

文章编号: 1000-0615(2018)10-1648-13

DOI: 10.11964/jfc.20170710902

## 带鱼高F值寡肽的制备工艺及活性

陶静<sup>1</sup>, 丁冬各<sup>1</sup>, 陈荫<sup>1</sup>, 王斌<sup>1\*</sup>,  
王加斌<sup>2</sup>, 赵玉勤<sup>1</sup>, 霍健聪<sup>1</sup>

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江舟山 316022;

2. 浙江海力生集团有限公司, 浙江舟山 316022)

**摘要:** 以带鱼为原料, 通过双酶分步水解制备蛋白酶解液, 利用活性炭吸附脱除芳香族氨基酸, 紫外和氨基酸组成分析测定高F值寡肽(HFP)的F值, 并对昆明小鼠体内的活性进行了系统评价。酶解实验结果显示, 带鱼蛋白采用胃蛋白酶和风味蛋白酶进行双酶分步水解, 胃蛋白酶的最优酶解工艺参数为酶用量3%, 料液比1:5(g/mL), 温度35℃, pH 2.0, 酶解时间3 h; 风味蛋白酶的最优酶解工艺参数为酶用量3%, pH 7.0, 温度50℃, 酶解时间3 h。活性炭型号筛选和脱芳工艺研究表明, 4号粉末活性炭(200目)优于其他4种活性炭, 在料液比1:20(g/mL)、pH 6.0、常温下处理4 h, 蛋液的脱芳率最高, F值(OD<sub>220</sub>/OD<sub>280</sub>)由脱芳前的5.75增加到脱芳后的30.72。制备的带鱼高F值寡肽经氨基酸组成分析验证, F值(支链氨基酸/芳香族氨基酸)为28.06。活性实验结果显示, 与对照组相比, 高F值寡肽剂量组昆明小鼠的醉酒时间明显延长, 醒酒时间显著缩短, 力竭游泳时间明显延长, 游泳后的剂量组肝糖原和肌糖原含量增加, 血清尿素氮和乳酸含量下降, 而乳酸脱氢酶活性则明显提高。另外, 剂量组小鼠体内的抗氧化酶SOD、GSH-Px和CAT的活性均显著提高, 而丙二醛含量则显著减少。本实验为带鱼高F值寡肽的制备提供技术支持, 所制备的高F值寡肽对小鼠具有较好的抗醉酒、醒酒、抗疲劳作用和抗氧化活性。

**关键词:** 带鱼; 高F值寡肽; 酶解; 脱芳工艺; 抗疲劳; 抗氧化

**中图分类号:** Q 556; TS 254.9

**文献标志码:** A

与游离氨基酸和蛋白质相比, 寡肽具有渗透压低、抗原性低、易于吸收利用等优点<sup>[1-2]</sup>。更为重要的是酶解制备的活性肽增加了多种重要生理功能, 如抗氧化、防治肝性脑疾病、抗肿瘤和提高免疫力等, 成为当前药物及保健品研究的热点<sup>[3-4]</sup>。高F值寡肽是指生物蛋白利用酶解制备的F值大于20、由3~9个氨基酸残基所组成的寡肽的混合物, F值是指混合物中支链氨基酸(BCAA, 即亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)与芳香族氨基酸(AAA, 即苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)的物质的量比值<sup>[5]</sup>。高F值寡肽的主要特征是

氨基酸混合物中BCAA与AAA比值远高于人体模式, 在临床上的应用已从最初的保肝护肝、辅助肝性脑病及苯丙酮尿症治疗延伸到抗疲劳、抗衰老及其他生物活性领域<sup>[6-7]</sup>, 而利用大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays*)、花生(*Arachis hypogaea*)等植物蛋白制备高F值寡肽, 并进一步开发功能食品成为研究焦点<sup>[8-9]</sup>。

海洋生物资源丰富, 充分利用海洋生物资源, 特别是大宗水产品及其加工下脚料, 进行高附加值海洋保健食品、药物和生物制品开发成为学术界和水产行业研究的焦点<sup>[10-11]</sup>。因此,

收稿日期: 2017-07-13 修回日期: 2018-01-21

资助项目: 国家自然科学基金(81673349); 浙江省公益技术研究项目(LGN18D060002); 浙江省自然科学基金(LY17C200011)

通信作者: 王斌, E-mail: wangbin4159@hotmail.com

以大宗海洋生物资源及其加工副产物为材料进行海洋药物和功能产品开发引起大家的重视,而海洋活性肽的研究成为最活跃的领域之一<sup>[12-14]</sup>。张朋等<sup>[15]</sup>以血管紧张素转换酶(ACE)抑制率为指标,利用碱性蛋白酶对鲣(*Katsuwonus pelamis*)碎肉蛋白进行酶解,利用超滤、葡聚糖凝胶(G-25)色谱和反相—高效液相色谱(RP-HPLC)分离降压肽Phe-Gly-Gly-Val (FGGV)。谭洪亮等<sup>[16]</sup>利用胃蛋白酶和胰蛋白酶两步酶解金枪鱼鱼骨胶原蛋白,经超滤、凝胶色谱和RP-HPLC制备胶原肽Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Gln-Gly (GPAG-PAGQEG),抗氧化实验结果表明,GPAG-PAGQEG对羟基自由基、DPPH自由基、ABTS自由基和超氧阴离子自由基具有良好的清除作用,GPAGPAGQEG亦显示出了良好的脂质过氧化抑制作用。基于此,本实验以带鱼为原料,利用蛋白酶酶解、活性炭吸附技术制备高F值寡肽,并对其抗醉酒、醒酒、抗疲劳和抗氧化活性进行系统研究,为带鱼高F值寡肽的产业化开发提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

带鱼(200~300 g/尾)于2016年11月购于浙江舟山沈家门东河水产品批发市场,经浙江海洋大学赵盛龙教授鉴定为日本带鱼(*Trichiurus japonicus*)。带鱼购买后用冰盒运至实验室,清水冲洗干净,去头、内脏和鱼骨后,于-18℃冷藏、备用。

中性蛋白酶( $6.0 \times 10^4$  U/g)、风味蛋白酶( $\geq 3.0 \times 10^4$  U/g)、碱性蛋白酶( $2.0 \times 10^5$  U/g)、木瓜蛋白酶( $\geq 6 \times 10^6$  U/g)购买于亚太恒信生物科技(北京)有限公司;胃蛋白酶( $1.6 \times 10^5$  U/g)、Sephadex G-25购买于Pharmacia公司;甲醛、三氯乙酸(TCA)、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇、乙腈(色谱纯)购买于国药集团化学试剂有限公司;1号(XHT-325型,50目)、2号颗粒状活性炭(XHJ-800型,50目)、3号(XHJ-150型,150目)、4号(XHJ-200型,200目)和5号(XHJ-303A型,320目)粉末状活性炭购买于上海鑫汇活性炭有限公司。

### 1.2 实验方法

蛋白酶的筛选 以蛋白水解度(DH)和蛋

白转化率为指标筛选实验用酶。按设定料液比将蒸馏水加入带鱼碎肉中,匀浆,按表1调各酶温度和pH值,将碱性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶4种内切酶作为第一步水解酶,按加酶量3%(酶质量/原料质量)分别加入到各反应容器中酶解3 h,沸水浴中15 min灭酶。将风味蛋白酶和木瓜蛋白酶两种外切酶作为第二步酶解候选蛋白酶,按表1调温度和pH值,按酶用量3%分别加入到各反应容器中酶解3 h,沸水浴15 min灭酶。

表1 各种蛋白酶最适水解条件

蛋白酶 proteases	温度/℃ temperature	pH	蛋白酶 proteases	温度/℃ temperature	pH
碱性蛋白酶 alcalase	50	8.5	中性蛋白酶 neutrase	50	7.0
胃蛋白酶 pepsin	37	2.0	风味蛋白酶 flavourzyme	50	6.0
胰蛋白酶 trypsin	50	8.0	木瓜蛋白酶 papain	50	7.0

酶解工艺参数优化 参照杜帅等<sup>[17]</sup>的方法进行。采用双酶分步水解工艺制备带鱼寡肽酶解液。通过实验筛选出胃蛋白酶作为第一步水解用酶,风味蛋白酶作为第二步水解用酶。以DH为主要指标,蛋白质转化率为次要指标,利用单因素实验,确定胃蛋白酶和风味蛋白酶的最适反应条件。

DH和蛋白转化率的测定 用凯氏定氮法测定酶解液中总氮量,甲醛电位滴定法检测氨基氮含量<sup>[18]</sup>。DH和蛋白转化率X参照杜帅等的<sup>[17]</sup>方法进行,计算公式:

$$DH(\%) = (\text{水解液中}\alpha\text{-氨基氮含量} - \text{水解前}\alpha\text{-氨基氮含量}) / (\text{原料总氮含量} - \text{原料中非蛋白氮}) \times 100$$

$$X(\%) = [(P - P_0) / (S - P_0)] \times 100$$

式中,  $P$ 为酶解液中溶于10% TCA氮含量(mg/mL);  $P_0$ 为酶解前溶于10% TCA氮含量(mg/mL);  $S$ 为原料中蛋白质的总氮量(mg/mL)。

活性炭型号筛选 参照杜帅等<sup>[17]</sup>方法进行。蛋白酶解液经真空抽滤、低温离心、膜超滤获得分子量小于3 ku组分。按实验设计量取特定量超滤酶解液,在恒温磁力搅拌器低速搅拌下,按照活性炭(g):酶解液(mL)=1:20加入活性炭,调混合液pH 6.0,温度30℃,吸附3 h后,于9 000 r/min离心10 min,取上清液,测定F值

(OD<sub>220</sub>/OD<sub>280</sub>)。根据F值优选出吸附能力最强的活性炭型号。

**脱芳工艺参数优化** 采用F值(OD<sub>220</sub>/OD<sub>280</sub>)作为吸附效果评价指标,参考杜帅等<sup>[17]</sup>的实验方法优化4号粉末活性炭的实验条件。分子量小于3 ku的酶解液样品利用4号粉末活性炭,通过单因素实验确定脱芳最优活性炭用量、pH值、温度和时间。

**BCAA和AAA含量的检测** 采用杜帅等<sup>[17]</sup>的方法进行。BCAA和AAA分别在220和280 nm处有最大吸收峰。高F值寡肽溶液经吸附脱芳后,9 000 r/min离心10 min,收集上清液,用紫外分光光度计分别测定220和280 nm波长处样品吸光值OD<sub>220</sub>和OD<sub>280</sub>,按照下列公式计算样品F值:

$$\text{样品F值} = \text{OD}_{220} / \text{OD}_{280}$$

**氨基酸组成分析** 参照Wu等<sup>[19]</sup>的方法进行。称取1.0 mg样品放入安瓿瓶中,加入2.0 mL HCl(6 mol/L)(色氨酸测定采用KOH水解),并充入少量氮气,在酒精灯下迅速封管,于110 °C水解24 h后,冷却水解物,移至坩埚,在70 °C水浴锅中挥发剩余盐酸,再加入少量双蒸水蒸干,重复3次。用pH 2.20的缓冲液溶解后定容,0.22 μm微孔滤膜除杂,滤液用HITACH L8800氨基酸全自动分析仪进行测定。

**实验小鼠分组** 参照黄程等<sup>[20]</sup>的实验方法进行。取同批次昆明系雄性小鼠32只[体质量为(20.0±1.0) g],适应性饲养5 d后,随机平均分成4组,并每天饲喂小鼠标准饲料。其中3个实验组小鼠灌胃液的样品浓度分别为50 mg/(kg·bw)(低剂量组)、100 mg/(kg·bw)(中剂量组)、200 mg/(kg·bw)(高剂量组),空白组灌胃等量生理盐水(bw为体质量)。

**抗醉酒实验** 3个实验组的小鼠每天上午10点按照设计剂量灌胃寡肽液1次,连续灌胃2周。末次灌胃40 min后,实验组和空白组按小鼠体质量0.3 mL/20 g均灌胃酒精度为40%的白酒。观察记录每组小鼠翻正反射消失时间和醉酒的小鼠数目。翻正反射消失标准:将灌胃白酒的小鼠背向下轻轻放入鼠笼,若背向下姿势保持30 s以上,则翻正反射消失,即为醉酒。醉酒率按下列公示计算:

$$\text{醉酒率}(\%) = (\text{醉酒数小鼠} / \text{每组小鼠总数}) \times 100$$

**醒酒实验** 按“抗醉酒实验”方法对高、中、低剂量组和空白组小鼠进行灌胃。末次灌胃前,按小鼠体质量0.3 mL/20 g灌胃酒精度为40%的白酒,30 min后,进行最后一次灌胃。记录每组小鼠的醒酒时间和时间缩短率。

$$\text{时间缩短率}(\%) = [(\text{空白组醒酒时间} - \text{剂量组醒酒时间}) / \text{空白组醒酒时间}] \times 100$$

**抗疲劳实验** 参考Zhao等<sup>[21]</sup>的方法进行。取同批次、生长情况相同的昆明系雄性小鼠55只,适应性饲养5 d,分高、中、低、空白4组,空白组10只,其他组15只,且各组间体质量相差不超过1 g。以灌胃液的氨基酸浓度为标准进行分组:高剂量组60.67 mg/mL、中剂量组30.62 mg/mL、低剂量组13.74 mg/mL、空白组灌胃等量生理盐水。每天灌胃1次,每次灌胃0.4 mL,连续灌胃30 d。血尿素氮(BUN)、肝糖原(LG)、肌糖原(MG)、乳酸(LA)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽—过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等理化指标的测定按照试剂盒方法进行。

## 2 结果

### 2.1 酶解工艺优化

**第一步水解用酶筛选** 以DH和蛋白转化率为指标,按照表1条件研究4种内切酶对带鱼碎肉蛋白的水解效果,结果显示1~4 h内,在各内切酶的水解反应下,样品的DH快速上升,4 h后样品的DH上升趋势;4个样品中,胃蛋白酶水解样品的DH最高,在4 h时DH为20.2%±1.02%;中性蛋白酶次之,在4 h时DH为18.49%±1.05%。以蛋白转化率为指标评价各种酶的活性,结果显示胃蛋白酶和中性蛋白酶水解样品的蛋白转化率较高,在3 h时分别为39.17%±2.03%和38.05%±2.25%,而3 h后中性蛋白酶水解样品的蛋白转化率略高于胃蛋白酶水解样品(图1)。但综合考虑时间、成本因素,以及对后续实验的影响,第一步水解用酶选择胃蛋白酶。

**第二步水解用酶筛选** 以DH和蛋白转化率为指标,按照表1条件研究风味蛋白酶和木瓜蛋白酶两种外切酶对胃蛋白酶水解后样品的水解效果,结果显示,风味蛋白酶水解样品的DH和蛋白转化率均高于木瓜蛋白酶。因此第二步水解用酶选择风味蛋白酶(图2)。

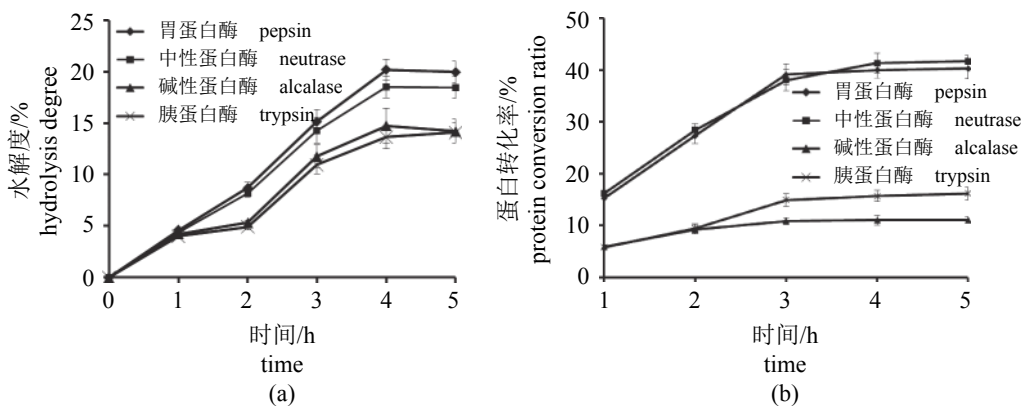


图 1 四种内切蛋白酶对带鱼碎肉蛋白水解液水解度(a)和蛋白转化率(b)的影响

Fig. 1 Influence of endoproteases on the hydrolysis degree (a) and protein conversion ratio (b) of protein hydrolysate of *T. japonicus*

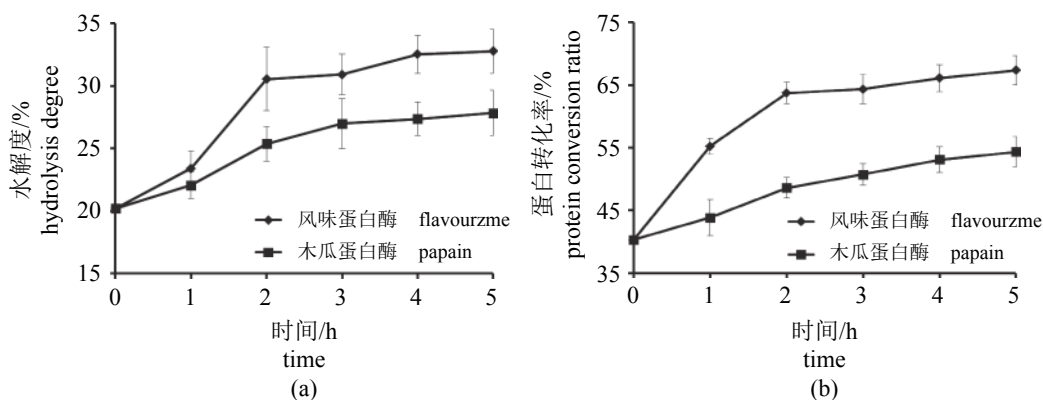


图 2 两种外切蛋白酶对带鱼碎肉水解液水解度(a)和蛋白转化率(b)的影响

Fig. 2 Influence of ectoalbumin on the hydrolysis degree (a) and protein conversion ratio (b) of protein hydrolysate of *T. japonicus*

胃蛋白酶工艺参数优化 加酶量对DH的影响较为显著, DH随着加酶量增加呈现上升趋势。但当加酶量超过3%时, 加酶量的增加对DH的影响明显变小, 差异不显著( $P>0.05$ )。加酶量较低时, 增加酶的数量会提高其与蛋白质肽键的接触几率, DH快速升高, 而到水解反应后期, 在底物浓度不断降低和积累的水解物的抑制作用下, DH趋于稳定。因此, 选择最适加酶量为3%(图3-a)。

水解温度为20~35 °C时, DH随温度升高而增大, 增幅较快。当温度继续升高超过35 °C时, 水解出现下降趋势; 当温度超过40 °C时, DH显著降低( $P<0.05$ ), 说明高温导致胃蛋白酶变性失活。因此, 选择最适温度为35 °C(图3-b)。

胃蛋白酶最适pH为1.5~2.0, pH超过2.0时, DH显著降低( $P<0.05$ ), 表明pH过高会降低胃蛋白酶活性。因此, 选择最适pH为2.0(图3-c)。

当料液比为1:1~1:5时, DH整体呈现上升的趋势; 当料液比为1:6时, DH呈下降趋势, 且料液比1:5时酶解物的水解度显著高于其他样品( $P<0.05$ )。过高和过低的底物浓度均不利于蛋白酶水解, 料液比过高时, 超过了胃蛋白酶水解能力, 底物水解不彻底。料液比过低时, 酶与底物蛋白肽键碰撞机会小, 酶活性难以发挥最大作用。因此, 综合考虑工艺中酶的价格成本和利用效率, 选择最适料液比为1:5(图3-d)。

水解时间在1~3 h内, DH呈现不断上升的趋势; 超过3 h后, DH逐渐趋于稳定, 差异不显著( $P>0.05$ )。反应开始阶段, 酶活性较强, 蛋白断裂的肽键数量较多, 水解反应速率较快; 而水解进行4 h后, pH的变化、水解产物的积累、底物浓度的降低均会抑制水解反应, 达到动态平衡, 从而DH逐渐趋于稳定。因此, 选择最适酶解时间为3 h(图3-e)。

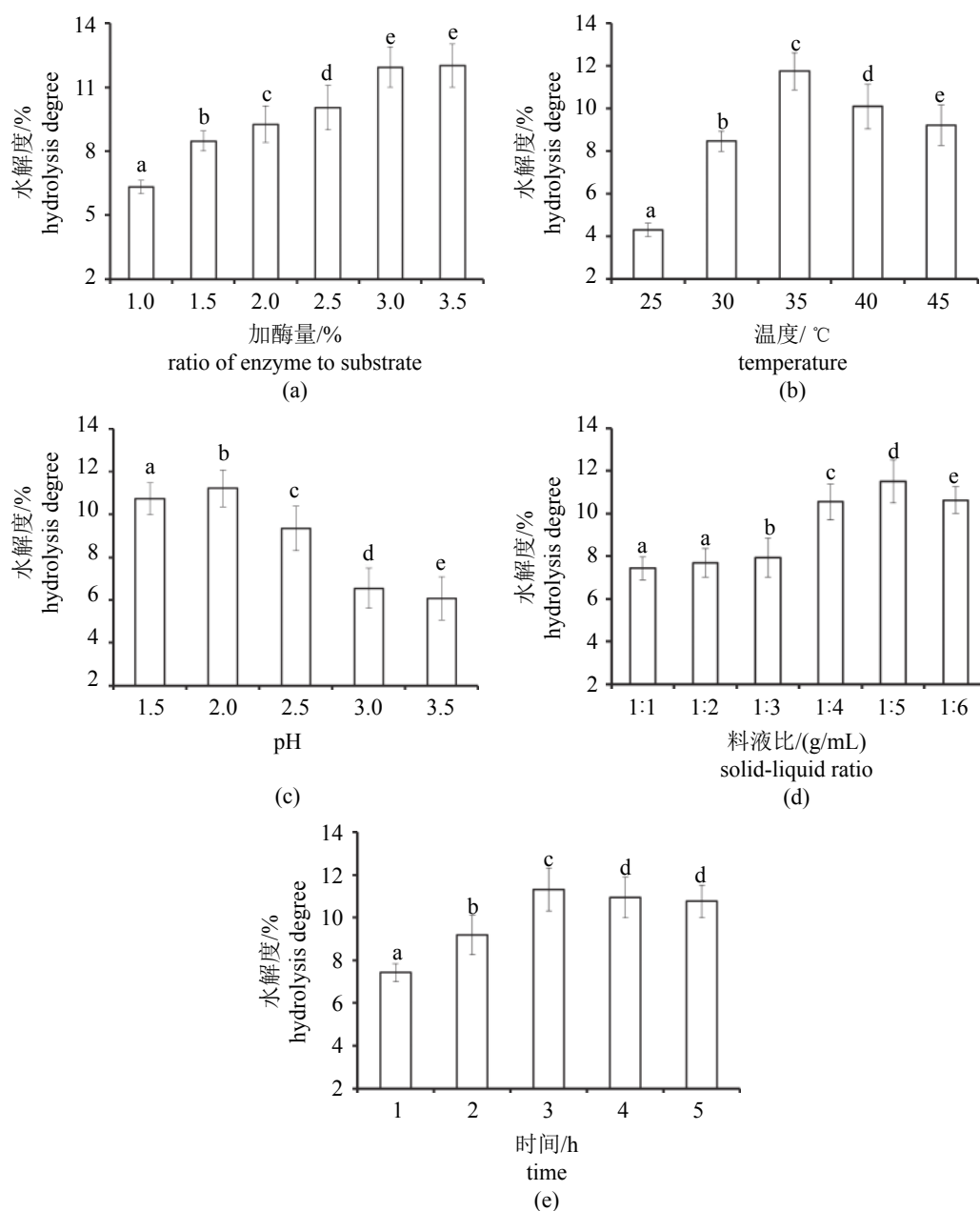


图3 加酶量(a)、温度(b)、pH(c)、料液比(d)和时间(e)对胃蛋白酶水解带鱼蛋白效果的影响与空白组比较,不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ ),下同

Fig. 3 Influence of amount of enzyme (a), temperature (b), pH (c), solid-liquid ratio (d) and time (e) on the hydrolysis effect of pepsin on proteins of *T. japonicas*

Different superscripts indicate significant difference compared with the control ( $P < 0.05$ ), the same below

风味蛋白酶工艺参数优化 加酶量为1%~3%时, DH表现出持续上升的趋势;但当加酶量超过3%时, DH趋于稳定,差异不显著( $P > 0.05$ )。因此,选择最适加酶量为3%(图4-a)。

温度从35 °C上升为50 °C时, DH呈现上升趋势,50 °C时达到最大值;温度高于55 °C时, DH呈现快速下降趋势,差异显著( $P < 0.05$ ),表明温度过高导致部分酶的活性丧失。因此,选择

最适温度为50 °C(图4-b)。

pH为6.0~6.5时, DH显著增大; pH为7.0时 DH达到最大;而pH大于7.0时, DH显著下降( $P < 0.05$ )。表明风味蛋白酶在中性水解环境中水解效果最好, DH最高,过高或过低pH均不利于 DH增长和后期样品的处理。因此,选择最适pH为7.0(图4-c)。

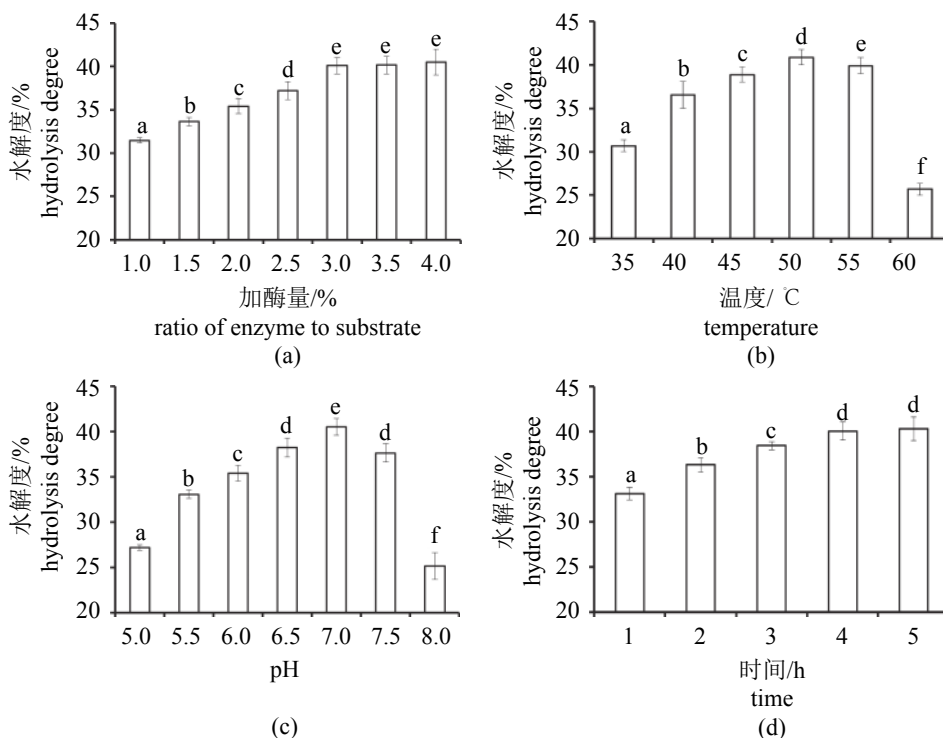


图 4 加酶量(a)、温度(b)、pH(c)和时间(d)对风味蛋白酶水解带鱼蛋白效果的影响

Fig. 4 Influence of amount of enzyme (a), temperature (b), pH (c) and time (d) on the hydrolysis effect of flavourzyme on protein of *T. japonicus*

水解时间为1~3 h内, DH升高较快; 超过3 h, DH增加不明显, 差异不显著( $P>0.05$ )。胃蛋白酶的水解反应中, 已将肽链部分氨基酸残基暴露出来, 从而风味蛋白酶可以较快地切除已经暴露在肽链上的氨基酸残基。因此, 选择最适酶解时间为3 h(图4-d)。

经过双步酶解后, 带鱼蛋白酶解液的最终DH达到 $40.51\% \pm 3.18\%$ , F值为5.75, 与F值寡肽的标准还有较大的差距。因此, 本实验对活性炭脱除溶液中游离态的AAA(脱芳)工艺参数进行优化, 提高蛋白水解液的F值。

## 2.2 活性炭脱芳工艺

为控制高F值寡肽分子量, 本实验利用3 ku超滤膜去除酶解物中大分子量组分, 分子量小于3 ku组分经凝胶色谱分析, 分子量约为837.54 u, 符合高F值寡肽的标准。目前, 活性炭因价格低, 吸附效果好, 被广泛用于降低蛋白酶解液中AAA的含量<sup>[22]</sup>。因此, 本实验以F值为检测指标, 筛选活性炭类型, 并对其脱芳工艺参数进行优化。

活性炭型号筛选 活性炭的颗粒大小、

表面积、孔径数目等参数显著影响其吸附AAA(脱芳)的效果。因此, 本实验分别考察了粉末状(1、3、4和5号)和颗粒状活性炭(2号)的脱芳能力。2号颗粒状活性炭吸附AAA的能力高于1号和5号, 而低于3号和4号, 但其BCAA的保留率相对较低, F值为13.09, 在所有样品中最小。4号活性炭对AAA的吸附能力稍弱于3号活性炭, 但其BCAA保留率较高, F值为26.49, 高于其他样品(图5)。因此, 后续采用4号粉末活性炭进行脱芳工艺优化。

**pH对脱芳效果的影响** 当pH为2~6时, 4号粉末活性炭对AAA去除率不断增大, 随后逐渐降低。pH的变化对BCAA保留率的影响并不明显, pH为6.0时, F值(24.88)最大。因此, 选择最佳吸附pH为6.0(图6-a)。

**吸附时间对脱芳效果的影响** 随着吸附时间的延长, 4号粉末状活性炭对AAA去除率逐渐升高, 在3 h后趋于稳定; 与此同时, BCAA保留率逐渐下降; 而F值呈现先升高后稍微下降的趋势, 4 h时达到最大值(24.99)。因此, 吸附时间4 h为宜(图6-b)。

**温度对脱芳效果的影响** 随着温度升

□ 芳香族氨基酸去除率 removal rates of aromatic amino acids  
 ■ 支链氨基酸保留率 retention rates of branched-chain amino acids  
 ■ F值 F value

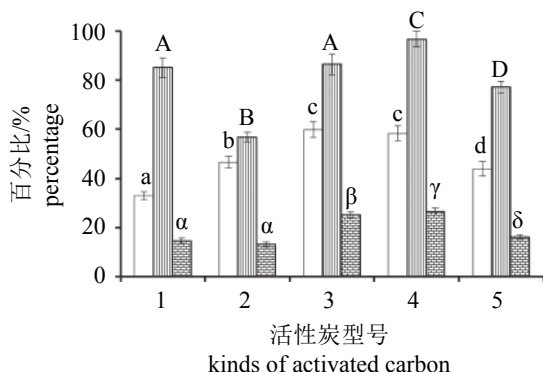


图5 五种活性炭吸附能力比较

1. 1号粉末状活性炭(XHJ-800型, 50目); 2. 2号颗粒状活性炭(50目); 3. 3号粉末状活性炭(XHJ-150型, 150目); 4. 4号粉末状活性炭(XHJ-200型, 200目); 5. 5号粉末状活性炭(XHJ-303A型, 320目); 两组间不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ ); 下同

Fig. 5 Comparison of the adsorption ability of five kinds of activated carbon

1. no.1 granular activated carbon (XHJ-800, 50 mesh); 2. no.2 powdered activated carbon (50 mesh); 3. no.3 granular activated carbon (XHJ-150, 150 mesh); 4. no.4 granular activated carbon (XHJ-200, 200 mesh); 5. no.5 granular activated carbon (XHJ-303A, 320 mesh); different superscripts indicate significant difference between two groups ( $P < 0.05$ ); the same below

高, AAA去除率、BCAA保留率和F值变化均不明显, 说明吸附温度对吸附效果无显著影响。因此, 选择室温下进行脱芳(图6-c)。

**料液比对脱芳效果的影响** AAA去除率在料液比为1:20时达到最大值, 而随后呈现相对剧烈的下降趋势; BCAA保留率随着样品比例的增加而逐渐升高; F值在料液比为1:20时达到最大值(25.27), 随后逐渐下降。因此, 选择最佳料液比为1:20(图6-d)。

### 2.3 氨基酸组成分析及F值确认

为进一步确认样品的F值, 本实验在最优条件下制备带鱼高F值寡肽, 并对其氨基酸组成进行分析, 样品的F值(BCAA/AAA)为28.06, 符合高F值寡肽的要求(表2)。另外, 带鱼高F值寡肽中含量最高的氨基酸为第一限制性氨基酸赖氨酸(Lys), 可弥补谷物食品中Lys含量较低的缺陷, 具有更高的营养价值。

### 2.4 带鱼高F值寡肽活性评价

**抗醉酒实验** 以小鼠醉酒率(%)、翻正反

射消失时间(min)、时间延长率(%)为检测指标, 研究带鱼高F值寡肽的抗醉酒效果。中剂量组和高剂量组小鼠的翻正反射消失时间显著高于空白组( $P < 0.05$ ); 低剂量组与空白组间的翻正反射消失时间差异不显著( $P > 0.05$ )(表3)。结果表明带鱼高F值寡肽液能够延长翻正反射消失时间, 浓度与翻正反射消失时间呈正相关。另外, 与空白组相比, 中剂量组和高剂量组小鼠开始醉酒的时间分别延后了22.44%和27.10%。因此, 带鱼高F值寡肽液具有一定的抗醉酒作用。带鱼高F值寡肽富含亮氨酸等BCAA, 同时丙氨酸的含量也达到15.695  $\mu\text{mol/L}$ , 二者共同作用促进体内产生稳定的 $\text{NAD}^+$ , 而 $\text{NAD}^+$ 作为辅酶促使乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶将乙醇转化为乙醛和乙酸, 降低了血液中乙醇浓度, 发挥抗醉酒作用<sup>[23]</sup>。

**醒酒实验** 以小鼠死亡数与醒酒时间为检测指标, 研究高F值寡肽的醒酒效果。空白组小鼠死亡2只, 而高剂量组和中剂量组无小鼠死亡; 高剂量组具有较强的醒酒作用, 与对照组、低剂量组和中剂量组均呈现显著性差异( $P < 0.05$ ); 中剂量组的醒酒时间也显著短于对照组( $P < 0.05$ ); 但是低剂量组与对照组间无显著性差异( $P > 0.05$ )(表3)。因此, 带鱼高F值寡肽液对醉酒小鼠有明显的醒酒效果, 且剂量越高, 醒酒效果越好。

**力竭游泳时间测定** 力竭游泳实验是一种常见的在抗疲劳实验中评价小鼠耐力的实验模型<sup>[21]</sup>。实验结果显示, 带鱼高F值寡肽低、中和高剂量组小鼠的游泳时间与空白组相比分别延长了24.69%、61.83%和93.07%, 差异显著( $P < 0.05$ ), 而高剂量组小鼠的游泳时间也显著长于低剂量组和中剂量组( $P < 0.05$ )(表4)。因此, 带鱼高F值寡肽能显著地延长小鼠力竭游泳时间, 增强其耐力, 具有显著的抗疲劳效果。

**BUN、LG、MG、LA的测定** 肌肉活动所需能量首先来源于糖原的分解, 然后来自肌肉和肝脏中糖原的流通。运动中, 当MG减少时, LG含量的降低则成为运动耐力的主要限制因素。因此, LG的储存量是评价剧烈运动能力的重要指标<sup>[24]</sup>。高剂量组小鼠的LG水平显著高于空白组、低剂量组和中剂量组( $P < 0.05$ ), 而低剂量组和中剂量组与空白组LG含量也呈现显著性差异( $P < 0.05$ ), 但低剂量组与中剂量组的LG含

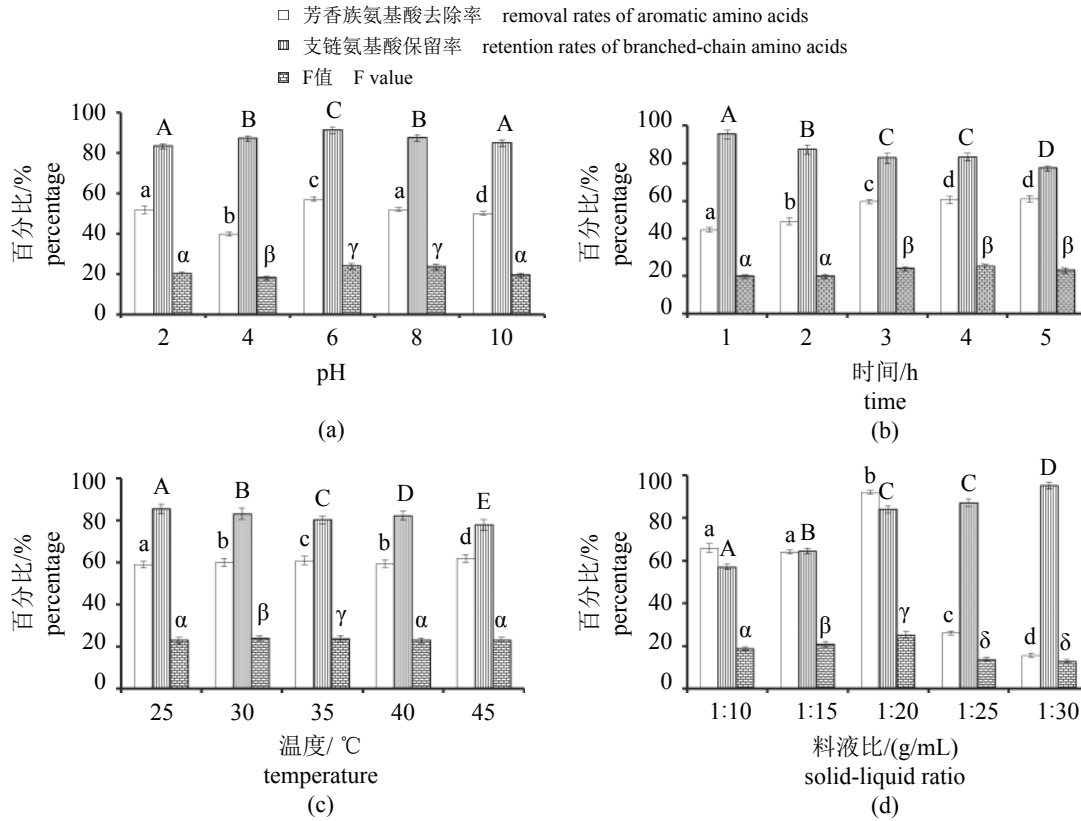


图6 pH(a)、吸附时间(b)、温度(c)和料液比(d)对脱芳效果的影响  
 Fig. 6 Influence of pH (a), time (b), temperature (c) and solid-liquid ratio (d) on the removal effect of aromatic amino acids

表2 带鱼高F值寡肽氨基酸成分分析表  
 Tab. 2 Amino acid composition analysis of high Fischer ratio oligo-peptide solution of *T. japonicus* μmol/L

氨基酸 amino acid	含量 content	氨基酸 amino acid	含量 content	氨基酸 amino acid	含量 content
丝氨酸 Ser	6.631	丙氨酸 Ala	15.695	苯丙氨酸 Phe	0.111
甘氨酸 Gly	4.034	脯氨酸 Pro	0.562	异亮氨酸 Ile	0.174
苏氨酸 Thr	7.733	赖氨酸 Lys	22.403	亮氨酸 Leu	0.489
谷氨酸 Glu	1.035	色氨酸 Trp	0.033	酪氨酸 Tyr	0.025
天门冬氨酸 Asp	5.472	缬氨酸 Val	4.080		

量差异不显著( $P>0.05$ )。中、高剂量组小鼠的MG水平显著高于对照组和低剂量组( $P<0.05$ ),且高剂量组小鼠的MG水平显著高于中剂量组( $P<0.05$ )(表4)。因此,小鼠摄取的一定浓度的带鱼高F值寡肽可减少运动时LG的消耗,保证机体有足够的LG储备和能量供应,以缓解疲劳。

糖和脂肪供能不足时,肌肉蛋白质和氨基酸的分解代谢加强,BUN含量增加。而蛋白质供能的效率比糖和脂肪都低得多,因此,蛋白质供能强度增强反映出机体的运动适应能力下

降、耐力不足<sup>[21]</sup>。带鱼高F值寡肽的浓度与实验小鼠BUN的含量呈负相关,高、中剂量组小鼠BUN含量与空白组相比降低了20.12%和16.16%,差异显著( $P<0.05$ ),而低剂量组与空白组无显著性差异( $P>0.05$ )(表4)。因此,带鱼高F值寡肽可减少小鼠在负荷运动下蛋白质的分解,提高蛋白质的利用效率,发挥抗疲劳的作用。

机体剧烈运动过程中会通过无氧糖酵解摄入充足能量,而肌肉会产生大量LA,并降低肌肉和血液中的pH,影响多种生理生化过程,损



表3 带鱼高F值寡肽的小鼠抗醉酒和醒酒效果比较  
**Tab. 3 Effect on prolonging time of the loss of righting reflex and shortening time to sober up of high-Fischer ratio oligo-peptide from *T. japonicus***

检测指标 parameters		空白组 control	低剂量组 low-dose group	中剂量组 middle dose group	高剂量组 high-dose group
抗醉酒效果 effect of resistance to drunkenness	动物数/只 mice number	8	8	8	8
	醉酒率/% drunk rate	100	88	75	62.5
	翻正反射消失时间/min disappearance time of righting reflex	20.59±1.89 <sup>a</sup>	23.68±2.07 <sup>ab</sup>	25.01±1.84 <sup>b</sup>	26.17±3.04 <sup>b</sup>
	时间延长率/% prolonged rate of time		15.01	22.44	27.10
醒酒效果 effect on sobering up in mice	死亡数/只 death number of mice	2	1	0	0
	醒酒时间/min time of sobering up	218±13.29 <sup>a</sup>	180±13.72 <sup>ab</sup>	162±14.12 <sup>b</sup>	149±10.89 <sup>c</sup>
	时间缩短率/% shorter time rate		17.43	25.69	31.65

注：与空白组比较，不同字母代表差异显著( $P<0.05$ )，下同

Notes: different superscripts indicated significant difference compared with the control ( $P<0.05$ ), the same below

表4 带鱼高F值寡肽对昆明小鼠负重游泳时间和理化指标的影响  
**Tab. 4 Effects of high-Fischer ratio oligo-peptide from *T. japonicus* on loaded swimming time and biologic parameters in mice (n=8)**

检测指标 biologic parameters		空白组 control	低剂量组 low-dose group	中剂量组 middle dose group	高剂量组 high-dose group
游泳时间/min	swimming time	15.43±0.97 <sup>a</sup>	19.24±1.36 <sup>b</sup>	24.97±1.67 <sup>c</sup>	29.79±2.87 <sup>d</sup>
肝糖原/(mg/g)	liver glycogen	10.27±0.47 <sup>a</sup>	13.29±1.09 <sup>b</sup>	14.36±0.97 <sup>b</sup>	16.41±1.18 <sup>c</sup>
肌糖原/(mg/g)	muscle glycogen	2.51±0.13 <sup>a</sup>	2.87±0.21 <sup>b</sup>	3.69±0.27 <sup>c</sup>	4.53±0.38 <sup>d</sup>
血尿素氮/(mmol/L)	blood urea nitrogen	8.97±0.29 <sup>a</sup>	8.05±0.32 <sup>ab</sup>	7.52±0.39 <sup>b</sup>	7.16±0.31 <sup>c</sup>
乳酸/(mmol/L)	lactic acid	2.96±0.19 <sup>a</sup>	2.63±0.27 <sup>a</sup>	2.51±0.15 <sup>ab</sup>	2.26±0.24 <sup>b</sup>
乳酸脱氢酶/(U/g prot)	lactic dehydrogenase	2 958.27±208.41 <sup>a</sup>	3 218.74±159.46 <sup>ab</sup>	3 567.35±259.33 <sup>bc</sup>	3 764.28±219.72 <sup>c</sup>

害身体健康。因此，肌肉LA含量也是衡量机体疲劳的重要指标<sup>[25]</sup>。带鱼高F值寡肽的浓度与LA含量呈负相关，高剂量组小鼠的LA含量[(2.26±0.24) mmol/L]显著低于空白组[(2.96±0.19) mmol/L]和低剂量组[(2.63±0.27) mmol/L]( $P<0.05$ )，但与中剂量组[(2.51±0.15) mmol/L]差异不显著( $P>0.05$ ) (表4)。LDH可以催化丙酮酸和LA的相互转化作用，减少肌肉中LA的积累，是评价肌肉损伤的重要指标<sup>[25]</sup>。带鱼高F值寡肽高剂量组小鼠LDH活性水平显著高于对照组和低剂量组，但与中剂量组差异不显著；中剂量组小鼠LDH活性水平显著高于对照组，但与低剂量组差异不显著( $P>0.05$ )；低剂量组小鼠LDH活性水平与对照组无显著性差异( $P>0.05$ ) (表4)。因此，带鱼高F值寡肽可提高LDH的活性以清除多余的LA，延缓疲劳的产生。

对抗氧化系统的影响 当受到有害因素伤害时，机体内活性氧(ROS)的产生和清除失衡，过剩的ROS攻击大分子物质，致使细胞损伤或功能丧失，出现氧化应激。然而，机体细胞含有复杂的内源性细胞防御机制以清除ROS(如SOD、GSH-Px、CAT等)，对由运动引发的机体氧化损伤和DNA损伤具有一定的保护作用<sup>[21]</sup>。

SOD能歧化和清除生物体内超氧自由基，在生物体的自我保护系统中具有重要作用。与对照组相比，中和高剂量组小鼠体内的SOD活性分别增加了20.75%和38.11%，具有差异显著性( $P<0.05$ )，然而低剂量组小鼠体内的SOD活性增加了4.86%，与对照组相比无显著性差异( $P>0.05$ ) (表5)。GSH-Px是一种过氧化物分解酶，可将有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物，保护细胞膜的结构及功能。低、中和高剂量组小鼠

体内的GSH-Px活性与对照组相比具有显著性差异( $P<0.05$ ),分别增加了24.575%、74.01%和94.54%,而且各样品组之间也呈现显著性差异( $P<0.05$ )(表5)。CAT是过氧化物酶的标志酶,约占过氧化物酶总量的40%,可催化过氧化氢分解成氧和水,使机体免受氧化损伤。样品组小鼠体内的CAT活性随着样品剂量的增加而增强,与对照组相比具有显著性差异( $P<0.05$ )(表5)。

MDA是膜脂过氧化最重要的产物之一,可

引起蛋白质、核酸等交联聚合,加剧细胞膜的损伤,是检测膜脂过氧化程度的重要指标。肝组织中低、中和高剂量组小鼠体内的MDA含量与对照组相比分别减少了24.68%、45.78%和59.42%,具有显著性差异( $P<0.05$ )。在血浆中,中剂量组和高剂量组小鼠体内的MDA含量与对照组相比分别减少了40.09%和46.63%,具有显著性差异( $P<0.05$ ),但低剂量组小鼠血浆中MDA含量与对照组相比差异不显著( $P>0.05$ )(表5)。

表5 带鱼高F值寡肽对昆明小鼠抗氧化作用的影响

Tab. 5 Effects of high-Fischer ratio oligo-peptide from *T. japonicus* on antioxidant function in mice (n=8)

检测指标 biologic parameters	空白组 control	低剂量组 low-dose group	中剂量组 middle dose group	高剂量组 high-dose group
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	70.21±3.24 <sup>a</sup>	73.65±3.09 <sup>a</sup>	84.78±5.18 <sup>b</sup>	96.97±4.79 <sup>c</sup>
谷胱甘肽-过氧化物酶/IU GSH-Px	52.78±2.53 <sup>a</sup>	65.75±3.29 <sup>b</sup>	91.84±6.02 <sup>c</sup>	102.63±8.15 <sup>d</sup>
过氧化氢酶/(U/g prot) CAT	205.56±12.29 <sup>a</sup>	278.44±16.24 <sup>b</sup>	325.93±16.11 <sup>c</sup>	368.27±25.16 <sup>d</sup>
肝中丙二醛/(mmol/L) MDA in liver	3.08±0.25 <sup>a</sup>	2.32±0.13 <sup>b</sup>	1.67±0.11 <sup>c</sup>	1.25±0.12 <sup>d</sup>
血浆中丙二醛/(mmol/L) MDA in blood	20.13±1.69 <sup>a</sup>	14.27±0.86 <sup>a</sup>	12.06±0.78 <sup>b</sup>	10.14±0.53 <sup>c</sup>

研究表明,带鱼高F值寡肽可通过提高抗氧化酶的活性消除体内多余的ROS,保护机体免受氧化损伤,发挥抗疲劳的作用。

### 3 讨论

目前,制备高F值寡肽的原料主要为玉米蛋白、大豆蛋白、酪蛋白和蛋清蛋白等<sup>[5]</sup>。海洋生物适应高盐、高压、缺氧等极端的海洋生境,其蛋白质的氨基酸组成和序列与陆地生物蛋白存在明显差异,潜藏着许多活性显著的氨基酸序列,用合理的蛋白酶水解,就能释放出与陆源蛋白所不同的肽类化合物。

酶解工艺对蛋白水解物的F值、得率和生物活性影响显著。目前,高F值寡肽制备通常采用二步酶解法,第一步利用蛋白酶将原料蛋白中AAA构成的肽键切开降解为小分子肽类,并暴露AAA残基;第二步利用蛋白酶将肽链中暴露出的AAA从C端或N端切掉,生成游离型AAA,最后通过脱芳处理制备F值大于20的寡肽<sup>[18]</sup>。所以,建立合理的酶解和脱芳工艺是制备高F值寡肽的关键。王海波等<sup>[26]</sup>利用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶制备玉米蛋白高F值寡肽,宋春丽等<sup>[27]</sup>采用碱性丝氨酸蛋白酶和蛋白酶II定向酶解大豆蛋白制备高F值寡肽取得了良好效果。本实验筛选得

到的第一步水解酶—胃蛋白酶倾向于剪切氨基端或羧基端为AAA的位点<sup>[28]</sup>,更利于AAA残基暴露,为第二步外切酶特异性切除AAA创造条件;第二步水解酶—风味蛋白酶可将苦味肽降解为氨基酸,改善蛋白水解样品的风味。同时,为了更利于今后的产业化,本实验采用活性炭脱芳工艺处理带鱼蛋白酶解液,最终产品的F值(BCAA/AAA)为28.06,符合高F值寡肽的要求。

目前,国内外学者对于高F值寡肽的保肝护肝、解酒、抗疲劳、抗氧化等生理活性关注较多。罗红宇等<sup>[28]</sup>研究发现金枪鱼高F值寡肽能明显缩短实验组小鼠醒酒时间,延长小鼠翻正反射消失时间,减少运动后小鼠LG的消耗,降低BUN含量和LA含量,表明金枪鱼高F值寡肽具有保肝、解酒和抗疲劳功能。王海波等<sup>[26]</sup>和张铁华等<sup>[29]</sup>研究发现,用玉米高F值寡肽可显著延长负重小鼠的力竭游泳时间,提高小鼠的缺氧存活时间和LG含量。郑惠娜<sup>[30]</sup>制备的马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)高F值寡肽在体外可有效清除羟基自由基、DPPH自由基和超氧阴离子自由基,在1.0 mg/mL浓度下可使H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤的L02肝细胞的半数致死剂量提高19.3%。与文献比较发现,带鱼高F值寡肽具有良好的解酒、抗疲劳、抗氧化等生理活性<sup>[26,28-30]</sup>。另外,高F值寡肽富含

的BCAA具有节氮功能和调节蛋白质代谢的作用,可以减少肌肉蛋白质的分解,纠正负氮平衡,在临床上可用于改善术后和卧床病人的蛋白质营养状况,也可作为运动员比赛后的营养补充剂<sup>[18]</sup>。

综上,带鱼作为一种产量丰富的海洋生物资源,是制备活性多肽的优质原料。本实验为带鱼高F值寡肽的制备提供技术支持,所制备的高F值寡肽对小鼠具有较好的抗醉酒、醒酒、抗疲劳和抗氧化作用,可用作辅助治疗肝性脑病、抗疲劳和抗氧化的功能食品进行开发。

#### 参考文献:

- [1] Chi C F, Hu F Y, Wang B, *et al.* Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(5): 2580-2601.
- [2] Li X R, Chi C F, Li L, *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) cartilage[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(3): 61.
- [3] Sila A, Bougatef A. Antioxidant peptides from marine by-products: isolation, identification and application in food systems. A review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 21: 10-26.
- [4] Pan X, Zhao Y Q, Hu F Y, *et al.* Anticancer activity of a hexapeptide from skate (*Raja porosa*) cartilage protein hydrolysate in HeLa Cells[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14(8): 153.
- [5] 韦荣编, 黄程, 罗红宇, 等. 食物源蛋白高F值寡肽的制备及应用研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(15): 289-294.
- Wei R B, Huang C, Luo H Y, *et al.* Progress in preparation and application of high Fischer ratio oligopeptides derived from food protein source[J]. *Food Science*, 2014, 35(15): 289-294(in Chinese).
- [6] Pedroche J, Yust M M, Lqari H, *et al.* Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases[J]. *International Dairy Journal*, 2004, 14(6): 527-533.
- [7] Zheng H N, Zhang C H, Cao W H, *et al.* Preparation and characterisation of the pearl oyster (*Pinctada martensii*) meat protein hydrolysates with a high Fischer ratio[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2009, 44(6): 1183-1191.
- [8] Udenigwe C C, Aluko R E. Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high Fischer ratio peptide mixture[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(8): 4762-4768.
- [9] Ichikawa K, Okabayashi T, Shima Y, *et al.* Branched-chain amino acid-enriched nutrients stimulate antioxidant DNA repair in a rat model of liver injury induced by carbon tetrachloride[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(12): 10803-10810.
- [10] Harnedy P A, FitzGerald R J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(1): 6-24.
- [11] Chi C F, Hu F Y, Wang B, *et al.* Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle[J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 662-667.
- [12] Lafarga T, Hayes M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients[J]. *Meat Science*, 2014, 98(2): 227-239.
- [13] Nikoo M, Benjakul S. Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant-cryoprotectant: a review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 19: 753-764.
- [14] Ahmed Z, Donkor O, Street W A, *et al.* Proteolytic activities in fillets of selected underutilized Australian fish species[J]. *Proteolytic activities in fillets of selected underutilized Australian fish species*[J]. *Food Chemistry*, 2013, 140(1-2): 238-244.
- [15] 张朋, 贺卯苏, 迟长凤, 等. 金枪鱼(*Katsuwonus pelamis*)碎肉蛋白降压肽的酶解制备及活性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(5): 1092-1098.
- Zhang P, He M S, Chi C F, *et al.* Preparation and characterisation of an antihypertensive peptide from protein hydrolysate of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) ground meat[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(5): 1092-1098(in Chinese).
- [16] 谭洪亮, 郁迪, 王斌, 等. 金枪鱼鱼骨胶原肽的制备及抗氧化活性研究[J]. *水产学报*, 2014, 38(1): 143-148.
- Tan H L, Yu D, Wang B, *et al.* Preparation and evaluation

- ation of an antioxidant peptide from collagen hydrolysate of skipjack tuna fishbone[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 143-148(in Chinese).
- [17] 杜帅, 宋茹, 罗红宇. 水解金枪鱼碎肉制备高F值寡肽[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(10): 124-133.
- Du S, Song R, Luo H Y. High Fischer ratio oligo-peptide from hydrolysates of tuna meat[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(10): 124-133(in Chinese).
- [18] Wang B, Wang Y M, Chi C F, *et al.* Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(11): 4641-4661.
- [19] Wu Q Q, Li T, Wang B, *et al.* Preparation and characterization of acid and pepsin-soluble collagens from scales of croceine and redlip croakers[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(6): 2003-2010.
- [20] 黄程, 杜帅, 宋茹, 等. 鳀鱼肉高F值寡肽液的生理活性研究[J]. *食品工业*, 2015, 36(3): 246-249.
- Huang C, Du S, Song R, *et al.* Activity of high Fischer ratio oligo-peptide from ground meat of Eleotridae[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(3): 246-249(in Chinese).
- [21] Zhao Y Q, Zeng L, Yang Z S, *et al.* Anti-fatigue effect by peptide fraction from protein hydrolysate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) swim bladder through inhibiting the oxidative reactions including DNA damage[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14(12): 221.
- [22] Cermakova L, Kopecka I, Pivokonsky M, *et al.* Removal of cyanobacterial amino acids in water treatment by activated carbon adsorption[J]. *Separation and Purification Technology*, 2017, 173: 330-338.
- [23] Fouré A, Nosaka K, Gastaldi M, *et al.* Effects of branched-chain amino acids supplementation on both plasma amino acids concentration and muscle energetics changes resulting from muscle damage: a randomized placebo controlled trial[J]. *Clinical Nutrition*, 2016, 35(1): 83-94.
- [24] Van Loon L J C, Saris W H M, Kruijshoop M, *et al.* Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72(1): 106-111.
- [25] Jha M K, Lee I K, Suk K. Metabolic reprogramming by the pyruvate dehydrogenase kinase-lactic acid axis: linking metabolism and diverse neuropathophysiology[J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2016, 68: 1-19.
- [26] 王海波, 李文亮, 张铁华, 等. 酶法制备玉米高F值寡肽及其抗疲劳功能评价[J]. *现代食品科技*, 2006, 22(4): 37-38.
- Wang H B, Li W L, Zhang T H, *et al.* The enzymatic preparation of high F value oligopeptide and the evaluation of its anti-fatigue[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006, 22(4): 37-38(in Chinese).
- [27] 宋春丽, 迟玉杰, 孙波, 等. 定向双酶切制备高F值大豆寡肽工艺技术参数的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(6): 110-113.
- Song C L, Chi Y J, Sun B, *et al.* Study on technology of preparing high Fischer ratio soybean oligopeptide with two proteinases[J]. *Food Science*, 2007, 28(6): 110-113(in Chinese).
- [28] 罗红宇, 杜帅, 郑斌, 等. 双酶分步水解金枪鱼(Eleotridae)碎肉制备高F值酶解液的工艺研究[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(4): 906-912.
- Luo H Y, Du S, Zheng B, *et al.* Preparation process of high Fischer ratio hydrolysates from tuna (Eleotridae) ground meat by sequential hydrolysis[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(4): 906-912(in Chinese).
- [29] 张铁华, 殷涌光, 陈玉江, 等. 高F值寡肽酸乳饮料的开发与功能评价研究[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(3): 38-42.
- Zhang T H, Yin Y G, Chen Y J, *et al.* Study on yoghurt drink of the high F ratio oligo-peptide from corn gluten meal and function evaluation[J]. *Food Research and Development*, 2007, 28(3): 38-42(in Chinese).
- [30] 郑惠娜. 酶法制备马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)高F值寡肽的研究[D]. 广州: 中国科学院南海海洋研究所, 2009.
- Zheng H N. Preparation and oligopeptides with a high Fischer ratio by proteolysis of *Pinctada martensii* meat[D]. Guangzhou: South China Sea Institute of Oceanology, 2009(in Chinese).

## Preparation and bioactivity evaluation of high Fischer ratio oligo-peptide from *Trichiurus japonicus*

TAO Jing<sup>1</sup>, DING Dongge<sup>1</sup>, CHEN Yin<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>1\*</sup>,  
WANG Jiabin<sup>2</sup>, ZHAO Yuqin<sup>1</sup>, HUO Jiancong<sup>1</sup>

(1. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Zhejiang Hailisheng Group Co. Ltd., Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** In the experiment, the preparation technology of the high Fischer ratio oligo-peptide (HFP) from *Trichiurus japonicus* (HFP-T) was studied, and the parameters on two-step sequential enzymolysis and removing aromatic amino acids (AAA) using activated carbon were optimized. The F value of the HFP was confirmed by determination of amino acid components. Taking hydrolysis degree and protein conversion ratio as criteria, binary-enzymes hydrolysis process was optimized and the results were as follows: pepsin was selected as the first enzyme, and its optimal parameters were ratio of enzyme to substrate 3%, ratio of meat to water 1 : 5 (g/mL), temperature 35 °C, pH 2.0 and enzymolysis time 3 h; flavourzyme was selected as the second enzyme, and its optimal parameters were ratio of enzyme to substrate 3%, pH 7.0, temperature 50 °C and enzymolysis time 3h. The highest hydrolysis degree and F value ( $OD_{220}/OD_{280}$ ) of hydrolysate prepared under the optimal parameters were  $40.51\% \pm 3.18\%$  and 5.75, respectively. In order to raise the F value of the sample by removal of AAA, five kinds of activated carbons including one powdered and four granular activated carbons were chosen to evaluate their removing AAA effects, and the results indicated that No.4 activated carbon (200 mesh) have the best removing AAA effects under the parameters of solid-liquid ratio 1 : 20 (g/mL) and pH 6.0 for 4 h at room temperature, and the F value ( $OD_{220}/OD_{280}$ ) of hydrolysate reached 30.72 from 5.75. The F value (BCAA/AAA) of hydrolysates (removing AAA) measured on Automatic Amino Acid Analyzer was calculated to be 28.06, and the content of Lysine was 22.403  $\mu\text{mol/L}$ . The results of activity tests showed that HFP-T can significantly prolong time of the loss of righting reflex and shorten time to sober up, increase liver and muscle glucogen contents and lower blood urea nitrogen and blood lactate levels after mice have exercised. HFP-T also enhanced the activity of lactic dehydrogenase to scavenge excessive LA for slowing the development of fatigue. In addition, HFP-T increased the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase to reduce the reactive oxygen species (ROS) damage in mice. In conclusion, HFP-T possessed good anti-fatigue capacities in mice by inhibiting the oxidative reactions and provided an important basis for developing the swim bladder peptide functional food.

**Key words:** *Trichiurus japonicus*; high Fischer ratio oligo-peptide (HFP); enzymatic hydrolysis; technology on removing aromatic amino acids; anti-fatigue; antioxidant

**Corresponding author:** WANG Bin. E-mail: Wangbin4159@hotmail.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (81673349); Public Projects of Zhejiang Province (LGN18D060002); Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LY17C200011)