

酶解发酵酸肉制备抗氧化肽的工艺优化

吴慧琳, 李苗云, 朱瑶迪, 赵改名, 郝云鹏, 任宏荣, 马阳阳, 赵莉君

(河南农业大学食品科学技术学院, 河南郑州 450002)

摘要:以侗族酸肉、苗族酸肉两种酸肉为原料,采用木瓜、碱性、风味及中性蛋白酶四种蛋白酶进行酶解,测定酶解液短肽得率、羟自由基及 DPPH 自由基清除率,结果表明碱性蛋白酶酶解液的短肽得率(侗族 86.01%,苗族 82.52%)、羟自由基(侗族 87.48%,苗族 79.88%)及 DPPH 自由基(侗族 74.63%,苗族 87.87%)清除率最高。通过比较分析苗族酸肉较侗族酸肉短肽得率更高,因此选择以蛋白酶种类、加酶量、酶解时间及料液比为自变量的单因素试验基础上,以苗族酸肉短肽得率及 DPPH 自由基清除率为评价指标,采用响应面优化最佳酶解条件。结果表明,酸肉抗氧化肽最佳酶解工艺为:碱性蛋白酶添加量 12600 U/g、酶解时间 1 h、料液比 1:1.09 (m:V)。在此最优条件下酶解获得的抗氧化肽得率为 83.35%,是预测值的 98.99%,DPPH 自由基清除率为 84.01%,是预测值的 97.33%,与预测值基本一致,表明以碱性蛋白酶酶解的酸肉肽具有较高的抗氧化活性及营养价值,同时为酸肉抗氧化肽的开发及利用提供理论依据。

关键词:发酵酸肉; 抗氧化肽; 蛋白酶解; 自由基清除率; 响应面法

文章编号: 1673-9078(2020)07-173-183

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1257

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Fermented Acid Meat to Produce Antioxidant Peptides

WU Hui-lin, LI Miao-yun, ZHU Yao-di, ZHAO Gai-ming, HAO Yun-peng, REN Hong-rong, MA Yang-yang, ZHAO Li-jun

(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Dong sour meat and Miao sour meat are used as raw materials, papaya, alkaline, flavor and neutral protease were used for enzymolysis, and the yield of short peptide, hydroxyl radical and DPPH radical scavenging rate of enzymolysis liquid were determined. The results showed that the short peptide yields from alkaline protease enzymolysis were 86.01% (Dong) and 82.52% (Miao), hydroxyl free radical clearance rates were 87.48% (Dong) and 79.88% (Miao), and DPPH free radicals clearance rates were 74.63% (Dong) and 87.87% (Miao). Through comparative analysis, the yield of short peptides from Miao sour meat was higher than that from Dong sour meat. Therefore, protease species, enzyme dosage, enzymatic hydrolysis time and solid-liquid ratio were selected as independent variables, taking the yield of Miao sour meat short peptide and DPPH radical scavenging rate as evaluation index, the optimal enzymatic hydrolysis conditions were determined using response surface. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis process of the antioxidant peptide of sour meat was as follows: the addition of basic protease is 12600 U/g, the enzymatic hydrolysis time is 1 h, and the ratio of feed to liquid is 1:1.09 (m:V). The yield of antioxidant peptide under the optimal conditions was 83.35%, which was the predictive value of 98.99%. DPPH free radical clearance rate was 84.01%, which was the predictive value of 97.33%. This suggests that the peptides from alkaline protease enzymolysis of sour meat have higher antioxidant activity and nutritional value, which provide theoretical basis for further development and utilization.

引文格式:

吴慧琳,李苗云,朱瑶迪,等.酶解发酵酸肉制备抗氧化肽的工艺优化[J].现代食品科技,2020,36(7):173-183

WU Hui-lin, LI Miao-yun, ZHU Yao-di, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of fermented acid meat to produce antioxidant peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 173-183

收稿日期: 2019-12-20

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0401200); 河南省高校创新人才计划项目(18HAST1T036); 河南省科技攻关项目(192102110216); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-37)

作者简介: 吴慧琳(1996-),女,硕士生,研究方向:食品加工与安全

通讯作者: 李苗云(1976-),女,博士,教授,研究方向:肉类加工与产品质量安全控制技术

Key words: fermented sour meat; antioxidant peptide; proteolysis; free radical scavenging rate; the response surface method

发酵酸肉是以新鲜猪肉为原料,通过添加适量米粉、盐及其他香辛料,自然条件下厌氧发酵而成的一种乳酸发酵肉制品^[1]。蛋白质是肉的重要组成成分,酸肉在发酵过程中微生物大量繁殖,大分子的蛋白质在组织蛋白酶和微生物胞外蛋白酶作用下发生降解,生成小肽、游离氨基酸等物质^[2,3]。蛋白质的降解受肉中内源蛋白酶和微生物胞外酶等共同作用的影响,发酵过程中微生物代谢产酸导致内源酸性蛋白酶活性增加及微生物胞外酶产生等因素导致蛋白质降解^[4,5],生成一些小肽、小肽、氨基酸等物质。此外酸肉中植物乳杆菌能降解肌浆蛋白和肌原纤维蛋白^[6],米酒乳杆菌可分解蛋白质产生游离氨基酸^[7]。目前对发酵酸肉的研究表明酸肉中蛋白质、胆固醇等降解产物小肽具调降血脂的作用^[8]。

生物活性肽是由几个或几十个氨基酸分子形成的小肽^[9],生物活性肽具有调节免疫及激素、降血压、血脂、抗疲劳、抗氧化等生理功能,是当前国际医药界、食品界最热门的研究课题和极具发展前景的功能因子^[10]。研究表明,蛋白质原料经酶解得到的多肽混合物具有比原料蛋白及氨基酸混合物更优越的食品加工性能及营养价值^[11-13];而且多肽制品不仅具有多种功能活性,如抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力等^[14-16],而且具有完全独立的吸收机制^[17],因此,作为一种新型的氮素营养物质,多肽制品具有更广阔的使用空间。

目前的研究表明酸肉肽具有降血脂作用^[8],而对酸肉肽的研究鲜见报道。鉴于此,拟以短肽得率与抗氧化能力为指标,对酸肉肽进行深度酶解,分析其抗氧化活性,为酸肉开发功能性活性成分与利用奠定基础,同时为拓宽发酵酸肉的食用营养性提供有关蛋白质酶解为抗氧化肽的基础研究数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶,北京 Solarbio 有限公司;风味蛋白酶、中性蛋白酶,河北格贝达生物科技有限公司;氢氧化钠,天津市光复精细化工研究所;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、乙二胺四乙酸(EDTA)、硫酸亚铁、邻二氮菲、无水乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、N-(1-萘基)乙二胺盐酸盐、4-氨基苯磺酸、三氯乙酸、L(+)-抗坏血酸均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

N-1100 旋转蒸发器,上海爱郎仪器有限公司;

SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;AE224 电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;YJZQ-10 型均质机,上海熙扬无菌均质器;PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;Neofuge1600 离心机,力新仪器上海有限公司;CU-240 电热恒温水槽,上海一恒科学仪器有限公司;UV-2600 紫外可见分光光度计,岛津分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

1.2.1.1 发酵酸肉加工工艺

发酵酸肉基本工艺流程:原料猪肉(五花肉)→清洗沥水→预煮→冷却→切块(3×2×1 cm)→加米粉/辣椒粉,食盐混匀→装坛→密封发酵→真空包装→灭菌→成品

侗族酸肉、苗族酸肉分别指添加辣椒粉、米粉辅料自然条件下发酵 120 d 制得。

1.2.1.2 酸肉样品预处理

酸肉经去除表面辅料,剔除瘦肉中脂肪及肌筋、肌膜等,切碎均匀置于-20℃冰箱中保存备用。参考 WenSiying 等^[18]的方法,稍作修改。将切碎酸肉肉样蒸制加热后处理,以数显温度计测得肉样中心温度为 70~73℃,取出肉样,用吸水纸吸干肉样表面的水分。

1.2.2 酸肉多肽的提取

粗蛋白的提取:称取 10 g 酸肉加 60 mL 水进行拍打均质,以 1 mol/L NaOH 调节 pH=11.0,静置 1 h,6000 r/min 离心 10 min,上清液以 0.1 mol/L HCl 回调至 pH=7.0,加 90%的乙醇 4℃沉淀 12 h,6000 r/min 离心取上清液,50℃旋转蒸发将上清液乙醇蒸出,获得蛋白质粗提液^[19]。配置一定浓度蛋白液,最适温度及最适 pH 条件下,添加一定量的酶进行加热水解 1.5 h,沸水浴灭酶 10 min,6000 r/min 离心 10 min 取上清液,得发酵酸肉肽。

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 蛋白酶的确定

表 1 不同蛋白酶酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of different proteases

酶	温度/℃	pH
木瓜蛋白酶	55	7
碱性蛋白酶	50	8
风味蛋白酶	50	7
中性蛋白酶	50	7

分别选择木瓜、碱性、风味及中性四种蛋白酶,在加酶量为 6000 U/g 及最适 pH、最适温度下水浴加

热 1.5 h, 将所得上清液进行短肽得率、OH 自由基及 DPPH 自由基清除率, 筛选适合的蛋白酶。

1.2.3.2 蛋白酶量的确定

选择料液比 1:6 条件下, 分别添加 2000、4000、6000、8000、10000 U/g 的碱性蛋白酶, 调节最适 pH=8.0、最适温度 50 °C 下水浴加热 1.5 h, 将所得上清液进行短肽得率、OH 自由基及 DPPH 自由基清除率, 选择适合的蛋白酶添加量。

1.2.3.3 酶解时间的确定

选择料液比 1:6 条件下, 添加 6000 U/g 碱性蛋白酶, 调节最适 pH=8.0、最适温度 50 °C 下分别水浴加热 0.5、1、1.5、2、2.5 h, 将所得上清液进行短肽得率、OH 自由基及 DPPH 自由基清除率, 选择适合的蛋白酶解时间。

1.2.3.4 料液比的确定

分别选择料液比 1:4、1:5、1:6、1:7、1:8 条件下, 添加 6000 U/g 碱性蛋白酶, 调节最适 pH=8.0、最适温度 50 °C 下水浴加热 1.5 h, 将所得上清液进行短肽得率、OH 自由基及 DPPH 自由基清除率, 选择适合的料液比。

1.2.4 响应面优化试验

在单因素的基础上, 分别以蛋白酶添加量 (A)、酶解时间 (B)、料液比 (C) 为自变量, 以苗族酸肉短肽得率及 DPPH 自由基清除率为响应值, 采用响应面法设计中心组合试验, 优化酸肉肽酶解工艺条件。试验因素水平表如表 2 所示, 采用 Design-Expert 8.05 对数据进行统计分析。

表 2 响应面优化因素水平表

Table 2 Box-Behnken design Optimization factor level table

因素	因素水平		
	-1	0	1
A 蛋白酶添加量/(U/g)	4000	6000	8000
B 酶解时间/h	1	1.5	2
C 料液比/(g/mL)	1:5	1:6	1:7

1.3 指标测定

1.3.1 短肽得率

参考 JANG^[20]等方法, 并稍做修改, 将体积分数为 5% 三氯乙酸 (TCA) 与蛋白酶水解液按料液比为 1:1 体积混合, 离心 (6000 r/min, 10 min), 利用考马斯亮蓝测定上清液中可溶性蛋白, 短肽得率公式为:

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

其中: 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质,

mg。

1.3.2 DPPH 自由基清除率的测定

参考朱夕波等^[21]的方法。将酸肉粗肽液浓度调为 2 mg/mL, 以相应浓度的 L-谷胱甘肽 (GSH) 及丁基羟基甲苯 (BHT) 为对照。A₀: 1 mL DPPH 0.2 mM (以 95% 乙醇溶解) + 1 mL 蒸馏水, A₁: 1 mL 0.2 mM DPPH + 1 mL 酸肉粗肽液; A₂: 1 mL 无水乙醇 + 1 mL 酸肉粗肽液, 充分混匀, 室温避光反应 30 min, 于 517 nm 测 OD 值。

$$DPPH\text{清除率} = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%$$

1.3.3 -OH 自由基清除率

参考 YanHongLi 等^[22]方法, 将酸肉粗肽液浓度调为 2 mg/mL, 以相应浓度的 L-谷胱甘肽 (GSH) 及丁基羟基甲苯 (BHT) 为对照。样品测定: 0.6 mL 邻二氮菲溶液 (5 mmol/L) 加 0.4 mL 磷酸钠缓冲液 (0.2 mol/L, pH=7.4) 混匀, 加 0.6 mL 粗肽液及 0.6 mL EDTA (15 mmol/L), 混匀, 加 0.6 mL FeSO₄ 溶液 (5 mmol/L) 及 0.8 mL H₂O₂ (0.1%), 摇匀置于 37 °C 反应 1 h, 536 nm 波长测定样品吸光度 A_S; 以去离子水代替样品, 吸光度记为 A_P; 以去离子水代替样品及 H₂O₂, 吸光度记为 A_B。

$$-OH\text{清除率} / \% = \frac{(A_S - A_P)}{(A_B - A_P)} \times 100\%$$

1.4 数据处理与分析

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 及 SPSS 19.0 进行数据处理分析, 数据进行 ANOVA 方差分析, 用 Duncan's 法进行统计学显著性分析。实验数据均为 3 次测定平均值, 并以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。显著性分析结果以字母法表示, 利用 Origin 8.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 蛋白酶的确定

按 1.2.2 方法提取酸肉蛋白质粗提液, 蛋白质粗提液中分别添加 6000 U/g 的木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶及中性蛋白酶于最适温度下水浴加热 1.5 h, 沸水浴灭酶 10 min, 离心, 上清液为酸肉粗肽液, 酶解产物进行 MW ≤ 3000 u 的超滤分离截留, 不同蛋白酶对酸肉肽短肽得率及活性的影响, 由表 3 所示, 对侗族、苗族酸肉经碱性蛋白酶分解短肽得率最高。四种酶中, 碱性蛋白酶是一种非特异性肽键内切酶,

酶切的位点较多,可将蛋白质等大分子从内部进行水解打开肽链,产生较多的短肽^[23]。木瓜蛋白酶对底物的水解具有一定的专一性,对酶解位点专一性高。中性蛋白酶对酸肉的酶解低于碱性蛋白酶。陈丹阳^[24]等利用胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶酶解蚕豆蛋白,结果表明不

同蛋白酶酶解程度各异,酶解相同时间时,碱性蛋白酶的酶解程度最高,同时碱性蛋白酶酶解物对 SC、STC 胆酸盐的抑制能力均显著高于其他酶的酶解物。碱性蛋白酶能作用于多种氨基酸,酶解特异性不强,能水解较多蛋白,暴露活性氨基酸序列^[25]。

表 3 两种酸肉不同蛋白酶对酸肉短肽得率

Table 3 Yield of short peptide of sour meat by different proteases of the two kinds of sour meat

指标	短肽得率/%			
	木瓜蛋白酶	碱性蛋白酶	风味蛋白酶	中性蛋白酶
侗族酸肉	67.97±0.71 ^{cd}	86.01±3.29 ^a	72.57±2.95 ^c	79.87±5.72 ^b
苗族酸肉	69.52±3.36 ^c	82.52±2.11 ^{ab}	73.37±1.94 ^c	62.77±2.61 ^d

注:同行小写字母不同,表示存在显著差异 $p<0.05$ 。下表同。

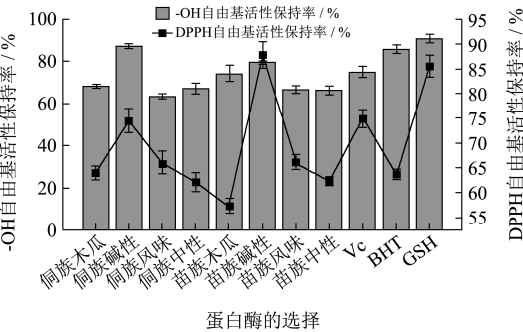


图 1 蛋白酶筛选结果

Fig.1 Protease screening results

表 4 复合蛋白酶不同添加量对酸肉短肽得率

Table 4 The yield of short peptide of sour meat by adding different amounts of complex protease

类别	短肽得率/%				
	碱性蛋白酶 2000 U/g	碱性蛋白酶 4000 U/g	碱性蛋白酶 6000 U/g	碱性蛋白酶 8000 U/g	碱性蛋白酶 10000 U/g
侗族酸肉	53.90±0.34 ^d	64.61±1.80 ^c	88.88±0.78 ^a	84.93±2.84 ^b	84.57±0.67 ^b
苗族酸肉	86.75±0.14 ^c	91.53±0.16 ^b	93.15±0.00 ^a	89.79±0.27 ^d	90.70±0.84 ^c

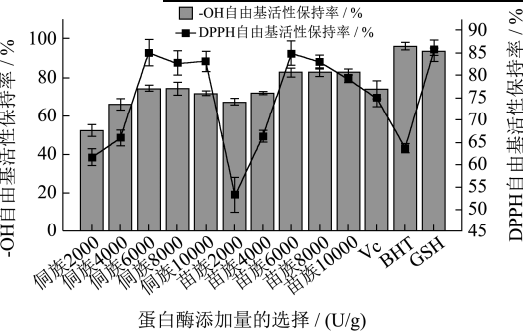


图 2 蛋白酶添加量的选择结果

Fig.2 Selection results of protease addition amount

按 1.2.2 方法提取酸肉蛋白质粗提液,调节蛋白粗提液 pH=8, 分别添加 2000 U/g、4000 U/g、6000 U/g、8000 U/g、10000 U/g 的碱性蛋白酶于 50 ℃下水浴加热 1.5 h, 沸水浴灭酶 10 min, 离心, 上清液为酸肉粗肽液, 酶解产物进行 MW≤3000 u 的超滤分离截留,

实验结果如图 1 所示。不同蛋白质分解提取的酸肉肽对-OH 自由基、DPPH 自由基清除率均表现为碱性蛋白酶最高, 侗族、苗族酸肉-OH 自由基分别为 87.48%、79.88%, DPPH 自由基清除率分别为 74.63%、87.87%, 侗族酸肉肽对-OH 自由基清除率及 DPPH 自由基清除率均小于对照谷胱甘肽(GSH), 大于二丁基羟甲基苯(BHT)及 Vc。因此, 选择碱性蛋白酶为响应面试验蛋白酶。

2.1.2 蛋白酶量的确定

不同蛋白酶对酸肉肽短肽得率及活性的影响, 由表 4 可知, 随酶添加量的增加, 侗族、苗族酸肉短肽得率均逐渐增大, 当酶量增大至 6000 U/g 时, 侗族、苗族酸肉短肽得率为 88.88%、93.15%不再有显著增加 ($p>0.05$)。戴遥^[26]等研究鲮鱼肉酶解物抗氧化活性, 结果表明碱性蛋白酶添加量 1000 U/g 蛋白~2500 U/g 蛋白时, 水解物的羟自由基清除率无明显变化, 当酶添加量为 3000 U/g 蛋白时达到最大。

由图 2 可知, 随碱性蛋白酶量的增加, 多肽得率、-OH 自由基清除率及 DPPH 自由基清除率逐渐增加。当加酶量 6000 U/g 时, 侗族、苗族酸肉肽对-OH 自由基清除率分别为 74.26%、82.58%, DPPH 自由基清除率分别为 85.07%、84.99%, 继续增加酶量, 对多肽得率、-OH 自由基及 DPPH 自由基清除率均不再有显著影响 ($p>0.05$), 说明当加酶量为 6000 U/g 时, 酶与

底物的结合已达到饱和状态,产生的部分活性多肽被过度水解为无活性的小分子肽或游离氨基酸,使其趋于稳定,不利于短肽的积累^[27]。因此选择最佳蛋白酶添加量为 6000 U/g 作为响应面中心点,侗族、苗族酸肉肽对-OH 自由基、DPPH 自由基清除率均小于对照 GSH、BHT。

2.1.3 酶解时间的确定

按 1.2.2 方法提取酸肉蛋白质粗提液,调节蛋白粗提液 pH=8,添加 6000 U/g 碱性蛋白酶,分别于 50 ℃ 水浴加热 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h,沸水浴灭酶 10 min,离心,上清液为酸肉粗肽液,酶解产物进行 MW≤3000 u 的超滤分离截留,不同蛋白酶对酸肉肽短肽得率及活性的影响,由表 5 可知,随酶解时间的增加,侗族、苗族酸肉肽短肽得率均逐渐增大,当酶解时间为 1.5 h 时,短肽得率不再有显著增加 ($p>0.05$)。

由图 3 可知,随酶解时间的增加,多肽得率、-OH 自由基清除率及 DPPH 自由基清除率逐渐增加。当酶

解 1.5 h 时,侗族-OH 自由基、DPPH 自由基清除率最高分别为 84.91%、85.27%,当酶解 2 h 时,苗族酸肉-OH 自由基、DPPH 自由基清除率最高分别为 81.10%、87.27%,随酶解时间的增加,对多肽得率、-OH 自由基及 DPPH 自由基清除率均不再有显著增加 ($p>0.05$),说明当酶解时间为 1.5~2 h 时,酶与底物已基本反应完全。苏现波^[28]等以碱性蛋白酶酶解提取鱼尾鳍抗氧化肽时发现酶解时间在前 3 h 内多肽得率及-OH 自由基清除率随时间得增加而逐渐升高,酶解时间多于 3 h 时,短肽得率及-OH 自由基清除率不在有显著变化。不同原料酶解条件各异可能是其不同组成及酶解产物的不同导致,同时过度酶解会导致蛋白质功能性发生改变,水解时间越长,酶解产物增加,酶活力受抑制,水解速度降低^[9]。综合分析,为减小时间对抗氧化肽活性的影响,选择最佳酶解时间为 1.5 h 作为响应面中心点,侗族、苗族酸肉肽对-OH 自由基、DPPH 自由基清除率均小于对照 GSH、BHT。

表 5 复合蛋白酶酶解时间对酸肉短肽得率

Table 5 Enzymatic hydrolysis time of complex proteinase for short peptide yield of sour meat

指标	短肽得率/%				
	酶解 0.5 h	酶解 1 h	酶解 1.5 h	酶解 2 h	酶解 2.5 h
侗族酸肉	63.89±0.24 ^d	70.97±0.25 ^c	74.81±0.11 ^a	70.85±0.51 ^c	71.88±0.69 ^b
苗族酸肉	57.60±0.64 ^e	66.34±0.52 ^d	77.58±1.01 ^a	76.12±0.52 ^b	74.35±0.08 ^c

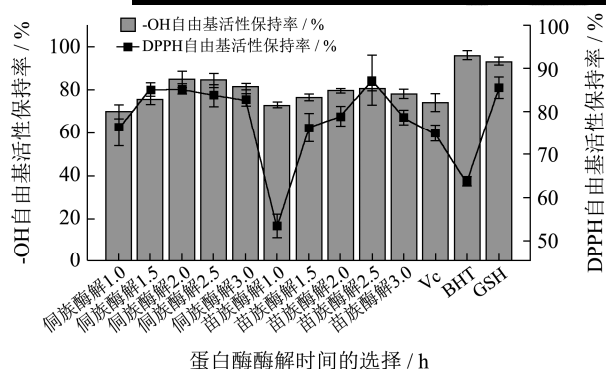


图 3 蛋白酶酶解时间的选择结果

Fig.3 Results of enzymatic hydrolysis time selection of protease

2.1.4 料液比的确定

称取酸肉分别以料液比 1:4、1:5、1:6、1:7 添加蒸馏水进行均质拍打,按 1.2.2 方法提取酸肉蛋白质粗提液,调节蛋白粗提液 pH=8,添加 6000 U/g 碱性蛋白酶,分别于 50 ℃ 水浴加热 1.5 h,沸水浴灭酶 10 min,离心,上清液为酸肉粗肽液,酶解产物进行 MW≤3000 u 的超滤分离截留,不同蛋白酶对酸肉肽短肽得率及抗氧化活性的影响,由表 6 可知,随料液比的增大,侗族、苗族酸肉肽短肽得率均逐渐增大,当料液比为 1:6 时,短肽得率不再有显著增加 ($p>0.05$) 这可能是当料液比较小时,底物浓度较低,酶与底物接触机率

小,酶解产生的短肽较少。随着底物浓度的增加,多肽得率增加。当料液比为 1:6 时,多肽得率最高。戴遥等研究鲮鱼肉酶解物^[26],料液比结果表明,碱性蛋白酶水解物在 1:30 (g/mL)时羟自由基的清除率最大,且随着料液比增加而减小。王艳梅^[29]等以碱性蛋白酶酶解黄缘盒龟肉,结果表明当料液比为 1.5:20 g/mL 时,-OH 清除率最高,分析可能是因为过多的水使酶的水解效率降低,产物肽生成量减少导致。随料液比继续增大,多肽得率下降,可能是因底物浓度增加导致溶液黏度提高,降低底物与酶的接触能力,减弱了酶解作用,导致短肽得率降低^[30]。

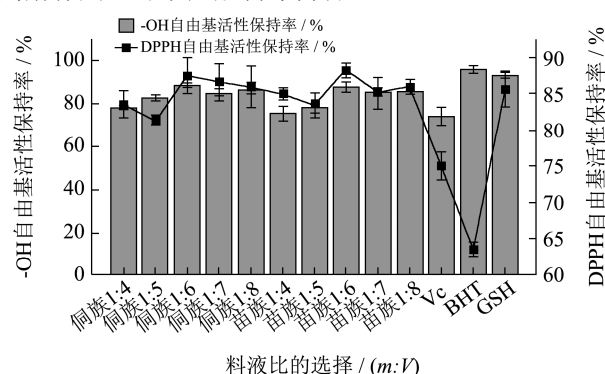


图 4 原料料液比的选择结果

Fig.4 Selection results of feedstock to liquid ratio

由图 4 可知, 随料液比的增大, 多肽得率、-OH 自由基清除率及 DPPH 自由基清除率逐渐增加。当料液比为 1:6 时, 侗族酸肉、苗族酸肉的-OH 自由基最高分别为 88.61%、87.85%, DPPH 自由基清除率也达到最高, 分别为 87.50%、88.35%, 随料液比的增大,

对多肽得率、-OH 自由基及 DPPH 自由基清除率均不再有显著增加 ($p>0.05$), 说明当料液比为 1:6 时, 已达到适宜的接触率。综合分析, 选择最佳料液比为 1:6 作为响应面试验中心点。

表 6 不同料液比对酸肉短肽得率

Table 6 Yield of short peptide of sour meat by liquid ratio of different materials

指标	短肽得率/%				
	料液比 1:4	料液比 1:5	料液比 1:6	料液比 1:7	料液比 1:8
侗族酸肉	56.03±0.37 ^b	58.20±2.27 ^b	63.91±1.53 ^a	61.20±1.00 ^a	61.99±1.68 ^a
苗族酸肉	55.72±0.63 ^c	65.96±2.87 ^{ab}	67.34±0.52 ^{ab}	69.19±2.60 ^a	63.84±2.98 ^b

表 7 Box-Behnken 设计方案及响应面结果

Table 7 Box-Behnken design scheme and response surface results

试验号	因素			短肽得率/%	DPPH 自由基清除率/%
	A 加酶量/(U/g)	B 酶解时间/h	C 料液比/(m/V)		
1	0	0	-1	77.34	74.63
2	-1	0	0	76.53	78.84
3	0	0	0	80.27	86.57
4	1	-1	1	80.73	82.15
5	0	0	0	83.47	85.65
6	-1	-1	1	76.52	73.24
7	0	0	0	82.15	84.06
8	1	-1	-1	77.74	78.16
9	0	-1	0	81.47	75.02
10	0	0	0	82.84	83.91
11	-1	1	1	77.63	82.84
12	1	1	-1	80.52	80.21
13	1	0	0	81.64	86.51
14	0	1	0	83.63	83.01
15	1	1	1	86.45	84.43
16	0	0	0	81.19	84.49
17	0	0	0	82.46	83.57

2.2 响应面优化试验结果

2.2.1 响应面优化试验结果

在单因素基础上, 比较侗族酸肉、苗族酸肉短肽得率, 筛选出苗族酸肉为响应面优化对象。

根据单因素试验结果, 以苗族酸肉短肽得率、DPPH 自由基清除率为响应值进行响应面优化试验, 试验方案及结果如表 7 所示。

使用 Design-Expert 8.05 软件分别短肽得率及 DPPH 自由基清除率响应值对自变量的二次回归方程, 短肽率回归方程为:

$$y_1=82.130+2.402A+1.104B+1.778C+0.694AB+0.231AC+0.276BC-1.486A^2-0.261B^2-1.231C^2$$

DPPH 自由基清除率回归方程为:

$$y_2=84.708+2.006A+1.980B+1.434C-0.618AB+0.813AC+1.270BC-0.720A^2-2.014B^2-2.548C^2$$

为了检验模型的实际有效性, 对结果进行方差分析与显著性检验, 结果见表 6、7。通过表 8、表 9 可知, 两个模型的 $p=0.0034$ 和 $p<0.0001$, 均小于 0.01, 两个模型均表现为极显著; 失拟项的 $p=0.08$ 和 $p=0.21$, 差异不显著, 说明模型拟合程度良好。短肽得率与 DPPH 自由基清除率的回归方程显著性分析发现两个模型的相关系数分别为 $R^2=0.86<0.95$ 和 $R^2=0.93<0.95$, R^2 值越大, 越接近 1, 说明模型拟合效果越好; 变异系数分别为 2.25%和 1.81%, 可知两个模型都能较好地反映真实试验值。因此, 可用这两个模

型对发酵酸肉的蛋白酶解肽进行预测。

短肽得率回归模型中一次项 A、C 均为极显著 ($p<0.01$), B 为显著 ($p<0.05$); 交互项均不显著 ($p>0.05$) 及二次项 A^2 、 C^2 显著, B^2 不显著。DPPH

自由基清除率的回归模型中一次项 A、B、C 为极显著 ($p<0.01$), 交互项 AB、AC 均不显著 ($p>0.05$), BC 为显著 ($p<0.05$); 二次项 A^2 不显著, B^2 、 C^2 为极显著。

表 8 回归模型方差分析 (短肽得率为响应面值)

Table 8 Variance analysis of regression model (the yield of short peptide is the response face value)

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	192.41	9	21.38	6.61	0.0034	**
A 加酶量	78.80	1	78.80	24.35	0.0006	**
B 酶解时间	16.66	1	16.66	5.15	0.0467	*
C 料液比	43.17	1	43.17	13.34	0.0044	**
AB	3.85	1	3.85	1.19	0.3010	
AC	0.43	1	0.43	0.13	0.7237	
BC	0.61	1	0.61	0.19	0.6733	
A^2	31.81	1	31.81	9.83	0.0106	*
B^2	0.98	1	0.98	0.30	0.5945	
C^2	21.84	1	21.84	6.75	0.0266	*
残差	32.36	10	3.24			
失拟差	25.64	5	5.13	3.812	0.0841	不显著
纯误差	6.73	5	1.35			
总误差	224.78	19				
$R^2=0.856$, $R^2_{Adj}=0.726$, 变异系数=2.246						

注: **表示影响极显著, $p<0.01$; *表示影响显著, $p<0.05$ 。

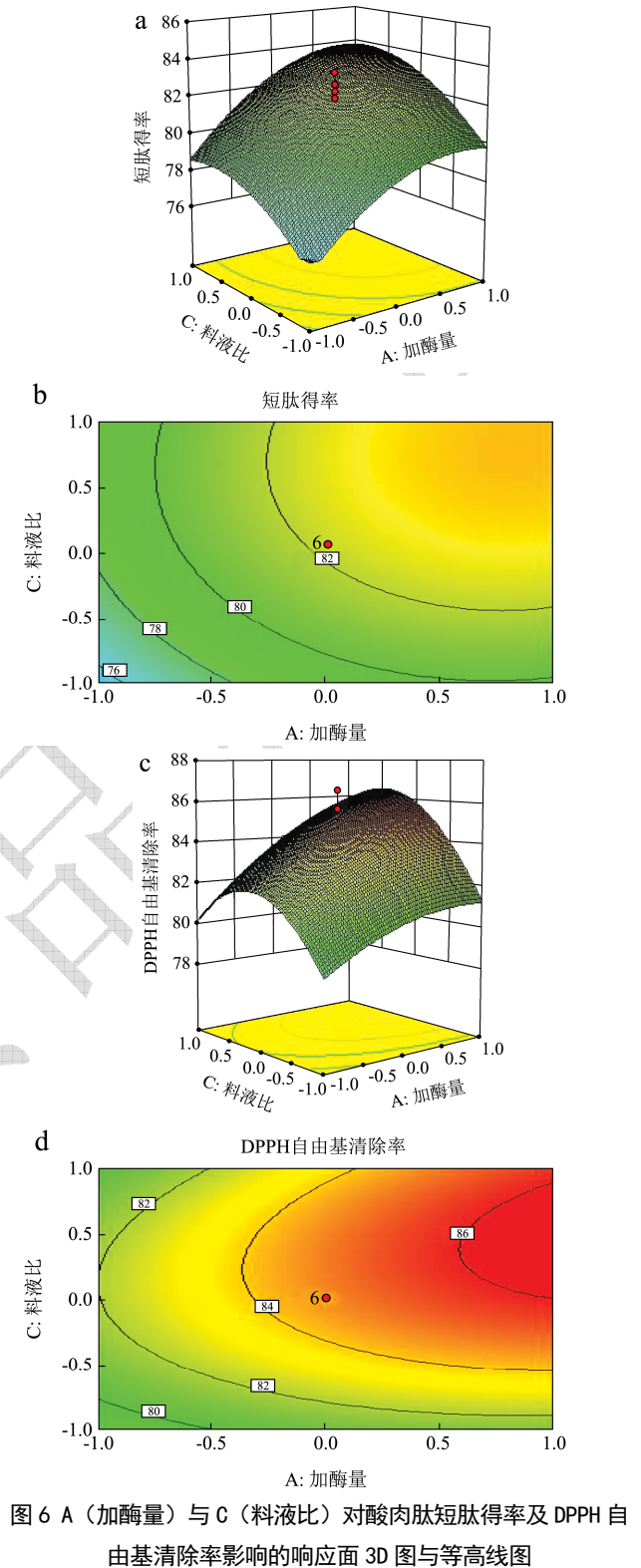
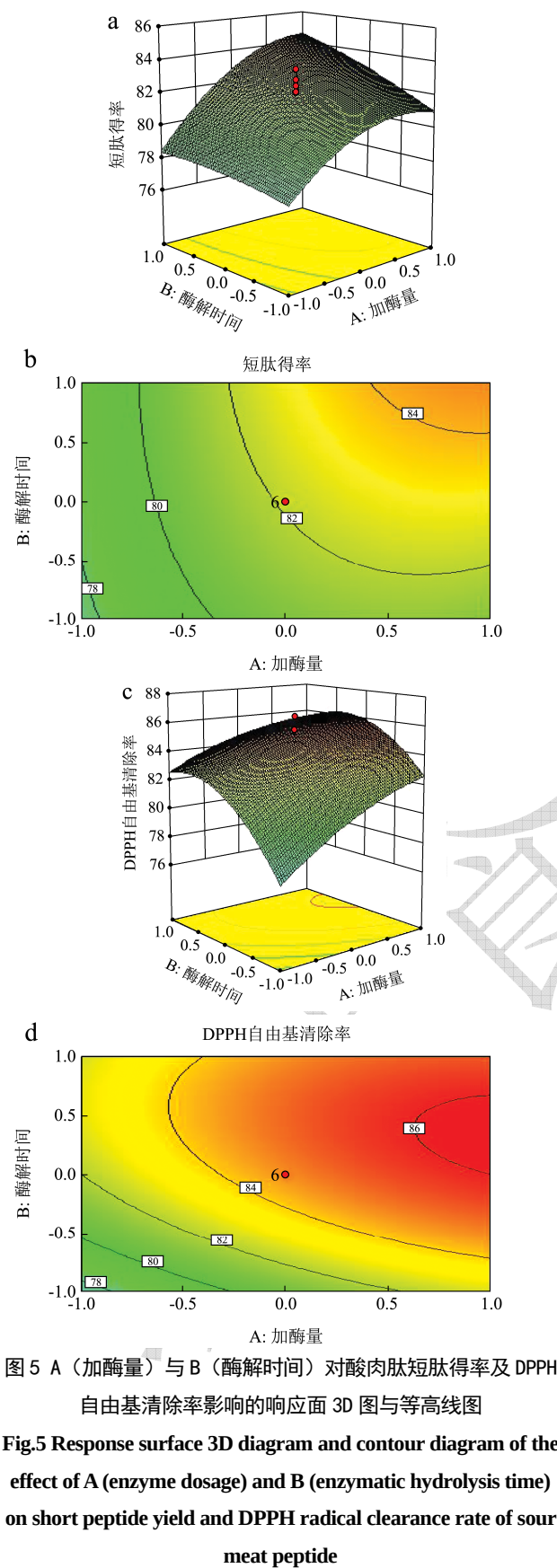
表 9 回归模型方差分析 (DPPH 自由基清除率为响应面值)

Table 9 Variance analysis of regression model (DPPH radical clearance rate is response face value)

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	297.90	9	33.10	15.41	<0.0001	**
A 加酶量	54.97	1	54.97	25.59	0.0005	**
B 酶解时间	53.53	1	53.53	24.92	0.0005	**
C 料液比	28.10	1	28.10	13.08	0.0047	**
AB	3.05	1	3.05	1.42	0.2609	
AC	5.28	1	5.28	2.46	0.1480	
BC	12.90	1	12.90	6.01	0.0342	*
A^2	7.47	1	7.47	3.48	0.0918	
B^2	58.45	1	58.45	27.21	0.0004	**
C^2	93.55	1	93.55	43.55	<0.0001	**
残差	21.48	10	2.15			
失拟差	14.73	5	2.95	2.18	0.2061	不显著
纯误差	6.75	5	1.35			
总误差	319.39	19				
$R^2=0.933$, $R^2_{Adj}=0.872$, 变异系数=1.807						

注: **表示影响极显著, $p<0.01$; *表示影响显著, $p<0.05$ 。

2.2.2 交互模型分析及酸肉肽提取工艺的确定



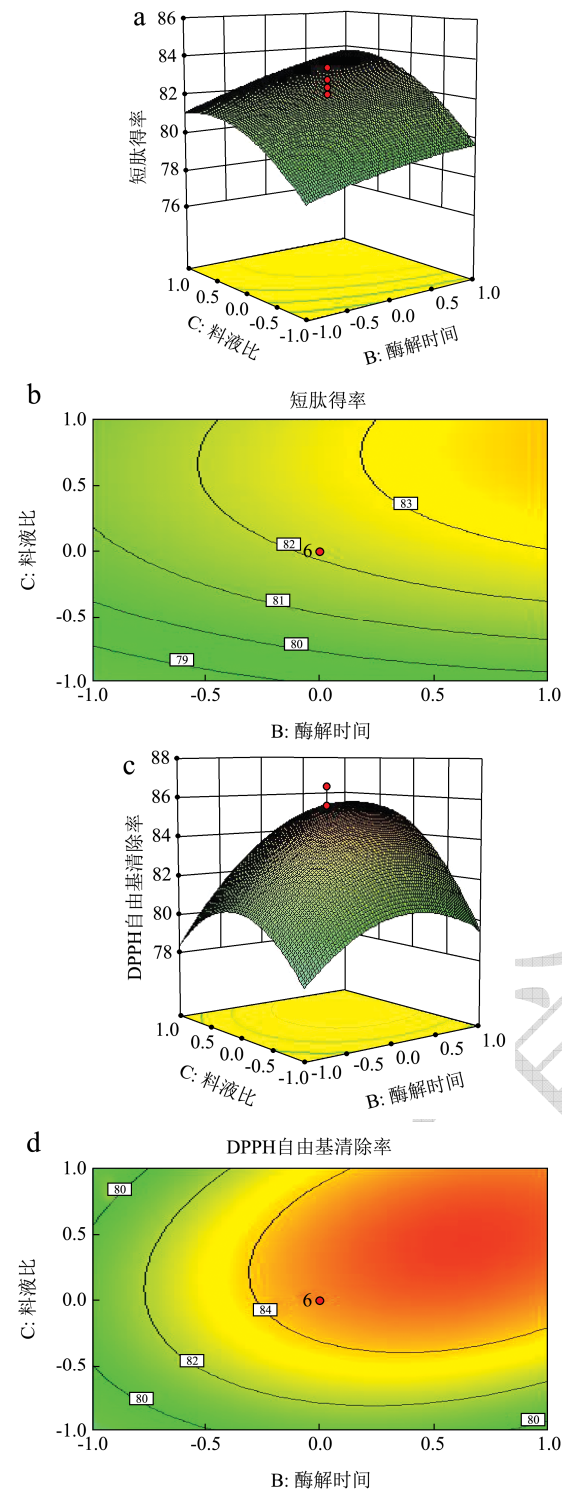


图 7 A（加酶量）与 B（酶解时间）对酸肉肽短肽得率及 DPPH 自由基清除率影响的响应面 3D 图与等高线图

Fig.7 Response surface 3D diagram and contour diagram of the effect of A (enzyme dosage) and B (enzymatic hydrolysis time) on short peptide yield and DPPH radical clearance rate of sour meat peptide

酸肉肽提取以短肽得率及 DPPH 自由基清除率为指标对自变量进行交互分析,其他因素不变的情况下,自变量交互项进行 3D 模型分析。Box-Behnken 回归

模型可得各交互响应面和等高线图(图 5-7),响应面 3D 图坡度越陡,说明响应值对工艺参数的变化越敏感,该自变量的变化对试验结果影响越大;等高线的形状反映交互作用的强弱,椭圆表示两因素交互作用显著,圆形反之^[31],椭圆排列越疏远,说明该因素变化对结果影响越小。

由图 5-7 可知,固定酶解时间条件下,随着蛋白酶添加量的增大,酸肉短肽得率及 DPPH 自由基清除率逐渐增大,一定添加量时基本趋于稳定(图 5);固定料液比条件下,随加酶量的增大,酸肉短肽得率呈先增加后降低,而 DPPH 自由基清除率随酶量增加而增大(图 6);固定料液比条件下,随加酶解时间的增大,酸肉短肽得率逐渐增加,但变化不明显,而 DPPH 自由基清除率随酶量增加先增加后降低(图 7),这与 DPPH 自由基清除率回归模型方差分析中的 BC 项 $p<0.05$ 结果一致。

交互项中 A(加酶量)和 C(料液比)对短肽得率的响应面坡度最陡,说明加酶量和料液比对短肽得率的影响最大;B(酶解时间)和 C(料液比) DPPH 自由基清除率的响应面坡度最陡,说明加酶量和酶解时间对 DPPH 自由基清除率的影响最大。A(加酶量)和 B(酶解时间)之间交互的短肽得率等高线图似圆形,且等高线之间排列较疏远,说明加酶量与酶解时间的交互作用对短肽得率的影响较小,同理,B(酶解时间)和 C(料液比)之间的交互作用对短肽得率的影响较大。B(酶解时间)和 C(料液比)之间交互的 DPPH 自由基清除率等高线图似圆形,且等高线之间排列较疏远,说明加酶量与酶解时间的交互作用对短肽得率的影响较小,同理,A(加酶量)和 B(酶解时间)之间的交互作用对 DPPH 自由基清除率的影响较大。结合模型和响应面曲线图分析,得到发酵酸肉酶解肽较合适的工艺参数为:加酶量 12600 U/g、酶解时间 1 h、料液比 1:1.09 (m:V),预测的短肽得率与 DPPH 自由基清除率分别为 84.21%、86.31%。

2.2.3 验证与多功能活性分析

表 10 响应面回归模型验证

Table 10 Response surface regression model validation		
指标	数值	
短肽得率/%	预测值	84.69
	实测值	84.69±1.32
DPPH 自由基清除率/%	预测值	85.17
	实测值	84.01±0.97

根据响应面优化预测模型最佳酶解条件为加酶量 12600 U/g、酶解时间 1 h、料液比 1:1.09 (m:V),以短肽得率及 DPPH 自由基清除率为响应值进行响应面

验证试验, 试验设计方案及结果如表 10 所示。

响应面优化预测模型的短肽得率与 DPPH 自由基清除率分别为 84.21%、86.31%。在最佳酶解条件下进行 3 次平行试验, 结果表明, 短肽得率平均值为 83.35%, 结果值是预测值的 98.99%, DPPH 自由基清除率为 84.01%, 结果值是预测值的 97.33%, 说明实验结果与模型符合良好, 与预测值基本一致, 可用此模型预测酸肉水解物的短肽得率及 DPPH 自由基清除率。

3 结论及讨论

3.1 发酵酸肉的食用价值和药用价值, 本研究通过筛选适合酸肉酶解的蛋白酶的基础上, 通过单因素分析蛋白酶添加量、酶解时间及料液比对酸肉肽得率及氧化活性的影响, 在单因素基础上建立响应面优化模型的回归方程, 短肽率回归方程为: $y_1=82.130+2.402A+1.104B+1.778C+0.694AB+0.231AC+0.276BC-1.486A^2-0.261B^2-1.231C^2$; DPPH 自由基清除率回归方程为: $y_2=84.708+2.006A+1.980B+1.434C-0.618AB+0.813AC+1.270BC-0.720A^2-2.014B^2-2.548C^2$ 。通过 F 检验和方差分析, 确定该二次模型能够很好地反映各因素对酶解法提取酸肉肽的影响。优化后的最佳酶解提取酸肉肽的工艺组合为: 碱性蛋白酶添加量 12600 U/g、酶解时间 1 h、料液比 1:1.09 (m:V)。通过模型预测酸肉肽得率为 83.35%、DPPH 自由基清除率为 84.01%, 与响应面模型验证实验结果, 抗氧化肽得率为 85.17%、DPPH 自由基清除率为 84.01%, 基本一致, 说明在此条件下对酸肉进行酶解获得的酸肉肽具有一定可行性。

3.2 后期将对酶解物作进一步分离、纯化及抗氧化肽结构的鉴定, 通过对结构的分析, 深入探究小分子肽活性结构的表达, 为活性肽的合成应用提供一定的基础研究。随着国内外对生物活性肽的深入研究, 对生物活性肽的开发利用及活性肽提取工艺研究将具有更广阔的前景。

参考文献

- [1] 谢月英, 李成龙, 韦诚, 等. 发酵酸肉胆酸盐结合肽的分离纯化及初步鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(2): 49-55
XIE Yue-ying, LI Cheng-long, WEI Cheng, et al. Purification and preliminary identification of the binding peptide of fermented sour meat cholic acid [J]. Food and Fermentation Industry, 2017, 43(2): 49-55
- [2] Ikonc'p, Tasic't, Pet r ovic'l, et al. Proteolysis and biogenic amines formation during the ripening of Petrovska klobasa, traditional dry-fermented sausage from Northern Serbia [J]. Food Control, 2013, 30(1): 69-75
- [3] 耿翠竹, 王海滨, 崔莹莹, 等. 蛋白质降解对猪肉制品品质影响的研究进展[J]. 肉类研究, 2016, 30(2): 35-39
GENG Cui-zhu, WANG Hai-bin, CUI Ying-ying, et al. Research progress on the effect of protein degradation on the quality of pork products [J]. Meat Research, 2016, 30(2): 35-39
- [4] Yin L J, Pan C L, Jiang S T. Effect of lactic acid bacterial fermentation on the characteristics of minced mackerel [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(2): 786-792
- [5] 陈超, 高学军, 刘营, 等. 产蛋白酶乳酸菌的筛选及蛋白酶的纯化[J]. 乳业科学与技术, 2008, 31(4): 160-162
CHEN Chao, GAO Xue-jun, LIU Ying, et al. Screening of lactic acid bacteria producing protease and purification of protease [J]. Milk Science and Technology, 2008, 31(4): 160-162
- [6] Fadda S, Olive G, Vignolo G. Protein degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a sausage model system [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(3): 1179-118
- [7] 李华丽, 何煜波. 酸肉生产主发酵期发酵条件的确定[J]. 中国食物与营养, 2005, 4: 40-43
LI Hua-li, HE Yu-bo. Determination of fermentation conditions in main fermentation period of sour meat [J]. Chinese Food and Nutrition, 2005, 4: 40-43
- [8] 卫飞. 不同发酵时段酸肉对实验小鼠血脂的影响研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012
WEI Fei. Effect of sour meat at different fermentation stages on serum lipids in mice [D]. Chongqing: Southwest University, 2012
- [9] 舒夏娃, 王春维. 动物蛋白制备生物活性肽酶解工艺的研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2006, 2: 38-41
SHU Xia-wa, WANG Chun-wei. Progress in the preparation of bioactive peptidolysis of animal protein [J]. Feed and Animal Husbandry, 2006, 2: 38-41
- [10] 张春红, 许静. 制备花生抗氧化肽酶解工艺的研究[J]. 食品工业, 2010, 31(3): 52-54
ZHANG Chun-hong, XU Jing. Study on enzymatic hydrolysis process for preparation of peanut antioxidant peptidins [J]. Food Industry, 2010, 31(3): 52-54
- [11] Gilbert E R, Wong E A, Webb K E. Board -invited review: peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health [J]. J Anim Sci, 2008, 86(9): 2135-2155
- [12] Hou Y Q, Wu Z L, Dai Z L, et al. Protein hydrolysates in

- animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance [J]. J Anim Sci Biotech, 2017, 8(1): 24-37
- [13] 隋晓楠,江连洲,李扬.大豆多肽的功能特性及在食品工业中的应用[J].中国食物与营养,2010,3:36-39
- SUI Xiao-nan, JIANG Lian-zhou, LI Yang. The functional characteristics of soybean polypeptide and its application in food industry [J]. Food and Nutrition in China, 2010(3): 36-39
- [14] Kim H J, Bae I Y, Ahn C W, et al. Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate [J]. Peptides, 2007, 28(11): 2098-2103
- [15] Liu E Q, Li H, Wu Y H, et al. Isolation and identification of hypocholesterolemic peptide derived from black soybean protein [J]. Food Sci, 2013, 34(19): 128-132
- [16] Ralison S S, Tourkara F, Karangwa E, et al. *In vitro* antioxidant activities of protein hydrolysate from germinated black soybean (*Glycine max* L.) [J]. Adv Food Sci Technol, 2013, 5(4): 453-459
- [17] Matthews D M, Mechanisms of peptide transport [A]. In: Dipeptides as New Substrates in Nutrition Therapy [M]. karger London, 1987
- [18] Wen Siying, Zhou Guanghong, Li Li, et al. Effect of cooking on *in vitro* digestion of pork proteins: A peptidomic perspective [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 63(1): 250-261
- [19] Kaneko T, Chihara T, Shimpo K, et al. Inhibition of azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci in mice fed a high-fat diet by *Pleurotus eryngii* (Eringi) and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2015, 16(9): 3881-3885
- [20] Jang A, Lee M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates [J]. Meat Sci, 2005, 69: 653-661
- [21] 朱夕波,周培根,李燕,等.猪皮胶原蛋白水解产物中的抗氧化活性肽的分离及其氨基酸组分[J].天然产物研究与开发, 2009,21:122-124
- ZHU Xi-bo, ZHOU Pei-gen, LI Yan, et al. Isolation of antioxidant peptides from collagen hydrolysates of pig skin and their amino acid components [J]. Natural Products Research and Development Hair, 2009, 21: 122-124
- [22] Yan Hong Li, Jiang Bo, Tao Zhang, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450
- [23] 周逢芳,蔡彬新,巫鑫睿,等.海参体壁蛋白 ACE 抑制肽酶解工艺及产物分子量分布研究[J].食品工业科技,2017,38(17): 163-167,173
- ZHOU Feng-fang, CAI Bin-xin, WU Xin-rui, et al. Study on the enzymatic hydrolysis process and product molecular weight distribution of the body wall protein of sea cucumber [J]. Food Industry Science and Technology, 2017, 38(17): 163-167, 173
- [24] 陈丹阳,韩涛,杜斌,等.酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽及其响应面优化[J].中国油脂,2018,43(10):46-52
- CHEN Dan-yang, HAN Tao, DU Bin, et al. Enzymatic hydrolysis of broad bean protein to prepare cholesterol-lowering peptide and its response surface optimization [J]. China Oils and Fats, 2008, 43(10): 46-52
- [25] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2002:1612
- XU Shu-yun, BIAN Ru-lian, CHEN Xiu. Pharmacological Experimental Method [M]. 3rd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 1612
- [26] 戴遥,吴胜军,舒留泉,等.鲮鱼肉酶解物抗氧化活性的研究[J].食品研究与开发,2018,39(3):35-40
- DAI Yao, WU Sheng-jun, SHU Liu-quan, et al. Yong fish enzyme content of antioxidant activity research [J]. Journal of Food Research and Development, 2018, 39(3): 35-40
- [27] 孙伟峰,周素梅,王强.酵母蛋白肽酶解制备工艺研究[J].食品工业科技,2009,30(5):194-196
- SUN Wei-feng, ZHOU Su-mei, WANG Qiang. Study on the preparation technology of yeast protein peptidolysis [J]. Food Industry Science and Technology, 2009, 30(5): 194-196
- [28] 苏现波,王更先.响应面法优化鱼尾鳍抗氧化肽酶解工艺[J].邯郸职业技术学院学报,2016,29(1):53-59
- SU Xian-bo, WANG Geng-xian. Response surface method to optimize the enzymatic hydrolysis process of fish tail fin antioxidant peptidase [J]. Journal of Handan Vocational and Technical College, 2016, 29(1): 53-59
- [29] 王艳梅,万全,赖年悦,等.黄缘盒龟肉的酶解工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J].水产学报,2013,37(4):622-630
- WANG Yan-mei, WAN Quan, LAI Nian-yue, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of yellow box turtle meat and its antioxidant activity *in vitro* [J]. Acta Fisheries Sinica, 2013, 37(4): 622-630

(下转第 297 页)