

# 酶法及美拉德反应改进鸡肉蛋白功能性质的研究

符笏茵, 白卫东, 刘曜儒, 王琴

(仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510000)

**摘要:** 利用不同单酶酶解鸡胸肉, 制得的酶解液和木糖进行美拉德反应, 考察不同酶解方式制得的底物对美拉德反应产物的各检测指标(肽、氨基酸、糖等反应底物含量和美拉德产物含量及其抗氧化性能力)影响, 并分析各检测指标间的相关性。实验表明: 酶解程度对美拉德反应产物特性有显著性影响, 酶解作用所得的肽具有更强的美拉德反应活性, 酶解程度越大的酶解液, 消耗糖量越多, 生成的MRPs越多, 其MRPs抗氧化活性越强, 同一反应起始浓度, 8 h与2 h酶解液的MRPs抗氧化能力相比, FRAP还原能力与DPPH·清除能力增强倍数高达2倍和7倍; 美拉德反应能明显改善酶解液的性质, 可溶性肽的含量最高增加了2倍, 可溶性氨基酸最高增加了1倍, 抗氧化能力最高增强了40倍; 从检测指标的相关性可知, 糖的消耗量变化一定程度上能反应美拉德反应的程度, 美拉德反应能促进肽的分解生成氨基酸。

**关键词:** 酶解; 肽; 美拉德反应; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2016)9-186-195

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.028

## Improving the Functional Properties of Chicken Protein in Maillard Reaction by Hydrolysis

FU Jia-yin, BAI Wei-dong, LIU Yao-ru, WANG Qin

(Zhongkai University of Agriculture and Technology College of Food Science and Technology, Guangzhou 510000, China)

**Abstract:** Various enzymes were used to hydrolyze chicken breast meat to produce enzymatic hydrolysates and xylose for Maillard reaction. The effect of the substrates obtained from different enzymatic hydrolysis methods on the Maillard reaction products (MRPs) (content of peptides, amino acids, sugars, and other reaction substrates, as well as content and antioxidant capacity of MRPs) were investigated and the correlation among all measured indicators were analyzed. The results indicated that the degree of hydrolysis (DH) significantly affected the properties of MRPs and the peptides produced by enzymatic hydrolysis showed higher reactivity for Maillard reaction. The hydrolysate with higher DH showed greater sugar consumption and increased MRP content, with higher antioxidant capacity. With the same initial concentration, ferric-reducing/antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) scavenging ability of the MRPS from eight-hour hydrolysate were twice and seven times higher than those of the MRPS from two-hour hydrolysate. The properties of enzymatic hydrolysates were significantly improved by the Maillard reaction, with two-fold maximum increase in soluble peptide content, one-fold maximum increase in soluble amino acid concentration, and 40-fold maximum increase in antioxidant capacity. Based on the correlation between the measured indices, sugar consumption reflects the extent of Maillard reaction to a certain degree, which in turn, improves the decomposition of peptides to generate amino acids.

**Key words:** enzymatic hydrolysis; chicken peptide; Maillard reaction; antioxidant capacity

美拉德反应(Maillard reaction)于1921年被提出, 直到1953年, Hodge和Risr<sup>[1]</sup>发现MRPs具有抗氧化性, 能够抑制植物油的氧化, 减缓腐败速率, 但其后的二三十年, 人们较关注美拉德反应带来的风味效果。直到同世纪80年代, 人工抗氧化剂被指出具有安全隐

收稿日期: 2015-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(A1131405)

作者简介: 符笏茵(1989-), 女, 硕士, 研究方向: 农产品贮藏及加工工程

通讯作者: 王琴(1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学与加工

患后, 科学家们开始重点关注美拉德产物的抗氧化性功能。Lingnert<sup>[2]</sup>发现, 美拉德反应可大大提高氨基化合物的抗氧化活性, 其抗氧化性甚至能与食品中常用的抗氧化添加剂(BHA和BHT)媲美<sup>[3]</sup>, 该发现掀起了学者们的对美拉德产物的抗氧化性研究的热潮。乔路<sup>[4]</sup>等研究发现, 鲍鱼脏器肽经过美拉德反应后, 其DPPH·清除活性增强百倍, 羟自由基清除活性及还原活性增强数十倍; 赵谋明<sup>[5,6]</sup>等研究发现, 草鱼肽与木糖, 大豆粕酶解产物等经过美拉德反应后, 其还原力、

自由基清除能力明显增强。

第二, 尽管我国鸡肉加工产业已达到大规模生产水平, 但鸡肉的深加工技术产品少, 加工手段较简单。且近年来寻找天然无毒的抗氧化剂已成为食品科学领域研究的热点之一, 另外, 蛋白质在受热中的不稳定性也一直是加工中的研究难点, 因此对鸡肉蛋白进行美拉德反应研究, 一方面为制备新型天然抗氧化剂提供参考, 另一方面为寻找改善蛋白的稳定性的方法提供可能性参考。

本文利用不同酶酶解所得的鸡肉酶解液与木糖的进行美拉德反应, 着重系统地研究酶解时间对美拉德产物抗氧化性的影响, 及美拉德反应对蛋白肽、氨基酸的溶解性影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

鸡胸肉: 购自佛山市南海区宏辉冷冻食品加工厂, 所用的鸡胸肉均属同一批次; 复合蛋白酶(Protamex)、碱性蛋白酶(Alcalase)、胰蛋白酶(Trypsin): 购于诺维信公司; OPA 衍生剂: Agilent Technologies; D-木糖(D-xylose, 缩写为 xyl): 阿拉丁试剂; Trolox、TPTZ、DPPH·、牛血清蛋白(BSA)、3,5-二硝基水杨酸、TNBS: 阿拉丁试剂; 甲醇、乙腈, 购买于 Sigma 公司; BCA 试剂盒: 北京博奥森生物技术有限公司; 醋酸钠、FeCl<sub>3</sub>、盐酸、苯酚、NaOH、亚硫酸钠、酒石酸钾钠、亚硫酸二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等, 以及其它试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器与设备

B-260 恒温水浴锅: 上海亚荣生化仪器厂; LXJ-IIB 离心机: 上海安亭科学仪器厂; KDN-103F 凯氏定氮仪: 上海纤检仪器有限公司; RE52CS-1 旋转蒸发仪: 上海亚荣生化仪器厂; HYP-304 消化炉: 上海纤检仪器有限公司; FA 1004 电子天平: 北京赛多利斯仪器系统有限公司; TECAN SUNRISE 酶标仪: 瑞士帝肯 Tecan 公司; THZ-8ZJ PH 计: 上海精科; UV 759 紫外-可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司; 1260 HPLC 高效液相色谱仪: Agilent; HH-Y6 数显恒温油浴锅: 金坛市天竞实验仪。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 鸡肉的基本成分测定

(1) 水分含量测定: 采用直接干燥法, 参照 GB/T 9695.15-2008;

鸡肉健康美味、营养丰富, 在我国肉类消费中排

(2) 灰分测定: 高温灼烧法, 参照 GB/T 9695.18-2008;

(3) 脂肪含量测定: 采用索氏抽提法, 参照 GB 9695.7-2008;

(4) 蛋白质含量测定: 采用凯氏定氮法, 参照 GB 9695.11-2008。

#### 1.3.2 肽氮率的测定

肽氮率的测定方法如式 1 所示, 式中酶解液肽含量为酶解液的上清溶液中的可溶性肽的氮含量, 原料总氮量即为鸡肉完全水解后的氮含量。酶解液的可溶性肽的氮含量用凯氏定氮法测定。

$$\text{肽氮率}(\%) = \frac{\text{酶解液肽氮量}}{\text{原料总氮量}} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.3.3 酶解液中游离的氨基酸组成测定

氨基酸检测条件: 美国安捷伦高效液相色谱仪, ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18 色谱柱, 用 OPA 衍生剂氨基酸方法测定柱温为 40 °C, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 340 nm。

洗脱液的盐溶液 A 为 0.04 mol/L 磷酸二氢钠, 用磷酸或 NaOH 调整 pH 为 7.8, 有机相 B 为 9:9:2 的甲醇、乙腈和水, 梯度洗脱条件: 0~1.9 min, 100% A; 1.9~18.1 min, 100% B; 18.1~20.6 min, 100% B; 20.6~23.5 min, 100% A, 24.2~26 min, 100% B。

#### 1.3.4 美拉德反应工艺

取同一批次的鸡胸肉解冻后, 去除明显的筋腱和脂肪, 搅碎后, 准确称取 40 g 肉糜至 500 mL 锥形瓶中, 加入 120 g 超纯水, 用 2 mol/L 氢氧化钠溶液或盐酸溶液调至 pH 为 7.0, 搅拌均匀后分别加入蛋白酶 0.08 g, 拌均, 水浴振荡, 温度为 55 °C, 转速为 180 r/min, PP、AP 和 TP 表示为鸡胸肉经过复合蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶, 酶解后所得的鸡肉酶解液。反应至终点时于 100 °C 条件下水浴加热 15 min, 再冷却至 4 °C, 4800 r/min 离心 20 min, 所得上清液进行两层滤纸过滤, 滤去肉渣、大分子蛋白、脂肪等, 得到澄清的鸡肉蛋白液。用超纯水调至蛋白质浓度为 45 mg/mL, 按 1:3 的蛋白质与木糖质量比添加木糖, 充分摇匀, 采用冷凝回流法, 于 120 °C 油浴加热, 反应时间分别为 30 min、50 min、70 min、90 min、160 min 和 240 min, 同时做热反应对比(即不加木糖进行热反应), 反应结束后, 立刻置于 0 °C 冰水冷却, 并贮藏于 -18 °C 备用, 所有检测指标在 3 d 内完成。

#### 1.3.5 游离氨基酸含量测定

采用 TBNS 法<sup>[7]</sup>, 将样品稀释 1 倍后, 准确移取 30 μL 稀释液于 EP 管中, 依次加入 0.2 mL pH 为 8.2

的磷酸缓冲液和 0.1 mL 0.01 TBNS 溶液, 50 °C 加热 30 min 后加入 0.1 M 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 0.2 mL, 摇匀, 30 min 测 420 nm 处 OD 值。结果以 L-亮氨酸等价吸光值的含量表示。

### 1.3.6 肽含量测定

用 BCA 法测定肽含量, 测定前采用三氯乙酸沉淀法去除蛋白质<sup>[8]</sup>。准确移取 2.5 mL 样液于 20 ml 离心管, 加入 2.5 mL 三氯乙酸 (10% *m/V*), 摇匀, 静置 10 min, 4000 r/min 离心 15 min, 所得白色沉淀物为蛋白质, 上清液为肽, 取上清液 0.6 mL, 稀释至 10 mL, 备用测定。

反应体系: 在 96 孔酶标板中, 依次顺序加入 20 μL 稀释液, 160 μL BCA 工作液 (现配现用)。酶标仪测定条件为: 562 nm, 37 °C 反应 30 min, 振荡 20 s。以结果以 BSA 等价吸光值的含量表示。

### 1.3.7 剩糖量测定

采用 DNS 法<sup>[9]</sup>测定酶解液中糖的含量, 先将样品稀释 33.3 倍, 移取 0.3 mL 稀释液和 0.9 mL DNS 工作液混合沸水加热 5 min 后, 立即冷却, 测定波长为 540 nm 条件下的吸光值, 结果以木糖等价吸光值的含量表示。

### 1.3.8 褐色产物 (A<sub>420 nm</sub>) 和中间产物 (A<sub>294 nm</sub>) 的测定

A<sub>420 nm</sub>: 将被测 MRP 样品稀释 10 倍, 置于 420 nm 处测定吸光值。

A<sub>294 nm</sub>: 将 MRP 样品稀释 100 倍, 置于 294 nm 处测定吸光值。

### 1.3.9 FRAP 还原能力的测定<sup>[10]</sup>

#### 1.3.9.1 FRAP 工作液的配制

(1) 缓冲液配制: 准确称取 0.31 g C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub> 定容于 100 ml, 用冰醋酸调 pH 至 3.6, 现配现用。

(2) TPTZ 溶液: 准确称取 0.15115 g TPTZ, 用浓度为 40 mmol/L 的盐酸溶液定容至 25 mL, TPTZ 浓度为 10 mmol/L, 现配现用。

(3) FeCl<sub>3</sub> 溶液配制: 准确称取 0.8125 g FeCl<sub>3</sub>, 定容至 250 ml, 浓度为 20 mmol/L, 现配现用。将以上三者按 10:1:1 比例混合即为 TPTZ 工作液, 该试剂现配现用。

#### 1.3.9.2 测定步骤与方法

测定前将 MRP 样品稀释 16.6 倍后移取 20 μL 稀释液与 96 孔板酶标板中, 先后加入新鲜配制的 TPTZ 工作液 150 μL, 和 20 μL 各浓度的 Trolox 溶液, 空白对照用超纯水代替, 置入恒温的酶标仪中, 振荡 1 min, 25 °C 条件下温育 10 min, 测定 593 nm 处的吸光值。样品需在热反应后的 24 h 内测定, FRAP 的还原能力

用 Trolox 的当量表示, FRAP 还原能力的计算公式为式 2:

$$\text{FRAP 还原能力} = A_i - A_0 - A_j \quad (2)$$

式中: A<sub>i</sub>, 加样后的吸光值; A<sub>0</sub>, 样品的吸光值, 水代替 TPTZ 溶液; A<sub>j</sub>, 无 TPTZ 溶液参与反应的吸光值, 水代替 TPTZ 溶液。

### 1.3.10 DPPH·清除能力的测定<sup>[11]</sup>

#### 1.3.10.1 试剂配制

准确称取 197.1 mg DPPH·, 用无水乙醇定容至 50 mL, 使用时用无水乙醇稀释 10 倍至浓度为 0.2 mM, 现配现用。

#### 1.3.10.2 检测方法

测定前稀释 MRP 样品 16.6 倍, 再准确移取 20 μL 稀释液于 96 孔板中, 再加入 160 μL 的 DPPH·试剂, DPPH·试剂与样品液的体积比为 3:1, 总体积为 180 μL, 置入恒温的酶标仪中, 振荡 1 min, 避光反应 30 min, 517 nm 下测定吸光值。DPPH·清除率计算公式为 (式 3)

$$\text{DPPH 清除率} = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

A<sub>0</sub>: 空白的吸光值, 即样品用水溶液代替; A<sub>i</sub>: 加样后 DPPH·溶液的吸光值; A<sub>j</sub>: 样品的吸光值, 即用水代替 DPPH·溶液。

#### 1.3.11 数据处理

采用 SPSS 软件对数据进行单因素方差分析及双侧相关性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 鸡胸肉的基本成分

表 1 鸡胸肉基本成分及组成

Table 1 Basic components and composition of chicken breast

| 鸡胸肉成分 | 水分         | 灰分        | 脂肪        | 蛋白质        |
|-------|------------|-----------|-----------|------------|
| 含量/%  | 72.50%±1.1 | 1.43%±0.3 | 0.73%±0.8 | 25.17%±1.2 |

鸡胸肉的基本成分如表 1 所示, 鸡胸肉的蛋白含量为 25.17%, 均比整只整鸡 (24%), 及鱼肉 (19.5%)、牛肉 (20.2%)、猪肉 (16.8%) 和羊肉 (11.2%) 等的蛋白质含量都高。鸡胸肉的脂肪含量为 0.73%, 也明显比整鸡 (7%)、猪肉 (28.8%)、牛肉 (10.2%)、鱼肉 (7.5%) 和羊肉 (28.7%) 低。鸡胸肉是高蛋白、低脂肪的健康肉类, 高蛋白含量适合用于水解获取蛋白肽, 低脂肪则降低了对美拉德反应试验的干扰。

### 2.2 各种酶的酶解效果

根据诺维信公司提供的肉类最佳酶解工艺对鸡

肉进行酶解, 酶解工艺: 酶解温度 55 °C, 酶解 pH 为 7, 酶添加量为 2%, 底物浓度 (占总质量比例) 为 1/3。

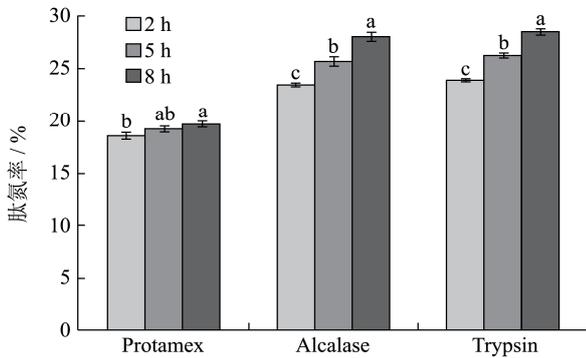


图 1 复合蛋白酶、碱性蛋白酶和胰蛋白酶酶解鸡肉的肽氮率  
Fig.1 Peptide nitrogen rates of chicken breast hydrolysates obtained by hydrolysis using Protamex, Alcalase, and Trypsin

由结果可知, 随着酶解时间延长, 各种酶的酶解液的肽氮率均显著增大 ( $p < 0.05$ ), 酶解效果明显, 酶解至 8 h 时, 肽氮率最高。

### 2.3 各种酶解液的游离氨基酸组成

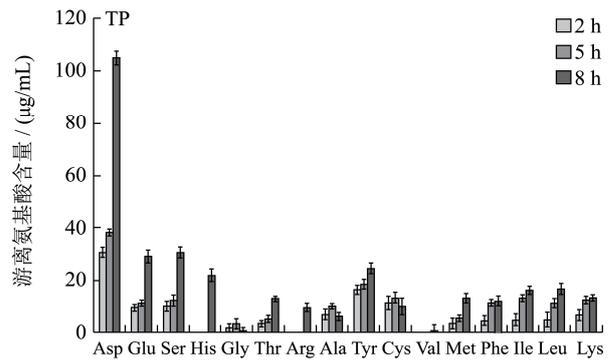
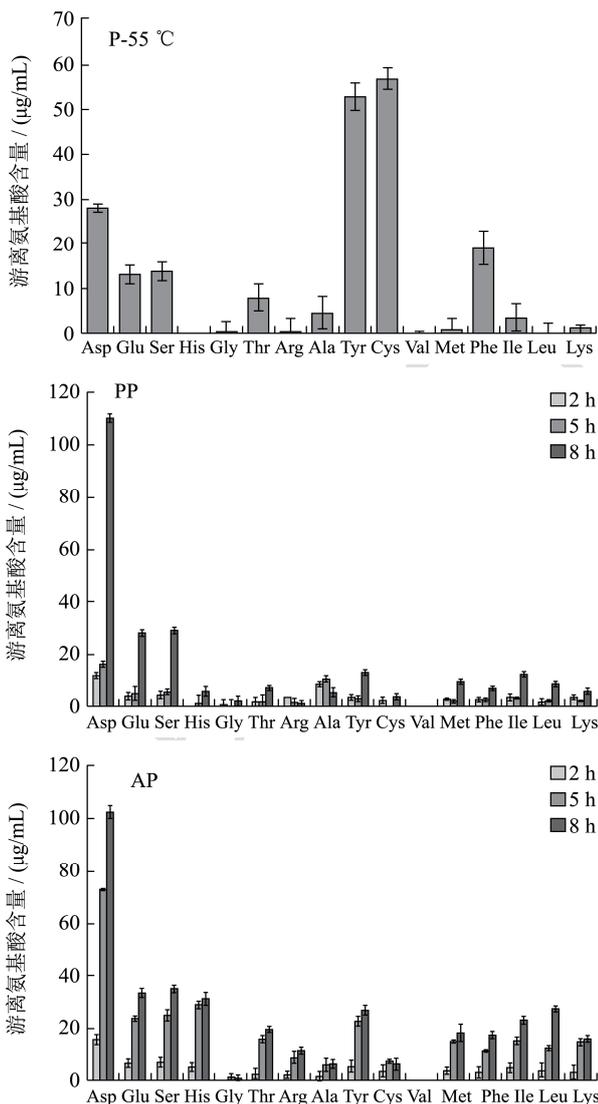


图 2 PP、AP 和 TP 各种酶解液游离氨基酸含量分别

Fig.2 Free amino acid content of PP, AP, and TP enzymatic hydrolysates with a reaction time of 2, 5, and 8 hours

注: P-55 °C 表示空白对比。

从图 2 可知, 鸡肉在 55 °C 条件下受热分解并释放氨基酸, 主要为 Asp、Glu、Ser、Thr、Cys 和 pHe, 其中含量较多的是 Tyr 和 Cys, 含量高达 52.42 µg/mL、及 56.48 µg/mL。

三种酶的鸡肉酶解液, 其氨基酸含量均随着酶解时间的延长而显著性 ( $p < 0.05$ ) 增加。

PP 的氨基酸中, Asp、Glu 和 Ser 含量最多, 分别高达 103.26 µg/mL、27.01 µg/mL 和 28.39 µg/mL, 其他种类的氨基酸生成量均在 18 µg/mL 以下。AP 酶解液中, 含量最多的有 Asp、Glu、Ser、His、Thr、Tyr、Met、pHe、Ile、Leu 和 Lys 等, 均达 20 µg/mL 以上, 其中 Asp 含量最多, 高达 100.96 µg/mL。TP 酶解液中, 含量较多的氨基酸主要有 Asp、Glu、Ser、His 和 Tyr 等, 均达 20 µg/mL 以上, 其中含量最多的是 Asp, 高达 100.965 µg/mL。

综上所述, 热反应和各种酶的酶解液中的氨基酸含量有相同的特点: 均都含有较高含量的 Asp、Glu、Ser 和 Tyr, 说明酶解伴随着的热反应所影响的。酶解后各种酶解液中的 Asp、Glu 和 Ser 的含量均大大增加, Asp 含量最多, 其次为 Glu、Ser, 说明酶解使这些氨基酸容易从鸡肉中释放出来。目前研究发现, 经过美拉德反应后具有抗氧化活性的氨基酸有 Ala、Lys、Gly、His、Cys、Arg、Asp 和 Tyr<sup>[12-14]</sup>等, 以测定的 16 种氨基酸作为总氨基酸时, 这些氨基酸在鸡肉热反应产物中占有 77.46%, 在各时间段 2 h、5 h 和 8 h 的不同酶解液中, PP 的分别为 63.23%、64.71%、70.57%, AP 的分别为 64.37%、66.37%和 62.65%, TP 的分别为 73.88%、65.25%和 68.88%。可见, 鸡肉水解物中的大部分氨基酸可生成具有抗氧化性的 MRPs, 在酶解过程中, 这些氨基酸含量无规律变化。

2.4 美拉德反应中肽的含量变化

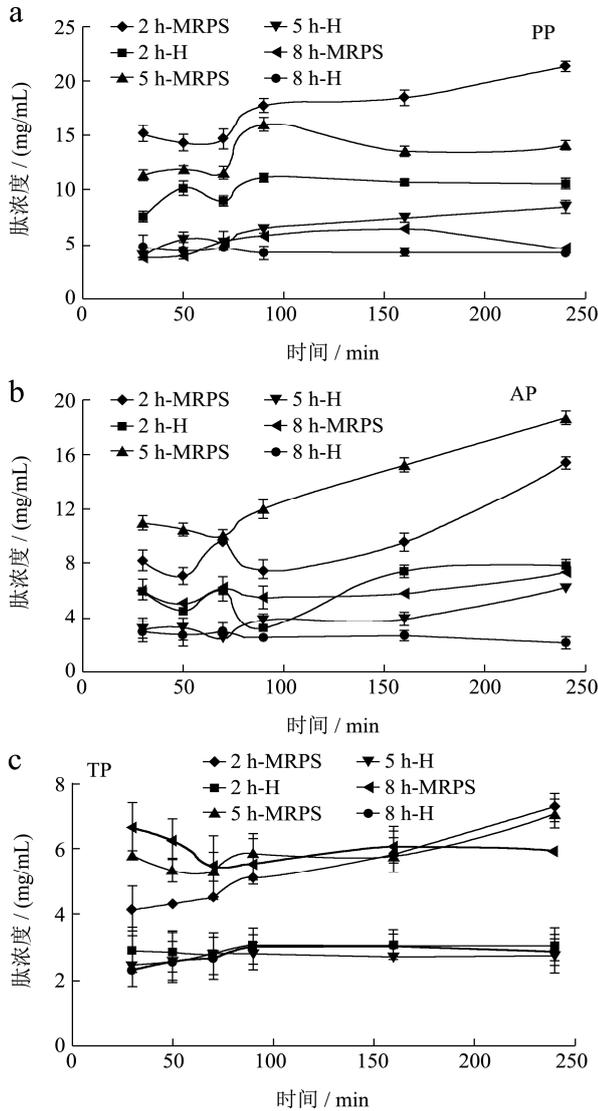


图3 PP、AP和TP酶解液的热反应产物及MRPs的肽含量

Fig.3 Peptide content of the thermal reaction products of PP, AP, and TP hydrolysates and MRPs

加热反应前，各酶解液的肽氮含量均调配至同一反应浓度，为45 mg/mL。加热后大部分肽容易受热变性而沉淀，肽含量均低于20 mg/mL。除了TP体系，酶解时间对热反应的肽含量有显著的反相关影响，说明酶解程度越大的肽热稳定性越差。

经过美拉德反应后，三种酶解液的MRPs肽含量最高可增加两倍，可能是因为美拉德反应能增强肽的溶解性或促进大分子肽的降解。酶解时间和加热时间有交互作用，不同酶解液的肽含量变化规律有差异，这可能与肽的结构有关。三种酶解液中，肽含量由高到低排序为：PP>AP>TP。

2.5 美拉德反应中游离氨基酸含量变化

2.5.1 PP体系中MRPs与热反应的氨基酸含量变化

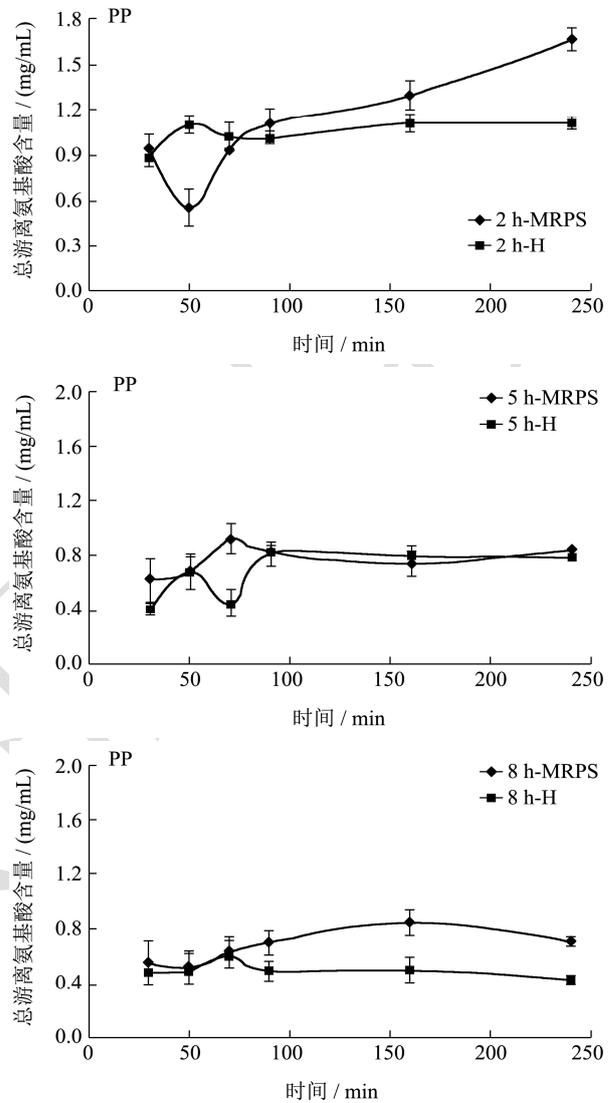
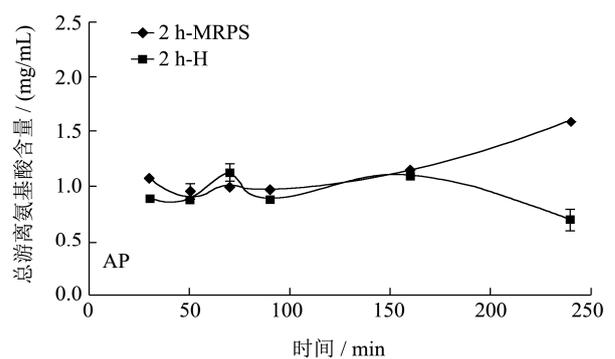


图4 PP的MRPs及热反应产物的游离氨基酸含量

Fig.4 Free amino acid content of the thermal reaction product and MRPs of PP hydrolysate

2.5.2 AP体系中MRPs与热反应的氨基酸含量变化



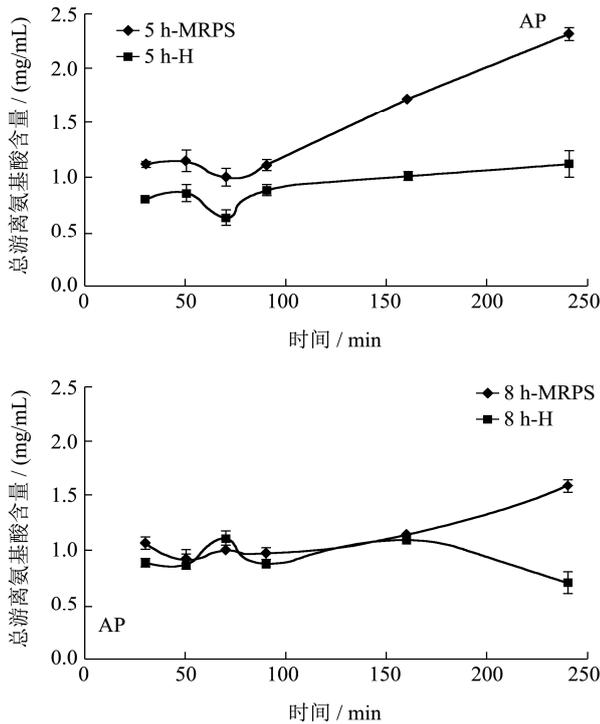


图5 AP的MRPs及热反应产物的游离氨基酸含量

Fig.5 Free amino acid content of thermal reaction product and MRPs of AP hydrolysate

2.5.3 TP 体系中 MRPs 与热反应的氨基酸含量变化

从图4、图5和图6的数据分析可知, PP、AP和TP在反应过程中,热反应中氨基酸含量主要受酶解时间影响,且加热时间是MRPs氨基酸含量增加的主要影响因素。在加热过程中,氨基酸含量增加或减少,说明氨基酸受热损失而减少的同时,肽受热分解生成氨基酸,但总体氨基酸的含量变化不明显。

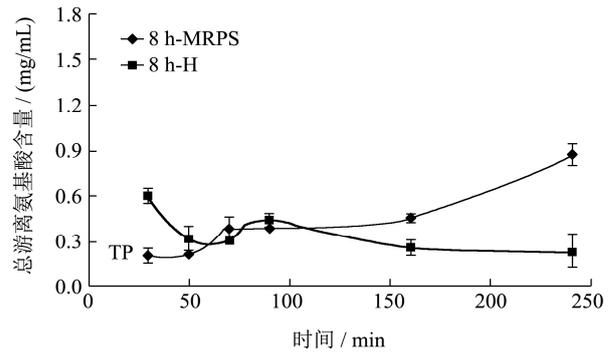
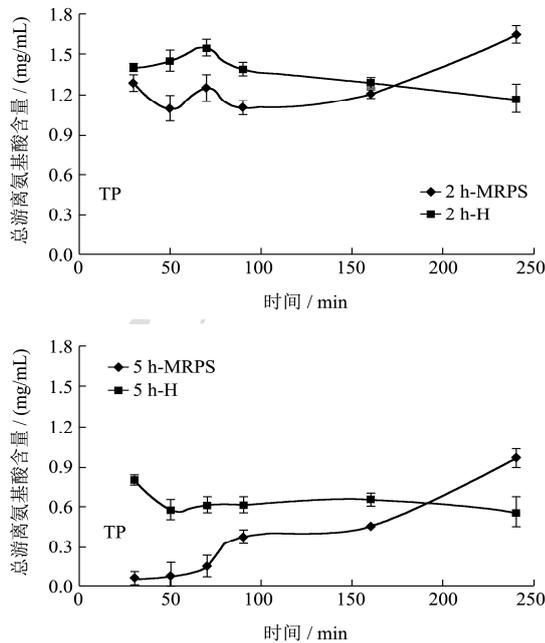


图6 TP的MRPs及热反应产物的游离氨基酸含量

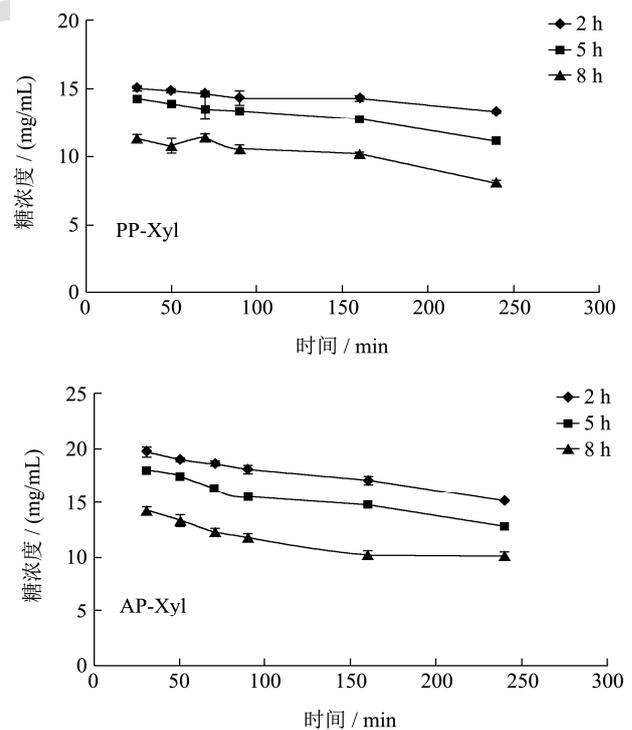
Fig.6 Free amino acid content of thermal reaction product and MRPs of TP hydrolysate

2.6 美拉德反应中糖含量的变化

糖是参与美拉德反应的重要底物,糖的消耗量一定程度上能反应美拉德的反应程度。

PP、AP、TP经过美拉德反应后,MRPs中剩下的糖含量的变化如图7所示,酶解时间对糖含量有显著反相关影响,加热时间对AP-MRPs中糖含量变化有显著正相关影响,对PP-MRPs和TP-MRPs有显著影响,但无相关关系,酶解时间是影响糖含量变化的主要影响因素,酶解时间和加热时间无交互作用。

反应至240 min的8h-MRPs的糖量最少,各酶解液8h-MRPs中剩下的糖量由低到高排序是:TP-MRPs=PP-MRPs>AP-MRPs。



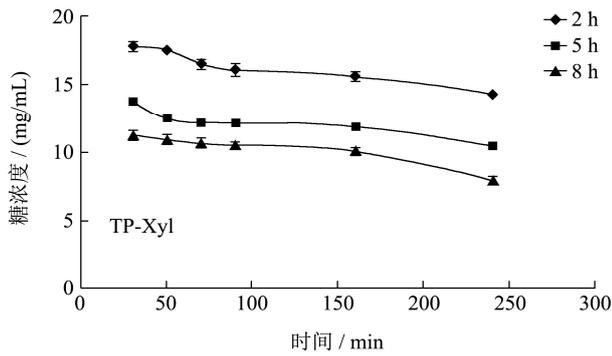


图7 PP、AP和TP的MRPs糖含量变化

Fig.7 Changes in the sugar content of MRPs of PP, AP and TP hydrolysates

2.7 褐色产物 ( $A_{420\text{ nm}}$ )和中间产物 ( $A_{294\text{ nm}}$ )

含量

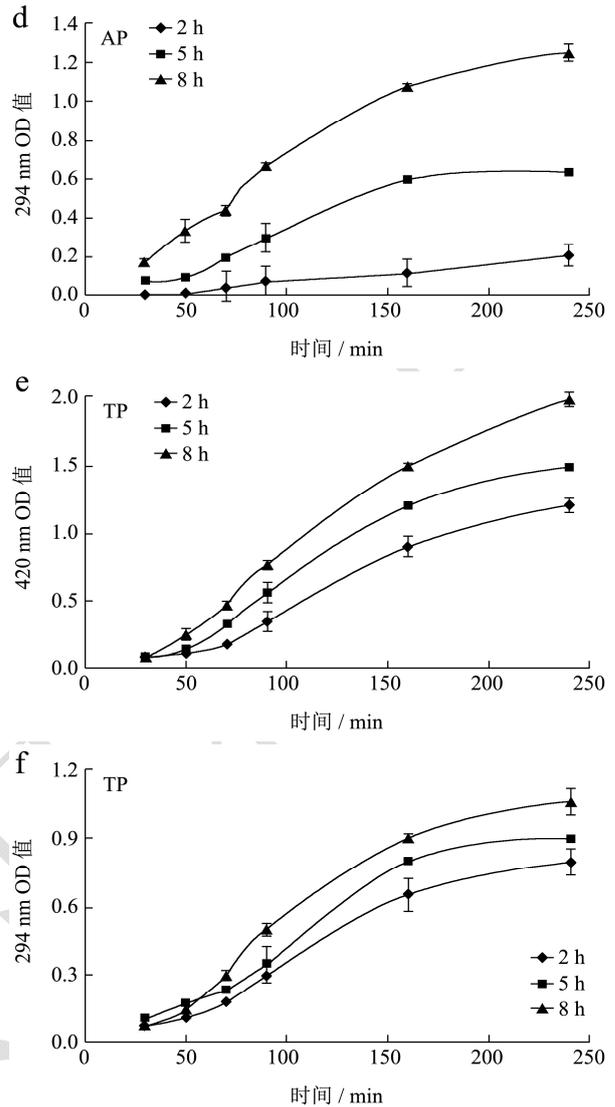
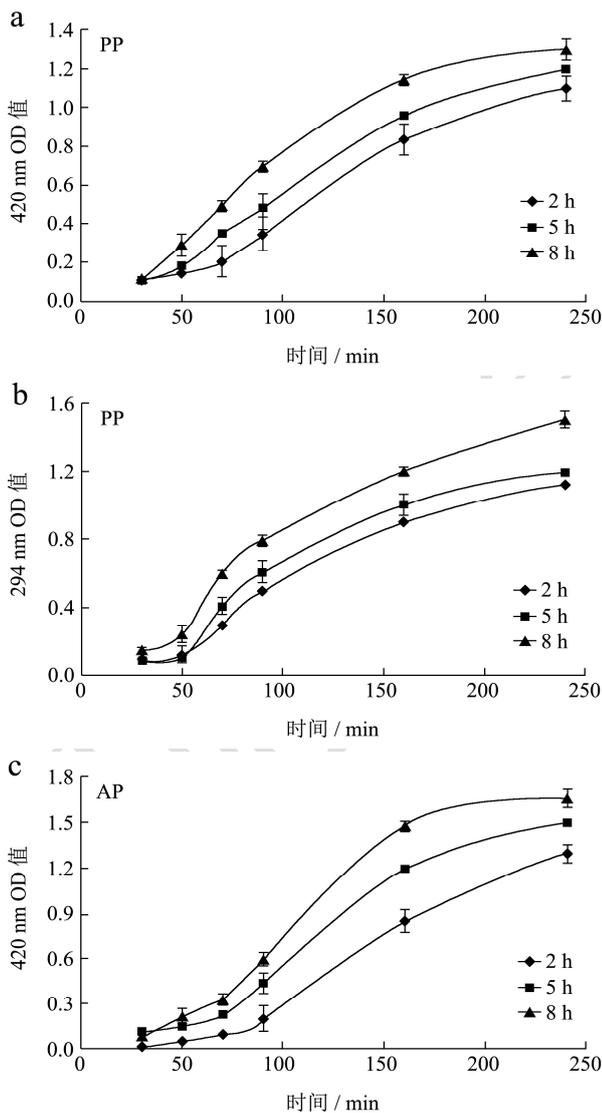


图8 PP、AP和TP的MRPs在420和294 nm处的吸光值

Fig.8 Absorbance values at 420 and 294 nm for MRPs of PP, AP and TP hydrolysates

注: a-f分别表示为PP、AP和TP的MRPs在420和294 nm处的吸光值OD。

酶解时间对各体系中的美拉德产物含量均有显著性影响, 酶解程度越大, 加热时间越长, 酶解液与木糖的美拉德反应程度越大, 消耗的糖量最多。420 nm最大吸光值排序: TP-MRPs>AP-MRPs>PP-MRPs, 吸光值分别为2.0、1.60、1.30和294 nm最大吸光值排序: PP-MRPs>AP-MRPs>TP-MRPs, 吸光值分别为1.50、1.25和1.10。

2.8 FRAP 还原能力与 DPPH·清除能力

FRAP 与 DPPH·法是目前使用最广泛的抗氧化能力测定方法之一, 且两者测定的结果具有较高相关性。因此采用这两种方法测定 MRPs 的抗氧化性, 并以此为指标筛选抗氧化效果最好的 MRPs。FRAP 还原能

力以国际公认抗氧化标准品 Trolox 的当量浓度表示。

### 2.8.1 PP 的 MRP<sub>s</sub> 抗氧化能力

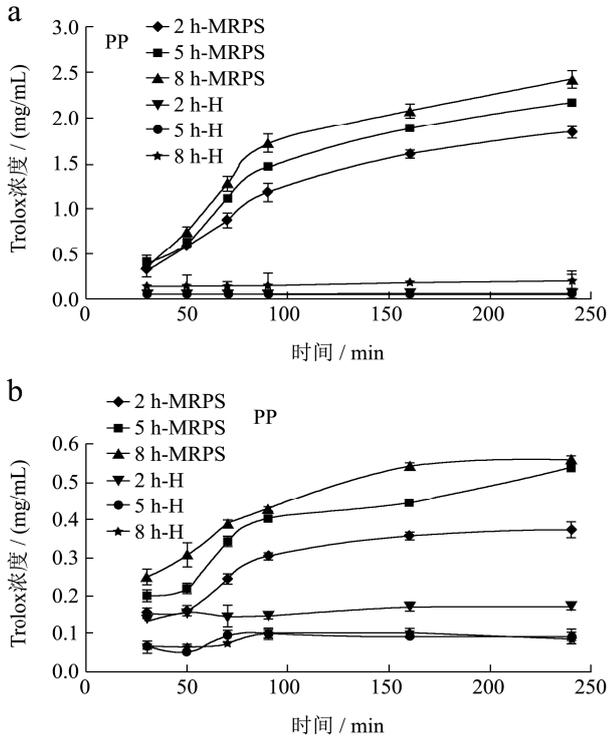


图9 PP 的 MRP<sub>s</sub> 与热反应产物的 FRAP 与 DPPH· 清除能力  
Fig.9 Antioxidant properties of MRP<sub>s</sub> of PP hydrolysate and FRAP value and DPPH· scavenging ability of thermal reaction product

注: a 和 b 分别表示为 PP 的 MRP<sub>s</sub> 的 FRAP 与 DPPH· 清除能力, 2h-MRP<sub>s</sub> 和 2h-H 分别表示为酶解 2 h 的酶解液的 MRP<sub>s</sub> 及其热反应产物, 5 h 和 8 h 以此类推。

由图 9 可知, 酶解时间对 PP-MRP<sub>s</sub> 的抗氧化能力增强程度均有显著影响, 对 DPPH· 清除能力增强有显著正相关影响, 且酶解时间为影响 DPPH· 增强程度的主要影响因素。经过美拉德反应后, PP 的 FRAP 还原力最高增强 10 倍以上, DPPH· 增强为 7 倍以上。

酶解程度越大和加热时间越长的 MRP<sub>s</sub> 的抗氧化活性越强, 即反应至 240 min 的 8h-MRP<sub>s</sub> 的抗氧化性最强, 还原能力相当于 2.42 mg/mL 的 Trolox, DPPH· 清除率为 0.56 mg/mL 的 Trolox 相当。

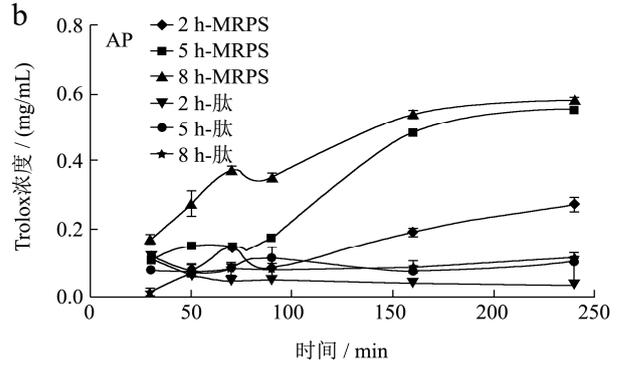
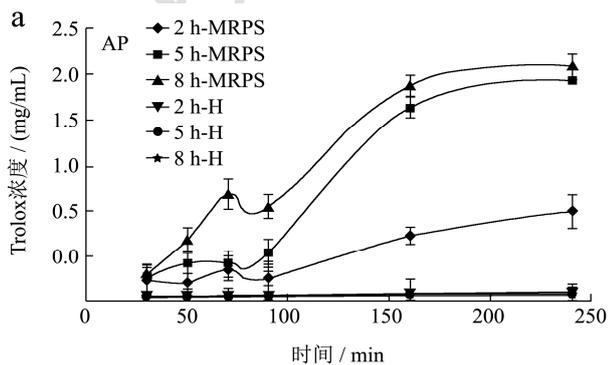


图10 AP 的 MRP<sub>s</sub> 与热反应产物的 FRAP 与 DPPH· 清除能力  
Fig.10 Antioxidant properties of MRP<sub>s</sub> of AP hydrolysate and FRAP value and DPPH· scavenging ability of thermal reaction product

注: a 和 b 分别表示为 AP 的 MRP<sub>s</sub> 的 FRAP 与 DPPH· 清除能力, 2h-MRP<sub>s</sub> 和 2h-H 分别表示为酶解 2 h 的酶解液的 MRP<sub>s</sub> 及其热反应产物, 5 h 和 8 h 以此类推。

### 2.8.2 AP 的 MRP<sub>s</sub> 抗氧化能力

由图 10 可知, 酶解时间对 AP-MRP<sub>s</sub> 的抗氧化性增强程度均有显著正相关影响, 且是影响 DPPH· 增强的主要影响因素。FRAP 还原力最高增强 26 倍以上, DPPH· 增强为 5 倍以上。反应至 240 min 的 8h-MRP<sub>s</sub> 的抗氧化性最强, 最强还原能力相当于 2.16 mg/mL 的 Trolox, DPPH· 清除率为 0.58 mg/mL 的 Trolox 相当。

### 2.8.3 TP 的 MRP<sub>s</sub> 抗氧化能力

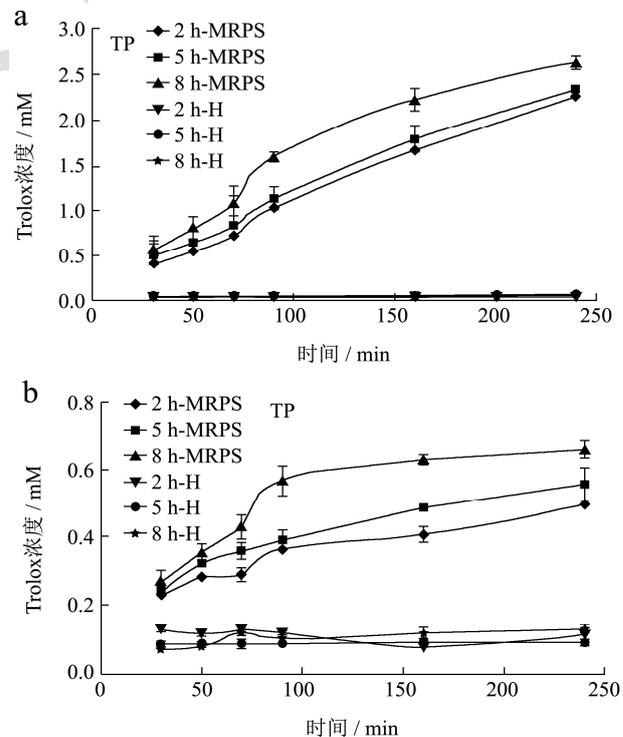


图11 TP 的 MRP<sub>s</sub> 与热反应产物的 FRAP 与 DPPH· 清除能力  
Fig.11 MRP<sub>s</sub> of TP hydrolysate and FRAP value and DPPH· scavenging ability of thermal reaction product

注: a 和 b 分别表示为 TP 的 MRPs 的 FRAP 与 DPPH·清除能力, 2h-MRPs 和 2h-H 分别表示为酶解 2 h 的酶解液的 MRPs, 及其热反应产物, 5 h 和 8 h 以此类推。

由图 11 可知, 酶解时间对 TP-MRPs 的抗氧化能力增强程度均有显著性影响, FRAP 还原力最高增强 40 倍以上, DPPH·增强为 5 倍以上。反应至 240 min 的 8h-MRPs 的抗氧化性最强, 还原能力相当于 2.62 mg/mL 的 Trolox, DPPH·清除率为 0.66 mg/mL 的

Trolox 相当。

综上所述, 酶解液在美拉德反应过程中, 酶解时间对其 MRPs 的 FRAP 还原能力和 DPPH·清除能力的增强程度均有显著性影响, 酶解时间越长的酶解液, 其 MRPs 抗氧化性越强, 经过美拉德反应后, 肽的抗氧化能力显著提高。

### 2.9 各指标的相关性分析

表 2 PP-MRPs 各指标相关性分析

Table 2 Correlation coefficients among different test indices of MRPs of PP hydrolysate

|           | 肽增加量    | 氨基酸增加量 | 剩糖量      | 最终产物    | 中间产物    | FRAP 增强程度 | DPPH·增强程度 |
|-----------|---------|--------|----------|---------|---------|-----------|-----------|
| 肽增加量      | 1       |        |          |         |         |           |           |
| 氨基酸增加量    | 0.078   | 1      |          |         |         |           |           |
| 剩糖量       | 0.712** | -0.409 | 1        |         |         |           |           |
| 最终产物      | -0.004  | 0.515* | -0.614** | 1       |         |           |           |
| 中间产物      | -0.069  | 0.477* | -0.665** | 0.984** | 1       |           |           |
| FRAP 增强程度 | 0.057   | 0.464  | -0.555*  | 0.962** | 0.945** | 1         |           |
| DPPH·增强程度 | -0.346  | 0.488* | -0.846** | 0.803** | 0.820** | 0.820**   | 1         |

表 3 AP-MRPs 各指标相关性分析

Table 3 Correlation coefficients among different test indices of MRPs of AP hydrolysate

|           | 肽增加量    | 氨基酸增加量  | 剩糖量      | 最终产物    | 中间产物    | FRAP 增强程度 | DPPH·增强程度 |
|-----------|---------|---------|----------|---------|---------|-----------|-----------|
| 肽增加量      | 1       |         |          |         |         |           |           |
| 氨基酸增加量    | 0.818** | 1       |          |         |         |           |           |
| 剩糖量       | -0.127  | -0.292  | 1        |         |         |           |           |
| 最终产物      | 0.468   | 0.630** | -0.686** | 1       |         |           |           |
| 中间产物      | 0.201   | 0.434   | -0.906** | 0.799** | 1       |           |           |
| FRAP 增强程度 | 0.449   | 0.626** | -0.791** | 0.918** | 0.913** | 1         |           |
| DPPH·增强程度 | 0.409   | 0.577*  | -0.701** | 0.980** | 0.783** | 0.874**   | 1         |

表 4 TP-MRPs 各指标相关性分析

Table 4 Correlation coefficients among different test indices of MRPs of TP hydrolysate

|           | 肽增加量     | 氨基酸增加量  | 剩糖量      | 最终产物    | 中间产物    | FRAP 增强程度 | DPPH·增强程度 |
|-----------|----------|---------|----------|---------|---------|-----------|-----------|
| 肽增加量      | 1        |         |          |         |         |           |           |
| 氨基酸增加量    | 0.306    | 1       |          |         |         |           |           |
| 剩糖量       | -0.622** | -0.418  | 1        |         |         |           |           |
| 最终产物      | 0.394    | 0.840** | -0.566*  | 1       |         |           |           |
| 中间产物      | 0.387    | 0.809** | -0.499*  | 0.990** | 1       |           |           |
| FRAP 增强程度 | 0.490*   | 0.758** | -0.746** | 0.876** | 0.849** | 1         |           |
| DPPH·增强程度 | 0.448    | 0.746** | -0.747** | 0.915** | 0.903** | 0.893**   | 1         |

注: 表 2、表 3 和表 4 中的“\*\*\*”表示为在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关; “\*\*”表示在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关。

由表 2、3 和 4 可知, PP、AP 和 TP 的 MRPs 中的糖含量、最终产物、中间产物、FRAP 和 DPPH·抗氧化能力间均具有显著相关关系, 说明美拉德反应是消耗糖量的过程, 美拉德产物累积得越多, 抗氧化性成分越多; PP 和 TP 的 MRPs 中, 肽增加量与剩糖量具有显著反相关关系, 而氨基酸变化量与糖含量无显

着相关关系; 氨基酸的增量基本上与各 MRPs 产物指标 (最终产物、中间产物、FRAP 和 DPPH·抗氧化能力) 有显著的正相关关系, 说明美拉德反应有利于促进肽分解生成氨基酸的生成。

### 3 结论

本文利用不同酶解液作为美拉德反应底物,探究美拉德反应对蛋白肽的特性影响,获得研究结果如下:

### 3.1 酶解程度明显影响 MRPs 的抗氧化性

从三种的酶的检测指标数据得出共同规律:酶解时间越长的酶解液,消耗糖量越多,生成的美拉德物质越多,其 MRPs 的抗氧化活性越强。同一起始反应浓度,8 h 与 2 h 酶解液的 MRPs 抗氧化能力相比,FRAP 还原能力与 DPPH-清除能力增强倍数高达 2 倍和 7 倍,由此说明,经酶解作用的肽,发生的美拉德反应程度越激烈,表现为糖的消耗量越大,美拉德产物越多,抗氧化能力越强。

### 3.2 美拉德反应改善酶解液的特性

在加热过程中,肽及氨基酸容易受热损失,含量减少,但经过美拉德反应后,肽的溶解性最高增加了 2 倍,氨基酸含量最高增加了 1 倍,抗氧化能力最高增强了 40 倍。

### 3.3 美拉德反应的检测指标间的相关性

糖的消耗量和氨基酸增加量分别与美拉德产物含量及其抗氧化性有显著的相关性,说明糖的消耗量变化一定程度上能反应美拉德反应的程度,美拉德反应能促进肽的分解生成氨基酸。

## 参考文献

- [1] Hodge John E; Rist Carl E. The Amadori rearrangement under new conditions and its significance for non-enzymatic browning reactions [J]. American Chemical Society, 1953, 75(2): 316-322
- [2] Franzke C, Ivanisky H. Antioxidant capacity of melanoidin [J]. Dtsch. Lebensm.-Rundsch, 1954, 50: 251-254
- [3] Lingnert H, Eriksson C E. Antioxidative Maillard reaction products. II. Products from sugars and peptides or protein hydrolysates [J]. Food Processing and Preservation, 1980, 4(3): 173-181.
- [4] Lingnert H, Eriksson C E. Antioxidative maillard reaction products. I. products from sugars and free amino acids [J]. Food Processing and Preservation, 1980, 4(3): 161-172
- [5] Yilmaz, Yusuf, Romeo Toledo. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. [J]. Food Chemistry, 2005, 93(2): 273-278
- [6] 乔路,周大勇,李秀玲,等.美拉德反应制备鲍鱼脏器肽呈味基料及其抗氧化活性研究[J].大连工业大学学报,2012, 30(6):407-411  
QIAO Lu, ZHOU Da-yong, LI Xiu-ling, et al. Antioxidant activity of taste components from abalone viscera peptides prepared by Maillard reaction[J]. Journal of Dalian Polytechnic University 2012, 30(6): 407-411
- [7] 赵谋明,刘洋,张佳男,等.木糖-草鱼肽美拉德反应产物的抗氧化性[J].农业工程学报,2014,30(9):279-286  
ZHAO Mou-ming, LIU Yang, ZHANG Jia-nan, et al. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from xylose and ctenopharyngodon idellus peptide [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(9): 279-286
- [8] Spellman D, McEvoy E, O'cuinn G, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(6): 447-453
- [9] 鲁伟,任国谱,宋俊梅.蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J].食品科学,2005,26(7):169-172  
LU Wei, REN Guo-pu, SONG Jun-mei. Determination of content of peptides in protein hydrolysates [J]. Food Science, 2005, 26(7): 169-172
- [10] Nurhalim N A, Don M M, Ahmad Z, et al. Modeling and optimisation of xylose production by enzymatic hydrolysis using neural network and particle swarm optimization [J]. Chemical Product and Process Modeling, 2015, 10(3): 173-178
- [11] Jalil A M M, Combet E, Edwards C A, et al. Antioxidant properties of breads prepared with  $\beta$ -glucan and black tea [J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2015, 74(OCE1): E31
- [12] Zhang Y, Shen Y, Zhu Y, et al. Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH- activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 569-574
- [13] Zhang H, Yang J, Zhao Y. High intensity ultrasound assisted heating to improve solubility, antioxidant and antibacterial properties of chitosan-fructose Maillard reaction products [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 253-262
- [14] Galeano P, Cuellar L, Schinella G. Influencia del procesamiento del grano de copoazu (theobroma grandiflorum), sobre la actividad antioxidante y el contenido fenolico [J]. Vitae, 2012, 19(1): S285-S287
- [15] Hwang I G, Kim H Y, Woo K S, et al. Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar-amino acid model system [J]. Food Chemistry, 2011, 126(1): 221-227