

棘胸蛙肌肉水解物的制备及抗氧化活性评价

邓凝¹, 王小娟¹, 苏德锦^{1,2}, 林丽婷¹, 李钰琦¹, 苏进全³, 张铃玉¹, 吴达仁¹, 李健^{1*}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361000)

(2. 福建泉州锦峰生物科技有限公司, 福建泉州 362500) (3. 福建省健丰生物科技有限公司, 福建泉州 362500)

摘要: 以棘胸蛙腿部肌肉为研究材料, 利用木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶两种酶, 以成品率和水解度为指标, 通过单因素结合响应面分析的方法优化棘胸蛙水解物的酶解工艺, 同时对棘胸蛙水解物抗氧化能力进行研究。结果表明, 棘胸蛙水解物经木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶的最佳酶解条件为: 在各酶最适 pH 和温度的条件下, 料液比为 1:15 (g/mL)、酶解时间 4 h、加酶量为 2% (m/m); 该工艺条件下, 棘胸蛙水解物的水解度分别为 19.23%、23.51%, 成品率分别为 22.66%、15.32%, 清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 2.61、2.95 mg/mL, 清除 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 值分别为 3.46、3.20 mg/mL, 清除羟基自由基的 IC₅₀ 值分别为 8.20、9.23 mg/mL。综上, 通过响应面法优化的棘胸蛙水解物酶解工艺方便可行, 制备得到的水解物具有较强抗氧化活性, 为棘胸蛙资源的开发提供了理论基础。

关键词: 棘胸蛙; 响应面法; 酶解; 水解物; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2023)05-201-209

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0671

Preparation of *Quasipaa spinosa* Muscle Hydrolysates and Evaluation of Their Antioxidant Activity

DENG Ning¹, WANG Xiaojuan¹, SU Dejin^{1,2}, LIN Liting¹, LI Yuqi¹, SU Jinqun³, ZHANG Lingyu¹, WU Daren¹, LI Jian^{1*}

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361000, China)

(2. Fujian Quanzhou Jinfeng Biotechnological Co. Ltd., Quanzhou 362500, China)

(3. Fujian Jianfeng Biotechnological Co. Ltd., Quanzhou 362500, China)

Abstract: The leg muscles of *Quasipaa spinosa* were enzymatically hydrolyzed using papain and acid protease to prepare hydrolysates. With the yield and degree of hydrolysis as indicators, the enzymatic hydrolysis process of *Q. spinosa* was optimized using single factor analysis combined with response surface methodology, and the antioxidant activity of the obtained *Q. spinosa* hydrolysates was evaluated. The optimal enzymatic hydrolysis conditions of *Q. spinosa* muscles using papain and acid protease were as follows: under the optimal pH and temperature for each enzyme, the solid-liquid ratio was 1:15, hydrolysis time was 4 h, and enzyme concentration was 2%. Under these process conditions, the degree of hydrolysis of *Q. spinosa* muscles obtained with papain and acid protease treatment was 19.23% and 23.51%; yield was 22.66% and 15.32%; IC₅₀ values for DPPH free radical scavenging were 2.61 and 2.95 mg/mL; IC₅₀ values for ABTS⁺ radical scavenging were 3.46 and 3.20 mg/mL; and IC₅₀ values for hydroxyl radical scavenging were 8.20 and 9.23 mg/mL, respectively. In summary, the enzymatic hydrolysis process of *Q. spinosa* muscles optimized using response surface methodology is convenient and feasible, and the obtained hydrolysates exhibit potent antioxidant activity. These findings provide a theoretical basis for the development of *Q. spinosa* resources.

Key words: *Quasipaa spinosa*; response surface methodology; enzymatic hydrolysis; hydrolysates; antioxidant activity

引文格式:

邓凝, 王小娟, 苏德锦, 等. 棘胸蛙肌肉水解物的制备及抗氧化活性评价[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 201-209.

DENG Ning, WANG Xiaojuan, SU Dejin, et al. Preparation of *Quasipaa spinosa* muscle hydrolysates and evaluation of their antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 201-209.

收稿日期: 2022-05-26

基金项目: 福建省高校产学研合作重点项目 (2021N5003); 省直单位教育和科研专项资金 (闽财指[2021]848 号); 泉州市科技重点项目 (2021N018)

作者简介: 邓凝 (1999-), 女, 硕士生, 研究方向: 食品安全与加工, E-mail: dengning99@163.com

通讯作者: 李健 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学及食品微生物技术研究, E-mail: lijian2013@jmu.edu.cn

棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*) 又名石蛙、石蛤等, 是我国独有的大型蛙种, 被称为中国“四大山珍”之一^[1]。有研究发现, 棘胸蛙肌肉中的蛋白质含量为 19.07%, 脂肪仅占 0.26%^[2]。此外, 棘胸蛙肌肉和蛙皮中富含钙、磷、铁等微量元素^[3,4]。目前, 棘胸蛙的销售以活蛙为主, 市面上尚缺乏对棘胸蛙的精深加工与利用, 国内外研究人员主要围绕棘胸蛙的养殖技术^[5]、个体发育^[6]、疾病防治^[7]、食性^[8]和生物学特征^[9]等方面展开研究。为进一步开发高值化产品, 扩宽棘胸蛙产品销售渠道, 实现棘胸蛙产业链的延长以及可持续发展^[10]。

肽类是一种易被人体吸收的物质, 具有增强机体免疫功能、延缓衰老和抗癌等功效, 可应用于功能性食品中, 前景广阔。制备水解物的常用手段有化学合成法^[11]、酶解法^[12]和微生物发酵法^[13,14]等, 其中, 酶水解法具有条件温和、安全无毒、工艺简单、成本低、效率高等优势, 已成为制备生物活性肽的常用手段。Kholoud 等^[15]选用三种蛋白酶对骆驼奶进行酶解, 研究结果表明木瓜蛋白酶的酶解产物具有较强的抑制脂质过氧化和抗氧化能力。汪超等^[16]发现利用酸性蛋白酶与瑞士乳杆菌对酪蛋白发酵, 显著提高水解物的产量。已有研究^[17,18]从棘胸蛙皮肤上分泌的抗菌肽克隆出 4 条 cDNA, 并发现 Spinosan-D 对 *E. coli* DH5 具有良好的抑制活性^[19], Spinosan-C 对大肠杆菌 TG1 菌株和枯草芽孢杆菌的生长也具有一定的抑制作用^[20]。

本文重点以棘胸蛙肌肉为研究材料, 利用酶解的方式得到棘胸蛙水解物, 通过单因素实验和响应面法筛选出最佳酶解工艺, 并且验证其抗氧化活性, 为生产棘胸蛙的高值化产品提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

棘胸蛙由福建省健丰生物科技有限公司提供; 木瓜蛋白酶 (200 U/mg)、酸性蛋白酶 (200 U/mg) 购自夏盛 (北京) 生物科技有限公司; 氢氧化钠、盐酸、甲醛、尿素、十二烷基硫酸钠购自国药集团化学试剂有限公司。

DENVER UB-7 pH 计, 购自北京赛多丽丝科学仪器有限公司; 5810R 高速离心机, 购自艾本德中国有限公司; DK-8D 恒温水浴锅, 购自金坛区金城海澜仪器制造厂; ME 203 电子天平, 购自梅特勒托利多仪器有限公司; FD-ID-50 冷冻干燥机, 购自北京博医康实验仪器有限公司; UDK 132 自动凯氏定氮仪, 购自意大利唯意朴公司; SX 2-10-13 马弗炉, 购自上海石

研电炉有限公司; Synergy H1MF 多功能酶标仪, 购自百泰克生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 棘胸蛙水解物与水提物的制备

参照张正哲^[21]的方法, 并稍做修改。取适量的棘胸蛙肌肉, 按料液比 1:15 (g/mL), 加入超纯水进行均质, 调节溶液至各酶适宜的 pH, 分别加入适量的蛋白酶 (木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶), 混匀后置于各酶最适温度下酶解 4 h 后, 沸水浴灭酶, 待冷却后, 离心 (4 °C、10 000 r/min、10 min), 取上清, 置于 -80 °C 冷冻 12 h 后, 冷冻干燥 48 h 后即得棘胸蛙水解物冻干粉。水提物冻干粉除不加酶外, 其余步骤与棘胸蛙水解物相同。

1.2.2 水解度与成品率的测定

1.2.2.1 水解度的测定

采用甲醛滴定法^[22]。取 5 mL 酶解液到 100 mL 的容量瓶中, 用去离子水定容至刻度线。准确量取 20 mL 的溶液置于烧杯中, 再加入 60 mL 的去离子水, 将溶液放置到磁力搅拌器上混匀, 插入 pH 计。先用 0.05 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定至 8.2, 再加入 36% 甲醛溶液 10 mL, 混匀后接着用 0.05 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定至 9.2, 记录 pH 值从 8.2 到 9.2 消耗溶液的体积。

氨基酸态氮的计算公式如下:

$$N = \frac{C \times (V_1 - V_2) \times 0.014}{5} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

N —氨基酸含量, %;

V_1 —第二次消耗 NaOH 标准溶液的体积, mL;

V_2 —以去离子水代替样品消耗 NaOH 标准溶液的体积, mL;

C —NaOH 浓度, mol/L;

0.014—氮的毫摩尔质量, mg/mol。

水解度计算公式如下:

$$DH = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

DH —水解度, %;

m —蛋白水解液氨基酸质量, mg;

M —样品总氮含量, mg。

1.2.2.2 成品率的测定

选择木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶对棘胸蛙肌肉进行酶解。成品率的计算公式如下:

$$P = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

P —成品率, %;

M_1 —棘胸蛙肌肉水解物冻干粉的质量, mg;

M_2 —棘胸蛙肌肉鲜重的质量, mg。

1.2.3 单因素试验

相关研究报道表明^[23], 蛋白酶解过程受酶添加量、料液比、酶解时间与温度的影响。以棘胸蛙肌肉为研究对象, 选择料液比、酶解时间、酶解 pH、酶解温度和加酶量进行单因素实验。各因素考察水平如下: 料液比 (g/mL) 选择 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40, 7 个水平; 酶解 pH 选择 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12, 12 个水平; 酶解温度 (°C) 选择 10、20、30、40、50、60、70、80, 8 个水平; 酶解时间 (h) 选择 1、2、3、4、5、6、7、8, 8 个水平; 加酶量 (% m/m) 选择 0.5、1、1.5、2、2.5、3, 6 个水平分别进行单因素实验。以水解物的成品率为指标, 确定最佳的料液比、酶解时间、酶解 pH、酶解温度和加酶量。在同一条件下, 两种酶进行 t 检验, * $P < 0.05$ 表示组间差异显著, ** $P < 0.01$ 表示组间差异极显著。

1.2.4 响应面试验

根据单因素实验结果, 以棘胸蛙水解物水解度为响应值, 选择加酶量、酶解时间、酶解温度和 pH 进行四因素三水平的响应面法优化实验设计, 确定棘胸蛙水解物的最佳酶解工艺条件, 四因素分别编码 A、B、C、D, 三水平分别用 -1、0、1 表示。

1.2.5 抗氧化活性的测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力的测定

参照 Luo 等^[24]的方法, 并稍做修改。用 95% 乙醇溶液配置 0.1 mmol/L DPPH 溶液。取 100 μL 不同浓度的酶解物样液加入 96 孔板中, 再加入 100 μL 的 DPPH 溶液中, 混匀避光反应 30 min, 在 517 nm 处测定吸光值。以抗坏血酸 Vc 作为阳性对照 (A_0), 超纯水为空白对照, 95% 乙醇为样品对照, 计算公式如下:

$$R_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

R_1 —DPPH 自由基清除率, %;

A_1 —样品组吸光值;

A_2 —样品对照组吸光值;

A_0 —空白对照组吸光值。

1.2.5.2 总抗氧化能力的测定

参照 Alqahtani 等^[25]的方法, 并稍做修改。将 7 mmol/L ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液按照 1:1 等量混合配置成原液, 避光放置 12~16 h 后,

用蒸馏水稀释原液获得 ABTS 工作液, 使其在 734 nm 的吸光度值在 0.7~0.9 之间。在 96 孔板中依次加入 160 μL ABTS⁺ 和 40 μL 不同浓度样品溶液, 避光静置 6 min, 以 Vc 作为阳性对照, 在 734 nm 处测定吸光度值 (A_s); 以超纯水为空白对照 (A_c), 样品清除率计算公式如下:

$$R_2 = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

R_2 —ABTS⁺ 清除率, %;

A_s —样品组吸光度值;

A_c —空白对照组吸光度值。

1.2.5.3 羟基自由基清除能力的测定

参照刘存芳等^[26]的方法, 并稍做修改。取 50 μL 水杨酸 (10 mmol/L)、50 μL 盐酸 (2.5 mmol/L)、50 μL 硫酸亚铁 (2.5 mmol/L)、50 μL 过氧化氢 (10 mmol/L) 和 50 μL 不同浓度的样品依次加入 96 孔板中, 振荡混匀, 37 °C 反应 30 min 后, 测定 510 nm 波长处吸光度值 (A_4); 以超纯水为空白对照 (A_3), 超纯水代替过氧化氢为样品对照 (A_5), 样品羟基自由基清除率的计算公式如下:

$$R_3 = \left(1 - \frac{A_4 - A_5}{A_3}\right) \times 100\% \quad (6)$$

式中:

R_3 —羟基自由基清除率, %;

A_4 —样品组吸光度值;

A_5 —样品对照组吸光度值;

A_3 —空白组吸光度值。

1.2.5.4 总还原能力

根据 Öztaşkin 等^[27]的方法测定样品总还原能力。称取铁氰化钾、三氯化铁和三氯乙酸, 分别溶于超纯水中, 配制成 1% 铁氰化钾溶液、10% 三氯乙酸溶液和 0.1% 氯化铁溶液, 避光储存。取 1 mL 不同浓度的待测样液, 加入 2.5 mL PBS 缓冲液 (pH 值 6.6, 0.2 mol/L) 和 1 mL 1% 铁氰化钾溶液。于 50 °C 水浴锅中加热 20 min 后, 加入 2 mL 10% 三氯乙酸和 1.2 mL 0.1% 氯化铁溶液终止反应, 避光静置反应 20 min 后于 700 nm 处测定吸光值。以 Vc 作为阳性对照。

1.2.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行相关性和显著性分析, 用单因素方差分析比较组间差异。* $P < 0.05$ 表示组间差异显著, ** $P < 0.01$ 表示组间差异极显著, 数据以平均值 \pm 标准差来表示, 每个实验独立重复三次。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

在不同料液比、pH 值、温度和酶解时间下，分别选用木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶对棘胸蛙肌肉进行酶解处理。结果显示，当料液比从 1:10 (g/mL) 到 1:15 (g/mL) 时，棘胸蛙水解物的提取率均呈上升趋势，当料液比继续增大，成品率趋于平缓，这可能是由于在棘胸蛙酶解体系中水的增加以及底物浓度的下降，底物分子与酶的结合的可能性降低，使得酶促反应下降，酶解效率降低 (图 1a)。随 pH 值的增加，木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶在 pH 值分别为 7.0 和 3.0 时达到最大值。随着 pH 值的继续增加，棘胸蛙水解物的成品率降低，可能是 pH 值过高时，使酶活性受限，酶解速度下降，成品率随之下降 (图 1b)。当酶解时间为 4 h 时，两种蛋白酶酶解水解物的成品率均达到最高。这说明酶解 4 h 可使底物与蛋白酶充分反应 (图 1c)。棘胸蛙水解物的成品率随温度升高而逐渐增加而后下降，在 50 °C 达到最高值。成品率升高表明温度的升高加速了反应体系中物质的运动，成品率降低表明过高的温度导致酶活降低，酶解效率降低 (图 1d)。随着加酶量的增加，棘胸蛙水解物的成品率呈先增加后平缓的趋势，表明加酶量的增大同时也增大了酶与底物的接触面积，从而加速酶解反应的进程，成品率趋于平缓，可能时因为加酶量达到饱和，底物与酶已结合完全 (图 1e)。

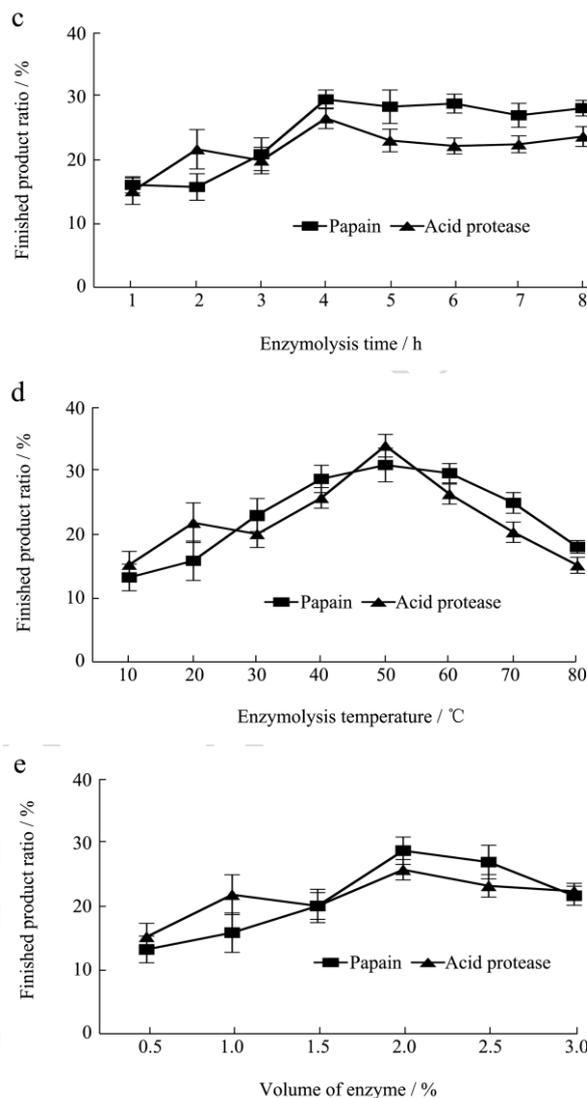
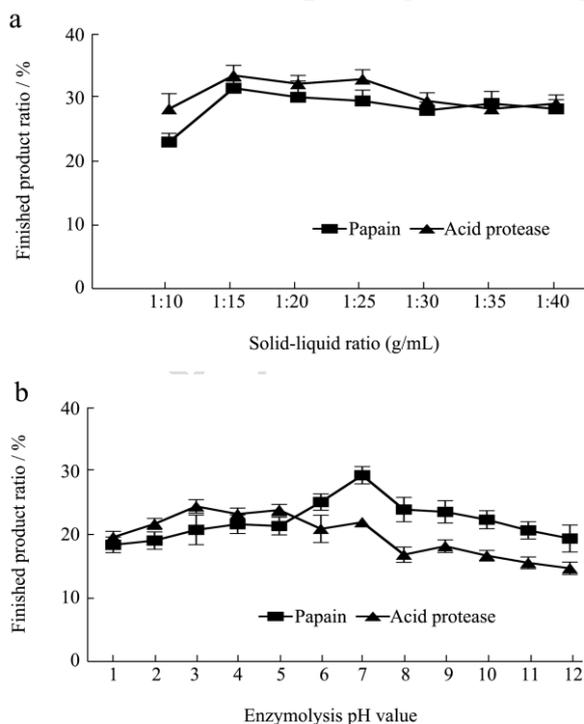


图 1 不同酶解条件下棘胸蛙水解物的成品率

Fig.1 The *Q. spinosa* hydrolysates yield on different enzymatic hydrolysis conditions

注：a：料液比；b：酶解 pH；c：酶解时间；d：酶解温度；e：加酶量。

综上所述，选择木瓜蛋白酶酶解时，选择料液比 1:15 (g/mL)、pH 值 7.0、加酶量 2%、温度 50 °C、酶解时间 4 h 作为响应面优化的基础；使用酸性蛋白酶酶解时选择料液比 1:15 (g/mL)、pH 值 3.0、加酶量 2%、温度 50 °C、酶解时间 4 h 作为响应面优化的基础。

2.2 响应面优化结果

2.2.1 响应面试验设计结果与方差分析

在单因素实验的基础上，为优化提取棘胸蛙水解物的最优酶解工艺条件，以加酶量、酶解温度、酶解时间、pH 值为自变量，以水解度为响应值，进行四因素三水平的响应面法优化实验设计。将各因素按照表 1 采用 Design-Expert 实验设计软件对数据进行拟

合,两种蛋白酶各设计了 29 组试验。根据各项的回归系数建立回归模型,二次多项回归方程如表 2 所示。

两种蛋白酶酶解的棘胸蛙水解物的方差分析结果如表 3 和表 4 所示。两种棘胸蛙水解物的模型 P 值分别为 0.000 8、0.000 2,表明二者的二次多项回归方程模型显著。木瓜蛋白酶的二次项系数 A^2 、 B^2 、 C^2 和

D^2 都有极显著性影响 ($P<0.01$); 酸性蛋白酶的二次项系数 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 都有极显著性影响 ($P<0.01$), 线性系数 D 呈显著水平 ($P<0.05$)。此外,从表中可知两种水解物的失拟项与纯误差之间的关系均为不显著,说明失拟因素不存在,可以使用二次多项回归方程分析试验结果。

表 1 响应面因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

酶种类	水平	因素			
		A: 加酶量/%	B: 酶解时间/h	C: 酶解温度/°C	D: pH 值
木瓜蛋白酶	-1	1.5	3	45	6.5
	0	2.0	4	50	7.0
	1	2.5	5	55	7.5
酸性蛋白酶	-1	1.5	3	45	2.5
	0	2.0	4	50	3.0
	1	2.5	5	55	3.5

表 2 二次多项回归方程

Table 2 Quadratic regression equation

酶种类	二次多项回归方程	R^2
木瓜蛋白酶	水解度 (%) = 18.75 - 0.28A - 0.24B - 1.56C - 0.080D - 0.36AB - 1.08AC + 0.36AD - 2.16BC + 2.28BD + 0.24CD - 6.19A ² - 4.57B ² - 3.55C ² - 7.81D ²	0.862 2
酸性蛋白酶	水解度 (%) = 33.37 + 0.61A - 1.18B + 1.61C + 2.67D + 2.68AB - 2.32AC + 0.33AD - 2.71BC - 0.58BD - 1.58CD - 7.85A ² - 5.27B ² - 7.02C ² - 8.39D ²	0.890 2

表 3 木瓜蛋白酶响应面方差分析结果

Table 3 Papain response surface variance analysis results

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	666.58	14	47.61	6.25	0.000 8	**
A-加酶量	0.94	1	0.94	0.12	0.730 0	
B-酶解时间	0.69	1	0.69	0.091	0.767 2	
C-酶解温度	29.30	1	29.30	3.85	0.070 0	
D-pH	0.077	1	0.077	0.010	0.921 3	
AB	0.52	1	0.52	0.068	0.797 6	
AC	4.68	1	4.68	0.61	0.446 0	
AD	0.52	1	0.52	0.068	0.797 6	
BC	18.72	1	18.72	2.46	0.139 1	
BD	20.86	1	20.86	2.74	0.120 1	
CD	0.23	1	0.23	0.030	0.864 2	
A ²	248.53	1	248.53	32.65	<0.000 1	**
B ²	135.31	1	135.31	17.77	0.000 9	**
C ²	81.55	1	81.55	10.71	0.005 6	**
D ²	395.90	1	395.90	52.01	<0.000 1	**
残差	106.57	14	7.61			
失拟项	95.48	10	9.55	3.44	0.056 8	不显著
纯误差	11.09	4	2.77			
总误差	773.15	28				

表 4 酸性蛋白酶响应面分析结果

Table 4 Results of acid protease response surface analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 115.52	14	79.68	8.11	0.000 2	**
A-加酶量	4.40	1	4.40	0.45	0.514 0	
B-酶解时间	16.76	1	16.76	1.71	0.212 6	
C-酶解温度	31.17	1	31.17	3.17	0.096 6	
D-pH	85.49	1	85.49	8.70	0.010 5	*
AB	28.68	1	28.68	2.92	0.109 6	
AC	21.58	1	21.58	2.20	0.160 5	
AD	0.43	1	0.43	0.044	0.837 5	
BC	29.32	1	29.32	2.98	0.106 0	
BD	1.35	1	1.35	0.14	0.716 8	
CD	9.99	1	9.99	1.02	0.330 5	
A ²	399.54	1	399.54	40.67	<0.000 1	**
B ²	180.29	1	180.29	18.35	0.000 8	**
C ²	319.84	1	319.84	32.56	<0.000 1	**
D ²	456.13	1	456.13	46.43	<0.000 1	**
残差	137.52	14	9.82			
失拟项	114.71	10	11.47	2.01	0.261 3	不显著
纯误差	22.81	4	5.70			
总误差	1 253.05	28				

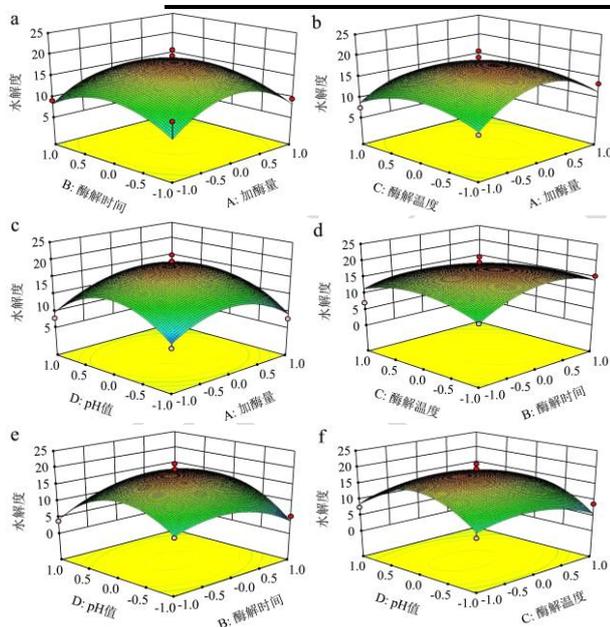
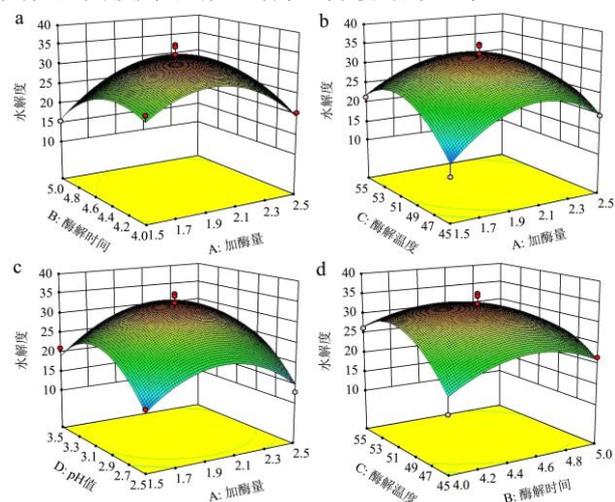


图 2 木瓜蛋白酶因素间相互作用的响应面图

Fig.2 Response surface diagram of interaction between papain factors

为了进一步分析各因素对响应值的影响，绘制了响应面图。响应面可直观表现出各因子对响应面的影响趋势，响应面图中曲线越陡，说明该因素的影响越

大，曲线越平滑，则影响越小。从图 2 可以看出，响应面在酶解温度方向等高线密集，这说明用木瓜蛋白酶酶解时酶解温度这个因素对棘胸蛙水解物的水解度影响显著，响应面在其他因素上比较稀疏，说明其他三个因素对棘胸蛙水解度影响相对较弱；从图 3 可以看出响应面在 pH 值方向陡峭，等高线密集，这说明用酸性蛋白酶酶解时 pH 值对棘胸蛙水解物的水解度影响显著，故含有这几个因素的曲面相对较陡峭，而其他曲面较为平滑。与方差分析结果一致。



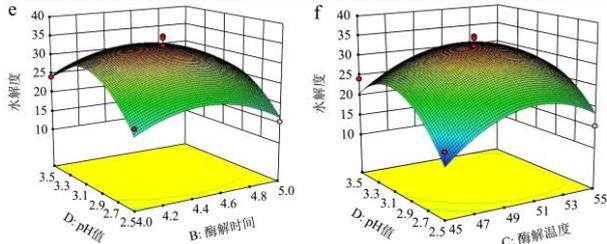


图3 酸性蛋白酶因素间相互作用的响应面图

Fig.3 Response surface diagram of interaction between acid protease factors

2.2.2 棘胸蛙水解物最佳酶解条件确定

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对各因素进行多元回归拟合, 得到二次多项回归方程和方差分析。分析得出木瓜蛋白酶最终酶解条件为: 加酶量 2.00%、pH 值 6.99、温度 48.85 °C、酶解时间 4.03 h、料液比 1:15 (g/mL)、水解度为 18.93%。将木瓜蛋白酶的工艺参数加酶量调整为 2.00%, pH 值为 7.00, 温度为 50.0 °C, 酶解时间为 4.00 h, 料液比为 1:15 (g/mL), 在此工艺测定的水解度为 18.26%。分析得出酸性蛋白酶最终酶解条件为: 加酶量 2.37%、pH 值 3.09、温度 49.7 °C、酶解时间 4.53 h、料液比 1:15 (g/mL)、水解度为 29.72%。将酸性蛋白酶的工艺参数加酶量调整为 2.00%, pH 值为 3.00, 温度为 50.0 °C, 酶解时间为 4.00 h, 料液比为 1:15 (g/mL), 在此工艺测定的水解度为 33.37%。实际条件下的水解度与理论条件下的水解度较为接近, 表明模型具有较高的相关度和可信度, 能体现水解物水解度与酶解条件之间的关系, 因此可通过该模型确定棘胸蛙水解物的最佳酶解工艺, 并可应用于棘胸蛙肌肉水解物制备的实际生产中。

2.3 不同蛋白酶处理下棘胸蛙水解物的水解度和成品率

表5 最佳酶解条件下提取水解物的水解度和成品率

Table 5 Hydrolysis degree and yield of extracted hydrolysates under the optimal enzymatic hydrolysis conditions

项目	水解度/%	成品率/%
水提取物	14.10±0.52 ^a	12.15±0.59 ^a
木瓜蛋白酶	19.23±1.48 ^b	22.66±0.72 ^b
酸性蛋白酶	23.50±0.86 ^c	15.32±0.33 ^c

注: 同列不同小写字母表示差异显著。

在木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶最佳酶解条件下对棘胸蛙肌肉的进行酶解, 各水解物的水解度和成品率如表 5 所示。两种蛋白酶酶解的棘胸蛙水解物与水提取物相比, 水解度和成品率都显著提高, 其中, 酸性蛋白酶酶解的水解物的水解度更高, 而木瓜蛋白酶酶解的

成品率更高。

2.4 棘胸蛙水解物体外抗氧化结果

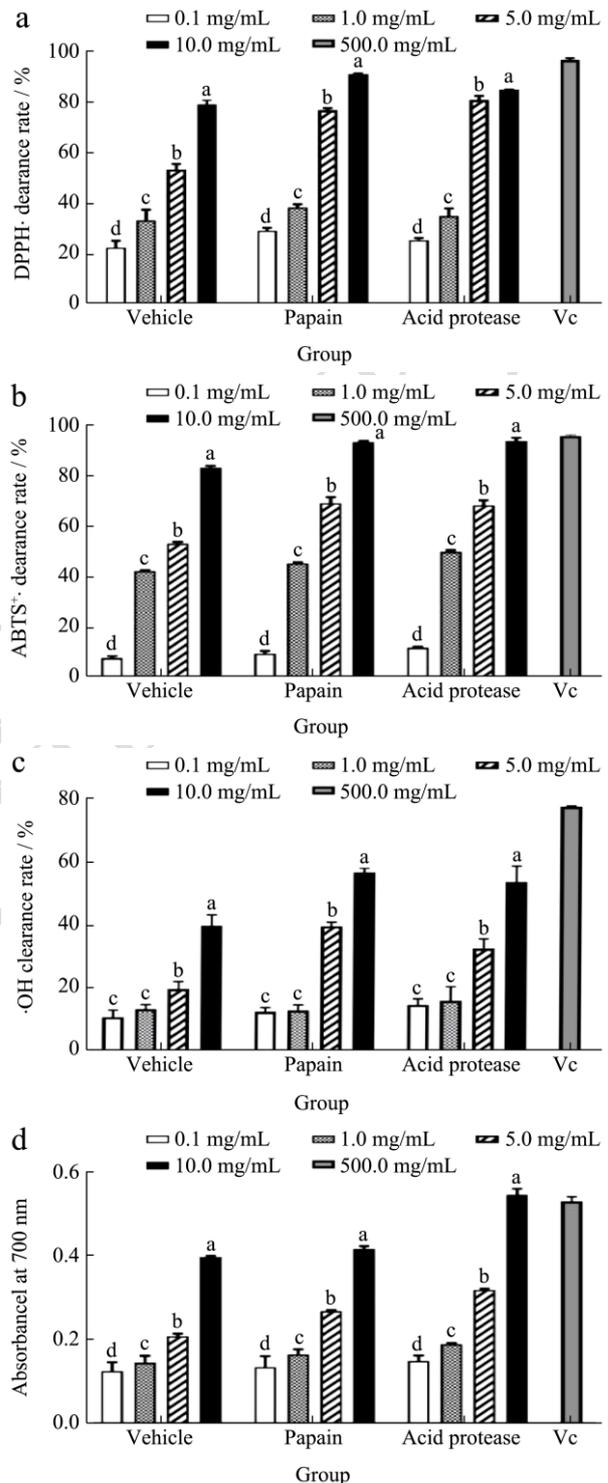


图4 棘胸蛙水解物的抗氧化活性

Fig.4 Antioxidant activity of *Q. spinosa* hydrolysates

注: (a) DPPH 自由基清除能力, (b) ABTS⁺自由基清除能力, (c) 羟基自由基清除能力, (d) 总还原能力。图中小写字母为各组内差异性显著。

参考郭鑫等^[28]的研究方法, 本文决定通过 DPPH

自由基、ABTS⁺自由基、羟基自由基清除能力和总还原能力的体外实验,评价三种棘胸蛙水解物的抗氧化能力。

通过四种体外抗氧化能力测定方法,综合评价了三组棘胸蛙水解物的抗氧化活性。三种棘胸蛙水解物的抗氧化能力见图4,图中以质量浓度为500 μg/mL的Vc作为阳性对照。结果表明,三种棘胸蛙水解物均具有一定的抗氧化能力,且在一定的浓度范围内,它们的抗氧化能力随着浓度的增大而增强。半抑制浓度IC₅₀值越低则代表其自由基清除作用越强^[29],抗坏血酸Vc是一种高效抗氧化剂,具有极强的抗氧化能力,其清除DPPH自由基的IC₅₀为4.2 μg/mL、清除ABTS⁺自由基的IC₅₀为43.58 μg/mL、清除羟基自由基的IC₅₀为0.64 mg/mL。其中,木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶酶解的棘胸蛙水解物对清除DPPH自由基的IC₅₀值分别为:2.61、2.95 mg/mL,对清除ABTS⁺自由基的IC₅₀值分别为:3.46、3.20 mg/mL,对清除羟基自由基的IC₅₀值分别为:8.20、9.23 mg/mL。Vc的抗氧化能力强于棘胸蛙水解物的抗氧化能力,但与较单一成分的Vc相比,棘胸蛙水解物属于天然的功能活性物质,其安全性要远远超过Vc和其它抗氧化药物,并且在浓度较高时可以起到很好的抗氧化效果。棘胸蛙水解物相比较于其他的水解物类别物质,抗氧化能力相接近甚至显示出一定的优势,其DPPH自由基、羟基自由基清除效率与赵玲等^[30]实验中海参水煮液水解物相接近;优于胡佳丽等^[31]玉米蛋白肽的抗氧化能力。

抗氧化剂或抗氧化物质能够将Fe³⁺还原为Fe²⁺,其吸光度越大,表明抗氧化活性越强^[32]。图4d显示,棘胸蛙水解物的还原能力与其浓度有着明显的剂量依赖关系,还原能力随着浓度的增长而增强,且在同一种酶不同浓度之间总还原能力差异显著($P < 0.05$),并且由酸性蛋白酶酶解的棘胸蛙水解物其质量浓度在10 mg/mL时还原能力与Vc质量浓度500 μg/mL的还原能力相当。

3 结论

本文分别利用木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶对棘胸蛙肌肉进行酶解,以水解物成品率和水解度为评价指标,经过单因素和响应面法分析建立了最佳酶解工艺。根据实际验证,确定了木瓜蛋白酶酶解最佳工艺为:加酶量2%、pH值7.0、温度50℃、酶解时间4h、料液比1:15(g/mL),此时的水解度值为19.23%,成品率为22.66%。同法优化酸性蛋白酶最佳工艺及实际验证确定了在加酶量2%、pH值3.5、温度50℃、酶解时间4h、料液比1:15(g/mL),其水解度值为23.50%,

成品率为15.32%。最后通过体外抗氧化实验表明,两种蛋白酶酶解的棘胸蛙水解物在浓度较高时显示出较好的抗氧化性以及还原能力,具有潜在的开发价值。

参考文献

- [1] 龙连玉.棘胸蛙的人工生态养殖技术[J].淡水渔业,2002,32(1):41-43.
- [2] 谢海妹,袁久尧.棘胸蛙养殖关键技术研究[J].浙江海洋学院学报:自然科学版,2007,26(4):457-460.
- [3] 姜宇栋,王骥腾,李新宇,等.浅谈棘胸蛙养殖模式[J].河北渔业,2013,8:52-53.
- [4] 梅祎芸,叶容晖,宋婷婷,等.浙江省棘胸蛙养殖现状及发展对策[J].浙江农业科学,2015,56(7):1122-1125.
- [5] 张平,廖常乐,王慧颖,等.棘胸蛙人工养殖技术研究概述[J].湖南林业科技,2019,46(5):94-99.
- [6] 吴晓雯,李晗慧,焦振鑫,等.棘胸蛙两性形态特征在个体发育过程中的变化[J].滁州学院学报,2014,16(5):33-36.
- [7] 吕耀平,金晶,施倩,等.棘胸蛙致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及病理组织观察[J].水生生物学报,2018,42(1):26-32.
- [8] 韦启浪,朱贵平,韦兰萍.棘胸蛙蝌蚪食物喜好性研究[J].农村经济与科技,2021,32(18):58-59.
- [9] 俞宝根.棘胸蛙不同地区的两性异形及人工环境下繁殖行为研究[D].金华:浙江师范大学,2010.
- [10] 陈敦学,陈兆军,吴小丽,等.棘胸蛙产业发展的思考[J].中国水产,2019,3:72-74.
- [11] 谢博,傅红,杨方.生物活性肽的制备、分离纯化、鉴定以及构效关系研究进展[J].食品工业科技,2021,42(5):383-391.
- [12] 朱秀清,李美莹,孙冰玉,等.复合酶分步水解法制备汉麻多肽及其抗氧化特性研究[J].食品工业科技,2021,42(2):161-169.
- [13] Chunsheng Li, Yue Zhao, Yueqi Wang, et al. Microbial community changes induced by *Pediococcus pentosaceus* improve the physicochemical properties and safety in fermented tilapia sausage [J]. Food Research International, 2021, 147(2): 110476.
- [14] Cahyo D N, Yusiati L M, Kurniawati A, et al. Catfish oil supplementation in Bali cattle diet: Effects on rumen fermentation parameters, carboxymethylcellulase and protease activity [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 782(2): 022082.
- [15] Kholoud Awad Al-Shams, Priti Mudgil, Hassan Mohamed Hassan, et al. Camel milk protein polypeptide with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in in vitro and in food model systems [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(1): 47-60.

- [16] 汪超,李阜烁,林文珍,等.响应面法优化酪蛋白源多肽制备工艺[J].中国乳品工业,2018,46(12):4-8.
- [17] Dong B J, Zhan Z G, Zheng R Q, et al. cDNA cloning and functional characterisation of four antimicrobial peptides from *Paa spinosa* [J]. Ztschrift Fur Naturforschung C Journal of Bioences, 2015, 70(9-10): 251-256.
- [18] YU Shuisheng, ZHAO Zenghui, GONG Xiaofei, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of beta-defensin from the Chinese spiny frog (*Quasipaa spinosa*) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2022, 126: 104264.
- [19] 程福珍,洪燕,郑荣泉,等.棘胸蛙抗菌肽 Spinosan-D 的原核表达及活性检测[J].浙江农业科学,2019,60(7):1250-1255.
- [20] 刘悦,詹忠根,朱兵,等.棘胸蛙抗菌肽 Spinosan-C 的串联表达与活性检测[J].生物工程学报,2018,34(1):132-139.
- [21] 张正哲.林蛙油多肽的制备及其活性研究[D].长春:吉林大学,2018.
- [22] 徐勤,葛向阳,刘建峰.甲醛法测大豆蛋白水解度的改进[J].饲料工业,2008,29(5):46-47.
- [23] Naqash S Y, Nazeer R A. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from muscles of *Nemipterus japonicus* and *Exocoetus volitans* using response surface methodology [J]. Amino Acids, 2012, 43(1): 337-345.
- [24] Wei Luo, Mouming Zhao, Bao Yang, et al. Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities [J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 499-504.
- [25] Yahya S Alqahtani. Bioactive stigmastadienone from *Isodon rugosus* as potential anticholinesterase, α -glucosidase and COX/LOX inhibitor: *In-vitro* and molecular docking studies [J]. Steroids, 2021, 172(1): 108857.
- [26] 刘存芳,史娟,刘军海,等.玫瑰红景天挥发性成分分析及其抗氧化和抗菌活性[J].食品工业科技,2020,41(1):32-37.
- [27] Öztaşkın N, Kaya R, MaraşA, et al. Synthesis and characterization of novel bromophenols: Determination of their anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities [J]. Bioorg Chem, 2019, 87: 91-102.
- [28] 郭鑫,陈美华,何旭,等.梅花鹿角多肽的制备工艺优化及其抗氧化活性研究[J].时珍国医国药,2021,32(8):1911-1915.
- [29] 张江涛,秦修远,周明,等.林蛙低聚肽的体外抗氧化与 ACE 抑制作用[J].中国食品添加剂,2019,30(6):46-53.
- [30] 赵玲,耿晓晓,刘淇,等.海参水煮液酶解多肽的抗氧化活性[J].渔业科学进展,2013,34(5):69-73.
- [31] 胡佳丽.基于超声/热处理的玉米蛋白抗氧化肽制备及其特性研究[D].镇江:江苏大学,2016.
- [32] 何书美,贾蜜英.用菌液的还原能力表征酸牛奶的抗氧化活性[J].食品科技,2013,2:39-41.