

朱淑云,段笑园,徐 琴,等. 酶解程度对水飞蓟蛋白理化特性的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):346-348.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.108

# 酶解程度对水飞蓟蛋白理化特性的影响

朱淑云,段笑园,徐 琴,梁小英

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

**摘要:**研究了不同酶解程度对水飞蓟蛋白理化特性(包括氨基酸组成、相对分子质量、溶解性、乳化性、乳化稳定性)的影响。结果表明:水飞蓟蛋白进行不同酶解处理后,氨基酸组成发生了变化,一些抗氧化氨基酸的含量提高,相对分子质量变小,酶解物的溶解性提高,持油性呈现先升高后降低的趋势,其中水解度 5% 的持油性最好,酶解物的乳化性和乳化稳定性都较酶解前有所提高。本研究结果为水飞蓟蛋白的改性提供了一定的数据支持。

**关键词:**水飞蓟蛋白;酶解程度;理化特性;氨基酸组成

**中图分类号:**TS201 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0346-02

水飞蓟是一种传统的药用植物,其药用成分水飞蓟素主要存在于水飞蓟籽壳中,其籽仁中主要含有蛋白质、油脂和淀粉等物质<sup>[1]</sup>。研究发现,水飞蓟籽仁脱脂粉中蛋白质含量高达 47.23%,水飞蓟蛋白以清蛋白为主,其氨基酸种类齐全,是一种优质的植物蛋白<sup>[2-3]</sup>。然而目前国内外学者对水飞蓟的研究主要集中在对水飞蓟素的开发利用上,对水飞蓟蛋白的研究较少<sup>[4-6]</sup>。若对水飞蓟蛋白进行深入开发研究,必将显著提高水飞蓟加工的附加值。蛋白质可通过物理、化学和蛋白酶法对其进行改性。利用蛋白酶限制性的水解蛋白来提高蛋白质的功能特性,具有作用条件温和,不破坏氨基酸结构,产生有害物质的可能性小,安全性高等优点,而且通过酶解产生的小分子物质更易被人体消化吸收,因此利用酶法对蛋白质进行改性已经成为当今最重要的蛋白质改性技术。目前国内研究蛋白酶解改性主要集中在蛋白酶的选择与酶解工艺的优化,有少数研究是针对酶解程度对产物理化特性的影响<sup>[7-9]</sup>,但是酶解程度对水飞蓟蛋白理化特性的影响尚未见研究报道。因此,本研究拟通过中性蛋白酶酶解水飞蓟蛋白,考察不同酶解程度下水飞蓟蛋白的氨基酸组成及理化性质的变化,以期对水飞蓟蛋白的改性以及水飞蓟活性肽的开发与利用提供理论依据和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

水飞蓟蛋白:自制;中性蛋白酶:无锡杰能科酶制剂公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

ALPHA1-4/2-4 型冷冻干燥机:德国 CHRIST 公司;Agilent 1100 液相色谱:美国安捷伦公司;WFJ200 可见分光光度计:尤尼柯上海仪器有限公司。

收稿日期:2014-12-11

基金项目:江苏省镇江市农业科技支撑项目(编号:NY2012031);江苏大学大学生科研立项资助项目(编号:13A109);江苏大学大学生实践创新训练项目(编号:201410299169W)。

作者简介:朱淑云(1975—),女,山东青岛人,博士,副教授,主要从事食品生物技术研究工作。E-mail:shyzyhu@eyou.com。

### 1.3 方法

**1.3.1 水飞蓟蛋白的限制性酶解方法** 将水飞蓟蛋白配制成一定浓度的溶液,调节 pH 值和温度,加入适量的中性蛋白酶进行酶解。反应过程中不断加入 0.5 mol/L NaOH 溶液保持反应体系的 pH 值恒定。当达到预期水解度时,将反应液置于 90 ℃ 保温灭酶,4 000 r/min 离心 20 min,上清液经浓缩后冷冻干燥即得蛋白酶解物。

**1.3.2 水飞蓟蛋白水解度的测定** 采用 pH-stat 法测水解度(DH)<sup>[10]</sup>。

**1.3.3 氨基酸组成的测定** 采用酸水解法。

**1.3.4 分子质量分布的测定** 采用高效液相色谱法。

**1.3.5 溶解性的测定** 采用考马斯亮蓝比色法。准确称取 0.20 g 样品溶于 20 mL 蒸馏水中,分别调节 pH 值至 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0,室温搅拌 30 min,然后 4 000 r/min 离心 20 min,取 1.0 mL 上清液测定蛋白质含量。溶解度以上清液中蛋白质含量占体系中蛋白总量的百分比表示。

**1.3.6 持油性和乳化性的测定** 按参考文献[11]的方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶解程度对水飞蓟蛋白氨基酸组成的影响

由表 1 可知,不同酶解程度的水飞蓟蛋白酶解物都富含谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸、亮氨酸和丝氨酸等氨基酸,随着酶解程度的提高,各氨基酸的含量都有所变化,其中一些抗氧化氨基酸(组氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸)的含量都较酶解前有所提高,其中甲硫氨酸的含量增加最显著,它们应该是酶解物具有抗氧化活性的重要物质基础,在一定程度上影响着不同酶解程度的酶解产物的抗氧化活性。

### 2.2 酶解程度对水飞蓟蛋白相对分子质量的影响

由表 2 可知,随着酶解程度的增大,相对分子质量大于 1 000 u 的肽段的含量逐渐减少,小于 1 000 u 的肽段含量则逐渐增加。在 180~1 000 u 范围的组分含量由 DH5% 时的 47.13% 提高到了 DH15% 时的 57.02%。大量研究证明:抗氧化肽多是分子质量 < 1 000 u 的寡肽<sup>[12]</sup>,因此,通过比较不同酶解度酶解产物的相对分子质量分布,有助于解释其所具有的抗氧化活性的差异。

表 1 不同酶解度酶解产物的氨基酸组成和含量

氨基酸	含量(%)			
	DH0%	DH5%	DH10%	DH15%
天冬氨酸	10.32	9.69	9.62	9.78
谷氨酸	20.54	19.87	20.19	20.40
组氨酸	2.06	2.90	2.84	2.74
精氨酸	10.14	10.66	10.72	10.81
赖氨酸	4.59	4.52	4.57	4.68
丙氨酸	4.73	4.68	4.73	4.73
缬氨酸	5.54	5.49	5.52	5.52
甲硫氨酸	0.67	1.29	1.26	1.74
苯丙氨酸	4.86	4.68	4.73	4.42
异亮氨酸	4.73	4.68	4.57	4.73
亮氨酸	7.16	7.11	7.10	7.26
脯氨酸	4.19	4.04	4.10	4.42
丝氨酸	5.77	5.17	5.05	5.23
苏氨酸	4.46	4.20	4.26	4.22
半胱氨酸	0.94	0.97	0.95	1.01
甘氨酸	5.81	5.82	5.68	5.73
酪氨酸	3.55	4.20	4.10	4.22

表 2 不同酶解度酶解产物的相对分子质量的分布

相对分子质量	分布(%)		
	DH5%	DH10%	DH15%
>3 000	10.66	9.24	9.30
3 000 ~ 1 000	18.61	13.18	10.17
1 000 ~ 180	47.13	52.32	57.02
<180	23.61	23.26	23.60

## 2.3 酶解程度对水飞蓟蛋白溶解性的影响

水飞蓟蛋白及其水解物的溶解度见图 1。从图 1 可见,水飞蓟蛋白具有典型的溶解度曲线,其在 pH 值 5 左右具有最低的溶解度。水解物呈现出与蛋白完全不一样的溶解度曲线,3 种水解物在 pH 值 5 左右的低溶解性区域已消失,在所有测定的 pH 值范围内,水解物都具有较高的溶解性,不同水解度的水解物之间的溶解性也呈现出一定差异,随着水解度增大,各个 pH 值下的溶解性略有增高。

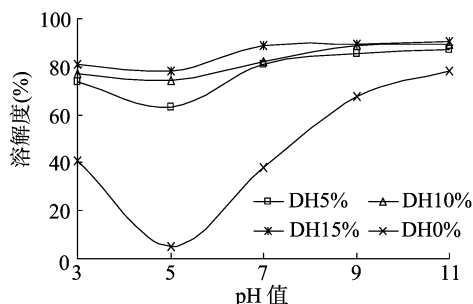


图1 不同酶解度酶解产物的溶解度曲线

## 2.4 酶解程度对水飞蓟蛋白持油性的影响

由图 2 可知,随着水解度的增大,酶解物的持油性逐渐降低。其中 DH5% 的水解物的持油性最好,比水飞蓟蛋白的持油性提高了 33% 左右,这可能是由于低度水解时,蛋白分子结构改变,分子中疏水基团暴露,使水解物的吸油性显著提高。但随着水解度的增大,多肽链被降解成更短的肽段,电荷的数量增加,极性增强,亲水基团增加,不利于形成蛋白质凝胶网络结构,导致吸油性降低<sup>[10]</sup>。

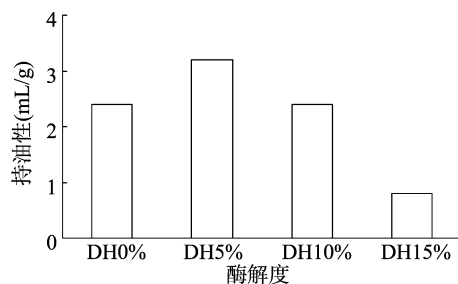


图2 不同酶解度酶解产物的持油性

## 2.5 酶解程度对水飞蓟蛋白乳化性及乳化稳定性的影响

由图 3 可知,在有限水解范围内,中性蛋白酶水解产物比水飞蓟蛋白具有更好的乳化性,由于水解使蛋白质分子变小,构象发生了改变,一些包埋于蛋白质内部的疏水性残基暴露出来,利于其向水油界面扩散降低界面张力,同时水解后的肽分子更易定位于水油界面,所以酶解物的乳化活性较蛋白有一定的提高。由图 4 可知,水解物的乳化稳定性都高于水飞蓟蛋白,但随着水解度的增大酶解物的乳化稳定性逐渐降低,其中 DH5% 的水解物的乳化稳定性最高。可能是由于水解度的进一步提高,使更多极性基团暴露,包裹在油滴表面的肽段越来越小,使油滴表面的保护层越来越薄,最终导致了乳化稳定性的降低。

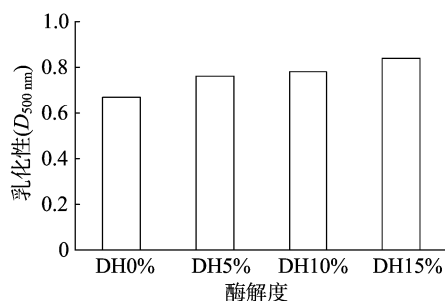


图3 不同酶解度酶解产物的乳化性

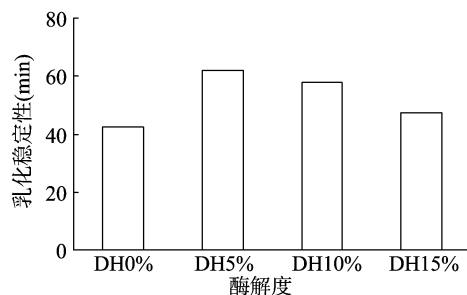


图4 不同酶解度酶解产物的乳化稳定性

## 3 结论

本研究比较了水解程度对水飞蓟蛋白氨基酸组成和理化性质的影响。研究发现水飞蓟蛋白经水解以后,各种氨基酸的含量都有所变化,特别是一些抗氧化氨基酸的含量都较酶解前有所提高;水解使水飞蓟蛋白的相对分子质量发生了变化,随着水解度的提高,相对分子质量较小的肽段逐渐增加;水解产物的溶解性显著提高;水解产物的乳化性和乳化稳定性都较水飞蓟蛋白有所提高,深度水解后的乳化稳定性有所下降。

谢宇奇, 零学仕, 周作树, 等. 枫香树叶黑色素粗产品提取工艺的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 348–351.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.109

# 枫香树叶黑色素粗产品提取工艺的优化

谢宇奇<sup>1</sup>, 零学仕<sup>2</sup>, 周作树<sup>1</sup>, 莫春风<sup>1</sup>, 奚文权<sup>1</sup>

(1. 百色学院化学与生命科学系, 广西百色 533000; 2. 广西南宁市环境监察支队, 广西南宁 530021)

**摘要:**以枫香树叶为原料提取黑色素粗产品。在单因素试验的基础上应用 Box-Behnken 中心组合设计建立数学模型, 以提取得率作为响应值, 对提取剂浓度、料液比、提取时间等 3 个主要影响因素进行响应面法分析, 得到枫香树叶黑色素提取的优化工艺条件。结果表明, 3 个因素对枫叶黑色素提取得率影响由大到小依次为料液比、乙醇浓度、提取时间, 最优提取工艺参数为乙醇浓度 40%、料液比 1 g : 40 mL、最佳提取时间 4 h, 此条件下初步干燥的枫香树叶黑色素粗产品的提取得率为 41.47%。

**关键词:**枫香树叶; 黑色素; 优化; 提取工艺; 工艺参数; 响应面分析法

**中图分类号:** R284.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0348-04

黑色素是广泛存在于动植物和微生物界的保护性色素<sup>[1-2]</sup>。天然黑色素具有抗病毒、抗辐射和提高免疫力等多种功效, 能抑制艾滋病病毒复制<sup>[3]</sup>、解蛇毒<sup>[4]</sup>, 还能治疗老年性痴呆症、帕金森症等与黑色素缺乏相关的神经系统疾病<sup>[5]</sup>。天然黑色素虽然存在较为广泛, 但是由于染色工序相对复杂, 染色效果不稳定、生产成本高等原因, 违规添加人工合成色素, 制造有毒“黑色”食品的现象时有发生, 存在致病安全隐患。从不同来源提取天然黑色素已经成为研究热点。人们已成功从黑米<sup>[6]</sup>、黑木耳<sup>[7]</sup>、花椒籽<sup>[8]</sup>等天然食品中提取出黑色素。枫香树(*Liquidambar formosana* Hance) 叶中含有丰富的花色苷类黑色素, 具有有祛风湿、行气、解毒等功效<sup>[9]</sup>, 常用于治疗疮疖肿痛及外伤出血等症<sup>[10-11]</sup>, 在药用研

究方面有重要开发价值<sup>[12-13]</sup>。我国壮族、黎族等少数民族利用枫香树叶黑色素染制黑色糯米饭有着悠久的历史, 其安全性和药用功效得到了长期检验, 是制取天然黑色素的理想原料。目前, 枫香树叶黑色素的提取工艺鲜见报道<sup>[14-16]</sup>。本试验以枫香树叶为原料, 采用响应面分析法优化提取工艺, 从而为枫香树叶黑色素的开发利用提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验材料和试剂 枫香树叶样品: 采集于广西壮族自治区百色市右江区, 洗净后经 60 ℃ 干燥, 粉碎备用; 无水乙醇、石油醚、盐酸、乙酸乙酯、丙酮等药品均为国产 AR 级。

1.1.2 仪器与设备 UA-2700 型分光光度计(日本岛津公司); TGL-16M 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(河南郑州市世纪双科实验仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 枫香树叶黑色素提取工艺流程 提取工艺流程: 新鲜

收稿日期: 2014-10-24

基金项目: 广西高校科学技术研究项目(编号: LX2014441)。

作者简介: 谢宇奇(1979—), 男, 壮族, 广西靖西人, 硕士, 高级实验师, 主要从事天然产物化学及化学分析研究。E-mail: xiekey@sina.com。

## 参考文献:

- [1] 袁丹, 张国峰, 王瑞杰. 水飞蓟果实、果皮及其提取物质量评价法的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(2): 119–122, 131.
- [2] 陈毓荃, 王春梅. 水飞蓟综合利用基础研究 II. 果实油脂和蛋白质[J]. 西北农业学报, 1998, 7(1): 84–86.
- [3] 朱淑云, 董英, 陈晓东, 等. 水飞蓟粕蛋白氨基酸组成及加工功能特性研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(8): 71–74, 83.
- [4] Charrier C, Azerad R, Marhol P, et al. Preparation of silybin phase II metabolites; Streptomyces catalyzed glucuronidation[J]. Journal of Molecular Catalysis B – Enzymatic, 2014, 102: 167–173.
- [5] Balszuweit F, John H, Schmidt A, et al. Silibinin as a potential therapeutic for sulfur mustard injuries[J]. Chemico-Biological Interactions, 2013, 206(3): 496–504.
- [6] Sadava D, Kane Susan E. Silibinin reverses drug resistance in human small-cell lung carcinoma cells[J]. Cancer Letters, 2013, 339(1):

- 102–106.
- [7] Zhao G L, Liu Y, Zhao M M, et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1438–1443.
- [8] 刘远洋, 顾炜, 郭健, 等. 酶解程度对花生蛋白理化性质及功能特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(2): 27–31.
- [9] Wang J S, Su Y J, Jia F, et al. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis[J]. Chemistry Central Journal, 2013, 7(1): 62.
- [10] 王素雅, 刘胜, 鞠兴荣, 等. 中性蛋白酶限制性水解对高温菜籽粕蛋白功能性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 56–59.
- [11] 朱淑云, 董英, 肖香, 等. 水飞蓟蛋白组分的理化特性研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(10): 15–20.
- [12] Zambrowicz A, Timmer M, Polanowski A, et al. Manufacturing of peptides exhibiting biological activity[J]. Amino Acids, 2013, 44(2): 315–320.