

金乌贼(*Sepia esculenta*)蛋白抗氧化肽的 酶解制备及活性评价*

郁迪¹ 王玉梅¹ 王斌¹ 迟长凤² 马剑茵¹ 邓尚贵¹

(1. 浙江海洋学院食品与医药学院 浙江省海洋生物医用制品重点工程技术研究中心 舟山 316022;

2. 浙江海洋学院海洋科学与技术学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

摘要 采用木瓜蛋白酶水解金乌贼(*Sepia esculenta*)蛋白,利用超滤、凝胶色谱和反相高效液相色谱从金乌贼蛋白水解物中制备抗氧化肽,采用氨基酸序列分析仪和质谱(ESI-MS)确定抗氧化肽结构,采用自由基清除实验和脂质过氧化抑制实验对多肽抗氧化能力进行评价。结果表明,金乌贼蛋白经木瓜蛋白酶水解和分离纯化得到 1 个抗氧化肽(AEH-P3),经氨基酸序列分析和质谱(ESI-MS)确定其结构为 Ala-Pro-Pro-Glu-Asn-Gly-Met-Ala-Gln-Met (APPENGMAQM),分子量为 1045.22Da。体外抗氧化实验结果表明:AEH-P3 对 DPPH 自由基(EC₅₀ 4.01mg/mL)、羟自由基(EC₅₀ 4.66mg/mL)、ABTS 自由基 (EC₅₀ 3.44mg/mL) 和超氧阴离子自由基 (EC₅₀ 6.03mg/mL) 具有良好的清除作用,Ala-Pro-Pro-Glu-Asn-Gly-Met-Ala-Gln-Met (APPENGMAQM)亦显示出了良好的脂质过氧化抑制作用,可以用于抗氧化相关的功能食品、药物或者食品添加剂。

关键词 金乌贼;多肽;抗氧化活性

中图分类号 Q516

抗氧化剂是一类可以降低或者消除自由基对人体损害和保护食品免受氧化损伤变质的物质。目前,以丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)和特丁基对苯二酚(TBHQ)为代表的化学合成抗氧化剂由于价格相对便宜、抗氧化活性好,从而被广泛地应用到食品工业中。但是,已有的研究表明化学合成抗氧化剂对人体的肝脏、肾脏等器官有不同程度的损伤(Jun *et al.*, 2004; Giménez *et al.*, 2009; Bougatef *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012)。因此,化学合成抗氧化剂的应用受到了较大影响,部分国家已限量或禁止使用对人体有毒副作用的化学合成抗氧化剂(Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013)。因此,寻找安全有效的天然抗氧化剂替代化学合成抗氧化剂成为研究热点。

研究表明,以生物蛋白为原料,采用酶解技术得到的酶解物及其组成多肽也具有显著的抗氧化活性

(胡文婷等, 2006; 徐怀德等, 2008; 曾名湧等, 2008; 王斌等, 2010; 杨萍等, 2012; 王艳梅等, 2013)。如:酪蛋白酶解多肽 YFYPEL (Suetsuna *et al.*, 2000)、牡蛎蛋白酶解多肽 LKQELEDLLEKQE (Qian *et al.*, 2008) 和海藻蛋白酶解多肽 VECYGPNRPF (Sheih *et al.*, 2009)均具有良好的自由基清除作用;Wang 等(2012)和 Luo 等(2013)研究发现双髻鲨蛋白酶解多肽 WDR、PYFNK 和 LNK 不仅具有良好的清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由的作用,而且还可以很好地抑制脂质过氧化反应。本课题组前期研究发现,以金乌贼(*Sepia esculenta*)蛋白为原料,利用木瓜蛋白酶制备的酶解物(AEH)具有良好的抗氧化活性(徐银峰等, 2011)。基于此,课题组以金乌贼蛋白酶解物(AEH)为材料,通过超滤、凝胶色谱和反相高效液相色谱(RP-HPLC)从中制备高活性抗氧化肽,利用氨基

* 国家自然科学基金项目, 81001393 号; “十二五”国家科技支撑计划, 2012BAD29B06 号; 浙江省自然科学基金项目, Y2110636 号。郁迪, 实验师, E-mail: yujiixin1003@sina.com

通讯作者: 王斌, 博士, 副教授, E-mail: wangbin4159@hotmail.com

收稿日期: 2013-05-29, 收修改稿日期: 2013-09-05

酸序列分析仪和质谱确定多肽的结构,采用 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS 自由基和超氧阴离子自由基清除实验和脂质过氧化实验评价制备多肽的活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DPPH 和木瓜蛋白酶(酶活力 6000)为上海源聚生物科技有限公司进口分装;葡聚糖凝胶 G-25 为 Pharmacia 进口分装;乙睛、硫酸软骨素(CS)均为 Fluka 公司产品;其它试剂均为国产分析纯。

金乌贼于 2011 年 10 月购于舟山市南珍水产品市场,由浙江海洋学院赵盛龙教授鉴定为金乌贼(*Sepia esculenta*),标本存放于浙江海洋学院药学实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 金乌贼蛋白酶解物(AEH)的制备 金乌贼除杂、去骨、去内脏和切块后,按料液比 1:1 (g/mL)加入磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 0.02mol/L),高速组织捣碎机匀浆后调液比至 1:3(g/mL),用 0.1mol/L 的盐酸调溶液 pH 至 7.0,按照金乌贼湿重加入 1.0%的入木瓜蛋白酶,在 55℃下酶解 5h 后,于 90℃保温 15min 灭酶,4500r/min 离心 15min,取上清液,经减压浓缩、真空干燥,得 AEH,于-20℃冷冻保存。

1.2.2 AEH 的超滤分级 将 AEH 配成 25.0mg/mL 的溶液用截留分子量为 10kDa 和 3kDa 的超滤膜进行分级,按分子量大小分为 AEH- (MW>10kDa)、AEH- (3kDa<MW<10kDa)和 AEH- (MW<3kDa)三个组分,分别浓缩冷冻干燥后测定其抗氧化活性,选择 DPPH 自由基清除活性最高的组份进行下一步分离。

1.2.3 Sephadex G-25 凝胶层析 将 DPPH 自由基清除活性最大的超滤组分 AEH- 配成 10.0mg/mL 的溶液,取 3mL 加入到预先处理好的 Sephadex G-25 层析柱(2.0×80cm),用超纯水洗脱,流速为 1.0mL/min,自动部分收集器每 5min 收集一管,于 220nm 检测吸光度并绘制吸光度曲线,合并各洗脱峰并冷冻干燥,得组分 AEH- -1、AEH- -2、AEH- -3 和 AEH- -4。测定冻干后的各组分的 DPPH 自由基清除率,大量收集清除率最高的洗脱峰并浓缩冷冻干燥。

1.2.4 反相高效液相色谱 将 AEH- -3 配成 100.0 μg/mL 的溶液,利用反相高效液相色谱纯化,色谱条件:高效液相色谱仪:Agilent 1260;色谱柱为:Zorbax C18 (250mm×4.6mm, 5μm);柱温:25℃;流动相:30%乙睛(含 0.1%三氟乙酸);洗脱速度 1.0mL/min;检测波长 220nm。

1.2.5 多肽的氨基酸序列检测和分子量测定 多肽的氨基酸序列分析采用 N-端分析法,利用氨基酸测序仪进行测定。分子量采用 ESI-MS 进行测定。

1.2.6 抗氧化试验 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS 自由基和超氧阴离子自由基清除率实验参照文献(王斌等,2010)描述的方法进行,脂质过氧化实验按照文献描述的方法进行(Wang *et al*, 2012)。

2 结果与讨论

2.1 AEH 的超滤分级

用截留分子量为 10kDa 和 3kDa 的超滤膜对 AEH 进行分级,得 AEH- (MW>10kDa)、AEH- (3kDa<MW<10kDa)和 AEH- (MW<3kDa)三个组分。抗氧化活性如图 1 所示:AEH- 在 5mg/mL 和 10mg/mL 浓度下对 DPPH 自由基清除率要高于 AEH、AEH- 和 AEH- 。据文献报道(Pihlanto-Leppälä, 2001; Ranathunga *et al*, 2006),蛋白酶解物的抗氧化活性与其分子量大小密切相关,低分子量的酶解物或多肽更易于直接与自由基结合或透过血脑屏障发挥其生物功能。AEH- 在所测的 4 个样品中具有最低的分子量,说明该组分中含有抗氧化活性较强的多肽。

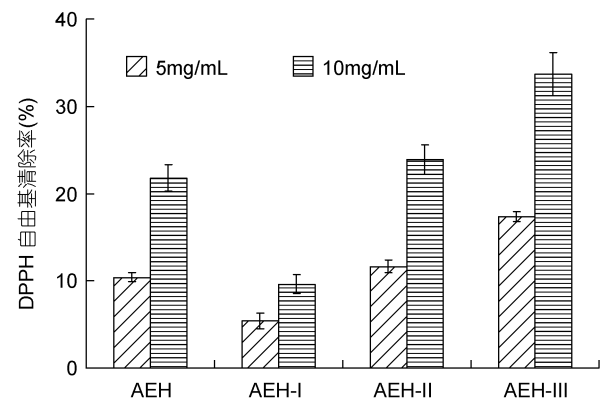


图 1 AEH 及其超滤分级组分的 DPPH 自由基清除活性
Fig.1 DPPH radical scavenging activity of AEH and its fractions by ultrafiltration

2.2 AEH- 的凝胶色谱分离纯化

如图 2 所示,AEH- 经过 Sephadex G-25 凝胶柱层析后获得 4 个组分 AEH- -1、AEH- -2、AEH- -3 和 AEH- -4。抗氧化活性显示(图 3):AEH- -3 活性最强,在 3.0mg/mL 和 5.0mg/mL 浓度下对 DPPH 自由基的清除率分别为 17.8%±1.07%和 21.4%±1.13%。

2.3 AEH- -3 的 RP-HPLC 分离纯化

如图 4 所示,AEH- -3 经 C18 RP-HPLC 分离纯

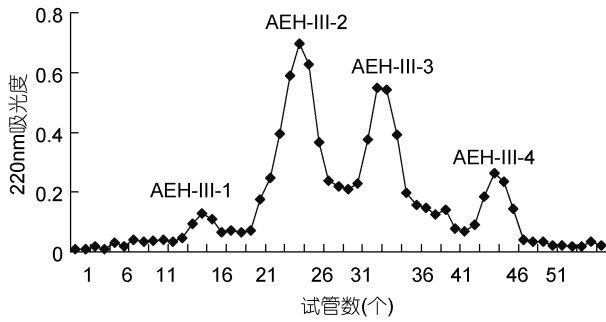


图2 AEH-III 的葡聚糖凝胶 G-25 柱层析曲线图

Fig.2 Gel filtration chromatography of AEH-III on a Sephadex-25 column

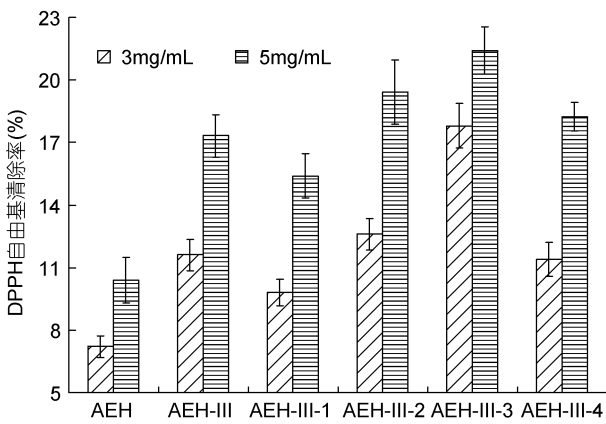


图3 AEH-III 及其凝胶过滤组分的 DPPH 自由基清除活性

Fig.3 DPPH radical scavenging activity of AEH-III and its fractions by gel filtration chromatography

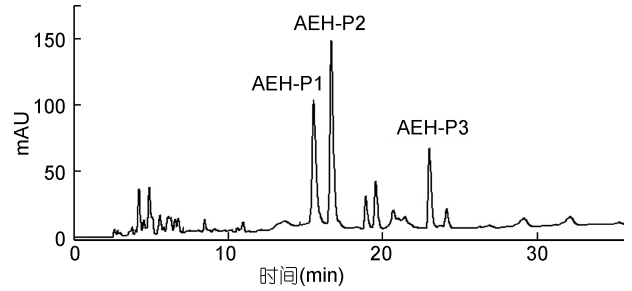


图4 AEH-III 的 C18 RP-HPLC 图

Fig.4 C18 RP-HPLC chromatogram of AEH-III

化, 获得三个量较大的组分 AEH-P1、AEH-P2 和 AEH-P3。AEH-P1、AEH-P2 和 AEH-P3 在 5.0mg/mL 浓度下对 DPPH 自由基清除率达到 43.21% ± 1.85%、53.09% ± 2.46% 和 60.38% ± 3.51%, 在所测的三个样品中, AEH-P3 的抗氧化活性最强。

2.4 AEH-P3 的氨基酸序列分析和分子量测定

AEH-P3 经高效液相检测基本为单一峰, 纯度达到序列分析要求。利用 Edman 降解法经蛋白质序列分析仪测定序列为 Ala-Pro-Pro-Glu-Asn-Gly-Met-Ala-Gln-Met (APPENGMAQM), ESI-MS 检测分子量为 1045.22Da ($[M+H]^+$ 为 1046.19Da) (图 5), 与理论分子量基本吻合。

2.5 AEH-P3 的抗氧化活性评价

2.5.1 AEH-P3 的自由基清除活性 以抗坏血酸 (Ascorbic Acid) 为对照组, 将 AEH-P3 配制成浓度为

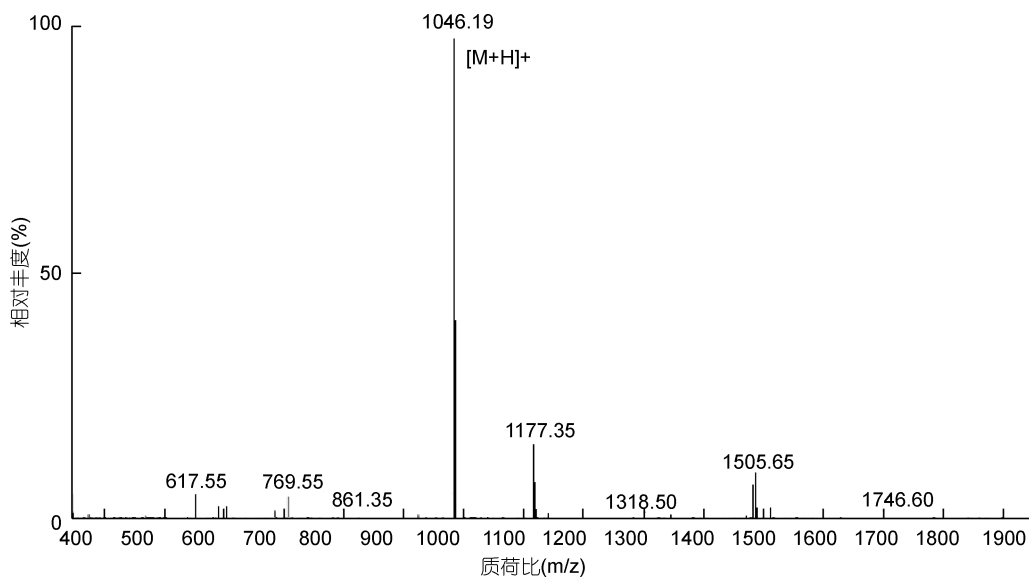


图5 AEH-P3 的质谱图

Fig.5 Mass spectrogram of AEH-P3

0.5、1.0、2.5、5.0 和 10.0mg/mL 浓度组, 分别测定其 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS 自由基、超氧阴离子自由基清除活性, 结果(图 6)表明: 随着浓度增加, AEH-P3 对 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS 自由基、超氧阴离子自由基的清除能力也随之增加, 具有一定的量效关系, EC_{50} 分别为 4.01、4.66、3.44 和 6.03mg/mL。但 AEH-P3 对自由基的清除能力低于同浓度的抗坏血酸(Ascorbic acid)。

2.5.2 AEH-P3 的抗脂质过氧化能力 以 BHT (2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)为阳性对照组, 将 AEH-P3

配制成浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0 和 10.0mg/mL 浓度组, 在 40℃下, 恒温培养箱中孵育 7 天, 每天记录其吸光度, 吸光值越高, 氧化程度越大, 抗脂质过氧化能力越弱; 反之, 吸光值越低, 氧化程度越低, 抗脂质过氧化能力越强。结果如图 7 所示: 空白组的吸光度最高, 表明该组氧化程度最高; 而 BHT 组吸光值最低, 表明该组氧化程度最低, 抗氧化的能力最强。活性肽 AEH-P3 的吸光值略高于 BHT, 但明显低于空白组, 说明 AEH-P3 亦具有较好的抗脂质过氧化能力。

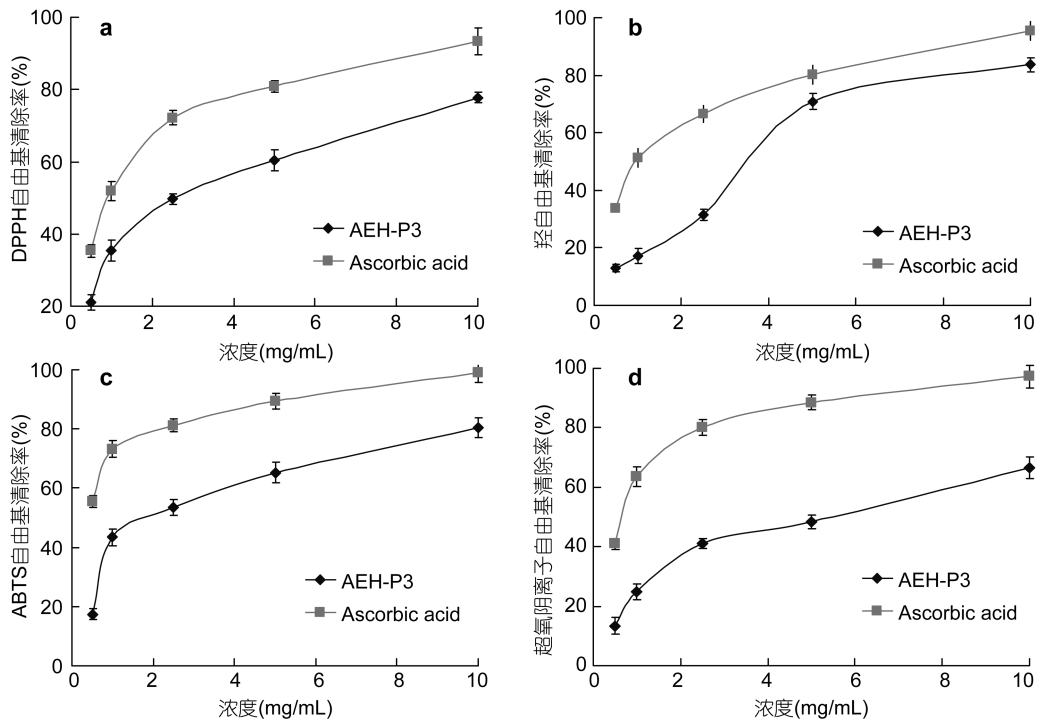


图 6 AEH-P3 的 DPPH 自由基(a)、羟自由基(b)、ABTS 自由基(c)、超氧阴离子自由基(d)的清除活性
Fig.6 DPPH radical (a), hydroxyl radical (b), ABTS radical (c) and superoxide radical (d) scavenging activities of AEH-P3

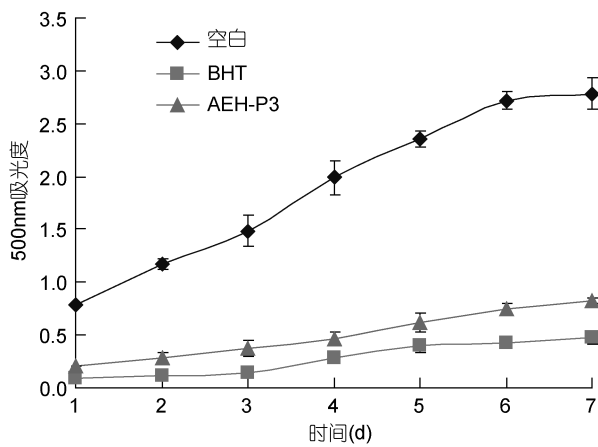


图 7 AEH-P3 的脂质过氧化抑制试验
Fig.7 Lipid peroxidation inhibition of AEH-P3

3 结论

已有的研究表明, 多肽的活性受到分子量大小和氨基酸组成的影响(Mendis *et al*, 2005; Guo *et al*, 2009)。本实验中, AEH-P3 显示了良好的自由基清除活性和抗脂质过氧化作用, 该结果与 Saito 等(2003)报道相一致, 即 2—10 肽较其蛋白、多聚肽和单个氨基酸具有更强的生物活性。另外, Guo 等(2009)研究表明多肽序列中含有 Tyr、Trp、His 和(或)Pro 会具有更强的活性; Marcuse(1962)报道 Tyr、Met、His、Lys、Gly 和 Trp 有助于多肽的抗氧化活性; Kawashima 等(1979)研究表明多肽中含有芳香族氨基酸如 Tyr、Pro 和 His 会促进其活性。因此, AEH-P3 抗氧化活性与其

序列中含有 Pro、Gly 和 Met 关系密切。另外, AEH-P3 的抗氧化活性低于阳性对照抗坏血酸(Ascorbic acid)和 BHT, 但是 AEH-P3 来源于食源蛋白, 其安全性要显著高于化学合成抗氧化剂, 可以通过增加剂量的方式来弥补抗氧化能力的不足。

本实验利用超滤、凝胶色谱和反相高效液相色谱(RP-HPLC)从金乌贼蛋白酶解物中制备了抗氧化活性显著的多肽 Ala-Pro-Pro-Glu-Asn-Gly-Met-Ala-Gln-Met (APPENGMAQM), 该研究结果对金乌贼以及头足类海洋生物蛋白的开发利用具有借鉴的意义; 同时, 制备的多肽抗氧化活性显著, 可以用于抗氧化相关的功能食品、药物或者食品添加剂。

参 考 文 献

- 王 斌, 于春光, 罗红宇等, 2010. 赤鲱鱼肉蛋白酶解产物的制备及抗氧化活性研究. 中国食品学报, 10(4): 113—118
- 王艳梅, 万 全, 赖年悦等, 2013. 黄缘盒龟肉的酶解工艺优化及其体外抗氧化活性研究. 水产学报, 37(4): 622—630
- 杨 萍, 柯虹乔, 章超桦等, 2012. 大眼金枪鱼头蛋白酶解物 1ku 超滤组分的抗氧化活性及其理化性质. 水产学报, 36(8): 1297—1303
- 胡文婷, 孙 谧, 王跃军, 2006. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)中抗氧化肽的分离纯化及性质研究. 海洋与湖沼, 37(1): 14—19
- 徐怀德, 殷金莲, 冯 丽等, 2008. 甲鱼蛋白酶解产物体外 ACE 抑制和抗氧化活性研究. 中国食品学报, 8(2): 58—64
- 徐银峰, 王 斌, 冯 刚等, 2011. 酶解制备金乌贼抗氧化产物的工艺优化及营养评价. 食品科学, 32(12): 68—72
- 曾名湧, 郭 瑶, 刘尊英等, 2008. 尼罗罗非鱼鱼皮胶原蛋白中游离基清除肽的制备及其抗氧化活性. 水产学报, 32(1): 117—124
- Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Manni L *et al*, 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. Food Chemistry, 118(3): 559—565
- Gim é nez B, Alem á n A, Montero P *et al*, 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. Food Chemistry, 114(3): 976—983
- Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M, 2009. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. Food Chemistry, 113: 238—245
- Jun S Y, Park P J, Jung W K *et al*, 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. European Food Research and Technology, 219(1): 20—26
- Kawashima K, Itoh H, Miyoshi M *et al*, 1979. Antioxidant properties of branched chain amino acid derivatives. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 27: 1912—1916
- Li Z, Wang B, Chi C *et al*, 2013. Purification and characterization of an antioxidant glycoprotein from the hydrolysate of *Mustelus griseus*. International Journal of Biological Macromolecules, 52: 267—274
- Luo H Y, Wang B, Li Z R *et al*, 2013. Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle protein. LWT-Food Science and Technology, 51(1): 281—288
- Marcuse R, 1962. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. Journal of the American Oil Chemists' Society, 39(2): 97—103
- Mendis E, Rajapakse N, Byun H G *et al*, 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects. Life Sciences, 77(17): 2166—2178
- Pihlanto-Leppälä A, 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. Trends in Food Science & Technology, 11(9—10): 347—356
- Qian Z J, Jung W K, Byun H G *et al*, 2008. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. Bioresource Technology, 99(9): 3365—3371
- Ranathunga S, Rajapakse N, Kim S K, 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). European Food Research and Technology, 222(3/4): 310—315
- Saito K, Jin D H, Ogawa T *et al*, 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 3668—3674
- Sheih I C, Wu T K, Fang T J, 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Bioresource Technology, 100(13): 3419—3425
- Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H, 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. The Journal of Nutritional Biochemistry, 11(3): 128—131
- Wang B, Li L, Chi C F *et al*, 2013. Purification and characterization of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. Food Chemistry, 138(2/3): 1713—1719
- Wang B, Li Z R, Chi C F *et al*, 2012. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. Peptides, 36(2): 240—250

PREPARATION AND EVALUATION OF AN ANTIOXIDANT PEPTIDE FROM PROTEIN HYDROLYSATE OF *SEPIA ESCULENTA*

YU Di¹, WANG Yu-Mei¹, WANG Bin¹, CHI Chang-Feng², MA Jian-Yin¹, DENG Shang-Gui¹

(1. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316022; 2. School of Marine Science and Technology, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316022)

Abstract In this text, protein hydrolysate (AEH) of *Sepia esculenta* was prepared by using papain, and a novel antioxidant peptide (AEH-P3) was isolated from AEH by using ultrafiltration, gel filtration chromatography and reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The amino acid sequence of AEH-P3 was identified as Ala-Pro-Pro-Glu-Asn-Gly-Met-Ala-Gln-Met (APPENGMAQM) with molecular weight of 1045.22Da. AEH-P3 exhibited good scavenging activity on DPPH radical, hydroxyl radical, ABTS radical and superoxide anion radical with EC₅₀ of 4.01, 4.66, 3.44 and 6.03mg/mL, respectively. AEH-P3 was also effectively against lipid peroxidation in a linoleic acid model system. These results suggested that AEH-P3 could be used as natural antioxidant in enhancing antioxidant properties of functional foods and in preventing oxidation reactions in food processing.

Key words *Sepia esculenta*; peptides; antioxidant activity