鸭蛋卵清蛋白多肽的酶解条件优化及生物活性

王 倩[1]，贺 萍[1]，刘 琪[1]，曾凡珂[1]，张晓元[2]，赖富饶[1]，吴 晖[*1,2]
（1. 华南理工大学 食品科学与工程学院，广东 广州 510640；2. 韶关市华工高新技术产业研究院，广东 韶关 512027）

摘要：通过正交试验探究了鸭蛋卵清蛋白的酶解条件，以水解度为指标确定了最佳酶解条件：选用木瓜蛋白酶，加酶量为 4.5×10^4 U/(g·min)，酶解时间 5.5 h，酶解温度 55 ℃，酶解 pH 6.40，最佳条件下的水解度为 27.91%。采用高效液相色谱法确定了鸭蛋卵清蛋白酶解产物（Hydrolysate of albumin in duck egg，HD）的相对分子质量分布范围：$0<M_w<300$ 占 33.71%，$300<M_w<450$ 占 29.21%，$450<M_w<1\ 450$ 占 20.42%，$1\ 450<M_w<6\ 500$ 占 0.49%，$6\ 500<M_w<12\ 500$ 占 5.05%，$M_w>12\ 500$ 占 11.12%。再对其生物活性进行探究，在 HD 的免疫活性实验中，250 μg/mL 的 HD 能显著提高 RAW 264.7 细胞中 NO、细胞因子 TNF-α 和 IL-6 的分泌量（$P<0.05$），1 000 μg/mL 的 HD 对 AAPH 诱导的红细胞溶血抑制率为（53.95±1.82）%，具有显著性（$P<0.05$），对 DPPH、$ABTS^+$· 自由基清除率分别为（31.92±0.54）%、（86.46±2.12）%，ORAC 值为 0.357 4 μmol/mg，表明 HD 也具有很好的体外抗氧化活性。

关键词：鸭蛋卵清蛋白；正交优化；免疫活性；体外抗氧化活性
中图分类号：TS 353.4　**文章编号**：1673-1689(2020)09-0089-10　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.09.013

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions of Ovalbumin from Duck Eggs and Biological Activity of the Resulting Peptides

WANG Qian[1]，*HE Ping*[1]，*LIU Qi*[1]，*ZENG Fanke*[1]，*ZHANG Xiaoyuan*[2]，*LAI Furao*[1]，*WU Hui*[*1,2]
(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;
2. Shaoguan Huagong High-tech Industrial Research Institute, Shaoguan 512027, China)

Abstract: The enzymatic hydrolysis conditions of ovalbumin from duck eggs were investigated through orthogonal test, and the optimal hydrolysis conditions were determined by taking the hydrolysis degree as the index: the amount of papain 4.5×10^4 U/(g·min), hydrolysis time 5.5 h, temperature 55 ℃, pH 6.40. With the optimal conditions, the hydrolysis degree was 27.91%. The molecular weight distribution ranges of hydrolysate were determined by HPLC: $0<M_w<300$(33.71%), $300<M_w<450$ (29.21%), $450<M_w<1\ 450$ (20.42%), $1\ 450<M_w<6\ 500$ (0.49%), $6\ 500<M_w<12\ 500$ (5.05%), and $M_w>12\ 500$ (11.12%). Its biological activity was further studied. Hydrolysate (250 μg/mL) significantly increased the secretion of NO, cytokines TNF-α and IL-6 in RAW 264.7 cells ($P<0.05$), showing a certain immunological activity. Meanwhile, the inhibition rate of 1 000 μg/mL hydrolysate for AAPH induced erythrocyte hemolysis was (53.95±1.82)% ($P<0.05$), the

收稿日期：2019-07-30
基金项目：广东省科技计划项目(2017A020108006；2016B010121014)。
* **通信作者**：吴 晖(1967—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事天然食品化学研究。E-mail：fehwu@scut.edu.cn

scavenging rates of DPPH and $ABTS^{+}$·free radical were (31.92±0.54)% and (86.46±2.12)%, and the ORAC value was 0.357 4 μmol/mg, indicating that the hydrolysate also had a good antioxidant activity *in vitro*.

Keywords: duck egg ovalbumin, orthogonal optimization, immunological activity, antioxidant activity *in vitro*

鸭蛋卵清蛋白约占鸭蛋总蛋白质的54%,是蛋清中最主要的蛋白质,且含有丰富的Ile、Leu、Met、Val和Phe。卵清蛋白营养价值较高,具有良好的蛋白质胶凝、乳化和起泡等功能特性,可在食品加工中赋予食品特殊的口感和风味[1]。关于卵清蛋白的研究主要集中在功能及物理特性的改性[2-3]、卵清蛋白与多糖、亚油酸制备纳米颗粒复合物[4-6]和制备生物活性肽[7-8]等方向。

生物活性肽的制备一般有酶解法、微生物发酵法和人工合成法。酶解法因操作简便、可工业化生产的优点而被大量采用。宋宏新[9]用DPPH自由基清除率和水解度为指标,用碱性蛋白酶水解鸡蛋卵白蛋白制备抗氧化活性肽,其产物的DPPH自由基清除率达到了96.92%,唐文婷[10]利用pepsin和trypsin复合水解卵白蛋白,再通过纯化分离得到2个具有抗菌活性的多肽组分,刘丽莉[11]探究了鸡蛋卵清蛋白的酶解工艺和产物的结构性质,结果发现采用碱性蛋白酶水解,样品水解度可达到26.55%,Chamila[12]考察了几种蛋白酶从蛋清中释放抗氧化肽的能力,选择了蛋白酶P1从卵白蛋白、卵转铁蛋白和半胱氨酸抑素中分离得到16条抗氧化肽。酶解法以简单易控制的优点已经被广泛应用于蛋白酶解产物的制备中。

文献中报道的动植物蛋白经酶解制备的多肽活性主要包括抗氧化、抗菌[13]、钙螯合[14]、抗癌[15]、抗高血压[16]、降血压[17]和免疫调节[18]等。任尧[19]报道了双酶水解鸭蛋蛋清多肽制备抗氧化肽的方法,陈功[20]报道了碱性蛋白酶和风味蛋白酶水解咸鸭蛋脱盐蛋清制备抗氧化肽的工艺,Cho等[21]比较了Alcalase、Neutrase、Flavourzyme、Protamex和Ficin 5种蛋白酶对鸡蛋蛋清蛋白的水解作用,发现中性蛋白酶水解产物的水解度和α-氨基酸产量最高;陈栋梁等[22]的研究表明鸡蛋卵清蛋白的复合蛋白酶水解产物对BALB/c小鼠的体液免疫和细胞免疫均有显著增强作用。以上研究表明以鸭蛋卵清蛋白为原料,采用酶解法获得一种具有多种生物活性的多肽产物具有可行性,同时也为鸭蛋的开发利用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸭蛋卵清蛋白,实验室制备(pH 4.5下60%饱和度硫酸铵沉淀所得,蛋白质总氮质量分数86.7%);RAW 264.7细胞,购自广东省中医院;碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶,购自上海源叶生物试剂公司;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉)二胺盐(ABTS)、2,2'-偶氮(二异丁基脒)二盐酸盐(AAPH),购自Sigma公司;其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。Infinite M1000 Pro酶标仪,购自瑞士Tecan公司;高速冷冻离心机,购自安徽嘉文仪器装备有限公司;HERAcell 150 iCO_2培养箱,购自美国Thermo Fisher公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白酶酶活的测定 蛋白酶酶活测定的方法参考李艳红[23]略做修改。称取100 mg(或100 μL)酶分别置于1、2号管中,3号管加入100 μL的0.02 mol/L pH 8.00磷酸钠缓冲液进行溶解定容,稀释1 000倍。取稀释后的样品酶液1 mL分别置于试管中37 ℃预热3 min,加入2 mL 1 g/dL酪蛋白溶液,在37 ℃水浴15 min。在1、2、3号管中立即加入3 mL 10 g/dL三氯乙酸,4 500 r/min离心10 min。取上清液0.5 mL,加0.55 mol/L碳酸钠2.5 mL,福林酚试剂0.5 mL,37 ℃水浴中避光孵育15 min,最后在680 nm下测定吸光值。以L-酪氨酸做标准曲线,3号管为空白对照。

酶活力单位定义:在37 ℃下每分钟水解酪蛋白产生1 μg L-酪氨酸为一个酶活单位,U/(g·min)。

$$酶活=\frac{A\times F\times V}{t\times W} \quad (1)$$

式中,A为根据标准曲线换算的L-酪氨酸质量浓度

(μg/mL);F 为稀释倍数;V 为混合液体积(mL);t 为反应时间(min);W 为酶质量(g)。

1.2.2 水解度的测定 取 250 μL 酶解上清液,加入 2.0 mL 0.212 5 mol/L pH 8.20 磷酸盐缓冲液和 1.0 mL 体积分数 0.01% TNBS,50 ℃下避光孵育 30 min,加入 2 mL 0.01 mol/L 的 Na_2SO_3 终止反应,冷却至室温后在 420 nm 下测量吸光值。以 L-亮氨酸绘制标准曲线,计算出 α-氨基酸含量。

$$DH=\frac{L_t-L_0}{L_{max}-L_0}\times 100\% \quad (2)$$

式(2)中,DH 为水解度(%);L_t 为时间 t 时释放的 α-氨基酸(mmol/L);L_0 为鸭蛋卵清蛋白原始的α-氨基酸 (mmol/L);L_{max} 为鸭蛋卵清蛋白在用6 mol/L HCl 在 100 ℃下水解 24 h 后的总氨基酸量(mmol/L)。

1.2.3 水解酶的筛选 鸭蛋卵清蛋白用蒸馏水溶解,配制成 1 g/dL 的蛋白质溶液,分别取 100 mL 溶液至 5 个 250 mL 锥形瓶中,按照表 1 的条件进行酶解,加酶量均为 2×10^4 U/(g·min),酶解时间 3 h,分别测量酶解上清液的水解度,确定最佳的鸭蛋卵清蛋白水解酶,并采用正交实验确定最佳酶解条件。

表 1 酶的特性

Table 1 Enzyme characteristics

蛋白酶种类	适宜温度/℃	酶解温度/℃	适宜 pH	酶解 pH
碱性蛋白酶	50~60	55	8.0~9.0	8.50
复合蛋白酶	35~60	50	5.5~7.5	7.00
木瓜蛋白酶	45~60	50	6.0~7.5	7.50
风味蛋白酶	45~50	50	5.0~7.0	7.50
中性蛋白酶	45	45	6.0~7.0	7.50

1.2.4 单因素实验设计

1)最佳酶解时间的筛选 根据 1.2.3 的结果选择木瓜蛋白酶进行后续酶解实验。选择酶解时间分别为 1、2、3、4、5、6 h 进行单因素实验。根据 1.2.3 的结果选择木瓜蛋白酶,酶解 pH 7.50,加酶量为 2×10^4 U/(g·min),在 50 ℃下酶解,通过测定样品的水解度选择最适宜的酶解时间。

2) 加酶量的筛选 选用加酶量分别为 1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^4、5×10^4、6×10^4 U/(g·min),酶解 pH 7.50,在 50 ℃下加入木瓜蛋白酶酶解 3 h,通过样品的水解度选择最适宜的加酶量。

3)酶解温度的筛选 选择酶解温度分别为 40、45、50、55、60 ℃,酶解 pH 7.50,加入木瓜蛋白酶酶解 3 h,加酶量为 2×10^4 U/(g·min),通过测定样品的水解度选择最适宜的酶解温度。

4)酶解 pH 的筛选 选择酶解 pH 分别为 5.00、5.50、6.00、6.50、7.00、7.50、8.00,加入木瓜蛋白酶酶解 3 h,加酶量为 2×10^4 U/(g·min),在 50 ℃下酶解,通过测定样品的水解度选择最适宜的酶解 pH。

1.2.5 正交试验设计 在单因素试验的基础上,以水解度为考察对象,每个因素选取 3 个水平,建立正交试验因素水平表,通过 $L_9(3^4)$正交试验对鸭蛋卵清蛋白水解条件进行优化设计,正交实验设计见表 2。

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels for orthogonal test

水平	*A* 酶解时间/h	*B* 加酶量/U/(g·min)	*C* 酶解温度/℃	*D* 酶解 pH
1	4.0	3.5×10^4	45	6.20
2	4.5	4.0×10^4	50	6.40
3	5.5	4.5×10^4	55	6.60

1.2.6 HD 相对分子质量的测定 采用 HPLC 进行相对分子质量的测定。配制 1 mg/mL 的 HD 溶液,过 0.22 μm 的滤膜后进色谱柱 TSK gel 2000SWXL (300 mm×7.8 mm)。流动相:乙腈/水/三氟乙酸(20∶80∶0.1,体积比),检测波长 220 nm,流量 0.5 mL/min,柱温 25 ℃,进样量 10 μL。用细胞色素 C(相对分子质量 12 500)、抑肽酶(相对分子质量 6 500)、杆菌肽(相对分子质量 1 450)、乙酰基四肽 GGYR(相对分子质量 451.2)和还原型谷胱甘肽(相对分子质量 307.3)作为相对分子质量校正标准[25]。

1.2.7 HD 的免疫活性评价 细胞免疫活性测定参考张婷等[26]的方法。接种 100 μL 细胞浓度 1×10^6 个/mL 的 RAW 264.7 细胞悬液于 96 孔板中,CO_2 培养箱培养 24 h 后,吸去上清液,加入 100 μL 不同质量浓度(1 000、500、250、125、62.5 μg/mL)的 HD 溶液,阳性对照组为 20 μg/mL 的 LPS,空白组为 DMEM 培养基,再培养 24 h 后收集细胞上清液,用试剂盒检测上清液中 NO、TNF-α 和 IL-6 的表达量。

1.2.8 HD 对 AAPH 诱导的红细胞溶血的保护作用 参考 Ma 等[27]的方法略做修改。取新鲜抗凝羊血 10 mL,1 200 *g* 离心 5 min,取沉淀。再用 pH 7.4 的 PBS 清洗 5 次后配制成体积分数 20%的红细胞悬浮液。用PBS 将样品配制成不同质量浓度 (1 000、750 μg/mL 和 500 μg/mL),在试管中加 200 μL 样

品和 200 μL 红细胞悬液,37 ℃孵育 30 min 后,加入 400 μL AAPH(200 mmol/L)孵育 1.5 h,加入 5 mL PBS 稀释样品后 1 200 *g* 离心 10 min,取上清液在 540 nm 下测定吸光值 *A*。全溶血组用蒸馏水替代 PBS,其吸光值记为 *B*。

$$溶血抑制率/\%=(1-\frac{A}{B})\times 100\% \quad (3)$$

1.2.9 HD 的体外抗氧化活性评价

1)DPPH 自由基清除能力　参考 You[28]的方法。取 2 mL 不同质量浓度的 HD 溶液，加入 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液混匀，避光反应 30 min 后于 517 nm 测定吸光度,用 Trolox 作阳性对照。

$$DPPH\ 清除率/\%=(1-(OD_{样品}-OD_{样品空白})/OD_{空白})\times 100\% \quad (4)$$

2)$ABTS^{+}\cdot$ 自由基清除能力　参考 Zhang[29]的方法略做修改。取 400 μL 不同质量浓度的 HD 溶液,加 4 mL $ABTS^{+}\cdot$ 反应液,避光反应 20 min 后,于 734 nm 下测吸光值。以 Trolox 作为阳性对照。

$$ABTS^{+}\cdot 自由基清除率/\%=(1-(OD_{样品}-OD_{样品空白})/OD_{空白})\times 100\% \quad (5)$$

3)ORAC 法测定样品体外抗氧化能力　参考王光[30]的方法略做修改,在 96 孔板中加入 25 μL 样品(质量浓度分别为 1 000、500、250、125、62.5 μg/mL)、25 μL 的 403.2 nmol/L 荧光素钠,37 ℃下预热5 min,用排枪加 150 μL 17.07 mmol/L 的 AAPH 启动反应,在 485/338 nm 下进行连续测定 2 h,设定每5 分钟测量一次荧光值。以 Trolox 作阳性对照,同时设定只加荧光素钠的荧光自然衰减组对照、加蒸馏水的空白对照组。

$$ORAC\ 值=((AUC_{样品}-AUC_{+AAPH})/(AUC_{Trolox}-AUC_{+AAPH}))\times(n/c) \quad (6)$$

公式(6)中,$AUC_{样品}$为样品的积分面积;AUC_{+AAPH} 为加 PBS 组的积分面积;*n* 为 Trolox 的摩尔浓度(μmol/L);*c* 为样品质量浓度(μg/mL)。

1.3 数据处理

所有试验均做 3 组平行，结果以平均值±标准方差(mean±SD)表示。采用 Origin 8.5、SPSS 17.0 和正交设计助手 V3.6 进行结果统计和方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶的酶活测定

根据 L-酪氨酸测定的标准曲线为:$y=0.008\ 9x+0.030\ 5$,$R^2=0.999\ 1$。5 种蛋白酶的酶活测定结果见表 3,5 种蛋白酶的酶活大小存在显著性差异 ($P<0.05$),风味蛋白酶和复合蛋白酶的酶活最高,中性蛋白酶的酶活最低。实验中测定的 5 种蛋白酶的实测酶活略高于李艳红[23]的实验结果,推测原因是蛋白酶的酶活与其存放条件和存放时间有关,存放越久酶活越低,蛋白酶的实测酶活就可能低于其标注酶活,因此为了试验的准确性,对本实验中用到的 5 种酶进行酶活标定,以便试验结果的统一。

表 3　5 种蛋白酶的实测酶活

Table 3　Enzyme activities of 5 proteases

酶种类	实测酶活/(U/(g·min))
碱性蛋白酶	289 887.62±4.23%[a]
中性蛋白酶	274 157.39±8.34[a]
复合蛋白酶	344 114.43±6.96[b]
木瓜蛋白酶	294 507.65±7.32[a]
风味蛋白酶	367 657.54±10.30[b]

注:不同小写字母表示数据间存在显著性差异($P<0.05$)。

2.2 5 种水解酶的筛选

蛋白酶的种类是影响酶解效率的重要因素之一,因底物与酶的特异性结合位点的不同而显示出差距。Doucet 报道[31]碱性蛋白酶可水解蛋白质中的 Glu、Met、Leu、Tyr、Lys 和 Gln 的羧端肽键且相对大的氨基酸侧链的肽键;中性蛋白酶可以水解羧端为 Tyr、Phe、Trp 等芳香族氨基酸的肽键;复合蛋白酶为一种温和的蛋白质内切酶,对酰胺基的水解能力较弱;风味蛋白酶的作用较为广泛,而木瓜蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶类,能裂解碱性氨基酸、亮氨酸或甘氨酸的肽键。由图 1 可知,木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和碱性蛋白酶水解产物的水解度较大,而中性蛋白酶的水解度最小,可能是因为鸭蛋卵清蛋白中的 Glu、Leu、Lys 和 Gly 含量较高，而芳香族氨基酸含量偏低,从而导致这种结果。木瓜蛋白酶可以特异性水解鸭蛋卵清蛋白中的肽键,从而可以释放出更多的 α-氨基酸,因而其产物的水解度最高。

2.3 单因素实验结果

2.3.1 酶解时间的筛选　由图 2 可知,随着酶解时间的延长，水解度呈现先上升后逐渐平缓的趋势,且当时间到达 5 h 后，水解度达到了 (24.74±0.63)%,随着酶解时间延长水解度未显著升高($P<0.05$),推测其原因是酶具有专一性,随着酶解时间的延长,特定位点的肽链已经大部分水解,因而水

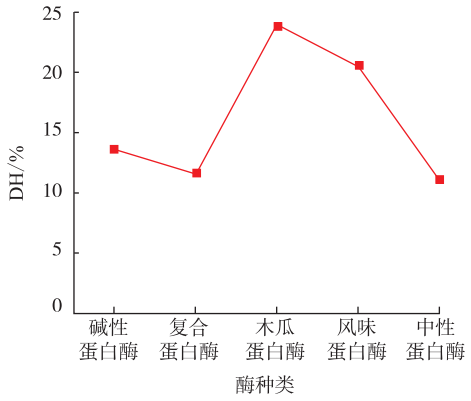


图 1 5 种蛋白酶对水解度的影响

Fig. 1 Effect of five proteases on hydrolysis degree

解度不会随着时间的无限延长而不断增加。因此后续选取 4、4.5、5 h 展开正交实验，探究最佳的酶解时间。

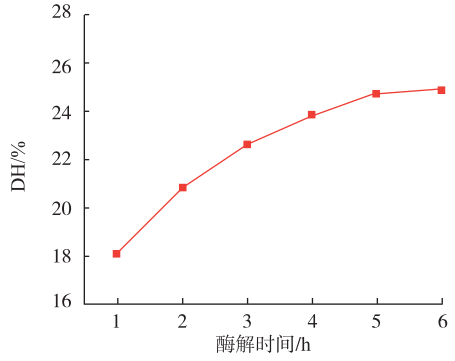


图 2 酶解时间对水解度的影响

Fig. 2 Effect of hydrolysis time on hydrolysis degree

2.3.2 加酶量的筛选 由图 3 可知,加酶量对水解度的影响趋势和酶解时间类似,呈现出先增加后平缓的趋势,当加酶量为 4×10^4 U/(g·min)时,水解度为(27.40±0.71)%,随着加酶量的增加,水解度基本保持不变,说明此时体系中底物与酶结合位点已经接近饱和,只增加体系中蛋白酶的量不能提高上清液中肽的水解度,也会造成资源的浪费。因此后续选择 3.5×10^4、4.0×10^4 U/(g·min) 和 4.5×10^4 U/(g·min)进行正交实验,探究最适宜的加酶量。

2.3.3 酶解温度的筛选 酶解温度也是影响酶解效率的条件之一,由图 4 可知,当酶解温度在 40~60 ℃之间变化时,水解度先增加后降低,在 50 ℃时水解度达到最高为(25.81±0.65)%,与李艳红[19]报道的木瓜蛋白酶最适温度 55 ℃相符。因此后续设定 45、50 ℃和 55 ℃进行正交实验,探究最佳实验条件。

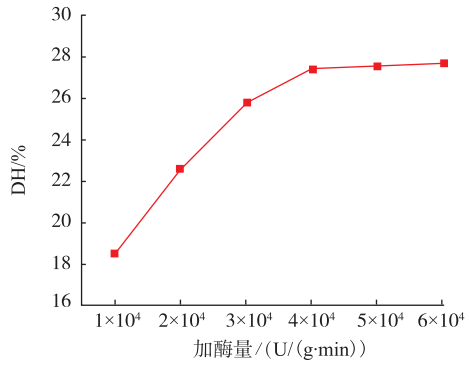


图 3 加酶量对水解度的影响

Fig. 3 Effect of enzyme addition on hydrolysis degree

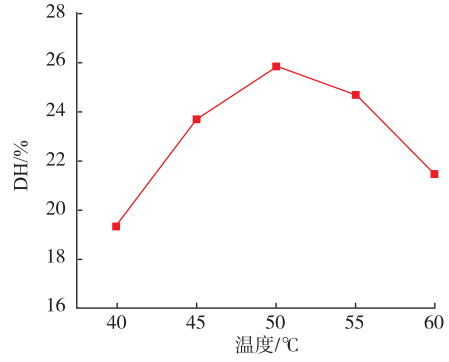


图 4 酶解温度对水解度的影响

Fig. 4 Effect of hydrolysis temperature on hydrolysis degree

2.3.4 酶解 pH 的筛选 木瓜蛋白酶的最适 pH 为 6.00~7.00,所以本研究中选择 pH 5.00~8.00 进行探究。由图 5 可知,木瓜蛋白酶的水解度随着 pH 的升高呈现先增加后降低的趋势,当 pH 为 6.50 时水解度达到最高为 (26.32±1.75)%, 为探究最适宜酶解 pH,选择 pH 值 6.20、6.40 和 6.60 进行正交实验。

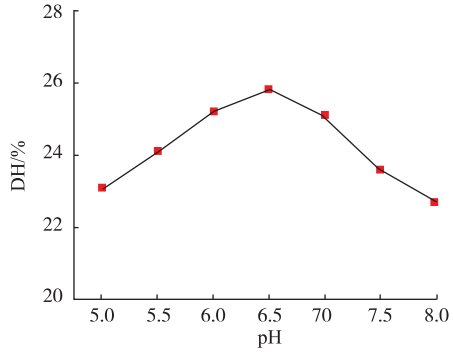


图 5 酶解 pH 对水解度的影响

Fig. 5 Effect of pH on hydrolysis degree

2.4 正交实验结果与分析

在单因素试验的基础上,对酶解时间、加酶量、酶解温度和酶解 pH 展开 $L_9(3^4)$正交试验,探究最优水平,正交试验设计见表 2,鸭蛋卵清蛋白酶解正交试验结果见表 4。

由表 4 可知,通过正交试验结果的极差分析可知对水解度影响大小排序为 $A>B>C>D$, 最优解 $A_3B_3C_3D_2$, 即通过正交试验得出木瓜蛋白酶的最佳水解条件为,水解时间为 5.5 h,加酶量为 4.5×10⁴ U/(g·min),酶解温度为 55 ℃,酶解 pH 6.40。采取此条件进行验证实验,经验证此条件下木瓜蛋白酶水解鸭蛋卵清蛋白的水解度为(27.91±0.57)%,表明该优化取得了较好的效果。后续实验均采用此优化结果制备鸭蛋卵清蛋白木瓜蛋白酶酶解产物(HD),并进行进一步分析。

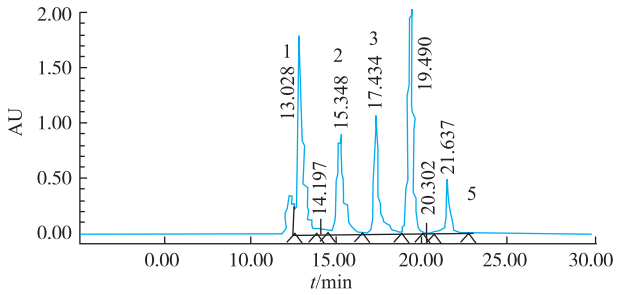
表 4 正交试验结果

Table 4 Orthogonal test results

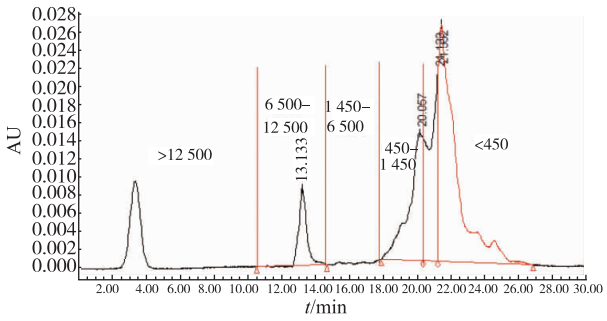
序号	A	B	C	D	DH/%
1	1	1	1	1	23.92
2	1	2	2	2	24.81
3	1	3	3	3	25.08
4	2	1	2	3	25.57
5	2	2	3	1	26.31
6	2	3	1	2	26.12
7	3	1	3	2	27.32
8	3	2	1	3	27.22
9	3	3	2	1	27.83
k_1	24.60	25.60	25.8	26.02	
k_2	26.00	26.11	26.1	26.08	
k_3	27.46	26.34	26.2	25.96	
R	2.85	0.74	0.48	0.13	

2.5 HD 的相对分子质量分布

采用高效液相色谱法进行酶解产物的相对分子质量分布测定,利用标准品的保留时间与 lg(M_w)做线性回归方程:$y=-0.204\ 2x+6.790\ 6$,$R^2=0.974\ 6$。标准品与样品的高效渗透色谱图见图 6。因此可求得鸭蛋卵清蛋白在经过木瓜蛋白酶水解后相对分子质量分布范围为:M_w<300 占 33.71%、300<M_w<450 占 29.21%、450<M_w<1 450 占 20.42%、1 450<M_w<6 500 占 0.49%、6 500<M_w<12 500 占 5.05%、M_w>12 500 占 11.12%。其中 M_w<1 450 的比例为 83.35%,表明鸭蛋卵清蛋白经过木瓜蛋白酶水解后产生了较多的小分子肽段,而 Doucet D[31]报道水解度大小和低相对分子质量肽段比例存在正相关,与本实验结果相符。本实验中采用优化后的条件进行卵清蛋白的酶解,卵清蛋白中的多肽片段被尽可能地分解, 推测其原因是采用木瓜蛋白酶水解 5.5 h 后,卵清蛋白中的多肽链被分解,从而使得产物中小分子肽段比例增加,因而产物的相对分子质量分布大部分在 1 500 以下。



(a)标准品的相对分子质量分布图



(b)HD的相对分子质量分布图

其中 1~5 分别表示细胞色素 C(相对分子质量 12 500)、抑肽酶(相对分子质量 6 500)、杆菌肽(相对分子质量 1 450)、乙酰基四肽 GGYR (相对分子质量 451.2) 和还原型谷胱甘肽(相对分子质量 307.3)的出峰时间

图 6 HD 的高效凝胶渗透色谱图

Fig. 6 High performance gel permeation chromatography of HD

2.6 HD 的免疫活性评价

多肽的免疫活性已经被一些文献报道,Wu[32]报道了利用 5 种蛋白酶酶解脱脂麦胚谷蛋白,其中碱性蛋白酶水解产物具有更好地促进脾细胞增殖、吞噬中性红和促进细胞因子分泌的能力,Songyi Lin[33]报道了松子仁蛋白肽在 3 000~10 000 的产物 PNMPP 可增强 ICR 小鼠的先天性免疫和适应性免疫。如图 7 所示,经过 HD 处理 24 h 的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的上清液中 NO、TNF-α 和 IL-6 的含量均显著高于空白组,说明以促进小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 参与并促进机体炎症反应,显示出一定

的免疫活性,从而显示出具有一定的免疫活性。在图 7(a)中,当采用 250 μg/mL 的 HD 处理细胞时,其 NO 分泌量达到了(42.37±1.05) μmol/L,是空白组的 1.5 倍,而在图 7(b)(c)中,TNF-α、IL-6 分泌量分别达到了(854.77±12.13) pg/mL 和(367.51±5.93) pg/mL,分别是空白组的 4.09 倍和 2.39 倍,均达到显著水平(p<0.01),表明 HD 在 250 μg/mL 时即可刺激巨噬细胞分泌促炎因子,激发机体内非特异性免疫。当 HD 质量浓度达到 1 000 μg/mL 时,3 种细胞因子 NO、TNF-α 和 IL-6 分泌量分别达到阳性对照 LPS(20 μg/mL)的 87.94%、59.10%和 73.53%,推测 HD 可能具有类似于脂多糖的抗原性,但是相对于脂多糖其引起的非特异性免疫反应又较温和,可能是一种潜在的免疫调节剂。

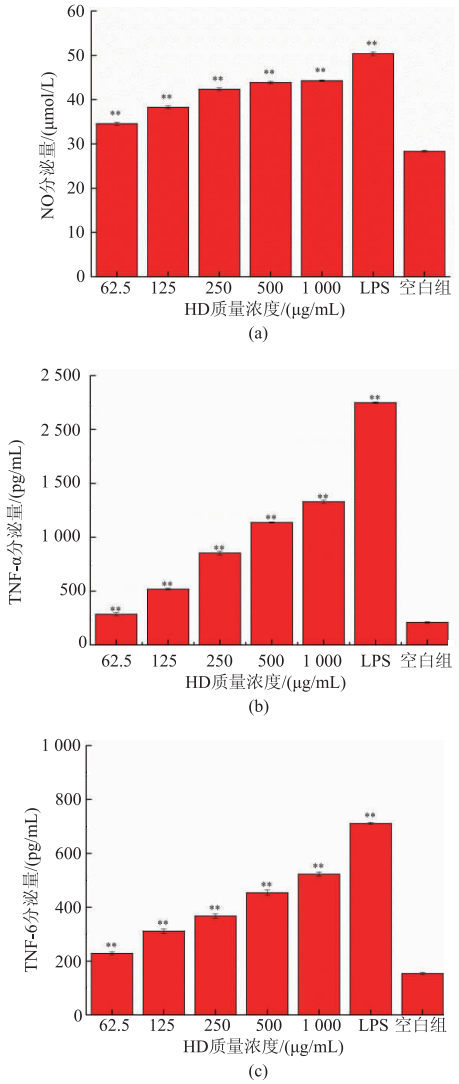


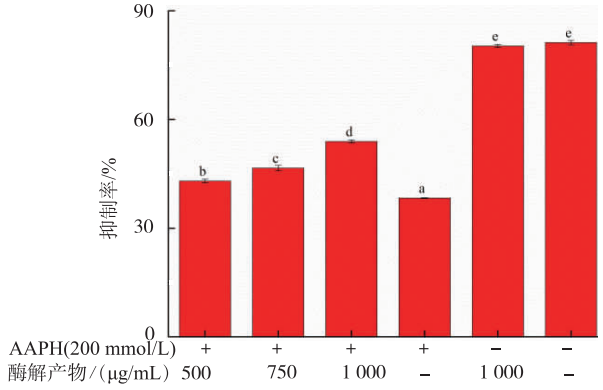
图 7 HD 的免疫活性

Fig. 7 Immunological activity of HD

2.7 HD 对 AAPH 诱导的红细胞溶血的保护

AAPH 可以在 37 ℃热分解产生烷基自由基,遇到氧气时会被氧化形成氢过氧自由基。氢过氧自由基可以攻击细胞膜与磷脂反应引起脂质过氧化从而破坏细胞膜的完整性,使红细胞溶血,因此可以通过测定溶血抑制率间接反应样品的体外抗氧化活性。

如图 8 所示,加入 1 000 μg/mL 样品的毒性组与不加 AAPH 的正常组的抑制率均在 80%以上,且无显著性差异(P<0.05),表明 HD 对人红细胞无损伤作用,可以进行后续实验。由图 8 可知,加入 HD 后的样品组(样品+AAPH)中红细胞溶血抑制率上升,且随着质量浓度增加溶血抑制率也显著增加(P<0.05)。HD 质量浓度达到 1 000 μg/mL 时,其溶血抑制率为(53.95±1.82)%,溶血抑制率为空白组(只加 PBS)的 0.67 倍,为 AAPH 损伤组(PBS+AAPH)的 1.41 倍,表明 HD 具有一定的红细胞溶血抑制作用。与 Chen[34]的实验结果相比,HD 在 1 000 μg/mL 时的红细胞溶血抑制率与纯化后的 SLT-3 多糖在 750 μg/mL 时的红细胞溶血抑制率相当,表明 HD 具有清除氢过氧自由基的能力。



同一试验下不同字母表明各数据间存在显著性差异(P<0.05)。

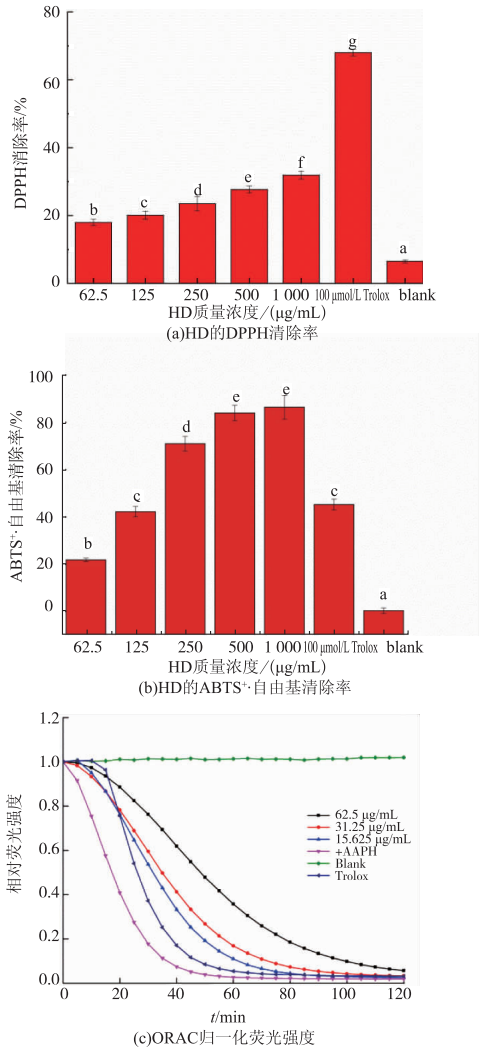
图 8 不同质量浓度的 HD 对红细胞溶血的抑制作用

Fig. 8 Inhibition of HD for erythrocyte hemolysis at different concentrations

2.8 HD 的体外抗氧化活性评价

HD 的体外抗氧化活性评价如图 9 所示。当 HD 的质量浓度为 1 000 μg/mL 时,其 DPPH、$ABTS^{+\cdot}$ 自由基清除率分别为(31.90±0.54)%和(86.41±2.12)%,均显著高于空白组(P<0.05),当 HD 质量浓度达到 125 μg/mL 时,其 $ABTS^{+\cdot}$ 自由基清除能力与 100 μmol/L 的 Trolox 无显著性差异(P<0.05),表明

HD 在 125 μg/mL 时 ABTS^{+}·自由基清除能力与 100 μmol/L 的Trolox 相当。分析其原因可能是 HD 中小分子多肽含量较高，其在水相体系中溶解度很好，因而具有较好的清除自由基能力。HD 的 ORAC 值经换算为 0.357 4 μmol/mg，与 Pádraigín A[35]的微藻多肽的 ORAC 值相当，表明 HD 还具有清除烷氧自由基的能力。但是 HD 的 DPPH 自由基清除率较小，可能是因为鸭蛋卵清蛋白经过木瓜蛋白酶酶解后，其中的高相对分子质量的蛋白质被分解为亲水性的小肽以及游离的氨基酸，极性增加，使其难以捕捉疏水性的 DPPH 自由基[36]。综合以上实验数据，表明 HD 具有一定的体外抗氧化活性。



同一试验下不同字母表明各数据间存在显著性差异（P<0.05）。

图 9　HD 的体外抗氧化活性评价

Fig. 9　Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of HD

3 结　语

本实验中探究了鸭蛋卵清蛋白的酶解条件，先以水解度为指标比较 5 种蛋白酶的水解效率，发现木瓜蛋白酶能特异性裂解鸭蛋卵清蛋白中 Leu 和 Gly 等碱性氨基酸间的肽键，具有最好的水解效果，再利用正交试验探究木瓜蛋白酶水解的最佳条件，采用了 $L_9(3^4)$实验比较了酶解时间、加酶量、酶解温度和酶解 pH 对水解度的影响，最佳条件为：水解时间为 5.5 h，加酶量为 4.5×10^4 U/(g·min)，酶解温度为 55 ℃，酶解 pH 6.40。经验证此条件下水解度为 27.91%，并以此为条件制备成鸭蛋卵清蛋白酶解产物(HD)进行后续实验。

采用液相色谱法对 HD 进行相对分子质量分布区间表征，有如下分布：0<M_w<300、33.71%，300<M_w<450、29.21%，450<M_w<1 450、20.42%，1 450<M_w<6 500、0.49%，6 500<M_w<12 500、5.05%，M_w>12 500、11.12%。相对分子质量分布数据表明鸭蛋卵清蛋白经过木瓜蛋白酶 5.5 h 水解后，M_w<1 450 的部分占 83.35%，结果表明 HD 中小分子肽含量较多，与本实验以水解度为指标进行酶解方案筛选有一定的关系，并推测小分子多肽含量高的 HD 可能具有一定的体外抗氧化活性和免疫调节活性。

本实验对 HD 的免疫活性和体外抗氧化活性进行了进一步的探究。当采用 250 μg/mL 的 HD 刺激小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 时，其 NO、TNF-α 和 IL-6 分泌量分别达到了空白组的 1.5 倍、4.09 倍和 2.39 倍，均达到显著水平(P<0.05)，表明 HD 在较低质量浓度下即可刺激细胞分泌促炎因子激发机体内非特异性免疫。HD 对 AAPH 诱导损伤的红细胞溶血抑制实验显示，1 000 μg/mL 的 HD 对细胞无毒害作用，其溶血抑制率为(53.95±1.82)%，为空白组的 0.67 倍，为 AAPH 损伤组的 1.41 倍，表明 HD 可以保护羊红细胞免受 AAPH 产生的氢过氧自由基的攻击，显示出一定的体外抗氧化能力。本实验中还采用化学法对 HD 的体外抗氧化活性进行了评价，结果显示当样品质量浓度为 1 000 μg/mL 时，其 DPPH 和ABTS^{+}·自由基清除率分别为(31.90±0.54)%和(86.41±2.12)%，ORAC 值为 0.357 4 μmol/mg，其 DPPH 自由基清除率较低可能是因为本实验中获得的多肽相对分子质量较小，在 DPPH 体系中难以捕捉疏水性自由基。活性探究实验表明鸭蛋卵清蛋白

酶解产物具有较好的免疫活性和体外抗氧化活性，也为鸭蛋的开发利用提供了理论支撑。

参考文献:

[1] MINE Y,NOUTOMI T,HAGA N. Emulsifying and structural properties of ovalbumin[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1991,39(3):443-446.
[2] LEI L,CHI Y,CHEN C,et al. Structural and functional properties of ovalbumin glycated by dry-heating in the presence of maltodextrin[J]. **International Journal of Food Properties**,2015,18(6):1326-1333.
[3] DELAHAIJE R J B M, LECH F J, WIERENGA P A. Investigating the effect of temperature on the formation and stabilization of ovalbumin foams[J]. **Food Hydrocolloids**,2019,91:263-274.
[4] WUSIMAN A, XU S W, NI H Y,et al. Immunomodulatory effects of Alhagi honey polysaccharides encapsulated into PLGA nanoparticles[J]. **Carbohydrate Polymers**,2019,211:217-226
[5] VISENTINI F F,FERRADO J B,PEREZ A A,et al. Simulated gastrointestinal digestion of inclusion complexes based on ovalbumin nanoparticles and conjugated linoleic acid[J]. **Food & Function**,2019,10:2630-2641.
[6] XIE H,XIANG C,LI Y,et al. Fabrication of ovalbumin/κ-carrageenan complex nanoparticles as a novel carrier for curcumin delivery[J]. **Food Hydrocolloids**,2018,89:111-121.
[7] 周国仪,成静,陈栋梁,等. 鸡卵清蛋白多肽的纯化及抗氧化作用的研究[J]. 食品科学,2009,30(15):30-32.
[8] 薛海燕,王战勇,宋宏新,等. 卵清蛋白水解及抗氧化肽制备工艺研究[J]. 陕西科技大学学报:自然科学版,2016,166(3):132-137.
[9] 宋宏新,秦婧,薛海燕,等. 卵白蛋白多肽的酶解制备及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2014,35(8):153-156.
[10] 唐文婷,张晖,王立,等. 卵白蛋白水解产物的抗菌性及抗氧化性[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(3):241-247.
[11] 刘丽莉,王焕,李丹,等. 鸡蛋清卵白蛋白酶解工艺优化及其结构性质[J]. 食品科学,2016,37(10):54-61.
[12] NIMALARATNE C,BANDARA N,WU J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white[J]. **Food Chemistry**,2015,188:467-472.
[13] MEMARPOOR-YAZDI M,ASOODEH A,CHAMANI J K. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates[J]. **Journal of Functional Foods**,2012,4(1):278-286.
[14] SUN N ,JIN Z ,LI D ,et al. An exploration of the calcium-binding mode of egg white peptide,Asp-His-Thr-Lys-Glu,and *in vitro* calcium absorption studies of peptide-calcium complex[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2017,65:9782-9789.
[15] LEE J H ,MOON S H,KIM H S,et al. Antioxidant and anticancer effects of functional peptides from ovotransferrin hydrolysates [J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2017,97:4857-4864.
[16] NEVES A C,PÁDRAIGÍN A H,MARTINA B,et al. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory,and antioxidant activities[J]. **Food Chemistry**,2017,218:396-405.
[17] MATOBA N,USUI H,FUJITA H,et al. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery[J]. **FEBS Letters**,1999,452(3):181-184.
[18] WU W J,ZHANG M,REN Y,et al. Characterization and immunomodulatory activity of a novel peptide,ECFSTA,from wheat germ globulin[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2017,65:5561-5569.
[19] 任尧. 鸭蛋清蛋白肽的酶法制备及其抗氧化活性研究[D]. 广州:华南理工大学,2011.
[20] 陈功. 脱盐咸鸭蛋蛋清的酶法水解[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(3):296-298.
[21] CHO D Y,JO K,CHO S Y,et al. Antioxidant effect and functional properties of hydrolysates derived from egg-white protein[J]. **Korean for Food Science of Animal Resourses**,2014,34(3):362-371.
[22] 陈栋梁. 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.
[23] 李艳红. 鹰嘴豆蛋白酶解物的制备及其抗氧化肽的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.
[24] NOH D O,SUH H J. Preparation of egg white liquid hydrolysate (ELH) and its radical-scavenging activity[J]. **Preventive Nutrition and Food Science**,2015,20(3):183-189.
[25] AMZA T ,AMADOU I ,BALLA A ,et al. Antioxidant capacity of hydrolyzed protein fractions obtained from an under-explored seed protein:gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*)[J]. **Journal of Food Science and Technology**,2015,52(5):2770-2778.
[26] 张婷,吴晖,赖富饶,等. 紫芝菌丝体多糖的结构鉴定及免疫活性研究[J]. 现代食品科技,2017(4):58-66.

[27] MA Y,LIU S,HUANG H. Alleviation effect of heat-treated and *in vitro* gastrointestinal digested soymilks on AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes[J]. **Food Research International**,2014,66:228-234.

[28] YOU S J,UDENIGWE C C,ALUKO R E,et al. Multifunctional peptides from egg white lysozyme [J]. **Food Research International**,2010,43(3):848-855.

[29] ZHANG Y,SHEN Y,ZHANG H,et al. Isolation,purification and identification of two antioxidant peptides from water hyacinth leaf protein hydrolysates (WHLPH)[J]. **European Food Research and Technology**,2017,244:83-96.

[30] 王光. 花生芽富硒的机理及有机硒的生物活性研究[D]. 广州:华南理工大学,2017.

[31] DOUCET D,OTTER D E,GAUTHIER S F,et al. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2003,51(21):6300-6308.

[32] WU W J,ZHANG M ,SUN C ,et al. Enzymatic preparation of immunomodulatory hydrolysates from defatted wheat germ (*Triticum vulgare*) globulin[J]. **International Journal of Food Science & Technology**,2016,51:2556-2566.

[33] LIN S,LIU X,LIU B,et al. Optimization of pine nut (*Pinus koraiensis*) meal protein peptides on immunocompetence in innate and adaptive immunity response aspects[J]. **Food and Agricultural Immunology**,2016,28(1):1-12.

[34] WENBO C,JUANJUAN M,FAN G,et al. Two novel polysaccharides from the torus of *Saussurea laniceps* protect against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes[J]. **Carbohydrate Polymers**,2018,200:446-455.

[35] PÁDRAIGÍN A H,O'KEEFFE M B,Fitzgerald R J,et al. Fractionation and identification of antioxidant peptides from an enzymatically hydrolysed Palmaria palmata protein isolate[J]. **Food Research International**,2017,100:416-422.

[36] ULUKO H,ZHANG S,LIU L,et al. Effects of thermal,microwave,and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates[J]. **Journal of Functional Foods**,2015,18:1138-1146.

科　技　信　息

欧盟批准 L-苏氨酸作为所有动物的饲料添加剂

据欧盟官方公报消息,2020 年 7 月 24 日,欧盟委员会发布法规(EU)2020/1091 号条例,根据欧洲议会和理事会法规(EC) No 1831/2003,批准 L-苏氨酸(L-threonine)作为所有动物的饲料添加剂。

据条例,这种 L-苏氨酸是由大肠杆菌(*Escherichia coli*)CGMCC 11473 生产而来。根据附件中规定的条件,这种添加剂被授权作为动物营养添加剂所属添加剂类别为“营养添加剂”,功能组别为“氨基酸、氨基酸盐及其类似物”。授权结束日期为 2030 年 8 月 16 日。本条例自发布之日起第 20 天生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准 L-苏氨酸作为所有动物的饲料添加剂 [EB/OL]. (2020-07-28). http://news.foodmate.net/2020/07/567500.html