

牡丹籽粕多肽的酶解制备工艺及其抗氧化性

刘淑芸¹, 申传龙¹, 孙汉巨^{1*}, 何述栋¹, 孙后田², 杨友煌², 金日生¹

¹合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥

²铜陵亚通牡丹产业发展有限公司, 安徽 铜陵

收稿日期: 2022年8月15日; 录用日期: 2022年11月1日; 发布日期: 2022年11月8日

摘要

为探究牡丹籽粕多肽作为抗氧化功能性食品成分的可能性, 本研究以牡丹籽粕蛋白为原料, 对牡丹籽粕抗氧化肽的制备工艺进行优化。首先, 以水解度(DH)和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率为指标, 通过单因素试验, 确定了酶解温度、时间、酶浓度、pH、底物浓度对牡丹籽粕蛋白酶解程度和抗氧化性的影响。在此基础上, 采用四因素三水平L₉(3⁴)正交试验, 优化抗氧化肽的最佳制备工艺, 其结果为: 酶解时间2 h, pH为9.5, 酶解温度60℃, 底物浓度10%, 酶浓度1.30%。随后, 将牡丹籽粕多肽进行体外模拟消化, 探究消化对其抗氧化性的影响。研究发现除2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵(ABTS⁺)清除能力没有明显差别外, 超氧阴离子(O₂⁻)自由基清除率和还原力分别提高了13.40%和14.79%, 表明牡丹籽粕的抗氧化性功能肽不会被胃肠消化破坏。本研究为牡丹籽粕多肽应用于食品体系提供理论支持。

关键词

牡丹籽粕, 多肽, 抗氧化性, 酶解

Study on Preparation Process and Antioxidant Activity of Polypeptide Prepared by Enzymes from Peony Seed Meal

Shuyun Liu¹, Chuanlong Shen¹, Hanju Sun^{1*}, Shudong He¹, Houtian Sun², Youhuang Yang², Risheng Jin¹

¹School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei Anhui

²Tongling Yatong Peony Industry Development Co. Ltd., Tongling Anhui

*通讯作者。

文章引用: 刘淑芸, 申传龙, 孙汉巨, 何述栋, 孙后田, 杨友煌, 金日生. 牡丹籽粕多肽的酶解制备工艺及其抗氧化性[J]. 食品与营养科学, 2022, 11(4): 255-268. DOI: 10.12677/hjfn.2022.114030

Abstract

In order to explore the possibility of peony seed meal peptides as antioxidant functional food components, this study optimized the preparation process of peony seed meal antioxidant peptides with peony seed meal protein as raw materials. Firstly, the hydrolysis degree (DH) and the free radical scavenging rate of 1,1-diphenyl-2-nitrophenylhydrazine (DPPH) were used as indexes, and the effects of hydrolysis temperature, time, enzyme concentration, pH and substrate concentration on the degree of proteolysis and antioxidant activity of peony seed meal were determined by single factor test. On this basis, L₉(3⁴) orthogonal test with four factors and three levels was used to optimize the optimal preparation process of antioxidant peptides. The results were as follows: enzymatic hydrolysis time 2 h, pH 9.5, enzymatic hydrolysis temperature 60°C, substrate concentration 10%, enzyme concentration 1.3%. Then, the peony seed meal polypeptide was simulated for digestion in vitro to explore the effect of digestion on its antioxidant activity. It was found that the scavenging capacity of 2,2'-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium (ABTS⁺) was not significantly different, the scavenging rate of superoxide anion (O₂⁻) radical and reducing power were increased by 13.40 and 14.79%, respectively, indicating that the antioxidant functional peptide of peony seed meal could not be damaged by gastrointestinal digestion. This study provides theoretical support for the application of peony seed meal peptides in food system.

Keywords

Peony Seed Meal, Polypeptide, Oxidation Resistance, Enzymatic Hydrolysis

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在人体生长过程中, 自由基的过量积累会引发癌症、糖尿病、心脑血管等一系列慢性疾病[1] [2]。因此, 清除自由基对维持人体健康至关重要。随着经济的发展和科技的进步, 人们开始对人工合成的抗氧化剂提出质疑[3]。同时, 天然抗氧化剂的研究引起了人们的极大兴趣[4]。生物活性肽能够以多种方式发挥其抗炎, 抗氧化等特性, 包括清除自由基、抑制活性氧的产生以及抑制促炎细胞因子的释放等[5] [6] [7]。自然界中存在的胶原蛋白及其衍生肽具有强氧化性、强生物相容性和对人体无刺激等特点[8] [9] [10]。已报道多种来源的多肽具有抗氧化功能, 如罗非鱼皮多肽[11]、海洋鱼低聚肽[12]、大豆多肽[13]等。

牡丹属毛茛科、芍药属, 是多年生落叶灌木, 原产于我国西北地区, 目前已被广泛种植。牡丹分为观赏型牡丹和油用型牡丹, 近年来, 由于国家卫生部批准牡丹籽油成为新资源食品, 因此, 油用型牡丹种的种植面积不断扩大, 在提取油脂的过程中, 牡丹籽粕的产量约为 25%~30%, 研究表明, 我国每年约产生 5×10^4 吨牡丹籽壳和饼粕, 其中只有少部分被用于饲料, 大部分被直接丢弃[14]。牡丹籽粕蛋白含量丰富, 约占种子重量的 28%, 具有良好的起泡性、持水性、乳化性和乳化稳定性, 具有广阔的开发利用前景。牡丹籽多肽是酶解牡丹籽粕的产物, 具有抗氧化、抗菌、降血压及免疫调节等生物活性[15] [16]。

目前,对于这样一种成分安全,营养价值高,功能性较好的物质相关研究却并不充分,牡丹籽粕水解后产生多肽抗氧化性相关研究较少,因此,本文通过测定 DPPH 清除率和 DH 对牡丹籽粕酶解工艺进行探究。随后将牡丹籽粕多肽进行体外模拟消化,测定不同浓度多肽液的抗氧化性,以评估模拟消化对样品抗氧化能力的影响。本研究开发了利用牡丹籽粕资源的新方法,减少了营养资源的浪费。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

牡丹籽粕购自山东省菏泽市尧舜牡丹生物技术有限公司;碱性蛋白酶(50 U/mg,食品级,诺维信生物技术有限公司);中性蛋白酶(50 U/mg,食品级,诺维信生物技术有限公司);木瓜蛋白酶(100 U/mg,食品级,诺维信生物技术有限公司);风味蛋白酶(200 U/mg,食品级,诺维信生物技术有限公司);胃蛋白酶、胰液(食品级,美国 Sigma 公司);氢氧化钠、盐酸、1,1-二苯基-2-苦基肼、过硫酸钾、无水乙醇、氨基丁三醇、邻苯三酚、磷酸、铁氰化钾、碳酸氢钠、三氯乙酸及三氯化铁(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2.2. 主要仪器设备

电热恒温水浴锅(HH-2,金坛区华城润华实验仪器厂);台式酸度计(PHS-25,浙江赛德仪器设备有限公司);电子天平(BSA3202S-CW,梅特勒托利多常州公司);紫外分光光度计(UV-1700,日本岛津公司);超低温冰箱(907,美国赛默飞世尔公司);真空冷冻干燥机(Lab-1A-50E,北京博医康司);高速小型离心机(TG16G,湖南凯达科学仪器有限公司);台式冷冻离心机(KH20R,湖南凯达科学仪器有限公司)。

2.3. 试验方法

2.3.1. 牡丹籽粕蛋白提取

提取牡丹籽粕蛋白,参照阎震等人[17]方法并进行简单修改。具体方法为:按照料液比 1:10 (m/v)将 100 g 牡丹籽粕与超纯水混合,搅拌混匀,使用 0.05 M NaOH 调节溶液 pH 至 9.5,使用 100 W 超声振荡 3.5 h,超声振荡结束后冷却至室温,随后 8000 r/min 离心 10 min,收集上清液,使用 0.05 M HCl 调节上清液 pH 至 3.6,8000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,将沉淀冷冻干燥,-20℃冰箱储存待用。

2.3.2. 酶解蛋白酶的筛选

如表 1 所示,使用风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶在各自最适酶解条件下对牡丹籽粕进行酶解试验,其中底物质量分数为 0.5%,加酶量 1%,以 DH 和 DPPH 自由基清除率为指标,找出适合酶解牡丹籽粕蛋白的蛋白酶。

Table 1. Optimum enzymatic hydrolysis conditions for different proteases
表 1. 不同蛋白酶的最适酶解条件

蛋白酶种类	温度(℃)	pH
风味蛋白酶	55	8.0
木瓜蛋白酶	55	7.0
中性蛋白酶	45	7.0
碱性蛋白酶	50	8.0

2.3.3. 单因素试验

1) 酶解时间对牡丹籽粕蛋白水解度和抗氧化性的影响

固定料液比 1:10 (m/v), 调节 pH 至 8.0, 加入 0.5% 的碱性蛋白酶, 在 45℃ 分别酶解 1、1.5、2、2.5、3 和 3.5 h。以 DH 和 DPPH 自由基清除率为指标, 确定最佳酶解时间。

2) 酶解 pH 对牡丹籽粕蛋白水解度和抗氧化性的试验

固定料液比 1:10 (m/v), 分别调节 pH 至 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0, 加入 0.5% 的碱性蛋白酶, 在 45℃ 酶解 2.5 h。以 DH 和 DPPH 自由基清除率为指标, 确定最佳酶解 pH。

3) 酶解温度对牡丹籽粕蛋白水解度和抗氧化性的试验

固定料液比 1:10 (m/v), 调节 pH 至 8.0, 加入 0.5% 的碱性蛋白酶, 分别在 45℃、50℃、55℃、60℃、65℃ 和 70℃ 酶解 2.5 h。以 DH 和 DPPH 自由基清除率为指标, 确定最佳酶解温度。

4) 酶解底物浓度对牡丹籽粕蛋白水解度和抗氧化性的试验

分别在料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 和 1:35 (m/v) 下, 调节 pH 至 8.0, 加入 0.5% 的碱性蛋白酶, 在 45℃ 酶解 2.5 h。以 DH 和 DPPH 自由基清除率为指标, 确定最佳酶解底物浓度。

5) 酶浓度对牡丹籽粕蛋白水解度和抗氧化性的试验

固定料液比 1:10 (m/v), 调节 pH 至 8.0, 分别加入 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 及 3.0% 的碱性蛋白酶, 分别在 45℃ 酶解 2.5 h。以 DH 和 DPPH 自由基清除率为指标, 确定最佳酶浓度。

2.3.4. 水解度测定

因为牡丹籽粕蛋白在酶解过程中会伴随着 H^+ 的吸收与释放, 所以采用 pH-State 法测定牡丹籽粕多肽的水解度[18], 如公式(1)所示进行计算。

$$DH(\%) = \frac{BN_b}{\alpha hMp} \times 100 \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pKa}}{1+10^{pH-pKa}}$$

$$pKa = 7.8 + \frac{298 - T}{298 \times T}$$

式中: N_b ——NaOH 溶液的浓度(M);

B ——NAOH 溶液消耗的体积(mL);

Mp ——底物中总蛋白质含量(g);

h ——每 g 底物中肽键的毫摩尔数(7.84 mMol/g)。

2.3.5. DPPH 自由基清除率指标的测定

配制浓度为 0.2% 的牡丹籽粕多肽溶液, 再称取 0.04 g 的 DPPH, 加入无水乙醇, 用 100 mL 的容量瓶定容, 获得 0.1 mMol/L 的 DPPH 溶液, 取 2 mL 上述样品溶液与等体积的 0.1 mMol/L DPPH 溶液充分混匀, 室温反应 30 min, 待反应结束后向比色管中加入反应液, 在 517 nm 处测定溶液的吸光值并记为 A_i ; 将 2 mL 样品液与等体积的去离子水混合均匀作为空白组, 其吸光值记为 A_j ; 将 2 mL DPPH 溶液与等体积的去离子水混合均匀作为对照组, 以 4 mL 无水乙醇调零, 测定吸光值为 A_0 。如公式(2)所示进行计算。

$$DPPH \text{ 自由基清除率 } (\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right) \times 100\% \quad (2)$$

2.3.6 正交试验

选择酶解 pH 值, 酶解温度, 底物浓度和酶浓度作为正交试验的因素, 根据单因素试验获得的最优条件分别安排 3 个水平, 试验指标为 DPPH·自由基清除率, 以确定酶解牡丹籽粕蛋白制备抗氧化活性肽的最优制备条件。表 2 所示为正交试验因素水平表。

Table 2. Levels of experimental factors for preparation of antioxidant active peptides by enzymatic hydrolysis of peony seed meal protein

表 2. 酶解牡丹籽粕蛋白制备抗氧化活性肽试验因素水平表

水平	因素			
	A 温度(°C)	B pH	C 底物浓度(%)	D 酶浓度(%)
1	50	8.5	0.8	1.3
2	55	9.0	1.0	1.5
3	60	9.5	1.2	1.7

2.3.7. 体外模拟胃肠道消化

对于体外胃蛋白酶-胰蛋白酶模拟胃肠消化, 溶解牡丹籽粕多肽(3% W/V)并使用 1 M HCL 将 pH 值保持在 2.0。加入胃蛋白酶(4% m/v), 37°C 孵育 2 小时。将 0.9 mM NaHCO₃ 溶液的 pH 值调节至 5.3, 并将 1.0 M NaOH 溶液的 pH 值调节至 7.5。加入胰蛋白酶(4% m/v), 混合, 37°C 反应 2 h, 终止反应。煮沸 10 min 后, 将混合物以 9000 r/min 离心 15 分钟。将上清液冻干并在 -20°C 冷藏, 即得消化后的牡丹籽粕多肽。

2.3.8. 体外抗氧化活性测定

按照正交试验获得的最优条件制备的多肽进行以下体外抗氧化试验[19]。

1) 超氧阴离子(O²⁻)自由基清除率测定试验

称取一定量的牡丹籽粕酶解多肽, 以 0.5% 为最低的底物浓度, 每组底物浓度依次以 0.5% 浓度梯度递增, 配制成 8 组等浓度梯度的酶解多肽溶液; 分别准确量取 4 mL 等浓度梯度的酶解多肽溶液, 加入 5 mL 浓度为 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液, 25°C 恒温水浴 20 min, 随后分别加入 1 mL 已在 25°C 的恒温水浴锅中预热 20 min 的浓度为 3 mmol/L 的邻苯三酚溶液, 混合均匀后在 25°C 下精确反应 5 min, 反应结束后立即加入 1 mL 浓度为 10 mol/L 的 HCl 溶液终止反应, 于 320 nm 处测定吸光度, 空白组以同体积的蒸馏水代替样品, 每个试样重复测定三次。的具体计算公式如下:

$$O_2^- \text{ 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

A_1 ——样品组在 5 min 时的吸光值与样品在 0 min 时的吸光值之差;

A_0 ——空白组在 5 min 时的吸光值与空白组在 0 min 时的吸光值之差。

2) ABTS⁺自由基清除率的测定试验

参考 Xican Li 等人[20]的研究方法, 取 7.4 mmol/L 0.2 mL 的 ABTS⁺溶液与 2.6 mmol/L 0.2 mL 的 K₂S₂O₈ 溶液混合, 在室温且四周无光黑暗的条件下反应 12 h, 之后用 pH 9.4 的磷酸盐缓冲液或无水乙醇稀释, 使其在 734 nm 处的吸光值为 0.7 ± 0.02, 该溶液就是 ABTS⁺工作液, 4°C 储存备用。

称取足量的牡丹籽粕酶解多肽, 配制成为以 0.025% 为最低浓度, 浓度梯度为 0.025% 递增的 8 组等浓度梯度的溶液, 分别准确吸取 0.8 mL 样品溶液置于管中, 加入 3.2 mL ABTS⁺ 工作液, 震荡混匀后在室温下避光反应 6 min, 反应结束后在 734 nm 处测定反应液的吸光值记为 A_s 。以无水乙醇代替样品作为空白组测其吸光值记为 A_a , 以无水乙醇为参比调零。ABTS⁺ 自由基清除率的具体计算公式如下:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_a} \right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

A_a ——无水乙醇 + ABTS⁺ 的吸光值;

A_s ——样品液 + ABTS⁺ 的吸光值。

3) 还原力的测定

参考高蕾蕾[21]的研究方法称取足量的牡丹籽粕酶解多肽, 配制成为以 0.05% 为最低浓度, 浓度梯度以 0.5% 递增的 8 组等浓度梯度的溶液。分别准确吸取 1 mL 上述样品溶液加入 2.5 mL, pH 值 6.6, 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液和 2.5 mL, 1% 浓度的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液, 混匀后在 50℃ 下反应 20 min, 冷却至室温后, 加入 2.5 mL, 10% 浓度的 TCA 溶液以终止反应。将上述所得溶液 3000 r/min 离心 10 min, 取 2.5 mL 上清液, 加入 2.5 mL 超纯水和 0.5 mL, 1 mg/mL $FeCl_3$, 混匀后, 室温反应 10 min, 在 700 nm 处测定其吸光值。溶液的吸光值越大表明牡丹籽粕酶解多肽的还原力越强。

2.3.9. 数据分析

所有试验重复三次。采用 ORIGIN 2021 软件处理数据, 结果以平均值 \pm 标准差表示。

3. 试验结果与分析

3.1. 牡丹籽粕蛋白酶解蛋白酶筛选

不同蛋白酶在各自的最佳反应条件下, 对牡丹籽粕蛋白的水解度值和 DPPH 自由基清除率值如图 1 所示。根据下图的试验结果可知经过碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和复合蛋白酶这四种酶酶解后得到的牡丹籽粕多肽对 DPPH 自由基清除率的值分别为 40%、41%、32% 和 26.2%; 而碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和复合蛋白酶对牡丹籽粕蛋白水解度(DH)的值分别为 24.3%、8.45%、6.5% 和 8.78%。这一系列数据表明, 用碱性蛋白酶和中性蛋白酶酶解后的多肽对 DPPH 自由基的清除能相差不大, 此外碱性蛋白酶对牡丹籽粕蛋白水解度(DH)的影响最大, 且远大于其它三种蛋白酶。可能是由于不同蛋白酶的作用位点不同, 所以不同蛋白酶酶解后的产物多肽分子量和空间结构也不同, 碱性蛋白酶酶解后所得的牡丹籽粕多肽 DPPH 自由基清除能力和水解度(DH)明显较高[22]。因此, 本次试验选用碱性蛋白酶作为牡丹籽粕多肽的水解酶, 并通过单因素与正交试验优化牡丹籽粕抗氧化活性肽酶解工艺。

3.2. 单因素试验结果

3.2.1. 酶解时间对牡丹籽粕多肽 DH 及 DPPH 的影响

酶解时间对牡丹籽粕多肽的 DPPH 自由基清除率和 DH 的影响如图 2 所示。随着酶解时间从 1 h 增长到 2 h, DPPH 自由基清除率也随着从 32.89% 增长到 50.78%, 2 h 以后随着时间的推移, DPPH 自由基清除率缓慢下降, 这可能是因为部分具有 DPPH 自由基清除活性的肽段被酶解[22]。同样的, 随着酶解时间从 1 h 增长到 2.5 h, 牡丹籽粕多肽的 DH 从 4.4% 增长到 6.4%, 2.5 h 以后牡丹籽粕多肽的 DH 趋于平稳。这可能是由于酶解时间达到 2.5 h, 酶和底物已经充分的反应, 完全水解[23]。综上所述, 在保证酶解产物具备较高的抗氧化活性的同时节省成本, 选择酶解时间 2 h 作为酶解牡丹籽粕多肽的最适时间。

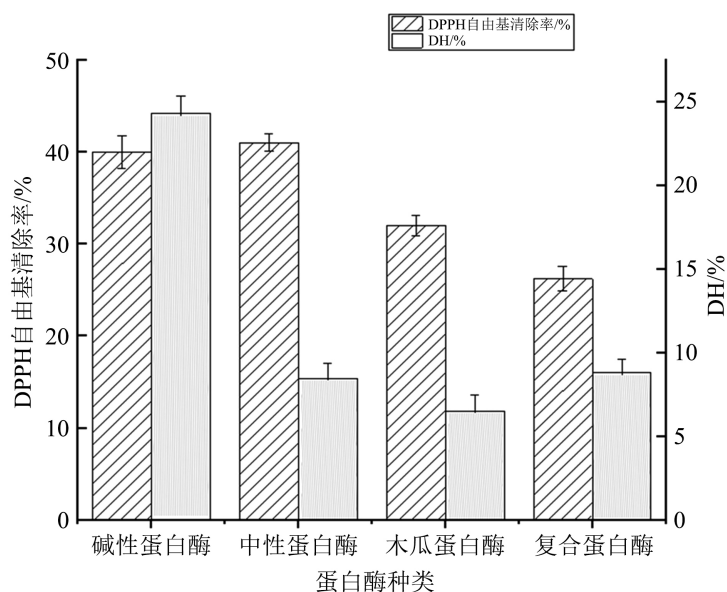


Figure 1. Effects of protease types on DH and DPPH of polypeptide solution of peony seed meal

图 1. 蛋白酶种类对多肽的 DH 及 DPPH 的影响

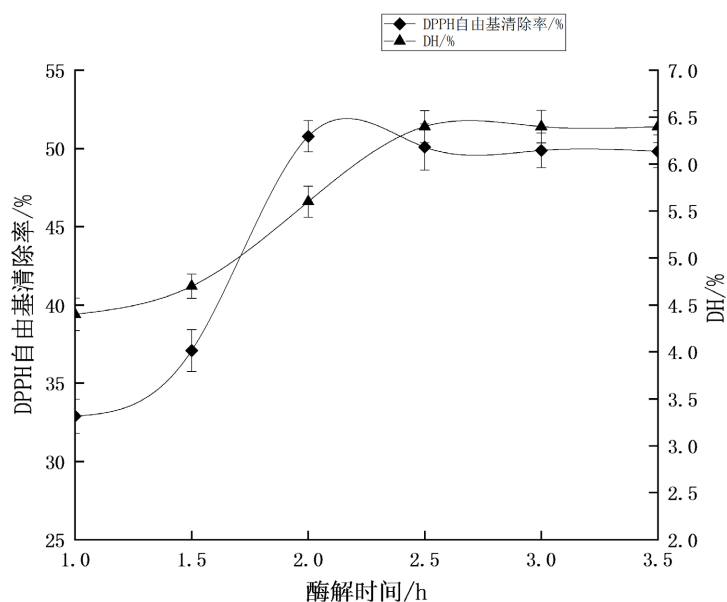


Figure 2. Effects of enzymatic hydrolysis time on DH and DPPH of polypeptide solution of peony seed meal

图 2. 酶解时间对多肽的 DH 及 DPPH 的影响

3.2.2. pH 对牡丹籽粕多肽 DH 及 DPPH 的影响

pH 对牡丹籽粕多肽的 DPPH 自由基清除率和 DH 的影响如图 3 所示。显然,随着 pH 从 7 增长到 9, DPPH 自由基清除率从 32.57% 增长到 56.57%, 当 pH 值继续增长达到 12, DPPH 自由基清除率从 56.57% 降低到 30.17%。同样的,随着 pH 值从 7 增长到 11, 牡丹籽粕多肽的水解度从 4.1% 增长到 8.78%, pH 值大于 11 后牡丹籽粕多肽的水解度趋于稳定。DPPH 自由基清除率和 DH 的变化趋势都表明, pH 值过高或过低都会对牡丹籽粕多肽的酶解过程造成影响。一方面这可能是因为过高或过低的 pH 值破坏了碱

性蛋白酶的正常空间结构,也有可能影响碱性蛋白酶的活性位点[24]。另一方面过高的 pH 值会使牡丹籽粕多肽变性[25]。所以,为了保证酶解产物具备较高的抗氧化活性,选择 pH = 9 作为酶解牡丹籽粕多肽的最适 pH 值。

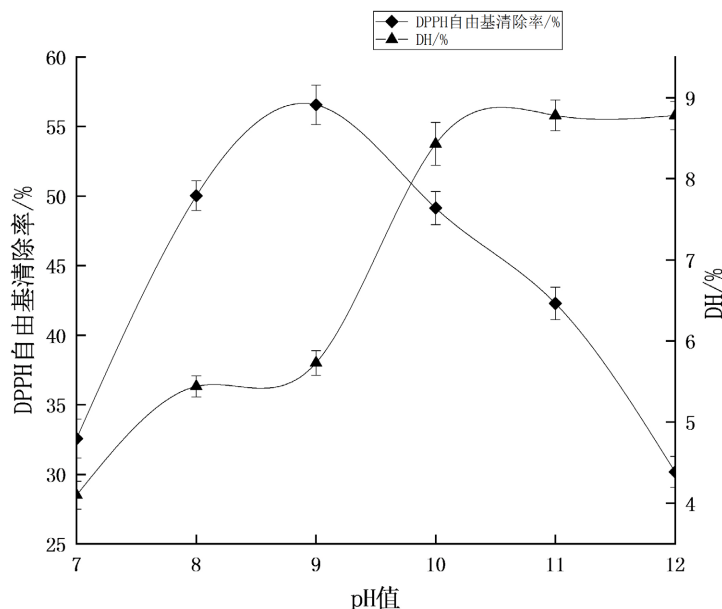


Figure 3. Effects of enzymatic pH on DH and DPPH of polypeptide solution of peony seed meal

图 3. pH 值对多肽的 DH 及 DPPH 的影响

3.2.3. 酶解温度对牡丹籽粕多肽 DH 及 DPPH 的影响

酶解温度对牡丹籽粕多肽的 DPPH 自由基清除率和 DH 的影响如图 4 所示。由图可得,随着酶解温度从 45℃ 增长到 55℃,DPPH 自由基清除率先从 49.24% 增长到 62.72%,当酶解温度继续增长达到 70℃,DPPH 自由基清除率从 62.72% 降低到 49.97%,这可能是因为温度过高使碱性蛋白酶变性失活了。同样的,酶解温度在 45℃~55℃,牡丹籽粕多肽的水解度先从 5.7% 增长到 6.47%,然后又降低到 5.81%。酶解温度达到 65℃ 时,水解度达到最大,为 9.07,并在 65℃ 后趋于平稳。较高水解度的多肽水解产物其自身的电子供体可能会与自由基反应终止自由基链反应,这可能是导致在 45℃~55℃ 这一区间内,DPPH 自由基清除率与水解度的变化趋势有差异的原因[25]。因此,选择 55℃ 作为酶解牡丹籽粕多肽的最适温度。

3.2.4. 底物浓度对牡丹籽粕多肽 DH 及 DPPH 的影响

底物浓度对牡丹籽粕多肽的 DPPH 自由基清除率和 DH 的影响如图 5 所示。随着底物浓度从 0.5% 增长到 1%,DPPH 自由基清除率也随着从 51.53% 增长到 64.14%,当底物浓度继续增长到 1.5%,DPPH 自由基清除率从 64.14% 缓慢下降到 59.34%。这表明当底物浓度为 1% 时,牡丹籽粕多肽的 DPPH 自由基清除率最大为 64.14%,具有较高的抗氧化活性。与此同时,随着底物浓度从 0.5% 增长到 0.75%,牡丹籽粕多肽的 DH 从 5.79% 增长到 6.89%,当底物浓度继续增长到 1.5%,牡丹籽粕多肽的水解度从 6.89% 降低到 4.8%。这表明,当底物浓度为 0.75% 时,牡丹籽粕多肽的水解度最大为 6.89%。当底物浓度增长到超过 1% 后,DPPH 自由基清除率和水解度均呈下降趋势。这可能是由于底物浓度过高,导致底物不能充分被酶解[26]。综上所述,为了保证酶解产物抗氧化活性高的同时水解度也较高,选择底物浓度 1% 作为酶解牡丹籽粕多肽的最适底物浓度。

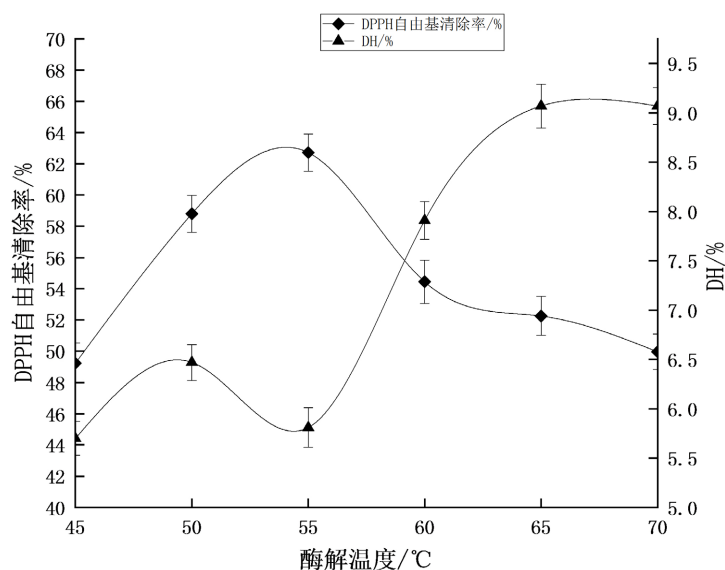


Figure 4. Effects of enzymatic hydrolysis temperature on DH and DPPH of polypeptide solution of peony seed meal

图 4. 酶解温度对多肽的 DH 及 DPPH 的影响

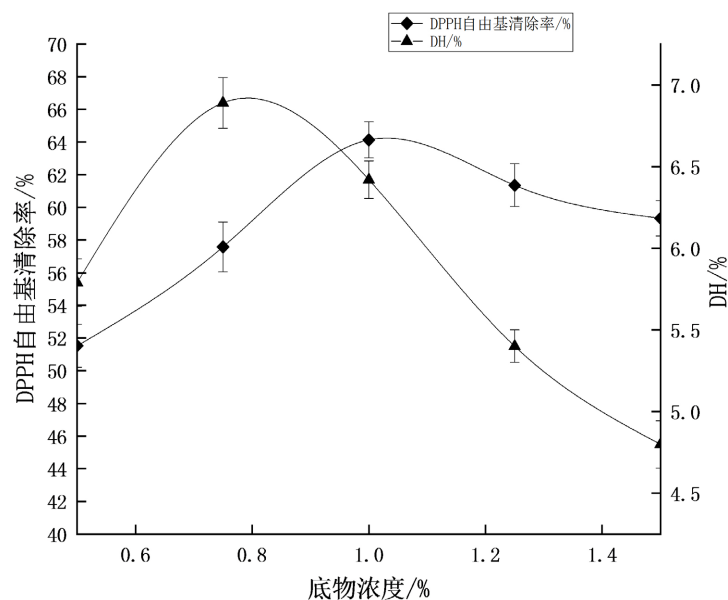


Figure 5. Effects of enzymatic hydrolysis concentration of substrate on DH and DPPH of polypeptide solution of peony seed meal

图 5. 底物浓度对多肽的 DH 及 DPPH 的影响

3.2.5. 酶浓度对牡丹籽粕多肽 DH 及 DPPH 的影响

酶浓度对牡丹籽粕多肽的 DPPH 自由基清除率和 DH 的影响如图 6 所示。随着酶浓度从 0.5% 增长到 1.5%，DPPH 自由基清除率也随着从 49.74% 增长到 86.53%。当底物浓度继续增长到 3%，DPPH 自由基清除率从 86.53% 降低到 34.02%。这表明，当酶浓度为 1.5% 时，牡丹籽粕多肽的抗氧化活性最高。这可能是由于部分具有 DPPH 自由基清除活性的肽段被过量的碱性蛋白酶水解了，失去了活性。与此同时，随着酶浓度从 0.5% 增长到 2.0%，牡丹籽粕多肽的水解度从 5.68% 增长到 6.71%，之后水解度趋于平缓。

这可能是因为酶的量过多，已经将底物水解完全，所以牡丹籽粕多肽的水解度没有明显变化。因此，选择 1.5% 作为酶解牡丹籽粕多肽的最适酶浓度。

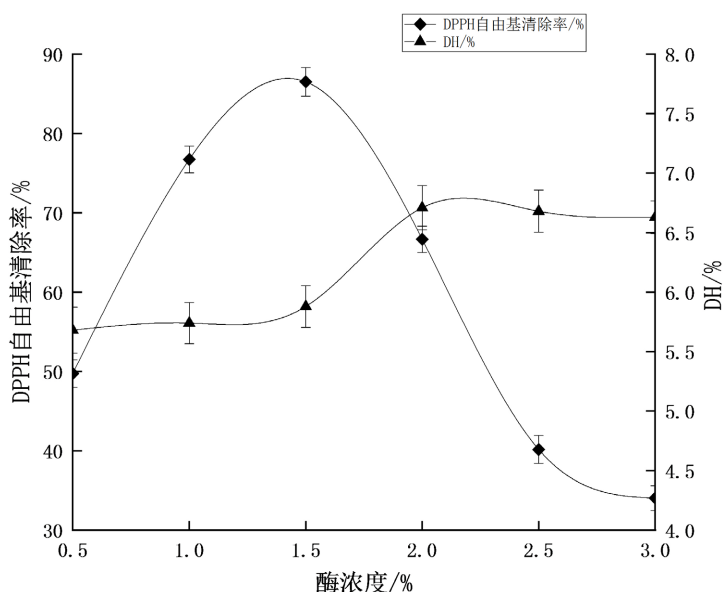


Figure 6. Effects of enzymatic hydrolysis concentration of enzyme on DH and DPPH of polypeptide solution of peony seed meal
图 6. 酶浓度对多肽的 DH 及 DPPH 的影响

3.3. 牡丹籽粕蛋白酶解工艺正交试验结果

由表 3 可知，各因素对酶解牡丹籽粕蛋白制备抗氧化活性肽试验的影响从大到小的顺序为酶浓度、底物浓度、温度和 pH。通过极差分析，确定了四因素的最优组合为 $D_1C_2A_3B_3$ 。所以最优的试验条件为：酶解温度 60°C ，溶液 pH 值 9.5，底物浓度 1.0%，酶浓度 1.3% 时，酶解牡丹籽粕蛋白制备的抗氧化活性肽对 DPPH 自由基清除率高，抗氧化活性强。并在此条件下，进行 3 次平行验证试验，验证值与预测值的误差在允许误差 5% 内，说明该模型合理可靠。

Table 3. Orthogonal test results of preparation of antioxidant peptides from peony seed meal
表 3. 牡丹籽粕制备抗氧化多肽正交试验结果

序号	A 温度($^\circ\text{C}$)	B pH	C 底物浓度(%)	D 酶浓度(%)	DPPH 自由基清除率(%)
1	1 (50°C)	1 (8.5)	1 (0.8%)	1 (1.3%)	82.21
2	1	2 (9.0)	2 (1.0%)	2 (1.5%)	86.60
3	1	3 (9.5)	3 (1.2%)	3 (1.7%)	32.04
4	2 (55°C)	1	2	3	60.97
5	2	2	3	1	34.15
6	2	3	1	2	82.67
7	3 (60°C)	1	3	2	76.21

Continued

8	3	2	1	3	58.66
9	3	3	2	1	88.45
K1	200.85	219.39	223.54	204.81	
K2	177.79	179.41	236.02	245.48	
K3	223.32	203.16	142.40	151.67	
k1	66.95	73.13	74.51	68.27	T = 643.78
k2	59.26	59.80	78.67	81.83	
k3	74.44	67.72	47.47	50.56	
R	15.18	13.33	31.20	31.27	
因素主→次	DCAB				
最优组合条件	D ₁ C ₂ A ₃ B ₃				

3.4. 模拟消化前后牡丹籽粕多肽的抗氧化性

牡丹籽粕多肽对 O_2^- 自由基的清除效果如图 7 所示。显而易见，随着牡丹籽粕抗氧化活性肽的浓度从 0.5% 增长到 3.5%，牡丹籽粕多肽对 O_2^- 自由基的清除率从 46.94% 增长到 87.76%，当牡丹籽粕抗氧化活性肽的浓度继续增长到 4.0%，牡丹籽粕多肽对 O_2^- 自由基的清除率基本不变。经过体外模拟胃肠道消化后，牡丹籽粕多肽的 O_2^- 自由基的清除率显著提升，虽然趋势与消化前类似，但在浓度为 3.5% 时为 96.52%，比消化前增加了 13.40%。

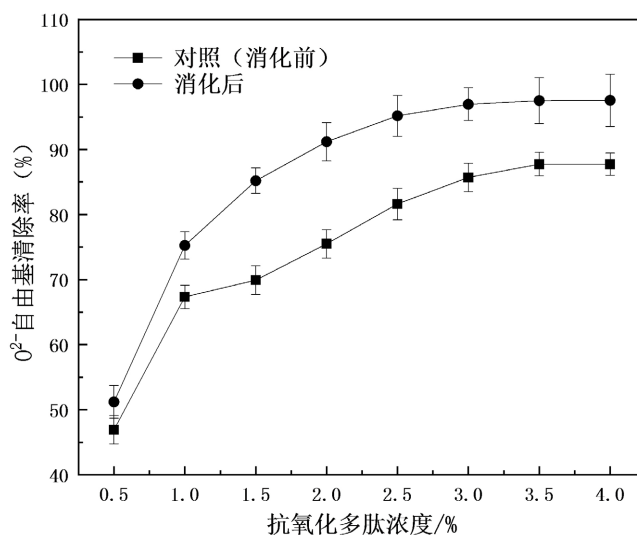


Figure 7. Effect of antioxidant polypeptide on O_2^- clearance

图 7. 抗氧化多肽浓度对 O_2^- 的清除率的影响

牡丹籽粕多肽对 $ABTS^+$ 自由基的清除效果由图 8 所示。随着牡丹籽粕抗氧化活性肽的浓度从 0.025% 增长到 0.1%，牡丹籽粕多肽对 $ABTS^+$ 自由基的清除率从 46.94% 增长到 97.23%，当牡丹籽粕抗氧化活性

肽的浓度继续增长到 0.2%，牡丹籽粕多肽对 ABTS⁺自由基的清除率基本不变。经过体外模拟胃肠道消化后，牡丹籽粕多肽的 ABTS⁺自由基的清除率没有明显变化。

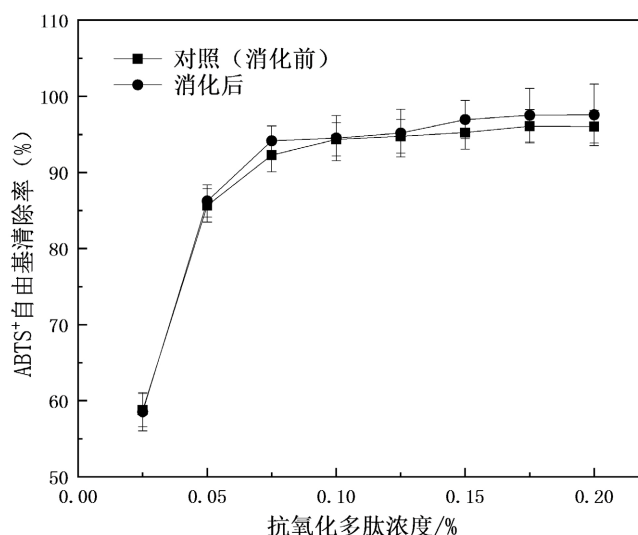


Figure 8. Effect of antioxidant polypeptide on ABTS⁺ clearance
图 8. 抗氧化多肽浓度对 ABTS⁺的清除率的影响

牡丹籽粕多肽还原力的测定结果如图9所示，随着牡丹籽粕抗氧化活性肽的浓度从0.5%增长到4.0%，牡丹籽粕多肽与铁氰化钾反应后的溶液的吸光值从0.25增长到0.78。当牡丹籽粕多肽浓度为3.5%时，其还原力为0.76，浓度再增加到4.0%时，还原力虽有上升但并不明显。经过体外模拟胃肠道消化后，牡丹籽粕多肽的还原力显著提升，虽然趋势与消化前类似，但在浓度为3.5%时为0.88，比消化前增加了14.79%。

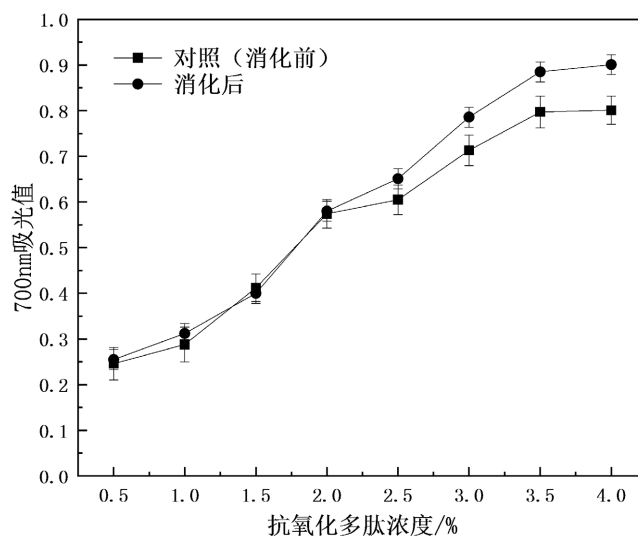


Figure 9. Effect of antioxidant polypeptide on reducing power
图 9. 抗氧化多肽浓度对还原力的影响

试验结果显示，牡丹籽粕多肽具有较强的抗氧化性，在浓度为 3.5% 的时候，O₂⁻ 自由基的清除率和还原力分别为 87.76% 和 0.76。当浓度为 0.1% 时，ABTS⁺ 自由基的清除率为 97.23%。与陈荣用碱性蛋白

酶酶解获得的牡丹籽粕多肽相比, ABTS⁺自由基的清除率提升了 42.77%。同时, 以上测定结果表明, 牡丹籽粕的抗氧化性可以通过胃肠消化显著提升, 除 ABTS⁺清除能力没有明显差别外, O₂⁻ 自由基清除率和还原力均有提高。这可能是由于经过体外胃肠道消化后牡丹籽粕多肽分子量降低, 小分子量的多肽分子更易在 N 末端暴露更多具备抗氧化活性的疏水性氨基酸和支链氨基酸[27]。其次, 也可能是因为经过胃蛋白酶和胰蛋白酶消化后, 多肽链上的部分氨基酸变为游离氨基酸, 从而提高了抗氧化能力[28]。这与发酵扁豆和发酵大豆胃肠道消化后的结果类似[16] [29]。

4. 结论

本文以牡丹籽粕为原料, 使用碱性蛋白酶作为水解蛋白酶, 对牡丹籽粕蛋白进行酶解制备抗氧化多肽。以 DH 和 DPPH 清除率为指标, 在单因素试验和四因素三水平 L₉(3⁴) 正交试验的基础上, 得到制备牡丹籽粕抗氧化肽的最佳反应条件为: 酶浓度 1.30%, 溶液 pH 值 9.5, 酶解时间 2 h, 底物浓度 1% 以及温度 60℃。该牡丹籽粕抗氧化肽经体外模拟胃肠消化后, 发现除 ABTS⁺清除能力没有明显差别外, O₂⁻ 自由基清除率和还原力分别提高了 13.40% 和 14.79%。牡丹籽粕的抗氧化性的提升可能是由于分子量降低及游离氨基酸含量升高。本研究为牡丹籽粕的开发利用提供了理论基础。

基金项目

铜陵市重点研究与开发计划项目(20190202023)。

参考文献

- [1] Cao, S.Y., Li, B.Y., Gan, R.Y., *et al.* (2020) The *in Vivo* Antioxidant and Hepatoprotective Actions of Selected Chinese Teas. *Foods*, **9**, Article No. 262. <https://doi.org/10.3390/foods9030262>
- [2] Zhao, X.Y., Zhang, F., Pan, W., *et al.* (2021) Clinical Potentials of Ginseng Polysaccharide for Treating Gestational Diabetes Mellitus. *World Journal of Clinical Cases*, **9**, 4959-4968. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i19.4959>
- [3] Mahnashi, M.H., Alyami, B.A., Alqahtani, Y.S., *et al.* (2021) Neuroprotective Potentials of Selected Natural Edible Oils Using Enzyme Inhibitory, Kinetic and Simulation Approaches. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **21**, Article No. 248. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03420-0>
- [4] Zhu, M., Pan, J., Hu, X., *et al.* (2021) Epicatechin Gallate as Xanthine Oxidase Inhibitor: Inhibitory Kinetics, Binding Characteristics, Synergistic Inhibition, and Action Mechanism. *Foods*, **10**, Article No. 2191. <https://doi.org/10.3390/foods10092191>
- [5] Demir, T. and Ağaoğlu, S. (2021) Antioxidant, Antimicrobial and Metmyoglobin Reducing Activity of Artichoke (*Cynara scolymus*) Powder Extract-Added Minced Meat during Frozen Storage. *Molecules*, **26**, 154-162. <https://doi.org/10.3390/molecules26185494>
- [6] Fratianni, F., d'Acerno, A., Cozzolino, A., *et al.* (2020) Biochemical Characterization of Traditional Varieties of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) of the Campania Region, Southern Italy. *Antioxidants*, **9**, Article No. 556. <https://doi.org/10.3390/antiox9060556>
- [7] Li, X., Guo, M., Chi, J., *et al.* (2020) Bioactive Peptides from Walnut Residue Protein. *Molecules*, **25**, Article No. 1285. <https://doi.org/10.3390/molecules25061285>
- [8] Altomare, A.A., Baron, G., Aldini, G., *et al.* (2020) Silkworm Pupae as Source of High-Value Edible Proteins and of Bioactive Peptides. *Food Science & Nutrition*, **8**, 2652-2661. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1546>
- [9] Khan, I.T., Nadeem, M., Imran, M., *et al.* (2020) Impact of Post Fermentation Cooling Patterns on Fatty Acid Profile, Lipid Oxidation and Antioxidant Features of Cow and Buffalo Milk Set Yoghurt. *Lipids in Health and Disease*, **19**, Article No. 74. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01263-1>
- [10] Tian, X., Zheng, J., Xu, B., *et al.* (2020) Optimization of Extraction of Bioactive Peptides from Monkfish (*Lophius litulon*) and Characterization of Their Role in H₂O₂-Induced Lesion. *Marine Drugs*, **18**, Article No. 468. <https://doi.org/10.3390/md18090468>
- [11] Pan, M., Liu, K., Yang, J., *et al.* (2020) Advances on Food-Derived Peptidic Antioxidants—A Review. *Antioxidants*, **9**, Article No. 799. <https://doi.org/10.3390/antiox9090799>
- [12] Dong, Y., Sun, L., Ma, C., *et al.* (2021) Characterization of a Synergistic Antioxidant Synthetic Peptide from Sea Cu-

- cumber and Pine Nut. *Journal of Food Science and Technology*, **59**, 2306-2317. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05245-8>
- [13] Jin, L., Zheng, D., Yang, G., *et al.* (2020) Tilapia Skin Peptides Ameliorate Diabetic Nephropathy in STZ-Induced Diabetic Rats and HG-Induced GMCs by Improving Mitochondrial Dysfunction. *Marine Drugs*, **18**, Article No. 363. <https://doi.org/10.3390/md18070363>
- [14] Pavlicevic, M., Maestri, E. and Marmiroli, M. (2020) Marine Bioactive Peptides—An Overview of Generation, Structure and Application with a Focus on Food Sources. *Marine Drugs*, **18**, Article No. 424. <https://doi.org/10.3390/md18080424>
- [15] Chelliah, R., Wei, S., Daliri, E.B.M., *et al.* (2021) The Role of Bioactive Peptides in Diabetes and Obesity. *Foods*, **10**, 251-254. <https://doi.org/10.3390/foods10092220>
- [16] 陈容, 胡素素, 郑淳坚, 等. 牡丹籽蛋白提取工艺及其多肽应用研究进展[J]. 现代食品, 2021, 29(19): 23-27.
- [17] Qiao, H., Bi, X., Zhang, Y., *et al.* (2020) Enzymic Polypeptide Antioxidant Activity and Inhibitory Activity on α -Glucosidase and α -Amylase from *Paeonia ostii* Cake. *Industrial Crops and Products*, **146**, Article ID: 112158. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112158>
- [18] 王敏, 李聪, 舒羽, 等. 油用牡丹籽粕蛋白及其酶解产物的功能性质研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(5): 67-71.
- [19] 阎震, 郭淑, 张金宝, 等. 酶解牡丹籽粕蛋白制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 168-174.
- [20] 余敏. 酶解豆粕制备美拉德风味增强肽的研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
- [21] 郑颖. 蛋清蛋白抗氧化肽的酶法制备、微胶囊化及生物活性评价[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [22] Li, X., Hu, Q., Jiang, S., *et al.* (2015) Flos *Chrysanthemi Indici* Protects against Hydroxyl-Induced Damages to DNA and MSCs via Antioxidant Mechanism. *Journal of Saudi Chemical Society*, **19**, 454-460. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.06.004>
- [23] 高蕾蕾. 牡丹籽蛋白的理化和功能特性及多肽的抗氧化活性研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 齐鲁工业大学, 2018.
- [24] Liu, D., Chen, M., Zhu, J., *et al.* (2022) A Two-Stage Enzymolysis Method and Its Application in Exerting Antioxidant Activity of Walnut Protein. *Frontiers in Nutrition*, **9**, Article ID: 889434. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.889434>
- [25] Qian, B., Zhao, X., Yang, Y., *et al.* (2020) Antioxidant and Anti-Inflammatory Peptide Fraction from Oyster Soft Tissue by Enzymatic Hydrolysis. *Food Science & Nutrition*, **8**, 3947-3956. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1710>
- [26] Yang, J., Huang, J., Zhu, Z., *et al.* (2020) Investigation of Optimal Conditions for Production of Antioxidant Peptides from Duck Blood Plasma: Response Surface Methodology. *Poultry Science*, **99**, 7159-7168. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.060>
- [27] Gómez, L.J., Gómez, N.A., Zapata, J.E., *et al.* (2020) Optimization of the Red Tilapia (*Oreochromis* spp.) Viscera Hydrolysis for Obtaining Iron-Binding Peptides and Evaluation of *in Vitro* Iron Bioavailability. *Foods*, **9**, Article No. 883. <https://doi.org/10.3390/foods9070883>
- [28] Lan, M., Li, W., Chang, C., *et al.* (2020) Enhancement on Enzymolysis of Pigskin with Ultrasonic Assistance. *Bioengineered*, **11**, 397-407. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1736736>
- [29] Al-Nimry, S., Dayah, A.A., Hasan, I., *et al.* (2021) Cosmetic, Biomedical and Pharmaceutical Applications of Fish Gelatin/Hydrolysates. *Marine Drugs*, **19**, 211-215. <https://doi.org/10.3390/md19030145>