

海洋鱼蛋白低聚肽结构和抗氧化活性的体外消化稳定性

冯晓文¹, 赵晓涵¹, 潘晓琦², 王卓然³, 谷瑞增¹, 刘文颖¹

(1. 中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

(2. 北京城市学院生物医药学部, 北京 100094) (3. 北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206)

摘要: 本研究通过体外模拟胃肠道消化海洋鱼蛋白低聚肽, 运用高效凝胶过滤色谱、紫外全波长扫描、圆二色光谱表征其消化前后结构变化, 测定其消化前后 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除能力、铁离子还原能力 (FRAP) 及氧自由基吸收能力 (ORAC) 的变化, 以探究模拟胃肠道消化对海洋鱼蛋白低聚肽结构及抗氧化活性的影响。分子量分布数据揭示了海洋鱼蛋白低聚肽中分子量为 150~1000 u 的组分为其主要组成部分, 所占比例最高可达 88.39%; 紫外全波长扫描、圆二色光谱扫描表明海洋鱼蛋白低聚肽对胃蛋白酶有很强的抗消化稳定性以及对胰蛋白酶有较好的抗消化稳定性。在浓度 1~15 mg/mL 范围内, 海洋鱼蛋白低聚肽的 DPPH 自由基清除率与其浓度成正相关, 最高为 67.86%; ABTS 自由基清除能力、FRAP 值及 ORAC 值三个抗氧化指标均显示海洋鱼蛋白低聚肽在消化后其抗氧化活性均有一定程度的提高, 其中 ORAC 值在先胃蛋白酶后胰蛋白酶消化后提高最显著 ($p<0.01$)。总之海洋鱼蛋白低聚肽的结构和抗氧化活性均具有抗消化稳定性。

关键词: 海洋鱼蛋白低聚肽; 体外模拟消化; 紫外光谱; 圆二色光谱; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2021)05-109-116

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0955

In Vitro Digestion Stability of Structure and Antioxidant Activity of Marine Fish Protein Oligopeptides

FENG Xiao-wen¹, ZHAO Xiao-han¹, PAN Xiao-qi², WANG Zhuo-ran³, GU Rui-zeng¹, LIU Wen-ying¹

(1. Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co. Ltd., Beijing 100015, China) (2. Biochemical School, Beijing City University, Beijing 100094, China) (3. College of Food Science and Engineering, Beijing Agricultural University, Beijing 102206, China)

Abstract: In this study, marine fish protein oligopeptides (MFPO) were digested through simulated gastrointestinal tract *in vitro*. The gel filtration chromatography, UV full wavelength scanning and circular dichroism spectrum were used to characterize the structure changes before and after digestion. DPPH free radical scavenging rate, ABTS free radical scavenging capacity, ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) were measured before and after digestion to explore the effect of simulated gastrointestinal digestion on antioxidant activity of MFPO. The components with molecular weight of 150~1000 u were the main components of MFPO, accounting for up to 88.39% revealed by the molecular weight distribution data. The MFPO was proved to have strong anti-digestion stability to pepsin and good anti-digestion stability to trypsin by UV full wavelength scanning and circular dichroism spectrum scanning. In the concentration range of 1~15 mg/mL, the DPPH free radical scavenging rate of MFPO was found positively correlated with their concentration,

引文格式:

冯晓文, 赵晓涵, 潘晓琦, 等. 海洋鱼蛋白低聚肽结构和抗氧化活性的体外消化稳定性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 109-116

FENG Xiao-wen, ZHAO Xiao-han, PAN Xiao-qi, et al. *In Vitro* digestion stability of structure and antioxidant activity of marine fish protein oligopeptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 109-116

收稿日期: 2020-10-17

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0400604); 国家自然科学基金项目 (31671963); 北京市科技创新基地培育与发展工程专项 (Z191100002819001)

作者简介: 冯晓文 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食源低聚肽研究; 共同第一作者: 赵晓涵 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品与食品过敏原

通讯作者: 刘文颖 (1984-), 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向: 食源低聚肽研究

and the highest was 67.86%. The other three antioxidant indexes including ABTS free radical scavenging capacity, FRAP and ORAC were also determined that the antioxidant activities of MFPO increased to a certain extent after digestion, among which the ORAC value increased most significantly after pepsin followed by trypsin digestion ($p < 0.01$). The results showed that the structure and antioxidant activity of MFPO had anti-digestion stability.

Key words: marine fish protein oligopeptides; simulated digestion in vitro; ultraviolet spectrum; circular dichroism spectrum; antioxidant activity

三文鱼因其英文 Salmon 音似三文而得名, 也叫鲑鱼、大马哈鱼或大麻哈鱼, 主要产于北冰洋、大西洋与太平洋的交界水域, 如加拿大、挪威、日本和美国等国家。三文鱼肉质鲜美, 口感好, 富含 n-3 系列不饱和脂肪酸、人脑神经和视觉神经中主要的脂质成分二十二碳六烯酸 (DHA) 和二十碳五烯酸 (EPA) 等生物活性物质, 还富含 VA、VB1、VB2、VB12 和 VD, 不仅能降低血液中的胆固醇含量, 有效防治心脑血管疾病及减轻因风湿、牛皮癣等疾病带来的痛苦, 还可预防慢性疾病、糖尿病和某些类似的疾病, 且多吃三文鱼有助于保持肠道健康, 降低结肠炎等肠道疾病风险, 被誉为“鱼中至尊”, “水中珍品”, “冰海之皇”^[1,2]。

随着人民生活水平的显著提高, 对海产品的消费需求日趋增长。三文鱼肉质为红色或鲜橘红色, 以其独特的口味、丰富的营养, 在消费者食物中所占比例不断增长。目前, 国内对三文鱼肉的研究报道主要是对其营养价值的阐述, 对于三文鱼酶解物海洋鱼蛋白低聚肽的研究鲜有报道。本中心使用酶解法酶解三文鱼肉制得海洋鱼蛋白低聚肽, 通过体外模拟人体胃肠道消化系统, 以分子量分布测定法、紫外全波长扫描法及圆二色光谱扫描法表征海洋鱼蛋白低聚肽消化前后结构方面的变化, 以 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、铁离子还原能力 (FRAP)、氧自由基吸收能力 (ORAC) 4 个抗氧化指标揭示海洋鱼蛋白低聚肽消化前后抗氧化活性的变化。

通过探索海洋鱼蛋白低聚肽结构和抗氧化活性的消化稳定性, 以期三文鱼肉在抗氧化领域高附加值产品的多元化开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

三文鱼肉, 北京中食海氏生物技术有限公司提供; 碱性蛋白酶 (20000 U/g)、中性蛋白酶 (200000 U/g), 诺维信公司; 无水乙醇、氢氧化钠、浓盐酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、过硫酸钾、醋酸钠, 北京化学试剂公司; 胃蛋白酶, 美国 Sigma 公司; 胰蛋白

酶, 美国 Solarbio 公司; 2,2-二苯基-1-苦味肼基自由基 (DPPH)、偶氮二异丁脒盐酸盐 (AAPH)、Fluorescein (荧光指示剂)、Trolox (水溶性维生素 E), 色谱纯, 美国 Sigma 公司; 2,2-联氮-二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS), 分析纯, 南京森贝伽生物科技有限公司; 2,4,6-三吡啶基-1,3,5-三嗪 (TPTZ), 酷尔化学科技 (北京) 有限公司; 三氯化铁、硫酸亚铁, 广东汕头市西陇化工有限公司。

YG30 型喷雾干燥机, 无锡市阳光干燥设备厂; HH-4 数显恒温水浴锅, 普瑞斯机械有限公司; FE20K 型 pH 计, 瑞士梅特勒-托利多公司; KQ-250E 超声波振荡器, 昆山市超声仪器有限公司; J-810 圆二色谱仪, 美国 Jasco 公司; Spectra MR 多功能酶标仪, 美国 Dynex 公司; SpectraMax i3x 多功能酶标仪, 美国 MD 公司; LC-20AD 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; UV-1780 紫外可见分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 海洋鱼蛋白低聚肽的制备

解冻三文鱼肉, 称取 50 g 于 1 L 的超纯水中, 90 °C 水浴加热 10 min, 降温至 55 °C 后, 用 2 mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH 值为 8.50, 按每克蛋白质 3000 单位的酶量的用量加入碱性蛋白酶, 酶解 3 h; 调节溶液 pH 值为 7, 温度为 45 °C, 按每克蛋白质 2000 单位的酶量加入中性蛋白酶, 酶解 2 h。酶解完毕, 沸水浴灭酶 15 min。10000 r/min 离心 30 min, 上清液待用。用截留分子量为 1000 u 的超滤膜过滤上清液, 滤过液经喷雾干燥机处理得到海洋鱼蛋白低聚肽干粉^[3]。喷雾干燥机条件为: 进料温度 25 °C, 进料速度 14 mL/min, 进风温度 135 °C, 进风压力 20 kPa。

1.2.2 体外模拟胃肠道消化实验

1.2.2.1 胃蛋白酶消化实验

取 15 mL 50 g/L 的海洋鱼蛋白低聚肽溶液, 调节溶液 pH 值为 2, 温度为 37 °C, 然后加入 3% (E/S) 胃蛋白酶 (≥ 250 units/mg), 混匀, 消化时间为 3 h, 100 °C 左右灭酶 10 min, 得胃蛋白酶消化组样品溶液。另移取 15 mL 未消化样品溶液为对照组样品^[4]。

1.2.2.2 胰蛋白酶消化实验

取 15 mL 50 g/L 的海洋鱼蛋白低聚肽溶液, 调节 pH 值为 6.8, 温度为 37 °C, 加热 1 min 后, 加入 3% (E/S) 胰蛋白酶 (≥ 250 units/mg), 混匀, 消化时间为 3 h, 100 °C 左右灭酶 10 min, 得胰蛋白酶消化组样品溶液^[4]。

1.2.2.3 先胃蛋白酶消化后胰蛋白酶消化实验

取 15 mL 50 g/L 的海洋鱼蛋白低聚肽溶液, 按 1.2.2.1 消化后, 再按 1.2.2.2 消化, 然后 100 °C 左右灭酶 10 min。得先胃蛋白酶消化后胰蛋白酶消化组样品溶液^[4]。

1.2.3 分子质量分布测定

测定条件为: 色谱柱: TSKgel G2000 SWXL (300×7.80 mm) 凝胶柱; 流动相: 乙腈、水、三氟乙酸体积比为 45:55:0.10; 流速: 0.50 mL/min; 进样体积: 10 μ L; 柱温: 30 °C, 紫外检测波长: 220 nm。经流动相配制 1 mg/mL 的待测液, 经孔径 0.20 μ m 聚四氟乙烯过滤膜过滤, 然后进行凝胶过滤, GPC 软件处理数据。将肽标准品乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (分子质量 189 u)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (分子质量 451 u)、杆菌酶 (分子质量 1450 u) 和细胞色素 C (分子质量 12500 u) 分别配制成质量分数 0.10% 的溶液, 过膜后进样, 制作相对分子质量校正曲线^[5]。

1.2.4 紫外全波长扫描

将不同处理组的海洋鱼蛋白低聚肽溶液稀释到浓度为 2 mg/mL, 利用紫外可见分光光度计以石英比色皿为容器进行紫外全波长扫描, 扫描条件为: 扫描波长 245~325 nm; 狭缝 1 mm; 采样间隔 0.50 nm; 慢速扫描。

1.2.5 圆二色光谱扫描

将不同处理组的海洋鱼蛋白低聚肽溶液稀释到浓度为 1 mg/mL, 使用圆二色光谱仪以石英比色皿为容器测定其二级结构组成, 圆二色光谱条件为: 光源采用氙灯; 氮气输出压力为 0.40 MPa; 带宽 1 nm; 光谱测量范围 180~260 nm; 步进 0.5 nm; 数据点采样时间为 0.25 s。每个样品采集三次, 用 CDNN 2.1-Simple Spectra 软件分析四组样品的圆二色光谱图。

1.2.6 DPPH 自由基清除能力测定

制备 1、2、5、10、15 mg/mL 的海洋鱼蛋白低聚肽溶液, 样品组 (A_x): 依次加入 100 μ L 0.10 mmol/L DPPH-无水乙醇溶液和 100 μ L 不同质量浓度的样品溶液; 无水乙醇组 (A_0): 依次加入 100 μ L 无水乙醇和 100 μ L 不同浓度的样品溶液; 对照组 (A_1): 依次加入 100 μ L 0.10 mmol/L DPPH-无水乙醇溶液和 100 μ L 蒸馏水。混匀, 避光反应 0.5 h, 517 nm 处测得吸

光值^[6,7]。根据式 (1) 计算清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率} / \% = (1 - \frac{A_x - A_0}{A_1}) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.7 ABTS 自由基清除能力测定

将 7 mmol/L 的 ABTS 储备液: 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液=1:1 (V/V) 混匀, 25 °C 避光反应 12~16 h, 得 ABTS 工作母液。用 0.10 mol/L PBS 稀释 ABTS 母液 35 倍得 ABTS 工作液, 使其在 734 nm 处的吸光值为 0.70 ± 0.02 。标准曲线检测孔中各加入 200 μ L 的 ABTS 工作液和 10 μ L 不同质量浓度的 Trolox 标准溶液; 样品检测孔各加入 200 μ L 的 ABTS 工作液和 1 mg/mL 的样品 10 μ L, 轻轻晃动 96 孔板片刻, 25 °C 静置 5 min, 于 734 nm 处测定 OD 值。以不同浓度的 Trolox 溶液为横坐标, 相应的 OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 如图 1 所示。根据标准曲线计算样品的 ABTS 自由基清除能力, 以 mmol Trolox/L 表示^[8,9]。

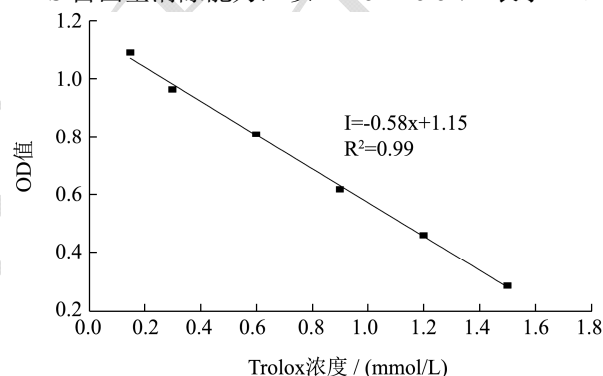


图1 ABTS 标准曲线

Fig.1 ABTS standard curve

1.2.8 FRAP 值测定

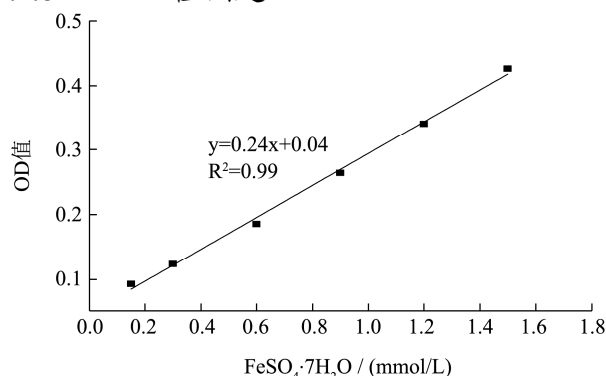


图2 FRAP 标准曲线

Fi.2 FRAP standard curve

300 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 3.60): 10 mmol/L TPTZ 溶液: 20 mmol/L FeCl₃ 溶液=10:1:1 (V/V/V), 混匀, 得 FRAP 工作液。调节 FRAP 工作液温度为 37 °C。空白对照孔依次加入 180 μ L 的 FRAP 工作液和 5 μ L 的 PBS; 标准检测孔中各加入 180 μ L 的 FRAP 工作液和 5 μ L 的不同浓度的 FeSO₄ 标准溶液; 样品检

测孔内各加入 180 μL 的 FRAP 工作液和 5 μL 1 mg/mL 样品溶液。摇床晃动 96 孔板片刻, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min, 于 593 nm 处测定 OD 值, 以不同浓度的 FeSO_4 标准溶液及对应的 OD 值得到标准曲线, 如图 2 所示。根据标准曲线计算样品的 FRAP 值^[10]。

1.2.9 ORAC 值测定

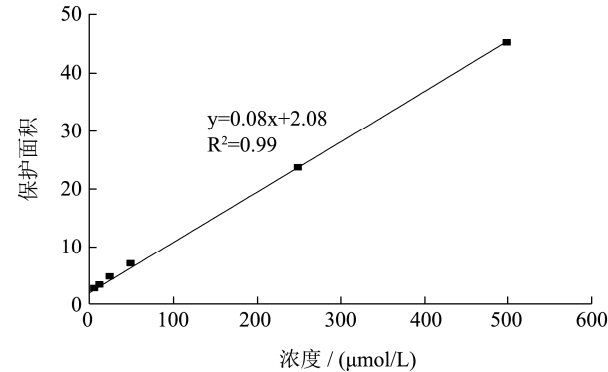


图 3 Trolox 标准曲线

Fig.3 Trolox standard curve

配置 pH=7.40, 75 mmol/L PBS、不同浓度的 Trolox 标准溶液、0.80 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fluorescein (荧光指示剂) 及 150 mmol/L 偶氮类化合物 AAPH。取 96 孔板, 依次加入 25 μL 1 mg/mL 样品溶液和 100 μL 的 Fluorescein, 此为实验组; 25 μL 不同浓度的 Trolox 标准溶液和 100 μL 的 Fluorescein, 此为标准曲线组; 25 μL PBS 和 100 μL 的 Fluorescein, 此为空白组。覆盖一层锡箔纸避光, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱反应 20 min, 最后于上述各孔中迅速加入 75 μL 150 mmol/L 偶氮类化合物 AAPH 启动反应, 另外在空白组的基础上做不加 AAPH 的对照。设定荧光酶标仪条件为: 激发波长 485 nm, 发射波长 530 nm, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 每隔 5 min 测定一次, 每次读数前晃匀 3~5 s, 测定总时间为 180 min。以不同浓度的 Trolox 标准溶液为横坐标, 荧光衰减曲线保护面积为纵坐标绘制标准曲线, 如图 3。根据标准曲线计算待测样品的 ORAC 值, 结果表示为 $\mu\text{mol Trolox/g}$ ^[11]。

1.2.10 数据处理

每组数据均重复 3 次, 实验结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 使用 Origin 2021 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 消化前后海洋鱼蛋白低聚肽的分子质量

分布

如表 1 所示, 模拟胃液组与未消化组分子量分布几乎一致 ($p>0.05$), 表明海洋鱼蛋白低聚肽具有很强的抗胃蛋白酶消化稳定性; 而模拟胰液组和先胃液消化后胰液消化组与未消化组相比, 分子量大于 1000 u 的组分均减少, 表明海洋鱼蛋白低聚肽中大分子肽尤其是 3000~5000 u 的组分对胰蛋白酶的消化稳定性不强; 相应的, 经胰蛋白酶消化以后分子量在 150~1000 u 的组分有所增加, 且分子量 150~1000 u 组分占总组分的 84%以上。张韦唯^[12]研究了体外模拟胃肠液消化对发酵菜粕抗氧化肽的影响, 在经模拟胃肠液消化处理后发酵菜粕抗氧化肽小于 1000 u 的组分所占的比例从 72.51%分别上升到 75.48%和 79.84%, 其分子量分布规律与本实验一致。

2.2 消化前后海洋鱼蛋白低聚肽的紫外全波

长扫描

四组海洋鱼蛋白低聚肽溶液的紫外扫描图如图 4 所示, 由图可知, 四组样品均在 270~280 nm 处有一弱吸收峰, 且经模拟胃肠液处理后, 与未消化组相比, 其余三组最大吸收峰发生了一定程度的左移, 其中未消化组吸收峰值为 0.26, 模拟胃液组吸收峰值为 0.41; 模拟胰液组、先胃后胰组与模拟胃液组相比, 紫外吸收值无显著差异 ($p>0.05$), 其原因可能是模拟胃肠液消化海洋鱼蛋白低聚肽后, 使得溶液中发色团和助色团如 C=O、COOH、NH₂ 的组成比例发生了变化, 从而偏光性发生了变化^[13]。

表 1 不同处理的海洋鱼蛋白低聚肽的分子质量分布

Table 1 Molecular weight distributions of MFPO with different treatments

消化方法	分子质量分布/%						重均分子质量/u
	5000~10000	3000~5000	2000~3000	1000~2000	150~1000	150 以下	
未消化组	0.04	0.75	2.25	12.88	78.05	5.65	599.40
模拟胃液组	0.04	0.77	2.25	12.68	78.25	5.98	598.80
模拟胰液组	0.04	0.08	0.42	5.40	88.39	5.60	449.10
先胃后胰组	0.01	0.18	0.71	8.67	84.28	5.99	531.30

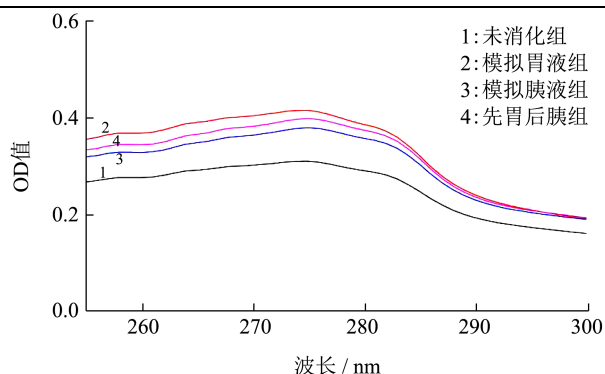


图4 不同处理的海洋鱼蛋白低聚肽的紫外全波长扫描

Fig.4 UV full wavelength scanning of MFPO with different treatments

2.3 消化前后海洋鱼蛋白低聚肽的圆二色谱扫描

圆二色谱图表征蛋白质二级结构的组成,不同处理组的圆二色谱图结果如图5所示,使用CDNN 2.1-Simple Spectra 软件分析样品圆二色谱图得出了不同处理组溶液中二级结构组成,如表2所示。分析可知,胃蛋白酶消化前后,海洋鱼蛋白低聚肽二级结构组成未发生显著变化 ($p>0.05$),表明了海洋鱼蛋白低聚肽的二

级结构具有抗胃蛋白酶消化稳定性;而经模拟胰液消化后,海洋鱼蛋白低聚肽中平行式 β -折叠和不规则卷曲所占比例有一定程度的减少,同时 α -螺旋和反平行式 β -折叠所占比例有所增加,最大增加量为10.93%。总体表明了海洋鱼蛋白低聚肽在结构方面对胃蛋白酶和胰蛋白酶具有较好的抗消化稳定性。CD信噪比是根据蛋白质或多肽的旋光性随温度或变性的变化而变化,主要是测定蛋白质折叠的热力学和蛋白质的稳定性。海洋鱼蛋白低聚肽经模拟胃肠液处理后,部分肽链二级结构及稳定性发生改变,从而使得信噪比有差异^[14]。

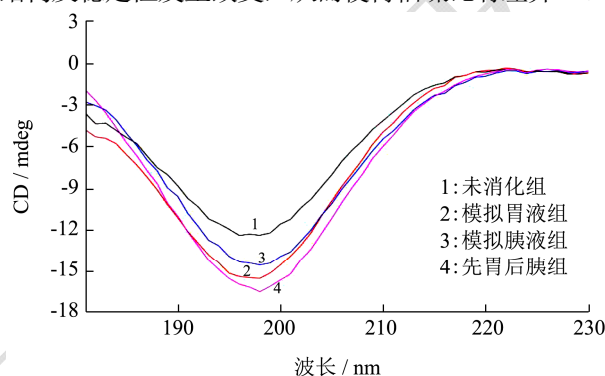


图5 不同处理的海洋鱼蛋白低聚肽的圆二色谱图

Fig.5 Circular dichroism spectrogram of MFPO with different treatments

表2 不同处理的海洋鱼蛋白低聚肽的二级结构

Table 2 Secondary structures of MFPO with different treatments

组别	比例/%				
	α -螺旋	平行式 β -折叠	反平行式 β -折叠	β -转角	不规则卷曲
未消化组	11.40	2.30	33.20	21.60	32.60
模拟胃液组	11.80	2.20	31.70	21.90	33.10
模拟胰液组	12.80	2.00	35.80	21.50	31.20
先胃后胰组	12.20	2.00	32.60	22.10	32.60

2.4 消化前后海洋鱼蛋白低聚肽的 DPPH 自由基清除能力

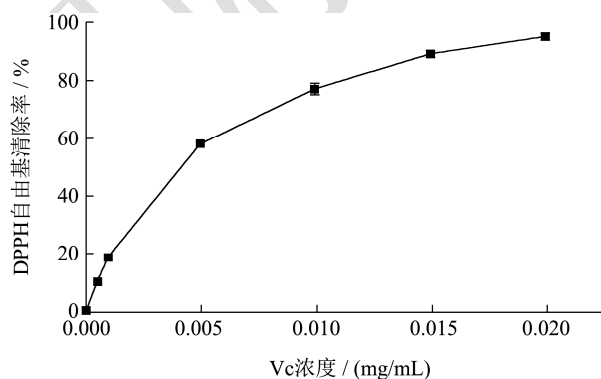


图6 Vc 的 DPPH 自由基清除活性

Fig.6 DPPH free radical scavenging activity of Vc

在抗氧化检测方法中,DPPH 自由基清除率是比较灵敏的方法之一,通过测定样品清除自由基后吸光度的变化来评测样品的抗氧化能力。如图7所示,在1~15 mg/mL 浓度范围内,不同处理组海洋鱼蛋白低聚肽的 DPPH 自由基清除率呈浓度依赖性增加。其中模拟胃液组 DPPH 自由基清除率 15 mg/mL 时最高,为67.86%,半抑制浓度 (IC_{50} 值) 约为 4.50 mg/mL,模拟胰液组 DPPH 自由基清除率整体都比模拟胃液组低。阳性对照抗坏血酸 (Vc) 的 DPPH 自由基清除率趋势与海洋鱼蛋白低聚肽类似,呈剂量依赖性增长,半抑制浓度 (IC_{50} 值) 约为 0.005 mg/mL,其 DPPH 自由基清除能力显著高于海洋鱼蛋白低聚肽。本中心前期以三文鱼皮为原料制得三文鱼皮胶原低聚肽,经模拟胃肠液消化以后其 DPPH 自由基清除率在 1~20 mg/mL 浓度范围内呈剂量依赖性,均从 10%左右上

升到了 60%左右, 其变化趋势与海洋鱼蛋白低聚肽一致^[15]。

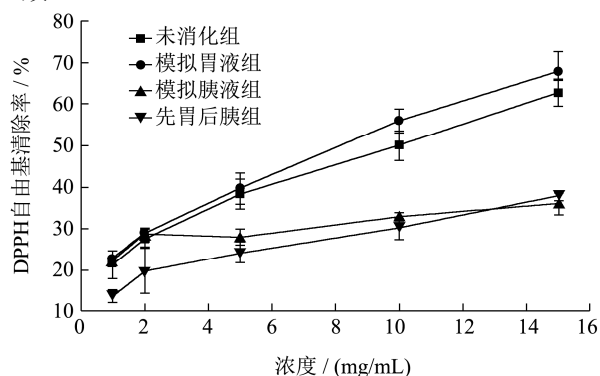


图7 不同处理的海洋鱼蛋白低聚肽的 DPPH 自由基清除活性
Fig.7 DPPH free radical scavenging activities of MFPO with different treatments

2.5 消化前后海洋鱼蛋白低聚肽的 ABTS 自由基清除能力

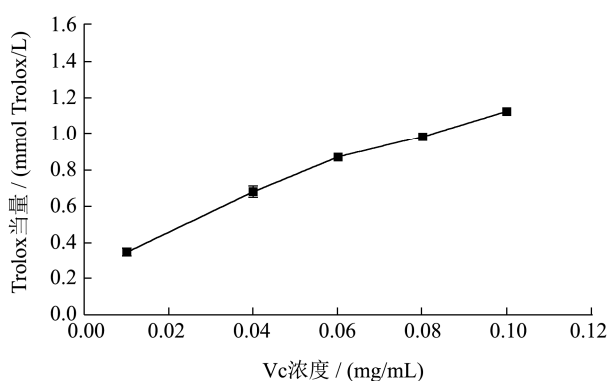


图8 Vc 的 ABTS 自由基清除能力

Fig.8 ABTS radical scavenging capacity of Vc

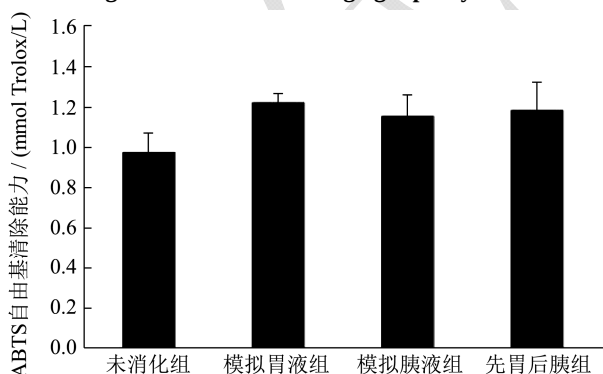


图9 不同处理的海洋鱼蛋白低聚肽的 ABTS 自由基清除能力
Fig.9 ABTS radical scavenging capacity of MFPO treated with different treatments

通过酶标仪测定不同浓度的 Trolox 标准溶液相应的吸光值, 得到 ABTS 标准曲线方程为: $y=0.58x+1.15$ ($R^2=0.99$)。基于标准曲线方程得出四组海洋鱼蛋白低聚肽 ABTS 自由基清除能力, 结果如图 9 所示, 与

未消化组相比, 其余三组 ABTS 自由基清除能力均有一定程度的增加, 与阳性对照组 0.3 mg/mL 的 Vc 清除率相当, 但均无显著影响 ($p>0.05$), 这表明海洋鱼蛋白低聚肽的 ABTS 自由基清除能力具有较好的抗消化稳定性。海洋鱼蛋白低聚肽的 ABTS 自由基清除率在模拟胃肠道消化后稍有提高的原因可能是: 模拟胃肠液消化海洋鱼蛋白低聚肽后, 产生了较多的亲水性的抗氧化活性肽段和具有抗氧化活性的氨基酸残基, 清除了大量的 ABTS 自由基, 使得蛋白酶消化后的海洋鱼蛋白低聚肽 ABTS 自由基清除能力有所提高。吴丽英^[16]以玛咖蛋白为研究对象, 通过模拟体外消化, 以 ABTS 为指标评价体外消化对玛咖蛋白抗氧化活性的影响, 结果表明经过模拟消化处理的样品的 ABTS 清除率和未经过处理的样品相比, 分别增至原来的 2.40 倍和 3.12 倍, 与本实验变化趋势基本一致。

2.6 消化前后海洋鱼蛋白低聚肽的铁离子还原能力

原能力

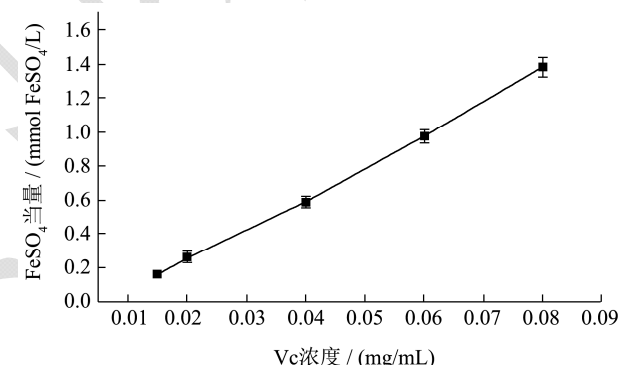


图10 不同浓度 Vc 的 FRAP 值

Fig.10 FRAP values of different concentrations of Vc

表3 不同处理的海洋鱼蛋白低聚肽的 FRAP 值

Table 3 FRAP values of MFPO treated with different

treatments	
处理方法	FRAP 值/ (mmol FeSO ₄ /L)
未消化组	0.07±0.001
模拟胃液组	0.08±0.003
模拟胰液组	0.09±0.002
先胃后胰组	0.08±0.003

通过测定不同浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 相应的 OD 值, 得出铁离子还原能力标准曲线表达式为: $y=0.24x+0.04$ ($R^2=0.99$)。由此得出了不同处理组海洋鱼蛋白低聚肽的铁离子还原能力, 结果如表 3 所示。由表 3 可知, 海洋鱼蛋白低聚肽的 FRAP 值远低于阳性对照组, 且经模拟胃肠液消化前后海洋鱼蛋白低聚肽溶液的铁离子还原能力只有轻微增加, 无显著影响

($p>0.05$), 表明了海洋鱼蛋白低聚肽的铁离子还原能力具有抗消化稳定性。Sae 等^[17]以超声辅助法制备鲑鱼鳞胶原蛋白, 经消化处理后, 其铁离子还原能力由 $0.05 \mu\text{mol Trolox/mL}$ 升高到 $0.09 \mu\text{mol Trolox/mL}$, 其变化规律与本实验保持一致。

2.7 消化前后海洋鱼蛋白低聚肽的氧自由基吸收能力

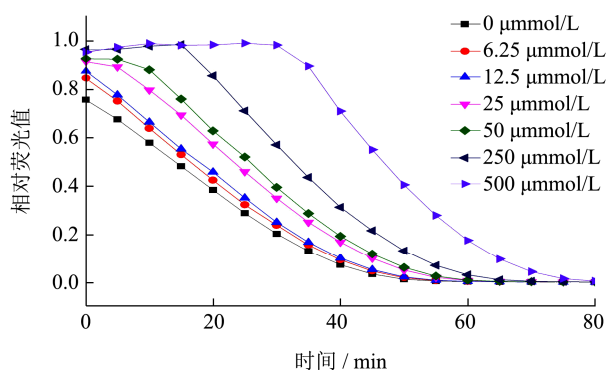


图 11 不同浓度 Trolox 的动态荧光衰减曲线

Fig.11 Dynamic fluorescence attenuation curves of Trolox at different concentrations

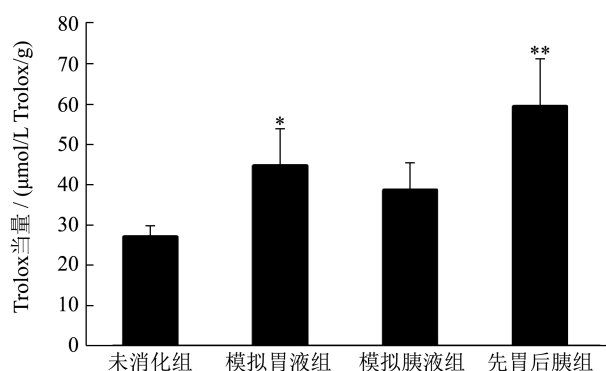


图 12 不同处理的海洋鱼蛋白低聚肽的 ORAC 值

Fig.12 ORAC values of MFBCO treated with different treatments

不同浓度 Trolox 标准液的动态荧光衰减曲线如图 11 所示。由此得到 Trolox 标准曲线方程为: $y=0.08x+2.08$, ($R^2=0.99$)。由此可得四组海洋鱼蛋白低聚肽溶液的 ORAC 值如图 12。从图 12 可得出, 先胃后胰处理组极大地提高海洋鱼蛋白低聚肽的 ORAC 值 ($p<0.01$)。且海洋鱼蛋白低聚肽分别经模拟胃、肠液消化处理后, 其 ORAC 值较未消化组相比, 均有提高, 最大值为 $59.594 \mu\text{mol Trolox/g}$, 阳性对照 Vc 的 ORAC 值为 $897.42 \mu\text{mol Trolox/g}$ 。Pimentel^[18]等证明蛋白质水解后肽末端氨基酸的序列和暴露程度影响抗氧化活性, 海洋鱼蛋白低聚肽经模拟胃、肠液消化处理后, 分子质量 $<1000 \text{ u}$ 的短肽所占比例均有不同

程度的增加, 最大可达 11.69%, 使得肽末端氨基酸的序列和暴露程度发生改变, 这可能与 ORAC 值增高有一定的关系。吴明泽^[19]等以中华圆田螺肉酶解产物为研究对象, 其 ORAC 值消化前 $800 \mu\text{mol/L}$, 在经酶解后, 酶解产物的 ORAC 最大可达 $1600 \mu\text{mol/L}$, 变化规律与本研究相似。

3 结论

本实验对海洋鱼蛋白低聚肽进行体外模拟胃肠消化, 分析其在消化期间抗氧化活性及结构变化, 主要结果如下: 分子量分布结果表明海洋鱼蛋白低聚肽较胃蛋白酶相比对胰蛋白酶的耐受性较差, 分子量 $3000\sim5000 \text{ u}$ 的组分被胰蛋白酶大量水解, 水解量最大高于 80%; 紫外全波长结果表明海洋鱼蛋白低聚肽在消化前后其最大吸收峰发生了一定程度地变化, 可能原因是经模拟胃肠液消化以后溶液中发色团和助色团组成发生了改变; 圆二色光谱对不同处理组的海洋鱼蛋白低聚肽二级结构组成进行了分析, 发现胰蛋白酶消化前后, 海洋鱼蛋白低聚肽的二级结构组成较胃蛋白酶组相比变化明显, α -螺旋和反平行式 β -折叠最大变化量为 10.93%。上述结果表明海洋鱼蛋白低聚肽在结构上具有极强的抗胃蛋白酶消化稳定性及相对较强的抗胰蛋白酶消化稳定性。ABTS 自由基清除率、FRAP 值及 ORAC 值三个抗氧化指标结果表明消化后海洋鱼蛋白低聚肽的抗氧化活性均提高, 其中经模拟胰液消化后的 ORAC 值提高最为显著 ($p<0.01$); DPPH 自由基清除率经模拟胰液消化后虽未提高, 但清除率稳定在 20%~30%, 仍具有一定的 DPPH 自由基清除能力。四个抗氧化指标表征了海洋鱼蛋白低聚肽抗氧化活性具有抗消化稳定性。海洋鱼蛋白低聚肽作为一种新兴蛋白资源, 在结构和抗氧化方面具有较好的抗消化稳定性, 这为三文鱼肉的高附加值利用及相关产品的多元化开发提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 邓林, 李华, 江建军. 挪威三文鱼的营养评价[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 377-379
DENG Lin, LI Hua, JIANG Jian-jun. Nutritional evaluation of Norwegian salmon [J]. Food Industry Technology, 2012, 8: 377-379
- [2] 苏红. 鲮鱼和三文鱼头汤煮制过程中营养物质的迁移规律及其抗氧化活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019
SU Hong. Study on nutrient migration and antioxidant activity of bighead carp and salmon head soup during cooking [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019

- [3] 刘文颖,林峰,谷瑞增,等.乳清低聚肽的制备及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2014,35(15):49-53
LIU Wen-ying, LIN Feng, GU Rui-zeng, et al. Preparation and antioxidant activity of whey oligopeptides [J]. Food Industry Technology, 2014, 35(15): 49-53
- [4] 刘文颖,谷瑞增,林峰,等.海洋骨胶原低聚肽钙配合物的稳定性[J].食品工业科技,2015,36(4):111-115
LIU Wen-ying, GU Rui-zeng, LIN Feng, et al. Stability of calcium complexes of marine collagen oligopeptide [J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(4): 111-115
- [5] LIU Wen-ying, LU Jun, GAO Fei, et al. Preparation, characterization and identification of calcium-chelating Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptides [J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(6): 851-860
- [6] Sethi Shruti, Joshi Alka, Arora Bindvi, et al. Significance of FRAP, DPPH, and CUPRAC assays for antioxidant activity determination in apple fruit extracts [J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(3): 591-598
- [7] Almeshia Abdulrahman-a, Abuelizz Hatem-a, Taie Hanan-a-a, et al. Investigation the antioxidant activity of benzo[g] triazoloquinazolines correlated with a DFT study [J]. Saudi Pharmaceutical Journal: the Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society, 2019, 27(1): 133-137
- [8] Rezanejad Reza, Heidarieh Marzieh, Ojagh Seyed-mandi, et al. Values of antioxidant activities (ABTS and DPPH) and ferric reducing and chelating powers of gamma-irradiated rosemary extract [J]. Radiochimica Acta, 2019, 108(6): 477-482
- [9] Zhang Hua, Yang Yi-fei, Zhou Zhi-qin. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(1): 256-263
- [10] Amjadi Ahmad, Mirmiranpour Hossein, Sobhani Seyed-omid, et al. Intravenous laser wavelength radiation effect on LCAT, PON1, catalase, and FRAP in diabetic rats [J]. Lasers in Medical Science, 2019, 35(1): 131-138
- [11] Mario Cesar-jucoski-bier, Adriane Bianchi-pedroni-medeiros, Norbert De-kimpe, et al. Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp [J]. Biotechnology Research and Innovation, 2019, 3(1): 168-176
- [12] 张韦唯.发酵菜粕抗氧化肽的提取分离、模拟消化吸收和抗衰老作用研究[D].镇江:江苏大学,2017
ZHANG Wei-wei. Study on extraction, separation, simulated digestion and absorption and anti-aging effect of antioxidant peptides from fermented rapeseed meal [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2017
- [13] 纪晓雯.酪蛋白铁螯合肽的分离、结构解析及细胞吸收研究[D].合肥:安徽农业大学,2018
JI Xiao-wen. Isolation, structure analysis and cell absorption of casein iron chelating peptide [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018
- [14] Greenfield N J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis [J]. Trends in Analytical Chemistry, 1999, 18(4): 236-244
- [15] 刘文颖,张铭皓,高丽辉,等.体外消化对三文鱼皮胶原低聚肽抗氧化活性的影响[J].食品工业科技,2021,42(1):317-321
LIU Wen-ying, ZHANG Ming-hao, GAO Li-hui, et al. Effect of *in vitro* digestion on antioxidant activity of collagen oligopeptides from salmon skin [J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(1): 317-321
- [16] 吴丽英.玛咖蛋白的提取纯化、理化性质及模拟体外消化研究[D].广州:华南理工大学,2017
WU Li-ying. Extraction, purification, physicochemical properties and simulated *in vitro* digestion of Maca protein [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [17] Thanasak Sae-leaw, Benjakul Sootawat. Antioxidant activities of hydrolysed collagen from salmon scale ossein prepared with the aid of ultrasound [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53(12): 2786-2795
- [18] Pimentel Filipa, Maria Cermenio, Kleekayai Thanyaporn, et al. Effect of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of the red seaweed *Porphyra dioica* [J]. Food Research International, 2020, 136: 109309
- [19] 吴明泽,王笑,胡祥昊,等.中华圆田螺肉抗氧化肽的分离纯化及小鼠体内活性研究[J].食品与机械,2019,35(12):151-157
WU Ming-ze, WANG Xiao, HU Xiang-hao, et al. Isolation, purification and *in vitro* activity of antioxidant peptides from the flesh of snails of China [J]. Food and Machinery, 2019, 35(12): 151-157