

文章编号:1673-1689(2009)03-0338-04

扇贝裙边胶原蛋白酶解物清除 超氧阴离子能力的研究

刘聪, 赵前程*, 李智博, 李伟, 汪秋宽

(大连水产学院 食品工程学院辽宁省水产品加工与综合利用重点开放实验室,大连 116023)

摘要:以扇贝裙边为原料,采用酶法提取胶原蛋白,并采用酶解技术制备扇贝裙边胶原蛋白酶解物,研究扇贝裙边胶原蛋白酶解液清除超氧阴离子的能力。结果表明:木瓜蛋白酶添加量为质量分数1.5%,酶解时间为90 min,酶解温度为60 ℃时,扇贝裙边胶原蛋白酶解物清除超氧阴离子的能力最好,为46.52%。

关键词:扇贝裙边;胶原蛋白酶解物;清除;超氧阴离子

中图分类号:Q 556.9

文献标识码:A

Study on the Scavenging Effect of Scallop Skirt Collagen Hydrolysate on Superoxide Anion Radical

LIU Cong, ZHAO Qian-cheng*, LI Zhi-bo, LI Wei, WANG Qiu-kuan

(Key and Open Laboratory of Aquatic Products Processing and Utilization of Liaoning Province, College of Food Engineering, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: In this study, the hydrolysate of collagen was firstly prepared from scallop skirt by enzymatic method and then the effect of collagen hydrolysate on the scavenging superoxide anion radical was explored. The results demonstrated that scallop skirt collagen hydrolysate exhibited a strong ability (46.52%) for scavenging superoxide anion radical when 1.5% papain enzyme was added at 60 ℃ for 90 min.

Key words: Scallop skirt, Collagen hydrolysate, scavenging, superoxide anion radical

目前生产胶原蛋白制品的原料主要来自于猪、牛等陆生哺乳动物的皮、骨和肌腱,因近年来随着全球生态环境恶化导致许多疯牛病、口蹄疫等流行病的发生,使得从陆生动物皮、骨中提取胶原蛋白的危险性增大^[1]。随着水产养殖业的快速发展,水

产加工业也有了很快的发展,越来越多的水产废弃物产生,这些废弃物一方面污染了环境,另一方面,造成了资源的浪费^[2]。

近几年来,人工养殖扇贝业发展迅速,在扇贝丁加工过程中,产生大量的下脚料——扇贝裙边。

收稿日期:2008-05-14

基金项目:大连市科技攻关项目(2006B10NC199)。

* 通讯作者:赵前程(1966-),男,辽宁大连人,副教授,工学博士,主要从事水产品加工与贮藏、食品营养与安全方面研究。Email:qczhao@hotmail.com

小部分扇贝裙边被作为饲料低价出售,大部分被白白扔掉,造成极大的资源浪费和环境污染^[3]。事实上,扇贝裙边中含有丰富的胶原蛋白,但目前国内还未见从扇贝裙边中提取胶原蛋白的文献报道,日本最新报道了这方面的内容^[4]。国内的曾庆祝等^[5]只是对扇贝裙边酶解液的抗氧化性进行了研究,但却并没有研究扇贝裙边胶原蛋白酶解液的抗氧化性,因而,本实验针对扇贝裙边胶原蛋白酶解液进行了抗氧化性方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

扇贝裙边:由长海县提供;木瓜蛋白酶,酶活 ≥ 100 万u/g,上海蓝季科技发展有限公司生产;胃蛋白酶,酶活110万u/g,上海蓝季科技发展有限公司产品;胰蛋白酶,酶活100~150万u/g,上海蓝季科技发展有限公司产品;其他试剂,均为分析纯。

1.2 设备

全能台式高速冷冻离心机,科峻仪器公司生产;HH-4数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;PHS-2C型精密酸度计,上海雷磁仪器厂生产;DS-1高速组织捣碎机,上海标本模型厂生产;721可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司产品;755B紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 扇贝裙边胶原蛋白的制备 参照 Xuan Ri Shen 等^[4]的方法,并进行了改进。将扇贝裙边用自来水清洗干净,用10%的正丁醇4℃萃取1d,去除脂肪类物质,用蒸馏水清洗至中性。将上述预处理的扇贝裙边放入烧杯中,与5倍体积的蒸馏水混合,用高速组织捣碎机搅拌均匀,匀浆在10 000 r/min条件下离心20 min,沉淀加入20倍体积0.1 mol/L NaOH,悬浮液搅拌过夜,第2天在10 000 r/min条件下离心20 min。这个碱性提取法重复3次。最后的沉淀用蒸馏水清洗至中性,然后沉淀加入10倍体积的0.5 mol/L乙酸,再用胃蛋白酶消化。最后的粘性溶液在10 000 r/min条件下离心1 h,获得的上清液即为粗胶制品。在粗提胶原蛋白溶液中加入NaCl至最终浓度为2.6 mol/L,胶原蛋白即以白色絮状沉淀析出,4 000 r/min离心30 min,弃去上清液,将胶原蛋白再次溶解于0.5 mol/L冰醋酸中,用0.1 mol/L冰醋酸溶液透析1 d,再用蒸馏水透析2 d,每天换透析液2次,真空冷冻干燥,得到的是纯度较高的胶原蛋白。

万方数据

1.3.2 扇贝裙边胶原蛋白含量的测定

1) 羟脯氨酸标准曲线的绘制 准确吸取羟脯氨酸标准工作液1.0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mL,分别用蒸馏水定容到100 mL。取上述标准液1 mL于试管中,分别加入1 mL柠檬酸缓冲液和1 mL 0.05 mol/L氯胺T溶液,室温(25℃)氧化10 min后,加入高氯酸1 mL,放置10 min,最后加入对二甲基氨基苯甲醛显色试剂1 mL,在65℃水浴显色10 min,冷却后在561 nm处测吸光度(蒸馏水为空白对照)。以羟脯氨酸质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,求出回归方程。^[6]

2) 提取液中胶原蛋白的含量(以羟脯氨酸计) 取透析后的胶原蛋白溶液1 mL,加入6 mol/L的盐酸50 mL,120~130℃水解8 h,水解完成后定容到100 mL,取其中1 mL调节pH值到6.0,再定容到50 mL。取1 mL按“1.3.2中1)”的方法测定吸光度。

1.3.3 扇贝裙边胶原蛋白酶解物的制备 取一定量冻干后的胶原蛋白,溶于一定量的蒸馏水中,放入一定量的酶,水浴酶解一段时间后,沸水灭活,最后离心,即得到扇贝裙边胶原蛋白酶解物^[7]。

1.3.4 超氧阴离子清除能力的测定 取上述酶解物,采用邻苯三酚自氧化法测定其超氧阴离子的清除能力^[8-9]。

2 结果与讨论

2.1 羟脯氨酸标准曲线绘制

根据羟脯氨酸标准曲线,得出提取液中胶原蛋白的质量浓度为8.11 g/dL,经过浓缩、冷冻干燥后保藏。经测定分析,冻干品中胶原蛋白含量为88%,水分为4.5%。

2.2 3种酶酶解物清除超氧阴离子能力的分析

取相同浓度的胶原蛋白酶解物,分别加入1.5%的酶酶解90 min,沸水灭活5 min后离心,测定其清除超氧阴离子的能力。

表1 3种酶的最适酶解条件

Tab. 1 Optimum hydrolytic conditions of three enzymes

酶的种类	温度/℃	pH值
胃蛋白酶	37	2.0
胰蛋白酶	50	8.0
木瓜蛋白酶	55	7.0

从图2可知,木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶

酶解扇贝裙边胶原蛋白溶液都具有清除超氧阴离子的能力,但以木瓜蛋白酶酶解物清除超氧阴离子的能力最强。故选择木瓜蛋白酶来制备扇贝裙边胶原蛋白酶解物。

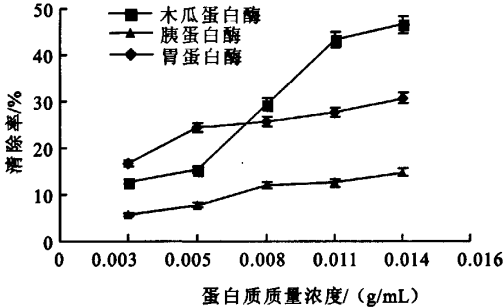


图1 扇贝裙边胶原蛋白酶解液清除超氧阴离子的能力
Fig. 1 Scavenging effect of scallop skirt collagen hydrolysate on superoxide anion radical

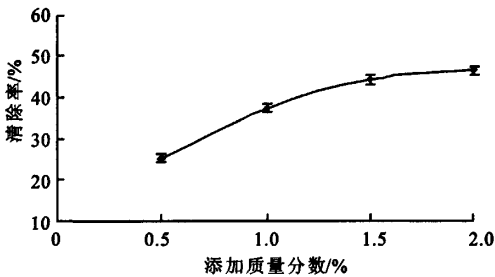


图2 不同加酶量对扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子能力的影响
Fig. 2 Effect of different papain dose on the scavenging of scallop skirt collagen hydrolysate on superoxide anion radical

2.3 木瓜蛋白酶酶解条件的确定

为提高扇贝裙边胶原蛋白酶解液清除超氧阴离子的能力,采用不同木瓜蛋白酶添加量、酶解时间和酶解温度对扇贝裙边胶原蛋白溶液进行酶解,以确定最佳酶解条件。

2.3.1 最佳木瓜蛋白酶添加量的确定 实验固定酶解温度为55℃,酶解时间为90 min,木瓜蛋白酶质量分数分别为0.5%、1.0%、1.5%、2.0%,实验结果如图3所示。结果表明,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力随着木瓜蛋白酶添加量的增加而提高,当木瓜蛋白酶添加质量分数为1.5%时,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力最大,虽然木瓜蛋白酶添加质量分数为2.0%时,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力比1.5%时稍高,但不明显,且木瓜蛋白酶用量较大,因此不宜采用,所以确定1.5%的木瓜蛋白酶添加质量分数为最佳添加量。

万方数据

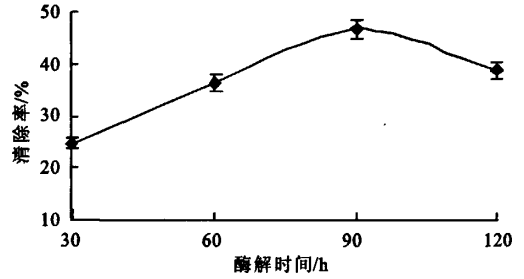


图3 不同酶解时间对扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子能力的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on the scavenging of scallop skirt collagen hydrolysate on superoxide anion radical

2.3.2 最佳酶解时间的确定 实验固定木瓜蛋白酶质量分数为1.5%,酶解温度为55℃,酶解时间分别为30、60、90、120 min,实验结果如图4所示。结果表明,当酶解时间为90 min时,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力最大。反应初期,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力随着酶解时间的增加而提高,但到达一定时间后,酶失去作用,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力不再提高,反而降低,所以确定最佳酶解时间为90 min。

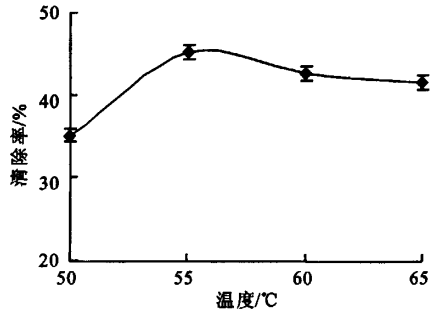


图5 不同酶解温度对扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子能力的影响

Fig. 5 Effect of reaction temperature on the scavenging of scallop skirt collagen hydrolysate on superoxide anion radical

2.3.3 最佳酶解温度的确定 实验固定木瓜蛋白酶质量分数为1.5%,酶解时间为90 min,酶解温度为50、55、60、65℃,实验结果如图5所示。

结果表明,当酶解温度达到55℃时,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力最大。反应初期,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力随着酶解温度的提高而提高,但到达一定温度后,酶失去作用,扇贝裙边胶原蛋白清除超氧阴离子的能力不再提高,反而降低,所以确定最佳酶解温度为55℃。

2.4 正交优化

采用正交实验,按照正交因素表^[10](表2)对扇

贝裙边胶原蛋白采用木瓜蛋白酶进行水解,并对水解液的超氧阴离子清除能力进行测定,结果见表 3。

表 2 木瓜蛋白酶酶解因素水平表

Tab. 2 The factors and levels of papain hydrolysis

水 平	因 素		
	A/(温度/℃)	B/(时间/min)	C/(酶质量分数/%)
1	50	30	1.5
2	55	60	2.0
3	60	90	2.5

从表 3 可知,木瓜蛋白酶水解液具有清除超氧阴离子的能力。对清除超氧阴离子的影响因素为 $A>B>C$,即温度 $>$ 时间 $>$ 酶质量分数,最佳组合为 $A_3B_3C_1$,即酶解温度为 60℃,酶解时间为 90 min,木瓜蛋白酶质量分数为 1.5%,此时的清除率为 46.52%。

正交实验的结果与单因素实验的结果不符,可能是由于温度、时间、酶质量分数三因素相互作用的结果,此结果与阎欲晓等^[10]的研究结果相似。

3 结 语

扇贝裙边中的胶原蛋白,经过酶法提取后,再经木瓜蛋白酶酶解,其清除率大于胰蛋白酶和胃蛋白

酶酶解的扇贝裙边胶原蛋白,因此采用木瓜蛋白酶酶解扇贝裙边胶原蛋白,得出其清除超氧阴离子能力的最优组合为:木瓜蛋白酶质量分数 1.5%,酶解时间 90 min,酶解温度 60℃,清除率可达到 46.52%。

表 3 木瓜蛋白酶水解液对超氧阴离子的清除作用

Tab. 3 The scavenging effect of hydrolysates produced by papain on superoxide anion radical

实验号	酶解条件			超氧阴离子清除率/%
	A	B	C	
1	1	1	1	32.96
2	1	2	2	31.10
3	1	3	3	38.14
4	2	1	2	37.42
5	2	2	3	33.96
6	2	3	1	42.64
7	3	1	3	43.27
8	3	2	1	41.75
9	3	3	2	41.94
K_1	102.20	113.65	117.35	
K_2	114.02	106.81	110.46	
K_3	126.96	122.72	115.37	
k_1	34.07	37.88	39.12	
k_2	38.01	35.60	36.82	
k_3	42.32	40.91	38.46	
R	8.25	5.31	2.30	

参考文献(References):

[1] 刘庆慧,王彩理,刘丛力. 鱼鳞胶原蛋白研究[J]. 海洋水产研究,2000,21(3):57-61.
Liu Qing-hui, Wang Cai-li, Liu Cong-li. Studies on properitie of collagen from fish scale[J]. *Marine Fisheries Research*, 2000,21(3):57-61. (in Chinese)

[2] 苑艳辉. 水产品下脚料综合利用研究之进展[J]. 水产科技情报,2004,31(1):44-48.
YUAN Yan-hui. Advances of research on utilization of aquatic products[J]. *Advices of Fisheries Science and Technology*, 2004,31(1):44-48. (in Chinese)

[3] 王国利. 扇贝裙的综合利用[J]. 中国调味品,1994,1:2-5.
WANG Guo-li. The comprehensive utilization of the apron of scallop[J]. *Chinese Condiment*, 1994,1:2-5. (in Chinese)

[4] Xuan Ri Shen, Hideyuki Kurihara, Koretaro Takahashi. Characterization of molecular species of collagen in scallop mantle [J]. *Food Chemistry*, 2007(102):1187-1191.

[5] 曾庆祝,许庆陵,林鲁萍. 扇贝边酶解物抗氧化作用研究[J]. 中国生化药物杂志,2005,26(2):86-89.
ZENG Qing-zhu, XU Qing-ling, LIN Lu-ping. Studies on antioxidation activity of hydrolysates from scallop skirt[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2005,26(2):86-89. (in Chinese)

[6] 张俊杰,曾庆孝. 鱼鳞中羟脯氨酸的测定[J]. 淮海工学院学报,2004,13(1):53-55.
ZHANG Jun-jie, ZENG Qing-xiao. Determination of Hydroxyproline in Fish Scales[J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology*, 2004,13(1):53-55. (in Chinese)

[7] 夏树华,王璋. 螺蛳腹足肌的酶解工艺[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(5):91-97.
XIA Shu-hua, WANG Zhang. Hydrolysis of *Bellamya Purificata* Foot Muscle[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(5):91-97. (in Chinese)

[8] Siposp P, Gamal EM, Blazoviz SA. Free radical reaction in the gallbladder[J]. *Acta chit Hung*, 1997,36(1-4):329-330.

[9] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 第 1 版. 北京:化学工业出版社,2000. 51.

[10] 阎欲晓,栗桂娇,李小梅,等. 文蛤蛋白抗氧化活性肽的研究[J]. 食品工业科技,2007,28(12):121-123.
YAN Yu-xiao, SU Gui-jiao, LI Xiao-mei, et al. Studies on antioxidative bioactive peptides of meretrix meretrix linnaeu[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007,28(12):121-123. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)