

文蛤肉酶解液清除自由基能力的研究

(广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530004) 阎欲晓 栗桂娇

摘要 利用木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶及两者组合水解文蛤肉, 研究了各种酶解液对两种自由基的清除能力。结果表明, 酶解液对羟基自由基及超氧自由基均有一定的清除能力。在一定的水解度范围内, 双酶水解液清除羟基自由基的能力最强, 其次为酸性蛋白酶的水解液和木瓜蛋白酶水解液。对于清除超氧自由基而言, 酸性蛋白酶的水解液强于双酶法水解液和木瓜蛋白酶水解液。

关键词 文蛤, 自由基清除率, 水解液

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2004)10-0060-03

文蛤营养价值极高, 具有平肝化痰、清肺、软坚散结等功效^[1], 目前对文蛤肉药理作用、水解液酶法制备条件、水解液降血脂功效方面都有研究^[1-3], 但有关其酶解液的抗氧化活性的研究未见报道。为此, 本研究采用几种常见的蛋白酶水解文蛤, 通过离体实验系统检测其清除羟基自由基和超氧自由基的效果, 为文蛤多肽的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜文蛤肉 购于南宁五里亭农贸市场, 去壳, 用高速组织捣碎机打碎; 木瓜蛋白酶($6.5 \times 10^5 \text{U/g}$)、中性蛋白酶($1 \times 10^6 \text{U/g}$) 庞博生物工程有限公司; 酸性蛋白酶($5 \times 10^4 \text{U/g}$) 无锡酶制剂厂; 其余化学试剂 均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 水解液清除羟基自由基^[4-5] 7.5mmol/L 邻非罗邻 0.75mL , 加 $\text{pH}7.4$ 的磷酸缓冲液 2.5mL , 充分混

匀后, 加 7.5mmol/L 的硫酸亚铁 0.75mL , 每加一管立即混匀, 加 $0.1\% \text{H}_2\text{O}_2 1.0 \text{mL}$, 最后以水补充至相同体积, 反应液 37°C 保温 1h , 测 536nm 处的吸光度, 为 $A_{\text{损伤}}$; 实验组先加样品后加 H_2O_2 , 测 $A_{\text{加样}}$; 不加 H_2O_2 和样品液, 为 $A_{\text{空白}}$ 。

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{加样}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{空白}} - A_{\text{损伤}}} \times 100\%$$

1.2.2 清除超氧阴离子自由基的方法^[6] 取 4.5mL $\text{pH}8.34$ 的 PBS (终浓度 50mmol/L), 1.2mL 蒸馏水, 混匀后在 25°C 的水浴中保温 20min , 取出后立即加入在 25°C 预热的邻苯三酚 0.3mL (终浓度 0.2mmol/L), 总体积为 6.0mL , 在 325nm 下测反应启动后 4min 内邻苯三酚自氧化速率, 为 $V_{\text{自}}$ 。待测液取试剂同前, 只是在加入邻苯三酚前分别加入一定量的样品体积, 蒸馏水减少相应体积, 测反应启动后 4min 内样品抑制邻苯三酚自氧化的氧化速率, 为 $V_{\text{样品}}$ 。

$$\text{清除率} = \frac{V_{\text{自}} - V_{\text{样品}}}{V_{\text{自}}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 木瓜蛋白酶水解液清除自由基的效果

准确称取一定量文蛤肉, 按加水比 $1:3$ (W/V) 加入蒸馏水, 升温到 45°C , 起始 $\text{pH}6.5$, 加酶量为 8000U/g 原料, 分别水解 1 、 1.5 、 3.5 、 4.5h , 得不同水解度的酶解原液, 分别离心取上清液, 按 1.2 方法进行自由基清除实验。

从表 1 和表 2 看出, 采用木瓜蛋白酶在最适水解条件下水解文蛤蛋白, 得到的水解液对羟基自由基和超氧自由基均具有清除作用, 而且随加样量的增加清除率增加。为了比较不同水解度的样品清除能力的大小, 将数据作图后计算清除 50% 自由基时氨基酸氮量 (SC_{50}), 以此作为对比指标, 可以看出, 经酶水解的样品, 其羟基自由基清除能力比未经酶水解

收稿日期: 2004-07-20

作者简介: 阎欲晓(1970-), 女, 讲师, 研究方向: 生物技术在食品工业中的应用。

参考文献:

[1] 王秋颖, 郭顺星, 等. 不同蜜环菌菌株生物学特性及菌丝多糖含量的研究[J]. 中国药科学, 2001, 36(9): 588-589.

[2] 刘洪玉, 陈惠群. 羊肚菌子实体生理特性研究[J]. 食用菌, 1996, 18(5): 2-3.

[3] 王秋颖, 郭顺星, 等. 不同蜜环菌菌株酯酶同工酶及过氧化物酶同工酶的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(2): 38-40.

表1 木瓜蛋白酶水解液清除超氧阴离子自由基的能力

样品水解度 (%)	氨基氮 (mg/mL)	抑制率 (%)					SC ₅₀ 氨基氮量 (mg)
		0.05mL	0.1mL	0.15mL	0.25 mL	0.5 mL	
30.24	1.6263	20.01	32.83	-	62.15	72.81	0.2940
34.64	2.04	19.38	33.56	-	59.49	70.15	0.3876
35.21	2.2693	25.48	35.67	-	65.88	74.41	0.3630
35.63	2.2126	25.41	34.80	-	65.35	72.28	0.3540
17.12(无酶解)	1.0968	16.41	28.45	36.22	45.09	59.81	0.3290

表2 木瓜蛋白酶水解液清除羟基自由基的能力

样品水解度 (%)	氨基氮量 (mg/mL)	清除率 (%)				SC ₅₀ 氨基氮量 (mg)
		0.5mL	1mL	1.5mL	2mL	
30.24	1.6263	18.44	41.12	68.30	77.55	1.9793
34.64	2.04	33.33	61.40	73.68	83.02	1.7373
35.21	2.2693	13.84	41.87	75.00	87.72	1.8222
35.63	2.2126	39.39	57.18	75.00	92.73	1.747
17.12(无酶解)	1.0968	21.58	25.97	26.98	28.95	7.1007
0.05%维生素 C		9.87	20.75	32.85	59.68	0.9207(维生素 C)

表3 酸性蛋白酶水解液抑制超氧阴离子自由基的能力

水解度 (%)	氨基氮 (mg/mL)	抑制率 (%)					SC ₅₀ 氨基氮量 (mg)
		0.05mL	0.1mL	0.15mL	0.25mL	0.5mL	
29.83	1.9138	41.89	53.22	65.45	70.91	89.42	0.1458
31.49	2.0424	46.84	62.54	70.07	80.91	89.11	0.1107
36.75	2.3071	53.69	66.81	76.66	81.89	90.79	0.0728
39.99	2.4584	40.46	57.51	61.34	74.41	84.39	0.2050
40.26	2.3298	39.72	52.47	64.39	71.09	84.99	0.2113
17.12(无酶解)	1.0968	16.41	28.45	36.22	45.09	59.81	0.3290

表4 酸性蛋白酶水解液清除羟基自由基的能力

水解度 (%)	氨基氮 (mg/mL)	抑制率 (%)				SC ₅₀ 氨基氮量 (mg)
		0.5mL	1mL	1.5mL	2mL	
29.83	1.9138	45.34	60.71	81.89	99.09	1.2510
31.49	2.0424	43.75	73.57	96.83	99.32	1.2197
36.75	2.1362	53.12	71.41	80.72	90.02	0.7039
39.99	2.3449	42.93	75.88	99.85	100	1.403
40.01	2.4584	39.63	76.18	94.23	98.34	1.5651
17.12(无酶解)	1.0968	21.58	25.97	26.98	28.95	7.1007

样品清除率显著提高,但超氧阴离子自由基的清除率变化不大,而且各水解液的清除能力与水解度大小不呈相关关系,说明水解度不同,得到的游离的及暴露的肽链末端氨基酸不同,影响清除效果。

2.2 酸性蛋白酶水解液清除自由基的效果

取一定量文蛤肉浆按酶量为 300U/g 原料加入酸性蛋白酶,在 pH2.5,温度为 35℃条件下水解 30min、45min、1h、2h、3h,灭酶,离心,取清液,测定水解液清除自由基的能力。

由表 3 及表 4 看出,经酸性蛋白酶水解的文蛤水解液,对两种自由基均有清除效果。以清除率达 50%时的氨基氮量为指标比较,水解液的清除能力比未经水解的文蛤蛋白有显著提高,且高于木瓜蛋白酶水解液的清除能力;对自由基的清除能力与水解度的大小不成相关关系,但在一定范围内随着水解

度的增加清除率增加,但水解度过大时,清除能力反而下降。

2.3 木瓜蛋白酶与酸性蛋白酶组合水解文蛤蛋白清除自由基的效果

考虑到双酶水解可能由于增加所切位点,产生的肽序列较多,所以以双酶组合对文蛤肉浆进行水解,水解顺序为先木瓜蛋白酶再酸性蛋白酶,实验条件按正交表进行,结果见表 5。

由表 5 可知,以清除 50%羟基自由基和超氧阴离子自由基时氨基氮消耗量为指标,水解时间为最主要影响因素,最佳清除条件为 A₃B₁C₂,即木瓜蛋白酶:酸性蛋白酶=0.5%:0.05%,水解时间为 1h,水解时间的分配为 1:2。

从正交实验结果中得出最佳双酶用量及水解时间分配,由于水解总时间为最显著影响因素,故进一

表5 正交实验及结果分析表 L₉(3⁴)

实验号	A 酶量 (木瓜:酸性)	B 时间(h)	C 时间比 (木瓜:酸性)	水解度 (%)	SC ₅₀ (·OH) 氨基氮量(mg)	SC ₅₀ (O ₂ ⁻) 氨基氮量(mg)
1	1(0.5%:0.1%)	1(1)	1(1:1)	42.87	1.0002	0.1444
2	1	2(2)	2(1:2)	50.01	1.2405	0.2025
3	1	3(3)	3(1:3)	52.46	1.2602	0.2668
4	2(0.5%:0.025%)	1	2	44.57	1.0855	0.1660
5	2	2	3	46.77	1.1914	0.1910
6	2	3	1	48.55	1.2274	0.2182
7	3(0.5%:0.05%)	1	3	45.79	1.1498	0.1150
8	3	2	1	46.63	1.1459	0.2118
9	3	3	2	50.03	1.1541	0.1653
K ₁	1.1670	1.0785	1.6868			
K ₂	1.1681	1.7889	1.1926			
·OH K ₃	1.1499	1.2139	1.2005			
R	0.0182	0.7104	0.4942			
K ₁	0.2046	0.1418	0.1915			
O ₂ ⁻ K ₂	0.1917	0.2018	0.1779			
K ₃	0.1640	0.2168	0.1909			
R	0.0406	0.07467	0.0135			

步探讨了水解时间对水解度及清除效果的研究,并进一步探讨了不同种类的蛋白酶水解液的清除能力,结果见图1。对于超氧自由基而言,单一酸性蛋白酶水解液的清除能力最强,双酶水解液的清除能力比单一木瓜蛋白酶水解液清除能力高。对于羟基自由基,在较低水解度下(DH<40%)双酶水解液(样品1、样品2)的清除效果明显优于单一酸性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解液,但样品4、样品5的水解度过大,其清除能力反而下降。原因可能是各种蛋白酶水解反应条件各异,影响底物蛋白构象变化;且各种蛋白酶的专一性,促使产物多肽的N-末端、C-末端氨基酸组成及排序各异,这是影响肽功能性质最主要的因素。

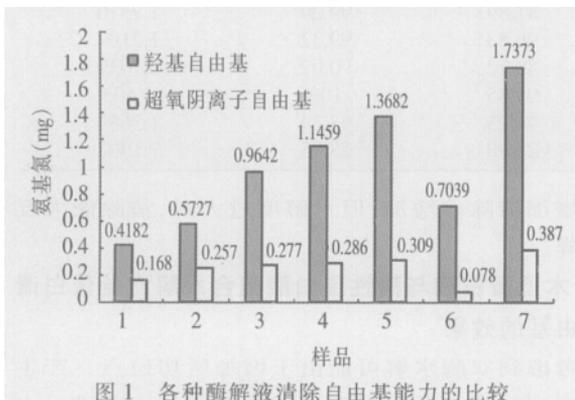


图1 各种酶解液清除自由基能力的比较

- 1 双酶 30min(DH=37.39%) 2 双酶 50min(DH=38.04%);
3 双酶 70min(DH=38.73%) 4 双酶 120min(DH=46.13%);
5 双酶 150min(DH=53.27%) 6 酸性蛋白酶(最佳 DH=36.75%) 7 木瓜蛋白酶(最佳 DH=34.64%)

3 结论

3.1 文蛤酶解液具有清除自由基的能力

文蛤水解液中富含多肽及游离的氨基酸,如牛

磺酸、胱氨酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸、亮氨酸、缬氨酸等,它们均具有抗氧化性能^[7]。在较低的水解度时,清除活性会随水解度增加而提高,但当水解度达一定值后,随着水解度的增加,清除能力反而降低。说明通过控制水解度可制得抗氧化效果良好的水解液。

3.2 不同蛋白酶文蛤水解液对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力存在差异

采用复合酶由于增加了所切位点,产生的肽序列较多,在水解度为40%内其酶解物清除能力较强,其次为酸性蛋白酶解液,较差的是木瓜蛋白酶解液。

参考文献:

- [1] 罗运满,吴冬宁,倪大石.文蛤肉的药理作用[J].中国海洋药物,1996(2):14~17.
- [2] 阎欲晓,粟桂娇.车螺蛋白酶法水解条件的研究[J].食品工业科技,2003(10):90~92.
- [3] 张广钦,禹志领,赵厚长.文蛤肉水解液降血脂作用的实验研究[J].中国海洋药物,1997(2):21~24.
- [4] 王晓春.车前草水煎液对氧自由基清除作用的研究[J].实用预防医学,2002(2):139~140.
- [5] 金鸣,蔡亚欣,李金莲.邻二氮菲-Fe²⁺氧化法检测 H₂O₂/Fe²⁺产生的羟自由基[J].生物化学与生物物理进展,1996(6):553~555.
- [6] 石双群,王会棉,苏小梅,等.ATP对超氧银离子自由基的清除作用[J].河北师范大学学报,1996(1):57~59.
- [7] 曾庆祝,曾庆孝.海洋贝类(牡蛎、扇贝、文蛤等)功能性食品的开发利用[J].氨基酸和生物资源,2002(3):31~34.