

# 丝胶蛋白酶解产物抗氧化活性的研究

范金波, 王芳, 孙雁, 姜鹭, 任发政\*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 教育部-北京市功能乳品重点实验室, 北京 100083)

**摘要:** 本实验采用六种蛋白酶对丝胶蛋白进行酶解, 并分析其酶解产物清除二苯代苦味酰基 (DPPH) 自由基能力。通过脂质过氧化体系、还原力、金属螯合能力评价其酶解 4h 酶解产物的抗氧化活性。结果表明: 各种酶解产物都呈现一定的清除 DPPH 自由基的能力, 其中以碱性蛋白酶最强 ( $p < 0.05$ ); 各种酶解产物都存在抑制脂质过氧化活性, 与其他蛋白酶相比碱性蛋白酶的抑制活性显著的高于其他酶 ( $p < 0.05$ ); 各种蛋白酶解产物具有一定的还原力和金属螯合能力。这些结果表明: 六种酶解产物都具有显著的抗氧化活性。

**关键词:** 丝胶蛋白; 蛋白酶; 酶解产物; 抗氧化活性; 亚油酸

## Study on Antioxidative Activities of Silk Sericin Hydrolysates

FAN Jin-bo, WANG Fang, SUN Yan, JIANG Lu, REN Fa-zheng\*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Key Laboratory of Functional Dairy, Ministry of Education and Beijing City, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Silk sericin was prepared from silkworm *Bombyx mori* and silk sericin hydrolysates (SSH) were obtained by hydrolysis of silk sericin with six proteases. Its ability to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals was determined. The antioxidant activities of the SSH, including lipid peroxidation in linoleic acid system, reducing power and ferrous ion chelating ability, were evaluated. The results showed that different protease hydrolysates possessed different ability to quench the ABTS cation radicals and DPPH radicals. Among those tested, Alcalase hydrolysate exhibits the highest scavenging activity than other protease ( $p < 0.05$ ). The results also showed that six SSH had potent antioxidative activity on peroxidation of linoleic acid. Alcalase hydrolysate exerted the highest inhibition than other protease ( $p < 0.05$ ). The reducing power and ferrous ion chelating ability of six SSH were significant. These results indicated that six SSH from silkworm *Bombyx mori* were natural antioxidant with potent antioxidative activity.

**Key words:** silk sericin; proteases; hydrolysates; antioxidant activities; linoleic acid

中图分类号: S886.9

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0250-04

自由基是细胞正常代谢过程中形成的, 其高浓度时不稳定很容易和体内的其它基团或者物质反应, 从而造成组织或者细胞的损伤。研究表明, 很多疾病如癌症、硬化、冠心病与其有关<sup>[1-2]</sup>。合成抗氧化剂如 BHA、BHT 已经应用到食品工业中, 但是有一些研究表明其存在着潜在的健康威胁<sup>[3-4]</sup>。因此, 自然来源的抗氧化剂成为了新的研究热点。研究报道乳清蛋白、大豆蛋白可以作为熟肉中的添加的自然抗氧化剂<sup>[5]</sup>。通过蛋白酶的酶解的乳清蛋白和大豆蛋白抗氧化活性会增强, 蛋白酶解产物有效的抑制了脂质和脂肪酸的过氧化<sup>[6]</sup>。

丝胶蛋白是天然的大分子蛋白, 占蚕丝蛋白的 25%~30%。丝胶蛋白具有很多生物功能。研究表明,

丝胶具有抑制酪氨酸酶活性和抗氧化作用; 对细胞和蛋白质有冻结保护作用; 丝胶及其水解物对大肠癌有明显的抑制作用<sup>[7]</sup>。因此, 丝胶可以应用到食品、化妆品、医药产品上, 丝胶蛋白是一种新的有价值的蛋白资源。蚕丝生产过程中, 每年大量的丝胶被排放掉, 既浪费资源又污染环境, 因此丝胶蛋白的回收和再利用将创造大量的经济和社会效益。

前面的研究中评价了丝胶蛋白的自由基清除活性和抗氧化活性, 结果表明: 丝胶蛋白具有显著的抗氧化活性。然而丝胶酶解产物的自由基清除活性和抗氧化活性方面的研究还未见报道。本实验研究六种丝胶蛋白酶解产物的抗氧化活性。

收稿日期: 2007-11-30

作者简介: 范金波(1977-), 男, 博士研究生, 研究方向为功能活性肽。E-mail: jinbofan@yahoo.cn

\*通讯作者: 任发政(1963-), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳品及肉品科学。E-mail: renfazheng@263.net

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

丝胶蛋白 自制。

碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶 诺维信公司; 胰蛋白酶 北京欣经科生物技术有限公司; 二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)、三硝基苯磺酸(TNBS)、3-(2-吡啶基)-5,6-双(4-苯磺酸)-1,2,4-三嗪(ferrozine)、亚油酸(linoleic acid)、L-亮氨酸(L-leucine) Sigma-Aldrich公司; 其他试剂均为市售分析纯。

1.1.2 仪器与amp;设备

UV-2102PC紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司; 3K30 Sigma 低温高速离心机 德国Sigma 公司; DK-8B 电热恒温水槽 上海精宏试验设备有限公司; L20冷冻干燥机 高效液相色谱设备 Waters公司; 液相色谱柱YMC-Diol-60凝胶色谱柱 日本Kyoto 公司。

1.2 方法

1.2.1 丝胶蛋白酶解液的制备

丝胶蛋白制备参照 Kato N 等<sup>[8]</sup>的方法。蚕茧中加入 5L 去离子水, 95℃ 恒温 120min, 过滤、透析 24h、冻干-20℃ 保存备用。

选取了碱性蛋白酶(A)、胰蛋白酶(T)、中性蛋白酶(N)、菠萝蛋白酶(B)、木瓜蛋白酶(P)、风味蛋白酶(F)六种蛋白酶分别在最适条件下对丝胶蛋白进行水解。丝胶蛋白溶液(2%)调整到合适的温度和 pH 值, 水浴振荡 30min, 加入 2% 蛋白酶开始水解。水解过程中通过不断的添加 0.1mol/L 的 NaOH 溶液恒定 pH 值。反应时每间隔 1h 取样在 100℃ 10min 灭活。水解液 4℃、10000g 冷冻离心 30min, 上清液冻干-20℃ 保存。六种蛋白酶水解 4h 的水解产物冻干分析其分子量分布、脂质过氧化抑制活性、还原力和金属螯合能力。

1.2.2 水解度的测定

水解度的测定参照 Benjakul S 等的方法<sup>[9]</sup>。蛋白水解液样品 125μl, 加入 2.0ml pH8.2 0.2mol/L PBS 和 1.0ml 0.01% TNBS 溶液, 充分混匀, 50℃ 水浴 30min, 加入 2.0ml 0.1mol/L 亚硫酸钠终止反应, 反应液室温冷却 15min, 420nm 处测定吸光度。L-亮氨酸作为标准。水解度计算公式如下:

$$DH(\%) = \frac{L_t - L_0}{L_{max} - L_0} \times 100$$

式中,  $L_t$  为  $t$  时  $\alpha$ -氨基酸的量;  $L_0$  为初始  $\alpha$ -氨基酸的量;  $L_{max}$  为初始蛋白质水解  $\alpha$ -氨基酸的总量。

1.2.3 DPPH·清除活性的测定

DPPH·清除活性测定参照 Suda I<sup>[10]</sup>的方法。

1.2.4 酶解产物相对分子量分布测定

凝胶体积排阻色谱技术分析滤过液相对分子量分布, Waters 液相色谱系统(Waters 2487 紫外检测器), YMC-Diol-60 凝胶色谱柱(5μm, 8.0mm × 300mm), 流动相: 0.1mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaCl:乙腈(7:3), pH7.0, 流速 0.7ml/min, 检测波长 215nm, 25℃ 恒温检测。多肽样品用超纯水溶解, 配制 1mg/ml 的浓度, 0.45μm 微孔滤膜过滤, 进样量 10μl。分子量标准: 溶菌酶 14400、胰岛素 5700、合成多肽 3820、VB<sub>12</sub> 1350。在上述条件下, 分析标准样分子量对数值与标准样保留时间的关系, 得出标准曲线回归方程:  $Y = -0.2731X + 6.5525$ 。式中,  $Y$  为分子量对数值;  $X$  为保留时间。

1.2.5 抗脂质过氧化能力

抗脂质过氧化能力的测定参照 Mendis E 等的方法<sup>[12]</sup>。

1.2.6 还原力的测定

还原力的测定参照 Oyaizu M 的方法<sup>[13]</sup>。

1.2.7 金属螯合能力的测定

样品的金属螯合能力评价通过测定二价铁离子的螯合能力, 参照 Chung YC 等的方法<sup>[14]</sup>。

1.2.8 统计分析

采用 SAS 8.0 软件(SAS Institute Inc., NC, 美国)的多重线性模型(GLM)进行方差分析。邓肯氏多重检验用来确定数据间的差异, 显著水平为  $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 丝胶蛋白的水解和水解度

蛋白质的水解程度是通过水解度评价的。选取了六种蛋白酶分别在最适条件下对丝胶蛋白进行水解 11h。图 1 是典型的蛋白质水解曲线。如图可知, 在蛋白酶水解过程中, 水解度在前 2h 内是迅速增加的, 而后增加缓慢, 特别是碱性蛋白酶。碱性蛋白酶的水解度在水

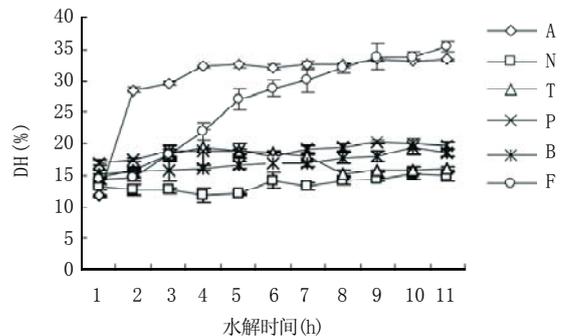


图 1 六种蛋白酶解过程水解度变化  
Fig.1 DH changes of six enzymatic hydrolysates

解 1h、2h 时分别为 11.69%、28.57%，而到 4h 时仅仅增加到 32.45%，此时中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和风味蛋白酶的水解度分别为 11.84%、19.42%、18.87%、16.17% 和 21.87%。所以碱性蛋白酶在较短的时间内有更高的水解效率。

2.2 DPPH 自由基清除活性

DPPH 自由基是一种稳定的自由基，其最大的吸收波长为 517nm。DPPH 自由基遇到提供质子的物质如抗氧化剂时就会被清除，表现为吸光度的降低<sup>[15]</sup>。基于这个原理，物质的抗氧化性可以用其清除 DPPH 自由基的能力来表示。由图 2 可知，不同蛋白酶产物表现出不同的抗氧化能力，与其他蛋白酶相比，碱性蛋白酶产物表现出最高的清除 DPPH 自由基能力 ( $p < 0.05$ )。碱性蛋白酶清除活性从 1h 到 3h 时逐渐增加，3h 时达到最大值  $36.46\% \pm 0.32\%$ ，其后逐渐降低。胰蛋白酶和菠萝蛋白酶间没有显著的差异 ( $p > 0.05$ )，但是它们的清除活性显著的高于中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶 ( $p < 0.05$ )。蛋白酶产物的抗氧化活性开始随着水解度的增加而增加，但是水解度到一定程度后抗氧化活性反而下降，可能是由于大量的蛋白被水解成氨基酸，而有报道表明小肽具有更高的自由基清除活性<sup>[16]</sup>。

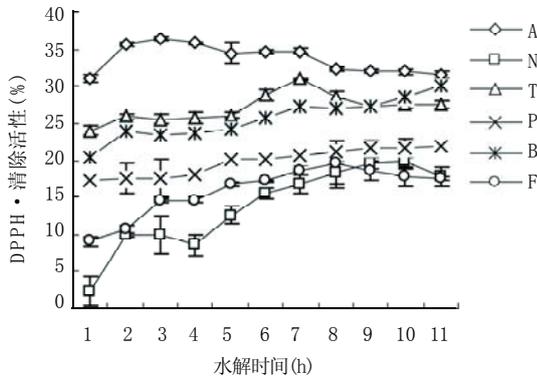


图 2 六种蛋白酶水解过程中 DPPH 自由基清除活性

Fig.2 DPPH radical scavenging activities of six enzymatic hydrolysates

2.3 相对分子量分布分析

六种蛋白酶产物相对分子量分布如图 3 所示。数据表明：六种蛋白酶产物主要由 1000~3000D 和 200~1000D 的小分子量肽组成。碱性蛋白酶由 1000~3000D (51.32%) 和 200~1000D (47.28%) 的小分子量肽组成。大量研究表明：抗氧化活性与酶解产物的分子量分布有关<sup>[18]</sup>。本研究结果表明：200~3000D 的小分子量肽与其高抗氧化活性相关。这些结果和前人的研究结果一致<sup>[19]</sup>。

2.4 抗亚油酸脂质过氧化能力

图 4 显示了六种蛋白酶产物的抗脂质过氧化活性。

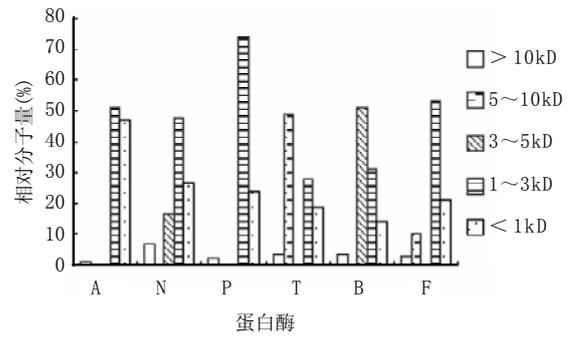


图 3 六种蛋白酶解产物相对分子量分布

Fig.3 Molecular size distribution profile of six enzymatic hydrolysates

高吸光度表明高浓度的过氧化物。由图 4 可知，对照在第 8d 亚油酸过氧化物达到最大浓度，与对照相比六种蛋白酶水解产物表现出了很强的抗脂质过氧化能力，延迟了脂质过氧化。与其他蛋白酶相比，碱性蛋白酶呈现出了最高的抗脂质过氧化能力 ( $p < 0.05$ ) 其活性与 BHT 相当。酶解产物延迟了脂质过氧化呈现量效关系，在不同浓度时与 VE 具有协同作用。清除自由基是抗脂质过氧化的机理之一。由于六种蛋白酶水解产物都具有清除自由基的活性，所以其表现出了抗脂质过氧化能力。

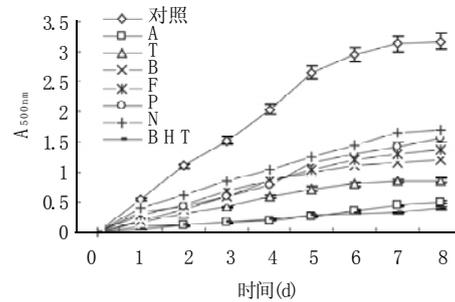


图 4 六种酶解产物亚油酸体系中抗脂质过氧化能力

Fig.4 Antioxidant activities of six enzymatic hydrolysates in linoleic acid system measured by ferric thiocyanate method

2.5 还原力

还原力可以作为具有潜在抗氧化活性的一个重要指

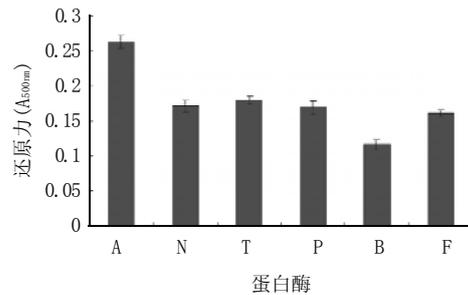


图 5 六种蛋白酶解产物还原力

Fig.5 Reducing power of six different hydrolysates

标, 抗氧化剂都具有一定程度的还原力, 吸光度越高表明还原力越强<sup>[20]</sup>。由图 5 可知, 六种蛋白酶水解产物呈现出不同的还原力。六种酶中, 碱性蛋白酶呈现出最高的还原力 ( $p < 0.05$ ) 为 0.43。BHA 在 3.6mg/ml 和 VE 在 8.6mg/ml 还原力分别为 0.12、0.13。所以碱性蛋白酶水解产物的具有较强的还原力。

## 2.6 金属螯合能力

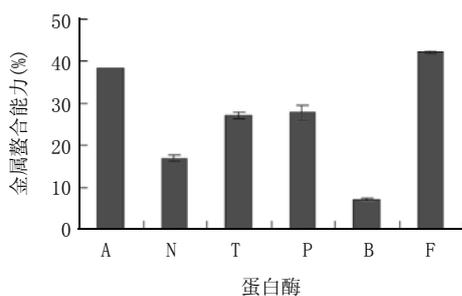


图 6 六种蛋白酶解产物的金属螯合能力  
Fig.6 Metal chelating ability of six different hydrolysates

由图 6 可知, 六种蛋白酶都有不同程度的金属螯合能力。其中碱性蛋白酶和风味蛋白酶的螯合能力最强, 而木瓜蛋白酶和胰蛋白酶活性次之。

## 3 结论

3.1 选取六种蛋白酶制备酶解产物, 并对其清除 DPPH 自由基能力进行了评价, 结果表明各种蛋白酶都具有一定的清除活性, 其中碱性蛋白酶活性最强 ( $p < 0.05$ )。

3.2 通过脂质过氧化体系、还原力、金属螯合能力评价其酶解 4 h 酶解产物的抗氧化活性。结果表明: 各种酶解产物都存在抑制脂质过氧化活性, 与其它蛋白酶相比碱性蛋白酶的抑制活性显著的高于其它酶 ( $p < 0.05$ ); 六种蛋白酶解产物具有一定的还原力和金属螯合能力。这些结果表明: 六种酶解产物都具有显著的抗氧化活性, 其中以碱性蛋白酶解产物活性最强。

## 参考文献:

[1] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002.  
[2] 凌关庭. 天然抗氧化剂及其清除氧自由基的进展[J]. 食品工业, 2000 (3): 19-22.  
[3] 岳振峰, 蓝芳, 谢丽琪. 气相色谱-质谱法测定 XO 酱中 BHA、BHT

和TBHQ [J]. 中国粮油学报, 2004, 19(5): 83-85.  
[4] 许彩芸, 郭建, 韩淑霞. 直接甲醇提取气相色谱测定BHA、BHT [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(8): 954-955.  
[5] DECKER E A, CRUM A D. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork [J]. Meat Science, 1993, 34(2): 245-253.  
[6] AMAROWICZ R, SHAHIDI F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 1997, 58(4): 355-359.  
[7] 周文林, 张雨青, 沈卫德. 天然丝胶蛋白的生物学活性[J]. 江苏蚕业, 2003(1): 1-3.  
[8] KATO N, SATO S, YAMANAKA A, et al. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1998, 62(1): 145-147.  
[9] BENJAKUL S, MORRISSEY M T. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(9): 3423-3430.  
[10] SUDA I. Antioxidative activity, in the methods of food functions analysis [M]. Korin Tokyo Japan, 2000: 218-220.  
[11] PELLEGRINI N, RE R, YANG M, et al. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay [M]//PT A. Oxidants and antioxidants. San Diego: Academic Press Inc, 1999: 379-389.  
[12] MENDIS E, RAJAPAKSE N, KIM S K, et al. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects [J]. Life Sciences, 2005, 77(17): 2166-2178.  
[13] OYAZUMI. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic-solvent and thin layer chromatography [J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 1988, 35(11): 771-775.  
[14] CHUNG Y C, CHANG C, CHAO W W, et al. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2454-2458.  
[15] AMAROWICZ R, PEGGR B, RAHIMI M P, et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies [J]. Food Chemistry, 2004, 84(4): 551-562.  
[16] MOOSMAN B, BEHL C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure-activity relationship [J]. Molecular Pharmacology, 2002, 61: 260-268.  
[17] MILIAUSKAS G, VENSKUTONIS P R, BEEK T A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts [J]. Food Chemistry, 2004, 85(2): 231-237.  
[18] WANG J, ZHAO Mou-ming, ZHAO Qiang-zhang, et al. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems [J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1658-1663.  
[19] KIMS Y, JE J Y, KIMS K. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(1): 31-38.  
[20] YEN, G C, WU J Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae* [J]. Food Chemistry, 1999, 65(3): 375-379.