

三文鱼多肽对鱼糜制品品质的影响及其生物活性的研究

朱芷萱^{1,2}, 刘 波³, 韩玲钰^{1,2}, 蒙月月^{1,2}, 韩世英^{1,2}, 李金颖^{1,2},
崔美琪^{1,2}, 许 喆^{1,2*}, 李婷婷^{1,2*}

(1. 大连民族大学生命科学院, 大连 116600; 2. 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600;
3. 大连瑞驰企业集团有限公司, 大连 116039)

摘 要: **目的** 利用三文鱼加工废弃物制备多肽, 探究其对鱼糜品质的影响及其生物活性。 **方法** 以三文鱼头部、鱼骨以及其他副产物废弃料为原料, 通过胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶进行酶解制备多肽, 讨论并比较其对鱼糜品质的影响, 并从体外抗氧化活性以及促骨生成活性两个角度对其生物活性进行初步探究。 **结果** 三文鱼不同部位以及不同的酶所制备的多肽对鱼糜凝胶均具有改良作用, 其中, 鱼骨中性酶肽效果最显著, 提升了凝胶强度、持水性以及白度等指标, 降低蒸煮损失以及氧化变色, 且具备较好的体外抗氧化活性, 同时能够促进成骨细胞的增殖分化, 有效提高细胞碱性磷酸酶活性。 **结论** 三文鱼多肽对鱼糜品质具有改良作用, 并具有良好的抗氧化活性及成骨活性, 可为潜在抗骨质疏松活性肽的进一步开发利用提供理论基础。

关键词: 三文鱼多肽; 鱼糜凝胶; 鱼糜制品品质; 抗氧化活性; 成骨活性; 碱性磷酸酶活性

Study on the effect of salmon polypeptide on the quality of surimi products and its biological activity

ZHU Zhi-Xuan^{1,2}, LIU Bo³, HAN Ling-Yu^{1,2}, MENG Yue-Yue^{1,2}, HAN Shi-Ying^{1,2},
LI Jin-Ying^{1,2}, CUI Mei-Qi^{1,2}, XU Zhe^{1,2*}, LI Ting-Ting^{1,2*}

(1. College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 2. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, Dalian 116600, China; 3. Dalian Rich Enterprise Group Co., Ltd., Dalian 116039, China)

ABSTRACT: Objective To prepare peptides from salmon processing waste and investigate its effect on the quality of surimi and its biological activity. **Methods** The peptides were prepared by enzymatic digestion of salmon head, fish bone and other by-product waste materials with pepsin, trypsin and neutral protease, and their effects on the quality of surimi were discussed and compared, and their biological activities were initially investigated in terms of *in*

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0400601)、浙江省深蓝渔业资源高效开发利用重点实验室开放基金项目(SL2021004)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0400601), and the Open Fund Project of Zhejiang Province Key Laboratory of Efficient Exploitation and Utilization of Deep Blue Fishery Resources (SL2021004)

***通信作者:** 许 喆, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品蛋白肽营养与构效关系。E-mail: xuzhe@dlnu.edu.cn

李婷婷, 博士, 教授, 主要研究方向为食品产品贮藏加工及质量安全。E-mail: jwltt@dlnu.edu.cn

***Corresponding author:** XU Zhe, Ph.D, Lecturer, Dalian Minzu University, No.18, West Liaohe Road, Dalian 116600, China. E-mail: xuzhe@dlnu.edu.cn

LI Ting-Ting, Ph.D, Professor, Dalian Minzu University, No.18, West Liaohe Road, Dalian 116600, China. E-mail: jwltt@dlnu.edu.cn

vitro antioxidant activity and osteogenic activity. **Results** The peptides prepared from different parts of salmon and different enzymes could improve the gel of surimi, among which, the neutral enzyme peptide of fish bone had the most significant effect, which improved the gel strength, water-holding capacity and whiteness, reduced cooking loss and oxidative discoloration, and had good *in vitro* antioxidant activity, as well as could promote the proliferation and differentiation of osteoblasts and effectively increase the cellular alkaline phosphatase activity. **Conclusion** The salmon polypeptide can improve the quality of surimi and has good antioxidant and osteogenic activities, which can provide a theoretical basis for the further development and utilization of the potential anti-osteoporosis active peptide.

KEY WORDS: salmon polypeptide; surimi gel; surimi product quality; antioxidant activity; osteogenic activity; alkaline phosphatase activity

0 引言

鱼糜制品营养价值丰富、口感风味佳、脂肪含量低,是一类以冷冻或新鲜的鱼肉为原料,经漂洗、过滤、混合、搅拌、二段式加热制成的方便食品^[1]。鱼糜制品在我国现今的市场上呈现逐步增长的趋势^[2]。而由于加工过程中不可避免的氧化反应的发生,导致凝胶类制品口感与色泽欠佳,因此市场上通过使用不同的改良剂对鱼糜凝胶质地和结构进行改善^[3]。但传统的糖类改良剂存在着热量高、用量大以及附着甜味的缺点,因此寻找用量小、无异味且纯天然的改良添加剂已经成为目前的研究热点。

骨质疏松症患病率较高,患病时骨量和骨密度降低,进而易发生骨折,是一种全身性骨病^[4-5]。目前,许多内源性蛋白质的生物活性肽已被用作骨再生剂,来治疗骨折和骨质疏松症^[6-7]。此类生物活性肽副作用小、来源天然且可以长期服用,因此已成为预防骨质疏松的重要研究方向。

三文鱼在我国具有较高的市场份额且加工产业巨大,而三文鱼的鱼头、鱼骨以及其他副产物是加工过程中最常见的加工副产品,且未能得到进一步的精深加工而频繁被抛弃丢弃,造成了环境的污染和资源的浪费。三文鱼废弃料中蕴含丰富的胶原蛋白,是优良天然蛋白源^[8-9]。刘文颖等^[10]将三文鱼鱼骨废弃料回收利用,成功制备出了骨胶原低聚肽钙螯合物,为新型活性肽作为补钙剂的研究提供了一定的理论基础。董陈颖等^[11]利用三文鱼肽降低了小鼠血清尿素氮含量,证明其具有明显的抗疲劳作用,且有最适剂量,为三文鱼的开发提供了理论依据。因此从三文鱼废弃料中制备出能够改善鱼糜制品品质且具有生物活性的多肽,为新型抗骨质疏松营养强化剂的开发提供理论基础,对提高三文鱼废弃料综合利用价值具有十分重要的现实意义。目前,关于以三文鱼为原料制备的多肽,其抗炎肽、抗氧化肽、抗菌肽以及血管紧张素 I 转化酶抑制肽等均已有了较多的相关报道^[12-15],但对于其在成骨活性方面的研究并不丰富。因此,本研究分别以三文鱼鱼头、鱼骨以及鱼副产物为原料,采用胃蛋白酶、胰蛋白酶以及中性蛋白酶水解制备三文鱼多肽,探讨其对鱼糜品

质的影响,并探究其体外抗氧化活性以及 MC3T3-E1 细胞增殖、碱性磷酸酶活性,为三文鱼多肽的生物活性研究和综合开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三文鱼废弃料(大连开发区瑞驰集团);大黄鱼(大连开发区金玛农贸)。

胃蛋白酶(250 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)、中性蛋白酶(50 U/mg)(北京索莱宝科技有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)粉末、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS](分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);维生素 E (vitamin E, VE)(分析纯,上海源叶生物科技有限公司);氯化钠、邻菲罗啉(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)粉末(分析纯,上海碧云天生物技术有限公司);0.45 μm 微孔滤膜(美国默克集团);前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞(中国科学院细胞库); α -MEM 培养基(美国 Hyclone 公司);四甲基偶氮唑盐 MTT、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(分析纯,美国 Sigma 公司)。

1.2 仪器与设备

202-00A 恒温烘干箱(青岛聚创环保集团有限公司);MP1100B 电子天平(精度 0.1 mg, 上海奥豪斯仪器有限公司);FD-1A-50 真空冷的干燥机(北京博医康仪器有限公司);ESB-500X 高剪切均质机(上海易勒机电设备有限公司);PHS-3E 酸度计(上海仪电科学仪器有限公司);DF101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);TA.XT.PLUS 质构仪(英国 Stale Micro Syst 公司);H-1850R 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Ci7600 色度仪(上海爱色丽色彩科技有限公司);Synergy H1 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 三文鱼多肽的酶解制备

(1)三文鱼废弃料的预处理

将鱼头、鱼骨及鱼皮和内脏等副产物于常温状态下解冻,去除残余的鱼肉后于121℃左右高压蒸煮40 min,在85℃恒温烘干箱中烘干48 h,取出冷却后分别用组织粉碎机进行粉碎,将粉碎得到的粉末分别进行除杂蛋白处理,以1:5的料液比例加入5% (*m*:*V*)氯化钠溶液,放入25℃电热恒温水浴锅中磁力搅拌6 h,每小时更换一次浴液,过滤后仔细清洗,再放入85℃恒温干燥箱中干燥48 h,分别得到鱼头、鱼骨、鱼副产物粉末,-18℃冷藏备用。

(2)三文鱼多肽的制备

参考黎重阳^[16]的方法,分别将鱼头、鱼骨及鱼副产物粉以1:5的料液比加入去离子水,并分别加4% (*m*:*V*)的胃蛋白酶、胰蛋白酶或中性蛋白酶,分别将胃蛋白酶混合液调至pH 2、40℃水浴,胰蛋白酶混合液调至pH 8、45℃水浴,中性蛋白酶混合液调至pH 7、50℃水浴。所有混合液均准确反应4 h后取立即取出,灭酶后(煮沸10 min),离心15 min (6000 r/min),其上清液过0.45 μm微孔滤膜,滤液于真空冷冻干燥机中冻干12 h后分别得到三文鱼鱼头多肽粉、三文鱼鱼骨多肽粉以及三文鱼副产物多肽粉。

1.3.2 三文鱼多肽对鱼糜品质的影响

(1)鱼糜凝胶的制备

大黄鱼去头、骨、鳞及皮,充分洗净后取肉,用5倍体积蒸馏水漂洗(20 min,反复两次),再用0.25% NaCl溶液漂洗20 min后过滤,取一定质量漂洗后鱼肉50 g,加入鱼肉质量3%的食盐后分别加入鱼糜质量分数4%的三文鱼鱼骨、鱼头以及鱼副产物多肽^[17],放入搅拌机混合添加冰块搅拌2 min(温度需控制在4~10℃),随后采用二段式加热(45℃加热20 min,90℃加热30 min),冷却后得到鱼糜凝胶样品,以未添加多肽的为对照组。

(2)对凝胶强度的影响

首先将鱼糜凝胶样品切成各边长度均为25 mm,再使用质构仪测定其强度。探头型号为P/5S;测前、测中和测后速度均为1 mm/s;压缩形变50%;触发力为15 g,每组重复3次。凝胶强度=破断力×破断距离。

(3)对质构特性的影响

采用P/50探头;测前、测中、测后速度均为1 mm/s;位移2 mm;触发力为5 g。

(4)对蒸煮损失率的影响

凝胶样品制备成10 mm×10 mm×20 mm的长方体,轻轻拭干表面水分后第一次称重,重量计为M1,于蒸煮袋中密封。90℃恒温水浴20 min,即时取出(保证每一个样凝胶品受热均匀,控制受热时间一致),将所得的凝胶样品表面水分擦拭干净后,再次对样品进行精确称重,重量计为M2。每组凝胶样品平行测定次数为3次。

(5)对持水性的影响

取一定量的凝胶样品准确称重W1,用三层规格一样的滤纸包裹样品后放入到50 mL的离心管中(注意包裹时不要让样品从滤纸中漏出来,以免离心过程中样品黏到离心管上,减少样品质量),在高速冷冻离心机中4℃离心10 min (3000 r/min)。擦干凝胶多余的水分并称重记为W2。每组样品平行测定3次。

(6)对色差的影响

使用色差仪测定,将凝胶样品完全覆盖在测试孔上,记录仪器上显示的 L^* 、 a^* 、 b^* 并重复3次。

1.3.3 三文鱼多肽的体外抗氧化活性

分别测定各多肽的DPPH自由基清除率、羟基自由基清除率和ABTS阴离子自由基清除率,测定方法均参考宋雪梅^[18]的研究略有修改,其中所有样品质量浓度均配制为1 mg/mL。

1.3.4 三文鱼多肽的促骨生成活性

(1)对成骨细胞活力的影响

使用MTT比色法测量了3种多肽对MC3T3-E1细胞增殖的影响,具体实验步骤参考XU等^[19]的研究。

(2)对碱性磷酸酶活性的影响

磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活力的测定为成骨细胞的分化产生的ALP活力,参考XU等^[19]的方法进行实验^[20-21]。

1.3.5 数据处理

所有数据均采用Origin 2021作图,SPSS 26.0对数据进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA),以 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 三文鱼多肽对鱼糜品质的影响

2.1.1 对凝胶强度的影响

凝胶强度可以用破断力和破断距离的乘积表示,凝胶强度的大小决定鱼糜的品质,且这两者呈正比关系^[22],是评判鱼糜品质的重要指标之一。如图1所示,与对照组相比(空白对照组的鱼糜凝胶与添加不同酶解多肽组的鱼糜凝胶在水分含量和蛋白含量上一致),加入不同三文鱼多肽对鱼糜凝胶的凝胶强度均有不同程度的提升,整体上,鱼骨部位所得多肽效果最为显著($P<0.05$),而以不同酶制备的鱼骨多肽中,由中性蛋白酶肽所制备的多肽对凝胶强度的提升最高。初步说明三文鱼鱼骨中性酶肽对鱼糜凝胶的改善效果较好。

2.1.2 对质构特性的影响

质构特性是反映鱼糜凝胶品质的一个重要指标^[23]。如表1所示,与对照组相比,三文鱼多肽的添加对鱼糜凝胶硬度、弹性、黏聚性、胶着度、咀嚼度和回复性整体具有提升作用。整体上,鱼骨部位所得多肽效果最为显著,而以不同酶制备的鱼骨多肽中,由中性蛋白酶肽所制备的多肽对凝

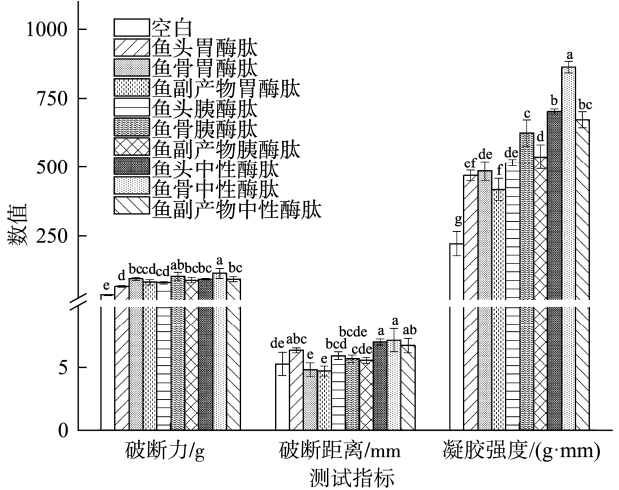
胶强度的提升最高。该结果可能是由于鱼骨中释放出的 Ca^{2+} 催化内源性转谷酰胺酶, 促进蛋白质分子间共价键的形成, 呈现出较好的蛋白网络结构, 鱼骨中性酶肽被凝胶的网格结构所包围^[24], 因此硬度、咀嚼度和回复性等都有所提高。

2.1.3 对蒸煮损失率的影响

蒸煮损失是鱼糜凝胶中水分、油脂等易损失物质蒸煮过程中减少的含量与其总重量的比例, 能够反映鱼糜凝胶的品质^[25]。如图 2 所示, 未经处理的鱼糜凝胶蒸煮损失较高, 而不同三文鱼多肽的添加对其均有显著改善作用。其中, 鱼骨中性酶肽对其改善效果最佳, 与凝胶强度以及质构特性结果一致。

2.1.4 对持水性的影响

持水性可以直接反映鱼糜制品的品质, 持水能力越强, 鱼糜制品品质越好^[26]。如图 3 所示, 未经任何处理的鱼糜凝胶持水性最差, 而三文鱼多肽的添加均有显著改善作用。其中, 效果最显著的是三文鱼鱼骨中性酶肽, 说明其对鱼糜凝胶的品质有良好的改善。



注: 在显著性标记中, 字母从 a~f 代表数值从大到小, 字母不同代表有显著性差异($P<0.05$), 下同。

图 1 不同三文鱼多肽对鱼糜凝胶强度的影响($n=3$)
Fig.1 Effects of different salmon peptides on the gel strength of surimi gel ($n=3$)

表 1 不同三文鱼多肽对鱼糜凝胶质构特性的影响($n=3$)

Table 1 Effects of different salmon polypeptides on the texture properties of surimi gel ($n=3$)

三文鱼多肽	硬度/g	弹性/mm	黏聚性/(g·sec)	胶着度/g	咀嚼度/mJ	回复性/mm
对照	36.91±4.31 ^c	0.88±0.04 ^b	0.36±0.03 ^c	16.82±1.07 ^{cde}	14.88±1.54 ^{cd}	0.12±0.01 ^c
鱼头胃酶肽	47.77±3.85 ^d	0.85±0.04 ^b	0.35±0.03 ^c	13.21±1.16 ^e	11.76±0.70 ^d	0.17±0.02 ^b
鱼骨胃酶肽	68.14±1.38 ^c	0.94±0.01 ^a	0.38±0.04 ^c	18.53±3.51 ^{cde}	16.09±4.44 ^{bcd}	0.18±0.02 ^b
鱼副产物胃酶肽	48.17±1.58 ^d	0.95±0.03 ^a	0.35±0.02 ^c	17.80±2.55 ^{cde}	15.63±2.93 ^{cd}	0.18±0.03 ^b
鱼头胰酶肽	70.23±8.07 ^c	0.95±0.01 ^a	0.38±0.05 ^c	15.96±2.73 ^{de}	17.93±1.93 ^{abc}	0.17±0.01 ^b
鱼骨胰酶肽	83.89±2.67 ^b	0.96±0.03 ^a	0.45±0.03 ^{ab}	21.70±3.97 ^{abc}	20.06±2.51 ^{abc}	0.20±0.03 ^b
鱼副产物胰酶肽	55.60±3.88 ^d	0.96±0.02 ^a	0.37±0.02 ^c	19.36±2.91 ^{cd}	16.24±3.34 ^{bcd}	0.18±0.02 ^b
鱼头中性酶肽	84.49±2.32 ^b	0.98±0.01 ^a	0.37±0.04 ^c	27.09±0.38 ^a	21.52±2.94 ^{ab}	0.20±0.02 ^b
鱼骨中性酶肽	128.97±6.29 ^a	0.97±0.01 ^a	0.51±0.01 ^a	26.24±5.05 ^{ab}	22.21±2.64 ^a	0.27±0.02 ^a
鱼副产物中性酶肽	69.92±5.87 ^c	0.97±0.01 ^a	0.40±0.05 ^{bc}	21.23±1.27 ^{bcd}	17.83±2.73 ^{abc}	0.12±0.01 ^b

注: 在显著性标记中, 每列的字母从 a~e 代表数值从大到小, 字母不同代表有显著性差异($P<0.05$), 下同。

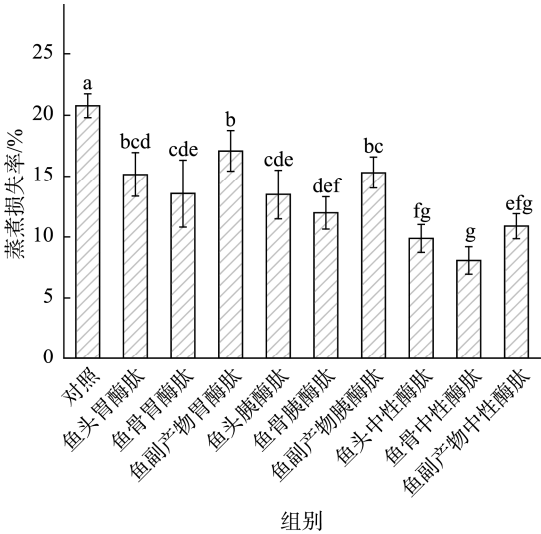


图 2 不同三文鱼多肽对鱼糜凝胶蒸煮损失率的影响($n=3$)
Fig.2 Effects of different salmon peptides on cooking loss rates of surimi gel ($n=3$)

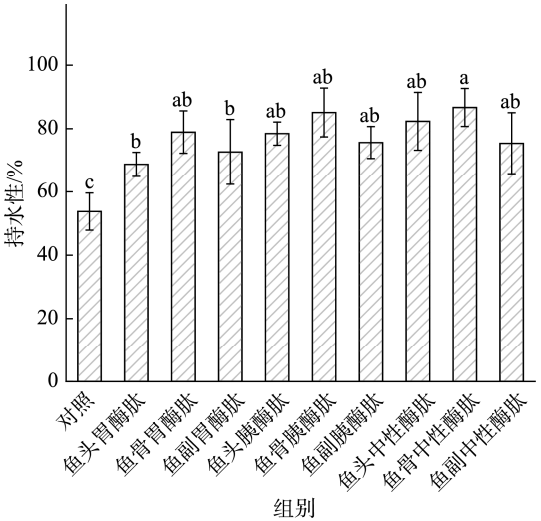


图 3 不同三文鱼多肽对鱼糜凝胶持水力的影响($n=3$)
Fig.3 Effects of different salmon peptides on the water holding capacities of surimi gel ($n=3$)

2.1.5 对色差的影响

肉品的色泽是影响顾客选购的一个主要因素, 在冷冻解冻时, 肉类的颜色会因一系列的反应如蛋白质的氧化和色素的分解而改变^[27]。由表 2 可知, 经过三文鱼多肽处理后的鱼肉 L^* 明显高于对照组, 说明经三文鱼多肽混合搅拌处理后, 所制备出的鱼糜凝胶色泽亮度增加, 相较于对照组, 经三文鱼多肽处理后的鱼肉 a^* 提高, b^* 降低, 说明在凝胶制备过程中色素降解以及脂肪氧化程度小, 因此, 多肽的添加对保持鱼糜凝胶色泽具有较好的效果, 其中, 三文鱼鱼骨中性酶肽效果最佳。

表 2 不同三文鱼多肽对鱼糜凝胶色差的影响($n=3$)
Table 2 Effects of different salmon polypeptides on the color of surimi gel ($n=3$)

三文鱼多肽	L^*	a^*	b^*
对照	72.54±3.24 ^e	1.41±0.11 ^d	13.05±2.67 ^a
鱼头胃酶肽	80.57±2.20 ^d	1.64±0.12 ^{bcd}	10.04±0.40 ^{cde}
鱼骨胃酶肽	81.36±1.29 ^{cd}	1.79±0.12 ^{ab}	10.97±0.42 ^{abc}
鱼副产物胃酶肽	81.69±0.79 ^{cd}	1.53±0.15 ^{cd}	12.31±0.72 ^{ab}
鱼头胰酶肽	84.52±0.52 ^{bc}	1.72±0.15 ^{bc}	10.27±0.27 ^{bcd}
鱼骨胰酶肽	83.87±1.32 ^{bcd}	1.87±0.02 ^{ab}	10.32±1.55 ^{bcd}
鱼副产物胰酶肽	83.21±2.81 ^{cd}	1.64±0.07 ^{bcd}	10.75±0.85 ^{bcd}
鱼头中性酶肽	87.34±0.09 ^{ab}	1.84±0.03 ^{ab}	8.75±0.08 ^{de}
鱼骨中性酶肽	88.73±1.32 ^a	1.99±0.19 ^a	8.05±0.26 ^c
鱼副产物中性酶肽	86.90±0.24 ^{ab}	1.80±0.11 ^{ab}	9.25±0.25 ^{cde}

2.2 三文鱼多肽的体外抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除率

在 517 nm 时, DPPH 的吸光值最高, 能够消除其他的游离基, DPPH 与具有供氢的抗氧化剂结合, DPPH 与 DPPH 的单电子成对, 吸收值下降, 对应的颜色从紫色到淡到无色^[28]。以 VE 作为阳性对照(X_1), 得到 VE 对 DPPH 自由基清除率(Y_1)的标准曲线, 线性拟合方程为 $Y_1=0.233X_1+2.3883$, $r^2=0.9914$ 。不同三文鱼多肽清除 DPPH 自由基能力如图 4 所示。其中, DPPH 自由基清除率最高的为鱼骨中性酶肽, 1 mg/mL 鱼骨中性酶肽的 DPPH 自由基清除率达 50.41%。

2.2.2 ABTS 阴离子自由基清除率

ABTS 是一种利用 ABTS 作显色剂的方法, 它可以评价各种抗氧化物溶液的抗氧化能力^[29]。以 VE 作为阳性对照(X_2), 得到 VE 对 ABTS 阴离子自由基清除率(Y_2)的标准曲线, 线性拟合方程为 $Y_2=0.965X_2+1.2366$, $r^2=0.9973$ 。图 5 显示了不同三文鱼多肽对 ABTS 自由基的清除作用。所有三文鱼多肽具备良好的 ABTS 自由基清除能力。其中, 清除率最为显著的是鱼骨中性酶肽, 在质量浓度为 1 mg/mL 时, 其 ABTS 清除率为 52.07%。

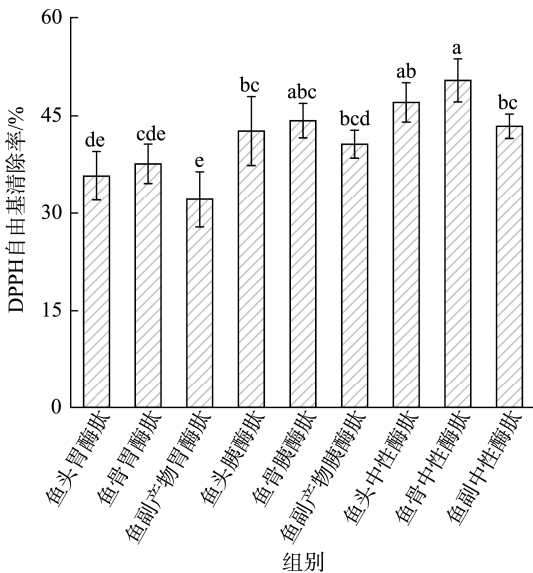


图 4 DPPH 自由基清除率($n=3$)

Fig.4 DPPH radical scavenging rate ($n=3$)

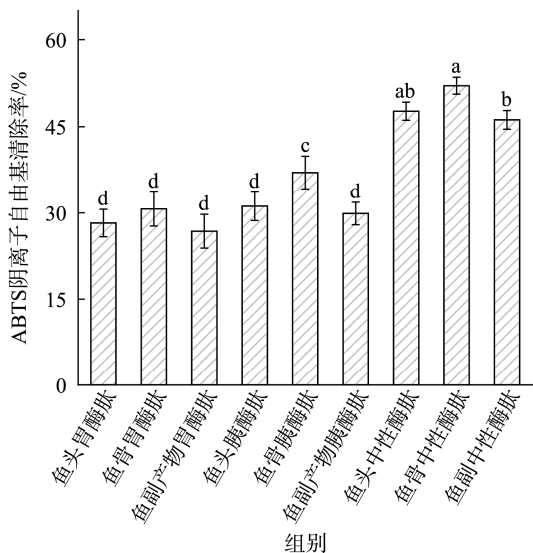


图 5 ABTS 阴离子自由基清除率($n=3$)

Fig.5 ABTS anion radical scavenging rate ($n=3$)

2.2.3 羟基自由基清除率

用 H_2O_2 作氧化剂, 与 Fe^{2+} 进行氧化, 得到 $\cdot OH$, 加入指示剂后, 吸收率下降, 可以捕获 $\cdot OH$ 产生有色物质^[30]。以 VE 作为阳性对照(X_3), 得到 VE 对羟基自由基清除率(Y_3)标准曲线, 线性拟合方程为 $Y_3=0.979X_3+2.1674$, $r^2=0.9977$ 。如图 6 所示, 由中性酶肽制备的三文鱼多肽的羟基自由基清除率整体上较高, 且 1 mg/mL 鱼骨中性酶肽的自由基清除率可达 76.23%, 为其中最高。该结果与上述两种方法所得结果一致。

通过体外抗氧化活性的测定可以得出, 本研究所制备的 9 种三文鱼多肽均具备良好的抗氧化活性, 总体来讲, 由中性蛋白酶酶解的多肽具有更强的抗氧化活性, 而鱼骨部位所制备的多肽抗氧化活性均高于鱼头及副产物。该结

果与对鱼糜品质的影响结果一致,原因可能是在鱼糜凝胶的制作过程中不可避免地会氧化变质,而三文鱼多肽所具有的良好抗氧化能力对鱼糜凝胶产生保护作用,使其品质明显优于未经处理的鱼糜凝胶,产生了一定的正面影响以及改善作用。

2.3 三文鱼多肽的促骨生成活性

2.3.1 对成骨细胞活力的影响

MC3T3-E1 成骨细胞株常作为细胞模型用于骨代谢的相关研究^[31-33]。如图 7 所示,实验组的细胞活力整体效果显著优于对照组。其中以鱼骨中性酶肽显示出了更好的促骨生成活性,可能是由于其本原料身就来源于骨。初步说明三文鱼多肽具有促骨生成活性,其中以鱼骨多肽为最佳。

2.3.2 对 ALP 活性的影响

ALP 常作为成骨细胞分化的标志^[34-38]。如图 8 所示,随着多肽浓度的增加以及处理时间的增长,ALP 活性均有一定程度的显著提升,且整体效果显著优于对照组。鱼骨中性酶肽显示出了更好的 ALP 活性,与成骨细胞活力结果一致。该实验结果也表明三文鱼鱼骨中性酶

肽具有进一步开发作为预防骨质疏松症功能性食品基料的潜力。

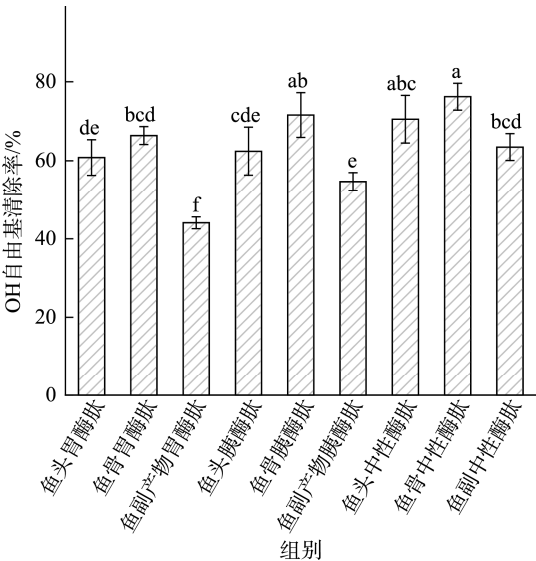
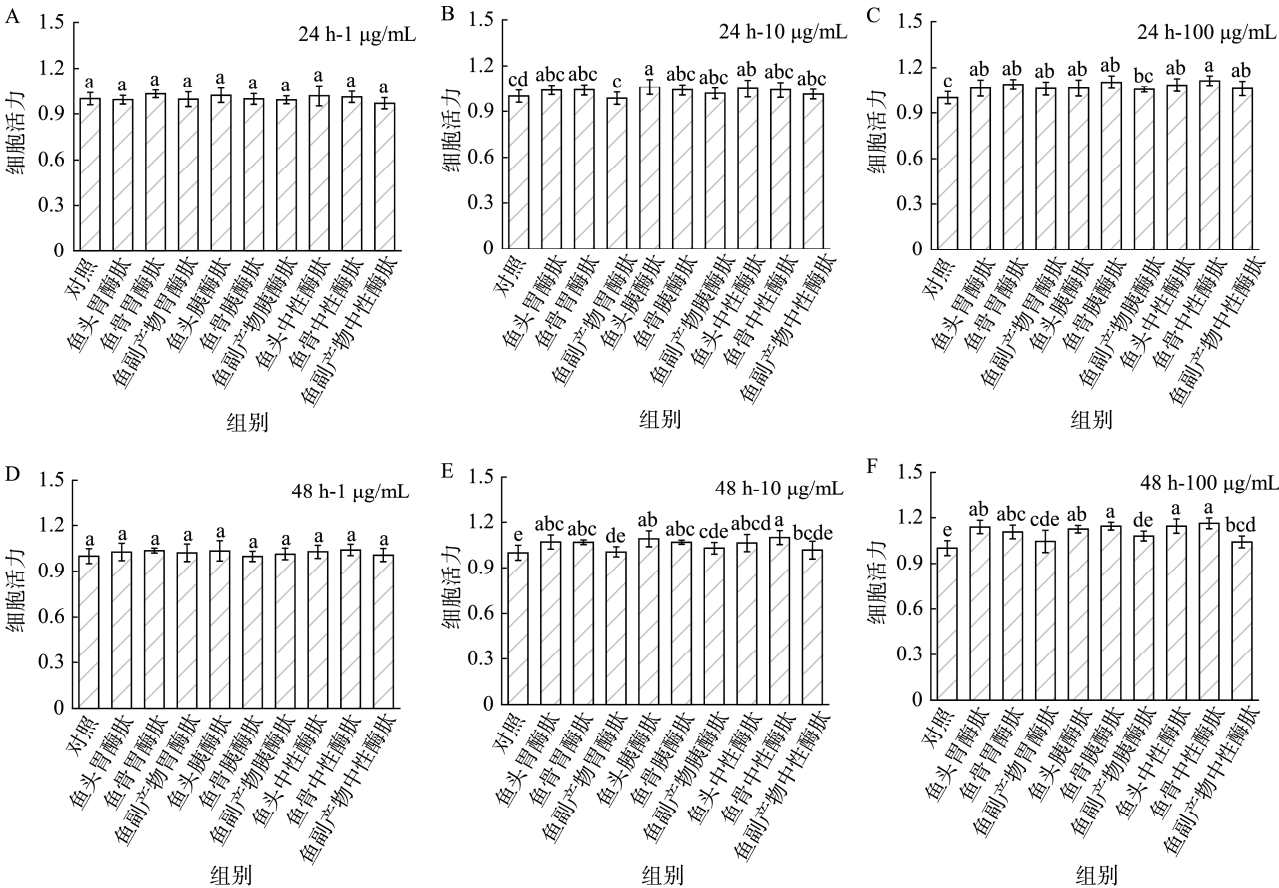


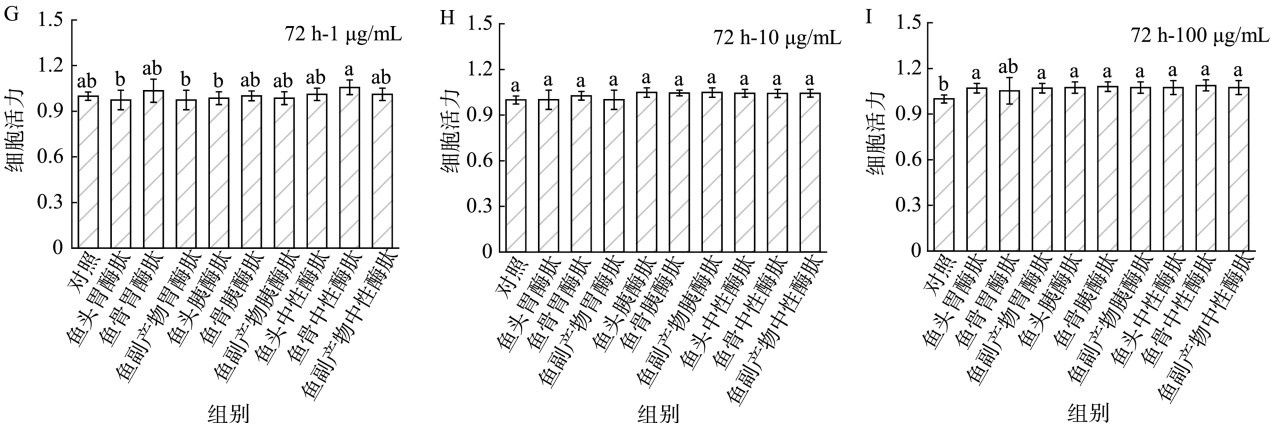
图 6 OH 自由基清除率(n=3)
Fig.6 OH radical scavenging rate (n=3)



注: A、B、C 分别为 1、10 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 24 h 内的细胞活力; D、E、F 分别为 1、10 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 48 h 内的细胞活力; G、H、I 分别为 1、10 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 72 h 内的细胞活力。

图 7 三文鱼多肽对成骨细胞活力的影响(n=6)

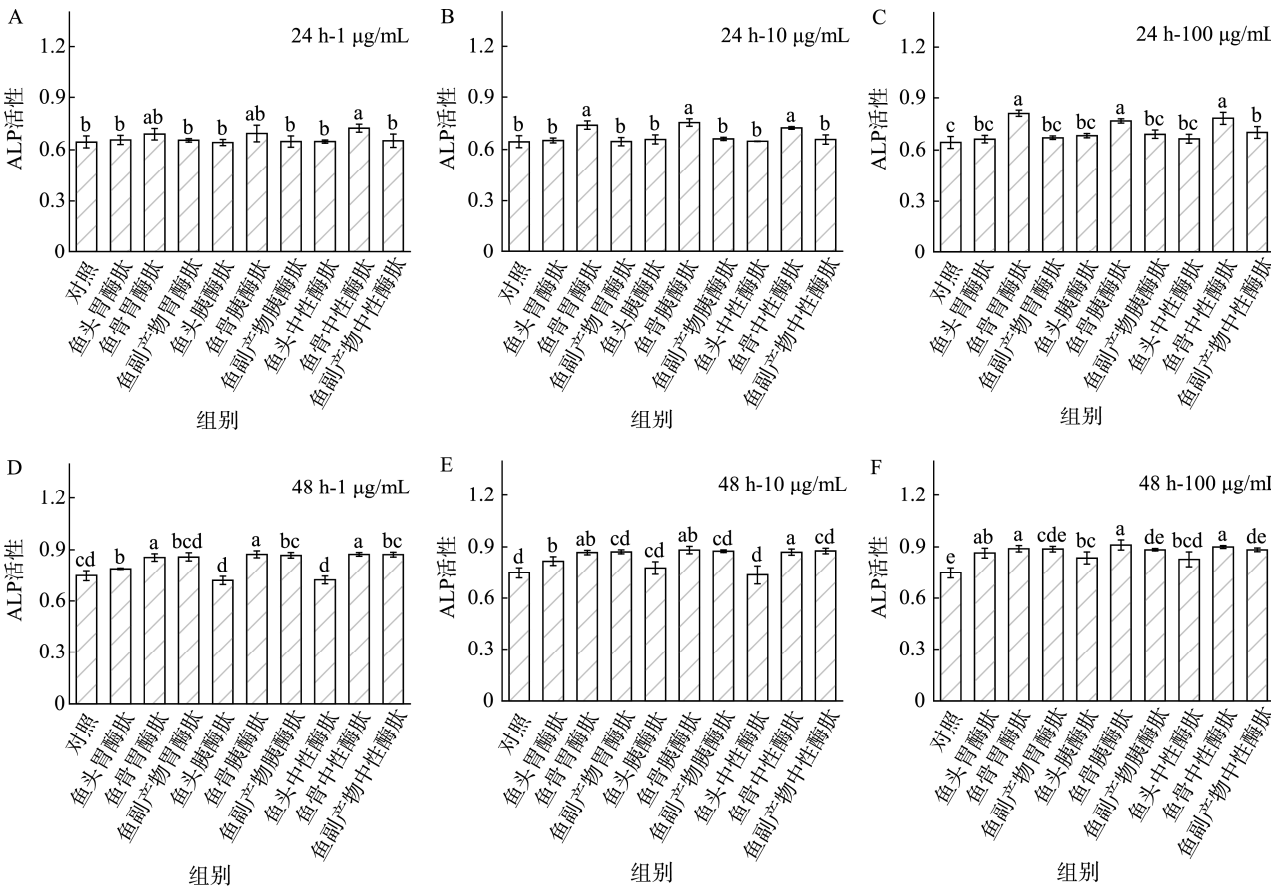
Fig.7 Effects of salmon polypeptides on the viabilities of osteoblasts (n=6)



注: A、B、C 分别为 1、10 和 100 µg/mL 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 24 h 内的细胞活力; D、E、F 分别为 1、10 和 100 µg/mL 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 48 h 内的细胞活力; G、H、I 分别为 1、10 和 100 µg/mL 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 72 h 内的细胞活力。

图 7(续) 三文鱼多肽对成骨细胞活力的影响(n=6)

Fig.7 Effects of salmon polypeptides on the viabilities of osteoblasts (n=6)



注: A、B、C 分别为 1、10 和 100 µg/mL 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 24 h 内的 ALP 活性; D、E、F 分别为 1、10 和 100 µg/mL 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 48 h 内的 ALP 活性; G、H、I 分别为 1、10 和 100 µg/mL 的三文鱼多肽处理后成骨细胞 72 h 内的 ALP 活性。

图 8 三文鱼多肽对 ALP 活性的影响(n=3)

Fig.8 Effects of salmon polypeptides on the activities of ALP (n=3)

- pressurized liquid extraction (PLE) [J]. Mar Drugs, 2021, 19(6): 323.
- [14] MCGRATH L, O'KEEFFE J, SLATTERY O. Antimicrobial peptide gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*) seven days post-challenge with *Neoparamoeba perurans* [J]. Dev Comp Immunol, 2022, 127: 104287.
- [15] SAISAVOEY T, SANGTANOO P, REAMTONG O, *et al.* Free radical scavenging and anti-inflammatory potential of a protein hydrolysate derived from salmon bones on RAW 264.7 macrophage cells [J]. J Sci Food Agric, 2019, 99(11): 5112–5121.
- [16] 黎重阳. 金枪鱼鱼皮和鱼骨胶原蛋白肽抗皮肤光老化活性及作用机制差异[D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- LI CY. Differences of anti-skinphotoaging activity and mechanism of tuna skin and bone collagen peptides [D]. Chongqing: Southwest University, 2021.
- [17] 张龙腾, 洪惠, 罗永康, 等. 鱼糜副产物酶解物对冻融鲑鱼鱼糜品质的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(10): 1–7.
- ZHANG LT, HONG H, LUO YK, *et al.* Effect of addition of hydrolysates derived from surimi processing byproducts on quality changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi after multiple freeze-thaw cycles [J]. Meat Res, 2019, 33(10): 1–7.
- [18] 宋雪梅. 玉米源肽对肝细胞酒精性损伤的保护作用[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- SONG XM. Protective effects of maize-derived peptides on alcoholic injury in hepatocytes [D]. Changchun: Jilin University, 2018.
- [19] XU Z, ZHU Z, CHEN H, *et al.* Application of a mytilus edulis-derived promoting calcium absorption peptide in calcium phosphate cements for bone [J]. Biomaterials, 2022, 282: 121390.
- [20] KAKITA A, SUZUKI A, ONO Y, *et al.* Possible involvement of p38 MAP kinase in prostaglandin E1-induced ALP activity in osteoblast-like cells [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004, 70(5): 469–474.
- [21] HSU CW, LIU S, HSU E, *et al.* Inhibition of rhBMP-2-induced ALP activity by intracellular delivery of SMURF1 in murine calvarial preosteoblast cells [J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(11): 4037–4043.
- [22] HUANG Q, HUANG X, LIU L, *et al.* Nano eggshell calcium enhanced gel properties of *Nemipterus virgatus* surimi sausage: Gel strength, water retention and microstructure [J]. Int J Food Sci Technol, 2021, 56(11): 5738–5752.
- [23] LI TT, LI JR, HU WZ, *et al.* Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives [J]. Food Chem, 2013, 138(2/3): 821–826.
- [24] 纪蓉, 顾伟钢, 张进杰, 等. 鱼糜凝胶劣化现象相关蛋白水解酶[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(1): 143–148.
- JI R, GU WG, ZHANG JJ, *et al.* Proteinases Involved in the modori phenomena of surimi [J]. Lett Biotechnol, 2011, 22(1): 143–148.
- [25] DONG X, HUANG Y, PAN Y, *et al.* Investigation of sweet potato starch as a structural enhancer for three-dimensional printing of *Scomberomorus niphonius* surimi [J]. J Texture Stud, 2019, 50(4): 316–324.
- [26] LIU C, LI W, LIN B, *et al.* Comprehensive analysis of ozone water rinsing on the water-holding capacity of grass carp surimi gel [J]. LWT-Food Sci Technol, 2021, 150: 111919.
- [27] LIANG F, LIN L, ZHU Y, *et al.* Comparative study between surimi gel and surimi/crabmeat mixed gel on nutritional properties, flavor characteristics, color, and texture [J]. J Aquat Food Prod Technol, 2020, 29(7): 681–692.
- [28] 谢娟平, 靳文娟, 张佳莹. 虎儿金植物有机硒、无机硒及 VC 体外抗氧化活性研究[J]. 陕西农业科学, 2020, 66(8): 49–51.
- XIE JP, JIN WJ, ZHANG JY. *In vitro* antioxidant activity of organic selenium, inorganic selenium and VC from Huerjin plant [J]. Shaanxi J Agric Sci, 2020, 66(8): 49–51.
- [29] SRIDHAR K, CHARLES AL. *In vitro* antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC₅₀ using advanced statistical programs [J]. Food Chem, 2019, 275: 41–49.
- [30] NWACHUKWU ID, ALUKO RE. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides [J]. J Food Biochem, 2019, 43(1): e12761.
- [31] LU RJ, XING HL, LIU CJ, *et al.* Antibacterial peptides inhibit MC3T3-E1 cells apoptosis induced by TNF- α through p38 MAPK pathway [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(15): 943.
- [32] PON-ON W, SUNTORNSARATOON P, CHAROENPHANDHU N, *et al.* Synthesis and investigations of mineral ions-loaded apatite from fish scale and PLA/chitosan composite for bone scaffolds [J]. Mater Lett, 2018, 221: 143–146.
- [33] 张兵, 朱亚辉, 王孝玉, 等. 酸枣仁皂苷 A 对小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(6): 824–828, 833.
- ZHANG B, ZHU YH, WANG XY, *et al.* Effects of sour jujube saponin A on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts in mice [J]. Med Jwest China, 2022, 34(6): 824–828, 833.
- [34] 兰倩, 辜仰聪, 肖欣, 等. 人牙周膜干细胞来源分泌体干预成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖和分化[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(1): 54–58.
- LAN Q, GU YC, XIAO X, *et al.* Human periodontal stem cell-derived exosomes intervene in the proliferation and differentiation of osteoblasts MC3T3-E1 [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(1): 54–58.
- [35] HOSSEINI S, NADERI-MANESH H, VALI H, *et al.* Contribution of osteocalcin-mimetic peptide enhances osteogenic activity and extracellular matrix mineralization of human osteoblast-like cells [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 173: 662–671.
- [36] 翟鑫祥, 董辉, 王晶, 等. 黄芪多糖保护去卵巢大鼠成骨细胞功能活性的机制研究[J]. 天津医药, 2022, 50(3): 265–269.
- ZHAI XX, DONG H, WANG J, *et al.* Study on the mechanism of astragalus polysaccharide protecting the functional activity of osteoblasts in de-ovulated rats [J]. Tianjin Med J, 2022, 50(3): 265–269.
- [37] 孙勃, 刘士波, 王培, 等. 细菌脂多糖通过 MAPK/ERK1/2 信号通路影响成骨细胞活性和凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(7): 799–803.
- SUN B, LIU SB, WANG P, *et al.* Bacterial lipopolysaccharide affects osteoblast activity and apoptosis via MAPK/ERK1/2 signaling pathway [J]. Chin Jimmunol, 2020, 36(7): 799–803.
- [38] YANG M, XU Z, WU D, *et al.* Characterizations and the mechanism underlying osteogenic activity of peptides from enzymatic hydrolysates of *Stichopus japonicus* [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(51): 15611–15623.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



朱芷萱, 硕士研究生, 主要研究方向为食品生物工程。

E-mail: zzz_0727@126.com



许 喆, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品蛋白肽营养与构效关系。

E-mail: xuzhe@dlnu.edu.cn



李婷婷, 博士, 教授, 主要研究方向为食品产品贮藏加工及质量安全。

E-mail: jwlitt@dlnu.edu.cn