

金枪鱼蒸煮液蛋白质的酶解及抗氧化活性研究

陈奕名, 张转圆, 蔡秀娟, 吕 钊, 周家哲, 李银平

青岛科技大学海洋科学与生物工程学院, 山东 青岛

收稿日期: 2023年5月25日; 录用日期: 2023年6月15日; 发布日期: 2023年6月28日

摘 要

利用碱性蛋白酶对提取的金枪鱼蒸煮液蛋白进行酶解, 以酶解度为指标, 通过响应面法优化酶解条件并对制备的生物活性肽进行抗氧化活性研究。实验结果表明最优酶解条件为料液比1:15, 加酶量3%, 酶解温度50°C, 酶解时间6 h, 酶解度为(24.63 ± 0.29)%。通过超滤对最优酶解条件下制备的多肽溶液进行分级, 探究不同组分的抗氧化活性。结果表明, <1 kDa的组分具有最高的抗氧化活性, 特别是对于DPPH自由基和羟自由基具有较高的清除能力。

关键词

金枪鱼蒸煮液, 酶解, 多肽, 抗氧化活性

Study on Enzymatic Hydrolysis and Antioxidant Activity of Tuna Cooking Solution Protein

Yiming Chen, Zhuanyuan Zhang, Xiujuan Cai, Yue Lv, Jiazhe Zhou, Yinping Li

College of Marine Science and Bioengineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao Shandong

Received: May 25th, 2023; accepted: Jun. 15th, 2023; published: Jun. 28th, 2023

Abstract

The alkaline protease was used to hydrolyze the extracted tuna cooking liquid protein. The enzymatic hydrolysis conditions were optimized by response surface method with the degree of enzymatic hydrolysis as the index. The antioxidant activity of the prepared bioactive peptides was studied. The results showed that the optimum conditions for enzymatic hydrolysis was 50°C, the time of enzymatic hydrolysis was 6 hours, and the degree of enzymatic hydrolysis was 24.63%. The polypeptide solution was prepared under the optimal enzymolysis conditions,

文章引用: 陈奕名, 张转圆, 蔡秀娟, 吕钊, 周家哲, 李银平. 金枪鱼蒸煮液蛋白质的酶解及抗氧化活性研究[J]. 水产研究, 2023, 10(2): 63-76. DOI: 10.12677/ojfr.2023.102008

and then ultrafiltration fractionation was performed to study the antioxidant activity of different components. The results showed that the components with < 1 kDa had the highest antioxidant activity, especially for DPPH free radicals and hydroxyl free radicals.

Keywords

Tuna Cooking Liquid, Enzymatic Hydrolysis, Polypeptide, Antioxidant Activity

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

金枪鱼(Tunas)属硬骨形目, 鲭科动物, 别名为吞拿鱼, 活跃于上层大海洋。金枪鱼肉属红色肉, 高蛋白、低脂肪, 富含 ω -3 脂肪酸, 氨基酸(尤其蛋氨酸、胱氨酸)、维生素(Va、Vd 等)、矿物质(Fe、Zn 等)等, 营养价值较高[1]。金枪鱼作为是世界上公认的高端经济深海鱼类, 主要被加工为生鱼片和各类罐藏食品, 在其被加工成食品的过程中会产生大量的副产物[2]。其中, 在利用金枪鱼肉工鱼罐头和鱼柳时, 会产生大量含有风味物质和营养成分的蒸煮液, 极具开发价值。

目前对于金枪鱼蒸煮液大多是直接酶解, 陈启航等[3]以金枪鱼蒸煮液作为原料, 先通过单因素实验考察水解度受到的影响, 再利用响应面优化酶解工艺条件, 最后采取正交法确定最适的杀菌条件。结果表明, 研制出的金枪鱼调味汁中氨基酸态氮含量可达 0.68 g/100mL。鲍伟等[4]通过采用电子鼻和 HPLC 等方法, 发现金枪鱼蒸煮液的添加可以有效提高猪肉的气味和滋味。何键东等[5]为了确定提取金枪鱼鱼油的最佳酶解工艺条件, 以金枪鱼蒸煮液作为原料, 以鱼油提取率为考察指标, 先使用胰蛋白酶对蒸煮液蛋白进行水解, 再采用响应面分析方法确定了最佳酶解工艺条件。李可欣等[6]先分析测定了金枪鱼蒸煮液的营养成分和抗氧化活性, 接着通过对不同脱腥方法的比较分析确定了最佳脱腥工艺, 最后创新性的制备了金枪鱼风味的沙拉酱。从已有的报道可以看出目前对金枪鱼蒸煮液的综合利用水平较低, 企业很少对这些副产物进行高效利用, 有的企业将其浓缩后售卖, 甚至丢弃, 这直接影响了金枪鱼的加工利用率[7]。关平彦等[8]探究了三种酶(中性蛋白酶、胰蛋白酶、风味酶)在不同加酶量下酶解金枪鱼加工副产物的过程, 结果显示: 金枪鱼下脚料添加量为 2 g, 料液比 1:5 时, 酶解过程风味蛋白酶转化率最大值 16.79%; 胰蛋白酶转化率最大值 16.63%; 中性蛋白酶转化率最大值 16.57%。柯红乔等[9]探究了五种蛋白酶(木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、trypsin、pepsin、Alcalase 2.4 L)对金枪鱼头蛋白的酶解过程。筛选出羟基自由基清除力最强的是 Alcalase 2.4 L 蛋白酶解液, 并通过响应面试验确定最佳酶解条件: 酶解时间 340 min, 酶解温度 54℃, 加酶量 0.38%, 羟基自由基清除率为 63.67%。张华丹等[10]以金枪鱼加工副产品为原料, 采取双酶酶解法提取粗鱼油并考察了料液比、蛋白酶 A、B 添加量和反应时间对粗鱼油提取率的影响, 确定最佳工艺条件: 料液比 1:3, 蛋白酶 A、B 添加量均为 1.5%, 反应时间各为 3 h 和 2 h, 粗鱼油提取率约为 6.58%, 其理化指标符合粗鱼油二级标准。章超[11]以 DPPH 自由基清除率作为指标, 探究四种酶(含雷肽酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶)对金枪鱼肉干粉的酶解过程, 确定胰蛋白酶为最佳的酶解用酶, 并利用超滤对酶解产物进行分级, 结果表明: 分子量小于 3 kDa 的多肽组分具有较高的 DPPH 自由基清除活性。通过单因素和正交实验, 优化酶水解的工艺参数, 确定最佳酶解反应条件: pH 为 8.0, 酶解温度为 37℃, 酶解时间为 2 h, 液固比为 5:1, 测得酶解后分子量小于 3 kDa 多肽的 DPPH

自由基清除率为 87.62%，多肽含量为 16.6%。课题组前期创新性的从金枪鱼蒸煮液中提取了蛋白、鱼油，之后再通过发酵将剩余部分制成调味料[12] [13] [14]，提升了金枪鱼蒸煮液的利用价值。通常情况下，相较于蛋白，多肽具有抗氧化、降血压、抗菌、提高免疫力等相对较好的生物活性功能[14] [15]。

本课题组以金枪鱼蒸煮液蛋白为原料，通过响应面设计确定最佳酶解工艺，对最优条件下制备的多肽进行超滤分级并对其抗氧化活性进行测定，以期在金枪鱼多肽的抗氧化性研究提供更多理论依据。

2. 实验部分

2.1. 实验材料和仪器

金枪鱼蒸煮蛋白，本实验室提供，具体制备方法参照已发表论文。甲醛(36%~38%)为食品级；碱性蛋白酶、氢氧化钠、邻苯二甲酸氢钾、硫酸亚铁、过氧化氢、Tris-HCl、邻苯三酚、氯化亚铁、菲洛嗪、二苯代苦味肼基自由基(DPPH)、水杨酸-乙醇均为分析纯。

紫外可见分光光度计，UV-1800PC 型，上海翱艺仪器有限公司；傅里叶变换红外光谱仪，Nicolet iS 10，赛默飞世尔科技有限公司；冷冻离心机，Happy-TL18 型，山东济南福的机械有限公司；真空冷冻干燥机，FD-1A-50 型，北京博医康实验仪器有限公司。

2.2. 实验方法

2.2.1. 蛋白质的酶解

将金枪鱼蒸煮液蛋白与去离子水按照一定的配比充分溶解后，调节反应条件并置于磁力搅拌器上酶解，结束后，根据 GB 5009.235-2016 中的比色法测定氨基酸态氮的含量[16]，进而计算酶解度。

$$\text{酶解度} = \frac{\text{酶解液中的氨基酸态氮含量(mg)}}{\text{蛋白质的含氮量(mg)}} \quad (1)$$

2.2.2. 单因素实验

以酶解度为指标，分别探究酶解时间(0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h)、酶解温度(35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃)、溶液 pH (6、7、8、9、10)、加酶量(金枪鱼蒸煮液蛋白质质量的 0.1%、0.5%、2.0%、3.5%、5%、6.5%、8%)、料液比(1:3、1:6、1:9、1:12、1:15)对其的影响。

1) 酶解时间对酶解度的影响

取适量蛋白粉于烧杯中，用 9 倍去离子水溶解，加入一定量的碱性蛋白酶(蛋白粉质量的 3.5%)，置于 50℃ 搅拌器上，分别反应 0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h，完成后放在沸水浴中灭酶 7 min，取出冷却后高速离心，测定上清液中氨基酸态氮含量。

2) 酶解温度对酶解度的影响

取适量蛋白粉于烧杯中，用 9 倍去离子水溶解，加入一定量的碱性蛋白酶(蛋白粉质量的 3.5%)，置于不同温度(35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃)搅拌器上，反应 3 h 后放在沸水浴中灭酶 7 min，取出冷却后高速离心，测定上清液中氨基酸态氮含量。

3) 溶液 pH 对酶解度的影响

取五组适量蛋白粉于烧杯中，用 9 倍去离子水溶解，分别调节溶液 pH 为 6、7、8、9、10，加入一定量的碱性蛋白酶(蛋白粉质量的 3.5%)，置于 55℃ 搅拌器上，反应 3 h 后放在沸水浴中灭酶 7 min，取出冷却后高速离心，测定上清液中氨基酸态氮含量。

4) 加酶量对酶解度的影响

取七组适量蛋白粉于烧杯中，用 9 倍去离子水溶解，分别加入一定量的碱性蛋白酶(蛋白粉质量的 0.1%、0.5%、2.0%、3.5%、5%、6.5%、8%)，调节溶液 pH 为 8，置于 55℃ 搅拌器上，反应 3 h 后放在

沸水浴中灭酶 7 min, 取出冷却后高速离心, 测定上清液中氨基酸态氮含量。

5) 料液比对酶解度的影响

取适量蛋白粉于烧杯中, 用不同比例 V (H₂O/mL):M (蛋白粉/g) = 1:3、1:6、1:9、1:12、1:15 的去离子水充分溶解, 加入一定量的碱性蛋白酶(蛋白粉质量的 3.5%), 调节溶液 pH 为 8, 置于 55℃ 搅拌器上, 反应 3 h 后放在沸水浴中灭酶 7 min, 取出冷却后高速离心, 测定上清液中氨基酸态氮含量。

2.2.3. 响应面设计

以酶解度作为响应值, 根据单因素对酶解度影响的实验结果, 利用响应法优化酶解工艺, 确定最优酶解条件。因素水平设计见表 1。

Table 1. Factors and levels of response surface experiment

表 1. 响应面试验设计因素水平

| 因素 | 水平 | | |
|----------|-----|-----|------|
| | -1 | 0 | 1 |
| A 料液比 | 1:3 | 1:9 | 1:15 |
| B 加酶量/% | 1 | 3.5 | 6 |
| C 提取温度/℃ | 40 | 50 | 60 |
| D 时间/h | 2 | 4 | 6 |

2.2.4. 超滤分级

将 1.2.3 最优条件下制备的多肽进行超滤分级, 分别用 1 kDa、3 kDa、10 kDa 大小的超滤管进行低温高速超滤, 收集不同片段(<1 kDa、1~3 kDa、3~10 kDa、>10 kDa)的多肽溶液, 用 Folin-酚法[17]测定其浓度, -18℃ 冷冻保存, 备用。

2.2.5. 不同分子量肽段的抗氧化活性测定

DPPH 自由基清除能力测定[18] [19]: DPPH 与醇溶液反应呈现紫色且稳定, 可在 517 nm 处得到最大吸光值。在室温避光条件下, 将 2 mL 不同分子量多肽溶液和 2 mL DPPH 溶液在小试管中混合均匀, 反应 0.5 h 后测定其吸光值, 记为 A_i ; 再用同样方法测得无水乙醇的吸光值 A_{i0} ; 最后将样品溶液换成无水乙醇, 测定吸光值, 记为 A_0 。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_{i0}) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

羟自由基清除能力测定[20]: 向 1 mL 不同分子量多肽溶液中, 依次加入 1 mL FeSO₄ 溶液(9 mmol/L)和 1 mL 水杨酸(9 mmol/L), 再加入 1 mL H₂O₂ 溶液(8 mmol/L)用以开启反应, 涡旋混匀, 37℃ 水浴半小时后在 510 nm 处测定其吸光值, 记为 A_i ; 再将 H₂O₂ 溶液换成去离子水, 测定吸光值, 记为 A_{i0} ; 最后将样品液换成去离子水, 测定吸光值, 记为 A_0 。

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_{i0})] / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

超氧自由基清除能力测定[21]: 先在 25℃ 水浴中将 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.2)溶液预热 25 min, 取 4.5 mL 于试管中, 然后依次加入 1 mL 不同浓度不同分子量大小的多肽溶液和 0.3 mL 邻苯三酚溶液(3 mmol/L), 25℃ 水浴条件下反应 5 min 后迅速加入 1 mL 盐酸(8 mol/L)以终止反应, 在 299 nm 处测定其吸光值, 记为 A_i ; 将 HCl 代替邻苯三酚溶液, 测定吸光值, 记为 A_{i0} ; 用去离子水代替样品溶液, 测定吸光

值, 记为 A_0 。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{[A_0 - (A_i - A_{i0})]}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

Fe^{2+} 螯合能力测定[22]: 向 1 mL 不同浓度不同分子量的多肽溶液中加入 0.05 mL FeCl_2 溶液(2 mmol/L), 涡旋混匀, 再加入 0.2 mL 菲洛嗪溶液(5 mmol/L), 室温静置 10 min 后在 562 nm 处测其吸光度, 记为 A_i 。以去离子水代替菲洛嗪溶液测定吸光值, 记为 A_{i0} ; 以去离子水代替样品溶液, 测定吸光值, 记为 A_0 。用 EDTA-2Na 做阳性对照并以去离子水进行调零。

$$\text{Fe}^{2+}\text{螯合率}(\%) = \frac{[A_0 - (A_i - A_{i0})]}{A_0} \times 100\% \quad (5)$$

3. 结果与讨论

3.1. 酶解条件优化

3.1.1. 酶解时间对酶解度的影响

如图 1 所示, 当酶解时间从 0.5 h 延长至 3 h 时, 酶解度随着酶解时间的延长逐渐提高, 但在 3 h 以后酶解度增长缓慢并达到平衡。其原因一是由于酶解时间的延长, 可酶解位点逐渐减少, 另一方面则是由于碱性蛋白酶活性的下降[23]。考虑到酶解时间过长会对金枪鱼蛋白酶解液的色泽和风味产生影响, 因此选择 3 h 作为后续的酶解时间。

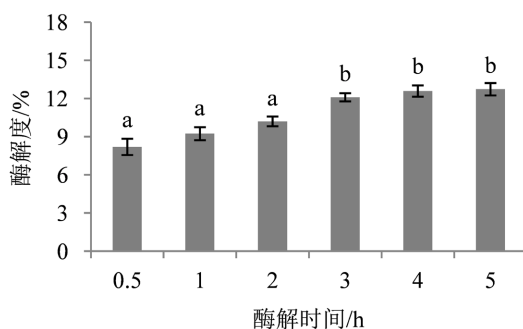


Figure 1. Effect of enzymatic hydrolysis time on enzymatic hydrolysis degree

图 1. 酶解时间对酶解度的影响

3.1.2. 酶解温度对酶解度的影响

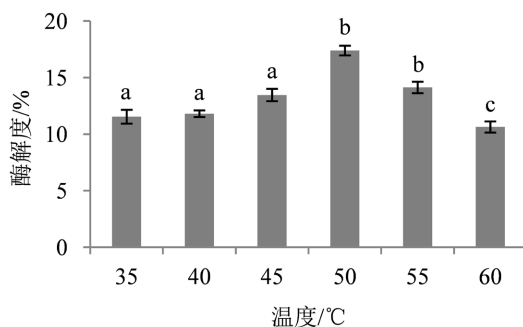


Figure 2. Effect of enzymatic hydrolysis temperature on enzymatic hydrolysis degree

图 2. 酶解温度对酶解度的影响

由图 2 可知,前期酶解度随着温度提高而缓慢上升,当温度升高至 50℃时酶解度达到最大值,为 17.39%。继续升温,随着酶解温度的升高,酶解度呈现显著降低趋势。这是因为酶解温度作为影响酶催化活性的重要因素之一,温度过高或过低均会抑制酶的活性甚至使酶失活,这与孙雪芹等[24]探究酶解温度对中华鳖肉水溶蛋白影响的分析结论一致,因此选用 50℃作为后续实验的酶解温度。

3.1.3. pH 对酶解度的影响

pH 会影响蛋白酶的催化能力和酶底物复合物的解离,进而影响到酶和底物的结合以及酶的催化效果。由图 3 可知,前期酶解度随 pH 的增大呈现升高趋势,当 pH = 8.0 时,酶解度达到最大值 17.76%,继续增大 pH,酶解度则出现了下降情况。这是因为碱性蛋白酶的最适作用 pH = 7.0~9.0 [25],当 pH 值过低时会导致蛋白之间的静电斥力减小而发生聚集沉降,pH 值过高又会使蛋白变性且黏度增大,还会造成环境污染,增大生产成本,因此选择 pH = 8.0 作为后续实验条件。

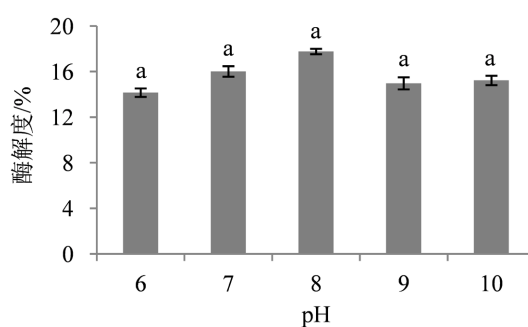


Figure 3. Effect of pH on enzymatic hydrolysis degree

图 3. pH 对酶解度的影响

3.1.4. 加酶量对酶解度的影响

由图 4 可知,前期酶解度随着加酶量的增加而显著升高,由于酶促反应与底物的量有很大关系[26],当酶的添加量达到 3.5%以后,蛋白粉被大量消耗,酶解反应因缺少底物而终止,酶解度无明显变化。这与吕远奇等[27]探究加酶量对鹿茸蛋白酶解度影响的实验结果一致。因此酶的添加量选择 3.5%。

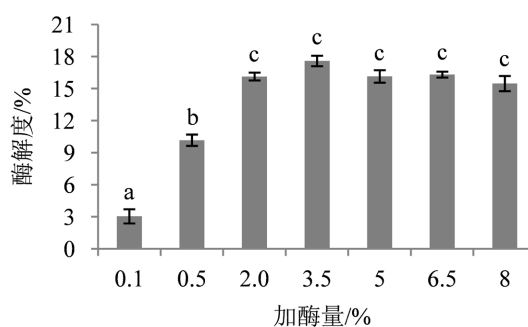


Figure 4. Effect of enzyme dosage on enzymatic hydrolysis degree

图 4. 加酶量对酶解度的影响

3.1.5. 料液比对酶解度的影响

由图 5 可知,当料液比从 1:3 升至 1:9 时,酶解度随着料液比的增加而增大;当料液比大于 1:9 后,酶解度逐渐降低。这主要是因为前期随着料液比的增加,蛋白酶与底物充分接触,蛋白酶解度呈上升趋势。

势, 当料液比超过一定范围时, 酶在持续反应中被逐渐消耗, 底物接近于饱和状态, 致使反应减慢, 同时料液比的增大会削弱酶对底物的作用并出现粘稠现象, 进而抑制酶解作用。林婉茹[28]等通过对马鲛鱼鱼头蛋白的酶解工艺研究发现酶解度随料液比的增加呈现先升高后下降的趋势, 与本实验结论一致, 因此选择 1:9 为最佳实验条件。

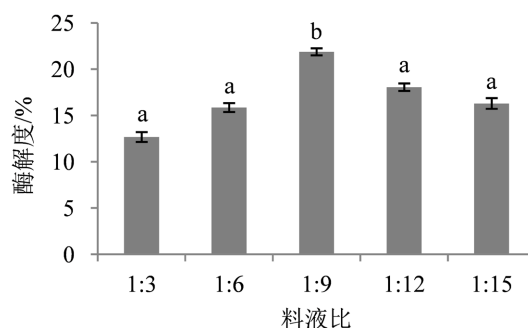


Figure 5. Influence of solid-liquid ratio on enzymatic hydrolysis degree

图 5. 料液比对酶解度的影响

3.2. 响应面条件优化

基于单因素实验结果分析, 选择酶解时间、酶解温度、加酶量、料液比四因素进行了 Box-Behnken [29] 试验设计, 结果见表 2, 对表 2 进行的方差分析结果见表 3。

Table 2. Response surface test design scheme and response value

表 2. 响应面试验设计方案及响应值

| 序号 | A 料液比 | B 加酶量/% | C 温度/℃ | D 时间/h | 酶解度/% |
|----|-------|---------|--------|--------|-------|
| 1 | 1 | 0 | 0 | -1 | 15.89 |
| 2 | 1 | 0 | -1 | 0 | 19.45 |
| 3 | 0 | 0 | -1 | 1 | 15.11 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16.89 |
| 5 | -1 | 0 | 0 | 1 | 15.24 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23.29 |
| 7 | -1 | 0 | 0 | -1 | 13.06 |
| 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 21.34 |
| 9 | -1 | 0 | -1 | 0 | 15.21 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21.37 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22.87 |
| 12 | -1 | 0 | 1 | 0 | 18.13 |
| 13 | 0 | 0 | -1 | -1 | 6.83 |
| 14 | 0 | 1 | -1 | 0 | 18.54 |
| 15 | 1 | 0 | 0 | 1 | 28.72 |
| 16 | 1 | 0 | 1 | 0 | 13.5 |

Continued

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|-------|
| 17 | 0 | -1 | -1 | 0 | 14.08 |
| 18 | 0 | 1 | 0 | 1 | 19.44 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23.29 |
| 20 | 0 | -1 | 0 | 1 | 19.9 |
| 21 | 1 | -1 | 0 | 0 | 16.74 |
| 22 | -1 | 1 | 0 | 0 | 21.03 |
| 23 | 0 | 0 | 1 | -1 | 10.96 |
| 24 | 0 | 1 | 1 | 0 | 18.56 |
| 25 | -1 | -1 | 0 | 0 | 11.88 |
| 26 | 0 | -1 | 0 | -1 | 11 |
| 27 | 1 | 1 | 0 | 0 | 22.48 |
| 28 | 0 | 1 | 0 | -1 | 21.36 |
| 29 | 0 | -1 | 1 | 0 | 14.23 |

Table 3. Analysis of variance of response surface model
表 3. 响应面模型的方差分析

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | P > F |
|----------------|--------|-----|--------|--------|---------|
| 模型 | 503.44 | 14 | 35.96 | 4.05 | 0.0065 |
| A-液料比 | 41.18 | 1 | 41.18 | 4.64 | 0.0490* |
| B-加酶量 | 93.96 | 1 | 93.96 | 10.61 | 0.0057* |
| C-温度 | 4.68 | 1 | 4.68 | 0.52 | 0.4790 |
| D-时间 | 137.70 | 1 | 137.70 | 15.54 | 0.0015* |
| AB | 2.907 | 1 | 2.907 | 0.3281 | 0.5758 |
| AC | 19.669 | 1 | 19.669 | 2.2203 | 0.1584 |
| AD | 28.355 | 1 | 28.355 | 3.2009 | 0.0952 |
| BC | 0.004 | 1 | 0.004 | 0.0004 | 0.9829 |
| BD | 29.268 | 1 | 29.268 | 3.3039 | 0.0906 |
| CD | 1.102 | 1 | 1.102 | 0.1244 | 0.7295 |
| A ² | 8.32 | 1 | 8.32 | 0.94 | 0.3487 |
| B ² | 12.61 | 1 | 12.61 | 1.42 | 0.2526 |
| C ² | 120.31 | 1 | 120.31 | 13.58 | 0.0024* |
| D ² | 47.04 | 1 | 47.04 | 5.31 | 0.0370* |
| 残差 | 124.01 | 14 | 8.85 | | |
| 失拟项 | 94.47 | 10 | 9.44 | 1.27 | 0.4379 |
| 纯误差 | 29.54 | 4 | 7.38 | | |
| 总离差 | 627.46 | 28 | | | |

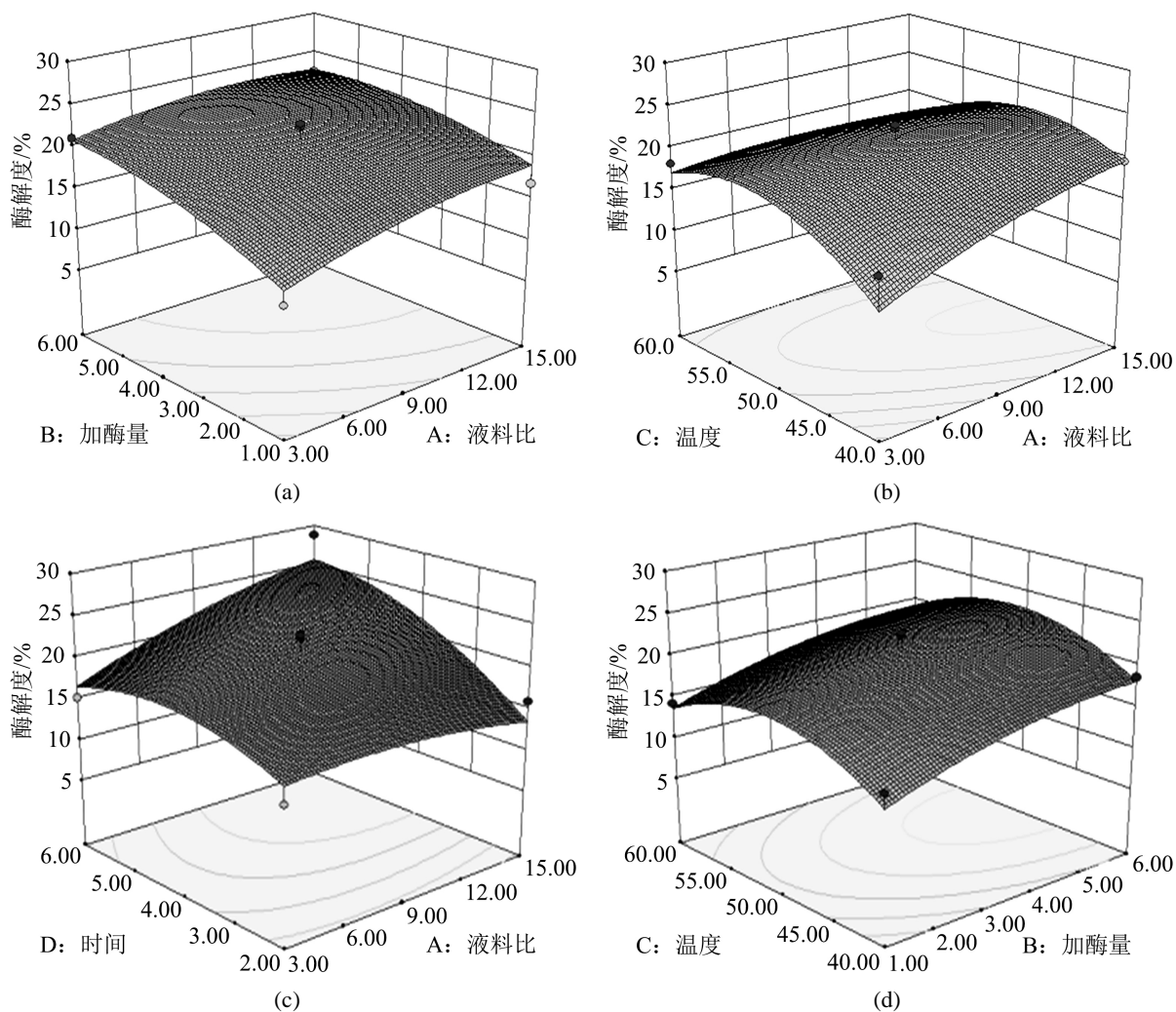
注: P < 0.05, 差异显著。

由表 3 可知, 该模型 $p < 0.01$, 说明回归模型显著, 失拟项 $p > 0.05$, 差异不显著, 所以该模型拟合度较好, 用于预测金枪鱼蒸煮液中蛋白酶解的条件优化较为可靠。通常, F 值越大对应的响应值会越大, 对于结果的影响也就越大[30], 所以, 由 F 值得出各因素对酶解度的影响顺序依次为 D (时间) > B (加酶量) > A (料液比) > C (温度)。通过软件对料液比(A)、加酶量(B)、酶解温度(C)、酶解时间(D)等四个因素进行回归拟合, 得到二次多项回归方程:

$$Y = 21.54 + 1.85A + 2.80B + 0.63C + 3.39D - 0.85AB - 2.22AC + 2.66AD - 0.033BC - 2.70BD + 0.52CD - 1.13A^2 - 1.39B^2 - 4.31C^2 - 2.69D^2$$

回归方程反应的是响应值被各个因素影响的方向和作用效果[31], 回归方程的二次项的系数都为负且对应响应面开口朝下, 图 6 中响应面的曲线弯曲弧度变化和交互作用对结果的影响变化呈现正比例关系, 说明交互作用不明显。

对上述方程式解逆矩阵得出金枪鱼蒸煮液中蛋白酶解的最佳工艺条件为: 料液比 1:15, 加酶量为 2.8%, 酶解温度 48.7℃, 酶解时间 6 h, 此条件下, 酶解度的预测值为 25.79%, 考虑到实际实验中的条件控制, 经过多次重复实验, 将最佳工艺条件微调为: 料液比 1:15, 加酶量 3%, 酶解温度 50℃, 酶解时间 6 h, 得到酶解度为(24.63 ± 0.29)%。



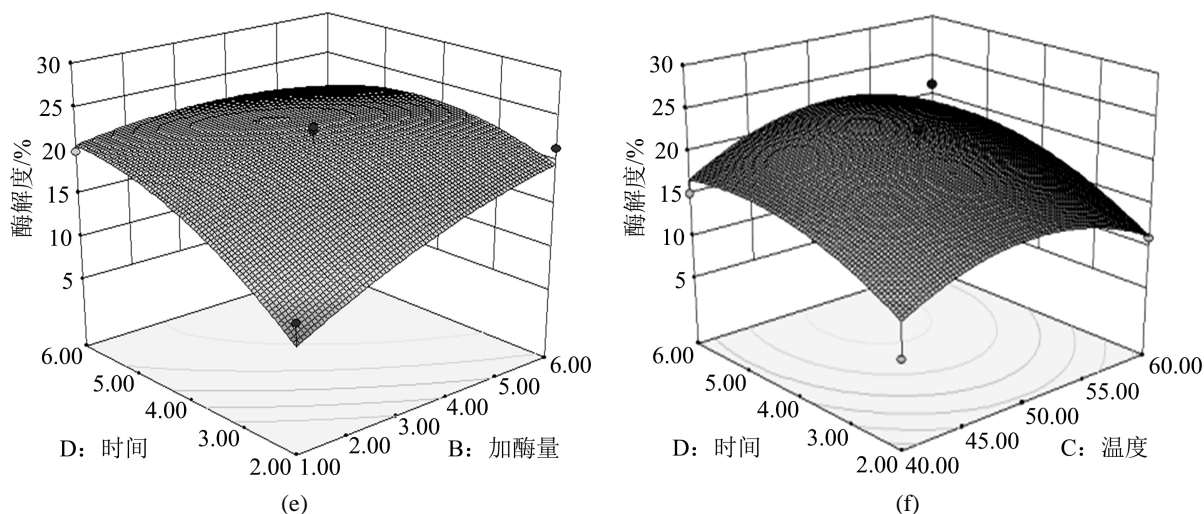


Figure 6. Response surface and contour diagram of interaction of various factors on enzymatic hydrolysis
图 6. 各因素交互作用对酶解度影响的响应面与等高线图

3.3. 不同分子量肽段的抗氧化活性

3.3.1. DPPH 自由基清除能力测定

研究表明, 自由基与人体健康密切相关。DPPH 作为一种稳定的自由基, 在 517 nm 处的吸光值会呈线性下降变化, 从而显示出实验样品的抗氧化能力[32]。从图 7 可以看出, 随着浓度的增大, 各肽段的清除能力也在不断升高, 所以不同的肽段均具有一定的 DPPH 自由基清除能力。同时结果表明, 分子量越低, 其 DPPH 清除能力越强, <1 kDa 多肽样品的 DPPH 清除能力最强, 当其浓度为 2 mg/ml 时, 其清除率可达到 77.66%。

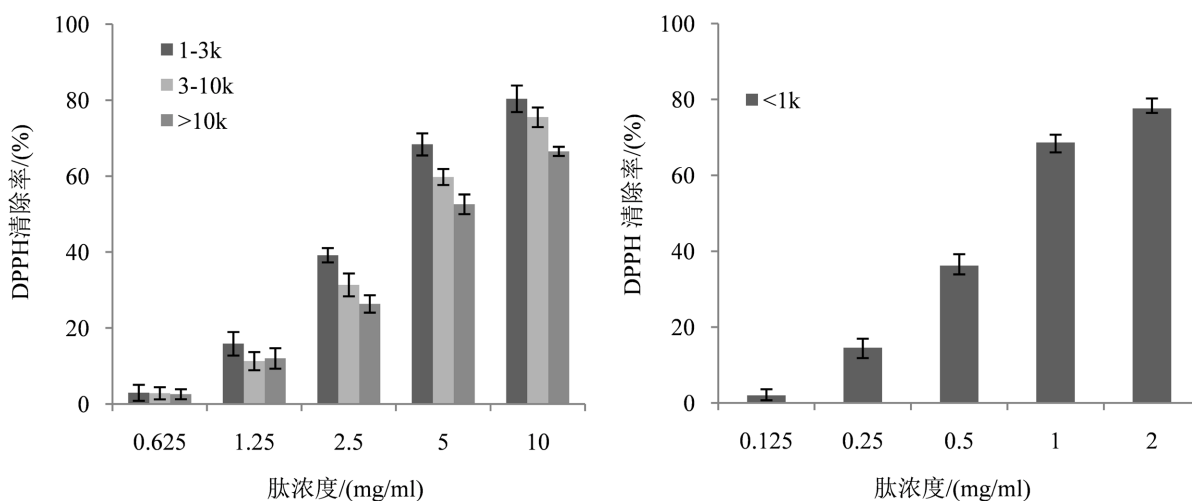


Figure 7. DPPH clearance rate of different protein peptide components
图 7. 不同蛋白肽组分的 DPPH 清除率

3.3.2. 羟自由基清除能力测定

羟自由基($\bullet\text{OH}$)作为一种对人体危害性较大的活性氧, 可以对组织中的糖类和蛋白质等物质进行氧化性破坏, 从而造成组织细胞的坏死[33]。四组多肽溶液对 $\bullet\text{OH}$ 的清除率结果如图 8 所示。总体来说, 多

肽溶液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力变化和其浓度变化呈正比例关系,相对分子量越小表现出的抗氧化能力就越强,当相对分子量 $<1\text{ kDa}$,浓度为 2 mg/ml 时,清除率可达到 91.95% 。

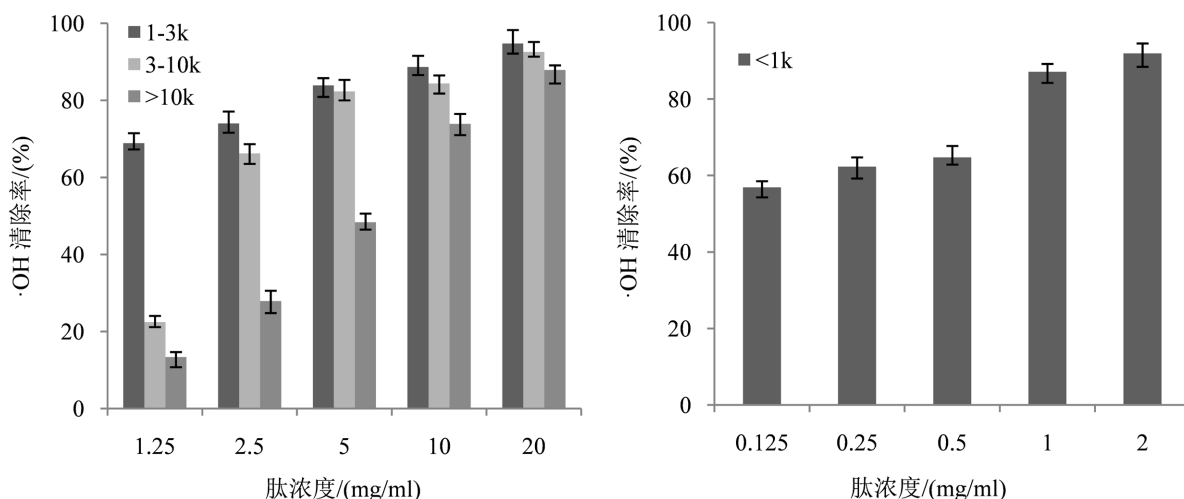


Figure 8. $\cdot\text{OH}$ clearance rate of different protein peptide components

图 8. 不同蛋白肽组分的 $\cdot\text{OH}$ 清除率

3.3.3. 超氧自由基清除能力测定

在弱碱环境中,邻苯三酚可以进行自氧化反应,产生超氧自由基,超氧自由基作为强氧化剂,可氧化不饱和脂肪酸为类脂过氧化物,通常情况下生物体内超氧自由基的产生与清除保持相对平衡[34],且在 299 nm 处有最大吸收峰。由图9可以看出清除率和肽浓度成正比关系,说明两者之间存在着量效关系,因此多肽溶液对超氧自由基具有一定的清除能力。比较四个组分的清除能力,可以得出,分子量越小,清除能力越强。

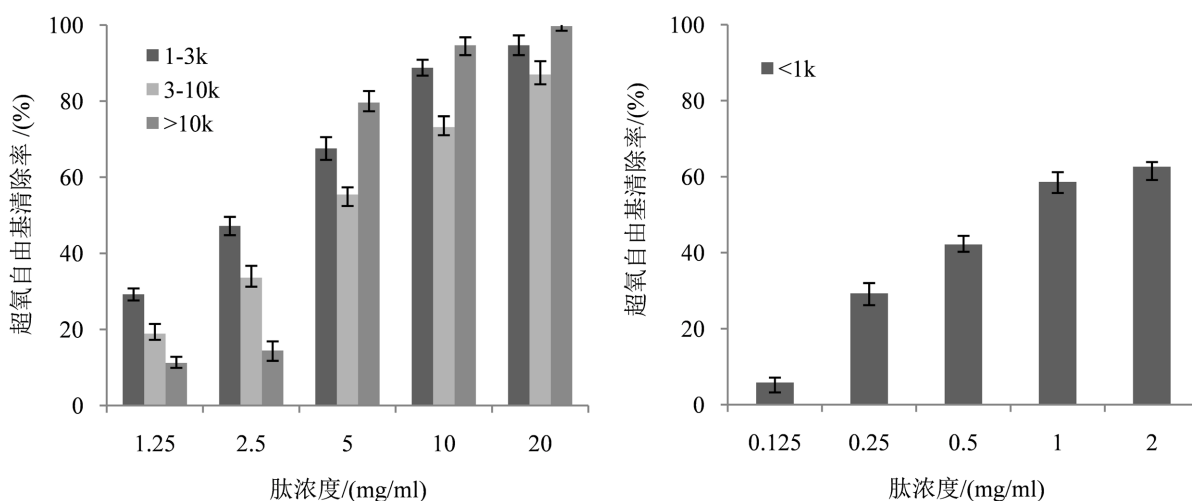


Figure 9. Superoxide radical scavenging rate of different protein peptide components

图 9. 不同蛋白肽组分的超氧自由基清除率

3.3.4. Fe^{2+} 螯合能力测定

铁是人体必需微量元素,对人体细胞呼吸和能量代谢调节具有重要的作用,人体缺铁可能会导致一

些疾病,但一些安全的铁补充剂如多糖铁螯合物等在机体内生物利用度不高。因此,最近越来越多的研究人员将注意力集中在铁肽螯合物上,在现有大量的研究揭示了通过酶水解各种蛋白质产生的多肽对铁离子具有较好的螯合作用[35]。菲洛嗪法[36]是常用的测定 Fe^{2+} 螯合能力的方法,本实验采用此法进行研究金枪鱼蒸煮液蛋白肽对其的螯合能力,结果如图 10 所示。可以看出, Fe^{2+} 的螯合能力随着蛋白肽浓度增大而增大,当蛋白肽浓度增加到一定程度时,后期螯合速率逐渐平缓;同时发现分子量越小对 Fe^{2+} 的螯合能力越强,尤其当相对分子量 <1 kDa 时, IC_{50} 达到 0.59 mg/ml,说明小分子的蛋白肽对于 Fe^{2+} 具有较好的螯合能力。

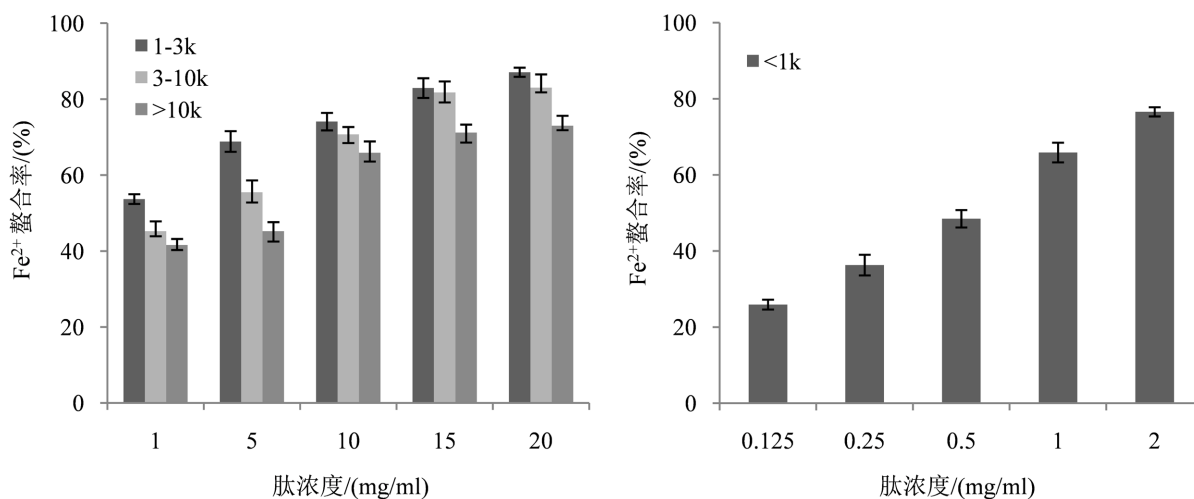


Figure 10. Fe^{2+} chelation rates of different protein peptide components

图 10. 不同蛋白肽组分的 Fe^{2+} 螯合率

4. 结论

本文以酶解度为指标,使用碱性蛋白酶对已制备的金枪鱼蒸煮液蛋白进行酶解,通过单因素实验探究各因素对酶解度的影响并采用响应面法对酶解工艺进行优化,得到最佳的酶解工艺条件:料液比 1:15,加酶量 3%,酶解温度 50°C ,酶解时间 6 h,酶解度可达 $(24.63 \pm 0.29)\%$ 。通过超滤将多肽分为不同大小的组分探究其抗氧化能力,结果表明: <1 kDa 多肽样品的 DPPH 清除能力最强,当其浓度为 2 mg/ml 时,其清除率可达到 77.66%;多肽溶液对超氧自由基具有一定的清除能力,且分子量越小清除能力越强; <1 kDa 的多肽样品对于 Fe^{2+} 具有较好的螯合能力, IC_{50} 可达 0.59 mg/ml。

致 谢

感谢课题组的大力支持和帮助,使本人的实验能够快速展开并取得一定成果。

参考文献

- [1] 王强,张利军,孙乐,吴涛,李晓龙.金枪鱼油精炼过程中关键指标控制的研究[J].粮食与食品工业,2022,29(3):10-13.
- [2] 段涛,田素娟,程波,户业丽,张玉容,蓝泽桥.人工养殖鲟鱼鱼头酶解蛋白粉的营养评价[J].饲料工业,2011,32(16):48-51.
- [3] 陈启航,朱秀花,俞珺,余娟,方旭波,陈小娥,江旭华.金枪鱼蒸煮液酶解工艺优化及风味海鲜调味汁的制备[J].食品工业科技,2018,39(9):124-130.
- [4] 鲍伟,李晔,苏秀榕,陈义方,王求娟,刘雅婷,王小凤,王颖,杨茗媛,申慧婷.基于电子鼻、电子舌和 GC-MS

- 分析饲料中添加金枪鱼蒸煮液对巴马香猪猪肉气味和滋味的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 229-234.
- [5] 何键东, 王朋, 胡焯, 罗红宇. 响应面法优化酶解提取金枪鱼鱼油的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(15): 8731-8735.
- [6] 李可欣, 丁慧璞, 周旭静, 张捷, 张晗琼, 刘利萍. 金枪鱼蒸煮汁的抗氧化性、脱腥处理及其风味沙拉酱的研制[J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 153-160.
- [7] 王新宇, 王欣欣, 位正鹏, 陈奕名, 王鹏, 李银平, 乔乐克, 刘瑞志. 超声波辅助提取金枪鱼蒸煮液鱼油工艺研究及品质分析[J]. 水产科技情报, 2022, 49(2): 82-90.
- [8] 关平彦, 夏磊, 杨凌杰, 闻正顺, 蔡祥敏. 金枪鱼加工副产物的生物转化工艺研究[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2021, 40(4): 322-330.
- [9] 柯虹乔, 杨萍, 洪鹏志. 酶解金枪鱼头蛋白制备羟基自由基清除物的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2011, 244(5): 10-14.
- [10] 张华丹, 余辉, 陈小娥, 郭维平, 方旭波. 双酶酶解金枪鱼加工下脚料提油工艺[J]. 食品科技, 2012, 37(8): 125-129.
- [11] 章超. 酶法水解金枪鱼肉制备生物活性肽[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江工业大学, 2016.
- [12] 王新宇, 谷秀, 位正鹏, 王鹏, 李银平, 闫鸣艳, 刘瑞志. 响应面法优化金枪鱼蒸煮液发酵制备海鲜调味基料工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 166-172.
- [13] 王欣欣, 陈奕名, 刘晓妍, 位正鹏, 王鹏, 刘瑞志, 闫鸣艳, 李银平. 金枪鱼蒸煮液中蛋白质的提取工艺优化及性质分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(23): 228-234.
- [14] 宁诗文, 崔珊珊, 尚宏丽. 响应面法优化大黄花鱼肉蛋白水解工艺及多肽抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 219-226.
- [15] Jiang, W., He, S., Su, D., Ye, M., Zeng, Q. and Yuan, Y. (2022) Synthesis, Characterization of Tuna Polypeptide Selenium Nanoparticle, and Its Immunomodulatory and Antioxidant Effects *in Vivo*. *Food Chemistry*, **383**, Article ID: 132405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132405>
- [16] 丛云霞, 丁世杰, 杨扬. 鱼露中的氨基酸态氮的甲醛法与分光光度计法的比较[J]. 食品安全导刊, 2020(27): 104-105.
- [17] 赵红倩, 宋风霞, 江祥师, 沈申焱, 尚东亮, 李莉蓉. Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验优化苦荞蛋白酶解制备抗菌肽的工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 158-164.
- [18] 李诚, 肖岚, 付刚, 陈代文, 张荣华, 余霞. 猪皮胶原蛋白抗氧化肽的分离纯化及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(15): 95-100.
- [19] Wang, Q., Li, W., He, Y., Ren, D., Kow, F., Song, L. and Yu, X. (2014) Novel Antioxidative Peptides from the Protein Hydrolysate of Oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). *Food Chemistry*, **145**, 991-996. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.099>
- [20] Huang, Y., Majumder, K. and Wu, J. (2010) Oxygen Radical Absorbance Capacity of Peptides from Egg White Protein Ovotransferrin and Their Interaction with Phytochemicals. *Food Chemistry*, **123**, 635-641. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.083>
- [21] Wang, C., Liu, X., Mei, D., Deng, M., Zheng, Y., Zheludkevich, M.L. and Lamaka, S.V. (2022) Local pH and Oxygen Concentration at the Interface of Zn Alloys in Tris-HCl or HEPES Buffered Hanks' Balanced Salt Solution. *Corrosion Science*, **197**, Article ID: 110061. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2021.110061>
- [22] Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. (2006) Antioxidant and Free Radical-Scavenging Activities of Wheat Germ Protein Hydrolysates (WGPH) Prepared with Alcalase. *Process Biochemistry*, **41**, 1296-1302. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.029>
- [23] 周宇朦, 孙洪浩, 孙小涵, 陈秀秀, 吕福军. 多种碱性蛋白酶酶学性质的比较研究[J]. 现代畜牧兽医, 2021(9): 9-13.
- [24] 孙雪芹, 廖彭莹, 刘华宇, 韦金锐, 刘舒凌, 陈俊, 林燕媚, 李锦清. 中华鳖肉水溶蛋白酶解工艺优化[J]. 食品科技, 2022, 47(11): 121-128.
- [25] 张剑, 赵雷敏, 康林霞. 碱性蛋白酶活力分析方法研究[J]. 日用化学工业, 2012, 42(3): 192-195.
- [26] 李佳霖, 杨焱, 李文, 陈万超, 刘晓风. 大球盖菇干制过程香气变化规律及与关键酶促反应的关联性[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(1): 30-42.
- [27] 吕远奇, 詹萍, 李江, 田洪磊, 张雪冰, 宋倩. 响应面法优化新疆马鹿茸蛋白质酶解工艺[J]. 食品工业, 2017,

38(6): 75-79.

- [28] 林婉茹, 王晓辉, 陈洪彬, 王宝贝, 郑宗平. 马鲛鱼鱼头蛋白酶解工艺研究[J]. 农产品加工, 2021(10): 26-29.
- [29] Chrystal, P.V., Greenhalgh, S., Macelline, S.P., Dorigam, J.C.P., Selle, P.H. and Liu, S.Y. (2022) A Multivariate Box-Behnken Assessment of Elevated Branched-Chain Amino Acid Concentrations in Reduced Crude Protein Diets Offered to Male Broiler Chickens. *PLOS ONE*, **17**, e0266080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266080>
- [30] 王晓琳, 秦鑫鑫, 冯晓梅, 韩玉谦. 用响应面法对鱼油纳米脂质体处方的优化[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(1): 49-55.
- [31] 戴喜末, 熊子文, 罗丽萍. 响应面法优化野艾蒿多糖的超声波提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 93-97.
- [32] 许申鸿, 杭瑚. 用 DPPH 分析法研究野生植物的抗氧化活性[J]. 青岛大学学报(自然科学版), 1999(3): 75-78.
- [33] Shen, Q., Ou, A., Liu, S., Elango, J. and Bao, B. (2019) Effects of Ion Concentrations on the Hydroxyl Radical Scavenging Rate and Reducing Power of Fish Collagen Peptides. *Journal of Food Biochemistry*, **43**, e12789. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12789>
- [34] Kelsen, S., He, X. and Chade, A.R. (2012) Early Superoxide Scavenging Accelerates Renal Microvascular Rarefaction and Damage in the Stenotic Kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **303**, F576-F583. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00154.2012>
- [35] Miao, J., Liao, W., Pan, Z., Wang, Q., Duan, S., Xiao, S., Yang, Z. and Cao, Y. (2019) Isolation and Identification of Iron-Chelating Peptides from Casein Hydrolysates. *Food & Function*, **10**, 2372-2381. <https://doi.org/10.1039/C8FO02414F>
- [36] 郭安鹊, 张星星, 张予林, 董鑫, 陈力维. 葡萄酒中总铁和 Fe^{2+} 的改良菲洛嗪法快速测定[J]. 农业机械学报, 2017, 48(10): 338-344.