

乌骨鸡黑色素的酶法提取及其抗氧化作用的初步研究

蔡华珍 陈守江 张丽 桑宏庆

(安徽科技学院,凤阳,233100)

摘要 以江西泰和乌骨鸡为研究对象,研究酶法水解乌鸡蛋白质分离黑色素的最佳工艺条件,并对黑色素清除 DPPH 自由基,以及黑色素延缓油脂酸败的能力进行了研究。结果表明:(1)酸性蛋白酶为最优水解酶,其加酶量 3.8%、固液比 1:2;其最佳酶解条件 pH2.8、酶解温度 34.8℃、酶解时间 20 h。(2)乌鸡黑色素能抑制 DPPH·自由基,抑制率随黑色素浓度增加而提高。(3)黑色素能延缓油脂酸败,在 70℃ 时添加浓度为 0.1 mg/mL 的黑色素于油脂中,60 h 时酸价为 0.3028 mg KOH/g,而对照(不加黑色素)的酸价在第 32 h 即升到 0.3130 mg KOH/g。

关键词 蛋白酶,泰和乌骨鸡,黑色素,抗氧化性

乌骨鸡是世界稀有,我国特有的珍禽,它集药、补、食 3 大功能于一体,对人体具有特殊的滋补功能。乌骨鸡与普通鸡最明显的差异就是含有黑色素。研究表明,乌骨鸡中的黑色素具有保护功效,可以避免紫外线引起的急慢性改变;具有清除自由基,抗氧化等功能,从而可以预防癌症,抗衰老,提高肌体的免疫力^[1~4]。

由于乌骨鸡黑色素与蛋白质结合在一起,对于乌骨鸡黑色素的分离,主要采用盐酸降解蛋白质的方法^[5],其他方法尚未见报道,但是该法可能造成黑色素形态和化学结构的损伤^[6]。本实验拟采用蛋白酶法分离黑色素,并对黑色素的抗氧化性能进行了研究,旨在找出酶法分离乌骨鸡黑色素的最佳工艺条件,为乌骨鸡食品的开发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

泰和乌骨鸡:购自江西省泰和县生物谷食品科技工业园;大豆色拉油(市售),DPPH(sigma)。

1.2 主要试剂

537 酸性蛋白酶、1398 中性蛋白酶、HAP 碱性蛋白酶(酶活力均 ≥ 10 万单位,上海酶制剂厂);木瓜蛋白酶(酶活力 ≥ 6000 万单位,国药集团化学试剂有限公司)。所用化学试剂均为分析纯。

1.3 乌骨鸡黑色素的提取工艺^[7]

全净膛乌鸡→清洗→剔骨取肉→绞碎→加酶、调 pH、恒温水解→酶水解液→离心→滤渣→清洗→黑色素

1.4 实验方案设计

1.4.1 黑色素提取

参照文献^[6],称取一定量绞碎混匀的乌鸡肉进行酶解实验,根据水解液中氨基态氮含量确定试验用酶种类。采用黄金分割法,依据水解液中氨基态氮含量确定最佳酶解工艺条件。酶解后将水解液离心(5 000 r/min,20 min),沉淀物用醚、蒸馏水反复洗涤(至少 4 次),经真空冷冻干燥得黑色素。

1.4.2 黑色素的抗氧化性能

测定黑色素对 DPPH·的清除能力;同时将黑色素添加到油脂中,根据酸价变化间接测定其抗氧化性能。

1.5 测定方法

1.5.1 氨基态氮的测定

电位滴定法^[8]

1.5.2 黑色素清除自由基能力测定

DPPH·法^[9]。将黑色素配成以下浓度:0.05 mg/mL,0.1 mg/mL,0.2 mg/mL,0.25 mg/mL,0.3 mg/mL,0.4 mg/mL,DPPH·用 95%乙醇配成 1×10^{-4} mol/L 的溶液,向 2 mL DPPH·溶液中加入 2 mL 样品溶液,总体积为 4 mL,摇匀,于 25℃ 水浴中放置 30 min 后倒入光径为 1 cm 的比色皿,记录 517 nm 吸光值为 $A_{\text{样品}}$ (用 2 mL 95%乙醇与 2 mL 样品液调 0 点,以扣除试剂本身颜色的影响),向 2 mL DPPH·溶液中加 2 mL 相应样品溶剂,记录吸光值为 $A_{\text{空白}}$,即空白对照。抑制率计算公式:

$$\text{抑制率 } \eta(\%) = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

1.5.3 油脂酸价的测定

酸碱中和法^[8]。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶种类的选择

第一作者:硕士,副教授。

收稿日期:2005-08-05

选用 537 酸性蛋白酶、1398 中性蛋白酶、HAP 碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶 4 种蛋白酶,按固液比(乌鸡肉:水=1:4,酶解时间 4 h,酶用量(相对于乌鸡肉重的质量分数) 2%,在各自的适宜反应条件下,水解乌鸡肉,测定水解液中氨基态氮含量(经实验证实,乌鸡肉中黑色素质量与水解液中氨基态氮含量之间高度线性相关,其相关系数达 0.9939,因此,为了研究方便,采用水解液中氨基态氮含量来间接反映乌鸡肉中的黑色素的含量)。结果见表 1。

表 1 不同蛋白酶水解乌鸡肉能力比较

酶的种类	氨基态氮/g·(100 mL) ⁻¹
酸性蛋白酶	0.264 4
中性蛋白酶	0.127 2
碱性蛋白酶	0.056 5
木瓜蛋白酶	0.240 3

由表 1 可知,4 种蛋白酶对乌鸡蛋白质的水解效果不同,酸性蛋白酶和木瓜蛋白酶对乌鸡肉有较强的水解能力,分别达到 0.264 4 g/100 mL、0.240 3 g/100 mL;碱性蛋白酶水解能力最差,只有 0.0565 g/100 mL。由于酸性蛋白酶酶解条件温和(30~50℃),便于水解操作,因而将其选为水解乌鸡肉蛋白质用酶。

2.2 酶解条件的确定

2.2.1 加酶量

取 pH3.0,温度 40℃,固液比 1:4,酶解时间 4 h,实验结果见表 2。

表 2 加酶量对乌鸡肉水解能力的影响

加酶量/%	氨基态氮/g·(100 mL) ⁻¹
2.0	0.264 4
2.5	0.270 3
3.0	0.274 5
3.5	0.298 9
3.8	0.305 2
4.1	0.305 1
5.0	0.305 2

由表 2 可知,在固定底物下,氨基态氮含量随加酶量的增加而增加,但加酶量达到 3.8%以后,不再增加,说明底物可能已被酶饱和,因而加酶量可确定为 3.8%。

2.2.2 酶水解温度的选择

已知酸性蛋白酶作用范围在 30~50℃,根据黄金分割法^[10]确定最佳酶解温度的试验点,其结果见表 3。

表 3 温度对酶水解能力的影响

试验点温度/℃	42.4	37.7	34.8	32.8
氨基态氮/g·(100 mL) ⁻¹	0.300	0.3120	0.3150	0.300

从表 3 可知,温度为 34.8℃为最佳酶解温度。

2.2.3 酶水解最适 pH 值

已知 537 酸性蛋白酶在 pH2.0~4.0 之间稳定,超过此范围,失活较严重,由黄金分割法,在 pH2.0~4.0 含优区间内找出最适 pH,经实验测得最适 pH=2.8(表 4)。

表 4 pH 值对水解能力的影响

试验点 pH	2.4	2.8	2.9	3.2
氨基态氮/g·(100 mL) ⁻¹	0.270 4	0.283 2	0.269 7	0.267 0

2.2.4 酶水解底物浓度的选择

在相同条件下,底物浓度不同,其水解效果亦有差异(表 5)。

表 5 底物浓度对水解效果的影响

固液比	氨基态氮/g·(100 mL) ⁻¹
1:1	0.375 0
1:2	0.417 0
1:3	0.360 5
1:4	0.268 5
1:5	0.219 1
1:6	0.121 2

注:实验条件,pH2.8,水解温度:34.8℃。537 酸性蛋白酶用量 3.8%,水解时间 4 h。

由表 5 可知,固液比为 1:2 时,氨基态氮含量最多,水解能力最强,超过或低于这一值时,水解能力均降低。当底物浓度增大时黏度也增大,影响酶分子的扩散和定向,不利于酶与底物充分接触,因而酶水解能力降低;另一方面,底物浓度减小,则影响了酶与底物的接触频率^[11]。所以底物浓度过大过小都不利于酶水解。因此,固液比采用 1:2 为宜。

2.2.5 加酶方式的确定

加酶量也是影响水解的因素之一。当底物浓度一定时,加酶量过大,可能导致酶本身相互水解^[12],使酶活力降低。本实验中其他条件一定,采用分批分次加入酶的方式。由表 6 可见,在不增加酶用量的情况下,采用分两次加入酸性蛋白酶对乌鸡肉进行水解效果更加理想。

表 6 加酶方式对水解效果的影响

加酶方式	一次加入	开始、酶解 2 h 后 2 次加入
加酶量/%	3.8	各 1.9
水解液中氨基态氮含量 /g·(100 mL) ⁻¹	0.205 0	0.339 3

2.2.6 酶解时间的确定

利用酸性蛋白酶在最佳条件下水解乌鸡肉,每隔

2 h 测定其水解液中氨基氮含量,其结果见图 1。

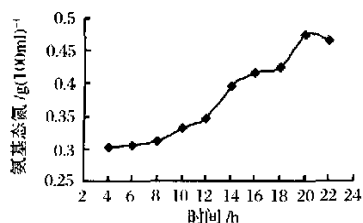


图1 酶解时间与水解能力影响

由图1中可见,在0~20 h之间,随着酶解时间的延长,水解液中氨基态氮呈上升趋势,当达到20 h时,水解液中氨基态氮含量最高,达0.473 6 g/100 mL,水解能力最强,20 h以后水解液中氨基态氮含量几乎不再增加,这可能与酶的活性下降有关。因而,可选定酶解时间为20 h。

2.3 乌骨鸡黑色素清除 DPPH·自由基的能力

根据试验设计,测定其清除 DPPH·自由基的能力,其结果见图2。

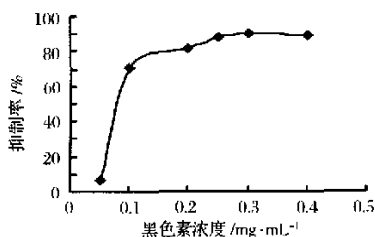


图2 黑色素清作 DPPH 自由基的能力

图2表明,当黑色素浓度为 1×10^{-4} g/mL时,对 DPPH·就具有较大的清除能力,其反应抑制率达70.98%,当达到0.3 mg/mL浓度时,抑制率高达90.10%。徐幸莲等^[13]研究发现乌鸡黑色素具有很强的清除 O_2^- 的能力。本试验发现,黑色素亦具有较强的清除 DPPH·的能力,这也说明了黑色素具有惊人的物化反应特性,能够有效地与活性物质作用,如羟自由基和水合离子,单线态氧、超氧离子等^[14]。

2.4 油脂酸价的变化

为了进一步验证黑色素的其他物化反应特性和在食品中的抗氧化效果,设计如下实验,取150g色拉油2份,向其中加入0.05 mg/mL,0.1 mg/mL二种浓度的黑色素液,于70℃恒温干燥箱中,进行加速氧化分解试验,同时以不加黑色素者为空白对照,每隔4 h取样测定油脂的酸价,比较其结果(图3)。

由图3可知,黑色素对油脂酸价有明显的抑制作用,其抑制的最小浓度为0.1 mg/mL。从油脂酸价

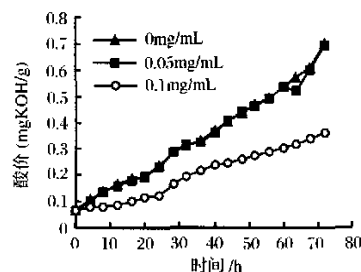


图3 黑色素对油脂酸价的影响

变化曲线来看,经70℃,32 h的恒温处理后,添加0 mg/mL和0.05 mg/mL两种黑色素浓度的油脂已经发生酸败,酸价分别达到0.3169 mg KOH/g、0.3130 mg KOH/g,而添加0.1 mg/mL浓度的油脂酸价只有0.1941 mg KOH/g,仍在国标规定(0.30 mg KOH/g)的范围之内,60 h以后酸价才达到0.3028 mg KOH/g,开始出现酸败现象,这比对照的贮藏期几乎延长一倍时间。这与前面所述的黑色素的抗氧化性实验结果相一致,说明黑色素具有较强的抑制油脂酸败的能力。

3 结 论

(1)酸性蛋白酶水解乌鸡肉能力最强;水解底物的固液比1:2,加酶量为鸡肉质量的3.8%;其最佳酶解条件为:温度34.8℃ pH2.8,酶解时间20 h;在加酶量不变的情况下分次加入,其水解效果更佳。

(2)乌骨鸡黑色素有较强的清除 DPPH·自由基能力,在浓度为 1×10^{-4} g/mL,反应抑制率达70.98%,浓度为0.3 mg/mL时抑制率高达90.1%。

(3)乌骨鸡黑色素有较强的抑制油脂酸败功能,其最小浓度为0.1 mg/mL,70℃下,该浓度油脂比对照贮藏期几乎延长1倍时间。

参 考 文 献

- 1 李连达,靖雨珍. 珍禽乌鸡的滋补与药用价值[J]. 中西医结合杂志,1990,10(1):62~63
- 2 袁 纛,袁 星,白庆余. 乌鸡黑素抗诱变作用的初步研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(5):301~303
- 3 Geremia, Corsaro C, Bonomo R. Eumelanins as free radical trap and superoxide dismutase activities in amphibia[J]. Comp Biochem Physiol,1984,98(1):67~69
- 4 Corsaro C. Melanins in physiological conduction protect against lipoperoxidation. A study on albino and pigmented xenopus[J]. Pigm Cell Res,1995,8(5):279~282
- 5 李 华,邱祥聘,龙继著. 乌骨鸡黑色素的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2002,34(8):33~35

- 6 阎克路. 蛋白酶和盐酸分离牦牛绒中黑色素的研究[J]. 纺织学报, 2001, 22(6): 348~350
- 7 成 坚. 酶解方法对乌鸡肉风味的影响[J]. 食品工业科技, 2005, 26(2): 82~84
- 8 宁正祥主编. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 163~164; 163~164
- 9 马庆一, 张 侠, 熊卫东, 等. 红薯梗中清除自由基活性成分的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 145~148
- 10 张一凡. 应用黄金分割法确定冰淇淋产品中的香精添加量[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2002, 8(4): 11~12
- 11 王璋编. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002, 73, 121
- 12 熊明民, 徐幸莲, 陈伯祥. 乌骨鸡肉酶解条件的研究[J]. 肉类研究, 1997(3): 16~19
- 13 徐幸莲, 庄 苏, 陈伯祥. 乌骨鸡黑色素对延缓果蝇衰老的作用[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(2): 105~108
- 14 徐幸莲. 黑色素的研究进展[J]. 中国畜产与食品, 1997, 4(3): 135~136

A Primary Study on Separating of Melanin by Enzymic Hydrolysis of Protein and on Antioxidization of the Melanin in Taihe Silkies

Cai Huazhen Chen Shoujiang Zhang Li Sang Hongqing

(Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

ABSTRACT Melanin was separated from protein in Taihe silkies by enzymic hydrolysis of protein. The optimal technology of the enzymic hydrolysis was studied. And the capabilities of the melanin on scavenging DPPH free-radical as well as on restraining rancid taste of oil were also studied. The results showed that the best protease of protein hydrolyzation was acidity protease, amount of which was 3.8% (to fowl) at the ratio of solid and liquid 1:2. The best condition of hydrolysis was at 34.8℃ for 20h with pH2.8. In addition, melanin could scavenge the DPPH· free-radical, which the ratio of restraining was related to concentration of melanin. Meanwhile, melanin could also reduce rancid taste of oil. Acid value of oil at 70℃ for 60h was 0.3028 mg KOH/g by adding melanin 0.1 mg/mL, whereas the oil adding nothing reached to 0.3130 mg KOH/g for 32h. Therefore, melanin in Taihe silkies could be essential role in antioxidantization.

Key words protease, Taihe silkies, melanin, antioxidantization

市场动态

我国甜味剂市场多档次共存

目前,我国甜味剂市场已形成高、中、低倍共存的局面,高倍甜味剂生产和应用较成熟的产品主要包括糖精钠、甜蜜素、安赛蜜、阿斯巴甜等。

糖精钠是甜味剂的老品种,生产工艺虽日趋成熟,但对其安全性一直有争议。部分国家限制其使用量,我国规定最大使用量为 0.5g/kg,同时还规定了每年的生产量和内销量。我国是世界上糖精钠主要生产和出口国。甜蜜素(环己基氨基磺酸钠),已在 80 多个国家批准使用,目前也是我国应用最多的高倍甜味剂之一。其生产能力约 3 万 t/a,实际用量每年为 2 万 t,生产规模较小。

目前应用阿斯巴甜的商品已经达到 600 多种,无砂糖糖果、压片甜食和胶姆糖等最多可占到用量的 40%,以下依次为饮料约占 25%、冷饮约 10%,以及乳制品、餐桌甜味料、药品、保健食品、冷餐后甜点和咸菜等。美国是全球阿斯巴甜最大的生产国和使用国,我国近年来开始生产阿斯巴甜,但产量较小。

安赛蜜是一种新的高倍甜味剂,于 2000 年被国际组织正式批准为食品添加剂,迄今为止已经在欧美国家取得了实际应用的好成绩。它的甜度是砂糖(3%砂糖溶液)的 200 倍左右,具有极优的耐酸、耐热和耐酶分解性,在腔中不分解,不会引起龋齿,摄入人体后不被吸收,24 h 内可以从尿排出,对人体安全无害,因此在食品加工中使用安全性甚高。这种甜味剂目前已在美国、欧盟和加拿大等 100 多个国家获准在食品中添加使用,其商品名为“萨耐特”。我国规定其最大使用量为 0.3g/g,已有工业化生产,但年产量不足万吨。

此外,还有三氯蔗糖、甜菊苷、阿力甜、纽甜、双甜等,均在高倍甜味剂市场中占有一席之地。