

# 鸡蛋清蛋白酶解肽和大豆蛋白酶解肽的协同抗氧化活性

饶胜其, 徐美玲, 高璐, 杨振泉, 方维明\*  
(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

**摘要:** 分别采用胃蛋白酶和碱性蛋白酶对鸡蛋清蛋白和大豆蛋白进行单酶和双酶酶解, 筛选得到抗氧化活性较高的鸡蛋清蛋白酶解液 I (A-P)H 和大豆蛋白酶解液 II PH, 并分别对上述两种酶解液依次进行超滤和树脂分离, 得到高活性的组分 I Fs 和 II Fs。将酶解液 I (A-P)H 与 II PH 以及组分 I Fs 和 II Fs 分别进行两两复配, 通过总还原力、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基和羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 抗氧化评价体系及 Chou-Talalay 联合指数 (combination index, CI) 分析其协同抗氧化能力。结果表明: 酶解液 I (A-P)H 与 II PH 复配物对总还原力的  $\text{CI}_{\text{总还原力}}$ 、对 DPPH 自由基清除率的  $\text{CI}_{\text{DPPH 自由基}}$  和对  $\cdot\text{OH}$  清除率的  $\text{CI}_{\cdot\text{OH}}$  分别为 0.404、0.827 和 0.557; 相对应树脂分离组分 I Fs 和 II Fs 复配物的  $\text{CI}_{\text{总还原力}}$ 、 $\text{CI}_{\text{DPPH 自由基}}$  和  $\text{CI}_{\cdot\text{OH}}$  分别为 0.344、0.383 和 0.808, 相比酶解液的复配物, 其  $\text{CI}_{\text{总还原力}}$  和  $\text{CI}_{\text{DPPH 自由基}}$  分别下降了 14.85% 和 53.69%。研究表明: 酶解液 I (A-P)H 与 II PH 以及树脂分离组分 I Fs 和 II Fs 具有显著的协同抗氧化效果, 而通过超滤和树脂粗分离能有效增强酶解液的抗氧化能力及其协同作用。

**关键词:** 鸡蛋清蛋白; 大豆蛋白; 协同作用; 抗氧化活性

## Synergistic Antioxidant Activities of Peptides Derived from Egg White Proteins and Soybean Proteins by Enzymatic Hydrolysis

RAO Sheng-qi, XU Mei-ling, GAO Lu, YANG Zhen-quan, FANG Wei-ming\*  
(School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

**Abstract:** Egg white proteins and soybean proteins were hydrolyzed by alcalase and/or pepsin, and the hydrolysate I (A-P) H from egg white proteins and II PH from soybean proteins with higher antioxidant activities were obtained. Ultrafiltration and resin separation of these two hydrolysates were carried out, respectively, and the fraction IFs from I (A-P)H and IIFs from II PH with stronger activities were obtained. The hydrolysates I (A-P)H and II PH as well as the fractions IFs and IIFs were combined, and the synergistic antioxidant effect of the mixtures was analyzed through three antioxidant evaluation systems including total reduce power, DPPH radical and hydroxyl radical scavenging activities as well as Chou-Talalay combination index (CI). The results showed that  $\text{CI}_{\text{reducing power}}$ ,  $\text{CI}_{\text{DPPH radical}}$  and  $\text{CI}_{\cdot\text{OH}}$  values of the mixture of I (A-P)H and II PH were 0.404, 0.827 and 0.557, respectively. Moreover,  $\text{CI}_{\text{reducing power}}$ ,  $\text{CI}_{\text{DPPH radical}}$  and  $\text{CI}_{\cdot\text{OH}}$  values of the mixture of fractions IFs and IIFs were 0.344, 0.383 and 0.808, respectively. Compared with the combined enzymatic hydrolysates, the  $\text{CI}_{\text{reducing power}}$  and  $\text{CI}_{\text{DPPH radical}}$  of the mixture of their fractions were reduced by 14.85% and 53.69%, respectively. The results demonstrated that the hydrolysates I (A-P)H and II PH as well as the fractions IFs and IIFs possess remarkable synergistic antioxidant effects, and ultrafiltration and resin separation can effectively enhance antioxidant abilities of the hydrolysates and their synergistic effects.

**Key words:** egg white protein; soybean protein; synergistic effect; antioxidant activity

中图分类号: TS262.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 23-0108-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201423022

动植物蛋白、海洋蛋白、废弃蛋白资源等酶解产生的抗氧化肽因其分子质量小、易吸收、活性强、安全性

高等特点, 能有效地清除体内过剩的活性氧自由基, 保护细胞和线粒体的正常结构和功能, 防止脂质过氧化的

收稿日期: 2014-06-30

基金项目: 江苏省自然科学基金青年科学基金项目 (BK20140479); 江苏省高校自然科学研究面上项目 (12KJD550007); 2013年度扬州大学科技创新培育基金资助项目 (2013CXJ084); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 饶胜其 (1981—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术及食品资源综合利用。E-mail: sqrao@yzu.edu.cn

\*通信作者: 方维明 (1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品深加工及食品生物技术。E-mail: wmfang@yzu.edu.cn

发生,在医药、化妆品、保健品和食品与饲料添加剂等方面有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。大豆蛋白和鸡蛋蛋白具有较高的生物效价和营养价值,水解后制备成的具有生理活性的大豆肽和鸡蛋肽的生物效价和营养价值也都很高,其中有关这两类蛋白来源酶解肽的抗氧化活性研究的报道也较多<sup>[2-3]</sup>,近年来受关注程度呈递增趋势。此外,许多研究发现多种功效因子联合作用比单一组分具有更好的效果,即呈现协同作用,这种作用可能源于具有不同作用机制的功效因子之间存在互补作用或相互修复作用<sup>[4-5]</sup>。已有研究证实,肽与肽之间及肽与非肽类抗氧化成分之间存在协同作用效果,且这种协同作用在不同的抗氧化评价体系中存在显著差异<sup>[6-7]</sup>。

尽管部分抗氧化肽被证实具有强效的抗氧化活性,但其分离纯化过程一般较繁琐,成本较高。相对于纯肽,蛋白水解母液或粗分离组分从产品开发方面更具有可行性。因此,如何提高蛋白水解液的生物活性显得尤为重要。许多研究显示碱性蛋白酶和胃蛋白酶对于蛋白原料中的高活性功能肽的释放具有显著效果<sup>[8-12]</sup>。除了通过蛋白原料与蛋白酶的双向筛选外,将活性较高的不同酶解液或粗分离组分进行复配以发挥其协同效应,也是提高目标产品生物活性较好的一种方式。本研究拟以鸡蛋清蛋白和大豆蛋白为实验对象,分别通过碱性蛋白酶和胃蛋白酶的不同酶解方式进行酶解,并将实验筛选到的具有较高抗氧化活性的大豆蛋白酶解液和鸡蛋清蛋白酶解液进行两两复配,且将这两种酶解液的相应粗分离组分也进行两两复配,通过总还原能力、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基和羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )3种抗氧化评价体系考察不同蛋白来源的酶解液之间及其相应粗分离组分之间的协同抗氧化效果,为高抗氧化活性蛋白酶解液产品的开发提供方法学指导及数据参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

鸡蛋清蛋白粉(蛋白质含量 $\geq 78\%$ ) 南通康德生物制品有限公司;大豆蛋白粉(蛋白质含量 $\geq 90\%$ ) 河南扩源化工产品有限公司。

碱性蛋白酶( $>10$ 万U/g) 上海蓝季科技发展有限公司;胃蛋白酶(1200U/g) 国药集团化学试剂有限公司;DPPH 美国Sigma公司;考马斯亮蓝G250、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA) 生工生物工程(上海)股份有限公司;胰蛋白胨、水杨酸、过氧化氢、铁氰化钾等均为国产分析纯。

Ultra 15超滤离心管 美国Millipore公司;

DA201-C大孔树脂 江苏苏青水处理集团有限公司;紫外-可见分光光度计;RE-3000旋转蒸发器 上海亚荣生化设备仪器厂;pico17微量台式离心机 美国Thermo公司;C-MAG HS7加热磁力搅拌器 上海圣科仪器设备有限公司;5804R型高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蛋白酶解液的制备

蛋白酶解参考庞美蓉<sup>[13]</sup>和侯雅坤<sup>[14]</sup>等的研究,稍作修改,具体步骤如下:各取4g鸡蛋清蛋白粉和大豆蛋白粉配制成2g/100mL的悬浊液,先在95℃保温10min以变性蛋白质,后分别采用胃蛋白酶和碱性蛋白酶进行单酶酶解以及采用胃蛋白酶与碱性蛋白酶按照不同顺序进行分步酶解,反应体系为200mL,酶解条件按表1方式进行。待酶反应完毕后,95℃保温10min以终止酶反应。整个酶解过程于酶反应器中进行,且通过酸碱滴定控制pH值。将所有最终酶解液的pH值调节至7.5,并于4℃、8000r/min离心15min,收集上清液,-20℃冻存,以待分析。

表1 单酶及双酶分步酶解条件

Table 1 Hydrolysis conditions of single enzymes and step-by-step dual enzymes

| 酶解方式       | pH      | 温度      | [E]/[S] | 酶解时间  | 酶解液命名              |
|------------|---------|---------|---------|-------|--------------------|
| 胃蛋白酶       | 2.0     | 37℃     | 2%      | 3h    | I PH/II PH         |
| 碱性蛋白酶      | 9.0     | 60℃     | 2%      | 3h    | I AH/II AH         |
| 胃蛋白酶→碱性蛋白酶 | 2.0→9.0 | 37℃→60℃ | 2%→2%   | 3h→3h | I (P-A)H/II (P-A)H |
| 碱性蛋白酶→胃蛋白酶 | 9.0→2.0 | 60℃→37℃ | 2%→2%   | 3h→3h | I (A-P)H/II (A-P)H |

注:I.鸡蛋清蛋白;II.大豆分离蛋白;P.胃蛋白酶;A.碱性蛋白酶;I PH.鸡蛋清蛋白的胃蛋白酶酶解液;其他类推。

#### 1.2.2 强疏水性活性肽的富集

将1.2.1节中收集到的酶解液I(A-P)H和II PH的离心上清分别装入截留分子量3kD的超滤离心管中,于4℃、4000×g进行超滤离心,收集滤过液。参考陈飞平等<sup>[15]</sup>的方法,将DA201-C大孔吸附树脂先后进行无水乙醇洗涤、碱洗涤、酸洗涤和蒸馏水清洗;分别称取10g清洗好的树脂并量取30mL上述超滤滤过液于150mL锥形瓶中,在25℃、160r/min条件下振荡4h,使树脂与料液充分接触,振荡结束后取出过滤,再将吸附有活性肽的大孔树脂置于150mL锥形瓶中,依次加入体积分数25%、50%和75%的乙醇30mL进行洗脱,收集75%乙醇洗脱液,利用旋转蒸发器在50℃条件下将乙醇和水挥发除去,最后用5mL pH7.5的PBS缓冲液进行重悬,-20℃冻存,最终分别获得粗分离组分(强疏水性活性肽)I Fs和II Fs,以待分析。

#### 1.2.3 抗氧化活性测定

以总还原能力、DPPH自由基清除能力和 $\cdot\text{OH}$ 清除

能力为考核指标,评价酶解液、粗分离组分、复配酶解液和复配分离组分的抗氧化活性。总还原能力采用 $\text{Fe}^{3+}$ 还原法<sup>[16]</sup>测定,以 $\text{EC}_{0.5}$ 值表示,即总还原能力的 $A_{700\text{ nm}}$ 值为0.5时所对应的多肽质量浓度<sup>[17]</sup>;DPPH自由基清除活性参考Shimada等<sup>[18]</sup>的方法测定,以 $\text{IC}_{50}$ 值表示,即清除50% DPPH自由基时所对应的多肽质量浓度<sup>[17]</sup>;·OH清除活性参考Guo Zhanyong等<sup>[19]</sup>的方法测定,以 $\text{IC}_{50}$ 值表示,即清除50%·OH时所对应的多肽质量浓度<sup>[17]</sup>。 $\text{EC}_{0.5}$ 值和 $\text{IC}_{50}$ 值的计算如下:先测试一系列多肽质量浓度样品的活性值,再利用多肽质量浓度和对应活性值作直线图或曲线图,根据所得直线方程或曲线方程求得 $\text{EC}_{0.5}$ 值和 $\text{IC}_{50}$ 值。

#### 1.2.4 联合指数(combination index, CI)分析

采用总还原能力 $\text{EC}_{0.5}$ 值、DPPH自由基清除 $\text{IC}_{50}$ 值和·OH清除 $\text{IC}_{50}$ 值为考核指标,通过Chou等<sup>[20-21]</sup>的中效原理计算CI值,将大豆蛋白的酶解液(或强疏水活性肽)和蛋清蛋白的酶解液(或强疏水活性肽)按照肽质量比1:1进行复配,以评价大豆蛋白的酶解液(或强疏水活性肽)和鸡蛋清蛋白的酶解液(或强疏水活性肽)联合应用的抗氧化效果。

$$\text{CI} = \frac{\text{Dx1}}{\text{D1}} + \frac{\text{Dx2}}{\text{D2}}$$

式中:D1和D2是药物1和药物2单独作用抑制率为50%时的作用浓度;Dx1和Dx2是药物1和药物2联合应用抑制率为50%时的作用浓度。

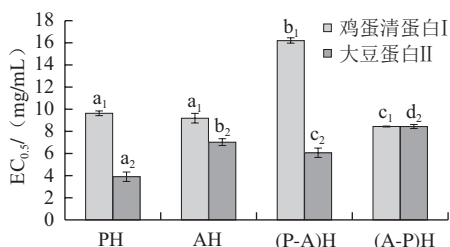
#### 1.3 数据统计分析

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析,用Duncan's多重分析进行组间显著性检验,显著水平为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡蛋清蛋白酶解液和大豆蛋白酶解液的抗氧化活性

#### 2.1.1 总还原能力



柱形图上字母下标1和2分别代表鸡蛋清蛋白酶解液和大豆蛋白酶解液,对于同一蛋白酶解液,字母不同表示酶解液活性具有显著性差异( $P < 0.05$ )。图2、3同。

图1 蛋清蛋白酶解液和大豆蛋白酶解液的总还原能力

Fig.1 Total reducing power of hydrolysates of egg white proteins and hydrolysates of soybean proteins

还原能力是衡量物质抗氧化能力的一个重要指标,一般两者之间呈正相关<sup>[12]</sup>。定义 $\text{EC}_{0.5}$ 为总还原能力的

$\text{OD}_{700\text{ nm}}$ 值为0.5时所对应的多肽质量浓度, $\text{EC}_{0.5}$ 值越小,表明总还原能力越强。由图1可知,鸡蛋清蛋白的4种酶解液的总还原能力大小顺序为I(A-P)H>I AH>I PH>I(P-A)H,其中,I(A-P)H、I AH和I PH的活性相差不大,活性最强的(A-P)H的 $\text{EC}_{0.5}$ 值为8.39 mg/mL;大豆蛋白的4种酶解液的总还原能力大小顺序为II PH>II(P-A)H>II AH>II(A-P)H,活性最强的II PH的 $\text{EC}_{0.5}$ 值为3.87 mg/mL,其总还原能力稍高于核桃蛋白的碱性蛋白酶解液( $\text{EC}_{0.5} > 5\text{ mg/mL}$ )<sup>[14]</sup>。

#### 2.1.2 DPPH自由基清除活性

DPPH自由基具有单电子,在517 nm波长处有强吸收峰,当反应体系中存在自由基清除剂时,能与DPPH自由基单电子配对而使吸收峰逐渐减弱,其褪色程度与其接受的电子数量成定量关系,因而可用分光光度计进行快速的定量分析<sup>[18]</sup>。半抑制浓度 $\text{IC}_{50}$ 指清除50% DPPH自由基时所对应的多肽质量浓度。 $\text{IC}_{50}$ 值越小,DPPH自由基清除活性就越强。由图2可知,鸡蛋清蛋白的4种酶解液的DPPH自由基清除活性大小顺序为I(A-P)H>I AH>I PH>I(P-A)H,与相应样品的总还原能力大小顺序保持一致,其中,DPPH自由基清除活性最强的I(A-P)H的 $\text{IC}_{50}$ 值为2.88 mg/mL;大豆蛋白的4种酶解液的DPPH自由基清除活性大小顺序为II PH>II AH>II(A-P)H>II(P-A)H,其中,活性最强的II PH的 $\text{IC}_{50}$ 值为1.62 mg/mL,其活性高于豌豆蛋白的双酶酶解液( $\text{IC}_{50}=3.01\text{ mg/mL}$ )<sup>[22]</sup>、扇贝裙边的复合蛋白酶酶解液( $\text{IC}_{50}=2.89\text{ mg/mL}$ )<sup>[23]</sup>和蚕蛹的碱性蛋白酶酶解液( $\text{IC}_{50}=4.24\text{ mg/mL}$ )<sup>[24]</sup>,结果表明I(A-P)H和II PH具有较强的DPPH自由基清除活性。

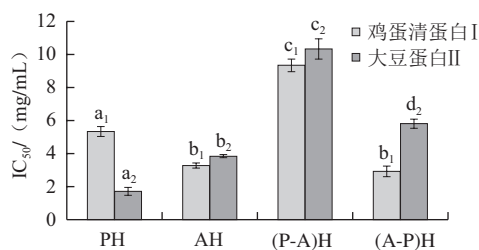


图2 蛋清蛋白酶解液和大豆蛋白酶解液的DPPH自由基清除活性

Fig.2 DPPH scavenging activities of hydrolysates of egg white proteins and hydrolysates of soybean proteins

#### 2.1.3 ·OH清除活性

·OH能与许多的有机物,特别是芳香族化合物(如水杨酸等)发生羟化反应,通过测定羟化产物的量,可以间接测定·OH的含量,从而可以用来测定抗氧化剂清除·OH的能力<sup>[19]</sup>。半清除浓度 $\text{IC}_{50}$ 指·OH清除50%时所对应的肽质量浓度, $\text{IC}_{50}$ 值越小,表明·OH清除活性越大。由图3可知,鸡蛋清蛋白的4种酶解液的·OH清除活性大小顺序为I PH、I(A-P)H>I AH>I(P-A)H,

其中,活性最强的PH和(A-P)H的 $IC_{50}$ 分别为1.69 mg/mL和1.85 mg/mL;大豆蛋白的4种酶解液的 $\cdot OH$ 清除活性大小顺序为II AH>II (A-P)H、II (P-A)H>II PH,其中,II AH、II (A-P)H和II (P-A)H的 $IC_{50}$ 值均在2.90~3.52 mg/mL之间。其中,活性最强的酶解液I PH、I (A-P)H和II AH的 $\cdot OH$ 清除活性均高于蚕蛹的碱性蛋白酶解液( $IC_{50}=4.51$  mg/mL)<sup>[24]</sup>。

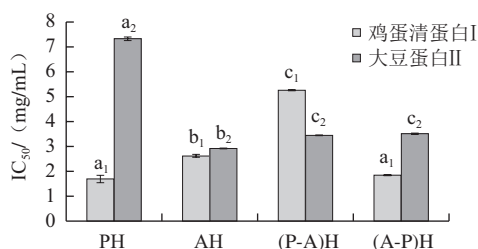
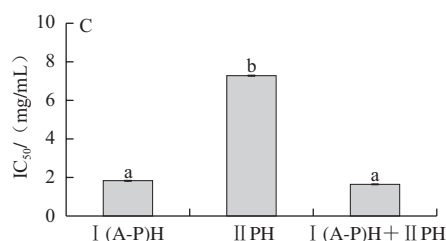
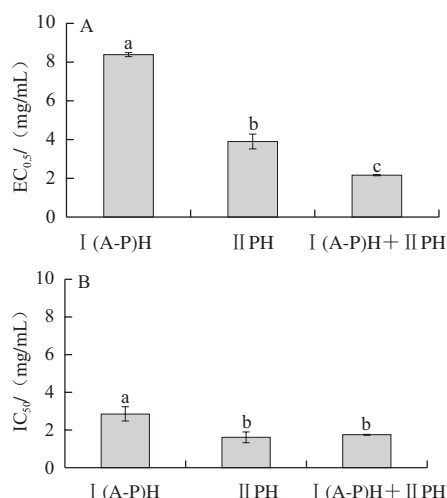


图3 蛋清蛋白酶解液和大豆蛋白酶解液的 $\cdot OH$ 清除活性

Fig.3 Hydroxyl radical scavenging activities of hydrolysates of egg white proteins and hydrolysates of soybean proteins

综合图1~3可知,鸡蛋清蛋白的4种酶解液和大豆蛋白的4种酶解液的总还原能力、DPPH自由基清除活性和 $\cdot OH$ 清除活性均没有呈现严格的一一对应关系,因为这3种抗氧化指标的测定原理不同,所反映的抗氧化活性与酶解液中的肽段组成具有重要关系。尽管如此,在鸡蛋清蛋白的4种酶解液中,酶解液I (A-P)H的总还原能力和DPPH自由基清除活性最强,而 $\cdot OH$ 清除活性与酶解液I PH相近,无显著差异( $P<0.05$ ),结果表明,酶解液I (A-P)H的抗氧化综合能力高于其他3种酶解液;在大豆分离蛋白的4种酶解液中,尽管酶解液II PH的 $\cdot OH$ 清除活性比其他3种酶解液低,但其总还原能力和DPPH自由基清除活性显著高于其他3种酶解液。据此,选择抗氧化活性较高的酶解液I (A-P)H和II PH进行下一步高活性抗氧化肽的富集。

## 2.2 酶解液的协同抗氧化活性



字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )。图5同。

图4 单一酶解液和复配酶解液的总还原能力(A)、DPPH自由基清除活性(B)和 $\cdot OH$ 清除活性(C)

Fig.4 Total reducing power (A), DPPH scavenging activity (B) and hydroxyl radical scavenging activity (C) of single and combined enzymatic hydrolysates

将酶解液I (A-P)H和II PH按照多肽质量浓度1:1进行复配,得到复合酶解液,测定复合酶解液的总还原力 $EC_{0.5}$ 值、DPPH自由基和 $\cdot OH$ 清除 $IC_{50}$ 值。由图4A可知,复配物的总还原能力明显高于单一酶解液;由图4B可知,复配物的DPPH自由基清除活性与II PH相当;由图4C可知,复配物的 $\cdot OH$ 清除活性与I (A-P)H相当。复配之后的复合酶解液的总还原力 $EC_{0.5}$ 、DPPH自由基清除 $IC_{50}$ 及 $\cdot OH$ 清除 $IC_{50}$ 值分别为2.14、1.71 mg/mL和1.64 mg/mL,抗氧化活性总体上强于单一酶解液。

表2 复配酶解液各抗氧化指标的CI指数

Table 2 CI indexes for antioxidant properties of combined enzymatic hydrolysates

| 复配物: I (A-P)H+II PH | CI    |
|---------------------|-------|
| 总还原能力               | 0.404 |
| DPPH自由基清除活性         | 0.827 |
| $\cdot OH$ 清除活性     | 0.557 |

由表2可知,I (A-P)H和II PH联合应用时,复合酶解液对总还原能力、DPPH自由基清除能力和 $\cdot OH$ 清除能力的CI值均小于1,说明它们之间的抗氧化作用存在协同效果。CI值越小,协同作用越强。在3个评价的抗氧化指标中,协同能力大小顺序为总还原能力> $\cdot OH$ 清除活性>DPPH自由基清除活性。根据Soriano等<sup>[25]</sup>的判断方法,  $0.9 \leq CI \leq 1.1$ 为叠加作用,  $0.8 \leq CI < 0.9$ 为低度协同作用,  $0.6 \leq CI < 0.8$ 为中度协同作用,  $0.4 \leq CI < 0.6$ 为高度协同作用,  $0.2 \leq CI < 0.4$ 为强协同作用。据此,复配物的总还原能力与对 $\cdot OH$ 清除能力为高度协同作用,而对DPPH自由基清除能力为低度协同作用。研究结果表明,酶解液I (A-P)H和II PH对总还原能力、 $\cdot OH$ 清除活性和DPPH自由基清除活性的协同能力具有显著差异。

## 2.3 酶解液粗分离组分的抗氧化活性及其协同效应

大量研究显示,抗氧化肽的生理活性与特定类型的氨基酸、氨基酸的种类、序列、构型和分子质量等都有着密切的关系<sup>[26]</sup>。相对于酶解原液,分子质量小于3 kD的小肽具有更强的总还原能力、DPPH自由基和 $\cdot OH$ 的

清除能力,即抗氧化活性更强<sup>[27-28]</sup>。众多的研究也显示,疏水性强的肽段一般都具有较强的抗氧化活性<sup>[22]</sup>。因此,采用超滤和大孔吸附树脂分离技术手段理论上能对酶解液中的高活性功能肽起到很好的富集作用。

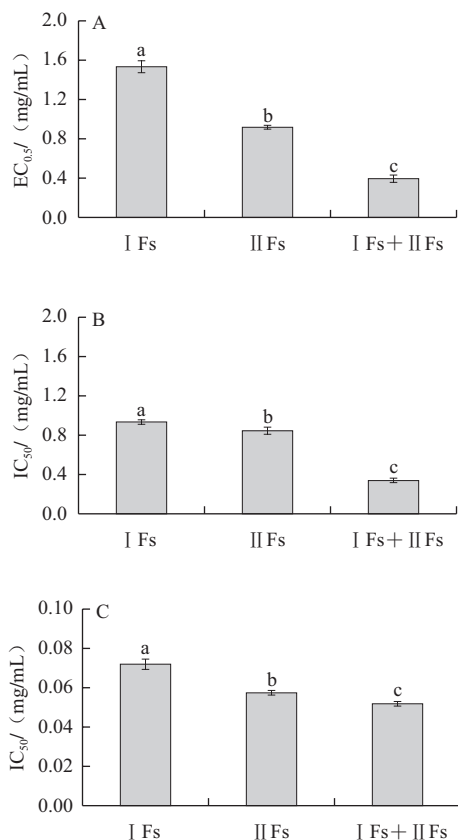


图5 单一分离组分和复配分离组分的总还原能力(A)、DPPH自由基清除活性(B)和 $\cdot\text{OH}$ 清除活性(C)

Fig.5 Total reducing power (A), DPPH scavenging activity (B) and hydroxyl radical scavenging activity (C) of single and combined fractions

本研究依次采用超滤和DA201-C大孔树脂分别对酶解液 I (A-P)H 和 II PH 中活性较高的抗氧化肽进行了富集,结果如图5所示,树脂分离组分 I Fs 的总还原能力  $\text{EC}_{50}$  值、DPPH 自由基清除  $\text{IC}_{50}$  值和  $\cdot\text{OH}$  清除  $\text{IC}_{50}$  值分别为 1.53、0.93 mg/mL 和 0.072 mg/mL,相应活性分别为酶解液 I (A-P)H 的 5.48、3.09 倍和 26.41 倍。树脂分离组分 II Fs 总还原能力  $\text{EC}_{50}$  值、DPPH 自由基清除  $\text{IC}_{50}$  值和清除  $\cdot\text{OH}$  清除  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.92、0.84 mg/mL 和 0.057 mg/mL,相应活性分别为酶解液 II PH 的 4.23、1.92 倍和 122 倍。以上数据表明,经过超滤与树脂纯化后,酶解液 I (A-P)H 和 II PH 的抗氧化活性得到显著增强,其中  $\cdot\text{OH}$  清除活性的增强幅度非常明显,有待进一步的实验证实。

树脂分离组分 I Fs 与 II Fs 按照多肽质量比 1:1 复配后,总还原能力  $\text{EC}_{50}$  值、DPPH 自由基清除  $\text{IC}_{50}$  值和  $\cdot\text{OH}$  清除  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.39、0.34 mg/mL 和 0.052 mg/mL,相对于单一的树脂分离组分其活性均得到有效提高,其中复配

物的总还原能力和 DPPH 自由基清除活性增强尤其明显,相对于 I Fs 分别提高了 2.92 倍和 1.74 倍。研究表明,经过复配后,受试样品的抗氧化能力得到进一步提高。

表3 复配分离组分的各抗氧化指标的 CI 指数

Table 3 CI indexes for antioxidant properties of combined fractions

| 复配物: I Fs + II Fs     | CI    |
|-----------------------|-------|
| 总还原能力                 | 0.344 |
| DPPH 自由基清除活性          | 0.383 |
| $\cdot\text{OH}$ 清除活性 | 0.808 |

由表3可知,DA201-C大孔树脂纯化后, I Fs 和 II Fs 联合应用时,其总还原能力、对 DPPH 自由基和对  $\cdot\text{OH}$  清除能力的 CI 值均小于 1,表明它们之间的抗氧化活性存在协同效应。并且根据 Soriano 等<sup>[25]</sup>的判断方法可知,复配物的  $\text{CI}_{\text{总还原能力}}$  值和  $\text{CI}_{\text{DPPH 自由基}}$  值在 0.2~0.4 之间,表明纯化后的复配物有强协同作用,而  $\text{CI}_{\cdot\text{OH}}$  值在 0.8~0.9 之间,为低度协同作用。对比表2和表3可知,相比酶解液的复配物,树脂分离组分的  $\text{CI}_{\text{总还原能力}}$  值和  $\text{CI}_{\text{DPPH 自由基}}$  值分别下降了 14.85% 和 53.69%,表明通过超滤和树脂粗分离有效增强了酶解液的协同抗氧化能力。

### 3 结论

分别采用胃蛋白酶和碱性蛋白酶对鸡蛋清蛋白和大豆蛋白进行单酶和有次序的双酶酶解,研究发现在鸡蛋清蛋白的酶解液中,其碱性蛋白酶和胃蛋白酶酶解液 I (A-P)H 具有较强的抗氧化活性,而在大豆蛋白的酶解液中,其胃蛋白酶酶解液 II PH 具有较强的抗氧化活性。超滤和大孔树脂纯化有效增强了酶解液的抗氧化能力。将酶解液 I (A-P)H 和 II PH 以及相应粗分离组分 I Fs 和 II Fs 分别进行两两复配,所得复配物的抗氧化活性均高于单一酶解液或单一粗分离组分,结合联合指数 CI 值分析,结果表明酶解液 I (A-P)H 和 II PH 以及相应粗分离组分 I Fs 和 II Fs 具有协同抗氧化效果。同时研究表明超滤和大孔树脂粗分离显著增强了鸡蛋清蛋白酶解肽和大豆蛋白酶解肽的协同抗氧化能力。该研究将为鸡蛋清蛋白酶解肽和大豆蛋白酶解肽的联合应用提供理论指导和数据支持。

### 参考文献:

- [1] POWER O, JAKEMAN P, FITZGERALD R J. Antioxidative peptides enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides[J]. *Amino Acids*, 2013, 44(3): 797-820.
- [2] 王俊杰, 赵燕, 涂勇刚, 等. 蛋源性抗氧化肽研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(2): 358-363.
- [3] 李文, 陈复生, 丁长河, 等. 大豆肽生理功能的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(4): 360-367.
- [4] DAI F, CHEN W F, ZHOU B. Antioxidant synergism of green tea

- polyphenols with  $\alpha$ -tocopherol and *L*-ascorbic acid in SDS micelles[J]. *Biochimie*, 2008, 90(10): 1499-1505.
- [5] ROMANO S C, ABADI K, REPETTO V, et al. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives[J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(2): 456-461.
- [6] SAITO K, JIN D H, OGAWA T, et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(12): 3668-3674.
- [7] 胡晓赟. 小肽抗氧化性及协同作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 32.
- [8] 谢宁宁, 陈小娥, 方旭波, 等. 水产抗氧化肽研究进展[J]. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 2010, 29(1): 74-80.
- [9] 马赛蕊, 胡晓, 吴燕燕, 等. 罗非鱼肉蛋白酶解液的抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2012, 33(19): 52-56.
- [10] 豆康宁, 石晓, 王飞. 大豆蛋白水解度与大豆肽抗氧化力关系研究[J]. *油料蛋白*, 2013, 38(10): 20-22.
- [11] POPOVIC L, PERICIN D, VASTAG Z, et al. Antioxidative and functional properties of pumpkin oil cake globulin hydrolysates[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2013, 90(8): 1157-1165.
- [12] AHN C B, KIM J G, JE J Y. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion[J]. *Food Chemistry*, 2014, 147: 78-83.
- [13] 庞美蓉, 丁秀臻, 孔祥珍, 等. 胃蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(7): 103-107.
- [14] 侯雅坤, 王晟, 黄昆, 等. 核桃蛋白酶解工艺优化与酶解液抗氧化活性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 43(4): 99-103.
- [15] 陈飞平, 周家华, 曾凡坤, 等. 苋籽ACE抑制肽的大孔树脂分离纯化[J]. *食品工业科技*, 2013, 35(11): 271-276.
- [16] OYAIU M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986, 44: 307-315.
- [17] CHURCH F C, SWAISGOOD H E, PORTER H D, et al. Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins[J]. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66(6): 1219-1227.
- [18] SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA K, et al. Antioxidative properties of xanthium on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(6): 945-948.
- [19] GUO Zhanyong, LIU Hongying, CHEN Xiaolin, et al. Hydroxyl radicals scavenging activity of *N*-substituted chitosan and quaternized chitosan[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16(24): 6348-6350.
- [20] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(2): 440-446.
- [21] CHOU T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies[J]. *Pharmacological Reviews*, 2006, 58(3): 621-681.
- [22] 张秋萍, 田亚平. 双酶法酶解豌豆蛋白制备高抗氧化多肽的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(4): 519-524.
- [23] 任佰萍, 张铭振, 孔繁东, 等. 扇贝裙边抗氧化肽酶解液的体内体外抗氧化性研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(8): 290-294.
- [24] 卢楠, 廖鲜艳, 翁新楚, 等. 蚕蛹抗氧化肽的制备及其体外抗氧化活性评价[J]. *上海大学学报: 自然科学版*, 2013, 19(2): 215-220.
- [25] SORIANO A F, HELFRICH B, CHAN D C, et al. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines[J]. *Cancer Research*, 1999, 59(24): 6178-6184.
- [26] 张晖, 唐文婷, 王立. 抗氧化肽的构效关系研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(7): 673-679.
- [27] 谢正军, 金征宇, 徐学明, 等. 苜蓿叶蛋白及其酶解物抗氧化活性的比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(5): 627-632.
- [28] 张敏, 周梅. 不同分子质量米糠多肽的抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2013, 34(3): 1-6.