

金枪鱼暗色肉蛋白肽制备工艺及理化性质研究

孙 慧^{1,2} 赵永强^{3,4} 于 刚^{3,4} 杨 涛⁵ 夏光华^{1,2}

(1. 海南大学食品科学与工程学院, 海南 海口 570228; 2. 海南省南海水产资源高效利用工程研究中心, 海南 海口 570228; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 4. 农业农村部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300; 5. 海南医科大学药学院, 海南 海口 570288)

摘要: [目的] 实现金枪鱼副产物的高值化利用, 从中制备抗氧化蛋白肽。[方法] 以黄鳍金枪鱼暗色肉为原料, 采用蛋白酶分步酶解制备抗氧化蛋白肽。以水解度和 DPPH 自由基清除率为评价指标, 通过单因素和响应面试验优化制备工艺, 并分析蛋白肽的抗氧化活性、氨基酸组成以及相对分子质量分布。[结果] 抗氧化蛋白肽的最优制备工艺为风味蛋白酶酶解温度 50 °C, pH 7.00, 酶添加量 6 000 U/g, 酶解时间 4.00 h; 二步酶解中, 胃蛋白酶酶解温度 55.69 °C, pH 值 1.41, 酶添加量 3 200 U/g, 酶解时间 5.16 h。该条件下, 蛋白肽的水解度和对 DPPH 自由基清除率最高, 分别为 21.55%, 85.89%。金枪鱼暗色肉风味蛋白酶—胃蛋白酶蛋白肽清除 DPPH 自由基的半抑制质量浓度 (IC₅₀) 为 1.613 mg/mL, 同时, 该蛋白肽含有 8 种必需氨基酸占比约 39.60%, 疏水性氨基酸占比约 35.13%。另外, 其相对分子质量主要集中在 3 000 以下, 占比约为 63.86%。[结论] 从金枪鱼副产物中采用分步酶解法所获蛋白肽具有很好的抗氧化活性且营养价值高。

关键词: 黄鳍金枪鱼; 暗色肉; 分步酶解; 蛋白肽; 抗氧化

Preparation process and physicochemical properties of tuna dark meat protein peptide

SUN Hui^{1,2} ZHAO Yongqiang^{3,4} YU Gang^{3,4} YANG Tao⁵ XIA Guanghua^{1,2}

(1. School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Hainan Provincial Engineering Research Center of Aquatic Resources Efficient Utilization in the South China Sea, Haikou, Hainan 570228, China; 3. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510300, China; 4. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou, Guangdong 510300, China; 5. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570288, China)

Abstract: [Objective] To realize the high-value utilization of tuna by-products and prepare antioxidant peptides from them. [Methods] Antioxidant protein peptides were prepared from the dark meat of yellowfin tuna by stepwise enzymatic hydrolysis using protease. The degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging rate were used as evaluation indexes. The preparation process was optimized through one-way and response surface experiments, and the antioxidant activities, amino acid composition, and relative molecular mass distributions of the peptides were analyzed. [Results] The optimal preparation process for the antioxidant peptides was enzymatic hydrolysis with flavor protease at 50 °C, pH 7.00, enzyme concentration of 6 000 U/g, and digestion time of 4.00 h. In the two-step enzymatic digestion, pepsin was used at 55.69 °C, pH 1.41, enzyme concentration of 3 200 U/g, and digestion time of 5.16 h. Under these conditions, the degree of hydrolysis of the protein peptide and the DPPH radical scavenging rate were the highest, reaching 21.55% and 85.89%, respectively. The semi-inhibition concentration (IC₅₀) for DPPH radical scavenging by the tuna dark meat flavor protease-pepsin protein peptide was 1.613 mg/mL. Additionally, the peptide contained eight essential amino acids, accounting for approximately 39.60%, and hydrophobic amino acids, accounting for about 35.13%. Its relative molecular mass was mainly concentrated below 3 000, comprising approximately 63.86%.

基金项目: 海南省重点研发计划 (编号: ZDYF2024XDNY188); 三亚崖州湾科技城科技专项 (编号: SKJC-2023-01-001)

通信作者: 夏光华 (1987—), 男, 海南大学教授, 博士。E-mail: xiaguanghua2011@126.com

收稿日期: 2024-05-07 **改回日期:** 2025-01-03

[Conclusion] Protein peptides obtained from tuna by-products through stepwise enzymatic digestion possess excellent antioxidant activity and high nutritional value.

Keywords: yellowfin tuna; dark meat; stepwise enzymatic digestion; protein peptide; antioxidant

金枪鱼是一种大洋暖水性高度洄游鱼类,常见金枪鱼有5个属、17个种,均属于硬骨鱼纲鲭形目鲭科^[1]。金枪鱼营养价值高^[2],其加工产业也因此发展迅速。在金枪鱼加工过程中,会产生大量副产物,例如内脏、鱼头、鱼骨、暗色肉等,但这些副产物加工利用程度较低。

生物活性肽具有多种生理功能,如抗氧化、抗肿瘤、抗菌等^[3-4],是药物、保健品以及防腐剂的潜在有效成分。动物蛋白源抗氧化肽在食品和生物体中表现出了有效的抗氧化活性,可作为功能性食品配料^[5]。酶解法是目前常用的生物活性肽制备方法。董倍余等^[6]采用水酶法制备了鲫鱼多肽,其表现出强 DPPH 自由基清除能力;贺江等^[7]用草鱼胶原蛋白粗提液制备抗氧化肽,其对 ABTS⁺ 自由基的抑制率高达 45.7%。韩梦瑶等^[8]从大口黑鲈鱼皮中提取胶原蛋白肽,发现碱性蛋白酶酶解胶原蛋白肽(APP)的抗氧化活性最佳,对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除率分别为 56.35% 和 38.41%。赵阔等^[9]以罗非鱼下脚料为原料,对比了单酶和双酶制备降血糖肽的效果,结果表明,双酶的水解效果优于单酶。卢素珍等^[10]利用二步酶解法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,降低水解物的相对分子质量。目前已有学者^[11-13]研究了金枪鱼的酶解,但对暗色肉研究较少,而且将双酶分步酶解工艺与金枪鱼暗色肉抗氧化肽制备相结合的研究尚未见报道。

金枪鱼暗色肉是金枪鱼加工过程中产生的副产物,往往因颜色深、易氧化、易变质、口感差等原因被剔除,商业价值较低,但是富含蛋白质和人体所需的氨基酸等。研究拟以金枪鱼暗色肉为原料,从木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、胃蛋白酶中选取2种能产生高活性产物的酶进行分步酶解,通过双酶酶解法制备抗氧化蛋白肽,并运用响应面法优化暗色肉蛋白肽的制备工艺,旨在获得更高清除 DPPH 自由基活性的抗氧化蛋白肽,为黄鳍金枪鱼加工副产品的高值化利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄鳍金枪鱼:中国水产科学院南海水产研究所;

复合蛋白酶(120 U/mg)、木瓜蛋白酶(800 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg):上海源叶生物科技有限公司;

风味蛋白酶、胃蛋白酶:≥20 U/mg,南京都莱生物技术有限公司;

2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)、L-丝氨酸:分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

DL-二硫苏糖醇(DTT):分析纯,上海皓鸿生物医药

科技有限公司;

邻苯二甲醛:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

十二烷基硫酸钠(SDS):分析纯,上海吉至生化科技有限公司;

L-抗坏血酸:分析纯,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

无水乙醇:分析纯,安徽天地高纯溶剂有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平:BSA124S-CW型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

全波长酶标仪:K6600-A型,西安昊兴生物科技有限公司;

真空冷冻干燥机:LGJ-12型,北京松源华兴科技发展有限公司;

台式高速冷冻离心机:TGL-16M型,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;

台式酸度计:FE28-CN型,上海吉馨实业发展有限公司;

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S型,上海力辰邦西仪器科技有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-S6型,金坛市国旺实验仪器厂;

全自动氨基酸分析仪:A300型,德国曼默博尔公司;

高效液相色谱仪:SSI 1500型,美国SSI公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理 取黄鳍金枪鱼暗色肉,切成3 cm×5 cm×1 cm 的鱼肉条,冻干48 h后用粉碎机打碎,按 $m_{\text{鱼肉粉}}:V_{\text{无水乙醇}}=1:7$ (g/mL)脱脂3次后,在55℃下干燥12 h即可得到脱脂鱼肉粉。

1.3.2 最适蛋白酶筛选 取适量脱脂鱼肉粉,按 $m_{\text{鱼肉粉}}:V_{\text{水}}=1:10$ (g/mL)加超纯水,搅拌成匀浆液。按表1中不同酶的最适pH进行调整,再加入相应蛋白酶。50℃酶解4 h后,90℃水浴灭酶15 min,冷却至室温后6 000 r/min离心15 min,取上清液。在-20℃预冷12 h后冷冻干燥48 h,将产物蛋白肽装入密封袋中,放在-20℃冰箱中保存备用。通过测定一定浓度蛋白肽溶液的水解度,选取最佳作用酶。

在上述步骤中,选取效果较好的3种酶排列组合,得到6种双酶分步酶解组合:碱性蛋白酶—胃蛋白酶(碱—胃)、胃蛋白酶—碱性蛋白酶(胃—碱)、碱性蛋白酶—风味蛋白酶(碱—风)、风味蛋白酶—碱性蛋白酶(风—碱)、风味蛋白酶—胃蛋白酶(风—胃)、胃蛋白酶—风味蛋白酶(胃—风)。按组合中蛋白酶的顺序依次进行双酶分步

表 1 蛋白酶作用条件

Table 1 Conditions of protease action

名称	酶解温度/℃	酶解 pH	酶添加量/(U·g ⁻¹)	酶解时间/h
复合蛋白酶	50	8.0	6 000	4
碱性蛋白酶	50	9.0	6 000	4
风味蛋白酶	50	7.0	6 000	4
木瓜蛋白酶	50	6.0	6 000	4
胃蛋白酶	50	1.8	6 000	4

酶解试验,通过测定 6 种组合酶解物的水解度和 DPPH 自由基清除率,确定最终双酶组合。

1.3.3 双酶分步酶解工艺流程

样品预处理→按 $m_{\text{鱼肉粉}}:V_{\text{水}}=1:10$ (g/mL) 加入超纯水→搅拌至匀浆液→调至最适酶解 pH 值→加入一种蛋白酶→水浴搅拌酶解→90℃水浴灭酶 15 min→离心 (6 000 r/min, 15 min)→吸取上清液→-20℃预冷 12 h, 冷冻干燥 48 h→一步酶解蛋白肽→按 $m_{\text{鱼肉粉}}:V_{\text{水}}=1:10$ (g/mL) 加入超纯水→搅拌至溶解→调至最适酶解 pH 值→加入另一种蛋白酶→水浴搅拌酶解→90℃水浴灭酶 15 min→离心 (6 000 r/min, 15 min)→吸取上清液→-20℃预冷 12 h, 冷冻干燥 48 h→二步酶解蛋白肽

1.3.4 双酶分步酶解工艺优化

(1) 单因素试验:固定料液比为 1:10 (g/mL), 风味蛋白酶的条件为酶解温度 50℃, pH 值 7.0, 酶添加量 6 000 U/g, 酶解时间 4 h, 考察胃蛋白酶的酶解温度 (40, 45, 50, 55, 60℃)、酶解 pH (1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6)、酶添加量 (2 000, 4 000, 6 000, 8 000, 10 000 U/g)、酶解时间 (2, 3, 4, 5, 6 h) 对 DPPH 自由基清除率的影响。

(2) 响应面优化试验:根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,结合单因素结果,以胃蛋白酶的酶解温度、酶解 pH、酶添加量及酶解时间作为自变量,蛋白肽的水解度和 DPPH 自由基清除率为响应值,进行四因素三水平响应面试验,优化抗氧化蛋白肽的制备工艺。

1.3.5 金枪鱼肉蛋白肽水解度测定 采用 OPA 反应法^[14]。称取适量冻干后的酶解产物,配制样品溶液,以 L-丝氨酸溶液作为标准品,去离子水作为空白。将 20 μL 的去离子水、标准品溶液及样品溶液加入到 96 孔板中,然后加入 150 μL 的 OPA 反应液,振荡摇匀,反应 2 min 后,于 340 nm 波长处用酶标仪测定其吸光值,每组试验做 5 次平行。按式(1)和式(2)计算样品的水解度。

$$S_{\text{NH}_2} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{atandard}} - A_{\text{blank}}} \times 0.9516 \times C_{\text{sample}}, \quad (1)$$

$$D_{\text{H}} = \frac{S_{\text{NH}_2} - \beta}{\alpha \times h_{\text{tot}}} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S_{NH_2} ——样品中丝氨酸的质量浓度,mg/L;

$A_{\text{sample}}、A_{\text{blank}}、A_{\text{atandard}}$ ——样品溶液、空白溶液及标准品溶液的吸收值;

D_{H} ——样品的水解度,%;

0.951 6——丝氨酸标准溶液浓度,mmol/L;

C_{sample} ——样品溶液质量浓度,mg/mL;

$\alpha、\beta$ 及 h_{tot} ——鱼肉原料的蛋白质常数,1.00, 0.40 及 8.6。

1.3.6 金枪鱼肉蛋白肽 DPPH 自由基清除率测定 参照 Brand-Williams 等^[15]的方法。将 2 mL 样品与 2 mL 溶解在 95% 乙醇中的 0.1 mmol/L DPPH 混合,2 mL 样品溶液和 2 mL 95% 乙醇溶液混合,2 mL 95% 乙醇溶液和 2 mL DPPH 溶液混合,避光存放 40 min 后,在 517 nm 处测定吸光值,每组 5 个平行。按式(3)计算清除率。

$$P = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

P ——DPPH 自由基清除率,%;

A_i ——2 mL 样品溶液和 2 mL DPPH 溶液吸光值;

A_j ——2 mL 样品溶液和 2 mL 95% 乙醇溶液吸光值;

A_0 ——2 mL 95% 乙醇溶液和 2 mL DPPH 溶液吸光值。

1.3.7 金枪鱼肉蛋白肽氨基酸组成分析 参照 Sinthusamran 等^[16]的方法。在 18 mm×180 mm 试管中取 20 mg 样品,加 5 mL 6 mol/L 盐酸溶液,振荡混匀。将试管密封,在 110℃下用密封管减压水解 24 h。取 0.2 mL 水解后的溶液,氮吹干燥后用 1 mL 蒸馏水稀释。将稀释后的溶液通过 0.22 μm 的滤膜过滤至进样瓶中,使用配备 C₁₈ ODS HYPERSIL 柱对混合物进行分离和定量,之后根据样品和标准品洗脱曲线上所对应的峰面积计算不同氨基酸含量。

1.3.8 金枪鱼肉蛋白肽相对分子质量测定 参照李军等^[17]的方法。称取适量样品,与超纯水混合,配制质量浓度为 2.0 mg/mL 溶液,之后将样品溶液用 0.22 μm 水系滤膜过滤,用高效液相色谱仪进行上样分析。标准品为细胞色素 C (12 384.00)、抑肽酶 (6 511.51)、L-氧化型谷胱甘肽 (612.63) 和羟脯氨酸 (131.13),质量浓度为 2 mg/mL,绘制相对分子质量校正曲线。采用 XBridge BEH 12.5 nm SEC 柱 (3.5 μm, 7.8 mm×300 mm),流动相为乙腈—水—三氟乙酸 ($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{三氟乙酸}}=45:55:0.1$),流量 0.5 mL/min,检测波长 220 nm,柱温 30℃,每次进样量 10 μL。

1.4 数据处理

每组试验设置 5 次平行,采用 Origin 2019 软件作图;采用 Design-Expert 13 软件建立数学模型;采用 IBM SPSS Statistics 26.0 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 最适蛋白酶的筛选

由图 1 可知,碱性蛋白酶、风味蛋白酶和胃蛋白酶表

现出较佳的水解效果,分别为7.22%,6.43%,6.93%。与此相比,复合蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解度较低。水解度高则表明在相同时间内酶解鱼肉更加彻底。但由于碱性蛋白酶、风味蛋白酶和胃蛋白酶最适pH相差较大,无法同步进行酶解,因此采取双酶分步酶解工艺。

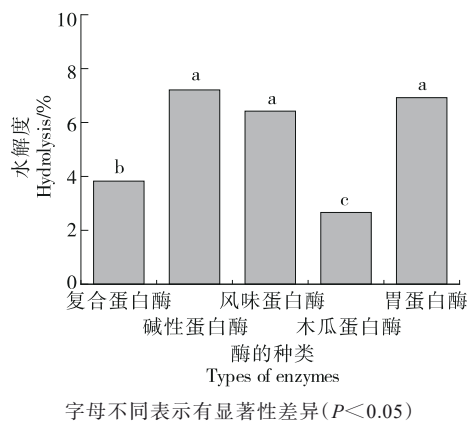


图1 不同蛋白酶对金枪鱼肉蛋白肽制备的影响

Figure 1 Effect of different proteases on the preparation of protein peptides from tuna meat

为了确定最佳酶解组合,以水解度和DPPH自由基清除率作为评价指标。由图2可知,风味蛋白酶和胃蛋白酶的双酶组合水解效果良好。特别是在风味蛋白酶和胃蛋白酶的双酶组合中,该蛋白肽水解度为33.46%,DPPH自由基清除率为84.12%,说明风味蛋白酶—胃蛋白酶组合二步酶解能有效水解金枪鱼肉,产生相对分子质量更小的短肽,并具有良好的抗氧化活性^[18]。同时,对比发现,胃蛋白酶的先后酶解顺序不同,对金枪鱼肉的酶解效果差异较大,当其作为第二步酶解的酶制剂时,所得到的蛋白肽表现出更强抗氧化活性和水解度。因此,后续对胃蛋白酶的酶解工艺进行优化。

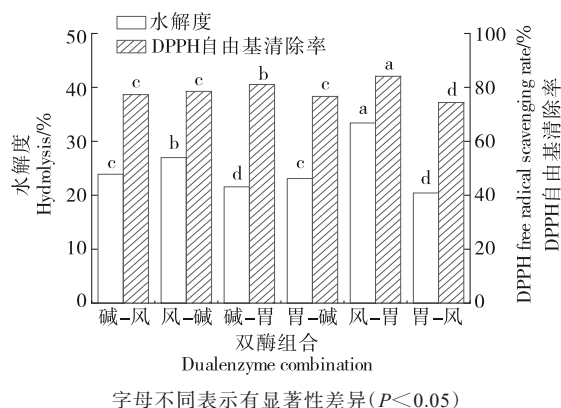
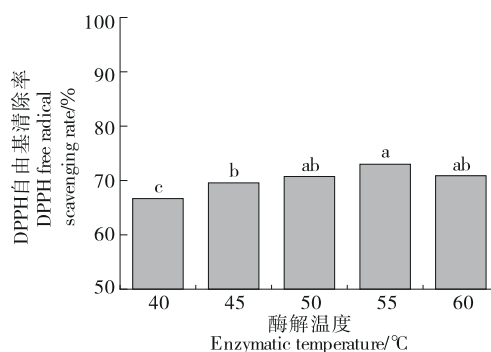


图2 酶解组合方式对金枪鱼肉酶解效果的影响

Figure 2 Influence of enzymatic hydrolysis combinations on the enzymatic hydrolysis of tuna meat

2.2 胃蛋白酶单因素试验

2.2.1 酶解温度对金枪鱼肉酶解效果的影响 由图3可知,随着胃蛋白酶酶解温度的逐步升高,所清除DPPH自由基的能力也在增强;当胃蛋白酶的酶解温度为55℃时,产生的蛋白肽对DPPH自由基的清除能力最强,清除率达到73.03%。但进一步升高胃蛋白酶的酶解温度,则对DPPH自由基的清除能力降低。这可能是在酶的最适温度范围内,适当升温可以提高酶活力,但温度过高会导致酶失活,反映为DPPH自由基清除率下降。因此,确定最适酶解温度为55℃。

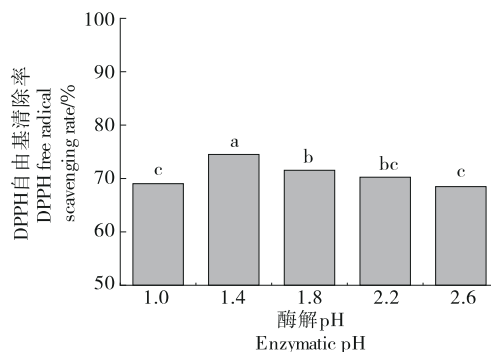


字母不同表示有显著性差异($P < 0.05$)

图3 酶解温度对金枪鱼肉蛋白肽抗氧化效果的影响

Figure 3 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on antioxidant effect of protein peptides in tuna meat

2.2.2 酶解pH对金枪鱼肉酶解效果的影响 由图4可知,随着溶液pH的增加,DPPH自由基清除率呈先上升后下降的趋势。胃蛋白酶的产物蛋白肽对DPPH自由基清除率在pH为1.4时达到最大值,为74.54%。这可能是pH的高低会影响酶的活性中心上的必需基团的解离,进而影响酶的活性和稳定性。只有在最适pH,酶活性才能达到最高水平^[19]。因此,确定最佳酶解pH为1.4。



字母不同表示有显著性差异($P < 0.05$)

图4 酶解pH对金枪鱼肉蛋白肽抗氧化效果的影响

Figure 4 Effect of enzymatic hydrolysis pH on the antioxidant effect of protein peptides in tuna meat

2.2.3 酶添加量对金枪鱼肉酶解效果的影响 由图 5 可知,随着胃蛋白酶添加量的增多,对 DPPH 自由基的清除能力出现了下降趋势,胃蛋白酶添加量在 4 000 U/g 时,产物蛋白肽对 DPPH 自由基清除率达到最大值,为 82.10%。分析原因可能是在酶解反应的初期,酶的添加量与 DPPH 自由基清除率呈正相关;但当酶用量过大时,反应可能达到过饱和状态^[20],反应速率并不会继续提高,反而可能导致底物过早地被完全分解为小分子,而这些小分子可能不具备足够的抗氧化活性或其抗氧化活性较低,从而使得 DPPH 自由基清除率不再显著提高。因此,确定酶最适添加量为 4 000 U/g。

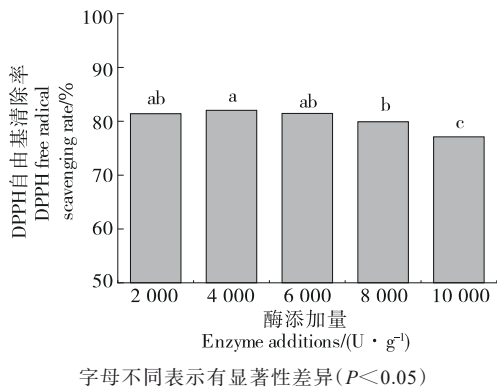


图 5 酶添加量对金枪鱼肉蛋白肽抗氧化效果的影响
Figure 5 Effect of enzyme addition on antioxidant effect of protein peptides in tuna meat

2.2.4 酶解时间对金枪鱼肉酶解效果的影响 由图 6 可知,随着胃蛋白酶酶解时间的增加,对 DPPH 自由基清除率先增加后下降,在酶解时间为 5 h 时,胃蛋白酶的产物蛋白肽对 DPPH 自由基清除率达到最大值,为 83.08%。这可能是初期酶解反应生成了具有较强清除能力的产物,当酶解时间超过 4 h 时,底物逐渐被消耗,酶解产物的生成速率可能减缓,从而导致 DPPH 自由基清除率出现下

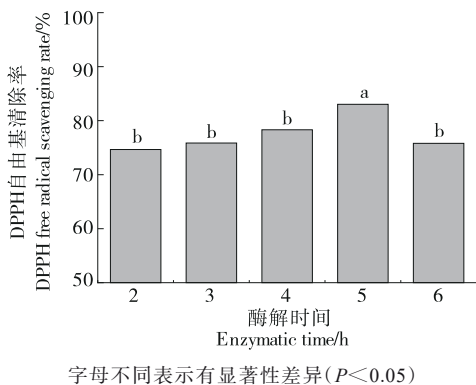


图 6 酶解时间对金枪鱼肉蛋白肽抗氧化效果的影响
Figure 6 Effect of enzymatic hydrolysis time on the antioxidant effect of protein peptides in tuna meat

降趋势^[21]。由此,确定最适宜酶解时间为 5 h。

2.3 胃蛋白酶酶解金枪鱼肉的响应面试验

2.3.1 响应面试验设计及结果 根据单因素试验结果,以酶解温度、酶解 pH、酶添加量及酶解时间为自变量,以水解度和 DPPH 自由基清除率为响应值,进行四因素三水平响应面分析。试验因素水平见表 2,试验结果见表 3。

表 2 响应面试验因素与水平表
Table 2 Response surface test factors and levels

水平	A 酶解温度/℃	B 酶解 pH	C 酶添加量/(U · g ⁻¹)	D 酶解时间/h
—1	50	1.0	2 000	4
0	55	1.4	4 000	5
1	60	1.8	6 000	6

表 3 Box-Behnken 响应面试验结果
Table 3 Box-Behnken response surface test results

试验号	A	B	C	D	Y ₁ 水解度/%	Y ₂ DPPH 自由基清除率/%
1	—1	—1	0	0	15.37	76.69
2	1	—1	0	0	17.09	77.05
3	—1	1	0	0	17.23	68.32
4	1	1	0	0	17.53	73.57
5	0	0	—1	—1	19.41	80.95
6	0	0	1	—1	19.80	69.71
7	0	0	—1	1	21.60	76.06
8	0	0	1	1	19.12	72.66
9	—1	0	0	—1	14.96	70.93
10	1	0	0	—1	17.14	73.50
11	—1	0	0	1	16.82	74.73
12	1	0	0	1	18.59	78.83
13	0	—1	—1	0	17.87	80.45
14	0	1	—1	0	22.83	76.04
15	0	—1	1	0	20.19	76.60
16	0	1	1	0	19.64	71.42
17	—1	0	—1	0	15.89	77.50
18	1	0	—1	0	18.91	80.09
19	—1	0	1	0	16.06	73.09
20	1	0	1	0	15.81	79.94
21	0	—1	0	—1	19.49	73.97
22	0	1	0	—1	19.95	68.91
23	0	—1	0	1	20.08	77.86
24	0	1	0	1	20.98	71.92
25	0	0	0	0	22.01	85.49
26	0	0	0	0	22.55	84.64
27	0	0	0	0	21.46	85.99
28	0	0	0	0	20.25	86.89
29	0	0	0	0	19.89	86.14

2.3.2 回归方程拟合和方差分析 将表3中的试验数据进行多元回归拟合,建立数学模型,并进行回归分析,得到水解度的回归方程:

$$Y_1=21.33+0.728\ 3A+0.647\ 5B-0.515\ 8C+0.536\ 7D-0.355\ 4B-0.817\ 5AC-0.102\ 5AD-1.45BC+0.11BD-0.717\ 5CD-3.86A^2-0.541\ 4B^2-0.681\ 4C^2-0.542\ 7D^2。 \quad (4)$$

由表4可知:回归模型的 P 值 $<0.000\ 1$,表示以水解度建立的回归模型极显著,模型的失拟项不显著($P=0.986\ 2>0.05$),这对于模型的可信度是有利的。模型调整系数 $R_{Adj}^2=0.889\ 5$,说明该模型可以解释88.95%的响应值变化;从各系数项的 P 值可以看出,模型方程中的A、B、C、D、AC、BC、 A^2 和 C^2 对水解度均有显著或极显著的影响。

表4 水解度回归分析结果[†]

Table 4 Hydrolysis degree regression analysis results

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	128.88	14	9.21	17.11	$<0.000\ 1$	**
A	6.37	1	6.37	11.83	0.004\ 0	**
B	5.03	1	5.03	9.35	0.008\ 5	**
C	3.19	1	3.19	5.93	0.028\ 8	*
D	3.46	1	3.46	6.42	0.023\ 8	*
AB	0.50	1	0.50	0.94	0.349\ 6	
AC	2.67	1	2.67	4.97	0.042\ 7	*
AD	0.04	1	0.04	0.08	0.784\ 0	
BC	8.44	1	8.44	15.68	0.001\ 4	**
BD	0.05	1	0.05	0.09	0.768\ 7	
CD	2.06	1	2.06	3.83	0.070\ 7	
A^2	96.65	1	96.65	179.60	$<0.000\ 1$	**
B^2	1.90	1	1.90	3.53	0.081\ 1	
C^2	3.01	1	3.01	5.60	0.033\ 0	*
D^2	1.91	1	1.91	3.55	0.080\ 5	
残差	7.53	14	0.54			
失拟项	2.37	10	0.24	0.18	0.986\ 2	
纯误差	5.16	4	1.29			
总差	136.41	28				

[†] “*”表示差异显著($P<0.05$);“**”表示差异极显著($P<0.01$); $R^2=0.944\ 8$; $R_{Adj}^2=0.889\ 5$ 。

通过回归分析,得到DPPH自由基清除率的回归方程:

$$Y_2=85.61+1.81A-2.7B-2.31C+1.17D+1.22AB+1.064C+0.382\ 5AD-0.192\ 5BC-0.22BD+1.96CD-4.81A^2-6.24B^2-3.52C^2-6.58D^2。 \quad (5)$$

由表5可知:回归模型的 P 值 $<0.000\ 1$,表明以DPPH自由基清除率建立的回归模型极其显著,同时模型的失拟项不显著($P=0.187\ 8>0.05$)。模型调整系数 $R_{Adj}^2=0.888\ 9$,表明模型的拟合度良好。从各系数项的 P 值可知,模型方程中的A、B、C、D、CD、 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 对DPPH

表5 DPPH自由基清除率回归分析结果[†]

Table 5 Results of regression analysis of DPPH free radical scavenging rate

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	744.31	14	53.17	17.01	$<0.000\ 1$	**
A	39.31	1	39.31	12.58	0.003\ 2	**
B	87.70	1	87.70	28.06	0.000\ 1	**
C	63.80	1	63.80	20.41	0.000\ 5	**
D	16.54	1	16.54	5.29	0.037\ 3	*
AB	5.98	1	5.98	1.91	0.188\ 3	
AC	4.54	1	4.54	1.45	0.248\ 3	
AD	0.59	1	0.59	0.19	0.671\ 8	
BC	0.15	1	0.15	0.05	0.830\ 8	
BD	0.19	1	0.19	0.06	0.807\ 1	
CD	15.37	1	15.37	4.92	0.043\ 7	*
A^2	149.88	1	149.88	47.95	$<0.000\ 1$	**
B^2	252.32	1	252.32	80.72	$<0.000\ 1$	**
C^2	80.51	1	80.51	25.76	0.000\ 2	**
D^2	281.11	1	281.11	89.94	$<0.000\ 1$	**
残差	43.76	14	3.13			
失拟项	37.87	10	3.79	2.57	0.187\ 8	
纯误差	5.89	4	1.47			
总差	788.07	28				

[†] “*”表示差异显著($P<0.05$);“**”表示差异极显著($P<0.01$); $R^2=0.944\ 5$; $R_{Adj}^2=0.888\ 9$ 。

自由基清除率均具有显著或极显著的影响。

2.3.3 因素交互作用分析 由图7可知,酶解温度与酶添加量、pH与酶添加量的等高线图接近椭圆,说明其交互作用强^[22],对水解度的影响也较为显著,此结果与表4的方差分析结果一致。

由图8可知,酶添加量和酶解时间的等高线图整体呈椭圆形,表明存在显著的交互作用。此结果与表5的方差分析结果一致。

2.3.4 最佳提取工艺分析与验证 根据回归方程的模型分析得知,在最优制备工艺下,蛋白肽的水解度和DPPH自由基清除率分别为21.55%和85.89%。胃蛋白酶最佳酶解工艺为酶解温度55.69℃,pH 1.41,酶添加量3 200 U/g,酶解时间5.16 h。验证实验($n=3$)结果显示水解度为 $(22.63\pm0.47)\%$,DPPH自由基清除率为 $(84.56\pm1.42)\%$ 。与模型预测值相比,误差不显著,表明利用响应面法优化得到的酶解条件是可行的。

2.4 金枪鱼肉蛋白肽清除DPPH自由基活性

如图9所示,质量浓度为1.0~8.0 mg/mL时,金枪鱼蛋白肽对DPPH自由基的清除能力服从线性分布($y=12.122x+30.452$, $R^2=0.981\ 5$)。由方程计算得出其半抑制质量浓度(IC_{50})为1.613 mg/mL;以 V_C 为阳性对照,发现

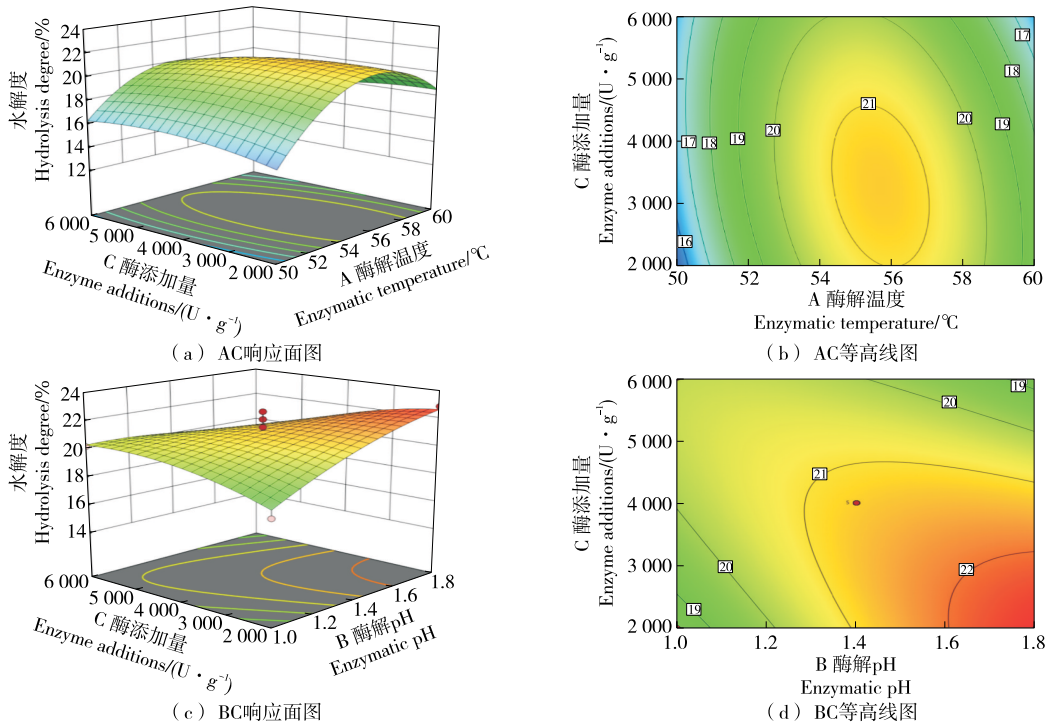


图 7 水解度各因素交互作用的响应面图和等高线图

Figure 7 Response surface plots and contour plots of the interaction of factors of hydrolysis degree

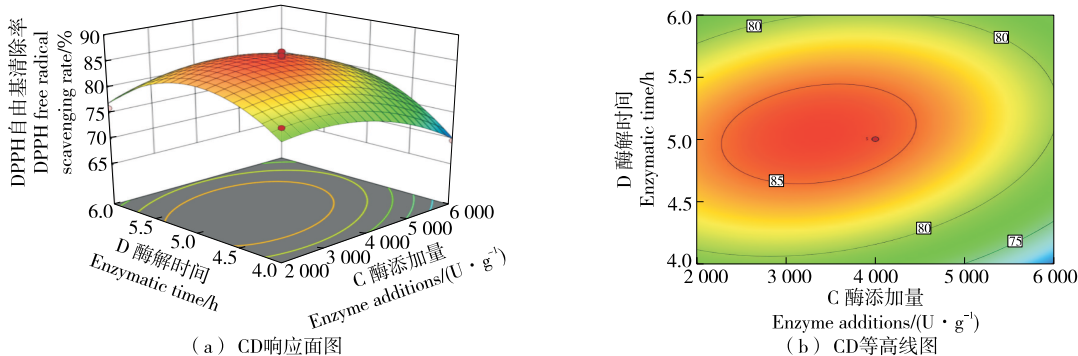


图 8 DPPH 自由基清除率各因素交互作用的响应面图和等高线图

Figure 8 Response surface plots and contour plots of the interaction of factors of DPPH free radical scavenging rate

蛋白肽的抗氧化性不及V_c,这可能是因为金枪鱼肉的水解产物是混合物,其中一些产物的抗氧化性较弱,存在的拮抗作用抑制了其活性。但一般DPPH自由基清除率IC₅₀<10 mg/mL时,即可认为有较好抗氧化性^[23]。因此,金枪鱼肉蛋白肽具有良好的DPPH自由基清除能力,优于张耀等^[24]制备的青鱼肉活性肽,其IC₅₀为9.52 mg/mL;同时,试验制备的蛋白肽对DPPH自由基的清除能力较马并喜等^[25]制备的鲤鱼肽的更好。

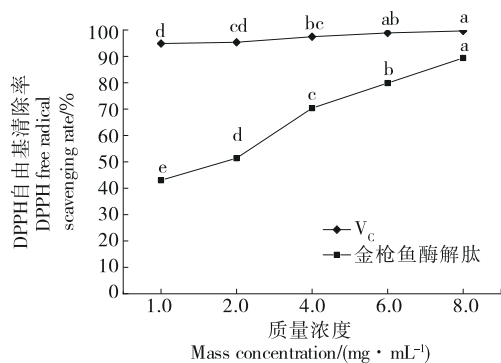
2.5 金枪鱼肉蛋白肽氨基酸组成

对金枪鱼暗色肉风味蛋白酶—胃蛋白酶蛋白肽中氨基酸组成进行分析,由表6可知:该蛋白肽中含有8种人体必需氨基酸,总含量达到了4.173 mg/g,占氨基酸总量

的39.60%;总氨基酸含量高达10.536 mg/g,其中谷氨酸、天冬氨酸等含量较高。此外,蛋白肽中还含有若干疏水性氨基酸,如色氨酸和苯丙氨酸等,疏水性氨基酸的总量占总氨基酸的35.13%。洪燕婷^[26]研究表明,疏水性氨基酸具有较强的抗氧化能力。因此,推测试验所制备的蛋白肽具有较强的抗氧化能力。

2.6 金枪鱼肉蛋白肽相对分子质量分布

由表7可知,风味蛋白酶—胃蛋白酶蛋白肽相对分子质量分布主要集中在3 000以下,约占总体的63.86%,构成了蛋白肽的主要组成部分,这与Ren等^[27]的研究结论相符。相对分子质量为1 000~<3 000的肽段占比约为31.69%;相对分子质量<1 000的寡肽,占比约为32.17%。



字母不同表示有显著性差异 ($P < 0.05$)

图9 不同浓度样品的DPPH自由基清除率

Figure 9 DPPH radical scavenging of samples at different concentrations

表6 风味蛋白酶—胃蛋白酶蛋白肽的氨基酸组成及含量[†]

Table 6 Amino acid composition and content of flavor protease pepsin protein peptide

种类	含量/(mg · g ⁻¹)	种类	含量/(mg · g ⁻¹)
脯氨酸 [#]	0.158	甲硫氨酸 ^{**}	0.208
天冬氨酸	1.040	异亮氨酸 ^{**}	0.544
苏氨酸 [*]	0.515	亮氨酸 ^{**}	0.862
丝氨酸	0.461	酪氨酸	0.372
谷氨酸	1.587	苯丙氨酸 ^{**}	0.439
甘氨酸	0.475	组氨酸	0.675
丙氨酸 [#]	0.673	色氨酸 [*]	0.058
半胱氨酸	0.063	赖氨酸 [*]	0.953
缬氨酸 ^{**}	0.594	精氨酸	0.675

[†] “*”表示人体必需氨基酸;“#”表示疏水性氨基酸。

表7 风味蛋白酶—胃蛋白酶蛋白肽的相对分子质量分布

Table 7 Relative molecular mass distribution of flavor protease pepsin protein peptide

相对分子质量	峰面积比例/%
≥10 000	5.30
5 000~<10 000	18.52
3 000~<5 000	12.31
1 000~<3 000	31.69
500~<1 000	8.81
<500	23.36

研究^[28]表明,相对分子质量越小,抗氧化活性越高,更易被人体吸收。

3 结论

双酶分步酶解黄鳍金枪鱼暗色肉制备抗氧化肽的最优工艺为:一步酶解采用风味蛋白酶,酶解温度 50 ℃,

pH 7.0,酶添加量 6 000 U/g,酶解时间 4 h;二步酶解采用胃蛋白酶,酶解温度 55.69 ℃,pH 1.41,酶添加量 3 200 U/g,酶解时间 5.16 h。此条件下,蛋白肽的水解度为 21.55%,对 DPPH 自由基的清除率为 85.89%。黄鳍金枪鱼暗色肉风味蛋白酶—胃蛋白酶蛋白肽对 DPPH 自由基的半抑制质量浓度为 1.613 mg/mL;此外,在该蛋白肽中共检出了 18 种氨基酸(包括 8 种必需氨基酸),其中必需氨基酸占 39.60%,疏水性氨基酸占 35.13%;相对分子质量主要分布在 3 000 以下,约占 63.86%。综上所述,通过金枪鱼暗色肉制备的蛋白肽具有较好的抗氧化活性、相对分子质量较小且具有一定的营养价值。

参考文献

- [1] 罗殷,王锡昌,刘源.黄鳍金枪鱼食用品质的研究[J].食品科学,2008,29(9):476-480.
LUO Y, WANG X C, LIU Y. Study on edible quality of yellowfin (tunathunnus albacares) dorsal meat[J]. Food Science, 2008, 29(9): 476-480.
- [2] 许丹,朱剑,严忠雍,等.加工方式对金枪鱼鱼糜制品氨基酸组成和营养价值影响研究[J].中国调味品,2020,45(11):74-80.
XU D, ZHU J, YAN Z Y, et al. Amino acid composition and nutritional value of tuna surimi products prepared by different processing methods[J]. China Condiment, 2020, 45(11): 74-80.
- [3] BABINI E, TAGLIAZUCCHI D, MARTINI S, et al. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins[J]. Food Chemistry, 2017, 228: 186-196.
- [4] HARNEDY P A, FITZGERALD R J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 6-24.
- [5] 黄明,王璐莎.动物蛋白源抗氧化肽的研究进展[J].中国农业科学,2013,46(22):4763-4773.
HUANG M, WANG L S. A review of the antioxidant peptides derived from animal protein[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(22): 4763-4773.
- [6] 董倍余,张敏娟,黄晓霞,等.优化鲫鱼多肽提取工艺及其抗氧化能力的研究[J].广州化工,2020,48(23):72-75.
DONG B Y, ZHANG M J, HUANG X X, et al. Study on optimization of extraction technology and antioxidant capacity of crucian polypeptide[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2020, 48(23): 72-75.
- [7] 贺江,赵自龙,彭磊,等.草鱼鱼鳞胶原蛋白提取及活性肽制备研究[J].食品研究与开发,2017,38(5):52-55.
HE J, ZHAO Z L, PENG L, et al. Extraction of collagen from fish scale of grass carp and preparation of bioactive peptide[J]. Food Research and Development, 2017, 38(5): 52-55.
- [8] 韩梦瑶,李新月,王晓梅,等.大口黑鲈鱼皮胶原蛋白肽的制备及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2022,38(4):175-182,194.
HAN M Y, LI X Y, WANG X M, et al. Study on preparation of

- collagen peptides from *Micropterus salmoides* skin and its antioxidant activity[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(4): 175-182, 194.
- [9] 赵阔, 罗山, 王涛, 等. 双酶法水解罗非鱼下脚料制备降血糖肽的工艺研究[J]. *农产品加工(上半月)*, 2021(1): 31-34.
ZHAO K, LUO S, WANG T, et al. Study on preparation of hypoglycemic peptide from tilapia leftovers by double enzyme hydrolysis[J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2021(1): 31-34.
- [10] 卢素珍, 涂宗财, 王辉, 等. 二步酶解法制备鱼鳞明胶抗氧化肽及其抗氧化活性研究[J]. *食品与机械*, 2019, 35(5): 160-166.
LU S Z, TU Z C, WANG H, et al. Preparation of antioxidant peptides by Two-Step enzymatic hydrolysis of fish scale gelatin [J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(5): 160-166.
- [11] 辛建美. 酶解金枪鱼碎肉制备活性肽及其分离的研究[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2011: 3-5.
XIN J M. Enzyme hydrolysis of tuna meat for preparation and isolation of active peptide[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2011: 3-5.
- [12] 王佳莉. 蛋白酶水解金枪鱼副产物的工艺研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011: 13-14.
WANG J L. Study on enzymatic hydrolysis technology of tuna by-products[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011: 13-14.
- [13] HSU K C. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(1): 42-48.
- [14] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642-646.
- [15] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28(1): 25-30.
- [16] SINTHUSAMRAN S, BENJAKUL S, KISHIMURA H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions[J]. *Food Chemistry*, 2014, 152: 276-284.
- [17] 李军, 罗娟, 涂宗财, 等. 鲢鱼骨胶原多肽的制备及其抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(2): 222-230.
LI J, LUO J, TU Z C, et al. Study on the preparation and antioxidant activity of collagen polypeptide from silver carp bone[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(2): 222-230.
- [18] 王文, 黄继红, 杨铭乾, 等. 玉米胚芽蛋白水解物的制备及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业*, 2016, 37(6): 47-52.
WANG W, HUANG J H, YANG M Q, et al. Study on preparation and antioxidant activity of hydrolysate from corn germ protein[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(6): 47-52.
- [19] 白云. 鱼蛋白酶水解工艺条件优化及产物功能性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2016: 17-18.
BAI Y. Optimization of fish protein hydrolysis process and function properties of the hydrolysates[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2016: 17-18.
- [20] 邓宇, 曹文红, 陈忠琴, 等. 白贝肉酶解工艺的优化及其产物呈味特性研究[J]. *中国调味品*, 2023, 48(3): 11-17.
DENG Y, CAO W H, CHEN Z Q, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of *monetaria moneta* and flavor characteristics of its products[J]. *China Condiment*, 2023, 48(3): 11-17.
- [21] 王梦娟, 王灵昭, 顾涵, 等. 南极磷虾自溶物深度酶解产物鲜味研究[J]. *中国调味品*, 2023, 48(1): 75-79.
WANG M J, WANG L Z, GU H, et al. Study on umami of deep enzymatic hydrolysates of Antarctic krill autolysates[J]. *China Condiment*, 2023, 48(1): 75-79.
- [22] 李泽林, 王秋婷, 郭其洪, 等. 鸡骨液酶解工艺优化及其酶解前后风味物质分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(10): 206-215.
LI Z L, WANG Q T, GUO Q H, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of chicken bone homogenate and its flavor components analysis before and after enzymatic hydrolysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(10): 206-215.
- [23] 郑义, 邵颖, 陈安徽, 等. 益智仁总黄酮超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2014, 35(6): 44-49.
ZHENG Y, SHAO Y, CHEN A H, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activities of total flavonoids from *Alpinia oxyphylla* fruits[J]. *Food Science*, 2014, 35(6): 44-49.
- [24] 张耀, 张露, 刘俊, 等. 青鱼肉活性肽的制备及其抗肿瘤活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(5): 35-42.
ZHANG Y, ZHANG L, LIU J, et al. Preparation and antitumor activity of peptides from *Mylopharyngodon piceus* muscle[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(5): 35-42.
- [25] 马井喜, 孙永杰, 冯印, 等. 鲤鱼肽的酶法制备工艺及其抗氧化性[J]. *食品科学*, 2013, 34(1): 225-229.
MA J X, SUN Y J, FENG Y, et al. Enzymatic preparation of bioactive peptides from carp meat and their antioxidant activity [J]. *Food Science*, 2013, 34(1): 225-229.
- [26] 洪燕婷. 酶解海鲈鱼鳞制备抗氧化肽的工艺研究和性质鉴定[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(10): 29-37.
HONG Y T. Process research and characteristic determination of antioxidant peptides from sea bass scales by enzymatic hydrolysis[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(10): 29-37.
- [27] REN J Y, ZHAO M M, SHI J, et al. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41(9): 1 624-1 632.
- [28] 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 J F, REN T T, ZHU B W. 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.