

东北林蛙卵蛋白酶解工艺及其酶解物的抗疲劳活性

李永政, 胡春晓, 王 铮, 金莉莉, 王秋雨*
(辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要: 研究复合蛋白酶对东北林蛙卵蛋白的酶解工艺及其酶解物的抗疲劳活性。分别考察 pH 值、加酶量、固液比、反应时间、反应温度对林蛙卵蛋白水解度的影响, 并通过正交试验得到最佳酶解工艺条件: 加酶量 3000U/g pro、温度 55℃、pH8.0、水解时间 5h、固液比 1:5.5(m/V)。以昆明小鼠为实验对象, 通过测定小鼠的负重游泳时间、肝糖原及血乳酸含量, 研究东北林蛙卵蛋白酶解物的抗疲劳活性, 结果显示最佳优化条件下得到的林蛙卵蛋白酶解物具有较好的抗疲劳作用。

关键词: 东北林蛙; 卵蛋白; 酶解工艺; 抗疲劳活性

Enzymatic Hydrolysis and Anti-Fatigue Activity of Egg Protein of *Rana dybowskii*

LI Yong-zheng, HU Chun-xiao, WANG Zheng, JIN Li-li, WANG Qiu-yu*
(College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: In order to exploit the resource of *Rana dybowskii* eggs, protamex was used to hydrolyze egg protein into small peptides in this study. The degree of hydrolysis of *Rana dybowskii* eggs was investigated with respect to hydrolysis parameters such as pH, enzyme dose, solid-to-liquid ratio, hydrolysis time and temperature. The optimal hydrolysis parameters were determined as follows: pH 8.0, 3000 U/g pro of enzyme dose, 55 °C, 1:5.5 (m/V) of solid-to-liquid ratio and 5 h of hydrolysis time. The hydrolysate obtained under these conditions was determined to have obvious anti-fatigue function in mice in terms of weight-loaded swimming time and the contents of blood lactic acid and liver glycogen.

Key words: *Rana dybowskii*; egg protein; hydrolysis; anti-fatigue activity

中图分类号: R931.77

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)09-0235-05

东北林蛙俗称田鸡、哈士蟆、雪蛤等, 在动物分类上属于两栖纲、无尾目、蛙科、蛙属, 广泛分布于我国东北地区^[1], 是集药、食补于一体的珍贵经济蛙种^[2]。近年来随着人工养殖技术的逐渐成熟和完善, 其资源十分丰富。东北林蛙卵具有较高的营养价值, 脱脂后蛋白质含量高达 80%, 氨基酸种类齐全, 含有人体营养所需的 9 种必需氨基酸, 必需氨基酸与总氨基酸的比值(E/T)高达 49.64%, 并且富含微量元素, 是一种天然优质的保健食品原料^[3-4]。但长期以来, 蛙卵一直作为林蛙加工的废料, 造成了优质动物蛋白资源的浪费。因此, 蛙卵的有效开发利用将显著增加林蛙产业的经济社会效益。

近年来科学研究表明, 蛋白质经消化道酶促水解

后, 主要以小肽的形式吸收, 并且比完全游离氨基酸更易被机体吸收利用^[5]。与蛋白质相比, 活性肽具有良好的理化性质、加工性能以及重要的生理功能, 如促进矿物质的吸收, 调节神经系统, 抗衰老、降血压、降血脂、降胆固醇、护肝、抗菌等作用^[6]。随着生物技术的发展, 利用酶法水解来改善蛋白质的功能性质已被应用于工业化生产, 所得活性肽亦可添加于食品或作为营养保健品的基料, 对提高蛋白资源利用率及经济价值具有重要意义^[7-8]。本实验以脱脂后的林蛙卵为原料, 研究复合蛋白酶对林蛙卵蛋白的最佳酶解条件, 并检测其酶解物的抗疲劳活性, 以期对林蛙卵的合理利用及其工业化产品的开发提供理论依据。

收稿日期: 2011-06-15

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科研项目(2009A314); 辽宁省科技厅科技攻关计划项目(2009209001)

作者简介: 李永政(1953—), 男, 实验师, 研究方向为食品科学。E-mail: wqy1961@yahoo.com.cn

* 通信作者: 王秋雨(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养学。E-mail: qiuyuwang@lnu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

东北林蛙卵由辽宁宏宇生物科技有限公司提供, 50℃烘干, 粉碎, 脱脂待用。

昆明种系实验小白鼠购于中国医科大学实验动物部, 动物健康合格证编号: SCXK(辽 2008-0005), 体质量 18~22g, 雄性。将小鼠随机分为 4 组, 每组 30 只, 组间体质量经 *t* 检验无显著差异。林蛙卵蛋白组、酶解后同剂量组和高剂量组的灌胃剂量分别为 0.625、0.625、1.000g/(kg·d), 对照组为同体积的蒸馏水。各组连续灌胃 35d 后进行各项指标的测定。

复合蛋白酶(5.8×10⁴ U/g pro) 南宁东恒华道生物技术有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 原料预处理

加热使蛋白质适度变性, 可提高蛋白质的水解度。保持其他条件不变, 改变预处理温度和时间两个参数, 酶解后以水解度为指标确定最佳预处理条件。

1.2.2 酶解工艺条件优化

在不同 pH 值、加酶量、反应时间、固液比、反应温度条件下, 选用复合蛋白酶对林蛙卵蛋白进行酶解, 酶解后沸水浴灭酶 10min, 8000r/min 离心 20min, 取上清液, 以水解度为指标确定其最佳水解条件。并在单因素试验的基础上, 以反应温度、pH 值、固液比、时间 4 个因素为变量, 进行四因素三水平正交试验(表 1), 获得卵蛋白最适酶解条件。

表 1 L₉(3⁴)正交试验因素水平设计表
Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	因素			
	A 反应温度/℃	B 反应时间/h	C 固液比(m/V)	D pH
1	53	4.0	1:4.5	7.0
2	55	4.5	1:5.0	7.5
3	57	5.0	1:5.5	8.0

1.2.3 测定方法

蛋白质含量测定: 采用微量凯氏定氮法; 游离氨基氮含量的测定: 采用茚三酮显色法; 水解度(DH)的计算采用如下公式^[9]:

$$\text{水解度} \% = \frac{A - B}{C} \times 100$$

式中: A 为酶解液中游离氨基氮含量; B 为原料中固有游离氨基氮含量; C 为原料蛋白强酸水解后总游离氨基氮含量。

1.2.4 负重游泳时间测定

小鼠于末次给予受试物 30min 后, 尾部负重 5% 体质量的铅丝, 在水深不少于 30cm、水温(25 ± 0.5)℃的游泳箱中游泳, 记录小鼠从入水至沉入水下 10s 不能浮出水面的时间, 为其竭力游泳时间^[10]。

1.2.5 肝糖原含量测定

小鼠于末次给予林蛙卵蛋白酶解物 30min 后, 30℃水箱中游泳 90min, 颈椎脱臼处死取出肝脏, 经生理盐水漂洗, 滤纸吸干, 精确称取肝脏 200mg, 加 8mL 三氯醋酸匀浆 1min, 3000r/min 离心 15min, 取上清液用蒽酮法测定肝糖原含量^[11]。

1.2.6 血乳酸含量的测定

小鼠于末次给予林蛙卵蛋白酶解物 30min 后, 在水深 30cm、水温 30℃的游泳箱中无负重游泳 90min, 休息 15min, 拔眼球采全血约 0.5mL。待血液凝固后 2000r/min 离心 15min, 取血清测定血乳酸含量^[12]。

2 结果与分析

2.1 东北林蛙卵蛋白粉中粗蛋白含量的分析结果

3 次实验测得脱脂东北林蛙卵中粗蛋白的含量为 80.07%。

2.2 酶解的预处理条件对林蛙卵蛋白酶解度的影响

2.2.1 预处理温度

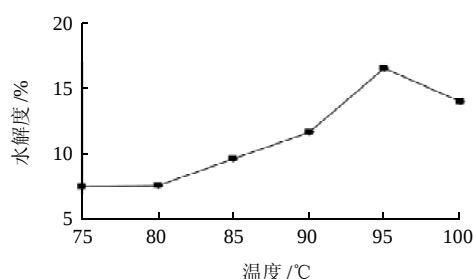


图 1 预处理温度对林蛙卵蛋白水解度的影响

Fig.1 Effect of pre-treatment temperature on hydrolysis degree of egg protein

在加酶量为 3000U/g pro、固液比 1:5、pH7.5 条件下, 保持加热时间(10min)不变, 在不同温度(75、80、85、90、95、100℃)条件下对蛙卵蛋白进行预处理, 然后进行酶解。如图 1 所示, 水解度普遍升高, 在 95℃时水解度最高。温度超过 95℃之后水解度下降, 这可能是由于温度过高而导致蛋白质过度变性所致。

2.2.2 预处理时间

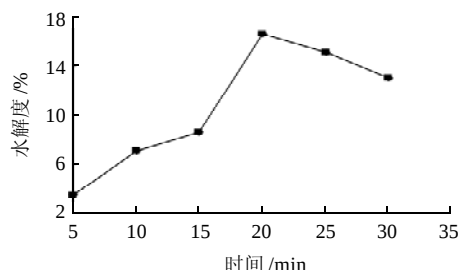


图2 预处理时间对林蛙卵蛋白水解度的影响

Fig.2 Effect of pre-treatment time on hydrolysis degree of egg protein

在95℃、加酶量为3000U/g pro、固液比1:5、pH7.5的条件下,对林蛙卵蛋白进行不同时间(5、10、15、20、25、30min)预处理,然后进行水解。如图2所示,随加热时间的延长,水解度缓慢升高,在20min时达到高峰,然后开始下降。由此得到预处理时间以20min为宜。

2.3 复合蛋白酶酶解工艺条件单因素试验结果

2.3.1 不同pH值对酶解效果的影响

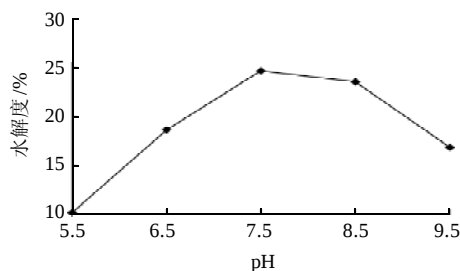


图3 pH值对林蛙卵蛋白水解度的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis pH on hydrolysis degree of egg protein

在反应温度50℃、反应时间3h、固液比1:5、加酶量为3000U/g pro条件下,由图3可知,pH值对酶解效果的影响很大,pH值为7.5时酶解液的水解程度最高,因此最适pH值为7.5。

2.3.2 不同加酶量对酶解效果的影响

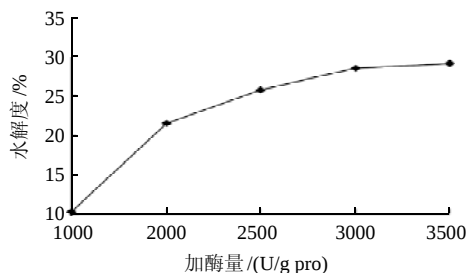


图4 加酶量对林蛙卵蛋白水解度的影响

Fig.4 Effect of enzyme dose on hydrolysis degree of egg protein

在反应温度50℃、反应时间3h、固液比1:5、pH值为7.5的条件下,由图4可知,随着加酶量的增加,酶解速度加快,当加酶量达到3000U/g pro时,水解度基本达到最大值;当加酶量超过3000U/g pro,水解度上升趋势变得平缓。从生产成本角度出发,选择加酶量为3000U/g pro。

2.3.3 不同固液比对酶解效果的影响

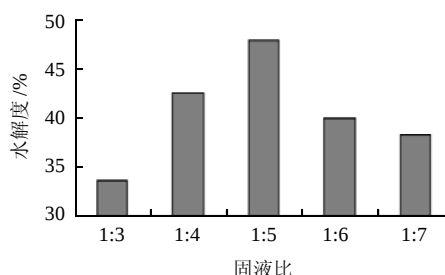


图5 固液比对林蛙卵蛋白水解度的影响

Fig.5 Effect of solid-to-liquid ratio on hydrolysis degree of egg protein

在反应温度50℃、时间3h、pH7.5、加酶量3000U/g pro条件下,如图5所示,固液比对酶解效果的影响较大。固液比较大时,底物浓度就高,溶质的流动性差,酶与底物的结合不充分,限制反应进行;固液比较小时,虽然底物分散更均匀,但加酶量大幅度下降,对酶解造成不利影响。因此,适宜固液比为1:5。

2.3.4 不同反应时间对酶解效果的影响

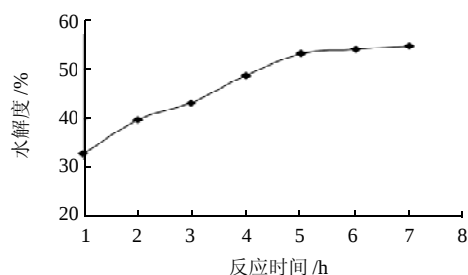


图6 反应时间对林蛙卵蛋白水解度的影响

Fig.6 Effect of hydrolysis time on hydrolysis degree of egg protein

在反应温度50℃、pH7.5、加酶量3000U/g pro、固液比1:5的条件下,由图6可知,林蛙卵蛋白的水解度随着酶解时间的延长而增加,水解进行到5h后,水解度的上升趋势趋于平缓。从经济效率的角度考虑,酶解时间以5h为宜。

2.3.5 不同反应温度对酶解效果的影响

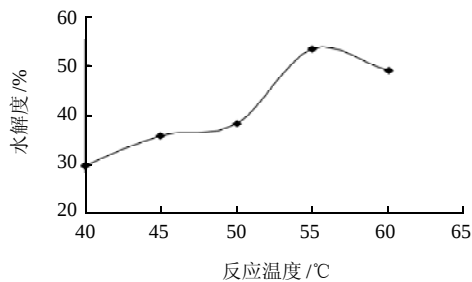


图7 反应温度对林蛙卵蛋白水解度的影响

Fig.7 Effect of hydrolysis temperature on hydrolysis degree of egg protein

在 pH7.5、加酶量 3000U/g pro、反应时间 5h、固液比 1:5 的条件下, 由图 7 可知, 在 40~55℃ 范围内, 水解度随着反应温度的上升而升高。超过 55℃ 后, 随着反应温度的升高, 水解度下降。这是由于高温条件使蛋白酶活力逐渐丧失, 因此最适温度为 55℃。

2.3.6 酶解条件的正交试验优化结果

表2 林蛙卵蛋白酶解条件的正交试验方案及结果分析

Table 2 Results of orthogonal tests

试验号	因素				游离氨基酸 含量/(mg/100mL)	水解 度/%
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	3286	40.06
2	1	2	2	2	3487	47.35
3	1	3	3	3	3685	54.80
4	2	1	2	3	3430	46.28
5	2	2	3	1	3429	50.95
6	2	3	1	2	4397	53.49
7	3	1	3	2	2885	42.77
8	3	2	1	3	4251	50.46
9	3	3	2	1	3490	47.10
水解度	K ₁	141.21	129.11	144.01	140.11	
	K ₂	150.72	148.76	140.73	143.61	
	K ₃	140.33	155.39	148.52	151.54	
	R	3.46	8.76	2.60	3.81	

由表 2 可知, $R_B > R_D > R_A > R_C$, 即影响林蛙卵蛋白水解度的主要因素顺序是: 反应时间 > pH 值 > 反应温度 > 固液比。正交试验优化得到的最佳组合为 $A_2B_3C_3D_3$, 在此条件下进行 3 次平行验证实验, 水解度为 56.83%, 即最佳工艺为酶解时间 5h、pH 值为 8.0、酶解温度为 55℃、固液比为 1:5.5。

2.4 林蛙卵蛋白酶解物的抗疲劳效果

2.4.1 对小鼠负重游泳时间的影响

运动耐力的提高是抗疲劳能力加强最有力的宏观表现, 游泳时间的长短可以反映动物运动疲劳的程度^[13]。

由表 3 可知, 各组小鼠负重游泳时间均高于空白对照组, 其中, 林蛙卵蛋白组可显著延长小鼠游泳时间($P < 0.05$), 而酶解物组可极显著延长小鼠游泳时间($P < 0.01$), 且与林蛙卵蛋白组的差异达到显著水平($P < 0.05$)。

表3 林蛙卵蛋白酶解前后对小鼠游泳时间、肝糖原和血乳酸含量的影响

Table 3 Effects of egg protein and its hydrolysate on weight-loaded swimming time and the contents of liver glycogen and lactic acid in mice

组别	剂量/ (g/(kg·d))	动物 数/只	游泳时 间/s	肝糖原含量/ (mg/100g)	血乳酸含 量/(mg/L)
空白对照组	同体积	10	351 ± 99	1560.2 ± 366.5	325.2 ± 5.7
林蛙卵蛋白组	0.625	10	445 ± 110*	1683.8 ± 418.6	267.7 ± 5.2*
酶解物组	0.625	10	562 ± 123***▲	1832.9 ± 467.7*	259.0 ± 5.6**
	1.000	10	698 ± 112***▲	2014.7 ± 441.5***▲	238.6 ± 6.1***▲

注: *, 与空白对照组比较, 差异显著($P < 0.05$); **., 与空白对照组比较, 差异极显著($P < 0.01$); ▲., 与林蛙卵蛋白组比较, 差异显著($P < 0.05$)。

2.4.2 小鼠肝糖原含量的影响

糖原的储备量直接影响肌体的运动能力, 肝糖原储备量的提高有助于运动能力和耐力的增强, 有利于抵抗和延缓疲劳的发生^[14]。由表 3 可知, 与空白对照组相比, 林蛙卵蛋白组的肝糖原含量无显著差异, 而酶解物同剂量组的差异达到显著水平($P < 0.05$)。

2.4.3 对小鼠运动后血乳酸含量的影响

剧烈运动时, 机体对能量的需求增加, 由于有氧代谢能力的不足, 需通过无氧酵解提供能量, 机体产生大量的乳酸, 使肌组织中 H^+ 浓度升高, pH 值降低, 引起一系列生化反应, 导致疲劳的产生^[15]。由表 3 可知, 与空白对照组相比, 运动后林蛙卵蛋白组血乳酸含量降低了 18%($P < 0.05$), 酶解物组同剂量组降低了 20%($P < 0.01$), 运动后的血乳酸值均明显低于空白对照组, 可判定酶解后林蛙卵蛋白酶解物具有缓解体力疲劳的作用^[16]。

3 结 论

复合蛋白酶对林蛙卵蛋白的最佳酶解工艺为: 加酶量 3000U/g pro、反应温度 55℃、pH8.0、酶解时间 5h、固液比 1:5.5。根据最佳工艺条件对林蛙卵蛋白进行酶解, 蛋白水解率可达到 56.83%。

经口服给予小鼠林蛙卵蛋白及其酶解物, 均能显著延长小鼠负重游泳时间, 增加肝糖原含量, 减少剧烈运动后血乳酸的产生, 而酶解后组在延缓疲劳的产生和加速疲劳的消除方面都具有更明显的作用, 表明林蛙卵蛋白及其酶解液均有明显的抗疲劳保健功效, 酶解后作用进一步增强。

参考文献:

- [1] 谢锋, 叶昌媛, 费梁, 等. 中国东北地区林蛙属物种的分类学研究[J]. 动物分类学报, 1999, 24(2): 224-231.
- [2] 王平, 李盛春, 陈晓平. 中国林蛙综合利用的现状与发展趋势探讨[J]. 中国林副特产, 2006(3): 86-88.
- [3] 杜景新, 王丽. 中国林蛙各部位氨基酸含量的分析[J]. 人参研究, 2003(3): 40-41.
- [4] 王宇, 尚德静, 冯伯森. 中国林蛙蛙卵营养成分分析[J]. 辽宁师范大学学报: 自然科学版, 2004, 27(4): 471-473.
- [5] 孔繁东, 杜娟, 祖国仁. 微生物酶水解林蛙肉蛋白质及产物抗氧化活性初探[J]. 中国酿造, 2009(1): 76-79.
- [6] 顾林, 孙婧. 鲫鱼蛋白水解及其中性蛋白酶水解液抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 177-180.
- [7] 迟玉杰, 田波. 蛋清寡肽制备技术的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 177-179.
- [8] ROBERTS P R, BURNEY J D, BLACK K W, et al. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastro in test inaltract[J]. Digestion, 1999, 60(4): 332-337.
- [9] 余勃, 陆兆新. 微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 104-107.
- [10] 李妍妍, 郑卫星, 苏秀榕. 林蛙油及其酶解液抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 619-621.
- [11] 宋健. 玄参多糖对游泳小鼠力竭时间及糖储备的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 217-219.
- [12] 林丹, 邓超, 汤鲁宏, 等. 霞水母糖蛋白抗疲劳作用的实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009(21): 862-865.
- [13] 江小云, 潘道东. 乳蛋白水解产生肽工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 360-363.
- [14] 尹晓平, 姜红, 高晓黎. 酶解天山马鹿血分离制备抗疲劳肽的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009(21): 391-394.
- [15] 陈东方, 王海玉, 李立, 等. 天然虾青素缓解体力疲劳作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(7): 2567-2569.
- [16] 张荣平, 赵昱. 中国食品和保健食品的理论与实践[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003: 105.