

待于今后的进一步研究;另一方面,萝卜红色素可以显著地抑制在 93℃ 高温下芥菜籽油对氧的吸收,说明其具有抑制高温下油脂自动氧化形成环状过氧化物的作用,可以减少油脂分子中双键的破坏,防止油脂的酸败。

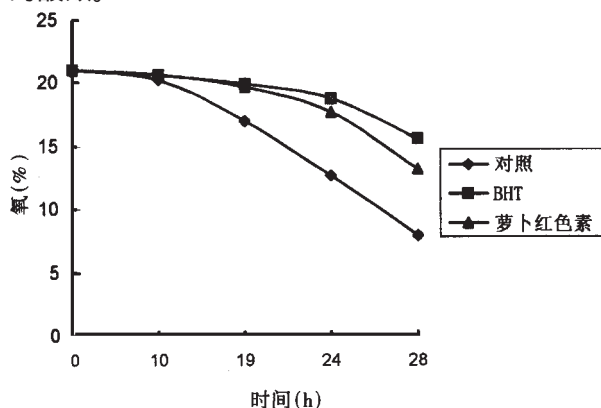


图3 萝卜红色素的抗氧吸收能力

3 结语

萝卜红色素作为多酚类色素,是高效的抗氧化物

质,能够强烈地抑制亚油酸(40℃)的自动氧化,防止氢过氧化物的形成;能够显著地抑制芥菜籽油(93℃)对氧的吸收,从而抑制高温条件下油脂自动氧化,防止双键的破坏和环状过氧化物的形成。其抗氧化能力与相同浓度的 BHT 相近。萝卜红色素是一种应用前景十分广阔的自然抗氧化剂,即为具有抗氧化功能的天然食用色素。

参考文献

- 1 Igarashi - k 等. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 4, 171—175.
- 2 Giusti - MM 等等. Journal of Food Science, 1996, 2, 322—326.
- 3 吕晓玲. 食品与发酵工业, 1985, 6, 19—25.
- 4 Hiroe Kikuzaki 等. Journal of Food Sciences, 1993, 6, 1407—1410.
- 5 黄雪松等. 食品工业科技, 1997, 4, 16—17.
- 6 Chen Z. Y 等. J. Am. Oil Chem. Soc., 1994, 71, 629—632.
- 7 黄梅丽等. 食品化学, 中国人民大学出版社, 1986

动物蛋白酶解研究(I)

宋焕禄 北京工商大学 100037

廖国洪 广东一品鲜生物科技有限公司 523243

摘 要 本文主要目的是以美拉德 (Maillard) 反应产物 (MRPs) 的风味为判断依据,以水解度 (DH) 为动物蛋白酶解液——Maillard 反应底物之一的特征性指标,根据 MRPs 的风味确定动物蛋白水解液的最佳 DH 或 DH 范围

关键词 动物蛋白水解液 水解度 (DH) 酶解 Maillard 反应

Abstract This paper studied mainly about the research of enzymatic hydrolysis of animal protein. The main task was to find out the optimal degree of hydrolysis (DH) of hydrolyzed animal protein (HAP) according to the flavor of Maillard reaction products (MRPs) which was used as a standard of estimation with DH as characteristic parameter for HAP. The substrate of Maillard reaction.

Key words hydrolyzed animal protein (HAP) degree of hydrolysis (DH) enzymatic hydrolysis Maillard reaction

酶解法是一种新兴的动物蛋白水解液的生产方法。与已有的生产方法相比,酶解法有很多优点,因此对酶法生产动物蛋白水解液的研究很受重视。人们从酶解机理、酶解原料、酶及酶解液等多方面进行了大量深入研究。C. M. O Meara 和 P. A. Munro 以米氏方程和兰格缪尔等温吸附模型为基础,研究了瘦肉的酶解

动力,并对酶解反应的影响因素如 pH 值、温度、时间、酶/底物比及底物浓度分别进行研究。研究者还试图从不同途径寻找更有效的酶,研究酶的性质、结构、作用特点、反应条件以及单、多酶水解效果的比较、不同底物水解效果的比较,等等。

人们还注意到,由于水解条件的变化,得到的水

解液有时会含有苦味,并影响到后面的 Maillard 反应产物的风味。研究认为,其原因是某种蛋白质含有疏水性氨基酸,它们常隐藏在蛋白质内部中,一旦水解暴露出来就会显出苦味。生产动物蛋白水解液的原料由于价格问题,生产成本一直降不下来。近年来人们一直在寻找价廉易得的生产原料,已用于生产的有植物蛋白替代品、肉类生产副产物(骨头残肉、动物毛血等),但存在很多问题和欠缺,有待解决。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

市售新鲜鸡胸肉,绞碎后冷藏备用。

1.1.2 主要试剂

磷酸盐(标准物质)缓冲液 pH6.864

硼砂(标准物质)缓冲液 pH9.182 上海市爱

建现成试剂厂

邻苯二甲酸氢钾缓冲液 pH4.003

福林试剂 实验室自备(1份试剂与1.5份水混合)

干酪素 化学纯 上海化学试剂供应站

L-酪氨酸 BR 公私合营上海生物化学制约

厂

甲醛 优级纯 北京市旭东化工厂

Flavorzyme Alcalase Protamex Neutrase Movo Nodisk 公司提供

中性蛋白酶 无锡酶制剂厂

植物蛋白水解液 自制

L-半胱氨酸盐酸盐

木糖

1.1.3 设备

电子万用炉 100W 天津市中环实验电炉有限公司

改良式微量凯氏定氮蒸馏装置

光学读数分析天平 TG328B 上海第二天平仪器厂

架盘药物天平 HG-TP11B 5 北京医用天平厂

上皿电子天平 JA2003 上海天平仪器厂

精密酸度计 PHS-2C 型 上海雷磁仪器厂

电热恒温水浴锅 HH-S112 型 江苏省医疗器械厂

磁力加热搅拌器 HJ-1 型 江苏省国华仪器

厂

分光光度计 721 型 上海第三分析仪器厂

离心沉淀器 800 型 上海手术器械厂

阿贝折光仪

高压灭菌锅 山东新华医疗器械厂

1.2 实验方法

1.2.1 样品蛋白质含量的测定:微量凯氏定氮法

1.2.2 酶活测定:福林法

1.2.3 固形物含量测定:折光法测定。

1.2.4 氨态氮测定:甲醛电位滴定法。

1.2.5 水解度(DH)的测定

水解度的定义是水解肽键数占肽键总数的百分比。测定水解度(DH)采用甲醛法(同氨态氮测定)。计算如下:

$$n_{-NH_2} = \frac{(V - V_0) \times C}{W} \times \frac{V_{tot}}{V}$$

式中

$V - V_0$ 氢氧化钠标准溶液滴定耗用量(ml)

C 氢氧化钠标准溶液浓度(mol/L)

W 水解用样品克数(g)

V_{tot} 水解液总体积(ml)

V 水解液取用体积(ml)

$h_{tot} = (1 \times Pro\%) / 110$

式中

h_{tot} 原料蛋白质中所含肽键总数 (mmol/g 原料)

$Pro\%$ 样品的蛋白质含量

110 氨基酸平均分子量

则有

$DH\% = (n - n_0) \times 100 / h_{tot}$

2 研究内容与结果讨论

2.1 样品蛋白质的测定:经凯氏定氮法测定,样品的蛋白质含量为 20.07%。

2.2 酶活测定

2.3 酶加量及反应时间的确定

2.3.1 实验步骤

以参考资料为依据,设定几个加酶量水平,通过测定不同反应下的水解度,作水解度对加酶量曲线和水解度对时间曲线,可大致确定合适的加酶量及反应时间。具体作法是:取 50g 鸡胸肉,加入 500ml 蒸馏水,在 80℃ 水浴中加热 100min 后冷却。调节 pH 值至各酶的最佳值外,按所设加酶量称加酶后于水浴中进行酶

表 1 同种蛋白酶的特性

| 酶类 | 作用特性 | 最适 pH 值 | 最适温度(℃) | 标注活力 |
|------------|---------|-----------|---------|--------------|
| Flavorzyme | 内 + 外肽酶 | 5.0 - 7.0 | 50 | 1000LAPU/g |
| Alcalase | 内肽酶 | 6.5 - 8.5 | 55 - 75 | 2.4AU/g |
| Protamex | 复合内肽酶 | 5.5 - 7.5 | 55 - 60 | 1.5AU/g |
| Neutrase | 内肽酶 | 5.5 - 7.0 | 50 - 60 | 0.5AU/g |
| 中性蛋白酶 | 内肽酶 | 5.5 - 7.0 | 37 - 50 | 5 - 20 万 U/g |

解,到达设定的反应时间后取 5ml 水解液,加入 25ml 蒸馏水,用甲醛滴定法测水解度。

2.3.2 结果讨论

(1) 中性蛋白酶(pH7.5,37℃)

表 3. 中性蛋白酶酶加量的确定

| 酶量(U/g 蛋白) | 时间 h | | | | |
|------------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 50 | 0.00 | 5.72 | 6.60 | 6.19 | 7.06 |
| 100 | 0.00 | 6.02 | 7.50 | 7.56 | 7.20 |
| 200 | 0.00 | 6.94 | 8.12 | 8.24 | 8.54 |
| 400 | 0.00 | 7.07 | 8.34 | 8.65 | 8.76 |

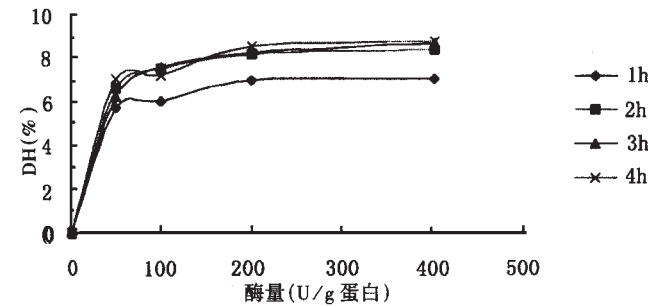


图 1 DH - 酶量曲线(中性蛋白酶)

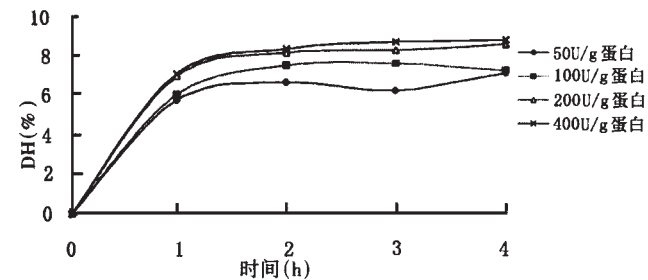


图 2 DH - 时间曲线(中性蛋白酶)

由图 1 及图 2 可以看出,中性蛋白酶的加量在 200U/g 蛋白以后水解液的 DH 值上升趋势基本趋于平缓,而反应时间则在 3h 以后水解液的 DH 值已趋于平缓。因此中性蛋白酶的适宜加量和反应时间确定为 250U/g 蛋白、3h。

(2) Neutrase(pH6.5,55℃)

表 4 Neutrase 酶加量的确定

| 酶量(U/g 蛋白) | 时间(h) | | | | |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 |
| 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 50 | 0.00 | 7.21 | 8.70 | 10.77 | 11.90 |
| 150 | 0.00 | 8.90 | 10.04 | 12.22 | 13.68 |
| 350 | 0.00 | 9.94 | 11.23 | 13.05 | 13.89 |
| 650 | 0.00 | 10.18 | 11.28 | 13.53 | 13.67 |
| 1000 | 0.00 | 11.70 | 11.53 | 13.51 | 13.56 |

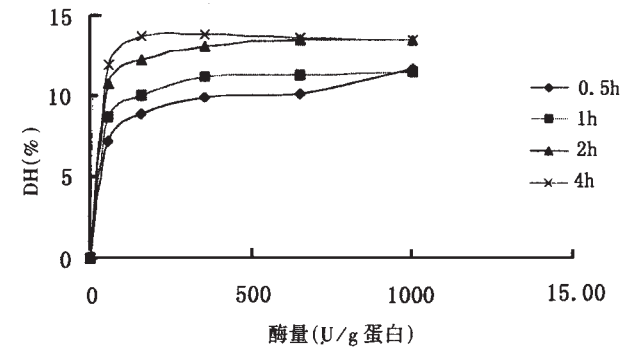


图 3 DH - 酶量曲线(Neutrase)

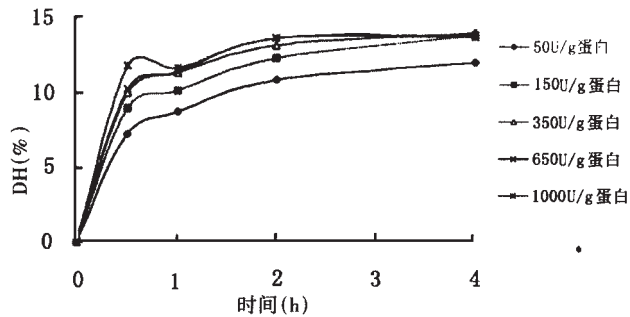


图 4 DH - 时间曲线(Neutrase)

表 2. 几种蛋白酶的酶活

| 相关项 | Flavorzyme | Alcalase | Protamex | Neutrase | 中性酶 |
|--------------------|------------|----------|----------|----------|--------|
| 最佳 pH 值 | 7.0 | 7.5 | 6.5 | 6.5 | 7.5 |
| 最适温度(℃) | 50 | 55 | 55 | 55 | 37 |
| 称酶量(g) | 0.1026 | 0.1053 | 0.0934 | 0.0882 | 0.0959 |
| 稀释倍数 | 200 | 3000 | 250 | 100 | 500 |
| 吸光度 A ₁ | 0.190 | 0.208 | 0.340 | 0.193 | 0.347 |
| 吸光度 A ₂ | 0.191 | 0.200 | 0.339 | 0.187 | 0.344 |
| 吸光度 A ₃ | 0.190 | 0.205 | 0.339 | 0.190 | 0.349 |
| 吸光度 A | 0.190 | 0.204 | 0.339 | 0.190 | 0.347 |
| 酶活(U/g) | 14470 | 227062 | 35450 | 8416 | 70681 |

由图 3 及图 4 可见 ,Neutrase 的适宜加量比较小 ,其加量大于 150U/g 蛋白以上水解度 (DH) 变化已经很小 ;反应时间在 3h 以后 DH 变化就不明显了。可见 Neutrase 的适宜加量及反应时间可定为 150U/g 蛋白、3h。

(3)Protamex(pH6.5 ,55℃)

表 5 Protamex 酶加量的确定

| 酶量(U/g 蛋白) | 时间(h) | | | | |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.0 | 0.5 | 2.5 | 5.5 | 9.5 |
| 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 25 | 0.00 | 7.21 | 9.58 | 11.23 | 12.71 |
| 200 | 0.00 | 8.31 | 11.70 | 14.21 | 15.80 |
| 800 | 0.00 | 10.54 | 14.33 | 16.51 | 18.09 |
| 2000 | 0.00 | 10.74 | 15.07 | 17.03 | 18.44 |
| 3200 | 0.00 | 13.18 | 16.33 | 18.30 | 19.21 |

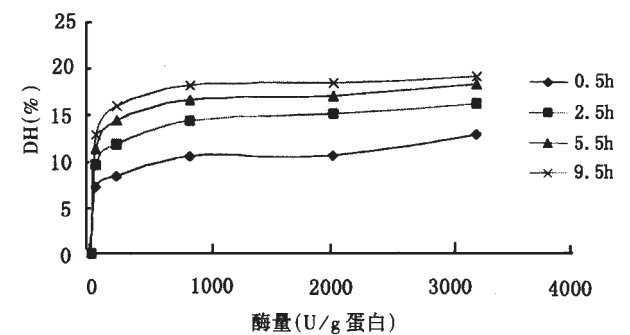


图 5 DH—酶量曲线(Protamex)

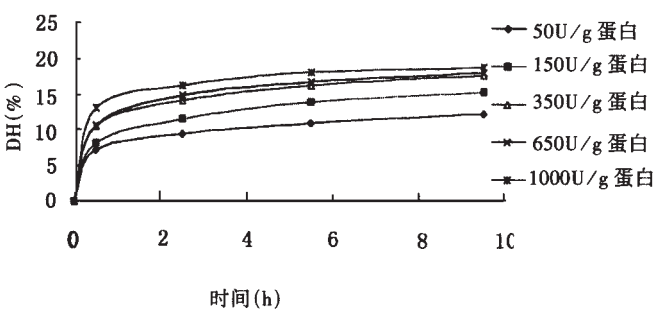


图 6 DH—时间曲线(Protamex)

由图 5 和图 6 ,Protamex 加量大于 1000U/g 蛋白、反应时间大于 6h 以后曲线的上升趋势已近平缓,因此可以选定 1000U/g 蛋白、6h 为其适宜加量和反应时间。

(4)Alcalase (pH7.5 ,55℃)

表 6 Alcalase 酶加量的确定

| 酶量(U/g 蛋白) | 时间(h) | | | | |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 3 | 6 | 10 |
| 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 100 | 0.00 | 6.86 | 10.12 | 11.54 | 13.55 |
| 400 | 0.00 | 7.98 | 10.11 | 12.31 | 13.98 |
| 800 | 0.00 | 9.09 | 11.45 | 14.17 | 14.84 |
| 1500 | 0.00 | 9.50 | 12.32 | 14.71 | 16.64 |
| 2300 | 0.00 | 10.09 | 12.50 | 15.21 | 16.76 |

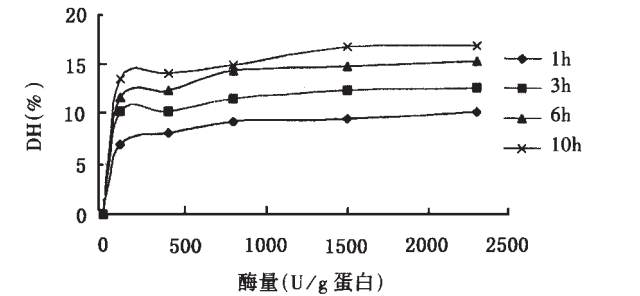


图 7 DH—酶量曲线(Alcalase)

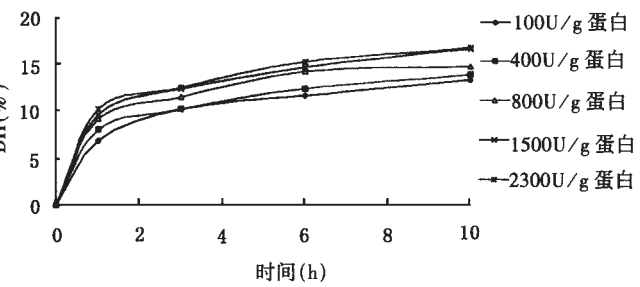


图 8 DH—时间曲线(Alcalase)

由图 7 及图 8 可以确定 Alcalase 的适宜加量为 1500U/g 蛋白 ,8h。

(5)Flavorzyme (PH7.0 ,50℃)

表 7. Flavorzyme 酶加量的确定

| 酶量(U/g 蛋白) | 时间(h) | | | | |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 3 | 6 | 10 |
| 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 500 | 0.00 | 12.73 | 17.78 | 22.50 | 32.24 |
| 1500 | 0.00 | 15.83 | 21.32 | 24.88 | 31.40 |
| 3500 | 0.00 | 21.00 | 28.26 | 32.54 | 35.33 |
| 7500 | 0.00 | 29.92 | 37.61 | 41.80 | 44.64 |
| 12000 | 0.00 | 33.10 | 43.06 | 47.81 | 49.50 |

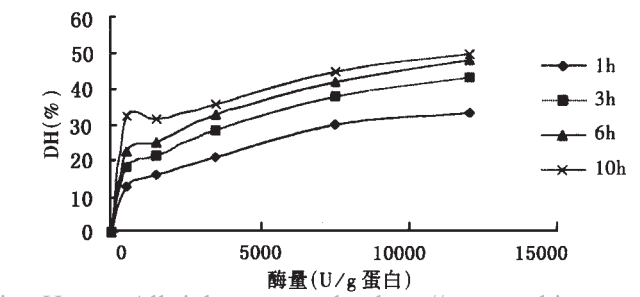


图 9 DH—酶量曲线(Flavorzyme)

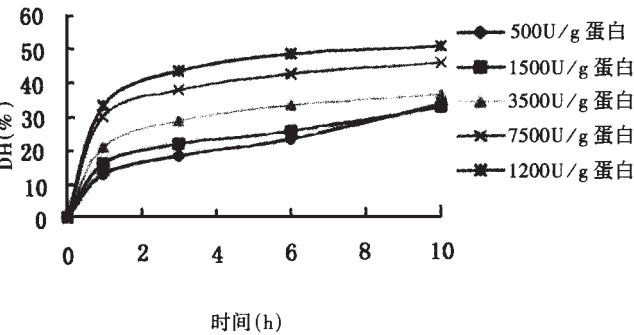


图 10 DH—时间曲线(Flavorzyme)

由图 9 及图 10 ,Flavorzyme 的 DH—酶量曲线基本上都是上升,并没有出现一个理论上的适宜值。从经济角度考虑,取 200U/g 蛋白的加量。而其反应时间在 8h 以后 DH 变化已不明显。

2.4 最佳酶组合的确定

2.4.1 实验步骤

称取 200g 鸡胸,加入 100g 蒸馏水,于 80℃ 水浴中加热 10min,调节 pH 值至酶的最适 pH 值处,称加酶后于水浴中进行酶解并间隔搅拌。每隔 1h 取 10ml 水解液,定容至 100ml,取 10ml 进行甲醛滴定测 DH 值。

(1) Alcalase & Flavorzyme (A&F)

表 8. 最佳酶组合的确定(1)

| 酶类 | 质量(g) | 温度(℃) | 时间(h) | 初始 pH 值 |
|------------|-------|-------|-------|---------|
| Alcalase | 0.354 | 55 | 1.5 | 7.5 |
| Flavorzyme | 2.219 | 50 | ≥4.0 | 7.5 |

| 时间(h) | 固形物(%) | ΔV _{NaOH} (ml) | n _计 (mmol/g) | n _校 (mmol/g) | DH(%) | Aa-N(%) |
|-------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|---------|
| 0.0 | 2.6 | 3.82 | 0.05 | 0.06 | — | 0.08 |
| 1.0 | 9.0 | 10.92 | 0.14 | 0.15 | 4.93 | 0.22 |
| 2.0 | 11.1 | 13.68 | 0.17 | 0.19 | 7.12 | 0.27 |
| 3.0 | 14.0 | 20.42 | 0.24 | 0.28 | 12.06 | 0.39 |
| 4.0 | 15.2 | 24.78 | 0.27 | 0.33 | 14.80 | 0.46 |
| 5.0 | 17.0 | 28.32 | 0.29 | 0.37 | 16.99 | 0.52 |
| 6.0 | 18.0 | 32.88 | 0.29 | 0.41 | 19.18 | 0.58 |
| 8.5 | 19.5 | 38.56 | 0.31 | 0.46 | 21.92 | 0.65 |
| 10.0 | 20.8 | 42.22 | 0.31 | 0.49 | 23.57 | 0.69 |

(2) Protamex & Flauorzyme (P&F)

表 9. 最佳酶组合的确定(2)

| 酶类 | 质量(g) | 温度(℃) | 时间(h) | 初始 pH 值 |
|------------|-------|-------|-------|---------|
| Protamex | 1.132 | 55 | 1.5 | 7.5 |
| Flavorzyme | 2.219 | 50 | ≥4.0 | 7.5 |

| 时间(h) | 固形物(%) | ΔV _{NaOH} (ml) | n _计 (mmol/g) | n _校 (mmol/g) | DH(%) | Aa-N(%) |
|-------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|---------|
| 0.0 | 2.6 | 3.62 | 0.05 | 0.06 | — | 0.09 |
| 1.0 | 10.0 | 13.42 | 0.17 | 0.24 | 9.86 | 0.33 |
| 2.0 | 12.4 | 20.04 | 0.28 | 0.39 | 18.09 | 0.54 |
| 3.0 | 13.6 | 26.22 | 0.31 | 0.45 | 21.38 | 0.63 |
| 4.0 | 14.9 | 31.08 | 0.35 | 0.54 | 26.31 | 0.63 |
| 5.0 | 16.0 | 33.98 | 0.36 | 0.58 | 28.50 | 0.81 |
| 6.0 | 16.8 | 37.00 | 0.37 | 0.62 | 30.69 | 0.86 |
| 7.0 | 17.8 | 42.72 | 0.39 | 0.69 | 34.53 | 0.97 |
| 8.5 | 19.4 | 45.50 | 0.38 | 0.70 | 35.08 | 0.96 |
| 10.0 | 21.2 | 46.08 | 0.36 | 0.72 | 36.17 | 0.92 |

(3) Neutrase & Flavorzyme (N&F)

表 10. 最佳酶组合的确定(3)

| 酶类 | 质量(g) | 温度(℃) | 时间(h) | 初始 pH 值 |
|------------|-------|-------|-------|---------|
| Neutrase | 0.715 | 55 | 1.5 | 6.5 |
| Flavorzyme | 2.219 | 50 | ≥4.0 | 6.5 |

| 时间(h) | 固形物(%) | ΔV _{NaOH} (ml) | n _计 (mmol/g) | n _校 (mmol/g) | DH(%) | Aa-N(%) |
|-------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|---------|
| 0.0 | 2.6 | 3.54 | 0.05 | 0.05 | — | 0.07 |
| 1.0 | 8.4 | 10.64 | 0.14 | 0.15 | 5.48 | 0.21 |
| 2.0 | 9.6 | 11.62 | 0.15 | 0.16 | 6.03 | 0.23 |
| 3.0 | 12.8 | 18.52 | 0.22 | 0.25 | 10.96 | 0.35 |
| 4.0 | 13.6 | 23.42 | 0.26 | 0.31 | 14.25 | 0.44 |
| 5.0 | 14.6 | 26.80 | 0.28 | 0.35 | 16.44 | 0.49 |
| 6.0 | 15.5 | 30.36 | 0.29 | 0.39 | 18.64 | 0.55 |
| 7.0 | 16.8 | 32.88 | 0.29 | 0.40 | 19.18 | 0.57 |
| 8.5 | 20.2 | 37.68 | 0.29 | 0.44 | 21.38 | 22.47 |
| 10.0 | 20.8 | 42.00 | 0.29 | 0.46 | 22.47 | 0.65 |

(4) 中性蛋白酶 & Flavorzyme (Z&F)

表 11. 最佳酶组合的确定(4)

| 酶类 | 质量(g) | 温度(℃) | 时间(h) | 初始 pH 值 |
|------------|-------|-------|-------|---------|
| 中性蛋白酶 | 0.142 | 37 | 1.5 | 7.5 |
| Flavorzyme | 2.219 | 50 | ≥4.0 | 7.5 |

| 时间(h) | 固形物(%) | ΔV _{NaOH} (ml) | n _计 (mmol/g) | n _校 (mmol/g) | DH(%) | Aa-N(%) |
|-------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|---------|
| 0.0 | 2.5 | 3.00 | 0.04 | 0.04 | — | 0.06 |
| 1.0 | 7.5 | 9.98 | 0.13 | 0.14 | 5.48 | 0.19 |
| 2.0 | 9.5 | 12.62 | 0.16 | 0.18 | 7.67 | 0.25 |
| 3.0 | 14.2 | 19.72 | 0.23 | 0.27 | 12.61 | 0.38 |
| 4.0 | 15.5 | 25.64 | 0.28 | 0.34 | 16.44 | 0.48 |
| 5.0 | 16.6 | 28.34 | 0.29 | 0.37 | 18.09 | 0.52 |
| 6.0 | 17.7 | 30.82 | 0.30 | 0.40 | 19.73 | 0.56 |
| 7.0 | 18.3 | 35.40 | 0.32 | 0.49 | 24.66 | 0.68 |
| 10.0 | 22.5 | 50.56 | 0.32 | 0.52 | 26.31 | 0.73 |

2.4.2 结果分析

由实验数据得到的四个酶组合 A&F、P&F、N&F、

Z&F 的固形物—曲线、Aa - N—时间曲线及 DH—时间曲线如下：

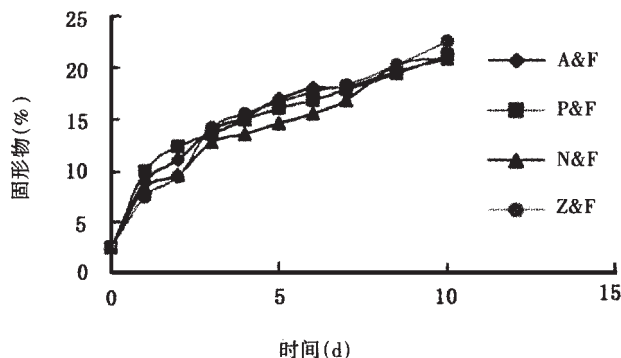


图 11 固形物—时间曲线

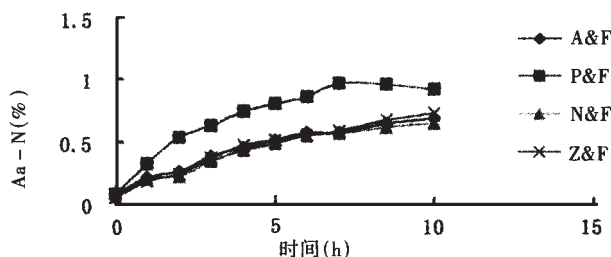


图 12 Aa - N—时间曲线

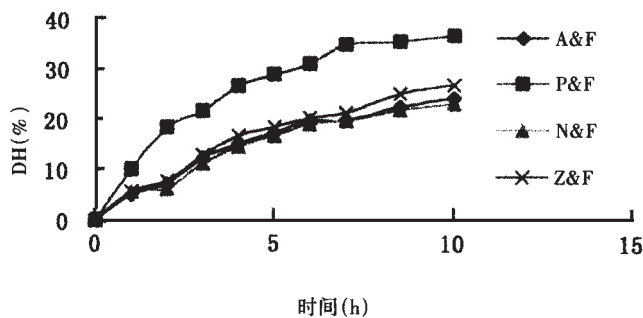


图 13 DH—时间曲线

由图 11、图 12 和图 13 可以看出，四种酶的固形物—时间曲线很相似，差别并不大，但是它们的 Aa - N—时间曲线、DH—时间曲线差别就很明显：P&F 酶组合变化最显著，另外三个酶组合相差不大。因此可以得出这样的结论：P&F 酶组合的水解效果是最好的。（待续）

黄酮类食用天然色素抗氧化活性的研究

王威 天津师范大学化学与生命科学学院 300074

摘 要 利用 DPPH 法^[1]对四种黄酮类食用天然色素的研究发现：它们都具有抗氧化活性，有的可与 BHT 相比美。从紫外光谱和黄酮含量的分析说明了四种色素的抗氧化活性与黄酮化合物含量及结构的关系。为进一步拓宽黄酮类食用天然色素的应用，提供科学依据。

关键词 黄酮化合物 DPPH 抗氧化活性 BHT 紫外光谱

Abstract The four natural edible flavonoid pigments were studied by DPPH. The results indicated that they all have had the antioxidant activities and some of them were the same as BHT. The analyses from ultraviolet spectrum and contents of the flavonoid confirmed the close relationship between the antioxidant activities of the four pigments and the contents and structures of the flavonoid. The present study provided the scientific basis for further developing the application of natural edible flavonoid pigments.

Key words Flavonoid DPPH Antioxidant activity BHT Ultraviolet spectrum

黄酮化合物抗氧化、抗自由基等方面的研究已有不少报道^[2]。天然黄酮提取物抗氧化性的研究也成为热门话题^[3-5]。食用天然高粱色素（棕色）和食用高粱色素（黑色）、洋葱皮色素和可可壳色素是黄酮类的天然着色剂。由于对光、热等条件极其稳定而广泛使用于食品着色，而作为黄酮化合物具有的抗氧化活性方面

的研究目前还未见到。黄酮类食用天然色素其他功能的开发利用更未被人们重视和应用。为了充分发挥天然食品添加剂具有的天然、保健、多功能等特性，造福于人民。我们利用紫外光谱和硝酸铝显色法对色素中的黄酮化合物进行定性、定量测定。通过 DPPH 法对其抗氧化能力的测定，以及常用食品抗氧化剂 BHT 和