

# Alcalase 降解水不溶性鸡肉蛋白规律 及其产物清除 DPPH 活性研究

赵谋明，周雪松，林伟锋

(华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640)

**摘要** 研究了 Alcalase 降解水不溶性鸡肉蛋白的规律及其产物清除 DPPH 自由基活性。结果表明 随酶解时间延长, 可溶性蛋白质、氨基酸含量不断增加, 而肽含量则在水解前 8h 达到最大, 随后不断降低; 肽的分子量分布趋势总体表现为大分子量的肽逐渐减少, 小分子量肽的含量逐渐增多, 肽分子量分布图中肽峰值不断向后推移。Alcalase 对分子量在 3000~15000Da 间的肽段降解能力较弱, 水解 24h 后, 这部分肽占总肽量的比值仍为 89.93%。水不溶性鸡肉蛋白 Alcalase 酶解产物有明显的清除 DPPH 活性, 其清除 DPPH 活性在酶解 4h 时达到最大, 随后不断下降, 对于同一酶解时间的产物, 浓度越大, 其清除 DPPH 活性越强, 但其清除 DPPH 能力并不与酶解液浓度成倍数关系。

**关键词** 水不溶性鸡肉蛋白, 酶解, 蛋白质降解, 清除 DPPH 活性

**Abstract:** Water-insoluble chicken meat protein was hydrolyzed by Alcalase to study the protein degradation and the scavenging effects of the hydrolysate on DPPH free radicals. Content of soluble protein and free amino acids increase steadily during hydrolysis. Peptide content increased in the first 8 h, but decreased gradually thereafter. The distribution profiles of peptide showed that large molecular peptides gradually decreased while small molecular peptides gradually increased with the elongation of hydrolysis. Peptides with molecular weight from 3kDa to 15kDa were hard to be degraded by Alcalase, the ratio of these peptides to the whole peptide content was 89.93% after 24 hours' hydrolysis. The hydrolysate had a noticeable scavenging activity toward DPPH. The scavenging activity reached the maximum after 4 hours' hydrolysis, then decreased thereafter. The scavenging activity had a good but not diploid correlation with the concentration of the hydrolysate.

**Key words:** water-insoluble chicken meat protein; enzymic hydrolysis; protein degradation; scavenging activity of DPPH

中图分类号 : TS201.2·5 文献标识码 : A

文章编号 : 1002-0306(2005)11-0059-03

鸡肉历来是为人类提供优质蛋白和美味的一类重要大宗肉类, 在“文明病”蔓延的今天, 其高蛋白、

收稿日期 : 2005-04-05

作者简介 : 赵谋明(1964-), 男, 博士生导师, 研究方向: 蛋白质化学与工程、食品生物技术。

基金项目 : 广东省科技计划项目; 农业攻关计划(2004A20302003)。

低脂肪、低胆固醇、低热量的原料特性使其倍受消费者的青睐。中国肉鸡产量从 1995 年超过欧盟, 成为仅次于美国的第二大肉鸡生产国, 目前每年仍以 5%~10% 的速度增长<sup>[1]</sup>。然而与之不匹配的是我国禽肉出口量不足禽肉产量的 5%; 禽肉(包括鸡肉)的加工量仅占总禽肉产量的 5% 左右, 而经过深加工的则不足 1%, 远远低于世界平均水平 20%。传统的鸡肉加工工艺, 如制成风味熟食、冷鲜分割肉等直接食用或烹调后食用不能充分地利用鸡肉的价值, 创造新的途径深加工鸡肉乃至禽肉产品已成为中国肉类工业的一大课题, 对肉鸡产业的可持续发展具有深远的意义。利用生物技术深度开发利用鸡肉是提高其资源利用率和附加值的有效途径。目前采用各种商用蛋白酶深度水解鸡肉已有报道, 但鸡肉酶解过程中其生化成分、生理活性变化以及其组分, 如可溶性蛋白、水不溶性蛋白酶解特性尚未见报道<sup>[2~5]</sup>。本文旨在通过采用 Alcalase 酶解水不溶性鸡肉蛋白, 研究其酶解过程中蛋白质降解规律、清除 DPPH 活性变化规律, 为鸡肉深加工成为调味品、保健品基料提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

鸡胸肉 购于广州市五山胜佳超市(冻藏), 切碎、绞成肉糜(两次), 装袋, 置于-18℃冰箱中冷冻, 实验前从冰箱中取出在流动的自来水中缓化解冻, 备用; Alcalase 2.4L 标称活力 2.4AU/kg, 由丹麦诺维信公司提供; DPPH 由 Sigma 公司提供; 实验中所采用试剂 均为国产分析纯。

MM12 型绞肉机 广东省韶关市食品机械厂; DS-1 高速组织捣碎机 上海标本模型厂; UV-754 分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; KDN-2C 型定氮仪 上海纤检仪器有限公司; GL-21M 高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机有限公司。

### 1.2 凝胶色谱条件

Amersham 蛋白质分析纯化系统, Superdex\_peptide\_10/300\_GL 玻璃柱, 洗脱液为

0.25mol/L NaCl, pH7.2 磷酸盐缓冲液 ,流速 0.5mL/min。标准肽样品为 Globin III (分子量为 2512Da)、Globin II( 分子量为 6214Da )、Globin I ( 分子量为 8519Da )、Globin I + III( 分子量为 10700Da )、Globin I + II( 分子量为 14404Da )、Globin ( 分子量为 16949Da ),由 Amersham 公司提供。

### 1.3 水不溶性鸡肉蛋白制备

将解冻的鸡肉糜加 2 倍水匀浆 1min , 离心 (4800×g, 20min ), 收集沉淀部分 ,加入绞肉机绞匀 ,即为水不溶性鸡肉蛋白样品。

### 1.4 测定方法

1.4.1 蛋白组分分析 氨基氮含量测定 : 甲醛电位滴定法 ; 可溶性氮测定 : 微量凯氏定氮法 ; 肽基氮含量 : 可溶性氮含量 - 氨基氮含量。

1.4.2 清除 DPPH 活性分析 参照文献[6]并结合前期实验 将 1.5mL 样品液添加到 1.5mL 含 DPPH 0.1mmol/L 的 95% 乙醇中 ,混合、振荡 ,在室温下放置 30min ,然后在波长 517nm 处检测。清除率计算公式如下 :

$$\text{清除率}(\%) = (\text{空白组} - \text{样品组}) / \text{空白组} \times 100\%$$

其中空白组采用 1.5mL 蒸馏水加 1.5mL 含 DPPH 0.1mmol/L 95% 的乙醇。

### 1.5 鸡肉水解工艺

酶作用条件采用厂家推荐参数范围结合前期正交优化实验结果。取水不溶性鸡肉蛋白 30g ( 蛋白质含量为 21.95% ) ,加 60g 蒸馏水匀浆 1min ,调节初始 pH 至 8.0 ,升温至 50℃ ,加入 Alcalase 0.045g 于水浴上恒温搅拌分别水解 4、8、12、16、24h 。酶解完毕 ,将酶解液于沸水中灭酶 20min ,离心 (4800×g, 20min ) 过滤 ,所得滤液为酶解产物。酶解产物稀释至 130g 用于分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水不溶性鸡肉蛋白酶解过程中可溶性氮、氨基氮、肽基氮变化规律

从图 1 可以看出 , 酶解产物中可溶性氮以及氨基氮含量随着酶解时间的延长呈增加趋势 , 在水解前期 (0~12h) , 可溶性氮、氨基氮含量增速较快 , 随后

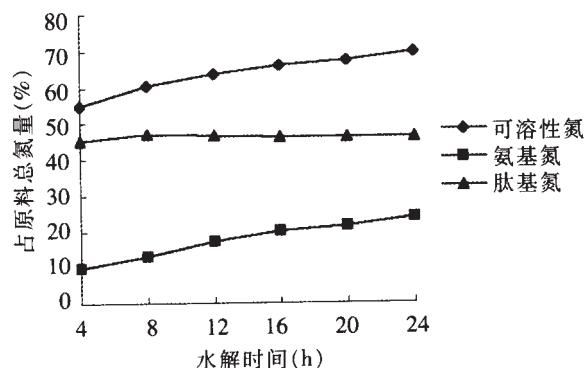


图 1 水不溶性鸡肉蛋白酶解过程中产物中氨基氮、可溶性氮和肽基氮含量变化

趋于缓慢 ; 酶解产物中肽的含量在前 8h 内增加 , 随后逐渐下降。这表明在水解前期 ,Alcalase 主要以水解水不溶性鸡肉蛋白为主 , 降解成分子量小的肽和游离氨基酸 , 表现为肽和氨基酸含量的增加 ; 随后 , 一部分肽也被 Alcalase 作为水解对象 , 降解成分子量更小的肽和氨基酸 , 这两个过程在水解过程中同时存在 , 当后者表现出优势时 , 就会表现为可溶性蛋白、氨基酸总量增加而肽含量却减少。

### 2.2 Alcalase 酶解水不溶性鸡肉过程中肽分子量变化规律

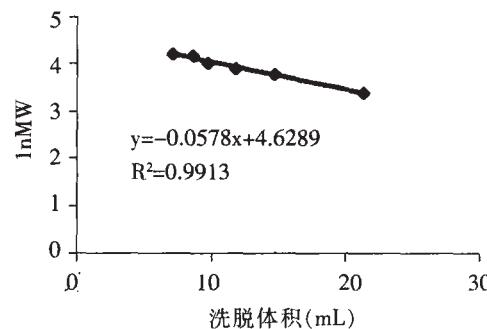


图 2 标准肽样品分子量与洗脱体积拟合直线

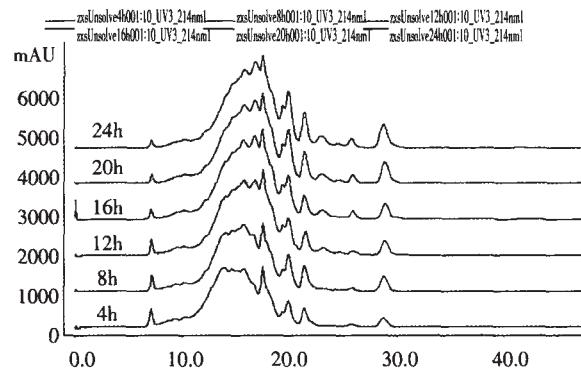


图 3 Alcalase 水解水不溶性鸡肉蛋白过程中肽分子量变化图谱

表 1 Alcalase 水解水不溶性鸡肉过程中酶解产物的肽分子量分布(%)

时间(h)	分子量范围(Da)		
	>15000	15000~3000	<3000
4	3.59	90.37	6.04
8	1.13	91.63	7.24
12	1.49	91.51	7.00
16	1.04	91.53	7.43
20	0.44	90.83	8.73
24	0.20	89.93	9.87

注 : 肽谱中分子量为 15000、3000Da 分别对应的洗脱体积是 7.83、19.93mL。

由图 3 以及表 1 可以看出 随着酶解时间的延长 , 肽的分子量分布总体表现为大的分子量肽逐渐减少 , 小分子量肽的含量逐渐增多 肽峰不断向后推移。在水解前 8h 内 ,分子量大于 15000Da 的肽含量占肽总量值显著减少 , 分子量在 3000~15000Da 以及小于 3000Da

间的肽含量比值增加，可见在这段时间里，Alcalase 主要水解水不溶性鸡肉蛋白以及分子量大于 15000Da 的肽。在 8~12h 间，分子量大于 15000Da 的肽含量比值表现出增加趋势；分子量在 3000~15000Da 以及小于 3000Da 间肽含量比值略有下降。这一方面可能与这段时间内仍有大分子蛋白被降解成分子量大于 15000Da 的肽，另一方面可能与肽的总量减少有关；12h 以后，随着酶解时间的延长，分子量大于 15000Da 的肽含量比值不断降低，分子量在 3000~15000Da 以及小于 3000Da 的肽含量比值逐渐增加，但分子量在 3000~15000Da 的肽变化不大，在 91.51% 至 89.93% 间，这表明 Alcalase 对分子量在 15000~3000Da 间的肽段水解能力较弱。若进一步水解这一肽段，可考虑采用其它酶（内切酶或外切酶）复合使用。

### 2.3 Alcalase 水解水不溶性鸡肉蛋白产物清除 DPPH 活性分析

实验中发现，酶解液在  $\lambda=517\text{nm}$  处有较强吸收，因此须采用水解液做对照以消除误差。同时发现，由于 DPPH 溶液为 95% 乙醇配制，如果添加量过多，会引起蛋白质沉淀严重，实验误差增加，因此，要保证实验结果准确性，一方面应稀释酶解液原料，另一方面应控制 DPPH 溶液的体积量，若实验中出现吸光值过低，则应提高 DPPH 的浓度，如由 0.1mmol/L 增加到 0.2mmol/L（故有国外文献采用 0.2mmol/L DPPH 溶液）。本文考虑直接采用酶解液分析其清除 DPPH 活性，其结果见图 4；另将酶解液稀释到 3 倍，即将原 1.5mL 酶解液样品变为 0.5mL 样品+1mL 蒸馏水，其结果如图 5。

从图 4、图 5 可以看出，水不溶性鸡肉蛋白 Alcalase 酶解产物有明显的清除 DPPH 活性，其清除 DPPH 活性在酶解 4h 时达到最大，随后不断下降，对于同一酶解时间的产物，浓度越大，其清除 DPPH 活性越强，但其清除 DPPH 能力并不与浓度成倍数关系，这主要是由于蛋白酶解产物为复杂的混合体系，稀释后活性并不表现为简单的倍数递减。这点与

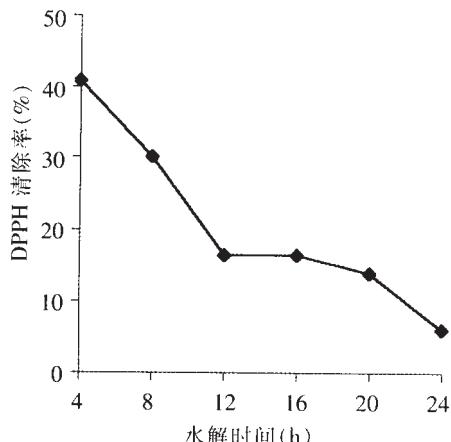


图 4 不同酶解时间产物(酶解液为 1.5mL.) 清除 DPPH 活性变化曲线

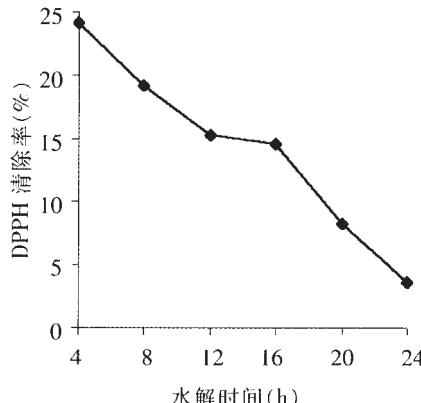


图 5 不同酶解时间产物(酶解液为 0.5mL) 清除 DPPH 活性变化曲线

Hui-Chun Wu 等在研究 mackerel 酶解过程中发现的规律一致<sup>[6]</sup>。

### 3 结论

Alcalase 酶解水不溶性鸡肉蛋白过程中，可溶性蛋白质、氨基酸含量随酶解时间延长呈现出不断增加趋势，而肽含量则在水解前 8h 达到最大，随后不断减小。随着酶解时间的延长，肽的分子量分布总体表现为大的分子量肽逐渐减少，小分子量肽的含量逐渐增多，肽分子量分布图中肽的峰值不断向后推移；Alcalase 对分子量在 3000~15000Da 间的肽段水解能力较弱，若水解这部分肽段，应考虑采用其它蛋白酶复合使用；水不溶性鸡肉蛋白 Alcalase 酶解产物有明显的清除 DPPH 活性，其清除 DPPH 活性在酶解 4h 时达到最大，随后不断下降。对于同一酶解时间的产物，浓度越大，其清除 DPPH 活性越强，但其清除 DPPH 能力并不与浓度成倍数关系。酶解产物清除 DPPH 自由基的机理以及有效肽成分有待进一步研究。

### 参考文献：

- [1] 平凡. 我国禽肉出口存在的问题与对策[J]. 食品信息指导, 2004(1): 25~27.
- [2] 车金林, 区其占, 莫世艺. 用宇佐美曲霉酸性蛋白酶水解鸡肉的研究[J]. 广西轻工业, 1996(1): 23~25.
- [3] Fonkwe L G, Singh R K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 1996, 31(6): 605~616.
- [4] Seth A, Diaz M, Mahoney. Iron solubilisation by chicken muscle protein digests[J]. J Sci Food Agric, 1999, 79: 1958~1963.
- [5] 谢永洪, 刘学文, 王文贤, 冉旭. 鸡肉蛋白酶水解工艺条件的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(5): 207~210.
- [6] Hui-Chun Wu, Hua-Ming Chen, Chyuan-Yuan Shiao. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus)[J]. Food Research International, 2003, 36: 949~957.