

鳀蛋白抗氧化酶解物制备工艺

向泽敏, 邱晓挺*, 娄永江, 严小军

(宁波大学海洋学院, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为有效提高鳀蛋白的附加值, 研究以DPPH自由基清除率为抗氧化活性评价指标, 采用蛋白酶酶解制备活性多肽的工艺, 选用菠萝蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶7种酶在各自最适的条件下酶解, 筛选出复合蛋白酶为最适用酶, 通过单因素实验分别研究加酶量、溶液初始pH、酶解温度和时间对酶解物抗氧化活性的影响, 在此基础上, 根据响应面法优化鳀蛋白抗氧化酶解物的制备工艺。结果显示, 最佳酶解工艺条件为加酶量8.53 U/mg, pH 5.54, 温度50.03 °C, 时间5.07 h。此外, 利用超滤法对最佳条件下制备的酶解物进行初步分级, 得到分子质量分别为大于10 000 u、3000~10 000 u和小于3000 u的3段组分, 且这3段组分对DPPH自由基的半抑制浓度 IC_{50} 值分别为0.64、0.52和0.37 mg/mL。研究表明, 最优条件下制备的酶解物的DPPH清除率达72.00%, 与模型预测值71.60%接近, 且其中小于3000 u的组分具有较强的DPPH自由基清除活性。

关键词: 鳀; 鳀; 酶解; 抗氧化活性; 响应面法

中图分类号: Q 545; TS 254.9

文献标志码: A

鳀(*Katsuwonus pelamis*)隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、金枪鱼科(Thunnidae), 是一种生活在海洋中上层的洄游性鱼类, 广泛分布于大西洋、印度洋、太平洋及地中海等温带及热带海域, 为重要的海洋经济种类之一, 具有生长快、产量高、营养丰富等优点^[1]。目前, 除鱼肉被制成生鱼片或罐头产品外, 大量副产物尤其是高蛋白、低脂肪且富含氨基酸的鱼鳔通常被加工成低值的鱼粉和肥料, 甚至被丢弃^[2]。其综合价值不仅未得到充分开发与利用, 还造成一定的资源浪费和环境污染。

近年来, 酶解鱼类蛋白质制备活性肽的研究已成为提高鱼类附加值和开发生物活性物质的热门方向之一。酶解具有效率高、条件温和可控、无副反应、适用面广、酶用量少且来源广的特点, 与酸碱降解相比具有无可比拟的优势^[3]。针对金枪鱼类的酶解制备活性肽的研究,

主要集中在鱼肉、骨和肠等方面^[4-7], 而关于鳀鳔深加工的研究尚未见报道。因此, 本研究以鳀鳔为实验材料, 采用蛋白酶解手段, 通过响应面优化工艺条件, 制备具有较高DPPH自由基清除率的抗氧化酶解物, 旨在为鳀蛋白的高值化利用及其抗氧化肽的进一步研究和开发应用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鳀鳔, 由宁波南联冷冻食品有限公司提供, 于-20 °C冷藏; 1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH), 购于TCI公司; 菠萝蛋白酶(3×10^5 U/g)、复合蛋白酶(1.2×10^5 U/g)、碱性蛋白酶(2×10^5 U/g)、木瓜蛋白酶(8×10^5 U/g)、中性蛋白酶(1×10^5 U/g)购于上海源叶生物科技有限公司,

收稿日期: 2017-01-12 修回日期: 2017-04-06

资助项目: 国家自然科学基金(31400683); 浙江省自然科学基金(LQ14C050001); 宁波大学人才引进启动基金(013-E00843134702, 013-E00843144702, 013-421504460); 宁波大学王宽诚幸福基金

通信作者: 邱晓挺, E-mail: xiaotingqiu@126.com

胃蛋白酶(3×10^3 U/g)、胰蛋白酶(2.5×10^5 U/g)购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 实验方法

鳕鱼酶解物的制备 取鳕鱼室温下解冻后剪成小碎片,于 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥脱水至恒重后磨成粉,分别称取一定量的干鱼鳔,根据酶种类的不同,按料液比 $1:10(W/V)$ 依次加入相应pH的磷酸盐缓冲液,再加入一定量的酶,放入恒温水浴锅中,在各自适宜的温度下酶解一定时间,沸水浴灭酶 10 min 后, $10\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,取上清液过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 水系滤膜,收集滤液备用。

DPPH自由基清除率的测定 称取DPPH粉末 10 mg ,无水乙醇溶解并定容至 50 mL ,摇匀得到浓度为 0.5 mmol/L 的DPPH储备液,置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷藏备用。使用前用乙醇将储备液浓度稀释至 0.1 mmol/L 。取3支试管,分别编号0、1和2,0号管加入 1 mL DPPH溶液和 1 mL 无水乙醇,1号管加入 1 mL DPPH溶液与 1 mL 酶解液,2号管加入 1 mL 无水乙醇和 1 mL 酶解液,分别充分混匀后静置,室温避光反应 30 min 后,利用DPPH的乙醇溶液呈紫红色且在波长 517 nm 处有最大吸收的特征,用酶标仪测定各样品在波长 517 nm 处的吸收值,分别标记为 A_0 、 A_1 和 A_2 。DPPH自由基清除率的计算公式:

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$
 每组样品重复3次,求得清除率的平均值。

蛋白酶的筛选 分别选择菠萝蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶,并在各自最适的温度和溶液pH的条件^[8-9]下对鳕鱼进行酶解,以酶解产物的DPPH自由基清除率为指标,筛选出最佳蛋白酶。

单因素实验 在选定最佳用酶的基础上,以DPPH自由基清除率为指标。单因素实验的基本条件为加酶量 5.0 U/mg 、初始pH 6.5 、温度 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 、酶解时间 5 h ,改变其中1个条件,保持其他条件不变,分别考察加酶量(1.2 、 3.0 、 5.0 、 8.0 、 10.0 U/mg)、初始pH(5.0 、 6.0 、 6.5 、 7.0 、 8.0)、酶解温度(40 、 45 、 50 、 55 、 $60\text{ }^\circ\text{C}$)和酶解时间(3 、 4 、 5 、 6 、 7 h)等因素对鳕鱼酶解物DPPH自由基清除率的影响,每项实验设置3个平行,结果取平均值。

响应面优化实验 在单因素实验的基础上,以加酶量(A)、初始pH(B)、酶解温度(C)、酶解时间(D)4个因素为因子,酶解液的DPPH自由基

清除能力为响应值,设计响应面实验。每组实验进行3次,结果取平均值。

酶解液的超滤分级 将响应面优化条件下制备的初酶解液,采用截留分子量分别为 $10\,000$ 和 3000 u 的超滤膜对其进行分级分离,分别收集超滤得到的3段组分: I ($>10\,000\text{ u}$)、II ($3000\sim 10\,000\text{ u}$)、III ($<3000\text{ u}$),将各组分冷冻干燥后,测定各自不同浓度下的DPPH自由基清除活性。每组实验重复3次,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶对DPPH自由基清除率的影响

7种不同蛋白酶的酶解物对DPPH自由基均具有不同程度的清除力,其中复合蛋白酶酶解物的DPPH清除率最高,为 64.25% (图1)。这可能与不同蛋白酶具有不同的催化位点,导致形成肽的序列也有所不同有关^[10]。因此,酶解鳕鱼制备抗氧化多肽的最佳用酶选定为复合蛋白酶。

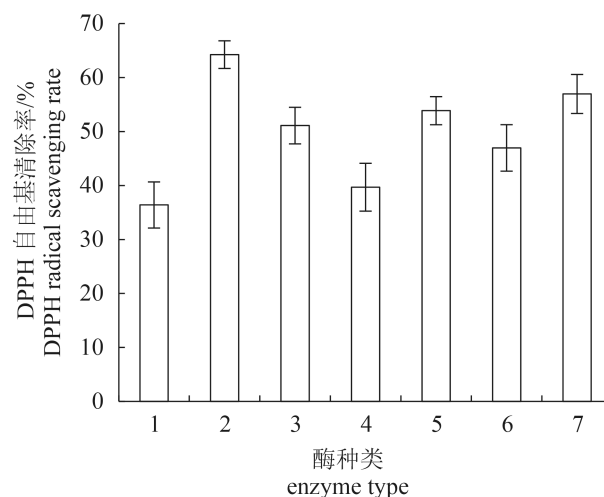


图1 酶种类对鳕鱼酶解物DPPH自由基清除率的影响

1. 菠萝蛋白酶, 2. 复合蛋白酶, 3. 碱性蛋白酶, 4. 木瓜蛋白酶, 5. 胃蛋白酶, 6. 胰蛋白酶, 7. 中性蛋白酶

Fig. 1 Effect of enzyme type on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates of *K. pelamis* swim bladder

1. bromelain, 2. compound proteinase, 3. alkaline proteinase, 4. papain, 5. pepsin, 6. trypsin, 7. dispase

2.2 加酶量对鳕鱼酶解物DPPH自由基清除率的影响

在其他因素不变的条件下,改变加酶量,当加酶量为 1.2 U/mg 时,复合蛋白酶酶解物的DPPH自由基清除率为 53.74% ,随着加酶量的增

加, DPPH自由基清除率也随之增大, 在加酶量为8.0 U/mg时, 酶解物的DPPH自由基清除率达到最高, 为64.12%; 但当继续增加加酶量时, DPPH自由基清除率却开始下降。这是因为起始阶段底物充足, 加酶量越大, 产生具有抗氧化

活性的肽段就越多, 当达到最高峰时, 起始底物耗尽, 这时再增加加酶量, 使得具有活性的片段被降解为不具抗氧化活性的分子量更小的肽或单个氨基酸, 从而使酶解物的DPPH自由基清除率降低(图2-a)。

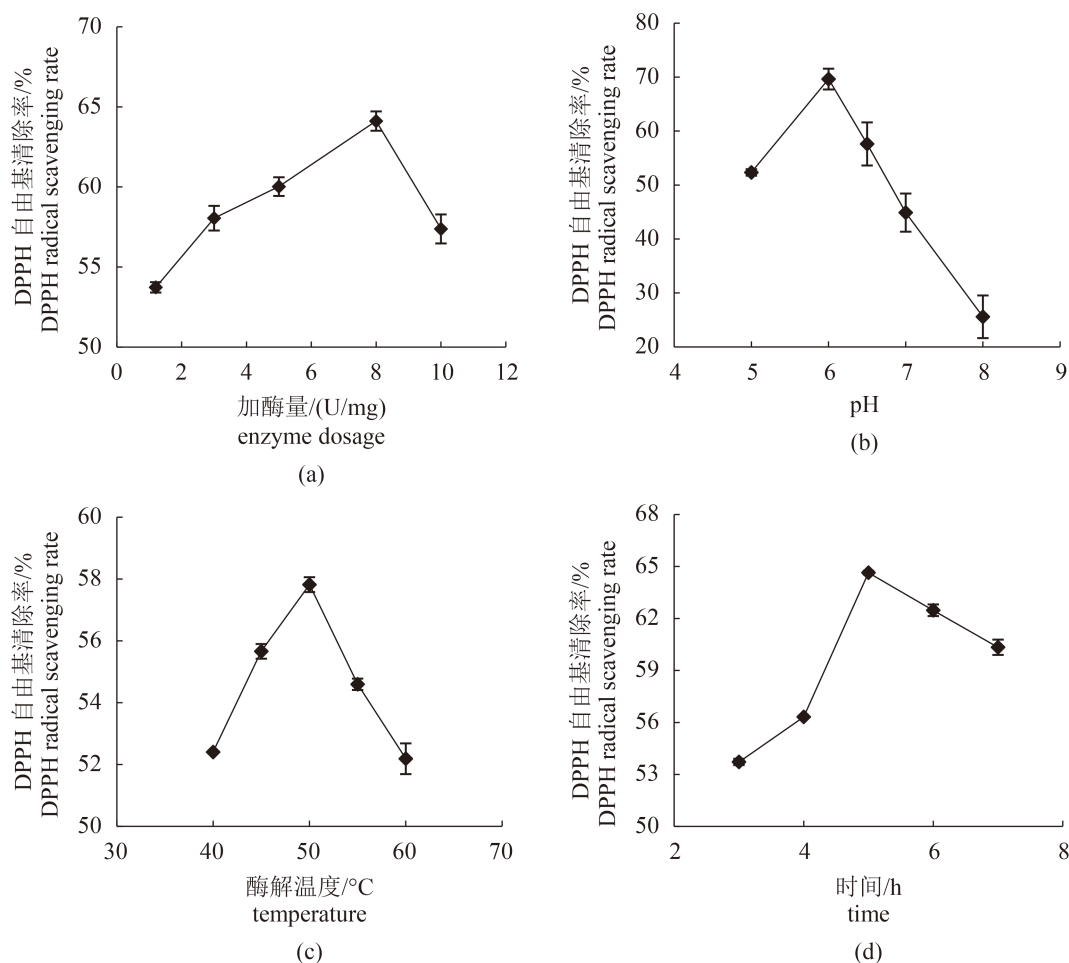


图2 单因素实验结果

(a)加酶量对酶解物DPPH自由基清除率的影响; (b) pH对酶解物DPPH自由基清除率的影响; (c)酶解温度对酶解物DPPH自由基清除率的影响; (d)酶解时间对酶解物DPPH自由基清除率的影响

Fig. 2 Results of single-factor experiments

(a) effect of enzyme dosage on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates; (b) effect of pH on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates; (c) effect of temperature on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates; (d) effect of time on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates

2.3 pH对鳀酶解物DPPH自由基清除率的影响

在加酶量5.0 U/mg、温度50 °C、酶解时间5 h的条件下, 改变初始pH大小。当初始溶液pH为5.0时, 复合蛋白酶酶解物的DPPH自由基清除率仅为52.35%; pH值增加至6.0时, DPPH自由基清除率达到最高, 为69.65%; 随着pH继续增加, 酶活性反而降低。这是由于酶活性与反应体系pH

值密切相关, pH值的改变会影响酶分子的空间构象、与催化有关基团的解离状况、酶分子及底物的结合及酶-底物复合物的解离, 进而影响酶活性^[11]。由图2-b可见, 此条件下的最适pH为6.0。

2.4 酶解温度对鳀酶解物DPPH自由基清除率的影响

其他因素不变, 改变酶解温度。温度较低

时, 酶活性受到抑制, 酶解温度设为40 °C时, 复合蛋白酶酶解物的DPPH自由基清除率为52.41%, 在一定的温度范围内, DPPH自由基清除率随着温度的增加而增大, 温度为50 °C时, 达到最大; 但当温度超过一定范围, 酶活性降低, DPPH自由基清除率也随之下降(图2-c)。

2.5 酶解时间对鳕蛋白酶解物DPPH自由基清除率的影响

其他因素不变, 改变酶解时间。时间较短时, 酶解不够充分, 当酶解时间为3 h时, 酶解物的DPPH自由基清除率仅为53.72%; 随着酶解时间的延长, 酶解物的DPPH自由基清除率也会随之增加, 酶解时间5 h时, DPPH自由基清除率达到最大值, 为64.64%; 当酶解时间过长时, DPPH自由基清除率便会有所下降, 这可能是由于原本具有DPPH自由基清除率的肽段被继续降解成无活性的片段所致(图2-d)。

2.6 响应面优化鳕蛋白抗氧化酶解物的制备工艺方案及结果

根据Box-Behnken设计原理^[12], 设计四因素三水平实验(表1), 响应面实验(表2)总次数为29, 其中中心点重复实验次数为5。采用Design Expert 8.0软件处理数据, 进行回归方差分析(表3)。

表 1 响应面实验设计因素及编码水平

Tab. 1 Factors and code levels of response surface design				
水平 levels	加酶量/(U/mg) enzyme dosage	pH	温度/°C temperature	时间/h time
-1	6	5	45	4
0	8	6	50	5
+1	10	7	55	6

通过对实验结果进行回归拟合, 得到响应面回归模型方程:

$$\text{DPPH自由基清除率} = 69.60 + 4.36 A - 5.34 B + 0.14 C + 3.97 D + 5.27 AB + 1.01 AC - 3.55 AD + 0.44 BC + 5.47 BD - 2.01 CD - 3.14 A^2 - 3.81 B^2 - 2.07 C^2 - 3.13 D^2$$

根据二次回归方程各因素绝对值大小, 可得到4个因素对DPPH自由基清除率的影响大小顺序: pH>加酶量>时间>温度。

方差分析可知, 模型的F值为23.28、 $P>F<0.0001$ 表明模型差异极显著, 拟合效果较好; 回归方程的一次项、交互项及二次项A、B、D、AB、

表 2 响应面实验设计与结果

Tab. 2 Design and results of response surface					
编号 no.	加酶量 enzyme dosage	pH	温度 temperature	时间 time	DPPH自由基 清除率/% DPPH radical scavenging rate
1	0	-1	-1	0	68.92
2	-1	-1	0	0	70.34
3	0	-1	1	0	68.61
4	0	-1	0	-1	68.04
5	0	0	1	1	66.35
6	-1	0	-1	0	60.78
7	0	0	0	0	71.28
8	0	1	1	0	59.40
9	0	0	-1	-1	60.14
10	0	0	0	0	64.99
11	-1	0	0	-1	50.19
12	-1	0	0	1	65.66
13	1	0	0	-1	68.11
14	1	0	-1	0	65.37
15	0	0	0	0	70.26
16	1	0	0	0	67.19
17	-1	0	0	0	47.91
18	0	-1	0	1	65.67
19	0	0	1	-1	63.50
20	0	0	0	0	70.77
21	-1	0	1	0	59.68
22	0	1	0	-1	47.01
23	0	1	-1	0	57.97
24	1	0	0	1	69.38
25	1	-1	0	0	68.54
26	0	0	0	0	70.69
27	0	0	-1	1	71.02
28	1	0	1	0	68.33
29	0	1	0	1	66.52

AD、BD、 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 分别对DPPH自由基清除率影响显著($P<0.05$); 失拟项 $P=0.9027>0.05$ 、 $F=0.38$ 表示相对于纯误差失拟项不显著, 说明回归方程与实际值可较好拟合; $R^2=0.9588$, 表明模

表 3 回归模型方差分析

Tab. 3 Variance analysis of regression model

方差来源	sources	平方和	SS	自由度	df	均方	mean square	F值	F value	P值	P value	显著性	significance
模型	model	1227.40		14		87.67		23.28		<0.0001		**	
A		228.46		1		228.46		60.68		<0.0001		**	
B		342.61		1		342.61		90.99		<0.0001		**	
C		0.23		1		0.23		0.062		0.8074			
D		188.89		1		188.89		50.17		<0.0001		**	
AB		111.09		1		111.09		29.50		<0.0001		**	
AC		4.12		1		4.12		1.09		0.3132			
AD		50.41		1		50.41		13.39		0.0026		**	
BC		0.76		1		0.76		0.20		0.6608			
BD		119.68		1		119.68		31.79		<0.0001		**	
CD		16.12		1		16.12		4.28		0.0575			
A ²		63.96		1		63.96		16.99		0.0010		**	
B ²		94.17		1		94.17		25.01		0.0002		**	
C ²		27.70		1		27.70		7.36		0.0168		*	
D ²		63.41		1		63.41		16.84		0.0011		**	
残差	residual	52.72		14		3.77							
失拟项	lack of fit	25.65		10		2.56		0.38		0.9027			
纯误差	pure error	27.07		4		6.77							
总和	total	1280.12		28									

注: *.差异显著($P<0.05$), **.差异极显著($P<0.01$)

Notes: *.significant difference ($P<0.05$), **.highly significant difference ($P<0.01$)

型的预测值与实际值高度相关; $R^2_{Adj}=0.9176$, 说明可信度高; 当信噪比大于4时, 模型可信, 实验测得信噪比为16.173, 大于4, 也说明模型可靠性强; 变异系数(CV)为3.01%, 说明实验的精确度高、实验模拟可信。因此, 该回归方程能比较准确地分析和预测鱼鳔酶解物的抗氧化能力与加酶量、pH、温度和时间关系, 进而确定酶解的最佳条件。

2.7 响应面图分析及结果验证

根据响应面实验结果和相应的回归方程, 利用软件制作出响应面图(图3)。由图可知, 响应值存在最佳值, 经分析, 鳔抗氧化酶解物制备的最佳工艺条件: 加酶量8.53 U/mg, pH 5.54, 温度50.03 °C, 时间5.07 h。响应面模型预测此条件下的DPPH自由基清除率为71.60%。为验证响应面模型的可靠性, 采用上述工艺条件

进行酶解实验, 重复3次, 得到DPPH自由基清除率的平均值为72.0%, 与预测值间的相对误差较小, 表明此响应面模型的拟合度高, 能较为准确地预测并优化鳔抗氧化酶解物制备工艺。

2.8 超滤后鳔各级酶解组分的DPPH自由基清除率比较

测定组分 I (>10 000 u)、II (3000~10 000 u)、III (<3000 u) 分别在不同浓度下的DPPH自由基清除率(图4)。一定范围内, 随着浓度的增加, 各组分的DPPH自由基清除率也基本呈增强趋势; 相同浓度下, 3段组分相比, 组分 III (<3000 u) 的DPPH自由基清除活性最强; 在浓度小于0.5 mg/mL 的范围内, 组分 I (>10 000 u) 和 II (3000~10 000 u) 在相同浓度下的DPPH自由基清除率基本一致, 而在浓度大于0.5 mg/mL 时, 相同浓度下组分 II

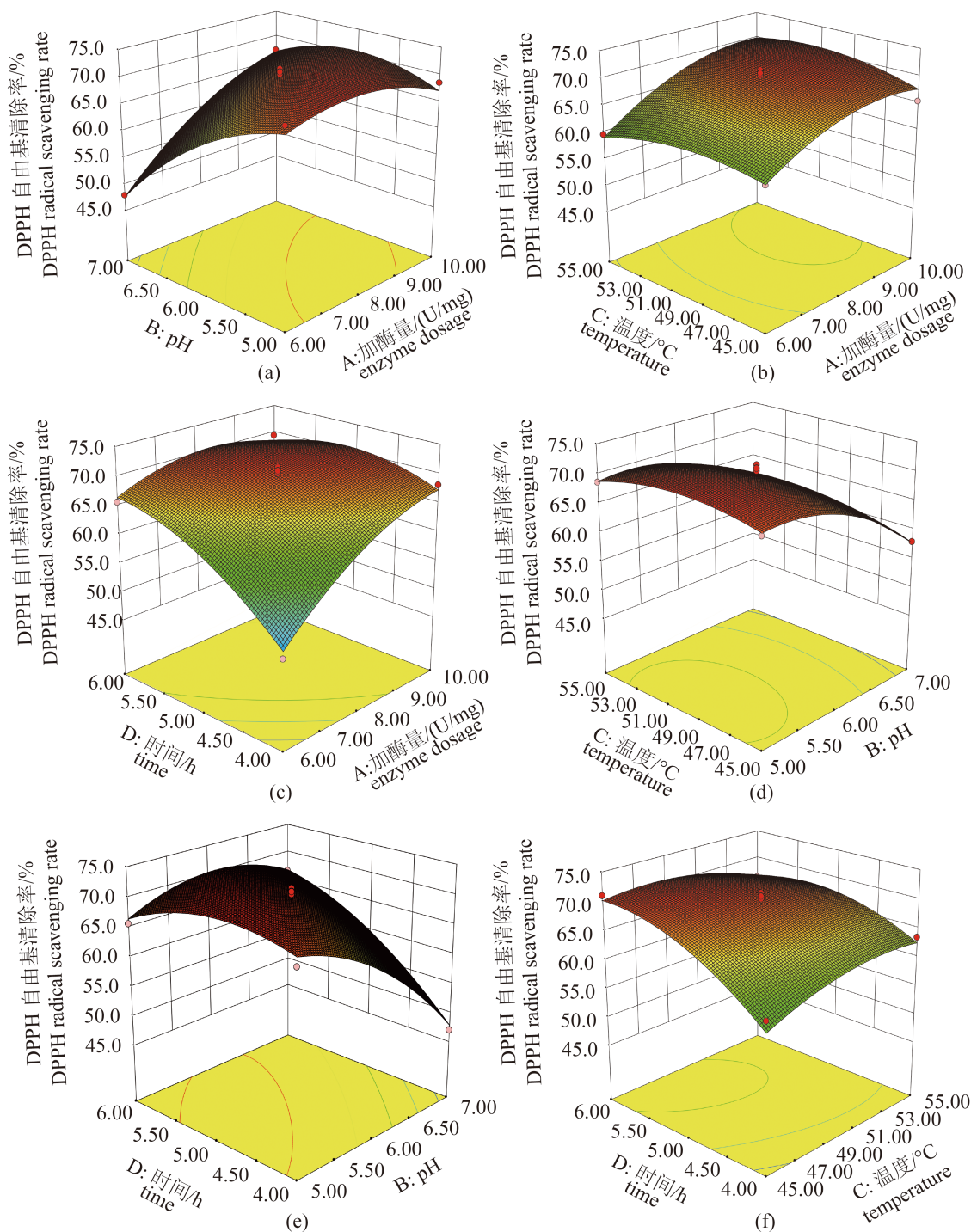


图3 各因素对鳢鲮酶解物DPPH自由基清除率的影响的响应面图

(a) 加酶量和pH对酶解物DPPH自由基清除率的影响响应面图; (b) 加酶量和温度对酶解物DPPH自由基清除率的影响响应面图; (c) 加酶量和时间对酶解物DPPH自由基清除率的影响响应面图; (d) pH和温度对酶解物DPPH自由基清除率的影响响应面图; (e) pH和时间对酶解物DPPH自由基清除率的影响响应面图; (f) 温度和时间对酶解物DPPH自由基清除率的影响响应面图

Fig. 3 Response surface plot of different factors on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates of *K. pelamis* swim bladder

(a) effect of enzyme dosage and pH on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates; (b) effect of enzyme dosage and temperature on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates; (c) effect of enzyme dosage and time on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates; (d) effect of pH and temperature on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates; (e) effect of pH and time on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates; (f) effect of temperature and time on DPPH radical scavenging rate of hydrolysates

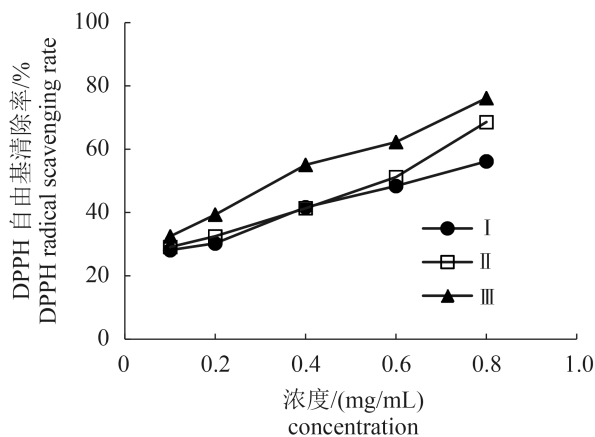


图4 不同浓度下鳀鳔各级酶解组分的DPPH自由基清除率

Fig. 4 DPPH radical scavenging rate of hydrolysis fractions of *K. pelamis* swim bladder with different molecular weight

的DPPH自由基清除率大于组分 I；经计算，组分 I、II 和 III 的 IC_{50} 分别为0.64、0.52和0.37 mg/mL。

3 讨论

本研究首次以鳀鳔为实验材料，采用酶解技术制备抗氧化多肽，通过单因素实验和响应面法对抗氧化酶解物的制备工艺进行优化，从而得到鳀鳔蛋白抗氧化酶解物制备的最佳工艺条件：复合蛋白酶加酶量8.53 U/mg，pH 5.54，温度50.03 °C，时间5.07 h，此条件下的DPPH自由基清除率为71.60%。段振华等^[13]采用复合蛋白酶对海南当地市场的干鱼鳔制品进行酶解，酶解条件的单因素探究结果为pH 5.0~7.0、温度50~60 °C和时间5~6 h，本研究在pH、温度和时间方面的优化结果符合段振华等^[13]研究的条件范围；在工艺优化手段上，本实验采用的响应面优化法更能直观地反映各因素间的相互作用及多个因素对响应值影响的函数关系，从而高效而准确地确定最优条件^[14]。常虹等^[15]又对酶解海南干鱼鳔蛋白制备抗氧化肽的最佳条件进行探索，以酶解产物清除DPPH自由基的能力为指标，从胰蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶3种酶中确定胰蛋白酶为最佳酶制剂，并采用单因素和响应面实验优化出最佳酶解条件，制备出对DPPH自由基清除力高达76.06%的鱼鳔抗氧化肽。与上述研究相比，本研究蛋白酶选择的范围更广，对最适蛋白酶的确定更为精准。本研

究在最优条件下制备得到的抗氧化酶解物对DPPH自由基清除率(71.60%)稍低于常虹等^[15]的研究结果(76.06%)，这种差异可能主要是由于蛋白酶和酶解底物的不同造成的，不同酶的酶切位点和酶解底物的氨基酸序列的不同使获得的酶解产物抗氧化肽的种类和含量存在差异^[16]。基于王佳莉^[17]关于蛋白酶水解金枪鱼副产物的工艺研究说明双酶联合酶解效果优于单酶酶解，能提高底物水解率，这为鳀鳔的进一步加工利用提供研究思路，将来可考虑采用双酶酶解鳀鳔，探究联合作用的酶的选择及双酶作用的酶解条件等对水解度和抗氧化能力的影响。

随着活性肽的逐步深入研究与应用，现有大量研究^[18-20]表明，许多海洋鱼类活性肽具有抗氧化活性，可以作为潜在的药物、保健品和食品防腐剂^[3, 21]。柯虹乔^[11]研究大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)鱼头蛋白酶解物超滤后的各组分的抗氧化活性，其中组分(<1000 u)的活性最好，对DPPH自由基的 IC_{50} 值为0.93 mg/mL；谭洪亮等^[22]从鳀鱼骨中制备出抗氧化的胶原十肽，分子质量为839.87 u，其氨基酸序列为Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Gln-Gly，对DPPH自由基的 IC_{50} 值为0.97 mg/mL，且氨基酸组成分析发现其富含Glu、Lys和Leu；Chi等^[23]对鳀暗色肉中性蛋白酶酶解物和碱性蛋白酶酶解物分别超滤得到的小于3000 u组分对DPPH自由基的 IC_{50} 值分别为3.09和2.21 mg/mL，二者均富含Glu、Leu和Asp等氨基酸。本研究通过超滤鳀鳔初酶解产物，得到的组分III(<3000 u)对DPPH自由基的清除活性(IC_{50} =0.37 mg/mL)均高于上述研究结果，但低于Wang等^[24]应用一系列连续分离技术从日本鲈(*Pseudoscophorus japonicus*)水解液中纯化出的分子质量为1664 u的抗氧化肽(IC_{50} =0.2335 mg/mL)，这说明鳀鳔酶解物中小于3000 u的组分具有较强的抗氧化活性，但若得到活性更高的抗氧化产物，还需通过柱层析等方法对其进一步分离纯化，得到单个活性肽并进行多肽序列鉴定，以探明多肽发挥抗氧化作用与其分子量大小、氨基酸残基种类和特定氨基酸序列等因素的关系及其实际应用的安全性和有效性。

参考文献：

- [1] Puncher G N, Arrizabalaga H, Alemany F, et al. Molecular identification of Atlantic bluefin tuna

- (*Thunnus thynnus*, Scombridae) larvae and development of a DNA character-based identification key for Mediterranean scombrids[J]. Plos One, 2015, 10(7): 1-19.
- [2] Herpandi N H, Rosma A, Nadiyah W A W. The tuna fishing industry: a new outlook on fish protein hydrolysates[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2011, 10(4): 195-207.
- [3] Castro R J S D, Sato H H. Biologically active peptides: processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries[J]. Food Research International, 2015, 74(8): 185-198.
- [4] 杨龙方, 桑卫国, 段清源. 响应面法优化鳀鱼褐色肉酶解工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(12): 175-180, 184.
- Yang L F, Sang W G, Duan Q Y. Study on optimization of enzymatic hydrolysis conditions of dark flesh of skipjack tuna by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(12): 175-180, 184(in Chinese).
- [5] Ovissipour M, Kenari A A, Motamedzadegan A, *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(2): 696-705.
- [6] Lee S H, Qian Z J, Kim S K. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2010, 118(1): 96-102.
- [7] Martínez-Alvarez O, Batista I, Ramos C, *et al.* Enhancement of ACE and prolyl oligopeptidase inhibitory potency of protein hydrolysates from sardine and tuna by-products by simulated gastrointestinal digestion[J]. Food and Function, 2016, 7(4): 2066-2073.
- [8] Je J Y, Qian Z J, Byun H G, *et al.* Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(5): 840-846.
- [9] Je J Y, Lee K H, Lee M H, *et al.* Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis[J]. Food Research International, 2009, 42(9): 1266-1272.
- [10] Lemes A C, Sala L, Ores J D C, *et al.* A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 950.
- [11] 柯虹乔. 酶解金枪鱼头蛋白制备抗氧化活性肽的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2011.
- Ke H Q. Preparation of antioxidant peptides from tuna head by enzymatic hydrolysis[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2011(in Chinese).
- [12] Shu G W, Bao C J, Chen H, *et al.* Fermentation optimization of goat milk with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* by Box-Behnken design[J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2016, 15(2): 151-159.
- [13] 段振华, 王美蓉, 汪菊兰, 等. 一种低值鱼鳔蛋白的酶解工艺试验研究[J]. 渔业现代化, 2007, 34(6): 43-46.
- Duan Z H, Wang M R, Wang J L, *et al.* Study on hydrolysis technology for a lower-value swim bladder with protease[J]. Fishery Modernization, 2007, 34(6): 43-46(in Chinese).
- [14] Ghaffari-Moghaddam M, Yekke-Ghasemi Z, Khajeh M, *et al.* Application of response surface methodology in enzymatic synthesis: a review[J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2014, 40(3): 252-262.
- [15] 常虹, 段振华, 成长玉, 等. 酶解鱼鳔蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(6): 3389-3391, 3469.
- Chang H, Duan Z H, Cheng C Y, *et al.* Study on antioxidant peptide prepared by enzymolysis of swim bladder protein[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(6): 3389-3391, 3469(in Chinese).
- [16] Mora L, Reig M, Toldrá F. Bioactive peptides generated from meat industry by products[J]. Food Research International, 2014, 65(11): 344-349.
- [17] 王佳莉. 蛋白酶水解金枪鱼副产物的工艺研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- Wang J L. Study on enzymatic hydrolysis technology of tuna by-products[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011(in Chinese).
- [18] Farvin K H S, Andersen L L, Otte J, *et al.* Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: fractionation and characterisation of peptide fractions[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 409-419.
- [19] Hsu K C. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product[J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 42-48.
- [20] Kumar N S S, Nazeer R A, Jaiganesh R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel

- (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*)[J]. Amino Acids, 2012, 42(5): 1641-1649.
- [21] Li-Chan E C Y. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients[J]. Current Opinion in Food Science, 2015, 1: 28-37.
- [22] 谭洪亮, 郁迪, 王斌, 等. 金枪鱼鱼骨胶原肽的制备及抗氧化活性研究[J]. 水产学报, 2014, 38(1): 143-148.
- Tan H L, Yu D, Wang B, *et al.* Preparation and evaluation of an antioxidant peptide from collagen hydrolysate of skipjack tuna fishbone[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(1): 143-148(in Chinese).
- [23] Chi C F, Hu F Y, Wang B, *et al.* Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle[J]. Marine Drugs, 2015, 13(5): 2580-2601.
- [24] Wang X Q, Xing R E, Liu S, *et al.* Purification and characterization of novel antioxidant peptides of different molecular weights from mackerel *Pneumatophorus japonicas* protein hydrolysate[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2015, 33(1): 159-168.

Methodology of the preparation of enzymatic hydrolysates with antioxidant activity of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) swim bladder protein

XIANG Zemin, QIU Xiaoting*, LOU Yongjiang, YAN Xiaojun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education,
School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to obtain higher added-value of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) swim bladder, compound proteinase was selected for enzymatic hydrolysis of skipjack swim bladder from seven enzymes including bromelain, compound proteinase, alkaline proteinase, papain, pepsin, trypsin and dispase. With the DPPH radical scavenging rate of hydrolysates as evaluating index, single-factor experiment was employed to investigate the effects of enzyme dosage, initial pH, reaction temperature and time on the antioxidant activity of hydrolysates separately. On the basis of the above observations of single-factor experiment, the optimum conditions for preparing antioxidant hydrolysates of skipjack tuna swim bladder were explored through response surface methodology (RSM). The results showed that, the optimal hydrolysis conditions were as follows: 8.53 U/mg of enzyme dosage, 5.54 of initial solution pH, 50.03 °C of reaction temperature and 5.07 h of reaction time. Furthermore, the hydrolysates were primarily sorted into three fractions with different molecular weight above 10 000 u, 3000 to 10 000 u and 0 to 3000 u by using ultrafiltration. The inhibitory concentration 50% (IC₅₀) values to DPPH radical of three fractions were 0.64, 0.52 and 0.37 mg/mL, respectively. It is demonstrated that DPPH radical scavenging rate of the hydrolysates could be up to 72.00% under these optimal conditions, which was in good agreement with the predicted value of 71.60%, and that fraction below 3000 u of the hydrolysates possesses the strongest effect. Preliminary results indicate that the hydrolysates of skipjack swim bladder could be an effective ingredient for antioxidant products such as health food or cosmetics.

Key words: *Katsuwonus pelamis*; swim bladder; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity; response surface methodology

Corresponding author: QIU Xiaoting. E-mail: xiaotingqiu@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31400683); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ14C050001); Talent Plan of Ningbo University (013-E00843134702, 013-E00843144702, 013-421504460); the K. C. Wong Magna Fund in Ningbo University