

酶解法制备植物抗氧化肽及其应用研究

张禹

(淮北师范大学信息学院,安徽 淮北 235000)

摘要: 本文研究酶解法制备植物抗氧化肽及其应用。选用酶解法制备的不同植物抗氧化肽进行研究,分析不同植物抗氧化肽的抗氧化活性,以及温度、酸碱性和底物浓度等对某植物抗氧化肽抗氧化活性的影响。不同植物抗氧化肽的抗氧化活性不同,温度、酸碱性等因素对植物抗氧化肽的抗氧化活性有影响。酶解法是常用的、简单的制备植物抗氧化肽的方法,植物抗氧化肽是天然、安全、抗氧化能力强的抗氧化剂,可以应用于各大领域。

关键词: 酶解法;植物抗氧化肽;应用

中图分类号:TS202

文献标识码:A

文章编号:1004-7344(2021)08-0285-02

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

豌豆蛋白(陕西米康生物科技有限公司),石油醚(30-60℃沸程)(天津市风船化学试剂科技有限公司),玉米蛋白(烟台生物公司);碱性蛋白酶(200U/mg)、胃蛋白酶(3000U/mg)、胰蛋白酶(2500U/mg):Novo公司;1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)、2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS):Sigma试剂公司;其他试剂均为国产分析纯。

pHS-25型酸度计(上海梅特勒-托利仪器设备公司);紫外可见分光光度计(上海梅特勒科学仪器有限公司);LGJ-18S冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);光电全自动生化分析仪(日本光电工业株式会社);BECKMANCOULTER离心机(美国贝克曼库尔特有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 提取蛋白

豌豆蛋白:取豌豆蛋白粉100g加入1L蒸馏水中,搅拌均匀,加入1mmol/L的NaOH直至pH为9.0,持续混合0.5h。取处理后溶液,以5000r/min速率离心0.25h。拿出上层加入1.0mmol/L的HCL,直至pH4.0,随后离心15min,速率5000r/min。使沉淀蛋白悬浮,调节pH为7.0,冷冻干燥悬浮液,密封4℃保存待用。

苦荞蛋白:取苦荞麦蛋白粉1:2(g/mL)比例混合石油醚当中,在窗边或者风口附近进行混合均匀,直至石油醚挥发大部分,用漏斗+纱布过滤出溶液,予以风干,取脱脂荞麦粉。将荞麦粉1:10(g/mL)混合蒸馏水,设置pH8.0,用热水溶解0.5h,提高水温到50℃。以9000r/min速率离心1/3h,拿出上层,设置pH4.5,以9000r/min速率离心1/3h,取出沉底的蛋白,使用去离子水进行频繁冲洗,调节pH7.0,真空冷冻干燥,密封保存待用。

1.2.2 制备水解产物

豌豆:底物浓度5%、加5%浓度的酶、设置pH9.0、水温提高到55℃、等待4h进行酶解。酶解结束后,以5000r/min速率离心0.25h,拿上层液冷冻干燥4℃保存待用。

苦荞麦:取苦荞蛋白在磷酸盐缓冲液(pH7)中溶解,样品浓度2%,匀浆30s,设置合适pH,使用酶开始水解。之后用酶解液放在沸水中消灭酶活性10min,冷却至25℃,设置反应液pH4.5,离心15min,速率5500r/min,取清液进行冷冻保存待用。

玉米:取玉米分离蛋白混合适量蒸馏水,浓度调整为5%,搅拌均匀,将其置于恒温水浴锅,温度设置为90℃,恒温搅拌10min。将溶液冷却至50℃,随后加入Alcalase蛋白酶,计时反应时间,过程中不断加入1mmol/L的NaOH。结束后灭酶活性离心操作,取上层清液冻干待用。

1.2.3 DPPH 自由基清除率

取DPPH9.75mg,加入适量无水乙醇进行溶解,加95%乙醇至500mL,配置DPPH溶液,浓度设置为0.2mmol/L。分别1:1混合DPPH溶液以及上述蛋白水解液,搅拌均匀,在黑暗室温中静置0.5h后在517nm位置测量不同溶液吸光度,使用Vc作为阳性对照。其公式表示为:

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

其中: A_0 -加水解液DPPH溶液的吸光度; A_1 -正常的吸光度; A_2 -空白样本DPPH溶液吸光度。

1.3 观察指标

1.3.1 温度的影响作用

豌豆:取0.5g豌豆抗氧化冻干粉,混合100mL蒸馏水,得5mg/mL的豌豆抗氧化肽溶液,温度设定为37℃、60℃、90℃、

120℃,保温处理 3h,每 30min 测定抗氧化活性。

苦荞:选取反应时间 4h,pH2.0,酶与底物质量比 1:50,水温设定为 23℃、30℃、37℃、44℃、51℃,水解时间为 2h,随后用沸水灭酶,测定苦荞蛋白的水解度。

玉米:设定 pH8.5、底物浓度 9%、加 3%浓度的酶,水温分别调成 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃,水解酶解时间 8h,测定水解液 DH 及羟自由基·OH 清除率。

1.3.2 pH 的影响作用

豌豆:取 0.5g 豌豆抗氧化冻干粉,混合 100mL 蒸馏水,得 5mg/mL 的豌豆抗氧化肽溶液,pH 设定为 1.0、4.0、7.0、10.0、13.0,水温 37℃保温处理 3h,每 30min 测定抗氧化活性。

苦荞:选取反应时间 4h,温度 37.5℃,酶与底物质量比 1:50,pH 设定为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0,水解酶解时间为 2h,随后用沸水灭酶,测定苦荞蛋白的水解度。

玉米:设定温度 50℃、底物浓度 9%、加 3%浓度的酶,调节 pH 为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,水解 8h。测定水解液 DH 及羟自由基·OH 清除率。

1.4 统计学分析

使用 SPSS24.6 软件对实验中的产生的所有数据应用 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 温度的影响作用

2.1.1 豌豆

当豌豆抗氧化肽在 37℃保存时,随着时间的变化,DHHP 自由基的清除率变化不大 ($P>0.05$);在 60℃保存时,DHHP 自由基的清除率会呈现出先升高后降低的态势,待保存 3h 之后,清除率会明显下降 ($P<0.05$);当温度设定为 90℃以及 120℃,清除率随着时间的变化呈现出持续降低的态势 ($P<0.05$)。

2.1.2 苦荞

温度会对苦荞蛋白的水解度产生影响,温度从低到高,苦荞蛋白的水解度先升高后降低,待水温达到 37℃这个最佳数值,水解度也达到一个最佳数值——27.94%,温度继续升高,但是苦荞蛋白的水解度与之呈现负相关。

2.1.3 玉米

随着温度的升高,玉米蛋白的水解度与 OH 清除率呈现出先升高后降低的态势,待水温达到 50℃最佳数值,水解度达到最佳数值——35.7%,相比于 55℃的水解度较高 ($P>0.05$),相比于其他温度的水解度显著高 ($P<0.05$)。待温度达到 50℃时,自由基的清除率也达到了最高,为 74.3%,该清除率相比于 55℃较高 ($P>0.05$),相比于其他温度的清除率显著高 ($P<0.05$)。

2.2 pH 的影响作用

2.2.1 豌豆

当 pH7 时,蛋白的清除率随着时间的变化而不发生显著变化 ($P>0.05$);在 pH4 以及 pH10 时,蛋白的清除率均呈现出持续下降的态势,当 pH4 时清除率在 30min 之内的下降幅度最大,当 pH10 时当清除率在 150~180min 的下降幅度是最大的 ($P<0.05$);

在 pH1 时以及 pH13 时,蛋白的清除率下降幅度相比于上述更显著 ($P<0.05$)。

2.2.2 苦荞

当 pH1.0~1.5,蛋白水解度提高,pH1.5 水解度最高 (27.21%),pH>1.5,水解度开始降低且变化明显。

2.2.3 玉米

当 pH8.0,水解度 38.32%,清除率 77.51%,与其他 pH 差异显著 ($P<0.05$)。

3 讨论

目前社会各界对抗氧化剂的要求是天然、价格低廉、效果好、毒性低微,并且要求也逐渐严格,因此从植物当中制备自由基消除剂逐渐成为食品、药品等行业的一个重要发展趋势^[1]。如果食物发生氧化会导致食品变质,如果含有脂肪的食物出现氧化可能会产生毒素,不但缩短食物的保质期,阻碍食品行业的发展,如果人体盲目摄入就会对脏器造成损伤,造成食品安全事故。以往通过化学方式制取的抗氧化剂,其产物对人体的毒性较大,风险性较高,并不适用于食品行业以及与其他与人体有接触的行业应用^[2]。

本次研究表明不同的温度以及 pH 会影响植物抗氧化肽的水解度以及 DHHP 自由基清除率。植物抗氧化肽的应用:①抗疲劳和抗氧化。抗氧化黑豆肽可以缓解自由基引发的疲劳状态;②应用于饲料当中可以起到提高营养价值,预防疾病的作用,如促进矿物质的吸收,降低乳猪腹泻率^[3];③化妆品。将植物抗氧化肽应用在化妆品当中可以提高皮肤的抗老化能力,改善或者预防皮肤干燥、暗淡、黑眼圈、皱纹、皮肤松弛等问题,有效延缓皮肤衰老;④食品。脂质氧化容易出现色泽、味道等变化,影响口感和安全性,使用抗氧化肽可以有效防止食物酸败,同时不会产生对人体的有害性^[4]。

综上所述,植物抗氧化肽是应对社会发展的重要产物,使用酶解法可以轻易的急性提取,制作的抗氧化剂可以应用在饲料、护肤品、食物中,但是在提取过程中应该注意影响因素,避免降低抗氧化活性。

参考文献

- [1] 姜珊,张康华,马青琳,等.酶解法制备植物抗氧化肽及其在饲料工业中的应用[J].粮食与饲料工业,2019(6):16-20.
- [2] 孙婷婷,杨文哲,张思晨,等.家蝇蛹的营养成分分析及抗氧化肽制备工艺研究[J].饲料工业,2019(18):35-42.
- [3] 屠瀚超,阳晓晶,罗松明.响应面优化酶解法制备岩豆抗氧化肽工艺[J].中国油脂,2020(6):43-47.
- [4] 卢素珍,涂宗财,王辉,等.二步酶解法制备鱼鳞明胶抗氧化肽及其抗氧化活性研究[J].食品与机械,2019,35(5):160-166.

收稿日期:2021-01-14

作者简介:张禹(1997—),男,汉族,安徽蚌埠人,本科在读,生物工程专业。