

# 林蛙皮胶原蛋白肽酶解工艺数学建模及抗氧化作用的研究

邱芳萍, 王长周, 季晓枫

(长春工业大学 化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012)

**摘要:**采用数理统计和数据拟合分析方法对林蛙皮胶原蛋白肽(LWT)酶解过程中的影响因素进行优化,建立了LWT酶解过程中影响因素与水解度关系的数学模型,验证了水解度的最佳值(峰值)。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法证明LWT的相对分子质量在3 500以下,HPLC表明其纯度较高。研究了LWT对溴代苯小鼠肝损伤的抗氧化作用,结果表明:LWT具有显著降低小鼠肝组织中MDA质量分数和显著升高小鼠肝组织中SOD活力的作用,具有抗氧化作用。

**关键词:**林蛙皮;胶原蛋白肽;酶解工艺;数学模型;抗氧化作用

中图分类号:Q 81/TS 234 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2013)01—0089—05

## Mathematical Modeling for the Optimum Enzymatic Hydrolysis of Rana Skin Collagen Peptide and Its Antioxidant Research

QIU Fang-ping, WANG Chang-zhou, JI Xiao-feng

(School of Chemical and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

**Abstract:** The influencing factors in the enzyme solution process of Rana skin collagen peptide (LWT) were optimized by using the mathematical statistics and data fitting analysis method. And the relationship between the influencing factors and hydrolyzing degree in the enzyme solution process of LWT was established. And the best value hydrolysis degree (peak) was forecasted. Used polyacrylamide gel electrophoresis method to determine the molecular weight of LWT which was under 3 500. High performance liquid chromatogram showed that the purity was in the high level. In the antioxidant effect of LWT on liver damage of bromobenzene mice were studied. The results showed that LWT have the remarkable effect on reducing MDA content and the obvious effect on rising SOD vitality in mice liver tissue and have antioxidant effect.

**Keywords:** rana skin, collagen peptide, enzymatic hydrolysis, mathematical modeling, antioxidant effect

林蛙是我国东北地区集药、食于一体的珍贵蛙种,养殖量和商品量逐年增加,据不完全统计,全省

年产蛙量在十亿余只,蛙油产量 200 t 左右,蛙油年产值 10 亿元左右,而蛙油仅占整蛙的 15%,其它部

收稿日期: 2012-01-09

基金项目: 吉林省中小企业创新基金项目(20106042)。

作者简介: 邱芳萍(1955—),女,吉林长春人,教授,博士研究生导师,主要从事生物技术研究。Email:qfp2004@126.com

位(脑、皮、肉和骨)作为废弃物或饲料,资源浪费,污染严重而林蛙皮中含有丰富的蛋白质、氨基酸、胶原蛋白、抗菌肽和透明质酸等生物活性物质,具有重要的应用价值及较大的开发利用潜力。

作者以长白山林蛙皮为原料,经酶解和膜分离手段等一系列工艺过程,建立了酶解最佳工艺的数学模型,制备出具有特殊分子结构、功能复杂多样的生物活性物质,对其溴代苯小鼠肝损伤及SOD、GSH-Px活力的影响进行了研究,以此证明:LWT可以作为新型的化妆品及保健品的原料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

昆明小鼠:雌性,体重25~30 g,吉林大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK-(吉)2008-0005;LWT:长春工业大学功能食品与生物技术研究制备,批号:20101210;血红蛋白,SOD,MDA,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒:南京建成生物技术公司产品;丙烯酰胺,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司产品;其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

日普利RPL-D2000 COLUMN HBATER高效液相色谱:山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司产品;DYY-8C型电泳仪:北京市六一仪器厂产品。

### 1.3 方法

**1.3.1 酶解工艺** 蛙皮→溶胀→酶解→过滤→脱腥→活性炭脱色→膜分离纯化→浓缩→冷冻干燥→微黄色粉末状LWT

**1.3.2 水解度的测定** 采用游离氨基氮甲醛快速滴定法<sup>[2]</sup>测定林蛙皮的水解度。

**1.3.3 酶解工艺的优化** 采用数理统计和数据拟合分析方法对LWT酶解过程中的加酶量、酶解温度、酶解时间、pH、料液质量体积比5因素进行优化,建立LWT酶解过程中影响因素与水解度关系的数学模型。

**1.3.4 相对分子质量测定** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[3]</sup>的方法测定LWT的相对分子质量。

**1.3.5 纯度检测** 高效液相色谱分析条件<sup>[4]</sup>:紫外-可见光检测器;色谱柱:C18,250 mm×4.6 mm;流动相: $v(\text{乙腈}):v(\text{水}):v(\text{三氟乙酸})=20:80:0.1$ ;波长:220 nm;流量:1 mL/min;柱温:30 °C;质量浓度:1

mg/mL;进样量:15~30  $\mu\text{L}$ 。

### 1.4 抗氧化活性实验

取健康雌性昆明小鼠,随机分为对照组、模型组及LWT低剂量组(200 mg/kg)、中剂量组(600 mg/kg)、高剂量组(1 800 mg/kg),每组各15只。3个LWT组给予不同剂量连续等体积灌胃,对照组和模型组动物灌胃给予同等容量的生理盐水。

末次给药后,摘眼取血,分别SOD活力和GSH-Px活力<sup>[5]</sup>,除对照组,其余各组灌胃给0.47 mg/kg溴代苯油,对照组给予色拉油,灌胃量为0.2 mL/20 g。经一系列处理后,测定丙二醛质量分数和SOD活力和GSH-Px活力及匀浆液蛋白质质量分数。溶血液和肝组织的MDA质量分数采用硫代巴比妥酸(TBA)比色分析法<sup>[6]</sup>测定,血红蛋白、蛋白质质量分数、SOD、GSH-Px活力的测定参照试剂盒说明书进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳酶解条件的确定

采用数理统计和数据拟合分析方法建立酶解工艺优化条件的数学模型,把加酶量作为水解度的重要影响因子,其他酶解条件可以作为次要影响因子。由一元插值可确定pH、酶解温度、酶解时间3个变量与加酶量均有线性关系,可做如下假设: $x$ 为林蛙皮在酶解反应中加酶量的大小,且为水解度的第一影响因子; $x_i(i=1,2,3)$ 为 $x$ 的影响因子(其中, $x_1$ 为酶的pH, $x_2$ 为酶解温度, $x_3$ 为酶解时间); $y$ 为林蛙皮酶解反应后的水解度,这里其为目标函数;由实验数据得到如下关系曲线,见图1~3。

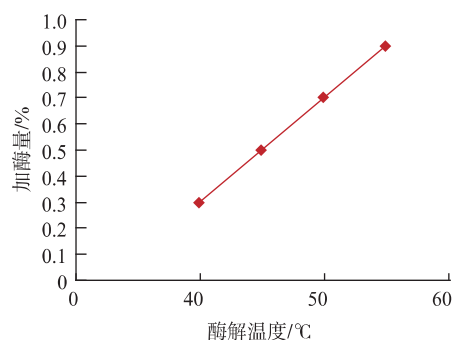


图1 酶解温度与加酶量的关系

Fig. 1 Relations between add enzyme quantity and enzymatic hydrolysis temperature

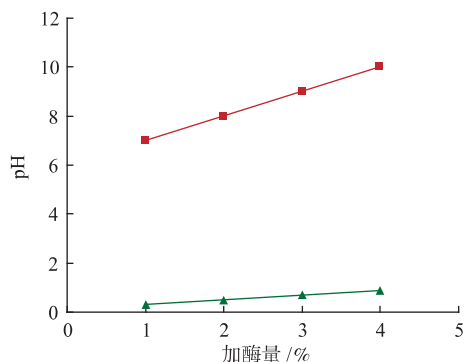


图2 加酶量与 pH 的关系

Fig. 2 Relations between add enzyme quantity and pH

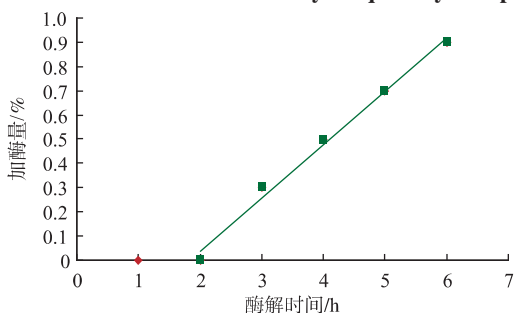


图3 酶解时间与加酶量的关系

Fig. 3 Relations between add enzyme quantity and enzymatic hydrolysis time

根据上面数据可知:  $x_1=k_1x+b_1$ ;  $x_2=k_2x+b_2$ ;  $x_3=k_3x+b_3$ ; 其中  $k_i=1, 2, 3, b=1, 2, 3$  为常数。

由上面的数据可确定如下:  $k_1=5, b_1=5.5, k_2=25, b_2=32.5, k_3=2.5, b_3=1.25$ 。

从上面可得到  $x_1$  与  $x$  之间的关系。

水解度是这里最为重要的指标,  $y=f(x)$  是目标函数。

$y$  受两个因素的影响, 一是加酶量的多少  $x$  (它与  $x_i, i=1, 2, 3$  之间的关系已经讨论过), 二是料液质量体积比。结果见图 4, 图 5。

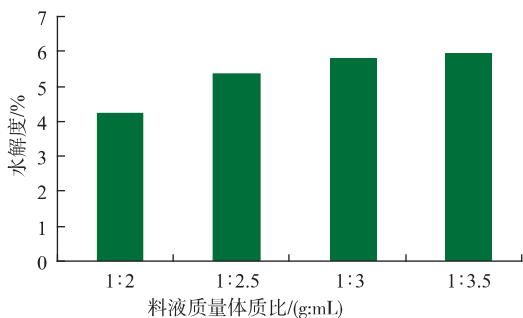


图4 料液质量体积比与水解度之间的关系

Fig. 4 Relations between hydrolyzing degree and ratio of solid to liquid

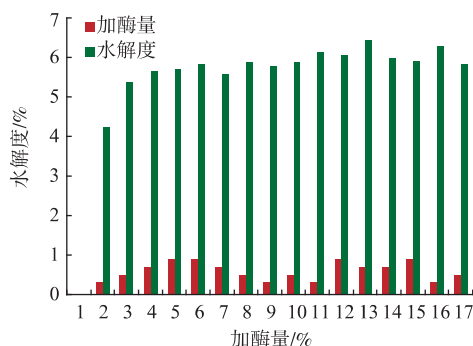


图5 加酶量与水解度之间的关系

Fig. 5 Relations between add enzyme quantity and hydrolyzing degree

根据图 4, 曲线可由代数方程表示: 令  $y=ax^k+b$

水解度与酶解温度、酶解时间、pH 值、酶量的大小均有直接的关系, 通过实验给出的数据分析, 当温度在  $50^\circ$ 、酶解时间约 3.0、pH 值时:

设水解度为  $y(\%)$ , 加酶量为  $x(\%)$ , 利用最小二乘法可得酶量与水解度之间的模型为:

$$y=6.081x^{0.013} \quad (1)$$

如图 6(a), (b) 所示:

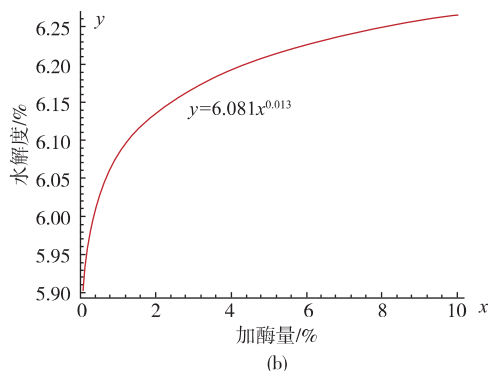
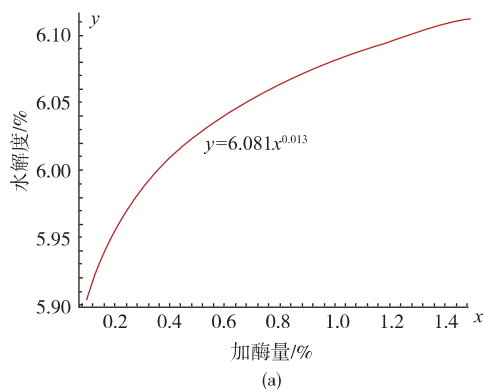


图6 加酶量与水解度之间的关系模型

Fig. 6 Relational model between enzyme quantity and hydrolyzing degree

图 6(a)是在加酶量 1.5%范围内的局部情况,图 6(b)较图 6(a)的范围扩大了到了加酶量为 10%的情况,分析上述结果,当加酶量在 0.5%时,水解度可达到 6.02%,当酶量在 0.58%时,水解度可达到 6.038%,当加酶量在 0.6%时,水解度可达到 6.04%,当酶量在 1.2%时,水解度可达到 6.10%,当酶量在 8%时,水解度可达到 6.247%。显然,当酶量  $x > 0.58$  时,水解度增加趋于平缓。

综上所述,确定最佳酶解条件为:加酶量 0.55%~0.58%,酶解时间 3.0 h,酶解温度 50 °C,pH 9.0,料液比 1 g:3 mL,经试验验证,酶解工艺条件与模型条件吻合。

## 2.2 相对分子质量分布

聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 7。

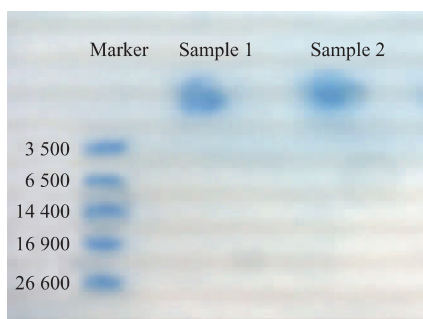


图 7 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 7 Polyacrylamide gel electrophoresis figure

电泳结果显示,该 LWT 的相对分子质量在 3500 以下,两个不同质量浓度的加样量基本上在同一相对分子质量水平上。

## 2.3 HPLC 图谱

高效液相色谱图表明 LWT 纯度较高,结果见图 8。

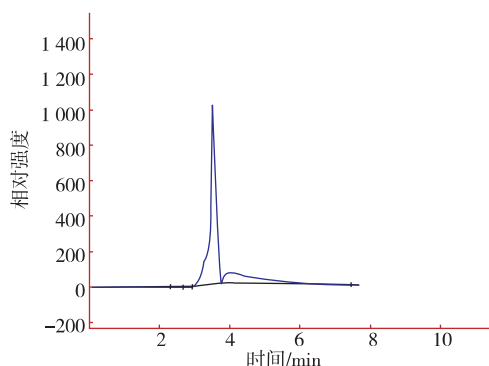


图 8 LWT 高效液相色谱图

Fig. 8 HPLC figure of LWT

## 2.4 LWT 对小鼠血液中 SOD、GSH-Px 活力的影响

LWT 低、中、高剂量组小鼠血液中 SOD 与 GSH-Px 活力与对照组相比较有所提高,但无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),实验结果见表 1。

表 1 LWT 对小鼠血液中 SOD、GSH-Px 活力的影响  
Table 1 Influence of LWT on the SOD and GSH-Px vitality in mice blood

组别	动物数/只	SOD/(U/g)	GSH-Px/U
对照组	15	6 119.88±1 658.96	216.30±52.35
低剂量组	15	8 153.90±4 208.67	227.30±71.31
中剂量组	15	8 004.41±3 453.94	240.74±49.37
高剂量组	15	8 001.75±3 865.31	252.80±60.50

注:各组之间没有显著性差异  $P > 0.05$ 。

## 2.5 LWT 对小鼠肝脏组织中 MDA 质量分数及 SOD、GSH-Px 活力的影响

模型组与对照组比较肝脏组织中 MDA 质量分数明显升高 ( $P < 0.05$ )。LWT 高剂量组小鼠肝组织中 MDA 质量分数与模型组相比显著降低,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );LWT 高剂量组小鼠肝组织中 SOD 活力与模型组相比较显著升高,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );GSH-Px 活力各组之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),实验结果见表 2。

表 2 LWT 对小鼠肝脏组织中 MDA 质量分数及 SOD、GSH-Px 活力的影响

Table 2 Influence of LWT on the MDA content and the SOD and GSH-Px vitality in liver tissue

组别	动物数/只	MDA / (nmol/mg)	SOD/ (U/mg)	GSH-Px/U
对照组	15	0.904 9±0.196 0	121.35±6.57	125.27±33.64
模型组	15	1.206 8±0.359 1*	113.05±19.56	109.45±33.43
低剂量组	15	1.097 3±0.416 0	110.07±9.07	107.52±23.98
中剂量组	15	0.980 9±0.414 0	113.19±8.34	108.15±28.16
高剂量组	15	0.849 3±0.255 3##	132.28±25.82***	114.35±41.91

注:\*与对照组相比  $P < 0.05$ ,##与模型组相比  $P < 0.01$ ,\*\*与模型组相比  $P < 0.01$ ,#与低剂量组相比  $P < 0.05$ 。各组之间无显著性差异

### 3 结 语

对长白山林蛙进行了综合利用研究,运用数学建模优化酶解工艺条件,得到最佳酶解条件为:加酶量 0.55%~0.58%,酶解时间 3.0 h,酶解温度 50℃,pH 9.0,料液质量体积比 1 g:3 mL,在此条件下制备出 LWT。

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和高效液相色谱分析方法,证明了该 LWT 的相对分子质量均在 3 500 以下,且纯度较高。

通过小鼠实验,对所得数据进行统计学分析,最后得出结论:LWT 具有显著降低小鼠肝组织中 MDA 含量和显著升高小鼠肝组织中 SOD 活力的作用,LWT 的抗氧化动物实验结果为阳性,具有抗氧化作用。

林蛙由于生长环境和习性,其安全性、保湿性、抑菌抗菌性,抗氧化、抗衰老等方面都有独特的天然优势,是适用于新型化妆品基料的绿色材料。该 LWT 可以作为新型化妆品和保健品的原料,具有较大的开发潜力和较高的应用价值。

### 参考文献:

- [1] 何照范,张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997.
- [2] 夏其昌,张祥民,周仲驹,等. 蛋白质电泳技术指南[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [3] Bunger H,Kaufner L,Pisonu. Quantitative analysis of hydrophobic pulmonary surfactant protein by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection[J]. *J Chromatogr A*,2000,870(1-2):363-369.
- [4] VishnuduttP,Bin G,Byoung-Joon S. Molecular mechanisms of al-coholic fatty liver[J]. *Alcohol Clin Exp Res*,2009,33(2):191-205.
- [5] Negre-SalvayreA,CoatrieuxC,Ingueneau C,et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins: Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors[J]. *British Journal of Pharmacology*,2008,153(1):6-20.

## 科 技 信 息

FDA 修订食品添加剂条例,允许对某些肉及家禽产品进行辐射处理

美国食品药品监督管理局(FDA)于 11 月 30 日发布一项最终规则,修订美国食品添加剂条例,它规定了非冷藏以及冷藏的未煮的肉类、肉类副产品和某些肉类食品可接受最大吸收剂量为 4.5 kGy (Kilogray)的电离辐射处理,以减少食源性致病菌,并延长保存期限。

另外,FDA 已发布了一项单独规则,将条例涵盖的非冷冻家禽产品和冷冻家禽产品接受电离辐射处理的最大允许吸收剂量分别增加至 4.5 kGy 和 7 kGy,并取消了在家禽辐射时使用的任何包装必须有氧的限制(即允许使用气调保鲜包装(modified atmosphere packaging)和真空包装)。条例涵盖的家禽产品包括新鲜(冷藏或非冷藏)或冷冻未煮的产品,主要为(1)整只或部分的 9 CFR 381.1(b)所定义的“即可烹煮家禽(ready-to-cook poultry)”(含或不含非液体调味品)或(2)机械分解的家禽产品(整只或部分家禽经机械去骨而生产成的全粉碎原料)。

以上规则已于 11 月 30 日生效,但相关利益方可在 12 月 31 日前提交任何异议。

[信息来源]WTO 检验检疫信息网. FDA 修订食品添加剂条例,允许对某些肉及家禽产品进行辐射处理 [EB/OL]. (2012-12-27). <http://www.wtociq.gov.cn/wto1/show.jsp?cid=261&aid=39271>.