

# 黄海海燕体壁酶解物抗氧化活性研究

## Study on preparation of body wall hydrolysate of starfish *Asterina pectinifera* and antioxidant activity detection

李裕博<sup>1,2</sup> 纪晓琳<sup>1,2</sup> 刘 山<sup>1,2</sup>

LI Yu-bo JI Xiao-lin LIU Shan

查 越<sup>1</sup> 辛丘岩<sup>1,2</sup> 启 航<sup>1,2</sup>

ZHA Yue XIN Qiu-yan QI Hang

(1. 大连工业大学食品学院, 辽宁 大连 116034; 2. 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁 大连 116034)

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China;

2. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian, Liaoning 116034, China)

**摘要:**分别用胃蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶在各自最适条件下酶解黄海海燕体壁制得酶解物,并应用电子自旋共振波谱技术检测酶解物对 DPPH 和羟基自由基的抗氧化活性。结果表明,黄海海燕体壁酶解物对 DPPH 和羟基自由基的清除能力随浓度升高而增强;酶解物浓度在 20 mg/mL 时,胃蛋白酶组、中性蛋白酶组和胰蛋白酶组对 DPPH 自由基的清除率分别为(52.25±0.14)%,(68.30±0.37)%,(46.27±0.47)%,对羟基自由基的清除率分别为(72.61±0.17)%,(81.82±0.79)%,(56.77±0.28)%;酶解物具有较明显的抗氧化能力。

**关键词:**黄海海燕;酶解物;抗氧化活性;电子自旋共振;自由基

**Abstract:** Hydrolysate was extracted from starfish *Asterina pectinifera*, the starfish *Asterina pectinifera* were hydrolyzed with pepsin, neutrase and trypsin under their optimal conditions to obtain the hydrolysate, and the antioxidant activity of hydrolysate was detected by using electron spin resonance(ESR) spectroscopy. The results indicated that the DPPH radical and hydroxyl radical scavenged ability increased with the increasing concentration of hydrolysate; at the concentration of 20 mg/mL, the clearance rate of pepsin group, neutrase group and trypsin group on DPPH radical were (52.25±0.14)%, (68.30±0.37)% and (46.27±0.47)% respectively, and the rate of hydroxyl radical were (72.61±0.17)%, (81.82±0.79)% and (56.77±0.28)% respectively.

基金项目:国家海洋食品工程技术研究中心立项建设项目(编号:2012FU125X03);辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划(编号:2014001)

作者简介:李裕博(1990—),男,大连工业大学在读硕士研究生。  
E-mail:imliyubo@163.com

通讯作者:辛丘岩、启航  
收稿日期:2014-09-15

**Keywords:** starfish *Asterina pectinifera*; hydrolysate; antioxidant activity; electron spin resonance(ESR); free radicals

黄海海燕(*Asterina pectinifera*)俗称海星,属海星纲有棘目海燕科,常见于中国黄海、渤海一带,是分布广泛的海洋生物资源之一<sup>[1]</sup>,主要以扇贝、鲍鱼、海胆等海珍品为食,对沿海的水产养殖造成巨大的危害。黄海海燕除含有蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸、微量元素和维生素等外,还含有大量结构独特且具有生物活性的代谢产物,具有良好的生理活性和药理活性<sup>[2]</sup>。由于海洋动物的生长环境特殊,其在生理和药理方面具有陆地生物所没有的活性物质如海燕皂苷、海参皂苷、虾青素、深海鱼油、鲞素,在抗氧化活性的研究方面具有潜在价值。到目前为止,具有抗氧化活性的酶解物已经从许多类型的海洋生物中提取出来,例如鱼类<sup>[3]</sup>、鱿鱼<sup>[4]</sup>、虾类<sup>[5]</sup>、棘皮动物<sup>[6]</sup>和双壳类软体动物<sup>[7]</sup>。

刘小玲等<sup>[8]</sup>利用蛋白酶对罗非鱼鱼皮进行酶解,经试验表明,鱼皮胶原肽对羟基具有一定的清除能力,且随着胶原肽浓度的增加而增大。王莅莎等<sup>[9]</sup>经 Sephadex G-100 凝胶过滤柱从雌、雄鲍鱼脏器粗多糖中各分离出两种多糖组分,经测定其清除羟基自由基的  $IC_{50}$  分别为 1.38, 0.99, 1.51, 1.19 mg/mL。任俊凤等<sup>[10]</sup>通过木瓜蛋白酶酶解河豚鱼皮提取胶原蛋白肽,并对其抗氧化活性进行了研究,确定蛋白肽具有清除自由基的能力。盘赛昆等<sup>[11]</sup>通过对鲷鱼肉进行酶解制备抗氧化活性肽,结果表明,酶解物对羟基自由基的最高清除率可达到 91.2%。张爽等<sup>[12]</sup>对鲍鱼外套膜酶解物进行了抗氧化活性的研究,测定酶解物清除 DPPH 自由基和羟基自由基的  $IC_{50}$  分别为 11.76, 12.07 mg/mL。周大勇等<sup>[13]</sup>

利用胃蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶对鲍鱼内脏进行酶解,测得3种酶解物对DPPH自由基清除率的 $IC_{50}$ 值均为4 mg/mL,对羟基自由基清除率的 $IC_{50}$ 值分别为8,4,5 mg/mL。顾明广等<sup>[14]</sup>对鱼皮胶原蛋白进行酶解制备抗氧化肽,抗氧化活性试验结果表明,小分子量胶原蛋白清除DPPH自由基的能力由原胶原蛋白的26%提高到74%。

电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)又称电子顺磁共振,是在磁场中测量临界状态下未成对的电子的理论基础上发展而来<sup>[15]</sup>,可以探测和识别具有未成对电子的分子,是检测自由基最直接最有效的方法<sup>[16]</sup>。氧自由基容易引起细胞损伤,导致疾病发生,对机体危害极大。本试验主要以黄海海燕体壁为原料制备酶解物,应用ESR技术检测粗酶解物对DPPH自由基和羟基自由基的清除作用,对不同酶种所得酶解物的清除效果进行了对比,以期为黄海海燕体壁酶解产物在保健食品开发相关领域的应用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 材料与试剂

黄海海燕(*Asterina pectinifera*):大连太平洋海珍品有限公司;

胃蛋白酶:13 274 U/g,上海生工生物股份有限公司;

胰蛋白酶:103 405 U/g,上海生工生物股份有限公司;

中性蛋白酶:75 000 U/g,南宁庞博生物工程有限公司;

DPPH:美国 sigma-aldrich 公司;

DMPO:优级纯,上海阿拉丁试剂有限公司;

其余试剂,均为国产分析纯试剂。

#### 1.1.2 主要仪器设备

冷冻离心机:RC-6 plus 型,美国 Virtis 公司;

真空冷冻干燥机:ZKBTES-55 型,美国 Virtis 公司;

干燥箱:PH070A 型,上海一恒科技有限公司;

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S 型,予华仪器有限公司;

酶标仪:infiniteM200 型,瑞士 TECAN 公司;

pH 计:PB-10 型,赛多利斯科学仪器有限公司;

电子顺磁共振波谱仪:A200 型,德国 Bruker Opertics 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 黄海海燕的预处理 新鲜黄海海燕,去除内脏,自来水清洗干净后,于干燥箱中烘干。用1 mol/L HCl 浸泡,每6 h 更换一次 HCl,直至不再产生气泡,用去离子水洗至中性,在干燥箱(80 ℃)中干燥 24 h 后粉碎备用。

1.2.2 酶解液的制备 将8 g 粉碎后的黄海海燕体壁粉与100 mL 水混合,分别在胃蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶的最适条件下(胃蛋白酶 37 ℃, pH 2.0;中性蛋白酶 45 ℃, pH 7.0;胰蛋白酶 37 ℃, pH 8.0)按照 2 500 U/g·底物加入酶,

酶解 3 h,酶解结束后置于沸水浴中灭酶 10 min,4 000 r/min 离心 20 min,取上清冷冻干燥后将3种酶的酶解物按照浓度为10,20,30,40,50 mg/mL 的梯度配成酶解液,置于-80 ℃ 冰箱中保存,备用。

1.2.3 肽得率的测定 将经过酶解的粗酶解液与10% TCA 按照1:1的比例混合均匀,静置30 min 后,采用福林酚法测定肽得率<sup>[17]</sup>。

1.2.4 酶解液清除 DPPH 自由基活性测定 200 μmol/L 的 DPPH 溶液和不同浓度的粗酶解液混合,避光保存 30 min,立即吸入毛细管,放入谐振腔,在中心磁场强度 3 368.6 G;微波功率 5.32 mW;微波频率 9.44 GHz;放大倍数  $1.42 \times 10^4$ ;调制幅度 1.0 G;调制频率 100 kHz;时间常数 81.92 ms;转换时间 40 ms 条件下扫描。空白组中粗酶解液用去离子水代替。以波谱信号第3个峰高值表示信号的相对强度,按式(1)计算清除率:

$$\text{清除率} = \frac{\text{空白组峰高} - \text{加样后峰高}}{\text{空白组峰高}} \times 100\% \quad (1)$$

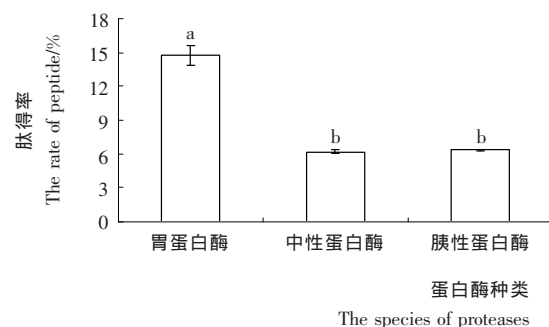
1.2.5 酶解液清除羟基自由基活性测定 将不同浓度的粗酶解液与羟基自由基体系混合,40 ℃水浴 30 min,立即吸入毛细管,放入谐振腔,在中心磁场强度 3 369.08 G;微波功率 74.8 mW;微波频率 9.44 GHz;放大倍数  $1.00 \times 10^5$ ;调制幅度 1.0 G;调制频率 100 kHz;时间常数 163.84 ms;转换时间 160 ms 条件下扫描,空白组中粗酶解液用去离子水代替,以波谱信号第2个峰高值表示信号的相对强度,按式(1)计算清除率:

1.2.6 统计学分析 试验中做3组平行,数据用平均值±标准偏差的方式表示,利用 SPSS 对所得数据进行统计分析,使用单向方差分析, $P < 0.05$  被认为是显著的。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄海海燕体壁酶解物肽得率

由图1可知,在中性蛋白酶和胰蛋白酶二者之间没有显著性差异,胃蛋白酶与其他两种酶存在显著性差异。此结果中胃蛋白酶组数据与黄鹏等<sup>[18]</sup>用胃蛋白酶酶解沙棘粕制备



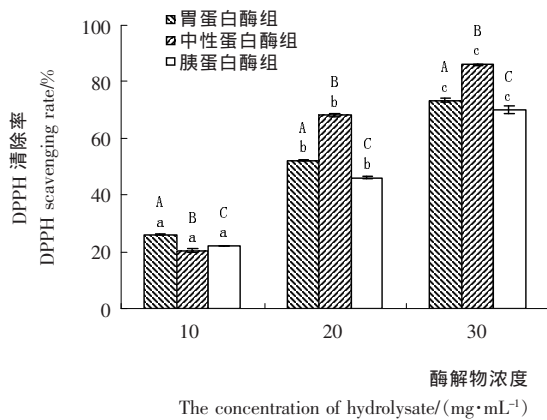
标注不同的字母表示数据间存在显著差异( $P < 0.05$ )

图1 3种蛋白酶对黄海海燕体壁进行酶解的肽得率  
Figure 1 The rate of peptide from the body wall of starfish *Asterina pectinifera* using the three proteases

生物活性肽报道的肽得率 4.58% 大致相近; 但与赵鸿霞等<sup>[19]</sup>报道用中性蛋白酶和胰蛋白酶酶解海参卵所得肽得率 50.49% 和 30.51% 的相比较低。

### 2.2 酶解液对 DPPH 自由基的清除作用

本试验采用电子自旋共振 (ESR) 技术分别检测不同浓度的黄海海燕体壁酶解液对 DPPH 自由基的清除效果, 3 种酶解液 (胃蛋白酶组、中性蛋白酶组和胰蛋白酶组) 对 DPPH 自由基都具有一定的清除效果 (图 2), 而且清除效果随着酶解液浓度的升高而增强 (图 3)。胃蛋白酶组、中性蛋白酶组和胰蛋白酶组对 DPPH 自由基清除能力的  $IC_{50}$  值分别为 19.68, 17.71, 21.23 mg/mL, 对于较高浓度的黄海海燕体壁酶解液, 中性蛋白酶的酶解液均具有较强的清除能力 ( $P < 0.05$ )。赵雅婷等<sup>[20]</sup>利用胃蛋白酶对黄海海燕体壁进行酶解制备胶原蛋白肽并对其抗氧化活性进行了研究, 结果证



标注不同大写字母表示相同酶解物浓度下各组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ); 标注不同小写字母表示各试验组内浓度梯度间数据存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

图 2 3 种蛋白酶酶解物对 DPPH 自由基的清除率

Figure 2 The determination of scavenging rate of the three kinds of hydrolysate on DPPH radical

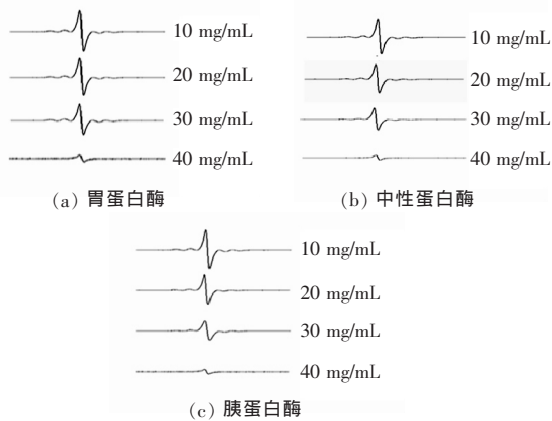


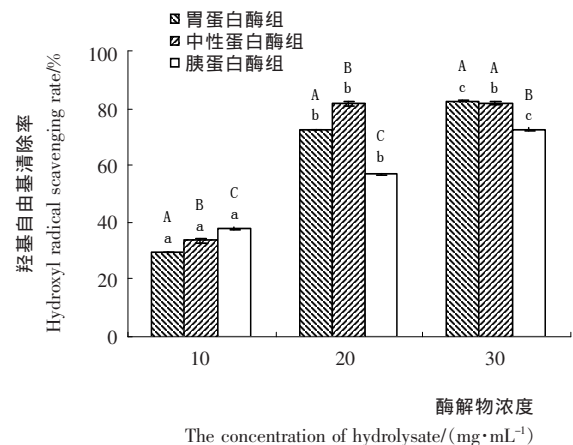
图 3 酶解物对 DPPH 自由基清除作用的 ESR 图谱

Figure 3 ESR spectrum of effects of hydrolysate on DPPH radical scavenging

明, 酶解物浓度为 20 mg/mL 时胃蛋白酶酶解物对 DPPH 自由基的清除率为 52%, 这与本试验中  $IC_{50}$  值相近。

### 2.3 酶解液对羟基自由基的清除作用

本试验采用电子自旋共振 (ESR) 技术检测黄海海燕体壁对粗酶解液对羟基自由基的清除效果, 3 种酶解液 (胃蛋白酶组、中性蛋白酶组和胰蛋白酶组) 对羟基自由基都具有一定的清除效果, 如图 4 所示, 而且清除效果随着酶解液浓度的升高而增强 (清除率由 ESR 峰值计算, 如图 5 所示), 胃蛋白酶组、中性蛋白酶组和胰蛋白酶组对羟基自由基的清除能力的  $IC_{50}$  值分别为 15.17, 11.94, 16.65 mg/mL。胃蛋白酶和中性蛋白酶酶解物对羟基自由基清除率没有显著差别 ( $P < 0.05$ ), 但是在 10 mg/mL 和 20 mg/mL 条件下, 中性蛋白酶组对羟基自由基具有显著较高的清除率。



标注不同大写字母表示相同酶解物浓度下各组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ); 标注不同小写字母表示各试验组内浓度梯度间数据存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

图 4 3 种蛋白酶酶解物对羟基自由基的清除率

Figure 4 The determination of scavenging rate of the three kinds of hydrolysate on hydroxyl radical

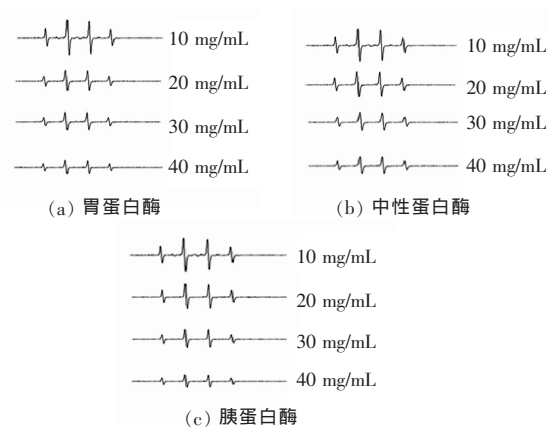


图 5 酶解物对羟基自由基清除作用的 ESR 图谱

Figure 5 ESR spectrum of effects of hydrolysate on hydroxyl radical scavenging

### 3 结论

本试验结果表明,由胃蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶酶解黄海海燕体壁所得到的酶解物对 DPPH 自由基和羟基自由基都具有很好的清除作用,可以作为抗氧化清除自由基的良好原料。并且中性蛋白酶酶解物对 DPPH 自由基和羟基自由基具有明显的清除能力,其对 DPPH 自由基和羟基自由基清除能力的  $IC_{50}$  值分别为 17.71, 11.94 mg/mL。黄海海燕体壁酶解液为开发新型功能性海洋食品基料提供了一定的理论依据,将提高黄海海燕的利用价值,并将扩展 ESR 技术在水产品加工与检测方面的应用。

#### 参考文献

- 郭承华,张芳,刘迅,等. 黄海产海燕黄海燕皂甙的制备[J]. 海洋通报,2000, 19(2): 93.
- 汪行舟,安立龙. 海星资源的开发现状及发展[J]. 资源开发与利用,2007, 24(3): 31~34.
- Je J Y, Lee K H, Lee M H, et al. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis[J]. Food Research International, 2009, 42(9): 1 266~1 272.
- Lin Lin, Li Ba-fang. Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86(14): 2 290~2 295.
- Guerard F, Sumaya-Martinez M T, Laroque D, et al. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(11): 1 486~1 491.
- Mamelona J, Saint-Louis R, Pelletier é. Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm byproducts[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(1): 147~154.
- Dong Xiu-ping, Zhu Bei-wei, Zhao Hong-xia, et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(5): 978~984.
- 刘小玲,林莹,尹秀华,等. 罗非鱼皮胶原肽的制备及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 92~95.
- 王莅莎,朱蓓薇,周大勇,等. 鲍鱼脏器多糖的抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(4): 65~69.
- 任俊凤,任婷婷,朱蓓薇. 河豚鱼皮胶原蛋白肽的提取及其抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 77~83.
- 盘赛昆,顾小红,汤坚,等. 鳙鱼肉酶解物清除羟基自由基的研究[J]. 食品与机械, 2008, 25(4): 64~67.
- 张爽,朱蓓薇,董秀萍,等. 不同分子质量鲍鱼外套膜酶解物抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 108~111.
- Zhou Da-yong, Zhu Bei-Wei, Qiao Lu, et al. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone viscera[J]. Food & Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers Part C, 2012, 90(2): 148~154.
- 顾明广,苏芳,刘艳霞. 酶解鱼皮胶原蛋白制备抗氧化肽工艺研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 149~151.
- 赵保路. 电子自旋共振技术在生物和医学中的应用[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2009: 58~59.
- Falch E, Velasco J, Aursand M, et al. Detection of radical development by ESR spectroscopy techniques for assessment of oxidative susceptibility of fish oils[J]. European Food Research and Technology, 2005, 221(5): 667~674.
- 杜明,朱蓓薇,云霞,等. 酶法水解松仁蛋白的最佳条件研究[J]. 食品工业科技, 2003(6): 36~38.
- 黄鹏,苏宁,王昌涛. 沙棘生物活性肽的制备及功效研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 67~69.
- 赵鸿霞,周大勇,秦磊,等. 响应面法优化海参卵酶解工艺[J]. 食品与机械, 2010, 26(5): 114~117.
- 赵雅聘,刘山,赵鑫. 黄海海燕体壁胶原蛋白肽的制备及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(1): 5~8.

(上接第 45 页)

- G Roudaut, C Dacremont, B Valles Pamies, et al. Crispness: a critical review on sensory an material science approaches[J]. Trends in Food Science & Technology, 2002, 13(6~7): 217~227.
- 于泓鹏,曾庆孝. 脆度的研究方法及其控制参数[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 85~89.
- 李自红,苏东民,张波,等. 物性测试仪研究休闲食品的特性[J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 326~329.
- Mitsuru Taniwaki, Takanori Hanada, Naoki Sakurai. Device for acoustic measurement of food texture using a piezoelectric sensor [J]. Food Research International, 2006, 39(10): 1 099~1 105.
- Lubov Iliassafov, Etal Shimoni. Predicting the sensory crispness of coated turkey breast by its acoustic signature[J]. Food Research International, 2007, 40(7): 827~834.
- 李春红,潘家荣,张波. 物性测试仪对休闲食品酥脆性的测试[J]. 现代科学仪器, 2008(6): 59~62.
- 张爱霞,邓宏斌,陆淳. 感官分析技术及其在食品工业中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2004(3): 113~114.
- 李云飞,殷涌光,徐树来,等. 食品物性学[M]. 第二版. 北京: 中国轻工业出版社, 2010.
- 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- 郝红涛,赵改名,柳艳霞,等. 肉类制品的质构特性及其研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 125~128.
- 罗应婷,杨钮娟. SPSS 统计分析从基础到实践[M]. 北京: 电子工业出版社, 2007.
- 贾瑜. 韧性饼干力学特性及质地评价的研究[J]. 江苏: 江苏大学, 2010.