

缢蛭蛋白肽制备工艺优化及其清除羟自由基作用

姚兴存 陆海侠 舒留泉 盘赛昆

(淮海工学院海洋学院, 连云港 222005)

摘 要 以缢蛭为试验材料, 采用羟自由基清除率为评价指标, 从胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶 5 种蛋白酶中筛选最适水解用酶, 在单因素试验基础上使用响应面法优化酶解工艺条件, 考察缢蛭蛋白肽的羟自由基清除能力并通过 Sephadex G-15 凝胶层析测定其分子质量分布。结果表明, 碱性蛋白酶酶解制备的缢蛭蛋白肽清除羟自由基能力明显强于其他蛋白酶, 优化后的碱性蛋白酶水解缢蛭蛋白工艺条件为底物浓度 6 mg/ml、加酶量 3%、pH 8.0、温度 55 °C、酶解时间 4 h, 蛋白肽的羟自由基清除率为 76.60%, IC_{50} 值为 1.89 mg/ml, 蛋白肽中 80% 以上是分子质量小于 1 500 Da 的小分子肽。

关键词 缢蛭蛋白 酶水解 羟自由基 清除率

中图分类号 TS254.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)03-0088-06

Optimization of the preparation of bioactive peptides from *Sinonovacula constricta* and its hydroxyl free radical scavenging activity

YAO Xing-cun LU Hai-xia SHU Liu-quan PAN Sai-kun

(School of Marine Science & Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

ABSTRACT Using *Sinonovacula constricta* as raw materials, optimum enzyme was selected from trypsin, pepsin, papain, alcalase and neutrase based on the hydroxyl free radical scavenging activity. Based on the single factor experiment, optimization of the hydrolysis conditions was conducted by the response surface methodology. The scavenging activity of hydroxyl free radical was investigated and the molecular weight of the enzymatic hydrolysates of *S. constricta* proteins was determined by a Sephadex G-15 gel column. The results showed that alcalase had the best hydrolytic effect and the optimum conditions for hydrolysis by alcalase were as follows: 6 mg/ml substrate, 3% enzyme, pH 8.0, 55 °C, 4 h. The scavenging activity of hydroxyl free radical of enzymatic hydrolysates was 76.60% and the IC_{50} was 1.89 mg/ml. The molecular weight of over 80% bioactive peptides from *S. constricta* was less than 1 500 Da.

KEY WORDS *Sinonovacula constricta* Enzymatic hydrolysis Hydroxyl free radical Scavenging activity

缢蛭 *Sinonovacula constricta* 是一种重要海产贝类, 广泛分布于我国沿海, 为四大养殖贝类之一, 具有很

江苏省科技支撑计划项目(BE2010430)和连云港市科技计划项目(CN0916)共同资助

收稿日期:2011-08-23;接受日期:2011-09-23

作者简介:姚兴存(1963-),男,副教授,主要从事海洋贝藻类精深加工与利用方面的研究。E-mail: yaoxingcun@126.com,

Tel:(0518)85895424

高的经济价值(齐钟彦等 1989)。缢蛏不仅营养丰富,其药用价值在《本草纲目》中也有记载。近几年,缢蛏资源的开发利用受到越来越多科研工作者的重视,相继报道了缢蛏多糖(孙萍萍等 2010)、蛋白(赵艳景等 2010)、降解物(王文生等 2010)、水提物(林文东 2011)、水解物(张永娟等 2011)等活性物质的提取制备及其生理活性,缢蛏活性物质的研究开发正成为新的研究热点,但缢蛏蛋白活性肽的制备和生物活性研究却鲜见报道。本研究从缢蛏肉中提取蛋白质,采用酶工程技术制备蛋白活性肽并优化酶解工艺条件,研究蛋白肽对羟自由基的清除作用,为海洋蛋白的高值化利用提供科学依据,促进缢蛏的深加工及综合利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

缢蛏 2011 年 3 月购于当地农贸市场。实验室中将鲜活缢蛏在海水中暂养 3 h 以上,后去壳取肉并沥干水分。将缢蛏肉置于组织捣碎机中,按 1:1 比例加入蒸馏水,打碎成匀浆,冷冻保存。

胰蛋白酶(酶活力 250 U/mg)、木瓜蛋白酶(酶活力 3 500 U/mg)、胃蛋白酶(酶活力 3 500 U/mg)购于美国 BBI 试剂公司;中性蛋白酶(100 U/mg)、碱性蛋白酶(120 U/mg)购于丹麦诺维信(Novo)公司;D-脱氧核糖、硫酸亚铁、铁氰化钾、硫代巴比妥酸(TBA)、抗坏血酸购于国药集团化学试剂有限公司;其他试剂皆为国产分析纯。

1.2 仪器

T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Primo R 多用途台式高速冷冻离心机,美国热电公司;DuoFlow 蛋白质层析系统,美国 Bio-Rad 公司;ALPHA-4 冷冻干燥机,德国 CHRIST 公司;KS-300 超声波细胞粉碎机,宁波科生仪器厂;FW-100 高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;RE-501 旋转蒸发仪,南京金正科教仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 缢蛏蛋白的提取

缢蛏肉中蛋白质采用酸法提取(陈申如等 2004)。按照固液比 1:9(m/m)加入蒸馏水,用稀盐酸调节 pH 至 2.4,放入 4 °C 冰箱中浸提 1.5 h,提取过程中不时搅拌,然后 4 500 r/min 离心 15 min,取上清液,用 NaOH 调节 pH 至 5.7,沉淀 30 min 后 4 500 r/min 离心分离 15 min,将沉淀物用冷冻干燥机冻干至粉末,即得缢蛏蛋白样品,冷藏备用。凯氏定氮法测得其蛋白质含量为 83%。

1.3.2 缢蛏蛋白活性肽的制备工艺

制备工艺参照 Je 等(2007)的方法并加以改进。取一定量的缢蛏蛋白样品,加水后将溶液酸碱度调节至蛋白酶的最适 pH 处,加入适量蛋白酶酶解,酶解结束后 100 °C 沸水浴中灭酶 10 min,自然冷却,8 000 r/min 离心 15 min,上清液即为缢蛏蛋白肽,冷藏备用。

1.3.3 清除羟自由基(\cdot OH)能力测定

采用酶解产物对 Fenton 体系产生的 \cdot OH 清除率的体外试验法进行测定(Andrews *et al.* 1986;陈美珍等 2004)。缢蛏蛋白活性肽对 \cdot OH 的清除效果用清除率(Scavenging activity)表示,按下式计算:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1 - A_0} \times 100$$

式中, A_0 为试剂空白的吸光度, A_1 为阳性对照管的吸光度, A_2 为样品管的吸光度。

1.3.4 响应面分析的因素与水平设计

在单因素试验基础上,采用 Design Expert 6.0 软件 Central Composite 设计响应面试验方案(王钦德等 2002),选取底物浓度、加酶量、pH、酶解时间 4 个相对重要因素,每个因素选取 3 个水平, $\alpha=1$,因素编码和水平取值见表 1。

表1 响应面分析因素与水平

Table 1 The design of factor and level by response surface method

编码水平 Code level	因素 Factors			
	A 底物浓度 Substrate concentration(mg/ml)	B 加酶量 Amount of enzyme(%)	C pH	D 时间 Time (h)
-1	2	1	7	2
0	4	3	8	4
1	6	5	9	6

2 结果与分析

2.1 水解缙蛭蛋白最适用酶的选择

为筛选缙蛭蛋白水解的最适蛋白酶,按照 1.3.2 的方法分别制备胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶 5 种蛋白酶的酶解液(蛋白活性肽),5 种酶的适宜水解条件列于表 2。以酶解时间为变量,设定酶解时间 4.5 h,每间隔 30 min 取样 1 次,测定蛋白肽的羟自由基清除率,考察羟自由基清除率随酶解时间的变化情况。试验结果见图 1。

表2 5种酶的适宜水解条件

Table 2 The optimum hydrolyzing conditions of five kinds of enzymes

蛋白酶种类 Protease		底物浓度 Substrate concentration(mg/ml)	温度 Temperature(°C)	加酶量 Amount of enzyme(%)	pH
胰蛋白酶	Trypsin	5	55	5	8.0
胃蛋白酶	Pepsin	5	37	5	2.5
木瓜蛋白酶	Papain	5	55	5	7.0
中性蛋白酶	Neutrase	5	55	5	7.0
碱性蛋白酶	Alcalase	5	55	5	8.0

图 1 的酶解物羟自由基清除率随水解时间变化曲线显示,在试验研究的范围内,水解进程的前 2 h,各蛋白酶水解物的羟自由基清除率增速较快,其后的 2.5 h 则逐渐趋于平缓。5 种蛋白酶在水解缙蛭蛋白的进程中,各自活性肽的羟自由基清除率都呈现逐渐增强的趋势,但大多在 3 h 后趋于平缓甚至降低。不同种类蛋白酶制备的蛋白肽对羟自由基的清除能力存在较明显差异,木瓜蛋白酶蛋白肽清除能力始终最弱,而碱性蛋白酶蛋白肽清除能力最强,清除率最大值为 52.5%。按照羟自由基清除率由大到小排列顺序为:碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶。因此,选用碱性蛋白酶作为缙蛭蛋白水解用工具酶。碱性蛋白酶是一种非特异性肽键内切酶,主要作用于含有疏水性羧基的肽键,从内部水解底物蛋白而随机产生大量小片段多肽,使其清除活性最强,而其他蛋白酶对底物位点的专一性较高,水解能力较弱(范远景等 2007)。

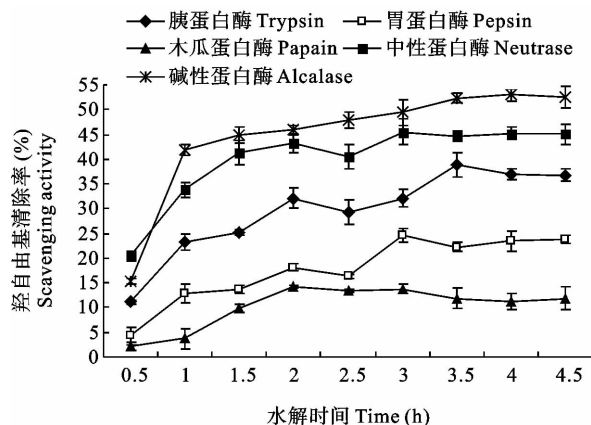


图1 5种蛋白酶水解物的羟自由基清除率随水解时间变化
Fig. 1 The scavenging activity of enzymatic hydrolysates by five proteases versus hydrolysis time

2.2 碱性蛋白酶制备缙蛭蛋白肽水解条件的优化

对于同一种蛋白酶,水解条件不同,则水解程度及水解产物的羟自由基清除能力也存在差异。因此,为得到具有较高羟自由基清除活性的蛋白肽,需要优化缙蛭蛋白的碱性蛋白酶水解条件。

根据单因素试验结果,通过 SPSS 13.0 软件分析,选取 4 个影响显著因素,使用 Design Expert 6.0 软件设计了 21 个试验点。响应面设计方案及试验结果见表 3,回归模型的方差分析见表 4。

表 3 响应面设计方案与试验结果

Table 3 Design and results of the response surface method

试验号 Test number	A 底物浓度 Substrate concentration(mg/ml)	B 加酶量 Amount of enzyme %	C pH 值 pH value	D 时间 Time (h)	羟自由基清除率 Scavenging activity(%)
1	4	3.00	8.00	2.00	61.4
2	4	3.00	7.00	4.00	67.5
3	6	5.00	7.00	6.00	66.9
4	4	3.00	8.00	6.00	65.0
5	4	5.00	8.00	4.00	70.3
6	4	3.00	8.00	4.00	71.2
7	2	5.00	9.00	6.00	55.4
8	6	1.00	9.00	2.00	65.6
9	4	1.00	8.00	4.00	69.8
10	6	5.00	9.00	2.00	69.0
11	4	3.00	8.00	4.00	71.8
12	4	3.00	8.00	4.00	71.9
13	4	3.00	9.00	4.00	71.1
14	2	1.00	7.00	2.00	46.2
15	2	1.00	9.00	6.00	52.1
16	6	3.00	8.00	4.00	77.8
17	6	1.00	7.00	6.00	64.0
18	2	3.00	8.00	4.00	60.8
19	4	3.00	8.00	4.00	70.6
20	4	3.00	8.00	4.00	70.6
21	2	5.00	7.00	2.00	49.9

表 4 回归模型方差分析结果

Table 4 Analysis of variance for regression model

方差来源 Source		平方和 Sum of squares	自由度 Degree of free	均方 Mean square	F 值 F Value	P 值 P Value
模型	Model	1 339.49	14	95.68	119.32	<0.000 1
	A	144.50	1	144.50	180.20	<0.000 1
	B	19.04	1	19.04	23.75	0.002 8
	C	6.48	1	6.48	8.08	0.029 5
	D	5.48	1	5.48	6.08	0.039 5
	AC	5.12	1	5.12	5.40	0.028 2
	A ²	9.32	1	9.32	12.35	0.017 4
	C ²	8.22	1	8.22	10.25	0.018 6
	D ²	159.10	1	159.10	198.42	<0.000 1
残差	Residual	4.81	6	0.80		
失拟项	Lack of fit	3.24	2	1.62	4.14	0.106 2
纯误差	Pure error	1.57	4	0.39		
总变异	Cor total	1 344.31	20			

注:本表仅列出差异显著项($P < 0.050 0$)

Note: Listed in this table are only significantly different items($P < 0.050 0$)

整体模型的 P 值小于 0.000 1 极显著,失拟项 P 值为 0.106 2 不显著,表明该模型拟合良好,试验方法可靠。表 4 可以看出,一次项 A、B、C、D,二次项 A、C、D,交互项 AC 影响显著。得到以羟自由基清除率(Y)为响应值的回归方程为: $Y=71.15+1.80A+1.80B+1.38C+8.50D+0.76AB-0.11AC-0.088AD+0.013BC+0.84BD-0.088CD-7.89A^2-1.79B^2-1.04C^2-1.79D^2$,相关系数 $R^2=0.996 4$,说明响应值(羟自由基清除率)的变化有 99.64% 来源于所选变量。因此,本回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以用其确定最佳提取工艺条件。由此,经软件优化后得到的酶解工艺条件为:底物浓度 6 mg/ml、加酶量 3%、pH 8.0、温度 55 °C、酶解时间 4 h,缢蛭蛋白肽羟自由基清除率的理论值为 77.86%。在此条件下,做 3 个平行试验,测定实际羟自由基清除率为 76.60%,与理论值相对偏差为 1.62%,说明该模型得到的水解条件可以较好反映实际情况。

将缢蛭蛋白肽配制成不同浓度梯度的溶液,分别测定羟自由基清除率,绘制清除率对浓度曲线,得到曲线回归方程为 $y=16.533\ln x+39.396$, $R^2=0.939 5$ 。蛋白肽的羟自由基清除能力用羟自由基清除率为 50% 时溶液质量浓度(IC_{50})来表示,由上述回归方程计算出其 IC_{50} 为 1.89 mg/ml,而阳性对照物维生素 C 的 IC_{50} 为 1.907 mg/ml(Yu *et al.* 2006),可见,缢蛭蛋白肽的羟基自由基清除能力与 V_C 大致相当。

2.3 缢蛭蛋白肽的分子质量与分布

取 2 ml 缢蛭蛋白肽溶液通过 Sephadex G-15 凝胶柱层析,由 Biologic DuoFlow 蛋白质层析系统程序控制自动上样。流动相为 50mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0),流速 0.4 ml/min,检测波长 280 nm。缢蛭蛋白肽的凝胶层析图谱见图 2。同样,以 L-酪氨酸、一磷酸腺苷、辅酶 I、杆菌肽锌为标准品进行上样层析,绘制 Sephadex G-15 凝胶过滤柱层析法(张龙翔等 1981)测定天然分子相对分子质量的标准曲线(图 3)。

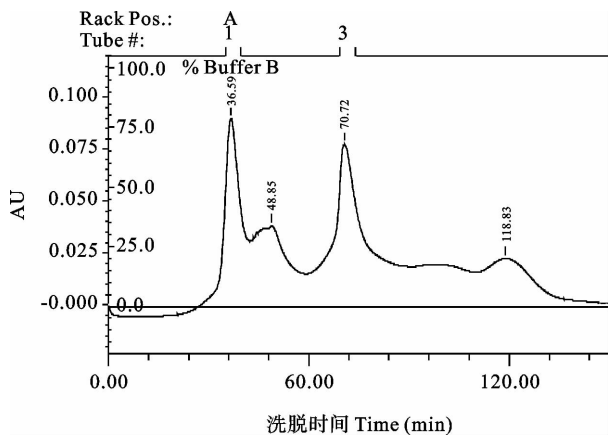


图 2 缢蛭蛋白肽 Sephadex G-15 层析色谱

Fig. 2 The Sephadex G-15 chromatogram of enzymatic hydrolysates from *S. constricta* proteins

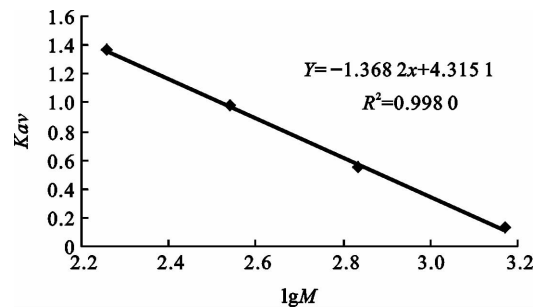


图 3 Sephadex G-15 凝胶层析测定分子质量标准曲线

Fig. 3 Standard curve of molecular weight determination by Sephadex G-15 column

图 2 显示,缢蛭蛋白肽层析图谱出现了 4 个洗脱峰,出峰时间依次为 36.59、48.85、70.72、118.83 min。根据图 3 的测定分子质量标准曲线方程 $K_{av} = -1.368 2 \lg M + 4.315 1$,由以上 4 个洗脱峰的出峰时间可以计算得到,1 号峰分子质量为 1 858 Da,2 号峰分子质量 1 255 Da,3 号峰分子质量 623 Da,

表 5 缢蛭蛋白肽的分子质量分布

Table 5 The molecular weight of bioactive peptides

分子质量范围 Molecular weight (Da)	平均肽链长度 Average length of peptide	含量百分比 Ratio of molecular weight (%)
2 000~1 500	16.6~12.5	19.29
1 500~1 000	12.5~8.3	16.20
1 000~500	8.3~4.2	28.33
<500	4.2 以下	36.18

4号峰分子质量137 Da。根据峰面积可以计算出蛋白肽链不同分子质量的含量比重,取氨基酸残基的平均分子量为120,则肽链的平均长度为分子量/120(范远景等 2007),结果如表5所示。

可见,缢蛭蛋白肽的分子质量主要分布于1500 Da以下,为平均肽链长度12.5以下的小分子肽,该部分肽占总水解物的80.71%。

3 结论

在底物蛋白浓度相同的情况下,通过研究蛋白酶的各自水解进程发现,不同种类蛋白酶产生的蛋白肽对羟自由基清除能力差别较大,活性肽对羟自由基清除能力取决于使用的水解酶种类。研究结果还显示,碱性蛋白酶产生的蛋白肽在清除羟自由基方面明显强于其他种类蛋白酶。

通过单因素试验和响应面分析,优化了碱性蛋白酶水解缢蛭蛋白的工艺条件,在缢蛭蛋白浓度6 mg/ml、碱性蛋白酶添加量3%、pH 8.0、温度55℃的最优条件下水解4 h后制备得到缢蛭蛋白肽,其羟自由基清除率为76.60%, IC_{50} 值为1.89 mg/ml,具有较好的羟自由基清除能力。

缢蛭蛋白肽分子质量分布测定结果表明,具有清除羟自由基能力活性肽中分子质量在1500 Da以下的小分子肽占80%以上。该蛋白肽的进一步分离纯化和结构组成等有待今后继续研究。

参 考 文 献

- 王文生,张付云,夏嵩,李伟. 2010. 不同降解工艺对缢蛭肉降解物活性的影响. 西北农业学报, 19(6):197~200
- 王钦德,杨坚. 2002. 食品实验设计与统计分析. 北京:中国农业大学出版社,423~425
- 齐钟彦,马绣同,王祯瑞. 1989. 黄渤海的软体动物. 北京:农业科学出版社,212
- 孙萍萍,王颖,孙剑锋,牟建楼. 2010. 响应面法对缢蛭粗多糖提取工艺的优化. 水产科学, 29(4):203~207
- 林文东. 2011. 缢蛭水提物的体外抗氧化活性研究. 亚太传统医药, 7(1):25~26
- 陈申如,张其标,倪辉. 2004. 酸法提取鲢鱼鱼肉蛋白质技术的研究. 海洋水产研究, 25(5):61~64
- 陈美珍,张永雨,余杰,谢雄彬. 2004. 龙须菜藻胆蛋白的分离及其清除自由基作用的初步研究. 食品科学, 25(3):159~162
- 张永娟,吕学军,张大勇. 2011. 缢蛭水解物的抗疲劳作用. 中国生化药物杂志, 32(2):133~136
- 张龙翔,张庭芳,李令媛. 1981. 生化实验方法和技术. 北京:高等教育出版社,124~132
- 范远景,姬莹莹,张焱. 2007. 大豆蛋白酶解肽的分子量分布及抑制ACE活性关系研究. 食品科学, 28(10):57~61
- 赵艳景,裴波,胡虹,王颖. 2010. 缢蛭YC-2蛋白的提取及抗氧化作用研究. 海洋科学, 34(6):34~38,49
- Andrews, A. T. 1986. Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications. 2nd Clarendon, Oxford, 53~75
- Je, J. Y., Qian, Z. J., and Byun, H. G. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry, 42(5):840~846
- Yu, H. H., Liu, X. G., and Xing, R. E. *et al.* 2006. In vitro determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish *Rhopilema esculentum*. Food Chem. 95(1):123~130