

海地瓜多肽分离及抗氧化活性研究

王天明^{1,3,4}, 苏意钢^{1,2}, 马永钧⁴, 秦乾安⁴, 叶兴乾¹, 陈士国¹, 胡亚芹^{1,2}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江省农产品加工技术研究重点实验室, 馥莉食品研究院, 浙江杭州 310058) (2. 浙江大学舟山海洋研究中心, 浙江舟山 316026) (3. 浙江海洋学院, 浙江舟山 316022) (4. 浙江兴业集团有限公司, 浙江舟山 316101)

摘要: 本文检测评价海地瓜体壁干粉及多肽氨基酸组成, 通过超滤膜分级过滤技术及层析色谱分离技术分级分离海地瓜酶解多肽, 采用生化水平及细胞水平抗氧化活性分析方法研究海地瓜多肽抗氧化活性特征。研究显示, 海地瓜体壁干粉及酶解多肽氨基酸含量丰富, 检测的 19 种氨基酸总量分别占样品干重的 63.06% 及 82.90%; 其中, 必需氨基酸含量分别为 10.87% 及 15.60%。海地瓜酶解多肽小分子肽 (<3 kDa) 含量最高, 达到 43.9%; 其次是分子量为 3 k~10 kDa 的多肽, 含量为 36.8%; 而 >10 kDa 的多肽含量最低, 仅为 19.3%。三种海地瓜多肽中, 小分子多肽 (<3 kDa) 抗氧化活性最高, ABTS 法及 FRAP 法检测的 TEAC 值分别为 0.61±0.03 mmol Trolox/g 及 0.32±0.02 mmol Trolox/g。海地瓜多肽明显增强 HepG-2 及 HEK293 细胞抗 H₂O₂ 氧化损伤能力, 且小分子多肽 (<3 kDa) 活性高于其他组分; G-25 层析分离海地瓜小分子多肽 (<3 kDa), 形成 6 个主要吸收峰, 对其样品抗氧化分析结果显示第 5 峰多肽样品抗氧化活性最高。

关键词: 海参; 海地瓜; 酶解; 多肽; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2014)5-75-81

Separation and Antioxidant Activity Evaluation of *Acaudina molpadioides* Peptide

WANG Tian-ming^{1,3,4}, SU Yi-gang^{1,2}, MA Yong-jun⁴, QIN Qian-an⁴, YE Xing-qian¹, CHEN Shi-guo¹, HU Ya-qin^{1,2}

(1. Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Fuli Institute of Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China) (2. Ocean Research Center of Zhoushan, Zhejiang University, Zhoushan 316026, China) (3. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China) (4. Zhejiang Industrial Group CO., LTD, Zhoushan 316101, China)

Abstract: Amino acid composition of body wall powder and hydrolytic peptide from *Acaudina molpadioides* (*A. molpadioides*) was analyzed and in vitro antioxidant activities of peptide separated from the hydrolytic fractionations were detected. The total oxidant activity of *A. molpadioides* hydrolytic peptide was evaluated. Results showed the both body wall and hydrolytic peptide contained 19 kinds of amino acids, which were occupied 63.06% and 82.90% of sample dry weight, respectively. Among which, the essential amino acid content were 10.87% and 15.60%, respectively. Three compositions with different molecular weight were separated from hydrolytic peptide by ultrafiltration. The small peptides (<3 kDa) took over the highest level (43.9%), followed by 3k-10kDa molecular weight peptides(36.8%), and the polypeptide above 10kDa was the minimum (19.3%). The ABTS and FRAP assays showed that compared to other compositions, the antioxidant activity of small peptides (<3 kDa) was the highest, the TEAC value was 0.61 ± 0.03 mmol Trolox/g and 0.32 ± 0.02 mmol Trolox/g, respectively. The result of cell culture experiments displayed that the three compositions from *A. molpadioides* hydrolytic peptide significantly enhanced the ability of HEK293 and HepG-2 cells against H₂O₂ oxidative damage. The small peptides (<3 kDa) appeared to be more active than the other components. Six major peaks in the small peptide composition were observed by glucose gel separation with G-25, and the highest antioxidant activity peptide was detected in the sample of the 5th fraction.

Key words: sea cucumber; *Acaudina molpadioides*; enzymatic hydrolysis; peptide; antioxidant

收稿日期: 2013-12-23

基金项目: 浙江省公益技术应用研究项目 (2013C32056); 浙江省博士后择优资助项目 (BSH1302060); 舟山市科技计划项目 (2012G33022); 国家科技支撑计划项目 (2012BAD38B09)

作者简介: 王天明 (1983-), 男, 博士后, 主要从事水产品加工; 通讯作者: 胡亚芹 (1972-), 女, 副教授, 博士生导师

海地瓜 [*Acaudina molpadioides* (Semper)] 属于棘皮动物门 (*Echinodermata*) 海参纲 (*Holothuroidea*) 芋参目 (*Molpadioides*) 尻参科 (*Caudinidae*) 海地瓜属 (*Acaudina*)^[1]。海地瓜与刺参营养成分相似, 具有丰富的蛋白、多糖、矿物元素及微量元素, 目前研究主要集中在对其营养成分分析及加工利用方面^[2-3]。海参多肽以刺参、梅花参、日本海参等传统海参为原料, 通过酶解工艺制成的具有多种功效的肽类; 海参多肽具有良好的稳定性、水溶性, 具有抗氧化、抗疲劳、降血压等诸多生理功能^[4-5]。

人体在新陈代谢过程中会产生活性氧 (ROS), 其具有强氧化活性, 对机体组织细胞产生很大威胁, 是人体自然衰老以及众多心血管疾病、大脑功能疾病、风湿病等产生的重要因素^[6-7]。近年来关于海参多肽的抗氧化活性功能研究已有报道, 赵芹等人采用 ox-LDL 建立的血管内皮细胞损伤模型和 H₂O₂ 处理构建的神经细胞损伤模型, 系统分析了不同分子量的刺参 (*Apostichopus japonicus*)、菲律宾刺参 (*Pearsonothuria graeffei*)、北极刺参 (*Thelenata anax*)、美国肉参 (*Isostichopus badionotus*) 和冰岛刺参 (*Cucumaria frondosa*) 等海参多肽抗氧化活性, 表明不同种类海参多肽均具有抗氧化活性^[8]; 王静等人采用化学发光法分析了不同分子量段刺参多肽的抗氧化活性, 发现海参多肽具有明显的自由基清除能力并且表现出分子量越小, 抗氧化活性越强的规律^[9]; 陈卉卉等人对海地瓜胶原多肽的制备及自由基清除功能进行了研究, 认为木瓜蛋白酶水解多肽清除自由基能力较强, 且小于 5 kDa 的肽抗氧化功能最强^[10]。

然而, 目前有关海地瓜多肽抗氧化活性的研究主要通过非生理条件下的检测, 缺乏细胞学水平和体内外实验的数据报道; 而且, 对于多肽样品的分离纯化也需要进一步深入。本研究采用优化的复合酶解工艺, 制备海地瓜多肽, 通过超滤膜分离技术制备分子量 10 kDa 以上、3~10 kDa 以及低于 3 kDa 的三种多肽样品, 采用 ABTS 和 FRAP 生化水平的总抗氧化能力及还原能力检测方法、HepG-2 和 HEK293 细胞毒性及抗 H₂O₂ 氧化损伤功能活性检测方法等抗氧化活性分析技术, 对不同分子量海地瓜进行抗氧化能力较为全面的评估, 阐明不同分子量海地瓜多肽抗氧化活性特征; 采用 Sephadex G-25 葡糖糖凝胶层析柱进一步分离纯化具有较高抗氧化活性的海地瓜多肽组分, 并对其抗氧化活性进行检测分析, 揭示海地瓜抗氧化多肽组分特征, 为进一步深入研究和开发具有高抗氧化活性的海地瓜多肽奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

冰冻海地瓜, 购自浙江兴业集团有限公司; 木瓜蛋白酶 (CAS 号: 9001-73-4)、胰酶 (CAS 号: 9002-07-7), 国药试剂公司产品; Sephadex G-25, 美国 GE; 无水乙醇, 国药试剂公司产品; 总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 法、FRAP 法), 碧云天生物技术研究; MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒, 碧云天生物技术研究。

1.2 主要的仪器设备

CWJ-30 粉碎机, 上海师锐机械设备有限公司; KQ-100VDE 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; CR22GIII 高速离心机, 日本 HITACHI 日立集团; D2010W 电动搅拌器, 上海梅颖浦仪器仪表有限公司; R-205 旋转蒸发器, 上海申胜生物技术有限公司; UV-2550 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; HH-S4 A 型恒温水浴锅, 北京科伟永兴仪器有限公司; 3 kDa、10 kDa 超滤膜包, 德国赛多利斯集团; BT100-1L 流量型蠕动泵、BT100-2J 高精度蠕动泵, 保定兰格恒流泵有限公司; LGJ-18 冷冻干燥机, 长沙湘仪仪器有限公司; MDF-382E (CN) 超低温冰箱, 日本三洋电器集团; COLUMN XK 16/100 层析柱, 美国 GE 医疗集团; DBS-100-LCD 自动部分收集器, 上海琪特分析仪器有限公司; CP2102 电子天平, 美国奥豪斯; DGG-9620AD 干燥箱, 上海森信实验仪器有限公司; Thermo fisher Forma 3110 水套式 CO₂ 细胞培养箱, 美国热电; Thermo Multiskan FC 酶标仪, 美国热电。

1.3 试验方法

1.3.1 海地瓜双酶酶解

取冰冻海地瓜, 放置于 4 °C 冰箱低温解冻后去除内脏, 取体壁组织, 洗净并置于 60 °C 烘箱烘干, 经粉碎制得海地瓜干粉; 取海地瓜干粉, 加 10 倍质量蒸馏水混匀, 加氢氧化钠调节 pH 至 8.0, 水浴恒温至 55 °C 后, 加入 2% (相当于海地瓜干粉质量) 的胰酶, 搅拌酶解 3 h 后, 调整 pH 至 7.0, 水温调整至 48 °C 并加入木瓜蛋白酶 2% (相当于海地瓜干粉质量), 继续搅拌酶解 5 h; 95~98 °C 灭酶 10 min 后冷却至室温, 4500 r/min 离心酶解液 20 min, 去除沉淀杂质, 保存酶解液。

1.3.2 海地瓜多肽制备

取海地瓜酶解液, 加入 1.5 倍体积无水乙醇, 搅

拌混匀, 4 °C 静置 24 h, 4500 r/min 离心 20 min, 取上清多肽溶液; 将制得的上清多肽溶液装入三角烧瓶, 放入冰盒内, 用 10 kDa 超滤膜低温过滤, 回流液体积为原体积 20% 时, 加入 1 倍体积蒸馏水稀释后继续过滤, 得一倍体积滤液 A, 剩余 20% 体积回流液 a; 取滤液 A 用 3 kDa 滤膜超滤, 采用同样方法, 得 20% 体积回流液 b 以及一倍体积滤液 B; 旋转浓缩滤液 B 获得浓缩滤液 c, 分别冻干回流液 a, 回流液 b 及浓缩滤液 c, 得到分子量分布为 >10 kDa, 3~10 kDa 及 <3 kDa 的三个多肽样品。

1.3.3 氨基酸检测

上海谱尼测试技术有限公司, 食品中氨基酸测定方法 (GB/T 5009.124-2003) 检测海地瓜体壁干粉及酶解多肽样品氨基酸含量。

1.3.4 海地瓜小分子多肽葡萄糖凝胶柱层析分离纯化

取 Sephadex G-25 葡糖糖凝胶干粉, 放入过量去离子水中, 沸水浴 2 h, 搅动后静置, 去除上层细粒悬液; 固定并清洗层析柱, 注水检测层析柱各接口密闭性, 使用装柱器完成装柱; 装柱完成后, 使用去离子水以 1.2 mL/min 流速平衡凝胶柱 6 h; 平衡完成后, 调节层析柱顶部适配器, 使进样口底部与床表面相切, 以 0.6 mL/min 流速加入 10% 海地瓜多肽溶液 3 mL, 后以 0.6 mL/min 流速加入去离子水进行洗脱; 使用自动部分收集器进行收集, 采用分光光度计在 274nm 波长处以去离子水为空白, 对收集液进行吸光度测定。

1.3.5 ABTS 抗氧化能力检测

ABTS 溶液和氧化剂溶液等比例混合, 避光室温放置 16 h, 为 ABTS 工作母液; 临用前用 PBS 稀释 80 倍, 制成 ABTS 工作液; 取离心管加入 ABTS 工作液 200 μ L 和样品 10 μ L, 室温避光静置 10 min, 用紫外-可见分光光度计测 734 nm 处吸光度; 以 0 mM、0.15 mM、0.3 mM、0.45 mM、0.6 mM、0.75 mM Trolox 溶液为标准溶液制作标准曲线^[11]。

1.3.6 FRAP 抗氧化能力检测

0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 3.6): 10 mmol/L TPTZ (溶于 40 mmol/L 盐酸): 20 mmol/L 三氯化铁=10:1:1, 按该比例将三种溶液混合得到 FRAP 工作液; 取 4.9 mL FRAP 工作液与 100 μ L 样品, 37 °C 反应 24 h 后, 在 593 nm 下测吸光度; 以 0 mM、0.15 mM、0.3 mM、0.45 mM、0.6 mM、0.75 mM Trolox 溶液为标准溶液制作标准曲线^[12]。

1.3.7 HepG-2 及 HEK293 细胞毒性检测

HepG-2 及 N293 细胞在 96 孔板上按 5×10^4 个/mL

的密度接种 200 μ L; 24 h 细胞贴壁后, 加入海地瓜多肽样品、 H_2O_2 或 PBS (空白组), 处理 24 h 后, 每孔加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT (前 30 min 配制), 孵育 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 100 μ L DMSO, 水平振荡 10 min, 用酶联检测仪在 570 nm 处测定吸光值 A, 计算细胞抑制率^[13]。

1.3.8 H_2O_2 氧化损伤的保护作用检测

HepG-2 及 N293 细胞在 96 孔板上按 5×10^4 个/mL 的密度接种 0.2 mL; 24 h 细胞贴壁后, 加入样品、PBS (空白组), 处理 24 h 后, 实验组加入新配置的 H_2O_2 溶液, 终浓度为 1.0 mM。继续孵育 24 h 后, 每孔加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT (前 30 min 配制), 孵育 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 100 μ L DMSO, 水平振荡 10 min, 用酶联检测仪在 570 nm 处测定吸光值 A, 计算细胞抑制率^[14]。

1.4 数据统计

采用 Excel, SPSS 18.0 对所得数据进行统计及差异分析; 采用 SigmaPlot 12.0 制图。

2 结果与讨论

2.1 海地瓜干粉及双酶解多肽的氨基酸组成特征分析

本实验使用 100 g 海地瓜体壁组织干粉, 经双酶酶解获得溶出的多肽总质量为 53.24 g, 海地瓜干粉及多肽氨基酸组成分析结果见表 1。结果显示, 在检测的 19 种氨基酸中, 海地瓜干粉氨基酸成分除 Cys 含量较低未检出外, 其他氨基酸含量均比较高, 总含量达 63.06%, 其中必需氨基酸含量为 10.87%, 与干刺参中氨基酸总量 $65.75 \pm 3.62\%$ 一致, 且必需氨基酸含量与刺参 $13.44 \pm 1.26\%$ 相近^[15]; 在氨基酸组成上, Gly 含量最高, 达 12.48%。作为胶原蛋白主要构成氨基酸的 Gly、Pro 及 Hpro 的含量分别为 12.48、5.56 及 4.17%, 与刺参中相应氨基酸比例基本一致^[15], 而高于糙参、马皱辐肛参、荡皮海参、黑乳参等海参中含量^[16], 这表明, 海地瓜体壁中胶原蛋白含量较高, 与刺参更为相近。此外, 表 1 中海地瓜酶解多肽氨基酸含量数据显示, 经过双酶酶解制备的海地瓜多肽氨基酸组成与干粉基本一致, 其氨基酸总量明显高于体壁干粉样品, 达到 82.9%, 必需氨基酸含量达到 15.6%, 说明实验采用的酶解方法对刺参组织中不同类型蛋白具有相近的水解能力, 其酶解产物多肽氨基酸含量比较全面,

营养价值较好。

表 1 海地瓜干粉及多肽样品氨基酸含量

Table 1 Content of amino acids in powder of *A. molpadioides* body wall and hydrolytic polypeptide

氨基酸种类		干品样品中氨基酸含量/%	多肽样品中氨基酸含量/%
甘氨酸	Gly	12.48	16.37
脯氨酸	Pro	5.56	7.72
L-羟脯氨酸	Hpro	4.17	5.56
苏氨酸	Thr	2.82	3.84
缬氨酸	Val	1.9	2.89
蛋氨酸	Met	0.66	1.07
异亮氨酸	Ile	1.12	1.7
亮氨酸	Leu	2.16	3.28
苯丙氨酸	Phe	1.08	1.6
赖氨酸	Lys	0.95	1
色氨酸	Trp	0.18	0.22
天冬氨酸	Asp	5.44	6.54
丝氨酸	Ser	2.44	2.96
谷氨酸	Glu	8.5	11.85
丙氨酸	Ala	7	9.22
胱氨酸	Cys	0(<0.01)	0(<0.01)
酪氨酸	Tyr	1.04	1.3
组氨酸	His	0.4	0.42
精氨酸	Arg	5.16	5.36
必须氨基酸	EAA	10.87	15.60
总氨基酸	TAA	63.06	82.90

注: EAA: 必需氨基酸; TAA: 总氨基酸。

2.2 海地瓜多肽分级分离及抗氧化活性特征

分析

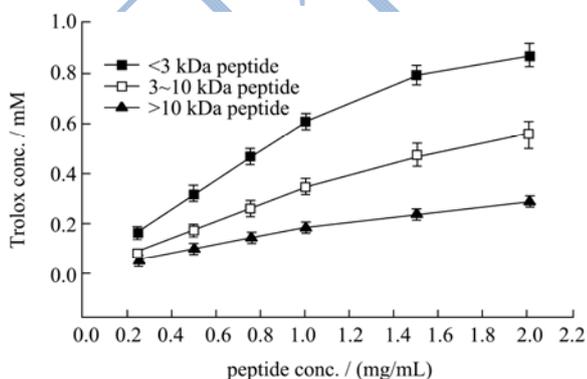


图 1 不同分子量海地瓜多肽的 ABTS⁺清除能力

Fig.1 ABTS⁺ scavenging activities of different molecular fractions of *A. molpadioides* peptide Values indicate the mean±SD (n=5)

注: 数值为平均数±标准差, 每组取样数为 5。

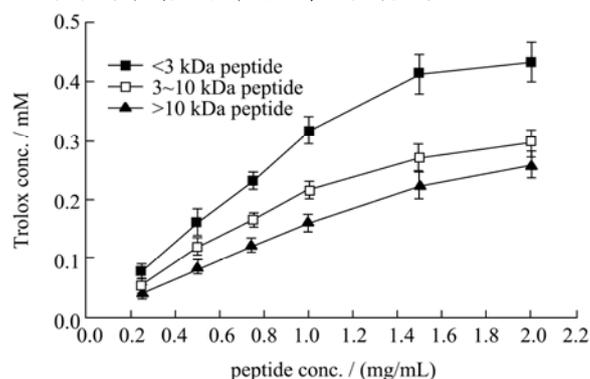


图 2 不同分子量海地瓜多肽的 Fe³⁺-TPTZ 清除能力

Fig.2 Fe³⁺-TPTZ scavenging activities of different molecular fractions of *A. molpadioides* peptide Values indicate the mean±SD (n=5)

注: 数值为平均数±标准差, 每组取样数为 5。

双酶酶解工艺制备的海地瓜多肽, 经过 10 kDa 及 3 kDa 超滤膜过滤, 制备>10 kDa、3 k~10 kDa 及<3 kDa 三种分子量大小的多肽样品。结果显示, 经实验双酶酶解工作制备的海地瓜多肽中, <3 kDa 小分子肽含量最高, 达到 43.9%, 其次是分子量为 3 k~10 kDa 的多肽, 含量为 36.8%, 而>10 kDa 的多肽含量最低, 仅为 19.3%; 这表明实验采用的酶解工艺对海地瓜体壁干粉具有很好的酶解效果, 获得的多肽分子量较小。

采用 Trolox 化合物作为抗氧化活性等价物, 使用 ABTS 法及 FRAP 法检测技术, 通过多肽对 ABTS⁺及 Fe³⁺-TPTZ 的还原活性检测, 对制备获得的三种海地瓜多肽进行抗氧化活性特征分析; 以 Trolox 当量 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity value, 即与 1.0 mg/mL 样品抗氧化能力相当的 Trolox mM 浓度) 表示抗氧化活性, 检测结果如图 1、2 所示。ABTS 检测结果表明 (图 1), 分子量>10 kDa、3 k~10 kDa 及<3 kDa 的三种海地瓜多肽均具有一定的 ABTS⁺清除能力, 且随分子量降低, 其活性显著增强, >10 kDa、3 k~10 kDa 及<3 kDa 多肽的 TEAC 值分别为 0.18±0.01 mmol Trolox/g、0.34±0.03 mmol Trolox/g 及 0.61±0.03 mmol Trolox/g, 之间差异极显著 (P<0.01); 以维生素 C (Vc) 为阳性对照品, 其 TEAC 值为 7.23±0.17 mmol Trolox/g, 显著高于海地瓜多肽 TEAC 值。海地瓜多肽抗氧化活性特征 FRAP 法检测结果表明 (图 2), 海地瓜三种多肽具有一定的 Fe³⁺-TPTZ 清除能力, 其 TEAC 值较 ABTS 法检测值低, 其中活性最高的<3 kDa 多肽 TEAC 值为 0.32±0.02 mmol Trolox/g, 显著低于阳性对照品 Vc 的 TEAC 值为 7.04±0.21 mmol Trolox/g, 说明多肽的对 Fe³⁺-TPTZ 还原能力相对 Vc 较弱, 且相比 ABTS⁺清除能力弱, 但两种方法检测

结果显示,海地瓜不同分子量多肽活性特征相似,随分子量降低,其活性显著增强,这与诸多报道中的结果一致^[9-10]。

2.3 小分子海地瓜多肽细胞毒性及对细胞抗氧化损伤的作用分析

由 2.2 结果可知,海地瓜多肽的抗氧化活性在>10 kDa、3 k~10 kDa 及<3 kDa 三种分子量区域中,随着分子量的减小,其抗氧化活性具有明显的增强趋势。然而,因为 ABTS、FRAP 检测抗氧化能力是在非生理条件下开展,海地瓜多肽作为开发功能食品乃至保健食品的良好材料,开展细胞水平的抗氧化功能检测将更加接近其固有的生理活性特征。为检测细胞水平的抗氧化活性,研究进一步利用人肝癌细胞 HepG-2、人胚肾细胞 HEK293,参考 Liu 等人采用的 MTT 法^[17],开展海地瓜小分子多肽的细胞毒性及抗 H₂O₂ 氧化损伤能力检测分析。

图 3 为三种分子量海地瓜多肽及 H₂O₂ 对 HepG-2 及 HEK293 细胞毒性检测结果。结果显示,相对 HepG-2 细胞,HEK293 细胞对 H₂O₂ 氧化损伤更为敏感,在低浓度 H₂O₂ 氧化胁迫下出现细胞生长受阻,其细胞存活能力较 HepG-2 明显较低,如在 0.1 mg/mL H₂O₂ 剂量条件下,HEK293 的存活率为 68.3%±4.1%,低于 HepG-2 的 78.3%±5.0%,差异极显著 (P<0.01);随剂量增加,两种细胞生长受阻显著加强,浓度为 2.0 mM 时,HepG-2 及 HEK293 细胞存活率分别降至 6.3%±2.5%及 3.0%±2.7% (图 3-A)。海地瓜多肽对两种细胞均具有促进增殖作用,但主要表现在较高浓度条件下 (见图 3-B, C)。

综合细胞毒性及多肽对两株细胞的促增殖活性,本研究使用浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 多肽进行细胞培养实验,加 H₂O₂ 浓度至 1.0 mM,以浓度为 0.1 mg/mL 还原型谷胱甘肽 (GSH) 为阳性对照品,检测多肽抗 H₂O₂ 氧化损伤能力,以细胞存活率表示细胞活性,检测结果如图 4 所示。结果表明,海地瓜多肽对 HepG-2 及 HEK293 细胞抗 H₂O₂ 氧化损伤能力具有明显的增强作用,随分子量降低,海地瓜多肽对细胞抗 H₂O₂ 氧化损伤能力明显增强,小分子量 (<3 kDa) 多肽活性最高,这与 2.2 中 ABTS 法及 FRAP 法检测结果趋势一致;同时,0.1 mg/mL 阳性对照品 GSH 培养下,HepG-2 及 HEK293 细胞存活率分别为 63.4%±1.2%及 57.3%±2.1%,而实验组中样品浓度为 1.0 mg/mL 时,细胞存活率最高值为 44.9%±2.3%及 43.9%±3.3%,低于阳性对照组,说明相比 GSH,

海地瓜酶解多肽增强细胞抗 H₂O₂ 氧化能力比较有限,可能与海地瓜酶解多肽肽链相对比较长有关。综合研究结果显示,生化水平的 ABTS、FRAP 抗氧化活性检测结果与细胞培养实验结果的一致性较好,说明使用 ABTS 及 FRAP 检测海地瓜多肽抗氧化活性具有较好的可靠性,且其方法较细胞培养检测简便快速,具有很好的实用性。

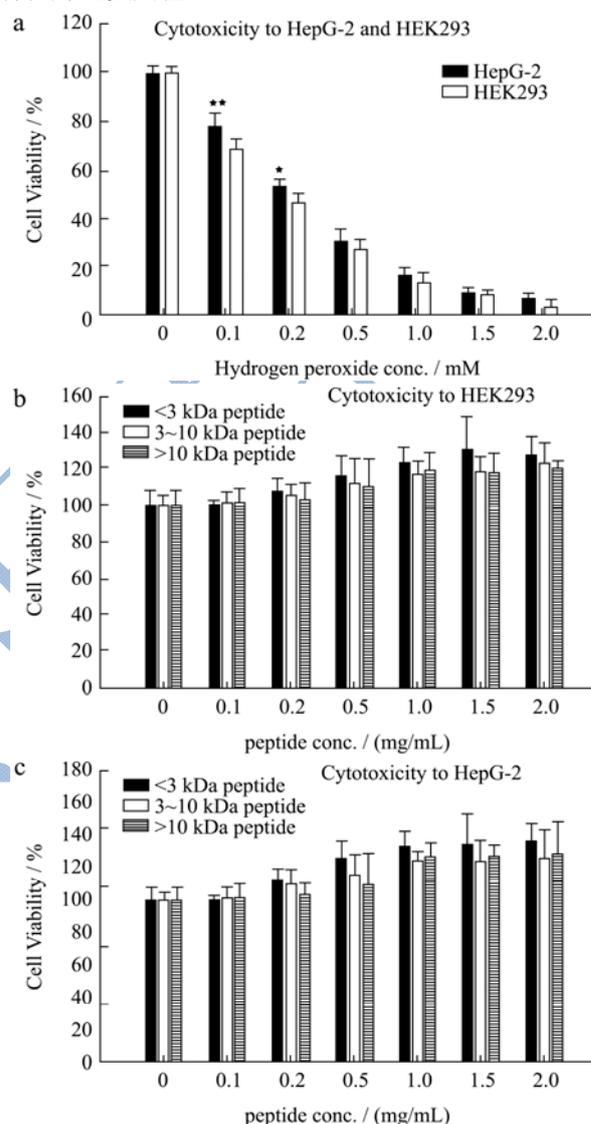


图 3 H₂O₂ 及三种海地瓜多肽 (分子量>10 kDa、3 k~10 kDa 及 <3 kDa) 对 HepG-2 和 HEK293 细胞毒性分析

Fig.3 Cytotoxicity of H₂O₂ and three compositions of *A. molpadioides* peptide (molecular weight >10 kDa, 3 k~10 kDa and <3 kDa) to HepG-2 and HEK293

注: *表示差异显著 (P<0.05), **表示差异极显著 (P<0.01), 数值为平均数±标准差, 每组取样数为 5。

图 4 中还可以发现,与 HepG-2 相比,低浓度海地瓜多肽对 HEK293 抗 H₂O₂ 氧化损伤活性增强更明显,如小分子量 (<3 kDa) 多肽浓度为 0.1 mg/mL 时,HEK293 细胞存活率从对照组的 12.0%±0.5%升至

23.6%±3.1%，升幅约 100%，而 HepG-2 细胞存活率从对照组 16.4%±0.4%升至 23.4%±3.1%，升幅约 43%；但到高浓度条件下，两种细胞检测数据差异并不明显。说明相对于 HepG-2 细胞，HEK293 细胞更加适合检测低浓度海地瓜多肽抗氧化活性，而对高浓度多肽检测的灵敏度并无优势。

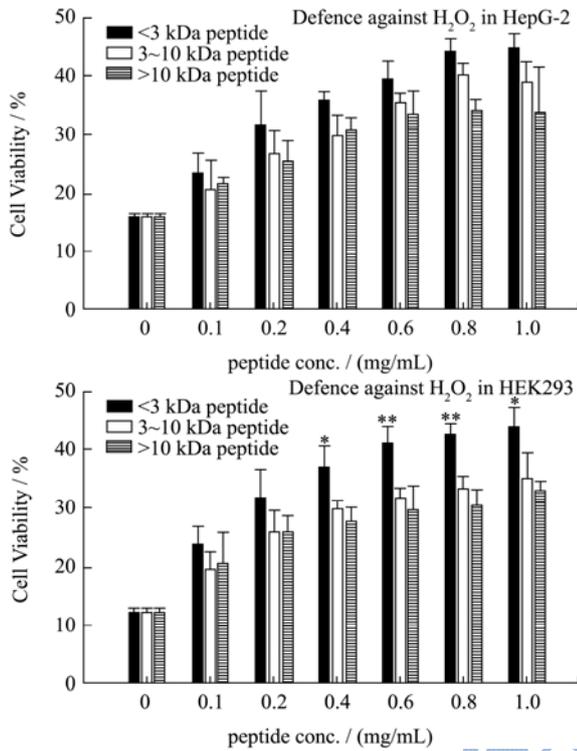


图4 三种海地瓜多肽（分子量>10 kDa、3 k~10 kDa及<3 kDa）对 HepG-2 和 HEK293 抗 H₂O₂ 氧化损伤活性分析

Fig.4 Analysis of anti H₂O₂ oxidative damage activity of three compositions of *A. molpadioides* peptide (molecular weight >10 kDa, 3 k~10 kDa and <3 kDa) in HepG-2 and HEK293

注：*表示差异显著（P<0.05），**表示差异极显著（P<0.01），数值为平均数±标准差，每组取样数为5。

2.4 小分子海地瓜多肽葡萄糖凝胶 G-25 层析分离

由 2.2 及 2.3 研究结果显示，海地瓜多肽组分中分子量<3 kDa 的小分子多肽，在生化水平及细胞水平的抗氧化活性均比大分子量多肽高。为进一步分析小分子多肽中多肽组分特征及其抗氧化活性，本研究采用 Sephadex G-25 葡糖糖凝胶柱层析（1.6×80 cm），对分子量<3 kDa 小分子海地瓜多肽进行分离纯化。本研究以 GSH 为标准品，以 274 nm 为检测波长，进行分离多肽样光谱检测；以 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL GSH 做标准曲线（如图 5）；以进样浓度 10%，进样量 3 mL，2.5 r/min 转速 0.6 mL/min 流量纯水洗脱，

5 min 收集 1 管分离样品，检测 Abs274 值并进行浓度分析（根据样品多肽吸收光谱扫描分析确定检测波长为 274 nm），获得如图 6 所示的分离峰图。结果，在色谱分离第 23、29、35、39、46 及 69 号收集管处出现六处峰值，标注为 F1、F2、F3、F4、F5 及 F6 号峰，其浓度分别达到 1.62、2.45、3.22、9.84、4.12 及 0.69 mg/mL。

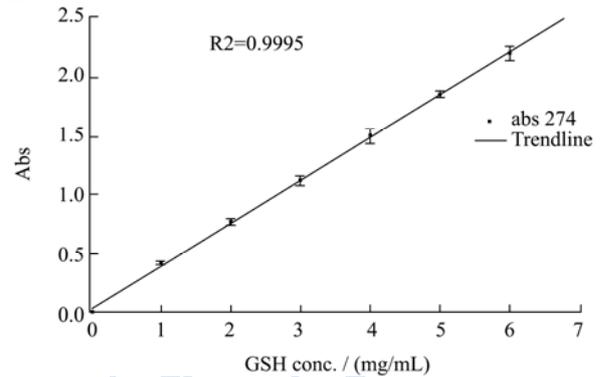


图5 不同浓度 GSH 标准曲线

Fig.5 Standard curve for peptide quantitation

注：数值为平均数±标准差，每组取样数为5。

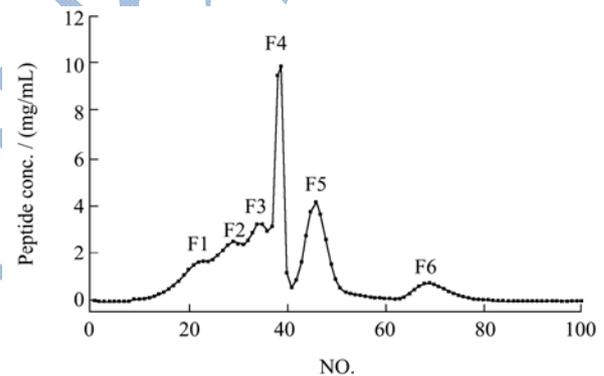


图6 海地瓜小分子多肽（<3 kDa）葡萄糖凝胶 G-25 色谱分离图

Fig.6 Glucose G-25 gel chromatography of *A. molpadioides* small peptides (<3 kDa)

2.5 小分子海地瓜多肽分离组分抗氧化活性分析

取分离获得的峰值处所在收集管及附近收集管内多肽样品（共计 12 份），根据检测浓度，均一化收集管内多肽溶液至 0.5 mg/mL 浓度，采用 ABTS 法及 FRAP 法快速检测纯化获得的海地瓜小分子多肽抗氧化活性，以 TEAC 值表示其活性大小，结果见图 7。图 7-A 为 ABTS 法检测的各分离组分抗氧化活性分析结果，数据显示，色谱分离图中浓度值最高的 F4 峰，多肽抗氧化活性最低，检测的两个样品中，39 号管收集的多肽 TEAC 值仅为 0.13±0.06 mmol Trolox/g；浓

度值次高的 F5 峰, 多肽抗氧化活性最高, 检测的两个样品中 46 号管收集的多肽 TEAC 值达 1.35 ± 0.12 mmol Trolox/g; 其他 F1、F2 及 F3 峰多肽抗氧化活性较高, 而 F6 峰多肽抗氧化活性与 F4 峰多肽相近。与 ABTS 法检测结果相比, FRAP 法总抗氧化活性检测 TEAC 值总体相对较低 (见图 7-B), 6 个色谱分离峰中的多肽样品抗氧化活性特征与 ABTS 法测得结果一致; 其中 F5 峰的 46 号管收集的多肽样品抗氧化活性最高, TEAC 值为 0.45 ± 0.04 mmol Trolox/g; F4 峰的 39 号管收集的多肽样品抗氧化活性最低, TEAC 值为 0.11 ± 0.01 mmol Trolox/g。

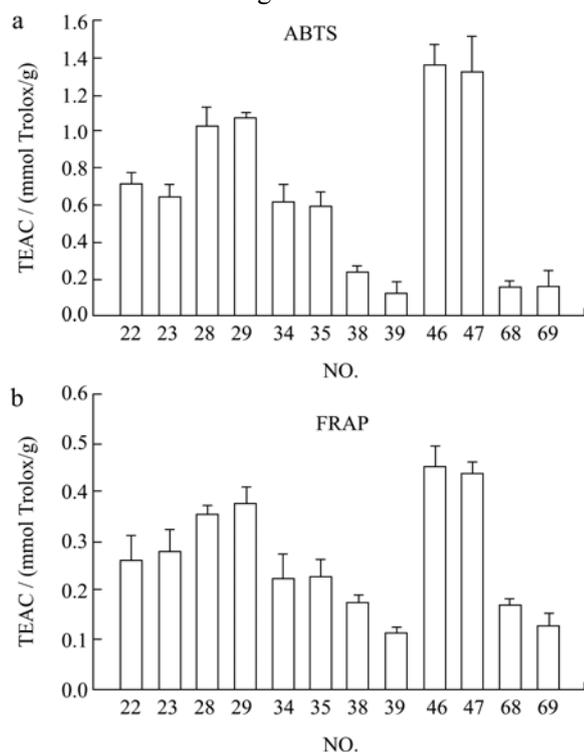


图7 海地瓜小分子多肽分离组分抗氧化活性 (ABTS 法 (a) 及 FRAP 法 (b) 检测)

Fig.7 Total antioxidant activity of separated components of *A. molpadioides* small peptides (ABTS-A, FRAP-B)

注: 数值为平均数±标准差, 每组取样数为 5。

3 结论

海地瓜蛋白质含量高, 富含必需氨基酸, 是值得深入开发的优质水产蛋白源。研究采用双酶酶解工艺制备海地瓜多肽, 采用超滤膜分级分离制备了分子量 >10 kDa、 3 k~ 10 kDa 及 <3 kDa 三种分子量大小的多肽样品, 经过 ABTS、FRAP 总抗氧化活性检测以及对 HepG-2、HEK293 两种细胞抗 H_2O_2 氧化损伤活性特征分析, 认为分子量 <3 kDa 的小分子海地瓜多肽具有明显的抗氧化功能活性, 经 G-25 凝胶层析分离纯化及总抗氧化活性分析, 发现小分子多肽中具有抗

氧化活性很高的活性组分。采用的生化水平检测结果与细胞水平检测结果基本一致, 说明海地瓜具有较好的研究价值, 应对这一资源丰富的低值原料进行更好的开发利用。

参考文献

- [1] 廖玉麟. 中国动物志, 棘皮动物门, 海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997
- [2] 伏伟华, 吴凤梧, 戚宝凤, 等. 海地瓜的研究- II 海地瓜与黄玉海参营养成分的比较[J]. 中国海洋药物, 1994, 51(3): 28-30
- [3] ZOU Z Z, YH Y I. Study on the chemical constituents of *Acaudina molpadioides* Semper [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2004, 2(6): 348-350
- [4] 赵兴坤. 海参肽的功能特性及其应用[J]. 中国食物与营养, 2003, 12: 31-33
- [5] ZHAO Xing-kun. Functional Characteristic and application of sea cucumber peptide [J]. Food and Nutrition in China, 2003, 12: 31-33
- [6] Zhao Y, Li B, Liu Z, et al. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(12): 1586-1591
- [7] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247
- [8] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2007, 39(1): 44-84
- [9] 赵芹. 海参胶原蛋白多肽抗氧化活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008
- [10] ZHAO Qin. Study on antioxidation activity of collagen polypeptides from sea cucumber [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008
- [9] 王静, 张京楼, 金海珠. 海参多肽的抗氧化性能研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(2): 67-71
- [10] WANG Jing, ZHANG Jing-lou, JIN Hai-zhu. Antioxidant activity of peptide fractions from sea cucumber protein hydrolysates [J]. Food & Machinery, 2010, 26(2): 67-71

- 自由基功能研究[J].中国食品学报,2010,1:19-25
- Chen Hui-hui, Yu Ping, Li Jian-rong. The preparation of collagen polypeptide with free radical scavenging ability purified from *Acaudina Molpadioides semper* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 1: 19-25
- [11] Arnao M B, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2001, 73(2): 239-244
- [12] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Analytical biochemistry, 1996, 239(1): 70-76
- [13] Dash R, Acharya C, Bindu P C, et al. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts [J]. BMB Rep, 2008, 41(3): 236-241
- [14] Liu Y, Nair M G. An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds [J]. Journal of Natural Products, 2010, 73(7): 1193-1195
- [15] 王永辉,李培兵,李天,等.刺参的营养成分分析[J].氨基酸和生物资源,2010,32(4):35-37
- Wang Yong-hui, Li Pei-bing, Li Tian, et al. Study on nutritional components of *Stichopus japonicus* [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2010, 32(4): 35-37
- [16] 王远红,王聪,郭丽萍,等.海参科(Holothuriidae)中4种海参的营养成分分析[J].中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(7): 111-114
- Wang Yong-hong, Wang Cong, Guo Li-ping, et al. Analysis of the nutritional components in four kinds of holothuroidea [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(7): 111-114
- [17] Liu R, Wang M, Duan J, et al. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from *Cornu Bubali* (water buffalo horn) [J]. Peptides, 2010, 31(5): 786-793