DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80961

# 微波辅助酶解罗非鱼皮抗氧化肽制备及结构分析

米春孝 周 慧 1,2,3 胡兴媛 朱婉婷 武 龙 1,2,3

(1.大连海洋大学食品科学与工程学院,辽宁 大连 116023; 2.国家海藻加工技术研发分中心,辽宁 大连 116023;3.辽宁水产品加工及综合利用重点实验室,辽宁 大连 116023)

摘要:[目的]通过微波辅助酶解法制备罗非鱼皮抗氧化肽并进行结构分析。[方法]通过单因素和响应面试验优化微波 预处理辅助碱性蛋白酶水解法制备抗氧化肽工艺条件,并分析微波处理对鱼皮结构、抗氧化肽的相对分子质量及氨基 酸组成与抗氧化活性的影响。[结果]微波辅助酶解制备抗氧化肽的最优工艺条件为微波功率441.50 W、微波温度 61.00 ℃、微波时间20 min、酶解时间6.21 h、加酶量2.20%、料液比1:40 (g/mL),此时罗非鱼皮抗氧化粗肽得率和抗氧 化活性相比对照组分别提高了8.23%和54.89%。经微波预处理的罗非鱼皮的硬度、胶黏性和咀嚼性相比对照组均显 著降低,且罗非鱼皮胶原纤维更加分散和疏松。[结论]微波预处理后可得到相对分子质量<1000,具有高含量的组氨 酸、苯丙氨酸、酪氨酸和半胱氨酸,且抗氧化活性较高的肽。

关键词:微波;罗非鱼皮;抗氧化肽;相对分子质量;氨基酸组成

# Preparation and structural analysis of antioxidant peptides from tilapia skin by microwave-assisted enzymatic hydrolysis

MI Chunxiao<sup>1</sup> ZHOU Hui<sup>1,2,3</sup> HU Xingyuan<sup>1</sup> ZHU Wanting<sup>1</sup> WU Long<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China; 2. National Seaweed Processing Technology Research and Development Branch Center, Dalian, Liaoning 116023, China; 3. Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Utilization of Liaoning Province, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: [Objective] To prepare antioxidant peptides from tilapia skin by microwave-assisted enzymatic hydrolysis and conduct structural analysis. [Methods] The processing conditions for preparing antioxidant peptides by microwave pretreatment-assisted alkaline protease hydrolysis are optimized through single-factor and response surface experiments, and the effects of microwave treatment on the structure of fish skin, the relative molecular weight, amino acid composition, and antioxidant activity of antioxidant peptides are analyzed. [Results] The optimal processing conditions for preparing antioxidant peptides by microwave-assisted enzymatic hydrolysis are as follows: microwave power of 441.50 W, microwave temperature of 61.00 °C, microwave time of 20 min, hydrolysis time of 6.21 h, enzyme dosage of 2.20%, and solid-to-liquid ratio of 1:40 (g/mL). Under these conditions, the yield and antioxidant activity of the crude antioxidant peptides from tilapia skin are increased by 8.23% and 54.89% respectively, compared with the control group. Additionally, the hardness, gumminess, and chewiness of tilapia skin pretreated by microwave are significantly reduced compared to the control group, and the collagen fibers of tilapia skin are more dispersed and looser. [Conclusion] After microwave pretreatment, peptides whose relative molecular weight is below 1 000 can be obtained, with a high content of histidine, phenylalanine, tyrosine, and cysteine, and high antioxidant activity.

Keywords: microwave; tilapia skin; antioxidant peptide; relative molecular weight; amino acid composition

基金项目:辽宁省教育厅面上项目(编号:JYTMS20230460);辽宁省科技厅(编号:2023-MSLH-009)

通信作者:周慧(1981一),女,大连海洋大学讲师,博士。E-mail: zhouui@dlou.edu.cn

收稿日期:2024-09-17 改回日期:2025-02-21

引用格式:米春孝,周慧,胡兴媛,等.微波辅助酶解罗非鱼皮抗氧化肽制备及结构分析[J].食品与机械,2025,41(6):173-181.

Citation:MI Chunxiao, ZHOU Hui, HU Xingyuan, et al. Preparation and structural analysis of antioxidant peptides from tilapia skin by microwave-assisted enzymatic hydrolysis[J]. Food & Machinery, 2025, 41(6): 173-181.

中国是罗非鱼产品的主要出口国,其年产量可达 1738947t,加工量达540600t<sup>[1]</sup>。罗非鱼主要以冻罗非 鱼片的形式出口<sup>[2]</sup>。在鱼片加工过程中产生的大量鱼皮、 鱼骨等副产物被丢弃或加工成低值产品<sup>[3]</sup>。罗非鱼皮中 蛋白质含量高达92.56%(以干基计),其中胶原蛋白约占 总蛋白的84.68%,是制备胶原蛋白肽的良好来源<sup>[4-5]</sup>。

机体代谢过程中会产生大量的自由基,自由基的过 量积累会引起机体的过氧化反应<sup>[6-7]</sup>。在正常的生理条 件下,抗氧化防御系统可以利用酶(如超氧化酶歧化酶、 过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶)和非酶抗氧化剂(如 褪黑激素、维生素、谷胱甘肽、辅酶、辅因子及抗坏血酸) 消除有害自由基的攻击。然而,自由基和内源性抗氧化 防御系统之间的不平衡会导致细胞氧化应激并破坏 DNA、蛋白质和膜脂质等细胞成分,进而导致糖尿病、阿 尔茨海默病、关节炎、心脏病等多种慢性疾病<sup>[8]</sup>。因此,开 发天然、安全、高效的抗氧化剂成为近年来的研究热 点<sup>[9-12]</sup>。抗氧化肽可通过提供电子稳定、抑制自由基<sup>[13]</sup>, 并可通过结构的共振保持自身的稳定性。氨基酸的种 类、含量、排列顺序以及某些氨基酸残基(如组氨酸、酪氨 酸、色氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸和脯氨酸)为肽抗氧化能力 的决定因素。

鱼皮胶原蛋白的三螺旋结构难以打开<sup>[14]</sup>,直接影响 了鱼皮的酶解效率和活性肽的得率。微波辐射可以渗透 到蛋白质内部,使蛋白质分子产生相干、有序运动,从而 松动蛋白质的空间结构并暴露蛋白酶的反应位点<sup>[15]</sup>。Jin 等<sup>[16]</sup>通过微波辅助碱性蛋白酶水解海参胶原蛋白制备抗 氧化肽。结果表明,微波作用显著提高了胶原蛋白的水 解程度,低相对分子质量(≤1000)的活性肽得率显著增 加,且水解产物的抗氧化活性显著提高。

研究拟以罗非鱼皮为原料,以DPPH自由基的半抑制 浓度(IC<sub>50</sub>)为指标,通过单因素和响应面试验优化微波预 处理辅助鱼皮酶解工艺,并分析微波预处理对鱼皮结构、 抗氧化肽的相对分子质量和氨基酸组成的影响,为罗非 鱼皮的高值化开发利用提供依据。

# 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

干燥罗非鱼皮:含水量(5.79±0.16)%,市售;

碱性蛋白酶:200 U/mg,上海源叶生物科技有限公司; 2,2-二苯基-1-苦基肼(DPPH):分析纯,美国 Sigma

公司;

无水乙醇、酸性品红、苦味酸等:分析纯,上海阿拉丁 生化科技股份有限公司;

三氟乙酸、乙腈:色谱纯,美国Sigma公司。

1.1.2 主要仪器设备 灵动型微波化学反应仪:COOLPEX型,上海屹尧仪 器科技发展有限公司;

酶标仪:synergyh型,美国博腾仪器有限公司;

质构仪:TMS-Pro型,北京市盈盛恒泰科技有限公司; 倒置显微镜:TS100型,尼康光学仪器(中国)有限 公司:

超滤:CHNT JXF型,正泰集团成套设备制造有限公司; 高效液相色谱仪:LC-20A型,岛津国际贸易(上海)有 限公司:

氨基酸分析系统:Elite-AAP型,大连伊利特分析仪器 有限公司;

冷冻干燥机:SCIENTZ-10N型,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 罗非鱼皮酶解物制备 称取定量鱼皮,加入去离 子水,于微波反应罐中进行微波预处理。将预处理后的 样品放入锥形瓶中调pH至10,加入碱性蛋白酶,于50℃ 摇床中酶解。沸水灭酶10 min,冷却,10 000 r/min离心 15 min,取上清液,冻干后得罗非鱼皮抗氧化肽。

1.2.2 单因素试验 分别考察微波预处理功率(360,440,520,600,680 W)、微波预处理温度(30,50,70,90℃)、微波预处理时间(20,30,40,50,60 min)、酶解时间(1,3,5,7,9 h)、加酶量(1.0%,1.5%,2.0%,2.5%,3.0%)和料液比[1:30,1:40,1:50,1:60(g/mL)]对罗非鱼皮水解产物得率和抗氧化活性的影响。抗氧化能力以DPPH自由基的IC<sub>50</sub>为响应值。

1.2.3 响应面试验 基于单因素试验,以微波功率、微波 温度、微波时间、酶解时间、加酶量和料液比为自变量,以 DPPH自由基的IC<sub>50</sub>为响应值,使用 Design-Expert V8.0 软 件进行响应面试验优化。

1.2.4 抗氧化肽的超滤和高效液相分离纯化

(1)超滤分离:罗非鱼皮酶解液通过相对分子质量为
1000,3000和5000的截留膜分级,得到M1(>5000)、
M2(3500~5000)、M3(1000~3500)和M4(<1000)4个</li>
组分,冻干后测定DPPH自由基的IC<sub>50</sub>。

(2)液相分离:使用配备反相制备柱 PREP-ODS(H) KIT(20 mm×250 mm)的高效液相色谱(HPLC)系统进一步纯化 M4组分。流动相A为5%乙腈(0.1%三氟乙酸),流速5 mL/min,进 样体积700 μL。梯度洗脱程序:0~15 min,2%~7% B;15~ 20 min,7%~45% B;20~35 min,45%~55% B;35~40 min, 55%~80% B;40~45 min,80%~10% B。测定 220 nm 处吸 收峰,并单独收集洗脱组分,冻干后测定 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub>。

1.2.5 抗氧化肽得率计算 按式(1)计算抗氧化肽得率。

$$R = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%, \tag{1}$$

式中: R——粗肽得率,%;

*m*<sub>1</sub>——鱼皮质量,g; *m*<sub>2</sub>——冻干肽粉质量,g。

1.2.6 DPPH自由基的IC<sub>50</sub>测定 根据丁洪基<sup>[7]</sup>的方法并 稍作修改。用去离子水分别配制质量浓度为2,4,6,8, 10 mg/mL的样品溶液。取100 μL样品溶液,加入100 μL DPPH溶液(乙醇配制,质量浓度为0.05 mg/mL)中,黑暗 中孵育30 min,通过酶标仪测量517 nm处吸光度。使用 乙醇代替 DPPH溶液作为对照组、乙醇代替样品溶液作为 空白组。IC<sub>50</sub>值定义为清除率达到50%时所需的样品溶 液质量浓度,按式(2)计算样品的DPPH自由基清除率。

$$A = \left(1 - \frac{A_{\rm s} - A_{\rm c}}{A_{\rm b}}\right) \times 100\%, \qquad (2)$$

式中:

A----DPPH自由基清除率,%;

A<sub>s</sub>、A<sub>c</sub>、A<sub>b</sub>——样品组、对照组和空白组的吸光度。

1.2.7 鱼皮压缩质构多面剖析(TPA) 将鱼皮叠成
20 mm×10 mm×2 mm,设置表面高度3 mm、形变百分量
40%、检测速度60 mm/min、起始力1.5 N,利用1000 N探
头对各组鱼皮进行TPA测定。

1.2.8 鱼皮组织切片观察 对罗非鱼皮进行 Van-Gieson 染色,于显微镜下放大10,20,40 倍观察。

1.2.9 相对分子质量分布测定 采用高效体积排阻色谱 法。色谱柱为 TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm。 流动相为乙腈一水—三氟乙酸( $V_{Zig}: V_{x}: V_{= MZR}$ 为40: 60:0.05),检测波长 220 nm;流速 0.5 mL/min;柱温 30 ℃; 进样体积 10  $\mu$ L。相对分子质量校正曲线所用标准品为 细胞色素 C(MW12384)、抑肽酶(MW6512)、杆菌酶 (MW1423)、乙氨酸—乙氨酸—酪氨酸—精氨酸 (MW451)、乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸(MW189)。使用配 有紫外检测器和 GPC 数据处理软件的色谱工作站,根据 相对分子质量校正曲线方程,计算肽的相对分子质量大 小及分布范围。

1.2.10 氨基酸分析 使用配备 Elite-AAP 氨基酸分析专 用色谱柱的 Elite-AAP 氨基酸分析系统进行氨基酸分析。 采用异硫氰酸苯酯(PITC)作为柱前衍生试剂,正己烷萃取 去除过量衍生试剂。流动相A为乙腈—甲醇—水( $V_{Zsi}$ :  $V_{PFF}$ : $V_{x}$ 为60:20:20),流动相B为pH 6.5、2.05 mg/mL的 B组分(伊利特公司)溶液。色谱分离条件:柱温 38 ℃;流 动相总流量 1.0 mL/min;检测波长 254 nm;进样量 10  $\mu$ L。 梯度洗脱程序: 0~39 min, 5%~45% A; 39~40 min, 45%~ 100% A;40~50 min, 100% A; 50~51 min, 100%~5% A; 51~ 70 min, 5% A。

1.2.11 统计分析 所有数据用 Excel 2017 软件进行数据 处理,用 SPSS 17.0 软件进行分析。单因素方差分析用于

分析各组间的差异;P<0.05表示显著差异,P<0.01表示极显著差异。所有试验重复3次。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素结果

由图1可知,随着微波功率、微波温度以及微波时间的 增加,酶解产物对DPPH自由基的ICs。均呈先下降后上升 趋势。这可能是适当的微波预处理可以改变鱼皮的结构, 有利于酶解位点的暴露[17]。而过于强烈的微波预处理会 导致酶解过度。随着酶解时间和加酶量的增加,DPPH自 由基的ICsa呈先下降后平缓的趋势,这是因为酶与底物的 接触已达到饱和。为了节省时间和成本,选择酶解时间 5h、加酶量2.5%进行后续优化。DPPH自由基的ICs。值随 着料液比的降低呈先下降后上升趋势,说明抗氧化能力随 着料液比的降低先上升后下降,在料液比为1:40 (g/mL) 时,抗氧化肽的抗氧化能力和得率最高。由于鱼皮中含有 丰富的胶原蛋白,过低的料液比可能导致溶液黏稠,酶分 布不均匀;过高的料液比会导致酶浓度降低,无法在特定 时间内与鱼皮完全反应。综上,选取微波功率440W、微波 温度70℃、微波时间20min、酶解时间5h、加酶量2.5%、料 液比1:40 (g/mL)进行后续响应面试验。

#### 2.2 响应面试验

在单因素试验基础上,进行 Plackett-Burman试验和 Box-Behnken 响应面试验。Plackett-Burman试验中各因 素水平见表1,试验方差分析见表2。由表2可知,微波时 间和料液比的P值大于微波功率、微波时间、酶解时间和 加酶量的,表明微波时间和料液比对活性肽 DPPH 自由基 的 IC<sub>50</sub>的影响相对较小。因此,选择微波功率、微波时间、 酶解时间和加酶量4个因素进行 Box-Behnken 响应面优 化试验,固定微波时间20 min,料液比1:40 (g/mL)。

Box-Behnken 试验中各因素水平见表3,试验设计及 结果见表4。由表5可知,模型P<0.01,极显著;失拟项P >0.05,不显著,表明试验数据与模型拟合良好,可以用来 预测罗非鱼皮酶解的最佳条件。交互项AB、BC、BD的P <0.05,与图2的交互作用一致,表明微波功率和微波温 度、微波温度和酶解时间、微波温度和酶用量之间存在显 著的交互作用。

应用 ANOVA 获得响应面模型的二次多项式回归 方程:

 $Y = 87.924 \quad 3 - 0.198 \quad 1A - 0.111 \quad 8B - 5.423 \quad 7C - 18.334 \quad 1D - 0.000 \quad 9AB + 0.001 \quad 5AC - 0.006AD - 0.027 \quad 4BC - 0.129 \quad 9BD + 0.245 \quad 5CD + 0.000 \quad 3A^2 + 0.008 \quad 2B^2 + 0.500 \quad 3C^2 + 5.248 \quad 7D^2_{\circ}$ (3)

根据响应面优化的结果预测最佳酶解条件为微波功 率441.50 W、微波温度61.00 ℃、酶解时间6.21 h、加酶量 2.20%,预测DPPH自由基的IC<sub>50</sub>值为3.668 mg/mL。为了 验证模型的有效性,根据实际情况,将试验条件修正为微



图1 各因素对罗非鱼皮酶解产物 DPPH 自由基的 IC50 和得率的影响

Figure 1 Effects of different factors on DPPH · IC<sub>50</sub> and extraction ratio of tilapia skin enzymatic hydrolysis products

波功率440 W、微波温度61 ℃、酶解时间6.2 h、加酶量2.2%,此时罗非鱼皮抗氧化肽的DPPH自由基的IC50值为3.962 mg/mL,接近理论值,说明优化模型可靠有效,适用于罗非鱼皮的酶解制备抗氧化肽。

#### 2.3 超滤和液相分离纯化结果

氨基酸和低相对分子质量肽通常表现出比蛋白质和

高相对分子质量多肽更好的 DPPH 自由基清除活性<sup>[18]</sup>。 由图 3 可知, MP4对 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub>为 3.765 mg/mL, 低于 MP、MP1、M2和 M3的,说明 MP4 拥有更强的 DPPH 自由基清除能力。超滤分离后相对分子质量<1000的 MP4组分含量最高,为72.25%。经微波预处理后蛋白质 结构变得更松散,分子间作用力降低,有利于酶与鱼皮的

	Table 1         Factors and levels of independent variables in Plackett-Burman experiment									
水平	A微波功率/W	B微波温度/℃	C微波时间/min	D酶解时间/h	E加酶量/%	F料液比(g/mL)				
-1	360	50	20	3	2	1:30				
1	520	90	40	7	3	1:50				

表1 Plackett-Burman 中自变量的因素水平

#### 表 2 Plackett-Burman 试验方差分析<sup>†</sup>

 
 Table 2
 Analysis of variance (ANOVA) for Plackett-Burman experiment

来源	平方和	自由度	均方	F值	P 值	显著性
模型	19.73	9	2.19	201.43	0.004 9	**
А	2.88	1	2.88	264.27	0.003 8	**
В	3.38	1	3.38	310.81	0.003 2	**
С	0.00	1	0.00	0.14	0.742 0	
D	6.62	1	6.62	608.32	0.001 6	**
Е	4.52	1	4.52	414.95	0.002 4	**
F	0.94	1	0.94	86.00	0.011 4	*
AE	0.25	1	0.25	22.86	0.041 1	*
BD	1.31	1	1.31	122.93	0.008 0	**
CD	11.10	1	11.10	1 019.86	0.001 0	**
残差	0.02	2	0.01			
总和	19.76	11				

† \*代表 P<0.05;\*\*代表 P<0.01。

#### 表3 Box-Behnken试验因素水平

Table 3 Factors and levels of independent variables in Box-Behnken experiment

水平	A微波功 率/W	B微波温 度/℃	C酶解时 间/h	D加酶 量/%
-1	360	50	3	2.0
0	440	70	5	2.5
1	520	90	7	3.0

接触从而促进酶解,因此低相对分子质量活性肽得率较大。DPPH自由基结构中3个苯环的空间共振作用阻碍了夹在中间的氮原子上的未成对电子与抗氧化剂的作用,增加了清除DPPH自由基的难度。MP4的相对分子质量低、尺寸小,更容易接近DPPH自由基中氮原子上的未成对电子,使其发挥电子成对作用,从而清除DPPH自由基,呈现更好的抗氧化活性。因此,以相对分子质量较小的MP4组分(<1000)进行后续高效液相分离纯化。

由图4可知,280 nm 处检测并收集保留时间为 8.47 min(F1)、10.11 min(F2)、11.74 min(F3)和28.99 min (F4)的4个组分。由图5可知,F1、F2和F4组分的DPPH 自由基的IC<sub>50</sub>值分别为(1.831±0.08),(2.862±0.16), (1.838±0.08) mg/mL,显著低于F3和MP4的(P<0.05)。 液相分离技术进一步去除了样品中的非肽物质和其他杂 质,提高了肽的纯度,增强了肽的抗氧化活性。但F3组分 的DPPH自由基的IC<sub>50</sub>值为(5.294±0.25) mg/mL,显著高 于MP4组分的,可能与其氨基酸组成有关。

### 2.4 微波预处理对罗非鱼皮的影响

由表6可知,微波预处理后鱼皮的硬度、胶黏性和咀嚼 性相比未处理组显著降低,这是因为微波可以打断蛋白质

#### 表4 Box-Behnken Design试验设计及结果

Table 4 Design and results of Box-Behnken experiment

试验号	А	В	С	D	DPPH $\cdot$ IC <sub>50</sub> /
1	- 1	0	-1	0	10 133 7
2	1	0	1	0	6 802 7
2	1	0	1	- 1	0.802 /
5	-1 1	0	0	- 1	9.430 0
4	1	0	0	1	4.089 4
5	0	1	-1	0	16.295 1
6	-1	l	0	0	14.4177
7	0	0	1	1	3.955 5
8	0	-1	1	0	4.615 6
9	1	1	0	-1	8.134 0
10	0	0	-1	-1	11.471 8
11	-1	0	1	0	6.109 9
12	1	-1	0	0	7.126 8
13	1	1	0	0	11.840 1
14	0	0	0	0	3.725 7
15	0	1	0	1	10.616 0
16	0	0	0	0	4.025 7
17	0	1	0	-1	15.612 1
18	0	0	0	0	4.255 7
19	1	0	-1	0	9.885 7
20	-1	-1	0	0	4.100 3
21	0	0	0	0	4.330 3
22	0	-1	0	-1	4.615 5
23	-1	0	0	1	6.948 6
24	0	-1	-1	0	6.733 8
25	0	0	1	-1	5.927 4
26	0	-1	0	1	4.817 2
27	0	0	-1	1	8.517 8
28	0	1	1	0	9.797 8
29	0	0	0	0	4.545 7

的共价键<sup>[17]</sup>,破坏蛋白质的部分结构,降低鱼皮内的分子 间作用力,从而导致鱼皮质构发生显著变化。鱼皮内分子 间作用力的降低有助于碱性蛋白酶对鱼皮的酶解。

由图6可知,微波预处理组罗非鱼皮胶原纤维的形态 与未处理组相比差异显著,微波处理后鱼皮结构变得疏 松,纤维间空隙变大。微波可破坏蛋白质中巯基的二硫 键<sup>[17]</sup>,导致蛋白质亚基分解,微波还可以有效打破氢键平 衡,使胶原三螺旋结构松散,从而破坏胶原蛋白分子四级 结构中胶原纤维构象,改变鱼皮蛋白结构易暴露蛋白质 与碱性蛋白酶反应的位点,破坏巯基的二硫键更易于得 到含半胱氨酸的肽段。

# 2.5 相对分子质量分布对鱼皮抗氧化肽抗氧化活性的 影响

由图7可知,各标准品之间分离度较好。由图8可知,

表 5	Box-Behnken Design试验方差分析 <sup>†</sup>
Table 5	ANOVA for Box-Behnken experiment

来源	平方和	自由度	均方	F值	<i>P</i> 值	显著性
模型	369.33	14	26.38	70.51	< 0.000 1	**
А	0.59	1	0.59	1.58	0.229 6	
В	180.73	1	180.73	483.03	$< 0.000 \ 1$	**
С	55.59	1	55.59	148.59	$< 0.000 \ 1$	**
D	20.40	1	20.40	54.52	$< 0.000 \ 1$	**
AB	7.85	1	7.85	20.98	0.000 4	**
AC	0.22	1	0.22	0.59	0.454 7	
AD	0.23	1	0.23	0.62	0.444 2	
BC	4.79	1	4.79	12.81	0.003 0	**
BD	6.75	1	6.75	18.05	0.000 8	**
CD	0.24	1	0.24	0.64	0.435 5	
$\mathbf{A}^2$	23.98	1	23.98	64.08	$< 0.000 \ 1$	**
$\mathbf{B}^2$	70.37	1	70.37	188.08	$< 0.000 \ 1$	**
$C^2$	25.97	1	25.97	69.42	$< 0.000 \ 1$	**
$\mathbf{D}^2$	11.17	1	11.17	29.85	$< 0.000 \ 1$	**
剩余	5.24	14	0.37			
失拟	4.85	10	0.48	4.94	0.068 7	不显著
纯误差	0.39	4	0.10			
总误差	374.57	28				

† \*\*代表  $P < 0.01; R^2 = 0.9860, R^2_{Adi} = 0.9720; CV = 7.94\%$ 。

相对分子质量和保留时间的拟合曲线为y=0.006 5x<sup>3</sup>-0.296 6x<sup>2</sup>+4.199 4x-14.823(R<sup>2</sup>=0.999 7)。根据拟合曲

线计算出的未处理组活性肽和微波预处理组活性肽 MP 相对分子质量分布和 DPPH 自由基的 IC如如表 7 所示。由 表 7 可知, MP的 DPPH 自由基的 ICso值为 4.244 mg/mL, 相比未处理组显著降低。与未处理组相比,微波预处理 后相对分子质量>1000的活性肽占比由6.28%下降至 1.58%,相对分子质量<300的活性肽含量由 26.20% 增加 到 31.81%。低相对分子质量肽通常拥有更强的 DPPH 自 由基清除活性[18]。大分子抗氧化肽的复杂空间构型限制 了其与自由基的接触,而小分子抗氧化肽由于体积小,反 应位点更易暴露,更容易与自由基反应。经微波预处理 后蛋白质结构变得更松散,分子间作用力降低,有利于酶 与鱼皮的接触及对鱼皮蛋白特定位点的剪切,从而显著 提高了抗氧化肽的抗氧化活性。经液相分离后得到的 4个组分中,F3组分中相对分子质量<300的肽含量为 63.14%,显著高于其他3个组分。F1、F2和F4具有比F3 更强的抗氧化活性,这是因为抗氧化肽的抗氧化活性与 氨基酸的位置和组成也有较强关联<sup>[19]</sup>。

#### 2.6 氨基酸组成对鱼皮抗氧化肽抗氧化活性的影响

氨基酸种类、含量和排列顺序对肽的抗氧化活性有 显著影响<sup>[20-21]</sup>。由表8可知,微波处理后活性肽的组氨 酸、酪氨酸、蛋氨酸和半胱氨酸含量明显增加。微波预处 理破坏了鱼皮内的分子间作用力,使酶与鱼皮接触更充 分。试验使用的碱性蛋白酶酶解蛋白可生成更多含有酪 氨酸等疏水结构的肽<sup>[22]</sup>。微波预处理有助于蛋白质中巯 基的暴露,使得活性肽中带有亲核硫侧链的蛋氨酸和半



Figure 2 Contour plot and 3D surface plot under the interaction of various factors







图4 M4高效液相分离组分的流出图







胱氨酸含量增加。

F1组分中的酪氨酸和半胱氨酸明显高于其他组分。 F2组分中的脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸含量高于其他组 分。F4组分中的酪氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸和苯丙氨酸含 量高于其他组分。带有芳香族侧链的酪氨酸和苯丙氨酸

#### 米春孝等:微波辅助酶解罗非鱼皮抗氧化肽制备及结构分析

表6 未处理组和微波预处理组鱼皮的 TPA 分析<sup>†</sup>

Table 6 TPA of tilapia skin in control and pretreatment groups

组别	硬度/N	弹性/mm	胶黏性/N	咀嚼性/mJ
未处理组	$45.9 \!\pm\! 0.4^a$	$0.54 \!\pm\! 0.05$	$35.70 \pm 2.50^a$	$22.40 \pm 0.90^{a}$
微波预处理组	$8.8\!\pm\!0.1^{\text{b}}$	$0.47 \!\pm\! 0.04$	$4.50 \pm 0.02^{b}$	$2.14 \pm 0.28^{b}$

† 字母不同表示差异显著(P<0.05)。



图6 未处理组和微波处理组罗非鱼皮显微镜图

Figure 6 Histological structure of tilapia skin of control and pretreatment groups





图7 5种标准品的色谱流出图及拟合曲线



残基可以提供氢原子以阻止自由基链式反应,从而发挥 抗氧化能力<sup>[23-24]</sup>。半胱氨酸通过转移硫醇基团中的氢与 自由基反应,具有较强的抗氧化能力。组氨酸的咪唑环 中的氮原子可提供一个电子给DPPH自由基,从而将其还 原为非自由基形式。蛋氨酸的分子结构中有一个含硫的

#### 表 7 未处理组和微波预处理组抗氧化肽以及液相分离组分的相对分子质量分布和 DPPH·IC。<sub>0</sub>†

Table 7 N

7 Molecular weight distribution and DPPH  $\cdot$  IC<sub>50</sub> of peptides in control and pretreatment groups and fractions in liquid phase separation

祖公		含量/%		DPPH·IC <sub>50</sub> /	祖公	含量/%			DPPH·IC <sub>50</sub> /
组刀	>1 000	300~1 000	<300	$(mg \cdot mL^{-1})$	组力	>1 000	300~1 000	<300	$(mg \cdot mL^{-1})$
СР	6.28	65.72	26.20	$8.783 \pm 0.54^a$	F2	15.49	74.74	9.77	$2.862\!\pm\!0.16^{c}$
MP	1.58	66.61	31.81	$4.244 \pm 0.46^{\text{b}}$	F3	0.20	36.66	63.14	$5.294 \pm 0.25^{\text{b}}$
F1	7.60	82.77	9.63	$1.831 \pm 0.08^{\circ}$	F4	19.66	73.98	6.36	$1.838 \pm 0.08^{\circ}$

† 小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

## 表8 未处理组鱼皮肽、微波预处理组鱼皮肽以及液相分离组分的氨基酸组成<sup>+</sup>

Table 8 Amino acid composition of peptides in control and pretreatment groups and fractions in liquid phase separation

与甘酚	含量/%								
安垄胶	СР	MP	F1	F2	F3	F4			
天冬氨酸	$5.51\!\pm\!0.31^{\text{b}}$	$5.83 \pm 0.05^{\text{b}}$	$6.78 \!\pm\! 0.44^a$	$4.62\!\pm\!0.08^{\circ}$	$4.73 \pm 0.03^{\circ}$	$4.52\!\pm\!0.02^{c}$			
谷氨酸	$9.28\!\pm\!0.32^{b}$	$9.42\!\pm\!0.29^{b}$	$11.33 \!\pm\! 0.49^a$	$7.38 \pm 0.29^{\circ}$	$8.87 \pm 0.13^{bc}$	$6.32\!\pm\!0.07^d$			
丝氨酸	$4.31\!\pm\!0.10^a$	$4.26\!\pm\!0.18^{a}$	$4.37 \!\pm\! 0.18^a$	$4.02\!\pm\!0.06^{\text{b}}$	$3.50 \pm 0.01^{\circ}$	$4.37\!\pm\!0.02^a$			
甘氨酸	$34.31\!\pm\!0.42^a$	$33.83 \!\pm\! 0.37^a$	$34.08 \!\pm\! 1.73^a$	$30.32 \!\pm\! 0.15^{\text{b}}$	$29.11 \!\pm\! 0.16^{\text{b}}$	$35.73 \!\pm\! 0.12^a$			
组氨酸	$0.65 \!\pm\! 0.02^{c}$	$0.87 \!\pm\! 0.02^a$	$0.66 \!\pm\! 0.00^{\circ}$	$0.49 \pm 0.05^d$	$0.72\!\pm\!0.01^{\text{b}}$	$0.62\!\pm\!0.04^{c}$			
精氨酸	$5.29\!\pm\!0.05^{c}$	$5.75 \!\pm\! 0.06^{\text{b}}$	$6.45 \!\pm\! 0.18^a$	$4.15 \!\pm\! 0.06^{d}$	$6.16 \pm 0.03^a$	$4.88 \!\pm\! 0.05^{cd}$			
苏氨酸	$3.22\!\pm\!0.13^a$	$2.75 \!\pm\! 0.00^{\rm b}$	$3.16\!\pm\!0.32^a$	$2.38 \!\pm\! 0.05^{\circ}$	$2.43 \!\pm\! 0.02^{c}$	$2.23 \pm 0.05^{\circ}$			
丙氨酸	$14.64\!\pm\!0.23^a$	$12.99 \pm 0.34^{\text{b}}$	$15.55 \!\pm\! 1.58^a$	$11.46 \pm 0.25^{\circ}$	$12.70 \pm 0.10^{b}$	$9.74 \!\pm\! 0.10^d$			
脯氨酸	$8.86 \pm 0.16^{\circ}$	$9.24 \pm 0.12^{\circ}$	$8.16 \pm 1.82^{\circ}$	$20.82\!\pm\!0.16^a$	$21.98\!\pm\!0.02^a$	$13.45 \!\pm\! 0.06^{\text{b}}$			
酪氨酸	$0.53 \pm 0.01^{\circ}$	$0.76 \pm 0.03^{\text{b}}$	$0.90\!\pm\!0.75^a$	$0.95 \!\pm\! 0.04^a$	$0.38 \pm 0.05^d$	$0.79 \pm 0.01^{b}$			
缬氨酸	$2.85 \!\pm\! 0.02^a$	$2.53 \!\pm\! 0.02^{ab}$	$1.30 \pm 0.85^{\circ}$	$2.68 \!\pm\! 0.05^a$	$1.84 \pm 0.17^{\rm b}$	$2.70\!\pm\!0.08^{a}$			
蛋氨酸	$1.08 \pm 0.00^{\text{b}}$	$1.46\!\pm\!0.52^{a}$	$0.42\!\pm\!0.05^{c}$	$0.46 \pm 0.00^{\circ}$	$0.43 \pm 0.09^{\circ}$	$0.52\!\pm\!0.05^{\circ}$			
半胱氨酸	$0.23 \!\pm\! 0.00^d$	$1.15 \pm 0.16^{b}$	$2.13 \!\pm\! 0.03^a$	$0.67 \pm 0.07^{\circ}$	$0.19\!\pm\!0.02^{d}$	$1.15 \pm 0.14^{b}$			
异亮氨酸	$1.37 \pm 0.01^{\circ}$	$1.69 \pm 0.01^{b}$	$0.70\!\pm\!0.07^{d}$	$2.01\!\pm\!0.19^{a}$	$1.00 \pm 0.00^{cd}$	$2.41 \!\pm\! 0.00^a$			
亮氨酸	$3.19 \pm 0.01^{\circ}$	$3.18 \pm 0.02^{\circ}$	$1.10 \pm 0.07^d$	$4.08 \!\pm\! 0.16^{\text{b}}$	$2.39 \!\pm\! 0.00^{cd}$	$5.46\!\pm\!0.03^{a}$			
苯丙氨酸	$1.75 \pm 0.21^{b}$	$1.64 \pm 0.02^{b}$	$0.80 \pm 0.01^{\circ}$	$1.50 \pm 0.14^{\text{b}}$	$0.69 \pm 0.18^{\circ}$	$3.34\!\pm\!0.01^a$			
赖氨酸	$2.93 \!\pm\! 0.16^a$	$2.65 \!\pm\! 0.19^a$	$2.11 \pm 0.17^{b}$	$2.02 \pm 0.13^{b}$	$2.87 \pm 0.04^{a}$	$1.77 \pm 0.01^{\circ}$			

† 小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

侧链,侧链上的硫原子可以参与还原反应,并能够与自由 基发生反应。因此,蛋氨酸、半胱氨酸等含硫氨基酸,酪 氨酸等芳香族氨基酸和含有咪唑环的组氨酸含量较高的 抗氧化肽具有较高的抗氧化活性,能够有效清除自由基。

# 3 结论

微波预处理辅助酶解制备罗非鱼皮抗氧化肽的最佳 条件为微波功率441.50 W、微波温度61 ℃、微波时间 20 min、酶解时间 6.21 h、加酶量 2.20%、料液比 1: 40 (g/mL)。微波预处理降低了鱼皮内部的分子间作用 力,破坏了鱼皮的肌原纤维结构,促进了鱼皮与酶的反 应,提高了活性肽的抗氧化活性。微波预处理改变了活 性肽的相对分子质量分布和氨基酸组成,增加了低相对 分子质量的肽含量,提高了酪氨酸、蛋氨酸和半胱氨酸含 量。低相对分子质量肽(<1000)含量高,蛋氨酸、半胱氨 酸等含硫氨基酸,酪氨酸、苯丙氨酸等芳香族氨基酸和含 有咪唑环的组氨酸含量高的肽能够有效清除自由基。然 而,氨基酸的排列顺序对肽的抗氧化活性也有显著影响, 后续可进一步研究活性肽的抗氧化作用机理。

## 参考文献

[1]全国水产技术推广总站,中国水产学会,农业农村部渔业渔政 管理局.中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社, 2023:58-89.

National Aquatic Technology Extension Station, China Fishery Administration Bureau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China Fishery Society. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2023: 58-89.

- [2] FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2024[EB/ OL]. (2024-06-08) [2025-02-21]. https://www. fao. org/ publications/home/fao-flagship-publications/the-state-of-worldfisheries-and-aquaculture/en.
- [3] 吕屹云, 邹国华. 中国罗非鱼出口贸易现状、问题及对策分析
  [J]. 全国流通经济, 2024(6): 57-60.
  LV Y Y, ZOU G H. Current situation and problems of China's tilapia export trade and its countermeasures[J]. China Circulation Economy, 2024(6): 57-60.
- [4] 宋增柳. 罗非鱼皮胶原蛋白发酵法提取及其电纺膜的制备与应用研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2021: 20-22. SONG Z L. Study on collagen extracted from the tilapia fish skin by fermentation method and its electrospun film fabrication and application[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2021: 20-22.
- [5] HE L, GAO Y F, WANG X Y, et al. Ultrasonication promotes extraction of antioxidant peptides from oxhide gelatin by modifying collagen molecule structure[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 78: 105738.
- [6] LIU Z Q. Bridging free radical chemistry with drug discovery: a promising way for finding novel drugs efficiently[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 189: 112020.
- [7] 丁洪基.活性氧与疾病关系的研究进展[J].临床与实验病理 学杂志, 2023, 39(2): 212-215.
   DING H J. Research progress on the relationship between
- reactive oxygen species and diseases[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2023, 39(2): 212-215.
- [8] 张强,李伟华. 抗氧化肽的研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 298-304.
  ZHANG Q, LI W H. Research status of antioxidant peptides[J].
  Food and Fermentation Industries, 2021, 47(2): 298-304.
- [9] LIU Y, XIE Y P, MA X Y, et al. Preparation and properties of antioxidant peptides from wampee seed protein[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2022, 16(1): 410-419.
- [10] 孟乐,金丹青,龚宣伊,等. 厚壳贻贝抗氧化肽的分离、鉴定及活性评价[J]. 中国海洋药物, 2024, 43(3): 59-66.
  MENG L, JIN D Q, GONG X Y, et al. Isolation, identification and activity evaluation of *Mytilus coruscus* antioxidant peptides[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2024, 43(3): 59-66.
- [11] 崔方超,刘晓白,王当丰,等.功能性海参肽的特性及其生物 活性研究进展[J]. 食品工业, 2023, 44(11): 182-187.
  CUI F C, LIU X B, WANG D F, et al. Research progress on characteristics and bioactivity of functional sea cucumber peptides[J]. The Food Industry, 2023, 44(11): 182-187.
- [12] 李爽,刘小芳,冷凯良,等.大西洋鳕鱼骨胶原蛋白肽的抗氧化 活性及稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(16): 50-56.
  LI S, LIU X F, LENG K L, et al. Antioxidant activity and stability of collagen peptides from Atlantic cod (Gadus morhua) bone[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50

(16): 50-56.

- [13] LÓPEZ-GARCÍA G, DUBLAN-GARCÍA O, ARIZMENDI-COTERO D, et al. Antioxidant and antimicrobial peptides derived from food proteins[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2022, 27(4): 1 343.
- [14] HONG H, FAN H B, CHALAMAIAH M, et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): current progress, challenges, and future perspectives[J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125222.
- [15] HUANG Y P, RUAN G H, QIN Z J, et al. Antioxidant activity measurement and potential antioxidant peptides exploration from hydrolysates of novel continuous microwave-assisted enzymolysis of the *Scomberomorus niphonius* protein[J]. Food Chemistry, 2017, 223: 89-95.
- [16] JIN H X, XU H P, LI Y, et al. Preparation and evaluation of peptides with potential antioxidant activity by microwave assisted enzymatic hydrolysis of collagen from sea cucumber *Acaudina molpadioides* obtained from Zhejiang Province in China[J]. Marine Drugs, 2019, 17(3): 169.
- [17] 杜杰,刘廷薇,马良,等. 微波一快速冻融耦合鱼皮明胶理化 性质分析[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 108-115.
  DU J, LIU T W, MA L, et al. Physicochemical properties of fish skin gelatin prepared by sequential microwave and rapid freezing-thawing pretreatment coupled to gelatinization[J].
  Food Science, 2021, 42(11): 108-115.
- [18] LIN D Q, SUN L C, CHEN Y L, et al. Peptide/protein hydrolysate and their derivatives: their role as emulsifying agents for enhancement of physical and oxidative stability of emulsions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 129: 11-24.
- [19] LI C Y, FU Y, DAI H J, et al. Recent progress in preventive effect of collagen peptides on photoaging skin and action mechanism[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11 (2): 218-229.
- [20] ZHU C Z, ZHANG W G, KANG Z L, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham[J]. Meat Science, 2014, 96(2): 783-789.
- [21] WU R B, HUANG J F, HUAN R, et al. New insights into the structure-activity relationships of antioxidative peptide PMRGGGGYHY[J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127678.
- [22] SHARMA K, NILSUWAN K, ZHANG B, et al. Protein hydrolysate from salmon frame debittered by plastein reaction: amino acid composition, characteristics and antioxidant activities[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2023, 58(1): 154-166.
- [23] CHAIJAN M, RODSAMAI T, CHAROENLAPPANIT S, et al. Characterization of antioxidant peptides from Thai traditional semi-dried fermented catfish[J]. Fermentation, 2021, 7: 262.
- [24] NWACHUKWU I D, ALUKO R E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12761.