

超滤膜分离鲍鱼内脏酶解物及其体外抗氧化活性的研究

叶燕军¹, 陈俊^{1,2}, 翁武银^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

(2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建厦门 361021)

摘要: 利用超滤膜对鲍鱼内脏酶解物进行分离, 考察了各分子量段酶解物的成分组成和抗氧化活性。利用截留分子量为 10000 u、3000 u、500 u 的超滤膜分离得到 FA、FB、FC 和 FD 等四个组分中, FA 组分的总糖和蛋白含量分别为 34.06% 和 17.20%, 而 FB、FC 和 FD 等组分主要是由蛋白组成, 其游离氨基酸含量分别高达 23.20、25.4、28.68 g/100g。根据 Tricine-SDS-PAGE 和 β -消除反应的分析结果, 表明 FA 中位于间隔胶的高分子组分(HMWF)含有 N-糖苷键结合的糖蛋白, 而分子量为 25 ku 的成分主要是蛋白。凝胶渗透色谱数据表明 FB、FC 和 FD 的分子量主要分布在 300 u 左右。另一方面, 体外抗氧化结果表明, 在低浓度下 FA 组分具有较强的 DPPH 自由基清除活性和还原力; 当质量浓度高于 5 mg/mL 时, 各超滤组分的 DPPH 自由基清除活性无明显差异, 但 FB、FC 和 FD 组分的还原力明显高于 FA 组分; 不管是低浓度还是高浓度, FB、FC 和 FD 组分的羟自由基清除活性都明显高于 FA 组分。

关键词: 鲍鱼内脏; 酶解; 超滤; 组分; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2015)5-130-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.021

In Vitro Antioxidant Activity of Abalone Viscera Hydrolysates Isolated by Ultrafiltration

YE Yan-jun¹, CHEN Jun^{1,2}, WENG Wu-yin^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

(2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen, 361021, China)

Abstract: Abalone viscera hydrolysates were separated by ultrafiltration, and the chemical composition and antioxidant activity of the hydrolysates in different ranges of molecular-weight were investigated. Four fractions (FA, FB, FC, and FD) were obtained by membrane ultrafiltration with molecular weight cut-off (MWCO) of 10000, 3000, and 500 u. In fraction FA, total sugar and protein contents were 34.06% and 17.20%, respectively. However, fractions FB, FC, and FD were mainly composed of proteins, and the free amino acid content was 23.20, 25.47, and 28.68 g/100 g, respectively. Based on the results from tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and β -elimination, the high molecular-weight fraction (HMWF) of FA in the spacer gel contained glycoproteins with N-glycosidic linkage, and components with molecular weight of 25 ku were proteins. Gel permeation chromatography data indicated that molecular weight of the fractions FB, FC, and FD were each approximately 300 u. Additionally, the result of *in vitro* antioxidant assay indicated that fraction FA had a relatively strong 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging ability and reducing power at low concentration. When the concentration was increased above 5 mg/mL, there were no significant differences in the DPPH radical-scavenging abilities among these fractions, but the reducing power of fraction FA was lower than that of other fractions. In both, low and high concentrations, the hydroxyl radical-scavenging abilities of fractions FB, FC, and FD were stronger than that of FA.

Key words: abalone viscera; enzymatic hydrolysis; ultrafiltration; fractions; antioxidant activities

收稿日期: 2014-09-04

基金项目: 厦门市海洋经济发展专项资金(13CZP003HJ05); 海洋公益性行业科研专项(201405016)

作者简介: 叶燕军(1989-), 女, 硕士, 研究方向: 水产品加工副产物综合利用

通讯作者: 翁武银(1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质化学和水产加工副产物综合利用研究

2013年福建省的鲍鱼产量已经达到8.8万t,占全国鲍鱼总产量的80.1%^[1]。随着鲍鱼产量的不断增加,为了适应市场需求,利用鲍鱼研发的煮干鲍、冷冻鲍、罐头鲍等加工产品不断增加。在加工生产过程中会产生约占鲍鱼重量25%的内脏下脚料。然而,这些加工副产物目前主要作为生产饲料和调味料的原料,宝贵的鲍鱼资源没有得到充分的利用。据报道,鲍鱼内脏经酶解、醇沉获得的多糖具有良好的抗氧化活性^[2],而且酶解法提取的鲍鱼内脏糖复合物也具有较强的还原能力和自由基清除能力^[3]。由于鲍鱼内脏富含多糖和蛋白,因此鲍鱼内脏利用蛋白酶进行酶解将产生多糖、糖肽以及蛋白肽组成的混合物,可以成为功能保健食品的优质原料。然而,有关鲍鱼内脏酶解产物的成分与抗氧化性之间的相关性目前还尚未报道。

通常,体内自由基和抗氧化酶会维持在一定平衡状态。当自由基产生过量时,人体中的细胞膜、核酸和蛋白容易受到自由基攻击,进而引发一系列的慢性疾病,如衰老、糖尿病和癌症等。另一方面,相对合成抗氧化剂,来源于食品等天然物质的活性多糖和寡肽由于自身具有良好的抗氧化能力、无副作用等特点,近年来逐渐受到关注^[4-5]。

超滤是一种以压力差为动力的膜分离技术,利用不同截留分子量的超滤膜对鲍鱼内脏酶解物进行分离,可以对不同分子量大小的多糖或寡肽进行分离和浓缩。因此,本研究利用超滤膜将鲍鱼内脏酶解物分成不同的分子量段,并对其成分和抗氧化活性进行分析,旨在为进一步利用鲍鱼内脏提取高抗氧化活性成分提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 原料

鲍鱼内脏,由厦门市岛之原生物科技有限公司提供;胰酶和木瓜酶,南宁庞博生物技术有限公司;PAS染色试剂盒,上海杰美基因医药科技有限公司;还原型谷胱甘肽(GSH),上海捷瑞生物工程有限公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器和设备

UV-8000A型紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;超滤膜,厦门三达膜科技有限公司;日立835-50型氨基酸分析仪,日本日立制造所;Agilent 1200型高效液相色谱仪,美国Agilent公司;Avanti J-25离心机,美国Beckman公司。

1.3 鲍鱼内脏酶解物的制备

将鲍鱼内脏捣碎,加入鲍鱼内脏质量2%的胰酶,在pH 8.0,50℃条件下酶解6h,然后将酶解液的pH调整至5.5,加入鲍鱼内脏质量1%的木瓜蛋白酶,在50℃条件下继续酶解12h。酶解液利用100℃灭酶10min,将离心(8000 r/min,10 min)获得的上清液依次利用截留分子量为10000 u、3000 u、500 u的超滤膜进行分离,分别收集FA(>10000 u)、FB(3000~10000 u)、FC(500~3000 u)和FD(<500 u)组分,通过冷冻干燥制备成干品供以下实验使用。

1.4 成分分析

样品总糖含量的测定参照Jaishee等人的方法^[6],蛋白含量按照GB/T 5009.5-1985的方法进行测定。

1.5 氨基酸组成分析

样品利用6 mol/L HCL于110℃真空条件下水解22 h,经0.22 μm膜过滤后,利用氨基酸分析仪测定样品的总氨基酸组成。对于游离氨基酸的测定,利用碘基水杨酸沉淀除掉蛋白和多肽,经0.22 μm膜过滤后,再利用氨基酸分析仪进行测定。

1.6 Tricine-SDS-PAGE

Tricine-SDS-PAGE参照Schägger报道的方法^[7]进行。其中,堆积胶为16.5%,间隔胶为10.0%,分离胶为4.0%。样品利用蛋白可溶性液(8 mol/L尿素-2% SDS-20 mmol/L Tris-HCL, pH 8.8)溶解后进行电泳。电泳结束后,蛋白染色是利用考马斯亮蓝R-250染色液进行染色;糖蛋白染色是利用PAS染色试剂盒进行染色。

1.7 HPLC

样品的分子量分布利用凝胶渗透色谱(GPC)进行测定。色谱柱为TSKgel G2000 SWxL(300 mm×7.8 mm),流动相为乙腈:水:三氟乙酸(45:55:0.1, V/V/V),在柱温30℃、流速0.5 mL/min的条件下,以检测波长为214 nm对样品进行测定。其中,以细胞色素C(12327 u)、抑肽酶(6533 u)、氧化型谷胱甘肽(613 u)、三甘肽(189 u)、甘氨酸(75 u)作为标准品绘制分子量标准曲线。

1.8 β-消除反应

根据王春玲等报道的方法^[8],样品利用0.2 mol/L NaOH配成质量浓度为0.1 mg/mL的溶液,45℃水浴

反应 30 min, 在波长 190~400 nm 进行紫外扫描, 其中利用蒸馏水溶解的样品作为对照。

1.9 抗氧化活性的测定

1.9.1 DPPH 自由基清除能力的测定

根据 Zhou 等报道的方法^[9]稍作修改。在 2 mL 的样品水溶液中加入 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液, 避光反应 30 min 后, 离心(10000 r/min, 10 min), 取上清在 517 nm 处测吸光度值(A_s), 以蒸馏水替代样品在测定波长下的吸光值(A), 以 2 mL 乙醇替代 DPPH 乙醇溶在测定波长下的吸光值(A_0), 以 GSH 作为阳性对照。样品对 DPPH 自由基清除率根据以下公式进行计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%)=[1-(A_s-A_0)/A] \times 100\%$$

1.9.2 羟自由基清除能力的测定

根据 Gu 等报道的方法^[10]稍作修改。在 1 mL 的样品水溶液中依次加入 0.3 mL 8 mmol/L FeSO_4 、0.25 mL 20 mmol/L H_2O_2 、1 mL 3 mmol/L 水杨酸后, 在 37 °C 水浴下反应 30 min, 冷却后加入 0.45 mL 蒸馏水, 离心(5000 r/min, 10 min), 取上清于 510 nm 处测吸光度值(A_s), 以 1 mL 蒸馏水替代样品在测定波长下的吸光值(A), 以 1 mL 蒸馏水替代水杨酸在测定波长下的吸光值(A_0), 以 GSH 作为阳性对照。样品对羟自由基清除率根据以下公式进行计算。

$$\text{羟自由基清除率}(\%)=[1-(A_s-A_0)/A] \times 100\%$$

1.9.3 还原能力的测定

根据 Yen 等报道的方法^[11]稍作修改。在 1 mL 样品水溶液中, 加入 1 mL 0.2 mol/L pH 6.6 的磷酸缓冲液和 1 mL 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 在 50 °C 水浴下反应 20 min, 然后加入 1 mL 10% 三氯乙酸, 充分混匀并冷却至室温, 离心(4000 r/min, 10 min)后, 取 2 mL 上清加入 2 mL 的蒸馏水和 0.4 mL 0.1% 三氯化铁, 在 700 nm 下测吸光度值, 以 GSH 作为阳性对照。其中吸光度值越高, 表示样品的还原力越好。

1.10 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 同时进行 Duncan 组间比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 鲍鱼内脏及其酶解超滤物的成分

经过测定, 本研究使用的鲍鱼内脏基本成分如表 1 所示。由表可知, 鲍鱼内脏原料中粗蛋白含量为 11.67%, 这与 Zhu 等^[3]报道的新鲜鲍鱼内脏相比, 蛋

白含量略低, 可能是由于本研究采用的内脏是鲍鱼经蒸煮后再摘取, 导致包含游离氨基酸等在内的水溶性蛋白在蒸煮过程中流失引起的。

表 1 鲍鱼内脏的基本成分

Table 1 Main components of abalone viscera

蛋白含量/%	总糖含量/%	灰分含量/%	水分含量/%
11.67±0.00	5.60±0.08	3.33±0.40	75.17±2.48

表 2 超滤膜分离鲍鱼内脏酶解物的蛋白含量和总糖含量

Table 2 Protein content and total sugar content of fractions from abalone viscera hydrolysates, separated by ultrafiltration

	FA	FB	FC	FD
蛋白含量/%	17.20±0.16 ^d	55.27±0.35 ^c	58.82±0.79 ^b	66.97±0.02 ^a
总糖含量/%	34.06±2.06 ^a	6.88±0.16 ^b	3.24±0.07 ^c	2.06±0.07 ^d

注: 同一行相同小写字母表示不显著($p > 0.05$)。

利用截留分子量为 10000 u、3000 u 和 500 u 的超滤膜对鲍鱼内脏酶解物进行分离, 对得到的 FA、FB、FC 和 FD 等四个组分的蛋白含量和总糖含量进行了测定, 结果如表 2 所示。在 FA 组分中, 蛋白含量明显低于总糖含量。随着膜截留分子质量的下降, 分离得到的组分中蛋白含量呈现上升的趋势, 总糖含量逐渐减少。在 FD 组分中, 蛋白含量约是总糖含量的 33 倍, 表明该组分主要是由蛋白肽组成。由表 2 的结果还可获知, 鲍鱼内脏经过蛋白酶酶解后, 会逐渐降解成多糖、糖肽和蛋白肽, 通过超滤膜的分级截留可以达到一定程度的分离。

2.2 超滤组分的氨基酸组成

对不同超滤膜截留获得的鲍鱼内脏酶解物的氨基酸组成进行测定, 结果如表 3 所示。在总氨基酸组成方面, FA 组分中的 Cys、Met、Phe 和 Val 含量都较高。当超滤膜截留分子质量的下降, 除 Cys 以外其他种类氨基酸含量都出现一定程度的增加, 其中 Glu、Lys、Leu 和 Tau 等含量增加较为明显。在 FD 组分中, Glu 含量可以达到 11.34 g/100g, 与报道的绿鲍内脏蛋白酶解物中 Glu 含量(11.60 g/100g)类似^[12]。另一方面, 由表 3 还可以发现 FA 组分的游离氨基酸大约只占总氨基酸含量的 5%, 表明在该组分中大部分氨基酸是以多肽或糖肽的形式存在。然而, 不管是 FB、FC, 还是 FD 组分, 都含有大量的游离氨基酸, 而且 Tau 都是以游离态的形式存在。在 FB 和 FC 组分中, Tyr 主要以游离氨基酸形式存在, 而在 FD 组分中游离态的 Tyr 明显少于总氨基酸, 表明有一部分可能是以多肽的形式存在。据研究报道, Glu、Asp、Pro、Tyr 和 Arg 是抗氧化性氨基酸, 都具有良好的清除自由基能力^[13~14]; 而在大豆蛋白肽的 N 末端含有 Val 或 Leu^[15],

以及在猪皮胶原肽的 C 末端含有 Arg^[16]时, 肽的自由基清除能力都较强; 游离态的 Tau 可以增强雏鸡体内抗氧化酶的活性^[17]。因此, 表 3 的氨基酸组成结果表明鲍鱼内脏酶解物各超滤组分都可能具有良好的抗氧化活性。另一方面, 从营养角度来看, 不同超滤膜截

留获得的鲍鱼内脏酶解物的 EAA/TAA 值都接近 40%, EAA/NEAA 值都大于 60%, 符合 FAO/WHO 的理想模式, 说明制备的鲍鱼内脏酶解物各超滤组分都是良好的蛋白资源。

表 3 超滤膜分离鲍鱼内脏酶解物的氨基酸组成 (g/100g 干基)

Table 3 Amino acid composition of fractions from abalone viscera hydrolysates, separated by ultrafiltration (g/100 g dry basis)

氨基酸	总氨基酸				游离氨基酸			
	FA	FB	FC	FD	FA	FB	FC	FD
天门冬氨酸 Asp	0.76	6.26	6.64	5.04	Nd	1.14	1.44	0.93
苏氨酸 Thr	0.88	3.00	3.28	2.12	Nd	1.76	2.17	0.56
丝氨酸 Ser	0.65	2.53	2.66	1.49	Nd	1.21	1.29	0.49
谷氨酸 Glu	0.86	6.61	6.47	11.34	0.02	2.16	2.30	2.85
甘氨酸 Gly	0.41	3.12	3.38	4.80	0.06	0.79	1.04	1.48
丙氨酸 Ala	0.48	2.84	3.00	2.71	0.06	1.57	1.59	2.69
半胱氨酸 Cys	1.66	1.62	1.72	1.14	0.07	0.53	0.62	0.70
缬氨酸 Val	1.01	3.35	3.43	5.32	0.10	1.83	1.90	3.31
甲硫氨酸 Met	1.18	1.71	1.62	2.21	0.06	0.83	1.18	1.79
异亮氨酸 Ile	0.71	2.95	3.44	4.48	0.07	1.43	1.48	2.52
亮氨酸 Leu	0.77	3.64	3.63	6.09	0.09	2.64	3.05	4.85
酪氨酸 Tyr	0.31	1.52	1.01	2.47	Nd	1.48	1.04	1.79
苯丙氨酸 Phe	1.08	2.97	2.99	3.39	Nd	0.17	0.22	0.23
赖氨酸 Lys	0.54	3.24	3.46	7.00	0.04	2.42	2.52	1.16
组氨酸 His	0.14	0.90	1.00	1.80	0.05	0.50	0.57	0.75
精氨酸 Arg	0.23	3.31	3.42	4.89	Nd	2.72	3.04	2.55
脯氨酸 Pro	0.14	2.52	2.64	3.39	Nd	0.02	0.02	0.03
总氨基酸 TAA	11.81	52.09	53.79	69.68	0.62	23.20	25.47	28.68
牛磺酸 Tau	0.75	6.14	7.04	7.36	0.40	5.49	6.79	6.36
必须氨基酸 EAA	6.17	20.86	21.85	30.61	0.36	11.08	12.52	14.42
非必须氨基酸 NEAA	5.27	27.02	27.52	32.38	0.21	8.90	9.34	10.96

注: 必需氨基酸: 甲硫氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、色氨酸、苏氨酸; 非必需氨基酸: 谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天门冬氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸; Nd: 未检测到。

2.3 Tricine-SDS-PAGE

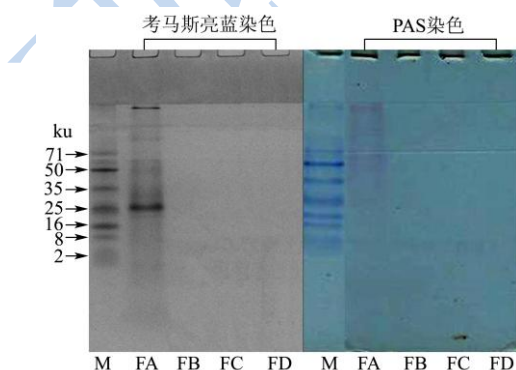


图 1 鲍鱼内脏超滤组分的 Tricine-SDS-PAGE 图谱

Fig.1 Tricine-SDS-PAGE patterns of fractions from abalone viscera hydrolysates, separated by ultrafiltration

为了进一步了解鲍鱼内脏超滤组分中蛋白肽的分子量组成, 利用 Tricine-SDS-PAGE 进行分析, 结果如图所示。FA 除了进入间隔胶的高分子组分 (HMWF) 和 25 ku 两种主要蛋白以外, 在 25 ku 附近还有少量连续分布的蛋白条带。然而, 在 FB、FC 和 FD 中都没有出现明显的蛋白条带, 表明鲍鱼内脏酶解物超滤组分中蛋白肽分子量都应该低于 2 ku。Tricine-SDS-PAGE 经 PAS 染色后, 可以发现在 FA 组分的 50 ku-HMWF 之间出现明显的紫红色谱带, 表明这区间含有一定量的糖蛋白, 而 25 ku 的电泳条带主要是蛋白。然而, 在 FB、FC 和 FD 组分中都没有发现紫红色的条带。一方面可能是该组分中糖蛋白肽含量低(表 2), 另一方面可能是糖蛋白肽的分子量低于 2 ku (考马斯亮蓝图), 导致无法检测。

2.4 HPLC

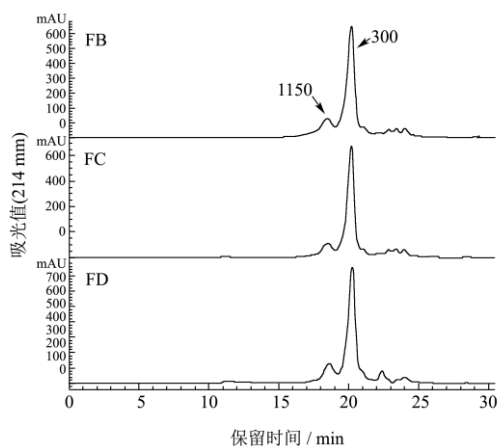


图2 鲍鱼内脏超滤组分高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of the fractions from abalone viscera hydrolysates, separated by ultrafiltration

由于 Tricine-SDS-PAGE 只能检测到 2 ku 以上分子量的蛋白, 因此利用 HPLC 对 FB、FC 和 FD 组分中蛋白肽的分子量分布进行了测定(图 2)。从图可以看出, FB、FC 和 FD 组分中都含有 1150 u 和 300 u 两个蛋白峰, 其中 300 u 是主要蛋白峰。然而, 即使利用不同超滤膜截留后, 这 3 种组分中蛋白肽的分子量分布却没有出现明显的差异。

2.5 β-消除反应

图 3 比较了碱处理前后鲍鱼内脏超滤组分的紫外吸收光谱。据报道, 200 nm 附近不仅是糖的特征吸收, 也可能是肽键的特征吸收^[18-19]。由图 3a 可知, 鲍鱼内脏酶解物的各超滤组分在 195 nm 左右都出现强吸收峰。而且, 在相同的质量浓度下, FA 组分的吸收峰明显较弱, 而 FB、FC、FD 组分之间差异不是很明显。这与鲍鱼内脏各超滤组分的糖蛋白的比例变化趋势类似(表 2), 表明 195 nm 附近鲍鱼内脏蛋白肽的紫外吸收强于鲍鱼内脏多糖。

另一方面, 当鲍鱼内脏各超滤组分利用 0.2 mol/L NaOH 处理后, 195 nm 附近的吸收峰开始消失, 但在 220 nm 附近出现明显的吸收峰(图 3b), 这可能是 195 nm 附近的吸收峰红移的结果。而且, 从图 3b 还可以看出, FD 组分在 240 nm 处出现较强的特征吸收, 而 FB 和 FC 组分次之, FA 组分最低。曾麒燕等^[20]发现 O-糖苷键经碱水解后, 肽链中的丝氨酸和苏氨酸可转变为 α-氨基丙烯酸和 α-氨基丁烯酸, 而这两种不饱和脂肪酸在 240 nm 处存在特征吸收。因此, 图 3b 的结果说明了 O-糖苷键在 FD 组分中含量最高, 而在 FA 组分最低。然而, PAS 染色的电泳图谱表明 FA 组分

明显存在大量的糖蛋白, 可以推断 FA 组分中的糖肽主要通过 N-糖苷键进行结合。这与王春玲等^[8]报道的结果相似。

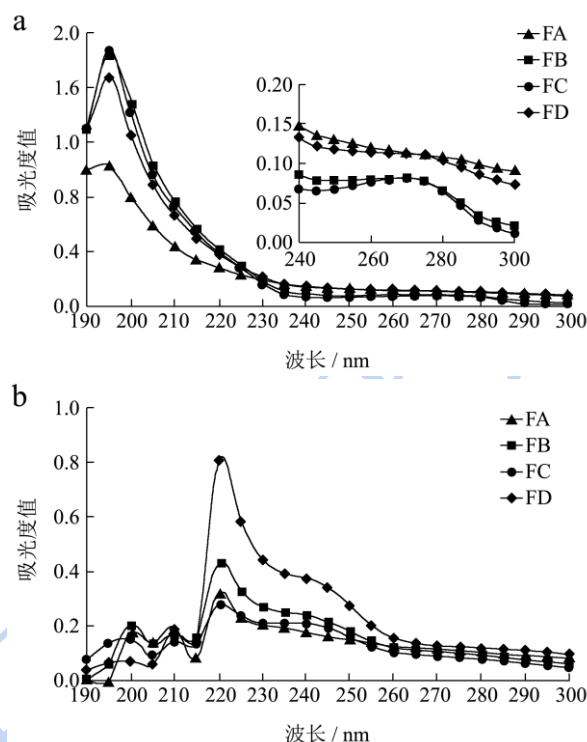


图3 鲍鱼内脏超滤组分碱处理前后紫外吸收光谱

Fig.3 UV absorption spectra of the fractions from abalone viscera hydrolysates, separated by ultrafiltration without (a) or with (b) NaOH treatment

注: a 为碱处理前; b 为碱处理后。

2.6 抗氧化活性

2.6.1 DPPH 自由基清除能力

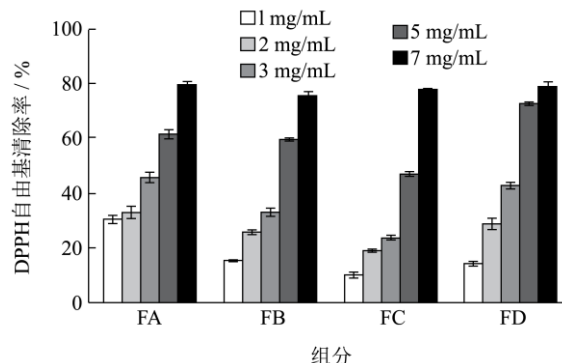


图4 不同浓度、分子量段的鲍鱼内脏酶解物的 DPPH 自由基清除能力

Fig.4 DPPH radical-scavenging ability of the fractions from abalone viscera hydrolysates at different concentrations

图 4 显示了鲍鱼内脏酶解物超滤组分对 DPPH 自由基的清除效果。由图可以看出, 不管是哪一种超滤组分, 随着鲍鱼内脏蛋白肽质量浓度的增加, DPPH

自由基的清除率都呈上升趋势,表明 DPPH 自由基清除率与鲍鱼内脏蛋白肽质量浓度之间存在密切的量效关系。在低浓度时,FA 组分对 DPPH 自由基的清除效果最好。然而,当浓度达到 5 mg/mL 时,FD 组分的 DPPH 自由基清除率明显高于 FA 组分。当浓度为 7 mg/mL 时,各超滤组分之间的 DPPH 自由基清除率没有明显的差异,都达到 80% 左右。Zhu 等^[21]利用酶解法提取的鲍鱼性腺多糖,在质量浓度为 5 mg/mL 时其 DPPH 自由基清除达 60% 左右。这与本研究中 FA 组分的 DPPH 自由基清除能力基本一致,表明 FA 组分主要是鲍鱼内脏多糖起到主要的作用。由于 FA 主要是由糖组成,而 FD 主要是由蛋白肽组成(表 2),因此各超滤组分对 DPPH 自由基的清除能力的不同,可能是由于这些组分中糖和蛋白肽比例不同引起的。另外,根据图 4 数据进行分析,鲍鱼内脏酶解物的 FA、FB、FC 和 FD 的 DPPH 自由基清除能力(IC₅₀ 值)分别为 4.00±0.10 mg/mL、4.80±0.05 mg/mL、5.40±0.10 mg/mL 和 3.40±0.10 mg/mL,但都明显低于 GSH 的 IC₅₀ 值(0.32±0.08 mg/mL)。

2.6.2 羟自由基清除能力

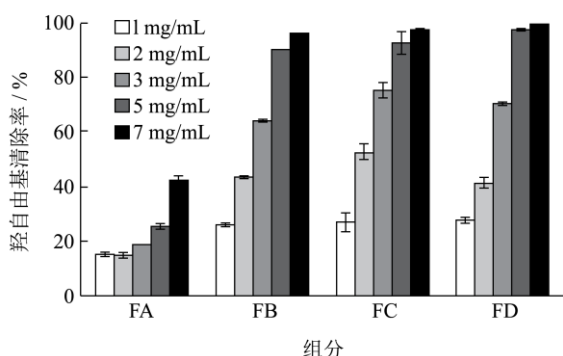


图 5 不同浓度、分子量段的鲍鱼内脏酶解物的羟自由基清除能力

Fig.5 Hydroxyl radical-scavenging abilities of the fractions from abalone viscera hydrolysates at different concentrations

图 5 显示了鲍鱼内脏酶解物超滤组分对羟自由基的清除效果。与 DPPH 自由基清除效果类似,随着鲍鱼内脏蛋白肽质量浓度的增加,各超滤组分的羟自由基清除率都呈上升的趋势。然而,不管是哪一种质量浓度,FA 组分对羟自由基清除效果都比其它三个组分差。当鲍鱼内脏蛋白肽质量浓度为 7 mg/mL 时,FB、FC 和 FD 组分对羟自由基清除率都能达到 90% 以上。Xie 等^[22]研究表明玉米蛋白水解物对羟自由基清除活性主要是通过提供电子或质子氢清除自由基。Tyr 中的酚羟基能作为氢供体^[23],自身就具有良好的抗氧化活性。有研究表明蜂王浆水解蛋白肽含 Tyr 残基时,羟自由基清除率可以得到增强^[24]。因此 FA 组分的羟

自由基清除活性低于 FB、FC 和 FD,可能是 FA 组分中 Tyr 含量较低(表 3)引起的。另外,根据图 5 数据进行分析,鲍鱼内脏酶解物的 FA、FB、FC 和 FD 的羟自由基清除能力(IC₅₀ 值)分别为 6.30±0.40 mg/mL、2.10±0.10 mg/mL、1.40±0.20 mg/mL 和 2.10±0.20 mg/mL,接近 GSH 的 IC₅₀ 值(2.13±0.04 mg/mL)。

2.6.3 还原能力

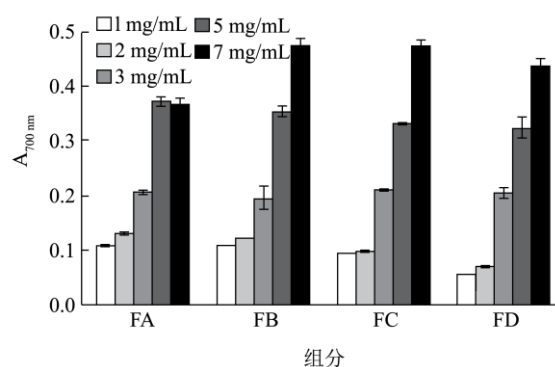


图 6 不同浓度、分子量段的鲍鱼内脏酶解物的还原能力

Fig.6 Reducing power of the fractions from abalone viscera hydrolysates at different concentrations

图 6 显示了鲍鱼内脏酶解物超滤组分的还原能力。由图可知,当超滤组分的质量浓度从 1 mg/mL 增加到 2 mg/mL 时,各组分的还原能力变化不明显,进一步提高质量浓度时,各超滤组分的还原力都出现明显的增强。当超滤组分的质量浓度超过 5 mg/mL 时,FA 组分的还原能力开始出现平衡,而 FB、FC 和 FD 组分的还原能力却还在增强。然而,还原能力(700 nm 下的吸光度值)达到 0.5 时,谷胱甘肽只需 0.15±0.01 mg/mL。Liu 等^[25]从乌骨鸡中提取抗氧化肽,发现肽的还原力主要与组成肽的 Glu、Asp 和 Arg 等亲水性氨基酸相关。在本研究中也发现 FB、FC 和 FD 组分中的 Glu、Asp 和 Arg 含量明显高于 FA 组分(表 3)。

根据以上抗氧化性的结果分析,表明 FB、FC 和 FD 组分之间的差异不是很明显,但与 FA 组分比较却有一定程度的不同,这可能跟 FB、FC 和 FD 组分的糖含量、蛋白含量和氨基酸组成(表 2,表 3),以及蛋白肽的分子量分布(图 1,图 2)等都没有明显差异的缘故。因此,今后只要采用截留分子量为 10000 u 的超滤膜对鲍鱼内脏酶解物进行分级截留,对糖和蛋白及其抗氧化活性物质能够达到一定程度的分离效果。

3 结论

3.1 利用不同截留分子量的超滤膜对鲍鱼内脏酶解物进行分离,得到 FA、FB、FC 和 FD 等四个组分,FA 主要由糖组成,而 FB、FC 和 FD 主要是由蛋白肽组成。

3.2 FA 组分中主要含有分子量为进入间隔胶的 HMWF 和 25 ku 两种成分, 其中 HMWF 成分中含有 N-糖苷键结合的糖蛋白, 25 ku 成分主要是蛋白; 而 FB、FC 和 FD 组分中蛋白肽的分子量主要分布在 300 u 附近, 组分中的糖蛋白主要通过 O-糖苷键进行结合。

3.3 在低浓度下, FA 组分具有较高的 DPPH 自由基清除率和还原力; 在高浓度下, 各超滤组分的 DPPH 自由基清除率没有明显的差异, 而 FB、FC 和 FD 的还原力却明显高于 FA 组分。不管是低浓度还是高浓度, FB、FC 和 FD 组分的羟自由基清除率都明显高于 FA 组分。

参考文献

- [1] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014
The ministry of agriculture fisheries bureau. china fishery statistical yearbook [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2014
- [2] Zhu B W, Wang L S, Zhou D Y, et al. Antioxidant activity of sulphated polysaccharide conjugates from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) [J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(6): 1663-1668
- [3] Zhou D Y, Zhu B W, Qiao L, et al. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 90(2): 148-154
- [4] 李松林. 克氏螯虾虾头 Protamex 蛋白酶水解产物的抗氧化活性和功能性质的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(4): 729-732
LI Song-lin. Antioxidant activity and functional properties of the hydrolysate of Grayfish (*Procambarus clarkia*) head protein prepared with protamex [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(4): 729-732
- [5] 何小庆, 曹文红, 章超桦, 等. 波纹巴非蛤蛋白酶解产物的抗氧化活性及分子量分布研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 74-80
HE Xiao-qing, CAO Wen-hong, ZHANG Chao-hua, et al. Antioxidant activity and molecular weight distribution of hydrolysates from *Paphia Undulate* protein [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(1): 74-80
- [6] Jaishee N, Chakraborty U. Evaluation of in vitro antioxidant activities of *Pteris biaurita* L [J]. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 6(2): 413-421
- [7] Sch ägger H. Tricine-SDS-PAGE [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 16-22
- [8] 王春玲, 夏焱, 张士娇, 等. 家蝇蛹甘露糖结合凝集素的结构及免疫调节作用[J]. 生物工程学报, 2013, 29(5): 601-611
WANG Chun-lin, XIA Yan, ZHANG Shi-jiao, et al. Structure and immunomodulation activity of a novel mannose binding lectin from housefly pupae [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(5): 601-611
- [9] Zhou D Y, Tang Y, Zhu B W, et al. Antioxidant activity of hydrolysates obtained from scallop (*Patinopecten yessoensis*) and abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) muscle [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(2): 815-822
- [10] Gu H F, Li C M, Xu Y J, et al. Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp [J]. *Food Research International*, 2008, 41(2): 208-217
- [11] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(1): 27-32
- [12] Viana M T, D'Abramo L R, Gonzalez M A, et al. Energy and nutrient utilization of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*) during starvation [J]. *Aquaculture*, 2007, 264(1-4): 323-329
- [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] Li B, Chen F, Wang X, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(4): 1135-1143
- [15] Suetsuna K, Chen J R. Isolation and Characterization of peptides with antioxidant activity derived from wheat gluten [J]. *Food Science and Technology Research*, 2002, 8(3): 227-230
- [16] Lapsongphon N, Yongsawatdigul J. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 992-999
- [17] 李丽娟, 王安, 王鹏. 牛磺酸对爱拔益加肉雏鸡生长性能及抗氧化功能的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(3): 696-701
LI Li-juan, WANG An, WANG Peng. Effects of taurine on growth performance and anti-oxidative ability of aa broilers [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(3): 696-701
- [18] 董洪新, 吕作舟. 阿魏侧耳酸提水溶性多糖的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 101-103
DONG Hong-xin, LV Zuo-zhou. Study on soluble polysaccharide by acid extraction from *Pleurotus Ferulae* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(1): 101-103

- [19] 刘惠君,刘维屏,陈爱平,等.光谱法研究异丙甲草胺及其S-对映体与脲酶的相互作用机制[J].光谱学与光谱析, 2004, 24(2):166-168
LIU Hui-jun, LIU Wei-ping, CHEN Ai-ping, et al. The reaction mechanism of metolochlor and S-isomer with urease [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2004, 24(2): 166-168
- [20] 曾麒燕,周德义,吴耀生,等.红桂木凝集素糖蛋白的特征及其糖肽键性质的分析[J].广西医科大学学报, 1999, 16(3):293-295
ZENG Qi-yan, ZHOU De-yi, WU Yao-sheng, et al. An analysis of glycoprotein characteristic and the nature of glycopeptides linkage *Artocarpus Lingnanensis* lectin [J]. Journal of Guang Xi Medical University, 1999, 16(3): 293-295
- [21] Zhu B W, Zhou D Y, Li T, et al. Chemical composition and free radical scavenging activities of a sulphated polysaccharide extracted from abalone gonad(*Haliotis Discus Hannai* Ino) [J]. Food Chemistry, 2010, 121(3): 712-718
- [22] Xie Z J, Huang J R, Xu X M, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 370-376
- [23] Wiriyaphan C, Chitsomboon B, Yongsawadigul J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts [J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 104-111
- [24] Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M, et al. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 238-245
- [25] Liu J H, Huang Y S, Tian Y G, et al. Purification and identification of novel antioxidative peptide released from Black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) [J]. European Food Research and Technology, 2013, 237(2): 253-263