

复合酶协同水解法制备 绿豆抗氧化多肽

马诗文¹, 高云^{1,*}, 韩思杨¹, 汤梅¹, 陈如¹, 李彤彤¹, 方志刚¹, 陆永祯²

(1. 辽宁科技大学化学工程学院, 辽宁鞍山 114051;

2. 辽宁科技大学创新创业中心, 辽宁鞍山 114051)

摘要: 研究复合酶协同水解法制备绿豆抗氧化活性多肽的最佳条件, 并探究其体外抗氧化活性。以水解度为指标, 在单因素实验的基础上, 以 pH、温度、底物浓度、酶用量为实验因素, 通过 $L_9(3^4)$ 正交实验设计筛选出制备绿豆多肽的最佳水解条件, 使用 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基及羟自由基的清除能力评价其抗氧化活性。结果表明: 复合酶协同水解绿豆蛋白的最适反应条件为 pH8.5, 温度 56 °C, 底物浓度 8%, 酶用量 4%, 水解度可达到 33.95%。所得绿豆抗氧化多肽对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基及羟自由基清除率分别为 82.8%、76.82% 和 56.85%, 具有较强的抗氧化活性, 在天然抗氧化剂和保健食品领域有一定的开发利用价值。

关键词: 绿豆蛋白, 复合酶水解, 抗氧化肽, 自由基

Preparation of Mung Bean Antioxidant Polypeptide by Complex Enzyme Synergistic Hydrolysis

MA Shi-wen¹, GAO Yun^{1,*}, HAN Si-yang¹, TANG Mei¹,
CHEN Ru¹, LI Tong-tong¹, FANG Zhi-gang¹, LU Yong-zhen²

(1. College of Chemical Engineering, University of Science and Technology, Anshan 114051, China;

2. Innovation and Entrepreneurship Center, University of Science and Technology, Anshan 114051, China)

Abstract: The optimum conditions for the preparation of antioxidant peptides from mung bean by complex enzyme synergistic hydrolysis were studied, and the antioxidant activity *in vitro* was investigated. Degree of hydrolysis as indicators, on the basis of single factor experiment, the optimum hydrolysis conditions for the preparation of mung bean polypeptide were selected by $L_9(3^4)$ orthogonal design using pH, temperature, substrate concentration, and enzyme concentration as experimental factors, its antioxidant activity was evaluated by scavenging DPPH free radicals, superoxide anion radicals and hydroxyl radicals. The results showed that the optimal reaction conditions for the synergistic hydrolysis of mung bean protein by complex enzyme were pH8.5, temperature 56 °C, substrate concentration 8%, enzyme dosage 4%, and hydrolysis degree up to 33.95%. The antioxidant peptides obtained from mung bean had strong antioxidant activity to DPPH free radical, superoxide anion free radical and hydroxyl radical, which were 82.8%, 76.82% and 56.85%, respectively. In the field of natural antioxidants and health food had a certain value of development and utilization.

Key words: mung bean protein; complex enzyme hydrolysis; antioxidant polypeptide; free radical

中图分类号: TS201.1 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2019)15-0161-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.15.026

引文格式: 马诗文, 高云, 韩思杨, 等. 复合酶协同水解法制备绿豆抗氧化多肽[J]. 食品工业科技, 2019, 40(15): 161-165, 183.

绿豆又称青小豆, 是豆科豇豆属一年生草本植物绿豆的成熟种子, 具有解毒消肿、消暑利尿和抗氧化作用^[1]。绿豆多肽是绿豆分离蛋白经水解而成的低聚肽混合物, 由于相对分子质量较小, 具有水溶性

高、黏度低、稳定性强等特性^[2-3], 人体极易吸收, 可提高机体免疫力^[4-5], 降低胆固醇、改善肾功能^[6], 还具有很强的抗氧化性, 可作为新型抗氧化剂使用^[7-8]。我国绿豆资源丰富, 价格低廉, 目前绿豆产品的深加

收稿日期: 2018-12-21

作者简介: 马诗文(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 810048435@qq.com。

* 通讯作者: 高云(1969-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: yuner9111@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(51634004); 辽宁省自然科学基金项目(20170540466); 2018年国家级大学生创新创业训练计划项目(201810146117); 辽宁省大学生创新创业训练计划项目(201710146000112; 201810146045); 辽宁科技大学第八期大学生创新创业训练计划项目(201810146244)。

工主要集中在绿豆淀粉的利用和生理活性物质提取等方面^[9-10],生产中的绿豆蛋白等副产物含量高,营养价值丰富,尚未得到充分利用,制备绿豆多肽是绿豆蛋白综合利用的有效途径。

优化绿豆蛋白的水解条件是改进制备绿豆多肽的重要方法,蛋白酶的选择及其酶解条件对绿豆多肽的制备以及抗氧化活性有着重要的影响^[11-12]。目前,国内对绿豆多肽的研究多集中在单酶水解的研究。卢珍华等^[13]通过研究木瓜蛋白酶对绿豆蛋白的水解作用,确定最佳反应条件为:酶浓度8%,底物浓度9%,反应温度65℃,反应时间3h,pH6.5。傅亮等^[14]以碱性蛋白酶酶解制备绿豆多肽,得到最佳酶解条件下的水解度为23.09%。顾薇等^[15]利用中性蛋白酶对绿豆分离蛋白进行酶法水解以制备寡肽,水解度的平均值可达28.82%。但是以复合酶协同水解绿豆蛋白制备绿豆多肽的研究尚未见报道。

本研究以绿豆蛋白为原料,以水解度为控制指标,选取碱性蛋白酶及中性蛋白酶复合,提供复合酶协同水解制备绿豆抗氧化肽的最佳工艺条件,为制备绿豆多肽提供了新思路。通过单因素实验和正交试验优化绿豆蛋白酶解的最适条件,并对绿豆抗氧化肽的自由基清除能力进行研究,为绿豆产品的深加工及综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

绿豆蛋白 哈尔滨哈达淀粉有限公司;中性蛋白酶(酶活力50000 U/g)、碱性蛋白酶(酶活力200000 U/g) 安琪酵母股份有限公司;DPPH Sigma公司;氢氧化钠、甲醛、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、硫酸亚铁、双氧水、水杨酸、Tris-HCl 缓冲溶液、邻苯三酚、V₀ 国药化学试剂有限公司。

FA2004N 型电子分析天平 上海精密仪器有限公司;DF-101 型集热式恒温加热磁力搅拌器 北京世纪森朗实验仪器有限公司;PHSJ-5 型实验室 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司;HH-8 型数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;DT5-1 型低速离心机 北京时代北利离心机有限公司;722S 型可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 绿豆抗氧化多肽制备工艺流程 配制一定浓度的绿豆分离蛋白水溶液,控制温度值为85℃水浴保温15min。达到反应温度值后,调节pH至适当值,冷却到酶适宜温度保温。加入水解所需的蛋白酶,将得到的水解液放入水浴锅中进行恒温酶解反应。反应适当时间取出置于沸水浴中加热15min以灭酶。将灭酶后的酶解液冷却至40℃,于离心机中

以4000 r/min 离心分离15min,取出上清液待用。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 pH对酶解效果的影响 在底物浓度为8%、酶解温度为54℃、酶用量为4%等条件相同的情况下,调节pH分别为6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,用中性蛋白酶与碱性蛋白酶1:1复合对绿豆蛋白进行水解,水解3h,以水解度为指标,考察pH对酶解效果的影响。

1.2.2.2 温度对酶解效果的影响 在底物浓度为8%、pH为8.0、酶用量为4%等条件相同的情况下,分别在酶解温度为46、48、50、52、54、56、58℃时,用中性蛋白酶与碱性蛋白酶1:1复合对绿豆蛋白溶液进行水解,水解时间为3h,以水解度为指标,考察酶解温度对酶解效果的影响。

1.2.2.3 底物浓度对酶解效果的影响 在pH为8.0、酶解温度为54℃、酶用量为4%等条件相同的情况下,用中性蛋白酶与碱性蛋白酶1:1复合对绿豆蛋白溶液进行水解,分别改变底物浓度为4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%,水解时间为3h,以水解度为指标,考察底物浓度对酶解效果的影响。

1.2.2.4 酶用量对酶解效果的影响 在底物浓度为8%、pH为8.0、温度为54℃等条件相同的情况下,用中性蛋白酶与碱性蛋白酶1:1复合对绿豆蛋白溶液进行水解,分别改变酶用量为2%、3%、4%、5%、6%、7%,水解时间为3h,以水解度为指标,考察酶用量对酶解效果的影响。

1.2.3 复合酶加酶方式实验 复合酶协同水解实验选取催化作用效果好的中性蛋白酶及碱性蛋白酶两种酶作为复合酶组合,按照以下水解步骤进行:先将其中一种蛋白酶加入绿豆蛋白溶液中,考虑反应结束后是否进行灭酶,再加入第二种蛋白酶,水解一定时间后终止反应,实验设计见表1。

1.2.4 正交试验设计 根据单因素实验结果,以pH、酶解温度、底物浓度、酶用量为影响因素,以水解度为指标,对复合水解绿豆蛋白制备绿豆多肽进行L₉(3⁴)正交实验进行优化,把单因素实验中得出的最佳条件确定为各因素的中间水平,实验因素及水平见表2。

1.2.5 水解度的测定 水解度的测定采用甲醛滴定法^[16]。取适量绿豆蛋白水解液,加入60mL去CO₂蒸馏水,用精密pH计调节pH为8.20,加入20mL已中和pH为8.20的甲醛,然后用0.1000mol/L标准NaOH溶液滴定pH到9.20,记下消耗NaOH的体积V₁,用蒸馏水替代样品,同时做空白实验,记录空白实验消耗NaOH的体积V₀,并用以下公式计算蛋白质的水解度。

表1 复合酶加入方式对水解度的影响

Table 1 Effect of composite enzyme addition method on hydrolysis degree

实验号	1	2	3	4	5	6
双酶	碱性酶+中性酶	碱性酶+中性酶	碱性酶+中性酶	碱性酶+中性酶	碱性酶+中性酶	碱性酶+中性酶
加酶顺序	同时	同时	先中性酶后碱性酶	先碱性酶后中性酶	先中性酶后碱性酶	先碱性酶后中性酶
是否灭酶	是	否	是	否	否	是

表2 L₉(3⁴)正交实验因素水平表

Table 2 Factors and levels of L₉(3⁴) orthogonal experiment

水平	因素			
	A pH	B 温度 (°C)	C 底物浓度 (%)	D 酶用量 (%)
1	7.5	52	8	3
2	8.0	54	9	4
3	8.5	56	10	5

$$\text{水解度}(\%) = \frac{V_0}{V_1} \times 100$$

1.2.6 DPPH 自由基清除率的测定 取 200 μL 绿豆多肽溶液加入到 5 mL 0.05 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液中,用无水乙醇定容到 6 mL,摇匀,在室温下避光反应 20 min,用无水乙醇做参比在 517 nm 处测定吸光度 A₀。用无水乙醇代替 5 mL DPPH 溶液,测定得到的吸光度为 A₁,并用以下公式表示样品对 DPPH 清除率^[17]。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100$$

1.2.7 超氧阴离子自由基清除率的测定 采用邻苯三酚自氧化法测定^[18]。取 200 μL 绿豆多肽溶液,加入到 5.76 mL、pH8.2 的 50 mmol/L Tris-HCL 缓冲溶液中,振荡混匀,在 25 °C 水浴保温 10 min 后加入 40 μL、25 mmol/L 邻苯三酚(25 °C 水浴预处理),迅速混合开始计时。测定 5 min 内在 320 nm 处的吸光度,每隔 30 s 读数一次。以蒸馏水代替样品溶液作为对照,分别将样品管和对照管作吸光度随时间变化得回归方程,其斜率为自氧化速率。记样品管自氧化速率为 ΔA₀,对照管自氧化速率为 ΔA₁,用以下公式表示样品对超氧阴离子清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_1}{\Delta A_0} \times 100$$

1.2.8 羟自由基清除率的测定 采用水杨酸法测定^[14]。取 200 μL 绿豆多肽溶液,加入到 5 mL 2 mmol/L 硫酸亚铁溶液和 5 mL、6 mmol/L 双氧水溶液混合溶液中,摇匀后加入 2 mL、6 mmol/L 水杨酸溶液,混合后立即在 510 nm 测 A₀ 值。用蒸馏水代替样品溶液作为对照,测定得到的吸光度为 A₁。用以下公式表示样品对羟自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

1.3 数据处理

每个实验重复三次,实验结果分析取平均值 ± 标准差。采用 Origin Pro 8.5 进行作图、正交试验设计助手(II3.1)软件进行正交试验设计。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 pH 对酶解反应的影响 酶的空间构型在酸碱不适宜的情况下会产生变化,从而导致酶失活;此外,pH 会影响底物与酶的解离状态,影响蛋白质的水解程度。图 1 表明,复合酶协同水解绿豆蛋白的

反应中,水解度的值会随着 pH 的变化而变化。水解反应在 pH6.5~8.5 的范围之间时,水解度测定结果会随 pH 的增加而上升。在 pH 为 8.5 时绿豆分离蛋白水解度最高,水解效果最好。当 pH 超过 8.5 时,水解度开始缓慢下降。说明 pH 为 8.5 时复合酶的酶活最强,水解效果最好。

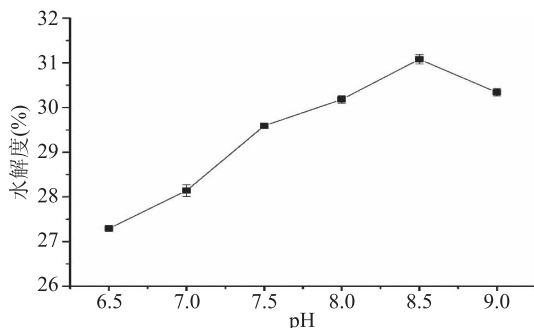


图 1 pH 对水解度的影响

Fig.1 Effect of pH on hydrolysis degree

2.1.2 温度对酶解反应的影响 酶促反应中温度过高会对蛋白酶的稳定性产生影响,易致酶失活,其次酶促反应过程中,温度会分别影响酶与底物、酶与抑制剂、激活剂、辅酶的结合。由图 2 可知,不同温度条件下,反应水解度值表现不同。随着温度的上升水解度也在不断升高,温度控制为 54 °C 的时候,水解绿豆蛋白得到的水解度较高,达到峰值,说明此时水解效果最好。而温度超过 54 °C 时,水解度开始呈缓慢下降趋势,这可能是高温影响了酶本身的活性而影响了产物的水解度。

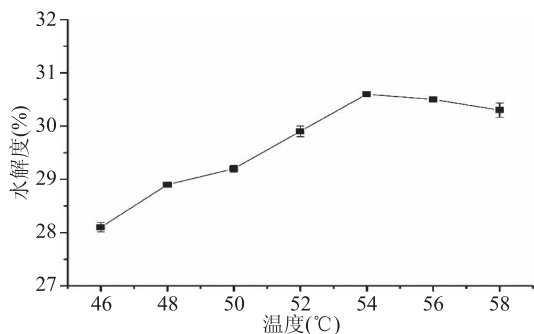


图 2 温度对水解度的影响

Fig.2 Effect of temperature on hydrolysis degree

2.1.3 底物浓度对酶解反应的影响 酶解反应中,底物浓度过高会增大水解液黏度从而产生底物抑制作用;此外,随着反应底物减少,酶量过剩会导致水解反应变慢。图 3 表明,随着底物浓度的增加,水解度也呈快速上升趋势,在底物浓度为 10% 时水解度达到最大,当底物浓度为 9% 时趋于平衡。综合考虑底物浓度对底物的抑制作用,认为复合酶水解绿豆蛋白在底物浓度为 9% 的时候,水解度较高,说明此时水解效果好,其次底物浓度为 10%、8%、7%、6%、5%、4%。

2.1.4 酶用量对酶解反应的影响 酶用量即为标注活力/底物量,酶用量对酶与底物反应具有促进作用。图 4 表明,加入不同酶用量酶解绿豆蛋白溶液,水解度值也有所不同。由图 4 中上升趋势可知,酶用量数值越高水解度也在增加。根据上述的实验结

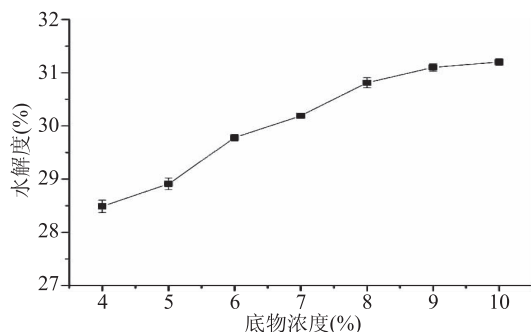


图3 底物浓度对水解度的影响

Fig.3 Effect of substrate concentration on hydrolysis

果以及实验材料的经济性原则,认为选择酶用量3%、4%、5%进行正交试验。

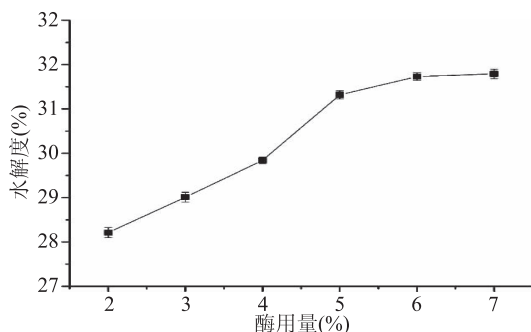


图4 酶用量对水解度的影响

Fig.4 Effect of enzyme concentration on hydrolysis

2.2 碱性蛋白酶和中性蛋白酶复合酶解水解条件的优化

2.2.1 复合酶加入方式对酶解水解度的影响 通过碱性蛋白酶和中性蛋白酶加酶顺序的差异以及加酶过程中是否进行灭酶,将复合酶两者比例设置为1:1,研究复合酶加入方式对绿豆蛋白水解度的影响,复合酶加入方式对水解度的影响结果如表3所示。

表3 复合酶加入方式对水解度的影响

Table 3 Effect of composite enzyme addition method on hydrolysis degree

实验号	1	2	3	4	5	6
水解度 (%)	25.18	28.79	26.21	30.89	29.19	27.43

由表3中数据可知实验序号4的实验结果最高,即碱性蛋白酶和中性蛋白酶复合酶协同水解的最佳加酶方式为先加入碱性蛋白酶,中间不需要经过高温灭酶处理,再加入中性蛋白酶酶解,这种加酶方式所得的酶解物水解度最高,水解度可达到30.89%。

2.2.2 正交实验设计及结果 在上述的碱性蛋白酶和中性蛋白酶复合酶法最佳加酶方式的条件下,对复合酶水解绿豆蛋白的最佳工艺条件进行优化。选取A(pH)、B(温度)、C(底物浓度)、D(酶用量)为4个因素,各取3个水平,以水解度为指标进行正交实验,实验结果如表4和表5所示。

由正交试验结果可知:各个因素对双酶协同水解反应的水解度大小影响程度的主次关系为:A > D > B > C,即 pH > 酶用量 > 酶解温度 > 底物浓度,复

表4 正交实验结果与分析

Table 4 Results of analysis orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	水解度 (%)
1	1	1	1	1	28.32
2	1	2	2	2	29.30
3	1	3	3	3	30.13
4	2	1	2	3	29.73
5	2	2	3	1	29.26
6	2	3	1	2	33.89
7	3	1	3	2	33.49
8	3	2	1	3	32.68
9	3	3	2	1	32.14
K ₁	87.75	91.54	94.89	89.72	
K ₂	92.88	91.24	91.17	96.68	
K ₃	98.31	96.16	92.88	92.54	
k ₁	29.250	30.513	31.630	29.907	
k ₂	30.960	30.413	30.390	32.227	
k ₃	32.770	32.053	30.960	30.847	
R	3.520	1.640	1.240	2.320	
最优方案	A ₃	B ₃	C ₁	D ₂	

表5 方差分析结果

Table 5 Result of variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度 df	均方 MS	F 比	F 临界值
A	18.591	2	9.2955	2.178	4.46
B	5.071	2	2.5355	0.594	4.46
C	2.311	2	1.1555	0.271	4.46
D	8.17	2	4.085	0.957	4.46

合酶协同水解绿豆蛋白的最佳工艺条件是A₃B₃C₁D₂,即 pH 为 8.5、温度 56 °C、底物浓度为 8%、酶用量 4%,根据此最佳工艺条件进行 3 次重复验证实验操作,实际测得的水解度平均值为 33.95%,超过了此前各组酶解工艺水解度值。

2.3 绿豆抗氧化肽的抗氧化活性评价

抗氧化活性评价主要测定单酶水解物(为中性蛋白酶单酶水解绿豆蛋白的水解物)、复合酶水解物对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基及羟基自由基的清除率,探讨绿豆多肽在 3 种抗氧化体系中的抗氧化作用,并以 V_c 和绿豆蛋白作为对照。

2.3.1 绿豆抗氧化肽清除 DPPH 自由基能力 由图 5 可知,各个样品都表现出一定的 DPPH 自由基清除活性,且活性均随样品浓度水平的提高而显著上升。在样品质量浓度达到 0.4 mg/mL 时,复合酶水解绿豆蛋白的水解产物 DPPH 自由基的清除率达到 82.8%;对于单酶水解绿豆蛋白而言,清除能力最大为 79.18%。而在相同浓度下,阳性对照 V_c 的最大清除率为 89.5%,绿豆蛋白的最大清除率为 56.13%。这说明在相同浓度下 V_c 清除 DPPH· 的能力表现最好,其次为复合酶水解绿豆蛋白的水解产物,单酶水解绿豆蛋白的水解物低于复合酶水解绿豆蛋白的水解产物而高于绿豆蛋白。

2.3.2 绿豆抗氧化肽清除超氧阴离子自由基能

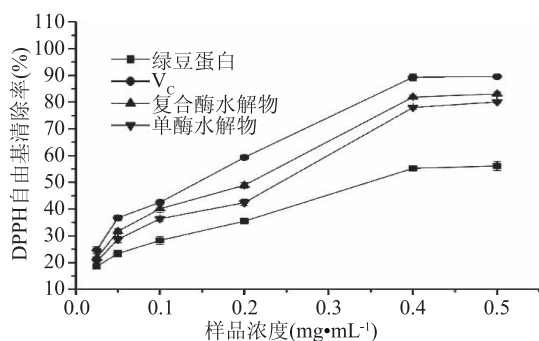


图5 绿豆多肽对 DPPH·清除能力的影响

Fig.5 Effects of mung bean polypeptide on DPPH· scavenging

力 由图6可知,各个样品对超氧自由基的清除作用都随样品浓度的增加而显著增强。在样品浓度达到0.4 mg/mL之前,单酶水解绿豆蛋白及复合酶水解绿豆蛋白的水解产物清除 O_2^- 的能力一直呈上升趋势;当样品浓度超过0.4 mg/mL时,开始呈平稳趋势。单酶水解绿豆蛋白及复合酶水解绿豆蛋白浓度为0.5 mg/mL时的超氧自由基清除率最高,分别为69.1%和76.82%。而在相同浓度下,阳性对照 V_c 的最大清除率为82.58%,绿豆蛋白的最大清除率为51.52%。可知在相同浓度下酶解产物清除 O_2^- 的能力低于 V_c ,而高于绿豆蛋白,且复合酶水解物对 O_2^- 清除能力大于单酶水解物。

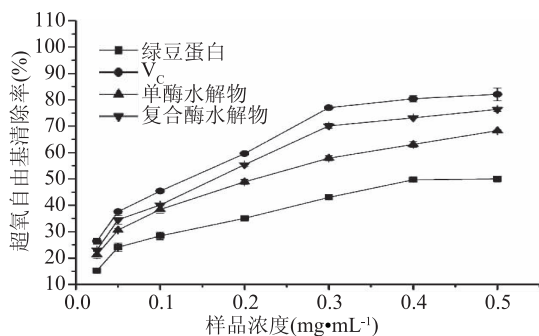


图6 绿豆多肽对 O_2^- 清除能力的影响

Fig.6 Effects of mung bean polypeptide on O_2^- scavenging

2.3.3 绿豆抗氧化肽清除羟自由基能力 由图7可知,各个样品对 $OH\cdot$ 均具有较好的清除能力,且清除能力均随样品浓度水平的提高而提高。在样品质量浓度达到20 mg/mL时,四种样品对 OH 自由基的清除率趋于平稳;阳性对照 V_c 的清除能力最大为69.51%,复合酶水解绿豆蛋白的水解产物最大值为56.85%,单酶水解绿豆蛋白清除能力最大为50.24%,绿豆蛋白的最大清除率为41.62%。这说明在相同浓度下复合酶水解绿豆蛋白的水解产物优于单酶水解绿豆蛋白的水解物清除 $OH\cdot$ 的能力。两者均低于 V_c ,而高于绿豆蛋白。

3 结论

本实验通过复合酶协同水解法制备绿豆抗氧化活性多肽,并对绿豆多肽的抗氧化活性进行评价。通过单因素实验结合正交实验得到复合酶协同水解绿豆蛋白的最适反应条件为 pH8.5,温度 56 °C,底物

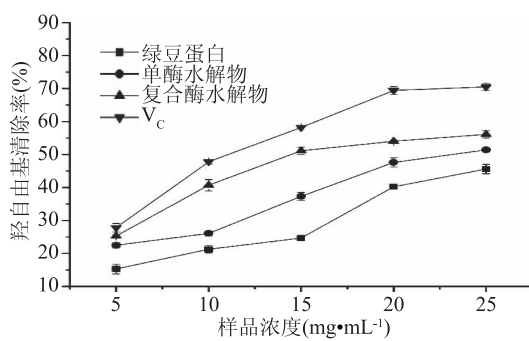


图7 绿豆多肽对 $OH\cdot$ 清除能力的影响

Fig.7 Effects of mung bean polypeptide on $OH\cdot$ scavenging

浓度8%,酶用量4%,水解度可以达到33.95%。同时发现绿豆抗氧化多肽对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基及羟自由基均有良好的清除能力,复合酶协同水解得到的绿豆抗氧化多肽对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基及羟自由基清除率分别为82.8%,76.82%和56.85%,表明绿豆多肽抗氧化效果明显,在保健食品领域有一定的开发利用价值。

参考文献

- [1] 张海生,孙健,张瑞妮,等.绿豆抗氧化活性肽的分离纯化及其组成分析[J].食品工业科技,2012,33(14):153-156.
- [2] 田旭静,段鹏慧,范三红,等.响应面法优化酶解藜麦蛋白制备抗氧化肽工艺[J].食品科学,2018,39(10):158-164.
- [3] 蒋海萍,廖丹葵,童张法.抗氧化活性肽的研究进展[J].广西科学,2015,22(1):60-64.
- [4] 张萍,陈合,廖娜.复合酶水解乳清蛋白制备抗氧化肽的工艺优化[J].乳业科学与技术,2017,40(5):8-11.
- [5] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean conglycinin[J]. J Agile Food Chem, 1995, 43: 574-578.
- [6] 张燕,魏汝君,潘风光,等.蛋清源活性肽抗氧化及抗炎活性[J].食品科学,2018,39(13):153-158.
- [7] 田茜,张文兰,李群,等.绿豆的品质特性及综合利用研究进展[J].中国农学通报,2016,32(9):77-82.
- [8] 张海均,贾冬英,姚开,等.绿豆的营养与保健功能研究进展[J].食品与发酵科技,2012,48(1):7-10.
- [9] 李杨,江连洲,王梅,等.碱性蛋白酶酶解绿豆分离蛋白制备多肽的工艺研究[J].食品工业科技,2011,32(10):384-387,390.
- [10] Chunyan Wang, Qiang Wang, Jin-qiang Tian. Optimization of enzymatic production of oligopeptides from apricot almonds meal with neutrase and N120P[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(12): 4952-4961.
- [11] 滕聪,么杨,任贵兴.绿豆功能活性及应用研究进展[J].食品安全质量检测学报,2018,9(13):3286-3291.
- [12] 杜梦霞,李璇,谢建华,等.绿豆蛋白与多肽理化性质及其生物活性研究进展[J].食品工业科技,2016,37(21):363-367.
- [13] 卢珍华,郭彩华.木瓜蛋白酶水解绿豆蛋白制备可溶性肽的研究[J].食品工业科技,2005(11):51-53.
- [14] 傅亮,何倩,陈勇,等.绿豆多肽的制备工艺及抗氧化作

(下转第183页)

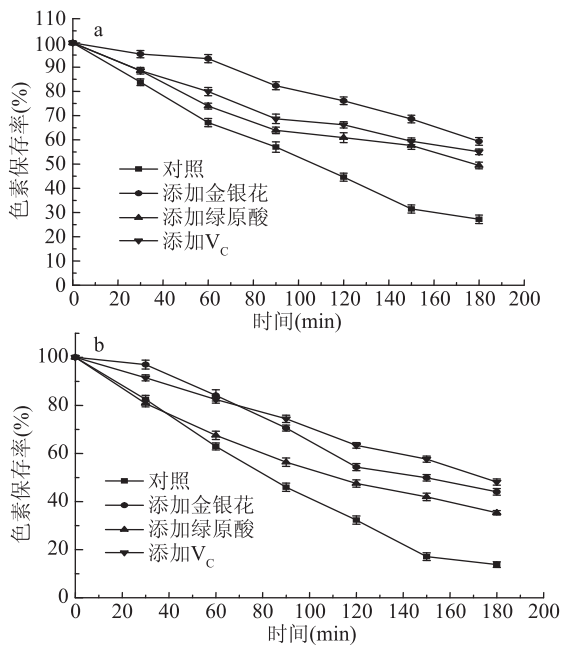


图6 金银花醇提取物护色效果及有效物质分析

Fig.6 Color-protection effect and effective substance analysis of ethanol extract of honeysuckle

注:a:红色素溶液光降解;b:黄色素溶液光降解。

一级降解动力学方程。结合添加金银花醇提取物后色素溶液的浊度(NTU),确定金银花醇提取物最优添加量为0.5 mg/mL,紫外照射180 min红色色素保存率可以达到56.26%(空白组20.43%);黄色色素保存率可以达到52.58%(空白组19.12%)。在pH=4的条件下,红色素和黄色素添加金银花醇提取物的色素保存率分别是空白组的4.58、5.93倍。因此金银花醇提取物能有效提高水溶性红曲红色素、黄色素的保存率以及酸性条件下的光稳定性。通过HPLC分析,金银花醇提取物中含有大量的绿原酸,红色素以及黄色素溶液中分别添加0.5 mg/mL绿原酸,色素保存率分别是空白组的2.18、3.20倍,因此金银花醇提取物的护色作用与其所含绿原酸密切相关。金银花醇提取物作为纯天然的红色素护色剂,其成本低,天然无害,具有很好的应用前景。

参考文献

[1]陈细丹,屠小夫,毛青钟,等.传统福建糯米红曲黄酒的工艺技术和质量控制[J].酿酒,2014,41(2):67-71.
 [2]Feng Y, Shao Y, Chen F. Monascus pigments [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(6):40-1421.
 [3]连喜军,红曲红色素的光褪色研究[J].肉类研究,2005(8):32-35.
 [4]王昌禄,王莹,陈勉华,等.红曲色素不同成分的光稳定性研究[J].食品研究与开发,2008,29(10):189-192.

[5]张庆庆,张帝,汤文晶,等.水溶性和醇溶性红曲色素的光稳定性[J].食品科学,2015,36(1):94-98.
 [6]刘立增,吴常燕,张凯,等.红曲色素的光褪色研究进展[J].食品研究与开发,2013,34(16):117-121.
 [7]连喜军,王昌禄,顾晓波,等.红曲色素稳定性研究现状及展望[J].肉类研究,2003,17(2):33-34.
 [8]Ming J, Zhao M, Lin L, et al. Lonicera japonica Thunb. extract improves the quality of cold-stored porcine patty through inhibition of lipid and myofibrillar protein oxidation [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2017, 53(4):986-993.
 [9]南海娟,王正荣,葛亚明,等.金银花与叶醇提取物对油脂的抗氧化活性比较[J].食品与发酵工业,2017,43(6):179-184.
 [10]Chen Y, Li Q, Zhang W P, et al. Effect of honeysuckle extract for color protection of human hair exposed to sunlight radiation [J]. Advanced Materials Research, 2013, 821-822:28-31.
 [11]Wen H U, Cuo T, Jiang W, et al. Effects of ultrahigh pressure extraction on yield and antioxidant activity of chlorogenic acid and cynaroside extracted from flower buds of *Lonicera japonica* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2015, 13(6):445-453.
 [12]Zhang Q, Zhang D, Tang W, et al. Photostability of water-soluble and alcohol-soluble monascus pigments [J]. Food Science, 2015, 36(1):94-98.
 [13]连喜军,王红娟,王昌禄,等.各类抗氧化剂对红曲红色素中红色素的护色作用[J].中国食品添加剂,2004(1):61-62.
 [14]于小蓉,孙莲,孟磊. HPLC测定新疆药桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷和槲皮素[J].中国现代应用药学,2011(11):1051-1054.
 [15]朱佳丽,敬璞.红曲红色素稳定性研究及光热降解动力学分析[J].食品与发酵科技,2017,53(5):49-53.
 [16]苏金为,甘纯玢,吕日新.水溶性红曲黄色素的制备[J].中国食品学报,2002,2(1):8-11.
 [17]林维宣,邱新国,杨红.山楂色素稳定性的研究[J].食品科学,1992,13(11):5-10.
 [18]Ji H, Jiang D H, Ye Y, et al. Study on extraction and stability of monascus pigments [J]. China Condiment, 2010, 7(35):86-89.
 [19]王昌禄,王莹,陈勉华,等.红曲色素不同成分的光稳定性研究[J].食品研究与开发,2008,29(10):189-192.
 [20]李刚,王志良,丁小蓉,等.西安地区市场饮料pH抽样检测[J].中国学校卫生,2002,23(5):455-456.
 [21]Jung H, Kim C, Shin C S. Enhanced photostability of monascus pigments derived with various amino acids via fermentation [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(18):7108.
 [22]Mapari S A S, Meyer A S, Thrane U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(14):6253.

(上接第165页)

用[J].食品与机械,2010,26(6):79-82.
 [15]顾薇,屠春燕,袁艳娟,等.中性蛋白酶酶解绿豆蛋白制备寡肽的研究[J].安徽农业科学,2008,36(36):16140-16141,16222.
 [16]杨文博,张英华.蛋白质水解度的测定方法研究[J].中国

调味品,2014,(3):88-90.
 [17]赵钟兴.蚕蛹蛋白酶解制备抗氧化和降血压活性产物及其动力学研究[D].南宁:广西大学,2012.
 [18]吴晖,任尧,李晓凤.鸭蛋清蛋白多肽体外抗氧化活性的研究[J].食品工业科技,2011,32(7):91-95.