

# 酶解牡丹籽粕蛋白 制备抗氧化肽的工艺优化

阎震<sup>1,2</sup> 郭淑<sup>2</sup> 张金宝<sup>3</sup> 王青<sup>2</sup> 程安玮<sup>2</sup> 贺圣文<sup>1,\*</sup> 孙金月<sup>1,2,4,\*</sup>

(1. 潍坊医学院公共卫生与管理学院, 山东潍坊 261053;

2. 山东省农业科学院农产品研究所/山东省农产品精深加工技术重点实验室/  
农业部新食品资源加工重点实验室, 山东济南 250100;

3. 潍坊医学院临床医学院, 山东潍坊 261053;

4. 山东省农业科学院, 山东济南 250100)

**摘要:** 利用制备的牡丹籽粕蛋白为原料, 对其进行酶解以获得具有抗氧化活性的多肽, 为牡丹籽粕的精深加工提供理论依据。首先进行蛋白酶的筛选, 选取最佳的碱性蛋白酶对碱溶酸沉法制备的牡丹籽饼粕蛋白进行酶解; 以水解度和 DPPH 自由基清除力为指标进行单因素实验, 分别考察底物浓度、酶解时间、加酶量、pH 和酶解温度对制备抗氧化活性肽的影响; 以 DPPH 自由基清除力为响应值, 对牡丹籽粕蛋白抗氧化肽的制备工艺进行响应面法优化, 确定的最佳制备工艺为: 底物浓度 0.7%、酶解时间 2 h、酶用量 4.60%、酶解温度 56 °C 和 pH8.0。抗氧化实验结果表明, 制备的抗氧化肽对 DPPH 自由基的清除率为 52.49%; 经 17 种水解氨基酸组成分析证明, 必需氨基酸占水解氨基酸总量的 32.24%, 具有较高的营养价值。

**关键词:** 牡丹籽粕蛋白 酶解 抗氧化肽 响应面分析

## Optimization of process for preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of protein prepared from peony seed meal

YAN Zhen<sup>1,2</sup>, GUO Xu<sup>2</sup>, ZHANG Jin-bao<sup>3</sup>, WANG Qing<sup>2</sup>,  
CHENG An-wei<sup>2</sup>, HE Sheng-wen<sup>1,\*</sup>, SUN Jin-yue<sup>1,2,4,\*</sup>

(1. School of Public Health and Management, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

2. Institute of Agro-Food Science and Technology Shandong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of  
Agro-Products Processing Technology of Shandong Province/Key Laboratory of  
Novel Food Resources Processing, Ministry of Agriculture, Jinan 250100, China;

3. Department of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

4. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

**Abstract:** The protein prepared from peony seed meal was subjected to hydrolysis to prepare the antioxidant peptides in order to providing a theoretical basis for the deep processing of peony seed meal. Firstly, the type of proteases was screened then alcalase was selected to hydrolyse the protein isolated from peony seed meal by alkaline-solubilization and acid-precipitation method. Then hydrolysis degree and DPPH free radical scavenging capacity were used as the response values to investigate the effects of single-factors including substance concentrations, hydrolysis time, enzyme dosage, enzymolysis temperature and pH on the activity of prepared antioxidant peptides. The optimal parameters for the preparation of antioxidant peptides from peony seed meal protein through response surface analysis were obtained as follows: substance concentration 0.7%, hydrolysis time 2 h, enzyme dosage 4.60%, enzymolysis temperature 56 °C and pH8.0, with a DPPH radical scavenging ratio of 52.49% for the prepared antioxidant peptides from peony seed meal protein. The analysis of amino acid composition of 17 kinds of hydrolysis showed that the essential amino acids accounted for 32.24% of the total amount of amino acids hydrolyzed, and the peony peptides have a high nutritional value.

收稿日期: 2017-08-10

作者简介: 阎震(1992-) 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与加工, E-mail: 18763891305@163.com。

\* 通讯作者: 贺圣文(1980-) 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: shengwenhe@163.com。

孙金月(1978-) 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物活性物质与功能食品, E-mail: moon\_s731@hotmail.com。

基金项目: 山东省农业科学院区域重大技术协同创新工程-油用牡丹产业技术集成与示范; 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXG2016B16); 山东省自主创新及成果转化专项(2014CGZH0712); 山东省泰山学者海外特聘专家人才引进项目(tshw20120747)。

**Key words:** peony seed meal protein; enzymolysis; antioxidant peptide; response surface analysis

中图分类号: TS229 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2018)07-0168-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.07.031

引文格式: 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, 180

牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 属于芍药科 (*Paeoniaceae*) 芍药属 (*Paeonia*), 为多年生落叶小灌木。牡丹籽含油量丰富, 籽油中饱和和脂肪酸总量为 80%~92%, 其中亚麻酸含量为 32%~67%, 亚油酸含量为 19%~35%<sup>[1-2]</sup>。α-亚麻酸作为人体的必需脂肪酸, 具有降胆固醇、降血脂等多种保健功能。2011年3月国家卫生部批准凤丹和紫斑牡丹籽油为新资源食品, 我国油用牡丹种植面积急剧扩大, 牡丹籽产量逐年提高, 油脂提取后产生大量的牡丹籽饼粕。目前这些饼粕主要作为饲料原料或食用菌培养基基料, 综合开发利用水平较低, 对其研究主要集中在牡丹籽饼粕蛋白的提取工艺优化和性质评价<sup>[3-6]</sup>。牡丹籽饼粕蛋白含量约 25%, 由于牡丹籽蛋白组成复杂, 水溶性差, 极大地限制了其在食品领域的应用。

1960年 Marcuse 首次报道了多肽具有抗氧化活性<sup>[7]</sup>, 此后对食源性抗氧化肽的活性研究引起广泛关注, 并发现许多来自食物蛋白的寡肽或多肽具有抗氧化活性<sup>[8-11]</sup>。抗氧化肽是介于蛋白质和氨基酸之间的肽类, 由 5~16 个氨基酸残基组成<sup>[12]</sup>, 与其它生物分子相比, 具有极强的生物活性和多样性, 抗氧化性更为显著, 安全性高<sup>[13]</sup>。但目前用牡丹籽粕蛋白研发活性肽的研究还鲜见报道, 个别有关牡丹籽蛋白酶解的工艺优化多以提高水解度为目标<sup>[14-15]</sup>。由于水解度与抗氧化能力之间并不是单纯的线性关系<sup>[16]</sup>, 根据蛋白水解度制备的抗氧化肽的活性还不是很高。

该研究将利用制备的牡丹籽粕蛋白为原料, 探究应用响应面法 (RSM) 优化制备抗氧化活性肽的最佳酶解条件, 获得利用牡丹籽粕蛋白制备具有较强抗氧化活性多肽的最佳工艺, 为牡丹籽粕的精深加工开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

牡丹籽 山东菏泽尧舜牡丹生物技术有限公司; 碱性蛋白酶 (2.4AU-A/g)、中性蛋白酶 (0.8AU-A/g)、复合蛋白酶 (1.5AU-A/g)、风味蛋白酶 (500LAPU/g) 诺维信公司; 木瓜蛋白酶 (800 U/mg)、1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH) 上海源叶生物科技有限公司; 氢氧化钠、铁氰化钾、三氯乙酸、盐酸等均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

电热恒温水浴锅 DK-S24 型 上海精宏公司; 台式酸度计 FE20K 型 美国梅特勒-托利多公司; 电子天平 AR423CN 型 美国奥豪斯公司; 紫外分光光度计 UV-1800 型 日本岛津公司; 高效冷冻离心机 Allegra 25R 型 美国 Beckman 公司; 超低温冰箱 907 型 美国赛默飞世尔公司; 真空冷冻干燥机

Lab-1A-50E 型 北京博医康公司; 离心机 LXJ-II B 上海安亭科学仪器厂; 全自动氨基酸分析仪 L-8900 日本日立公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 牡丹籽粕蛋白的制备 称取 80 g 牡丹籽粕加入 2000 mL 去离子水, 用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 到 11.0, 180 W 超声 2.5 h, 使蛋白充分溶解, 5000 r/min 离心 10 min, 去沉淀留上清, 收集上清液用 1 mol/L HCl 调 pH 至 3.80, 5000 r/min 离心 10 min, 去上清留沉淀, 沉淀置于 -60 °C 真空冷冻干燥机中冻干, -20 °C 储存备用。

1.2.2 蛋白酶的筛选 称取制备的牡丹籽粕蛋白 5 份, 底物质量分数为 2%, 溶于去离子水, 然后分别加入 5 种酶, 加酶量 6.25%, 在各自最适温度和 pH 条件下酶解 8 h, 5 种酶情况详见表 1。酶解 8 h 后, 将酶解液置于沸水中 10 min 灭酶活, 10000 r/min 离心 10 min, 在酶解过程的不同时刻记录为维持 pH 恒定所加入的 NaOH 的量计算水解度, 取上清液冻干, 配制成相同浓度的多肽溶液测定 DPPH 自由基清除能力。

表 1 5 种蛋白酶水解牡丹籽粕蛋白的最适酶解条件

Table 1 Optimal reaction conditions of five enzymes used for hydrolysis of peony seed meal protein

蛋白酶种类	温度(°C)	pH
风味蛋白酶	55	7.0
复合蛋白酶	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

1.2.3 牡丹籽粕蛋白的酶解 称取制备的牡丹籽粕蛋白溶于去离子水, 置于 80 °C 水浴中预热 20 min, 然后用 0.5 mol/L NaOH 溶液将混合液 pH 快速调至 8.0; 加入碱性蛋白酶的量为 6.25%, 缓慢搅拌混匀后, 于 50 °C 恒温水浴锅中进行酶解, 通过滴加 0.5 mol/L NaOH 溶液使混合液 pH 保持不变, 并记录一定时间间隔的碱液消耗量, 来计算牡丹籽粕蛋白的水解度。2 h 后将酶解液置于沸水中 10 min 灭酶活, 冰浴迅速冷却, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液冷冻干燥备用。

1.2.4 多肽制备的单因素实验 在选用最佳蛋白酶碱性蛋白酶的基础上, 以底物质量分数、酶解时间、加酶量 ([E]/[S])、酶解温度、酶解 pH 为自变量, 以 DPPH 自由基清除率和水解度为响应值, 研究各单因素对制备多肽的抗氧化活性的影响。在酶解温度 50 °C、底物质量分数 2%、加酶量 6.25%、pH 8.0、酶解时间 2 h 的条件下酶解牡丹籽粕蛋白, 设置各因素的

水平分别为:底物质量分数 0.5%、0.75%、1%、2%、3%、4%;水解时间 1、1.5、2、2.5、3、3.5 h;加酶量 2.50%、3.75%、5%、6.25%、7.50%、8.75%;酶解温度 45、50、55、60、65 °C;酶解 pH6.0、7.0、8.0、9.0、10.0。

1.2.5 响应面优化实验 在单因素基础上筛选出影响较大的四个因子进行 Box-Behnken 中心组合实验设计。固定 pH = 8.0,选择时间(A)、底物质量分数(B)、温度(C)、加酶量(D)为自变量,以 DPPH 自由基清除率为响应值,设计四因素三水平的响应面分析进行实验。确定利用酶解牡丹籽粕蛋白制备抗氧化肽的最佳工艺,并进行实验验证。响应面优化实验的自变量因素及水平设计见表 2。

表 2 响应面优化实验的自变量因素及水平设计

Table 2 Independent variables and their levels used in response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A 水解时间(h)	1.5	2	2.5
B 底物浓度(%)	0.5	1	1.5
C 酶解温度(°C)	50	55	60
D 加酶量(%)	4	5	6

### 1.2.6 指标的测定

1.2.6.1 牡丹籽粕蛋白酶解物水解度的测定 根据 pH-state 法<sup>[17]</sup>计算水解度(DH)。pH-state 法是根据水解过程中释放质子的量进行水解度的测定。在蛋白质水解过程中记录不同时刻为维持反应体系 pH 恒定而消耗的碱量,根据消耗的碱量按下式计算出蛋白质的水解度。

$$DH(\%) = \frac{CV}{\alpha hm} \times 100$$

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

$$pK_a = 7.8 + \frac{298-T}{298} \times 2400$$

式中 C: NaOH 溶液浓度(mol/L); V: NaOH 溶液消耗体积(mL); m: 样品蛋白质质量(g); h: 每克原料牡丹籽粕蛋白中肽键的毫摩尔数(h = 7.84 mmol/g); T: 实验温度(K)。

1.2.6.2 牡丹籽粕蛋白酶解物对 DPPH 自由基清除率的测定 将待测样品配制成浓度为 133.3 mg/L 的溶液,取 2 mL 溶液加入 2 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液,混匀,室温下避光反应 30 min,于 517 nm 波长下测定吸光度值  $A_1$ 。空白组加入 2 mL 样品液和 2 mL 去离子水,吸光度值为  $A_2$ 。对照组加入 2 mL DPPH 溶液和 2 mL 去离子水,用 4 mL 无水乙醇调零,测定吸光度值为  $A_0$ <sup>[18-20]</sup>。计算公式:

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

1.2.7 多肽中氨基酸组成分析 使用氨基酸全自动分析仪,根据 GB 5009.124-2016 对制备得到的牡丹多肽粉进行 17 种水解氨基酸组成分析。

### 1.3 数据统计分析

采用 SPSS Statistics 17.0 软件对数据进行显著性

分析,结果以平均值 ± 标准差表示。 $p < 0.05$  表示差异显著有统计学意义, $p < 0.01$  说明差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 水解蛋白酶的筛选

5 种蛋白酶水解牡丹籽粕蛋白的水解度随酶解时间的变化曲线如图 1A 所示。水解反应都符合典型的酶学进程曲线,但每种酶又表现出各自不同的反应特性。牡丹籽粕蛋白的水解度随酶解时间的延长而逐渐增大,酶解反应的最 50 min 内,水解度增加较快,100 min 后变缓。水解曲线结果表明,在前 50 min 水解速度从高到低依次为:复合蛋白酶 > 碱性蛋白酶 > 中性蛋白酶 > 风味蛋白酶 > 木瓜蛋白酶;50 min 后复合蛋白酶和碱性蛋白酶的水解度增加趋势仍然较为明显,其余三种酶的水解度则上升缓慢,其中木瓜蛋白酶和风味蛋白酶的水解速度最为缓慢。这些结果表明,木瓜蛋白酶和风味蛋白酶这两种酶对牡丹籽粕蛋白的水解能力较弱,而复合蛋白酶和碱性蛋白酶较为适合酶解牡丹籽蛋白。碱性蛋白酶能特异性催化疏水性氨基酸的水解,而复合蛋白酶则作用广泛,二者较适合催化牡丹籽粕蛋白的水解,说明牡丹籽粕蛋白中含有大量的疏水性氨基酸,如丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸等,这与庞雪飞等<sup>[15]</sup>的研究结果相符。

图 1B 结果表明,分别用 5 种蛋白酶酶解牡丹籽蛋白,经碱性蛋白酶酶解后得到的多肽对 DPPH 自由基的清除能力较强,且水解度高;经木瓜蛋白酶酶解后得到的多肽对 DPPH 自由基的清除能力最强,但水解度太低,制备得到的多肽量很少,蛋白的利用率极低,浪费严重。综合考虑水解度和 DPPH 自由基

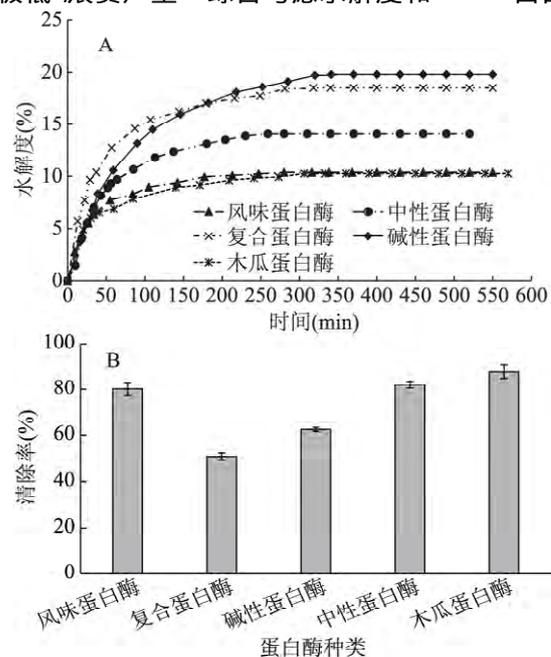


图 1 不同蛋白酶酶解对牡丹籽粕多肽水解度(A)和 DPPH 自由基清除率(B)的影响

Fig.1 Effects of proteases on hydrolysis degree A, DPPH free radical scavenging rate B of peptides prepared from peony seed meal

清除能力,碱性蛋白酶是水解牡丹籽粕蛋白制备抗氧化肽的最适宜蛋白酶,因此后续实验研究将选用碱性蛋白酶对牡丹籽粕蛋白进行酶解。

## 2.2 单因素实验

**2.2.1 底物浓度对水解度及 DPPH 自由基清除率的影响** 不同底物质量分数对水解度和 DPPH 自由基清除能力的影响差异极显著 ( $p < 0.01$ ),结果如图 2 所示。随底物质量分数的增加,水解度与清除率都呈现先升高后降低的趋势。在底物质量分数为 0.75% 时, DPPH 自由基清除率达到最大为 50.83%,此时水解度为 5.67%;底物质量分数为 0.75%~2% 时,清除率和水解度变化不大;之后二者都显著降低。该变化趋势可能是因为底物浓度过大,导致有效浓度降低,反应体系的粘度增大,酶与底物不能充分接触反应,导致水解度与清除率都降低<sup>[21]</sup>。因此,选择 0.5%、1% 和 1.5% 3 个水平进行响应面分析。

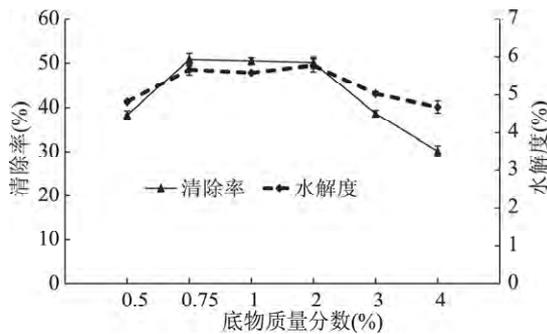


图 2 底物浓度对酶解物水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 Effects of substance concentrations on DH and DPPH free radical scavenging activity of hydrolysates

**2.2.2 酶解时间对水解度及 DPPH 自由基清除率的影响** 酶解时间对水解度和 DPPH 自由基清除能力的影响差异极显著 ( $p < 0.01$ ),结果如图 3 所示。随酶解时间的延长,牡丹籽粕蛋白的水解度先增加,酶解 2.5 h 时达最高值,然后趋于稳定;DPPH 清除率在酶解 2 h 时达最大值为 51.34%,而后随时间的延长清除率反而降低,推测原因可能是由于蛋白酶解过程是逐步进行的,具有 DPPH 自由基清除活性的肽段部分被酶解,导致活性降低。多肽的抗氧化活性在于其含有能与自由基反应的特殊基团,即供氢基

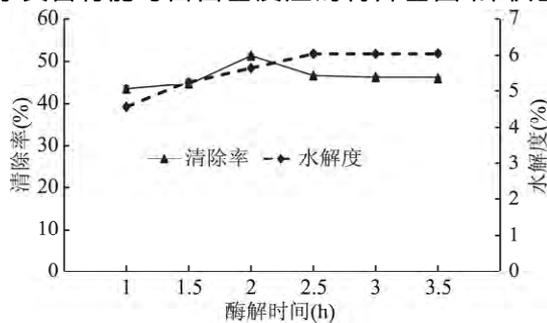


图 3 酶解时间对酶解物水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 Effects of hydrolysis time on DH and DPPH free radical scavenging activity of hydrolysates

团,只有这些多肽在适当的分子量时,这些特定的供氢基团才能够最大限度地接触自由基,从而表现出较强的抗氧化性<sup>[22]</sup>。因此,选择酶解时间 1.5、2、2.5 h 进行响应面分析。

**2.2.3 加酶量对水解度及 DPPH 自由基清除率的影响** 加酶量对水解度和 DPPH 自由基清除能力的影响差异极显著 ( $p < 0.01$ ),结果如图 4 所示。DPPH 自由基清除率随加酶量的增加而增大,当加酶量达到 5% 时,清除率达到最大,之后呈降低趋势。清除率下降的原因可能是过量的酶催化可使具有抗氧化活性的肽段进一步水解,失去活性。因此,选择加酶量 4%、5%、6% 三个水平进行响应面分析。

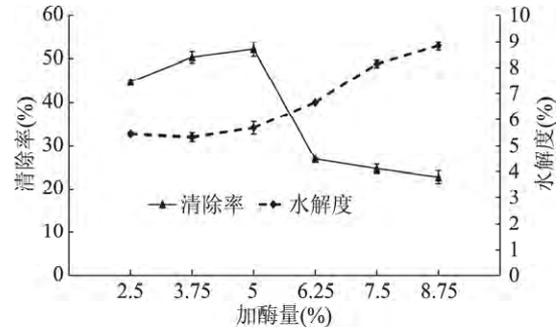


图 4 加酶量对酶解物水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4 Effects of enzyme dosage on DH and DPPH free radical scavenging activity of hydrolysates

**2.2.4 酶解温度对水解度及 DPPH 自由基清除率的影响** 酶解温度对水解度和 DPPH 自由基清除能力的影响差异显著 ( $p < 0.05$ ),结果如图 5 所示。随着温度的升高,酶解物的 DPPH 自由基清除率呈现先增加后降低的趋势,原因可能是温度过高会导致酶活力降低甚至失活<sup>[23]</sup>。在温度为 55 °C 时,清除率达到最高,而此时的水解度却最低为 5.65%;55~65 °C 时,酶解度升高,水解度与清除率的变化趋势不一致。相关研究表明,酶解产物的抗氧化性与水解度有一定的关系,但并不是水解度越高,抗氧化性就越强,相对较高水解度的蛋白水解产物可能含有电子供体物质,可与自由基反应,将其转化为更稳定的产物并终止自由基链反应<sup>[24]</sup>。研究抗氧化肽的工艺条件,我们应以酶解产物的抗氧化性作为响应值,而不能

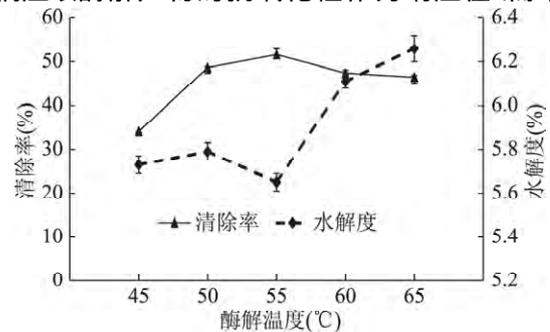


图 5 酶解温度对酶解物水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.5 Effect of temperature on DH and DPPH free radical scavenging activity of hydrolysates

只简单地提高水解度,所以选择 50、55、60 ℃ 三个因素进行响应面分析。

2.2.5 pH 对水解度及 DPPH 自由基清除率的影响 酶解 pH 对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响差异极显著 ( $p < 0.01$ ),结果如图 6 所示。随着 pH 的升高,DPPH 自由基清除率先升高后降低;当 pH8.0~9.0 时,清除率升高较缓慢,在 pH 为 9.0 时达最大。较高 pH 条件下进行酶解,反应体系中需加入较多的 NaOH,NaOH 可与反应过程中生成的酸中和生成盐,使得产品中盐分含量较高,在进行抗氧化活性测定前需增加脱盐工序,造成成本增加。所以,制备活性肽时选用的最适酶解 pH 为 8.0,而不选择 pH9.0 作为响应面分析的因素。

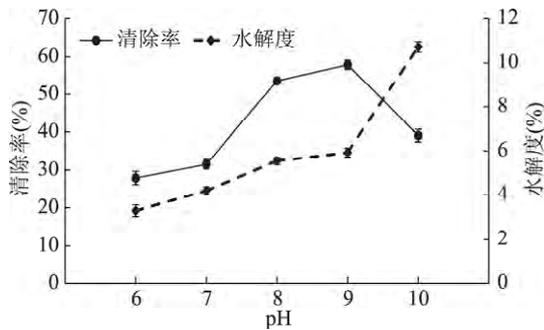


图6 pH对酶解物水解度和DPPH自由基清除率的影响

Fig.6 Effects of pH value on DH and DPPH free radical scavenging activity of hydrolysates

通过上述各单因素对制备活性肽的影响的分析表明,牡丹籽粕蛋白酶解产物的水解度与抗氧化能力之间并不存在线性关系。本实验旨在研究利用牡丹籽粕蛋白制备抗氧化肽的工艺条件。因此,在进行响应面分析时只选用 DPPH 自由基清除率作为响应值。

### 2.3 酶解工艺参数的响应面实验优化

2.3.1 响应模型分析 响应面分析结果见表 3,表中 1~24 号是析因实验,25~29 号是中心实验。29 个实验点分为析因点和零点,其中析因点为自变量,取值在  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  所构成的三维顶点;零点为区域的中心点,零点实验重复 5 次,用以估计实验误差。应用 Design-Expert 8.0 软件对各因素进行回归拟合分析,得到二次多项回归模型为: DPPH 自由基清除率  $Y(\%) = 52.15 - 0.67A - 1.36B + 0.34C - 0.65D - 0.018AB - 0.36AC + 0.62AD - 1.11BC + 0.31BD + 0.023CD - 4.44A^2 - 1.38B^2 - 3.29C^2 - 1.19D^2$ 。

响应面实验中,以水解物的 DPPH 清除率作为工艺优化的指标,结果见表 4。回归模型的  $F$  值为 15.13,具有高度的显著性 ( $p < 0.0001$ ),失拟项  $F$  值为 1.10,具有不显著性 ( $p > 0.05$ ),说明失拟和纯误差相关不显著,存在失拟因素。模型的决定系数  $R^2 = 0.9380$ ,  $R^2_{adj} = 0.8760 > 0.70$ ,响应值(DPPH 自由基清除率)的变化有 93.80% 来自于所选的变量,即酶解时间、底物质量分数、酶解温度和加酶量,说明方程对实验拟合较好。表 4 回归方程各项方差分析表明,因子 B、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  对 Y 值有极其显著的影响 ( $p < 0.01$ ),因子 A、D、BC 对 Y 值有显著影响 ( $p <$

表3 响应曲面法实验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface experiment

实验组别	A	B	C	D	DPPH 自由基清除率 (%)
1	1.5	0.5	55	5	48.54
2	2.5	0.5	55	5	46.04
3	1.5	1.5	55	5	47.00
4	2.5	1.5	55	5	44.43
5	2	1	50	4	47.56
6	2	1	60	4	49.40
7	2	1	50	6	46.23
8	2	1	60	6	48.16
9	1.5	1	55	4	47.76
10	2.5	1	55	4	45.80
11	1.5	1	55	6	45.18
12	2.5	1	55	6	45.71
13	2	0.5	50	5	46.92
14	2	1.5	50	5	46.41
15	2	0.5	60	5	49.96
16	2	1.5	60	5	45.01
17	1.5	1	50	5	45.13
18	2.5	1	50	5	44.97
19	1.5	1	60	5	45.08
20	2.5	1	60	5	43.62
21	2	0.5	55	4	52.69
22	2	1.5	55	4	48.23
23	2	0.5	55	6	50.79
24	2	1.5	55	6	47.58
25	2	1	55	5	52.60
26	2	1	55	5	51.72
27	2	1	55	5	52.89
28	2	1	55	5	50.67
29	2	1	55	5	52.89

0.05)。在选择的实验范围内,可以推断各因子对 DPPH 自由基清除率的影响依次是: B(底物质量分数) > A(水解时间) > D(加酶量) > C(酶解温度)。

2.3.2 两因子交互作用分析 各因子交互作用对 DPPH 自由基清除率的响应面三维和等值线图如图 7 所示。结果表明,在所选范围内存在极值,它是响应曲面的最高点,也是等值线图中最小椭圆的中心。

图 7(A~F)表明,底物质量分数对酶解产物 DPPH 自由基清除率的影响最为显著,曲面较陡;其次是酶解时间和加酶量;酶解温度对其影响最小,曲面平缓。底物质量分数与酶解时间,加酶量与酶解时间,酶解温度与底物质量分数之间的交互作用较为显著,等值线图中呈现椭圆。

2.3.3 最佳酶解条件的预测及验证实验 通过二次多项数学模型进行解析,得出酶解蛋白的最佳工艺条件即底物质量分数 0.7%、加酶量 4.63%、酶解时间 1.95 h、酶解温度 56 ℃、pH8.0。根据实际的操作条件,将酶解牡丹籽蛋白制备抗氧化肽的最佳条件优

表4 二次回归模型的方差分析结果

Table 4 Analysis of variance for quadric regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	208.73	14	14.9	15.13	<0.0001	**
A	5.49	1	5.5	5.57	0.0333	*
B	22.09	1	22.1	22.41	0.0003	**
C	1.34	1	1.3	1.36	0.2631	
D	5.06	1	5.1	5.13	0.0399	*
AB	0.00	1	0.0	0.00	0.9724	
AC	0.42	1	0.4	0.43	0.5233	
AD	1.55	1	1.6	1.57	0.2304	
BC	4.93	1	4.9	5.00	0.0421	*
BD	0.39	1	0.4	0.40	0.5391	
CD	0.00	1	0.0	0.00	0.9645	
A <sup>2</sup>	127.17	1	127.2	129.02	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	12.45	1	12.4	12.63	0.0032	**
C <sup>2</sup>	69.75	1	69.7	70.76	<0.0001	**
D <sup>2</sup>	9.33	1	9.3	9.46	0.0082	**
残差	13.80	14	1.0			
失拟项	10.13	10	1.0	1.10	0.5040	
纯误差	3.67	4	0.9			
总误差	222.53	28				

注: \*\*表示差异极显著( $p < 0.01$ ), \*表示差异显著( $p < 0.05$ )。

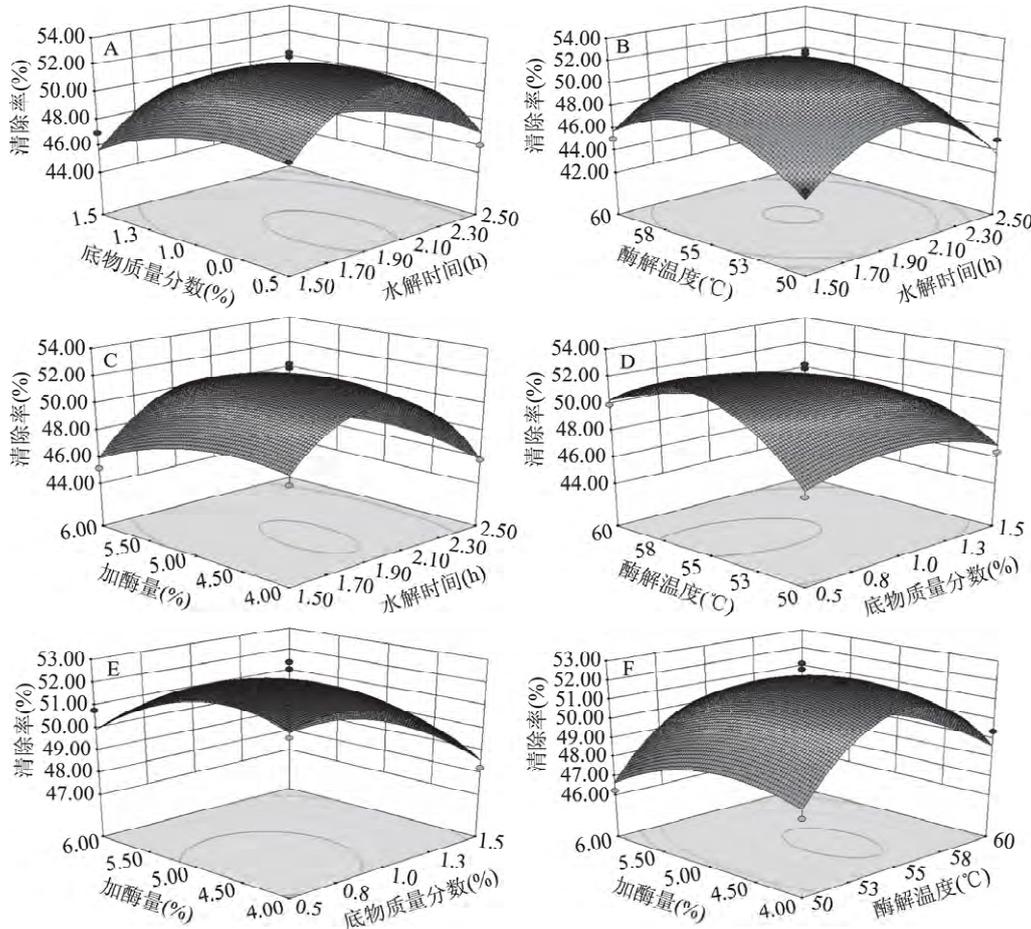


图7 任意两变量交互作用对 DPPH 自由基清除率影响的响应曲面图

Fig.7 Response surface plots for the synergistic effects of any two variables on DPPH radical scavenging activity

化为底物质量分数 0.7%、加酶量 4.60%、酶解时间 2 h、酶解温度 56 °C、pH8.0,在此条件下进行 4 次验证实验,结果测得酶解产物对 DPPH 自由基清除率为(52.49% ± 0.2768%)。通过实验获得的自由基清除率 52.49% 与理论预测值 52.74% 的误差小于 1%,验证了该模型的有效性。

2.3.4 牡丹多肽粉氨基酸组成 通过对牡丹多肽粉进行 17 种水解氨基酸组成分析,可以看出氨基酸种类齐全,其中必需氨基酸含量较高,占总氨基酸量的 32.24%,人体需要量最大的亮氨酸和赖氨酸含量较多,表明牡丹多肽具有较高的营养价值;17 种水解氨基酸中谷氨酸含量最高,胱氨酸的含量最低,是牡丹籽多肽粉的第一限制氨基酸;异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸等必需氨基酸含量占总氨基酸的 32.24%。

表 5 牡丹多肽粉氨基酸组成分析

Table 5 Analysis of amino acid composition of peony peptides

氨基酸种类	质量分数 (%)	氨基酸种类	质量分数 (%)
天门冬氨酸	7.87	酪氨酸	2.11
谷氨酸	18.8	苯丙氨酸	2.75
丝氨酸	3.89	蛋氨酸	1.78
甘氨酸	3.82	赖氨酸	1.54
组氨酸	1.38	苏氨酸	2.46
精氨酸	5.32	异亮氨酸	2.89
胱氨酸	0.88	亮氨酸	5.71
丙氨酸	3.63	缬氨酸	3.90
脯氨酸	3.04		
总氨基酸(TAA)	71.77	EAA/TAA	32.24
必需氨基酸(EAA)	23.14		

### 3 结论

选用 5 种蛋白酶对牡丹籽粕蛋白进行酶解,以蛋白水解度和 DPPH 自由基清除率为指标,筛选确定碱性蛋白酶为水解牡丹籽粕蛋白的最佳酶源,并得出酶解产物的抗氧化性与水解度有一定的关系,但并不是简单的线性关系;水解度越高,抗氧化性不一定越强。通过单因素和响应面法分析优化得到采用碱性蛋白酶水解牡丹籽粕蛋白制备抗氧化肽的最佳条件为:底物质量分数 0.7%、加酶量 4.60%、酶解时间 2 h、酶解温度 56 °C、pH8.0,该条件下通过实验获得的 DPPH 自由基清除率为 52.49%,与理论预测值 52.74% 的误差小于 1%。对制备得到的牡丹多肽粉进行 17 种水解氨基酸组成分析,可以看出氨基酸种类齐全,其中必需氨基酸含量较高,占 32.24%,表明牡丹多肽具有较高的营养价值。该研究利用新食品资源油用牡丹籽粕蛋白作为原料开展制备抗氧化肽的研究,提高了牡丹籽粕的利用率,为牡丹籽粕的精深加工开发利用提供了理论依据。

#### 参考文献

[1]王顺利,任秀霞,薛璟祺,等.牡丹籽油成分、功效及加工工艺的研究进展[J].中国粮油学报,2016,31(3):139-146.

[2]朱献标,翟文婷,董秀勋,等.牡丹籽油化学成分及功能研究进展[J].中国油脂,2014,39(1):88-91.

[3]宋艳秋,吴苏喜,肖志红.牡丹籽蛋白的制备工艺优化及功能性质评价[J].中国油脂,2015,40(7):26-30.

[4]李加兴,房惠芳,陈选,等.牡丹籽粕蛋白提取工艺优化及其等电点分析[J].食品与机械,2014,30(3):147-150.

[5]庞雪飞,何东平,胡传荣,等.牡丹籽蛋白功能特性的研究[J].中国粮油学报,2014,29(7):45-48.

[6]刘柏华,殷钟意,郑旭煦,等.超声波对牡丹籽粕蛋白质碱提取工艺及氨基酸组成的影响[J].食品与发酵工业,2015,41(9):215-219.

[7]Marcuse R. Antioxidative effect of amino-acids [J]. Nature, 1960, 186(4728):886-887.

[8]陈丽,张瑜,谭亦成,等.响应面法优化锐孔法制备大米抗氧化肽微胶囊工艺[J].食品科学,2014,35(22):97-103.

[9]Shavandi A, Hu Z, Teh S S, et al. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent [J]. Food Chemistry, 2017, 227: 194-201.

[10] Garciamora P, Martínmartínez M, Angeles B M, et al. Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities [J]. Food Chemistry 2017 221:464.

[11]丁顺杰,罗金凤,丁晓雯,等.酶解缬丝蚕蛹蛋白抗氧化肽的分离与稳定性研究[J].食品科学,2015,36(3):35-40.

[12]Chen H M, Muramoto Koji, Yamauchi Fumio, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1996, 44(9): 2619-2623.

[13]王瑞雪,孙洋,钱芳.抗氧化肽及其研究进展[J].食品科技,2011,36(5):83-86.

[14]韩扬,马媛,王昌涛,等.牡丹籽蛋白酶解工艺条件的研究[J].食品工业科技,2009,30(10):250-256.

[15]庞雪凤,何东平,胡传荣,等.不同水解度牡丹籽蛋白氨基酸组成及营养评价[J].食品工业,2014,35(11):288-292.

[16]武萌萌.螺旋藻抗氧化多肽的制备及活性研究[D].北京:北京林业大学,2010.

[17]Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food protein [M]. New York: Elsevier Applied Science, 1986.

[18]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 & Analysis, 2006, 19(6-7):669-675.

[19]于丽娜,高俊安,杨庆利,等.酶解花生蛋白制备功能性短肽条件优化研究[J].食品科学,2012,33(11):104-109.

[20]Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(7):2467-2474.

[21]赵立娜,汪少芸,饶平凡,等.茶渣蛋白的提取、有限酶解及抗氧化性研究[J].中国食品学报,2012,12(2):53-59.

(下转第 180 页)

2.3.3 羟自由基清除能力 如图8,随着多糖浓度的增加,对羟自由基的清除率随之增加。在1~3 mg/mL范围里,增加较为快速,在3~5 mg/mL范围内,羟自由基清除率增加缓慢。当浓度为5 mg/mL,羟自由基清除率49.2%。其 $IC_{50}$ 值为6.38 mg/mL。

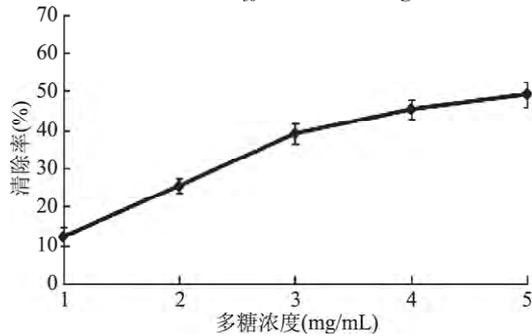


图8 黄秋葵超微粉多糖对羟自由基的清除率  
Fig.8 Scavenging rate of  $\cdot OH$  of polysaccharides from superfine powder of okra

2.3.4 还原力的测定 由图9可得,黄秋葵超微粉多糖具有较强的还原力,随着多糖浓度的增加其还原力越强。在1~5 mg/mL范围内增长趋势接近于线性增加。在5 mg/mL时,多糖还原力高达0.995。其 $IC_{50}$ 值为2.49 mg/mL。

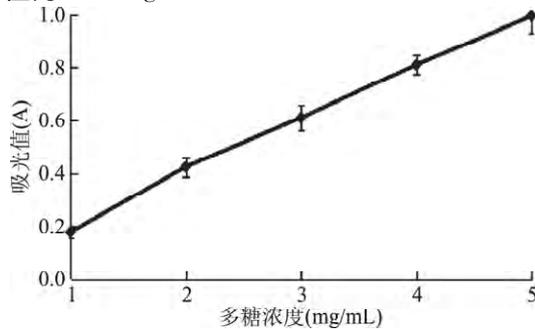


图9 黄秋葵超微粉多糖的还原力测定  
Fig.9 Determination of reducing force of polysaccharides from superfine powder of okra

### 3 结论

采用响应面法对黄秋葵超微粉多糖提取条件进行优化,建立了黄秋葵超微粉多糖得率与微波时间、超声波时间、超声波功率这三种因素的二次多项回归模型。由该模型优化的多糖提取条件为料液比1:100 (g:mL)、微波时间2 min、超声波时间14 min、超声波功率800 W。经验证,得到的实际测定值为(27.68% ± 0.42%)。说明该模型能较好的预测实际得率,用响应面法对黄秋葵超微粉中多糖提取条件进行优化准确可行。抗氧化活性实验表明黄秋葵超微粉多糖对DPPH自由基、超氧阴离子自由基、羟自

由基均有一定的清除能力并且具有较强的还原能力。多糖在四种体系中的 $IC_{50}$ 值分别是1.53、4.12、6.38和2.49 mg/mL,说明黄秋葵超微粉多糖具有较好的抗氧化活性。

### 参考文献

- [1] Sengkhampan N, Sagis LM, Vries RD, et al. Physicochemical properties of pectins from okra [J]. Food Hydrocolloids, 2010, 4 (1): 35-41.
- [2] 任丹丹, 陈谷. 响应面法优化黄秋葵多糖超声提取工艺 [J]. 食品科学, 2011, 32(8): 143-146.
- [3] 程旺开, 许月明. 响应面优化黄秋葵叶多糖的提取工艺及其抗氧化活性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017(4): 38-42.
- [4] 宋思圆, 苏平. 黄秋葵花果胶多糖的超声提取工艺优化及其体外抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2017, 38(2): 283-289.
- [5] 邹林武, 赵谋明. 香菇多糖提取工艺的优化及其抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(19): 177-182.
- [6] 岳凤丽, 陈庆敏, 于克学, 等. 微波辅助提取超微木木耳多糖的工艺优化 [J]. 食品研究与开发, 2014, 22(9): 13-17.
- [7] 王晓炜, 程光宇. 超微粉碎和普通粉碎对柳松菇多糖的提取及凝胶柱层析分离的研究 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2006, 29(1): 66-70.
- [8] 张圣杰, 陈相艳, 李文香, 等. 超声联合超微粉碎法提取金针菇多糖新探究 [J]. 食品工业, 2014, 35(4): 101-104.
- [9] 邱志敏, 芮汉明. 微波辅助提取枸杞多糖的工艺优化及其抗氧化性研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 220-223.
- [10] Yang Z, Zhai W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.) [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(1): 169-176.
- [11] 朱晓君, 安辛欣, 顾丽, 等. 超声辅助同时提取条斑紫菜多糖及藻胆蛋白工艺的优化 [J]. 食品科学, 2008, 29(5): 241-244.
- [12] 刘航, 国旭丹, 马雨洁, 等. 超声波辅助提取苦荞麦多糖工艺优化及其体外抗氧化研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(14): 45-50.
- [13] Pérez - Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results [J]. Food Research International, 2008, 41(3): 274-285.
- [14] 曹楠楠, 陈香荣, 吴艳. 苦豆子多糖的超声波提取工艺优化及理化性质研究 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 209-214.
- [15] 王振宇, 孙芳, 刘荣. 微波辅助提取松仁多糖的工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(9): 133-135.
- [16] 张君萍, 侯喜林, 董海艳, 等. 响应曲面法优化超声波提取洋葱籽多糖工艺 [J]. 食品科学, 2011, 30(2): 99-102.
- [17] 食品科学, 2016, 37(1): 133-138.
- [18] Jamdar S N, Rajalakshmi V, Pednekar M.D., et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 178-184.

(上接第174页)

[22] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidant properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(1): 49-53.

[23] 贾韶千, 李艳霞. 黄鳝鱼骨多肽制备及其抗氧化活性