

鹿血多肽的制备工艺及抗氧化能力研究

胡太超^{1,2}, 陶荣珊¹, 李庆杰³, 张 晶^{1,4}, 苏凤艳¹, 王艳梅^{1,4}, 王全凯^{1,2,*}

(1. 吉林省中韩动物科学研究院, 吉林长春 130600;

2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118;

3. 长春中医药大学附属医院, 吉林长春 130021;

4. 长春科技学院, 吉林长春 130600)

摘 要:以新鲜鹿血为原料,利用胰蛋白酶水解制备鹿血多肽,以水解度为指标,在单因素和正交实验的基础上,确定酶解的最佳工艺条件,即加酶量为 6%, pH 为 9, 反应温度为 37℃, 反应时间为 4h, 水解度为 46.72% ± 0.11%。并进一步对鹿血多肽进行抗氧化能力测定,在高浓度时多肽的羟自由基清除能力和 DPPH 自由基清除能力较高。

关键词:酶解, 正交实验, 抗氧化能力

Study on the preparation process and the antioxidant capacity of deer blood polypeptide

HU Tai-chao^{1,2}, TAO Rong-shan¹, LI Qing-jie³, ZHANG Jing^{1,4},

SU Feng-yan¹, WANG Yan-mei^{1,4}, WANG Quan-kai^{1,2,*}

(1. Jilin Sino-ROK Academy of Animal Sciences, Changchun 130600, China;

2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. The Affiliated Hospital of Changchun College of TCM, Changchun 130021, China;

4. Changchun University of Sciences and Technology, Changchun 130600, China)

Abstract: The extraction of deer blood polypeptide was studied using trypsin hydrolysis with fresh deer blood as raw material. This article took the degree of hydrolysis as index. The optimum conditions for enzymatic hydrolysis was determined on the basis of single factor and orthogonal experiment. The optimum conditions were the amount of enzyme 6%, pH9, the hydrolysis temperature 37℃, reaction time 4h, which the degree of hydrolysis reached 46.72% ± 0.11% under this condition. And determination of antioxidant capacity of the peptides were performed. The high concentration of deer blood polypeptide had strong hydroxyl radicals scavenging ability and DPPH radical scavenging ability.

Key words: enzymatic hydrolysis; orthogonal experiment; antioxidant capacity

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)17-0107-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.17.014

鹿血即梅花鹿或马鹿的腔血或茸血,系传统的名贵中药。其性热,味甘咸,归肝、肾二经;具有养血益精、行血祛瘀、消肿疗伤等作用^[1]。经近代动物实验和临床研究表明,鹿血具有抗缺氧抗疲劳^[2]、抗衰老^[3]、增强免疫功能^[4]、补肾益精^[5]、促进代谢^[6]、补血功能^[7]、对神经功能的影响^[7]和创伤愈合^[8]等方面的药理作用,具有很好的药用价值和巨大的开发潜力。

鲜鹿血含水分 80%~81%,有机成分 16%~17%,其中主要是蛋白质^[9]、酶类^[10]、多种脂类、磷脂、嘌呤、激素类、固醇类、维生素类、糖脂类和多糖类

等;无机成分占 2%~4%,灰分占 3%~4%,并含多种常量和有益微量元素^[11]。

鹿血的研究和应用仍处在初级阶段,大多为粗制品,没有进行深加工,对鹿血加工利用和功能作用的研究比较滞后。目前鹿血产品主要形式为鹿血酒、鹿血口服液、鹿血口嚼片、鹿血滋补胶囊。本文利用胰蛋白酶对鹿血进行水解,制备鹿血多肽,通过正交实验探索最佳提取工艺条件,为鹿血的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜鹿血 购于双阳鹿乡;胰蛋白酶(活力 250U/mg) 上海惠世生物科技有限公司;邻苯三酚,水杨酸,FeSO₄,H₂O₂ 长春赛奥克生物科技有限公司;DPPH Sigma 公司;其它试剂均为分析纯。

PHS-3C 精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司

收稿日期: 2013-11-28 * 通讯联系人

作者简介: 胡太超(1989-),女,硕士,研究方向: 动物药。

基金项目: 国际科技合作专项(2011DFA32900);吉林省科技发展计划项目(20120246);长科技合(2012219)。

公司;GB204 电子分析天平 德国 SARTORIUS 公司;W201B 恒温水浴锅 上海申生科技有限公司;UV2800 紫外可见分光光度计 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 水解度的测定 取一定量新鲜鹿血,按 1:9 的体积比加入 5% 柠檬酸钠,然后 4000r/min 离心 30min,取上清液进行酶解,并计算出其水解度。选取加酶量、pH、反应时间、反应温度四个因素,研究其对鹿血水解度的影响,找出最优酶解条件。

本实验采用 pH-state 法^[12]测定水解度,计算公式如下:

$$DH(\%) = B \times N \times 1/\alpha \times 1/m \times 1/h_{tot} \times 100$$

其中: B 是碱液的体积(mL); N 是碱液的摩尔浓度(mol/mL); α 是氨基的解离度; m 是底物中蛋白质的质量(g); h_{tot} 是每克原料蛋白的肽键毫摩尔数(mmol/g)。

1.2.2 单因素实验设计

1.2.2.1 加酶量对水解度的影响 取等体积鹿血 5 份,调节 pH 为 8.5,分别加入 2%、3%、4%、5%、6% 的胰蛋白酶于 37℃ 反应 4h,测定其水解度,重复 3 次,取平均值。

1.2.2.2 不同 pH 对水解度的影响 取等体积鹿血 5 份,加入 5% 的胰蛋白酶,分别调节 pH 为 7、7.5、8、8.5、9,于 37℃ 反应 4h,测定其水解度,重复 3 次,取平均值。

1.2.2.3 酶解时间对水解度的影响 取等体积鹿血 5 份,加入 5% 的胰蛋白酶,调节 pH 为 8.5,置于 37℃ 水浴中,分别反应 2、4、6、8h,测定其水解度,重复 3 次,取平均值。

1.2.2.4 反应温度对水解度的影响 取等体积鹿血 5 份,加入 5% 的胰蛋白酶,调节 pH 为 8.5,调节反应温度分别为 30、34、37、40℃,反应 4h,测定其水解度,重复 3 次,取平均值。

1.2.3 正交实验设计 在单因素实验的基础上采用正交实验对酶解工艺进行优化,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平	因素			
	A 加酶量 (%)	B pH	C 时间 (h)	D 温度 (℃)
1	4	8	4	34
2	5	8.5	6	37
3	6	9	8	40

1.2.4 抗氧化能力测定 本文采用体外抗氧化模型对最佳工艺条件下制备的鹿血多肽进行抗氧化能力测定,水解度为 46.72%。在 0.1~10mg/mL 范围内与维生素 C(V_c) 的抗氧化能力进行对比,初步研究了其抗氧化能力。

1.2.4.1 羟自由基清除能力的测定 采用水杨酸比色法测定多肽对羟自由基清除能力。具体测定参考文献^[13]:在干燥的试管中分别加入 2.0mmol/L 硫酸

亚铁溶液 1.5mL、30mmol/L 过氧化氢溶液 1.5mL、6.0mmol/L 水杨酸溶液 1.5mL,振荡,摇匀,于 37℃ 水浴,15min 后取出,在 510nm 处测其吸光度 A_0 ;然后加入样液 2.0mL,振荡,摇匀,于 37℃ 水浴 15min 后取出,测其吸光度 A 。重复测定三次,取平均值。

清除率计算公式为:

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

式中: A_0 —为试剂空白液的吸光度; A —为样液的吸光度。

1.2.4.2 超氧阴离子自由基清除能力的测定 采用邻苯三酚自氧化法^[14]测定鹿茸多肽对超氧阴离子自由基的清除能力。具体测定参照文献^[15]:在干燥的试管中加入 4.5mL 0.05mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH8.2),4.0mL 去离子水,0.2mL 待测样液,混匀后,置于 25℃ 恒温水浴 10min。取出后迅速加入 0.3mL (25℃ 温浴 10min) 的邻苯三酚溶液(3mmol/L, 10mmol/L HCl 配制),混匀后立即在 320nm 下测定,每隔 30s 测定 1 次吸光度值,记录 4min 内吸光度值的变化,并求出其变化斜率,用 10mmol/L HCl 代替邻苯三酚做空白调零。用去离子水代替样品溶液同样方法测定 4min 内吸光度值的变化,并求出其变化斜率。重复实验三次,取平均值。

清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = (k_0 - k)/k \times 100$$

式中: k_0 —空白管吸光度值变化斜率; k —样品管吸光度值变化斜率。

1.2.4.3 DPPH 自由基清除能力的测定 参照文献^[16]的 DPPH 测定方法:无水乙醇配制 DPPH 溶液 0.2mmol/L,保存于棕色瓶中备用。精确吸取 2mL 不同浓度的样品于试管中,分别加入 2mL DPPH 溶液,充分混合,摇匀,水浴(40℃)30min 后倒入比色皿中,于 517nm 处测定其吸光度值 A_1 ,同样测定 2mL 样品液和 2mL 无水乙醇的吸光度值 A_2 以及 2mL DPPH 溶液加入 2mL 蒸馏水的吸光度值 A_0 。用蒸馏水作空白。重复 3 次,取平均值。样品溶液对 DPPH 自由基清除率(即抑制率)用下面的公式计算:

$$P(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

式中: P —抗氧化剂对 DPPH 自由基清除率(%); A_1 —2.0mL 样品液 + 2.0mL DPPH 溶液混合液的吸光度值; A_2 —2.0mL 样品液 + 2.0mL 无水乙醇混合液的吸光度值; A_0 —2.0mL DPPH 溶液 + 2.0mL 蒸馏水混合液的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 加酶量对水解度的影响 结果见图 1,在一定范围内加酶量对水解度影响较大,随着加酶量的增加,水解度增大,当加酶量达 5% 后,水解度增加幅度趋于平缓,此时加酶量对水解度影响不大,酶与底物结合达到饱和状态,所以从实验成本和水解效率两方面考虑,最适加酶量确定为 5%。

2.1.2 不同 pH 对水解度的影响 结果见图 2,pH 在 7~9 时,水解度随 pH 增大而增大,在 pH 为 9.5 时酶已失活,所以酶的最佳 pH 为 9。

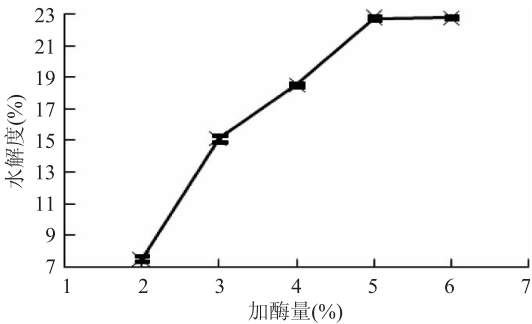


图1 加酶量对水解度的影响

Fig.1 Effects of enzyme content on the DH

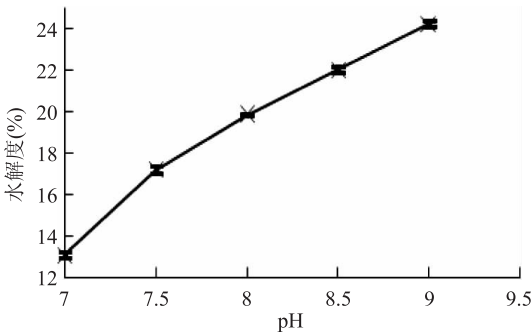


图2 不同 pH 对水解度的影响

Fig.Effects of different pH on the DH

2.1.3 酶解时间对水解度的影响 结果见图 3,在前 6h 内,水解度随时间延长而增大,4~6h 增长较快,6h 后增长缓慢,趋于平缓,因此选用 6h 为最适酶解时间。

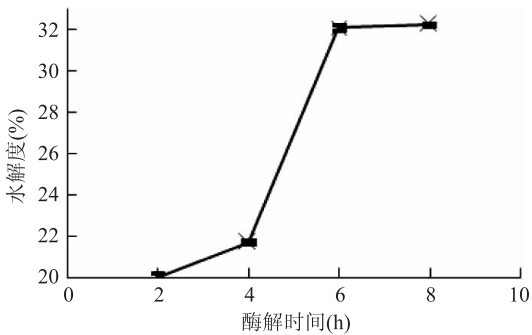


图3 酶解时间对水解度的影响

Fig.3 Effects of enzymolysis time on the DH

2.1.4 反应温度对水解度的影响 结果见图 4,反应温度不同会影响酶活力的大小,从而影响水解度的大小。在一定范围内,随着反应温度的升高,水解度增大,达到 37℃ 后,水解度开始下降,所以本实验的最佳反应温度为 37℃。

2.2 正交实验

正交实验结果如表 2 所示。
由极差分析可知四个因素对水解度影响的主次顺序是加酶量 > pH > 反应温度 > 反应时间,方差分析表明,加酶量、pH 和反应温度对结果均有极显著影响,反应时间有显著影响。提取鹿血多肽的最优工艺条件为 A₃B₃C₁D₂,即加酶量为 6%,pH 为 9,反应温度为 37℃,反应时间为 4h。

经实验验证,实验条件:加酶量为 6%,pH 为 9,

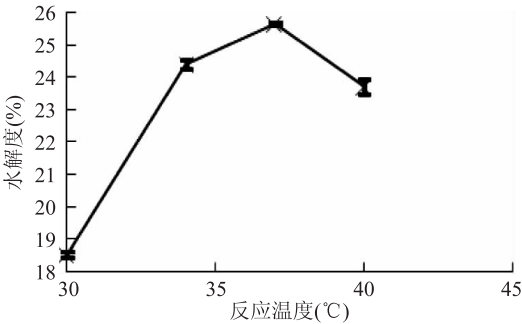


图4 反应温度对水解度的影响

Fig.4 Effects of reaction temperature on the DH

反应温度为 37℃,反应时间为 4h,平行测定三次,水解度以均值 ± 标准偏差的形式表示为 46.72% ± 0.11%。

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of the orthogonal test

实验号	A	B	C	D	水解度 (%)
1	1	1	1	1	18.18
2	1	2	2	2	22.74
3	1	3	3	3	30.80
4	2	1	2	3	34.25
5	2	2	3	1	31.28
6	2	3	1	2	46.12
7	3	1	3	2	39.41
8	3	2	1	3	43.00
9	3	3	2	1	41.55
K ₁	71.73	91.83	106.50	91.02	
K ₂	111.63	96.21	98.52	108.27	
K ₃	123.15	118.47	101.49	107.25	
k ₁	23.91	30.61	35.50	30.34	
k ₂	37.21	32.07	32.84	36.09	
k ₃	41.05	39.49	33.83	35.75	
R	17.15	8.88	2.66	5.75	
优水平	A ₃	B ₃	C ₁	D ₂	
优组合	A ₃ B ₃ C ₁ D ₂				
主次顺序	A > B > D > C				

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	971.845	2	485.923	196.377	**
B	272.016	2	136.008	54.965	**
C	21.645	2	10.823	4.374	*
D	125.041	2	62.521	25.267	**
误差	22.27	9	2.474		
总和	1412.818	17			

注: F_{0.01}(2,9) = 8.02; F_{0.05}(2,9) = 4.26。

2.3 抗氧化能力测定

2.3.1 羟自由基清除能力的测定 由图可以看出 0.1~4mg/mL 范围内, V_c 的羟自由基清除能力随着其浓度的增加而增加, 4mg/mL 后清除能力增加缓慢,

趋于饱和。多肽的清除能力随着浓度的增加而增加,当4mg/mL,增加缓慢。2mg/mL后多肽的清除能力强于 V_c ,表现出较强的羟自由基清除能力。

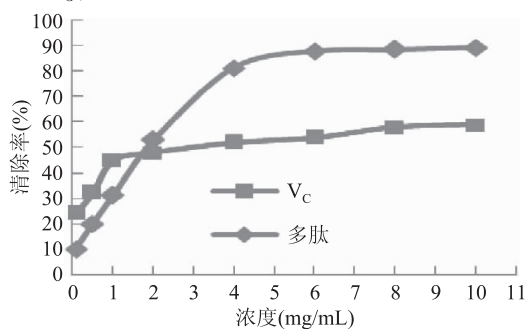


图5 羟自由基清除能力

Fig.5 Hydroxyl radicals scavenging ability

2.3.2 超氧阴离子自由基清除能力的测定 V_c 的清除率开始时增加较明显,1mg/mL后增加趋于平缓,但始终高于多肽的清除率。多肽随着浓度增加,超氧阴离子自由基清除率增加,但增加较缓慢。多肽的超氧阴离子清除能力较弱。多肽的清除率开始时增加较明显,1mg/mL后增加趋于平缓,但始终高于多肽的清除率。多肽随着浓度增加,超氧阴离子自由基清除率增加,但增加较缓慢。多肽的超氧阴离子清除能力较弱。

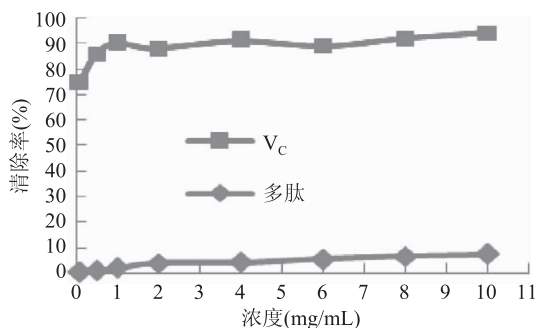


图6 超氧阴离子自由基清除能力

Fig.6 Superoxide anion radical scavenging ability

2.3.3 DPPH 自由基清除能力的测定 V_c 的 DPPH 自由基清除能力变化不明显,0.1~10mg/mL 间均在90%左右波动。多肽的清除能力随着浓度增加而增大,10mg/mL时接近 V_c 的清除能力。说明多肽低浓度时,清除率低于 V_c 的清除率,高浓度时其清除能力与 V_c 相当。

多肽的 DPPH 自由基清除能力变化不明显,0.1~10mg/mL间均在90%左右波动。多肽的清除能力随着浓度增加而增大,10mg/mL时接近 V_c 的清除能力。说明多肽低浓度时,清除率低于 V_c 的清除率,高浓度时其清除能力与 V_c 相当。

3 结论

通过正交实验研究对水解度影响的主次顺序依次是加酶量、pH、反应温度、反应时间,最佳提取工艺条件:加酶量为6%,pH为9,反应温度为37℃,反应时间为4h。经过验证,在此条件下的水解度为46.72%,表明此方法可行。通过与 V_c 的抗氧化能力

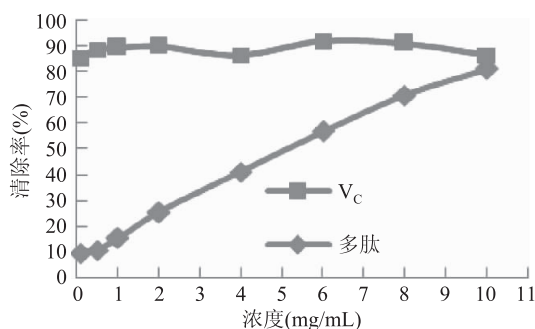


图7 DPPH 清除能力

Fig.7 DPPH radical scavenging ability

对比,鹿血多肽在高浓度时的羟自由基清除能力和 DPPH 自由基清除能力较高,可能与鹿血中所含的抗氧化活性肽有关。本实验研究为鹿血的进一步开发利用提供基础依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [2] 杨怀江, 李瑞敏. 梅花鹿血粉胶囊抗缺氧、抗疲劳作用研究[J]. 长春中医学院学报, 2001, 17(2): 44.
- [3] 黄开华. 梅花鹿血酶解制备抗氧化活性多肽及其抗衰老功能的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007.
- [4] 胡圣爱, 王册, 耿智辉, 等. 复方鹿血冻干粉免疫调节作用的研究[J]. 河北医药, 2003a, 25(10): 732.
- [5] 宋胜利, 葛志广, 宋文涛, 等. 鹿血资源的开发及利用前景[J]. 农牧产品开发, 2000, 11: 5-8.
- [6] 袁相恋, 薄士儒, 李庆杰, 等. 鹿血化学成分和药理作用及其应用研究进展[J]. 经济动物学报, 2011, 15(4): 207-211.
- [7] 赵世臻. 鹿产品及其保健[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [8] 崔丽春. 梅花鹿血液中三种抗衰老成分的动力学分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.
- [9] 贾晓光, 陈敏, 倪慧. 鹿血中的无机元素和氨基酸[J]. 中药材, 1999, 22(10): 492-493.
- [10] 刘春娟. 鹿茸和鹿血活性多肽的研究[M]. 吉林: 吉林大学, 2012.
- [11] 蒋蕾, 赵文静, 常惟智. 鹿血的药理作用及临床应用概况[J]. 中药研究进展, 2006, 23(6): 12-13.
- [12] Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. Elsevier Applied Science Publishing Co, Inc New York, 1986: 97-98.
- [13] 文赤夫, 董爱文, 罗庆华, 等. 紫花地丁中芹菜素提取和清除自由基活性研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(1): 20-23.
- [14] Cotellet N, Bernier JL, Catteau JP, et al. Antioxidant Properties of Hydroxy - Flavones [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1996, 20(1): 35-43.
- [15] 王群, 郑海涛, 葛尧, 等. 酶法制备鳙鱼鱼皮胶原蛋白肽及其清除超氧阴离子自由基的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(14): 87-93.
- [16] 王萍, 葛丽花. 阿魏酸低聚糖的体外抗氧化性质的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 8-11.