

贾蕾, 何慧, 向极钐, 等. 碎米荠硒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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070059

JIA Lei, HE Hui, XIANG Jiqian, et al. Preparation and Antioxidant Activity of Se-containing Peptides from *Cardamine ensliensis* in *Vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 205–212. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070059

· 工艺技术 ·

碎米荠硒肽的制备及其体外抗氧化活性分析

贾 蕾¹, 何 慧¹, 向极钐², 赵小红¹, 侯 焘^{1,*}

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070;

2. 恩施土家族苗族自治州农业科学院, 湖北恩施 445002)

摘 要: 本文以恩施碎米荠为原料, 采用酶法制备具有抗氧化活性的碎米荠硒肽。以蛋白提取率为指标, 通过单因素实验和正交试验优化了碎米荠蛋白的提取条件; 以 DPPH·、ABTS⁺清除率为考察指标, 优化了碎米荠蛋白的酶解参数, 利用超滤设备对碎米荠蛋白酶解液进行分级分离, 确定了碎米荠硒肽制备的最佳方案; 考察了碎米荠硒肽的还原力、Fe²⁺螯合能力。结果表明, 碎米荠蛋白提取的最优条件为: 提取溶液 0.1 mol/L NaOH、液料比 45:1 mL/g、提取温度 60 °C、提取时间 3 h、提取 2 次, 此时碎米荠蛋白的提取率为 72.91%。碎米荠硒肽制备的最佳条件为: 碱性蛋白酶、底物浓度 4%、酶底比 1.0%、酶解时间 1 h, 超滤膜截留分子量为 1 kDa, 所得碎米荠硒肽的含硒量为 362.378 mg/kg, 其 DPPH·、ABTS⁺清除率的 EC₅₀ 值分别为 0.435 和 0.399 mg/mL, 并表现出良好的还原力和 Fe²⁺螯合能力。

关键词: 恩施碎米荠, 抗氧化肽, 酶解, 超滤

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)06-0205-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070059



本文网刊:

Preparation and Antioxidant Activity of Se-containing Peptides from *Cardamine ensliensis* in *Vitro*

JIA Lei¹, HE Hui¹, XIANG Jiqian², ZHAO Xiaohong¹, HOU Tao^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Enshi Tujia & Miao Autonomous Prefecture Academy of Agricultural Sciences, Enshi 445002, China)

Abstract: In this study, the enzymatic method was used to prepare Se-containing peptides (SeCPPs) with antioxidant activity from *Cardamine ensliensis*. The extraction conditions of protein of *C. ensliensis* (SeCP) were optimized by single-factor experiments and orthogonal test with protein extraction rate as the index. The enzymatic parameters of SeCP were optimized with DPPH· and ABTS⁺ scavenging rate as the investigated index, and ultrafiltration equipment was used to determine the best protocol for the SeCPPs. The reducing power and Fe²⁺ chelating ability of Se-containing peptides were investigated. The results showed that the optimal conditions for the extraction of SeCP were: 0.1 mol/L NaOH solution, liquid to material ratio 45:1 mL/g, extraction temperature 60 °C, extraction time 3 h, twice. Under this condition, the extraction rate of SeCP was 72.91%. The optimum conditions for the enzymatic preparation of antioxidant SeCPPs were: 4% substrate concentration, 1.0% enzyme substrate ratio, 1 h digestion time, 1 kDa molecular weight retained by ultrafiltration membrane. The Se content in SeCPP was 362.378 mg/kg, and the EC₅₀ values of DPPH· and ABTS⁺ scavenging rate were 0.435 and 0.399 mg/mL, respectively. Besides, SeCPPs showed better reducing power and Fe²⁺ chelating ability.

Key words: *Cardamine ensliensis*; antioxidant peptides; enzymolysis; ultrafiltration

收稿日期: 2021-07-06

基金项目: 中国博士后科学基金第 67 批面上资助 (2020M672313)。

作者简介: 贾蕾 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物活性肽与分子营养, E-mail: 1835377619@qq.com。

* 通信作者: 侯焘 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物活性肽与分子营养, E-mail: houtao@mail.hzau.edu.cn。

恩施碎米荠(*Cardamine ensiensis*)是一种十字花科碎米荠属的多年生草本植物,可药食两用,现已开始规模化种植^[1]。该植物属于高聚硒植物,脂肪含量低、蛋白含量高、矿物质种类丰富,具有明显的地域特色,是极具开发价值的植物资源^[2]。植物中硒的蓄积通常涉及硒代氨基酸的合成,以此消除植物体出现的硒代谢不平衡,防止机体功能失调^[3]。目前,针对碎米荠的研究多集中于其生理特性、耐硒机理、大分子物质(如硒蛋白、硒多糖)的生理活性等方面。比如,石爱华等人对碎米荠的基础理化性质和营养价值进行了研究^[4];有学者利用基因组学、生物信息学等技术对碎米荠的耐硒机制进行了初步探究^[5];还有研究发现碎米荠多糖具备良好的抗肿瘤活性^[6]。然而,对来源于碎米荠的小分子活性物质的研究却鲜见,结合其耐硒、富硒的植物特点以及硒和肽均具有良好的抗氧化活性^[7-8],开发来源于碎米荠的抗氧化活性硒肽极具应用前景。

近年来,国内外研究者在植物源抗氧化肽方面已做了大量研究,证实其营养价值和附加价值均较高,与生物合成的抗氧化物相比,其副作用小、生产成本低,对于促进人体健康具有重要意义^[9]。例如,米糠蛋白水解物被证实具有良好的抗氧化、抗炎活性,能够减轻氧化应激,缓解代谢综合征^[10];燕麦麸蛋白水解物在体外细胞实验中,表现出了降低活性氧含量、提高抗氧化酶活性和降低促凋亡酶活性的能力,可防止氧化应激导致的细胞凋亡^[11];菜籽粕蛋白水解物在体内外实验中均显示具有良好的抗氧化能力,不仅能够清除超氧阴离子,且能够大幅度降低体内的丙二醛含量,是抗氧化肽的优良来源^[12]。

本研究以恩施碎米荠为原料,从中提取碎米荠蛋白,然后以自由基清除能力为评价指标,通过蛋白酶的筛选及单因素实验确定最佳酶解方案,后采用膜分离设备得到抗氧化活性较强的小分子碎米荠硒肽,以期对碎米荠的深入开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

恩施碎米荠干株 恩施土家族苗族自治州农业科学院提供;碱性蛋白酶(1.50×10^5 U/mL)、中性蛋白酶(6.69×10^4 U/mL)、复合蛋白酶(1.85×10^5 U/g)、胰蛋白酶(2.50×10^5 U/g)、木瓜蛋白酶(8.00×10^5 U/g)

诺维信(中国)生物技术有限公司;1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS) 源叶生物;硒标准溶液(1000 mg/mL) 天津市光复精细化工研究所;盐酸、硝酸为国产优级纯;其他试剂 均为国产分析纯。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 巩义市予华仪器有限责任公司;FE20 实验室 pH 计、ML204/02 电子天平 上海梅特勒-托利多仪器有限公司;LGJ-12 冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司;半自动凯氏定氮仪 海能仪器股份有限公

司;Multiskan Spectrum 全波长酶标仪 美国 Thermo 公司;截留分子量为 5、3、1 kDa 再生纤维素卷式膜

美国 Millipore 公司;Kylin-S12+AS-90L+SA50+5500 型液相色谱-原子荧光联用仪 北京吉天仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程及操作要点 本实验碎米荠肽的制备工艺流程如图 1 所示。恩施碎米荠干株打粉,过 80 目筛,低温干燥条件下贮藏,用于碎米荠蛋白提取;蛋白提取采用碱液提取,调节 pH 以沉淀蛋白,并对所提取蛋白进行氨基酸分析。利用商业酶酶解蛋白,酶解前碎米荠蛋白溶液沸水浴 30 min 预变性,酶解结束后,同样沸水浴灭酶 10 min,最终以 DPPH·、ABTS⁺清除能力为指标筛选制备具有高抗氧化活性的碎米荠肽,利用超滤分级获得活性最高的肽级分。

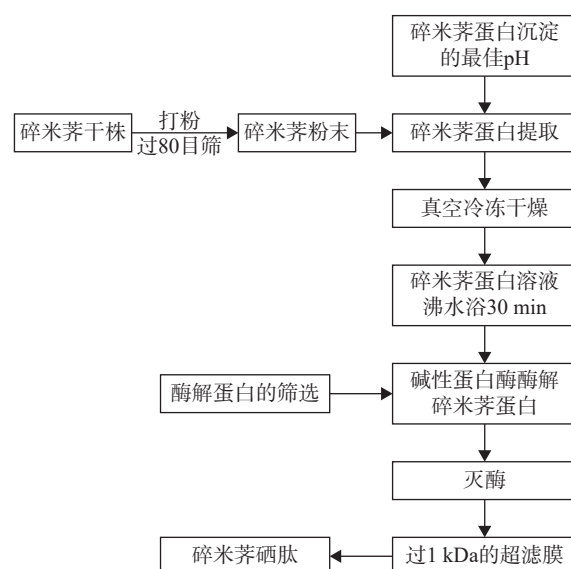


图1 碎米荠硒肽制备的工艺流程图

Fig.1 Process flow chart of preparation of selenopeptide from *C. ensiensis*

1.2.2 碎米荠蛋白提取工艺优化及氨基酸分析

1.2.2.1 碎米荠蛋白沉淀的最佳 pH 的确定 利用 0.10 mol/L 的 NaOH 溶液在液料比 $40:1 \text{ mL/g}$ 、 40°C 的条件下对碎米荠浸提 3 h, 提取结束后, 离心 (3800 r/min , 20 min) 保留上清液, 将其均分为 11 份, 依次调节 pH 为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0, 静置 2 h 后, 离心 (10000 r/min , 20 min) 收集上清液。用考马斯亮蓝法测上清液中蛋白的残留量。

1.2.2.2 单因素实验 以 0.100 mol/L NaOH 溶液、提取温度 40°C 、液料比 $40:1 \text{ mL/g}$ 、提取时间 3 h、提取 1 次作为固定条件, 考察 NaOH 溶液浓度 (0.025 、 0.050 、 0.075 、 0.100 、 0.125 mol/L)、提取温度 (30 、 40 、 50 、 60 、 70°C)、液料比 ($20:1$ 、 $30:1$ 、 $40:1$ 、 $50:1$ 、 $60:1 \text{ mL/g}$)、提取时间 (2 、 3 、 4 、 5 、 6 h)、提取次数 (1 、 2 、 3) 对碎米荠蛋白提取率的影响。

表 1 碎米荠蛋白提取正交试验因素水平表

Table 1 Independent variables and levels of orthogonal of the extraction of *C. ensliensis* proteins

水平	A 液料比(mL/g)	B 温度(℃)	C NaOH浓度(mol/L)
1	45:1	55	0.08
2	50:1	60	0.10
3	55:1	65	0.12

1.2.2.3 正交试验 在单因素实验基础上,采用三因素三水平正交表 $L_9(3^4)$,如表 1 所示,以蛋白提取率为测定指标,对提取条件进行优化。

1.2.2.4 蛋白质提取率的测定 参考文献 [13] 对碎米荠粉的蛋白质氮和非蛋白质氮进行分离,具体方法为: 20 mL 5% 三氯乙酸溶液在室温下浸提 0.1 g 碎米荠粉 1 h,非蛋白质氮类物质溶于三氯乙酸,蛋白质氮存于沉淀内。参考 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》,利用凯氏定氮法对碎米荠粉的氮含量、非蛋白质氮含量以及碎米荠蛋白纯度进行测定,蛋白质系数取 6.25,得到碎米荠粉中的蛋白含量为 9.79%。碎米荠蛋白提取率参考以下公式进行计算:

$$\text{蛋白提取率}(\%) = \frac{\text{碎米荠蛋白质量} \times \text{碎米荠蛋白纯度}}{\text{碎米荠粉质量} \times \text{碎米荠粉蛋白含量}} \times 100$$

1.2.2.5 氨基酸分析 参考 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》对碎米荠蛋白进行氨基酸种类及含量进行测定。

1.2.3 碎米荠硒肽制备工艺的优化及体外抗氧化活性

1.2.3.1 单因素实验 考察碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶对碎米荠蛋白酶解效果的影响。在五种酶的最适反应条件下(表 2),按照碎米荠蛋白质量浓度 3%、加酶量 3%、反应时间 3 h 的酶解条件,以水解度(DH)、DPPH·和 ABTS⁺清除率为主要指标,筛选出最佳试验用蛋白酶。

表 2 蛋白酶的最适反应条件

Table 2 Optimal reaction conditions of protease

蛋白酶种类	最适温度(℃)	最适pH	酶活
碱性蛋白酶	55	8.0	1.50×10^5 U/mL
中性蛋白酶	50	7.0	6.69×10^4 U/mL
复合蛋白酶	55	7.0	1.85×10^5 U/g
木瓜蛋白酶	50	7.5	2.50×10^5 U/g
胰蛋白酶	37	6.5	8.00×10^5 U/g

在最佳实验用蛋白酶的最适反应条件下,考察碎米荠蛋白质量浓度(2%、3%、4%、5%、6%)、酶解时间(1、2、3、4、5 h)、酶底比(0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%)对碎米荠蛋白酶解效果的影响。其中,以碎米荠蛋白质量浓度 3%、酶解 3 h、酶底比 3.0% 为固定条件,以 DPPH·、ABTS⁺清除率为主要指标,筛选出最佳的酶解条件。

1.2.3.2 碎米荠蛋白酶解物的分级 碎米荠蛋白酶解液依次通过截留分子量为 5、3、1 kDa 的超滤膜,收集不同级分的滤出液,旋转浓缩后冻干即为不同级分的碎米荠肽。测定不同级分碎米荠肽的 DPPH·、ABTS⁺清除能力以及硒含量,确定分离碎米荠酶解液的超滤膜规格。

1.2.3.3 水解度的确定 采用 Ph-STAT法测定DH^[14-15]。

$$\text{DH}(\%) = \frac{1}{\alpha} \times \frac{\text{BN}_b}{\text{Mh}_{\text{tot}}} \times 100$$

式中: α 表示 NH_2 基团的平均解离度,等于 1.01; B 表示碱液的用量(L); N_b 表示碱液的浓度(0.5 mol/L); M 表示蛋白的质量(kg); h_{tot} 表示蛋白底物的总肽键数,由氨基酸检测结果计算得知碎米荠蛋白的 h_{tot} 值为 7.95 mmol/g。

1.2.3.4 硒含量的测定 参考 GB 5009.93-2017《食品中硒含量的测定》对碎米荠不同级分肽的硒含量进行测定。

1.2.3.5 DPPH·清除能力的测定 参考文献 [16] 的方法对碎米荠蛋白酶解液(2.0 mg/mL)及不同级分碎米荠肽的 DPPH·清除能力进行测定。清除率为 50% 的质量浓度为半有效浓度(EC_{50} 值),用来表示不同级分碎米荠肽的 DPPH·清除能力。

1.2.3.6 ABTS⁺清除能力的测定 参考文献 [17] 的方法对碎米荠蛋白酶解液(2.0 mg/mL)及不同级分碎米荠肽的 ABTS 自由基清除能力进行测定。用 EC_{50} 值表示不同级分碎米荠肽的 ABTS⁺清除能力。

1.2.3.7 还原力的测定 参考文献 [18] 的方法对碎米荠硒肽的还原力进行测定。取 100 μL 待测样品溶液与试管内,依次加入 100 μL 0.2 mol/L PBS 缓冲液(pH6.6)和 100 μL 1.0% 的铁氰化钾溶液,混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min,冷却至室温后加入 100 μL 10% 的三氯乙酸溶液,混匀,3000 r/min 下离心 10 min,取 100 μL 上清液于 96 孔板内,依次加入等体积的蒸馏水和 1/5 体积的 0.1% 三氯化铁溶液,混匀,室温下避光静置 10 min,用酶标仪在 700 nm 下测定吸光值。

1.2.3.8 Fe^{2+} 螯合能力 参考文献 [19] 的方法对碎米荠硒肽的 Fe^{2+} 螯合能力进行测定。96 孔板内,依次加入 100 μL 待测样品溶液、135 μL 超纯水和 5 μL 2 mmol/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,室温静置 3 min 后,继续加入 10 μL 5 mmol/L 的非洛嗪溶液,均匀混合后,室温静置 10 min,用酶标仪在 562 nm 下测定吸光值,以 EDTA-2Na 作为阳性对照。

$$\text{Fe}^{2+} \text{螯合率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_1 为待测样品的吸光值; A_0 为空白对照组的吸光值。

1.3 数据处理

所有实验重复 3 次,取平均值,数据处理利用 SPSS.17 软件,绘图利用 GraphPad Prism7.0 软件进

行处理,采用单因素方差分析(ANOVA)对 $P<0.05$ 的差异进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 碎米荠蛋白最佳沉淀 pH 的确定

考马斯亮蓝法是测定可溶性蛋白含量的方法,在其他条件固定的情况下,所测 OD 值的大小与蛋白含量呈正相关关系,因此,碎米荠蛋白提取液上清中蛋白含量最低时的 pH 即为沉淀碎米荠蛋白的最佳 pH。如图 2 所示,OD 值随着 pH 的增大呈现先减后增的趋势,当 pH 为 4.0 时,OD 值最小,即蛋白沉降较为完全。由此确定碎米荠蛋白沉淀的最佳 pH 为 4.0。

2.2 碎米荠蛋白提取的单因素实验

2.2.1 NaOH 溶液浓度对蛋白提取率的影响 如图 3a 所示,碎米荠蛋白提取率随 NaOH 溶液浓度的增大呈现先增加后减小的趋势。因为随着碱液浓度的增

加,碎米荠的细胞壁被破坏,更利于蛋白的溶出,当 NaOH 溶液为 0.1 mol/L 时,蛋白提取率最高为 61.57%,显著高于其他碱液浓度提取所得蛋白($P<0.05$),而随着碱液浓度的继续增大,部分蛋白质溶解,不利于沉降,碎米荠蛋白提取率随之下降。因此,选择碎米荠

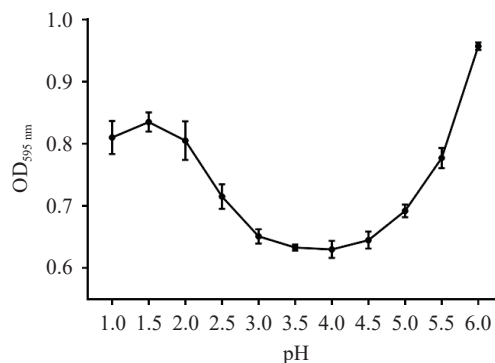


图 2 pH 对上清液光密度的影响

Fig.2 Effect of pH on the optical density of the supernate

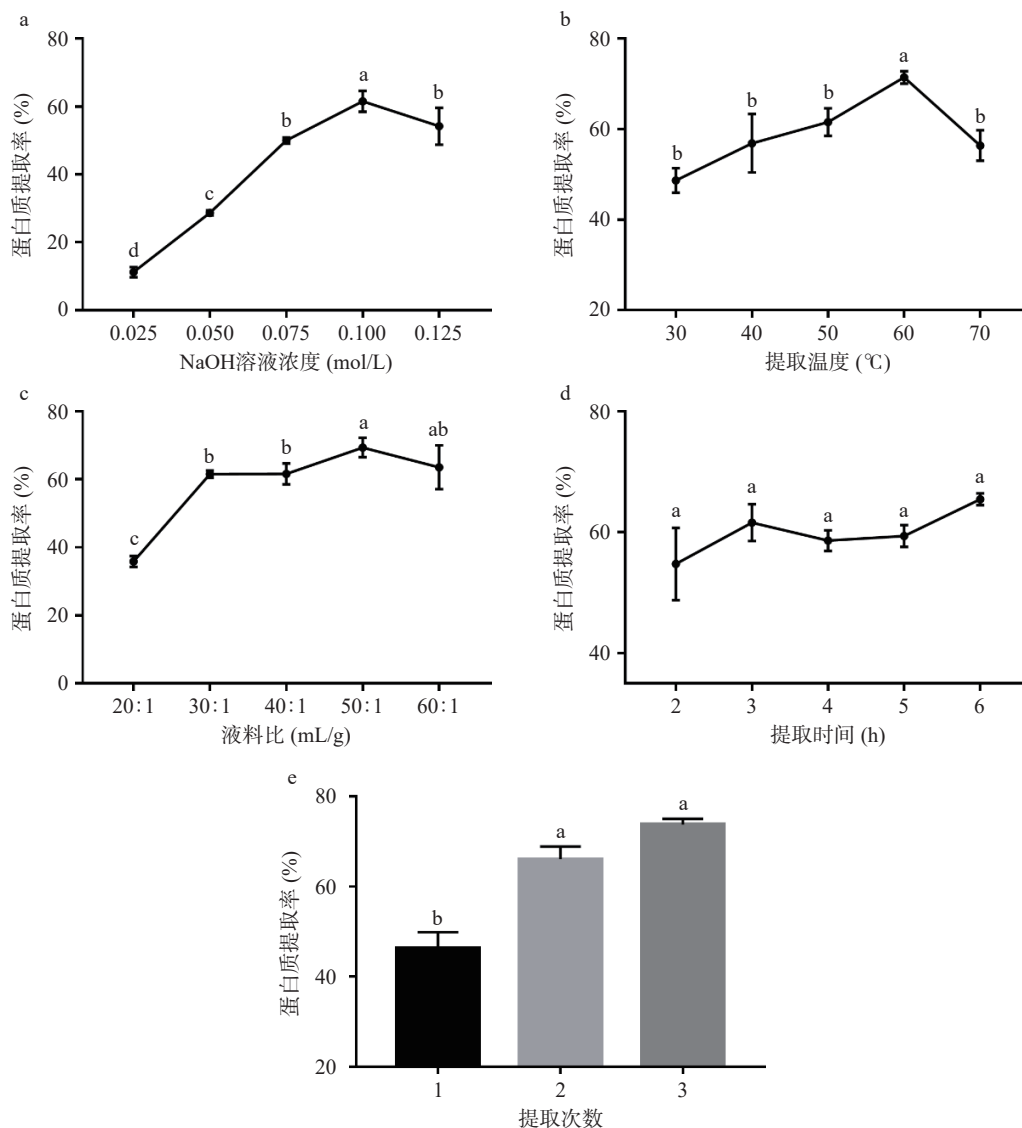


图 3 各因素对碎米荠蛋白提取率的影响

Fig.3 Influence of various factors on the extraction rate of SeCP

注: 对于同一指标, 不同字母表示数据差异显著($P<0.05$), 相同字母数据表示差异不显著($P>0.05$); 图 4~图 7 同。

蛋白提取的最佳 NaOH 溶液浓度宜控制在 0.10 mol/L 左右。

2.2.2 提取温度对蛋白提取率的影响 如图 3b 所示,提取温度在 30~50 ℃ 时,蛋白质的提取率变化不显著($P>0.05$); 60 ℃ 时,蛋白质的提取率显著高于其他处理组($P<0.05$)。随着温度的增加,蛋白提取率下降,其原因可能是温度过高,导致蛋白质变性,影响蛋白质的溶出。因此,碎米荠蛋白提取的最佳温度应控制在 60 ℃ 左右。

2.2.3 液料比对蛋白提取率的影响 如图 3c 所示,蛋白的提取率随着液料比的增加而趋于平稳,在液料比为 50:1 mL/g 时,蛋白质提取率最高为 69.32%,且与液料比为 40:1 mL/g 时的提取率有显著性差异($P<0.05$),因为随着液料比的增加,溶液的浓稠度变小,碎米荠粉的分散性改善,有利于蛋白的溶出。因此,蛋白质提取的液料比宜控制在 50:1 mL/g 左右。

2.2.4 提取时间对蛋白质提取率的影响 如图 3d 所示,随着提取时间的增加,碎米荠蛋白的提取率并没有显著性改变,说明浸提时间对蛋白的提取率影响较小。这可能是在较短的浸提时间内,碱液就打开了碎米荠的细胞壁,与蛋白质充分接触,高效地促使蛋白

溶出。综合考虑,选择 3 h 作为最佳提取时间。

2.2.5 提取次数对蛋白提取率的影响 如图 3e 所示,碎米荠蛋白提取率随着提取次数的增加而增大,提取 2 次与 3 次,蛋白提取率虽有增大,但已无显著性差异($P>0.05$),故选择碎米荠蛋白的最佳提取次数为 2 次。

2.3 碎米荠蛋白质提取的正交试验

根据单因素实验的结果,选取 NaOH 溶液浓度、提取温度、液料比 3 个因素进行正交试验,各因素设 3 个水平,结果如表 3 所示。采用极差分析可知 3 个因素均会影响碎米荠蛋白提取率,NaOH 溶液浓度的影响最大,其最佳提取组合为 $A_1B_2C_2$,即采用液料比 45:1 mL/g、60 ℃、0.1 mol/L NaOH 溶液、3 h、提取 2 次作为碎米荠蛋白的最佳提取条件。经验证,此时碎米荠蛋白的提取率为 72.91%,所得碎米荠蛋白的纯度为 50.50%。

2.4 碎米荠蛋白的氨基酸分析

由表 4 可知,碎米荠蛋白富含多种氨基酸。其中,44.37% 为人体必需氨基酸,疏水性氨基酸占比约 52.09%。生物活性肽的活性与其分子量、链长、氨基酸组成以及排序等有关,疏水性氨基酸(如 Leu、

表 3 碎米荠蛋白提取的正交试验及极差分析
Table 3 Orthogonal test and range analysis of SeCP extraction

实验号	A	B	C	提取率(%)
1	1	1	1	60.58
2	1	2	2	71.40
3	1	3	3	65.12
4	2	1	2	62.55
5	2	2	3	63.22
6	2	3	1	51.11
7	3	1	3	64.62
8	3	2	1	61.38
9	3	3	2	63.30
K_1	197.10	187.75	173.07	
K_2	176.88	196.00	197.25	
K_3	189.30	179.53	192.96	
k_1	65.70	62.58	57.69	
k_2	58.96	65.33	65.75	
k_3	63.10	59.84	64.32	
R_1	6.74	5.49	8.06	

表 4 碎米荠蛋白的氨基酸分析结果
Table 4 Amino acid analysis results of SeCP

氨基酸种类	氨基酸含量(g/100 g蛋白质)	氨基酸种类	氨基酸含量(g/100 g蛋白质)
天门冬氨酸(Asp)	13.365±0.078	丝氨酸(Ser)	5.590±0.006
苯丙氨酸(Phe)	8.081±0.159	亮氨酸(Leu)	12.453±0.115
异亮氨酸(Ile)	5.339±0.062	酪氨酸(Tyr)	5.237±0.053
谷氨酸(Glu)	22.694±0.204	苏氨酸(Thr)	6.092±0.002
甘氨酸(Gly)	7.173±0.058	赖氨酸(Lys)	6.054±0.031
丙氨酸(Ala)	7.982±0.078	脯氨酸(Pro)	5.807±0.024
胱氨酸(Cys)	—	组氨酸(His)	3.052±0.015
缬氨酸(Val)	9.764±0.081	精氨酸(Arg)	2.541±0.048
蛋氨酸(Met)	2.685±0.001		

Ile、Pro)以及芳香族氨基酸(如 Tyr)对于肽的抗氧化活性具有显著贡献^[20-22]。疏水氨基酸可以增加水-脂界面多肽的存在,并有助于清除脂相中产生的自由基^[23]。高含量的疏水性氨基酸及其在序列 N 端或 C 端第三位的位置更有利于抗氧化能力的提升,例如,在棕榈仁饼粕蛋白水解物中有 9 种抗氧化肽均具有较强的 DPPH·清除作用,其结构中的疏水氨基酸含量较高^[24]。碎米荠蛋白含有丰富的疏水性氨基酸(约 52.09%)和芳香族氨基酸(如 Phe、Tyr),具有制备抗氧化活性肽的结构基础。

2.5 不同蛋白酶对碎米荠蛋白酶解效果的影响

由图 4 可知,经碱性蛋白酶和胰蛋白酶处理后,碎米荠蛋白水解物的自由基清除率显著高于其他酶解组($P<0.05$),且碱性蛋白酶在水解过程中拥有最高的 DH,此时,碎米荠蛋白水解物的 DPPH·、ABTS⁺清除率和 DH 分别为 84.86%、67.16%、14.58%。综合自由基清除率和水解度考虑,选择碱性蛋白酶作为水解碎米荠蛋白的实验用酶。

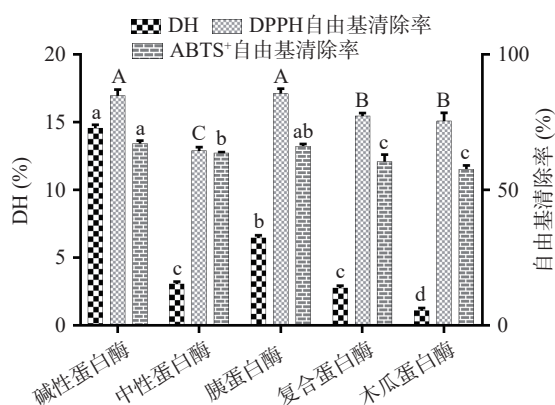


图 4 蛋白酶的种类对碎米荠蛋白水解物自由基清除率和水解度的影响

Fig.4 Effects of protease types on free radical scavenging rate and degree of hydrolysis of SeCP hydrolysates

2.6 碎米荠蛋白酶解的单因素实验

2.6.1 碎米荠蛋白质量浓度对碎米荠蛋白酶解的影响 如图 5a 所示,随着碎米荠蛋白质量浓度的增加,碎米荠蛋白酶解物的自由基清除率呈现先增加后减小的趋势,当底物浓度为 4% 时, DPPH·、ABTS⁺清除率均达到了最高,分别为 75.06%、70.41%,但与其他浓度并没有显著性差异($P>0.05$)。这可能是因为碎米荠蛋白质量浓度较低时,蛋白酶与碎米荠的蛋白接触未达到饱和状态,随着碎米荠蛋白浓度的增加,酶促反应速率提高,继续提高碎米荠蛋白浓度,则会出现底物抑制作用,不利于碎米荠蛋白水解。因此选择 4% 作为碎米荠蛋白酶解的底物浓度。

2.6.2 酶解时间对碎米荠蛋白酶解的影响 如图 5b 所示,随着酶解时间的增加,ABTS⁺的清除率变化不显著, DPPH·的清除率还略有减小,当酶解时间为 1 h 时, DPPH·、ABTS⁺清除率分别为 76.55%、67.32%。

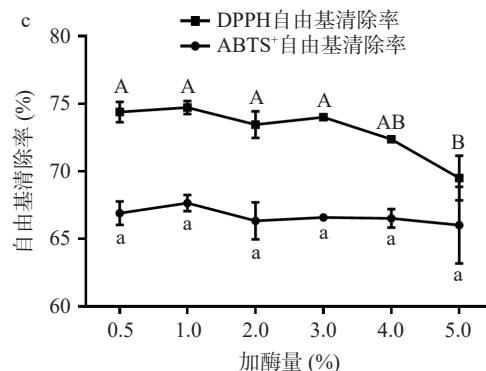
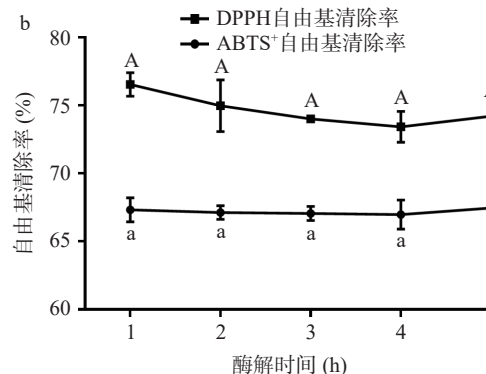
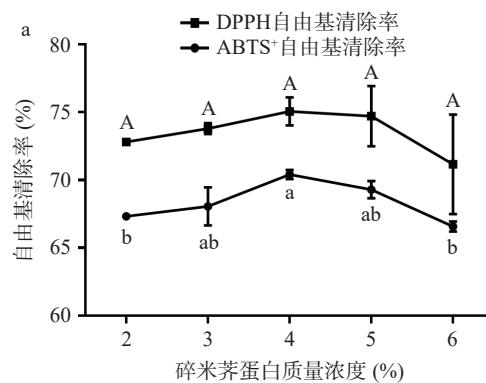


图 5 各因素对碎米荠蛋白酶解效果的影响

Fig.5 Influence of various factors on the enzymatic hydrolysis of SeCP

这说明 1 h 就足以产生较多的抗氧化肽段,而随着酶解时间的持续增长,部分活性肽被进一步水解,导致其结构发生变化,从而影响其抗氧化活性。因此,选择 1 h 作为碎米荠蛋白酶解的最佳时间。

2.6.3 加酶量对碎米荠蛋白酶解的影响 如图 5c 所示,当加酶量处于 0.5%~3.0% 时,酶解物的自由基清除率没有显著性变化($P>0.05$),且随着加酶量继续增大,自由基清除率有所下降。当加酶量为 1.0% 时,酶解物对 DPPH·、ABTS⁺的清除率达到最高。因此,选择 1.0% 为碎米荠蛋白酶解的最佳加酶量。

2.7 不同级分碎米荠肽的硒含量及抗氧化活性

如图 6 所示,不同分子量的碎米荠肽其含硒量无显著差异($P>0.05$),但 ABTS⁺清除率 EC₅₀ 值却呈现显著性变化($P<0.05$)。Mw<1 kDa 的碎米荠肽其 EC₅₀ 值显著小于其他级分($P<0.05$); DPPH·清除率的 EC₅₀ 值随着分子量的减小而有所下降,但

Mw<1 kDa 和 Mw<3 kDa 碎米荠肽的 DPPH·清除率无显著差异($P>0.05$)。综合考虑,选择截留量为 1 kDa 的超滤膜用于分离分级碎米荠蛋白酶解液,所得碎米荠肽即为碎米荠硒肽,其含硒量为 362.378 mg/kg, DPPH·和 ABTS⁺清除率的 EC₅₀ 值分别为 0.435 和 0.399 mg/mL。

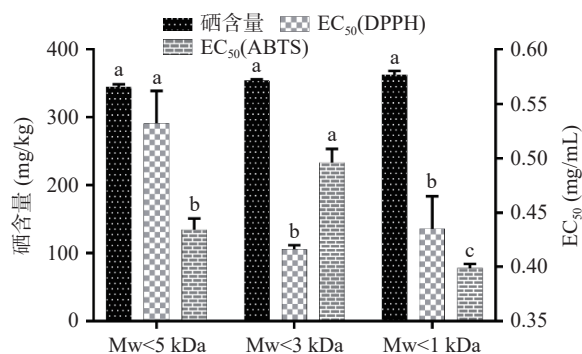


图 6 不同级分碎米荠肽的硒含量及自由基清除率

Fig.6 Selenium content and free radical scavenging rate of SeCP hydrolysate in different fractions

肽的分子质量、疏水性、氨基酸组成和肽序列是影响肽抗氧化活性发挥的关键结构因素^[25]。有研究表明小分子量的肽相较于蛋白质往往拥有更好的抗氧化活性,其原因可能是小肽更易通过肠上皮细胞被机体吸收利用,从而发挥生理活性^[26]。Li 等^[27] 将来源于郫县豆瓣酱的水溶性肽分离为>5、3~5、1~3 和<1 kDa 四种级分,经体外实验发现分子量<1 kDa 的肽表现更显著的 DPPH·和 ABTS⁺清除活性,本实验结果与该文献报道一致。硒是多种氧化还原酶的重要组成部分(如谷胱甘肽过氧化物酶、硒蛋白 P),其生物活性的发挥受摄入量、赋存形式以及生物利用度等因素的影响^[28]。其中,有机硒化合物的安全性高,活性稳定,在调节氧化还原平衡、催化引发细胞损伤的过氧化物的还原以及保护机体免受氧化损伤方面,表现出极大的优势^[29]。碎米荠肽中硒含量较高,其具有高抗氧化能力可能是硒、肽协同作用的结果。

2.8 碎米荠硒肽的体外抗氧化活性

碎米荠硒肽的还原力、Fe²⁺螯合能力如图 7 所示。由图 7a 可知,碎米荠硒肽的还原力与其质量浓度存在剂量-效应关系,浓度越高,OD_{700 nm} 值越大,还原力越强。由图 7b 可知,当质量浓度为 0.8 mg/mL 时,碎米荠硒肽的 Fe²⁺螯合能力与阳性对照 EDTA-2Na 大致相当,螯合率达到了 94.99%,说明碎米荠硒肽能充当还原剂与氧化剂反应,并能螯合金属离子,抑制其对油脂氧化反应的催化能力。

3 结论

以恩施碎米荠为原料,利用碱溶酸沉法提取碎米荠蛋白,并在其质量浓度 4%、酶解时间 1 h、碱性蛋白酶加酶量 1%、超滤膜截留分子量为 1 kDa 的条件下制备得碎米荠硒肽,其 DPPH·、ABTS⁺清除率

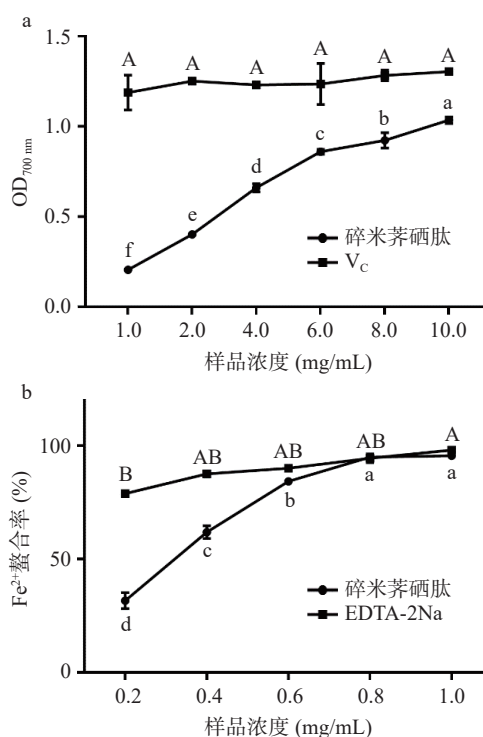


图 7 碎米荠硒肽的体外抗氧化试验结果

Fig.7 Antioxidant test of SeCPPs in vitro

注: a 为还原力; b 为 Fe²⁺螯合能力。

的 EC₅₀ 值分别为 0.435 和 0.399 mg/mL。本研究以恩施州特色农产品为原料,为开发碎米荠硒肽成为功能性食品奠定了基础,也为其产业化提供了新思路。

参考文献

- [1] BOTH E B, SHAO S X, XIANG J Q, et al. Selenolanthionine is the major water-soluble selenium compound in the selenium tolerant plant *Cardamine violifolia* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2018, 1862: 2354–2362.
- [2] 唐万贵, 谭家珍, 张思波, 等. 超富硒药材恩施莛叶碎米荠的研究 [J]. *西部中医药*, 2018, 31(7): 137–139. [TANG W G, TAN J Z, ZHANG S B, et al. Research on super Se-riched herb ensi *Cardamine violifolia* [J]. *Western Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 31(7): 137–139.]
- [3] ZHU Y G, PILON-SMITS E A H, ZHAO F J, et al. Selenium in higher plants: Understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation [J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(8): 436–442.
- [4] 石爱华, 彭祚全. 莛叶碎米荠本草考证及生物学研究 [J]. *微量元素与健康研究*, 2015, 32(5): 61–64. [SHI A H, PENG Z Q. Textual research and biological study on *Cardamine violifolia* [J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 2015, 32(5): 61–64.]
- [5] 罗金华. 壶瓶碎米荠 GST-u4 基因克隆及表达产物活性初步研究 [D]. 武汉: 湖北民族大学, 2020. [LUO J H. Cloning of *Cardamine hupingshanensis* GST-u4 gene an preliminary study on activity of expressed product [D]. Wuhan: Hubei Minzu University, 2020.]
- [6] 李美东. 壶瓶碎米荠多糖分离纯化、结构鉴定及生物活性研究 [D]. 武汉: 湖北民族大学, 2021. [LI M D. Study on the isolation, purification, structure identification and biological activity of

- Cardamine hupingsahnensis* polysaccharides[D]. Wuhan: Hubei Minzu University, 2021.]
- [7] NAVARRO-ALARCON M, CABRERA-VIQUE C. Selenium in food and the human body: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 400(1-3): 115-141.
- [8] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: A review[J]. *Peptides*, 2010, 31(10): 1949-1956.
- [9] SIOW H L, GAN C Y. Extraction, identification, and structure-activity relationship of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from cumin seeds (*Cuminum cyminum*)[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 22: 1-12.
- [10] SENAPHAN K, SANGARTIT W, PAKDEECHOTE P, et al. Rice bran protein hydrolysates reduce arterial stiffening, vascular remodeling and oxidative stress in rats fed a high-carbohydrate and high-fat diet[J]. *European Journal of Nutrition*, 2018, 57: 219-230.
- [11] ESFANDI R, WILLMORE W G, TSOPMO A. Antioxidant and anti-apoptotic properties of oat bran protein hydrolysates in stressed hepatic cells[J]. *Foods*, 2019, 8(5): 160.
- [12] DAI C H, ZHANG W W, HE R H, et al. Protein breakdown and release of antioxidant peptides during simulated gastrointestinal digestion and the absorption by everted intestinal sac of rapeseed proteins[J]. *LWT*, 2017, 86: 424-429.
- [13] 沈阳农学院植物生理生化教研室. 植物体内蛋白质氮和非蛋质氮的测定(上)[J]. *新农业*, 1979(13): 28-29. [Department of Plant Physiology and Biochemistry, Shenyang Agricultural College. Determination of protein nitrogen and non-egg nitrogen in plants (part one)[J]. *Xin Nongye*, 1979(13): 28-29.]
- [14] 李雪. 紫花芸豆抗氧化肽的分离纯化及其稳定性的研究[D]. 佳木斯: 黑龙江八一农垦大学, 2019. [LI X. Study on separation, purification and stability of antioxidant peptides from purple kidney bean[D]. Jiamusi: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019.]
- [15] 谢丽蒙, 程凡升, 袁瑾, 等. 食源性蛋白质水解度常数 h_{tot} 值的测定[J]. *氨基酸和生物资源*, 2013, 35(1): 15-18. [XIE L M, CHENG F S, YUAN J, et al. Study on the h_{tot} value of foodborne protein[J]. *Biotic Resources*, 2013, 35(1): 15-18.]
- [16] LIU J, WANG C N, WANG Z Z, 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 Chemistry*, 2011, 126(1): 261-269.
- [17] RUI L, ZHENG W W, LI J, et al. Rapid identification of bioactive peptides with antioxidant activity from the enzymatic hydrolysate of *Macraa veneriformis* by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2015, 167: 484-489.
- [18] YOU L J, ZHAO M M, REGENSTEIN J M, et al. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion[J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(3): 810-816.
- [19] CARTER P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine)[J]. *Analytical Biochemistry*, 1971, 40(2): 450-458.
- [20] CHAI T T, ZHI Y S, HSU K C, et al. Antioxidant activity of semen cassiae protein hydrolysate: Thermal and gastrointestinal stability, peptide identification, and in silico analysis[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(9): 38-48.
- [21] NWACHUKWU I D, ALUKO R E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(1): e12761.
- [22] YANG J J, HU L, CAI T T, et al. Purification and identification of two novel antioxidant peptides from perilla (*Perilla frutescens* L. Britton) seed protein hydrolysates[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200021.
- [23] SAMARANAYAKA A G P, LI-CHAN E C Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications[J]. *Journal of Functional Foods*, 2011, 3(4): 229-254.
- [24] WANG J Y, LU S L, LI R T, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from Chinese dry-cured mutton ham[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(3): 1246-1255.
- [25] LI Y, YU J. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2014, 18(2): 147-156.
- [26] WONG F C, XIAO J B, WANG S Y, et al. Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 99: 44-57.
- [27] LI M Y, FAN W L, XU Y. Identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant peptides derived from Pixian broad bean paste[J]. *LWT*, 2021, 151: 112221.
- [28] RAYMAN M P. Selenium and human health[J]. *The Lancet*, 2012, 379(9822): 1256-1268.
- [29] ZHANG J S. Evaluation of nanotoxicity of foods and drugs: Biological properties of red elemental selenium at nano size (Nano-Se) *in vitro* and *in vivo*[M]. *Nanotoxicity: From In Vivo and In Vitro Models to Health Risks*, 2009: 97-114.