

超声预处理大米蛋白制备抗氧化肽

贾俊强¹, 马海乐^{1,2,3*}, 曲文娟¹, 丁青芝¹, 曹辉¹, 骆琳¹, 王振斌¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 江苏省农产品生物加工与分离工程技术研究中心, 镇江 212013; 3. 河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003)

摘要: 为优化中性蛋白酶解大米蛋白制备抗氧化肽的工艺条件, 采用超声波预处理大米蛋白。以 1,1-二苯基-2-苦基苯肼 (DPPH) 清除率为响应值, 用响应面分析法研究超声功率、超声处理时间和超声处理初始温度对制备抗氧化肽工艺的影响。同时研究了其抗氧化肽清除超氧自由基、DPPH、羟自由基能力及螯合 Fe^{2+} 和还原能力。结果表明: 最佳超声预处理大米蛋白的工艺为: 超声功率 1500 W、超声处理时间 20 min、超声处理初始温度 40℃, 该条件下的抗氧化肽 (2.2057 g/L) 清除 DPPH 可达到 74.8%, 抗氧化肽得率为 33.2%。与未经超声预处理比较, 抗氧化肽得率提高了 43.7%, DPPH 的半抑制率 (IC_{50}) 降低了 17.7%。抗氧化试验表明, 大米蛋白抗氧化肽清除超氧自由基、DPPH 和羟自由基的 IC_{50} 值分别为 0.0678、0.9315 和 0.1173 g/L, 分别是维生素 C 的 IC_{50} 值的 1.8、175.8 和 1.4 倍; 其螯合 Fe^{2+} 的 IC_{50} 值是乙二胺四乙酸的 42.2 倍, 还原能力是维生素 C 的 0.7 倍。

关键词: 大米蛋白; 超声预处理; 酶解; 抗氧化肽

中图分类号: TS201.2⁺5; TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2008)-8-0288-06

贾俊强, 马海乐, 曲文娟, 等. 超声预处理大米蛋白制备抗氧化肽[J]. 农业工程学报, 2008, 24(8): 288—293.

Jia Junqiang, Ma Haile, Qu Wenjuan, et al. Ultrasonic pretreatment for preparation of antioxidant peptides from rice protein[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(8): 288—293.(in Chinese with English abstract)

0 引言

随着近年来生物活性肽的研究, 人们发现抗氧化肽具有低价、高效和低毒的特性, 适宜作为人类保健的抗氧化剂使用。抗氧化肽的制备主要通过酶法、发酵法等食品生物技术手段从天然动植物蛋白质中得到, 具有抗氧化活性稳定、无毒副作用及来源方便等优点。目前国内学者分别从鹰嘴豆蛋白^[1]、玉米蛋白^[2]、大豆蛋白^[3]、芝麻蛋白^[4]、花生蛋白^[5]、白果活性蛋白^[6]及猪骨^[7]中通过酶法得到抗氧化肽。

目前市场上销售的大米蛋白主要是生产大米淀粉的副产物, 含有70%左右的蛋白质。由于大米蛋白在生产过程中高度变性, 水溶性很差。因此, 采用传统酶解方法, 大米蛋白的降解效率很低。

超声波具有空化作用, 产生的气泡经挤压破裂, 可以瞬间产生极强的机械剪切力, 使蛋白质降解, 或者改变蛋白质构象, 促使其亲水基团更多地暴露出来, 提高蛋白质在水中的溶解度, 有利于酶和蛋白质底物结合, 最终提高酶解效率。朱建华用超声处理豆粕提高了蛋白质的浸提率, 用超声处理大豆分离蛋白从而改变了大豆分离蛋白的黏度^[8,9]; 何荣海用超声处理紫菜蛋白显著提

高了酶解效率^[10]。目前国内外采用超声预处理大米蛋白制备抗氧化肽的研究还未见报道。本文拟对通过超声预处理提高大米蛋白酶解制备抗氧化肽的效率进行研究, 并进一步考察其产品的抗氧化活性, 为大米蛋白的进一步开发利用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料

大米蛋白由嘉吉饲料镇江有限公司提供; 中性蛋白酶 (酶活 14000 U/g, 无锡雪梅酶制剂有限公司); 1,1-二苯基-2-苦基苯肼 (DPPH) (Sigma 公司); 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)、吩嗪甲酯硫酸盐 (PMS)、四氮唑蓝 (NBT)、双氧水 (H_2O_2)、三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris)、氯化亚铁、菲咯嗪 (Ferrozine)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、铁氰化钾等均为分析纯试剂, 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备

GA99-II D 超声细胞粉碎机 (无锡上佳生物科技有限公司); WFJ7200 型分光光度计 (尤尼柯 (上海) 仪器有限公司); DZF-6020 型真空干燥箱 (上海益恒试验仪器有限公司); SHZ-88A 往复式水浴恒温振荡器 (太仓市实验设备厂); LD5-2A 型离心机 (北京医用离心机厂); PHS-3C 精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 超声预处理大米蛋白的响应面分析试验设计

根据前期预试验研究结果, 固定料液比为 1:9, 选取超声功率、超声处理时间、超声处理初始温度 (料液超声处理前的初始温度) 做 3 因素 3 水平响应面分析试验,

收稿日期: 2007-10-08 修订日期: 2008-06-16

基金项目: 江苏省普通高校研究生科研创新计划 (CX07B-183z)

作者简介: 贾俊强 (1973—), 男, 博士生, 研究方向为食品生物技术。镇江学府路 301 号 江苏大学食品与生物工程学院, 212013。

Email: jjq-wqy@163.com

*通讯作者: 马海乐, 教授, 江苏省农产品生物加工与分离工程技术研究中心主任, 河南科技大学兼职教授, 从事食品功能因子及其分离技术、食品生物技术研究。镇江学府路 301 号 江苏大学食品与生物工程学院, 212013。

Email: mhl@ujs.edu.cn

3因素3水平编码表见表1, 响应面分析试验设计采用Box-Behnken方法, 见表2。

表1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素水平	X_1 功率/W	X_2 时间/min	X_3 温度/℃
1	1500	40	60
0	1250	30	50
-1	1000	20	40

被超声处理的大米蛋白按照正交试验设计优化的酶解条件进行(另文发表), 即: 经超声波预处理大米蛋白后, 采用中性蛋白酶进行酶解, 底物浓度([S]) 10%、加酶量([E]/[S]) 1120 U/g、pH6.0、温度60℃、酶解时间30 min。沸水浴灭酶10 min, 经3500 r/min离心10 min收集上清液。按下式计算抗氧化肽得率 H_y :

$$H_y = \frac{C \times V}{M} \times 100$$

式中 H_y ——抗氧化肽得率, %; C ——抗氧化肽的浓度, g/L; V ——酶解后上清液体积, L; M ——参加酶解反应的大米蛋白质量, g。

超声预处理大米蛋白效果的评价: 以DPPH自由基清除率为超声预处理大米蛋白效果好坏的评价指标。将上述酶解方法及条件下所得的酶解上清液稀释40倍后做为待测样品, 抗氧化活性测定按照1.2.2 2) 中待测样品对DPPH自由基清除率测定方法进行。

1.2.2 大米蛋白抗氧化肽的抗氧化性能试验

最优超声工艺处理的大米蛋白经中性酶酶解(酶解条件同1.2.1), 3500 r/min 离心 10 min 收集上清液, 55℃真空干燥、粉碎, 用大米蛋白酶解物粉末进行下列抗氧化试验。

1) 清除超氧自由基($O_2\cdot$)的测定方法

按文献[11]的方法, 用pH8.0、浓度为50 mol/L的Tris-HCl 缓冲液将大米蛋白抗氧化肽稀释成不同的浓度梯度, 各取1.5 mL不同梯度大米蛋白抗氧化肽溶液, 然后依次加入0.5 mL NBT (300 μ mol/L, 以pH8.0的Tris-HCl 缓冲液配制), 0.5 mL NADH (468 μ mol/L, 以pH8.0的Tris-HCl缓冲液配制), 0.5 mL PMS (60 μ mol/L, 以pH8.0的Tris-HCl缓冲液配制), 混匀后在25℃中水浴5 min, 取出在560 nm处测定吸光值, 空白对照组以缓冲液代替大米蛋白抗氧化肽溶液。按下式计算大米蛋白抗氧化肽对 $O_2\cdot$ 的清除率 E :

$$E = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

式中 E ——对 $O_2\cdot$ 的消除率, %; A_1 ——添加大米蛋白抗氧化肽的吸光值; A_0 ——空白吸光值。

同时配制不同浓度的维生素C溶液, 按照上述方法测定维生素C对超氧自由基($O_2\cdot$)的清除率。

2) 清除DPPH自由基的测定方法

将大米蛋白抗氧化肽稀释成不同的浓度梯度后分别做为待测样品备用。

取2 mL待测样品于试管中, 再加入2 mL浓度为

0.04 g/L的DPPH无水乙醇溶液, 混合均匀, 反应20 min, 3500 r/min离心分离10 min, 取上清液在517 nm处测其吸光值为 A_i ; 另取2 mL待测样品于试管中, 分别加入无水乙醇2 mL, 反应20 min, 3500 r/min离心分离10 min, 取上清液在517 nm处测其吸光值为 A_j ; 以2 mL 0.04 g/L DPPH无水乙醇溶液和2 mL无水乙醇反应做为参比, 其吸光值记为 A_0 。按下式计算待测样品对DPPH自由基的清除率 K [12]:

$$K = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100$$

式中 K ——对DPPH自由基的清除率, %; A_0 ——2 mL 0.04 g/L的DPPH无水乙醇溶液加2 mL无水乙醇的吸光值; A_i ——2 mL 0.04 g/L的DPPH无水乙醇溶液加2 mL待测样品的吸光值; A_j ——2 mL无水乙醇加2 mL待测样品的吸光值。

同时配制不同浓度的维生素C溶液, 按照上述方法测定维生素C对DPPH自由基的清除率。

3) 清除羟自由基($\cdot OH$)的测定方法

将大米蛋白抗氧化肽用双蒸水配制成不同浓度梯度, 各取2 mL上述浓度的大米蛋白抗氧化肽溶液, 依次加入2 mL 6 mmol/L的 $FeSO_4$ 、2 mL 6 mmol/L的 H_2O_2 , 混匀后静置10 min, 再加入2 mL 6 mmol/L水杨酸, 混匀, 静置30 min, 在510 nm处测其吸光值记为 A'_i , 当用双蒸水代替水杨酸时的吸光值记为 A'_j 。空白对照组以双蒸水代替大米蛋白抗氧化肽溶液, 吸光值记为 A'_0 。按下式计算大米蛋白抗氧化肽对羟自由基($\cdot OH$)的清除率 Y [12,13]:

$$Y = [1 - (A'_i - A'_j)/A'_0] \times 100$$

式中 Y ——对羟自由基的清除率, %; A'_i ——大米蛋白抗氧化肽反应的吸光值; A'_0 ——空白吸光值; A'_j ——无水杨酸参加反应时大米蛋白抗氧化肽的吸光值。

同时配制不同浓度的维生素C溶液, 按照上述方法测定维生素C对羟自由基($\cdot OH$)的清除率。

4) 对 Fe^{2+} 的螯合能力测定

按文献[14]的方法, 将大米蛋白抗氧化肽稀释成不同的浓度梯度, 各取1 mL上述浓度的大米蛋白抗氧化肽, 分别加入3.7 mL去离子水, 然后加入 $FeCl_2$ (2 mmol/L, 0.1 mL), 混匀后加入Ferrozine (5 mmol/L, 0.2 mL) 混匀后静置10 min。在562 nm下测定样品吸光度值 A'' 。空白组以双蒸水代替大米蛋白抗氧化肽溶液的吸光值记为 A''_0 。按下式计算大米蛋白抗氧化肽对 Fe^{2+} 的螯合率:

$$\text{螯合率} = (1 - A''/A''_0) \times 100\%$$

式中 A'' ——不同浓度大米蛋白抗氧化肽的吸光值; A''_0 ——空白吸光值。

同时配制不同浓度的EDTA溶液, 按照上述方法测定EDTA对 Fe^{2+} 的螯合能力。

5) 还原能力的测定

在2.5 mL pH6.6 磷酸盐缓冲液中加入不同浓度大米蛋白抗氧化肽1 mL、1%铁氰化钾2.5 mL, 混匀后50℃恒温20 min, 再加2.5 mL 10%三氯乙酸, 然后3000 r/min离心分离10 min, 取上层清液加蒸馏水2.5 mL和0.1% $FeCl_3$ 0.5 mL, 在700 nm测定吸光值 [15]。

同时配制不同浓度的维生素C溶液，按照上述方法测定维生素C的还原能力。

2 结果与分析

2.1 超声预处理参数对大米蛋白通过酶解制备抗氧化肽的影响

Box-Behnken试验设计及结果详见表2。根据表2通过SAS8.2统计软件对响应面回归过程进行数据分析，建立响应面的回归模型，进而寻求最优响应值的因素水平，分析结果见表3和表4。由SAS软件自动分析给出响应面回归模型方程 $Y = 51.44 + 6.09X_1 - 4.26X_2 - 2.41X_3 + 5.83X_1^2 - 1.00X_1X_2 - 2.26X_1X_3 + 3.03X_2^2 + 2.31X_2X_3 + 1.60X_3^2$ 。从表3可以看出，除了 X_1X_2 不显著外，其它项均显著。剔除不显著项，回归方程简化为 $Y = 51.44 + 6.09X_1 - 4.26X_2 - 2.41X_3 + 5.83X_1^2 - 2.26X_1X_3 + 3.03X_2^2 + 2.31X_2X_3 + 1.60X_3^2$ （ X_1 、 X_2 、 X_3 为各因素水平的编码数）。

表 2 Box-Behnken 设计和试验结果
Table 2 Box-Behnken design and experimental results

试验号	因 素			DPPH 清除率/ %
	X_1	X_2	X_3	Y
1	-1	-1	0	57.39
2	-1	1	0	51.95
3	1	-1	0	70.64
4	1	1	0	61.22
5	0	-1	-1	66.15
6	0	-1	1	55.61
7	0	1	-1	51.93
8	0	1	1	50.61
9	-1	0	-1	51.91
10	1	0	-1	69.54
11	-1	0	1	52.73
12	1	0	1	61.32
13	0	0	0	51.11
14	0	0	0	51.37
15	0	0	0	51.85

表 3 偏回归系数的估计值
Table 3 Estimated value of partial regression coefficient

参数	估计值	标准误差	T 值	P 值
X_1	6.09	0.413998	14.71626	0.0001
X_2	-4.26	0.413998	-10.2899	0.000149
X_3	-2.41	0.413998	-5.81525	0.002123
X_1^2	5.83	0.609388	9.564237	0.000212
X_1X_2	-1.00	0.585481	-1.69946	0.149982
X_1X_3	-2.26	0.585481	-3.86007	0.011879
X_2^2	3.03	0.609388	4.969465	0.004214
X_2X_3	2.31	0.585481	3.936932	0.010994
X_3^2	1.60	0.609388	2.631054	0.046474

从表4回归模型的方差分析表可以看出，失拟项大于 F 的概率是0.061032，即失拟项不显著，且复相关系数 $R^2=99.01\%$ ，复相关系数越接近1，说明回归方程的拟合度越好。模型的调整确定系数为97.24%，可以较好解释模型的变化。同时也可以看出，3个因素之间的关系是二

次方程关系，因素之间的影响是很大的。通过响应面回归方程，经SAS软件分析，可以得出模型中最佳提取工艺参数：超声功率1500 W、超声处理时间20 min、超声处理初始温度40℃，其DPPH自由基清除率预测可达到80.2%。对以上工艺参数进行验证试验，经3次平行试验，各抗氧化肽清除DPPH自由基分别为：76.0%、75.3%和73.2%，此时抗氧化肽的浓度分别为2.2015、2.2103和2.2052 g/L，清除DPPH自由基的平均值为74.8%，抗氧化肽的平均浓度为2.2057 g/L，试验结果较理想。在此工艺条件下，抗氧化肽得率为33.2%。与未经超声处理的相比较（另文发表），抗氧化肽得率提高了43.7%，DPPH自由基的 IC_{50} 降低了17.7%。

表 4 回归方程的方差分析
Table 4 Variance analysis of regression equation

回归项	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	687.8077	76.42307	55.73634	0.000176
一次项	3	488.4977	162.8326	118.7559	0.0001
二次项	3	153.6674	51.22246	37.35721	0.000756
交叉项	3	45.6426	15.2142	11.09591	0.011953
失拟	3	6.5739	2.1913	15.54849	0.061032
纯误差	2	0.2819	0.141		
复相关系数 R^2 99.01%					
离回归偏差 (RMSE) 1.17					
调整确定系数 R^2 97.24%					

大米蛋白经超声预处理后，其水解产物的抗氧化活性明显提高，这可能是因为超声预处理使大米蛋白内部的蛋氨酸和酪氨酸充分暴露出来，蛋氨酸和酪氨酸对抗氧化肽活性和稳定性的提高具有重要的作用^[16]。邓乾春等人分别用加酶量为7000 U/g的碱性蛋白酶和2000 U/g的中性蛋白酶从白果活性蛋白中制备抗氧化肽^[6]。然而，从超声预处理的大米蛋白中制备抗氧化肽时，酶的使用量仅为1120 U/g。因此，超声预处理不仅可以提高抗氧化肽的活性，同时也提高了抗氧化肽得率，提高了酶的使用效率。目前，“酶解-膜分离耦合”技术已被广泛用于活性肽的制备^[17]，超声预处理技术如果与其结合使用可以极大地降低酶使用量，提高酶解产量，这也是课题今后研究的重点。

2.2 大米蛋白抗氧化肽的抗氧化试验分析

2.2.1 大米蛋白抗氧化肽的清除超氧自由基（ $O_2\cdot^-$ ）效果分析

超氧自由基是基态氧接受一个电子后形成的第一个氧自由基，可以经过一系列反应生成其它的氧自由基。抗氧化肽因其氨基酸组成中具有酚羟基、巯基等给电子基团，能够与氧自由基发生氧化还原反应，使氧自由基被彻底清除。用Excel对试验数据进行多项式回归，回归方程见图1，维生素C和米蛋白抗氧化肽的回归决定系数 R^2 分别在0.95以上，回归方程显著。

从图1可以看出，维生素C和米蛋白抗氧化肽都随着浓度的增加， $O_2\cdot^-$ 的清除率提高。根据回归方程分别得到维生素C和米蛋白抗氧化肽的 IC_{50} ，即：维生素C的 IC_{50} 为0.0376 g/L，米蛋白抗氧化肽的 IC_{50} 为0.0678 g/L。

大米蛋白抗氧化肽的 IC_{50} 约为维生素C的 IC_{50} 的1.8倍, 尽管大米蛋白抗氧化肽清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力不如维生素C的强, 但仍表现出较强的清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力。

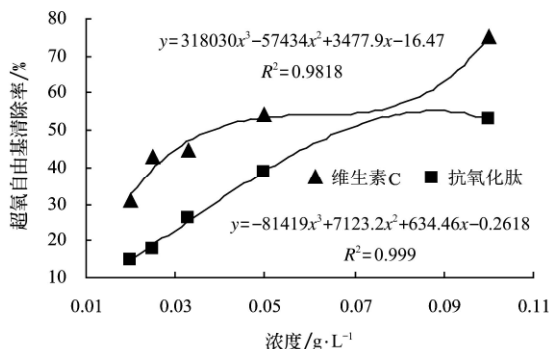
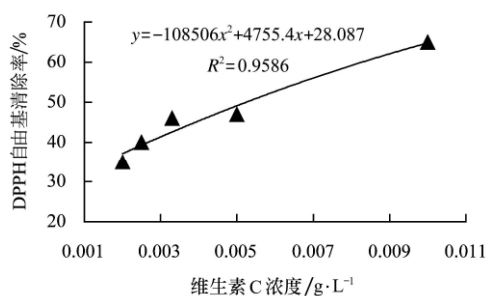


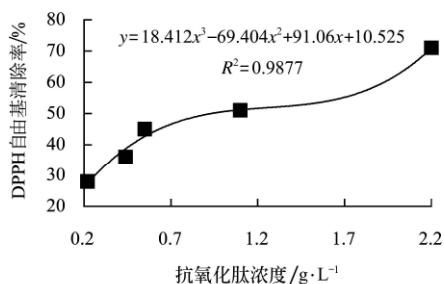
图1 维生素C和米蛋白抗氧化肽对超氧自由基的清除作用
Fig.1 Scavenging effect of ascorbic acid and antioxidant peptides of rice protein on superoxide anions radical

2.2.2 大米蛋白抗氧化肽抑制 DPPH 自由基的效果分析

DPPH是一种有机自由基, 清除DPPH自由基目前被作为评价物质是否具有抗氧化能力的指标之一。试验数据用Excel进行多项式回归, 回归方程见图2, 维生素C和米蛋白抗氧化肽的回归决定系数 R^2 分别在0.95以上, 回归方程显著。从图2可以看出, 随着维生素C和抗氧化肽剂量的增加, 其清除DPPH自由基的效果增强, 分别呈二次方和三次方量效关系。通过浓度与清除率的回归方程, 可得出维生素C的 IC_{50} 为0.0053 g/L、抗氧化肽的 IC_{50} 为0.9315 g/L。大米蛋白抗氧化肽的 IC_{50} 约为维生素C的 IC_{50} 的175.8倍, 因此可以看出, 尽管大米蛋白抗氧化肽具有清除DPPH自由基效果, 但大米蛋白抗氧化肽清除DPPH自由基不如维生素C的好。



a. 维生素C对DPPH自由基清除率



b. 大米蛋白抗氧化肽对DPPH自由基清除率

图2 维生素C和米蛋白抗氧化肽对DPPH自由基的清除作用
Fig.2 Scavenging effect of ascorbic acid and antioxidant peptides of rice protein on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical

2.2.3 大米蛋白抗氧化肽清除羟自由基($\cdot OH$)的效果分析

用Excel分别对试验数据进行多项式回归, 回归方程见图3, 维生素C和米蛋白抗氧化肽的回归决定系数 R^2 分别在0.95以上, 回归方程显著。由图3可以看出, 维生素C和米蛋白抗氧化肽表现出较强的清除羟自由基的能力, 而且随其浓度的增大对羟自由基的清除能力呈增大的趋势, 均呈三次方量效关系。通过浓度与清除率之间的回归方程, 可以得到维生素C的 IC_{50} 为0.0862 g/L、抗氧化肽的 IC_{50} 为0.1173 g/L。大米蛋白抗氧化肽 IC_{50} 约为维生素C IC_{50} 的1.4倍, 说明大米蛋白抗氧化肽清除羟自由基的能力比较接近维生素C。

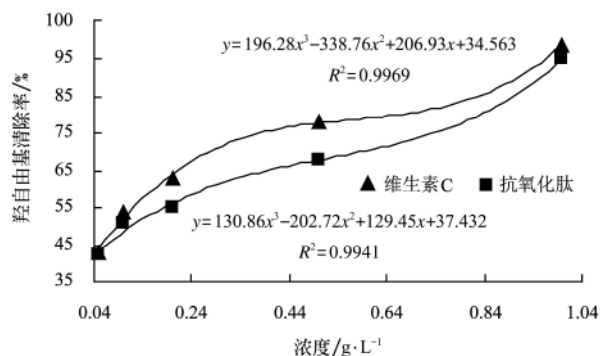
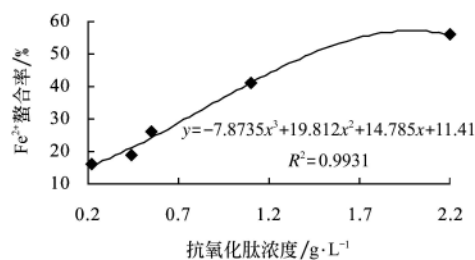


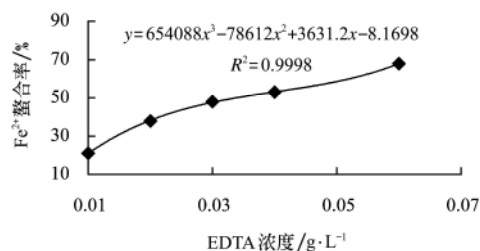
图3 维生素C和米蛋白抗氧化肽对羟自由基的清除作用
Fig.3 Scavenging effect of ascorbic acid and antioxidant peptides of rice protein on hydroxyl radical

2.2.4 大米蛋白抗氧化肽对 Fe^{2+} 的螯合能力分析

铁可通过Fenton反应使过氧化物产生自由基, 进而导致人类的一些心血管疾病。因而 Fe^{2+} 被认为是产生氧自由基和促进油脂过氧化的原因之一^[18], 降低Fenton反应中 Fe^{2+} 的浓度可以预防氧化损伤。用Excel对试验数据进行多项式回归, 回归方程见图4, EDTA和米蛋白抗氧化



a. 大米蛋白抗氧化肽对 Fe^{2+} 螯合率



b. EDTA 对 Fe^{2+} 的螯合率

图4 大米蛋白抗氧化肽和EDTA对 Fe^{2+} 的螯合作用
Fig.4 Effect of antioxidant peptides of rice protein and Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) on chelation to ferrous ion

肽的回归决定系数 R^2 分别在0.95以上,回归方程显著。从图4可以看出,大米蛋白抗氧化肽具有较强的螯合 Fe^{2+} 能力。因此,大米蛋白抗氧化肽表现出较强的抗氧化活性。从大米蛋白抗氧化肽浓度和 Fe^{2+} 螯合率之间的回归方程,可得出大米蛋白抗氧化肽的 IC_{50} 为1.4282 g/L,同样可以得到EDTA的 IC_{50} 为0.0338 g/L。从它们的 IC_{50} 可以看出,大米蛋白抗氧化肽 IC_{50} 约为EDTA IC_{50} 的42.2倍。

2.2.5 大米蛋白抗氧化肽的还原能力分析

在还原能力分析中,反应产物在700 nm处的吸光值越大,表明样品的还原能力越大。还原力与抗氧化活性存在极大的相关性,还原力越强,表明被测样品的抗氧化活性越好^[19, 20]。试验数据用Excel进行多项式回归,回归方程见图5,维生素C和米蛋白抗氧化肽的回归决定系数 R^2 均在0.95以上,回归方程显著。

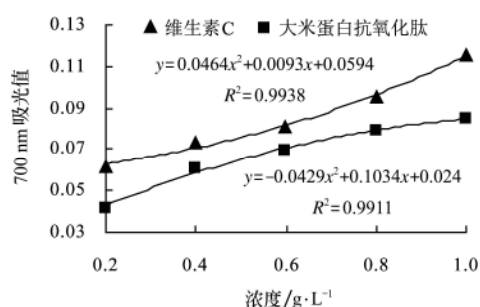


图5 维生素C和米蛋白抗氧化肽的还原能力

Fig.5 Reduction ability of ascorbic acid and antioxidant peptides of rice protein

从图5可以看出,随着维生素C和米蛋白抗氧化肽浓度的增加,还原能力也进一步增加。大米蛋白抗氧化肽浓度0.2 g/L时吸光度为0.042,维生素C浓度为0.2 g/L时吸光度为0.062,可见大米蛋白抗氧化肽的还原能力约为维生素C的0.7倍。尽管大米蛋白抗氧化肽还原力不如维生素C强,但大米蛋白抗氧化肽作为天然抗氧化剂,已表现出较强的还原能力,是一种理想的抗氧化剂。

3 结 论

1) 通过3因素3水平响应面分析试验得到超声预处理大米蛋白的数学模型,经SAS软件分析,该模型能够较好地模拟超声预处理大米蛋白酶解制备抗氧化肽的过程。大米蛋白超声处理的最佳工艺参数为:超声功率1500 W、超声处理时间20 min、超声处理初始温度40℃;使用中性蛋白酶进行酶解,其工艺参数为:底物浓度([S])10%、加酶量([E]/[S])1120 U/g、pH6.0、温度60℃、酶解时间30 min。在此工艺条件下,抗氧化肽(2.2057 g/L)清除DPPH可达到74.8%,抗氧化肽得率为33.2%;与未经超声处理的相比较,抗氧化肽得率提高了43.7%,DPPH自由基的 IC_{50} 降低了17.7%。

2) 大米蛋白抗氧化肽的抗氧化性能试验结果表明,大米蛋白抗氧化肽具有较强的清除 O_2^- 、DPPH自由基、羟自由基能力,其 IC_{50} 分别为0.0678、0.9315和0.1173 g/L,分别是维生素C IC_{50} 的1.8倍、175.8倍和1.4倍。大米蛋白抗氧化肽对 Fe^{2+} 具有一定的螯合作用,其 IC_{50} 为

1.4282 g/L,约为EDTA IC_{50} 的42.2倍。大米蛋白抗氧化肽还原能力的试验结果表明,大米蛋白抗氧化肽的还原能力约为维生素C的0.7倍,两者均表现出较强的还原能力。

[参 考 文 献]

- [1] 李艳红,刘 坚,张 涛,等. 酶解鹰嘴豆蛋白制备抗氧化肽工艺优化研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(1): 268—273.
- [2] 张晓峰,陈庆森,庞广昌. 玉米短肽的制备及其抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 33—35.
- [3] 徐 力,赵忠岩,李鸿梅,等. 大豆蛋白的小分子酶解产物抗氧化活性研究[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(1): 48—52.
- [4] 李干红,丁晓雯. 芝麻蛋白酶解条件控制及其产物抗氧化研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(6): 104—106.
- [5] 史 军,王金水,蔡凤英,等. 花生蛋白酶解条件及活性肽抗氧化特性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2006, 27(6): 29—33.
- [6] 邓乾春,陈春艳,潘雪梅,等. 白果活性蛋白的酶法水解及抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(11): 155—159.
- [7] 付 刚,李 诚,马长中,等. 猪骨抗氧化肽的酶解制备研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 136—138.
- [8] 朱建华,杨晓泉,熊 健,等. 超声处理对低温脱溶豆粕蛋白质浸提率的影响[J]. 粮油加工与食品机械, 2003, (7): 40—42.
- [9] 朱建华,杨晓泉. 超声处理对大豆分离蛋白流变学性质的影响[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 52—57.
- [10] 何荣海,马海乐,周存山,等. 超声波在酶法生产紫菜降血压肽过程中的应用[J]. 江苏大学学报(自然科学版), 2007, 28(1): 4—7.
- [11] Liu F, Chang S T. Free radicals scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts[J]. Life Sci, 1997, 60: 763—771.
- [12] Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 2755—2759.
- [13] 徐怀德,闫宁环,陈 伟,等. 黑莓原花青素超声波辅助提取优化及抗氧化性研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(2): 264—269.
- [14] Lee Y L, Yen M T, Mou J L. Antioxidant properties of various extracts from *Hypoglycosus mamoreus*[J]. Food Chemistry, 2007, 104: 1—9.
- [15] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucose amine[J]. J P J Nutr, 1986, 44: 307—315.
- [16] Elias R J, Bridgewater J D, Vachet R W, et al. Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin in food lipid dispersions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(25): 9565—9572.
- [17] 齐 崑,何志敏,何明霞. 酶解反应与膜分离耦合连续制备酪蛋白磷酸肽[J]. 化学工程, 2006, 34(4): 43—46.
- [18] 邹 磊,汪立君,呼 晴,等. 后发酵过程中乙醇对豆豉抗氧化能力的影响[J]. 食品发酵与工业, 2006, 32(12): 28—31.

- [19] Dorman H J D, Kosar M, Kahlos K, et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(8): 4563–4569.
- [20] 王昌禄, 江慎华, 陈志强, 等. 香椿老叶中活性物质提取及其抗氧化活性的研究[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(10): 229–234.

Ultrasonic pretreatment for preparation of antioxidant peptides from rice protein

Jia Junqiang¹, Ma Haile^{1,2,3*}, Qu Wenjuan¹, Ding Qingzhi¹, Cao Hui¹, Luo Lin¹, Wang Zhenbin¹

(1. College of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Jiangsu Provincial Research Center of Bio-process and Separation Engineering of Agri-products, Zhenjiang 212013, China;

3. College of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: In order to optimize enzymolysis technology for production of antioxidant peptides from rice protein using neutral protease, rice protein was pretreated by ultrasonic. Effects of ultrasonic power, time and initial temperature of ultrasonic treatment on the technology, in which scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical was taken as response value, were analyzed with response surface methodology. In addition, scavenging effects of antioxidant peptides of rice protein on superoxide anion radical, DPPH radical and hydroxyl radical, and their effects on chelation to ferrous ion and reduction ability were studied. The results showed that the optimum conditions of ultrasonic treatment were ultrasonic power 1500 W, ultrasonic pretreatment time 20 min and initial temperature of ultrasonic treatment 40°C. Under the optimum conditions the antioxidant peptides (2.2057 g/L) that ultrasonic-treated rice protein was hydrolyzed with neutral protease were obtained, and their scavenging effect of DPPH radical increased to 74.8%, and their yield was 33.2%. Compared with the antioxidant peptides derived from untreated rice protein, the yield of antioxidant peptides derived from ultrasonic-treated rice protein increased by 43.7%, and their half inhibitory concentration (IC_{50}) value decreased by 17.7%. Moreover, the result of antioxidation showed that the IC_{50} values of antioxidant peptides derived from ultrasonic-treated rice protein for scavenging superoxide anion, DPPH, and hydroxyl radicals were 0.0678, 0.9315 and 0.1173 g/L, respectively; and the corresponding IC_{50} values were 1.8, 175.8, and 1.4 times of that of ascorbic acid. Their IC_{50} value for chelation to ferrous ion was 42.2 times of that of ethylenediaminetetraacetic acid, and their reduction ability was 0.7 times of that of ascorbic acid.

Key words: rice protein; ultrasonic pretreatment; enzymatic hydrolysis; antioxidant peptides