

北太平洋鱿鱼 (*Todarodes pacificus*) 内脏自溶液总氨基酸组成质量评价和体外抗氧化性分析

张开强¹, 韦荣编², 宋茹^{1,*}, 江旭华³

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江 舟山 316022;
2. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022; 3. 浙江富丹旅游食品有限公司, 浙江 舟山 316022)

摘要: 采用自溶法水解鱿鱼内脏, 测定鱿鱼内脏自溶液 (squid viscera autolysates, SVAs) 的蛋白质提取率、可溶性氮含量、游离氨基酸含量和水解度, 分析SVAs总氨基酸组成, 评价其营养价值, 并对SVAs的体外抗氧化能力进行分析。结果表明: SVAs的蛋白质提取率为 $(53.89 \pm 1.17)\%$ 、可溶性氮质量分数为 $(78.47 \pm 1.16)\%$ 、游离氨基酸质量浓度为 (0.22 ± 0.03) mg/mL、水解度为 $(14.73 \pm 2.02)\%$ 。SVAs中必需氨基酸含量占氨基酸总量的37.03%, 呈味氨基酸 (天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸) 含量占氨基酸总量的42.40%。氨基酸组成与联合国粮农组织/世界卫生组织推荐氨基酸评分标准模式和全鸡蛋蛋白质氨基酸模式相比较, 得出SVAs是一种营养丰富、且氨基酸组成合理的优质蛋白源。研究还表明, SVAs具有良好的体外抗氧化能力, 其中清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基和羟自由基的 IC_{50} 值分别为0.24 mg/mL和0.74 mg/mL, 还原能力强于相同质量浓度的L-肌肽。

关键词: 鱿鱼内脏; 自溶液; 营养评价; 体外抗氧化性

Assesment of Total Amino Acids and Antioxidant Activity of Squid (*Todarodes pacificus*) Viscera Autolysates

ZHANG Kaiqiang¹, WEI Rongbian², SONG Ru^{1,*}, JIANG Xuhua³

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood, College of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. College of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 3. Zhejiang Fudan Tourism Food Co. Ltd., Zhoushan 316022, China)

Abstract: The squid viscera were hydrolyzed via autolysis to produce squid viscera autolysates (SVAs). The protein yield, soluble nitrogen content, free amino acid content and degree of hydrolysis (DH) of SVAs were assayed. Moreover, the total amino acid composition of SVAs was evaluated to determine their nutritional value. The *in vitro* antioxidant activity was also determined. Results showed the protein yield, soluble nitrogen content, free amino acid concentration and degree of hydrolysis of SVAs were $(53.89 \pm 1.17)\%$, $(78.47 \pm 1.16)\%$, (0.22 ± 0.03) mg/mL and $(14.73 \pm 2.02)\%$, respectively. The essential amino acid content of SVAs was 37.03%. Furthermore, the content of taste-active amino acids including aspartic acid, glutamic acid, alanine and glycine was 42.40%. According to the amino acid score pattern recommended by the FAO/WHO and the amino acid pattern of whole egg proteins, SVAs can be seen as a good source of rich proteins and reasonable amino acid components. SVAs displayed *in vitro* strong antioxidant activity with IC_{50} values for scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals and hydroxyl radicals of 0.24 and 0.74 mg/mL, respectively. In addition, SVAs showed stronger reducing power compared with the same concentration of L-carnosine.

Key words: squid viscera; autolysates; nutritional value assessment; *in vitro* antioxidant activity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701040

中图分类号: TS254.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 01-0238-06

引文格式:

张开强, 韦荣编, 宋茹, 等. 北太平洋鱿鱼 (*Todarodes pacificus*) 内脏自溶液总氨基酸组成质量评价和体外抗氧化性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 238-243. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701040. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Kaiqiang, WEI Rongbian, SONG Ru, et al. Assesment of total amino acids and antioxidant activity of squid (*Todarodes pacificus*) viscera autolysates[J]. Food Science, 2017, 38(1): 238-243. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701040. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-01-03

基金项目: 舟山市科技计划项目 (2014C41005); 浙江省自然科学基金项目 (LY15C200018)

作者简介: 张开强 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与安全. E-mail: zhangkaiqiang3@163.com

*通信作者: 宋茹 (1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为水产品加工与贮藏、食品化学与营养. E-mail: rusong@zjou.edu.cn

鱿鱼内脏是鱿鱼在加工过程中产生的一种主要副产物,约占鱿鱼所有副产物的80%左右,鱿鱼内脏营养物质含量丰富,其中蛋白质和脂肪的含量占内脏湿质量的20%以上^[1]。目前鱿鱼内脏主要还是加工成附加值较低鱼粉,不仅未充分发掘鱿鱼内脏的营养价值,而且鱼粉加工过程中产生的大量废气、废水,对环境造成极大污染,不适合水产加工企业可持续性、绿色环保发展要求。研究表明,通过添加外源酶水解方式,可以从水产品加工副产物中获取不同生物活性的蛋白水解液、肽类或氨基酸。如杨涛等^[2]利用碱性蛋白酶水解海参内脏,得到对羟自由基和超氧阴离子自由基有良好清除作用的海参多肽。姜梦云等^[3]采用复合蛋白酶水解鳗鱼加工副产物,制备出对微生物有促生长作用的培养液。刘春娥等^[4]研究了不同蛋白酶对鱿鱼内脏的水解效果,得到了氨基酸含量丰富的水解液。

水产动物内脏本身就富含多种内源性蛋白酶,如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胶原蛋白酶和弹性蛋白酶等^[5],这些蛋白酶在适宜的条件下能够水解自身蛋白(自溶作用)或外加蛋白,生成具有不同生物活性或营养价值的蛋白水解液。Klomklao等^[6]用杂交鳃鱼内脏提取物水解小牙鲷鱼肉蛋白,得到蛋白回收率高、氨基酸组成丰富的水解液;郑杰等^[7]利用海参肠组织的自溶作用制备出有体外抗氧化性的自溶液;Samaranayaka等^[8]报道自溶法制备的太平洋鳕鱼肉水解液要比外加蛋白酶(风味蛋白酶、中性蛋白酶)得到的水解液表现出更强的自由基清除能力。与添加外源酶方法相比较,自溶法成本低,而且内源蛋白酶的协同水解有利于功能型蛋白水解液的生成,所以利用自溶技术制备蛋白水解液有着广泛的应用前景。在前期鱿鱼内脏自溶工艺优化基础上,本实验以获得的鱿鱼内脏自溶液(squid viscera autolysates, SVAs)为研究对象,分析该自溶液的水解效果,测定水解产物总氨基酸组成,与联合国粮农组织/世界卫生组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, FAO/WHO)推荐氨基酸评分标准模式和全鸡蛋蛋白质氨基酸模式进行比较,并对其体外抗氧化能力进行分析,旨在为SVAs的应用提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

北太平洋鱿鱼(*Todarodes pacificus*)内脏由浙江富丹旅游食品有限公司提供。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil, DPPH)、L-肌肽 上海阿拉丁试剂有限公司;其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

TM-767型搅拌机 中山市海盘电器有限公司;
HHS型电热恒温水浴锅 上海博讯实业有限公司;
722型分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;
LGJ-10型真空冷冻干燥机 河南兄弟仪器设备有限公司;
L-8900型氨基酸自动分析仪 日本日立公司;
KJELTECTM 8400型全自动凯氏定氮仪 丹麦福斯有限公司。

1.3 方法

1.3.1 SVAs的制备

从水产加工企业收集新鲜鱿鱼内脏,冰袋保鲜运回实验室,手工分离混杂在一起的鱿鱼眼、鱿鱼皮、鱿鱼软骨,剥去内脏上附带的鱿鱼墨囊及精蛋白,将鱿鱼内脏用蒸馏水清洗除去表面附着物,然后用聚乙烯保鲜袋分装(1~2 kg/袋),-20℃条件下冻藏,备用。

将袋装鱿鱼内脏在流动水冲洗条件下解冻,切成小块,组织捣碎机捣碎,根据鱿鱼内脏糜的质量按照1:4的比例加入相应体积蒸馏水,振荡混匀,用12 mol/L的NaOH溶液调节混合浆液至pH 7.0,然后50℃水浴水解90 min,100℃加热灭酶10 min,流水将自溶浆液快速冷却至室温,8 000 r/min离心15 min,收集上清液,即为SVAs(squid viscera autolysates, SVAs),分装,-20℃条件下冻藏,备用。

1.3.2 蛋白质提取率的测定

采用凯氏定氮法^[9]测定鱿鱼内脏及SVAs中的蛋白质含量,根据公式(1)计算蛋白质提取率。

$$\text{蛋白质提取率}/\% = \frac{M_1}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: M_1 为自溶液蛋白质含量/(mg/g); M_0 为鱿鱼内脏蛋白质含量/(mg/g)。

1.3.3 可溶性氮含量的测定

参照文献[10]采用三氯乙酸沉淀法去除SVAs中非可溶性含氮物质和大分子蛋白质,然后采用凯氏定氮法测定SVAs的氮含量,根据公式(2)计算可溶性氮含量。

$$\text{可溶性氮含量}/\% = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: m_1 为三氯乙酸沉淀后自溶液氮含量/(mg/g); m_0 为三氯乙酸沉淀前自溶液氮含量/(mg/g)。

1.3.4 游离氨基酸含量的测定

采用甲醛电位滴定法^[9]进行测定。

1.3.5 水解度(degree of hydrolysis, DH)的测定

DH定义为水解过程中断裂肽键数与底物中肽键总数的百分比,参照文献[11]中的方法测定SVAs的DH,按公式(3)计算,其中SVAs的总氮含量和 α -氨基态氮含量分别采用凯氏定氮法和甲醛电位滴定法测定^[9]。

$$DH/\% = \frac{w_1}{w_0} \times 100 \quad (3)$$

式中： w_1 为 α -氨基态氮含量/(mg/g)； w_0 为总氮含量/(mg/g)。

1.3.6 氨基酸组成分析

SVAs经真空冷冻干燥后，称取10.4 mg SVAs冷冻干燥粉，用15 mL 6 mol/L的HCl溶解，然后在氮气保护下110 °C水解22 h，冷却，转移至25 mL容量瓶中，定容。取出1 mL SVAs在55 °C条件下氮气吹干，加入1 mL蒸馏水复溶，再烘干，反复3次。最后用1 mL去离子水（含0.02 mol/L HCl）充分溶解，混匀，0.45 μ m滤膜过滤，取滤液20 μ L用氨基酸自动分析仪进行成分分析。

1.3.7 SVAs的营养价值评价

参照文献[12]中FAO/WHO在1973年所建议的氨基酸评分标准模式和全鸡蛋蛋白质的氨基酸模式，利用氨基酸评分（amino acid score, AAS）、化学评分（chemical score, CS）和必需氨基酸指数（essential amino acid index, EAAI）来评价SVAs的营养价值，计算见公式（4）~（6）。

$$AAS = \frac{\text{样品中氨基酸含量}/(\text{mg/g pro})}{\text{FAO/WHO评分模式同种氨基酸含量}/(\text{mg/g pro})} \times 100 \quad (4)$$

$$CS = \frac{\text{样品中氨基酸含量}/(\text{mg/g pro})}{\text{全鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量}/(\text{mg/g pro})} \times 100 \quad (5)$$

$$EAAI = \sqrt[n]{\frac{\text{Lys}(t)}{\text{Lys}(s)} \times 100 \times \frac{\text{Arg}(t)}{\text{Arg}(s)} \times 100 \times \cdots \times \frac{\text{Met}(t)}{\text{Met}(s)} \times 100} \quad (6)$$

式（6）中： n 为样品中氨基酸种类数； t 为样品中某种氨基酸含量/(mg/g pro)； s 为全鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量/(mg/g pro)。

1.3.8 体外抗氧化能力的测定

将SVAs冷冻干燥粉，用去离子水溶解，得到不同质量浓度样品（0.0~2.0 mg/mL），分别采用DPPH自由基清除率、羟自由基清除率和还原力来分析SVAs的体外抗氧化能力，L-肌肽和抗坏血酸（VC）为对照样品。

1.3.8.1 DPPH自由基清除能力的测定

参照文献[13]中的方法进行，取1.5 mL待测样品与1.5 mL无水乙醇混合，加入375 μ L质量分数为0.02%的DPPH乙醇液，漩涡混合均匀，室温条件下暗处放置60 min，以无水乙醇调零，测定样品在517 nm波长处的吸光度，根据公式（7）计算DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (7)$$

式中： $A_{\text{对照}}$ 为用等体积的去离子水代替样品按如上操作后测得的吸光度； $A_{\text{空白}}$ 为用等体积的无水乙醇代替0.02%的DPPH乙醇液按如上操作后测得的吸光度； $A_{\text{样品}}$ 为样品在517 nm波长处的吸光度。

1.3.8.2 羟自由基清除能力的测定

根据文献[13]的方法稍加修改，将1.0 mL 0.75 mmol/L邻二氮菲溶液，2.0 mL pH 7.4磷酸盐缓冲液和1.0 mL 0.75 mmol/L FeSO₄溶液混合，加入1.0 mL待测样品，剧烈混匀，加入体积分数为0.12%的H₂O₂ 1.0 mL，37 °C条件下水浴60 min，用蒸馏水调零，测定样品在536 nm波长处的吸光度，根据公式（8）计算羟自由基清除率。

$$\text{羟自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (8)$$

式中： $A_{\text{对照}}$ 为用等体积去离子水代替样品按如上操作后测得的吸光度； $A_{\text{空白}}$ 为用等体积去离子水代替样品和0.12%的H₂O₂溶液按如上操作后测得的吸光度； $A_{\text{样品}}$ 为样品在536 nm波长处的吸光度。

1.3.8.3 还原力的测定

根据文献[14]中的方法，取1.0 mL待测样品与1.0 mL pH 6.6磷酸盐缓冲液和1.0 mL 质量分数1%铁氰化钾溶液混合，50 °C水浴20 min，然后流水冷却，加入1.0 mL 质量分数10%三氯乙酸溶液，振荡混合，3 000 r/min离心10 min，取上清液2 mL于试管中，加入2 mL蒸馏水和0.8 mL质量分数0.1%三氯化铁，充分混合，室温条件下放置10 min，相同反应条件下用等体积蒸馏水代替样品调零，测定样品700 nm波长处的吸光度。根据吸光度高低来判定还原能力，吸光度越高表示还原能力越强。

1.4 数据统计分析

SVAs水解效果评价和体外抗氧化性实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$) 表示。

2 结果与分析

2.1 SVAs水解效果评价

SVAs的蛋白质提取率为（53.89 $\pm$ 1.17）%，说明鱿鱼内脏经自身内源酶的水解作用，可将其中50%以上的蛋白质加以利用，其中SVAs可溶性氮含量达到（78.47 $\pm$ 1.16）%，表明SVAs主要由可溶性蛋白、肽类和氨基酸组成。SVAs中游离氨基酸质量浓度为（0.22 $\pm$ 0.03）mg/mL，DH值为（14.73 $\pm$ 2.02）%。DH值大小可反映出蛋白质的水解程度，DH值越高，表示水解液中的游离氨基酸含量越高^[15]。陈昭等^[11]报道鱿鱼肝脏在内源蛋白酶的作用下进行自水解，其中自水解温度为20~70 °C、初始pH 3.0~8.0、保温水解4 h时，所得自溶液的DH值均在30%左右，高于本实验结果，分析原因主要与保温水解时间不同有关（SVAs的自溶时间为90 min）。此外，蛋白

质和所用水解酶种类不同,也会影响水解液的DH值和生物活性,如Najafian等^[16]分别采用木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶水解巴丁鱼肌原纤维蛋白,其中木瓜蛋白酶水解液的DH值高达89.17%,且表现为最强的体外抗氧化性。而Klompong等^[17]用碱性蛋白酶2.4 L和风味蛋白酶500 L水解黄条纹鲮肉得到HA和HF两种水解液,其中HA水解液对DPPH自由基清除能力和Fe³⁺还原成Fe²⁺还原能力随着DH值的增加而降低,但HF水解液则未观察到该变化规律。Jamdar等^[18]报道了蛋白水解液的DH值过高会降低水解液的乳化性、发泡性等功能性。

2.2 SVAs氨基酸组成分析

表1 SVAs氨基酸组成分析
Table 1 acid composition of SVAs

mg/g		mg/g	
氨基酸种类	含量	氨基酸种类	含量
天冬氨酸(Asp)	16.96	亮氨酸*(Leu)	18.78
苏氨酸*(Thr)	10.01	酪氨酸(Tyr)	3.22
丝氨酸(Ser)	7.69	苯丙氨酸*(Phe)	14.16
谷氨酸** (Glu)	37.18	赖氨酸*(Lys)	12.74
甘氨酸** (Gly)	26.61	组氨酸(His)	4.98
丙氨酸** (Ala)	15.15	精氨酸(Arg)	14.22
半胱氨酸(Cys)	2.91	脯氨酸(Pro)	13.59
缬氨酸*(Val)	14.27	必需氨基酸总量(EAA)	83.75
蛋氨酸*(Met)	4.30	呈味氨基酸总量(DAA)	95.90
色氨酸(Trp)	—	氨基酸总量(TAA)	226.17
异亮氨酸*(Ile)	9.40		

注:*,必需氨基酸;**,呈味氨基酸;—,酸性条件下被破坏,未检测到。

由表1可知,SVAs中共检测出17种氨基酸,除色氨酸外,人体所需的必需氨基酸全部被检测出,EAA/TAA为37.03%,其值略低于FAO/WHO的推荐值40%^[19]。DAA占TAA的42.40%,其中呈鲜味的谷氨酸(37.18 mg/g,占TAA16.43%)和呈甜味的甘氨酸(26.61mg/g,占TAA11.77%)含量较高。据报道海参肠组织自溶液中谷氨酸和甘氨酸含量质量分数分别为16.2%和14.9%^[7],与实验结果接近。另外,水产品水解液或其调味品中的谷氨酸含量普遍比较高,与其鲜味特征具有一致性^[10,12,20-21]。但值得注意的是,同一类原料因制备方法不同,所得水解液的氨基酸组成和含量可能会存在一定差异,如用亚临界水萃取法得到的鲑鱼内脏水解液不仅谷氨酸的含量偏低,即使在萃取温度为160℃时,谷氨酸含量最高时也只有2.62 mg/100 g,而且精氨酸在萃取温度为190、220、280℃时均未检出^[22]。

一些游离疏水性氨基酸,如缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等,不仅本身具有一定的抗氧化作用,而且由这些疏水性氨基酸所组成的肽类往往具有更强的抗氧化活性^[10]。Najafian等^[16]从巴丁鱼肌原纤维蛋白的木瓜蛋白酶水解液中分离得到3条抗氧化肽:VPKNYFHDIV,

LVMFLDNQHRVIRH和FVNQPYLLYSVHMK,其中FVNQPYLLYSVHMK的抗氧化活性最强,认为肽段中疏水性氨基酸残基亮氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸对高抗氧化活性有贡献。由表1可以得出,SVAs中的疏水性氨基酸(甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸和亮氨酸)含量丰富,总量占TAA的51.40%。所以,SVAs在抗氧化型调味料方面有进一步开发的潜力。

2.3 SVAs的营养价值评价

将表1中的必需氨基酸含量转换成mg/g pro的形式,并和FAO/WHO提出的氨基酸评分标准模式以及全鸡蛋蛋白质氨基酸模式进行对比,分析SVAs的AAS、CS和EAAI,结果见表2。

表2 SVAs的必需氨基酸含量、AAS、CS及EAAI
Table 2 Essential amino acid contents, AAS, CS and EAAI of SVAs

氨基酸种类	FAO/WHO模式	全鸡蛋模式	SVAs	AAS	CS
苏氨酸	40	47	46.39	115.98	98.70
缬氨酸	50	66	66.13	132.26	100.20
蛋氨酸+半胱氨酸*	35	57	33.41	95.46	58.61
苯丙氨酸+酪氨酸	60	93	80.54	134.23	86.60
异亮氨酸	40	54	43.56	108.90	80.67
亮氨酸	70	86	87.03	124.33	101.20
赖氨酸	55	70	59.04	107.35	84.34
EAAI					85.90

注:*,第一限制性氨基酸。

从表2中AAS结果可以看出,SVAs中必需氨基酸除了第一限制性氨基酸(蛋氨酸+半胱氨酸)比FAO/WHO推荐值略低以外,其他氨基酸含量评分高于FAO/WHO的推荐值,这说明SVAs的蛋白质营养价值非常高。CS是将待评定食品的必需氨基酸含量与鸡蛋蛋白相对应的氨基酸含量进行比较,CS值越接近100,表明食品的氨基酸组成与全鸡蛋蛋白必需氨基酸组成越接近。结果中SVAs中的苏氨酸、缬氨酸和亮氨酸和全鸡蛋蛋白氨基酸基本一致,(苯丙氨酸+酪氨酸)和赖氨酸的CS值为85左右,而(蛋氨酸+半胱氨酸)CS值仅为58.61。表2结果说明除了含硫氨基酸(蛋氨酸和半胱氨酸)外,SVAs的营养价值要高于FAO/WHO推荐值,而稍低于全鸡蛋模式。

2.4 SVAs的体外抗氧化性

2.4.1 DPPH自由基清除能力

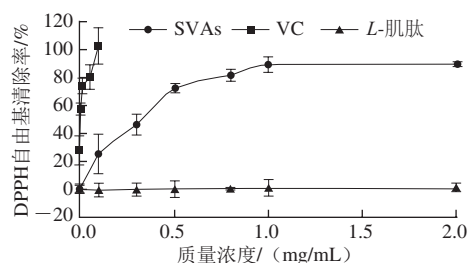


图1 SVAs质量浓度对DPPH自由基清除率的影响
Fig. 1 DPPH radical-scavenging activity of SVAs

由图1可知,当SVAs质量浓度在0.0~1.0 mg/mL范围时,其DPPH自由基清除能力随着质量浓度的增大而增强,在1.0 mg/mL时,SVAs对DPPH自由基的清除率达到90%以上。SVAs清除50%DPPH自由基时质量浓度为0.24 mg/mL (IC_{50} 值),其DPPH自由基清除能力虽然低于同质量浓度的VC,但是强于相同质量浓度的L-肌肽和一些鱼蛋白水解液,如虎头鲨肌浆蛋白中性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解液的DPPH自由基 IC_{50} 值分别为1.44 mg/mL和1.48 mg/mL^[23]。DPPH自由基是一种醇溶性自由基,SVAs中疏水性氨基酸含量较高,将有利于SVAs中一些疏水性较强肽段的形成,从而提高其DPPH自由基清除效果。

2.4.2 羟自由基清除能力

羟自由基是最为活跃的一种自由基,易与体内细胞和组织内物质发生反应,甚至能直接引起DNA损伤,对人体健康产生危害^[19]。因此,羟自由基清除能力是评价抗氧化剂发挥抗氧化性能的一个重要指标,SVAs体外羟自由基清除能力见图2。

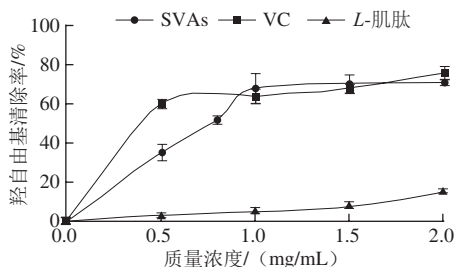


图2 SVAs质量浓度对羟自由基清除率的影响

Fig. 2 Hydroxyl radical-scavenging activity of SVAs

由图2可知,SVAs清除羟自由基能力明显强于相同质量浓度的L-肌肽,而且在质量浓度小于1.0 mg/mL时,SVAs对羟自由基的清除具有剂量依赖性,即随着质量浓度的增大,SVAs清除羟自由基能力也逐渐地增强。SVAs清除羟自由基的 IC_{50} 值为0.74 mg/mL,当质量浓度大于1.0 mg/mL时,SVAs与VC表现出相近的羟自由基清除率。Saidi等^[24]在研究金枪鱼加工副产物的风味蛋白酶水解液时发现,羟自由基清除能力和水解液中肽分子质量大小和氨基酸组成有着密切的关系,低分子质量肽的羟自由基清除效果要好于高分子质量肽,而一些芳香族氨基酸,如酪氨酸和苯丙氨酸的存在有利于提高水解液的羟自由基清除效果。此外,疏水性氨基酸包括缬氨酸、丙氨酸和亮氨酸等,酸性氨基酸谷氨酸均与肽段表现出强羟自由基清除能力有关^[23,25]。SVAs中与羟自由基清除有关的氨基酸含量丰富,说明该自溶液是一种非常好的羟自由基清除剂。

2.4.3 还原力

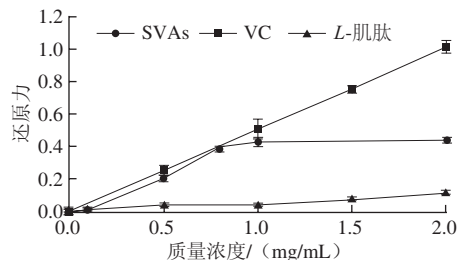


图3 SVAs的还原力分析

Fig. 3 Reducing power of SVAs

在还原力实验中,抗氧化剂作为电子的供体,能将铁氰化钾中的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,而后 Fe^{2+} 再与 $FeCl_3$ 反应生成在700 nm波长处有最大吸光度的普鲁士蓝($Fe_4(Fe(CN)_6)_3$)^[26]。因此,700 nm波长处吸光度越大,表示样品的还原能力越强。由图3可知,在质量浓度低于1.0 mg/mL时,SVAs的还原能力具有典型的剂量依赖性,与其DPPH自由基和羟自由基清除特性具有一致性。当质量浓度大于1.0 mg/mL时,虽然SVAs的还原能力明显低于VC,但是明显强于L-肌肽。蛋白水解过程中所使用酶种类和水解液DH值大小将直接影响水解液中肽生成和其氨基酸序列组成,肽段中的酸性氨基酸残基(谷氨酸和天冬氨酸)和碱性氨基酸残基(精氨酸、组氨酸和赖氨酸)可以作为供氢体和金属螯合剂,有助于肽类还原能力发挥^[24,27]。由表1氨基酸分析结果可计算出SVAs中的酸性氨基酸(谷氨酸37.18 mg/g、天冬氨酸16.96 mg/g)和碱性氨基酸(精氨酸14.22 mg/g、赖氨酸12.74 mg/g、组氨酸4.98 mg/g)总量占到氨基酸总量的38.06%,但是SVAs中活性肽的结构解析还有待进一步研究。

3 结论

SVAs可溶性氮含量高,而且氨基酸组成合理,第一限制氨基酸为(蛋氨酸+半胱氨酸),其余必需氨基酸含量均高于FAO/WHO的推荐值。SVAs的体外DPPH自由基和羟自由基清除能力以及还原力要强于同质量浓度的L-肌肽,有进一步开发为功能型风味肽的应用前景。但是,SVAs中活性肽的分离及鉴定尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 李朝宗,司伟兰,段杉.以鲑鱼内脏酿造鲑鱼油的制曲工艺研究[J].中国调味品,2011,36(12): 83-86. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2011.12.023.
- [2] 杨涛,万端极,吴正奇,等.海参内脏制备海参多肽工艺优化及其抗氧化测定[J].食品科技,2014,39(3): 218-223.
- [3] 姜梦云,洪滨,杨晓霞,等.鳃功能性水解鱼蛋白的研究[J].大连海洋大学学报,2015,30(5): 531-535. DOI:10.16535/j.cnki.dlhyxb.2015.05.015.

- [4] 刘春娥, 洪林, 曹立民, 等. 鲑鱼内脏蛋白质酶解工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(9): 83-86. DOI:10.3969/j.issn.1002-0306.2004.09.029.
- [5] SHAHIDI F, KAMIL Y V A J. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2001, 12(12): 435-464. DOI:10.1016/S0924-2244(02)00021-3.
- [6] KLOMKLAO S, KISHIMURA H, BENJAKUL S. Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle[J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 1006-1012. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.09.037.
- [7] 郑杰, 吴海涛, 朱蓓薇, 等. 海参肠自溶水解物抗氧化活性的研究[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(5): 313-317. DOI:10.3969/j.issn.1674-1404.2011.05.001.
- [8] SAMARANAYAKA A G P, LI-CHAN E C Y. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*)[J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 768-776. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.08.076.
- [9] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 79-80.
- [10] 宋茹, 汪东风, 谢超, 等. 黄鲫胃蛋白酶解液体外抗氧化、抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 127-131.
- [11] 陈昭, 田元勇, 马春, 等. 鲑鱼肝脏自水解过程中内源蛋白酶的作用研究[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 223-226. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201307046.
- [12] 王雪峰, 涂行浩, 吴佳佳, 等. 草鱼的营养评价及关键风味成分分析[J]. 中国食品学报, 2014, 14(12): 182-189.
- [13] de AVELLAR I G J, MAGALHÃES M M M, SILVA A B, et al. Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2004, 1675(1/2/3): 46-53. DOI:10.1016/j.bbagen.2004.08.006.
- [14] SONG Ru, WEI Rongbian, RUAN Guanqiang, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 221-229. DOI:10.1016/j.lwt.2014.06.043.
- [15] NG K L, AYOB M K, SAID M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 43: 725-731. DOI:10.1016/j.indcrop.2012.08.017.
- [16] NAJAFIAN L, BABJI A S. Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 452-461. DOI:10.1016/j.lwt.2014.07.046.
- [17] KLOMPONG V, BENJAKUL S, KANTACHOTE D, et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1317-1327. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.07.016.
- [18] JAMDAR S N, RAJALAKSHMI V, PEDNEKAR M D, et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 178-184. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.12.027.
- [19] CACCIUTTOLO M A, TRINH L, LUMPKIN J A, et al. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1993, 14(3): 267-276. DOI:10.1016/0891-5849(93)90023-N.
- [20] 章超桦, 邓尚贵, 洪鹏志. 虾组织快速自溶技术在海鲜调味料生产上的应用研究[J]. 食品发酵与工业, 2000, 26(2): 36-39. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2000.02.010.
- [21] 巍巍, 牟建楼, 王颀. 海湾扇贝酱营养成分及品质分析[J]. 食品工业, 2015, 36(1): 203-207.
- [22] KIM R H, ASADUZZAMAN A K M, YOU C H, et al. Stability of antioxidant properties and essential amino acids in squid viscera hydrolysate produced using subcritical water[J]. Fisheries and Aquatic Sciences, 2013, 16(2): 71-78. DOI:10.5657/fas.2013.0071.
- [23] NAJAFIAN L, BABJI A S. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 9: 280-289. DOI:10.1016/j.jff.2014.05.003.
- [24] SAIDI S, DERATANI A, BELLEVILLE M P, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process[J]. Food Research International, 2014, 65: 329-336. DOI:10.1016/j.foodres.2014.09.023.
- [25] ELIAS R J, KELLERBY S S, DECKER E A. Antioxidant activity of proteins and peptides[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48(5): 430-441. DOI:10.1080/10408390701425615.
- [26] XIE Zhengjun, HUANG Junrong, XU Xueming, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 370-376. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.03.078.
- [27] QIAN J, TANG Q L, CRONIN B, et al. Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of human serum albumin in a lyophilized formulation of interferon alfa-2b[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1194(1): 48-56. DOI:10.1016/j.chroma.2008.01.040.