

南极磷虾抗氧化多肽制备的研究

王继宏,汪之和,田鑫,李燕*
(上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘要:以清除超氧阴离子自由基、DPPH 自由基和羟基自由基能力为指标,筛选制备南极磷虾抗氧化多肽的水解条件,得到高效的抗氧化多肽制品。结果表明:胰蛋白酶、中性蛋白酶复合,酶解南极磷虾 6h 后得多肽的抗氧化能力最强,超氧阴离子自由基的清除率达到 11.5%,DPPH 自由基的清除率达到 72.7%,羟基自由基的清除率达到 84.8%。经超滤分离,分子量范围在 5~10ku 的多肽表现出较强的清除三种自由基的能力。对其进行 tricine-SDS-PAGE 电泳,结果显示电泳图谱上出现了两个条带。

关键词:抗氧化,南极磷虾,酶解,超滤, tricine-SDS-PAGE 电泳

Preparation of Antarctic krill peptides with anti-oxidant activity

WANG Ji-hong, WANG Zhi-he, TIAN Xin, LI Yan*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China)

Abstract: In the study, the free radical scavenging ability against superoxide, DPPH and hydroxyl radical was investigated to screen optimum hydrolysis conditions for preparing Antarctic krill peptides with high anti-oxidant activity. Results indicated that peptides prepared by trypsin and neutral protease for 6h, showed the highest anti-oxidant activity, with free radical scavenging effect on superoxide, DPPH and hydroxyl radical by 11.5%, 72.7% and 84.8%, respectively. Through ultra-filtration, peptides (5~10ku) exhibited stronger scavenging activity against free radicals, which further revealed with two bands in the tricine-SDS-PAGE electrophoretogram.

Key words: anti-oxidant activity; Antarctic krill; hydrolysis; ultra-filtration; tricine-SDS-PAGE electrophoresis

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)03-0109-04

南极磷虾是一个巨大的蛋白资源,并且被认为具有很大的药用前景,波兰和前苏联有文献称磷虾为健康食品,并且用南极磷虾来治疗动脉硬化和降低血液中胆固醇的含量。在磷虾体内发现了各种有用的化学物质,有几种经研究被认为具有商业开发的价值^[1]。对于我国这样一个自然资源相对贫乏的人口大国来讲,对南极磷虾的综合开发利用具有重要的战略意义。

抗氧化肽属生物活性肽的一种。不仅具有多肽产品的营养作用,而且具有抗氧化和清除自由基的功能,可增强人体抗衰老、抗疾病能力。目前市场上的抗氧化剂大多为人工合成的,例如维生素 C、维生素 E,作用效果好,但化学合成物质存在着安全隐患,它在清除自由基的同时也对人体的组织或器官产生副作用。研究表明,许多动植物的水解蛋白和氨基酸都有抗氧化性^[2]。分子量在 3~10ku 的磷虾多肽比天然抗氧化剂维生素 E 的清除自由基能力强^[3]。南极磷虾多肽不仅可以加工成营养补充剂,而且也可以作为制备抗氧化、抗衰老的保健品或化妆品的

原料,具备广阔的开发利用潜力^[4]。因此,无副作用的生物活性肽更具优势。然而,南极磷虾抗氧化多肽的生产缺乏技术基础,抗氧化多肽提取耗时久、得率低、效果差、成本高,导致现在市场上抗氧化多肽产品处于初级开发阶段^[5]。本实验旨在基于国内外对抗氧化性多肽分子结构、分子大小与抗氧化生理功能联系的研究,达到短时、高产率、低成本水解出具有较强抗氧化功能的南极磷虾多肽,为抗氧化南极磷虾多肽产品的进一步开发、生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

冷冻的南极磷虾 2012 年 3 月捕于南极 FAO 48.2 区;中性蛋白酶 19630U/g,上海源叶生物科技有限公司;胰蛋白酶 174850U/g,上海生物技术公司;三氯化铁 天津市博迪化工有限公司;水杨酸 天津市博迪化工有限公司;硫酸亚铁 上海第二钢铁厂;DPPH 自由基 Sigma 公司;抗超氧阴离子自由基与产生超氧阴离子自由基测试盒 南京建成生物研究所;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳低分子量标准蛋白质 上海源叶生物科技有限公司;三羟甲基氨基甲烷 上海维编科贸有限公司;SDS sino-American biotechnology 公司;碳酸钠、氢氧化钠、三氯乙酸(TCA)、四甲基乙二胺、过硫酸铵、丙烯酰胺等 国药集团,分析纯。

收稿日期:2013-07-01 *通讯联系人

作者简介:王继宏(1986-),女,硕士研究生,研究方向:多肽的分离纯化。

基金项目:国家高新技术研究发展(863);计划海洋技术领域或主题研究(2011AA090801)。

RO-NF-UF-4100 型膜分离装置、中空纤维式超滤组件:外压式 PS-5,内压式 PS-10,PES-3 卷式超滤组件 上海摩速科学器材有限公司;GL-20G-II 冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;UNICO UV-2000 紫外可见分光光度计 北京谱析通用仪器有限责任公司;真空冷冻干燥器 CHRIST ALPHA1-2,北京博励行仪器有限公司;DYCZ-24D 垂直板电泳槽 北京市六一仪器厂;DYY-III 稳压稳流电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 南极磷虾蛋白水解物的制备 参照迟海^[6]等方法,将冷冻的南极磷虾装入保鲜袋封口,用冷水解冻,称取一定量解冻的南极磷虾于 Tris-缓冲液(0.05mol/L,pH7.5)中,料液比(w/v)为 1:2^[3],均质 1min,加入复合酶(中性蛋白酶:胰蛋白酶=1:1)^[7],置于 45℃ 恒温水浴保温 6h,酶解结束后,100℃ 灭酶 10min。冷却后,4℃ 11000r/min 离心 20min,取上清液测其抗氧化活性。

1.2.2 抗氧化能力的测定

1.2.2.1 样品的抗超氧阴离子自由基能力 方法参照测试盒说明书。

1.2.2.2 样品清除 DPPH 自由基的能力参考文献^[9]

取 0.2mL 待测液和 1.8mL 无水乙醇于 10mL 试管中,然后加入 2.0mL 浓度为 0.2mmol/L 的 DPPH·无水乙醇溶液,手振荡使其混合均匀,室温下反应 20min,在 4℃、转速为 5000r/min 离心 10min,然后在 517nm 波长处用分光光度计测上清液的吸光值为 A_1 ;取 0.2mL 待测液和 1.8mL 无水乙醇于 10mL 试管中,加入 2.0mL 无水乙醇,手振荡使其混合均匀,室温下反应 20min,在 4℃、转速为 5000r/min 离心 10min,然后在 517nm 波长处用分光光度计测上清液的吸光值为 A_j ;参比为 2.0mL 浓度为 0.2mmol/L 的 DPPH·无水乙醇溶液和 2.0mL 无水乙醇的混合反应液,手振荡使其混合均匀,室温下反应 20min,在 4℃、转速为 5000r/min 离心 10min,然后在 517nm 波长处用分光光度计测上清液的吸光值 A_0 。

待测液对 DPPH 自由基的清除率的计算公式为:

$$K(\%) = [1 - (A_j - A_1) / A_0] \times 100$$

1.2.2.3 样品清除羟基自由基能力 在 10mL 试管中加入 1.5mL 的待测液,然后依次加入 0.3mL 浓度为 6mmol/L 的 FeSO_4 ,1.5mL 浓度为 6mmol/L 的水杨酸,用蒸馏水补齐至 4.8mL,摇匀,最后加入 0.3mL 浓度为 6mmol/L 的 H_2O_2 启动反应,静置 10min 后于 510nm 处测定吸光度。考虑到提取液本身的吸光度,做试样空白,测出扣除试样空白的吸光度,同时测定空白对照液的吸光度。

$$\text{清除率}(\%) = (A_0 - A_1 + A_2) / A_0 \times 100$$

其中: A_0 为未加提取液时溶液的吸光度; A_1 为加提取液后溶液的吸光度; A_2 为提取液的吸光度。

1.2.3 超滤分离 将南极磷虾蛋白酶解液离心,取上清液,经 10ku 超滤膜(PS-10 中空纤维组件)截流分离,保留浓缩液;将滤液再经 5ku 超滤膜(PS-5 中

空纤维组件)截流分离,保留浓缩液;将滤液再经 3ku 超滤膜(PES-3 卷式超滤组件)截流,保留浓缩液;将滤液再经 0.5ku 纳滤膜(卷式组件)截流,保留浓缩液和滤液。超滤过程保持组件最大工作压力不超过 0.15MPa,纳滤不要超过 0.4MPa,依次制备分子量为 10ku 以上、5~10、3~5、0.5~3、0.5ku 以下的南极磷虾多肽溶液。然后将各部分溶液进行真空冷冻干燥,分别测定其抗氧化活性。

1.2.4 tricine-SDS-PAGE 电泳 配制 15.5% 的分离胶、10% 的夹层胶和 4% 的浓缩胶。制作凝胶板,先制备分离胶,聚合后,再制备夹层胶,最后制备浓缩胶,三种胶长度比例为 4:1.5:1,上样量:浓度为 300mg/mL 的样品 8、12 μL ,打开电源,将电压调至 30V 电泳 1h,待样品进入分离胶后,将电压调至 100V,待染料前沿迁移至距硅胶框底 1~1.5cm 处,停止电泳,一般需要 4~6h,电泳结束后,剥胶,将胶放在大培养皿内,用固定液固定 20min,染色 20~30min,漂洗。

2 结果与讨论

2.1 酶解条件的筛选

本实验选用复合酶在 pH7.5,温度 45℃,料液比(m/v)为 1:2 的条件下,改变时间,对南极磷虾蛋白进行酶解。采用抗氧化活性大小为指标,确定最适合的酶解时间,改变了以往国内在活性肽生产工艺上先测水解度,再做常规活性测定^[12]的方法。

2.1.1 清除超氧阴离子自由基能力的测定 超氧阴离子自由基是生命代谢中对生物体危害很严重的一种自由基,清除超氧阴离子自由基的能力是检测样品抗氧化性的重要指标。

图 1 显示,南极磷虾蛋白酶解液清除超氧阴离子自由基的能力大于未经酶解的南极磷虾蛋白的清除能力,且在 1、4h 时酶解液清除超氧阴离子自由基的能力达到较大值,约为未酶解南极磷虾蛋白的 1.71 倍,之后逐渐变小,但在 2h 时清除率下降,可能是蛋白酶解得到多肽,随着酶解时间的增加,其肽段断裂,产生氨基酸残基,掩盖了具有清除超氧阴离子自由基的某些氨基酸末端的活性基团或活性位点,使其清除率突然下降。因此经 1 或 4h 酶解,可得到对超氧阴离子自由基有较强清除能力的南极磷虾多肽。

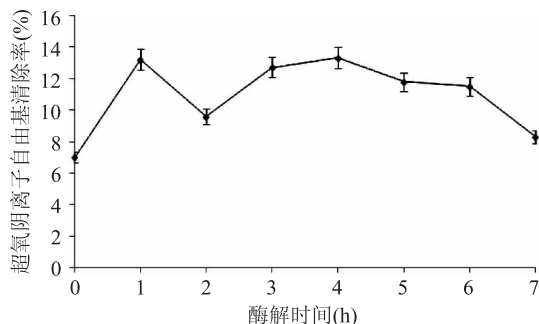


图 1 酶解物的超氧阴离子自由基清除能力

Fig.1 The scavenging effects of zymolyte on superoxide anion free radical

2.1.2 清除 DPPH 自由基能力的测定 DPPH·是一种很稳定的氮中心的自由基,它的稳定性主要来自3个苯环的共振稳定作用及空间障碍,使夹在中间的氮原子上不成对的电子不能发挥其应有的电子成对作用。作为一种稳定的自由基,DPPH·可以捕获其他的自由基。有自由基清除剂存在时,DPPH·的单电子被捕捉而使其颜色变浅,在最大光吸收波长处的吸光值下降,且下降程度呈线性关系,从而以评价实验样品的抗氧化能力^[11]。

图2表明,南极磷虾蛋白酶解液清除 DPPH 自由基的能力大于未经酶解的南极磷虾蛋白清除能力,且在酶解 6h 时酶解液清除 DPPH 自由基的能力达到最大,为未酶解南极磷虾蛋白的 3.17 倍,之后逐渐变小。因此经 6h 酶解,可得到对 DPPH 自由基有较强清除能力的南极磷虾多肽。

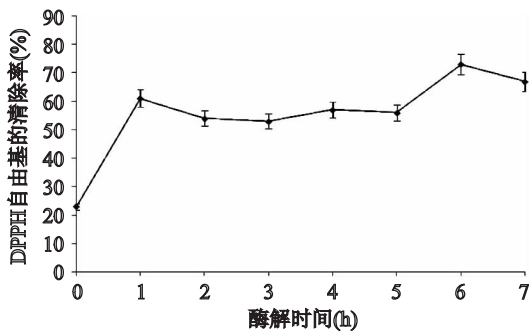


图2 酶解物的清除 DPPH·能力

Fig2 The scavenging effects of zymolyte on DPPH·

2.1.3 清除羟基自由基能力的测定 自由基是引起人类衰老和许多疾病的重要因素,例如癌症、多发性硬化症、帕金森疾病、免疫系统疾病等,羟基自由基是人体内最主要的自由基,其消除率是反映药物抗氧化作用的重要指标^[10]。

图3显示,南极磷虾蛋白酶解液清除羟基自由基的能力大于未经酶解的南极磷虾蛋白清除能力,且在酶解 6h 时酶解液清除羟基自由基的能力达到最大,为未酶解南极磷虾蛋白的 1.57 倍,之后逐渐变小。因此经 6h 酶解,可得到对羟基自由基有较强清除能力的南极磷虾多肽。

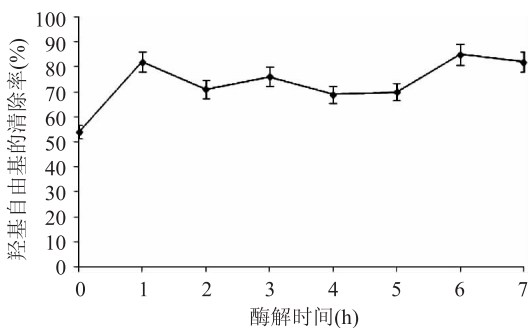


图3 酶解物的清除羟基自由基能力

Fig.3 The scavenging effects of zymolyte on hydroxyl free radical

以清除超氧阴离子自由基、DPPH 自由基和羟基自由基为指标,在复合酶的最适酶解条件下,南极磷虾蛋白经 1h 或 6h 酶解,制得的多肽表现出的清除

自由基的能力较强,但在确定的 pH、温度、酶量、底物的条件下,增加酶解时间,减少原料浪费,底物酶解的较充分,多肽的产率也增高,满足实际生产的要求;蛋白酶解 6h,多肽表现出最强的清除三种自由基的能力。对超氧阴离子自由基的清除率达到 11.5%,对 DPPH·的清除率达到 72.7%,对羟基自由基的清除率达到 84.8%。

2.2 超滤分离

对分子量为 10ku 以上、5~10、3~5、0.5~3、0.5ku 以下 5 部分的南极磷虾多肽分别取相同体积 8mL (浓度均为 20mg/mL),进行抗氧化能力测定。

由图4可以看出,超滤分离的样品中,随着分子量从大到小的变化,样品的清除超氧阴离子自由基的能力、DPPH 自由基的能力、羟基自由基的能力都是先增大后减小,在样品浓度相同的情况下,超氧阴离子自由基清除率最低,羟基自由基清除率高于 DPPH 自由基清除率,但分子量在 5~10ku 部分的 DPPH 自由基清除率达到最高;分子量在 5~10ku 部分对 DPPH 自由基的清除能力、羟基自由基的清除能力、超氧阴离子清除能力都高于其他部分,对 DPPH 自由基的清除率达到 95%,羟基自由基的清除率达到 89%,超氧阴离子自由基的清除率达到 53.5%。

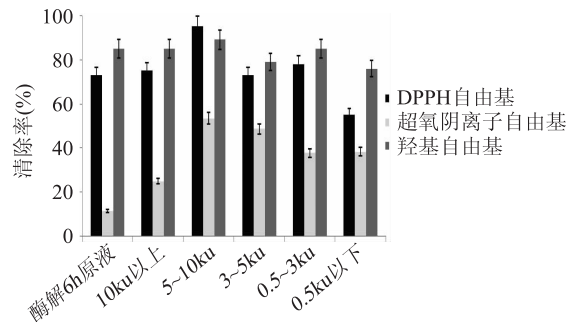


图4 不同分子量南极磷虾多肽的抗氧化能力

Fig.4 The antioxidant ability of antarctic krill polypeptide with different molecular weight

王立才^[15]等人研究了小麦胚芽多肽,其抗氧化活性随分子量的降低而升高,分子量在 2ku 以下肽段的生物活性较高。而南极磷虾多肽分子量在 5~10ku 部分的抗氧化活性最高,取 4mg 测其对 DPPH 自由基的清除率,比李明杰^[3]等人的研究结果高约 28%。一般情况下,物质的抗氧化能力与其供氢体有关,关于多肽的抗氧化活性可能与组氨酸有关^[16]。

2.3 tricine-SDS-PAGE 电泳

图5为取截留在 5~10ku 后南极磷虾多肽 tricine-SDS-PAGE 电泳图谱,结果出现了两个条带,分子量约为 12250ku 和 4609ku,其未分布在膜的分子量范围内,主要是不同厂家生产的标示相同的截留分子质量的膜,对同一溶质的截留率不一定相同,选择膜不能只看分子质量,还要根据实践确定^[17];另外,膜的寿命有限,而且在一定情况下随着操作的选择性不断下降,其处理能力也不断地、缓慢地下降。这被认为是膜分离方法的致命弱点^[18]。要获得高效的南极磷虾抗氧化活性多肽,需对截留后样品进一步

分离纯化。

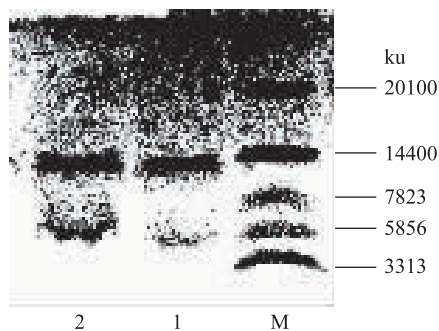


图5 5~10ku 南极磷虾多肽
tricine-SDS-PAGE 电泳结果

Fig.5 The tricine-SDS-PAGE electrophoresis results of antarctic krill polypeptide of 5~10ku

注:M:Marker;1:样品加样量为 8 μ L;
2:样品加样量为 12 μ L。

3 结论

3.1 选择复合酶(中性蛋白酶:胰蛋白酶 = 1:1),在 pH7.5,温度 45 $^{\circ}$ C,料液比(m/v)为 1:2 的条件下,酶解 6h,得到具有较高抗氧化活性的南极磷虾多肽。

3.2 南极磷虾蛋白酶解液的抗氧化能力大于未经酶解的南极磷虾蛋白的抗氧化能力,抗超氧阴离子清除率为 1.71 倍,DPPH 自由基的清除率为 3.17 倍,羟基自由基的清除率为 1.57 倍。

3.3 抗氧化的南极磷虾多肽经截流处理后,分子量在 5~10ku 部分表现出较强的抗氧化能力。对抗超氧阴离子的自由基的清除率达到 53.5%,对 DPPH 自由基的清除率达到 95%,对羟基自由基的清除率达到 89%。

3.4 由于超低分子量多肽,极易从凝胶上浸出,因此染色及脱色时间不宜太长,脱色后凝胶也不宜在水中浸泡保存过久,否则条带会消失。

3.5 5~10ku 部分的南极磷虾多肽,对其进行 tricine-SDS-PAGE 电泳,结果出现两个条带。主要由分子量为 12250ku 和 4609ku 的多肽组成。

参考文献

[1] 孙松,严小军.开发南极磷虾生物资源[C].2002 年中国·

青岛海洋科技与经济发展国际论坛.青岛:2002.254-258.

[2] 冯永财,赵晓丹,刘涛.大豆肽的生理及加工特性分析[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2003,19(1):90-92.

[3] 李明杰,姜国良,赫佳明.南极磷虾肽制备工艺优化及抗氧化测定[J].食品工业科技,2012,33(3):279-301.

[4] 王亚恩.南极磷虾油脂降血脂、抗氧化力及其改善记忆力功能实验研究[D].青岛:中国海洋大学,2011.

[5] 郑建仙.活性肽和蛋白质生产-关键技术与典型范例[M].北京:科学技术文献出版社,2006:60-62.

[6] 迟海,杨峰,李学英,等.不同解冻方式对南极磷虾品质的影响[J].现代食品科技,2011,27(11):1291-1295.

[7] 赵玲,曹荣,刘淇,等.南极磷虾酶解多肽的抑菌活性[J].渔业科学进展,2011,32(4):112-116.

[8] Oyaizu M.Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J].Jap J Nutr,1986,44:307.

[9] 郭雪峰,岳永德,汤峰,等.用清除有机自由基 DPPH 法评价竹叶提取物抗氧化能力[J].光谱学与光谱分析,2008,28(7):1578-1582.

[10] 颜军,苟小军,纪小明,等.分光光度法测定 Fenton 反应产生的羟基自由基[J].成都大学学报,2009,28(2):91-93.

[11] 柳爱莲,刘绣华.天然产物抗 DPPH 自由基活性研究[J].周口师范学院学报,2007,24(5):80-82.

[12] 宋金翠,孟宪军,陕方,等.关于蛋白质水解生产活性肽物质的思考[J].食品工业科技,2005,26(11):185-187.

[13] 刘欣.食品酶学[M].北京:中国轻工业出版社,2006.53-64.

[14] 江洁,王文侠,栾广忠.大豆深加工技术[M].北京:中国轻工业出版社,2004.358-376.

[15] 王才立,张志国,王成忠,等.不同分子质量小麦胚芽多肽的体内抗氧化活性[J].食品科学,2013,34(7):275-278.

[16] Chen H M, Muramoto K, Yamaguehi F, et al. Antioxidative Properties of histidined from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46:49-53.

[17] 杨义芳.中药与天然活性产物分离纯化和制备[M].北京:中国轻科学出版社,2011:434-458.

[18] 刘莱娥.膜分离技术应用手册[M].北京:化学工业出版社,2001.2-28.

(上接第 108 页)

[13] Sala J M, Lafuente M T. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling[J]. Postharvest Biology and Technology, 2000, 20:81-89.

[14] Singh SP, Singh Z. Controlled and modified atmospheres influence chilling injury, fruit quality and antioxidative system of Japanese plums[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2013, 48(2):363-374.

[15] Singh Z, Zaharah S S. Controlled atmosphere storage of mango fruit - an overview[J]. Acta Horticulturae, 2013, 992:481-492.

[16] Edusei V O, Ofosu Anim J, Johnson P N T, et al. Extending postharvest life of green chilli pepper fruits with modified atmosphere packaging[J]. Ghana Journal of Horticulture, 2012, 10:131-140.