

牛骨髓蛋白及其碱性蛋白酶酶解物的功能特性比较

帕尔哈提·柔孜^{1,2}, 古丽米热·阿巴拜克日¹, 刘源^{2*}, 李鹏飞¹, 曹博¹, 买买提·吾买尔¹, 杨晓君¹

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 该研究通过水提法提取牛骨髓蛋白 (Bovine Bone Marrow Protein, BBMP), 采用碱性蛋白酶制备牛骨髓蛋白酶解物 (Bovine Bone Marrow Alkaline Protease Hydrolysate, BBMP-AH), 测定两者的氨基酸含量, 同时比较分析结构特征、理化性质以及抗氧化活性。结果表明, BBMP-AH 蛋白含量高于 BBMP, BBMP-AH 必需氨基酸和疏水性氨基酸含量明显的增加; 紫外和红外光谱图谱表明, BBMP 及 BBMP-AH 均显出典型的蛋白吸收峰且酶解后蛋白质二级结构发生了明显的变化; 理化性质试验结果表明, BBMP 及 BBMP-AH 的等电点在 pH 值 6 左右, 远离等电点时, 具有较好的理化特性, 酸碱性条件下理化性质显著改善。与原蛋白相比, 酶解物最高溶解性提高到 94.40%、乳化性为 1.24 m²/g、乳液稳定性为 116.33%, 持水性为 3.94 g/g, 持油性略有降低; BBMP-AH 的抗氧化活性显著强于 BBMP, 均具有较强的 DPPH·、·OH、O₂⁻、ABTS⁺ 清除能力和总还原能力。综上, 酶解处理能够改善牛骨髓蛋白理化性质, 提高其抗氧化能力, 延伸开发应用范围。

关键词: 牛骨髓; 蛋白; 酶解物; 结构表征; 氨基酸分析; 功能特性; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2024)05-43-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0614

Comparison of the Functional Characteristics of Bovine Bone Marrow Protein and Its Hydrolysate Obtained with Alkaline Protease

ROZI Parhat^{1,2}, ABABAIKERI Gulimire¹, LIU Yuan^{2*}, LI Pengfei¹, CAO Bo¹, WUMAIER Maimaiti¹, YANG Xiaojun¹

(1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. School of Agriculture & Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: In this study, bovine bone marrow protein (BBMP) was extracted by the water extraction method, and alkaline protease was used to prepare BBMP hydrolysate (Bovine bone marrow protein alkaline protease hydrolysate, BBMP-AH). The amino acid contents of both BBMP and BBMP-AH were determined, and the structural characteristics, physicochemical properties, and antioxidant activities were compared and analyzed. The results showed that the protein content of BBMP-AH was higher than that of BBMP, and BBMP-AH contained higher contents of essential amino acids and hydrophobic amino acids. The UV and FT-IR spectra showed that both BBMP and BBMP-AH exhibited typical protein

引文格式:

帕尔哈提·柔孜, 古丽米热·阿巴拜克日, 刘源, 等. 牛骨髓蛋白及其碱性蛋白酶酶解物的功能特性比较[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5): 43-52.

ROZI Parhat, ABABAIKERI Gulimire, LIU Yuan, et al. Comparison of the functional characteristics of bovine bone marrow protein and its hydrolysate obtained with alkaline protease [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 43-52.

收稿日期: 2023-05-23

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年基金项目 (2019D01B25)

作者简介: 帕尔哈提·柔孜 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能多肽的制备与活性筛选, E-mail: parhatruzi@126.com

通讯作者: 刘源 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味与品质评价, E-mail: y_liu@sjtu.edu.cn

absorption peaks, and the protein's secondary structure underwent significant changes after enzymatic hydrolysis. The examinations of physicochemical properties revealed that the isoelectric points of BBMP and BBMP-AH were around pH 6. When the pH was far from the isoelectric point, BBMP and BBMP-AH exhibited better physicochemical properties, whilst the physicochemical properties were significantly improved under acidic and alkaline conditions. Compared with the original protein, the highest solubility of the enzymatic hydrolysate increased to 94.40%, the emulsifying ability was 1.24 m²/g, the emulsion stability was 116.33%, and the water-holding capacity was 3.94 g/g, with a slight decrease in oil-holding capacity. The antioxidant activity of BBMP-AH was significantly stronger than that of BBMP, with both BBMP-AH and BBMP having relatively strong DPPH[·], ·OH, O₂^{·-}, and ABTS^{·+} scavenging abilities and total reducing capacity. In summary, the enzymatic hydrolysis treatment could significantly improve the physicochemical properties of bovine bone marrow protein, increase its antioxidant capacity, and expand the development and application scope of bovine bone marrow protein.

Key words: bovine bone marrow; protein; enzymatic hydrolysis; structural characterization; amino acid assay; functional properties; antioxidant activity

近年来,骨源活性肽的制备、功能开发及产业化应用已成为动物源功能食品研究领域的热点。目前,国内外以畜禽骨和鱼类骨骼为原料制备胶原蛋白或制成促进骨折愈合的骨肽注射液^[1],以及防治风湿、骨折、关节炎、骨质疏松、腰椎间盘突出等疾病的复方骨肽、骨肽片等药物陆续上市,随着其营养成分、功效等研究的日益深入,发现骨类蛋白具有多种潜在的功能^[2]。陆生动物骨类蛋白中,牛骨研究取得了很好的进展,但骨髓开发利用尚处于初级阶段。因此,探讨牛骨髓功能肽的高效制备、生物活性和食用品质等对其药用与保健功能挖掘及健康产品、特色产品的研发,对推动牛产业链上下游的转型升级和效益提升,生产优质畜产品等方面有现实意义。

胶原蛋白分子量较大,需要酶解转变成小分子量肽才能扩大其应用范围^[3]。其中,以酶解法将大分子的胶原分解为具有较低分子量的多肽及单肽,是目前该领域研究的重要课题。因原料及处理方式不同,所选用适合的酶种也有所不同,魏洁琼等^[4]研究发现制备牛骨胶原蛋白肽酶解效果最优的酶种为碱性蛋白酶,酶解物具有较好的清除自由基活性;齐景凯等^[5]用木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶双酶分步水解的胶原蛋白肽的各氨基酸种类及含量比酶解前明显增加;张靖等^[6]研究发现,采用碱性蛋白酶制备的羊骨蛋白酶解物具有较强的抗氧化活性。随着新资源食品和添加剂种类增多,越来越多的学者关注着蛋白及其相关产品理化性质和食用品质,乌日古莫乐^[7]发现牛骨蛋白在pH值为8时,理化性质表现最佳;张鑫^[8]研究指出牛鼻肉蛋白酶解以后功能特性进一步增强。从牛骨髓中提取蛋白,不

仅能提高牛骨的附加值,而且可以解决牛骨资源浪费的问题,但酶解后蛋白含量、理化特性是否改善是需要研究的课题之一,也是丰富骨类多肽资源最佳途径。

等电点、溶解度、乳化性、乳化稳定性、持水性以及持油性等因素是蛋白质在食品体系发挥作的功能特性^[7],这些在食品添加剂及相关产品开发方面能作为重要参考参数^[9],因此应该进一步挖掘其原蛋白和酶解物在食药功能上的价值。前期课题组探讨了牛骨髓蛋白胃蛋白酶酶解产物理化性质和抗氧化活性^[10],不同酶种可能会影响其食用品质。为了进一步明确不同酶解产物功能特性差异,本文制备牛骨髓蛋白(Bovine Bone Marrow Protein, BBMP)、碱性蛋白酶解产物(Bovine Bone Marrow Alkaline Protease Hydrolysate, BBMP-AH)^[10],探讨两者的氨基酸含量,同时分析牛骨髓中的蛋白质和酶解产物的结构特征、理化性质以及抗氧化活性,从而综合评价牛骨髓蛋白的营养价值,开发牛骨髓为基础的相关食品提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛骨购买于新疆阿勒泰地区,经新疆农业大学食品科学与药学院巴吐尔·阿不力克木教授鉴定为新疆褐牛腿骨;牛血清蛋白E-BC-K318-M,Elabscience公司;考马斯亮蓝G-250,上海蓝季科技发展有限公司;2,2-联苯基-1-苦基胍自由基,上海麦克林生化科技公司;碱性蛋白酶(400 U/mg),

北京华迈科生物技术有限责任公司；所有有机溶剂均为国产分析纯。

FA1004 电子天平，常州市幸运电子设备有限公司；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器，上海兴创科学仪器设备有限公司；BCD-208JDE 冷藏冷冻箱，浙江星星冷链集成股份有限公司；T6 新世纪紫外可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；RE-52 旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器有限公司；SF-TDL-40D 离心机，上海菲恰尔分析仪器股份有限公司；XHF-DY 高速分散器，宁波新芝生物有限公司；TGL-16M 高度冷冻离心机，湖南湘鑫仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理

取出冷冻的牛骨，将骨髓与骨质分开，初步洗净，除去骨髓中的残留碎片和多余的肉渣并洗去多余血迹，将所得的牛骨髓冷冻至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下硬化再放置于捣药罐中按照比例约为 1:6 的液氮粉碎成粉末，保存在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱，备用^[10]。

1.2.2 BBMP及BBMP-AH的提取

按照参考文献^[10]制备 BBMP。根据下式 (1) 计算牛骨髓蛋白得率：

$$Y_1 = \frac{M}{m \times (1-n)} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

Y_1 —BBMP 得率，%；

M —水提蛋白粉末质量，g；

m —牛骨髓粉末质量，g；

n —牛骨髓粉末油含量，%。

参照文献^[4]并略作修改，取牛骨髓蛋白粉末 200 mg，加水 100 mL，将溶液 pH 值调至 9，加 2% (m/V) 的碱性蛋白酶， $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下用磁力搅拌器酶解 2 h，待酶解结束，沸水灭酶 15 min，冷却，pH 值调到 7，离心，经适当浓缩，透析 (3 500 u, 48 h)，冷冻干燥得牛骨髓蛋白酶解物。根据下式 (2) 计算牛骨髓酶解物得率：

$$Y_2 = \frac{N}{M} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

Y_2 —BBMP-AH 得率，%；

M —水提蛋白粉末质量，g；

N —牛骨髓酶解物粉末质量，g。

1.2.3 蛋白含量的测定

标准曲线的绘制^[10,11]：配制不同质量浓度的 (0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL) 牛血清蛋白溶液 1 mL，分别加入 3 mL 考马斯亮蓝溶液，在迅速摇匀后避光反应 5 min，测定于 595 nm 处的吸光度。以蛋白质量浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线。如图 1 所示，标准曲线回归方程为 $Y=1.013\ 9X+0.692$ ($R^2=0.999\ 6$)。取质量浓度为 1 mg/mL 的蛋白提取液，按照上述蛋白标准曲线的试验步骤测定其蛋白含量。

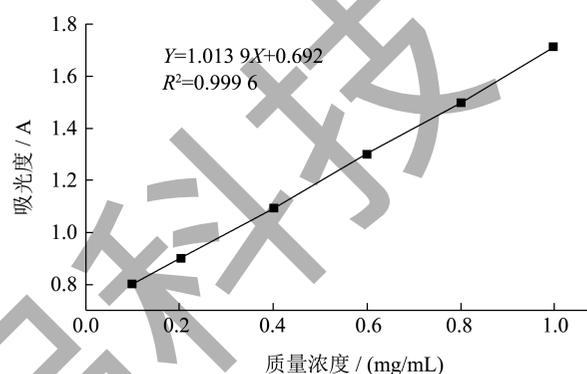


图 1 标准曲线图

Fig.1 The standard curve of protein

1.2.4 氨基酸组成分析

参照 GB 5009.124-2016 食品安全国家标准食品中氨基酸的测定，制备样品测定液，使用自动氨基酸分析仪进行分析。

1.2.5 牛骨髓蛋白及酶解物的结构表征

1.2.5.1 紫外光谱分析

将 1 mg/mL 的 BBMP 及 BBMP-AH 溶液在室温条件下用紫外分光光度计于 190~400 nm 波长范围内进行扫描，以蒸馏水为空白对照^[10,12]。

1.2.5.2 红外分析

取少量 BBMP 及 BBMP-AH，与适量溴化钾混合，用压片法测定其 $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 范围内的红外吸收光谱^[10,12]。

1.2.6 牛骨髓蛋白及酶解物的功能特性研究

1.2.6.1 等电点的测定

将样品配制成 1 mg/mL 的溶液，用盐酸 (0.5 mol/L) 或氢氧化钠 (0.5 mol/L) 分别调 pH 值为 2 到 10，测定不同 pH 值条件下原蛋白和酶解产物在 660 nm 处的透光率，绘制 pH 值与透光率的对应关系图^[13]。

1.2.6.2 溶解度的测定

将样品配制成 1 mg/mL 的溶液，用盐酸 (0.5 mol/L)

或氢氧化钠 (0.5 mol/L) 分别调 pH 值为 2 到 10, 混合 6 min, 离心 (3 500 r/min) 25 min, 取上清液进行蛋白含量测定, 按下式 (3) 计算溶解性^[13]。

$$S = \frac{M_2}{M_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

S —溶解性, %;

M_1 —悬浮液中加入的蛋白含量;

M_2 —离心后上清液蛋白含量。

1.2.6.3 蛋白乳化性和乳化稳定性的影响

参照文献^[13]测定 BBMP 及 BBMP-AH 的乳化性 (EAI) 与乳化稳定性 (ESI) 的影响, 将样品配制成 1 mg/mL 的溶液, 用盐酸 (0.5 mol/L) 或氢氧化钠 (0.5 mol/L) 分别调 pH 值为 2 到 10, 加入花生油 5 mL, 10 000 r/min 高速均质 2 min。分别在 0 min (A_0) 和静置 10 min (A_{10}) 时迅速从烧杯底部吸取 50 μ L 乳浊液与 5 mL SDS (1%) 溶液混合均匀, 在 500 nm 处测定吸光度。用下式 (4~5) 计算 EAI 和 ESI:

$$B = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times D}{C \times \Phi (1 - \theta) \times 1000} \quad (4)$$

$$E = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

B —乳化性 (EAI), m^2/g ;

E —乳化稳定性 (ESI), %;

D —样品稀释倍数;

C —蛋白质浓度, mg/mL;

Φ —光程 (0.01);

θ —乳状液的油体积分数 (0.25)。

1.2.6.4 持水性的测定

准确称取 10 mg 样品记录为 m_0 , 将样品称量入离心管中记录重量为 m_1 , 加 10 mL 蒸馏水溶解, 将溶液 pH 值分别调至 2~10, 漩涡混合 6 min 并于 30 $^{\circ}$ C 恒温箱恒温 30 min, 离心 (4 000 r/min、30 min), 除去上层清液, 称重记为 m_2 , 按下式 (6) 计算持水性^[14]。

$$W = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \quad (6)$$

式中:

W —持水性, g/g。

1.2.6.5 持油性的测定

准确称取 10 mg 样品记录为 m_0 , 将样品移至离

心管中记录重量为 m_1 , 量取 10 mL 植物油加入管中, 漩涡混合 5 min, 使得样品的含油量达到饱和, 静置 30 min, 离心 (4 000 r/min、20 min), 将上清液的油去掉, 称量离心管质量记录为 m_2 , 按下式 (7) 计算持油性^[15]。

$$O = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \quad (7)$$

式中:

O —持油性, g/g。

1.2.7 牛骨髓蛋白及酶解物的抗氧化活性

1.2.7.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除能力的测定

配置不同质量浓度的 (0.1、0.2、0.4、0.8、10 mg/mL) 待测样液, 分别准确移取 2 mL 至具塞试管中, 各加入 DPPH 溶液 (0.2 mmol/L), 放置于恒温箱 (37 $^{\circ}$ C) 恒温 30 min, 于 517 nm 处测定吸光度。空白对照组选用蒸馏水, 阳性对照组选用抗坏血酸^[16]。BBMP 及 BBMP-AH 对 DPPH \cdot 的清除率按下式 (8) 计算:

$$R_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (8)$$

式中:

R_1 —DPPH \cdot 清除率, %;

A_0 —空白组;

A_1 —样品组;

A_2 —对照品组。

1.2.7.2 羟自由基 (\cdot OH) 清除能力的测定

配置不同质量浓度的 (0.1、0.2、0.4、0.8、10 mg/mL) 待测样液, 各准确移取 1 mL 于试管, 并加入 1 mL $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液 (6 mmol/L)、 H_2O_2 (0.1%) 溶液和水杨酸-乙醇溶液 (6 mmol/L), 反应 30 min 后, 于 510 nm 处测吸光度^[16]。BBMP 及 BBMP-AH 对 \cdot OH 清除率按下式 (9) 计算:

$$R_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (9)$$

式中:

R_2 — \cdot OH 清除率, %;

A_0 —空白组;

A_1 —样品组;

A_2 —对照品组。

1.2.7.3 超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2\cdot^-$) 清除能力的测定

配置不同质量浓度的 (0.1、0.2、0.4、0.8、

10 mg/mL) 待测样液, 各准确移取 1 mL 于试管, 加入 2 mL pH 值 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 (50 mmol/L), 在恒温水浴锅 (25 °C) 放置 15 min 后, 加入 1 mL 的邻苯三酚-HCl 溶液 (6 mmol/L), 25 °C 下反应 4 min, 用 0.1 mL 的盐酸 (10 mol/L) 终止反应, 于 420 nm 处测定吸光度^[16]。BBMP 及 BBMP-AH 对 O₂^{·-} 的清除率按下式 (10) 计算:

$$R_3 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (10)$$

式中:

R₃——O₂^{·-} 清除率, %;

A₀——空白组;

A₁——样品组;

A₂——对照组。

1.2.7.4 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 自由基清除能力的测定

将 7 mol/L ABTS 与 4.95 mmol/L K₂S₂O₈ 溶液按 1:1 比例混合, 避光反应 12~16 h, 用无水乙醇稀释, 使其在 734 nm 波长处吸光度为 0.7±0.02 之间。将 0.4 mL 的不同质量浓度试样溶液与 3.6 mL ABTS 工作液混合, 在 30 °C 下进行 6 min 的避光反应, 然后用 734 nm 波长测量吸光度^[16]。BBMP 及 BBMP-AH 对 ABTS^{·+} 清除能力按下式 (11) 计算:

$$R_4 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (11)$$

式中:

R₄——ABTS^{·+} 清除率, %;

A₀——空白组;

A₁——样品组。

1.2.7.5 总还原能力测定

准确吸取不同质量浓度的 (0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL) BBMP 及 BBMP-AH 溶液 0.8 mL 于具塞试管中, 分别加入 0.2 mol/L 的 pH 值为 6.6 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 0.4 mL, 再加入质量分数 1% 的铁氰化钾 0.4 mL, 水浴锅 (50 °C) 放置 20 min, 冷却后, 移取 φ=10% 的 C₂HCl₃O₂ 水溶液 0.4 mL、蒸馏水 1.6 mL 和质量分数 0.1% 的 FeCl₃ 水溶液 0.4 mL 于管内, 室温放置 10 min, 700 nm 处测吸光度^[17]。

1.3 数据处理

每个样品至少重复测定 3 次, 取平均值 ± 标准差形式表示, 采用 Origin 9.0、PeakFitver 4.12 进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 牛骨髓蛋白及酶解物的蛋白含量测定分析

BBMP 蛋白含量为 36.44%, 得率为 25.71%, BBMP-AH 蛋白含量为 38.91%, 得率为 45.28%, 经酶解后 BBMP-AH 的蛋白含量有所升高, 说明酶解有一定的效果。

2.2 氨基酸组成分析

表 1 牛骨髓不同制备物的游离氨基酸含量 (mg/g)

Table 1 Amino acid content of BBMP and BBMP-AH (mg/g)

氨基酸	BBMP	BBMP-AH
天冬氨酸 Asp	27.15	30.29
谷氨酸 Glu	49.02	47.21
丝氨酸 Ser	55.61	11.63
组氨酸 His	4.20	6.74
甘氨酸 Gly	42.11	9.32
苏氨酸 Thr	13.98	12.39
精氨酸 Arg	9.46	13.45
丙氨酸 Ala	27.95	14.06
酪氨酸 Tyr	7.93	10.37
半胱氨酸 Cys	0.11	1.59
缬氨酸 Val	13.46	14.00
蛋氨酸 Met	0.02	4.49
色氨酸 Trp	1.33	—
苯丙氨酸 Phe	4.79	13.29
异亮氨酸 Ile	3.71	6.93
亮氨酸 Leu	7.53	23.27
赖氨酸 Lys	29.18	16.70
脯氨酸 Pro	4.53	14.45
氨基酸总量 TAA	302.05	250.20
疏水性氨基酸	61.97	90.50
必须氨基酸 EAA	72.66	91.09
EAA/TAA (%)	24.06	36.41

如表 1 所示, BBMP 和 BBMP-AH 的 TAA 分别为 302.05 mg/g、250.20 mg/g, EAA 所占的比例分别为 24.06%、36.41%。BBMP 中 Ser 含量最多, 其次为 Glu、Gly, 分别占 TAA 的 18.41%、16.22%、13.94%, 胶原蛋白特征性氨基酸 (Gly、Lys、Pro) 总量分别达到 42.11、29.18、4.53 mg/g。BBMP-AH 中 Glu 含量最多, 鲜味强度较高的氨基酸, 不仅具有较高的营养价值, 同时还可以促进机体生物代

谢^[18], 其次为 Asp、Leu, 分别占 TAA 的 18.87%、12.11%、9.30%, 不含有 Trp, 是由于碱性条件下结构被破坏, 胶原蛋白特征性氨基酸 (Gly、Lys、Pro) 总量达到 9.32、16.70、14.45 mg/g。BBMP-AH 的 EAA 与影响抗氧化活性的疏水性氨基酸含量明显高于 BBMP, 说明碱性蛋白酶能有效酶解牛骨髓蛋白。BBMP 和 BBMP-AH 与吴婷^[19]研究的牦牛骨髓胶原蛋白显示了相似的氨基酸组成分布。

2.3 牛骨髓蛋白及酶解物的结构表征

2.3.1 紫外光谱分析

蛋白质吸收紫外光的主要原因是侧链基团对 Tyr、Trp、Phe、His 和 Cys 残基的吸收, 以及通过肽键的强吸收^[12]。如图 2 所示, BBMP 和 BBMP-AH 分别在 232、230、279、278 nm 处观察到与羰基和芳香氨基酸残基相对应的显著吸收峰。酶解处理后, 吸收峰向短波长移动, 表现出减色效应和蓝移的趋势。这可能是因为经酶解后肽键上的羰基氧和氨基氮参与了络合反应, 导致了电子跃迁现象, 从而影响胶原蛋白的紫外吸收特性^[10]。

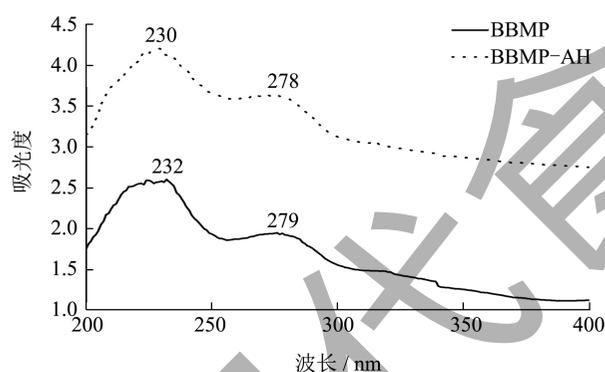


图 2 BBMP 及 BBMP-AH 的紫外光谱图

Fig.2 Ultraviolet absorption spectrum of BBMP and BBMP-AH

2.3.2 红外分析

FT-IR 光谱是一种对物质定性与定量的分析技术, 可用于阐明蛋白质二级结构^[20], BBMP 和 BBMP-AH 的 FT-IR 光谱图如图 3 所示。

图 3 可知, BBMP 和 BBMP-AH 在 4 000~400 cm^{-1} 均呈现出蛋白类化合物的特征吸收峰, 利用 PeakFitver 4.12 软件计算 BBMP 和 BBMP-AH 的拟合二级结构含量变化发现, 蛋白质二级结构在酶解前后发生了较大的变化。酶解处理后, α -螺旋和 β -折叠含量增加到 46.05% 和 34.06%, 而 β -转角含量减少到 19.89%, 并且未出现无规则卷曲。结果表明, 蛋白质分子中的氢键被打破, 羰基数量增

加, 蛋白裂解产生更多的低分子量多肽, 从而慢慢暴露出隐藏在蛋白质结构中的疏水基团, 多肽的抗氧化活性得到增强^[20]。酶解后, 蛋白质的特征吸收峰一定程度的蓝移或红移, 这些变化也表明酶解处理后蛋白质二级结构发生了变化。

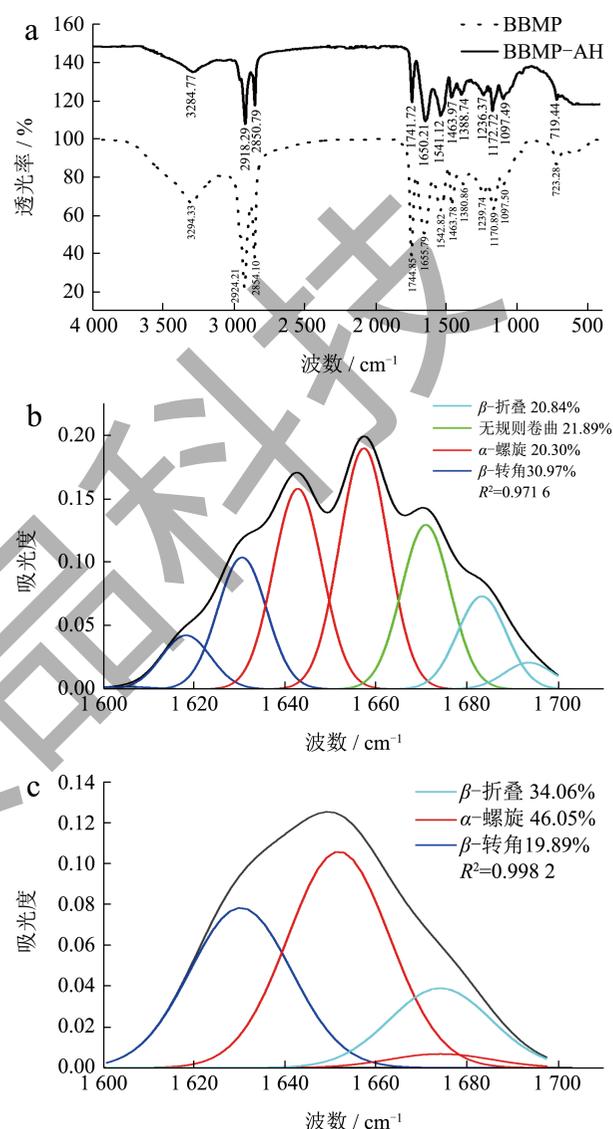


图 3 BBMP 及 BBMP-AH 的红外光谱图

Fig.3 FT-IR spectra of extracted collagen of BBMP and BBMP-AH

注: (a) BBMP 及 BBMP-AH 红外光谱图; (b) BBMP 曲线拟合图; (c) BBMP-AH 曲线拟合图。

2.4 牛骨髓蛋白及酶解物的功能特性研究结果

2.4.1 等电点

胶原蛋白在等电点处物理性质会发生明显的变化, 分子之间没有静电排斥, 导致溶液的浑浊程度增加, 透光率降低^[12]。如图 4a 所示, BBMP 及 BBMP-AH 在不同的 pH 值条件下透光率呈现先降低

后升高的趋势,当 pH 值为 6 时最低,分别为 14.61%、15.36%。因此,可初步推断 BBMP 和 BBMP-AH 的等电点在 pH 值为 6 左右。这与杨恒^[15]报道胶原蛋白的等电点一般在 pH 值为 6~9 左右的研究结果相似。

2.4.2 溶解性的分析

溶解性能显著影响蛋白质的其他功能特性,如图 4b 所示, BBMP 及 BBMP-AH 在较低或较高的 pH 值时,溶解性较好,当 pH 值为 6 时溶解性最低(70.78%、77.49%),这是由于蛋白质在其等电点附近发生聚沉现象,从而导致其溶解度下降,这与范三红等^[21]研究的结果相似。当 pH 值为 9 时溶解性达到最大(91.16%、94.40%),说明碱性蛋白有利于蛋白和多肽溶解度的提高。BBMP-AH 的溶解度整体高于 BBMP,可能是因为酶解使破坏蛋白质结构,断开部分肽链,将大分子蛋白逐渐转变为小分子多肽或氨基酸,产生大量的离子型基团,增强肽的水合作用^[13]。

2.4.3 乳化性及乳化稳定性的分析

如图 4c 所示, BBMP 和 BBMP-AH 的乳化性及乳化稳定性均随 pH 值的增加先降后升,当溶液 pH 值处于等电点时最低(0.43 m²/g 和 0.69 m²/g, 61.39% 和 66.61%),和溶解性表现出相似的曲线图,在等电点附近乳化性及乳化稳定性较差。当 pH 值为 9 时 BBMP 和 BBMP-AH 的乳化性达到最高 1.10 m²/g 和 1.24 m²/g, 乳化稳定性达到最高的 103.18% 和 116.33%,表明碱性条件下 BBMP 和 BBMP-AH 的乳化性及乳化稳定性表现均最佳^[22],与乌日古莫乐^[7]报道吉尔利阁蒙古牛骨胶原蛋白在 pH 值为 8 时乳化性及乳化稳定性最好的结果相似。然而, pH 值过高时蛋白可能会被破坏,导致乳化性及乳化稳定性的下降。BBMP-AH 的乳化性及乳化稳定性略高于 BBMP,可能是酶解会破坏蛋白质的结构,分子量降低,导致蛋白液的乳化活性升高。

2.4.4 持水性

如图 4d 所示, BBMP 和 BBMP-AH 的持水性呈现出降后升的变化,过碱性环境下持水性下降。当 pH 值达到等电点时持水性最低(2.54 和 2.67 g/g),这是由于蛋白质在等电点的总电荷值为零,分子之间的交互作用最强,结合和收缩蛋白的水化和膨胀率最低^[23]。在 pH 值为 9 时, BBMP 和 BBMP-AH 的持水性最高(3.83、3.94 g/g),是因为电离后蛋白间的相互作用变小,结合水的能力增大,表现为持

水性增强^[24]。BBMP-AH 持水性显著高于 BBMP,说明牛骨髓酶解物的持水性比原蛋白的持水性更好,这可能与原蛋白及酶解物的结构有关。

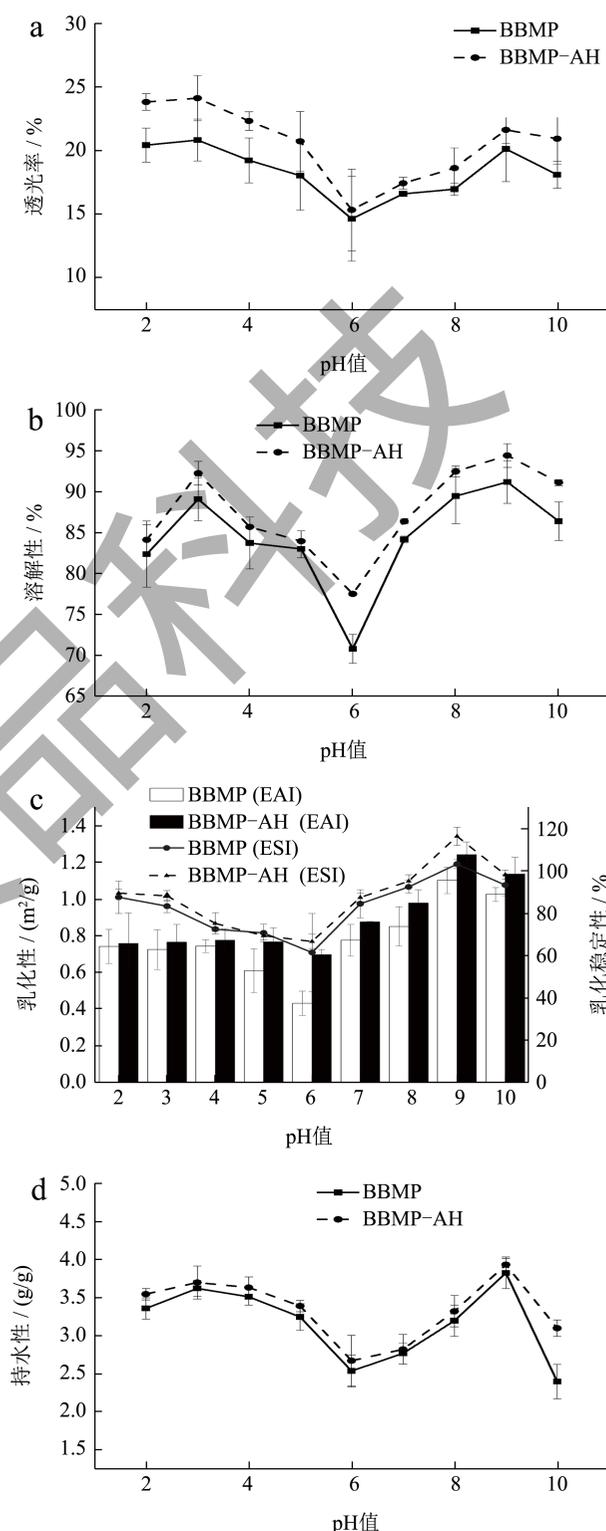


图 4 BBMP 及 BBMP-AH 理化特性研究

Fig.4 Functional properties of BBMP and BBMP-AH

注:(a) 等电点;(b) 溶解性;(c) 乳化性和乳液稳定性;(d) 持水性。

2.4.5 持油性的分析

蛋白质的吸油性表现为截留油脂的能力,是蛋白质应用于肉制品、乳制品以及烘焙制品等食品配方及加工中的重要性质^[24],BBMP的持油性为10.38 g/g, BBMP-AH的持油性为7.51 g/g;酶解物的持油性显著低于原蛋白,这是因为胶原蛋白水解后,其吸油率也相应下降。同时,由于大分子的胶原蛋白被酶解降解为低分子量的多肽,使其具有较高的亲水性,从而造成吸油性的降低^[25]。

2.5 牛骨髓蛋白及酶解物抗氧化活性结果

2.5.1 DPPH·清除能力

DPPH 自由基因其稳定性常作为体外抗氧化活性的重要指标^[26],不同质量浓度的BBMP、BBMP-AH与维生素C(Vc)对DPPH·的清除能力如图5a所示。在0.1~1.0 mg/mL范围内,质量浓度与清除能力间均呈正比关系。当质量浓度为0.1 mg/mL时,BBMP和BBMP-AH的DPPH·清除能力相似,随着质量浓度的升高,BBMP-AH的清除率明显高于BBMP。当质量浓度1 mg/mL时,BBMP、BBMP-AH的清除率分别是43.29%、57.88%,其半抑制浓度 IC_{50} 值分别为1.86、0.97 mg/mL,BBMP-AH的DPPH·清除能力显著强于BBMP($P<0.05$)此结果表明酶解能够显著改善BBMP的抗氧化活性。

2.5.2 ·OH清除能力

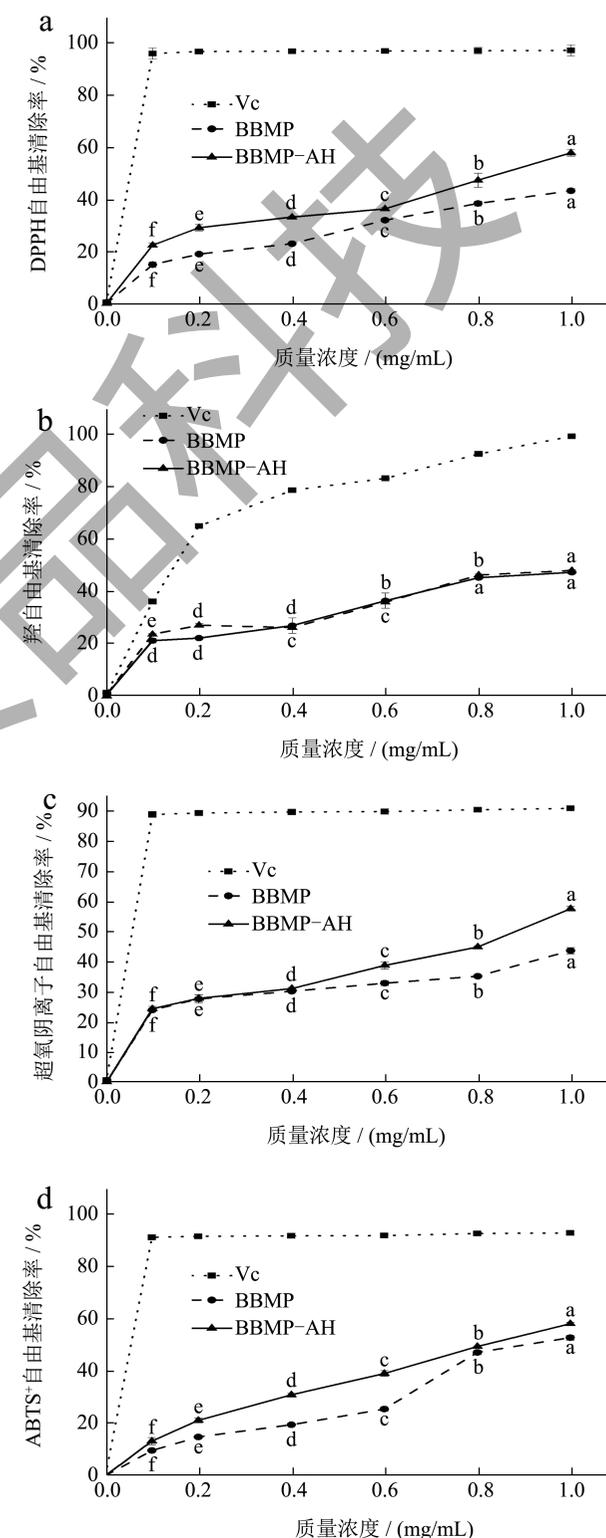
·OH是体内产生的活性最高的自由基,会与机体细胞反应后造成损伤,因此·OH清除能力的检测是很有必要的^[27]。如图5b所示,BBMP及BBMP-AH在0.1~1.0 mg/mL质量浓度范围内的·OH的清除能力随着质量浓度的升高逐渐增强,当1 mg/mL时达到最高值,分别是47.37%、48.08%,其半抑制浓度 IC_{50} 值分别为1.59 mg/mL、1.45 mg/mL。同样,经酶解后BBMP-AH的抗氧化活性有所改善。

2.5.3 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力

如图5c所示,BBMP及BBMP-AH在0.1~1.0 mg/mL范围内随着浓度的增高, $O_2^{\cdot-}$ 清除率也增高,当质量浓度在0.1~0.2 mg/mL的范围内,BBMP及BBMP-AH的清除率的差距不明显,但质量浓度大于0.2 mg/mL时,BBMP-AH的清除率显著高于BBMP。当质量浓度为1.0 mg/mL时,BBMP及BBMP-AH的 $O_2^{\cdot-}$ 清除率达到43.95%、57.84%,其半抑制浓度 IC_{50} 值分别为3.86、1.03 mg/mL,BBMP-AH的 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力显著强于BBMP($P<0.05$)。

2.5.4 ABTS⁺清除能力

如图5d所示,BBMP及BBMP-AH在0.1~1.0 mg/mL质量浓度范围内随着浓度的增高,ABTS⁺清除率也增高。当质量浓度为1 mg/mL时,清除率分别达到52.81%、58.15%,其半抑制浓度 IC_{50} 值分别为0.76、0.58 mg/mL。BBMP-AH的ABTS⁺清除率比原蛋白强,这可能与经酶解后BBMP的结构变化有关。



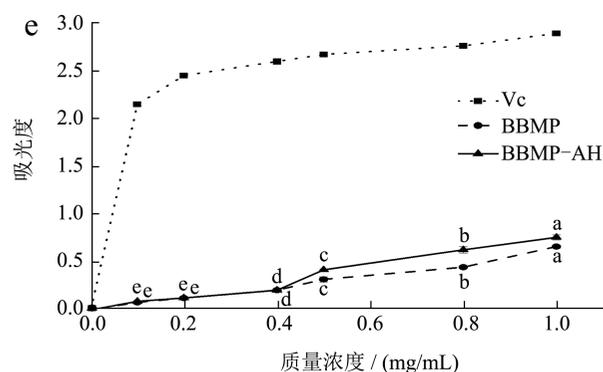


图5 BBMP及BBMP-AH的抗氧化活性

Fig.5 Antioxidant activity of BBMP and BBMP-AH

注: (a) DPPH·清除能力; (b) ·OH清除能力; (c) O₂⁻清除能力; (d) ABTS⁺清除能力; (e) 总还原能力。

2.5.5 总还原能力

蛋白的总还原能力与抗氧化活性之间具有显著的相关性^[28]。如图5e所示, 0.1~1.0 mg/mL质量浓度范围内BBMP和BBMP-AH总还原能力明显低于阳性对照Vc。当质量浓度在0.1~0.4 mg/mL时, BBMP及BBMP-AH的总还原能力相似, 大于0.4 mg/mL时, BBMP-AH的总还原能力比BBMP的总还原能力明显升高。当质量浓度1.0 mg/mL时BBMP及BBMP-AH总还原能力最高, 分别为0.66、0.76, 表明两种被测蛋白的还原力均较弱且BBMP-AH比BBMP有更强的还原力^[8]。

3 结论

本研究对BBMP及BBMP-AH的氨基酸含量、结构、理化性质和抗氧化能力进行了研究和比较。结果表明, BBMP及BBMP-AH的蛋白含量分别为36.44%、38.91%, BBMP及BBMP-AH的必须氨基酸含量分别为72.66%、91.09%, 疏水性氨基酸含量分别为61.97%、90.50%; 紫外光谱和红外光谱表明, BBMP及BBMP-AH均显出了典型的蛋白吸收峰, 且酶解使蛋白质二级结构发生了明显的变化; BBMP及BBMP-AH的等电点均在pH值6左右, 当pH值为9时溶解性、乳化性和乳化稳定性、持水性达到最大, 分别为91.16%、94.40%, 1.10 m²/g、1.24 m²/g, 103.18%、116.33%, 3.83 g/g、3.94 g/g。与原蛋白相比, 酶解处理能提高牛骨髓蛋白的溶解性、持水性、乳化性和乳化稳定性, 且对DPPH·、·OH、O₂⁻、ABTS⁺清除能力及总还原能力指标均高于原蛋白。因此, 酶解处理可以改善牛骨髓蛋白理化性质及生物活性, 延伸其在食品加工

产业中的应用范围。后期营养特性、食用品质、生物活性以及构效关系需要进一步探讨, 阐明呈味—活性—加工规律。

参考文献

- [1] KETNAWA S, LICEAGA A M. Effect of microwave treatments on antioxidant activity and antigenicity of fish frame protein hydrolysates [J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10(3): 582-591.
- [2] SHEN D Y, BEGUM N, SONG H L, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity and umami taste of peptides (<1 ku) from porcine bone protein extract [J]. Food Bioscience, 2021, 40(10): 100901.
- [3] YAO Y M, WANG M Y, LIU Y, et al. Insights into the improvement of the enzymatic hydrolysis of bovine bone protein using lipase pretreatment [J]. Food Chemistry, 2020, 302(C): 125199.
- [4] 魏洁琼, 余群力, 韩玲, 等. 牛骨胶原蛋白肽制备工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(5): 203-211, 218.
- [5] 齐景凯, 张玉芬. 牛骨酶解工艺及其酶解液中游离氨基酸的分析研究[J]. 中国食品添加剂, 2013, 1: 109-115.
- [6] 张靖, 苏琳, 陈晓雨, 等. 羊骨抗氧化肽酶解法制备和响应面工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(3): 18-27.
- [7] 乌日古莫乐. 吉尔利阁蒙古牛骨胶原蛋白的提取及理化特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
- [8] 张鑫. 牛胶原蛋白的功能特性及多肽的抗氧化活性研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2021.
- [9] WANG W J, SHEN M Y, LIU S C, et al. Gel properties and interactions of mesona blumes polysaccharide soy protein isolates mixed gel: The effect of salt addition [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 192: 193-201.
- [10] 古丽米热·阿巴拜克日, 帕尔哈提·柔孜, 则拉莱·司玛依, 等. 牛骨髓蛋白的酶解工艺优化及其理化性质和抗氧化特性[J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 171-181.
- [11] 则拉莱·司玛依, 帕尔哈提·柔孜, 吾哈丽妮萨·麦提托合提, 等. 三种甘草种子蛋白的提取方法、结构及抗氧化活性比较研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 227-234.
- [12] HU G H, WANG D B, SUN L N, et al. Isolation, purification and structure identification of a calcium-binding peptide from sheep bone protein hydrolysate [J]. Foods, 2022, 11(17): 2655.
- [13] 宋乐. 驼掌胶原蛋白的提取及其理化性质研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [14] HOU H, LI B, ZHANG Z, et al. Moisture absorption and retention properties, and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1432-1439.
- [15] 杨恒. 超声辅助对鸡肺胶原蛋白提取工艺、理化性质

- 及其酶解产物抗氧化活性的影响[D].南京:南京财经大学,2020.
- [16] ROZI P, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 97-106.
- [17] CHOUDHARY A, KUMAR R, SRIVASTAVA R B, et al. Isolation and characterization of phenolic compounds from *Rhodiola imbricata*, a Trans-Himalayan food crop having antioxidant and anticancer potential [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 16: 183-193.
- [18] 汪正兴,韩强,郜海燕,等.响应面试验优化亚临界水提取核桃粕蛋白工艺及其氨基酸分析[J].食品科学,2017, 38(20):191-196.
- [19] 吴婷.牦牛骨胶原蛋白提取纯化及结构解析[D].兰州:甘肃农业大学,2017.
- [20] WU SH ZH, HE ZH P, WANG Q Q, et al. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of peptides of Chinese pecan (*Carya cathayensis*) and analysis of their antioxidant capacities and structures [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2021, 27(2): 1239-1251.
- [21] 范三红,贾槐旺,张锦华,等.不同提取方法对紫苏籽粕蛋白功能性质的影响[J].中国调味品,2021,46(12):61-69.
- [22] DU Y, JIANG Y, ZHU X, et al. Physicochemical and functional properties of the protein isolate and major fractions prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed [J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 923-929.
- [23] 安兆祥,蔡志鹏,黄占旺,等.黑木耳蛋白提取工艺优化及其功能特性研究[J].食品工业科技,2021,42(18):157-166.
- [24] BIKAKI M, SHAH R, MULLR A, et al. Heat induced hydrolytic cleavage of the peptide bond in dietary peptides and proteins in food processing [J]. Food Chemistry, 2021, 357: 129621.
- [25] 李卫林,曹健,吕燕红,等.胶原蛋白酶解产物功能特性研究[J].皮革化工,2007,24(2):13-16.
- [26] XIAO J X, LI Y F, CHEN B B, et al. Enzymatic preparation and antioxidative activity of hydrolysate from Rice bran protein [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14(6): 3163-3174.
- [27] ZHU K X, ZHOU H M, QIAN H F. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1296-1302.
- [28] 李明杨,刘帅光,卢梦娇,等.不同抗氧化剂体外抗氧化活性及其对肉品氧化稳定性的影响[J].食品科学,2022, 43(1):67-75.