

刘廷强,严泽民,周华峰,等. 蚯蚓小分子多肽提取物的制备及抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):463-466.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.132

蚯蚓小分子多肽提取物的制备及抗氧化活性

刘廷强^{1,2}, 严泽民², 周华峰², 侯冬梅², 段明星¹

(1. 清华大学生命科学学院, 北京 100084; 2. 江苏隆力奇生物科技股份有限公司研发中心, 江苏常熟 215555)

摘要:研究了自溶酶解制备蚯蚓小分子多肽提取物的工艺,并对其抗氧化活性进行了初步研究。通过单因素和正交试验法,以肽的得率为评价指标,确定了最佳制备工艺:反应时间 1 h,料液比 1.0 g : 1.5 mL,温度 35 ℃,pH 值 6.76。在此工艺条件下,1.7 kg 鲜蚯蚓经自溶酶解,酶解液经分子膜截留并冷冻干燥,共得到了 103.39 g 蚯蚓小分子多肽提取物。该产品为微黄色粉末,略带独特香味,主要为相对分子质量 3 000 以下的小分子多肽和氨基酸。在浓度为 10、30 mg/mL 时,蚯蚓小分子多肽提取物对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除率分别为 91.1%、53.0%。

关键词:蚯蚓;自溶酶解;小分子多肽;抗氧化

中图分类号: TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0463-04

蚯蚓为环节动物门(Annelida)寡毛纲(Oligochaeta)动物,可改良土壤,促进农业增产,在物质循环、生物多样性、保护生态环境等方面发挥着特殊作用。此外,蚯蚓还是我国常用中药,名为地龙。研究发现,蚯蚓具有治疗心血管疾病^[1-2]、癌症^[3]、哮喘^[4-5]等多种药理作用,同时还具有增强免疫力^[6-7]、促进伤口愈合^[8]等作用。蚯蚓中含有丰富的人体所需营养物质^[9-10],包括蛋白质、核酸、微量元素、维生素等,其中蛋白质总量约占干质量的 45.90%~68.11%。蚯蚓经酶水解可获得小分子多肽和氨基酸,不仅可以提供均衡的、易于吸收的营养物质,而且蚯蚓肽还具有抗氧化^[11]、增强免疫^[12]、抗菌^[13]等生理活性,在保健食品领域具有潜在的应用前景。蚯蚓自身含有丰富的蛋白酶,在一定条件下容易发生自溶酶解。目前,通过外源蛋白酶或自身酶水解制备蚯蚓酶解物研究已有相关报道^[14-17],但制备工艺主要以生成氨基酸为主。本研究以肽的得率为评价指标,结合单因素法和正交试验法,对蚯蚓自溶酶解工艺进行优化,采用分子膜截留技术,去除蚯蚓自身腥味,制备略带香味的蚯蚓小分子多肽提取物,并考察其抗氧化活性,旨在为开发高附加值的蚯蚓保健食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

赤子爱胜蚓(*Eisenia foelide*, 天津贾立明蚯蚓养殖有限公司);溶菌酶(14 000 Da, 华美生物工程公司);胰岛素(5 733 Da, 徐州万邦金桥制药有限公司);杆菌肽(1 422 Da, Sigma 公司);谷胱甘肽还原型(307 Da, Sigma 公司)、DPPH

(Sigma 公司);其他化学试剂均为国产分析纯试剂。TOSOH TSK-Gel-2000 SW_{XL} 色谱柱(300 mm × 7.8 mm);Agilent 1200 系列高效液相色谱仪;TU1900 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);L-8900 氨基酸分析仪(日本日立公司)。

1.2 方法

1.2.1 自溶酶解处理方法 将鲜蚯蚓洗净,置于纯净水中让其尽量吐出体内的食物残渣。用高速捣碎机将洗净的鲜蚯蚓捣碎,蚯蚓捣碎液即为鲜蚯蚓原液。在蚯蚓原液中加入一定体积的去离子水,混匀,在一定条件下进行自溶酶解反应,反应结束后,于沸水浴酶灭活 5 min,经 12 000 r/min 转速离心 10 min,上清液即为自溶酶解液。每个试验重复 3 次。

1.2.2 肽得率测定方法 采用双缩脲试剂法^[18],检测蚯蚓自溶酶解液中肽的浓度。自溶酶解液加入等体积的 10% TCA 溶液,静置 30 min,离心,取 1 mL 上清液,补水至 2 mL,在 540 nm 处测定 *D* 值。以杆菌肽为对照,参照标准曲线的回归方程 $y = 0.06149x + 0.00422$ ($r^2 = 0.99658$),计算肽浓度。肽得率计算公式如下:

肽得率 = 肽的浓度 × 酶解液体积 / 样品湿质量 × 100%。

1.2.3 蚯蚓自溶酶解工艺的优化

1.2.3.1 pH 值对自溶酶解条件的影响 取 1 g 蚯蚓捣碎液,加入 1 mL 去离子水,混匀,经测定混合液 pH 值为 6.76。分别在 pH 值为 6.0、6.5、6.76、7.0、7.5、8.0 条件下进行自溶酶解,于最佳反应温度条件下反应 4 h。分别检测自溶酶解液中肽的浓度,计算肽得率。

1.2.3.2 温度对自溶酶解条件的影响 取 1 g 蚯蚓捣碎液,加入 1 mL 去离子水,混匀,分别于 30、35、40、45、50、55、60 ℃ 下反应 4 h。分别检测自溶酶解液中肽浓度,计算肽得率。

1.2.3.3 料液比对自溶酶解条件的影响 取 1 g 蚯蚓捣碎液,分别加入不同体积的去离子水,混匀,配制成 1.0 g : 1.0 mL、1.0 g : 1.5 mL、1.0 g : 2.0 mL、1.0 g : 2.5 mL、1.0 g : 3.0 mL 料液比的蚯蚓混合液,于最佳 pH 值和温度条件下反应 4 h。分别检测自溶酶解液中肽的浓度,计算肽的得率。

收稿日期:2015-05-20

基金项目:2014 年度第一批江苏省博士后科研资助计划(编号:1401025B)。

作者简介:刘廷强(1983—),男,江西南昌人,博士,研究方向为天然产物的开发与应用。E-mail: tq-liu@hotmail.com。

通信作者:段明星,硕士,教授,主要从事多肽蛋白质药物及核酸疫苗的研究。E-mail: duanmx@mail.tsinghua.edu.cn。

1.2.3.4 反应时间对自溶酶解条件的影响 于最佳 pH 值、温度和料液比条件下,分别自溶酶解 1、2、3、4、5、6、7 h。反应结束后,分别检测自溶酶解液中肽的浓度,计算肽的得率。

1.2.3.5 正交试验 在单因素试验结果基础上,按照表 1 所示的 4 因素 3 水平设计正交试验。

表 1 自溶酶解条件因素水平

水平	因素			
	A:pH 值	B:料液比(g : mL)	C:温度(℃)	D:时间(h)
1	6.00	1.0 : 1.0	35	1
2	6.76	1.0 : 1.5	40	2
3	7.00	1.0 : 2.0	45	3

1.2.4 HPLC 检测肽的分子量分布情况 采用 HPLC 对蚯蚓自溶酶解物中肽的分子量分布情况进行分析。检测条件:乙腈:水:三氟乙酸=20:80:0.1;流速:0.5 mL/min;柱温:25℃;进样量:20 μL;检测波长:220 nm。采用溶菌酶、胰岛素、杆菌肽、谷胱甘肽还原型为对照,以相对分子质量的对数对保留时间作线性回归,得到标准曲线方程 $y = 8.342 - 0.28x (r^2 = 0.988\ 25)$ 。

1.2.5 蚯蚓小分子多肽提取物的制备 在自溶酶解最优工艺条件下,对 1.7 kg 鲜蚯蚓进行自溶酶解。酶解原液首先经相对分子质量为 3 000 的超滤膜进行超滤,滤液再经相对分子质量为 300 的纳滤膜进行截留,截留液冷冻干燥,即为蚯蚓小分子多肽提取物。采用 HPLC 检测肽的分子量分布情况。

1.2.6 蚯蚓小分子多肽提取物总氮含量及游离氨基酸含量的检测 参照 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》规定的方法,采用凯氏定氮法,对蚯蚓小分子多肽提取物总氮含量进行分析。参照 GB/T 5009.124—2003《食品中氨基酸的测定》规定的方法,用 3% 磺基水酸溶液溶解样品并定容,样品溶液摇匀后过滤、离心,采用日立 L-8900 氨基酸分析仪测定上清液,对蚯蚓小分子多肽提取物中 16 种游离氨基酸进行分析。

1.2.7 蚯蚓小分子多肽提取物的体外抗氧化活性检测 参照前人研究方法^[19],分别以 α-熊果苷和维生素 C 为阳性对照,检测蚯蚓小分子多肽提取物对 DPPH 自由基和超氧阴离子的清除作用,考察其体外抗氧化活性。

2 结果与分析

2.1 pH 值对蚯蚓自溶酶解的作用

以肽的得率为评价指标,考察 pH 值对自溶酶解的作用。由图 1 可知,当 pH 值低于 7.0(即 6.0、6.5、6.76)时,肽的得率差别不大。当 pH 值大于 6.76 时,肽得率开始下降并趋于稳定。蚯蚓匀浆液和水混合时,其 pH 值为 6.76 左右,因此选择 6.76 作为自溶酶解试验的 pH 值。

2.2 温度对蚯蚓自溶酶解的作用

由图 2 可知,在 35℃ 自溶酶解时,肽的得率最高。随着温度的上升,肽的得率缓慢下降。但在 60℃ 时,肽的得率反而增大。虽然在 60℃ 时仍可以获得较高得率,但是温度过高容易导致蛋白质、肽活性发生改变。因此,选择 35℃ 为自溶酶解试验的温度。

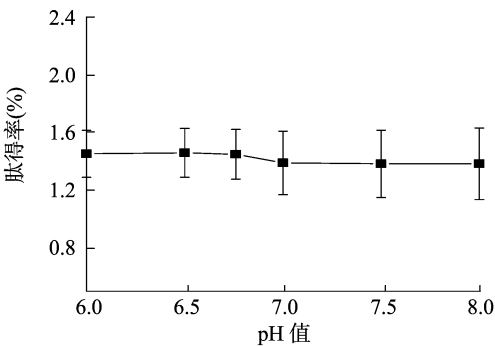


图1 pH 值对蚯蚓自溶酶解的作用

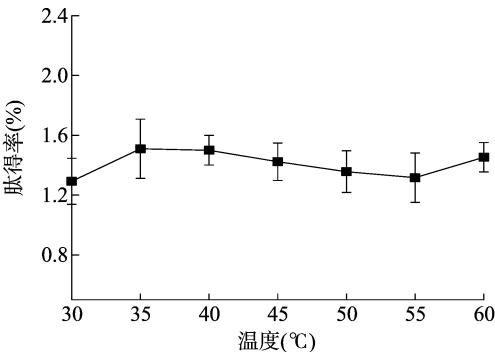


图2 温度对蚯蚓自溶酶解的作用

2.3 料液比对蚯蚓自溶酶解的作用

由图 3 可知,随着加水量的增大,蚯蚓肽的得率首先缓慢上升,然后缓慢下降,在料液比为 1.0 g : 2.0 mL 时达到最大。因此,选择料液比为 1.0 g : 2.0 mL。

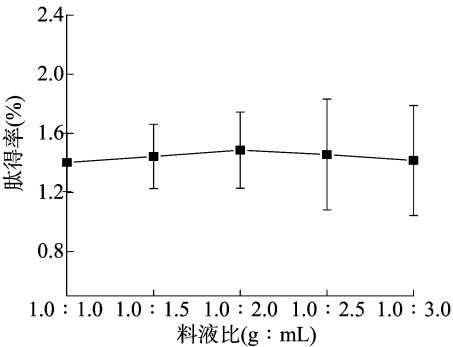


图3 料液比对蚯蚓自溶酶解的作用

2.4 反应时间对蚯蚓自溶酶解的作用

由图 4 可知,在自溶时间为 1 h 时,肽的得率最高,随着自溶时间的延长,肽的得率逐渐降低。

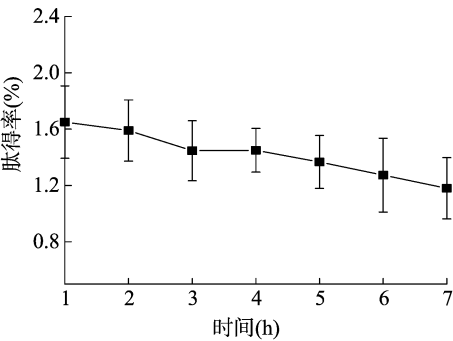


图4 反应时间对自溶酶解的作用

2.5 正交试验法优化蚯蚓自溶水解条件

在单因素试验基础上,通过正交试验考察各因素之间的关系,结果如表 2 所示。

表 2 自溶酶解正交试验结果与极差分析

序号	A	B	C	D	肽得率(%)
1	1	1	1	1	1.610
2	1	2	2	2	1.590
3	1	3	3	3	1.520
4	2	1	2	3	1.480
5	2	2	3	1	1.630
6	2	3	1	2	1.630
7	3	1	3	2	1.400
8	3	2	1	3	1.570
9	3	3	2	1	1.640
k_1	1.573	1.497	1.603	1.627	
k_2	1.580	1.597	1.570	1.540	
k_3	1.537	1.597	1.517	1.523	
R	0.043	0.100	0.086	0.104	

由表 2 可知,蚯蚓自溶酶解时间、料液比对肽的得率影响较大。最佳自溶条件为时间 1 h,料液比为 1.0 g: 1.5 mL,温度为 35 ℃,pH 值为 6.76。在此条件下,肽的得率可达到 1.63%。

2.6 蚯蚓小分子多肽提取物的小试制备

1.7 kg 鲜蚯蚓在最优工艺条件下进行自溶酶解,自溶酶解原液经相对分子质量为 3 000 的超滤膜过滤,滤液再经相对分子质量为 300 的纳滤膜截留,截留液冷冻干燥,共制备得到 103.39 g 蚯蚓小分子多肽提取物,去除蚯蚓本身腥味,略带独特香味。经双缩脲试剂法检测,肽的含量约为 27.8%。采用 HPLC 法对自溶酶解原液和蚯蚓小分子多肽提取物分别进行检测,检测结果如图 5 所示。

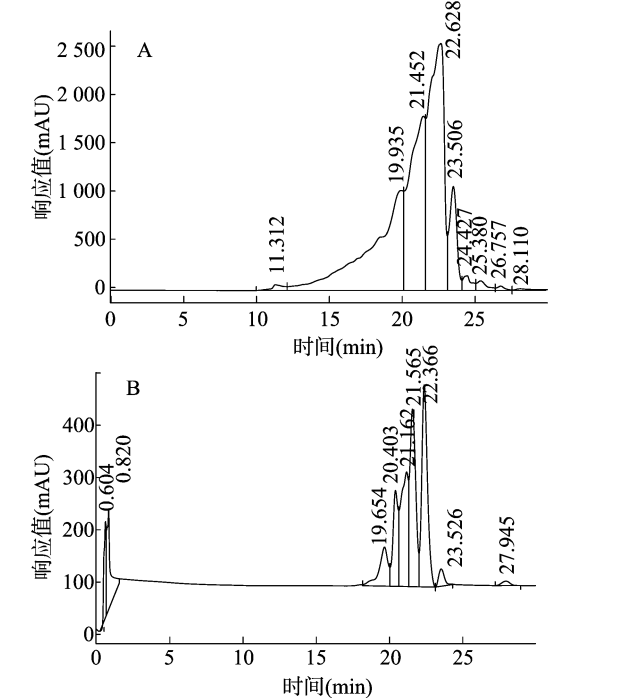


图 5 HPLC 检测自溶酶解原液(A)和蚯蚓小分子多肽提取物(B)

经对照标准蛋白出峰时间,蚯蚓自溶酶解原液中主要为

小分子多肽和氨基酸,但仍有较多的大分子肽和蛋白质。与自溶酶解原液相比,通过分子截留技术获得的蚯蚓小分子多肽提取物主要为相对分子质量 3 000 (保留时间为 17.352 min) 以下的小分子多肽及氨基酸,不含大分子的多肽和蛋白质。

2.7 蚯蚓小分子多肽提取物总氮含量及游离氨基酸含量

经凯氏定氮法检测,每 100 g 蚯蚓小分子多肽提取物样品中总氮含量为 12.0 g,以换算系数 6.25 计算,蛋白质含量约为 75% 左右。如表 3 所示,蚯蚓小分子多肽提取物样品中 16 种游离氨基酸总含量为 35.5%。每 100 g 样品中含有赖氨酸 1.59 g,苯丙氨酸 2.79 g,苏氨酸 3.18 g,异亮氨酸 2.43 g,亮氨酸 5.65 g,缬氨酸 2.48 g。

表 3 蚯蚓小分子多肽提取物中游离氨基酸含量

氨基酸	含量(%)	氨基酸	含量(%)
ASP	0	ILE	2.43
THR	3.18	LEU	5.65
SER	0	TYR	1.13
GLU	5.95	PHE	2.79
GLY	1.13	LYS	1.59
ALA	4.50	HIS	1.30
VAL	2.48	ARG	1.76
MET	0.92	PRO	0.69

2.8 蚯蚓小分子多肽提取物的抗氧化活性

采用 DPPH 法检测蚯蚓小分子多肽提取物对 DPPH 自由基的清除作用,以 α -熊果苷为阳性对照,结果如图 6 所示。

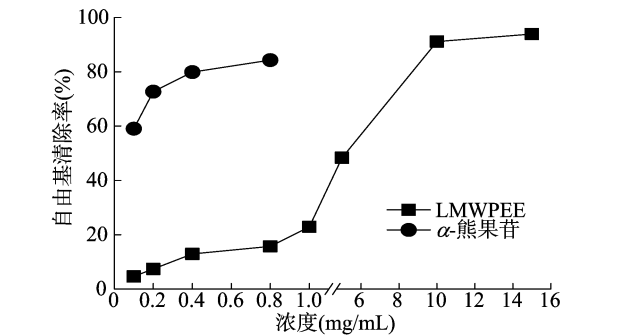


图 6 蚯蚓小分子多肽提取物对 DPPH 自由基的清除作用

由图 6 可知,低浓度时, α -熊果苷对 DPPH 自由基的清除作用较为明显,0.8 mg/mL α -熊果苷处理下,DPPH 自由基清除率达 84.3%。低浓度 LMWPEE 处理下,蚯蚓小分子多肽提取物对 DPPH 自由基具有清除作用,但效果不明显,随着 LMWPEE 浓度的升高,对 DPPH 自由基的清除作用逐渐增强。当 LMWPEE 浓度升至 5 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率为 48.3%;当 LMWPEE 浓度进一步升高至 10 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率达 91.1%。

采用邻苯三酚法检测蚯蚓小分子多肽提取物对超氧阴离子自由基的清除作用,以维生素 C 为阳性对照,结果如图 7 所示。维生素 C 浓度较低时,维生素 C 对超氧阴离子自由基的清除作用较为明显;当维生素 C 浓度为 0.5 mg/mL 时,清除率达 92.5%。LMWPEE 对超氧阴离子自由基有一定的清除

作用,当 LMWPEE 浓度为 10 mg/mL 时,超氧阴离子自由基清除率为 20.7%;当 LMWPEE 浓度达 30 mg/mL 时,超氧阴离子自由基清除率达到 53.0%。

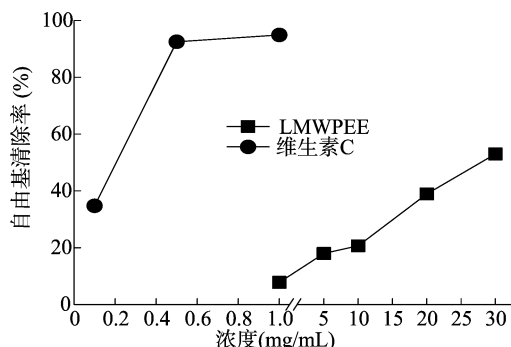


图7 蚯蚓小分子多肽提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

综合体外抗氧化活性的检测结果,蚯蚓小分子多肽提取物对自由基的清除作用具有一定的选择性,高浓度下对 DPPH 自由基的清除作用较为明显,对超氧阴离子自由基具有一定的清除作用。

3 结论

目前,蚯蚓蛋白质水解工艺主要以生成氨基酸为主。刘波等通过外源酶和内源酶水解获得的产物中,相对分子质量 220 以下的含量约 72%,即氨基酸含量都接近 72%^[15-16]。李国雷等通过加长自溶酶解时间至 48 h,获得的酶解产物中氨基酸含量更高,约 78%^[14]。这些研究报道并未对水解产物进行进一步处理,水解液不仅仍带有蚯蚓自身的腥味,且不利于保存。本研究首次采用双缩脲试剂法,以肽的得率为评价指标,对蚯蚓自溶酶解工艺进行优化。确定了蚯蚓自溶酶解的最佳制备工艺为:反应时间 1 h,料液比 1.0 g : 1.5 mL,温度 35 °C, pH 值 6.76。同时,采用分子膜截留技术和冷冻干燥技术,对酶解液进行处理,制备获得了蚯蚓小分子多肽提取物。去除了蚯蚓自身所带的腥味,产品为微黄色、略带香味的粉末,主要含有相对分子质量 3 000 以下的小分子多肽和氨基酸,16 种游离氨基酸总含量为 35.5%。通过双缩脲试剂法检测,肽的含量为 27.8%,由于该检测法对二肽灵敏度不高,因此肽的实际含量应更高。在浓度为 10、30 mg/mL 时,蚯蚓小分子多肽提取物对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除率分别为 91.1%、53.0%。本研究制备工艺简单,不引入其他外源蛋白酶,去除了蚯蚓自身腥味,制备获得了微黄色粉末状、略带香味的蚯蚓小分子多肽提取物。该产品不仅具有均衡的营养物质,而且具有较好的抗氧化活性,可应用于抗衰老和增强免疫等功能的保健食品开发。

参考文献:

- [1] Mihara H, Sumi H, Yoneta T, et al. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus* [J]. The Japanese Journal of Physiology, 1991, 41 (3): 461 - 472.
- [2] 李淑兰, 谢桂芹, 弭晓菊, 等. 地龙降压作用的研究 [J]. 中医药信息, 1995, 12 (3): 22 - 24.
- [3] 张绍章, 田 琼, 王克为, 等. 中药地龙胶囊对食管癌和肺癌的辐射增效作用 [J]. 第四军医大学学报, 1992, 13 (3): 165 - 168.
- [4] 王 左. 地龙液治疗支气管哮喘急性发作临床观察 [J]. 中国中医急症, 1996, 5 (1): 3 - 5.
- [5] 陈梅唏. 地龙提取液对哮喘患者血浆中 PGI₂、TXA₂ 的影响 [J]. 桂林医学院学报, 1997, 10 (2): 31 - 32.
- [6] 张凤春, 陈云峰, 苏彦珍. 地龙对巨噬细胞免疫活性的增强作用 [J]. 中国药学杂志, 1998, 33 (9): 532 - 535.
- [7] Hrzenjak T, Hrzenjak M, Kasuba V, et al. A new source of biologically active compounds - earthworm tissue (*Eisenia foetida*, *Lumbricus rubellus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1992, 102 (3): 441 - 447.
- [8] 张凤春, 陈云峰, 苏彦珍, 等. 地龙促进大白兔背部创伤伤口收缩的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23 (9): 49 - 50.
- [9] 王光忠, 胡 迪, 陈敬炳, 等. 地龙类药材化学成分分析 [J]. 中药材, 1998, 21 (3): 133 - 135.
- [10] 张绍章, 姚素臣, 李子蓉. 蚯蚓提取物的物理性状和化学成分的检测 [J]. 第四军医大学学报, 1994, 15 (2): 134 - 135.
- [11] 周亿金, 李文平. 蚯蚓抗氧化提取液抗氧化作用研究 [J]. 动物医学进展, 2009, 30 (6): 58 - 62.
- [12] 傅炜昕, 董占双, 李铁英, 等. 免疫活性地龙肽的制备及其对小鼠 NK 细胞活性的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2007, 36 (6): 650 - 652.
- [13] 崔东波, 郑彦杰, 王运吉, 等. 蚯蚓抗菌肽的分离 [J]. 大连轻工业学院学报, 2004, 23 (4): 265 - 269.
- [14] 李国雷, 廖 敏, 张 楠, 等. 蚯蚓蛋白水解酶自溶水解蚯蚓工艺及其产物组成特征 [J]. 江西农业大学学报, 2014, 36 (6): 1373 - 1379.
- [15] 刘 波, 谢 骏, 郑小平, 等. 蚯蚓蛋白酶解工艺及其产物分析 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15 (1): 78 - 83.
- [16] 刘 波, 郑小平, 周群兰, 等. 蚯蚓外源酶与内源酶酶解产物分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19 (1): 16 - 20.
- [17] 王彬彬, 聂俊华, 李志强, 等. 外源蛋白酶对蚯蚓蛋白酶解的影响 [J]. 中国农学通报, 2009, 25 (1): 224 - 228.
- [18] 鲁 伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法 [J]. 食品科学, 2005, 26 (7): 169 - 171.
- [19] 郑 捷, 李 素, 胡爱军, 等. 不同分子量真鲷鱼骨多肽抗氧化活性的研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35 (2): 108 - 111.