

马铃薯渣蛋白抗氧化肽的酶法制备*

王蓓 马海乐 乔玮

(江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

【摘要】 以马铃薯渣为原料,采用酶法将薯渣中的蛋白转化为具有抗氧化活性的多肽。以酶解液对 DPPH 自由基清除率为酶解效果评价指标,从木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶等 6 种商业蛋白酶中筛选出胰蛋白酶为最佳水解用酶。通过优化试验,得出薯渣蛋白最佳酶解条件为:底物质量浓度 4 g/(100 mL)、加酶量 7%、pH 值 8.0、料液温度 50℃、酶解时间 90 min。酶解液稀释 20 倍后对 DPPH 自由基的清除率为 72%,酶解液清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 值为 0.155 g/(100 mL)。

关键词: 马铃薯渣 抗氧化肽 酶解 DPPH 自由基清除率

中图分类号: TS215 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2010)S0-0198-05

Enzymatic Preparation of Anti-oxidation Peptide from Potato Pulp

Wang Bei Ma Haile Qiao Wei

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract

Protease screening was studied to prepare potato antioxidant peptide using the enzymolysis method. With potato dregs as the raw material and the scavenging rate of hydrolysate to the DPPH radical as an index, neutral protease was screened out from the following six kinds of protease: papain, flavor protease, neutral protease, alkaline protease, trypsin and pepsin. The optimum hydrolysis conditions obtained by the experiments were substrate concentration 4 g/(100 mL), 7% enzyme-substrate ratio, pH value 8.0, 50°C and 90 min reaction time. After being diluted 20 times, the scavenging rate of hydrolysate liquid to the DPPH radical reached 72%. The EC_{50} value of hydrolysate scavenging the DPPH radical was 0.155 g/(100 mL).

Key words Potato pulp, Antioxidant peptide, Zymohydrolysis, Scavenging rate of DPPH radical

引言

作为马铃薯淀粉生产过程中产生的主要副产物,马铃薯渣的主要成分为水、细胞碎片和完整的淀粉细胞^[1],其中蛋白质含量 1%~4%,淀粉含量小于 1%,营养价值较低^[2],自带菌多达 33 种,不易储存、运输,腐败变质后产生恶臭,造成环境污染。若加热干燥,则生产企业成本过高,通常作为饲料^[3]或当成废渣作掩埋处理,但会导致土壤和地下水的污染,同时利用程度较低^[4]。这些问题迫

使许多淀粉厂停止生产,是目前淀粉行业亟待解决的问题。

植物抗氧化(活性)肽能够消除自由基,抑制或消除以及减缓氧化反应。其抗氧化机理包括:给抗氧化酶提供氢、缓冲生理 pH 值、螯合金属离子和捕捉自由基等^[5]。国外已有报道从马铃薯蛋白中水解出 3 条抗氧化肽^[6]。本文以马铃薯渣为原料,采用酶解法制备生物活性肽,以酶解液对 DPPH 自由基的清除率为抗氧化指标,选择最佳的水解用酶,进行酶解条件的优化试验。

收稿日期:2010-07-01 修回日期:2010-07-22

*“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD27B06)

作者简介:王蓓,硕士生,主要从事功能多肽制备技术研究,E-mail: wangbei724@163.com

通讯作者:马海乐,教授,博士生导师,主要从事食品功能特性研究,E-mail: mhl@ujs.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与设备

马铃薯渣, 青海民和威思顿精淀粉有限责任公

司(干基蛋白质含量 37.8%); 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH, 分析纯), Sigma 公司; 无水乙醇、盐酸、氢氧化钠, 国药集团化学试剂有限公司。

6 种商业蛋白酶性能见表 1。

表 1 试验用蛋白酶的酶活及作用条件

Tab. 1 Activities and action conditions of several protein enzymes

酶的种类	缩写	最适作用条件	酶液稀释倍数	酶活力/万 U·g ⁻¹	特异性
木瓜酶	A	pH 值 6.0, 60℃	5 000	5.18	Arg-、Lys-、Phe-X-COOH
风味酶	B	pH 值 6.0, 50℃	10 000	5.65	作用范围广
中性酶	C	pH 值 7.0, 60℃	1 250	1.56	作用范围广
碱性酶	D	pH 值 9.0, 50℃	10 000	10.36	作用范围广
胰蛋白酶	E	pH 值 8.0, 50℃	2 500	0.77	Arg(Lys)-1-X
胃蛋白酶	F	pH 值 1.8, 37℃	5 000	1.39	作用范围广

HH-S 型数显恒温水浴锅, 江苏省金坛市医疗仪器厂; WFJ7200 型可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; PHS-3C 型精密 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; LD5-2A 型离心机, 北京医用离心机厂; Sartorius 型电子天平(万分之一精度), 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白酶的初选

在相同的底物质量浓度、加酶量、酶解时间, 以及每种酶推荐的最适温度和 pH 值下, 对薯渣进行酶解, 初步筛选较优蛋白酶。称取 10g 薯渣, 加蒸馏水配成底物质量浓度为 5 g/(100 mL) 的料液, 于恒温水浴锅中加热至推荐的最适温度, 调节料液至推荐 pH 值后, 按加酶量 5% 加入一定量的蛋白酶, 保温水解不同时间, 酶解结束后, 将 pH 值调至 7.0, 沸水浴灭酶 10 min, 然后在 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 并将其稀释 20 倍后, 测定酶解液对 DPPH 自由基清除率。

1.2.2 单因素对酶解液清除率的影响

对选出的酶, 进一步考察底物质量浓度、酶解时间、加酶量对其酶解效果的影响。在进行各单因素试验时, 基本流程为: 一定底物质量浓度马铃薯渣液(料液体积选择 200 mL)→调节 pH 值、温度到酶最适值→加酶→酶解一定时间→调节 pH 值至中性→灭酶(100℃, 10 min)→离心(3 500 r/min, 10 min)→收集上清液→将上清液稀释到 20 倍后测定 DPPH 自由基清除率。

1.2.3 蛋白酶酶解马铃薯蛋白工艺条件的优化

以单因素试验得到的最适条件为正交试验设计中心点, 以酶解时间、底物质量浓度和加酶量为试验因素, 设置 3 个不同的水平选用 L₉(3⁴) 正交表, 安排 9 组试验, 以 DPPH 自由基清除率为评定指标, 优

化最佳反应条件, 并确定在此条件下马铃薯抗氧化肽的 EC₅₀ 值。

1.2.4 DPPH 自由基清除率的测定方法

取 2 mL 待测样品于试管中, 再加入 2 mL 质量浓度为 0.04 g/L 的 DPPH 无水乙醇溶液, 混合均匀, 反应 20 min, 3 500 r/min 离心分离 10 min, 取上清液在 517 nm 处测其吸光度, 记为 A_i; 另取 2 mL 待测样品于试管中, 分别加入无水乙醇 2 mL, 反应 20 min, 3 500 r/min 离心分离 10 min, 取上清液在 517 nm 处测其吸光度, 记为 A_j; 以 2 mL 0.04 g/L DPPH 无水乙醇溶液和 2 mL 无水乙醇反应作为参比, 其吸光度记为 A₀。待测样品对 DPPH 自由基清除率的计算公式为^[7]

$$E_{\text{DPPH}} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right) \times 100\%$$

式中 A₀——DPPH 无水乙醇溶液 + 无水乙醇的吸光度

A_i——DPPH 无水乙醇溶液 + 待测样品的吸光度

A_j——无水乙醇 + 待测样品的吸光度

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶的选择试验

6 种蛋白酶的初选试验结果如图 1 所示。图 1 表明, 薯渣经 6 种商业蛋白酶酶解所得的水解液对 DPPH 自由基均有一定抑制作用, 其中中性酶(C)、碱性酶(D)、胰蛋白酶(E)表现较优, 酶解液对 DPPH 自由基的清除率在 70% 左右, 马铃薯抗氧化肽的 EC₅₀ 值均较低, 但存在较大差异。由于酶自身具有特异性, 故对于同一种原料蛋白的作用位点不同, 导致所得酶解液对 DPPH 自由基清除率不同, 所得多肽的量和抗氧化活性不同。

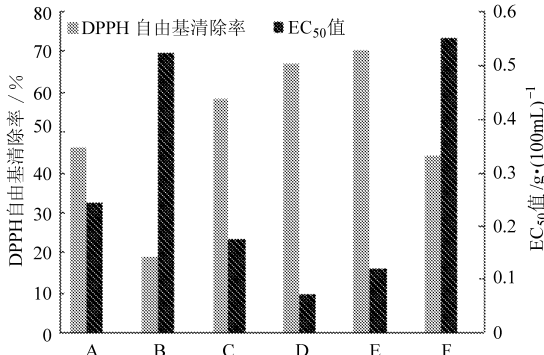


图1 各酶解液的 DPPH 自由基清除率和 EC₅₀ 值

Fig.1 DPPH free radical scavenging effect and EC₅₀ value of hydrolysate

6种酶按照表1中列出的最适温度和pH值,分别酶解90min以上,所得水解物的上清液对DPPH自由基清除率随酶解时间的变化趋势如图2所示。由图2可以看出,随着酶解时间的增加,清除率总体呈现上升的趋势,因为酶解时间的延长酶解出的肽段增加,而继续酶解趋于平缓是因为底物减少、产物抑制效应、抗氧化活性肽所占比例可能逐渐减小。在清除率方面,胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶效果较为突出,均在50%以上。在酶解时间5~30min内,胰蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物对DPPH自由基清除率变化趋势较为明显。另外,胰蛋白酶有专一的作用位点Arg(Lys)-I-X,而碱性蛋白酶作用广泛,不利于获得纯度高的产品。胰蛋白酶在酶活力较低(表1)的情况下还能达到此效果,可见其作用能力之强。

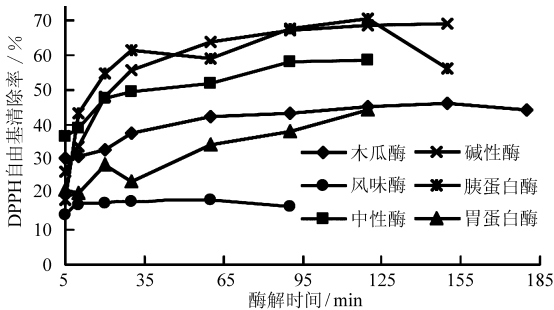


图2 6种酶不同酶解时间对DPPH自由基清除率的影响

Fig.2 Influence of 6 different enzymes' reaction time on DPPH free radical scavenging effect

此外,胰蛋白酶水解马铃薯蛋白的速度较中性酶和木瓜蛋白酶快,说明胰蛋白酶对水解马铃薯蛋白更具有专一性。这与赵晶等^[8]的研究结果一致,故本文选胰蛋白酶为后续研究水解用酶。

2.2 酶解试验

2.2.1 单因素试验

(1) 酶解时间

在底物质量浓度5g/(100mL)、加酶量5%、pH值8.0、温度50℃条件下进行酶解反应,酶解时间对

酶解液DPPH自由基清除率的影响如图3所示。

由图3可以看出,随着酶解时间的延长清除率先是快速上升然后趋于平缓最后逐渐下降,这是因为随着酶解时间的延长,产生的活性肽增加,底物减少,并出现产物抑制作用,使反应动力下降,速率减小,导致30min之后DPPH的抑制率变得平缓;当时间进一步延长125min,部分多肽被降解,故水解物的抗氧化活性略有下降。

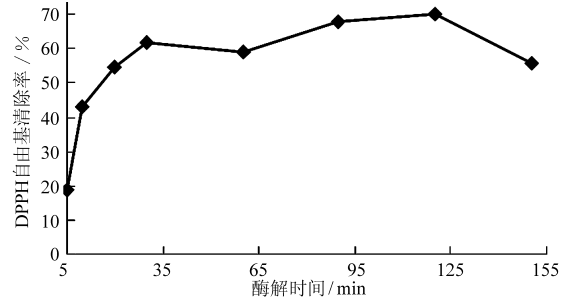


图3 酶解时间对酶解液DPPH自由基清除率的影响

Fig.3 Influence of reaction time on DPPH free radical scavenging effect

(2) 底物质量浓度

在加酶量5%、pH值8.0、温度50℃的条件下,进行酶解反应90min,底物质量浓度对酶解液DPPH自由基清除率的影响如图4所示。

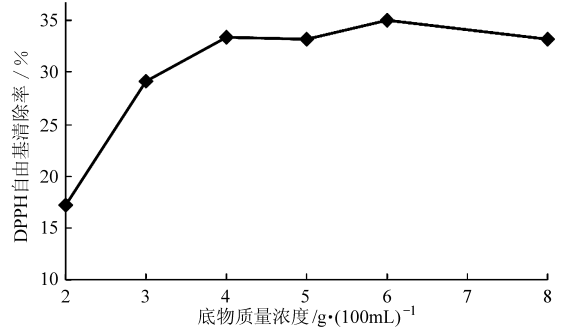


图4 底物质量浓度对酶解液DPPH自由基清除率的影响

Fig.4 Influence of protein concentration on DPPH free radical scavenging effect

由图4可以看出,随着底物质量浓度的增加DPPH自由基清除率呈现先上升后平缓的趋势,在底物质量浓度为4g/(100mL)以后增长平缓甚至出现下降。在浓度较低时,酶相对过量,底物质量浓度的增大会加大酶与底物的结合,酶能够充分发挥作用,同时底物质量浓度的增加可以将反应平衡右移,使产物增加。但随着底物质量浓度的加大,酶量不再充足,反应动力变弱;另外料液粘度增大,使搅拌速率降低,传热传质能力降低,所以酶解物对DPPH清除率的增加不显著。

(3) 加酶量

在底物质量浓度5g/(100mL)、pH值8.0、温度50℃的条件下,酶解90min,加酶量对酶解液

DPPH 自由基清除率的影响如图 5 所示。

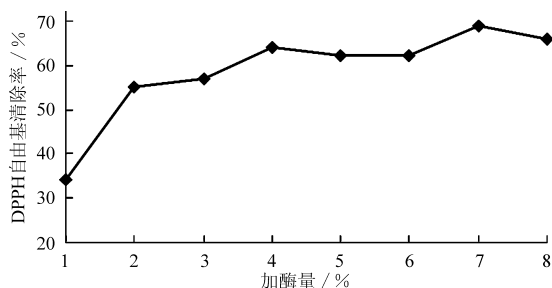


图 5 加酶量对酶解液 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 5 Influence of enzyme concentration on DPPH free radical scavenging effect

由图 5 可以看出,随着加酶量的增大,酶解液的 DPPH 自由基清除率呈上升趋势,在加酶量为 2% 时清除率增加速度较高,但加酶量大于 2% 后,清除率均在 55% ~ 70% 间波动。酶浓度越大,越能充分利用底物,生成的肽段越多,然而随着加酶量增加底物质量浓度相对逐渐减小直至底物不足;当酶浓度进一步增大,则抗氧化活性长肽链被降解,清除率下降。

2.2.2 正交试验结果与分析

根据单因素所选取的酶解时间、底物质量浓度、加酶量,进行三因素三水平正交试验,试验设计如表 2 所示;以上清液稀释 20 倍测定其 DPPH 自由基清除率为检测指标,结果如表 3 所示。

表 2 正交试验水平设计

Tab. 2 Orthogonal experimental scheme

水平	因素		
	酶解时间 A /min	底物质量浓度 B /g·(100 mL) ⁻¹	加酶量 C/%
1	60	4	6
2	90	5	7
3	120	6	4

利用正交设计助手软件分析,得到胰蛋白酶最优酶解条件组合为 A₂B₁C₂,即酶解时间 90 min、底物质量浓度 4 g/(100 mL)、加酶量 7%,即第 4 组组合,重复第 4 组试验得到清除率为 72%。

2.2.3 最优条件下 EC₅₀ 值的确定

采用胰蛋白酶在最佳酶解工艺条件下酶解马铃薯蛋白,对酶解液固形物质量浓度与清除率之间试验数值关系进行方程回归,由图 6 可以得到酶解物

表 3 L₉(3⁴) 正交试验安排与结果

Tab. 3 Results of L₉(3⁴) orthogonal experiment

试验序号	A	B	C	DPPH 自由基清除率/%
1	1	1	1	51.2
2	1	2	2	51.9
3	1	3	3	49.5
4	2	1	2	64.3
5	2	2	3	53.3
6	2	3	1	53.8
7	3	1	3	57.8
8	3	2	1	50.7
9	3	3	2	58.5
k ₁	50.867	57.767	51.900	
k ₂	57.133	51.967	58.233	
k ₃	55.667	53.933	53.533	
R	6.266	5.800	6.333	

的 EC₅₀ 值为 0.155 g/(100 mL),文献[9]中经酶法处理大豆糖蜜样品 EC₅₀ 值为 0.919 g/(100 mL)。

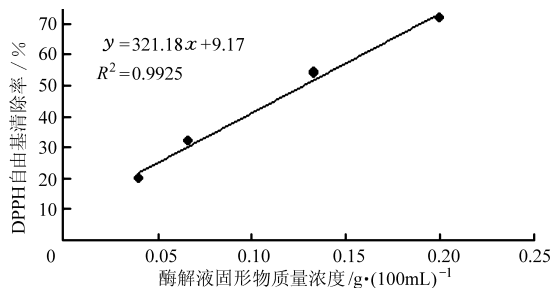


图 6 最优条件下大米抗氧化肽的 EC₅₀ 值

Fig. 6 EC₅₀ value of rice antioxidant on optimal experimental condition

3 结论

(1)木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶等 6 种商业蛋白酶中后 3 种被用于马铃薯蛋白酶解时,其酶解液具有较高的 DPPH 自由基清除活性,其中胰蛋白酶是酶解效果最佳的蛋白酶。

(2)胰蛋白酶催化法制备抗氧化肽的最佳酶解反应条件为:底物质量浓度 4 g/(100 mL)、加酶量 7%、酶解时间 90 min,酶解液稀释 20 倍后对 DPPH 自由基的清除率为 72%,酶解液清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 值为 0.155 g/(100 mL)。

参 考 文 献

- Frank Mayer. Potato pulp: properties, physical modification and applications [J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59(1~3):231~235.
- 王拓一,张杰,吴耘红,等. 马铃薯渣的综合利用研究[J]. 农产品加工·学刊,2008(7):103~105.

- Wang Tuoyi, Zhang Jie, Wu Yunhong, et al. Review on comprehensive utilization of the potato pulp [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2008(7): 103 ~ 105. (in Chinese)
- 3 赵凤敏,李树君,方宪法,等.马铃薯薯渣固态发酵制作蛋白饲料的工艺研究[J].农业机械学报,2006,37(8):49 ~ 51.
Zhao Fengmin, Li Shujun, Fang Xianfa, et al. Study on solid substrate fermentation technology in producing protein feeds with potato residues [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2006, 37(8): 49 ~ 51. (in Chinese)
- 4 王卓,顾正彪,洪雁.马铃薯渣的开发与利用[J].中国粮油学报,2007,22(2):133 ~ 136.
Wang Zhuo, Gu Zhengbiao, Hong Yan. Review: exploitation and utilization of potato pulp[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2007, 22(2): 133 ~ 136. (in Chinese)
- 5 周小理,李红敏.植物抗氧化(活性)肽的研究进展[J].食品工业,2006(3):11 ~ 13.
Zhou Xiaoli, Li Hongmin. Progress in research on antioxidant peptides from plant [J]. Food Industry, 2006(3): 11 ~ 13. (in Chinese)
- 6 Katsuhiko Kudo, Shuichi Onodera, Yasuyuki Takeda, et al. Antioxidative activities of some peptides isolated from hydrolyzed potato protein extract[J]. Journal of Functional Foods, 2009,1(2): 170 ~ 176.
- 7 Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000,48(7): 2755 ~ 2759.
- 8 赵晶,王雪飞,白扬.酶法水解马铃薯蛋白技术的研究[J].食品科技,2008(8):48 ~ 50.
Zhao Jing, Wang Xuefei, Bai Yang. Study on the technique of hydrolyzed potato protein by proteinase [J]. Food Science and Technology, 2008(8):48 ~ 50. (in Chinese)
- 9 李晓磊,李丹,殷涌光.酶法提高大豆糖蜜抗氧化活性及其机理[J].农业机械学报,2009,40(2):135 ~ 138.
Li Xiaolei, Li Dan, Yin Yongguang. Enhanced antioxidant activity of soybean molasses using cellulase[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(2): 135 ~ 138. (in Chinese)
-

(上接第 181 页)

- 3 徐艳阳,张慙,陈亦辉,等.热风 and 微波真空联合干燥甘蓝试验[J].无锡轻工大学学报,2003,22(6):64 ~ 66,95.
Xue Yanyang, Zhang Min, Chen Yihui, et al. Studies on combination drying of wild cabbage with hot-air and vacuum microwave[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2003, 22(6): 64 ~ 66,95. (in Chinese)
- 4 韩清华,李树君,马季威,等.微波真空干燥膨化苹果脆片的研究[J].农业机械学报,2006,37(8):155 ~ 158,167.
Han Qinghua, Li Shujun, Ma Jiwei, et al. Microwave vacuum drying and puffing characteristics of apple chips [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2006, 37(8): 155 ~ 158,167. (in Chinese)
- 5 宁夏农林科学院农副产品贮藏加工研究所,宁夏轻工设计研究院食品发酵研究所,宁夏农林科学院枸杞研究所,等. GB/T 18672—2002 枸杞(枸杞子)[S].