蛋清酶水解工艺优化及水解物对小鼠生理指标的影响

霍永久， 占今舜， 金晓君， 赵国琦
（扬州大学 动物科学与技术学院，江苏 扬州 225009）

摘要：通过正交试验得出 Neutrase 蛋白酶水解蛋清的最佳条件，然后选取 2 月龄雄性小鼠 40 只，随机分成 4 组，每组 10 只，连续灌喂蛋清水解物 4 周，检测小鼠的血清生化指标和肝脏抗氧化指标。结果表明，酶水解的优化条件为：温度 55 ℃、pH 6.0、酶量为 5 g/dL、蛋清体积比为 1∶5。在此条件下，水解物的蛋白质残留率为 24.28%，水解度达 3.71%。水解物的相对分子质量大部分集中在 1 000 以下，其中 180~300、300~500、500~1 000 所占的比率分别为 28.03%、41.84%、23.69%。N-6h 组小鼠血清中的谷丙转氨酶、葡萄糖和总胆固醇含量显著低于对照组（P<0.05）。N-3h 组小鼠肝脏的 T-SOD 和 GSH-PX 活力显著高于对照组（P<0.05）；N-6h 组小鼠肝脏的 MDA 含量显著低于对照组（P<0.05）。综上，蛋清水解物能够改善小鼠生理功能，其中酶解 3 h 时的产物效果较好。

关键词：蛋清蛋白；酶水解；抗氧化；生化指标
中图分类号：TS 253　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2016)08—0855—09

Study on the Optimal Hydrolysis Condition of Egg White and Effect of Protein Hydrolysate on Physiological Indexes of Mice

HUO Yongjiu， *ZHAN Jinshun*， *JIN Xiaojun*， *ZHAO Guoqi*
（College of Animal Science and Technology，Yangzhou University，Yangzhou 225009，China）

Abstract：To obtain the optimal hydrolysis condition of egg white by Neutrase enzyme，forty 2-month male mice were divided into 4 groups，control group，egg white protein group，N-6h group and N-3h group，respectively. The mice were injected with 0.3mL egg white peptide by gavage. The serum biochemical indexes and liver anti-oxidase vitality were measured after four weeks. The results showed that the optimal hydrolysis technology of were as follows，temperature at 55 ℃，pH 6.0，5 % of enzyme dosage and concentration of egg white for 1∶5. Under this condition，the residual rate and hydrolyzing degree of protein were 24.28 %and 3.71%，respectively. The molecular weight of hydrolysate were mainly less than 1 000，the percentage of 180~300，300~500 and 500~1000 were 28.03%，41.84% and 23.69%，respectively. The serum glutamic-pyruvic transaminase，glucose ，total cholesterol content of mice and the liver MDA content in N-6h group were lower and the liver T-SOD and GSH-PX vitality of mice in N-3h group were higher as compared to the control group（P<0.05）.In conclusion，the hydrolysate of egg white could improve physiological function of mice，

收稿日期：2015-03-09
基金项目：江苏省高校优势学科建设工作资助项目（PAPD）。
作者简介：霍永久（1971—），男，江苏东海人，农学博士，副教授，主要从事猪营养、生产与环境研究。E-mail：huoyj@126.com

and the effect of 3h enzymolysis product was better.

Keywords: egg white protein, enzyme hydrolysis, anti-oxidation, biochemical index

蛋清蛋白中含有丰富的蛋白质和多种必需氨基酸,且氨基酸组成比例均衡,是人体吸收利用最高的一种蛋白质。在食品行业,利用蛋黄生产卵磷脂、胆碱等活性物质较多,而对蛋清的重视程度不够,其常作为废弃物被丢弃,因此亟需开展蛋清的综合利用研究[1-3]。据报道,从蛋清中提取出的活性物质具有免疫调节、抑制脂质过氧化、清除自由基等功能[4-6]。国内外已有利用蛋清蛋白肽液生产功能性饮料,如利用鹌鹑蛋清多肽制作保健饮料[7]。蛋清蛋白具有不耐热、易凝固等特性,限制了其在食品加工中的应用。然而,通过酶水解方法制作低分子化的蛋清降解蛋白质,可以改善蛋清蛋白的功能性质,拓宽其应用范围。Neutrase 是由枯草芽孢杆菌深层发酵培养、经提取精制而成的一种内切蛋白酶,主要具备蛋白酶活性以及少量的酯酶活性,具有广泛的特异性,对动植物蛋白质、多肽、酯、酰胺等都有较强的酶解能力。目前,采用 Neutrase 蛋白酶对杏仁、燕麦麸皮和骨胶原蛋白质进行水解已有报道[8-10]。本课题研究中采用 Neutrase 蛋白酶酶解鸡蛋清蛋白,对水解温度、pH、酶用量及蛋清浓度几个水解参数进行优化,探索适宜的水解条件。另外,利用小鼠作为模型,研究蛋清水解物对小鼠生理指标的影响,为进一步生产蛋清蛋白活性物质和开发功能性饮料食品提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验方法

1.1.1 酶水解蛋清蛋白的工艺流程 超市所购新鲜鸡蛋(洗净,消毒)→分离蛋清和蛋黄→稀释蛋清→95 ℃加热变性 20 min→调节 pH→酶解反应→终止酶解反应

1.1.2 单因素试验 在单因素试验中分别研究酶解的温度、pH、酶用量及蛋清浓度对水解鸡蛋清蛋白反应的影响,以水解度为指标,确定适宜的酶解条件。

1.1.3 正交试验 在 Neutrase 酶(由诺维信生物科技有限公司提供)水解鸡蛋清蛋白单因素试验的基础上,以蛋白质残留率和水解度为考察指标,对水解温度、pH、Neutrase 酶用量和蛋清体积比 4 个因素进行正交设计,以确定 Neutrase 酶水解鸡蛋清蛋白的最佳水解工艺参数,因素水平如表 1 所示。

表 1 $L_9(3)^4$ 正交试验设计

Table 1 $L_9(3)^4$ orthogonal design

水平	因素			
	A (温度/℃)	*B* (pH)	*C* (酶量/(g/dL))	*D* (蛋清体积比)
1	45	6.0	3	1:3
2	50	6.5	4	1:4
3	55	7.0	5	1:5

1.1.4 动物试验设计 将扬州大学比较医学中心提供的 2 月龄雄性小鼠预饲 4 d 以适应新环境(自然光照,室内温度 20~25 ℃,湿度(50±10)%。第 5 天早上 8:00 断食,并于当日 11:00 称质量,弃去体质量超过平均体质量±2.00 g 范围者,将小鼠分为 4 组(见表 2),每组 10 只,每天自由采食、饮水。

表 2 小鼠灌胃蛋清蛋白试验分组

Table 2 Group design for gavage egg white protein

组 别	灌喂样品	样品水解度
对照组	生理盐水	–
蛋清蛋白组	(体积比 1:5)蛋清蛋白溶液	加热变性 20 min
N-3h 组	Neutrase-3h 蛋清蛋白酶解物	1.97%
N-6h 组	Neutrase-6h 蛋清蛋白酶解物	3.71%

每天用灌胃针按表 2 进行灌喂,灌喂量为0.3 mL,连续灌喂 4 周,灌喂顺序按照分组顺序进行,以确保每天在同一时间给药。每天加料、换水、定时通风换气,每两天换一次垫料。

1.2 试验指标测定

1.2.1 水解度及蛋白质残留率 总氮含量由凯式半自动定氮仪测得,方法参照《饲料分析及饲料质量检测技术》。

氨基氮含量由甲醛滴定法测得。准确吸取试样 5 mL(氨基氮含量约 1~5 mg)于小烧杯中,加 5 滴体积分数 30%过氧化氢,将烧杯置于磁力搅拌器上,pH 计电极插入烧杯内试样中适当位置,开动磁力

搅拌器,先用 0.1 mol/L HCl 或 NaOH 将溶液 pH 调至 8.5,保持 1 min 不变,然后慢慢注入预先调好的中性甲醛溶液 10 mL,1 min 后用 NaOH 标准滴定溶液滴定 pH 值 8.5,记录消耗的 NaOH 标准滴定溶液体积。计算公式如下:

$$\rho_{TN}=c(HCl)\times(V-V_k)\times14 \quad (1)$$

$$\rho_{AN}=c(NaOH)\times V(NaOH)\times14 \quad (2)$$

$$w_{HD}=\frac{\rho_{AN}}{\rho_{TN}}\times100\% \quad (3)$$

$$w_{PR}=\frac{\rho_{CN}}{\rho_{TN}}\times100\% \quad (4)$$

上式中:ρ_{TN} 为总氮质量浓度,ρ_{AN} 为氨基氮质量浓度,均为 mg/5 mL 计量;w_{HD} 为水解度;w_{PR} 为蛋白质残留率;ρ_{CN} 为离心沉淀物的含氮量。

1.2.2 蛋清蛋白水解物相对分子质量分布检测 蛋白水解物相对分子质量采用高效液相色谱法进行检测。水解物溶液经 0.45 μm 微孔过滤膜过滤后上 TSK 2000 型凝胶色谱柱(7.8 mm×300 mm),流动相为乙腈-水-三氟乙酸=45:55:0.01(体积比),柱温为 30 ℃,体积流量为 0.5 mL/min,检测波长为 220 nm。以细胞色素 C(M_W 12 500),杆菌酶(M_W 1450),乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(M_W 451),乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(M_W 189)为标准品,测定水解物的相对分子质量分布。

1.2.3 氨基酸分析 总氨基酸和游离氨基酸分析采用 Agilen 1100 型高效液相分析仪进行测定。样品处理和检测方法由扬州大学分析测试中心提供。高效液相色谱仪条件:C_{18} 柱 4.0 mm×125 mm;柱温 40 ℃;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 338 nm 和 262 nm(Pro);流动相 A 20 mmol/L 醋酸钠液;流动相 B 20 mmol/L 醋酸钠液;V(甲醇):V(乙腈)=1:2:2。

1.2.4 生化指标和抗氧化指标的测定 试验结束时,小鼠禁食 12 h 后摘除眼球取血,血液于室温静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 10 min,吸取血清,-40 ℃保存待测。眼眶取血后立即采用颈椎脱臼法处死,取出肝脏并用预冷的生理盐水反复冲洗,滤纸吸干表面水分后称质量,再用预冷的生理盐水制成 10 g/dL 的肝脏匀浆,3 000 r/min 4 ℃离心 10 min,取上清液,-40 ℃保存待测。血清生化指标由江苏省苏北医院完成,肝脏抗氧化指标根据南京建成生物工程有限公司提供的试剂盒说明书上方法进行测定。

1.3 数据分析

用软件 SPSS 15.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),Duncan 法进行均值的多重比较,以 $P<0.05$ 作为差异显著性标准。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 温度对 Neutrase 酶水解蛋清蛋白的影响 Neutrase 酶解鸡蛋清在 pH 7.0,酶质量浓度 6 g/dL,蛋清体积比 1:4 的条件下,温度分别设为 40、45、50、55、60、65 ℃进行酶解反应,6 h 后收集蛋清水解液,沸水浴灭活酶 20 min 后取上清液待测。测得的结果如图 1 所示,在一定范围内,随着温度的升高,Neutrase 蛋清蛋白酶解液的水解度呈显著上升趋势,当温度达到 50 ℃,其水解度高于其它组,当温度再继续升高时,水解度呈显著下降,这可能是 Neutrase 在 50 ℃以上的条件下已部分失活,导致水解度降低。

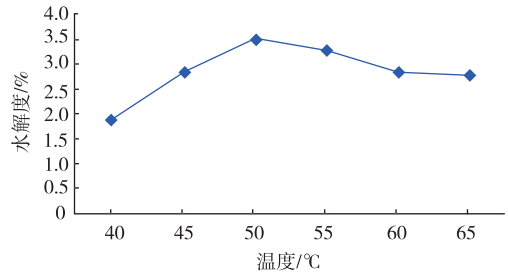


图 1 温度对 Neutrase 酶水解蛋清蛋白的影响

Fig. 1 Effect of temperature on Neutrase enzyme hydrolyzing egg white proteins

2.1.2 pH 对 Neutrase 酶水解蛋清蛋白的影响 Neutrase 酶解鸡蛋清在温度 50 ℃,酶用量 6 g/dL,蛋清体积比 1:4 的条件下,pH 分别设为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 进行酶解反应,6 h 后收集蛋清水解液,沸水浴灭活酶 20 min 后取上清液待测。测得的结果如图 2 所示,随着 pH 值升高,水解度呈现先增后减的趋势,当 pH 为 6.0 时,水解度最高,说明其为酶水解蛋清的最佳 pH。当 pH 过低或过高,均会抑制 Neutrase 酶的活性。

2.1.3 Neutrase 酶用量对水解蛋清蛋白的影响 Neutrase 酶解鸡蛋清在温度 50 ℃,pH 7.0,蛋清体积比 1:4 的条件下,Neutrase 酶用量分别设为 3、4、5、6、7、8 g/dL 进行酶解反应,6 h 后收集蛋清水解液,沸水浴灭活酶 20 min 后取上清液待测。测得的

结果如图 3 所示,在一定范围内,随着酶用量的增加,Neutrase 蛋清蛋白酶解液的水解度呈现增加的趋势。当酶用量超过 5 g/dL 时,各组之间的水解度差异不大,这是因为当酶用量达一定水平时底物被酶所饱和,使得酶促反应速率减慢,水解度不再增加。

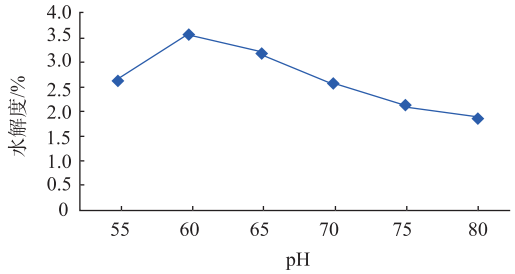


图 2　pH 对 Neutrase 酶水解蛋清蛋白的影响

Fig. 2　Effect of pH on Neutrase enzyme hydrolyzing egg white proteins

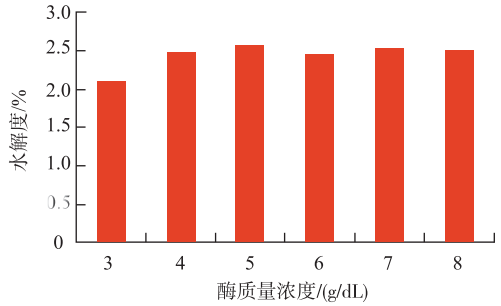


图 3　Neutrase 酶质量浓度对水解蛋清蛋白的影响

Fig. 3　Effect of Neutrase enzyme dosage on hydrolyzing egg white proteins

2.1.4　蛋清浓度对 Neutrase 酶水解蛋清蛋白的影响　Neutrase 酶解鸡蛋清在温度 50 ℃,pH 7.0,酶用量 5 g/dL 的条件下，蛋清体积比分别设为 1:3、1:4、1:5 进行酶解反应,6 h 后收集蛋清水解液，沸水浴灭活酶 20 min 后取上清液待测。测得的结果如图 4 所示,随着蛋清体积比的降低,Neutrase 蛋清蛋白酶解液的水解度呈现出增加的趋势,说明底物浓度越稀,增加了 Neutrase 蛋白酶与蛋清蛋白碰撞的机会,使得水解度增加。

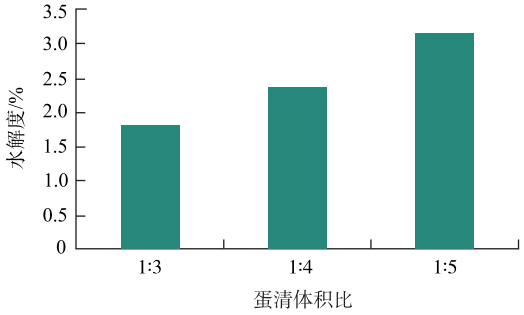


图 4　蛋清体积比对 Neutrase 酶水解蛋清蛋白的影响

Fig. 4　Effect of concentration of egg white on Neutrase enzyme hydrolyzing egg white proteins

2.2　正交试验结果

从表 3 和 4 可知，以蛋白质残留率为考察指标,影响 Neutrase 酶水解鸡蛋清蛋白的主次因素依次为:pH>酶用量>蛋清体积比>温度。Neutrase 酶水解鸡蛋清蛋白的最优组合为 $A_1B_1C_3D_3$，即温度 45 ℃、pH 6.0、酶量为 5 g/dL、蛋清体积比为 1:5。以水解度为考察指标,影响 Neutrase 酶水解鸡蛋清蛋白的主次因素依次为：蛋清浓度>酶用量>pH>温度。Neutrase 酶水解鸡蛋清蛋白的最优组合为 $A_3B_1C_3D_3$,即温度 55 ℃、pH 6.0、酶量为 5 g/dL、蛋清体积比为 1:5。综合蛋白质残留率和水解度两个考察指标,尽可能降低蛋白质残留率即提高底物蛋清蛋白的利用率的同时，尽量提高水解度，确定 Neutrase 酶水解鸡蛋清蛋白的最佳水解工艺参数为:温度 55 ℃、pH 6.0、酶量为 5 g/dL、蛋清体积比为 1:5。在此条件下,Neutrase 酶水解鸡蛋清蛋白的蛋白质残留率为 24.28%,水解度达 3.71%。

表 3　以蛋白质残留率为考察指标正交试验 $L_9(3)^4$ 结果

Table 3　Effect of $L_9(3)^4$ orthogonal design

组别	因素				蛋白质残留率/%			
	温度	pH	酶用量	蛋清体积比	(1)	(2)	(3)	T_i
1	1(45 ℃)	1(6.0)	1(3 g/dL)	1(1:3)	32.82	33.05	32.94	98.81
2	1	2(6.5)	2(4 g/dL)	2(1:4)	31.68	31.25	31.45	94.38
3	1	3(7.0)	3(5 g/dL)	3(1:5)	28.76	29.41	28.76	86.94
4	2(50 ℃)	1	2	3	26.53	26.47	26.04	79.04
5	2	2	3	1	33.17	34.90	35.33	103.39
6	2	3	1	2	37.82	38.39	38.33	114.54
7	3(55 ℃)	1	3	2	24.00	24.76	24.08	72.84

续表 3

组别	因素				蛋白质残留率/%			
	温度	pH	酶用量	蛋清体积比	(1)	(2)	(3)	T_i
8	3	2	1	3	36.83	36.99	35.96	109.78
9	3	3	2	1	37.09	36.54	37.67	111.30
K_1	280.13	250.68	323.12	313.50				
K_2	296.96	307.55	284.72	281.76				
K_3	293.92	312.78	263.17	275.76				
k_1	31.13	27.85	35.90	34.83				
k_2	33.00	34.17	31.64	31.31				
k_3	32.66	34.75	29.24	30.64				
R(极差)	1.87	6.90	6.66	4.19				

表 4　以水解度为考察指标正交试验 $L_9(3)^4$ 结果

Table 4　Effect of $L_9(3)^4$ orthogonal design

组别	因素				水解度/%			
	温度	pH	酶用量	蛋清体积比	(1)	(2)	(3)	T_i
1	1(45 ℃)	1(6.0)	1(3 g/dL)	1(1∶3)	1.79	1.54	1.66	4.99
2	1	2(6.5)	2(4 g/dL)	2(1∶4)	2.22	2.20	2.13	6.56
3	1	3(7.0)	3(5 g/dL)	3(1∶5)	3.49	3.37	3.32	10.18
4	2(50 ℃)	1	2	3	3.18	3.17	3.18	9.53
5	2	2	3	1	2.08	2.15	2.16	6.39
6	2	3	1	2	1.43	1.20	1.32	3.96
7	3(55 ℃)	1	3	2	3.68	3.50	3.59	10.77
8	3	2	1	3	3.48	3.47	3.48	10.43
9	3	3	2	1	1.15	1.14	1.14	3.42
K_1	21.73	25.30	19.38	14.81				
K_2	19.88	23.37	19.52	21.29				
K_3	24.62	17.56	27.34	30.14				
k_1	2.41	2.81	2.15	1.65				
k_2	2.21	2.60	2.17	2.37				
k_3	2.74	1.95	3.04	3.35				
R(极差)	0.53	0.86	0.88	1.70				

2.3　Neutrase 酶水解蛋清蛋白水解物相对分子质量分布分析

由图 5 和表 5 可知,Neutrase 酶在温度 55 ℃、pH 6.0、酶量为 5 g/dL、蛋清体积比为 1∶5 的条件下酶水解鸡蛋清蛋白 6 h，水解物的相对分子质量大部分集中在 1 000 以下，即以 2~8 个氨基酸的短肽形式存在,其中 180~300、300~500、500~1 000 所占的比率分别为28.03%、41.84%、23.69%。

2.4　Neutrase 酶水解蛋清蛋白水解物氨基酸分析

由表 6 可知，总游离氨基酸质量浓度为 0.886 3 mg/mL,占总氨基酸含量的 4.32%,水解物中大部分是由 2 个以上氨基酸的肽形式存在。

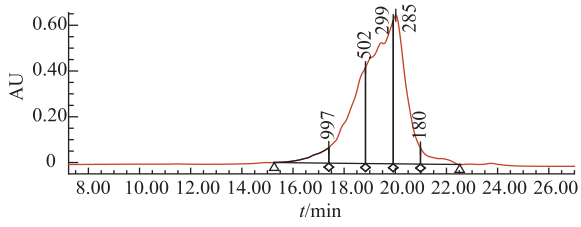


图 5　酶解物相对分子质量分布曲线

Fig. 5　Elution curve of zymolyte molecular weight

表 5　酶解物相对分子质量分布

Table 5　Distribution of zymolyte molecular weight

峰编号	相对分子质量分布	各峰保留时间/min	相对含量/%
1	>1 000	17.40	3.47
2	1 000-500	18.83	23.69
3	500-300	19.92	41.84
4	300-180	20.03	28.03
5	<180	20.98	2.98

表 6　酶水解物氨基酸分析

Table 6　Amino acid analysis of zymolyte

氨基酸	蛋清酶解物				鸡蛋清蛋白	
	游离氨基酸		总氨基酸		总氨基酸	
	质量浓度/(mg/mL)	相对含量/%	质量浓度/(mg/mL)	相对含量/%	质量浓度/(mg/mL)	相对含量/%
天冬氨酸 Asp	0.077 3	8.72	2.06	10.05	1.95	9.90
谷氨酸 Glu	0.152 9	17.25	2.49	12.13	2.75	13.91
丝氨酸 Ser	0.003 8	0.43	1.45	7.05	1.35	6.82
组氨酸 His	0.028 2	3.19	0.50	2.46	0.52	2.63
甘氨酸 Gly	0.008 0	0.90	0.77	3.75	0.70	3.53
苏氨酸 Thr	0.017 3	1.95	0.99	4.81	0.88	4.45
精氨酸 Arg	0.022 4	2.53	1.17	5.71	1.11	5.63
丙氨酸 Ala	0.081 9	9.24	1.37	6.68	1.27	6.42
酪氨酸 Tyr	0.075 7	8.54	0.81	3.95	0.76	3.85
半胱氨酸 Cys-s	0.107 4	12.12	0.37	1.81	0.35	1.76
缬氨酸 Val	0.032 1	3.62	1.44	7.03	1.34	6.80
蛋氨酸 Met	0.084 1	9.49	0.79	3.86	0.75	3.82
苯丙氨酸 Phe	0.051 9	5.85	1.28	6.24	1.25	6.34
异亮氨酸 Ile	0.045 4	5.12	1.17	5.69	1.09	5.51
亮氨酸 Leu	0.088 6	9.99	1.77	8.63	1.68	8.50
赖氨酸 Lys	0.008 9	1.00	1.44	7.03	1.38	6.99
脯氨酸 Pro	0.000 5	0.06	0.64	3.13	0.62	3.15
合计(Total)	0.886 3	100.00	20.51	100.00	19.74	100.00

2.5　酶解物对小鼠血清生化指标的影响

由表 7 可知,N-3h 和 N-6h 组小鼠血清中的谷丙转氨酶含量和葡萄糖浓度均显著小于对照组和蛋清蛋白组($P<0.05$),其他各组之间差异不显著;N-6h 组小鼠血清中的总胆固醇含量显著低于对照组($P<0.05$),其中对照组含量最高。其他各项指标各处理组之间差异不显著。

2.6　酶解物对小鼠肝脏抗氧化指标的影响

由表 8 可知,N-3h 组小鼠肝脏的 T-SOD 活力显著高于对照组($P<0.05$),其他各组之间差异不显著;对照组小鼠肝脏的 GSH-PX 活力显著低于其他各组($P<0.05$),其中 N-3h 组最高;蛋清蛋白组和 N-6h 组小鼠肝脏的 MDA 含量显著低于对照组($P<0.05$),其中 N-6h 组最低。

表 7　酶解物对小鼠血清生化指标的影响

Table 7　Effect of zymolyte on blood biochemical indexes of mice

项目	对照组	蛋清蛋白组	N-3h	N-6h
白蛋白/(g/L)	36.16±2.22	34.76±1.15	36.92±2.76	35.80±1.90
总蛋白/(g/L)	53.82±3.45	53.30±4.00	52.98±3.26	51.30±2.05
球蛋白/(g/L)	17.66±1.99	18.54±3.51	18.00±2.13	19.00±1.06

续表 7

项目	对照组	蛋清蛋白组	N-3h	N-6h
白蛋白/球蛋白	2.06±0.23	1.94±0.42	1.96±0.23	1.90±0.10
谷草转氨酶/(U/L)	146.50±15.71	147.00±22.11	137.25±19.22	147.25±5.85
谷丙转氨酶/(U/L)	28.50±2.65^{b}	29.50±2.52^{b}	21.67±2.52^{a}	22.33±4.93^{a}
葡萄糖/(mmol/L)	6.39±0.78^{b}	7.17±1.07^{b}	5.13±1.37^{a}	5.74±0.79^{a}
尿素氮/(mmol/L)	6.39±0.78	7.35±1.17	6.92±1.41	7.58±1.53
镁/(mmol/L)	1.57±0.38	1.84±0.17	1.78±0.14	1.70±0.11
钙/(mmol/L)	2.42±0.27	2.50±0.10	2.43±0.12	2.38±0.09
甘油三酯/(mmol/L)	2.21±0.61	2.38±0.59	1.85±0.61	1.62±0.29
总胆固醇/(mmol/L)	3.62±0.49^{b}	3.19±0.68^{ab}	2.88±0.63^{ab}	2.79±0.30^{a}

注:同行上标不同小写字母表示差异显著(P<0.05),相同字母或无字母表示差异不显著(P>0.05)。下表 8 同。

表 8　酶解物对小鼠肝脏抗氧化指标的影响

Table 8　Effect of zymolyte on liver anti-oxdiotant indexes of mice

项目	对照组	蛋清蛋白组	N-3h	N-6h
T-SOD 活力/(U/mL)	228.56±12.42^{a}	258.37±18.88^{ab}	270.66±14.74^{b}	253.21±22.48^{ab}
GSH-PX 活力/(U/mL)	327.11±7.14^{a}	422.65±3.80^{c}	596.79±4.96^{d}	391.32±9.84^{b}
MDA 浓度/(nmol/mL)	2.73±0.05^{a}	2.49±0.04^{b}	2.50±0.06^{ab}	1.91±0.10^{c}

3 讨　论

天然蛋清中存在抑制蛋白酶的物质,酶解前通过加热处理能降低或消除蛋清内的蛋白酶抑制物质,而且还能使变性后的蛋白质暴露出更多的酶作用点,进而促进酶解反应。然而,加热处理需要采取适当的方式,否则加热过度会阻碍酶的水解作用。杨万根等[11]研究蛋清酶解前的变性条件,结果发现,在碱性条件下变性获得的去抑制效果显著优于酸性条件,且随着温度的升高,去抑制效果显著增加,95 ℃时的去抑制作用尤为明显。因此,本试验中采用的热处理条件为 95 ℃,20 min。王昌涛等[8]发现 Neutrase 蛋白酶水解燕麦麸在条件为加酶量 9 g/dL、反应时间 3 h、料水比 1:25(g/mL)、pH 7、温度 45 ℃时达最大值。安广杰和徐清萍[9]发现 Neutrase 水解牛骨素制备明胶最佳工艺为温度 50 ℃、pH 5.5、加酶量 2 g/dL、底物质量分数 4.0%、水解时间 3 h。王淑媛等[12]利用中性蛋白酶,在条件为 pH 6.7~7,温度 45 ℃,时间 4 h,料液比为 1:20(g/mL),水解浓缩玉米蛋白质效果最好。另外,张祥奎和谭书明[13]的研究结果表明,酶法水解蛋清蛋白制备多肽的优化水解工艺条件为加酶量 0.8 g/dL,水解温度 55 ℃,时间 5 h,pH 6.5。周利亘等[14]研究发现,中性蛋白酶水解制备蛋清蛋白肽的最佳工艺条件为底物溶液 pH 7.0,加酶量 5 000 U/g,水解温度 55 ℃,水解 6 h。从以上可知,根据底物类型的不同,Neutrase 酶解底物的最适温度可能范围为 45~55 ℃,最佳 pH 范围为 5.5~7.5。在中性条件下,其将蛋白质肽键分解为蛋白胨、多肽以及游离氨基酸,是一种广泛应用于食品、制药、饲料、化妆品等行业的生物催化剂。本试验中 Neutrase 酶在 55 ℃,pH 6.0、酶量 5 g/dL,蛋清体积比为 1:5 的优化条件下,酶解鸡蛋清蛋白的蛋白质残留率为 24.28%,即有一部分蛋白质未能与 Neutrase 酶发生酶促反应。

蛋清蛋白虽是一种优质的蛋白质,但是直接食用会导致其利用率低和出现过敏反应。然而,经过酶解,蛋清蛋白分解成多肽,不仅改进了营养价值,易吸收和低致敏性,还能起到改善机体的免疫功能和提高抗氧化功能等作用[15-16]。迟玉杰等[17]研究发现,蛋清蛋白肽相对分子质量越小,其抗氧化活性越强。蛋清蛋白肽通过作为氢供体、自由基稳定剂及以螯合金属离子的方式来抑制过氧化作用。另外,随着蛋清肽浓度增大,抗氧化性增大[18-19]。研究表明,给小鼠饲喂蛋清蛋白水解物能够增强血浆的自由基清除,提高血清中 GSH-PX 活性,降低血清中 MDA 含量[5,20]。本试验中,利用 Neutrase 酶解鸡蛋清 3 h 和 6 h 的产物能够提高小鼠肝脏 T-SOD 和 GSH-PX 活性,降低 MDA 含量,结果与其一致,说明

蛋清酶解物具有提高小鼠肝脏的抗氧化能力。另外,酶解 3 h 的蛋清产物肝脏 T-SOD 和 GSH-PX 活性均高于酶解 6 h 的产物,表明酶解时间不同,其产物不同,导致其作用不同。谷丙转氨酶是一种转氨酶,主要存在于肝脏、心脏和骨骼肌中。当肝细胞或某些组织损伤或坏死,均会导致血液中的谷丙转氨酶升高。从本试验结果看,蛋清酶解物可以降低血清中的谷丙转氨酶活力,说明其对肝脏等组织具有保护作用。体内的组织、细胞活动所需的能量主要来自于葡萄糖,当血液中葡萄糖含量降低,会提高动物的采食量。在本试验中,蛋清酶解物降低血糖的含量,说明其能够提高小鼠采食量,促进生长。王莹等[21]研究发现,碱性蛋白酶和风味蛋白酶酶解蛋清后的蛋清肽能降低血清尿素氮的含量,但差异不显著。本试验结果与其不同,可能是因为不同酶解蛋清所得蛋清肽不同所致。胆固醇具有形成胆酸、合成激素和构成细胞膜的作用,但当其过量时会导致动脉粥样硬化、形成静脉血栓等。在本试验中,蛋清酶解物能够显著降低血清总胆固醇的含量,降低甘油三酯的含量。说明蛋清酶解物具有预防心脑血管疾病的作用。

4 结 语

Neutrase 酶解蛋清蛋白的优化条件为:

温度 55 ℃、pH 6.0、加酶量为 5 g/dL、蛋清体积比为 1:5。另外,蛋清水解物能够改善小鼠血清的生化指标,提高其抗氧化功能,其中酶解 3 h 时的产物效果比较好。

参考文献:

[1] 杨万根,王璋,徐玉娟,等. 蛋清利用研究进展[J]. 食品科学,2009,30(23):456-459.
YANG Wangen,WANG Zhang,XU Yujuan,et al. Review on utilization of egg white[J]. **Food Science**,2009,30(23):456-459. (in Chinese)

[2] 王彩丽,方正武,荣俊. 蛋白酶水解蛋清的工艺研究[J]. 长江大学学报(自然科学版),2009,6(2):72-74.
WANG Caili,FANG Zhengwu,RONG Jun. Study on hydrolysis of egg albumin with prolease [J]. **Journal of Yangtze University(Natural Science Edition)**,2009,6(2):72-74. (in Chinese)

[3] 张建林,王海滨. 蛋清肽的功能特性及制备技术研究进展[J]. 肉类工业,2010(6):53-55.
ZHANG Jianlin,WANG Haibin. Review on functional properties and preparation technology of egg white peptide [J]. **Meat Industry**,2010(6):53-55. (in Chinese)

[4] HARTMANN R,MEISEL H. Food-derived peptides with biological activity:from research to food applications [J]. **Current Opinion in Biotechnology**,2007,18(2):163-169.

[5] 刘静波,王莹,林松毅. 蛋清蛋白水解物体内抗氧化作用的实验研究[J]. 食品工业,2009(2):5-8.
LIU Jingbo,WANG Ying,LIN Songyi. Research on the antioxidant activity of egg white protein hydrolysate *in Vivo* [J]. **Food Industry**,2009(2):5-8. (in Chinese)

[6] MARIA A M,MARTA M,JEANNE E,et al. Effect 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**,2008,109:361-367.

[7] 车科,麻成金,黄群,等. 鹌鹑蛋清多肽饮料的研制[J]. 中国食物与营养,2008(11):39-41.
CHE Ke,MA ChengJin,HUANG Qun,et al. Study on poly-peptide beverage of quail egg albumin [J]. **Food and Nutrition in China**,2008(11):39-41.(in Chinese)

[8] 王昌涛,冯冰,董银卯. 响应面法对 Neutrase 蛋白酶酶解燕麦麸的优化研究[J]. 食品科技,2008(5):134-137.
WANG Changtao,FENG Bing,DONG Yinmao. Optimization of enzymatic hydrolysis of oatbran by Neutrase protease response surface method[J]. **Food Science and Technology**,2008(5):134-137. (in Chinese)

[9] 安广杰,徐清萍. Neutrase 蛋白酶降解骨胶原蛋白制备水解明胶[J]. 食品与机械,2007,23(3):39-40,174.
AN Guangjie,XU Qingping. Producing gelatin hydrolysates from bovine bone with Neutrase[J]. **Food and Machinery**,2007,23(3):39-40,174. (in Chinese)

[10] 王春艳, 田金强, 王强. Neutrase 和 N120P 蛋白酶同步水解杏仁蛋白制备杏仁短肽工艺研究 [J]. 中国油脂,2010,35(10):25-29.
WANG Chunyan,TIAN Jinqiang,WANG Qiang. Preparation of almond oligopeptides by Neutrase and N120P enzymatic

hydrolysis from apricot kernel protein[J]. **China Oils and Fats**,2010,35(10):25-29. (in Chinese)

[11] 杨万根,王璋,许时婴. 蛋清酶解前的变性条件研究[J]. 食品工业科技,2007,28(2):123-125.
YANG Wangen,WANG Zhang,XU Shiying. Study on denaturation conditions of egg white prior to enzymatic hydrolysis[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2007,28(2):123-125.(in Chinese)

[12] 王淑媛,王素英. 中性蛋白酶酶解玉米肽及其醒酒活性研究[J]. 食品研究与开发,2007,28(4):60-64.
WANG Shuyuan,WANG Suying. Study on antialcoholism of corn peptides hydrolyzed by Neutrase [J]. **Food Research and Development**,2007,28(4):60-64. (in Chinese)

[13] 张祥奎,谭书明. 酶法水解蛋清蛋白制备多肽的条件优化[J]. 贵州农业科学,2011,39(10):153-155.
ZHANG Xiangkui,TAN Shuming. Preparation process optimization of polypeptides from egg white protein by enzymatic hydrolysis[J]. **Guizhou Agricultural Sciences**,2011,39(10):153-155. (in Chinese)

[14] 周利亘,王君虹,张治国,等. 中性蛋白酶水解蛋清蛋白的工艺[J]. 浙江农业科学,2011(2):335-337.
ZHOU Lihuan,WANG Junhong,ZHANG Zhiguo,et al. Hydrolytic process of egg white protein by neutral protease [J]. **Journal of Zhejiang Agricultural Sciences**,2011(2):335-337. (in Chinese)

[15] 翁丹丹,陈有亮. 鸭蛋清酶水解及其水解物对免疫功能的影响[J]. 科技通报,2009,25(3):271-275.
WENG Dandan,CHEN Youliang. Hydrolysis of duck egg white and effect of hydrolysates on erythrocyte immune function in rats [J]. **Bulletin of Science and Technology**,2009,25(3):271-275. (in Chinese)

[16] 刘爽,夏杨毅,尚永彪. 鸡蛋蛋清蛋白酶解产物的研究进展[J]. 食品科学,2013,34(15):409-414.
LIU Shuang,XIA Yangyi,SHANG Yongbiao. Advances in egg white protein hydrolysates [J]. **Food Science**,2013,34(15):456-459. (in Chinese)

[17] 迟玉杰,李冰,程缘. 蛋清蛋白肽体外抗氧化作用模式的研究[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(5):1543-1549.
CHI YuJie,LI Bing,CHENG Yuan. Study on antioxidantive action mode of egg white-derived peptides *in Vitro* [J]. **Journal of Food Safety and Quality**,2013,4(5):1543-1549. (in Chinese)

[18] 张建林,黄梅香,吴琼,等. 鸭蛋蛋清肽抗氧化性的研究[J]. 武汉工业学院学报,2011,30(2):8-10.
ZHANG Jianlin ,HUANG Meixiang,WU Qiong,et al. Antioxidation of peptides from duck egg white [J]. **Journal of Wuhan Polytechnic University**,2011,30(2):8-10. (in Chinese)

[19] 金嫘,王晶,李新华. Alcalase 碱性蛋白酶酶解蛋清制备抗氧化活性肽[J]. 食品研究与开发,2009,30(6):59-62.
JIN Lei,WANG Jing,LI Xinhua. Study on the anti-oxidative activity of peptide from egg white hydrolysised by Alcalase[J]. **Food Research and Development**,2009,30(6):59-62. (in Chinese)

[20] MANSO M A,MIGUEL M,EVEN J,et al. Effect 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.

[21] 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):286-288,312.
WANG Ying,LIU Jingbo,LIN Songyi,et al. Evaluation of the bioactivity of albumen peptides *in Vivo* [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2009,30(2):286-288,312.(in Chinese)