



# 美拉德反应对醋蛋多肽抗氧化活性的影响

杨 锋<sup>1,2</sup>, 陈锦屏<sup>1</sup>, 林心怡<sup>2</sup>

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 广西工学院生物与化学工程系, 广西 柳州 545006)

**摘 要:** 采用醋蛋多肽与葡萄糖发生美拉德反应来改善醋蛋多肽的抗氧化活性。结果表明: 优化的美拉德反应条件为醋蛋多肽与葡萄糖质量比1:2、反应初始pH10、反应温度100℃、反应时间120min。在此反应条件下, 反应产物的抗氧化活性与未反应的醋蛋多肽相比, DPPH自由基清除率从12.7%增加到64.8%,  $\text{Fe}^{3+}$ 还原能力( $A_{700\text{nm}}$ )从0.107增加到0.718。在此反应过程中, 反应产物的抗氧化活性随着反应体系pH值降低、中间产物( $A_{294\text{nm}}$ )和褐变程度( $A_{420\text{nm}}$ )以及接枝度的增加而不断增强。

**关键词:** 美拉德反应; 醋蛋多肽; 抗氧化活性

## Effect of Maillard Reaction on Antioxidant Activity of Peptides from Vinegar Eggs

YANG Feng<sup>1,2</sup>, CHEN Jin-ping<sup>1</sup>, LIN Xin-yi<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou 545006, China)

**Abstract:** Maillard reaction of the peptide from vinegar-eggs with glucose was investigated to improve antioxidant activity of the peptide. The results showed that the optimal Maillard reaction conditions were peptide-glucose ratio of 1:2, reaction initial pH of 10, reaction temperature of 100 °C, and reaction time of 120 min. Under these optimal reaction conditions, DPPH radical scavenging activity of Maillard reaction products revealed an increase from 12.7% to 64.8%, and  $\text{Fe}^{3+}$  reducing activity exhibited an enhancement from 0.107 to 0.718 when compared with the peptide from vinegar-eggs. During the process of Maillard reaction, antioxidant activity of Maillard reaction products was increased with the decrease of pH, and the increase of absorbance at 294 nm and 420 nm as well as the substitution degree.

**Key words:** Maillard reaction; peptide from vinegar-egg; antioxidant activity

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)03-0137-04

醋蛋是流传于民间的一项验方, 以米醋为基质, 加入鸡蛋浸泡而成。醋使蛋清中的蛋白分子降解, 释放出具有活性的蛋白寡肽及氨基酸<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2-4]</sup>表明醋蛋中的活性肽具有很强的血管紧张素转换酶抑制作用, 具有降血压功能。另外, 陈黎斌等<sup>[5]</sup>用胃蛋白酶-胰酶复合酶体系水解醋蛋液, 发现醋蛋水解液具有一定的抗氧化活性。

美拉德反应是食品中的氨基化合物(氨基酸、肽及蛋白质)与羰基化合物(糖类)发生的复杂反应, 已有研究<sup>[6]</sup>表明美拉德反应产物中的类黑精、还原酮以及一些含N、S的杂环化合物具有抗氧化活性。沈晗等<sup>[7]</sup>研究发现酱油多肽的美拉德热反应产物具有较高的抗氧化活性和很好的应用价值; 孟艳丽等<sup>[8]</sup>采用鲢鱼肽与葡萄糖发生美拉德反应, 结果表明美拉德反应产物表现出很好的抗氧化活性。Benjakul等<sup>[9]</sup>研究猪血蛋白和还原糖的美拉德反应, 发现美拉德反应产物也具有抗氧化活性, 并且抗氧化活性与体系的褐变程度和中间产物的形成有关。Gu等<sup>[10]</sup>研究酪蛋白和葡萄糖美拉德反应产物的抗氧化活性, 结果

表明不同分子质量的美拉德反应产物具有不同的抗氧化活性。本实验采用醋蛋多肽与葡萄糖发生美拉德反应, 研究美拉德反应对醋蛋多肽抗氧化活性的影响, 为进一步提高醋蛋液的开发价值提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鸡蛋购于广西柳州潭中市场; 9°米醋王 广东美味鲜调味食品有限公司。

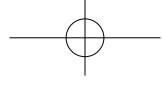
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 美国Sigma公司; 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS) 上海楷洋生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

WFZ UV-2000型紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; TGL-16G离心机 上海安亭科学仪器厂; RE-52旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; FD-2冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; HH-8电

收稿日期: 2011-11-28

作者简介: 杨锋(1978—), 男, 副教授, 博士, 主要从事农产品加工技术及高值化开发研究。E-mail: yangfeng78@126.com



热恒温水浴锅 国华电器有限公司；PHS-3D精密pH计 上海雷磁仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 醋蛋多肽的制备

挑选大小均一的鸡蛋，洗去表面污垢，用75%酒精擦拭鸡蛋表面，晾干后称质量，以醋蛋比3:1(V/m)加入米醋于20~25℃密封浸泡36h，挑破蛋膜，用纱布过滤，得醋蛋液。将醋蛋液煮沸后于5000r/min离心20min，取上清液减压浓缩后冻干得醋蛋多肽，备用。

#### 1.3.2 美拉德反应

取0.2g醋蛋多肽粉末，溶于20mL蒸馏水，按不同醋蛋多肽、葡萄糖质量比例加入葡萄糖，用1mol/L的NaOH溶液调节pH值至所需值，置于不同温度条件下反应至所需时间，得到反应样品液，备用。

#### 1.3.3 抗氧化活性的测定

##### 1.3.3.1 Fe<sup>3+</sup>还原能力的测定

参照Oyaizu<sup>[11]</sup>的方法，略作修改。取1mL样品液于具塞试管中，加入2.5mL 0.2mol/L、pH6.6的磷酸盐缓冲液和2.5mL 10g/100mL的K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>溶液并混合均匀，于50℃保温20min后快速冷却，加入2.5mL 10g/100mL的三氯乙酸溶液，过滤。取上清液2.5mL，加入2.5mL蒸馏水和1mL 0.1g/100mL的FeCl<sub>3</sub>，混合均匀，静置10min后测定700nm波长处的吸光度，吸光度越大，样品的还原能力越强。

##### 1.3.3.2 DPPH自由基清除能力的测定

参照Tang Chuanhe等<sup>[12]</sup>的方法，略作修改。用无水乙醇配制0.1mmol/L DPPH溶液，避光保存。将2mL样品液及2mL DPPH溶液加入同一试管中，摇匀，室温条件下静置30min后于517nm波长处测定其吸光度(A<sub>i</sub>)，同时测定DPPH溶液与2mL蒸馏水混合后的吸光度(A<sub>c</sub>)，以及2mL样品液与2mL无水乙醇混合后的吸光度(A<sub>b</sub>)。按照式(1)计算DPPH自由基清除率，清除率越大则抗氧化能力越强。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_i - A_b}{A_c}) \times 100 \quad (1)$$

#### 1.3.4 美拉德反应过程中指标的测定

##### 1.3.4.1 pH值

反应后的样品液直接用pH计测定pH值。

##### 1.3.4.2 294、420nm波长处的吸光度

将反应后的样品液用蒸馏水稀释5倍后，用蒸馏水做空白对照，在紫外-可见分光光度计上测定294、420nm波长处的吸光度。

##### 1.3.4.3 接枝度

参照Lertittikul等<sup>[13]</sup>的方法，略作修改。取反应后的样品液0.4mL与2mL pH8.2的磷酸盐缓冲液混合，再加入1mL 0.01g/100mL TNBS试剂，振荡混匀，在50℃水浴中避光反应30min，然后再加入2mL 0.1mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>溶

液终止反应，在室温条件下放置30min后在420nm波长处测吸光度。空白对照是在相同操作条件下以蒸馏水代替0.01g/100mL TNBS试剂。按式(2)计算接枝度。

$$\text{接枝度}/\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中：A<sub>0</sub>表示未反应时样品吸光度；A<sub>t</sub>表示反应t时间后样品吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 美拉德反应条件对反应产物抗氧化活性的影响

#### 2.1.1 醋蛋多肽、葡萄糖质量比对反应产物抗氧化活性的影响

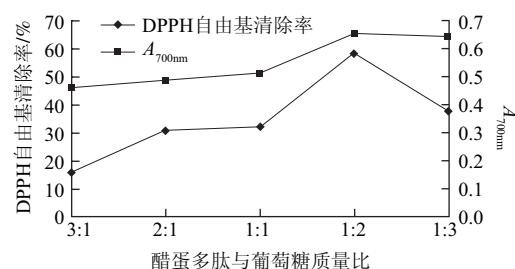


图1 醋蛋多肽、葡萄糖质量比对反应产物抗氧化活性的影响

Fig.1 Effect of the ratio between peptide from vinegar-egg and glucose on antioxidant activity of Maillard reaction products

在反应初始pH9、反应温度90℃、反应时间90min的条件下，改变葡萄糖的添加量，考察醋蛋多肽、葡萄糖质量比对反应产物抗氧化活性的影响。由图1可知，不同醋蛋多肽与葡萄糖反应质量比对反应产物抗氧化活性有一定程度的影响。随着葡萄糖添加量的增大，反应产物的DPPH自由基清除率和Fe<sup>3+</sup>还原能力有所升高，当醋蛋多肽与葡萄糖的质量比达到1:2时，反应产物的抗氧化活性最强，其中DPPH自由基清除率为58.1%、Fe<sup>3+</sup>还原能力(A<sub>700nm</sub>)为0.653，继续增加葡萄糖的用量，反应产物的抗氧化活性反而有所下降，这与朱敏<sup>[14]</sup>的研究结果相似，即在研究精氨酸和本糖的美拉德反应产物的抗氧化活性时发现精氨酸和本糖的物质的量比为1:1时，产物的抗氧化活性最好，比例过高或过低都会影响产物的抗氧化活性，其中的原因有待于进一步研究。因此，在进行美拉德反应时，选择醋蛋多肽、葡萄糖的质量比为1:2。

#### 2.1.2 反应初始pH值对反应产物抗氧化活性的影响

美拉德反应产物的抗氧化活性与反应初始pH值密切相关，因为pH值影响着氨基酸的存在形式，进而影响到美拉德反应的进程。高pH值有利于美拉德反应的起始缩合反应的进行，也有助于糠醛类产物经Amadori重排成还原酮类产物，引起褐变，而褐变的程度与产物的抗氧化活性直接相关<sup>[13]</sup>。在醋蛋多肽、葡萄糖的质量比为1:2、反应温度90℃、反应时间90min的条件下，改变反应初

始pH值,考察反应初始pH值对反应产物抗氧化活性的影响。由图2可知,反应产物的DPPH自由基清除率随着反应初始pH值的增大而增加,在pH值为10时达到最大,之后又下降;  $\text{Fe}^{3+}$ 还原能力也随着反应初始pH值的增大而增加,在pH值为9时最大,之后有所降低,但是下降幅度不大。所以综合来看,选择反应初始pH值为10。

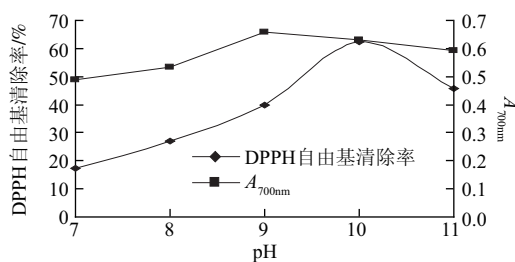


图2 反应初始pH值对反应产物抗氧化活性的影响

Fig.2 Effect of reaction initial pH on antioxidant activity of Maillard reaction products

#### 2.1.3 反应温度对反应产物抗氧化活性的影响

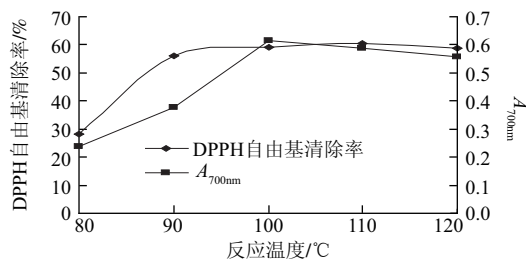


图3 反应温度对反应产物抗氧化活性的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on antioxidant activity of Maillard reaction products

在醋蛋多肽、葡萄糖的质量比为1:2、反应初始pH10、反应时间90min的条件下,改变反应温度,考察反应温度对反应产物抗氧化活性的影响。由图3可知,反应温度对反应产物的抗氧化活性影响很大,在低于100℃时,反应产物的抗氧化活性随着反应温度的增加而迅速增大,当反应温度超过100℃时,继续升高反应温度,反应产物的活性增幅不大。因此选择反应温度为100℃。

#### 2.1.4 反应时间对反应产物抗氧化活性的影响

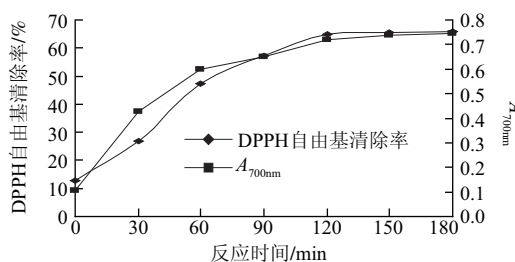


图4 反应时间对反应产物抗氧化活性的影响

Fig.4 Effect of reaction time on antioxidant activity of Maillard reaction products

在醋蛋多肽、葡萄糖的质量比为1:2、反应初始pH10、反应温度100℃的条件下,改变反应时间,考察反应时间对反应产物抗氧化活性的影响。由图4可知,反应产物的抗氧化活性随着反应时间的延长而不断增加,在反应进行到120min时,反应产物的抗氧化活性趋于稳定,并且继续反应到180min时活性变化不大。因此,选择反应时间120min。

#### 2.2 美拉德反应产物抗氧化活性与美拉德反应进程之间的关系

表1 美拉德反应产物的抗氧化活性与反应进程之间的关系

Table 1 Correlation between antioxidant activity of Maillard reaction products and the process of Maillard reaction

反应时间/min	0	30	60	90	120	150	180
pH	10	8.3	7.8	6.7	6.4	6.4	6.4
$A_{294\text{nm}}$	0.260	0.928	1.593	1.829	1.957	1.919	1.900
$A_{420\text{nm}}$	0.079	0.326	0.411	0.526	0.538	0.545	0.549
接枝度/%	0	12.9	18.2	19.6	22.5	23.4	24.3
DPPH自由基清除率/%	12.7	26.9	47.3	57.2	64.8	65.5	65.9
$\text{Fe}^{3+}$ 还原能力( $A_{700\text{nm}}$ )	0.107	0.427	0.601	0.652	0.718	0.739	0.746

为探讨醋蛋多肽与葡萄糖进行美拉德反应后反应产物抗氧化活性的变化与美拉德反应进程之间的关系,在上述优化的美拉德反应条件下,即醋蛋多肽、葡萄糖的质量比为1:2、反应初始pH10、反应温度100℃,测定了美拉德反应进程中体系pH值的变化、中间产物( $A_{294\text{nm}}$ )的变化、褐变程度( $A_{420\text{nm}}$ )的变化、接枝度的变化以及抗氧化活性的变化。由表1可知,在醋蛋多肽与葡萄糖进行美拉德反应过程中,体系的pH值随反应的进行不断下降,且在120min内下降幅度较大,之后趋于平稳。这可能是因为美拉德反应作用了一部分氨基,羰氨缩合反应封闭了游离的氨基,致使反应体系的pH值下降;另一方面由于美拉德反应产生一些有机酸,如乙酸和蚁酸,也使体系的pH值下降<sup>[15]</sup>。 $A_{294\text{nm}}$ 反映的是美拉德反应过程中产生的无色中间产物量的变化<sup>[16]</sup>,这些无色中间产物主要是由糖裂解产生的酮、醛类等小分子物质<sup>[17]</sup>。在反应120min内, $A_{294\text{nm}}$ 急剧增大,而后继续反应此吸光度变化不大。说明这些无色中间产物主要在反应的前120min内生成并积累到一定浓度,继续反应,这些中间产物之间或与肽等发生聚合反应,进入美拉德反应的终极阶段,生成大分子的褐色物质<sup>[17]</sup>。 $A_{420\text{nm}}$ 反映的是体系的褐变程度<sup>[18]</sup>。反应时间短,体系的颜色较浅,随着反应时间的延长,吸光度增加,体系的颜色逐渐加深,表明形成了褐色的聚合物——类黑精。类黑精是一种以短肽和色素相结合的混合物,是美拉德反应产物中的主要抗氧化成分<sup>[19]</sup>。在反应前120min内,产物的褐变程度明显, $A_{420\text{nm}}$ 增幅较大,之后变化较小。综合产物抗氧化活性随反应时间的变化结果来看,随着美拉德反应时间的延长,产物的抗氧化能力也显著增强,在120min后变化不大,这





一变化趋势与体系褐变程度的变化趋势一致,说明美拉德反应产物的抗氧化活性与体系的褐变程度有关。接枝度是通过测定体系自由氨基的减少来计算的,反映的是美拉德反应进行的程度<sup>[20]</sup>。接枝度越小,表明美拉德反应程度越低;接枝度越大,表明美拉德反应程度越高。接枝度随着反应时间的延长而不断上升,表明美拉德反应一直进行,当反应时间达到120min后,接枝度的变化趋于平稳,综合产物抗氧化活性随反应时间的变化结果来看,反应产物的抗氧化活性随着反应时间的延长而不断增加,反应120min后,反应产物抗氧化活性的增加也趋于平稳,这也进一步说明反应产物的抗氧化活性与美拉德反应进行的程度有关。

### 3 结 论

3.1 利用醋蛋多肽与葡萄糖进行美拉德反应的优化工艺条件为:醋蛋多肽、葡萄糖质量比为1:2、反应初始pH10、反应温度100℃、反应时间120min。在此条件下,反应产物的抗氧化活性与醋蛋多肽相比,DPPH自由基清除率从12.7%增加到64.8%, $\text{Fe}^{3+}$ 还原能力( $A_{700\text{nm}}$ )从0.107增加到0.718。因此,美拉德反应是提高醋蛋多肽抗氧化活性的有效方法。

3.2 反应产物的抗氧化活性与美拉德反应进行的程度有关,反应产物的抗氧化活性随着体系pH值的降低、中间产物( $A_{294\text{nm}}$ )的增加、褐变程度( $A_{420\text{nm}}$ )的增加以及接枝度的增加而不断增强。

#### 参考文献:

- [1] 王丹波,王林富,许加广,等.醋蛋浸泡中蛋白质的变化及醋蛋粉的制备研究[J].食品科技,2006,31(5):48-50.
- [2] 陈黎斌,杨严峻.从醋蛋水解物中分离纯化ACE抑制活性物质[J].食品与发酵工业,2007,33(12):29-31.
- [3] 马千里,黄永春,杨锋,等.醋蛋中ACE抑制肽的研究初探[J].食品科学,2008,29(10):207-210.
- [4] 杨锋,马千里,黄永春.醋蛋中ACE抑制肽的分离及稳定性研究[J].食品科学,2009,30(24):57-59.
- [5] 陈黎斌,杨严峻,刘晓君.醋蛋水解液抗氧化活性的研究[J].食品研究与开发,2006,27(4):41-43.
- [6] 章银良,熊卫东,白明星.美拉德反应制备新型抗氧化剂的研究[J].食品科技,2010,35(2):219-222.
- [7] 沈晗,金志刚,孙宝国,等.酱渣多肽及其美拉德热反应产物的抗氧化性[J].北京工商大学学报:自然科学版,2010,28(2):6-9.
- [8] 孟艳丽,董士远.美拉德反应修饰的鲢鱼肽抗氧化活性初探[J].肉类研究,2010(8):26-30.
- [9] BENJAKUL S, LERTITTIKUL W, BAUER F. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system[J]. Food Chemistry, 2005, 93: 189-196.
- [10] GU F L, KIM J M, HAYAT K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system[J]. Food Chemistry, 2009, 117: 48-54.
- [11] OYAIZU M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [12] TANG Chuanhe, WANG Xiansheng, YANG Xiaoquan. Enzymatic hydrolysis of hemp(*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2009, 114: 1484-1490.
- [13] LERTITTIKUL W, BENJAKUL S, TANAKA M. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 669-677.
- [14] 朱敏.抗氧化作用的精氨酸:木糖美拉德反应产物的制备条件[J].食品工业科技,2002,23(5):82-83.
- [15] AMES J M. Applications of the Maillard reaction in food industry[J]. Food Chemistry, 1998, 62: 431-439.
- [16] 沈军卫,樊金玲,朱文学,等.模式美拉德反应产物的抗氧化性与反应进程的关系研究[J].食品科技,2010,35(3):253-257.
- [17] 孙丽平,庄永亮,张莉,等.酶解小麦蛋白产物-还原糖美拉德反应的光谱研究[J].分析化学研究简报,2009,37(9):1359-1362.
- [18] CHAWLA S P, CHANDER R, SHARMA A. Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins[J]. Food Chemistry, 2009, 116: 122-128.
- [19] 项惠丹,许时婴,王璋.蛋白质与还原糖美拉德反应产物的抗氧化活性[J].食品科学,2008,29(7):53-55.
- [20] LI Yue, LU Fang, LUO Changrong, et al. Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar[J]. Food Chemistry, 2009, 117: 69-74.