

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

何小庆, 曹文红, 章超桦, 赵子科

(广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 国家贝类加工技术研发分中心(湛江), 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

摘要: 以波纹巴非蛤为原料, 分离得到肌浆蛋白、肌原纤维蛋白、基质蛋白 3 种蛋白组分, 分别研究其氨基酸组成及其胰蛋白酶酶解产物的体外抗氧化活性及分子量分布。结果表明该三种蛋白质中必需氨基酸、碱性氨基酸、疏水性氨基酸和支链氨基酸含量较高。抗氧化实验结果显示, 三种蛋白对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基均有一定的清除效果, 且清除率与酶解液浓度存在一定的量效关系。与其它两种蛋白酶解产物相比, 肌浆蛋白酶解液中小分子肽含量最高, 分子量小于 1500 u 占 42.55±0.27%, 其对自由基清除效果也明显高于其它两种蛋白酶解液, 对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除活性的 IC₅₀ 值分别为 4.82、4.70 和 3.75 mg/mL。肌浆蛋白和肌原纤维蛋白酶解产物的还原能力相当, 浓度为 10 mg/mL 时, 其 OD₇₀₀ 分别为 0.58 和 0.57, 基质蛋白酶解产物的还原能力较弱。

关键词: 波纹巴非蛤; 氨基酸; 抗氧化活性; 分子量分布

文章编号: 1673-9078(2014)1-74-80

Antioxidant Activity and Molecular Weight Distribution of Hydrolysates from *Paphia Undulate* Protein

HE Xiao-qing, CAO Wen-hong, ZHANG Chao-hua, ZHAO Zi-ke

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang), College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Three types of protein including sarcoplasmic protein, myofibrillar protein and stromal protein from *Paphia undulate* were isolated. The amino acid composition, antioxidant activity in vitro and molecular weight distribution of the hydrolysates prepared with trypsin were investigated. All of the three protein fractions contained higher contents of essential amino acids, alkaline, hydrophobic and branched-chain amino acid. Protein hydrolysates showed a good radical scavenging activity with dose-effect. The hydrolysates of sarcoplasmic protein with the highest contents of small molecule peptide exhibited the strongest radical scavenging activities including DPPH radical, hydroxyl radical and superoxide anion radical, with the IC₅₀ values being 4.82, 4.70 and 3.75 mg/mL, respectively and the molecular weight less than 1500 u accounted for 42.55±0.27%. The hydrolysates of sarcoplasmic protein and myofibrillar protein showed similar reducing power and their OD₇₀₀ were 0.58 and 0.57 at 10 mg/mL, respectively. While the hydrolysates of stromal protein displayed lower reducing power.

Key words: *Paphia undulate*; amino acids; antioxidant activity; molecular weight distribution

波纹巴非蛤分布于我国福建、广东、广西等沿海地区, 福建省云霄县东山湾是波纹巴非蛤主产区,

收稿日期: 2013-09-11

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (GARS-48)

作者简介: 何小庆(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工与贮藏

通讯作者: 曹文红(1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 海洋生物活性物质研究

2007 年年产量近 4 万 t^[1]。但以带壳鲜销为主, 其经济效益均不高, 可以说是一种尚未得到充分利用的海洋贝类资源。我们前期的研究表明波纹巴非蛤粗蛋白占原料的 68.77% (以干基计), 是良好的贝类蛋白质资源。因此, 为了提高其附加值, 有必要做一些基础研究。

生物体内氧化产生过多的自由基是导致机体衰老、心血管疾病、癌症等一系列疾病的重要因素。

食品在加工和贮藏过程中发生脂肪氧化产生哈喇味降低消费者接受度。一些化学合成的抗氧化剂,如二叔丁对甲酚(BHT),叔丁羟基茴香醚(BHA)和没食子酸丙酯(PG)等可以有效的清除过量的自由基,抑制脂质过氧化反应。但是这些合成的抗氧化剂会对人体造成危害,一些国家已限制使用这些合成的抗氧化剂。于是人们把目光转向安全、天然抗氧化剂。

近几年,从各种蛋白质酶解产物中获得抗氧化活性肽成为研究热点。如玉米^[2]、大豆^[3]、鸡蛋^[4]和牛奶^[5]等抗氧化活性肽表现出非常强的抗氧化活性。此外,水产品包括鲑鱼^[6]、虾^[7]和一些软体动物^[8]蛋白酶解产物也是非常好的抗氧化活性肽的来源。

但是,对波纹巴非蛤的研究主要集中于基本成分测定^[9]及低分子肽的制备^[10]等方面。对其组成蛋白特性及其酶解产物的抗氧化活性等研究尚未见报道。因此,本文参照 Saito^[11]方法,对以波纹巴非蛤蛋白进行分离,并对其氨基酸组成及其酶解产物的体外抗氧化活性、分子量分布进行探讨,为波纹巴非蛤蛋白资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜的波纹巴非蛤购于广东湛江水产品批发市场;胰蛋白酶,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;二苯代苦味酰基自由基(DPPH)和还原型谷胱甘肽, Sigma 公司;其他试剂为分析纯。

FA2104A 电子分析天平,上海天平仪器厂; T18 basic 高速组织捣碎机,德国 IKA 集团公司; HH-4 型数显恒温水浴锅,上海浦东物理光学仪器厂; SB-5200 超声波清洗机,海新芝生物技术研究; UV-2102 紫外/可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司; Sigma 3K3 高速冷冻离心机,贝朗国际生物工程公司;数显 pH 25C 酸度计,上海康仪仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 波纹巴非蛤蛋白分离

提取条件为 0-4 °C。参照 Saito 等^[11]方法,将波纹巴非蛤肉置于 3 倍体积预冷的 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,匀浆 5 min, 4 °C 浸提 90 min 后(不时搅拌),离心(10000 r/min, 15 min, 4 °C),收集上清液,沉淀部分继续重复上述操作,收集上清液和沉淀 S₁。将两次离心后的上清液混合,按 1:1 的比例加入 10%的 TCA,离心(10000 r/min, 15 min, 4 °C),得到的上清液为非蛋白氮组分,得到的沉淀

S₂用丙酮漂洗 3 次,去除 TCA,挥发掉丙酮后,用冰水溶解即得到肌浆蛋白组分。将上述沉淀 S₁置于 3 倍体积的 0.1 mol/L, pH 7.0 的 PBS 中(含 1.0 mol/L NaCl),匀浆 5 min, 4 °C 浸提 18 h 后(不时搅拌),离心(10000 r/min, 15 min, 4 °C),收集上清液,沉淀部分重复上述操作,收集两次离心后的上清液,混合,即为肌原纤维蛋白组分,最后得到的沉淀部分即为基质蛋白组分。肌原纤维蛋白组分经透析脱盐,即得脱盐的肌原纤维蛋白。

1.2.2 波纹巴非蛤组成蛋白含量测定

所有蛋白质组分含量测定均采用微量凯氏定氮法(GB/T5009.3-2003)。

1.2.3 波纹巴非蛤组成蛋白氨基酸组成分析

取适量的波纹巴非蛤三种蛋白干粉,加入 6 mol/L 的盐酸,110 °C 条件下水解 24 h 后,采用氨基酸自动分析仪测定除色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)以外的 16 种氨基酸。

1.2.4 波纹巴非蛤组成蛋白酶解产物制备

波纹巴非蛤三个蛋白组分在温度 37 °C、pH 8.0、加酶量为 2500:1 (U/g)、底物浓度为 4%的条件下,采用胰蛋白酶酶解 3 h,然后煮沸 10 min 灭酶,4500 r/min 离心 10 min。收集上清液冷冻干燥,备用。

1.2.5 波纹巴非蛤蛋白组分酶解产物抗氧化活性测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除活性的测定

参照文献^[12]的方法,取 1.5 mL 不同浓度的蛋白酶解液与等体积的 0.2 mmol/L DPPH 自由基的 95%乙醇溶液于试管中,混匀,室温放置 30 min 后,在 517 nm 波长下测其吸光值。每个浓度做 3 个平行。同时用还原型谷胱甘肽(GSH)作为阳性对照。DPPH 自由基清除率(Y₁)按下式计算:

$$Y_1/\% = [A - (A_s - A_0)]/A \times 100$$

注: A_s 为样品和 1.5 mL DPPH 自由基乙醇溶液反应后的吸光值; A₀ 为样品和 1.5 mL 95%的乙醇反应后的吸光值; A 为蒸馏水和 1.5 mL DPPH 自由基乙醇溶液反应后的吸光值。

1.2.5.2 羟基自由基清除活性的测定

参照文献的方法^[13],取 2.0 mL 不同浓度的蛋白酶解液和 2.0 mL 9 mmol/L 的水杨酸乙醇溶液和 2.0 mL 9 mmol/L 硫酸亚铁溶液,混匀,加入 2.0 mL 8.8 mmol/L H₂O₂ 启动反应。在 37 °C 水浴保温 30 min 后,在 510 nm 处测其吸光值。羟基自由基清除率(Y₂)按以下公式计算:

$$Y_2/\% = [A_0 - (A_s - A_c)]/A_0 \times 100$$

注: A_s 为实验组的吸光值; A₀ 为蒸馏水代替样品组的吸光值; A_c 为蒸馏水代替 H₂O₂ 组的吸光值。

1.2.5.3 超氧阴离子自由基清除活性的测定

参照文献^[14]的方法,取 2 mL 不同浓度的酶解液和 2.5 mL 浓度为 50 mmol/L, pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液混合,于 25 °C 的条件下保温 2 min,然后加入 0.15 mL 3 mmol/L 的邻苯三酚溶液(含 10 mmol/L HCl)。4 min 内每 30 s 在 325 nm 出测一次吸光值(A),作 A-t 图,其斜率即为自氧化速率。GSH 作为阳性对照。超氧阴离子自由基清除率(Y₃)计算公式如下:

$$Y_3/\%=(V_0-V_1)/V_0\times 100$$

注: V₀ 为蒸馏水代替酶解液组的自氧化速率, V₁ 为酶解液组的自氧化速率。

1.2.5.4 还原能力的测定

参照 Wu 等^[15]的方法,取 1.0 mL 不同浓度的蛋白酶解液于试管中,加入 2.5 mL 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)和 2.5 mL 10 mg/mL 的铁氰化钾溶液,混匀,50 °C 水浴保温 20 min,然后加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸,混匀,3000 r/min 离心 10 min,取 2.5 mL 上清液,加入 2.5 mL 的蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 三氯化铁,混匀,室温放置 10 min,在 700 nm 波长下测吸光值。每个浓度做 3 个平行,吸光度越大表示还原能力越强。同时用谷胱甘肽(GSH)作为阳性对照组。

1.3 酶解产物分子量分布测定

采用高效体积排阻色谱法(HPSEC)测定波纹巴非蛤三个蛋白组分酶解液的分子量分布。色谱柱: Waters Protein-pak 60 (WAT085250);流动相为 0.05 mol/L, pH 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液;洗脱速度为 0.7 mL/min;检测波长为 214 nm;柱温为 25 °C;进样体积为 20 μL。标准品: Lysozyme (14400 u), Bovine insulin (5733.49 u), Insulin B (3496 u), Angiotensin II (1046.18 u), Hippuryl-L-His-L-Leu (429.47 u)。以保留时间(t)和分子量的对数 LgM 作图,得到分子量回归方法为: $LgM=-0.2155t+5.9028$ (R²=0.9908)。

1.4 数据分析

所有试验均重复 3 次,实验结果表述为平均值±标准偏差,采用 Origin 8.0 作图分析。

2 结果与分析

2.1 波纹巴非蛤蛋白组成

本文根据 1.2.1 描述的方法对波纹巴非蛤蛋白质进行分离,得 3 个蛋白质组分即肌浆蛋白、肌原纤维蛋白和基质蛋白,各蛋白质组分占波纹巴非蛤总蛋白比例如图 1 所示。

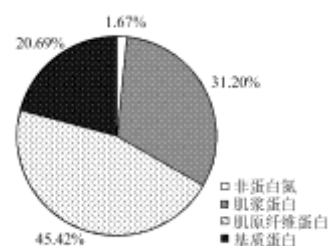


图 1 波纹巴非蛤肉蛋白质组成

Fig.1 Protein compositions of *Paphia undulate*

由图 1 可以看出:波纹巴非蛤肌原纤维蛋白组分所占比例最大,占 45.42%±1.18%,依次是肌浆蛋白组分(31.20%±1.69%)、基质蛋白组分(20.69%±1.26%)、非蛋白氮占 1.67%±0.09%,非蛋白氮主要由游离氨基酸、小肽及核苷酸等物质组成,这可能与波纹巴非蛤味道鲜美有极密切的关系。与其它水产动物相比,贝类软体部分(可食部分)无骨骼组织,其组织与结构主要是由蛋白质(特别是肌原纤维蛋白和基质蛋白)、多糖等大分子物质组成。肌原纤维蛋白在肉制品加工与贮存过程中起非常重要的作用,不仅与肌肉收缩有关,而且与肉制品的流变学特性如弹性、质地、黏结性、保水性等有着密切的关系,在糜类肉制品和重组肉制品的质构特性中起重要作用^[16]。

2.2 蛋白组分氨基酸组成分析

食物蛋白质中氨基酸组成对机体各种生理功能具有重要意义。波纹巴非蛤肉蛋白组分中各氨基酸占总氨基酸的百分比如表 1 所示。由表 1 可知,在波纹巴非蛤肉蛋白组分中,肌原纤维蛋白组分中 7 种必需氨基酸(色氨酸在酸水解中被破坏,未检测)总含量最高,占该组分氨基酸总量的 38.92%,依次为肌浆蛋白组分(35.20%),基质蛋白组分(32.78%)。在波纹巴非蛤肌浆蛋白和肌原纤维蛋白组分中,就检测的这 7 种必需氨基酸而言,赖氨酸含量较高,分别占 7.82% 和 8.85%。赖氨酸在营养学上具有特殊的意义,有增进食欲、促进幼儿生长与发育的作用,促进钙的吸收及其在体内的积累、加速骨骼生长^[17]。赖氨酸是谷物蛋白质第一限制氨基酸,由于我国居民以谷物为主食,因此摄入富含赖氨酸的食物可以改善我国居民摄食蛋白质氨基酸组成。

此外,三个蛋白组分含较高的碱性氨基酸,疏水性氨基酸和支链氨基酸。其中,肌浆蛋白中碱性氨基酸含量最高,占总氨基酸的 21.42%,其次为肌原纤维蛋白(18.21%)和基质蛋白(14.70%)。疏水性氨基酸在肌浆蛋白、肌原纤维蛋白和基质蛋白中分别为 40.18%、35.33% 和 43.85%。相对于碱性氨基酸和疏

水性氨基酸而言,肌浆蛋白中支链氨基酸的含量略低,占 16.15%,在肌原纤维蛋白和基质蛋白中支链氨基酸分别占 19.34%和 16.19%。活性肽与其特定氨基酸组成以及氨基酸序列有密切关系,研究表明肽链中含较高的 His、Pro、Ala、Val、Met 和 Leu 能增强活性肽的抗氧化能力^[8]。波纹巴非蛤中的这三个蛋白组分都含有这些抗氧化相关的氨基酸,由此可以推测波纹巴非蛤肉蛋白组分中存在较强的抗氧化活性片段。

表 1 波纹巴非蛤蛋白质组分氨基酸组成 (%)

Table 1 Amino acid composition of protein components from

Paphia undulate

氨基酸	肌浆蛋白	肌原纤维蛋白	基质蛋白
天冬氨酸(Asp)	9.56	11.98	10.70
苏氨酸(Thr*)	4.87	4.59	4.59
丝氨酸(Ser)	4.08	4.17	4.37
谷氨酸(Glu)	14.08	19.34	15.56
甘氨酸(Gly)	8.95	3.34	11.56
丙氨酸(Ala)	7.64	6.87	6.78
缬氨酸(Val*)	4.98	4.60	4.59
甲硫氨酸(Met*)	2.43	2.82	2.85
异亮氨酸(Ile*)	4.60	5.09	4.37
亮氨酸(Leu*)	6.57	9.66	7.22
酪氨酸(Tyr)	3.39	3.53	3.22
苯丙氨酸(Phe*)	3.93	3.32	3.63
组氨酸(His)	1.90	1.30	1.59
赖氨酸(Lys*)	7.82	8.85	5.52
精氨酸(Arg)	11.69	8.14	7.59
脯氨酸(Pro)	3.51	2.45	5.70
必需氨基酸/%	35.20	38.92	32.78
支链氨基酸含量/%	16.15	19.34	16.19
碱性氨基酸含量/%	21.42	18.21	14.70
疏水性氨基酸含量/%	40.18	35.33	43.85

注: *为必需氨基酸。表中支链氨基酸含量是指 Val、Leu、Ile 3 种氨基酸总和占氨基酸总量的值; 碱性氨基酸含量是指 His、Arg、Lys 3 种氨基酸总和占氨基酸总量的值; 疏水性氨基酸含量是指 Phe、Val、Leu、Ile、Pro、Ala、Gly 7 种氨基酸总和占氨基酸总量的值。

2.3 蛋白组分酶解产物抗氧化活性测定

2.3.1 DPPH 自由基清除活性

DPPH·是一种很稳定的自由基,在有机溶液中呈紫色,特征吸收波长为 517 nm,广泛用于评价天然产物的抗氧化活性。GSH 是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成的具有生物活性的三肽化合物。GSH 是很多酶反应的辅基,在生物体内有很强的

清除自由基、解毒等多种生理功能,通常也作为体外抗氧化性评价阳性对照组的物质。图 2 比较了波纹巴非蛤三个蛋白组分酶解液的 DPPH·清除活性。由图 2 可知,三个蛋白组分酶解液均表现出 DPPH 自由基清除效果,且随着酶解液浓度的增大,DPPH·清除活性增强,在实验范围内呈现一定量效关系。这与 Je 等^[9]报道金枪鱼肝酶解液浓度与其抗氧化活性呈正相关的结果相似。回归分析得出肌浆蛋白、肌原纤维蛋白和基质蛋白酶解液的 DPPH·清除活性的 IC₅₀ 分别为 4.82、9.19 和 9.31mg/mL。由此可以看出,肌浆蛋白酶解液的 DPPH·清除活性最高,肌原纤维蛋白和基质蛋白酶解液的 DPPH·清除活性相当。但三个蛋白组分的酶解液的 DPPH·清除活性均弱于阳性对照组 GSH (IC₅₀=0.03 mg/mL),这与阿拉斯加鳕鱼鱼皮酶解液的 DPPH·清除活性 (IC₅₀=2.5 mg/mL) 弱于 GSH (IC₅₀=0.025 mg/mL) 报道的结果相似^[20]。肌浆蛋白酶解液抗氧化能力较其它两种蛋白酶解液强,可能是因为肌浆蛋白中碱性氨基酸含量高,研究表明碱性氨基酸(His、Arg 和 Lys)有增强抗氧化活性的作用^[21]。胰蛋白酶作用于 Lys 和 Arg 羧基端,有利于 Lys 和 Arg 从蛋白链中释放出来,产生较多的羧基端为 Lys 和 Arg 的多肽或 Lys 和 Arg。

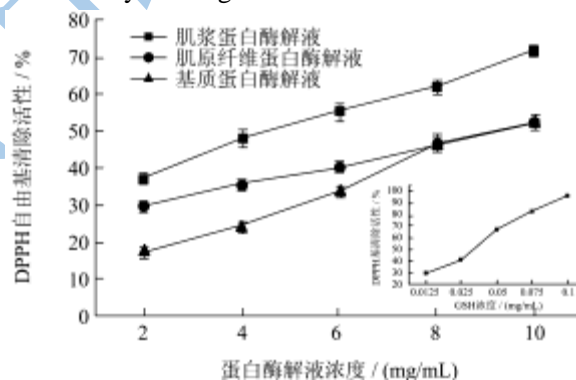


图 2 蛋白酶解液及 GSH 的 DPPH 自由基清除活性

Fig.2 DPPH radical scavenging activities of glutathione and protein hydrolysates

2.3.2 羟基自由基清除活性

羟基自由基 (·OH) 被认为是最活泼、最具有破坏性的基团,容易跟一些生物分子反应,如氨基酸,蛋白质和 DNA,进而造成机体损伤,引发病变。因此,清除·OH 对保护人体抵抗一些疾病具有重要作用。

由图 3 可知,三个蛋白组分的酶解液对·OH 具有较强的清除活性,在实验范围内,呈明显的量效关系。肌浆蛋白酶解液表现出最强的·OH 清除活性,IC₅₀ 为 4.70mg/mL,其次为肌原纤维蛋白酶解液 (IC₅₀=6.34 mg/mL),而基质蛋白酶解液的·OH 清除活性较弱 (IC₅₀= 8.42 mg/mL)。且肌浆蛋白和肌原纤维蛋白酶

解液的·OH清除活性比阳性对照组 GSH 强($IC_{50}=7.98$ mg/mL), 这一现象与 You 等^[22]对泥鳅蛋白酶解的研究相似。呈现此现象的原因一是三个蛋白质组成不一样, 产生的酶解产物各异; 二是蛋白酶的选择, 酶的专一性导致产物多肽 N-末端、C-末端的氨基酸组成和排列顺序不一样, 而这是影响多肽功能活性的主要因素。可能肌浆蛋白更容易被胰蛋白酶酶解, 产生更多具有抗氧化活性的多肽产物。

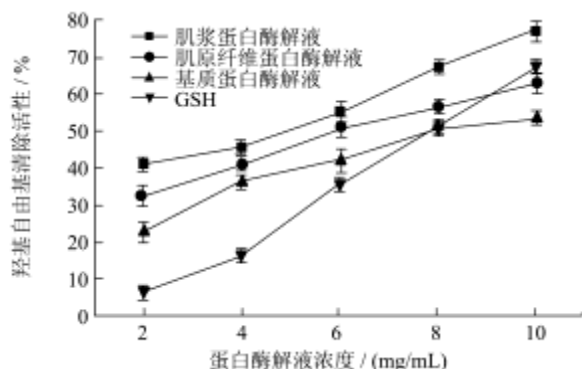


图3 蛋白酶解液及 GSH 的 OH·清除活性

Fig.3 OH·scavenging activities of glutathione and protein hydrolysates

2.3.3 超氧阴离子自由基清除活性

超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 是基态氧接受一个电子后形成的第一个氧自由基, 可以经一系列反应生成其它的氧自由基。抗氧化肽因具有提供氢质子和电子的能力, 能够与氧自由基发生氧化还原反应, 从而能终止自由基连锁反应, 起到清除或抑制自由基的目的。

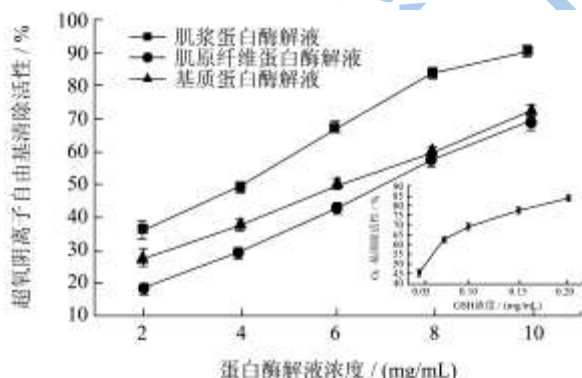


图4 蛋白酶解液及 GSH 的 $O_2^{\cdot-}$ 清除活性

Fig.4 $O_2^{\cdot-}$ scavenging activities of glutathione and protein hydrolysates

由图 4 可知, 三个蛋白组分的酶解液对 $O_2^{\cdot-}$ 具有较好的清除活性, 在实验范围内均与蛋白酶解液浓度呈现一定量效关系。与肌原纤维蛋白和基质蛋白酶解液相比, 肌浆蛋白酶解液的 $O_2^{\cdot-}$ 清除活性最强。与 DPPH 清除能力的测定结果相似, 三个蛋白组分的酶解液的 $O_2^{\cdot-}$ 清除活性均弱于阳性对照组 GSH。 $O_2^{\cdot-}$ 清

除活性大小依次为: GSH ($IC_{50}=0.05$ mg/mL) >肌浆蛋白酶解液 ($IC_{50}=3.75$ mg/mL) >基质蛋白酶解液 ($IC_{50}=6.11$ mg/mL) >肌原纤维蛋白酶解液($IC_{50}=7.03$ mg/mL)。

2.3.4 蛋白组分酶解液还原力的测定

表2 波纹巴非蛤蛋白酶解液的还原力

Table 2 Reducing power of Paphia undulate protein hydrolysate

浓度/ (mg/mL)	肌浆蛋白 酶解液	肌原纤维蛋 白酶解液	基质蛋白 酶解液	浓度/ (mg/mL)	GSH
2	0.25±0.01	0.27±0.04	0.14±0.01	0.025	0.30±0.03
4	0.29±0.01	0.31±0.06	0.16±0.03	0.05	0.49±0.01
6	0.41±0.03	0.42±0.02	0.28±0.01	0.075	0.62±0.01
8	0.46±0.01	0.51±0.07	0.39±0.06	0.10	0.74±0.02
10	0.58±0.05	0.57±0.01	0.43±0.01	0.125	0.83±0.05

Note: Values are shown as means ± SD of triplicate determinations.

通常情况下, 样品的还原力与抗氧化活性呈正相关, OD_{700} 越大, 表明样品的还原能力越强。由表 2 可知, 三个蛋白酶解液具有一定的还原能力, 还原力随着浓度的增加而增加, 当酶解液多肽浓度为 10 mg/mL 时, 肌浆蛋白, 肌原纤维蛋白和基质蛋白酶解液的 OD_{700} 分别达到 $0.58±0.05$ 、 $0.57±0.01$ 和 $0.43±0.01$ 。肌浆蛋白和肌原纤维蛋白酶解液的还原能力相当, 且均强于基质蛋白酶解液, 但三者的还原能力均弱于阳性对照组 GSH。You 等^[22]研究表明泥鳅多肽具有较强的还原力, 这可能与富含 His、Met、Trp、Lys 和 Tyr 这些与抗氧化活性有关的氨基酸。

2.4 蛋白酶解液分子量分布

采用 HPSEC 法测定波纹巴非蛤各蛋白酶解液分子量分布, 分子量分布图谱如图 5 所示, 图谱中洗脱峰的分子量及其占总峰面积的比例见表 3。由图表可知, 肌浆蛋白、肌原纤维蛋白和基质蛋白酶解液多肽的分子量分布主要集中在 5000 u 以下, 分别占 $87.56±0.11\%$ 、 $76.23±0.44\%$ 、 $73.83±0.73\%$, 可以看出蛋白酶解效果较好, 短肽的含量较高。但三个蛋白组分水解产生的蛋白质和肽分子量分布范围有显著性差异。肌浆蛋白酶解液中分子量小于 1500 u 组分所占比例最高为 $42.55±0.27\%$; 肌原纤维蛋白酶解液含量最高的分子量在 1500~3000 u 之间, 所占比例为 $27.79±0.35\%$; 基质蛋白酶解效果不如前两种蛋白, 分子量偏大, 含量最高的在 3000~5000 u 之间, 所占比例为 $27.96±0.02\%$, 大于 5000 u 的分子量占 $26.19±0.03\%$ 。相比之下, 肌浆蛋白酶解液酶解效果

最好,小分子肽含量最高。Aleman 等^[23]研究发现,小分子量的肽段具有更好的抗氧化活性。曹文红等^[24]研究发现菲律宾蛤仔、波纹巴非蛤和马氏珠母贝 3 种南海贝类酶解产物抗氧化活性的高活性组分的分子量均小于 1500 u。前面研究表明肌浆蛋白酶解液的抗氧化能力最强,基质蛋白酶解液抗氧化能力最弱,这可能与肌浆蛋白酶解液中小分子肽含量显著高于其它两种组成蛋白酶解液中的小分子肽的含量存在一定的关系。

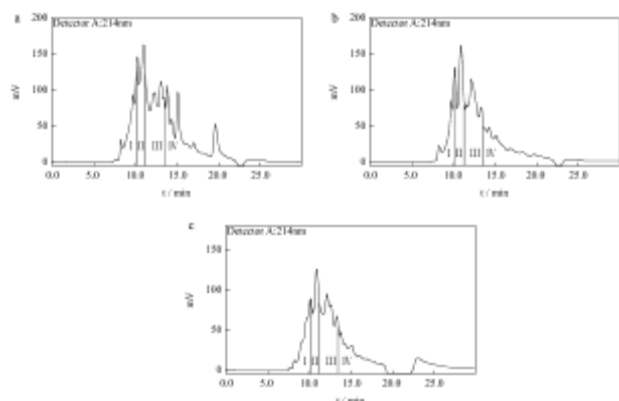


图 5 蛋白酶解液的分子量分布色谱图

Fig.5 The molecular weight distribution of the protein hydrolysates

注: a: 肌浆蛋白酶解液, b: 肌原纤维蛋白酶解液, c: 基质蛋白酶解液; I: $M_w > 5000\text{ u}$, II: $3000\text{--}5000\text{ u}$, III: $1500\text{--}3000\text{ u}$, IV: $<1500\text{ u}$ 。

表 3 蛋白酶解液分子量分布

Table 3 Molecular weight distribution (percent of the total area) of protein hydrolysate

组别	分子量/u	肌浆蛋白酶解液/%	肌原纤维蛋白酶解液/%	基质蛋白酶解液/%
I	>5000	12.45 ± 0.02^c	23.74 ± 0.28^b	26.19 ± 0.03^a
II	$3000\text{--}5000$	32.45 ± 0.01^a	21.72 ± 0.40^c	27.96 ± 0.02^b
III	$1500\text{--}3000$	12.57 ± 0.25^c	27.79 ± 0.35^b	25.60 ± 0.57^b
IV	<1500	42.55 ± 0.27^a	27.02 ± 0.09^b	20.26 ± 0.14^c

注: 表格中同一行中不同字母代表有显著性差异 ($p < 0.05$)。

3 结论

3.1 波纹巴非蛤蛋白中肌原纤维组分占原料粗蛋白的 45.42%, 肌浆蛋白组分占 31.20%, 基质蛋白组分占 20.69%, 非蛋白氮占 1.67%。该三种蛋白质中必需氨基酸及与抗氧化活性相关的碱性氨基酸、疏水性氨基酸和支链氨基酸含量较高

3.2 胰蛋白酶酶解产物的体外抗氧化实验结果显示, 波纹巴非蛤三种组成蛋白对 DPPH 自由基、羟基自由

基和超氧阴离子自由基均有较好的清除效果, 且清除率与酶解液浓度存在一定的量效关系。与其它两种蛋白酶解产物相比, 肌浆蛋白酶解产物的自由基清除效果最好, 对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由清除活性的 IC_{50} 值分别为 4.82、4.70 和 3.75 mg/mL, 依次为肌原纤维蛋白和基质蛋白酶解液。此外, 肌浆蛋白和肌原纤维蛋白酶解产物的还原力相当, 浓度为 10 mg/mL 时, 其 OD_{700} 分别为 0.58 和 0.57, 基质蛋白酶解产物的还原能力较弱。实验结果表明波纹巴非蛤三个蛋白组分尤其是肌浆蛋白酶解液产物可以作为较好的天然抗氧化剂。

3.3 胰蛋白酶对肌浆蛋白酶解效果最好, 小分子量所占比例最高, 其中分子量小于 1500 u 的小分子肽含量最高, 占 $42.55 \pm 0.268\%$ 。肌原纤维蛋白酶解效果次之, 基质蛋白酶解液中大分子量含量较高。肌浆蛋白酶解液的抗氧化能力最强, 基质蛋白酶解液抗氧化能力最弱, 这与酶解液分子量分布有一定的关系。波纹巴非蛤组成蛋白酶解液的分子量分布及抗氧化活性关系还需作进一步研究。

参考文献

- [1] 王万东. 福建省东山湾云霄海区波纹巴非蛤养殖状况监测 [J]. 养殖与饲料, 2009, 6: 7-21
Wang W D. Breeding condition monitoring of *Paphia undulate* from the east valley roller in Fujian sea area in China [J]. Animals Breeding and Feed, 2009, 6: 17-21
- [2] Zhou K, Sun S, Canning C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1192-1197
- [3] Gibbs B F, Zougman A, Masse R, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food [J]. Food research international, 2004, 37(2): 123-131
- [4] Rao S, Sun J, Liu Y, et al. ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1245-1252
- [5] Power O, Jakeman P, FitzGerald R J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides [J]. Amino Acids, 2013, 44(3): 797-820
- [6] Lin L, Li B F. Radical scavenging properties of protein hydrolysates from jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin [J]. Journal of the Science of Food

- and Agriculture, 2006, 86(14): 2290-2295
- [7] Binsan W, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 185-193
- [8] 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
- [9] 章超桦,洪鹏志,雷晓凌,等.波纹巴非蛤肉的食品化学特性及其在鱼糜制品中的应用[J].湛江海洋大学学报,2000, 20(1): 28-31
- Zhang C H, Hong P Z, Lei X L, et al. Food Chemical Properties of the Edible Part of *Paphia undulate* and Its Application in Fish Paster Products [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2000, 20(1): 28-31
- [10] 陈纯馨,陈忻,岑佩强,等.波纹巴非蛤生物活性肽的分离与提纯研究[J].食品科学,2009,20:143-145
- Chen C X, Chen X, Cen P Q, et al. Isolation and Purification of Bioactive Peptides from *Paphia undulate* Meat [J]. Food science, 2009, 20: 143-145
- [11] Saito T, Iso N, Mizuno H, et al. Effect of thermal treatment on extraction of proteins from meats [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1983, 49(10): 1569-1572
- [12] 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
- [13] 张兴茂,吴晖,赖富饶.酱油渣蛋白水解产物抗氧化性研究[J].现代食品科技,2011,27(10):1200-1204
- Zhang X M, Wu H, Lai F R. The Analysis of Antioxidant Activity of Soy Sauce Residue Protein Hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(10): 1200-1204
- [14] Yang P, Ke H, Hong P, et al. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(12): 2460-2466
- [15] Wu J, Chen S, Ge S, et al. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(1): 42-51
- [16] 于巍,周坚.鱼类肌原纤维蛋白热凝及流变学特性研究进展[J].食品科技,2007,(11):14-16
- Yu W, Zhou J. Advances on thermal gelation and rheological properties of fish myofibrillar protein [J]. Food Science and Technology, 2007, 11: 14-16
- [17] Noguchi S, Matsumoto J J. Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during frozen storage -III. Preventive effect of some amino acids, peptides, acetyl amino acids sulfur compounds [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1975, 41(2): 243-249
- [18] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1996, 44(9): 2619-2623
- [19] Je J Y, Lee K H, Lee M H, et al. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis [J]. Food research international, 2009, 42(9): 1266-1272
- [20] Jia J, Zhou Y, Lu J, et al. Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(4): 635-640
- [21] Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 238-245
- [22] You L, Zhao M, Regenstein J M, et al. In vitro antioxidant activity and in vivo anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion [J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 188-194
- [23] Alemán A, Giménez B, Pérez-Santín E, et al. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2011, 125: 334-341
- [24] 曹文红,章超桦,吴红棉,等.几种南海贝类酶解产物的生物活性及其分子量分布研究[J].食品与机械,2009,2:52-57
- Cao W H, Zhang C H, Wu H M, et al. Bioactive activities and molecular weight distribution of enzymatic hydrolysates of several shellfishes from South China Sea [J]. Food and Machinery, 2009, 2: 52-57