

# 克氏螯虾虾头Protamex蛋白酶水解产物的 抗氧化活性和功能性质研究

李松林

(淮阴工学院食品工程系, 南京大学淮安高新技术研究院, 江苏淮安 223003)

**摘要:** 使用 Protamex 蛋白酶对克氏螯虾虾头蛋白进行水解, 以制备抗氧化活性肽。结果表明: 虾头蛋白肽的还原力、 $\text{Fe}^{2+}$  整合力和 DPPH 自由基清除能力与蛋白肽的浓度之间存在量效关系, 均随着肽浓度的增大而增大。通过对蛋白肽的分子量分布进行研究, 发现, 95.14% 的多肽的分子量小于 1000 Da。同时测定了酶解产物的功能特性, 结果表明 pH 对虾头蛋白水解物的溶解性、起泡性和乳化性具有显著影响。

**关键词:** 抗氧化活性; 功能特性; 克氏螯虾虾头; 分子量分布

**文章编号:** 1673-9078(2013)4-729-732

## Antioxidant Activity and Functional Properties of the Hydrolysate of Crayfish (*Procambarus clarkia*) Head Protein Prepared with Protamex

LI Song-lin

(Department of Food Engineering, Faculty of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, High-Tech Research Institute of Nanjing University, Huaian 223003 China)

**Abstract:** Protamex was used as biocatalyst to hydrolyze the crayfish (*Procambarus clarkia*) head protein (CHP) to prepare antioxidant peptides. The antioxidant activities of crayfish (*Procambarus clarkii*) head protein hydrolysate (CHPH), including reducing power,  $\text{Fe}^{2+}$  chelating activity, DPPH radical scavenging activity, increased with increasing the hydrolysate concentration. The molecular weight distribution of CHPH revealed that 95.14% of the total amount was peptides with molecular weight lower than 1000 Da. And pH values had a significant effect on solubility, foaming capacity and emulsion activity of the hydrolysate.

**Key words:** antioxidant activity; functional properties; procambarus clarkia head; molecular weight distribution

克氏原螯虾, 原产于北美洲, 1929年由日本引入到我国<sup>[1]</sup>。克氏螯虾味道鲜美, 营养丰富, 带动了我国龙虾养殖业和出口冻虾仁加工业的发展。然而, 冻虾仁加工中有接近虾质量80%的大量虾头、虾壳被废弃, 造成了严重的浪费和环境污染。据报道虾头中含粗蛋白13.13%, 粗脂肪4.5%, 甲壳质10~15%和壳聚糖7.5%, 同时含有虾油、虾青素和各种氨基酸等<sup>[2]</sup>。江苏盱眙龙虾资源丰富, 年产量可达10000 t以上。随着克氏螯虾虾仁加工企业生产规模的提高和产量的扩大, 产生了大量的虾头废弃物。如果不对虾头进行处理, 既造成了资源的浪费, 又导致污染环境。

蛋白质类天然抗氧化剂物质中最有前途的当属肽类, 肽类不仅在油溶体系中有良好的增效作用, 而且

在水溶体系、乳化体系及干燥体系中也有较高的抗氧化活性。许多研究证实, 氧化与人类及其他动物的许多疾病, 诸如癌症、老化、风湿性关节炎等的发病机理有关<sup>[3]</sup>。人体通过适当摄入具有抗氧化活性的物质, 可以降低体内自由基水平, 防止脂质过氧化, 帮助机体抵御疾病<sup>[4]</sup>。由于化学合成抗氧化剂可能具有潜在的毒性, 因此人们更加关注天然抗氧化剂的开发与应用。

本研究运用 Protamex 蛋白酶对克氏螯虾虾头蛋白进行水解, 获得了抗氧化活性肽, 并测定了其抗氧化活性和功能性质, 为从废弃虾头中提取天然的抗氧化剂提供了理论依据, 同时为进一步分析研究虾头蛋白抗氧化肽的结构及其作用机理提供了基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

克氏螯虾虾头, 江苏淮安盱眙县; Protamex 蛋白

收稿日期: 2012-11-14

基金项目: 江苏淮安科技支撑项目(农业: SN1172)

作者简介: 李松林(1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为食品资源的开发与利用

酶, 南宁庞博生物工程有限公司; 菲洛嗪, 丹麦诺维信公司; DPPH (二苯代苦味酰基自由基), GSH (谷胱甘肽), ABTS (2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐), 美国 Sigma-aldrich 公司; 其他试剂均为分析纯。

HH-600 数显恒温水浴锅, UV752N 紫外可见分光光度计, 上海精科实业有限公司; FreeZone 6 L 真空冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; FA-2104N 电子分析天平, 上海精密科学仪器有限公司; eppendorf 5430 台式高速离心机, 艾本德中国有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 虾头蛋白肽的制备工艺

虾头→干燥→研磨→虾头粉→脱脂虾头→碱提酸沉→离心→沉淀物真空冷冻干燥→虾头蛋白→酶解→灭酶(100 °C 水浴, 10 min)→离心(10000 r/min, 30 min)→上清液→浓缩→真空冷冻干燥→虾头蛋白肽

其中酶解条件为: 酶/底物=1:500, 虾头粉/水=1:7, 温度 55 °C, pH=7.0, 时间 t=320 min。酶解反应完成后, 对水解产物的水解度 (degree of hydrolysis, DH) 进行测定<sup>[5]</sup>。

### 1.2.2 虾壳蛋白肽抗氧化功能评价

DPPH· 自由基清除能力测定<sup>[6]</sup>, 还原能力测定<sup>[6]</sup>, Fe<sup>2+</sup>螯合力测定<sup>[7]</sup>。

### 1.2.3 虾头蛋白肽功能特性评价

pH-溶解度的测定<sup>[8]</sup>, 泡沫形成能力的测定<sup>[9]</sup>, 乳化性测定<sup>[10]</sup>。

### 1.2.4 水解物的分子量分布

采用高效凝胶渗透色谱法测定, 色谱柱: TSK gel G2000 SWXL (7.8 mm×30 cm)。洗脱液: 水/乙腈/三氟乙酸 (55:45:0.1, v/v/v)。柱温为室温, 流速为 0.5 mL/min。检测波长: 220 nm。制作标准曲线的标准样品: Gly-Gly-Gly (189 Da), Gly-Gly-Tyr-Arg (451 Da), 杆菌肽 (1450 Da) 和细胞色素 C (12384 Da)。

## 2 结果与分析

### 2.1 还原力

由图 1 可知, 虾头蛋白酶水解产物 (DH=13.6%) 具有较强的还原能力, 而且与样品的浓度呈现出明显规则的递增趋势。但是在 0~1 mg/mL 的浓度范围内, CHPH 的还原力要低于对照品 BHT。这可能是由于 CHPH 是多肽混合物, 其中某些多肽只有较弱或者无还原力。Binsan 等人报道, 凡纳滨对虾的头胸部中的生物活性提取物的还原力同样与提取物的浓度具有线性递增趋势<sup>[11]</sup>。

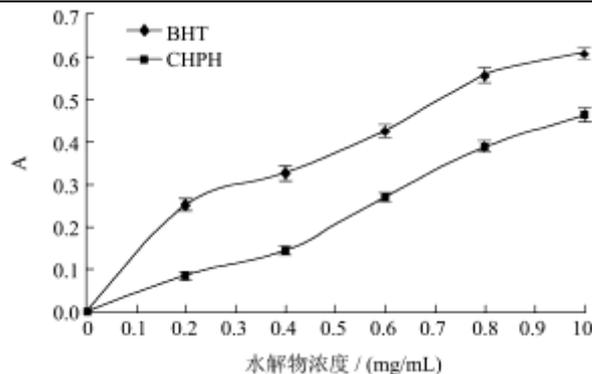


图1 克氏螯虾虾头水解物的还原能力

Fig.1 Reducing power of CHPH

### 2.2 Fe<sup>2+</sup>螯合力

菲洛嗪与Fe<sup>2+</sup>会形成复合物, 螯合剂可以阻断此复合物的形成, 导致复合物颜色逐渐变淡, 因此可以通过颜色的变化来评价螯合剂的金属离子螯合能力<sup>[12]</sup>。由图2所示, 虾头蛋白水解物的Fe<sup>2+</sup>螯合力随着浓度的增大而增大。虽然螯合能力低于EDTA, 但是在浓度为 6.0 mg/mL时, 其Fe<sup>2+</sup>螯合力达到了83%以上。

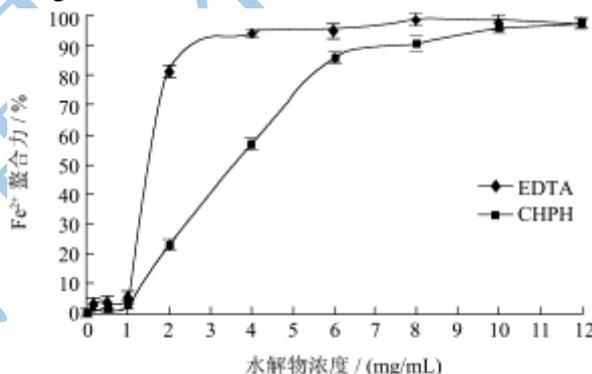


图2 克氏螯虾虾头水解物的Fe<sup>2+</sup>螯合能力

Fig.2 Fe<sup>2+</sup>-chelating activity of CHPH

### 2.3 对 DPPH· 自由基的清除能力

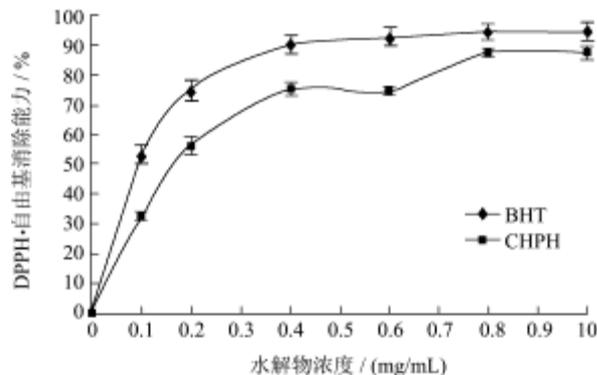


图3 克氏螯虾虾头水解物的DPPH· 自由基清除能力

Fig.3 Scavenging effect of CHPH on DPPH

DPPH· 自由基清除实验被广泛应用于测定蛋白水解物的抗氧化性。如图 3 所示, 对 CHPH 在不同浓度下的 DPPH· 自由基清除活力进行了测定, 同时使用 BHT 作为自由基清除的对照。虾头蛋白肽的自由基清

除活力具有一定的剂量效应,随着水解物浓度的增加,其 DPPH 自由基清除能力呈现递增的趋势。IC<sub>50</sub>(即自由基清除能力达到 50%时所需酶解样品的浓度)被广泛用于测定自由基清除功效。IC<sub>50</sub> 越低,表明该物质的自由基清除能力越高。在本实验中,虾头蛋白水解物的 IC<sub>50</sub> 为 0.175 mg/mL,高于 BHT (IC<sub>50</sub>=0.095 mg/mL)。这是由于 BHT 本身为强抗氧化剂,而虾头蛋白肽是由不同的多肽混合物组合而成。其中某些分子量范围的多肽可能具有较强的自由基清除活力,然而其中可能还包括某些多肽只有较弱的清除活力,甚至不具有活力。

#### 2.4 虾壳蛋白水解物分子量分布

多肽的分子量大小与其抗氧化性具有一定的相关性。如图4和表1所示,95.14%的虾头蛋白水解物的分子量小于1000 Da。这说明水解物中包含了大量的低分子量多肽。这些低分子量多肽中分子量小于180 Da的比例为45.15%,37.68%的多肽分子量为180~500 Da,12.31%的多肽分子量为500~1000 Da。Gao等人报道了棉籽蛋白水解物中,由分子量为0.8~1.2 kDa组成的多肽具有最强的抗氧化性活力<sup>[3]</sup>。因此,虾头水解物的抗氧化性活力可能主要来源于分子量小于1000 Da的多肽部分。

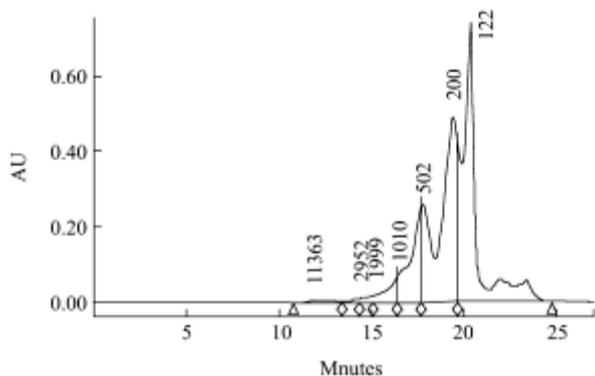


图4 虾壳蛋白水解物的分子量分布

Fig.4 Molecular weight distribution profile of CHPH

表1 虾头白水解物的分子量分布

Table 1 Molecular weight distribution profile of CHPH

分子量/Da	多肽比例/%
<180	45.15
180~500	37.68
500~1000	12.31
1000~2000	3.19
2000~3000	0.72
3000~5000	0.44
>5000	0.51
<1000	95.14

#### 2.5 溶解度

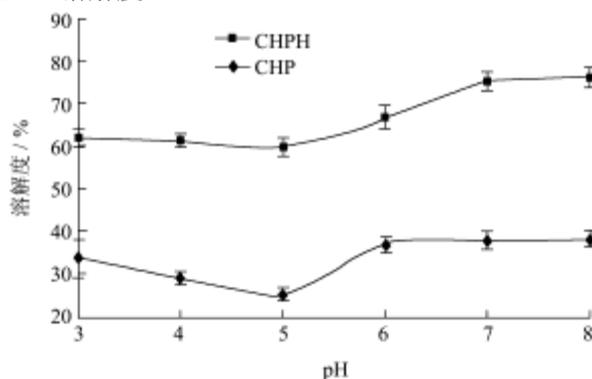


图5 克氏螯虾虾头水解物的在不同 pH 条件下的溶解度

Fig.5 Solubility of CHPH prepared with Protamex at different pH

不同pH条件下的虾头蛋白溶解性曲线如图5所示。溶解度是蛋白质最主要的功能性质之一,可以反映出蛋白质表面的亲水集团和疏水集团之间的平衡<sup>[4]</sup>。图2反映了未处理过的CHP在pH=5附近具有最低溶解度值25%。在pH=3~8的范围内,CHPH的溶解度大于57%。当pH=5时,同样具有最低溶解度;而在pH=8时,溶解度达到了80%。这说明pH值对水解物的溶解度具有重要的影响。

#### 2.6 起泡性

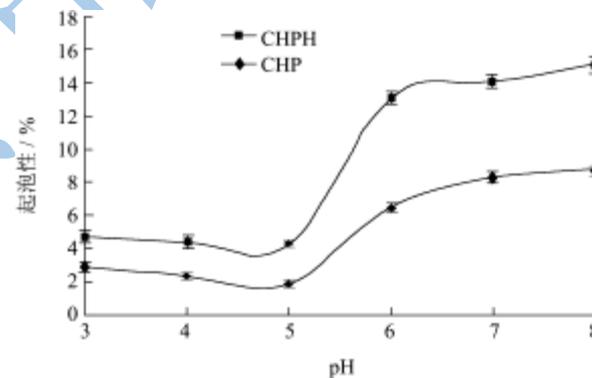


图6 克氏螯虾虾头水解物的在不同 pH 条件下的起泡性

Fig.6 Foaming capacity of CHPH prepared with Protamex at different pH

由图6所示,pH值对CHP和CHPH的起泡性均具有显著的影响。其中在pH=5时,两者的起泡性最低。这与两者在不同pH值下的溶解度保持一致。这可能是因为在低溶解度的蛋白质不能迅速移动到空气/水的接触界面,因此导致了较低的起泡性。随着pH值的继续增大(pH=5~8),起泡性快速增加。在pH=8时,CHPH的起泡性到达了18%左右。Li等人在对草鱼蛋白的水解物进行起泡性研究时,同样发现起泡性随着pH值的增加而增加(pH=4~8)<sup>[15]</sup>。

#### 2.7 乳化性

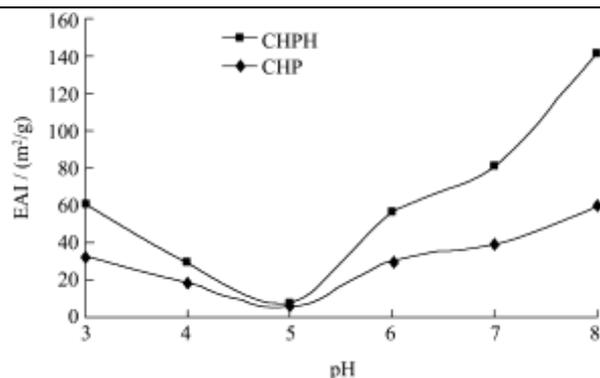


图7 克氏螯虾虾头水解物的在不同 pH 条件下的乳化性

Fig.7 Emulsifying activity index of CHPH prepared with Protamex at different pH

如图7所示, pH对CHPH和CHP的乳化性具有显著的影响。与不同pH条件下的溶解度相似, 乳化性指数(EAI, emulsifying activity index)在pH=5时最低。同时, EAI随着蛋白溶解度的增大而增大。原因可能在于, 当pH=5时, 蛋白质溶解度最低而无法快速扩散并吸附在油/水界面。由于在不同pH条件下蛋白质溶解度的改变, 因此导致了EAI的变化。较低分子量的蛋白质容易扩散、并在界面发生吸附, 从而降低界面张力, 这可能是CHPH的乳化能力高于CHP的原因; 在较高pH条件下, 由于蛋白质所带负电荷使未能展开的蛋白质肽链相互排斥而在界面进行定向排列, 这样有利于肽链中亲水和疏水氨基酸残基的暴露, 促进其在油/水界面的作用, 降低表面张力。这可能是CHPH在较高pH时乳化能力高的原因。

### 3 结论

通过酶解的方式水解克氏螯虾虾头蛋白, 可以得到具有抗氧化性的肽类。虾头蛋白肽的还原能力,  $Fe^{2+}$ 螯合力和自由基清除能力与蛋白肽的浓度之间存在着量效关系, 均随着水解物浓度的增大而增大。通过对水解物的分子量分布进行研究, 发现95.14%的多肽的分子量小于1000 Da。实验结果证明, 虾头蛋白水解物具有一定的抗氧化活性, 具有良好的功能特性, 为从虾头蛋白中提取天然抗氧化剂提供了有力的证据, 同时为进一步研究虾头蛋白抗氧化肽的结构和作用机理提供了基础。

### 参考文献

[1] 张爱军,沈继红.龙虾的综合加工利用[J].中国资源综合利用,2005,9:35-36  
[2] 罗梦良,钱名全.虾仁加工废弃的头、壳的综合利用[J].淡水

渔业,2003,33(6):59-60

- [3] J P Jia, Y G Zhou, J Z Lu, et al. Enzymatic hydrolysis of Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90: 635-640  
[4] 陈炳卿.营养与食品卫生学(第四版)[M].北京:人民卫生出版社,2002  
[5] Adler-Nissen J, Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. J Agric Food Chem 1979, 27: 1256-1263  
[6] A Yildirim, A Mavi, A A Kara. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 4083-4089  
[7] E A Decker, B Welch. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38: 674-677  
[8] V Morr, B German, J E Kinsella, et al. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure[J]. Journal of food science, 1985, 50: 1715-1718  
[9] 李娜,赵谋明,任娇艳.鲮鱼酶解可溶性蛋白营养特性及品质的研究[J].现代食品科技,2009,25(5):469-473  
[10] K N Pearce, J E Kinsella. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 26: 716-723  
[11] W Binsan, S Benjakul, W Visessanguan, et al. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Food Chemistry, 2008, 106: 185-193  
[12] F Yamaguchi, T Ariga, Y Yoshimira, et al. Antioxidant and antiglycation of carcinol from *Garcinia indica* fruit rind [J]. Journal of Agriculture Food Chemistry, 2000, 48: 180-185  
[13] D D Gao, Y S Cao, H X Li. Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90: 1855-1860  
[14] 杨瑾,唐传核.鸡蛋清蛋白水解物的物化及功能性质的研究[J].现代食品科技,2011,27(11):1316-1319  
[15] X Li, Y K Luo, H X Shen, et al. Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92: 292-298