

中性蛋白酶水解鸡骨泥制备短肽工艺优化

朱 瀛¹, 赵改名^{1*}, 柳艳霞¹, 赵莉君¹, 田 玮²

(1. 河南省肉制品加工与质量安全控制重点实验室, 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002;
2. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘 要: 为了探究酶法制备鸡骨泥短肽的最佳工艺, 该文研究了以中性蛋白酶解鸡骨泥时各因素对短肽得率和羟自由基清除率的影响, 以及鸡骨泥肽清除超氧阴离子自由基和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)的能力。试验探究了酶解过程中不同底物浓度、酶浓度、反应温度和反应时间对短肽得率和羟自由基清除率的影响, 采用响应曲面优化得到了以短肽得率为目标的中性蛋白酶解鸡骨泥的最优工艺, 当反应液 pH 值为 7.2, 反应温度 42 ℃, 反应时间 2 h, 底物质量分数 5%, 酶添加量 200 mg/g, 该条件下制备鸡骨泥肽, 测得其短肽得率为 56.16%, 羟自由基清除率为 54.12%。采用该酶解工艺制备鸡骨泥肽, 测得其对超氧阴离子自由基最高清除率为 56.01%, 对 DPPH 自由基最高清除率为 81.57%, 说明鸡骨泥肽具有一定的抗氧化活性, 研究结果为酶法制备鸡骨泥肽提供参考。

关键词: 酶; 优化; 水解; 鸡骨泥; 中性蛋白酶; 短肽; 抗氧化活性

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.12.044

中图分类号: TS251.94

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-12-0309-06

朱 瀛, 赵改名, 柳艳霞, 赵莉君, 田 玮. 中性蛋白酶水解鸡骨泥制备短肽工艺优化[J]. 农业工程学报, 2016, 32(12): 309—314. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.12.044 http://www.tcsae.org

Zhu Ying, Zhao Gaiming, Liu Yanxia, Zhao Lijun, Tian Wei. Optimization of enzymatic hydrolysis of chicken bone protein for production of antioxidant peptides using nutrase[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(12): 309—314. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.12.044 http://www.tcsae.org

0 引 言

据联合国粮食及农业组织统计数据显示, 近 10 年来世界肉类生产中鸡肉产量增长很快, 其中亚洲是鸡肉增长最快的地区。中国是世界第二鸡肉生产大国^[1]。但是目前中国对包括鸡骨在内的动物骨的加工利用还比较落后, 每年都有大量的动物骨被浪费或加工成附加值低的产品^[2]。动物的开发与利用主要集中于猪骨、牛骨、鹅骨和鸡骨等, 这其中由于鸡骨的产量大, 有很大的开发价值^[3-4]。鸡骨泥与鸡骨架和鸡肉相比, 水分、脂肪含量偏低, 而蛋白质、钙、磷、灰分等偏高。这其中, 鸡骨泥的钙磷比约为 2:1, 有利于人体吸收, 能够作为补钙的来源, 在鸡骨泥中检测出 9 种必需氨基酸^[5]。目前鸡骨泥的开发和利用主要集中在明胶和骨素上^[6], 采用酶解法制备鸡骨泥功能短肽是亟待研究的课题。

生物活性肽由于其具有免疫调节、激素调节、降血压、降血脂、抗疲劳、抗氧化等生理调节功能, 是当前国际医药界、食品界热门的研究课题和极具发展前景的

功能因子^[7]。蛋白质酶解法生产功能性短肽安全性高, 能在温和的条件下进行定位水解产生特定的短肽, 且水解过程较易控制^[8]。酶水解可以提高蛋白质的功能特性, 蛋白酶水解产生的肽具有特殊的功效作用, 肽类不仅在油溶体系中有良好的增效作用, 而且在水溶体系、乳化体系及干燥体系中也具有较高的抗氧化活性, 某些小分子的肽甚至具有特殊的生理活性^[9-10]。

中性蛋白酶是一类在中性条件下作用于蛋白质肽键的蛋白酶, 可将蛋白质水解成多肽或游离氨基酸。中性蛋白酶作用条件温和, 是最早发现并广泛应用于工业化生产的蛋白酶制剂^[11]。本试验采用中性蛋白酶酶解鸡骨泥, 考察不同底物浓度、加酶量、反应温度和反应时间对产物短肽得率的影响, 并通过羟自由基、超氧阴离子自由基和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率来评价产物的抗氧化活性, 以期酶法制备鸡骨泥肽提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要原料

鸡骨泥采购于河南大用集团, 质量为 20 kg, 保存于 -40 ℃冰柜中进行后续试验。中性蛋白酶购于北京 Solarbio 公司, 为固体, 酶活力为 60 000 U/g。

1.2 主要仪器

AL104 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); THZ-82 型恒温水浴振荡器(金坛市杰瑞尔电器有限公司); UV-2600 型紫外分光光度计(岛津企业管理有限

收稿日期: 2015-12-22 修订日期: 2016-04-05

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903012); 国家‘十一五’科技支撑计划项目(2007BAD70B02)

作者简介: 朱 瀛, 研究方向为畜禽副产品加工。郑州 河南省肉制品加工与质量安全控制重点实验室, 河南农业大学, 450002。Email: 331044189@qq.com
*通信作者: 赵改名, 教授, 博士, 从事肉制品加工与质量控制。郑州 河南省肉制品加工与质量安全控制重点实验室, 河南农业大学, 450002。

Email: gmzhao@126.com

公司); ALLEGRA A-64A 型高速离心机 (Beckman Coulter); BPJ-9156A 型精密鼓风干燥箱 (上海一恒仪器有限公司); ALPHAI-4LD-plus 型台式真空冷冻干燥机 (德国 CHRIST 公司)。

1.3 工艺流程

短肽制备工艺流程如图 1 所示。

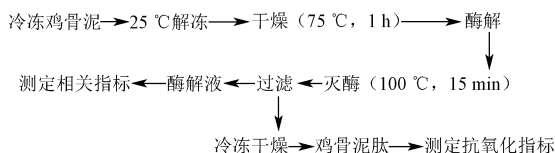


图 1 短肽制备工艺流程图

Fig.1 Production process of antioxidant peptides

本试验酶解过程如下: 向 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 蒸馏水。加入一定量的底物, 以质量分数 (%) 表示。之后加入一定量的酶, 加酶量以 mg/g 表示。底物和酶添加完毕后放入恒温水浴振荡器中反应。

单因素试验固定的试验条件为: 底物质量分数 5%, 加酶量 200 mg/g, 反应温度 42 °C, 反应时间 3 h。

1.4 指标测定方法

1.4.1 可溶性蛋白浓度测定

考马斯亮蓝法: 考马斯亮蓝 G-250 测定蛋白质含量属于染料结合法的一种。该染料在游离状态下呈红色, 在稀酸溶液中当它与蛋白质的疏水区结合后变为青色, 前者最大光吸收在 465 nm, 后者在一定蛋白质浓度范围内蛋白质与色素结合物在 595 nm 波长下的吸光度与蛋白质含量成正比, 故可用于蛋白质的定量测定^[12]。

1.4.2 短肽得率测定

短肽得率测定采用 Jang^[13]方法: 将质量分数为 5% 三氯乙酸与蛋白酶水解液以 1:1 体积比混合, 离心 (4 985 g/min, 12 min), 取上清液采用考马斯亮蓝法测其可溶性蛋白, 短肽得率计算公式如下

$$\text{TCA-NSI} = \frac{N_1}{N_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中 TCA-NSI 为三氯乙酸可溶性氮得率, %; N_1 为在 5% TCA 中可溶性蛋白, mg; N_2 为酶解液中可溶性蛋白, mg。

1.4.3 羟自由基清除率测定

采用 Gohil^[14]方法: 配制 0.75 mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液, 取 1 mL 于试管中, 依次加入 0.2 mmol/L (pH 值 7.4) 的磷酸缓冲液 2 mL 和蒸馏水 1 mL, 充分混匀, 加 0.75 mmol/L 的 FeSO_4 溶液 1 mL, 混匀, 加入 1 mL 0.01% H_2O_2 , 于 37 °C 水浴 60 min, 测定 536 nm 处的吸光值 A_p 。

其他操作同上, 用 1 mL 蒸馏水代替 1 mL H_2O_2 测定吸光值 A_B 。

其他操作同上, 用 1 mL 酶解液代替 1 mL 蒸馏水, 测定吸光值 A_S 。

清除率按以下公式计算:

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{A_S - A_p}{A_B - A_p} \times 100\% \quad (2)$$

1.4.4 超氧阴离子清除能力测定

采用 Halliwell 方法^[15]邻苯三酚自氧化法测定超氧阴离子自由基清除率: 分别配制 5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g/mL}$ 的鸡骨泥肽和维生素 C 溶液。取 50 mmol/L (pH 值 8.2) 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL 于试管中, 加入 2 mL 蒸馏水, 30 mmol/L 的邻苯三酚溶液 0.5 mL, 充分混匀, 添加按照上法配制的不同浓度鸡骨泥液及维生素 C 溶液 1 mL, 空白组添加 1 mL 蒸馏水, 在 25 °C 恒温反应 20 min, 于 320 nm 波长处测吸光度 $A_{\text{空白}}$, 在 4 min 内, 每隔 30s 读数一次, 计算 4 min 内的平均增值 $A_{\text{样}}$ 。

清除率按以下公式计算

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (3)$$

1.4.5 DPPH 自由基清除能力测定

采用 Marfak^[16]方法: 分别配制 10、20、30、40、50、60 mg/L 的鸡骨泥肽和维生素 C 的无水乙醇溶液。试管中加入 2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液, 加入 2 mL 各个梯度的鸡骨泥肽液或维生素 C 的无水乙醇溶液, 混匀后在室温 (25 °C) 避光条件下放置 30 min, 测定 517 nm 处吸光值 A_1 。再测定 2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液和 2 mL 无水乙醇混合后的吸光值 A_2 。

清除率按以下公式计算

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \times 100\% \quad (4)$$

1.5 数据分析

本试验中采用 Microsoft Excel 2007 软件处理数据 (样本平均值 ± 标准偏差), 利用 IBM SPSS Statistics 13.0 统计分析软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 采用 Design expert 8.0 软件做响应曲面分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果及分析

2.1.1 底物浓度的单因素试验结果

表 1 表明, 底物质量分数由 1% 上升到 5% 过程中, 短肽得率和羟自由基清除率都有明显 ($P < 0.05$) 的上升趋势, 说明低底物浓度时, 随着底物浓度的增加, 酶与底物的结合几率增加, 使得溶液中的活性物质浓度上升。

表 1 不同底物浓度对短肽得率和羟自由基清除率的影响

Table 1 Influence of different substrate concentrations on TCA-NSI and hydroxy free radical clearance rate

底物质量分数 Substrate concentration/%	短肽得率 TCA-NSI/%	羟自由基清除率 Hydroxy free radical clearance rate/%
1	40.64±0.33 ^f	35.28±0.16 ^f
3	45.87±0.82 ^d	46.89±0.23 ^d
5	55.89±0.18 ^a	56.14±0.78 ^a
7	53.40±0.08 ^b	56.02±0.45 ^a
9	46.12±0.58 ^d	52.23±0.31 ^b
11	47.21±0.14 ^c	51.32±0.65 ^c
13	42.32±0.44 ^e	43.58±0.21 ^e

注: 表中数据为平均值 ± 标准差, 同一列中不同字母表示不同处理间存在显著差异 ($P < 0.05$), 下同。加酶量 200 mg/g, 反应温度 42 °C, 反应时间 3 h。
Note: The data in the table and figure are the average value ± the standard deviation, different letters in the same column, express that there are significant differences between different treatment groups ($P < 0.05$), the same below. Enzyme concentration 200 mg/g, temperature 42 °C, reaction time 3 h.

当底物质量分数由 5% 上升到 13% 过程中，短肽得率和羟自由基清除率开始下降，说明较高底物浓度时，随着底物浓度的上升，有效水分下降，使得酶与底物的运动受阻。当底物浓度过高时，会形成不会继续反应的中间产物，使得部分酶失活，这便是酶解过程中的底物抑制作用^[17]。由于底物抑制的存在，溶液中活性物质得率下降。

2.2.2 加酶量的单因素试验结果

表 2 表明，当加酶量由 50 mg/g 上升至 200 mg/g 过程中，随着加酶量的增加，短肽得率和羟自由基清除率呈明显 ($P<0.05$) 的上升趋势。这是由于加酶量由低至高的过程中，酶分子同底物结合的几率逐渐增大，从而使得大分子的蛋白被水解为小分子肽的几率增大，进而使得溶液中的活性物质的得率增大^[18]。

表 2 不同加酶量对短肽得率和羟自由基清除率的影响
Table 2 Influence of different enzyme concentrations on TCA-NSI and hydroxy free radical clearance rate

加酶量 Enzyme concentration/ (mg·g ⁻¹)	短肽得率 TCA-NSI/%	羟自由基清除率 Hydroxy free radical clearance rate/%
50	39.28±0.11 ^f	35.08±0.33 ^e
100	45.16±0.54 ^e	48.52±0.54 ^d
150	48.32±0.62 ^d	50.88±0.61 ^c
200	56.53±0.27 ^a	54.87±0.89 ^{ab}
250	57.02±0.09 ^a	55.12±0.75 ^{ab}
300	53.12±0.23 ^b	55.56±0.12 ^a
350	52.01±0.16 ^c	54.23±0.56 ^b

注：底物质量分数 5%，反应温度 42 ℃，反应时间 3 h。
Note: Substrate concentration 5%, temperature 42 ℃, reaction time 3 h.

当加酶量由 200 mg/g 上升至 350 mg/g 过程中，随着加酶量的增加，短肽得率和羟自由基清除率呈平缓甚至有下降的趋势。这是由于加酶量较高时，酶分子已经结合了大部分底物的酶切位点，使得溶液中的活性物质浓度达到了最高，同时由于一部分短肽与酶反应生成了没有活性的游离氨基酸，使得羟自由基的清除率有所下降^[18]。

2.2.3 反应温度的单因素试验结果

表 3 表明，当温度由 36 ℃ 上升到 42 ℃ 过程中，随着温度的上升，短肽得率和羟自由基清除率逐渐上升。这是由于在酶最适温度以下时，随着温度的上升，酶分子的运动能力增强，与底物分子结合概率增大，使得溶液中活性物质浓度不断上升^[18]。

表 3 不同温度对短肽得率和羟自由基清除率的影响
Table 3 Influence of different temperatures on TCA-NSI and hydroxy free radical clearance rate

温度 Temperature/℃	短肽得率 TCA-NSI/%	羟自由基清除率 Hydroxy free radical clearance rate/%
36	48.62±0.17 ^f	40.33±0.71 ^e
38	50.45±0.66 ^d	44.74±0.08 ^d
40	54.21±0.41 ^c	49.23±0.54 ^c
42	56.37±0.43 ^a	52.24±0.11 ^a
44	55.11±0.24 ^b	51.18±0.46 ^b
46	49.48±0.15 ^e	50.46±0.12 ^b

注：底物质量分数 5%，加酶量 200 mg/g，反应时间 3 h。
Note: Substrate concentration 5%, enzyme concentration 200 mg/g, reaction time 3 h.

当温度由 42 ℃ 到 46 ℃ 过程中，随着温度的上升，短肽得率和羟自由基清除率逐渐下降。这是由于，当温度超过酶最适温度后，随着温度的上升，溶液中酶分子的结构逐渐被破坏，使得能够有效参与反应的酶分子数量下降，从而导致溶液中产生的活性物质浓度下降。

2.2.4 反应时间的单因素试验结果

表 4 表明，反应时间由 0.5 h 上升到 2 h 过程中，随着时间的增加，短肽得率和羟自由基清除率有明显的上升。这是由于在酶分子与底物分子充分结合之前，随着反应时间的增加，产物的浓度会不断增加，溶液中的活性物质浓度也随之不断上升。

表 4 不同反应时间对短肽得率和羟自由基清除率的影响
Table 4 Influence of different reaction times on TCA-NSI and hydroxy free radical clearance rate

时间 Time/h	短肽得率 TCA-NSI/%	羟自由基清除率 Hydroxy free radical clearance rate/%
0.5	35.64±0.37 ^e	40.87±0.81 ^f
1.0	40.25±0.27 ^d	45.99±0.37 ^e
1.5	50.45±0.48 ^c	48.03±0.57 ^d
2.0	55.48±0.62 ^a	54.84±0.60 ^c
2.5	54.21±0.18 ^b	57.47±0.31 ^a
3.0	55.89±0.93 ^a	56.38±0.17 ^b

注：底物质量分数 5%，加酶量 200 mg/g，反应温度 42 ℃。
Note: Substrate concentration 5%, enzyme concentration 200 mg/g, temperature 42 ℃

当反应时间由 2 h 上升至 3 h 过程中，随着时间的增加，短肽得率和羟自由基清除率在上下波动。如果短肽被水解为游离氨基酸的量大于大分子蛋白被水解为短肽的量，就会出现短肽得率下降的现象。同时由于不同短肽具有不同的功能特性，在这一时刻羟自由基清除率反而上升，可能是因为大分子蛋白水解产生的短肽清除羟自由基的能力大于那些被水解为游离氨基酸的短肽而造成的^[19]。

2.3 响应曲面设计

由单因素试验分析可知，短肽得率与羟自由基的变化趋势基本一致，是影响最终酶解液抗氧化活性的重要指标。

故根据单因素试验情况，固定反应时间 2 h。以底物浓度、加酶量和温度作为影响因素，短肽得率作为响应值设计如下试验（表 5），并得到结果如表 6 所示。

采用逐步回归法得出底物浓度、加酶量和温度对短肽得率的优化方程，优化方程如下：

$$\text{TCA-NSI}(\%) = 56.16 + 1.86A + 2.86B + 1.51C + 1.39AB - 2.93AC + 0.13BC - 4.53A^2 - 4.04B^2 - 0.71C^2$$

式中 A 为底物质量分数，%； B 为加酶量，mg/g； C 为温度，℃。

表 5 表明，短肽得率的回归模型显著。信噪比 9.303 高于临界值 4，表明二次多元回归模型极其显著。校正 $R^2=0.8702$ ，说明该模型拟合程度较好。失拟项 $P=0.0861>0.05$ ，表明由误差引起的失拟不显著，试验误差小。

表 5 响应面试验设计及结果

Table 5 Experiment design and result of the response surface

试验编号 No.	底物质量分数 Substrate concentration A/ %	加酶量 Enzyme concentration B/ (mg·g ⁻¹)	温度 Temperature C/ ℃	短肽得率 TCA-NSI/%
1	5	200	42	55.13
2	7	200	40	52.52
3	3	150	42	44.28
4	3	250	42	46.05
5	5	200	42	57.28
6	5	150	44	48.24
7	7	250	42	53.68
8	5	200	42	56.84
9	7	150	42	46.34
10	5	250	40	54.31
11	3	200	40	44.08
12	3	200	44	55.18
13	5	150	40	47.71
14	5	200	42	56.57
15	5	250	44	55.37
16	7	200	44	51.89
17	5	200	42	54.98

表 6 短肽得率回归模型方差分析结果

Table 6 ANOVA analysis of regression model of TCA-NSI

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P-value
Model	322.9	9	35.88	12.92	0.0014
A-底物质量分数	27.53	1	27.53	9.91	0.0162
B-加酶量	65.21	1	65.21	23.48	0.0019
C-温度	18.18	1	18.18	6.55	0.0376
AB	7.76	1	7.76	2.79	0.1386
AC	34.4	1	34.4	12.39	0.0097
BC	0.07	1	0.07	0.025	0.8781
A ²	86.45	1	86.45	31.13	0.0008
B ²	68.77	1	68.77	24.76	0.0016
C ²	2.13	1	2.13	0.77	0.4102
残差 Residual	19.44	7	2.78		
失拟项 Lack of Fit	15.1	3	5.03	4.64	0.0861
误差项 Pure Error	4.34	4	1.08		
总和 Cor Total	342.34	16			

Design Expert 软件给出了以最大短肽得率为目标的最优酶解条件为底物质量分数 5%，加酶量 200 mg/g，温度 42 ℃，pH 7.2，反应时间 2 h，此时短肽得率为 56.16%±0.88%。在此条件下制备鸡骨泥肽，测定其抗氧化活性。

2.4 抗氧化能力测定

目前对于活性物质的抗氧化能力的评价方法多种多样，单一的指标难以说明一种物质的抗氧化活性^[20]。目前已知的抗氧化剂通常通过以下 5 种途径来达到抗氧化目的：抑制脂质过氧化反应；直接清除活性氧自由基；清除氧；螯合金属离子；激活机体本身内在抗氧化防御系统^[21-23]。

本试验选取了超氧阴离子自由基以及 DPPH 自由基测定鸡骨泥肽对他们的清除能力，从而在一定程度上评价鸡骨泥肽的抗氧化活性。

2.4.1 超氧阴离子清除能力结果

O₂⁻自由基通常是在代谢过程中或者氧的光照活化条件下由一个电子传递给氧形成的。O₂⁻自由基可通过线粒体中的辅酶 Q、半醌、内质网膜上的细胞色素 P450 和血红蛋白，肌红蛋白，肾上腺素等自氧化产生。

图 2 表明，在 5~20 μg/mL 质量浓度内，随着浓度的上升，鸡骨泥肽和维生素 C 对 O₂⁻自由基清除率都有明显上升，而质量浓度 20 μg/mL 以上，鸡骨泥肽的清除率变化不明显稳定在 55%左右的清除率。说明在低浓度时，鸡骨泥肽同维生素 C 有相近清除能力，同时也反映出鸡骨泥肽相比维生素 C 对 O₂⁻自由基清除能力较弱。

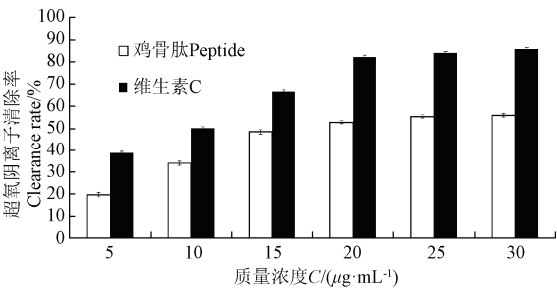


图 2 超氧阴离子自由基清除率结果

Fig.2 Result of superoxide anion free radical clearance rate

2.4.2 DPPH 自由基清除能力结果

图 3 表明，随着浓度的上升，鸡骨泥肽对 DPPH 自由基的抑制率逐渐上升，最终稳定在 80%左右。对比维生素 C 对 DPPH 自由基的清除率，可以说明鸡骨泥肽对 DPPH 自由基有较好的抑制作用。

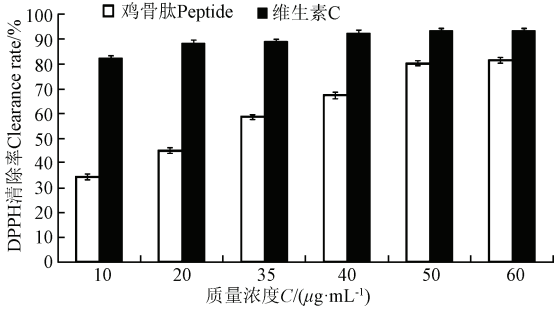


图 3 DPPH 自由基清除率结果

Fig.3 Result of DPPH free radical clearance rate

3 结 论

1) 底物浓度、加酶量、反应温度以及反应时间都会对产物最终的短肽得率以及相关抗氧化活性产生很大影响，反应中存在底物抑制、产物抑制以及酶失活等各种情况阻碍反应的发生。

2) 通过响应面试验得到出底物浓度、加酶量和反应温度对短肽得率的优化方程，决定系数 R² 为 0.8702，以短肽得率为目标的最优酶解条件为：底物质量分数 5%，加酶量 200 mg/g，温度 42 ℃，pH 值 7.2，反应时间 2 h，

采用该酶解工艺制备鸡骨泥肽,测得短肽得率为 56.16%。

3) 通过测定最优酶解条件下产物的抗氧化活性指标,得出鸡骨泥肽对超氧阴离子自由基以及 DPPH 自由基都有一定清除能力,这其中对超氧阴离子自由基的清除率最高为 56.01%;对 DPPH 自由基清除率最高为 81.57%。采用不同蛋白酶,例如木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶等,酶解鸡骨泥会得到不同的产物,其短肽得率和抗氧化活性可能不同,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 李睿,王海燕,尚永彪. 鸡骨的综合利用研究进展[J]. 肉类工业, 2010(11): 9—11.
Li Rui, Wang Haiyan, Shang Yongbiao. Research progress on comprehensive utilization of chicken bones[J]. Meat Industry, 2010(11): 9—11. (in Chinese with English abstract)
- [2] 卢进峰,张小弓,王雅静. 鸡骨深加工及综合利用[J]. 肉类工业, 2010(9): 54—56.
Lu Jinfeng, Zhang Xiaogong, Wang Yajing. Deep processing and comprehensive utilization of chicken bone[J]. Meat Industry, 2010(9): 54—56. (in Chinese with English abstract)
- [3] 李娇娇,李诚. 酶解鹅骨蛋白制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2013(20): 194—198.
Li Jiaojiao, Li Cheng. Optimization of enzymatic hydrolysis of goose bone protein for production of antioxidant peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013(20): 194—198. (in Chinese with English abstract)
- [4] 邹利. 猪骨粉酶解液制备 MPRs 的抗氧化性及肉味香精的工艺研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2010.
Zou Li. Study on the antioxidant activity of MPRs prepared by enzymatic pig bone meal and the process of meat flavor[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [5] 夏秀芳. 畜禽骨的综合开发利用[J]. 肉类工业, 2010(11): 9—11.
Xia Xiufang. Comprehend utilization of livestock and poultry bones[J]. Meat Industry, 2010(11): 9—11. (in Chinese with English abstract)
- [6] 许雄. 鸡骨渣的酶解及其应用研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.
Xu Xiong. Study on Enzymolysis of Chicken Bone Residues and its Application[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2009. (in Chinese with English abstract)
- [7] 王树华,王树祥,王昀. 抓紧发展生物活性肽[J]. 化工管理, 2004(5): 27—27.
Shu Hua, Wang Shuxiang, Wang Yun. Grasping the development of biological active peptide[J]. Chemical Industry Management, 2004(5): 27—27. (in Chinese with English abstract)
- [8] 彭德翔,丁卓平. 抗衰老活性肽的研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 267—270.
Peng Dexiang, Ding Zhuoping. Advances of anti-ageing activity peptides[J]. Modern food science and technology, 2006, 22(2): 267—270. (in Chinese with English abstract)
- [9] Panyam Dinakar, Kilara Arun. Enhancing the functionality of food proteins enzymatic modification[J]. Trends in Food Science & Technology, 1996, 7(4): 120—125.
- [10] 郑建仙. 功能性食品(第 2 卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [11] 王俊,苏国万,赵谋明. 产中性蛋白酶种曲培养基的优化及酶学特性研究[J]. 现代食品科技, 2012(28): 1002—1017.
Wang Jun, Sun Guowan, Zhao Mouming. Optimization of the medium for production of neutral protease and research of the enzymatic properties[J]. Modern food science and technology, 2012(28): 1002—1017. (in Chinese with English abstract)
- [12] 郝建军,康宗利,于洋. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [13] Jang A, Lee M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates[J]. Meat Sci, 2005, (69): 653—661.
- [14] Gohil K, Moyr K, Farzin S, et al. mRNA expression profile of a human cancer cell line in response to Ginkgo biloba extract: induction of antioxidant response and the Golgi system[J]. Free Radic Re, 2000, (33): 831—849.
- [15] Halliwell B, Gutteridge J M C. Antioxidant activity of burdock its scavenging effect on free radical and active of 50% ethaolic red aextract[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 21—25.
- [16] Marfak A, Trouillas P, Allais DP, et al. Reactivity of flavonoids with 1-hydroxyethyl radical: ar-radiolysis study[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1670: 28—29.
- [17] 张宇昊. 花生短肽制备及其功能活研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
Zhang Yuhao. Study on Preparation of Peanut Oligopeptides and its Functional Activities[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007. (in Chinese with English abstract)
- [18] 王玉霞. 鸡骨肽制备及其 ACE 抑制活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
Wang Yuxia. Study on the Processing Technology of Chicken Bone Peptides and its Inhibitory Activity to ACE[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [19] 赵钟兴. 蚕蛹蛋白酶解制备抗氧化和降血压活性产物及其动力学研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.
Zhao Zhongxing. Screening of ACE Inhibitory Activity and Antioxidative Activity and Kinetic of Enzymic Hydrolysates for Protein of Silkworm Pupae[D]. Nanning: Guangxi University, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [20] 马小媛,钱卫平. 抗氧化能力评价方法[J]. 化学进展, 2011(8): 1738—1746.
Ma Xiaoyuan, Qian Weiping. Methods to determine antioxidant capacity[J]. Process in Chemistry, 2011(8): 1738—1746. (in Chinese with English abstract)
- [21] 包斌,得力格尔桑,许勤. 抗氧化肽的研究进展[J]. 内蒙古农业大学学报, 2004, 25(1): 121—124.
Bao Bin, Deligeersang, Xu Qin. Advances in study on antioxidative peptide[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University, 2004, 25(1): 121—124. (in Chinese with English abstract)
- [22] 陈炳卿. 营养与食品卫生学第四版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [23] 陈君石,闻之梅. 食物、营养与癌症预防[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999.

Optimization of enzymatic hydrolysis of chicken bone protein for production of antioxidant peptides using nutrase

Zhu Ying¹, Zhao Gaiming^{1*}, Liu Yanxia¹, Zhao Lijun¹, Tian Wei²

(1. Henan Key Lab. of Meat Quality and Safety Control, College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Animal Husbandry and Veterinary Science Engineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Chicken bone is the main by-product of chicken slaughtering and processing. In order to explore new ways to use chicken bone and promote the high added value of chicken bone, the preparing technology and antioxidant activity of chicken bone peptides are investigated systematically in this paper, so as to provide theory basis for the industrial preparation and utilization of chicken bone peptides. This experiment uses the nutrase to hydrolyze chicken bone residue, investigates the effect of different substrate concentration, enzyme concentration, reaction temperature and reaction time on the yield of oligopeptide of product, and evaluates the antioxidant activity of the product according to the clearance rate of hydroxyl free radicals, superoxide anion free radicals and DPPH free radicals. The single factor experiment is aimed to explore the influence of different substrate concentration, enzyme concentration, reaction temperature and reaction time during the enzymolysis on the oligopeptide yield and the clearance rate of hydroxyl free radical. The results show: 1) Lower substrate concentration can affect the combination of enzyme and substrate molecules, on the other hand, higher substrate concentration will cause the phenomenon of substrate inhibition and enzyme inactivation; 2) Lower enzyme concentration will affect the combination of enzyme and substrate molecules, and higher enzyme concentration also will make part of the short peptides hydrolyzed to free amino acid, which can lead to oligopeptide yield decline; 3) Lower reaction temperature will affect the diffusion motion of enzyme and substrate molecules in the solution, and higher temperature will cause the structural changes of enzyme molecules and then can make a part of enzyme lose activity; 4) Shorter reaction time will affect the combination of enzyme and substrate molecules, and longer reaction time will lead to the fluctuating phenomenon of oligopeptide yield and clearance rate of hydroxyl free radical. Aiming at higher oligopeptide yield, using the response surface optimization, the best process using nutrase to hydrolyze chicken bone residue is obtained: the pH value of reaction solution is 7.2, the reaction temperature is 42 °C, the reaction time is 2 h, the substrate concentration is 5%, and the enzyme concentration is 200 mg/g. When preparing the peptides of chicken bone residue under these conditions, the oligopeptide yield and clearance rate of hydroxyl free radicals are measured as 56.16% and 54.12%, respectively. Also the regression equation is gotten by using the response surface optimization, which can explain how substrate concentration and enzyme concentration affect the oligopeptide yield. By determining the antioxidant activity index of the product with optimal enzymatic hydrolysis conditions, it is concluded that the chicken bone residue peptide has some clearance ability on superoxide anion free radicals and DPPH free radicals. The clearance rate of ultra oxygen anion free radical is as high as 56.01%, which is a common removal ability, and the clearance rate of DPPH free radical is as high as 81.57%, which is a good removal ability. The test result shows that the product hydrolyzed by nutrase from chicken bone residue has biological antioxidant activity from a certain extent.

Keywords: enzymes; optimization; hydrolysis; chicken bone residue; nutrase; oligopeptide; antioxidant activity