

## 虾夷扇贝裙边酶解物美拉德反应产物的自由基清除活性

崔小凡, 杜椅楠, 孙世广, 韩佳润, 阎佳楠, 姜昕昱, 李傲婷, 吴海涛\*

(大连工业大学食品学院 国家海洋食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034)

**摘要** 以虾夷扇贝裙边为原料,利用中性蛋白酶制备其酶解物及美拉德反应产物。扇贝裙边蛋白的条带主要分布在 200, 97 ku 和 42 ku。其中性蛋白酶酶解 3 h 后,水解度达 28.95%。将酶解物与核糖反应制备美拉德反应产物,并分析其抗氧化活性和风味物质组成。结果表明:美拉德反应生成较多的中间产物和褐色物质。经美拉德反应后,酶解物生成较多挥发性成分,尤其是杂环化合物种类增加。此外,酶解物的羟基和 ABTS 自由基清除能力仅分别为 42.7%和 31.64%,且未表现出明显的 DPPH 自由基清除能力。然而,经 12 h 的美拉德反应后,酶解物的羟自由基、DPPH 和 ABTS 自由基清除能力均得到显著提高,表明扇贝裙边酶解物-核糖美拉德反应产物具有良好的抗氧化能力,可作为抗氧化剂应用于食品工业中。

**关键词** 虾夷扇贝; 裙边; 酶解物; 美拉德反应; 自由基清除活性

**文章编号** 1009-7848(2022)08-0276-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.08.030

扇贝(*Patinopecten yessoensis*)属双壳软体动物,具有丰富的营养价值。2018 年,中国扇贝的水产养殖总量高达 192 万 t。近年来,扇贝养殖业发展迅速,在其加工过程中,裙边大多作为副产物被丢弃,造成了严重的资源浪费。

大量研究表明酶解可有效回收水产品副产物的功能成分,其水解产物大多具有良好的抗氧化能力<sup>[1]</sup>,前期研究表明<sup>[2]</sup>,扇贝裙边中富含丰富的蛋白质,可以通过酶解方式来制备其功能性酶解产物。研究发现,虾夷扇贝的肌肉<sup>[2]</sup>、扇贝边<sup>[3]</sup>和马氏珠母贝肉的酶解物<sup>[4]</sup>均具有良好的自由基清除能力。然而,有关虾夷扇贝雄性生殖腺酶解产物抗氧化能力的研究未见报道。

美拉德反应是在加热过程中肽、蛋白质、氨基酸与还原糖之间的反应,其所产生的风味物质会进一步影响食品风味<sup>[5]</sup>。此外,一些研究表明,美拉德反应可以用来提高大豆蛋白酶解物<sup>[6]</sup>、海参肠酶解物<sup>[7]</sup>、鲷鱼鳞多肽<sup>[8]</sup>和牡蛎酶解物<sup>[9]</sup>的抗氧化活性。本课题组前期研究发现,美拉德反应有效增强了栉孔扇贝裙边酶解物的羟自由基和 ABTS 自由基清除能力<sup>[10]</sup>。美拉德反应对虾夷扇贝裙边酶解

物抗氧化活性的影响有待研究。

本文用虾夷扇贝裙边酶解物和核糖制备美拉德反应产物,探究反应过程中中间体物质的形成,颜色和挥发性化合物的变化。此外,探究酶解物和美拉德反应产物的羟自由基、DPPH 和 ABTS 自由基清除能力,为虾夷扇贝裙边蛋白的高值化利用提供试验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 原料及主要试剂

虾夷扇贝,购自大连长兴市场;中性蛋白酶,购自南宁庞博生物工程有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和购自美国 Sigma-Aldrich 公司;核糖、木瓜蛋白酶、L-酪氨酸、EDTANa<sub>2</sub>,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;二甲基吡咯啉氮氧化物(DMPO),购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;2,6-二叔丁基对甲酚(BHT),购自天津光复精细化工研究所;其它试剂均为生化试剂或分析纯级。

#### 1.2 主要仪器与设备

电子顺磁共振波谱仪(ESR),购自德国 Bruker BioSpin 公司;气相色谱-质谱联用仪,购自安捷伦(中国)科技有限公司;高速低温离心机,购自 HITACHI;精密电子天平,购自美国双杰兄弟(集团)有限公司;精密 pH 计,购自上海雷磁仪器厂;酶标定量测定仪,购自 TECAN;紫外-可见分光光度计,购自上海光谱仪器有限公司。

收稿日期: 2021-08-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC0311205);辽宁省兴辽英才计划项目(XLYC1907101)

作者简介: 崔小凡(1996—),女,硕士生

通信作者: 吴海涛 E-mail: wht205@163.com

### 1.3 方法

1.3.1 制备虾夷扇贝裙边冻干粉 虾夷扇贝裙边经沸水浴 10 min 变性处理后冷冻干燥, 粉碎后于  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.3.2 SDS-PAGE 分析 参照 Zhao 等<sup>[11]</sup>的方法对虾夷扇贝裙边冻干粉的蛋白质分子量分布进行分析。用  $1\times$  上样缓冲液制备蛋白质浓度为  $1\text{ mg/mL}$  的样品溶液, 经沸水浴 10 min 后摇动 12 h, 将蛋白质样品 ( $10\text{ }\mu\text{L}$ ) 加载到聚丙烯酰胺凝胶中 (5% 的浓缩胶, 10% 的分离胶) 进行分析, 浓缩胶电流为  $7\text{ mA}$ , 分离胶电流为  $15\text{ mA}$ 。试验结束后, 用考马斯亮蓝 G250 染色液对凝胶进行染色, 脱色后成像。

1.3.3 制备虾夷扇贝裙边酶解物 采用中性蛋白酶 (酶活为  $204\ 326\text{ U/g}$ ) 对虾夷扇贝裙边冻干粉进行酶解, 酶解条件为: 加酶量  $3\ 000\text{ U/g}$  蛋白、底物质量分数 4%、pH 7.0、酶解温度  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 酶解时间分别为 0.5, 1, 2, 3 h。酶解后的溶液于沸水浴 10 min 后离心  $4\ 000\times g$ , 10 min, 将上清液收集后冷冻干燥, 制得不同酶解时间的虾夷扇贝裙边酶解物 (SMHs) 并通过 pH-stat 法计算其水解度 (DH)<sup>[12]</sup>, 其计算公式如下:

$$\text{DH}(\%) = \frac{B \times N_b}{M_p} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (1)$$

式中,  $B$ ——保持 pH 不变所消耗碱 (NaOH) 的体积, mL;  $N_b$ ——碱的物质的量浓度, mol/L;  $M_p$ ——底物中蛋白总量, g;  $h_{\text{tot}}$ ——底物蛋白质中肽键总数, mmol/g, 其中本研究中  $h_{\text{tot}}$  为 7.5;  $\alpha$ ——水解过程中  $\alpha$ -氨基的解离度, 具体计算公式如下:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad (2)$$

式中, pH——溶液的酸碱度; pK——电离平衡常数。

1.3.4 制备美拉德反应产物 用去离子水配制  $20\text{ mg/mL}$  的酶解物溶液和  $40\text{ mg/mL}$  的核糖溶液, 将两种溶液按体积比 1:1 混合后调至 pH 7.0, 分装于  $4\text{ mL}$  旋盖玻璃瓶中, 然后置于干浴器中在  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下加热 4 h 或 12 h 以获得虾夷扇贝裙边酶解物-核糖美拉德反应产物 (MRPs), 将美拉德反应产物冷冻干燥后于  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.3.5 美拉德反应产物的褐变程度 将制得的美拉德反应产物溶液用去离子水稀释到合适倍数后用紫外分光光度计测定其在波长  $294\text{ nm}$  (稀释 100 倍) 和  $420\text{ nm}$  (稀释 5 倍) 处的吸光值。

1.3.6 美拉德反应产物挥发性物质组成 取  $3\text{ mL}$  美拉德产物原液于  $10\text{ mL}$  分析小瓶中, 加入  $20\text{ }\mu\text{L}$  的内标物 (环己酮,  $100\text{ mg/L}$ ) 后通过 HS-SPME/GC/MS 进行检测, 色谱柱为 HP-5MS 5% 聚苯基甲基硅氧烷  $30\text{ m} \times 250\text{ }\mu\text{m} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ , 升温程序为: 初温  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保持 3 min; 以  $3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$  的速度升温到  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 以  $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$  的速度升温至  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 以  $20\text{ }^{\circ}\text{C/min}$  的速度升温至  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保持 5 min; 分流进样, 载气流量 (He) 为  $1.5\text{ mL/min}$ , 进样量为  $1\text{ }\mu\text{L}$ 。扫描条件为: 全谱扫描; 质量扫描范围  $29\sim 400\text{ amu}$ ; 电子能量  $70\text{ eV}$ ; 传输线温度  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 四极杆温度  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 离子源温度  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.7 DPPH 自由基的清除能力测定 利用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (pH 6.0,  $0.1\text{ mol/L}$ ) 配制不同的样品溶液, 取  $300\text{ }\mu\text{L}$  样品溶液与  $200\text{ }\mu\text{L}$  DPPH ( $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ ) 溶液混合均匀后避光反应 30 min,  $2\ 000\times g$  离心 10 min 后收集上清, 转移至毛细管中, 将毛细管的一端用凡士林封口后, 放入谐振腔中检测其 ESR 波谱, 测试条件为: 中心磁场强度  $3\ 317.71\text{ G}$ , 微波功率  $5.07\text{ mW}$ , 微波频率  $0.44\text{ GHz}$ , 调制幅度  $1.00\text{ G}$ , 调制频率为  $100.00\text{ kHz}$ , 时间常数  $327.68\text{ ms}$ , 转换时间  $160.00\text{ ms}$ 。同时以 BHT 为对照, DPPH 的清除率 ( $E$ ) 的计算公式如下:

$$E(\%) = \frac{h_0 - h_x}{h_0} \times 100 \quad (3)$$

式中,  $h_0$ ——将 PBS 溶液替代样品溶液后测得 ESR 图谱中间最高峰的峰高;  $h_x$ ——样品溶液测得的 ESR 图谱中间最高峰的峰高。

1.3.8 羟自由基清除能力测定 参照 Wu 等<sup>[13]</sup>方法对虾夷扇贝酶解物美拉德反应产物的羟自由基清除能力进行检测。利用磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4,  $0.15\text{ mol/L}$ ) 配制不同的样品溶液。取样品溶液  $78\text{ }\mu\text{L}$ , DMPO 溶液 ( $1\text{ mmol/L}$ )  $5\text{ }\mu\text{L}$ , EDTANa<sub>2</sub> 和 FeSO<sub>4</sub> 混合液 ( $6\text{ mmol/L}$ )  $10\text{ }\mu\text{L}$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6%)  $8\text{ }\mu\text{L}$ , 混合均匀于  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下反应 30 min 后转移到毛细管中, 将毛细管的一端用凡士林封口后, 放

入谐振腔中检测羟自由基信号谱图,测试条件为中心磁场强度 3 368.99 G,微波功率 0.721 mW,微波频率 9.44 GHz,调制幅度 1.00 G,调制频率为 100 kHz,时间常数 81.92 ms,转换时间 40 ms,同时以维生素 C 为对照,羟自由基清除率( $E$ )计算公式如下:

$$E(\%) = \frac{h_1 - h_2}{h_1} \times 100 \quad (4)$$

式中, $h_1$ ——将 PBS 溶液替代样品溶液后测得 ESR 图谱中第 2 个峰的峰高; $h_2$ ——样品溶液测得的 ESR 图谱中第 2 个峰的峰高。

1.3.9 ABTS 自由基清除能力测定 参照 Han 等<sup>[10]</sup>的方法进行试验。将过硫酸钾 (2.4 mmol/L) 与 ABTS 溶液 (7.0 mmol/L) 按照体积比 1:1 的比例混合均匀后于室温下避光反应 12 h 制备 ABTS 自由基储备液。使用前以 pH 7.4 的 PBS 溶液 (0.2 mol/L) 为溶剂稀释 ABTS 自由基储备溶液至波长 734 nm 处吸光值为  $0.7 \pm 0.02$ 。将 10  $\mu$ L 样品溶液与 1 mL 稀释后的 ABTS 溶液混合避光反应 6 min 后在波长 734 nm 处测定其吸光值并使用如下公式计算样品的 ABTS 自由基清除率( $S$ ):

$$S(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

式中, $A_0$ ——超纯水代的吸光值; $A_s$ ——样品的吸光值。

1.3.10 统计方法 试验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 <http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html> 在线软件进行 student's  $t$  检验, $P < 0.05$  表示结果具有显著性差异。

## 2 结果讨论

### 2.1 虾夷扇贝裙边蛋白质分子质量分布

凯氏定氮结果表明,虾夷扇贝裙边冻干粉中含有约 77% 的蛋白质。由图 1 可知,虾夷扇贝裙边中蛋白质主要分布于 200 ku (肌球蛋白重链),97 ku (副肌球蛋白) 和 42 ku (肌动蛋白)。肌球蛋白重链和肌动蛋白是水产动物中常见的蛋白质组分,比如竹荚鱼 (*Trachurus trachurus*)<sup>[14]</sup> 和大黄鱼<sup>[15]</sup>。Nozawa 等<sup>[16]</sup> 发现虾夷扇贝肌肉中的蛋白质组分主要分布在 230, 210, 100 ku 和 45 ku。此外,分子质量约为 97~110 ku 的副肌球蛋白也广泛存在于海

洋动物肌肉中<sup>[17]</sup>,比如章鱼<sup>[18]</sup>和海参<sup>[11]</sup>。

### 2.2 虾夷扇贝裙边的酶解曲线

由图 2 所示,在酶解前 30 min 内水解度快速上升,分别达到了 17.33% 和 8.37%,在 30~120 min 缓慢升高,120 min 后趋于稳定。在水解 3 h 后,虾夷扇贝裙边酶解物的水解度 (DH) 达到 28.95%。Wu 等<sup>[13]</sup> 也发现用中性蛋白酶酶解虾夷扇贝雌性生殖腺 3 h 后,其水解度能够达到 34.25%,这些结果表明中性蛋白酶对虾夷扇贝裙边具有良好的酶解作用。

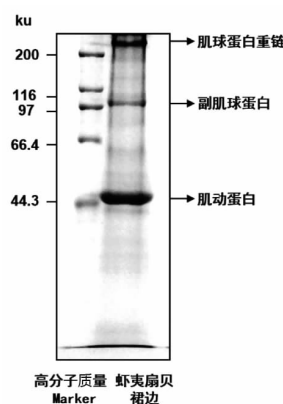


图 1 虾夷扇贝裙边的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE of scallop (*P. yessoensis*) mantle

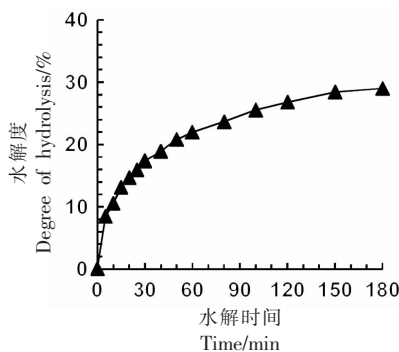


图 2 虾夷扇贝裙边粉酶解过程中的水解度曲线

Fig.2 DH curve of scallop (*P. yessoensis*) skirt powder in the process of hydrolysis

### 2.3 虾夷扇贝裙边酶解物-核糖美拉德反应产物的紫外吸光度及褐变程度

美拉德反应产物在波长 294 nm 和 420 nm 处的吸光值可以分别用来表示美拉德反应中间产物的生成和褐变程度。如图 3a 所示,随着加热时间的延长,美拉德反应产物在波长 294 nm 下的吸光

度显著升高,加热 4 h 和 12 h 后获得的美拉德反应产物的吸光度是酶解物的 3.33 倍和 10.67 倍。海参肠酶解物-核糖美拉德反应产物也呈现出了相似的结果<sup>[7]</sup>。

褐变程度也经常用来表征食物的美拉德反应程度。由图 3b 所示,加热时间为 0 h 的美拉德反应产物在波长 420 nm 处的吸光值仅有 0.07,然

而,加热 4 h 和 12 h 后,吸光度显著增加,尤其是加热 12 h 后美拉德反应产物的吸光度是未加热的 13 倍。Sun 等<sup>[9]</sup>研究发现,鸡肉副产物的 MRPs 褐变程度随着加热时间延长而增大。这些结果表明在美拉德反应过程中,有大量的中间产物和褐色物质生成。

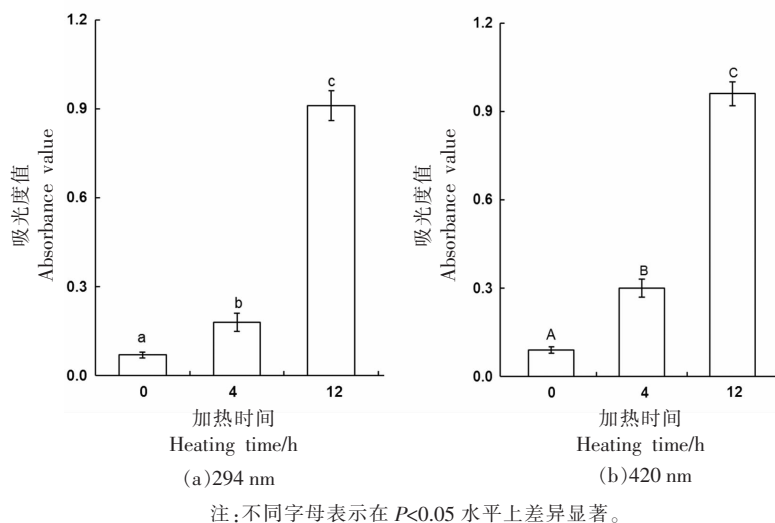


图 3 虾夷扇贝裙边酶解物-核糖美拉德产物在 294 nm(a)、420nm(b)的 UV 吸光度

Fig.3 The UV-vis spectra of the MRPs of scallop (*P. yessoensis*) skirt hydrolysates were obtained at 294 nm (a) and 420 nm (b)

#### 2.4 虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德产物挥发性成分分析

利用 GC-MS 对酶解物及其美拉德产物的挥发性成分进行分析,结果如表 1 所示,酶解物中只有 25 种挥发性成分,包括 13 种醛类、3 种酮类、1 种醇类、1 种酸类、1 种酯类、3 种杂环类和 3 种烷烃类,而美拉德反应产物中挥发性成分分别达到 32 种(美拉德反应 4 h)和 30 种(美拉德反应 12 h),与酶解物相比,经美拉德反应后有 1 种醛类、2 种酮类、6 种醇类、4 种酯类、11 种杂环类和 2 种烷烃类生成。此外不同加热时间获得的美拉德产物,生成的风味物质组成也有差异。由表 1 可知,杂环化合物的含量随着反应时间的增加而升高,尤其是糠醛(美拉德反应的标志性产物<sup>[20]</sup>)。经美拉德反应 4 h 后醇类的种类增加,但继续进行美拉德反应至 12 h 时,醇类的种类呈现降低的趋势,这可能是由于长时间的加热导致醇类物质的

挥发,使其检出量降低<sup>[21]</sup>。

醛是虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德产物中的主要挥发性成分。苯甲醛与甜味、果味、焦糖味有关<sup>[22]</sup>。在虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德产物中共鉴定出了 5 种酮,这些酮可以散发出令人愉悦的气味<sup>[23]</sup>。此外,其它挥发性化合物也可以改善食品的风味,例如苯甲醛(水果味、甜味)和 1,1-十二烷二醇(水果味),这些结果表明,美拉德反应可以用来改善虾夷扇贝裙边酶解物的风味。

由表 1 可知,杂环化合物是 12 h 后美拉德反应产物中的主要风味物质,尤其是糠醛,含量最高。Han 等<sup>[7]</sup>研究发现,糠醛含量与美拉德产物 DPPH 自由基清除能力之间的相关系数为 0.958。此外,美拉德反应后 2H-吡喃-6-羧酰胺 2H-吡喃-2-酮的含量也明显增加,这可能也会改善其自由基清除能力<sup>[7]</sup>。虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德产物的自由基清除能力需要进一步研究。

表1 虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德产物的GC-MS分析结果

Table 1 GC-MS analysis result of the scallop (*P. yessoensis*) mantle hydrolysates and MRPs

	保留时间/min	挥发性物质名称	相对含量/%		
			SMHs	MRPs-4 h	MRPs-12 h
醛类	5.368	戊醛	1.26	2.14	0.71
	10.16	乙醛	0.34	1.49	0.29
	14.869	庚醛	1.74	2.85	1.27
	17.187	苯甲醛	0.69	1.32	1.10
	18.369	辛醛	1.93	2.42	1.56
	19.456	2-氟-苯甲醛	0.65	-	0.49
	19.742	反-2-辛烯醛	-	0.10	-
	19.73	2-乙基-2-丁烯醛	0.09	-	-
	20.668	壬醛	0.43	0.47	0.22
	20.79	2,5-双(三甲基硅氧基)苯甲醛	0.13	-	-
	22.456	癸醛	0.31	0.32	0.29
	23.36	反-2-癸烯醛	0.10	0.11	-
	23.985	十一醛	0.11	0.10	-
	27.809	十四醛	0.06	-	0.11
	酮类	17.866	2,5-辛二酮	0.05	-
20.42		2-壬酮	0.18	0.32	0.37
17.778		2,3-辛二酮	-	0.15	-
24.477		3-癸烯-2-酮	0.69	0.97	0.51
23.791		2-十一酮	-	-	0.13
醇类	19.082	2-乙基-1-己醇	-	-	0.33
	19.482	氯苄硫醇	-	0.10	-
	20.546	1-辛醇	-	0.11	-
	21.621	反-1,3-丁二烯-1-醇	-	0.05	-
	23.985	反-9-十八烯-1-醇	-	0.19	-
	25.19	反-2-癸烯-1-醇	-	0.43	-
	26.627	1,1-十二二醇	0.39	0.15	0.38
酸类	6.608	乙酸	0.23	0.62	0.84
酯类	17.523	甲酸庚酯	-	0.35	-
	21.495	苯甲酸,2-三甲氧甲硅烷基-三甲氧甲硅烷基聚酯	-	0.16	0.12
	22.067	2-咪喃甲酸,2-甲基戊基酯	0.20	0.06	-
	26.345	2-丙烯酸,2-三甲氧甲硅烷基-三甲氧甲硅烷基聚酯	-	-	0.09
	26.345	乙二酸,双-三甲基硅基酯	-	-	0.16
杂环类	11.834	糠醛	-	12.67	92.98
	13.424	3(2H)-咪嗪酮	-	0.05	0.12
	15.41	2-吡喃-甲酰胺	-	0.14	0.26
	17.523	2H-吡喃-2-酮	-	0.13	0.42
	17.698	3,4-二甲基-1-H-吡唑	-	-	0.11
	18.064	2-戊基咪喃	0.18	-	-
	19.341	2,2'-双咪喃	0.28	-	-
	19.345	5-甲酰基-1H-吡咯-3-甲基	-	-	0.11
	19.738	3,4-二氢-咪喃	-	-	0.09
	21.625	21(H)吡啶酮	-	0.04	0.10
	22.258	2-正-庚基咪喃	0.04	-	-
	22.067	4-吡啶	-	-	0.08
	23.463	4-甲氧基吡啶	-	-	0.04
	25.106	2-甲氧基咪喃	-	0.05	0.11

(续表 1)

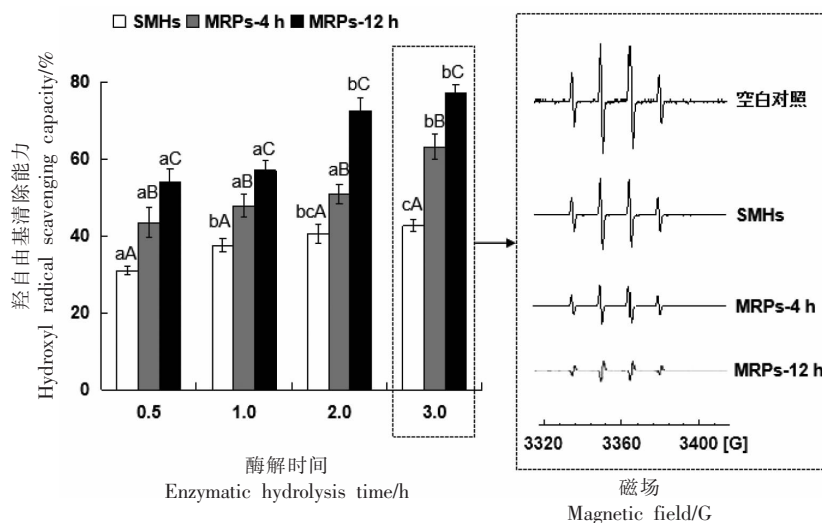
	保留时间/min	挥发性物质名称	相对含量/%		
			SMHs	MRPs-4 h	MRPs-12 h
烷烃类	17.873	3-乙基-2-甲基-戊烷	-	0.18	-
	20.027	1,2-二甲基-环丁烷	-	-	-
	21.724	1,2-二甲基-环丙烷	-	0.09	-
	23.802	6-亚甲基-双[3.1.0]己烷	1.08	-	-
	24.118	1,2,3-三[三甲氧甲硅烷基]-苯	0.80	-	-
	27.592	1,9-癸二炔	0.15	0.32	0.45

注：“-”表示未检测到对应物质。

## 2.5 虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德反应产物的自由基清除能力

**2.5.1 羟自由基的清除能力** 羟自由基是重要的活性氧，具有很强的氧化能力。进一步通过 ESR 的方法来检测虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德反应产物的羟自由基清除能力<sup>[13]</sup>。由图 4 可知在同一酶解时间下，羟自由基清除能力呈现 MRP-12 h > MRP-4 h > SMHs 的趋势，并且酶解 1 h 以后，酶解物本身的羟自由基清除能力也显著提高。另

外，美拉德反应 12 h 后获得的反应产物的羟自由基清除能力是酶解物的 1.51~1.80 倍。通过酶解 3 h 后的酶解物及其相应的美拉德反应产物的 ESR 信号可以看出，酶解物和美拉德反应产物的 ESR 信号强度均显著下降，且随着美拉德反应时间延长，信号强度降低的越明显，这与栉孔扇贝裙边酶解物的美拉德反应产物的研究结果一致<sup>[24]</sup>。这些结果表明，美拉德反应可以有助于提高虾夷扇贝裙边酶解物的羟自由基清除能力。



注：图中不同小写字母表示同一样品在不同酶解时间下的差异显著 ( $P < 0.05$ )；图中不同大写字母表示不同样品在同一酶解时间下的差异显著 ( $P < 0.05$ )，下同。

图 4 虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德反应产物的羟自由基清除能力和 ESR 图谱

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging capacity and the ESR spectra of the scallop (*P. yessoensis*) mantle hydrolysates and MRPs

**2.5.2 DPPH 自由基清除能力** 图 5 显示了在不同酶解时间下，虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德反应产物的 DPPH 自由基清除能力。低浓度的酶解物在不同酶解时间下 DPPH 自由基清除能力均为 0%，无明显 DPPH 自由基清除能力。然而，经过

美拉德反应后，MRPs 表现出了较强的 DPPH 自由基清除能力。此外，酶解 1~3 h 后的酶解物对应的美拉德产物具有更高的 DPPH 自由基清除能力。通过酶解 3 h 后的酶解物及其相应的美拉德反应产物的 ESR 信号可以看出，酶解物的 ESR 信号强

度与空白组相比没有明显变化,而美拉德反应产物的ESR信号强度显著下降,且随着美拉德反应时间延长,信号强度降低的越明显。进一步对虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德反应产物进行冻干后

分析,发现其 $IC_{50}$ 值分别为10.3(SMHs),0.57 mg/mL(MRPs-4 h)和0.37 mg/mL(MRPs-12 h),均高于BHT(0.016 mg/mL)。

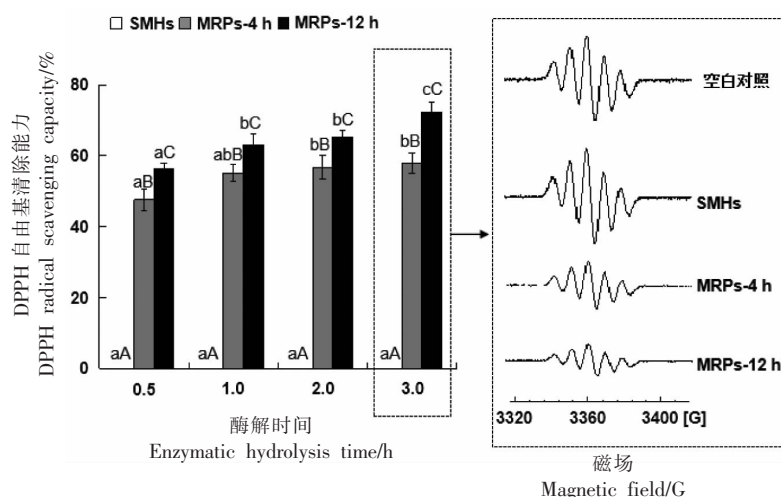


图5 虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德反应产物的DPPH自由基清除能力和ESR图谱  
Fig.5 DPPH radical scavenging capacity and the ESR spectra of the scallop (*P. yessoensis*) mantle hydrolysates and MRPs

2.5.3 ABTS自由基的清除能力 图6显示了虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德反应产物的ABTS自由基清除能力。在同一酶解时间下,ABTS自由基清除能力呈现MRPs-12 h > MRPs-4 h > SMHs的趋势,并且酶解1 h以后,酶解物本身的ABTS自由基清除能力也显著提高。酶解3 h后获得的酶解物具有最高的ABTS自由基清除能力(31.64%)。此外,经美拉德反应后,不同酶解时间获得的酶解物的ABTS自由基清除能力均有了显著提高,其中美拉德反应12 h获得的酶解物的ABTS自由基清除能力是酶解物的2.18~2.49倍,海参肠酶解物-核糖美拉德产物也显示出相似的结果<sup>[25]</sup>。综上,美拉德反应可以用作提高虾夷扇贝裙边酶解物抗氧化能力的有效方法。

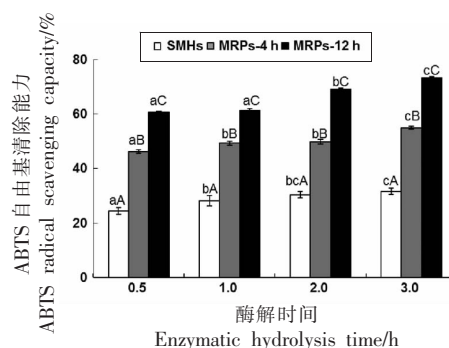


图6 虾夷扇贝裙边酶解物及其美拉德反应产物的ABTS自由基清除能力

Fig.6 The ABTS radical scavenging capacity of the scallop (*P. yessoensis*) mantle hydrolysates and MRPs

系尚需进一步研究。

### 3 结论

美拉德反应后,虾夷扇贝裙边酶解物的中间产物数量、褐变程度和风味物质均有所增加。并且其羟自由基、DPPH和ABTS自由基清除能力也得到显著改善。综上,美拉德反应可用于增强虾夷扇贝裙边酶解物的自由基清除能力,而虾夷扇贝裙边酶解物的美拉德反应与自由基清除能力之间的关

### 参 考 文 献

- [1] JAEYOUNG J, KAHWA L, MIHYUN L, et al. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis[J]. Food Research International, 2009, 42(9): 1266-1272.

- [2] ZHOU D Y, TANG Y, ZHU B W, et al. Antioxidant activity of hydrolysates obtained from scallop (*Patinopecten yessoensis*) and abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) muscle[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 815–822.
- [3] 张超, 唐志红, 赵振军, 等. 碱性蛋白酶水解扇贝边条件的优化[J]. 食品科技, 2015, 4(1): 162–165. ZHANG C, TANG Z H, ZHAO Z J, et al. Optimizing hydrolysis conditions of scallop brim by alkaline protease [J]. Food Science and Technology, 2015, 4(1): 162–165.
- [4] 胡雪琼, 周盛华, 夏杏洲, 等. 马氏珠母贝肉酶解产物清除自由基活性的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 3(5): 97–99. HU X Q, ZHOU S H, XIA X Z, et al. Study on free radicals scavenging activity of enzymatic hydrolysate from *Pinctada martensii* meat [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 3(5): 97–99.
- [5] NORMAH I, NOORASMA M. Flavor improvement of mud clam (*Polymesoda erosa*) hydrolysate by using Maillard reaction [J]. International Food Research Journal, 2018, 25(3): 1146–1152.
- [6] LIU P, HUANG M G, SONG S Q, et al. Sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from soy protein hydrolysates with different molecular weight distribution [J]. Food & Bioprocess Technology, 2012, 5(5): 1775–1789.
- [7] HAN J R, ZHU Z M, WU H T, et al. Kinetics of antioxidant-producing Maillard reaction in the mixture of ribose and sea cucumber (*Stichopus japonicus*) gut hydrolysates [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2017, 26(8): 993–1002.
- [8] 方菲, 陈惠敏, 汪少芸. 鲷鱼鳞多肽-木糖美拉德反应产物的制备、结构与功能[J]. 食品科学, 2018, 39(8): 182–190. FANG F, CHEN H M, WANG S H. Preparation, structure and function of Maillard reaction products derived from snapper fish scalespeptides and xylose [J]. Food Science, 2018, 39(8): 182–190.
- [9] 刘海梅, 陈静, 郝良文, 等. 葡萄糖-牡蛎酶解液美拉德反应体系的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 47–52. LIU H M, CHEN J, HAO L W, et al. Antioxidant activity of Maillard reaction products from glucose and oyster enzymatic hydrolysate [J]. Food Science, 2018, 39(17): 47–52.
- [10] HAN J R, YAN J N, SUN S G, et al. Characteristic antioxidant activity and comprehensive flavour compound profile of scallop (*Chlamys farreri*) mantle hydrolysates-ribose Maillard reaction products [J]. Food Chemistry, 2018, 261(13): 337–347.
- [11] ZHAO C C, YANG Y, WU H T, et al. Characterization of proteolysis in muscle tissues of sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Food Science & Biotechnology, 2016, 25(6): 1529–1535.
- [12] QIN L, ZHU B W, ZHOU D Y, et al. Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad [J]. LWT – Food Science and Technology, 2011, 44(4): 1113–1118.
- [13] WU H T, JIN W G, SUN S G, et al. Identification of antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Patinopecten yessoensis*) female gonads [J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(5): 713–722.
- [14] SILVA H A, MENDES R, NUNES M L, et al. Protein changes after irradiation and ice storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) [J]. European Food Research & Technology, 2006, 224(1): 83–90.
- [15] LI T, HU W, LI H, et al. Protein changes in post mortem large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) monitored by SDS-PAGE and proteome analysis [J]. Food Control, 2014, 41(6): 49–55.
- [16] NOZAWA H, MORI T, KIMURA M, et al. Characterization of a transglutaminase from scallop hemocyte and identification of its intracellular substrates [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 140(3): 395–402.
- [17] WATABE S, KANTHA S S, HASHIMOTO K, et al. Phosphorylation and immunological cross-reactivity of paramyosin: A comparative study [J]. Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1990, 96(1): 81–88.
- [18] HURTADO J L, MONTERO P, BORDERÍAS J, et al. Properties of proteolytic enzymes from muscle of *Octopus (Octopus vulgaris)* and effects of high hydrostatic pressure [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(7): 2555–2564.



- [19] SUN W, ZHAO M, CUI C, et al. Effect of Maillard reaction products derived from the hydrolysate of mechanically deboned chicken residue on the antioxidant, textural and sensory properties of *Cantonese sausages* [J]. *Meat Science*, 2010, 86 (2): 276–282.
- [20] WANG H Y, QIAN H, YAO W R. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity[J]. *Food Chemistry*, 2011, 128 (3): 573–584.
- [21] ERIC K, RAYMOND LV, ABBAS S, et al. Temperature and cysteine addition effect on formation of sunflower hydrolysate Maillard reaction products and corresponding influence on sensory characteristics assessed by partial least square regression[J]. *Food Research International*, 2014, 57(1): 242–258.
- [22] FORS S. Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related compounds[J]. *Computer Methods in Applied Mechanics & Engineering*, 1983, 74(3): 307–326.
- [23] ZHAO Q, SHEN Q, GUO R, et al. Characterization of flavor properties from fish (*Collichthys niveatus*) through enzymatic hydrolysis and the Maillard reaction[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2016, 29(3): 482–495.
- [24] ZHANG L, LIU Y Z, LU D, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitory, antioxidant activities, and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from scallop mantle[J]. *International Journal of Food Properties*, 2015, 18(1): 33–42.
- [25] HAN J R, DU YN, TANG Y, et al. Structural changes, volatile compounds and antioxidant activities of Maillard reaction products derived from scallop (*Patinopecten yessoensis*) female gonad hydrolysates[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2019, 28(4): 352–364.

### Free Radical Scavenging Activities of Maillard Reaction Products from Scallop (*Patinopecten yessoensis*) Mantle Hydrolysates

Cui Xiaofan, Du Yinan, Sun Shiguang, Han Jiarun, Yan Jianan, Jiang Xinyu, Li Aoting, Wu Haitao\*  
(School of Food Science and Technology, National Engineering Research Center of Seafood,  
Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning)

**Abstract** In this paper, the scallop (*Patinopecten yessoensis*) mantle was used as the raw material, and the enzymatic hydrolysate was prepared by neutral protease. *P. yessoensis* mantle proteins (SMs) were primarily distributed 200, 97 ku and 42 ku. The SMs were hydrolyzed by neutrase for 3 h (SMHs) and the hydrolysis degree of SMHs reach 28.95%. Maillard reaction products (MRPs) were prepared by reacting ribose and SMHs, and its antioxidant activity and flavour composition were investigated. The Maillard reaction produced more intermediate products and brown matter, and the SMHs produced more volatile components after the Maillard reaction, especially an increased variety of heterocyclic compounds. Moreover, the SMHs had hydroxyl and ABTS radical scavenging capacity of 42.7% and 31.64%, respectively, but no DPPH scavenging ability. But after 12 hours of Maillard reaction, the hydroxyl, DPPH and ABTS radical scavenging capacity of the SMHs was significantly improved. These results suggested that the scallop mantle hydrolysates-ribose MRPs had potential antioxidant capacity and which had potential to use as an antioxidant in the food industry.

**Keywords** scallop (*Patinopecten yessoensis*); mantle; hydrolysates; Maillard reaction; free radical scavenging capacity