

酶解法制备胶原蛋白肽及其抗氧化活性的研究

朱静静¹, 潘道东^{1,2*}, 孙杨赢¹, 吴振¹, 曹锦轩¹, 曾小群¹

(1. 宁波大学 浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 南京师范大学 食品科学与营养系, 江苏 南京 210097)

摘要:以浙东白鹅为研究对象,在木瓜蛋白酶和风味蛋白酶复合一次酶解鹅皮胶原蛋白基础上,选取4种常见蛋白酶对胶原蛋白酶解产物进行二次酶解,并优化二次酶解条件以提高其产物的抗氧化活性,以抗氧化能力为指标确定二次酶解中的最佳水解酶。在单因素试验基础上,以还原力为指标,选取pH、酶解温度和酶解时间为考察因素,利用响应曲面法确定最佳酶解条件。结果表明,在胶原蛋白的二次酶解中,以碱性蛋白酶酶解所得产物抗氧化活性较好,响应曲面法确定碱性蛋白酶最优酶解条件为pH 8.96、酶解温度 49.3℃、酶解时间 5.7 h,此时所得多肽还原力达到 13.48×10^{-2} ,较优化前提高了 3.51%。

关键词:胶原蛋白; 胶原蛋白肽; 氧化活力; 碱性蛋白酶; 还原力

中图分类号: TS251.92

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 04-0026-07

胶原蛋白是生物体内常见的细胞外蛋白,多分布在动物的皮、骨、软骨、牙齿、肌腱、韧带等部位^[1]。胶原蛋白肽是胶原蛋白经降解后所得的小肽混合物,研究表明,胶原蛋白肽具有抗氧化、降血压、提高机体对矿物元素的吸收能力、增强免疫力、抗菌等诸多生理活性^[2]。抗氧化性胶原蛋白肽因具有抑制生物大分子过氧化、清除体内自由基的功效以及较高的安全性而被广泛关注。因此,如何获得抗氧化活性较强的天然胶原蛋白肽成为近年来国内外研究的热点。

蛋白质多肽链内部普遍存在着许多生物活性功能区,采用合理的降解工艺使胶原蛋白长链断裂,暴露功能基团,随之表现出不同的生物活性^[3]。目前制备抗氧化性肽最常见的方法是酶解法,其工艺主要包括单酶水解法和多酶水解法两种。研究发现,单一酶作用范围小,只能使少量蛋白溶解,不能达到酶解效果;选用多种酶对底物进行水解时,可有效增大底物的水解程度,从而使得更多的活性氨基酸残基暴露出来^[4]。Zhao等^[5]采用菠萝蛋白酶和碱性蛋白酶分步酶解海参蛋白,其产物生

物活性更强。Byun等^[6]用碱性蛋白酶、链霉菌蛋白酶、胶原酶对狭鳕鱼皮分步酶解,所得酶解物活性较强。贾韶千等^[7]以还原力为指标,采用碱性蛋白酶和胃蛋白酶双酶分步水解银杏种仁蛋白,得到具有较高活性的抗氧化肽。这些研究表明,内肽酶是制备抗氧化活性肽的重要酶类,然而这些酶对鹅皮胶原蛋白的降解作用以及所得小分子产物的生物活性强弱缺乏相应的研究,因此,探究内肽酶酶解鹅皮胶原蛋白、确立最优的胶原蛋白肽制备条件具有重要意义。

本文以浙东白鹅鹅皮为提取胶原蛋白肽的原料,采用分步酶解法,对鹅皮胶原蛋白酶解产物的DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基清除能力,以及还原力进行测定,并以还原力为指标对酶解条件进行优化,旨在获得抗氧化活性较高的胶原蛋白肽。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

浙东白鹅由象山曙海大白鹅食品有限公司提

收稿日期: 2016-01-04.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家农业科技成果转化基金(2014GB2C220153); 浙江省自然科学基金(LQ14C200002)。

第一作者: 朱静静(1988—),女,山东菏泽人,在读硕士研究生,主要研究方向: 畜产品加工技术。E-mail: jingjingzhu18@163.com

*通信作者: 潘道东(1964—),男,浙江临海人,教授,主要研究方向: 畜产品加工技术。E-mail: daodongpan@163.com

供;碱性蛋白酶[EC3.4.21.14]、胰蛋白酶[EC3.4.21.4]、中性蛋白酶[EC3.4.24.4]、胰凝乳蛋白酶[EC3.4.21.1]购自北京索莱宝科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)购自美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

H-2050R 型台式高速冷冻离心机(湘仪离心机有限公司);电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);GelX1850 凝胶成像分析系统(上海欧翔科学仪器有限公司);Alpha1-4LD plus 冷冻干燥机(德国 Marin Christ);Infinite200pro 酶标仪(TECAN 公司)。

1.3 鹅皮胶原蛋白肽的提取

胶原蛋白提取参考 Woo 等方法^[8],并稍作修改。将浙东白鹅宰杀后,取其鹅皮、除去可见脂肪,然后剪碎鹅皮,处理后的鹅皮采用乙醚进一步除去鹅皮脂肪,然后利用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 除去杂蛋白,将所得上清液于 4°C 、2%胃蛋白酶(pH 2.0)酶解 72 h。酶解完成后收集酶解产物并冷冻干燥,得胶原蛋白。

胶原蛋白一次酶解参考丁琳等方法^[9],向所提取的胶原蛋白(底物浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)中加入 $4000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 木瓜蛋白酶和风味蛋白酶混合酶液(1:1, pH 6.0)于 50°C 酶解 5 h,酶解后即得胶原蛋白粗产物。

二次酶解:向所得的第一次酶解后的产物分别添加 $4000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 碱性蛋白酶(温度 50°C , pH 9.0)、胰蛋白酶(温度 37°C , pH 8.0)、中性蛋白酶(温度 50°C , pH 8.0)、胰凝乳蛋白酶(温度 37°C , pH 8.0)对一次酶解所得胶原蛋白产物进一步酶解 5 h,以获得抗氧化能力更好的胶原蛋白肽。

1.4 抗氧化活性的测定

1.4.1 DPPH 自由基清除能力的测定

鹅皮胶原蛋白酶解产物 DPPH 清除能力的测定参考 Li 等方法^[10],并稍作修改。向 1.5 mL PE 管中加入 0.5 mL 一次酶解产物和二次酶解产物溶液,分别加入 0.125 mL 0.2%(w/v) DPPH 溶液(99.5%乙醇溶解,现用现配)、0.5 mL 99.5%乙醇,混匀,混合液常温避光反应 60 min 后,测定 517 nm 处吸光值。空白组用 0.5 mL 蒸馏水代替样品溶液。对照组用 0.125 mL 99.5%乙醇代替 DPPH 溶液。

DPPH 清除率 $= ((A_0 + A_1 - A_2) / A_0) \times 100\%$, (1) 式中, A_0 为空白组吸光度; A_1 为对照组吸光度; A_2 为样品组吸光度。

1.4.2 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力的测定

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力测定参考涂勇刚等方法^[11],略作修改。试验设空白组、样品组和对照组,样品组试管中依次加入 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液(pH 7.4)、 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻菲罗啉溶液、样品溶液、 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 溶液各 0.2 mL, 0.1 mL $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液,混匀, 37°C 避光反应 1 h 后,测定 536 nm 处吸光值。空白组中用 0.2 mL 蒸馏水代替样品溶液;对照组中用 0.3 mL 蒸馏水代替样品溶液和 H_2O_2 溶液。

$\cdot\text{OH}$ 清除率 $= ((A_2 - A_1) / (A_0 - A_1)) \times 100\%$, (2) 式中, A_0 为对照组吸光度; A_1 为空白组吸光度; A_2 为样品组吸光度。

1.4.3 超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除能力的测定

采用邻苯三酚自氧化法测定鹅皮胶原蛋白酶解液 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力^[12]。将 250 μL 一次酶解产物和二次酶解产物样品与 450 μL $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)混匀,室温放置 10 min 后加入 25 μL $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液,每隔 5 min 测定 320 nm 处吸光值。空白组用同体积蒸馏水代替样品溶液。

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率 $= (\Delta A_0 - \Delta A_1) / \Delta A_0 \times 100\%$, (3) 式中, ΔA_0 为空白组吸光度变化值; ΔA_1 为样品组吸光度变化值。

1.4.4 还原力的测定

鹅皮胶原蛋白酶解液还原能力测定采用 Wu 等方法^[13],略作修改。依次加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液(pH 6.6)、1%铁氰化钾、一次酶解产物和二次酶解产物样品溶液各 200 μL ,混匀,于 50°C 恒温水浴 20 min,然后加入 200 μL 10%三氯乙酸,再次混匀。混合液 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液 0.5 mL,依次加入 0.5 mL 蒸馏水、0.1 mL 0.1% FeCl_3 ,混匀,常温反应 10 min,于 700 nm 处测定吸光值。

1.5 水解度(DH%)的测定

胶原蛋白肽水解度测定参考赵新准等方法^[14]。

1.6 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳

将胶原蛋白酶解产物进行 Tricine-SDS-PAGE 以确定其分子量范围^[15]。取 20 μL $5 \times$ 蛋白上样缓冲液与 80 μL 胶原蛋白酶解液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)混匀,沸水浴 10 min,室温冷却后备用。配制 SP-Tricine SDS-PAGE 凝胶(18%的分离胶、5%的浓缩胶),各泳道上样量为 10 μL ,浓缩胶 120 V, 30 min,分离胶 150

V, 2 h. 考马斯亮蓝 R250 染色液染色 30 min, 脱色, 凝胶成像系统观察并拍照。

1.7 胶原蛋白酶解条件的确立

以水解度(DH%)和还原力(A_{700})为指标对碱性蛋白酶酶解工艺进行优化。设定底物质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别对 pH(A)为 6、7、8、9、10、11、12、13, 酶的用量(B)为 2 000, 3 000, 4 000, 5 000, $6\,000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 酶解时间(C)为 3, 4, 5, 6, 7 h 和酶解温度(D)为 30, 40, 50, 60, 70°C 进行单因素试验。在单因素试验基础上, 采用响应面分析试验, Design-Expert 8.0.b 软件分析, 确定最佳酶解条件。

1.8 数据统计与分析

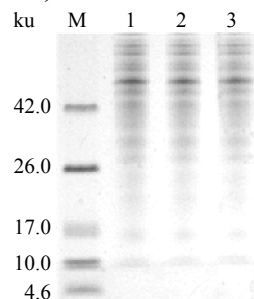
数据结果采用 SAS 8.0 软件进行统计学处理, 所有数据均采用 $\bar{x} \pm \text{std}$ 表示, 不同处理间的差异采用 one-way ANOVA 进行比较分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著, 最终处理结果用 Origin 9.0 作图。

2 结果与分析

2.1 一次酶解所得鹅皮胶原蛋白产物的 Tricine-SDS-PAGE

一次酶解后所得鹅皮胶原蛋白产物 Tricine-SDS-PAGE 结果如图 1 所示, 经木瓜蛋白酶+风味蛋白酶复合酶解后的胶原蛋白产物分子量主要集中在 26 ku 以上, 2 500 u 以下仅有微弱的肽片段产生。Kitts^[16]和 Jiang^[17]等研究报道, 多肽的生物活性功能取决于其氨基酸组成和氨基酸的序列, 每个生物活性肽主要包含 3~20 个氨基酸残基, 分子量在 2 500 u 以下, 而在本文中, 一次酶解后的胶原蛋白产物大多集中于 26 ku 以上, 此时酶解产物含有

大量蛋白片段, 这意味着胶原蛋白酶解不充分, 有必要选择合适的酶来进一步酶解这些大分子量的胶原蛋白片段, 使之降解为胶原蛋白肽, 释放出更高活性。一次酶解后胶原蛋白产物对 DPPH $\cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率见表 1, 一次酶解后胶原蛋白产物对 DPPH $\cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率分别为 31.18%、18.02% 和 13.24%, Fe^{3+} 的还原能力为 8.31×10^{-2} , 这些数据也表明, 一次酶解后的胶原蛋白产物抗氧化活力仍然低下。因此, 该产物需进一步酶解。



泳道 M 为预染的 Marker; 泳道 1、2 和 3 为平行样本

图 1 一次酶解所得鹅皮胶原蛋白产物的电泳图

表 1 一次酶解所得胶原蛋白产物抗氧化能力

清除率/%			$A_{700}/10^{-2}$
DPPH $\cdot$	$\cdot\text{OH}$	$\text{O}_2^{\cdot-}$	
31.18 $\pm$ 1.03	18.02 $\pm$ 0.59	13.24 $\pm$ 0.95	8.31 $\pm$ 0.17

2.2 二次酶解产物抗氧化能力的比较

本文选用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 4 种酶对一次酶解后的胶原蛋白产物进一步酶解, 对酶解后的胶原蛋白肽再次进行抗氧化能力测定。根据 1.4 节所述方法测定相同质量浓度($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)下不同种类蛋白酶二次酶解产物的抗氧化能力(表 2)。

表 2 不同蛋白酶二次酶解胶原蛋白的产物抗氧化能力

蛋白酶种类	清除率/%			$A_{700}/10^{-2}$
	DPPH $\cdot$	$\cdot\text{OH}$	$\text{O}_2^{\cdot-}$	
碱性蛋白酶酶解液	83.03 $\pm$ 0.25 ^b	37.92 $\pm$ 2.55 ^c	68.05 $\pm$ 1.82 ^b	13.10 $\pm$ 0.22 ^c
胰蛋白酶酶解液	71.85 $\pm$ 0.73 ^d	27.13 $\pm$ 0.46 ^d	56.19 $\pm$ 1.28 ^d	12.82 $\pm$ 0.41 ^c
中性蛋白酶酶解液	57.36 $\pm$ 0.29 ^e	19.88 $\pm$ 1.00 ^f	45.08 $\pm$ 1.73 ^e	10.25 $\pm$ 0.25 ^d
胰凝乳蛋白酶酶解液	54.22 $\pm$ 0.90 ^f	22.60 $\pm$ 1.77 ^e	53.77 $\pm$ 2.29 ^d	9.32 $\pm$ 0.36 ^d
0.1 mg $\cdot$ mL ⁻¹ Vc	50.71 $\pm$ 2.01 ^g	91.14 $\pm$ 2.00 ^b	62.92 $\pm$ 0.96 ^c	70.43 $\pm$ 2.12 ^b
1 mg $\cdot$ mL ⁻¹ Vc	92.64 $\pm$ 0.29 ^a	>100 ^a	90.21 $\pm$ 0.28 ^a	272.35 $\pm$ 1.90 ^a
20 mmol $\cdot$ L ⁻¹ BHT	81.36 $\pm$ 0.46 ^c	-	-	-
空白组	0	0	0	3.80 $\pm$ 0.14 ^e

注: 字母不同代表差异显著, $P < 0.05$; “-”代表未测。

表2数据显示,胶原蛋白经2次酶解后,4种酶二次酶解产物清除DPPH效率与一次酶解产物相比,清除自由基的能力均显著提高;还显示碱性蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、胰凝乳蛋白酶的产物在清除DPPH的效率上存在着显著性差异,碱性蛋白酶酶解后的产物对DPPH清除能力达到了83.03%,明显优于 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Vc、 $20\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ BHT和其余3种蛋白酶酶解后的产物;在清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的效率上,碱性蛋白酶的酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率分别为37.92%和68.05%,均优于其他几种酶酶解物的清除效果,也相应强于一次酶解后的产物对它们的清除能力。另外碱性蛋白酶酶解产物还原力为 13.10×10^{-2} (吸光值越大,表明样品的还原力越强),高于其他几种酶解产物对 Fe^{3+} 的还原能力,且不同酶解产物间存在显著差异($P<0.05$)。

综上所述,二次酶解后,胶原蛋白肽抗氧化能力得到提高;对所选的4种酶进行比较,发现碱性蛋白酶酶解产物对DPPH、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率、对 Fe^{3+} 还原力均高于其他酶解产物;用碱性蛋白酶酶解鹅皮胶原蛋白可以获得抗氧化活性更高的胶原蛋白肽。

2.3 碱性蛋白酶酶解胶原蛋白最佳条件的确定

每种酶均有其最适的反应条件,在最适的反

应条件下酶的活性最高。由于每种酶对于特定底物都会有不同的酶解条件,在不同的酶解条件下所得到的抗氧化能力也不尽相同,所以有必要对碱性蛋白酶最佳酶解条件进行确定。碱性蛋白酶酶解胶原蛋白的最佳条件主要通过单因素试验和响应面曲线来确定。

2.3.1 单因素试验结果

碱性蛋白酶二次酶解胶原蛋白的单因素试验结果如图2所示。从图2(a)可见,二次酶解产物的还原力先增加后减少,水解度与其保持相似的变化趋势。当 $\text{pH}=11$ 时,水解度达到最大,为67.16%,还原力在 $\text{pH}=9$ 时达到最大值,为 13.21×10^{-2} 。由图2(b)和(c)可知,随着酶添加量的不断增加和酶解时间的不断延长,胶原蛋白肽的水解度及还原力不断增强。当酶添加量高于 $4000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 或酶解时间大于5 h时,水解度和还原力上升趋势平缓。由图2(d)可知,随着酶解温度的升高,水解度和还原力先增大后减小,这可能是由于温度过高抑制酶的活性,导致酶解不彻底,进而影响酶解液的还原能力。

在单因素试验的基础上,结合水解度、还原力(A_{700})双指标,筛选出 pH 、温度、时间3个因素为显著因素,以还原力为指标,利用Design-Expert 8.0.b软件进行Box-Behnken 3因素3水平响应面试验设计,以确定最优酶解条件(表3)。

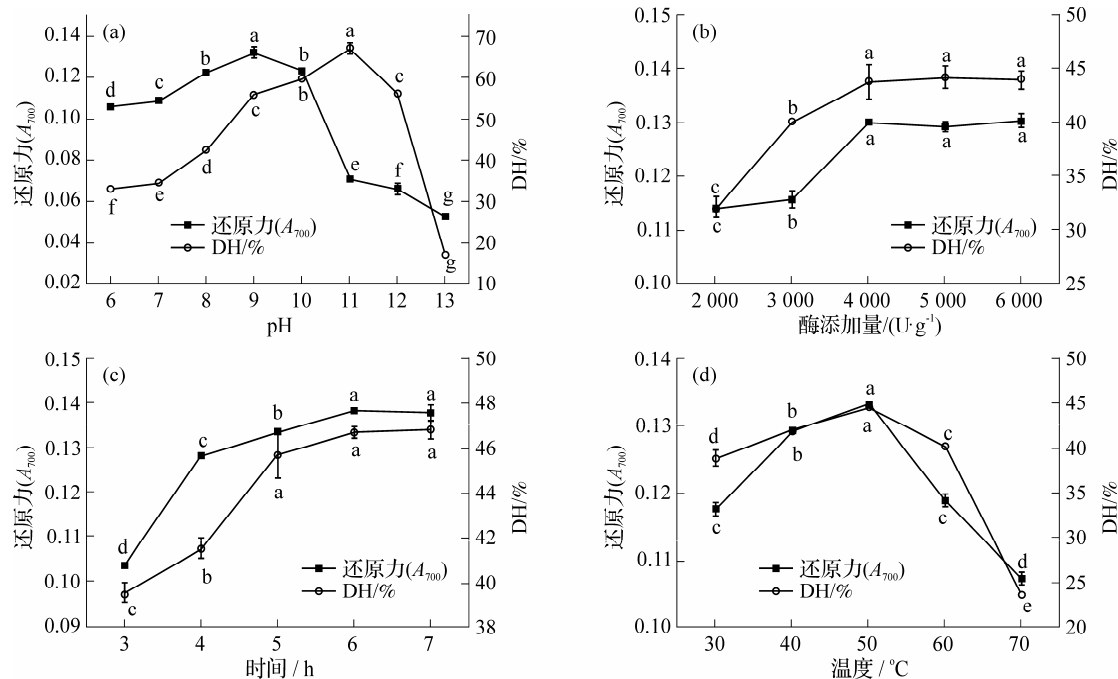


图2 碱性蛋白酶酶解条件对水解度和还原力的影响

表3 碱性蛋白酶响应曲面试验设计

水平	pH	温度/°C	时间/h
-1	8.5	45	5
0	9	50	6
1	9.5	55	7

2.3.2 响应面设计

在单因素实验的基础上, 根据表3响应曲面试验设计方案, 采用 Box-Behnken 设计方法, 对碱性蛋白酶酶解条件进行确立, 结果见表4.

表4 响应曲面试验设计及结果

序号	pH	温度/°C	时间 h	$A_{700}/10^{-2}$
1	-1	-1	0	12.72±0.03
2	0	0	0	13.43±0.22
3	1	0	-1	13.04±0.19
4	-1	1	0	11.58±0.03
5	0	1	-1	12.23±0.14
6	0	0	0	13.51±0.16
7	0	-1	-1	12.82±0.16
8	0	0	0	13.55±0.17
9	0	-1	1	12.43±0.09
10	0	0	0	13.52±0.18
11	1	1	0	12.01±0.10
12	1	0	1	11.98±0.24
13	-1	0	-1	12.51±0.17
14	0	0	0	13.47±0.21
15	-1	0	1	12.64±0.14
16	1	-1	0	12.40±0.06
17	0	1	1	11.58±0.19

2.3.3 响应曲面试验的方差分析

经 Design-Expert 8.0.b 软件对碱性蛋白酶的酶解试验结果进行多元回归分析, 建立了碱性蛋白酶酶解条件(pH A 、温度 B 和时间 C)与酶解产物还原力 Y 的数学模型:

$$Y = -2.480 + 0.374A + 0.025B + 0.110C + 7.434AB - 5.983AC - 1.267BC - 0.021A^2 - 3.187B^2 - 4.335C^2.$$

对模型的方差分析结果见表5, 该模型显著性 $P < 0.0001$, 极显著, 说明该模型具有意义; 模型失拟项 $P > 0.05$, 不显著, 说明模型拟合度好. 分析各模型系数的 P 值, 得出 A 的影响不显著, 而其他模型的影响均显著.

表5 回归方程显著性检验与方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob
模型 ¹⁾	7.202E-004	9	8.002E-005	313.05	<0.0001
A	8.845E-009	1	8.845E-009	0.035	0.8577
B	1.103E-004	1	1.103E-004	431.34	<0.0001
C	4.884E-005	1	4.884E-005	191.05	<0.0001
AB	1.382E-005	1	1.382E-005	54.05	0.0002
AC	3.580E-005	1	3.580E-005	140.03	<0.0001
BC	1.605E-006	1	1.605E-006	6.28	0.0406
AA	1.143E-004	1	1.143E-004	447.10	<0.0001
BB	2.674E-004	1	2.674E-004	1045.88	<0.0001
CC	7.912E-005	1	7.912E-005	309.53	<0.0001
残差	1.789E-006	7	2.556E-007		
失拟项 ²⁾	9.521E-007	3	3.174E-007	1.52	0.3394
纯误差	8.372E-007	4	2.093E-007		
总和	7.220E-004	16			

注: 1)有显著性; 2)不显著.

2.3.4 响应面交互作用分析

通过表5的试验结果及其回归模型绘制响应曲面, 分析酶解条件对多肽还原力的影响, 结果如图3所示. 通过 Design-Expert 8.0.b 软件求解方程, 以鹅皮中胶原蛋白肽的还原力为指标, 根据响应曲面对3个因素的优化结果分析得出碱性蛋白酶最佳酶解条件为: pH 8.96、酶解温度 49.27 °C、酶解时间 5.68 h, 此时多肽的还原力达到 13.56×10^{-2} . 参照响应面分析得到的最优条件, 结合实际操作的可性, 修正酶解条件为 pH 8.96、酶解温度 49.3 °C、酶解时间 5.7 h, 实际测得还原力为 13.48×10^{-2} , 与理论值的相对偏差为 0.59%, 不显著 ($P > 0.05$). 因此采用响应面分析方法得到的优化条件准确可靠, 具有实际应用价值.

3 讨论

胶原蛋白抗氧化肽是一种生物活性肽, 它的抗氧化活性强弱与肽的氨基酸组成、排列顺序有关, 研究发现分子量较小的多肽抗氧化活性较强^[16]. 本研究发现, 胶原蛋白在木瓜蛋白酶+风味蛋白酶一次酶解后蛋白分子量基本在 26 ku 以上, 所得产物为大分子蛋白片段, 其抗氧化活性低下, 二次酶解后, 胶原蛋白水解度增加, 水解产物的抗氧化活性显著增强. 内肽酶是酶解鹅皮胶原蛋白的重要

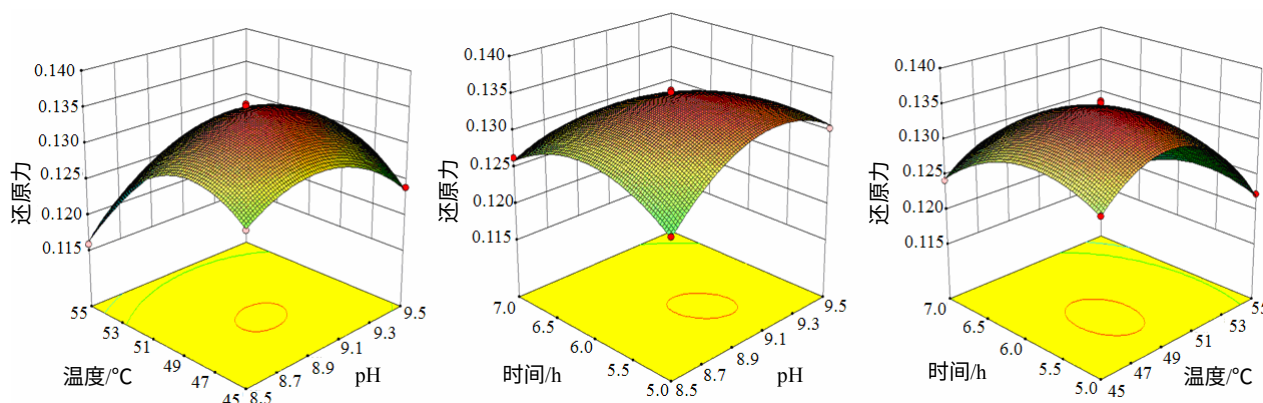


图3 酶解时间、pH、酶解温度因素之间相互作用对碱性蛋白酶酶解效果的影响

酶类,不同种类的内肽酶对胶原蛋白的降解程度不相同,其抗氧化活力也存在显著差异。不同酶的专一性和酶切位点不同,故其酶解产物的抗氧化能力存在差异性。Chen等^[18]研究发现,芳香族氨基酸对于多肽清除自由基所表现出来的抗氧化能力具有重要的意义,其原因可能在于芳香族氨基酸上的咪唑环具有捕捉自由基和提供质子的能力。在本研究结果中,同样酶解条件下,碱性蛋白酶酶解产物具有更强的抗氧化活力,可能是由于碱性蛋白酶酶解胶原蛋白后释放出更多的 Tyr、Phe 和 His 等芳香族氨基酸残基。

酶解时间、溶液 pH、酶解温度和加酶量等酶解条件是影响多肽得率和活性的重要因素。因此在酶解过程中需控制酶解条件,以期获得目的肽。本研究结果表明,在一次酶解的基础上,选用碱性蛋白酶酶解胶原蛋白所得酶解产物抗氧化活性更强。陈晶等^[19]研究发现利用复合蛋白酶与风味蛋白酶进行分步酶解鱼骨蛋白比使用单一酶酶解时,水解度分别提高了 9.81%和 11.07%。杨铭铎等^[20]比较了单酶水解、双酶同步水解和双酶分步水解对麦胚蛋白的酶解效果,结果表明,双酶分步水解、双酶同步水解、单酶水解的酶解效果依次降低。这与本研究结果相似。

4 结论

首先用木瓜蛋白酶+风味蛋白酶对提取的鹅皮胶原蛋白进行酶解,经测定发现其抗氧化能力较弱,通过 Tricine-SDS-PAGE 分析,酶解液的分子量基本在 26 ku 以上,意味着胶原蛋白仍以蛋白片段形式存在。采用二次酶解后其产物抗氧化活性

显著提高,碱性蛋白酶酶解后的产物 DPPH[·]、·OH 与 O₂^{·-}清除率分别达到 83.03%, 37.92%和 68.05%,还原力(A₇₀₀)为 13.10×10⁻²,效果均优于其他酶解产物,表现出更强的抗氧化能力。通过单因素试验和响应曲面试验确定碱性蛋白酶最佳酶解条件为 pH 8.96、酶解温度 49.3 °C、酶解时间 5.7 h,在此条件下多肽还原力达到 13.48×10⁻²。本文的研究结果为鹅皮的高附加值产品的开发提供了理论基础,有利于提高鹅皮下脚料的再利用率。

参考文献:

- [1] GÓMEZ G M C, GIMÉNEZ B, LÓPEZ C M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8):1813-1827.
- [2] QIAN Z J, JUNG W K, KIM S K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6):1690-1698.
- [3] 程云辉, 曾知音, 郭建伟, 等. 抗氧化肽的酶法制备及其构效关系的研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 174-180.
- [4] CHEISON S C, ZHANG S B, WANG Z, et al. Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor[J]. Food Research International, 2009, 42(1):91-97.
- [5] ZHAO Y, LI B, LIU Z, et al. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(12):1586-1591.

- [6] BYUN H G, KIM S K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(12):1155-1162.
- [7] 贾韶千, 吴彩娥, 范龚健, 等. 双酶法制备银杏抗氧化肽工艺研究[J]. 食品科学, 2011, 32(21):201-206.
- [8] WOO J W, YU S J, CHO S M, et al. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(5):879-887.
- [9] 丁琳, 任晓芬, 朱浩嘉, 等. 优化提取鹅皮胶原蛋白肽及其层析分离产物的特性研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(10):134-140.
- [10] LI B, CHEN F, WANG X, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4):1135-1143.
- [11] 涂勇刚, 孙亚真, 田颖刚, 等. 泰和乌骨鸡黑色素的体外抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2):145-149.
- [12] MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47(3):469-474.
- [13] WU H C, CHEN H M, SHIAU C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*)[J]. Food Research International, 2003, 36(9):949-957.
- [14] 赵新淮, 冯志彪. 大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J]. 东北农业大学学报, 1995, 26(2):178-181.
- [15] 孙波, 迟玉杰, 徐宁, 等. Tricine-SDS-PAGE 电泳检测蛋白清肽分子量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5):385-388.
- [16] KITTS D D, WEILER K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery[J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9(16):1309-1323.
- [17] JIANG H, TONG T, SUN J, et al. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2014, 154:158-163.
- [18] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(9):2619-2623.
- [19] 陈晶, 刘友明, 熊善柏, 等. 复合蛋白酶与风味蛋白酶分步水解鱼骨蛋白工艺的优化[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(5):704-708.
- [20] 杨铭铎, 吴莹莹, 张洪微. 不同酶解法水解黑龙江小麦胚蛋白的抗氧化功能比较研究[J]. 食品科学, 2011, 32(2):124-126.

Study on the Preparation and Antioxidant Activities of Collagen Peptides from Goose Skin

ZHU Jing-jing¹, PAN Dao-dong^{1,2*}, SUN Yang-ying¹, WU Zhen¹, CAO Jin-xuan¹, ZENG Xiao-qun¹

(1. Key Laboratory of Animal Protein Food Deep Processing Technology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Food Science & Nutrition Department, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: In this study, on the basis of enzymolysis with papain and flavourzyme of collagen from the skin of Zhedong white goose, four common hydrolase solutions were used for two-step enzymolysis. Subsequently the conditions of two-step enzymolysis were optimized and the suitable hydrolyase was selected by antioxidant ability. By employing a single-factor test, pH, reaction temperature and reaction time were selected according to reducing power, then the response surface method was used to determine the optimum enzymatic process. The results showed that alkaline protease had a better antioxidant activity in the two-step enzymolysis, the optimum enzymolysis conditions were as follows: pH of 8.96, temperature of 49.3 °C, time of 5.7 h. Under these conditions, the reducing power of peptides reached to 13.48×10^{-2} , which increased 3.51% than before.

Key words: collagen; collagen peptides; antioxidant activities; alkaline protease; reducing power

(责任编辑 章践立)