



## 罗非鱼鱼皮酶解物及其硒螯合物的结构与抗氧化特性

冯文静<sup>1</sup>, 相欢<sup>2</sup>, 胡晓<sup>2\*</sup>, 李来好<sup>2\*</sup>, 陈胜军<sup>2</sup>, 邓尚贵<sup>1</sup>

(1. 浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江 舟山 316022;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300)

**摘要:** 为了高值化利用罗非鱼副产物资源以及为酶解物-硒螯合物的产业化提供理论依据, 本实验以罗非鱼鱼皮胶原蛋白 (TSC) 为原料, 用 4 种蛋白酶对其进行酶解, 分别获得了酸性蛋白酶酶解物 (TSCAc)、木瓜蛋白酶酶解物 (TSCP)、菠萝蛋白酶酶解物 (TSCB)、碱性蛋白酶酶解物 (TSCAl), 以  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  为硒源, 制备并筛选出硒螯合量最高的酶解物, 测定酶解物及其硒螯合物的紫外光谱、荧光光谱、红外光谱、表面疏水性, 并对酶解物及其硒螯合物的抗氧化性与抗氧化稳定性进行分析。结果显示, TSCAl 的水解度 (DH) 最高 (18.2%), 其与硒螯合后的硒螯合量最高 (153.5 mg/g), 硒螯合率最高 (23.7%), 小分子量 (500~1 000 u) 的含量最高。其与硒螯合后, 紫外光谱吸收峰强度增大, 荧光光谱吸收峰由波长 419.8 nm 红移到 422.0 nm 且荧光强度减弱, 疏水性在螯合后降低, 表明 TSCAl 与硒螯合生成了新的物质。推测酰胺键、氨基的氮原子、羧基的氧原子可能参与了与硒的螯合反应。研究表明, 碱性蛋白酶酶解物-硒螯合物 (TSCAl-Se) 具有良好的抗氧化性, 其在不同温度、pH 值以及经胃消化后皆具有稳定的抗氧化活性。本研究制备了一种新型罗非鱼鱼皮胶原蛋白酶解物-硒螯合物, 为研究和开发硒元素膳食补充剂及抗氧化剂提供了理论依据。  
**关键词:** 罗非鱼; 鱼皮; 胶原蛋白; 硒; 酶解物; 螯合物; 结构; 抗氧化

中图分类号: TS 254.4; S 985

文献标志码: A

我国罗非鱼资源丰富, 其养殖产量和出口量稳居世界前列<sup>[1]</sup>。罗非鱼加工过程中会产生 60%~70% 的副产物, 常被用作饲料或被丢弃, 不仅造成资源的浪费, 而且容易污染环境<sup>[2-3]</sup>。加工副产物中的鱼皮含有丰富的胶原蛋白, 可作为制备活性肽的良好来源。多肽具有优于氨基酸的吸收机制和不可比拟的生理功能, 如抗氧化、降血压、调节免疫、抑菌等。Cai 等<sup>[4]</sup>用碱性蛋白酶水解草

鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 鱼皮, 从蛋白水解物中分离得到 3 个抗氧化肽, 氨基酸序列分别为 Pro-Tyr-Ser-Phe-Lys (640.74 u)、Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Leu (618.89 u) 和 Val-Gly-Gly-Arg-Pro (484.56 u), 均具有较强的抗氧化活性。张华<sup>[5]</sup>研究发现, 所提取的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 鱼皮胶原蛋白多肽有较好的自由基清除能力、还原能力、脂质过氧化抑制能力及亚铁离子还原能力。郭瑶<sup>[6]</sup>研

收稿日期: 2022-06-20 修回日期: 2022-10-05

资助项目: 国家特色淡水鱼产业技术体系专项 (CARS-46); 茂名市引进创新创业团队项目 (200201095834980); 广东省重点领域研发计划项目 (2021B0202060001); 广东省企业科技特派员专项 (GDKTP2021035300); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2020TD69); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2021SD06); 浙江省高层次人才特殊支持计划 (2021RS1006)

第一作者: 冯文静 (照片), 从事水产品加工研究, E-mail: fwjxh2020@163.com

通信作者: 胡晓, 从事水产品加工、水产生物制品研究与开发, E-mail: hnhuxiao@163.com;

李来好, 从事水产品加工、水产品质量安全与水产品标准化研究, E-mail: laihao@163.com



究了罗非鱼鱼皮胶原蛋白酶解液的体外抗氧化活性, 发现其在不同抗氧化体系中均表现出一定的体外抗氧化效果。夏光华<sup>[7]</sup>研究发现, 罗非鱼鱼皮胶原蛋白酶解液具有较强的清除 DPPH [diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl] 和 ABTS [2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)] 自由基的能力, 且在一定浓度范围内随着酶解液质量浓度的增加而增强, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 10.8 和 8.3 mg/mL。华鑫<sup>[8]</sup>以罗非鱼鱼皮和刺参体壁为原料, 从罗非鱼鱼皮酶解产物中分离得到高活性 ACE (angiotensin I converting enzyme) 抑制肽, 3 条肽段中 NRARTCR 的 ACE 抑制活性最高, IC<sub>50</sub> 值为 61.4 μmol/L。孙姗姗<sup>[9]</sup>以罗非鱼鱼皮为原料, 制备了胶原, 以胶原为母蛋白, 获得了具有 ACE 抑制活性的酶解肽, 并发现碱性蛋白酶的 ACE 抑制活性最高。蔡金秀等<sup>[10]</sup>以绿鳍马面鲀 (*Navodon septentrionalis*) 鱼皮为原料, 在制备胶原蛋白的基础上, 通过酶解法制备了有较高生物活性的 ACE 抑制肽。Yu 等<sup>[11]</sup>采用超滤法从日本黄姑鱼 (*Nibea japonica*) 鱼皮蛋白水解液中分离纯化了一个小于 3 ku 的低分子量肽段 NJSP, 发现其可以保护免疫系统免受氧化损伤, 维持体内平衡。董晓泽等<sup>[12]</sup>研究了日本黄姑鱼鱼皮免疫活性肽酶解工艺, 发现最优酶种和酶解条件下所得的酶解产物作用于 RAW 264.7 的相对增值率为 57.5%。Atef 等<sup>[13]</sup>以鱼皮胶原蛋白为原料, 研究其对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和沙门氏菌 (*Salmonella*) 的抗菌活性, 发现用中性蛋白酶和木瓜蛋白酶制备的胶原蛋白水解液有最强的抑菌活性。

硒是人体必需的微量元素之一, 具有抗氧化、保护生物膜、提高机体免疫力等作用。硒元素缺乏会导致许多疾病, 如克山病、大骨结病等<sup>[14]</sup>。与无机硒相比, 有机硒能主动穿过肠壁。人体可以有效地将硒贮存、积累在靶组织内, 供机体利用。因此, 以无机硒作为硒源, 开发生物活性高的有机硒非常必要<sup>[15]</sup>。目前国内外以胶原蛋白为原料制备钙、铁、锌螯合肽的研究较多, 对胶原蛋白酶解物-硒螯合物的研究较少。

本研究以罗非鱼鱼皮胶原蛋白 (TSC) 为原料, 通过酶水解法得到不同的酶解物, 将酶解物与硒螯合, 制备出酶解物-硒螯合物。测定碱性蛋白酶酶解物 (TSCAl) 和碱性蛋白酶酶解物-硒螯合物 (TSCAl-Se) 的紫外光谱、荧光光谱、红外光谱、

表面疏水性, 比较二者的结果, 并分析它们的抗氧化活性及抗氧化稳定性。旨在为硒元素膳食补充剂、抗氧化剂的产业化提供科学的理论依据, 为罗非鱼鱼皮的高值化利用提供新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

罗非鱼鱼皮购于广东百维生物科技有限公司。酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶和胰酶购自合肥博美生物科技有限责任公司, HCl、NaOH、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>、十二烷基硫酸钠 (SDS)、邻苯二甲醛 (OPA)、无水乙醇、丝氨酸、DL-二硫苏糖醇 (DTT)、2,3-二氨基萘 (DAN)、8-苯胺-1-萘磺酸盐 (ANS)、FeCl<sub>2</sub>、水杨酸、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 和胆酸钠购自国药集团化学试剂有限公司 (均为分析纯)。

### 1.2 仪器与设备

Cary Eclipse 荧光分光光度计 (VARIAN, 美国); IRAffinity-1 红外光谱仪 (岛津, 日本); UV2550 紫外可见分光光度计 (岛津, 日本); Alpha1-4 真空冷冻干燥机 (Christ, 德国); SHA-BA 水浴恒温振荡器 (常州金坛精达仪器制造有限公司); H1850R 型高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); AvantiJ26XP 型高速离心机 (贝克曼库尔特, 美国); LC-20AD 高效液相色谱仪 (岛津, 日本); Sunrise-basic Tacan 吸光酶标仪 (TECAN, 瑞士)。

### 1.3 实验方法

**罗非鱼鱼皮胶原蛋白的制备** 参照 Lin 等<sup>[16]</sup>的方法并稍作修改, 将罗非鱼鱼皮冲洗干净, 室温下用 NaOH 溶液 (0.1 mol/L) 浸泡 30 min, 期间不断搅拌, 料液体积比为 1 : 10, 浸泡后用流水将鱼皮洗至中性, 再用 HCl 溶液 (0.1 mol/L) 浸泡 10 min, 期间不断搅拌, 料液体积比约为 1 : 10, 浸泡后用流水洗至中性, 沥干水分。接着将鱼皮用打浆机打浆, 浆液装入烧杯放至 60 °C 水浴振荡器中, 加热 5 h, 以 5 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 取上清液, 利用凯氏定氮法测定上清液中的蛋白含量。冷冻干燥上清液, 得到 TSC。

**罗非鱼鱼皮胶原蛋白的酶解工艺** 参照 Zhang 等<sup>[17]</sup>的方法并稍作修改, 分别向 TSC 溶液 (蛋白质量浓度 7%) 中加入 2% (底物蛋白质量分数) 的蛋白酶, 采用的 4 种蛋白酶分别为酸性蛋白

酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和碱性蛋白酶, 在各自最优的酶解条件 (pH、温度) 下分别酶解 1、2、4、6、8 和 24 h (表 1)。酶解完成后, 将装有酶解液的锥形瓶沸水浴, 加热 10 min 灭酶, 接着 10

000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液, 称重。冷冻干燥上清液, 得到罗非鱼鱼皮胶原蛋白酶解物。将 4 种酶解物分别命名为 TSCAc、TSCP、TSCB 和 TSCAl。

表 1 不同蛋白酶的酶解条件

Tab. 1 Enzymatic hydrolysis conditions of different proteases

蛋白酶 protease	酶解条件 enzymatic hydrolysis conditions				
	酶活性/(U/mg) enzymatic activity	温度/°C temperature	pH	加酶量/% volume of enzyme	酶解时间/h enzymatic hydrolysis time
酸性蛋白酶 acid protease	50	40	3	2	1, 2, 4, 6, 8, 24
木瓜蛋白酶 papain	1 500	50	7	2	1, 2, 4, 6, 8, 24
菠萝蛋白酶 bromelain	500	55	7	2	1, 2, 4, 6, 8, 24
碱性蛋白酶 alkaline protease	200	50	8	2	1, 2, 4, 6, 8, 24

水解度 (DH) 的测定 TSCAc、TSCP、TSCB 和 TSCAl 水解度的测定采用 OPA 法<sup>[18]</sup>, OPA 法是基于初级氨基酸和邻苯二醛的反应。制备 OPA 试剂: 称量 3.8 g 四硼酸钠和 100 mg SDS, 充分溶解到 75 mL 去离子水中。称量 80 mg OPA, 溶解到 4 mL 乙醇中, 与上一步的溶液混合均匀。再称量 88 mg DTT (dithiothreitol) 加入上述溶液中, 加去离子水至 100 mL。制备丝氨酸标准品: 称量 10 mg 丝氨酸溶于 100 mL 蒸馏水。吸取 400  $\mu$ L 稀释后的样品溶液, 与 3 mL OPA 试剂混合 2 min, 用紫外-可见分光光度计 (UV2550, SHIMADZU) 在 340 nm 处测量吸光度。样品中的游离氨基酸用丝氨酸氨基当量表示, 如 Nielsen 等<sup>[18]</sup> 所述。样品中的水解度 (DH) 计算公式:

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

$$h = \frac{\text{Serine-NH}_2 - \beta}{\alpha}$$

式中, Serine-NH<sub>2</sub>=mmol serine NH<sub>2</sub>/g 蛋白;  $\beta=0.5$ ,  $\alpha=0.8$ ,  $h_{\text{tot}}=11.1$  (以胶原蛋白计算)。

罗非鱼鱼皮胶原蛋白酶解物硒螯合物的制备 参照吴佳南等<sup>[19]</sup> 的方法, 配制 0.5 mol/L 的 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 溶液。Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 溶液: TSCAl 溶液 = 1:2 (体积比), 混合均匀, 调节 pH 值至 9.0, 80 °C 水浴加热振荡 1 h。冷却后, 以 4 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液。接着加入 5 倍体积的 95% 乙醇溶液, 静置沉淀 12 h。再以 4 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取沉淀。冷冻干燥沉淀, 得到 TSCAl-Se 的冻干粉。

硒的螯合量和螯合率的测定 根据 Tang

等<sup>[20]</sup> 的方法测定硒的螯合量和螯合率。硒螯合量的测定原理是测定硒和 DAN 反应后的吡硒醇的含量。DAN 缓冲溶液制备: 准确称量 1.0 g DAN 溶于 1 L HCl (0.1 mol/L) 中。将样品溶液和 DAN 溶液以 1:10 的体积比混匀, 室温静置 2 h。再加入 5 mL 甲苯, 用紫外-可见分光光度计在 380 nm 处测量吸光度。样品空白: 不含 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 的罗非鱼鱼皮胶原蛋白酶解物。通过硒标准溶液测定标准曲线。硒的螯合率由硒的螯合量除以加入的 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 的质量, 再乘以 100 得到。

分子质量分布的测定 采用高效液相色谱法测定 TSCAl 的分子质量分布。流动相 A: 乙腈 (含有 0.1% 的三氟乙酸), B: 水 (含有 0.1% 的三氟乙酸), A:B=20:80 (体积比), 检测波长为 214 nm, 进样体积为 20  $\mu$ L (2 mg/mL), 流速为 0.5 mL/min。用流动相配制含有氧化型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽、杆菌肽、抑肽酶、细胞色素 C 的标准品溶液 (质量体积浓度为 2 mg/mL), 使用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后进样。色谱条件下分析制备的标准品溶液, 横坐标为保留时间 (min), 纵坐标为分子质量对数 (lg M<sub>w</sub>), 制作标准曲线。相同条件下检测 TSCAl 溶液。根据溶液的保留时间, 按照标准曲线  $y=-0.189 4x+6.543 5$ , 计算溶液的分子质量分布。

紫外-可见光吸收光谱 参照 Zhou 等<sup>[21]</sup> 的方法, 稍作修改。将 TSCAl 和 TSCAl-Se 冻干粉用去离子水配制成 0.5 mg/mL 的溶液, 记录其在 200~600 nm 范围内的紫外光谱。

内源性荧光光谱 参照 Miriani 等<sup>[22]</sup> 的方法, 并稍作修改。用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液

(PBS, pH 7.0) 配制 20 mg/mL 的 TSCAl、TSCAl-Se 溶液。激发波长为 290 nm, 发射波长为 300~500 nm。发射和激发带宽设置为 5 nm。

**傅里叶-变换红外光谱** 将 TSCAl 和 TSCAl-Se 冻干粉与 KBr 一起碾碎, 压片, 在 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$  的范围内进行红外扫描<sup>[23]</sup>。

**表面疏水性** 用疏水探针 ANS 测定表面疏水性<sup>[24]</sup>。每个样品用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 稀释到 5 mg/mL。然后在 2 mL 的 TSCAl 和 TSCAl-Se 中加入 20  $\mu\text{L}$  ANS 溶液 (8 mmol/L)。在激发波长为 375 nm, 扫描波长为 400~650 nm 的条件下, 测定每个样品的荧光强度。

**TSCAl-Se 的抗氧化性** 羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 清除活性的测定方法参照 Zeng 等<sup>[25]</sup>, 并稍作修改。反应混合物中含有 200  $\mu\text{L}$  不同浓度的 TSCAl 或 TSCAl-Se 溶液、200  $\mu\text{L}$  蒸馏水、50  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_2$  溶液 (9 mmol/L) 和 50  $\mu\text{L}$  水杨酸-乙醇溶液 (9 mmol/L)。反应开始时加入 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 (8.8 mmol/L)。37  $^\circ\text{C}$  加热 30 min 后, 在 510 nm 处测定吸光度。 $\cdot\text{OH}$  的清除活性以清除率表示:

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_3} \times 100\%$$

式中,  $A_1$  为样品的吸光度;  $A_2$  为用蒸馏水代替  $\text{FeCl}_2$  溶液的吸光度;  $A_3$  为蒸馏水代替样品溶液的吸光度。

**TSCAl-Se 的抗氧化稳定性** TSCAl-Se 的抗氧化稳定性测定参考 Liu 等<sup>[26]</sup> 的方法, 稍作修改。

**TSCAl-Se 在不同温度下的抗氧化稳定性**

将 TSCAl-Se 溶液 (5 mg/mL) 在不同温度梯度 (25、40、60、80、100  $^\circ\text{C}$ ) 下处理 2 h。然后将其置于冰中冷却至室温, 测定其抗氧化活性, 测定方法见“TSCAl-Se 的抗氧化性”。

**TSCAl-Se 在不同 pH 下的抗氧化稳定性**

TSCAl-Se 溶液 (5 mg/mL) 分别在不同 pH 水平 (3、5、7、9、11) 下室温放置 2 h。然后测定其抗氧化活性, 测定方法见“TSCAl-Se 的抗氧化性”。

**TSCAl-Se 的消化特性分析** 测定 TSCAl-Se 的体外模拟消化的方法参考 Marambe 等<sup>[27]</sup>。称量 0.2 g NaCl, 加入 100 mL 水, 盐酸 (1.0 mol/L) 调节 pH 至 2.0, 配制得到模拟胃液空白液。配制 4 mg/mL 的胃蛋白酶溶液, 加入到模拟胃液空白液中, 制成模拟胃液。模拟胃消化实验: 称量 10 mg/mL 蛋白浓度的 TSCAl-Se, 加入 25 mL 模拟胃液空白液, 37  $^\circ\text{C}$  加热振荡 10 min, 盐酸 (0.1

mol/L) 调节 pH 至 2.0, 加入 1 mL 新鲜配制的模拟胃液。37  $^\circ\text{C}$  摇床振荡加热 2 h (150 r/min)。空白对照: 不加螯合物的溶液。样品对照: 加入底物和模拟胃液空白液, 不加模拟胃液。反应结束后, 用 NaOH (1 mol/L) 调节 pH 值至 6.8。以 1 000 r/min、4  $^\circ\text{C}$  离心 8 min, 取上清液。分别测定胃消化前后溶液的  $\cdot\text{OH}$  清除活性。 $\cdot\text{OH}$  的清除活性以清除率表示, 方法见“TSCAl-Se 的抗氧化性”。

## 1.4 数据分析

所有实验均重复 3 次。实验数据使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 实验数值用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 结果间的差异性用单因素方差分析方法 (One-Way ANOVA) 分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。采用 Origin 9.1 软件做图。

## 2 结果

### 2.1 水解度的测定

水解度定义为底物中肽键断裂的百分比<sup>[28]</sup>。水解度影响水解产生的肽的大小、结构和氨基酸组成<sup>[15]</sup>。在各自的最佳水解条件下水解 1、2、4、6、8 和 24 h 后, TSCAc、TSCP、TSCB 和 TSCAl 的水解度如图 1 所示。随着酶解时间的增加, TSCAc 的水解度逐渐增加。TSCP 的水解度在 1~6 h 逐渐增加, 6~24 h 趋于平缓。TSCB 的水解度缓慢增加。TSCAl 的水解度在 1~6 h 增加迅速, 6~8 h 缓慢增加。4 种酶解物在各时间的水解度: TSCAl > TSCP > TSCAc > TSCB。酶解 24 h, TSCAl 的水解度达到最高 (18.2%); TSCP 酶解 8 h 时水解度最高 (11.7%); TSCAc 酶解 24 h 时的水解度最高 (13.0%); TSCB 酶解 24 h 时的水解度最高 (1.2%)。24 h 时, TSCAl 的水解度最高。

### 2.2 硒的螯合量和螯合率的测定

随着酶解时间的增加, TSCAc 的硒螯合量先升高再降低, 在 6 h 达到最高硒螯合量 93.2 mg/g; TSCP 的硒螯合量基本保持不变, 螯合量较低 (不超过 7 mg/g); TSCB 的硒螯合量先升高再降低, 1~2 h 升高明显, 2~6 h 缓慢升高, 6~24 h 缓慢降低, 6 h 时达到最高硒螯合量 141.3 mg/g; TSCAl 的硒螯合量大致呈逐渐升高趋势, 且螯合量从酶解 1 h 时就较高, 最高硒螯合量达到 153.5 mg/g (酶解 24 h 时)。随着酶解时间的增加, TSCAc 的硒螯合率先上升后下降, 在酶解 6 h 时, 达到最

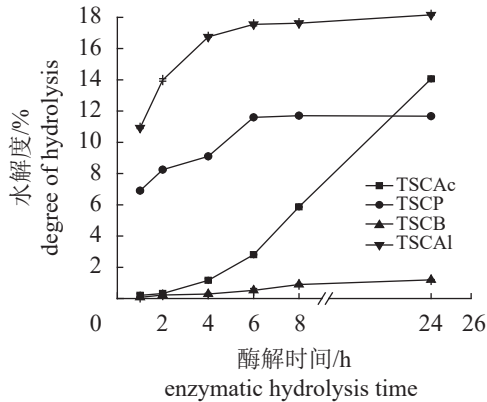


图1 TSCAc、TSCP、TSCB和TSCAl的水解度

TSCAc. 酸性蛋白酶酶解物, TSCP. 木瓜蛋白酶酶解物, TSCB. 菠萝蛋白酶酶解物, TSCAl. 碱性蛋白酶酶解物, 下同。

Fig. 1 Degree of hydrolysis of TSCAc, TSCP, TSCB and TSCAl

TSCAc. hydrolysates prepared by acid protease, TSCP. hydrolysates prepared by papain, TSCB. hydrolysates prepared by bromelain, TSCAl. hydrolysates prepared by alkaline protease, the same below.

高的硒整合率 14.4% (图 2-b); TSCP 的硒整合率基本不变, 但整合率较低, 不超过 2%; TSCB 的硒整合率在 1~2 h 增加迅速, 2~6 h 缓慢增加, 6~24 h 缓慢降低, 酶解 6 h 时达到最高硒整合率 21.8%; TSCAl 的硒整合率从酶解 1 h 时就较高, 并缓慢增加, 最高硒整合率达到 23.7% (酶解 24 h 时) (图 2)。由于碱性蛋白酶酶解物的硒整合率显著高于其他 3 种酶, 因此选用碱性蛋白酶酶解所得的罗非鱼鱼皮胶原蛋白酶解物及其硒整合物进

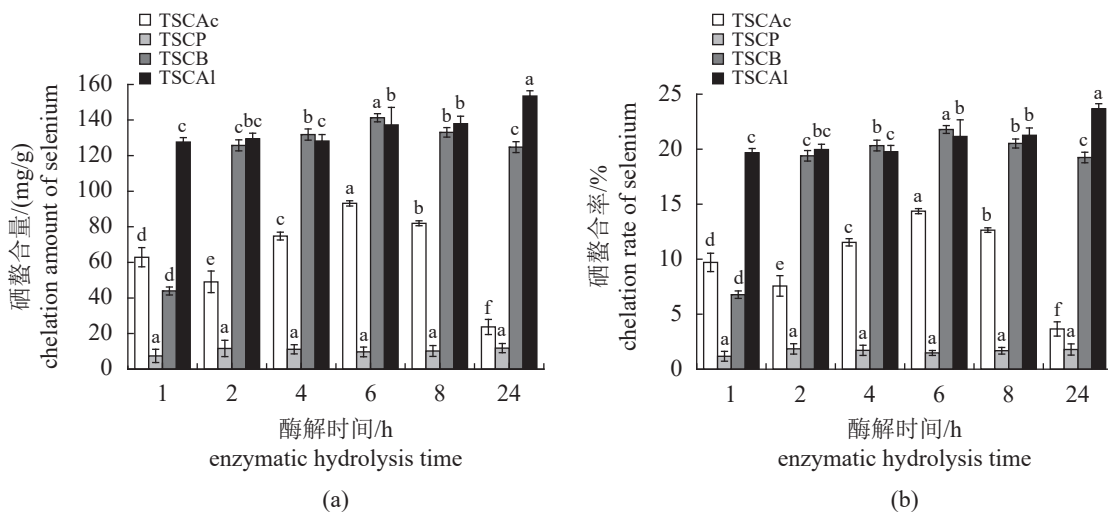


图2 TSCAc、TSCP、TSCB和TSCAl的硒整合量(a)和硒整合率(b)

同一种酶解物不同时间的不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Selenium chelation amount (a) and selenium chelation rate (b) of TSCAc, TSCP, TSCB and TSCAl

Different lowercase letters for the same hydrolysate at different time indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

行后续实验。

### 2.3 TSCAl 的分子质量分布

由于酶解物的抗氧化活性与其分子质量密切相关, 因此测定酶解物的分子质量分布。研究表明, 低分子质量的多肽具有更强的抗氧化活性<sup>[29]</sup>。TSCAl 酶解 24 h 后, 有超过 90% 的分子质量分布在 500~3 000 u, 含量最高的是 1 000~3 000 u 的酶解物, 约占 50% (图 3)。TSCAl 的分子质量分布测定结果显示, TSC 酶解 1 h 得到的酶解物的分子质量较大, >10 000 u 的部分占比最大 (41.7%), 其次是 5 000~10 000 u 的部分 (27.6%), <3 000 u 的部分占比不到 20%; 酶解 2 h 的酶解物的分子质量明显变小, >5 000 u 的部分占 1.7%, <1 000 u 的部分占到 43.3%; 随着酶解时间的进一步增加, 酶解物的分子质量进一步减小, 酶解 4 h 时, <1 000 u 的部分占 43.4%; 酶解 6 h 时, <1 000 u 的部分占 46.8%; 酶解 8 h 时, <1 000 u 的部分占 48.2%; 酶解 24 h 时, <1 000 u 的部分占 53.7%。

### 2.4 TSCAl 和 TSCAl-Se 的紫外-可见光光谱测定

TSCAl、TSCAl-Se 的紫外吸收光谱有明显差别, 且它们的 230 nm 波长附近的吸收带与芳香族氨基酸残基的吸光度有关 (图 4)。芳香族氨基酸中的色氨酸、酪氨酸分子内含有共轭双键, 在 280 nm 波长附近具有最大的光吸收峰。TSCAl 与硒结合后, 210~238 nm 波长吸收带的强度明显减小且

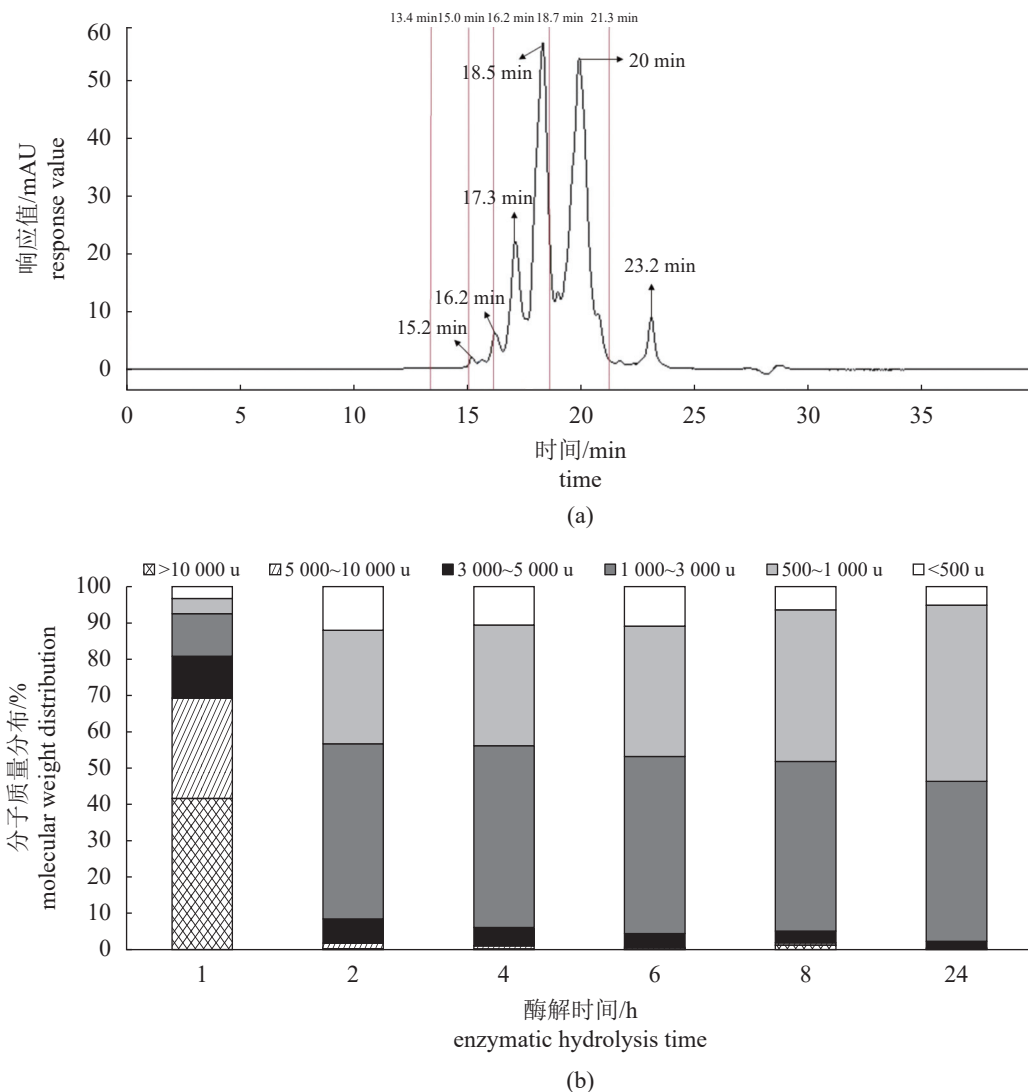


图3 TSCAI的分子质量分布液相图谱(a)和TSCAI的分子质量分布图(b)

Fig. 3 Liquid phase diagram of molecular weight distribution of TSCAI (a), molecular weight distribution of TSCAI (b)  
 <13.4 min. >1000 u; 13.4-15.0 min. 5 000-10 000 u; 15.0-16.2 min. 3 000-5 000 u; 16.2-18.7 min. 1 000-3 000 u; 18.7-21.3 min. 500-1 000 u; >21.3 min. <500 u

出现蓝移, 而>238 nm波长的吸收带的强度增加。

### 2.5 TSCAI和TSCAI-Se的荧光光谱测定

TSCAI的荧光强度比TSCAI-Se强, 表明TSCAI暴露的发色团多, 形成聚集体后, TSCAI-Se暴露的发色团少(图5)。荧光强度在酶解物与硒整合后显著减弱, 此现象可以由硒离子的荧光猝灭作用解释。TSCAI的最大吸收峰在419.80 nm处, TSCAI和硒整合后, 发生了红移, TSCAI-Se的最大吸收峰在422.02 nm处。

### 2.6 TSCAI和TSCAI-Se的红外光谱测定

TSCAI的红外光谱和TSCAI-Se的红外光谱发生了明显变化(图6), 说明氨基酸的某些基团参

与了反应, 振动频率发生了变化<sup>[30]</sup>。如图所示, 在3 000~3 500 cm<sup>-1</sup>处, TSCAI有宽峰, 峰值为3 280 cm<sup>-1</sup>, TSCAI-Se的峰值为3 365 cm<sup>-1</sup>, 红移85 cm<sup>-1</sup>。此处的峰主要是N-H伸缩振动所导致, 峰值的变化是因为酶解物和硒整合后, 影响了N-H的伸缩振动, 可能也影响了O-H的伸缩振动, 导致氢键断裂或增加, 这种变化对维持TSCAI和TSCAI-Se的二级结构意义重大。TSCAI在1 393 cm<sup>-1</sup>的吸收峰是O-H振动的缘故, 在TSCAI-Se中移动到1 400 cm<sup>-1</sup>, 红移7 cm<sup>-1</sup>; TSCAI在1 446 cm<sup>-1</sup>的吸收峰也是O-H振动的缘故, 在TSCAI-Se中移动到1 456 cm<sup>-1</sup>, 红移10 cm<sup>-1</sup>。在2 800~3 000 cm<sup>-1</sup>, TSCAI和TSCAI-Se都有峰出现, 但

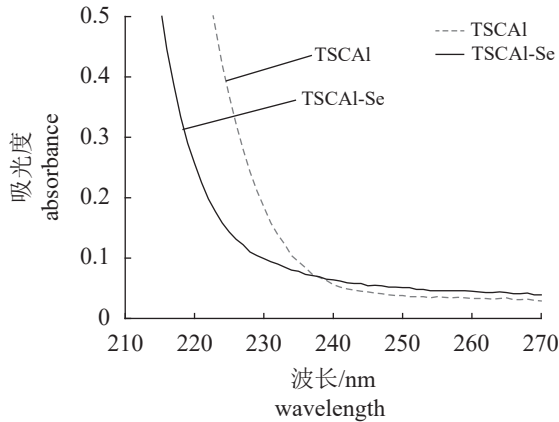


图 4 TSCAI 和 TSCAI-Se 的紫外-可见光光谱图

Fig. 4 UV spectroscopy of tilapia skin collagen alcalase hydrolysates and its selenium complex

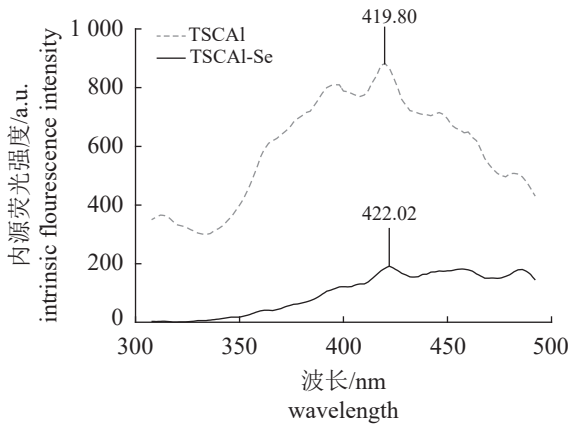


图 5 TSCAI 和 TSCAI-Se 的荧光光谱图

“a.u.”是荧光强度的单位, 以相对值表示。

Fig. 5 Fluorescence spectra of tilapia skin collagen alcalase hydrolysates and its selenium complex

“a.u.” is the unit of fluorescence intensity, expressed as relative values.

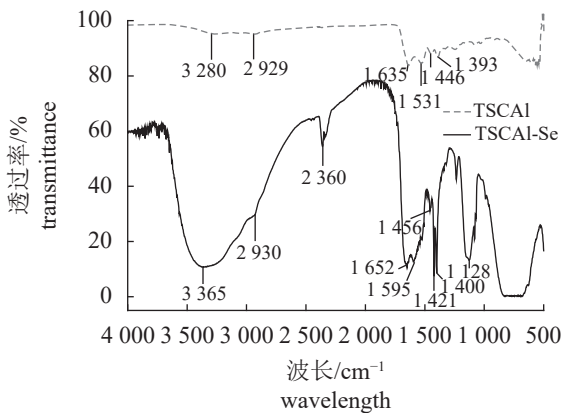


图 6 TSCAI 和 TSCAI-Se 的红外光谱图

Fig. 6 Infrared spectroscopy of tilapia skin collagen alcalase hydrolysates and its selenium complex

强度不高, TSCAI 的峰值为  $2\,929\text{ cm}^{-1}$ , TSCAI-Se 的峰值为  $2\,930\text{ cm}^{-1}$ , 红移了  $1\text{ cm}^{-1}$ 。从峰值的变化可知, 酶解物和硒整合后, 影响了 C-H 振动, 进而影响了疏水性。TSCAI 和 TSCAI-Se 在  $1\,600\sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$  有特有的酰胺带, 其中, TSCAI 在  $1\,635\text{ cm}^{-1}$  有吸收峰, TSCAI-Se 在  $1\,652\text{ cm}^{-1}$  有吸收峰, 此处的吸收峰主要是 C=O 伸缩振动所导致, 红移了  $18\text{ cm}^{-1}$ 。TSCAI-Se 中 -COO<sup>-</sup> 的吸收峰移动到了  $1\,421\text{ cm}^{-1}$ 。

### 2.7 TSCAI 和 TSCAI-Se 的表面疏水性

荧光强度可以反映疏水性的高低, TSCAI 的荧光强度显著高于 TSCAI-Se (图 7), 说明整合后的表面疏水性有所降低, 这可能是由于硒和疏水性氨基酸整合后导致疏水性下降。TSCAI 中的疏水性、芳香族氨基酸含量更多<sup>[31-32]</sup>。

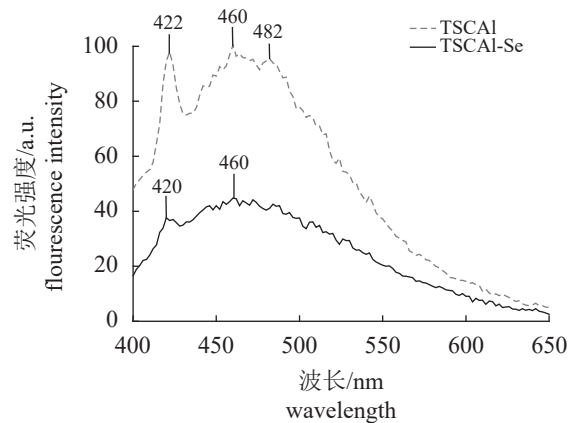


图 7 TSCAI 和 TSCAI-Se 的表面疏水性图

Fig. 7 Surface hydrophobicity of tilapia skin collagen alcalase hydrolysates and its selenium complex

### 2.8 TSCAI 和 TSCAI-Se 的抗氧化性测定

实验测定了 TSCAI、TSCAI-Se 和  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力, 来评价酶解物和整合物的体外抗氧化活性。经计算, TSCAI、TSCAI-Se 和  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  清除  $\cdot\text{OH}$  的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 6.60、0.05 和  $0.17\text{ mg/mL}$ 。说明 TSCAI、TSCAI-Se 和  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  都对  $\cdot\text{OH}$  具有较好的清除活性, 特别是 TSCAI-Se, 其抗氧化活性显著高于 TSCAI 与  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (图 8)。

### 2.9 TSCAI 和 TSCAI-Se 抗氧化稳定性的测定

TSCAI 和 TSCAI-Se 在不同温度下抗氧化稳定性的测定结果 TSCAI 和 TSCAI-Se 对  $\cdot\text{OH}$  的清除活性相差较大, TSCAI 对  $\cdot\text{OH}$  的清除活性

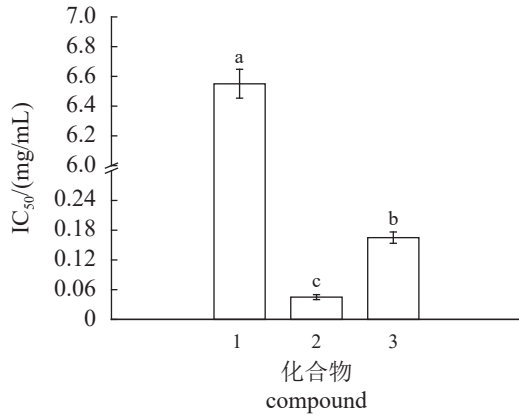


图8 TSCAl、TSCAl-Se 和 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 的·OH 清除活性 IC<sub>50</sub> 值图

1. TSCAl, 2. TSCAl-Se, 3. Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>; 不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

Fig. 8 Plots of IC<sub>50</sub> values of ·OH scavenging activity for TSCAl, TSCAl-Se and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

1. TSCAl, 2. TSCAl-Se, 3. Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>; different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

在 50% 以下, TSCAl-Se 对 ·OH 的清除活性在 90% 以上。随着温度的上升, TSCAl 的抗氧化活性缓慢降低; TSCAl-Se 的抗氧化活性先缓慢升高、再保持平稳, 最后缓慢降低。二者对 ·OH 的清除活性随温度变化的幅度较小 (图 9)。

TSCAl 和 TSCAl-Se 在不同 pH 下抗氧化稳定性的测定结果 在各 pH 下, TSCAl-Se 对

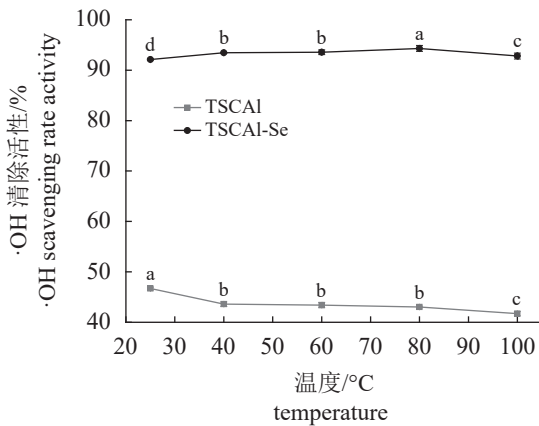


图9 TSCAl 和 TSCAl-Se 在不同温度下的 ·OH 清除活性

同一样品的不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

Fig. 9 ·OH scavenging activity of tilapia skin collagen alcalase hydrolysates and its selenium complex at different temperature

Different lowercase letters in the same sample indicate significant differences ( $P<0.05$ ), the same below.

·OH 的清除活性都明显高于 TSCAl, TSCAl 对 ·OH 的清除活性都低于 57%, 而 TSCAl-Se 对 ·OH 的清除活性都高于 73%。随着 pH 值的增加, TSCAl 对 ·OH 的清除活性先升高后降低, pH 值为 7 时达到最大值 (56.5%); TSCAl-Se 对 ·OH 的清除活性随着 pH 值的增加先升高后降低, 当 pH=7 时, 达到最大值 (93.9%) (图 10)。

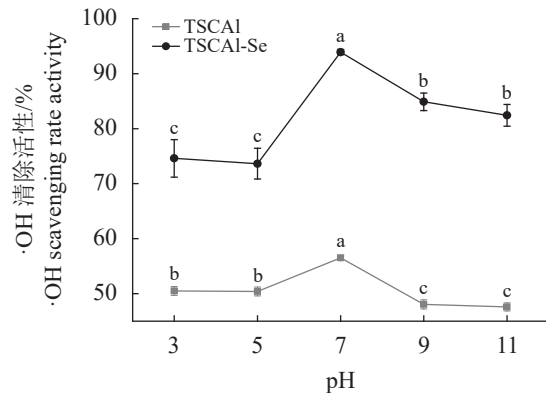


图10 TSCAl 和 TSCAl-Se 在不同 pH 值下的 ·OH 清除活性

Fig. 10 ·OH scavenging activity of tilapia skin collagen alcalase hydrolysates and its selenium complex at different pH

## 2.10 TSCAl 和 TSCAl-Se 模拟胃消化后的抗氧化性测定结果

抗氧化的酶解物、螯合物在体内发挥活性的关键因素之一是对胃消化的抵抗。经过口服摄入后, 其需要抵抗胃酶的完全水解, 顺利通过肠壁而保持其抗氧化性的完整。在消化过程中, 其抗氧化性可能受到激活或抑制<sup>[33]</sup>。在消化前, TSCAl 对 ·OH 的清除活性为 73.8%, TSCAl-Se 对 ·OH 的清除活性为 86.7%。经过胃蛋白酶消化 2 h 后, TSCAl 对 ·OH 的清除活性下降至 55.3%, TSCAl-Se 对 ·OH 的清除活性下降至 74.4% (表 2)。

## 3 讨论

### 3.1 水解度

水解度 (DH) 的变化反映了水解程度的变化, DH 越大表示水解的程度越高, 生成的肽段越多。DH 很难达到 100%, 一般会在 100% 以下的某个值趋于平衡, 这是由于很难保证酶解的各种影响因素同时处于最优。本研究中的 4 种罗非鱼鱼皮胶原蛋白酶解物的 DH 差异明显, TSCAl 最高, TSCB 最低 (图 1)。这种差异可能是由不同酶的特



表 2 TSCAI 和 TSCAI-Se 的胃消化液对·OH 的清除活性

Tab. 2 Effect of the ·OH scavenging rate activity of tilapia skin collagen alcalase hydrolysates and its selenium complex %

样品 sample	胃消化前的·OH 清除活性 ·OH scavenging activity before the stomach digestion	胃消化后的·OH清除活性 ·OH scavenging activity after the stomach digestion
TSCAI	73.78±2.03 <sup>b</sup>	55.26±1.32 <sup>c</sup>
TSCAI-Se	86.66±0.88 <sup>a</sup>	74.35±0.47 <sup>b</sup>

注: 同列数据不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Notes: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

异性导致。有研究表明, 酶解物的 DH 取决于蛋白酶的类型。例如在蛋白酶浓度、水解时间相同的条件下, 碱性蛋白酶酶解三文鱼骨架的酶解液的 DH 高于风味蛋白酶<sup>[34]</sup>。碱性蛋白酶是一种深度内切酶, 主要切割疏水性氨基酸 C-端肽键上的限制性位点的肽键。本实验的水解结果与之前文献中报道的结果一致<sup>[34]</sup>。

### 3.2 硒的螯合量和螯合率

实验结果显示, 相较于其他蛋白酶, 碱性蛋白酶酶解罗非鱼鱼皮得到的酶解物与硒的螯合量和螯合率最高(图 2)。这可能与蛋白酶在酶切位点上的差异性从而导致产物肽段序列的不同有关, 同时也与碱性蛋白酶不但能水解肽键, 还具备水解酰胺键、酯键以及转酯、转肽等特性有关。

### 3.3 酶解物的分子质量分布

酶解 24 h 时, 小分子质量酶解物 (<1 000 u) 的占比最大(图 3-a), 说明此时酶解效果较好。从图 3-b 中可以看出, 酶解前期的分子质量变化比较明显, 而酶解后期分子质量分布的变化不大。此趋势和水解度的结果类似。说明酶解前期水解度大, 向小分子质量的转化更多。

由于 TSCAI 的硒螯合量和螯合率最高, 酶解 24 h 得到的酶解物中, 小分子质量的含量最高, 因此选用碱性蛋白酶酶解 24 h 所得的 TSCAI 和 TSCAI-Se 进行后续实验。

### 3.4 紫外-可见光光谱

当加入硒后, 酶解物的紫外吸收光谱的吸收带发生偏移且强度发生改变(图 4), 说明酶解物中羰基的氧原子和硒发生了反应。光谱的变化可能是发色团、助色团偏振的缘故。有研究显示, 含有发色团(如 C=C、C=O、-N=N-、-NO<sub>2</sub> 和 -C=S 等)助色团(如 -COOH、-OH、-SO<sub>3</sub>H、-NHR、-NH<sub>2</sub> 和 -NR<sub>2</sub> 等)的酶解物与元素离子螯合后, 自身结构可能会发生改变, 导致紫外光谱发生变化。还有

研究表明, 螯合物的生成会改变其配位体对光的吸收性能, 酶解物与硒螯合后, 相应原子的价电子跃迁出现不同<sup>[35]</sup>。TSCAI 与硒螯合后, 其紫外光谱发生了变化, 可以推测出其与硒之间发生了螯合反应, 生成了新的物质 TSCAI-Se。

### 3.5 荧光光谱

荧光强度可以反映芳香族氨基酸暴露于水的程度, 这与蛋白质三级结构的变化有关。芳香族氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)在特定的激发波长下会产生内源性荧光, 在蛋白质中, 内源性荧光主要来源于色氨酸的吲哚基团<sup>[36]</sup>。发色团暴露在溶剂中的时间越长, 荧光光谱的最大值( $\lambda_{\max}$ )会发生红移, 向较长波长移动。而当发色团嵌入蛋白质分子内部更多时,  $\lambda_{\max}$  移动到较短的波长, 发生蓝移。TSCAI 含有发色基团, 能发射荧光, 与硒螯合后, TSCAI 的生色基团与硒相互作用, 基团的结构会发生改变, 引起荧光特性的变化。经过一系列的反应, TSCAI 和 TSCAI-Se 的结构发生了变化, 荧光峰的位置和强度发生了变化(图 5)。有研究者发现, 矿物质离子能引起肽的折叠<sup>[37]</sup>, 与酶解物螯合后, 荧光强度降低, 且发生红移, 本实验与其研究结果一致。荧光光谱的变化表明, TSCAI 与硒发生了螯合反应, 生成了一种新的物质。

### 3.6 红外光谱

由于 TSCAI 中存在氨基和羧基, 氨基的伸缩振动、边角振动, 羧基的伸缩振动, 都会使红外光谱图中的吸收峰随之变化, 当其与硒发生螯合反应后, 吸收峰也会发生变化。TSCAI 的红外光谱和 TSCAI-Se 的红外光谱明显不同, TSCAI 与硒形成螯合物后, 主要吸收峰的位置发生了明显变化, 相对强度也发生了改变(图 6)。说明经过反应后, 氨基酸的某些基团参与了反应, 受到了激发, 振动频率发生了改变。本实验结果与之前的研究结果一致<sup>[38]</sup>, 推测酰胺键、氨基的氮原子、羧基

的氧原子可能参与了与硒的螯合反应, 且羧基与硒可能以共价键相螯合。

### 3.7 表面疏水性

蛋白质的表面疏水性 ( $H_0$ ) 是蛋白质表面与极性水环境接触的疏水性基团数量的指标, 与蛋白质的乳化性质密切相关。使用 ANS 荧光可反映样品的表面疏水性, 且荧光强度与蛋白质的表面疏水性成正相关, 荧光强度越高, 表明表面疏水性越强。有研究表明, 表面疏水性与蛋白质的空间构象和暴露的氨基酸残基的空间构象有关<sup>[39]</sup>, 表面疏水性的变化可反映蛋白质空间结构的变化。TSCAI 的荧光强度明显高于 TSCAI-Se, 表明 TSCAI 的表面疏水性更高 (图 7)。这可能是由于硒与疏水性氨基酸螯合, 导致螯合物的疏水性降低, 因此荧光强度降低。文献<sup>[24]</sup>报道, 样品的荧光强度升高, 表明蛋白质去折叠后, 其表面疏水性增强。

### 3.8 抗氧化性

活性氧 (ROS) 包括  $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{HO}_2$  和  $\cdot\text{ROO}$ , 活性氮包括  $\cdot\text{NO}$  和  $\cdot\text{ONOO}$ 。 $\cdot\text{OH}$  在氧自由基中具有最强的反应活性, 由于其氧化能力强, 容易影响生命活动的氧化代谢过程。当自由基和抗氧化的防御体系之间显著失衡,  $\cdot\text{OH}$  可导致蛋白质氧化、DNA 链断裂、脂质氧化等, 造成细胞损伤、色素沉积等反应<sup>[40]</sup>。

体外抗氧化实验表明, TSCAI-Se 的  $\cdot\text{OH}$  清除活性比  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  高, 而  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  的  $\cdot\text{OH}$  清除活性比 TSCAI 高 (图 8), 说明酶解物与硒发生螯合反应后其抗氧化活性明显增强。其抗氧化活性的提升并不是由原料抗氧化能力的简单叠加所致, 而是因为螯合反应所生成的螯合物具有更好的清除自由基的能力。实验发现, TSCAI-Se、TSCAI 和  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  的自由基清除率均呈剂量依赖性。本实验结果与秦修远等<sup>[41]</sup>的研究结果一致, 其研究发现豌豆低聚肽硒螯合物对  $\cdot\text{OH}$  的清除活性相对于豌豆低聚肽有很大提高, 玉米低聚肽螯合物的清除自由基能力比玉米低聚肽强<sup>[42]</sup>。陈濠<sup>[43]</sup>研究发现, 灵芝蛋白肽-硒螯合物的  $\cdot\text{OH}$  清除作用高于灵芝蛋白肽。李洪艳<sup>[35]</sup>发现真鲷 (*Pagrus major*) 鱼头制备的肽及其硒螯合物对  $\cdot\text{OH}$  有一定的清除作用, 且随着被测物浓度的增加, 其对  $\cdot\text{OH}$  的清除率也相应增加。

### 3.9 抗氧化稳定性

对于功能食品原料或食品添加剂中的抗氧化

剂来说, 食品加工和贮藏过程中, 其抗氧化性能否保持稳定很重要。

TSCAI 和 TSCAI-Se 在不同温度下的抗氧化稳定性 许多食品加工方法采用热处理来杀菌, 因此, 确定不同温度对酶解物抗氧化活性的影响对生产具有重要意义。TSCAI 和 TSCAI-Se 的抗氧化性在不同温度下虽然略有波动, 但相对稳定, 表明它们有良好的热稳定性 (图 9)。100 °C 时, 二者的抗氧化稳定性都有所降低, 说明高温会影响其抗氧化活性。高温是蛋白质变性的重要原因之一, 有研究表明, 60 °C 以上的高温会影响蛋白质的二级结构, 导致抗氧化性下降。例如高温 (60~100 °C) 加热 2 h 后, 金华火腿抗氧化酶解物的抗氧化活性显著下降<sup>[44]</sup>。Wong 等<sup>[45]</sup>报道了 Trp-Ala-Phe-Ala-Pro-Ala 和 Met-Tyr-Pro-Gly-Leu-Ala 的抗氧化活性在热处理后未发生变化。Gallego 等<sup>[46]</sup>发现西班牙干腌火腿中的肽 SNAAC 在不同的温度下保持了稳定的抗氧化性。总之, TSCAI 和 TSCAI-Se 具有良好的热稳定性, 在不同温度下, 二者 (尤其是 TSCAI-Se) 可保持高抗氧化活性。

TSCAI 和 TSCAI-Se 在不同 pH 下的抗氧化稳定性 随着 pH 值的增加, TSCAI 和 TSCAI-Se 的抗氧化性都是先升高后降低, 在 pH=7 时达到最高 (图 10)。碱性条件下其抗氧化性降低, 可能的原因: ①外消旋作用。碱性环境时, 很可能会发生外消旋反应, 形成 *L*-和 *D*-异构体的混合物, 二者之间存在生物活性的差异<sup>[47]</sup>。②脱酰胺反应。较高的 pH 值促进脱氨, 导致结构和构象发生改变, 丧失抗氧化活性。③肽降解的活化能随 pH 值的变化而改变。一般来说, 每种肽都有最适的 pH 范围, 在此范围内, 肽的结构相对稳定, 抗氧化性也较好<sup>[44]</sup>。pH=7 时, TSCAI 和 TSCAI-Se 的抗氧化性最好。总之, TSCAI 和 TSCAI-Se 的抗氧化活性随着 pH 值的变化略有波动, 抗氧化活性基本保持良好。

### 3.10 模拟胃消化后的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性

经过胃消化后, TSCAI 和 TSCAI-Se 对  $\cdot\text{OH}$  的清除活性都降低 (表 2)。可能是胃的消化环境导致 TSCAI 的某些结构发生了变化, 从而影响其螯合硒的能力。胃消化后, TSCAI 对  $\cdot\text{OH}$  的清除活性下降了 18.5%, TSCAI-Se 对  $\cdot\text{OH}$  的清除活性下降了 12.3%, 说明 TSCAI-Se 的稳定性更好。本实验结果与之前的一些研究结果一致。蔡金秀等<sup>[48]</sup>

研究发现, 经胃肠模拟消化后, 绿鳍马面鲷鱼皮胶原抗氧化肽的抗氧化活性有所下降, 但大部分活性未丧失。王雨辰等<sup>[49]</sup>发现胰蛋白酶消化前后, 10 mg/mL 质量浓度的豌豆低聚肽对·OH 的清除能力下降 14.8%。王贝贝等<sup>[50]</sup>研究发现, 胶原肽在体外模拟消化后, 对 DPPH 的清除率和还原力明显下降。总之, TSCAI 和 TSCAI-Se 经胃消化后保持良好的·OH 清除活性。

综上所述, 采用不同蛋白酶对罗非鱼鱼皮胶原蛋白进行酶解, 碱性蛋白酶酶解物 (TSCAI) 的水解度最高 (18.2%), 小分子质量的肽 (500~1 000 u) 占比最高, 其与硒元素螯合后的硒螯合量最高 (153.5 mg/g), 硒螯合率最高 (23.7%)。TSCAI 与硒螯合后, 其紫外光谱吸收带强度和位置发生了改变, 荧光光谱的荧光强度减弱, 吸收峰红移了 2 cm<sup>-1</sup>, 表面疏水性降低, 说明其与硒螯合生成了新物质。此外, TSCAI-Se 在 100 °C 以下的温度、较宽的 pH 值范围和胃消化后皆具有良好的抗氧化稳定性。鉴于此, TSCAI-Se 有望成为抗氧化剂和硒元素膳食补充剂的潜在原料。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 陈胜军, 李来好, 杨贤庆, 等. 我国罗非鱼产业现状分析及提高罗非鱼出口竞争力的措施[J]. 南方水产, 2007, 3(1): 75-80.  
Chen S J, Li L H, Yang X Q, et al. Present situation of tilapia industry and measures of improving export competition power[J]. South China Fisheries Science, 2007, 3(1): 75-80 (in Chinese).
- [2] 吝少伟, 王琦, 王海滨. 罗非鱼副产物综合利用技术研究及产品开发展进[J]. 肉类研究, 2013, 27(10): 33-36.  
Lin S W, Wang Q, Wang H B. Progress in comprehensive utilization of tilapia byproducts and development of new products[J]. Meat Research, 2013, 27(10): 33-36 (in Chinese).
- [3] 梁小明, 韦倩妮, 吴军, 等. 罗非鱼加工废弃物的综合利用探讨[J]. 现代食品, 2020(10): 29-31.  
Liang X M, Wei Q N, Wu J, et al. Comprehensive utilization of tilapia processing waste[J]. Modern Food, 2020(10): 29-31 (in Chinese).
- [4] Cai L Y, Wu X S, Zhang Y H, et al. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 16: 234-242.
- [5] 张华. 比目鱼皮抗氧化肽的制备及分离纯化 [D]. 天津: 天津大学, 2013.  
Zhang H. Preparation and purification of antioxidant peptides from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) skin[D]. Tianjin: Tianjin University, 2013(in Chinese).
- [6] 郭瑶. 罗非鱼皮胶原肽的制备及其抗氧化活性的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.  
Guo Y. Preparation of peptides from enzymic hydrolysates of tilapia skin collagen and its antioxidant properties[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006(in Chinese).
- [7] 夏光华. 罗非鱼皮胶原蛋白的性质及高值化利用研究 [D]. 海口: 海南大学, 2013.  
Xia G H. The properties and high value utilization research of tilapia skin collagen[D]. Haikou: Hainan University, 2013(in Chinese).
- [8] 华鑫. 利用罗非鱼鱼皮及刺参体壁制备 ACE 抑制肽 [D]. 厦门: 集美大学, 2017.  
Hua X. Preparation of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from tilapia skin and sea cucumber[D]. Xiamen: Jimei University, 2017(in Chinese).
- [9] 孙姗姗. 罗非鱼鱼皮胶原制备及其 ACE 抑制肽释放规律的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2018.  
Sun S S. Study on skin collagen preparation and ACE inhibitory peptides releasing pattern of *Oreochromis mossambicus*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2018(in Chinese).
- [10] 蔡金秀, 夏姗姗, 马佳雯, 等. 马面鱼皮 ACE 抑制肽的制备、分离纯化及稳定性[J]. 中国食品学报, 2022, 22(3): 225-234.  
Cai J X, Xia S S, Ma J W, et al. Preparation, isolation and stability of collagen ACE inhibitory peptides from the skin of *Navodon septentrionalis*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(3): 225-234 (in Chinese).
- [11] Yu F M, He K, Dong X Z, et al. Immunomodulatory activity of low molecular-weight peptides from *Nibea japonica* skin in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 68: 103888.
- [12] 董晓泽, 徐书敏, 王丽君, 等. 日本黄姑鱼鱼皮免疫活性肽的酶解制备工艺研究[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2020, 39(2): 110-116.  
Dong X Z, Xu S M, Wang L J, et al. Process optimization for preparation of immunoregulatory peptides from *Nibea japonica* by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2020, 39(2): 110-116 (in Chinese).

- [13] Atef M, Chait Y A, Ojagh S M, *et al.* Anti-salmonella activity and peptidomic profiling of peptide fractions produced from sturgeon fish skin collagen (*Huso huso*) using commercial enzymes[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2657.
- [14] Bernhard M. Selenium[M]. Switzerland: Springer Cham, 2018.
- [15] Liu R, Xing L J, Fu Q Q, *et al.* A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products[J]. *Antioxidants*, 2016, 5(3): 32.
- [16] Lin L, Li B F. Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86(14): 2290-2295.
- [17] Zhang X D, Dai Z Y, Zhang Y Q, *et al.* Structural characteristics and stability of salmon skin protein hydrolysates obtained with different proteases[J]. *LWT*, 2022, 153: 112460.
- [18] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642-646.
- [19] 吴佳南, 孙娜, 林松毅, 等. 鳕鱼皮明胶肽硒复合物的制备及结构表征[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 87-93.  
Wu J N, Sun N, Lin S Y, *et al.* Preparation and structural characterization of peptide-selenium complex from Hoki (*Macrurus novaezelandiae*) skin gelatin[J]. *Food Science*, 2021, 42(4): 87-93 (in Chinese).
- [20] Tang H Y, Huang Q, Wang Y L, *et al.* Development, structure characterization and stability of food grade selenium nanoparticles stabilized by tilapia polypeptides[J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 275: 109878.
- [21] Zhou C, Mi S, Li J, *et al.* Purification, characterisation and antioxidant activities of chondroitin sulphate extracted from *Raja porosa* cartilage[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 241: 116306.
- [22] Miriani M, Keerati-U-Rai M, Corredig M, *et al.* Denaturation of soy proteins in solution and at the oil-water interface: a fluorescence study[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(4): 620-626.
- [23] Gao H, Ma L, Li T Q, *et al.* Impact of ultrasonic power on the structure and emulsifying properties of whey protein isolate under various pH conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 81: 113-122.
- [24] Zhang Q T, Tu Z C, Xiao H, *et al.* Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. *Food and Bioprocess Processing*, 2014, 92(1): 30-37.
- [25] Zeng W C, Zhang Z, Gao H, *et al.* Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89(2): 694-700.
- [26] Liu K L, Du R F, Chen F S. Stability of the antioxidant peptide Semet-Pro-Ser identified from selenized brown rice protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2020, 319: 126540.
- [27] Marambe H K, Shand P J, Wanasundara J P D. Release of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein under simulated gastrointestinal digestion[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(17): 9596-9604.
- [28] Williams A P. Enzymic hydrolysis of food proteins[J]. *Food Chemistry*, 1987, 26: 81-82.
- [29] Peña-Ramos E A, Xiong Y L, Arteaga G E. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84(14): 1908-1918.
- [30] Nara M, Tanokura M. Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(1): 225-239.
- [31] 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.
- [32] Van dan Bertus B, Dijkstra B W, Vriend G, *et al.* Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 220(3): 981-985.
- [33] Escudero E, Mora L, Toldrá F. Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and *in vitro* digestion[J]. *Food Chemistry*, 2014, 161: 305-311.
- [34] 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.
- [35] 李洪艳. 真鲷鱼头制取鱼油及肽硒螯合物的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2013.  
Li H Y. Study on the preparation of fish oil and peptide-selenium chelates from red sea bream head[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2013(in Chinese).
- [36] Cui C, Zhao M M, Yuan B E, *et al.* Effect of pH and pepsin limited hydrolysis on the structure and functional properties of soybean protein hydrolysates[J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(12): C1871-C1877.
- [37] Wu H H, Liu Z Y, Zhao Y H, *et al.* Enzymatic prepara-

- tion and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein[J]. *Food Research International*, 2012, 48(2): 435-441.
- [38] Yuan B, Zhao C, Cheng C, *et al.* A peptide-Fe(II) complex from *Grifola frondosa* protein hydrolysates and its immunomodulatory activity[J]. *Food Bioscience*, 2019, 32: 100459.
- [39] 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.
- [40] Agrawal H, Joshi R, Gupta M. Isolation and characterisation of enzymatic hydrolysed peptides with antioxidant activities from green tender sorghum[J]. *LWT*, 2017, 84: 608-616.
- [41] 秦修远, 陆路, 崔欣悦, 等. 豌豆低聚肽硒螯合物的体外抗氧化作用[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(5): 53-58.  
Qin X Y, Lu L, Cui X Y, *et al.* Antioxidant effects *in vitro* of selenium-chelating pea oligopeptide[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(5): 53-58 (in Chinese).
- [42] 秦修远, 曹珂璐, 王雨辰, 等. 玉米低聚肽硒螯合物的体外抗氧化作用[J]. *食品科技*, 2019, 44(1): 297-301.  
Qin X Y, Cao K L, Wang Y C, *et al.* Antioxidant effects of selenium-chelating corn oligopeptide *in vitro*[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(1): 297-301 (in Chinese).
- [43] 陈濠. 灵芝蛋白肽-硒螯合物的制备及性质研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016.  
Chen H. Preparation and property research of *Ganoderma lucidum* peptide-selenium chelate[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016(in Chinese).
- [44] 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.
- [45] Wong F C, Xiao J B, Ong M G L, *et al.* Identification and characterization of antioxidant peptides from hydrolysate of blue-spotted stingray and their stability against thermal, pH and simulated gastrointestinal digestion treatments[J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 614-622.
- [46] Gallego M, Mora L, Reig M, *et al.* Stability of the potent antioxidant peptide SNAAC identified from spanish dry-cured ham[J]. *Food Research International*, 2018, 105: 873-879.
- [47] Mathews C K, van Holde K E. *Biochemistry*[M]. 4th ed. New York: Pearson, 2012.
- [48] 蔡金秀, 夏姗姗, 马佳雯, 等. 马面鱼皮胶原抗氧化肽的分离制备及稳定性研究[J]. *核农学报*, 2021, 35(11): 2569-2577.  
Cai J X, Xia S S, Ma J W, *et al.* Isolation, preparation and stability of collagen antioxidant peptides from the skin of *Navodon septentrionalis*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(11): 2569-2577 (in Chinese).
- [49] 王雨辰, 高丽辉, 韩涛, 等. 豌豆低聚肽在模拟胃肠消化体系中的抗氧化作用[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(4): 146-150,155.  
Wang Y C, Gao L H, Han T, *et al.* Antioxidant effect of pea oligopeptides in simulated gastrointestinal digestive system[J]. *Cereals & Oils*, 2021, 34(4): 146-150,155 (in Chinese).
- [50] 王贝贝, 于哲, 李强, 等. 模拟胃肠消化对羊皮胶原肽抗氧化活性的影响及其消化保护分析[J]. *食品科学*, 2022, 43(7): 128-138.  
Wang B B, Yu Z, Li Q, *et al.* Effects of simulated gastrointestinal digestion on antioxidant activity of sheepskin collagen peptides and their digestive protection[J]. *Food Science*, 2022, 43(7): 128-138 (in Chinese).

## Structure and antioxidant properties of tilapia skin hydrolysate and its selenium chelate

FENG Wenjing<sup>1</sup>, XIANG Huan<sup>2</sup>, HU Xiao<sup>2\*</sup>, LI Laihao<sup>2\*</sup>, CHEN Shengjun<sup>2</sup>, DENG Shanggui<sup>1</sup>

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

2. Key Lab of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** Selenium is one of the essential trace elements in the human body. Lack of selenium can lead to many diseases, such as Keshan disease, large bone disease and so on. Compared with inorganic selenium, organic selenium can cross the intestinal wall actively, so it is necessary to develop organic selenium with high biological activity. Selenium chelate, a collagen protease hydrolysate, has good antioxidant properties, can also supplement selenium and collagen for human body, and has high bioavailability. In order to make efficient use of tilapia by-product resources and provide theoretical basis for the industrialization of selenium chelate, tilapia skin collagen (TSC) was used as raw material for enzymatic hydrolysis by 4 kinds of proteases. The enzymolysis products of acid protease (TSCAc), papain enzymolysis product (TSCP), bromelain enzymolysis product (TSCB) and alkaline protease enzymolysis product (TSCAl) were obtained. Using Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> as the source of selenium, the hydrolysate with the highest selenium binding amount was prepared and screened. UV, fluorescence, FTIR and surface hydrophobicity of the enzyme hydrolysate and its selenium chelate were determined, and the antioxidant activity and antioxidant stability of the enzyme hydrolysate and its selenium chelate were analyzed. The hydrolysate of alkaline protease (TSCAl) had the highest hydrolysis degree (18.2%), and the proportion of molecular weight < 1 000 u was 53.7%, which was higher than that of other hydrolysates. The chelate of alkaline protease (TSCAl-Se) had the highest selenium binding amount (153.5 mg/g) and the selenium binding rate was 23.7%. After the chelation of TSCAl and selenium, the intensity of the absorption band at 210-238 nm wavelength decreased and showed a blue shift, and the intensity of the absorption band at 238 nm-300 nm wavelength increased. After the chelation of TSCAl and selenium, the fluorescence intensity of the fluorescence spectrum weakened, and the absorption peak red shifted 2 nm. After TSCAl chelated with selenium, in the infrared spectrum, the absorption peak of N-H moved from 3 280 cm<sup>-1</sup> to 3 365 cm<sup>-1</sup>, the absorption peak of O-H shifted from 1 393 cm<sup>-1</sup> to 1 400 cm<sup>-1</sup>, another absorption peak of O-H moved from 1 446 cm<sup>-1</sup> to 1 456 cm<sup>-1</sup>, the absorption peak of C-H shifted from 2 929 cm<sup>-1</sup> to 2 930 cm<sup>-1</sup>, the absorption peak of C=O shifted from 1 635 cm<sup>-1</sup> to 1 652 cm<sup>-1</sup>. These indicate that TSCAl and selenium combine to form a new substance. The IC<sub>50</sub> values of TSCAl, TSCAl-Se and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> for scavenging OH radicals were 6.6 mg/mL, 0.05 mg/mL and 0.17 mg/mL, respectively. The antioxidant activity of TSCAl and TSCAl-Se fluctuated slightly at different temperature but was relatively stable. The antioxidant stability of them decreased at 100 °C. With the increase of pH, the antioxidant activity slowly increased first and then decreased, and reached the highest value at pH=7. These results indicate that the selenium chelate of alkaline protease hydrolysate of tilapia skin collagen has good antioxidant activity and antioxidant stability, which provides a theoretical basis for the research and development of selenium dietary supplements and antioxidant.

**Key words:** tilapia; fish skin; collagen; selenium; enzymatic hydrolysate; chelate; structure; antioxidant

**Corresponding authors:** HU Xiao. E-mail: hnhuxiao@163.com;

LI Laihao. E-mail: laihaoli@163.com

**Funding projects:** National Characteristic Freshwater Fish Industry Technology System (CARS-46); Introduction of Innovation and Entrepreneurship Team Project of Maoming City (200201095834980); Key-area Research and Development Program of Guangdong Province (2021B0202060001); Special Project for Guangdong Enterprise Science and Technology Commissioners (GDKTP2021035300); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD69); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Funds, South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS (2021SD06); Special Support Program for High-level Talents of Zhejiang Province (2021R51006)