

基于响应面法的鲛鳔活性肽制备工艺

王雪芹^{1,2}, 滕李超^{1,2,3}, 于华华^{1,2}, 邢荣娥^{1,2}, 李鹏程^{1,2}

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室 海洋大科学中心, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 鲛鳔是一种低脂肪高蛋白的优质海洋生物资源, 其氨基酸含量丰富, 蛋白质含量高达 75.30%。本实验选用胰蛋白酶, 胃蛋白酶, 木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶水解鲛鳔鱼糜, 比较各酶解产物对 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的清除率, 确定木瓜蛋白酶为最佳用酶。在单因素实验基础上进行响应面优化实验, 确定酶解反应的最佳条件为: 加酶量 829.51 U/g, pH 值 7.37, 酶解温度 47.09 °C, 酶解时间 5.86 h, 液固比 5.79 : 1。在最优条件下验证其 DPPH 自由基清除率为 80.22%±0.63%, 接近预测值 80.55%。经响应面法实验制备的鲛鳔活性肽粉末呈淡黄色, 具有较好的抗氧化活性, 其羟自由基清除能力的 IC₅₀ 值为 1.69 mg/mL, 可作为潜在的抗氧化剂。

关键词: 鲛鳔; 酶解反应; 木瓜蛋白酶; DPPH 自由基清除率; 响应面分析

中图分类号: P745 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)05-0042-12

DOI: 10.11759/hyxx20211117001

鲛鳔(*Lophius litulon*), 属软骨鱼类, 又名蛤蟆鱼、海蛤蟆, 广泛分布于中国沿海海域。鲛鳔体型短粗, 头大, 口宽, 牙齿尖锐, 模样丑陋, 因此早期对其研究较少。近年来, 人们不断尝试探讨鲛鳔的综合利用, 鲛鳔的捕获量逐年上升, 其利用价值明显提高。目前, 对鲛鳔的加工利用主要停留在冷冻品、盐干品、罐头、鱼骨粉及鱼粉等产品形式^[1], 也有部分学者以鲛鳔鱼皮胶原蛋白、鱼肝等为原料, 采用酶技术制备鲛鳔活性肽^[2]。鲛鳔鱼肉鲜嫩味美, 营养丰富, 可制成干肉条、干鱼片等产品销售, 但对其精深加工鲜有报道。因此, 开发和利用鲛鳔鱼肉这一优质的蛋白资源, 生产高附加值产品具有重要意义。

生物活性肽是一类对人体生命活动有益的肽类化合物, 具有抗氧化、抗菌、抗疲劳、免疫调节、降血压等生物活性, 是近年来的研究热点^[3]。生物活性肽的制备方法较多, 常见的有化学法和酶解法, 化学法通常反应剧烈, 耗时较长且污染环境; 酶解法因为具有反应条件温和, 成本较低, 安全性高等优点, 备受关注^[4]。在蛋白酶解过程中, 酶类的选择尤为重要, 不同蛋白酶的酶切位点和酶解条件不同, 因此需要对酶解条件进行优化确定酶解反应的最优条件以得到目标蛋白肽^[5]。如王晓玲等^[6]采用木瓜蛋白酶制备带鱼蛋白水解肽, 在料液比为 1 : 10 g/mL,

加酶量 20 000 U/g, 酶解温度 45 °C, pH 6.5, 酶解时间 6 h 的条件下其水解度高达 71.3%; 周燕芳等^[7]选择中性蛋白酶酶解海产低值鱼制备抗氧化肽, 在酶浓度 1 400 U/g, 底物浓度 3.0%, 酶解温度 60 °C, pH 7.0, 酶解时间 2 h 的最佳条件下制得的抗氧化肽 1,1-二苯基-3-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率为 68.63%; 羟自由基清除率为 75.22%; 柏昌旺等^[8]筛选出动物蛋白酶制备牡蛎短肽, 响应面实验结果显示: 料液比 1 : 3.9 g/mL, 酶解温度 47 °C, pH 6.5, 酶解时间 3 h, 加酶量 3 300 U/g 的最佳条件下, 牡蛎短肽得率为 58.53%, 相比原酶解工艺提高 24.8%。

随着经济的快速发展和人们生活水平的不断提高, 人们逐渐认识到许多疾病均与人体内氧化产生的自由基有关, 当机体内的抗氧化物与氧化剂之间

收稿日期: 2021-11-17; 修回日期: 2021-12-20

基金项目: 2020 年度省新旧动能转换重大工程重大课题攻关项目(2020-1220); 中国科学院 STS 项目(2021T3038)

[Foundation: Key Projects for Major Projects on the Transformation of Old and Novel Kinetic Energy of Shandong Province No. 2020-1220; STS Project of the Chinese Academy of Sciences, No. 2021T3038]

作者简介: 王雪芹(1985—), 女, 山东青岛人, 副研究员, 博士, 主要从事海洋生物活性物质研究, 电话: 0532-82898702, E-mail: xueqin-wang@qdio.ac.cn; 李鹏程(1957—), 通信作者, 研究员, 主要从事海洋生物活性物质研究, E-mail: pcli@qdio.ac.cn

的平衡失常时,就会导致氧化应激,严重的话会造成氧化损伤,从而影响机体健康^[9]。因此,我们需要寻求外源性抗氧化剂来清除体内过多的自由基,以维持机体的健康。人工合成的抗氧化剂虽然具有较强的抗氧化作用,但对人体有潜在的致畸和致癌等副作用^[10],而天然抗氧化剂因其安全无毒、来源广等优点被广泛研究。

海洋生物具有多样性、复杂性和特殊性等特点,从而产生与陆地生物不同的机体防御系统。目前,已从一些海洋生物包括大黄鱼^[11]、鳕鱼^[12]、海参^[13]、鲱鱼^[14]、牡蛎^[15]、海藻^[16]等体内发现存在的天然生物活性肽。其中以海洋生物抗氧化肽的研究较为广泛,如从沙丁鱼^[17]、鲈鱼^[18]、牡蛎^[19]、海藻^[20]、海藻^[21]等海洋生物资源中均获得活性较好的抗氧化肽。海洋生物蛋白源抗氧化肽可通过各种途径清除内源性和外源性自由基,且具有抗氧化性强、种类多、副作用低等特点^[9]。随着人们对食品品质及食品安全的要求越来越高,抗氧化肽已被广泛应用于食品领域,如肉类、海鲜类、水果蔬菜类及饮料类等食品加工工业中,以及化妆品和医药领域等。未来,抗氧化肽将应用于人类生活的方方面面,成为各学科学家们研究的热点。

本研究以鮫鳔鱼糜为研究对象,采用定向酶解技术制备鮫鳔抗氧化肽。以抗氧化活性为筛选指标,经筛酶、单因素实验和响应面优化实验确定鮫鳔抗氧化肽的最优制备条件,并进一步验证其抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜鮫鳔采自青岛市水产批发市场,鮫鳔清洗后采肉搅碎获得鱼糜,冷藏备用;胰蛋白酶(2.5×10^5 U/g),胃蛋白酶(3.0×10^3 U/g),木瓜蛋白酶(8.0×10^5 U/g),菠萝蛋白酶(6.0×10^5 U/g)购自于索莱宝公司;DPPH试剂(Sigma, 美国),番红花红、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、盐酸、硫酸亚铁等常规试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

实验采用的仪器与设备如下:高速组织捣碎机(PHILIPS);DHG-9030A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);冷冻高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 鮫鳔营养成分分析

鮫鳔营养成分测定指标如下^[22]。水分测定:常压干燥法;灰分测定:高温灼烧法;脂肪含量测定:索氏抽提法;蛋白质含量测定:半微量凯氏定氮法;氨基酸测定:氨基酸分析仪。

1.3.2 最佳蛋白酶的筛选

分别称取适量鮫鳔鱼糜,按照液固比为6:1的比例加入去离子水,不同的蛋白酶处理条件不同,在适当的恒温水浴中不断搅拌,达到各蛋白酶最佳酶解温度后,保温5 min左右,用1.0 mol/L的NaOH或HCl调节pH至各蛋白酶的最适条件(表1),加酶量为1 000 U/g,酶解时间为5 h。

表1 各蛋白酶的酶解参数

Tab. 1 Parameters for enzymatic hydrolysis of each protease

蛋白酶	酶活力/ (U·g ⁻¹)	pH	酶解温度/°C	酶解时间/h
木瓜蛋白酶	8.0×10^5	6.5	50	5
胰蛋白酶	2.5×10^5	8~8.5	45	5
胃蛋白酶	3.0×10^3	2.0	35	5
菠萝蛋白酶	6.0×10^5	6.5	35	5

酶解过程结束后,将酶解液置于沸水中加热10 min,钝化灭酶,再用酸或碱调节酶解液的pH至中性,4 °C低温离心(10 000 r/min, 15 min),上清液-20 °C冷藏备用。分别测定各蛋白酶酶解液的DPPH自由基清除能力,筛选最佳用酶。

1.3.3 单因素实验

影响酶解反应的因素主要包括:加酶量、pH值、酶解温度、酶解时间和液固比,任一因素的改变,均会对酶解反应的过程产生影响^[23]。在前期实验确定的最佳蛋白酶的酶解条件基础上,设计酶解反应的各个因素水平,其他实验条件固定,分别考察加酶量(600, 800, 1 000, 1 200, 1 500, 2 000 U/g),pH值(5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0)、酶解温度(30, 40, 50, 55, 60 °C)、酶解时间(3, 4, 5, 6, 7, 8 h)和液固比(2:1, 4:1, 6:1, 8:1和10:1)对DPPH自由基清除能力的影响,实验做3次平行。

1.3.4 响应面优化实验

在单因素实验结果的基础上,进一步采用响应面分析法(Response Surface Methodology, RSM)对鮫鳔酶解产物的酶解条件进行优化。响应面分析法是

一种综合试验设计和数学建模的优化方法,具有试验次数少、试验周期短、预测性能好等优点^[24]。考虑到酶解反应的5个因素间的相互影响,以单因素实验获得的最优实验参数为中心,分别对加酶量、pH值、酶解温度、酶解时间和液固比5个因素设置3个水平,最终通过RSM取得各因素最优水平值。

1.3.5 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除能力的测定方法参考文献^[25]略作修改。样品组依次加入 3.0 mL 酶解产物和 1.0 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液,对照组依次加入 3.0 mL 50%乙醇溶液和 1.0 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液,充分混合,静置 30 min,于 517 nm 比色。同时用 50%乙醇溶液做空白,每个浓度重复 3 次,实验结果用清除率 E 来表示:

$$E(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

1.3.6 羟自由基清除能力的测定

羟自由基清除能力的测定方法参考文献^[26]略作修改。向试管中依次加入 1.0 mL 不同质量浓度的酶解产物(终浓度为:0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10 mg/mL), 0.5 mL EDTA-Fe 溶液(2 mmol/L), 1.0 mL 磷酸缓冲液(PBS, 150 mmol/L, pH7.4), 1.0 mL 番红花红(360 μg/mL), 最后加入 1.0 mL H₂O₂(3%), 混匀, 37 °C 水浴 30 min, 于 520 nm 比色。空白组用缓冲溶液来代替样品,对照组用缓冲液代替样品和过氧化氢,同时用 VC 作对照。每个浓度重复 3 次,实验结果用清除率 E 来表示:

$$E(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 鲮鱼糜的营养成分

鲮鱼糜的营养成分如表 2 所示,其水分含量较高,达到 83.40%,灰分和蛋白质含量很低,分别为 1.10%和 0.50%。其粗蛋白含量为 12.50%,换算为干基蛋白质含量则高达 75.30%。实验结果表明,鲮鱼糜是一种低脂肪高蛋白的优质蛋白源。

表 2 鲮鱼糜的营养成分

Tab. 2 Nutritional components of minced monkfish fillet

组分	百分比/%			
	水分	灰分	粗脂肪	蛋白质
鱼糜	83.40	1.10	0.50	12.50

2.2 鲮鱼糜的氨基酸组成

在鲮鱼糜进行氨基酸检测时,共检出 16 种氨基酸,含量最高的是与鲜味有关的谷氨酸,含量为 12.17%,其次是必需氨基酸赖氨酸和亮氨酸,分别为 7.47%和 6.02%(见表 3)。大部分的抗氧化肽在 N 端包含疏水性氨基酸,如缬氨酸或亮氨酸^[27], Najafian 等^[28]从巴丁鱼获得的抗氧化多肽,其 N 端疏水性氨基酸如苯丙氨酸和 C 端亲水性赖氨酸的存在,使其具有较高的抗氧化活性。鲮鱼糜的总氨基酸含量较高,为 63.21%,必需氨基酸含量为 29.58%,其中必需氨基酸/总氨基酸和必需氨基酸/非必需氨基酸比值分别为 0.47 和 0.88,两者均高于 FAO/WHO 建议值 0.40 和 0.60。说明鲮鱼糜营养均衡,可作为优质的蛋白源来制备活性肽。

表 3 鲮鱼糜的氨基酸组成

Tab. 3 Amino acid composition of minced monkfish fillet

序号	氨基酸	含量比例/%
1	苏氨酸*(Thr)	3.55
2	丝氨酸(Ser)	3.43
3	谷氨酸(Glu)	12.17
4	甘氨酸(Gly)	4.28
5	丙氨酸(Ala)	3.43
6	胱氨酸(Cys)	0.32
7	缬氨酸*(Val)	4.04
8	蛋氨酸*(Met)	1.99
9	异亮氨酸*(Ile)	3.49
10	亮氨酸*(Leu)	6.02
11	酪氨酸(Tyr)	1.87
12	苯丙氨酸*(Phe)	3.01
13	赖氨酸*(Lys)	7.47
14	组氨酸(His)	1.20
15	精氨酸(Arg)	4.64
16	脯氨酸(Pro)	2.29
	∑AA	63.21
	∑EAA	29.58
	∑EAA/∑NEAA	0.88
	∑EAA/∑AA	0.47

注: ∑AA 表示氨基酸总量; ∑EAA 表示必需氨基酸含量; ∑NEAA 表示非必需氨基酸含量, *表示必需氨基酸。

2.3 蛋白酶的选择

选择胰蛋白酶,胃蛋白酶,木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶

白酶作为实验用酶。分别称取适量鱼糜，按照液固比为 6 : 1 加入去离子水，调节至各蛋白酶最适宜的酶解温度和 pH 值，加酶量 1 000 U/g，酶解时间 5 h。酶解过程结束后，灭酶，低温离心，取上清液测定各蛋白酶酶解产物的 DPPH 自由基清除能力。

从图 1 可以看出，木瓜蛋白酶酶解产物的 DPPH 自由基清除能力最高，达到了 72.08%，与其他 3 种蛋白酶酶解产物的抗氧化活性达到了显著性差异 ($P < 0.05$)，其次是胃蛋白酶和菠萝蛋白酶，而胰蛋白酶酶解产物的 DPPH 自由基清除能力最低，为 64.62%。因此，实验后期选择木瓜蛋白酶为最佳用酶进行鲛鳔活性肽的制备和抗氧化活性的研究。

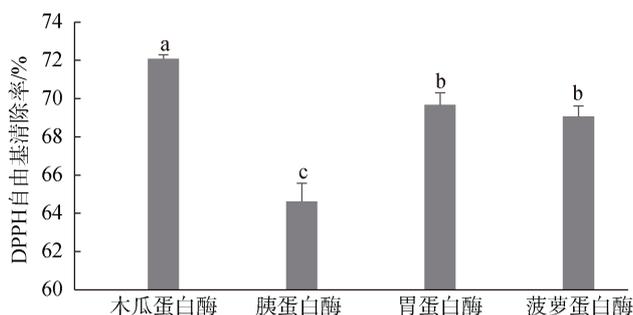


图 1 各蛋白酶酶解产物的抗氧化活性

Fig. 1 Antioxidant activity of enzymolysis products of each protease

2.4 单因素实验制备鲛鳔活性肽

任一酶解反应因素的改变都会影响酶解产物的活性。本实验采用单因素实验对各个因素水平进行分析，筛选出木瓜蛋白酶在酶解反应中各个因素的最优水平，为后续的反应面实验提供理论依据。

2.4.1 加酶量

选用液固比 6 : 1，酶解时间 5 h，酶解温度 50 °C，pH 6.5，蛋白酶加酶量分别为 600, 800, 1 000, 1 200, 1 500, 2 000 U/g。

从图 2 可以看出，随着加酶量从 800 U/g 增加到 1 000 U/g，酶解产物的 DPPH 自由基清除率逐渐增加并达到最高值 82.78%；随着加酶量的进一步增加，酶解产物的 DPPH 自由基清除率开始下降，且酶解液的颜色加深。因此，选择加酶量 1 000 U/g 木瓜蛋白酶为最佳加酶量。

2.4.2 pH

选用 6 : 1 液固比，加酶量为 1 000 U/g，酶解时间 5 h，酶解温度 50 °C，pH 值分别为 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0。

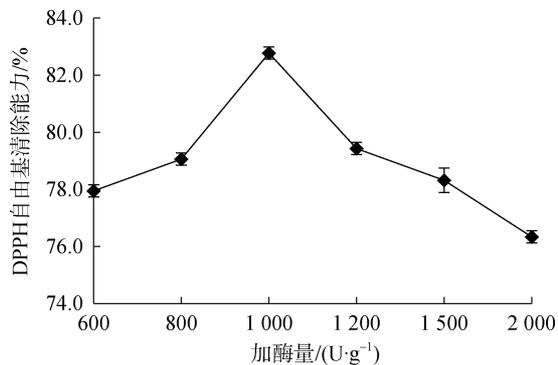


图 2 加酶量对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme concentration on the DPPH radical scavenging activity

由于每种蛋白酶都有最适的 pH 值，当最适 pH 值发生较大偏离时，维持蛋白酶三维结构的共价键受到离子作用的干扰，导致酶蛋白自身会发生变性^[29]。从图 3 可以看出，pH 值为 5.0~7.0，酶解产物的 DPPH 自由基清除率呈上升趋势，并在 pH 为 7.0 的时候达到最高值 83.27%；随着 pH 的进一步升高，偏离木瓜蛋白酶的最适 pH 值范围，酶解产物的 DPPH 自由基清除率显著性下降，当 pH 值为 9.0 时仅为 74.10%，较最高值相比，降幅达到 12.37%。因此，选择 pH 值为 7.0 进行后续实验。

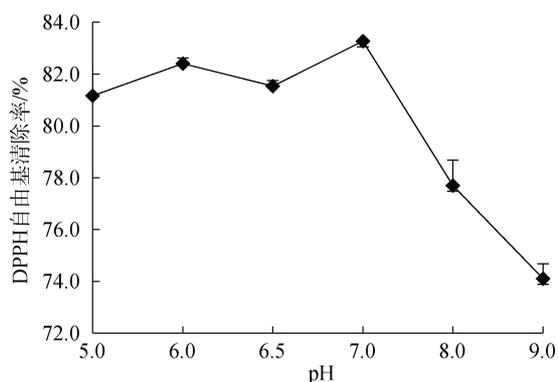


图 3 pH 值对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 3 Effect of pH on the DPPH radical scavenging activity

2.4.3 酶解温度

选用液固比 6 : 1，加酶量为 1 000 U/g，酶解时间 5 h，pH 值为 6.5，酶解温度分别为 30, 40, 50, 55, 60 °C。

图 4 结果显示，酶解温度从 30 °C 升高为 50 °C 时，酶解产物的 DPPH 自由基清除率与酶解温度成正比，这表明在一定温度范围内，蛋白酶的活性与温度呈正相关性，随着温度的升高，酶的水解效率增强，生成活性肽的抗氧化活性增强，在酶解温度为 50 °C 的

时候, 酶解产物的 DPPH 自由基清除率达到了 82.78%。随着酶解温度继续升高到 55 °C, 酶解产物的 DPPH 自由基清除率显著性下降, 说明当温度高于某一点时, 酶蛋白的特定结构会发生改变, 酶的活性也会降低甚至失活^[30]。虽然在温度升高到 60 °C 的时候, DPPH 自由基清除率有所升高, 但仍未达到最高值, 因此, 选择酶解温度为 50 °C 进行后续实验。

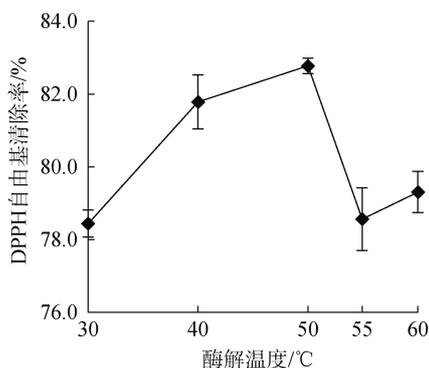


图 4 酶解温度对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 4 Effect of hydrolysis temperature on the DPPH radical scavenging activity

2.4.4 酶解时间

选用 6 : 1 液固比, 加酶量为 1 000 U/g, 酶解温度为 50 °C, pH 值为 6.5, 酶解时间分别为 3, 4, 5, 6, 7, 8 h。

从图 5 可以看出, 酶解时间在 3~4 h 时, 酶解产物的 DPPH 自由基清除率还未有明显变化, 但当酶解时间达到 5 h 时, DPPH 自由基清除率显著升高, 达到 82.03%, 并随着酶解时间的延长趋于平衡。分析原因可能是随着酶解时间的延长, 底物逐渐被消耗, 酶的催化效率降低, 酶解反应趋于平衡, 得到的酶解产物抗氧化活性也不再升高。因此, 选择酶解时间 5 h 进行后续实验。

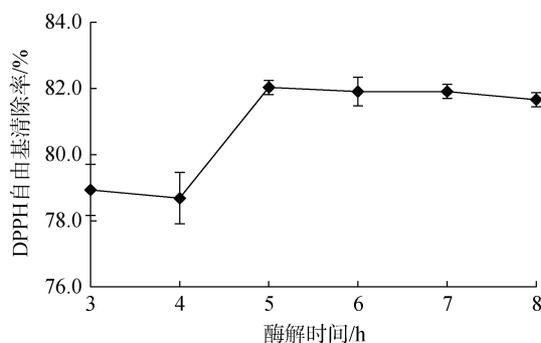


图 5 酶解时间对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 5 Effect of hydrolysis time on the DPPH radical scavenging activity

2.4.5 液固比

加酶量为 1 000 U/g, 酶解温度为 50 °C, pH 值为 6.5, 酶解时间为 5 h, 液固比分别为 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1 和 10 : 1。

图 6 表明, 随着液固比的增加, 酶解产物的 DPPH 自由基清除率显著性增加, 在液固比为 6 : 1 的时候达到最高值, 为 80.05%, 然而当液固比达到 10 : 1 时, DPPH 自由基清除率开始下降。这是由于在适宜的液固比下, 底物与蛋白酶充分结合, 有利于水解产物的形成, 其抗氧化活性较好; 当料液比增加到一定程度时, 底物浓度过低导致酶解效率低, 水解度降低^[31]。因此, 选择料液比 6 : 1 进行后续实验。

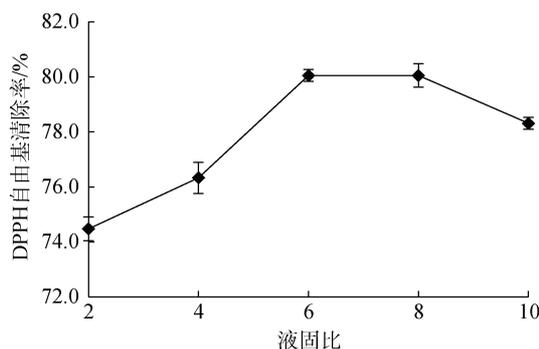


图 6 液固比对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 6 Effect of liquid-to-solid ratio on the DPPH radical scavenging activity

2.5 响应面优化实验制备鲛鳔活性肽

在单因素实验结果的基础上, 进一步采用响应面优化实验对酶解反应的五大因素水平进行筛选, 以酶解产物的 DPPH 自由基清除率为评价指标, 分析木瓜蛋白酶对鲛鳔鱼糜的最佳酶解制备工艺。本实验中采用的响应面优化实验, 设置每个因素 3 个水平, 实验因素和水平设计见表 4。

表 4 响应面分析法因素水平表

Tab. 4 Levels and factors of the orthogonal test

实验因素	代码	编码水平		
		-1	0	1
加酶量/(U·g ⁻¹)	A	800	1 000	1 200
pH	B	6	7	8
酶解温度/°C	C	40	50	60
酶解时间/h	D	4	5	6
液固比	E	4	6	8

2.5.1 响应面优化实验因素设计及结果

响应面实验设计与结果见表 5。实验结果表明, 在 46 组实验中, DPPH 自由基清除率的范围为 67.10%~81.63%, 不同因素水平下酶解产物的 DPPH 自由基清除能力不同。通过 Design Expert 12.0 软件分析, 得出二次多项回归方程如下:

$$Y(\%) = 77.23 - 0.5156A - 0.2070B - 0.9449C + 0.4059D - 0.3778E + 0.8903AB - 1.56AC - 0.850AD - 0.8117AE - 1.04BC + 3.21BD + 1.85BE - 2.98CD + 1.98CE - 1.33DE + 1.32A^2 - 2.05B^2 - 3.42C^2 + 0.0558D^2 - 1.19E^2, \quad (3)$$

其中, Y 代表酶解产物的 DPPH 自由基清除率, A, B, C, D, E 分别代表加酶量、pH 值、酶解温度、酶解时间和液固比的各个编码值。

通过 F 检验来判定回归方程中各变量对响应值影响的显著性, 结果表明, 整体模型的 P 值小于 0.000 1, 模型 F 值等于 37.04 均表示该二次方程模型高度显著。同时 $A, C, D, E, AB, AC, AD, AE, BC, BD, BE, CD, CE, DE, A^2, B^2, C^2, E^2$ 对响应面值均有显著性影响 ($P < 0.05$)。此外, 模型失拟项不显著, 模型决定系数 $R^2 = 0.9674$, 说明该模型方程的拟合程度较好, 预测值与实测值之间具有高度的相关性, 用该模型能较好地优化实验方案。

表 5 响应面实验设计及结果

Tab. 5 Experimental design and results of response surface

编号	加酶量/(U·g ⁻¹)	pH	温度/°C	酶解时间/h	液固比	DPPH 自由基清除率/%
1	800	6	50	5	6	77.21
2	1 200	6	50	5	6	75.93
3	800	8	50	5	6	75.36
4	1 200	8	50	5	6	77.64
5	1 000	7	40	4	6	70.61
6	1 000	7	60	4	6	74.86
7	1 000	7	40	6	6	78.50
8	1 000	7	60	6	6	70.83
9	1 000	6	50	5	4	76.78
10	1 000	8	50	5	4	72.65
11	1 000	6	50	5	8	72.08
12	1 000	8	50	5	8	75.36
13	800	7	40	5	6	74.97
14	1 200	7	40	5	6	76.60
15	800	7	60	5	6	77.01
16	1 200	7	60	5	6	72.41
17	1 000	7	50	4	4	74.83
18	1 000	7	50	6	4	78.23
19	1 000	7	50	4	8	77.01
20	1 000	7	50	6	8	75.10
21	1 000	6	40	5	6	71.70
22	1 000	8	40	5	6	74.29
23	1 000	6	60	5	6	71.41
24	1 000	8	60	5	6	69.83
25	800	7	50	4	6	78.50
26	1200	7	50	4	6	79.05

续表

编号	加酶量/(U·g ⁻¹)	pH	温度/℃	酶解时间/h	液固比	DPPH 自由基清除率/%
27	800	7	50	6	6	80.41
28	1 200	7	50	6	6	77.55
29	1 000	7	40	5	4	76.33
30	1 000	7	60	5	4	69.97
31	1 000	7	40	5	8	71.29
32	1 000	7	60	5	8	72.84
33	800	7	50	5	4	77.34
34	1 200	7	50	5	4	76.98
35	800	7	50	5	8	78.50
36	1 200	7	50	5	8	74.89
37	1 000	6	50	4	6	78.79
38	1 000	8	50	4	6	70.71
39	1 000	6	50	6	6	72.73
40	1 000	8	50	6	6	77.49
41	1 000	7	50	5	6	77.05
42	1 000	7	50	5	6	77.05
43	1 000	7	50	5	6	77.19
44	1 000	7	50	5	6	77.73
45	1 000	7	50	5	6	77.05
46	1 000	7	50	5	6	77.32

2.5.2 响应面优化实验作图分析

由上述方差分析结果可以看出,加酶量、酶解温度、酶解时间和液固比4个因素对酶解产物的DPPH自由基清除率影响较大,且加酶量和pH值、pH值和液固比、酶解温度和酶解时间、酶解时间和液固比等两因素水平之间的相互作用也达到了显著性。响应面图形是响应值分别对应5个自变量所构成的一个三维空间图,可直观反映出各自变量对响应值的影响。

图7为根据多元二次回归模型得到的响应面曲线图,从图中可以看出各响应面曲线图均与坐标轴有一定的角度,说明两因素交互作用均有不同程度的显著性^[23]。从图7a—d可以看出,当考察pH、酶解温度、酶解时间和液固比与加酶量之间的相互作用时,酶解产物的DPPH自由基清除率随着pH和酶解时间的增加而显著升高,说明加酶量与pH、加酶量与酶解时间的交互作用显著;酶解产物的DPPH自由基清除率随着酶解温度和液固比的增加先缓慢升高后降低,说明加酶量与酶解温度、加酶量与液固

比在一定水平范围内交互作用显著。分析可能原因为温度升高导致蛋白酶活力下降,液固比升高,底物浓度降低,蛋白酶的酶解效率降低,间接导致了酶解产物的活性降低。

从图7e和图7f可以看出,当考察酶解温度和酶解时间与pH之间的相互作用时,酶解产物的DPPH自由基清除率随着酶解时间的增加显著升高,随着酶解温度的增加呈先上升后缓慢下降的趋势,说明pH与酶解时间交互作用显著,与酶解温度在40~50℃交互作用显著。

图7g和图7j考察了pH和酶解时间与液固比之间的相互作用,从图中可以看出,酶解产物的DPPH自由基清除率随着pH和酶解时间的增加而升高,且随着酶解时间的增加,DPPH自由基清除率增加的趋势较明显。此外,从图7h和图7i可看出,酶解产物的DPPH自由基清除率随着酶解时间和液固比的增加缓慢升高,说明酶解时间和液固比与酶解温度间有一定的交互作用。

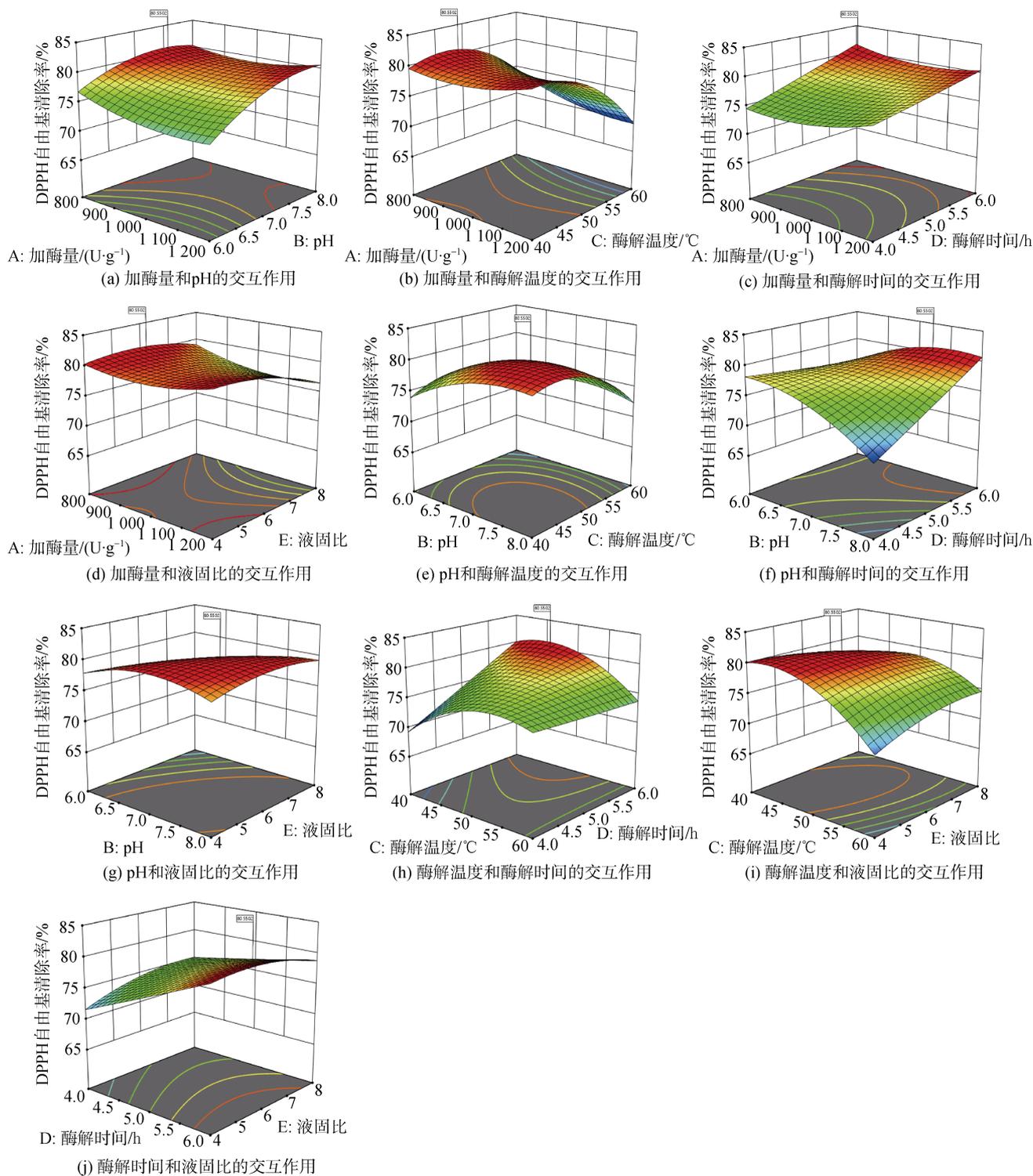


图7 交互作用的响应面曲线图
Fig. 7 Response surface plots for the interactions

2.5.3 响应面法验证性实验

根据 Design Expert 12.0 所建立的数学模型进行参数最优分析, 得到高抗氧化活性的鲛鳔活性肽最优酶解参数条件为: 加酶量 829.51 U/g, pH 值 7.37,

酶解温度 47.09 °C, 酶解时间 5.86 h, 液固比 5.79 : 1, DPPH 自由基清除率预测值为 80.55%。在最优酶解条件下, 进行了重复性实验, 测得最优条件下制备的鲛鳔活性肽是一种淡黄色粉末, 其 DPPH 自由基

清除率为 80.22%±0.63%，实验测定值与预测值之间并无显著性差异，说明此模型可以较好的预测鳢鱼活性肽的 DPPH 自由基清除率。

2.6 鳢鱼活性肽的抗氧化活性

在响应面优化实验中，我们选择实验所得酶解液来直接测定其 DPPH 自由基清除率，保证实验的时效性，同时减少因冷冻干燥过程造成一定的实验误差。后续实验中，我们进一步对最优酶解条件下获得的鳢鱼活性肽进行 DPPH 自由基清除率的定量研究，发现其在 10 mg/mL 的质量浓度下，DPPH 自由基清除率为 97.75%±0.63%，实验结果表明鳢鱼活性肽具有较好的 DPPH 自由基清除能力。

羟自由基是目前已知活性氧自由基中对生物体毒性最大、危害最大的一种自由基，过量的羟自由基会引起机体功能紊乱，乃至机体病变和死亡^[32]，因此，本实验进一步讨论了鳢鱼活性肽对羟自由基的清除能力。从图 8 可以看出，鳢鱼活性肽的质量浓度在 0~5 mg/mL 时，对羟自由基的清除能力呈显著增加的趋势；随着浓度的继续升高，鳢鱼活性肽清除羟自由基的能力减缓增加。对其趋势线进行分析可知，鳢鱼活性肽羟自由基清除能力的半抑制浓度 IC₅₀ 值为 1.69 mg/mL。

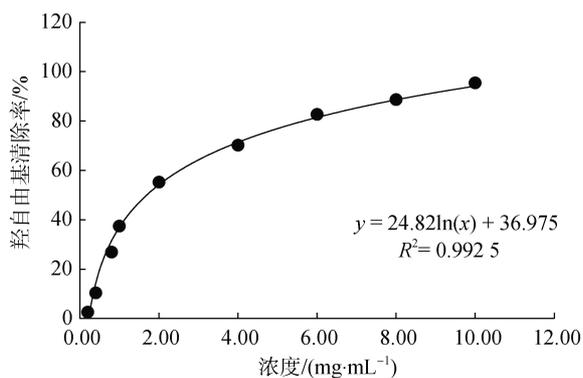


图 8 鳢鱼活性肽的羟自由基清除能力

Fig. 8 Hydroxyl radical scavenging activities of monkfish active peptide

杨会成等^[33]研究了鳢鱼皮胶原蛋白肽的清除自由基活性，其结果表明，当鳢鱼皮胶原蛋白肽浓度为 10 mg/mL 时，DPPH 自由基和羟自由基清除率分别为 68.78%和 70.48%。此外，林慧敏等^[2]研究了鳢鱼肝的羟自由基清除能力，在最佳条件下制备的鳢鱼肝抗氧化肽对羟自由基的清除能力为 76.74%。相比较而言，本研究获得的鳢鱼活性肽的抗氧化活性较高，为其后续应用提供了理论依据。

3 结论

鳢鱼糜水分含量较高，灰分和脂肪含量很低，蛋白质(干基)含量高达 75.30%，是一种低脂肪高蛋白的优质蛋白源。此外，鳢鱼糜的氨基酸含量丰富，富含与抗氧化活性有关的氨基酸，如谷氨酸、亮氨酸和赖氨酸等，这为鳢鱼活性肽的高抗氧化活性提供理论依据。本实验选择木瓜蛋白酶为最佳实验用酶，在单因素实验的基础上，进行响应面优化实验，确定鳢鱼活性肽最优酶解参数条件为：加酶量 829.51 U/g，pH 值 7.37，酶解温度 47.09 °C，酶解时间 5.86 h，液固比 5.79 : 1，DPPH 自由基清除率预测值为 80.55%。经响应面实验制备的鳢鱼活性肽，是一种淡黄色粉末，其 DPPH 自由基清除率为 80.22%±0.63%。进一步对其抗氧化活性进行验证，结果表明：鳢鱼活性肽质量浓度为 10 mg/mL 时，其 DPPH 自由基清除率为 97.75%±0.63%，羟自由基清除能力的 IC₅₀ 值为 1.69 mg/mL。综上所述，本实验获得的鳢鱼活性肽，可作为潜在的抗氧化剂，应用于食品和医药领域，以实现鳢鱼的高值化利用。

参考文献:

- [1] 王锡念, 徐志善, 孙钦军, 等. 超声波辅助酶解提取鳢鱼皮胶原蛋白的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 175-180.
WANG Xinian, XU Zhishan, SUN Qinjun, et al. Optimization of ultrasonic assisted enzymatic extraction of collagen from fish skin of *Lophiiformes*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(1): 175-180.
- [2] 林慧敏, 李仁伟, 张宾, 等. 鳢鱼肝抗氧化肽的酶法制备及对羟自由基的清除作用[J]. 中国食品学报, 2012, 12(7): 9-16.
LIN Huimin, LI Renwei, ZHANG Bin, et al. Enzymatic preparation and functional evaluation of antioxidant peptides derived from *Lophius Litulon* liver[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(7): 9-16.
- [3] 高云龙, 徐梦豪, 赵祥忠. 响应面优化冰岛刺参内脏团抗氧化肽制备工艺及其组成分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 235-243.
GAO Yunlong, XU Menghao, ZHAO Xiangzhong. Optimization of preparation process of antioxidant peptides in the visceral mass of *Cucumaria Frondosa* by response surface methodology and its composition analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 235-243.

- [4] 郑文文, 王令充, 吴皓, 等. 海洋贝类活性肽生物活性及酶解制备研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(1): 72-74.
ZHENG Wenwen, WANG Lingchong, WU Hao, et al. Progress in research on shellfish bioactive peptides and their enzymolysis preparation[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2011, 29(1): 72-74.
- [5] SHAHIDI F, ZHONG Y. Bioactive peptides[J]. Journal of Aoac International, 2008, 91(4): 914-931.
- [6] 王晓玲, 张芹, 张洪芳, 等. 带鱼蛋白水解肽制备条件优化[J]. 食品工业, 2019, 40(5): 90-93.
WANG Xiaoling, ZHANG Qin, ZHANG Hongfang, et al. Study on the preparation conditions of hairtail hydrolyzed[J]. The Food Industry, 2019, 40(5): 90-93.
- [7] 周燕芳, 林晓君, 李粉玲. 酶解海产低值鱼制备抗氧化肽的研究[J]. 食品工业, 2017, 38(8): 1-4.
ZHOU Yanfang, LIN Xiaojun, LI Fenling. Study on preparation of antioxidant peptides from marine low-value fish by enzymatic hydrolysis[J]. The Food Industry, 2017, 38(8): 1-4.
- [8] 柏昌旺, 章超桦, 林海生, 等. 响应面法优化制备牡蛎短肽工艺[J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(6): 85-92.
BAI Changwang, ZHANG Chaohua, LIN Haisheng, et al. Optimization of preparation process of oyster oligopeptides by response surface methodology[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(6): 85-92.
- [9] 蒋海萍. 蓝圆鲹蛋白制备抗氧化肽的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2014.
JIANG Haiping. Preparation of antioxidative peptides from round scad protein[D]. Nanning: Guangxi University, 2014.
- [10] 阎果兰, 靳利娥. 食品中抗氧化剂的发展趋势[J]. 山西食品工业, 2005(3): 20-22.
YAN Guolan, JIN Lie. Trends in antioxidants in food[J]. Shanxi Food Industry, 2005(3): 20-22.
- [11] 李致瑜, 张翀, 田玉庭, 等. 大黄鱼内脏抗氧化肽的稳定性研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(1): 151-158.
LI Zhiyu, ZHANG Chong, TIAN Yuting, et al. Stability of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(1): 151-158.
- [12] 王曼, 侯虎, 左亚军, 等. 鳕鱼肉酶解产物对小鼠抗疲劳和体内抗氧化作用[J]. 中国海洋药物, 2018, 37(5): 53-59.
WANG Man, HOU Hu, ZUO Yajun, et al. Anti-fatigue and antioxidant effects of enzymatic protein hydrolysate from *Alaska Pollock*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2018, 37(5): 53-59.
- [13] 王祖哲, 马普, 左爱华, 等. 刺参低聚肽对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(8): 85-90.
WANG Zuzhe, MA Pu, ZUO Aihua, et al. Hypoglycemic effect of *Apostichopus japonicus* oligo-peptides in alloxan-induced diabetic mice[J]. Food Research and Development, 2019, 40(8): 85-90.
- [14] WANG X Q, YU H H, XING R E, et al. Preparation and identification of antioxidative peptides from Pacific herring (*Clupea pallasii*) protein[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(10): 1-17.
- [15] 黄健, 欧昌荣, 王求娟, 等. 牡蛎预防醉酒及对小鼠酒精性肝损伤保护的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(10): 29-33.
HUANG Jian, OU Changrong, WANG Qiujuan, et al. Anti-inebriation and liver protection effect of oyster on alcoholic liver injury in mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(10): 29-33.
- [16] 袁鑫, 闫培生. 褐藻降血糖活性物质的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 215-219.
YUAN Xin, YAN Peisheng. Research progress of brown algae hypoglycemic active substances[J]. Food Research and Development, 2021, 42(4): 215-219.
- [17] 李亚会, 李积华, 吉宏武, 等. 远东拟沙丁鱼抗氧化肽的分离纯化及结构解析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 229-238.
LI Yahui, LI Jihua, JI Hongwu, et al. Isolation, purification and structural analysis of antioxidant peptides from *Sardinops sagax*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 229-238.
- [18] WANG X Q, YU H H, XING R E, et al. Optimization of antioxidative peptides from mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) viscera[J]. PeerJ, 2018, 6: e4373.
- [19] 赵荣涛, 王宁丽, 魏鉴腾, 等. 牡蛎蛋白酶解多肽降糖及抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2018, 39(3): 28-31.
ZHAO Rongtao, WANG Ningli, WEI Jianteng, et al. Evaluation of hypoglycemic and antioxidant activity for peptides from oyster protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(3): 28-31.
- [20] 冯书珍, 卢宇凤, 刘南英, 等. 海藻多糖的单糖组成对体外抗氧化活性的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 116-121, 169.
FENG Shuzhen, LU Yufeng, LIU Nanying, et al. Effect of monosaccharide composition on antioxidant activity of algal polysaccharides[J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(1): 116-121, 169.
- [21] 王子菲. 绿侧花海葵肽的体外抗氧化性及护肝作用机制研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
WANG Yufei. The antioxidant activity of *anthopleura anjunae* peptides in vitro and the mechanism of protecting liver[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019.

- [22] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
WU Moucheng. Food analysis and sensory evaluation[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002.
- [23] 李慧凝, 张明振, 孟少珂, 等. 响应面法优化鳀鱼肽的复合酶酶解工艺及氨基酸评价[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 121-127.
LI Huining, ZHANG Mingzhen, MENG Shaoke, et al. Optimization process condition using response surface for bi-enzymatic of *Katsuwonus pelamis* peptides and amino acid evaluation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 121-127.
- [24] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
LI Li, ZHANG Sai, HE Qiang, et al. Application of response surface methodology in experiment design and optimization[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2015, 34(8): 41-45.
- [25] 贾韶千, 李艳霞. 黄鳍鱼骨多肽制备及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 133-138.
JIA Shaoqian, LI Yanxia. Preparation and antioxidant activity of monopterus albus bone peptides[J]. Food Science, 2016, 37(1): 133-138.
- [26] YOU L J, ZHAO M M, LIU R H, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(14): 7948-7953.
- [27] 张晖, 唐文婷, 王立, 等. 抗氧化肽的构效关系研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7): 673-679.
ZHANG Hui, TANG Wenting, WANG Li, et al. Review on structure-activity relationship of antioxidative peptides[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(7): 673-679.
- [28] 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.
- [29] 胡二坤, 郭兴凤, 郑慧, 等. 木瓜蛋白酶水解鱼蛋白酶解产物抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(4): 26-29.
HU Erkun, GUO Xingfeng, ZHENG Hui, et al. Study on antioxidant activity of hydrolyzed fish proteolysis product of papain[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(4): 26-29.
- [30] 厉望, 靳挺, 武玉学. 带鱼蛋白酶解条件优化及酶解物抗氧化性能[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 234-239.
LI Wang, JIN Ting, WU Yuxue, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of hairtail protein and antioxidant activities of its hydrolysates[J]. Food Science, 2013, 34(9): 234-239.
- [31] JEEVITHAN E, WU W H, WANG N P, et al. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(10): 1767-1777.
- [32] 申彩红. 海参肽的酶法制备及其抗氧化、抗疲劳活性研究[D]. 泉州: 华侨大学, 2015.
SHEN Caihong. Study on the enzymatic preparation of sea cucumber peptide and its antioxidant and anti-fatigue activities[D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2015.
- [33] 杨会成, 郑斌, 廖妙飞, 等. 鲛鳃皮胶原蛋白肽最佳制备工艺及自由基清除活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 159-164.
YANG Huicheng, ZHENG Bin, LIAO Miaofei, et al. Study on optimal preparation process and free radical scavenging activity of collagen peptides from *Lophius litulon* skin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(20): 159-164.

Optimization of monkfish active peptide using response surface methodology

WANG Xue-qin^{1, 2}, TENG Li-chao^{1, 2, 3}, YU Hua-hua^{1, 2}, XING Rong-e^{1, 2},
LI Peng-cheng^{1, 2}

(1. CAS and Shandong Province Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Center for Ocean Mega-Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Nov. 17, 2021

Key words: monkfish; enzymatic hydrolysis; papain; DPPH radical scavenging activity; response surface methodology

Abstract: Minced monkfish fillet is an excellent marine biological resource with a diverse range of amino acids, a high protein content of up to 75.30%, and low fat content. In this experiment, four kinds of proteases, i.e., trypsin, pepsin, papain, and bromelain, were used for hydrolysis to produce the monkfish protein hydrolysate. Papain was chosen as the best enzyme of the four after considering the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of various enzymatic hydrolysates. Based on a single factor experiment, the study used response surface methodology to obtain the optimal conditions. The parameters of the experiment were as follows: enzyme concentration of 829.51 U/g, pH of 7.37, hydrolysis temperature of 47.09 °C, hydrolysis time of 5.586 h, and liquid-to-solid ratio of 5.79:1. The investigation found that the maximum DPPH scavenging activity was 80.22%±0.63%, which was comparable to the experimental predicted value of 80.55%. The monkfish peptide prepared using response surface methodology was a light-yellow powder with high antioxidant activity. Its IC₅₀ of hydroxyl radical scavenging ability was 1.69 mg/mL, showing its potential as an antioxidant.

(本文编辑: 杨悦)