

# 罗非鱼鱼皮多肽的超滤分离及其抗氧化活性研究

刘成梅, 梁汉紫, 刘 伟, 万 婕

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 中德食品工程中心, 江西 南昌 330047)

**摘 要:** 采用超滤技术分离罗非鱼鱼皮蛋白酶解液(TSP-I), 研究超滤压力、时间和浓度对膜渗透通量、渗透增量和膜效能的影响。结果表明: 超滤处理的压力为28Psi, 时间为40min, 浓度为5%的操作条件下, 膜渗透通量为9.98LHM, 渗透增量为2.68g/10min, 膜效能为3.41g/m<sup>2</sup>·min, 超滤处理达最佳效果。利用分光光度法检测了抗坏血酸和超滤后所得多肽粉(TSP-II)对超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub>·)、羟基自由基(·OH)、二苯代苦味酰自由基(DPPH·)及双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的清除能力。实验发现: 超滤处理所得多肽具有一定的抗氧化能力, TSP-II对四种自由基的清除作用顺序为: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > ·OH > O<sub>2</sub>· > DPPH·。以清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力为代表相比较, 0.80mg/ml TSP-II和0.03mg/ml抗坏血酸清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力相当。

**关键词:** 罗非鱼鱼皮; 胶原多肽; 抗氧化作用; 分光光度法

## Study on Separation of Peptides Derived from *Oreochromis niloticus* Skin with Ultra-filtration Technology and Its Antioxidative Activity

LIU Cheng-mei, LIANG Han-ying, LIU Wei, WAN Jie

(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University,  
Sino-German Food Engineering Center, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Peptides derived from TSP-I was separated by ultra-filtration technology, the effects of pressure, temperature and concentration of peptides on ultra-filtration permeate flux, permeate increment and membrane efficiency. The results showed that the optimum conditions are: 5% TSP-I, pressure 28 Psi and time 40 min. Under the condition, ultra-filtration permeate flux is 9.98 LHM, ultra-filtration permeate increment is 2.68 g/10min and membrane efficiency is 3.41 g/m<sup>2</sup>·min. The capacities on scavenging O<sub>2</sub>·, ·OH, DPPH· and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of VC and TSP-II were investigated by spectrophotometry. Study informed that TSP-II had a certain extent antioxidation, the order of scavenging ability is H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > ·OH > O<sub>2</sub>· > DPPH·. On scavenging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.80 mg/ml TSP-II is equivalent to 0.03 mg/ml VC.

**Key words** tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen polypeptide radical anti-oxidizing action; spectrophotometry

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0227-04

自由基是指具有不配对价电子的原子、原子团、分子或离子。过量的自由基会引起广泛损伤效应, 与炎症、肿瘤、免疫性疾病及衰老有密切关系。研究发现, 蛋白质经酶解处理会产生具有特殊功能的活性肽<sup>[1]</sup>, 其中, 鱼皮多肽的抗氧化性质研究越来越引起人们的关注。由于酶解液中含有未水解的蛋白质、酶及一些其他大分子物质, 将其进行进一步的分离纯化将有利于提高鱼皮多肽的抗氧化活性。

超滤是一种压力驱动膜分离过程, 它是根据高分子溶质之间或高分子与小分子溶质之间分子量的差别进行分离的方法<sup>[2]</sup>。目前, 很多研究者都采用超滤的方式对蛋白水解物中的功能性多肽进行分离。

超滤过程中伴随着浓差极化、形成凝胶层等问题的出现, 致使膜渗透通量降低, 影响物料进行高效的超滤处理。本实验采用超滤分离鱼皮蛋白酶解液, 研究超滤的操作压力、操作时间及原料浓度对膜渗透通量、

收稿日期: 2007-07-28

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0540); 国家创新基金项目(05C26213600936);

国家农业科技成果转化资金项目(2006GB2C500148)

作者简介: 刘成梅 (1963-), 男, 教授, 博士, 主要从事食品加工新技术研究。E-mail: liuchengmei@ncu.edu.cn

渗透增量及膜效能的影响,优化超滤操作条件,提高膜渗透通量和分离效果。并测定了超滤处理后多肽粉的抗氧化效果,以期鱼皮抗氧化多肽的生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

罗非鱼鱼皮多肽粉(TSP-I)购自江西可生生化公司,其制作工艺为:鱼皮→酸碱处理→热水浸提→酶解→脱色、脱味→过滤→离子交换处理→浓缩→喷雾干燥→产品。

邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、双氧水、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、水杨酸、乙醇、硫酸亚铁、二苯代苦味酰自由基等均为分析纯。

超滤设备 Pall公司;紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;CentriVap concentrator 冷冻干燥机 Labconco 公司;DGG-9140B 型电热恒温鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司;电子分析天平 奥豪斯公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 超滤各指标的测定<sup>[3]</sup>

膜渗透通量以单位时间内通过单位面积滤过液的体积来表示;膜效能以单位时间内通过单位面积滤过液的质量来表示;渗透增量为浓度、压力及样液量固定的情况下,每间隔10min收集超滤液,冷冻干燥后测定的样品质量。

$$\text{膜通量 (LMH)} = \frac{V}{T \times S} \quad (1)$$

$$\text{膜效能 (MMH)} = \frac{M}{T' \times S} \quad (2)$$

式中, V 为样液通过膜表面的体积(L); T 为样液通过膜表面所消耗时间(h); M 为样液通过膜表面的质量(g); T' 为样液通过膜表面所消耗时间(min); S 为超滤膜的表面积(m<sup>2</sup>)。

#### 1.2.2 清除超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)能力检测<sup>[4]</sup>

将pH 8.2 Tris-HCl缓冲液和50mmol/L邻苯三酚25℃恒温水浴10min后,取5ml pH8.2 Tris-HCl缓冲液,加5μl 50mmol/L邻苯三酚,摇匀,325nm下立即测定,每隔0.5min测定吸光度(以pH8.2 Tris-HCl缓冲液为空白),一般以测定3.5min平均计。加入不同浓度样品(VC、TSP-II)后氧化率测定:取5ml pH 8.2 Tris-HCl缓冲液,加待测样品5~20μl,50mmol/L邻苯三酚5μl,摇匀,立即同上测定。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A} \times 100 \quad (3)$$

式中, ΔA<sub>0</sub> 为邻苯三酚的自氧化速率; ΔA 为加入待测溶液后邻苯三酚的自氧化速率。

#### 1.2.3 清除羟基自由基(·OH)能力检测<sup>[5]</sup>

反应体系中加入9mmol/L FeSO<sub>4</sub> 1ml、9mmol/L水杨酸-乙醇1ml、不同浓度样品(VC、TSP-II)1ml,最后加8.8mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1ml启动反应,37℃反应0.5h,以蒸馏水为参比,在510nm下测量各浓度的吸光度。以9mmol/L FeSO<sub>4</sub> 1ml、9mmol/L水杨酸-乙醇1ml、不同浓度样品(VC、TSP-II)1ml和1ml蒸馏水做为待测溶液的本底吸收值。清除率计算公式为:

$$\text{清除率 (\%)} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

式中, A<sub>0</sub> 为空白对照液的吸光度; A<sub>x</sub> 为加入待测溶液后的吸光度; A<sub>x0</sub> 为不加显色剂H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的待测溶液本底的吸光度。

#### 1.2.4 DPPH·清除能力检测<sup>[6]</sup>

反应体积为4.0ml,按表1加样品(VC、TSP-II)后,摇匀,室温下放置30min,乙醇调零,517nm下测定各吸光度(A)。

表1 DPPH·加样实验  
Table 1 Experiment of scavenging DPPH·

吸光度	溶液组成
A <sub>0</sub>	2.0ml 0.2mmol/L DPPH·溶液(乙醇配制)+2.0ml乙醇
A <sub>i</sub>	2.0ml 0.2mmol/L DPPH·溶液+2.0ml样品液
A <sub>j</sub>	2.0ml样品液+2.0ml乙醇

$$\text{清除率计算: 清除率 (\%)} = 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

#### 1.2.5 清除双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)能力检测<sup>[7]</sup>

样品(VC、TSP-II)溶于3.4ml磷酸缓冲液(pH7.4)中,然后加入0.6ml 4mol/L双氧水溶液中,放置10min后,混合液在230nm下测定吸光度。以不加样品的双氧水溶液为对照,对双氧水抑制率(%)表示为:

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (6)$$

式中, A<sub>c</sub> 为不加样的吸光度; A<sub>s</sub> 为加样的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 超滤结果分析

#### 2.1.1 操作压力对膜渗透通量和膜效能的影响

将STP-I的浓度调至5%,在压力分别为20、25、

28、32Psi 的条件下超滤处理 30min, 测定膜通量, 选择最适的反应压力。

超滤分离蛋白质分子时, 压力与流速对于渗透通量的影响通常是相联系的。在溶质浓度和流速一定时, 选择合适的操作压力, 避免膜表面“凝胶层”的形成, 以得到最佳的膜渗透通量<sup>[1]</sup>。如图 1 所示, 在 20~25Psi 的压力范围内, 渗透通量随操作压力升高而呈线性增加, 在压力为 25~32Psi 范围内, 渗透通量随操作压力升高虽近似线性, 但其增加幅度明显小于 20~25Psi 时渗透通量的增加幅度。当其操作压力上升到 28Psi 以后, 膜渗透通量的增加幅度很小。根据浓差极化和凝胶层的阻力模型可知<sup>[8]</sup>, 随着压力的增加, 大分子物质不断被溶剂带到膜表面累积达吸附饱和后形成凝胶层, 此时, 如果再增加压力时, 只能增加凝胶层的厚度和传质阻力, 但不会使超滤的膜通量增加。同时, 操作压力过大时, 除了增加能耗外, 超滤过程所形成的凝胶层厚度和致密度也相应增加, 加重膜污染。

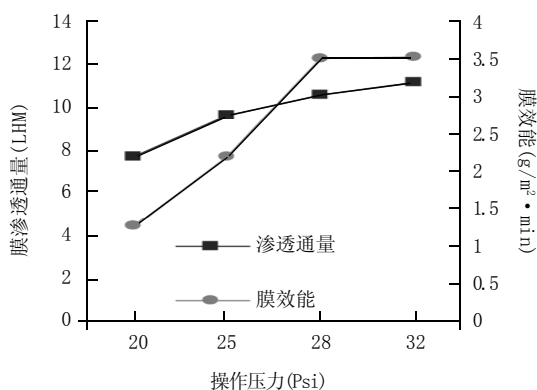


图1 不同操作压力下的膜渗透通量与膜效能

Fig.1 Effects of operating pressure on ultra-filtration permeation flux and membrane efficiency

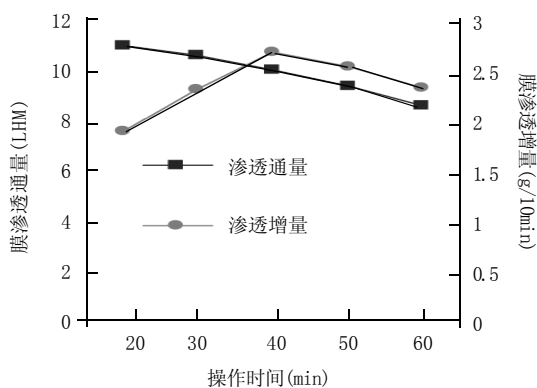


图2 不同操作时间对膜渗透通量的影响

Fig.2 Effects of operating time on ultra-filtration permeation flux and permeation increment

从图 1 中可以看出, 膜效能随着操作压力的增加而

增大, 当其压力达到 28Psi 后, 膜效能的增加幅度趋于平缓, 故综合考虑渗透通量和膜效能两项指标, 压力以 28Psi 为宜。

## 2.1.2 操作时间对膜渗透通量和超滤液增量的影响

将 STP-I 的浓度调至 5%, 在压力为 28Psi 的条件下超滤处理 10、20、30、40、50、60min, 测定膜通量和超滤液增量, 选择最适反应时间。

从图 2 中可以看出, 在超滤处理的全过程中, 膜通量随时间的延长一直呈下降趋势。系统运行一段时间后, 由于膜表面的浓差极化现象加剧, 膜面凝胶层增厚以及水解液中某些组分的沉积, 导致膜通量下降<sup>[9]</sup>。超滤处理的前 40min, 母液中富集了一定量的分子量小于 9000D 的组分, 随着超滤时间的增加, 母液中小于 9000D 的组分越来越少, 故膜渗透增量随着时间的变化趋势是先增加后减小, 40min 时达到最大值。从提高原料利用率的角度出发, 超滤时间 40min 最为合适。

## 2.1.3 不同浓度的 TSP-I 溶液对膜渗透通量与膜效能的影响

将 STP-I 的浓度分别调至 2.5%、5%、7.5% 和 10%, 在压力为 25Psi 的条件下超滤处理 50min, 测定膜通量和膜效能, 选择最适的反应浓度。

蛋白质和多肽都是两性化合物, 有很强的表面活性, 极易吸附在聚合物表面。料液溶质浓度越大, 黏度越大, 扩散系数越小, 超滤膜的表面越容易形成浓差极化和凝胶层, 使得膜渗透通量较小, 增加其污染程度。如图 3 所示, 本实验研究的是 TSP-I 溶液浓度分别为 2.5%、5%、7.5% 和 10% 时对膜渗透通量的影响。膜的渗透通量随着 TSP-I 浓度的升高而降低<sup>[10]</sup>。随着溶液浓度的增加, 蛋白质分子间的相互作用力也有所增大, 从而削弱了蛋白质分子与膜之间的作用力, 使膜渗透通量下降。

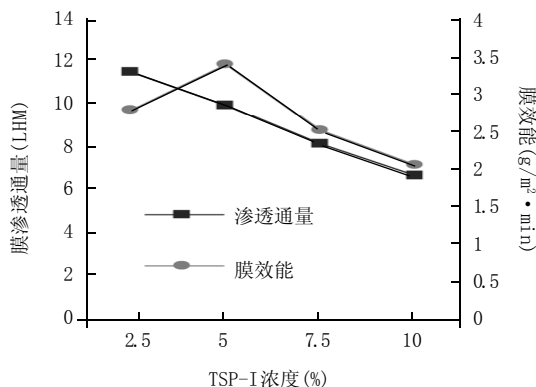
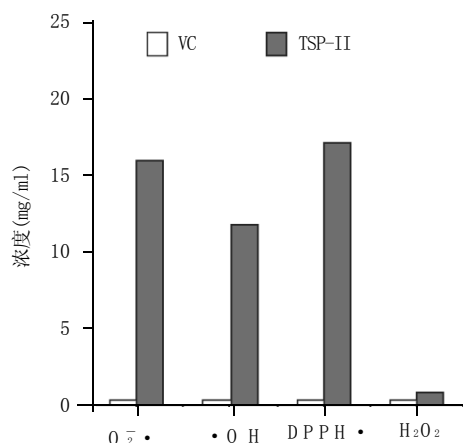


图3 不同浓度的 TSP-I 溶液膜渗透通量与膜效能

Fig.3 Ultra-filtration permeation flux and membrane efficiency of TSP-I in different concentrations

图4 TSP-II 清除四种自由基的IC<sub>50</sub>Fig.4 IC<sub>50</sub> of TSP-II on four kinds of free radicals

如图3所示,随着TSP-I浓度的增加,膜效能先升高后降低。当其浓度为5%时,虽然膜渗透通量低,但原料液的浓度较高,因而膜效能最大。综合考虑,选择5%的TSP-I溶液,可减小膜污染,提高生产效率。

## 2.2 TSP-II (TSP-I超滤后的多肽粉)抗氧化性质的研究结果

通过分光光度法测定不同浓度TSP-II对四种自由基的清除能力,从表2中可以看出:超滤处理所得的TSP-II对四种自由基具有不同强度的清除效果。在实验浓度范围内,其清除能力均随浓度的增加而增大。在其浓度为10 g/ml时,对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和DPPH $\cdot$ 的清除值均达最大,由于TSP-II对 $H_2O_2$ 的清除效果显著,故其浓度梯度相对于清除其他自由基时缩小了10倍。

半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)是指清除自由基50%时的原料浓度,此处即指TSP-II的浓度。IC<sub>50</sub>数值越小其清除能力越强,以此为指标比较TSP-II和VC对几种自由基的清除效果,结果如图4所示。TSP-II清除四种自由基能力的顺序为: $H_2O_2 > \cdot OH > O_2^{\cdot-} > DPPH\cdot$ 。11.73mg/ml TSP-II和0.026mg/ml抗坏血酸清除 $\cdot OH$ 的能力相当;15.98mg/ml TSP-II和0.0071mg/ml抗坏血酸清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力相当;17.12mg/ml TSP-II和0.0070mg/ml抗坏血酸清除DPPH $\cdot$ 的能力相当;0.80mg/ml TSP-II和0.03mg/ml抗坏血酸清除 $H_2O_2$ 的能力相当。

## 3 结论

表2 不同浓度TSP-II的抗氧化性质

Table 2 Antioxidation characters of different concentrations of TSP-II

浓度(mg/ml)	清除率(%)			
	$O_2^{\cdot-}$	$\cdot OH$	DPPH $\cdot$	$H_2O_2$
2( $H_2O_2$ 0.2)	5.54	2.77	15.68	4.41
4( $H_2O_2$ 0.4)	12.03	5.18	19.44	20.32
6( $H_2O_2$ 0.6)	18.74	8.16	21.07	34.20
8( $H_2O_2$ 0.8)	23.43	19.50	26.13	50.09
10( $H_2O_2$ 1.0)	31.63	31.79	28.67	64.59

3.1 本实验采用超滤技术分离TSP-I溶液,研究了超滤压力、时间和浓度对膜渗透通量、膜效能和渗透增量的影响,结果表明:超滤处理的最佳压力为28Psi,时间为40min,浓度为5%的操作条件下,膜渗透通量为9.98LHM,渗透增量为2.68g/10min,膜效能为3.41g/m<sup>2</sup>·min,此时超滤处理达最佳效果。

3.2 TSP-II对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 $H_2O_2$ 和DPPH $\cdot$ 的清除效果均比及VC,但仍具有一定的抗氧化能力,其清除能力顺序为: $H_2O_2 > \cdot OH > O_2^{\cdot-} > DPPH\cdot$ 。11.73mg/ml TSP-II和0.026mg/ml抗坏血酸清除 $\cdot OH$ 的能力相当;15.98mg/ml TSP-II和0.0071mg/ml抗坏血酸清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力相当;17.12mg/ml TSP-II和0.0070mg/ml抗坏血酸清除DPPH $\cdot$ 的能力相当;0.80mg/ml TSP-II和0.03mg/ml抗坏血酸清除 $H_2O_2$ 的能力相当。

## 参考文献:

- [1] 蒋菁莉,任发政,蔡华伟.牛乳酪蛋白降血压肽的超滤分离[J].食品科学,2006,27(7):124-128.
- [2] 张晓楠,郭立安.超滤在蛋白质纯化中的应用[J].中国生化药物杂志,1999,20(2):97-98.
- [3] 陈山,杨晓泉,郭祀远,等.大豆肽超滤分离纯化过程的研究[J].食品与发酵工业,2003,29(1):49-52.
- [4] 苗志伟,周卫红,刘小兰,等.超氧化物歧化酶模型化合物的合成、表征和活性测定[J].有机化学,1999,19:537-541.
- [5] 陈留勇,孟宪军,贾薇,等.黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究[J].食品科学,2004,25(2):167-170.
- [6] 邓胜国,邓泽元,黄丽.荷叶黄酮体外抗氧化活性的研究[J].食品科技,2006(7):274-276.
- [7] RUCH K J, KLAUNTING J E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechin isolated from Chinese green tea[J]. Carcinogenesis, 1989(10):1003-1008.
- [8] 陈全胜,赵杰文,岳鹏翔.中空纤维超滤膜分离菜籽饼粕中蛋白质的试验[J].农业机械学报,2006,37(8):1-4.
- [9] 邓成萍,薛文通,孙晓琳,等.超滤在大豆多肽分离纯化中应用[J].食品科学,2006,27(2):192-195.
- [10] 王湛.膜分离技术基础[M].北京:化学工业出版社,2000:207-208.