

蛭螬酶法制备抗氧化活性肽

张海英¹, 李秀梅², 潘方方¹, 杨培龙², 俞晓亭¹, 石冬冬^{2,*}, 马文建^{1,*}

(1. 天津科技大学 生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457; 2. 中国农业科学院 饲料研究所, 农业部饲料生物技术重点实验室, 北京 100181)

摘要: 建立蛭螬多肽的制备工艺, 探究多肽的抗氧化活性。采用酶法将蛭螬制备成蛭螬蛋白水解肽, 以蛭螬多肽提取率及其总抗氧化能力为衡量指标, 通过单因素试验确定了酶种类、酶虫比、底物浓度、水解体系 pH 值、酶解温度和时间对蛭螬多肽提取率及其总抗氧化能力的影响。通过正交试验优化蛭螬多肽提取率及其总抗氧化能力, 获得最佳酶解工艺, 即底物浓度 5%、水解体系 pH 7、酶解温度 40℃。在此试验条件下, 蛭螬多肽的提取率为 14.21%, 总抗氧化能力为 0.752 mmol/L。

关键词: 蛭螬; 抗氧化肽; 酶解; 正交试验; 制备

Preparation Process of Antioxidant Peptides from *Protaetia brevitarsis* Larvae by Enzymolysis

ZHANG Hai-ying¹, LI Xiu-mei², PAN Fang-fang¹, YANG Pei-long², YU Xiao-ting¹,
SHI Dong-dong^{2,*}, MA Wen-jian^{1,*}

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of the Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100181, China)

Abstract: The enzymatic hydrolysis parameters of antioxidant peptide extracted from *Protaetia brevitarsis* larvae were optimized. The *Protaetia brevitarsis* larvae was prepared into proteolytic peptides by enzymolysis technology, the extraction rate of *Protaetia brevitarsis* larvae peptides and total antioxidant capacity were chosen as the index. The effects of enzyme species, enzyme/worm ratio, substrate the concentrarion, pH value, enzymatic hydrolysis temperature and time on the extraction rate of peptides and total antioxidant capacity were determined by single-factor test. Then the conditions for the maximum extraction rate of *Protaetia brevitarsis*

作者简介: 张海英(1990—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 微生物代谢与酶工程。

- [J]. Food Microstructure, 1985, 4(2): 297-312
- [2] Meyer A. Processed cheese manufacture[M]. London: Food Trade Press, 1973
- [3] Thomas M A. The manufacture of processed cheese. Scientific principles[C]//Thomas M A, Hyde K A: Manufacture of Processed Cheese—a Working Manual, 1973
- [4] Guinea T P, Cari M, Kalb M. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products[J]. Cheese Chemistry Physics & Microbiology, 2004, 2:349-394
- [5] 邵辉, 王春满, 孙艳波, 等. 再制干酪制造方法的研究[J]. 农产品加工, 2007 (8): 72-73, 77
- [6] 苏永红, 鄂卫峰. 重制干酪工艺研究[J]. 中国乳业, 2005(8): 50-53
- [7] 王亚威, 邵辉, 鲁慧峰. 再制干酪的研究[J]. 中国乳品工业, 2003, 31 (5): 26-28
- [8] 惠大丰, 姜长鉴. 统计分析系统 SAS 软件实用教程[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 1996
- [9] 李春喜, 王文林. 生物统计学[M]. 北京: 科学出版社, 1997
- [10] 胡良平. 实用统计分析教程[M]. 北京: 军事医学出版社, 2001: 563-588
- [3] 乔为仓, 刘宁. 再制干酪的制造与前景预测[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(3): 169-170
- [4] 范丽芳. 再制干酪的技术难点[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(2): 48-50

收稿日期: 2018-08-18

larvae peptides and total antioxidant activity were optimized by orthogonal experiments. The results indicated that the best condition for the enzymatic hydrolysis process were as follows: substrate concentration of 5 %, the initial pH at 7, enzymolysis temperature of 40 °C. Under these conditions, the extraction rate of *Protaetia brevitarsis* larvae peptides and total antioxidant capacity were 14.21 % and 0.752 mmol/L, respectively.

Key words: *Protaetia brevitarsis* larvae; antioxidant peptide; enzymatic hydrolysis; orthogonal test; preparation

引文格式:

张海英,李秀梅,潘方方,等. 蛭螭酶法制备抗氧化活性肽[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(8): 152–158

ZHANG Haiying, LI Xiumei, PAN Fangfang, et al. Preparation Process of Antioxidant Peptides from *Protaetia brevitarsis* Larvae by Enzymolysis[J]. Food Research and Development, 2019, 40(8): 152–158

蛭螭(*Protaetia brevitarsis*)是东亚地区一种经典的民间药材,它含有多种人类所需的氨基酸和无机元素,临床上用于促进血液循环已有数百年历史。近年来人们也对蛭螭进行了更深入的科学研究。现代药理研究表明蛭螭具有抗肿瘤、保肝、治疗口疮、小儿哮喘、中风、血吸虫病肝硬化等多种药物活性,是一种极具研究和开发价值的药材^[1]。Xu 等发现了蛭螭的粗提物的抗凝活性,且其中的几种纤维蛋白(原)溶解剂具有抗血栓作用^[2];研究表明蛭螭的乙醇和石油醚提取物具有优异的抗真菌活性^[3]。蛭螭在韩国还被用于治疗慢性肝硬化,Oh 等研究发现它可以降低肝细胞损伤的程度^[4]。

随着越来越多的蛋白质水解物被发现具有抗氧化能力,新型抗氧化肽不断的被开发。抗氧化肽具有抗脂质过氧化能力和螯合金属离子的能力,还能够清除生物体内过量自由基。资源昆虫养殖的兴起,使昆虫抗氧化肽的研究也随之增多,采用双酶水解黄粉虫蛋白粉纯化得到的抗氧化多肽对羟基自由基和超氧阴离子自由基具有很强的清除作用,清除率可分别达到 74.20 % 和 87.32 %^[5–6]。研究表明大麦虫各蛋白组分均有体外抗氧化作用,随着浓度的增大,各蛋白液的总还原能力、对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力也随之增强^[7–8]。研究发现碱性蛋白酶对蚕蛹蛋白具有较好的水解效果,其水解产物有较高抗氧化活性,对 DPPH·、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟基自由基($\cdot OH$)都具有较强的清除能力^[9–10]。然而,蛭螭作为重要的昆虫资源之一,其蛋白水解物抗氧化作用的研究鲜见报道。

蛋白酶解产物的抗氧化性易受原料蛋白理化特性、选用酶的种类、水解程度等因素的影响。本研究以蛭螭为试验材料,以蛭螭多肽提取率及其抗氧化能力为衡量指标,通过单因素试验,从控制酶种类、酶虫比、底物浓度、水解体系 pH 值、酶解时间、酶解温度对蛭

螭多肽提取率及其抗氧化能力的影响,最终确定蛭螭抗氧化多肽的适宜提取条件,并通过正交试验优化最佳酶解工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蛭螭:中国农业科学院河北廊坊基地,经鉴定为金龟科白星花金龟 *Protaetia brevitarsis* 的幼虫;脂肪酶($\geq 3\ 000.0\ U/g$)、胰蛋白酶($\geq 50\ 000\ U/g$)、酸性蛋白酶($\geq 50\ 000\ U/g$)、中性蛋白酶($\geq 60\ 000\ U/g$);沃凯化工科技有限公司;总抗氧化能力检测试剂盒、三吡啶基三嗪(tripyridyltriazine, TPTZ):碧云天生物技术公司;LGJ-18 真空冷冻干燥机:北京松源华兴科技发展有限公司;SHZ-B 水浴恒温振荡器:苏州威尔实验用品有限公司;Sigma 3K15 离心机:北京科普顺科技有限公司;新型 T18 高速分散机:上海捷沪仪器仪表有限公司;FE-28 pH 计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Synergy H1 酶标仪:北京京科瑞达科技有限公司;Kjeltec TM8400 凯氏定氮仪:福斯华(北京)科贸有限公司。Folin-酚试剂:北京索莱宝科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺流程

取数只洗干净的蛭螭,放入 100 °C 的开水中约 40 s,立刻取出,将水擦干,放入 -20 °C 冰箱内,保存至备用。准确称取 10 g 蛭螭,按所需底物浓度加入溶液,用转速为 8 000 r/min 高速分散机匀浆,得到虫浆液。加入所需要的酶,放在水浴恒温振荡器中,150 r/min, 45 °C 酶解 3 h。放在 70 °C 的水浴恒温振荡器中灭活 30 min, 4 °C 静置过夜。4 000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 取上清,冷冻干燥后,用凯氏定氮法测量肽的含量。

1.2.2 酶的选择

酶解法制备抗氧化肽是利用酶把蛋白质的肽键

断裂,产生肽段。如,酶解鹰嘴豆制备抗氧化肽^[11],酶解获得鱼肽^[12]、酶解获得骨胶原蛋白肽^[13]等。本研究在底物浓度 5 %、酶虫比 0.6 %,酶解 3 h 的条件下,分别考察脂肪酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶对蛭螭多肽提取率及总抗氧化能力的影响,确定适宜的蛭螭蛋白水解酶种类。4 种酶的酶解最佳条件见表 1。

表 1 4 种酶酶解最佳条件
Table 1 Four enzyme digestion optimum conditions

酶种类	最适温度/℃	最适 pH 值
脂肪酶	55	6
酸性蛋白酶	55	3
中性蛋白酶	45	7
胰蛋白酶	55	8

1.2.3 工艺参数的确定

根据筛选出的最优酶,以蛭螭多肽提取率及其总抗氧化能力为衡量指标,考察酶虫比、底物浓度、酶解时间、水解体系 pH 值和酶解温度对衡量指标的影响。

1.2.3.1 酶虫比的筛选

在 55 ℃,酶解时间 3 h,底物浓度 5 %,水解体系 pH 5 条件下,酶虫比分别为 0.4 %、0.5 %、0.6 %、0.7 %、0.8 %,测定各衡量指标。

1.2.3.2 底物浓度的筛选

在 55 ℃,酶解时间 3 h,酶虫比 0.6 %,水解体系 pH 5 的条件下,底物浓度分别为 20 %、10 %、7 %、5 %、4 %,测定各衡量指标。

1.2.3.3 水解体系 pH 值的筛选

在 55 ℃,酶解时间 3 h,酶虫比 0.6 %,底物浓度 5 %的条件下,水解体系 pH 值分别为 4、5、6、7、8,测定各衡量指标。

1.2.3.4 酶解时间的筛选

在 55 ℃,水解体系 pH 5,酶虫比 0.6 %,底物浓度 5 %的条件下,酶解时间分别为 1、2、3、4、5 h,测定各衡量指标。

1.2.3.5 酶解温度的筛选

在酶解时间 3 h,酶虫比 0.6 %,底物浓度 5 %,水解体系 pH 5 的条件下,酶解温度分别为 35、40、45、50、55 ℃,测定各衡量指标。

1.2.3.6 最佳工艺条件的选择

在单因素试验的基础上,利用正交试验法,以底物浓度、水解体系 pH 值、酶解温度作为 3 个考察因素,选取 3 个水平进行试验。采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行正交试验设计,来确定蛭螭多肽提取以及总抗氧化能力的最佳工艺条件。

1.2.4 蛭螭多肽含量的测定

蛭螭总蛋白含量的测定根据 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法检测,蛭螭水解液中多肽的含量测定依据 Folin-酚法检测^[14]。多肽提取率的计算公式为:

$$\text{多肽提取率}/\% = \text{蛭螭多肽含量}/\text{蛭螭总蛋白质量} \times 100$$

1.2.5 总抗氧化能力的测定

根据总抗氧化能力试剂盒(FRAP法)的方法测定。将酶解液稀释一定倍数后,4 000 r/min 离心 15 min,依次加入 5 μ L 待测样品,150 μ L TPTZ 稀释液、15 μ L TPTZ 溶液和 15 μ L 检测缓冲液于 96 孔板中,轻轻混匀。37 ℃孵育 3 min ~5 min 后,在 593 nm 处用酶标仪读取各孔 OD 值。

2 结果与分析

2.1 酶种类对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响

由于酶的酶切位点不同,酶解产物会有不同的生物活性。考察 4 种酶对蛭螭多肽提取率及抗氧化能力的影响,结果如图 1 和图 2 所示。

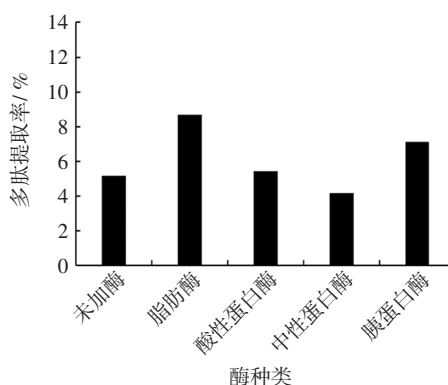


图 1 酶种类对蛭螭多肽提取率的影响

Fig.1 Effect of enzyme types on the extraction rate of *Protactia brevitaris* larva

脂肪酶酶解得到的蛭螭多肽提取率较高,可达到 8.70 %,同时,其具有较强的抗氧化能力,抗氧化能力为 0.501 mmol/L。可见,脂肪酶是制备蛭螭抗氧化肽的较适合的酶。

2.2 酶虫比对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响

酶虫比对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响试验结果见图 3、图 4。

从图可知,其它条件不变,随着酶虫比的增大,蛭螭多肽得率稍有增加,在酶虫比为 0.60 % 时,蛭螭多肽提取率可达到最大值 10.79 %;当酶虫比继续增大,蛭螭多肽提取率下降,这是因为酶添加量越大,酶与底

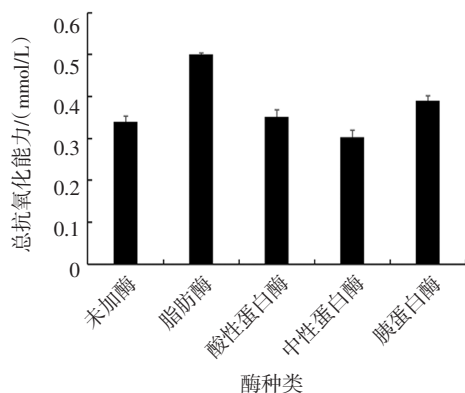


图2 酶种类对蛭螭多肽抗氧化能力的影响

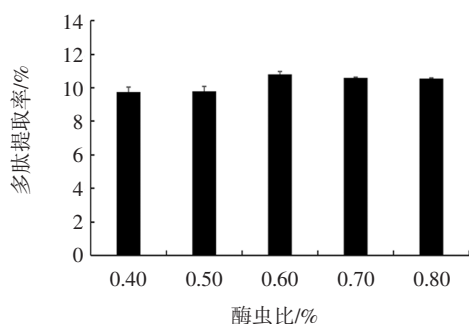
Fig.2 Effect of enzyme types on antioxidant activity of *Protactia brevitaris larva*

图3 酶虫比对蛭螭多肽提取率的影响

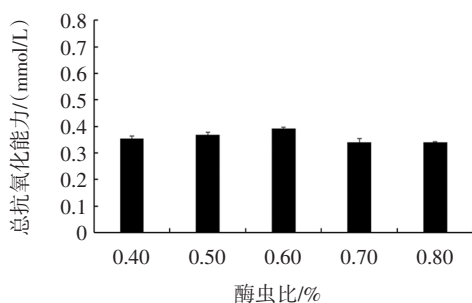
Fig.3 Effect of enzyme-worm ratio on the extraction rate of *Protactia brevitaris larva*

图4 酶虫比对蛭螭多肽抗氧化能力的影响

Fig.4 Effect of enzyme-worm ratio on antioxidant activity of *Protactia brevitaris larva*

物接触越充分,酶解越佳,但当添加到一定量后,酶与底物结合为饱和状态,继续添加酶效果不明显^[15];随着酶虫比的增大,测得鲜虫多肽抗氧化能力不一定增强,在酶虫比为0.60%时,测得鲜虫多肽抗氧化能力有最大值0.392 mmol/L,与最小值相差0.070 mmol/L,最终确定适宜的酶虫比为0.6%。

2.3 底物浓度对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响

底物浓度对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响试验结果见图5、图6。

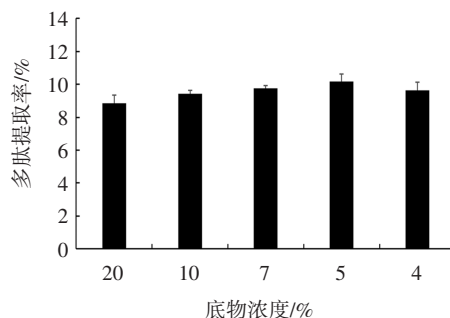


图5 底物浓度对蛭螭多肽提取率的影响

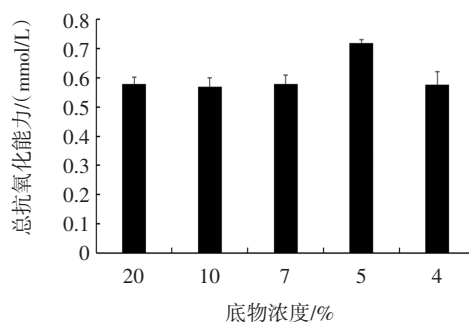
Fig.5 Effect of substrate concentration on the extraction rate of *Protactia brevitaris larva*

图6 底物浓度对蛭螭多肽抗氧化能力的影响

Fig.6 Effect of substrate concentration on antioxidant activity of *Protactia brevitaris larva*

由图5、图6可知,其它条件不变,随着底物浓度的增大,测得鲜虫多肽得率稍有增加,在底物浓度为5%时有最大值10.18%,底物浓度继续升高,多肽得率下降,因为溶剂较少时,蛋白扩散阻力较大,溶出率小,随着溶剂用量的增加,蛋白更容易溶入溶剂中,提取率随之增加,当溶剂用量过大时,部分溶质会残留在水相中造成损失,而且不利于后续的减压浓缩^[16];随着底物浓度的增大,测得鲜虫多肽抗氧化能力增强,在底物浓度为5%时有最大值0.719 mmol/L,底物浓度继续升高,多肽抗氧化能力减弱,最终确定适宜的底物浓度为5%。

2.4 水解体系pH值对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响

水解体系pH值对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响试验结果见图7、图8。

由图7、图8可知,其它条件不变,水解体系pH值从4到7范围内,随着水解体系pH值的升高,蛭螭多肽提取率及其抗氧化能力逐渐提高,在水解体系pH值为7时,蛭螭多肽提取率及其抗氧化能力均达到最大值,分别为11.9%和0.434 mmol/L;当水解体系pH值继续升高,蛭螭多肽提取率及其抗氧化能力反而下降。原因是中性条件下,两性的氨基酸呈阴离子状态而有利

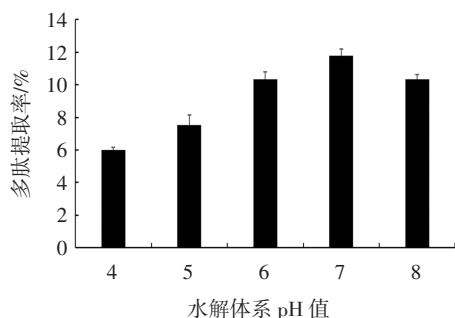


图 7 水解体系 pH 值对蛭螭多肽提取率的影响

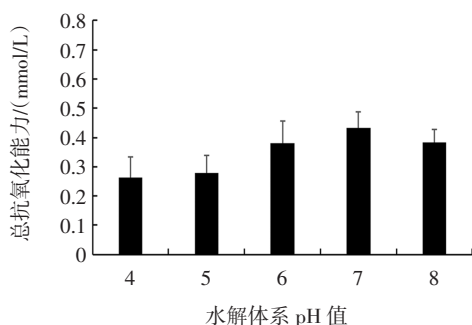
Fig.7 Effect of hydrolysis system pH on the extraction rate of *Protactia brevitaris larva*

图 8 水解体系 pH 值对蛭螭多肽抗氧化能力的影响

Fig.8 Effect of hydrolysis system pH on antioxidant activity of *Protactia brevitaris larva*

于氨基反应,而且在水解体系 pH 值为 7 时,抗氧化能力最强,所以,选择 7 作为的适宜的水解体系 pH 值。

2.5 酶解时间对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响

酶解时间对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响试验结果见图 9、图 10。

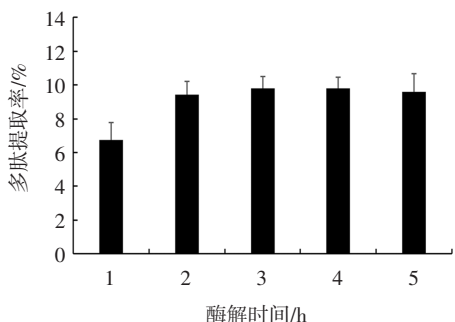


图 9 酶解时间对蛭螭多肽提取率的影响

Fig.9 Effect of enzymolysis time on the extraction rate of *Protactia brevitaris larva*

由图 9、图 10 可知,其它条件不变,随着酶解时间的增加,测得鲜虫多肽得率稍有升高,在酶解时间为 3 h 时有最大值 9.80%,酶解时间继续延长,多肽得率稍有下降,在各处理之间差异性不显著;随着酶解时间的增加,测得蛭螭多肽抗氧化能力稍有增强,在酶解时

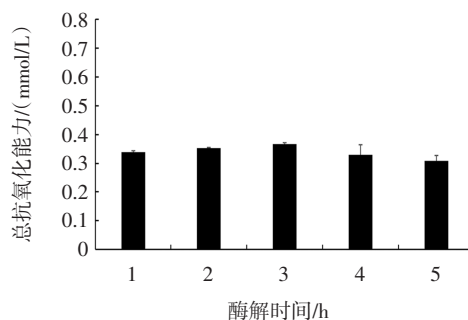


图 10 酶解时间对蛭螭抗氧化能力的影响

Fig.10 Effect of enzymolysis time on antioxidant activity of *Protactia brevitaris larva*

间为 3 h 时有最大值 0.373 mmol/L,酶解时间继续增加,多肽抗氧化能力减弱,原因是酶解产物会影响蛋白酶的催化反应速率,产物在反应初期的抑制能力较弱,反应时间越长,游离的小肽和氨基酸越多,产物的抑制能力就越强^[17],导致 3 h 后多肽提取率以及抗氧化能力值下降。

2.6 酶解温度对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响

酶解温度对蛭螭多肽提取率及其抗氧化作用的影响试验结果见图 11、图 12。

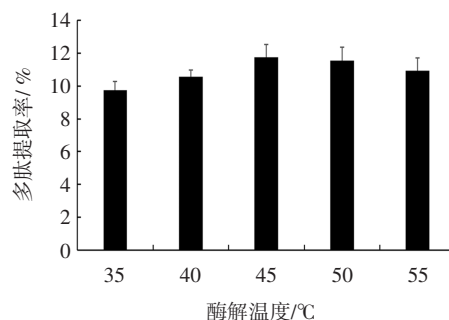


图 11 酶解温度对蛭螭多肽提取率的影响

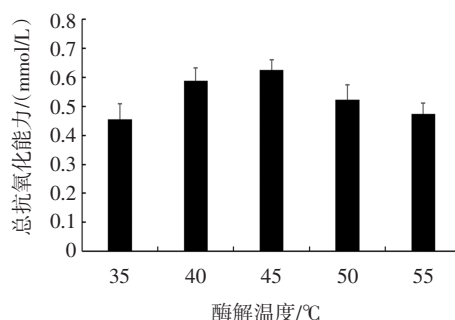
Fig.11 Effect of enzymatic temperature on the extraction rate of *Protactia brevitaris larva*

图 12 酶解温度对蛭螭多肽抗氧化能力的影响

Fig.12 Effect of enzymatic temperature on antioxidant activity of *Protactia brevitaris larva*

由图 11、图 12 可知,其它条件不变,随着酶解温度的升高,鲜虫多肽得率增加,在酶解温度为 45 ℃时有最大值 11.94 %,温度继续升高,多肽率下降;随着酶解温度的升高,测得鲜虫多肽抗氧化能力增强,在酶解温度为 45 ℃时有最大值 0.625 mmol/L, 酶解温度继续升高,多肽抗氧化能力减弱,原因是在 45 ℃时,水解效果比较好,产生较多的相对分子量比较小具备高抗氧化活性的分子肽。因此,选择 45 ℃为酶解适宜温度。

2.7 正交试验

根据单因素试验结果,选取影响蛭螬多肽以及总抗氧化能力效果各因素中有意义的水平做正交试验,对结果进行极差分析,以确定最佳的提取条件。底物浓度(A)、水解体系 pH 值(B)、酶解温度(C)对蛭螬多肽以及总抗氧化能力的影响较显著,因此,采用 $L_9(3^3)$ 正交表,以底物浓度(A)、水解体系 pH 值(B)、酶解温度(C)作为 3 个考察因素,选取 3 个水平进行试验。正交因素水平表见表 2, 酶法提取多肽工艺正交试验结果及方差分析见表 3、表 4。

表 2 $L_9(3^3)$ 正交试验因素水平表
Table 2 Factors and levels for $L_9(3^3)$ orthogonal array design

水平	因素		
	A 底物浓度/%	B 水解体系 pH 值	C 酶解温度/℃
1	7	6	40
2	5	7	45
3	4	8	50

表 3 酶法提取多肽工艺 $L_9(3^3)$ 正交试验设计及结果
Table 3 $L_9(3^3)$ orthogonal experiment design and results of enzymatic extraction of polypeptide

试验号	A	B	C	多肽提取率/%
1	1	1	1	7.783
2	2	1	2	8.115
3	3	1	3	7.178
4	1	2	2	11.757
5	2	2	3	12.861
6	3	2	1	12.596
7	1	3	3	12.535
8	2	3	1	12.573
9	3	3	2	12.030
K_1	32.074	23.075	32.952	
K_2	33.550	37.214	31.902	
K_3	31.804	37.139	32.574	
k_1	10.691	7.692	10.984	
k_2	11.183	12.405	10.634	
k_3	10.601	12.380	10.858	
R	0.582 2	4.713	0.350	

表 4 方差分析结果
Table 4 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
底物浓度	0.287 7	2	0.143 8	0.35	0.741 0
水解体系 pH 值	34.033 8	2	17.016 9	41.34	0.023 6
酶解温度	0.087 2	2	0.043 6	0.11	0.904 2
误差	0.823 2	2	0.411 6		
合计	35.231 9	8			

由表 3 和表 4 的分析结果可以看出, $R_B > R_A > R_C$, 3 个因素对蛭螬多肽提取率的影响顺序为: 水解体系 pH 值(B)>底物浓度(A)> 酶解温度(C)。3 个因素中,对蛭螬多肽提取率影响最大的因素是水解体系 pH 值。在试验设计范围内,优化得到酶法提取蛭螬多肽的最佳条件为 $A_2B_2C_1$,即底物浓度 5 %、水解体系 pH 7、酶解温度 40 ℃。

总抗氧化能力工艺正交试验结果及方差分析见表 5、表 6。

表 5 总抗氧化能力工艺 $L_9(3^3)$ 正交试验设计及结果
Table 5 $L_9(3^3)$ orthogonal test design and results of total antioxidant capacity technology

试验号	A	B	C	总抗氧化能力/(mmol/L)
1	1	1	1	0.257
2	2	1	2	0.160
3	3	1	3	0.157
4	1	2	2	0.398
5	2	2	3	0.593
6	3	2	1	0.251
7	1	3	3	0.399
8	2	3	1	0.554
9	3	3	2	0.273
K_1	1.053	0.574	1.062	
K_2	1.206	1.242	0.830	
K_3	0.681	1.225	0.808	
k_1	0.351	0.191	0.354	
k_2	0.402	0.414	0.277	
k_3	0.227	0.408	0.269	
R	0.175	0.223	0.085	

表 6 方差分析结果
Table 6 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
底物浓度	0.066 1	2	0.033 1	3.17	0.239 7
水解体系 pH 值	0.096 8	2	0.048 4	4.65	0.177 1
酶解温度	0.018 0	2	0.009 0	0.86	0.536 5
误差	0.020 8	2	0.010 4		
合计	0.201 7	8			

由表 5 和表 6 的分析结果可以看出, $R_B > R_A > R_C$, 3 个因素对蛭螭多肽总抗氧化能力的影响顺序为: 水解体系 pH 值(B) > 底物浓度(A) > 酶解温度(C)。以由直观分析和方差分析得出, 考察蛭螭多肽总抗氧化能力的最佳条件为 $A_2B_2C_1$, 即底物浓度 5 %、水解体系 pH 7、酶解温度 40 ℃。

2.8 验证试验

按 $A_2B_2C_1$ 条件进行 3 次平行试验, 蛭螭多肽提取率以及总抗氧化能力的平均值分别为 14.21 % 和 0.752 mmol/L, 高于表 3、表 5 中每一项试验结果, 故 $A_2B_2C_1$ 为最佳提取工艺条件。

3 结论

本试验利用酶解法提取蛭螭多肽, 探索其多肽的抗氧化活性。首先选出了最佳脂肪酶, 再通过 5 个单因素: 酶虫比、酶解温度、酶解时间、底物浓度、水解体系 pH 值进行考察, 得出蛭螭多肽的提取工艺以及抗氧化能力条件为: 酶虫比为 0.6 %, 酶解温度为 45 ℃, 酶解时间为 3 h, 底物浓度为 5 %, 水解体系 pH 值为 7。通过正交试验优化蛭螭多肽提取率及其总抗氧化能力, 获得最佳酶解工艺, 即底物浓度 5 %、水解体系 pH 7、酶解温度 40 ℃。在此提取条件下, 蛭螭多肽提取率 14.21 %, 总抗氧化能力为 0.752 mmol/L。由本研究可知, 蛭螭酶解液具有天然的抗氧化能力, 在抗氧化食品、饲料和药品领域中据有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 董庆峰, 张崇禧, 张书锋, 等. 蛭螭的化学成分及药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2008, 26(1): 14-16
- [2] Xu X, Liu W, Li W, et al. Anticoagulant activity of crude extract of *Holotrichia diomphalia* larvae[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 177: 28-34
- [3] Pei K, Cao W, Guo Q Q, et al. Analysis of liposoluble constituents in *Holotrichia diomphalia* by GC-MS and investigation their anti-inflammatory and analgesic activities[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 35(35): 357-360
- [4] Oh W Y, Pyo S, Lee K R, et al. Effect of *Holotrichia diomphalia* larvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 87(2/3): 175
- [5] 张莉莎, 张建新, 欧晓峰, 等. 黄粉虫抗氧化活性肽的分离纯化研究[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 180-183
- [6] 何桂梅, 张建新, 郭倩. 双酶水解黄粉虫水溶性蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 西北农业学报, 2011, 20(2): 193-197
- [7] 郭倩, 张建新, 何桂梅, 等. 大麦虫蛋白质的提取分离及抗氧化性研究[J]. 西北农业学报, 2011, 20(2): 188-192
- [8] 张建新, 郭倩, 何桂梅, 等. 大麦虫水溶蛋白的分离纯化及抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 30-33
- [9] 闵建华, 李建科, 陈婷. 蚕蛹多肽的制备工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 123-126
- [10] 许彦腾, 张建新, 宋真真, 等. 黑水虻幼虫蛋白质的制备及体外抗氧化活性[J]. 核农学报, 2014, 28(11): 2001-2009
- [11] 刘宇, 刘春泉, 庄世文, 等. 鹰嘴豆肽清除自由基作用的研究[J]. 食品科技, 2009(3): 173-176
- [12] 王雪芹. 鲑鱼多肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014: 42-62
- [13] 张根生, 黄巧莉, 杨春燕, 等. 木瓜蛋白酶法制备猪骨胶原多肽工艺条件研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 262-265
- [14] 艾自明. 牡蛎多肽的理化性质、药理活性测定及其口服结肠定位微丸的研究[D]. 济南: 山东大学, 2010: 46-49
- [15] 曹亚兰. 大豆抗氧化肽的制备、分离纯化及结构鉴定 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012: 35-47
- [16] 孙亚男, 李文香, 胡欣蕾, 等. 杏鲍菇多肽提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(4): 144-149
- [17] 张建新, 郭赵梅, 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

收稿日期: 2018-08-20