

红凤菜多肽的制备及其美拉德反应产物的 抗氧化性能研究

黄姿梅¹, 黄国霞^{2,3*}, 汪 青^{2,3}

(1. 柳州职业技术学院环境与食品工程学院, 柳州 545006; 2. 广西科技大学生物与化学工程学院, 柳州 545006;
3. 广西糖资源绿色加工重点实验室, 柳州 545006)

摘 要: **目的** 优化红凤菜蛋白提取工艺并制备活性多肽, 对多肽进行改性, 探讨产物的抗氧化性能, 深入开发其蛋白资源。**方法** 结合超声和高剪切技术, 用响应面法优化提取红凤菜中的蛋白质, 采用酶解法制备多肽并进行糖基化改性, 且研究其抗氧化性能。**结果** 最优条件为料液比 1:47 (g:mL), 300 W 超声波处理 20 min, 高剪切 6 次, 提取温度为 46.7℃, 提取时间 2.5 h, 提取液 pH 8.40 时, 此时蛋白提取率为 79.64%, 接近响应面预测值。用蛋白酶水解红凤菜蛋白制备活性肽, 以抗氧化性能为指标筛选合适的酶并优化酶解条件。用超滤膜加压过滤对水解产物进行分级, 分级产物中, $M_w < 1$ kDa 的多肽抗氧化性能最佳。红凤菜多肽与木糖进行美拉德反应后, 对 1,1 二苯基-2-三硝基苯肼自由基和 2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸自由基的清除率分别为 87.65%、80.65%, 比改性前提高了 7.99%和 11.37%。**结论** 本方法的红凤菜蛋白提取率高, 糖基化产物的抗氧化效果好。

关键词: 红凤菜; 蛋白; 酶解; 多肽; 抗氧化; 美拉德反应

Study on the preparation of polypeptides from *Gynura bicolor* and the antioxidant properties of Maillard reaction products

HUANG Zi-Mei¹, HUANG Guo-Xia^{2,3*}, WANG Qing^{2,3}

(1. School of Environmental and Food Engineering, Liuzhou Vocational & Technical College, Liuzhou 545006, China;
2. Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Green Processing of Sugar Resources, Liuzhou 545006, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction process of *Gynura bicolor* protein, prepare active peptides, and then modify the peptides, explore the antioxidant properties of the products, and further develop its protein resources. **Methods** Combined with ultrasonic and high shear technology, response surface methodology was used to optimize the extraction of protein from *Gynura bicolor*. Peptides were prepared by enzymatic hydrolysis, and then was modified by glycosylation, and the antioxidant properties of the products were studied. **Results** The protein

基金项目: 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2021KY1049)、广西科技大学科学基金项目(校科自 1419201)、柳州职业技术学院 2020 年度课题项目(2020KB08)

Fund: Supported by the Guangxi University Young and Middle-aged Teachers' Basic Scientific Research Ability Improvement Project (2021KY1049), the Science Foundation of Guangxi University of Science and Technology (1419201), and the 2020 Project of Liuzhou Vocational & Technical College (2020KB08)

*通信作者: 黄国霞, 高级实验师, 主要研究方向为生物大分子的功能改性。E-mail: GuoxiaHuang1234@aliyun.com

*Corresponding author: HUANG Guo-Xia, Senior Engineer, Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Donghuan Road 268, Liuzhou 545006, China. E-mail: GuoxiaHuang1234@aliyun.com

extraction rate was the highest when the solid-liquid ratio was 1:47 (g:mL), ultrasonic 300 W treatment for 20 min, high shear treatment for 6 times, the extraction temperature was 46.7°C, the extraction time was 2.5 h, and the pH of extraction solution was 8.40. Under the optimum conditions, the protein extraction rate was 79.64%, which was close to the predicted value of response surface experiment. The active peptides were prepared by hydrolyzing *Gynura bicolor* protein with protease. Taking antioxidant activity as index, the appropriate enzymes were screened and the enzymatic hydrolysis conditions were optimized. The hydrolysates were graded by pressure filtration with ultrafiltration membrane. Among the graded products, the polypeptide with Mw<1 kDa had the best antioxidant performance. After Maillard reaction of polypeptide with xylose, the clearance and 2,2-azo-bis-3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid radical were 87.65% and 80.65%, respectively, which were 7.99% and 11.37% higher than those before modification.

Conclusion This method has high protein extraction rate and good antioxidant effect of glycosylated products.

KEY WORDS: *Gynura bicolor*; protein; enzymolysis; polypeptide; antioxidant; Maillard reaction

0 引言

红凤菜(*Gynura bicolor* DC.)是菊科菊三七属草本植物^[1],民间又称红背菜、观音菜、观音苋、血皮菜、紫背天葵等,在广西、广东等多个省份常见有大面积生长。其味清甜、微苦,可清炒、凉拌、煮汤,是一种广受欢迎的野菜。因人们的喜爱,多地也有人工种植^[2],甚至制成了饮料^[3],拓宽了蔬菜种植种类,提高了经济效益。红凤菜是一种药食同源的植物,具有凉血、活血、治外伤出血、解毒消肿等功效^[4]。目前人们对红凤菜的研究主要集中在色素^[5-6]、黄酮^[7-8]、多酚^[9]、奎宁酸^[10]、甾醇类等物质的提取及提取物的抗氧化性能方面^[11]。

蛋白质是植物体生命活动的基础物质,是多种生理功能必不可少的物质。除了果实以外,茶叶、烟草叶、辣木叶等植物叶片也含有丰富的蛋白质^[12-14]。多肽是生物体的重要活性物质,它是蛋白质水解的中间产物。多肽可以直接从生物体内提取,也可以人工合成小片段多肽,或者用酶解蛋白质的方法获取多肽,其中酶解法因为条件温和、成本低,是最常用的方法。相比蛋白质,多肽分子量更小,组成简单,更容易被人体吸收。由于链长较短,无法进行复杂的折叠盘绕,因而结构更简单,亲水性更强,容易使氨基酸基团展示在外而发挥活性。许多多肽可以清除自由基、螯合金属离子、提供还原力等作用,所以具有抗氧化性^[15]。近年来,人们从元菇、碎米荠、汉麻等多种植物中制备了活性肽,均具有良好的抗氧化活性^[16-18]。目前,尚未有从红凤菜中提取蛋白质并制备多肽的相关报道。

超声和高剪切具有作用时间短、破碎力强、样品损失少等特点,尤其适用于具有坚硬外壁的植物组织的破碎。本研究结合超声和高剪切技术,采用碱溶酸沉的方法,对红凤菜中的蛋白质进行提取,并用蛋白酶对提取的蛋白质进行酶解,通过超滤膜分级小分子多肽,最后用木糖和多肽进行美拉德反应,并测试美拉德反应产物清除自由基的能力,为红凤菜的深入开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

红凤菜摘取茎叶部分,水流冲洗去除泥沙,择去枯黄腐败老叶,60°C干燥,粉碎,过 60 目筛,备用。

1.2 仪器与试剂

BME 100L 高剪切混合乳化机(上海威宇机电有限公司); Cary 60 紫外可见分光光度计(美国安捷伦科技有限公司); JY 92-IIN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司); Alpha 1-4LDplus 冷冻干燥机(德国 Marin Christ 公司); GHG 9030A 鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); UFSC20001 型超滤杯(美国密理博公司); AL204 万分之一型电子分析天平(梅特勒-托利多中国有限公司)。

牛血清蛋白(生化试剂,国药集团工业股份有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2-azo-bis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)(分析纯,上海源叶生物科技有限公司); 考马斯亮蓝 G250(生化试剂,阿拉丁试剂有限公司); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸铜、无水乙醇、硼酸、氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 试验用水为超纯水。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白质提取及工艺优化

(1) 蛋白质标准曲线绘制

采用考马斯亮蓝法测定不同浓度牛血清蛋白溶液的吸光度值 A_{595} , 分别以质量浓度为横坐标(X, mg/mL)、 A_{595} 为纵坐标(Y)绘制标准曲线,拟合的方程为 $Y=9.2286X+0.1862$ ($r^2=0.9979$),线性关系好,可用于蛋白质检测。

(2) 红凤菜蛋白的提取及含量测定

取红背凤菜粉末 1.0 g,放入烧杯中,加入磷酸缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=8.0),浸泡 10 min 后进行超声破碎,然后

转移到高剪切专用瓶内,置于水浴锅中,进行间歇式高速剪切,每次 30 s。随后离心(4000 r/min, 15 min),收集上清液,调节 pH 至等电点附近,混匀后冷藏静置 4 h,离心分离(3000 r/min, 15 min),取沉淀,水洗至中性,冻干后收集,即为红凤菜蛋白质成品。

称取蛋白质冻干粉适量,用水溶解定容至 10 mL,取 1 mL 加入到 5 mL 考马斯亮蓝 G250 溶液中,测吸光度值 A_{595} ,计算蛋白溶液浓度及冻干粉中蛋白含量(提取的蛋白质纯度为 85.32%)。另称取适量提取液,按照凯氏定氮法测定红凤菜中总蛋白质含量。经凯氏定氮法测定,红凤菜总蛋白含量为 18.2%(干重)。红凤菜蛋白提取率计算如公式(1):

$$\text{红凤菜蛋白提取率}/\% = \frac{m_1 \times c_1}{m_2 \times c_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 : 为冻干粉总质量(g); m_2 为红凤菜样品总量(g); c_1 为冻干粉中蛋白含量(%), c_2 为红凤菜中总蛋白质含量(%)。

(3)红凤菜蛋白质等电点测定

参考徐弦等^[19]的方法,用若干量筒量取 10 mL 第 1 次离心收集的上清液,滴加盐酸分别把 pH 调为 3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8,冷藏静置 12 h。10000 r/min 离心 15 min,取 1 mL 上清液加入到 5 mL 考马斯亮蓝 G250 溶液中,测 595 nm 处的吸光度值。

(4)蛋白质提取工艺优化

分别考察超声波处理功率(100、200、300、400、500 W)及处理时间(5、10、15、20、25、30 min)、高剪切次数(3、4、5、6、7)、提取温度(20、30、40、50、60、70℃)、提取液 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5)、料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60, g/mL, 下同),提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h)对蛋白质提取率的影响。

(5)响应面优化

选取料液比、提取液 pH、提取温度进行响应面试验,采用 Box-Behnken 设计三因素三水平试验方案如表 1。响应值为红凤菜蛋白质提取率。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平
Table 1 Factor and level of Box-Behnken test

因素	水平		
	-1	0	1
A 料液比(g:mL)	1:30	1:40	1:50
B 提取液 pH	7.5	8.0	8.5
C 提取温度/℃	30	40	50

1.3.2 多肽制备及工艺优化

(1)酶解单因素试验

选取胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶和碱性蛋白酶 5 种蛋白酶,底物浓度为 3%,加酶量为 3000 U/g,分别在各种酶的最适温度和 pH 下酶解 4 h,高温灭活,测定酶解产物的水解度和自由基清除率。

进一步优选最佳酶反应条件,考察酶解时间(1、2、3、4、5 h)、酶解温度(45、50、55、60、65℃)、酶解 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)和加酶量(1000、2000、3000、4000、5000 U/g)对自由基清除率的影响。

(2)酶解产物的超滤分级

将酶解产物依次用截留分子量为 5、3、1 kDa 的超滤膜进行过滤,压力为 0.1 MPa,分别收集不同分子量组的滤液,冷冻干燥,得到不同分子量组的红凤菜多肽粉末。以多肽的抗氧化活性为指标,优选最适合的组。

1.3.3 水解度测定

参考文献^[20],用凯氏定氮法联合甲醛滴定法测定酶解产物的水解度(degree of hydrolysis, DH)。

1.3.4 抗氧化活性测试

参考文献^[21]进行操作,测试酶解液及多肽对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的清除能力。

1.3.5 红凤菜多肽的糖基化改性

用木糖与红凤菜多肽发生美拉德反应制备糖基化的多肽^[22]。木糖和红凤菜多肽(Mw<1 kDa)质量比为 1:2,初始 pH 为 11.5,总质量浓度为 80 mg/mL,在 100℃下混合反应 4 h,冰浴冷却,冷冻干燥,-20℃保存,待紫外光谱测试,抗氧化活性测试及体外模拟胃肠道消化后的抗氧化测试^[23]。

1.3.6 数据处理

所有数据平行测 3 次,结果均以平均值±标准偏差表示。数据分析采用标准方差分析,多重分析使用 SPSS 17.0 进行 t 检验,两组数据有显著差异的用不同字母表示(P<0.05),差异不显著的用同一字母表示(P>0.05)。

2 结果与分析

2.1 蛋白提取的工艺优化

2.1.1 红凤菜蛋白质等电点

蛋白质是两性电解质,溶液的 pH 会影响其分子的电荷性质和质量。当蛋白质处于等电点时,净电荷为零,相邻的分子之间没有静电斥力,容易聚沉,此时溶解度最低。pH 偏离等电点时,蛋白质分子携带同种符号的净电荷,相邻的分子相互排斥,阻止单个分子聚集成沉淀,这时溶解度较大^[24]。结果显示, pH 为 4.2 时,上清中的吸光度值最低,即蛋白质含量最少,说明大部分蛋白质已经沉淀。越偏离 4.2,蛋白质溶解度越大,沉淀越少,因而上清液中检测到的蛋白质含量越多。据此可以判定红凤菜蛋白质的等电点为 4.2,所以调节提取液 pH 为 4.2 进行后续试验。

2.1.2 超声处理对蛋白质提取率的影响

植物组织的细胞壁主要成分为纤维素和果胶。纤维素链在细胞内捆绑在一起,提供了强度,当细胞被拉伸时,纤维素链相互滑动,提供了延展性^[25]。要使蛋白质溶出,必须先破坏这层壁垒。超声通过液体介质形成许多密集的小气泡,这些小气泡迅速炸裂,产生的能量可以使细胞组

织破碎, 细胞壁及细胞内含物得以溶出。较低功率的超声处理不足以提供足够的能量, 细胞壁破碎不完全, 适当提高功率(小于 300 W)能够明显提高蛋白质提取率。过高的功率(大于 300 W)会使小气泡产生和炸裂的速度加快, 热效应明显, 局部温度过高会使蛋白发生热变性, 不利于提取。另外过于密集而迅速的气泡炸裂也会使部分蛋白分子结构被破坏, 电荷组成改变, 导致蛋白质提取率降低。

超声处理时间对红凤菜蛋白质提取率有一定的影响。在 20 min 之前, 延长处理时间可以显著增加提取率。超过 20 min 之后, 蛋白质提取率有所下降。处理 20 min 已经能使绝大部分组织破碎, 蛋白质容易溶出; 长处理时间, 超声产生的空穴效应和热效应会使蛋白质部分发生变性, 还可能会使蛋白分子的肽键断裂, 形成一些链长较短的多肽片段, 而这些多肽片段在下一步的等电点沉淀步骤中难以被沉淀下来, 最终造成蛋白质提取率下降^[26]。因此选择超声功率为 300 W, 时间为 20 min。

2.1.3 高速剪切对蛋白提取率的影响

转子与定子作相对的高速旋转, 引起的层流、湍流和空穴效应使物料受到强大的剪切力、摩擦力、高频振动等物理作用, 从而被有效地分散和粉碎, 达到物料超细粉碎的效果。因此在处理含纤维较多、较硬的颗粒物料方面, 高剪切处理效果良好^[27-28]。高剪切处理可以有效增加红凤菜蛋白质提取率。在剪切 6 次时, 蛋白质提取率达到最高值。剪切次数过多, 可能会使提取液黏稠度过大, 产生糊化等现象, 不利于蛋白的提取。因此, 本研究选择高剪切处理次数为 6 次。

2.1.4 提取单因素结果

提取时间在 0.5~2.5 h 之间时, 蛋白质提取率与提取时间呈正相关, 2.5~3.0 h 提取率不再增加。蛋白质是一类具有长链的生物大分子, 其复杂的盘绕折叠结构会让它和细胞组织中的其他物质互相包埋或者绞联, 需要一定时间才能溶出至提取液中。2.5 h 已能使提取液中的蛋白浓度基本达到饱和, 蛋白质提取率达到最大, 再增加时间不能使提取率再升高。所以选择提取时间为 2.5 h, 并设置为固定条件。

在 20~50℃之间, 随着温度的升高, 蛋白质提取率随之增加, 50℃时达到最大值, 50℃后蛋白质提取率有所下降。蛋白质的溶出需要一个适当的温度。温度的升高, 有利于蛋白质分子的舒展, 与其他物质之间的包埋或者绞联减少, 从而有利于蛋白质溶出, 提取率上升。但蛋白质是热不稳定、对温度较为敏感的物质, 过高的温度会使蛋白质的空间结构遭到破坏, 甚至分解, 等电点改变, 导致酸沉时沉淀减少, 提取率降低。另外, 过高的温度会使组织中的糖类、脂肪等其他物质溶解到提取液中, 分子密度增大, 提取液黏度增加, 会降低蛋白质的溶解度, 提取率下降^[29]。所以红凤菜中蛋白质的最佳提取温度为 50℃。

提取液的 pH 对提取率的影响较大。低于 8.0 时, 增加提取液的碱性, 能够使蛋白分子带更多的负电荷, 增加静电斥力, 蛋白质分子分散均匀, 从而提高蛋白质的溶解度, 因此提取率逐步上升。连接蛋白分子基本单元氨基酸的是肽键。肽键较不稳定, 在强酸强碱下会断裂, 造成蛋白部分水解成氨基酸、多肽。提取液 pH 超过 8.0 后, 蛋白质提取率随着溶液碱性的增加而下降。因此, 提取液最适合的 pH 为 8.0。

在料液比为 1:10 时, 红凤菜中蛋白质提取率最低, 溶剂太少会使提取液黏度大, 单位体积内蛋白浓度高, 导致蛋白溶出受阻。随着提取液用量的增加, 蛋白质得以分散, 单位体积内浓度较低, 增加细胞内外的渗透压力, 所以蛋白质提取率与提取液用量呈正相关。当料液比为 1:40 时, 蛋白质提取率最高, 继续增加提取液用量, 蛋白质的提取率有所下降。提取液中大部分为水分子, 提取液量的增加使蛋白质表面的亲水性基团形成水化层, 使蛋白质颗粒之间距离增大, 随着溶剂体积的增加, 影响红凤菜中蛋白质的析出效果, 蛋白质提取率降低。因此最适料液比为 1:40。

2.1.5 响应面试验结果

料液比、提取液 pH 和提取温度对蛋白质提取率的响应面试验方案及结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验方案设计及试验结果
Table 2 Box-Behnken experimental design and results

试验序号	A 料液比 (g:mL)	B 提取液 pH	C 提取温度 /℃	提取率 /%
1	1:30	7.5	40.0	56.18
2	1:50	8.0	30.0	77.95
3	1:40	7.5	50.0	67.92
4	1:30	8.0	50.0	61.80
5	1:40	8.0	40.0	79.36
6	1:40	8.0	40.0	78.59
7	1:30	8.5	40.0	66.85
8	1:40	8.5	30.0	71.53
9	1:50	8.0	50.0	70.10
10	1:40	8.0	40.0	80.88
11	1:30	8.0	30.0	58.69
12	1:40	8.0	40.0	78.92
13	1:50	7.5	40.0	76.44
14	1:40	8.0	40.0	79.59
15	1:40	8.5	50.0	70.96
16	1:40	7.5	30.0	68.77
17	1:50	8.5	40.0	70.84

回归模型的方差分析见表 3。从表 3 中可分析建立红凤菜蛋白质提取回归模型的可信度, 该回归方程的失拟项大于 0.05, 模型 *P* 值小于 0.0001, 说明该方程的拟合度较好, 该模型极显著, 因此该回归方程可以指导红凤菜中蛋白质的提取。该模型拟合出的回归方程为:

$$Y=79.47+9.48A+0.86B+0.23C-0.068AB-0.74AC+0.070BC-6.78A^2-6.12B^2-3.56C^2$$

方差分析显示, 模型 $P<0.0001$, 回归方程 $R^2=0.9936$, 失拟项 $P=0.4128$, 说明此模型极显著, 与实际拟合情况很好, 误差小, 模型成立。A、B、 A^2 、 B^2 、 C^2 、AB、AC 均为极显著 ($P<0.0001$), C 为显著, 说明这几个因素对红凤菜中蛋白质提取均有极显著的影响。比较 F 值大小可以看出 3 个因素对红凤菜中的蛋白质提取率的影响主次顺序为: $A>B>C$ 。各因素之间交互作用对蛋白质提取率的影响依次为: $AB>AC>BC$ 。

图 1 是各因素对蛋白质提取率的响应面及等高线。响应面图坡度的陡峭程度及等高线的椭圆度可以反映出两个因素交互显著程度。响应面曲线坡度越大, 等高线越密集且呈现椭圆状, 则表明该因素值的改变对蛋白质提取率的影响越大, 两因素的交互作用越显著。从图 1 可以看出, 3 个响应面图的曲面都呈中心最高, 四周向下倾斜形状, 两两因素的等高线基本都呈椭圆形, 其中料液比与 pH 等高线的

椭圆度最大, 说明各因素对蛋白质提取率的影响较大, 各因素交互作用明显, 其中料液比与 pH 的交互作用最明显。

经拟合, 最优试验方案为料液比 1:47.30, pH 8.40, 提取温度 46.71℃, 预测值为 80.23%。将最优方案取整, 在料液比 1:47, pH 8.40, 提取温度 46.7℃条件下进行 3 次平行试验, 平均值为 79.64%, 与预测值非常接近, 说明该拟合模型可靠。

2.2 蛋白质酶解条件优化

2.2.1 酶的选择

由图 2 可知, 红凤菜蛋白用中性蛋白酶酶解后, 其水解产物的水解度最高, 同时, 对自由基清除的能力均比其他蛋白酶处理的效果要好。试验条件下, 水解度为 29.47%, 对 DPPH·和 ABTS⁺·的清除率分别为 79.82%、68.50%。所以后续试验中均采用中性蛋白酶对红凤菜蛋白进行水解。

表 3 响应面试验回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	918.10	9	102.01	120.92	<0.0001	**
A	335.53	1	335.53	397.73	<0.0001	**
B	14.77	1	14.77	17.51	0.0041	**
C	4.74	1	4.74	5.62	0.0495	*
AB	66.18	1	66.18	78.44	<0.0001	**
AC	30.03	1	30.03	35.60	0.0006	**
BC	0.02	1	0.02	0.02	0.8832	
A ²	222.86	1	222.86	264.17	<0.0001	**
B ²	89.69	1	89.69	106.31	<0.0001	**
C ²	107.71	1	107.71	127.67	<0.0001	**
残差	5.91	7	0.84			
失拟项	2.81	3	0.94	1.21	0.4128	
净误差	3.09	4	0.77			
总误差	924.01	16				

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

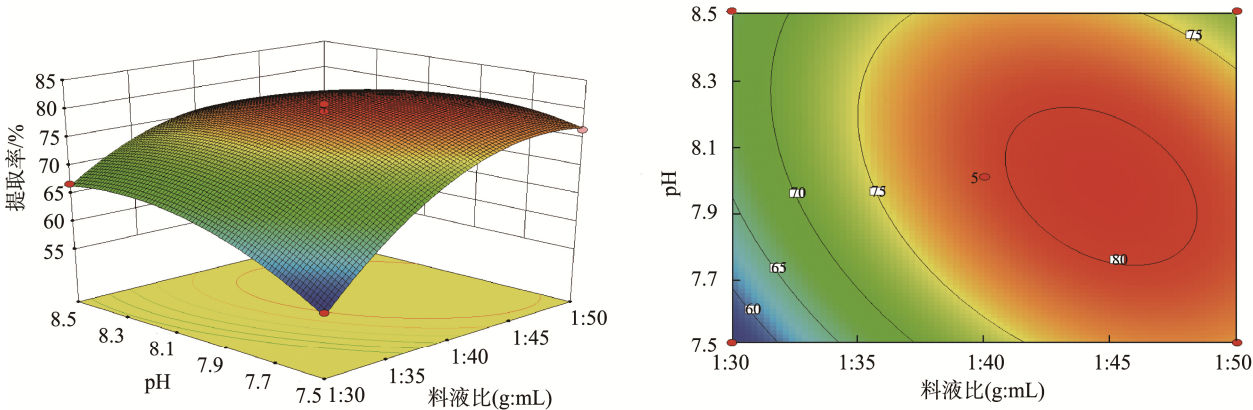


图 1 各因素对红凤菜蛋白提取率响应面及等高线
Fig.1 Response surface and contour lines of various factors on *Gynura bicolor* protein extraction rate

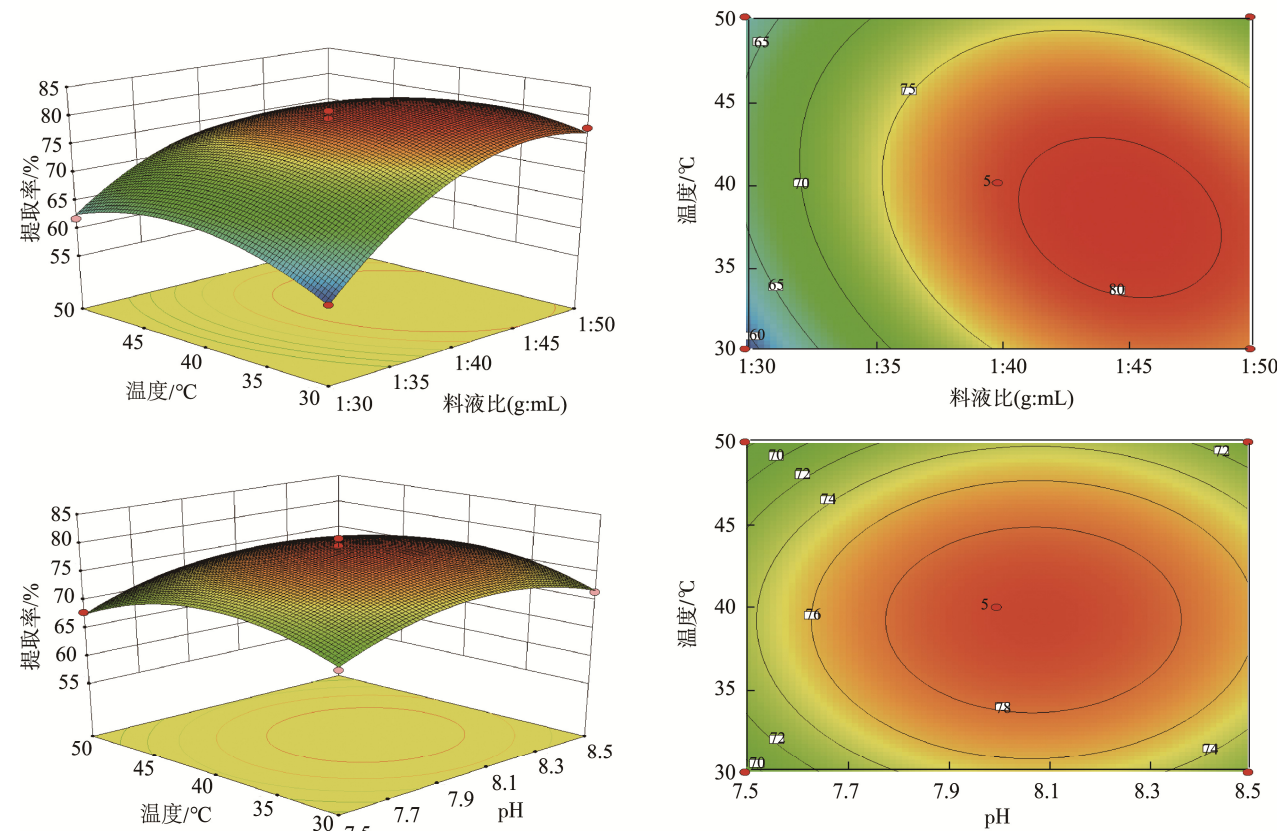
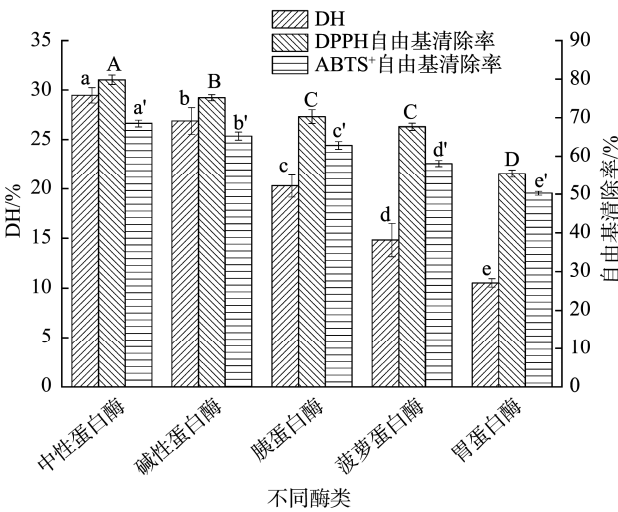


图 1(续) 各因素对红凤菜蛋白提取率响应面及等高线

Fig.1 Response surface and contour lines of various factors on *Gynura bicolor* protein extraction rate



注: 同一类别不同字母代表同一指标间差异具有显著性, $P < 0.05$, 下同。

图 2 不同蛋白酶对红凤菜蛋白水解度及水解产物对自由基清除率的影响($n=5$)

Fig.2 Effects of different proteases on degree of *Gynura bicolor* protein hydrolysis and free radical scavenging rate of hydrolysates ($n=5$)

2.2.2 酶解单因素红凤菜蛋白酶解产物抗氧化活性的影响

(1) pH 对红凤菜蛋白酶解产物抗氧化活性的影响

蛋白质对 pH 比较敏感, pH 的改变容易使蛋白质分

子的解离状态发生变化, 使底物不能和酶结合, 或者结合后不能生成产物。pH 还会影响酶分子活性部位上有关基团的解离, 从而影响与底物的结合或催化, 酶活性降低。另外, pH 也可能影响到中间络合物的解离状态, 不利于催化生成产物^[24]。如图 3A 所示, 当 pH 为 7.0 时, 酶解产物对自由基的清除效果最佳, 与其他 pH 条件下的效果有明显区别。因此本研究中, 中性蛋白酶酶解红凤菜蛋白的最佳 pH 为 7.0。

(2) 酶解温度对红凤菜蛋白酶解产物抗氧化活性的影响
蛋白酶需要在适合的温度下才能发挥最大作用, 温度过低酶促反应进行缓慢, 温度过高会导致酶部分失活。如图 3B 所示, 温度为 55°C 时, 酶解产物对自由基的清除率最高, 说明在这个温度下酶解产生的活性肽最多, 最容易发挥抗氧化性, 因此, 选择酶解温度为 55°C。

(3) 酶解时间对红凤菜蛋白酶解产物抗氧化活性的影响
中性蛋白酶的对蛋白质的水解条件比较温和, 因此, 蛋白质的水解需要一定的时间。如图 3C 所示, 在 3 h 以内, 酶解产物对自由基的清除率随着时间的延长而升高, 酶解时间为 3 h 时, 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的清除率最高, 分别 80.09% 和 70.44%。3 h 之后则呈缓慢下降趋势。本研究选择酶解时间为 3 h。

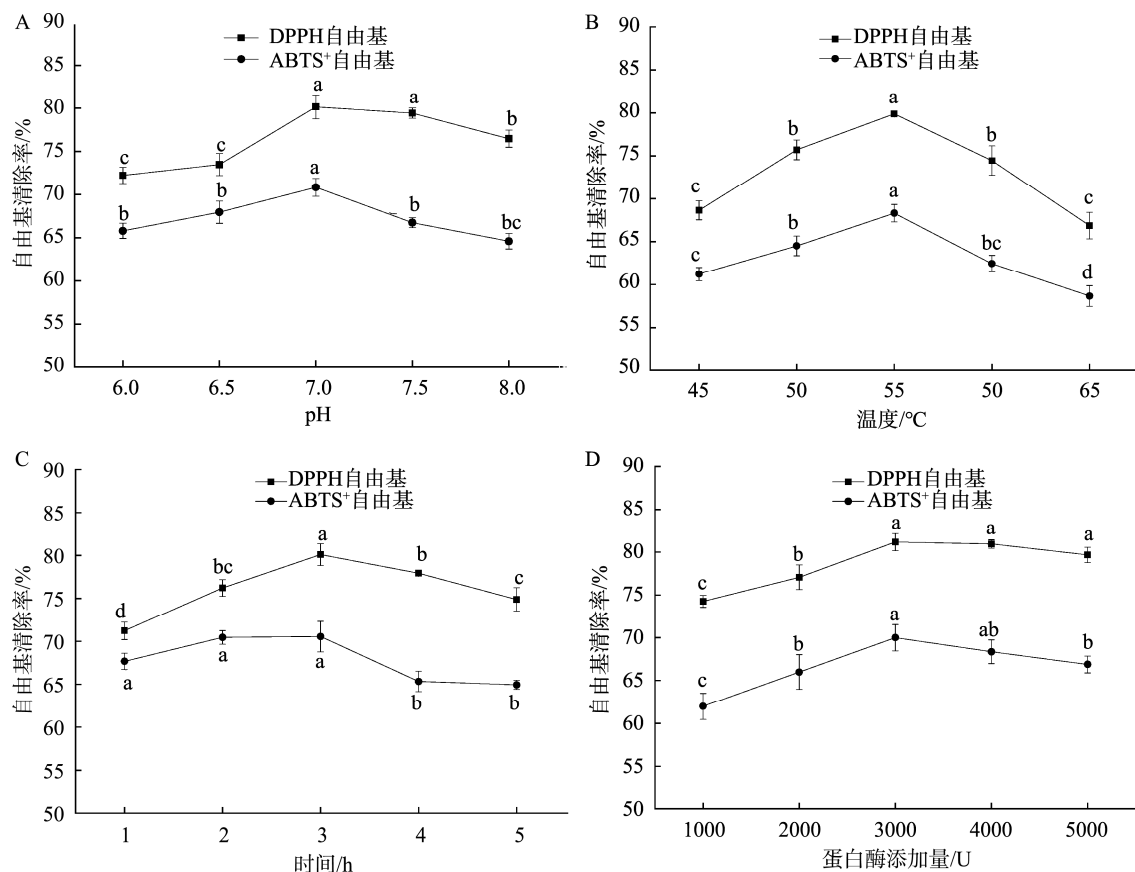


图 3 酶解各因素对自由基清除率的影响(n=5)

Fig.3 Effects of enzymatic hydrolysis factors on free radical scavenging rate (n=5)

(4) 酶添加量对红凤菜蛋白酶解产物抗氧化活性的影响

如图 3D 所示, 酶添加量在 3000 U 以内时, 酶的增多有利于提高酶解产物的抗氧化性能, 加酶量为 3000 U 时, 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的清除率最高, 分别为 81.17% 和 70.01%。此后再增加酶的投入量, 酶解产物对自由基的清除率有略微下降。可见酶添加量为 3000 U 时, 能产生最多的活性肽。酶添加量太少, 仍有部分蛋白质未能被催化水解, 肽产生量少。酶添加量过多则容易使蛋白质过度水解, 形成游离氨基酸, 活性肽含量减少。因此选择的酶添加量为 3000 U。

综上, 酶添加量为 3000 U, 反应温度为 55°C, pH 为 7.0, 反应时间为 3 h 的条件下, 酶解产物的抗氧化性能最佳。

2.3 不同分子量组酶解产物的抗氧化活性

经过超滤膜分级, 得到了不同分子量组的产物。如图 4 所示, 分子量对红凤菜多肽的抗氧化性能影响显著。分子量小于 1 kDa 时, 多肽对 DPPH 和 ABTS⁺自由基的清除率最高, 与其他组有显著区别。分子量在 1~3 kDa 之间和在 3~5 kDa 之间的多肽对两种自由基的清除能力区别不明显。分子量大于 5 kDa 时, 多肽对两种自由基的清除率最低。有研究表明, 郫县豆瓣酱的水溶性肽中, 分子量小于 1 kDa

的多肽比高分子量的多肽能更有效地清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基^[30], 这与本研究结果相一致。多肽抗氧化作用的发挥与其氨基酸组成尤其是表面氨基酸残基组成以及多肽的疏水性有重要关系^[31]。疏水性氨基酸含量高的多肽具有更好的抗氧化作用^[32]。蛋白质的分子量大, 链长比较长, 折叠盘绕成复杂的大基团, 许多具有抗氧化活性的疏

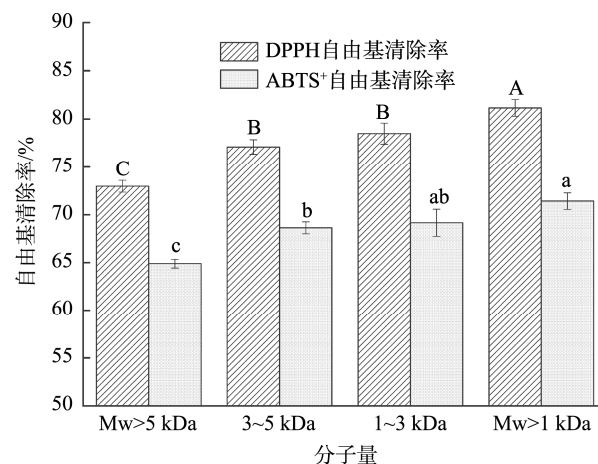


图 4 分级产物的自由基清除效果(n=5)

Fig.4 Free radical scavenging effects of graded products (n=5)

水性氨基酸被包埋在分子内部而不能发挥作用。蛋白质被酶解成小片段多肽后, 被包埋的活性氨基酸暴露于多肽片段表面, 能更好的发挥抗氧化作用。此外, 分子量更小 ($M_w < 1$ kDa) 的多肽更容易通过上皮细胞而被机体吸收, 发挥活性作用^[33]。

2.4 红凤菜多肽糖基化改性

从图 5 可看出, 红凤菜多肽与木糖进行美拉德反应后, 抗氧化性能明显提高, 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除率分别提高了 7.99% 和 11.37%。为了产品的进一步使用, 研究了体外模拟胃肠道消化前后红凤菜多肽及其与木糖美拉德反应产物的抗氧化性能, 发现未经糖基化的多肽经过消化后, 抗氧化性能有所降低, 其中对 DPPH 自由基的清除率降低显著, 对 ABTS⁺ 自由基的清除率有所降低, 但是变化不显著。经过糖基化改性后, 对两种自由基的清除率有略微的升高。综上可知, 糖基化改性对提高多肽的抗氧化性能有明显作用。可能是因为经过美拉德反应, 糖裂解产生酮、醛等小分子中间体, 这些小分子活性产物可以聚合或与多肽结合形成黑色素^[34], 这是美拉德反应产物中重要的抗氧化成分。

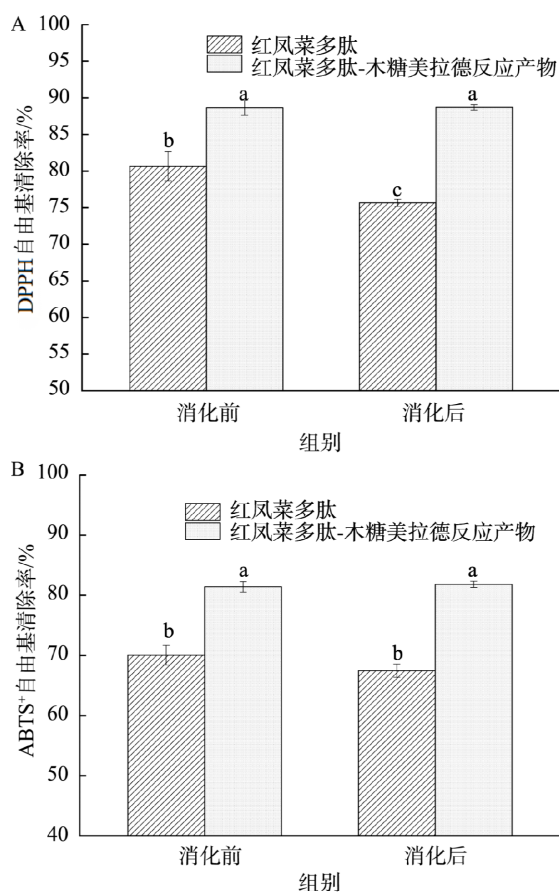


图 5 糖基化改性对 DPPH 自由基(A)和 ABTS⁺ 自由基(B)抗氧化活性的影响(n=5)

Fig.5 Effects of glycosylation modification on DPPH (A) and ABTS⁺ (B) free radical antioxidant activity (n=5)

3 结 论

本研究采取超声处理, 浸提配合间歇式高剪切的方式, 通过单因素、响应面试验对红凤菜中的蛋白质提取工艺进行了优化, 在最优条件下, 蛋白质提取率为 79.64%。用蛋白酶水解红凤菜蛋白制备活性肽, 以抗氧化性能为指标筛选合适的蛋白酶并优化酶解条件, 酶解产物有较好的抗氧化性能。用超滤膜对水解产物进行分级, 选取 $M_w < 1$ kDa 的多肽与木糖进行美拉德反应, 反应产物对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除率分别为 87.65%、80.65%。经过糖基化改性的多肽经过胃肠道体外模拟消化后, 抗氧化活性并未降低, 更耐消化。本研究制备的多肽营养成分高, 鲜味突出, 易被人体吸收且具有较好的抗氧化性, 在多种食品加工方面具有潜在价值。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第七十七卷第一分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
Editorial board of the vegetation map of China, Chinese academy of sciences. Flora of China volume 77 volume 1 [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [2] 祁百福. 红凤菜扦插苗扩繁关键技术[J]. 现代园艺, 2018, 9: 8-69.
QI BF. Key techniques of cuttage propagation of *Gynura bicolor* [J]. Mod Horticult, 2018, 9: 8-69.
- [3] 张帅, 张少平, 邱珊莲, 等. 红凤菜复合饮料的研制[J]. 福建农业科技, 2018, 11: 44-48.
ZHANG S, ZHANG SP, QIU SL, et al. Development of *Gynura bicolor* compound beverage [J]. Fujian Agric Sci Technol, 2018, 11: 44-48.
- [4] 江苏新医学院. 中药大辞典上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
Jiangsu New Medical College. Dictionary of traditional Chinese medicine volume I [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1997.
- [5] 庄莹莹, 彭妙会, 李雁群. 红凤菜紫色素提取和分离[J]. 食品工业科技, 2012, 13: 288-290.
ZHUANG YY, PENG MH, LI YQ. Extraction and isolation of purple pigments from *Gynura bicolor* [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 13: 288-290.
- [6] 张帅, 张少平, 郑云云, 等. 红凤菜花色苷三种提取方法的工艺优化和比较[J]. 食品工业科技, 2017, 12: 270-276.
ZHANG S, ZHANG SP, ZHENG YY, et al. Optimization and comparison of three extraction methods of anthocyanin from *Gynura bicolor* [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 12: 270-276.
- [7] 吕寒, 裴咏萍, 李维林, 等. 红凤菜中黄酮类化合物的高效液相色谱与多级质谱联用分析[J]. 时珍国医国药, 2011, 11: 2582-2583.
LV H, PEI YP, LI WL, et al. Detection of Flavonoids in *Gynura bicolor* DC. by HPLC-MSⁿ [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 11: 2582-2583.
- [8] 任冰如, 吕寒, 陈剑, 等. 红凤菜新鲜茎叶中总黄酮提取物的 LC-MS 分析[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 3: 108-110.
REN BR, LV H, CHEN J, et al. LC-MS analysis of total flavonoids extracts from fresh stem and leaf of *Gynura bicolor* [J]. J Plant Res Environ, 2014, 3: 108-110.
- [9] ZHOU MJ, WU XH, GAO Q, et al. Study on the total flavonoid and total phenol contents and antioxidant and α -amylase inhibitory activities of *Gynura bicolor* [J]. J Yangzhou Univ, 2021, 4: 53-57.
- [10] 鲜新, 吕寒, 孟秀花, 等. 红凤菜不同器官中黄酮类和奎宁酸类成分的 HPLC 法测定[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 6: 66-68.
XIAN X, LV H, MENG XH, et al. Determination of components of flavonoids and quinic acids in different organs of *Gynura bicolor* by HPLC method [J]. J Plant Res Environ, 2020, 6: 66-68.

- [11] 杨秀娟, 赵晓燕, 马越, 等. 红凤菜中活性物质的提取及对超氧阴离子自由基的清除作用[J]. 食品科学, 2005, 11: 78–81.
YANG XJ, ZHAO XY, MA Y, *et al.* Study on extraction of active substance in *Gynura bicolor* DC and its scavenging effects to free oxygen radical [J]. Food Sci, 2005, 11: 78–81.
- [12] 郭刚军, 胡小静, 徐荣, 等. 辣木叶酶法水解提取蛋白质工艺优化[J]. 食品工业科技, 2021, 5: 194–199.
GUO GJ, HU XJ, XU R, *et al.* Process optimization of protein extraction from moringa oleifera leaf by enzymatic hydrolysis [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 5: 194–199.
- [13] 李猛政, 李荣华, 夏岩石, 等. 烟草叶蛋白提取技术研究进展[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(4): 85–91.
LI MZ, LI RH, XIA YS, *et al.* Research progress on extraction technology of tobacco leaf proteins [J]. Chin Tob Sci, 2021, 42(4): 85–91.
- [14] 张子迪, 李宜慧, 朱彩霞, 等. 绿茶蛋白质的提取及抗氧化肽的制备研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(7): 202–206.
ZHANG ZD, LI YH, ZHU CX, *et al.* Study on the extraction of protein from green tea and preparation of antioxidant peptides [J]. J Anhui Agric Sci, 2020, 48(7): 202–206.
- [15] 张强, 李伟华. 抗氧化肽的研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 298–304.
ZHANG Q, LI WH. Research progress of antioxidant peptides [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(2): 298–304.
- [16] 栗铭鸿, 姜伊悦, 张小勇, 等. 酶法制备元蘑蛋白肽及其分级组分抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 176–181.
LI MH, JIANG YY, ZHANG XY, *et al.* Preparation and antioxidant activity of protein peptides by enzymatic from hohenbuehelia serotina [J]. Food Mach, 2019, 35(11): 176–181.
- [17] 贾蕾, 何慧, 向极轩, 等. 碎米荠晒肽的制备及其体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 205–212.
JIA L, HE H, XIANG JQ, *et al.* Preparation and antioxidant activity of se-containing peptides from cardamine ensiensis *in vitro* [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(6): 205–212.
- [18] 朱秀清, 李美莹, 孙冰玉, 等. 复合酶分步水解法制备汉麻多肽及其抗氧化特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 161–169.
ZHU XQ, LI MY, SUN BY, *et al.* Preparation of polypeptides from hemp by two-step enzymatic hydrolysis with complex enzymes and its antioxidant properties [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(2): 161–169.
- [19] 徐弦, 安兆祥, 李晓明, 等. 柑橘皮蛋白质提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 154–162.
XU X, AN ZX, LI XM, *et al.* Optimization of extraction process of protein from citrus peel and its antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(16): 154–162.
- [20] 贾建. 乳清蛋白酶解工艺参数优化及酶解产物功能特性的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.
JIA J. Study on optimization of whey protein enzymic hydrolysis technology parameters and characteristics of enzymic hydrolysis products [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2008.
- [21] LIU J, WANG CN, WANG ZZ, *et al.* The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides [J]. Food Chem, 2011, 126(1): 261–269.
- [22] RUI L, ZHENG WW, LI J, *et al.* Rapid identification of bioactive peptides with antioxidant activity from the enzymatic hydrolysate of *Mactra veneriformis* by UHPLC–Q-TOF mass spectrometry [J]. Food Chem, 2015, 167: 484–489.
- [23] CHEN X, FANG F, WANG SY. Physicochemical properties and hepatoprotective effects of glycated Snapper fish scale peptides conjugated with xylose via maillard reaction [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 137: 111115–111121.
- [24] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 等. 生物化学(上册) 第3版[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
WANG JY, ZHU SG, XV CF, *et al.* Biochemistry (volume one) 3rd edition [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002.
- [25] ZHANG Y, YU JY, WANG X, *et al.* Cosgrove. Molecular insights into the complex mechanics of plant epidermal cell walls [J]. Science, 2021, 372(6543): 706–711.
- [26] 史睿, 何静, 吉木图. 超声波辅助提取骆驼皮胶原蛋白的工艺及结构表征[J]. 中国食品学报, 2022, 2: 213–223.
SHI R, HE J, JI RMT. Ultrasonic-assisted extraction and structure characterization of collagen from camel ckin [J]. J Chin Instit Food Sci Technol, 2022, 2: 213–223.
- [27] 黄国霞, 李桥换, 阎柳娟. 均质剪切辅助响应面法提取扛板归总黄酮及其抗氧化性能研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32: 127–135.
HUANG GX, LI QH, YAN LJ. Optimization of extraction process of total flavonoids in *Polygonum perfoliatum* L. using response surface methodology and high-speed shearing technique and study on its antioxidant activity [J]. Nat Prod Res Dev, 2020, 32: 127–135.
- [28] 郑慧, 夏欣, 何奕洁, 等. 高剪切乳化技术辅助提取荷叶水不溶性膳食纤维工艺优化及其物性分析[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33: 275–281.
ZHENG H, XIA X, HE YJ, *et al.* Optimization of high shear emulsification assisted extraction of insoluble dietary fiber from lotus leaf and its physical properties [J]. Nat Prod Res Dev, 2021, 33: 275–281.
- [29] 姚海霞, 王娟, 王立梅, 等. 竹豆清蛋白提取工艺优化及亚基组成分析[J]. 食品与机械, 2018, 34(6): 174–179.
YAO HX, WANG J, WANG LM, *et al.* Optimization on extraction technology and analysis of subunit component of bamboo bean [J]. Food Mach, 2018, 34(6): 174–179.
- [30] LI MY, FAN WL, XU Y. Identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant peptides derived from Pixian broad bean paste [J]. LWT, 2021, 151: 112221.
- [31] 张丰文, 周丽亚, 董超, 等. 纳豆中抗氧化肽的分离纯化与活性研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(2): 158–165.
ZHANG FW, ZHOU YL, DOGN C, *et al.* Purification of antioxidant peptides from natto supernatant and study on its activity [J]. Biotechnol Bull, 2022, 38(2): 158–165.
- [32] GHASSEM M, ARIHARA K, MOHAMMADI S, *et al.* Identification of two novel antioxidant peptides from edible bird's nest (*Aerodramus fuciphagus*) protein hydrolysates [J]. Food Funct, 2017, 8(5): 2046–2052.
- [33] LI Y, YU J. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides [J]. J Med Food, 2014, 18(2): 147–156.
- [34] ZHA F, WEI B, CHEN S, *et al.* The Maillard reaction of ashrimp by-product protein hydrolysate: Chemical changes and inhibiting effects of reactive oxygen species in human HepG2 cells [J]. Food Funct, 2015, 6: 1919.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



黄姿梅, 硕士, 主要研究方向为食品加工与检验。
E-mail: 41690627@qq.com



黄国霞, 高级实验师, 主要研究方向为生物大分子的功能改性。
E-mail: GuoxiaHuang1234@aliyun.com