



# 鱼鳞多肽亚铁螯合物的氨基酸测定及体外抗氧化活性分析

覃 宇

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 采用凝胶渗透色谱和全自动氨基酸分析仪分别对鱼鳞多肽亚铁螯合物的分子量分布和氨基酸组成进行了检测。研究了鱼鳞多肽亚铁螯合物对 DPPH 自由基和过氧化氢( $H_2O_2$ )的清除作用,并比较了抗坏血酸、鱼鳞多肽和鱼鳞多肽亚铁螯合盐对二者的清除能力。分子量测定及氨基酸组成分析表明,鱼鳞多肽的相对分子质量分布区间为 500~5000 Da,多肽亚铁螯合物相对分子质量分布区间为 5000~10000 Da,鱼鳞多肽亚铁螯合物中甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸的含量较高,酪氨酸、组氨酸的含量相对较低。体外抗氧化实验结果表明:鱼鳞多肽亚铁螯合物能清除 DPPH 自由基和过氧化氢,抗坏血酸、鱼鳞多肽亚铁螯合物和鱼鳞多肽这三种物质对 DPPH 自由基和过氧化氢清除能力的强弱顺序为维生素 C< 鱼鳞多肽亚铁螯合物 > 鱼鳞多肽,故鱼鳞多肽亚铁螯合物具有较强的清除 DPPH 自由基和过氧化氢的能力。

**关键词:** 鱼鳞多肽亚铁螯合物;氨基酸;抗氧化;DPPH 自由基;过氧化氢

中图分类号: TS254.5

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2019) 03-0112-04

鱼鳞是水产品加工过程中重要的副产物之一,对其深入开发研究、进行高附加值转化可解决资源浪费和环境污染的问题。鱼鳞源生物活性肽具有多种生理活性,其中抗氧化活性的研究比较成熟,目前已从鲤鱼、鲢鱼、罗非鱼、草鱼等鱼鳞中提取制备了多种鱼鳞源活性肽,并分别进行了体外和体内的抗氧化活性分析,发现其抗氧化作用显著<sup>[1]</sup>。微量元素铁是维持机体正常生命活动的重要成分,人体缺铁会引发贫血、孕妇早产、发育不良、免疫力下降等多种症状。多肽螯合铁与传统补铁剂相比,在体内易吸收,利用率高,目前已成为研究的热点<sup>[2]</sup>。具有抗氧化活性的多肽与铁形成螯合物后仍具有较强的抗氧化性。李文军<sup>[3]</sup>等发现大豆多肽铁螯合物的抗氧化性随着浓度增加而增强,且强于原料大豆多肽。汪学荣<sup>[4]</sup>等研究表明,猪血多肽

亚铁螯合物在体外抗氧化实验中,具有较强的清除超氧阴离子自由基和过氧化氢的能力。刘安军<sup>[5]</sup>等在以猪血液血红蛋白为原料制备的天然有机多肽铁的抗氧化研究中发现,多肽铁对鼠干匀浆 MDA 的生成有一定的抑制作用,同时具有较强的清除氧自由基和双氧水的能力。霍健聪等<sup>[6]</sup>以鱼蛋白为原料制备了多肽亚铁螯合物,对螯合产物的抗氧化性进行了初步研究,结果表明多肽螯合亚铁具有明显的抗氧化活性。

笔者在前期研究中以草鱼鱼鳞多肽和氯化亚铁为原料,制备了鱼鳞多肽亚铁螯合物,并对其结构进行了表征。本文以鱼鳞多肽亚铁盐为原料,测定了其分子量分布和氨基酸组成,并研究了其体外抗氧化作用,为鱼鳞高附加值的开发应用提供基础数据和一定的参考。

收稿日期:2019-04-19

**基金项目:** 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目“有机废弃生物处理与资源化利用技术”(项目编号:T201535);武汉职业技术学院校级科研项目“鱼鳞多肽螯合铁的制备及其抗贫血功能研究”(项目编号:2017YK032)。

**作者简介:** 覃宇(1979-),女,湖北恩施人,武汉职业技术学院生物工程学院副教授,研究方向:有机废弃物资源化利用。

## 一、材料与方法

### (一)材料与仪器

鱼鳞多肽,纯度>96%,铄德食品股份有限公司;鱼鳞多肽亚铁螯合物,实验室自制;混合氨基酸标准液 2.5  $\mu\text{mol/mL}$  (Wako 公司);过氧化氢、乙醇、盐酸、柠檬酸、磷酸、碘化钾、硫代硫酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、抗坏血酸(Vc) 分析纯;可溶性淀粉,食品级;相对分子质量校正曲线所用的标准品:细胞色素 C(Mr=12500 Da),抑肽酶(Mr=6500 Da),杆菌酶(Mr=1450 Da), 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(Mr=451 Da),乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(Mr=189 Da),阿拉丁试剂。

UV-1800 型双光束紫外可见分光光度计(日本岛津仪器公司);HH-2 电热恒温水浴锅(巩义市予华仪器公司);78-1 磁力加热搅拌器(杭州仪表厂);FE320 酸度计(梅特勒-托利多仪器有限公司);EL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);Cence 湘仪 L600 离心机(湖南湘仪仪器有限公司);L-8900 型氨基酸分析仪(株式会社日立制作所);Agilent1260B 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)。

### (二)实验方法

#### 1.鱼鳞多肽及其亚铁螯合物的分子量分布测定<sup>[7]</sup>

采用高效液相色谱(HPLC)法测定。色谱条件:色谱柱为 TSK gel2000 SWXL (300 mm $\times$ 7.8 mm),流动相:V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸)= 45:55:0.1,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,紫外检测波长 220 nm,流速 0.5 mL/min,进样体积 20  $\mu\text{L}$ 。所有流动相和样品均经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

#### 2.鱼鳞多肽亚铁螯合盐的氨基酸组成分析

按照《GB 5009 124-2016 食品中氨基酸的测定》中的酸水解法,使用氨基酸自动分析仪测定鱼鳞多肽亚铁螯合物中各种氨基酸含量。称取样品约 60 mg,于水解管中加入 6 mol/L 盐酸 10 mL,真空封管,水解 22 h 后,冷却。将水解液全部转移到 50 mL 容量瓶内,用去离子水定容。将水解液过滤后,吸取滤液 2 mL 于 10 mL 管中,在 40~50  $^{\circ}\text{C}$  左右吹干,残留物用 1~2 mL 水溶解,最后蒸干,用 4.0 mL 0.02 mol/L 稀盐酸溶解,过滤后供仪器测定用。

测定条件:pH 专用色谱柱,流动相:pH 缓冲溶液、茚三酮溶液;流速 0.4 mL/min;操作压 5400 Psi;柱温 135  $^{\circ}\text{C}$ ;紫外检测器,检测波长 480 nm、570 nm;进样体积 20  $\mu\text{L}$ 。每个样品平行测定 3 次,以平均值表示测定结果,氨基酸的种类和含量以外标法定性和定量分析。

#### 3.鱼鳞多肽和鱼鳞多肽亚铁螯合盐抗氧化性的测定<sup>[8]</sup>

分别取质量浓度依次为 0.24、0.48、0.72、0.96、1.20 mg/mL 的样品 1.0 mL,各加入 3.0 mL 浓度为 0.004% DPPH(乙醇为溶剂),旋涡振荡器振荡 10 s,

室温避光反应 30 min,同时以无水乙醇做空白对比,于波长 517 nm 下测定吸光度。计算式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\%$$

上式中: $A_0$ ——乙醇代替样品反应后的吸光度; $A_s$ ——样品与 DPPH 反应后的吸光度

#### 4.鱼鳞多肽和鱼鳞多肽亚铁螯合盐对过氧化氢的清除实验<sup>[9-11]</sup>

样品的过氧化氢清除率采用碘量法进行,取样品溶液适量,加入 pH 3.0、0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 5.0 mL,定容至 25 mL,再加入浓度约 0.015 mol/L 的过氧化氢溶液(用时配制)1.0 mL,于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中保持 20min,取出后加入 10% KI 溶液 2 mL 和 2 mol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 mL,避光反应 2 h。反应结束后用 0.002 mol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液滴定。以 1% 淀粉溶液指示终点,同时以双蒸水为空白。

碘量法原理为:

样品中还原性成分 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (过量)  $\rightarrow$  氧化产物 +  $\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (残留)



$$\text{清除率}(\%) = (1 - V_s / V_0) \times 100\%$$

上式中: $V_0$ ——空白所消耗的滴定液  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  的体积(mL); $V_s$ ——样品溶液消耗的滴定液  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  的体积(mL)。

## 二、结果与分析

### (一)分子量测定结果

鱼鳞多肽和鱼鳞多肽亚铁螯合盐的分子量分布范围见表 1。其中鱼鳞多肽中分子量小于 5000 Da 的组分占 90.13%,而分子量在 190~500 Da 的小肽仅占总量的 11.85%,大部分是分子量在 500~5000 Da 的组分,占比达到 77.37%,说明鱼鳞胶原肽成分的主体是多肽。与亚铁离子螯合后,螯合盐的分子量分布明显增大,其中分子量在 5000~10000 Da 的胶原肽增加到 49%,说明亚铁离子更多地与多肽分子发生了螯合反应,从而增大了高分子量肽的比例。

表 1 鱼鳞多肽及其亚铁螯合盐的分子量分布

分子量 分布范围/Dal	峰面积百分比(220nm)/%	
	鱼鳞多肽	鱼鳞多肽亚铁螯合盐
10000~100000		22
5000~10000		27
>5000	9.87	
5000~3000	14.93	19
3000~2500	6.71	5
2500~1500	24.83	15
1500~500	30.9	12
500~190	11.85	1
<190	0.92	0

(二) 鱼鳞多肽亚铁螯合物的氨基酸分析

从表 2 中可以看出,鱼鳞多肽亚铁螯合物中含量较高的氨基酸为甘氨酸(17.356 g/100 g 蛋白质),其次为谷氨酸(9.551 g/100 g 蛋白质)。另外,天冬氨酸和丙氨酸含量分别为 6.956 g/100 g 蛋白质和 6.046 g/100 g 蛋白质。这几种高含量的氨基酸分别具有不同的特定功能,其中甘氨酸和丙氨酸与甜味有关,谷氨酸具有鲜味特征,天冬氨酸钾盐与镁盐的混合物,主要用于消除疲劳,临床上用来治疗心脏病、肝病、糖

尿病等疾病。天冬氨酸钾盐可用于治疗低钾症,铁盐可治疗贫血。因此,将鱼鳞多肽与金属离子结合,有可能开发成抗贫血补铁剂。另外,据报道<sup>[12]</sup>蛋白质水解后形成的多肽活性与其中含有的疏水性氨基酸的含量有关,如具有抗氧化活性的多肽,其 N-端多为疏水性氨基酸,且疏水性氨基酸的存在与其抗氧化活性呈正相关<sup>[13]</sup>。表 2 中疏水性氨基酸脯氨酸和丙氨酸的含量分别为 7.236 g/100 g 和 6.046 g/100 g,相对较高,故可能具有一定的抗氧化活性。

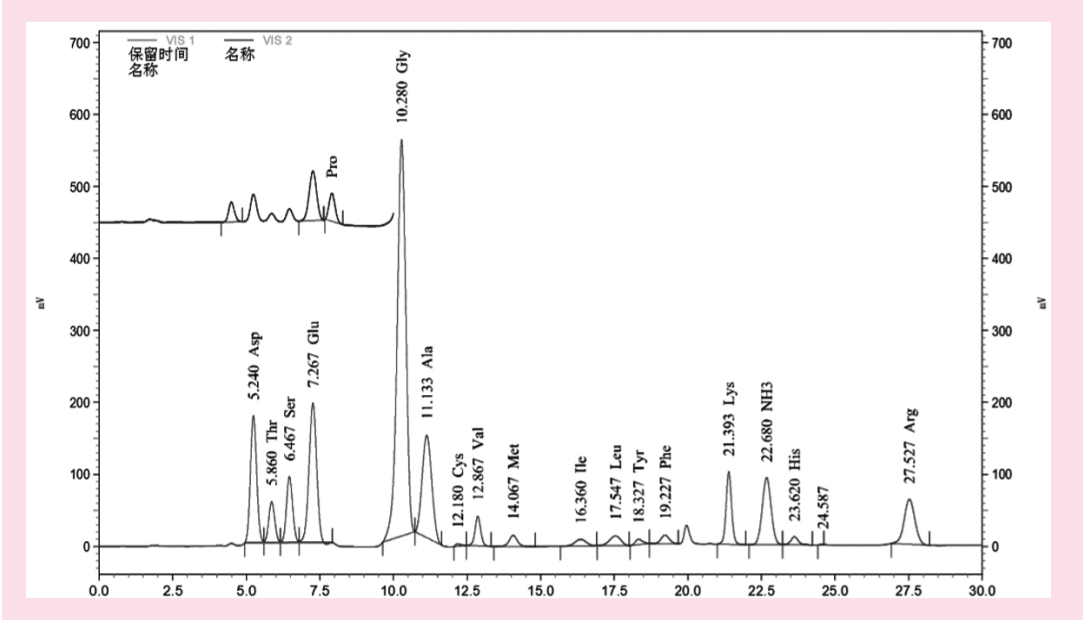


图 1 鱼鳞多肽亚铁螯合盐的氨基酸组成色谱图

表 2 鱼鳞多肽亚铁螯合盐的氨基酸组成

氨基酸名称	样品质量(g)	稀释倍数	测定液氨基酸含量(ng/20uL)	样品含量(g/100g)
天冬氨酸	0.0565	50	786.005	6.956
苏氨酸	0.0565	50	205.01	1.814
丝氨酸	0.0565	50	294.004	2.602
谷氨酸	0.0565	50	1079.303	9.551
甘氨酸	0.0565	50	1961.197	17.356
丙氨酸	0.0565	50	683.145	6.046
缬氨酸	0.0565	50	141.945	1.256
蛋氨酸	0.0565	50	89.719	0.794
异亮氨酸	0.0565	50	72.548	0.642
亮氨酸	0.0565	50	129.838	1.149
酪氨酸	0.0565	50	62.6	0.554
苯丙氨酸	0.0565	50	84.836	0.751
赖氨酸	0.0565	50	357.725	3.166
组氨酸	0.0565	50	61.22	0.542
精氨酸	0.0565	50	634.128	5.612
脯氨酸	0.0565	50	817.633	7.236

(三) 鱼鳞多肽和鱼鳞多肽亚铁螯合盐的抗氧化活性

1.DPPH 自由基清除能力

分别配制不同浓度的鱼鳞多肽、多肽亚铁螯合盐、Vc 溶液,各取 1 mL,按上述方法测定不同浓度样品对 DPPH 自由基的清除能力,结果见图 2。

如图 2 所示,与 Vc 相比,鱼鳞多肽和多肽螯合盐均有一定的 DPPH 自由基清除能力,且多肽亚铁螯合盐的清除能力强于鱼鳞多肽,但两者都略弱于 Vc。而且随着浓度的增加,两者对 DPPH 自由基的清除能力也随之增强。当各样品浓度均为 1.5 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率分别为 52.3%(Vc)、48.6%(多肽螯合盐)、46.2%(鱼鳞多肽)。不同抗氧化剂作为自由基清除剂与 DPPH 反应时,随着各自用量的增大,DPPH 的紫色逐渐变浅。这是由于抗氧化剂提供电子与 DPPH 分子中的单电子配对,生成了稳定态的 DPPH2 分子,其颜色较浅,且褪色程度与其接受的电子数量成定量关系。

2.过氧化氢的清除实验

图 3 反应了鱼鳞多肽、多肽亚铁螯合盐和 Vc 对过氧化氢的清除能力。由图中趋势可看出,维生素 C



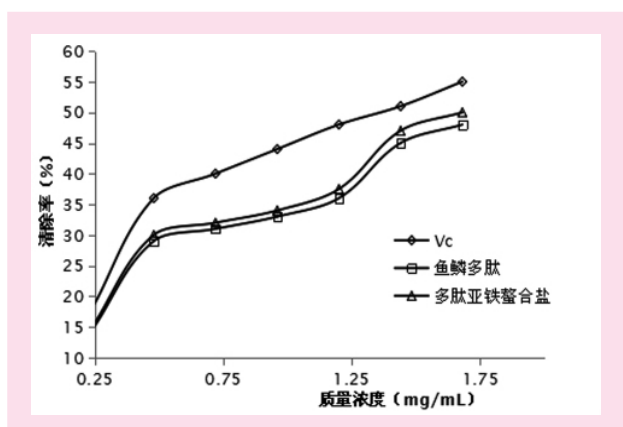


图2 鱼鳞多肽和鱼鳞多肽亚铁螯合盐的DPPH自由基清除能力

清除过氧化氢的能力最强，其次是多肽亚铁螯合盐，最后是鱼鳞多肽，且随着浓度的增加，三者对过氧化氢的清除率均增加，例如当多肽亚铁螯合盐的浓度为0.3 mg/mL时，对过氧化氢的清除率为31.2%，在质量浓度达到0.6 mg/mL时，鱼鳞多肽亚铁螯合盐对过氧化氢的清除率达到60.7%，稍弱于维生素C，但强于鱼鳞多肽对过氧化氢的清除能力。由于过氧化氢的强氧化性和扩散性，在生物体内易穿透细胞膜而引起氧化损伤<sup>[9]</sup>，因此用合适的抗氧化剂清除体内的过量过氧化氢有着重要的意义。本实验通过模拟胃液环境，对鱼鳞多肽及其螯合物进行体外抗氧化性实验，为进一步进行更深入的活性研究奠定了良好的基础。

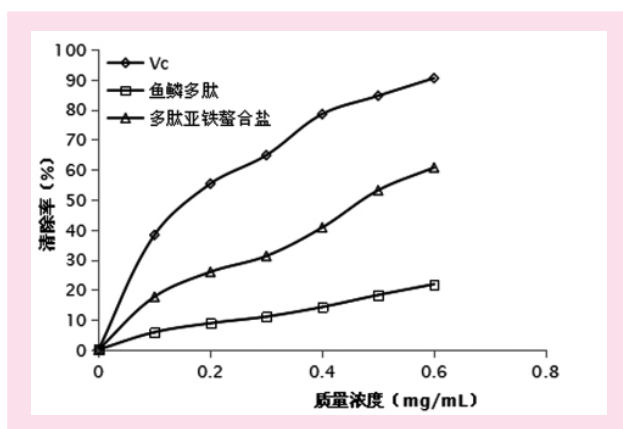


图3 鱼鳞多肽和鱼鳞多肽亚铁螯合盐对过氧化氢的清除作用

### 三、结论

通过对鱼鳞多肽和多肽亚铁螯合盐的分子量分布测定可知，鱼鳞多肽中分子量在500–5000 Da的组分高达90%以上，而与亚铁离子螯合后，螯合盐分子量分布大大增加，为5000–10000 Da之间，占比49%。对鱼鳞多肽亚铁螯合盐的氨基酸分析表明其中甘氨酸含量最高，组氨酸含量最低，且疏水性氨基酸

脯氨酸和丙氨酸含量较高。

另外，对鱼鳞多肽和多肽亚铁螯合盐进行体外抗氧化性实验得知，两者均具有一定的抗氧化作用，虽弱于阳性对照维生素C，但多肽亚铁螯合盐清除DPPH自由基和过氧化氢的能力强于鱼鳞多肽，且三者的抗氧化性随着浓度增加而随之增大。综合上述分析，鱼鳞多肽亚铁螯合盐有较强的抗氧化性，亚铁离子跟随多肽分子进入机体，易于吸收，补充必需氨基酸的同时也可提高机体的抗氧化能力，还可以补铁，具有广阔的市场前景。

### 参考文献：

- [1] 于志鹏,赵文竹,刘静波.鱼鳞源生物活性肽研究进展与应用前景[J].农产品加工,2015,(8):57–60.
- [2] 胡乔迁,孙丰婷,张萌,等.多肽-亚铁螯合物的研究进展[J].现代食品,2018,(3):36–38.
- [3] 李文军,王帅,汪建明,等.大豆多肽铁螯合物制备及其抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2017,(15):39–44.
- [4] 汪学荣.猪血多肽螯合盐的制备技术及性质研究[D].重庆:西南大学,2008.
- [5] 刘安军,刘景彬,范艳丽,等.多肽-Fe的抗氧化研究[J].食品科技,2006,(5):136–138.
- [6] 霍健聪,邓尚贵,谢超.带鱼下脚料蛋白多肽亚铁螯合物的制备及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2009,(4):267–270.
- [7] 丁丹华,彭光华,何东平. HPLC法测定油茶籽多肽相对分子质量分布及氨基酸组成[J].中国油脂,2010,(11):68–71.
- [8] Kou Xiaohong, Gao Jie, Xue Zhaohui, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (Cicer arietinum L.) albumin hydrolysates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, (50): 591–598.
- [9] 汪学荣,彭祥伟,阚建全.猪血多肽亚铁螯合盐的体外抗氧化作用研究[J].食品工业科技,2011,(10):135–138.
- [10] 龙盛京,罗佩卓,覃日昌.17种清热中药抗活性氧作用的研究[J].中草药,1999,(1):40–43.
- [11] 赵保路.氧自由基和天然抗氧化剂[M].北京:科学出版社,1999.
- [12] ELIAS R J, KELLERBY S S, DECKER E A. Antioxidant activity of proteins and peptides[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, (5): 430–441.
- [13] UDENIGWE C C, ALUKO R E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, (5): 3148–3161.

【责任编辑：高小娥】

（下转第120页）

## An Empirical Study of Optimal Team Size in Computer Programming Collaborative Learning Environment

Jiang Sai-da

(Department of Computer, Shangqiu Vocational College, Shangqiu 476000, China)

**Abstract:** Collaborative programming has long been widely recognized as the best way of computer programming. Today, collaboration has proven to produce better results in the programming process. However, the optimal group size required for collaboration needs to be studied more deeply. The purpose of this paper is to instill and familiarize with the teamwork spirit of software projects and to determine the effective (best) team size required in the real-world programming/learning context. Two different experiments were organized and conducted to determine the parameters that determine the optimal team size. Voluntary participants of different genders were randomly divided into 5 parallel teams of different sizes, ranging from 1 to 5 in the first experiment. Each team size is replicated six times. The second experiment involved teams of the same sex (male or female) of different sizes. Compile-time errors recorded by problem analysis and coding time and for each team size record. Finally, the effectiveness of the team was analyzed. The study shows that collaboration is very beneficial for new computer programming learners. When learning is done with the company of others, they are easy to master the programming concept. The study also showed that the optimal team size that can be used in computer programming collaborative learning is four.

**Key words:** optimal team size; collaborative learning; collaborative programming; computer programming



(上接第 115 页)

120

## Determination of Amino Acids and Analysis of Antioxidant Activity in Vitro

QIN Yu

(School of Bioengineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074China)

**Abstract:** The molecular weight distribution and amino acid composition of the ferrous chelates of fish scale peptides were detected by gel permeation chromatography and automatic amino acid analyzer. The scavenging effects of the scalar peptide ferrous chelate on DPPH free radicals and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) were studied, and the scavenging ability of ascorbic acid, fish scale peptide and scaly peptide ferrous chelate salt was compared. Molecular weight determination and amino acid composition analysis showed that the relative molecular mass distribution range of fish scale polypeptide was 500~5000Da, the relative molecular mass distribution range of polypeptide ferrous chelate was 5000~10000Da. The content of glycine, glutamic acid, aspartic acid and proline in the ferrous chelates of the fish scale polypeptide is relatively high, and the content of tyrosine and histidine is relatively low. The results of in vitro antioxidant experiments showed that the sulphate peptide ferrous salt can scavenge the DPPH free radicals and hydrogen peroxide, ascorbic acid, fish scale peptide ferrous salt and fish scale peptides. It is a vitamin C <fish scale polypeptide ferrous salt> fish scale polypeptide, so the fish scale polypeptide ferrous chelate salt has a strong ability to scavenge DPPH free radicals and hydrogen peroxide.

**Key words:** fish scale polypeptide ferrous chelate; amino acid; antioxidant; DPPH free radical; hydrogen peroxide