鲢鱼肽美拉德反应产物超滤组分的抗氧化活性研究

刘敏，孟艳丽，董士远，曾名湧

（中国海洋大学食品科学与工程学院，山东青岛 266003）

摘要：鲢鱼肽美拉德反应产物（MRPs）经 5 kDa、1 kDa 超滤膜分离、然后再经溶剂分级后，获得了不同组分，分析其抗氧化活性与理化特性。通过对不同组分的 DPPH 自由基清除活性、金属离子螯合活性和总抗氧化能力的测定可以看出，水溶性组分中的高分子量化合物比低分子量化合物具有较高抗氧化活性，而醇溶性组分中高分子量的抗氧化活性比低分子量的低。MRPs 中水溶性组分 F-3（>5 kDa）对 DPPH 自由基清除活性、对金属离子的螯合活性和总抗氧化力最高；水溶性组分中 F-3 和 F-2（1 kDa~5 kDa）的褐变程度较高，F-3 的荧光强度最高；FI-IR 分析发现，F-2 和 F-3 在 860.01 cm^{-1} 和 948.61 cm^{-1} 处有强烈的吸收峰，这表明肽因美拉德反应发生了结构的变化。因此，鲢鱼肽 MRPs 中起主要抗氧化作用的为水溶性物质，且其中相对高分子量的有色水溶性产物抗氧化活性较强。

关键词：鲢鱼肽；超滤；美拉德反应；抗氧化活性

文章篇号：1673-9078(2015)6-219-223 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.034

Investigation on the Antioxidant Activity of Silver Carp Peptide Maillard Reaction Products Isolated by Ultrafiltration

LIU Min, MENG Yan-li, DONG Shi-yuan, ZENG Ming-yong

(College of Food Science & Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Maillard reaction products (MRPs) from silver carp peptide were isolated using a 5-kDa and 1-kDa ultrafiltration system, which was followed by solvent fractionation in order to investigate the antioxidant activity and chemical properties of different fractions. Measurements of the free-radical scavenging activity, metal ion chelating activity, and total antioxidant capacity of different fractions showed that high molecular weight (HMW) compounds displayed higher antioxidant activity than that of low molecular weight (LMW) compounds in the water-soluble fraction. In contrast, the antioxidant activity of HMW compounds was lower than that of LMW compounds in the alcohol-soluble fraction. The DPPH radical scavenging activity, metal ion chelating activity, and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) of the water-soluble fraction F-3 (> 5 kDa) in silver carp peptide MRPs were the highest. The browning intensities of F-3 and F-2 (1~5 kDa) were the strongest and the fluorescence intensity of F-3 was the highest. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) showed that MRPs had a strong absorption peak at 860.66 cm^{-1}, while F-2 and F-3 had sharp absorption peaks at 860.01 cm^{-1} and 948.61 cm^{-1}, respectively, indicating that the reducing sugar may be linked to the peptide skeleton, which thus, leads to structural changes. Therefore, the water-soluble substances from MRPs play a major antioxidant role, and the colored water-soluble products with relatively HMW show strong antioxidant activity.

Key words: silver carp peptide; ultrafiltration; Maillard reaction; antioxidant activity

美拉德反应是指食品中的羰基化合物（糖类）和氨基化合物（胺、氨基酸、肽等）发生的非酶促褐变反应。该反应体系较为复杂，通常分为三个阶段，即初级阶段、中级阶段和高级阶段。美拉德反应产物（MRPs）抗氧化活性方面的研究现已成为国内外研究的热点。大量的研究表明：MRPs 中一些物质具有较强的抗氧化活性，甚至某些物质的抗氧化能力可与抗氧化剂相媲美[1]。为了探究起抗氧化作用的主要物质，Gu F 等[2~3]研究了酪蛋白-葡萄糖的 MRPs 超滤后不同分子量范围组分的 DPPH 自由基清除活性、还原力、Fe^{2+} 螯合活性及卵磷脂氧化抑制活性，发现高分子的 MRPs（MW>50 ku）表现出最高的还原力。Rufi án-Henares 和 Morales[4]从八种氨基酸-葡萄糖模型系统中产生的水溶性类黑精超滤分离后各部分的抗氧化性、抗菌性及体外降血压活性，发现类黑精的低分子量化合物比纯类黑精有更高的抗氧化活性。Jing 等人[5]将加热 1 h 后的 MRPs 用乙醇分离，并分析了中

收稿日期：2014-09-04

基金项目：国家自然科学基金资助项目（31270038）

作者简介：刘敏（1990-），女，硕士，主要研究方向：水产品高值化利用

通讯作者：董士远（1974-），男，博士，副教授，主要研究方向：水产品高值化利用

低分子量（LMW）和高分子量（HMW）MRPs 的抗氧化活性，发现 HMW-MRPs 比 LWM-MRPs 具有更高的抑制脱氧核糖氧化的作用及更高的 DPPH 自由基清除活性。Amigo-Benavent M 等人[6]研究了大豆蛋白和低聚果糖的 MRPs 的抗氧化活性（$ORAC_{FL}$ 法），发现 Maillard 反应和焦糖化作用产生的有色新型抗氧化剂主要为水溶性成分。

尽管现在已对 MRPs 的抗氧化活性进行了一系列的研究，但对肽的 Maillard 反应产物分离的研究报道还较少，其抗氧化产物的机理研究还未见报道。因此，本论文将鲢鱼肽美拉德反应产物先进行超滤再经溶剂萃取，分析其不同组分的抗氧化活性和理化特征，为肽类美拉德反应产物的抗氧剂开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鲢鱼肽，实验室自制；碱性蛋白酶（Alcalase 2.4L）、DPPH (2, 2-二苯基-1-三硝基苯肼)、TPTZ（2, 4, 6-三(2-吡啶基)-S-三嗪）、Trolox（6-羟基-2, 5, 7, 8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸）、硫酸奎宁均购于 Sigma-Aldrich 上海有限公司；其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

超滤系统 Bioq-MU1000，汇和堂生物工程设备(上海)有限公司；盒式超滤膜，1 kDa，膜面积 0.1 m^2；5 kDa，膜面积 0.1 m^2，美国密理博公司；XW-80A 微型漩涡混合仪，上海沪西分析仪器厂有限公司；UV-2500 紫外可见分光光度计，日本岛津公司；GL-21M 高速冷冻离心机，湖南湘仪离心机仪器有限公司；Nicolet iS10 傅立叶变换红外光谱仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；FW-4A 型粉末压片机，天津市拓普仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 MRPs 的制备

鲢鱼肽的制备：取一定量的鲢鱼肉与异丙醇按照 1:1 比例混合，在 45 ℃水浴锅内保温搅拌 1.5 h，然后进行抽滤。将抽滤后的脱脂样品置于通风橱内，挥发掉异丙醇。脱脂后鲢鱼肉与蒸馏水 1:7 混合，调 pH 为 8.0，55 ℃，加入 3.6%的 Alcalase 2.4L 蛋白酶（以鲢鱼肉蛋白含量计），水解 63 min；灭酶，离心，上清液用 5 kDa 膜超滤，收集滤液然后冷冻干燥，冻干粉密封包装后在-18 ℃下保存。

参照孟艳丽等[7]方法。鲢鱼肽和葡萄糖以游离氨基和羰基摩尔比 1:1 分别在 pH 8.0、90 ℃条件下反应 8 h，将得到的鲢鱼肽与葡萄糖 Maillard 反应产物(MRPs)立即冰浴冷却，以待进一步分析。

1.3.2 超滤

将鲢鱼肽 MRPs 先后经 1 ku，5 ku 膜超滤，分别收集通过 1 ku 的组分（F-1，<1 ku）、通过 5 ku 超滤膜而未通过 1ku 膜的组分（F-2, 1-5 ku）以及未通过 5 ku 超滤膜的组分（F-3，>5 ku）。

1.3.3 水溶性、醇溶性组分制备

鲢鱼肽 MRPs 的水溶性和醇溶性组分的制备参照 Amigo-Benavent M.等人[6]的方法。向 50.00 mg 样品中加入 1.70 mL 的超纯水，在旋涡混合器上振动 2 min 后，再在 9000×g 的离心力下离心 10 min，将上清液收集合并称为水溶性组分。醇溶性的组分与水溶性组分收集步骤相同，将超纯水换为无水乙醇即可。

1.3.4 DPPH 自由基清除活性的测定

将1 mL 0.25 mmol/L DPPH溶液（溶于无水乙醇）置于试管中，加入4 mL待测液，振荡混匀，室温下放置30 min后，在517 nm处测其吸光值(As)，空白为1 mL无水乙醇加入4 mL蒸馏水调零，对照为1 mL DPPH溶液加上4 mL蒸馏水在测定波长的吸光值(Ac)，样品空白为1 mL乙醇加上4 mL的样品在测定波长的吸光值为A_{SB}。各组样品对DPPH的清除能力用抑制率R表示：

$$R/\% = [1-(A_s - A_{SB})/A_C]\times 100\%$$

测定醇溶性组分时，空白及稀释都用无水乙醇代替蒸馏水。

1.3.5 金属离子螯合活性的测定

金属离子螯合活性的测定是采用菲洛嗪作为显色剂的比色法。将1 mL的样液（稀释20倍）加入0.10 mL 2 mmol/L 氯化亚铁和0.20 mL 5 mmol/L的菲洛嗪，再加入3.70 mL的蒸馏水，在30 ℃的水浴上反应10 min后，在波长562 nm下比色。金属螯合率采用下式计算：

$$螯合率/\% = [1-(A_S - A_{SB})/A_C]\times 100\%$$

注：A_S、A_{SB}、A_C分别表示样品、样品空白、对照的吸光值。

1.3.6 总抗氧化能力测定（FRAP 法）

总抗氧化能力采用 FRAP（Ferric reducing/antioxidant power）法测定。向0.10 mL样品中加入0.30 mL去离子水，再加入3 mL预热至37 ℃的FRAP工作液（FRAP工作液：10 mmol/L TPTZ、20 mmol/L $FeCl_3$ 溶液、0.30 mol/L醋酸钠缓冲液以1:1:10的体积比混合，现用现配），摇匀后37 ℃水浴10 min，然后立即冰浴1 min，于593 nm处测其吸光值。测定不同浓度的trolox（0~1.20 μmol/L）的总抗氧化能力，绘制标准曲

线，将样品的抗氧化的能力换算为μmol trolox / L样品。

1.3.7 褐变强度、荧光值的测定

将经超滤和经去离子水、无水乙醇萃取分离后的MRPs分别稀释适当倍数，在420 nm下用分光光度计测定吸光值。将MRPs经过适当的稀释后，用荧光分光光度计F-2500（激发波长350 nm，发射波长420 nm）进行测定。同时用浓度为1 μg/mL的硫酸奎宁（0.05 mol/L H_2SO_4配制）作为基准，结果表示为相对于1 μg/mL的硫酸奎宁的荧光强度。

1.3.8 傅里叶变换红外光谱 FT-IR 测定

各组样品的近红外光谱用FT-IR分光光度计测定。采用光谱级的KBr稀释样品粉末至同一浓度并进行压片，检测波数范围为400~4000 cm^{-1}，每次扫描64次取平均值。同时用纯的KBr作为背景。

1.3.9 统计分析

实验数据的显著性差异由SS18.0软件进行分析。对数据进行单因素方差分析（one way analysis of variance, one way ANOVA），以L-S-D多重比较进行检验

2 结果与讨论

2.1 DPPH 自由基清除活性

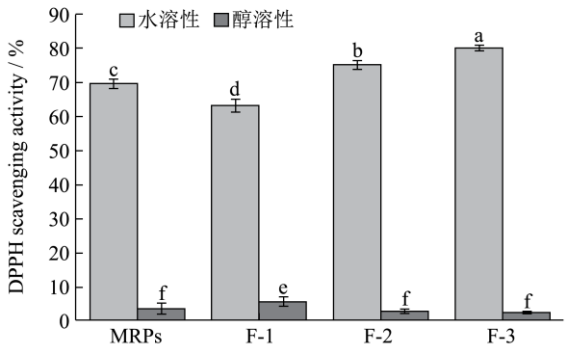


图 1 不同组分对 DPPH 自由基的清除活性

Fig.1 DPPH radical scavenging activity of different fractions

注：a~e:不同字母代表差异性显著（p<0.05）。

水溶性组分的DPPH自由基清除活性显著高于醇溶性组分（p<0.05），水溶性组分的DPPH自由基清除率均高于60%，而醇溶性组分的清除率都在10%以下（图1）。在水溶性组分中，F-3对DPPH自由基的清除活性显著高于MRPs、F-1和F-2（P<0.05），F-1的DPPH自由基清除活性最低。在醇溶性组分中，F-1的DPPH自由基清除活性显著高于其余各组（p<0.05），但MRPs、F-2和F-3对DPPH自由基清除活性之间差异不显著（p>0.05）。这说明MRPs中具有DPPH自由基清除作用的有效成分主要为水溶性物质而非醇溶性，且其水溶性组分中高分子量的物质具有更强的DPPH自由基清除活性，这可能与美拉德反应形成的高分子量的类黑精有关[8]。醇溶性组分中，低分子量的物质对DPPH自由基的清除率较高，这可能是由于低分子量的MRPs易溶于乙醇中。

2.2 金属离子螯合活性

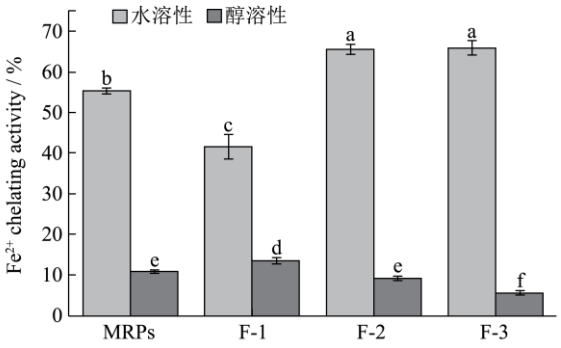


图 2 不同超滤组分对 Fe^{2+}的螯合活性

Fig.2 Fe^{2+} chelating activity of different fractions

注：a~e:不同字母代表差异性显著（p<0.05）。

不同组分的金属离子（Fe^{2+}）螯合活性如图2所示。MRPs的各水溶性组分的Fe^{2+}螯合活性均显著高于醇溶性组分（P<0.05）。在水溶性组分中，F-1的Fe^{2+}螯合活性显著比其他各组低（P<0.05），螯合率约为MRPs、F-2和F-3组螯合活性的75.00%、63.20%和62.70%，F-2和F-3组之间对Fe^{2+}的螯合活性无显著性差异（P>0.05）。在醇溶性组分中，F-1的Fe^{2+}螯合活性最高，F-3的螯合活性最低，F-1的金属离子螯合率为F-3的2.42倍，MRPs的螯合活性与F-2之间差异不显著（P>0.05），但与F-1和F-3之间差异显著（P<0.05）。因此，高分子量的MRPs具有较高的螯合Fe^{2+}离子的作用，而醇溶性组分中低分子量的物质对Fe^{2+}的螯合作用较强。

2.3 总抗氧化能力（FRAP 法）

FRAP 法测定总抗氧化能力的原理实质上是基于氧化还原反应，三价铁离子与三吡啶三吖嗪(PTZ)的复合物被样品中具有还原性的物质还原为二价铁的形式，呈现出蓝色，在 593 nm 处具有最大光吸收。

MRPs 中不同组分的总抗氧化能力如图 3 所示。其中水溶性组分的总抗氧化能力远高于醇溶性组分。在水溶性组分中，F-3 的总抗氧化能力最高，F-1 的总抗氧化能力最低，F-2 和 F-3 的总抗氧化能力均显著高于未经分离的 MRPs（P<0.05），而 F-1 的总抗氧化能力比 MRPs 低。在醇溶性组分中，F-1 的总抗氧化能力最高，其余组分之间没有显著性差异（P>0.05）。但 0.50 mg/mL BHT 的总抗氧化能力达到 1.00 μmol

Trolox/L，如在相同浓度的情况下，鲢鱼肽与葡萄糖反应产物的总抗氧化能力仍然比不上人工合成的BHT。

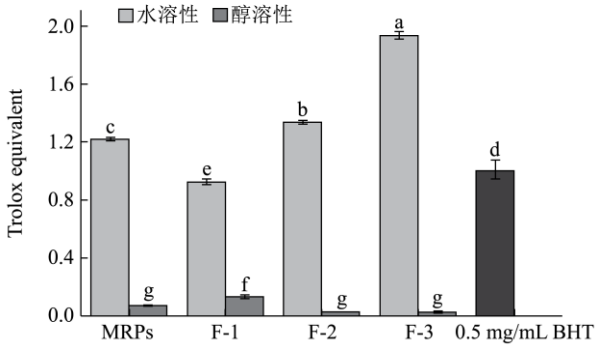


图 3 不同超滤组分的总抗氧化能力

Fig.3 The FRAP of different fractions from ultrafiltration

注：a~g:不同字母代表差异性显著。2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)的浓度为 0.5 mg/mL。

2.4 褐变

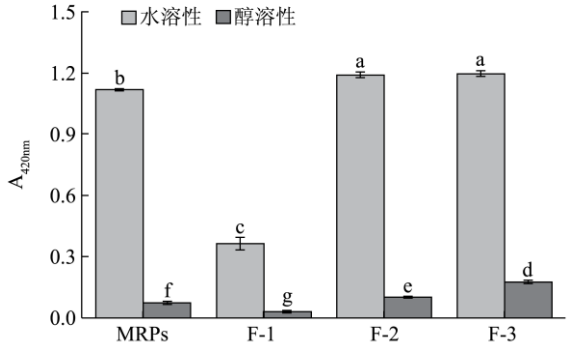


图 4 不同超滤组分的褐变程度

Fig.4 The browning changes the extent of different water-soluble and alcohol-soluble components

注：a-g:不同字母代表差异性显著（p<0.05）。

MRPs 不同组分的褐变程度如图 4 所示。水溶性组分的褐变强度显著高于醇溶性组分。在水溶性组分中，F-2 和 F-3 的褐变程度比 MRPs 高，F-1 的褐变程度最低，仅为 MRPs 的 1/3。在醇溶性组分中，各组分间的褐变程度具有显著性差异（p<0.05），F-3 具有最高的褐变程度，F-1 的褐变程度最低，MRPs 的褐变程度介于 F-1 和 F-2 之间。这说明有色物质主要存在于高分子量的物质中，低分子量的物质大部分是无色的。

2.5 荧光值

美拉德反应产物的荧光值是其反应进行到高级阶段的标志之一，也反映了形成的的晚期糖基化终产物(AGEs)。

不同组分的荧光强度如图 5 所示。水溶性组分的荧光值高于醇溶性组分。在水溶性组分中，各样品间均具有显著性差异（P<0.05），F-3 的荧光强度高于 F-2，F-1 的荧光强度最低，这可能是因为美拉德反应形成的荧光化合物具有较高的分子量。在醇溶性组分中，F-1 的荧光值最低，与其他组分相比具有显著性差异（P<0.05），MRPs 和 F-2、F-3 之间差异性不显著（P>0.05），这可能是因为在 MRPs 中，小分子的物质易溶于乙醇，而较高分子量的产物醇溶性差，导致测定中荧光值低。从吸光度与抗氧化活性变化趋势上看，产物中具有在紫外和可见区的官能团数量增加的同时抗氧化能力也增大，这说明 MRPs 中的抗氧化集团是增加的，这与相关报道是一致的[9]。

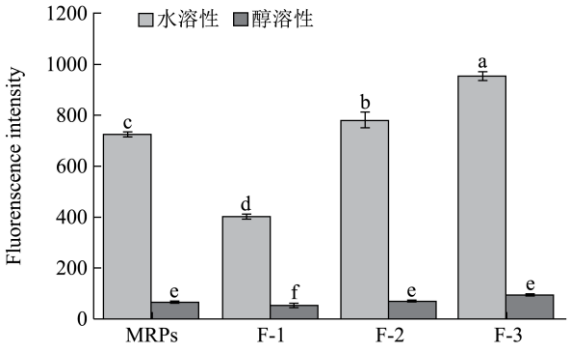


图 5 不同超滤组分的荧光强度

Fig.5 The fluorescence intensity of different water-soluble and alcohol-soluble components

注：a~f:不同字母代表差异性显著（p<0.05）。

2.6 傅里叶变换红外光谱 FT-IR 分析

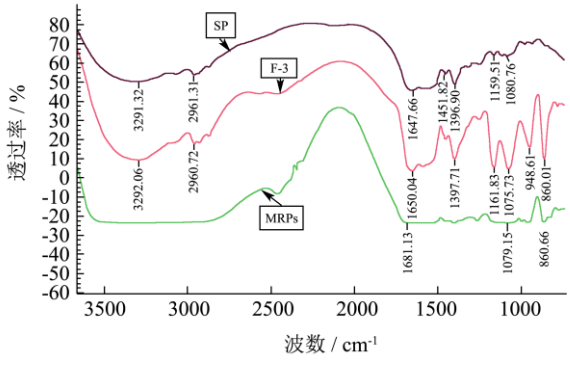


图 6 鲢鱼肽(SP)、MRPs 和 F-3 的红外光谱图

Fig.6 Infrared spectra of silver carp peptide, MRPs and MRPs III

FT-IR 光谱分析是研究蛋白质-碳水化合物结构特征的一项特别有效的技术。蛋白质中最显著的光谱特征是有酰胺Ⅰ带和酰胺Ⅱ带，分别在 1650 cm^{-1} 和 1540 cm^{-1} 左右[10]。酰胺Ⅰ带中约 80%由于肽键的面内羰基 C=O 伸缩振动及其附近的 N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩振动而产生。而酰胺Ⅱ带，主要是由 60%的 N-H 面内

弯曲振动和 40%的 C-N 伸缩振动产生[11]。在 1200~850 cm^{-1} 的范围内，各碳水化合物都有很强的特征吸收，也就是所谓的指纹区[12]，由 C-O、C-C 的伸缩振动或者 C-H 的弯曲振动引起[12]。

肽进行美拉德反应时，由于一些功能基团的消耗和产生可能引起红外光谱的一些变化。其氨基减少，伴随 MR 的产物如 Amadori 化合物（C=O），Schiff 碱（C=N）和吡嗪（C-N）可能会增加[13]。图 6 为鲢鱼肽、MRPs 和 F-3 的红外光谱图。F-1（图中未显示）与 MRPs 的红外光谱图相似，F-2（图中未显示）和 F-3 的光谱图相似。3 条光谱分别在 1647.66 cm^{-1}、1650.04 cm^{-1} 和 1681.13 cm^{-1} 处有吸收峰，分别代表鲢鱼肽、MRPs 和 F-3 的酰胺Ⅰ带。与鲢鱼肽相比，F-3 的强度增加，可能是 MR 修饰所致。鲢鱼肽在 1200~850 cm^{-1} 的范围内吸收较弱，而 MRPs 在 860.66 cm^{-1} 处有强烈的吸收峰，F-3 在 860.01 cm^{-1} 和 948.61 cm^{-1} 处有强烈的吸收峰，说明还原糖可能连接到肽的骨架上，导致肽的结构发生部分变化。

3 结论

鲢鱼肽美拉德反应产物经超滤分级、溶剂分级后，通过对不同组分的 DPPH 自由基清除活性、金属离子螯合活性和总抗氧化能力的测定可以看出，水溶性组分中的高分子量化合物比低分子量化合物具有较高抗氧化活性，而醇溶性组分中高分子量的抗氧化活性比低分子量的低。高分子量的组分在 420 nm 处有较强吸收，但荧光强度值与褐变强度的变化趋势不一致，这可能是由于褐色物质的产生先于荧光物质的生成。FT-IR 分析发现，F-2 和 F-3 酰胺Ⅰ带的强度增加，可能是 MR 修饰所致，说明还原糖可能连接到肽的骨架上，导致肽的结构发生部分变化。因此，鲢鱼肽 MRPs 中起主要抗氧化作用的为水溶性物质；MRPs 中相对高分子量的有色水溶性产物抗氧化活性强。

参考文献

[1] Silván J M, van de Lagemaat J, Olano A, et al. Analysis and biological properties of amino acid derivates formed by Maillard reaction in foods [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41: 1543-1551

[2] Gu F, Kim J M, Hayat K., et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system [J]. Food Chem., 2009, 117: 48-54

[3] Gu F, Kim J M, Abbas S, et al. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-glucose [J]. Food Chem., 2010, 120: 505-511

[4] Rufián-Henares J A, Morales F J. Functional properties of melanoidins: in vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities [J]. Food Research International, 2007, 40: 995-1002

[5] Jing H, Kitts D D. Antioxidant activity of sugarlysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 429: 154-163

[6] Amigo-Benavent M, del Castillo M D, Fogliano V. Are the major antioxidants derived from soy protein and fructo-oligosaccharides model systems colored aqueous soluble or insoluble compounds? [J]. Eur. Food Res. Technol., 2010, 231: 545-553

[7] 孟艳丽,曾名湧,张军宁,等.温度对鲢鱼肽美拉德反应产物的化学特性和抗氧化活性的影响[J].海洋湖沼通报, 2013,1: 69-74
MENG Yan-li, ZENG Ming-yong, ZHANG Jun-ning, et al. Effects of different temperatures on the chemical properties and the antioxidant activity of Maillard reaction products from chub peptide [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2013, 1: 69-74

[8] Morales F J, Jiménez-Pérez S. Peroxyl radical scavenging activity of melanoidins in aqueous systems [J]. Eur. Food Res. Technol., 2004, 218: 515-520

[9] 章银良,张陆燕,周文权,等.不同温度对酪蛋白-木糖模式美拉德反应产物抗氧化的影响[J].现代食品科技,2014, 30(4): 211-219
ZHANG Yin-liang, ZHANG Lu-yan, ZHOU Wen-quan. Effects of different temperatures on the antioxidant activity of Maillard reaction products from casein-xylose model system [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(4): 211-219

[10] Oliver C M, Kher A, McNaughton D, Augustin M A. Use of FTIR and mass spectrometry for characterization of glycated caseins [J]. Journal of Dairy Research, 2009, 76: 105-110

[11] Krilov D, Balarin M, Kosovic M, et al. FT-IR spectroscopy of lipoproteins-a comparative study [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2009, 73: 701-706

[12] Kirill I S. Determination of structural peculiarities of dexran, pullulan and γ-irradiated pullulan by fourier-transform IR spectroscopy [J]. Carbohydr. Res., 2002, 337: 1445-1451

[13] Farhat I A, Orset S, Moreau P, et al. FTIR study of hydration phenomena in protein-sugar systems [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1998, 207: 200-208

现代食品科技