

羊肺蛋白酶解工艺优化及体外抗氧化活性研究

Optimization of protease enzymatic hydrolysis of sheep lung and studies on antioxidant activities of its hydrolysates

杨旭卉¹ 文 飞¹ 王先倩¹ 齐 琦² 苏 伟¹ 托 尼³

YANG Xu-hui¹ WEN Fei¹ WANG Xian-qian¹ QI Qi² SU Wei¹ TUO Ni³

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵州省晴隆县海权清真肉羊食品加工有限公司, 贵州 黔西南布依族苗族自治州 561400)

(1. College of Liquor and Food, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 3. Qinglong County, Guizhou Sea Power Sheep Halal Food Processing Ltd., Southwest Guizhou Autonomous Prefecture, Guizhou 561400, China)

摘要:为优化羊肺酶解工艺及探讨酶解物体外抗氧化活性, 采用中性蛋白酶酶解羊肺, 以水解度为评价指标, 在单因素试验的基础上, 运用响应面法优化酶解工艺。结果表明: 羊肺的最佳酶解条件为酶解温度 50 ℃, 加酶量 1 700 U/g, 水料比 2:1(mL/g), 酶解时间 4 h。在最优条件下, 进行 3 次验证性实验, 测得实际水解度为 18.89%, 与理论水解度 (18.19%) 相比误差较小。体外抗氧化结果表明: 羊肺酶解产物具有一定的抗氧化活性, 其还原力的吸光值为 0.472, 清除 DPPH·、·O₂⁻ 和 ·OH 的 IC₅₀ 值分别为 67.00, 40.07, 31.88 mg/mL。

关键词: 羊肺; 蛋白; 酶解; 抗氧化

Abstract: By using the hydrolysis degree as the evaluation, the sheep lung enzymatic process was optimized to investigate the antioxidant activities of the enzymolysis products, hydrolyzed by neutral protease. On the basis of single factor studies, the response surface analysis (RSM) assay was then used to obtain the best enzymatic process. Our results showed that the optimal condition was as follows. The enzyme amount was 1 700.0 U/g, with solid-liquid ratio 2:1(mL/g), enzymatically hydrolyzed for 4 h at 50 ℃. Under this optimal conditions, 3 times of the replication experiments turned out that the error of the actual degree of hydrolysis (18.89%) was small, compared with the theory one (18.19%). Moreover, the absorption value of reducing power was found to be 0.472, and IC₅₀ of the DPPH radical scavenging rate, the superoxide anion radical scavenging rate, and the hydroxyl radical scavenging rate were 67 mg/mL,

40.07 mg/mL, and 31.88 mg/mL, respectively. These results of above detection indicated that enzymatic hydrolysates of sheep lungs possessed certain antioxidant activity *in vitro*.

Keywords: sheep lung; protein; hydrolysis; antioxidant

目前, 酶解技术因其反应条件温和、反应时间短、效率高等优点而广泛应用于多肽的制备, 也使得通过酶解内脏等副产物来制备生物活性肽成为研究热点。Barkia 等^[1-2] 分别利用碱性蛋白酶酶解沙丁鱼内脏和鱼头, 前者获得了分子量为 3.5 kD 的抗氧化活性肽, 后者得到 ACE(血管紧张素转化酶)抑制肽。Elavarasan 等^[3] 通过风味蛋白酶来酶解 3 种不同淡水鲤鱼, 得到的多肽表现出较高的 ACE 抑制活性。Zhou Da-yong 等^[4] 通过 5 种不同的蛋白酶酶解鲍鱼内脏, 研究不同酶解产物的抗氧化活性及其与原料中总氨基酸组成的差异分析, 结果表明不同的肽液都具有较优的抗氧化活性; 与原料氨基酸相比, 不同酶解产物的氨基酸含量有所差异, 5 种酶解产物中都存在清除自由基活性较强的组氨酸、亮氨酸和酪氨酸。Mamelona 等^[5] 通过碱性蛋白酶酶解无脊椎动物副产物(包括海参内脏、生殖腺和海胆), 所得酶解物均具有较高的清除 ORAC 自由基和抑制脂质过氧化自由基的能力。

随着羊肉需求量增多和加工企业生产规模的扩大, 产生大量的羊副产物, 这些副产物常被加工成饲料或直接丢弃, 不仅产品附加值较低, 而且对环境造成污染。中国羊肉加工企业虽多, 但对羊副产物的加工利用大多还停留在粗加工阶段, 使得大量的羊副产物未得到充分利用。羊肺为羊肉加工过程中的副产物之一, 蛋白质含量丰富, 同时含铁、硒等营养元素, 并有补益肺气、止咳、利尿行水的作用。因此, 对羊肺进行深加工、精加工, 提高其附加值是亟待解决的问题。

目前, 国内外学者已对羊骨^[6-8]、羊脑^[9]、羊胎盘^[10-11]、

基金项目: 黔西南州种草养羊产业发展省州科技合作专项项目(编号: 黔西南科号[2012]4)

作者简介: 杨旭卉, 女, 贵州大学在读硕士研究生。

通讯作者: 苏伟(1974—), 男, 贵州大学副教授, 博士。

E-mail: suwei1886@163.com

收稿日期: 2016-03-05

羊肝^[12]、羊胃^[13]等羊副产物进行了相关研究,而关于羊肺的研究^[14]主要集中于绵羊肺炎支原体分离与鉴定等畜禽方面,对羊肺进行酶解,研究其抗氧化活性的研究未有报道。本研究采用酶解技术,通过响应面优化羊肺酶解工艺,研究羊肺酶解产物的体外抗氧化活性及其氨基酸组成,以期为羊肺深加工、生物活性肽产品的开发和提高羊肺资源加工利用率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

羊肺:贵州晴隆海权羊肉加工有限公司;
DPPH(1,1-二苯基-2-苦肟基):美国 Sigma 公司;
中性蛋白酶(酶活力 40 万 U/g)、碱性蛋白酶(酶活力 40 万 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活力 80 万 U/g)、胰蛋白酶(酶活力 4 万 U/g):广西南宁庞博生物有限公司;
其他试剂:均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

定氮仪:KDN-08 系列,浙江托普仪器科学有限公司;
电热恒温水浴锅:HH-S6 型,北京科伟仪器有限公司;
酸度计:PHS-06 型,上海欧宇仪器有限公司;
紫外分光光度计:TU-1950 系列,北京普析仪器科学有限公司;
氨基酸分析仪:L8800 型,日本日立仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺流程

原料预处理→石油醚脱脂 12 h→按比例加水匀浆→调节 pH 值→恒温酶解→灭酶(100 ℃,10 min)→冷却→过滤→酶解液→测定水解度

1.2.2 蛋白酶的筛选 以水解度为指标进行筛选。称取已脱脂的原料 15 g,根据表 1 不同酶的作用条件,进行酶解。

1.2.3 水解度的测定 总氮含量测定按 GB 5009.5—2010 的凯氏定氮法执行;水解后生成的氨基态氮含量测定采用甲醛电位滴定法^[15]进行。水解度按式(1)计算:

$$c = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%,$$

式中:

c ——水解度,%;

m_1 ——水解后生成的氨基的量,g;

m_2 ——样品中总氮含量,g。

表 1 各种酶酶解条件					
Table 1 Hydrolysis conditions of 4 kind of proteases					
蛋白酶种类	pH	温度/ ℃	加酶量/ (U·g ⁻¹)	水料比 (mL/g)	酶解时 间/h
木瓜蛋白酶	6.5	50	1 400	3∶1	5
胰蛋白酶	7.5	55	1 400	3∶1	5
碱性蛋白酶	8.0	50	1 400	3∶1	5
中性蛋白酶	7.0	50	1 400	3∶1	5

1.2.4 酶解液体外抗氧化活性测定

- (1) 清除 DPPH 自由基能力测定:参照文献[16]。
- (2) 还原力测定:参照文献[16]。
- (3) 清除超氧阴离子能力测定:参照文献[16]。
- (4) 清除羟基自由基能力测定:参照文献[17]。

1.2.5 单因素试验 以水解度为指标,以中性蛋白酶进行羊肺酶解,调节 pH 至 7.0,以酶解时间、酶解温度、加酶量、水料比为酶解因素,确定单因素的条件:

- (1) 酶解时间:分别称取 5 份(每份 15 g)脱脂匀浆羊肺,在反应温度为 50 ℃、pH 为 7.0、水料比为 2∶1(mL/g)、加酶量为 1 200 U/g 的条件下,研究酶解时间(1,2,3,4,5 h)对羊肺水解度的影响。
- (2) 酶解温度:分别称取 5 份(每份 15 g)脱脂匀浆羊肺,在 pH 为 7.0、水料比为 2∶1(mL/g)、加酶量为 1 200 U/g 的条件下酶解 4 h,研究酶解温度(40,45,50,55,60 ℃)对羊肺水解度的影响。

(3) 加酶量:分别称取 5 份(每份 15 g)脱脂匀浆羊肺,在酶解温度为 50 ℃、水料比为 2∶1(mL/g)、pH 为 7.0 的条件下酶解 4 h,研究加酶量(400,800,1 200,1 600,2 000 U/g)对羊肺水解度的影响。

(4) 水料比:分别称取 5 份(每份 15 g)脱脂匀浆羊肺,在酶解温度为 50 ℃、pH 为 7.0、加酶量为 1 600 U/g 的条件下酶解 4 h,研究水料比(1∶1,2∶1,3∶1,4∶1,5∶1,mL/g)对羊肺水解度的影响。

1.2.6 羊肺基本理化成分测定

- (1) 蛋白质含量:参照 GB 5009.5—2010 采用凯氏定氮法测定。
- (2) 脂肪含量:参照 GB/T 5009.6—2003 采用索氏抽提法测定。
- (3) 水分含量:参照 GB/T 5009.3—2003 采用直接干燥法测定。
- (4) 灰分含量:参照 GB/T 5009.4—2003 采用灼烧法测定。

1.2.7 羊肺酶解液中氨基酸含量分析 参考文献[18],略微修改:称取羊肺酶解液 0.5 mL 于水解管中,加入 6 mol/L HCl 溶液 5 mL,充氮气后,热融密封,110 ℃烘箱中水解 24 h,待放冷后,用蒸馏水无损转移水解液至容量瓶中,用 6 mol/L HCl 调节 pH 值至 2~3,再用蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶,取约 1 mL 适量浓度的水解液过 45 μm 滤膜至进样瓶,采用全自动氨基酸分析仪上样测定。

2 结果与分析

2.1 羊肺基本组成分析

由表 2 可知,羊肺酶解液的粗蛋白质含量在 17%左右,可用于羊肺多肽的酶解。

2.2 蛋白酶的筛选

蛋白酶的种类不同,其作用位点及其所结合的底物特异性也有所不同。在各酶最适条件下,对羊肺进行酶解,结果见图 1。由图 1 可知,4 种蛋白酶中,中性蛋白酶的水解度最

表 2 羊肝基本组分分析

Table 2 Analysis of the main components of Sheep liver

g/100 g			
粗蛋白	脂肪	水分	灰分
16.90±0.82	0.84±0.20	79.23±0.31	2.03±0.16

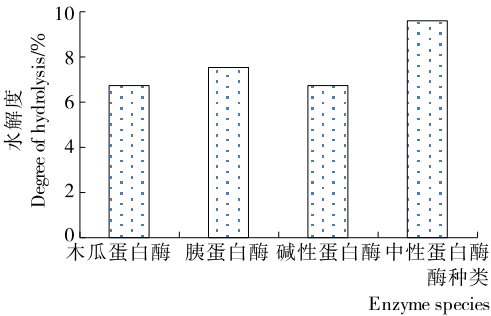


图 1 酶种类对羊肺酶解液水解度的影响

Figure 1 Effect of enzyme type on the degree of hydrolysis of sheep lung

高,为 9.58%,其次是胰蛋白酶(7.51%),木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的水解度均为 6.70%。中性蛋白酶是一种金属蛋白酶,其主要作用于疏水性氨基酸残基或任一氨基酸肽键的-Leu 端^[19],其酶解产物的水解度最高。因此,选用中性蛋白酶酶解羊肺进行后续试验。

2.3 单因素试验条件对中性蛋白酶酶解羊肺水解度的影响

2.3.1 酶解时间 由图 2 可知,酶解时间 4 h 前,随着酶解时间的延长,羊肺水解度呈逐渐增大趋势,酶解 4 h 后水解度变化较小。这是因为在反应 4 h 前,酶活力高,酶解时间的延长促使反应向正方向进行,加快羊肺蛋白质被降解的速率,当酶解反应达到 4 h 后,大分子蛋白完全被降解为小分子肽,酶切位点开始减少,酶活力降低,使得水解度趋于平缓^[20]。因此,考虑时间成本,选择 4 h 为最佳酶解时间。

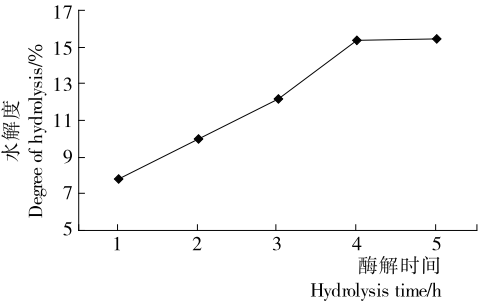


图 2 酶解时间对羊肺酶解液水解度的影响

Figure 2 Effect of hydrolysis time on the hydrolysis degree of sheep lung

2.3.2 酶解温度 由图 3 可知,温度过高或过低都会对羊肺水解度造成影响,高温会使蛋白质的结构发生变性,从而使酶活性降低,水解度降低;低温不利于酶与底物反应完全,水解不彻底,也会造成水解度较低。所以,选择酶解温度为 50 ℃。

2.3.3 加酶量 由图 4 可知,在酶添加量低于 1 600 U/g

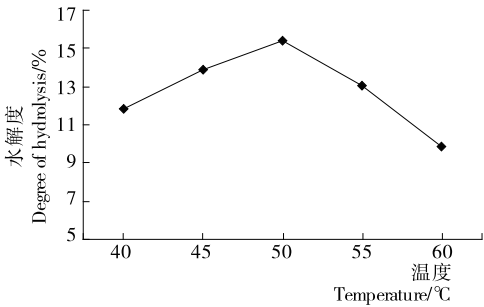


图 3 酶解温度对羊肺酶解液水解度的影响

Figure 3 Effect of hydrolysis temperature on the hydrolysis degree of sheep lung

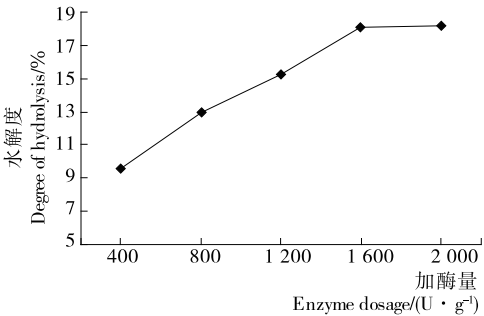


图 4 加酶量对羊肺酶解液水解度的影响

Figure 4 Effect of amounts of enzymes on the hydrolysis degree of sheep lung

时,水解度上升趋势较快,高于 1 600 U/g 时,水解度变化缓慢。出于蛋白酶使用成本的考虑,选择酶用量为 1 600 U/g。

2.3.4 水料比 在蛋白酶解反应中,水在反应中有利于分子的扩散和运动,一方面水量的多少会影响酶与底物的浓度高低,另一方面会影响水解的效果^[18]。由图 5 可知,在一定范围内,羊肺水解度随水料比的增大而增大,在水料比为 2 : 1 (mL/g)时水解度达到最大值,随后水解度表现为逐步减小。考虑合理用水,选择水料比 2 : 1 (mL/g)较为适宜。

2.4 响应面优化试验结果与分析

在单因素试验的基础上,以酶解温度、加酶量、水料比、酶解时间为自变量,水解度为响应值,按照 Box-Behnken 中心组合设计原理,进行响应面试验设计,因素水平编码表见表 3,试验设计和分析采用 Design-Expert.V8.0.6 软件。

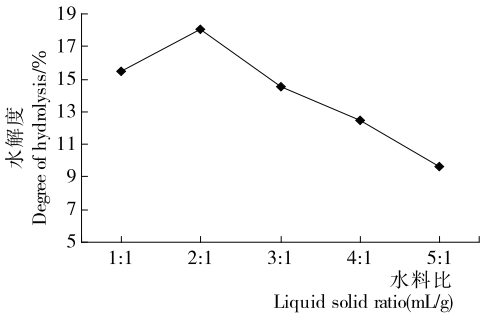


图 5 水料比对羊肺酶解液水解度的影响

Figure 5 Effect of water-solid ratio on the hydrolysis degree of sheep lung

表 3 因素水平编码表
Table 3 Factors and levels table

水平	A 酶解温度/℃	B 加酶量/(U · g ⁻¹)	C 水料比(mL/g)	D 酶解时间/h
－1	45	1 200	1 ∶ 1	3
0	50	1 600	2 ∶ 1	4
1	55	2 000	3 ∶ 1	5

2.4.1 试验数据分析 利用 Design-Expert.V8.0.6 软件,对表 4 试验数据进行多元回归拟合,得到水解度对自变量酶解温度、加酶量、水料比、酶解时间的二次多项式回归模型方程:

Y=18.08+0.60A+0.64B+0.05C+0.41D－0.82AB－0.19AC－0.72AD+0.44BC－0.06BD－0.10CD－3.23A²－1.24B²－1.98C²－2.16D²。

(2)

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Box-Behnken experimental design matrix and results

试验号	A	B	C	D	Y 水解度/%
1	0	－1	1	0	13.95
2	0	0	1	1	14.03
3	1	－1	0	0	14.51
4	0	0	0	0	17.63
5	0	1	－1	0	15.13
6	0	0	1	－1	13.45
7	0	0	0	0	17.87
8	1	0	0	－1	13.24
9	0	0	－1	－1	13.11
10	0	－1	0	－1	13.49
11	－1	0	－1	0	11.89
12	1	1	0	0	13.55
13	1	0	1	0	13.79
14	－1	1	0	0	13.81
15	－1	0	0	－1	11.14
16	－1	0	1	0	12.61
17	0	0	－1	1	14.08
18	0	－1	0	1	14.02
19	1	0	0	1	13.04
20	0	1	0	－1	15.78
21	0	－1	－1	0	15.02
22	0	1	0	1	16.09
23	－1	－1	0	0	11.49
24	0	0	0	0	18.31
25	0	0	0	0	18.23
26	0	0	0	0	18.35
27	－1	0	0	1	13.83
28	0	1	1	0	15.82
29	1	0	－1	0	13.84

由表 5 可知,模型的决定系数 $R^2=0.968\ 9$,校正系数 R^2_{adj} 为 0.937 9,该模型能解释 93.79%的中性蛋白酶解羊肺响应值的变化。回归模型 $P<0.000\ 1$,表明拟合得到的模型方程极显著;失拟项 $P=0.139\ 3>0.05$ 不显著,说明回归方程与实测值之间拟合较好;一次项 A、B、交互项 AB,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 差异均为极显著($P<0.01$),一次项 D 与交互项 AD 差异显著($P<0.05$)。从表 5 中各因素 P 值可知,影响水解度的主次关系为:加酶量>温度>酶解时间>料液比。

表 5 回归方程各项的方差分析[†]

Table 5 Analysis of variance of regression equation

变异来源	均方	自由度	平方和	F 值	P 值	显著性
回归模型	109.66	14	7.83	31.19	< 0.000 1	* *
A	4.32	1	4.32	17.20	0.001 0	* *
B	4.94	1	4.94	19.67	0.000 6	* *
C	0.03	1	0.03	0.11	0.743 2	
D	1.98	1	1.98	7.90	0.013 9	*
AB	2.69	1	2.69	10.71	0.005 6	* *
AC	0.15	1	0.15	0.59	0.455 1	
AD	2.09	1	2.09	8.31	0.012 0	*
BC	0.77	1	0.77	3.08	0.100 9	
BD	0.01	1	0.01	0.05	0.829 4	
CD	0.04	1	0.04	0.15	0.703 0	
A ²	67.51	1	67.51	268.83	< 0.000 1	* *
B ²	9.91	1	9.91	39.47	< 0.000 1	* *
C ²	25.39	1	25.39	101.12	< 0.000 1	* *
D ²	30.15	1	30.15	120.08	< 0.000 1	* *
残差	3.52	14	0.25			
失拟项	3.12	10	0.31	3.16	0.139 3	
纯误差	0.39	4	0.10			
总和	113.17	28				

[†] * * 表示差异极显著, $P<0.01$; * 表示差异显著, $P<0.05$;
 $R^2=0.968\ 9$, $R^2_{\text{adj}}=0.937\ 9$ 。

2.4.2 响应面直观图分析 图 6 中显示了各自变量之间的交互作用对羊肺水解度三维响应图和等高线图的影响。由图 6 可知,酶解温度与加酶量、酶解温度与酶解时间之间的交互作用显著,这与方差分析结果吻合。在试验范围内,酶解温度与加酶量、酶解温度与酶解时间之间的交互作用对水解度的影响与单因素变化结果一致。图 6(a)沿加酶量方向的等高线密度高于酶解温度,说明加酶量对水解度的影响大于酶解温度;而图 6(c)沿酶解温度方向的等高线密度高于酶解时间,说明酶解温度对水解度的影响大于酶解时间。

2.4.3 验证实验 通过软件 Design-Expert.V8.0.6 对方程进行求解,得出中性蛋白酶解羊肺的最佳工艺条件为:酶解温度 50.25 ℃,加酶量为 1 698.58 U/g,水料比为 2.03 ∶ 1 (mL/g),酶解时间为 4.08 h,此时理论上水解度为 18.19%。考虑实际操作可行性,将其修正为:酶解温度 50 ℃,加酶量 1 700 U/g,水料比 2 ∶ 1(mL/g),酶解时间 4 h,对上述最优

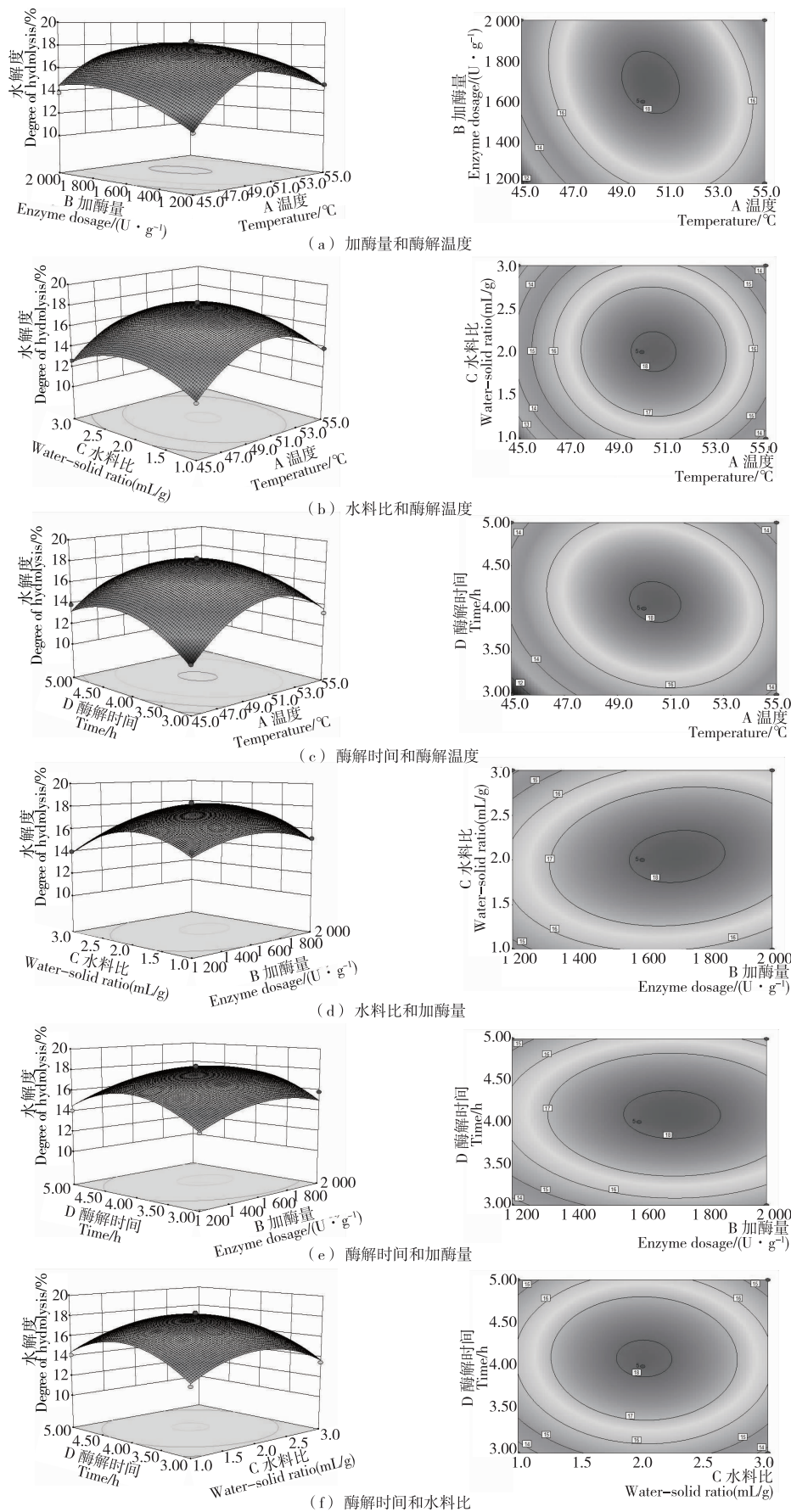


图 6 因素之间的交互作用对羊肺酶解液水解度的影响
Figure 6 Response surface plots showing the interactive effect of hydrolysis temperature, amounts of enzymes, and enzyme hydrolysis time on the DH of sheep lung

酶解条件进行验证,取脱脂羊肺,在最优酶解条件下进行 3 次验证实验,得到羊肺酶解液水解度为 18.89%,实际值与理论值相接近,说明模型拟合度较好。

2.5 氨基酸组成分析

氨基酸的组成在一定程度上影响酶解物的生物活性。由表 6 可知,羊肺酶解液中含有甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和异亮氨酸等疏水性氨基酸,占总氨基酸含量的 27.02%。研究^[21]表明,疏水性氨基酸在脂相中具有良好的溶解性,从而保证了酶解物具有较强的抗氧化活性。羊肺酶解液中疏水性氨基酸的存在,也为其具有较强抗氧化活性提供了可能。

表 6 羊肺酶解液氨基酸结果分析[†]

Table 6 Amino acid composition analysis of Sheep lung g/100 g

氨基酸	含量	氨基酸	含量
天冬氨酸	4.01	异亮氨酸*	1.88
苏氨酸*	1.73	亮氨酸*	3.84
丝氨酸	1.52	酪氨酸	1.06
谷氨酸	6.45	苯丙氨酸*	2.02
甘氨酸	6.43	赖氨酸*	2.93
丙氨酸	3.90	组氨酸*	1.01
半胱氨酸	0.15	精氨酸	3.33
缬氨酸*	2.87	脯氨酸	4.16
蛋氨酸*	0.86	疏水性氨基酸	27.02

[†] * 表示必需氨基酸;疏水性氨基酸^[21]包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和异亮氨酸。

2.6 羊肺酶解液的体外抗氧化活性

2.6.1 清除 DPPH· 能力 由图 7 可知,羊肺酶解液与 Vc 对 DPPH· 的清除率随着质量浓度的增大而逐渐增大,不同质量浓度的酶解液和 Vc 与 DPPH· 清除率之间近似呈量效关系,这与 Zhou Da-yong 等^[4]采用 DPPH 法测定中性蛋白酶酶解鲍鱼内脏所得酶解物清除 DPPH· 的结果一致。在质量浓度为 100 mg/mL 时,羊肺酶解液对 DPPH· 的清除率为 73.20%,而 Vc 的清除率达到 95.20%。羊肺酶解液的 IC₅₀ 值为 67 mg/mL,高于 Vc 的 IC₅₀ 值 26.5 mg/mL。IC₅₀

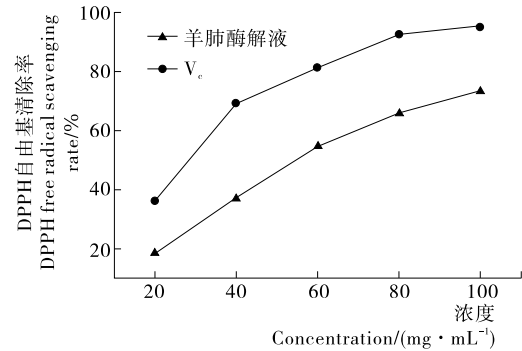


图 7 羊肺酶解液与 Vc 对 DPPH· 的清除作用
Figure 7 Scavenging effect of sheep lung hydrolysate derived from the neutral proteases and ascorbic acid on DPPH radical

值越低,表明抗氧化能力越强。尽管羊肺酶解液的清除能力不如 Vc,但其表现出良好的抗氧化活性。

2.6.2 还原力 多数研究^[21-22]表明,还原力与抗氧化能力具有相关性,还原力越大,其抗氧化能力越强。由图 8 可知,在一定浓度范围内,羊肺酶解液和 Vc 的还原力都随着质量浓度的增大而增大,呈现出剂量效应关系。在相同质量浓度(11 mg/mL)下,羊肺酶解液的吸光值为 0.472,约为 Vc 吸光值(0.973)的 48.51%。羊肺酶解液的还原力虽低于 Vc 的还原力,但羊肺酶解液可作为一种良好的天然抗氧化剂。

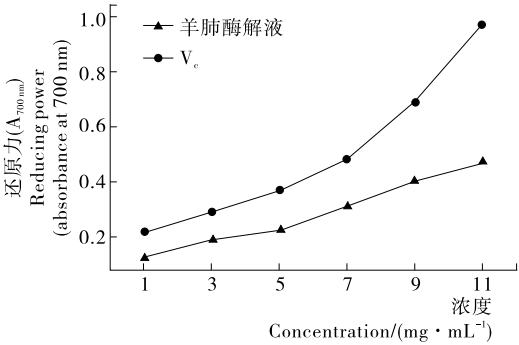


图 8 羊肺酶解液与 Vc 的还原能力
Figure 8 Reduction ability of sheep lung hydrolysate derived from the neutral proteases and ascorbic acid

2.6.3 清除 O₂⁻· 能力 O₂⁻· 是基态氧接受一个电子后形成的第一个氧自由基,经过一系列反应生成其它的氧自由基,会损伤 DNA 和细胞膜,对细胞有显著的破坏性。由图 9 可知,在试验浓度范围内,羊肺酶解液与 Vc 对 O₂⁻· 的清除率都随着质量浓度的增加而增大,在浓度为 30 mg/mL 时,羊肺酶解液对 O₂⁻· 的清除率为 34.91%,Vc 的清除率达到 95.34%,这与王雨生等^[23]酶解黄鳍金枪鱼皮所得胶原肽与 Vc 对超氧阴离子的研究结果相似。与 Vc 相比,尽管羊肺酶解液的清除 O₂⁻· 能力较 Vc 弱,但其仍表现出一定的清除 O₂⁻· 能力。羊肺酶解液与 Vc 的 IC₅₀ 值分别为 40.07, 10.01 mg/mL。

2.6.4 清除 ·OH 能力 在自由基体系中,·OH 的活性最强,能与体内多种生物分子(如氨基酸、蛋白质和 DNA)反应,引起机体发生多种疾病^[21]。由图10可知,在试验浓度

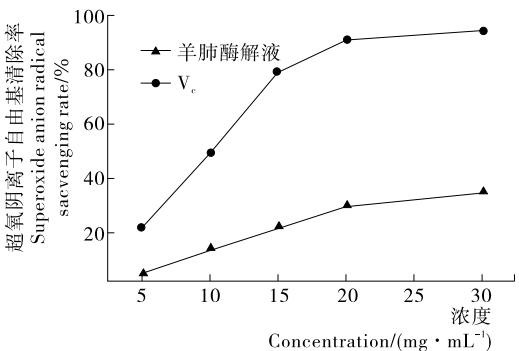


图 9 羊肺酶解液与 Vc 对 O₂⁻· 的清除作用
Figure 9 Scavenging effect of sheep lung hydrolysate derived from the neutral proteases and ascorbic acid on superoxide anions radical

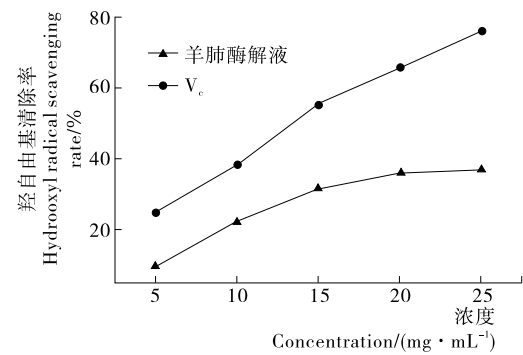


图 10 羊肺酶解液与 Vc 对 ·OH 的清除作用

Figure 10 Scavenging effect of sheep lung hydrolysate derived from the neutral proteases and ascorbic acid on hydroxyl radical

范围内,羊肺酶解液和 Vc 对 ·OH 的清除率与质量浓度之间表现出量效关系。在质量浓度为 25 mg/mL 时,羊肺酶解液对 ·OH 的清除能力为 38.92%,低于王艳梅等^[22]关于黄缘盒龟肉的酶解产物对 ·OH 55% 的清除率,而 Vc 对 ·OH 的清除能力达到 75.48%。羊肺酶解液与 Vc 清除 ·OH 的 IC₅₀ 值分别为 31.88,14.03 mg/mL。羊肺酶解液的 IC₅₀ 值约为 Vc 的 2.27 倍。

3 结论

通过蛋白酶筛选试验表明了中性蛋白酶为羊肺最佳酶解酶。在单因素试验基础上,利用软件 Design-Expert 8.0.6 对试验结果进行分析,得到酶解羊肺的最佳水解工艺组合为:酶解温度 50 ℃,加酶量 1 700 U/g,水料比 2 : 1(mL/g),酶解时间 4 h。在该条件下羊肺酶解液水解度为 18.89%。羊肺酶解液中含有 17 种氨基酸,对自由基具有一定抗氧化作用的疏水性氨基酸含量为 27.02%。羊肺酶解液具有一定抗氧化活性,在试验浓度范围内,其还原力的吸光值为 0.472,对 DPPH ·、O₂⁻ · 和 ·OH 的清除率达到 73.21%,34.91%,38.92%,IC₅₀ 值分别为 67.00,40.07,31.88 mg/mL。试验为提高羊肺加工利用率及开发生物活性肽提供了理论依据,但有关羊肺酶解液中抗氧化组分的分离纯化、作用机理以及体内抗氧化试验都有待进一步研究。

参考文献

[1] BARKIA A, BOUGATEF A, KHALED H B, et al. Antioxidant activities of sardinelle heads and/or viscera protein hydrolysates prepared by enzymatic treatment[J]. Journal of Food Biochemistry, 2010(34): 303-320.

[2] BOUGATEF A, NEDJAR-ARROUME N, RAVALLEC-PLE R, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 350-356.

[3] ELAVARASAN K, SHAMASUNDAR B A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates prepared from three freshwater carps (*Catla catla* ,*Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*) using flavorzyme [J]. International

Journal of Food Science & Technology, 2014, 49(5): 1 344-1 350.

[4] ZHOU Da-yong, ZHU Bei-wei, QIAO Lu, et al. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera[J]. Food and Bioprocess Processing, 2012, 90(2): 148-154.

[5] MAMELONA J, SAINT-LOUIS R, PELLETIER É. Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm byproducts [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(1): 147-154.

[6] 刘金凯, 高远, 王振宇, 等. 氧化羊骨油对羊肉味调基料挥发性风味物质的影响[J]. 中国农业科学, 2014, 47(4):749-758.

[7] 詹萍, 张晓鸣, 田洪磊. 羊骨蛋白酶解物热反应制备羊肉香精的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 286-289.

[8] 冯雅蓉, 马佰珍. 羊骨降血压肽制备工艺的研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版, 2011,31(3): 253-256.

[9] 常飞, 杨雪果, 肖士成, 等. 脱脂羊脑蛋白酶解条件优化及酶解产物体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 114-121.

[10] 周洁静, 侯银臣, 刘旺旺, 等. 采用不同蛋白酶制备羊胎盘抗氧化肽的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 156-161.

[11] 侯银臣, 周洁静, 刘旺旺, 等. 羊胎盘提取剩余物发酵制备活性肽工艺及产物生物活性[J]. 农业工程学报, 2015, 31(1): 311-316.

[12] 韩志慧, 隋姣, 马佰珍. 明目羊肝羹的工艺技术研究[J]. 山西农业科学, 2013, 41(3): 254-258.

[13] BHASKAR N, MODI V K, GOVNDARAJU K, et al. Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(2): 388-394.

[14] 李媛, 陶岳, 阿依吐拉 · 肉孜, 等. 从湖羊肺脏中分离绵羊肺炎支原体的鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(4): 375-379.

[15] 李侠, 张利宽, 刘春萌, 等. 响应面法优化荞麦蛋白酶解工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(22): 145-148.

[16] 赵强忠, 刘丹. 秋刀鱼抗氧化肽制备及其抗氧化活性的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(10): 165-171.

[17] 杜昕, 肖岚, 李诚, 等. 枯草芽孢杆菌发酵牦牛血制备抗氧化肽工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 165-168.

[18] 王雪芹, 邢荣娥, 刘松, 等. 鲈鱼蛋白酶解工艺优化及酶解物的抗氧化活性测定[J]. 现代食品科技, 2013, 29(5): 1 023-1 028.

[19] 胡学智, 王俊. 蛋白酶生产和应用的进展[J]. 工业微生物, 2008, 38(4): 49-61.

[20] 李宁, 刘红芝, 刘丽, 等. 中性蛋白酶分步酶解花生分离蛋白制备花生短肽的研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(24): 5 237-5 247.

[21] 张艳萍, 戴志远, 张虹. 贻贝蛋白的酶解及其酶解物的抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(1): 10-18.

[22] 王艳梅, 万全, 赖年悦, 等. 黄缘盒龟肉的酶解工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 水产学报, 2013, 37(4): 622-630.

[23] 王雨生, 冷云, 陈海华, 等. 黄鳍金枪鱼皮胶原肽酶解工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 72-78.