黑蚂蚁蛋白的酶解优化及抗氧化肽的超滤膜分离

凌萌乐，刘通讯
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：本文研究了酶量、温度、pH 和时间四个因素对黑蚂蚁蛋白的碱性酶法水解的影响。通过响应面设计，以各个抗氧化活性为指标，优化了超氧自由基清除率，DPPH 自由基清除率，羟基自由基清除率，还原力和亚油酸自氧化抑制作用最强的酶解工艺条件。验证实验证实方程的准确率达 95%以上。采用超滤膜及离子交换色谱对酶解产物进行了分离，发现 5~10 kDa 和 1~3 kDa 组分的抗氧化能力最强，碱性肽对超氧自由基清除能力、羟基自由基清除能力、亚油酸自氧化抑制作用贡献较大，酸性肽对 DPPH 自由基清除能力及还原力的贡献较大。

关键字： 拟黑多刺蚁；酶解；抗氧化活性；膜分离
文章篇号：1673-9078(2013)5-1089-1092

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of *Polyrhachis vicina* Roger Protein and Graded Membrane Separation of the Antioxidant Peptides

LING Meng-le, LIU Tong-xun
(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The influences of hydrolysis time, pH, temperature, enzyme and time on enzymatic hydrolysis of *Polyrhachis vicina* Roger protein by alcalase 2.4L were investigated. The antioxidant activity of the product was evaluated by determining five indexes including the scavenging activities of superoxide radical, DPPH• and hydroxyl radical, reducing power and inhibitory ability against oxidation of linoleic acid. By response surface methodology (RSM), the hydrolysis conditions were optimized to achieve the highest antioxidant activity of the product. Verification experiments confirmed the accuracy of equations more than 95%. Ultrafiltration and chromatography techniques were performed to purify enzymatic hydrolysates. It was found that peptides in the range of 5~10 kDa and 1~3 kDa mainly accounted for the activity. Basic peptides had greater scavenging capacity against superoxide radical and hydroxyl radical, as well as inhibitory ability against oxidation of linoleic acid, than acidic peptides. Acidic peptides had higher DPPH· radical scavenging activities and reducing power compared with basic peptides.

Key words: *polyrhachis vicina* roger; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity; membrane separation

蚂蚁含有人体必需的 70 余种营养物质。目前关于蚂蚁制品抗氧化作用的研究比较多，但对蚂蚁活性成分的研究较少。关于蚂蚁活性肽功效及分离纯化方面鲜有报道。刘斐等[1]研究了红褐林蚁多肽的免疫活性及镇痛、抗感染作用。李典忠等[2]报道了红林蚁小分子多肽的提取分离及镇痛作用研究。关于蚂蚁蛋白的酶解控制方面，鲁晓翔等[3]以氨基态氮生成率为指标通过单因素法优化酶解蚂蚁蛋白的工艺。此外，高力[4]等报道了酶解提高了拟黑多刺蚁醇提物的各氨基酸及多肽含量，显著性提高了拟黑多刺蚁醇提物的抗氧化性。本文主要通过响应面法，以抗氧化能力为指标，优化拟黑多刺蚁的酶解工艺，并采用超滤和阴离子交换色谱吸附法分离纯化抗氧化肽，以期为蚂蚁蛋白的利用提供有益的参考。

收稿日期：2012-12-08

作者简介：凌萌乐（1987-），男，硕士，研究方向：粮食、油脂及植物蛋白工程

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

拟黑多刺蚁蚁干：产地云南，粉碎，过 60 目筛，备用；Alcalase 蛋白酶(2.4 AU/g)诺维信(中国)公司；其他化学试剂均为分析纯。

2501PC 紫外-可见分光光度计，日本岛津公司；VIVAFLOW 50 型板式超滤膜包，德国 Sartorius 公司；NID-3 紫外检测仪，上海泸西分析仪器有限公司；层析柱，Whatman 公司；BT00-300M 型蠕动泵，保定兰格恒流泵有限公司；中空纤维超滤膜，美国 Pharmacia 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解液制备

称取 8 g 蚂蚁粉配制底物浓度 8%的水溶液（*m/m*），升温至酶解温度后用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值，加入碱性蛋白酶（E/S），保持 pH 值恒定，酶解后沸水浴 10 min 灭酶，4000 r/min 离心 20 min，抽滤，冷冻干燥。蛋白质测定采用凯氏定氮法 GB/T 5009.5-2003；氨基酸含量采用甲醛滴定法；DH=氨基酸含量/水解物蛋白量；多肽含量=水解物蛋白量-氨基酸含量。

1.2.2 超滤

采用 10 kDa 的超滤膜进行全回流超滤分离，工作压力为 0.1 MPa，流速为 200 mL/min，工作温度为(25±2) ℃，当截留液质量下降到原处理液的 10%后终止操作，取透过液作为下一级超滤的初始料液，利用截留分子质量逐级减小的超滤膜(5 kDa、3 kDa、1 kDa)重复进行上述操作，最终得到>10 kDa、10~5 kDa、5~3 kDa、3~1 kDa、<1 kDa5 个组分。

1.2.3 DEAE-Sepharose FF 离子交换色谱

冻干粉溶于 10 mmoL pH 9.0 Tris-HCl 中，过微孔膜除杂，通过恒流泵泵入柱中，泵速 1 mL/min，初始流动相为 10 mmoL pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液，洗脱液为 0.02 M、0.1 M、0.2 M、0.4 M、0.6 M、0.8 M、1 M、1.6 M、2.5 M NaCl 溶液（用 10 mmoL pH9.0 Tris-HCl 配置）。洗脱速度为 2 mL/min，检测波长：220 nm。所收集组分一律过超滤膜除盐。

1.2.4 抗氧化性能测定

羟基自由基清除率测定[5]，DPPH 自由基清除率测定[6]，还原力测定[7]，超氧自由基清除能力[8]，亚油酸自氧化速率抑制作用[9]。

1.2.5 统计学分析

利用 SPSS 进行 F 检验、回归分析，用 DESIGN 对响应面进行分析，α=0.05。

2 结果与分析

2.1 响应面法优化酶解工艺

前期研究发现酶解时间、温度、pH 值和加酶量等因素对酶解物均有显著性影响。根据单因素实验的结果，在底物浓度 8%的情况下，设定酶解时间(1~3 h)、酶解温度(40~50 ℃)、pH=8~9 和加酶量(0.1~0.5%)，以抗氧化能力为指标，通过响应面对酶解工艺进行优化。因素水平及水解物理化性质和抗氧化实验结果见表 1。响应面所设计的 27 个实验中，水解度 DH 介于 2.43% (14，实验序号，下同) ~7.93%(19)，多肽含量介于 17.21 mg/mL (13)~21.85 mg/mL (24)，超氧自由基清除率介于 79.48% (17)~86.85% (25)，DPPH 清除率介于 51.793% (14)~69.186% (19)，羟基自由基清除率介于 1.638 mg/mL (13)~1.308 mg/mL (26)，还原力介于 0.54(21)~0.474(10)，亚油酸自氧化抑制率（第五天吸光度）介于 0.592(1)~0.283(26)。可见各因素水平显著影响酶解产物的理化特性及其抗氧化性能。在水相体系，所有样品的抗氧化性能明显低于 Vc 和 TP。在油相体系中，即使酶解物的添加量低至 0.016 mg/mL，亚油酸自氧化抑制率与 1 mg/mL TP (0.456，第五天吸光度，下同)和 0.1 mg/mL TBHQ (0.476)相当。拟黑多刺蚁含有 SOD 和 V_E，然而在酶解过程及后来的灭酶处理中 SOD 和 V_E 可能已失活。笔者推测酶解物优异的亚油酸自氧化抑制率可能与拟黑多刺蚁含有较多的碱性氨基酸有关，在酶解过程这些碱性氨基酸以小肽的方式被释放出来。研究证明碱性肽主链中的碱性氨基酸对其抑制脂质过氧化的能力有重要作用[10]。

采用 SAS、DESIGN 分析响应面，得出超氧自由基清除，DPPH 清除率，羟基自由基清除率，还原力及亚油酸自氧化抑制率的最佳酶解条件。结果见表 2。对不同的条件进行了验证实验，实验结果与预测结果相差在±5%之间，证明预测值与实验值具有较好的拟合度。

表 2 优化结果

Table 2 Results of optimization test

优化指标	时间/h	加酶量/%	pH 值	温度/℃	抗氧化效果		
					指标	优化结果	验证试验
超氧	2.27	0.27	8.73	41.58	清除率/%	87.26	90.12
DPPH	2.83	0.33	8.05	44.27	清除率/%	70.17	68.19
羟基	1.94	0.23	8.70	46.52	IC_{50}/(mg/mL)	1.29	1.35
还原力	2.00	0.22	8.48	41.23	吸光度 A	0.54	0.55
亚油酸	2.37	0.42	8.92	47.16	吸光度 A	0.23	0.24

2.2 超滤法分离纯化酶解物

蚂蚁酶解物 DPPH 自由基清除能力较抗氧化剂最差，因此按照表 2 所优化的 DPPH 自由基清除率最佳条件制备酶解物，即：pH=8.05、T=44.27 ℃、E/S=0.34%、t=2.83 h。利用中空纤维超滤膜分级超滤获到>10 kDa、10~5 kDa、5~3 kDa、3~1 kDa、<1 kDa 5 个组分。不同组分的抗氧化性结果见表 3。分子量大小对酶解物的抗氧化活性具有显著性影响。5~10 kDa 组分超氧和 DPPH 自由基清除率最高，其次>10 kDa 组分，最次为<1 kDa 组分；1~3 kDa 组分羟基自由基清除率最高，其次>10 kDa 组分，最次为 5~10 kDa 组分；1~3 kDa 组分还原力最强，其次为 5~10 kDa 组分，最次为<1 kDa 组分；1~3 kDa 组分亚油酸自氧化抑制作用最强，其次为<1 kDa，最次为 5~10 kDa 组分。

Kim 等对 Hoki 鱼骨架蛋白酶解物的研究也发现分子量为 1~3 kDa 的组分抑制亚油酸体系脂质过氧化的活性最强[11]。综上可以看出 5~10 kDa、1~3 kDa 组分抗氧化能力最强，其次为>10 kDa、3~5 kDa 组分，<1 kDa 组分抗氧化能力最差。因此选择 5~10 kDa 与 1~3 kDa 进行下一步分离。

表 1 因素水平表及酶解物的理化及抗氧化性质

Table 1 Factors and levels and results of physical-chemical and anti-oxidant properties of the hydrolysates

试验号	加酶量/%	pH	温度/℃	DH/%	多肽/(mg/mL)	超氧/%	DPPH/%	羟基 IC50	还原力(A)	亚油酸(A)
1	-1（0.1）	0（8.5）	0（45）	3.10	19.69	80.88	60.29	1.43	0.51	0.59
2	1（0.5）	0（8.5）	0（45）	4.75	19.63	82.12	59.14	1.37	0.47	0.48
3	-1（0.1）	0（8.5）	0（45）	4.16	19.75	85.25	61.82	1.39	0.49	0.42
4	1（0.5）	0（8.5）	0（45）	5.65	19.64	84.00	63.66	1.42	0.51	0.32
5	0（0.3）	-1（8）	-1（40）	6.79	18.63	82.20	67.27	1.63	0.53	0.44
6	0（0.3）	-1（8）	1（50）	5.96	20.03	82.25	63.15	1.48	0.48	0.42
7	0（0.3）	1（9）	-1（40）	3.92	20.96	86.25	55.02	1.31	0.52	0.33
8	0（0.3）	1（9）	1（50）	3.13	21.12	85.37	51.24	1.34	0.48	0.30
9	0（0.3）	0（8.5）	-1（40）	4.75	20.05	83.37	64.60	1.37	0.51	0.50
10	0（0.3）	0（8.5）	1（50）	4.85	21.42	81.15	55.03	1.35	0.47	0.41
11	0（0.3）	0（8.5）	-1（40）	6.50	19.80	85.29	66.27	1.46	0.51	0.28
12	0（0.3）	0（8.5）	1（50）	4.09	19.90	82.25	63.51	1.41	0.49	0.32
13	-1（0.1）	-1（8）	0（45）	5.12	17.21	82.37	65.11	1.63	0.50	0.45
14	-1（0.1）	1（9）	0（45）	2.43	20.71	85.62	51.79	1.34	0.51	0.56
15	1（0.5）	-1（8）	0（45）	7.22	19.44	82.21	66.75	1.47	0.50	0.58
16	1（0.5）	1（9）	0（45）	3.92	20.88	84.62	52.08	1.40	0.49	0.28
17	0（0.3）	-1（8）	0（45）	6.01	20.00	79.84	68.57	1.57	0.49	0.54
18	0（0.3）	1（9）	0（45）	3.69	21.12	82.10	53.10	1.42	0.50	0.40
19	0（0.3）	-1（8）	0（45）	7.93	18.58	81.69	69.18	1.60	0.50	0.36
20	0（0.3）	1（9）	0（45）	3.76	21.18	84.58	58.30	1.44	0.51	0.30
21	-1（0.1）	0（8.5）	-1（40）	4.82	19.36	85.62	57.55	1.36	0.54	0.46
22	-1（0.1）	0（8.5）	1（50）	3.73	18.68	84.22	57.36	1.32	0.49	0.48
23	1（0.5）	0（8.5）	-1（40）	5.20	20.54	86.12	61.24	1.34	0.51	0.44
24	1（0.5）	0（8.5）	1（50）	4.66	21.85	84.29	55.81	1.35	0.49	0.33
25	0（0.3）	0（8.5）	0（45）	5.31	20.25	86.86	65.79	1.32	0.53	0.29
26	0（0.3）	0（8.5）	0（45）	5.37	20.84	86.22	66.50	1.30	0.53	0.28
27	0（0.3）	0（8.5）	0（45）	4.85	19.22	86.37	65.85	1.31	0.53	0.28

注：亚油酸添加量为 0.016 mg/mL，结果为第五天吸光度；超氧自由基清除实验添加量为 20 mg/mL；DPPH 自由基清除实验添加量为 0.25 mg/mL；羟基自由基清除实验和还原力添加量为 2.5 mg/mL。

表 3 不同分子量组分抗氧化性

Table 3 Antioxidant activity of the components with different molecular weights

抗氧化性	酶解物	不同分子量/kDa				
		>10	5~10	3~5	1~3	<1
超氧 IC_{50}/(mg/mL)	13.64	7.84	7.13	20.31	21.74	41.07
DPPH IC_{50}/(mg/mL)	0.19	0.20	0.11	0.21	0.32	0.49
羟基 IC_{50}/(mg/mL)	1.29	0.73	6.78	3.84	0.54	15.04
还原力 IC_{50}/(mg/mL)	2.61	3.30	1.47	2.74	1.42	4.54
亚油酸吸光度(A)	0.31	0.49	0.33	0.37	0.25	0.37

2.3 DEAE-Sepharose FF 分离纯化酶解物

5~10 kDa 及 1~3 kDa 组分经 DEAE-Sepharose FF 离子交换色谱分离，各组分的含量分布及其抗氧化性能见表 4。其中 5~10 kDa 组分经 10 mmoL pH=9.0 Tris-HCl 缓冲液，0.02 M、0.1 M、0.2 M、0.4 M、0.6 M NaCl6 种洗脱液各洗脱出一个峰；1~3 kDa 组分经 10 mmoL pH=9.0 Tris-HCl 缓冲液，0.02 M、0.1 M、0.2 M、0.4 M NaCl 5 种洗脱液各洗脱出一个峰，分别以洗脱液命名。

实验结果显示，离子吸附强度对抗氧化性有显著

性影响。5~10 kDa 及 1~3 kDa 组分 Tris-HCl 组羟基清除能力及超氧自由基清除能力最强，而 0.6M NaCl 组最差。Tris-HCl 组主要为碱性肽，其碱性氨基酸含量较高或碱性氨基酸在端链较多，其等电点较高，溶解于 pH=9.0 的 Tris-HCl 中，因 pH<pI，故整体表现为偏正电性，不被 DEAE-Sepharose FF 离子交换色谱吸附而直接分离出来。由表 4 可见，5~10 kDa 和 1~3 kDa 组分 Tris-HCl 组分亚油酸自氧化抑制作用也最强，尤其是 1~3 kDa 组，其亚油酸自氧化抑制率与 0.5 mg/mL V_E(第五天吸光度=0.111)相当而优于 0.1 mg/mL TBHQ (0.476)。碱性氨基酸等被认为是催化氧化的目标物，其侧链很容易被氧化生成羰基衍生物[12]，说明碱性氨基酸可充当超氧阴离子清除剂的角色，达到抗氧化的效果。

表 4 1~3 kDa 和 5~10 kDa 组分离子交换色谱分离与抗氧化性

Table 4 Ion-exchange chromatography and antioxidant activity of 1-3kDa and 5-10kDa components

组分	含量/%	IC_{50}/(mg/mL)				亚油酸（A）
		超氧	DPPH	羟基	还原力	
5~10 kDa		7.13	0.11	6.78	1.47	0.33
Tris-HCl	26.64	3.16	0.76	1.73	2.67	0.14
0.02 M NaCl	15.81	4.78	0.57	3.45	1.76	0.23
0.1 M NaCl	12.60	6.67	0.15	4.76	1.13	0.37
0.2 M NaCl	15.60	10.77	0.09	8.93	0.92	0.55
0.4 M NaCl	17.04	15.16	0.05	18.78	0.81	0.90
0.6 M NaCl	12.30	20.33	0.04	28.56	0.63	0.56
1~3 kDa		21.74	0.32	0.54	1.42	0.25
Tris-HCl	33.01	10.46	0.69	0.13	3.75	0.11
0.02 M NaCl	10.70	11.24	0.47	0.14	3.12	0.13
0.1 M NaCl	30.84	17.43	0.23	0.47	2.14	0.37
0.2 M NaCl	10.69	25.19	0.14	0.78	1.37	0.47
0.4 M NaCl	14.78	41.67	0.16	1.15	0.65	0.79

相反，5~10 kDa 及 1~3 kDa 组分 0.6 M NaCl 组分的 DPPH 自由基清除能力与还原力最强，而 Tris-HCl 组最弱。0.6 M NaCl 组分主要为酸性肽，因其多肽中酸性氨基酸含量较高，整体表现为偏负电性，容易被 DEAE-Sepharose FF 离子交换色谱吸附，而所用洗脱液盐离子浓度越高其吸附能力越大。这说明酸性肽对 DPPH 自由基清除能力与还原力的贡献最大。

3 结论

3.1 拟黑多刺蚁蛋白含量为 54.51%[13]。然而由于含有较多的纤维，体壳中含有大量的壳聚糖和甲壳素，矿物质含量高且其在整个 pH 范围蛋白的溶解性较低[13]。从而影响了其水解度及蛋白质的利用率。

3.2 抗氧化能力测定主要分为体外和体内抗氧化试验。体外抗氧化评价方法的不同，拟黑多刺蚁最佳的酶解条件有所差异。总体而言，拟黑多刺蚁水解物在油相体系中显示出比水相更强的抗氧化能力。此外，肽的分子量大小影响其抗氧化活性的高低。碱性肽对多肽抗氧化能力贡献最大，而酸性肽对 DPPH 自由基清除能力与还原力的贡献最大，这可能与酸性氨基酸的离子螯合性有关。

参考文献

[1] 刘斐,陈希久,于晓辉,等.红褐林蚁多肽的免疫活性及镇痛、抗感染作用[J].北华大学学报(自然科学版),2010,11(6):549-552

[2] 李典忠,周云雷,姜海燕,等.红林蚁小分子多肽的提取分离及镇痛作用研究[J].长春中医学院学报,1998,14(70):57

[3] 鲁晓翔,王绍树,张明春.酶法水解蚂蚁蛋白的研究[J].食品科学,1997,9:17-21

[4] 高力,刘通讯.酶解拟黑多刺蚁的乙醇浸提液的理化及抗氧化活性[J].现代食品科技,2013(4)

[5] de Avellar I G, Magalhães M M, Silva A B, et al. Reevaluating the role of 1, 10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1675: 46-53

[6] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. J. Agric. Food Chem, 2003, 51(12): 3661-3667

[7] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity [J]. J. Agric. Food Chem, 1995, 43 (1):27-32

[8] Yu W L, Zhao Y P, Xue Z, et al. The antioxidant properties of lycopene concentrate extracted from tomato paste [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2001, 78(7):697-701

[9] Saha K, Lajisa N H, Israfa D A, et al. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected malaysian medicinal plants [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 92: 263-267

[10] Pham T, Kodvawala A, Hui D Y. The receptor binding domain of apolipoprotein E is responsible for its antioxidant activity [J]. Biochem, 2005, 44(20): 7577-7582

[11] Kim S Y, Je J Y, Kim S K. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion [J]. J. Nutr. Biochem., 2007, 18(1): 31-38

[12] Stadtman E R, Berlett B S, Chock P B.

Manganese-dependent disproportionation of hydrogen peroxide in bicarbonate buffer [J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1990, 87: 384-388

[13] 王婧,刘通讯.拟黑多刺蚁的理化分析[J].现代食品科技, 2010, 10:1092-1095

[14] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment [J]. J.Agric. Food Chem, 2003, 51(12): 3661-3667

现代食品科技