

王攀,范娜. 木瓜蛋白酶酶解核桃饼粕制备抗氧化多肽的研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):238-241.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.054

# 木瓜蛋白酶酶解核桃饼粕制备抗氧化多肽的研究

王攀,范娜

(商洛学院生物医药与食品工程学院,陕西商洛 726000)

**摘要:**以核桃饼粕为原料,研究优化木瓜蛋白酶酶解核桃饼粕制备抗氧化活性多肽的工艺条件。通过研究酶解温度、酶解时间、底物浓度、酶添加量以及酶解 pH 值对酶解产物抗氧化活性的影响,正交优化酶解工艺参数,并将酶解物利用葡聚糖凝胶层析柱进行分离,测定其抗氧化活性。结果表明,当木瓜蛋白酶在酶解温度为 60 ℃、酶解时间为 3.5 h、底物浓度为 2.5 g/100 mL、加酶量为 6 500 U/g、pH 值为 6.5 的酶解条件下,酶解物的抗氧化活性较好,酶解液对二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)和羟基自由基的清除率分别为 52.24% 和 53.20%;酶解液经葡聚糖凝胶层析柱分离,酶解物分离多肽的分子量越大,抗氧化活性越低。

**关键词:**核桃饼粕;木瓜蛋白酶;抗氧化活性;生物活性肽

**中图分类号:**TS209 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)11-0238-04

核桃营养价值较高,含有丰富的油脂和蛋白质,在工业生产中常被作为榨油用料<sup>[1]</sup>,核桃饼粕是核桃油深加工的副产物<sup>[2]</sup>,大多作为动物饲料,目前对其利用具有一定的局限性,主要集中于蛋白质与多肽的开发方面<sup>[3]</sup>。虽然核桃饼粕中蛋白质含量高达 30%~50%<sup>[4]</sup>,但核桃蛋白溶解性较低<sup>[5]</sup>,限制了食品加工中核桃蛋白的利用<sup>[6]</sup>。近年来,对核桃饼粕的深加工已逐步开展起来,主要是利用核桃饼粕制备核桃多肽<sup>[7]</sup>,核桃多肽不仅具有良好的溶解性,而且还具有易消化

吸收、促进微生物发酵以及抗氧化等生理活性<sup>[6]</sup>。抗氧化肽是一种具有抗氧化活性的生物活性肽,具有清除体内自由基的功能,是一种潜在的、可以利用的外源性抗氧化物质<sup>[8]</sup>,且采用酶水解核桃蛋白可以制得具有抗氧化活性的生物活性肽<sup>[9]</sup>。本研究主要以核桃饼粕为原料,通过研究酶解温度、酶解时间、底物浓度、酶添加量以及酶解 pH 值等因素对木瓜蛋白酶酶解核桃饼粕产物抗氧化活性的影响,正交优化酶解工艺参数,并对酶解物利用葡聚糖凝胶层析柱进行分离,考察分离物的抗氧化活性,以期对核桃饼粕抗氧化活性多肽的制备提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验材料与试剂 核桃饼粕,购自洛南食品加工厂;木瓜蛋白酶(酶活性 100 000 U/g),购自南宁宏博生物工程有限公司;DPPH,购自 Sigma 公司;无水乙醇、乙醚、氢氧化钠、

收稿日期:2018-03-09

基金项目:陕西省农业科技创新与攻关项目(编号:2016NY-147);

商洛学院服务地方经济社会发展专项(编号:2015SKY-FWDF004)。

作者简介:王攀(1983—),男,陕西宝鸡人,硕士,讲师,主要从事农产品综合利用及新产品开发。Tel:(0914)2398182;E-mail:w1p2004@163.com。

## 参考文献:

- [1]姜程曦,张铁军,陈常青,等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中草药,2017,48(1):1-16.
- [2]柳威,林懋怡,刘晋杰,等. 滇黄精研究进展及黄精研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14):226-234.
- [3]王慧,袁德培,曾楚华,等. 黄精的药理作用及临床应用研究进展[J]. 湖北民族学院学报(医学版),2017,34(2):58-60,64.
- [4]王文君,向灿辉,刘成红. 黄精总黄酮的提取与性质分析[J]. 食品工业,2014,35(10):258-262.
- [5]吴丁丁,穆小静,易小琦,等. 双水相萃取技术的新发展[J]. 食品工业科技,2017,38(8):395-400.
- [6]Xavier L, Sonia Freire M, Vidal - Tato I A. Aqueous two - phase systems for the extraction of phenolic compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology,2014,89(11):1772-1778.
- [7]Pimentel M, Araujo A I, Figueiredo Z, et al. Aqueous two - phase

system for citrinin extraction from fermentation broth[J]. Separation and Purification Technology,2013,110(23):158-163.

- [8]裴志胜,薛长风,王晋伟,等. 鲮鱼鱼脑乙酰胆碱酯酶的双水相萃取[J]. 食品科技,2017,42(3):264-267.
- [9]李越山,徐艳阳,史爱莹,等. 响应面法优化黑豆酯酶的双水相萃取工艺[J]. 食品科技,2015,40(7):233-239,244.
- [10]Tabaraki R, Nateghi A. Optimization of ultrasonic - assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology[J]. Ultrasonics Sonochemistry,2011,18(6):1279-1286.
- [11]吴德智,郑强,李安,等. 缬草总黄酮超声辅助双水相提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械,2017,33(5):162-167.
- [12]许海棠,赵彦芝,张金彦,等. 响应面法提取瓶尔小草总黄酮及其抗氧化活性[J]. 食品科技,2017,42(2):215-220.
- [13]周婧,李钢,徐静. 红海榄不同部位总酚和总黄酮含量分析及抗氧化活性研究[J]. 食品科技,2017,42(6):220-224.

盐酸、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、 $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液、邻二氮菲均为分析纯。

1.1.2 试验设备 FA1004 型电子分析天平,购自北京赛多利斯仪器系统有限公司;755B 型紫外可见分光光度计,购自上海精密科学仪器有限公司;TDL-40B 型低速台式离心机,购自上海安亭科学仪器厂;HH-4 型电热恒温水浴锅,购自北京科伟永兴仪器有限公司;UV-1100 型紫外可见分光光度计,购自上海美析仪器有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 核桃蛋白的制备 将 10 g 核桃饼粕溶解在 100 mL 磷酸缓冲液(pH 值为 7.5~10.0)中,调节温度至 60 ℃,并用 NaOH 溶液(3.5 mol/L)调节 pH 值至 8.5~9.0,在溶解过程中不断搅拌 1 h,冷却后,4 000 r/min 离心 20 min,取上清液,用 HCl(1 mol/L)将 pH 值调至 4.0~5.0,静置 30 min,4 000 r/min 离心 20 min,取沉淀低温干燥或风干,得核桃蛋白,备用<sup>[10]</sup>。

1.2.2 核桃多肽液的制备 取 3 g 核桃蛋白溶于 100 mL 水中,在 60 ℃ 水浴锅中保温 30 min,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 6.5,并维持 pH 值和温度恒定,加入 7 000 U/g 木瓜蛋白酶,酶解 4 h 后,沸水浴灭酶 10 min,迅速冷却后,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用<sup>[11]</sup>。

1.2.3 单因素试验 利用木瓜蛋白酶按照“1.2.2”节的方法酶解核桃饼粕,并固定其他条件,分别单一改变其中酶解温度(50、55、60、65、70 ℃)、底物浓度(2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 g/100 mL)、酶添加量(6 000、6 500、7 000、7 500、8 000 U/g)、酶解时间(3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 h)、酶解 pH 值(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5),获得酶解液,考察核桃饼粕酶解物的抗氧化活性。

1.2.4 正交试验 在单因素的基础之上,选择 4 个影响较大的因素进行正交试验,对木瓜蛋白酶酶解核桃蛋白制备抗氧化多肽的工艺参数进行优化。

## 1.3 测定方法

1.3.1 清除二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)能力的测定 配制 0.02 mol/L DPPH 溶液,取 2 mL 置于试管中,加入 2 mL 无水乙醇摇匀,避光静置 30 min,用无水乙醇作参比,在 517 nm 下测定吸光度,记为  $D_1$ ;另将 2 mL 酶解液与 2 mL 0.02 mol/L DPPH 溶液充分混合,避光静置 30 min,并以 2 mL 酶解液与 2 mL 无水乙醇混合作为参比测定其吸光度,记为  $D_2$ <sup>[12-14]</sup>。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{清除率} = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 100\%。$$

1.3.2 清除羟基自由基(·OH)能力的测定 采用邻二氮菲- $\text{Fe}^{2+}$ 氧化法<sup>[12-15]</sup>测定核桃饼粕酶解物清除羟基自由基的能力。(1)吸取 15 mmol 邻二氮菲应用液 1 mL 放于试管中,先加入 pH 值为 7.5 的磷酸缓冲液 2 mL 以及 1 mL 的蒸馏水,充分振荡后加入 0.75 mmol/L 硫酸亚铁溶液 1 mL,立刻混匀,最后加入 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 1 mL,室温下静置 1 h。在波长为 536 nm 处测定吸光度,记为  $D_b$ ;(2)同上,用 1 mL 蒸馏水代替(1)中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液,在波长为 536 nm 处测定吸光度,记为  $D_c$ ;(3)用 1 mL 酶解液代替(1)中的蒸馏水,在波长为 536 nm 处测定吸光度,记为  $D_a$ ;羟基自由基清除率计算公式

如下:

$$\text{清除率} = \frac{D_a - D_b}{D_c - D_b} \times 100\%。$$

1.3.3 Sephadex G-50 层析分离核桃蛋白 层析条件如下:层析柱中凝胶为葡聚糖凝胶 G-50;柱床体积为 1.6 cm × 60.0 cm;上样量为 2 mL;流速为 0.16 mL/min;缓冲液为去离子水;柱温为室温(25 ℃左右)。

用去离子水调节流速,冲洗凝胶柱,待柱平衡后,取正交试验最优酶解条件下所得的核桃饼粕蛋白多肽液 2 mL 进行上样,每小时收集 1 管,测定其抗氧化活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 酶解温度对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响 由图 1 可知,木瓜蛋白酶酶解温度对核桃饼粕酶解物的抗氧化活性有一定的影响。随酶解温度的升高,核桃饼粕酶解物的抗氧化活性整体呈现先增后减的趋势,当酶解温度为 60 ℃ 时,DPPH 自由基和羟基自由基清除率都达到最高,但随着酶解温度的继续升高,抗氧化活性逐渐降低,这主要是由随温度的继续升高,木瓜蛋白酶的活性在高温下逐渐降低所致。

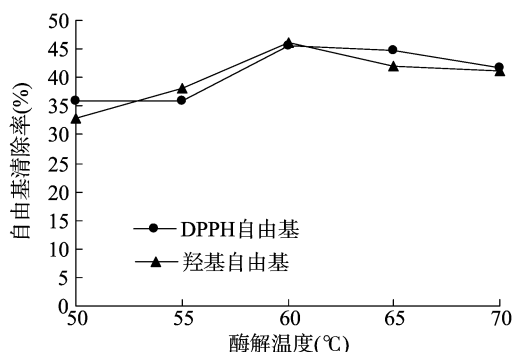


图1 酶解温度对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响

2.1.2 底物浓度对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响 由图 2 可知,木瓜蛋白酶酶解底物浓度对核桃饼粕酶解物的抗氧化活性有一定的影响。当底物浓度为 2.0~2.5 g/100 mL 时,随底物浓度的增加,核桃饼粕酶解物的抗氧化活性逐渐增强,当底物浓度为 2.5 g/100 mL 时,DPPH 自由基和羟基自由基清除率都达到最高,但随底物浓度的进一步增大,核桃饼粕酶解物的抗氧化活性基本稳定。

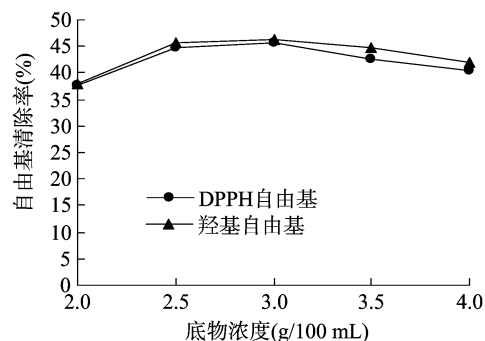


图2 底物浓度对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响

2.1.3 酶添加量对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响 由图 3 可知,木瓜蛋白酶添加量对核桃饼粕酶解物抗氧化活性

有明显的影响,随酶添加量的增大,核桃饼粕酶解物对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除率均呈现先增后减的趋势,且核桃饼粕酶解物对 DPPH 自由基清除率明显低于羟基自由基。当酶添加量为 7 000 U/g 时,DPPH 自由基和羟基自由基清除率都达到最高,但当酶添加量在 6 500~7 000 U/g 范围内时,核桃饼粕酶解物的抗氧化活性变化不大。

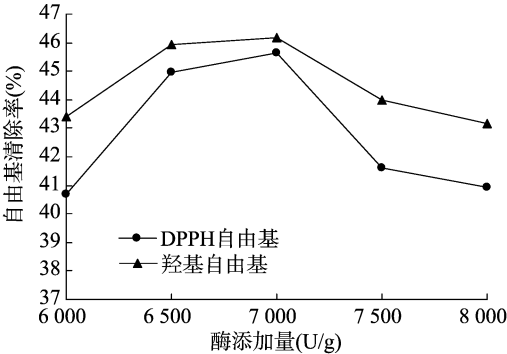


图3 酶添加量对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响

2.1.4 酶解时间对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响 由图 4 可知,木瓜蛋白酶酶解时间对核桃饼粕酶解物抗氧化活性有一定的影响。当酶解时间为 3.0~4.0 h 时,随酶解时间的延长,核桃饼粕酶解物的抗氧化活性变化较小;当酶解时间大于 4.0 h 时,核桃饼粕酶解物的抗氧化活性随酶解时间的延长呈现下降趋势;酶解 3.5 h 时,核桃饼粕酶解物对 DPPH 自由基和羟基自由基清除率都达到最高,分别为 46.73%、47.28%。

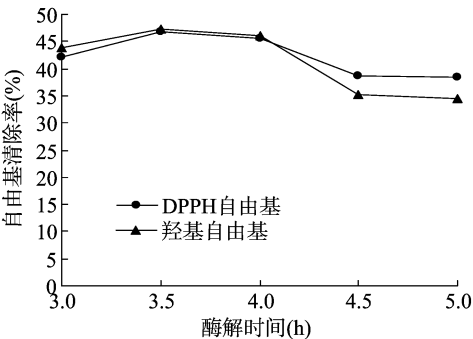


图4 酶解时间对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响

2.1.5 酶解 pH 值对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响 由图 5 可知,木瓜蛋白酶酶解 pH 值对核桃饼粕酶解物抗氧化活性有明显的影响。随着酶解 pH 值的升高,核桃饼粕酶解物的抗氧化活性先升高后降低;当酶解 pH 值为 6.5 时,核桃饼粕酶解物对 DPPH 自由基和羟基自由基清除率都达到最高,分别为 45.64%、46.16%。

2.2 正交试验结果与分析

根据单因素试验结果,以酶解温度、底物浓度、酶添加量(加酶量)、酶解 pH 值 4 个因素进行正交试验,优化木瓜蛋白酶酶解制备核桃抗氧化多肽工艺条件。

由表 2 可知,4 种因素对 DPPH 自由基清除率的影响大小依次为温度>加酶量>pH 值>底物浓度,对羟基自由基清除率的影响大小依次为温度>底物浓度>pH 值>加酶量。且最佳水平组合均为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即酶解温度 60℃、底物浓度

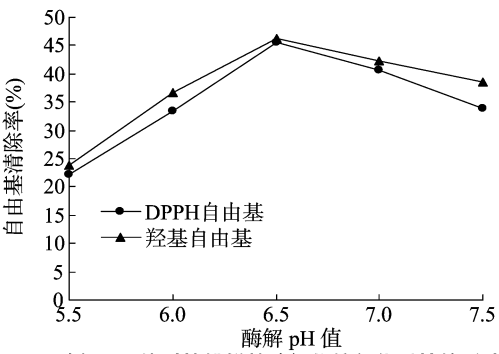


图5 酶解 pH 值对核桃饼粕酶解物抗氧化活性的影响

水平	因素			
	A: 温度 (℃)	B: 底物浓度 (g/100 mL)	C: 加酶量 (U/g)	D: pH 值
1	55	2.0	6 500	6.0
2	60	2.5	7 000	6.5
3	65	3.0	7 500	7.0

2.5 g/100 mL、酶添加量 6 500 U/g、酶解 pH 值 6.5,在上述条件下,经验证试验 DPPH 自由基清除率达到 52.24%,羟基自由基清除率达到 53.20%。

2.3 葡聚糖凝胶层析

按照“1.3.3”节的方法将酶解液过葡聚糖凝胶层析柱,按时间顺序,每小时收集 1 管,共收集 7 管,并按收集时间进行编号,测每管洗脱液的抗氧化活性,结果见表 3。

由表 3 可知,不同分离物之间抗氧化性存在明显差异,且当洗脱时间小于 1 h 或大于 6 h 时,其分离物无抗氧化活性;当洗脱时间为 2~6 h 时,随洗脱时间的延长,分离物的抗氧化活性逐渐增强,洗脱时间为 6 h 时,分离物的抗氧化活性最强,对 DPPH 自由基和羟基自由基清除率分别为 42.38% 和 44.49%。根据凝胶层析分离原理,分子量大的物质先流出凝胶柱,分子量小的物质后流出凝胶柱<sup>[16-17]</sup>,由此可知,2~6 管分离物的分子量依次降低,说明分离物的抗氧化活性随分子量的减小逐渐增强。

4 结论

木瓜蛋白酶酶解核桃饼粕时,酶解温度、酶解时间、底物浓度、酶添加量以及酶解 pH 值对酶解产物抗氧化活性均有一定的影响,且当木瓜蛋白酶在酶解温度为 60℃、酶解时间为 3.5 h、底物浓度为 2.5 g/100 mL、加酶量为 6 500 U/g、pH 值为 6.5 的酶解条件下,酶解物的抗氧化活性较好,酶解液对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除率分别为 52.24% 和 53.20%。

木瓜蛋白酶酶解核桃饼粕,其酶解所得多肽液的抗氧化活性随分子量的增大逐渐降低。

参考文献:

[1] 田娅玲. 核桃抗氧化肽的制备及其分离纯化[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.  
[2] 王 端. 葛根核桃肽复合饮料的研制[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.

表 2 核桃饼粕酶解物抗氧化活性正交试验结果

试验号	因素				结果	
	A:温度	B:底物浓度	C:加酶量	D:pH 值	DPPH 清除率(%)	羟基自由基清除率(%)
1	1	1	1	1	43.86	44.56
2	1	2	2	2	44.57	45.12
3	1	3	3	3	43.34	43.69
4	2	1	2	3	43.74	45.21
5	2	2	3	1	47.62	48.34
6	2	3	1	2	48.58	49.67
7	3	1	3	2	46.69	47.13
8	3	2	1	3	47.52	48.24
9	3	3	2	1	46.21	47.57
$k_1$	43.92	44.76	46.97	45.90		
$k_1'$	44.46	45.63	47.49	46.82		
$k_2$	46.98	46.57	44.71	46.95		
$k_2'$	47.74	47.23	45.97	47.30		
$k_3$	46.81	46.38	46.38	44.74		
$k_3'$	47.65	47.03	46.39	45.71		
$R$	3.06	1.81	2.26	2.21		
$R'$	3.28	1.60	1.52	1.59		

注: $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$  为 DPPH 清除率平均值; $k_1'$ 、 $k_2'$ 、 $k_3'$  为羟基自由基清除率平均值; $R$ 、 $R'$  分别表示 DPPH 清除率和羟基自由基清除率试验极差。

表 3 核桃饼粕酶解分离物的抗氧化活性

管号	抗氧化活性	
	DPPH 自由基清除率(%)	羟基自由基清除率(%)
1	—	—
2	15.81	16.27
3	20.38	21.49
4	21.61	23.25
5	31.56	32.17
6	42.38	44.49
7	—	—

注:“—”表示未检出。

[3]梁 杏. 核桃饼粕多酚提取纯化及其抗氧化和降脂活性初步研究[D]. 昆明:云南中医学院,2016.

[4]张庆祝,丁晓雯,陈宗道,等. 核桃蛋白质研究进展[J]. 粮食与油脂,2003(5):21-23.

[5]章亭洲. 山核桃的营养、生物学特性及开发利用现状[J]. 食品与发酵工业,2006,32(4):90-93.

[6]马 岩,孟宪军. 核桃抗氧化多肽喷雾干燥的工艺优化[J]. 食品工业科技,2016,37(12):243-249.

[7]颜小捷,蒋周田,杨子明,等. 核桃多肽的制备及其体外抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(2):40-43.

[8]Rajapakse N,Mendis E,Byun H G,et al. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems[J]. Journal of Nutrition Biochemistry,

2005,16(9):562-569.

[9]刘昭明,黄翠姬,巫俊良,等. 木瓜蛋白酶水解核桃蛋白的工艺条件优化及水解物抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(13):6136-6138.

[10]郭兴峰,陈计峦,林 燕,等. 热榨和冷榨核桃饼粕中蛋白质提取及其性质研究[J]. 农业工程学报,2012,28(18):287-292.

[11]李艳伏,徐怀德,陈金海,等. 木瓜蛋白酶酶解核桃粕蛋白产物抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报,2008,8(5):8-14.

[12]刘昭明,黄翠姬,孟陆丽,等. 核桃蛋白肽的抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业,2009,35(1):58-61.

[13]Chen H M,Muramoto K,Yamauchi F,et al. Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidant peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1996,44(9):2619-2623.

[14]朱艳华,谭 军. 玉米多肽抗氧化作用的研究[J]. 中国粮油学报,2008,23(1):36-38,43.

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

[16]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.

[17]赵 伟. 牡丹花化学成分分离与鉴定[D]. 济南:山东师范大学,2016.