

武润琳, 刘建伟, 熊善柏, 等. 混酶水解法制备的鲢鱼皮多肽的抗氧化活性[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(4): 114-120.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.016

混酶水解法制备的鲢鱼皮多肽的抗氧化活性

武润琳, 刘建伟, 熊善柏, 胡杨, 尤娟, 刘茹

华中农业大学食品科学技术学院/国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉), 武汉 430070

摘要 以鲢鱼皮为原料, 采用混酶水解法制备鲢鱼皮抗氧化肽, 经超滤膜分离得到 SP1(>6 ku)、SP2(3~6 ku)、SP3(<3 ku) 3 种组分, 研究不同分子质量组分的体外抗氧化能力及 SP1 和 SP3 组分的氨基酸组成, 并选出体外抗氧化能力最强的 SP3 组分, 进行体内抗氧化活性评价。结果表明: 3 种组分的羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和还原能力从高到低的顺序均为 SP3>SP2>SP1, 而铜离子螯合率无显著差异; 氨基酸分析结果显示 SP3 组分中疏水性氨基酸所占比例较高; 体内抗氧化试验显示: 相较于损伤模型组, 灌服 SP3 组分的小鼠肝脏和脾脏指数明显增大, 且血清和肝脏中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)的酶活力明显提高, 丙二醛(MDA)含量明显降低。综上可知, SP3 组分在体内外均具有较好的抗氧化活性。

关键词 鲢鱼皮; 多肽; 超滤; 抗氧化活性; 抗氧化肽; 混酶水解法

中图分类号 TS 254.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)04-0114-07

在食品、化妆品、医药等领域中, 抗氧化剂的使用一直都颇受关注, 但合成的抗氧化剂具有毒性, 而植物来源的抗氧化剂存在稳定性不足、成本过高或影响食品感官品质的缺陷^[1-2], 相比而言, 动物蛋白制备的抗氧化肽稳定性好且生物安全性高, 尤其是鱼蛋白水解物, 因其具有低过敏性、良好的保湿和抗氧化性等特点而被广泛研究^[3-5]。

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*) 是中国的大宗淡水鱼之一, 2018 年养殖产量高达 386 万 t^[6], 其生产加工中的鱼皮副产物是抗氧化肽的良好材料来源。在食品和医药行业, 常用酶水解法制备抗氧化肽^[7]。柳慧琴^[8]和 Zhang 等^[9]分别通过酶解皱纹盘鲍性腺和牛脊髓制备抗氧化肽, 并发现混酶水解效果明显优于单酶水解。在常用的酶制剂中, 木瓜蛋白酶和中性蛋白酶的最适温度和 pH 范围存在交叉, 混合使用可产生协同作用, 使水解产物暴露出更多具有抗氧化能力的氨基酸残基和肽链, 但这 2 种酶混合使用制备鱼皮抗氧化肽的研究相对缺乏, 本实验室前期已通过响应面法优化试验确定了最佳酶解工艺, 考虑到多肽的抗氧化能力受多种因素影响, 本研究主要从抗氧化肽分子质量大小和氨

基酸组成角度出发, 通过体外自由基清除能力测定评估体外抗氧化活性, 并进一步评价体外抗氧化能力最强组分的体内抗氧化活性, 从而为强抗氧化性鲢鱼皮多肽的制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲢鱼皮来自湖北楚江红水产有限公司, 清除多余的鱼肉和鱼鳞, 剪成小块洗净, -20 °C 储存备用; 4 周龄雄性昆明种小鼠, 购于华中农业大学实验动物中心(许可证号: SCXK(鄂)2015-0019); 超氧化物歧化酶试剂盒、过氧化氢酶试剂盒, 南京建成科技有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒, 上海科顺生物科技有限公司; 丙二醛试剂盒, 苏州科铭生物技术有限公司; 中性蛋白酶(酶活力 51 093 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活力 56 231 U/g)、D-半乳糖和 V_C 均购于上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器设备

722 型可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 818 型 pH 计, ORINO 研究公司; TDL-80-ZB 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; FD-1A-50 型冷

收稿日期: 2020-03-12

基金项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-45-28); 湖北省技术创新专项重大项目(2017ABA141)

武润琳, 硕士研究生. 研究方向: 水产品加工与贮藏. E-mail: wurunlin2018@163.com

通信作者: 刘茹, 博士, 教授. 研究方向: 水产品加工与贮藏. E-mail: liuru@mail.hzau.edu.cn

冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;DHL电脑恒流泵,上海黄浦沪西仪器厂;BS-100A自动部分收集器,上海沪西分析仪器有限公司;酶标仪,北京金业德祥生物科技有限公司。

1.3 鲑鱼皮明胶及抗氧化肽的制备

参考刘建伟等^[10]的方法,解冻预处理的鲑鱼皮,于0.1 mol/L NaOH溶液中连续搅拌2 h(料液比1:20(g/mL)、搅拌速度150 r/min),去除杂蛋白,重复1次,用10%异丙醇溶液(料液比1:20(g/mL))浸泡6 h除脂,重复1次,浸泡结束用清水冲至无溶剂味,加0.05 mol/L醋酸溶液(料液比1:10(g/mL))搅拌4 h,蒸馏水洗至中性,再用10倍质量热水(45℃)浸提4 h,4 000 r/min离心15 min,旋蒸浓缩上清液,采用凯氏定氮法(GB/T 5009.5—2016)测蛋白质含量,得明胶溶液备用。

取适量鲑鱼皮明胶配制蛋白质质量分数为5%的溶液,添加木瓜蛋白酶与中性蛋白酶(酶活比为1:1),使其酶活力达到8 000 U/g,在pH 7.3、温度55℃条件下酶解4 h,冷却后以4 000 r/min离心15 min,取上清液,并将其依次通过截留分子质量为6 ku和3 ku的超滤膜,收集膜上下各组分,冷冻干燥备用,各组分记为SP1(>6 ku)、SP2(3~6 ku)、SP3(<3 ku)。

1.4 体外抗氧化活性的测定

1)羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力的测定。参照魏明等^[11]的方法测定不同组分对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力,并计算出清除率。

2)超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除能力的测定。参考敖纯^[12]方法并稍作修改。取4.5 mL pH 8.0磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L)于25℃水浴加热20 min,将1 mL试样与0.4 mL的邻苯三酚(25 mmol/L)溶液混匀,25℃水浴反应5 min,加1 mL的HCl(1 mol/L)终止反应,在波长420 nm处测定吸光值 A_1 ,阳性组不加入邻苯三酚溶液,测定吸光值 A_2 ,空白组不加试样,测定吸光值为 A_3 ,以 V_c 做对照,计算公式为:

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{的清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\% \quad (1)$$

3)还原能力的测定。参考Oyaizu^[13]的方法稍作修改。取1 mL不同浓度的样品,用去离子水做空白,依次加入2.5 mL pH 6.6的磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L)和2.5 mL 1%的铁氰化钾溶液,混匀,50℃水浴20 min,再加2.5 mL 10%三氯乙酸溶液,

混匀,4 000 r/min离心10 min,收集上清液,将上清液和蒸馏水各取2.5 mL后再加0.5 mL 0.1%的三氯化铁溶液,迅速混匀。测定700 nm处吸光值,并以 V_c 作为对照。

4)铜离子螯合能力的测定。参考Carrascocastilla等^[14]的方法进行测定。在离心管中依次加入2 mL pH 6.0的乙酸钠缓冲液(50 mmol/L),50 μL 各样品和 CuSO_4 溶液(5 mmol/L)混合均匀,室温静置30 min后加入50 μL 的邻苯二酚紫溶液(4 mmol/L),摇匀,静置30 min后于632 nm处测吸光值 A_1 ,以水为空白,测定吸光值 A_0 ,用EDTA做对照。计算公式如下:

$$\text{Cu}^{2+} \text{螯合率} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

1.5 氨基酸组成分析

选取SP1(>6 ku)和SP3(<3 ku)组分,参照GB 5009.124—2016进行酸水解氨基酸的测定。

1.6 体内抗氧化活性的测定

1)小鼠的饲养及处理。将60只健康雄性昆明小鼠,随机分为6组,初始质量均在19 g左右。试验前先喂养1周以适应环境。喂养条件:室温20~25℃,湿度40%~70%,以标准饲料喂食并及时更换饮水瓶。

6个试验组分别为:正常对照组(CG)、D-半乳糖氧化损伤模型组(DG)、多肽低剂量组(LG)、中剂量组(MG)、高剂量组(HG)和 V_c 阳性组(VG),其中DG、LG、MG、HG和VG组的小鼠,均在腹腔注射600 mg/(kg·d)的D-半乳糖,CG组小鼠以等体积生理盐水替代,建模成功后,将预先冻干的SP3组分多肽配成一系列不同剂量的多肽溶液,给小鼠灌胃,并与DG和CG组小鼠对比,找出SP3组分体内抗氧化的起效剂量范围,最终确定LG、MG和HG组小鼠分别以200、400、800 mg/(kg·d)剂量灌胃,而VG组小鼠以等体积400 mg/(kg·d)剂量的 V_c 灌胃,CG和DG组均以等体积的去离子水代替,每周称1次质量并根据体质量调整剂量,同时观察小鼠的外观体征和行为活动,持续49 d。试验最后1 d禁食12 h后,颈椎脱臼处死,采样。

2)脏器指数的测定。解剖处死的小鼠,将其肝脏、肾脏和脾脏快速取出并剔除表面脂肪膜,用4℃生理盐水清洗表面残血,滤纸吸干水分再称质量(g),计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{脏器质量}}{\text{小鼠质量}} \times 100\% \quad (3)$$

3)体内抗氧化指标的测定。血清的制备:收集

小鼠眼球中全血于 2 mL 离心管,室温静置 2 h 后以 10 000 r/min 离心 15 min,将上清液置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,避免反复冻融。

肝脏匀浆的制备:在 25 mL 离心管中加入 1 g 肝脏组织和 9 mL 预冷生理盐水,均质机匀浆后以 4 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用。

血清和肝脏中 SOD、GSH-Px、CAT 的酶活力及 MDA 含量测定的具体操作,参见试剂盒说明书。

1.7 统计分析

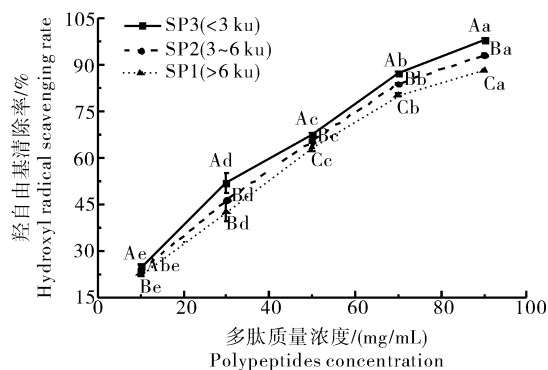
试验结果均以“平均值±标准偏差”来表示,每项数据做 3 次重复。利用 SPSS 进行 *F* 检验、回归分析,显著性水平为 0.05;使用 Origin 2017 及 Excel 等软件进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 多肽的羟自由基清除能力

图 1 显示出不同组分多肽的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力均随多肽质量浓度增加而显著增强,在相同的多肽质量浓度下,3 种组分的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力大小排序为: $\text{SP3} > \text{SP2} > \text{SP1}$,即分子质量小于 3 ku 的 SP3 组分具有最大的 $\cdot\text{OH}$ 清除率。对于 SP3 组分而言,当质量浓度由 10 mg/mL 提高至 90 mg/mL 时, $\cdot\text{OH}$ 清除率从 24.72% 迅速增至 98.00%,其半抑制质量浓度 (IC_{50}) 值为 20 mg/mL。由此可知,该法制备的鲢鱼皮多肽具有较强的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。因此,分子质量较小的 SP3 组分具有较好的抗氧化性能,在采用酶解法制备抗氧化肽时应适当提高水

解度,以获得更多分子质量较小的组分,提高产物的抗氧化能力。



注:同一组分不同的小写字母及同一浓度不同的大写字母均表示存在显著性差异 ($P < 0.05$),下同。Note: Different lowercase alphabets in the same fraction and different capital letters in the same concentration denote significant differences ($P < 0.05$), the same as below.

图 1 不同质量浓度多肽的羟自由基清除能力

Fig.1 The scavenging ability of different concentrations of polypeptides on hydroxyl radical

2.2 多肽的超氧阴离子自由基清除能力

从图 2 可以看出, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率随多肽质量浓度的增加而显著增大,且增长速率逐渐变缓,而对照组 V_c 的变化趋势呈线性增加,SP1、SP2 和 SP3 三种组分的 IC_{50} 分别为 38.26、29.27 和 18.22 mg/mL,表明多肽的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力随多肽分子质量的增大而降低,可能是分子质量较大的组分具有更多过长的肽片段,包埋了具备抗氧化能力的氨基酸残基,进而降低了清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力。

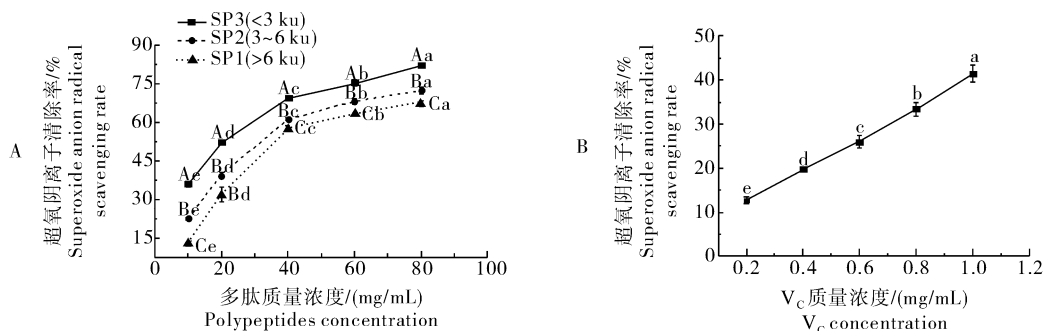


图 2 不同质量浓度多肽(A)和 V_c (B)的超氧阴离子清除能力

Fig.2 The scavenging ability of different concentrations of polypeptides (A) and V_c (B) on superoxide anion

2.3 多肽的还原能力

由图 3 知,不同多肽组分的还原能力随多肽质量浓度的增大均呈线性增强趋势,其中 SP3 的还原能力和增长速率明显大于 SP1 和 SP2 的,且 30

mg/mL 的 SP3 组分吸光值为 0.548 与质量浓度 0.05 mg/mL 的 V_c 相接近。

2.4 多肽的铜离子螯合能力

由图 4 可知,随着多肽质量浓度的增加,3 种组

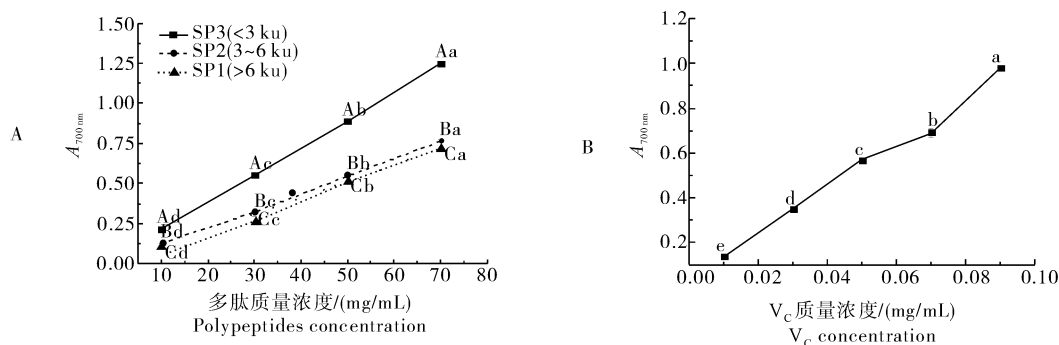
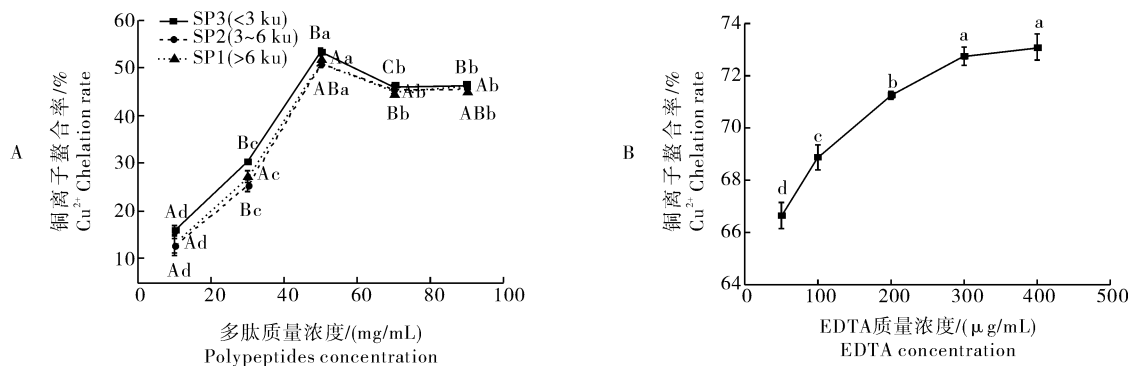
图3 不同质量浓度多肽(A)和 V_c (B)的还原能力Fig.3 Reductive ability of different concentrations of polypeptides (A) and V_c (B)

图4 不同质量浓度多肽(A)和EDTA(B)的铜离子螯合能力

Fig.4 Copper chelating ability of different concentrations of polypeptides (A) and EDTA (B)

分的 Cu^{2+} 螯合率均呈现出先增后降并趋于平缓的趋势,且在 50 mg/mL 时, Cu^{2+} 螯合率达到最大值,其中 SP3 组分的为 53.30%,明显高于另外 2 种组分的。在对照组 EDTA 中,随着质量浓度的增加, Cu^{2+} 螯合率呈现出先增大后趋于平稳的趋势,相比而言,鲢鱼皮抗氧化肽的 Cu^{2+} 螯合能力明显弱于 EDTA 的。

2.5 多肽的氨基酸组成比较分析

在体外抗氧化试验中发现,SP3 组分的 $\cdot OH$ 清除率、 $O_2\cdot^-$ 清除率和还原能力均显著高于另外 2 种组分,与 SP1 组分相比尤为明显,所以选择了这 2 种分子质量差别最大且体外抗氧化能力差异最显著的多肽组分进行氨基酸组成分析。表 1 显示 2 种组分的氨基酸种类一致,必需氨基酸含量接近,甘氨酸、脯氨酸和谷氨酸含量相对较高,其中甘氨酸含量均在 27% 左右,半胱氨酸、酪氨酸和组氨酸的含量较少,不足 1%,符合 I 型胶原蛋白特点。针对所测得的 17 种氨基酸,将其中的必需氨基酸、酸/碱性氨基酸和疏水性氨基酸进行汇总,对比 2 种组分中四

者所占比例,发现疏水性氨基酸含量差异较大,SP1 组分比 SP3 组分低 0.92%,而其余种类氨基酸含量接近。

2.6 多肽对小鼠内脏组织的影响

表 2 显示了不同灌胃小鼠体内脏器指数的变化情况,其中损伤模型组的肝脏和脾脏指数明显低于其他组,而肾脏指数间无显著差异($P > 0.05$);与正常对照组相比,多肽组和 V_c 阳性组的肝脏指数略低,脾脏指数略高,但均大于损伤模型组的脏器指数。以上说明 D-半乳糖造成的氧化损伤会影响小鼠的肝脏和脾脏,而对肾脏无明显作用,同时也反映出鲢鱼皮多肽在一定程度上可以增强脏器的生理功能,缓解氧化损伤。

2.7 多肽对小鼠不同组织中抗氧化指标的影响

由表 3 可知,在损伤模型组小鼠体内,无论血清还是肝脏中 SOD、GSH-Px 和 CAT 的酶活力均明显低于其他组,MDA 含量明显高于其他组,说明注射 D-半乳糖的小鼠,体内酶促防御系统受到严重破坏,机体的抗氧化能力显著降低($P < 0.05$),对比发

表 1 SP1 和 SP3 多肽组分的氨基酸组成及含量

氨基酸 Amino acid	占 SP1 含量比 Content of SP1	占 SP3 含量比 Content of SP3	%
天冬氨酸 [#] Asp	6.34	6.16	
苏氨酸 ^Δ Thr	3.07	3.10	
丝氨酸 Se	3.53	3.49	
谷氨酸 [#] Glu	11.04	10.88	
甘氨酸 Gly	27.09	26.97	
丙氨酸 [*] Ala	9.83	10.31	
半胱氨酸 Cys	0.10	0.05	
缬氨酸 ^{Δ*} Val	2.41	2.45	
蛋氨酸 ^{Δ*} Met	2.07	2.19	
异亮氨酸 ^{Δ*} Ile	1.64	1.58	
亮氨酸 ^Δ Leu	2.79	2.78	
酪氨酸 Tyr	0.87	0.61	
苯丙氨酸 ^{Δ*} Phe	2.35	2.34	
赖氨酸 ^{&} Lys	4.20	4.08	
脯氨酸 ^{&*} Pro	12.92	13.28	
组氨酸 ^{&} His	0.59	0.61	
精氨酸 ^{&} Arg	9.16	9.12	
必需氨基酸 Essential amino acid	16.46	16.33	
酸性氨基酸 Acidic amino acid	17.38	17.04	
碱性氨基酸 Basic amino acid	26.87	27.09	
疏水氨基酸 Hydrophobic amino acid	34.01	34.93	

注:Δ 为必需氨基酸;# 为酸性氨基酸;& 为碱性氨基酸;* 为疏水氨基酸。Note:Δ stands for the essential amino acids;# stands for acidic amino acid;& stands for basic amino acid;* stands for hydrophobic amino acid.

表 2 多肽对小鼠脏器指数的影响

组别 Groups	肝脏指数 Index of liver	肾脏指数 Index of kidney	脾脏指数 Index of spleen
CG	4.86±0.23a	1.31±0.13a	0.16±0.03ab
DG	3.95±0.06b	1.25±0.02a	0.14±0.04b
VG	4.65±0.47ab	1.22±0.19a	0.19±0.06ab
LG	4.59±0.85ab	1.38±0.19a	0.17±0.02ab
MG	4.06±0.37ab	1.20±0.13a	0.20±0.03a
HG	4.72±0.17ab	1.29±0.23a	0.19±0.06ab

注:同列不同小写字母表示具有显著差异($P<0.05$)。下同。Note:Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

现正常小鼠体内酶活力最高,MDA 含量也最低。对于灌服了 V_C 和鲑鱼皮多肽的氧化损伤型小鼠而言,其体内 SOD、GSH-Px 和 CAT 的酶活力得到了一定的提升,脂质氧化产物 MDA 的生成也受到了明显的抑制,且灌服不同剂量鲑鱼皮多肽的小鼠,体内酶促防御系统遭受破坏的程度随剂量的增多而降低。这些数据表明 V_C 和鲑鱼皮多肽可能通过提高动物体内防御系统酶活力,减少机体中过多自由基和过氧化物的生成,并降低它们对细胞的毒害。此外,V_C 和鲑鱼皮多肽清除自由基和螯合金属离子的能力,也可能会进一步抑制体内脂质氧化,延缓小鼠衰老。

表 3 多肽对小鼠血清和肝脏的抗氧化指标的影响

Table 3 Effects of polypeptides on oxidation index in the serum and liver of rats

组别 Groups	SOD 活力/(U/mL) Activity of SOD	GSH-Px 活力/(U/mL) Activity of GSH-Px	CAT 活力/(U/mL) Activity of CAT	MDA 含量/(nmol/mL) Content of MDA	
血清 Serum	CG	232.30±95.92a	117.29±5.53a	8.07±0.94a	9.24±0.74e
	DG	162.80±89.69d	82.08±2.64e	3.43±0.84c	15.82±0.82a
	VG	220.68±7.36ab	103.67±2.19c	6.89±0.79a	10.48±1.14d
	LG	175.80±11.07d	90.61±1.56d	4.05±0.57bc	13.41±0.44b
	MG	189.82±4.60c	94.69±1.46d	5.36±0.18ab	11.79±0.41c
	HG	213.13±4.53b	109.54±1.79b	6.72±0.43a	11.26±0.21cd
肝脏 Liver	CG	70.51±5.05a	174.64±3.71a	114.40±39.40a	3.38±0.12d
	DG	43.51±2.51c	125.67±5.65e	67.70±66.89d	4.98±0.21a
	VG	57.05±2.57b	160.78±2.05b	100.88±2.61b	3.63±0.37c
	LG	46.52±3.05c	140.39±2.88d	84.31±4.52c	4.31±0.18b
	MG	54.85±2.09b	148.59±1.38b	85.82±2.61c	4.19±0.16b
	HG	57.53±1.52b	156.30±4.45c	94.86±11.37bc	3.96±0.25bc

3 讨论

抗氧化肽是研究最为广泛的生物活性肽之一,其抗氧化活性与结构、分子质量大小、氨基酸组成和

序列等因素密切相关^[1-2,15]。对于不同种类的氨基酸而言,疏水性氨基酸可通过提高脂溶性,促进其与疏水性自由基或不饱和脂肪酸的结合,进而抑制氧化反应^[4,16]。此外,它也可以同一些非多肽类抗氧

化剂发挥协同作用,利用其还原性恢复多酚类抗氧化剂的活性状态,达到连续发挥抗氧化剂生物活性的目的^[3,9]。本研究中,疏水性氨基酸比例较高的SP3组分抗氧化能力明显优于SP1的,其原因可能同上。

从分子质量角度来看,多肽分子质量较小时穿膜能力强、空间位阻小且活性位点暴露多,更利于其生物活性的发挥^[3]。一般认为含有2~9个氨基酸的寡肽抗氧化性要强于大分子的蛋白质和多肽^[17],且分子质量在1~3 ku时,抗氧化活性较强^[4,15,18],本研究中也发现分子质量最小的SP3组分具有最强的体外抗氧化活性,类似地,在不同海马多肽组分中,分子质量最小(<2.5 ku)的组分, $O_2^- \cdot$ 清除率和 Fe^{3+} 还原力最高^[19];在草鱼皮多肽中,分子质量<3 ku的组分, $O_2^- \cdot$ 的清除能力明显优于分子质量>10 ku及5~10 ku组分的^[20];此外,分子质量<3 ku的黑籽瓜种子多肽组分,也具有较高的 $O_2^- \cdot$ 、 $\cdot OH$ 和DPPH \cdot 的清除能力^[21]。因此,多肽的分子质量与其抗氧化能力密切相关,通常分子质量越小,其抗氧化能力越强。但需要指出,当分子质量过小时,可能会因多肽中大量单个氨基酸和无抗氧化能力的寡肽的存在,导致抗氧化能力降低^[15],后续研究中可进一步分离纯化抗氧化活性较高的多肽,并进行肽序鉴定,探索抗氧化肽的构效关系,进而制备特定氨基酸序列的抗氧化肽。

体内抗氧化试验表明,与衰老组小鼠相比,灌服不同剂量多肽的小鼠体内SOD、GSH-Px和CAT酶活力明显提高,MDA含量明显降低,说明SP3组分多肽有助于提高小鼠体内的防御系统酶活,并清除自由基,进而提升其抗氧化能力。综上,本研究中分子质量较小的SP3组分多肽,在体内外均具有较强的抗氧化活性,可作为一种功能性天然抗氧化剂添加到食品中。

参考文献 References

[1] SHARMA S, SINGH R, RANA S. Bioactive peptides: a review [J]. International journal bioautomation, 2011, 15(4): 223-250.

[2] LORENZO J, MUNEKATA P, GOMEZ B, et al. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products: a review [J]. Trends in food science and technology, 2018, 79: 136-147.

[3] 张翀. 大黄鱼蛋白源抗氧化肽的制备、性质及抗氧化机理研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016. ZHANG C. Study on preparation of antioxidant peptides by enzymolysis of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and its properties and func-

tional mechanism [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016 (in Chinese with English abstract).

[4] COMERT E D, GOKMEN V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century [J]. Food research international, 2018, 105: 76-93.

[5] HARNEDY P A, RICHARD J F. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review [J]. Journal of functional foods, 2012, 4(1): 6-24.

[6] 农业农村部渔业渔政管理局. 2019 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 25. Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. 2019 China fishery statistics yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 25 (in Chinese).

[7] SILA A, BOUGATEF A. Antioxidant peptides from marine by-products: isolation, identification and application in food systems: a review [J]. Journal of functional foods, 2016, 21: 10-26.

[8] 柳慧琴. 牛脊髓肽的制备及其抗氧化活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019. LIU H Q. Research on the preparation of bovine spinal peptide and its antioxidant activity [D]. Changchun: Jilin University, 2019 (in Chinese with English abstract).

[9] ZHANG H S, XUE J, ZHAO H X, et al. Isolation and structural characterization of antioxidant peptides from degreased apricot seed kernels [J]. Journal of AOAC international, 2018, 101(5): 1661-1663.

[10] 刘建伟, 梁文文, 熊善柏, 等. 响应面法优化鲢鱼皮抗氧化肽的混合酶解工艺 [J]. 食品工业, 2018, 39(3): 157-161. LIU J W, LIANG W W, XIONG S B, et al. Optimization of bienzymatic hydrolysis of silver carp skin for preparation of antioxidant peptides by response surface methodology [J]. The food industry, 2018, 39(3): 157-161 (in Chinese with English abstract).

[11] 魏明, 薛正莲, 赵世光, 等. 米曲霉发酵米糠制取米糠多肽及其抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 114-118. WEI M, XUE Z L, ZHAO S G, et al. Study on the preparation of peptides from rice bran and antioxidant activity by *Aspergillus oryzae* fermentation [J]. Science and technology of food industry, 2014, 35(19): 114-118 (in Chinese with English abstract).

[12] 敖纯. 虫茶醇提取物对超氧阴离子和羟基自由基的清除作用 [J]. 肉类研究, 2010(4): 60-64. AO C. Scavenging effects of sandy-tea ethanol extract on super oxide anion and hydroxyl radical [J]. Meat research, 2010(4): 60-64 (in Chinese with English abstract).

[13] OYAIZU M. Studies on products of browning reaction: antioxidative reaction prepared from glucosamine [J]. Nutrition, 1986, 44: 307-315.

[14] CARRASCO-CASTILLA J, ALAN J H, CRISTIAN J M, et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates [J]. Food chemistry, 2012, 135(3): 1789-1795.

[15] 黄明, 王璐莎. 动物蛋白源抗氧化肽的研究进展 [J]. 中国农业

- 科学, 2013, 46(22): 4763-4773. HUANG M, WANG L S. A review of the antioxidant peptides derived from animal protein [J]. *Scientia agricultura sinica*, 2013, 46(22): 4763-4773 (in Chinese with English abstract).
- [16] 李汉洋, 李建杰, 王帅, 等. 核桃多肽的抗氧化活性及其分子量、氨基酸组成特性研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(13): 1-7. LI H Y, LI J J, WANG S, et al. Study on antioxidant activity of walnut polypeptide and its molecular weight, amino acid composition characteristic [J]. *Science and technology of food industry*, 2018, 39(13): 1-7 (in Chinese with English abstract).
- [17] MINE Y, LI-CHAN E, JIANG B, et al. Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals [J]. *International journal of dairy technology*, 2011, 64(2): 316-317.
- [18] SILA A, SAYARI N, BALTI R, et al. Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction of carotenoproteins generated from shrimp by-products by enzymatic hydrolysis [J]. *Food chemistry*, 2014, 148: 445-452.
- [19] 葛晓鸣, 顾伟, 徐永健. 海马水解蛋白的氨基酸组成与抗氧化能力的关系 [J]. *核农学报*, 2019, 33(2): 322-329. GE X M, GU W, XU Y J. Relationship of amino acids composition and antioxidative capacity of hydrolyzed protein from *Hippocampus-kuda* bleeker [J]. *Journal of nuclear agricultural sciences*, 2019, 33(2): 322-329 (in Chinese with English abstract).
- [20] 蔡路响, 冷利萍, 李秀霞, 等. 草鱼鱼皮不同分子量肽段体外抗氧化性能的研究 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(12): 58-64. CAI L Y, LENG L P, LI X X, et al. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of different molecular weight peptide fractions from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin [J]. *Science and technology of food industry*, 2017, 38(12): 58-64 (in Chinese with English abstract).
- [21] 齐希光, 陆晓婷, 张晖, 等. 不同分子量黑籽瓜种子多肽抗氧化能力的研究 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(9): 74-80. QI X G, LU X T, ZHANG H, et al. Study on the *in vitro* antioxidant capacity of different molecular weight polypeptides of black seed-watermelon seeds [J]. *Science and technology of food industry*, 2016, 37(9): 74-80 (in Chinese with English abstract).

Antioxidant activity of polypeptides from silver carp skin prepared by mixed enzymatic hydrolysis

WU Runlin, LIU Jianwei, XIONG Shanbai, HU Yang, YOU Juan, LIU Ru

*College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
National R&D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan),
Wuhan 430070, China*

Abstract The polypeptides were prepared from silver carp skin by the method of mixed enzymatic hydrolysis, and divided into SP1 (>6 ku), SP2 (3-6 ku) and SP3 (<3 ku) by ultrafiltration. The antioxidant capacity *in vitro* of three polypeptides and the amino acid composition of SP1 and SP3 were analyzed. It was suggested that SP3 has the strongest antioxidant capacity *in vitro*. Subsequently, the antioxidant capacity *in vivo* of SP3 was measured. The results showed that the order of hydroxyl radical scavenging rate, superoxide anion radical scavenging rate and reducing ability in the three polypeptides was SP3 > SP2 > SP1, but there was no significant difference in chelating rate of copper ions. Analysis of amino acid composition showed that the percentage of hydrophobic amino acid in SP3 was significantly higher than SP1. Besides, compared with the injured group, SP3 group had higher indexes of liver and spleen. Furthermore, SP3 significantly increased the activities of SOD, GSH-Px and CAT and decreased the content of MDA in serum and liver. In conclusion, SP3 has better antioxidant activity than SP1 and SP2.

Keywords silver carp skin; polypeptides; ultrafiltration; antioxidant activity; antioxidant peptides; mixed enzymatic hydrolysis

(责任编辑: 赵琳琳)