

文章编号: 1000-0615(2019)04-1245-10

DOI: 10.11964/jfc.20170910960

## 胰蛋白酶酶解制备孔鲷软骨蛋白寡肽及其抗氧化活性

杨帆<sup>1</sup>, 栗丽<sup>1</sup>, 陈荫<sup>1</sup>, 王斌<sup>1\*</sup>, 王加斌<sup>2</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 316021)

**摘要:** 以孔鲷软骨为材料, 采用盐酸胍抽提、丙酮分级沉淀, 制备孔鲷软骨蛋白; 以DPPH·和HO·清除活性为导向, 采用胰蛋白酶酶解、膜超滤、DEAE-52阴离子交换层析、Sephadex G-15凝胶层析和反相高效液相色谱(RP-HPLC)等技术, 制备抗氧化肽, 并对其活性进行系统评价。结果显示, 孔鲷软骨蛋白经胰蛋白酶酶解和分离纯化得到2个抗氧化肽RCPE-A和RCPE-B, 经氨基酸序列分析确定其序列分别为Gly-Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Gly (GEEGPRG)和Gly-Glu-Glu-Gly-Thr-Met-Gly-Leu (GEEGTMGL), 质谱(ESI-MS)测定其分子量分别为700.71和792.87 u。体外自由基清除实验结果显示, RCPE-A与RCPE-B对DPPH·(EC<sub>50</sub> 2.94和1.16 mg/mL)、HO·(EC<sub>50</sub> 0.34和0.54 mg/mL)、ABTS<sup>+</sup>·(EC<sub>50</sub> 0.34和0.10 mg/mL)和O<sub>2</sub><sup>-</sup>·(EC<sub>50</sub> 0.11和0.03 mg/mL)具有良好的清除作用, RCPE-A与RCPE-B亦显示出较强的脂质过氧化抑制作用。研究表明, 孔鲷软骨蛋白酶解物及制备多肽可用于抗氧化相关的功能食品开发, 也可以用作抗氧化剂延长相关产品的货架期。

**关键词:** 孔鲷; 软骨; 多肽; 抗氧化活性; 自由基清除活性

**中图分类号:** TS 254.9

**文献标志码:** A

生物活性肽是由2~20个氨基酸残基构成的一类具有多种生物学功能的长链或环状结构化合物, 其参与调节生长发育, 促进免疫、调节激素水平及影响细胞衰老死亡等多种生命活动<sup>[1-3]</sup>。酶法降解蛋白质由于酶解过程易于定向控制, 产品安全等优势成为活性肽制备的常用方法, 制备的活性肽既可以提供人体所需的营养物质, 还能作为添加剂用于药物或者保健品开发<sup>[3-4]</sup>。

近年来, 国内外学者对酶解制备活性肽进行了广泛研究, 而以莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)<sup>[5]</sup>、紫贻贝(*Mytilus eduli*)<sup>[6]</sup>、鳀(*Katsuwonus pelamis*)<sup>[7-8]</sup>、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)<sup>[9-10]</sup>等海水产品及其下脚料为原料制备抗氧化肽成为重要的研究领域。张昱等<sup>[11]</sup>利用Alcalase水解蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)鱼皮胶原蛋白, 利用膜超滤技术制备分子量在1~4 ku的活性肽组分Fraction II, 其对D-Gal诱导的氧

化损伤大鼠肝脏具有较好的保护作用, 可以显著降低血清中的谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性, 提高肝脏组织的抗氧化酶活性和总抗氧化能力。向泽敏等<sup>[12]</sup>研究结果表明, 酶解鳀制备抗氧化肽的最佳酶种为复合蛋白酶, 响应面法优化的最佳工艺为加酶量8.53 U/mg、pH 5.54、温度50.03 °C、时间5.07 h; 小于3 ku的超滤组分具有较强的DPPH自由基(DPPH·)清除活性, 半数清除浓度(EC<sub>50</sub>值)为0.37 mg/mL。Chi等<sup>[13-14]</sup>以马面鲷(*Navodon septentrionalis*)鱼皮和鱼头为原料制备的抗氧化肽GSGGL、GPGGFI、FIGP、WEGPK、GPP和GVPLT对DPPH·、羟自由基(HO·)、ABTS自由基(ABTS<sup>+</sup>·)和超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)具有良好的清除能力, 并显示出了良好的脂质过氧化抑制作用。

孔鲷(*Raja porosa*)别名喀氏鲷, 属于软骨鱼纲(Chondrichthyes)、鲛形目(Rajiformes)、鲛科

收稿日期: 2017-09-10 修回日期: 2018-01-23

资助项目: 国家自然科学基金(81673349)

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

(Rajidae)、鳐属(*Raja*)。研究证明孔鳐软骨富含多糖、蛋白、多肽等活性物质<sup>[15]</sup>。罗红宇等<sup>[16]</sup>对微波辅助提取孔鳐软骨多糖的工艺进行了优化,制备的多糖具有显著的抗氧化和血管生成抑制活性;Chi等<sup>[17]</sup>和Li等<sup>[18]</sup>对孔鳐软骨胶原蛋白及其酶解物的性质进行了细致研究,结果表明,软骨含有I型和II型胶原蛋白,分子量与胶原蛋白酶解物的抗氧化活性成反比,与溶解度、发泡能力和乳化性能成正比。Pan等<sup>[19-20]</sup>采用胰蛋白酶/碱性蛋白酶(1:3)双酶复合体系水解孔鳐软骨蛋白,利用超滤和色谱技术从酶解物中制备3个抗氧化多肽FIMGPY、GPAGDY和IVAGPQ,其对DPPH $\cdot$ 、HO $\cdot$ 、ABTS $^+$ 和O $_2^-$  $\cdot$ 具有良好的清除能力,另外FIMGPY对人宫颈癌HeLa细胞的半数抑制浓度(IC $_{50}$ )为4.81 mg/mL,并可通过升高Bcl-2/Bax比值和Caspase-3的蛋白表达水平诱导HeLa细胞凋亡。为了深入研究孔鳐软骨抗氧化肽,本实验采用胰蛋白酶酶解孔鳐软骨蛋白,并对酶解物中的抗氧化肽及其活性进行了系统研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

孔鳐购于舟山市南珍菜场,种属由浙江海洋大学赵盛龙教授鉴定,标本存放于浙江海洋大学食品与医药学院药学系实验室。盐酸胍、DPPH、ABTS和胰蛋白酶(20 000 U/g)购于美国Sigma公司;DEAE-52、Sephadex G-15购于上海源聚生物工程有限公司;乙腈购于美国Fisher Scientific公司;其他试剂为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 实验方法

**孔鳐软骨总蛋白的提取** 取孔鳐软骨500 g切成碎块[小于0.5 cm $\times$ 0.5 cm],加入适量蒸馏水匀浆后,浸于5倍体积的1.0 mol/L盐酸胍溶液中(含0.02 mol/L MES和0.02 mol/L EDTA, pH 7.6),4 $^{\circ}$ C搅拌抽提48 h,于4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心20 min,上清液透析脱盐,于冰浴下缓慢加入预冷丙酮至其浓度为30%, $-20^{\circ}$ C下静置4 h后,于4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min高速离心20 min,沉淀为孔鳐软骨30%丙酮沉淀蛋白(RP30);上清液继续加入预冷丙酮至最终丙酮浓度为60%, $-20^{\circ}$ C下静置4 h后,于4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min高速离心20 min,

沉淀为孔鳐软骨60%丙酮沉淀蛋白(RP60),冻干,备用。

**孔鳐软骨蛋白的酶解** 取RP60按照料液比1:3加入到磷酸盐缓冲液中(0.5 mol/L),调溶液温度至40 $^{\circ}$ C, pH 8.0,加入总量为蛋白质量2.5%的胰蛋白酶,水解4 h后,于90 $^{\circ}$ C下保温10 min灭酶活,酶解液于4 $^{\circ}$ C、9 000 r/min离心20 min,收集上清液(RCPH)备用。

**孔鳐软骨蛋白抗氧化肽的制备** ①超滤。将RCPH用截留分子量为10 ku的超滤膜进行分段,得到RCPH-I (MW<10 ku)和RCPH-II (MW>10 ku)2个组分,脱盐冻干,测DPPH $\cdot$ 和HO $\cdot$ 清除活性。

②离子交换层析。将DPPH $\cdot$ 和HO $\cdot$ 清除活性最强的超滤组分配成50.0 mg/mL的溶液,用0.22  $\mu$ m微孔滤膜除去不溶物,取4 mL缓慢加入预处理好的DEAE-52阴离子交换树脂层析柱中(直径 $\times$ 柱长:2 cm $\times$ 100 cm),分别用90 mL的水、0.1、0.5和1.0 mol/L NaCl溶液梯度洗脱,流速为0.6 mL/min,洗出溶液每5 min收集一管,并于280 nm检测吸光值,按峰合并试管内溶液,选择DPPH $\cdot$ 和HO $\cdot$ 清除能力最强峰冻干,备用。

③Sephadex G-15凝胶过滤层析。将DPPH $\cdot$ 和HO $\cdot$ 清除活性最强的离子交换层析组分配成10.0 mg/mL的溶液,用0.22  $\mu$ m微孔滤膜除去不溶物,取4 mL加入到预先处理好的Sephadex G-15层析柱(2.0 cm $\times$ 160 cm),用超纯水于0.6 mL/min流速下洗脱,每3 min收集一管,于280 nm检测吸光值,按峰合并试管内溶液,比较各峰的DPPH $\cdot$ 和HO $\cdot$ 清除能力,选择抗氧化能力最强组分冻干,备用。

④反相高效液相色谱(RP-HPLC)纯化。将DPPH $\cdot$ 和HO $\cdot$ 清除能力最强的凝胶层析组分配成100.0  $\mu$ g/mL的溶液,用0.22  $\mu$ m微孔滤膜除去不溶物,利用RP-HPLC纯化,色谱条件:高效液相色谱仪为Agilent 1260;色谱柱为Zorbax C $_{18}$ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);柱温为25 $^{\circ}$ C;流动相为水—乙腈;梯度洗脱为0~32 min (0%~50%乙腈), 33~34 min (50%~100%乙腈), 35~37 min (100%乙腈);进样体积为100  $\mu$ L;流速为0.8 mL/min;检测波长为280 nm。

**多肽的氨基酸序列检测和分子量测定** 多肽的氨基酸序列分析采用N-端分析法,利用

ABI 494蛋白/多肽测序仪进行测定。分子量采用ESI-MS进行测定。

**抗氧化试验** DPPH·、HO·、ABTS<sup>+</sup>和O<sub>2</sub>·清除实验,以及脂质过氧化实验按照文献<sup>[21]</sup>描述的方法进行。半数清除率(EC<sub>50</sub>)定义为自由基清除率为50%时的样品浓度。

## 2 结果

### 2.1 孔鲷软骨蛋白与酶解物的制备及抗氧化活性

孔鲷软骨组织匀浆液经盐酸胍抽提、透析和丙酮分级沉淀,得到30%丙酮沉淀蛋白(RP30) 2.74 g,得率为0.55%;60%丙酮沉淀蛋白(RP60) 3.59 g,得率为0.72%。制备蛋白的抗氧化活性结果显示,在20 mg/mL浓度下,RP60的DPPH·和HO·清除活性均高于RP30,故选择RP60进行酶解。RP60经胰蛋白酶在40 °C、pH 8.0条件下酶解4 h,得酶解物RCPH, RCPH在20.0 mg/mL浓度下对DPPH·和HO·清除率分别为62.4%±1.87%和65.9%±2.34%,高于RP30和RP60的活性(表1)。

表1 孔鲷软骨蛋白、酶解物和超滤分段组分的DPPH·和HO·清除活性

组别 groups	DPPH·清除率±RSD DPPH· scavenging rate	·OH清除率±RSD ·OH scavenging rate
RP30(20.0 mg/mL)	13.7±1.26	16.5±1.47
RP60(20.0 mg/mL)	31.8±1.77	28.3±1.14
RCPH (20.0 mg/mL)	62.4±1.87	65.9±2.34
RCPH-I (20.0 mg/mL)	69.2±2.62	73.9±2.45
RCPH-II (20.0 mg/mL)	48.1±2.33	59.1±1.75

### 2.2 孔鲷软骨蛋白抗氧化肽的制备

**超滤** RCPH用截留分子量为10 ku的超滤膜分段,得RCPH-I (MW<10 ku)和RCPH-II (MW>10 ku)2个组分,抗氧化实验结果表明,在20.0 mg/mL浓度下,RCPH-I对DPPH·和HO·的清除率为69.2%±2.62%和73.9%±2.45%,高于RCPH-II和RCPH(表1),与Li等<sup>[18]</sup>和Chi等<sup>[22]</sup>报道蛋白酶解物的抗氧化活性与其平均分子量成负相关的结果相一致。因此,本实验选择富含更多的小分子抗氧化肽的RCPH-I做进一步的纯化。

**DEAE-52阴离子交换层析** RCPH-I样品经DEAE-52阴离子交换层析分离,获得3个活性组分(RCPH-I-1、RCPH-I-2和RCPH-I-3)(图1)。自由基清除活性结果表明,在10.0 mg/mL浓度下,RCPH-I-3的DPPH·与HO·清除率分别为58.12%±1.09%和81.82%±1.88%,均高于RCPH-I [DPPH·(39.14%±1.58%), HO·(63.52%±2.03%)], RCPH-I-1 [DPPH·(34.26%±1.14%), HO·(55.89%±2.58%)]和RCPH-I-2 [DPPH·(40.94%±1.38%), HO·(73.53%±2.21%)]的活性(图2)。因此,选择RCPH-I-3做进一步的纯化。

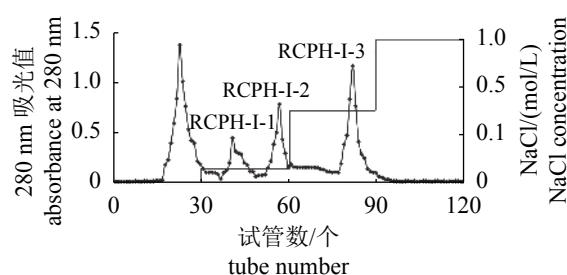


图1 RCPH-I的DEAE-52阴离子交换层析分步洗脱曲线图

Fig. 1 Anion-exchange chromatography of RCPH-I on a DEAE-52 cellulose column

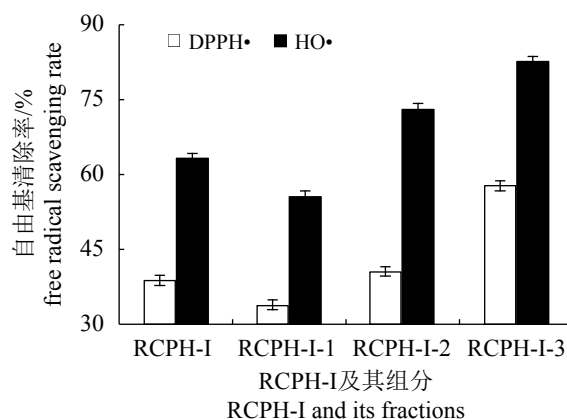


图2 RCPH-I及其各组分在10.0 mg/mL浓度时的DPPH·和HO·清除率

Fig. 2 DPPH· and HO· scavenging rates of three fractions from RCPH-I at the concentration of 10.0 mg/mL

**Sephadex G-15 凝胶过滤层析** RCPH-I-3经Sephadex G-15凝胶色谱柱分离获得RCPH-I-3A和RCPH-I-3B(图3),自由基清除活性结果表明,在5.0 mg/mL的浓度下,RCPH-I-3A对DPPH·与

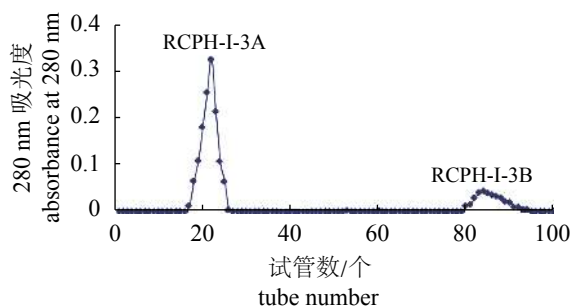


图3 RCPH-I-3的葡聚糖凝胶G-15柱层析曲线图

Fig. 3 Gel filtration chromatography of RCPH-I-3 on a Sephadex-15 column

HO•的清除率分别为 $46.53\% \pm 1.95\%$ 和 $53.42\% \pm 1.64\%$ , 均高于RCPH-I [DPPH•( $20.18\% \pm 1.52\%$ ), HO•( $33.25\% \pm 1.66\%$ )], RCPH-I-3 [DPPH•( $35.76\% \pm 1.36\%$ ), HO•( $47.63\% \pm 1.87\%$ )]和RCPH-I-3B [DPPH•( $30.72\% \pm 1.63\%$ ), HO•( $38.63\% \pm 1.58\%$ )]的活性(图4)。因此, 选择RCPH-I-3A做进一步的纯化。

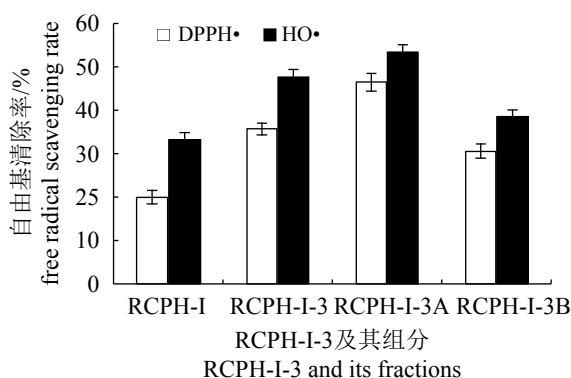


图4 RCPH-I-3及其凝胶过滤组分在5.0 mg/mL浓度时的DPPH•和HO•清除活性

Fig. 4 DPPH• and HO• scavenging rate of RCPH-I-3 and its fractions by Sephadex G-15 gel filtration chromatography at the concentration of 5.0 mg/mL

**RP-HPLC分离纯化** RCPH-I-3A经Zorbax C<sub>18</sub>柱洗脱后, 按色谱峰收集保留时间为20.184 min (RCPE-A)和22.294 min (RCPE-B)组分(图5), RCPE-A和RCPE-B在5.0 mg/mL浓度下对DPPH•和HO•显示出较强的清除作用, 纯度经RP-HPLC检测达到序列分析要求。

### 2.3 多肽的氨基酸序列分析和质谱分析

经蛋白质序列分析仪测定, RCPE-A为7肽, 序列为Gly-Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Gly (GEEGPRG), ESI-MS检测分子量为700.71 u ( $701.74 \text{ u} [\text{M}+\text{H}]^+$ )

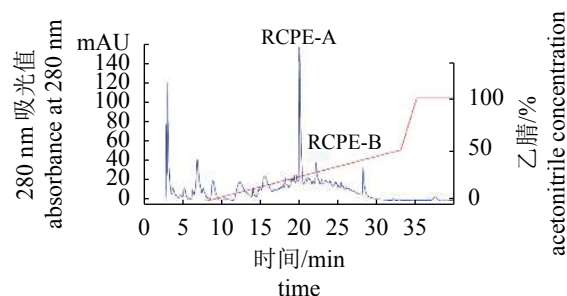


图5 RCPH-I-3A的RP-HPLC图

Fig. 5 RP-HPLC profile of RCPH-I-3A on a Zorbax C18 column

(图6), 与理论分子量(700.66 u)基本吻合; RCPE-B为8肽, 序列是Gly-Glu-Glu-Gly-Thr-Met-Gly-Leu (GEEGTMGL), ESI-MS检测分子量为792.87 u ( $793.11 \text{ u} [\text{M}+\text{H}]^+$ )(图6), 与理论分子量(792.82 u)基本吻合。

### 2.4 抗氧化活性

**DPPH•清除活性** RCPE-A和RCPE-B在0.1~5.0 mg/mL浓度内对DPPH•清除率结果表明, 随着浓度增加, RCPE-A和RCPE-B对DPPH•的清除能力也随之增强, 呈现明显的量效关系, EC<sub>50</sub>值分别为2.94和1.16 mg/mL (图7)。RCPE-B的DPPH•清除能力明显强于RCPE-A。另外, RCPE-B的EC<sub>50</sub>值也低于多肽GFGPL (2.249 mg/mL)、VGGRP (2.937 mg/mL)<sup>[23]</sup>、TTANIEDRR (2.503 mg/mL)<sup>[24]</sup>、FIMGPY (2.60 mg/mL)、GPAGDY (3.48 mg/mL)、IVAGPQ (3.93 mg/mL)<sup>[20]</sup>、GPE (2.43 mg/mL)、GARGPQ (2.66 mg/mL)和GFTGPPGFNG (1.99 mg/mL)<sup>[25]</sup>的EC<sub>50</sub>值。因此, RCPE-B对DPPH•具有较强的清除能力, 可在抗氧化体系中作为质子供体参与反应, 消除自由基的损伤。

**HO•清除活性** RCPE-A和RCPE-B在浓度0.1~5.0 mg/mL范围内的HO•清除率结果表明, RCPE-A和RCPE-B对HO•的清除能力随着样品浓度的增加而增加。RCPE-A的EC<sub>50</sub>值为0.34 mg/mL, 低于RCPE-B的0.54 mg/mL, 且在所测浓度范围内RCPE-A的HO•清除活性明显高于同浓度的抗坏血酸(图8)。同时, RCPE-A的EC<sub>50</sub>值也低于FPELLI (0.57 mg/mL)<sup>[26]</sup>、FIMGPY (3.04 mg/mL)、GPAGDY (3.92 mg/mL)、IVAGPQ (5.03 mg/mL)<sup>[20]</sup>、PYSFK (2.283 mg/mL)、GFGPL (1.612 mg/mL)和VGGRP (2.055 mg/mL)<sup>[23]</sup>。HO•生物体内可杀死红细胞, 降解DNA、细胞膜和多糖, 破坏作用

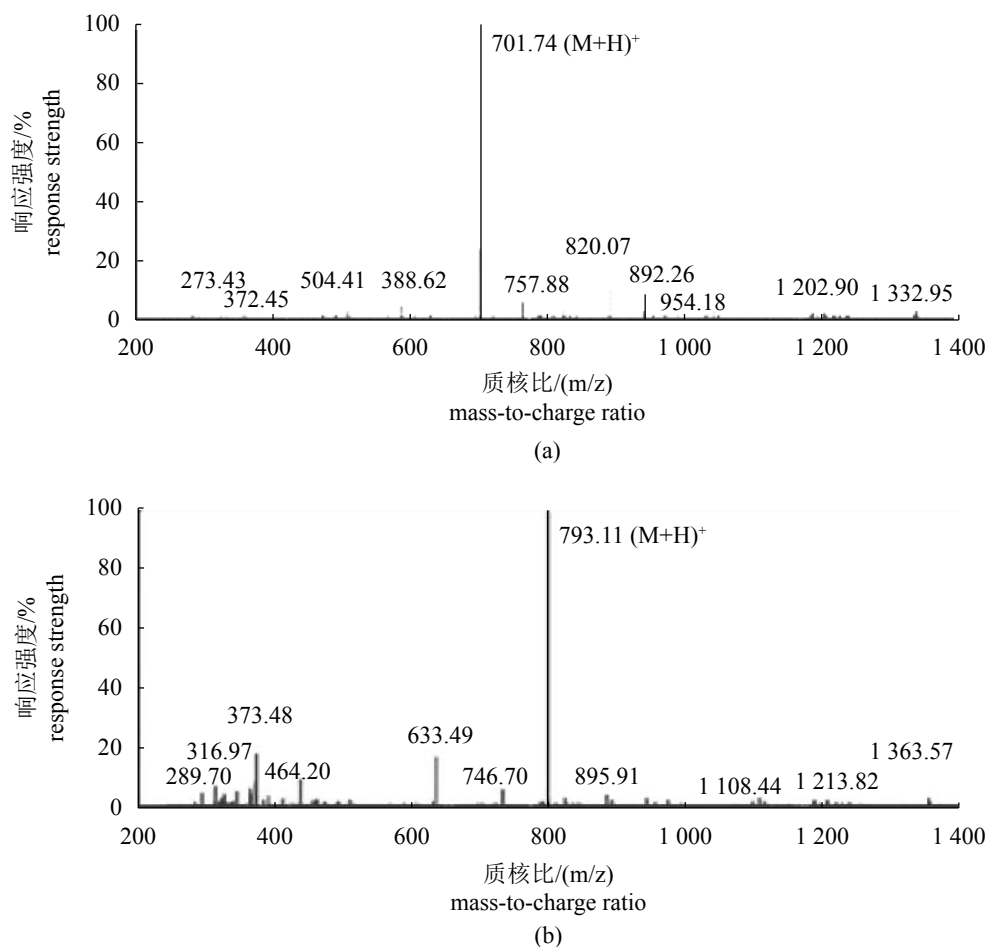


图 6 RCPE-A (a)和RCPE-B (b)的质谱图

Fig. 6 Mass spectrogram of RCPE-A (a) and RCPE-B (b)

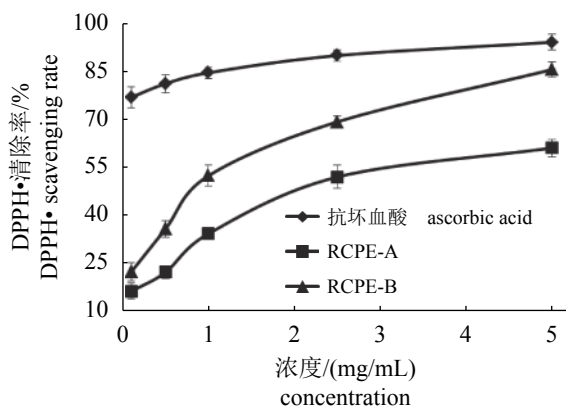


图 7 RCPE-A和RCPE-B的DPPH清除能力

Fig. 7 DPPH scavenging activities of RCPE-A and RCPE-B

极强。RCPE-A对HO•具有较强的清除作用，可用于消除由HO•引起的机体损伤。

ABTS<sup>+</sup>清除活性 随着浓度从0.1 mg/mL上升至5.0 mg/mL，RCPE-A和RCPE-B对ABTS<sup>+</sup>

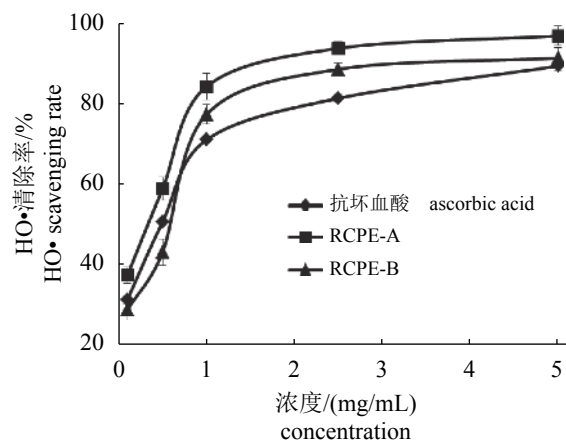


图 8 RCPE-A与RCPE-B的HO清除能力

Fig. 8 HO scavenging activities of RCPE-A and RCPE-B

的清除能力也随之增加，且RCPE-B的活性强于同浓度的RCPE-A (图9)。RCPE-B的EC<sub>50</sub>值为0.10 mg/mL，低于RCPE-A的0.34 mg/mL，也低于

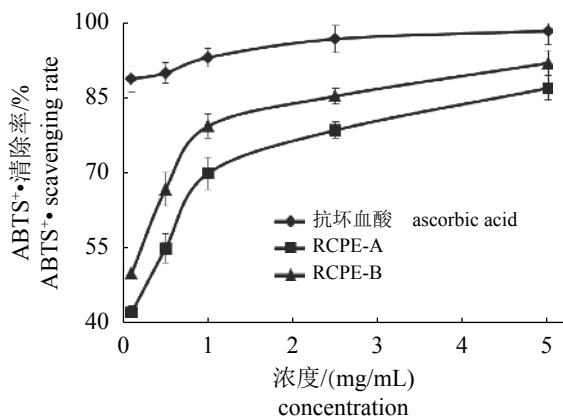


图9 RCPE-A与RCPE-B的ABTS<sup>•</sup>清除能力

Fig. 9 ABTS<sup>•</sup> scavenging activities of RCPE-A and RCPE-B

多肽WEGPK (5.407 mg/mL)、GPP (2.472 mg/mL)、GVPLT (3.124 mg/mL)<sup>[14]</sup>、FIMGPY (1.04 mg/mL)、GPAGDY (0.77 mg/mL)、IVAGPQ (1.29 mg/mL)<sup>[20]</sup>、GFGPL (0.328 mg/mL)、VGRP (0.465 mg/mL)<sup>[23]</sup>、GPE (0.24 mg/mL)、GARGPQ (0.18 mg/mL)、GFTGPPGFNG (0.29 mg/mL)<sup>[24]</sup>、FPELLI (0.40 mg/mL)和VFAAL (0.38 mg/mL)<sup>[26]</sup>的EC<sub>50</sub>值。因此, RCPE-B具有较强的ABTS<sup>•</sup>清除能力。

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除活性** RCPE-A和RCPE-B在浓度为0.05~5 mg/mL范围内可剂量依赖性地清除系统内过量的O<sub>2</sub><sup>-</sup>(图10)。RCPE-B的EC<sub>50</sub>值为0.03 mg/mL, 低于RCPE-A (0.11 mg/mL)、GPAGPAGQEG (0.38 mg/mL)<sup>[8]</sup>、YLMR (0.450 mg/mL)、VLYEE (0.693 mg/mL)、MILMR (0.993 mg/mL)<sup>[9]</sup>、FIMGPY (1.61 mg/mL)、GPAGDY (1.66 mg/mL)、

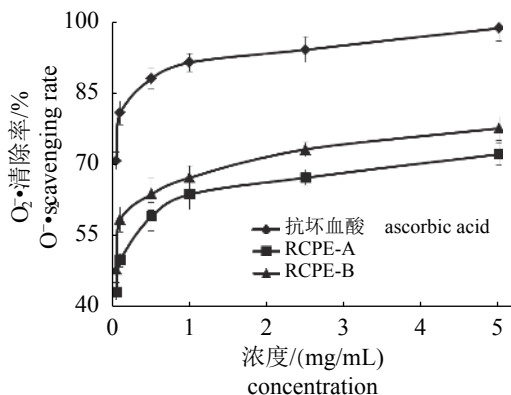


图10 RCPE-A与RCPE-B的O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力

Fig. 10 O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging activities of RCPE-A and RCPE-B

IVAGPQ (1.82 mg/mL)<sup>[20]</sup>、GPE (0.10 mg/mL)、GARGPQ (0.14 mg/mL)和GFTGPPGFNG(0.11 mg/mL)<sup>[24]</sup>等多肽的EC<sub>50</sub>值。O<sub>2</sub><sup>-</sup>在人体内能引发体内脂质过氧化, 加快从皮肤到内部器官整个机体的衰老过程, 并可诱发皮肤病变、心血管疾病、癌症等。机体内通过超氧化物歧化酶(SOD)将其转化成过氧化氢和氧气除去。因此, RCPE-B可能具有类似SOD的作用, 减轻过量的O<sub>2</sub><sup>-</sup>对机体的损伤。

**脂质过氧化抑制实验** 各种自由基清除实验的机制有所差异, 难以综合地反映多肽对脂质过氧化的抑制作用。例如本实验中, RCPE-B的DPPH<sup>•</sup>、ABTS<sup>•</sup>和O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力强于RCPE-A, 而HO<sup>•</sup>的清除活性弱于RCPE-A。因此, 常采用脂质过氧化抑制实验评价化合物的抗氧化活性。以BHT为阳性对照, 将RCPE-A和RCPE-B配成浓度为5.0 mg/mL的溶液加入到亚油酸体系中, 于40 °C恒温孵育7 d, 每天记录500 nm吸光值, 吸光值低, 表示体系氧化程度低, 所测样品的脂质过氧化抑制能力强。实验结果表明, 空白组的吸光值最大, 氧化程度最高; BHT组吸光值最低, 氧化程度最低, 其抗氧化能力最强; RCPE-A和RCPE-B组的脂质过氧化水平明显低于空白组, 但略高于同浓度的BHT(图11)。因此, RCPE-A和RCPE-B具有明显的脂质过氧化抑制能力, 且RCPE-B的抗脂质过氧化能力强于RCPE-A。另外, BHT作为化学合成抗氧化剂存在多种风险, 而RCPE-A和RCPE-B来源于食用蛋白, 相对更加安全, 使用过程中可通过增加用量以抵消活性较弱的不足。

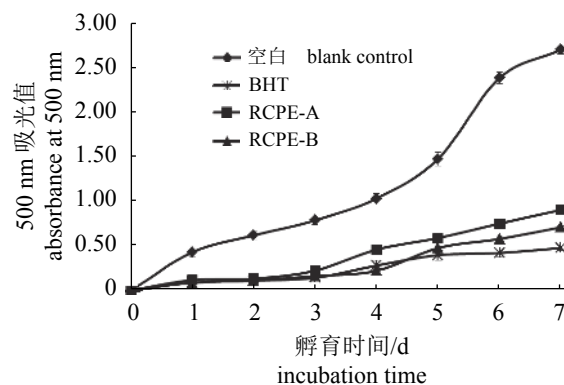


图11 RCPE-A与RCPE-B的抗脂质过氧化能力

Fig. 11 Lipid peroxidation inhibition assays of RCPE-A and RCPE-B

### 3 讨论

根据联合国粮农组织(FAO)报告,每年捕捞和养殖的水产鱼类约有1.45亿t,而加工过程中会产生15%以上的副产物,给环境带来了巨大压力<sup>[9]</sup>。Roslana等<sup>[27]</sup>报道鱼类加工副产物中蛋白含量为7%~35%,且富含蛋氨酸和赖氨酸,是优质的蛋白资源。因此,充分利用水产品加工下脚料进行高附加值海洋功能产品开发,既可以解决环境保护难题,还可以满足人们养生保健的需求。目前,海洋多肽的研究主要集中于抗氧化肽、降压肽、抗肿瘤肽等方面,且已从海洋生物中分离制备多种抗氧化肽(表2)。Je等<sup>[28]</sup>利用胃蛋白酶水解金枪鱼鱼骨,并从中制备多肽VKAGFAWTANQQLS,其在1.2 mg/mL浓度下对DPPH $\cdot$ 和HO $\cdot$ 的清除率分别为80%和70%,且具有较强的脂质过氧化抑制作用。Chi等<sup>[14, 29]</sup>以绿鳍马面鲀(*Navodon septentrionalis*)鱼头和鱼皮为实验材料制备WDR、PYPFNK、LDK、GPE、GARGPQ和GFTGPPGFNG等6个活性肽,其对DPPH $\cdot$ (EC<sub>50</sub>分别为4.438、1.927、4.541、0.405、0.194和0.118 mg/mL)、HO $\cdot$ (EC<sub>50</sub>分别为5.567、2.385、

4.149、0.179、0.089和0.073 mg/mL)和O<sub>2</sub> $\cdot^-$ (EC<sub>50</sub>分别为3.223、4.668、2.881、0.563、0.564和0.311 mg/mL)具有较强的清除作用,并显示出良好的脂质过氧化抑制作用。本实验以孔鳐软骨为材料,制备的抗氧化肽GEEGPRG和GEEGTMGL具有较强的自由基清除活性和脂质过氧化抑制作用,可用于抗氧化相关的药物、功能产品开发,为软骨鱼类软骨的高效利用提供了理论依据和技术支持。

多肽的结构特征决定其生物学功能,同时也可以指导预测多肽的活性和定向制备。已有研究证明:分子量大小对多肽的生物活性具有重要影响,2~10肽相对于蛋白质和氨基酸更易于在体内吸收,具有更强的抗氧化活性<sup>[30]</sup>;Li等<sup>[18]</sup>和Chi等<sup>[22]</sup>报道蛋白酶解物的抗氧化活性与其平均分子量成负相关;Sila等<sup>[3]</sup>报道分子量较小的多肽供氢基团更易与自由基结合,发挥其自由基清除作用。因此,GEEGPRG和GEEGTMGL分别为7肽和8肽复合物,分子量较小,在抗氧化体系中更容易与自由基结合,发挥其自由基清除作用。

氨基酸组成也是影响多肽功能的重要因素,

表2 海洋生物来源的部分抗氧化肽

Tab. 2 Antioxidant peptides from marine organisms

物种 species	加工副产物 by-products	多肽序列 peptides sequence
鳀 <i>K. pelamis</i>	鱼骨	VKAGFAWTANQQLS、GPAGPAGQEG
	暗色肉	LPTSEAAKY、PMDYMT
沙丁鱼 <i>Sardina pilchardus</i>	鱼头和内脏蛋白	LHY、LARL、GGE、GAH、GAWA、PHYL、GALAAH
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	鱼鳞明胶	DPALATEPDPMPF
大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	鱼鳍	FLNEFLHV
绿鳍马面鲀 <i>N. septentrionalis</i>	鱼头	WEGPK、GPP、GVPLT
	鱼皮	GSGGL、GPGGFI、FIGP
紫贻贝 <i>M. eduli</i>	肉	YPPAK
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	鱼肉	YLMSR、VLYEE、MILMR
鮫 鱈 <i>Lophius litulon</i>	鱼肉	EWPAQ、FLHRP、LMGQW
路氏双髻鲨 <i>Sphyrna lewini</i>	鱼肉	WDR、PYPFNK、LDK
	软骨	GPE、GARGPQ、GFTGPPGFNG
孔鳐 <i>R. poros</i>	软骨	FIMGPY、GPAGDY、IVAGPQ
	鱼肉	APPTAYAQS、NWDMEKIWD
灰星鲨 <i>Mustelus griseus</i>	鱼肉	GAA、GFVG、GHSHR、ELLI、KFPE

Nimalaratne等<sup>[31]</sup>和Chen等<sup>[32]</sup>报道Gly残基使得多肽结构具有更强的柔韧度,其侧链上的氢原子可以作为质子供体中和自由基。因此,RCPE-A与RCPE-B为胶原肽,氨基酸序列为Gly-X-Y的重复单元,Gly的存在使得其易于变型增加与自由基接触的几率,同时Gly残基侧链上的氢原子亦可作为质子供体中和自由基。

Marcuse<sup>[33]</sup>和Guo等<sup>[34]</sup>报道氨基酸序列中的疏水性氨基酸和芳香族氨基酸,如Tyr、Met、His、Lys和Trp等可增强多肽的活性;Xing等<sup>[35]</sup>报道多肽序列中的疏水性氨基酸(如Pro和Met)依靠其侧链的疏水作用帮助多肽与疏水性自由基结合,更好地发挥抗氧化活性。因此,RCPE-A与RCPE-B富含的Pro、Met和Leu等残基促进多肽与自由基的结合,增强其抗氧化活性。

Chang等<sup>[36]</sup>报道多肽NTDGSTDYGILQINSR和LDEPDPLI中的碱性氨基酸(Arg)和酸性氨基酸(Glu、Asp)对其活性具有关键作用。而RCPE-A与RCPE-B中含有酸性氨基酸(Glu)和碱性氨基酸(Arg)等残基,对其抗氧化活性亦具有积极影响。因此,孔鳐软骨胰蛋白酶酶解物及制备的多肽具有显著的自由基清除和脂质过氧化抑制活性,可作为原料或添加剂用于抗氧化相关的功能产品开发。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Yoshikawa M. Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects[J]. *Peptides*, 2015, 72: 208-225.
- [ 2 ] 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.
- [ 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 ] Halim N R A, Sarbon N M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: a comprehensive review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 51: 24-33.
- [ 5 ] Silva J F X, Ribeiro K, Silva J F, *et al.* Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 196: 96-106.
- [ 6 ] Wang B, Li L, Chi C F, *et al.* Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2-3): 1713-1719.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] 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 of an antioxidant peptide from collagen hydrolysate of skipjack tuna fishbone[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 143-148(in Chinese).
- [ 9 ] 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.
- [10] 李致瑜, 庄玮婧, 张宁宁, 等. Alcalase蛋白酶酶解大黄鱼内脏制备抗氧化肽[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(8): 109-117.  
Li Z Y, Zhuang W J, Zhang N N, *et al.* Preparation of antioxidative peptide from *Pseudosciaena crocea*'s viscera hydrolysed by Alcalase[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(8): 109-117(in Chinese).
- [11] 张昱, 彭新颜, 黄萍萍, 等. 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽 Fraction II 对D-Gal诱导氧化损伤大鼠肝脏的保护作用[J]. *水产学报*, 2017, 41(6): 944-951.  
Zhang Y, Peng X Y, Huang P P, *et al.* Protective effects of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) skin peptides against D-Gal-induced liver damage in rats[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(6): 944-951(in Chinese).
- [12] 向泽敏, 邱晓挺, 姜永江, 等. 鳀蛋白抗氧化酶解物制备工艺[J]. *水产学报*, 2017, 41(6): 962-970.  
Xiang Z M, Qiu X T, Lou Y J, *et al.* Methodology of the preparation of enzymatic hydrolysates with antioxidant activity of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) swim bladder protein[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(6): 962-970(in Chinese).
- [13] Chi C F, Wang B, Wang Y M, *et al.* Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from



- protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle[J]. Food Research International, 2014, 55: 222-228.
- [14] Chi C F, Wang B, Wang Y M, *et al.* Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 1-10.
- [15] 冯刚, 王斌, 罗红宇, 等. 海洋软骨鱼软骨抗肿瘤物质的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2011, 30(2): 168-172.
- Feng G, Wang B, Luo H Y, *et al.* Review on antitumor substances of cartilage from soft bone fish[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2011, 30(2): 168-172(in Chinese).
- [16] 罗红宇, 王斌, 冯刚, 等. 微波辅助提取孔鲷抗氧化和血管生成抑制活性软骨多糖的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(7): 14-21.
- Luo H Y, Wang B, Feng G, *et al.* Microwave-assisted extraction of the polysaccharide with antioxidant and anti-angiogenesis activity from the cartilage of *Raja porosa*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(7): 14-21(in Chinese).
- [17] Chi C F, Wang B, Li Z R, *et al.* Characterization of acid-soluble collagens from the cartilages of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*), red stingray (*Dasyatis akajei*), and skate (*Raja porosa*)[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(4): 909-916.
- [18] Li Z R, Wang B, Chi C F, *et al.* Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*[J]. Food Research International, 2013, 51(1): 283-293.
- [19] 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.
- [20] Pan X, Zhao Y Q, Hu F Y, *et al.* Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 25: 220-230.
- [21] Wang B, Li Z R, Chi C F, *et al.* Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle[J]. Peptides, 2012, 36(2): 240-250.
- [22] Chi C F, Cao Z H, Wang B, *et al.* Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight[J]. Molecules, 2014, 19(8): 11211-11230.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Park S Y, Kim Y S, Ahn C B, *et al.* Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20: 88-95.
- [26] Guo P, Qi Y J, Zhu C H, *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) seeds[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19: 394-403.
- [27] Roslana J, Yunos K F M, Abdullah N, *et al.* Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product[J]. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2014, 2: 312-319.
- [28] 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.
- [29] Chi C F, Wang B, Hu F Y, *et al.* Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin[J]. Food Research International, 2015, 73: 124-129.
- [30] Saito K, Jin D H, Ogawa T, *et al.* Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12): 3668-3674.
- [31] Nimalaratne C, Bandara N, Wu J P. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white[J]. Food Chemistry, 2015, 188: 467-472.

- [32] Chen C, Chi Y J, Zhao M Y, *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(1): 457-466.
- [33] Marcuse R. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1962, 39(2): 97-103.
- [34] Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein[J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(1): 238-245.
- [35] Xing L J, Hu Y Y, Hu H Y, *et al.* Purification and identification of antioxidative peptides from dry-cured Xuanwei Ham[J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 951-958.
- [36] Chang O K, Ha G E, Han G S, *et al.* Novel antioxidant peptide derived from the ultrafiltrate of ovomucin hydrolysate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(30): 7294-7300.

## Peptides from the tryptic hydrolysate of cartilaginous proteins of *Raja porosa* and their antioxidant activities

YANG Fan<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, CHEN Yin<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>1\*</sup>, WANG Jiabin<sup>2</sup>

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

2. Zhejiang Hailisheng Group Co., Ltd., Zhoushan 316021, China)

**Abstract:** In the experiment, cartilaginous proteins of *Raja porosa* were prepared using guanidine-HCl extraction and acetone precipitation, and two antioxidant peptides (RCPE-A and RCPE-B) were subsequently isolated from the tryptic hydrolysates of cartilaginous proteins using ultrafiltration, anion-exchange chromatography, gel filtration chromatography and reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The amino acid sequences and antioxidant activities including free radical scavenging activity and lipid peroxidation inhibition were also measured. The results indicated that the amino acid sequences of RCPE-A and RCPE-B were identified as Gly-Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Gly (GEEGPRG) and Gly-Glu-Glu-Gly-Thr-Met-Gly-Leu (GEEGTMGL) with molecular weights of 700.71 and 792.87 u, respectively. RCPE-A and RCPE-B exhibited good scavenging activity on DPPH• (EC<sub>50</sub> 2.94 and 1.16 mg/mL), HO• (EC<sub>50</sub> 0.34 and 0.54 mg/mL), ABTS<sup>+</sup>• (EC<sub>50</sub> 0.34 and 0.10 mg/mL), and O<sub>2</sub><sup>-</sup>• (EC<sub>50</sub> 0.11 and EC<sub>50</sub> 0.03 mg/mL). In addition, RCPE-A and RCPE-B were effectively against lipid peroxidation in a linoleic acid model system. The antioxidant activities of RCPE-A and RCPE-B were due to the smaller size and the presence of antioxidant amino acids including Gly, Glu, Pro, Arg, Met and/or Leu within their peptide sequences. These results suggested that RCPE-A and RCPE-B might serve as potential antioxidants and be used as food additives and functional foods.

**Key words:** *Raja porosa*; cartilage; peptide; antioxidant activity; free radical scavenging activity

**Corresponding author:** WANG Bin. E-mail: wangbin4159@hotmail.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (81673349)