

曹学彬,王建波,邢荣莲,等. 北极海参不同酶解多肽的抗氧化活性与高效液相色谱分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):211-214.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.053

北极海参不同酶解多肽的抗氧化活性 与高效液相色谱分析

曹学彬¹, 王建波², 邢荣莲², 姜爱莉²

(1. 山东东方海洋科技股份有限公司/国家海藻与海参工程技术研究中心, 山东烟台 264000;

2. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

摘要:利用 5 种蛋白酶酶解北极海参蛋白得到 5 种多肽,通过化学方法检测 5 种多肽的体外抗氧化活性,结果表明,5 种酶解多肽的体外抗氧化能力均随多肽浓度的增加而提高,对羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力大小顺序为木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP>胰蛋白酶酶解多肽 TP≈酸性蛋白酶酶解多肽 AP>中性蛋白酶酶解多肽 NP>胃蛋白酶酶解多肽 PP,对超氧阴离子(O_2^-)清除能力大小顺序为胰蛋白酶酶解多肽 TP>酸性蛋白酶酶解多肽 AP>中性蛋白酶酶解多肽 NP>木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP>胃蛋白酶酶解多肽 PP,还原能力强弱顺序为酸性蛋白酶酶解多肽 AP>中性蛋白酶酶解多肽 NP>胰蛋白酶酶解多肽 TP>胃蛋白酶酶解多肽 PP>木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP。利用高效液相色谱分析酶解多肽的分子量分布,PP、PAP 分别集中在 8~20、20~14 ku,NP 和 TP 小于 7 ku 的含量较高,AP 一部分在 20~7 ku,另一部分在 7~3 ku。

关键词:北极海参;多肽;抗氧化;羟自由基;超氧阴离子;酶解;高效液相色谱;分子量

中图分类号:TS254.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)20-0211-04

小分子量的多肽容易被人体吸收,具有对人体有益的各种生理功能^[1-2]。抗氧化性多肽是生物活性肽的一种,通过减少氧自由基、羟自由基($\cdot\text{OH}$)从而达到抗衰老的功能^[3-5],使用安全性高。海参(*Acaudina molpadioides*)是典型的高蛋白、低脂肪、极低胆固醇、富含矿物质和维生素的优质食品,体壁富含蛋白质、皂苷、多糖等营养成分,具有多种保健功能及药用价值,是制备生物活性多肽的理想原料^[6-7]。

海参多肽具有良好的溶解性和稳定性特点,易消化吸收,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^[8-9]。来自海参的生物活性肽有两大类,一类是存在于生物体中的天然多肽,如海参上皮组织中具有抗肿瘤和抗炎活性的五肽,由亮氨酸、脯氨酸、丝氨酸、精氨酸等氨基酸构成,其中个别氨基酸为 D-型^[10];另一类是海参生物蛋白质酶解产生的活性肽,如 Zhao 等连续酶解海参制备得到的 ACE 抑制多肽^[11]。

不同种类的海参由于生活环境和摄食不同,其营养价值和生理功效也有所差异^[12]。苏永昌等研究了地瓜参多肽抗氧化活性^[13];赵芹等系统分析了不同分子量的刺参(*Apostichopus japonicus*)、菲律宾刺参(*Pearsonothuria graeffei*)、美国肉参(*Isostichopus badionotus*)和冰岛刺参(*Cucumaria frondosa*)等海参多肽抗氧化活性^[14];陈卉卉等对东海海参胶原多肽的制备及自由基清除功能进行了研究^[15]。

酶解水产品蛋白质进行深加工是经常采用的一种加工方法,也是获取抗氧化多肽的重要途径^[3-4]。曾庆祝等研究表明,枯草杆菌蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解扇贝边所得酶解物具有较好的 $\cdot\text{OH}$ 清除效果,其清除率分别为 84.37%、

收稿日期:2017-05-17

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31070368,31572622)。

作者简介:曹学斌(1978—),男,山东潍坊人,硕士,高级工程师,主要从事海参养殖及深加工研究。Tel:(0631)6792268;E-mail:caoxuebin1978@163.com。

通信作者:姜爱莉,博士,教授,主要从事海洋生物化工研究。Tel:(0535)6881942;E-mail:jal9035@163.com。

[17]蔡超. 酸奶在贮存期间参数的变化和对货架寿命预测模型的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012:18.

[18]段琼辉,李永,葛竹兴,等. 大麦苗粉营养成分分析及评价[J]. 现代中药研究与实践,2014(3):55-57.

[19]商业部茶叶产局,商业部杭州茶叶加工研究所. 茶叶品质理化分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989.

[20]王卫平,冯建军. 食品品质改良剂:亲水胶体的性质及应用(之一)[J]. 食品与发酵工业,1995(1):77-79.

[21]彭劲娣. 亲水胶体的应用[J]. 食品研究与开发,2000,21(6):15-16.

[22]李祎,林智鑫,包怡红. 凝固型紫薯酸奶工艺研究[J]. 安徽

农业科学,2014,42(18):5937-5941,5949.

[23]邢广良. 乳酸菌混合发酵制备功能性双蛋白酸乳酪的研究[D]. 南京:南京农业大学,2015:45-46.

[24]王军辉,查学强,姜绍通. 发酵豆奶制作工艺优化的探讨[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版),2008,31(7):1029-1033.

[25] Ambati P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2001,17(4):331-335.

[26]吴祖兴,杨倩. 新型双蛋白奶产品的研究[J]. 食品科技,2008(10):25-28.

79.93%, 这 2 种酶解物均可提高小鼠血液中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,并降低小鼠肝脏中丙二醛(MAD)含量^[16]。

北极海参(*Holothuria mexicana*)产于北大西洋深海,无污染、纯野生,营养丰富,蛋白质占干物质含量的 60% 以上。由于原产地居民不食用海参,北极海参价格显著低于黄渤海刺参,目前对于北极海参的活性成分及活性研究报道较少,对其多肽的生理活性进行深入研究,对该资源的开发利用具有较大的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

北极海参购自山东烟台海参市场,常规方法水发,低温保存备用。胃蛋白酶、胰蛋白酶购自北京拜尔迪生物技术有限公司;中性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶购自北京东华强盛生物技术有限公司;牛血清白蛋白标品购自 Sigma-Aldrich (上海)贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 海参多肽的制备

1.2.1.1 海参体壁蛋白的提取 发制好的海参组织用捣碎机搅碎,加入 10 倍体积的 0.1 mol/L NaOH 溶液,40 ℃ 水浴搅拌 12 h,离心收集上清,加入 10% 三氯醋酸(TCA)于 4 ℃ 沉淀 3 h,离心收集沉淀,丙酮反复洗涤至沉淀为白色,冷冻干燥得海参体壁蛋白。

1.2.1.2 酶解工艺流程 海参体壁蛋白溶解,分别加入 5 种蛋白酶溶液,酶的用量为 2 500 U/g。分别在各种酶的最适条件下水解 3 h,100 ℃ 加热 0.5 h 灭酶,4 000 r/min 离心,上清液中加入 3 倍体积无水乙醇,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,即为海参多肽溶液。福林酚法检测多肽含量。

1.2.2 体外抗氧化能力的测定

1.2.2.1 羟自由基($\cdot\text{OH}$)的体外清除作用 采用 Fenton 法^[17-18]测定海参多肽对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的体外清除作用, $\cdot\text{OH}$ 采用 $\text{EDTA Na}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ 体系产生。

清除率 = $(D_{\text{样品}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

式中: $D_{\text{样品}}$ 、 $D_{\text{空白}}$ 、 $D_{\text{对照}}$ 分别为测试样品、空白和对照的吸光度。

1.2.2.2 超氧阴离子($\text{O}_2\cdot$)体外清除作用 测定方法用比色分光法,具体操作参考文献^[19]。

1.2.2.3 还原力的测定 参照 Yen 等的方法^[20]。

1.2.3 海参多肽的分子量分布 采用安捷伦 1 200 高效液相色谱仪分析 5 种酶解多肽的分子量分布。色谱条件:TSK PW4000 凝胶柱,柱温 25 ℃,自动进样 5 μL ,流动相为纯净水,流速 1 mL/min,214 nm 检测。

2 结果与分析

2.1 海参多肽的制备

试验表明,酸性蛋白酶水解海参蛋白所得的酶解多肽(AP)得率最高,为 89.7%;其次是胰蛋白酶酶解多肽(TP),得率为 88.6%,木瓜蛋白酶酶解多肽(PAP)得率为 76.3%,中性蛋白酶酶解多肽(NP)得率为 70.5%;胃蛋白酶水解蛋白所得的多肽(PP)得率最低,仅为 70.5%。

2.2 5 种酶解多肽对羟自由基的清除能力

由图 1 可知,几种酶解多肽对羟自由基的清除率均随多肽浓度的增加而提高,当 TP、PAP、AP 的浓度为 1.6 mg/mL 时,对羟自由基的清除率已经达到 100%。相同浓度下,木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP 对羟自由基的清除能力最强,其半清除浓度 IC_{50} 为 0.277 mg/mL,中性蛋白酶酶解多肽 NP 的 IC_{50} 为 0.414 mg/mL,胰蛋白酶酶解多肽 TP 及酸性蛋白酶酶解多肽 AP 的 IC_{50} 为 0.342 mg/mL,胃蛋白酶酶解多肽 PP 对羟自由基的清除率最低。清除能力强弱顺序为 $\text{PAP} > \text{TP} \approx \text{AP} > \text{NP} > \text{PP}$ 。

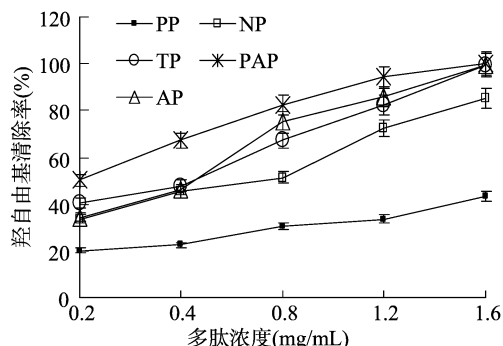


图1 5 种酶解多肽对羟自由基的清除能力

2.3 5 种酶解多肽对超氧阴离子的清除能力

由图 2 可知,几种酶解多肽对超氧阴离子的清除能力均随多肽浓度的增加而提高,相同浓度下,胰蛋白酶酶解多肽 TP 对超氧阴离子的清除能力最强, IC_{50} 为 0.966 mg/mL,其次是酸性蛋白酶酶解多肽 AP, IC_{50} 为 1.177 mg/mL,中性蛋白酶酶解多肽 NP 的 IC_{50} 为 2.150 mg/mL,木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP 的 IC_{50} 为 2.325 mg/mL,胃蛋白酶酶解多肽 PP 对超氧阴离子的清除率最低,尤其是在较高浓度下。清除能力强弱顺序为 $\text{TP} > \text{AP} > \text{NP} > \text{PAP} > \text{PP}$ 。

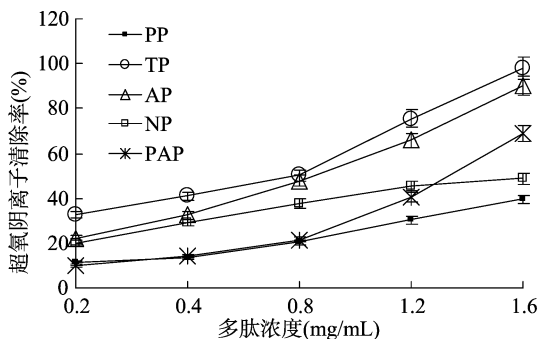


图2 5 种酶解多肽对超氧阴离子的清除能力

2.4 5 种酶解多肽的还原能力

还原能力也是抗氧化能力的一个指标,但是还原能力在抗氧化过程中所起作用大小目前还不清楚。从图 3 可以看出,5 种酶解多肽的还原能力均与浓度呈正相关,其中酸性蛋白酶酶解多肽 AP 的还原能力最强,其次是中性蛋白酶酶解多肽 NP 和胰蛋白酶酶解多肽 TP,胃蛋白酶酶解多肽 PP 和木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP 的还原能力相对较弱,远低于其他 3 种酶解多肽。

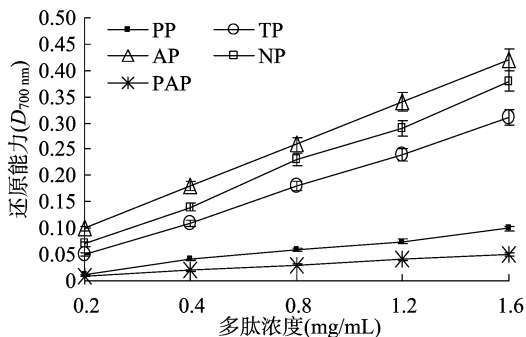


图3 5种酶解多肽的还原能力

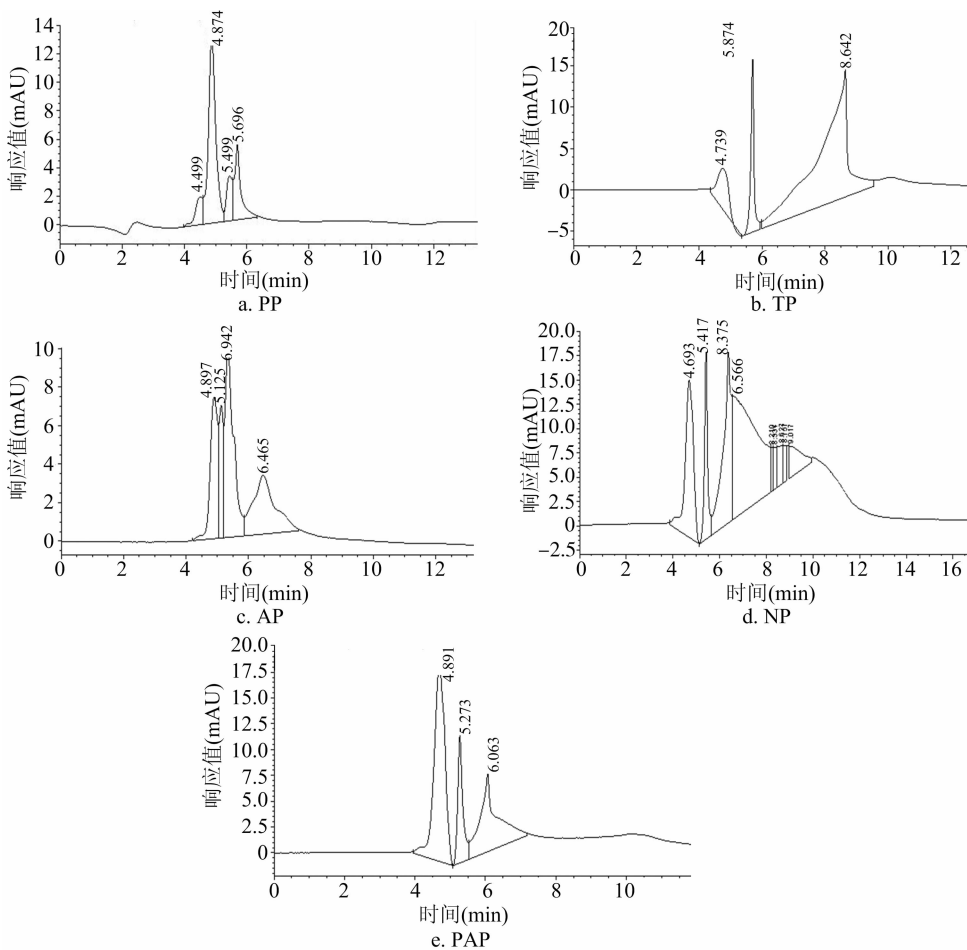


图4 5种酶解多肽的高效液相色谱图示

3 讨论

对海洋生物的研究发现,多肽的生理作用与组成多肽的氨基酸序列有关^[21-22];一些生物活性肽的生理功能还与多肽的结构、疏水性、所带电荷等有关^[23-24]。许多研究表明,海参多肽的抗氧化性与分子量密切相关,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^[25],但抗氧化活性与分子量并不是呈正相关关系,多肽的抗氧化性还取决于组成多肽的氨基酸组成和序列^[26]。由于短肽含有某些能与自由基反应的特殊基团即供氢基团,只有当这些短肽分子量适当时,这些特殊的供氢基团才能得到最大的暴露,进而充分地、与自由基作用,此时才具有较强的抗氧化性^[26]。Qian 等指出,含硫

2.5 酶解海参多肽的高效液相分析

利用高效液相色谱分析 5 种海参酶解多肽的分子量分布,结果(图 4)显示,胃蛋白酶酶解多肽 PP 的分子量分布范围窄,肽段主要集中在 8~20 ku,其中分子量为 14 ku 左右的占了大部分;中性蛋白酶酶解多肽 NP 的分子量分布范围宽,低分子量肽段(小于 7 ku)含量比较高;胰蛋白酶酶解多肽 TP 的分子量小于 7 ku 的占了大部分;酸性蛋白酶酶解多肽 AP 的分子量范围分为两部分,一部分在 20~7 ku,另一部分在 7~3 ku;而木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP 的大部分肽段分子量在 20~14 ku,还有少量肽段分子量 5~7 ku。

基的半胱氨酸能够直接与自由基作用,对多肽的抗氧化性有重要贡献^[27]。Saiga 等发现,含酸性氨基酸的短肽具有较好的抗氧化效果,原因是酸性氨基酸的侧链羧基能钝化金属离子,终止自由基链式反应^[28-30]。

本研究中所用的 5 种蛋白酶对于酶切位点的选择性是有差异的。中性蛋白酶酶切位点多,对底物肽键的选择性大,酶解得到的 NP 的分子量大部分集中在小分子量部分;酸性蛋白酶是将 2 个疏水氨基酸打断,作为内肽酶的同时还可以切开蛋白或多肽羧基或氨基末端肽键,游离出氨基酸,同时也可以水解蛋白多肽酯键,水解范围相对较宽,但是对芳香族氨基酸没有特异性;胃蛋白酶水解肽键两端必须是疏水性氨基酸、芳香族氨基酸氨基与其他氨基酸形成的肽键,如果是脯氨酸

则不水解,制备的多肽含有的芳香族氨基酸含量较少或者 2 个芳香族氨基酸在蛋白中的距离较远;胰蛋白酶酶切赖氨酸、精氨酸羧基与别的氨基酸形成的肽键,制备的蛋白内含有赖氨酸及精氨酸的残基相对要多;木瓜蛋白酶不但有蛋白酶、酯酶活性,还具有合成功能,可把蛋白水解物合成为类蛋白质,可水解蛋白质和多肽中赖氨酸和精氨酸的羧基端,并能优先水解那些在肽键的 N 端具有 2 个羧基的氨基酸或芳香 L-氨基酸的肽键,也可以通过切断壳聚糖的 β -1,4 糖苷键降解植物细胞壁中壳聚糖。5 种蛋白酶酶切位点的不同,酶解得到的多肽分子量及氨基酸残基也有所不同,相应地,表现出的体外抗氧化活性也就有较大的差异。

4 结论

利用 5 种蛋白酶酶解海参蛋白得到 5 种多肽,通过化学方法检测 5 种多肽的体外抗氧化活性,结果表明,5 种酶解多肽的体外抗氧化活性均随多肽浓度的增加而提高,对羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力大小顺序为木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP > 胰蛋白酶酶解多肽 TP \approx 酸性蛋白酶酶解多肽 AP > 中性蛋白酶酶解多肽 NP > 胃蛋白酶酶解多肽 PP,对超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除能力大小顺序为胰蛋白酶酶解多肽 TP > 酸性蛋白酶酶解多肽 AP > 中性蛋白酶酶解多肽 NP > 木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP > 胃蛋白酶酶解多肽 PP,还原能力强弱顺序为酸性蛋白酶酶解多肽 AP > 中性蛋白酶酶解多肽 NP > 胰蛋白酶酶解多肽 TP > 胃蛋白酶酶解多肽 PP > 木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP。综合比较胰蛋白酶酶解多肽 TP 具有最好的综合抗氧化能力。

参考文献:

- [1] 周雪松. 水解蛋白来源的抗氧化肽研究进展[J]. 中国食品添加剂,2005(6):84-87.
- [2] 付学军,崔志峰. 小分子量海参肽对小鼠的抗疲劳作用[J]. 食品科技,2007(4):259.
- [3] 吴继卫,何海伦,路敬涛,等. 海洋生物蛋白的酶解及酶解产物的抗氧化活性[J]. 海洋科学,2005,29(3):76-80.
- [4] 陈美珍,余杰,郭慧敏. 大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学,2000,23(1):43-47.
- [5] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(3):574-578.
- [6] 佟长青,朱春芃,曲敏,等. 刺参蛋白胰蛋白酶解产物生物活性的研究[J]. 河北渔业,2013(11):6-9,32.
- [7] 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.
- [8] 李志英,许喜林,陈健. 虎纹海参多肽酶解制备工艺及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2012,33(6):159-161.
- [9] 崔风霞. 海参胶原蛋白生化性质及胶原肽活性研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2007.
- [10] 苏秀榕,娄永江,常亚青,等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究[J]. 营养学报,2003,25(2):181-182.
- [11] Zhao Y H, Li B F, Liu Z Y, et al. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(12):1586-1591.
- [12] 赵玲,殷邦忠,刘淇,等. 4 种海参多肽抗氧化活性的比较研究[J]. 中国海洋药物,2012,31(2):19-24.
- [13] 苏永昌,刘淑集,吴成业. 海参多肽的制备工艺优化及其抗氧化测定[J]. 福建水产,2009(2):6-10.
- [14] 赵芹. 海参胶原蛋白多肽抗氧化活性的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2008.
- [15] 陈卉卉,于平,励建荣. 东海海参胶原蛋白多肽的制备及清除自由基功能研究[J]. 中国食品学报,2010,10(1):19-25.
- [16] 曾庆祝,许庆陵,林鲁萍. 扇贝边酶解物抗氧化作用研究[J]. 中国生化药物杂志,2005,26(2):86-89.
- [17] 杨鑫鹏,杨文字,叶强. 红毛五加叶水提液对羟自由基清除率的测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(35):21653-21656,21659.
- [18] 吴海涛,张彧,缪琪,等. 牡蛎水提液的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2005,31(4):42-45.
- [19] 萧华山,何文锦,傅文庆,等. 一种用分光光度计检测氧自由基的新方法[J]. 生物化学与生物物理进展,1999,26(2):180-182.
- [20] Yen G C, Duh P D. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1993, 70(4):383-386.
- [21] Clare D A, Swaisgood H E. Bioactive milk peptides: a prospectus[J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83(6):1187-1195.
- [22] Elias R J, Kellerby S S, Decker E A. Antioxidant activity of proteins and peptides[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48(5):430-441.
- [23] Cho S S, Lee H K, Yu C Y, et al. Isolation and characterization of bioactive peptides from Hwangtae (yellowish dried Alaska pollack) protein hydrolysate[J]. Journal of Food Science and Nutrition, 2008, 13(3):196-203.
- [24] Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides[J]. Trends in Food Science and Technology, 2001, 11(9/10):347-356.
- [25] 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[J]. 现代食品科技,2014,30(5):75-81.
- [26] 王静,张京楼,王铎喜,等. 海参多肽的抗氧化性能研究[J]. 食品与机械,2010,26(2):67-71.
- [27] Qian Z J, Jung W K, Kim S K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6):1690-1698.
- [28] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12):3661-3667.
- [29] Davalos A, Miguel M, Bartolome B, et al. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(9):1939-1944.
- [30] Rajapakse N, Mendis E, Jung W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. Food Research International, 2005, 38(2):175-182.