

## 不同鱼皮肤抗氧化活性及结构特性的比较

张晓颀<sup>1,2</sup>, 戴志远<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>浙江工商大学海洋食品研究院 浙江省水产品加工技术研究联合重点实验室 杭州 310035

<sup>2</sup>河北省农林科学院生物技术与食品科学研究所 石家庄 050035

<sup>3</sup>海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116000

**摘要** 鱼皮是水产品加工的主要副产物,因利用率较低而备受关注。为更好地了解不同鱼皮肤的抗氧化活性及结构特性,采用碱性蛋白酶分别水解三文鱼皮、鲟鱼皮和鳙鱼皮。通过水解度(DH)、三氯乙酸氮溶指数(TCA-NSI)和分子质量评估鱼皮的水解程度,根据 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率、·OH 自由基清除率、Fe<sup>2+</sup>螯合活性和还原力检测鱼皮的抗氧化活性,并比较 3 种鱼皮肤的结构特性。结果表明:鲟鱼皮肤的 DH(22.34%)和多肽含量(48.65%)最高,分子质量最低,其水解效果最好。3 种鱼皮肤的抗氧化活性呈浓度依赖性,其中鲟鱼皮肤抗氧化活性显著高于鲟鱼皮肤和鳙鱼皮肤( $P<0.05$ )。鲟鱼皮肤的疏水性和荧光强度较高,且含有较高含量的疏水性氨基酸,这些对抗氧化活性有积极的影响。傅里叶变换红外光谱证实不同鱼皮肤的内部微环境和蛋白质二级结构有一定差异,造成其抗氧化活性的差异较大。本研究可为鱼皮肤的制备及开发应用提供一定的理论依据。

**关键词** 鱼皮; 多肽; 抗氧化活性; 结构特性

文章编号 1009-7848(2023)10-0335-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.10.033

近年来,自由基介导的氧化应激和抗氧化剂的研究备受关注<sup>[1]</sup>。自由基的大量生成会破坏细胞膜、蛋白质和 DNA,与机体的衰老和免疫系统的削弱密切相关<sup>[2]</sup>。抗氧化活性物质可清除体内多余的自由基,防止氧化应激。食品在贮存过程中易发生氧化,导致食品质量下降,因此需要使用抗氧化剂以延长其货架期。而常用的合成抗氧化剂具有潜在毒性,被严格控制使用<sup>[2]</sup>。亟需寻找安全、无毒的抗氧化活性物质。

2020 年我国水产总产量为 6 545 万 t<sup>[3]</sup>,其中副产物占 40%~55%。水产品副产物含有大量蛋白质,水解后的多肽具有较高的抗氧化活性,有望成为合成抗氧化剂的安全替代品,已成为近年来制备抗氧化肽的重要原料<sup>[4-5]</sup>。研究表明,抗氧化肽的肽链通常含有 1 个或多个疏水性氨基酸残基或芳香族氨基酸残基,氨基酸的组成会造成多肽抗氧化活性的差异<sup>[5]</sup>。尽管国内外对抗氧化活性的多肽进行了大量研究,其结构特性还需进一步研究。

三文鱼刺身、鲟鱼子酱和鳙鱼头是三文鱼、鲟鱼和鳙鱼的主要销售形式,在加工过程中会产生鱼皮等副产物,这些鱼皮的附加值及利用率较低。研究表明,鱼皮多肽具有较高的抗氧化活性<sup>[6-7]</sup>,而不同鱼皮多肽在抗氧化活性和结构特性上存在一定差异。本研究采用碱性蛋白酶分别水解三文鱼皮、鲟鱼皮和鳙鱼皮,对其水解效果、氨基酸组成和结构特性进行比较,分析它们之间的差异性,并评价鱼皮多肽的抗氧化活性,为提高鱼皮的利用价值提供理论和技术支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

三文鱼皮,悦胜行贸易有限公司;鳙鱼皮,千岛湖海苗森生态食品有限公司;鲟鱼皮,鲟鳇生物科技有限公司;碱性蛋白酶(Alcalase,酶活力为  $1.2 \times 10^5$  U/mg),丹麦 Novozymes 公司;菲洛嗪、碳酸酐酶(29 000 u)、细胞色素 C(12 400 u)、抑肽酶(6 500 u)和马尿酸-组氨酸-亮氨酸(HHL,429 u),美国 Sigma 公司;三氯乙酸(TCA)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、FeCl<sub>2</sub>和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等均为分析纯级,国药集团化学试剂有限公司。

收稿日期: 2022-10-29

基金项目:“蓝色粮仓”国家重点研发计划项目  
(2019YFD0902000)

第一作者: 张晓颀,女,博士,助理研究员

通信作者: 戴志远 E-mail: dzy@zjsu.edu.cn

## 1.2 设备与仪器

数显恒温水浴锅,邦西仪器科技(上海)有限公司;LYNX-4000 高速冷冻离心机、Evolution 60S 紫外可见分光光度计,美国 Thermo 公司;冷冻干燥机,美国 Labconco 公司;Spectra MAX190 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;F-4500 荧光分光光度计,日本 Hitachi 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 鱼皮肤的制备** 将新鲜鱼皮切成小块,置于 40 °C 干燥箱中烘干,粉碎成粉末后密封保存。经前期试验筛选得到碱性蛋白酶制得的鱼皮多肽抗氧化活性最优,因此本试验选择碱性蛋白酶水解鱼皮。鱼皮粉末与蒸馏水按 1:8(m/V)的比例混匀,调节混合液温度至 55 °C 和 pH 值至 8.0,添加 1% 的碱性蛋白酶(m/V)。水解过程中连续加入 0.1 mol/L NaOH 以维持反应液的最适 pH。反应结束后,95 °C 加热 10 min 灭活蛋白酶,8 000 r/min 离心 10 min 后,收集上清液真空冷冻干燥后,计算得率并于 -20 °C 保存。

**1.3.2 水解度的测定** 水解度采用 pH-stat 法测定<sup>[8]</sup>。

**1.3.3 TCA-氮溶指数 (TCA-NSI) 的测定** 取 20% TCA 将蛋白沉淀,利用 BCA 试剂盒测定样品的 TCA-NSI<sup>[7]</sup>。

**1.3.4 分子质量的测定** 采用高效液相色谱 (HPLC) 测定抗氧化肽的分子质量<sup>[7]</sup>。色谱柱为 TSK-gel G2000SWxl (7.8 mm×30 mm);流动相为 V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸)=45:55:0.1;流速为 0.5 mL/min;检测波长为 280 nm;进样量为 10 μL。

**1.3.5 氨基酸组成的测定** 取 1.00 g 样品在 110 °C 用 6 mol/L HCl 水解 22 h,离心过滤后用 HPLC 测定氨基酸<sup>[9]</sup>。

**1.3.6 DPPH 自由基清除率** 参考 Lin 等<sup>[10]</sup>的方法测定 DPPH 自由基清除率。取不同浓度的样品溶液 1.5 mL 与 DPPH 溶液 1 mL (0.02%, m/V, 溶于 95% 乙醇)混匀,室温避光反应 30 min,于 517 nm 波长处测定吸光度值。式中, $A_1$ ——样品的吸光度; $A_2$ ——95% 乙醇与样品反应的吸光度; $A_3$ ——蒸馏水与 DPPH 溶液反应的吸光度。按式

(1) 计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad (1)$$

**1.3.7 ·OH 自由基清除率** 参考张晓顿等<sup>[7]</sup>的方法测定·OH 自由基清除率。

**1.3.8 Fe<sup>2+</sup>螯合活性** 参考 Lin 等<sup>[10]</sup>的方法测定 Fe<sup>2+</sup>螯合活性。取 0.1 mL 20 mmol/L FeCl<sub>2</sub> 溶液与不同浓度的 4.7 mL 样品溶液混匀,室温静置 30 min 后,加入 0.2 mL 5 mmol/L 菲洛嗪,静置 10 min 后于 562 nm 波长处测定吸光度值。式中, $A_1$ ——样品的吸光度值; $A_2$ ——空白组的吸光度值。按式(2)计算 Fe<sup>2+</sup>螯合活性:

$$\text{Fe}^{2+}\text{螯合活性}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) \times 100 \quad (2)$$

**1.3.9 还原力** 参考 Alavi 等<sup>[8]</sup>的方法测定还原力。

**1.3.10 疏水性的测定** 在 4 mL 样品溶液 (0.3 mg/mL) 中加入 20 μL ANS (8 mmol/L) 作为荧光探针。荧光光谱激发波长为 375 nm,发射波长为 485 nm,波长范围为 380~650 nm,狭缝宽度为 5 nm<sup>[9]</sup>。

**1.3.11 荧光发射光谱的扫描** 用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 配制成 0.2 mg/mL 的样品溶液。荧光光谱激发波长为 290 nm,发射光谱扫描范围为 300~500 nm,狭缝宽度为 5 nm<sup>[11]</sup>。

**1.3.12 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 的测定** 取 2 mg 样品加入 0.2 g KBr,充分研磨混匀、压片,在 4 000~400 cm<sup>-1</sup> 范围内测定 FTIR<sup>[10]</sup>。

**1.3.13 Zeta-电位的测定** 将样品溶解到 50 mmol/L pH 7.0 PBS 中,配成 10 mg/mL 的溶液。使用 Zeta-电位分析仪测定,测试体积为 1 mL,测试温度为 25 °C<sup>[12]</sup>。

## 1.4 数据统计与分析

每个处理重复 3 次,结果以“平均数±标准差”表示,用 SPSS 21.0 统计软件进行方差分析,采用多重比较分析法对各组进行显著性检验 ( $P < 0.05$ ),用 Origin 2019b 软件作图。

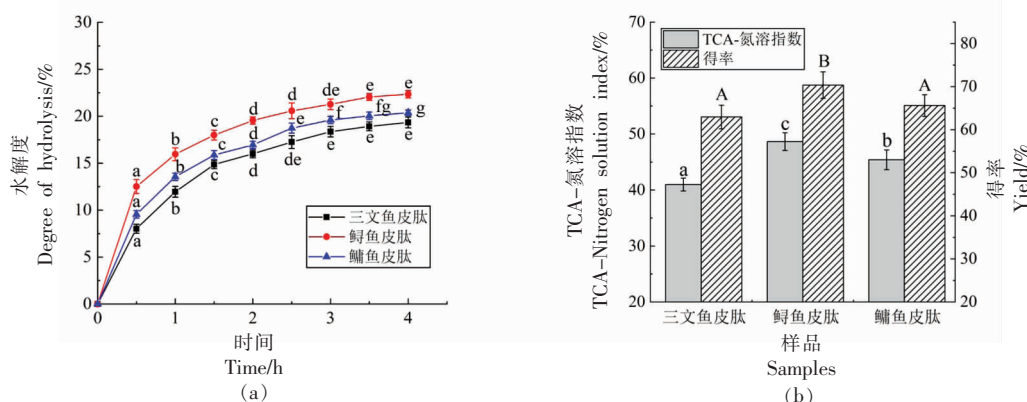
## 2 结果与分析

### 2.1 不同鱼皮肤的水解程度

为评价 3 种鱼皮肤的水解效果,在最适的 pH 和温度条件下水解鱼皮肤 4 h,3 种鱼皮肤的水解

曲线如图 1a 所示。DH 是衡量蛋白质水解程度的重要参数<sup>[13]</sup>,表示水解物中断裂的肽键占底物中总肽键的百分比<sup>[14]</sup>。碱性蛋白酶可作用于芳香族或疏水性氨基酸的 C 端肽键,是非特异性内切蛋白酶。前期研究表明,碱性蛋白酶为制备鱼皮多肽的最适蛋白酶<sup>[7,15]</sup>。结果表明,随着水解时间的延长,各鱼皮肤的 DH 值呈上升趋势;在 3 h 后,DH 曲线变得平缓。其中,鲟鱼皮肤具有较高的 DH 值。水解 4 h 后,三文鱼皮肤、鲟鱼皮肤、鳙鱼皮肤的 DH 值分别为 19.51%,22.34%,20.37%。3 种鱼皮肤的水解趋势与鱼骨蛋白肽<sup>[16]</sup>和核桃蛋白肽<sup>[17]</sup>相似。

TCA-NSI 也可反映蛋白质的水解情况,TCA-NSI 越高表明多肽得率越高。水解程度会影响水解物的分子质量、氨基酸组成、结构特性和生物活性<sup>[18-19]</sup>。3 种鱼皮肤水解 4 h 后的 TCA-NSI 和得率如图 1b 所示。3 种鱼皮肤的 TCA-NSI 之间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。鲟鱼皮肤的 TCA-NSI 值最高(48.65%),其次是鳙鱼皮肤(45.41%)和三文鱼皮肤(40.98%)。与其它鱼皮肤相比,鲟鱼皮肤的得率最高(70.36%)。对 DH 和 TCA-NSI 进行相关性分析发现,3 种鱼皮肤中 DH 与 TCA-NSI 均呈正相关。



注:不同字母表示不同组间差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

图 1 不同鱼皮肤的 DH(a)、TCA-NSI 和得率(b)

Fig.1 DH (a), TCA-NSI and yield (b) of different fish skin peptide

## 2.2 不同鱼皮肤的分子质量分布

图 1 为标准品相对分子质量色谱图,根据其的对数与  $K_{av}$  值作曲线,得到标准曲线方程为  $y = -0.2099x + 7.0174$  ( $R^2 = 0.9907$ ),说明线性关系良好。由表 1 可知,3 种鱼皮肤分子质量分布表现出一定的差异,小分子肽(180~3 000 u)含量为鲟鱼皮肤>鳙鱼皮>三文鱼皮肤,表明鲟鱼皮肤水解更为彻底。本研究表明,鱼多肽分子质量分布与 DH 值呈负相关,这与 Zhang 等<sup>[15]</sup>和 Alavi 等<sup>[8]</sup>的研究结果一致。此外,Wu 等<sup>[2]</sup>发现,分子质量<3 000 u 的多肽具有较好的抗氧化活性,分子质量大小与抗氧化活性呈负相关。本研究制备的鲟鱼皮肤具有较低的分子质量,推测其可能具有较高的抗氧化活性。

## 2.3 不同鱼皮肤的氨基酸组成

不同鱼皮肤的氨基酸组成如表 2 所示。鲟鱼皮肤的总氨基酸含量最高(82.44 g/100 g),其次是鳙鱼皮肤(78.14 g/100 g)和三文鱼皮肤(77.44 g/100 g)。三文鱼皮肤、鲟鱼皮肤和鳙鱼皮肤的酸性氨基酸(Glu 和 Asp)分别占总氨基酸的 15.98%,16.50%,15.5%,碱性氨基酸(Arg、Lys、His)分别占总氨基酸的 11.41%,11.78%,11.31%,疏水性氨基酸(Trp、Phe、Val、Leu、Ile、Ala、Met 和 Pro)分别占总氨基酸的 26.74%,30.73%,31.30%。多肽中的疏水性氨基酸可清除自由基,与抗氧化活性相关<sup>[20]</sup>,水解过程中疏水性氨基酸 C 末端的肽键断裂,裂解后疏水性氨基酸处于新肽链的端基,可发挥其抗氧化效果<sup>[21]</sup>。His 的咪唑环可螯合金属离子,进

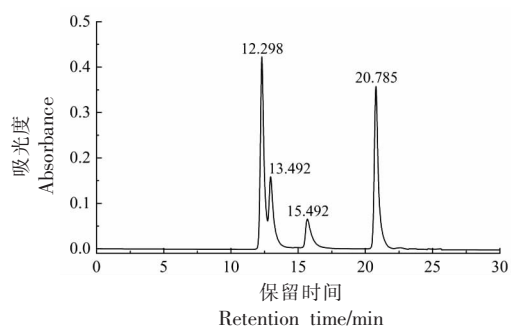


图2 标准品相对分子质量色谱图

Fig.2 Chromatogram of relative molecular weight of standard substance

而抑制由金属离子催化产生的氧化反应,使多肽具有良好的抗氧化活性<sup>[20]</sup>;Trp 可将质子提供给缺少电子的自由基,从而使自由基淬灭<sup>[22]</sup>;Gly 是强抗氧化剂谷胱甘肽的重要组成氨基酸,同时也是

表1 不同鱼皮肤的分子质量

Table 1 Molecular weight of different fish skin peptides

分子质量 范围/u	面积占比/%		
	三文鱼皮肤	鲟鱼皮肤	鳙鱼皮肤
>10 000	0.02	—	0.03
4 000~10 000	—	—	—
2 000~4 000	—	—	—
1 000~2 000	17.48	11.21	13.08
<1 000	82.50	88.79	86.89

3种鱼皮肤含量最多的氨基酸。此外,短链多肽C端的Leu也可增强其抗氧化活性<sup>[21]</sup>。综上所述,不同鱼皮肤的氨基酸含量和组成有所差异,鱼皮肤的氨基酸组成与抗氧化活性有关。

表2 不同鱼皮肤氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of different fish skin peptides

氨基酸组成/g·(100 g) <sup>-1</sup>	三文鱼皮肤	鲟鱼皮肤	鳙鱼皮肤
甘氨酸(Gly)	20.239 ± 0.132 <sup>b</sup>	19.863 ± 0.215 <sup>b</sup>	17.384 ± 0.329 <sup>a</sup>
谷氨酸(Glu)	9.923 ± 0.061 <sup>a</sup>	10.365 ± 0.284 <sup>a</sup>	9.882 ± 0.216 <sup>a</sup>
丙氨酸(Ala)	7.617 ± 0.163 <sup>a</sup>	8.229 ± 0.090 <sup>b</sup>	7.749 ± 0.047 <sup>a</sup>
精氨酸(Arg)	6.846 ± 0.291 <sup>a</sup>	7.419 ± 0.064 <sup>b</sup>	6.800 ± 0.078 <sup>a</sup>
脯氨酸(Pro)	6.078 ± 0.154 <sup>a</sup>	7.900 ± 0.062 <sup>b</sup>	8.925 ± 0.282 <sup>c</sup>
天冬氨酸(Asp)	6.056 ± 0.108 <sup>b</sup>	6.130 ± 0.098 <sup>b</sup>	5.673 ± 0.136 <sup>a</sup>
丝氨酸(Ser)	3.432 ± 0.051 <sup>b</sup>	3.918 ± 0.050 <sup>c</sup>	2.648 ± 0.044 <sup>a</sup>
色氨酸(Trp)	3.254 ± 0.095 <sup>a</sup>	3.845 ± 0.076 <sup>c</sup>	3.436 ± 0.079 <sup>b</sup>
赖氨酸(Lys)	3.271 ± 0.083 <sup>a</sup>	3.443 ± 0.103 <sup>a</sup>	3.641 ± 0.012 <sup>b</sup>
亮氨酸(Leu)	2.688 ± 0.115 <sup>a</sup>	2.921 ± 0.168 <sup>ab</sup>	3.168 ± 0.050 <sup>b</sup>
苏氨酸(Thr)	2.341 ± 0.109 <sup>a</sup>	2.600 ± 0.024 <sup>b</sup>	2.628 ± 0.022 <sup>b</sup>
缬氨酸(Val)	2.177 ± 0.145 <sup>a</sup>	2.441 ± 0.028 <sup>b</sup>	2.566 ± 0.069 <sup>b</sup>
苯丙氨酸(Phe)	1.965 ± 0.072 <sup>a</sup>	2.275 ± 0.121 <sup>a</sup>	2.172 ± 0.052 <sup>a</sup>
异亮氨酸(Ile)	1.498 ± 0.031 <sup>a</sup>	1.885 ± 0.069 <sup>b</sup>	1.818 ± 0.008 <sup>b</sup>
蛋氨酸(Met)	1.466 ± 0.049 <sup>b</sup>	1.238 ± 0.069 <sup>a</sup>	1.463 ± 0.061 <sup>b</sup>
组氨酸(His)	1.302 ± 0.025 <sup>b</sup>	0.918 ± 0.027 <sup>a</sup>	0.873 ± 0.543 <sup>a</sup>
酪氨酸(Tyr)	0.511 ± 0.022 <sup>a</sup>	0.854 ± 0.070 <sup>c</sup>	0.745 ± 0.030 <sup>b</sup>
半胱氨酸(Cys)	0.027 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.034 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.034 ± 0.003 <sup>a</sup>
游离氨基酸总量(TFAA)	80.690 ± 1.615 <sup>a</sup>	86.281 ± 1.545 <sup>b</sup>	81.607 ± 1.238 <sup>a</sup>

注:不同字母表示不同鱼皮肤间差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

## 2.4 不同鱼皮肤抗氧化肽活性的比较

以 DPPH 自由基清除率、·OH 自由基清除率、Fe<sup>2+</sup>螯合活性和还原力评价多肽的抗氧化活性。不

同抗氧化试验的作用机制有所不同。DPPH 自由基遇到抗氧化剂时,会与含氢供体的抗氧化剂结合,结合强度可反映抗氧化活性的强弱<sup>[10]</sup>;·OH 的

化学性质极其活跃,易与氨基酸、蛋白质、DNA 等生物分子发生反应,一旦与物质接触,可在瞬间发生反应<sup>[5]</sup>;过渡金属离子引发活性氧的产生,加速脂质过氧化连锁反应,抗氧化剂对其螯合作用会延缓氧化反应<sup>[20]</sup>;还原力可表征抗氧化剂提供电子的能力,是评价抗氧化活性的重要指标<sup>[23]</sup>。

不同质量浓度(1.0~8.0 mg/mL)鱼皮肤的抗氧化活性如图 3 所示。抗氧化试验结果表明,鱼皮肤的 DPPH、·OH 自由基清除率、Fe<sup>2+</sup>螯合活性和还原力均呈浓度依赖性,这一结果与之前的报道一致<sup>[7,23]</sup>。虽然 3 种鱼皮肤均具有一定的抗氧化活性,但对比 3 种鱼皮肤发现,不同质量浓度下鲟鱼皮肤的抗氧化活性显著高于三文鱼皮肤和鳙鱼皮肤( $P < 0.05$ )。胡晓等<sup>[5]</sup>研究表明,一定范围内罗非鱼酶解肽的抗氧化活性随水解程度的增加而增加,对其活性组分氨基酸含量进行鉴定发现,Trp、Gly 和 His 为其含量较高的氨基酸,抗氧化活性可能与水解过程中多肽链的长度和氨基酸排列有关,本试验也证明了这一观点。水解之后,鱼皮蛋白表面暴露了更多的非特异性蛋白组分,这些组分在二级结构中的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠中,可将 Fe<sup>3+</sup>还原成 Fe<sup>2+</sup>。鱼皮肤还原力的不同与氨基酸侧链基团中暴露的电子密度有关,电子密度起着极性 or 电荷部分的作用<sup>[6]</sup>。一般来说,多肽的抗氧化活性不仅与原料和蛋白质的一级结构有关,也与芳香族或疏水性氨基酸残基的含量相关<sup>[24]</sup>。

## 2.5 不同鱼皮肤结构特性的对比

### 2.5.1 疏水性分析

疏水性可表示蛋白质的疏水基团含量,是反映蛋白质分子结构的重要指标之一<sup>[25]</sup>。Wani 等<sup>[26]</sup>研究表明,多肽疏水性的差异主要取决于疏水性氨基酸的含量,这在抗氧化活性中起重要作用。不同鱼皮肤的表面疏水性如图 4 所示。结果表明,鲟鱼皮肤(431)和鳙鱼皮肤(427)的表面疏水性显著高于三文鱼皮肤(387)( $P < 0.05$ ),鲟鱼皮肤和鳙鱼皮肤中有较多的疏水性氨基酸,这与之前氨基酸分析结果一致。Noman 等<sup>[25]</sup>表明,疏水性与蛋白质的空间构象和暴露的氨基酸残基有关。在水解过程中,蛋白酶对埋藏的疏水区进行了高特异性的切割,使蛋白分子内部的疏水基团释放出来<sup>[27]</sup>。

### 2.5.2 荧光发射光谱分析

在蛋白质氨基酸中,

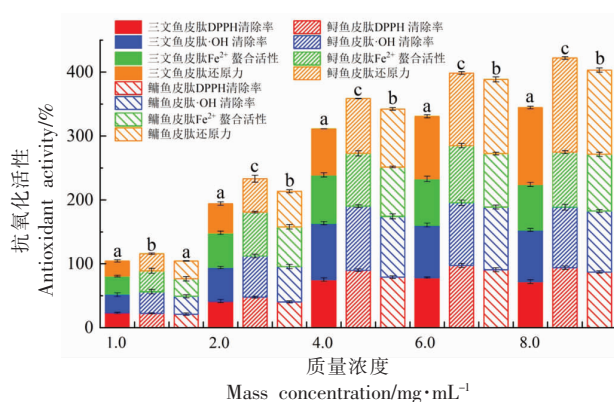


图 3 不同质量浓度下不同鱼皮肤的抗氧化活性比较

Fig.3 Comparison of antioxidant activity of different fish skin peptides at different concentrations

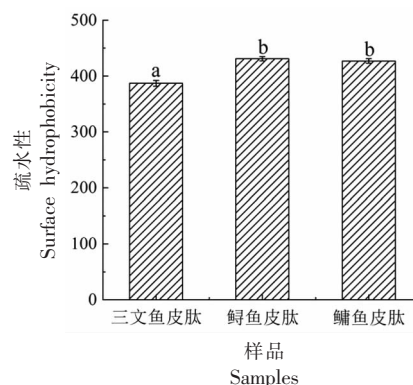
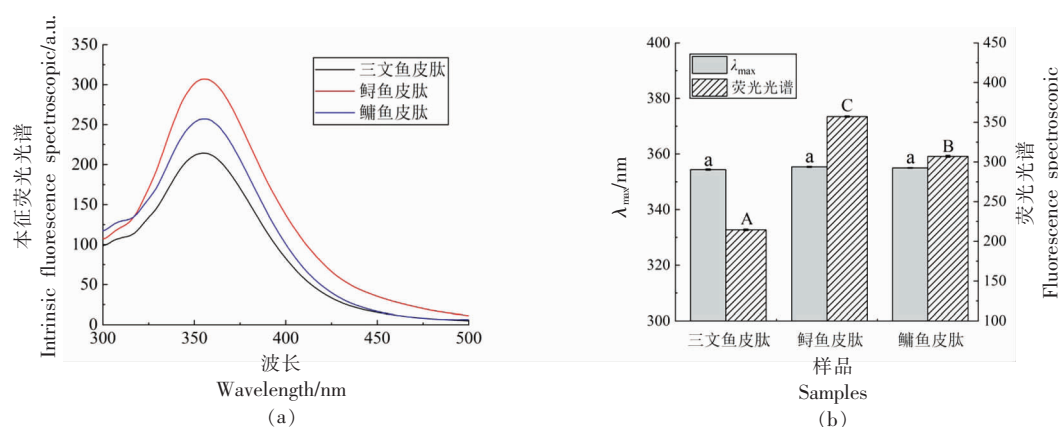


图 4 不同鱼皮肤的疏水性

Fig.4 Surface hydrophobicity of different fish skin peptides

Trp 具有荧光特性,且 Trp 残基对微环境的变化很敏感,其荧光强度可表征蛋白质的三级结构<sup>[28]</sup>。Trp 残基的特征峰为  $\lambda = 360$  nm,荧光光谱峰位、峰强的改变都反映了色氨酸所处环境的变化。不同鱼皮肤的荧光光谱如图 5 所示。三文鱼皮肤、鲟鱼皮肤和鳙鱼皮肤的  $\lambda_{\max}$  分别为 354.5, 355.4, 355.6 nm, 3 种鱼皮肤的荧光光谱峰位无显著差异 ( $P > 0.05$ )。3 种鱼皮肤的  $\lambda_{\max}$  均在 360 nm 附近,说明 Trp 残基位于蛋白质分子外部的极性环境中<sup>[29]</sup>。此外,在  $\lambda$  最大值时,鲟鱼皮肤荧光强度(357.2) > 鳙鱼皮肤荧光强度(307.1) > 三文鱼皮荧光强度(214.5)。结果表明,鱼皮肤的荧光强度与水解度呈正相关。水解程度越大,鱼皮蛋白会暴露出越多的 Trp 残基,这与氨基酸分析结果相一致,这对多肽的抗氧化活性有着积极作用。不同荧光基团的

图5 不同鱼皮肤的荧光光谱、 $\lambda_{\max}$ 和荧光强度Fig.5 Fluorescence spectroscopic,  $\lambda_{\max}$  and fluorescence intensity of different fish skin peptides

活性部位、肽类和暴露氨基酸的变化不同,导致荧光峰强度和 $\lambda_{\max}$ 值不同<sup>[29]</sup>。

**2.5.3 FTIR 分析** FTIR 可表征大分子中官能团的振动和蛋白质的二级结构,波数的变化显示了分子结构的变化,信号强度可代表相关官能团的浓度<sup>[30]</sup>。由图6可看出,鱼皮肤的光谱相当复杂,包含许多不同官能团贡献的谱带,3种鱼皮肤在4000~400  $\text{cm}^{-1}$ 范围内具有相似的吸收模式。3种鱼皮肤在3500~3000  $\text{cm}^{-1}$ 之间存在较强吸收峰,表明多肽分子内形成了C=O-N-H的氢键<sup>[31]</sup>,且氢键含量为鳕鱼皮肤>鲟鱼皮肤>三文鱼皮肤。3000~2800  $\text{cm}^{-1}$ 的吸收峰与 $\text{CH}_3$ 和 $\text{CH}_2$ 的伸缩振动相关,这种伸缩振动通常发生在蛋白质的脂肪族侧链中<sup>[18]</sup>,其中峰值位于2924  $\text{cm}^{-1}$ 和2850  $\text{cm}^{-1}$ 的振动吸收分别属于 $\text{CH}_2$ 的对称和非对称拉伸振动<sup>[9]</sup>。同时,图中SBPHs的酰胺I带(1700~1600  $\text{cm}^{-1}$ )信号较强,这与C=O键和肽键的C-N伸缩振动有关,其峰型受蛋白质二级结构的影响<sup>[32]</sup>。这些结果表明,不同鱼皮肤的内部微环境和疏水区有一定差异。

在FTIR谱图中,酰胺I带(1700~1600  $\text{cm}^{-1}$ )与C=O键和肽键的C-N伸缩振动有关,可反映蛋白质的二级结构<sup>[11]</sup>。图6中鱼皮抗氧化肽的酰胺I带信号较强,其峰型受蛋白质二级结构的影响。利用Omic 8.2软件和Peakfit 4.21软件得到高斯曲线拟合图,根据各子峰峰面积计算鱼皮肤二级结构的含量(表3)。各子峰与蛋白质二级结构归属关系为:1664~1646  $\text{cm}^{-1}$ 为 $\alpha$ -螺旋特征峰;

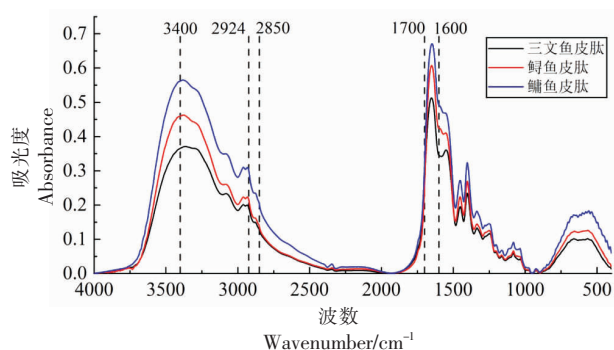


图6 不同鱼皮肤的FTIR谱图

Fig.6 FTIR spectra of different fish skin peptides

1700~1682  $\text{cm}^{-1}$ 和1637~1615  $\text{cm}^{-1}$ 为 $\beta$ -折叠特征峰;1681~1664  $\text{cm}^{-1}$ 为 $\beta$ -转角特征峰;1645~1637  $\text{cm}^{-1}$ 为无规卷曲特征峰<sup>[18]</sup>。 $\alpha$ -螺旋结构是有序结构,易发生构象变化; $\beta$ -折叠和 $\beta$ -转角结构属于相对伸展的有序结构,而无规卷曲结构是无序结构<sup>[9]</sup>。对比各二级结构含量发现鱼皮肤中 $\beta$ -折叠结构的含量最高(34.14%~41.04%),无规卷曲结构含量最低(10.61%~11.80%),与已有报道一致<sup>[9]</sup>。前期研究表明,水解会使鱼皮蛋白的二级结构由 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠转变为 $\beta$ -转角,鱼皮的有序结构被破坏,蛋白分子变得柔韧疏松<sup>[23]</sup>。鳕鱼皮肤中 $\alpha$ -螺旋结构含量较高,三文鱼皮和鳕鱼皮肤的 $\alpha$ -螺旋含量分别为24.41%和22.89%。 $\alpha$ -螺旋是蛋白质二级结构中最稳定的。鲟鱼皮和鳕鱼皮肤中 $\beta$ -折叠较低,表明蛋白质疏水相关位点暴露,暴露的疏水性氨基酸可促进多肽清除自由基的相关位点,进而提升抗多肽的抗氧化活性<sup>[11]</sup>。

表 3 不同鱼皮肤二级结构的含量

二级结构/%	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规卷曲
三文鱼皮肤	24.41	41.04	23.09	11.45
鲟鱼皮肤	22.89	34.17	31.14	11.80
鳙鱼皮肤	33.94	34.14	21.31	10.61

2.5.4 Zeta-电位 蛋白质的 Zeta-电位可表示溶液中蛋白分子的静电相互作用,反映溶液的稳定性<sup>[30]</sup>,其大小与带电基团和氨基酸残基的分布有关<sup>[33]</sup>。由图 7 可知,3 种鱼皮肤的 Zeta-电位均为负值,说明蛋白分子表面带有大量负电荷,静电斥力使颗粒散落分布而不易发生聚集<sup>[34]</sup>。鲟鱼皮肤的 Zeta-电位绝对值显著高于鳙鱼皮肤和三文鱼皮肤( $P < 0.05$ ),可能是因为水解过程释放的带负电荷氨基酸多于带正电荷的氨基酸所致。

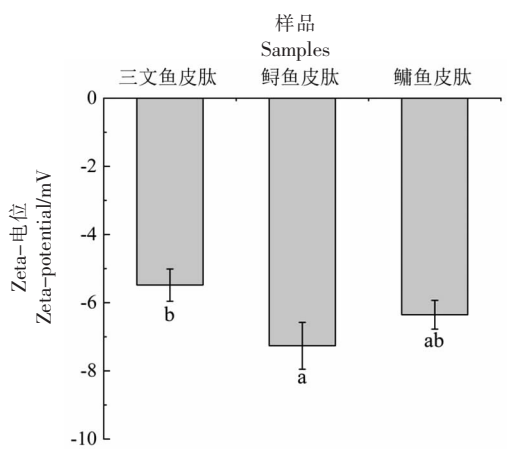


图 7 不同鱼皮肤的 Zeta-电位

Fig.7 Zeta-potential of different fish skin peptides

### 3 结论

研究表明,不同鱼皮肤的氨基酸组成、蛋白质构象和微环境体系有一定的差异,造成其抗氧化活性有所差异。水解程度较高的鲟鱼皮肤具有最高的抗氧化活性,同时鲟鱼皮肤具有较高的荧光强度、疏水性和较低的 Zeta-电位,表明其疏水性氨基酸含量较高。通过酶解技术挖掘了鱼皮抗氧化肽,提升了鱼皮副产物的应用价值和营养价值,可为水产源蛋白质加工深层次利用提供理论依据。随着鱼皮肤抗氧化活性研究的深入,下一步应对多肽-食物相互作用对其抗氧化活性和生物利用率展开研究。

### 参 考 文 献

- [1] ZHAO J, HE J, DANG Y L, et al. Ultrasound treatment on the structure of goose liver proteins and antioxidant activities of its enzymatic hydrolysate [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(1): e13091.
- [2] WU R B, WU C L, LIU D, et al. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease [J]. Food Chemistry, 2018, 248: 346-352.
- [3] 国家统计局. 中国统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2020: 1592.  
The State Statistical Bureau. China Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Statistical Publishing House, 2020: 1592.
- [4] ZHU C Z, ZHANG W G, KANG Z L, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham[J]. Meat Science, 2014, 96(2): 783-789.
- [5] 胡晓, 周雅, 陈星星, 等. 罗非鱼肌浆蛋白源抗氧化肽的制备、分离纯化及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 63-70.  
HU X, ZHOU Y, CHEN X X, et al. Preparation, purification and *in vitro* evaluation of antioxidant peptides from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) sarcoplasmic protein[J]. Food Science, 2021, 42(3): 63-70.
- [6] YANHOUBZADEH Z, GHADIKOLAI F P, KABOOSI H, et al. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(1): 625-632.
- [7] 张晓岷, 张益奇, 朱凯, 等. 三文鱼皮四种蛋白酶解物抗氧化活性及功能特性的差异研究[J]. 核农学报, 2021, 35(6): 1402-1409.  
ZHANG X D, ZHANG Y Q, ZHU K, et al. Study of four proteases on antioxidant activities and func-

- tional properties of salmon skin hydrolysates[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(6): 1402-1409.
- [8] ALAVI F, JAMSHIDIAN M, REZAEI K. Applying native proteases from melon to hydrolyze kilka fish proteins (*Clupeonella cultriventris caspia*) compared to commercial enzyme alcalase[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 314-322.
- [9] WANG Y Y, WANG C Y, WANG S T, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases[J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128765.
- [10] LIN J, HONG H, ZHANG L T, et al. Antioxidant and cryoprotective effects of hydrolysate from gill protein of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in preventing denaturation of frozen surimi[J]. Food Chemistry, 2019, 298: 124868.
- [11] 许晶, 韩东, 王昱婷, 等. 超声预处理对大豆蛋白酶解物结构及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(19): 78-84.
- XU J, HAN D, WANG Y T, et al. Effect of ultrasound pretreatment on structure and antioxidant activity of soybean protein hydrolysates[J]. Food Science, 2018, 39(19): 78-84.
- [12] 王耀松, 马天怡, 胡荣蓉, 等. L-组氨酸修饰乳清蛋白结构及其热诱导凝胶特性[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 16-23.
- WANG Y S, MA T Y, HU R R, et al. L-Histidine modifies the structure and heat-induced gel properties of whey protein[J]. Food Science, 2021, 42(6): 16-23.
- [13] ZHENG Z J, LI J X, LI J W, et al. Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 97: 105222.
- [14] BALTI R, BOUGATEF A, EL HADJ ALI N, et al. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases[J]. Journal of Amino Acids, 2011, 2011: 107179.
- [15] ZHANG X D, DAI Z Y, ZHANG Y Y, et al. Structural characteristics and stability of salmon skin protein hydrolysates obtained with different proteases[J]. LWT, 2022, 153: 112460.
- [16] TAN X Y, QI L B, FAN F J, et al. Analysis of volatile compounds and nutritional properties of enzymatic hydrolysate of protein from cod bone[J]. Food Chemistry, 2018, 264: 350-357.
- [17] KONG X, ZHANG L, SONG W, et al. Separation, identification and molecular binding mechanism of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from walnut (*Juglans regia* L.) protein[J]. Food Chemistry, 2021, 347: 129062.
- [18] LONG G H, JI Y, PAN H B, et al. Characterization of thermal denaturation structure and morphology of soy glycinin by FTIR and SEM[J]. International Journal of Food Properties, 2015, 18(4): 763-774.
- [19] 朱红艳, 裴斌, 吴凌燕, 等. 同步辐射显微红外光谱研究 6-OHDA 诱导帕金森病细胞模型[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(3): 686-689.
- ZHU H Y, FEI X, WU L Y, et al. Synchrotron radiation-based FTIR microspectroscopy study of 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease cell model[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2013, 33(3): 686-689.
- [20] LIU Y Y, WAN S Y, LIU J, et al. Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkworm[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(1): e13081.
- [21] CHUNKAO S, YOURAVONG W, YUPANQUI C T, et al. Structure and function of mung bean protein-derived iron-binding antioxidant peptides[J]. Foods, 2020, 9(10): 1406.
- [22] RAJAPAKSE J, MENDIS E, JUNG W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. Food Research International, 2005, 38(2): 175-182.
- [23] HU F, CI A T, WANG H, et al. Identification and hydrolysis kinetic of a novel antioxidant peptide from pecan meal using alcalase[J]. Food Chemistry, 2018, 261: 301-310.
- [24] IDOWU A T, BENJAKUL S, SINTHUSAMRAN S, et al. Protein hydrolysate from salmon frames: Production, characteristics and antioxidative activity[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(2): e12734.
- [25] NOMAN A, ALI A H, AL-BUKHAITI W Q, et al. Structural and physicochemical characteristics of lyophilized Chinese sturgeon protein hydrolysates



- prepared by using two different enzymes[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(10): 3313–3322.
- [26] WANI A A, SOGI D S, SINGH P, et al. Characterization and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed protein isolates and salt assisted protein concentrates [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2011, 20(4): 877.
- [27] SINTHUSAMRAN S, IDOWU A T, BENJAKUL S, et al. Effect of proteases and alcohols used for debittering on characteristics and antioxidative activity of protein hydrolysate from salmon frames[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(2): 473–483.
- [28] XU X F, LIU W, LIU C M, et al. Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 251–260.
- [29] 吴隆坤, 江连洲, 王丽娟, 等. 不同模式超声预处理对莲子蛋白酶解物及其结构的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 100–105.
- WU L K, JIANG L Z, WANG L J, et al. Effects of ultrasonic pretreatment with different working modes on enzymatic hydrolysis and structural characteristics of lotus seed protein [J]. *Food Science*, 2018, 39(23): 100–105.
- [30] AI M M, TANG T, ZHOU L D, et al. Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of preserved egg white hydrolysates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87: 933–942.
- [31] 孙佳悦, 钱方, 姜淑娟, 等. 基于红外光谱分析热处理对牛乳蛋白质二级结构的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(23): 82–86.
- SUN J Y, QIAN F, JIANG S J, et al. Effect of heat treatments on the secondary structure of milk proteins analyzed by fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Food Science*, 2017, 38(23): 82–86.
- [32] MORAND M, GUYOMARCH F, PEZENNEC S, et al. On how  $\kappa$ -casein affects the interactions between the heat-induced whey protein/ $\kappa$ -casein complexes and the casein micelles during the acid gelation of skim milk[J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21(9): 670–678.
- [33] 许英一, 王彪, 王宇, 等. 限制性酶解燕麦蛋白功能特性和抗氧化活性[J]. *食品工业*, 2020, 41(6): 198–201.
- XU Y Y, WANG B, WANG Y, et al. The functional properties and antioxidant activity of oat protein by restricted enzymatic hydrolysis[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(6): 198–201.
- [34] TEH S S, BEKHIT A E D A, CARNE A, et al. Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain[J]. *Food Chemistry*, 2016, 203: 199–206.

## Comparison of Antioxidant Activity and Structural Properties of Different Fish Skin Peptides

Zhang Xiaodi<sup>1,2</sup>, Dai Zhiyuan<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Aquatic Products Processing of Zhejiang Province, Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology and Food Science, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050035

<sup>3</sup>Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116000, Liaoning)

**Abstract** Fish skin is the main by-product of aquaculture processing, which has attracted much attention due to its low utilization rate. To better understand the antioxidant activity and structural properties of different fish skin peptides, salmon skin, sturgeon skin and bighead carp skin were hydrolyzed by alcalase. The degree of hydrolysis (DH), trichloroacetic acid-nitrogen solution index (TCA-NSI) and molecular weight of fish skin peptides were evaluated, and the antioxidant activities of fish skin peptides were examined based on 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) radical scavenging rate,  $\cdot\text{OH}$  radical scavenging rate,  $\text{Fe}^{2+}$  chelating activity and reducing power, and the structural properties of the three fish skin peptides were compared. The results showed that sturgeon skin peptides had the highest DH (22.34%) and TCA-NSI (48.65%) and the lowest molecular weight, indicating the best hydrolysis. The antioxidant activity of the three fish skin peptides was concentration-dependent, with sturgeon skin peptides having significantly

higher antioxidant activity than sturgeon skin peptides and bighead carp peptides ( $P < 0.05$ ). The sturgeon skin peptides had higher hydrophobicity and fluorescence intensity and contained higher content of hydrophobic amino acids, which had positive effects on the antioxidant activity. Fourier transform infrared spectroscopy confirmed some differences in the internal microenvironment and protein secondary structure of different fish skin peptides, resulting in a greater variation in antioxidant activity. This study can provide some theoretical basis for the preparation and development of fish skin peptides for application.

**Keywords** fish skin; peptide; antioxidant activity; structural characteristic