

胰蛋白酶制备乌贼缠卵腺抗氧化活性多肽的研究

周颢, 叶捷娜, 张林佳, 黄芳芳, 杨最素*

(浙江海洋大学食品与药学院, 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江舟山 316022)

摘要 [目的] 探讨胰蛋白酶制备乌贼缠卵腺抗氧化活性多肽的工艺及体外抗氧化活性。[方法] 以乌贼缠卵腺为原料, 用胰蛋白酶进行酶解, 采用单因素和正交试验优化乌贼缠卵腺抗氧化活性肽的提取工艺; 将酶解液超滤分成 4 个分子段, 通过体外检测 DPPH 清除率、·OH 清除率和还原力评价其抗氧化活性。[结果] 胰蛋白酶酶解乌贼缠卵腺在加酶量 2 000 U/g、pH 为 8.5、料液比 1:3、酶解时间 8 h 条件下得到的酶解物对 DPPH 的清除率最大。酶解液经超滤得到的 <3 kD 分子段的多肽具有良好的 DPPH 清除能力、·OH 清除能力和还原能力。[结论] 胰蛋白酶酶解制备的乌贼缠卵腺多肽具有较好的体外抗氧化活性, 可作为抗氧化肽的理想来源。

关键词 乌贼缠卵腺; 多肽; 胰蛋白酶; 酶解; 抗氧化活性

中图分类号 TS 254.9 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)16-0183-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.16.049



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Preparation of Antioxidant Activity Polypeptide from Cuttlefish Ovary Gland by Trypsin

ZHOU Xie, YE Jie-na, ZHANG Lin-jia et al (Zhejiang Engineering Research Center for Marine Biomedical Products, School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022)

Abstract [Objective] To explore the conditions for the preparation of antioxidant peptides from the nidamental glands of cuttlefish by trypsin and study the antioxidant activities of the enzymatic hydrolysates *in vitro*. [Method] The nidamental glands of cuttlefish were used as raw materials and hydrolyzed by trypsin. Single-factor and orthogonal tests were used to optimize the extraction process for anti-oxidant peptides from the nidamental glands of cuttlefish. The enzyme hydrolysate was ultrafiltered into 4 molecular segments, and its antioxidant activity was evaluated by *in vitro* detection of DPPH clearance rate, ·OH clearance rate and reducing power. [Result] The optimized conditions were as follows: volume of enzyme of 2 000 U/g, pH of 8.5, solid-liquid ratio of 1:3 and hydrolysis time of 8 h. Peptides with a Mw of less than 3 kD exhibited appreciable antioxidant activities, including DPPH scavenging, ·OH scavenging and reducing activities. [Conclusion] The peptides from the nidamental glands of cuttlefish by trypsin had excellent antioxidant activities *in vitro* and could be an ideal source of antioxidant peptides.

Key words Nidamental gland of cuttlefish; Peptides; Trypsin; Enzymatic hydrolysis; Antioxidant activity

人体内自由基的生成和清除一般处于动态平衡状态, 过多的自由基会干扰这种平衡, 从而产生氧化应激反应并引起炎症、糖尿病等疾病^[1]。化学合成的抗氧化剂已普遍应用于生物医学产品、日用化妆品和食品等行业^[2]。然而化学合成的抗氧化剂对人体健康有潜在的毒性, 因此, 开发安全有效的天然抗氧化剂已引起人们的广泛关注^[3]。近年来, 越来越多动植物来源的多肽已被证实具有清除自由基的能力^[4], 这为开发新型抗氧化剂提供了新的思路。研究表明, 通过酶解大分子蛋白得到的抗氧化肽通常具有抗氧化活性强、生物安全性等优势^[5]。海洋蛋白是制备抗氧化活性肽的高质量原料。鲍鱼内脏、鲤鱼鱼鳞等海洋生物蛋白已被报道用于制备具有良好抗氧化活性的多肽^[6-7]。

乌贼肉质细腻脆口、营养丰富, 且具有很高的医用价值, 备受消费者青睐。但在乌贼加工的过程中, 会产生乌贼内脏、乌贼皮、乌贼墨和乌贼骨等大量副产物, 近年来研究发现从这些副产物中可以提取大量的具有抗氧化、抗炎等活性的产物^[8]。乌贼缠卵腺作为乌贼加工的副产物之一, 已被报道用于制备具有抗疲劳、提高免疫功能的生物活性物质^[9]。乌贼缠卵腺的舍弃是对蛋白质资源的一种极大耗损。该研究通过单因素和正交试验优化胰蛋白酶酶解乌贼缠卵腺制备

抗氧化肽的工艺, 并通过测定 DPPH 清除率、·OH 清除率以及还原力探究不同分子量酶解产物的抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 试验材料 新鲜雌乌贼内脏, 购自舟山农贸市场。胰蛋白酶(酶活 250 U/g), 购自北京亚太恒信生物科技有限公司; DPPH、铁氰化钾、邻二氮菲, 购自上海晶纯试剂有限公司; 其他常用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备 HWS-24 数显恒温水浴锅(山东城创新仪器有限公司); Cogent u Scale 超滤系统(美国密理博公司); pH S-250 pH 计(上海理达仪器厂); UV-1600PC 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); CF16RN 高速冷冻离心机(日立仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 乌贼缠卵腺抗氧化活性肽制备工艺。 取乌贼缠卵腺, 去除周围其他组织, 捣碎成匀浆液→调料液比→调 pH→胰蛋白酶酶解(37 ℃)→灭酶活(沸水浴 10 min)→离心(12 000 r/min, 15 min)→取上清液→冷冻干燥。

1.3.2 单因素试验。 该试验以加酶量(1 000、1 500、2 000 和 2 500 U/g)、pH(7.5、8.0、8.5 和 9.0)、料液比(1:1、1:2、1:3 和 1:4)和酶解时间(2、4、6 和 8 h)为影响因素进行单因素试验, 以游离氨基氮(ANN)含量为指标, 来确定胰蛋白酶酶解的条件范围。该试验除被考察的单因素外, 其他 3 因素均为相同的固定值(加酶量为 1 500 U/g、pH 为 8.0、料液比为 1:3、酶解时间为 8 h)。ANN 含量与水解度呈正相关。ANN 含量用甲醛电位滴定法测定^[10]。

基金项目 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2019R411021)。

作者简介 周颢(1995—), 女, 浙江嵊州人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋天然药物。*通信作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事海洋生物资源综合利用研究。

收稿日期 2021-02-03

1.3.3 正交试验优化乌贼缠卵腺抗氧化活性肽提取工艺。根据单因素试验结果,考虑到 pH、时间、加酶量、料液比 4 个因素,选取 $L_9(3^4)$ 正交试验记录表,以 DPPH 清除率评价酶解液的抗氧化活性。因素和水平见表 1。

表 1 正交试验因素和水平
Table 1 Factor and level of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A(加酶量 Enzyme volume//U/g)	B (pH)	C(料液比 Solid-liquid ratio)	D(酶解时间 Enzymatic hydrolysis time//h)
1	1 500	7.5	1:1	4
2	2 000	8.0	1:2	6
3	2 500	8.5	1:3	8

1.3.4 超滤截留。取冷冻干燥的乌贼缠卵腺酶解液,用超滤系统进行超滤分段,得到 4 个不同分子段的提取液,分别为 < 3 kD、3~10 kD、>10~30 kD、>30 kD。将各分子段的超滤液进行冷冻干燥,测定其体外抗氧化活性。

1.3.5 体外抗氧化能力的测定。DPPH 清除率^[11]、·OH 清除率^[12]、还原力^[13]的检测参照文献进行并适当改进。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 加酶量对乌贼缠卵腺酶解物的 ANN 含量的影响。从图 1 可以看出,随着胰蛋白酶添加量的持续增加,酶解物的 ANN 含量先上升后下降。在加酶量为 2 000 U/g 时,ANN 含量到达最高值。当加入少量胰蛋白酶时,底物会和胰蛋白酶充分结合,加酶量越大,底物水解越充分。但当胰蛋白酶超过一定量后,过多的酶分子会抑制中间产物转化成终产物^[10]。因此选择加酶量 1 500、2 000、2 500 U/g 进行后续正交试验。

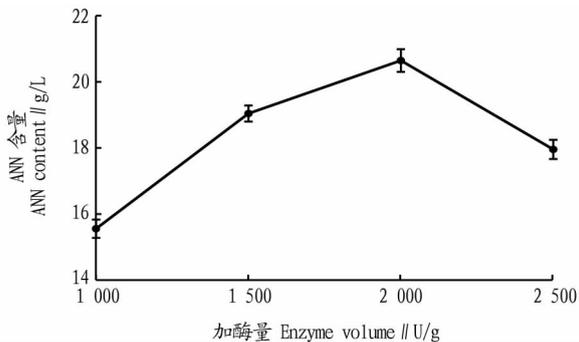


图 1 加酶量对乌贼缠卵腺酶解物的 ANN 含量的影响

Fig.1 Effect of enzyme volume on ANN content of hydrolysates from the nidamental glands of cuttlefish

2.1.2 pH 对乌贼缠卵腺酶解物的 ANN 含量的影响。从图 2 可以看出,随 pH 的增加,酶解物的 ANN 含量先增加后降低。胰蛋白酶的 pH 过高或过低都会导致酶活性降低,从而影响底物的水解^[14]。因此选择 pH 为 7.5、8.0、8.5 进行后续正交试验。

2.1.3 料液比对乌贼缠卵腺酶解物的 ANN 含量的影响。从图 3 可以看出,当料液比持续增加,酶解物的 ANN 含量先上

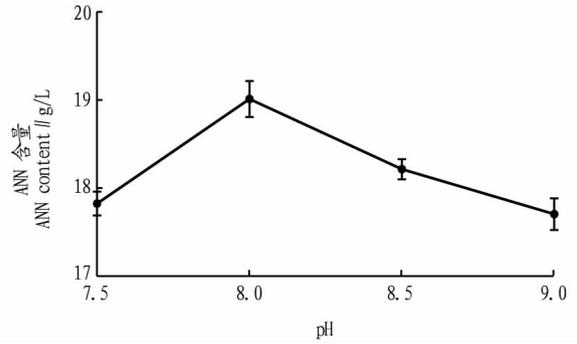


图 2 pH 对乌贼缠卵腺酶解物的 ANN 含量的影响

Fig.2 Effect of pH on ANN content of hydrolysates from the nidamental glands of cuttlefish

升后下降。在料液比为 1:3 时,酶解物的 ANN 含量到达最高值。这可能是因为酶解过程中较小的料液比使底物浓度降低,从而导致酶促反应的速度降低,酶解产物减少。因此选择料液比为 1:1、1:2、1:3 进行后续正交试验。

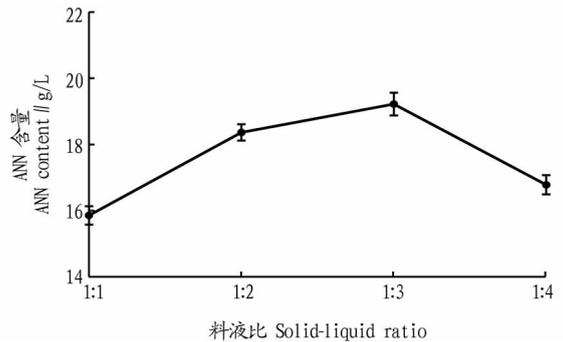


图 3 料液比对乌贼缠卵腺酶解物的 ANN 含量的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on ANN content of hydrolysates from the nidamental glands of cuttlefish

2.1.4 酶解时间对乌贼缠卵腺酶解物的 ANN 含量的影响。从图 4 可以看出,酶解时间越长,酶解物的 ANN 含量越高。当酶解时间为 8 h 时,酶解物的 ANN 含量最高。所以选择酶解时间为 4、6、8 h 进行后续正交试验。

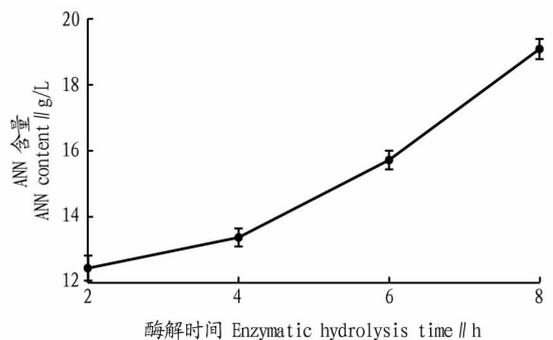


图 4 酶解时间对乌贼缠卵腺酶解物的 ANN 含量的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on ANN content of hydrolysates from the nidamental glands of cuttlefish

2.2 正交试验 为进一步优化乌贼缠卵腺抗氧化活性肽的制备工艺,进行了正交试验,结果见表 2。从表 2 可以看出,影响胰蛋白酶酶解产物 DPPH 清除率的各因素排序为 D>A>C>B,即酶解时间>加酶量>料液比>pH,其中酶解时间的

影响最大,pH的影响最小。在组合为 A₂B₃C₃D₃ 即加酶量为 2 000 U/g、pH 为 8.5、料液比为 1:3、酶解时间为 8 h 时,酶解物的 DPPH 清除率最高。

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果Table 2 Results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号 Test No.	A	B	C	D	DPPH 清除率 DPPH scavenging rate//%
1	1	1	1	1	40.08
2	1	2	2	2	48.90
3	1	3	3	3	71.35
4	2	1	2	3	69.95
5	2	2	3	1	62.27
6	2	3	1	2	64.47
7	3	1	3	2	60.56
8	3	2	1	3	57.82
9	3	3	2	1	58.67
k ₁	53.44	56.86	54.13	53.67	
k ₂	65.56	56.33	59.17	57.98	
k ₃	59.01	64.83	64.72	66.37	
R	12.12	8.50	10.59	12.70	

2.3 超滤截留 通过超滤将乌贼缠卵腺的酶解物分为分子量<3 kD、3~10 kD、>10~30 kD、>30 kD 的多肽,其抗氧化能力如图 5 所示。与其他超滤组分相比,<3 kD 的组分具有最高的 DPPH 清除率、·OH 清除率和还原力。研究表明,低分

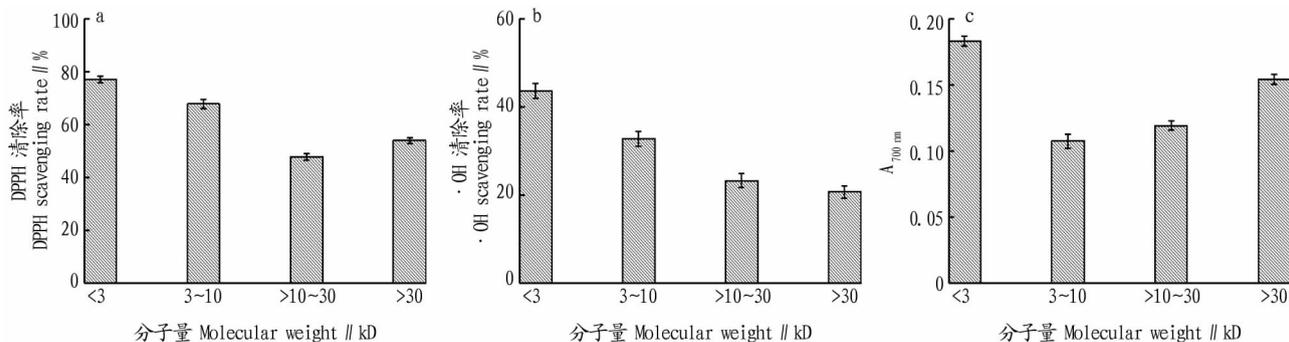


图 5 不同分子量对 DPPH 清除率(a)、·OH 清除率(b)和还原力(c)的影响

Fig.5 Effects of different molecular weights on DPPH scavenging rate(a) ·OH scavenging rate (b)reducing power (c)

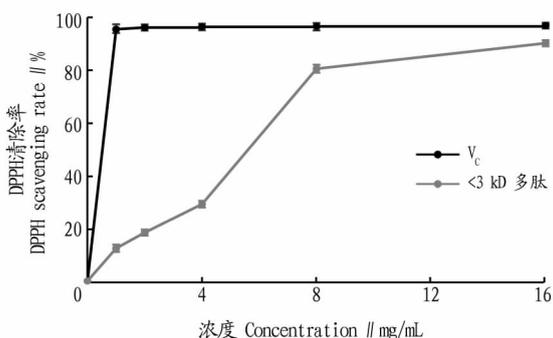


图 6 不同浓度的样品对 DPPH 清除率的影响

Fig.6 Effects of different sample concentrations on DPPH scavenging rate

子量的蛋白质水解产物具有较强的抗氧化活性^[15]。因此,选择分子量<3 kD 的组分用于后续抗氧化活性的评估。

2.4 抗氧化活性的评估

2.4.1 DPPH 清除率的测定。由图 6 可知,<3 kD 分子段多肽随着其浓度的升高,DPPH 清除率也升高;当多肽浓度为 16 mg/mL 时,清除率达到最大,最大清除率为 90.95%。而阳性对照抗坏血酸(V_c)的 DPPH 清除率都在 95%~100%。所以<3 kD 的乌贼缠卵腺抗氧化肽具有良好的 DPPH 清除能力。

2.4.2 ·OH 清除率的测定。由图 7 可知,阳性对照 V_c 组随浓度的增加,其对·OH 的清除率增加,增加幅度较大;当 V_c 浓度为 16 mg/mL 时,·OH 清除率最大达到 84.07%。<3 kD 分子段多肽随浓度的增加,·OH 清除率也呈上升趋势,在多肽浓度为 16 mg/mL 时达到最大清除率 63.61%,但其增加幅度较阳性对照组低。因此<3 kD 的乌贼缠卵腺抗氧化肽具有较好的·OH 清除率。

2.4.3 还原力的测定。由图 8 可知,<3 kD 分子段多肽随着浓度的升高,其还原力值逐渐升高。在浓度为 16 mg/mL 时,还原力达到最大值(0.284)。但同等浓度下的抗坏血酸的还原能力要强于<3 kD 的乌贼缠卵腺抗氧化肽的能力。因此<3 kD 的乌贼缠卵腺抗氧化肽有较好的还原能力。

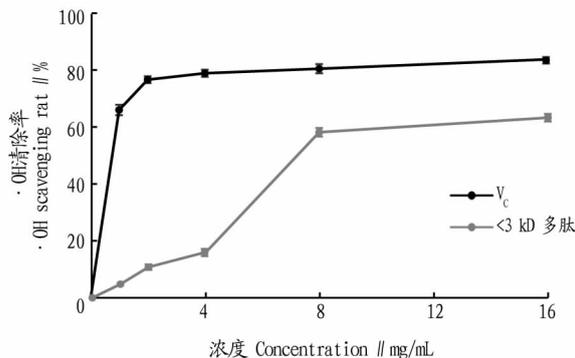


图 7 不同浓度的样品对·OH 清除率的影响

Fig.7 Effects of different sample concentrations on ·OH scavenging rate

3 结论

该试验结合单因素和正交试验筛选出胰蛋白酶提取乌贼缠卵腺抗氧化活性多肽的最优条件:加酶量为 2 000 U/g,pH 为 8.5,料液比为 1:3,酶解时间为 8 h。酶解液通过超滤

得到 4 个不同分子段,分别为<3 kD、3~10 kD、>10~30 kD、>30 kD。通过检测 DPPH 清除率、·OH 清除率和还原力,发现<3 kD 分子段多肽具有最佳的抗氧化活性。该研究结果表明乌贼缠卵腺抗氧化活性多肽具有良好的抗氧化活性,可

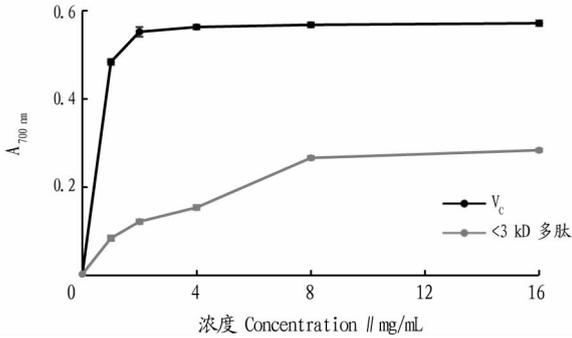


图8 不同浓度的样品对还原力的影响

Fig.8 Effects of different sample concentrations on reducing power

作为天然抗氧化剂,在生物医学、日用化妆品和食品行业有一定的开发利用价值。

参考文献

- [1] SILA A,BOUGATEF A.Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems.A review[J].Journal of functional foods,2016,21:10-26.
- [2] PAN X,ZHAO Y Q,HU F Y,et al.Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage [J].Journal of functional foods,2016,25:220-230.
- [3] BOUGATEF A,HAJJI M,BALTI R,et al.Antioxidant and free radical-sca-

ving activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases[J].Food chemistry,2009,114(4):1198-1205.

- [4] 张昊,任发政.天然抗氧化肽的研究进展[J].食品科学,2008,29(4):443-447.
- [5] SARMADI B H,ISMAIL A.Antioxidative peptides from food proteins: A review[J].Peptides,2010,31(10):1949-1956.
- [6] 田裕心,彭亚博,姚昱锐,等.响应面优化鮑鱼内脏抗氧化肽制备工艺及其活性[J].食品工业,2019,40(4):110-115.
- [7] 李美娜,黎德佳,谢景,等.鲤鱼鱼鳞蛋白的酶解制备工艺及其抗氧化活性[J].安徽农业科学,2017,45(19):86-89.
- [8] 宋正规,雷静,薛张芝,等.乌贼皮胶原蛋白特性与抗氧化能力研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(2):286-293.
- [9] 刘倩茹,柏圣达,赵国雨,等.北太平洋鲑鱼鳔抗氧化酶解寡肽的制备[J].湖北农业科学,2018,57(13):70-74,78.
- [10] 颜琳,姜双双,闫欣,等.皱纹盘鲍腹足抗氧化肽的制备及其工艺优化[J].食品与发酵工业,2019,45(17):123-128.
- [11] 曾健辉,朱宝君,王娟,等.响应面法优化酶解海洋低值鱼肉制备抗氧化肽工艺[J].安徽农业科学,2016,44(22):80-83.
- [12] 李世博,镜鲤(*Cyprinus carpio*)鱼皮抗氧化胶原蛋白肽的制备和性质研究[D].哈尔滨:黑龙江大学,2013.
- [13] YE H,ZHOU C H,SUN Y,et al.Antioxidant activities *in vitro* of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum* [J].European food research and technology,2009,230(1):101-109.
- [14] 刘建伟,梁文文,熊善柏,等.响应面法优化鲢鱼皮抗氧化肽的混合酶解工艺[J].食品工业,2018,39(3):157-161.
- [15] LI Y,LI J,LIN S J,et al.Preparation of antioxidant peptide by microwave-assisted hydrolysis of collagen and its protective effect against H_2O_2 -induced damage of RAW264.7 cells[J].Marine drugs,2019,17(11):1-13.

(上接第167页)

- [8] 汤忠琴,尚静,张磊,等.不同田间配置对套作大豆主要虫害的种群分布影响[J].四川农业大学学报,2018,36(3):297-302,308.
- [9] 汤秋玲,马康生,高希武.蔬菜蚜虫抗药性现状及抗性治理策略[J].植物保护,2016,42(6):11-20.
- [10] 梁彦,张帅,邵振润,等.棉蚜抗药性及其化学防治[J].植物保护,2013,39(5):70-80.
- [11] 何秀玲.害虫抗药性研究与治理状况概述[J].世界农药,2013,35(5):34-38.
- [12] 中华人民共和国农业部.农药田间药效试验准则 第27部分:杀虫剂防治十字花科蔬菜蚜虫:GB/T 1464.27—2010[S].北京:中国农业出版社,2010.
- [13] 刘宏英,张红,马玉勇,等.高产高油春大豆新品种湘春豆28号选育及栽培技术[J].作物研究,2015,29(6):651-652,654.
- [14] 曹金锋,胡铁欢,孙永媛,等.丰产抗病抗倒大豆新品种沧豆11选育[J].作物研究,2020,34(1):53-56.
- [15] 唐江华,苏丽丽,李亚杰,等.不同耕作方式对复播大豆光合特性、干物质生产及经济效益的影响[J].应用生态学报,2016,27(1):182-190.
- [16] 朱元刚,高凤菊,曹鹏鹏,等.种植密度对玉米-大豆间作群体产量和经济产值的影响[J].应用生态学报,2015,26(6):1751-1758.
- [17] 任媛媛,王志梁,王小林,等.黄土塬区玉米大豆不同间作方式对产量和经济收益的影响及其机制[J].生态学报,2015,35(12):4168-4177.

- [18] 邓业成,王荫长,李洁荣,等.啮虫脒的杀虫活性研究[J].西南农业学报,2002,15(1):50-53.
- [19] 王建军,韩召军,王荫长.新烟碱类杀虫剂毒理学研究进展[J].植物保护学报,2001,28(2):178-182.
- [20] 汝医,李慧冬,王文博,等.气相色谱法测定玉米中高效氯氟氰菊酯残留[J].农药,2008,47(12):893-895.
- [21] 虞游毅,杨璐,廖享,等.高效氯氟氰菊酯和氯氟菊酯在苹果中的残留降解动态及其去除方法[J].浙江农业学报,2018,30(8):1376-1381.
- [22] 杨庆喜,刘娜,程功,等.噻虫胺在水稻和土壤中的残留及消解动态[J].农药,2018,57(5):343-346,358.
- [23] 岳强,闫文涛,张苹,等.氨基阿维菌素苯甲酸盐对苹果树草小卷叶蛾的田间防治效果[J].中国果树,2019(6):80-82.
- [24] 谭璟慧,谢宏斌,李贵荣,等.超高效液相色谱法同时测定蜂蜜中双甲脒及其代谢物残留量[J].食品安全质量检测学报,2020,11(12):4091-4096.
- [25] 韩文清,尹蓉,秦一凡.几种杀虫剂防治大豆蚜虫对比试验[J].农业开发与装备,2018(12):131-132.
- [26] 吴廷娟,谢小龙,李景亮,等.不同农药种类对金银花蚜虫的防治效果[J].安徽农业科学,2020,48(1):145-146,149.
- [27] 赵春攀,朱国渊,龙继明,等.5种杀虫剂对辣木蚜虫的防治效果[J].热带农业科技,2018,41(4):46-49.
- [28] 马聪娟.噻虫胺对小麦蚜虫的防治效果试验[J].农村科技,2020(2):40-42.