

牡蛎蛋白肽的制备及促进生长发育功能

王长伟, 李八方*, 宋文山, 刘楚怡, 冯晓梅 (青岛海洋生物医药研究院, 山东青岛 266071)

摘要 [目的]研究牡蛎蛋白肽的制备工艺及其功能活性评价。[方法]以新鲜无壳牡蛎为原料,采用胰酶酶解的方法制备牡蛎活性肽,经膜分离后使用HPLC测定其相对分子质量分布,使用断乳SD大鼠进行促进生长发育功能评价。[结果]得到均分子量为750 Da的活性肽,该活性肽在灌胃给药剂量为2.0 g/kg(剂量/体重)时,具有改善大鼠生长发育的功能。[结论]该研究对牡蛎肽的生产具有一定指导意义。

关键词 牡蛎蛋白肽;制备工艺;生长发育;功能活性;SD断乳大鼠

中图分类号 TS254.5 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)17-0161-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.17.047



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Preparation of Oyster Protein Peptide and Its Function in Promoting Growth and Development

WANG Chang-wei, LI Ba-fang, SONG Wen-shan et al (Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao, Shandong 266071)

Abstract [Objective] The research aimed to study the preparation process of oyster protein peptide and its functional activity evaluation. [Method] The oyster active peptide was prepared by trypsin enzymatic hydrolysis using fresh oysters without shells as raw material. The oyster protein peptide were separated from the hydrolyzate by membrane, their molecular weight distribution was determined by HPLC, and the function of promoting growth and development was evaluated by SD weaning rats. [Result] The active peptide with average molecular weight of 750 Da was obtained, besides the protein peptide could improve the growth and development of rats at the dose of 2.0 g/kg (dose/body weight). [Conclusion] The study has certain guiding significance to the production of oyster peptide.

Key words Oyster protein peptide; Preparation process; Growth and development; Functional activity; SD weaning rat

牡蛎味道鲜美、营养价值丰富,历来受世人推崇。古人认为它是“水产品之最贵者”,古罗马人把它誉为“海中美味——圣鱼”,西方人称之为“神赐魔石”“海中牛奶”,日本人则誉之为“根之源”^[1]。牡蛎肉含有丰富的糖原、蛋白质、氨基酸、脂肪、微量元素和维生素等,其中糖原占18%~39%,蛋白质为45%~57%,脂肪为7%~11%。牡蛎氨基酸组成完善,据世界粮农组织评定,牡蛎肉中必需氨基酸完全程度和质量比例优于人乳和牛乳^[2],其除了含人体必需的20种常见氨基酸外,还含有β-氨基丙酸、γ-氨基丁酸、鸟氨酸、牛磺酸等多种具有重要生理价值的氨基酸。特别是牛磺酸的含量尤其丰富,明显高于其他动物性食品^[3],含量可以达到总氨基酸量的30.98%。

随着食品、医药、生物技术的快速发展和营养知识的普及,以及人均收入水平的提高和消费水平的提高,人类对于食品的要求已经从温饱过渡到了营养水平,天然、健康、营养、安全已经成为21世纪食品工业发展的主要议题。人类对牡蛎保健功能的认识已逾千年,早在我国古代《神农本草经》《名医别录》《本草纲目》《海药本草》等医疗史籍中已经有对于牡蛎药用价值的记载。牡蛎又是中国卫生部公布的第一批68种药食同源的食品之一^[4]。目前,运用现代科技手段,牡蛎资源在普通食品、保健食品、功能食品、医药、化学化工等领域得到了广泛的应用。近年来,不少学者报道了牡蛎提取物具有增强机体免疫力、抗疲劳、抗氧化、降血压、降血糖等重要的生理功能,在我国医学界得到广泛的认可和应用^[5-10],但对牡蛎肽的促生长发育作用仍鲜有报道。笔者采

用新鲜去壳牡蛎为原料,使用胰酶酶解,分离后得到牡蛎功能活性肽,使用HPLC测定功能蛋白肽的相对分子质量分布,并使用SD断乳大鼠进行其促进生长发育功能评价。

1 材料与方法

1.1 试验材料及主要设备 新鲜去壳牡蛎,市售;胰酶,广西庞博生物有限公司;SPF级SD断乳大鼠,济南朋悦实验动物繁育有限公司;其他试剂均为分析纯。恒温振荡器(常州国华电器有限公司);pH计(安莱立思仪器科技有限公司);分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);匀浆机(上海那艾精密仪器有限公司);高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);液相实验室用膜分离设备(上海摩速科学器材有限公司);高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 牡蛎肽制备的单因素试验。牡蛎肉洗净沥干水分,匀浆后加入一定比例的水,加胰蛋白酶进行酶解,酶解完成后,将酶解液加热至90~100℃灭酶10~15 min,然后将其离心(10 000 r/min)10 min得上清液,测定水解度(DH),根据水解度大小确定最佳酶解条件。

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% = \left[\frac{\text{水解液 NH}_2 \text{ 的含量} (\mu\text{mol/mL})}{6.25 N (\text{mg/mL})} - \text{原料蛋白质中游离 NH}_2 \text{ 含量} (\text{mmol/g}) \right] / h_{tot} \times 100\%$$

式中,DH为水解度(%);h为水解后每克蛋白质被裂解的肽键毫摩尔数(mmol/g); h_{tot} 为每克原料蛋白质的肽键毫摩尔数(mmol/g),牡蛎蛋白肽取8.0。

1.2.2 牡蛎肽制备的响应面设计。根据单因素试验结果使用响应面设计软件Design-Expert 8.0.6进行试验设计,固定料液比1:1、水解时间4 h,对不同温度、不同pH及加酶量进行优化,共设计17个反应。酶解后将酶解液加热至90~100℃灭酶10~15 min,然后将其离心(10 000 r/min)10 min

基金项目 山东省重点研究计划(2016YYSP003)。

作者简介 王长伟(1983—),女,山东泰安人,高级工程师,硕士,从事海洋功能制品的研究与开发工作。*通信作者,教授,博士,博士生导师,从事海洋功能制品研发工作。

收稿日期 2019-03-26

得上清液,测定水解度(DH),根据水解度大小确定最佳酶解条件。

1.2.3 牡蛎蛋白肽的分离纯化。通过离心分离、粗滤、超滤等步骤去除异味以及大分子蛋白,通过纳滤去除部分盐分并进行浓缩,冷冻干燥后分析其质量并进行动物活性试验。

1.2.4 分子量测定。柱温 30 ℃,体积流量为 0.8 mL/min 下使用 TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm(GEL LOT 502R)色谱柱,在检测波长 220 nm 下测定,其中流动相为乙腈:0.05%三氟乙酸,体积比为 30:70。

1.2.5 牡蛎肽功能活性的测定。选用断乳 SD 大鼠,4 周龄,试验开始时体重为 50~80 g。试验分组及受试样品给予时间:分别设 3 个剂量组——低剂量组(0.5 g/kg)、中剂量组(1.0 g/kg)、高剂量组(2.0 g/kg),另外设一个正常对照组,实验大鼠除每天给予基础饲料和水外,每天灌胃受试样品一次(正常对照组灌胃生理盐水),受试样品给予时间为 42 d。给药期间每周检测大鼠 2 次体重,观察记录其体重变化情况。试验结束后,检测试验动物的体重、鼻腔长、鼻尾长、胫骨长度。

1.3 数据统计分析 统计分析结果用平均数和标准差表示(Mean±SD)。SPSS 13.0 统计学分析, $P<0.05$ 组间差异显著, $P>0.05$ 无明显统计学差异。给药组身长高于正常对照组,且差异有显著性,食物利用率不明显低于正常对照组,可判定该受试样品改善生长发育动物试验结果阳性。

2 结果与分析

2.1 牡蛎肽制备的单因素试验 由单因素试验结果(图 1~4)可知,随着水解时间的延长,水解度越来越大,但在 4 h 时趋于平缓;不同的 pH 水解度大小不一样,在酸性条件下,水解度很小,中性条件下,水解度加大,但也未达到最大,只有 pH 为 8 时水解度达最大,这与胰酶酶活的最适 pH 是一致的,碱性条件增大的情况下,水解度又随之降低;相同条件下,随着加酶量的增加,水解度也增加,但在 3 000 U/g 时又趋于平缓;水解温度从 30 ℃ 开始,随着温度的升高水解度增大,到 50 ℃ 时水解度最大,超过 50 ℃ 随着温度的增加,水解度又降低,这与胰酶酶活的最适温度也是一致的;通过对不同固液比的酶解液水解度大小测定得知,固液比越高,水解度越大。

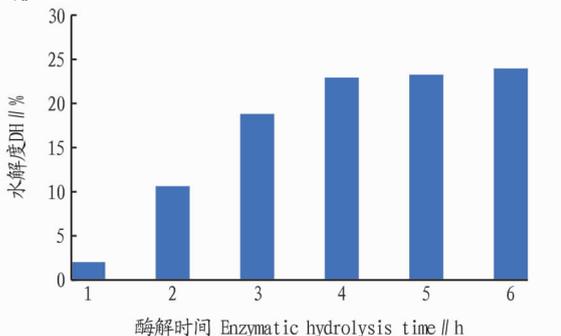


图 1 不同酶解时间的水解度变化

Fig. 1 Changes of hydrolysis degree at different enzymatic hydrolysis time

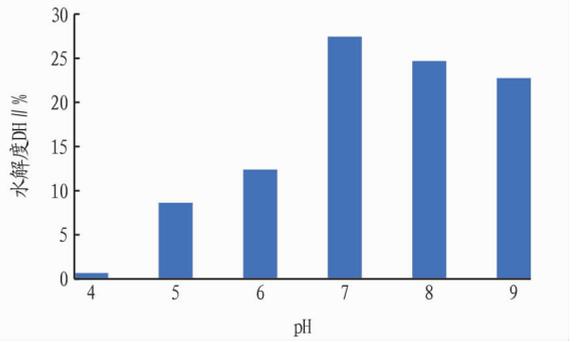


图 2 不同酶解 pH 的水解度变化

Fig. 2 Changes of hydrolysis degree at different pH

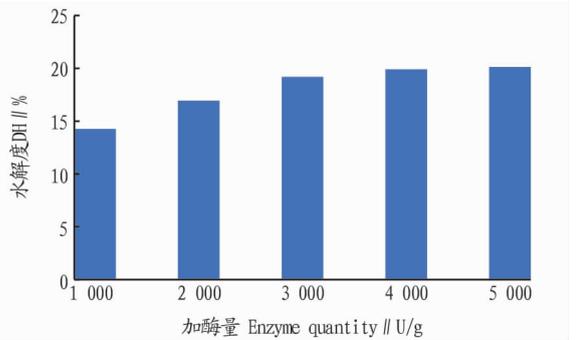


图 3 不同加酶量的水解度变化

Fig. 3 Changes of hydrolysis degree at different enzyme quantity

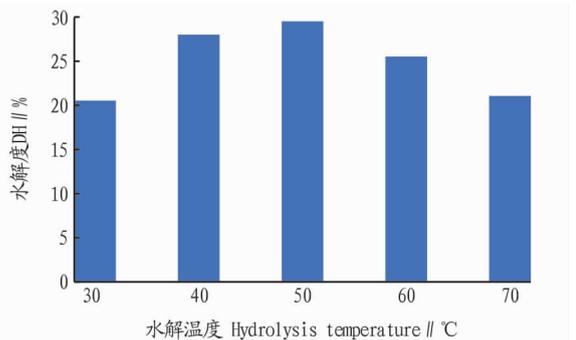


图 4 不同水解温度的水解度变化

Fig. 4 Changes of hydrolysis degree at different hydrolysis temperatures

2.2 牡蛎肽制备的响应面试验

2.2.1 反应温度和 pH 对水解度的影响。把加酶量固定为 0 水平,可得到反应温度和 pH 的交互模型,如图 5 所示。由图 5 可知,当反应温度过高或过低时,水解度均比较低,只有当反应温度取值适中时,在同一 pH 条件下,水解度达最大;同样,pH 过高或过低时,水解度均较低,只有取某一适中值时,在同一反应温度下,水解度最大。

2.2.2 反应温度和加酶量对水解度的影响。把 pH 固定为 0 水平,可得到反应温度和加酶量的交互模型,如图 6 所示。由图 6 可知,当固定反应温度为某一值时,随着加酶量的增加,水解度逐渐增大,但到一定量时,增加缓慢;而固定某一加酶量时,水解温度过高或过低,水解度均偏低,只有温度取某一最适宜时,水解度最大。

2.2.3 加酶量和 pH 对水解度的影响。把反应温度固定为 0

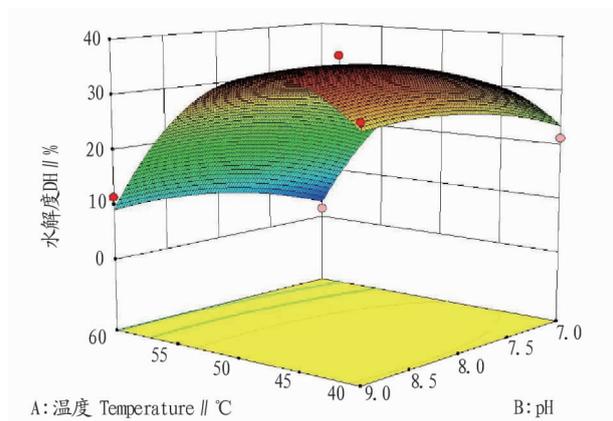


图5 温度与pH对水解度的影响

Fig. 5 Effect of temperature and pH on hydrolysis degree

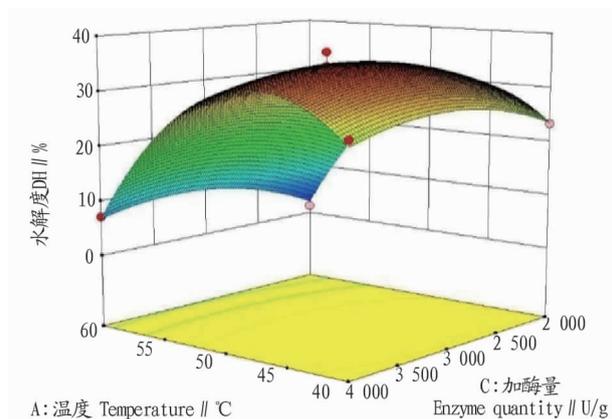


图6 温度与加酶量对水解度的影响

Fig. 6 Effect of temperature and enzyme quantity on hydrolysis degree

水平,可得到加酶量和pH的交互模型,如图7所示。由图7可知,固定某一pH,随着加酶量的增加,水解度也在加大,但到一定量时,水解度增加缓慢;固定某一加酶量,pH过高或过低,水解度均较低,只有pH取某一合适值时,水解度最大。

通过响应面试验,得到胰酶酶解牡蛎液的最佳条件为温度51.10 °C、pH 8.23、加酶量3 750 U/g、水解时间4 h,该条件下水解度最大,为36.4%。这一结果与单因素试验结果是相吻合的。

2.3 牡蛎蛋白肽的分离纯化 牡蛎蛋白肽制备工艺路线为酶解—灭酶—离心(10 000 r/min, 10 min, 2次)—滤膜过滤

(0.45 μm)—超滤(截留分子量为10 K超滤膜)—纳滤(脱盐,截留分子量150~300 Da)—浓缩冻干。纳滤时,当溶液剩余原溶液的一半体积时,再补充一半体积继续纳滤,如此反复进行,使用电导率仪对纳滤液及滤出液进行测定,当最终纳滤液电导率约为500 μs/cm时,停止纳滤,将浓缩液进行冻干,最终测得脱盐率在26%~35%。

2.4 分子量测定 对最佳酶解条件下得到的牡蛎肽进行分离纯化,脱盐后得到的产物进行分子量测定,结果如图8所示,均分子量为750 Da。

2.5 牡蛎肽功能活性测定

2.5.1 SD大鼠日均采食量的变化。由表1可见,各剂量组SD大鼠的日均采食量与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),食物利用率无显著性差异。

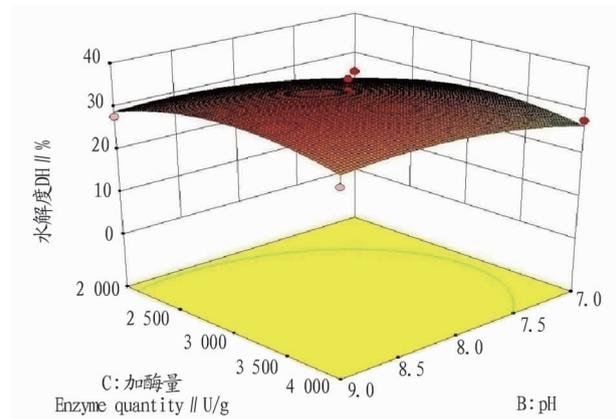


图7 pH与加酶量对水解度的影响

Fig. 7 Effect of pH and enzyme quantity on hydrolysis degree

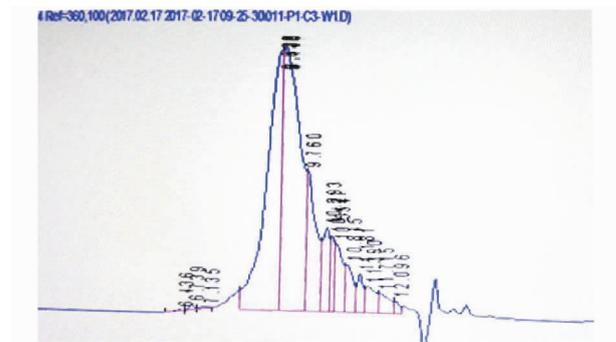


图8 牡蛎蛋白肽分子量分布

Fig. 8 Molecular weight distribution of oyster protein peptide

表1 大鼠日均采食量统计

Table 1 Statistics of average daily feed intake in rats

组别 Group	第1周 First week	第2周 Second week	第3周 Third week	第4周 Fourth week	第5周 Fifth week	第6周 Sixth week	第7周 Seventh week
正常对照组 Normal control group	10.30	10.41	13.28	17.25	20.83	19.70	24.19
低剂量组 Low dose group	10.30	9.20	12.95	14.60	17.96	19.54	23.99
中剂量组 Medium dose group	10.30	9.90	13.64	15.59	19.58	20.89	24.80
高剂量组 High dose group	10.30	10.40	14.49	16.63	20.83	20.42	26.69

2.5.2 牡蛎蛋白肽对SD大鼠体重变化的影响。由表2可知,低、中剂量组SD大鼠的初始体重、试验终期体重与对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$);高剂量组SD大鼠的

初始体重与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),但试验终期体重与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

表2 SD大鼠体重变化
Table 2 Weight change of SD rats

组别 Group	1 d	4 d	8 d	12 d	14 d	17 d	22 d	25 d	29 d	31 d	36 d	42 d
正常对照组 Normal control group	67.11	86.03	113.85	147.44	164.40	191.76	224.74	248.49	273.28	297.31	337.34	349.30
低剂量组 Low dose group	66.86	88.03	155.24	149.84	161.70	188.20	229.11	250.29	268.86	287.23	313.61	339.06
中剂量组 Medium dose group	66.15	86.31	116.80	150.31	163.79	190.25	235.21	259.54	280.89	301.76	335.57	359.24
高剂量组 High dose group	65.68	88.68	122.00	156.48	172.36	167.88	242.96	262.33	293.65	314.23	344.56	377.73*

注: *表示与正常对照组比较差异显著($P < 0.05$)

Note: * indicates significant difference compared with the normal control group ($P < 0.05$)

2.5.3 牡蛎蛋白肽对SD大鼠鼻肛长、鼻尾长、胫骨长度的影响。由表3可知,低、中剂量组SD大鼠的鼻肛长、鼻尾长、胫骨长度与对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$);高剂量组SD大鼠的胫骨长度与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),但鼻肛长、鼻尾长与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

因此可以判定,42 d给药结束后牡蛎肽高剂量组体重与对照组差异显著($P < 0.05$),鼻肛长、鼻尾长大于对照组且差异显著($P < 0.05$)。日均采食量与对照组比较差异不显著($P > 0.05$)。由此判定该试验制备的牡蛎蛋白肽在灌胃给药剂量为2.0 g/kg时,具有改善大鼠生长发育的功能。

表3 大鼠鼻肛长、鼻尾长、胫骨长度统计结果
Table 3 Length of nose-anus, nose-tail and tibia statistical results in SD rats

组别 Group	鼻肛长 Length of nose-anus//cm	鼻尾长 Length of nose-tail//cm	胫骨长度 Length of tibia//mm
正常对照组 Normal control group	24.25±0.80	42.01±1.86	35.50±1.00
低剂量组 Low dose group	23.6±0.77	42.18±1.18	35.38±0.52
中剂量组 Medium dose group	24.21±1.05	43.04±0.69	34.83±1.98
高剂量组 High dose group	25.49±0.78*	43.70±1.40*	36.50±1.22

注: *表示与正常对照组比较差异显著($P < 0.05$)

Note: * indicates significant difference compared with the normal control group ($P < 0.05$)

3 结论

使用胰酶水解新鲜无壳牡蛎制备所得的蛋白肽,经离心、膜分离纯化后得到了均分子量为750 Da的活性肽。经SD断乳大鼠喂养42 d后,灌胃给药剂量为2.0 g/kg时,具有显著改善大鼠生长发育的功能。该研究成果对于牡蛎肽的生产具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 叶知秋. 海鲜食疗养生法[M]. 长春:吉林科学技术出版社,2004.
- [2] ANCONA MENDEZ L, SANDOVAL CASTRO C A, BELMAR CASSO R, et al. Effect of substrate and harvest on the amino acid profile of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) [J]. Journal of food composition and analysis, 2005, 18(5): 447-450.

- [3] 曾利荣, 张尔贤. 牡蛎的食用与药用价值及其开发利用[J]. 自然杂志, 1998, 20(6): 322-325.
- [4] 徐怀德. 药食同源:新食品加工[M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
- [5] SCHULLER-LEVIS G B, PARK E. Taurine: New implications for an old amino acid [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 226(2): 195-202.
- [6] 许丹, 林峰, 朱小语, 等. 牡蛎肽对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2016, 48(3): 392-397.
- [7] 陈栋梁, 饶邦福, 凌海军. 海洋生物活性肽的开发及应用[C]// 亚太多肽学会多肽抗肿瘤国际论坛论文集. 武汉:中国保健协会, 2004.
- [8] 张贵川, 袁吕江. 食源性生物活性肽的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(9): 157-162.
- [9] 周婕慧, 金赢凯, 徐海红, 等. 生物活性肽的抗炎功能及其对氧化应激的调节作用[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(3): 4-6, 14.
- [10] 蔡冰娜, 吴园涛, 孙恢礼. 牡蛎肽肠内营养制剂对小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2816-2818.