

大黄鱼内脏抗氧化肽的稳定性研究

李致瑜, 张翀, 田玉庭, 郑宝东

(福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002)

摘要: 本文旨在研究大黄鱼抗氧化肽在不同条件下的抗氧化稳定性。通过凝胶排阻色谱选择抗氧化活性较强的组分, 并采用 DPPH 自由基清除率以及 Fe^{2+} 螯合力来评价大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性。在中性 pH、常温、低浓度 NaCl 以及适量 K^+ , Ca^{2+} , Al^{3+} 条件下, 大黄鱼抗氧化肽抗氧化活性基本保持稳定, DPPH 自由基清除率和 Fe^{2+} 螯合力分别维持在 88.5% 和 66.7% 左右。在高浓度盐、高温、 Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} 等离子的引入和长时间紫外辐照下, 大黄鱼抗氧化肽抗氧化活性下降超过 30%。另外, 酸性 pH、70 °C 下加入葡萄糖、果糖、乳糖分别将大黄鱼抗氧化肽 DPPH 的清除活性提高至 90% 左右, 相反, 碱性条件有利于大黄鱼抗氧化肽螯合 Fe^{2+} 活性, 说明处理过程对不同抗氧化指标的影响有所差异。此外, 胃蛋白酶消化处理对大黄鱼抗氧化肽抗氧化活性影响不显著, 而进一步的糜蛋白酶消化却显著降低了多肽的抗氧化稳定性。因此, 合理的加工、贮藏工艺有利于维持大黄鱼抗氧化肽的稳定性。

关键词: 大黄鱼内脏抗氧化肽; 抗氧化活性; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2016)1-151-158

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.024

Stability of Antioxidant Peptides Extracted from *Pseudosciaena crocea* Viscera

LI Zhi-yu, ZHANG Chong, TIAN Yu-ting, ZHENG Bao-dong

(College of Food Science, Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The stability of the antioxidant activity of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera were studied under different conditions. Peptides with strong antioxidant activity were selected by size exclusion chromatography (SEC), and the antioxidant activity was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging rate and Fe^{2+} chelating capacity as indexes. Under conditions of neutral pH, room temperature, low NaCl concentration, and appropriate amounts of K^+ , Ca^{2+} , and Al^{3+} , the antioxidant activity of the antioxidant peptides from *Pseudosciaena crocea* viscera was generally stable, and DPPH radical scavenging rate and Fe^{2+} chelating capacity were 88.5% and 66.7%, respectively. With high NaCl concentration, high temperature, additions of K^+ , Ca^{2+} , and Al^{3+} , and long-duration ultraviolet irradiation, the antioxidant activity of the antioxidant peptides from *Pseudosciaena crocea* viscera was reduced by 30%. Furthermore, at acidic pH and additions of glucose, fructose, and lactose at 70 °C, the DPPH radical scavenging activity of the antioxidant peptides from *Pseudosciaena crocea* viscera was increased to approximately 90%; while alkaline conditions were conducive for the Fe^{2+} chelating capacity, indicating that treatments have different impacts on different antioxidant indicators. In addition, pepsin digestion treatment had no significant impact on the antioxidant activity of antioxidant peptides from *Pseudosciaena crocea* viscera, and further chymotrypsin digestion significantly decreased the antioxidant activity stability of the peptides. Therefore, appropriate processing and storage are critical for maintenance of the stability of the antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera.

Key words: antioxidant peptides from *Pseudosciaena crocea* viscera; antioxidant activity; stability

自由基是一种可单独存在并带有一个或数个不成对电子的原子或分子, 其化学性质极为活泼, 具有很强的氧化活性。自由基不仅与人体氧化应激以及各类

收稿日期: 2015-02-13

基金项目: 福建省海洋高新技术产业发展专项项目 (2013007)

作者简介: 李致瑜 (1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品加工与贮藏研究

通讯作者: 郑宝东 (1967-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事食品加工与贮藏研究

慢性疾病有关, 而且在食品加工过程中, 可能引发脂质过氧化等不良化学反应, 造成食品风味、质地的改变和营养价值的降低。抗氧化肽主要是由 2-20 个氨基酸组成的寡肽, 通常以无活性形式存在于各类动植物源蛋白序列中, 通过蛋白酶酶解可将这些功能性片段分离出来^[1]。由于活性强、结构稳定和安全系数高等特点, 已受到各领域学者的关注。已有研究人员从大豆^[2]、花生^[3]、草鱼^[1]的原料中制备出具有不同功能性的抗氧化肽。

当今抗氧化肽的研究方向主要集中在结构和功能性鉴定, 而对其在加工、贮藏过程中的抗氧化稳定性则鲜有报道。在不同环境下, 多肽链上可能发生脱酰胺、环化、氧化、水解等作用, 导致生物活性肽的功能性丧失^[4]。因此, 全面评价抗氧化肽在其在加工、贮藏和消化过程中的稳定性对其在功能性食品中的应用有着重要参考价值^[5]。Zhu 等全面评价金华火腿肽的抗氧化稳定性, 结构表明: 适量的 NaCl 和适度的酸解有利于其抗氧化活性的提高^[4]。

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*), 又名大王鱼、石头鱼等, 广泛分布于我国东、南海及黄海南部, 是我国传统“四大海产”之一。有关大黄鱼的研究主要集中在养殖、保鲜及鱼肉的深加工方面。Chi 等采用胃蛋白酶-alcalase 联合酶解大黄鱼鱼肉, 得到三个具有较强抗氧化活性的肽段^[6]。大黄鱼内脏蛋白比例达到 21.5%, 并含有丰富的必需氨基酸, 如赖氨酸、色氨酸、缬氨酸等。而有关大黄鱼内脏蛋白的研究则未见相关报道。经前期研究表明, 采用 alcalase 制备的大黄鱼内脏肽具有潜在的抗氧化活性。然而其在加工、贮藏和消化过程中的抗氧化稳定性还没有确定。因此, 本文旨在研究大黄鱼内脏肽在不同 pH、温度、辐照环境、金属离子、胃肠道消化的抗氧化活性。以期为大黄鱼副产品的深度开发及应用提供一定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

大黄鱼内脏: 由福建福鼎海鸥水产食品有限公司提供, 包装于双层聚乙烯袋中置于-20℃冷冻备用。Alcalase 酶制剂 (2.4 AU/g)、胃蛋白酶 (10 U/mg)、糜蛋白酶 (30 U/mg): 诺维信公司。1,1-二苯基-2-苦基肼、ferrozine (菲咯嗪): sigma 公司。8-苯胺基-1-萘磺酸铵 (8-anilino-naphthalene-1-sulphonic acid ammonium salt, ANS): Fluka 公司。盐酸、氢氧化钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化铬、氯化铜、氯化亚铁、氯化铁、三氯化铝、葡萄糖、乳糖、木糖、蔗糖等均为国药分析纯。

绞肉机: 永康市迪利工贸有限公司; PB-10 数显 pH 计: 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; SHA-B 水浴恒温振荡器: 常州国华电器有限公司; H1850R 台式高速冷冻离心机: 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; TU-1810DPC 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 无菌操作台: 苏州博兰特实验室设备有限公司; EYEL 4 冷冻干燥机: 日本东京理化仪器株式会社; 澳华 SK-1 快速混匀漩涡混合器:

广州罡然机电设备有限公司。F-7000 荧光分光光度计: 日本日立公司。

1.2 大黄鱼抗氧化肽的制备工艺

大黄鱼内脏→解冻 (25℃温水浸泡)→洗涤 3~4 次→除去性腺、鱼鳃、胆囊等→绞碎→异丙醇脱脂 2-3 次→灭酶 (沸水浴 10 min)→加水匀浆 (10 g 底物溶于 100 mL 蒸馏水中)→调节 pH 至 9-加 Alcalase 碱性蛋白酶 (2%)→酶解 90 min→灭酶 (沸水浴 10 min)→离心 (5000 r/min 20 min)→微滤 (0.45 μm)→大孔树脂 D392 脱色 (pH 8.5、温度 45℃、脱色时间: 4 h)→超滤浓缩 (3000 u)→透过液→冷冻干燥→大黄鱼内脏多肽粉

1.3 试验方法

1.3.1 大黄鱼内脏水解物的分离

将 0.3 g 的大黄鱼抗氧化肽溶于 1 mL 的去离子水中, 混匀后, 经 0.45 μm 水相微孔滤膜过滤, 滤液经 Sephadex-G25 凝胶层析柱分离, 用蒸馏水做为流动相, 流速为 0.75 mL/min, 分管收集, 每管收集 4 mL。在 220 nm 下监测洗脱液的吸光值并绘制相应的洗脱曲线。以 DPPH 自由基清除法测定各管的抗氧化活性, 并绘制相应的抗氧化活性曲线。结合抗氧化曲线与洗脱曲线确定抗氧化活性最高的组分, 收集该组分, 经浓缩、冷冻干燥后。放置与-20℃隔氧环境下保藏。

1.3.2 pH 对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性的影响

配制 8 mg/mL 的大黄鱼抗氧化肽, 分别采用 1 M HCl 或 1 M NaOH 调节 pH 值至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 后静置 1 h, 测定其 DPPH 清除率和螯合 Fe²⁺活性。

1.3.3 温度对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性的影响

配制 8 mg/mL 的大黄鱼内脏抗氧化肽, 分别在 20℃、40℃、60℃、80℃、100℃的水浴锅中保温 2 h, 快速冷却至室温, 并测定其 DPPH 清除率和螯合 Fe²⁺活性。

1.3.4 NaCl 对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性的影响

配制 8 mg/mL 的大黄鱼抗氧化肽, 分别加入 2%、4%、6%、8%和 10%的 NaCl, 在沸水中加热 15 min 后用冰块快速冷却至室温。测定不同浓度 NaCl 下大黄鱼内脏肽的 DPPH 清除率和螯合 Fe²⁺活性。

1.3.5 紫外辐照条件对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性的影响

配制 8 mg/mL 的大黄鱼抗氧化肽, 置于紫外灯

(257.3 nm) 下 10 cm 处, 控制环境温度为 25 °C。在 0 h、1 h、2 h、3 h、5 h、8 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h 后检测其 DPPH 清除率和螯合 Fe²⁺活性。

1.3.6 不同金属离子对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性的影响

分别配置 20 mM 的 KCl、CaCl₂、FeCl₂、CuCl₂、CrCl₃、FeCl₃、AlCl₃ 母液, 将等质量大黄鱼抗氧化肽与不同浓度金属离子混合, 使得最终浓度分别为 0、1、2、3、4、5、6 mM, 混合液混匀静置 2 h 后, 测定其 DPPH 清除率和螯合 Fe²⁺活性。

1.3.7 不同糖类对大黄鱼抗氧化肽对多肽抗氧化活性的影响

配制 8 mg/mL 的大黄鱼抗氧化肽, 分别加入 0.4 g 的葡萄糖、木糖、果糖和蔗糖, 使多肽与糖类质量比为 2:1, 分别放置在 30 °C 和 70 °C 的水浴锅中, 存放 2 h 后测定其 DPPH 清除率和螯合 Fe²⁺活性。

1.3.8 体外模拟胃肠消化

1.3.8.1 体外模拟胃液连续消化

在参考 Liu 的方法的基础上稍作改动^[7], 配制 8 mg/mL 的大黄鱼抗氧化肽, 并用 1 M 的 HCl 调节溶液至 pH=2, 以 E/S=4% (质量分数) 加入胃蛋白酶, 在 37 °C 下反应 2 h, 接着用沸水浴加热 10 min 以终止消化, 冷却至室温后离心 (8000 g) 15 min, 取上清液并分为两份, 一份继续进行体外模拟消化, 另一份在冷冻干燥后进行抗氧化活性和表面疏水性的鉴定。

1.3.8.2 体外模拟肠道连续消化

将胃液消化后的大黄鱼内脏肽用 0.9 mol/L 的 NaHCO₃ 调节至 pH=5.3, 然后用 1 M 的 NaOH 调节值 pH=7.5, 以 E/S=4% (质量分数) 加入糜蛋白酶, 在 37 °C 下反应 2 h, 接着用沸水浴加热 10 min 以终止消化, 冷却至室温后离心 (8000 r/min) 15 min, 取上清液进行抗氧化活性和表面疏水性的鉴定。

1.3.9 表面疏水性的测定

采用 Haskard 的方法并略做调整^[9], 采用 8-苯胺-1-萘磺酸做为荧光探针测定大黄鱼抗氧化肽的表面疏水性, 将大黄鱼抗氧化肽溶于 1 M 的 PBS (pH 7), 并配置成 0.5~5 mg/mL 的溶液, 加入 15 μL 的 8 mM 的 ANS, 漩涡振荡后, 用荧光分光光度计测量其吸光度, 发射波长选用 374 nm, 激发波长选用 485 nm。将大黄鱼抗氧化肽浓度与溶液荧光值的斜率当做是大黄鱼内脏肽的表面疏水性。

1.3.10 DPPH 自由基清除率的测定

采用 Xie 的方法做适当改进^[8]。将 0.5 mL 的 8 mg/mL 大黄鱼抗氧化肽加入到 2.5 mL 的 0.0015 mol/L

的 DPPH 溶液中, DPPH 用 95% 的乙醇溶液配制。充分混匀后, 在避光处放置 30 min 后, 用紫外-可见分光光度计在 517 nm 测定其吸光度, 以 2 mL 蒸馏水与 2 mL 乙醇混合后的吸光度为空白对照。抑制率可用下列公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (A_{\text{bst}=0} - A_{\text{bst}=30\text{min}}) / A_{\text{bst}=0} \times 100$$

式中, $A_{\text{bst}=0}$ 为未加酶溶液的吸光度值; $A_{\text{bst}=30\text{min}}$ 为溶液静置 30min 后吸光度值。

1.3.11 螯合 Fe²⁺活性的测定

在参考 Chung 的方法基础上做适当调整^[4]。精确配置 5 mM ferrozine 后, 取 0.3 mL 添加到 0.2 mL 的 0.5 mM FeCl₂ 中, 接着添加大黄鱼抗氧化肽并反应 20 min, 以蒸馏水为空白对照, 在 562 nm 处测量其吸光度

$$\text{螯合 Fe}^{2+}\text{活性(Chelating activity}\%) = [(B-A)/B] \times 100$$

注: A: 样品在 562 nm 处的吸光度, B: 空白对照在 562 nm 出的吸光度。

1.4 数据分析

每个试验重复三次, 结果以“平均值±SD”表示。方差分析使用 SPSS.17.0 软件, 采用 Origin8.0 作图, 图中不同的字母表示数据之间显著性 ($p < 0.05$) 的差异

2 结果与讨论

2.1 大黄鱼抗氧化肽的分离纯化

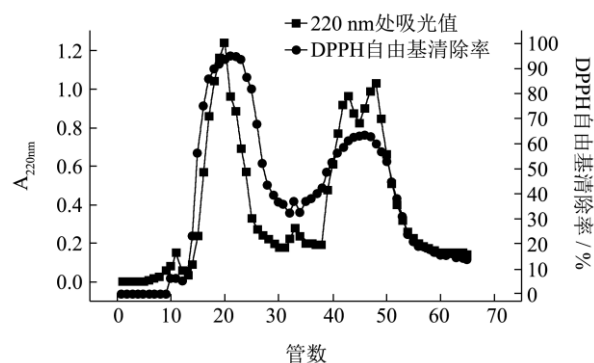


图1 大黄鱼抗氧化肽的分离纯化

Fig.1 Separation and purification of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera

DPPH 自由基稳定存在于 95% 的乙醇溶液中并在 517 nm 出呈最大吸收波长中。当 DPPH 与质子或电子结合后, 其最外层轨道上的不成对电子转变为空轨道或孤对电子对, 此时, 自由基被猝灭, 而其相应的吸收波长也随之减弱。DPPH 自由基模型广泛由于鉴定抗氧化剂的疏水性和给电子能力。大黄鱼内脏蛋白水

解物经 Sephadex-G25 凝胶过滤柱分离得到的洗脱曲线和 DPPH 清除力如图 1 所示。通过 Sephadex-G25 凝胶过滤柱可洗脱出两个峰,当洗脱体积达到 0.8 个柱体积时,随着洗脱体积的增加,洗脱液的自由基清除力迅速上升,到达第 21 管时吸光值最高,且其自由基清除力也达到最大值,随后洗脱液的吸光值和 DPPH·清除率迅速下降,当达到第 40-50 管中洗脱出峰 II,其清除率有所回升,但仍显著低于峰 I($p<0.01$)。因此,收集峰 I 的洗脱液,经浓缩、冷冻干燥后,作为后续抗氧化稳定性的研究对象

2.2 pH 对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化稳定性的影响

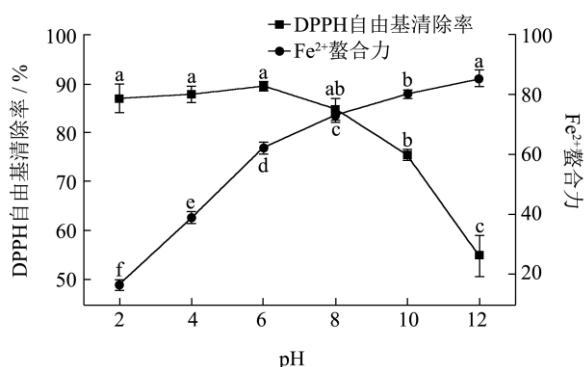


图 2 pH 对大黄鱼抗氧化肽抗氧化稳定性的影响

Fig.2 Effect of pH on the antioxidant activities of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera

不同 pH 对大黄鱼抗氧化肽抗氧化活性的影响如图 2 所示,随着 pH 上升,大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除率先上升后下降。当 pH 接近中性 (pH 6) 时,大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除率达到最强。而在酸性条件下, DPPH 清除率没有显著降低 ($p>0.05$),当 pH 为 2 时,大黄鱼抗氧化肽仍保持 85% 以上的 DPPH 清除活性。然而,当大黄鱼抗氧化肽处于碱性环境下, DPPH 清除活性显著下降 ($p<0.01$), pH 为 12 时,大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除力仅为 54.80%,相比 pH 6 时降低了 35.03%。这可能是由于在碱性环境下,多肽容易发生外消旋反应,使部分 L-氨基酸转变成 D-型氨基酸,形成 D-和 L-型多肽的混合物,从而引起化合物极性、空间位阻等结构性质的改变^[10]。因此,大黄鱼抗氧化肽在碱性环境中可能引起疏水性或给质子能力下降,导致抗氧化活性丧失下降。Fe²⁺可通过 Feilin 反应将过氧化氢转化为羟自由基,羟自由基是一种化学性质极不稳定的活性氧,过量的羟自由基对食品组分和人体健康都具较大威胁^[6]。因此,螯合 Fe²⁺常作为评价抗氧化肽活性的重要指标。大黄鱼抗氧化

肽的螯合 Fe²⁺能力随 pH 上升呈显著上升趋势 ($p<0.05$),当 pH12 时,大黄鱼抗氧化肽的螯合 Fe²⁺活性达到最大,这可能是由于碱性环境下,多肽分子上带有较多的负电,提高了其于 Fe²⁺的静电吸引作用,从而增强了多肽的螯合金属离子能力^[11]。

2.3 温度对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化稳定性的影响

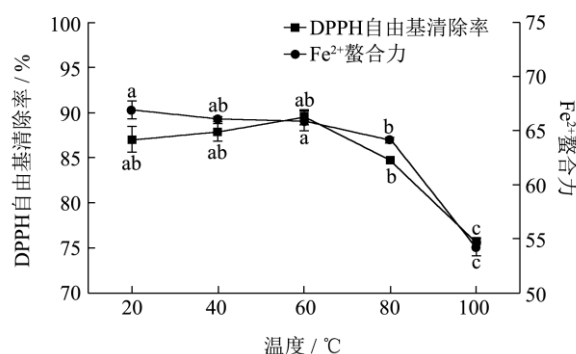


图 3 温度对大黄鱼抗氧化肽抗氧化稳定性的影响

Fig.3 Effect of temperature on the antioxidant activities of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera

大黄鱼抗氧化肽的热稳定性如图 3 所示,在 20~60 °C 范围内,多肽的 DPPH 清除活性和 Fe²⁺螯合力基本保持稳定,即使在 100 °C 处理 90 min。DPPH 清除力仍然保持在 85% 以上。这可能是低分子量肽不具有热敏感的三级、四级结构,因此其空间结构对热作用敏感性较低^[12]。多肽的螯合 Fe²⁺活性在一定的温度范围内也基本维持稳定,然而,当温度超过 80 °C 时,Fe²⁺螯合力表现出显著的下降趋势 ($p<0.01$),根据 zhou 的结论,这是由于多肽分子还保留少量的二级结构,并在于金属形成配合物过程中起到重要作用。较高的温度可能会破坏多肽分子中残留的二级结构,导致大黄鱼抗氧化肽的螯合金属离子能力下降^[4]。

2.4 NaCl 对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化稳定性的影响

不同浓度的 NaCl 对大黄鱼抗氧化肽抗氧化活性的影响如图 4 所示,当 NaCl 浓度小于 6% 时,大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除活性和螯合 Fe²⁺活性变化不大 ($p>0.05$),而当 NaCl 浓度超过 6% 时, DPPH 清除活性和螯合 Fe²⁺活性均显著下降 ($p<0.01$)。当 NaCl 含量达到 10% 时, DPPH 清除率和螯合 Fe²⁺能力分别降至 44.51% 和 40.07%。这是由于高浓度的 Na⁺、Cl⁻可

通过反离子效应覆盖在多肽的分子表面,引起多肽的 Zeta 电位和水合作用的降低^[13],从而导致其抗氧化活性的下降。

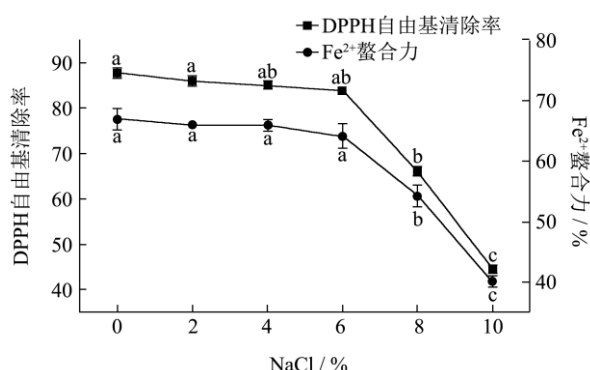


图 4 NaCl 对大黄鱼抗氧化肽抗氧化稳定性的影响

Fig.4 Effect of NaCl on the antioxidant activities of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera

2.5 紫外辐照对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化稳定性的影响

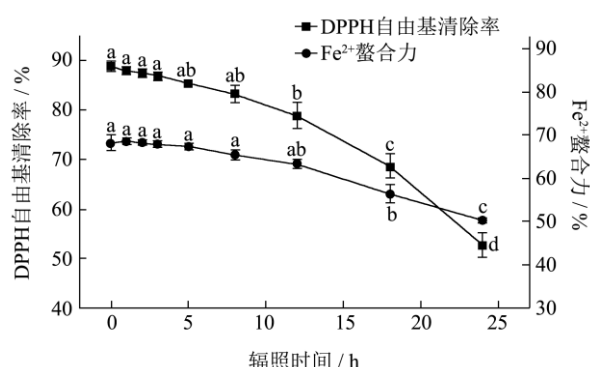


图 5 紫外辐照对大黄鱼抗氧化肽抗氧化稳定性的影响

Fig.5 Effect of UV irradiation on the antioxidant activity of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera

紫外辐照对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性如图 5 所示。随着辐照时间的延长,大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性损失率较高,其中 DPPH 清除活性在 12 h 时降低了 9.74% ($p < 0.05$),当 24 h 后降至 50.18% ($p < 0.01$),研究表明长时间紫外光作用使多肽外层电子从基态跃迁到激发态,降低了其物理、化学稳定性^[14],例如,如今苯环、酚羟基、氨基上 H⁺的电离。另外,紫外辐照能引发 H₂O 分子裂解为羟自由基等,一定程度抑制了大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性。大黄鱼抗氧化肽的螯合 Fe²⁺活性在 12 h 后大幅降低 ($p < 0.01$)。进一步证实了紫外辐照可能对大黄鱼抗氧化肽的理化 and 结构性产生较大破坏。

2.6 不同金属离子对大黄鱼抗氧化肽的抗氧

化稳定性的影响

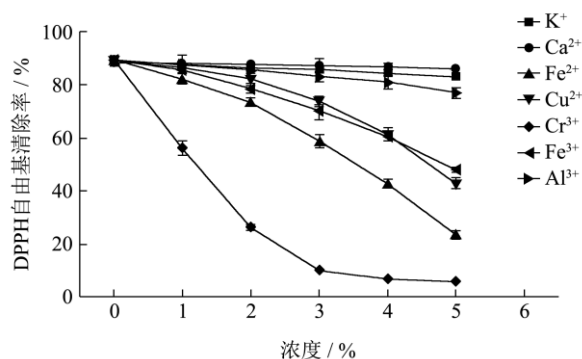


图 6 不同金属离子对大黄鱼抗氧化肽清除 DPPH 自由基活性的影响

Fig.6 Effect of different metal ions on the DPPH radical scavenging activity of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera

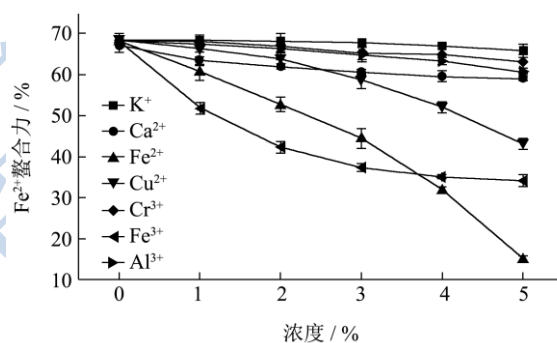


图 7 不同金属离子对大黄鱼抗氧化肽螯合 Fe²⁺活性的影响

Fig.7 Effect of different metal ions on Fe²⁺-chelating ability of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera

不同金属离子大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性如图 6~7 所示,添加不同浓度 K⁺、Ca²⁺、Al³⁺对大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除率影响较小 ($p > 0.05$),而 Cu²⁺、Fe²⁺、Cr³⁺、Fe³⁺则显著降低了多肽的 DPPH 清除率 ($p < 0.01$),其中 Fe²⁺抑制大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除活性的效果最为显著。因此,说明 Cu²⁺、Fe²⁺、Cr³⁺、Fe³⁺与大黄鱼抗氧化肽的亲合力较强,除了静电作用外,共价键、离子键与物理吸附都在金属离子与多肽类物质之间的相互作用中起到重要作用。此外,Cr、Fe 在 d 轨道上含有空轨道,易于接受带有孤对电子对的抗氧化肽(亚氨基、羰基)形成配合物^[15],可能导致大黄鱼抗氧化肽给质子能力和表面疏水性的降低。大黄鱼抗氧化肽的 Fe²⁺螯合力随 K⁺、Ca²⁺、Al³⁺、Cr³⁺浓度增加变化不显著 ($p > 0.05$),这与 DPPH 清除活性有所差异,说明多肽结构的变化对不同抗氧化指标的影响可能并不一致。而 Fe²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺则显

著抑制大黄鱼抗氧化肽的螯合 Fe^{2+} 能力 ($p < 0.01$)。前期实验表明, 大黄鱼抗氧化肽具有较强的还原力, 可能通过将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 而且对 Cu^{2+} 亦表现出较强的螯合作用。因此, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 通过不同方式占据多肽的活性位点, 竞争性的抑制大黄鱼抗氧化肽的螯合外源 Fe^{2+} 的活性。

2.7 不同糖类对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化稳定性的影响

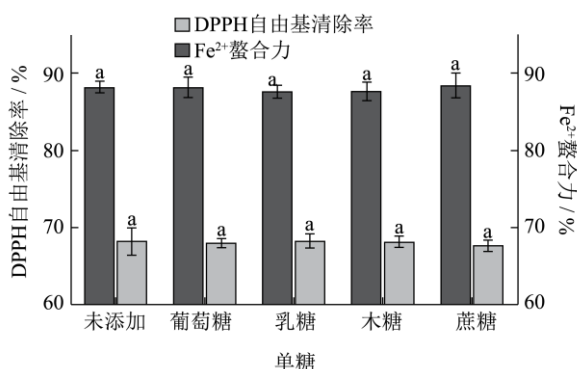


图 8 30 °C 下不同单糖对大黄鱼抗氧化肽抗氧化活性的影响

Fig.8 Effect of different monosaccharides on the DPPH radical scavenging activity of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea viscera* at 30 °C

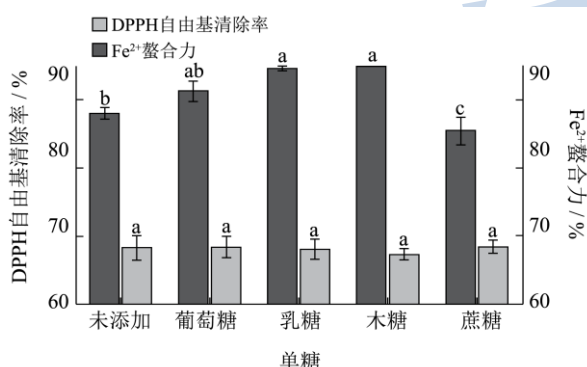


图 9 60 °C 下不同糖类对大黄鱼抗氧化肽抗氧化活性的影响

Fig.9 Effect of different sugars on DPPH radical scavenging activity of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea viscera* at 60 °C

不同糖类添加对大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性如图 8-图 9 所示, 当存放温度为 30 °C 时, 不同糖类对大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除力和螯合 Fe^{2+} 活性影响不大 ($p > 0.05$), 说明常温下糖类与大黄鱼抗氧化肽相互作用较弱。

而当大黄鱼抗氧化肽存放温度为 60 °C 时, 葡萄糖、乳糖、木糖组大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 自由基清除率显著提高 ($p < 0.05$), 并伴随着溶液颜色的加深, 而蔗糖组的抗氧化活性则变化不显著 ($p > 0.05$), 根据

Benjakul 等的研究结论, 这是由于在一定温度下还原糖上的羰基通过美拉德反应与多肽上的氨基结合, 形成美拉德反应产物 (MRPs), 通过研究表明 MRPs 中的褐色素主要包括还原酮、吡咯酮、脱氧果糖噁类物质, 相对于氨基酸、多肽等具有更强的给质子能力^[16]。因此, 还原糖的添加有利于提高大黄鱼抗氧化肽的抗氧化活性。另外, 比较三组还原糖对大黄鱼抗氧化肽抗氧化活性的影响可发现, 木糖>乳糖>葡萄糖, 可能是在此条件下, 木糖与大黄鱼抗氧化肽反应更为彻底, 生成的产物更有利于清除自由基。而螯合 Fe^{2+} 活性则随葡萄糖、乳糖、果糖的加入变化并不显著 ($p > 0.05$), 这与 You 的结论不一致^[17], 可能原料及反应条件的差异有关。通过比较 DPPH 自由基清除率与 Fe^{2+} 螯合力。进一步证实了不同抗氧化指标之间存在着一定的独立性。

2.8 模拟胃肠道消化过程对大黄鱼抗氧化肽的表面疏水性的影响

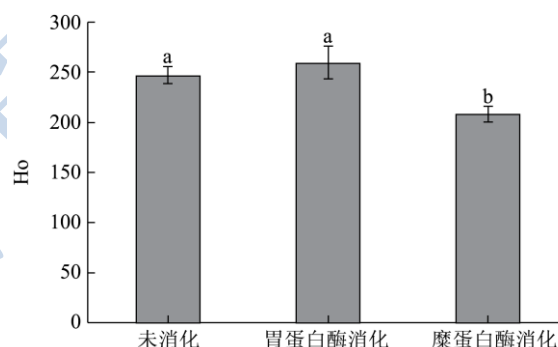


图 10 模拟胃肠道消化过程对大黄鱼内脏肽表面疏水性的影响

Fig.10 Effect of pepsin-trypsin simulated gastrointestinal digestion on surface hydrophobicity of peptides extracted from *Pseudosciaena crocea viscera*

荧光探针 ANS 能与多肽链上的芳香族氨基酸(色氨酸、苯丙氨酸)结合。可间接地作为一种评价蛋白质疏水性的疏水指示剂^[18]。由图 10 可知, 大黄鱼抗氧化肽经胃蛋白酶消化后, 由于蛋白酶的作用可能导致多肽疏水残基进一步暴露^[4], 使表面疏水性提高, 但在本实验中表现的并不显著 ($p > 0.05$)。然而, 在糜蛋白酶消化 2 h 后, 大黄鱼抗氧化肽的疏水性显著降低 ($p < 0.05$)。可能是糜蛋白酶与大黄鱼抗氧化肽的亲合力较强, 促进大黄鱼抗氧化肽进一步降解为小分子肽或氨基酸, 从而极性基团数量增多, 不利于 ANS 与大黄鱼抗氧化肽的结合。

2.9 模拟胃肠道消化过程对大黄鱼抗氧化肽

的表面疏水性的影响

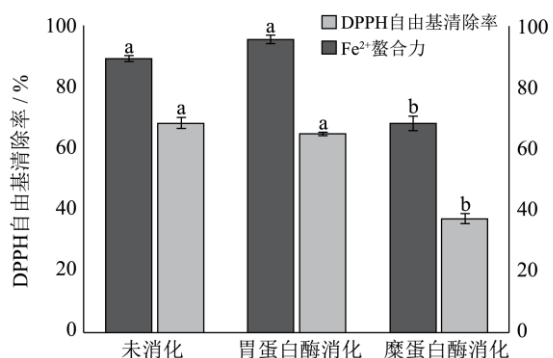


图 11 模拟胃肠道消化过程对大黄鱼内脏肽表面疏水性的影响

Fig.11 Effect of pepsin-trypsin simulated gastrointestinal digestion on antioxidant activity of peptides extracted from

Pseudosciaena crocea viscera

大黄鱼抗氧化肽经体外模拟胃肠道消化酶消化后 DPPH 清除活性和螯合 Fe²⁺活性如图 11 所示, 当经胃消化道酶系消化 120 min 后, 大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除率有变化不显著 ($p>0.05$), 而 Fe²⁺螯合力则显著下降 ($p<0.05$)。根据 Zhu 等的研究表明, 这是由于胃蛋白酶水解提高了大黄鱼抗氧化肽的疏水性, 使其易于捕获脂溶性的 DPPH 自由基, 从而提高了大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除活性。而胃蛋白酶相应的降低了多肽的极性, 包括多肽分子的表面电荷量, 导致大黄鱼抗氧化肽与 Fe²⁺的静电作用降低^[19]。当胃蛋白酶产物进一步通过胰酶模拟肠道消化后, 大黄鱼抗氧化肽的 DPPH 清除活性和 Fe²⁺螯合力都呈显著下降趋势 ($p<0.01$)。糜蛋白酶加入进一步导致了产物中肽段的裂解和游离氨基酸比例升高。这不利于保持酶解产物的功能稳定性。多肽分子内的氨基酸主要通过协同作用而形成比氨基酸或小分子抗氧化剂更强抗氧化活性, 包括清除自由基、螯合金属离子和抑制脂质过氧化等^[1]。因此, 胃肠道消化不利于保持酶解产物的功能稳定性。

3 结论

3.1 本文以 DPPH 自由基清除率和螯合 Fe²⁺为指标, 评价大黄鱼多肽在不同环境下的抗氧化稳定性。结果表明: 中性和酸性 pH、20-60 °C 范围内和高温条件下加入还原糖都有利于大黄鱼多肽的自由基清除活性。而碱性条件、高温、过量 NaCl、Cu²⁺、Fe²⁺、Cr³⁺、Fe³⁺, 长时间的辐照和胃肠道消化过程都对其 DPPH 自由基清除活性有不利的影响。

3.2 碱性 pH 条件对大黄鱼抗氧化肽的螯合 Fe²⁺活性有促进作用。然而酸性 pH、高温、过量 NaCl、Cu²⁺、

Fe²⁺、Cr³⁺、Fe³⁺处理, 长时间的辐照和胃肠道消化过程不利于大黄鱼抗氧化肽螯合 Fe²⁺。另外, 添加单糖、K⁺、Ca²⁺、Al³⁺、Cr³⁺等元素对其活性影响不显著。本研究为合理的加工、贮藏和应用大黄鱼抗氧化肽提供了一定的依据, 并进一步促进了大黄鱼产业中副产品的综合利用。

参考文献

- [1] Sarmadi B H, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review [J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956
- [2] Moure A, Domínguez H, Parajó J C. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(19): 7600-7608
- [3] Chen G, Zhao L, Zhao L, et al. *In vitro* study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(2): 357-362
- [4] Zhu C Z, Zhang W G, Kang Z L, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham [J]. Meat Science, 2014, 96(2): 783-789
- [5] Sannaveerappa T, Westlund S, Sandberg A S, et al. Changes in the antioxidative property of herring (*Clupea harengus*) press juice during a simulated gastrointestinal digestion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(26): 10977-10985
- [6] Chi C F, Hu F Y, Wang B, et al. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle [J]. Food Chemistry, 2015, 168: 662-667
- [7] 刘珊珊, 敖静, 谢宁宁, 等. 酪蛋白抗氧化肽的胃肠消化稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2014, 02: 47-54
LIU Shan-shan, AO Jing, XIE Ning-ning, et al. Study on the stability of casein antioxidant peptides during simulated gastrointestinal digestion [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 02: 47-54
- [8] Xie Z, Huang J, Xu X, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 370-376
- [9] Haskard C A, Li-Chan E C Y. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(7): 2671-2677
- [10] Liardony R, Jost R. Racemization of free and protein - bound amino acids in strong mineral acid [J]. International Journal

- of Peptide and Protein Research, 1981, 18(5): 500-505
- [11] G A Kerkut. Biochemistry [M]. Reading: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1985
- [12] Arcan I, Yemenicioğlu A. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans [J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 301-312
- [13] Loveday S M, Wang X L, Rao M A, et al. Effect of pH, NaCl, CaCl₂ and temperature on self-assembly of β-lactoglobulin into nanofibrils: a central composite design study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(15): 8467-8474
- [14] Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, et al. Protein damage, repair and proteolysis [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2014, 35: 1-71
- [15] 王子怀,胡晓,李来好,等.肽-金属离子螯合物的研究进展[J].食品工业科技,2014,8:359-362
WANG Zi-huai, HU Xiao, LI Lai-hao, et al. Research progress in peptide-mineral ion complexes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 8: 359-362
- [16] Benjakul S, Visessanguan W, Phongkanpai V, et al. Antioxidative activity of caramelisation products and their preventive effect on lipid oxidation in fish mince [J]. Food Chemistry, 2005, 90(1): 231-239
- [17] 尤娟. 鱗鱼鱼肉蛋白抗氧化肽的制备及其糖基化产物功能特性的研究[D].北京:中国农业大学,2014
YOU Juan. Preparation, purification, characterization of antioxidant peptides derived from silver carp protein and functional properties of their glycation products [J]. Beijing: China Agricultural University, 2014
- [18] Benjakul S, Seymour T A, Morrissey M T, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. Journal of Food Science, 1997, 62(4): 729-733
- [19] Zhu L, Chen J, Tang X, et al. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(8): 2714-2721