

大西洋鳕鱼皮多肽体外抗氧化活性研究

阎洁¹, 沈楚仪², 李彤¹, 徐大海¹, 邹舒舒¹, 杨最素^{1*}

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江舟山 316000; 2. 浙江海洋大学东海科学技术学院, 浙江舟山 316000)

摘要 [目的]探讨大西洋鳕鱼皮多肽的体外抗氧化活性。[方法]选择胰蛋白酶酶解鳕鱼皮, 分别以氨基氮滴定法和 DPPH 自由基清除率作为筛选指标, 通过正交试验, 筛选出酶解的最优条件; 将超滤液分成 5 段, 分别进行 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基及亚铁离子螯合能力的体外抗氧化活性。[结果]胰蛋白酶酶解大西洋鳕鱼皮的最优条件为料液比 1:1, 加酶量 2 500 U/g、酶解时间 4 h、温度 45 °C、pH 9.0。当分子量小于 5 kD 时, DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和 Fe²⁺ 离子螯合能力最强。[结论]经胰蛋白酶酶解, 获得的大西洋鳕鱼皮多肽存在较好的抗氧化活性。

关键词 鳕鱼皮; 多肽; 胰蛋白酶; 抗氧化**中图分类号** TS254 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)23-0144-04**Study on Antioxidant Activity of Atlantic Codfish Skin Polypeptides *in vitro***YAN Jie¹, SHEN Chu-yi², LI Tong¹ et al (1. College of Food and Medicine, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316000; 2. Donghai Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316000)

Abstract [Objective] The research aimed to discuss the antioxidant activity of Atlantic codfish skin polypeptides *in vitro*. [Method] The enzymatic codfish skin was selected by trypsin, amino nitrogen titration method and DPPH free radical scavenging rate were used as screening indicators. The optimum conditions for enzymolysis were screened by orthogonal test. The ultrafiltrate was divided into 5 segments and the antioxidant activities *in vitro* of DPPH free radical scavenging rate, ABTS free radical force and ferrous ion chelating ability were performed. [Result] The optimal conditions for trypsin enzymatic hydrolysis of Atlantic codfish skin were: solid-liquid ratio 1:1, enzyme dosage 2 500 U/g, hydrolysis time 4 h, temperature 45 °C, and pH 9. When the molecular weight was less than 5 kD, DPPH radical scavenging ability, ABTS radical scavenging ability, and Fe²⁺ ion chelating ability were the strongest. [Conclusion] After trypsin digestion, the obtained Atlantic codfish skin polypeptides has better antioxidant activity.

Key words Codfish skin; Polypeptides; Trypsin; Antioxidant

鳕鱼是全球年捕捞量最大的鱼类之一, 有重要的食用和经济价值, 主要分为大西洋鳕鱼、格陵兰鳕鱼和太平洋鳕鱼。在我国, 鳕鱼主要分布于黄海和东海北部, 鳕鱼皮中富含的蛋白质最高可达总量的 80% 以上, 若能对其充分利用, 不但可以提高鱼类加工的附加值, 而且可以减少海洋资源的浪费以及环境的污染, 获得良好的经济效益与社会效益, 对促进鱼类产品加工业的发展具有重要意义^[1-2]。目前鱼类胶原蛋白在工业生产中所占的比例较小, 相比于牛、猪等陆生动物的胶原蛋白, 鱼类胶原蛋白更容易酶解, 且抗原性和过敏性也较低, 这些理化性质比陆生动物胶原蛋白更具有明显的优势。我国鳕鱼皮资源丰富, 而国内外对鳕鱼皮的关注度不高, 对鳕鱼皮胶原蛋白肽的功能特性和抗氧化活性的研究比较少。鳕鱼皮为加工副产品, 约占加工量的 7%~8%。鱼皮中的干物质有 50% 以上为胶原蛋白, 因此鳕鱼皮可作为一种新型的、富有优势的胶原蛋白资源^[3-6]。该试验旨在研究大西洋鳕鱼皮蛋白多肽的功能特性和抗氧化活性, 为其在食品、化妆品等相关领域的开发和应用提供依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 大西洋鳕鱼皮购自舟山市水产品企业; 胰蛋白酶购于北京亚太恒信生物有限公司; DPPH、乙醇、邻二氮菲、硫酸亚铁、H₂O₂、ABTS、氯化亚铁、EDTA 均购自国药集

团化学试剂有限公司。

1.2 试验仪器 U2800 紫外分光光度计, 上海光谱仪器公司; CR21G 低温高速离心机, 日本日立公司; HWS12 电热恒温水浴锅, 上海一恒仪器有限公司; Cogent u Scale 超滤系统, 美国密理博公司; DS-1 高速组织搅拌机, 上海标本模型厂。

1.3 试验方法

1.3.1 鳕鱼皮的预处理。将干大西洋鳕鱼皮清水浸泡 2 h, 去鱼鳞、去碎肉后清洗干净, 剪碎成 3 cm×3 cm 的小方块, 用 20 倍鱼皮质量的 0.1 mol/L 的 NaOH 浸泡鱼皮以脱去杂蛋白, 浸泡 12 h 后, 反复冲洗至中性, 沥干, 组织搅拌机 15 000 r/min 搅碎 15 min 匀浆至糊状。处理后的样品于低温储存备用。

1.3.2 酶解液的制备。将匀浆好的鳕鱼皮取 10 g, 调解料液比, 按照设定的条件加入适量的胰蛋白酶进行酶解。酶解结束在 100 °C 水浴下灭活 10 min, 冷却至室温后, 在低温高速离心机中以 9 000 r/min 的转速离心 10 min, 收上清液备用。

1.3.3 酶解工艺优化。筛选工艺的标准是分别以游离氨基氮含量和 DPPH 自由基清除率, 考察料液比(A)、加酶量(B)、酶解时间(C)、酶解温度(D)、E(pH)这 5 个因素对胰蛋白酶酶解制备鳕鱼皮的抗氧化肽产生的影响。通过设计正交试验确定大西洋鳕鱼皮抗氧化肽提取的最佳工艺条件。L₁₆(4⁵) 正交试验设计因素和水平见表 1。

1.3.3.1 电位滴定法测定游离氨基氮。根据文献[7]进行游离氨基氮的测量。取 10 mL 的酶解液置于烧杯中, 加 60 mL 的蒸馏水, 磁力搅拌后用 0.05 mol/L NaOH 溶液滴定至 pH 为 8.2, 加入 10 mL 的甲醛混合均匀, 再次用相同浓度的 NaOH 溶

基金项目 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2016R411001)。
作者简介 阎洁(1994—), 女, 山西安泽人, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全。*通讯作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事海洋生物活性物质的提取与功能研究。

收稿日期 2018-03-27

液继续滴定至 pH=9.2(记下消耗 NaOH 标准的毫升数 V_1),同时取 70 mL 的蒸馏水做试剂空白试验(V_2)。按下列公式计算游离氨基氮含量,游离氨基氮含量与水解度呈正相关。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factor and level of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor				
	A(料液比) Solid-liquid ratio	B(加酶量) Enzyme dosage//U/g	C(酶解时间) Hydrolysis time//h	D(酶解温度) Hydrolysis temperature °C	E (pH)
1	1:1	1 000	4	40	6
2	1:2	1 500	5	45	7
3	1:3	2 000	6	50	8
4	1:4	2 500	7	55	9

$$X = (V_1 - V_2) \times C \times 0.014 \times 1\,000 / (5 \times V) \quad (1)$$

式中, X 为样品中游离氨基氮的含量(g/L); V_1 为测定用样品加入甲醛稀释后消耗的 NaOH 标准液(mL); V_2 为空白试验加入甲醛稀释后消耗 NaOH 标准溶液的体积(mL); V 为样品取用量(mL); C 为 NaOH 标准溶液的浓度(mol/L);0.014 为氮的毫摩尔质量(g/mmol)。

1.3.3.2 DPPH 自由基清除能力。根据文献[8]进行 DPPH 的测量。0.3 mL 样品和 2.7 mL 质量浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液混合并剧烈振荡 2 min,再将其放置于黑暗中 1 h,于 517 nm 处测吸光度。以 A_s 为阳性对照。DPPH 自由基清除率按以下公式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [(A_s - A_i) / A_s] \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_s 为 DPPH 溶液的吸光度, A_i 为加入样品或抗坏血酸后的吸光度。

1.3.4 酶解液的超滤与分离。将大批量最优条件下的灭活、离心后的酶解液进行抽滤。除去酶解液中所含的固体杂质,使固液分离。然后将酶解液的粗提液进行超滤分段,分

别过 30、10、8.5 kD 膜,将得到 5 个组分,依次为 >30 kD(MD-I)、>10~30 kD(MD-II)、>8~10 kD(MD-III)、>5~8 kD(MD-IV)、≤5 kD(MD-V)。分别称量 15.0、10.0、5.0、2.5、1.0 mg/mL 的 MD-I、MD-II、MD-III、MD-IV、MD-V 和 MD 粗体物进行 DPPH 清除能力的测定,ABTS 自由基清除试验及亚铁离子螯合能力测定。

1.3.5 抗氧化活性分析。

1.3.5.1 DPPH 自由基清除能力。不同浓度的样品多肽对 DPPH 自由基的清除能力测定参照“1.3.3.2”方法。

1.3.5.2 ABTS 自由基清除能力。首先将 ABTS 溶于过硫酸钾溶液(2.45 mmol/L)中使浓度达到 7 mmol/L,在暗室静放 16 h 后,用 PBS 缓冲溶液稀释,当吸光度在 734 nm 下检测值为 0.70 ± 0.02 ,该值为 A_c 。1 mL ABTS 稀释液与 1 mL 样品充分混合,10 min 后在 734 nm 紫外光下检测,检测值为 A_s 。按下列公式计算 ABTS 自由基的清除率:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = (A_c - A_s) / A_c \times 100\% \quad (3)$$

1.3.5.3 Fe^{2+} 螯合能力测定。将 100 μL 不同浓度的样品溶液加入微量离心管中,依次加入 135 μL 的去离子水和 5 μL 2 mmol/L 的氯化亚铁溶液,充分混匀,3 min 后加入 10 μL 5 mmol/L 的菲咯嗪,剧烈振荡后,在室温下静置 10 min。反应后的溶液在 562 nm 处测其吸光度 A_s 。以去离子水作为空白对照测其吸光度 A_c ,EDTA 代替样品作为阳性对照。抗氧化肽与 EDTA 的 Fe^{2+} 螯合能力计算公式如下:

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 螯合能力} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100\% \quad (4)$$

2 结果与分析

2.1 最佳酶解工艺的确定

2.1.1 以游离氨基氮含量为指标。以游离氨基氮含量为指标,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验确定鲑鱼皮多肽胰蛋白酶解的最佳条件见表 2。对表 2 正交试验结果进行极差分析,结果显

表 2 游离氨基氮含量正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of free amino nitrogen content

序号 No.	因素 Factor					游离氨基氮含量 Free amino nitrogen content//g/L
	A(料液比) Solid-liquid ratio	B(加酶量) Enzyme dosage//U/g	C(酶解时间) Hydrolysis time//h	D(酶解温度) Hydrolysis temperature//°C	E(pH)	
1	1:1	1 000	4	40	6	0.022 4
2	1:1	1 500	5	45	7	0.036 9
3	1:1	2 000	6	50	8	0.025 2
4	1:1	2 500	7	55	9	0.064 4
5	1:2	1 000	5	50	9	0.033 6
6	1:2	1 500	4	55	8	0.050 4
7	1:2	2 000	7	40	7	0.018 2
8	1:2	2 500	6	45	6	0.074 6
9	1:3	1 000	6	55	7	0.011 2
10	1:3	1 500	7	50	6	0.015 4
11	1:3	2 000	4	45	9	0.027 1
12	1:3	2 500	5	40	8	0.008 4
13	1:4	1 000	7	45	8	0.013 1
14	1:4	1 500	6	40	9	0.005 6
15	1:4	2 000	5	55	6	0.008 4
16	1:4	2 500	4	50	7	0.039 2
k_1	0.004	0.002	0.003	0.001	0.003	
k_2	0.004	0.003	0.002	0.004	0.002	
k_3	0.002	0.002	0.002	0.003	0.002	
k_4	0.002	0.005	0.001	0.003	0.003	
R	0.002	0.003	0.001	0.003	0.001	

示,影响胰蛋白酶酶解物得率的各因素排序为: $B=D>A>C=E$,即加酶量和酶解温度的影响最大,酶解时间和 pH 的影响最小;其最佳酶解条件为一 $A_1B_4C_1D_2E_4$,即料液比为 1:1,加酶量为 2 500 U/g,酶解时间为 4 h,酶解温度为 45 °C, pH 为 9。

2.1.2 以 DPPH 自由基清除率为指标。以 DPPH 自由基清除率为指标,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验确定鳕鱼皮多肽胰蛋白酶解的最佳条件见表 3。对表 3 正交试验结果进行极差分

析,结果显示,影响胰蛋白酶酶解物得率的各因素排序从大到小依次为 A、B、D、C、E,即料液比的影响最大, pH 的影响最小;其最佳酶解条件为 $A_1B_2C_1D_1E_1$,即料液比为 1:1,加酶量为 1 500 U/g,酶解时间 4 h,酶解温度为 40 °C, pH 为 6。

综合分析以上 2 种方法,认为最优酶解条件为 $A_1B_4C_1D_2E_4$,即料液比为 1:1,加酶量为 2 500 U/g,酶解时间为 4 h,酶解温度为 45 °C, pH 为 9。然后在该条件下按“1.3.1”方法大量提取得到大西洋鳕鱼皮多肽的粗提物。

表 3 DPPH 自由基清除指标正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results of DPPH radical scavenging index

序号 No.	因素 Factor					DPPH 清除率 DPPH clearance rate//g/L
	A (料液比) Solid-liquid ratio	B(加酶量) Enzyme dosage//U/g	C(酶解时间) Hydrolysis time//h	D(酶解温度) Hydrolysis temperature//°C	E(pH)	
1	1:1	1 000	4	40	6	23.06
2	1:1	1 500	5	45	7	25.35
3	1:1	2 000	6	50	8	22.45
4	1:1	2 500	7	55	9	18.16
5	1:2	1 000	5	50	9	11.43
6	1:2	1 500	4	55	8	18.78
7	1:2	2 000	7	40	7	18.78
8	1:2	2 500	6	45	6	20.00
9	1:3	1 000	6	55	7	13.47
10	1:3	1 500	7	50	6	21.63
11	1:3	2 000	4	45	9	20.82
12	1:3	2 500	5	40	8	17.35
13	1:4	1 000	7	45	8	10.00
14	1:4	1 500	6	40	9	18.37
15	1:4	2 000	5	55	6	7.35
16	1:4	2 500	4	50	7	12.86
k_1	22.255	14.490	18.880	19.390	18.010	
k_2	17.248	21.033	15.370	19.043	17.615	
k_3	18.318	17.350	18.573	17.092	17.145	
k_4	12.145	17.093	17.142	14.440	17.195	
R	10.110	6.543	3.510	4.950	0.865	

2.2 多肽对 DPPH 自由基的清除能力 经超滤得到的 5 个组分,依次命名为 MD-I、MD-II、MD-III、MD-IV、MD-V,配制浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0 和 15.0 mg/mL 浓度组,分别测定其 DPPH 自由基清除率,并以抗坏血酸(V_c)为对照组。从图 1 可看出,随着浓度增加,活性肽 MD-I、MD-II、MD-III、MD-IV、MD-V 对 DPPH 自由基的清除能力也随之增加,即两者之间具有量效关系,但随着分子段的减少,对 DPPH 自由基的清除能力也随之增加。而与同浓度的抗坏血酸相比,活性比较低。其中,MD-V(分子段 ≤ 5 kD)的 DPPH 清除能力较强,在浓度 15 mg/mL 时其清除能力最强,为 75.23%。

2.3 多肽对 ABTS 自由基的清除能力 不同浓度和不同分子段活性肽对 ABTS 的清除能力结果见图 2。随着浓度增加,活性肽 MD-I、MD-II、MD-III、MD-IV、MD-V 对 ABTS 的清除能力也随之增加,具有量效关系,但与同浓度的抗坏血酸相比,活性较低。其中 MD-V(分子段 ≤ 5 kD)活性最强,

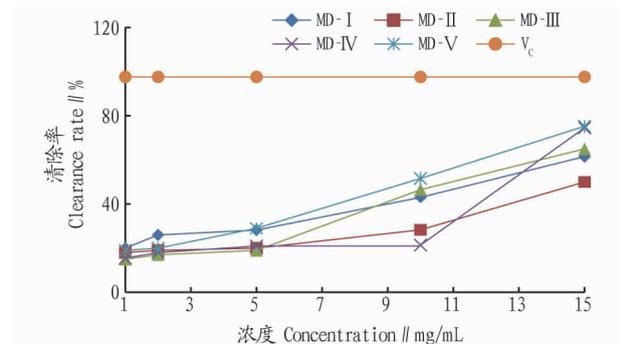


图 1 不同浓度和分子段多肽对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 1 The scavenging ability of DPPH free radicals by peptides of different concentrations and molecular weights

在浓度为 15 mg/mL 时清除能力最高,达到 99.50%。

2.4 多肽对 Fe^{2+} 螯合能力测定 从图 3 可看出,随着浓度增加,活性肽 MD-I、MD-II、MD-III、MD-IV、MD-V 对 Fe^{2+} 螯

合能力也随之增加,具有量效关系,但与同浓度的 EDTA 相比,活性较低。其中 MD-V (分子段 ≤ 5 kD) 活性最强,在浓度为 10 mg/mL 时整合能力最高,达到 77.83%。

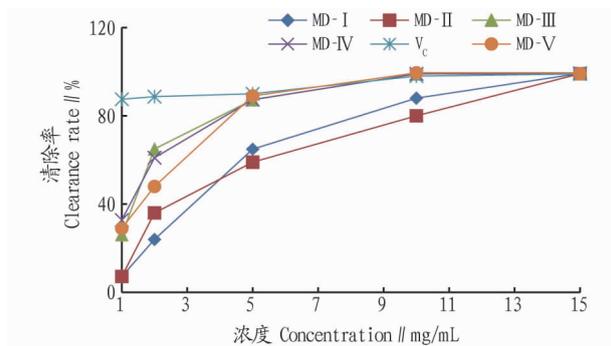


图2 不同浓度和分子段多肽对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 2 The scavenging ability of ABTS free radicals by peptides of different concentrations and molecular weights

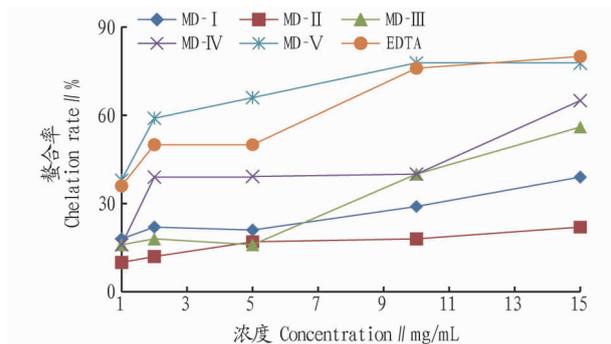


图3 不同浓度和分子段多肽对 Fe²⁺ 的螯合能力

Fig. 3 The chelation ability of Fe²⁺ by peptides of different concentrations and molecular weights

3 结论

该试验用胰蛋白酶提取大西洋鲑鱼皮多肽,采用了 L₁₆(4⁵) 正交试验,分别以游离氨基氮含量和 DPPH 自由基清除率为筛选指标,综合考虑后,确定的最佳条件为料液比为 1:1,加酶量为 2 500 U/g,酶解时间为 4 h,酶解温度为 45 ℃,pH 为 9,在此条件下,鲑鱼皮多肽具有最高的提取率。

将酶解液超滤后获得 5 个分子段,依次为分子量 >30 kD (MD-I)、>10~30 kD (MD-II)、>8~10 kD (MD-III)、>5~8 kD (MD-IV)、 ≤ 5 kD (MD-V),经抗氧化试验,发现随着酶解液浓度的增加,分子量的减少,当分子量 ≤ 5 kD 时对 DPPH 自由基清除、ABTS 自由基清除力增加,但比同浓度的 V_c 低;对 Fe²⁺ 螯合能力测定结果表明,分子量 ≤ 5 kD 时活性最强,但较同浓度的 EDTA 相近,其余组活性偏低。因此认为经胰蛋白酶提取的大西洋鲑鱼皮多肽具有较好的抗氧化活性,这将为鲑鱼皮的功能产品研发提供试验依据,有望开发保健品等。

参考文献

- [1] 吴缙,陈舜胜. 鱼皮胶原蛋白的制备及性能研究进展[J]. 内陆水产, 2008,33(9):34-37.
- [2] 傅燕凤,沈月新. 浅谈鱼皮胶原蛋白的利用[J]. 食品研究与开发, 2004,25(2):16-18.
- [3] 赵海英,梁程超,缪锦来,等. 鲑鱼皮胶原蛋白的制备及其成分分析[J]. 中国海洋药物, 2005,24(5):30-32.
- [4] 陈洁,胡晓赞. 蛋白水解物的抗氧化性研究与展望[J]. 中国食品学报, 2011,11(9):111-119.
- [5] 刘春娥,刘峰,李刚杰,等. 鲑鱼皮胶原蛋白酶解液的制备及抗氧化研究[J]. 安徽农业科学, 2011,39(34):21328,21344.
- [6] 沈楚仪,杨素. 鲑鱼皮胶原蛋白肽的制备与活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018,46(1):16-17,51.
- [7] 张桂和,赵谋明,巫光宏. 方格星虫酶解物成分分析及其抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2007,26(3):80-84.
- [8] 肖月娟,李润丰,郑立红,等. 斑鲮鱼蛋白控制酶解及其酶解物抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2010,10(5):91-97.

(上接第 143 页)

- [9] 屈慧鹤. 小麦谷朊蛋白对霞多丽葡萄酒澄清效果的研究[J]. 食品科学, 2008,29(11):210-212.
- [10] 阿衣满古力·哈力哈拜,朱璇,热合满·艾拉. 果胶酶澄清和田红葡萄酒工艺研究[J]. 新疆农业科学, 2010,47(6):1102-1106.
- [11] MAGRO L D,HERTZ P F,FERNANDEZ-LAFUENTE R,et al. Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases:A potential biocatalyst for grape juice clarification[J]. RSC Advances, 2016,32(6):27242-27251.
- [12] NADAROGU H,ADIGUZEL G,ADIGUZEL A,et al. A thermostable-endo- β -(1,4)-mannanase from *Pediococcus acidilactici* (M17): Purification, characterization and its application in fruit juice clarification[J]. European food research and technology, 2017,243(2):193-201.

- [13] APONSO M,MARAPANA U,MANAWADUGE R. Process optimization of pectinase enzyme aided clarification of Israel blue (*Vitis vinifera* L.) grape juice[J]. European journal of academic essays, 2017,4(4):165-174.
- [14] DIBLAN S,TURKYILMAZ M,OZKAN M. Effects of various clarification agents on the anthocyanins and color of red grape juice from Kalecik Karasi grapes (*Vitis vinifera* L.) [J]. Food processing and technology, 2015,6(8):104-108.
- [15] CAC. Codexgeneral standard for fruit juices and nectars: Codex Stan 247—2005[S]. CAC, 2005.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中多元素的测定:GB 5009.268—2016[S]. 北京:中国标准出版社, 2016:1-5.

科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如 1990 年不能写成 90 年,文中避免出现“去年”“今年”等写法。小于 1 的小数点前的零不能省略,如 0.245 6 不能写成 .245 6。小数点前或后超过 4 位数(含 4 位数),从小数点向左右每 3 位空半格,不用“,”隔开。如 18 072. 235 71。尾数多的数字(5 位以上)和小数点后位数多的小数,宜采用 $\times 10^n$ (n 为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。