

文蛤酶解产物的抗氧化活性评价及其组成分析

胡大伟¹, 李恒^{1*}, 蒋敏¹, 丁海龙², 王松涛², 沈才洪², 许正宏^{3,4}, 史劲松^{1*}

1(江南大学 药学院, 江苏 无锡, 214122) 2(国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州, 646000)

3(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡, 214122) 4(粮食发酵工艺与技术国家工程实验室(江南大学), 江苏 无锡, 214122)

摘要 比较不同分子质量分布的文蛤酶解产物的抗氧化活性, 分析小分子酶解组分(enzymatic hydrolysate components with low molecular weight, LMEC)的组成。通过蛋白酶种类的筛选确定文蛤软体酶解工艺, 以总还原力与多种自由基清除能力表征各酶解组分的抗氧化活性, 采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)与高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)分析 LMEC 分子质量, 采用超高压液相色谱-质谱联用技术(ultra-performance liquid chromatography and mass spectrometry, UPLC-MS)分析 LMEC 的肽段组成。建立了以风味蛋白酶与中性蛋白酶双酶酶解获取文蛤软体酶解物的稳定工艺流程, LMEC 具有较好的抗氧化活性, 其总还原力为 54.16%, 羟自由基、DPPH 自由基及超氧阴离子清除率最大分别为 53.5%、49%、47.7%。LMEC 含有 79% 蛋白肽类, 平均分子质量 1.05 kDa, 富含 Ala、Thr、Val、Leu、Pro、Glu 等氨基酸, 推测了 6 种可能的肽段组成。该研究为文蛤抗氧化活性提供理论依据, 也为后续活性肽的分离提供参考方向。

关键词 文蛤; 酶解; 抗氧化; 组成分析; 肽

文蛤(*Meretrix meretrix* L.)是我国沿海地区常见的经济贝类, 其肉质鲜美, 食用与药用历史悠久。《本草纲目》中记载了文蛤的“治疗疮、疖、肿毒, 消积块, 解酒毒”功效;《伤寒论》中也述及文蛤可治疗“饮水不止”的消渴之症^[1-2]。近代研究进一步明确了文蛤具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖、降血脂、免疫调节和抗疲劳等多种药理作用^[3-7]。其中, 抗氧化活性是其他各类生理功能的基础^[8-10], 可作为活性评价的基础依据。

蛤类等海洋生物是优良的活性蛋白、活性多肽的来源。采用生物酶酶解的方式可以促进活性物质的发现, 从而实现海洋蛋白资源的高值化利用。文蛤中含有多种营养与活性成分, 其中蛋白含量约占干物质总质量的 50% 以上^[11-13]。蛋白的酶法水解是近年广泛应用的一项生物技术, 动物组织中的蛋白质、蛋白复合物等大分子原料可被蛋白酶酶解成肽类等小分子物质, 从而利于后续浓缩和活性物质提取。

本研究以文蛤软体为原料, 通过筛选酶解用酶进

而确定酶解工艺条件, 在评价酶解物抗氧化活性的基础上, 进一步对抗氧化活性的组成物质进行分析, 探索具有抗氧化活性的文蛤小分子肽类物质的构成特征。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

文蛤软体:南通昌华水产食品有限公司, -20℃ 储存备用;酶解用蛋白酶:诺维信;抗坏血酸、水杨酸、DPPH、邻苯三酚等试剂:国药试剂集团;弱阴离子交换柱(DEAE FF)5 mL 柱:GE 公司;用于分子质量测定的 HPLC 标准品由尿嘧啶(112 Da)、核糖核酸酶 A(13.7 kDa)及牛血清蛋白(66 kDa)组成:苏州赛分科技有限公司。

1.2 实验仪器

Eppendorf Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机, 德国 DASGIP 公司; Triad 2.5 L 冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; Milli-Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; UltiMate 3000 高效液相色谱, 美国 Dionex 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解工艺及蛋白酶筛选

考查不同种类蛋白酶对文蛤软体酶解的效率。测定水解度与水解得率考察水解情况, 选择水解度高的蛋白酶研究复合酶解, 确定最佳酶解工艺。

第一作者:硕士研究生(李恒副教授和史劲松教授为共同通讯作者, E-mail:liheng@jiangnan.edu.cn, shijs@163.com)。

基金项目:国家海洋公益性行业科研专项经费项目(20130507);四川省重点研发计划项目(2017JZ0043)

收稿日期:2019-02-23, 改回时间:2019-03-26

1.3.2 水解度与水解得率的测定

根据水解物中游离氮与总氮含量的比值计算酶解后的水解度。采用甲醛滴定法测定游离氮含量。取不同条件的酶解上清液 5 mL 于 250 mL 锥形瓶中,加入 60 mL 冷却的去 CO₂ 水,搅拌并且精密测定其 pH 值。用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液(用基准邻苯二甲酸氢钾标定过)调节 pH 值至 8.2,再加入 pH 值已中和至 7.0 的甲醛溶液 20 mL,随后记录将其 pH 值滴定至 9.2 时所消耗的 0.1 mol/L NaOH 溶液的体积。利用凯氏定氮法测定样品中总氮含量。水解得率反映酶解后可溶性物质的得率,计算如公式(1)所示:

$$\text{水解得率}/\% = \frac{\text{原料质量} - \text{残渣质量}}{\text{原料质量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 抗氧化能力的测定

(1) 总还原能力的测定

在不同梯度浓度的样品中加入铁氰化钾,50 ℃ 加热 20 min 后迅速冷却,加入三氯乙酸,3 500 r/min 离心 10 min,取适量上清加入 FeCl₃,混匀静置 10 min,在 700 nm 处检测吸光值。

(2) 水杨酸法测定羟自由基清除能力

采用固定反应时间法,在 510 nm 处测量含被测物反应液的吸光度,并与空白液比较,以测定被测物对羟自由基的清除作用。在试管中加入一定浓度的待测液,依次加入 FeSO₄、水杨酸,蒸馏水补齐至 10 mL,最后加入 H₂O₂,静置 10 min 后于 510 nm 处测定吸光值。

(3) DPPH·清除率测定

准确称取 7.0 mg 的 DPPH·,用无水乙醇定容至 100 mL 棕色容量瓶中于 4 ℃ 避光保存。将制得的文蛤酶解物及各分离组分分别配制成不同浓度的溶液,分别取 2 mL 不同浓度的样品溶液,和等体积已配制好的 DPPH·溶液混合摇匀,常温避光静置 30 min 后于 517 nm 下测定其吸光度 A_i,取 2 mL DPPH·溶液与等体积无水乙醇混合,测定混合液的吸光度 A_j,以及样品溶液与等体积无水乙醇混合液的吸光度值 A_c,每个样品平行测定 3 次,实验以 V_c 作为对照。DPPH·清除率按照公式(2)进行计算:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}/\% = \frac{A_j - (A_i - A_c)}{A_j} \times 100 \quad (2)$$

(4) 清除超氧阴离子自由基(O₂^{-·})活性的测定

采用邻苯三酚自氧化法测定超氧阴离子自由基清除率。取一定量的 Tris-HCl 缓冲液置于 25 ℃ 水浴

5 min,分别加入不同量的样品溶液和邻苯三酚,混匀后 25 ℃ 继续水浴 5 min 后加入 HCl 终止反应,于 420 nm 处检测吸光值。

1.3.4 小分子酶解组分(enzymatic hydrolysate components with low molecular weight, LMEC)物质分析

总蛋白含量采用凯氏定氮法测定;灰分含量采用高温灼烧法测定;脂肪含量采用索氏提取法测定;总糖含量采用苯酚硫酸法测定;水解氨基酸及游离氨基酸均采用氨基酸自动分析仪进行测定。

1.3.5 LMEC 的分子质量测定

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)初步判断分子质量范围,同时采用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)精确测定。

SDS-PAGE 条件:配制 18% 的分离胶,5% 浓缩胶,样品经浓缩胶分离时,电压为 80 V,时间约为 30 min;经分离胶分离时,电压为 100 V,时间为 100 min,电泳缓冲液为变性蛋白胶电泳缓冲液。电泳至蓝色指示前沿至分离胶 3/4 位置时停止电泳。

HPLC 条件:将 LMEC 用流动相配成 1 g/L 的溶液,经 0.2 μm 滤膜过滤后进行检测。使用已知特定分子质量的标准品分析并绘制标准曲线。色谱条件为:色谱柱 Zenix SEC-80,7.8 × 300 mm;流动相为 V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸) = 40:60:0.05;检测波长 214 nm;流速 1 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。

1.3.6 LMEC 的初步分离及肽序分析

采用 DEAE-FF 弱阴离子交换柱进行初步分离,以 NaCl 溶液作为洗脱液。线性洗脱采用 1 mol/L NaCl 溶液,梯度洗脱设定 NaCl 溶液浓度在 100 min 内由 0 增加至 1 mol/L,之后在出峰浓度下进行梯度洗脱,每次洗脱直到样品基线平稳至少 5 个柱体积再切换至下一浓度梯度。

对分离得到的组分进行液相色谱与质谱联用分析(liquid chromatography and mass spectrometry, LC-MS)。液相色谱条件:色谱仪 Waters Acquity UPLC;检测器 Waters Acquity PDA;检测波长 200 ~ 400 nm;流动相为甲酸、乙腈溶液;柱温 45 ℃;流速 0.3 mL/min;进样量 5 μL。质谱条件:离子方式 ESI⁺;毛细管电压 3.5 kV;锥孔电压 30 V;离子源温度 100 ℃;脱溶剂气温度 400 ℃;质量范围 20 ~ 2 000 m/z。检测数据使用 MassLynx 进行氨基酸序列的推测分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 对实验数据进行处理分析,数据结果用平均值 \pm 标准差表示,采用 Origin 8.5 进行作图。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的选择

以水解度及水解得率为判定指标进行水解用蛋白酶种类的选择。由表 1 结果比较可知,风味蛋白酶对文蛤软体的水解度最高,为 28.08%,其次为复合蛋白酶和酸性蛋白酶;中性蛋白酶酶解后可溶性组分的水解得率最高,为 71.67%。基于以上结果,以风味蛋白酶分别与复合蛋白酶及中性蛋白酶复配进一步优化酶解效果。风味蛋白酶与中性蛋白酶双酶酶解后,水解度与水解得率分别为 33.39% 和 76.27%,由此确定酶解用酶及条件。

表 1 不同蛋白酶水解得率及水解度

Table 1 Hydrolytic yield and hydrolytic degree of different protease

蛋白酶	水解温度/℃	水解 pH	水解度/%	水解得率/%
复合蛋白酶	40	6.0	22.85 \pm 1.23	65.20 \pm 2.37
碱性蛋白酶	55	7.8	12.36 \pm 0.78	59.67 \pm 3.57
酸性蛋白酶	40	3.0	20.42 \pm 1.06	49.72 \pm 2.58
木瓜蛋白酶	37	7.0	17.94 \pm 0.68	52.13 \pm 4.21
菠萝蛋白酶	50	7.1	15.47 \pm 0.51	59.87 \pm 2.17
中性蛋白酶	55	7.2	15.69 \pm 0.78	71.67 \pm 1.35
风味蛋白酶	50	7.0	28.08 \pm 2.34	64.20 \pm 2.38
风味 + 中性蛋白酶	50	7.0	33.39 \pm 1.59	76.27 \pm 5.78
风味 + 复合蛋白酶	50	7.0	32.64 \pm 1.14	71.80 \pm 3.89

2.2 酶解工艺及得率

通过试验确定的最佳酶解工艺如图 1 所示,将冷冻文蛤肉置于室温下解冻 1 h,煮沸 10 min 后按照 1:3 (mg: mL) 的料液比加入去离子水匀浆。

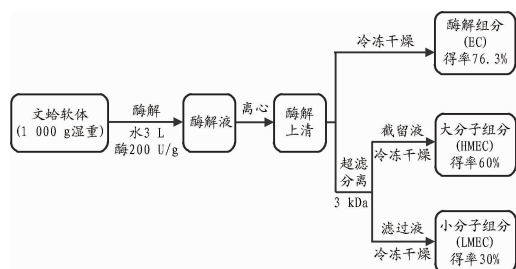


图 1 文蛤软体酶解工艺流程图

Fig. 1 Flow chart of enzymatic hydrolysis of *Meretrix Meretrix L.*

匀浆后加入风味蛋白酶与中性蛋白酶各 100 U/g 湿重,在其最适酶解条件下酶解 4 h。水解结束后于 100 ℃ 灭活 10 min,冷却后 4 ℃ 过夜,8 000 r/min 离心去

除沉淀,水解得率为 76.3%,上清液经 3 kDa 超滤分离得大分子组分 (enzymatic hydrolysate components with high molecular weight, HMEC)、小分子组分 (LMEC),得率分别为 60% 和 30%。

2.3 酶解物体外抗氧化活性评价

总还原能力能客观地反应物质的整体抗氧化活性^[14]。其测定原理是铁氰化钾在抗氧化剂的作用下 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , Fe^{2+} 进一步和 Fe^{3+} 反应生成的普鲁士蓝在波长 700 nm 处有吸收。吸收值越大,表示样品的还原力越大。实验结果由图 2 所示,随着各组分浓度的增大,其总还原能力也逐渐增大,当质量浓度高于 20 g/L 后,总还原力上升趋势趋于平缓。酶解物 (enzymatic hydrolysate components, EC) 及小分子质量组分 (LMEC) 的抗氧化活性差异不大,且略高于大分子组分 (HMEC)。在质量浓度为 25 g/L 时, LMEC 的总还原能力为 54.16%。

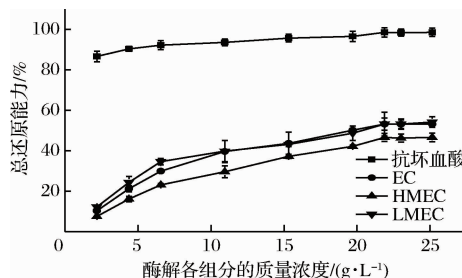


图 2 酶解各分组的总还原能力

Fig. 2 Total reducing capacity of hydrolysate fractions

羟自由基是造成组织脂质过氧化、蛋白质解聚等的主要活性氧种类^[15]。测定过程中,双氧水在 Fe^{2+} 的作用下生成羟自由基及 Fe^{3+} ,向体系中加入水杨酸与羟自由基反应,生成在 510 nm 处有特殊吸收的 2,3-二羟基苯甲酸。如果向反应体系中加入具有清除羟自由基功能的物质,有色化合物的生成量就会相应减少。羟自由基清除率是反映物质抗氧化作用的重要指标。结果由图 3 所示。

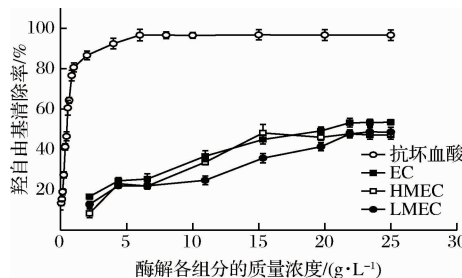


图 3 酶解各分组的羟自由基清除活性

Fig. 3 Scavenging activity of hydroxyl radical in various hydrolysate fractions

文蛤酶解各组分对羟自由基均具有一定的清除能力,酶解物整体组分略高于分离组分。随着各组分质量浓度的增大,羟自由基的清除率也缓慢升高,组分 EC 在 23 g/L 时羟基自由基清除率可达到 53.5%。

DPPH· 是一种较为稳定的自由基。由图 4 所示,文蛤酶解物各组分对 DPPH· 均具有一定的清除能力。组分 EC 与 LMEC 的 DPPH· 清除能力显著高于 HMEC,随质量浓度的升高,对 DPPH· 的清除率也逐渐增大,在 15 ~ 20 g/L 达到饱和,清除率最高约 49%。

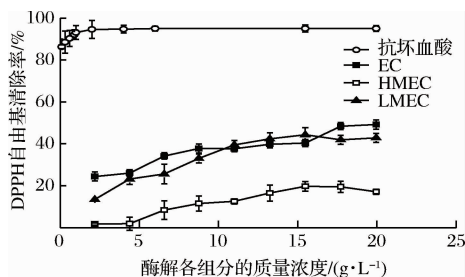


图 4 酶解各组分的 DPPH 自由基清除活性

Fig. 4 Scavenging activity of DPPH radical in various hydrolysate fractions

超氧阴离子是氧气在生物体内产生的第一个自由基^[16],不仅自身具有毒性,而且可经过一系列反应生成其他氧离子自由基而进一步对机体产生损害。测定方法中,邻苯三酚发生链式自氧化反应产生 $O_2^{\cdot-}$,在 pH < 9 时,邻苯三酚自氧化速率与生成的 $O_2^{\cdot-}$ 浓度呈正比,因此可通过紫外分光光度计来定量检测抗氧化剂对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用,从而间接评价抗氧化剂的抗氧化能力。由图 5 所示,文蛤酶解物各组分对超氧阴离子自由基均有一定的清除能力,2 种分离组分的超氧阴离子清除能力在较高浓度下相近,均略低于未分离组分 EC。各组分在质量浓度为 21.9 g/L 时,对超氧阴离子自由基的清除率均达到最大,依次为 EC 53.2%、LMEC 47.7% 和 HMEC 47.6%。

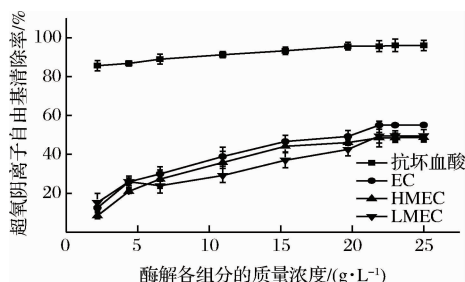


图 5 酶解各组分的超氧阴离子自由基清除活性

Fig. 5 Scavenging activity of superoxide anion radical in various hydrolysate fractions

文蛤软体酶解物 (EC) 及其超滤分离的组分 (LMEC、HMEC) 均具有一定的抗氧化活性,其中,小分子组分的总还原能力与 DPPH 清除能力高于大分子组分。为进一步探讨 LMEC 产生抗氧化活性的原因,从组分的构成角度首先进行研究,分析 LMEC 的物质基础。

2.4 酶解产物 LMEC 的组分构成

各酶解组分的基本组成见表 2。

表 2 酶解产物的组成

单位: % (质量分数)

Table 2 Composition of enzymatic hydrolysate fractions

组分	LMEC	HMEC	EC
蛋白/肽	79.01	60.30	65.77
总糖	1.27	10.84	6.80
脂肪	7.82	18.97	21.11
灰分	9.38	9.40	6.15
总量	97.48	99.51	99.83

由表 2 可看出,各组分中含量最高的物质均为蛋白或肽类,所含质量分数均达到 60% 以上。超滤处理进一步提高了 LMEC 的蛋白含量至 79.01%,同时使得大部分脂肪与糖类物质富集于 HMEC 组分中。文献报道,小分子肽类具有良好的抗氧化活性,且更易被吸收^[17]。NAZEER 等^[18]用木瓜蛋白酶酶解紫文蛤 (*Meretrix casta*) 的产物具有很高的抗氧化活性,经 FPLC 离子交换层析和凝胶过滤层析,分离得到具有抗氧化活性的肽类物质。张泽等^[19]以水解度作为评价指标,考察了中性蛋白酶和胰蛋白酶双酶水解长牡蛎的最佳工艺,并证明了酶解产物有一定的还原能力和对 DPPH 自由基有较强的清除能力。由此推测,LMEC 的抗氧化活性与其含有大量的肽类物质有直接关系。

2.5 LMEC 中肽类组分分子质量测定

首先采用 SDS-PAGE 重点对 LMEC 中的肽类组分进行分析。由图 6 可直观看到,文蛤软体经双酶酶解后 (EC),产生一系列大小不一的酶解产物,条带分子质量主要集中于 16 kDa 以下。通过超滤分离后,LMEC 的分子质量集中于 1.2 kDa 以下,仅由少量 12 ~ 20 kDa 组分残留,说明超滤可较高效地将小分子肽类组分富集。

进一步地,采用 HPLC 方法更精确地分析,结果如图 7-b 所示。因组分较为复杂,LMEC 的 HPLC 图谱中在 6.0 ~ 12.0 min 形成较大的宽峰,12.0 ~ 16.0 min 还有 3 个吸收峰。为判定其分子质量,我们在同样的液相条件下进行标准品的检测,结果如图 7-a 所示。

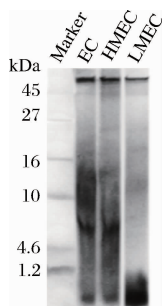


图6 酶解产物 SDS-PAGE 检测

Fig. 6 Detection of enzymatic hydrolysate fractions by SDS-PAGE

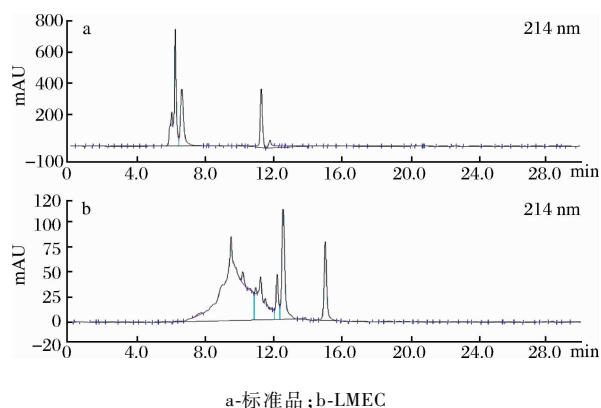


图7 LMEC 及标准品的 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatogram of LMEC and standard products

通过曲线拟合得到分子质量与保留时间的线性计算式 $\lg M = -0.5447t + 8.24$, 并以此计算得到 LMEC 的分子质量为 1.05 kDa, 与 SDS-PAGE 的结果相吻合。

2.6 LMEC 氨基酸组成分析

蛋白质中氨基酸组成与其生理功能具有密切关联^[20]。LMEC 的氨基酸组成如表 3 所示。LMEC 含有较高含量的游离氨基酸, 其中以三支链氨基酸 (Leu、Val 和 Ile) 和 His 含量较高。分析水解氨基酸组成可以看出, LMEC 中肽类组分中主要含有 Glu、Asp、三支链氨基酸及 Arg 等氨基酸单元。文献报道, Arg 及三支链氨基酸 (branched chain amino acid, BCAA) 是长时间持续运动时参与供能的重要氨基酸^[21]。由于肌肉中支链氨基酸分解非常活跃, BCAA 能以相当快的速率转氨基和完全氧化, 其氧化产生 ATP 的效率高于其他氨基酸, 进而可能影响机体的氧化指标 (如丙二醛、超氧化物歧化酶及乳酸脱氢酶等)^[22-23]。

2.7 LMEC 的初步分离与肽段组成分析

在测定 LMEC 氨基酸组成的基础上, 进一步了解

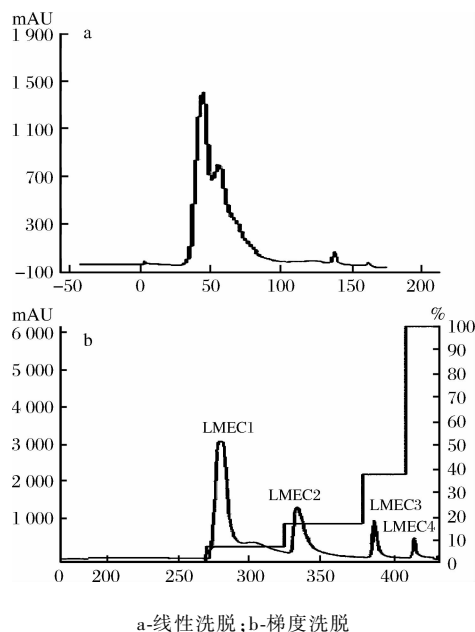
LMEC 可能含有的肽类构成。为简化后续分析过程, 首先对 LMEC 进行初级分离。采用 DEAE 对 LMEC 进行线性与梯度洗脱分离, 结果如图 8 所示。

表 3 LMEC 的氨基酸组成

单位: % (质量分数)

Table 3 Amino acid composition in LMEC

氨基酸	游离氨基酸	水解氨基酸
Asp	0.187 3	7.563 7
Glu	0.537 7	11.538 3
Ser	0.026 1	1.913 8
His	0.820 2	1.342 3
Gly	0.303 4	3.679 0
Thr	0.205 8	2.762 9
Arg	0.030 6	3.429 7
Ala	0.670 7	3.925 5
Tau	0.269 9	0.362 7
Tyr	0.414 1	2.303 9
Cys	0.597 1	0.352 4
Val	0.498 7	3.833 5
Met	0.519 8	2.059 8
Phe	0.677 3	2.676 8
Ile	0.639 3	3.488 5
Leu	1.766 6	5.509 2
Lys	1.010 9	5.784 0
Pro	0.085 1	3.036 7
总计	8.522 5	65.562 4



a-线性洗脱; b-梯度洗脱

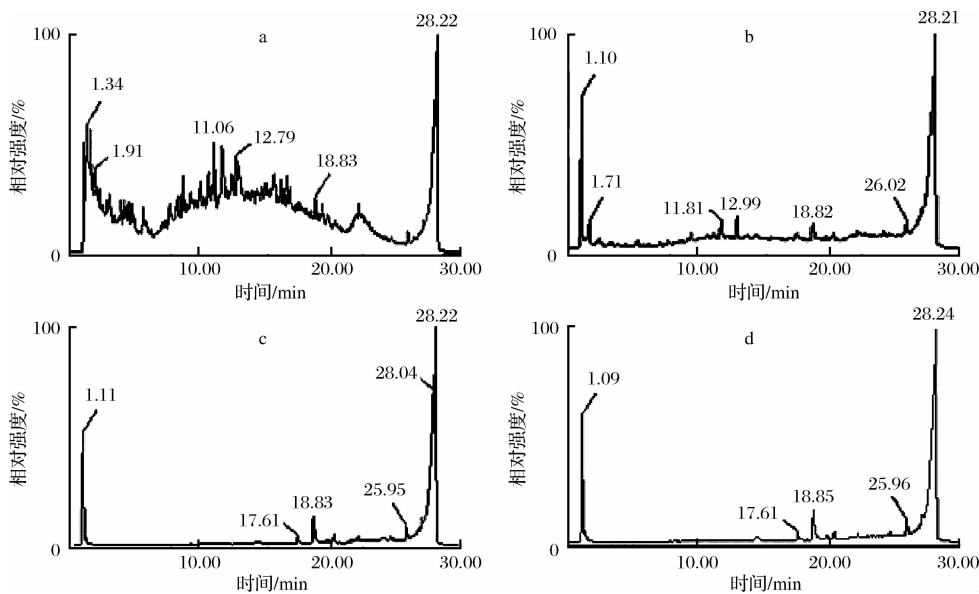
图8 DEAE 线性及梯度洗脱曲线

Fig. 8 DEAE linear and gradient elution curves in DEAE

通过线性洗脱 (图 8-a), 确定了样品中成分在 0、0.064、0.163、0.37、1 mol/L NaCl 浓度下可被洗脱, 以此进行 NaCl 梯度洗脱, 如图 8-b 得到 4 个组分, 按

照洗脱顺序依次标记为 LMEC1 ~ LMEC4。
分别对获得的 4 个洗脱组分进行 UPLC-MS 联用分析。分析 4 个组分的液相图可知,LMEC1 成分较为复杂,LMEC2、LMEC3 及 LMEC4 谱图类似。对 4

个组分中液相分析得到物质进一步进行质谱分析(图 9),并基于质谱系统的多肽分析方法进行序列鉴定,得到其所含多肽的序列汇总如表 4。



a-LMEC1;b-LMEC2;c-LMEC3;d-LMEC4

图 9 LMEC 的液相图谱

Fig. 9 Liquid chromatogram of LMEC

表 4 LMEC 可能含有的多肽序列

Table 4 Polypeptide sequences speculated in LMEC

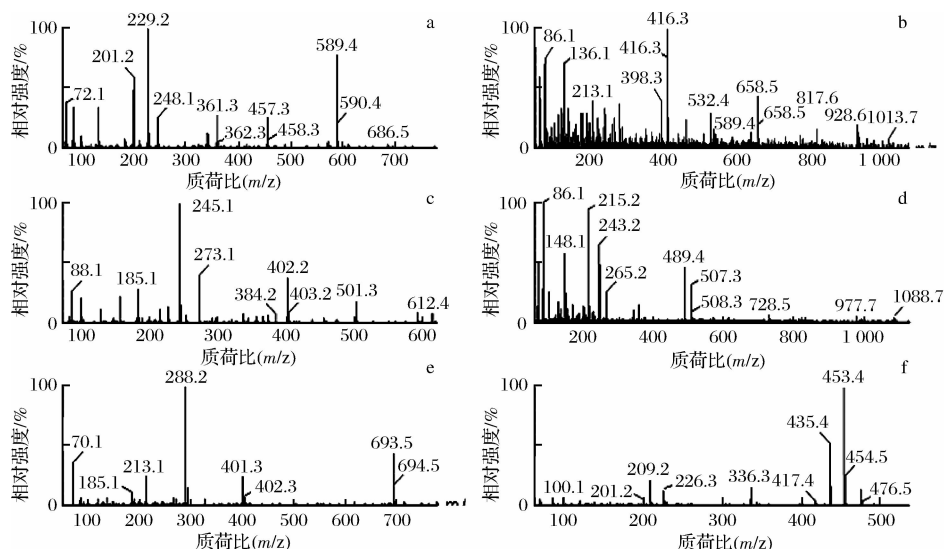
保留时间/ min	分子量/ Da	氨基酸组成
11.05	588	Val-Glu-Leu-Thr-Lys
11.71	927	Thr-Leu-Ala-Leu-Gly-Lys-Gly-Gly-Val-Leu
11.80	610	Val-Gly-Pro-Leu-Pro-Glu
13.04	935	Lys-Gly-Ser-Glu-Val-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe
16.69	692	Thr-Thr-Leu-Leu-Val-Phe
18.84	451	Tyr-Ala-Ala-Ala-Gly

分析发现,推测得到的多肽序列中多含有 Ala、Thr、Val、Leu、Pro、Glu 等,与 LMEC 的氨基酸组成分析结果相吻合。文献报道抗氧化肽通常在 N 端含有疏水性氨基酸,如 Val 或 Leu,且序列中多含有 Pro、His、Tyr、Trp 和 Cys 等氨基酸^[24]。吴艳艳等^[25]从珍珠贝的蛋白酶酶解产物中分离出相对分子质量为 1 039.56 Da 的 1 种抗氧化肽,具有清除自由基的活性,其氨基酸序列为 Gly-Ala-Gly-Leu-Pro-Gly-Lys-Arg-Glu-Arg。JIN 等^[26]通过酶解舟贝分离出 Met-Cys-Leu-Asp-Ser-Cys-Leu-Leu(P1)和 His-Pro-Leu-Asp-Ser-Leu-Cys-Leu(P2)2 种抗氧化肽,均具有 DPPH·及 ABTS+清除活性。王雪琴等^[27]也从鲮鱼蛋白酶解

产物中分离得到 Leu-Asp-Ile-Gln-Lys-Glu-Val(843.5 Da)和 Thr-Ala-Ala-Ile-Val-Asn-Thr-Ala(759.4 Da)2 个具有抗氧化活性的肽序。对比发现,实验分析得到的肽段序列符合文献中对于抗氧化肽的特征描述,因而与其具有的抗氧化活性存在一定的关联。但其确定的抗氧化活性尚需进一步实验证实,因而对 LMEC 的精细分离及活性验证工作还有待进一步开展(图 10)。

3 结论

以水解度及水解得率为优化依据,考察并筛选了文蛤软体酶解用蛋白酶种类,确定了双酶酶解的最佳条件为风味蛋白酶与中性蛋白酶各 100 U/g,50℃水解 4 h,优化后的水解度是 33.39%,水解得率是 76.3%。酶解产物经超滤分离得到 LMEC 及 HMEC 组分,通过体外抗氧化活性检测发现 LMEC 具有较好的抗氧化活性。进一步对 LMEC 进行物质基础分析发现,LMEC 含有约 79% 的肽类物质,分子质量约 1.05 kDa。通过离子交换初步分离并采用 UPLC-MS 联用,分析并推测了 LMEC 中可能含有的 6 种肽序,富含 Ala、Thr、Val、Leu、Pro、Glu 等氨基酸单元,符合文献报道的抗氧化肽序列特征。通过研究,从物质层面



a ~ f-保留时间分别为 11.05、11.71、11.80、13.04、16.69、18.84 min

图 10 LMEC 中可解析的肽类物质质谱图

Fig. 10 Mass spectra of LMEC

对文蛤酶解物中产生抗氧化活性的肽类物质进行了初步定性分析,为文蛤抗氧化活性提供理论依据,也为后续活性肽的分离提供参考方向。

参 考 文 献

- [1] 赵莎莎,赵玉勤,张亚茹,等. 文蛤多肽的制备及对非酒精性脂肪肝细胞模型的修复作用[J]. 中国食品学报, 2017,17(6):33-39.
- [2] 何耀涛,邓家刚,杜成智,等. 文蛤肉药用价值研究概况[J]. 广西中医药大学学报,2017,20(3):65-67.
- [3] YIN Hua, YUAN Qiang, CHU Yunyue. Extraction and determination of polysaccharides from *Meretrix meretrix* Linnaeus[J]. Marine Drugs, 2006, 25(1): 48-53.
- [4] HSIEH Y L, TENG H J, YEH Y H, et al. The protective effects of clams on hypercholesterolemia in late-stage triple-transgenic Alzheimer's diseased mice hearts[J]. Marine Drugs, 2018, 16(8): 263.
- [5] HUANG Fangfang, ZHAO Shasha, YU Fangmiao, et al. Protective effects and mechanism of *Meretrix meretrix* oligopeptides against nonalcoholic fatty liver disease[J]. Marine Drugs, 2017, 15(2): 31-44.
- [6] 严晓丹,钱建瑛,许泓瑜,等. 文蛤不同极性提取物对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 中国海洋药物, 2015, 34(5): 71-76.
- [7] 潘静,徐惠,张小蒙,等. 文蛤活性肽的研究现状及应用前景[J]. 科技资讯, 2017, 15(10): 239-241.
- [8] 甘瑾. 玛咖 (*Lepidium meyenii* Walp.) 抗氧化活性及活性物质基础的研究[D]. 北京: 北京林业科学研究院, 2013: 1-112.
- [9] Umayaparvathi S, Meenakshi S, Vimalraj V, et al. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*) [J]. Biomedicine and Nutrition, 2014 (4): 343-353.
- [10] CHEN Ling, HUANG Gangliang. Antioxidant activities of phosphorylated pumpkin polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 256-261.
- [11] 杨晋,陶宁萍,王锡昌. 文蛤的营养成分分析及其用于海味香精的酶解液制备[J]. 食品工业科技, 2007, 4: 146-149.
- [12] WANG Lingchong, CHEN Liye, LI Junsong. Structural elucidation and immune-enhancing activity of peculiar polysaccharides fractionated from marine clam *Meretrix meretrix* (Linnaeus) [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 201: 500-513.
- [13] 李和生,刘智勇,王鸿飞. 文蛤多肽组分的分离及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(6): 30-34.
- [14] 慕蕾,王振宇. 松仁多肽的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 35(10): 110-113.
- [15] 孟娟霞,赵明峰. 活性氧与组织器官纤维化[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(5): 1284-1288.
- [16] 刘占才,牛俊英. 超氧阴离子自由基对生物体作用机理的研究[J]. 焦作教育学院学报, 2002, 18(4): 48-51.
- [17] LIANG Mingcai, WANG Zhengxuan, LI Hui, et al. L-Argi-

- nine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 115: 315 – 328.
- [18] NAZEER R A, PRABHA K R D, KUMAR N S S, et al. Isolation of antioxidant peptides from clam *Meretrix casta* (Chemnitz) [J]. Food Sci Technol, 2013, 50 (4): 777 – 783.
- [19] 张泽, 赵前程, 程继龙, 等. 长牡蛎蛋白双酶水解工艺及其产物的抗氧化活性 [J]. 湖南农业科学, 2012, 52 (11): 2 315 – 2 317.
- [20] 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.
- [21] JET L L, MILLER R H. Amino acid metabolism during exercise in trained rats: The potential role of carnitine in the metabolism of branched chain amino acid [J]. Metabolism, 1987, 36 (8): 748 – 752.
- [22] MOURA C S, LOLLO P C B, MORATO P N, et al. Modulatory effects of arginine, glutamine and branched-chain amino acids on heat shock proteins, immunity and antioxidant response in exercised rats [J]. Food & Function, 2017, 8 (9): 3 228 – 3 238.
- [23] CHAI T T, LAW Y C, WONG F C. Enzyme-assisted discovery of antioxidant peptides from edible marine invertebrates: A review [J]. Marine drugs, 2017, 15 (2): 42 – 58.
- [24] 张晖, 唐文婷, 王立, 等. 抗氧化肽的构效关系研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32 (7): 673 – 679.
- [25] WU Yanyan, WANG Jing, LI Laihao, et al. Purification and identification of an antioxidant peptide from *Pinctada fucata* muscle [J]. Journal of Food, 2018, 1 (16): 11 – 19.
- [26] JIN J E, AHN C B, JE J Y. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed ark shell (*Scapharca subcrenata*) [J]. Process Biochemistry, 2018, 72: 170 – 176.
- [27] WANG Xueqin, YU Huahua, XING Rongen, et al. Purification and identification of antioxidative peptides from mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) protein [J]. RSC Advances, 2018, 8 (37): 20 488 – 20 498.

Antioxidant evaluation and composition characterization of enzymatic hydrolysates of *Meretrix meretrix* L.

HU Dawei¹, LI Heng^{1*}, JIANG Min¹, DING Hailong², WANG Songtao²,
SHEN Caihong², XU Zhenghong^{3,4}, SHI Jinsong^{1*}

1 (School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2 (National Engineering Research Center for Solid-State Brewing, Luzhou 646000, China)

3 (School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

4 (National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology (Jiangnan University), Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Antioxidant activities of enzymatic hydrolysates of *Meretrix meretrix* L. with different molecular weights were compared, and the enzymatic hydrolysate components with low molecular weight (LMEC) were analyzed. A stable double-enzyme hydrolysis technique with flavor protease and neutral protease to prepare *Meretrix meretrix* L. hydrolysates was established. The LMEC presented relatively good antioxidant activities, as their total reducing power was 54.16%, and its maximum scavenging rates of hydroxyl radicals, DPPH free radicals and superoxide anions were 53.5%, 49%, and 47.7%, respectively. Besides, LMEC included 79% oligo-peptides with an average molecular weight of 1.05 kDa, and it was rich in Ala, Thr, Val, Leu, Pro, and Glu. According to UPLC-MS analysis, LMEC were speculated to have six possible peptides. This study provides a theoretical basis for understanding the antioxidant activity of *Meretrix meretrix* L. and also for separating active peptides in the future.

Key words *Meretrix meretrix* L.; enzymatic hydrolysis; antioxidant; component analysis; peptides