

丝素肽的制备及其抗氧化活性研究

谷平平¹, 李琳琳², 娄小平^{1*}, 金歌¹

¹郑州大学第一附属医院, 郑州 450000; ²许昌陶瓷职业学院, 禹州 461670

摘要: 本文以废蚕丝为原料, 通过脱胶精炼、碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 降解后得到丝素肽溶液, 并采用超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)体系、羟基自由基($\cdot OH$)体系、二苯代苦味酰基自由基(DPPH \cdot)体系考察了不同水解度丝素肽体外清除自由基的活性。结果表明, 丝素蛋白溶液在底物浓度 5%, 加酶量([E]/[S])2%, 反应温度 60 °C, pH 值 8.5 时, 通过控制反应时间可获得水解度为 0~23.92% 的丝素肽, 在此范围内丝素肽清除自由基的能力随水解度的提高而不断增强, 在水解度为 23.92% 时, 丝素肽对超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除率达 73.69%, 对羟基自由基($\cdot OH$)的清除率为 82.49%, 对二苯代苦味酰基(DPPH \cdot)的清除率为 70.79%, 抗氧化活性最好。

关键词: 丝素蛋白; 丝素肽; 酶解; 抗氧化活性

中图分类号: Q51

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.08.023

Preparation of Silk Fibroin Peptide and Its Antioxidant Activity

GU Ping-ping¹, LI Lin-lin², LOU Xiao-ping^{1*}, JIN Ge¹

¹The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China; ²Xuchang Ceramics College, Yuzhou 461670, China

Abstract: Waste silk was used as raw material in this study. Fibroin peptide were prepared by degummed and hydrolyzed of Alcalase 2.4L. In addition, superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl free radical ($\cdot OH$) and DPPH free radical (DPPH \cdot) assays were used to evaluate free radical scavenging activities of fibroin peptides. The results showed that fibroin peptides with DH value 0-23.92% can be obtained by controlling the reaction time under the following conditions: substrate concentration of 5%, enzyme dosage ([E]/[S]) of 2%, temperature of 60 °C, pH 8.5. As the hydrolysis degree increased, scavenging rate of silk fibroin peptide was continuously enhanced in the range of DH. The silk fibroin had the highest antioxidant activity when the DH was 23.92%. The scavenging rates of silk fibroin peptide with DH 23.92% on $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ and DPPH \cdot were 73.69%, 82.49% and 70.79%, respectively.

Key words: silk protein; silk fibroin peptide; antioxidant activity; enzymatic hydrolysis

丝素蛋白由于其结构致密, 溶解性差, 导致其虽然具有良好的营养价值, 但难以被人体所吸收, 利用程度较低, 故通常需将丝素蛋白进行水解, 降解成具有独特的生理活性和药用价值的多肽类物质。根据新天丝生物技术有限公司的报道, 经硫酸化处理过的丝素蛋白水解产物可以被制成抗凝药剂, 经抗血液凝固活性试验, 发现它像肝素一样, 具有抗血液凝固活性, 可替代肝素广泛的应用于如尿毒症病人人工透析或体外循环时血液中的抗凝剂。Rhee SK 等曾将丝素蛋白水解后的产物分别配成 0.3%、0.6%、0.9% 的浓度, 加入到泡菜中, 结果表明, 对乳酸菌的生长有显著抑制作用, 证明丝素肽具有抗菌作用。丝素肽具有良好的吸收机制, 并具有一些不

可比拟的生理功能, 如降血糖作用、降胆固醇作用、抗氧化作用、改善肠道生理功能、防止脑老化和冷冻保护作用等, 因此丝素在功能性食品、化妆品及医药等多个领域具有很高的开发价值。本文对丝素肽的抗氧化活性进行了探索研究, 为将丝素肽开发为功能性食品或食品添加剂奠定理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料与主要试剂

废蚕丝: 农户处购买; 碱性蛋白酶(Alcalase 2.4 L) 3.11 × 10⁷ U/g, 丹麦诺维信酶制剂公司, 食品级。NaOH, 邻苯三酚, 乙醇, 水杨酸, 均为分析纯, 成都市科龙化工试剂厂。

1.2 主要仪器

半自动凯氏定氮仪, HR-500, 上海华睿仪器有限公司。

2 实验方法

2.1 水解度(DH)的测定

采用 pH-stat 法^[1]测定丝素蛋白的水解度,计算公式如下所示。

$$DH = \frac{B \times N_b}{a \times m \times h_{tot}} \times 100\%$$

式中:B:消耗的 NaOH 量(mL);Nb:NaOH 摩尔浓度; $\alpha = 10^{pH-pK / (1+10^{pH-pK})}$,其中 pK 为氨基酸的平均 pK,按 7.0 算(平均解离常数);pH 为反应起始 pH 值; α : α -氨基酸的平均解离度; h_{tot} :每克丝素蛋白中肽键的 mmol 数(mmol/g),对于丝素蛋白 $h = 12.4 \text{ mmol/g}$;m:蛋白质总量。

2.2 碱性蛋白酶降解丝素蛋白的单因素实验

碱性蛋白酶 Alcalase2.4 L 所能作用的肽键的范围较宽,并对结晶区中由丙氨酸、甘氨酸或酪氨酸参与形成的肽键有特异性,所以能使丝素更大程度地水解^[2-5],因此,本试验选用碱性蛋白酶作为水解用酶。

在酶解反应中,为了使酶解反应能充分进行,需要筛选合适的酶解条件,从而使酶显示出足够的催化活性。影响酶解效果的因素主要有底物浓度、加酶量、pH 值、温度和时间。因此,本实验对这五个因素进行了单因素实验,即在加酶量为 2%、pH 为

8.5,反应温度为 55 ℃,反应时间为 4 h 的条件下,分别设定底物浓度为 2%、3%、4%、5%、6%、7% 对丝素蛋白进行酶解,并测定其水解度;在底物浓度为 5%,pH 为 8.5,温度为 55 ℃,反应时间为 4 h 的条件下,分别以加酶量 1.0%、1.5%、2%、2.5%、3.0%、3.5% 对丝素蛋白进行酶解,并测定其水解度;在加酶量为 2.0%、底物浓度为 5%,温度为 60 ℃,反应时间为 4 h 时,参考碱性蛋白酶的最适作用条件,分别在 pH 为 7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 对丝素蛋白进行酶解,并测定其水解度;酶促反应受温度影响较大,酶解温度太低,蛋白酶不易激活,反应速度较慢,温度过高则会引起酶蛋白变性失活,因此,在加酶量为 2.0%、底物浓度为 5%,pH 为 8.5,反应时间为 4 h 时,分别以温度为 45、50、55、60、65 ℃ 对丝素蛋白进行酶解反应,并测定其水解度;在加酶量为 2%、底物浓度为 5%,pH 为 8.5,温度为 55 ℃ 时,分别在 1.0、2.0、3.0、3.5、4.0、4.5、5、5.5 h 时测定其水解度。

2.3 碱性蛋白酶降解丝素蛋白的正交实验

通过碱性蛋白酶水解丝素蛋白的单因素实验,选定合适的正交试验的因素水平,进一步优化酶解条件,得出丝素蛋白的最佳酶解工艺条件,正交实验因素水平表如表 1 所示。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表

Table 1 Levels and factors of the $L_9(3^3)$ orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors			
	(A)加酶量 Enzyme dosage ([E]/[S])	(B)酶解时间 Reaction time (h)	(C)底物浓度 Substrate concentration (g/mL)	(D)pH 值 pH value
1	1.5%	4.5	3%	8
2	2.0%	3.5	5%	8.5
3	2.5%	4	4%	9

将一定浓度的底物与酶在恒温摇床中进行反应,不断加入 0.5 mol/L NaOH,从而使反应体系的 pH 值保持在试验规定的范围内,用 pH-stat 法测定水解度。水解反应终止时煮沸 10 min 进行灭酶^[6-9]。冷却后,酶解液以 10000 rpm 的速度离心 20 min,除去蛋白酶及未水解完全的丝素蛋白,取上清液浓缩得到丝素肽产物。

2.4 抗氧化活性的测定

2.4.1 丝素肽对 O_2^- 自由基清除能力的测定

邻苯三酚在弱碱性条件下能迅速自氧化,释放

出 O_2^- 自由基,生成有色中间物—红碲酚,红碲酚的生成量可用分光光度法进行测定。当有抗氧化剂存在时, O_2^- 自由基被清除,从而阻断了红碲酚的积累。因而通过检测红碲酚的生成量即可判断抗氧化剂的抗氧化能力。具体操作方法如下:在 4.5 mL Tris(三羟甲基氨基甲烷)-HCl-EDTA 缓冲液(pH 8.2)中,加入 0.5 mL 20 mg/mL 的水解液,10 μ L 45 mol/L 的邻苯三酚,混匀后在 25 ℃ 条件下保温 5 min,每隔 0.5 min 测定 325 nm 处的光密度值。同时以蒸馏水代替水解液做对照实验^[10,11]。经测定

得出不同水解度下的产物对 O_2^- 的清除率。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\%$$

式中: A_0 为空白对照液的吸光值; A_x 为加入水解液后的吸光值。

2.4.2 丝素肽清除羟基自由基($\cdot OH$)能力的测定

Fe^{2+} 与 H_2O_2 混合产生 $\cdot OH$, 加入水杨酸可捕捉 $\cdot OH$, 并产生有色物质, 该物质在 510 nm 下有特征吸收。根据此原理, 在反应体系中依次加入 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 为 7.4) 6 mL, 10 mmol/L 的水杨酸 1 mL, 3.8 mmol/mL $FeSO_4$ -EDTA (1:1) 1 mL, 然后加入 10 g/L 的水解产物 2 mL, 最后加入 2 mL 8 mmol/L H_2O_2 启动反应。以 2 mL 去离子水代替水解产物作为对照组, 37 °C 条件下水浴恒温 60 min, 之后加入 2 mL 6 mol/L HCl 终止反应^[12], 在 510 nm 测定吸光值。经测定得出不同水解度下的产物对 $\cdot OH$ 的清除率。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\%$$

式中: A_0 为空白对照液的吸光值; A_x 为加入水解液后的吸光值。

2.4.3 丝素肽清除二苯代苦味酰基(DPPH \cdot)能力的测定

二苯代苦味酰基(DPPH \cdot)法是一种广泛应用于筛选抗氧化剂的方法, 其主要是因为 DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基, 其孤对电子在 517 nm 附近有强吸收(乙醇溶液呈紫色)。当有自由基清除剂存在时, 孤对电子被配对, 吸收消失或减弱, 通过测定吸收减弱的程度可评价自由基清除剂的活性。

用无水乙醇配制 1 mmol/L 的 DPPH 溶液, 冰箱避光保存, 将 2 mL 蒸馏水与 2 mL 1 mmol/L 的 DPPH \cdot 乙醇溶液加入同一试管中, 摇匀, 放置 30 min, 于 517 nm 处测定其吸光 A_0 , 即为空白对照液的吸光值, 测定样品清除能力时, 2 mL 浓度为 10 g/L 的丝素肽样品与 2 mL 1 mmol/L 的 DPPH \cdot 乙醇溶液混匀于试管中, 静置 30 min 后, 5000 rpm 离心 5 min^[13], 取上清液测定其吸光度 A_x , 即为丝素肽样液的吸光值, 同时测定丝素蛋白水解溶液与 2 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_x 。经测定得出不同水解度下的产物对 DPPH \cdot 的清除率, 清除率越高表明抗氧化越强。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\%$$

式中: A_0 为空白对照液的吸光值; A_x 为加入水解液后的吸光值。

3 结果与分析

3.1 碱性蛋白酶的单因素实验结果分析

碱性蛋白酶 Alcalase 是 NOVO 酶制剂公司产品, 在我国被广泛应用于丝绸、皮革、食品和医药工业以及生物技术领域, 具有很高的水解蛋白质能力^[14-16]。

由图 1 是各因素对丝素蛋白水解度的影响曲线, 由图 1 可知当底物浓度在 2% ~ 5% 之间时, 随着底物浓度的增加, 水解度不断提高; 超过 5% 时水解度开始下降。因此本实验选用的底物浓度的水平范围为 3%、4%、5%。随着加酶量的增加, 水解度逐渐提高, 即酶解效果越好; 但是, 当加酶量超过 2.5% 时, 碱性蛋白酶催化水解丝素蛋白的水解度变化幅度较小, 基本达到平衡状态, 即水解度的提高并不与加酶量同倍增加, 故选用的加酶量的水平范围为 1.5%、2.0%、2.5%。随着 pH 由 7.5 增大至 8.5, 曲线变化幅度较大, 碱性蛋白酶催化丝素蛋白的水解度明显增大, 在 pH 为 8.5 时其水解度最大; 当 pH 超过 8.5 后, 曲线呈下降趋势, 但 pH 为 9 时的水解度依旧高于 pH 为 7.5 和 8 的。故本实验选用的 pH 值水平为 8、8.5、9。该反应的水解度随着温度上升而增加, 当温度为 60 °C 时, 反应 DH 达到最大值 22%, 继续提高反应温度反而会降低反应的 DH 值, 这可能是 Alcalase 酶在高温下变性, 从而导致酶催化活性减弱, 不利于酶解反应的进行所致。在水解 1 ~ 4 h 内, 曲线的变化幅度较大。继续水解时, 曲线的变化幅度明显变小, 说明水解程度增加幅度减小。这可能是因为作用 4 h 后, 碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L 的底物水解已接近平衡, 故本实验最终选择 3.5、4.0、4.5 h 作为碱性蛋白酶水解丝素蛋白的水平范围。

3.2 碱性蛋白酶催化丝素蛋白水解反应的正交实验结果分析

根据单因素实验结果, 选取的温度、加酶量、底物浓度、pH、反应时间五个因素中, 由于温度对实验结果影响较小, 故正交试验以水解度为指标, 选取底物浓度、pH 值、加酶量、时间四个因素进行设计, 每个因素选取三个水平, 实验结果见表 2。

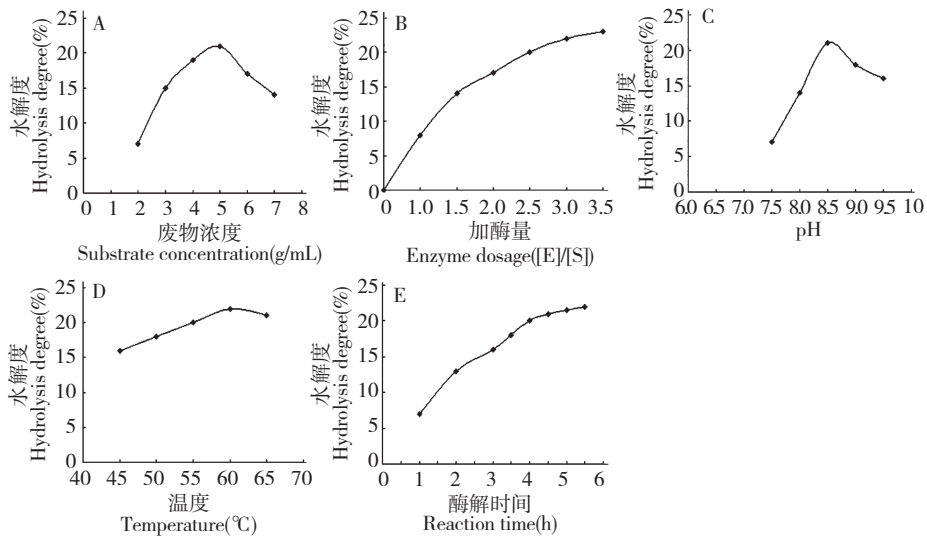


图1 底物浓度(A)、加酶量(B)、pH(C)、水解温度(D)及反应时间(E)对丝素蛋白水解度的影响

Fig. 1 Effect of substrate concentration (A), enzyme dosage (B), pH (C), reaction temperature (D) and reaction time (E) on degree of hydrolysis of silk fibroin

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验及结果

Table 2 Results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

实验号 No.	A	B	C	D	水解度 DH (%)
1	1.5%	4.5	3%	8	9.3
2	1.5%	3.5	5%	8.5	19.82
3	1.5%	4	4%	9	16.74
4	2.0%	4.5	5%	9	23.35
5	2.0%	3.5	4%	8	20.94
6	2.0%	4	3%	8.5	19.44
7	2.5%	4.5	4%	8.5	18.68
8	2.5%	3.5	3%	9	16.49
9	2.5%	4	5%	8	21.37
K1	45.86	51.33	45.23	51.61	
K2	63.73	57.25	64.54	57.94	
K3	56.54	57.55	56.36	56.58	
R	17.87	6.22	19.31	6.33	
最优水平 Optimal level	A ₂	B ₃	C ₂	D ₂	

由上表可知,四个因素对水解度的影响顺序依次为:底物浓度 > 加酶量 > pH 值 > 酶解时间。最优方案为 $A_2B_3C_2D_2$,即加酶量为 2%,酶解时间为 4.0 h,底物浓度为 5%,pH 值为 8.5,反应温度为 60℃,在此条件下,水解度达到最大值,可达 23.92%。

3.3 丝素肽的抗氧化活性结果分析

图2 是不同水解度条件下的的丝素蛋白水解产

物对超氧自由基、·OH 及 DPPH·清除能力曲线,由图2 可知未酶解的丝素蛋白基本没有清除超氧自由基的能力,但经酶解的丝素肽却表现出不同程度的清除超氧自由基的能力,由此可知酶解丝素蛋白有利于丝素蛋白的抗氧化活性的发挥。未酶解的丝素蛋白虽然具有一定的清除·OH 的能力,但清除能力较弱。经酶解的水解产物表现出不同程度的清

除·OH的能力都明显高于未水解的丝素蛋白,由此表明酶解丝素蛋白有利于丝素蛋白的抗氧化活性的充分发挥。未酶解的丝素蛋白基本没有清除DPPH·的能力,即没有抗氧化活性。经酶降解后的丝素肽表现出不同程度的清除DPPH·的能力,由

此可知丝素蛋白只有被酶降解后才能表现出其抗氧化活性,在碱性蛋白酶Alcalase2.4 L作用下,丝素肽清除DPPH·的能力随水解度的提高而不断增强,但其清除能力与水解度之间并非简单的线性关系。

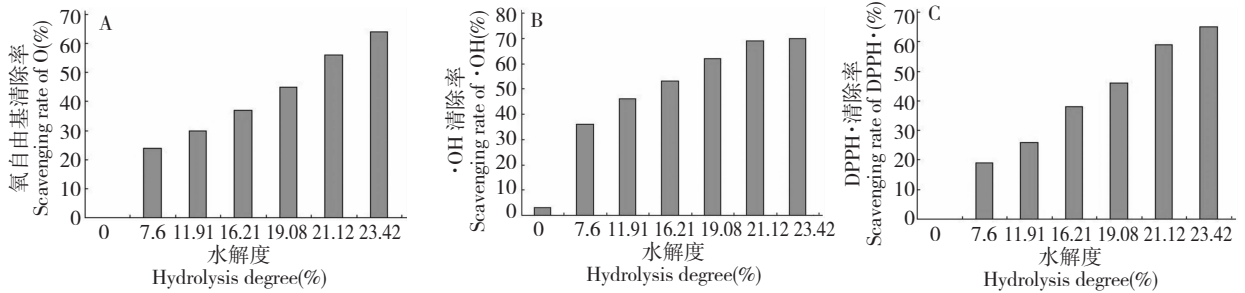


图2 不同水解度的丝素肽对超氧自由基(A)、·OH(B)、DPPH·(C)的清除能力

Fig. 2 Scavenging effects of different degrees of silk fibroin peptides on superoxide anion free radical, ·OH and DPPH·

4 结论

通过实验可以发现,丝素肽水解液具有一定的抗氧化能力,其中不同水解度的丝素肽的抗氧化能力有所差异。一定范围内,丝素肽的抗氧化能力随着水解度的增加而增大,但并非是简单的线性关系,本实验中我们可知丝素肽在水解度为23.92%时其抗氧化性达到最大。

参考文献

- Feng YW(冯永巍). The optimization of corn peptide hydrolytics processing and the development of corn peptide functional beverage. Changchun: Jilin Agricultural University(吉林农业大学), MSc. 2007.
- Zhang YN(张娅楠), Zhao L(赵利), et al. Study on hydrolyzed eel head protein by proteases. *J Henan Univ Technol* (河南工业大学学报), 2010, 31(5): 34-36.
- Chen J(陈晶), Liu YM(刘友明), Xiong SB(熊善柏), et al. Composite protease-enzyme fractional hydrolysis fish protein and flavor process optimization. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2007, 26: 704-707.
- Wu JH(吴金鸿). Study on preparation of sericin peptides and their biological activity function and structure. Wuxi: Jiangnan University(江南大学), PhD. 2008.
- Li YL(李艳丽), Chen G(陈光), et al. Study on alkaline protease hydrolysis to prepare corn peptide. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2004, 26: 142-144.
- Lan JJ(蓝建京), Tan Y(覃玥), et al. Study on the kinetics of the alkaline protease hydrolysis of silk fibroin. *Guangxi Agric Sci* (广西农业科学), 2012, 29(3): 87-89.

- Gao G(高光), Mou GQ(牟光庆). Conditongs of alkali protease hydrolyzing tussah fibroin. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2010, 31: 245-247.
- Huang L(黄雷), Wang XY(王学英), et al. Study on the optimum condition of enzymatic hydrolysis of silk fibroin. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2006, 34: 428-429.
- Sui YJ(隋玉杰), He H(何慧), Wang J(王进), et al. Comparison the anti-alcoholism bioactivities between corn crude peptides prepared by neutrase and alcalase. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2006, 21: 102-104.
- Chen LH(陈力宏). Study on preparation of Cocoon floor peptides and antioxidant activity. Zhenjiang: Jiangsu University(江苏大学), MSc. 2006.
- Hou WJ(侯文娟), Zhang ML(张美莉), et al. Preparation of antioxidant peptides from Buckwheat Globulin by enzyme hydrolysis. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30: 274-279.
- Xu JG(徐建国), Tian CR(田呈瑞), et al. Study on scavenging capacity of free radical by natural mulberry red pigment *in vitro*. *Food Sci* (食品科学), 2005, 26(12): 77-80.
- Wu MM(吴萌萌). Preparation and activity of antioxidant peptides from *Spirulina platensis*. Beijing: Beijing Forestry University(北京林业大学), MSc. 2010.
- Chen J(陈杰). Study on enzymatic hydrolysis of silk fibroin. Suzhou: Soochow University(苏州大学), MSc. 2001.
- Li QL(李琦丽), Wu WG(吴卫国), et al. Study on hydrolysis technology of rice residue protein by bi-enzyme hydrolysis. *Cereals Oils* (粮食与油脂), 2011, 21: 19-22.
- Li YL(李艳丽), Cong JM(丛建民), Chen G(陈光). Double enzyme hydrolysis for preparation of corn peptides. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31: 145-148.