

王立, 卞欢, 吴海虹, 等. 超声辅助酶解鹅肝蛋白的动力学和热力学及酶解物抗氧化性能[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1395-1401.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.028

超声辅助酶解鹅肝蛋白的动力学和热力学及酶解物抗氧化性能

王立^{1,2}, 卞欢¹, 吴海虹¹, 邹焱¹, 王道营¹, 徐为民¹

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2.扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

摘要: 以鹅肝为原料, 采用超声预处理鹅肝蛋白后, 添加胰酶进行酶解, 制备鹅肝多肽, 研究超声辅助鹅肝蛋白酶解动力学和热力学, 并比较常规酶解和超声辅助酶解制备鹅肝多肽的抗氧化性能。酶解时间为 150 min 时, 与常规酶解相比, 超声辅助酶解的水解度提高了 16.05%。酶解时间为 130 min 时, 与常规酶解相比, 超声辅助酶解的鹅肝多肽得率提高了 15.63%。酶解温度为 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 时, 与常规酶解相比, 超声辅助酶解动力学参数即反应速率常数 k 分别提高了 214.00%、115.00%、64.00%、41.00%, 其酶解反应的热力学参数 E_a 、 ΔH 、 ΔS 、 ΔG 分别下降了 70.00%、79.00%、30.00%、2.00%, 表明超声处理会导致蛋白质内部氢键断裂、氨基酸残基氧化修饰以及交联引发的聚合作用, 降低其反应所需活化能, 提高反应速率。抗氧化结果表明, 超声辅助酶解产物中的多肽浓度为 1 mg/ml 时, 其对 2,2-二苯基-1-硝基苯肼(DPPH) 自由基、2,2-联氨基双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二氮盐(ABTS) 自由基和羟自由基的清除率分别为 51.20%、67.80%、61.70%, 与常规酶解物相比差异显著($P < 0.05$)。超声预处理破坏了鹅肝蛋白的非共价作用, 包括氢键、范德华键和疏水性, 鹅肝蛋白水解物能提供更多的单电子或氢的多肽, 因此超声辅助酶解产物具有较高消除自由基的功能, 表明超声辅助酶解制备的鹅肝多肽具有较高的抗氧化性能。本研究不仅为鹅肝抗氧化多肽的制备提供了科学依据, 还为鹅肝蛋白精深加工及其附加值的提高奠定了理论基础。

关键词: 鹅肝蛋白; 超声辅助酶解; 酶解动力学; 酶解热力学; 抗氧化

中图分类号: TS209 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1395-07

Enzymolysis kinetics and thermodynamics of goose liver protein with ultrasonic-assisted processing and antioxidant activity of its hydrolysates

WANG Li^{1,2}, BIAN Huan¹, WU Hai-hong¹, ZOU Ye¹, WANG Dao-ying¹, XU Wei-min¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China; 2. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

收稿日期: 2017-06-12

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题项目(2014BAD04B11); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1008]; 江苏省博士后科研资助计划项目(1601131C)

作者简介: 王立(1990-), 男, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事农产品加工研究。(Tel) 15850520906; (E-mail) 247391269@qq.com

通讯作者: 邹焱, (E-mail) zouye@jaas.ac.cn; 王道营, (E-mail) wdy0373@aliyun.com

Abstract: Using goose liver as material, enzymolysis kinetics and thermodynamics of goose liver protein with ultrasonic pretreatment were studied by adding pancreatin, and its antioxidant activity between the conventional and ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis was compared. The results showed that the hydrolysis degree of ultrasonic-assisted enzymolysis increased by 16.05% and the yield of

the peptide increased by 15.63% compared with the conventional enzymolysis when the enzymolysis time was 150 min and 130 min, respectively. At the enzymolysis temperature of 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, compared with the conventional enzymatic hydrolysis, the kinetic parameters of the ultrasonic assisted enzymolysis reaction rate constant k increased by 214.00%, 115.00%, 64.00%, 41.00%, respectively, and the thermodynamic parameters of enzymatic hydrolysis E_a , ΔH , ΔS and ΔG decreased by 70.00%, 79.00%, 30.00% and 2.00%, respectively. The results indicated that the ultrasonic treatment caused the breakdown of hydrogen bonds inside the protein, the oxidation of amino acid residues and cross-initiated polymerization to reduce the reaction of the activation energy and improve the reaction rate. The scavenging rates of DPPH free radicals, ABTS free radicals and hydroxyl free radicals were 51.20%, 67.80% and 61.70%, respectively, compared with the conventional hydrolysate, there was a significant difference ($P < 0.05$). The pretreatment of ultrasound disrupted the non-covalent effects of the liver protein, including hydrogen bonds, van der Waals bonds and hydrophobicity, and the hydrolysate could provide more single and hydrogen polypeptides. The ultrasonic digestion goose liver peptides had high antioxidant properties when the concentration of peptide in the ultrasonic assisted hydrolysate was 1 mg/ml. This study not only provided a scientific basis for the preparation of goose liver antioxidant peptides, but also laid a theoretical foundation for the deep processing of goose liver protein and its added value.

Key words: goose liver protein; ultrasonic-assisted enzymolysis; enzymolysis kinetics; enzymolysis thermodynamics; antioxidation

鹅肝被誉为世界三大美食(肥鹅肝、鱼子酱、松茸蘑)之一^[1],它质地细嫩、脂香独特,是一种高级滋补品,含有人体所需的多种营养素,特别是含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素、卵磷脂、核酸、各种酶以及钙、磷等金属元素^[2-3]。它还含有大量的超氧化物歧化酶(SOD),具有明显的脂质抗氧化作用^[4],可以保护细胞和组织不受损伤,具有防止肿瘤发生^[5]和抗衰老^[6]等药用价值。此外,鹅肝中的硒具有抗动脉粥样硬化的作用,同时硒对黄曲霉毒素 B1 的致癌性有破坏作用,可提高机体免疫力^[7]。

超声波是一种安全高效的技术,在适当条件下具有促进酶解和提高提取率等优点^[8-12]。随着国内外研究人员对蛋白质资源的不断开发和利用,酶解蛋白制备不同功能活性肽的研究主要集中于大豆蛋白、小麦蛋白和水产蛋白^[13-15],鹅肝中含有大量蛋白质,但关于鹅肝蛋白制备生物活性肽的动力学及热力学的报道较少。本试验拟以新鲜鹅肝为研究对象,采用超声辅助酶解鹅肝蛋白制备活性多肽,研究酶解过程中的动力学和热力学,进一步比较常规酶解和超声辅助酶解所得多肽的抗氧化性能,旨在提高鹅肝在食品领域中的潜在应用,以期为鹅肝蛋白的精深加工及其附加值的提高奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鹅肝购于南京市孝陵卫农贸市场,2,2-二苯基-

1-硝基苯肼(DPPH)购于Sigma公司,2,2-联氮基双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氮盐(ABTS)购于萨恩化学技术(上海)有限公司。

胰酶(BR,1:4 000)购于上海源叶生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

HJ-8(DF-1)集热式磁力搅拌器购于常州国华电器有限公司,HH-8数显恒温水浴锅购于国华电器有限公司,JYL-D001九阳料理机购于九阳股份有限公司,Uncen MR台式冷冻离心机购于德国Herolab公司,M124A电子天平购于上海衡发实业有限公司,便携式pH计购于上海米青科实业有限公司,UV-6100型分光光度计购于上海美普达仪器有限公司,SCIENTZ-D超声波细胞粉碎机购于宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 鹅肝常规多肽酶解液的制备 鹅肝60 g,去表面和内部薄膜切丁,搅成肉糜,90 °C灭酶20 min,10%异丙醇脱脂12 h,按1:6的料液比加蒸馏水,酶解(胰酶2%,20~50 °C,pH 8,150 min),90 °C水浴灭酶20 min,离心(5 000 g,15 min),取上清液,透析48 h,获得鹅肝常规多肽酶解液。

1.3.2 鹅肝超声多肽酶解液的制备 鹅肝60 g,去表面和内部薄膜切丁,搅成肉糜,90 °C灭酶20 min,10%异丙醇脱脂12 h,按1:6的料液比加蒸馏水,超声预处理鹅肝蛋白(150 W,5 min),酶解(胰酶

2%, 20~50 °C, pH 8, 150 min), 90 °C 水浴灭酶 20 min, 离心(5 000 *g*, 15 min), 取上清液, 透析 48 h, 获得鹅肝超声多肽酶解产物。

1.3.3 水解度的测定 水解度的测定参考 pH-stat 法^[16]。

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} = \frac{N_b \times B \times 100}{\alpha \times M_p \times h_{\text{tot}}} \quad (1)$$

式中: *DH* 为水解度(%), N_b 为 NaOH 的浓度(mol/L), *B* 为酶解过程中消耗 NaOH 的体积(ml), M_p 为酶解液中鹅肝蛋白的质量(g), α 为氨基酸的平均解离度, h_{tot} 为底物蛋白中的摩尔肽键数, 鹅肝蛋白为 7.6 mmol/L^[16]。

$$\alpha = \frac{100(pH - pK)}{1 + 10(pH - pK)} \quad (2)$$

式中: *pH* 为氨基酸平均值 7.0, *pK* 为氨基酸的初始值, 胰酶的 *pK* 为 8.0。

1.3.4 鹅肝多肽浓度的测定 多肽浓度的测定参考 Qu 等^[17]建立的福林酚比色法, 略有改动。1 ml 的酶解样品加入 1 ml 福林酚 A 液(10.00 g 氢氧化钠, 50.00 g 碳酸钠, 0.25 g 硫酸铜, 0.50 g 酒石酸钾, 定容至 500 ml), 室温下反应 10 min, 再加入 4 ml 福林酚, 55 °C 热水浴 5 min, 冷水浴 10 min, 于 650 nm 处测吸光度, 以去离子水替代酶解样品作为空白对照, 根据标准曲线计算样品中多肽的含量。

1.3.5 鹅肝超声辅助酶解对其动力学反应速率常数 *k* 的影响 酶解鹅肝蛋白模型采用 Qu 等^[17]建立的一级动力学模型。其模型表达式如下:

$$\frac{dC_t}{dt} = -kC_t \quad (3)$$

式中: C_t 为 *t* min 时鹅肝多肽的浓度(mg/ml), *k* 为反应速率常数(min^{-1}), *t* 为酶解时间(min)。

对式(3)进行积分, 鹅肝酶解模型可表达为:

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -kt \quad (4)$$

式中: C_0 为鹅肝蛋白的初始浓度(mg/ml)。在酶解反应体系中, 鹅肝蛋白的浓度通过多肽生成量表示。一级动力学模型在此条件($t = 0 - \infty$, $C_t = Q_\infty - Q_t$ 和 $C_0 = Q_\infty$)下可表达成:

$$\ln(Q_\infty - Q_t) = -kt + \ln Q_\infty \quad (5)$$

式中: Q_∞ 为鹅肝蛋白彻底酶解后的多肽浓度(mg/ml), 在 pH8, 50 °C 的反应条件下酶解 150 min 测得。 Q_t 为 *t* min 时鹅肝多肽的浓度(mg/ml), *r* 值

为 $\ln(Q_\infty - Q_t)$ 比 *t* 的线性回归斜率。

1.3.6 超声辅助酶解对热力学参数的测定 温度与鹅肝酶解反应速率常数 *k* 的关系通常采用阿伦尼乌斯方程(Arrhenius)^[18]表示:

$$k = A e^{\left(\frac{-E_a}{R \times T}\right)} \quad (6)$$

式中: *k* 为反应速率常数(min^{-1}), *A* 为前指因子(min^{-1}), E_a 为活化能(J/mol), *R* 为气体摩尔常数[8.314 J/(mol · K)], *T* 为开尔文温度(K)。

通过对 $\ln k$ 比 $1/T$ 进行线性回归, 活化能(E_a)由直线斜率计算而来。为了更好地理解温度对酶解和宏观变化的影响, 通过过渡态理论^[16]研究酶解反应的焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和吉布斯自由能变(ΔG)。

$$k = \frac{k_B \times T}{h} e^{\left(\frac{-\Delta G}{R \times T}\right)} = \frac{k_B \times T}{h} e^{\left(\frac{-\Delta H}{R \times T} + \frac{\Delta S}{R}\right)} \quad (7)$$

式中: k_B 为玻尔兹曼常数(1.38×10^{-23} J/K), *T* 为开尔文温度(K), *h* 为普朗克常数(6.6256×10^{-34} J/s), ΔG 为吉布斯自由能变(J/mol), ΔH 为焓变(J/mol), ΔS 为活化熵变[J/(mol · K)]。

1.3.7 鹅肝蛋白酶解液的抗氧化试验

1.3.7.1 DPPH 自由基清除率 95%乙醇现配 0.1 mmol/L 的 DPPH, 1 ml 的多肽样品加入 1 ml 的乙醇, 再加入 1 ml 的 DPPH 溶液于试管中, 振荡混匀后于 37 °C 水浴中避光反应 0.5 h, 于波长 517 nm 处测吸光度 A_2 , 乙醇作为空白测定吸光度 A_1 ^[19]。DPPH 自由基清除率计算如式(8)所示:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \times 100\% \quad (8)$$

式中: A_1 为空白组吸光度, A_2 为试验组吸光度。

1.3.7.2 ABTS 自由基清除率 ABTS 自由基溶液的配制: 取 0.100 g ABTS 和 0.029 g 过硫酸钾溶于 100.0 ml 磷酸盐钠缓冲液中, 充分混合后于 4 °C 下避光保存 16 h, 备用。试验时取 2.0 ml ABTS 自由基溶液, 加入 18.0 ml 磷酸盐钠缓冲液, 配成 ABTS 储备液于波长 734 nm 处测吸光度为 0.80 ± 0.05 , 即为 ABTS 工作液, 现配现用。测定方法: 取 0.1 ml 多肽溶液, 加入 3.9 ml ABTS 工作液, 混合均匀后于室温下静置 10 min, 于波长 734 nm 处测定吸光度 A_2 , 以去离子水代替多肽样品溶液测定空白吸光度 A_0 , 以磷酸盐钠缓冲液代替 ABTS 工作液测得吸光度 A_0 ^[20]。ABTS 自由基清除率的计算如式(9)所示:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (9)$$

式中: A_1 为对照组吸光度, A_2 为试验组吸光度, A_0 为空白组吸光度。

1.3.7.3 羟自由基清除率 试管中分别加入 0.5 ml 水杨酸-乙醇溶液、0.5 ml FeSO_4 溶液、0.5 ml 多肽溶液和 1.0 ml H_2O_2 溶液, 混匀后在室温下反应 10 min。于波长 510 nm 处测定吸光度 A_2 。取 0.5 ml 蒸馏水代替 FeSO_4 溶液, 测得吸光度 A_1 , 取 0.5 ml 蒸馏水代替多肽溶液, 测得空白吸光度 A_0 [21]。羟自由基清除率的计算如式(10)所示:

$$\text{羟自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (10)$$

式中: A_1 为对照组吸光度, A_2 为试验组吸光度, A_0 为空白组吸光度。

1.4 数据分析

上述所有试验均进行 3 次重复, 结果表示为平均值±标准差。采用 SPSS18.0 统计软件进行处理, Origin9.0 作图, 用组间 ANOVA 进行统计分析, Turkey 检验用于组间数据分析, $P < 0.05$ 表示 2 组之间差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同酶解时间对鹅肝蛋白水解度及多肽浓度的影响

图 1 显示, 在鹅肝酶解反应初始阶段前 40 min 内, 常规酶解和超声辅助酶解的酶解反应速率均较快。但随着酶解反应时间的延长, 反应速率的增加逐渐减缓, 并趋于稳定。这是因为随着酶解时间的

延长, 反应底物逐渐减少。当酶解时间为 150 min 时, 与常规酶解相比, 超声辅助酶解鹅肝蛋白的水解度提高了 16.05%, 这可能是由于鹅肝蛋白经过超声处理后, 蛋白分子结构展开, 暴露出更多与胰酶酶切的活性位点, 提高了酶与底物的结合速率 [16, 22]。同时, 鹅肝蛋白水解度曲线和已报道的猪脑蛋白水解度曲线相类似 [23], 是典型的水解曲线形状。在酶解前 60 min 时, 常规酶解和超声辅助酶解的鹅肝多肽浓度迅速增加, 而且超声酶解制备的鹅肝多肽浓度明显高于常规酶解法制备的鹅肝多肽浓度, 这是因为超声预处理使得蛋白质粒径减小, 破坏其蛋白内部作用力, 如氢键、范德华力、疏水性, 改变了鹅肝蛋白质的构象, 进而提高了鹅肝蛋白与胰酶的亲和力 [24-26], 并且在酶解初始阶段超声辅助酶解的水解度显著高于常规酶解的水解度。随着酶解时间的延长, 多肽浓度逐渐趋于稳定, 这主要是因为随着鹅肝蛋白反应底物的减少, 胰酶的自我消解及抑制所造成的 [27]。在鹅肝酶解 130 min 时, 多肽浓度达到最大值, 此时超声辅助酶解的鹅肝多肽浓度为 6.65 mg/ml, 而常规酶解的鹅肝多肽浓度为 6.21 mg/ml, 表明超声处理提高了鹅肝蛋白的水解度, 获得更多鹅肝多肽类物质。酶解时间为 130 min 时, 常规酶解和超声辅助酶解的多肽得率分别为 72.43%、83.75%, 与常规酶解相比, 超声酶解多肽得率提高了 15.63%。但随着酶解时间的延长, 多肽浓度呈现下降趋势, 这可能是随着鹅肝蛋白水解度的提高, 多肽降解形成游离氨基酸, 导致其多肽浓度下降 [16]。因此, 酶解时间设为 130 min 较为适宜。

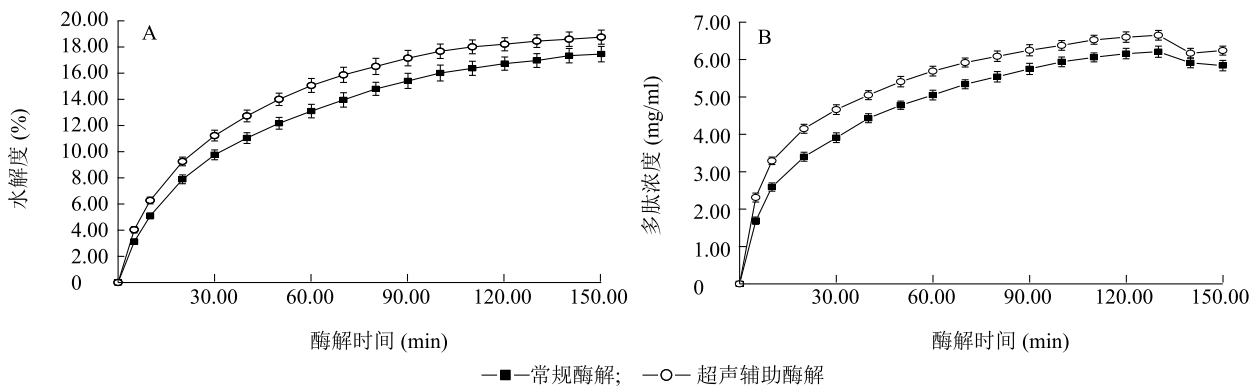


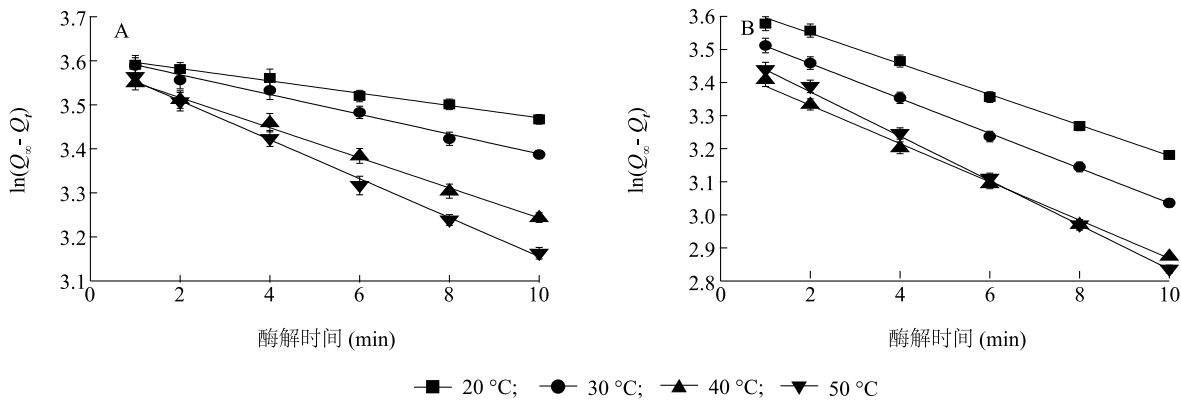
图 1 鹅肝常规酶解和超声辅助酶解的水解曲线 (A) 和多肽浓度 (B)

Fig.1 Degree of hydrolysis (A) and peptide concentration (B) of conventional and ultrasonic assisted enzymolysis of goose liver

2.2 超声辅助酶解对动力学反应速率常数 k 的影响

反应速率常数 k 是化学反应的特性常数,其物理意义是各反应物浓度为单位浓度时的反应速率^[28], k 值的大小主要取决于温度和催化剂等。本试验采用的鹅肝底物蛋白浓度为 60 g/L,酶浓度为 20 g/L,pH 值为 8。酶解 150 min 时,研究常规酶解和超声波辅助酶解在不同温度(20 °C、30 °C、40 °C、50 °C)下的反应速率常数 k ,并将酶解时间为 1~10

min 的酶解蛋白浓度用于计算 k 值。图 2 显示,常规酶解在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 时的回归系数分别为 0.990 7、0.985 4、0.991 2、0.986 5,超声辅助酶解在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 时的回归系数分别为 0.989 1、0.991 5、0.985 3、0.991 4,其回归系数均大于 0.980 0,表明在酶解前 10 min 内,常规酶解和超声辅助酶解的线性关系均较好,可采用一级动力学方程进行描述^[15]。



A: 鹅肝常规酶解; B: 鹅肝超声辅助酶解。 $\ln(Q_{\infty} - Q_t)$: t min 内鹅肝蛋白的减少量。

图 2 不同温度下酶解时间与 $\ln(Q_{\infty} - Q_t)$ 的线性拟合

Fig.2 Linear fitting of enzymolysis time and $\ln(Q_{\infty} - Q_t)$ at different temperatures

表 1 显示,酶解温度为 20~50 °C,常规酶解和超声辅助酶解的反应速率常数随温度升高呈升高趋势,这是由于温度对鹅肝酶解的影响较大,温度的升高使得酶与底物的碰撞频率增加,从而提高反应速率^[29]。在相同酶解温度条件下,超声辅助酶解的 k 值均大于常规酶解的 k 值($P < 0.05$)。在 20 °C、30 °C、40 °C 和 50 °C 下,与常规酶解的 k 值相比,超声辅助酶解的 k 值分别增加了 214%、115%、64% 和

41%,表明通过超声预处理,可提高酶解反应速率。Zou 等^[16]发现当超声频率为 20 Hz,超声功率为 80 W 且超声时间为 5 min 时,超声辅助酶解猪脑蛋白可提高猪脑蛋白酶解速率。超声辅助酶解反应速率常数的增量(k_{us})随温度的升高而降低,与 k 值的变化趋势相反。这可能是由于超声波在物质中的传播速度与饱和空气量成正比,随着温度的升高饱和空气量下降,降低了超声处理的效果^[30-31]。

表 1 在不同温度下常规酶解和超声辅助酶解法的反应速率常数

Table 1 Reaction rate constants in the conventional and ultrasonic assisted enzymolysis at different temperatures

酶解方法	温度(°C)	k (min^{-1})	k_{us} (min^{-1})	R_{adj}^2
常规酶解	20	$0.014 5 \pm 0.000 9$	-	0.990 7
	30	$0.023 8 \pm 0.001 2$	-	0.985 4
	40	$0.035 4 \pm 0.002 5$	-	0.991 2
	50	$0.044 2 \pm 0.002 3$	-	0.986 5
超声辅助酶解	20	$0.045 5 \pm 0.002 1$	$0.031 0 \pm 0.001 5$	0.989 1
	30	$0.051 2 \pm 0.002 3$	$0.027 4 \pm 0.001 4$	0.991 5
	40	$0.057 9 \pm 0.003 7$	$0.022 5 \pm 0.001 3$	0.985 3
	50	$0.062 2 \pm 0.003 9$	$0.018 0 \pm 0.001 7$	0.991 4

k : 反应速率常数; k_{us} : 超声辅助酶解反应速率常数的增量; R_{adj}^2 : 回归系数。

2.3 超声辅助酶解鹅肝蛋白对反应热力学参数的影响

热力学参数活化能 E_a 表示分子由非活跃分子转化为活跃分子所需的能量,可反映化学反应的快慢^[16]。在酶解反应中,活化能大多处于 40~400 kJ/mol,如果反应所需活化能小于 40 kJ/mol,反应就会迅速达到平衡,由 $\ln k$ 与 T^{-1} 的斜率和截距可求得活化能等热力学参数(图 3)。表 2 显示,常规酶解和超声辅助酶解所需活化能均小于 40 kJ/mol,说明 2 种酶解方式均可快速进行。与常规酶解相比,超声辅助酶解的 E_a 、 ΔH 、 ΔS 分别降低了 70%、79%、30%,差异显著 ($P < 0.05$),反应所需 ΔG 下降了 2%,这可能是由于超声处理导致蛋白质内部氢键断裂、氨基酸残基氧化修饰及交联引发的聚合作用,降低了其反应所需的活化能,提高反应速率^[32]。此结果与 Zou 等^[16] 采用聚能式超声处理猪脑蛋白酶解制备多肽的结果相似。以上结果表明,超声处理可明显降低鹅肝酶解所需活化能,提高反应速率。

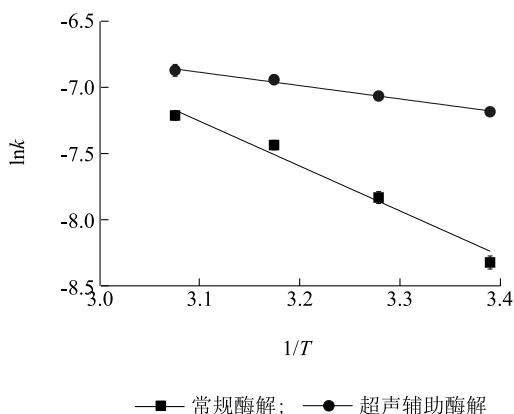


图 3 常规酶解和超声辅助酶解的 $\ln k$ 与 $1/T$ 的拟合直线
Fig.3 The relationship between $\ln k$ and $1/T$ in the conventional and ultrasonic-assisted enzymolysis

表 2 常规酶解与超声辅助酶解的热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters in the traditional and ultrasonic assisted enzymolysis

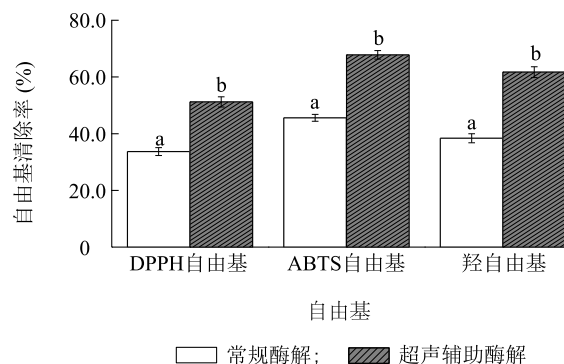
酶解方法	E_a (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS [J/(mol/K)]	ΔG (kJ/mol)
常规酶解	28.238	27.974	-218.754	95.383
超声辅助酶解	8.402	5.945	-284.351	93.568

E_a : 活化能; ΔG : 吉布斯自由能变; ΔH : 焓变; ΔS : 活化熵变。

2.4 抗氧化活性

活性氧(ROS)是一类未配对电子的含氧物质,主要包括羟自由基和 DPPH 自由基等,过量自由基的产

生会导致机体细胞凋亡,诱发各类病变^[33]。图 4 显示,多肽浓度为 1 mg/ml 时,常规酶解和超声辅助酶解的产物对 DPPH 自由基的清除率分别为 33.7% 和 51.2%,对 ABTS 自由基的清除率分别为 45.3% 和 67.8%,对羟自由基的清除率分别为 39.6% 和 61.7%。超声辅助酶解物清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基的能力显著高于常规酶解液 ($P < 0.05$)。通过超声预处理使得蛋白质粒径变小,破坏其蛋白质内部作用力,如氢键、范德华力和疏水性,改变了鹅肝蛋白的构象,且超声辅助酶解的鹅肝蛋白水解度显著高于常规酶解,蛋白水解物能提供更多的单电子或氢的多肽,因此具有较高的消除自由基的能力^[25]。叶丛林等^[34] 采用胰酶酶解乌贼内脏得到的多肽分子量为 3 000~5 000 时,对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率分别为 55.1%、46.9%。以上结果表明,鹅肝超声多肽酶解液具有较高清除羟自由基的能力,超声辅助鹅肝蛋白酶解得到的多肽具有较强抗氧化能力,是一种潜在的多肽类抗氧化剂。



不同小写字母表示常规酶解和超声辅助酶解对同一自由基的清除率之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 常规酶解和超声辅助酶解鹅肝蛋白酶解液的抗氧化活性
Fig.4 Antioxidant activity of enzymatic hydrolyzate of goose liver by conventional and ultrasonic-assisted enzymolysis

3 结论

以鹅肝蛋白为原料,采用一级动力学模型、阿伦尼乌斯方程和过渡态理论,研究超声辅助酶解鹅肝蛋白的反应动力学和热力学。结果表明,与常规酶解相比,超声辅助酶解可明显提高鹅肝蛋白的水解度和多肽得率,降低酶解反应所需活化能和焓变,显著提高鹅肝蛋白酶解的反应速率。抗氧化试验结果表明,超声辅助酶解制备的鹅肝多肽对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟自由基清除效果较好,与常规酶解相比,超声辅助酶解制备的鹅肝多肽的抗氧化

性得到了显著提高,该研究为鹅肝的精深加工及其附加值的提高奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 侯会绒. 一种新型风味鹅肝酱的研制[J]. 肉类工业, 2013(12): 17-20.
- [2] 谢章斌, 罗婷, 范亚苇, 等. 复合风味蛋白酶改善鹅肝酱风味的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 235-239.
- [3] 郑捷, 刘安军, 赵莹, 等. 一种新型鹅肝酱的研制[J]. 现代食品科技, 2010, 26(7): 712-716.
- [4] 夏丽丽, 王倩倩, 杨彪, 等. 肥肝鹅恢复期血液生化指标、肝脏常规营养成分及脂代谢相关基因表达水平的变化研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(4): 967-972.
- [5] 张小平. 川味胡萝卜鸭肝酱的开发研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [6] 鞠美玲. 低温环境下烹任鹅肥肝的营养及工艺优化研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [7] 詹珺, 杨超, 李玉飞, 等. 浅谈肥鹅肝的营养价值[J]. 食品工程, 2013(1): 60-61.
- [8] 刘晨, 刘安军, 马艳弘, 等. 蓝莓酒渣花色苷的超声波辅助提取工艺及抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 242-247.
- [9] GALANAKIS C M. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2012, 26(2): 68-87.
- [10] KADAM S U, TIWARI B K, O' DONNELL C P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(20): 4667-4675.
- [11] 王鹏, 郭丽, 周凤超, 等. 玉米皮类黄酮超声波提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(11): 337-340.
- [12] 王凯. 玉米蛋白超声辅助酶解及其过程原位实时监测技术的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [13] 吕乐, 刘冬, 万红霞, 等. 碱性蛋白酶 *Alcalase* 酶解大米蛋白制备小分子肽的动力学研究[J]. 现代食品科技, 2014(7): 149-153.
- [14] 陈源, 孙海燕, 刘冬, 等. 碱性蛋白酶 *Alcalase* 2.4 L 酶解小麦麸皮蛋白制备小分子肽动力学研究[J]. 食品科技, 2014(8): 17-20.
- [15] 黄秋霞, 孙建华, 兰雄雕, 等. 碱性蛋白酶酶解罗非鱼下脚料蛋白动力学研究[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 53-57.
- [16] ZOU Y, DING Y, FENG W, et al. Enzymolysis kinetics, thermodynamics and model of porcine cerebral protein with single-frequency countercurrent and pulsed ultrasound-assisted processing[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 28: 294-301.
- [17] QU W, MA H, LIU B, et al. Enzymolysis reaction kinetics and thermodynamics of defatted wheat germ protein with ultrasonic pretreatment[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(6): 1408-1413.
- [18] SUBHEDAR P B, GOGATE P R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations[J]. Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic, 2014, 101: 108-114.
- [19] LIU J, YAN J, LIN S, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities[J]. Food Chemistry, 2015, 175(9): 258-266.
- [20] PIHLANTO A, AKKANEN S, KORHONEN H J. ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*) [J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 104-112.
- [21] TIAN Y, ZENG H, XU Z, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(2): 522-529.
- [22] LI C, XUE H, CHEN Z, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of peanut protein isolate-polysaccharide conjugates prepared by ultrasonic treatment or classical heating[J]. Food Research International, 2014, 57: 1-7.
- [23] 邹焯. 猪脑多肽的制备、分离及其生物活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2015.
- [24] HU H, WU J, CHAN L, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647-655.
- [25] JIANG L, WANG J, LI Y, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates[J]. Food Research International, 2014, 62(6): 595-601.
- [26] JAMBRAK A R, MASON T J, LELAS V, et al. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 121(1): 15-23.
- [27] LEEB E, GÖTZ A, LETZEL T, et al. Influence of denaturation and aggregation of β -lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides[J]. Food Chemistry, 2015, 187: 545-554.
- [28] 靳福全. 关于反应速率、反应速率常数及指前因子的讨论[J]. 大学化学, 2013, 28(2): 75-76.
- [29] 金建. 基于计算机模拟与超声辅助酶法制备高生物利用度玉米蛋白的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2015.
- [30] GENG M, THAGARD S M. The effects of externally applied pressure on the ultrasonic degradation of Rhodamine B[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(1): 618-625.
- [31] LIU S, DONG X, WEI F, et al. Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 23: 100-108.
- [32] ZHOU Y, VACHET R W. Increased protein structural resolution from diethylpyrocarbonate-based covalent labeling and mass spectrometric detection[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012, 23(4): 708-717.
- [33] 包显颖, 陈丽, 倪姮佳, 等. 抗氧化多肽研究及其应用前景[J]. 生命科学, 2016(9): 998-1005.
- [34] 叶丛林, 李荣, 杨最素, 等. 乌贼内脏酶解多肽的制备和抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2013(14): 6159-6161.

(责任编辑: 王妮)