

doi: 10.3969/j.issn.1004-6755.2012.09.001

# 大鲵肉酶解产物的制备及其抗氧化性的研究

王文莉, 张伟, 于新莹, 李伟, 佟长青, 曲敏, 金桥

(辽宁省水产品加工及综合利用重点开放实验室, 大连海洋大学食品工程学院, 辽宁 大连, 116023)

**摘要:**以大鲵肉为原料, 利用 *Aspergillus* sp. 酸性蛋白酶进行酶解, 研究其最佳的酶解条件以及酶解产物的抗氧化作用。结果表明, 大鲵肉酶解的最佳工艺条件为 *Aspergillus* sp. 酸性蛋白酶加酶量为 0.4% (质量比) 及底物浓度为 0.1 g/mL 时, 酶解时间 5.5 h, pH 2.0, 温度 45 °C。时间飞行质谱表明酶解产物的分子量小于 2 000, 苯酚硫酸法测定糖含量为 2%, Folin-酚试剂法测蛋白含量为 93%。大鲵酶解产物清除羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 和 DPPH 自由基的能力随浓度升高而增强。

**关键词:**大鲵肉; 酸性蛋白酶; 抗氧化活性

大鲵是世界上现存最大的也是最珍贵的两栖动物<sup>[1]</sup>。它的叫声很像幼儿哭声, 因此人们又叫它“娃娃鱼”, 是国家二类保护水生野生动物, 是农业产业化和特色农业重点开发品种。由于大鲵具有较高的营养和药用价值, 被视为珍品。大鲵肉中蛋白含量丰富, 氨基酸组成全面, 符合人体需要量模式, 且呈味氨基酸含量和比例都较高, 味道鲜美<sup>[2]</sup>。

本文以大鲵肉为原料, 利用酸性蛋白酶进行酶解, 对其酶解产物进行抗氧化活性试验, 发现其具有较强的抗氧化作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大鲵肉, 2010年10月由张家界(中国)金驰大鲵生物科技有限公司提供。

*Aspergillus* sp. 酸性蛋白酶由大连海洋大学·张家界(中国)金驰大鲵生物科技有限公司生物技术联合实验室制备。其它试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鲵肉酶解液的制备** 取新鲜的大鲵肉, 洗净后用组织捣碎机研磨成糜状物, 加入一定量的水, 搅拌均匀后加入酸性蛋白酶, 改变酶解温度、pH、加酶量和酶解时间等因素, 测定酶解产物的肽得率<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 蛋白质含量和酶解液肽含量的测定** 蛋

白含量采用 Folin-酚法测定; 采用三氯乙酸 (TCA) 沉淀大分子蛋白后, 采用 Folin-酚法测定酶解液的肽含量。

**1.2.3 糖含量的测定** 采用三氯乙酸 (TCA) 沉淀大分子蛋白后, 用苯酚-硫酸法测定样品中糖含量。

**1.2.4 大鲵肉酶解产物分子量的测定** 大鲵肉酶解液冻干后的产物用 5~10  $\mu\text{L}$  0.15% 三氟乙酸 (TFA) 溶解后离心, 取离心后的上清液与等体积的基质混合点靶进行时间飞行质谱 (MALDI-TOF) 测定。质谱测定的条件:  $\text{N}_2$  激光源, 波长 337 nm, 正离子线性方式检测 (飞行管长 1.6 m, 加速电压为 25 kV)。基质: 芥子酸 (SA), 用 0.1% TFA/50% 的乙腈配成饱和溶液, 再将该溶液与 0.1% TFA/50% 的乙腈以 1:1 的比例混合。

**1.2.5 清除羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 能力的测定** 分别取酶解液 2 mL, 加入 1 mL 9 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$ , 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇 2 mL, 混匀后加入质量分数为 7.5% 的双氧水 2 mL 启动反应, 在 37 °C 水浴保温 30 min, 以蒸馏水作为空对照, 于 510 nm 下测吸光度, 考虑到样品本身的吸光度以 9 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  1 mL, 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇 2 mL, 不同浓度的酶解液 2 mL 为本底吸收<sup>[4-5]</sup>。清除率计算公式如下:

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率}/\% = (A_0 - (A_x - A_{x_0})) / A_0 \times 100\%$$

式中,  $A_0$  为空白对照的吸光度值;  $A_x$  为加入

样液的吸光度值;  $A_{x_0}$  为不加  $H_2O_2$  的样液的吸光度值。

1.2.6 清除 DPPH 自由基能力的测定 用无水乙醇配制  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的 DPPH 溶液, 于棕色瓶中低温避光保存备用。分别取 2 mL 酶解液于试管中, 加入 2 mL 所配制的 DPPH 溶液, 混合均匀, 在 25 °C 水浴中反应 30 min, 移入 1 cm 比色管中, 于 517 nm 处测定其吸光度值  $A_1$ , 同时测定 2 mL 样液加 2 mL 无水乙醇 25 °C 水浴中反应 30 min 后的吸光度值  $A_2$ , 以及 2 mL DPPH 加 2 mL 蒸馏水 25 °C 水浴中反应 30 min 后的吸光度值  $A_0$ , 酶解液对 DPPH 的清除率按下式计算:

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

式中,  $A_0$  为试剂空白的吸光值;  $A_1$  为样液的吸光值;  $A_2$  为样液本底的吸光值<sup>[6-8]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶解大鲵肉制备低聚肽单因素条件的影响

2.1.1 酶解温度对大鲵肉酶解的影响 将酶解条件设定为: pH 值 2.0, 加酶量为 0.5% (质量比), 于 40、45、50、55、60 °C 下分别酶解 4.5 h, 底物浓度为 0.1 g/mL, 测肽得率如图 1 所示。由图 1 可知, 当酶解温度在 40~60 °C 之间变化时, 随着酶解温度继续上升, 肽得率逐渐升高, 当温度达到 55 °C, 肽得率达到最大值后, 再继续提高酶解温度, 所得的肽得率出现下降的趋势。温度过高, 可以使酶变性甚至失活。但当温度达到 45 °C 后, 肽得率变化不是很大, 考虑到成本等问题, 所以, 确定大鲵肉酶解反应的最适温度为 45 °C。

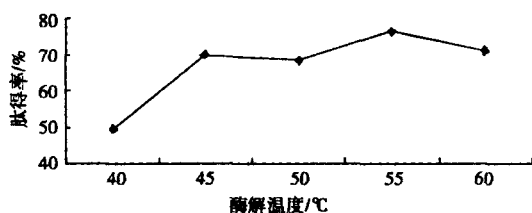


图 1 不同酶解温度对大鲵肉酶解的影响

2.1.2 酶解时间对大鲵肉酶解的影响 将酶解条件设定为: pH 值 2.0, 加酶量为 0.5% (质量比), 于 45 °C 下分别酶解 1.5、3、4、5、6 h, 底物浓度为 0.1 g/mL。测定肽得率如图 2 所示。由图 2 可知, 当酶解时间在 3~5 h 之间变化时, 随着酶解时间的增大肽得率不断增加, 但在 5 h 后上

升幅度趋于平缓, 故确定酶解时间为 5 h 最佳。

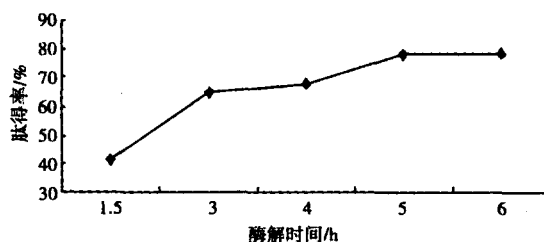


图 2 不同酶解时间对大鲵肉酶解的影响

2.1.3 pH 值对大鲵肉酶解的影响 将酶解条件设定为: pH 分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0, 加酶量为 0.5% (质量比), 于 45 °C 下酶解 5 h, 底物浓度为 0.1 g/mL。测定肽得率如图 3 所示。由图 3 可知, 随着 pH 的不断升高, 肽得率出现下降趋势, 所以, 大鲵肉酶解液反应的最适 pH 为 2.0。

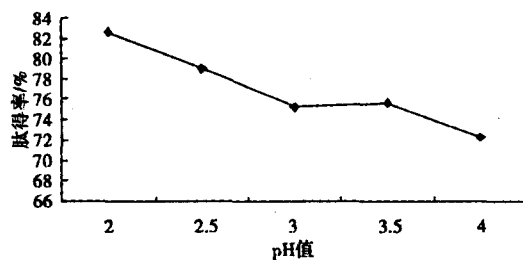


图 3 不同 pH 值对大鲵肉酶解的影响

2.1.4 酶加量对大鲵肉酶解的影响 将酶解条件设定为: pH 值 2.0, 加酶量为 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% (质量比), 于 45 °C 下分别酶解 5 h, 底物浓度为 0.1 g/mL。测定肽得率如图 4 所示。由图 4 可知, 当加酶量不断增加时, 肽得率不断上升, 当酶加量大于 0.3% 时, 肽得率上升幅度平稳, 综合成本和肽得率两方面考虑, 确定酶加量为 0.4% (质量比)。

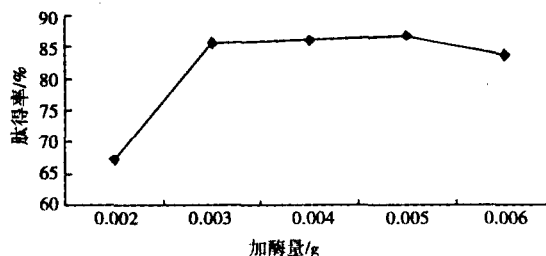


图 4 不同加酶量对大鲵肉酶解的影响

2.1.5 最佳酶解条件的确定 影响酶解反应的几个主要因素为酸性蛋白酶的加酶量、酶解时间、pH 和酶解温度。根据上述单因素试验分析, 并考虑生产成本等因素, 以所得肽得率为指标做酶

加量,酶解时间,pH和温度4因素3水平的正交试验L9(3<sup>4</sup>),正交试验的因素水平见表1,正交试验结果见表2。

表1 正交因素水平表

水平	因素			
	A	B	C	D
1	2.0	45	4.5	0.3%
2	2.5	50	5.0	0.4%
3	3.0	55	5.5	0.5%

注: A: pH; B: 酶解温度(℃); C: 酶解时间(h); D: 加酶量(质量比)

表2 正交试验安排及结果

试验号	因素				肽得率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	84.43
2	1	2	2	2	76.79
3	1	3	3	3	79.16
4	2	1	2	3	77.51
5	2	2	3	1	78.66
6	2	3	1	2	73.89
7	3	1	3	2	92.12
8	3	2	1	3	72.84
9	3	3	2	1	64.43
K1	240.55	254.1	231.16	227.52	
K2	230.1	228.46	218.94	242.97	
K3	229.39	217.48	249.94	229.55	
k1	80.18	84.7	77.05	75.84	
k2	76.7	76.15	72.98	80.99	
k3	76.46	72.49	83.31	76.52	
R	3.72	12.21	10.33	5.15	

注: A: pH; B: 酶解温度(℃); C: 酶解时间(h); D: 加酶量(质量比)

由表2可知,各因素对酶解大鲵肉制备低聚糖肽影响的大小顺序为 B>C>D>A,即酶解温度>酶解时间>加酶量>pH。各个因素的影响顺序为 B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>A<sub>1</sub>,由表2可以看出,B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>A<sub>3</sub>肽得率最高,因为pH值的影响不是最明显的,所

以最优水平为 B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>A<sub>1</sub>,即 pH 为 2.0,酶解温度为 45℃,酶解时间为 5.5 h。加酶量为 0.4%(质量比)。

2.2 大鲵肉酶解产物分子量的测定

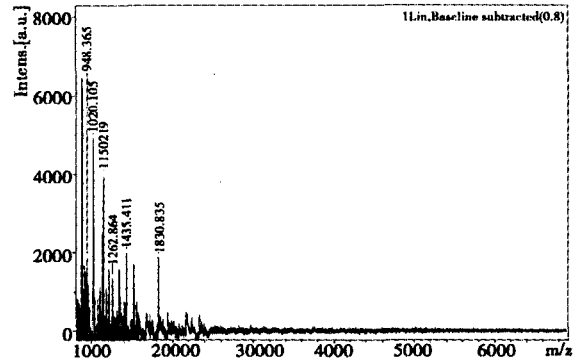


图5 大鲵酶解液飞行质谱图

图5的飞行质谱表明酸性蛋白酶酶解大鲵肉获得的产物,确定为低聚肽,核质比在小于2000的区域。m/z 主要有 948.365、1 020.105、1 150.219、1 262.864、1 435.411、1 830.835。

2.3 大鲵肉酶解液抗氧化性的研究

2.3.1 清除羟基自由基(·OH)能力测定 准确称取冻干后的酶解产物,将其配成2 mg/mL的溶液,分别取0.6 mL、1.0 mL、1.4 mL、1.8 mL、2.0 mL上述溶液,按1.2.5的方法测定其清除羟基自由基能力,结果如图6。

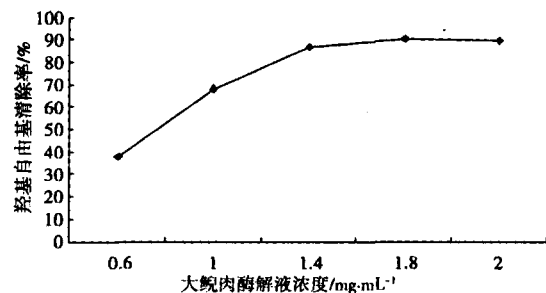


图6 清除羟基自由基(·OH)能力测定

随着酶解液浓度的增加,羟基自由基(·OH)的清除率达到86%左右就趋于平缓增加状态,一直增加到89%左右,清除率不再增大,故大鲵酶解液肽粉的浓度达到2 mg/mL,清除羟基自由基(·OH)能力达到最大。

2.3.2 清除DPPH自由基能力的测定 准确称取冻干后的酶解产物,将其配成2 mg/mL,分别取0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL上述溶液,加蒸馏水至2 mL,按1.2.6的方法测定

其清除 DPPH 自由基能力,结果如图 7。

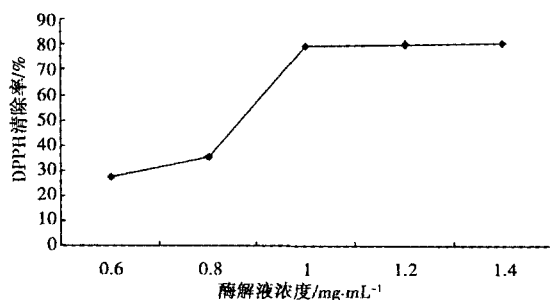


图7 清除 DPPH 自由基能力的测定

随着酶解产物浓度的增加,DPPH 的活性清除率达到 80%左右就趋于平缓状态,故大鲵酶解液肽粉的浓度达到 1.2 mg/mL,DPPH 清除率达到最大。

### 3 结论

由试验结果可知,酸性蛋白酶水解大鲵肉的最适条件为 pH 为 2.0,酶解温度 45 ℃,酶解时间 5.5 h,加酶量 0.4%(质量比)。酶解产物具有清除羟基自由基和 DPPH 自由基的能力,测定结果表明当大鲵肉酶解液低聚肽的浓度达到 2 mg/mL,清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )能力达到最大,当

浓度达到 1.2 mg/mL 时,DPPH 清除率达到最大。

### 参考文献:

- [1] 高士贤,戴定远,范勤德. 常见药用动物[M]. 上海:上海科技出版社,1984
- [2] 马小燕,陈易彬,李彦军. 酶法水解大鲵蛋白的工艺研究[J]. 中国酿造,2009,212(11):92-94
- [3] 刘程惠,董秀萍,赵露露. 等. 胰蛋白酶酶解法制备海参肽的工艺条件[J]. 大连轻工业学报,2006,25(1):83-85
- [4] 马利华,贺菊萍,秦卫东,等. 槐花提取物抗氧化性能研究[J]. 食品科学,2007,28(9):75-77
- [5] 白鹤,赵前程,李伟,等. 酶水解美洲帘蛤蛋白质及其产物抗氧化活性初探[J]. 水产科学,2009,28(4):196-199
- [6] Xie, Z., Huang J., Xu, X., & Jin, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Food Chemistry, 2008,111, 370-376
- [7] Singh, N., & P. S., R.. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. Food Chemistry, 2004, 85:611-616
- [8] Song, L., Li, T., Yu, R., Yan, C., Ren, S., & Zhao, Y.. Antioxidant activities of hydrolysates of *Arca subcrenata* prepared with three proteases. Marine Drugs, 2008, 6: 607-619.

## Study on the enzymatic hydrolysates of flesh from *Andrias davidianus* and its Antioxidant Activities

WANG Wen-li, ZHANG Wei, YU Xin-ying, LI Wei,

TONG Chang-qing, QU Min, JIN Qiao

(Key and Open Laboratory of Aquatic Products Processing and Utilization of Liaoning Province,  
Dalian Ocean University, Liaoning Dalian 116023)

**Abstract:** Flesh of *Andrias davidianus* was hydrolyzed by acid protease in this article. The optimal conditions of enzymolysis of flesh of *Andrias davidianus* and the antioxidant activities of hydrolyzate were studied. The results showed optimal concentration of flesh of *Andrias davidianus* were 0.4% (mass ratio) of *Aspergillus* sp. acid protease and 0.1 g/mL of substrate concentration, reaction time was 5.5 h, pH2.0, temperature was 45 ℃. The enzymatic hydrolysates were determined by MALDI-TOF to be less than 2 000, the content of polysaccharides was 2% which were determined by phenol-sulfuric acid method. The protein was determined by Lowry method and its content is 93%. There were well relationships between the contents of enzymatic hydrolysates and activities of scavenging hydroxyl free radical and DPPH free radical appeared linear relationships.

**Key words:** Key words : flesh of *Andrias davidianus*; Acid protease; Antioxidant activities

(收稿日期:2012-05-31)