

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.05.029

二步酶解法制备鱼鳞明胶抗氧化肽及其抗氧化活性研究

Preparation of antioxidant peptides by Two-Step enzymatic hydrolysis of fish scale gelatin

卢素珍¹ 涂宗财^{1,2,3} 王辉¹ 祝邹¹

LU Su-zhen¹ TU Zong-cai^{1,2,3} Wang Hui¹ ZHU Zou¹

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 江西师范大学国家淡水鱼加工技术研发专业中心, 江西 南昌 330022; 3. 江西省淡水鱼高值化利用工程技术研究中心, 江西 南昌 330022)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China; 2. National Research and Development Center of Freshwater Fish Processing, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China; 3. Engineering Research Center of Freshwater Fish High-value Utilization of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

摘要:通过碱性蛋白酶进行第一步酶解, 胰蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶分别进行第二步酶解制备鱼鳞明胶抗氧化肽。结果表明, 二步酶解法能有效提高酶解物的水解度, 降低水解物的分子量, 碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物具有显著的自由基清除能力和 Fe^{2+} 螯合能力。通过响应面优化的胰蛋白酶最佳二步酶解工艺为: 底物浓度 100 mg/mL、pH 7.8、温度 53 °C、时间 50 min, 该条件下制备的水解物的 Fe^{2+} 螯合率为 65.72%, 清除 DPPH·、·OH 和 O_2^- · 的 IC_{50} 值分别是 7.39, 0.68, 1.84 mg/mL。

关键词:二步酶解; 鱼鳞明胶; 抗氧化肽

Abstract: Based on the alcalase hydrolysis, the grass carp scales gelatin were subjected to two-step enzymatic hydrolysis with trypsin, flavor protease, papain and pepsin respectively, to prepare antioxidant peptides. Results showed that two-step enzymatic hydrolysis could effectively increase the hydrolysis degree and decrease the molecular weight of hydrolysates. The alcalase-trypsin hydrolysates had significant free radical scavenging ability and Fe^{2+} chelating ability. Response surface methodology was performed to optimize the two-step enzymatic hydrolysis

conditions, and the optimal enzymatic hydrolysis parameters were as follows: substrate concentration of 100 mg/mL, pH 7.8, hydrolysis temperature of 53 °C and hydrolysis time of 50 min. Under this optimal hydrolysis condition, the maximum Fe^{2+} chelating ability was 65.72% and the IC_{50} value for DPPH·, ·OH and O_2^- · were 7.39, 0.68 and 1.84 mg/mL, respectively.

Keywords: two-step enzymatic hydrolysis; fish scale gelatin; antioxidant peptides

中国是淡水鱼养殖大国, 2013~2017 年, 淡水鱼养殖年产量为 2 481~2 815 万 t, 淡水鱼养殖产量逐年增加, 而淡水产品加工总量只有 362~408 万 t, 加工利用率仅为 13.77%~16.06%^[1-5]。另一方面, 鱼类加工的副产物主要包括鱼头、皮、鳍、鳞、卵和内脏等, 约占加工鱼类生物量的 60% 以上, 这些副产物少部分被加工成低廉的饲料, 大部分被直接丢弃造成环境污染和资源浪费, 一定程度上影响了渔业和水产养殖业的经济效益^[6-7]。

活性氧自由基在生物体信号传导过程中发挥重要作用, 但当机体内的自由基过剩时则可能导致细胞损伤, 诱发糖尿病、冠心病和癌症等诸多疾病^[8]。抗氧化肽可以提高抗氧化酶的活力从而降低活性氧自由基的水平, 保护细胞抵御自由基介导的氧化应激损伤^[9]。酶解工艺是抗氧化肽制备的关键, 主要的酶解方法包括单酶法^[10-11]和多酶分步酶解法^[12-13]。如 Zhao 等^[14]和 Zhang 等^[15]分别通过单酶法制备敏鱼鱼鳔和海蜇头抗氧化肽, Yarnpakdee 等^[12]和 Yang 等^[8]分别通过双酶二步酶解法制备罗非鱼和带鱼鱼肉抗氧化肽。与单酶解法相比, 双酶二

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助(编号: CARS-45); 江西省科技计划项目(编号: 20141BBF60043)

作者简介:卢素珍, 女, 南昌大学在读硕士研究生。

通信作者:涂宗财(1965—), 男, 江西师范大学/南昌大学教授, 博导, 博士。E-mail: tuzc_mail@aliyun.com

收稿日期:2019-01-21

步酶解法具有酶切位点多、酶解程度高,更易制备高抗氧化活性肽的优势^[8]。

因此,本研究拟以草鱼鱼鳞为原料,通过双酶二步酶解法制备草鱼鱼鳞明胶抗氧化肽,为草鱼鱼鳞的提值增效和提高淡水鱼产品加工利用率提供参考。并通过响应面试验对二步酶解工艺进行优化,为草鱼鱼鳞明胶抗氧化肽的制备提供一种高效、省时、经济的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

草鱼鱼鳞:南昌市鄱阳湖农牧渔业发展股份有限公司;

碱性蛋白酶: 8.68×10^7 U/g,诺维信生物技术有限公司;

胰蛋白酶 (4.07×10^7 U/g)、风味蛋白酶 (1.83×10^5 U/g)、木瓜蛋白酶 (4.27×10^6 U/g)、胃蛋白酶 (4.92×10^6 U/g)、抑肽酶:索莱宝生物科技有限公司;

乙腈、三氟乙酸、细胞色素 C、L-还原型谷胱甘肽和羟脯氨酸:色谱纯,索莱宝生物科技有限公司;

其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪:D-2000 HSM 型,日本 Hitachi 公司;

酶标仪:synergH1 型,美国伯腾仪器有限公司;

电子天平:ML104/02 型,梅特勒—托利仪器(上海)有限公司;

pH 计:DZG-6021P 型,梅特勒—托利仪器(上海)有限公司;

冷冻干燥机:LGJ-1D-80 型,北京亚泰科隆仪器技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鱼鳞明胶抗氧化肽的制备 根据文献[16]的方法制备草鱼鱼鳞明胶。第一步酶解的方法参考文献[17]并修改如下:称取 10 g 草鱼鱼鳞明胶于 100 mL 蒸馏水,按酶与底物的比例为 1:100(g/g)加入碱性蛋白酶,酶解条件为 pH 8.0、温度 50 °C、时间 4 h,酶解结束后煮沸 10 min,冷却后,4 000 r/min 离心 10 min,上清液冻干。称取 10 g 冻干的碱性蛋白酶水解物按表 1 进行第二步酶解,酶解结束后煮沸灭酶 10 min,离心取上清液。一部分上清液用于测定抗氧化活性、氨基态氮含量,另一部分冻干保存待用。所使用酶的活力按 SB/T 10317—1999 进行测定。

表 1 第二步酶解条件

Table 1 Two-step enzymatic hydrolysis conditions

酶的种类	酶与底物的比例(g/g)	底物浓度/(mg·mL ⁻¹)	pH	温度/°C	酶解时间/h
胰蛋白酶	1:50	50	8	50	4
风味蛋白酶	1:50	50	6	50	4
木瓜蛋白酶	1:50	50	7	50	4
胃蛋白酶	1:50	50	2	37	4

1.2.2 水解度的测定 采用甲醛滴定法测定水解液中氨基氮的含量^[18],参照 GB 5009.5—2006 测定原料中总氮含量,按式(1)计算水解度。

$$h = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

h ——水解度,%;

m_1 ——氨基态氮含量,mg/mL;

m_2 ——总氮含量,mg/mL。

1.2.3 分子量的测定 根据 GB 31645—2018 修改如下: XBridge BEH 125A SEC(7.8 mm×300 mm, 3.5 μm);流动相为乙腈—水—三氟乙酸(体积比 40:60:0.05),流速 0.5 mL/min,上样量 10 μL,柱温 30 °C,L-2400 型紫外检测器,检测波长 220 nm。以细胞色素 C(12 384 Da)、抑肽酶(6 512 Da)、L-还原型谷胱甘肽(613 Da)和羟脯氨酸(131 Da)为标准品绘制标准曲线。平均分子量按式(2)计算:

$$\log M_w = -0.228 39t + 6.539 04, \quad (2)$$

式中:

M_w ——分子量, Da;

t ——保留时间, min。

1.2.4 抗氧化能力的测定

(1) DPPH·清除能力:根据文献[19]修改如下,600 μL 1 mg/mL 的样品与等体积 0.039 mg/mL DPPH 甲醇溶液混合均匀,避光反应 20 min,517 nm 处测吸光值 A_1 。600 μL DPPH 与等体积蒸馏水反应为控制组 A_0 ,600 μL 样品与等体积甲醇反应为对照组 A_2 。相同浓度的二叔丁基羟基甲酚(BHT)作为阳性对照。DPPH·清除率按式(3)计算。

$$S = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S ——自由基清除率,%;

A_1 ——样品组吸光值;

A_2 ——对照组吸光值;

A_0 ——控制组吸光值。

(2) $\cdot OH$ 清除能力: 根据文献[20]修改如下, 500 μL 1 mg/mL 的样品与 150 μL 2.22 mg/mL $FeSO_4$ 、125 μL 0.68 mg/mL H_2O_2 、500 μL 0.41 mg/mL 水杨酸(乙醇溶解), 37 $^\circ C$ 水浴反应 20 min, 离心 1 min。上清液于 510 nm 处测吸光值 A_1 。500 μL 蒸馏水代替样品的吸光值为 A_0 , 125 μL 甲醇代替 H_2O_2 的吸光值为 A_2 。相同浓度的 BHT 作为阳性对照。 $\cdot OH$ 清除率根据式(3)计算。

(3) O_2^- 清除能力: 根据文献[21]修改如下, 200 μL 1 mg/mL 的样品与 1.3 mL 7.88 mg/mL Tris-HCl (pH 8.8) 混合, 加入 100 μL 0.19 mg/mL 邻苯三酚(用 0.36 mg/mL HCl 配制) 室温反应 10 min, 加入 50 μL 291.68 mg/mL HCl 终止反应, 420 nm 处测吸光值 A_1 。200 μL 蒸馏水代替样品为控制组 A_0 , 100 μL HCl 代替邻苯三酚为对照组 A_2 。相同浓度的谷胱甘肽(GSH)为阳性对照。 O_2^- 清除率按式(3)计算。

(4) Fe^{2+} 螯合能力: 根据文献[22]修改如下, 800 μL 1 mg/mL 的样品与 10 μL 0.25 mg/mL $FeCl_2$ 、20 μL 2.46 mg/mL 菲洛嗪混合反应 10 min, 562 nm 处测吸光值 A_1 。800 μL 蒸馏水代替样品为控制组 A_0 , 10 μL 蒸馏水代替 $FeCl_2$ 为对照组 A_2 。相同浓度的 BHT 为阳性对照。 Fe^{2+} 螯合率按式(4)计算。

$$C = [1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}] \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

C ——亚铁离子螯合率, %;

A_1 ——样品组吸光值;

A_2 ——对照组吸光值;

A_0 ——控制组吸光值。

1.2.5 响应面试验设计 根据前期单因素试验结果, 以 Fe^{2+} 螯合率为指标, 进行温度、时间和 pH 的三因素三水平 Box-Behnken 响应面优化。

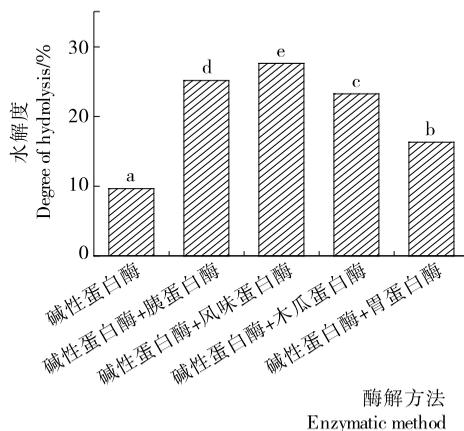
1.2.6 数据处理 采用 SPSS 17.0 和 Design-Expert 8.0.5 进行数据处理及统计分析, 选取 LSD 和 Duncan 用于显著性分析 ($P < 0.05$), 用 Origin 2018 作图。试验数据为 3 个平行样品的平均值。

2 结果与分析

2.1 二步酶解对水解度的影响

水解度通常用于检测蛋白质肽键断裂释放出短链多肽的程度, 水解度越大肽键断裂释放出的短链多肽越多[23-24]。二步酶解对水解度的影响如图 1 所示, 在碱性蛋白酶水解的基础上, 加入胰蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶二步酶解后水解度分别提高了 15.52%, 17.99%, 13.62%, 6.68%, 碱性蛋白酶—风味蛋白酶水解

物的水解度最大为 27.63%, 表明二步酶解可以显著提高酶解物的水解度。这一结果与 Sun 等[24] 和 Sinthusamran 等[25] 的结果一致。螺旋藻蛋白通过碱性蛋白酶酶解水解度为 25.47%, 而通过碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶二步酶解水解度为 32.90%, 水解度增大了 7.43%[24]。凡纳滨对虾通过自源酶(胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶)进行自体分解, 水解度为 35.31%, 通过 0.5% 和 1.0% 碱性蛋白酶进行二步酶解后, 水解度分别为 42.28% 和 44.93%, 水解度分别增大了 6.97% 和 9.62%[25]。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)
图 1 二步酶解对水解度的影响

Figure 1 Effect of two-step enzymatic hydrolysis on hydrolysis degree

2.2 二步酶解对分子量的影响

如图 2 所示, 碱性蛋白酶水解物以及 4 种酶的二步酶解物的体积排阻色谱图中主要的峰均为 4 个, 表明水解物由 4 组不同分子量范围的组分组成。

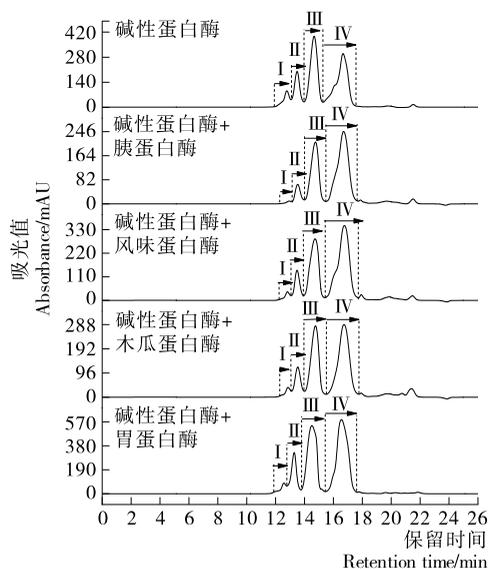


图 2 水解物的体积排阻色谱图

Figure 2 Size exclusion chromatogram of hydrolysates

如表 2 所示,与碱性蛋白酶水解物相比,胰蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶二步酶解物中分子量较大的组分 I、II 和 III 的相对含量减小,而分子量较小的组分 IV 的相对含量增大,表明胰蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶能够将碱性蛋白酶水解物中大分子量的肽段进一步水解成分子量更小的肽段。可能是胰蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶在二步酶解过程中引入了新的酶切位点,以胰蛋白酶为例,其酶切位点是赖氨酸和精氨酸,在二步酶解过程中胰蛋白酶可以将含有赖氨酸和精氨酸的大分

子量多肽进一步酶解成分子量更小的多肽。

2.3 二步酶解对抗氧化能力的影响

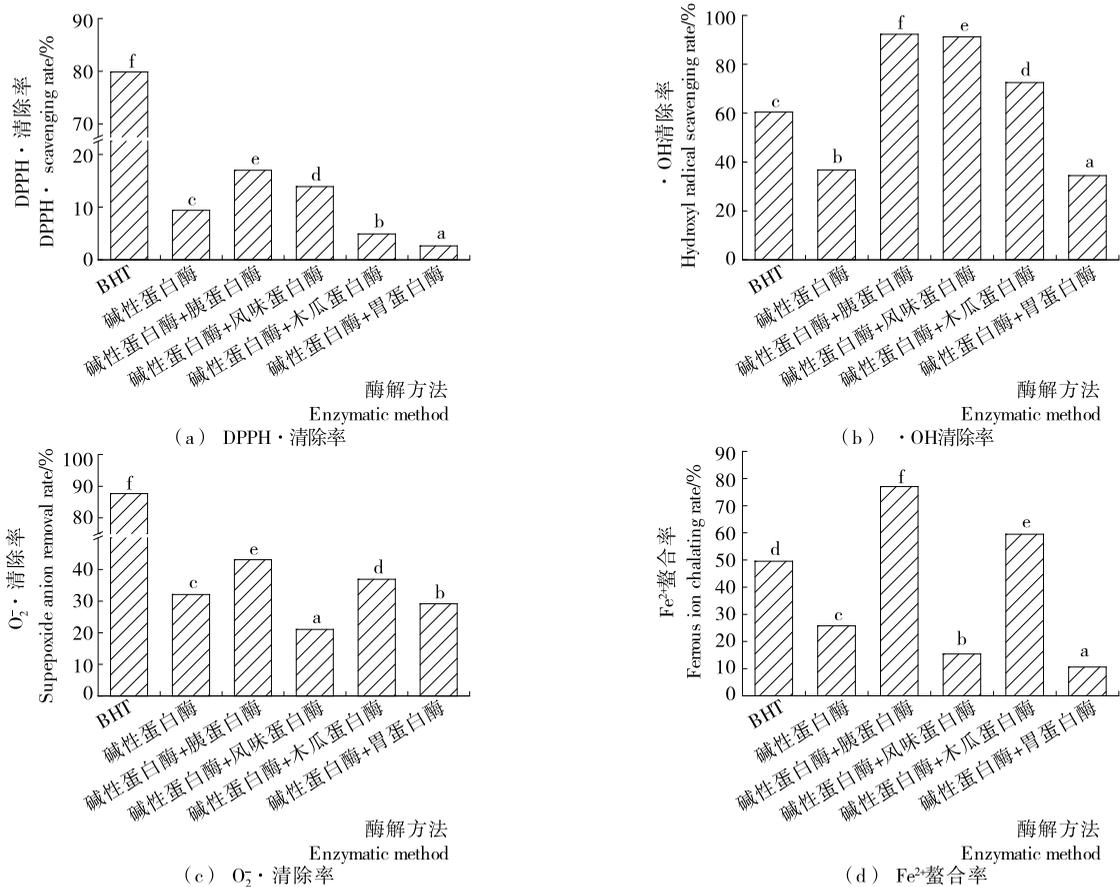
如图 3 所示,草鱼鱼鳞明胶经过碱性蛋白酶酶解后,水解物的 DPPH·、·OH、O₂⁻·清除率和 Fe²⁺螯合率分别是 9.38%,36.78%,32.06%,25.77%,经过胰蛋白酶二步酶解后水解物的 DPPH·、·OH、O₂⁻·清除率和 Fe²⁺螯合率分别提高至 16.98%,92.28%,43.11%,77.03%,显著高于风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶二步酶解物,表明胰蛋白酶二步酶解物的抗氧化活性最强。另外,胰

表 2 水解物中各组分的分子量及其相对含量[†]

Table 2 Molecular weight and relative content of each component of hydrolysates

酶解方法	组分 I		组分 II		组分 III		组分 IV	
	分子量/Da	相对含量/%	分子量/Da	相对含量/%	分子量/Da	相对含量/%	分子量/Da	相对含量/%
A	3 657~7 438	5.98	2 278~3 657	13.11	1 138~2 278	36.10	268~1 138	42.17
B	3 506~5 483	0.89	2 231~3 506	6.96	1 014~2 231	30.16	207~1 041	53.67
C	3 581~6 286	2.40	2 314~3 581	9.05	1 035~2 314	30.19	241~1 035	51.13
D	3 488~6 591	2.74	2 219~3 488	9.64	1 008~2 219	30.96	229~1 008	45.99
E	4 171~7 321	3.04	2 491~4 171	12.38	1 030~2 491	34.28	241~1 030	47.07

[†] A 碱性蛋白酶,B 碱性蛋白酶+胰蛋白酶,C 碱性蛋白酶+风味蛋白酶,D 碱性蛋白酶+木瓜蛋白酶,E 碱性蛋白酶+胃蛋白酶。



字母不同表示差异显著(P<0.05)

图 3 二步酶解对水解物的抗氧化能力的影响

Figure 3 Effect of two-step hydrolysis on antioxidant ability of hydrolysates

蛋白酶二步酶解物的·OH清除率和Fe²⁺螯合率显著高于阳性对照BHT,表明碱性蛋白酶和胰蛋白酶二步酶解法制备的草鱼鱼鳞明胶抗氧化肽具有替代合成抗氧化剂的应用前景。不同的酶其酶切位点不同,这是水解物具有不同程度抗氧活性的主要原因,与单酶法相比,双酶二步酶解法具有更多的酶切位点,可显著提高水解物的抗氧化活性。如罗非鱼鱼皮明胶的中性蛋白酶水解物的·OH清除率为52.21%,在此基础上通过碱性蛋白酶进行二步酶解后,水解物的·OH清除率提高了47.03%,达99.24%^[26]。水母明胶通过碱性蛋白酶和胰蛋白酶分别单独酶解后水解物的O₂⁻·清除率分别是38.3%和30.3%,·OH清除率分别是78.9%和66.5%,而通过胰蛋白酶和碱性蛋白酶二步酶解后水解物的O₂⁻·清除率和·OH清除率分别是52.8%和94.2%^[27]。

碱性蛋白酶和胰蛋白酶二步酶解物的高抗氧化活性也可能是由其高的水解度和低的分子量分布所引起的。2.1、2.2结果证明,在碱性蛋白酶酶解的基础上,胰蛋白酶进一步酶解不仅可以提高水解物的水解度,还可以将大分子量多肽进一步酶解为小分子量多肽,降低水解物的分子量分布。You等^[28]研究表明在一定的水解度范围内,泥鳅蛋白水解物的·OH和DPPH·清除率随着水解度的增大而增大。Jin等^[29]研究表明玉米蛋白在碱性蛋白酶酶解的基础上,风味蛋白酶二步酶解后水解度增大了4%,其DPPH·、·OH和O₂⁻·清除率分别增大了29.09%,20.73%,12.65%。Chi等^[30]研究表明分子量小的水解物与自由基之间的相互作用更有效,而Onuh等^[31]研究证实分子量<1kDa的比分子量>1kDa的水解物具有更显著的自由基清除能力和Fe²⁺螯合能力。

2.4 响应面试验设计方案及结果

为进一步优化二步酶解条件,达到降低能耗、缩短时间、提高酶解效率的目的,结合项目组前期研究,以碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物的Fe²⁺螯合率为考察指标,对胰蛋白酶第二步酶解的pH、温度和时间进行了三因素三水平的Box-Behnken响应面优化,试验设计及结果分别见表3、4。

由表5可知,因素A、C对碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物的Fe²⁺螯合率影响显著(P<0.01),因素B不显著(P>0.05),交互相AB、AC和BC影响不显著(P>0.05);

表3 Box-Behnken设计试验因素与水平

Table 3 Factors and their levels used for Box-Behnken design

水平	A pH	B 温度/℃	C 时间/min
-1	7	40	10
0	8	50	30
1	9	60	50

表4 试验设计方案与结果

Table 4 Experimental design scheme with experimental results for response surface analysis

试验号	A	B	C	Fe ²⁺ 螯合率/%
1	-1	-1	0	45.76
2	-1	0	1	58.36
3	0	-1	-1	46.90
4	-1	0	-1	40.80
5	-1	1	0	47.58
6	1	0	-1	35.19
7	0	0	0	60.77
8	0	-1	1	56.53
9	0	0	0	54.98
10	1	0	1	44.01
11	1	-1	0	36.84
12	1	1	0	34.60
13	0	0	0	55.00
14	0	1	1	63.90
15	0	1	-1	48.20

由F值可知,3个因素对碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物的Fe²⁺螯合率的影响依次是:时间>pH>温度。模型的P值为0.0021,达到极显著水平(P<0.01),失拟项F值为0.033,不显著(P>0.05),表明模型拟合良好。以pH、温度、时间为变量,碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物的Fe²⁺

表5 Fe²⁺螯合率为响应值的回归模型方差分析[†]

Table 5 Analysis of variance (ANOVA) of regression equation with Fe²⁺ chelating ability as response

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1197.04	9	133.00	20.04	0.0021**
A	219.00	1	219.00	32.99	0.0022**
B	8.52	1	8.52	1.28	0.3087
C	334.20	1	334.20	50.35	0.0009**
AB	4.13	1	4.13	0.62	0.4660
AC	19.08	1	19.08	2.88	0.1507
BC	9.26	1	9.26	1.40	0.2907
A ²	577.64	1	577.64	87.03	0.0002**
B ²	38.19	1	38.19	5.75	0.0617
C ²	0.12	1	0.12	0.018	0.8983
残差	33.19	5	6.64		
失拟项	10.92	3	3.64	0.33	0.8112
纯误差	22.26	2	11.13		
合计	1230.23	14			

[†] *表示差异显著(P<0.05), **表示差异极显著(P<0.01);R²=0.9730,R_{adj}²=0.9245,R_{pre}²=0.8172。

整合率为响应值,进行回归分析,得到回归方程:

$$Y_1 = -852.013 + 203.249A + 3.904B + 0.789C - 0.102AB - 0.109AC + 7.608 \times 10^{-3} BC - 12.508A^2 - 0.032B^2 + 4.505 \times 10^{-4} C^2. \quad (5)$$

通过响应模型优化得到碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物的 Fe^{2+} 整合率最大值为 65.20%,此时第二步酶解的条件为 pH 7.75、温度 53.19 °C、时间 50 min。

考虑到实际操作的方便性,调整第二步酶解的条件为底物浓度 100 mg/mL、pH 7.8、温度 53 °C、时间 50 min,预测值的 Fe^{2+} 整合率是 65.08%,重复 3 次验证实验后计算平均值,得到实际 Fe^{2+} 整合率为 65.72%,与预测值相差 0.64%。由此可知,模型比较可靠。未优化的第二步酶解的条件:底物浓度 50 mg/mL、pH 8.0、温度 50 °C、时间 4 h,碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物的 Fe^{2+} 整合率为 63.26%。经过优化后,碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物的 Fe^{2+} 整合率提高了 2.46%,底物浓度增大了 1 倍,酶解时间缩短了 190 min。

2.5 酶解物的抗氧化活性

经过响应面优化,碱性蛋白酶—胰蛋白酶一步酶解法制备的草鱼鱼鳞明胶水解物的 DPPH·、·OH 和 $O_2^-·$ 的 IC_{50} 值分别是 7.39、0.68、1.84 mg/mL。Ren 等^[32]通过碱性蛋白酶单酶法制备草鱼鱼肉的抗氧化肽的·OH 的 IC_{50} 值是 1.81 mg/mL,涂宗财等^[33]通过风味蛋白酶单酶法制备的草鱼鱼鳔抗氧化肽的 DPPH·、·OH 和 $O_2^-·$ 的 IC_{50} 值分别是 8.05、3.54、5.14 mg/mL,夏光华等^[13]通过碱性蛋白酶、胰蛋白酶和 Orientase 20A 酶三酶法制备的罗非鱼鱼皮抗氧化肽的 DPPH· 的 IC_{50} 值是 10.78 mg/mL。由此可知,与 Ren 等^[32]、涂宗财等^[33]和夏光华等^[13]的研究相比,本研究通过碱性蛋白酶和胰蛋白酶一步酶解法制备的鱼鳞明胶水解物具有较强的抗氧化活性。

3 结论

本研究以草鱼鱼鳞为原料制备鱼鳞明胶,经碱性蛋白酶进行第一步酶解,胰蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶分别进行一步酶解制备抗氧化肽,发现碱性蛋白酶—胰蛋白酶一步酶解物具有较强的抗氧化活性。胰蛋白酶一步酶解的最佳工艺为:底物浓度 100 mg/mL、pH 7.8、温度 53 °C、时间 50 min,与未优化工艺相比,最佳工艺的底物浓度增大了 1 倍,酶解时间缩短了 190 min。根据最佳工艺制备的草鱼鱼鳞明胶水解物的 DPPH·、·OH 和 $O_2^-·$ 的 IC_{50} 值分别是 8.05、3.54、5.14 mg/mL。根据碱性蛋白酶和胰蛋白酶一步酶解工艺制备的草鱼鱼鳞明胶粗水解物由 4 个不同分子量范围的组分组成,其中分子量为 207~1 041 的组分 IV 相对含量较高,是碱性蛋白酶—胰蛋白酶水解物抗氧化活性较强的主要原因,

有必要对组分 IV 进行分离纯化、筛选出活性较强的抗氧化肽并鉴定其结构。

参考文献

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴: 2014[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 7-97.
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴: 2015[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 30-104.
- [3] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴: 2016[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 27-101.
- [4] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴: 2017[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 24-98.
- [5] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴: 2018[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 21-95.
- [6] HALIM N, YUSOF H M, SARBON N M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review[J]. Trends in Food Science and Technology, 2016, 51: 24-33.
- [7] ZAMORA-SILLERO J, GHARSALLAOUI A, PRENTICE C. Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview[J]. Marine Biotechnology, 2018, 20(2): 118-130.
- [8] YANG Xiu-rong, ZHANG Lun, DING Dong-ge, et al. Preparation, identification, and activity evaluation of eight antioxidant peptides from protein hydrolysate of Hairtail (*Trichiurus japonicus*) Muscle[J]. Marine Drugs, 2019, 17(1): 1-18.
- [9] CHEN Tao-tao, ZHENG Chen, Wang Hui-min, et al. Underlying action mechanism of a novel antioxidant peptide derived from *Allium tuberosum* Rottler protein hydrolysates and its protective effects on hydrogen peroxide induced cell injury[J]. Journal of Functional Food, 2018, 40: 606-613.
- [10] CAI Lu-yun, WU Xiao-sa, ZHANG Yu-hao, et al. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin[J]. Journal of Functional Food, 2015, 16(3): 234-242.
- [11] SAIDI S, DERATANI A, BELLEVILLE M P, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process [J]. Food Research International, 2014, 65: 329-336.
- [12] YARNPAKDEE S, BENJAKUL S, KRISTINSSON H G, et al. Preventive effect of Nile tilapia hydrolysate against oxidative damage of HepG2 cells and DNA mediated by H_2O_2 and AAPH[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(10): 6 194-6 205.
- [13] 夏光华, 申铎日, 蔡锦红, 等. 三酶法制备罗非鱼鱼皮胶原蛋白抗氧化肽及活性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(23):

- 175-179.
- [14] ZHAO Wen-hao, LUO Qian-bin, PAN Xin, et al. Preparation, identification, and activity evaluation of ten antioxidant peptides from protein hydrolysate of swim bladders of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) [J]. Journal of Functional Food, 2018, 47: 503-511.
- [15] ZHANG Qin, Song Cheng-cheng, ZHAO Jun, et al. Separation and Characterization of Antioxidative and Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Jellyfish Gonad Hydrolysate[J]. Molecules, 2018, 23(1): 1-15.
- [16] SHA Xiao-mei, TU Zong-cai, LIU Wei, et al. Effect of ammonium sulfate fractional precipitation on gel strength and characteristics of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scale[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 36: 173-180.
- [17] LIU Wen-ying, GU Rui-zeng, LIN Feng, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from pilot-scale black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle oligopeptides[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(11): 2 782-2 788.
- [18] 杨莉莉. 鱼鳞胶原肽的分步酶解法制备及其特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 23-25.
- [19] BERSUDER P, HOLE M, SMITH G. Antioxidants from a heated histidine-glucose model system I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1998, 75(2): 181-187.
- [20] WENG Wu-yin, TANG Lan-lan, WANG Bao-zhou, et al. Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates[J]. Journal of Functional Food, 2014, 11(11): 342-351.
- [21] GIRGIH A T, HE R, HASAN F M, et al. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions[J]. Food Chemistry, 2015, 173: 652-659.
- [22] CHUNG Yun-chin, CHANG Cheng-tien, CHAO Wen-wan, et al. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2 454-2 458.
- [23] KIMATU B M, ZHAO Li-yan, YUAN Biao, et al. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions[J]. Food Chemistry, 2017, 230: 58-67.
- [24] SUN Yi-jun, CHANG Rong, LI Qing-ye, et al. Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*[J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(5): 685-692.
- [25] SINTHUSAMRAN S, BENJAKUL S, KIJROONGRO-JANA K, et al. Protein Hydrolysates from Pacific White Shrimp Cephalothorax Manufactured with Different Processes: Compositions, Characteristics and Antioxidative Activity[J]. Waste and Biomass Valorization, 2018, DOI: 10.1007/S12649-018-0517-1.
- [26] ZHANG Yu-feng, DUAN Xiu, ZHUANG Yong-liang. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin[J]. Peptides, 2012, 38(1): 13-21.
- [27] ZHUANG Yong-liang, SUN Li-ping, XUE Zhao, et al. Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity in vitro[J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(2): 222-228.
- [28] YOU Li-jun, ZHAO Mou-ming, CUI Chun, et al. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(2): 235-240.
- [29] JIN Du-xin, LIU Xiao-lan, ZHENG Xi-qun, et al. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 427-436.
- [30] CHI Chang-feng, WANG Bin, HU Fa-yuan, et al. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin [J]. Food Research International, 2015, 73: 124-129.
- [31] ONUH J O, GIRGIH A T, ALUKO R E, et al. In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions [J]. Food Chemistry, 2014, 150(2): 366-373.
- [32] REN Jiao-yan, ZHAO Mou-ming, SHI John, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Rejuvenation Research, 2008, 108(2): 727-736.
- [33] 涂宗财, 唐平平, 郑婷婷, 等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 160-166.