

文章编号:1673-1689(2007)03-0080-05

方格星虫酶解物成分分析及其抗氧化作用

张桂和^{1,2}, 赵谋明¹, 巫光宏³

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640; 2. 海南大学海洋学院, 海南海口 570228; 3. 华南农业大学生命科学学院 广州, 广东广州 510642)

摘要: 用木瓜蛋白酶对方格星虫(*Sipunculus nudus*)进行酶促水解, 并对酶解物冻干粉的成分进行了分析, 其中粗蛋白质量分数为 69.02%, 多肽质量分数为 60.60%, 肽的平均链长为 3.73 个氨基酸残基, 肽分子的平均相对分子质量为 447.6; 游离氨基酸占 5.27%。氨基酸分析结果显示, 方格星虫酶解物含有 17 种氨基酸(色氨酸未测), 其中人体必需氨基酸含量较高, 占总氨基酸数的 30.62%。方格星虫酶解物中还含有 P、Fe、Mg、Mn、Zn、Cu、Se 等至少 12 种矿质元素, 以及含有抗氧化作用的营养成分, 并通过动物试验证明了方格星虫酶解物具有显著的抗氧化作用。方格星虫酶解物可用于食品添加或用作功能性食品。

关键词: 方格星虫; 酶解物; 成分分析; 抗氧化作用

中图分类号: Q 556

文献标识码: A

The Nutritional Components of Enzymatic Hydrolysate from *Sipunculus nudus* and Effects on Anti-oxidation

ZHANG Gui-he^{1,2}, ZHAO Mou-ming¹, WU Guang-hong³

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 2. College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. College of Life Science, South China University of Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The nutritional components in *Sipunculus nudus* after being partly hydrolyzed by papain was systematically investigated. The results showed that the enzymatic hydrolysate lyophilized powder riched in oligo-peptide (average 3.73 amino acid residue), mineral elements (P, Fe, Mg, Mn, Zn, Cu, Se, and so on) and all the essential amino acids. The hydrolysis products of *Sipunculus nudus* with an enzymatic hydrolysis degree of 26.79% contained about 60.60% of oligo-peptides which average molecular weight was 447.6 Dalton. To study the anti-oxidative effect of the enzymatic hydrolysate of *Sipunculus nudus*, the hemolysis extent of red blood cells was detected by spectrophotometric methods, and self-oxidative inhibition was studied using the 1,2,3-phentriol. The results demonstrated that the enzymatic hydrolysate of *Sipunculus nudus* had evident antioxidation effects. It may be the source for functional food.

Key words: *Sipunculus nudus*; Enzymatic hydrolysate; nutritional components; anti-oxidation

收稿日期: 2006-10-14.

基金项目: 广东省科技计划项目(2003B21304), 广州市科技攻关项目(200421-E0061).

作者简介: 张桂和(1964-), 广西玉林人, 男, 蛋白质化学与工程博士研究生, 副教授.

通讯作者: 赵谋明(1964-), 湖南安化人, 男, 教授, 博导, 主要从事蛋白质化学与工程研究. Email: femmzhao@scent.edu.cn

方格星虫(*Sipunculus nudus*),俗称沙虫,属于星虫动物门,星虫科,方格星虫属动物^[1]。方格星虫肉质脆嫩,味道鲜美,富含蛋白质、多种氨基酸、微量元素,是一种食疗兼优的药膳。我国多种药典中记载了其食用和药用价值,有些地区用其代替中药冬虫夏草。据记载,星虫性寒、味甘、咸,具有滋阴降火、清肺补虚活血强身及补肾养颜等功能,可治疗骨蒸潮热、阴虚盗汗、肺虚喘咳、胸闷痰多以及妇女产后乳汁稀少等症,对治疗肺病咳嗽、神经衰弱、小儿脾虚与肾亏而夜尿频繁等症均有效果^[2-8]。为了综合开发对其进行深加工利用,本研究用木瓜蛋白酶酶解方格星虫,分析酶解产物的含氮量、氨基酸组成、肽含量和肽平均分子链长以及酶解物中的矿质元素,并对酶解物的抗氧化特性进行了研究,旨在将其产品用于食品添加或用作功能性食品。

1 材料与方法

1.1 材料及主要设备

新鲜方格星虫(*Sipunculus nudus*),购自海口市板桥海产品市场及海口市附近海区的渔获物。体长12 cm~15 cm,体宽1.1 cm~1.4 cm,体重10~13 g。试验所用昆明系小鼠,雄性,体重(20±2) g,由南方医科大学实验动物中心提供。

木瓜蛋白酶由广西南宁海发生物酶制品厂生产,活力 6×10^5 U/g。仪器主要有美国 Waters 高效液相色谱仪,德国 Perkin Elmer Elan 6000 电感耦合等离子质谱仪等。

1.2 方法

1.2.1 样品处理方法 方格星虫采到后,用自来水除去泥沙,立即称重,加入等质量蒸馏水,用绞肉机高速绞碎成匀浆后取样。

1.2.2 一般营养成分分析方法 水分测定采用105℃常压干燥,重量法测定;粗蛋白测定采用微量凯氏定氮法;脂肪测定采用索氏提取法;总灰分测定采用高温灰化法,总糖测定采用蒽酮比色法。

1.2.3 酶解物制备方法 取方格星虫匀浆,用10 mol/L NaOH 调节 pH 值至7.5,按底物质量的0.1%~0.2%的比例(w/w)将木瓜蛋白酶混悬于蒸馏水中,在40℃水浴下溶解;然后将酶溶液与底物混合,在50℃水浴恒温振荡培养箱中连续振荡反应,待反应到4 h后取出,加热煮沸5 min 灭酶以终止酶解反应。然后水解液经8 000 g 高速离心10 min,上清液为浅黄色透明溶液,经旋转蒸发浓缩、

冷冻干燥后得浅黄色带少量光泽的粉状固体。

1.2.4 酶解物分析检测方法 酶解物主要成分测定:总氮、脂肪和灰分测定同1.2.2;游离氨基氮含量测定采用甲醛固定快速滴定法^[9];肽用双缩脲法测定^[10]。

氨基酸分析:采用6 mol/L HCl 在110℃水解样品22 h,美国 Waters 高效液相色谱仪测定,用 PICO. TAG 氨基酸分析柱,柱温38℃,体积流量1 mL/min,检测波长254 nm。采用盐酸水解法,色氨酸被破坏,故分析结果中没有色氨酸。

水解度(DH)的计算^[11,12]: $DH = (\text{游离氨基氮产量} / \text{样品中总氮量}) \times 100\%$

肽分子平均链长计算: $PCL \approx 100 / DH$

肽分子平均相对分子质量计算: $PMW = PCL \times \text{氨基酸平均相对分子质量}$ 。氨基酸平均相对分子质量为120。

矿物元素测定:Perkin Elmer Elan 6000 电感耦合等离子质谱(ICP-MS)法测定,雾化器体积流量0.72 L/min,自动透镜电压,定点跳峰式测定,峰停留时间300 ms。

1.2.5 酶解物抗氧化作用分析

1) 酶解物对 H_2O_2 诱导的氧化溶血的抑制作用 小鼠摘眼球取血,制成抗凝血液,3 000 g 离心得红细胞,用生理盐水洗3次,制成体积分数0.5%的悬浮液,取该悬浮液1 mL,加入不同浓度的酶解物溶液,最后加1 mL 10 mmol/L 的 H_2O_2 启动反应,37℃作用1 h,用生理盐水稀释6倍,3 000 g 离心5 min,取上清测415 nm 吸光值^[13]。抑制率(%)= $[A_{415}(CK+H_2O_2) - A_{415}(H_2O_2+酶解物)] \div A_{415}(CK+H_2O_2) \times 100\%$;溶血度(%)=1-抑制率(%)。

2) 酶解物对邻苯三酚自氧化的抑制作用 用50 mmol/L pH 8.2 的 Tri-HCl 缓冲液配制不同浓度的酶解物溶液,取不同浓度的酶解物溶液4.5 mL,加入10 μL 45 mmol/L 邻苯三酚溶液,25℃下测定325 nm 处吸光值,每隔2 min 测定一次,4 min 内测完,计算抑制率^[10,14]。

2 结果与分析

2.1 原料组成

方格星虫经测定水分质量分数为73.33%,各组分质量分数(湿重)分别为:粗蛋白19.67%、灰分4.65%、粗脂肪0.18%、总糖1.42%。说明方格星虫样品中主要成分是蛋白质,并且蛋白质和灰分含

量相当丰富。

2.2 酶解物主要成分

表1为方格星虫酶解物冻干粉中蛋白质、肽、脂肪、总糖和灰分质量分数。由表1可以发现,酶解物主要成分为含氮有机物质,其中肽质量占含氮物质的87.80%,游离氨基酸占含氮物质的7.64%。

表1 方格星虫酶解物冻干粉的主要成分质量分数
Tab.1 The general composition of the enzymatic hydrolysate lyophilized powder

成分	质量分数/%
粗蛋白	69.02
多肽	60.60
游离氨基酸	5.27
脂肪	0.59
总糖	4.80
灰分	15.70
水分	9.44

2.3 氨基酸分析

由表2可看出,方格星虫酶解物中共检测出17种氨基酸(色氨酸未测)。人体的必需氨基酸含量较高,占总氨基酸的比值(EAA/TAA)为30.62%。必需氨基酸与非必需氨基酸的比值(EAA/NEAA)达到44.14%。从单一氨基酸检测结果上看,谷氨酸含量最高,精氨酸含量次之,天冬氨酸、甘氨酸、赖氨酸、丙氨酸、亮氨酸、组氨酸、苏氨酸和苯丙氨酸含量也较高。谷氨酸和天冬氨酸不但是鲜味氨基酸,还是脑营养剂,是人类消耗最大的氨基酸,能促进神经细胞兴奋,对大脑功能和中枢神经系统的正常活动具有重要意义,用于治疗小儿神经发育落后、神经衰弱和提高智力等。据报道,精氨酸是许多幼年哺乳动物生长所必需的氨基酸,通过动物研究表明,精氨酸还是创伤后的必需氨基酸,创伤后增加精氨酸摄入可降低氮的损失,从而促进创伤的愈合。方格星虫酶解物中的精氨酸含量很高,儿童和创伤病人食用更为有益。

从表2还可以看出,方格星虫酶解物中甲硫氨酸含量较低,为限制性氨基酸。除甲硫氨酸外,方格星虫酶解物的必需氨基酸含量均衡,有利于人体的吸收利用。

2.4 酶解物中平均肽链长度分析

酶解物中游离氨基氮质量分数0.843 2 g/hg,样品中总氮质量分数为3.147 2 g/hg,水解度为26.79%,肽分子平均链长(PCL)为3.73个氨基酸

残基,肽分子平均相对分子质量(PMW)为447.6。

肽链长度对食物蛋白质具有很重要的意义,营养价值高的蛋白类食物应富含低分子肽,尤其是2肽和3肽,同时又尽可能少含游离氨基酸^[15]。本实验酶解物正是含少量游离氨基酸的小肽混合物,提示其具有较高的营养价值。

表2 方格星虫水解物中的氨基酸质量分数
Tab.1 Contents of amino acid in the enzymatic hydrolysate of *Sipunculus nudus*

氨基酸种类	质量分数/(mg/g)	氨基酸种类	质量分数/(mg/g)
天冬氨酸(Asp)	59.03	缬氨酸(Val)*	20.08
谷氨酸(Glu)	85.92	甲硫氨酸(Met)*	8.39
丝氨酸(Ser)	21.56	胱氨酸(Cys)	0.79
甘氨酸(Gly)	46.42	亮氨酸(Ile)*	19.31
组氨酸(His)	28.47	异亮氨酸(Leu)*	31.99
精氨酸(Arg)	74.34	苯丙氨酸(Phe)*	21.18
苏氨酸(Thr)*	29.62	赖氨酸(Lys)*	44.01
丙氨酸(Ala)	37.40	必需氨基酸(EAA)	174.58
脯氨酸(Pro)	26.61	氨基酸总量(TAA)	570.07
酪氨酸(Tyr)	14.95	必需氨基酸比例(EAA/TAA,%)	30.62

注:表中*为必需氨基酸(EAA)。

2.5 矿质元素

从表3可以看出,方格星虫酶解物中至少含有12种常量和微量元素,其中有4种属必需微量元素。酶解物中含量最高的几种元素是Na、K、P、Fe、Mg、Ca和Mn。

表3 方格星虫酶解物的矿质元素质量分数
Tab.3 Contents of some mineral elements in the enzymatic hydrolysate of *Sipunculus nudus*

(mg/hg)			
矿质元素	质量分数/(mg/hg)	矿质元素	质量分数/(mg/hg)
Na	226.63	Mn	0.64
K	105.95	Zn	0.38
P	42.91	Cu	0.24
Fe	29.73	Sr	0.20
Mg	18.47	Se	0.16
Ca	12.55	Co	0.01

从本实验的测定结果来看,方格星虫的磷、铁、镁含量较丰富,食用有助于改善膳食结构中这3种矿物元素的缺乏。现代医学理论普遍认为无机元素尤其是某些微量元素参与调节人体代谢,维持着

人体的正常生理功能,无机元素缺乏可能导致许多疾病的发生。磷、铁、镁、锰、锌、铜、硒等是人体必须从食品中摄取的无机盐和微量元素;磷、铁是儿童生长发育必不可少的重要营养元素;锌是重要的健脑元素;硒具有极高的营养及医用价值,被称为人体细胞的活性因子,对防治克山病、防癌抗癌、延缓衰老等具有十分重要的作用。磷、铁、镁、锰、锌、铜、硒等微量元素在方格星虫体内均有一定含量,同其它一些水产品相比(如鳕鱼、鲜贝可食部分中不含锰、铜元素),其所含人体必需微量元素的种类较为齐全。

2.6 方格星虫酶解物抗氧化作用分析

2.6.1 方格星虫酶解物对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞(RBC)溶血的影响 从表 4 可知, H_2O_2 组的吸光值远比对照组大,说明 H_2O_2 能明显地引起红细胞溶血,即红细胞膜受到影响。当在 H_2O_2 体系中加入方格星虫酶解物后,溶血度显著降低,说明方格星虫酶解物可抑制红细胞氧化作用,并且在 20~200 mg/mL 质量浓度范围内表现为一定的量效关系。

表 4 酶解物对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞(RBC)溶血的影响
Tab.4 Effect of Enzymatic Hydrolysate on the hemolysis of rat RBC induced by H_2O_2 ($X \pm SD, n=5$)

实验组	酶解物 质量浓度/ (mg/mL)	$A_{415\text{ nm}}$	溶血 度/%	抑制 率/%
CK	0	0.228 ± 0.015	—	—
CK+ H_2O_2	0	0.781 ± 0.011^a	100	0
H_2O_2 + 酶解物	20	0.702 ± 0.024^b	89.88	10.12
	50	0.589 ± 0.058^b	75.42	24.58
	100	0.523 ± 0.013^b	66.97	33.03
	200	0.447 ± 0.032^b	57.23	42.77

注:与 a 比较, b: $p < 0.05$ 。

2.6.2 方格星虫酶解物对邻苯三酚自氧化的抑制作用 邻苯三酚在碱性条件下能迅速发生自氧化反应,生成 $O_2^{\cdot -}$ 和有色中间物,其反应速度依赖于自氧化反应生成的 $O_2^{\cdot -}$ 浓度,在 4 min 内 $O_2^{\cdot -}$ 生成量和中间产物较稳定,故可以测定不同质量浓度的方格星虫酶解物对邻苯三酚自氧化的抑制作用,结果见表 5。

从表 5 可知,方格星虫酶解物能清除邻苯三酚自氧化反应所生成的 $O_2^{\cdot -}$,其抑制率随酶解物浓度的增加而增加,说明方格星虫酶解物有较强的抗氧化作用。

3 讨 论

3.1 酶解物的营养价值

方格星虫酶解物的主要成分为含氮物质,在酶解物冻干粉中含量达 69.02%。多肽含量为 60.60%,它们是平均链长为 3.73 个氨基酸残基的小肽;游离氨基酸仅占 5.27%。从蛋白质消化吸收的角度而言,这种小肽和游离氨基酸的混合物在肠壁的吸收远比单纯混合氨基酸快,极易被吸收。所以这种酶解物对于消化蛋白质能力较差甚至缺乏的病人及婴幼儿是一种很好的蛋白质来源形式。

表 5 酶解物对邻苯三酚自氧化的抑制效果
Tab.5 Effect of Enzymatic Hydrolysate on the self-oxidation of 1,2,3-phentriol ($X \pm SD, n=5$)

酶解物 质量浓度/ (mg/mL)	$A_{325\text{ nm}}$ (2 min)	$A_{325\text{ nm}}$ (4 min)	$\Delta A/\Delta t$	抑制 率/%
0	0.446	0.570	0.062 ^a	—
20	0.508	0.587	0.039 ^b	37.09
50	0.481	0.548	0.033 ^b	46.77
100	0.465	0.523	0.029 ^b	53.22
200	0.428	0.473	0.023 ^b	62.90

注:与 a 比较, b: $p < 0.05$ 。

从氨基酸组成看,方格星虫酶解物的必需氨基酸种类齐全,除甲硫氨酸外含量均较高,占总氨基酸的 30.62%,尤其是赖氨酸含量很高。赖氨酸是谷类蛋白质的第一限制氨基酸,对儿童的生长发育具有重要意义。因此,酶解物可用于某些特殊食品,例如婴幼儿食品或作营养强化剂。酶解物中还含有较高的 Na、K、P、Fe、Mg、Ca、Mn 和 Zn 等矿物质元素,这些元素均有很重要的生物功能。为补充人体微量元素,方格星虫酶解物还可作为一定的微量元素来源食用。

3.2 酶解物的抗氧化功能

细胞膜的脂质过氧化会使膜的通透性增加,引起膜内外物质的内流和外泻,促使红细胞溶血的发生。因而这些指标能反映机体的抗氧化能力和自由基水平^[13,14]。本实验结果显示,方格星虫酶解物对 H_2O_2 引起的脂质过氧化有明显的抑制作用,能减轻红细胞溶血的发生,维持正常的生理功能。方格星虫酶解物还对邻苯三酚自氧化速率有明显的抑制效果,说明方格星虫酶解物具有较强的抗氧化能力,提示可能有抗氧化肽的产生。机体内自由基的氧化作用与许多病理生理现象,如衰老、肿瘤、心

血管疾病和炎症有关。目前国内外已将抗氧化检测用于抗衰老等保健食品的评价,对保健食品的开发具有积极的作用。本实验结果表明,方格星虫酶解

物对氧自由基有直接的清除作用,提示该酶解物可能在抗衰老、抗肿瘤和抗炎等方面发挥作用。分离纯化抗氧化作用的组分有待于今后的进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 李凤鲁,孔庆兰,史贵田,等. 中国沿海方格星虫属(星虫动物门)的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1990, 20(1): 93—99.
LI Feng-lu, KONG Qing-lan, SHI Gui-tian, et al. Studies on the genus *Sipunculus*(*Sipuncula*) of the China coasts[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1990, 20(1): 93—99. (in Chinese)
- [2] 中国人民解放军海军后勤部卫生部等编. 中国药用海洋生物[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977. 37.
- [3] 章超桦,铃木健,吉江由美子. 沙虫干呈味及功能成分研究[J]. 湛江海洋大学学报, 1999, 20(2): 24—27.
ZHANG Chao-hua, Takeshi Suzuki, Yumiko Yoshie. Studies on tasty substance and functional components of the dried *Sha-chong*(*Sipunculus nudus*)[J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 1999, 20(2): 24—27. (in Chinese)
- [4] 谢宗壖. 海洋水产品营养与保健[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991. 57—58.
- [5] 郑建仙. 功能性食品(第二卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 191—192.
- [6] 沈先荣,蒋定文,贾福星,等. 方格星虫延缓衰老作用研究[J]. 中国海洋药物, 2004, (1): 30—32.
SHEN Xian-rong, JIANG Ding-wen, JIA Fu-xing, et al. Studies on anti-senescence effect of *Sipunculus nudus* preparation [J]. *Chinese Journal of Marine Medicine*, 2004, (1): 30—32. (in Chinese)
- [7] 沈先荣,蒋定文,贾福星,等. 海洋星虫提取物的抗疲劳作用研究[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2003, 10(2): 112—114.
SHEN Xian-rong, JIANG Ding-wen, JIA Fu-xing, et al. The anti-fatigue effect of *Sipunculidae* preparation on mice[J]. *Chin J Naut Med & Hyperbar Med*, 2003, 10(2): 112—114. (in Chinese)
- [8] 黄玉良,黄群,黄哲元,等. 复方星虫口服液对小鼠免疫功能的影响[J]. 福建中医学院学报, 1998, 8(2): 32—33.
HUANG Yu-liang, HUANG Qun, HUANG Zhe-yuan, et al. Effect of *Fufangxingchong Koufuye* to immunologic function in mice[J]. *Journal of Fujian College of Chinese Traditional Medicine*, 1998, 8(2): 32—33. (in Chinese)
- [9] 王朝旭,赵丹,王小雪. 酶法水解骨蛋白最佳条件的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(2): 48—49.
WANG Chao-xu, ZHAO Dan, WANG Xiao-xue. Studies on the optimal conditions of hydrolysis to bone protein by enzymes[J]. *Food Science*, 2001, 22(2): 48—49. (in Chinese)
- [10] 李建武,萧能,余瑞元,等. 生物化学实验原理与方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 318—323.
- [11] 余杰,陈美珍. 酶法水解鳗鱼头蛋白及其应用的研究[J]. 食品工业科技, 2001, 22(1): 45—47.
YU Jie, CHEN Mei-zhen. Studies on hydrolysis of eel head by enzymes to prepare fish protein hydrolyzate and its application[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2001, 22(1): 45—47. (in Chinese)
- [12] Adler Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food protein [M]. London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd, 1986. 82—83.
- [13] Huimin Qi, Quanbin Zhang, Tingting Zhao, et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 37, 195—199.
- [14] Junhong Wu, Chen Xu, Chengyong Shan, et al. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*[J]. *Life Sciences*, 2006, 78: 622—630.
- [15] Liaset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry: chemical characterization and nutritional evaluation [J]. *J Sci Food Agric*, 2000, 80: 581—589.

(责任编辑:杨萌)