

扇贝加工副产物中蛋白质提取及其 酶解物抗氧化活性分析

Analysis of protein extraction and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from scallop processing by-products

郭 宇^{1,2} 文诗雨¹ 倪 策¹ 欧晓晖¹ 屈婷敏¹ 吴 颖¹

GUO Yu^{1,2} WEN Shi-yu¹ NI Ce¹ OU Xiao-hui¹ QU Ting-min¹ WU Ying¹

贺舒雯¹ 李虹辉¹ 崔 波³ 程云辉^{1,3} 文 李¹

HE Shu-wen¹ LI Hong-hui¹ CUI Bo³ CHENG Yun-hui^{1,3} WEN Li¹

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410000; 2. 中国科学院大学生命科学学院,
北京 101408; 3. 齐鲁工业大学[山东省科学院]食品科学与工程学院, 山东 济南 250353)

(1. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology,
Changsha, Hunan 410000, China; 2. College of Life Science, University of Chinese Academy of
Sciences, Beijing 101408, China; 3. School of Food Science and Engineering, Qilu University of
Technology [Shandong Academy of Sciences], Jinan, Shandong 250353, China)

摘要:目的:对扇贝加工副产物中蛋白质酶解物进行抗氧化活性分析,提高扇贝加工副产物的利用价值。方法:以海湾扇贝加工副产物为原料,分别采用碱提酸沉法、碱提硫酸铵沉法和低温乙醇变性沉淀法提取蛋白质,并进行 SDS-PAGE 电泳分析。对胃蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶水解蛋白酶解产物的抗氧化活性进行分析;进一步分析中性蛋白酶解物的分子量分布、氨基酸组成和羟脯氨酸含量。结果:碱提硫酸铵沉法所获的蛋白质纯度最高,达 91.16%,且电泳效果最佳。4 种酶解物均具备 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟自由基清除力和还原能力,而中性蛋白酶水解产物的抗氧化活性最高,尤其是羟自由基清除效果明显,清除率高达 (77.24 ± 1.87)%;该酶解物中含天冬氨酸等 15 种氨基酸,总含量达 84 g/100 g,羟脯氨酸含量达 (11.82 ± 0.09)%。结论:从扇贝加工副产物中采用碱提硫酸铵沉法所获的蛋白质,经中性蛋白酶水解产生的小分子肽产物具有很好的抗氧化活性,营养价值高,可进一步开发抗氧化功能食品。

关键词:扇贝;副产物;蛋白质;酶解;肽;抗氧化活性

基金项目:湖南省自然科学基金面上项目(编号:2021JJ30024);
湖南省研究生科研创新项目(编号:CX20210816)

作者简介:郭宇,男,长沙理工大学在读本科生。

通信作者:文李(1971—),女,长沙理工大学教授,博士。

E-mail: wl@csust.edu.cn

收稿日期:2022-05-30 **改回日期:**2022-09-21

Abstract: Objective: This study aimed to improve the utilization value of scallop processing by-products, by analyzing the antioxidant activity of its protein hydrolysates. **Methods:** The processing by-products of *Argopecten irradians* were used as raw materials, and the proteins were extracted by alkali extraction and acid precipitation, alkali extraction and ammonium sulfate precipitation and low temperature ethanol denaturation precipitation. Then the proteins were analyzed by SDS-PAGE. Pepsin, flavourzyme, dispase and alcalase were used to hydrolyze the protein, and the antioxidant activities of the hydrolysate products were analyzed. The molecular weight distribution, amino acid composition and hydroxyproline content of dispase hydrolysates were further analyzed. **Results:** The purity of protein obtained by alkaline ammonium sulfate precipitation method was the highest, reaching 91.16%, with the optimal electrophoretic results. All the four hydrolysates had DPPH, ABTS, hydroxyl radical scavenging ability and reducing ability, and the dispase hydrolysate showed the highest antioxidant ability, especially hydroxyl radical scavenging rate, which reached (77.24 ± 1.87)%. The hydrolysate of dispase contained 15 kinds of amino acids such as aspartic acid, with a total content of 84 g/100 g, and the content of hydroxyproline reached (11.82 ± 0.09)%. **Conclusion:** The protein obtained from the by-products of scallop processing by alkaline extraction and ammonium sulfate precipitation, and its dispase hydrolysates have optimal antioxidant activity and high nutritional value,

which can be further developed as antioxidant functional food.

Keywords: scallop; by-product; protein; enzymolysis; peptide; antioxidant activity

近年来,中国水产品产量激增,加工副产物亦增多,但因其组成成分多、处理困难等,只有少部分能用作养殖饲料,绝大部分被丢弃处理,造成大量优质资源浪费。海湾扇贝(*Argopecten irradians*)是一种高蛋白、低脂、食用价值高的海鲜产品^[1],其加工副产物富含蛋白质,有研究^[2]尝试将其加工副产物应用到食品、保健品等领域,这对扇贝加工副产物的深入研究具有重要的应用价值^[3]。

氧化应激是指体内活性氧自由基快速积累,但清除防御系统不能及时清除而导致的机体受损^[4]。生物活性肽是蛋白质中天然氨基酸以不同组成和排列方式构成的不同肽类的总称,是源于蛋白质的多功能活性因子^[5]。其中抗氧化多肽可消除体内多余的氧自由基,减轻自由基对机体的损伤,因而可用于治疗由自由基积累引发的疾病^[6]。由于人工合成抗氧化肽的安全性仍受到广泛质疑,因而食源性抗氧化肽备受青睐^[7]。从天然食物中获得氧自由基清除剂或抗氧化剂,是未来预防氧化应激潜在的有效治疗策略。而利用天然植物或动物加工副产物蛋白来制备生物活性肽,既可以避免蛋白质资源的浪费,又可以开发出新型的天然抗氧化剂^[8-9]。

研究拟利用碱提酸沉法、碱提硫酸铵沉法和低温乙醇变性沉淀法,从扇贝加工副产物中提取扇贝蛋白。采用胃蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶对副产物中蛋白质进行酶解,并分析酶解产物的抗氧化活性,以期更好地为扇贝加工副产物的高值化利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

扇贝加工副产物:烟台东宇海珍品有限公司;

碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶、风味蛋白酶:生物试剂,北京索莱宝科技有限公司;

十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N,N-四甲基乙二胺(TEMED):纯度99%,上海麦克林生化科技有限公司;

1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH):纯度97%,上海麦克林生化科技有限公司;

2,2-联氮-(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS):纯度98%,嘉兴思诚化工有限公司;

谷胱甘肽(GSH):纯度≥98%,北京酷来搏科技有限公司;

其他化学试剂:分析纯,中国医药集团有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9246A型,太仓精宏实验设备有限公司;

超级水浴:HH-601型,常州金坛良友仪器有限公司;
电子天平:AX224ZH型,奥豪斯仪器(常州)有限公司;

冷冻干燥机:LJGJ-25C型,四环福瑞科科技发展有限公司;

电泳仪:DYY-6C型,北京市六一仪器厂;

磁力搅拌器:8S-1型,常州国宇仪器制造有限公司;

快速混匀器:XH-C型,金坛市医疗仪器厂;

脱色摇床:TS-1000型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

台式高速冷冻离心机:TGL-16M型,湘仪离心机有限公司;

分光光度计:岛津UV1800型,岛津国际贸易(上海)有限公司;

超微弱发光测量仪:BPCL-1-TGC型,广州微光科技有限公司;

高效液相色谱系统:Waters e2695型,泰灵佳科技有限公司;

重金属消解仪:SH230N型,济南海能仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 扇贝加工副产物蛋白提取 采用低温乙醇变性沉淀法、碱提酸沉法和碱提硫酸铵沉淀法3种方法进行蛋白质的提取,并利用凯氏定氮法进行纯度对比。

(1) 低温乙醇变性沉淀法:在胡昂等^[10]方法的基础上优化。将扇贝加工副产物洗净,冻干48 h后,用研钵研磨2 h磨成粉末。将扇贝副产物粉和95%乙醇分别置于4℃冰箱预冷4 h,按 $m_{\text{扇贝副产物粉}}:V_{\text{乙醇}}=1:10$ (g/mL)的物料比将95%乙醇加入扇贝副产物粉中,调节pH值至7.0,置于4℃冰箱反应24 h。将混合液于5 000 r/min下离心20 min,收集沉淀,并按1:2 (g/mL)的物料比加入95%乙醇,再次置于4℃冰箱反应24 h。取出混合液在上述条件下离心,收集沉淀于-20℃冰箱冻存。

(2) 碱提酸沉法:在李丽等^[11]方法的基础上优化。将扇贝副产物粉与0.1 mol/L NaOH按 $m_{\text{扇贝副产物粉}}:V_{\text{NaOH}}=1:30$ (g/mL)的物料比混合,搅拌均匀,并调节pH值至12,超声处理30 min。将混合液置于40℃水浴锅中搅拌9 h,8 000 r/min离心15 min,收集上清。用1.0 mol/L HCl调节pH值至4.4,8 000 r/min离心15 min,收集沉淀于-20℃冰箱冻存。

(3) 碱提硫酸铵沉淀法:在刘泰标等^[12]方法的基础上优化。将扇贝副产物粉与0.1 mol/L NaOH按 $m_{\text{扇贝副产物粉}}:V_{\text{NaOH}}=1:40$ (g/mL)的物料比混合,搅拌均匀,并超声处理30 min,置于30℃水浴锅中反应11 h。于4℃,10 000 r/min离心10 min,收集上清。加入过饱和硫酸铵,置于4℃冰箱中过夜。于上述条件下离心,取沉淀,袋透析48 h后收集透析液,置于-20℃冰箱中

冻存。

将以上 3 种方法提取的蛋白质置于提前预冻 1 h 的真空冷冻干燥机中-60 ℃冻干 48 h,得到固体粉末,分别密封保存。

1.2.2 扇贝加工副产物蛋白含量分析 按 GB/T 6432—2018 执行。

1.2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳 根据 O'Sullivan 等^[13]的方法,修改如下:浓缩胶和分离胶含量分别为 5% 和 12%,上样体积为 20 μL。20 mA 恒流进样 15 min,40 mA 恒流电泳至溴酚蓝指示剂距离凝胶底部 1 cm。

1.2.4 酶解物的制备 称取碱提硫酸铵沉淀法制备的扇贝蛋白 1.500 0 g,按料液比 $m_{\text{扇贝蛋白}}:V_{\text{去离子水}}=1:50$ (g/mL) 加入去离子水,水化 2 h。按表 1 分别加入 4 种酶进行酶解,酶解时加入 0.1 mol/L HCl 或 NaOH 使 pH 值稳定在设定值,并记录所消耗的酸碱体积,计算水解度(DH)。酶解结束后,将酶解产物置于 99 ℃灭活 8 min。冷却后,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液冻干(-60 ℃,48 h)。上述试验均设置 3 个平行试验。

表 1 不同蛋白酶的反应条件

Table 1 Reaction conditions of different enzymes

酶种类	酶活/ (U·g ⁻¹)	温度/ ℃	pH	加酶量/ %	时间/ h
胃蛋白酶	3×10 ⁴	37	2	5.00	4
中性蛋白酶	5×10 ⁴	50	7	3.00	4
风味蛋白酶	3×10 ⁴	53	7	5.00	4
碱性蛋白酶	2×10 ⁵	50	10	0.75	4

1.2.5 酶解物的抗氧化活性检测

(1) DPPH 自由基清除率:根据 GB/T 39100—2020。取 3 支试管,按表 2 添加试剂。

1 号管为试验组(A_s),2 号管为对照组(A_c),3 号管为空白组(A_b),混匀后避光反应 30 min,517 nm 下检测吸光值。其中,使用样品溶剂调零,谷胱甘肽作阳性对照,进行 3 次平行试验。按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$P=\left(1-\frac{A_s-A_c}{A_b}\right)\times 100\%, \quad (1)$$

式中:

表 2 DPPH 试剂添加量

Table 2 DPPH reagent additions

溶液名称	1 号管/mL	2 号管/mL	3 号管/mL
DPPH 溶液	3.0	—	3.0
样品溶液	1.0	1.0	—
样品溶剂溶液	—	—	1.0
无水乙醇溶液	—	3.0	—

P ——清除率,%;

A_s ——待测溶液与 DPPH 溶液混合液的吸光度;

A_c ——待测溶液与无水乙醇溶液混合液的吸光度;

A_b ——DPPH 溶液与样品溶剂溶液混合液的吸光度。

(2) ABTS 自由基清除率:根据 GB/T 39100—2020。

取 2 支试管,按表 3 添加试剂。

表 3 ABTS 试剂添加量

Table 3 ABTS reagent additions

溶液名称	1 号管/mL	2 号管/mL
ABTS ⁺ 溶液	3.6	3.6
样品溶液	0.4	—
样品溶剂溶液	—	0.4

1 号管为试验组(A_s),2 号管为空白组(A_b),混匀后避光反应 5 min,734 nm 下检测吸光值。其中,使用样品溶剂调零,谷胱甘肽作阳性对照,进行 3 次平行试验。按式(2)计算 ABTS 自由基清除率。

$$P=\frac{A_b-A_s}{A_b}\times 100\%, \quad (2)$$

式中:

P ——清除率,%;

A_b ——ABTS⁺溶液与样品溶剂溶液混合液的吸光度;

A_s ——待测溶液与 ABTS⁺溶液混合液的吸光度。

(3) 羟自由基清除率:利用紫外超微弱发光测量仪检测羟自由基清除能力^[14]。用硼砂溶液润洗测量管,按表 4 加入溶液。将混合液放入反应池,设置反应时间为 900 s,每 0.1 s 测定一次发光强度,记录峰值,平行测定 3 次。以蒸馏水为空白对照,谷胱甘肽为阳性对照。

按式(3)计算羟自由基清除率。

$$P=\frac{L_b-L_s}{L_b}\times 100\%, \quad (3)$$

式中:

P ——清除率,%;

L_b ——样品溶剂溶液混合液的发光强度;

L_s ——待测溶液与样品溶剂溶液混合液的发光强度。

表 4 羟自由基试剂添加量

Table 4 Dosage of hydroxyl radical reagents

溶液名称	添加量/μL	溶液名称	添加量/μL
样品溶液	50	抗坏血酸溶液	20
邻菲罗啉溶液	50	硼砂缓冲液	780
硫酸铜溶液	50	30%过氧化氢溶液	50

(4) 还原能力:在 Wang 等^[15]方法的基础上优化,将 1 mL 扇贝肽、2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.6)和 2.5 mL 1.0 g/100 mL 铁氰化钾溶液混合。50 ℃下反应 25 min。混合物中加入 0.5 mL 1.0 g/100 mL TCA, 6 500 r/min 离心 10 min。取 2.5 mL 上清液与 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL 1.0 g/100 mL 氯化铁溶液混合。反应 10 min 后,700 nm 处测定吸光度。使用样品溶剂调零,谷胱甘肽做阳性对照。

1.2.6 中性酶解产物的分子量分布分析 采用高效凝胶过滤色谱法分析中性酶解产物的相对分子量分布^[16]。以多孔性填料为固定相,依据酶解混合物中肽分子大小进行分离。在肽键的紫外吸收波长 220 nm 处检测吸光度,使用 Empower 软件对色谱图及其数据进行处理。通过计算肽的相对分子质量大小及分布范围,得出不同分子质量大小的肽所占百分比。

1.2.7 中性酶解产物的氨基酸组分测定

(1) 氨基酸含量:利用盐酸将中性酶解产物彻底水解成游离氨基酸(色氨酸在酸水解过程中几乎完全被破坏,因此无法测定其含量),经过离子交换柱分离,分离产物与茚三酮溶液反应变色,通过可见光—分光光度检测器测定氨基酸含量^[17]。

按式(4)计算样品测定液氨基酸含量。

$$C_i = \frac{C_s}{A_s} \times A_i, \quad (4)$$

式中:

C_i ——扇贝肽液中氨基酸浓度, nmol/mL;

A_i ——扇贝肽液中氨基酸的峰面积;

A_s ——氨基酸标准液的峰面积;

C_s ——氨基酸标准液浓度, nmol/mL。

按式(5)计算试样中各氨基酸含量。

$$X_i = \frac{C_i \times F \times V \times M}{m \times 10^9} \times 100, \quad (5)$$

式中:

X_i ——扇贝肽氨基酸的含量, g/100 g;

F ——稀释倍数;

V ——定容体积, mL;

M ——氨基酸摩尔质量, g/mol;

m ——称样量, g。

(2) 羟脯氨酸含量:在 105 ℃下用硫酸水解扇贝肽,水解结束后过滤并稀释。羟脯氨酸与氯胺 T 发生反应后,一定条件下可以与对二甲氨基苯醛生成红色产物,在 550 nm 处有最大吸收值^[18]。按式(6)计算羟脯氨酸含量。

$$X = \frac{0.25C}{m \times v} \times 100\%, \quad (6)$$

式中:

X ——扇贝肽中羟脯氨酸含量, %;

C ——利用标准方程计算得出扇贝肽液中羟脯氨酸质量浓度, $\mu\text{g/mL}$;

m ——扇贝肽的质量, g;

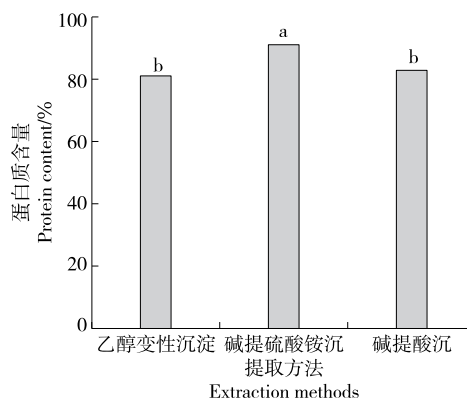
v ——在 250 mL 容量瓶中吸取的滤液体积, mL。

1.2.8 统计分析 用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,设置最小显著水平为 0.05,进行分析及差异显著性检验。对不同处理数据进行 Duncan 多重比较,数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 蛋白分析

2.1.1 蛋白质含量 如图 1 所示,3 种方法所提蛋白含量均超过 80%。李丽等^[11]利用碱提酸沉法提取扇贝蛋白,蛋白含量为 77.97%;在此法基础上进行优化,提取过程中增加超声波处理,并将酸沉的 pH 值由 4.1 提高到 4.4,增加了蛋白质的沉淀量,因而所提取蛋白含量有所提高,达 82.95%。刘泰标等^[12]利用碱提硫酸铵沉法从牡蛎中提取含硒蛋白质,含硒蛋白量为 44.90%;对该提取方法进行优化,增加超声波处理并将碱提的时间由 9 h 延长至 11 h,获得扇贝蛋白含量达 $(91.16 \pm 1.36)\%$ 。经比较,优化后的碱提硫酸铵沉淀法最适合从扇贝副产物中提取蛋白质。



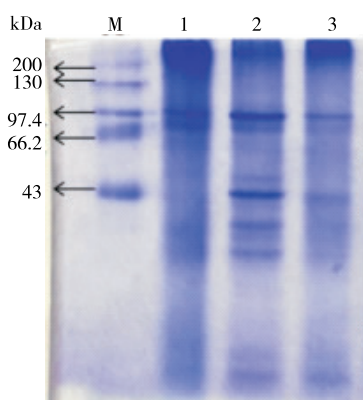
字母不同表示差异显 ($P < 0.05$)

图 1 3 种提取方法所获蛋白含量

Figure 1 The content of proteins obtained by three different extraction methods ($n=9$)

2.1.2 SDS-PAGE 分析 如图 2 所示,乙醇变性法所提取的蛋白降解严重,而碱提酸沉法只能提取部分蛋白质,无法获得全蛋白。碱提硫酸铵沉法所提取的蛋白质分子量分布最广,电泳分离条带清晰,说明提取过程中蛋白质未被降解且杂质干扰少。

综合蛋白提取纯度和电泳条带效果,对碱提硫酸铵沉法所提蛋白进行酶解。



M. 分子量标记 1. 乙醇变性沉淀法 2. 碱提硫酸铵沉法
3. 碱提沉法

图 2 不同提取方法所获蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱
Figure 2 SDS-PAGE electrophoresis map of proteins obtained from different extractions

2.2 4 种酶解物的抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除率 如图 3 所示, 阳性对照谷胱甘肽对 DPPH 自由基的清除率为 $(95.67 \pm 0.09)\%$; 4 种扇贝肽中, 中性蛋白酶酶解产物的 DPPH 自由基清除率最高, 为 $(29.20 \pm 0.73)\%$ 。

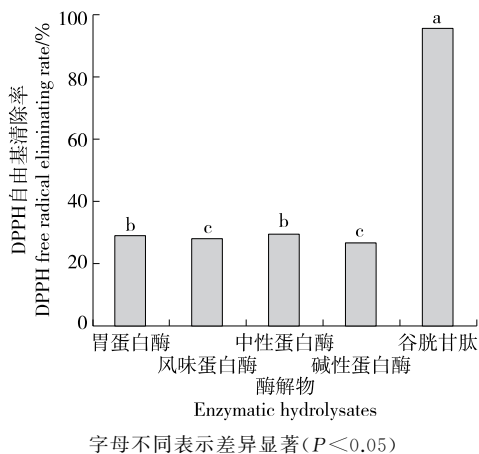


图 3 4 种酶解产物的 DPPH 自由基清除率

Figure 3 DPPH free radical eliminating rate of four kinds of enzymatic hydrolysates ($n=9$)

2.2.2 ABTS 自由基清除率 如图 4 所示, 酶解物和谷胱甘肽浓度相同, 谷胱甘肽的 ABTS 自由基清除率高达 $(99.80 \pm 0.01)\%$, 而样品中清除力最强的是碱性蛋白酶酶解物, 清除率为 $(69.75 \pm 0.79)\%$, 其次是中性蛋白酶酶解物和风味蛋白酶酶解物; 而胃蛋白酶对 ABTS 自由基清除率最低。Wang 等^[4]在分析不同酶解产物的抗氧化活性时也发现碱性蛋白酶酶解物的 ABTS 自由基清除率最高, 不过清除率仅为 40%。研究中, 除胃蛋白酶酶解产物外, 所获得的其他 3 种酶解产物的 ABTS 自由基清除

率均高于 50%, 具有较强的抗氧化能力。

比较图 3 和图 4, 研究制备的 4 种扇贝蛋白酶酶解物对 ABTS 自由基的清除力整体高于对 DPPH 自由基的, 说明从扇贝加工副产物中提取的蛋白质, 经 4 种蛋白酶水解后, 产生了更多有利于清除 ABTS 自由基的肽段。

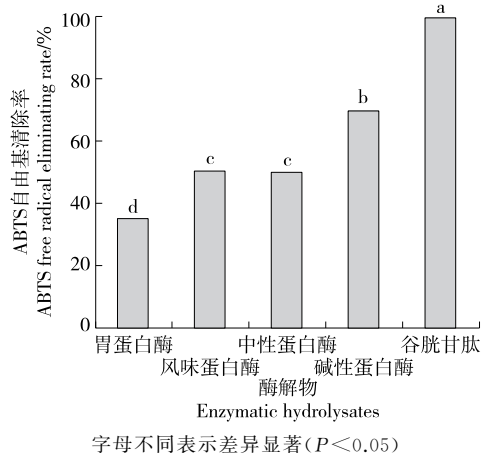


图 4 4 种酶解物的 ABTS 自由基清除率

Figure 4 ABTS free radical eliminating rate of four kinds of enzymatic hydrolysates ($n=9$)

2.2.3 羟自由基清除率 如图 5 所示, 4 种扇贝蛋白酶酶解物中, 清除效果最佳的是中性蛋白酶酶解物和风味蛋白酶酶解物, 二者无显著差异, 清除率均超过 80%, 而碱性蛋白酶酶解物的清除率最低。

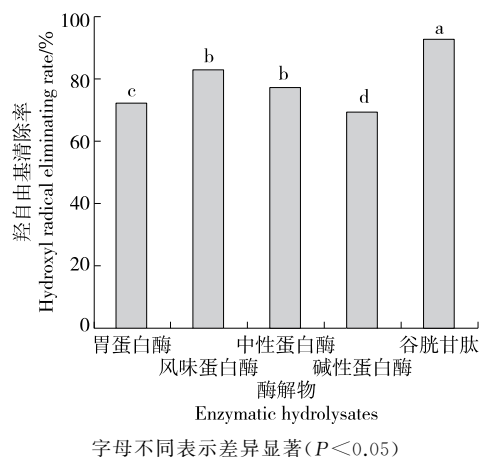
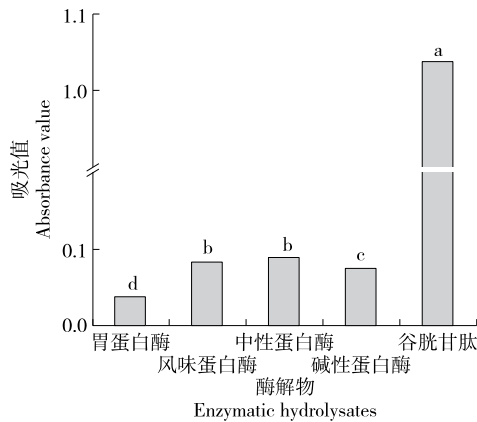


图 5 4 种酶解物的羟自由基清除率

Figure 5 Hydroxyl radical eliminating rate of four kinds of enzymatic hydrolysates ($n=9$)

2.2.4 还原能力 如图 6 所示, 4 种酶解产物中, 中性蛋白酶酶解物的还原能力最强。由于试验采用的扇贝蛋白酶酶解混合物, 未对特定抗氧化肽进行纯化, 产物中含多个不同氨基酸序列的寡肽, 因而其还原力低于纯肽——谷胱甘肽。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 6 4 种酶解物的还原能力

Figure 6 Reduction capacity of four kinds of enzymatic hydrolysates ($n = 9$)

中性蛋白酶酶解产物的抗氧化活性高于其他酶解物。为了解该酶解产物的营养特性,进一步对其氨基酸组分及羟脯氨酸含量进行分析。

2.3 中性蛋白酶水解产物分子量分布及氨基酸组分

2.3.1 分子量分布 如图 7 所示,根据出峰时间和峰面积,利用 Empower 软件处理中性蛋白酶水解物的分子量分布(表 5)。扇贝肽相对分子量主要分布在 200 ~ 5 000 Da,总占比达(95.17 ± 1.49)%,说明中性蛋白酶对扇贝加工副产物的酶解较充分,可以获得大量的小分子肽产物。

2.3.2 氨基酸组分分析 如图 8 和表 6 所示,由中性蛋白酶制备的扇贝肽中含天冬氨酸等 15 种氨基酸,总量达 84 g/100 g。研究制备的扇贝肽中含苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸 6 种必需氨基酸,含量为(10.61 ± 0.30) g/100 g;且扇贝肽中潜在抗氧化氨基酸有 Ala、Tyr、Pro 3 种,含量达(14.78 ± 0.32) g/100 g,具有

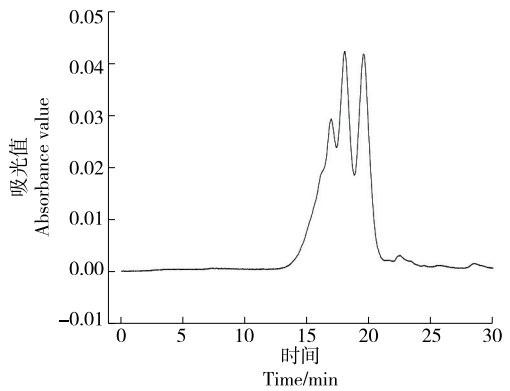


图 7 中性蛋白酶水解产物分子量分布的 HPLC 图

Figure 7 HPLC map of disperse hydrolysates

表 5 中性蛋白酶水解产物分子量分布

Table 5 Molecular weight distribution of disperse hydrolysates

相对分子量/Da	占比/%	相对分子量/Da	占比/%
<200	0.25 ± 0.03	3 000~5 000	9.59 ± 0.19
200~1 000	42.53 ± 0.73	5 000~10 000	4.35 ± 0.17
1 000~3 000	43.05 ± 0.40	>10 000	0.23 ± 0.01

很高的营养价值。

2.3.3 羟脯氨酸含量 经测定,中性蛋白酶水解物的吸光度为 0.41,羟脯氨酸含量为(11.82 ± 0.09)%。Liu 等^[19]研究表明,胶原蛋白中含有较多羟脯氨酸,每天摄入胶原蛋白水解物可改变人体血液中肽的组成比例,并保持较高水平肽含量。羟脯氨酸是一种亚氨基酸,可使胶原肽衍生为低聚肽,对蛋白酶产生高抗性,防止被机体的蛋白酶水解。这类肽经口服至肠道吸收并进入血液过程中,能始终以肽形式存在。因此含羟脯氨酸的小分子肽能完整通过肠细胞中肽转运体系,进而吸收入血液,更稳定、高效地发挥肽的生物活性^[20-21]。

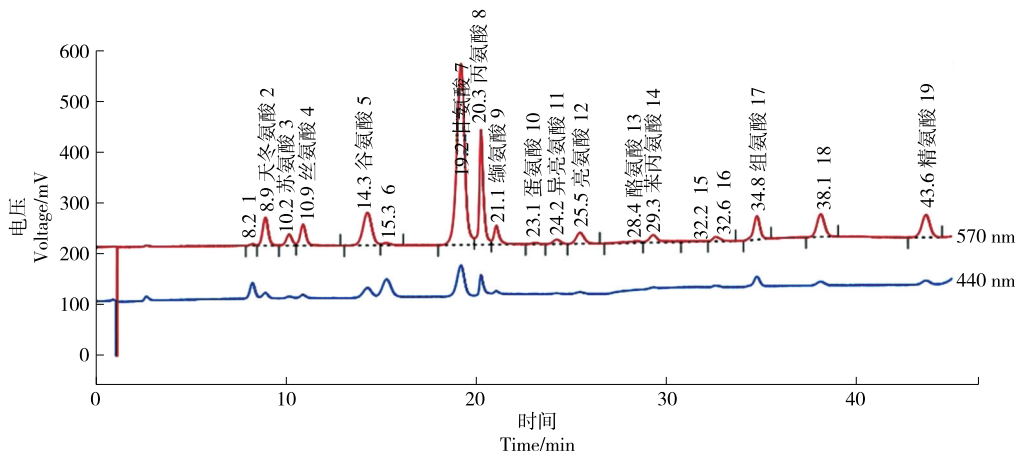


图 8 中性蛋白酶水解产物氨基酸分析色谱图

Figure 8 Amino acid analysis chromatogram of disperse hydrolysates

表 6 中性蛋白酶水解产物中氨基酸组分及其含量[†]
Table 6 Contents of amino acid in dispase hydrolysates

氨基酸	保留时间/min	响应值	氨基酸浓度/(nmol · mL ⁻¹)	氨基酸含量/(10 ⁻² g · g ⁻¹)
天冬氨酸	8.927	1 169.368 5	166.34±1.90	4.81±0.10
苏氨酸	10.171	512.355 5	71.74±2.50	1.86±0.05
丝氨酸	10.899	915.496 0	115.64±0.50	2.64±0.05
谷氨酸	14.279	2 066.213 0	272.36±8.30	8.71±0.05
甘氨酸	19.204	10 282.299 5	1 442.00±1.00	23.50±0.05
丙氨酸	20.259	3 415.720 5	562.99±3.60	10.90±0.10
缬氨酸	21.063	796.639 5	95.06±1.30	2.42±0.05
蛋氨酸	23.099	84.384 5	10.85±1.50	0.35±0.05
异亮氨酸	24.248	259.606 5	42.84±2.70	1.22±0.05
亮氨酸	25.457	642.617 5	89.04±1.70	2.54±0.05
酪氨酸	28.432	201.677 5	24.29±1.40	0.96±0.05
苯丙氨酸	29.312	527.768 0	61.93±4.70	2.22±0.05
组氨酸	34.756	1 061.546 5	115.71±5.10	3.90±0.15
精氨酸	43.648	1 376.004 5	178.23±1.00	6.75±0.05
脯氨酸	15.300	1 224.224 5	399.65±15.10	11.60±0.22
合计			3 648.67	84.38

[†] 脯氨酸采用检测器 2(440 nm),其他氨基酸均采用检测器 1(570 nm)。

3 结论

利用优化的碱提硫酸铵沉法,在物料比($m_{\text{扇贝副产物粉}} : V_{\text{NaOH}}$)1 : 40 (g/mL)、30 ℃ 沉淀 11 h 的条件下,从扇贝加工副产物中提取蛋白质,可获得纯度高达(91.16 ± 1.36)%的蛋白质产物。不同酶解物对于不同自由基清除效果不同,但总体上利用中性蛋白酶制备的扇贝肽的 DPPH 自由基清除力、羟自由基清除力及还原能力更佳。对中性蛋白酶物的氨基酸组分分析结果表明,扇贝肽中富含多种氨基酸,包括 6 种人体必需氨基酸,且羟脯氨酸含量达(11.82 ± 0.09)%,营养价值高。含羟脯氨酸的小分子肽在人体内可稳定高效地发挥其生物活性,这是今后将进一步探讨的课题。此外,借鉴 Wen 等^[8]和 Qu 等^[22]报道的生物信息学研究手段,有望筛选出潜在的特定氨基酸序列的扇贝源生物活性肽。

参考文献

[1] 王一帆. 扇贝加工副产物抗氧化活性肽的纯化及性质的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017: 1-4.
WANG Y F. Studies on the purification and properties of antioxidant peptides from scallop by-products[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017: 1-4.
[2] SUBRA-PATERNAULT P, THONGDENG H, GRELARD A, et al. Extraction of phospholipids from scallop by-product using supercritical CO₂/alcohol mixtures [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2): 990-998.
[3] JENSEN I J, WALQUIST M, LIASET B, et al. Dietary intake of cod

and scallop reduces atherosclerotic burden in female apolipoprotein e-deficient mice fed a western type high fat diet for 13 weeks[J]. Nutrition & Metabolism, 2016, 13(1): 1-11.
[4] WANG Z X, LIU X Y, XIE H K, et al. Antioxidant activity and functional properties of alcalase-hydrolyzed scallop protein hydrolysate and its role in the inhibition of cytotoxicity in vitro[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128566.
[5] 陈月华, 程云辉, 许宙, 等. 食源性生物活性肽免疫调节功能研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 210-213.
CHEN Y H, CHENG Y H, XU Z, et al. Research progress in immune regulation of food-derived bioactive peptides[J]. Food & Machinery, 2016, 32(5): 210-213.
[6] KARAMI Z, AKBARI-ADERGANI B. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(2): 535-547.
[7] PEIGHAMBARDOUST S H, KARAMI Z, PATEIRO M, et al. A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications [J]. Biomolecules, 2021, 11(5): 631.
[8] WEN L, HUANG L, LI Y, et al. New peptides with immunomodulatory activity identified from rice proteins through peptidomic and in silico analysis[J]. Food Chemistry, 2021, 364: 130357.
[9] 文李, NIYOKWIZERA I, 刘步青, 等. 食源性免疫活性肽的筛选策略及作用机制研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(2): 7-11, 37.
WEN L, NIYOKWIZERA I, LIU B Q, et al. Progresses of the

- screening strategies and the effect mechanism researches of food-derived immunopeptides[J]. Food & Machinery, 2020, 36(2): 7-11, 37.
- [10] 胡昂, 段蕊, 胡志东, 等. 响应面法优化中性蛋白酶解海湾扇贝副产物制备抗氧化酶解物研究[J]. 海洋渔业, 2020, 42(1): 98-109.
- HU A, DUAN R, HU D D, et al. Optimization of hydrolysis conditions on the antioxidant hydrolysates from *Argopecten irradians* by-product using neutral protease[J]. Marine Fisheries, 2020, 42(1): 98-109.
- [11] 李丽, 曹亚男, 姜雯, 等. 栉孔扇贝中蛋白质的提取条件优化[J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2021, 37(2): 157-161, 182.
- LI L, CAO Y N, JIANG W, et al. Optimized extraction conditions of protein from scallop *Chlamys farreri* [J]. Journal of Ludong University (Natural Science Edition), 2021, 37(2): 157-161, 182.
- [12] 刘泰标, 梁兴唐, 尹艳镇, 等. 牡蛎碱溶法提取含硒蛋白质工艺优化[J]. 广州化工, 2021, 49(10): 63-66.
- LIU T B, LIANG X T, YIN Y Z, et al. Optimization of extraction process of selenium containing protein from Oyster[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2021, 49(10): 63-66.
- [13] O'SULLIVAN J, MURRAY B, FLYNN C, et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53: 141-154.
- [14] NOWAK M, TRYNISZEWSKI W, SARNIAK A, et al. Light Emission from the Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2 System: Possible application for the determination of antioxidant activity of plant phenolics [J]. Molecules, 2018, 23(4): 866.
- [15] WANG Y, WANG C Y, WANG S T, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysate obtained with different proteases [J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128765.
- [16] 黄伟乾, 霍玫希, 罗浩, 等. 凝胶色谱法(GPC)检测特殊膳食食品中小分子肽的分子量分布的研究[J]. 现代食品, 2021(17): 192-195.
- HUANG W Q, HUO W X, LUO H, et al. Research on molecular weight distribution of small molecule peptides in special dietary foods in gel chromatography[J]. Xiandaishipin, 2021(17): 192-195.
- [17] 国家药品监督管理局. 食品中氨基酸的测定: GB/T 5009.124—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Medical Products Administration. Method for determination of amino acids in foods: GB/T 5009.124—2016[S]. Beijing: China Quality and Standards Publishing, 2016.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 肉与肉制品羟脯氨酸含量测定: GB/T 9695.23—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Meat and meat products-Determination of hydroxyproline content: GB/T 9695.23—2008 [S]. Beijing: China Quality and Standards Publishing, 2008.
- [19] LIU C F, SUGITA K, NIHEI K I, et al. Absorption of hydroxyproline-containing peptides in vascularly perfused rat small intestine in situ[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(8): 1741-1747.
- [20] FENG M M, BETTI M. A novel collagen glycopeptide, Pro-Hyp-CONH-GlcN, stimulates cell proliferation and hyaluronan production in cultured human dermal fibroblasts[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 45: 277-287.
- [21] SHIGEMURA Y, SUZUKI A, KUOKAWA M, et al. Changes in composition and content of food-derived peptide in human blood after daily ingestion of collagen hydrolysate for 4 weeks [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(5): 1944-1950.
- [22] QU T, HE S, NI C, et al. In Vitro anti-inflammatory activity of three peptides derived from the byproduct of rice processing[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2022, 77: 172-180.
- (上接第 159 页)
- [17] 陶浩, 李笑, 陈敏. 基于改进 ORB 特征的遥操作工程机器人双目视觉定位[J]. 测控技术, 2019, 38(7): 19-23.
- TAO H, LI X, CHEN M. Binocular vision of teleoperation engineering robot based on improved ORB feature[J]. Measurement & Control Technology, 2019, 38(7): 19-23.
- [18] 宋海涛, 何文浩, 原魁. 一种基于 SIFT 特征的机器人环境感知双目立体视觉系统[J]. 控制与决策, 2019, 34(7): 1545-1552.
- SONG H T, HE W H, YUAN K. A robot environment perception binocular stereo vision system based on SIFT feature[J]. Control and Decision, 2019, 34(7): 1545-1552.
- [19] 冯喆, 李卫豪, 崔笛. 基于高光谱成像和深度学习的山核桃内源性异物检测[J]. 农业机械学报, 2021, 52(S0): 466-471.
- FENG Z, LI Z H, CUI D. Detection of endogenous foreign bodies in pecan based on hyperspectral imaging and deep learning[J]. Journal of Agricultural Machinery, 2021, 52(S0): 466-471.
- [20] 王红霞, 周家奇, 辜承昊, 等. 用于图像分类的卷积神经网络中激活函数的设计[J]. 浙江大学学报(工学版), 2019, 53(7): 1363-1373.
- WANG H X, ZHOU J Q, GU C H, et al. Design of activation function in convolutional neural network for image classification[J]. Journal of Zhejiang University (Engineering Edition), 2019, 53(7): 1363-1373.
- [21] REN S, HE K, GIRSHICK R, et al. Faster R-CNN: Towards real-time object detection with region proposal networks [J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis & Machine Intelligence, 2017, 39(6): 1137-1149.