# 秋刀鱼抗氧化肽制备及其抗氧化活性的研究

赵强忠，刘丹
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

**摘要：**本文选择胰酶对秋刀鱼蛋白进行酶解，以蛋白质利用率和氧化自由基吸收能力（ORAC 值）为指标，运用响应面分析法优化秋刀鱼蛋白制备抗氧化肽的酶解工艺，并且对酶解产物的特性进行了研究。结果表明：最优酶解条件为加酶量 1085 U/g 蛋白，水料比 3:1，酶解时间 8 h 时，此时蛋白质利用率和 ORAC 值分别为 76.86%和 883.40 μmol Trolox equivalent/g。秋刀鱼酶解产物的总氨基酸含量为 4576.69 mg/100 mL，其中游离氨基酸和肽态氨基酸分别占 34.28%和 65.31%；总氨基酸中必需氨基酸占 34.76%，抗氧化活性氨基酸和支链氨基酸占 26.25%，说明秋刀鱼酶解产物具有较高的营养价值。秋刀鱼酶解产物中相对分子质量在 1000~3000 Da 之间的组分最多，占 44.18%。秋刀鱼酶解产物清除 DPPH·的 $IC_{50}$ 值为 3.32 mg/mL，清除 $O_2^-$·的 $IC_{50}$ 值为 5.08 mg/mL，当秋刀鱼酶解产物的蛋白浓度为 10 mg/mL 时，其吸光值为 0.67，说明秋刀鱼酶解产物具有较高的抗氧化活性。

**关键词：**秋刀鱼；酶解；抗氧化；氨基酸

**文章篇号：**1673-9078(2014)10-165-171 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.028

# Preparation of Antioxidant Peptides from Pacific Saury and Characterization of Their Antioxidant Activities

**ZHAO Qiang-zhong, LIU Dan**
(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, trypsin was used for the enzymatic hydrolysis of proteins from Pacific saury. Based on the protein utilization ratio and oxidative free radical absorbance capacity (ORAC), the enzymatic hydrolysis technology was optimized for the preparation of antioxidant peptides from Pacific saury proteins by using a resonance surface analysis. The characteristics of the enzymatic hydrolysates were also examined. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were as follows: enzyme dosage, 1,085 U/g; liquid-to-solid ratio, 3:1; and hydrolysis duration, 8 h. Under these conditions, the protein utilization ratio was 76.86%, and ORAC value was 883.40 μmol Trolox equivalent/g. The total amino acid content was 4,576.69 mg/100 mL in the enzymatic hydrolysates from Pacific saury, of which 34.28% were free amino acids and 65.31% were peptides. Among the total amino acids, essential amino acids accounted for 34.76% and antioxidant amino acids and branched-chain amino acids accounted for 26.25%. These results indicated that Pacific saury has high nutritional value. Hydrolysates with molecular weights of 1000~3000 Da were the most abundant and accounted for 44.18% of the enzymatic hydrolysates of Pacific saury. Moreover, the enzymatic hydrolysates showed DPPH radical scavenging activity ($IC_{50}$ value, 3.32 mg/mL), $O_2^-$ radical scavenging activity ($IC_{50}$ value, 5.08 mg/mL), and light absorption power (0.67 at 10.0 mg/mL). Thus, enzymatic hydrolysates of Pacific saury have relatively high antioxidant activities.

**Key words:** pacific saury; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity; amino acids

秋刀鱼（*Pacific saury*）属颌针鱼亚目，刀鱼科，又称竹刀鱼，属于中上层鱼类，主要分布于日本北部的千岛寒流海域，在日本是一种很受欢迎的可食性鱼类[1]。近几年，我国从日本进口的秋刀鱼数量持续增长，且秋刀鱼本身价格低廉，所以在我国具有广阔的市场前景[2]。然而，秋刀鱼作为一种高蛋白高脂肪的经济鱼类，通常直接食用，资源利用率低，其经济价值未被充分挖掘。因此，如何对秋刀鱼进行深加工以提高产品附加值具有重要意义。

秋刀鱼体内含丰富的脂肪酸和蛋白质，其中蛋白质含人体所需的 8 种必需氨基酸，是一种营养丰富的优质蛋白。秋刀鱼蛋白的酶解产物中含大量具有较高营养价值的抗氧化活性氨基酸和支链氨基酸，抗氧化活性氨基酸和支链氨基酸具有延迟运动性疲劳发生、快速消除运动后疲劳、改善肝功能的作用，具有较高的营养保健功能[3]。因此，以秋刀鱼为原料生产精制鱼油，提油后的鱼糜经酶降解蛋白质制备具有生物活性的酶解产物应用于食品、医药和化妆品等领域，可

收稿日期：2014-05-14
基金项目：十二五”国家科技支撑计划项目（2012BAD33B03，2012BAD37B08）
作者简介：赵强忠（1976-），男，副教授，研究生导师，研究方向：食品生物技术、乳品科学

有效提高秋刀鱼的经济价值。

目前，国内外对于秋刀鱼的报道主要集中在贮藏、资源颁布、生物学形态和习性、种群变动和捕捞方面，也有少数的研究者对秋刀鱼的营养成分、蛋白的酶解物及氨基酸组成进行了研究，而以秋刀鱼为原料制备生物活性肽的研究报道极少。本论文以秋刀鱼为原料，应用响应面分析法优化秋刀鱼蛋白制备抗氧化活性肽的酶解工艺，探讨了加酶量、水料比和酶解时间对蛋白质利用率和氧化自由基吸收能力（ORAC 值）两个响应值影响的变化规律，并且对酶解产物的特性进行了研究，旨在为酶解深海鱼蛋白制备生物活性肽提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

秋刀鱼：市售，去头和内脏，清洗干净，搅成肉糜，脱脂后置于-18 ℃冰箱中冷冻，备用。

酶制剂：胰酶（$2.3\times10^5$ U/g），重庆市祥盛生物制药有限公司；还原性谷胱甘肽（GSH）色谱纯，美国 Sigma 公司；其他化学试剂均为分析纯；去离子水为实验室自制。

### 1.2 主要实验仪器及分析软件

pHS-25 数显 pH 计，上海精密科学仪器有限公司；MM12 型绞肉机，广东省韶关市食品机械厂；SHA-C 水浴恒温振荡器，江苏省金坛市恒农仪器厂；KND-103F 型定氮仪，上海纤检仪器有限公司；GL-21M 高速冷冻离心机，长沙湘仪离心机仪器有限公司；Sartorius BP211D 分析天平，中科院广州化学研究所；101A-2 型数显电热鼓风干燥箱，上海浦东跃欣科学仪器厂；UV-754 分光光度计，上海精密科学仪器有限公司；A300 全自动氨基酸分析仪，德国 MembraPure 公司；全波长扫描多功能读数仪，美国热电公司；Waters 高效液相色谱，美国 Waters 公司。应用统计分析软件 Design Expert7.0 进行响应面实验的设计和数据分析。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 理化性质分析方法

总蛋白质的测定：半微量凯氏定氮法；水分含量：恒温干燥法；灰分：马弗炉法；脂肪测定：索氏抽提法[4]。

#### 1.3.2 酶解产物的制备

秋刀鱼肉→绞成鱼糜→脱脂→冷冻备用→解冻→加入一定比例的水搅拌均匀→酶解→灭酶（沸水浴 15 min）→冷却→离心→过滤取上清液→秋刀鱼蛋白酶解物溶液（PSPHs）

#### 1.3.3 蛋白质利用率的测定

采用凯氏定氮法（GB/T5009.5-2003）。

蛋白质回收率/%=$N_1/N_2\times100$

式中：$N_1$ 为酶解上清液总氮量，g；$N_2$ 为原料总氮量，g[5]。

#### 1.3.4 ORAC 法

参照 Blanca Hernndez Ledesma[5]等人的方法并略有改变。在 96 孔荧光板各微孔中分别加入待测样品 20 μL（将各酶解产物用 75 mmol/L 磷酸盐缓冲液做适当稀释，各样品待测液浓度为 0.04~0.06 mg/mL）后添加 70 nmol/L 荧光素（FL）120 μL，在 37 ℃下保温 15 min 后，用多道移液器迅速在各孔中加入 12 mmol/L AAPH 60 μL 启动反应，并将微孔板置于酶标仪中在 37 ℃下以激发波长 485 nm，发射波长 520 nm 进行连续测定，每 2 min 测定 1 次各孔荧光强度，测定时间设定在荧光衰减呈基线后为止，即设为 2 h。

#### 1.3.5 还原力的测定

参照 Sampath Kumar[6]方法并略有改变。用去离子水配制一定浓度的 PSPHs 及 GSH 对照溶液，取各样品 2 mL 加入到 2 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.6）和 2 mL 1%的铁氰化钾溶液的混合物中，在 50 ℃保温 20 min 后再加入 2 mL 10%的 TCA，然后以 3000 r/min 离心 10 min，取上清液 2 mL 与 2 mL 蒸馏水以及 0.4 mL 0.1%氯化铁反应，10 min 后测定其在 700 nm 处的吸光值。

#### 1.3.6 清除 DPPH 自由基能力的测定

参照谢正军[7]等人的方法并略有改变。准确称取 7.92 mg DPPH，用 95%乙醇溶解并定容到 100 mL，配制成 0.2 mmol DPPH 乙醇溶液。用去离子水配制一定浓度的 PSPHs 及 GSH 对照溶液。取各样品液及对照液 2.0 mL 与 2.0 mL DPPH 乙醇溶液混合摇匀，室温下放置 30 min 后测 517 nm 处的吸光值，计为 $A_i$；取各样品液及对照液 2.0 mL 与 2.0 mL 95%乙醇溶液混合摇匀测定 517 nm 处的吸光值，读数计为 $A_j$；取 2 mL DPPH 乙醇溶液加上 2 mL 蒸馏水混合摇匀测定 517 nm 处的吸光值，读数计为 $A_c$；空白为 2 mL 95%的乙醇加入 2 mL 蒸馏水调零。所有测定值均为三次平均值，DPPH 自由基的清除率计算公式为：

$R=[1-(A_i-A_j)/A_c]\times100\%$

#### 1.3.7 清除超氧阴离子自由基($O_2^{-}\cdot$)能力的测定

参照 Fernandez C[8]等人的方法并略有改变。准确称取 37.8 mg 邻苯三酚，用 10 mmol/L HCl 溶解并定容到 100 mL，配制成浓度为 3 mmol/L 的溶液，并用

去离子水配制一定浓度的PSPHs及GSH溶液。取100 mmol/L Tris-HCl缓冲液（pH 8.2）4.5 mL于25 ℃水浴保温20 min，取出后立即加入样品2 mL、蒸馏水3 mL及邻苯三酚0.5 mL（试验前于25 ℃保温）后迅速摇匀，恒温下每隔30 s测一次$A_{325}$值，反应4.5 min后结束，样品抑制邻苯三酚自氧化的速率作为$V_{样}$（即每分钟光吸收的平均变化率）。空白管中以10 mmol/L HCl代替样品溶液，反应启动后4.5 min内邻苯三酚自氧化速率作为$V_{自}$。$O_2^{\cdot-}$·的清除率计算公式为：

$O_2^{\cdot-}$·清除率=[($V_{自}$-$V_{样}$)/$V_{自}$]×100%

### 1.3.8 分子量的测定

采用凝胶色谱法测定肽的分子量分布，检测条件：Waters高效液相色谱（Waters 600），TSK gel G2000SWXL分析柱；洗脱液0.04 mol/L磷酸缓液，流速1 mL/min，检测波长214 nm。标准肽样品：Conalbumin（75000 Da），Oralbumin（43000 Da），Cytochrome c（12384 Da），Aprotinin（6512 Da），Vitamin B12（1855 Da），Glutathione（307 Da），相对分子质量的对数值与洗脱体积拟合直线方程为y=-0.1547x+5.6431（$R^2$=0.996），其中，y为标准肽分子量的对数；x为洗脱体积。

### 1.3.9 氨基酸组成的测定

采用A300氨基酸自动分析进行氨基酸组成分析。取1 mL样品溶液与5 mL 6 M盐酸在110 ℃条件下水解24 h后，定容至25 mL，取2 mL溶液挥干后用稀释液稀释，溶液经0.22 μm滤膜过滤后上样，测定总氨基酸组成。

## 2 结果与分析

### 2.1 秋刀鱼营养成分分析

秋刀鱼的一般营养成分如见表1。

表1 秋刀鱼的营养成分/%

Table 1 Nutrient content (%) of Pacific saury

| 名称 | 蛋白质 | 脂肪 | 水分 | 灰分 |
|---|---|---|---|---|
| 秋刀鱼 | 18.18±1.32 | 19.62±0.91 | 60.20±0.31 | 0.74±0.11 |

由表1可知：秋刀鱼的蛋白含量高达18.18%，一些海洋鱼类如小黄鱼和海鳗[9]的蛋白含量分别为17.91%和18.23%，秋刀鱼的蛋白含量与其相差无几；秋刀鱼的脂肪含量也相当高，达到19.62%，而小黄鱼和海鳗的脂肪含量分别为3.25%和6.08%，秋刀鱼脂肪含量显著高于这两种鱼类。由此可见，秋刀鱼属于高蛋白和高脂肪鱼类。

### 2.2 酶解工艺条件的响应面分析

#### 2.2.1 回归模型的建立

根据central composite实验设计原理，综合预实验中单因素实验所得结果，以$Y_1$-蛋白质利用率(%)和$Y_2$-ORAC值（μmol Trolox equivalent/g）为响应值，选取加酶量、水料比和酶解时间三个对响应值影响最大的因素，采用响应面分析法（Response Surface Analysis，RSA）来寻求酶解最优工艺。实验因素水平见表2，实验设计及结果见表3。

表2 响应面试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of the resonance surface experiment

| 因素 | 水平 | | |
|---|---|---|---|
| | -1 | 0 | 1 |
| $X_1$[加酶量/(U/g蛋白)] | 750 | 1000 | 1250 |
| $X_2$(水料比) | 2:1 | 3:1 | 4:1 |
| $X_3$(时间/h) | 6 | 8 | 10 |

表3 响应面分析方案及实验结果

Table 3 Experimental results for the resonance surface methodology

| 实验号 | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $Y_1$ | $Y_2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | -1 | 0 | 66.01 | 703.56 |
| 2 | 1 | -1 | 1 | 73.26 | 718.65 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 73.84 | 906.61 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 76.31 | 896.17 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 61.2 | 578.13 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 73.40 | 911.40 |
| 7 | -1 | 0 | 0 | 63.42 | 708.34 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 77.21 | 882.81 |
| 9 | 1 | -1 | -1 | 69.33 | 660.87 |
| 10 | 0 | 1 | 0 | 77.20 | 777.16 |
| 11 | 1 | 1 | -1 | 80.91 | 732.62 |
| 12 | 1 | 0 | 0 | 74.18 | 811.35 |
| 13 | -1 | 1 | -1 | 75.22 | 674.11 |
| 14 | 0 | 0 | 1 | 71.90 | 886.14 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 72.13 | 849.19 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 78.04 | 688.26 |
| 17 | -1 | -1 | -1 | 54.98 | 514.35 |
| 18 | -1 | 1 | 1 | 66.33 | 587.84 |
| 19 | 0 | 0 | -1 | 72.19 | 796.68 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 73.58 | 877.08 |

运用Design Expert（Trial Version 7.0.3）软件，对以上20个实验点响应值进行回归分析，经回归拟合后，得到$Y_1$和$Y_2$的标准回归方程：

$Y_1$=-61.64+0.13×$X_1$+23.86×$X_2$+3.43×$X_3$-4.48×$10^{-3}$×$X_1X_2$+9.21×$10^{-4}$×$X_1X_3$-1.37×$X_2X_3$-5.32×$10^{-5}$×$X_1^2$-0.52×$X_2^2$-0.02×$X_3^2$

$Y_2$=-2901.60+3.52×$X_1$+931.34×$X_2$+113.29×$X_3$-0.06×$X_1X_2$+8.98×$10^{-3}$×$X_1X_3$-15.76×$X_2X_3$-1.59×$10^{-3}$×$X_1^2$-118.79×$X_2^2$-4.44×$X_3^2$

### 2.2.2 回归模型检验

表 4 蛋白质利用率的响应面二次模型方差分析

**Table 4 Analysis of variance for the response surface quadratic model for the protein utilization ratio**

| 方差来源 | 均方差 | 自由度 | 平方和 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 回归模型 | 718.35 | 9 | 79.82 | 17.79 | <1×$10^{-4}$ | * |
| 残差 | 44.86 | 10 | 4.49 | | | |
| 失拟检验 | 26.19 | 5 | 5.24 | 1.40 | 0.36 | |
| 纯误差 | 18.67 | 5 | 3.73 | | | |
| 总方差 | 763.21 | 19 | | | | |
| $X_1$ | 297.35 | 1 | 297.35 | 66.28 | <1×$10^{-4}$ | * |
| $X_2$ | 279.73 | 1 | 279.73 | 62.36 | <1×$10^{-4}$ | * |
| $X_3$ | 0.35 | 1 | 0.35 | 0.078 | 0.79 | |
| $X_1X_2$ | 10.03 | 1 | 10.03 | 2.24 | 0.17 | |
| $X_1X_3$ | 1.70 | 1 | 1.70 | 0.38 | 0.55 | |
| $X_2X_3$ | 60.19 | 1 | 60.19 | 13.42 | 4.4×$10^{-3}$ | * |
| $X_1^2$ | 30.44 | 1 | 30.44 | 6.79 | 0.03 | * |
| $X_2^2$ | 0.75 | 1 | 0.75 | 0.17 | 0.69 | |
| $X_3^2$ | 0.018 | 1 | 0.018 | 4.05×$10^{-3}$ | 0.95 | |

表 5 ORAC 值的响应面二次模型方差分析

**Table 5 Analysis of variance for the response surface quadratic model for ORAC value**

| 方差来源 | 均方差 | 自由度 | 平方和 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 回归模型 | 2.65×$10^5$ | 9 | 2.94×$10^4$ | 32.42 | 1×$10^{-4}$ | * |
| 残差 | 9.06×$10^3$ | 10 | 9.06×$10^2$ | | | |
| 失拟检验 | 6.45×$10^3$ | 5 | 1.29×$10^3$ | 2.47 | 0.17 | |
| 纯误差 | 2.61×$10^3$ | 5 | 5.22×$10^2$ | | | |
| 总方差 | 2.74×$10^5$ | 19 | | | | |
| $X_1$ | 3.01×$10^4$ | 1 | 3.01×$10^4$ | 33.25 | 2×$10^{-4}$ | * |
| $X_2$ | 8.09×$10^3$ | 1 | 8.09×$10^3$ | 8.93 | 0.01 | * |
| $X_3$ | 6.46×$10^2$ | 1 | 6.46×$10^2$ | 0.71 | 0.42 | |
| $X_1X_2$ | 2.05×$10^3$ | 1 | 2.05×$10^3$ | 2.26 | 0.16 | |
| $X_1X_3$ | 1.61×$10^2$ | 1 | 1.61×$10^2$ | 0.18 | 0.68 | |
| $X_2X_3$ | 7.95×$10^3$ | 1 | 7.95×$10^3$ | 8.77 | 0.01 | * |
| $X_1^2$ | 2.71×$10^4$ | 1 | 2.71×$10^4$ | 29.92 | 3×$10^{-4}$ | * |
| $X_2^2$ | 3.88×$10^4$ | 1 | 3.88×$10^4$ | 42.82 | < 1×$10^{-4}$ | * |
| $X_3^2$ | 8.66×$10^2$ | 1 | 8.66×$10^2$ | 0.96 | 0.35 | |

F 检验反映回归模型的有效性，失拟检验反映所用模型与实验拟合的程度即二者差异的程度，校正决定系数 $R^2$ 用来评价回归方程的优劣，变异系数反映数据离散程度的绝对值。回归模型各项的方差分析结果见表 4 和表 5。

由表 4 和表 5 可知，模型 F 值分别为 17.19 和 32.42，“Prob>F”值均小于 0.05，表明该二次方程模型显著。失拟项 P 值均>0.05，对模型是有利的，因此可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。由统计学计算得出，模型的 $R^2$ 分别为 0.89 和 0.94，模型的变异系数值分别为 2.96%和 3.97%，说明两个模型分别有 11.17 和 6.3 的变异不能由该模型解释，模型的拟合性较好。以上各参数表明该实验方法可靠，各因素水平区间设计合理，可用来对胰酶酶解秋刀鱼蛋白制备抗氧化活性肽的工艺研究进行初步分析和预测。试验中一次项 $X_1$(加酶量)、$X_2$(水料比)及交互项 $X_2X_3$(水料比和酶解时间)和二次项 $X_1^2$、$X_2^2$ 影响较为显著，各个因素对 $Y_1$ 和 $Y_2$ 的影响不是简单的线性关系。由 F 值可知，加酶量和水料比对结果影响较大，酶解时间影响较小。

### 2.2.3 回归模型降维分析及最优化分析

对回归模型进行降维分析，加酶量、酶解时间和水料比对蛋白质利用率和 ORAC 值的影响以及任一两个因素的交互作用见图 1。

由图 1 可知，每个因变量和自变量之间都显示着复杂的关系。由图 1a 显示加酶量和水料比增加有利于蛋白质利用率提高，这是因为加酶量和水料比增加，酶与底物蛋白的结合机会大大增加，蛋白质利用率提高。图 1b 显示当水料比处于低水平时，随着酶解时间延长，蛋白质利用率逐渐提高；当水料比处于较高水平时，蛋白质利用率明显高于低水平时的蛋白质利用率，且酶解一段时间后，蛋白质利用率反而降低。这是因为酶的催化速度受产物的影响，当水料比较高时，即底物浓度较低时，在酶解初期，几乎所有的酶分子的活性位点都被底物饱和结合，继而促进反应的进行；随着酶解时间延长，酶活力逐渐下降以及游离氨基酸和小肽等产物增多，产物的抑制作用增强。由图 1c 和 d 可知，最大 ORAC 值均出现在各因变量的中心值，说明过量的加酶量、过长的酶解时间和过大的水料比都不利于提高氧化自由基吸收能力，这可能是因为过量的加酶量和过长的酶解时间使酶解程度加深，产物中具有较强抗氧化活性的肽类被部分水解成具有较弱抗氧化活性或无抗氧化活性的肽类和游离氨基酸，导致 ORAC 值减小。由上图还可以看出，达到最大蛋白质利用率和 ORAC 值所需条件并不完全一致，说明两响应值之间相互制约。

对响应面结果利用软件进行最优化分析，在 pH 为 8，酶解温度为 50 ℃的条件下，以蛋白质利用率与 ORAC 值为评价指标，确定其酶解的最优条件为加酶量 1083.90 U/g 蛋白，水料比 3.19，酶解时间 8.05 h，

此时蛋白质利用率为76.86%，ORAC值为883.40 μmol Trolox equivalent/g。

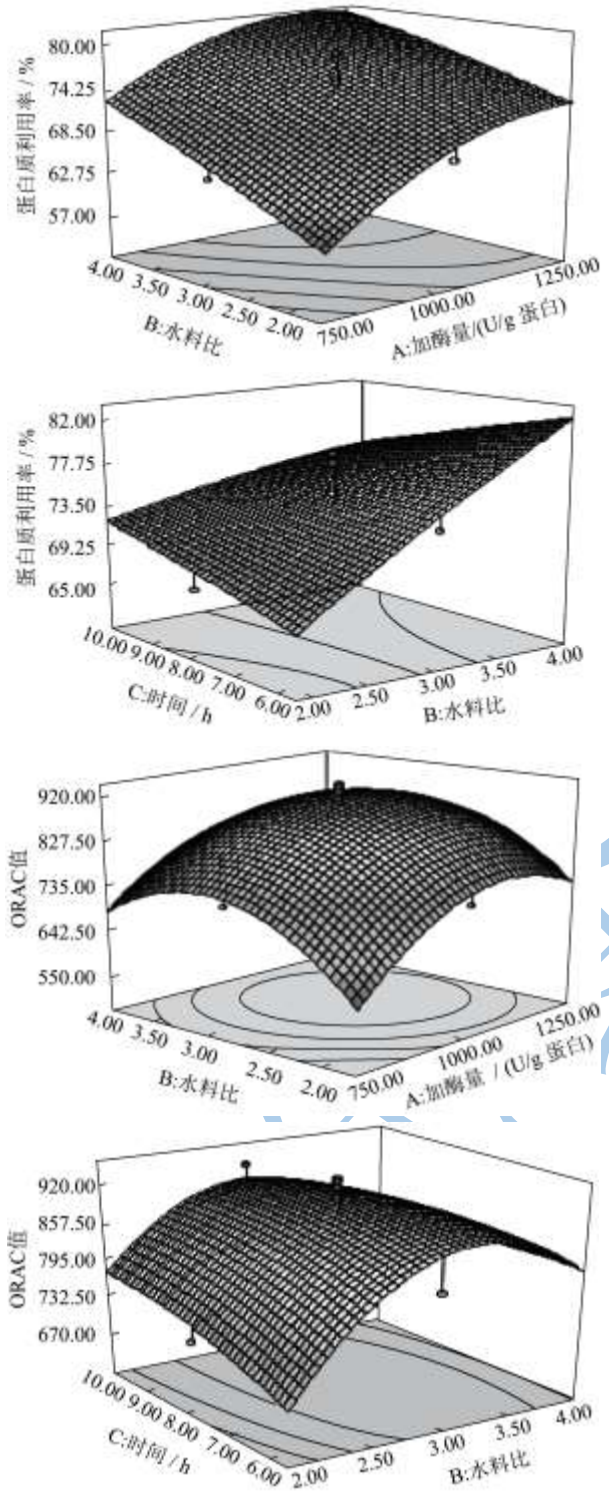



图 1 蛋白质利用率和 ORAC 值的响应面分析

**Fig.1 Analysis of the protein utilization ratio and ORAC value using resonance surface methodology**

### 2.2.4 验证实验

采用上述优化后的酶解工艺条件：加酶量 1085 U/g 蛋白，水料比 3:1，酶解时间 8 h，测得的蛋白质利用率和 ORAC 值结果分别为 77.16%和 877.92 μmol Trolox equivalent/g。通过 OriginPro 8.5.1 软件计算，在设定显著性水平 $P<0.01$ 前提下，预测值和实际值无显著性不同，表明预测模型可行。

## 2.3 PSPHs 的特性研究

### 2.3.1 PSPHs 的营养学特性

蛋白质的营养价值很大程度上取决于其所能提供必需氨基酸的量和比例。PSPHs 的氨基酸组成见表 7。

表 7 PSPHs 的氨基酸分析（$10^{-2}$mg/mL）

**Table 7 Amino acid analysis of PSPHs**

| 氨基酸 | 总氨基酸含量 | 游离氨基酸含量 | 肽态氨基酸含量 |
|---|---|---|---|
| 天冬氨酸(Asp) | 434.33 | 64.71 | 369.62 |
| 苏氨酸(Thr) | 252.81 | 32.53 | 220.33 |
| 丝氨酸(Ser) | 209.11 | 22.93 | 186.26 |
| 谷氨酸(Glu) | 786.51 | 104.88 | 681.58 |
| 甘氨酸(Gly) | 259.93 | 12.22 | 247.74 |
| 丙氨酸(Ala) | 325.27 | 57.34 | 267.93 |
| 胱氨酸($(Cys)_2$) | 27.98 | - | 27.98 |
| 缬氨酸(Val) | 177.43 | 51.31 | 126.16 |
| 蛋氨酸(Met) | 93.22 | 41.59 | 51.59 |
| 异亮氨酸(Ile) | 178.04 | 54.41 | 123.66 |
| 亮氨酸(Leu) | 334.15 | 187.48 | 146.66 |
| 酪氨酸(Tyr) | 148.72 | 109.11 | 39.60 |
| 苯丙氨酸(Phe) | 167.71 | 108.62 | 59.07 |
| 组氨酸(His) | 241.72 | 165.01 | 76.74 |
| 赖氨酸(Lys) | 387.57 | 294.02 | 93.56 |
| 精氨酸(Arg) | 289.02 | 260.23 | 28.84 |
| 脯氨酸(Pro) | 263.17 | 2.73 | 260.48 |
| 氨基酸总量 | 4576.69 | 1568.01 | 2957.82 |
| 必需氨基酸 | 1590.93 | 769.92 | 802.52 |
| 支链氨基酸 | 689.63 | 293.15 | 396.47 |
| 抗氧化活性氨基酸 | 511.63 | 315.73 | 177.39 |

注：支链氨基酸包括Ile、Leu、Val等，抗氧化活性氨基酸主要包括His、Tyr、Cys、Met等。

从表 7 可以看出，PSPHs 中的氨基酸种类齐全，几乎包含了构成蛋白质的所有氨基酸，人体所必需的氨基酸除色氨酸外均可测出。PSPHs 中游离氨基酸总量为 15.69 mg/mL，肽态氨基酸总量为 29.58 mg/mL，分别占总氨基酸含量的 34.28%和 65.31%，酶解液中肽态氨基酸的比例大于游离氨基酸的比例。在 PSPHs 的总氨基酸和肽态氨基酸组成中，谷氨酸含量最高，天冬氨酸次之，胱氨酸含量最低。在 PSPHs 的游离氨基酸组成中，赖氨酸含量最高，精氨酸次之，而未检测出胱氨酸，这可能是因为秋刀鱼蛋白中胱氨酸的含

量较低，减少了酶作用于胱氨酸残基的机会。PSPHs 中必需氨基酸含量占总氨基酸含量的 34.76%，His、Tyr、Cys 和 Met 等具有抗氧化活性的氨基酸和 Ile、Leu、Val 等支链氨基酸含量也较高，这两类氨基酸占总氨基酸含量的 26.25%。由此可见，PSPHs 具有较高的营养价值和抗氧化活性。

### 2.3.2 PSPHs 的分子质量分布

通过凝胶过滤色谱对 PSPHs 的分子量分布进行分析，其分析结果见表 8。

表 8 酶解液凝胶色谱分析结果

**Table 8 Analytical results of enzymatic hydrolysates by gel filtration chromatography**

| 相对分子质量/Da | 保留时间/mL | 峰面积/(mAU·mL) | 峰面积百分比/% |
|---|---|---|---|
| >10000 | 9.78 | 127.36 | 0.53 |
| 10000~5000 | 10.52 | 1594.23 | 6.63 |
| 5000~3000 | 11.00 | 6907.89 | 28.74 |
| 3000~1000 | 11.16 | 10619.24 | 44.18 |
| <1000 | 12.68 | 4786.38 | 19.91 |

由表 8 可知，PSPHs 中分子量在 1000~3000 Da 范围内的组分为其主要成分，占 44.18%，其次为分子量在 5000~3000 Da 范围内的组分，占 28.74%，分子量大于 10000 Da 的组分最少，仅占 0.53%。据报道，小分子量的肽段在人体中具有更加显著的生理功能，目前国内外热点研究的主要是分子量在 3000 Da 以下的小分子肽[10]。PSPHs 中 3000 Da 以下的小分子肽占 65.09%，这一组分的肽段对 PSPHs 的营养价值和生物活性起着重要的作用。

### 2.3.3 PSPHs 体外抗氧化模型评价

以 GSH 为对照物，通过体外化学模型对优化条件下制备得到的 PSPHs 的 DPPH·清除能力、$O_2^{-}$·清除能力和还原力等进行了评价，结果如图 2。

从图 2a 可知，PSPHs 和 GSH 对 DPPH·均有显著的清除能力，且 PSPHs 的浓度与清除率间存在一定的线性相关性，对其进行线性拟合所得方程为 y=0.14x+0.04(方程拟合系数 $R^2$=0.99)，计算知 PSPHs 清除 DPPH·的 $IC_{50}$ 值为 3.32 mg/mL。

从图 2b 可知，GSH 具有较强的 $O_2^{-}$·清除能力，浓度为 1 mg/mL 时清除率可达 72%，当浓度增加至 5 mg/mL 时其清除率可达 97.42%。PSPHs 也具有一定的 $O_2^{-}$·清除力，且浓度与清除率间存在一定的对数相关性，对其进行对数拟合所得方程为 y=0.18ln(x)+0.22（方程拟合系数 $R^2$=0.98），计算知 PSPHs 清除 $O_2^{-}$·的 $IC_{50}$ 值为 5.08 mg/mL。

从图 2c 可以看出，PSPHs 表现出一定的还原力，表明 PSPHs 可以作为电子供体，使自由基与自由电子结合从而终止链反应。PSPHs 浓度高低与其还原力大小间呈一定的线性相关性 y=0.05x+0.07（方程拟合系数 $R^2$=0.99），说明 PSPHs 供电子的能力随浓度的提高而增强。当 PSPHs 的蛋白浓度为 10 mg/mL 时，其吸光值为 0.67。

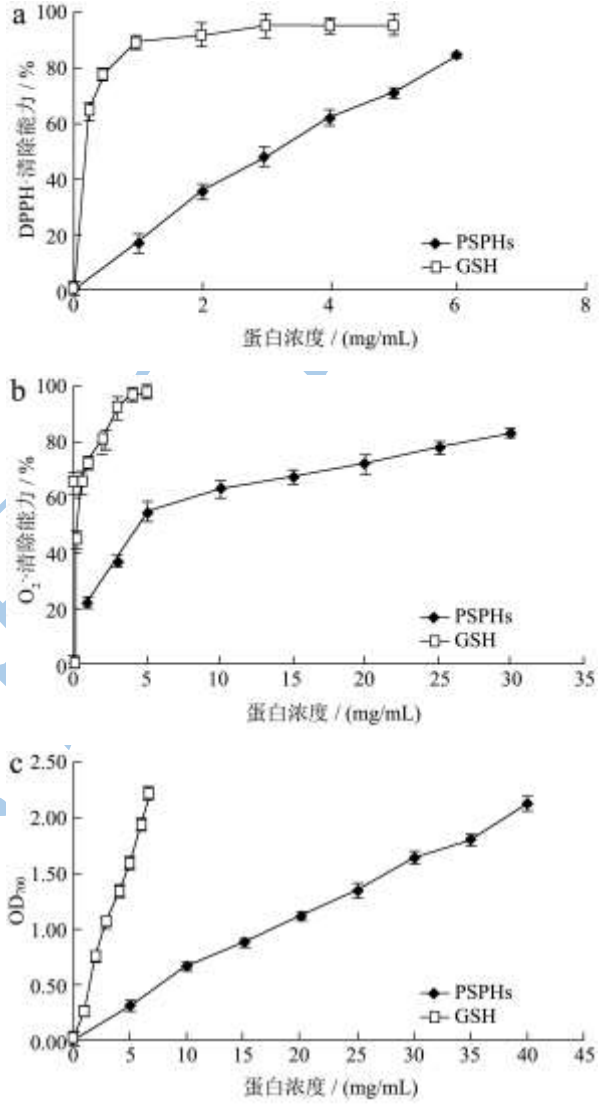



图 2 PSPHs 清除 DPPH·和 $O_2^{-}$·的能力及还原力

**Fig.2 Scavenging activity of PSPHs against DPPH· and $O_2^{-}$· radicals, and reducing power**

从上述结果可知：秋刀鱼多肽具有较高的抗氧化活性。酶解产物的抗氧化活性与氨基酸组成、分子量大小有明显的相关性[11]。PSPHs 具有较高的抗氧化活性，可能是部分氨基酸和多肽对产物的抗氧化活性贡献较大，如可螯合和捕获自由基的 His 或含有 His 的肽，可作为供氢体的 Tyr 以及可作为供质子体的芳香性氨基酸，这些氨基酸均具有较高的抗氧化活性。此外，这些氨基酸中的共轭结构对维持抗氧化的稳定性起了至关重要的作用[12]。PSPHs 中抗氧化活性氨基酸

含量为 11.18%，芳香性氨基酸含量为 6.91%，它们是 PSPHs 具有抗氧化特性的重要物质基础。另一方面，PSPHs 中分子质量在 1000~3000 Da 之间的组分最多，占 44.18%。Wu[13]等报道鲭鱼蛋白的酶解产物中 1400 Da 肽段的抗氧化活性比 200 Da 或 900 Da 的肽段强；Chang-Bum[14]等的相关报道指出，从鲑鱼蛋白的酶解产物中分离出的具有较强抗氧化活性的肽段分子质量均分布在 1000~3000 Da 之间。PSPHs 有较高的抗氧化活性还可能和分子质量在 1000~3000 Da 之间的组分的含量有关。

## 3 结论

3.1 秋刀鱼蛋白质和脂肪含量较高，分别达 18.18%和 19.62%，是一种很好的蛋白质和深海鱼油资源。

3.2 运用响应面分析法优化秋刀鱼蛋白制备抗氧化肽的酶解工艺，得到最优酶解条件为：加酶量 1085 U/g 蛋白，水料比为 3:1，酶解时间 8 h，此时蛋白质利用率和 ORAC 分别为 76.86%和 883.40 μmol Trolox equivalent/g。

3.3 PSPHs 几乎包含了构成蛋白质的所有氨基酸，其总氨基酸含量为 45.77 mg/mL，其中必需氨基酸占 34.76%，抗氧化活性氨基酸和支链氨基酸占 26.25%，说明 PSPHs 具有较高的营养价值。PSPHs 清除 DPPH·的 $IC_{50}$ 值为 3.32 mg/mL，清除 $O_2^-$·的 $IC_{50}$ 值为 5.08 mg/mL，当 PSPHs 的蛋白浓度为 10 mg/mL 时，其吸光值为0.67，说明 PSPHs 具有较高的抗氧化活性。

3.4 酶解产物的营养价值和抗氧化活性与氨基酸组成、分子量大小有关。PSPHs 中抗氧化活性氨基酸、芳香性氨基酸以及 3000 Da 以下的小分子肽是 PSPHs 具有营养价值和抗氧化活性的重要物质基础。

## 参考文献


[1] Hideki Mori, Yurie Tone, Kouske Shimizu, et al. Studies on fish scale collagen of Pacific saury [J]. Material s Science and Engineering C, 2013, 33: 174-181

[2] 叶彬清,陶宁萍,王锡昌.秋刀鱼营养成分分析、贮藏加工及副产物综合利用研究进展[J].食品工业科技, 2013, 22(34): 367-374
YE Bin-qing, TAO Ning-ping, WANG Xi-chang. Progress on nutritional evaluation, storage and processing of Cololabis saira and comprehensive utilization of its processing by-products [J]. The Food Industry Science and Technology, 2013, 22(34): 367-37

[3] 陈建文,高建华,钟海明,等.秋刀鱼蛋白酶解物的制备及氨基酸评价[J].食品研究与开发,2007,142(9):53-55
CHEN Jian-wen, GAO Jian-hua, ZHONG Hai-ming, et al. Preparation and free amino acids analysis of enzymatic hydrolysates from cololabis saira [J]. Food Research and Development, 2007, 142(9): 53-55

[4] 杨慧芬,李明元,沈文.食品卫生理化检测标准手册[M].北京:中国标准出版社,1998
YANG Hui-fen, LI Ming-yuan, SHEN Wen. Food health physical and chemical testing standards manual [M]. Beijing, China standard press, 1998

[5] Blanca Hemndez-Ledesma, Lourdes Amigo, Isidra Re-Cio, et al. ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β-lactoglobulin. interactions with ascorbic acid [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 3392- 3397

[6] Sampath Kumar N S, Nazeer R A, Nazeer Jaiganesh R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (Magalaspis cordyla) and croaker (Otolithes ruber) [J]. Amino Acids, 2012,42(5): 1641-1649

[7] XIE Zheng-jun, HUANG Jun-rong, XU Xue-ming. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2008, 111: 370-376

[8] Fernandez C, Kalpowitz N, Carcia R C, et al. GSH transport mitochondria: defense against TNF2 induced oxidative stress and alcohols induced defect [J]. Am. J. Phsiol., 1997, 273: 17-271

[9] 于琴芳,邓放明.鲢鱼、小黄鱼、鳕鱼和海鳗肌肉中营养成分分析及评价[J].农产品加工,2012,9:11-18
YU Qin-fang, DENG Fang-ming. Analysis and evaluation of nutritional componets in muscle of silver carp, small yellow croaker, gadus macrocephaius and muraenesox cinereus [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2012, 9: 11- 18

[10] 李琳琳,曹新志,刘芳,等.蚕丝蛋白水解液中多肽相对分子质量分布的测定[J].食品工业科技,2014,35(7):95-99
LI Lin-lin, ZAO Xin-zhi, LIU fang. Determination of molecular weight distribution of peptides in silk protein hydrolyzate [J]. Science and Technolog, 2014, 35 (7): 95-99

[11] 周雪松,赵谋明,林伟锋,等.Alcalase酶解鸡肉蛋白及产物的自由基清除活性[J].华南理工大学学报,2006,34(3):117-122
ZHOU Xue-song, ZHAO Mou-ming, LIN Wei-feng. Enzymatic hydrolysis of chicken protein by alcalase and scavenging activity of resulted hydrolysates on free radicals [J]. Journal of south China university of technology, 2006, 34(3): 117-122

[12] 游丽君.泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D].广州:华南理工大学,2010
YOU Li-jun. Study on the purification of antioxidant peptide from loach protein and its antifatigue and anticancer activities [D]. Guangzhou, South China University of Technology, 2010

[13] Wu H C, Chen H M, Shiau C Y. Free amino acides and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus) [J]. Food Research International. 2003, 36: 949-957

[14] Chang-Bum Ahn, Jae-Young Je, Young-Sook Cho. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis [J]. Food Research International. 2012, 49: 92-98

现代食品科技