

虾蛄肉酶法制备抗氧化肽的工艺优化和活性研究*

李云涛 陈博 马剑茵

(浙江海洋学院 食品与药学院 舟山 316004)

提要 以虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)肉为研究的对象,用胰蛋白酶水解得到抗氧化肽,以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率为指标,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验和三因素三水平的响应面分析法,对酶解工艺进行分析优化。结果表明最佳的酶解工艺条件为:温度 51.1°C, pH7.07, 加酶量 1500U/g, 料液比 1:3.09, 酶解时间 2h, DPPH 自由基清除率 47.3466%, 理论值与预测值相差很小,说明该方法可行。在此条件下测得羟基自由基的清除率为 88.9%, 超氧阴离子清除率为 29.13%, 还原力 A_{700} 为 0.243, 表明虾蛄肉酶解多肽有较强的抗氧化性,可以进一步分离纯化从中提取抗氧化肽。

关键词 虾蛄(*Oratosquilla oratoria*); 多肽; 酶解; 抗氧化活性

中图分类号 TQ464.7 doi: 10.11693/hyhz20121219001

将蛋白质通过酶解制备成生物活性肽是目前食品、药品科学界的研究热点,许多研究资料显示,多肽有很强的抗氧化活性及抗菌、免疫调节、抑制胰岛细胞凋亡、改善胰岛素抵抗、抗高血压、降血脂、诱导肿瘤细胞凋亡或分化、抗血管生成等作用(王导等, 2011; 王静凤等, 2007),多肽对许多疾病的发生、发展和临床治疗有重要意义。抗氧化肽是一种重要的多肽,它具有清除人体内多余自由基,减轻机体所受损伤,抗衰老、抗肿瘤、解毒等作用(Je 等, 2005)。国内外的科学工作者以海洋生物蛋白为原料,通过酶解法制备抗氧化肽多有报道,如李志英等(2012)用木瓜蛋白酶水解虎纹海参(*Holothuriapervicax*),在加酶量 12.0%, 水解 2h, 温度 55°C, pH8.0 时得到的酶解液有很好的抗氧化作用。Kim 等(2001)用链霉菌蛋白酶 E 水解阿拉斯加鳕鱼(*Theragra chalcogramme*)得到的多肽在亚油酸体系中有很高的抗氧化活性,可开发成一种天然的抗氧化剂。Qian 等(2008)分别用多种酶水解牛蛙(*Ranacatesbeiana*)皮蛋白,从中提取并分离纯化得到多肽,有很高的抗氧化活性。Binsan 等(2008)从白虾(*Litopenaeus vannamei*)头胸部提取出了抗氧化肽等。

虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、口足目(Stomatopoda)、虾

蛄科(Squillidae)、口虾蛄属(*Oratosquilla*),俗称“螳螂虾”、“琵琶虾”、“虾爬子”等,产量大,分布广,绝大多数种类生活于热带和亚热带,在中国南海已发现 80 余种。目前对虾蛄的药用研究主要集中在甲壳素和乙醇提取物抗肿瘤方面(顾帝水等, 2004; 杨丹等, 2006),而对虾蛄肉酶解多肽的研究尚未见报道。

本研究以虾蛄肉为原料,用胰蛋白酶酶解制备抗氧化肽。并综合运用正交试验和响应面法分析优化虾蛄肉抗氧化肽的酶解条件,既可以让数据点分布均匀合理,又可以分析各项的显著性和影响因素之间的交互作用,使分析结果更可靠,更有说服力,从而为虾蛄肉抗氧化肽的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

材料:新鲜虾蛄采集自浙江舟山近海海域,去壳、头部、背部,洗净用匀浆机搅碎为肉糜。

试剂:胰蛋白酶,邻二氮菲,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH);其它试剂均为分析纯。

仪器设备:85-2 恒温磁力搅拌器; ZD-420 不锈钢新型电热恒温水槽; FE20 实验室 pH 计; BSA323S 电子天平; JJ-2 组织捣碎机; CF16RXII 高速冷冻离心机;

* 浙江省重点科技创新团队建设项目, 2012R10029-10 号; 李云涛, 硕士研究生, Email: phalyt@163.com

通讯作者: 马剑茵, 教授, E-mail: chymjy@zjou.edu.cn

收稿日期: 2012-12-19, 收修改稿日期: 2013-05-21

FD-1000 冷冻干燥机; UV1100 紫外分光光度计。

1.2 试验方法

1.2.1 虾蛄肉蛋白酶解多肽的制备工艺 精密称取虾蛄肉糜, 调 pH 值, 在水浴保温条件下加入一定量的蛋白酶酶解, 酶解到设定时间时将酶解液在 100°C 水浴中灭活 15min, 4000r/min 离心 20min, 取上清液冷冻干燥得到虾蛄肉蛋白酶解物, 取定量配制成 5mg/ml 的水解液样品, 备用。

1.2.2 抗氧化能力的测定方法 DPPH 自由基清除活性的测定是根据 Bersuder 等(1998)描述的方法稍作修改。取 1.5ml 样品与 1.5ml 含 0.02%DPPH 的 99.5%乙醇溶液混合, 振荡, 在暗室室温下放置 30min, 然后在波长 517nm 处测吸光值。DPPH 自由基清除率(R_1)按公式(1)计算, 其中, 空白调零: 1.5ml99.5%乙醇+1.5ml 蒸馏水, A_c : 1.5ml 含 0.02%DPPH 的 99.5%乙醇溶液+1.5ml99.5%乙醇, A_j : 1.5ml 样品+1.5ml99.5%乙醇, A_i : 1.5ml 样品+1.5ml 含 0.02%DPPH 的 99.5%乙醇溶液。

$$R_1 = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\% \quad (1)$$

清除羟自由基能力的测定方法参考 Elmastasa 等(2006)和金铭等(1996)的工作。取 0.75mmol/L 的邻二氮菲 2.0ml 于试管中, 依次加入 2ml 磷酸盐缓冲液(pH7.4)和 2ml 蒸馏水, 充分混匀后, 加入 0.75mmol/L 的硫酸亚铁溶液 2ml, 混匀, 加入 1ml 1.0%的 H_2O_2 , 37°C 水浴 6min, 测定波长 536nm 处的吸光度 A_p ; 用 1ml 蒸馏水代替 1ml H_2O_2 , 测得吸光度 A_b ; 用样品代替 1ml 的蒸馏水, 测得吸光度 A_s 。羟自由基清除率(R_2)按公式(2)计算。

$$R_2 = [(A_s - A_p) / (A_b - A_p)] \times 100\% \quad (2)$$

还原力的测定参考 Shon 等(2004)的方法。2ml 酶解液样品加入到 2ml 的 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.6)和 2ml 的 1%铁氰化钾溶液的混合液中。混合物 50°C 水浴 20min, 在反应混合物中加入 2ml 的 10%的 TCA(三氯乙酸), 混合后以 3000r/min 离心 10min, 取上清 2ml, 加入 2ml 蒸馏水和 0.4ml 的 0.1% $FeCl_3$ 充分混匀反应, 10min 后测定其在 700nm 处的吸光值, 值越大说明还原力越强。

超氧阴离子清除参考许申鸿等(2001)的工作。对照组: 4.5ml 150mmol/L 的 Tris-HCl+4.2ml 蒸馏水混匀, 于 25°C 恒温 20min, 再加入预热过的 3mmol/L 邻三苯酚 0.3ml, 迅速摇匀, 立即倒入比色皿中, 在波长 325nm 处每 30s 测定一次吸光度值 A_0 , 测 4min, 以时间为横坐标, A_0 为纵坐标进行线性回归分析, 得到的

直线斜率为反应速率 ΔA_0 。

样品组: 4.5ml 50mmol/L Tris-HCl+3.2ml 蒸馏水+1ml 样品混匀, 于 25°C 恒温 20min, 再加入预热过的 3mmol/L 邻三苯酚 0.3ml, 同上操作测定加样后的自氧化速率 ΔA_1 。

空白调零: 用 9ml 10mmol/L 的 HCl 调零。

清除超氧阴离子能力用 R_3 表示, 由公式(3)计算得到。

$$R_3 = (\Delta A_0 - \Delta A_1) / \Delta A_0 \times 100\% \quad (3)$$

1.2.3 抗氧化肽的组成成分分析方法 水分含量按照 GB/T5009.3-2003 测定, 灰分含量按照 GB/T5009.4-2003 测定, 采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白质含量, 脂肪含量按照 GB/T5009.6-2003 测定。

1.3 实验设计

1.3.1 正交试验 在初步确定酶解工艺的基础上, 选择料液比(A)、pH 值(B)、加酶量(C)、温度(T)、酶解时间(D)等因素设计 $L_{16}(4^5)$ 正交表, 优化以确定最佳工艺。选取因素和水平排列见表 1, 正交实验及结果见表 3。

表 1 因素和水平表

Tab.1 Design of factors and levels in the experiments

水平	A	B	C(u/g)	T(°C)	D(h)
1	1:1	7.0	500	35	2
2	1:2	7.5	1000	40	4
3	1:3	8.0	1500	45	6
4	1:4	8.5	2000	50	8

1.3.2 响应面设计 在正交试验的基础上, 按照 Box-Behnken(操龙飞等, 2012)中心组合实验设计原理, 以 pH 值、温度、酶量为自变量, 以 R_1 为响应值, 每一个自变量的高、中、低水平分别由 1、0、-1 编码表示, 设计见表 2。

表 2 虾蛄肉酶解响应面实验因素水平表

Tab.2 Coded variables and their coded levels in response surface analysis

水平	B	A	T
-1	6.50	1:2	35
0	7.00	1:3	45
1	7.50	1:4	55

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

由表 3 可知, 5 个因素的极差大小顺序为: $B > T$

$>A>C>D$, 即 pH 值的影响最大, 其次是温度和料液比, 影响最小的是时间。对于每一个因素来说, $T_i(i=1, 2, 3, 4)$ 是指该因素在表 1 所示的 i 水平条件下得到的 R_1 值的均值, 根据极差和均值可得出最优组合是: 料液比 1:4, pH 值 7.0, 加酶量 1500u/g, 温度 50°C, 时间 2h。

表 3 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计与结果
Tab.3 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design and results

实验号	A	B	C(u/g)	T(°C)	D(h)	$R_1(\%)$
1	1:1	7.0	500	35	2	32.0
2	1:1	7.5	1000	40	4	28.1
3	1:1	8.0	1500	45	6	27.0
4	1:1	8.5	2000	50	8	30.9
5	1:2	7.0	1000	45	8	27.6
6	1:2	7.5	500	50	6	24.6
7	1:2	8.0	2000	35	4	23.1
8	1:2	8.5	1500	40	2	25.8
9	1:3	7.0	1500	50	4	47.5
10	1:3	7.5	2000	45	2	35.2
11	1:3	8.0	500	40	8	26.7
12	1:3	8.5	1000	35	6	20.9
13	1:3	7.0	2000	40	6	35.7
14	1:4	7.5	1500	35	8	23.8
15	1:4	8.0	1000	50	2	32.5
16	1:4	8.5	500	45	4	19.3
均值(T1)	29.500	35.700	25.650	24.950	31.375	
均值(T2)	25.275	27.925	27.275	29.075	29.500	
均值(T3)	32.575	27.325	31.225	27.275	27.050	
均值(T4)	27.825	24.225	31.025	33.875	27.250	
极差	7.300	11.475	5.575	8.925	4.325	

利用 SPSS 软件对各因素进行回归分析, 结果见表 4 和表 5, 采用逐步回归的方法, 模型经方差分析检验得到: $F=7.010$, $P=0.006$, 在 $\alpha=0.05$ 水平时, 可认为实验结果和料液比、pH 值和温度之间存在线性关系, 则回归方程为 $Y=26.187-3.503A+2.498B+2.048T$ 。回归系数经过 t 检验得到三个因素的 P 值分别为 0.006, 0.033, 0.072, 水平 $\alpha=0.10$ 时, 三个因素均有显著性意义。分析结果与极差分析结果一致。由于显著性因素较多, 所以需要通过响应面法进一步优化, 获得最佳酶解方案。

表 4 正交实验方差分析表
Tab.4 ANOVA analysis of orthogonal design results

模型	平方和	自由度	均方	F	P
回归	453.945	3	151.315	7.010	0.006
残差	259.024	12	21.585		
总计	712.969	15			

表 5 正交实验回归系数
Tab.5 Regression coefficients of orthogonal design

模型	非标准系数 β	标准误差	t	P
常量	26.187	4.646	5.637	0.000
A	-3.503	1.039	-3.371	0.006
B	2.498	1.039	2.404	0.033
T	2.048	1.039	1.971	0.072

2.2 响应面分析结果

经过正交实验结果分析, 得到料液比、pH 值和温度是显著性因素, 所以以这三个因素作为自变量, R_1 作为响应值, 具体的因素和水平表见表 2, 实验结果见表 6。

用 Design Expert 8.0.6 软件对表 6 中的实验数据进行多元回归拟合, 显著性检验和回归模型系数见表 7。回归模型的 $F=23.3$, 其 $P=0.0002$, 表明该模型

表 6 虾蛄肉酶解多肽提取响应面实验设计与结果
Tab.6 Experimental design and the results of responsesurface analysis

实验号	B	A	T	$R_1(\%)$
1	-1	-1	0	28.09
2	1	-1	0	35.89
3	-1	1	0	30.04
4	1	1	0	32.98
5	-1	0	-1	19.4
6	1	0	-1	21.3
7	-1	0	1	36.8
8	1	0	1	41.08
9	0	-1	-1	23.4
10	0	1	-1	29.54
11	0	-1	1	38.01
12	0	1	1	42.6
13	0	0	0	45.36
14	0	0	0	44.87
15	0	0	0	42.05
16	0	0	0	45.00
17	0	0	0	46.12

表 7 响应面法方差分析(ANOVA)的分析结果

Tab. 7 The analysis of variance of the constructed regression model

分析对象	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	1215.72	9	135.08	23.30	0.0002	*
B	35.57	1	35.57	6.14	0.0424	*
A	12.18	1	12.18	2.10	0.1905	
T	526.50	1	526.50	90.83	0.0001	**
BA	5.90	1	5.90	0.48	0.5101	
BT	1.36	1	1.36	0.23	0.6432	
AT	0.68	1	0.68	0.12	0.7419	
B ²	292.16	1	292.16	50.40	0.0002	**
A ²	89.09	1	89.09	15.37	0.0057	*
T ²	190.00	1	190.00	32.78	0.0070	*
失拟项	30.98	3	10.33	4.31	0.0961	不显著

注: * 差异显著(P<0.05); ** 差异极显著(P<0.01)

极为显著, 决定系数 $R^2=0.9677$, 表明回归模型与实际情况拟合性良好, 可以用于酶解工艺。模型中, T、T² 对 R₁ 的影响极为显著, pH 对 R₁ 的影响显著, 得到 pH 值、料液比、温度的二元回归模型方程为 $Y=44.6800+2.10875B+1.23375A+8.11250T-1.21500BA+0.58250BT-0.41250AT-8.33000B^2-4.60000A^2-6.71750T^2$ 。

利用软件分析各个因素的交互作用, 并根据回归分析的结果绘制相应的响应面和等高线图, 从图 1—图 3 中可以看出各个因素均有极值点, 对二元回归方程进行求导, 用软件优化分析得到最佳的条件为 B=7.070, A=1: 3.09, T=51.10°C, R₁=47.3466%, 经验证, 在响应面所得的最佳条件下得出的 R₁ 为 49.02%, 与预测结果相比相对误差为 3.53%, 与预测值基本相符, 可以作为最佳酶解条件。

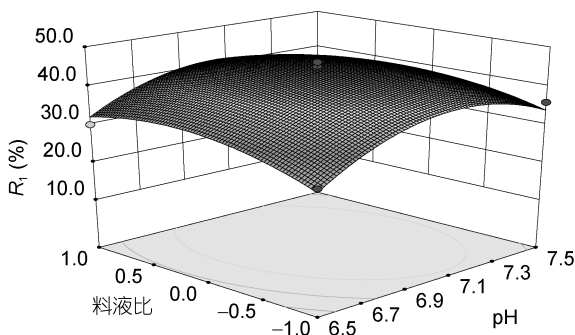


图 1 pH 和料液比对 R₁ 影响的响应面和等高线图
Fig.1 Response surface and contour plot for the effect of cross-interaction between pH and S : L on R₁

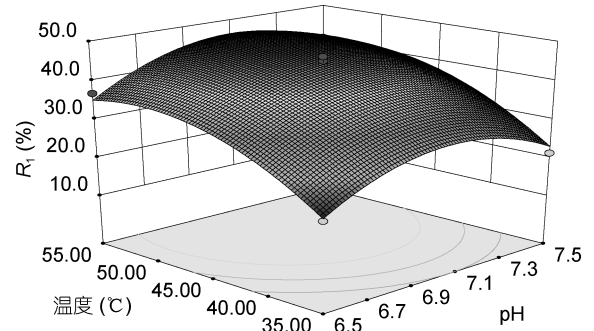


图 2 pH 和温度对 R₁ 影响的响应面和等高线图
Fig.2 Response surface and contour plot for the effect of cross-interaction between pH and temperature on R₁

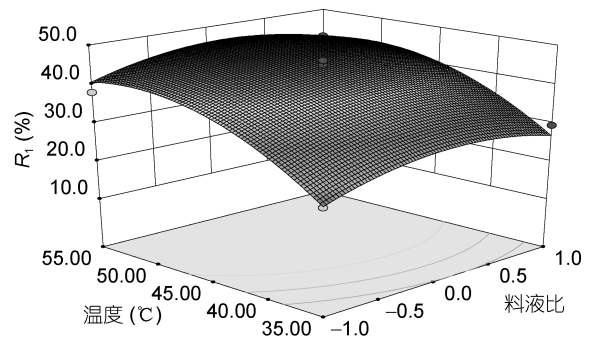


图 3 料液比和温度对 R₁ 影响的响应面和等高线图
Fig.3 Response surface and contour plot for the effect of cross-interaction between S : L and temperature on R₁

2.3 抗氧化肽的组成成分分析

按照 1.2.3 中多肽的成分分析方法, 测得虾蛄酶解多肽中水分、蛋白质、脂肪、灰分的含量见表 8。

表 8 原料成分含量分析
Tab.8 Analysis of the ingredient of raw material

原料	水分(%)	蛋白质(%)	脂肪(%)	灰分(%)	其他(%)
虾蛄酶解多肽	10.4	79.9	3.4	3.50	0.65

2.4 抗氧化实验结果

以 0.1mg/ml 维生素 C 作为阳性对照, R₁ 为 74.10%, R₂ 为 38.64%, R₃ 为 40.01%, 还原力为 A₇₀₀ 为 0.265, 样品超氧阴离子测定所得数据如图 4 和图 5 所示, ΔA₀ 为 0.5646, ΔA₁ 为 0.4001, R₃ 为 29.13%, R₂ 为 88.9%, 还原力 A₇₀₀ 为 0.243。

3 讨论与结论

整个实验采用 L₁₆(4⁵)正交试验和三因素三水平的响应面分析法(牛瑞等, 2011), 综合分析最佳酶解工艺。在正交实验中存在 3 个显著因素, 利用 Box-Behnken 设

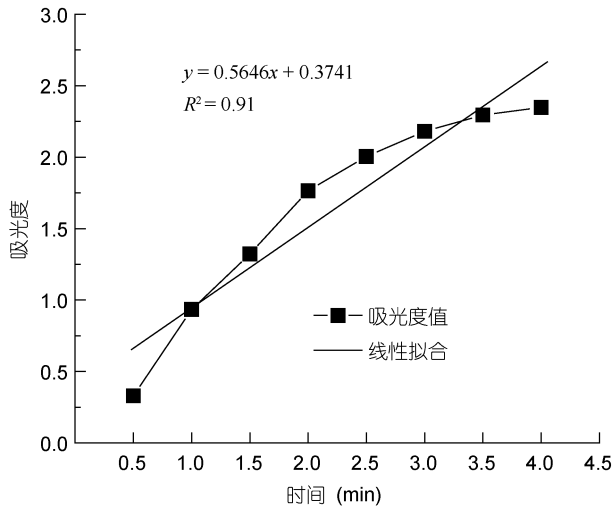


图4 对照组邻苯三酚自氧化速率

Fig.4 The control group rate of pyrogallol auto-oxidation

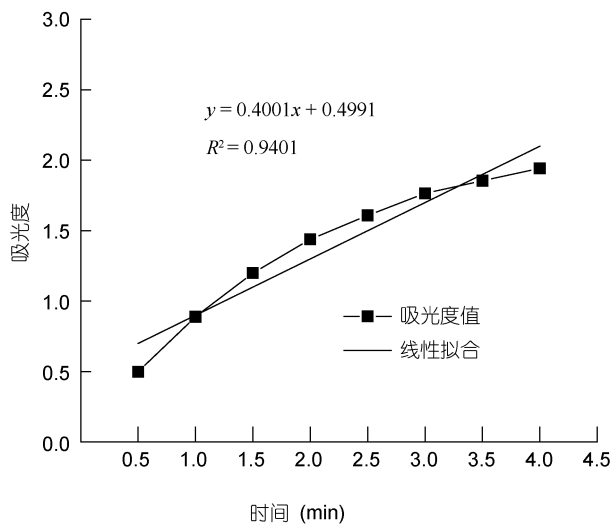


图5 样品组邻苯三酚自氧化速率

Fig.5 Sample group rate of pyrogallol auto-oxidation

计原理设计三因素三水平的响应面分析方案, 响应面法优化实验中建立的模型回归效果显著, 拟合性良好, 可以很好地预测实验结果, 最终优化的最佳酶解条件为: 料液比 1 : 3.09, pH 值 7.07, 加酶量 1500u/g, 温度 51.10°C, 时间 2h。预测 R_1 为 47.3466%, 经验证 R_1 为 49.02%, 与预测结果相比相对误差为 3.53 %, 说明该方法可行, 这可以为海洋生物提取抗氧化肽提供依据, 对海洋虾蛄类生物的深加工和开发功能性食品有重要的意义。

按照最佳条件提取得到的抗氧化肽粗品, 经抗氧化能力的测定, 得到 R_2 为 88.9%, R_3 为 29.13%, 还原力 A_{700} 为 0.243, 与维生素 C 阳性对照组相比, 表

明虾蛄肉酶解多肽的抗氧化性较强, 可以进一步对粗品进行分离纯化, 利用凝胶渗透色谱、反相高效液相和质谱等分析技术获得具有较强抗氧化能力的单一多肽。

参 考 文 献

- 王 导, 朱翠凤, 2011. 海洋生物活性肽的生理活性研究进展. 医学综述, 17(5): 661—662
- 王静凤, 王 奕, 崔凤霞, 2007. 鲑鱼皮胶原蛋白多肽对 B16 黑色素瘤细胞黑色素合成的影响. 国药理学通报, 23(9): 1181—1184
- 牛 瑞, 孙 谧, 于建生等, 2011. 扇贝裙边酶解制备抗氧化肽的实验研究. 中国水产科学, 18(1): 214—221
- 许申鸿, 杭 瑚, 李运平, 2001. 超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究及改进. 化学通报, 8: 516—519
- 李志英, 许喜林, 陈 健, 2012. 虎纹海参多肽酶解制备工艺及抗氧化性研究. 食品研究与开发, 33(6): 159—161
- 杨 丹, 何兰珍, 刘 毅, 2006. 从虾蛄壳制备甲壳素和壳聚糖的研究. 食品科学, 27(12): 437—438
- 金 鸣, 蔡亚欣, 李金荣等, 1996. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的羟自由基. 生物化学与生物物理进展, 23(6): 553—555
- 顾帝水, 孔 霞, 黄培春, 2004. 口虾蛄提取物对人鼻咽癌细胞基质金属蛋白酶-9 的抑制作用. 现代中西医结合杂志, 13(21): 2816—2818
- 操龙飞, 游华军, 陈子涵等, 2012. 响应面法优化罗非鱼排蛋白分段酶解工艺. 海洋与湖沼, 43(6): 29—32
- Bersuder P, Hole M, Smith G, 1998. Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. J Am Oil ChemSoc, 75(2): 181—187
- Binsan W, Benjakul S, Visessanguan W *et al*, 2008. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Food Chem, 106(1): 185—193
- Elmastasa M, Gulcin I, Isildak O *et al*, 2006. Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. Journal of the Iranian Chemical Society, 3(3): 258—266
- Je J Y, Park P J, Kim S K, 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Res Int, 38: 45—50
- Kim S K, Kim Y T, Byun H G *et al*, 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. J Agric Food Chem, 49(4): 1984—1989
- Qian Z J, Jung W K, Kim S K *et al*, 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. Bioresource Technol, 99(6): 1690—1698

Shon M Y, Choi S D, Kahng G G *et al*, 2004. Antimutagenic antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl

acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 659—666

OPTIMIZATION FOR PREPARATION OF ANTIOXIDANT PEPTIDE FROM ORATO-SQUILLA ORATORIA MEAT BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

LI Yun-Tao, CHEN Bo, MA Jian-Yin

(*Food and Pharmacy Department of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China*)

Abstract Polypeptide was extracted from *Oratosquilla oratoria* meat in trypsin hydrolysis technology. Indicated by the scavenging rate of DPPH scavenging, optimization of enzymatic hydrolysis was carried in an orthogonal experiment in dimension of $L_{16}(4^5)$ in response surface methodology. The result shows that the best conditions for the extraction were: temperature 51.1°C, pH 7.07, enzyme dosage 1500U/g, solid to liquid ratio of 1:3.09, lasting time 2h, and DPPH scavenging activity rate 47.35%. Difference between theoretical and predicted values is very small, indicating that the optimized conditions are reliable and feasible. Under these conditions, the scavenging rate of hydroxyl radical was 88.9%, that of superoxide anion radical was 29.13%, and the reducing power of A_{700} was 0.243. Therefore, polypeptide in *Oratosquilla oratoria* meat can be well sustained with a strong resistance against oxidation, and can be further purified for application.

Key words *Oratosquilla oratoria*; polypeptide; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity