

## 大眼金枪鱼头蛋白酶解物 1 ku 超滤组分的 抗氧化活性及其理化性质

杨 萍, 柯虹乔, 章超桦\*, 洪鹏志

(广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524025)

**摘要:** 研究大眼金枪鱼头蛋白酶解物 1 ku 超滤组分的还原力、自由基清除能力及对衰老小鼠体内抗氧化能力的影响, 分析 1 ku 超滤组分的一般成分、氨基酸组成及分子量分布, 为进一步分离纯化金枪鱼头抗氧化肽提供基础。体外结果显示, 1 ku 超滤组分对羟基自由基、超氧阴离子和 DPPH 自由基的清除活性随浓度的增加而增强,  $IC_{50}$  分别为 1.38、0.73 与 0.93 mg/mL, 还原力也随浓度的增加而增大, 在浓度为 12.5 mg/mL 时为 0.763; 体内结果显示, 灌胃 30 mg/kg 的 1 ku 超滤组分连续 42 d, D-半乳糖致衰老小鼠肝组织的超氧化物歧化酶(SOD)活性、肝组织和血清的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性显著提高( $P < 0.05$ ), 血清丙二醛(MDA)含量显著降低( $P < 0.01$ ); 理化分析结果显示, 1 ku 超滤组分(干基计)蛋白质含量为 96.40%, 脂肪 0.11%, 灰分 4.86%, 疏水性氨基酸占氨基酸总量的 35.8%, 活性组分分子量在 1 802~2 519 u 和 422~922 u。

**关键词:** 大眼金枪鱼; 鱼头; 酶解物; 超滤; 抗氧化活性

**中图分类号:** TS 254.1

**文献标志码:** A

天然抗氧化肽具有较强的抗氧化活性及很高的安全性, 在食品、医药和饲料行业中显示出应用优势, 近年来已成为国内外研究的热点。酶法是目前生产活性肽的主要方法。从水产品以及水产品加工下脚料中采用酶解法制备抗氧化肽, 得到广泛的研究, Jia 等<sup>[1]</sup>从狭鳕中提取得到具有很好的体外清除自由基及还原能力的抗氧化肽, 许庆陵等<sup>[2]</sup>用酶水解鲢鱼肉得到羟自由基清除率很高的抗氧化肽, Jun 等<sup>[3]</sup>酶解黄盖鲷下脚料、贾建萍等<sup>[4]</sup>酶解三文鱼皮蛋白得到抗氧化活性很高的多肽。这充分显示了水产品中的蛋白具有制备抗氧化肽的潜力。

金枪鱼又名吞拿鱼、鲔鱼, 是一类生活在海洋中上层的鱼类, 常见的有长鳍金枪鱼、黄鳍金枪鱼、大眼金枪鱼、蓝鳍金枪鱼等 7 种, 在大西洋、太平洋和印度洋都有分布, 属于大洋暖水性洄游鱼类。联合国粮农组织(FAO)数据显示, 2002—2007

年, 世界金枪鱼产量维持在 400~450 万 t<sup>[5]</sup>。我国金枪鱼除少数冰鲜销售外, 主要用于制作生鱼片和罐头, 产品主要供应日本和欧美市场。在加工过程中, 会产生大量的下脚料, 包括金枪鱼鱼头、内脏, 鱼骨, 暗色肉和鱼皮等约占总重量的 50%~70%<sup>[5]</sup>。这些下脚料中含有大量的蛋白质、脂肪、矿物质及多种生物活性物质。研究分析, 大眼金枪鱼头蛋白质含量干基计达 63.3%, 是良好的蛋白质源。实验用酶水解大眼金枪鱼头蛋白, 制备了羟基自由基清除率达 63.7%的酶解物<sup>[6]</sup>, 并且研究了酶解物的体外抗氧化活性<sup>[7]</sup>, 采用超滤得到抗氧化活性较高的 1 ku 超滤组分。本实验研究了 1 ku 超滤组分的还原力、自由基的清除活性以及对 D-半乳糖衰老模型小鼠抗氧化系统的影响, 并分析了 1 ku 超滤组分的理化性质, 旨在为分离出高效的金枪鱼头抗氧化肽提供基础。

收稿日期: 2012-01-21

修回日期: 2012-06-06

资助项目: 广东省自然科学基金项目(10152408801000031); 广东海洋大学自然科学基金(2010)

通讯作者: 章超桦, E-mail: zhangch@gdou.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)鱼头:由广东广远渔业集团有限公司提供; Alcalase 2.4 L(2.4 AU/g)购自诺维信公司; 脱氧核糖、二苯代苦味肼基自由基(DPPH)、抑肽酶(6500 u)、杆菌肽(1450 u)、L-酪氨酸(181 u)等购自 Sigma 公司; 超氧化物歧化酶(SOD)活力测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力测定试剂盒、丙二醛(MDA)含量测定试剂盒及考马斯亮蓝测定试剂盒购自南京建成科技有限公司; D-半乳糖, 美国 MBCHEM 公司生产, 广州威佳科技有限公司分装。其他试剂均为分析纯。

SPF级 KM 小鼠 40 只, 雄性, 购入时体质量为 22~29 g。由广东省医学实验动物中心提供, 质量合格证编号: 0076537。

### 1.2 主要仪器设备

CR22G 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司), UV-2102 紫外-可见分光光度计(上海尤尼科仪器厂), FDU-1100 冷冻干燥机(日本东京理化器械株式会社), Mini pellicon 超滤器与膜包(美国 Minipore 公司)。

### 1.3 金枪鱼头蛋白酶解物 1 ku 超滤组分的制备

参考文献[6]的方法, 采用 Alcalase 2.4L 酶解金枪鱼头, 得到金枪鱼头蛋白酶解物, 然后依次通过截留分子量为 8、5、3、1 ku 的超滤膜, 得到 1 ku 超滤组分, 以下简称 THPH-1。其中冷冻干燥的 THPH-1 用于一般成分分析及小鼠的灌胃实验。

### 1.4 THPH-1 的理化性质分析

**一般成分测定** 水分: 直接干燥法(GB/T5009.3-2010); 灰分: 550℃灼烧法(GB 5009.4-2010); 蛋白质: 半微量凯氏定氮法(GB/T 5009.5-2010); 脂肪: 索氏抽提法(GB/T 5009.6-2003)。

**THPH-1 的氨基酸组成分析** 样品经 6 mol/L HCl 水解后, 采用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪进行 17 种氨基酸含量测定。另取样品经 5 mol/L NaOH 水解, 同机测定色氨酸含量。

**THPH-1 的分子量分布** 分子量分布采用 Sephadex G-25(1.6 cm×72 cm)分析检测。以蒸馏水作为洗脱液, 洗脱流速为 0.8 mL/min, 分子量标准品是抑肽酶、杆菌肽和 L-酪氨酸, 根据出峰时间和

分子量大小的对数作分子量标准线性回归方程为  $Lg Mr = -0.0097x + 4.7107 (R^2 = 0.9968)$ , 样品的分子量根据其洗脱时间和标准曲线求得。

### 1.5 THPH-1 的还原力

参考 Oyaizu<sup>[8]</sup>方法。将 2 mL 样品加到 2 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=6.6)和 2 mL 1% 的铁氰化钾溶液的混合液中。震荡混匀, 混合物在 50℃保温 20 min, 然后在反应混合物中加入 2 mL 10% 的 TCA, 混合后以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL 与 2 mL 蒸馏水以及 0.4 mL 0.1% 氯化铁在试管中反应, 10 min 后测定其在 700 nm 处的吸光值。

### 1.6 THPH-1 对羟基自由基的清除活性

采用 Fenton 体系<sup>[2,9]</sup>测定。

### 1.7 THPH-1 对超氧阴离子自由基的清除活性

采用邻苯三酚自氧化体系<sup>[10]</sup>测定。

### 1.8 THPH-1 对 DPPH 自由基的清除活性

参考 Shimada 等<sup>[11]</sup>方法, 将 1.5 mL 不同浓度样品液添加到 1.5 mL 含 0.1 mmol/L DPPH 的 95% 乙醇中, 振荡混匀, 在室温下放置 30 min, 然后在波长 517 nm 处检测。清除率为

$$\text{清除率}(\%) = [(A_c - A_i) / A_c] \times 100$$

式中,  $A_c$  为 1.5 mL DPPH 溶液加上 1.5 mL 蒸馏水在 517 nm 处的吸光值

$A_i$  为 1.5 mL 样品液加上 1.5 mL DPPH 溶液在 517 nm 处的吸光值

### 1.9 THPH-1 对 D-半乳糖致衰老小鼠肝脏和血清 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响

40 只雄性小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只。正常对照组每日颈背部皮下注射生理盐水一次, 其余组每日用 D-半乳糖按照 400 mg/kg 体质量颈背部皮下注射一次。造模同时给药, 高剂量组、低剂量组按 0.2 mL/10g 体质量灌胃 120 和 30 mg/kg 的 THPH-1, 正常对照组和衰老模型组灌服等量的生理盐水, 连续 42 d。末次给药后, 停药禁食 1 d, 摘除眼球取血, 分离血清, 然后迅速取出肝脏于超低温冰箱中冻存待测。SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量按照试剂盒说明书方法进行检测, 蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定。

### 1.10 数据处理

结果用 mean ± SD 表示。采用 SPSS 13.0 软件对数据进行单因素方差分析和多重比较。差异显著

水平为  $P < 0.05$ , 极显著水平为  $P < 0.01$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 THPH-1 的理化性质

**一般成分** 对 THPH-1 的一般成分进行分析(表 1)。由表可知, THPH-1 的蛋白质含量最高, 干基计为 96.40%, 脂肪含量仅为 0.11%, 灰分稍高为 4.86%。

表 1 THPH-1 的一般成分

Tab. 1 Common nutrition component of THPH-1

成分 component	含量/% content
粗蛋白质 crude protein	88.02±0.29
水分 moisture	8.69±0.01
粗脂肪 crude fat	0.10±0.01
灰分 ash	4.44±0.01

**氨基酸组成** 氨基酸分析结果显示 THPH-1 中游离氨基酸含量占 8.07%, 肽形式存在的氨基酸占氨基酸总量的 91.93%, 说明 THPH-1 主要由肽组成(表 2), 在总氨基酸中, Glu、Gly、Ala、Lys 和 Leu 含量较高, 疏水性氨基酸(Pro、Ala、Val、Ile、Leu、Tyr、Phe、Trp)含量达 35.8%。

表 2 THPH-1 的氨基酸组成和相对百分含量

Tab. 2 Composition and relative content of amino acid of THPH-1 %

氨基酸 amino acid	游离氨基酸 free amino acid	总氨基酸 total amino acid	%
天门冬氨酸 Asp	2.38	7.95	
苏氨酸 Thr	4.48	4.22	
丝氨酸 Ser	3.58	3.49	
谷氨酸 Glu	8.66	14.46	
脯氨酸 Pro	0.15	3.98	
甘氨酸 Gly	3.13	8.67	
丙氨酸 Ala	9.55	8.43	
胱氨酸 Cys	5.82	/	
缬氨酸 Val	11.04	5.30	
甲硫氨酸 Met	5.22	3.98	
异亮氨酸 Ile	6.57	4.34	
亮氨酸 Leu	5.37	8.19	
酪氨酸 Tyr	0.30	3.37	
苯丙氨酸 Phe	0.45	4.58	
赖氨酸 Lys	1.79	8.31	
组氨酸 His	26.87	3.86	
精氨酸 Arg	2.54	6.63	
色氨酸 Trp	1.04	0.75	

**THPH-1 的分子量分布及各部分洗脱液对羟基自由基的清除活性** THPH-1 经 Sephadex G-25 凝胶色谱分离得到四个峰(图 1), 由表 3 可知, 峰 I 的分子量在 1 802~2 519 u, 约占 15.8%; 峰 II 的分子量介于 422~922 u, 约占 36.8%; 峰 III 分子量在 152~422 u, 占 47.4%; 峰 IV 可能是一些杂质产生的吸收。收集前 3 个组分, 真空浓缩后测定各组分的羟基自由基清除率, 计算出  $IC_{50}$ 。由表 3 可见, 不同分子量的各组分对羟基自由基的清除活性不同, 与 THPH-1 相比, 峰 I 和峰 II 对羟基自由基清除活性有显著提高。峰 II 的活性最好, 其  $IC_{50}$  为 0.527 mg/mL, 羟基自由基清除活性提高了 61.8%, 这可能是由于其富含活性肽的缘故。峰 III 活性较低, 推测可能与其含氨基酸较多有关。

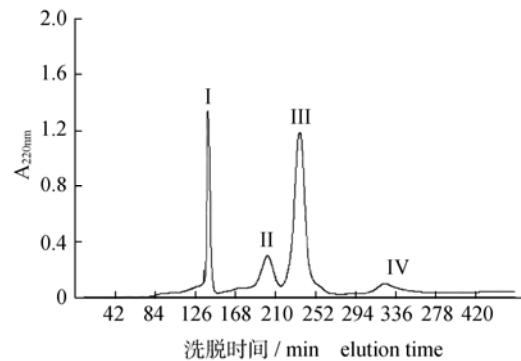


图 1 THPH-1 的葡聚糖凝胶 G-25 柱层析谱图  
Fig. 1 Sephadex G-25 size-exclusion chromatography of THPH-1

众多研究已发现, 抗氧化肽的氨基酸组成、相对分子量与抗氧化活性有一定的关系。Hsu 等<sup>[12]</sup>从金枪鱼煮汁中分离得到 3 种富含 Glu、Ala、Asp 的抗氧化活性肽, 相对分子质量分别为 584、938 和 1305 u。Mendis 等<sup>[13]</sup>从鱼皮中分离出抗氧化肽 His-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Leu(797 u), 其疏水性氨基酸比例很高。任娇艳等<sup>[14]</sup>从草鱼蛋白中分离出疏水性氨基酸占总氨基酸残基量 50% 的抗氧化肽, 其相对分子质量为 966.3 u。本研究结果显示 1 ku 超滤组分的蛋白质含量高达 96.40%(干基), 肽含量达 91.93%, Glu、Gly、Ala、Lys 和 Leu 含量高, 且富含疏水性氨基酸。葡聚糖凝胶 G-25 柱层析结果显示, THPH-1 的相对分子量在 2 520 u 以下, 活性更高组分的分子量在 1 802~2 519 u、422~922 u。

表 3 THPH-1 的分子量分布及各峰的羟基自由基清除活性  
 Tab. 3 The MW distribution of THPH-1 and IC<sub>50</sub> of Hydroxyl radical scavenging activity of gel chromatography fractions

组分 fractions	组分比例/% ratio	分子量/u molecular weight	羟基自由基清除活性 IC <sub>50</sub> /(mg/mL) IC <sub>50</sub> of Hydroxyl radical scavenging activity
I	15.8	2519~1802	0.929
II	36.8	922~422	0.527
III	47.4	422~154	1.65
THPH-1	—	—	1.38

## 2.2 THPH-1 的还原力

在一般情况下,物质的还原能力与抗氧化能力呈正相关<sup>[15]</sup>。还原力是通过有颜色的氧化还原反应来判定待测物是否能作为良好的电子供体将 Fe<sup>3+</sup>还原为 Fe<sup>2+</sup><sup>[18]</sup>。加入待测物后,在 700 nm 处根据其吸光值的变化可以得知 Fe<sup>2+</sup>含量的变化<sup>[16]</sup>。待测物的还原性与吸光值大小有关,吸光值越大还原性越强。由图 2 可见,THPH-1 的还原力随着蛋白浓度的增加而增大,存在显著的线性关系( $R^2=0.9973$ )。在蛋白浓度为 5 mg/mL 时,还原力为 0.313,与同浓度金枪鱼头蛋白酶解物相比,还原力 0.437<sup>[7]</sup>有所下降。李雪等<sup>[17]</sup>研究草鱼鱼肉蛋白酶解物、Klompong 等<sup>[18]</sup>研究金带细鲈的 Alcalase 酶解物的还原力时,均发现水解度增加还原力下降。这与本实验结果相似。但是, Moure 等<sup>[19]</sup>在研究大豆蛋白酶解物超滤组分的抗氧化性时发现肽段越短,其还原力越强。Klompong 等<sup>[18]</sup>研究金带细鲈的 Flavourzyme 酶解物还原力时,得到水解度对还原力无影响的结果。因此,蛋白酶解物的还原力与其浓度、肽段长短以及蛋白酶的种类都有关。

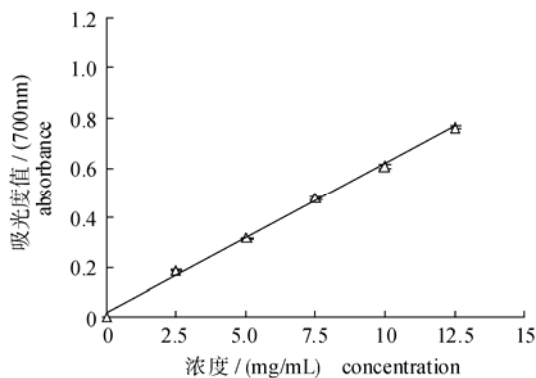


图 2 THPH-1 的还原力  
 Fig. 2 Reducing power of THPH-1

## 2.3 THPH-1 的自由基清除活性

THPH-1 对羟基自由基、超氧阴离子和 DPPH 自由基的清除活性见表 4。结果可见,THPH-1 对羟

基自由基、超氧阴离子和 DPPH 自由基的清除率均随蛋白浓度的增加而增加,且有良好的线性关系,相关系数分别为 0.9697、0.9886 及 0.9995。这与相关文献报道结果一致<sup>[20-21]</sup>。金枪鱼头蛋白酶解物对羟基自由基、超氧阴离子和 DPPH 自由基清除率的 IC<sub>50</sub> 分别为 2.84、1.20、1.34 mg/mL<sup>[7]</sup>, THPH-1 则分别为 1.38、0.73 与 0.93 mg/mL, THPH-1 对 3 种自由基的清除活性均高于未经超滤的酶解物,其中以羟基自由基清除活性提高的幅度最大,达 51.4%,说明 THPH-1 富集了酶解物中的抗氧化活性肽。超滤分离是分离纯化活性肽的有效手段,且诸多实验证实大多数抗氧化肽的相对分子质量小于 3 ku。Kim 等<sup>[22]</sup>发现鱼骨架蛋白酶解液中 1~3 ku 的超滤组分的自由基清除活性最高,在浓度为 0.5 mg/mL 时,对羟基自由基与 DPPH 自由基清除率为 84.93% 与 83.39%,在浓度为 1.0 mg/mL 时对超氧阴离子自由基清除率为 28.97%;任俊凤等<sup>[23]</sup>发现河豚鱼皮胶原蛋白肽中 1 ku 超滤组分的自由基清除活性最高,其对羟基自由基和 DPPH 自由基清除率的 IC<sub>50</sub> 为 0.373 与 2.4837 mg/mL,在浓度为 50 mg/mL 时对超氧阴离子自由基清除率为 53.79%。

## 2.4 THPH-1 对 D-半乳糖致衰老小鼠肝组织和血清 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响

模型组小鼠肝组织中 SOD 活性与正常对照组比显著降低( $P<0.05$ );与模型组相比,高、低剂量组小鼠肝组织中 SOD 活性升高,其中低剂量组有显著性差异( $P<0.05$ )(表 5)。模型组小鼠肝组织中 GSH-Px 活性降低,与正常对照组相比有显著差异( $P<0.05$ );高、低剂量组小鼠肝组织中 GSH-Px 活性显著高于模型组( $P<0.05$ )。与正常对照组相比,模型组、高、低剂量组小鼠肝组织中 MDA 含量均降低,但都没有显著性差异。可见,灌胃 THPH-1 可以显著提高 D-半乳糖诱导衰老小鼠肝组织的 SOD 活性与 GSH-Px 活性。

表 4 THPH-1 的羟基自由基、超氧阴离子、DPPH 自由基清除率

Tab. 4 Scavenging effect of THPH-1 on hydroxyl/superoxide/1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical

浓度/(mg/mL) concentration	羟基自由基 清除率/% hydroxyl radical scavenging activ- ity	浓度/(mg/mL) concentration	超氧阴离子 清除率/% superoxide anion scavenging ac- tivity	浓度/(mg/mL) concentration	DPPH 自由基清 除率/% DPPH scaveng- ing activity
0.5	10.73±0.72	0.1	21.54±0.76	0.25	18.13±0.07
1.0	15.87±0.92	0.5	37.47±0.67	0.5	29.19±0.26
1.5	40.73±0.88	1.0	48.15±0.23	0.75	40.93±0.47
2.0	60.22±0.43	1.5	59.65±0.48	1.0	51.90±0.22
2.5	72.03±0.36	2.0	77.34±0.42	1.25	62.17±0.59

表 5 THPH-1 对小鼠肝组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响(n=10)

Tab. 5 Effects of THPH-1 on SOD,GSH-Px and MDA in liver of mice

组别 group	SOD 活力/(U/mg prot) SOD activity	GSH-Px 活力/(U/mg prot) GSH-Px activity	MDA 含量/(nmol/mg prot) MDA content
正常对照组 control	128.6±13.2 <sup>acd</sup>	0.93±0.17 <sup>a</sup>	1.54±0.24
衰老模型组 aged model	112.9±10.2 <sup>b</sup>	0.77±0.09 <sup>b</sup>	1.48±0.33
高剂量组 high dose	116.7±13.6 <sup>cb</sup>	0.90±0.013 <sup>a</sup>	1.43±0.24
低剂量组 low dose	129.1±12.1 <sup>d</sup>	0.89±0.08 <sup>a</sup>	1.37±0.19

注: 不同上标小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 不同上标大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。

Notes: Column values with different lower\_case indicate significant difference ( $P<0.05$ ), values with different capital indicate significant difference ( $P<0.01$ ).

由表 6 可知, 模型组、高、低剂量组小鼠血清中 SOD 活性均比正常对照组显著升高( $P<0.05$ ), 其中高剂量组有极显著差异( $P<0.01$ )。模型组小鼠血清中 GSH-Px 活性降低, 与正常对照组相比有显著差异( $P<0.05$ )。高、低剂量组小鼠血清中 GSH-Px 活性显著高于模型组( $P<0.05$ ), 其中高剂量组有极显著差异( $P<0.01$ )。模型组小鼠血清中 MDA 含量比正常对照组稍低, 但无显著差异; 高、低剂量组小鼠血清 MDA 含量均极显著低于模型组( $P<0.01$ )和正常对照组( $P<0.01$ )。可见, 灌胃 THPH-1 可以显著提高 D-半乳糖诱导衰老小鼠血清的 GSH-Px 活性, 显著降低血清的 MDA 含量。

SOD 是一种存在于细胞液中的抗氧化酶, 它能清除体内各种过氧化物和超氧阴离子自由基, 降低对生物膜和其他组织造成的损伤, 对机体的氧化与抗氧化的平衡起着重要作用, 它的活性高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。GSH-Px 是动物体内一种重要的催化过氧化氢分解的酶, 有清除过氧化物和保护细胞免于氧化损伤的重要作用, 因此当机体受到氧化应激时就会发生活性

变化, 从而可作为判断抗过氧化能力的重要指标。MDA 是一种脂质过氧化物, 可间接反映出机体内的脂质过氧化水平。D-半乳糖诱导导致衰老小鼠模型是抗氧化、延缓衰老药物及保健食品筛选工作中经常选用的实验动物模型, D-半乳糖供给过量, 超常产生活性氧, 打破了受控于遗传模式的活性氧产生与消除的平衡状态, 引起过氧化效应。本研究发现灌胃 THPH-1(120、30 mg/kg 体质量)连续 42 d 后, D-半乳糖诱导衰老小鼠血清的 MDA 含量显著低于模型组( $P<0.01$ ), 肝组织和血清的 GSH-Px 活性均显著高于模型组( $P<0.05$ ), 且 GSH-Px 活性恢复或超过正常对照组水平, 灌胃 30mg /kg 组小鼠肝组织的 SOD 显著高于模型组( $P<0.05$ )。说明灌胃 THPH-1, 可以防止自由基对肝组织脂质的氧化和细胞膜的破坏, 有效地清除体内堆积的自由基, 使体内自由基防护体系的功能有所恢复, 显示了 THPH-1 的体内抗氧化活性。林琳等<sup>[24]</sup>研究鲑鱼胶原蛋白水解肽的抗氧化活性时, 也证实在体外具有良好的超氧阴离子与羟基自由基清除活性的 2 ku 超滤组分, 可以提高 D-半乳糖诱导导致衰老小

鼠血液及皮肤中 SOD 和 GSH-Px 的活力,降低 MDA 含量。

表 6 THPH-1 对小鼠血清 SOD、GSH-P<sub>x</sub> 活性和 MDA 含量的影响(n=10)

Tab. 6 Effects of THPH-1 on SOD, GSH-P<sub>x</sub> and MDA in serum of mice

组别 group	SOD 活力/(U/mg prot) SOD activity	GSH-P <sub>x</sub> 活力/(U/mg prot) GSH-P <sub>x</sub> activity	MDA 含量/(nmol/L) MDA content
正常对照组 control	127.2±18.3 <sup>AA</sup>	12.7±3.6 <sup>a</sup>	5.40±1.15 <sup>AA</sup>
衰老模型组 aged model	145.9±19.0 <sup>b</sup>	9.9±2.0 <sup>BA</sup>	5.14±0.60 <sup>AA</sup>
高剂量组 high dose	150.3±14.4 <sup>BB</sup>	14.5±3.8 <sup>AB</sup>	3.86±0.74 <sup>BB</sup>
低剂量组 low dose	152.6±22.0 <sup>b</sup>	15.1±4.6 <sup>a</sup>	4.06±0.61 <sup>BB</sup>

注:不同上标小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不同上标大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。

Notes: Column values with different lower\_case indicate significant difference ( $P<0.05$ ), values with different capital indicate significant difference ( $P<0.01$ ).

### 3 结论

大眼金枪鱼头蛋白酶解物 1 ku 超滤组分体外具有一定的还原力,对羟基自由基、超氧阴离子和 DPPH 自由基有较好的清除活性;体内显著提高 D-半乳糖诱导衰老小鼠肝组织的 SOD 活性,显著提高肝组织和血清的 GSH-P<sub>x</sub> 活性,显著降低血清的 MDA 含量。1 ku 超滤组分蛋白质含量干基计高达 96.40%,肽含量达 91.93%,富含与抗氧化活性有关的氨基酸,有两个活性更高的组分。说明 1 ku 超滤组分富集了大眼金枪鱼头蛋白酶解物中的抗氧化肽,有望进一步分离纯化得到活性更高的单一抗氧化肽。

#### 参考文献:

- Jia J P, Zhou Y G, Lu J Z, *et al.* Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(4): 635-640.
- 许庆陵, 曾庆祝, 朱莉娜, 等. 鲢酶解物对羟自由基的清除作用[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 93-99.
- Jun S Y, Park P J, Jung W K, *et al.* Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein[J]. European Food Research and Technology, 2004, 219 (1): 20-26.
- 贾建萍, 周彦钢, 鲁健章, 等. 三文鱼皮胶原肽的制备及其抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(4): 94-99.
- Herpandi N H, Rosma A, Nadiyah Wan 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.
- 柯虹乔, 杨萍, 洪鹏志. 酶解金枪鱼头蛋白制备羟基自由基清除物的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2011, (5): 10-14.
- Yang P, Ke H Q, Hong P Z, *et al.* Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(12): 2460-2466.
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- Chung S K, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*)[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1977, 61(1): 118-123.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47(3): 469-474.
- Shimada K, Fujikawa K, Tahara K, *et al.* Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 945-948.
- Hsu K C, Lu G H, Jao C L. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*)[J]. Food Research International, 2009, 42(5-6): 647-652.
- Mendis E, Rajapakse N, Kim S K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(3): 581-587.
- 任娇艳, 赵谋明, 崔春, 等. 草鱼蛋白源抗氧化肽的分离及鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(13): 13-17
- Chen H M, Murarotto K J, Fumio Y C. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 49-53.
- Ferreira I C F R, Baptista P, Vilas-Boas M, *et al.* Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Indi-

- vidual cap and stipe activity[J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1511–1516.
- [17] 李雪, 罗永康, 尤娟. 草鱼鱼肉蛋白酶解物抗氧化性及功能特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(1): 94–99.
- [18] 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.
- [19] Moure A, Domingue H, Parajo J C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates[J]. Process Biochemistry, 2006, 41 (2): 447–456.
- [20] 任海伟, 王常青. 黑豆低聚肽的抗氧化活性评价及其氨基酸组成分析[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 45–50.
- [21] 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.
- [22] Kim S Y, Je J Y, Kim S K. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(1): 31–38.
- [23] 任俊凤, 任婷婷, 朱蓓薇. 河豚鱼皮胶原蛋白肽的提取及其抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(2): 77–83.
- [24] 林琳, 李八方. 鲑鱼皮胶原蛋白水解肽抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(4): 48–51.

## Antioxidant activity and physicochemical properties of 1 ku fraction by ultrafiltration of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate

YANG Ping, KE Hong-qiao, ZHANG Chao-hua\*, HONG Peng-zhi

(College of Food Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** To produce bioactive peptides from the by-products of fish processing, bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head was hydrolyzed by alcalase, and the tuna head protein hydrolysate (THPH) was fractionated through ultrafiltration membranes with a range of molecular weight cutoffs (MWCO) of 8, 5, 3 and 1 ku, respectively, to yield the fraction THPH-1 with MW distribution < 1 ku. The antioxidant activities of THPH-1 were evaluated using reducing power, free radical scavenging and aged model mice induced by D-galactose. The physicochemical properties of THPH-1 were analysed also. THPH-1 showed evident radical scavenging activity in a dose-dependent manner with the IC<sub>50</sub> values for hydroxyl radical, superoxide radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical being 1.38, 0.73 and 0.93 mg/mL respectively. The reducing power of THPH-1 was 0.763 at 12.5 mg/mL. The activities of superoxide dismutase (SOD) of liver and the activities of glutathione peroxidase (GSH-P<sub>x</sub>) of liver and serum in aged model mice were significantly increased ( $P < 0.05$ ) compared with that of the normal control group mice after 42 days administrated orally at a dose of 30 mg/kg THPH-1, and the content of malondialdehyde (MDA) of serum in aged model mice was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The physicochemical properties showed that THPH-1 contained 96.40% of protein (on dry basis), 0.11% of fat and 4.86% of ash. The total hydrophobic amino acids content of THPH-1 was 35.8% of the total amino acids content. The molecular weight distribution of the higher activity fractions of THPH-1 were located at 1 802–2 519 u and 422–922 u. These results indicate that THPH-1 from tuna head hydrolysate would be very fairly helpful in the preparation of antioxidative peptides and a beneficial ingredient for functional food.

**Key words:** *Thunnus obesus*; fish head; enzymatic hydrolysate; ultrafiltration; antioxidant activity

---

**Corresponding author:** ZHANG Chao-hua. E-mail: zhangch@gdou.edu.cn