

富硒花生降胆固醇活性肽的制备工艺优化及活性研究

刘欣,刘昆仑

(河南工业大学粮油食品学院,郑州450001)

摘要:旨在为降胆固醇保健品的开发提供理论依据,以富硒花生芽为原料,采用碱溶酸沉法提取富硒花生蛋白,并对其进行酶解和超滤制备富硒花生降胆固醇活性肽。以胆固醇胶束溶解度抑制率为指标,通过单因素试验和响应面试验确定最佳酶解工艺条件,并对酶解物的氨基酸组成、超滤前后多肽的降胆固醇活性及硒含量进行了研究。结果表明:最佳酶解工艺条件为采用木瓜蛋白酶、加酶量16 000 U/g、pH 8.0、底物质量浓度3 g/100 mL、酶解温度41 °C、酶解时间90 min,在此条件下富硒花生蛋白酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率为 $(45.58 \pm 0.49)\%$,显著高于未富硒花生蛋白酶解物的 $[(32.70 \pm 0.71)\%]$;富硒花生蛋白酶解物的总疏水性氨基酸含量占总氨基酸含量的36%。超滤后分子质量小于10 kDa的多肽组分的降胆固醇活性最强,胆固醇胶束溶解度抑制率为 $(52.72 \pm 0.63)\%$,且硒含量最高(10.13 mg/kg)。综上,利用木瓜蛋白酶酶解富硒花生蛋白和超滤的方法可以制备富硒花生降胆固醇活性肽。

关键词:富硒花生蛋白;酶解;降胆固醇肽;氨基酸组成;超滤;硒含量

中图分类号:TQ936.2;Q517 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)12-0113-07

Optimization of preparation process and activity of selenium-enriched peanut peptides with cholesterol-lowering activity

LIU Xin, LIU Kunlun

(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to provide theoretical basis for the development of cholesterol-lowering health products, the selenium-enriched peanut protein was extracted from selenium-enriched peanut buds by alkaline solution and acid precipitation, and the selenium-enriched peanut protein was enzymatically hydrolyzed and ultrafiltered to prepare selenium-enriched peanut peptides. With the inhibition rate of cholesterol micellar solubility as index, the optimal enzymatic hydrolysis process was determined by single factor experiment and response surface methodology. The amino acid compositions, cholesterol-lowering activity before and after ultrafiltration and selenium content of the enzymolysis product were studied. The results showed that papain was the best protease, and the optimal enzymatic hydrolysis conditions were dosage of enzyme 16 000 U/g, pH 8.0, mass concentration of substrate 3 g/100 mL, enzymatic hydrolysis temperature 41 °C, and enzymatic hydrolysis time 90 min. Under these conditions, the inhibition rate of cholesterol micellar solubility of selenium-enriched peanut peptides reached $(45.58 \pm 0.49)\%$, which was significantly higher than that of peanut peptides without selenium-enriched $(32.70 \pm 0.71)\%$, and the hydrophobic amino acid content accounted for 36% of the total amino acid content. The component

with the molecular mass less than 10 kDa had the highest cholesterol-lowering activity and selenium content (10.13 mg/kg), and its inhibition rate of cholesterol micellar solubility was $(52.72 \pm 0.63)\%$. In conclusion, selenium-enriched peanut peptides with cholesterol-lowering activity can be prepared by papain enzymatic hydrolysis and ultrafiltration.

收稿日期:2023-05-23;修回日期:2024-06-22

基金项目:国家自然科学基金项目(32172259);河南省自然科学基金优秀青年基金项目(212300410033);河南工业大学自科创新基金重点项目(2021ZKCJ03)

作者简介:刘欣(1999),女,硕士研究生,研究方向为蛋白质加工与应用(E-mail)2848736761@qq.com。

通信作者:刘昆仑,教授,博士(E-mail)knlniu@126.com。

Key words: selenium – enriched peanut protein; enzymatic hydrolysis; cholesterol – lowering peptides; amino acid composition; ultrafiltration; selenium content

花生中蛋白质含量为 24% ~ 36%，仅次于大豆。花生蛋白中含有 8 种人体必需氨基酸，氨基酸利用率高达 98%，营养价值高^[1-2]。硒是人体必需的一种微量营养元素，具有抗氧化、抗肿瘤、拮抗重金属、预防心血管疾病等作用^[3]。硒以多种有机形式存在于人体中，是含硒蛋白质和几种抗氧化酶的组成部分^[4]。有机硒化合物毒性远低于无机硒化合物，且生物利用率更高^[5]，其主要与蛋白质结合以硒蛋白的形式存在^[6]。花生中富含蛋白质，是硒的良好载体，且花生在发芽过程中可吸收无机硒并向有机硒转化，利用花生发芽进行富硒生产富硒花生芽是获得有机硒的合理途径^[7]。

高胆固醇血症是高脂血症的一种，可引起血管堵塞，产生动脉粥样硬化，进而导致高血压、脑血管病、冠心病等严重的心脑血管疾病，危害极大。当前医学上用于治疗高脂血症的化学类药物对人体副作用较大，研究发现从食源性蛋白中获得的具有降胆固醇作用的多肽，不仅效果好，且天然无害^[8]。目前，常见的用于生产降胆固醇活性肽的原料主要有乳清蛋白^[9]、酪蛋白^[10]、蚕豆蛋白^[11]、核桃蛋白^[12]、亚麻籽蛋白^[13]等。花生蛋白酶解物的活性研究主要集中在抗氧化^[14]、降血压^[15]和抗菌^[16]等方面，对富硒花生肽降胆固醇活性的研究较少。

本研究利用花生发芽进行富硒，以富硒花生芽为原料制备富硒花生蛋白，并对其进行酶解得到富硒花生肽，进一步通过超滤制备富硒花生降胆固醇活性肽。以胆固醇胶束溶解度抑制率为指标，通过单因素试验和响应面试验对酶解工艺进行优化，并对超滤前后多肽的降胆固醇活性进行分析，以期降胆固醇保健品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

花生(远杂6号),河南省农业科学院;木瓜蛋白酶(800 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、风味蛋白酶(20 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、牛磺胆酸钠、胆固醇,上海源叶生物科技有限公司;油酸,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

GL-10000C 离心机,上海安亭科学仪器厂;SB-5200DTD 超声波清洗机,宁波新芝生物科技股

份有限公司;XMTD-7000 电热恒温水浴锅,北京市永光明医疗仪器有限公司;LGJ-25C 冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂有限公司;UV-1901 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 花生芽的培养

对花生进行剥壳,分别挑选 120 粒颗粒饱满、表皮光滑、无霉烂的去壳花生于 2 个发芽盒中,用质量分数 1% 的 NaClO 浸泡 15 min 杀菌消毒,用去离子水冲洗干净。培养富硒花生芽的花生用 300 μmol/L 亚硒酸钠(Na_2SeO_3)溶液浸泡 6 h,培养未富硒花生芽的花生用蒸馏水浸泡 6 h^[17],然后取出沥干,置于铺有 2 层纱布的发芽盒中,加入 30 mL 去离子水,1~2 d 后将发芽的花生插入发芽盘中,发芽盘底部的水没过芽根,于 25℃ 恒温培养箱中进行发芽,每隔 12 h 喷水 20 mL,每隔 24 h 换水,7 d 后停止发芽,得富硒花生芽和未富硒花生芽。

1.2.2 花生蛋白的制备

将花生芽于 50℃ 烘箱中干燥 12 h,粉碎过 0.425 mm(40 目)筛,按料液比 1:10 向锥形瓶中加入花生芽粉和正己烷,于 25℃ 下振荡 6 h,静置分层,收集下层沉淀,于通风橱挥发干溶剂^[18],得脱脂花生芽粉。称取 100 g 脱脂花生芽粉于烧杯中,以料液比 1:10 加水溶解,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 9.0,55℃ 水浴搅拌 2 h,冷却后用 1 mol/L HCl 调 pH 至 4.5,5 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,冷冻干燥后得花生蛋白^[19]。

1.2.3 花生蛋白的酶解

向花生蛋白中加入蒸馏水配制成一定质量浓度的花生蛋白溶液,用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节 pH,加入一定量蛋白酶,在一定酶解温度下水浴加热搅拌一定时间,沸水浴灭酶 15 min,冷却后 5 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,冷冻干燥后得花生蛋白酶解物。

1.2.4 水解度的测定

采用茆三酮比色法^[20]测定花生蛋白水解度。

1.2.5 胆固醇胶束溶解度抑制率的测定

参考张宇等^[9]的方法测定花生蛋白酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率。

1.2.6 氨基酸组成分析

参照 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准

食品中氨基酸的测定》测定富硒花生蛋白酶解物的氨基酸组成。

1.2.7 富硒花生蛋白酶解液的超滤分离

将富硒花生蛋白酶解液采用截留分子质量30 kDa和10 kDa的超滤管进行分离,得到分子质量>30 kDa、10~30 kDa、<10 kDa 3个组分,收集各组分并冷冻干燥。

1.2.8 硒含量测定

参照 GB 5009.93—2017《食品安全国家标准食品中硒的测定》第一法测定硒含量。

1.2.9 数据处理

采用 SPSS 20 进行统计分析,Origin 2017 绘图,采用 JMP14.0 进行响应面试验分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

在加酶量 12 000 U/g、底物质量浓度 3 g/100 mL、各酶的最适 pH(碱性蛋白酶 pH 8、中性蛋白酶 pH 7、风味蛋白酶 pH 6.5、木瓜蛋白酶 pH 7)和最适酶解温度(50℃)条件下,考察蛋白酶对富硒花生蛋白水解度和富硒花生蛋白酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响,结果分别见图 1 和图 2。

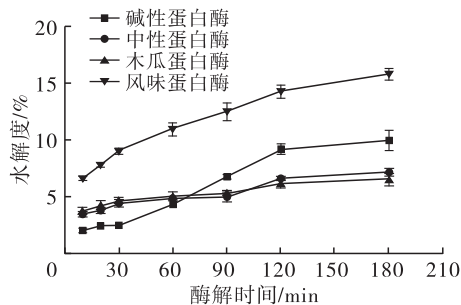


图 1 蛋白酶对富硒花生蛋白水解度的影响

Fig. 1 Effect of protease on hydrolysis degree of selenium-enriched peanut protein

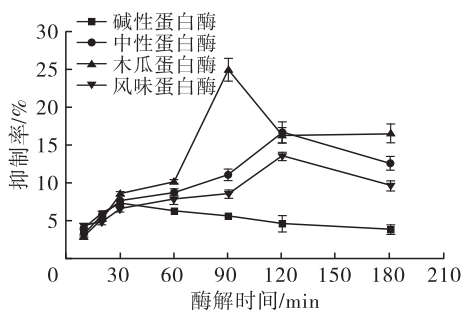


图 2 蛋白酶对富硒花生蛋白酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig. 2 Effect of protease on inhibition rate of cholesterol micellar solubility of selenium-enriched peanut enzymolysis product

水解度反映了不同酶对花生蛋白的水解能力和

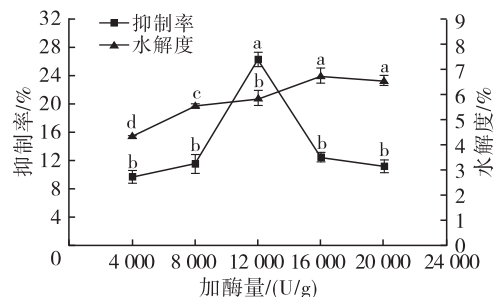
酶解程度,不同蛋白酶因其酶切位点及水解方式不同,酶解富硒花生蛋白的水解度也不相同。由图 1 可知,随着酶解反应的进行,4 种蛋白酶的水解度变化趋势相同,均先逐渐升高后趋于稳定。4 种蛋白酶在酶解 120 min 时均接近最大酶解程度,其中:木瓜蛋白酶水解度为(6.22±0.22)%,中性蛋白酶水解度为(6.65±0.14)%,碱性蛋白酶水解度为(9.21±0.26)%,风味蛋白酶水解度最大,达(14.32±0.39)%。

由图 2 可知,随着酶解时间的延长,4 种富硒花生蛋白酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率呈现先上升后下降或趋于平缓的趋势。蛋白质在水解过程中长链被打开,形成了不同相对分子质量的肽段^[21]。富硒花生蛋白酶解物的降胆固醇活性可能与蛋白质经酶解后暴露出来的某些氨基酸残基有关。4 种蛋白酶在相同时间内的富硒花生蛋白酶解物抑制率由高到低依次为木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶,且采用木瓜蛋白酶酶解 90 min 时的胆固醇胶束溶解度抑制率最高,为(24.96±1.18)%,约是中性蛋白酶的 2 倍,这可能是因为木瓜蛋白酶的酶切位点通常在亮氨酸、缬氨酸等疏水性氨基酸的 C 端。因此,选用木瓜蛋白酶为最佳酶制备富硒花生降胆固醇活性肽(这与宋玲钰^[22]的研究结果一致),且控制酶解时间为 90 min。

2.2 富硒花生蛋白酶解的单因素试验

2.2.1 加酶量对水解度及胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

固定 pH 7、底物质量浓度 3 g/100 mL、酶解温度 50℃、酶解时间 90 min,考察加酶量对富硒花生蛋白水解度和酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响,结果见图 3。



注:同一指标不同字母表示存在显著差异($p < 0.05$)。下同
Note: Different letters of the same index indicate significant differences ($p < 0.05$). The same below

图 3 加酶量对富硒花生蛋白水解度和酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig. 3 Effect of enzyme dosage on hydrolysis degree of selenium-enriched peanut protein and inhibition rate of cholesterol micellar solubility of its enzymolysis product

由图3可知,在加酶量4 000~20 000 U/g范围内,富硒花生蛋白水解度呈连续上升趋势,而胆固醇胶束溶解度抑制率则呈现先上升后下降趋势。当加酶量为12 000 U/g时,胆固醇胶束溶解度抑制率为(26.36±0.61)%,降胆固醇活性达到最强;当加酶量大于12 000 U/g时,底物酶解充分,相对分子质量较大的多肽被水解为相对分子质量更小的肽段或氨基酸^[13],降胆固醇活性肽减少,胆固醇胶束溶解度抑制率降低。因此,选择最适加酶量为12 000 U/g。

2.2.2 pH对水解度及胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

固定加酶量12 000 U/g、底物质量浓度3 g/100 mL、酶解温度50℃、酶解时间90 min,考察pH对富硒花生蛋白水解度和酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响,结果见图4。

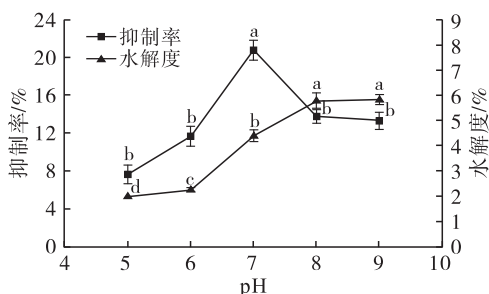


图4 pH对富硒花生蛋白水解度和酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig. 4 Effect of pH on hydrolysis degree of selenium-enriched peanut protein and inhibition rate of cholesterol micellar solubility of its enzymolysis product

由图4可知,随着pH增大水解度先增加后趋于平缓,这可能是由于花生蛋白等电点在4.5左右,富硒花生蛋白在酸性条件下溶解性较差,碱性条件下溶解性好,底物与蛋白酶的接触面积增加,有利于酶解^[23]。当pH在5~9范围内,胆固醇胶束溶解度抑制率随pH增加先升高后降低,当pH为7时,酶解物的降胆固醇活性最强,胆固醇胶束溶解度抑制率达(20.87±0.72)%。因此,确定最适pH为7。

2.2.3 底物质量浓度对水解度及胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

固定加酶量12 000 U/g、pH 7、酶解温度50℃、酶解时间90 min,考察底物质量浓度对富硒花生蛋白水解度和酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响,结果见图5。

由图5可知,当底物质量浓度在1~9 g/100 mL时,随着底物质量浓度的增大水解度和胆固醇胶束溶解度抑制率均呈现先上升后下降的趋势,当底物

质量浓度为7 g/100 mL时,水解度最大,当底物质量浓度为5 g/100 mL时,胆固醇胶束溶解度抑制率最大,为(27.00±0.64)%。当底物质量浓度大于5 g/100 mL时,胆固醇胶束溶解度下降的原因可能是具有降胆固醇活性的肽被进一步水解所致^[24]。因此,选择最适底物质量浓度为5 g/100 mL。

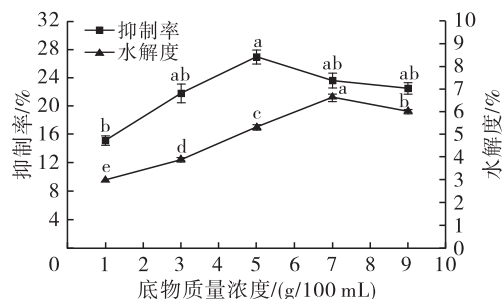


图5 底物质量浓度对富硒花生蛋白水解度和酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig. 5 Effect of substrate concentration on hydrolysis degree of selenium-enriched peanut protein and inhibition rate of cholesterol micellar solubility of its enzymolysis product

2.2.4 酶解温度对水解度及胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

固定加酶量12 000 U/g、pH 7、底物质量浓度5 g/100 mL、酶解时间90 min,考察酶解温度对富硒花生蛋白水解度和酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响,结果见图6。

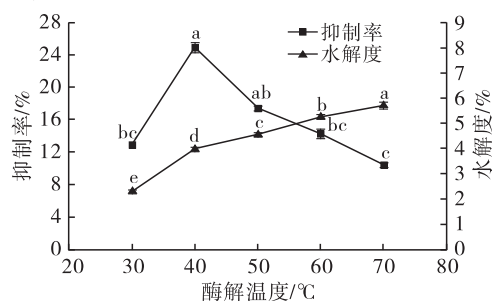


图6 酶解温度对富硒花生蛋白水解度和酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig. 6 Effect of temperature on hydrolysis degree of selenium-enriched peanut protein and inhibition rate of cholesterol micellar solubility of its enzymolysis product

由图6可知,在30~70℃范围内,随着酶解温度的升高水解度不断升高,而胆固醇胶束溶解度抑制率先升高后降低。当酶解温度为40℃时,酶解物的降胆固醇活性最强,胆固醇胶束溶解度抑制率为(24.94±0.38)%。酶解温度超过40℃时,胆固醇胶束溶解度抑制率降低的原因可能是,当酶解温度继续升高时,水解度增大,具有降胆固醇活性的相对分子质量较大的多肽被继续水解为小肽段或氨基

酸^[25],导致酶解物的降胆固醇活性降低。因此,选择最适酶解温度为40℃。

2.3 富硒花生蛋白酶解的响应面试验

2.3.1 回归模型分析

在单因素试验基础上,固定酶解时间90 min,以胆固醇胶束溶解度抑制率(Y)为响应值,加酶量、pH、底物质量浓度和酶解温度为因素,设计响应面试验,响应面试验因素与水平见表1,响应面试验设计与结果见表2。利用JMP软件对回归模型及回归系数进行方差分析,结果分别见表3和表4。

表1 响应面因素与水平

Table 1 Response surface methodology factors and levels

水平	X_1 加酶量/ (U/g)	X_2 pH	X_3 底物质量浓度/ (g/100 mL)	X_4 酶解 温度/℃
-1	8 000	6	3	30
0	12 000	7	5	40
1	16 000	8	7	50

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface methodology design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	$Y/\%$
1	-1	-1	-1	-1	21.83 ± 0.37
2	-1	-1	0	0	32.23 ± 0.91
3	-1	-1	1	-1	33.27 ± 0.62
4	-1	0	1	1	32.12 ± 0.66
5	-1	1	-1	1	22.93 ± 0.19
6	-1	1	0	-1	29.43 ± 0.27
7	0	-1	-1	1	15.66 ± 0.29
8	0	0	-1	0	39.50 ± 0.46
9	0	0	0	0	32.76 ± 1.35
10	0	0	0	0	31.04 ± 0.56
11	0	1	1	0	35.64 ± 0.34
12	0	-1	0	-1	10.62 ± 0.24
13	1	-1	-1	0	16.63 ± 0.52
14	1	-1	1	1	29.68 ± 0.87
15	1	0	1	-1	33.34 ± 0.65
16	1	1	-1	-1	35.57 ± 0.93
17	1	1	0	1	35.46 ± 1.21

表3 回归模型方差分析

Table 3 ANOVA for regression models

变异来源	自由度	平方和	均方	F	p	显著性
模型	13	104 4.598 9	80.353 8	9.276 9	0.046 0	*
总误差	3	25.985 2	8.661 7			
失拟	2	24.512 8	12.256 4	8.324 3	0.238 0	
纯误差	1	1.472 4	1.472 4			
校正总和	16	107 0.584 1				

注:**表示极显著, $p < 0.01$; *表示显著, $p < 0.05$ 。下同

Note: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. The same below

表4 回归系数方差分析

Table 4 Analysis of variance

方差来源	估计值	标准误差	t	p	显著性
截距	33.795 983	1.726 277	19.58	0.000 3	**
X_1	-0.340 861	0.941 683	-0.36	0.741 4	
X_2	5.459 167	0.938 823	5.81	0.010 1	*
X_3	2.297 518	0.977 428	2.35	0.100 3	
X_4	0.541 997	0.941 683	0.58	0.605 2	
X_1X_2	5.625 601	1.143 686	4.92	0.016 1	*
X_1X_4	4.083 937	1.267 338	3.22	0.048 5	*
X_2^2	-6.983 568	2.023 355	-3.45	0.040 9	*
X_4^2	-8.239 141	1.914 347	-4.30	0.023 1	*

由表3可知:该模型 $p < 0.05$,说明模型显著;失拟项 $p > 0.05$,说明不存在失拟因子。模型的决定系数(R^2)为0.975 7,校正决定系数(R_{Adj}^2)为0.870 5,表明模型拟合效果好。由表4可知,各因素对胆固醇胶束溶解度抑制率影响的主次顺序为 $X_2 > X_3 > X_4 > X_1$,即pH > 底物质量浓度 > 酶解温度 > 加酶量,且加酶量和pH、加酶量和酶解温度之间交互作用显著。

2.3.2 最佳酶解工艺确定

通过JMP定制试验分析,得到最佳酶解工艺条件为加酶量16 000 U/g、pH 8.0、底物质量浓度3 g/100 mL、酶解温度41℃,在此条件下富硒花生蛋白酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率预测值为46.64%。在最佳酶解工艺条件下分别对富硒花生蛋白与未富硒花生蛋白进行酶解,富硒花生蛋白酶解物平均胆固醇胶束溶解度抑制率为(45.58 ± 0.49)% ,试验值与预测值接近,具有较强的降胆固醇活性,而未富硒花生蛋白酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率为(32.70 ± 0.71)% ,显著低于富硒花生蛋白酶解物的,说明硒对肽的降胆固醇能力具有协同促进作用,但其协同作用机制仍需进一步研究。

2.4 富硒花生蛋白酶解物的氨基酸组成

富硒花生蛋白酶解物的氨基酸组成如表5所示。

由表5可知,富硒花生蛋白酶解物中共检测到17种氨基酸,其中包含7种必需氨基酸,总必需氨基酸含量为23.4%。已有研究表明降胆固醇活性肽含有大量的疏水性氨基酸,如Yuan等^[26]指出亚麻籽降胆固醇活性肽的主要成分是亮氨酸、脯氨酸、甘氨酸、异亮氨酸等疏水性氨基酸,本研究中降胆固醇活性肽含8种疏水性氨基酸,总疏水性氨基酸含量达28.2%,占总氨基酸含量的36%,这可能是其具有降胆固醇活性的主要原因,这也与张宇等^[9]研究的肽的降胆固醇活性与其含有的疏水性区域有关的结果一致。

表5 富硒花生蛋白酶解物的氨基酸组成及含量
Table 5 Amino acid composition and content of selenium-enriched peanut enzymolysis product

氨基酸	含量/%
天冬氨酸(Asp)	11.0
苏氨酸(Thr) [△]	2.4
丝氨酸(Ser)	3.9
谷氨酸(Glu)	15.4
甘氨酸(Gly)*	3.6
丙氨酸(Ala)*	3.8
胱氨酸(Cys)	0.6
缬氨酸(Val)* [△]	3.8
蛋氨酸(Met)* [△]	1.4
异亮氨酸(Ile)* [△]	3.1
亮氨酸(Leu)* [△]	5.1
酪氨酸(Tyr)	3.3
苯丙氨酸(Phe)* [△]	4.7
组氨酸(His)	2.0
赖氨酸(Lys) [△]	2.9
精氨酸(Arg)	8.7
脯氨酸(Pro)*	2.7
总疏水性氨基酸	28.2
总必需氨基酸	23.4
总氨基酸	78.3

注: * 为疏水性氨基酸; △ 为必需氨基酸

Note: *. Hydrophobic amino acids; △. Essential amino acids

2.5 富硒花生蛋白酶解物超滤分离及活性对比

不同分子质量的富硒花生蛋白酶解物对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响见图7。

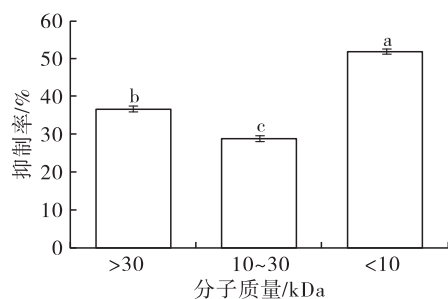


图7 不同分子质量的富硒花生蛋白酶解物对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig. 7 Effect of selenium-enriched peanut enzymolysis products with different molecular mass on inhibition rate of cholesterol micellar solubility

由图7可知,富硒花生蛋白酶解液经超滤分离后,分子质量小于10 kDa的组分降胆固醇活性最强,胆固醇胶束溶解度抑制率达(52.72 ± 0.63)%,与超滤前的酶解物相比,胆固醇胶束溶解度抑制率提高了7.14个百分点,这与唐涌泽^[12]研究的核桃降胆固醇多肽的分子质量主要集中在10 kDa以下的结果一致。

2.6 原料及产品的硒含量

未富硒花生芽、富硒花生芽、富硒花生蛋白、富硒花生蛋白酶解物及不同分子质量的富硒花生蛋白酶解物的硒含量见表6。

表6 不同样品的硒含量

Table 6 Selenium content of the different samples

样品	硒含量/(mg/kg)
未富硒花生芽(干基)	0.23 ± 0.01
富硒花生芽(干基)	4.26 ± 0.03
富硒花生蛋白	8.95 ± 0.06
酶解物	9.60 ± 0.05
酶解物(>30 kD)	9.91 ± 0.02
酶解物(10~30 kD)	9.23 ± 0.05
酶解物(<10 kD)	10.13 ± 0.04

由表6可知,富硒花生芽中的硒含量为4.26 mg/kg,远高于未富硒花生芽的(0.23 mg/kg)。富硒花生芽、富硒花生蛋白和富硒花生蛋白酶解物中硒含量分别为4.26、8.95 mg/kg和9.60 mg/kg。这一结果说明富硒花生芽中的硒元素主要与蛋白质结合,并且酶解工艺使硒元素在活性肽中进一步富集^[27]。富硒花生芽硒含量约是富硒土壤增施硒肥的富硒花生(0.449 mg/kg)^[28]的10倍,富硒花生蛋白酶解物的硒含量约是富硒核桃蛋白酶解物(0.82 mg/kg)^[29]的12倍,说明通过花生发芽进行富硒是一条有效的途径。分子质量小于10 kDa的多肽组分的硒含量最高,为10.13 mg/kg。硒主要通过清除血管壁沉积的脂质过氧化物、自由基等有害物质,使血管保持畅通,保证血脂正常循环,从而达到降血脂的作用,毛龙^[30]研究发现,纳米硒能显著降低高脂高胆固醇饮食诱导的ApoE基因缺陷小鼠血清总胆固醇、甘油三酯以及低密度脂蛋白胆固醇含量,所以高硒含量可能是分子质量小于10 kDa的多肽组分降胆固醇活性最强的重要原因之一。

3 结论

通过酶解法制备富硒花生降胆固醇活性肽,在单因素试验的基础上,以胆固醇胶束溶解度抑制率为响应值对酶解工艺条件进行响应面试验优化。确定最佳酶解工艺条件为采用木瓜蛋白酶、加酶量16 000 U/g、pH 8.0、底物质量浓度3 g/100 mL、酶解温度41 °C、酶解时间90 min,在此条件下酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率为(45.58 ± 0.49)%。对最佳酶解工艺条件下得到的产物进行氨基酸分析和超滤分离,酶解物中总疏水性氨基酸含量占总氨基酸含量的36%,超滤后分子质量小于10 kDa组分的降胆固醇活性最强,胆固醇胶束溶解度抑制率达(52.72 ± 0.63)%,其硒含量与酶解物相比也有所提高。

参考文献:

- [1] 裴剑慧, 王强, 周素梅. 我国花生蛋白资源的开发与利用[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(12): 53-55.
- [2] 邓源喜, 张姚瑶, 董晓雪, 等. 花生营养保健价值及在饮料工业中的应用进展[J]. 保鲜与加工, 2018, 18(6): 166-169, 174.
- [3] ZHAO M, LUO T, ZHAO Z, et al. Food chemistry of selenium and controversial roles of selenium in affecting blood cholesterol concentrations[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(17): 4935-4945.
- [4] JACOBSON G A, NARKOWICZ C, TONG Y C, et al. Plasma glutathione peroxidase by ELISA and relationship to selenium level[J]. Clin Chim Acta, 2006, 369(1): 100-103.
- [5] JIN W, YOON C, JOHNSTON T V, et al. Production of selenomethionine-enriched *Bifidobacterium bifidum* BGN4 via sodium selenite biocatalysis[J/OL]. Molecules, 2018, 23(11): 2860 [2023-05-23]. <https://doi.org/10.3390/molecules23112860>.
- [6] KIELISZEK M, LIPINSKI B, BŁAZEJAK S. Application of sodium selenite in the prevention and treatment of cancers[J/OL]. Cells, 2017, 6(4): 39 [2023-05-23]. <https://doi.org/10.3390/cells6040039>.
- [7] DE OLIVEIRA A P, NOMURA C S, NAOZUKA J. Evaluation of selenium enrichment of adzuki bean (*Vigna angularis*) sprouts: Translocation, bioaccessibility and Se-protein speciation[J]. Microchem J, 2017, 134: 19-26.
- [8] MAIHEMUTI M, WANG J, HUANG B, et al. A novel peptide derived from rice α -globulin decreased cholesterol micellar solubility *in vitro* and inhibited cholesterol absorption in rats[J]. Ann Nutr Metab, 2019, 75: 293.
- [9] 张宇, 李晓东, 刘璐, 等. 乳清蛋白降胆固醇肽的制备及活性研究[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 14-20.
- [10] 梁小慧, 王孝治, 赵佳园, 等. 酪蛋白源降胆固醇肽的酶解制备工艺优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 280-287.
- [11] 陈丹阳, 韩涛, 杜斌, 等. 酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽及其响应面优化[J]. 中国油脂, 2018, 43(10): 46-52.
- [12] 唐涌泽. 降胆固醇核桃多肽的制备及其活性研究[D]. 山西 太谷: 山西农业大学, 2020.
- [13] 包小兰, 刘晓静, 郑睿, 等. 亚麻籽降胆固醇活性肽的酶解工艺优化及分级制备[J]. 中国油脂, 2020, 45(6): 30-35.
- [14] YU J, MIKIASHVILI N, BONKU R, et al. Allergenicity, antioxidant activity and ACE-inhibitory activity of protease hydrolyzed peanut flour[J/OL]. Food Chem, 2021, 360: 129992 [2023-05-23]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129992>.
- [15] SHI A, LIU H, LIU L, et al. Isolation, purification and molecular mechanism of a peanut protein-derived ACE-inhibitory peptide[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(10): e111188 [2023-05-23]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111188>.
- [16] YE X Y, NG T B. Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen[J]. J Pept Res, 2001, 57(4): 330-336.
- [17] 薛梅, 邵志颖, 李彭. 外源硒处理的花生芽蛋白中五种硒形态分析[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(8): 42-49.
- [18] 康云, 刘昆仑. 米糠肽-铁锌螯合物制备工艺研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6579-6585.
- [19] 高林, 赵文婷, 田侠, 等. 富硒花生分离蛋白制备工艺的优化[J]. 中国食品学报, 2017, 17(10): 107-115.
- [20] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 176-177.
- [21] NAGAOKA S, FUTAMURA Y, MIWA K, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281(1): 11-17.
- [22] 宋玲钰. 花生降胆固醇肽的制备及饮料开发[D]. 山东 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [23] MARTÍN-DEL-CAMPO S T, MARTÍNEZ-BASILIO P C, SEPÚLVEDA-ÁLVAREZ J C, et al. Production of antioxidant and ACEI peptides from cheese whey discarded from Mexican white cheese production[J/OL]. Antioxidants, 2019, 8(6): 158 [2023-05-23]. <https://doi.org/10.3390/antiox8060158>.
- [24] 田地, 任健. 黑豆抗氧化肽的酶解条件优化及分级制备[J]. 中国油脂, 2019, 44(7): 64-67.
- [25] 马汉军, 周光宏, 余小领, 等. 高压与加热协同处理对牛肌肉中蛋白酶活性的影响[J]. 高压物理学报, 2011, 25(1): 89-96.
- [26] YUAN X, BAO X, LIU X, et al. Flaxseed-derived peptides ameliorate hepatic cholesterol metabolism in Sprague-Dawley rats fed a high-cholesterol and high-fat diet[J]. J Sci Food Agric, 2022, 102(12): 5348-5357.
- [27] 陈冰冰, 欧颖仪, 叶灏铎, 等. 富硒辣木叶蛋白ACE抑制肽的酶解工艺优化及活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 1-9.
- [28] 杨苛, 覃连红, 余江敏, 等. 富硒土壤增施硒肥对不同花生品种硒富集能力及产量的影响[J]. 贵州农业科学, 2021, 49(5): 28-33.
- [29] 卢蕊纯, 苏嘉毅, 杨迅, 等. 富硒核桃粕蛋白降血压肽的酶解制备及硒含量分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(2): 161-169.
- [30] 毛龙. 纳米硒改善高脂高胆固醇饮食诱导的ApoE基因缺陷小鼠血脂异常和动脉粥样硬化的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.