

酶水解鲫鱼蛋白质及产物抗氧化活性初探

顾林, 孙婧

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225001)

摘 要: 本实验主要研究了碱性蛋白酶对鲫鱼的水解作用及其水解液的抗氧化活性, 探讨了酶浓度、底物浓度、水解温度、时间、pH 对鲫鱼蛋白质水解度的影响, 同时用 DPPH (二苯基苦基苯肼) 自由基法和改进的邻苯三酚法测定分析水解液的抗氧化活性。结果表明: 酶解条件为 [E] 为 4%, [S] 为 10%, pH 8.0, 时间为 4h, 温度为 50℃ 时可以获得较高水解度, 同时水解液对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 具有较高清除率。

关键词: 鲫鱼; 碱性蛋白酶; 自由基; 酶水解

Preliminary Study on Enzymatic Hydrolysis of Crucian Carp Protein and Its Antioxidant Activities

GU Lin, SUN Jing

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: In this research, enzymatic hydrolysis of carp protein with Alkalase and its antioxidant activities were studied. The effects of [E], [S], temperature, time and pH on degree of hydrolysis were in detail investigated. The radical scavenging activities of hydrolysates were analyzed with two different methods, the inhibition of DPPH radicals and improved pyrogallol method. The results showed that the optimum conditions of enzymatic hydrolysis were: [E] 4%, [S] 10%, pH 8.0, time 4 h, and temperature 50 °C. Hydrolysates prepared on these conditions had a high degree of hydrolysis and also showed strong scavenging activities of DPPH radical and the superoxide anion-radical.

Key words crucian carp alkali protease free radicals enzymatic hydrolysis

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0184-05

我国水产资源丰富, 水产品年产量达 5 000 多万吨, 尤其是我国的淡水渔业在世界水产业中具有重要的地位和作用。淡水养殖总产量占世界淡水养殖总产量的 68%^[1], 但是我国淡水鱼加工率不足 10%, 且每年因贮藏、销售条件的限制造成的损失率达 30%^[2]。淡水鱼主要以鲜食为主。淡水鱼利用率低, 经济效益差, 许多地区时有季节性压塘现象出现, 严重影响了农民的生产积极性及淡水养殖业可持续发展。发展淡水鱼精深加工, 充分开发利用淡水渔业资源, 提高淡水鱼附加值, 成为淡水鱼加工利用的一个重要研究方向^[3]。

淡水鱼是一种优质动物蛋白质, 不仅蛋白质含量高, 氨基酸模式更接近人体需要。通过酶法加工淡水鱼蛋白可以获得具有特殊生理机能的短肽。近些年的研究表明, 食物蛋白质酶解产物中的一些短肽除营养功能外, 还具有广泛的生理调节功能, 如促进钙吸收、降血压、降胆固醇、免疫调节等^[4-7]。食物蛋白质酶解制备活性短肽研究已成为食品科学界和医药学界的关注热点, 目前, 鱼类蛋白质制备活性短肽研究

主要集中于海洋鱼类^[8], 淡水鱼类研究主要集中于鲢鱼等蛋白质的提取制备以及制取氨基酸口服调味料等方面^[9], 有关鲫鱼 (crucian carp) 酶解制备活性短肽的研究鲜见报道。本实验以鲫鱼为原料研究碱性蛋白酶对鲫鱼的水解作用及其水解液的抗氧化活性, 以期对鲫鱼抗氧化肽的制备提供一定的科学基础, 为鲫鱼深加工寻找新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲫鱼购于扬州市农贸市场。

碱性蛋白酶 Novo 公司; 酪氨酸 (分析纯)、酪蛋白 (化学纯)、二苯基苦基苯肼 (DPPH、分析纯) Sigma 公司; 福林酚、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甲醛等试剂均为分析纯。

1.2 仪器

755s 紫外-可见分光光度计 上海蔡康光学仪器有限公司; 722 分光光度计 上海分析仪器总厂; 电子天

收稿日期: 2007-07-28

作者简介: 顾林 (1956-), 男, 副教授, 研究方向为农产品加工。

平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 5804R 型离心机 德国Eppendorf公司; HYP-II 消化炉 上海纤检仪器有限公司; PHS-3D 型 pH 计 上海三信仪表厂。

1.3 方法

1.3.1 材料的处理

新鲜鱼→预处理→脱脂→加热变性(90℃, 15min)→烘干脱水(85℃)→供试鱼粉→水解→离心分离→测定水解度、抗氧化活性

1.3.2 化学成分分析方法

蛋白质含量的测定: 凯氏定氮法^[10]; 脂肪的测定: 索氏抽提法^[10]; 水分的测定: 烘干法^[10]。

1.3.3 酶活力的测定

福林法^[11]。

1.3.4 游离氨基态氮的测定

甲醛滴定法^[12]。

1.3.5 蛋白质水解度(DH)的测定^[13]。

$$\text{水解度 DH (\%)} = \frac{\text{水解液中游离氨基态氮含量}}{\text{样品总氮量}} \times 100$$

1.3.6 清除 DPPH 自由基能力的测定^[14]

用无水乙醇配制 $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 DPPH 溶液, 于棕色瓶中避光低温保存备用。分别取 2ml 不同条件下水解的水解液于试管中, 加入 2ml 所配制的 DPPH 溶液, 混合均匀, 在 25℃ 水浴反应 30min 后, 移入 1cm 的比色皿中, 在 517nm 处测定其吸光度值 A_i , 同时测 2ml 样品液 + 2ml 无水乙醇 25℃ 水浴反应 30min 后的吸光度值 A_j 以及 2ml DPPH 溶液 + 2ml 蒸馏水 25℃ 水浴反应 30min 后的吸光度值 A_0 。水解液对 DPPH 自由基的清除率按下式计算:

$$\text{清除率 S (\%)} = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100$$

1.3.7 清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)能力的测定^[15]

取邻苯三酚 0.1ml 于试管中, 加入 pH8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 5ml, 加入不同条件下水解得到的水解液 0.25ml, 迅速混匀, 在 25℃ 水浴保温 15min 后, 使用 1cm 比色皿, 以蒸馏水做空白对照, 在 320nm 处时测吸光度 A_i , 并测定本底扣除水解液自身的干扰, 水解液对超氧阴离子自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{清除率 S (\%)} = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100$$

式中, A_0 为试剂空白的吸光度值; A_i 为样液的吸光度值; A_j 为样液本底的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 酶浓度对鲫鱼蛋白质水解的影响

分别用质量百分率浓度为 1%、2%、3%、4%、5% 的碱性蛋白酶, 在底物浓度为 10% (质量百分率)、pH9.0、55℃ 条件下, 对鲫鱼样品进行 4h 水解。分别按 1.3.5、1.3.6 和 1.3.7 的方法测定水解液的水解度及对自由基的清除能力, 结果如图 1、2 所示。

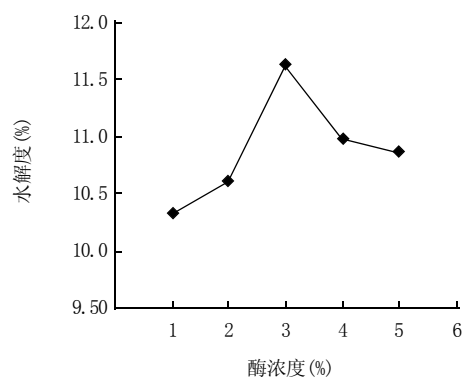


图1 酶浓度对水解度的影响

Fig.1 Effects of [E] on DH

由图 1 可见, 酶浓度为 3% 时, 鲫鱼蛋白质水解度达到最大, 为 11.63%, 但随着酶浓度的增大, 水解度反而有所下降。产生这种现象的原因可能是酶水解达到一定程度时, 由于底物浓度的降低、水解产物浓度的增加, 从而抑制了酶的活性, 造成水解度的下降^[16]。

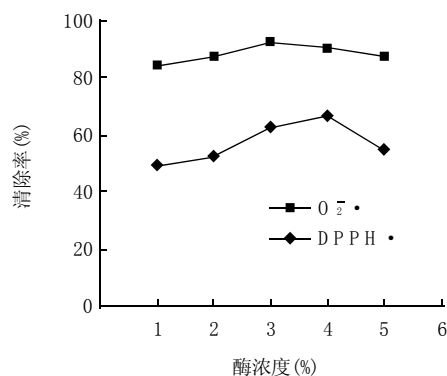


图2 酶浓度对自由基清除率的影响

Fig.2 Effects of [E] on radical scavenging activity

由图 2 可见, 水解液对自由基的清除的效果则根据自由基的不同而有所差异, 水解液对 DPPH· 的清除率远低于对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率。水解液对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率最高达 92.5%, 而对 DPPH 的最高清除率仅为 67.5%, 但两者都随着酶浓度的逐渐增加, 其清除率均呈现先增大后下降的趋势。

综合测定结果与生产成本等方面考虑, 可以认为制

取抗氧化活性肽时, 采用酶浓度 3%~4% 较为合适。

2.2 底物浓度对鲫鱼蛋白质水解的影响

按质量百分率分别配制底物浓度为 4%、6%、8%、10%、12% 的溶液, 在 pH 为 9.0、酶浓度为 4%、温度为 55℃ 条件下水解 4h。分别按 1.3.5、1.3.6 和 1.3.7 的方法测定其水解度及对自由基的清除率, 结果如图 3、4 所示。

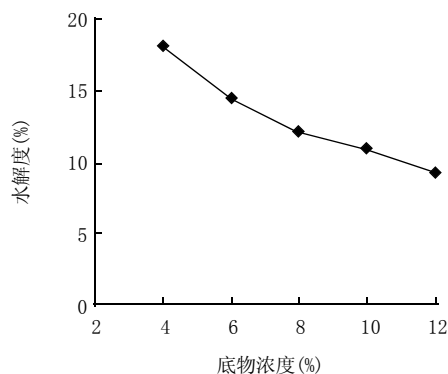


图3 底物浓度对水解度的影响

Fig.3 Effects of [S] on DH

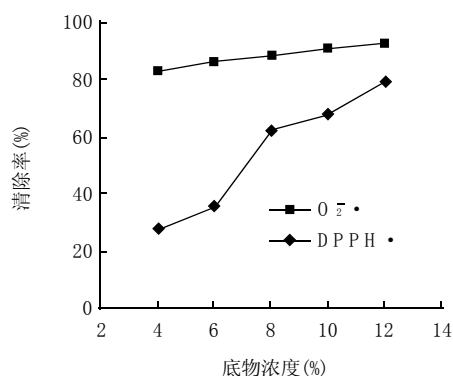


图4 底物浓度对自由基清除率的影响

Fig.4 Effects of [S] on radical scavenging activity

由图 3 可见, 随着底物浓度的逐渐增加, 水解度呈不断下降的趋势。与之相反, 由图 4 可见, 水解液对自由基的清除率随着底物浓度的逐渐增加则不断上升, 对 DPPH· 的清除率上升的幅度较大、最为明显, 而对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率则在 86%~93% 间缓慢上升。结合水解度、清除率及简化生产过程、节约能源等方面综合考虑, 可以认为制取抗氧化活性肽时, 采用 8% 底物浓度进行酶解较为合适。

2.3 酶解 pH 对鲫鱼蛋白质水解的影响

分别采用 pH 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 在底物浓度为 8%、水解温度为 55℃、酶浓度为 4% 的条件下水解 4h。分别按 1.3.5、1.3.6 和 1.3.7 的方法测定水解度及水解液对自由基的清除率, 结果如图 5、6 所示。

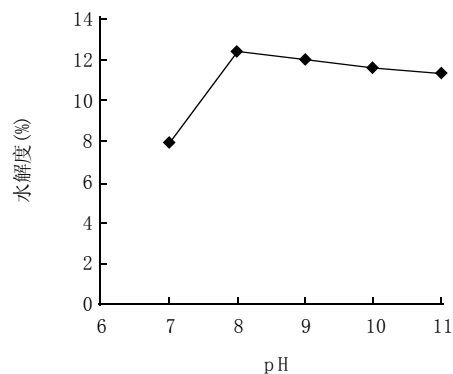


图5 pH 对水解度影响

Fig.5 Effects of pH values on DH

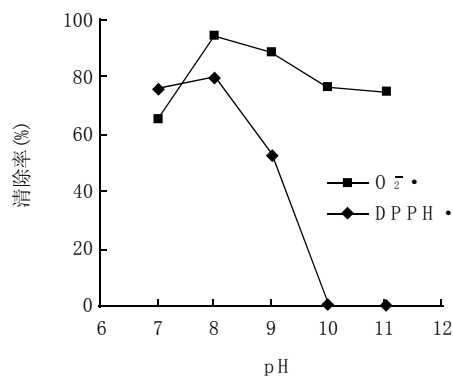


图6 pH 对自由基清除率的影响

Fig.6 Effects of pH values on radical scavenging activity

pH 能影响酶活性部位的解离和底物蛋白的解离, 从而直接影响了酶与底物蛋白的结合与催化, 每个催化反应都有一个最适的 pH^[16]。由图 5 可见, pH 为 8.0 时, 酶对底物的水解能力较强。同时, 由图 6 可见, 当 pH 为 8.0 时, 酶水解产物对两种自由基的清除能力最强, 而随着 pH 值的逐渐增加水解产物对自由基的清除能力有所减弱, 当 pH 大于 10.0 时对 DPPH· 完全没有清除作用。结合水解度、清除率及简化产物精制过程、节约生产成本等方面综合考虑, 可以认为制取抗氧化活性肽时, 采用 pH 8.0~9.0 进行酶解较为合适。

2.4 酶解时间对鲫鱼蛋白质水解的影响

以碱性蛋白酶浓度为 4%、底物浓度为 8%、pH 9.0、水解温度为 55℃ 条件分别水解 2、3、4、5、6 h。分别按 1.3.5、1.3.6 和 1.3.7 的方法测定水解度及其水解产物对自由基的清除能力, 结果如图 7、8 所示。

由图 7、8 可见, 水解度随着水解时间的增加而逐渐增大, 水解时间直接影响到酶的催化反应。同时, 随着水解时间的增加水解产物对自由基清除率也逐渐增大, 但当水解度达到一定程度后, 继续延长水解时间, 水解液清除自由基的能力则有所下降^[16]。可见水解产物对自由基的清除率并不是随着水解度增大而增大, 而是

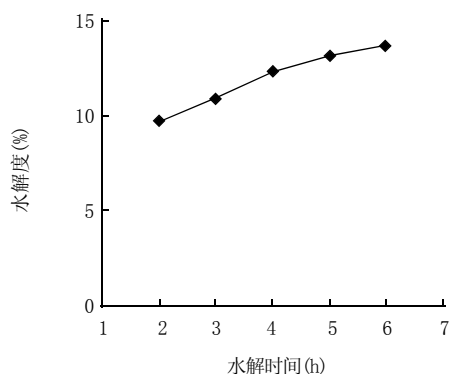


图7 时间对水解度的影响
Fig.7 Effects of time on DH

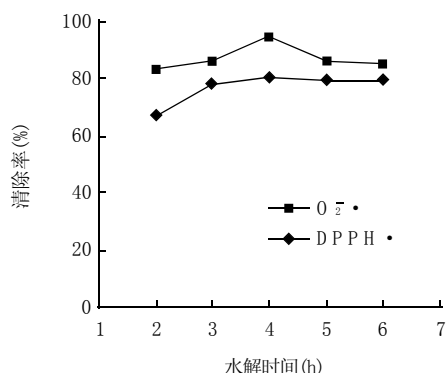


图8 水解时间对自由基清除率的影响
Fig.8 Effects of time on radical scavenging activity

以水解4h时得到的产物对两种自由基的清除效果最好，其中对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率最高可达94.9%。因此综合考虑，可以认为制取抗氧化活性肽时，酶解时间选择4~5h较为合适。

2.5 酶解温度对鲫鱼蛋白质水解的影响

分别采用40、45、50、55、60℃的水解温度，在酶浓度为4%、底物浓度为8%、pH8.0条件下水解4h。分别按1.3.5、1.3.6和1.3.7的方法测定其水解度及其对自由基的清除率，结果如图9、10所示。

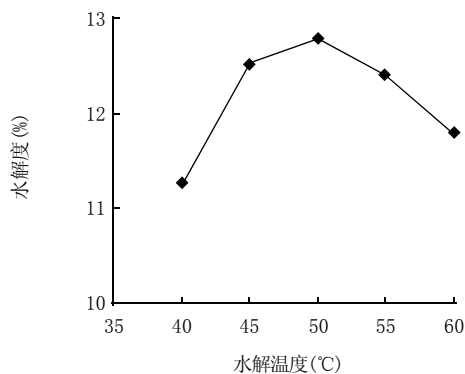


图9 水解温度对水解度的影响
Fig.9 Effects of temperature on DH

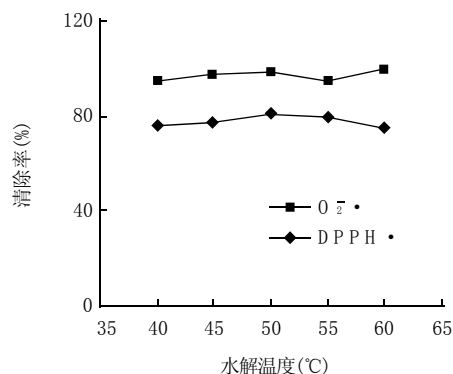


图10 水解温度对自由基清除率的影响
Fig.10 Effects of temperature on radical scavenging activity

各种酶催化反应都有最适的温度^[16]。由图9可见，水解温度低于50℃时，水解度随温度上升而增加，而高于50℃时，水解度随温度增加而降低，可见50℃是该酶解反应最适的作用温度。由图10可见，水解温度对自由基的清除率影响不大，清除率都较高，对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除最高接近100%，对DPPH·清除也都在80%左右。可以认为制取抗氧化活性肽时，50℃为酶解的最佳温度。

综合上述实验结果，采用酶浓度为4%、底物浓度为10%、pH8.0、水解时间为4h、水解温度为50℃的条件进行水解实验，结果测得水解度为12.82%、 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率为98.5%、DPPH·的清除率为80.5%。可以认为酶浓度为4%、底物浓度为10%、pH8.0、水解时间为4h、水解温度为50℃是制备鲫鱼抗氧化活性肽的适宜条件。

3 结论

由实验结果与分析可见，碱性蛋白酶水解鲫鱼制备抗氧化肽是可行的，其水解产物对自由基的清除率能够达到较高的水平。碱性蛋白酶水解鲫鱼制备抗氧化肽的适宜条件为酶浓度为4%、底物浓度为10%、pH8.0、水解时间为4h、水解温度为50℃。

碱性蛋白酶水解鲫鱼制备抗氧化肽的最佳工艺条件以及鲫鱼抗氧化肽的纯化与精制和组成结构鉴定有待进一步深入研究。

参考文献：

- [1] 贾敬德. 21世纪我国淡水渔业展望[J]. 淡水渔业, 2000, 30(1): 3-6.
- [2] 汪之和. 我国水产品加工业的发展现状和展望[J]. 食品科学, 1999, 20(9): 19-21.
- [3] 陈胜军, 曾名勇. 淡水鱼加工利用的研究进展[J]. 中国水产, 2002(5): 70-71.
- [4] 曾名勇, 崔海英, 李八方. 海洋生物活性肽及其生物活性研究进展[J]. 中国海洋药物杂志, 2005, 24(1): 46-51.
- [5] 辛志宏, 吴守一, 马海乐, 等. 从麦胚蛋白质中制备降血压肽的研究

青钱柳多糖提取工艺的研究

谢建华, 谢明勇*, 聂少平, 董彩军, 黄 璞, 刘 昕

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 以江西修水青钱柳粉末为原料, 采用热水浸提法提取青钱柳多糖, 研究了提取温度、提取次数、提取时间和料液比对青钱柳多糖得率的影响, 并以提取次数、提取时间和料液比为考察因素, 在 90 ℃下, 采用 $L_9(3^3)$ 正交试验确定了热水浸提法提取青钱柳多糖的最佳工艺参数, 即提取次数为三次, 提取时间为 150min, 液料比为 1:8。在上述提取条件下, 热水浸提法提取青钱柳多糖得率可达到 6.54%。

关键词: 青钱柳; 多糖; 提取; 得率

Study on Extraction Technology of Polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja

XIE Jian-hua, XIE Ming-yong*, NIE Shao-ping, DONG Cai-jun, HUANG Pu, LIU Xin

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Polysaccharides in *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja samples of Xiushui country in Jiangxi province were obtained from dried *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja powder by hot water extraction. The effects of extraction times, extraction time and the powder-to-water ratio were studied. $L_9(3^3)$ orthogonal test was carried out by taking extraction times, extraction time and the powder-to-water ratio as the parameters to determine at extraction temperature of 90 ℃. The optimal conditions are as following: extraction three times, extraction time 150 minutes and the powder-to-water ratio 1:8. Under these conditions, the yield of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides reached 6.54%.

Key words *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharide; extraction yield

中图分类号: Q946.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0188-05

青钱柳 [*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja] 又名青钱李、摇钱树等, 系双子叶植物纲 [*Dicotyledneae*] 胡桃科 [*Juglandaceae*] 青钱柳属植物。青钱柳属高大乔木, 广泛分布于江西、浙江、江苏、福建、台湾、广东、

广西等长江以南地区^[1]。它是我国特有的单种属植物, 是国家重点保护的濒危植物之一, 属三类保护植物。长期以来, 民间采其嫩叶制茶食用, 该茶具有生津止渴、清热解暑、降压强心及延年益寿的作用, 可有效地用于

收稿日期: 2007-07-26

*通讯作者

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT0540); 江西省自然科学基金资助项目 (9920029); 南昌大学测试基金资助项目 (2006017)

作者简介: 谢建华 (1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品化学与天然产物化学研究。

[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 120-123.

[6] 何慧, 郭会侠, 孔林, 等. 用玉米大豆复配蛋白制备降血压肽水解酶筛选研究[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(6): 25-29.

[7] 许庆陵, 曾庆祝, 崔铁军, 等. 鲢头酶解物对ACE的抑制活性[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(2): 87-91.

[8] 裘迪红. 鲈鱼蛋白酶解与脱腥工艺方法的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2002.

[9] 黄艳春. 酶解淡水鱼蛋白制取血管紧张素转化酶抑制肽的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[10] 张意静. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 190-192.

[11] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 292-

297.

[12] 陈钧辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 57.

[13] 毋瑾超, 朱碧英. 低值鱼酶解蛋白的制取及其组成研究[J]. 水产科学, 2001, 20(4): 7-10.

[14] 韦零, 卢家炯, 莫海涛, 等. 甘蔗汁提取物抗氧化活性初步研究[J]. 广西轻工业, 2006, 22(1): 11-14.

[15] 刘彬, 黄文, 张洁, 等. 家蝇幼虫提取物清除氧自由基的作用[J]. 昆虫知识, 2006, 43(1): 85-88.

[16] 张强, 阚国仕, 陈红漫, 等. 酶解玉米蛋白粉制备抗氧化肽[J]. 食品工业科技, 2005, 22(6): 109-111.