

葛珍珍, 许明月, 赵玉翔, 等. 杜仲籽粕水解肽的制备及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 218-224. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020050

GE Zhenzhen, XU Mingyue, ZHAO Yuxiang, et al. Preparation and Antioxidant Activity Analysis of Hydrolyzed Peptides from *Eucommia ulmoides* Seed Meal[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 218-224. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020050

· 工艺技术 ·

杜仲籽粕水解肽的制备及其抗氧化活性分析

葛珍珍^{1,2,3}, 许明月¹, 赵玉翔¹, 赵光远^{1,2,3}, 纵伟^{1,2,3,*}

(1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南郑州 450001;

2. 河南省冷链食品质量安全控制重点实验室, 河南郑州 450001;

3. 食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南郑州 450001)

摘要: 以碱提酸沉得到的杜仲籽粕蛋白为原料, 以水解度和总抗氧化能力 (T-AOC) 为指标, 在单因素实验的基础上, 以酶添加量、酶解时间和底物浓度为考察因素, 采用 Box-Behnken 法进行三因素三水平响应面试验优化设计得出杜仲籽粕水解肽的制备最佳工艺参数, 并对得到的杜仲籽粕水解肽进行体外抗氧化测定。结果表明, 中性蛋白酶为最优蛋白酶, 最佳酶解条件为酶添加量 10000 U/g, 酶解时间 1.50 h, 底物浓度 20 g/L, 在该条件下的水解度为 47.45%±1.50%, T-AOC 为 30.62±0.59 μmol/g; 最佳工艺下得到的杜仲籽粕水解肽, 对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基清除率的 IC₅₀ 值分别为 0.731、4.258、0.407 mg/mL, 表现出良好的抗氧化性, 为杜仲籽粕高值化利用及抗氧化肽功能产品开发提供理论依据。

关键词: 杜仲籽粕, 水解肽, 制备工艺, 抗氧化

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)21-0218-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020050



本文网刊:

Preparation and Antioxidant Activity Analysis of Hydrolyzed Peptides from *Eucommia ulmoides* Seed Meal

GE Zhenzhen^{1,2,3}, XU Mingyue¹, ZHAO Yuxiang¹, ZHAO Guangyuan^{1,2,3}, ZONG Wei^{1,2,3,*}

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Henan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, Zhengzhou 450001, China;

3. Food Production and Safety Henan Collaborative Innovation Center, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: *Eucommia ulmoides* seed meal protein prepared by alkali extraction and acid precipitation was utilized as raw material. On the basis of single factor experiment, the total evaluation value of the hydrolysis degree and total antioxidant capacity (T-AOC) as response value was used to optimize the addition of enzyme, hydrolysis time and substrate concentration. And the Box-Behnken method was used for three factors and three levels response surface test design to determine the best enzymatic preparation process of hydrolyzed peptides from *Eucommia ulmoides* seed meal. The antioxidant activity of the obtained hydrolyzed peptides was determined *in vitro*. The results showed that neutral protease was the best protease, and the best enzymatic hydrolysis condition were enzyme was 10000 U/g, hydrolysis time 1.50 h and substrate concentration 20 g/L. Under these conditions, the degree of hydrolysis and T-AOC of hydrolyzed peptides were 47.45%±1.50% and 30.62±0.59 μmol/g, separately; the IC₅₀ for DPPH free radical, superoxide anion radical and ABTS free radical scavenging rates were 0.731, 4.258 and 0.407 mg/mL, respectively. The *Eucommia ulmoides* seed meal peptides prepared under these conditions had great antioxidant capacity and provided a theoretical basis for the high-value utilization of *Eucommia ulmoides* seed meal and the development of antioxidant peptide functional products.

Key words: *Eucommia ulmoides* seed meal; hydrolyzed peptides; preparation technology; antioxidant activity

收稿日期: 2022-02-11

基金项目: “十三五”国家重点研发项目 (2017YFD060130205)。

作者简介: 葛珍珍 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物分离提取及其功能活性研究, E-mail: gezzfood@163.com。

* 通信作者: 纵伟 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬深加工, E-mail: weizong1965@163.com。

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv)是我国特有的名贵滋补药材和珍稀树种^[1-3], 主要分布在陕西、甘肃、四川、河南等秦岭以南地区^[4]。杜仲籽油作为新资源食品, 含有多种功能性的营养成分^[5], 但其在生产时, 大量籽粕遭到丢弃, 不仅对环境造成污染, 而且导致大量营养素和功能因子的流失。杜仲籽粕的蛋白含量高达 35.98%, 含有 18 种氨基酸, 人体必需氨基酸含量占总氨基酸的 32.3%, 是一种新型的植物蛋白来源, 但其高回收价值尚未得到重视^[6-8]。

目前, 绿豆多肽^[9]、大豆多肽^[10]、鹰嘴豆多肽^[11]等植物源多肽因其具有较好的抗氧化性而备受关注, 并且已有较多新型的抗氧化肽, 如红花籽抗氧化肽^[12]、菠萝蜜种子蛋白肽^[13]、木薯叶片多肽^[14]等被开发出来。黄群等^[15]通过酶解制备的杜仲籽粕抗氧化肽对超氧阴离子自由基清除率最高可达 56.6%; 葛珍珍等^[16]前期发现, 杜仲籽粕蛋白经消化酶体外消化的产物对 DPPH·、ABTS⁺·和·OH 的清除率分别可达 63.34%、58.16%、71.11%。因此, 通过不同方法制备得到的杜仲籽粕水解肽的抗氧化能力有所不同, 但是否能以不同的评判指标得到抗氧化性更强的水解肽还有待进一步探究。

综上, 本文以杜仲籽粕为原料, 通过响应面法优化酶解制备杜仲籽粕水解肽的工艺条件, 在此工艺基础上选取 DPPH·、超氧阴离子以及 ABTS 三种自由基的清除率对杜仲籽粕水解肽的体外抗氧化性进行研究, 旨在为提高杜仲籽粕附加价值, 杜仲籽粕蛋白的功能性开发及其水解肽在功能性产品中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

杜仲籽粕 中国农业科学院郑州果树研究所; 酸性蛋白酶(50 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒 上海源叶生物科技有限公司; 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS) Sigma 公司; 其余试剂均为分析纯。

PHS-3C 型 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司; HC-3618R 型高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司; SPARK 多模式酶标仪 奥地利 Tecan 有限公司; RE-52AA 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; SHB-3 型循环水多用真空泵 郑州杜普仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 杜仲籽粕蛋白提取 按照葛珍珍等^[16]的方法提取蛋白。称取杜仲籽粕 20 g, 按料液比 1:15(杜仲籽粕质量(g)与水体积(mL)的比例)混合均匀, 用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 10, 在 40 °C 的水浴锅中浸提 1.5 h, 9000 r/min 离心 15 min, 得上清液用 1 mol/L HCl 溶液调 pH 至 4.2, 静置 30 min, 9000 r/min 离

心 15 min 后, 将沉淀用少量的蒸馏水复溶, 调其 pH 至中性, 冷冻干燥得到杜仲籽粕蛋白粉(纯度为 70.03%)。

1.2.2 蛋白酶的筛选 选择酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶分别对杜仲籽粕蛋白进行初步水解^[17-18]。水解条件为酶添加量 6000 U/g、底物质量浓度 30 g/L, 在不同蛋白酶的最适酶解温度和 pH 条件下(表 1), 水解 3 h, 以总抗氧化能力和水解度为评价指标, 综合筛选出具有抗氧化且水解度相对较高的蛋白酶, 进行下一步实验。

表 1 不同蛋白酶酶解试验条件
Table 1 Test conditions for enzymatic hydrolysis of different proteases

蛋白酶	最适温度(°C)	pH	底物质量浓度(g/L)	酶添加量(U/g)	酶解时间(h)
酸性蛋白酶	40	3.5	30	6000	3
中性蛋白酶	45	7.5	30	6000	3
碱性蛋白酶	40	10.5	30	6000	3

1.2.3 酶解单因素实验 选取中性蛋白酶为最适水解酶, 在该酶的最适温度(45 °C)和 pH(7.5)下, 设定其单因素水解的基本条件为: 酶添加量为 6000 U/g, 酶解时间为 2.5 h, 底物浓度为 40 g/L。改变其中一个条件, 固定其他条件并分别考察酶添加量、酶解时间及底物浓度对总抗氧化能力和水解度的影响。各个因素水平梯度分别为: 酶添加量 2000、4000、6000、8000、10000 U/g; 酶解时间 1.5、2、2.5、3、3.5 h; 底物浓度 10、20、30、40、50 g/L。酶解结束后, 沸水浴灭酶 10 min, 然后离心、取上清液, 测定其总抗氧化能力和水解度, 通过比较确定各因素酶解工艺最适的条件。

1.2.4 响应面法试验设计 在单因素实验上, 根据 Box-Behnken 试验设计原理, 以总抗氧化能力和水解度的总评归一值(OD)为响应值, 选取酶添加量、酶解时间、底物浓度作为响应因子, 利用 Design Expert 软件进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计, 试验因素及水平见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验因素水平表
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A 酶添加量(U/g)	6000	8000	10000
B 酶解时间(h)	1.5	2	2.5
C 底物浓度(g/L)	20	30	40

1.2.5 总抗氧化能力(T-AOC)测定 用 T-AOC 检测试剂盒进行测定。将 ABTS 溶液和氧化剂等体积混合配制成 ABTS 工作液。临用前, 用蒸馏水将 ABTS 工作液稀释至在 405 nm 处的吸光度为 1.4±0.05。用蒸馏水将 Trolox 溶液(10 mmol/L)稀释至 0.05、0.15、0.3、0.6、0.9、1、1.2、1.5 mmol/L。取

200 μL ABTS 工作液再分别加入 5 μL 的酶解液, 混匀, 室温放置 6 min, 测定 405 nm 下的吸光值, 带入标准曲线方程($y=-1.1833x+1.5175, R^2=0.994$)算出样品的总抗氧化能力。

1.2.6 水解度测定 参考 PENAS 等^[19] 的邻苯二甲醛法, 取 400 μL 酶解液与 3 mL 邻苯二甲醛法 OPA 试剂迅速混匀, 避光反应 2 min, 以未水解样品做空白对照, 测定 340 nm 处的吸光值, 按照下式计算水解度(degree of hydrolysis, DH)。

$$\text{DH}(\%) = \frac{1.8114 \times \Delta A \times d}{c} \times 100$$

式中: ΔA 为水解样品的吸光度与未水解样品的吸光度的差值; d 为稀释倍数; c 为蛋白质质量浓度, g/L 。

1.2.7 计算总评归一值 OD 以总抗氧化能力和水解度为指标, 采用 Hassan 法^[20] 处理归一化, 单指标评价价值(d)和总评归一值(OD)按照下列公式进行换算:

$$d = \frac{Y_i - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}}$$

$$\text{OD} = \frac{d_1 + d_2}{2}$$

式中: d 表示单指标评价价值, d_1 表示总抗氧化能力指标评价价值, d_2 表示水解度指标评价价值, Y_i 表示指标中第 i 个值, Y_{\min} 表示指标中最小值, Y_{\max} 表示指标中最大值。

1.2.8 杜仲籽粕水解肽的体外抗氧化试验

1.2.8.1 DPPH 自由基清除率测定 参考 YANG 等^[21] 的方法, 并进行一定的调整。将杜仲籽粕水解物配成质量浓度分别为 0.02、0.04、0.08、0.2、0.4、0.8、2、4、6、8 mg/mL 的溶液。在试管中依次加入 150 μL 上述浓度的酶解液及 150 μL 的 DPPH 乙醇溶液(0.6 mmol/L), 振荡混匀后, 在室温条件下避光静置 30 min, 测定 517 nm 处的吸光值。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_1 为加样品与 DPPH 乙醇溶液时的吸光度; A_2 为加样品与无水乙醇时的吸光度; A_0 为无水乙醇与 DPPH 乙醇溶液时的吸光度。

1.2.8.2 超氧阴离子自由基清除率测定 参考杨永涛^[22] 的方法, 并进行一定的调整。配制质量浓度分别为 0.2、0.4、0.8、2、4、6、8 mg/mL 的样品溶液。在试管中加入 4.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液(pH 为 8.2, 浓度为 0.05 mol/L), 2.5 mL 的蒸馏水, 30 $^\circ\text{C}$ 水浴 20 min。然后加入 1.5 mL 不同浓度样品溶液, 以及 0.5 mL 的邻苯三酚溶液(25 mmol/L), 快速摇匀, 于 30 $^\circ\text{C}$ 水浴反应 8 min 后, 立即滴加 0.1 mL 的 HCl(8 mmol/L)终止反应, 测定 320 nm 处的吸光值。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_1 为加样品时的吸光度; A_2 为用蒸馏水代替邻苯三酚溶液时的吸光度; A_0 为用蒸馏水代替样品时的吸光度。

1.2.8.3 ABTS 自由基清除率的测定 参考 ZILIC 等^[23] 的方法, 并进行一定的调整。配制质量浓度分别为 0.02、0.04、0.08、0.2、0.4、0.8、2、4、6、8 mg/mL 的样品溶液。将 ABTS 溶液(7 mmol/L)和过硫酸钾溶液(2.45 mmol/L)按照 1:1 体积比混合均匀, 避光放置 12 h。取上述混合液, 用无水乙醇调其吸光度在 734 nm 处为 0.70 ± 0.02 , 即得 ABTS 工作液。取 0.4 mL 样品溶液, 加入 ABTS 工作液 4.0 mL, 静置反应 5 min 后, 测定 734 nm 处的吸光度。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_1 为加样品时的吸光度; A_2 为用蒸馏水代替 ABTS 工作液时的吸光度; A_0 为用蒸馏水代替样品时的吸光度。

1.3 数据处理

所有试验均进行 3 组平行实验, 数据采用平均值 \pm 标准差的形式表示, 采用 SPSS22.0 和 Origin Expert8.0.6 软件对数据进行分析处理。显著性差异用单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行表示($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

由图 1 可知, 中性蛋白酶酶解液的总抗氧化能

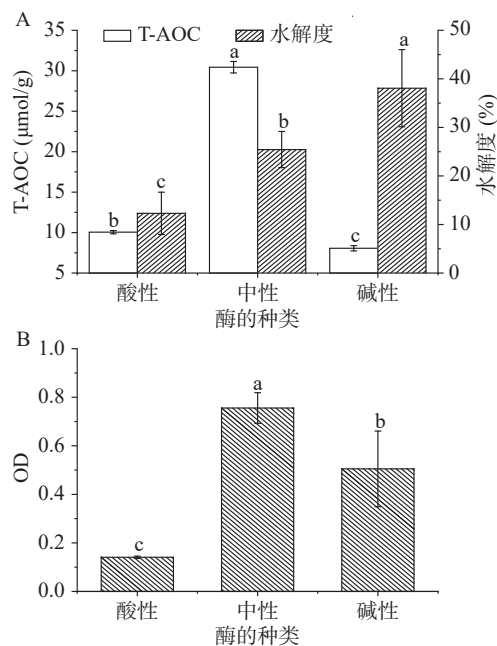


图 1 不同蛋白酶对杜仲籽粕蛋白水解肽 T-AOC 和水解度 (A)、OD 值(B)的影响

Fig.1 Effects of different proteases on T-AOC, degree of hydrolysis (A) and OD value (B) of *Eucommia ulmoides* seed meal protein hydrolysate

注: 不同小写字母表示同一指标不同处理间的差异显著性, $P < 0.05$; 图 2~图 4 同。

力最高, 其次是酸性蛋白酶、碱性蛋白酶; 而碱性蛋白酶对杜仲籽粕蛋白的水解度最高, 其次是中性蛋白酶、酸性蛋白酶。不同的蛋白酶具有特定的酶切位点, 从而得到不同肽链组成的酶解产物, 所以其生物活性也存在较大差异^[24]。本研究中, 中性蛋白酶处理后的 OD 值最大, 综合考虑酶解液的水解度和抗氧化活性, 本实验选择中性蛋白酶为最适作用酶。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 酶添加量的影响 由图 2 可知, 在测量范围内, 酶解液的总抗氧化能力呈现先增大后减少的趋势。当酶添加量为 8000 U/g 时, 总抗氧化能力达到 24.03 $\mu\text{mol/g}$, 达到最大值; 而当酶添加量为 4000 U/g 时, 水解度达到最大值, 为 55.7%。这可能是由于随着酶量的增加, 酶和底物达到饱和, 其水解度达到最大值, 随着酶量继续增加, 过多的酶将抗氧化能力较低的肽段进一步水解, 从而得到抗氧化性较好的多肽^[25]。综合两者得到的 OD 值, 与总抗氧化能力呈现相同的趋势。因此, 确定酶添加量为 8000 U/g。

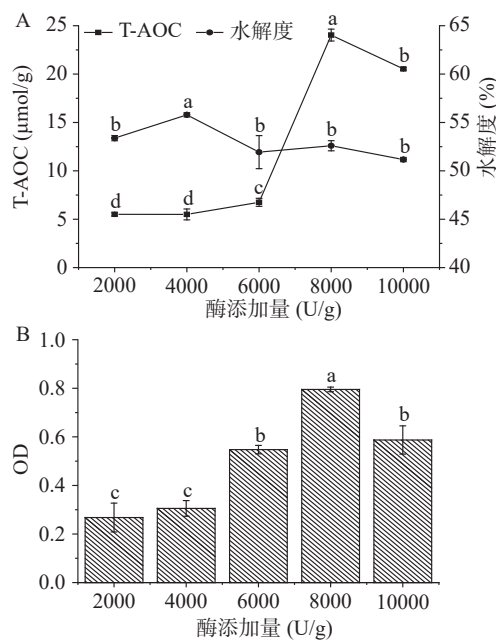


图 2 酶添加量对杜仲籽粕蛋白水解肽 T-AOC 和水解度 (A)、OD 值(B)的影响

Fig.2 Effect of enzyme addition on T-AOC, hydrolysis degree (A) and OD value (B) of *Eucommia ulmoides* seed meal protein hydrolysate

2.2.2 酶解时间的影响 由图 3 可知, 在酶解时间为 1.5~3.5 h 内, 酶解液的水解度和总抗氧化能力均呈现先增大后降低的趋势。当酶解时间为 2 h 时, 总抗氧化能力达到最大值 18.92 $\mu\text{mol/g}$, 继续增加酶解时间, 底物逐渐被转化而导致酶解速率下降, 生成的活性肽被进一步水解, 从而导致酶解液的总抗氧化能力降低^[26]。酶解时间为 2.5 h 时, 其水解度达到最大值 52%。综合考虑酶解液的总抗氧化能力和水解度的大小, 确定酶解时间为 2 h。

2.2.3 底物浓度的影响 由图 4 可知, 随着底物浓度

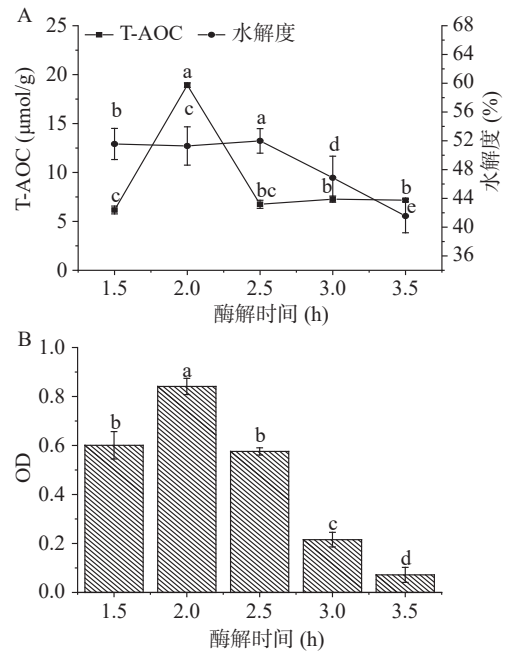


图 3 酶解时间对杜仲籽粕蛋白水解肽 T-AOC 和水解度 (A)、OD 值(B)的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis time on T-AOC, hydrolysis degree (A) and OD value (B) of *Eucommia ulmoides* seed meal protein hydrolysate

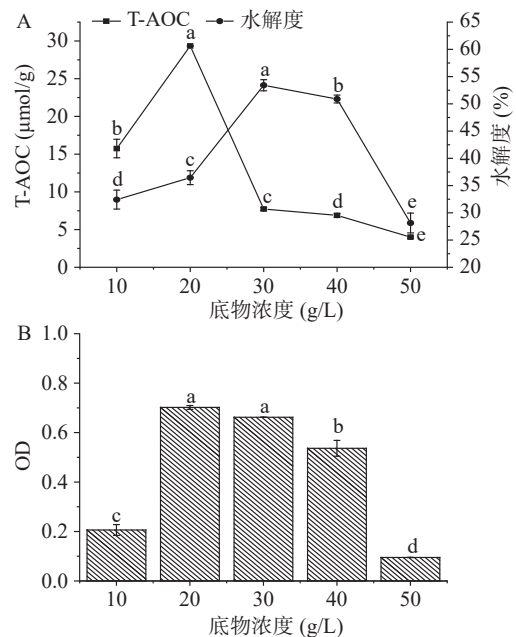


图 4 底物浓度对杜仲籽粕蛋白水解肽 T-AOC 和水解度 (A)、OD 值(B)的影响

Fig.4 Effect of substrate concentration on T-AOC, hydrolysis degree (A) and OD value (B) of *Eucommia ulmoides* seed meal protein hydrolysate

的增加, 总抗氧化能力和水解度均先增加后降低, 其中底物浓度 20 g/L 时, 总抗氧化能力为 29.3 $\mu\text{mol/g}$, 达到最大值, 水解度为 36.4%。在底物浓度为 30 g/L 时其水解度为 53.4%, 相较前者有所增加, 之后逐渐降低。这是因为在底物浓度较低时, 随着底物浓度的增加, 酶和底物结合速率也随之增加, 当酶和底物达到饱和后, 继续增加底物浓度, 会对酶与底物的反应

起到抑制作用^[27-28]。而总抗氧化能力先增加后降低,这是因为随着水解度的增加使多肽暴露出更多的活性基团,但过高的水解度会破坏活性肽的结构,从而使总抗氧化性降低^[29]。综合考虑酶解液的总抗氧化能力和水解度的大小,确定底物浓度为 20 g/L。

2.3 响应面试验结果

2.3.1 中心组合试验结果 根据前述实验设计方案,选择酶添加量(A)、酶解时间(B)、底物浓度(C)三个因素为考察指标,以总抗氧化能力和水解度的总评归一值(OD)为响应值,利用 Origin-Expert8.0.6 软件对响应结果进行多元回归拟合,建立的二次响应面回归方程如下: $OD=0.33+0.10A+0.041B-0.20C-0.10AB-0.028AC+0.078BC+0.085A^2+0.10B^2-0.054C^2$ 。

从实验结果(表 3)和方差分析(表 4)可以看出,

表 3 响应面设计及结果
Table 3 Response surface design and results

试验号	因素			T-AOC ($\mu\text{mol/g}$)	水解度 (%)	OD
	A	B	C			
1	0	0	0	26.5524	16.394	0.25721
2	-1	0	1	23.344	17.891	0.151687
3	0	-1	-1	28.9329	24.815	0.608634
4	-1	-1	0	24.9944	18.233	0.237842
5	-1	1	0	29.2255	20.129	0.487889
6	1	0	-1	31.8009	20.878	0.628496
7	1	-1	0	26.6493	33.842	0.761695
8	1	0	1	24.4468	18.509	0.183023
9	0	0	0	26.2303	19.072	0.319039
10	0	0	0	25.8923	20.511	0.344658
11	1	1	0	29.4565	23.638	0.599129
12	0	1	1	24.1479	21.984	0.31026
13	0	-1	1	20.9921	17.013	0.033119
14	0	1	-1	29.9903	21.445	0.57513
15	0	0	0	27.212	17.170	0.321057
16	-1	0	-1	27.7603	22.428	0.486
17	0	0	0	26.4726	22.242	0.415272

表 4 回归方程模型的显著性检验及方差分析
Table 4 Explicitness test and variance analysis of regression equation model

方差来源	平方和	自由度	均方和	F值	P值	显著性
模型	0.58	9	0.065	10.52	0.0026	**
A-酶添加量	0.082	1	0.082	13.29	0.0082	**
B-酶解时间	0.014	1	0.014	2.23	0.1792	
C-底物浓度	0.33	1	0.33	53.32	0.0002	**
AB	0.043	1	0.043	6.92	0.0339	*
AC	3.089E-003	1	3.089E-003	0.50	0.5015	
BC	0.024	1	0.024	3.92	0.0882	
A ²	0.031	1	0.031	4.98	0.0607	
B ²	0.046	1	0.046	7.52	0.0288	*
C ²	0.013	1	0.013	2.03	0.1970	
残差	0.043	7	6.154E-003			
失拟项	0.030	3	0.010	3.09	0.1519	不显著
纯误差	0.013	4	3.244E-003			
总误差	0.63	16				

$R^2=0.9312$ $R^2_{Adj}=0.8427$

注: *为显著($P<0.05$); **为极显著($P<0.01$)。

模型极显著($P=0.0026<0.01$),说明模型较为稳定,失拟项不显著($P=0.1509>0.05$),说明方程拟合性良好,即回归方程模型有显著意义。决定系数 R^2 为 0.9312,即响应值的变化有 93.12% 与所选变量有关系,说明模型拟合程度良好,能够较准确地预测和分析实际情况^[29];模型的校正决定系数 R^2_{Adj} 为 0.8427,说明不确定因素对实验结果的干扰较小,该模型与数据拟合度良好,即回归方程模型适合杜仲籽粕多肽制备工艺的分析与预测^[30]。模型的一次项 A、C 极显著($P<0.01$),交互项 AB、二次项 B² 差异显著($P<0.05$)。对比各因素的 F 值大小可知,在三个因素中,按照对结果的影响排序,底物浓度(C)>酶添加量(A)>酶解时间(B)。

2.3.2 响应面模型验证 通过对响应面优化工艺结果拟合分析得出:中性蛋白酶酶解杜仲籽粕蛋白制备抗氧化肽的最佳工艺条件为酶添加量 9999.98 U/g,酶解时间 1.50 h,底物浓度 20 g/L,在最佳工艺条件下,杜仲籽粕抗氧化肽的 OD 值为 0.938。

结合实际情况将上述所得最佳条件修正为:酶添加量 10000 U/g,酶解时间 1.50 h,底物浓度 20 g/L,在此条件下进 3 组验证试验,测得杜仲籽粕蛋白酶解液的总抗氧化能力为(30.62±0.59 $\mu\text{mol/g}$),水解度为 47.45%±1.50%,OD 值为 0.932,与响应面回归模型所得到的预测值(0.938)偏差 0.397%,说明这次响应面分析的回归模型可以很好地预测实际试验结果。

2.4 杜仲籽粕水解肽的体外抗氧化试验

不同质量浓度的酶解液和 V_C 对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基的清除率测定结果如图 5 所示。在测量的质量浓度范围内,酶解液和 V_C 对自由基的清除能力均随着质量浓度的增大而逐渐增大,呈现出一定的剂量依赖性。当水解肽的浓度为 0.8 mg/mL 时,对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基的清除率分别为 57.4%、16.7%、75.2%;浓度为 8 mg/mL 时,对自由基的清除率分别为 78.6%、75.4%、96.1%,而当 V_C 的浓度为 0.8 mg/mL 时,对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基的清除率分别为 91.5%、94.4%、99.5%,由此可看出,杜仲籽粕水解肽对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基的清除能力在低浓度时不如 V_C ,但高浓度时与 V_C 相当。本研究以水解度和总抗氧化能力为指标,在响应面优化的最佳工艺条件下制备出来的多肽,对超氧阴离子自由基的清除率可高达 75.4%,且该最佳条件所需的底物质量浓度、酶添加量和酶解时间与黄群等^[15]制备抗氧化肽条件相比(底物质量浓度为 7.32 g/100 mL、酶用量为 12292.3 U/g、酶解时间为 2.59 h)更少,即此次优化得到的杜仲籽粕水解肽具有更强的抗氧化能力。

采用 SPSS22.0 软件进行回归拟合,计算得水解

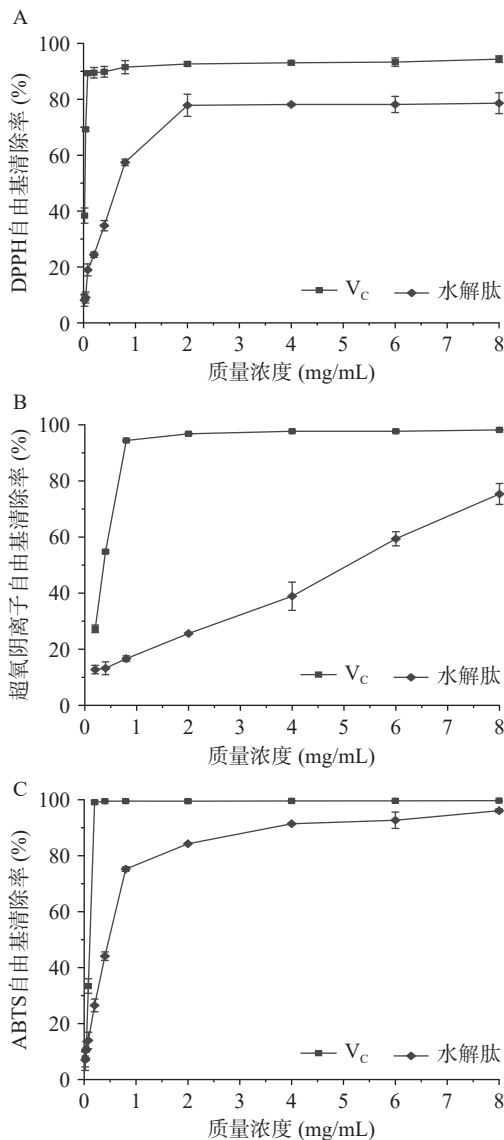


图 5 不同浓度酶解液对自由基的清除率

Fig.5 Scavenging rate of different concentrations of enzymatic hydrolysate on free radicals

肽对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基清除率的 IC_{50} 分别为 0.731、4.258、0.407 mg/mL。当某物质的 IC_{50} 低于 10 mg/mL 时,一般说明其有较好的抗氧化活性^[31],杜仲籽粕水解肽对三种自由基清除率的 IC_{50} 均远小于 10 mg/mL,综上,杜仲籽粕蛋白水解肽具有明显的抗氧化性。

3 结论

本实验以杜仲籽粕为原料,通过碱提酸沉得到杜仲籽粕蛋白,利用酶解法制备多肽,通过单因素实验及响应面试验对酶添加量、酶解时间和底物浓度这三个因子进行优化,得到最佳工艺条件:酶添加量 10000 U/g,酶解时间 1.50 h,底物浓度 20 g/L,在此条件下,酶解液的水解度为 $47.45\% \pm 1.50\%$,总抗氧化能力为 $(30.62 \pm 0.59 \mu\text{mol/g})$,且随着杜仲籽粕蛋白酶解液浓度的增大,其清除 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基的能力也不断增大,表明杜仲籽粕多肽具有良好的抗氧化功能。本文仅对

酶解杜仲籽粕蛋白制备多肽工艺条件及其抗氧化性进行了研究,但其抗氧化能力与结构特征间的关联性仍有待进一步探究。

参考文献

- [1] 高宏伟,李玉萍,李守超.杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J].*中医药信息*,2021,38(6):73-81. [GAO H W, LI Y P, LI S C. Study advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Eucommia ulmoides* oliv[J]. *Information on Traditional Chinese Medicine*, 2021, 38(6): 73-81.]
- [2] 冯晗,周宏灏,欧阳冬生.杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J].*中国临床药理学与治疗学*,2015,20(6):713-720. [FENG H, ZHOU H Y, OUYANG D S. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Eucommia ulmoides*[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2015, 20(6): 713-720.]
- [3] ZHU M Q, SUN R C. *Eucommia ulmoides* oliver: A potential feedstock for bioactive products[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(22): 5433-5438.
- [4] 汤诗杰,李和平,贺善安.杜仲研究的现状与展望[J].*林业科技开发*,2007(2):8-12. [TANG S J, LI H P, HE S A. Present situation and prospect of *Eucommia ulmoides* research[J]. *Journal of Forestry Engineering*, 2007(2): 8-12.]
- [5] 武毅楠,高梦珂,李攀峰,等.杜仲籽油对 2 型糖尿病 KKAY 小鼠糖脂代谢及肠道菌群的影响[J].*食品安全质量检测学报*,2022,13(3):728-736. [WU Y N, GAO M K, LI P F, et al. Effect of *Eucommia ulmoides* seed oil on glycolipid metabolism and gut microbiota in KKAY mice with type 2 diabetes mellitus[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(3): 728-736.]
- [6] 朱莉伟,陈素文,蒋建新,等.杜仲种仁化学成分研究[J].*中国野生植物资源*,2005(2):41-42,45. [ZHU L W, CHEN S W, JIANG J X, et al. Study on chemical constituents of *Eucommia* kernel[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2005(2): 41-42, 45.]
- [7] 吴凡,蒲灵操,单旺,等.碱性蛋白酶提取杜仲籽粕蛋白的工艺优化[J].*粮食科技与经济*,2013,38(6):54-57. [WU F, PU L C, DAN W, et al. Optimization of alkaline protease for protein extraction from *Eucommia* seed meal[J]. *Grain Science and Technology and Economy*, 2013, 38(6): 54-57.]
- [8] 黄诚,尹红.基于超声波辅助法的杜仲籽蛋白提取工艺优化[J].*吉首大学学报(自然科学版)*,2014,35(1):78-82. [HUANG C, YIN H. Optimization of extraction technology of *Eucommia* seed protein based on ultrasonic assisted method[J]. *Journal of Jishou University (Natural Sciences Edition)*, 2014, 35(1): 78-82.]
- [9] XIA J, SONG H, HUANG K, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of mung-bean protein[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(6): 1735-1741.
- [10] RAYAPROLU S, HETTIARACHCHY N, HORAX R, et al. Amino acid profiles of 44 soybean lines and ACE-I inhibitory activities of peptide fractions from selected lines[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2015, 92(7): 1-11.
- [11] 周丽卿.鹰嘴豆多肽的制备及其改性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2012. [ZHOU L Q. Study on the preparation and modification of chickpea peptide[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012.]
- [12] 刘晓艺,王玉岩,过利敏,等.不同分子量红花籽抗氧化肽稳

- 定性研究[J/OL]. 食品工业科技: 1-14 [2022-01-11]. [LIU X Y, ZHOU Y Y, GUO L M, et al. Study on the stability of antioxidant peptides from safflower seeds with different molecular weights[J/OL]. Science and Technology of Food Industry: 1-14 [2022-01-11].]
- [13] CHAI T T, XIAO J, MOHANA DASS S, et al. Identification of antioxidant peptides derived from tropical jackfruit seed and investigation of the stability profiles[J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 127876.
- [14] 张作达, 王琴飞, 吴若娜, 等. 木薯叶片多肽的制备与抗氧化功能研究[J/OL]. 食品与发酵工业: 1-12 [2022-01-13]. [ZHANG Z D, WANG Q F, WU N N, et al. Study on preparation and antioxidant function of polypeptides from cassava leaf[J/OL]. Food and Fermentation Industries: 1-12 [2022-01-13].]
- [15] 黄群, 杨万根, 余信, 等. 杜仲籽粕蛋白酶解制备抗氧化肽工艺优化[J]. *食品科学*, 2013, 34(17): 205-209. [HUANG Q, YANG W G, YU J, et al. Process optimization for antioxidant peptide preparation from *Eucommia* seed meal protein by enzymatic hydrolysis[J]. *Food Science*, 2013, 34(17): 205-209.]
- [16] 葛珍珍, 王维静, 张圆, 等. 杜仲籽粕蛋白的分离提取及其体外消化产物的抗氧化特性研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(4): 202-207. [GE Z Z, WANG W J, ZHANG Y Y, et al. Extraction of *Eucommia ulmoides* seed protein and antioxidant properties of its digested products *in vitro*[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(4): 202-207.]
- [17] 贺东亮. 紫苏多肽分离纯化及其抗肿瘤活性研究[D]. 太原: 中北大学, 2019. [HE D L. Study on purification and anti-cancer effects of peptides derived from *perilla frutescens*[D]. Taiyuan: North University of China, 2019.]
- [18] 郑德勇, 陈成聪, 颜阳蕾, 等. 茶树籽蛋白质微波辅助酶解制备多肽的研究[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(12): 135-140, 155. [ZHENG D Y, CHEN C C, YAN Y L, et al. The polypeptides preparation from *Camellia sinensis* seeds protein by microwave-assisted enzymolysis[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2020, 35(12): 135-140, 155.]
- [19] PENAS E, PRSTAMO G, GOMEZ R. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins[J]. *Food Chemistry*, 2004, 85(4): 641-648.
- [20] LI J C, WANG R, SHENG Z L, et al. Optimization of baicalin, wogonoside, and chlorogenic acid water extraction process from the roots of *Scutellariae Radix* and *Lonicerae japonicae flos* using response surface methodology (RSM)[J]. *Processes*, 2019, 7(11): 854.
- [21] YANG R W, LI X F, LIN S Y, et al. Identification of novel peptides from 3 to 10 kDa pine nut (*Pinus koraiensis*) meal protein, with an exploration of the relationship between their antioxidant activities and secondary structure[J]. *Food Chemistry*, 2017, 219: 311-320.
- [22] 杨永涛. 罗布麻总黄酮的提取、分离纯化及其抗氧化性能研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018. [YANG Y T. Study on extraction, purification and antioxidant activity of total flavonoids from *Apocynum venetum*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]
- [23] ZILIC S, SERPEN A, AKILLIOGLU G, et al. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(5): 1224-1231.
- [24] XU Z, MAO T M, HUANG L, et al. Purification and identification immunomodulatory peptide from rice protein hydrolysates[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2019, 30(1): 150-162.
- [25] 岳阳. 大米抗氧化肽的制备及其抗衰老功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021. [YUE Y. Preparation of rice antioxidant peptides and its anti-aging effects[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.]
- [26] 郎蒙, 李燕, 蒋蔚薇, 等. 响应面优化南极磷虾粉肽制备工艺及 α -葡萄糖苷酶抑制活性分析[J/OL]. 上海海洋大学学报: 1-13 [2021-11-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2024.S.20210601.1631.006.html>. [LANG M, LI Y, JIANG W W, et al. Optimization of preparation process and α -glucosidase inhibitory activity of Antarctic krill powder peptide by response surface methodology[J/OL]. Journal of Shanghai Ocean University: 1-13 [2021-11-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2024.S.20210601.1631.006.html>.]
- [27] 乔晓林. 酶解小麦面筋蛋白制备抗氧化肽工艺优化[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014. [QIAO X L. Preparation of antioxidant peptides and optimization of enzymatic hydrolysis of wheat gluten[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2014.]
- [28] FANG X B, XIE N N, CHEN X E, et al. Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology[J]. *Food and Bioprocess Processing*, 2012, 90(4): 676-682.
- [29] 郭瑶. 罗非鱼皮胶原肽的制备及其抗氧化活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006. [GUO Y. Preparation of peptides from enzymic hydrolysates of tilapia skin collagen and its antioxidant properties[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006.]
- [30] SONG R, LIANG T, SHEN Q, et al. The optimization of production and characterization of antioxidant peptides from protein hydrolysates of *Agrocybe aegerita*[J]. *LWT*, 2020, 134: 109987.
- [31] 郑义, 邵颖, 陈安徽, 等. 益智仁总黄酮超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2014, 35(6): 44-49. [ZHENG Y, SHAO Y, CHEN A H, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activities of total flavonoids from *Alpinia oxyphylla* fruits[J]. *Food Science*, 2014, 35(6): 44-49.]