# 僵蚕抗氧化多肽的初步分离及活性分析

文水莎，王彩连，杨雪海，陆如水，李灿辉，文采灵，刘文彬

（四川大学化学工程学院，成都 610065）

**摘要**：采用酶解法制备僵蚕（*Bombyx batryticatus*）中抗氧化肽，通过超滤进行初步分离，分析其抗氧化活性。以 1,1-二苯基-2-苦味酰基苯肼（DPPH）清除率为指标，筛选出胰蛋白酶作为最适蛋白水解酶，酶解条件为温度 50℃，pH=6.9，酶量 0.31 g/L，底物浓度 3.0 g/L，酶解时间 3.67 h，对 DPPH 清除率为 60%. 采用超滤技术获得分子量 3 ku 以下的小分子肽，其 DPPH 清除率为 96%. 僵蚕蛋白水解液对 DPPH 有 50%清除率时，底物浓度为 2 g/L，其总还原力、抑制脂质体氧化能力与对照抗坏血酸相当。高温下处理 2.5 h 内其抗氧化活性几乎没有变化，反复冻融 6 次对其抗氧化活性也几乎没有影响，但在常温下随保存天数的增加其抗氧化活性减弱。

**关键词**：生物化学工程；僵蚕；抗氧化肽；蛋白酶解；分离纯化

**中图分类号**：Q819　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2015)03-0290-06

# Purification and activity identification of white muscardin silkworm (*Bombyx batryticatus*) antioxidant peptide

WEN Shuisha, WANG Cailian, YANG Xuehai, LU Rushui, LI Canhui, WEN Cailing, LIU Wenbin

(*College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu* 610065, *China*)

**Abstract:** In our current study, the antioxidant peptide was produced from enzymatic hydrolysate of white muscardin silkworm and was preliminary separated through the ultrafiltration. The antioxidant activity was analyzed. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity was used as the criterion for antioxidant activity. Peptides derived from trypsin hydrolysate exhibited the highest DPPH radical scavenging activity. Protein was enzymatically hydrolyzed at 50℃, pH=6.9, 0.31 g/L for enzyme concentration, 3.0 g/L for substrate concentration, 3.67 h for enzymatic hydrolysis time. DPPH clearance was 60%. After ultrafiltration to obtain the low-molecular weight peptide less than 3 ku, the DPPH scavenging activity arrived at 96%. The concentration for DPPH scavenging activity of 50% was 2 g/L, the total reductive activity and liposome oxidation inhibition was quite equal with ascorbic acid. High temperature treatment (boiling water bath) for 2.5 h as well as repeated freeze-thaw for 6 times, seemed not to affect the antioxidant activity. But the antioxidant activity decreased with the increasing storage days at room temperature.

**Key words:** biochemical engineering; *Bombyx batryticatus*; antioxidant peptide; proteolysis; separation and puriffication

## 0 引言

生物活性肽（bioactive peptides）是由蛋白质水解产生，由数个到数十个氨基酸组成，对生物机体的生命活动有益或具有生理作用的肽类化合物。生物活性肽的研究与开发利用已经成为全球食品和营养等相关领域的一个重要课题[1]。抗氧化肽是生物活性肽的一种，具有过氧化氢分解促进剂的作用，可降低

**基金项目**：高等学校博士学科点专项科研基金（20090181120050）

**作者简介**：文水莎（1990—），女，本科生，主要研究方向：生物工程

**通信联系人**：刘文彬，讲师，主要研究方向：生物工程. E-mail: wbliu@scu.edu.cn

自氧化速率，减少脂肪过氧化氢含量，减少自由基的生成，与超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）等酶类相比具有更多的优越性。其结构简单，不易受环境条件的影响而失活，进入机体一般不发生免疫反应，具有很高的安全性，可以代替化学合成的抗氧化剂。

我国是养蚕大国，蚕业资源丰富，僵蚕作为蚕业资源的副产品，已有成熟的人工培育技术，随着僵蚕的药理研究进展及其在临床应用表现出的良好疗效，僵蚕的药用价值日益受到关注，市场供不应求，每年仅国内需求量就在 400 t 以上[2]。国内外学者对僵蚕的成分和药理活性研究也不断深入，作为僵蚕主要药理成分之一，僵蚕中的蛋白质品种多、品质高、活性好。因此，通过酶水解作用，有可能从僵蚕中得到生物活性肽。

## 1 材料、设备与方法

### 1.1 材料

僵蚕粉（购自成都同仁堂药店，粉碎后过 60 目筛）、DPPH（西安热默尔生物科技有限公司）、考马斯亮蓝（北京赛驰生物科技有限公司）、3 ku 超滤管（默克密理博中国有限公司）、抗坏血酸（vitamin C，VC）、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶皆购至成都格雷西亚化学技术有限公司。

### 1.2 设备

紫外分光光度计（UV-1800PC，上海美谱达仪器有限公司）、台式高速离心机（TGL-16G，上海安亭科学仪器厂）、超声波破碎仪（CPX130，美国 COLE-PARMER 公司）、冷冻干燥机（FD-1C-50，北京博医康实验仪器有限公司）。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 DPPH 法测定抗氧化活性

取 2.0 mL 待测样品，加入 2.0 mL 0. 2 mmol/L DPPH 的乙醇溶液，混合均匀，于室温下暗处放置 20 min. 在 517 nm 波长下测定其吸光值 $A_1$. 空白组为 2.0 mL 乙醇代替 DPPH 溶液，加入样品溶液测定吸光值 $A_2$；对照组为 2.0 mL 蒸馏水和 2.0 mL DPPH 乙醇溶液，测定其吸光值为 $A_0$[3]. 每次实验重复 3 次。DPPH 自由基清除率按式（1）计算：

$$\text{DPPH}（\%）=1-(A_1-A_2)/A_0\times 100， \quad （1）$$

其中，$A_0$ 为 DPPH 样品溶剂的吸光值；$A_1$ 为 DPPH 溶液+样品溶液的吸光值；$A_2$ 为 DPPH 溶剂+样品溶液吸光值。

#### 1.3.2 僵蚕蛋白提取

称取 9.0 g 僵蚕粉末，加入 90.0 mL 去离子水用超声破碎仪于 80 Hz，间隔 2 s，破碎 10 min[4]. 将破碎液于 4 000 r/min 离心 10 min. 取上清液进行抽滤。将过滤液于 15 000 r/min 离心 10 min. 所得上清液用微孔过滤器进行过滤，取得到的澄清液体，用考马斯亮蓝测定蛋白质含量，最后冷冻干燥 48 h，得到僵蚕蛋白固体。

#### 1.3.3 抗氧化肽制备

僵蚕蛋白浓度为 3.0 g/L，蛋白酶浓度为 0.31 g/L，各 20.0 mL，反应温度为 50℃，反应时间为 3.67 h，pH=6.9. 15 min 沸水浴灭酶，测水解液的 DPPH 清除率及蛋白含量。每次实验重复 3 次取平均值。

### 1.3.4 总还原力测定

根据文献[5]取样品液 0.1 mL，加入 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液（pH=6.6）和 10 g/L 的铁氰化钾溶液各 2.5 mL，混合物于 50℃水浴中加热 20 min，再加 100 g/L 三氯乙酸溶液 2.5 mL，充分混合，3 000 r/min 离心 5 min. 取上清液 2.5 mL，加入蒸馏水 2.5 mL 和 1 g/L 三氯化铁溶液 0.5 mL，静置 10 min 后，在 700 nm 波长处测定其吸光度 $A_{700}$. 以 $A_{700}$ 值反映还原力大小，$A_{700}$ 值越高，水解物的还原力越大。

### 1.3.5 抑制脂质体氧化能力测定

取 0.2 mL 样品、0.4 mL 卵黄悬浮液、25 mmol/L $FeSO_4$ 溶液，加磷酸缓冲溶液至最终体积为 4.0 mL，混匀后，于 37℃恒温 1 h，加入 1.0 mL 20%三氯乙酸。对照组不加样品，并提前加入 1.0 mL 20%三氯乙酸。静置 10 min 后，3 500 r/min 离心 10 min，取 2.0 mL 上清液，加入 1.0 mL 质量分数为 0.8%的硫代巴比妥酸，加热于 100℃沸水浴 15 min，冷却后，于 523 nm 波长处测吸光度值。空白组使用磷酸缓冲溶液[6]。样品对卵黄脂蛋白脂质体氧化（liposome oxidation，LPO）的抑制率表示为

$$SA=（A_c–A_s）/A_c×100\%\ ,\qquad（2）$$

其中，$A_c$ 为加入样品的吸光度；$A_s$ 为不加样品的吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最佳酶选择

如图 1 所示，在相同反应条件下（在各自最适 pH 值），胰蛋白酶水解僵蚕蛋白的 DPPH 清除率最高，为 68%. 因此，选择胰蛋白酶作为僵蚕蛋白酶解的最佳水解酶。

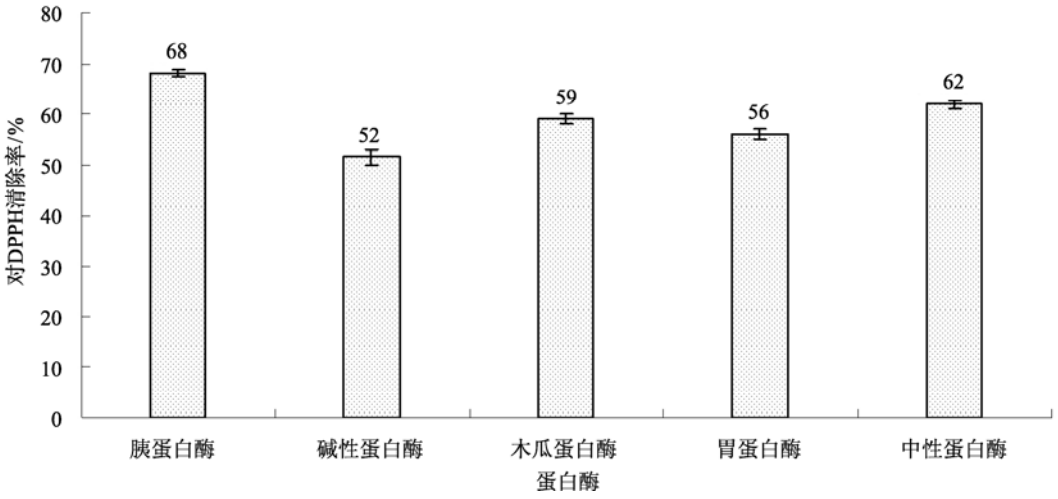



图 1 各蛋白酶水解产物 DPPH 自由基清除效果

Fig. 1 DPPH scavenging activities of peptides hydrolyzed by several proteinases

### 2.2 僵蚕水解液中抗氧化活性肽的初步分离

僵蚕蛋白经胰蛋白酶水解后，得到 0.499 6 g/L 的多肽水解液，共 40.0 mL，其 DPPH 清除率为 60%（如图 2 所示）. 可以看出，酶解后样品的抗氧化活性大大提高。取 4.0 mL 蛋白经 3 ku 超滤膜超滤后，得到 3.6 mL 滤过液，其蛋白浓度为 0.308 g/L，未与酶解液及蛋白液换算成相同浓度蛋白前其 DPPH 清除率为 59%. 换算为相同浓度下蛋白，可得出其清除率为 96%. 3 ku 超滤膜主要截留分子量大于 3 ku 的

多肽，其滤液通常为小于 3 ku 的多肽，即氨基酸不超过 30 个（以 1 个氨基酸残基平均分子质量约 110 u 计）。超滤后所得在相同蛋白含量下对 DPPH 的清除率也大为提高，说明抗氧化活性成分集中在透过 3 ku 膜的滤液中，为小分子多肽。

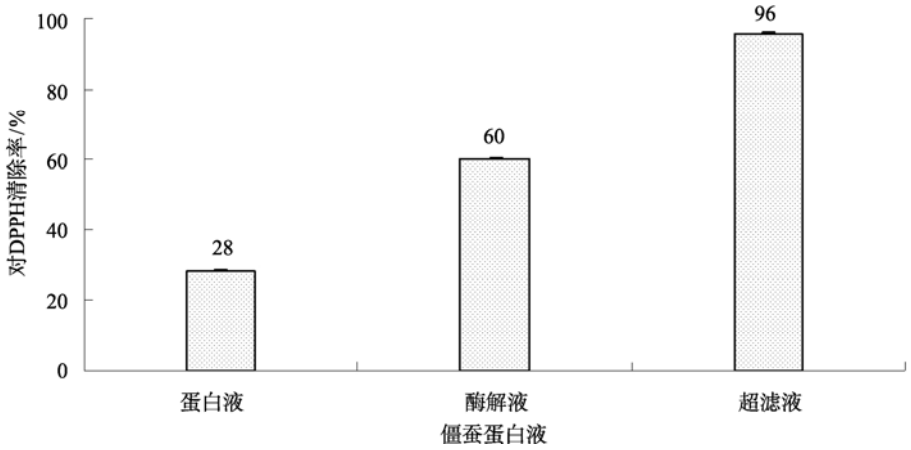



图 2 酶解前后及超滤后僵蚕蛋白液对 DPPH 自由基清除效果

Fig. 2 DPPH scavenging activities of peptide before and after enzymatic hydrolysis and after ultrafiltration

蛋白液在酶解之前仍有一定的清除效果，僵蚕本身化学成分复杂，含有多种维生素[4]，如胡萝卜素、核黄素、VC、维生素 D、生育酚、视黄素等。胡萝卜素、生育酚、VC、维生素 D 都是常见的抗氧化剂，具有较强的清除效果，且均为水溶性的。实验所使用的僵蚕蛋白含有一定量的杂质，这些杂质即包括一定量的上述抗氧化性物质。

### 2.3 僵蚕水解液抗氧化性

如图 3 所示，对于僵蚕蛋白，当添加的僵蚕蛋白浓度为 2.0 g/L 时，所得酶解液对 DPPH 清除率为 50%. 由图 4 可看出，僵蚕蛋白胰蛋白酶水解产物的总还原力随浓度的增加而增加，6.0 g/L 的僵蚕蛋白胰蛋白酶水解产物其总还原力约与 0.08 g/L 的抗坏血酸相当（如图 5 所示）。僵蚕蛋白酶解液对脂质体氧化有一定的抑制作用，并且随着底物浓度的升高，抑制率也明显增高。僵蚕蛋白反应底物浓度为 6.0 g/L 时，相当于抗坏血酸浓度为 1.0 g/L 时的抑制效果（如图 6 和图 7 所示）。

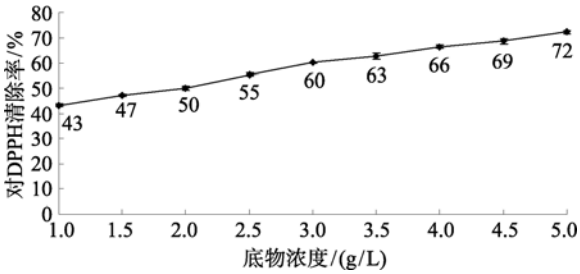



图 3 僵蚕蛋白酶解液对 DPPH 自由基的清除效果

Fig. 3 DPPH scavenging activities of white muscardin silkworm protein hydrolysate

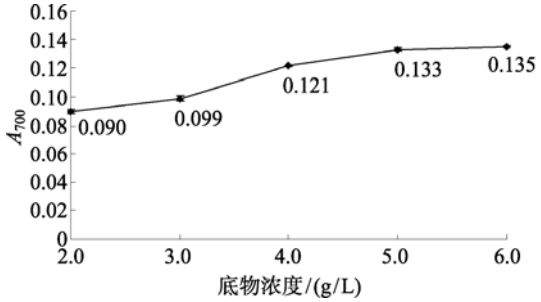



图 4 僵蚕蛋白酶解液的总还原力

Fig. 4 Reductive activity of white muscardin silkworm protein hydrolysate

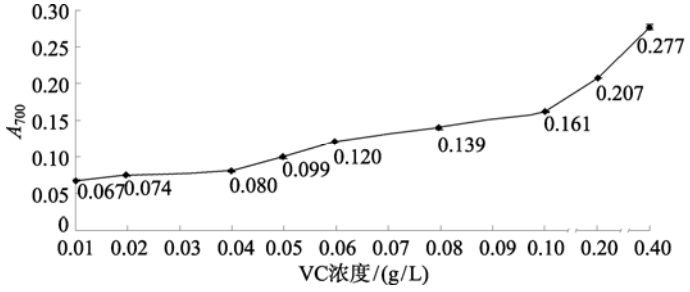



图 5 VC 的总还原力

Fig. 5 Reductive activity of VC

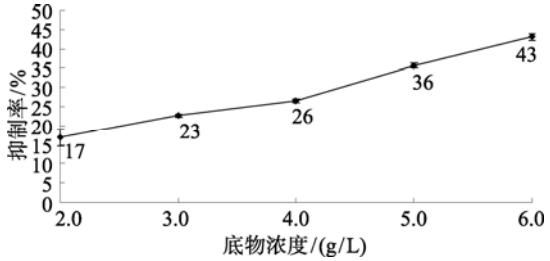



图 6 酶解液抑制脂质体氧化的效果

Fig. 6 Effect of peptide content on the liposome oxidation inhibition

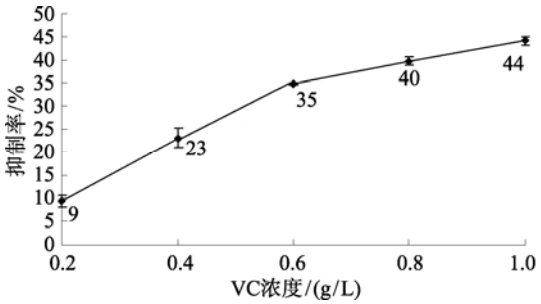



图 7 VC 抑制脂质体氧化的效果

Fig. 7 Liposome oxidation inhibition effect of VC

## 2.4 僵蚕酶解液的稳定性

如图 8 所示，随着加热时间的变化，酶解液对 DPPH 清除率逐渐降低，但是变化很小。经过 2.5 h 的沸水处理，僵蚕蛋白酶解液的抗氧化活性下降 11.14%. 抗氧化肽应用在食品、化妆品、保健品领域，必须要经历高温灭菌处理，研究表明，僵蚕抗氧化肽完全能经受这样的处理而保持其活性。如图 9 所示，反复冻融在 6 次以内，僵蚕蛋白酶解液对 DPPH 清除率整体呈降低趋势，但是降低幅度很小，抗氧化活性下降 3.91%. 如图 10 所示，在常温下，随着保存天数的增加，僵蚕蛋白水解液对 DPPH 自由基清除率逐渐下降，下降幅度较大，放置 5 d 后抗氧化活性降低 43.53%，说明僵蚕蛋白抗氧化肽不适合在常温下保存，可能与僵蚕蛋白抗氧化肽变性失活有关。

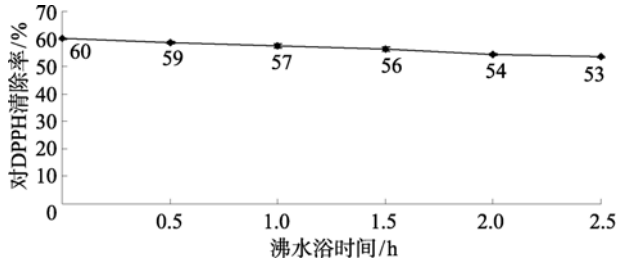



图 8 沸水浴时间对酶解液抗氧化活性的影响

Fig. 8 Effect of boiling water bath time on the antioxidant ability of hydrolysate

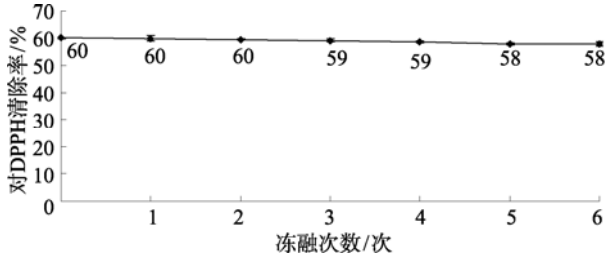



图 9 反复冻融次数对酶解液抗氧化活性的影响

Fig. 9 Effect of repeated freezing and thawing on the antioxidant ability of hydrolysate

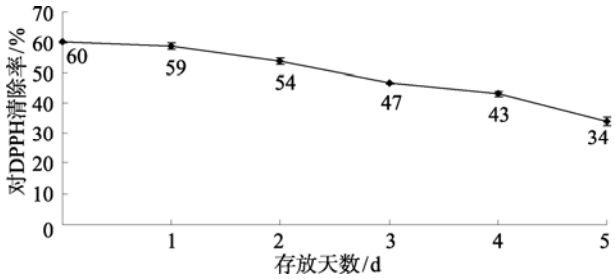



图 10 常温下放置天数对酶解液抗氧化活性的影响

Fig. 10 Effect of storage time on the antioxidant ability of hydrolysate

## 3 结论

以僵蚕蛋白为原料，通过建立僵蚕多肽抗氧化活性的检测方法，以 DPPH 清除率为指标，对僵蚕蛋白酶解前后的抗氧化性进行检测对比，在此基础上，通过超滤技术对僵蚕蛋白酶解液进行初步分离，并研究其分离前后的抗氧化性。胰蛋白酶的水解效果较好，所得酶解液对 DPPH 清除率为 50%. 研究了僵蚕蛋白酶解液的稳定性，发现抗氧化肽短时间内有较强耐高温性，但不适合在常温下保存。

**[参考文献]（References）**

[1] 李振华，龚吉军，赵延华，等. 抗氧化肽的研究进展[J]. 食品研究与开发，2011，32（6）：157-160.
LI Z H, GONG J J, ZHAO Y H, et al. The research progress of antioxidant peptides[J]. Food Research and Development, 2011, 32(6): 157-160. (in Chinese)

[2] 李冬生，王金华，李世杰，等. 僵蚕白僵菌生物学特性的基础研究[J]. 湖北农业科学，2004（4）：101-103.
LI D S, WANG J H, LI S J, et al. Basic research on the biological characteristic of four *Beauveria bassiana* strains isolated from silkworm larvae[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2004(4): 101-103. (in Chinese)

[3] ZHANG S B, WANG Z, XU S Y. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008, 85(6): 521-527.

[4] 李高扬，崔堂兵，陈亮. 蚕蛹蛋白酶解制备抗氧化肽的初步研究[J]. 现代食品科技，2011，27（7）：810-814.
LI G Y, CUI T B, CHEN L. Preliminary study of enzymatic hydrolysis of silkworm pupa protein for production of antioxidant peptide[J]. Modern Food Science & Technology, 2011, 27(7): 810-814. (in Chinese)

[5] 范建凤，王泽南，杨柯，等. 蟹抗氧化肽的分离纯化及活性研究[J]. 食品科学，2010，31（13）：48-51.
FAN J F, WANG Z N, YANG K, et al. Separation, purification and activity assay of antioxidant peptides from swimming crab[J]. Food Science, 2010, 31(13): 48-51. (in Chinese)

[6] 吴海涛，张彧，缪琪，等. 牡蛎水提液的抗氧化特性[J]. 食品与发酵工业，2005，31（4）：42-45.
WU H T, ZHANG Y, MIAO Q, et al. Study on the antioxidant activities of oyster water extract *in vitro*[J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(4): 42-45. (in Chinese)