

牡蛎蛋白酶解物的制备及其抗氧化活性研究

林海生¹, 曹文红^{1,2,3}, 章超桦^{1,2,3,*}, 黄嘉莉¹

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088;

2. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东湛江 524088;

3. 国家贝类加工技术研发分中心, 广东湛江 524088)

摘要: 选用中性蛋白酶, 研究了前处理方法、E/S、pH、温度和时间对酶解牡蛎蛋白效果的影响, 制备牡蛎蛋白酶解物, 分析其游离氨基酸含量及分子量分布, 体外实验测定其抗氧化活性。结果表明, 酶解前100℃热处理10min能够提高酶解物中蛋白肽的含量, E/S为2.0%、pH7.0、温度50℃、时间3.0h为酶解的适宜条件, 其DH达到14.95%; 所制备的EHOP的主要成分为小分子肽类物质, 分子量主要集中在500~3091u, EHOP的还原性较强, 且对羟基自由基和超氧阴离子均有较好的清除能力, EHOP浓度为25mg/mL时, 其还原力 A_{700} 为0.44, 超氧自由基清除率和 $\cdot\text{OH}$ 清除率分别为68.86%和21.20%。

关键词: 前处理, 牡蛎, 酶解, 抗氧化活性

Study on preparation and antioxidant activity *in vitro* of enzymatic hydrolysis from oyster protein

LIN Hai-sheng¹, CAO Wen-hong^{1,2,3}, ZHANG Chao-hua^{1,2,3,*}, HUANG Jia-li¹

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Zhanjiang 524088, China;

3. National Research and Development Branch Center For Shellfish Processing, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: To investigate the antioxidant activity *in vitro* of enzymatic hydrolysis derived from oyster protein (EHOP for short) by neutral protease, Effects of pre-treatment methods, enzyme addition, pH, temperature and time on extraction result were studied and then the amino acid components and the distribution of the relative molecular weight of EHOP were analyzed. Results showed that the content of peptides obtained through the digestive action could be increased by the pre-treatment methods heated at 100℃ for 10min. These optimized conditions were as follows: E/S 2.0%, pH7.0, temperature 50℃, enzymatic hydrolysis time 3.0h, under which the DH was 14.95%. The EHOP was rich in bioactive peptides and most of the molecular weights were about from 500 to 3091u. They had good ability to eliminate the superoxide anion free radical and $\cdot\text{OH}$, the scavenging rates of which were shown to be 68.86% and 21.20% respectively when the concentration was 25mg/mL, and the absorption values A_{700} was 0.44, which showed strong reducing power.

Key words: pre-treatment; oyster; enzymatic hydrolysis; antioxidant activities

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)16-0163-06

利用酶法水解蛋白质获得小分子肽类物质是蛋白质高值化利用的重要途径。肽类物质易被人体吸收, 且具有多种生物功能, 在功能食品中发挥重要作用^[1]。预处理是酶法制备活性肽的重要环节, 首先, 通过预处理改变蛋白质的空间结构, 柔化蛋白质刚性结构, 使部分弱键断裂, 内部非极性基团暴露到分子表面, 增大了酶的接触位点, 提高酶水解蛋白质的效

率^[2]。同时还能去除与目标产物无关的物质, 如油脂、小分子水溶性物质、微量元素等。常见的前处理方法有热处理、超声波处理、微波处理等^[3]。

牡蛎是我国主要的经济贝类之一, 具有非常高的营养价值^[4], 其蛋白质含量极高, 以湿基计约占10%, 其氨基酸组成完善, 必需氨基酸完全程度和质量比例优于人乳和牛乳, 是酶法制备生物活性肽的优质原料。目前, 大部分研究者利用牡蛎原料直接加酶进行水解^[5], 酶解效率较低且酶解产物成分复杂、功能因子难以确定, 而较少探讨前处理对牡蛎蛋白结构的改变及酶解的影响及其工艺的研究。本研究选用中性蛋白酶, 研究了前处理方法、酶和底物比

收稿日期: 2013-02-04 * 通讯联系人

作者简介: 林海生(1985-), 男, 在读硕士硕士生, 研究方向: 海洋生物资源利用。

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-48)。

E/S、pH、温度和时间对酶解工艺的影响,利用热预处理对牡蛎蛋白进行改性并高效酶解制备牡蛎蛋白酶解物(Enzymatic hydrolysates from oyster protein, EHOP),分析其主要成分并测定其体外抗氧化活性,为进一步开发牡蛎功能食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牡蛎 湛江市东风市场,经广东海洋大学蔡英亚教授鉴定为近江牡蛎(*Ostrea rivularis*);中性蛋白酶(20万μg/g) 广西庞博生物科技;牛血清蛋白、磷酸异构酶(26625u)、肌球蛋白(16950u)、抑肽酶(6512u)、胰岛素B(3496u)、杆菌肽(1423u)、马尿酸-组氨酸-亮氨酸(433u) 美国Sigma;铁氰化钾、氯化铁、邻二氮菲、硫酸铁 国产分析纯。

FDu-1100型冷冻干燥机 TOKYO RIKAKIKAI埃朗科技;GL-10LMD型高速冷冻离心机 湖南星科科学仪器有限公司;3K15型台式高速离心机 德国Sigma;EVO300PC型紫外可见光光度计 美国Thermo Fisher Scientific;PHS-3C型雷磁pH计 上海精密科学仪器有限公司;VOS-201SD型真空干燥器 TOKYO RIKAKIKAI埃朗科技;AUW120型分析天平 日本SHIMADZU;SB-5200型超声波清洗器 海新芝生物技术研究所;LC-20AT型HPLC(分析柱为蛋白凝胶柱PROTEIN-PAK 60) 日本岛津;Water HPLC氨基酸自动分析仪 美国Waters公司。

1.2 前处理对牡蛎酶解效果的影响

将洗净沥干的新鲜牡蛎肉打浆后,分别称取10.0g于50mL锥形瓶中,按比例1:4(w/v)加蒸馏水,匀浆(10000r/min, 2min),采用热变性(分别在80、85、90、95、100℃下保温10min)和超声波变性方法(功率360W,温度45℃,时间10min)对牡蛎匀浆液进行处理,冷却至室温,匀质(10000r/min, 2min),调节pH7.0,按照酶和底物比(E/S)2.0%加入中性蛋白酶,在55℃条件下进行酶解,未处理组的匀质液未经处理,直接加酶按照相同酶解条件进行水解。1.0、1.5、2.0、3.0、3.5h分别取出适量酶解液,灭酶后测定水解度(DH)和蛋白肽含量。

1.3 牡蛎蛋白的制备

根据1.2前处理实验结果,按照以下工艺制备牡蛎蛋白:牡蛎→清洗、沥干→组织捣碎→称重、加水1:4(w/v)→不同温度热变性处理或超声波处理→三层纱布过滤→固形物→低温真空干燥→丙酮脱脂(4℃丙酮m/V=1:10,搅拌5min)→牡蛎蛋白粉(-18℃冷冻保存)。

1.4 牡蛎蛋白酶解工艺研究

牡蛎蛋白粉→加水(m/V=1:10)→匀质(10000r/min, 2min)→酶解→灭酶(100℃, 10min)→离心(6000r/min, 20min, 4℃)→上清液→低温真空浓缩→冷冻干燥→EHOP(淡黄色粉末)。

1.5 中性蛋白酶酶解牡蛎蛋白的单因素实验

参照汪秋宽等^[9]选用中性蛋白酶作为水解酶,以DH、蛋白肽含量及·OH清除率为主要评价指标,考察E/S、pH、酶解温度、酶解时间对酶解效果的影响。

1.5.1 E/S单因素实验 分别称取5.0g牡蛎蛋白粉置于五个100mL锥形瓶中,按比例1:10(m/V)加蒸馏水,

匀浆,调节pH为7.0,分别按照E/S为1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%加入蛋白酶,55℃酶解3.0h,灭酶,测定水解度(DH)、蛋白肽含量及·OH清除率。

1.5.2 pH单因素实验 分别称取5.0g牡蛎蛋白粉置于三个100mL锥形瓶中,按比例1:10(m/V)加蒸馏水,匀浆,分别调节体系pH6.5、7.0、7.5,按照E/S 2.0%加入蛋白酶,55℃酶解3.0h,灭酶,测定DH、蛋白肽含量及·OH清除率。

1.5.3 酶解温度单因素实验 分别称取5.0g牡蛎蛋白粉置于五个100mL锥形瓶中,按比例1:10(m/V)加蒸馏水,匀浆,调节pH为7.0,按照E/S 2.0%加入蛋白酶,分别在45、50、55、60、65℃条件下酶解3.0h后灭酶,测定DH、蛋白肽含量及·OH清除率。

1.5.4 酶解时间单因素实验 称取5.0g牡蛎蛋白粉置于五个100mL锥形瓶中,按比例1:10(m/V)加蒸馏水,匀浆,调节pH为7.0,按照E/S 2.0%加入蛋白酶,恒温55℃条件下进行酶解,分别于1.0、2.0、3.0、4.0、5.0h后取出酶解液,灭酶,测定DH、蛋白肽含量及·OH清除率。

1.6 体外实验测定抗氧化活性

将EHOP配制浓度分别为5.0、10.0、15.0、20.0、25.0mg/mL的水溶液为待测样品,以V_C(1mmol/L和2mmol/L)作阳性对照,测定还原力^[7]、超氧自由基清除率^[8]、·OH清除率^[9]。

1.7 指标的测定

1.7.1 水解度(DH)的测定^[10] 采用甲醛滴定法测定酶解前后体系中α-氨基态氮的含量;牡蛎原料总氮含量采用凯氏定氮法测定。DH计算公式如下:

$$DH(\%) = \frac{(\text{水解液中}\alpha\text{-氨基氮含量} - \text{酶解前}\alpha\text{-氨基氮含量})}{(\text{原料总氮含量} - \text{酶解前}\alpha\text{-氨基氮})} \times 100$$

1.7.2 蛋白肽含量的测定 上清液蛋白肽含量测定:双缩脲法^[11]。以BSA含量(0~10.53mg/mL)为横坐标,吸光度为纵坐标建立标准曲线,回归方程为 $y = 0.0458x + 0.0648$,其中 $R^2 = 0.9998$ 。相同操作方法测定酶解物上清液的吸光度代入回归方程即可求出蛋白肽含量。

1.7.3 游离氨基酸含量测定 EHOP样品不经酸碱水解,加水定容,过0.22μm微膜后上样至Water HPLC氨基酸分析仪进行测定。

1.7.4 酶解产物分子量分布测定 高效体积排阻色谱(HPSEC)法^[12]。

2 结果与分析

2.1 前处理对牡蛎酶解效果的影响

2.1.1 前处理对DH的影响 从图1可以看出,随着酶解时间的增加,各组实验的DH呈上升趋势。相对于未处理组,超声波前处理能够提高DH,酶解3.5h后DH高达43.03%,而且增长趋势最为明显;而热处理后再进行酶解的实验组,其DH均小于未处理组。另外,从图中曲线可看出,DH的大小与热处理的温度不存在明显的线性关系。

超声波处理能使蛋白质发生变性,使更多的肽键暴露出来,提高蛋白酶水解速率^[13],导致DH升高。本研究超声波前处理(功率360W,温度45℃,时间

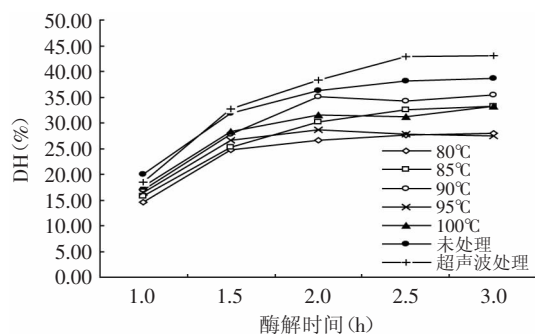


图1 不同前处理方法对水解度的影响

Fig.1 Influence of different pre-treatment methods on DH

10min)的结果与该观点相一致,但是与郭玉华等^[14]报道的超声波(功率100W,温度25℃,时间5~20min)处理不利于酶解,导致DH和氮回收率降低的结果不一致,其原因可能是超声波的条件不一致。

未处理组的DH大于热处理组,这是因为热变性对蛋白质结构及酶解作用的影响有两个方面,一是破坏分子构象,使整个结构变的松散而引起活性基团暴露,增加蛋白质与酶之间的作用位点,加快酶解速度;二是因分子之间疏水相互作用改变或-SH氧化生成S-S导致网状结构形成,部分酶的作用位点反而被包埋^[15]。水产蛋白质结构中(肌球蛋白、肌动蛋白)含有较多的-SH基,热处理容易使松散的蛋白质肽链重新结合,最终导致DH有所降低。郭玉华等^[14]研究牡蛎酶解工艺中也发现,热处理不利于DH的提高;段振华等^[16]研究表明,利用蛋白酶水解热处理后的鳙鱼蛋白,其DH有所降低。本实验结果与之相一致。

2.1.2 前处理对酶解蛋白肽含量的影响 随着酶解时间的延长,酶解肽的含量不断增加。与未处理组相比,热处理能够明显提高体系中酶解肽的含量。100℃热处理10min的效果最明显,酶解2.0h后,体系中蛋白肽含量达到2.58mg/mL,是未处理组的2.1倍;相对于未处理组,超声波处理也能一定程度提高体系中蛋白肽的含量,但效果不如热处理组好(图2)。

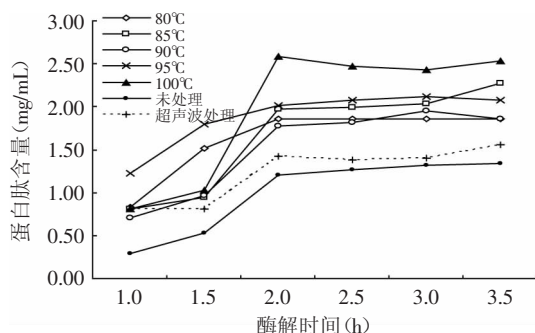


图2 前处理方法对蛋白肽含量的影响

Fig.2 Influence of different pre-treatment methods on the concern of peptides

热处理使蛋白质发生变性,其空间结构发生了肽链的展开和肽链的重新结合的变化,导致暴露出来的酶解位点及掩蔽的肽键发生了改变,因而热变

性蛋白在酶解过程中释放出来的游离氨基酸及蛋白肽与未处理组不同。郑惠娜等^[17]研究发现,热预处理对马氏珠母贝肉蛋白酶解的短肽得率具有显著性的提高;赵谋明等^[12]报道了酶解前热处理不利于鸡肉蛋白酶解过程中游离氨基酸的释放(即DH降低),但有利于大分子量肽的生成。本实验中,相对于未处理组,牡蛎蛋白热处理后水解释放的游离氨基酸含量减少,而获得的蛋白肽含量提高,与相关报道一致。对牡蛎酶解前适当地进行前处理有助于提取更多的牡蛎活性肽。由于超声波处理的结果不理想,对蛋白肽的获得比热水处理差,而对于DH指标而言,热水处理相比超声波处理结果无差异,因此选择采用热处理(100℃,10min)作为前处理方法,按照1.3工艺制备牡蛎蛋白粉供实验用。

2.2 中性蛋白酶酶解牡蛎蛋白的单因素实验

2.2.1 E/S对酶解效果的影响 图3显示,E/S在1.0%~3.0%的范围内,DH和蛋白肽含量都随加酶量的增多而先增后降,且当E/S=2.0%时均达到最大值,水解度为16.85%,蛋白肽含量为18.09mg/mL;而·OH清除率的随加酶量的增加呈“M”趋势变化,在2.5%的E/S时最大,为12.63%。综上,基于酶解肽的含量出发,选择E/S为2.0%作为酶与底物比例的最佳水平。

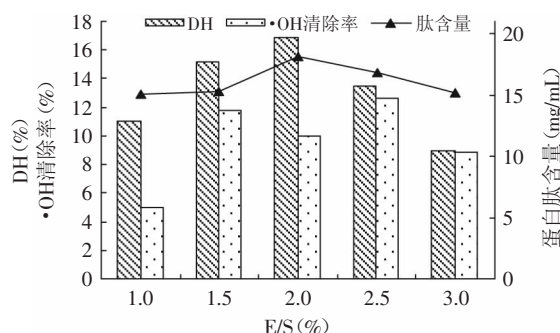


图3 酶与底物比对酶解效果的影响

Fig.3 Effect of E/S on hydrolysis of oyster protein

2.2.2 pH对酶解效果的影响 当pH7.0时,DH和·OH清除率达到最高,分别为16.85%和9.96%;而蛋白肽含量则在pH6.5时最高,达到20.75mg/mL,选择pH7.0作为酶的最适pH。

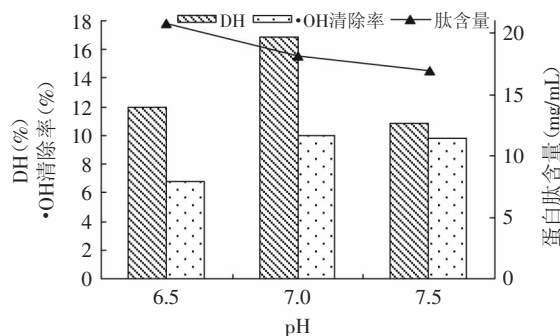


图4 pH对酶解效果的影响

Fig.4 Effect of pH on hydrolysis of oyster protein

2.2.3 温度对酶解效果的影响 温度是影响酶促反

应的重要因素,由图5看出,50~55℃为酶解的较适宜温度范围,而温度大于55℃,DH和蛋白肽含量迅速下降。温度过高,酶的结构发生改变而导致酶解速率下降。•OH清除率在45~65℃范围内随温度的上升先增高后降低再升高,50℃时达到最高13.35%。综合考虑选择50℃作为酶解的最佳温度。

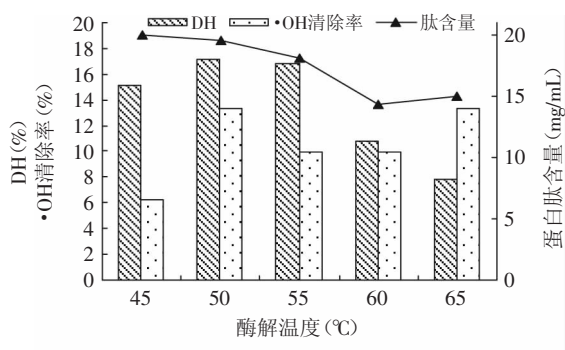


图5 温度对酶解效果的影响

Fig.5 Effect of the temperature on hydrolysis of oyster protein

2.2.3 反应时间对酶解效果的影响 在1.0~2.0h范围内,DH随时间不断增大,2.0h以后增长幅度逐渐变缓。变性后的牡蛎蛋白主要为不溶性蛋白,在不溶性底物蛋白的酶水解中,酶吸附在不溶性蛋白表面,首

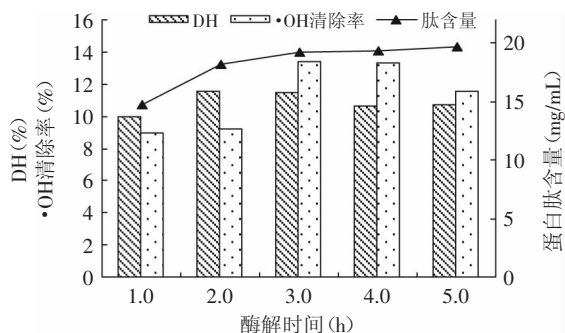


图6 反应时间对酶解效果的影响

Fig.6 Effect of the time on hydrolysis of oyster protein

先水解稀疏结合的不溶性蛋白上的聚合肽,然后再慢慢水解中心的肽键。因此反应刚开始时水解速度较慢,一段时间后速度加快,达到平衡又开始减慢。蛋白肽含量和•OH清除率则在1.0~3.0h内迅速提高,3.0h之后才开始处于稳定水平,见图6。由此可知酶解牡蛎蛋白的最适时间为3.0h。

综上,选择E/S为2.0%,pH7.0,温度50℃,酶解时间为3.0h的酶解条件,按照1.4酶解工艺制备EHOP,其DH达到14.95%。

2.3 EHOP的分子量分布及游离氨基酸含量

2.3.1 分子量分布 EHOP的主要成分为肽类物质,凝胶色谱共分离出6个峰(图7),根据峰面积计算其

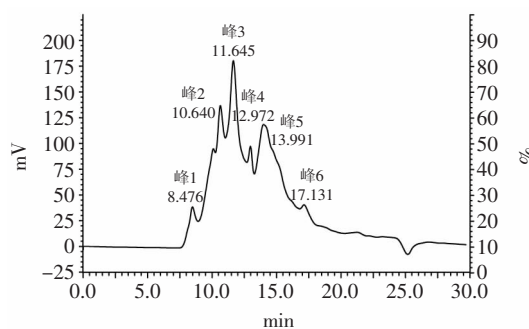


图7 EHOP的分子量分布图

Fig.7 The molecular weight distribution of EHOP

表1 EHOP分子量分布及相对含量

Table 1 Molecular weight distribution and relative content of EHOP

峰号	分子量(u)	百分比(%)
1	28993~63307	3.35
2	9972~28993	22.23
3	4159~9972	26.37
4	3091~4159	6.75
5	500~3091	34.69
6	73~500	6.61

表2 EHOP中游离氨基酸的组成及含量

Table 2 The free amino acid constituents and content of EHOP

氨基酸名称	含量(mg/g)	(mmol/g)	氨基酸名称	含量(mg/g)	(mmol/g)
磷-丝氨酸P-Ser	-	-	蛋氨酸Met	5.60	37.54
牛磺酸Tau	-	-	异亮氨酸Ile	3.69	28.09
天冬氨酸Asp	1.45	10.90	亮氨酸Leu	15.10	115.10
苏氨酸Thr	2.02	16.93	酪氨酸Tyr	9.03	49.81
丝氨酸Ser	2.34	22.29	苯丙氨酸Phe	9.77	59.13
天冬酰胺Asn	2.36	17.83	氨基正丁酸g-ABA	2.99	28.96
谷氨酸Glu	5.20	35.37	组氨酸His	10.99	70.83
氨基己二酸a-AAA	0.52	3.20	3-甲基-组氨酸3Mehis	0.55	3.26
甘氨酸Gly	1.24	16.46	赖氨酸Lys	4.53	30.95
丙氨酸Ala	4.37	48.99	氯化铵NH ₄	0.39	22.69
缬氨酸Val	2.70	23.04	精氨酸Arg	6.37	36.57
半胱氨酸(Cys) ₂	3.06	12.74	脯氨酸Pro	-	-
胱硫醚Cysttha	2.48	11.14	羟脯氨酸Hypro	-	-

注:-表示未检出。

相对含量,结果显示,酶解混合物的分子量分别集中在500~3091u、4159~9972u和9972~28993u之间,其中分子量在500~3091u左右的低分子肽含量最高,占34.69%(表1)。

2.3.2 游离氨基酸成分及含量 EHOP中游离氨基酸含量为96.71mg/g,其中必需氨基酸:44.87%(m/m),非必需氨基酸:55.13%(m/m)。表2可以看出,含量最高的游离氨基酸是亮氨酸和组氨酸,分别为115.10mmol/g和70.83mmol/g,其次是苯丙氨酸、酪氨酸和丙氨酸,由此可推断,中性蛋白酶的酶解位点主要为亮氨酸、组氨酸和苯丙氨酸等,这与相关文献报道的相一致^[18]。另外,EHOP中游离的支链氨基酸比例较高,约占总游离氨基酸含量的23.69%(n/n),而芳香族氨基酸约占15.52%(n/n),支链氨基酸可以通过血流进入大脑,降低大脑的5-羟色胺的产生,可减轻脑力疲劳。

2.4 牡蛎蛋白酶解物的抗氧化活性

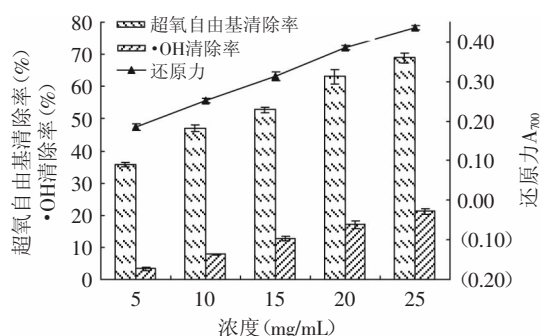


图8 EHOP的抗氧化活性

Fig.8 The antioxidative effect *in vitro* of EHOP

还原力是衡量物质抗氧化能力的一个重要指标,一般两者之间显正相关。图8可以看出,EHOP在5~25mg/mL范围内,随着浓度的增加,其还原力呈线性增大,25mg/mL的还原力A₇₀₀为0.44。EHOP具有较好的还原力,可能与活性肽中的还原性氨基酸含量有关。超氧自由基和·OH是一种重要的活性氧,是生物体内主要的自由基,能对机体细胞和组织造成一定损害,常用来评价抗氧化能力的大小^[19]。实验结果显示,EHOP对超氧自由基和·OH有较好的清除作用,其清除率随浓度的增加而快速升高。当浓度为25mg/mL时,对超氧自由基清除率高达68.86%,而·OH清除率达到21.20%,略高于2.0mmol/L的V_C的清除率(20.40%)(表3)。综上所述,体外实验表明,EHOP具有良好的抗氧化活性,为下一步探讨其他功能活性提供理论基础。

表3 维生素C的抗氧化活性测定

Table 3 The antioxidant activities *in vitro* of V_C

浓度 (mmol/L)	还原力A _{700nm}	超氧自由基清除率 (%)	·OH清除率 (%)
1.0	2.90±0.55	99.66±4.32	14.46±1.02
2.0	2.94±0.68	100.00±3.86	20.40±1.75

3 结论

牡蛎蛋白质在加热和超声波处理下,其结构中

亚基解离与酶切位点的适度暴露与隐藏对酶解肽的获得存在一定的规律。热处理能够明显提高酶解肽的含量,100℃热处理10min的效果最为明显,酶解2.0h后,体系中蛋白肽含量达到2.58mg/mL,是未处理组的2.1倍。热处理在牡蛎综合加工具有重要意义,能够在提取油脂及水溶性的有效成分的同时使牡蛎蛋白质得到浓缩,变性后的牡蛎蛋白有利于功能性肽的制备。

E/S为2.0%、pH7.0、温度50℃、时间为3.0h的酶解条件制备的EHOP,主要成分为肽类物质(游离氨基酸含量为96.71mg/g),分子量在500~3091u左右的低分子肽含量较高,占34.69%。EHOP对·OH和超氧阴离子均有较好的清除能力,且还原性较强,具有良好的体外抗氧化活性,可作为生物活性物质开发功能食品。但由于EHOP成分较多,是否具有结构特异的高效抗氧化肽还需进一步探讨。

参考文献

- [1] 胡晓,孙恢礼,李来好,等. 我国酶解法制备水产功能性肽的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(24):410-413.
- [2] 赵谋明,周雪松,林伟锋. 鸡肉蛋白热处理与酶解特性的关系研究[J]. 农业工程学报,2006,22(6):169-172.
- [3] 袁贤达. 蝮蛇酶解活性肽的制备工艺及其化学成分研究[D]. 长春:长春中医药大学,2010.
- [4] 李超柱,潘珍凤,陈艳辉,等. 牡蛎软体活性物质的研究进展[J]. 食品工业与科技,2012,33(8):412-415.
- [5] Aneona Mendez L, Sandoval Castro C A, Belmar Cassoetes R. Effect of substrate and harvest on the amino acid Profile of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18(5): 447-450.
- [6] 汪秋宽,宋琳琳,徐玲,等. 牡蛎抗氧化活性肽的酶解工艺研究[J]. 大连水产学院学报,2009,24(2):95-99.
- [7] 游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D]. 广州:华南理工大学,2010.
- [8] 王群,郑海涛,葛尧,等. 酶法制备鳕鱼鱼皮胶原蛋白肽及其清除超氧阴离子自由基的研究[J]. 中国农学通报,2011,27(14):87-93.
- [9] 周冉,李淑芬,张大成. 鹿茸提取物体外抗氧化活性分析[J]. 食品科学,2009,30(9):33-36.
- [10] 余勃,陆兆新. 微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定方法[J]. 食品科学,2005,26(4):104-107.
- [11] 汪志华,王毅梅,蔡广霞,等. 大米肽含量的快速测定方法[J]. 食品科学,2011,32(12):169-173.
- [12] 林海生,曹文红,卢虹玉,等. 牡蛎酶解产物改善小鼠学习记忆能力的初步研究[J]. 食品工业科技,2012,33(19):341-345.
- [13] 阙建全. 食品化学[M]. 第2版. 北京:中国农业出版社,2008:59-61.
- [14] 郭玉华,曾名勇. 牡蛎酶解工艺的研究[J]. 中国海洋药物杂志,2008,27(2):37-41.
- [15] Friedman M, Grosjean O K, Zahnley J C. Inactivation of soya bean trypsin inhibitors by thiols[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1982, 33(2):165-172.
- [16] 段振华,张敏,汤坚. 酶法水解鳕鱼下脚料及其降苦机理

研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(5): 19-22.

[17] 郑惠娜, 章超桦, 吉宏武, 等. Plackett-Burman 设计在胰酶酶解马氏珠母贝肉蛋白主要影响因子筛选中的应用[J]. 食品科技, 2010, 35(12): 28-32.

[18] Adler-nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. New York: Elsevier Applied Science, 1986: 13-15.

[19] 荣建华, 李小定, 谢笔钧, 等. 大豆肽体外抗氧化效果的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 118-120.

(上接第153页)

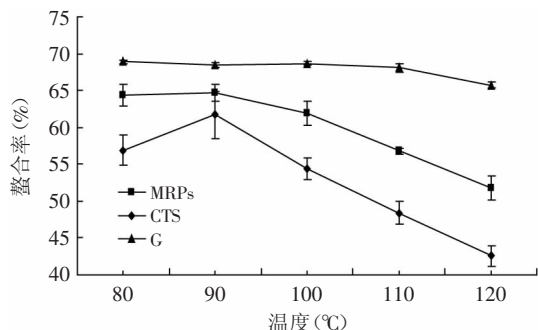


图6 温度对壳聚糖MRPs螯合铁离子能力的影响

Fig.6 The iron ion chelating ability of MRPs at different temperature

的缓解升高温度给改性前壳聚糖螯合铁离子能力的下降程度, 是有实际应用价值的。

3 结论

本研究表明, 壳聚糖经美拉德反应改性后, 产物MRPs体外抗氧化能力得到显著提高 ($p < 0.05$)。壳聚糖MRPs的DPPH自由基清除率、还原能力均随着葡萄糖浓度、壳聚糖浓度增加而呈现增大趋势。低、中粘度壳聚糖MRPs仅在还原能力上有显著差异 ($p < 0.05$), 而在DPPH自由基清除率和螯合铁离子能力上差异不显著 ($p > 0.05$)。在3.6~5.4范围内, pH对MRPs抗氧化活性有比较复杂的综合影响, 并不是单纯的pH越大或越小越好。反应温度的升高能显著提高MRPs的DPPH自由基清除率和还原能力。本研究为制备兼具抑菌和抗氧化双重功效的天然添加剂——改性壳聚糖提供了理论依据。

参考文献

- [1] 耿健强, 李鹏, 阙兴传, 等. 壳聚糖保鲜包装材料的研究及应用进展[J]. 化工新型材料, 2010(6): 42-46.
- [2] Kanatt S R, Chander R, Sharma A. Effect of irradiated chitosan on the rancidity of radiation-processed lamb meat[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39: 997-1003.
- [3] Rao M S, Chander R, Sharma A. Development of shelf stable intermediate-moisture meat products using active edible coating and irradiation[J]. Journal of Food Science, 2005, 70: 325-331.
- [4] 姚倩, 孙涛, 瞿佳华, 等. 不同取代度O-羧甲基壳聚糖的抗氧化性能[J]. 食品工业科技, 2008(5): 113-115.
- [5] 姚倩, 孙涛, 徐轶霞. 低聚壳聚糖衍生物的制备及其抗氧化性能[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 530-533.
- [6] 孙彬. 甲壳低聚壳聚糖类席夫碱的制备及其抗氧化活性的

研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2003.

[7] XING Rong, LIU Song, LI Pengcheng, *et al.* Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities *in vitro*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005(13): 1573-1577.

[8] ZHONG Zhimei, JI Xia, LI Pengcheng, *et al.* The preparation and antioxidant activity of the sulfanilamide derivatives of chitosan and chitosan sulfates[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007(15): 3775-3782.

[9] Sweetie R Kanatt, Ramesh Chander, *et al.* Chitosan glucose complex-A novel food preservative[J]. Food Chemistry, 2008, 106: 521-528.

[10] 王惠英, 孙涛, 周冬香, 等. 美拉德反应产物抗氧化性能研究进展[J]. 食品科技, 2007(8): 12-15.

[11] H L Chang a, Y C Chen a, F J Tan b. Antioxidant properties of a chitosan-glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage[J]. Food Chemistry, 2011(24): 589-595.

[12] 龚平, 阙建全. 美拉德反应产物性质的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 141-145.

[13] A Kumaran R J K. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus[J]. Food Chemistry, 2006, 97: 109-114.

[14] Liu X, Zhao M, Wang J, *et al.* Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21(3): 219-228.

[15] Jao, C H, Ko W C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice[J]. Fishery Science, 2002, 68: 430-435.

[16] Kamil Y V, Jeon Y J, Shahidi F. Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*) [J]. Food Chemistry, 2002, 79: 69-77.

[17] 赵天湖范, 闫冬, 徐人杰, 等. 大叶冬青苦丁茶多糖提取、纯化与抗氧化活性研究[J]. 作物研究, 2011, 25(1): 56-60.

[18] Peng C, Wang Y, & Tang Y. Synthesis of crosslinked chitosan-crown Ethers and evaluation of these products as adsorbents for metal ions[J]. Journal of Applied Polymer Science, 1998, 70: 501-506.

[19] Kyung W Kim, R L Thomas. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights [J]. Food Chemistry, 2007, 101: 308-313.

[20] 赵希荣. 壳聚糖与葡萄糖发生美拉德反应的条件及产物的抗氧化性能[J]. 中国食品添加剂, 2004(1): 63-66.