

鳕鱼骨胶原蛋白肽的抗氧化活性

赵玲¹, 李亚^{2,3}, 刘淇^{*1}, 曹荣¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 山东永康食品有限公司, 山东 烟台 264006;

3. 烟台嘉惠海洋生物科技有限公司, 山东 烟台 264006)

摘要: 以鳕鱼骨为原料, 采用热水提取法提取胶原蛋白, 并采用中性蛋白酶、复合蛋白酶、酸性蛋白酶和胃蛋白酶分别进行酶解制备鳕鱼骨胶原蛋白肽。以对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^-\cdot$ 自由基的清除率作为评价指标, 比较4种蛋白酶酶解制备的鳕鱼骨胶原蛋白肽的抗氧化活性。结果表明: 4种蛋白酶制备的鳕鱼骨胶原蛋白肽对3种自由基均有一定的清除能力, 且其清除能力随样品质量浓度的增大而增强; 4种蛋白酶酶解制备的鳕鱼骨胶原蛋白肽对3种自由基的清除能力各不相同, 其中对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力最强且有较好的量-效关系; 当多肽质量浓度在4~10 mg/mL时, 4种蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\text{DPPH}\cdot$ 的清除能力优于对 $\text{O}_2^-\cdot$ 的清除能力。

关键词: 鳕鱼骨; 胶原多肽; 抗氧化活性; 自由基

中图分类号: TS 254.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)04—0425—05

Antioxidative Activity of Collagen Peptides Extracted from Cod Bone

ZHAO Ling¹, LI Ya^{2,3}, LIU Qi^{*1}, CAO Rong¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Shandong Yongkang Food Co. LTD, Yantai 264006, China; 3. Yantai Jiahui Biotechnology Co. LTD, Yantai 264006, China)

Abstract: Collagen was prepared from cod bone by hot water extraction, and then it was enzymolyzed by neutral protease, protamex, acidic protease and pepsin respectively to obtain collagen peptides. The scavenging capacities to $\cdot\text{OH}$, $\text{DPPH}\cdot$ and $\text{O}_2^-\cdot$ free radicals were selected to assay the antioxidant activities of different collagen peptides from cod bone. Results indicated that the scavenging capacities of four kinds of collagen peptide from cod bone to free radicals enhanced with the increase of sample concentration. However, the capacity of scavenging three kinds of free radicals was different for every collagen peptide. They had the strongest scavenging capacity to $\cdot\text{OH}$ compared with other two free radicals, and the better scavenging capacity to $\text{DPPH}\cdot$ than $\text{O}_2^-\cdot$ when the samples' concentration were 4~10 mg/mL.

Keywords: cod bone, collagen peptide, antioxidant activity, free radical

收稿日期: 2012-08-30

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201303086)。

* 通信作者: 刘淇(1965—), 男, 山东招远人, 研究员, 主要从事水产品加工与综合利用研究。E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

随着水产品加工技术和食品冷链物流技术的进步,以冷冻鱼片、预调理水产品为代表的水产品加工业得到了快速发展。与此同时,在水产品加工过程中产生了大量的鱼皮、鱼骨等下脚料尚未得到充分利用。因此,综合利用水产品加工下脚料,不仅是水产品加工的一个重要研究方向,也是提高水产品加工业经济效益和社会效益的必然要求。

研究表明,鱼骨可用于制作多种食品,也可用于提取胶原蛋白、软骨素及制备 CMC 活性钙等^[1]。目前,国内外关于从鱼类加工下脚料中制备胶原蛋白或肽制品的研究报道很多^[1-5],其中以鱼皮为原料的研究居多^[6],而关于鱼骨胶原蛋白的研究相对较少。抗氧化肽以其相对分子质量小、易吸收、活性强等特点受到重视,在医药、化妆品、保健品和食品与饲料添加剂等方面有广阔前景^[7-8]。作者以鳕鱼骨为研究对象,旨在通过对其胶原蛋白肽的抗氧化活性研究,为鳕鱼骨在保健食品和医药等领域的开发与利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鳕鱼排:太平洋真鳕(*Gadus macrocephalus*)加工下脚料,烟台嘉惠海洋生物科技有限公司提供。

中性蛋白酶(1.3×10^5 U/g):吉宝(青岛)生物科技有限公司产品;复合蛋白酶(1.0×10^5 U/g):诺维信生物技术有限公司产品;酸性蛋白酶(5.0×10^4 U/g),北京东华强盛生物技术有限公司产品;胃蛋白酶($\geq 1.2 \times 10^3$ U/g),国药集团化学试剂有限公司产品;其它试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

数显恒温水浴锅 HH-2, 国华电器有限公司产品;N-1001 型旋转蒸发仪:上海爱朗仪器有限公司产品;CoolSafe 110 Freeze Dryer:LABGENE 公司产品;UV-2082 型紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品;PB-10 型 pH 计:Sartorius 公司产品;L-550 型台式低速离心机:湘仪离心机仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 鳕鱼骨胶原蛋白的提取 提取工艺流程:鳕鱼排→漂烫→去肉→清洗→热水浴提取→过 300 目筛→微滤→真空浓缩→醇沉→冷冻干燥→鳕鱼骨胶原蛋白粉

1.3.2 鳕鱼骨胶原蛋白肽的制备 取粗制的鳕鱼骨胶原蛋白粉配制成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液,分别用中性蛋白酶、复合蛋白酶、胃蛋白酶、酸性蛋白酶在各自最适酶解条件下进行酶解(见表 1),酶解完成后 90 °C 灭酶 15 min, 4 000 r/min 离心 20 min 后取上清液,冻干后得鳕鱼骨胶原肽 P_{中性}、P_{复合}、P_胃和 P_{酸性},于 -20 °C 储藏备用。

表 1 不同蛋白酶酶解条件

Table 1 Hydrolysis conditions of different enzymes

酶种类	温度/°C	加酶量/(U/g)	时间/h	pH
中性蛋白酶	45	2 000	5	8
复合蛋白酶	50	2 000	5	8
胃蛋白酶	40	2 000	5	2
酸性蛋白酶	40	2 000	5	3

1.3.3 抗氧化活性测定

1) 鳕鱼骨胶原蛋白肽对 DPPH·自由基清除率的测定 DPPH·是一种稳定的以氮为中心的质子自由基,在 517 nm 波长处有最大吸收,与抗氧化剂反应时,其孤对电子与抗氧化剂中的电子配对使其乙醇溶液由紫色褪色成黄色,褪色程度反映出抗氧化剂的活性强弱^[9]。

测定方法参照文献[10]进行。向不同试管加入等体积不同浓度的溶剂、鳕鱼骨胶原蛋白肽,混匀后 25 °C 反应 30 min,在 517 nm 下测定其 OD 值,平行做 3 次取平均值。

2) 对·OH 自由基清除率的测定 ·OH 是造成组织细胞损伤的重要活性氧之一。人体在正常的生命活动中通过新陈代谢即可以产生·OH,它可以引起膜过氧化、蛋白质交联变性、核酸损伤等,是公认的毒性最大的自由基^[11]。因此,·OH 的检测在自由基损伤研究中有重要的意义。

测定方法参照文献[12]进行,加入鳕鱼骨胶原蛋白肽后将溶液混合均匀,37 °C 水浴保温 30 min,在 510 nm 下测定其 OD 值,平行做 3 次取平均值。

3) 对 O₂⁻·自由基清除率的测定 邻苯三酚在弱碱条件下发生自氧化反应产生 O₂⁻·,O₂⁻·清除剂能使邻苯三酚自氧化产物在 325 nm 处吸收峰受到抑制。采用光化学方法监测,可间接测得 O₂⁻·的生成及 O₂⁻·的清除率^[13]。测定方法参照文献[14-15]进行,加鳕鱼骨胶原蛋白肽后将溶液混合均匀,于 325

nm 波长处测定其 OD 值,平行做 3 次取平均值。

2 结果与分析

2.1 鳕鱼骨胶原蛋白肽对 DPPH· 的清除效果

4 种蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 DPPH· 的清除能力结果见图 1。由图 1 可知,从总体上看 4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 DPPH· 的清除能力随着样品质量浓度的增加而增强;多肽质量浓度在 2~4 mg/mL 时,4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 DPPH· 的清除能力顺序为 $P_{\text{酸性}} > P_{\text{胃}} > P_{\text{中性}} = P_{\text{复合}}$; 在 6~12 mg/mL 时,清除能力顺序为 $P_{\text{酸性}} > P_{\text{中性}} > P_{\text{复合}} > P_{\text{胃}}$ 。4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 DPPH· 的清除能力均明显高于王东等^[16] 提取的鲑鳕鱼骨胶原蛋白肽(3 mg/mL, 13.33%), 推测这可能与多肽的提取制备工艺和鱼骨的品种有关。

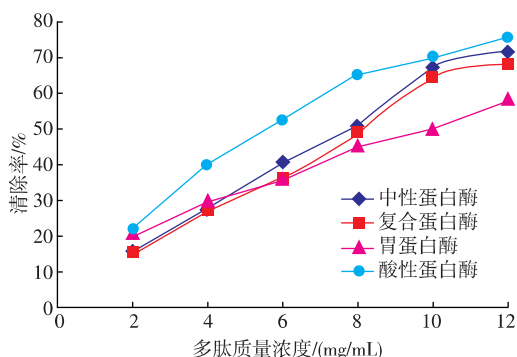


图 1 4 种蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 DPPH· 的清除能力

Fig. 1 Scavenging capacities of four kinds of collagen peptides from cod bone to DPPH· free radical

2.2 鳕鱼骨胶原蛋白肽对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果

4 种蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力见图 2。由图可知,在受试浓度范围内,4 种蛋白酶酶解胶原肽的清除能力均随样品质量浓度增大而增强;中性蛋白酶和复合蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力较大, 当多肽质量浓度为 6 mg/mL 时,二者对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力相同;酸性蛋白酶酶解胶原蛋白肽居中;胃蛋白酶酶解胶原蛋白肽的清除能力最弱,且明显小于其它 3 种蛋白酶的酶解胶原蛋白肽。

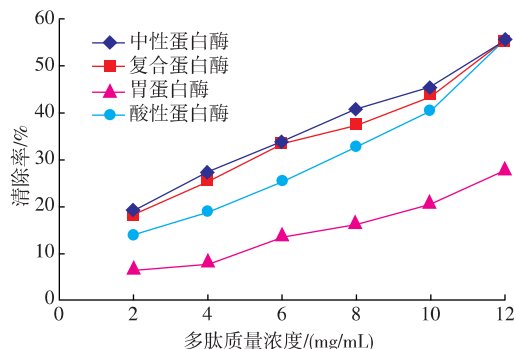


图 2 4 种蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力
Fig. 2 Scavenging capacities of four kinds of collagen peptides from cod bone to $O_2^{\cdot-}$ free radical

2.3 鳕鱼骨胶原蛋白肽对 $\cdot OH$ 的清除效果

4 种蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 $\cdot OH$ 的清除能力见图 3。由图 3 可知, 在受试质量浓度范围内,4 种蛋白酶酶解胶原肽对 $\cdot OH$ 清除能力均随质量浓度的增大而增强,且有较好的量-效关系;清除能力顺序为 $P_{\text{中性}} > P_{\text{复合}} > P_{\text{酸性}} > P_{\text{胃}}$ 。多肽质量浓度在 0.75 mg/mL 至 1.25 mg/mL 时,中性蛋白酶和复合蛋白酶对 $\cdot OH$ 清除能力随质量浓度的增加而急剧增强。经比较知,4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\cdot OH$ 的清除能力与王东等^[16] 提取的鲑鳕鱼骨胶原蛋白肽(3 mg/mL, 11.24%)相比有显著提高,其中,当质量浓度为 0.1 mg/mL 时, 中性蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\cdot OH$ 的清除率达到 14.1%。

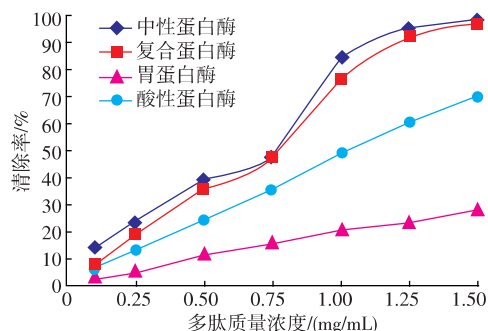


图 3 4 种蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 $\cdot OH$ 的清除能力
Fig. 3 Scavenging capacities of four kinds of collagen peptides from cod bone to $\cdot OH$ free radical

经比较可知, 尽管胃蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\cdot OH$ 清除能力最弱,当质量浓度为 1.5 mg/mL 时,胃蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\cdot OH$ 的清除率仍达到 27.97%,均大于 4 种蛋白酶酶解胶原肽在质量浓度为 2 mg/mL 时对 DPPH· 和 $O_2^{\cdot-}$ 清除率,因而 4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\cdot OH$ 的清除能力明显优于

其它 2 种自由基。

2.4 蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的清除效果比较

比较图 4~7 可知,同一种蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的清除能力各不相同;多肽浓度在 4~10 mg/mL 时,4 种蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 $\text{DPPH}\cdot$ 的清除能力均大于对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的清除能力。

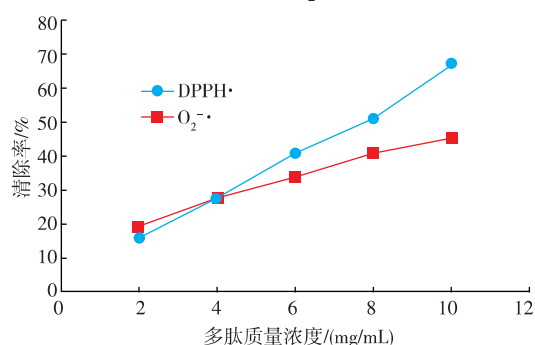


图 4 中性蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 2 种自由基的清除能力

Fig. 4 Scavenging capacity of collagen peptide prepared by neutral protease to two kinds of free radicals

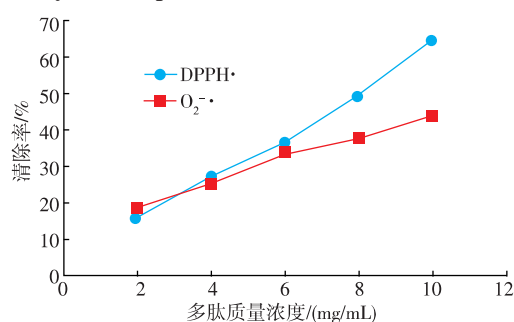


图 5 复合蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 2 种自由基的清除能力

Fig. 5 Scavenging capacity of collagen peptide prepared by protamex to two kinds of free radicals

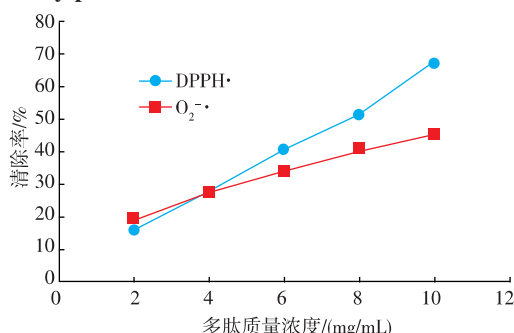


图 6 胃蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 2 种自由基的清除能力

Fig. 6 Scavenging capacity of collagen peptide prepared by acidic protease to two kinds of free radicals

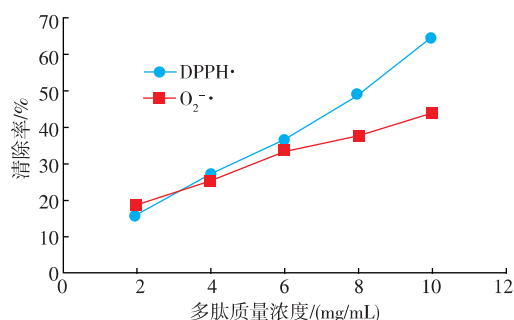


图 7 酸性蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白肽对 2 种自由基的清除能力

Fig. 7 Scavenging capacity of collagen peptide prepared by pepsin to two kinds of free radicals

3 结 语

我国鳕鱼年加工量 $(4\sim5)\times 10^5 \text{ t}^{[17]}$,在其生产过程中会产生鱼骨等大量下脚料,鳕鱼骨中富含胶原蛋白,蛋白质质量分数约为 35.78%^[1]。作者通过热水浸提法制备鳕鱼骨胶原蛋白,采用 4 种酶分别酶解鳕鱼骨胶原蛋白制备胶原蛋白肽,并测定了其对于 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 3 种自由基的清除效果。结果表明:中性蛋白酶、复合蛋白酶、酸性蛋白酶和胃蛋白酶酶解鳕鱼骨胶原蛋白制得的胶原蛋白肽其抗氧化活性较强,其对 3 种自由基的清除能力均随样品质量浓度的增大而增强,但不同蛋白酶酶解胶原蛋白肽对 3 种自由基的清除能力各不相同。因此,鳕鱼骨胶原蛋白肽在功能性食品、化妆品及生物制药等方面具有很好的应用潜力,值得进一步研究、开发。

参考文献:

- [1] 张崑,朱志伟,曾庆孝. 鱼骨利用的研究现状[J]. 食品研究与开发,2007,28(9):182-185.
ZHANG Yin,ZHI Zhi-wei,ZENG Qing-xiao. Recent research on utilization of fish bone[J]. **Food Research and Development**, 2007,28(9):182-185. (in Chinese)
- [2] 师晓栋,何海伦,王运涛,等. 酶法进行海洋低值蛋白资源高值化利用初探[J]. 海洋科学,2001,25(3):4-7.
SHI Xiao-dong,HE Hai-lun,WANG Yun-tao,et al. Preliminary Study on Value-increment of Low Valued Marine Protein by Enzymatic Hydrolysis[J]. **Marine Sciences**,2001,25(3):4-7. (in Chinese)
- [3] 郭瑶,曾名勇,崔文萱. 水产胶原蛋白及胶原多肽的研究进展[J]. 水产科学,2006,25(2):101-104.
GUO Yao,ZENG Ming-yong,CUI Wen-xuan. Aquatic collagen and active polypeptide[J]. **Fisheries Science**,2006,25(2):101-104. (in Chinese)
- [4] Ogawa M,Moody M W. Biochemical properties of black drum and sheep shead seabream skin collagen [J]. **Journal of Agricultural and food Chemistry**,2003(51):8088-8092.
- [5] Nagai T,Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material-skin,bone and fins[J]. **Food Chemistry**,2000(68):277-281.
- [6] 曾名勇,张联英,刘尊英,等. 几种鱼皮胶原蛋白的理化特性及其影响因素[J]. 中国海洋大学学报,2005,35(4):608-612.
ZENG Ming-yong,ZHANG Lian-ying,LIU Zun-ying,et al. Physico-Chemical characteristics and modification of several fish skin collagen[J]. **Periodical of Ocean University of China**,2005,35(4):608-612. (in Chinese)
- [7] 李珂,卜红,杨秀华,等. 骨蛋白酶解物的抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(6):773-776.
LI Ke,BO Er-hong,YANG Xiou-hua. Study on anti-oxidant enzymatic hydrolysis of bone protein [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(6):773-776. (in Chinese)
- [8] 牛瑞,于建生. 鳕鱼多肽的抗氧化活性及其分离纯化[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(4):562-566.
NIU Rui,YU Jian-sheng. Antioxidant activity and purification of pollock peptides [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(4):562-566. (in Chinese)
- [9] 贾建萍,鲁健章,周彦钢,等. 不同来源胶原肽的抗氧化活性及吸湿保湿性能[J]. 食品科学,2010,31(21):169-172.
JIA Jian-ping,LU Jian-zhang,ZHOU Yan-gang,et al. Antioxidant activity,moisture-absorbing and moisture-retention properties of collagen peptides from different sources[J]. **Food Science**,2010,31(21):169-172. (in Chinese)
- [10] 刘蕾,魏玉西,王长云,等. 侧扁柳珊瑚(*Subergorgia suberosa*)乙醇提取物抗氧化和抑菌活性研究[J]. 海洋科学,2010,34(9):19-22.
LIU Lei,WEI Yu-xi,WANG Chang-yun,et al. Antioxidation and bacteriostasis activity of the ethanol extract of *Subergorgia suberosa*[J]. **Marine Sciences**,2010,34(9):19-22. (in Chinese)
- [11] 陈冠华,田益玲,杨更亮,等. 荧光分光光度法测定中药对羟自由基的清除率[J]. 光谱学与光谱分析,2002,22(4):634-636.
CHEN Guan-hua,TIAN Yi-ling,YANG Geng-liang,et al. Determination of eliminating ratio of Chinese traditional medicine for hydroxyl radical by fluorescent spectrophotometry[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**,2002,22(4):634-636. (in Chinese)
- [12] 徐文汇,魏玉西,郭奇. 剑麻花提取物的抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2009,30(9):47-50.
XU Wen-hui,WEI Yu-xi,GUO Qi. Study on antioxidant activities of different fractions of ethanol extract and polysaccharides of sisal flower[J]. **Food Science**,2009,30(9):47-50. (in Chinese)
- [13] 王晓春,龙苏,徐克前,等. 车前草水煎液对氧自由基清除作用的研究[J]. 实用预防医学,2002,9(2):139-140.
WANG Xiao-chun,LONG Su,XIU Ke-Qian,et al. The scavenging effect of cheqiancao on oxygen free radical [J]. **Practical Preventive Medicine**,2002,9(2):139-140. (in Chinese)
- [14] 刘淇,李慧,赵玲,等. 鳕鱼皮胶原蛋白肽的功能特性及抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2012,33(1):135-137.
LIU Qi,LI Hui,ZHAO Ling,et al. Study on functional properties and antioxidation activity of collagen polypeptide from codfish skin[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2012,33(1):135-137. (in Chinese)
- [15] Ock-Sook Yi,Annes S Meyer,Edwin N Frankel. Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system[J]. **JAACS**,1997,74(10):1301-1306.
- [16] 王东,蒲训,陈明凯,等. 鲑鳟鱼骨提取胶原肽工艺与产品生物活性研究[J]. 中兽医医药杂志,2010,4:15-19.
WANG Dong,PU Xun,CHEN Ming-kai,et al. Studies on the extracting process and bioactivities of collagen polypeptides from trout bone[J]. **Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine**,2010,4:15-19. (in Chinese)
- [17] 黄薇,邓尚贵,唐艳,等. 鳕鱼皮复合肽的制备工艺研究[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2011,30(5):401-404.
HUANG Wei,DENG Shang-gui,TANG Yan,et al. Preparation conditions of cod skin peptides by compound enzyme [J]. **Journal of Zhejiang Ocean University:Natural Science**,2011,30(5):401-404. (in Chinese)