

柴鱼蛋白肽的酶法制备、分离纯化及结构鉴定

任娇艳, 张榕, 杨继国, 尹嘉欣, 刘金钊, 宁正祥, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以柴鱼为原料, 酶解制备柴鱼蛋白肽, 并以抗氧化活性和蛋白质回收率为指标对柴鱼蛋白肽酶解工艺进行了优化研究, 用离子交换层析法和凝胶层析法对酶解液进行分离纯化, 最后用基质辅助激光解吸电离飞行时间 (MALDI-TOF-MS) 串联质谱法和反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 对分离组分进行结构鉴定。研究显示, 1、最佳用酶为木瓜蛋白酶; 最适加酶量为 1.0%; 最佳预处理条件为 100 °C、5 min; 最佳酶解时间为 4 h。2、经过 DEAE-52 纤维素层析后, 分离出 A、B、C 三个组分, 其中 A 组分的抗氧化活性最好, 后对 A 组分用 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶进一步分离纯化, 分离出 A1、A2 两个成分, 其中 A1 的抗氧化活性最好。3、用 MALDI-TOF-MS 质谱对 A1、A2 进行分子量鉴定, 检测发现, A1、A2 组分的分子量主要集中在 378.830 Da, 进一步做氨基酸分析后, 推测其可能含有的氨基酸组成为 Lys、Leu、Pro。

关键词: 柴鱼蛋白; 酶解; 多肽; 柱层析法; 质谱法; 氨基酸分析

文章编号: 1673-9078(2015)9-155-161

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.026

Enzymatic Preparation, Separation, and Structural Identification of Bonito Protein Hydrolysates

REN Jiao-yan, ZHANG Rong, YANG Ji-guo, YIN Jia-xin, LIU Jin-chuan, NING Zheng-xiang, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Bonito protein hydrolysates were prepared by enzymatic hydrolysis using bonito fish as the raw material. Enzymatic hydrolysis processing was optimized using antioxidant activity and protein recovery rate as indicators. The protein hydrolysates were then separated and purified by means of ion exchange chromatography and gel chromatography. Finally, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectra (MALDI-TOF-MS), in tandem with reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was applied for structural identification of fraction composition. The optimum For the hydrolysis reaction, the best hydrolytic enzyme and its concentration were papain; and 1.0%, respectively. The optimum pretreatment conditions were 100 °C for 5 minutes After 4-hour hydrolysis, three fractions, labeled A, B, and C, were obtained from the hydrolyzate through DEAE-52 cellulose column chromatography. Fraction A had the highest antioxidant activity, which was further separated by gel chromatography on Sephadex G-15 column to give two fractions. The fraction with the highest antioxidant activity was labeled A1 and the other was labeled A2. Using MALDI-TOF-MS, the molecular weights of A1 and A2 were found to be around 378.830 Da. Further amino acid analysis revealed that the short-chain peptide had a possible amino acid composition of Lys, Leu, and Pro.

Key words: bonito protein, enzymatic hydrolysis, peptides, column chromatography, mass spectrometry, amino acid assay

柴鱼, 属鲈形总目、柴属, 是重要的海洋洄游鱼类, 主要产于太平洋、印度洋和大西洋^[1]。柴鱼肉呈红色, 蛋白质含量高, 可鲜食。因其鱼脂含量低 (鲜态为 1%~5%), 在日本常加工为鱼干型产品, 制成罐头^[2]。鱼肉蛋白与人体肌肉蛋白的氨基酸比例接近,

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 广东省自然科学基金杰出青年基金项目 (S2013050013954); 教育部新世纪人才支持计划项目 (NCET-13-0213); 中央高校基本科研业务费重点项目 (2013ZZ0061)

作者简介: 任娇艳 (1980-), 女, 教授, 研究方向为食品生物化学、食品营养与健康

很容易被人体吸收, 因此是一种优秀的食物蛋白来源^[3]。制备动物蛋白肽通常采用酶法水解, 酶解法制备的产品因为生产条件温和, 水解条件容易控制, 水解产物的安全性也较高。在酶法制备中, 常用的酶类有中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、Alcalase、胰蛋白酶、菠萝蛋白酶, 探究的因素有料液比、加酶量、酶解温度、酶解时间、pH 值等^[4]。另外, 酶解前对原料进行适当的预处理, 比如加热, 可以在一定程度上提高酶解的效率。由于酶解产物的成分一般不纯, 分子量大小不一, 需要对酶解产物进行分离纯化, 然后对分离纯化的组分进一步做结构鉴定。用质谱法鉴定

多肽的结构有很大的优越性, 质谱法可以将蛋白质与序列数据库联系起来, 而且具有高效、快速的特点, 十分适合鉴定多肽的结构, 因此已经成为鉴定蛋白质和多肽的首选方法^[5]。

在我国主要贸易的鲑鱼类中, 柴鱼产量最高, 在我国东海、南海的捕捞量非常大。同时, 对柴鱼的使用主要集中于直接使用或者制成鱼干等初加工产品, 缺乏对深加工产品的开发, 产品附加值较低^[6]。而且, 柴鱼肉蛋白质含量很高, 鱼脂含量低。因此发展柴鱼深加工, 通过柴鱼的二次、三次加工增值实现柴鱼加工的系列化、多样化和高附加值是柴鱼加工利用的一个重要研究方向。

本实验以柴鱼肉为原料, 酶解制备柴鱼蛋白肽, 并用控制变量法对柴鱼蛋白肽酶解工艺进行了优化研究, 以提高柴鱼蛋白质的回收率和利用率。在此基础上, 将柴鱼蛋白肽通过 DEAE-52 纤维素离子交换柱和 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析柱, 对柴鱼蛋白肽混合物进行逐级分离纯化。最后, 对分离纯化的组分进行了结构鉴定。本文在探索柴鱼深加工工艺方面, 理论和实践意义重大。

1 材料与方法

1.1 材料

柴鱼, 购自广州鱼市场, 去头、尾、骨及内脏, 冲洗干净后于绞肉机中绞成肉糜, 放冰箱于 -4 °C 保存, 作为基础原料备用; 胰蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、Alcalase、水解蛋白酶, 购自南宁庞博生物工程有限公司; DEAE-52 纤维素层析柱填料, Sephadex G-15 葡聚糖凝胶柱填料, 购自广州市齐云生物技术有限公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 基质, 购自上海迈瑞尔化学技术有限公司; 乙腈, 购自瑞典 Pharmacia 公司; 标准混合多肽, 购自德国 Bruker 公司; 氨基酸标准品, 异硫氰酸苯酯 (PITC), 三乙胺 (TEA), 购自 Sigma 公司; 其它化学试剂均为分析纯。

1.2 主要的仪器设备

PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; HYP-1020 消化炉, 上海书培实验设备有限公司; KDN-1 型自动凯氏定氮仪, 上海科晓科学仪器有限公司; BS-100A 自动部份收集器, 上海泸西分析仪器厂有限公司; HL-2B 数显恒流泵, 上海泸西分析仪器厂有限公司; 752N 紫外可见光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; RE-52A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪

器厂; SHZ-D(III) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限公司; 4800 Plus MALDI TOF/TOF Mass 质谱仪, (ABI) 美国应用生物系统公司; Pico. Tag® 氨基酸分析柱, 美国 Waters 公司; Waters 600 高效液相色谱系统, 美国 Waters 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解工艺条件

称取一定质量的柴鱼原料于锥形瓶中, 按料液比为 1:3 加入水, 混匀, 预处理后, 按不同加酶量分别加入各蛋白酶, 酶解温度为 55 °C, 在各酶的最适水解 pH 值下 (胰蛋白酶: pH 8.0, 风味蛋白酶: pH 7.0, 木瓜蛋白酶: pH 7.0, 复合蛋白酶: pH 7.0, Alcalase: pH 9.0, 水解蛋白酶: pH 7.5) 进行酶解, 沸水浴 10 min 灭酶, 4 °C, 8000 r/min 下离心 20 min, 过滤, 收集上清液, 喷雾干燥, 保存。

(1) 最适加酶量的筛选: 按上述酶解工艺, 设计不同加酶量分别为 0.2%、0.5%、1.0%、1.5%, 以蛋白质回收率为指标, 探究最优加酶量。

(2) 最佳预处理条件的筛选: 按上述酶解工艺, 设计不同预处理条件分别为 85 °C 下处理 15 min, 90 °C 下处理 10 min 和 100 °C 下处理 5 min, 以蛋白质回收率为指标, 探究最优预处理条件。

(3) 最适酶解时间的筛选: 按上述酶解工艺, 设计不同酶解时间分别 4 h、8 h、12 h, 以蛋白质回收率为指标, 探究最优酶解时间。

1.3.2 蛋白质回收率测定

采用凯氏定氮法, 参照 GB5009.5-85。分别测定原料蛋白质含量和酶解液的蛋白质含量, 按以下公式计算蛋白质回收率:

$$\text{蛋白质回收率} = \frac{\text{酶解液的蛋白质含量}}{\text{原料蛋白质含量}} \times 100\%$$

1.3.3 还原力测定

还原力的测定参照文献^[7]的方法并有所改良。配制不同浓度的酶解液, 各取 2 mL 分别加到 2 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH 6.6) 和 2 mL 的铁氰化钾 (1%, *m/V*) 溶液中, 混合物在 50 °C 保温 20 min, 然后在反应混合液中加入 2 mL TCA (10%, *m/V*), 于 3000 r/min 离心 10 min, 然后取上清液 2 mL 与 2 mL 蒸馏水以及 0.4 mL 氯化铁 (0.1%, *m/V*) 在试管中反应, 10 min 后测定其在波长 700 nm 处吸光值计为酶解液的还原力。

1.3.4 羟基自由基清除能力测定

采用邻二氮菲法测定^[8]。取浓度为 5 mmol/L 的邻二氮菲溶液 0.6 mL, 加入浓度为 150 mmol/L 磷酸盐

缓冲液 (pH=7.4) 0.4 mL, 混匀后加入浓度为 5 mmol/L 的硫酸亚铁溶液 0.6 mL, 充分混匀, 加入不同浓度的样品液 2 mL 以及 0.1% 的 H₂O₂ 0.4 mL, 摇匀, 37 °C 保温 60 min, 测样品管在波长 536 nm 处的吸光值 A 样品。按上述操作, 采用去离子水代替样品液和 H₂O₂ 溶液, 得未损伤管吸光值 A 未损伤。按下式计算羟自由基清除率:

$$\text{HO}\cdot\text{清除率} = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}}} \times 100\%$$

1.3.5 DPPH 自由基清除率测定

DPPH 自由基清除率的测定参照文献^[9]的方法。配制不同浓度梯度的酶解液, 各取 2.0 mL 与 2.0 mL DPPH 溶液混合均匀, 室温下放置 30 min 中后测 517 nm 下的吸光值, 计为 OD 样; 以 95% 乙醇为空白做对照测定, 读数计为 OD 空。按下式计算 DPPH 自由基的清除率:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率} = \frac{\text{OD}_{\text{空}} - \text{OD}_{\text{样}}}{\text{OD}_{\text{空}}} \times 100\%$$

1.3.6 DEAE-52 纤维素层析柱分离纯化

取 DEAE-52 纤维素填料, 先后用去离子水、HCl 溶液、NaOH 溶液活化后上样, 以 0.5 mL/min 流速分别加入去离子水、0.1 mol/L NaCl 溶液和 0.3 mol/L NaCl 溶液进行洗脱, 自动部分收集器收集洗脱液。将收集的分液通过旋转蒸发器进行浓缩, 双缩脲法测定各组分肽含量^[10], 测定各分离组分还原力及 DPPH 自由基清除率。

1.3.7 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析柱分离纯化

经 DEAE-52 分离后, 筛选得到抗氧化活性最好的组分进一步用 Sephadex G-15 分离纯化。进样后以 0.5 mL/min 的流速加入去离子水进行洗脱; 使用自动

部分收集器进行收集, 收集液通过旋转蒸发器进行浓缩, 测定各分离组分抗氧化活性。

1.3.8 MALDI-TOF-MS 分析^[11]

配制乙腈/超纯水 (1:1, 0.1% TFA) 作为溶剂待用, 将 CHCA 溶于上述溶剂, 制成饱和溶液, 离心, 取上清液得到基质溶液。将标准混合多肽和样品分别与基质溶液按 1:1 的比例混合均匀, 取 1 μL 点在 MALDI 靶板上, 于室温自然干燥后, 将样品板放进离子源中进行测定, 累计 10 次单次扫描信号为最终质谱图。

1.3.9 氨基酸分析

采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC, Waters) 进行氨基酸分析, 以异硫氰酸苯酯 (PITC) 进行柱前衍生化^[12]。将三乙胺 (TEA) 溶液 (TEA-水-乙醇=1:2:2) 加到样品中, 真空条件下挥发完全, 然后加入 PITC 溶液 (PITC-乙醇-TEA-水=1:7:1:1) 室温下反应 20 min。取 50 μL 样品上柱 (Pico. Tag@分析柱, 3.9×150 mm), 用 pH 6.4 醋酸钠缓冲液 (洗脱液 A) 以及 60% (V/V) 乙腈水溶液 (洗脱液 B) 进行梯度洗脱。洗脱步骤如下: 0~10 min, 线性洗脱 (0~46% B); 10~12 min, 线性洗脱 (46~100% B); 12~15 min, 等速洗脱 (100% B); 流速: 1 mL/min; 柱温: 38 °C; 检测波长: 254 nm。

1.3.10 数据统计

数据分析采用 SPSS 19.0 软件, 以 P<0.05 为具有统计学意义上的差异, 数据用 $\bar{x} \pm S.D.$ 表示; 采用 Origin 8.5 制图。

2 结果与讨论

2.1 酶解工艺条件的筛选

2.1.1 最佳水解酶的确定

表 1 不同酶解液的还原力、羟自由基清除率和蛋白质回收率

Table 1 Reducing power, hydroxyl radical scavenging activity, and protein recovery ratio of different enzymatic hydrolysates

水解用酶	浓度为 7.5 mg/mL 时的还原力吸光值	羟自由基清除率的 IC ₅₀ 值/(mg/mL)	蛋白质回收率/%
胰蛋白酶	0.39 ± 0.02 ^c	51.79 ± 1.91 ^b	45.86 ± 0.08 ^a
风味蛋白酶	0.43 ± 0.01 ^b	37.96 ± 1.90 ^a	23.67 ± 0.15 ^f
木瓜蛋白酶	0.45 ± 0.02 ^a	36.77 ± 1.12 ^a	31.31 ± 0.44 ^e
复合蛋白酶	0.37 ± 0.02 ^d	45.62 ± 2.20 ^b	36.22 ± 0.25 ^c
Alcalase	0.40 ± 0.02 ^c	38.76 ± 2.29 ^a	33.89 ± 0.47 ^d
水解蛋白酶	0.34 ± 0.03 ^e	45.95 ± 1.14 ^b	42.36 ± 0.14 ^b

注: 各列中不同上标字母 (a~c) 表示差异显著。

从表 1 可知, 各种蛋白酶解液在相同浓度 7.5 mg/mL 时, 木瓜蛋白酶的还原力最强, 且与其它酶解液有显著性差异; 在羟基自由基清除率 IC₅₀ 值处, 风

味蛋白酶、木瓜蛋白酶和 Alcalase 的 IC₅₀ 值较低, 与其它三组有明显差异, 其中木瓜蛋白酶解液的 IC₅₀ 值最低。综合还原力和羟基自由基清除率来看, 木瓜蛋

白酶的抗氧化活性最好。在蛋白质回收率方面，木瓜蛋白酶解液的蛋白质回收率达到 31.31%。以还原力和羟基自由基清除能力为主筛选指标，以蛋白质回收率为辅筛选指标，选择木瓜蛋白酶为柴鱼蛋白的最佳水解用酶，并以木瓜蛋白酶做进一步优化研究。

2.1.2 其它最适酶解条件的确定

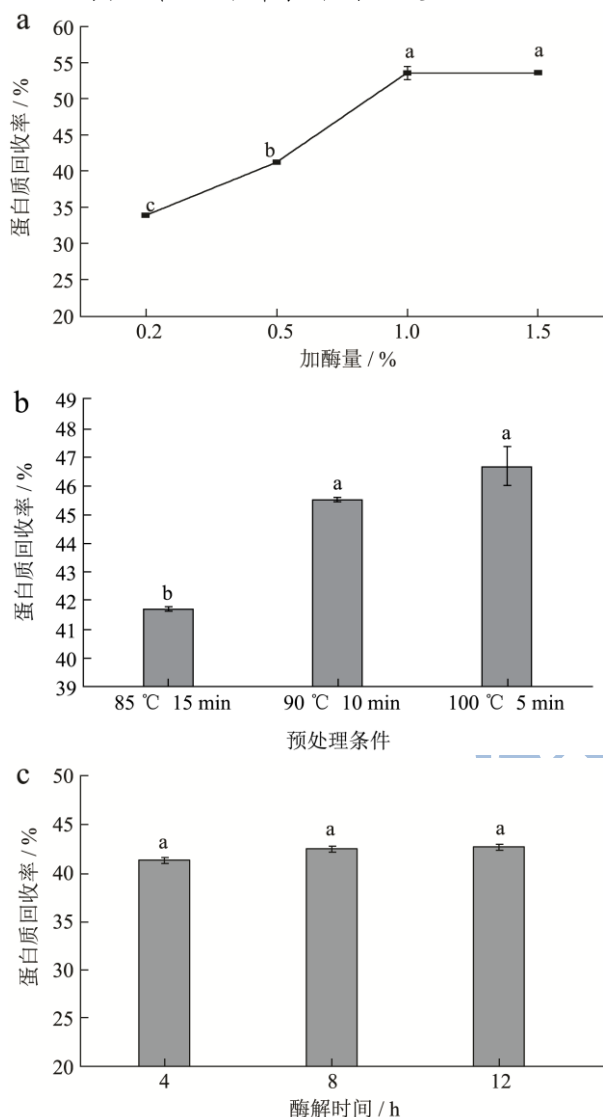


图 1 不同酶解条件对蛋白质回收率的影响

Fig.1 Effect of different hydrolysis conditions on the protein recovery ratio values indicate the mean \pm S.D. (n = 3)

注：a：不同加酶量对蛋白质回收率的影响，b：不同预处理条件对蛋白质回收率的影响，c：不同酶解时间对蛋白质回收率的影响；数值为平均数 \pm 标准差，每组取样数为3。

由图 1a 可知，当加酶量小于 1.5% 时，酶解液的蛋白质回收率随着加酶量的增加而显著提高；当加酶量达到 1.5% 时，与 1% 的加酶量相比，蛋白质回收率没有提高，二者间无显著性差异，因此，以加酶量为 1% 作为最适加酶量。

由图 1b 可知，预处理温度对蛋白质回收率的影

响较大。在 85 °C 下加热 15 min，蛋白质回收率最低 (41.70%)；在 90 °C 下加热 10 min，蛋白质回收率显著增加 (达到 45.51%)；90 °C 与 100 °C (蛋白质回收率为 46.69%) 的预处理条件下的蛋白质回收率相比，预处理温度提高后，蛋白质回收率仍有较大增加，尽管统计学分析差异不显著，但预处理温度高时所需加热时间减少。故筛选出最优预处理条件为 100 °C、5 min。

从图 1c 可以看到，随着酶解时间的增加，蛋白质回收率变化无显著性差异。这是因为在一定量底物的情况下，仅需 4 h 的酶解时间就可以把底物酶解完全，之后酶解时间再增加，对蛋白质回收率无影响，因此，从节能角度考虑，筛选出最优酶解时间为 4 h。

综上所述，筛选出木瓜蛋白酶的最适加酶量为 1%，最优预处理条件为 100 °C、5 min，最优酶解时间为 4 h。

2.2 柴鱼蛋白肽的分离纯化

2.2.1 DEAE-52 纤维素层析柱分离纯化

柴鱼蛋白酶解物经 DEAE-52 纤维素层析柱分离的洗脱图如图 2 所示，管号 1-60 的洗脱液为去离子水，管号 61-120 的洗脱液为 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液，管号 121-180 的洗脱液为 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液。

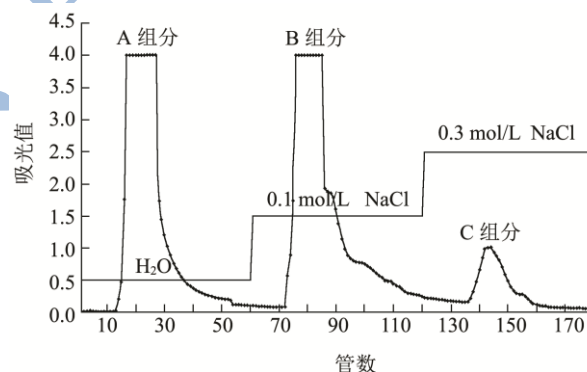


图 2 柴鱼蛋白酶解物经 DEAE-52 洗脱图

Fig.2 Separation profile of bonito protein hydrolysates on DEAE-52 column

注：部分超出分光光度计量程的均以吸光值为 4 处理。

从图 2 可知，每种洗脱液均有一个对应的峰值响应，证明有对应地把多肽成分洗脱出来，在此分别记为 A 组分、B 组分和 C 组分，可根据出峰时间收集有效分离液，分离液浓缩后 A、B、C 组分的多肽浓度分别为 8.86 mg/mL、5.88 mg/mL、0.52 mg/mL。

由于 A、B、C 组分是通过不同浓度盐溶液洗脱而得，考虑到 NaCl 的存在可能会影响羟基自由基清除率的测定，且通过空白对照的预实验确实证明了这一点，故此未用羟基自由基清除率的指标，而选用

DPPH 自由基清除率评价洗脱组分活性。相对 A、B 组分，由于 C 组分过柱分离后收集液浓度过低，未进行 DPPH 的 IC₅₀ 值测定，故设计实验在浓度 0.5 mg/mL 下对比各组分的抗氧化活性。

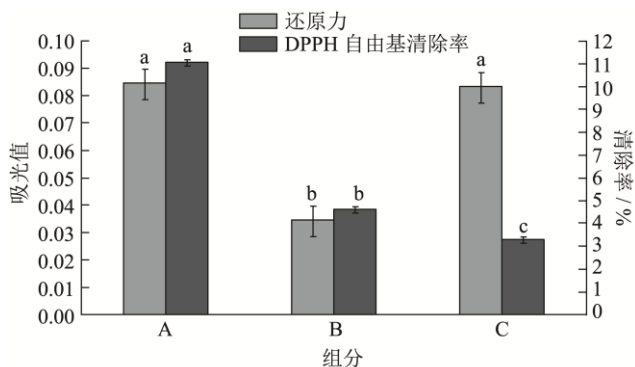


图3 各组分还原力和 DPPH 自由基清除率大小的比较

Fig.3 Reducing power and DPPH radical scavenging activity of three fractions values indicate the mean ±S.D. (n = 3)

注：数值为平均数 ± 标准差，每组取样数为 3。

从图 3 可知，在各组分浓度均为 0.5 mg/mL 时，A 和 C 的还原力较高（吸光值分别为 0.084、0.082），且与 B 组分（吸光值为 0.035）相比有显著性差异；A 组分的 DPPH 自由基清除率最高，为 11.07%，明显高于 B 和 C（分别为 4.62%、3.28%）。故选用 A 组分进一步用 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析柱进行分离。

2.2.2 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析柱分离纯化

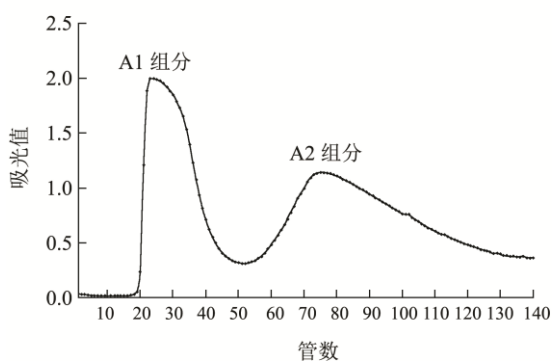


图4 A 组分经 Sephadex G-15 洗脱图

Fig.4 Separation profile of fraction A on Sephadex G-15 column

A 组分经过 Sephadex G-15 的进一步纯化后，其洗脱图如图 4 所示。由图 4 可知，经过二次纯化后，A 组分分离出两种主要成分，在此分别记为 A1 和 A2。通过洗脱图，根据峰响应时间进行收集。测得 A1 浓缩液的多肽浓度为 2.01 mg/mL，A2 浓缩液的多肽浓度为 0.50 mg/mL。

根据前面几种抗氧化活性检测方法的筛选，A 组分对 DPPH 自由基清除能力较为敏感，而且由于 DPPH 在自由基中是比较稳定的一种自由基，所以测

定 DPPH 自由基清除率具有很好的稳定性和重现性，故此处用 DPPH 自由基清除率来对 A1、A2 两种成分进行抗氧化活性评价。其结果如图 5。

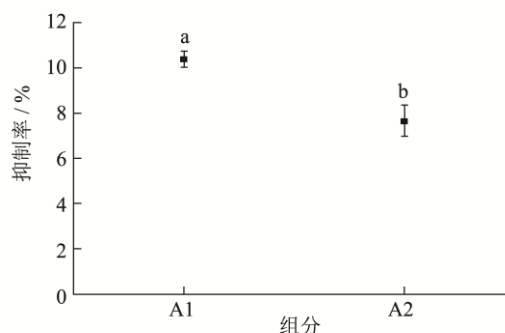


图5 A1、A2 组分的 DPPH 自由基清除率比较

Fig.5 DPPH radical scavenging activity of fraction A1 and fraction A2 Values indicate the mean ±S.D. (n = 3)

注：数值为平均数 ± 标准差，每组取样数为 3。

由上图所示，在 0.5 mg/mL 浓度下，A1 成分对 DPPH 自由基的抑制率为 10.38%，A2 成分为 7.64%，且 A1 与 A2 相比具有显著性差异。因此 A1 成分为 A 组分中抗氧化活性最强的成分。

2.3 柴鱼蛋白肽的结构鉴定

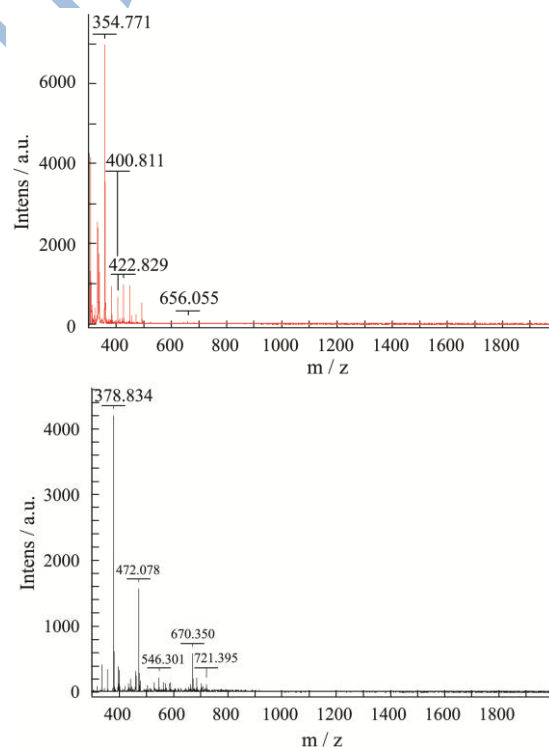


图6 A1 成分的 MALDI-TOF-MS 一级质谱图

Fig.6 MS spectrum of fraction A1

图 6 和图 7 分别是 A1、A2 成分的 MALDI-TOF-MS 质谱图。通过对比图 6 和图 7，可以发现，A1 成分中的分子量范围在 700 Da 以内，离子丰度最高的在

4400 左右, A2 成分的分子量范围在 570 Da 以内, 离子丰度最高在 2800 左右。总体来说, A1 成分的分子量比 A2 成分的大, 这与 Sephadex G-15 层析柱分离纯化结果一致, 先通过层析柱的 A1 是分子量大的成分, 后出来的 A2 是分子量较小的成分。

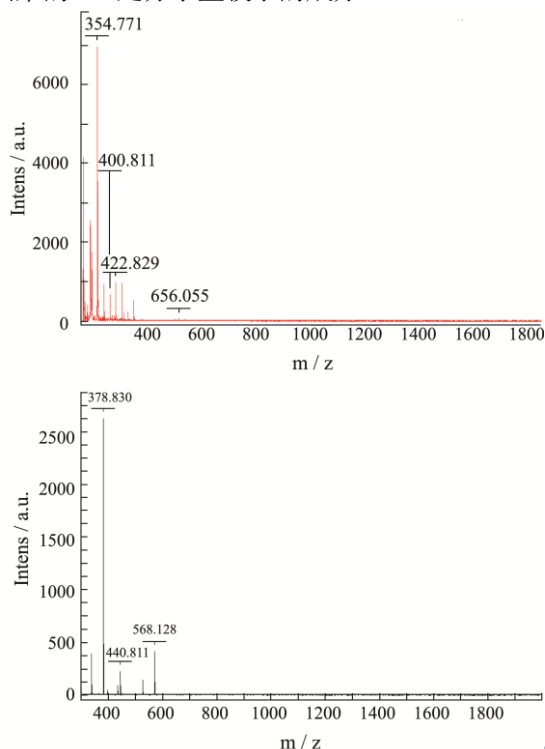


图 7 A2 成分的 MALDI-TOF-MS 一级质谱图

Fig.7 MS spectrum of fraction A2

由图 6、7 可知, A2 出现峰值的质荷比在 A1 的图中也能看到相应大小的峰, 尤其是质荷比为 378.830 左右的离子丰度均为最高, 说明该肽段为 A 组分的主要成分。在通过 Sephadex G-15 的时候, A1 成分洗脱出来后, 该肽段尚未完全洗脱出来, 故随着 A2 成分的洗脱而被洗脱出来, 于是两种成分中都有这种物质的存在。因此证明 378.830 Da 的肽段为纯化后的最主要成分。

2.4 氨基酸分析

结合 MALDI-TOF-MS 质谱分析中 A1 的主要成分为 378.830 Da 的肽段, 选取 A1 中含量较高的氨基酸, 推测其可能的氨基酸组成为 Lys、Leu、Pro。

3 结论

制备柴鱼蛋白肽的最佳用酶为木瓜蛋白酶, 最佳加酶量为 1.0%, 最佳预处理条件为 100 °C、5 min, 最佳酶解时间为 4 h。用 DEAE-52 纤维素离子交换柱对柴鱼蛋白酶解物进行分离纯化后, 共得到 A、B、C 三个组分, 其中 A 组分的抗氧化活性最高。继续选取

A 组分进行 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶柱分离纯化, 分离出 A1、A2 两个成分, 其中 A1 组分抗氧化活性最好。对 A1、A2 进行 MALDI-TOF-MS 质谱检测, 得出分子量主要集中在 378.830 Da 附近, 进一步做氨基酸分析后, 推测该氨基酸组成可能为 Lys、Leu、Pro。

表 2 各氨基酸在 A1、A2 组分中的百分含量

Table 2 Percentage of amino acid content in fraction A1 and fraction A2

氨基酸	分子量	A1/%	A2/%
天冬氨酸(Asp)	133.10	5.62	1.19
谷氨酸(Glu)	147.13	7.05	1.78
丝氨酸(Ser)	105.09	5.60	4.98
甘氨酸(Gly)	75.07	12.44	3.49
组氨酸(His)	155.00	2.55	41.84
精氨酸(Arg)	174.20	8.89	10.67
苏氨酸(Thr)	119.12	6.28	8.53
丙氨酸(Ala)	89.09	12.34	3.44
脯氨酸(Pro)	115.13	6.40	2.38
酪氨酸(Tyr)	181.20	0.76	1.63
缬氨酸(Val)	117.15	5.80	1.50
蛋氨酸(Met)	149.21	0.25	0.29
半胱氨酸(Cys)	121.15	0.03	0.17
异亮氨酸(Ile)	131.17	4.07	1.25
亮氨酸(Leu)	131.18	8.33	2.07
苯丙氨酸(Phe)	165.19	1.60	6.33
赖氨酸(Lys)	146.19	11.99	8.45
总量	-	100	100

参考文献

- [1] 孙静,李晔,张春丹,等.响应面法优化双酶水解鳕鱼下脚料[J].中国食品学报,2013,13(6):104-110
SUN Jing, LI Ye, ZHANR Chun-dan, et al. Optimization of bienzymatic hydrolysis of katsuwonus pelamis byproducts by response surface methodology [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(6): 104-110
- [2] Hiroyuki Fujita, Tomohide Yamagami, Kazunori Ohshima. Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects [J]. Nutrition Research, 2001, 21(8): 1149-1158
- [3] Hordur G Kristinsson, Barbara A Rasco. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties [J]. Food Science and Nutrition, 2000, 40(1), 43-81
- [4] 朱凤仙,戴志远,张燕平,等.酶解制备水产动物活性肽研究

- 进展[J].食品研究与开发,2008,29(11):159-162
- ZHU Feng-xian, DAI Zhiyuan, ZHANG Yan-ping, et al. Research progress of bioactive peptides prepared by enzyme hydrolysis from aquatic animal proteins [J]. Food Research and Development, 2008, 29(11): 159-162
- [5] Karen Fox, Alvin Fox, John Rose, et al. Speciation of coagulase negative staphylococci, isolated from indoor air, using SDS page gel bands of expressed proteins followed by MALDI TOF MS and MALDI TOF-TOF MS-MS analysis of tryptic peptides [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(2): 243-250
- [6] 陈爱娜,龚艳丹,苗圃. 鲣鱼的利用探索[J].科学养鱼,2011, (10):69
- CHEN Ai-na, GONG Yan-dan, MIAO Pu. The utilization and exploration of the bonito [J]. Scientific Fish Farming, 2011, (10): 69
- [7] Elizabeth Escudero, Leticia Mora, Paul D. Fraser, et al. Identification of novel antioxidant peptides generated in spanish dry-cured ham [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3): 1282-1288
- [8] Sheng-Jun Wu, Jin-Hua Wu, Ling-Zhu Xia, et al. Preparation of xanthan-derived oligosaccharides and their hydroxyl radical scavenging activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 1612-1614
- [9] Luigi Milella, Ammar Bader, Nunziatina De Tommasi, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species [J]. Food Chemistry, 2014, 160(1): 298-304
- [10] 林智.食品中蛋白质含量的测定[J].当代化工,2010,39(2): 224-226
- LIN Zhi. The determination of the protein content in food [J]. Contemporary Chemical Industry, 2010, 39(2):224-226
- [11] Richard M Caprioli, Terry B armer, Jocelyn Gile. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF-MS [J]. Analytical Chemistry, 1997, 69(23): 4751-4760
- [12] 任娇艳.草鱼蛋白源抗疲劳生物活性肽的制备分离及鉴定技术研究[D].广州:华南理工大学,2008
- REN Jiao-yan. Study on the preparation, purification and identification of antifatigue biopeptides from grass carp protein [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2008