

# 功能性蛋黄肽的制备及体外活性研究

何 晨,王彦超,常耀光,薛长湖

(中国海洋大学食品科学与工程学院,山东青岛 266003)

**摘 要:**本实验采用乙醇-正己烷脱脂蛋黄粉为底物,Alcalase 2.4L 为水解酶制剂,经两次酶解制备得一种蛋黄肽产品,产品得率达到 41%。对该产品的基本物化指标进行了测定,蛋白含量高于 85%,灰分含量低于 10%,在较宽的 pH 范围内溶解性良好,热稳定性高。体外活性实验表明,该产品可以通过与钙离子结合抑制磷酸钙沉淀,表现出了潜在的促进肠道钙吸收的能力,且具有较好的抗氧化能力。

**关键词:**蛋黄粉,蛋黄肽,抗氧化,钙结合

## Study on the preparation and characterization of bioactive peptides from egg yolk

HE Chen, WANG Yan-chao, CHANG Yao-guang, XUE Chang-hu

(School of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Employing defatted yolk powder by ethanol-hexane extraction as substrate, yolk peptide with high quality was obtained by hydrolysis with 2.4L Alcalase. The hydrolysis process was conducted for twice and yield rate was up to 41%. The physical and chemical indexes of the product were measured: the peptide content was above 85% and the ash content was less than 10%, which features good solubility and high heat stability within a wide pH range. Activity experiment *in vitro* indicated that yolk peptide product had strong ability to prevent calcium phosphate from sediment, suggesting a potential on improving intracellular calcium absorption. Meanwhile, the oxidation resistance activity of yolk peptide was conformed in this study.

**Key words:** yolk powder; yolk peptide; antioxidant; Calcium-binding

中图分类号: TS253.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)19-0053-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2014.19.002

作为禽蛋的生产大国,我国的鸡蛋生产总量连续多年位居世界第一。2012 年我国禽蛋产量达到 2861 万 t, 占世界总产量的 40% 以上。尽管如此,我国市场上的蛋加工制品种类却非常贫乏,绝大多数以带壳鲜蛋的形式出售。仅有的几种蛋加工产品也多是粗加工品(如蛋黄粉)。蛋黄富含多种营养物质,例如蛋白质、脂肪、铁、钙、磷、锌和其他维生素等。

随着生活水平提高,人们对于从自然生物中提取具有生物活性分子,应用于人类健康和食品贮藏的需求越来越强烈<sup>[1]</sup>。研究显示,在所有的生物活性分子中,生物活性肽具有很大的潜力。天然蛋白质中的肽往往没有生物活性,只有在经过蛋白酶水解后才具有了多种生物活性<sup>[2]</sup>。在众多的生物活性肽中,

磷酸肽因其具有非常鲜明的结构和活性,而成为一类具有很高研究价值的生物大分子物质,高磷酸肽的主要功能基团是磷酸肽丝氨酸残基。而磷酸肽丝氨酸残基可以与钙离子有效结合,阻止不溶性的钙磷酸盐形成,从而提高生物价<sup>[3]</sup>。

虽然目前国内外对于从蛋黄中分离高磷蛋白及制备磷酸肽的研究已较多,但其制备方法得率相对较低,难以引入工业化的规模生产,例如徐彩娜等人采用双酶分步水解法的最高得率也仅为 11.49%<sup>[4]</sup>。本文试图通过优化蛋黄粉的脱脂过程和酶解过程,获得一种优质蛋黄磷酸肽的制备工艺。同时以商业化产品酪蛋白磷酸肽(CPP)为对照,对本实验所得产物多肽的功能性质和体外活性进行探究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

蛋黄粉 购自威海大丰实业有限公司;酪蛋白磷酸肽(CPP) 购自北京奥博星生物技术有限责任公司;DPPH、Ferrozine 试剂 购自 Sigma-Aldrich;

收稿日期:2014-01-07

作者简介:何晨(1989-),女,硕士,研究方向:食品加工与安全。

基金项目:国家自然科学基金(31371876);海洋公益研究专项计划(201105029)。

[13] Sun chunyu, Chen guang. The impact of properties and structures with different power ultrasonic treatment on soy protein isolate film[J]. Jilin Agricultural University of science, 2010, 32

(6): 693-696.

[14] 吴琼,陈丽娜,代永刚. 响应面优化转谷氨酰胺酶改性大豆分离蛋白工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 7-10.

Alcalase 2.4L 购自诺维信生物有限公司;95%乙醇、正己烷、氯仿、甲醇、浓硫酸、钼酸钠、硫酸联铵、硫酸铜、硫酸钾、氯化亚铁、氯化钙等 均为国产分析纯。

SG-4050C 型数显电子恒温水浴锅 上海硕光电子科技有限公司;101 型电热鼓风干燥箱 东莞市立佳精密仪器有限公司;BSAZ23S-CW 型电子天平 Sartorius;TDL-5-A 型高速离心机 上海安亭科学仪器厂;3c starter 通用型 pH 计 奥豪斯仪器上海有限公司;HJ-2 型磁力搅拌器 常州国华电器有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 蛋黄肽产品酶解工艺研究

1.2.1.1 工艺过程 蛋黄粉→脱脂→烘干→酶解→灭酶(100℃,10min)→离心取上清(5000r/min,10min)→喷雾干燥

1.2.1.2 脱脂 本文采用乙醇—正己烷脱脂:将蛋黄粉与 95%乙醇按照(1/10,w/v)混合,室温下搅拌提取 30min,加入 5 倍体积的正己烷,室温下搅拌提取 6h,静置 2h,抽滤,取滤渣,50℃烘干备用<sup>[5]</sup>。

1.2.1.2 酶解 粗蛋白按照(1/10,w/v)加蒸馏水,用一定浓度的氢氧化钠调节 pH 至 7,加入 Alcalase 2.4L 酶(E/S=4%),50℃恒温水浴锅中酶解 5h。采用水解度(DH)值,即水解度,考察酶解过程中的蛋白质的水解程度随时间的变化情况。DH 值的测定方法采用 pH-Stat 法<sup>[6]</sup>。测定方法如下:酶解的过程中,通过补加 NaOH 溶液,保持反应体系的 pH 恒定为 7。在特定的条件下,水解反应的最终结果只与 DH 值有关,而在一定条件下,DH 值与补加的 NaOH 体积成正比,水解度的计算公式如式 1 所示。

$$DH(\%) = \frac{B \times N}{\alpha \times m \times h} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中:B 为消耗 NaOH 体积;N 为 NaOH 的摩尔浓度; $\alpha$  为平均解离度,0.44;m 为被水解蛋白质量;h 为每克蛋白质底物具有的肽键毫摩尔数,6.850。

1.2.1.3 二次酶解 为了使粗蛋白酶解的更完全,本研究采用两次酶解的方法。第一次酶解的酶渣烘干后重复第一次酶解的过程。将两次酶解产物进行混合,计算整个酶解过程的酶解得率。

### 1.2.2 蛋黄肽的基本性质测定

1.2.2.1 基本成分测定 灰分:按照国标 GB/T 5009.4-2010 中的方法测定<sup>[7]</sup>;蛋白质:采用国标 GB/T5009.5-2010 中的凯氏定氮法<sup>[8]</sup>;磷元素:采用钼蓝比色法<sup>[9]</sup>。

1.2.2.2 蛋黄肽在不同 pH 下的溶解度 分别称取粗蛋白和蛋黄肽,配成浓度为 1% 的悬浮液或溶液,用 10% 盐酸和 4% 氢氧化钠分别调 pH 至 2~10,室温下振摇 10min,使其溶解。2000r/min 离心 5min 取上清。用 Folin-酚法<sup>[10]</sup>测定可溶性蛋白,计算溶解度,公式如式 2:

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{可溶性蛋白}}{\text{粗蛋白}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.2.3 蛋黄肽的热稳定性 分别称取粗蛋白,蛋黄肽和 CPP,配成浓度为 1% 的悬浮液或溶液,于 100℃水浴锅中加热 30min,测定加热前后 420nm 波长下的

吸光度值。以吸光度值的变化作为衡量溶液热稳定性的指标。

### 1.2.3 蛋黄肽的体外活性实验

1.2.3.1 阻止磷酸钙沉淀的定性实验 参考文献[11],采用 pH-Stat 法检测样品对磷酸钙沉淀的抑制效果。测定方法如下:取 0、0.1、0.2g/L 的蛋黄肽溶液,0.1g/L 的粗蛋白溶液和 0.1g/L 的 CPP 溶液,分别加入适量的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$ ,使  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  的浓度均为 0.008mol/L。立即用 0.1mol/L NaOH 溶液调节反应液的 pH 至 7.2,并不断滴加 0.1mol/L NaOH 溶液使 pH 保持在 7.2。记录不同时刻 NaOH 溶液的消耗量,并以时间为横坐标,NaOH 溶液消耗量为纵坐标作图。

1.2.3.2 DPPH 自由基清除实验 参考文献[12],分别称取一定量的粗蛋白,蛋黄肽和 CPP,配制成浓度为 1.0mg/mL 的溶液。取该溶液 200 $\mu\text{L}$ ,加入甲醇 600 $\mu\text{L}$ ,0.15mmol/L 的 DPPH 溶液 200 $\mu\text{L}$ ,混匀 2min,室温条件下避光静置,测定不同时间 517nm 波长处的吸光度值,同时做空白对照实验,实验过程同上。代入清除率计算式 3,计算清除率:

$$\text{清除率}(\text{RS}, \text{A}\%) = \left[ \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{空}}} \right] \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.3.3 金属铁离子螯合能力实验 参考文献[12],分别称取一定量的粗蛋白,蛋黄肽和 CPP,配制成浓度为 1.0、2.0mg/mL 的溶液。取该溶液 200 $\mu\text{L}$ ,加入 2mmol/L 氯化亚铁溶液 10 $\mu\text{L}$ ,超纯水 600 $\mu\text{L}$ ,5mmol/L Ferrozine 溶液 20 $\mu\text{L}$ ,摇匀 2min,室温下静置 10min,测定 562nm 波长处的吸光度值。同时做空白对照和 EDTA 阳性对照实验,实验过程同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶解工艺研究

由图 1 可以看出,两次酶解的酶解曲线形状基本相同。在 2h 内水解率增长迅速,随后 3h 内继续增长但速率明显减缓。对比两次酶解过程水解度的变化情况,说明第二次酶解过程中水解度依旧较高,尤其是在反应初始的 1h 内,甚至超过第一次酶解过程的水解度。通过测定酶解后上清液中的固形物含量得出,第二次水解上清液的固形物含量为 3.5%,与第一次水解上清液的 3.9% 几乎相同,说明二次酶水解对提高产物的得率具有重要的贡献。因此,从减低成本和充分利用资源的角度,本实验优化得蛋黄肽的制备工艺为:二次酶水解,水解时间 3h。脱脂率为 61.4%,酶解得率为 41.0%。

### 2.2 蛋黄肽的基本性质测定

2.2.1 样品的灰分与蛋白质含量 由表 1 可以看出,与粗蛋白相比,蛋黄肽的灰分含量有小幅增加,这是因为在酶解过程中为了使 pH 保持在最佳酶活范围内,需要不断添加碱造成的。虽然目前我国对以蛋黄为原料的多肽产品还没有标准出台,但是依据成分类似的大豆肽粉 GB/T22492-2008<sup>[13]</sup>中的规定,灰分在 8% 以内,符合标准。蛋黄肽的蛋白含量为 86.20%,依照大豆肽粉 GB/T22492-2008<sup>[14]</sup>中的规定,粗蛋白含量在 85% 以上,属于二级质量标准。

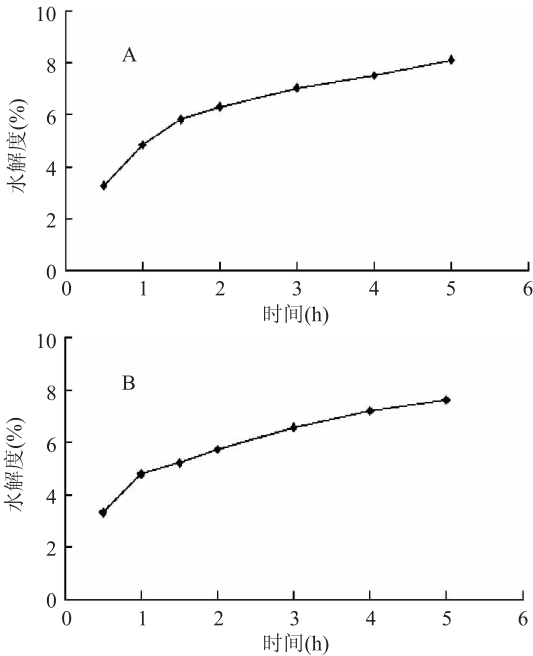


图1 酶解过程中水解度的变化曲线

Fig.1 Changes of hydrolysis degree with a function of reaction time

注:A 第一次酶解过程;B 第二次酶解过程。

表1 样品的蛋白质和灰分含量测定结果

Table 1 Determination of protein and ash content in the samples

| 样品名称          | 粗蛋白    | 蛋黄肽    |
|---------------|--------|--------|
| 含氮量(g/100g)   | 12.816 | 13.792 |
| 总蛋白含量(g/100g) | 80.10  | 86.20  |
| 灰分含量(%)       | 4.49   | 7.32   |

2.2.2 样品的磷含量 由表2得出,尽管2.1表明第二次酶解与第一次酶解的水解度相差无几,但是所得的蛋黄肽的磷含量却有大幅的降低,大量的磷被留在了酶渣中。磷含量减少而氮含量未明显降低意味着N/P(摩尔比)比值升高。有研究表明<sup>[15]</sup>,N/P(摩尔比)越低,阻止磷酸钙沉淀效果越好。因此,本实验对两次水解所得产物的体外活性进行了测定。

表2 样品的磷含量测定结果

Table 2 Determination of phosphorus content in the samples

| 样品名称 | 粗蛋白  | 一次酶解<br>蛋黄肽 | 二次酶解<br>蛋黄肽 | 二次酶解<br>后残渣 |
|------|------|-------------|-------------|-------------|
| 磷(%) | 0.98 | 0.55        | 0.11        | 0.61        |

2.2.3 溶解度 能否在宽的pH范围内都有较好的溶解能力是产品的重要性质。由图2可以看出,酶解后粗蛋白的溶解度有了较大程度的提高。对于粗蛋白,溶液pH在2~10范围内,其溶解度分别处于5%~40%。对于蛋黄肽,溶液pH在2~10范围内,其溶解度均高于40%。溶解度的增大归因于,蛋白经过水解后亲水性的离子化氨基和羟基的暴露。相比较而言,酶解的蛋黄肽的溶解度随pH的变化更为明显。pH=4时,溶解度最低(50%),此pH环境接近蛋黄肽的等电点。随着pH的升高,其溶解度最高可

达到90%以上,推测在较低pH时小肽之间容易聚合或生成小聚合物<sup>[14]</sup>。

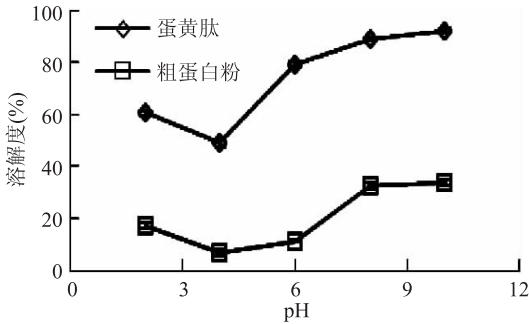


图2 pH对溶解度的影响

Fig.2 Changes of solubility with a function of pH

2.2.4 热稳定性 产品是否具有较好的热稳定性,关系到该产品在生产、加工、运输、贮藏过程中的多项技术指标。由图3得出,在25℃和100℃条件下,酶解后的蛋黄肽产品较粗蛋白的热稳定性均显著增加( $p < 0.05$ )。100℃条件下,CPP与蛋黄肽产品的热稳定性差异不显著。所以在该产品的加工过程中,可以进行有效的灭菌处理,而不必担心产品性质的变化。

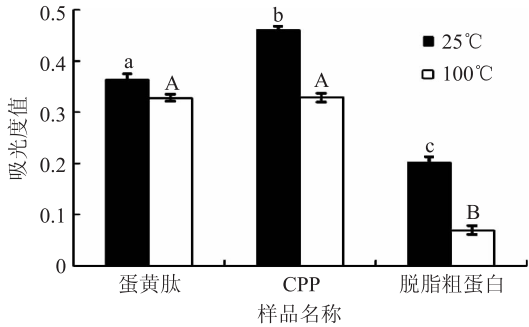


图3 不同产品的稳定性测定结果

Fig.3 Thermal stability determination of different samples

注: $p < 0.05$ ,差异显著。用A、B、C、a、b、c表示,图5、图6同。

2.3 产品功能体外研究实验

2.3.1 阻止磷酸钙沉淀的定性实验 由图4得出,空白组和添加粗蛋白组,NaOH滴定量在15min之内迅速上升到8mL,归因于 $\text{Ca}^{2+}$ 与 $\text{PO}_4^{3-}$ 形成 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 沉淀,说明粗蛋白不能阻止磷酸钙沉淀的发生。而添加CPP组和添加蛋黄肽组,NaOH滴定量的突变时间变成了10~30min。说明添加CPP和蛋黄肽可以有效延迟 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 沉淀的发生。 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 沉淀生成的时间越迟,说明该样品的持钙能力越强。当添加蛋黄肽的浓度达到0.2g/L时, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 最终沉淀量仅为空白样品的1/3。

2.3.2 抗氧化性研究 由图5得出,蛋黄肽的DPPH自由基清除率显著高于粗蛋白和CPP的DPPH自由基清除率。随着反应时间的延长,蛋黄肽和CPP的DPPH自由基清除率均不断增加。CPP的最高清除率仅为7%,不足蛋黄肽清除率的一半,而粗蛋白几乎没有DPPH自由基清除能力。

与 $\text{Fe}^{2+}$ 的螯合能力是一种有效的评价物质抗氧化活性的方法<sup>[16]</sup>。 $\text{Fe}^{2+}$ 由于具有很强的吸电子能

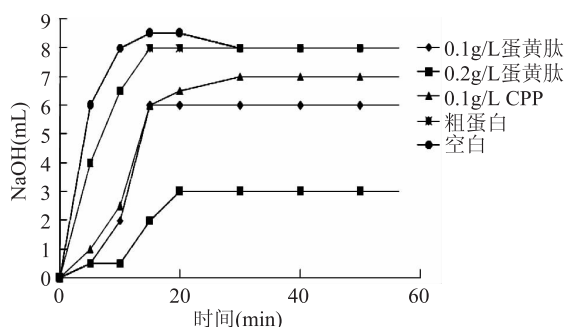


图4 不同样品阻止磷酸钙沉淀效果测定结果

Fig.4 Determination of calcium phosphate precipitation with the addition of different samples

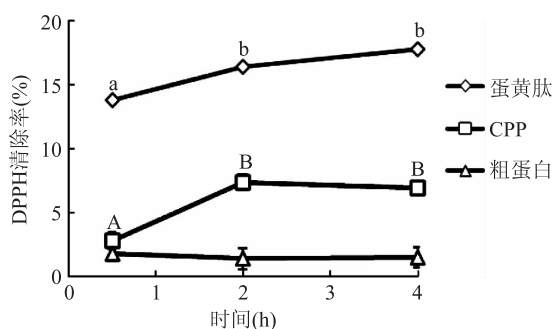


图5 样品的DPPH清除率测定结果

Fig.5 Determination of DPPH-scavenging abilities of different samples

力,能够诱导自由基反应的产生和传播。Ferrozine试剂能与 $\text{Fe}^{2+}$ 反应产生红色的复合物,因此可以通过测定反应液的吸光度值来计算其 $\text{Fe}^{2+}$ 螯合能力<sup>[17]</sup>。结果如图6,粗蛋白几乎没有亚铁离子螯合能力,而CPP和蛋黄肽产品都有明显的亚铁离子螯合能力。无论是在1mg/mL还是2mg/mL浓度下,蛋黄肽产品都较CPP在亚铁离子螯合能力方面有显著提高。

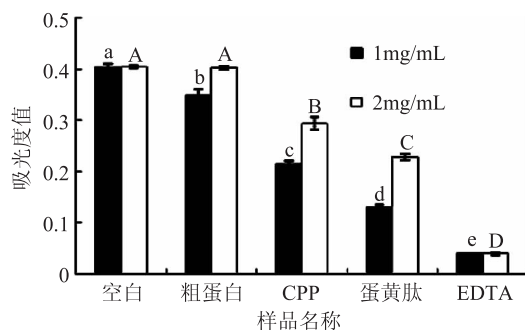


图6 样品的亚铁离子螯合能力测定结果

Fig.6 Determination of  $\text{Fe}^{2+}$ -chelating abilities of different samples

上述实验结果表明,本实验所得蛋黄肽产品具有良好的体外抗氧化性,具有开发抗氧化产品的潜在价值。

### 3 结论

本实验采用 Alcalase 2.4L 两次酶解经乙醇-正

己烷脱脂后的粗蛋白可以获得高品质蛋黄肽产品:得率为41%;蛋白含量大于85%,灰分低于8%;在较宽的pH范围内有较好的溶解性;热稳定性良好,可以进行有效的热灭菌处理。体外活性实验表明,蛋黄肽产品可以有效延缓和抑制磷酸钙沉淀的发生,具有较好的DPPH自由基清除能力和亚铁离子螯合能力,抗氧化性良好。本实验的工艺简单,可以高效制备高品质蛋黄肽,对蛋黄粉的有效利用和其加工制品的开发应用具有重要的应用价值。

### 参考文献

- [1] McCann KB, Shiell BJ, Michalski WP, *et al.* Isolation and characterization of antibacterial peptides derived from the f(164-207) region of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein[J]. International Dairy Journal, 2005, 15: 113-143.
- [2] Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality[J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 549-560.
- [3] 徐彩娜,殷涌光,王二雷,等.卵黄高磷蛋白及其磷酸肽的研究进展[J].食品工业科技,2010,31(9):428-451.
- [4] 徐彩娜,林松毅,刘静波,等.双酶分步水解制备卵黄高磷蛋白磷酸肽的实验研究[J].食品科技,2008,11:6-10.
- [5] 张维农,刘大川,胡小泓.正己烷-含水乙醇混合溶剂制取大豆浓缩蛋白工艺的研究[J].中国油脂,2002,04:42-44.
- [6] Nissen JA. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins[M]. Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 132-152.
- [7] GB/T 5009.4-2010 食品中灰分的测定[S].
- [8] GB/T 5009.5-2010 食品中蛋白质的测定[S].
- [9] 马文,赵亮,谢复新,等.钼蓝法测定玉米浆中磷含量[J].安徽大学学报,1996,01:31-33.
- [10] 蔡武城,袁厚积.生物物质常用化学分析法[M].北京:科学出版社,1982,93.
- [11] 刘小丽.卵黄高磷蛋白及其磷酸肽的制备和研究[D].西安:西北大学,2003.
- [12] Mina MY, Ahmad A, Jamshid Khan C. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolyzates[J]. Journal of Functional Food, 2012(4): 278-286.
- [13] GB/T 22492-2008 大豆肽粉[S].
- [14] 陈历俊.大豆活性肽的研制与应用[D].哈尔滨:东北农业大学,1998.
- [15] Li Y, Tome D, Desjeux JF. Indirect effect of casein phosphopeptides on calcium absorption in rat ileum *in vitro*[J]. Reproduction, Nutrition, Development, 1989, 29: 227-233.
- [16] Hsu CL, Chen WL, Weng YM, *et al.* Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods[J]. Food Chemistry, 2003, 83: 85-92.
- [17] Ishikawa S, Yano Y, Arihara K, *et al.* Egg yolk phosphatidylcholine inhibits hydroxyl radical formation from the Fenton reaction[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004, 68: 1324-1331.