

文章编号:1673-1689(2009)06-0773-04

## 骨蛋白酶解物的抗氧化作用

李珂, 卜尔红, 杨秀华, 扈麟, 李宗军\*

(食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南农业大学, 湖南长沙 410128)

**摘要:**研究了骨胶原蛋白酶解物的总抗氧化能力、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除作用和抑制超氧阴离子自由基的能力。通过与谷胱甘肽(GSH)的比较发现,溶液质量浓度在100~150 mg/mL时,该骨胶原多肽的总抗氧化能力为GSH的71.92%。溶液质量浓度在2.5~20 mg/mL时,该多肽羟自由基清除作用为谷胱甘肽的1.36倍。溶液质量浓度为10~150 mg/mL时,多肽抑制超氧阴离子自由基的能力低于谷胱甘肽。

**关键词:**骨胶原多肽;总抗氧化能力;羟自由基清除作用;抑制超氧阴离子自由基能力

**中图分类号:**Q 516; TQ 936.16

**文献标识码:**A

### Study on Anti-Oxidant Enzymatic Hydrolysis of Bone Protein

LI Ke, BO Er-hong, YANG Xiou-hua, HU Lin, LI Zong-jun

(Province Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In this manuscript, the effect of bone collagen peptide and glutathione (GSH) on the total antioxidant capacity, hydroxyl radical scavenging and superoxide anion free radical inhibition was carefully investigated. It was found that this peptide exhibited; (1) 71.92% total antioxidant capacity that of GSH at the range of 2.5 mg/mL ~ 20 mg/mL; (2) 1.36 times hydroxyl radical scavenging that of GSH at the range of 2.5 mg/mL ~ 20 mg/mL; (3) But superoxide anion free radical inhibition of this peptide was lower than that of GSH at the range of 10 mg/mL ~ 150 mg/mL. The results indicated that bone collagen peptide is a perfect peptide on antioxidation function.

**Key words:** bone collagen peptide, total antioxidant capacity, scavenging effect of hydroxyl radical, inhibit ability of superoxide anion free radical

正常人体内的自由基处于产生与清除的动态平衡,如果自由基产生过多或清除过慢,会对生物体产生一系列损害,加速衰老并诱发各种疾病<sup>[1-2]</sup>。人类及动物许多疾病与自由基代谢失衡有关,如癌

症、老年性痴呆、关节炎、胃溃疡、动脉硬化等<sup>[3-4]</sup>。补充外来抗氧化活性物质能降低机体自由基水平,防止脂质过氧化,帮助机体抵御疾病,延缓衰老<sup>[5]</sup>。抗氧化肽以其相对分子质量小、易吸收、活性强等

收稿日期:2008-11-17

基金项目:湖南省重大科技专项(2007FJ1003)。

\* 通讯作者:李宗军(1968-),男,湖南岳阳人,教授,博士生导师,主要从事食品微生物学研究。Email: lizongjun@yahoo.com.cn

特点受到重视,在医药、化妆品、保健品和食品与饲料添加剂等方面有广阔前景。

蛋白酶水解骨胶原多肽产物中存在多种抗氧化肽,它们具有较强抑制生物大分子过氧化、清除体内自由基、美容、保湿、增加皮肤弹性、促进钙质沉降等功能<sup>[6,9]</sup>。目前国内外酶解大豆蛋白、乳蛋白、鱼类蛋白、鸡蛋卵蛋白获得具有抗氧化功能多肽的研究报道较多,对于酶解动物骨骼获得具有抗氧化功能多肽的研究报道则较少。作者主要研究了前期通过优化酶解条件制备出的骨多肽粉的抗氧化特性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与设备

**1.1.1 材料** 多肽粉,自制:猪骨→清洗破碎→加水蒸煮→去脂→干燥→粗粉碎→超微粉碎→骨粉→配制成骨泥→杀菌→调 pH 值→加酶→酶解→灭酶→过滤→多肽液真空浓缩→冷冻干燥→成品;多肽粉粗蛋白质量分数为 98.91%,氨基酸质量分数为 12.18%,三氯乙酸(TCA)可溶性蛋白占总蛋白的 95%以上。

**1.1.2 主要药品与试剂** 还原型谷胱甘肽(GSH),sigma 公司提供;总抗氧化能力测定试剂盒,羟自由基测定试剂盒,抑制与产生超氧阴离子自由基测试盒,均由南京建成科技有限公司提供。

**1.1.3 主要设备** HH-S8 型电热恒温水浴锅,金坛市岸头国瑞实验仪器厂制造;AB-L 分析天平,梅特勒-托利多(中国)有限公司制造;7200 型可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司制造;TY5258 型低温冰箱,日本 SANYO 株式会社制造。

### 1.2 方法

**1.2.1 总抗氧化能力的测定** 总抗氧化能力是指在 37℃ 时,每分钟每毫升样品使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时,为一个总抗氧化能力单位。其测定采用南京建成科技有限公司的总抗氧化能力试剂盒,按说明书中要求进行操作。

**1.2.2 羟自由基清除作用的测定** 羟自由基清除能力是指每毫升样品在 37℃ 下反应 1 min,使反应体系中  $H_2O_2$  浓度降低 1 mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。其测定采用南京建成科技有限公司的羟自由基测定试剂盒,按说明书中要求进行测定。

**1.2.3 抑制超氧阴离子自由基能力的测定** 抑制超氧阴离子自由基能力是指在反应体系中,每升样品在 37℃ 反应 40 min 所抑制的超氧阴离子自由基

相当于 1 mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位。其测定采用南京建成科技有限公司的抑制与产生超氧阴离子自由基测试盒,按说明书中要求进行操作。

**1.2.4 数据分析** 按总抗氧化能力、羟自由基清除作用、超氧阴离子自由基清除能力检测试剂盒说明书中要求,对样本进行测定前均需要做预备试验,以确定检测所需最佳浓度范围。故先做预备试验,然后根据预备试验结果配制最佳检测浓度范围内的不同浓度的多肽液和谷胱甘肽(GSH)溶液,检测以上 3 项指标,每项检测均做 7 个平行。实验数据采用 Minitab14 统计分析软件进行数据处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 总抗氧化能力

通过预实验证明两种被测溶液质量浓度范围在 100~150 mg/mL 时吸光值与总抗氧化能力成良好线性关系。最佳检测质量浓度范围内测得的总抗氧化能力结果见图 1。

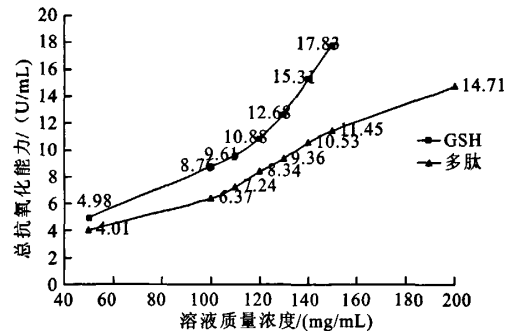


图 1 不同质量浓度多肽及谷胱甘肽溶液总抗氧化能力  
Fig.1 Effect of peptide and GSH concentration on the total antioxidant capacity

经统计学检验,结果表明所测多肽溶液各质量浓度之间以及谷胱甘肽溶液各质量浓度之间的总抗氧化性差异极显著( $P < 0.01$ ),多肽及谷胱甘肽溶液质量浓度为 100~150 mg/mL 时总抗氧化能力与其质量浓度成正相关,随着质量浓度的升高而增强。相同质量浓度下两种溶液的总抗氧化性差异均极显著( $P < 0.01$ ),在溶液质量浓度为 100~150 mg/mL 时,多肽的总抗氧化能力稍低于谷胱甘肽,为谷胱甘肽总抗氧化能力的 71.92%。110 mg/mL 谷胱甘肽溶液与 130 mg/mL 多肽溶液总抗氧化能力的方差分析结果  $F = 4.49 < F_{0.05}(1,6) = 5.99, P = 0.056 > 0.05$ ,说明 110 mg/mL 谷胱甘肽溶液与 130 mg/mL 多肽溶液总抗氧化能力并无显著性差异( $\alpha = 0.05$ ),可以认为两者总抗氧化能力

基本相等。

## 2.2 抑制羟自由基的能力

预实验证明两种被测溶液质量浓度范围在 2.5~10 mg/mL 时吸光值与羟自由基清除作用成良好线性关系。最佳检测质量浓度范围内测得的羟自由基清除作用结果见图 2。

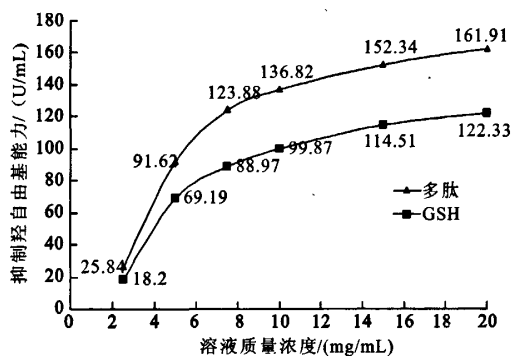


图2 不同质量浓度多肽及谷胱甘肽溶液抑制羟自由基能力

Fig. 2 Effect of peptide and GSH concentration on the hydroxyl radical scavenging

经统计学检验,结果表明所测多肽溶液各质量浓度之间以及谷胱甘肽溶液各质量浓度之间的羟自由基清除作用差异极显著( $P < 0.01$ ),多肽及谷胱甘肽溶液质量浓度为 2.5~20 mg/mL 时羟自由基清除作用与其质量浓度成正相关,随着质量浓度的升高而增强。相同质量浓度下两种溶液羟自由基清除作用差异均极显著( $P < 0.01$ ),在溶液质量浓度为 2.5~20 mg/mL 时,多肽羟自由基清除作用为谷胱甘肽的 1.36 倍,多肽羟自由基清除作用明显高于谷胱甘肽的。5 mg/mL 多肽溶液与 7.5 mg/mL 谷胱甘肽溶液羟自由基清除作用的方差分析结果  $F = 2.81 < F_{0.05}(1, 6) = 5.99$ ,  $P = 0.119 > 0.05$ ,说明 5 mg/mL 多肽溶液与 7.5 mg/mL 谷胱甘肽溶液羟自由基清除作用差异不显著( $\alpha = 0.05$ ),可以认为两者羟自由基清除作用相等。

## 2.3 抑制超氧阴离子自由基能力

预实验证明,多肽及谷胱甘肽溶液质量浓度在 10~50 mg/mL 时吸光值与抑制超氧阴离子自由基能力基本成线性关系。检测浓度范围内测得的抑制超氧阴离子自由基能力结果见图 3。

实验数据经统计学检验,结果表明所测多肽溶液各质量浓度之间以及谷胱甘肽溶液各质量浓度之间的抑制超氧阴离子自由基能力差异极显著( $P < 0.01$ ),多肽及谷胱甘肽溶液质量浓度为 10~150 mg/mL 时抑制超氧阴离子自由基能力与其质量浓度成正相关,随着质量浓度的增加而增强。相

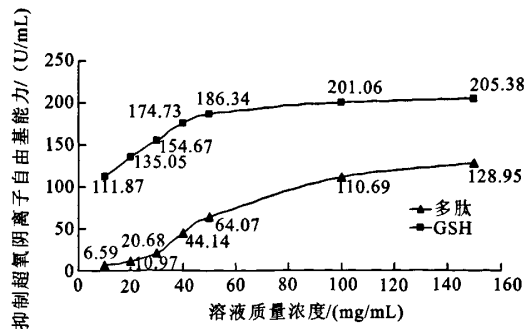


图3 不同质量浓度多肽及谷胱甘肽溶液抑制超氧阴离子自由基能力

Fig. 3 Effect of peptide and GSH concentration on the superoxide anion free radical inhibition ability

同质量浓度下两种溶液抑制超氧阴离子自由基能力差异均极显著( $P < 0.01$ ),谷胱甘肽抑制超氧阴离子自由基的能力要高于多肽的。同质量浓度多肽与谷胱甘肽平均值的比较见表 1,可以看出,随着质量浓度的增加,差异逐渐减小。

表1 多肽与谷胱甘肽抑制超氧阴离子自由基能力比较

Tab. 1 Comparison of superoxide anion free radical inhibition ability by peptide and GSH

质量浓度/ (mg/mL)	抑制羟自由基能力/(U/L)		多肽与谷胱甘肽 抑制能力比较/%
	多肽	谷胱甘肽	
10	6.59	111.87	5.89
20	20.68	135.05	8.12
30	44.14	154.67	13.37
40	64.07	174.73	25.26
50	110.69	186.34	34.38
100	110.69	201.06	55.05
150	128.95	205.38	62.79

## 3 结语

通过对自制骨胶原多肽与谷胱甘肽(GSH)抗氧化能力的测定,与谷胱甘肽进行对照,结果表明,该骨胶原多肽具有较强抗氧化能力。在溶液质量浓度为 100~150 mg/mL 时,多肽的总抗氧化能力稍低于谷胱甘肽,为谷胱甘肽的 71.92%。该多肽羟自由基清除作用明显高于谷胱甘肽的,在溶液质量浓度为 2.5~20 mg/mL 时,该多肽羟自由基清除作用为谷胱甘肽的 1.36 倍。相同质量浓度下谷胱甘肽抑制超氧阴离子自由基的能力要高于该骨胶原多肽,在 10~150 mg/mL 质量浓度范围内随着质量浓度的增加,两者抑制超氧阴离子自由基的能力差异逐渐减小。

## 参考文献(References):

- [1] 荣建华, 李小定, 谢笔钧. 大豆肽抗氧化效果的研究[J]. 食品科学, 2003, 23(11): 118-120.  
RONG Jian-hua, LI Xiao-ding, XIE Bi-jun. Anti-oxidant effect of soybean peptide in vitro study[J]. *Food Science*, 2003, 23(11): 118-120. (in Chinese)
- [2] Laakso S. Inhibitor of lipid peroxidation by casein; Evidence of molecular encapsulation of 1,4-pentadiene fatty acids [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 792(1): 11-15.
- [3] Hu M, Mc Clements D J, Decker E A. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, Whey protein isolate, and soy protein isolate[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(6): 1696-1700.
- [4] 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: 752-758.
- [5] 程时, 丁海勤. 谷胱甘肽及其抗氧化作用今日谈[J]. 生理科学进展, 2002, 33(1): 85-90.  
CHEN Shi, DING Hai-qin. Glutathione and its anti-oxidation today to talk about[J]. *Progress in Physiological Science*, 2002, 33(1): 85-90. (in Chinese)
- [6] Moskowitz R W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease[J]. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 2000, 30(2): 87-99.
- [7] Mendis E, Rajapakse N, Kim S K. Antioxidant properties of radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53(3): 581-587.
- [8] GELITA Group. Osteoarthritis patients report improved function in collagen hydrolysate study [J]. *Biotech Business Week*, 2004, 28: 129.
- [9] 唐传核, 彭志英. 一种新型功能性食品基料——胶原多肽[J]. 中国商办工业, 2001(5): 44-45.  
TANG Chuan-he, PENG Zhi-ying. A new functional food ingredient—collagen peptide[J]. *China Business of Industry*, 2001(5): 44-45. (in Chinese)

(责任编辑: 秦和平)

## 《食品与生物技术学报》2010年征稿征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为CSCD核心期刊、全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外10余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》,双月刊,A4(大16K)开本,144页,全年6期,每册定价15.00元,全年定价90元。邮发代号:28-79,全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部