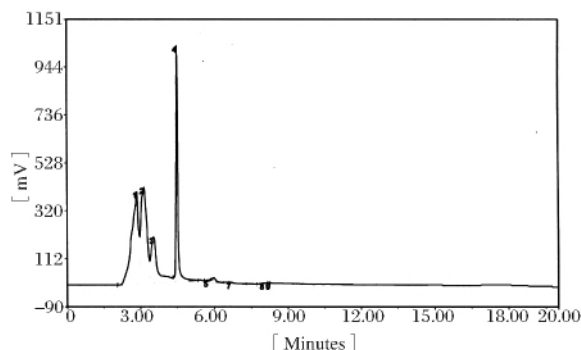


图4 II<sub>1</sub>的反相高效液相洗脱图谱

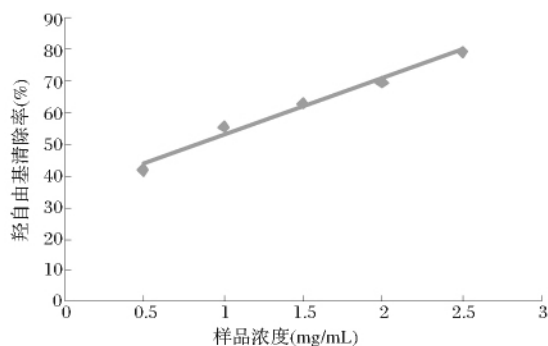


图5 RP-HPLC洗脱峰III的羟自由基清除率

3.4 目标肽抗氧化活性测定

将样品设置为0.5mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL共5个浓度梯度所测得的羟自由基清除率依次为42.16%、55.26%、63.05%、69.85%和79.41%, DPPH自由基清除能力为18.13%、36.86%、53.39%、70.04%和85.91%,还原力测定其吸光值分别为0.129、0.294、0.429、0.601、0.736(图5~7),各数据间具有显著性差异(P < 0.05)。

4 讨论

本实验研究了菲律宾蛤仔组织蛋白经不同蛋白酶水解后的水解度及羟自由基清除率,其中,碱性蛋白酶酶解物水

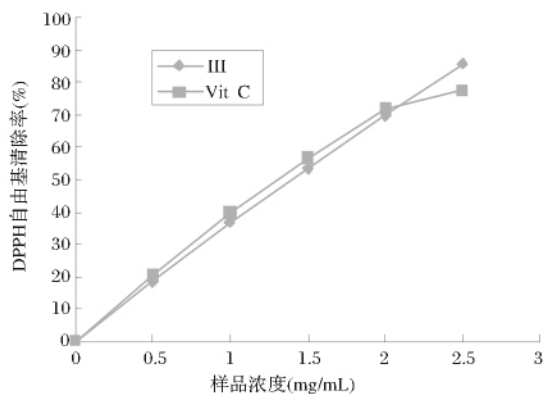


图6 RP-HPLC洗脱峰III的DPPH自由基清除率

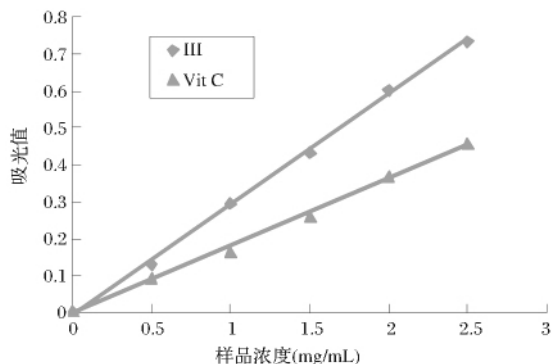


图7 RP-HPLC洗脱峰III及Vit C的还原力

解度最大,而胰蛋白酶酶解对羟自由基的清除力最强,可见,不同蛋白酶对菲律宾蛤仔组织蛋白进行水解时,所得到的酶解寡肽的抗氧化活性与其氨基酸组成及其结构有关,而与水解度之间没有必然的关联,这与Guo等<sup>[15]</sup>的研究结论相似。用超滤膜截取胰蛋白酶酶解液得到3个不同分子量的组分都具有清除羟自由基活性,但以I<sub>1</sub>活性最大,由此可推测,酶解物的抗氧化性能除了与其组成及结构有关外,可能还与其分子量大小有关。I<sub>1</sub>经DEAE-sepharoseFF阴离子交换和RP-HPLC分离纯化后,最终得到1个抗氧化性能较好的寡肽III,该肽对羟自由基的清除率随着浓度增加而增大,IC<sub>50</sub>约为0.8 mg/mL;当浓度为2.5 mg/mL时,与Vit C相比,III的羟自由基清除率、DPPH自由清除率及氧化还原力相对较高,具有开发为食品添加剂及医药品的潜能。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] Keisuke GT, Takuo K, Kiyokun M. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2008, 150: 45 - 52.

[2] 魏玉西,郭道森,李荣贵,等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinensis*)血浆中防卫素的纯化及其抗菌功能[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(12): 1145 - 1148.

[3] 张莉,刘万顺,韩宝芹,等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)蛋白聚糖的分离提取及其抗肿瘤活性的初步研究[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(1): 62 - 68.

[4] 邢成名,尚延昌,袁晓玲,等. 菲律宾蛤仔对兔动脉粥样硬化

的预防和治疗作用研究[J]. *青岛大学医学院学报*, 2005, 41(2): 137 - 143.

[5] 常林瑞,黄清荣,孙振兴,等. 菲律宾蛤仔多糖提取物抑制蚕豆根尖细胞微核形成的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(3): 235 - 238.

[6] 范秀萍,吴红棉,王娅楠,等. 菲律宾蛤仔糖胺聚糖的免疫活性研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(4): 370 - 372.

[7] Rolf JM, Greg C. The free radical theory of aging: A critical review [J]. *Adv Free Radical Biol Med*, 1985, 1(1): 165 - 223.

[8] Nicola JS. Free radicals in gastrointestinal and hepatic disease [J]. *Immunopharm Free Radical Spec*, 1995: 143 - 174.

[9] Joshua AS, John CB, Mark AL, et al. Free radical - mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models [J]. *Free Radical Biol Med*, 2008, 45: 219 - 230.

[10] Braugher JM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke. II. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation [J]. *Free Radical Biol Med*, 1989, 6: 289 - 301.

[11] Cacciuto MA, Trinh L, Lumpkin JA, et al. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells [J]. *Free Radical Biol Med*, 1993, 14: 267 - 276.

[12] 赵志淮,冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定 [J]. *食品科学*, 1994, 17(11): 65 - 67.

[13] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>氧化法检测H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>产生的羟自由基[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(6): 553 - 555.

[14] Song LY, Li TF, Yu RM, et al. Antioxidant activities of hydrolysates of *Arca subcrenata* prepared with three proteases [J]. *Mar Drugs*, 2008, 6(4): 607 - 619.

[15] Guo H, Yoshiaki K, Masame Y. Isolation and properties of antioxidative peptides from water-soluble royal jelly protein hydrolysate [J]. *Food Sci Technol Res*, 2005, 11(2): 222 - 230.

## 美科学家开发 可防心脏病的转基因大豆

据英国《泰晤士报》网站报道,美国科学家研究出一种能预防心脏病的转基因大豆,这是第一种能对人体健康产生直接作用的转基因食品。如果接下来的试验获得成功,这种大豆有望于四年内投入市场。

据报道,美国南达科他大学进行的试验表明,从这种转基因大豆中提炼出的豆油可以增加长链欧米加3脂肪酸在人类血液中的浓度。这种酸主要存在于三文鱼、鲑鱼和新鲜金枪鱼等富含油的鱼类体内。欧米加3脂肪酸可以预防心血管疾病和糖尿病,而且有助于青少年脑细胞发育。

南达科他大学教授威廉·哈里斯对33名志愿者进行的试验显示,食用这种转基因大豆油的人血液内欧米加3脂肪酸浓度平均增加了4%至5%,这将使心脏病发病率降低50%。而食用普通大豆油则没有这个效果。

“短短几周就能看到效果。我认为,如果人们每年都食用这种转基因大豆制作的食品,人体血液中欧米加3脂肪酸含量将不断增加,”哈里斯说。