

分类号：TS253.9

密 级：公开

单位代码：10363

学 号：2210530134

咸蛋清抗氧化肽的分离纯化及活性研究

THE PURIFICATION AND ACTIVITY STUDY OF ANTIOXIDANT PEPTIDE SDERIVED FROM SALTED EGG WHITE

学生姓名： 黄伟

指导教师： 蔡为荣

专 业： 生物与医药

研究方向： 天然产物分离纯化

论文答辩日期：2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：黄伟

日期：2024 年 06 月 03 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者名 黄伟 指导教师签名: 李万荣

日期: 2024 年 6 月 3 日

日期: 2024 年 6 月 3 日

咸蛋清抗氧化肽的分离纯化及活性研究

摘要

本文以咸鸭蛋清为原料,采用等电点法预处理脱盐,而后采用双酶酶解脱盐咸蛋清制备具有良好抗氧化活性的酶解液,经超滤、葡聚糖LH-20进一步分离纯化,通过体外抗氧化实验和细胞实验对蛋清抗氧化肽进行研究,并得到以下结论:

1.咸蛋清制备工艺的优化。采用等电点对咸蛋清进行脱盐预处理,选取了五种常见的蛋白酶,包括风味酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶以及木瓜蛋白酶,对咸蛋清进行了针对性的酶解处理。以酶解产物中DPPH·清除率为首要评价标准,辅以DH值作为参照指标,经过筛选发现碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶在酶解效果上最为出色,因此选作双酶解的候选酶种。系统探讨了底物浓度、酶解温度、酶解时长、pH值以及酶添加量五大因素对蛋清酶解液中DPPH·清除能力及水解度(DH值)的影响。通过单因素实验与正交实验相结合的方式,最终确定了碱性蛋白酶酶解咸蛋清的最优化工艺条件为:底物浓度设定为5%,酶添加量为8%,pH值调节至9.0,酶解温度控制在55℃,酶解过程持续6h。此时的DPPH·清除率可以达到 $90.27\pm0.52\%$;木瓜蛋白酶的最佳优化工艺为底物浓度5%、酶添加量8%、pH为8.0、温度为50℃酶解时间6h,此时的DPPH自由基清除率可以达到 $88.21\pm0.95\%$ 。而后采用双酶结合的方式探究加酶顺序、加酶时间、加酶量比,进一步制备较好抗氧化效果的蛋清酶解液。得到的双酶酶解工艺为:先加碱性蛋白酶反应4h后,灭酶再加入木瓜蛋白酶反应2h。两酶加入比例为:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=1:1,即碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶各加酶量4%。此时的DPPH自由基清除率可以达到 $95.65\pm0.71\%$ 。

2.进一步通过超滤和葡聚糖 LH-20 凝胶分离纯化,以 DPPH·、ABTS⁺、PTIO·为指标,对分离纯化得到的各组分的体外抗氧化活性进行分析,筛选抗氧化肽。在浓度为 1 ug/mL~1 mg/mL 时,浓度越大,抗氧化能力越强,呈现出一定的量效关系。其中经超滤所得所得的四个组分中小于 3kda 分子量的 F4 组分的抗氧化活性最好,F4 的清除能力均优于其他组分,F4 在实验范围内,DPPH·的清除率为 65.69±1.35%,ABTS⁺清除率为 96.11±2.26%。PTIO·清除率为 61.67±1.65%。经葡聚糖凝胶 LH-20 分离得到了四个组分中,F4-3 组分浓度的增加会导致其在 DPPH·、ABTS⁺和 PTIO·清除能力方面呈现上升趋势。在浓度为 1ug/mL~1mg/mL 内的 DPPH·、ABTS⁺、PTIO·的清除率分别为 72.19±1.58%、98.56±2.62、78.85±2.01%,F4-3 在抗氧化三指标的检测中表现出较好的抗氧化活性,因此选用抗氧化能力最好的 F4-3 为研究对象继续进行下一步细胞实验探究。

3.采用细胞实验对咸蛋清抗氧化肽的各组分进行研究。通过建立 H₂O₂ 诱导 L929 成纤维细胞发生氧化应激损伤的实验模型,从分离提取得到的八个组分对受损细胞的保护效应进行了深入探究。实验数据显示,在 100-500 µg/mL 的浓度区间内,蛋清肽对未经损伤的 L929 细胞生长既未表现出促进作用,也未体现出抑制效果。本实验中选择了 400 µmol/L 的 H₂O₂ 浓度,此时的细胞存活率为 52.71 ± 1.3%,以此来诱导 L929 细胞产生氧化损伤,从而构建了一个可靠的氧化应激损伤模型。经过 F4-3 组分预处理后,L929 氧化损伤细胞的存活率得到了提高,从 81.45 ± 2.12%上升至 91.32 ± 1.43%,该组分对受氧化损伤的细胞表现出保护作用。进一步通过 DCFH 荧光探针、活死试剂盒、线粒体膜电位试剂盒对其氧化应激反应进行探究。结果表明,在细胞处理过程中,使用浓度为 500 µg/mL 的 F4-3 组分进

行预处理，可以有效保护细胞，提升细胞存活率。因此，经 F4-3 组分为实验组中抗氧化效果最好的抗氧化肽。

关键词：蛋清多肽，酶法水解，抗氧化，L929 细胞，氧化损伤

Isolation, purification and activity of Antioxidant Peptide from salted Egg White

ABSTRACT

In this paper, Salted Duck Egg white was pretreated and desalted by isoelectric point method, and then the enzyme hydrolysate with good antioxidant activity was prepared by double enzyme hydrolysis of salted egg white, which was further separated and purified by ultrafiltration and dextran LH-20. The antioxidant peptides of egg white were studied by in vitro antioxidant experiment and cell experiment, and the following conclusions were obtained.

1. Optimization of preparation technology of salted egg white. The salted egg white was desalted by isoelectric point, and five common proteases were selected, including flavor enzyme, trypsin, neutral protease, alkaline protease and papain. Taking the DPPH clearance rate of the enzymatic hydrolysate as the primary evaluation standard and the DH value as the reference index, it was found that alkaline protease and papain were the best in enzymatic hydrolysis, so they were selected as the candidate enzymes for double enzymatic hydrolysis. The effects of substrate concentration, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time, pH value and enzyme addition on DPPH scavenging ability and hydrolysis degree (DH) in egg white enzymatic hydrolysate were systematically discussed. Through the combination of single factor experiment and orthogonal experiment, the optimal process conditions for alkaline protease enzymatic hydrolysis of salted egg white were determined as follows: substrate concentration 5%, enzyme addition 8%, pH 9.0, enzymatic hydrolysis temperature 55 °C . The enzymatic hydrolysis process lasted 6 hours. At this time, the DPPH scavenging rate can reach $90.27 \pm 0.52\%$; the best optimization process of papain is 5%

substrate concentration, 8% enzyme addition, 8.0 pH, 50 °C enzymatic hydrolysis time 6 h, and the DPPH radical scavenging rate can reach $88.21 \pm 0.95\%$. Then the enzyme hydrolysate with better antioxidant effect was prepared by using the method of double enzyme combination to explore the sequence, time and ratio of adding enzyme. The double enzyme hydrolysis process was as follows: alkaline protease was added for 4 h, then papain was added for 2 h. The addition ratio of the two enzymes is: alkaline protease: papain = 1:1, that is, the amount of alkaline protease and papain is 4%. At this time, the scavenging rate of DPPH radical can reach $95.65 \pm 0.71\%$.

2. Furthermore, the antioxidant activity of the isolated and purified components was analyzed by ultrafiltration and dextran LH-20 gel separation and purification, and the antioxidant peptides were screened by DPPH, ABTS+ and PTIO. When the concentration is $1\mu\text{g/mL} \sim 1\text{mg/mL}$, the higher the concentration, the stronger the antioxidant capacity, showing a certain dose-effect relationship. Among the four components obtained by ultrafiltration, F4, which is less than the molecular weight of 3kda, has the best antioxidant activity, and the scavenging ability of F4 is due to other components. F4 is in the experimental range, the scavenging rate of DPPH is $65.69 \pm 1.35\%$ and the scavenging rate of ABTS + is $96.11 \pm 2.26\%$. The clearance rate of PTIO was $61.67 \pm 1.65\%$. Among the four components separated by dextran gel LH-20, the increase of the concentration of F4-3 will lead to an increase in DPPH, ABTS+ and PTIO scavenging ability. The clearance rates of DPPH, ABTS+ and PTIO in $1\mu\text{g/mL} \sim 1\text{mg/mL}$ were $72.19 \pm 1.58\%$, $98.56 \pm 2.62\%$ and $78.85 \pm 2.01\%$, respectively. F4-3 showed good antioxidant activity in the detection of three antioxidant indexes, so F4-3 with the best antioxidant capacity was selected as the research object to continue the next step of

cell experiment.

3. The components of antioxidant peptides in salted egg white were studied by cell experiment. Through the establishment of an experimental model of oxidative stress injury in L929 fibroblasts induced by H_2O_2 , the protective effects of eight components extracted from L929 fibroblasts on the damaged cells were studied. The experimental data showed that in the concentration range of $100\text{-}500\ \mu\text{g} / \text{mL}$, egg white peptide neither promoted nor inhibited the growth of undamaged L929 cells. In this experiment, $400\ \mu\text{mol} / \text{L}$ H_2O_2 concentration was selected, and the cell survival rate was $52.71 \pm 1.3\%$. In order to induce oxidative damage in L929 cells, a reliable oxidative stress injury model was constructed. After pretreatment with F4-3 component, the survival rate of L929 oxidative damaged cells was increased from $81.45 \pm 2.12\%$ to $91.32 \pm 1.43\%$. This component showed a protective effect on oxidative damaged cells. Furthermore, the oxidative stress reaction was studied by DCFH fluorescence probe, living death kit and mitochondrial membrane potential kit. The results showed that pretreatment with F4-3 component at the concentration of $500\ \mu\text{g} / \text{mL}$ could effectively protect the cells and improve the cell survival rate. Therefore, the F4-3 group was divided into the best antioxidant peptides in the experimental group.

KEYWORDS: Egg white polypeptide, Enzymatic hydrolysis, Antioxidant, L929 cells, Oxidative damage

目 录

摘 要	IV
ABSTRACT	VII
第 1 章 绪论	- 1 -
1.1 咸鸭蛋概述	- 1 -
1.1.1 鸭蛋	- 1 -
1.1.2 咸鸭蛋清	- 1 -
1.1.3 咸鸭蛋清的组成	- 1 -
1.2 咸鸭蛋清综合利用现状	- 2 -
1.2.1 咸蛋清的直接利用	- 2 -
1.2.2 咸蛋清脱盐再利用	- 3 -
1.2.3 咸蛋清中活性成分的提取	- 3 -
1.3 生物活性肽的研究进展	- 4 -
1.3.1 抗氧化肽	- 4 -
1.3.2 抗炎肽	- 4 -
1.3.3 抗菌肽	- 4 -
1.4 抗氧化的研究方法	- 4 -
1.5 自由基与人体健康及抗氧化	- 6 -
1.5.1 自由基的简介	- 6 -
1.5.2 自由基与人体健康的联系	- 6 -
1.5.3 自由基与抗氧化的关系	- 7 -
1.6 研究目的意义及内容	- 7 -
1.6.1 研究目的及意义	- 7 -
1.6.2 研究内容	- 8 -
第 2 章 蛋清酶解工艺的优化	- 9 -
2.1 材料与仪器	- 10 -
2.1.1 实验材料与试剂	- 10 -
2.1.2 主要仪器及设备	- 10 -
2.2 试验方法	- 10 -
2.2.1 脱盐蛋清粉的制备及成分测定	- 10 -
2.2.2 蛋清酶解液的制备	- 11 -
2.2.3 酶种类的筛选	- 11 -
2.2.4 蛋白酶酶解工艺优化	- 12 -

2.2.5 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶双酶解工艺条件的确定	- 13 -
2.2.6 蛋清水解过程中冻干颗粒空间结构的扫描电镜分析	- 14 -
2.2.7 蛋清粉氨基酸组成分析	- 15 -
2.2.8 统计分析	- 15 -
2.3 结论与分析	- 15 -
2.3.1 咸鸭蛋清成分分析结果	- 15 -
2.3.2 脱盐蛋清酶筛选结果	- 15 -
2.3.3 碱性蛋白酶水解单因素试验结果分析	- 16 -
2.3.4 碱性蛋白酶水解正交试验结果分析	- 17 -
2.3.5 木瓜蛋白酶水解单因素试验结果分析	- 18 -
2.3.6 木瓜蛋白酶水解正交试验结果分析	- 20 -
2.3.7 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶双酶酶解咸蛋清条件的确定	- 21 -
2.3.8 扫描电镜结果	- 23 -
2.3.9 蛋清粉氨基酸分析结果	- 24 -
2.4 本章小结	- 25 -
第 3 章 蛋清多肽的分离纯化及抗氧化研究	- 26 -
3.1 材料与仪器	- 27 -
3.1.1 实验材料与试剂	- 27 -
3.1.2 主要仪器与设备	- 27 -
3.2 试验方法	- 27 -
3.2.1 超滤分离	- 27 -
3.2.2 Sephadex L- 20 分离纯化	- 28 -
3.2.3 蛋清肽对 DPPH 自由基清除能力	- 29 -
3.2.4 蛋清肽对 ABTS ⁺ 自由基清除能力	- 29 -
3.2.5 蛋清肽对 PTIO 自由基清除能力	- 30 -
3.2.6 统计分析	- 30 -
3.3 结果与分析	- 30 -
3.3.1 超滤分离结果	- 30 -
3.3.2 超滤组分蛋清肽对 DPPH 自由基的清除能力	- 30 -
3.3.3 超滤组分对 ABTS ⁺ 自由基的清除能力	- 31 -
3.3.4 超滤组分对 PTIO 自由基的清除能力	- 32 -
3.3.5 Sephadex L- 20 分离结果	- 33 -
3.3.6 经 LH-20 分离后 F4 各组分对 DPPH 自由基的清除能力	- 34 -
3.3.7 经 LH-20 分离后 F4 各组分对 ABTS ⁺ 自由基的清除能力	- 34 -

3.3.8 经 LH-20 分离后 F4 各组分对 PTIO 自由基的清除能力	- 35 -
3.4 本章小结	- 36 -
第 4 章 蛋清蛋白抗氧化肽对 L929 细胞氧化损伤模型的保护作用	- 37 -
4.1 材料与仪器	- 38 -
4.1.1 主要仪器与药品	- 38 -
4.1.2 试验仪器与设备	- 38 -
4.2 试验方法	- 38 -
4.2.1 L929 细胞的复苏、培养传代、冻存	- 38 -
4.2.2 蛋清抗氧化肽对 L929 细胞的毒性作用	- 40 -
4.2.3 H ₂ O ₂ 诱导的 L929 细胞氧化损伤模型的建立	- 40 -
4.2.4 蛋清肽各组分对 H ₂ O ₂ 诱导后 L929 细胞活力的影响	- 40 -
4.2.5 F4-3 组分不同浓度对 H ₂ O ₂ 诱导后 L929 细胞活力的影响	- 41 -
4.2.6 F4-3 组分对 H ₂ O ₂ 诱导的 L929 细胞内 ROS 的影响	- 41 -
4.2.7 F4-3 不同浓度的 F4-3 对 L929 细胞活死染色	- 41 -
4.2.8 F4-3 对 H ₂ O ₂ 诱导的 L929 细胞线粒体膜电位的影响	- 42 -
4.2.9 统计分析	- 42 -
4.3 结论与分析	- 43 -
4.3.1 蛋清抗氧化肽对 L929 细胞的毒性作用	- 43 -
4.3.2 H ₂ O ₂ 诱导的 L929 细胞氧化损伤模型的建立	- 44 -
4.3.3 蛋清肽各组分对 H ₂ O ₂ 诱导后 L929 细胞活力的影响	- 45 -
4.3.4 F4-3 组分不同浓度对 H ₂ O ₂ 诱导后 L929 细胞活力的影响	- 46 -
4.3.5 F4-3 组分对 H ₂ O ₂ 诱导的 L929 细胞内 ROS 的影响	- 47 -
4.3.6 不同浓度的 F4-3 对 L929 细胞活死染色	- 48 -
4.3.7 F4-3 对 H ₂ O ₂ 诱导的 L929 细胞线粒体膜电位的影响	- 49 -
4.4 本章小结	- 50 -
第 5 章 结论与展望	- 51 -
5.1 结论	- 51 -
5.2 展望	- 52 -
参考文献	- 53 -
致 谢	- 62 -

第 1 章 绪论

1.1 咸鸭蛋概述

1.1.1 鸭蛋

中国是全球最大的蛋品生产和消费大国。禽蛋产业发达，禽蛋年总产量长期稳居世界第一^[1]。中国拥有庞大的人口基数和多样化的饮食文化，使得蛋品成为了我们日常生活中不可或缺的重要食材之一。

鸭蛋作为一种营养丰富的食品，其含有高质量的蛋白质，这些蛋白质包含人体所需的氨基酸^[2]，易于消化吸收，是构建和修复人体组织的重要物质基础。鸭蛋含有维 A、维 D、维 E、维 K 以及 B 族维生素，其蛋黄中的维 A 和维 D 含量尤为丰富^[3]。蛋黄中富含卵磷脂，对大脑和神经系统的发育有益，同时也是细胞膜的重要组成成分^[4]。鸭蛋中含有一定量的胆固醇^[5]，虽然人体需要适量的胆固醇以维持生理功能，但对于高血脂、心血管疾病患者，应控制摄入量。鸭蛋还含有一些生物活性物质，如胆碱、 ω -3 脂肪酸、抗氧化剂等，对健康有一定益处。鸭蛋作为一种营养均衡的食品，适量食用可以为人体提供多种必要的营养素^[6]。

1.1.2 咸鸭蛋清

咸蛋清是经过盐水浸泡、腌制而成的咸鸭蛋中包裹蛋黄的白色蛋白部分^[7]，据文献记载，咸蛋清中至少含 7-10% 的氯化钠^[8]。市场对咸鸭蛋的需求主要集中在腌制后的鸭蛋黄部分，尤其是在传统节日如端午节的粽子制作以及日常饮食中^[9]，咸蛋黄因其独特的口感和色泽备受青睐，相比之下，咸蛋清的消费需求较低。在腌制过程中，为了达到咸蛋的风味要求，其内部盐分含量极高^[10]，这大大限制了咸蛋清在食品加工中的直接应用，因为过高的盐分容易影响食品的整体风味和营养价值，如果摄入过量会对人体健康存在一定的危害。咸蛋清的大量废弃不仅浪费了优质的蛋白质资源^[11]，其含有的盐分如果排放不规范，会对土壤和水资源环境造成负面影响^[12]。

1.1.3 咸鸭蛋清的组成

咸鸭蛋清含有多种丰富的营养成分，包括大量的蛋白质、氨基酸、维生素和微量元素等。其中，咸蛋清中的优质蛋白主要由卵白蛋白、伴白蛋白和卵球蛋白组成。高质量的蛋白质，这对于人体细胞修复和生长至关重要^[13]。蛋白质

是构建肌肉、骨骼、皮肤等组织所必需的基本元素。咸蛋清还含有多种维生素和矿物质，包括维生素 A、B2、D 以及钙、铁等微量元素。维 A 对于保护视力和促进免疫系统功能起着重要作用；而 B 族维生素则参与能量代谢过程，并支持神经系统正常运作；维 D 则有助于钙吸收和骨骼健康。此外，咸蛋清中还存在着一些抗氧化剂如硒等物质，可以帮助减少自由基对身体造成的损伤，并提供保护效果。在适度摄入下，咸蛋清为我们提供均衡且全面的营养成分。咸鸭蛋清的营养价值与新鲜蛋清相似^[14]，但在盐分和某些营养素的可利用性上有所区别。由于高盐含量，咸蛋清适合偶尔食用，并且在饮食中注意配合清淡食物，以保持健康的膳食平衡。因此，充分发挥咸鸭蛋清的营养价值对于食品行业发展以及生态环境保护等方面具有重要意义。

1.2 咸鸭蛋清综合利用现状

随着科学技术的发展，咸蛋清的蛋白质资源开始被深入挖掘，通过酶解、改性等手段，提取出具有特定功能的生物活性肽^[15]，用于保健品^[16]、化妆品^[17]等高附加值产品的开发。在环保与资源循环利用方面，咸蛋清的高效利用体现了循环经济的理念，有助于减少废弃物的排放，提高资源利用率，减轻环境污染压力。国家和地方各级政府出台了一系列政策支持咸蛋清等食品副产品资源的深度开发和综合利用，鼓励相关企业投入研发力量，推动咸蛋清衍生产业向高科技、高附加值方向发展。咸蛋清的综合利用现状正处在从单一的饲料用途向多元化、高附加值应用转变的过程中，但仍面临着技术成本、市场接受度和规模化生产的挑战，尚有很大的发展潜力等待发掘。

1.2.1 咸蛋清的直接利用

咸蛋清直接用于炒菜，增加咸鲜味道，如咸蛋清炒金瓜、咸蛋清炒空心菜等；也可以作为腌制材涂抹在肉类上，腌制鱼片、猪肉^[18]，王等^[19]用咸蛋清添加到鸡肉中制作鸡肉糜；或者可以在制作煎饼、馅料等食品；咸蛋清可作为配料之一，制作咸蛋清香干^[20]；另外咸蛋清可加入到面条、饺子皮、混沌皮等面食制作中，提供特殊的口感和风味；也可在制作香肠^[21]等肉类加工产品时，作为粘结剂和风味增强剂使用；也可制作虾条^[22]；咸蛋清加入到汤品中增加咸鲜味，如咸蛋瘦肉汤等，例如在煲仔饭、烩饭、炒饭等饭类制作中使用咸蛋清，提供额外的风味^[23]。由于咸蛋清的咸度较高，直接使用时需根据实际情况调整菜品整

体的咸度，以免过咸。另外，随着食品科技的发展，咸蛋清经过脱盐处理后，其在食品工业中的应用范围进一步拓宽，可以用于制作更多类型的食品和饮料产品。

1.2.2 咸蛋清脱盐再利用

咸蛋清脱盐后再利用是一个旨在减少资源浪费、提高咸蛋产业附加值的重要研究方向^[24]。咸蛋清含有丰富的蛋白质，但由于腌制过程中盐分含量很高，直接利用受到限制。经过脱盐处理后咸蛋清作为食品配料，提供蛋白质和独特风味；可以混合其他食材制作馅料，用于中式面点^[7]；作为填充物或黏合剂，增加口感和营养价值。蛋白质经过酶解处理后可以生成生物活性肽，用于开发抗氧化肽^[25]、降压肽^[26]、免疫调节等功效的功能性的肽；脱盐后的咸蛋清作为优质蛋白质来源，可用于动物饲料中^[27]；在生物科技领域，咸蛋清蛋白经过处理后，可以作为某些药物制剂或化妆品的原料^[28]；咸蛋清脱盐后含有的蛋白质及其他营养成分可以作为有机肥料的组成部分为植物提供营养。目前咸蛋清脱盐主要方法有以下几种一是反渗透：反渗透是一种借助半透膜的压力驱动脱盐技术，当外界压力大于渗透压时，溶剂能够逆着自然渗透的方向透过膜，从而将水分子与盐离子分离，实现脱盐目的^[29]。二是离子交换树脂，离子交换树脂具有选择吸附特定离子的能力，通过离子交换反应，水中的阳离子和阴离子被树脂上的可交换离子取代，从而实现脱盐^[30]。三是纳滤，作为一种膜分离技术，其地位恰好处于反渗透技术和超滤技术两者之间，兼具两者部分特性而又有所区别，能够有效去除部分单价和高价离子，适用于特定场合的脱盐处理^[31]。

1.2.3 咸蛋清中活性成分的提取

目前，咸鸭蛋清中生物活性成分的提取研究主要聚焦于溶菌酶和抗生物素蛋白的提取^[32]。溶菌酶是一种具有极高安全性能的自然杀菌剂和防腐剂，可广泛应用于食品保鲜^[33]、日常化工^[34]以及医药制剂^[35]等领域。研究结果指出，禽蛋蛋清中溶菌酶的含量非常丰富，大约占据了蛋清蛋白的 0.2%~0.4%^[36]，利用咸蛋清为起始材料，运用亲和层析、离子交换技术以及直接结晶等工艺制备溶菌酶^[37]。抗生物素蛋白，也被称为亲和素，最初在鸡蛋清中发现^[38]。因此，在亲和纯化^[39]、药物传递、生化检测和医疗诊断等领域广泛应用了抗生物素蛋白。

1.3 生物活性肽的研究进展

目前研究结果显示生物活性肽具备多种不同的生物学功能，能够改善整体健康状态，并降低患上癌症^[40]、糖尿病^[41]以及心脏病^[42]等特定慢性疾病的风险。至今为止，已经确认了一系列营养功能较强的生物活性肽，包括抗氧化、抗炎、抑制癌细胞增殖、杀菌作用以及调节免疫系统和血压等方面。

1.3.1 抗氧化肽

目前已研究对来自动植物的生物活性肽的抗氧化特性进行了评估^[43]。生物活性肽一般可以从牛奶^[44]、鱼类^[45]、肉类^[46]、鸡蛋^[47]、玉米^[48]、小麦^[49]和大豆^[50]等动植物中提取得到。制备条件的改变会影响抗氧化肽的生物活性^[51,52]。已经确定了抗氧化肽的主要作用机制包括对肽键和羟基能够有效清除活性氧、活性氮自由基；抑制自由基的产生；激活调节细胞生理生化反应以共同防御功能^[53]。因此，人们开始关注寻找自然产生的抗氧化肽来取代合成抗氧化肽。

1.3.2 抗炎肽

当前从已有的文献中显示，可以从天然动植物中可以提取有抗炎疗效的活性肽，例如鸡蛋、牛奶^[54]。通常情况下，这些生物活性肽与抗炎效果之间存在紧密联系^[55]。弘子姗^[56]通过碱性蛋白酶酶解核桃从中分离出具有抗炎活性的生物活性肽；杨玉亮^[57]通过从牦牛骨中通过酶解方式，利用超滤、高效液相等分离手段进行分离纯化提取牦牛骨源抗炎活性肽。

1.3.3 抗菌肽

抗菌肽通过改变细胞膜和生物过程来发挥作用，包括细胞分裂等关键环节^[58]。它们能够在细菌膜内形成通道或孔隙，并且具备抑制合成代谢活性、基因表达和信号转导的能力，并促进血管生成^[59,60]。例如，利用酪蛋白提取纯化得到的抗菌肽已被证明变形链球菌和菌牙龈卟啉单胞菌具有广谱抗菌活性^[61]。此外，从海蟹、牡蛎、带鱼以及鲢鱼等海洋生物中提取抗菌肽，现已被规模生产使用^[62]。从凤尾鱼烹饪废水中分离出来的 GLSRLFTALK 肽已被证实可以有效地抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌^[63]。另外，Aguilar-Toalá等人^[64]发现<3kDa的蛋白水解物组分具有更高的抑制活性，并且增强了大肠杆菌膜通透变化。

1.4 抗氧化的研究方法

当前，国际和国内的抗氧化研究广泛采用了体外化学实验、细胞培养实验

以及动物模型实验作为主要的研究手段。在体外化学研究的基础上构建了体内模型。通过运用这些经过验证的经典细胞和动物实验模型，能够更加精确且高效地测定功能性成分的抗氧化性能。由此，在探究抗氧化作用的相关科研工作中，此类实验模型扮演着至关重要的角色。

在体外评估抗氧化能力时，通常采用 DPPH·、ABTS⁺以及 PTIO·等技术手段量化自由基清除效能。抗氧化过程中的工作机制在于：在活性自由基损害生物体内关键分子之前，抗氧化剂通过向自由基捐赠氢原子或电子，并伴随质子转移反应，最终形成稳定化合物，同时自身转变为较稳定的抗氧化剂衍生物自由基形式^[65]。Liu^[66]以 DPPH·和 ORAC 为指标测定卵黏蛋白的蛋清酶解液的抗氧化活性。Karthikeyan 等^[67]通过常见种类的蛋白酶对咸鸭蛋清进行酶解，发现中性蛋白酶水解产物具有优异的抗氧化能力。Wang 等^[68]通过预处理的方式，即脉冲电场技术前处理蛋清蛋白肽，并以 DPPH·为指标对其抗氧化活性作进一步探究，通过预处理得到的蛋清蛋白肽抗氧化能力得到了提高。Thaha 等^[69]通过实验评估了蛋清肽的抗氧化活性，发现其具备出色的 DPPH 和 ABTS 自由基消除能力，在维持牛奶脂肪免受氧化侵害以及对抗食物中酪氨酸酶导致的变色现象方面发挥着关键作用。与体内方法相比，体外化学抗氧化性能评价方法具备成本效益高和实验周期较短的特点。

自从确立了测定细胞内部抗氧化活性的方法以来，科研工作者们持续不断地开发和完善各类与细胞功能相关的实验模型。Lee 等发现，使用凤胃蛋白酶进行酶解得到的黄膜水解产物对巨噬细胞中脂多糖刺激下促炎因子上调的抑制作用，因此卵黄膜经酶解得到的酶解液具有出色的抗氧化活性^[70]。马思彤等成功建立了基于过氧化氢诱导的 HepG2 细胞损伤模型，并使用的是碱性蛋白酶对鸡蛋清蛋白质进行了酶解处理，经过酶解程序，他们在分子量少于 1kDa 的酶解产物中鉴定出了具有显著活性的成分。这些成分被证实能有效抑制过氧化氢在 HepG2 细胞内诱发的活性氧生成，从而有效地防护细胞免受氧化应激所造成的损害，并进一步阻止了由氧化应激所触发的细胞凋亡进程^[71]。细胞内抗氧化相较于传统的体外化学分析法，采用检测细胞真实状态构建的综合系统模拟实验更加全面系统，是研究天然产物产生抗氧化活性的一种验证方法。

1.5 自由基与人体健康及抗氧化

1.5.1 自由基的简介

自由基，化学上也称为“游离基”，是指具有不成对电子的原子、分子或离子。在分子结构中，通常电子都是成对存在的，以满足稳定状态的要求。当一个分子或原子由于外界条件（如光、热、辐射、化学反应等）作用导致共价键断裂时，如果断裂的结果使得其中一个原子获得或丢失了一个电子，那么这个带有单个不成对电子的原子或原子团就成为自由基^[72]。自由基具有很高的化学活性，因为那个未成对的电子使其倾向于与其他物质发生反应，以达到稳定状态。自由基很容易与其他分子发生氧化还原反应，从而改变目标分子的化学性质。在生物体系中，自由基尤其是氧自由基的产生和清除是维持氧化还原稳态的关键因素之一^[73]。然而，过量的自由基会导致细胞结构受损，被认为是许多疾病（如癌症、心血管疾病、神经退行性疾病）以及衰老过程中的重要因素^[74]。在正常的线粒体代谢活动中，活性氧（ROS）作为一种自然生成的副产物出现，其中包括但不限于超氧阴离子、羟基自由基以及过氧化氢（ H_2O_2 ）等组分^[75-77]。然而，当这类活性氧的浓度逐渐蓄积至过量时，其会对线粒体的基础结构及其正常功能构成不利影响，并有可能进一步触发对整个机体的潜在破坏作用^[78]。这将致使氧化状态加剧，并可能导致抗氧化防御体系的失衡，从而诱发了所谓的氧化应激现象^[79]。

1.5.2 自由基与人体健康的联系

自由基是新陈代谢过程中自然产生的副产品，特别是在线粒体中，氧气在生成 ATP 的过程中会产生一些自由基，如超氧化物。自由基过多会导致细胞和 DNA 损伤，这些累积的损伤被认为是导致衰老的重要机制之一。自由基过多会打破细胞内氧化还原平衡，加快老化进程。自由基通过氧化反应攻击细胞膜、蛋白质、脂质和核酸，可能导致炎症、肿瘤、心血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病（如阿尔茨海默病、帕金森病）等多种慢性疾病的发病风险增加^[80]。过度的自由基可损伤免疫系统的细胞，影响其正常功能，降低机体抵抗力。自由基可破坏皮肤的胶原蛋白和弹性纤维，加速皮肤老化^[81]，还可能导致眼部组织病变，如白内障和青光眼。

1.5.3 自由基与抗氧化的关系

自由基与抗氧化剂之间存在着直接的对立和相互作用关系，在生物学和医学上尤其重要。自由基是具有未配对电子的分子或原子，因其未配对电子使其具有高度的化学活性。自由基在人体内通过多种途径产生，比如代谢过程、环境污染、紫外线照射、烟草烟雾、酒精摄入等。自由基在体内过量积累时，会引发连锁反应，尝试获取额外电子达到稳定状态，这一过程称为氧化反应。在氧化过程中，自由基可能会攻击和损伤细胞膜、蛋白质、DNA 等生物分子，从而导致细胞功能障碍，诱发炎症反应、加速衰老、甚至参与多种慢性疾病的发生与发展。抗氧化剂则是一类能够阻止或减缓氧化反应的物质，它们通过向自由基提供电子，使其变为较稳定的化合物，从而终止自由基链式反应。抗氧化剂包括多种维生素（如维生素 C、维生素 E）、微量元素（如硒）、植物化学物质（如多酚、类胡萝卜素）和其他生物活性成分。它们通过中和自由基或者通过提高机体自身抗氧化酶系的活性，帮助维护细胞内的氧化还原平衡，保护细胞不受自由基损害。总的来说，自由基与抗氧化剂之间的关系体现在动态平衡之中，健康的机体需要不断清除自由基，同时利用内外源性抗氧化剂来抵抗自由基造成的氧化应激。通过合理饮食、适当运动和健康的生活习惯，我们可以增强自身的抗氧化能力，从而减轻自由基对健康的负面影响。

1.6 研究目的意义及内容

1.6.1 研究目的及意义

在我国，咸鸭蛋是备受喜爱的传统蛋制品之一。咸蛋清中富含易于人体消化吸收的高质量蛋白质，然而由于盐分含量较高，无法直接利用。通过去除咸蛋清中的盐分并进行酶解处理，可以提升其实际应用价值。咸蛋清中蛋白质含量约占10%，其中必需氨基酸比例适宜，并容易被人体吸收和利用，因此可视为一种优质全价蛋白质资源。蛋白水解后，可以生成具有抗氧化特性的肽段。作为一种天然的抗氧化剂，蛋白水解物在食品工业和医药领域具有营养和功能价值。由于其低致敏性、易消化以及抗氧化等生物活性优点，回收咸蛋清经过脱盐和酶法水解制备的蛋白水解物被用作潜在的抗氧化剂，被大量应用于医药、食品及化妆品行业。这对新药开发和人体健康起着重要作用。蛋清蛋白相较于自然界中其他提取得到的蛋白，由于其蛋白质构成与人体自身的蛋白模式相近，因此利用蛋清蛋白提取生物活性肽更为安全可靠。

当前阶段, 蛋清蛋白肽的研究重点主要在于探索其体外酶解制备技术和其体外化学性质进行评估这两个领域。然而, 对其双酶解后分离纯化并通过体外抗氧化和细胞探究的研究相对较少。尽管已经通过一系列的技术制备出蛋清蛋白肽, 但因其制备效率低下及生物利用率不足的问题, 限制了其生物活性的有效发挥, 进而增加了进一步开发利用的难度。为此, 亟需在提升蛋清蛋白肽制备效能方面寻求创新路径, 并构建细胞模型, 以细胞层面的研究来深入探究其生物活性效应。此举旨在为禽蛋资源在农产品加工中开发抗氧化肽提供技术支持, 并有望为研发预防疾病和维护人体健康的新型功能性产品开辟崭新途径。

1.6.2 研究内容

(1) 预处理咸蛋清及脱盐, 并对酶解工艺进一步改进, 制备抗氧化活性肽的研究

将咸蛋清经等电点脱盐后进行酶解, 以 DPPH· 为主要指标, DH 为参考指标考察碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、复风味蛋白酶、木瓜蛋白酶五种酶酶解后的抗氧化活性。筛选出 2 种抗氧化活性最好的蛋白酶进行研究, 采用单因素和正交实验, 探究双酶的酶解时间、添加酶量、底物浓度、PH、酶解温度、双酶的酶添加时间、顺序及比例, 确定最佳的酶解工艺条件。

(2) 脱盐咸蛋清酶解液的分离纯化及抗氧化研究

将双酶酶解得到的具有最高抗氧化活性的酶解产物通过 50、10、3 kDa 的 50 mL 超滤管进行分级分离。分别得到分子质量 >50 kDa(F1)、10~50 kDa(F2)、3~10 kDa (F3) 和 <3 kDa (F4) 的 4 个组分, 而后将分离得到的四个组分通过对 DPPH·、ABTS⁺、PTIO· 抗氧化活力的测定, 筛选出抗氧化活性最好的组分继续通过葡聚糖 LH-20 凝胶色谱层析分离柱分离纯化。并对得到四个组分进一步做 DPPH·、ABTS⁺、PTIO· 三指标评价, 为咸蛋清抗氧化功能活性的开发提供支持。

(3) 蛋清肽对过氧化氢诱导 L929 细胞氧化损伤的保护作用

通过建立细胞氧化应激模型, 探究蛋清抗氧化肽对于氧化损伤 L929 细胞的保护作用。本研究进一步运用 CCK-8 检测细胞活力、使用 DCFH-DA 活性氧荧光探针、细胞活死试剂盒、线粒体膜电位试剂盒对进行检测, 探究蛋清抗氧化肽中最优组分对经 H₂O₂ 诱导损伤的 L929 细胞所展现的保护效应。

第 2 章 蛋清酶解工艺的优化

蛋白质经酶解后具有抗氧化^[82]、抗菌^[83]、钙螯合^[84]、抗癌^[85]、降血压^[86]和抗炎^[87]等活性，大量研究文献已证实，经蛋白酶降解处理后的产物通常展现出优越的生物活性特征。

本章以咸蛋清为原料，采用双酶酶解的方式，以蛋清酶解液对 DPPH·清除率为主要指标，DH 为参考指标，通过对五种常见蛋白酶类型：胰蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶以及碱性蛋白酶进行评估和比对，旨在挑选出在抗氧化性能上表现最优的两种酶。在此基础上，为了使水解度进一步增大，并期望研究抗氧化活性更好的水解产物的性质，本章研究双酶水解鸭蛋清的效果，考虑到蛋白酶本身是蛋白质，如果同时加入不同的酶进行水解，蛋白酶之间可能会相互为底物，导致相互水解，并且每种酶的最佳水解条件也有所不同，不能同时满足各种酶的最佳水解条件，所以选择多酶分步水解法，即先将反应体系调到一种酶的最佳水解条件，加入酶进行水解，水解一定时间后再将反应体系调到另外一种酶的最佳水解条件进行水解，水解完毕后灭酶活，测定 DPPH·和水解度。通过单因素和正交实验试验对咸蛋清酶解过程中底物浓度、酶添加量、酶解温度、酶解时间等条件对其酶解效果的影响。而后进一步通过双酶酶解优化，获得抗氧化能力高的蛋清酶解液的最佳工艺参数，为进一步分离纯化做准备。

2.1 材料与仪器

2.1.1 实验材料与试剂

表 2-1 实验材料与试剂

Table2-1 The chemical reagents for this experiment

药品名称	纯度/ 规格	生产商
咸鸭蛋清		安徽雨杏食品有限公司
氢氧化钠	AR	国药有限集团
柠檬酸	AR	国药有限集团
胰蛋白酶(Trypsin)	BR	源叶生物科技有限公司
风味蛋白酶(Flavor enzyme)	BR	合肥博美生物科技有限责任公司
木瓜蛋白酶(Papain)	BR	源叶生物科技有限公司
碱性蛋白酶(Alkaline protease)	BR	源叶生物科技有限公司
中性蛋白酶(Neutral protease)	BR	合肥博美生物科技有限责任公司
1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)	AR	沃凯有限公司

2.1.2 主要仪器及设备

表 2-2 仪器及设备

Table 2-2 Instruments and equipments

药品名称	纯度/规格	生产商
电子天平	CP214	奥豪斯仪器有限公司
pH 计	PHSJ-5	上海雷磁仪器厂
数显集热式磁力搅拌器	DF101B	常州市金坛大地仪器厂
数显恒温水浴锅	HH-S28	金坛大地自动化仪器厂
超滤离心管	3、10、50k	美国 Millipore 公司
高速离心机	L550	湘仪离心机有限公司
酶标仪	MultiskanFC 型	赛默飞世尔仪器有限公司
氨基酸自动分析仪	LA8080	日立株式会社
冷冻干燥机	LGJ-10	北京松源华兴科技发展有限公司

2.2 试验方法

2.2.1 脱盐蛋清粉的制备及成分测定

将处理后得的咸蛋清液与等量的水进行混合，用质量分数 50%的柠檬酸调节 pH 至 3.0，在 60℃的条件下恒温搅拌 5 h，加入 NaOH 溶液调节 pH 值至 5.6，

过滤得沉淀物，将所得沉淀物与 2 倍得水进行混合，匀浆，并重复此操作一次，将所得的沉淀物再次与等量的水混合进行冷冻干燥，即所得蛋清粉^[88]。

食品中蛋白质的测定按照：食品安全国家标准中 GB 5009.5-2016；脂肪的测定按照 GB 5009.6-2016；NaCl 含量的测定可参照 GB/T 12457-2008；水分的测定按照 GB 5009.3-2016；灰分的测定遵循 GB 5009.4-2016。

2.2.2 蛋清酶解液的制备

参照王^[89]的方法制备蛋清酶解液，并稍作修改。将适量蛋清粉溶解在去离子水中，以配置一定浓度的蛋清蛋白溶液。将溶液置于 95 °C 水浴环境中保温 5 min，然后将温度调制适宜蛋白酶所需反应的特定温度，并将其转移至恒温电磁搅拌器上。随后，利用 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液精准调整溶液的 pH 值至所选蛋白酶最佳反应 pH 范围。而后加入合适量的蛋白酶，开始进行酶解计时。在酶解反应进程中，为了确保 pH 值保持恒定，会向其中添加适量的 NaOH 溶液。达到设定酶解时间后，取出酶解液置于沸水中 15 min，以达到灭酶活的目的，而后采用离心机设定参数为:5000 r/min;15 min，将上清液收集起来并通过冷冻干燥处理后，将其储藏于-20°C 冰箱中，以备后续使用。

2.2.3 酶种类的筛选

2.2.3.1 酶的种类

以 DPPH·清除率作为主要指标，DH 为参考指标，选择了产生蛋清蛋白肽最适宜的蛋白酶^[90]。选取的各种酶最适温度、pH 及酶添加量见表 2-3

表 2-3 五种蛋白酶的酶解条件

Table 2-3 Conditions for Enzymatic Hydrolysis of five Proteases

酶的种类	条件设定				
	底物浓度 (%)	酶添加量 (%)	温度 (°C)	pH 值	酶解时间 (h)
风味蛋白酶(Flavor enzyme)	5	6	55	6.0	3
碱性蛋白酶(Alkaline protease)	5	6	55	9.0	3
胰蛋白酶(Trypsin)	5	6	45	8.0	3
木瓜蛋白酶(Papain)	5	6	55	7.0	3
中性蛋白酶(Neutral protease)	5	6	55	7.0	3

2.2.3.2 DPPH 自由基清除能力

按 Jayapala N 的方法^[91]，略作修改，测定蛋清酶解后，其 DPPH·清除能力。将 100 μ L 新制备的 0.2 mM DPPH 甲醇溶液加入 96 孔微量滴定板的每个孔中，

依次加入 100 μL 不同浓度的不同组分的样品，在室温下在黑暗中孵育 30 min，并在 517 nm 下测量。一式三份进行测定，并通过使用以下公式计算：

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = [1 - (A1 - A2)/A0] \times 100\%$$

式中：A0—甲醇+DPPH 溶液；A1—样品+DPPH 溶液；A2—样品+甲醇

2.2.3.3 水解度 (DH) 的测定

参考 Ren 稍作修改^[92]，采用 pH-Stat 法测定 DH。称取一定量的蛋清粉配制蛋清溶液，于 90 $^{\circ}\text{C}$ 下热处理 15 min。调节溶液至适宜 pH 值，加入相应蛋白酶后恒温酶解，加入 0.5 mol/L NaOH 保持 pH 稳定。酶解结束后迅速在沸水浴 10 min 钝化蛋白酶。水解度的计算公式如下：DH 按如下公式计算：

$$DH(\%) = N_b \times \frac{1}{a} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\%$$

式中：B—酶解中加入的 NaOH 溶液体积，mL；Nb—NaOH 的浓度，mol/L；Mp—底物中蛋白质质量，g； $h_{tot} = 9.1438$ (鸭蛋清蛋白)； $a = [10(\text{pH} - \text{pK})]/[1 + 10(\text{pH} - \text{pK})]$ ，pH 为酶解时 pH 值， $\text{pK} = 7.0$ 。

2.2.4 蛋白酶酶解工艺优化

2.2.4.1 碱性蛋白酶单因素实验

基于已筛选出的碱性蛋白酶开展酶解实验，选取蛋清蛋白酶解液对 DPPH·清除率作为主要评价标准，同时参考 DH 值变化情况，系统探讨 pH 值、酶解温度、底物浓度以及酶添加量这五个关键因素对碱性蛋白酶在蛋清蛋白水解过程中效果的影响程度。具体设置如下：pH 梯度为 8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 五个水平；酶解温度则设置为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 五种条件；底物浓度依次设定为 2%、3%、4%、5%、6% 和 7%；酶用量梯度包括 3%、5%、7%、9% 和 11%；而酶解时间则分别设为 2、4、6、8 和 10 h。研究了底物浓度、酶添加量、pH、酶解温度以及酶解时间等因素对酶解过程的影响，优化酶解工艺。

2.2.4.2 碱性蛋白酶酶解条件正交优化

在基于碱性蛋白酶单因素实验结果，进一步运用 $L_9(3^4)$ 正交设计方法进行优化，以明确碱性蛋白酶在酶解过程中的各项最佳条件。具体的正交试验因素水平设置可参见表格 2-4。

表 2-4 正交试验因素水平

Table 2-4 Factor level of orthogonal test

水平	A/底物浓度 (%)	B/酶添加量 (%)	C/温度 (°C)	D /酶解时间 (h)
1	4	6	50	5
2	5	7	55	6
3	6	8	60	7

2.2.4.3 木瓜蛋白酶单因素实验

考察因素同2.2.4.1，不同变量的具体设置如下：pH值分四个梯度进行调控，分别是5.0、6.0、7.0以及8.0；酶解温度设置了五个不同的级别，依次是40°C、45°C、50°C、55°C和60°C；底物浓度按照递增模式设计，包含3%、4%、5%、6%和7%五个浓度等级；酶添加量也相应地分为五个层次，分别是3%、5%、7%、9%和11%；酶解的过程时间涵盖了2至6 h，每间隔1 h作为一个试验时长点。

2.2.4.4 木瓜蛋白酶酶解条件正交优化

基于木瓜蛋白酶单因素实验结果，进一步运用 $L_9(3^4)$ 正交设计方法进行优化，以明确木瓜蛋白酶在酶解过程中的各项最佳条件。具体的正交试验因素水平设置可参见表格 2-5。

表 2-5 正交试验因素水平

Table 2-5 Factor level of orthogonal test

水平	A/底物浓度 (%)	B/酶添加量 (%)	C/温度 (°C)	D /酶解时间 (h)
1	3	6	45	4
2	4	7	50	5
3	5	8	55	6

2.2.5 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶双酶解工艺条件的确定

2.2.5.1 加酶顺序的确定

表 2-6 双酶加入方式试验设计

Table. 2-6 Design of adding mode of double enzyme

序号	总加酶量/%	pH	时间/h	加酶方式
1	8	8.0	6	按 2.2.4.2 Papain protease 正交优化
2	8	9.0	6	按 2.2.4.4 Alkaline protease 正交优化
3	4+4	8.0→9.0	3+3	在 1 的基础上（时间减半）→灭酶→在 2 的基础上（时间减半）
4	4+4	9.0→8.0	3+3	在 2 的基础上（时间减半）→灭酶→在 1 的基础上（时间减半）

根据 2.3.4 和 2.3.6 的正交试验的优化结果，我们对双酶的加酶顺序进行探究，试验设计见表 2-6。具体设计如下：碱性蛋白酶加木瓜蛋白酶酶添加总量为 8%，酶解总时间 6 h，所使用的两种不同类型的蛋白酶的酶添加量的比例及酶解时间的比例设置为 1:1，pH 及酶解温度根据正交所得该酶最佳反应条件。将三份等量样品取出，实验组三酶解条件为：将样品水溶液的 pH 调至 8.0、温度为 50℃后添加木瓜蛋白酶，在反应 3h 后停止酶活并冷却，然后将 pH 调到 9.0、温度为 55℃的碱性蛋白酶的最适值后，继续进行 3 h 的酶解，并最终停止反应获得酶解液。实验组四酶解条件为：将样品水溶液的 pH 调到 9.0、温度为 55℃的碱性蛋白酶的最适值后，在反应 3h 后停止酶活并冷却，然后将 pH 调至 8.0、温度为 50℃后添加木瓜蛋白酶进行 3 h 的酶解，并最终停止反应获得酶解液。在结束反应之后，测定 DPPH·和 DH 以确定双酶添加顺序。

2.2.5.2 分段加酶时间比的确定

在确定了加酶方式的基础上，对加酶时间比进行探究，设计五种加酶比例方式。即首先加入碱性蛋白酶，然后再加入木瓜蛋白酶，加入过程中酶的条件参照 2.2.4 的正交试验结果。加入等量的两种酶，加入时间比例分别设置为：碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的比例为 1:5、2:4、3:3、4:2、5:1。在反应结束后，我们对 DPPH·和 DH 进行测定来确定双酶解时间比。

2.2.5.3 两酶加酶量比例的确定。

确定了先加碱性蛋白酶灭酶后再加入木瓜蛋白酶的加酶方式，加酶时间比为 4: 2 的基础上，继续对两种酶的酶添加量比例进行探究。具体如下：取六组等量样品，在两种酶添加量之和为 8% 的前提下，首先使用碱性酶进行反应 4 h，然后灭酶停止酶活性并加入木瓜蛋白酶继续反应 2 h。碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶的酶添加比例分别为 1:5、2:4、3:3、4:2、5:1。在反应结束后，通过 DPPH·和 DH 测定双酶解加酶量比。

2.2.6 蛋清水解过程中冻干颗粒空间结构的扫描电镜分析

将经冷冻干燥处理得到的蛋清粉样本，以及在最佳工艺条件下酶解后取得的上清液冻干粉末和沉淀物样本，将样品通过导电双面胶牢固地固定在样品台上，随后实施喷金处理，以确保样品能够满足在扫描电子显微镜下进行有效观察所需的条件，并对这些样本进行微观结构的详细观测并拍摄照片，以此对比

酶解前后的蛋清蛋白结构变化情况。

2.2.7 蛋清粉氨基酸组成分析

本试验采取日立一氨基酸自动分析仪进行氨基酸测定，参照陈梦微的方法略加修改^[93]。具体操作方法为取样品0.1 g，加入8 mL 6mol/L的HCL溶液混合，在减压状态下密封水解管，采用氮气置换。在110℃下水解22 h，再向水解管内加入48 mL 10 mol/L NaOH中和 HCL以停止反应，用去离子水将待测溶液定容至25 mL后使用 0.22 mm 水系滤膜过滤，即可测定样品氨基酸组成。

2.2.8 统计分析

所有实验均作3次重复，数据采用SPSS 24.0进行统计，结果以平均值±标准差表示，图表绘制采用Origin 2018软件完成。

2.3 结论与分析

2.3.1 咸鸭蛋清成分分析结果

表 2-7 脱盐蛋清粉的基本成分分析(%)

Table. 2-7 Analysis of basic components of desalted egg white powder(%)

样品	蛋白质	脂肪	NaCl	水分	灰分
咸蛋清	11.32	0.53	10.98	73.21	0.28
脱盐蛋清粉	77.23	0.12	2.73	3.23	5.57

从上表2-7中可以看出，咸蛋清干粉末中蛋白质含量占约11.32%，NaCl含量占 10.98%，经初步等电点脱盐，其脱盐蛋清粉的蛋白质含量约占77.23%，NaCl含量约为2.73%，NaCl含量经等电点脱盐后下降，为蛋清肽进行进一步的分离纯化和分析做准备。

2.3.2 脱盐蛋清酶筛选结果

蛋白酶的专一性特征体现在对蛋清粉的不同酶解反应中，图2-1所示，经过不同蛋白酶处理后的蛋清粉水解产物在抗氧化性能上的差异。实验结果显示，碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶对于咸蛋清中DPPH·的清除效果较好于其他三种蛋白酶，其中碱性蛋白酶的清除效率高达66.1±1.16%，木瓜蛋白酶的清除率也达到55.7±0.91%。鉴于这两种蛋白酶展现出卓越的抗氧化性能，后续实验将优先选择碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行深化研究。

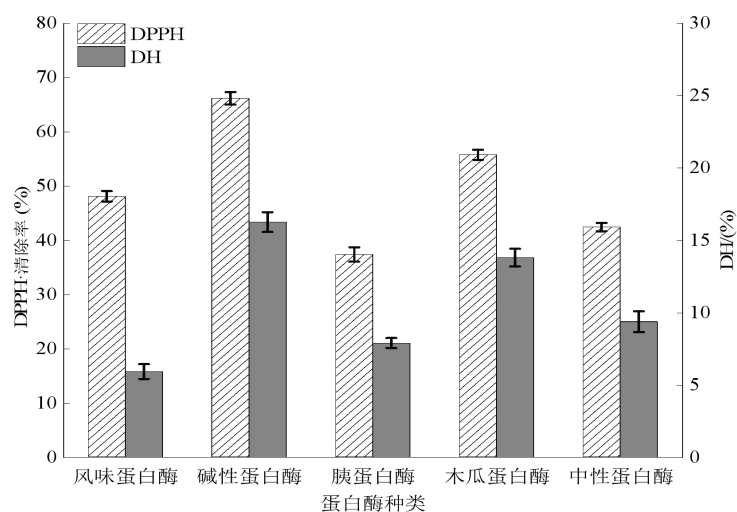


图 2-1 不同蛋白酶水解液的 DPPH·清除率及水解度

Fig. 2-1 DPPH scavenging rate and degree of hydrolysis of different protease hydrolysates

2.3.3 碱性蛋白酶水解单因素试验结果分析

按表 2-3 各酶对应的酶解条件，酶解效果如图 2-2 所示。从图 2-2a 结果可以得出，当底物浓度为 2% 时，酶与底物结合的可能性较小，导致水解程度较低。这是因为在低浓度下，酶分子之间相互竞争与底物结合，由于少量的底物可供选择，使得每个酶分子都有更多机会与其它未被占用的活性位点发生反应。通过观察碱性蛋白酶在不同条件下抗氧化活性和水解效果表现出来趋势可以看出，在 5% 左右时达到最优状态。因此，在实验中增加适量的底物浓度有助于提高 DPPH·清除率较高的酶解液水解反应效果。从图 2-2b 结果可以看出，当底物浓度保持不变时，随着酶的投入量增加，DPPH·清除能力也得到了提高，在碱性蛋白酶的添加量达到 7% 时达到最好清除效果，而后酶的活性呈现出增长速度减缓的趋势。图 2-2c 中 pH 值的变动对碱性蛋白酶水解效能有影响，蛋清酶解产物的抗氧化性能随 pH 值上升而提升。当 pH 9.0 时 DPPH·清除活性逐渐趋于平缓，之后在 pH 超过 11 后，略微下降；图 2-2 d 随着温度升高至 55℃ 时，该酶对 DPPH·清除活性达到了最高点。这说明在 55℃ 左右是碱性蛋白酶发挥最佳效果的最适温度。图 2-2 e 可以看出在初始阶段，酶解液表现出较快的抗氧化活性提升和水解度增加，在 6 h 达到最佳水解状态，进一步观察发现，在 6 h 后继续延长酶解时间，DPPH·清除率和水解度的增幅不再明显。这可能是因为特定肽链已经被充分水解并释放了大量具有抗氧化能力的多肽物质。随着酶解时间延长，

蛋白质结构中原本隐藏或固定在内部位置上的多肽序列得以暴露并释放出来。

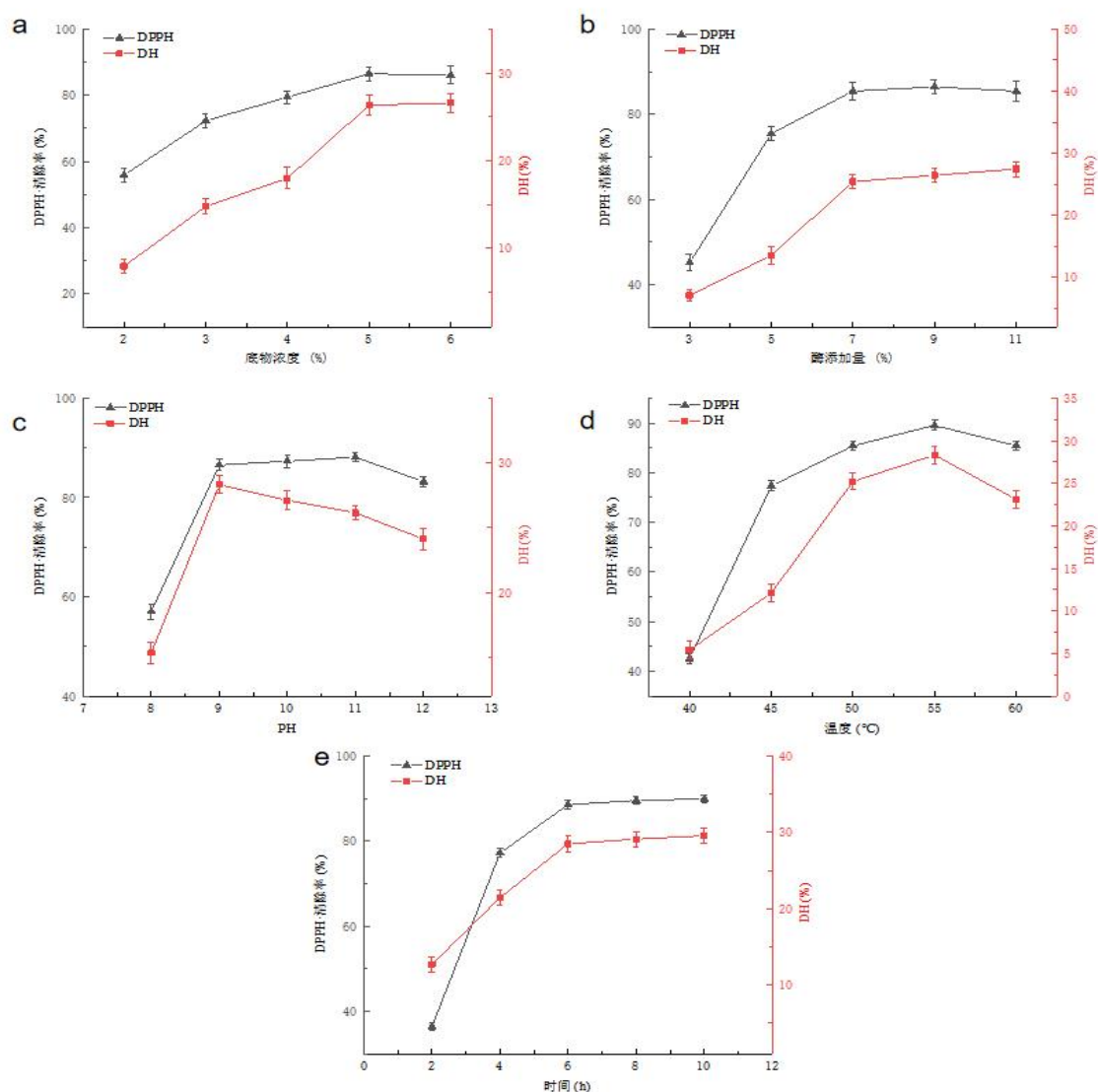


图 2-2 水解条件对碱性蛋白酶水解产物 DPPH·清除率的影响

Fig. 2-2 Effect of hydrolysis conditions on DPPH· scavenging of alkaline protease hydrolysates

a. 底物浓度, b. 酶添加量, c.pH, d. 酶解温度, e. 酶解时间

a.substrate concentrat, b.enzyme dosage, d.enzymolysis temperature, e.hydrolysis time

2.3.4 碱性蛋白酶水解正交试验结果分析

本章节主要以制备DPPH·清除效果最好的酶解液, 根据表2-8的正交结果可知, DPPH·清除效果最好的因素组合为A2B3C2D3, 因此选择A2B3C2D3为本正交试验的最好组合, 即酶解条件为底物浓度为5%、酶添加量为8%、酶解温度为55°C、酶解时间为6 h。通过上述酶解条件的作用下的碱性蛋白酶酶解液, 其DPPH·清除率为 $90.27 \pm 0.52\%$ 。

表 2-8 正交实验设计及结果

Table 2-8 orthogonal experimental design and results

序号	A 底物浓度/%	B 酶添加量/%	C 温度/°C	D 时间/h	DPPH·清除率/ (%)
1	1 (4)	1 (6)	1 (50)	1 (5)	58.51
2	1	2 (7)	2 (55)	2 (6)	73.25
3	1	3 (8)	3 (60)	3 (7)	67.33
4	2 (5)	1	2	3	72.33
5	2	2	3	1	69.17
6	2	3	1	2	89.38
7	3 (6)	1	3	2	60.36
8	3	2	1	3	73.19
9	3	3	2	1	77.34
K1	66.36	63.73	73.69	68.34	B>A>C>D
K2	76.96	71.87	74.31	74.33	
K3	70.30	78.02	65.62	70.95	
R	10.60	14.28	8.69	5.99	

2.3.5 木瓜蛋白酶水解单因素试验结果分析

根据图2-3a中，在5%左右时达到最优状态。这是因为随着底物浓度增加，在给定时间内可供选择的底物数量增多了，并且每个酶分子都能够找到一个适配的活性位点进行结合和催化反应，过高或过多的底物可能会导致部分已经结合在活性位点上的酶无法及时释放出来进行新一轮催化作用。基于实验结果和考虑到最佳效果以及实验成本等方面因素，我们将选取5%作为接下来实验条件中蛋白酶最佳使用的底物浓度值。在酶添加量达到7%时，DPPH·清除率已经超过了85%，说明此时已经取得了较好的抗氧化效果。考虑到蛋白酶成本问题，最终选择的最佳添加量设定为7%。这样既能保证较高的抗氧化效果，又能有效控制生产成本。由图2-3c可知，对于木瓜蛋白酶，酶解液对DPPH·的清除能力在pH值6.5-8.5区间内表现为随着pH值的增高而增强。当pH在8.0时，此时的DPPH·的清除能力达到峰值，随后，在pH值不断提升的过程中，酶解液所展现的抗氧化性能出现了逐渐减弱的趋势；与此同时，伴随着pH值的增加，水解度也呈现出同步递减的现象。水解度与抗氧化性之间并未显示出一致的正比例关系，即存在一个特定的最优水解度，在此条件下酶解液的抗氧化性能能达到峰

值。若水解度不够充分，具有抗氧化特性的肽段未能充分释放，故抗氧化活性受限；若水解度过大，原本具有抗氧化功能的肽链结构遭到破坏，从而出现了水解度越高抗氧化活性反而越弱的现象。因此，对于木瓜蛋白酶而言，则选择了最适pH值为8.0，以期在有效水解的同时获得最大的抗氧化效果。

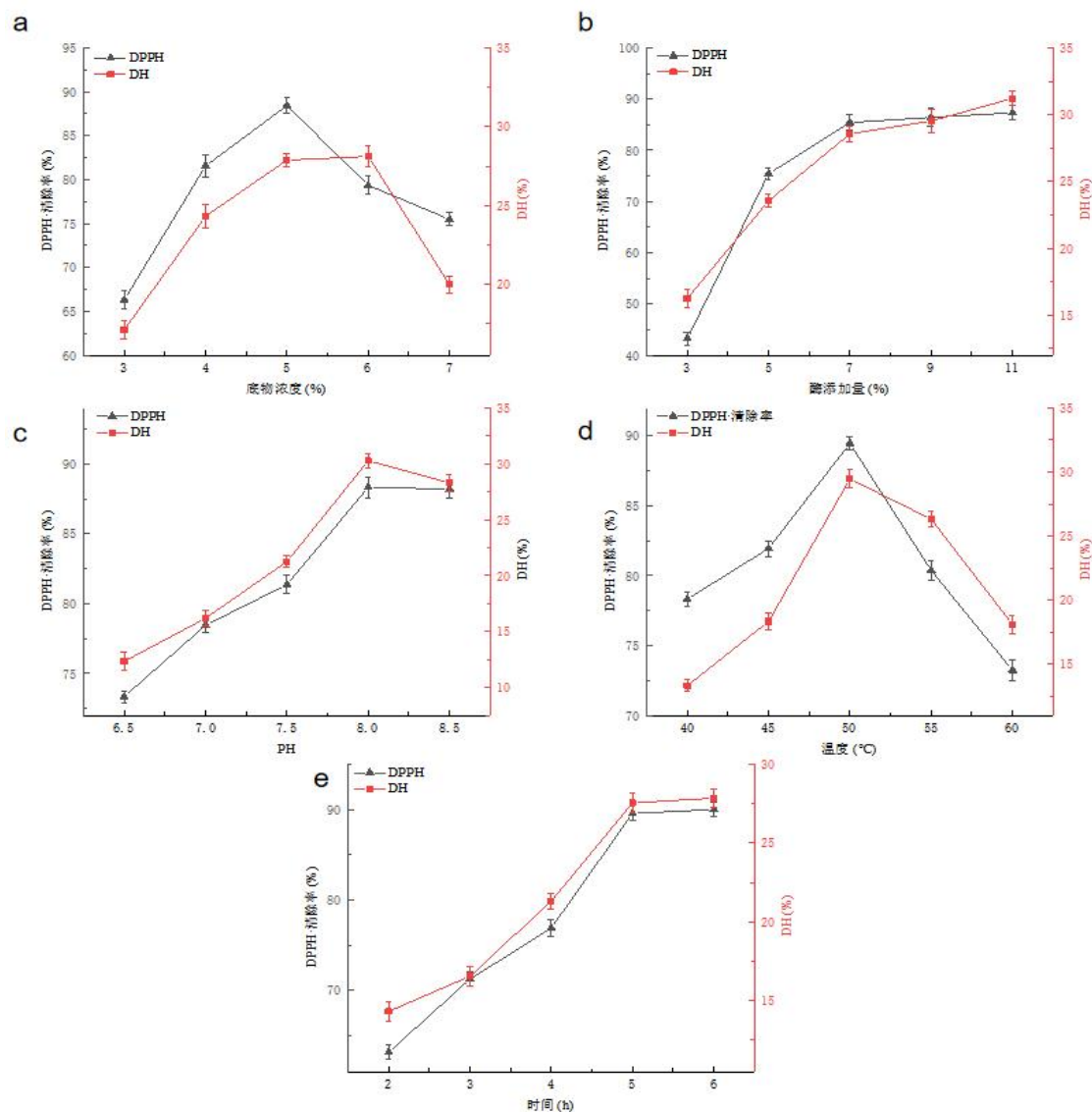


图 2-3 水解条件对木瓜蛋白酶水解产物 DPPH·清除率的影响

Fig. 2-3 Effect of hydrolysis conditions on DPPH· clearance of papain hydrolysates

a. 底物浓度, b. 酶添加量, c.pH,d. 酶解温度, e. 酶解时间

a.substrate concentrat, b.enzyme dosage, d.enzymolysis temperature, e.hydrolysis time

由图2-3d所示，随着温度的升高，木瓜蛋白酶解液的DPPH·清除率和DH都呈现增长趋势，木瓜蛋白酶在50℃时表现出了较好的DPPH·清除活性。随着温度升高，观察到DPPH·清除率和DH都开始下降。因此，在50℃左右是木瓜蛋白

酶展现出较优秀抗氧化效果的最适工作温度。在图2-3e可知DPPH·清除率和DH在酶解时间延长的过程中呈现相似的趋势初始阶段，木瓜蛋白酶酶解液表现出较快的抗氧化活性提升和水解度增加，在经过5 h后达到稳定状态。此时，木瓜蛋白酶展示出最高水平的抗氧化活性，而水解度变化逐渐减缓。进一步观察发现，在经过5 h后继续延长酶解时间，水解度和自由基清除率的增幅不再明显。

2.3.6 木瓜蛋白酶水解正交试验结果分析

根据表2-9的正交结果可知，DPPH·清除效果最好的因素组合为A3B3C2D3，因此选择A3B3C2D3为本正交试验的最好组合，即酶解条件为底物浓度为5%、酶添加量为8%、酶解温度为50℃、酶解时间为6 h。通过上述酶解条件的作用下的木瓜蛋白酶酶解液，其DPPH·清除率为 $88.21 \pm 0.95\%$ 。

表 2-9 正交实验设计及结果

Table 2-9 Orthogonal experimental design and results

序号	A 底物浓度/%	B 酶添加量/%	C 温度/℃	D 时间/h	DPPH·清除率 /%
1	1 (3)	1 (6)	1 (45)	1 (4 h)	65.43
2	2 (4)	2 (7)	3 (55)	1	74.03
3	3 (5)	3 (8)	1	2 (5 h)	83.18
4	1	2	1	3 (6 h)	66.29
5	2	1	2 (50)	2	63.62
6	3	1	3	1	70.18
7	1	3	2	1	78.34
8	2	3	3	3	75.24
9	3	2	2	2	86.33
K1	74.21	70.02	70.28	71.79	A>B>C>D
K2	66.70	70.96	75.55	74.18	
K3	79.97	79.90	75.05	74.90	
R	13.27	9.88	5.27	3.11	

2.3.7 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶双酶酶解咸蛋清条件的确定

2.3.7.1 加酶顺序的确定

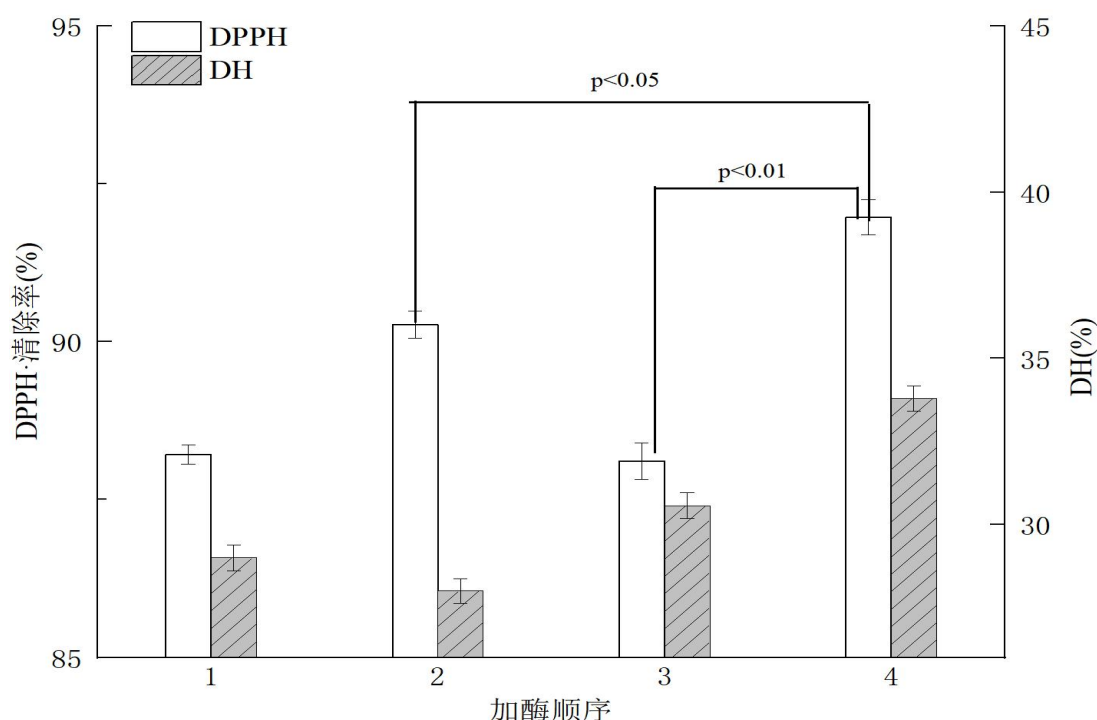


图 2-7 双酶加酶顺序对酶解效果的影响

Fig. 2-7 Effect of double-added enzyme sequence on Enzymatic Hydrolysis

注：双酶加酶顺序的实验组 1、2、3、4 的具体情况，按表 2-6 设置的各实验条件。

在双酶解蛋清蛋白的反应中，酶的加入顺序对酶解效果起着重要影响。为了研究碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的加酶顺序对酶解效果的影响，进行了一系列实验。结果显示，实验组四的加酶方式下，即先加入碱性蛋白酶灭酶后再加入木瓜蛋白酶，DPPH 自由基清除活性和水解度均高于其他实验组。此时的 DPPH 自由基清除率为 $91.49 \pm 0.45\%$ ，不同顺序添加不同种类的酶会产生不同的效果。通过控制加入顺序，我们可以制备出双酶解过程中抗氧化效果更好的酶解液。其次，该实验结果也为进一步优化双酶解工艺提供了指导方向。

2.3.7.2 加酶时间比例的确定

通过实验结果显示，在碱性蛋白酶作用 4 h 后再加入木瓜蛋白酶作用 2 h 的情况下，DPPH·清除率以及 DH 达到最高值。这表明，在双酶解过程中，适当的加酶时间可以提高咸蛋清的水解效果。根据实验结果，我们可以得出结论：先进行碱性蛋白酶作用 4 h 后，再灭活该酶并调节 pH 值，并随即加入木瓜蛋白酶进行 2 h 的作用是一种较为理想的加酶时间安排方式。这样能够兼顾两种不同类型的

酶对咸蛋清中DPPH·清除能力。此时的DPPH·清除率为 $93.86 \pm 1.01\%$ 。

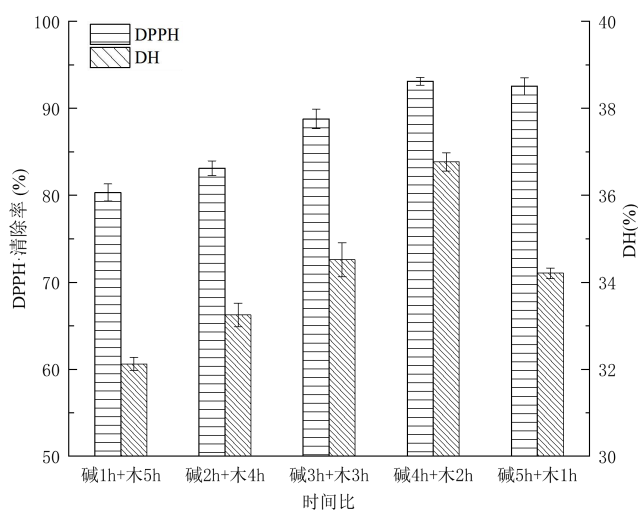


图 2-8 双酶解加酶时间比例对酶解效果的影响

Fig. 2-8 Effect of time ratio of double enzyme addition enzyme on Enzymatic Hydrolysis

2.3.7.3 加酶比例的确定

根据图 2-9 的结果显示，在样品溶液先加入碱性蛋白酶酶解 4 h，灭酶后再加入木瓜蛋白酶酶解 2 h、两酶的总添加量为 8%的基础上，设置了 5 种加酶比例，其中碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解时的加酶比例为 3:3 时，此时酶解得到酶解液的 DPPH·清除效果为最高，其 DPPH·清除率为 $95.65 \pm 0.71\%$ ，因此选用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解时的加酶比例为 3:3 为双酶酶解的最终加酶比例。

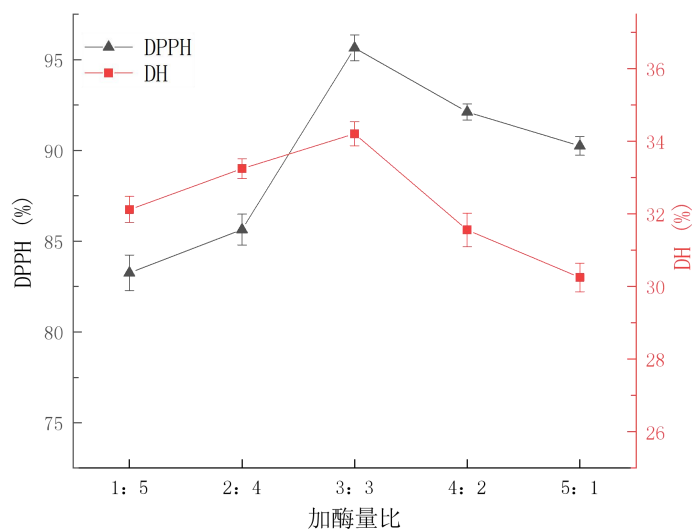


图 2-9 双酶解加酶量比对酶解效果的影响

Fig. 2-9 Effect of double Enzymatic Hydrolysis on Enzymatic Hydrolysis

结果说明了在双酶解过程中,适当调整碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的加入比例能够达到更好制备抗氧化功效的酶解液。碱性、木瓜蛋白酶双酶解的最佳方式为:先加碱性蛋白酶反应4 h灭酶再加入木瓜蛋白酶反应2 h。两酶加入比例为:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=3:3,即碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶各加酶量4%。

2.3.8 扫描电镜结果

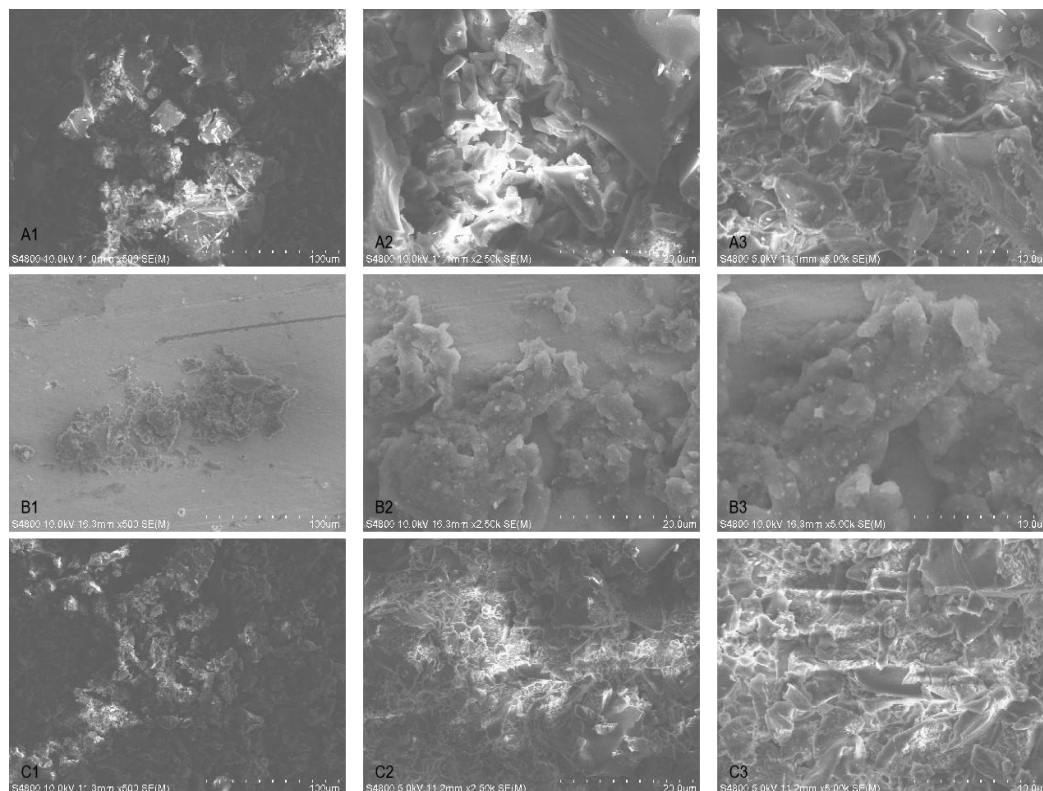


图 2-10 蛋清双酶解前后扫描电镜图

Fig. 2-10 Scanning electron microscope image of egg white before and after enzymatic hydrolysis

注: A1、A2、A3为1、2.5、5 k放大倍数双酶解蛋清上清液冻干粉颗粒的结构; B1、B2、B3为1、2.5、5 k放大倍数的双酶解蛋清沉淀物冻干粉颗粒结构; C1、C2、C3为1、2.5、5 k放大倍数的双酶解蛋清冻干粉颗粒结构。

蛋清经蛋白酶水解后所得的上清液冻干颗粒,其结构具有疏松的特性,但由于水解作用,原本完整的蛋清蛋白分子被切割成了较小的肽段或氨基酸。由于水解产物分子量小,易于形成更多的空腔和更细腻的结构。蛋清经蛋白酶水解得到沉淀物。这部分沉淀物通常包含不易溶解的大分子碎片、未完全水解的蛋白质片段以及可能与其他分子结合形成的复合物。沉淀物冻干颗粒的结构可能会较为紧密,由于沉淀物中往往包含较大的分子片段和较高的分子间相互作用力,因此形成的冻干颗粒可能不像上清液冻干那样呈现非常疏松多孔的海绵

状结构，而是相对较为致密。冻干后的沉淀物颗粒形状各异，可能为不规则的块状。相比上清液冻干颗粒，沉淀物冻干颗粒的孔隙率可能会较低。蛋清蛋白冻干颗粒的结构成三维多孔结构。微观上看，冻干蛋清蛋白颗粒的内部结构类似于海绵或蜂窝状，具有很大的比表面积。

2.3.9 蛋清粉氨基酸分析结果

根据氨基酸检测数据显示，蛋清肽中谷氨酸和丝氨酸的浓度尤为突出，同时，其中包含的苏氨酸、亮氨酸、赖氨酸等七种必需氨基酸总占比达到了45%。鉴于这些氨基酸在人体内无法自行足量合成或合成速率不足以满足机体日常需求，必须依赖外部食物来源补充，故此结果印证了蛋清肽富含重要的营养价值，能有效供给人体所需的必需氨基酸。

表 2-3 蛋清粉的氨基酸测定结果

Table. 2-3 Determination of amino acids in egg white powder

氨基酸名称	英文缩写	未脱盐未酶解 (%)	脱盐双酶酶解后
甘氨酸	Gly-G	2.29	3.25
丝氨酸	Ser-s	4.55	7.34
苏氨酸	Thr-t	3.22	4.87
组氨酸	His-h	0.85	1.02
天冬氨酸	Asp-d	6.52	9.82
谷氨酸	Glu-e	7.91	12.85
精氨酸	Arg-r	2.71	3.69
丙氨酸	Ala-a	2.99	4.15
半胱氨酸	Cys-c	2.75	4.17
蛋氨酸	Met-m	3.77	5.21
赖氨酸	Lys-k	3.87	5.52
缬氨酸	val-v	3.99	5.78
亮氨酸	Leu-l	4.53	7.22
脯氨酸	Pro-p	2.24	3.15
苯丙氨酸	Phe-f	4.15	6.24
酪氨酸	Tyr-y	1.55	2.78
异亮氨酸	Lle-i	2.12	3.29
总和		60.01	90.35

2.4 本章小结

本章以咸鸭蛋清为原料，以DPPH·清除率为主要指标，DH为参考指标，从五种常用的蛋白酶中筛选出两种酶解抗氧化性最好的碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶作为探究双酶的实验对象，通过单因素和正交实验分别考察两种酶的对底物浓度、酶添加量、酶解时间、pH、酶解温度对这两个指标的影响，而后对两种酶的酶添加顺序、分段加酶时间比以及两酶加酶量比进行探究，通过正交实验确定了碱性蛋白酶的优化工艺为底物浓度5%、酶添加量8%、pH: 9.0、温度为55℃酶解时间6 h; 此时的DPPH·清除率可以达到 $90.27 \pm 0.52\%$; 木瓜蛋白酶优化工艺为底物浓度5%、酶添加量8%、pH: 8.0、温度为50℃酶解时间6 h, 此时的DPPH·清除率可以达到 $88.21 \pm 0.95\%$ 。最佳的双酶工艺为：先加碱性蛋白酶反应4 h后，灭酶再加入木瓜蛋白酶反应2 h。两酶加入比例为:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=1:1，即碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶各加酶量 4%。此时的DPPH·清除率可以达到 $95.65 \pm 0.71\%$ ，说明脱盐后样品经双酶酶解具有更优越的自由基清除能力，为下一步分离纯化提供了技术支持。

第3章 蛋清多肽的分离纯化及抗氧化研究

蛋白酶解产物构成了一种多元复杂的混合体系，内含氨基酸、多肽片段以及其他盐类离子等多种成分。鉴于其成分的多样性和复杂性，对这类酶解产物进行有效的分离纯化以提炼出结构简洁且活性优越的单一或少数几种纯化产物显得极为关键^[94]。通常依据多肽的极性差异、电荷特性及其分子大小的不同属性，采取相应的分离纯化技术对初步制得的粗多肽进行精细化处理。常见的方法是凝胶柱层析，可以使根据凝胶网状的大小和不同的形态结构来实现对混合溶液中目标成份的有效纯化，并最终得到所需纯净产物^[95]。如张莉莉等在酶解大豆采用的葡聚糖G25凝胶柱进行分离^[96]；李鸿梅酶解玉米时采用的G10和G25进行分离^[97]。在蛋白酶解物处理过程中，采用合适且可靠的技术手段对其进行精确地分离提纯至关重要。凝胶柱层析在操作过程中都需要仔细控制各项参数，并结合理论知识与经验指导，才能够成功地获取到具备较高活性且组成简单明确的提纯产物。

本章节将由上一章节所研究的最优工艺制备的蛋清酶解液，为了进一步纯化蛋清酶解产物并提取鸭蛋清蛋白酶解产物纯化产物，我们采用Sephadex LH-20层析柱进行操作。通过Sephadex LH-20层析柱，我们可以逐步将混合溶液中杂质去除，并得到高纯度且具有抗氧化活性的鸭蛋清蛋白酶解产物纯化产物。因此，本章节旨在通过超滤管与Sephadex LH-20层析柱联合使用，从原始样品中提取出高效且富含抗氧化活性成份的鸭蛋清蛋白酶解产物纯化产品，并评估其抗氧化活性。

3.1 材料与仪器

3.1.1 实验材料与试剂

表 3- 1 实验材料与试剂

Table 3- 1 The materials and reagents for this experiment

药品名称	纯度/规格	生产商
蛋清酶解液		自制
DPPH	AR	沃凯有限公司
ABTS	AR	沃凯有限公司
PTIO	AR	阿拉丁有限公司
无水乙醇	AR	国药试剂有限集团
甲醇	AR	国药试剂有限集团

3.1.2 主要仪器与设备

表 3-2 试验仪器及设备

Table 3-2 Instruments and equipments

药品名称	纯度/规格	生产商
电子天平	CP214	奥豪斯仪器有限公司
紫外检测仪	HD-5	骥辉分析仪器（上海）有限公司
恒流泵	DHL-A	保定芯之有限公司
自动部分收集器	BS-100A	上海沪西分析仪器厂有限公司
超滤离心管	3、10、50k	美国 Millipore 公司
高速离心机	L550	湘仪离心机有限公司
酶标仪	MultiskanFC 型	赛默飞世尔仪器有限公司
冷冻干燥机	LGI-10	北京松源华兴科技发展有限公司

3.2 试验方法

3.2.1 超滤分离

由 2.2.5.2 最优工艺制备的蛋清酶解液依次通过规格为 50 mL、截留分子量分别为 50kDa、10kDa 以及 3kDa 的超滤管进行过滤处理。随后，对进行离心操作（条件为 4000 $\times g$ ，持续 30 min）后的截留液和透过液进行收集。分别得到分子质量 >50 kDa (F1)、10~ 50kDa (F2)、3~10kDa (F3) 和 <3kDa (F4) 的 4 个组分，冷冻干燥，测定各组分的抗氧化活性。

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{冻干组分质量}}{\text{各冻干后组分总质量}} \times 100\%$$

3.2.2 Sephadex L- 20 分离纯化

将处理好的 Sephadex L- 20 装入层析柱(160 mm×80 cm)，超纯水冲洗平衡过夜。用超纯水将F4 (<3 kDa) 的组分制备一定浓度的样品溶液，并通过0.22 μm孔径滤膜进行过滤净化，然后进行上样操作。选用超纯水作为洗脱溶剂，试验合适的流速，在220 nm波长下监测F4样品的洗脱过程。经过分离步骤后，成功获得了4个不同的组分，这些组分均被收集并经过冻干处理，随后对其抗氧化活性进行了测定。

(1) 凝胶溶胀

将200 g的Sephadex LH-20树脂置于500 mL去离子水中，在烧杯中准备就绪后，将其放置在电磁加热器上进行加热处理。确保树脂在加热过程中始终保持微沸状态，并持续热处理两小时，在此期间需以平稳连贯的动作使用玻璃棒搅拌，目的是防止因剧烈沸腾而导致的意外状况发生。应当留意的是，过高的搅拌速率可能会对树脂结构产生不良影响。待树脂溶液冷却至室温后，需谨慎地去除其中的任何悬浮杂质，并将上层多余的水分轻轻倾倒出去。

(2) 凝胶柱装填

将直径为160 mm、高度为80 cm的层析柱进行彻底清洁后，接着用去离子水进行三次循环冲洗。于柱体底部排放口处注入约3-5 mL的双蒸水以密封底部。接下来，须以轻柔手法沿柱壁逐层添加已充分膨胀的凝胶材料，在填充操作过程中要适时补充水分，并务必避免引入气泡。装填完毕后，旋紧密闭进样口，让其静置2-3h。此时需仔细检查凝胶柱的整体状态，确认其中不存在气泡、异物及明显的层次断开情况，并确保柱面平滑且水平。倘若发现上述任何异常现象，有必要重新进行凝胶柱的配置与填充工作。

(3) 平衡

逐步调整蠕动泵的运行流速，按照每半小时增加一至两倍的速度节奏进行，最终将流速提升至0.5 mL/min。将紫外检测仪与层析柱连接并进行校准，选择220 nm波长来测量吸光度值，并开始记录基线数据。在确保基线达到完全稳定，并无异常微小峰显现的约30 min等待期过后，再次进行紫外检测仪的校准，继而正式启动样品进样程序。

(4) 上样

配置合适的样品浓度而后过 0.22 μm 滤膜，每次进样量为5 mL。

(5) 洗脱

采用去离子水充当流动相介质，并设定流速，以此进行样品的洗脱操作。过程中，通过紫外检测装置实时监测洗脱液的吸光强度变化，能够揭示不同分子量区间的物质所产生的吸收峰。依据各峰值的不同特点，我们将相应地把分离出的各个组分进行收集，并逐一标识清楚，随后将这些组分储存在零下20℃的低温环境中以确保其稳定性。

(6) 冻干

蛋清肽组分经过葡聚糖凝胶层析成功分离后，可通过冷冻干燥技术将其转化为冻干粉末状态，并在-20℃的条件下妥善储存。

3.2.3 蛋清肽对 DPPH 自由基清除能力

按 Jayapala N 的方法^[91]，略作修改，检测分离成分的 DPPH·清除能力。将 100 μL 新制备的 0.2 mM DPPH 甲醇溶液加入 96 孔微量滴定板的每个孔中，依次加入 100 μL 不同浓度的不同组分的样品，在室温下在黑暗中孵育 30 min，并在 517 nm 下测量。每组样品设 3 组平行，按以下公式计算：

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

式中：A₀—甲醇+DPPH 溶液在 517 nm 的吸光度值；A₁—样品+DPPH 溶液在 517 nm 的吸光度值；A₂—样品+甲醇在 517 nm 的吸光度值。

3.2.4 蛋清肽对 ABTS⁺自由基清除能力

按 Thaipong K 方法^[98]，略作修改。通过将 ABTS⁺（7 mmol/L）和过硫酸钾（2.45 mmol/L）等体积混合避光处静置 12 h 制备工作溶液，在室温下在黑暗中孵育过夜以产生深绿色 ABTS⁺，现配现用，并用无水乙醇稀释，直到在 734 nm 处的吸光度为 0.7±0.1。将 50 μL 样品液与 200 μL ABTS⁺工作溶液分别加入 96 孔微量滴定板中，并在室温下孵育 10 min。在 734 nm 处测量吸光度。每组样品设 3 组平行组，按以下公式计算：

$$\text{ABTS}^+ \text{自由基清除率 (\%)} = [(B_0 - B_1) / B_0] \times 100\%$$

式中：B₁—样品液+ABTS⁺溶液在 734 nm 的吸光度值；B₀—无水乙醇+ABTS⁺溶液在 734 nm 的吸光度值。

3.2.5 蛋清肽对 PTIO 自由基清除能力

按 LI X 的方法^[99]，略作修改将 PTIO•溶解在磷酸盐缓冲液（pH 7.0，50 mM）中作为工作溶液，将 20 μ L 的样品液和 80 μ L PTIO 磷酸盐缓冲溶液添加到 96 孔微量滴定板中，在 37°C 中孵育 30 min 后，557 nm 下测定吸光度。PTIO•清除活性与 ABTS⁺清除活性的计算结果相同。

3.2.6 统计分析

所有实验均作3次重复，数据采用SPSS 24.0进行统计，结果以平均值 $\pm$ 标准差表示，图表绘制采用Origin 2018软件完成。

3.3 结果与分析

3.3.1 超滤分离结果

表 3-3 超滤分离组分得率

Table3-3 Yield of components separated by ultrafiltration

样品	分子量大小/Da	得率/%
酶解液	-	100
F1	>50k	19.23
F2	10~50k	13.69
F3	3~10k	25.17
F4	<3k	53.29

经过双酶酶解处理后，对蛋清酶解液依次通过截留分子量为 50、10、3 kDa 的50mL超滤管，成功获得四个组分，分别收集这四个组分并命名为F1(>50 kDa)、F2(10~ 50kDa)、F3(3~10kDa)、F4(<3kDa)，将收集好的各组分进行冻干处理，并测定它们不同指标的抗氧化活性。从表3-1中可以看出，F4组分的得率最高为53.29%，F3次之，F2得率最低仅为13.69%。

3.3.2 超滤组分蛋清肽对 DPPH 自由基的清除能力

DPPH法作为一种广受欢迎的评估手段，常被用来衡量天然抗氧化剂对自由基清除的能力，其便捷高效的特性使之成为众多研究者的选择。在这个过程中，具有抗氧化能力的物质会提供电子或质子给深紫色的DPPH自由基，从而将其还原成浅紫色或无色^[100]。当DPPH溶液与具有抗氧化能力的物质接触时，这些物质会转移一个电子或一个质子给DPPH自由基，并使其发生还原反应。在这个过程中，深紫色的DPPH逐渐减少并转变为浅紫色甚至无色。通过检测溶液颜色变化可以确定样品对DPPH自由基清除作用强度及其抗氧化能力。本实验在探

究不同浓度下经超滤分离得到的蛋清肽组分对DPPH·的清除能力。从图3-1中可以观察到，随着蛋清多肽浓度的增加，其对DPPH·的清除能力也逐渐提高。实验结果显示，不同组分的蛋清肽在浓度范围为1 $\mu\text{g/mL}$ 至1 mg/mL 时，蛋清多肽与DPPH·之间呈现几乎线性变化关系。蛋清酶解液经超滤得到的各组分在浓度达到1 mg/mL 时，DPPH·的清除率为 $65.69 \pm 1.35\%$ ，F1的清除率仅为 $50.22 \pm 1.53\%$ 。结果表明了F4组分蛋清多肽具有出色的DPPH·清除能力，并且该能力随着浓度增加而逐渐增强。

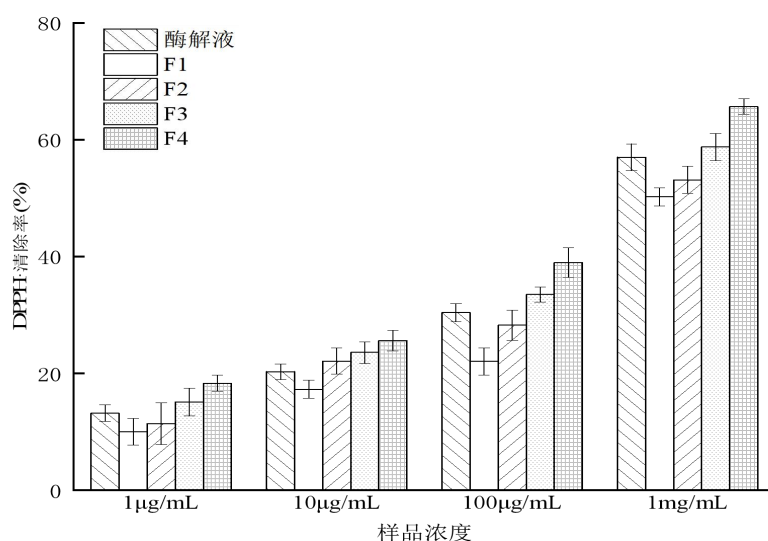


图 3-1 超滤组分蛋清肽对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 3-1 Scavenging effect of ultrafiltration component egg white peptide on DPPH free radical

3.3.3 超滤组分对 ABTS⁺自由基的清除能力

ABTS⁺和K₄SO₈可以发生反应产生稳定的阳离子自由基，并且在734 nm处有一个明显的吸收峰。当添加抗氧化剂时，可以有效地抑制这些自由基的生成^[101]。ABTS⁺和K₄SO₈是两种化学物质，它们可以发生反应产生稳定的阳离子自由基。这些自由基在光谱上表现为一个明显的吸收峰，波长为734 nm。这个吸收峰的存在说明了反应过程中电子转移的发生。然而，在某些情况下，我们希望抑制这些自由基的生成。为此，可以添加一种抗氧化剂来有效地阻止或减少自由基的形成。超滤组分的ABTS⁺清除能力如图3-2，在一定的浓度范围内，各组分随着浓度的增大，自由基的清除率也在逐渐上升，1 mg/mL 的F4组分对ABTS⁺清除率达 $96.11 \pm 2.26\%$ ，高于同等浓度下的其他组分。

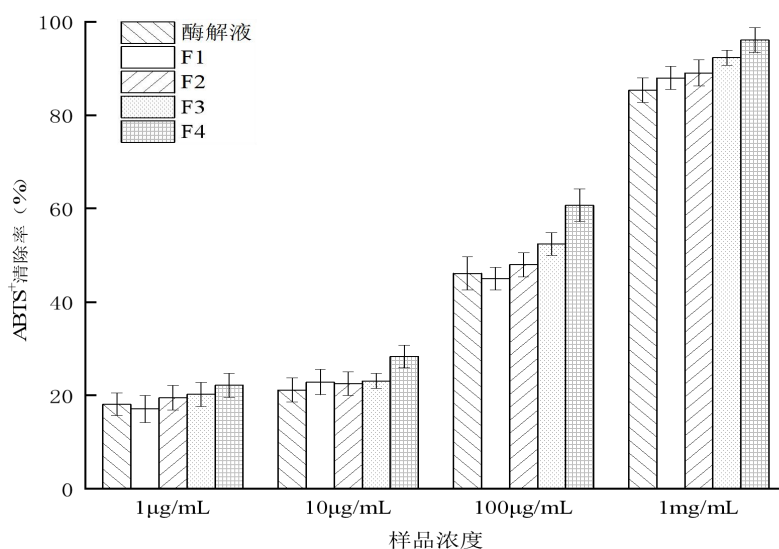
图 3-2 超滤组分蛋清肽对 ABTS⁺自由基的清除能力

Fig. 3-2 Scavenging effect of ultrafiltration component egg white peptide on ABTS⁺ free radical

3.3.4 超滤组分对 PTIO 自由基的清除能力

PTIO (Carboxy-PTIO) 具有很高的反应活性, 能够与一氧化氮迅速发生还原反应, 并将其转化为无毒的产物。当 PTIO 与一氧化氮发生反应时, 溶液会呈现出鲜艳的紫色。这是由于还原反应导致了电子数量的变化, 进而改变了溶液中某些分子或离子的吸收光谱特性。通过测量溶液吸光度可以获得关于反应程度和产物生成情况的定量信息^[102]。如图 3-3, 相同浓度下 F4 组分的 PTIO 的清除能力最强, 且在浓度为 1 mg/mL 蛋清肽 F4 组分 PTIO 的清除率达到 61.67%±1.65%, 高于酶解液。超滤分级对水解产物的抗氧化性能具有明显影响, 与 Jovanovic^[103]等所得到的结果基本一致, 经过分级处理后, 抗氧化活性得到了提升。为了进行后续试验, 综上所述, 经超滤分离的 F4 组分具有良好的抗氧化活性, 可以作为一种潜在的抗氧化剂使用。

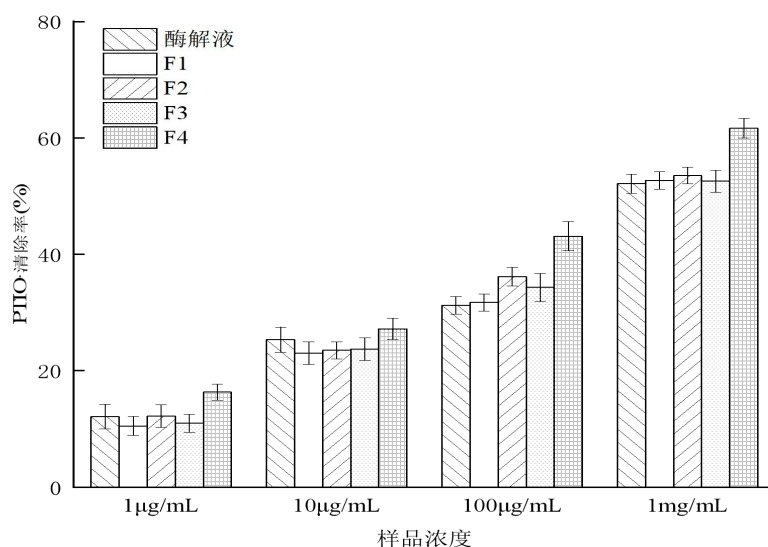


图 3-3 超滤组分蛋清肽对 PTIO 自由基的清除能力

Fig. 3-3 Scavenging effect of ultrafiltration component egg white peptide on PTIO free radical

3.3.5 Sephadex L- 20 分离结果

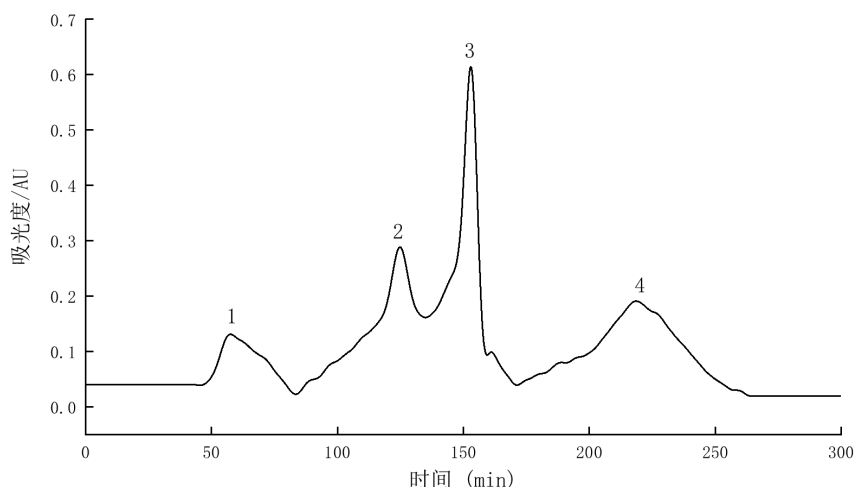


图 3-4 F4 的 Sephadex LH-20 色谱图

Fig. 3-4 Sephadex LH-20 chromatogram of F4

对得到抗氧化活性最好的 F4(<3kDa)组分, 经 Sephadex L- 20 凝胶层析柱再一次分离, 成功地分离出四个不同的组分。在此过程中, 确立了凝胶层析的最佳分离条件, 即选用直径为 160 mm、高度为 80 cm 的中压层析柱, 并以 200 mg/mL 的上样浓度进行操作, 同时保持流速在 0.5 mL/min。其保留时间(RT)分别为 57.83、124.83、152.92 和 219.03 min, 分别收集了每一个峰的组分, 并命名为 F4-1、F4-2、F4-3、F4-4, 将收集好的各组分进行冻干处理, 并

进一步测定它们不同指标的抗氧化活性，进一步做自由基清除研究。

3.3.6 经 LH-20 分离后 F4 各组分对 DPPH 自由基的清除能力

由图3-5可知，经葡聚糖LH-20凝胶柱洗脱的4个组分及F4组分均具有DPPH·清除能力，DPPH·清除率随浓度增加而增大，蛋清蛋白肽浓度与各超滤组分DPPH·清除率成正相关。当浓度在1 mg/mL时，F4-3对 DPPH·的清除率为 $72.19 \pm 1.58\%$ ，较好与其他组分。

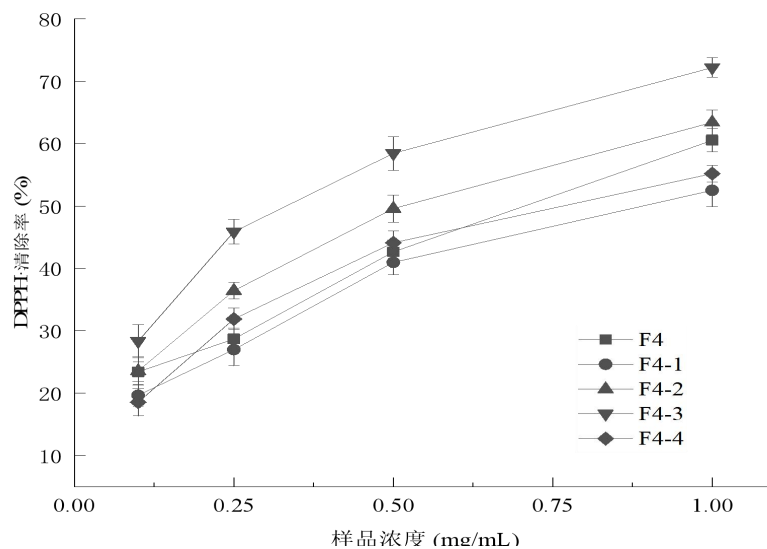


图 3-5 LH-20 分离后各组分蛋清肽对 DPPH·的清除能力

Fig. 3-5 Scavenging ability of each component of egg white peptide on DPPH free radical after separation of LH-20

3.3.7 经 LH-20 分离后 F4 各组分对 ABTS⁺自由基的清除能力

图3-6为F4经LH-20分离后各四个组分及F4组分对ABTS⁺清除率的比较，F4-3组分的ABTS⁺的清除能力在浓度为10 ug/mL-100 ug/mL时，随组分浓度的增大而增大，并且在100 ug/mL时达到实验浓度内的最大清楚效果。在100 ug/mL时，四个组分的ABTS⁺清除率排序为F4-3>F4-4>F4-2>F4-1>F4，其ABTS⁺依次为 $98.56 \pm 2.62\%$ 、 $93.22 \pm 2.21\%$ 、 $89.52 \pm 1.84\%$ 、 $73.56 \pm 1.85\%$ 、 $66.52 \pm 3.33\%$ 。

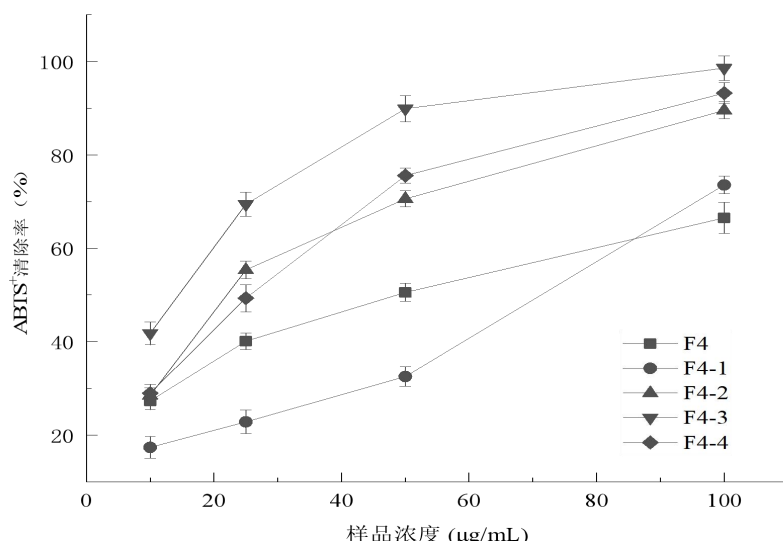


图 3-6 LH-20 分离后各组蛋清肽对 ABTS⁺自由基的清除能力

Fig. 3-6 Scavenging ability of each component of egg white peptide on ABTS⁺ free radical after separation of LH-20

3.3.8 经 LH-20 分离后 F4 各组分对 PTIO 自由基的清除能力

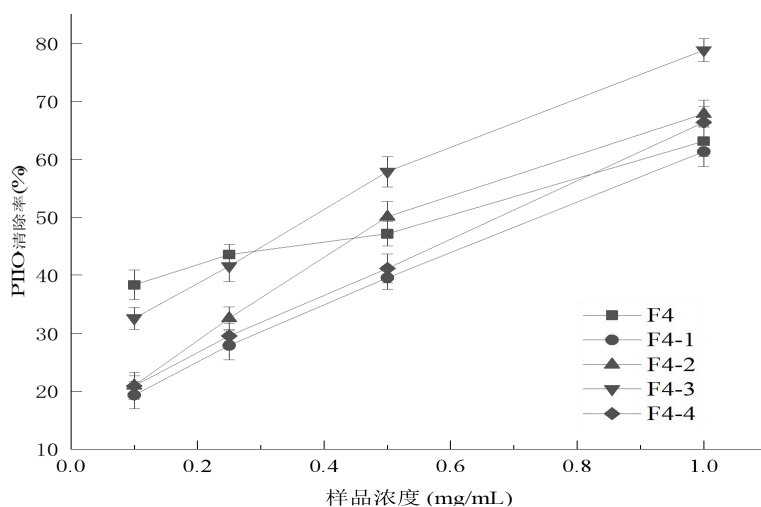


图 3-7 LH-20 分离后各组蛋清肽对 PTIO 自由基的清除能力

Fig. 3-7 Scavenging ability of each component of egg white peptide on PTIO radical after separation of LH-20

经过PTIO实验检测值，结果如图3-7所示。从图中可以明显观察到四种组分的抗氧化能力大小依次为F4-3>F4-4>F4-2>F4-1>F4。特别是在浓度为1 mg/mL时，F4-3的PTIO值最高，达到了78.85±2.01%，而未纯化的F4则表现出最低的抗氧化活性。在浓度0.1-0.25 mg/mL范围内各组分的清除率差异不大。然而当

浓度超过0.25 mg/mL后，我们发现 F4-3 组分中蛋清肽对PTIO•的清除率优于其他实验组分。因此，在接下来的细胞实验中，我们将选择具有较好抗氧化活性的F4-3组分蛋清肽作为研究对象，并进一步探究其在细胞内对氧化损伤方面的作用。

3.4 本章小结

本章以第二章双酶酶解研究为前提，对经双酶酶解得到的酶解液，采用超滤和凝胶层析技术进行分离纯化，通过对DPPH•、ABTS⁺、PTIO•抗氧化活性的探究，最终得到最具抗氧活性的蛋清肽。并得到以下结论：

（1）经50、10、3 kDa 的50mL超滤管超滤管成功分离得到四个组分，分别命名为F1(>50 kDa)、F2(10~ 50kDa)、F3(3~10kDa)、F4(<3kDa)，从F4在不同浓度下对三种自由基的清除能力来看，小于3kda的分子量的F4组分抗氧化活性最好，各浓度中F4的清除能力均优于其他组分，F4在实验范围内，DPPH•的清除率为65.69±1.35%，ABTS⁺清除率为96.11±2.26%。PTIO•清除率为61.67±1.65%。因此选用抗氧化能力最好的F4进行后续试验。研究表明，许多具有高抗氧化活性的纯化肽低于3kDa^[104]，低分子量肽的高抗氧化活性可能与其两级结构的破坏有关^[105]，与我们的结果相似。

（2）经葡聚糖凝胶LH-20分离得到四个组分中，F4-3在DPPH•、ABTS⁺、PTIO•清除能力方面随浓度的增加而增加。在浓度为1ug/mL-1mg/mL下的DPPH•、ABTS⁺、PTIO•的清除率分别为72.19±1.58%、98.56±2.62、78.85±2.01%，F4-3在抗氧化三指标的检测中表现出较好的抗氧化活性，因此选用抗氧化能力最好的F4-3进行后续试验。

第4章 蛋清蛋白抗氧化肽对L929细胞氧化损伤模型的保护作用

体外抗氧化活性检测适用于初步鉴定和筛选蛋清源肽的抗氧化潜能，但无法真实再现其在人体复杂生理状态下的实际功能机理^[106]。相较之下，细胞培养模型能够更加逼真地模拟生物体内部的新陈代谢流程，并且还兼具实验周期较短、成本效益高等优势^[107]。通过特定的细胞模型更能真实评估其抗氧化活性。

在已有的研究中，通常情况下会采用肿瘤细胞建立氧化损伤模型进行细胞探究，肿瘤细胞相较于普通正常细胞虽然更容易培养。但肿瘤组织往往处于低氧微环境，故此，由肿瘤细胞所呈现的活性肽对抗氧化应激的抑制作用机制可能并不完全贴合实际情况。相反，小鼠成纤维细胞（例如L929细胞），作为小鼠皮肤组织不可或缺的部分，对于维持皮肤组织弹性及水分平衡至关重要^[108]。这类细胞对外界来源的活性氧和辐射敏感，易于诱发氧化应激反应。正因如此，小鼠成纤维细胞被广泛应用在构建氧化应激模型实验中。相较于肿瘤细胞，成纤维细胞更能代表正常人体细胞的代谢状况，从而能够在实验中提供一个更为贴近人体真实氧化应激状态的模拟环境。

过氧化氢（ H_2O_2 ）作为一种关键的小分子活性氧（ROS）成分，具备穿越细胞膜的能力，从而有效地渗透进入细胞内部，并在其中参与一系列化学反应，继而转化生成具有高度活性的自由基^[109]。当细胞内存在过量的ROS，如过氧化氢和超氧阴离子，会触发细胞内信号传导，并发生氧化应激现象。这将导致大分子物质如蛋白质、DNA以及脂质遭受损伤，最终引发细胞自噬、坏死和凋亡等病理变化，导致疾病的发生^[110]。过氧化氢（ H_2O_2 ）易于通过解离氧离子的方式来生成自由基，这一特性使得利用 H_2O_2 构建模拟体内氧化应激状态的体外实验模型得到了学界广泛的采纳和应用。

本章以之前制备得到的蛋清蛋白酶解产物为研究对象，采用超滤和凝胶层析技术得到了8个多肽组分，使用 H_2O_2 诱导L929细胞损伤，在细胞中引发了氧化应激反应，从而建立起一个模拟细胞内发生损伤情况下的实验模型。同时还研究了这些多肽在 H_2O_2 诱导下对L929细胞所引发的氧化应激反应中的作用，并初步评价了它们保护L929细胞免受 H_2O_2 诱导引起的损伤机制。希望这些结果为进一步开发和利用富含抗氧化肽的蛋清提供了理论依据。

4.1 材料与仪器

4.1.1 主要仪器与药品

表 4-1 实验试剂与药品

Table 4-1 The chemical reagents for this experiment

药品名称	纯度/规格	生产商
蛋清肽	/	自制
甲醇	AR	国药试剂有限集团
过氧化氢	AR	国药试剂有限集团
胎牛血清	生化级	Gemini 公司
高糖 DMEM	生化级	美国 hyclone 公司
CCK-8 检测试剂盒	生化级	碧云天生物技术有限公司
青霉素-链霉素抗体	生化级	碧云天生物技术有限公司
胰蛋白酶	生化级	碧云天生物技术有限公司
PBS 缓冲液	生化级	碧云天生物技术有限公司
L929 细胞	细胞级	中国科学院上海细胞库
线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)	生化级	碧云天生物技术有限公司
活 / 死细胞染色试剂盒	生化级	碧云天生物技术有限公司
活性氧检测试剂盒	生化级	碧云天生物技术有限公司

4.1.2 试验仪器与设备

表 4-2 试验仪器及设备

Table 4-2 Instruments and equipments

仪器/药品	型号/纯度	生产商
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州净化设备有限公司
二氧化碳细胞培养箱	371	德国艾本德股份公司
高速离心机	TGC-10B	上海安亭仪器设备有限公司
多功能酶标仪	UVmini- 1280	日本岛津有限公司
荧光倒置显微镜	IX73-DP80	日本奥林巴斯公司
恒温培养箱	WJ-80B-II	上海圣科仪器设备有限公司

4.2 试验方法

4.2.1 L929 细胞的复苏、培养传代、冻存

4.2.1.1 细胞复苏

从-80℃的冰箱中取出L929细胞，将其移入预先设定在37摄氏度的水浴装置

中温和复苏，过程中保持轻柔摇动以确保均匀升温。直至冻存管内的冰晶完全融化，紧接着采用75%浓度的酒精对手中的细胞冻存管外部进行严格消毒处理，随后迅速将细胞溶液转移至无菌超净工作台上进行后续操作。

使用移液枪头轻柔地混合细胞，并将其转移到离心管中。以1000 r/min的速度离心3 min，倒掉上清液。接着加入1 mL完全培养基，在移液枪的帮助下轻柔混合，然后转移到细胞培养瓶中。同时，在细胞培养瓶中添加4 mL完全培养基。将细胞培养瓶放置在无菌培养箱内，保持37°C、5%CO₂条件下进行培养，并每天监测细胞状态，定期更换培养基。

4.2.1.2 细胞传代

在开始实验操作之前，首要是对细胞进行详尽的显微镜观察，通过细致观察，判断细胞是否处于最佳的生长状态，或者是否接近汇合期，以便于决定下一步的操作方案。如果细胞生长良好，形态规则且密度适中，说明细胞状态适宜，可以考虑继续原代培养，让细胞继续增殖以达到实验所需数量或实验要求的状态。反之，若细胞呈现出过度密集、生长停滞或其他不良现象，则应当及时进行细胞传代，通过细胞消化、计数和重新接种的方式，把一部分细胞转移至新鲜的培养基中，以维持细胞的正常生长与增殖，确保实验数据的准确性和可靠性。具体操作：使用一次性无菌培养瓶进行培养，使用含有10%胎牛血清和1%双抗的DMEM完全培养基，将细胞放置于无菌培养箱中，直至细胞融合程度达到80%-90%为止。然后使用胰酶消化并收集至离心管，在1000 r/min下离心3 min，去除上清液，并加入均匀混合的培养基进行传代培养。每隔三天进行一次传代。

4.2.1.3 细胞冻存

将生长状况良好的细胞经过两次无血清培养基洗涤后，进行胰酶消化处理，并收集细胞。事先在冻存管中标注好该细胞详细信息。随后，加入适量的冷冻液并置于冷藏盒中，采取梯度降温冷冻法存储细胞。首先，将细胞置于4°C冰箱中静置15 min，随后转移至-20°C冰箱中存放20 min，然后转存至-80°C冰箱。待细胞在-80°C条件下冷藏一整晚后，最终将其移入液氮容器中进行长期保藏，以备后续细胞复苏之需。

4.2.1.4 样品预处理

使用DMEM培养基配制浓度为5 mg/mL的样品液，取适量蛋清肽进行稀

释，并通过0.22 μm滤膜过滤消除微生物污染，以备后续实验使用。

4.2.2 蛋清抗氧化肽对 L929 细胞的毒性作用

本研究使用 CCK-8 法进行毒性检测实验。在细胞对数生长期，我们取 100 μL 密度为 5×10^4 个/mL 的 L929 细胞悬液，并将其加入 96 孔板中的各个孔中。接下来，我们将培养皿置于 5% CO₂、37°C 恒温培养箱中进行 24 h 的培养。随后，在每个孔中添加不同浓度(0.1、0.25、0.5、1 mg/mL) 的蛋清抗氧化肽各组分液，每个处理组设置 3 个复孔。同时保留以完全培养基作为细胞对照组。在上样 100 μL 后，再次进行 24 h 的培养。之后，我们用新鲜的 PBS 洗涤细胞一次，并加入含有 10% CCK-8 无血清培养基的溶液。然后将 96 孔板放回细胞培养箱中孵育 30 min。完成孵育后，取出培养板并使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各个孔的吸收值。最后根据以下公式计算细胞存活率：

$$\text{细胞活力(\%)} = \frac{B1-B0}{B2-B0} \times 100\%$$

式中：B1—加样品的吸光度值；B0—不加细胞和样品的吸光度值；B2—加细胞不加样品的吸光度值。

4.2.3 H₂O₂ 诱导的 L929 细胞氧化损伤模型的建立

H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤模型，被广泛应用于评估生物活性物质对氧化应激的抑制作用。H₂O₂ 是 ROS 的重要成分之一，能够引发氧化应激反应，并最终导致细胞死亡和凋亡。因此，在本研究中我们选择了小鼠成纤维细胞系 L929，通过加入 H₂O₂ 处理来建立 L929 细胞的氧化应激损伤模型。为了确定最佳的 H₂O₂ 诱导条件，我们将 5×10^4 个/mL 的 L929 细胞均匀地分布在 96 孔板上，设置 90 μL 的细胞混合液为正常组及实验组，在恒温恒湿条件下，将样本置于 37°C 且含有 5% 二氧化碳浓度的培养箱中进行为期 24 h 的孵育过程。孵育结束后，在对照组样品中添加 10 μL 的细胞培养基。实验组加入 10 μL 不同浓度（100-1000 μM）的 H₂O₂，继续培养 12 h 后，通过 CCK-8 法评价细胞存活率。参照实验数据，我们确定了在 L929 细胞氧化损伤模型构建中，选用能够使 L929 细胞存活率逼近 50% 的 H₂O₂ 浓度作为最适宜的实验剂量。

4.2.4 蛋清肽各组分对 H₂O₂ 诱导后 L929 细胞活力的影响

设置正常对照组、损伤组和保护组。将 L929 细胞混合的细胞悬液分配至 96 孔板中。对照空白组不做细胞接种，仅注入 80 μL 培养基，而其余各实验组则分

别添加80 μL 含有细胞的悬浮液。所有组别在37°C、5% CO_2 条件下培养箱中培养24 h后，针对空白组、保护组以及损伤组，分别追加10 μL 培养基，实验组加入10 μL 蛋清肽样品溶液（最终浓度分别为100、250、500 $\mu\text{g/mL}$ ）进行进一步的24 h培养。接着，在对照组的试管中注入10 μL 的培养基作为基础处理。与此同时，对于损伤组和保护组的试管，分别向其中加入10 μL 浓度为400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 溶液来进行特定处理。此后继续进行12 h的孵育阶段。紧接着，运用CCK-8试剂盒法检测各组细胞的存活率。

4.2.5 F4-3 组分不同浓度对 H_2O_2 诱导后 L929 细胞活力的影响

设置正常对照组、损伤组和保护组。将L929细胞添加至96孔板中。在实验设置中，对照组不包含细胞成分，仅注入80 μL 培养基，而其它各实验组则添加80 μL 含有细胞的悬浮液。这些样本均置于37°C、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培育24 h。到达指定时间后，正常对照组、保护组以及损伤组各添加10 μL 的培养基，实验组则按照不同浓度梯度（分别为25、50、100、250、500、750和1000 $\mu\text{g/mL}$ ）加入10 μL 蛋清肽样品溶液，并继续培养24h。之后，在对照组中同样补充10 μL 培养基，而在损伤组和保护组内则分别向其中加入10 μL 浓度为400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 溶液，继续进行12 h的孵育环节。最终，利用CCK-8检测法评估所有组别的细胞存活率。

4.2.6 F4-3 组分对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞内 ROS 的影响

采用了DCFH-DA荧光探针来测定细胞内活性氧物种（ROS）的水平。DCFH-DA作为一种被普遍采用的检测手段，常用来评估细胞内ROS状态的变化。在细胞环境中，DCFH-DA的作用机理体现在它能轻松地穿越细胞膜屏障而进入细胞内部。细胞内的酯酶会将DCFH-DA水解，生成非荧光的DCFH（2',7'-二氯二氢荧光素）。细胞内产生的活性氧（如超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基等）能够氧化DCFH，将其转变为具有强烈绿色荧光的DCF（2',7'-二氯荧光素）。

4.2.7 F4-3 不同浓度的 F4-3 对 L929 细胞活死染色

L929细胞活/死染色实验是一种常用的细胞生物学实验，用于区分活细胞和死细胞，以评估细胞毒性、细胞活力或细胞增殖状况。这类实验通常采用两种不同类型的染料，一种是对活细胞无害且仅能透过活细胞膜进入细胞的染料，如Calcein AM或FDA（荧光素二乙酸酯），染色后活细胞会发出绿色荧光；另

一种则是只对死细胞或细胞膜破裂的细胞染色的染料，如PI（碘化丙啶）或Eth D-III，这些染料不能透过完整的细胞膜，但可以插入死细胞破损的膜结构中，发出红色荧光。分为对照组、模型组及给药组，给药组给予不同浓度F4-3蛋白肽预处理2 h，除对照组外，各组加入400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ，作用48 h:小心吸出各孔培养基，过滤后冰箱保存，按照试剂盒说明书，用活细胞和死细胞活力盒对洗涤的细胞进行染色，然后放置于倒置荧光显微镜下用激发波长为480 nm 来激活荧光信观察活细胞和死细胞染色，拍照并保存。

4.2.8 F4-3 对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞线粒体膜电位的影响

选取正处于对数生长期的L929细胞，并将其均匀分布在6孔板中。通过施加400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 H_2O_2 来诱导细胞凋亡，并设置阴性对照组和阳性对照组作为参照。将细胞置于37℃、5% CO_2 浓度的恒温恒湿培养箱中，培养24 h。随后，倾去培养孔内的上清液，并按照预定的操作流程对细胞进行相应的处理，再次倾去上清。在暗处条件下，向细胞中加入相应浓度的JC-1染色液进行染色处理，维持孵育20 min。之后，用PBS缓冲液对细胞进行两次洗涤，每孔再加入2 mL新鲜的细胞培养液。最后，通过荧光显微镜技术来观测并分析细胞线粒体膜电位的动态变化。

4.2.9 统计分析

所有实验均作3次重复，数据采用SPSS 24.0进行统计，结果以平均值 $\pm$ 标准差表示，图表绘制采用Origin 2018软件完成。

4.3 结论与分析

4.3.1 蛋清抗氧化肽对 L929 细胞的毒性作用

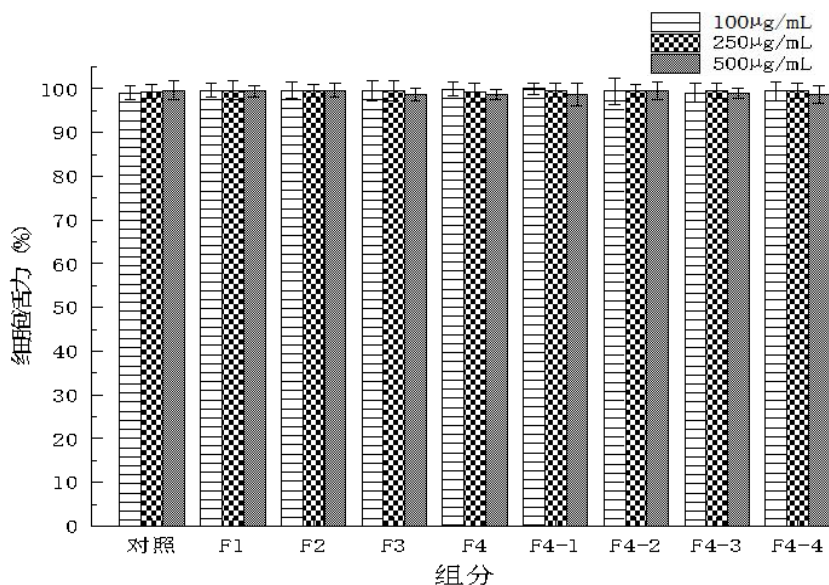
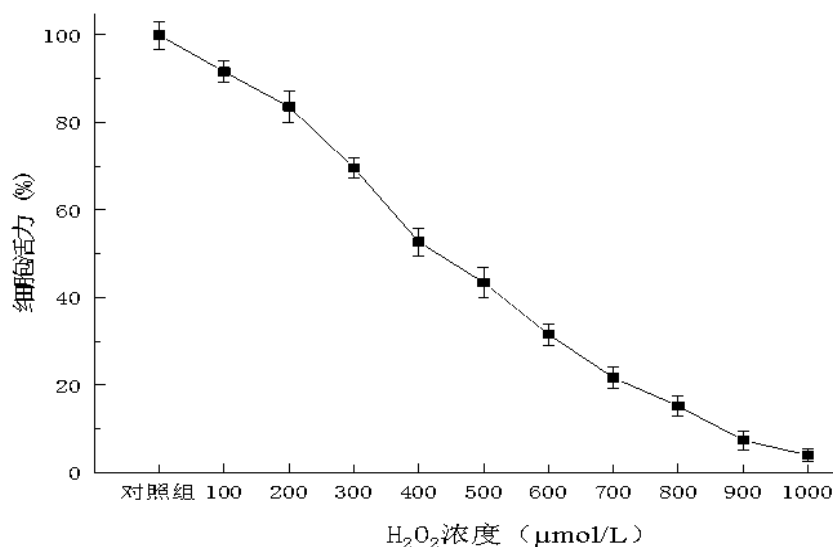


图 4-1 各组分蛋清肽不同浓度下的细胞活力

Fig. 4-1 Cell viability of egg white peptides at different concentrations

为了深入探究蛋清肽对L929细胞生长状况的直接影响，本研究采用了CCK-8（Cell Counting Kit-8）法检测细胞活力，在不加过氧化氢（ H_2O_2 ）的情况下，对各实验组进行了严谨的检测评估。由图4-1我们能够清晰地看出，当不同组分的蛋清抗氧化肽分别以100、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 的不同浓度应用于L929细胞时，其对细胞存活能力的影响表现为极为积极的一面。相较于未经处理的正常对照组，这三个剂量组的L929细胞存活率均高达98%以上，这一数值充分证明了在这些浓度范围内，蛋清抗氧化肽并未对细胞生存造成负面影响，反而可能有助于维持细胞健康状态。实验结果显示，在没有外源性氧化胁迫的情况下，无论各组分蛋清肽处于何种浓度，其处理过的细胞组与未处理对照组之间的细胞存活率并无差异，这有力地说明了在常规培养条件下，蛋清肽本身并不会对L929细胞产生任何毒性作用，即它不对细胞生长周期产生抑制或促进作用。

4.3.2 H₂O₂ 诱导的 L929 细胞氧化损伤模型的建立图 4-2 不同浓度的 H₂O₂ 下的细胞活力Fig. 4-2 Cell viability at different concentrations of H₂O₂

H₂O₂不仅可以直接氧化脂质和蛋白质，还能够渗透细胞膜并积累自由基，导致细胞受损和死亡。因此，我们利用H₂O₂来刺激细胞，并建立了一个模拟氧化损伤的实验模型。如上图所示，在增加H₂O₂浓度的同时，对L929细胞生长的抑制作用也随之增强，相比于空白组，细胞活力下降。H₂O₂对L929细胞存活率呈现出浓度依赖性。当H₂O₂浓度为400 μM时，与对照组相比，细胞存活率约为52.71±1.3%，接近半抑制浓度；当浓度增至1000 μM时，由于氧化应激反应过大，导致细胞存活率急剧下降，存活率极其低下，仅为对照组平均水平的3.98±1.79%，鉴于此，我们在后续实验中选定400 μM的H₂O₂作为造成细胞损伤的最佳浓度。

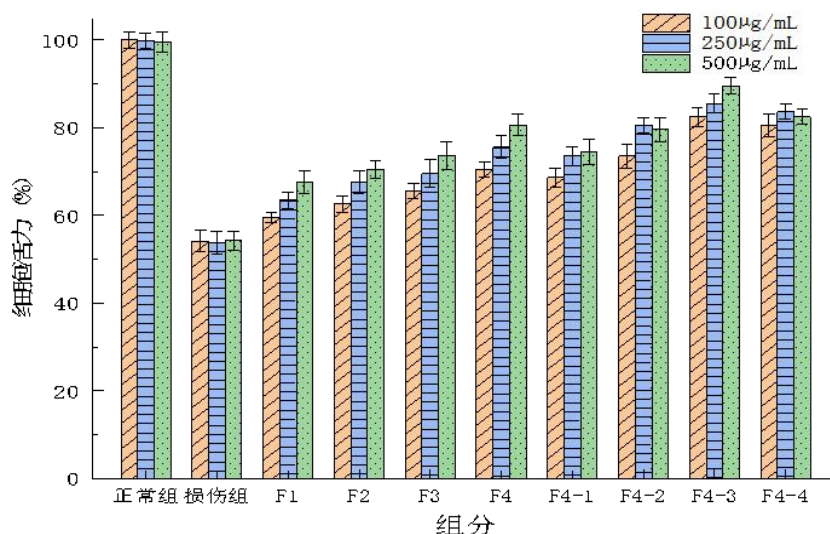
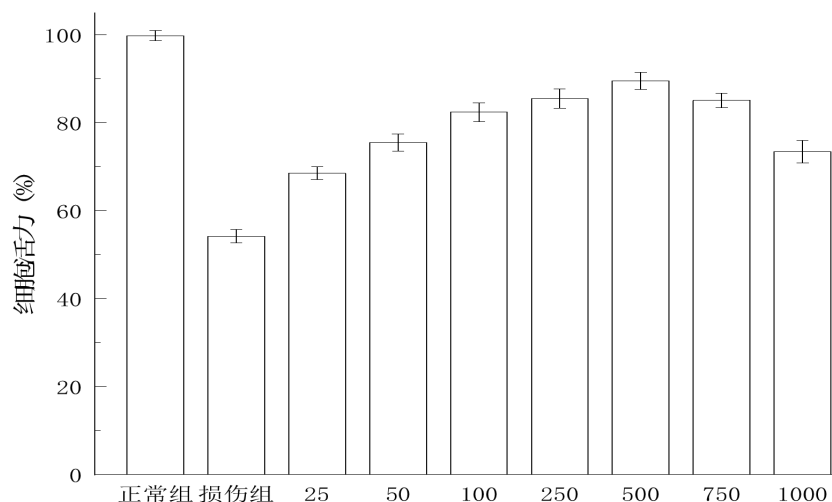
4.3.3 蛋清肽各组分对 H_2O_2 诱导后 L929 细胞活力的影响图 4-3 蛋清肽各组分对 H_2O_2 诱导后 L929 的细胞活力

Fig. 4-3 Cell viability of L929 induced by H_2O_2 induced by each component of egg white peptide

如图4-3所示，在经 H_2O_2 处理的损伤组中，细胞存活率大约为对照组的 $54.86\% \pm 2.1\%$ ，而当采用不同浓度的蛋清的抗氧化肽干预已被氧化损伤的L929细胞后，观察到细胞存活率得到了不同程度的提升。在 $400 \mu\text{M}$ 的 H_2O_2 诱导L929细胞损伤条件下，经超滤分离和LH-20分离的八个组分在 H_2O_2 损伤前 24 h分别加入100、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下的蛋清肽各组分均能提高 L929 细胞的存活率，说明其对 L929 细胞均具有保护作用，与损伤组相比，在各浓度中F4-3组分对细胞的保护作用最为有效，并且随着抗氧化肽浓度的升高，细胞存活率随之提高，在一定浓度范围内，蛋清抗氧化肽各组分对细胞存活率的影响呈浓度依赖性，不同组分100-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的蛋清肽，且随着浓度的升高，细胞存活率随之增加。综合实验结果来看，蛋清肽在浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 H_2O_2 诱导L929细胞氧化损伤的保护作用较好与其他实验浓度。8个组分中以F4-3加入的细胞存活率最高。F4-3组分对细胞的保护作用优于其他7个组分。这也与前面研究的体外抗氧化活性所对应，F4-3组分预处理的L929氧化损伤细胞的存活率从 $81.45 \pm 2.12\%$ 提高至 $91.32 \pm 1.43\%$ ，总体来看，F4-3的活性强于其他七个抗氧化肽组分。

4.3.4 F4-3 组分不同浓度对 H_2O_2 诱导后 L929 细胞活力的影响图 4-4 F4-3 组分不同浓度对 H_2O_2 诱导后 L929 的细胞活力Fig. 4-4 Cell viability of L929 induced by H_2O_2 at different concentrations of F4-3 components

当F4-3浓度从25 $\mu\text{g/mL}$ 增至500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞的存活率呈现出逐渐上升的趋势, 直至为500 $\mu\text{g/mL}$ 这一浓度时为保护效果最好的浓度。对由 H_2O_2 诱导的L929细胞氧化损伤起到了保护效果, 使得细胞存活率大幅提升至 $92.13\% \pm 1.25\%$, 显示出强大的抗氧化防护效能。蛋清肽的浓度继续增高至750和1000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞活力开始呈现抑制现象。这可能是由于高浓度的蛋清肽引起了渗透压改变, 进而导致细胞内外水分平衡被破坏。过高的浓度可能导致细胞外部溶液浓度过大, 引起细胞失水, 继而导致细胞体积收缩、细胞膜结构变形受损, 最终引发细胞膜破裂, 加速细胞死亡的过程。这一现象提示, 在利用蛋清肽或其他类似生物活性物质进行细胞保护时, 选择适宜的浓度至关重要, 过高浓度不仅不能起到保护作用, 反而可能对细胞产生有害影响。

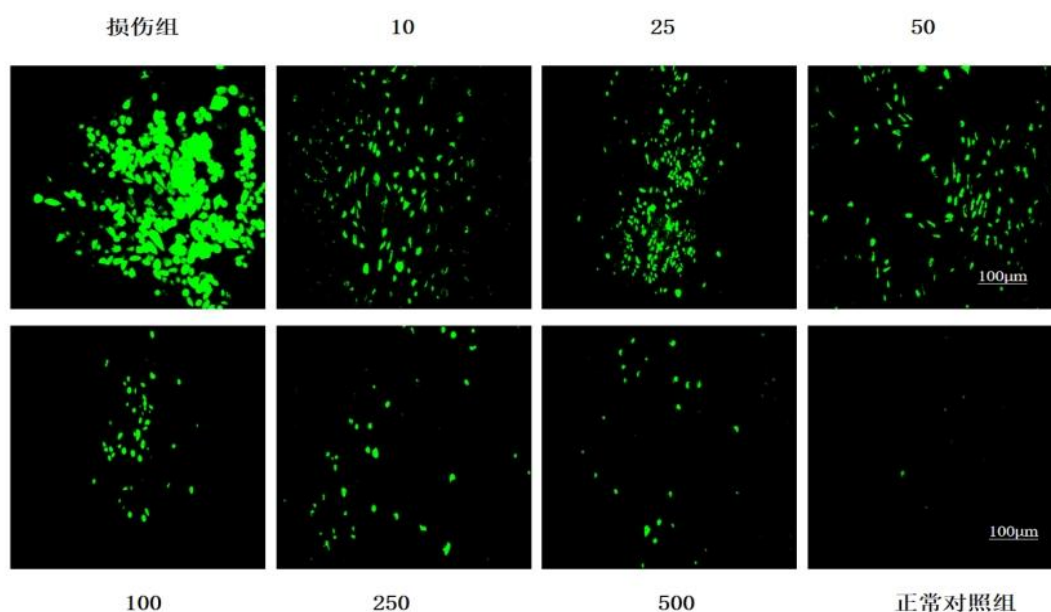
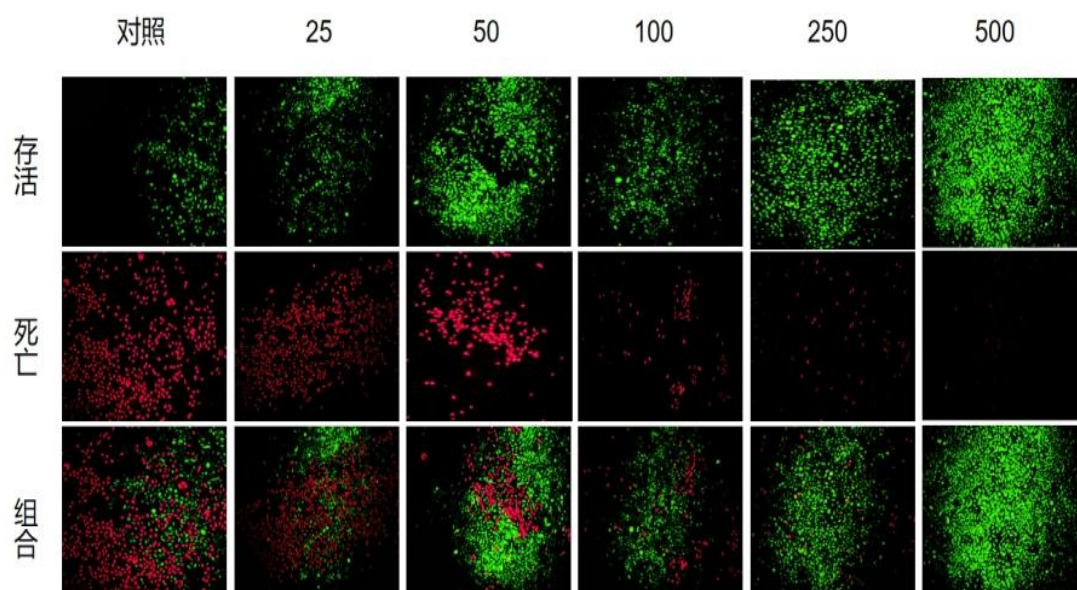
4.3.5 F4-3 组分对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞内 ROS 的影响图 4-5 不同浓度的 F4-3 组分对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞内 ROS 的荧光图片

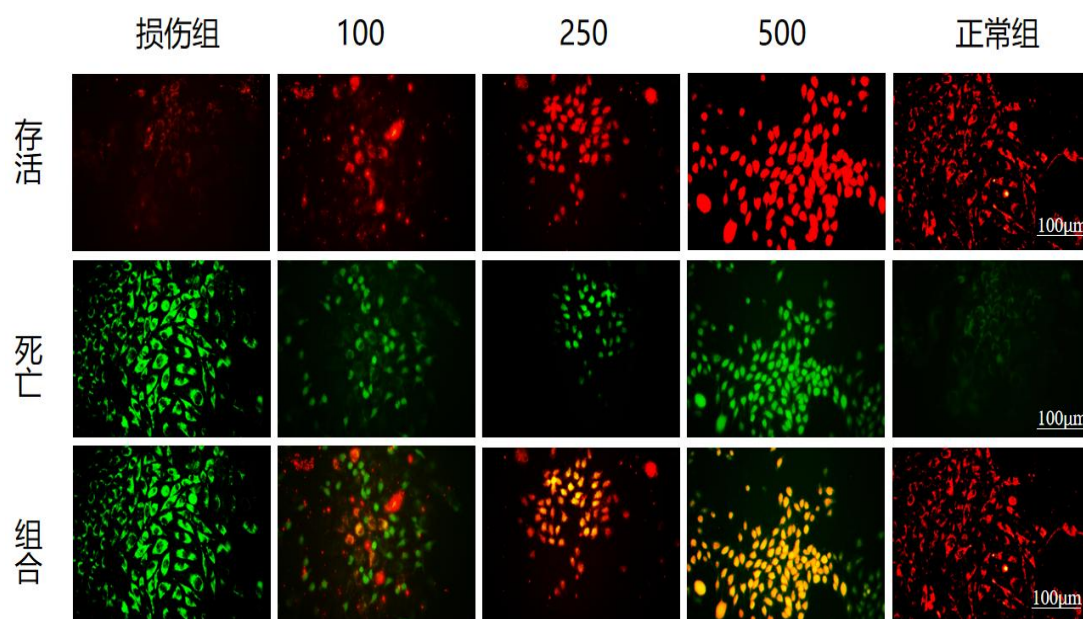
Fig. 4-5 Fluorescence images of H_2O_2 -induced ROS in L929 cells by different concentrations of F4-3 components

DCFH-DA 作为一种亲脂性化合物，能够轻松穿越细胞膜屏障。初始状态下，DCFH-DA 不具备荧光特性。然而，在进入细胞内部后，它会被细胞内酯酶催化分解为 DCFH。随后，细胞内产生的活性氧（ROS）会对 DCFH 进行氧化作用，这一过程会导致 DCFH 转变为一种具有强烈绿色荧光的 DCF 分子。荧光强度的高低与细胞内活性氧浓度直接相关，即荧光越强，表明细胞内的活性氧水平越高。通过监测 DCFH-DA 探针转化后的荧光信号强度及其在细胞内的积累程度，可以直接评估细胞内活性氧的动态水平。在图 4-5 的活性氧荧光图片中，我们可以观察到，在实验的损伤组中，当细胞经过 $400 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导条件下，细胞内部的活性氧（ROS）含量出现了显著上升，这一点通过拍摄的荧光图片得以直观体现，图片中 ROS 表达区域呈现出密集的荧光分布。然而，随着 F4-3 组分中蛋清肽浓度的逐渐增加，这一趋势发生了逆转。在加入不同浓度的 F4-3 蛋清肽后，细胞内 ROS 的水平呈现出逐渐下降的趋势。这一现象生动描绘了 F4-3 组分中的蛋清肽对于调控细胞内 ROS 水平的积极作用，随着其浓度的提升，细胞内 ROS 的清除效果愈发明显，从而有效改善了细胞的氧化状态。这一结果验证了蛋清肽在抗氧化方面的潜力。

4.3.6 不同浓度的 F4-3 对 L929 细胞活死染色

图 4-6 不同浓度的 F4-3 组分对 H_2O_2 诱导后 L929 细胞内活死荧光图片Fig. 4-6 Live and dead fluorescence images of L929 cells induced by H_2O_2 with different concentrations of F4-3 components

染色后活细胞会发出绿色荧光；另一种则是只对死细胞或细胞膜破裂的细胞染色的染料。如图4-6所示，在蛋清抗氧化肽的不同浓度下细胞的活死图片可以看出，随着F4-3组分的蛋清抗氧化肽从25、50、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 的加入，蛋清肽组分的浓度逐渐增大的同时，从所得的荧光图像中，我们可以直观且清晰地观察到随着浓度处理条件的变化，显示为绿色荧光的活细胞数目呈现出逐渐增多的趋势，在实验设定的500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度条件下，活细胞数量达到了峰值。与此对应的是，那些标记为红色荧光，代表受损或死亡的细胞数量则在不断减少。这一现象有力地证明了蛋清抗氧化肽在实验过程中对L929细胞具有保护作用，能够有效地减轻乃至抵抗氧化应激对细胞造成的损伤，从而提升了细胞存活率和整体健康状态。通过荧光染色技术的可视化证据，我们可以确切地了解到蛋清抗氧化肽在细胞保护层面的功效，这对于理解其潜在的抗氧化机制以及在生物医学领域可能的应用具有重要意义。

4.3.7 F4-3 对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞线粒体膜电位的影响图 4-7 不同浓度的 F4-3 组分对 H_2O_2 诱导后 L929 细胞内膜电位荧光图片Fig. 4-7 Fluorescence images of L929 cells induced by H_2O_2 induced by different concentrations of F4-3 components

线粒体作为细胞内ROS主要的场所，一旦其生成的ROS水平过高，将会引发线粒体膜结构和功能的变化，特别是可能导致膜通透性的失衡以及膜电位的瓦解，进而触发释放细胞凋亡相关因子等线粒体功能异常的现象。利用JC-1染料对L929细胞进行显色实验，可实时监测其线粒体跨膜电位的动态变化。通过对比红色和绿色荧光信号强度的变化，我们可以间接评估这些细胞的功能状态。正常状态下，L929细胞的线粒体膜电位保持高位，表现为红色荧光强度超过绿色荧光。当引入 H_2O_2 时，它能够诱发线粒体膜电位的去极化过程，破坏膜的完整性；在此过程中，原先占主导地位的红色荧光逐渐转变为绿色荧光，这一转变特征预示着在氧化应激环境下，细胞已进入早期凋亡阶段。实验结果显示，相较于对照组，经 H_2O_2 处理后的细胞表现出明显的绿色荧光增多和红色荧光减少，揭示了线粒体膜电位的显著降低。在F4-3预处理之后，随着其浓度的增加，观察到红色荧光强度呈现依赖性增长，而绿色荧光则相对减弱。这意味着F4-3成功地阻止了因 H_2O_2 引起的线粒体膜电位的下滑，并且能够防止细胞过早进入凋亡程序。这说明了F4-3在L929细胞对抗氧化应激诱导凋亡的过程中，发挥了关键作用，通过稳定细胞线粒体膜电位，有效地保护了线粒体免受损害，从而维护其正常功能。

4.4 本章小结

利用 L929 细胞构建氧化应激模型，研究蛋清抗氧化肽对氧化损伤的 L929 细胞的保护作用。在此基础上，采用 CCK-8 法测定细胞活力、DCFH-DA 荧光探针、细胞活死试剂盒、线粒体膜电位试剂盒对其进行探究，研究蛋清抗氧化肽活性最好的组分对 H_2O_2 诱导损伤的 L929 细胞的保护作用。蛋清抗氧化肽在浓度为 100、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 中和正常对照组相比存活率均高达 98.0% 以上。通过 H_2O_2 诱导 L929 细胞氧化损伤实验，得到最佳诱导浓度为 400 μM ，与对照组相比，细胞存活率约为 $52.71 \pm 1.3\%$ ，接近半抑制浓度；通过 CCK-8 法测定细胞活力以及采用活性氧探针、活死试剂盒、线粒体膜电位试剂盒的实验结果，F4-3 组分的蛋清肽为抗氧化活性最好的组分。

第5章 结论与展望

5.1 结论

本研究采用咸鸭蛋清作为起始材料，通过实施等电点法实现高效的脱盐处理，进而转化成蛋清蛋白粉。首先进行了单因素及正交优化实验以确定最佳的酶解工艺条件，最终选择了一种双酶体系作为制备抗氧化性最好的蛋清蛋白酶解液。随后，运用超滤技术和凝胶柱层析技术对酶解产物进一步分离纯化，旨在获取具有更高抗氧化性能的组分。最好通过体外抗氧化实验以及细胞层面的实验，系统深入地考察了所得到的抗氧化组分对氧化损伤细胞的保护作用。

1.以DPPH·清除率为主要指标，DH为参考指标，从五种常用的蛋白酶中筛选出两种酶解抗氧化性最好的碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶作为探究双酶的实验对象，通过单因素分别考察两种酶的对底物浓度、酶添加量、酶解时间、pH、酶解温度对这两个指标的影响，而后对两种酶的酶添加顺序、分段加酶时间比以及两酶加酶量比进行探究，通过正交实验确定了碱性蛋白酶的优化工艺为底物浓度5%、酶添加量8%、pH: 9.0、温度为55℃酶解时间6h; 此时的DPPH·清除率可以达到 $90.27\pm0.52\%$ ；木瓜蛋白酶优化工艺为底物浓度5%、酶添加量8%、pH: 8.0、温度为50℃酶解时间6 h，此时的DPPH·清除率可以达到 $88.21\pm0.95\%$ 。最佳的双酶工艺为：先加碱性蛋白酶反应4 h后，灭酶再加入木瓜蛋白酶反应2 h。两酶加入比例为:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=1:1，即碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶各加酶量4%。此时的DPPH·清除率可以达到 $95.65\pm0.71\%$ 。

2.经50、10、3kDa的50 mL超滤管成功分离得到四个组分，分别收集这四个组分并命名为F1(>50kDa)、F2(10~50kDa)、F3(3~10kDa)、F4(<3kDa)，从F4在不同浓度下对三种自由基的清除能力来看，小于3kda分子量的F4组分抗氧化活性最好，各浓度中F4的清除能力均优于其他组分，F4在实验范围内，DPPH·的清除率为 $65.69\pm1.35\%$ ，ABTS⁺清除率为 $96.11\pm2.26\%$ 。PTIO·清除率为 $61.67\pm1.65\%$ 。因此选用抗氧化能力最好的F4进行后续试验。经葡聚糖凝胶LH-20分离得到了四个组分中，F4-3在DPPH·清除能力和ABTS⁺、PTIO·清除能力方面随浓度的增加而增加。在实验范围内的DPPH·、ABTS⁺、PTIO·的清除率分别为 $72.19\pm1.58\%$ 、 $98.56\pm2.62\%$ 、 $78.85\pm2.01\%$ ，F4-3在抗氧化三指标的检测中表现出较好的抗氧化活性，因此选用抗氧化能力最好的F4-3进行后续试验。

3.通过H₂O₂诱导L929细胞氧化损伤实验，得到最佳诱导浓度为400 μM时，与对照组相比，细胞存活率约为52.71±1.3%，利用L929细胞构建氧化应激模型，研究蛋清抗氧化肽对氧化损伤的L929细胞的保护作用。在此基础上，采用CCK-8法测定细胞活力、DCFH-DA荧光探针、细胞活死试剂盒、线粒体膜电位试剂盒对其进行探究，研究蛋清抗氧化肽活性最好的组分对H₂O₂诱导损伤的L929细胞的保护作用。并得到以下结论：蛋清抗氧化肽在浓度为100、250、500 μg/mL中，各个实验组的L929细胞存活率均高达98.0%以上。通过CCK-8法测定细胞活力以及采用活性氧探针、活死试剂盒、线粒体膜电位试剂盒的实验结果，F4-3组分的蛋清肽为抗氧化活性最好的组分。

5.2 展望

本研究通过双酶酶解、超滤、凝胶柱层析、体外抗氧化、细胞实验对咸蛋清的抗氧化进行探究，制备了抗氧化活性较好的组分，根据目前研究存在的问题提出几点建议：

（1）在对咸鸭蛋清脱盐再酶解制备抗氧化肽的研究中，本研究仅对常用的五种蛋白酶进行双酶酶解实验，但并未深入研究其他不常见的蛋白酶及三种以上的酶组合的抗氧化活性。

（2）本文主要研究经超滤和 LH-20 分离纯化后蛋清肽的体外抗氧化和部分细胞实验，可进一步通过系统的细胞实验及动物实验，探究其抗氧化的活性机制研究。

参考文献

- [1] 张利庠.我国蛋鸡产业高质量发展助力乡村振兴[J].中国畜牧业, 2021 (17): 33-36
- [2] KAEWMANEE T, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W. Changes in chemical composition, physical properties and microstructure of duck egg as influenced by salting[J]. Food Chemistry, 2009, 112 (3): 560-569.
- [3] 陶志云, 胡艳, 朱春红, 等. 鸭蛋中氨基酸含量测定及分析[C]. 中国畜牧兽医学学会家禽学分会代表会议暨全国家禽学术讨论会, 2013.
- [4] 许晓慧, 赵彬侠, 赵立新. 从蛋黄中提取及纯化卵磷脂[J]. 食品科学, 2006, 27 (8): 129-132
- [5] 黄德仙, 李江滨, 陈海文, 等. 鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑蛋中胆固醇含量的比较[J]. 安徽农学通报, 2013, 000 (011): 109-110.
- [6] 牛书玉, 惠庆亮, 曲光宪. 鸭蛋的营养与应用[J]. 水禽世界, 2012 (6): 50-51.
- [7] 黄奕源, 潘竞龙, 欧阳宏佳, 等. 咸鸭蛋腌制过程相关指标变化规律及最佳配方的筛选研究[J]. 广东农业科学, 2019, 46 (06): 142-149.
- [8] WANG Z F, DAI C, WANG T Y. A simple method to evaluate oil in salted egg[J]. International journal of food properties, 2017, 20 (sup2): 1816-1822.
- [9] LI X, CHEN S, YAO Y, et al. The quality characteristics formation and control of salted eggs: A review[J]. Foods, 2022, 11 (19): 29-39.
- [10] 孙静, 杜金平, 向俊, 等. 腌制前清洗消毒对咸蛋游离氨基酸的影响[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12 (15): 6160-6168
- [11] CHENG S, ZHANG T, WANG X, et al. Influence of salting processes on water and lipid dynamics, physicochemical and microstructure of duck egg[J]. LWT, 2018, 95: 143-149.
- [12] 肖丹华, 林捷, 郑华. 咸蛋清的利用和研究现状[C]. "科技创新与食品产业可持续发展"学术研讨会暨2008年广东省食品学会年会论文集, 2008.
- [13] AI M, XIAO N, JIANG A. Molecular structural modification of duck egg white protein conjugates with monosaccharides for improving emulsifying capacity[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106-115.
- [14] 周冰. 咸鸭蛋清的脱盐、特性及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.

- [15] ASLAM M Z. 发酵乳ACE抑制性生物活性肽降低高血压的体内外评价[D]. 北京: 北京林业大学,2019.
- [16] 陈彩霞, 苏秀兰, 韩瑞兰.生物活性肽调节免疫功能的研究现状[J].现代预防医学, 2016, 43 (15):2798-2801
- [17] 屈浩. 一种大豆咖啡虫草花生物活性肽的制备方法和应用[P].中国专利:114717284, 2022-07-08.
- [18] 史梅莓, 王洋, 周贤波, 等.咸蛋清和复配胶对肉糜制品品质的影响[J].食品工业, 2021, 42 (3): 167-172
- [19] 王智云, 钟声涛, 郭思浩,等.咸蛋清鸡肉糜生产工艺研究[J].农产品加工·创新版, 2019, 000 (009): 36-38.
- [20] 聂嘉文, 吴雨青, 陈雨琴, 等.咸蛋清凝胶性能改良及其在咸蛋清香干加工中的应用[J].食品工业科技, 2023, 44 (17): 251-262.
- [21] 刘华桥, 阮丹丹, 李双艳. 咸蛋清鸡肉米肠及其制作方法[P].中国专利:111227190,2020-06-05.
- [22] 黄备恩. 一种虾条的制作方法[P].中国专利:110495578,2019-11-1-26.
- [23] LI X, CHEN S, YAO Y, et al. The Quality Characteristics Formation and Control of Salted Eggs: A Review.Foods,2022,11(19):2949-2958
- [24] 谢颖, 方东升, 周璟明, 等.咸蛋清脱盐和蛋白回收的研究现状[J].北京农业: 下旬刊, 2014.36: 4-6
- [25] 谢亮亮, 李晶晶, 蔡为荣.超滤联用中压柱层析分离咸鸭蛋清抗氧化肽[J].食品与发酵工业, 2023, 49 (13): 159-164.
- [26] 饶胜其, 刘锋锋, 居涛, 等.源于鸡蛋清溶菌酶ACE抑制肽的分离纯化及结构鉴定[J].食品工业科技, 2012, 033 (005): 90-94.
- [27] XIAO N, HUANG X, HE W, et al.A review on recent advances of egg byproducts: Preparation, functional properties, biological activities and food applications[J].Food Research International, 2021, 147: 110-117.
- [28] 李俊, 陈薛琪, 乔野, 等. 一种具有抗衰修复活性的蛋清蛋白多肽的制备方法[P].中国专利:115141869,2022-08-04.
- [29] 陶鑫. 脱盐低水解度蛋清肽粉制备及其功能性质研究[D].武汉: 武汉轻工大学, 2019.

- [30] 任尧. 鸭蛋清蛋白肽的酶法制备及其抗氧化活性研究[D].广州: 华南理工大学, 2011.
- [31] 夏春荣, 王晓杰, 曲悦.玉米糖肽的纳滤脱盐工艺[J].食品与生物技术学报, 2022, 41 (04): 12-18.
- [32] 李逢振.咸蛋清资源化综合利用的研究[J].农产品加工, 2020 (05): 85-86.
- [33] 魏兆军. 一种食品用耐高温溶菌酶复合保鲜膜的制备方法[P].中国专利:113388169,2021-08-05.
- [34] 李慧, 庞姗姗, 田家瑶, 等.氧化石墨烯固定化溶菌酶的研究进展[J].广州化工, 2023, 51 (8): 16-19.
- [35] 孙明杰, 孙天宇.含溶菌酶的药物组合物及其应用[P].中国专利:112533628,2021-03-19
- [36] 李逢振, 等.蛋壳残留蛋清中溶菌酶高效提取技术的研究[J].农产品加工, 2017, 24 (446): 63-64.
- [37] 张灏, 赵玉萍, 杨严俊, 等.超滤法提取蛋清溶菌酶[J].无锡轻工大学学报, 2002 (06): 607-612.
- [38] 胡欣. 利用磁性纳米粒子检测蛋清中抗生物素蛋白的方法研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [39] 冯朝波, 王炜军.咸鸭蛋清抗生物素蛋白的分离纯化及快速测定方法的建立[J].山东化工, 2011, 40 (8): 70-72.
- [40] 李宁, 石爱民, 刘红芝, 等.生物活性肽抗癌活性及其作用机制研究进展[J].中国食品学报, 2019, 19 (11): 261-269.
- [41] 王丽华. 抗糖尿病生物活性肽的筛选与活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [42] 刘洁琳, 温绍君. 心包液中生物活性肽与缺血性心脏病研究进展[C].五洲国际心血管病研讨会, 2006.
- [43] GIRGIH A T, HE R, MALOMO S, et al.Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides[J].Journal of Functional Foods, 2014, 6: 384-394.
- [44] PEÑA-RAMOS E A, XIONG Y L.Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties[J].Meat Science, 2003, 64 (3): 259-263.
- [45] 左依瑾, 于子淇, 申雪晴, 等.鱼源抗氧化肽的结构与其功能关系研究进展[J].食品工业科技, 2023, 44 (14): 419-429.

- [46] RYAN J T, ROSS R P, BOLTON D, et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish[J]. *Nutrients*, 2011, 3 (9): 765-791.
- [47] 孙浩浩, 彭常安. 鸡蛋中功能活性肽的研究进展[J]. *粮食流通技术*, 2022 (016): 50-54.
- [48] 周明, 秦修远, 贾福怀, 等. 玉米低聚肽中抗氧化肽的分离纯化及结构鉴定[J]. *食品工业*, 2019 (5): 232-235.
- [49] 刘文颖, 谷瑞增, 鲁军, 等. 小麦低聚肽中抗氧化肽的分离纯化及结构鉴定[J]. *食品工业*, 2016 (6): 106-108.
- [50] SHAHIDI F, ZHONG Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010, 112 (9): 930-940.
- [51] SÁNCHEZ A, VÁZQUEZ A. Bioactive peptides: A review[J]. *Food quality and safety*, 2017, 1 (1): 29-46.
- [52] WANG L, MAO X, CHENG X, et al. Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate[J]. *International journal of food science & technology*, 2010, 45 (4): 807-812.
- [53] WEN C, ZHANG J, ZHANG H, et al. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 105: 308-322.
- [54] MINE Y, LI-CHAN E, JIANG B. Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals[M]. John Wiley & Sons, 2010.
- [55] PARK K H, NAN Y H, PARK Y, et al. Cell specificity, anti-inflammatory activity, and plausible bactericidal mechanism of designed Trp-rich model antimicrobial peptides[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2009, 1788 (5): 1193-1203.
- [56] 弘子姗. 核桃源抗炎肽的制备及其抗溃疡性结肠炎机制研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2023.
- [57] 杨玉亮. 牦牛骨源抗炎活性肽分离纯化与作用机制解析[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- [58] 王兴顺, 耿艺介, 李文楚. 抗菌肽抗菌机制及其应用研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2012, 40 (4): 447-452.

- [59] 邵长轩, 党安凯, 战昭含, 等. β -折叠抗菌肽的研发及应用策略[J].畜牧兽医学报, 2022, 53 (08): 2490-2501.
- [60] YADAVALLI S S, CAREY J N, LEIBMAN R S, et al.Antimicrobial peptides trigger a division block in *Escherichia coli* through stimulation of a signalling system[J].Nature communications, 2016, 7 (1): 22-34.
- [61] 齐诗哲. 乳源抗菌肽的制备及蛋白质组学分析[D].大连: 大连海洋大学, 2022.
- [62] 张欢, 郑炜, 谢超, 等.4种水产蛋白抗菌肽安全性分析[J].食品科技, 2023, 48 (01): 148-152.
- [63] TANG W, ZHANG H, WANG L, et al.Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis[J].Food Chemistry, 2015, 168: 115-123.
- [64] AGUILAR-TOALÁ J, DEERING A, LICEAGA A. New insights into the antimicrobial properties of hydrolysates and peptide fractions derived from chia seed (*Salvia hispanica* L.)[J].Probiotics and antimicrobial proteins, 2020, 12: 1571-1581.
- [65] NIKI E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo[J].Free Radical Biology and Medicine, 2010, 49 (4): 503-515.
- [66] LIU Y-F, OEY I, BREMER P, et al. Pulsed electric fields treatment at different pH enhances the antioxidant and anti-inflammatory activity of ovomucin-depleted egg white[J].Food chemistry, 2019, 276: 164-173.
- [67] VENKATACHALAM K, NAGARAJAN M. Assessment of different proteases on degree of hydrolysis, functional properties and radical scavenging activities of salted duck egg white hydrolysate[J].Journal of food science and technology, 2019, 56 (6): 3137-3144.
- [68] WANG K, WANG J, LIU B, et al. Effects on DPPH inhibition of egg-white protein polypeptides treated by pulsed electric field technology[J].Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93 (7): 1641-1648.
- [69] THAHA A, WANG B-S, CHANG Y-W, et al. Food-derived bioactive peptides with antioxidative capacity, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activity[J].Processes, 2021, 9 (5): 747-753.

- [70] LEE D, BAMDAD F, KHEY K, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of chicken egg vitelline membrane hydrolysates[J]. Poultry science, 2017, 96 (9): 3510-3516.
- [71] 马思彤, 刘静波, 张婷, 等. 体外模拟胃肠消化及碱性蛋白酶处理后蛋清肽抗氧化活性差异及肽序列解析[J]. 食品科学, 2020, 41 (21): 113-120.
- [72] 刘燕, 马雪萍, 史玉柱, 等. 滨蒿提取物对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及抗氧化活性[J]. 中药药理与临床: 2024, 01:1-14.
- [73] 李德娟. 咖啡酸邻硝基苯乙酯抗大鼠MIRI作用及其心脏代谢物分析[D].: 重庆: 西南大学, 2018.
- [74] 张琼, 杨玉贤, 蔡苇, 等. 兰坪虫草活性成分的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2024, 33 (02): 67-71.
- [75] XING Y, ZHENG Y, YANG S, et al. Artemisia ordosica polysaccharide alleviated lipopolysaccharide-induced oxidative stress of broilers via Nrf2/Keap1 and TLR4/NF- κ B pathway[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 223: 11-25.
- [76] PISOSCHI A M, POP A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review[J]. European journal of medicinal chemistry, 2015, 97: 55-74.
- [77] PISOSCHI A M, POP A, IORDACHE F, et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 209: 11-18.
- [78] 梁恒, 钱军, 刘志鹏, 等. 新型氮氧自由基HPN对大鼠脑缺血再灌注损伤后缺氧相关蛋白表达的影响[J]. 遵义医科大学学报, 2024, 47 (03): 230-236.
- [79] POPRAC P, JOMOVA K, SIMUNKOVA M, et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases[J]. Trends in pharmacological sciences, 2017, 38 (7): 592-607.
- [80] 于佳欣, 林淼, 张文轩, 等. 阿尔茨海默病相关免疫炎症反应的研究进展[J]. 生命科学: 2024, 3(30):1-17.
- [81] 殷小雅, 赵颖, 陈艳, 等. 青刺果油组合物的抗氧化及保湿活性研究[J]. 日用化学品科学, 2023, 46 (06): 46-51.
- [82] 龚频, 岳山, 王小娟, 等. 酶法制备蛹虫草多肽工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 陕西科技大学学报, 2023, 41 (5): 50-56.

- [83] 张琦, 王凤扬, 鄢梦, 等.山苍子蛋白抗菌肽的抑菌特性及稳定性研究[J].中国测试, 2023, 49 (8): 81-86.
- [84] 宫瑞林, 刘伯业, 陈复生, 等.小麦蛋白肽钙螯合物的制备工艺及结构表征[J].河南工业大学学报自然科学版, 2024, 44 (6): 1-8.
- [85] 游丽君.泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳, 抗癌功效研究[D].广州: 华南理工大学, 2010.
- [86] 黄滢波.酵母多肽降血压机制的研究[D].广州: 华南理工大学, 2021.
- [87] 张来弟, 孙杨赢, 周昌瑜, 等.鸭肝蛋白酶解产物中抗炎肽的分离鉴定及活性分析[J].食品科学, 2023, 44 (12): 150-156.
- [88] 崔春, 任娇艳, 赵谋明, 赵海峰.一种咸蛋清高效脱盐制备高起泡性蛋清粉的方法[P].中国专利:101878924.2010-11-10
- [89] 王晴晴, 蔡为荣, 汪玉玲, 等.蛋清多肽-铁螯合物的制备、表征及对Caco-2细胞的促增殖作用[J].食品与发酵工业, 2024, 50 (04): 197-203.
- [90] 张建林.鸭蛋蛋清肽的酶法制备及其ACE抑制和抗氧化活性评价[D].武汉: 武汉工业学院, 2011.
- [91] JAYAPALA N, TORAGALL V, B.S G K, et al.Preparation, characterization, radical scavenging property and antidiabetic potential of laminarioligosaccharides derived from laminarin[J].Algal Research, 2022, 63: 102-117.
- [92] REN Y, WU H, LI X, et al.Purification and characterization of high antioxidant peptides from duck egg white protein hydrolysates[J].Biochemical and biophysical research communications, 2014, 452 (4): 888-894.
- [93] 陈梦微.蛋清硒肽的制备、结构鉴定及免疫功能探究[D].无锡: 江南大学, 2023.
- [94] 盖莉莉, 高丹丹, 李明生, 等.食源性抗氧化肽分离纯化方法研究进展[J].食品安全质量检测学报, 2018, 9 (16): 4343-4348.
- [95] 周婷婷.抗氧化大豆多肽制备、纯化的研究[D].上海: 上海海洋大学, 2010.
- [96] 张莉莉, 严群芳, 王恬.大豆生物活性肽的分离及其抗氧化活性研究[J].食品科学, 2007 (05): 208-211.
- [97] 李鸿梅, 杨锐, 于雷, 等.玉米蛋白粉水解产物的分离及其抗氧化活性[J].食品科学, 2010, 31 (01): 117-122.

- [98] THAIPONG K, BOONPRAKOB U, CROSBY K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19 (6): 669-675.
- [99] LIU Y, YOU Y, LI Y, et al. Characterization of carboxymethylated polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* and their antioxidant and antibacterial activities[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 38: 355-362.
- [100] 杨盈, 严宝珍, 聂舟, 等. α -生育酚与自由基DPPH $\cdot$ 的反应机理研究[J]. *波谱学杂志*, 2008 (03): 331-336.
- [101] 刘通. 黑木耳多糖铁复合物制备、结构表征及其抗缺铁性贫血活性的研究[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2019.
- [102] 王钦波, 王晓东. PTIO自由基清除分析法的PH值效应与黄芩素及黄芩苷的构效分析[J]. *现代医院*, 2019, 19 (01): 145-148.
- [103] JOVANOVIĆ J, STEFANOVIĆ A, ŽUŽA M, et al. Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration[J]. *Hemijaska industrija*, 2016, 70 (4): 419-428.
- [104] 王耀冉, 陈明杰, 查磊, 等. 响应面法优化草菇抗氧化肽的酶法制备工艺[J]. *食品工业科技*, 2022, 43 (15): 227-233.
- [105] ELIAS R J, KELLERBY S S, DECKER E A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48 (5): 430-441.
- [106] 曲亭菲. 基于多肽组学与生物信息学的海参活性肽筛选及活性研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023.
- [107] 曹晨灿, 谭淇丹, 刘蕾, 等. 用于抗糖化功效评价的细胞模型研究现状及应用前景[J]. *日用化学工业*, 2023, 53 (12): 1451-1458.
- [108] 刘娜. 南鹤虱倍半萜成分的提取、纯化和鉴定及其抗氧化活性研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [109] 吴志明. 链霉菌N2拮抗水稻纹枯病菌的作用机制及其对水稻诱导抗性研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2018.
- [110] 李海枝, 王曙宾, 郭珊珊, 等. 发酵火麻仁蛋白粉对HepG2细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47 (15): 84-89.

攻读学位期间发表的论文及其他成果

- [1] 第一.蛋清抗氧化肽的多级分离纯化及对 L929 细胞氧化损伤的保护作用[J]安徽工程大学学报.录用
- [2] 第五.蛋清多肽-铁螯合物的制备、表征及对 Caco-2 细胞的促增殖作用[J]. 食品与发酵工业, 2023.
- [3] 第七.一种简便逆流萃取色谱装置[P]. 中国专利: 216934791U , 2022-07- 12.

致 谢

预想过很多写致谢的场景，但到真正落笔的这一刻，还是在实验室 104 的工位上。总想把三年安工程的点滴都写下来留作回忆，也许很多年后再次回看此篇致谢又将是另一番体会。此时此刻感触很多，却又不知从哪写起，随着年龄的增长，情感愈加内敛，也不太喜欢告别，因为安工程才让我对芜湖这座城市从了解走向熟悉直至热爱，爱上了芜湖这座江城，十年的时间里走遍了多城市，直至研究生的脚步走至芜湖，总想再多吹吹滨江公园的晚风。

这一年我 29 岁了，与安工程的故事始于 2021 的金秋，也即将结束于 2024 年的盛夏。打字的这一刻也慢慢明白，我即将走出校园，奔赴新的工作岗位，书写人生新的篇章，诠释人生所属的新的角色，我的三年研究生生活和校园时代也已接近尾声，可能这次真的是我最后的一次学生生涯了。

回首这一路走来，从入伍→专科→本科→研究生。经历了太多的不易，无数次徘徊无数次挣扎，有努力也有幸运，我花了人生中最美好的十年才走到了今天，我从来都不是同一批中最优秀的，一路走来跌跌撞撞，可能多了足够的坚持和幸运，所以上天才会如此眷顾这个憨憨的大猪男孩。

和我那些同龄的战友、同学、朋友相比，我好像一直都在校园的怀抱里，想起 2021 年 3 月 24 日收到朱西平老师电话通知拟录取的那一刻，我的人生已然走入了另一阶段，从未想到我会如此的幸运，来到了安工程。

感谢我的导师蔡为荣教授和我的师娘陈欣欣给我学习和生活上的照顾，眷眷之心诚表谢意，铭记师恩，砥砺前行。同时也向学院的领导和各位老师表达最衷心的感谢。

感恩一路陪伴和支持我的爸爸妈妈，感谢他们一直在用自己的方式全心全意的爱着我，在过去的二十几年中倾尽他们所有的爱和支持，尊重和支持我的每一个决定，感谢爸爸妈妈的碎碎念念和家人长久以来的鼓励，感谢你们。

感谢我的辅导员王玲玲老师，尽管在日常的班级工作中也偶有犯错，但她始终给予了我足够的包容和理解。

感谢露露一直以来的陪伴和支持，感谢我的师姐们在学习上的帮助，感谢我肉嘟嘟的同门小曹和我可爱的师妹们陈取明、张玉茹、王真真等，很感谢在安工程与你们相遇、相识、熟悉。

山水一程三生有幸，能够在安徽工程大学成为我们生食研 21 的班长，感谢各位同学三年以来对于我工作的支持，问及初心，大概是淋过雨的我总想着帮你们撑把伞，避点我走过的坑。我还记得和咱们生食研 21 同学始于风雨操场，也许多年后我们还能想起那次演出的瓢泼大雨。

最后感谢普通的自己，一路平凡且一路前行。

梦回 2020 年的 4 月 1 日，如果再选一次，我还是会选择考研选择安工程。

感谢陪伴走过这一程的所有人，感谢所有遇见，论文的结束在致谢，但我们一直都在，让我们将回忆停留在北京中路 8 号，未来的故事才刚开始。

再见了，我人生学习生涯最后一次的学生时代！