

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90026

大口黑鲈鱼胶原蛋白肽的制备及抗氧化活性研究

Study on preparation of collagen peptides from *Micropterus salmoides* skin and its antioxidant activity

韩梦瑶^{1,2,3,4} 李新月^{1,2,3,4} 王晓梅^{1,2,3,4}

HAN Meng-yao^{1,2,3,4} LI Xin-yue^{1,2,3,4} WANG Xiao-mei^{1,2,3,4}

王国治^{1,2,3,4} 叶金云^{1,2,3,4} 张忠山^{1,2,3,4}

WANG Guo-zhi^{1,2,3,4} YE Jin-yun^{1,2,3,4} ZHANG Zhong-shan^{1,2,3,4}

(1. 水生动物繁育与营养国家地方联合工程实验室, 浙江 湖州 313000;

2. 浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室, 浙江 湖州 313000;

3. 中国水产科学研究院水生动物繁育与营养重点实验室, 浙江 湖州 313000;

4. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000)

(1. National-Local Joint Engineering Laboratory of Aquatic Animal Genetic Breeding and Nutrition, Huzhou, Zhejiang 313000, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Aquatic Resources Conservation and Development, Huzhou, Zhejiang 313000, China; 3. Key Laboratory of Aquatic Animal Genetic Breeding and Nutrition of Chinese Academy of Fishery Sciences, Huzhou, Zhejiang 313000, China; 4. College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou, Zhejiang 313000, China)

摘要:目的: 探究酶种类对胶原蛋白肽抗氧化活性的影响。方法: 从大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)鱼皮中提取胶原蛋白, 采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶酶解胶原蛋白, 得到碱性蛋白酶酶解胶原蛋白肽(APP)、中性蛋白酶酶解胶原蛋白肽(NPP)、木瓜蛋白酶酶解胶原蛋白肽(PP)、胰蛋白酶酶解胶原蛋白肽(TP), 比较其总抗氧化活性、还原活性、对 DPPH、 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 清除能力以及亚铁离子整合能力和脂质氧化抑制活性。结果: 4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽都具有抗氧化活性, 且抗氧化能力与胶原蛋白肽浓度呈正相关, 其中 APP 的抗氧化活性最佳, 总抗氧化活性和还原活性分别为 1.725 和 0.958, 对 DPPH \cdot 和 O_2^- 清除率分别为 56.35% 和 38.41%。结论: 碱性蛋白酶酶解的胶原蛋白肽抗氧化活性更佳。

关键词: 大口黑鲈鱼皮; 蛋白酶; 酶解; 胶原蛋白肽; 抗氧化活性

Abstract: Objective: Collagen was extracted from the skin of *Mi-*

cropterus salmoides and used to explore the effect of enzyme types on the antioxidant activity of collagen peptides. **Methods:** Four kinds of enzymes were used, namely alkaline protease, neutral protease, papain and trypsin. The enzymatic hydrolysis of collagen Alkaline protease enzymatically hydrolyze collagen peptide (APP), Neutral protease enzymatically hydrolyze collagen peptide (NPP), Papain enzymatically hydrolyze collagen peptide (PP), Trypsin hydrolysis of collagen peptide (TP), were obtained and compared their total antioxidant activity, including reducing activity, DPPH, $\cdot\text{OH}$ and O_2^- free radical scavenging ability, ferrous ion chelating ability and lipid Oxidation inhibitory activity. **Results:** Four kinds of proteases enzymatically hydrolyze collagen peptides all have antioxidant activity, and the antioxidant capacity was positively correlated with the concentration of collagen peptides. Among them, APP has the best antioxidant activity. The total antioxidant activity and reducing activity respectively were 1.725 and 0.958, and the scavenging rates for DPPH and O_2^- radical respectively were 56.35% and 38.41%, respectively. **Conclusion:** The collagen peptides hydrolyzed by alkaline protease have better antioxidant activity.

Keywords: *Micropterus salmoides* skin; protease; enzymatic hydrolysis; collagen peptide; antioxidant activity

基金项目: 浙江省基础公益计划项目(编号:GN21D060001); 现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARs-45-11)

作者简介: 韩梦瑶, 女, 湖州师范学院在读硕士研究生。

通信作者: 张忠山(1982—), 男, 湖州师范学院教授, 博士。

E-mail: 01959@zjhu.edu.cn

收稿日期: 2021-09-29

中国水域辽阔, 水产资源丰富, 其中淡水养殖占水产

养殖产量的 75%。鱼类在加工和消费过程中会产生约 50% 的下脚料,包含鱼皮、鱼尾、鱼骨、鱼鳍、鱼鳞等^[1],这些下脚料不仅会对环境造成污染,同时也是一种资源的浪费。大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)俗称加州鲈,原产于北美洲,于 20 世纪 80 年代被引入中国养殖^[2],目前已成为中国养殖的主要淡水鱼种之一^[3]。

胶原蛋白是结缔组织的重要组成部分,是一种白色、不透明、无支链的纤维状蛋白质,主要存在于动物的皮、骨、牙齿、韧带和血管中,起着支撑器官、保护机体的作用^[4],目前胶原蛋白的提取方法主要有酸法^[5]、酶法^[6]、碱法^[7]、热水法^[8]等。胶原蛋白肽是胶原蛋白的酶解产物,一般由 3~20 个氨基酸组成^[9],具有抗氧化、降血脂、提高免疫力等生物活性^[10]。因其分子量小,溶解性好,易被人体肠道吸收,目前在保健食品、化妆品中得到广泛应用^[11-12]。

人体内含有多种自由基,自由基会引起机体发生病变和衰老,甚至引起癌症。目前,研究人员^[13-15]已从鳕鱼(*Theragra chalcogramma*)、鮫鱈鱼(*Lophius litulon*)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)等鱼皮中得到了具有抗氧化活性的多肽,证实了从水产动物中提取的多肽具有良好的抗氧化活性,拥有较好的发展前景。大口黑鲈近年来在浙江省的养殖规模和产量增长非常迅速,深受养殖户和消费者的欢迎,但在深加工过程中会产生大量鱼皮副产物,其富含胶原蛋白,可作为提取胶原蛋白的原料。但目前对大口黑鲈鱼皮多肽的提取及其抗氧化活性报道较少。

为了提高效率和产率,研究拟采用酸酶复合法提取大口黑鲈鱼皮胶原蛋白,所得胶原蛋白用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶 4 种酶进行酶解,得到 4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽,通过测定总抗氧化活性、还原活性、清除自由基(DPPH·、·OH 和 O₂⁻·)能力以及亚铁离子螯合能力和脂质氧化抑制活性,确定最适蛋白酶,旨在为大口黑鲈鱼皮开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

大口黑鲈鱼皮:湖州市海鲜市场;

30% 双氧水、硫酸亚铁、硫酸铜、磷酸钠、钼酸铵、水杨酸、铁氰化钾、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、还原型辅酶 I(NADH)、吩嗪硫酸甲酯(PMS):分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

碱性蛋白酶(20 万 U/g)、中性蛋白酶(10 万 U/g)、木瓜蛋白酶(80 万 U/g)、胰蛋白酶(25 万 U/g):上海源叶生物有限公司;

乙腈、三氟乙酸:色谱纯,美国 Sigma 公司。

试验用水为 Milli-Q 去离子水。

1.1.2 主要仪器设备

冷冻高速离心机: TG16KR 型,长沙东旺实验仪器有限公司;

循环水式真空泵: SHZ-P(Ⅲ)型,杭州庚雨仪器有限公司;

紫外可见分光光度计: UV-1200 型,南京菲勒仪器有限公司;

质谱仪: AutoflexⅢ型,日本岛津仪器有限公司;

电泳仪: POWER 300 型,莱普特仪器科学仪器有限公司;

冷冻干燥机: SJIA-10N 型,宁波市双嘉仪器有限公司;

数显鼓风干燥箱: BGZX-9076MBE 型,广州航信科学仪器有限公司;

电热恒温水浴锅: DK-S24 型,无锡沃信仪器制造有限公司;

电子天平: AR224CN 型,广州市怡华新电子仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大口黑鲈鱼皮胶原蛋白的制备 鱼皮清洗后烘干,剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,加入 0.5 mol/L 碳酸钠溶液搅拌浸泡 24 h,脱去杂蛋白和色素,用蒸馏水冲洗至 pH 7,晾干。按 $m_{\text{鱼皮}} : V_{10\% \text{异丙醇}}$ 为 1 : 10 (g/mL) 的比例混合搅拌浸泡 24 h 进行脱脂处理,蒸馏水洗净,晾干;将除杂后的鱼皮按照料液比($m_{\text{鱼皮}} : V_{\text{乙酸}}$) 1 : 100 (g/mL) 的比例加入含有 0.3% 胃蛋白酶的 0.5 mol/L 乙酸中搅拌浸泡 24 h,4 000 r/min 离心 10 min,上清液缓慢加入氯化钠盐析 24 h,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀用乙酸复溶,蒸馏水透析,真空冷冻干燥得到大口黑鲈鱼皮胶原蛋白。

1.2.2 不同酶解胶原肽的制备 称取大口黑鲈鱼皮胶原蛋白 1 g,按照料液比($m_{\text{鱼皮胶原蛋白}} : V_{\text{乙酸}}$) 1 : 100 (g/mL) 的比例,加入 0.5 mol/L 乙酸溶解,得到胶原蛋白溶液。分成 4 份,向其中加入碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶,并调节胶原蛋白溶液 pH 在各酶的最适 pH 范围内(表 1),最适温度下酶解 4 h,100 °C 灭酶 10 min,冷却至室温后离心(4 000 r/min,10 min),取上清分别得到碱性蛋白酶酶解胶原蛋白肽(APP)、中性蛋白酶酶解胶原蛋白肽(NPP)、木瓜蛋白酶酶解胶原蛋白肽(PP)、胰蛋白酶酶解胶原蛋白肽(TP)。

表 1 4 种蛋白酶的最适 pH、温度

Table 1 Optimal pH and temperature for 4 kinds of proteases

蛋白酶种类	最适 pH	最适温度/°C
碱性蛋白酶	10	55
中性蛋白酶	7	50
木瓜蛋白酶	6	55
胰蛋白酶	8	50

1.2.3 胶原蛋白及胶原蛋白肽分子量测定

(1) 胶原蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳:根据文献[16]修改如下:称取 5 mg 胶原蛋白溶于 1 mL 5% SDS 溶液, 85 °C 变性 1 h, 冷却至室温, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。配制 8% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, 加入 20 μ L 的蛋白样品和高分子量的蛋白质标记物, 在电泳槽中加入电泳缓冲液, 电泳结束后, 加入考马斯亮蓝 R-250 染液染色 4 h, 回收染色液, 加入乙酸-甲醇脱色液, 数小时更换一次脱色液, 直至背景清晰, 放入凝胶成像仪进行观察。

(2) 大口黑鲈鱼皮胶原蛋白的紫外吸收光谱:根据文献[17]修改如下:将大口黑鲈鱼皮胶原蛋白用 0.5 mol/L 乙酸配制质量浓度为 1 mg/mL 的溶液, 用紫外分光光度计在波长范围 400~200 nm 扫描。

(3) 质谱仪测定胶原蛋白肽分子量:根据文献[18]修改如下:设定波长 $\lambda=337$ nm, 加速电压 25 kV。乙腈和超纯水 1:1 混合(含 0.1% 三氟乙酸)作为溶剂使用, 将 APP、NPP、PP、TP 溶解于溶剂中, 配成 1 mg/mL 的溶液。样品和基质溶液 1:1 (g/mL) 混合, 取 1 μ L 点在靶板上, 自然干燥后, 将样品板放进仪器中进行测定。

1.2.4 水解度测定 采用茚三酮法^[19], 按式(1)计算胶原蛋白肽的蛋白水解度(DH)。

$$d = \frac{N_1 - N_2}{N_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

d ——水解度, %;

N_1 ——蛋白酶水解后氨基态氮含量, μ mol/L;

N_2 ——原料中游离氨基态氮含量, μ mol/L;

N_0 ——原料中总游离氨基态氮含量, μ mol/L。

1.2.5 胶原蛋白肽抗氧化活性研究

(1) 总抗氧化能力:采用钼酸铵法^[20], 酶解胶原蛋白肽与钼酸铵溶液反应, 于 695 nm 进行比色, 吸光度代表各管总抗氧化能力。

(2) 还原能力:采用铁氧化钾还原法^[21], 以 pH 6.6 磷酸盐缓冲液代替样品作为空白对照, 测定各管 OD 值, 绘制还原能力曲线。

(3) 清除 DPPH· 活性:根据文献[22], 按式(2)计算 DPPH· 清除率。

$$\eta = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

η ——自由基清除率, %;

A_0 ——对照管 OD 值;

A_1 ——加入胶原蛋白肽的 OD 值。

(4) 清除·OH 活性:采用水杨酸法^[23], 以 3 mmol/L 水杨酸溶液进行调零, 于 510 nm 下测吸光度, 按式(2)计算胶原蛋白肽对·OH 的清除率。

(5) 清除 O_2^- · 活性:根据文献[24]修改如下:向 1~6 号试管依次加入 0~1 mL 酶解胶原蛋白肽, 每管加入 Tris-HCl 缓冲液补足至体积为 3 mL, 向试管中依次加入 300 μ mol/L 的 NADH 溶液、468 μ mol/L 的 NBT 溶液和 60 μ mol/L 的 PMS 溶液各 0.5 mL, 每加入一种溶液都要混匀一次;另取一管用 0.5 mL Tris-HCl 缓冲液代替 NADH 溶液作为对照管, 室温静置 5 min, 在 560 nm 下测定吸光度, 按式(3)计算胶原肽对 O_2^- · 的清除率。

$$\eta = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

η —— O_2^- · 清除率, %;

A_0 ——加入 Tris-HCl 缓冲液的 OD 值;

A_1 ——加入胶原蛋白肽的 OD 值。

(6) 亚铁离子螯合能力:根据文献[25], 按式(4)计算胶原肽的亚铁离子螯合能力。

$$\eta = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

η ——亚铁离子螯合率, %;

A_0 ——对照管 OD 值;

A_1 ——加入胶原蛋白肽的 OD 值。

(7) 脂质氧化抑制活性:根据文献[26]修改如下:将 0.5 mL 酶解胶原蛋白肽与 2.5 mL 2.5% 亚油酸无水乙醇、2 mL 磷酸盐缓冲液混合, 吸取 0.0~0.1 mL 混合液, 用 75% 乙醇补足至 5 mL, 随后加入 30% 硫氰酸铵溶液 0.1 mL, 20 mmol/L FeCl₂ 0.05 mL, 准确计时 3 min, 在 500 nm 处测定吸光度, 并用蒸馏水代替 FeCl₂ 作为空白管调零, 按式(5)计算胶原蛋白肽脂质氧化抑制率。

$$\eta = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

η ——脂质氧化抑制率, %;

A_0 ——对照管 OD 值;

A_1 ——加入胶原蛋白肽的 OD 值。

1.2.6 数据分析 数据结果以平均值±标准偏差表示, 采用 Graphpad Prism 9 对试验数据进行处理及作图。

2 结果与分析

2.1 胶原蛋白及胶原蛋白肽分子量

2.1.1 胶原蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳 由图 1 可知, 大口黑鲈鱼皮胶原蛋白主要由两条 120 kDa 的 α 链和一条 200 kDa 的 β 链组成, 符合 I 型胶原蛋白的特征。I 型胶原蛋白是鱼皮和鱼鳞中发现的主要胶原蛋白, 主要由两条 α 链和一条 β 链组成^[16]。 β 链是 α 链的二聚体, 表明 I 型胶原蛋白结构完整, 胃蛋白酶未破坏胶原蛋白的结构, 与周瑞等^[6]研究结果保持一致。图 1 中, 在 α_2 条带以下,

无其他明显的条带,表明提取的大口黑鲈鱼皮胶原蛋白纯度较高,三螺旋结构保持完好。

2.1.2 大口黑鲈鱼皮胶原蛋白的紫外吸收光谱 在 200~400 nm 范围内对大口黑鲈鱼皮胶原蛋白进行扫描,结果如图 2 所示,大口黑鲈鱼皮胶原蛋白的最大吸收峰在 234 nm 处,与 I 型胶原蛋白的特征吸收峰位置 235 nm 十分接近。这主要是一 C=O、-COOH、CO-NH₂ 等生色基团在 235 nm 附近对紫外光有较大吸收,与鮫鱈鱼皮^[27]、暗纹东方鲀(*Tetrodon lineatus*)鱼皮^[6]和马面鱼(*Thamnaconus modestus*)皮^[28]研究结果一致,由此可以推断,所提取的胶原蛋白为 I 型胶原蛋白。

2.1.3 不同蛋白酶酶解胶原肽质谱图 由图 3~图 6 可知,APP、NPP、PP、TP 的相对分子质量分别集中在 110~1 942,200~1 883,112~1 943,120~1 951 Da。不同的蛋白酶具有不同的酶切位点,从而使得 APP、NPP、PP、TP 氨基酸组成和序列发生变化,相对分子质量出现差异。研究^[29]表明,分子量越小,抗氧化活性越高,更易被人体吸收。

2.1.4 不同蛋白酶酶解胶原肽氨基酸的相对百分含量

如表 2 所示,APP、NPP 和 PP 都含有 12 种氨基酸,而 TP 仅含有 11 种氨基酸。氨基酸的种类、数量及排列顺序与多肽抗氧化能力有着紧密联系。研究^[30]表明,酸性氨基酸(Asp、Glu)、芳香族氨基酸(Phe、Tyr、Trp)、含硫氨基酸(Met、Cys)和疏水性氨基酸具有较强的抗氧化能力。试验中 APP 所含有的抗氧化氨基酸种类和含量较为丰富,因此推断 APP 具有较强的抗氧化能力。

2.2 酶种类对胶原蛋白水解度的影响

蛋白质通过酶解,生成的小分子肽更易被人体吸收。通过测定其水解度,可以了解不同蛋白酶的酶解程度。由图 7 可知,碱性蛋白酶的酶解效果最好($P < 0.05$),其水解度可以达到 25.44%,其他 3 种蛋白酶的酶解效果相差不多,与胡杨等^[31]研究结果一致。结合质谱图可知,水解度越大,肽键断裂更彻底,分子量越小。

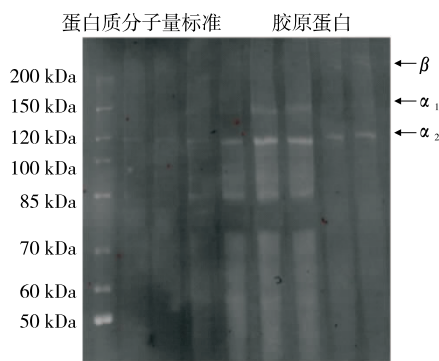


图 1 大口黑鲈鱼皮胶原蛋白 SDS-PAGE 图

Figure 1 SDS-PAGE image of *Micropterus salmoides* skin collagen

2.3 大口黑鲈鱼皮胶原蛋白肽的抗氧化活性

2.3.1 总抗氧化能力 由图 8 可知,4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽都具有总抗氧化能力,并且随浓度的增加呈上升趋势,其中 APP 总抗氧化能力明显优于其他 3 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽。这可能与其水解度有关,碱性蛋白酶水解度最高,肽键断裂更彻底,更有利用水解出抗氧化氨基酸,提高胶原蛋白肽的抗氧化活性^[32]。

2.3.2 还原能力 由图 9 可知,4 种蛋白酶酶解胶原肽都具有还原能力,但 APP 还原能力明显优于其他 3 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽($P < 0.05$),当 APP 质量浓度为 10 mg/mL 时,吸光度达到 0.958,优于鮫鱈鱼皮胶原蛋白肽^[27](还原能力为 0.676)。总抗氧化能力和还原能力之间具有明显的正相关性,由图 8 和图 9 可知,抗氧化和还原能力依次为 APP>NPP>PP>TP。结果表明,大口黑鲈鱼皮胶原蛋白肽的抗氧化活性与其浓度和酶解液的水解度密切相关。

2.3.3 清除 DPPH· 活性 由图 10 可知,质量浓度为 0.25~2.00 mg/mL 时,TP 清除 DPPH· 能力并未随着其质量浓度的升高而增强,当质量浓度达到 2.50 mg/mL 时,清除率明显上升,原因可能是设定浓度还未达到其合适浓度。而其他 3 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽清除率远高于 TP,当 APP 质量浓度为 1.5 mg/mL 时,DPPH· 清除率已达到最大值 56.35%。可以看出,在相同浓度下,APP 具有较强的 DPPH· 清除率。原因可能是碱性蛋白酶是一种深入的内切蛋白酶,能够切除多种肽键,释放出活性肽段,更有利于清除自由基,提高抗氧化能力。

2.3.4 清除·OH 活性 由图 11 可知,质量浓度为 1~5 mg/mL 时,PP 的·OH 清除率无显著变化,仅为 3.5%,其他 3 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽清除率已达到 55%~67%,原因可能是未达到 PP 的合适浓度。APP 质量浓度在 2~4 mg/mL 时,清除率从 31.55% 升高到 67.05%,显著高于 PP($P < 0.05$);在质量浓度为 4 mg/mL 后,清除率呈平缓的趋势,表示已达到最大清除率。与大菱鲆鱼皮胶原蛋白肽^[11]相比,APP 对·OH 的清除能力更强。

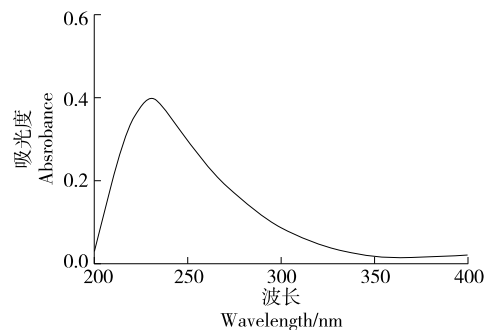


图 2 大口黑鲈鱼皮胶原蛋白的紫外吸收光谱

Figure 2 Ultraviolet absorption of collagen from *Micropterus salmoides* skin

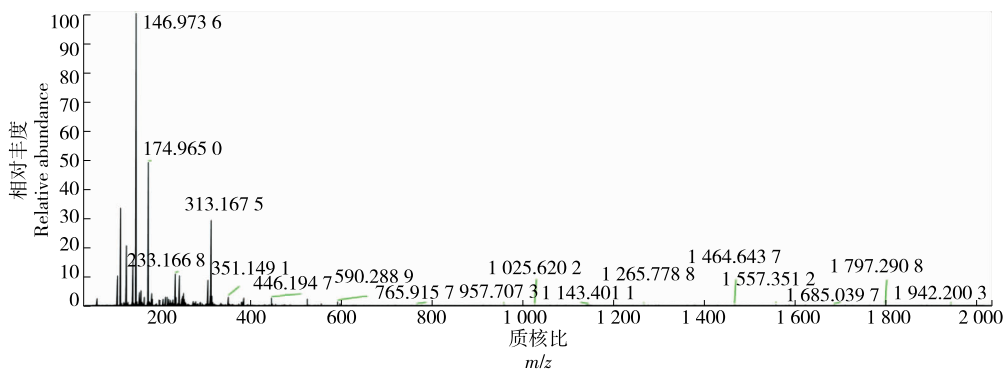


图 3 APP 质谱图

Figure 3 APP mass spectrum

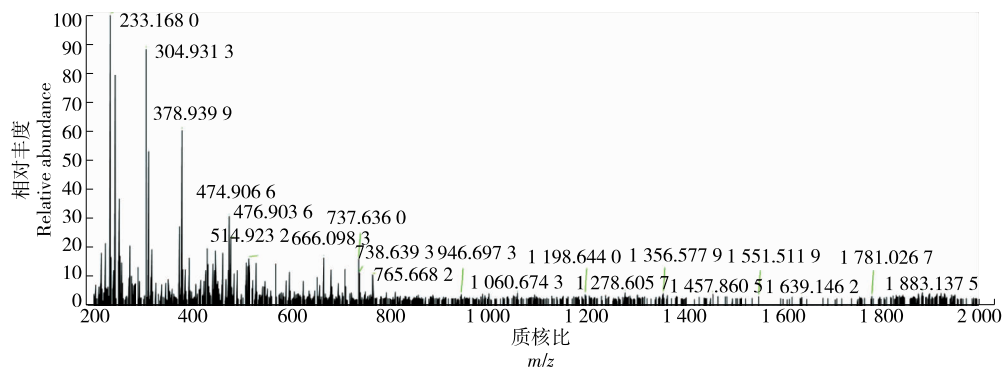


图 4 NPP 质谱图

Figure 4 NPP mass spectrum

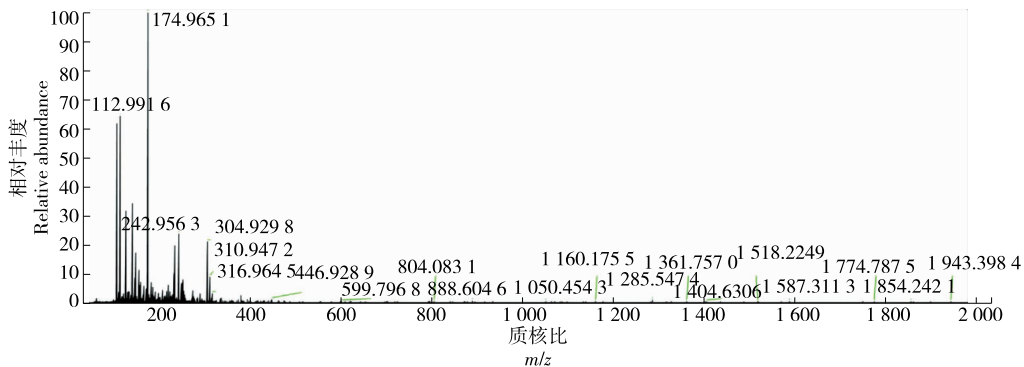


图 5 PP 质谱图

Figure 5 PP mass spectrum

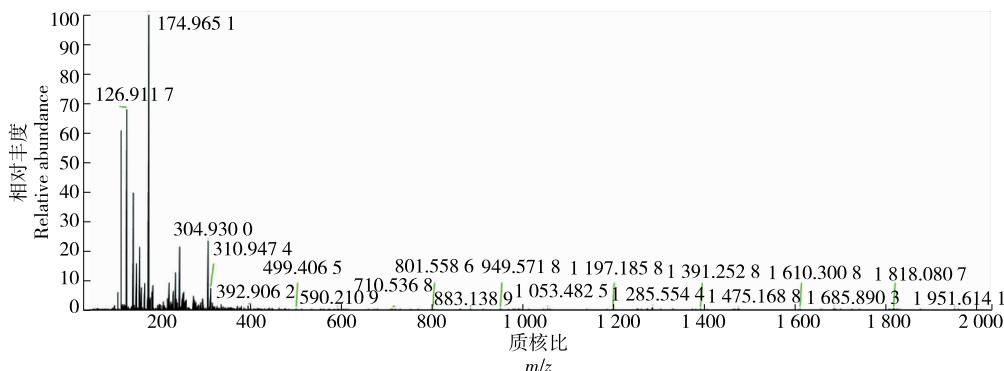


图 6 TP 质谱图

Figure 6 TP mass spectrum

表 2 不同蛋白酶解胶原肽氨基酸的相对百分含量

Table 2 The relative percentages of amino acids in collagen peptides hydrolyzed by different proteases

氨基酸	APP	NPP	PP	TP
丙氨酸(Ala)	13.39	11.43	13.12	13.08
甘氨酸(Gly)	25.32	31.53	26.49	25.53
苏氨酸(Thr)	3.28	1.45	3.05	2.56
丝氨酸(Ser)	4.97	2.93	4.73	4.72
缬氨酸(Val)	2.27	3.37	1.91	1.60
亮氨酸(Leu)	4.17	5.71	4.24	3.91
脯氨酸(Pro)	11.26	7.96	12.17	12.42
羟脯氨酸(Hyp)	8.42	5.74	7.03	7.99
甲硫氨酸(Met)	1.71	4.94	1.88	0.00
天冬氨酸(Asp)	7.43	7.89	7.79	7.65
苯丙氨酸(Phe)	2.99	0.00	2.85	2.98
谷氨酸(Glu)	14.79	13.11	14.74	3.03
异亮氨酸(Ile)	0.00	1.40	0.00	0.00

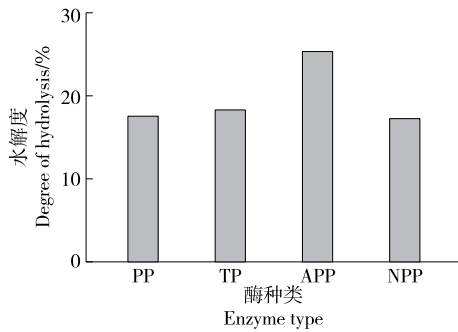


图 7 不同蛋白酶的水解效果比较

Figure 7 Comparison of hydrolysis effects of different proteases

2.3.5 $O_2^- \cdot$ 清除活性 由图 12 可知,当胶原蛋白肽质量浓度为 0.05 mg/mL 时,APP 的 $O_2^- \cdot$ 清除率可以达

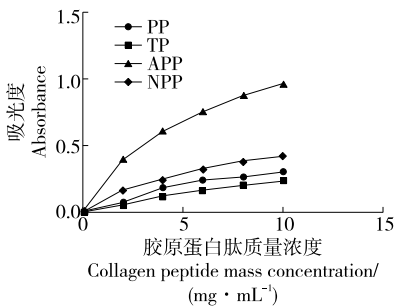


图 9 不同酶解胶原蛋白肽还原能力

Figure 9 Different enzyme hydrolyzed collagen peptide reduction ability

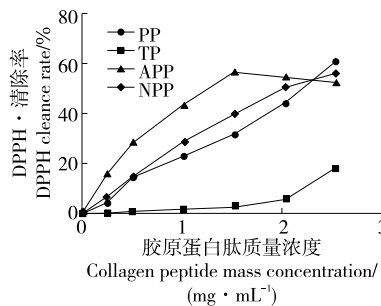


图 10 不同酶解胶原蛋白肽 DPPH · 清除率
Figure 10 DPPH free radical scavenging rate of different enzymatically hydrolyzed collagen peptides

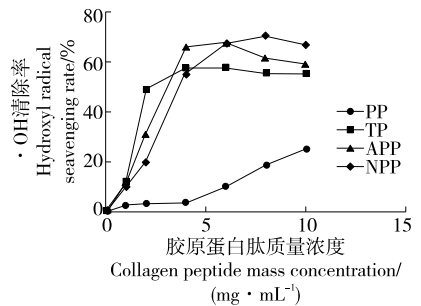


图 11 不同酶解胶原蛋白肽 ·OH 清除率
Figure 11 Hydroxyl radical scavenging rate of different enzymatic collagen peptides

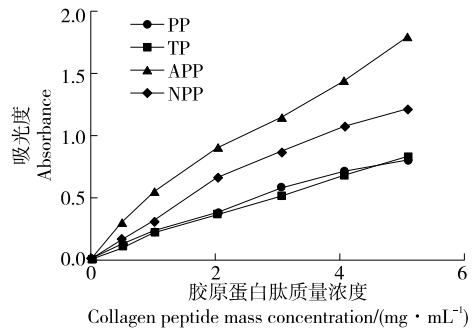


图 8 不同酶解胶原蛋白肽总抗氧化能力

Figure 8 Total antioxidant capacity of collagen peptides hydrolyzed by different enzymes

38.41%, 已经达到最大清除率,之后趋于平缓。说明大口黑鲈鱼皮胶原蛋白肽对 $O_2^- \cdot$ 的清除活性有极限,此时浓度和清除率无显著关系。在相同浓度下, $O_2^- \cdot$ 清除率依次为 APP>NPP>TP>PP。APP、NPP 和 TP 对 $\cdot OH$ 和 $O_2^- \cdot$ 都具有较强的清除能力,而 PP 清除能力明显低于其他 3 种,可能原因是木瓜蛋白酶主要作用于蛋白质疏水区域的肽键,疏水性的肽和氨基酸抗氧化活性较低,从而使水解液对自由基的清除能力降低^[33]。

2.3.6 亚铁离子螯合能力 由图 13 可知,在胶原蛋白肽质量浓度为 0.125~0.250 mg/mL 时,APP 亚铁离子螯合能力增加趋势最为明显。从清除率趋势来看,APP 亚铁离子螯合能力最强,与杨雅兰等^[33] 研究结果一致。可能与碱性蛋白酶水解度最高有关,碱性蛋白酶具有最强的剪切力,通过水解使其释放出更多的活性肽段和氨基酸,从而与亚铁离子进行螯合。

2.3.7 脂质氧化抑制活性 由图 14 可知,4 种蛋白酶解胶原蛋白肽对脂质氧化都具有很高的抑制活性,抑制率可以达到 99%。脂质氧化生成的醛与糖尿病、阿尔兹海默症等疾病密切相关^[34],而胶原蛋白肽可以有效抑制脂质氧化,预防疾病的发生。

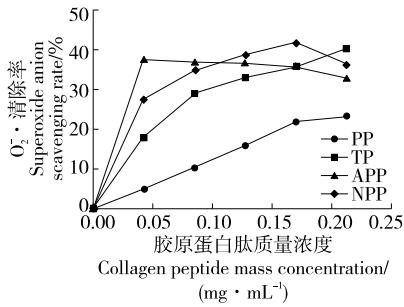


图 12 不同酶解胶原蛋白肽
 O_2^- 清除率

Figure 12 Scavenging rate of superoxide anion free radicals of different enzymatic collagen peptides

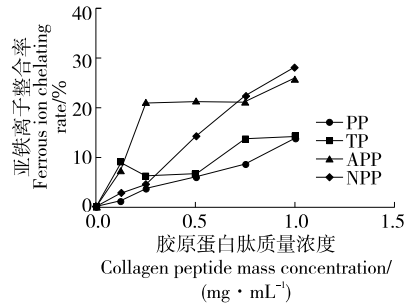


图 13 不同酶解胶原蛋白肽
亚铁离子螯合能力

Figure 13 Different enzyme-hydrolyzed collagen peptides with ferrous ion chelating ability

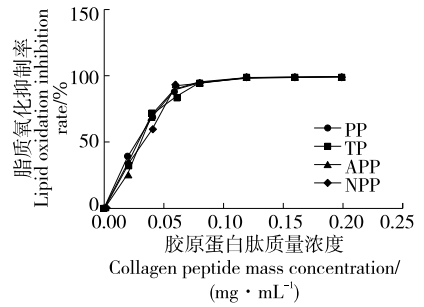


图 14 不同酶解胶原蛋白肽
脂质氧化抑制活性

Figure 14 Different enzyme hydrolyzed collagen peptides lipid oxidation inhibitory activity

3 结论

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳证实了从大口黑鲈鱼皮中提取的胶原蛋白为 I 型胶原蛋白, 含有 3 条链, 分别为两条 120 kDa 的 α 链和一条 200 kDa 的 β 链。采用酸酶复合法提取大口黑鲈鱼皮胶原蛋白不仅可以提高效率 and 得率, 而且可以保持胶原蛋白的三螺旋结构。试验利用 4 种蛋白酶酶解大口黑鲈鱼皮胶原蛋白, 结果表明, 4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽均具有抗氧化能力, 且抗氧化能力和胶原蛋白肽浓度、水解度都呈一定的正相关关系。水解度越大, 分子量越小, 抗氧化活性越高。蛋白酶的类别对胶原蛋白肽具有一定的影响, 有可能是不同酶类具有不同的酶切位点, 酶解成不同分子量和氨基酸组成的胶原蛋白肽, 从而产生不同的抗氧化活性。4 种蛋白酶中, 碱性蛋白酶具有最高的水解度和抗氧化活性。

参考文献

- [1] 李保强, 王利强, 丁建虹, 等. 鱼鳞胶原蛋白的研究进展[J]. 包装工程, 2018, 3(17): 53-60.
LI Bao-qiang, WANG Li-qiang, DING Jian-hong, et al. Research progress in fish scale collagen[J]. Packaging Engineering, 2018, 3(17): 53-60.
- [2] 周凡, 线婷, 贝亦江, 等. 周期性“饥饿—再投喂”对大口黑鲈幼鱼补偿生长的影响[J]. 水产学杂志, 2019, 32(3): 27-33.
ZHOU Fan, XIAN Ting, BEI Yi-jiang, et al. Effects of cyclic starvation-refeeding treatment on compensatory growth of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(3): 27-33.
- [3] 丁庆秋, 陈宇航, 曹双俊, 等. 大口黑鲈的营养需求研究进展[J]. 养殖与饲料, 2013(11): 38-43.
DING Qing-qiu, CHEN Yu-hang, CAO Shuang-jun, et al. Research progress on nutritional requirements of *Micropterus salmoides*[J]. Breeding and Feed, 2013(11): 38-43.
- [4] ARUMUGAM G K S, SHARMA D, BALAKRISHNAN R M, et al.

Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin (Article) [J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2018, 9: 19-26.

- [5] 淑英, 敖冉, 宋佳, 等. 响应面法优化鳕鱼皮酸性胶原蛋白的提取工艺[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 269-272, 77.
SHU Ying, AO Ran, SONG Jia, et al. Optimization of extraction condition of acid-soluble collagen from cod skin by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(24): 269-272, 77.
- [6] 周瑞, 李若男, 周丽莎, 等. 暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白的提取及其特性[J]. 水产学报, 2020, 44(8): 1 349-1 359.
ZHOU Rui, LI Ruo-nan, ZHOU Li-sha, et al. Extraction and characteristics of collagens from the skin of puffer fish (*Tetrodointiformes fasciatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(8): 1 349-1 359.
- [7] 温慧芳, 赵利, 陈丽丽, 等. 碱法提取鲷鱼皮胶原蛋白工艺优化的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(19): 233-236, 42.
WEN Hui-fang, ZHAO Li, CHEN Li-li, et al. Study on process optimization of extracting collagen from *Amiurus nebulosus* skin by alkali way[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(19): 233-236, 42.
- [8] 赵睿, 王晓丹, 祖国仁, 等. 热水法抽提鳕鱼皮胶原蛋白条件的响应面分析[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(2): 98-100.
ZHAO Rui, WANG Xiao-dan, ZU Guo-ren, et al. Response surface methodology's analysis on extracting collagen from cod's skin by hot water extraction[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2011, 30(2): 98-100.
- [9] HE R, GIRGIH A T, MALOMO S A, et al. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions (Article) [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 219-227.
- [10] 郭瑶, 曾名勇, 崔文萱. 水产胶原蛋白及胶原多肽的研究进展[J]. 水产科学, 2006, 25(2): 101-104.
GUO Yao, ZENG Ming-yong, CUI Wen-xuan. Aquatic collagen and active polypeptide[J]. Fisheries Science, 2006, 25(2): 101-104.
- [11] 王志, 赵峰, 王珊珊, 等. 大菱鲆鱼皮抗氧化胶原肽的制备及特

- 性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8 267-8 275.
- WANG Zhi, ZHAO Feng, WANG Shan-shan, et al. Preparation and characteristic analysis of antioxidant collagen peptides from turbot skins[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(22): 8 267-8 275.
- [12] 李露园, 王升帆, 朱有贵, 等. 酶法制备鲟鱼皮胶原蛋白多肽及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(20): 138-143.
- LI Lu-yuan, WANG Sheng-fan, ZHU You-gui, et al. Enzymatic preparation and antioxidant activity of sturgeon skin collagen polypeptide[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(20): 138-143.
- [13] LIU F, LIU C, LORENA D, et al. Evaluation of the antioxidant activity of collagen peptide additive extracted from cod skin (Article) [J]. Journal of Environmental Protection and Ecology, 2012, 13(3A): 1 836-1 841.
- [14] 马华威, 杨会成, 付万冬, 等. 鲛鳊鱼皮胶原蛋白肽的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 80-84.
- MA Hua-wei, YANG Hui-cheng, FU Wan-dong, et al. Antioxidant activity of collagen peptides from *Lophius litulon* skin[J]. Food Science, 2014, 35(9): 80-84.
- [15] 盛周煌, 贾盟盟, 朱良. 罗非鱼皮胶原蛋白多肽的体外抗氧化活性[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 274-278.
- SHENG Zhou-huang, JIA Meng-meng, ZHU Liang. In vitro antioxidant activity of collagen peptides from tilapia skin[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(11): 274-278.
- [16] AHMAD M, BENJAKUL S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) [J]. Food Chemistry, 2009, 120(3): 817-824.
- [17] 黄宇玫, 李敏, 曾芳, 等. 酸提和酶解两步法连续提取鳙鱼鱼鳞胶原蛋白工艺研究[J]. 食品科技, 2019, 44(2): 152-158.
- HUANG Yu-mei, LI Min, ZENG Fang, et al. Extraction process of bighead fish scale collagen by two-step method of acid extraction and enzymatic hydrolysis[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(2): 152-158.
- [18] ALFIERI M, BARBARO F, CONSOLINI E, et al. A targeted mass spectrometry method to screen collagen types I-V in the decellularized 3D extracellular matrix of the adult male rat thyroid[J]. Talanta, 2019, 193: 1-8.
- [19] 史文军, 万夕和, 黎慧, 等. 酶解异育银鲫制备不同分子量段抗氧化肽的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(23): 61-67.
- SHI Wen-jun, WAN Xi-he, LI Hui, et al. Study on the preparation of antioxidant peptide with different molecular weights from crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) meat enzymolysis[J]. Food Research and Development, 2017, 38(23): 61-67.
- [20] 卞伟明, 刘蓉飞, 杨帆, 等. 罗汉果花黄酮和多糖的提取与活性研究[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(10): 121-124.
- BIAN Wei-ming, LIU Rong-fei, YANG Fan, et al. Extraction and activity of flavone and polysaccharides from *Siraitia grosvenorii* flower[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(10): 121-124.
- [21] 李瑞杰, 胡晓, 李来好, 等. 罗非鱼皮酶解物钙离子结合能力及其结合物的抗氧化活性[J]. 南方水产科学, 2019, 15(6): 106-111.
- LI Rui-jie, HU Xiao, LI Lai-hao, et al. Calcium ion binding ability of tilapia skin hydrolysate and its antioxidant activity[J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(6): 106-111.
- [22] 余蔚, 欧阳彤, 罗碧琦, 等. 马氏珠母贝黏液糖蛋白分离纯化及其抗氧化活性研究[J]. 南方水产科学, 2020, 16(4): 100-107.
- YU Wei, OUYANG Tong, LUO Bi-qi, et al. Study on extraction and purification of glycoprotein from *Pinctada martensii* mucus and its antioxidant activity[J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(4): 100-107.
- [23] 林大都, 张勇, 翟明, 等. 银桦花醇提物成分预试及其抗氧化活性[J]. 北方园艺, 2020(19): 113-117.
- LIN Da-du, ZHANG Yong, ZHAI Ming, et al. Preliminary chemical analysis and antioxidant activity of the ethanol extract from flower of *Grevillea robusta* [J]. Northern Horticulture, 2020(19): 113-117.
- [24] SWEETIR R, KANATT R C, SHARMA A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat[J]. Food Chemistry, 2007, 100(2): 451-458.
- [25] TAHERKHANI M. Chemical constituents, total phenolic content, antimicrobial, antioxidant and radical scavenging properties, chelating ability, tyrosinase inhibition and in vitro cytotoxic effects of *Artemisia Aucheri* herbs [J]. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2017, 50(11): 736-745.
- [26] 吴青, 黄晓钰, 雷红涛, 等. 沙田柚果皮精油、中果皮和果核提取物的抗氧化活性研究[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2001, 22(4): 88-91.
- WU Qing, HUANG Xiao-yu, LEI Hong-tao, et al. Study on antioxidant activity of essential oil from flavelo and extracts of mesocarp and seed of *Shatian shaddock*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2001, 22(4): 88-91.
- [27] 杨会成, 郑斌, 廖妙飞, 等. 鲛鳊鱼皮胶原蛋白肽最佳制备工艺及自由基清除活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 159-164.
- YANG Hui-cheng, ZHENG Bin, LIAO Miao-fei, et al. Study on optimal preparation process and free radical scavenging activity of collagen peptides from *Lophius litulon* skin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(20): 159-164.
- [28] 宋正规, 朱丽娜, 张洪超, 等. 胃蛋白酶提取马面鱼皮胶原蛋白及结构分析[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 260-267.
- SONG Zheng-gui, ZHU Li-na, ZHANG Hong-chao, et al. Extraction and structural characterization of collagen from skin of *Thamnaconus modestus*[J]. Food Science, 2018, 39(20): 260-267.
- [29] 任俊凤, 任婷婷, 朱蓓薇. 河豚鱼皮胶原蛋白肽的提取及其抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 77-83.
- REN Jun-feng, REN Ting-ting, ZHU Bei-wei. Studies on the extraction and antioxidant activity of the collagen peptide from pufferfish (*Fugu rubripes*) skin [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(1): 77-83.

(下转第 194 页)