

# 大菱鲆鱼皮抗氧化胶原肽的制备及特性分析

王志, 赵峰, 王珊珊, 欧帅, 张晋, 马玉洁, 周德庆\*

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室,  
海洋药物与生物制品功能实验室, 青岛 266071)

**摘要: 目的** 以大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)鱼皮为原料制备抗氧化胶原肽并分析其特性。**方法** 在单因素实验基础上通过响应面法优化鱼皮酶解工艺, 并对所制备胶原肽进行 G-15 葡聚糖凝胶层析分离及体外抗氧化活性检测。**结果** 大菱鲆鱼皮酶解的最适酶为中性蛋白酶, 最佳工艺条件为: 酶解温度 52 °C, 酶解时间为 338 min, 加酶量为 1142 U/g, 反应体系 pH 值为 6.7。按照此最佳条件制备得到鱼皮酶解液羟自由基清除率为 34.44%, 与理论值接近。大菱鲆鱼皮胶原肽经过层析分离, 得到了 3 种不同分子质量的多肽组分 TSP1、TSP2、TSP3, 其中 TSP3 体外抗氧化活性最好, 具有更强的羟自由基清除能力、亚铁离子螯合能力、苯代苦味肼基自由基清除能力以及还原力。**结论** 本研究为大菱鲆及其他鱼皮多肽的开发研究以及鱼类副产物高值化利用提供了技术参考。

**关键词:** 大菱鲆; 胶原肽; 酶解工艺; 抗氧化

## Preparation and characteristic analysis of antioxidant collagen peptides from turbot skins

WANG Zhi, ZHAO Feng, WANG Shan-Shan, OU Shuai, ZHANG Jin, MA Yu-Jie, ZHOU De-Qing\*

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao), Qingdao 266071, China)

**ABSTRACT: Objective** To prepare antioxidant collagen peptides from turbot fish skins and analyze the characteristic. **Methods** Based on the single factor experiments, the enzymatic hydrolysis conditions of fish skins were optimized by response surface methodology, and the prepared collagen peptides were separated by G-15 dextran gel chromatography and tested for *in vitro* antioxidant activity. **Results** The results showed that the most suitable enzyme in the enzymatic hydrolysis process was neutral protease. The optimum technological conditions were determined as follows: the enzymatic hydrolysis temperature was 52 °C, the enzymatic hydrolysis time was 338 min, the amount of enzyme added was 1142 U/g, and the pH of the reaction system was 6.7. According to the optimum conditions, the free radical scavenging rate of turbot skin hydrolysate was 34.44%, which was closed to the theoretical value. After chromatography separation, antioxidant component TSP1, TSP2, TSP3 were finally obtained. The best antioxidant component among them was TSP3, which had strong hydroxyl radical scavenging ability, ferrous ion chelating ability, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity and reducing power.

基金项目: 烟台市科技计划项目(2019ZDCX011)、中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020XT0502)

**Fund:** Supported by the Science and Technology Program of Yantai (2019ZDCX011), and Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(NO.2020XT0502)

\*通讯作者: 周德庆, 研究员, 主要研究方向为水产品加工利用与质量安全。E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

\*Corresponding author: ZHOU De-Qing, Professor, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China. E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

**Conclusion** This study provides technical reference for the exploitation and research of turbot and other fish polypeptides and the high value utilization of fish by-products.

**KEY WORDS:** turbot; collagen peptides; enzymolysis process; antioxidant activity

## 1 引言

胶原肽作为胶原蛋白的酶解产物,其结构含有 3~20 个氨基酸,是一种具有多种生物活性的功能多肽<sup>[1,2]</sup>。胶原肽因分子质量小、溶解性强、能直接被吸收等特点,已被广泛应用于保健食品、化妆品等诸多领域<sup>[2,3]</sup>,胶原肽产品的地位日益突出。制备胶原肽的方法主要有热水抽提法、酸水解法、碱水解法、酶解法等多种方法,其中酶解法因其胶原肽得率高、安全及反应条件可控,是胶原肽制备的主要方法<sup>[4]</sup>。酶解胶原肽因原料的来源、酶的种类和水解方法的不同,其活性、功能以及得率也各有不同<sup>[5]</sup>。

随着水产品加工的不断发展和一些主要的经济养殖鱼类,在加工过程中会产生鱼皮、鱼骨等边角料,这些加工副产物中含有丰富的胶原蛋白,尤其是鱼皮<sup>[6]</sup>。目前,关于鱼皮制备抗氧化胶原肽的研究已日渐成熟,王雨生等<sup>[7]</sup>以黄鳍金枪鱼皮为原料,得到了具有抗氧化性的胶原肽;宋思佳等<sup>[8]</sup>采用了多种蛋白酶对鲢鱼鱼皮进行酶解,结果表明,鱼皮经过酶解后得到了具有抗氧化活性的蛋白肽,且酶解组分分子量越小,抗氧化活性越强;董丽莎等<sup>[3]</sup>对黑线鳕鱼皮酶解胶原肽的研究表明其不仅具有抗氧化活性,还对预防辐射损伤具有一定的作用。鱼皮酶解胶原肽的制备及其生物活性的研究受到广泛关注。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*),也称多宝鱼,是产于地中海和东北大西洋之间的一种经济鱼类<sup>[9,10]</sup>。大菱鲆目前以鲜销为主,但随着产量的增加以及加工业的兴起,大菱鲆鱼皮的进一步加工利用将会成为提高大菱鲆经济价值的重要措施<sup>[11]</sup>。因此,利用酶解工艺将其转化为高值化活性胶原肽具有重要的意义。本研究通过中性蛋白酶对大菱鲆鱼皮进行酶解,在单因素实验基础上通过响应面法优化鱼皮酶解工艺,并对所制备胶原肽进行初步分离及体外抗氧化活性的测定,旨在为大菱鲆及其他鱼类多肽的开发研究以及鱼类副产物高值化利用提供技术参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

新鲜大菱鲆样品直接从青岛本水产养殖场购买,放血致死,取下鱼皮,置于-20℃保存。

胃蛋白酶(3000 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)(北京索莱宝科技有限公司);中性蛋白酶(60 U/mg)(北京博奥拓达科技有限公司);其他化学试剂皆为分析纯(国药集团化学

试剂有限公司)。

BSA224S 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器);JK9830 自动凯氏定氮仪(济南精锐分析仪器);Neofuge 15R 冷冻离心机(上海 Heal Force 公司);UV1102 II 紫外分光光度计(上海天美科学仪器);DBS-160F 电脑自动部分收集系统(上海精科实业有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 样品前处理

取出鱼皮解冻,将附着在鱼皮上的肌肉组织去除干净,将其剪成小块、清洗后使用 0.1 mol/L NaOH 溶液以料液比为 1:20 (g/mL)于 4℃搅拌 24 h,以减少样品中的杂蛋白、色素、以及内源性蛋白酶对实验的影响。再将样品洗至中性,加入 10%异丙醇于 1:10 (g/mL)于 4℃搅拌 24 h,进行脱脂处理<sup>[12]</sup>。将脱脂后的样品用去离子水清洗干净并用 0.3 mol/L 醋酸溶液<sup>[13]</sup>溶胀处理 20 min。

#### 2.2.2 酶解液制备

溶胀后的样品匀浆,按料液比 1:20 (g/mL)加入蒸馏水,再加入蛋白酶,用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节体系 pH,将样品于特定反应温度下恒温震荡酶解。酶解至终点时于沸水中灭酶 15 min<sup>[14,6]</sup>。冷却后离心 20 min (8000 r/min),收集上清液进行抽滤,制得滤液即为鱼皮酶解原液,置于 4℃短期保存。

#### 2.2.3 水解度测定

参照赵新淮等<sup>[15]</sup>和史文军等<sup>[16]</sup>的方法进行水解度(degree of hydrolysis, DH)测定。

#### 2.2.4 抗氧化活性测定

##### (1)羟自由基清除率测定

参照 You 等<sup>[17]</sup>和王雪芹<sup>[18]</sup>的方法进行羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除率测定。

##### (2)还原力测定

参照 Bougateg 等<sup>[19]</sup>的方法进行还原力的测定。

##### (3)苯代苦味肼基自由基清除率测定

参照李云涛等<sup>[20]</sup>的方法进行苯代苦味肼基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)清除率测定。

##### (4)Fe<sup>2+</sup>螯合能力的测定

参照胡晓赞<sup>[21]</sup>的方法有所改动,其中 FeCl<sub>2</sub> 浓度是 1 mmol/L,加入去离子水 3 mL。

#### 2.2.5 最佳酶的筛选

为了探索鱼皮酶解的最佳蛋白酶,本研究分别选取了 3 种蛋白酶进行酶解实验。酶解条件:酶解时间 240 min,加酶量 4000 U/g。以水解度为指标,以羟自由基清除率为辅

助指标, 检测了不同蛋白酶对鱼皮样品的水解效果。3 种蛋白酶的特征参数值见表 1<sup>[16]</sup>。

表 1 3 种蛋白酶的特征参数  
Table 1 Feature values of 3 proteases

酶的名称	酶活/(U/mg)	温度/°C	pH 值
胃蛋白酶	3000	37	2.0
中性蛋白酶	60	50	7.0
胰蛋白酶	250	37	8.0

### 2.2.6 单因素实验

筛选出鱼皮酶解的最佳蛋白酶后, 为了提升该酶的最佳使用效率, 本研究分别设置了以酶解时间、酶解温度、pH 值、以及加酶量为单一限制条件, 以水解度和羟自由基清除率为检测指标的单因素实验。

时间单因素实验: 设置酶解时间分别为 40、80、160、240、320、400 min, 其他条件: 温度 50 °C, 加酶量 4000 U/g, pH 7, 每组 3 次平行。

温度单因素实验: 设置酶解温度分别为 30、40、50、60、70、80 °C, 其他条件: 时间 338 min, 加酶量 4000 U/g, pH 7, 每组 3 次平行。

pH 单因素实验: 设置酶解体系 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9、10, 其他条件: 时间 338 min, 温度 52 °C, 加酶量 4000 U/g, 每组 3 次平行。

加酶量单因素实验: 设置酶解加酶量分别为 0、1000、2000、3000、4000、5000、6000 U/g, 其他条件: 时间 338 min, 温度 52 °C, pH 7, 每组 3 次平行。

### 2.2.7 响应面法优化实验设计

在单因素实验的基础上, 以羟自由基清除率(Y)为响应值, 分别以酶解温度( $X_1$ )、酶解时间( $X_2$ )、加酶量( $X_3$ )以及 pH 值( $X_4$ ) 4 个单因素为自变量, 应用 Design-Expert 8.0 软件建立 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 中心组合模型, 对大菱鲆鱼皮酶解的条件进行响应面优化设计, 根据实验结果确定蛋白酶酶解提取鱼皮多肽的最佳工艺参数<sup>[22]</sup>。响应面设计见表 2。

### 2.2.8 氨基酸组成分析

胶原肽氨基酸组成分析参照 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》<sup>[23]</sup>中的盐酸水解法测定除色氨酸外的 17 种氨基酸。色氨酸的测定参照邹朝阳等<sup>[24]</sup>的方法。

### 2.2.9 分子量测定

胶原肽分子量的测定参考 GB/T 22492-2008《大豆肽粉》<sup>[25]</sup>。

### 2.2.10 分离纯化

将最佳酶解条件下的冷冻干燥多肽粉末重新溶解, 选用 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶对多肽样品进行进一步分离, 部分操作步骤参照白歌等<sup>[26]</sup>的方法。样品浓度为 100 mg/mL,

上样前经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 流速为 0.3 mL/min, 洗脱剂为超纯水<sup>[27]</sup>, 上样量为 5 mL, 每 30 min 收集一管洗脱液, 紫外检测波长为 220 nm。

### 2.2.11 数据分析

采用 Graphpad 5 软件对数据统计和作图, 采用 IBM SPSS Statistics 22 对数据进行显著性分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)。

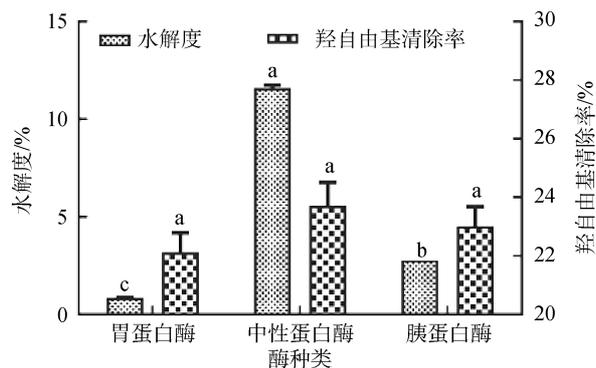
表 2 响应面因素及水平

因素	编码	水平		
		-1	0	1
温度/°C	$X_1$	40	50	60
时间/min	$X_2$	240	320	400
加酶量/(U/g)	$X_3$	1000	2000	3000
pH 值	$X_4$	6	7	8

## 3 结果与分析

### 3.1 最佳蛋白酶的选择

选取了胃蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶对鱼皮样品进行酶解, 结果如图 1 所示。中性蛋白酶的酶解效果最好, 其酶解稀释液的水解度达到了 11.60%, 且显著强于胃蛋白酶和胰蛋白酶。羟自由基清除率作为体外抗氧化活性的检测指标之一, 能更好地反映水解多肽样品的抗氧化活性。在本研究选取的 3 种蛋白酶中, 中性蛋白酶酶液对羟自由基的清除效率最高, 达到 23.71%, 略高于胃蛋白酶(22.13%)和胰蛋白酶(23.02%)。综合水解度与羟自由基清除率 2 个检测指标, 对大菱鲆鱼皮酶解效果最好的蛋白酶是中性蛋白酶, 因此, 本研究以中性蛋白酶作为最佳的酶解蛋白酶进行后续实验。



注: 不同小写字母代表相同检测指标下组间的差异显著 ( $P < 0.05$ ); 以下同。

图1 不同蛋白酶对鱼皮水解效果的影响( $n=3$ )

Fig.1 Effect of different proteinase on hydrolysis of fish skin ( $n=3$ )

### 3.2 酶解最佳条件优化

大菱鲆鱼皮酶解最佳条件的优化结果如图 2 所示。酶解时间是影响鱼皮酶解效果的关键因素,时间过短则酶解不够充分,时间太长会影响酶解效率<sup>[28]</sup>。由图 2 可以看出,随着酶解时间的增加,酶解稀释液的水解度和羟自由基清除率均逐渐增加,在水解时间达到 320 min 时酶解能力趋于平稳,其水解度达到 12.31%,羟自由基清除率也达到最大,为 26.30% (图 2A); 除酶解时间外,温度也是蛋白酶反应的关键因素,随着温度的逐渐升高,酶解稀释液的水解度和羟自由基清除率均呈现上升趋势,在温度达到 50 °C 时,效率达到最佳,其水解度和羟自由基清除率分别为 8.06% 和 28.90%。此后随着温度的升高,其水解度和羟自由基清除率又呈现下降趋势(图 2B); pH 值对鱼皮酶解的影响趋势(图 2C)和酶解时间的结果大致相似,在 pH 值为 7 时,其水解度逐渐达到最高且趋于稳定,但羟自由基清除能力在 pH 值大于 7 时逐渐降低;不同加酶量下,酶解稀释液的水解度随着加酶量的不断增加而逐渐增加,但在加酶量为 2000 U/g 时趋于平稳,在加酶量大于 3000U/g 时开始下降。羟自由基清除率则在加酶量为 2000 U/g 时

达到最高,此后,随着加酶量增加,其羟自由基清除能力有所降低(图 2D)。水解度随着加酶量的增加先增加后降低,此结果和李露园等<sup>[2]</sup>在以加酶量为单因素时鲟鱼皮胶原蛋白肽酶解的结果相似,可能是由于酶量的增加抑制了底物的扩散,降低了反应速率<sup>[2]</sup>,也可能是随着加酶量的增加,酶与底物接触的机会增加,但当加酶量继续增大可能会出现过度酶解现象使多肽分解为氨基酸而使水解度变低<sup>[29]</sup>。董丽莎等<sup>[3]</sup>在使用胰蛋白酶对黑线鲟鱼皮酶解时所进行的单因素实验也得到了相似的结果。羟自由基清除率与水解度的结果趋势相同,也可能是此原因导致。综合 2 种检测指标分析结果,鱼皮蛋白最佳酶解条件为:酶解时间 320 min、酶解温度 50 °C、体系 pH 为 7、加酶量 2000 U/g。

### 3.3 响应面法优化酶解工艺

#### 3.3.1 中心组合实验结果

实验根据 Box-Behnken 的中心组合原理设计实验方案,对大菱鲆鱼皮酶解稀释液进行羟自由基清除率的检测,并采用分析软件 Design-Expert 8.0 对实验结果进行响应面分析,参数设计与实验结果见表 3。

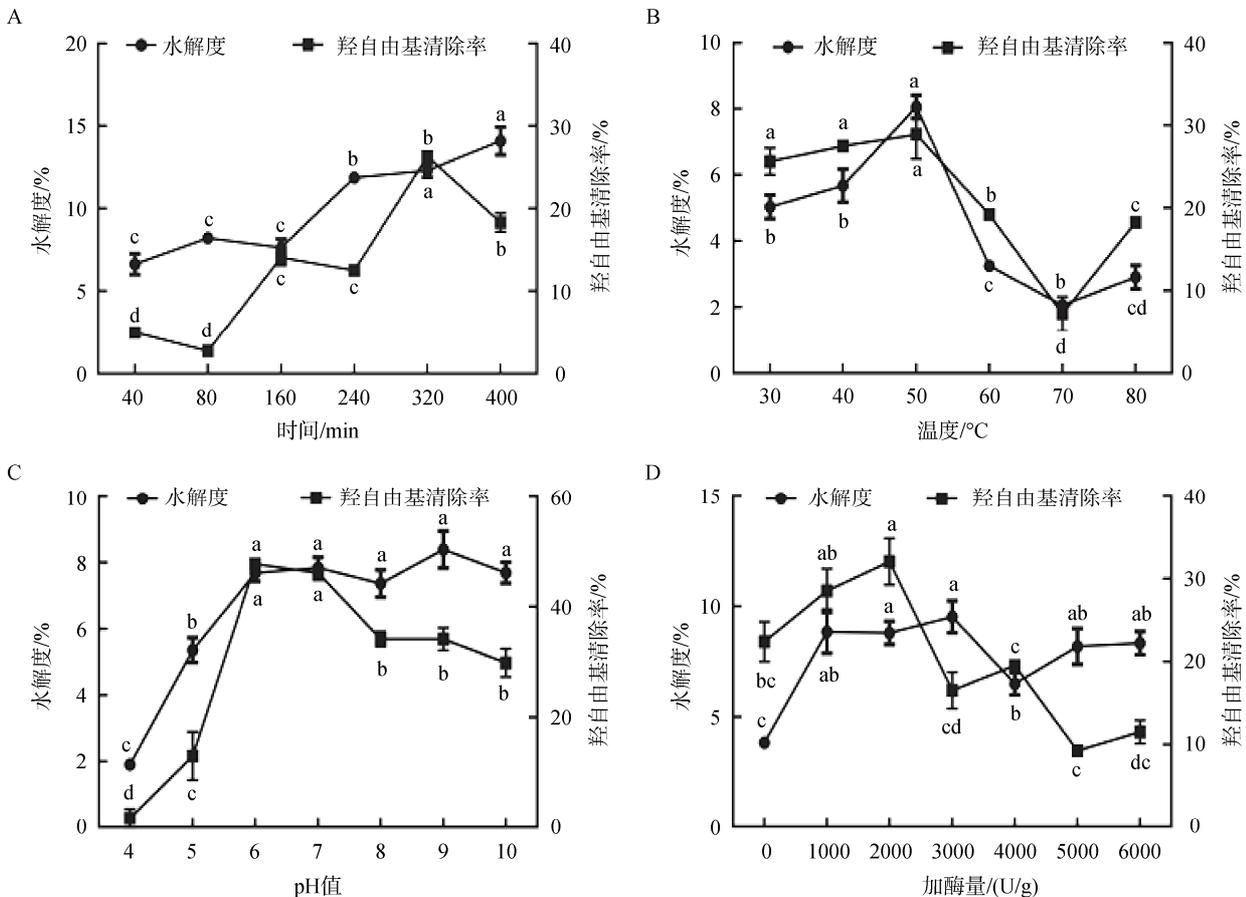


图2 酶解条件的优化 ( $n=3$ )

Fig.2 Optimization of enzymatic hydrolysis conditions ( $n=3$ )

表 3 响应面实验参数与结果  
Table 3 Technical parameters and results of response surface experiment

编号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y/%
1	0	0	1	1	36.64
2	0	-1	1	0	25.44
3	1	-1	0	0	24.72
4	0	1	0	-1	28.91
5	0	-1	-1	0	20.85
6	0	0	0	0	14.11
7	0	0	1	-1	41.17
8	1	0	1	0	14.30
9	0	0	-1	-1	16.58
10	-1	0	1	0	5.01
11	0	-1	0	1	25.85
12	-1	1	0	0	13.86
13	-1	0	0	1	18.56
14	1	0	0	1	8.18
15	0	1	1	0	29.04
16	0	1	-1	0	12.22
17	0	0	0	0	17.10
18	0	0	0	0	23.20
19	0	0	-1	1	33.48
20	0	0	0	0	10.82
21	0	0	0	0	27.66
22	-1	0	0	-1	26.87
23	1	0	0	-1	26.29
24	-1	-1	0	0	14.49
25	0	-1	0	-1	13.21
26	1	0	-1	0	17.07
27	-1	0	-1	0	29.17
28	0	1	0	1	26.52
29	1	1	0	0	24.78

对实验数据进行回归拟合后, 羟自由基清除率(Y)的回归方程:

$$Y = -894.35766 + 9.90307X_1 + 0.80326X_2 + 0.028469X_3 + 154.70251X_4 - 7.00510E-003X_1X_2 - 6.09573E-004X_1X_3 + 0.019274X_1X_4 - 2.10867E-005X_2X_3 - 0.015789X_2X_4 + 2.74316E-003X_3X_4 - 0.067247X_1^2 - 4.58681E-004X_2^2 - 3.58525E-006X_3^2 - 11.42285X_4^2$$

对羟自由基清除率回归模型进行方差分析, 结果见表 4。该模型回归  $P < 0.01$ , 差异极显著, 失拟项  $P > 0.05$ , 不显著, 表明该模型可以用于大菱鲆鱼皮酶解工艺实验的分析和预测。羟自由基清除率回归模型的方差分析表明  $X_3$  和  $X_4$  这 2 个因素在实验过程中起主要作用, 而  $X_1$  以及  $X_2$

这 2 个因素在实验取值范围内对影响不显著。交互项  $X_1X_3$  对羟自由基清除率的影响显著, 其余影响均不显著。二次项  $X_4^2$  对羟自由基清除率的影响极显著,  $X_1^2$  对羟自由基清除率的影响高度显著, 说明其对羟自由基清除率的影响并不是简单的线性关系。 $X_2^2$  和  $X_3^2$  对水解度的影响均不显著。由表中  $F$  值分析可知, 4 个因素对鱼皮水解的影响依次为: 加酶量 > pH 值 > 温度 > 时间<sup>[4,30,31]</sup>。

表 4 羟自由基清除率回归模型方差分析  
Table 4 Variance analysis of regression model of •OH clearance

项	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X <sub>1</sub>	26.1	1	26.1	0.89	0.3605	
X <sub>2</sub>	3.51	1	3.51	0.12	0.7341	
X <sub>3</sub>	182.2	1	182.2	6.24	0.0256	*
X <sub>4</sub>	175.09	1	175.09	6.00	0.0281	*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	125.62	1	125.62	4.30	0.0570	
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	148.63	1	148.63	5.09	0.0406	*
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0.15	1	0.15	5.089E-003	0.9441	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	11.38	1	11.38	0.39	0.5424	
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	6.38	1	6.38	0.22	0.6474	
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	30.1	1	30.1	1.03	0.3272	
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	293.33	1	293.33	10.04	0.0068	**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	55.9	1	55.9	1.91	0.1882	
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	83.38	1	83.38	2.86	0.1132	
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	846.37	1	846.37	28.98	<0.0001	**
模型	1699.01	14	121.36	4.16	0.0059	**
残差	408.83	14	29.2			
失拟	224.24	10	22.42	0.49	0.8383	
纯误差	184.6	4	46.15			
总和	2107.85	28				

注: \*\*为差异极显著,  $P < 0.01$ ; \*为差异显著,  $P < 0.05$ 。

### 3.3.2 响应面法优化酶解工艺的确定及验证

由回归模型模拟可得, 大菱鲆鱼皮酶解的最佳工艺条件为酶解温度 51.80 °C, 酶解时间为 338.26 min, 加酶量为 1142.42 U/g, pH 值为 6.72, 响应面模型预测羟自由基清除率为 33.93%。根据模拟结果选取实际最佳工艺条件为酶解温度 52 °C, 酶解时间为 338 min, 加酶量为 1142 U/g, pH 值为 6.7, 得到鱼皮酶解液羟自由基清除率为 34.44%, 与理论值相差 0.51%。验证结果表明最佳酶解条件下理论值与实际值很接近, 该工艺可以较好地优化大菱鲆鱼皮酶解条件。

### 3.4 大菱鲆鱼皮胶原肽的分析与分离纯化

#### 3.4.1 氨基酸组成分析

鱼皮胶原肽的氨基酸组成分析如表 5 所示, 可以看出

多肽的氨基酸总含量较高,为 79.24%。胶原肽中氨基酸占比不尽相同,其中甘氨酸(glycine, Gly)含量最高。Gly 是一种分子中同时含有酸性和碱性官能团的氨基酸,其是强抗氧化剂谷胱甘肽(glutathione, GSH)的重要组成氨基酸。此外,多肽中存在 Gly-X-Y 的氨基酸重复序列是胶原肽的主要特征之一<sup>[32]</sup>,这也与大菱鲆鱼皮胶原肽含有大量甘氨酸相符。除甘氨酸外,胶原肽中还富含丙氨酸、谷氨酸、脯氨酸等氨基酸,这与已经报道的蓝点马鲛鱼抗冻胶原肽的氨基酸组成相似<sup>[32]</sup>。此检测结果也与酶解前鱼皮的氨基酸组成相似<sup>[24]</sup>,说明大菱鲆鱼皮经过中性蛋白酶酶解之后,其氨基酸组成基本不会发生太大变化。有学者发现,抗氧化多肽中疏水性氨基酸通过与氧结合或抑制脂质中氢的释放来延缓脂质过氧化反应而使得多肽具有较强的体外抗氧化能力,除此之外,肽的构象也是其具有体外抗氧化能力的重要因素<sup>[33]</sup>。胶原肽含有的主要氨基酸如甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸等疏水性氨基酸,且其按照特定顺序相互作用,使得多肽酶解液具有极强的体外抗氧化能力<sup>[34]</sup>。大菱鲆鱼皮经过酶解之后,也含有大量甘氨酸、丙氨酸以及脯氨酸等氨基酸,表明其具有很强的抗氧化性。

表 5 大菱鲆鱼皮胶原肽氨基酸组成(干重, g/100 g)  
Table 5 Amino acid composition of turbot skin collagen peptides (dry, g/100 g)

氨基酸	含量/(g/100 g)	氨基酸	含量/(g/100 g)
甘氨酸*	18.64	苏氨酸	2.46
丙氨酸*	8.75	苯丙氨酸*	2.16
谷氨酸	8.58	缬氨酸*	1.98
脯氨酸*	7.91	蛋氨酸	1.93
精氨酸	6.94	异亮氨酸*	1.27
天冬氨酸	5.60	组氨酸	1.11
丝氨酸	4.31	酪氨酸	1.09
赖氨酸	3.59	半胱氨酸	0.16
亮氨酸*	2.68	色氨酸*	0.08

注: \*表示该氨基酸为疏水性氨基酸。

### 3.4.2 胶原肽相对分子量分布测定

经过酶解之后,大菱鲆鱼胶原肽分子量主要分布在 2 kDa 以下,其中<500 Da 的多肽含量占比 51.83%,是多肽中含量最多的组分,分子量在 500 Da~1 kDa 的多肽含量为 36.13%。分子量在 1~2 kDa 的多肽含量为 9.42%,含量占比较少,而分子量>2 kDa 的多肽含量最低,仅为 2.62%。由结果可以看出,大菱鲆鱼皮中的蛋白质在经过长时间的酶解后,大部分都分解成了小分子多肽,多肽分子的量大多分布于 1 kDa 以下,分子量较低,此研究结果也与王雪芹<sup>[18]</sup>的研究结果相似,酶解过后多肽主要在 1 kDa 以下,但本研究样品酶解后所得的多肽分子量更低。

表 6 大菱鲆鱼皮胶原肽相对分子量分布测定  
Table 6 Relative molecular weight distribution of turbot skin collagen peptides

分子量范围/Da	含量/%
>5000	0.08
5000~3000	0.65
3000~2000	1.89
2000~1000	9.42
1000~500	36.13
500~180	47.64
<180	4.19

### 3.4.3 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析及各组分体外抗氧化活性检测

通过 G-15 葡聚糖凝胶层析,多肽混合物按照分子量从大到小依次得到分离,分离结果如图 3 所示。大菱鲆鱼皮酶解混合多肽经过分离后,得到了 3 个组分 TSP1、TSP2、TSP3,其分子量大小关系为: TSP1>TSP2>TSP3。

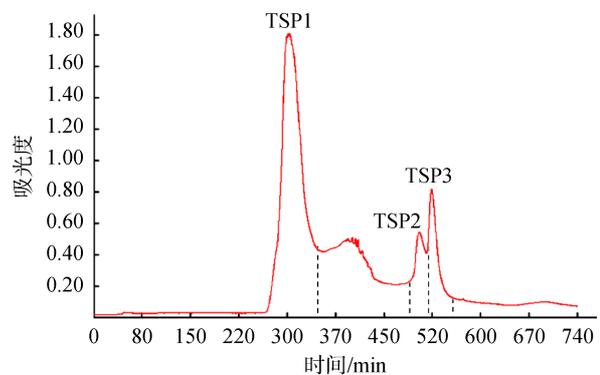


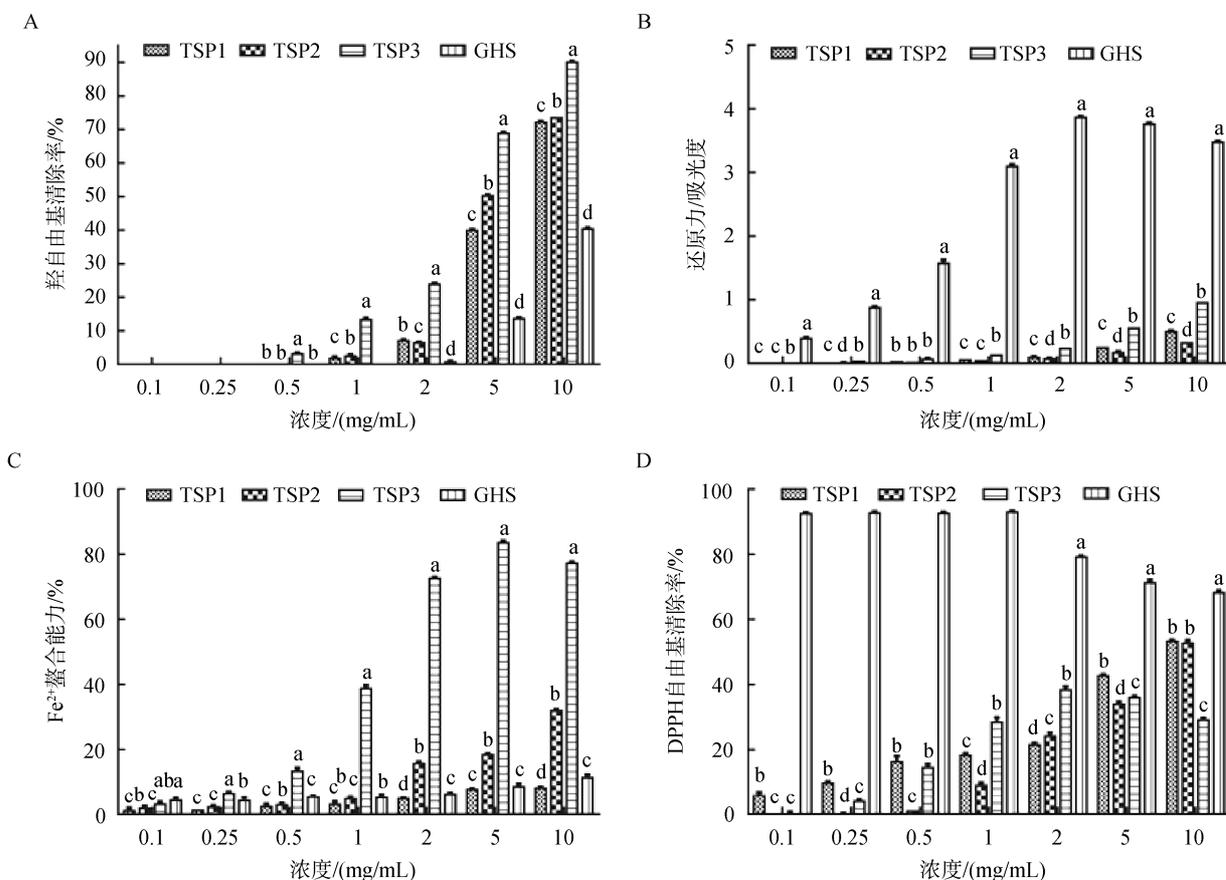
图3 胶原肽葡聚糖G-15凝胶层析图谱

Fig.3 Sephadex G-15 gel chromatography fractions of collagen peptides

将得到的 TSP1、TSP2、TSP3 分别进行体外抗氧化活性的测定,以同浓度下的谷胱甘肽作为阳性对照,结果如图 4 所示。由羟自由基清除能力的检测结果来看,除了 0.1、0.25、0.5 mg/mL 3 个浓度由于检测浓度水平太低而无法检测,其余浓度下 TSP1、TSP2 和 TSP3 的羟自由基清除能力都随着组分浓度的增加而不断增强,但各浓度下 TSP3 的羟自由基清除能力均明显强于 TSP1 和 TSP2 ( $P<0.05$ )。TSP1、TSP2 和 TSP3 对羟自由基清除率的半抑制浓度(inhibitant concentration 50,  $IC_{50}$ )分别为 0.79、0.75、0.50 mg/mL,且都小于 GSH 的  $IC_{50}$  (1.07 mg/mL),说明 3 个组分的羟自由基清除能力均强于谷胱甘肽。有数据表明,黄鳍金枪鱼皮混合胶原肽的  $IC_{50}$  为 0.39 mg/mL<sup>[7]</sup>, TSP1、TSP2 和 TSP3 的羟自由基清除能力与之相比均较差,但清除能力最强的 TSP3,已与 VC 的羟自由基清除能力接近 ( $IC_{50}$ : 0.53 mg/mL)<sup>[7]</sup>。还原力的检测是通过铁氰化钾测量

的样品的还原功率, 其中较高的吸光度表示较高的还原功率。结果表明, 3 个组分的还原力随着浓度的增加而不断增强, 说明 3 个组分均具有抗氧化能力。TSP1、TSP2 和 TSP3 还原力的  $IC_{50}$  分别为: 4.83、4.83、2.73 mg/mL, TSP3 的还原力明显强于 TSP1 和 TSP2 ( $P<0.05$ )。TSP1、TSP2 和 TSP3 的还原力都明显弱于 GSH ( $P<0.05$ ), 此结果与蔡路鸣等<sup>[35]</sup>对草鱼鱼皮还原力的研究结果相似, TSP3 的还原力与草鱼鱼皮酶解后分子量 $<3$  kDa 多肽还原力较为接近。此外, 3 个组分的还原力均强于鸡皮明胶抗氧化肽<sup>[34]</sup>, 但只有 TSP3 的还原力强于黄鳍金枪鱼皮混合胶原肽<sup>[7]</sup>, 可以推测出鱼类皮肤含有丰富的抗氧化胶原肽。亚铁离子螯合能力的检测结果与羟自由基清除率的检测结果相似, TSP1、TSP2 和 TSP3 亚铁离子螯合能力的  $IC_{50}$  分别为: 3.89、1.70、0.22 mg/mL。TSP3 的亚铁离子螯合能力明显强于 TSP1 和 TSP2 ( $P<0.05$ )。与还原力不同的是, 随着浓度的增大, TSP2 和 TSP3 的亚铁离子螯合能力明显强于谷胱甘肽( $P<0.05$ ), 而 TSP1 则和 GSH 的亚铁离子螯合能力相近。亚铁离子螯合能力的检测结果与 Mhd 等<sup>[35]</sup>的研究结果相似, 不同的是阳性对照不一样, 这可能是因为 GSH 的亚铁离子螯合能力

一般<sup>[21]</sup>。当 GSH 浓度为 10 mg/mL 时, 亚铁离子螯合率仅为 11.7%, 此结果虽低于胡晓赞<sup>[21]</sup>对 GSH 亚铁离子螯合能力的研究, 是因为检测方法的略有不同。3 个组分对 DPPH 自由基具有一定的清除能力, 但其清除能力都弱于谷胱甘肽。TSP1、TSP2 和 TSP3 对 DPPH 自由基清除率的  $IC_{50}$  分别为: 1.49、0.61、0.35 mg/mL, 其中清除能力最强的是 TSP3, 其大约能达到同浓度谷胱甘肽清除能力的 50%。3 个组分的 DPPH 自由基清除能力均明显强于鸡皮明胶抗氧化肽( $IC_{50}$ : 16.68 mg/mL)<sup>[34]</sup>, 但只有 TSP3 的  $IC_{50}$  比黄鳍金枪鱼皮混合胶原肽的  $IC_{50}$  (0.43 mg/mL)小<sup>[7]</sup>, 说明大菱鲆鱼皮酶解胶原肽在经过纯化后, DPPH 自由基清除能力有所增强。综合 4 种抗氧化实验指标来看, 抗氧化活性最好的是 TSP3, 其具有显著的体外抗氧化活性, 且抗氧化能力随着浓度的增大而增大, 且都强于已经报道的淡水草鱼鱼皮多肽<sup>[35]</sup>和家禽类鸡皮明胶<sup>[34]</sup>。此外, 对比黄鳍金枪鱼混合多肽<sup>[7]</sup>的研究发现, TSP3 的部分抗氧化能力与之相当或者更强。这说明大菱鲆鱼皮酶解分离得到的小分子组分 TSP3 是一种优秀的鱼类抗氧化胶原肽, 同时也说明分子量越小的组分, 其各项抗氧化能力也越强<sup>[8,36]</sup>。



注: 不同小写字母代表相同浓度下不同组分抗氧化活性的差异显著性( $P<0.05$ )。

图4 各组分的体外抗氧化活性检测( $n=3$ )

Fig.4 *In vitro* antioxidant activity of each component ( $n=3$ )

## 4 结 论

大菱鲆鱼皮通过中性蛋白酶酶解以及单因素和响应面实验,确定了酶解的最佳工艺条件为:酶解温度 52 °C,酶解时间为 338 min,加酶量为 1142 U/g, pH 值为 6.7,得到鱼皮酶解液羟自由基清除率为 34.44%。采用 G-15 葡聚糖凝胶层析对大菱鲆酶解混合胶原肽进行分离,得到 3 种不同分子量的肽段组分。通过分析发现它们在体外具有不同的抗氧化能力,低分子量的胶原肽段较其他肽段组分具有显著的抗氧化能力。最终得到抗氧化活性较强的组分 TSP3,其在羟自由基清除、亚铁离子螯合等方面能力卓越。此外,与已经报道的黄鳍金枪鱼混合多肽<sup>[7]</sup>、鸡皮明胶<sup>[34]</sup>和草鱼皮多肽<sup>[35]</sup>相比,TSP3 的部分抗氧化能力相当或者更为优秀。但对于其他抗氧化能力及其抗氧化机制的研究还需深入探索,以便使该抗氧化胶原肽的应用更加广泛。研究表明大菱鲆鱼皮是一种很好的活性抗氧化胶原肽来源,利用凝胶过滤技术能够分离得到活性更佳的组分,为大菱鲆及其他鱼类副产物的多肽高值化应用提供了技术参考。

## 参考文献

- [1] 贾冬英,王文贤,姚开,等. 胶原蛋白多肽功能特性的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(6): 21-24.  
Jia DY, Wang WX, Yao K, et al. Study on functional properties of collagen peptides [J]. Food Sci, 2001, 22(6): 21-24.
- [2] 李露园,王升帆,朱有贵,等. 酶法制备鲟鱼皮胶原蛋白多肽及其抗氧化活性研究[J]. 食品发酵与工业, 2019, 45(20): 138-143.  
Li LY, Wang SF, Zhu YG, et al. Enzymatic preparation and antioxidant activity of sturgeon skin collagen polypeptide [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(20): 138-143.
- [3] 董丽莎,李妍妍,张红燕,等. 黑线鳕鱼皮胶原蛋白胰蛋白酶酶解多肽对 UVB 诱导 HaCaT 光损伤的抑制作用[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 185-192.  
Dong LS, Li YY, Zhang HY, et al. Inhibitory effects of peptides derived from tryptic hydrolysate of skin collagen from *Melanogrammus aeglefinus* on UVB-induced photodamage in HaCaT cells [J]. Food Sci, 2018, 39(10): 185-192.
- [4] 廖涛,黄晨曦,江洪有,等. 响应面法优化鲟鱼皮胶原蛋白多肽的酶解工艺[J]. 食品科技, 2018, 43(1): 141-147.  
Liao T, Huang CX, Jiang HY, et al. Optimization extraction of enzyme soluble collagen peptides from sturgeon by response surface methodology [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(1): 141-147.
- [5] 成晓瑜,张顺亮,戚彪,等. 胶原与胶原蛋白多肽的结构功能及其应用研究现状[J]. 肉类研究, 2011, 25(12): 33-39.  
Cheng XY, Zhang SL, Qi B, et al. Current situation of research into the structures functions, and applications of collagen and collagen peptides [J]. Meat Res, 2011, 25(12): 33-39.
- [6] 何娟,程晓凤,罗永康,等. 鲑鱼皮抗氧化肽水解用酶的筛选研究[J]. 食品科技, 2017, (3): 135-140.  
He J, Cheng XF, Luo YK, et al. Screen of protease for preparing antioxidant peptides from silver carp skin [J]. Food Sci Technol, 2017, (3): 135-140.
- [7] 王雨生,冷云,陈海华,等. 黄鳍金枪鱼皮胶原肽酶解工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 72-78.  
Wang YS, Leng Y, Chen HH, et al. Studies on enzymolysis technology of collagen peptide and antioxidant activities from tuna skin [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2015, 15(2): 72-78.
- [8] 宋思佳,吕健,刘怀高,等. 鲑鱼鱼皮蛋白肽的制备与抗氧化活性评价[J]. 渔业现代化, 2017, 44(6): 37-42.  
Song SJ, Lv J, Liu HG, et al. Preparation of *Hypophthalmichthys molitrix* skin protein peptides and the evaluation of the antioxidant activity [J]. Fish Mod, 2017, 44(6): 37-42.
- [9] 王垚,傅新鑫,潘锦锋,等. 大菱鲆背部肌肉基本组成、质构及加工特性[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 64-69.  
Wang Y, Fu XX, Pan JF, et al. Chemical composition, texture and processing characteristics of dorsal and abdominal muscles of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Food Sci, 2015, 36(23): 64-69.
- [10] Jeronimo D, Cruz C, Saraiva A. Polycystic liver in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. J Fish Dis, 2011, 34(12): 937-938.
- [11] 杨俊峰. 大菱鲆鱼皮多肽液的制备及其抗运动疲劳作用[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(10): 98-102.  
Yang JF. Preparation and anti-exercise-fatigue activity of peptide liquid from *Scophthalmus maximus* fishskin [J]. Food Res Dev, 2017, 38(10): 98-102.
- [12] 王艳. 草鱼皮胶原蛋白的提取、性质研究及膜性能表征[D]. 天津: 天津科技大学, 2014.  
Wang Y. Extraction and properties of collagen from grass carp skins and characterization of films [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2014.
- [13] 黄爱妮,汪海波,李丽,等. 鲑鱼鱼皮中酶溶性胶原蛋白提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(16): 78-81.  
Huang AN, Wang HB, Li L, et al. Study on extraction of pepsin-soluble collagens from silver carp skin [J]. Food Res Dev, 2016, 37(16): 78-81.
- [14] 洪燕婷,汪少芸,黄茂坤,等. 食品源鱼皮明胶抗冻多肽的酶解工艺[J]. 通化师范学院学报, 2018, 39(2): 60-64.  
Hong YT, Wang SY, Huang MK, et al. Enzymatic hydrolysis of antifreeze peptides from food fish skin gelatin [J]. J Tonghua Norm Univ, 2018, 39(2): 60-64.
- [15] 赵新淮,冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, (11): 65-67.  
Zhao XH, Feng ZB. Determination of hydrolysis degree of protein hydrolysate [J]. Food Sci, 1994, (11): 65-67.
- [16] 史文军,万夕和,黎慧,等. 酶解异育银鲫制备不同分子量段抗氧化肽的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(23): 61-67.  
Shi WJ, Wan XH, Li H, et al. Study on the preparation of antioxidant peptide with different molecular weights from crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) meat enzymolysis [J]. Food Res Dev, 2017, 38(23): 61-67.
- [17] You LJ, Zhao MM, Liu RH, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by

- papain digestion [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(14): 7948–7953.
- [18] 王雪芹. 鲈鱼多肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究[D]. 青岛: 中国科学院大学, 2014.  
Wang XQ. Study on the antioxidant activity and antifatigue effect of mackerel peptides [D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences, 2014.
- [19] Bougateg A, Nedjar AN, Manni L, *et al.* Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins [J]. *Food Chem*, 2010, 118(3): 559–565.
- [20] 李云涛, 陈博, 马剑茵. 虾蛄肉酶法制备抗氧化肽的工艺优化和活性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 335–340.  
Li YT, Chen B, Ma JY, *et al.* Optimization for preparation of antioxidant peptide from orato-squilla oratoria meat by enzymatic hydrolysis [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sin*, 2014, 45(2): 335–340.
- [21] 胡晓赞. 小肽抗氧化性及协同作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.  
Hu XY. Antioxidant properties and synergistic effect of small peptides [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.
- [22] 陈孟, 杨会成, 周宇芳, 等. 响应面法优化鱼皮胶原蛋白多肽螯合锌工艺[J]. *中国酿造*, 2013, 32(6): 101–105.  
Chen M, Yang HC, Zhou YF, *et al.* Optimization of chelating process for skin collagen peptide and zinc by response surface methodology [J]. *China Brew*, 2013, 32(6): 101–105.
- [23] GB 5009.124-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定[S].  
GB 5009.124-2016 National food safety standard-Determination of amino acids in food [S].
- [24] 邹朝阳, 赵峰, 王志, 等. 大菱鲆不同部位营养与质构品质分析评价[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 186–195.  
Zou ZY, Zhao F, Wang Z, *et al.* Analysis and evaluation of nutrition and texture quality in different parts of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Prog Fish Sci*, 2019, 40(6): 186–195.
- [25] GB/T 22492-2008 大豆肽粉[S].  
GB/T 22492-2008 Soy peptides powder [S].
- [26] 白歌, 张国治, 芦鑫. 花生蛋白制备ACE抑制肽的初步分离纯化研究[J]. *河南工业大学学报*, 2016, (37): 26–30.  
Bai G, Zhang GZ, Lu X. Preliminary separation and purification of ACE inhibitory peptides prepared by peanut protein [J]. *J Henan Univ Technol*, 2016, (37): 26–30.
- [27] Tkaczewska J, Bukowski M, Mak P. Identification of antioxidant peptides in enzymatic hydrolysates of carp (*Cyprinus carpio*) skin gelatin [J/OL]. *Molecules*, [https://doi:10.3390/molecules24010097](https://doi.org/10.3390/molecules24010097).
- [28] Tan XY, Qi LB, Fan FJ, *et al.* Analysis of volatile compounds and nutritional properties of enzymatic hydrolysate of protein from cod bone [J]. *Food Chem*, 2018, (264): 350–357.
- [29] 李倩, 王茂剑, 张健, 等. 鲑鱼皮酶解工艺优化及肽段分析[J]. *食品科学*, 2013, 34(21): 198–203.  
Li Q, Wang MJ, Zhang J, *et al.* Optimized preparation and characterization of peptides from enzymatic hydrolysis of codfish skin [J]. *Food Sci*, 2013, 34(21): 198–203.
- [30] 公维洁, 卓先勤, 杭瑜瑜, 等. 响应面优化制备马面鱼皮胶原蛋白的预处理工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(3): 98–105, 135.  
Gong WJ, Zhuo XQ, Hang YY, *et al.* Optimization of pretreatment technology for collagen from *Navodon septentionalis* skin by response surface methodology [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(3): 98–105, 135.
- [31] 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 JW, Liang WW, Xiong SB, *et al.* Optimization of bienzymatic hydrolysis of silver carp skin for preparation of antioxidant peptides by response surface methodology [J]. *Food Ind*, 2018, 39(3): 157–161.
- [32] Fu WQ, Wang PX, Chen YY, *et al.* Preparation, primary structure and antifreeze activity of antifreeze peptides from *Scomberomorus niphonius* skin [J]. *LWT- Food Sc Technol*, 2019, (101): 670–677.
- [33] 程云辉, 曾知音, 郭建伟, 等. 抗氧化肽的酶法制备及其构效关系的研究进展[J]. *食品与机械*, 2009, 25(6): 174–180.  
Cheng YH, Zeng ZY, Guo JW, *et al.* Preparation and structure-activity relationship of antioxidant peptides [J]. *Food Mach*, 2009, 25(6): 174–180.
- [34] Mhd SN, Farah B, Howell NK. Purification and characterization of antioxidative peptides derived from chicken skin gelatin hydrolysate [J]. *Food Hydrocol*, 2018, (85): 311–320.
- [35] 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 LY, Leng LP, Li XX, *et al.* Evaluation of the *In vitro* antioxidant properties of different molecular weight peptide fractions from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(12): 58–64.
- [36] Jiang HP, Tong TZ, Sun JH, *et al.* Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate [J]. *Food Chem*, 2014, (154): 158–163.

(责任编辑: 满朝坤)

## 作者简介

王志, 硕士, 主要研究方向为食品工程与营养。

E-mail: 2435245202@qq.com

周德庆, 研究员, 主要研究方向为水产品加工利用与质量安全。

E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn