

## 海湾扇贝酶解产物清除自由基活性的研究

张一江<sup>1</sup>, 曹文红<sup>2</sup>, 毕春波<sup>1</sup>

1(河北理工大学轻工学院, 河北唐山, 063000) 2(广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江, 524025)

**摘要** 利用双酶(胰酶 0.3%和枯草杆菌中性蛋白酶 0.8%),在 50℃、pH 值 7.0~8.0、料水比 1:3 的条件下,对海湾扇贝肉酶解 4h 后制备得到产物。该酶解产物对羟自由基的清除活性  $IC_{50}$  为 2.01 mg/mL,对超氧阴离子的清除活性  $IC_{50}$  为 9.54 mg/mL,对 DPPH 自由基的清除活性  $IC_{50}$  为 5.90 mg/mL。Sephadex G-15 (1.6 cm×68 cm)凝胶色谱结果表明,该酶解产物中分子质量分布在 1450~288 u,肽链长度在 13.2~2.6 的组分具有较强的清除羟自由基和 DPPH 自由基活性。

**关键词** 海湾扇贝,酶解,自由基,清除,分子质量分布

近几年对自由基的生理功能和毒性的研究越来越引起人们的关注。研究表明,动脉粥样硬化、血栓的形成、心肌缺血再灌注损伤、糖尿病和肝炎等疾病中氧自由基起到重要作用<sup>[1]</sup>。致癌、促癌和癌的形成都有氧自由基的产生和参与<sup>[2]</sup>。自由基在食品和化工产品氧化中的作用更是众所周知,所以有关抗氧化剂清除自由基的研究得到普遍关注,然而合成抗氧化剂往往有毒副作用。为了减轻自由基的危害,目前寻找高效、价廉、低毒甚至无毒的抗氧化剂备受关注。研究发现,一些肽类具有显著的清除自由基活性,典型的代表是肌肽和谷胱甘肽,某些食品蛋白质来源的肽亦具有清除自由基活性。如,金枪鱼蛋白<sup>[3]</sup>、牛奶蛋白<sup>[4]</sup>、小麦麸质<sup>[5]</sup>、鹰嘴豆蛋白<sup>[6]</sup>等的酶解产物均具有一定的清除自由基的活性。

海湾扇贝是一种海洋贝类,又称大西洋内湾扇贝,因肉嫩味美、营养丰富被称为“冰海之皇”。扇贝肉蛋白质含量较高,所含氨基酸丰富、均衡,具有很高的开发利用价值。近几年来,有关水解蛋白制备生物活性肽的研究成为水产品下脚料加工利用的新方向。本文采用生物技术手段,对扇贝肉进行双酶水解,得到了具有清除自由基作用的水溶性蛋白质水解物,通过凝胶色谱层析确定酶解产物中高清除自由基活性组分的分子量范围,结果为进一步的研究开发提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

新鲜扇贝购自广东湛江东风市场,开壳取肉分装,-18℃保藏备用。

第一作者:学士,讲师。

收稿日期:2007-10-17

枯草杆菌中性蛋白酶(酶活 1:500),由无锡酶制剂厂提供,胰酶(酶活 1:500),由上海化学试剂公司提供。

分子质量标准品牛血清白蛋白( $M_w$ 67000u)、抑肽酶( $M_w$ 6500u)、杆菌肽( $MW$ 1450u)、L-酪氨酸( $M_w$ 181.19u)购自北京华美生物有限公司。 $\alpha$ -脱氧核糖、二苯基苦味酰基苯肼(DPPH)购自 Sima 公司。

### 1.2 扇贝肉酶解产物的制备

将海湾扇贝肉匀浆后,同时加入双酶(胰蛋白酶和枯草杆菌中性蛋白酶),50℃、pH 为 7.0~8.0 条件下,酶解 4 h。酶解结束后,沸水浴 10 min 灭酶,冷却后调节 pH 值至 7.0,4 000 r/min 离心后的上清液用于清除自由基活性的测定。

### 1.3 羟自由基清除活性的测定<sup>[7]</sup>

取 0.2 mL 的  $FeSO_4$ -EDTA 混合液(10 mmol/L)于具塞试管中,加入 0.2 mL 的  $\alpha$ -脱氧核糖溶液(20 mmol/L),然后再加入 0.2 mL 测试样品,并用磷酸缓冲液(pH 7.4)定容至 1.8 mL,最后加入 0.2 mL 的  $H_2O_2$ (10 mmol/L),37℃水浴保温 1 h,然后加入 1 mL 2.8% 的三氯乙酸终止反应,再加入 1 mL 1% 的硫代巴比妥,混匀后沸水浴中加热 10 min,冷却后稀释 5 倍于 532 nm 处测光吸收值  $A_s$ 。不加样品,同上操作处理,测定其对比吸光值  $A_c$ 。样品的自由基清除能力(Scavenging Activity,  $S_A$ )可表示为: $S_A/\% = (A_s - A_c)/A_s$ 。自由基清除率为 50% 样品液的浓度记为  $IC_{50}$ 。

### 1.4 珠母贝糖胺聚糖对超氧阴离子自由基清除作用的测定<sup>[8]</sup>

(1)取 2.4 mL Tris-HCl 缓冲液于试管中,再加入 0.4 mL 蒸馏水,混匀,4 min 后加入 1 滴 10 mol/L HCl 溶液,然后于 325 nm 处测得吸光度值( $A_{00}$ )。

(2)取 2.4 mL Tris-HCl 缓冲液于试管中,再加入 0.1 mL 蒸馏水,混匀,加入 0.3 mL 邻苯三酚溶液,混匀,4 min 后加入 1 滴 10 mol/L HCl 溶液,然后于 325 nm 处测得吸光度值( $A_{01}$ )。

(3)取 2.4 mL Tris-HCl 缓冲液于试管中,加入 0.1 mL 样液,混匀,再加入 0.3 mL 蒸馏水,混匀,4 min 后加入 1 滴 10 mol/L HCl 溶液,然后于 325 nm 处测得吸光度值( $A_{10}$ )。

(4)取 2.4 mL Tris-HCl 缓冲液于试管中,加入 0.1 mL 样液,混匀,再加入 0.3 mL 邻苯三酚溶液,混匀,4 min 后加入 1 滴 10 mol/L HCl 溶液,然后于 325 nm 处测得吸光度值( $A_{325}$ )。

$$\text{抑制率}/\% = (1 - \frac{A_{325} - A_{10}}{A_{01} - A_{00}}) \times 100$$

自由基清除率为 50% 样品液的浓度记为  $IC_{50}$ 。

### 1.5 酶解液清除 DPPH 自由基的测定<sup>[9]</sup>

将 1.5 mL DPPH 自由基溶液(0.1 mmol/L,溶于 95% 乙醇)置于试管中,加入 1.5 mL 待测液(1.3 mL 蒸馏水+0.2 mL 酶解液),振荡摇匀,室温放置 30 min 后,在 517 nm 处测定其吸光值( $A_i$ ),空白为 1.5 mL 95% 的乙醇加入 1.5 mL 蒸馏水调 0,对照为 1.5 mL DPPH 自由基溶液加上 1.5 mL 蒸馏水在测定波长的吸光值( $A_c$ ),酶解液在测定波长的吸光值为  $A_j$ 。酶解液对 DPPH 自由基的清除能力用抑制率 R 表示。公式为:

$$R/\% = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}) \times 100$$

自由基清除率为 50% 样品液的浓度记为  $IC_{50}$ 。

### 1.6 酶解产物分子量分布的测定<sup>[10]</sup>

将 4 种分子量标准品分别上样至 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶柱(1.6 cm×68 cm),用蒸馏水洗脱,流速为 0.8 mL/min,用自动部分收集器收集,每管 3 mL,测定 280 nm 处的吸光值,得到分子量回归方程为  $V_e = -28.654 \lg Mr + 194.42$ ,其中  $V_e$  为洗脱液体,Mr 为分子量,决定系数为 0.9888。将酶解液配制可溶性蛋白含量为 10 mg/mL 的样品上样在相同的条件下进行凝胶层析,利用分子量回归方程考察酶解产物的分子量分布。

## 2 结果与讨论

### 2.1 扇贝酶解产物对羟自由基的清除作用

羟自由基是活性最强的氧自由基,可介导多种病理变化,如引发不饱和和脂肪酸发生脂质过氧化反应,

损伤细胞的膜结构及功能等。因此,清除羟自由基对维持机体正常的生理活动和抗衰老均具有重要的意义<sup>[11]</sup>。图 1 为扇贝酶解产物及抗坏血酸(Vc)对羟自由基清除作用的实验结果。

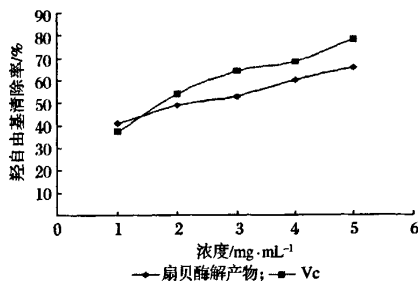


图 1 扇贝酶解产物与 Vc 对羟自由基的清除作用

由图 1 可以得出,扇贝酶解产物对羟自由基的清除作用有明显的量效关系。在 1~5 mg/mL 的浓度范围内,其对羟自由基的清除率随着酶解产物浓度的增加而近似线性地增加。当酶解产物浓度为 5 mg/mL 时,清除率可达 65.64%。扇贝酶解产物的清除羟自由基活性  $IC_{50}$  为 2.01 mg/mL。由图 1 中 Vc 对羟自由基清除作用的实验结果可知,Vc 的清除羟自由基活性  $IC_{50}$  为 1.69 mg/mL。扇贝酶解产物对羟自由基的清除作用稍弱于 Vc。这表明海湾扇贝的胰酶和枯草杆菌中性蛋白酶双酶解产物具有较强的羟自由基清除能力。

### 2.2 扇贝酶解产物对超氧阴离子自由基的清除作用

氧在体内生成氧自由基时,产生的第 1 个自由基便是超氧阴离子自由基。高等动物吸收的氧气大部分被线粒体电子传递还原成水。有些酶如羟基乙酸酶可以把氧气直接还原成  $H_2O_2$ ,也有少数酶如黄嘌呤脱氢酶可以把氧气还原成超氧阴离子自由基。此外,体内其他一些生化反应过程如自氧化反应也会产生超氧阴离子自由基。它本身不仅具有毒性,还可通过一系列的生化反应生成其他氧自由基。由图 2 可知,扇贝酶解产物对超氧阴离子自由基在 1~5 mg/mL 浓度范围内最大的清除率仅为 17.10%, $IC_{50}$  为 9.54 mg/mL。而相同浓度范围内的 Vc 对超氧阴离子自由基清除率除浓度为 1 mg/mL 时为 74.09% 外,其它浓度的均在 90% 以上, $IC_{50}$  为 0.32 mg/mL。这表明海湾扇贝酶解产物对超氧阴离子自由基的作用较弱。

### 2.3 扇贝酶解产物对 DPPH 自由基的清除作用

二苯基苦味酰基自由基(DPPH 自由基)是一种很稳定的自由基,在乙醇溶液中呈深紫色,在 517 nm

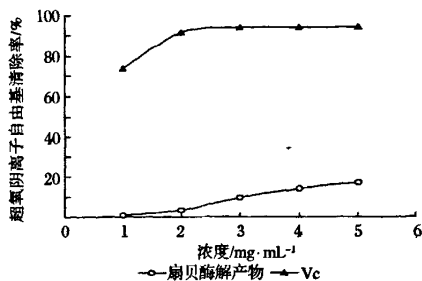


图2 扇贝酶解产物与Vc对超氧阴离子自由基的清除作用

处有最大吸收峰,当有自由基清除剂存在时其颜色减退,退色程度与清除剂的清除能力及数量呈定量关系。用分光光度法进行定量分析可评价抗氧化物质的抗氧化能力<sup>[12]</sup>。图3为扇贝酶解产物与Vc对DPPH自由基的清除作用。由图3可知,扇贝酶解产物在低浓度时对DPPH自由基清除作用较弱,1 mg/mL和2 mg/mL时自由基清除率分别为6.92%和8.83%。随着酶解物浓度的增加,其对DPPH自由基的逐渐呈剂量关系,当酶解物的浓度达到5 mg/mL时自由基清除率可达55.04%, $IC_{50}$ 为5.90 mg/mL。相同浓度范围的Vc对DPPH自由基的清除率在30.80%~75.89%, $IC_{50}$ 为1.88 mg/mL为扇贝酶解产物的清除活性要弱些。但比与相同浓度的其他一些蛋白质酶解产物相比,如虾夷扇贝卵巢的酶水解物<sup>[13]</sup>、乳清分离蛋白酶解物<sup>[14]</sup>和脱色猪血红蛋白酶解物<sup>[15]</sup>要强。这表明海湾扇贝酶解产物具有一定的清除DPPH自由基活性。

#### 2.4 扇贝酶解产物的分子质量分布

图4为海湾扇贝的酶解产物经Sephadex G-15凝胶层析图谱。从图4可以看出,出现5个吸收峰,A~E。根据分子质量回归方程可知,酶解产物分

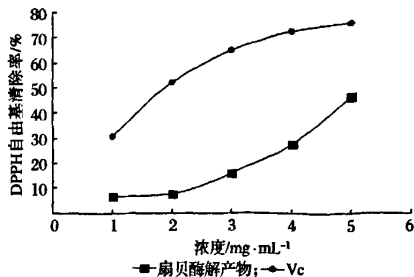


图3 扇贝酶解产物与Vc对DPPH自由基的清除作用  
子质量分布在150 000 u以下,峰A处分子质量在151 356~9 772 u,约占酶解产物比重的20.4%;峰B组分分子质量在1 450~288 u,主要是一些短肽,约占酶解产物比重的18.5%;峰D组分分子质量在288~93 u,主要成分为氨基酸,约占酶解产物比重23.4%;峰D不太明显,在41管至49管之间,分子质量在311~45 u,约占酶解产物比重的16.3%;峰E的分子质量小于45u,酶解产物比重的21.4%,可能是由于凝胶色谱的拖尾现象或者是其它有机物质。

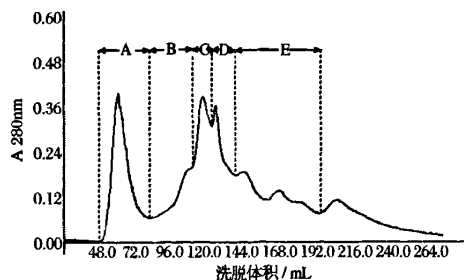


图4 扇贝酶解产物的Sephadex G-15凝胶色谱图

将各吸收峰收集后合并,测定其对羟自由基、超氧阴离子自由基、DPPH自由基等3种自由基的清除活性,结果见表5。

表1 扇贝酶解产物的分子质量分布及各分子范围清除自由基活性( $IC_{50}$ )

组分	分子质量范围/u	比例/%	清除羟自由基活性 /mg·mL <sup>-1</sup>	清除超氧阴离子自由基 活性/mg·mL <sup>-1</sup>	清除DPPH自由基 活性/mg·mL <sup>-1</sup>
A	151 356~9 772	20.4	6.74	17.23	9.45
B	9 772~1 450	14.7	3.17	13.40	6.78
C	1 450~288	18.5	0.84	6.12	3.08
D	288~93	16.3	1.41	7.34	4.67
E	93~0	21.4	—	10.06	—
酶解产物	—	—	2.01	9.54	5.90

由表5可以看出,原酶解产物经过凝胶色谱分离后,分子质量不同的组分对自由基的清除作用不同,分子质量分布在1 450~288u的组分具有较强的自由基清除活性,对羟自由基、超氧阴离子自由基和

DPPH自由基的清除活性 $IC_{50}$ 分别为0.84 mg/mL、6.12 mg/mL和3.08 mg/mL,其他组分活性相对较低。从目前报道的各种自由基清除活性(抗氧化)肽来看,其分子质量较小,氨基酸残基的数目一般在20

个以内<sup>[16]</sup>。由于蛋白质 20 种氨基酸的平均分子质量为 128u,除去氨基酸与氨基酸形缩合成肽键时生成的水分子,峰 C 组分的肽链长度在 13.2~2.6。这表明海湾扇贝酶解产物中具有较强自由基清除活性的主要是短肽物质,这与有关文献报道是一致的。

研究表明,海湾扇贝胰酶和枯草杆菌中性蛋白酶双酶酶解产物对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^-$ )、DPPH 自由基(DPPH $\cdot$ )的清除效果完全不同,对羟自由基的清除作用较强,对超氧阴离子具有一定的清除作用,对 DPPH 自由基的清除作用较弱。提示海湾扇贝酶解液对这 3 种自由基可能有着不同的抗氧化机制。

### 3 结 论

利用胰酶(0.3%)和枯草杆菌中性蛋白酶(0.8%)对海湾扇贝的(胰酶和枯草杆菌中性蛋白酶在 50℃、pH 为 7.0~8.0、料水比 1:3 的条件下酶解 4h,制备具有清除自由基活性的酶解产物,其对羟自由基的清除活性为 2.01 mg/mL,对超氧阴离子自由基的清除活性为 9.54 mg/mL,对 DPPH 自由基的清除活性为 5.90 mg/mL。海湾扇贝的胰酶和枯草杆菌中性蛋白酶双酶酶解产物中清除自由基活性较强组分的分子质量在 1 450~288u,肽链长度在 13.2~2.6。高活性的清除自由基活性尚需进一步的分离纯化研究。

### 参 考 文 献

- 1 赵保路.氧自由基和天然抗氧化剂[M].北京:科学出版社,1999
- 2 Dreher D, Junld A F. Role of oxygen free radicals in cancer development[J]. European Journal of Cancer, 1996, 32; 30~38
- 3 Je J Y, Qian Z J, Byun H G, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2007, 42( 5): 840~846
- 4 Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1 306~1 314
- 5 Wang J S, Zhao M M, Zhao Q Z, et al. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems [J]. Food Chemistry, 2007, 101( 4): 1 658~1 663
- 6 Li Y H, Jiang B, Zhang T, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106( 2): 444~450
- 7 Mendis E, Rajapakse N, Byun H G. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects[J]. Life Sciences, 2005, 77, (17), 9: 2 166~2 178
- 8 陈灵然,王琴.蕨麻多糖的提取及其清除自由基的作用[J].中国兽医科技,2004,34(4):59~62
- 9 李 琳,赵谋明.鳙鱼蛋白酶解液清除自由基的研究[J].水产科学,2005,24(10):15~18
- 10 曹文红,章超桦.酶解中国毛虾制备低分子肽的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(11):81~84
- 11 许庆陵,曾庆祝,朱莉娜,等.鲢酶解物对羟自由基的清除作用[J].水产学报,2004,28(1):93~99
- 12 刘小红,张尊听,段玉峰,等.市售天然植物香料的抗氧化作用研究[J].食品科学,2002, 23(1): 143~145
- 13 田元勇,高悦勉.虾夷扇贝卵巢酶水解产物抗氧化性的研究[J].大连水产学院学报,2007,22(1):46~48
- 14 刘志东,郭本恒,王荫榆,等.乳清分离蛋白酶解物的抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2007,19(3): 477~481
- 15 郭善广,赵谋明,崔 春.脱色猪血红蛋白酶解产物[J].化学与生物工程,2007,24(4):49~56
- 16 晓 雯,李洪军,章道明.抗氧化肽研究进展[J].食品研究与开发,2003,24(3):36~38

## Study on Free Radical Scavenging Activity of Enzymatic Hydrolysate of *Argopecten irradians* Edible Part

Zhang Yijiang<sup>1</sup>, Cao Wenhong<sup>2</sup>, Bi Chunbo<sup>1</sup>

1( College of Light Industry, Hebei Polytechnic University, Tangshan 063000, China )

2(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**ABSTRACT** Hydrolysate with free radical scavenging activity was prepared from the edible part of *Argopecten irradians* by pancreatin (0.3%) and neutral protease (0.8%), under the condition of 50℃, pH7.08~8.0, solid water ratio 1:3 and reaction time 4h. The hydrolysate showed an IC<sub>50</sub> of 2.01mg/mL for hydroxyl radical, an IC<sub>50</sub> of 9.54mg/mL for superoxide radical and an IC<sub>50</sub> of 5.90mg/mL for DPPH radical. The hydrolysate was fractionated with a Sephadex G-15 column (1.6cm×68cm). The absorbance of each fractionated tube was measured at 280nm and its molecular weight distribution was calculated according to a regressive equation between the elution volume and the logarithm of the molecular weight. Gel filtration of the hydrolysate on Sephadex G-15 chromatogram yielded five absorbance peaks. Peak C exerted the strongest hydroxyl radical and superoxide radical scavenging activity, the molecular weight ranged from 1 450 u to 288 u, and the lengths of peptide linkage located between 13.2~2.6.

**Key words** *Argopecten irradians*, enzymatic hydrolysis, free radicals scavenging activity, molecular weight distribution