研究论文

蛋清肽的工艺优化、抗氧化作用及特性

周向军[1]，吴红艳[1]，颜彩映[1]，穆青山[1]，张 继[*1,2]
（1. 天水师范学院 生命科学与化学学院，甘肃 天水 741001；2. 西北师范大学 生命科学学院，甘肃 兰州 730070）

摘要：以对 DPPH 自由基清除率为考察指标，筛选适宜蛋清肽制备蛋白酶。研究酶活、温度、蛋清含量及 pH 值对蛋清肽清除 DPPH 自由基的影响，利用正交试验探讨制备蛋清抗氧化肽的最佳工艺；以抗坏血酸(VC)为对照，研究蛋清肽总还原力大小、对羟自由基、超氧阴离子自由基的清除作用及对脂质过氧化的抑制作用；研究蛋清肽的部分特性。结果表明：风味蛋白酶适宜蛋清肽的制备，酶解时间选择 90 min。最佳工艺为：pH 5，45 ℃，蛋清体积分数 8%，酶活 1 125 U。此条件下对 DPPH 自由基清除率为 53.273%。蛋清肽对羟自由基(0.308 4~1.542 mg/mL)、超氧阴离子自由基(0.089~0.443 mg/mL)具有一定的清除能力，清除率随其质量浓度的增大而增加，且具有一定的还原力。对羟自由基，VC 的 IC_{50}=0.092 mg/mL，蛋清肽 IC_{50}=1.24 mg/mL，对超氧阴离子自由基，VC 的 IC_{50}=0.021 6 mg/mL，蛋清肽的 IC_{50}=0.054 mg/mL。在 0.667~10.667 mg/mL 范围内，蛋清肽对脂质过氧化的抑制作用随其质量浓度增加而减小，在 0.667~10.667 μg/mL 范围内反而具有促进脂质过氧化作用。蛋清肽等电点在 pH 3 左右，其对羟自由基清除率随温度增加逐渐下降；在 pH 2~10 范围内，其溶解度几乎成线性增加。

关键词：蛋清肽；工艺优化；抗氧化作用；特性
中图分类号：TS 201.1　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)08—0844—10

Technology Optimization, Antioxidant Activities and Characteristics of Peptide from Egg White

ZHOU Xiang-jun[1]，*WU Hong-yan*[1]，*YAN Cai-ying*[1]，*MU Qing-shan*[1]，*ZHANG Ji*[*1,2]
(1. College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China; 2. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to optimize enzymolysis technology for production of antioxidant peptides from egg white, the effects of enzyme activity, enzymolysis temperature, egg white content and pH were analyzed by orthogonal test with the scavenging rate of hydrolysate to DPPH radical as an index. Scavenging effects of the hydrolysate on hydroxyl radical, superoxide anion radical, lipid peroxidation and its total reduction capacity were investigated using ascorbic acid as controls, and its partial characteristics were also explored. Flavourzyme was screened out from four kinds of

收稿日期：2013-01-02
基金项目：国家自然科学基金项目(50773064)；天水师范学院重点学科支持项目(ZD08037)。
作者简介：周向军(1980—)，男，甘肃镇原人，理学硕士，讲师，主要从事、食品酶学方面的研究。E-mail：zhouxiangjun125@126.com
[*] **通信作者**：张 继(1963—)，女，甘肃兰州人，理学博士，研究员，博士研究生导师，主要从事高分子化学方面的研究。E-mail：egaoxy@126.com

alkaline protease,neutral protease,trypsin and flavourzyme and enzymolysis time was 90 min. The optimum conditions were as follows:pH 5,enzymolysis temperature 45 ℃,egg white content 8% and enzyme activity 1 125 U. under such conditions,Scavenging rates of the hydrolysate on DPPH radical was 53.273%. Scavenging effects on hydroxyl (0.308 4~1.542 mg/mL) and superoxide anion radical(0.089~0.443 mg/mL) increased with its concontration,and their half inhibitory concentration (IC_{50}) value was 0.092 mg/mL and 0.021 6 mg/mL for VC,1.24 mg/mL and 0.054 mg/mL for the hydrolysate,respectively. Inhibition effects of the hydrolysate to lipid peroxidation (0.667~10.667 mg/mL) decreased with increasing concentration,but it was activated within 0.667~10.667 μg/mL. Isoelectric point of the hydrolysate was about pH=3,scavenging effects of the hydrolysate on hydroxy radical decreased with increasing temperature,and its solubility increased linearly within pH 2~10.

Keywords: egg white peptide,technology optimization,antioxidant activities,characteristics

蛋清蛋白质(egg white protein,EWP)不仅来源丰富、营养价值高、具有起泡性、乳化性及凝胶性等多种功能特性,而且其氨基酸组成与人体相似,因此可被人体全面吸收[1],目前被广泛应用于火腿、腊肠及面制品生产中[2]。但EWP含有蛋白酶抑制因子、维生素结合蛋白及过敏性蛋白等不利因素[3],限制了其大范围应用。在食品加工行业,很大一部分蛋清被作为废弃物丢弃,不仅浪费了目前较为紧缺的蛋白质资源,而且还易造成环境污染[4],因此EWP的进一步改性显得十分必要。大量研究表明,通过控制水解度使EWP酶解生成的小肽,其不仅有利于人体吸收[5]、致敏性更低,还有可能提供潜在的生物活性[6-7],如降血压[8]、抗凝血、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、降血脂等功能[9],这进一步提高了EWP的附加值,开辟了鸡蛋清深加工的新途径。王莹、陈栋梁等研究表明,蛋清肽对小鼠具有增强免疫功能[10-11],丁红军、朱艳华等探讨了芝麻及玉米肽的生物活性[12-13]。作者探讨风味蛋白酶水解EWP生成抗氧化肽的最佳工艺、抗氧化作用及其特性,为EWP在食品、医药保健领域开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

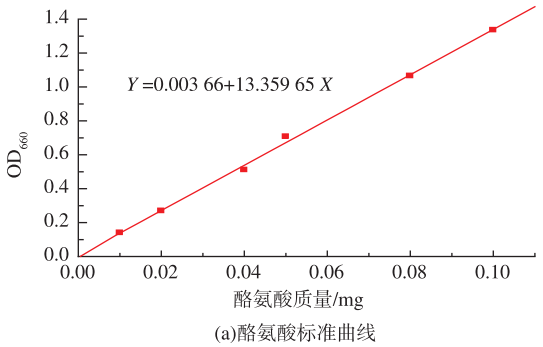
1.5 MG AS1.398中性蛋白酶、Flavorzyme风味蛋白酶及Alcalase FG 2.4 L碱性蛋白酶:均为诺维信产品;胰蛋白酶、DPPH:为Sigma产品;其余均为分析纯。

茚三酮显色剂:茚三酮0.5 g,果糖0.3 g,10 g磷酸氢二钠及6 g磷酸二氢钾定容至100 mL。

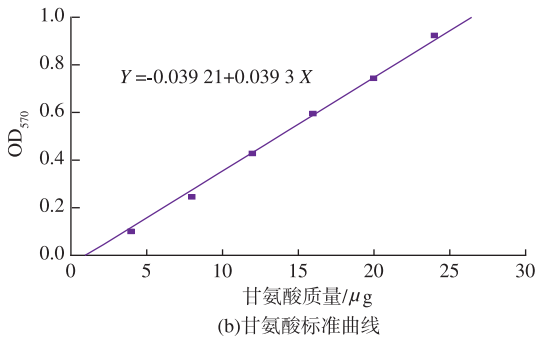
1.2 方法

1.2.1 蛋白酶活性测定 参考SB/T 10317-1999及福林-酚法[14-15]测定蛋白酶活性。酶活定义为:1 g固体或1 mL液体蛋白酶,在一定温度和pH下,1 min水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸为1个活力单位,以U/g(U/mL)表示。一定质量或体积的酶,溶解定容至一定体积(使测定光密度值在0.1~0.8范围内)。1 mL酶液在各最适温度条件下预热5 min,加入同样温度预热的蛋清1 mL,反应10 min,加入2 mL 0.4 mol/L三氯乙酸(TCA)终止反应,3 500 r/min离心10 min,取上清液1 mL,加入0.4 mol/L Na_2CO_3溶液5 mL,福林试剂1 mL,40 ℃显色20 min,660 nm测光密度值,同时做空白对照。

1.2.2 酪氨酸及甘氨酸标准曲线的制作 酪氨酸标准曲线见图1(a),Y=0.003 66+13.359 65X,R^2=0.998 6,酪氨酸在0.01~0.1 mg范围内,线性良好,可用于酶活测定。甘氨酸标准曲线见图1(b),Y=0.039 3X-0.039 21,R^2=0.995 29,甘氨酸在4~24 μg范围内,线性良好,可用于蛋清肽溶解性测定。



(a)酪氨酸标准曲线



(b)甘氨酸标准曲线

图 1　标准曲线

Fig. 1　Standard curve

1.2.3　蛋白酶的初筛　在相同蛋清体积分数(蛋清与水的体积比)、酶活、酶解时间及各酶最适温度和pH条件下进行酶解以初筛。取一定体积的蛋清,在推荐的温度下，调节至各最适pH，加酶保温250 min,TCA终止反应,离心,取上清液稀释一定倍数,测定对DPPH自由基清除率。

1.2.4　蛋白酶作用条件的复筛　对初筛的蛋白酶通过单因素和正交试验,确定最适酶解条件。单因素试验:分别在不同酶活、温度、蛋清体积分数及pH条件下进行对DPPH自由基清除率的测定。正交试验:以确定的酶活、温度、蛋清体积分数及pH进行$L_9(3^4)$正交试验。

1.2.5　抗氧化试验

1）蛋清肽对DPPH自由基的清除。取酶解液0.2 mL于试管中,用水补至2 mL,混匀,加入2 mL 0.04 g/L DPPH无水乙醇溶液,混匀,室温暗处反应20 min,3 500 r/min离心10 min，取上清液在517 nm处测其光密度值为A_i；另取0.2 mL样液于试管中,用水补充至2 mL,混匀,加入无水乙醇2 mL,室温暗处反应20 min，取上清液在517 nm处测光密度值为A_j；以2 mL 0.04 g/L DPPH无水乙醇和2 mL无水乙醇为参比,光密度值为A_0[16]。对DPPH自由基的清除率K=[1−(A_i−A_j)/A_0]×100%。

2)蛋清肽对羟自由基的清除。参考牛慧慧等方法[3]。取1 mL 1.25 mmol/L邻二氮菲乙醇溶液于试管中，加入0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mL蒸馏水于试管中,用pH 7.4 0.2 mol/L磷酸缓冲溶液补至2 mL。混匀,加入1 mL 1.25 mmol/L硫酸亚铁溶液,混匀,加入1 mL 0.025%双氧水,37 ℃水浴60 min,536 nm测损伤管光密度值($A_{损}$)。未损伤管以相同体积蒸馏水代替双氧水($A_{未}$),样品管以蛋清肽代替损伤管相应体积的蒸馏水($A_{样}$),使其终质量浓度分别为0.308 4、0.616 8、0.925 2、1.233 6、1.54 2 mg/mL,其它同损伤管。加入3 mg/mL VC,使终质量浓度分别为0.03、0.06、0.09、0.12、0.15 mg/mL,同法操作。

$K_{OH}(\%)=(A_1-A_S)/(A_W-A_S)\times100\%$。

式中,K_{OH}为OH清除率;A_1为样品管的光密度值;A_S为损伤管光密度值;A_W为未损伤管光密度值。

3)蛋清肽对超氧阴离子自由基的清除。参考李艳红等方法[17]。0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mL 1 mg/mL蛋清肽于试管中,用0.1 mmol/L pH 8.2 Tris-HCl缓冲液补至2.8 mL,加入0.1 mL 0.018 mmol/L邻苯三酚,迅速混匀并开始计时,320 nm处测定光密度值,每隔30 s测定A_{320}，共2 min。以0.1 mL蒸馏水和2.8 mL 0.1 mmol/L pH 8.2 Tris-HCl缓冲液为对照。VC同法操作。制作光密度值随时间变化回归方程,斜率为邻苯三酚自氧化速率v。

$K(\%)=(v_0-v_1)/v_0\times100\%$。

式中,K为清除率;v_0($\Delta A_0/\Delta t$)为对照邻苯三酚自氧化速率(ΔA_{320}/min);v_1($\Delta A_1/t$)为样品邻苯三酚自氧化速率(ΔA_{320}/min)。

4)蛋清肽总还原力的测定。参考贾俊强等方法[18],分别取0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mL 0.2 mg/mL蛋清肽于试管中,用0.2 mol/L pH 6.6磷酸缓冲液补至1 mL,加入0.75 mL 1%铁氰化钾,混匀后50 ℃水浴20 min,2 mL 10%三氯乙酸终止反应,3 000 r/min离心10 min。取上清液2 mL，加入0.5 mL 0.1% $FeCl_3$混匀,700 nm测定光密度值。VC同法操作。

5)蛋清肽对脂质过氧化的抑制。参考吕英华方法[19]。硫代巴比妥酸(TBA)法测定。样品管加入2、4、8、16、32 mg/mL VC 1 mL和0.05,0.1,0.2,0.4,0.8 mL蛋清肽，用0.1 mol/L pH 7.4磷酸缓冲液补至1.0 mL,加入1.0 mL 400 μmol/L硫酸亚铁,最后加蛋黄1.0 mL,混匀后于37 ℃水浴反应60 min,TCA-TBA-HCl溶液2 mL，混匀后沸水浴加热15 min,迅速冷却后,4 000 r/min离心10 min，取上清液在535 nm处测光密度值A_s。对照管以缓冲液代替蛋清肽,测得为A_c。空白管加入2 mL缓冲液,1.0 mL 400 μmol/L硫酸亚铁,测得光密度值A_0。

$I(\%)=(A_c-A_s)/(A_c-A_0)\times100\%$。

式中,I为抑制率;A_c为对照管光密度值,A_s样品管光密度值,A_0为空白管光密度值。

1.2.6　特性试验

1)pH对羟自由基清除率的影响。取5 mL蛋清

肽,调 pH 至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0,用蒸馏水补至相同体积,37 ℃水浴 30、60、90、120 min，分别测定羟自由基清除能力[20]。

2)温度对蛋清肽清除·OH 能力的影响。取蛋清肽 8 mL,调至 pH 3,用 pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液补至相同体积，分别在 60、70、80、90 ℃下加热,30、60、90、120、150 min 时测定清除·OH 能力[21]。

3)蛋清肽溶解性测定。2 mg 甘氨酸稀释定容至 100 mL，分别加入 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1,1.2 mL 甘氨酸溶液,用水补至 2 mL,充分混匀,加入 1 mL 显色剂,混匀,沸水浴 15 min,迅速冷却,测定光密度值,制作甘氨酸标准曲线[22]。取样品 5 mL,调至 pH 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0,定至 10 mL,搅拌 30 min,7 500 r/min 离心 15 min,取上清液 2 mL,测定光密度值。以 OD_{570} 表示溶解性大小,制作溶解性和 pH 曲线。

4)等电点测定。取 5 mL 蛋清肽稀释至 10 mL,分别调 pH 至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0,660 nm 测定各溶液的透光率,作 pH 和透光率曲线[23]。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

选取风味蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶及胰蛋白酶进行酶活测定，以相同的总酶活对 EWP 进行单酶水解,各酶作用的条件见表 1。

表 1 蛋白酶的酶活及作用条件

Tab. 1 Activities and action conditions of protein enzymes

酶的种类	最适温度/℃	最适 pH	酶液稀释倍数	酶活/(×10⁴ U/g 或×10⁴ U/mL)
风味蛋白酶	45	6.5	1000	1460
中性蛋白酶	60	7.0	2500	4200
碱性蛋白酶	50	9.0	8500	16150
胰蛋白酶	50	8.0	2800	3391

酶对底物具有一定的特异性,底物不同则蛋白酶水解产物的结构不同,因此,酶的种类及酶水解蛋白的能力对产物的抗氧化和特性具有较大的影响[24-25]。由图 2 可知,风味蛋白酶对 DPPH 清除率基本上维持在最高水平,其次为中性蛋白酶,胰蛋白酶与碱性蛋白较为接近,这可能是风味蛋白酶作用位点较为广泛,能暴露出更多的活性位点,从而增强抗氧化作用。因此选择风味蛋白酶作为蛋清肽的最佳水解酶。随酶解时间的延长,由于底物减少、产物抑制效应及少量肽链被降解,导致蛋清肽得率降低,抗氧化性降低,同时考虑到试验周期等原因,酶解时间选择 90 min。

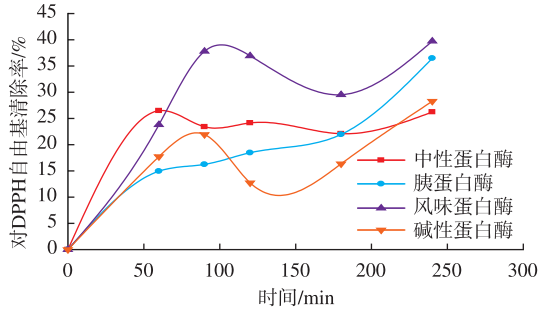


图 2 蛋白酶的筛选

Fig. 2 Selection of protein enzymes

2.2 单因素实验

酶活对蛋清肽清除 DPPH 的影响见图 3(a)。酶活对 DPPH 清除率有极显著影响(p<0.01),当逐渐增加酶活时,其对 DPPH 清除率增加,这是因为在蛋清体积分数一定的条件下,产物生成率取决于酶活,酶活越大,EWP 与酶的接触机会越多,但酶活太大则增加了成本且生成的肽易被降解[26],因此选择酶活 1 000 U。蛋清体积分数对蛋清肽清除 DPPH 率的影响见图 3(b)。蛋清体积分数对 DPPH 清除率有极显著影响(p<0.01),蛋清体积分数较低时,酶与其作用几率较低,反应速度慢,当增加蛋清体积分数时,反应平衡右移,有利于产物增加。但蛋清体积分数较大时,清除率出现下降趋势,这是因为此时酶活不再充足,同时 EWP 间易产生交联聚合现象,溶液粘度过大，影响 EWP 的扩散及酶与蛋清的接触和有效反应,反应速度减慢[27],因此选择 EWP 含量为 8%。pH 对蛋清肽清除 DPPH 的影响见图 3(c)。pH 对 DPPH 清除率有极显著影响(p<0.01),酶的构象和解离状态及 EWP 解离状态均会随溶液 pH 的变化而变化,影响酶与底物的催化。随 pH 逐渐增大，对 DPPH 清除率逐渐降低,pH 6.5 时为最低值,为 34.24%,随 pH 继续增大,对 DPPH 清除率逐渐增加并趋于稳定。因此选择 pH=5.5。温度对蛋清肽清除 DPPH 的影响见图 3(d)。温度对 DPPH 清除率有极显著影响(p<0.01)。温度对酶促反应速度的影响有两个方面,一方面提高温度可增加反应速度,另一方面随温度的升高,酶失活速度也随之增加。随温度的升高,其对DPPH 清除率随之增加,40 ℃达到最大值,为40.17%,随后继续增大温度,清除率先下降后上升，可能是生成的多肽重新被酶水

解，随温度的继续升高，又逐渐产生的缘故，因此温度选择为 40 ℃。

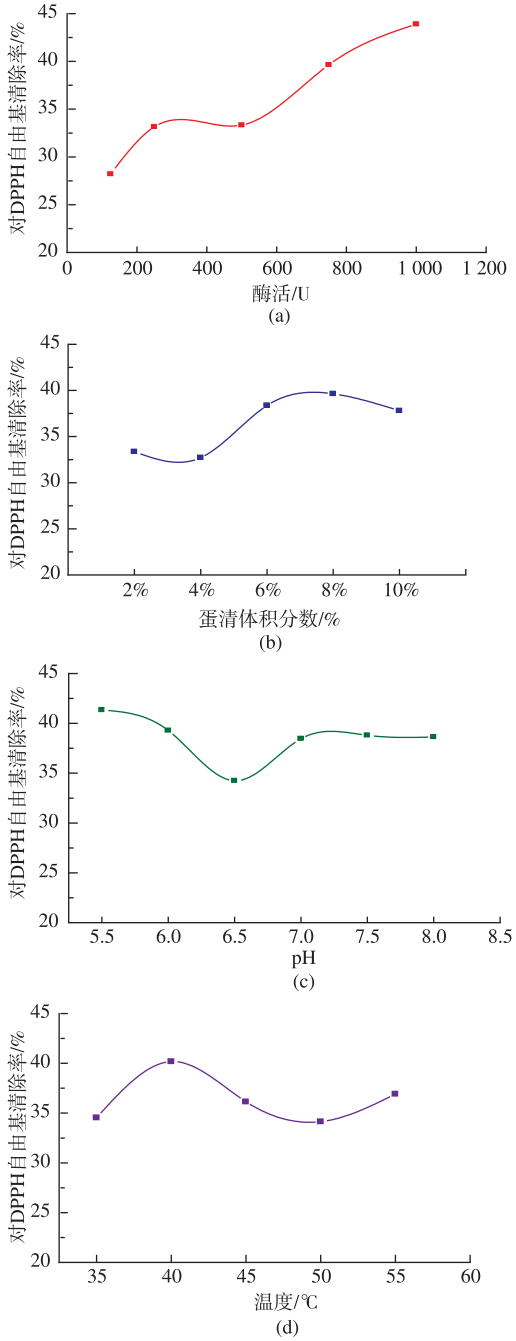


图 3　单因素实验

Fig. 3　Orthogonal test

2.3　正交试验

方差具有齐性(sig=0.12>0.05)，可进行正交分析。正交试验设计见表 2。由表 3 可知，各因素主次顺序依次为 $D>A>B>C$，即酶活>pH>温度>蛋清体积分数，最佳组合为 $A_1B_3C_2D_3$，即 pH 5、温度 45 ℃、蛋清肽质量浓度 8 g/dL，酶活 1 125 U。由表 4 可知，A、B、D 因素影响极显著，C 因素影响显著，与极差分析一致。但最佳组合未出现在正交表中，需要对其进行验证[29]。在最佳条件下重复三次，清除率分别为 53.1%、53.27%、53.45%，平均为 53.27%，高于表 3 最佳 3 号中的 50.71%。RSD 为 0.3285%，重现性好。

表 2　正交试验设计

Table 2　Orthogonal experimental scheme

水平	因素			
	A pH	*B* 温度/℃	*C* 蛋清肽质量浓度/%	*D* 酶活/U
1	5	35	7.5	875
2	5.5	40	8	1 000
3	6	45	8.5	1125

表 3　正交试验结果

Table 3　Results of orthogonal experiment

序号	*A*	*B*	*C*	*D*	DPPH 清除率/%
1	1	1	1	1	44.2
					43.84
					44.89
2	1	2	2	2	45.6
					46.13
					46.3
3	1	3	3	3	49.12
					50.18
					50.71
4	2	1	2	3	46.5
					47.04
					46.5
5	2	2	3	1	42.1
					42.1
					42.45
6	2	3	1	2	44.54
					44.19
					44.89
7	3	1	3	2	45.87
					46.4
					45.52
8	3	2	1	3	47.38
					47.29
					47.55
9	3	3	2	1	44.96
					43.82
					45.13

序号	*A*	*B*	*C*	*D*	DPPH清除率/%
k_1	46.307	45.523	45.373	43.753	
k_2	44.38	45.027	45.687	45.337	
k_3	46.07	46.207	45.697	47.667	
R	1.927	1.18	0.324	3.914	
较优水平	A_1	B_3	C_2	D_3	
主次因素	*D*>*A*>*B*>*C*				

表 4　方差分析

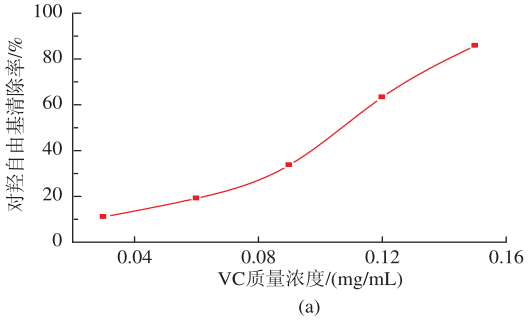
Table 4　Variance of analysis

方差来源	自由度	均方	离差平方和	*F* 值	显著性	临界值
A	2	12.255	24.51	53.668	**	
B	2	3.22	6.447	14.117	**	$F_{0.05}(2,18)$=3.55
C	2	0.901	1.802	3.947	*	$F_{0.01}(2,18)$=6.01
D	2	42.213	84.426	184.862	**	
误差	18	0.228	4.11			

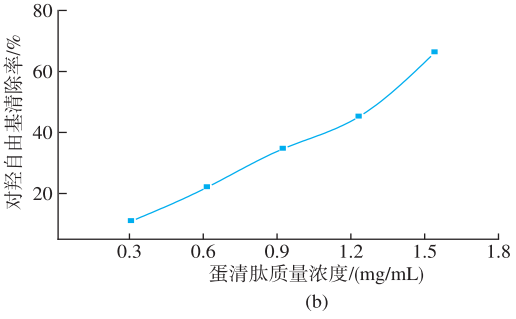
注:$F>F_{0.01}(2,18)$,说明因素的影响特别显著,记为“**”;$F_{0.01}(2,18)>F>F_{0.05}(2,18)$,说明因素的影响显著,记为“*”[28]。

2.4　抗氧化试验

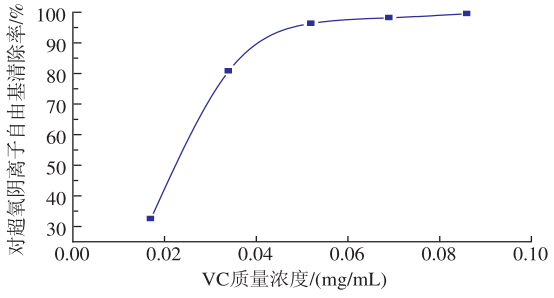
VC 及蛋清肽对羟自由基的清除分别如图 4(a)和(b)。VC 的 IC_{50}=0.092 mg/mL,蛋清肽 IC_{50}=1.24 mg/mL,约为后者的 13 倍,说明 VC 对羟自由基清除率远强于蛋清肽,后者在 0.308 4~1.542 mg/mL 范围内,随质量浓度增大其对羟自由基的清除率逐渐增大。VC 及蛋清肽对超氧阴离子自由基的清除率见图 4(c)和(d),VC 的 IC_{50}=0.021 6 mg/mL,蛋清肽的 IC_{50}=0.054 mg/mL,约为后者的 2.5 倍,说明 VC 对超氧阴离子自由基清除率稍强于蛋清肽,后者在 0.089~0.443 mg/mL 范围内随质量浓度增大,其对超氧阴离子自由基的清除率先逐渐增大,后趋于稳定。VC 及蛋清肽的总还原力见图 4(e)和(f)。还原力表示物质提供电子的能力,还原能力越强,越易提供电子使自由基成为稳定物质,从而中断连锁反应[30-31]。随 VC 及蛋清肽质量浓度不断增加,其总还原力均几乎成线性增加,这说明蛋清肽还原能力具有较好的量效关系[32],但前者强于后者。VC 及蛋清肽对脂质过氧化的抑制率见图 4(g)和(h),卵黄中不饱和脂肪酸在 Fe^{2+}催化下,能诱发过氧化生成烷氧基(LO·)和烷过氧基(LOO·),进一步发生链式反应。在加热的条件下,过氧物可与 TBA 反应生成红色化合物,532 nm 处具有光吸收[33]。当 VC 在0.667~10.667 mg/mL 范围时,其对脂质过氧化具有抑制作用,但抑制作用随 VC 质量浓度不断增加反而下降;另外,试验中还发现当 VC 质量浓度在 0.667~10.667 μg/mL 范围时,其对脂质过氧化具有促进作用,这可能是 VC 在讲 Fe^{3+}还原为Fe^{2+}时产生了自由基,对脂质体氧化起到了促进作用[34]。蛋清肽对脂质过氧化的抑制作用无一定规律,在0.086~0.341 mg/mL 范围内,抑制作用随其质量浓度增加而增加,0.341~1.371 mg/mL 范围内反而减弱。



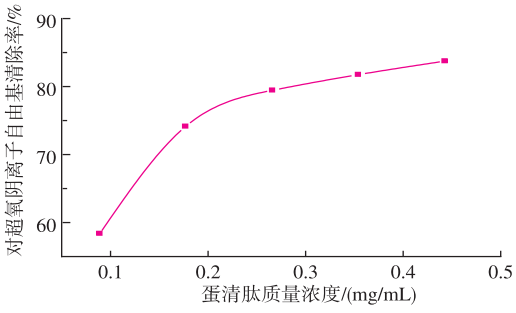
(a)



(b)



(c)



(d)

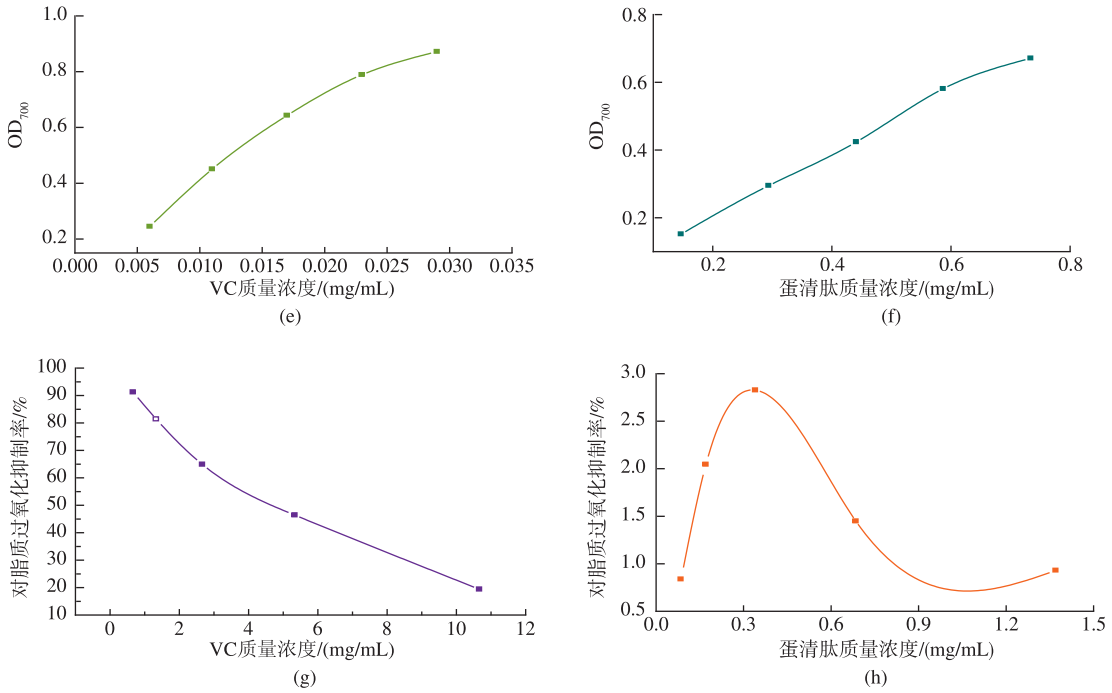


图 4　抗氧化试验

Fig. 4　Antioxidant experiment

2.5　蛋清肽的特性研究

由图 5(a)可知,不同 pH 条件下蛋清肽对羟自由基的清除作用随时间几乎不发生变化,这说明蛋清肽对羟自由基清除率对 pH 稳定性较好。溶解性是蛋白质功能性质的最重要因素之一,蛋白质溶解性与电荷、疏水性有关,高电荷、低疏水性可提高溶解性。EWP 酶解可提高电荷数目,疏水性逐渐暴露,但前者作用大于后者,因此,整体上增加了蛋白质的溶解性[35]。由图 5(b)可知,蛋清肽溶解性随 pH 增加而增大,说明溶解性对 pH 的稳定性较差。由图 6(a)可知,蛋清肽抗氧化作用随反应时间的延长和温度逐渐升高逐渐下降,这主要是高温不利于蛋清肽向产物的转化,且易使 EWP 变性聚集。等电点时,蛋白质、肽的浊度最高。由图 6(b)可知,蛋清肽在pH 3 时透光率最低,即浊度最大,说明其等电点在3 左右,只有在酸度较大情况下易于析出,因此可广泛应用于食品行业[36]。

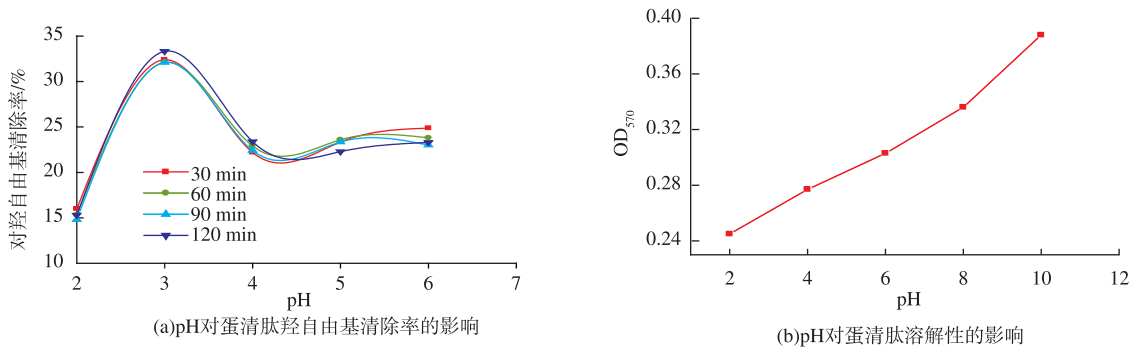
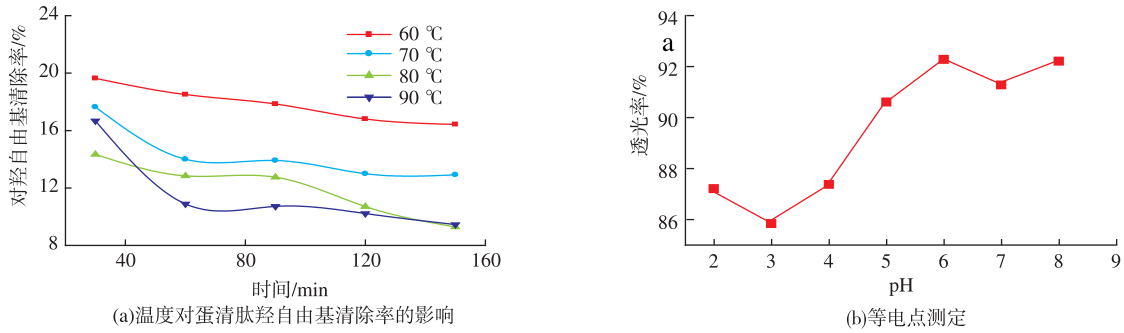


图 5　pH 对蛋清肽羟自由基清除率及蛋清肽溶解性的影响

Fig. 5 Scavenging hydroxyl radical and solubility of egg white peptide with different pH



(a)温度对蛋清肽羟自由基清除率的影响　(b)等电点测定

图 6　温度对蛋清肽羟自由基清除率的影响及等电点测定

Fig.6　Scavenging hydroxyl radical for different temperature and isoelectric point of egg white peptide

3 结　语

1)风味蛋白酶为蛋清抗氧化肽的最佳制备酶,酶解时间选择 90 min。最佳工艺为:pH 5、45 ℃、蛋清体积分数 8%,酶活 1 125 U。此条件下对 DPPH 自由基平均清除率为 53.273%。

2)在 0.308 4~1.542 mg/mL、0.089~0.443 mg/mL 范围内,蛋清肽对羟自由基、超氧阴离子自由基均具有一定的清除能力,清除率随其含量的增大而增加,但清除作用低于 VC。在 0.667~10.667 mg/mL 范围内,蛋清肽对脂质过氧化的抑制作用随其含量增加而减小,在 0.667~10.667 μg/mL 范围内反而具有促进脂质过氧化作用。蛋清肽等电点在 pH 3 左右,对羟自由基清除率随温度增加逐渐下降;在 pH 2~10 范围内,溶解度变化较大。

参考文献:

[1] 刘静波,于志鹏,赵文竹,等. 蛋清肽酶解工艺及血管紧张素转化酶抑制活性的研究[J]. 农业机械学报,2010,41(7):147-152.
LIU Jing-bo,YU Zhi-peng,ZHAO Wen-zhu,et al. Enzymatic hydrolysis technology for ACE-inhibitory peptides from egg white [J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**,2010,41(7):147-152.(in Chinese)

[2] 孙强,迟玉杰,胥伟. 糖基化反应对蛋清蛋白质凝胶性的影响[J]. 食品科学,2012,33(5):49-52.
SUN Qiang,CHI Yu-jie,XU Wei. Effects of glycosylation on gel properties of egg white protein [J]. **Food Science**,2012,33(5):49-52.(in Chinese)

[3] 牛慧慧,马美湖,杨昆. 蛋清肽的抗氧化稳定性与功能特性[J]. 食品科学,2011,32(15):139-143.
NIU Hui-hui,MA Mei-hu,YANG Kun. Antioxidant stability and functional properties of egg peptides [J]. **Food Science**,2011,32(15):139-143.(in Chinese)

[4] 牛慧慧. 蛋清肽制备及其生物功能性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2011.

[5] 郑云,蔡木易,范慰慰. 蛋清白蛋白酶解工艺的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(12):69-71.
ZHENG Yun,CAI Mu-yi,FAN Wei-wei. Study on the hydrolysis of egg albumin [J]. **Food and Fermentation Industries**,2005,31(12):69-71.(in Chinese)

[6] 田波,迟玉杰,吴非. 蛋清蛋白质酶改性条件的研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(2):30-32.
TIAN Bo,CHI Yu-jie,WU Fei. Study on modification conditions of egg white via enzymatic hydrolysis [J]. **Food and Fermentation Industries**,2003,29(2):30-32.(in Chinese)

[7] 郭本恒,孔保华. 保健与功能食品[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1996:74-139.

[8] MANSO M A,MIGUEL M,EVEN J,et al. Effects of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats[J]. **Food Chemistry**,2008,109(2):361-367.

[9] 于志鹏. 蛋清源 ACE 抑制肽的结构鉴定及稳定性研究[D]. 长春:吉林大学,2011.

[10] 王莹,刘静波,林松毅,等. 蛋清肽的体内生物活性评价[J]. 食品工业科技,2009,30(2):286-288.
WANG Ying, LIU Jing-bo, LIN Song-yi, et al. Evaluation of the bioactivity of albumen peptides *in vivo* [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2009, 30(2): 286-288. (in Chinese)

[11] 陈栋梁,刘莉,唐良艳,等. 卵清蛋白肽对小鼠机体的免疫增强作用[J]. 食品科技,2007(1):219-223.
CHEN Liang-dong, LIU Li, TANG Liang-yan, et al. Enhancement immune function of ovalbumin peptide in mice [J]. **Food Science and Technology**, 2007(1): 219-223. (in Chinese)

[12] 丁红军. 芝麻抗氧化肽的分离纯化与生物活性研究[D]. 西安:陕西师范大学,2008.

[13] 朱艳华. 玉米多肽的制备、理化性质及生物活性的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.

[14] 郑宝东. 食品酶学[M]. 南京:东南大学出版社,2006:237-239.

[15] 裴小平,唐道邦,肖更生,等. 酶法制备鸡肉蛋白抗氧化肽工艺研究[J]. 食品与发酵工业,2009,35(11):104-108.
PEI Xiao-ping, TANG Dao-bang, XIAO Geng-sheng, et al. Study on preparation antioxidation peptides of hydrolysis protease of chicken protein[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2009, 35(11): 104-108. (in Chinese)

[16] 马海乐,刘斌,李树君,等. 酶法制备大米抗氧化肽的蛋白酶筛选[J]. 农业机械学报,2010,41(11):119-123.
MA Hai-le, LIU Bin, LI Shu-jun, et al. Enzymatic preparation of rice antioxidation peptide [J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**, 2010, 41(11): 119-123. (in Chinese)

[17] 李艳红,江波,刘柱,等. 鹰嘴豆蛋白 Alcalase 水解工艺及其体外抗氧化活性的研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2007,33(4):392-399.
LI Yan-hong, JIANG Bo, LIU Zhu, et al. enzymatic hydrolysisi of chickpea protein by alcalase and its antioxidative activities[J]. **Journal of Zhejiang University: Agric & Life Sci**, 2007, 33(4): 392-399. (in Chinese)

[18] 贾俊强,马海乐,曲文娟,等. 超声预处理大米蛋白制备抗氧化肽[J]. 农业工程学报,2008,24(8):288-293.
JIA Jun-qiang, MA Hai-le, QU Wen-juan. Ultrasonic pretreatment for preparation of antioxidant peptides from rice protein[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Engineering**, 2008, 24(8): 288-293. (in Chinese)

[19] 吕英华,苏平,那宇,等. 桑椹色素体外抗氧化能力研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2007,33(1):102-107
LU Ying-hua, SU Ping, NA Yu, et al. Study on antioxidant activities of mulberry pigment *in vivo* [J]. **Journal of Zhejiang University: Agric &life Sci**, 2007, 33(1): 102-107. (in Chinese)

[20] 肖连东. 酶法改性麦芽蛋白功能特性的研究[J]. 中国食品学报,2009,9(5):151-156.
XIAO Lian-dong. Studies on the functional property of enzymatic modified malt protein [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2009, 9(5): 151-156. (in Chinese)

[21] 李雪,尤娟,罗永康. 草鱼肉蛋白酶解物功能特性及质量控制的研究[J]. 食品工业科技,2011,32(2):81-84.
LI Xue, YOU Juan, LUO Yong-kang. Functional properties and quality control of protein hydrolysates from grass carp fish (*Ctenopharyngodon idellus*) meat[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2011, 32(2): 81-84. (in Chinese)

[22] 曹艳萍,杨秀利,薛成虎,等. 马铃薯蛋白质酶解制备多肽工艺优化[J]. 食品科学,2010,31(20):246-250.
CAO Yan-ping, YANG Xiu-li, XUE Cheng-hu, et al. Enzymatic preparation of polypeptides from potato protein [J]. **Food Science**, 2010, 31(20): 246-250. (in Chinese)

[23] 刘小玲. 鸡骨明胶的制备、结构及功能性质研究[D]. 无锡:江南大学,2005.

[24] 康玮丽,唐军虎,敬思群. 酶解核桃蛋白制备抗氧化肽工艺条件优化[J]. 食品与发酵工业,2010,36(12):94-99.
KANG Wei-li, TANG Jun-hu, JING Si-qun. Optimization of the preparation of antioxidative peptide from walnut protein with enzymolysis technology[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010, 36(12): 94-99. (in Chinese)

[25] 周徐慧,钱平,卢蓉蓉,等. 酶法制备汉麻籽蛋白抗氧化肽[J]. 食品与发酵工业,2008,34(5):76-81.
ZHOU Xu-hui, QIAN Ping, LU Rong-rong, et al. preparation of antixidant peptides from hempseed protein by enzymatic hydrolysis[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2008, 34(5): 76-81. (in Chinese)

[26] 金晶,徐志宏,魏振承,等. 双酶分步水解制备菜籽蛋白肽[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(1):50-55.
JIN Jing, XU Zhi-hong, WEI Zhen-cheng, et al. Preparation repeseed protein by double enzymes [J]. **Journal of Food Science**

and Biotechnology,2010,29(1):50-55.(in Chinese)

[27] 李建杰,荣瑞芬. 复合酶解制备核桃多肽工艺条件的优化[J]. 中国油脂,2011,36(1):22-26.
LI Jian-jie,RONG Rui-fen. Optimization of the preparation conditions of walnut peptides by compound enzymatic hydrolysis[J]. **China Oil and Fats**,2011,36(1):22-26.(in Chinese)

[28] 王如德,怀燕,程琮. SPSS 13.0 在空白列正交试验设计及其数据处理中的应用[J]. 中国卫生统计,2007,24(4):426-427.
WANG Ru-de,HUAN Yan,CHENG Zong. Application of orthogonal test design and its data processing in the blank of SPSS13.0[J]. **Chinese Journal of Health Statistics**,2007,24(4):426-427.(in Chinese)

[29] 曹辉,马海乐,曲文娟,等. 大米蛋白的木瓜酶酶解及其水解物的抗氧化活性[J]. 中国粮油学报,2009,24(7):10-13.
CAO Hui,MA Hai-le,QU Wen-juan,et al. Enzymatic hydrolysis of rice protein with papain and antioxidation activity of hydrolysate[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**,2009,24(7):10-13.(in Chinese)

[30] 谢正军,金征宇,徐学明,等. 苜蓿叶蛋白及其酶解物抗氧化活性的比较[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(5):627-632.
XIE Zheng-jun,JIN Zheng-yu,XU Xue-ming,et al. Comparison of antioxidant activities of alfalfa leaf protein and its hydrolysates[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(5):627-632.(in Chinese)

[31] 李珂,卜尔红,杨秀华,等. 骨蛋白酶解物抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(6):773-775.
LI Ke,BO Er-hong,YANG Xiu-hua,et al. Study on antioxidant enzymatic hydrolysis of bone protein [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(6):773-775.(in Chinese)

[32] 綦蕾,王振宇. 红松松仁抗氧化肽的制备及体外抗氧化活性评价[J]. 食品与发酵工业,2010,36(7):78-82.
QI Lei,WANG Zhen-yu. Preparation of antioxidant peptides from korean pine nuts and evaluation of their activities *in vitro*[J]. **Food and Fermentation Indurstries**,2010,36(7):78-82.(in Chinese)

[33] 崔艳丽,王培培,周军明,等. 复合酶酶解法提取褐藻糖胶及其结构分析和抗氧化性研究[J]. 浙江大学学报:理学版,2011,38(5):536-540.
CUI Yan-li,WANG Pei-pei,ZHOU Jun-ming,et al. Extraction of fucoidan using multienzyme enzymolysis and their structural analysis,antioxidation research[J]. **Journal of Zhejiang University:Science Edition**,2011,38(5):536-540.(in Chinese)

[34] 莫凤奎,朱澄云,黄松鹤,等. 维生素 E 和维生素 C 对大豆磷脂脂质体的抗氧化作用[J]. 中国药物化学杂志,1997,7(2):121-124.
MO Feng-kui,ZHU Cheng-yun,HUANG Song-he,et al. Studies on the inhibiting effect of vitamin E and C on peroxidation of soybean liposomal membranes[J]. **Chinese Journal of Medicinal Chemistry**,1997,7(2):121-124.(in Chinese)

[35] 玄国东,何国庆,熊皓平,等. 大米蛋白酶法改性及酶解物功能特性研究[J]. 中国粮油学报,2005,20(3):1-4.
XUAN Guo-dong,HE Guo-qing,et al. Enzymatic modification of rice protein and functional properties of the hydrolysates[J]. **Journal of The Chinese Cereals and Oils Association**,2005,20(3):1-4.(in Chinese)

[36] 杨立,邹波,李玓璘,等. 鱼鳞抗氧化肽的酶法制备工艺及特性[J]. 食品科学,2011,32(12):115-119.
YANG Li,ZOU Bo,LI Di-li,et al. Enzymatic preparation and characterization of antioxidant peptides from grass carp scales[J]. **Food Science**,2011,32(12):115-119.(in Chinese)