

## 不同蛋白酶水解鹿鞭制备活性肽的比较研究

王帅, 钟立成\* (黑龙江省野生动物研究所, 黑龙江哈尔滨 150081)

**摘要** [目的]研究制备鹿鞭活性肽的最佳蛋白酶。[方法]选用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶分别在最适条件下水解鹿鞭,以水解物鹿鞭活性肽的水解度(DH)及其对还原能力、抑制硫代巴比妥酸(TBARS)的作用和清除DPPH自由基作用的影响为指标,优选出最佳水解蛋白酶。[结果]碱性蛋白酶水解鹿鞭产物鹿鞭活性肽的水解度、还原能力、对卵磷脂脂质氧化的抑制作用和DPPH自由基的清除率都为最高。[结论]碱性蛋白酶水解鹿鞭产物鹿鞭活性肽具有很好的抗氧化性。

**关键词** 鹿鞭;蛋白酶;酶水解;活性肽

**中图分类号** R282.74 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)05-0109-02

## Comparative Study on Preparation of Active Peptides Hydrolyze by Different Proteases

WANG Shuai, ZHONG Li-cheng (Heilongjiang Provincial Institute of Wildlife Sciences, Harbin, Heilongjiang 150081)

**Abstract** [Objective]The research aimed to study the optimal protease for preparation of deer penis active peptide. [Method]The alkaline protease, neutral protease, compound protease and trypsin were respectively used to hydrolyze deer penis under optimum conditions, the degree of hydrolysis (DH) of the hydrolyzate deer penis active peptide and its effect on reduction, inhibition of TBARS and scavenging of DPPH free radical were taken as indexes to optimize the optimal hydrolytic protease. [Result]The degree of hydrolysis, reducing ability, inhibition of lecithin lipid oxidation and DPPH radical scavenging rate of alkaline protease hydrolysis deer penis active peptide were the highest. [Method] Alkaline protease hydrolysis deer penis product deer penis active peptide has good oxidation resistance.

**Key words** Deer penis; Hydrolysate; Enzymatic hydrolysis; Active peptides

鹿鞭为鹿科动物马鹿或梅花鹿的阴茎和睾丸,具有补肾精、壮肾阳、益精和强腰膝等功效,主治肾虚劳损、腰膝酸痛、遗精早泄、耳聋耳鸣、阳痿等疾病。鹿鞭药用已近有3000年历史,最早见于《名医别录》《日华子本草》《医林纂要》等医药古籍,明代《本草纲目》记载详细,现广泛收载于地方药品标准中,1991年收入部颁药品标准<sup>[1]</sup>。

鹿鞭具有很好的药效和滋补保健功能,并广泛用于临床,但对其药理学研究相对匮乏,致使鹿鞭虽然常见于一些中药方剂中,人们对其药物作用机理并不十分清楚<sup>[2]</sup>。我国鹿鞭开发的制品多数是以保健酒形式存在,开发出的制品也比较简单,存在深度开发和利用严重不足。研究表明,动物药材的功源于其内部所含有的生物活性成分,其生物活性成分可能主要是由氨基酸组成的活性肽<sup>[3]</sup>。因此,利用酶水解方法提取鹿鞭活性肽并研究其功效,能够提高鹿鞭附加值,对鹿鞭的开发和利用具有重要意义。该试验通过采用蛋白酶水解鹿鞭以获得鹿鞭活性肽,分别选用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶在最适条件下对鹿鞭进行水解,通过对比其水解度(DH)以及鹿鞭活性肽还原能力、硫代巴比妥酸(TBARS)的抑制作用和DPPH自由基的清除率,从而优选出最佳水解蛋白酶。

## 1 材料与方

**1.1 材料与主要试剂** 马鹿鞭购于吉林鑫鹏鹿场;碱性蛋白酶购于东恒华道公司,中性蛋白酶和复合蛋白酶购于Solarbio公司,胰蛋白酶购于Novo公司;DPPH自由基购于Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

**1.2 仪器与设备** 梅特勒Delta 320型pH计、电热恒温水

浴锅LH 586-2、高速离心机TGL-16C、紫外可见分光光度计UV-2120 PSC、JD500-2型电子天平、精密增力电动搅拌机JJ-1。

## 1.3 研究方法

**1.3.1 鹿鞭的预处理。**取马鹿鞭1 kg,去除包皮,剁成小块(1 cm<sup>3</sup>左右),用预冷的蒸馏水(4℃)冲洗至无血色。绞碎胶体磨匀浆,离心收集沉淀,沉淀为粉碎的鹿鞭,放4℃冷室冷藏待用。

**1.3.2 最佳蛋白酶的筛选。**将鹿鞭残渣配成底物浓度为4%(W/W)的溶液,酶水解采用4种蛋白酶(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶),不同时间连续进行水解,将4种蛋白酶与底物浓度比都设为2:100,同时把酶反应温度和pH调节至各酶最佳反应条件,反应进程中连续放入1 mol/L的NaOH,保持pH不变,并记录耗碱量(mL)、鹿鞭活性肽的水解度(DH)。待结束酶水解后,在90℃水浴下5 min灭活,然后连续加入1 mol/L的HCl,将鹿鞭活性肽溶液pH调整为7.0,真空冷冻干燥鹿鞭活性肽溶液,在4℃下冻干保存鹿鞭活性肽样品。将冻干的鹿鞭活性肽溶解成40 mg/mL的溶液,通过测定不同蛋白酶水解产生的鹿鞭活性肽的水解度、还原能力、对卵磷脂脂质氧化的抑制作用和DPPH自由基的清除率,从而筛选出最佳的蛋白酶。

**1.3.3 水解度的测定。**根据pH-Stat法<sup>[4]</sup>,水解度的计算公式为:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, $h$ 为鹿鞭中被水解的肽键的量(mmol/g)。 $h_{tot}$ 为鹿鞭中肽键的总量(mmol/g)。

其中:

$$h = B \times N_b \times 1/\alpha \times 1/M_t \quad (2)$$

式(2)中, $B$ 为鹿鞭水解过程耗碱量(mL); $N_b$ 为碱液的浓度

**基金项目** 黑龙江省森林工业总局应用研究项目(sgzjy2013009)。

**作者简介** 王帅(1981—),男,黑龙江哈尔滨人,副研究员,硕士,从事经济动物养殖利用和标准化研究。\*通讯作者,研究员,从事经济动物养殖和标准化研究。

**收稿日期** 2017-11-30

(mol/L);  $M_t$  为鹿鞭活性肽水解液中鹿鞭蛋白质的量(g);  $1/\alpha$  为校正系数。

**1.3.4 脂肪氧化体系 (Liposome) 的制备。** 参照改进 Decker 等<sup>[5]</sup> 的方法。将浓度为 0.4 mg/mL 大豆卵磷脂溶解在 0.24 mol/L KCl 溶液中, 5 mmol/L 组氨酸缓冲溶液 (pH 6.8) 均质后, 在 5 °C 温度下超声波降解溶液 45 min。鹿鞭活性肽抗氧化活性的测定, 分别准备卵磷脂脂质体 10 mL 与每个准备测定的鹿鞭活性肽混合溶液 2 mL 进行试验。用 1 mL 水与 5 mL 卵磷脂脂质混合溶液作为阴性对照, 0.02% BHA 与 5 mL 卵磷脂脂质混合溶液作为阳性对照。脂质氧化是由铁的氧化还原反应所引起, 将 0.2 mL 25 mmol/L  $FeCl_3$  和 0.2 mL 5 mmol/L 抗坏血酸盐加入脂质/蛋白溶液 (6 mL) 中。各待测溶液保持 38 °C 温度不变 1 h, 快速测定 TBARS。

**1.3.5 亚铁还原能力 (FRAP) 的测定。** 采用 Benzie 等<sup>[6]</sup> 的方法。取 12.0 mL 的 FRAP (ferric reducing/antioxidant power) 试剂, 加热到 38 °C, 然后向其加入 0.4 mL 鹿鞭活性肽和 1.2 mL  $H_2O$ , 反应 10 min, 吸光度在分光光度计调节至 593 nm 波长进行测定。同时做阴性对照和阳性对照进行比较。以 100, 250, 500, 1 000  $\mu\text{mol/L}$   $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  绘制标准曲线。样品抗氧化活性以达到同样吸光度所需的  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (mmol/L) 表示。

**1.3.6 DPPH 自由基清除能力的测定。** 采用 Saiga 等<sup>[7]</sup> 的方法。取 8 mL  $1 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH 和甲醇混合溶液分别与不同酶水解产生的鹿鞭活性肽溶液 2 mL 同时放进试管摇匀, 常温下避光反应 30 min。测量吸光度, 在分光光度计调节至 517 nm 波长下对照甲醇进行测量。根据下列公式计算不同水解液对 DPPH 自由基的清除率:

$$\text{清除率} = [1 - (B_1 - B_2) / B_3] \times 100\%$$

式中,  $B_1$  的吸光度是 DPPH - 鹿鞭活性肽混合溶液;  $B_2$  的吸光度是鹿鞭活性肽溶液;  $B_3$  的吸光度是未加鹿鞭活性肽时 DPPH 溶液。

## 2 结果与分析

**2.1 不同蛋白酶不同水解时间的鹿鞭活性肽的水解度 (DH) 变化** 从图 1 可以看出, 随着水解反应时间的延长, 不同蛋白酶水解鹿鞭产生的鹿鞭活性肽水解度曲线变化明显, 鹿鞭活性肽水解度曲线在 8 h 以后上升趋势开始变得缓慢; 而采用碱性蛋白酶水解所制造出的鹿鞭活性肽水解度变化明显高于其他 3 种蛋白酶水解所产生的鹿鞭活性肽, 且差异显著 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 鹿鞭活性肽对卵磷脂脂质氧化的抑制作用** 从图 2 可以看出, 总体来说, 不同蛋白酶水解鹿鞭后所产生的鹿鞭活性肽都具有在卵磷脂脂质氧化体系中抑制 TBARS 的作用 ( $P < 0.05$ ), 然而在整个水解的过程中, 经碱性蛋白酶水解所获得的鹿鞭活性肽抑制 TBARS 作用明显高于其他 3 种蛋白酶水解所产生的鹿鞭活性肽。

**2.3 鹿鞭活性肽还原能力的测定** 从图 3 可以看出, 鹿鞭通过碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶分别水解以后产生鹿鞭活性肽, 全是随着反应时间的持续增加其

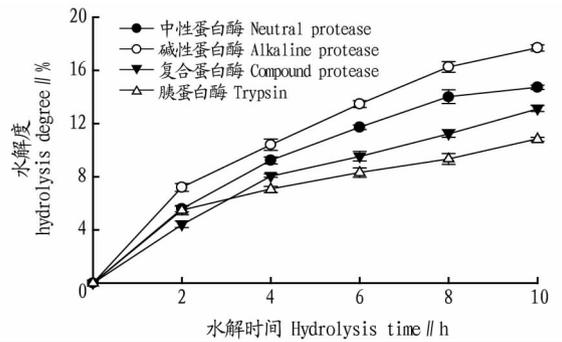


图 1 不同蛋白酶水解鹿鞭不同反应时间的鹿鞭活性肽的水解度变化

Fig. 1 Changes of the hydrolysis degree of deer penis active peptides with different protease hydrolysis deer penis with different reaction time

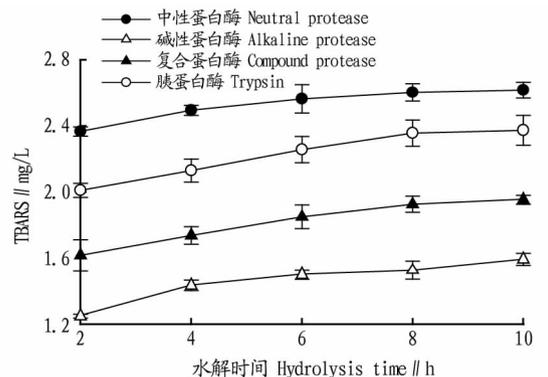


图 2 不同蛋白酶水解鹿鞭生成的鹿鞭活性肽抑制 TBARS 的作用

Fig. 2 Inhibition of TBARS of deer penis active peptides with different protease hydrolysis deer penis

还原能力得到加强, 而通过碱性蛋白酶水解鹿鞭生成的鹿鞭活性肽的还原能力明显高于其他 3 种蛋白酶水解所生成的鹿鞭活性肽, 且差异显著 ( $P < 0.05$ )。鹿鞭活性肽具有较高的还原能力是因为鹿鞭在酶水解时肽链会发生断裂可以有效地增加氢离子数量。

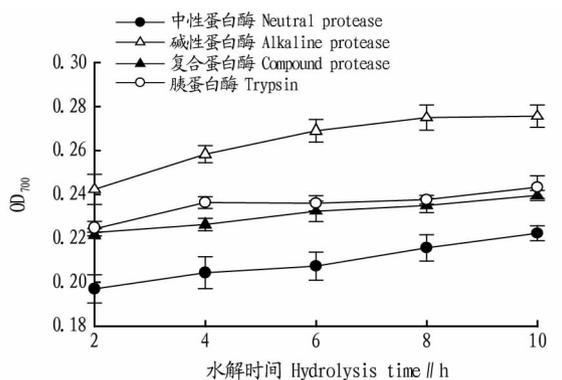


图 3 不同蛋白酶水解鹿鞭生成的鹿鞭活性肽对还原能力的影响

Fig. 3 Effect of deer penis active peptides preparation of hydrolyze by different proteases on the reduction ability

**2.4 鹿鞭活性肽对 DPPH 自由基清除能力的测定** 从图 4

(下转第 123 页)

植物空间的顶层面类似于整个空间的“天花板”,即指由植物枝叶形成的或密闭或稀疏的空间层面(表1)。

表1 森林公园各层面植物应用种类

Table 1 The species at all levels of forest park

序号 Code	植物空间 Plant space	种类 Type
1	水平层面	金边麦冬( <i>Liriope spicata</i> )、玉簪( <i>Hosta plantaginea</i> )、酢浆草( <i>Oxalis corniculata</i> )、络石( <i>Trachelospermum jasminoides</i> )、迎春( <i>Jasminum nudiflorum</i> )、绣线菊( <i>Spiraea salicifolia</i> )等
2	垂直层面	紫薇、木芙蓉( <i>Hibiscus mutabilis</i> )、大叶女贞( <i>Ligustrum compactum</i> )、石榴( <i>Punica granatum</i> )、木瓜( <i>Chaenomeles sinensis</i> )、海棠花( <i>Malus spectabilis</i> )、白皮松( <i>Pinus bungeana</i> )、黑松( <i>Pinus thunbergii</i> )、木槿( <i>Hibiscus syriacus</i> )、蜡梅( <i>Chimonanthus praecox</i> )等
3	顶层面	二球悬铃木、朴树、银杏、榉树( <i>Catalpabungei</i> )、马褂木( <i>Liriodendron chinensis</i> )、黄山栎( <i>Koelreuteria integrifoliola</i> )、水杉( <i>Metasequoia glyptostroboides</i> )、黄连木( <i>Pistacia chinensis</i> )、五角枫( <i>Acer elegantulum</i> )、黄金槐( <i>Sophora japonica</i> )、垂柳( <i>Salix babylonica</i> )、千头椿( <i>Ailanthus altissima</i> )等

**3.1 水平层面植物景观设计** 济南森林公园水平层面的设计多为大面积同种草本或花卉群体栽植,植物种类丰富,其中地被植物有金边麦冬、玉簪、酢浆草等,灌木类植物有锦带、迎春、金钟等济南地区常见的乡土植物。

**3.2 垂直层面植物景观设计** 济南森林公园垂直层面的植物在设计时借用原址上生长多年的种苗,多为群植的大乔木,植物群体景观效果好。垂直层面的植物在设计时注重林冠线的高低错落。

**3.3 顶层面植物景观设计** 植物空间顶层面的设计疏密有致,公园中心大草坪周边植物安排较密,由密及疏逐渐过渡到草坪中央,植物顶层设计或封闭或开敞,游走其中,能够形成不同的心理感受。

#### 4 结语

济南森林公园因其前身为苗圃,利用其有利的植物种类资源,在景观配置方面保留部分原有的风格进行改建,创造

出不同种宜人的植物景观空间,由以生产为目的创造经济效益转变为以游览为目的创造社会效益,是一个值得景观设计者关注的案例。

#### 参考文献

- [1] 姜财起,张云,陈梅.以济南森林公园为例探讨生态建园应用及成效[J].中国园艺文摘,2015(1):76-77.
- [2] 王文雯,肖鹏,郭大鹏,等.济南森林公园规划设计[J].风景园林,2014(S1):54-55.
- [3] 刘立坤,张吉祥.社会生态视域下的城市综合公园解析:以济南西郊森林公园为例[C]//中国城市规划协会.规划60年:成就与挑战——2016中国城市规划年会论文集.(12规划实施与管理).北京:中国建筑工业出版社,2016:195-204.
- [4] 胡子正.园林植物空间结构解析:以杭州西湖景区为例[D].杭州:浙江大学,2012:18-23.
- [5] 尹晶萍.浅析森林公园道路植物景观营造安徽大龙山国家森林公园[J].林产工业,2014(2):56-58.
- [6] 梁金兰,郭双宙.森林公园植物景观规划设计初步[J].南京林业大学学报(自然科学版),2004(3):83-86.
- [7] 赵乃莉.植物景观空间的营造[J].山西建筑,2010,36(6):338-340.

(上接第110页)

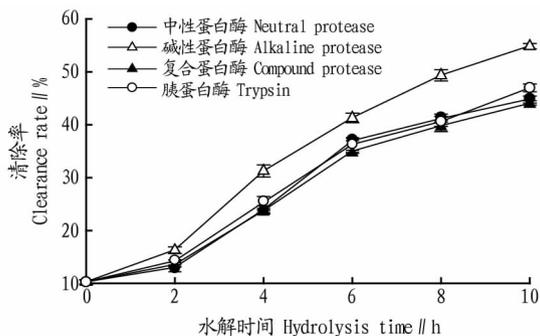


图4 不同蛋白酶水解鹿鞭生成的鹿鞭活性肽对DPPH自由基的清除作用

Fig.4 Scavenging effect of DPPH free radical of deer penis active peptides with different protease hydrolysis deer penis

可以看出,鹿鞭通过碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶分别水解以后,随着水解时间的增加,其生成的鹿鞭活性肽清除DPPH自由基的效果与还原能力同样得到加强。通过碱性蛋白酶水解比中性蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶水解产生的鹿鞭活性肽有更高的清除DPPH自由基作用,且差异显著( $P < 0.05$ )。鹿鞭活性肽具有自由基清除能力,是因为鹿鞭活性肽中包含有色氨酸、亮氨酸和赖氨酸等氨基酸残基具有较弱的抗氧化能力。

#### 3 结论

该试验通过使用4种不同蛋白酶(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶)在最适条件下水解鹿鞭,研究鹿鞭活性肽的水解度和抗氧化活性,结果发现,碱性蛋白酶水解鹿鞭产物鹿鞭活性肽水解度、抑制TBARS的作用、还原能力和对DPPH自由基的清除率都为最高。鹿鞭活性肽抗氧化性的产生是由于蛋白质经过水解使蛋白质分解成特殊肽和氨基酸残基成分,因而使其具有了抗氧化性;其抗氧化作用模式主要是通过终止自由基的产生能力,以及提供氢离子以起到还原作用的能力共同实现的。

#### 参考文献

- [1] 胡雅妮,李峰,康延国.鹿鞭的生药学研究进展[J].中草药,2003,34(7):12-14.
- [2] 李峰.鹿鞭的生药学研究[D].沈阳:辽宁中医学院,2004.
- [3] 王浴生,邓文龙,薛春生.中药药理与应用[M].北京:人民卫生出版社,1998:1093-1102.
- [4] ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London: Elsevier Applied Science Publishers,1986.
- [5] DECKER E A, IVANOV V, ZHU B Z, et al. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by carnosine and histidine[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, 49(1): 511-516.
- [6] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay[J]. Analytical biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.
- [7] SAIGA A, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2003, 51(12): 3661-3667.