

## 黄缘盒龟肉的酶解工艺优化及其体外抗氧化活性研究

王艳梅<sup>1</sup>, 万全<sup>2</sup>, 赖年悦<sup>3</sup>, 林琳<sup>1</sup>, 叶应旺<sup>1</sup>, 姜绍通<sup>1</sup>, 陆剑锋<sup>1\*</sup>

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009;

2. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036;

3. 合肥市畜牧水产技术推广中心, 安徽 合肥 230022)

**摘要:** 龟类不仅营养价值高, 而且具有潜在的药用价值, 通过研究龟肉酶解产物的功能特性, 可以科学认识其营养保健功能。以黄缘盒龟肉为原料, 羟自由基清除率为指标, 碱性蛋白酶为水解酶, 通过正交试验  $L_9(3^4)$  得到制备抗氧化肽的最佳酶解条件为 pH 值 8.0、酶解温度 55 °C、料液比 1.5:20 g/mL、加酶量(酶/底物, E/S)3.0%、酶解时间 3 h, 酶解液对羟自由基清除率达到 82.08%。酶解产物体外抗氧化活性的结果表明, 酶解产物对羟自由基、超氧阴离子自由基、DPPH 自由基和过氧化氢均有较好的清除作用, 还具有一定的还原能力、亚铁离子螯合能力和亚油酸自氧化抑制能力。总体而言, 黄缘盒龟酶解产物在不同的体外抗氧化体系中都表现出一定的抗氧化效果, 具有良好的开发利用前景。

**关键词:** 黄缘盒龟; 龟肉; 蛋白酶; 酶解; 抗氧化性

**中图分类号:** S 986.2

**文献标志码:** A

黄缘盒龟 (*Cistoclemmys flavomarginata*), 又名黄缘闭壳龟、断板龟、克蛇龟、夹蛇龟、黄板龟、夹板龟等, 隶属爬行动物纲、龟鳖目、龟科、盒龟属, 国内主要分布于安徽、江苏、浙江、河南等少数几个行政区域, 国外主要分布于日本琉球群岛等地<sup>[1]</sup>。黄缘盒龟属于珍稀龟类, 具有一定的观赏价值; 以其为主要原料与中药配伍, 既能起到抗癌解毒的功效, 又能作为滋阴壮阳和延年益寿的高级滋补品, 可以防治多种疾病和疑难杂症, 且无任何副作用, 民间常作为“药龟”进行食用, 经济价值和营养价值极高<sup>[2]</sup>。目前, 对黄缘盒龟已经成功进行养殖和繁育<sup>[3]</sup>, 但有关其龟肉生理活性成分的研究尚属空白。

抗氧化肽能有效地清除体内过剩的活性氧自由基, 抑制脂质、蛋白质和 DNA 等生物大分子的过氧化, 预防和治疗自由基诱发的疾病, 如心血管疾病、糖尿病、癌症和老年痴呆症等<sup>[4-5]</sup>。近年来, 水产动物天然抗氧化肽已成为研究热点之一, 现已从日本金线鱼和翱翔飞鱼<sup>[6]</sup>、白鲢<sup>[7]</sup>、沙丁

鱼<sup>[8]</sup>、罗非鱼<sup>[9]</sup>、甲鱼<sup>[10]</sup>等原料中提取到抗氧化肽。研究表明, 采用酶解法制备的抗氧化肽具有抗氧化活性强和安全性高等特点。鉴于此, 本试验以黄缘盒龟为原料, 羟自由基清除率为指标, 确定了最佳水解酶, 通过优化酶解条件制备出抗氧化肽类, 并对其进行体外抗氧化活性的测定, 包括对羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、DPPH 自由基 (DPPH $\cdot$ )、过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 的清除能力和还原能力, 以及亚铁离子螯合能力和亚油酸自氧化抑制能力, 同时与常见的抗氧化剂 V<sub>C</sub> 和肌肽的抗氧化能力进行比较, 旨在为黄缘盒龟的精深加工及其综合利用提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

原料: 黄缘盒龟 [体质量 (473.12 ± 49.02) g, 水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量分别为 79.99%、18.12%、0.58% 和 0.7%] 由安徽省长

收稿日期: 2012-09-23 修回日期: 2013-01-17

资助项目: 国家星火计划重点项目 (2012GA710002); 安徽省 115 产业创新团队计划资助

通信作者: 陆剑锋, E-mail: lujf@sibs.ac.cn

江水生动物保护研究中心提供。

试剂:胃蛋白酶、胰蛋白酶——国药集团化学试剂有限公司;中性蛋白酶、碱性蛋白酶——北京奥博星生物技术有限责任公司;风味蛋白酶、木瓜蛋白酶——南宁庞博生物工程有限公司;DPPH Sigma 公司;抗坏血酸( $V_c$ )——天津博迪化工股份有限公司;肌肽——合肥博美生物科技有限责任公司;其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

PHS-3C 精密 pH 计——上海大普仪器有限公司;CT15RT 高速冷冻离心机——上海天美生化仪器设备工程有限公司;722E 型可见分光光度计、752 型紫外可见分光光度计——上海光谱仪器有限公司;FD-1B-50 冷冻干燥机——北京博医

康实验仪器有限公司。

### 1.3 酶解液的制备工艺

黄缘盒龟→宰杀→去除内脏、皮膜→切碎龟肉→调节料液比→调节 pH 值→加酶→保温酶解(不断调节 pH 值,使酶解过程在初始 pH 值下进行)→沸水浴灭酶 10 min→高速离心(10 000 r/min 10 min)→酶解液

### 1.4 蛋白酶的选择

取 1 g 黄缘盒龟肉置于 50 mL 三角瓶中,加入 20 mL 蒸馏水,调节至各酶的适宜 pH 值及温度(表 1),酶添加量(酶/底物, E/S) 2.0%,酶解 3 h,灭酶,离心,定容,测定  $\cdot OH$  清除率,以此评价酶解效果(最适酶的  $\cdot OH$  清除率最大)。

表 1 6 种不同蛋白酶的适宜酶解条件

Tab.1 Suitable hydrolytic conditions for six different proteases

酶的种类 enzyme	胃蛋白酶 pepsin	胰蛋白酶 trypsin	中性蛋白酶 neutralse	碱性蛋白酶 alcalase	风味蛋白酶 flavourzyme	木瓜蛋白酶 papain
pH	2.0	8.0	7.0	7.5	7.0	7.0
温度/ $^{\circ}C$ temperature	37	50	50	55	50	55

### 1.5 碱性蛋白酶酶解工艺条件优化

碱性蛋白酶酶解黄缘盒龟肉单因素试验的基本条件设定为料液比 1:20 g/mL、pH 值 7.5、酶解温度 55  $^{\circ}C$ 、加酶量 (E/S) 2.0%、酶解时间 3 h。通过改变其中一个条件,固定其他条件以分析各单因素对  $\cdot OH$  清除率的影响,并用优化出的因素水平替换基本条件中的各因素水平进行逐一的单因素试验。各因素的水平梯度分别为:料液比

0.5:20、1.0:20、1.5:20、2.0:20、2.5:20 g/mL; pH 值 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5;酶解温度 45、50、55、60、65  $^{\circ}C$ ;加酶量 (E/S) 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%;酶解时间 1、2、3、4、5 h。

根据单因素试验设计正交试验,确定碱性蛋白酶制备黄缘盒龟肉抗氧化肽的工艺条件。 $L_9(3^4)$  正交试验设计的各因素及水平排列见表 2。

表 2 正交试验因素水平表

Tab.2 Factors and levels for the orthogonal design

水平 level	因素 factor			
	A	B	C	D
	pH	温度/ $^{\circ}C$ temperature	加酶量 (w/w)/% enzyme-to-substrate ratio	料液比 (w/v)/(g/mL) material-to-liquid ratio
1	7.5	50	2.0	1.0:20
2	8.0	55	2.5	1.5:20
3	8.5	60	3.0	2.0:20

### 1.6 酶解产物抗氧化活性测定

用优化出的工艺条件水解黄缘盒龟肉,对得到的酶解液进行冷冻干燥,将冻干样品密封于  $-20^{\circ}C$  下保存。通过测定清除  $\cdot OH$  能力、清除  $O^{2-}$  能力、清除 DPPH  $\cdot$  能力、清除  $H_2O_2$  能力、

还原能力、螯合亚铁离子能力和抑制亚油酸自氧化能力来综合反映黄缘盒龟肉酶解液中抗氧化肽的抗氧化性及抗氧化作用模式,并将酶解产物与常见的抗氧化剂  $V_c$  和肌肽的抗氧化性进行比较研究,分析它们之间抗氧化活性的差异。

羟自由基清除活性的测定<sup>[10]</sup> 采用可见光分光光度法。在试管中分别加入 0.5 mL 10 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、0.5 mL 样品液、0.5 mL 10 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液、3.5 mL 蒸馏水,最后加入 5 mL 100 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动 Fenton 反应,振荡混合,水浴 37 °C 保温 30 min 后,在 510 nm 处测定吸光度 A<sub>1</sub>;取 0.5 mL 蒸馏水代替 10 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液,测得的吸光度为 A<sub>2</sub>;取 0.5 mL 蒸馏水代替样品液,测得的吸光度为 A<sub>3</sub>。  
·OH 清除率的计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_3] \times 100$$

超氧阴离子自由基清除活性的测定<sup>[10]</sup> 采用邻苯三酚自氧化法测定。取 4.5 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)、4.2 mL 蒸馏水,混匀后在 25 °C 水浴中保温 20 min,取出后立即加入 0.3 mL 已在 25 °C 水浴中预热过的 30 mmol/L 邻苯三酚(以 10 mmol/L HCl 配制)。空白管用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液,迅速摇匀后倒入比色杯,在 325 nm 处每隔 30 秒测定吸光度,计算线性范围内每分钟吸光度的增加值。在加入邻苯三酚前,先加 1 mL 样品液,蒸馏水相应减少 1 mL。O<sup>2-</sup>·清除率的计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = (\Delta A_0 - \Delta A)/\Delta A_0 \times 100$$

式中,ΔA<sub>0</sub> 为空白溶液的吸光度随时间的变化率;ΔA 为样品溶液的吸光度随时间的变化率。

DPPH 自由基清除活性的测定<sup>[11]</sup> 将样品液 2 mL 及 2 mL 1 × 10<sup>-4</sup> mol/L DPPH·溶液(95% 乙醇配制)加入同一具塞试管中摇匀,室温下密闭静止 30 min,在 517 nm 波长处测定吸光度,以 2 mL 95% 乙醇和 2 mL 蒸馏水的混合溶液为参比。DPPH·清除率的计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

式中,A<sub>1</sub> 为样品液 + DPPH·溶液的吸光度;A<sub>2</sub> 为样品液 + 95% 乙醇溶液的吸光度;A<sub>0</sub> 为 DPPH·溶液 + 蒸馏水的吸光度。

还原能力的测定<sup>[12]</sup> 取一定浓度的样品 2 mL,加入 2.5 mL 0.2 mol/L pH 6.6 的磷酸盐缓冲液和 2.5 mL 1% 的铁氰化钾溶液,混匀,在 50 °C 保温 20 min 后加入 2.5 mL 10% 的三氟乙酸,混合后以 3 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.5 mL,加 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% FeCl<sub>3</sub>,在 700 nm 波长处测定吸光度。吸光度越

大,则还原能力越强。

过氧化氢清除活性的测定<sup>[13]</sup> 样品溶于 3.4 mL 磷酸缓冲液(pH 7.4)中,然后加入 0.6 mL 4 mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,混匀,放置 10 min 后,在 230 nm 处测定吸光度。对照为不加样品的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率的计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = (A_c - A_s)/A_c \times 100$$

式中,A<sub>c</sub> 为不加样品的吸光度;A<sub>s</sub> 为加入样品的吸光度。

亚铁离子螯合能力的测定<sup>[14]</sup> 参照 Dong 等<sup>[14]</sup>的方法,并略作修改。2 mL 不同浓度的样品与 2.8 mL 蒸馏水混合,然后加入 0.1 mL 2 mmol/L FeCl<sub>2</sub> 和 0.1 mL 5 mmol/L 菲洛嗪,反应 10 min 后,在 562 nm 处测定吸光度。亚铁离子螯合能力的计算公式如下:

$$\text{螯合能力}(\%) = (A_c - A_s)/A_c \times 100$$

式中,A<sub>c</sub> 为不加样品的吸光度;A<sub>s</sub> 为加入样品的吸光度。

亚油酸自氧化抑制能力的测定<sup>[15]</sup> 取不同浓度的样品溶液 0.5 mL,加入 2.0 mL 亚油酸乳化液(2.5 mL 亚油酸溶于 100 mL 95% 的乙醇中),与 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液溶液 4.0 mL 在具塞试管中混匀,混匀后于 60 °C 避光反应 24 h。取 50 μL 反应液,依次加入 4.0 mL 75% 的乙醇,50 μL 30% 的硫氰酸铵和 50 μL 20 mmol/L FeCl<sub>2</sub>(溶于 3.5% HCl),震荡混匀,3 min 后,在 500 nm 处测定吸光值。吸光值越小,说明样品对亚油酸的自氧化抑制能力越强。

## 1.7 数据统计分析

每个试验重复 3 次,结果取平均值。数据统计分析采用 Excel 软件进行,显著性水平  $P < 0.05$ ,极显著性水平  $P < 0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶的选择

由图 1 可知,龟肉水溶液(未添加酶,即对照)的·OH 清除率仅为 10.03%,而在各种酶的适宜条件下,碱性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解得到的酶解液·OH 清除率均高于 40%,其中碱性蛋白酶的酶解液·OH 清除率最高(47.15%)。通过方差分析可知,碱性蛋白酶与胰蛋白酶、木瓜蛋白酶所得酶解液对·OH 清除率分别存在显著性差异和极显著性差异,且相比

较而言,这3种酶中碱性蛋白酶的价格最低,因此本试验选用碱性蛋白酶作为水解酶。

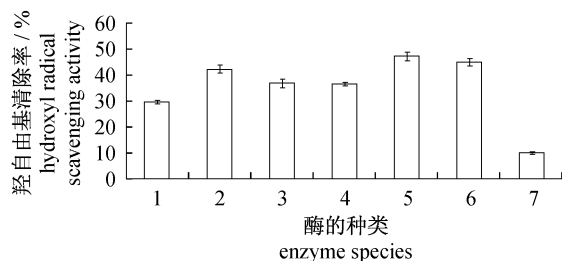


图1 不同蛋白酶水解液清除羟自由基能力比较

1. 胃蛋白酶, 2. 木瓜蛋白酶, 3. 中性蛋白酶, 4. 风味蛋白酶, 5. 碱性蛋白酶, 6. 胰蛋白酶, 7. 对照。

Fig.1 Hydroxyl radical scavenging abilities of hydrolysates by different proteases

1. pepsin, 2. trypsin, 3. neutrase, 4. alcalase, 5. flavourzyme, 6. papain, 7. control.

## 2.2 单因素试验

**pH 值对羟自由基清除率的影响** 同一种酶在酶解时的最适 pH 值并不是一个常数,最适 pH 值因底物种类的不同而不同<sup>[16]</sup>。由图 2 可知,·OH 清除率先随 pH 值的增大而升高,在 pH 8.0 时,·OH 清除率达到最大,随后开始呈现下降趋势。这可以从 pH 值与酶催化的关系上解释,即在不同的 pH 值条件下,底物分子和酶分子中基团的解离状态不同,从而影响酶与底物的结合能力以及酶分子的催化能力。通常,酶只在适宜的 pH 值范围内,才能显示其催化活性,当在最适 pH 值条件下,酶催化反应速度达到最大。因此在酶解开始时要先调好 pH 值,以使酶解效果达到最好。从试验结果看,pH 8.0 较佳。

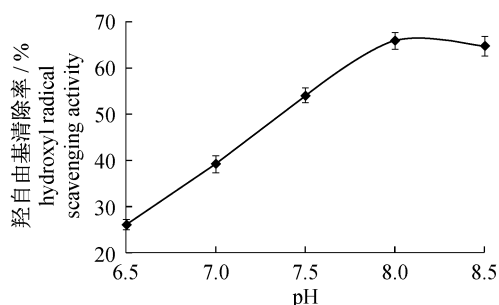


图2 pH 值对羟自由基清除率的影响

Fig.2 Effect of pH on hydroxyl radical scavenging activity

**酶解温度对羟自由基清除率的影响** 由图 3 可知,·OH 清除率随温度的升高呈先上升后下降的趋势。在蛋白酶解过程中,温度影响蛋白酶催化反应的速度和酶的稳定性。温度升高,反应速度会加快,但酶是一种具有生物活性的蛋白质,温度过高会使酶的特异性结构发生改变,酶的活性会降低甚至失活,从而影响反应速度<sup>[17]</sup>。从耗能角度看,酶解温度 55 °C 最佳。

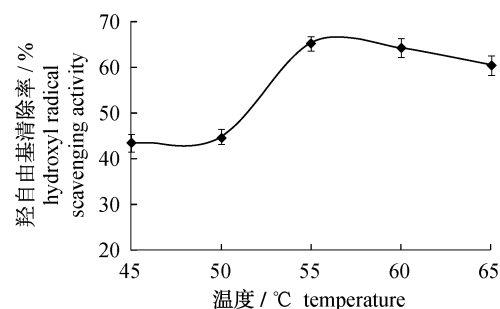


图3 温度对羟自由基清除率的影响

Fig.3 Effect of temperature on hydroxyl radical scavenging activity

**加酶量对羟自由基清除率的影响** 由图 4 可知,随着加酶量的不断增加,·OH 清除率不断上升,但当加酶量达到 2.5% 时,·OH 清除率的增加趋于平缓,因此从成本角度考虑,选择加酶量为 2.5% 比较合理。

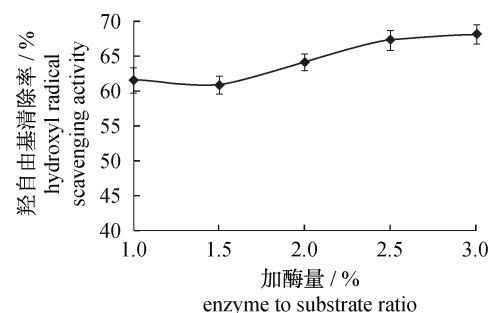


图4 加酶量对羟自由基清除率的影响

Fig.4 Effect of enzyme-to-substrate ratio on hydroxyl radical scavenging activity

**时间对羟自由基清除率的影响** 酶的催化速度会受到产物的影响,反应初期,产物的抑制作用小,随着时间的延长,酶活力逐渐下降,游离小肽和氨基酸增多,产物的抑制作用增加<sup>[18]</sup>。由图 5 可知,反应进行 3 h 后,·OH 清除率随时间的延长呈缓慢下降的趋势,因此选择 3 h 为最佳酶解时间。

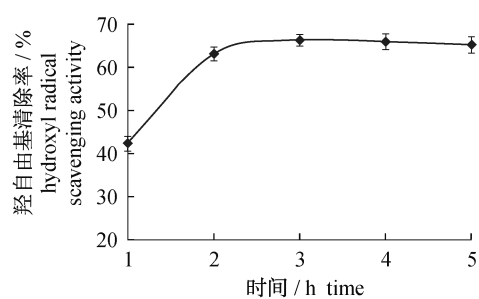


图5 时间对羟自由基清除率的影响

Fig.5 Effect of time on hydroxyl radical scavenging activity

料液比对羟自由基清除率的影响 由图6可知,当料液比为1.5:20 g/mL时,·OH清除率达到最高。当料液比减小时,·OH清除率也随着减小,这是因为随着水过多的加入,酶的有效质量浓度降低,结果反应速度降低,蛋白降解产物中抗氧化肽生成量减少;当料液比大于1.5:20 g/mL时,·OH清除率也呈下降趋势,这是因为酶解反应中水量过少,不利于蛋白质分子的溶解和

伸展,结果用于酶解的反应位点减少,影响了抗氧化活性肽的生成量或种类<sup>[19]</sup>。从成本角度看,料液比1.5:20 g/mL最佳。

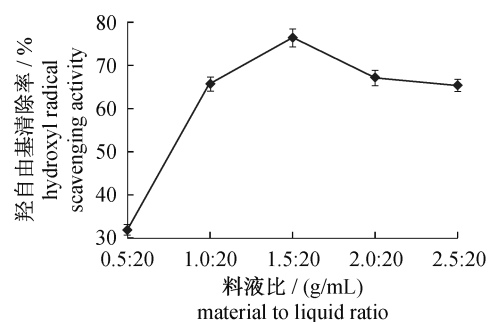


图6 料液比对羟自由基清除率的影响

Fig.6 Effect of material-to-liquid ratio on hydroxyl radical scavenging activity

### 2.3 正交优化试验

正交试验设计及结果见表3,对试验结果进行方差分析见表4。

表3 正交试验设计及结果

Tab.3 Design and results of orthogonal experiment

序号 no.	酶解条件 conditions of hydrolysis				羟自由基清除率/% hydroxyl radical scavenging activity
	A	B	C	D	Y
1	1(7.5)	1(50)	1(2%)	1(1:20)	50.58
2	1	2(55)	2(2.5%)	2(1.5:20)	75.92
3	1	3(60)	3(3%)	3(2:20)	62.16
4	2(8.0)	1	2	3	65.60
5	2	2	3	1	76.35
6	2	3	1	2	78.71
7	3(8.5)	1	3	2	70.35
8	3	2	1	3	69.01
9	3	3	2	1	65.97
K <sub>1</sub>	62.89	62.18	66.10	64.30	
K <sub>2</sub>	73.55	73.76	69.16	74.99	
K <sub>3</sub>	68.44	68.95	69.62	65.59	

表4 方差分析结果

Tab.4 Results of variance analysis

方差来源 source	离均差平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	显著性 significance
A	341.641	2	170.821	46.672	**
B	406.472	2	203.236	55.529	**
C	44.010	2	22.005	6.012	**
D	408.948	2	204.474	55.867	**
误差 error	32.943	9	3.660		
总和 total	1 234.014	17			

Notes:  $F_{0.05}(2,9) = 4.26$ ,  $F_{0.01}(2,9) = 8.02$ 。

根据正交试验的方差分析结果可知,因素 A (pH)、B(温度)和 D(料液比)对 $\cdot\text{OH}$ 清除率有极显著影响,因素 C(加酶量)有显著影响,影响 $\cdot\text{OH}$ 清除率的主要因素顺序是: $D > B > A > C$ 。在本试验中, $\cdot\text{OH}$ 清除率越大越好,优化方案应选取各因素最大 K 值所对应的水平,因此选得最佳组合为  $A_2B_2C_3D_2$ 。将直接分析得到的最佳组合 ( $A_2B_3C_1D_2$ ) 与计算分析得到的最佳组合 ( $A_2B_2C_3D_2$ ) 同时进行验证试验, $\cdot\text{OH}$ 清除率分别为 79.49% 和 82.08%。由验证试验结果可知, $A_2B_2C_3D_2$  为碱性蛋白酶最佳酶解工艺条件,即 pH 值 8.0、酶解温度  $55\text{ }^\circ\text{C}$ 、加酶量 (E/S) 3.0%、料液比 1.5:20 g/mL、酶解时间 3 h。

#### 2.4 酶解产物的抗氧化作用

酶解液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性 在体内活性氧自由基中, $\cdot\text{OH}$ 具有最强的活性,很容易与生物分子(如氨基酸、蛋白质和 DNA)反应,因此清除 $\cdot\text{OH}$ 是预防各种疾病的一种有效方法<sup>[20]</sup>。由图 7 可知, $V_c$ 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果最好,其次是肌肽,虽然酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 的效果不如 $V_c$ 和肌肽,但其对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力与浓度呈现出明显的量效关系。

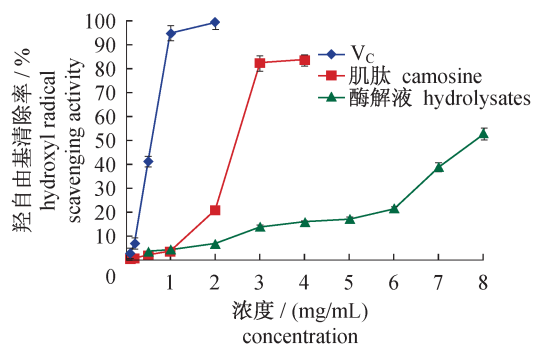


图 7 酶解液对羟自由基的清除效果

Fig. 7 Hydroxyl radical scavenging ability of hydrolysates

酶解液对 $O^{2-}\cdot$ 的清除活性 虽然 $O^{2-}\cdot$ 活性不大,但它可转化成活性更强的氧化物,如单线态氧和 $\cdot\text{OH}$ ,间接引发脂质过氧化反应<sup>[21]</sup>。由图 8 可知,随着样品浓度的升高,3 种物质对 $O^{2-}\cdot$ 的抑制率均增大,且当浓度高于 0.5 mg/mL 时,对 $O^{2-}\cdot$ 的抑制率均趋于平缓。样品浓度在 0.1 ~ 1.0 mg/mL 范围内,酶解液对 $O^{2-}\cdot$ 的抑制率不如肌肽,但当浓度高于 1.0 mg/mL 时,酶解液对 $O^{2-}\cdot$ 的抑制率高于肌肽,表明酶解液

是一种较好的 $O^{2-}\cdot$ 抑制剂。

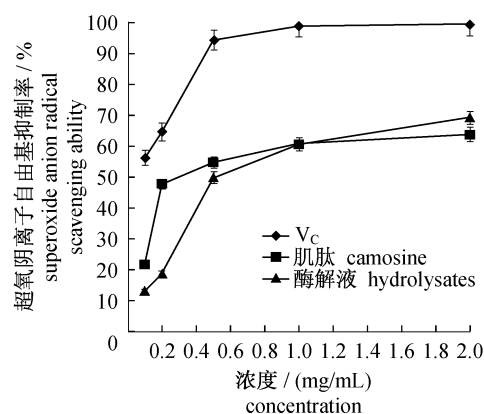


图 8 酶解液对超氧阴离子自由基的清除效果

Fig. 8 Superoxide anion radical scavenging ability of hydrolysates

酶解液对 DPPH $\cdot$ 的清除活性 从图 9 可知, $V_c$ 对 DPPH $\cdot$ 的清除作用最强,在很小的浓度时清除率就达到了将近 100%,远远高于肌肽和酶解液。而酶解液与肌肽相比,酶解液对 DPPH $\cdot$ 的清除率比肌肽高很多,在浓度为 3 mg/mL 时,酶解液对 DPPH $\cdot$ 的清除率是肌肽的 2 倍多,显示酶解液具有较强的 DPPH $\cdot$ 清除作用。在相同的测定方法和样品浓度 (2 mg/mL) 下,黄缘盒龟肉多肽 DPPH $\cdot$ 清除率 (43.31%) 显著高于罗非鱼鱼皮多肽 (15.68%)<sup>[11]</sup>,表明黄缘盒龟肉是一种有效的 DPPH $\cdot$ 清除剂。

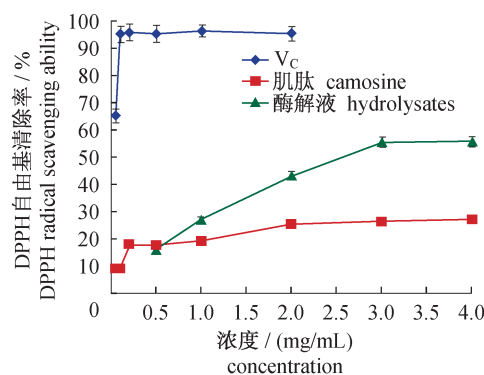


图 9 酶解液对 DPPH 自由基的清除效果

Fig. 9 DPPH radical scavenging ability of hydrolysates

酶解液的还原能力 样品的还原能力与抗氧化能力呈正相关,还原能力大的样品是良好的电子供体,其供应的电子不仅能使 $Fe^{3+}$ 还原成 $Fe^{2+}$ ,同时能与自由基反应,使自由基成为较为稳定的物

质,从而中断自由基连锁反应<sup>[22]</sup>。图10显示出V<sub>C</sub>还原能力最高,在0.1~0.5 mg/mL浓度范围内V<sub>C</sub>的还原能力迅速增强,随后趋于稳定。肌肽和酶解液的还原能力随样品浓度的增大而增大,即还原能力与样品浓度呈线性正相关。与肌肽相比,酶解液具有更高的还原能力。在相同的测定方法和样品浓度(10 mg/mL)下,黄缘盒龟肉多肽的还原能力(0.459)是大豆肽(0.046)<sup>[12]</sup>的近10倍,表明黄缘盒龟肉具有较强的还原能力。

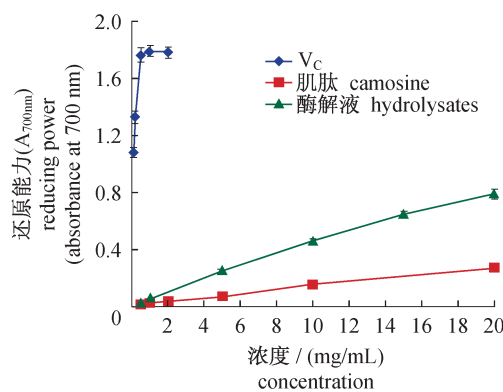


图10 酶解液的还原能力

Fig. 10 Reducing power of hydrolysates

酶解液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除活性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在生物体内容易被分解为H<sub>2</sub>O和O<sub>2</sub>,在O<sup>2-</sup>·、金属离子或者强烈紫外线照射时,会发生均裂生成·OH,所以清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分子可以阻止·OH的产生。由图11可知,随着样品浓度的升高,3种物质对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除率均增大,且当浓度高于1 mg/mL时,3种物质对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除能力基本相同,显示酶解液是一种较好的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除剂。在相同的测定方法和样品浓度(2 mg/mL)下,黄缘盒龟肉多

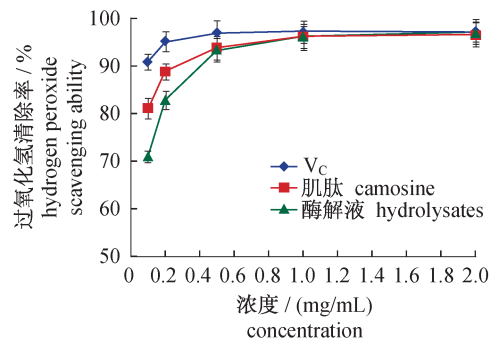


图11 酶解液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除效果

Fig. 11 Hydrogen peroxide scavenging ability of hydrolysates

肽H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除率(97.27%)显著高于罗非鱼鱼皮多肽(4.41%)<sup>[11]</sup>,表明黄缘盒龟肉具有较强的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除能力。

酶解液的亚铁离子螯合能力 由图12可知,V<sub>C</sub>的亚铁离子螯合能力随浓度的变化不大,螯合能力非常低,在5 mg/mL时,V<sub>C</sub>的亚铁离子螯合能力仅为9.47%,而肌肽和酶解液的亚铁离子螯合能力随浓度的增大而迅速增强,在5 mg/mL时,肌肽和酶解液的亚铁离子螯合能力分别达95.26%和85.90%,表明酶解液具有较强的亚铁离子螯合能力。

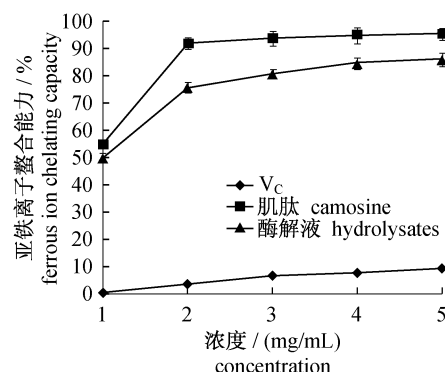


图12 酶解液的亚铁离子螯合能力

Fig. 12 Ferrous ion chelating capacity of hydrolysates

酶解液对亚油酸自氧化的抑制能力 由图13可知,随着浓度的增大,V<sub>C</sub>和酶解液的吸光值均呈显著下降趋势,而肌肽的吸光值下降趋势平缓,表明V<sub>C</sub>和酶解液对亚油酸自氧化的抑制作用与浓度呈现出明显的量效关系。虽然同V<sub>C</sub>和肌肽相比,酶解液对亚油酸自氧化的抑制作用偏低,但其对亚油酸自氧化抑制作用随样品浓度的增大而下降的斜率最大。

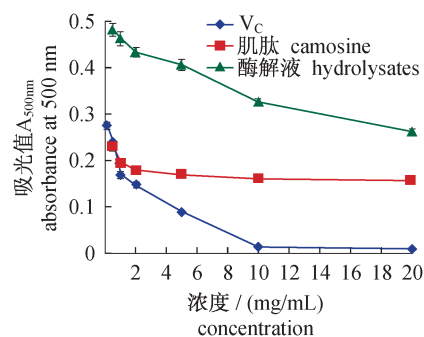


图13 酶解液对亚油酸自氧化的抑制能力

Fig. 13 Inhibition of linoleic acid autoxidation of hydrolysates

### 3 结论

通过比较 6 种不同类型的蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶)对黄缘盒龟肉的酶解效果,确定碱性蛋白酶为最适水解酶。在单因素和正交试验的基础上,优化出酶解黄缘盒龟肉制备抗氧化肽的最佳酶解条件:pH 值 8.0、酶解温度 55 ℃、加酶量(酶/底物,E/S)3.0%、料液比 1.5:20 g/mL、酶解时间 3 h,此条件下,羟自由基清除率达到 82.08%。此外,从·OH、O<sup>2-</sup>·、DPPH·、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除效果及还原能力、亚铁离子螯合能力、亚油酸自氧化抑制能力等方面探讨了龟肉酶解产物的体外抗氧化能力。研究表明,黄缘盒龟肉酶解产物的抗氧化活性较强,值得进一步开发利用。目前,有关黄缘盒龟肉酶解产物的生理活性及抗氧化肽的分离纯化工作正在进行中。

#### 参考文献:

- [1] 李修峰,李蓓,张友谦.黄缘盒龟的生物学特征和经济价值[J].北京水产,2006(4):12-15.
- [2] 吴遵霖,曾旭权.中华龟鳖文化博览[M].北京:中国农业出版社,2007.
- [3] 郭旭升.黄缘闭壳龟的拟生态人工养殖技术[J].水产养殖,2007,28(4):24-25.
- [4] Ryan J T, Ross R P, Bolton D, et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish [J]. Nutrients, 2011, 3(9):765-791.
- [5] Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18(2):163-169.
- [6] Naqash S Y, Nazeer R A. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of *Nemipterus japonicus* and *Exocoetus volitans* muscle [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2010, 19(3-4):180-192.
- [7] 许庆陵,曾庆祝,朱莉娜,等.鲢酶解物对羟自由基的清除作用[J].水产学报,2004,28(1):93-99.
- [8] Suetsuna K, Ukeda H. Isolation of an octapeptide which possesses active oxygen scavenging activity from peptic digest of sardine muscle [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1999, 65(6):1096-1099.
- [9] Raghavan S, Kristinsson H G, Leeuwenburgh C. Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(21):10359-10367.
- [10] 徐怀德,殷金莲,陈沁.甲鱼酶解产物抗氧化功能的研究[J].中国食品学报,2007,7(4):25-32.
- [11] 刘成梅,梁汉紫,刘伟,等.罗非鱼鱼皮多肽的超滤分离及其抗氧化活性研究[J].食品科学,2008,29(5):227-230.
- [12] 荣建华,李小定,谢笔钧.大豆肽体外抗氧化效果的研究[J].食品科学,2002,23(11):118-120.
- [13] 王运改.鲟鱼皮明胶多肽抗衰老活性的研究[D].合肥:合肥工业大学,2011.
- [14] Dong S Y, Zeng M Y, Wang D F, et al. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4):1485-1493.
- [15] Wu H C, Chen H M, Shiau C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Research International, 2003, 36(9-10):949-957.
- [16] 丁利君,钟森辉.鳕鱼蛋白酶解工艺优化及其酶解液抗氧化研究[J].食品科学,2008,29(8):398-401.
- [17] 孟昌伟,陆剑锋,宫子慧,等.鲟鱼骨胶原多肽的制备工艺研究[J].肉类工业,2011(9):35-39.
- [18] 赵梅,吴成业.罗非鱼下脚料酶解工艺的响应面法优化[J].食品研究与开发,2007,28(5):48-53.
- [19] 宋茹,冯婷立,谢超.海产小杂鱼抗氧化肽制备工艺[J].食品科学,2011,32(12):29-33.
- [20] Je J Y, Park P J, Kim S K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate [J]. Food Research International, 2005, 38(1):45-50.
- [21] 曾名湧,郭瑶,刘尊英,等.尼罗罗非鱼鱼皮胶原蛋白中游离基清除肽的制备及其抗氧化活性[J].水产学报,2008,32(1):117-124.
- [22] 孟艳丽,董士远.美拉德反应修饰的鲢鱼肽抗氧化活性初探[J].肉类研究,2010(8):26-30.



## Optimization of enzymatic technology of yellow-margined box turtle muscle and antioxidant abilities of its hydrolysates *in vitro*

WANG Yanmei<sup>1</sup>, WAN Quan<sup>2</sup>, LAI Nianyue<sup>3</sup>, LIN Lin<sup>1</sup>, YE Yingwang<sup>1</sup>,  
JIANG Shaotong<sup>1</sup>, LU Jianfeng<sup>1\*</sup>

(1. College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

3. Hefei City Center for Animal Husbandry and Fishery Technical Extension, Hefei 230009, China)

**Abstract:** Antioxidants are known to be beneficial to human health as they may protect the body against damage by reactive oxygen species, which can attack DNA, protein and membrane lipids and play a critical role in a variety of disease such as cancer, diabetes, cardiovascular disease and Alzheimer's disease. However, there is much evidence that the use of natural antioxidants in foodstuffs is more attractive because of the potential health hazards associated with synthetic antioxidants *in vivo*. Turtle not only has a high nutritional value, but also has a potential medicinal value. In order to better know turtle's nutrition and healthy function, the functional properties of enzymatic hydrolysates from yellow-margined box turtle (*Cistoclemmys flavomarginata*) muscle were investigated in this research. An enzymatic treatment procedure was devised to make the preparation of antioxidant peptide. By using a L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal array design, the optimum conditions for hydrolyzing yellow-margined box turtle muscle with Alcalase to obtain antioxidant peptides with the highest hydroxyl radical scavenging activity were as follows: pH 8.0, temperature 55 °C, material-to-liquid ratio 1.5:20 g/mL, enzyme-to-substrate ratio 3.0% and reaction time 3 h. Under the above conditions, the scavenging rate of hydroxyl radical was 82.08%. Subsequently, the antioxidant properties of yellow-margined box turtle hydrolysates were determined *in vitro*. The results showed that the enzymatic hydrolysates had good scavenging abilities on hydroxyl radical (·OH), superoxide anion radical (O<sup>2-</sup>·), α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl radical (DPPH·) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and they also had certain reducing power, ferrous ion chelating capacity and the inhibition of linoleic acid autoxidation. In general, the yellow-margined box turtle hydrolysates showed certain antioxidant activities in different systems *in vitro*, and they will have new and broad prospects.

**Key words:** *Cistoclemmys flavomarginata*; turtle muscle; protease; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity

**Corresponding author:** LU Jianfeng. E-mail: lujf@sibs.ac.cn