

## 制备芝麻抗氧化肽的蛋白酶筛选

芦鑫<sup>1,2</sup>, 姜梦楠<sup>3</sup>, 张丽霞<sup>1,2</sup>, 孙强<sup>1,2</sup>, 宋国辉<sup>1,2</sup>, 黄纪念<sup>1,2</sup>

(1. 河南省农业科学院农副产品加工研究所, 郑州 450002; 2. 河南省农产品生物活性物质工程技术研究中心, 郑州 450002; 3. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002)

**摘要:**研究了菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶 2709 和 Alcalase 蛋白酶分别酶解芝麻蛋白制备芝麻抗氧化肽, 测定多肽产率、水解度并评价抗氧化活性, 以多肽产率和抗氧化活性为参数采用逼近理想解排序法对酶解物进行排序, 确定适宜制备芝麻抗氧化肽的蛋白酶。结果表明: 蛋白酶品种差异会显著影响芝麻抗氧化肽的制备效果; 在加酶量相同时, 碱性蛋白酶 2709、Alcalase 蛋白酶、胰蛋白酶酶解芝麻蛋白能力强, 多肽产率高, 且抗氧化活性强; 根据与最优向量距离总和, 用于制备芝麻抗氧化肽蛋白酶的适宜性由高到低依次为碱性蛋白酶 2709、Alcalase 蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶。

**关键词:** 芝麻蛋白; 抗氧化肽; 蛋白酶; 逼近理想解排序法

中图分类号: TS229; TS218

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)11-0028-06

## Screening of protease for preparing antioxidant peptide from sesame protein

LU Xin<sup>1,2</sup>, JIANG Mengnan<sup>3</sup>, ZHANG Lixia<sup>1,2</sup>, SUN Qiang<sup>1,2</sup>,  
SONG Guohui<sup>1,2</sup>, HUANG Jinian<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Agricultural and Sideline Products Processing of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Engineering Research Centre of Bioactive Substances in Agricultural Products, Zhengzhou 450002, China; 3. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** To select the suitable protease hydrolyzing sesame protein to generate antioxidant peptide, the yields of peptide, degrees of hydrolysis and antioxidant capacities were determined during hydrolyzing sesame protein by Bromelain, Papain, Neutrase, Trypsin, alkaline protease 2709 and Alcalase, then the yield of peptide and antioxidant capacities were analyzed by technique for order preference by similarity to ideal solution to ascertain the order of hydrolysate derived from six proteases. The results showed that varieties difference of protease significantly influenced the performance of antioxidant peptide prepared from sesame protein. When the enzyme addition was the same, high degree of hydrolysis and yield of peptide were observed in hydrolyzing sesame protein by alkaline protease 2709, Alcalase and Trypsin, and their hydrolysates showed high antioxidant activity. According to the sum of distance of optimal vector, the suitable protease for preparation of antioxidant peptide from sesame protein from high to low was obtained as follows: alkaline protease 2709, Alcalase, Trypsin, Neutrase, Bromelain and Papain.

**Key words:** sesame protein; antioxidant peptide; protease; technique for order preference by similarity to ideal solution

收稿日期: 2018-03-20; 修回日期: 2018-07-18

基金项目: 河南省农业科学院优秀青年科技基金(2016YQ24); 国家特色油料产业技术体系(CARS-14)

作者简介: 芦鑫(1981), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为油脂加工(E-mail) xinlu1981@foxmail.com。

通信作者: 黄纪念, 研究员, 博士(E-mail) hjinian@sina.com。

芝麻是我国主要的油料作物之一, 油脂含量约为 50%, 蛋白质含量为 20%~22%<sup>[1]</sup>。芝麻在我国主要用于榨油, 每年产生 50 万 t 以上芝麻饼粕<sup>[2]</sup>。研究表明, 芝麻饼粕中富含蛋白质, 含量为 38%~50%, 具有开发利用价值<sup>[3]</sup>。由于缺乏加工技术,

目前芝麻饼粕主要用作饲料与肥料。

利用蛋白酶解蛋白可生产具有降血压、抗氧化、抗菌、调节免疫等生理功能的活性肽<sup>[3]</sup>。芝麻蛋白经过酶解可以制备抗氧化肽与降血压肽<sup>[4-6]</sup>。由于不同的蛋白酶作用肽键位点的不同,通过酶解得到不同特性的肽类,同时试验条件的差异也会对酶解产物产生重要的影响。因此,选择合适的酶是保证制备高活性抗氧化肽的关键<sup>[7]</sup>。目前,关于制备芝麻抗氧化肽适用的蛋白酶种类报道较少,有必要对适用制备芝麻抗氧化肽的蛋白酶进行筛选。

抗氧化能力的评价方法尚未统一,其根据原理,可以划分成清除自由基方法,如1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力法、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除能力法;还原氧化物能力法,如还原铁离子能力法(FRAP);细胞抗氧化评价等<sup>[8]</sup>。同种物质采用不同抗氧化测定方法,其结果存在差异,这影响对该物质的抗氧化能力的评价。因此,需要综合考虑多种抗氧化测定的结果。

逼近理想解排序法(TOPSIS)是系统工程中常用的多指标综合评价方法,通过计算评价对象到最优向量与最劣向量的距离,进而对评价对象进行排序,优化方案应该距理想解近,而距负理想解远<sup>[9-10]</sup>。本研究通过测定木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶2709、Alcalase蛋白酶酶解芝麻蛋白制备抗氧化肽的产率、DPPH自由基清除率、ABTS自由基清除率、FRAP值,利用TOPSIS算法对上述指标进行综合排序,找出制备芝麻抗氧化肽的最佳工具酶,为后续芝麻抗氧化肽的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

低温芝麻粕:实验室自制,低温压榨后,采用沸程30~60℃石油醚50℃索氏抽提6h,回收溶剂,获得低温芝麻粕。

胰蛋白酶(酶活 $1.10 \times 10^5$  U/g),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;中性蛋白酶(酶活 $6.51 \times 10^4$  U/g),广州裕立宝生物科技有限公司;菠萝蛋白酶(酶活 $5.84 \times 10^4$  U/g)、碱性蛋白酶2709(酶活 $2.42 \times 10^5$  U/g),上海源叶生物科技有限公司;木瓜蛋白酶(酶活 $5.95 \times 10^4$  U/g),国药集团化学试剂有限公司;Alcalase蛋白酶(酶活 $2.81 \times 10^5$  U/g)、DPPH、ABTS、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝,美国Sigma-Aldrich公司;其他试剂为分析纯,购自国药集团化学试剂有限

公司。

TGL20M-II高速冷冻离心机,湖南凯达科学仪器有限公司;TGL-16A小型离心机,上海悦峰仪器仪表有限公司;UV-6300双光束型紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;DNM-9606酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司;XS205分析天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;DF-101S集热式磁力搅拌器,金坛市医疗器械厂。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 芝麻蛋白制备

参考袁东振等<sup>[11]</sup>的方法。取低温芝麻粕以质量体积比1:18加入蒸馏水,采用5 mol/L NaOH调节溶液pH至10.5,45℃搅拌提取30 min,5 000 r/min离心30 min,收集上清液,调节pH 5.0,5 000 r/min离心30 min,收集沉淀。采用相同条件对沉淀进行碱溶酸沉二次处理,将沉淀中和后,采用截留相对分子质量为5 000 Da透析膜透析,冻干,获得芝麻蛋白,纯度为 $(85.03 \pm 0.37)\%$ 。

#### 1.2.2 芝麻抗氧化肽制备

分别取58.80 g芝麻蛋白加入1 000 mL水,结合文献报道与蛋白酶使用说明书,采用5 mol/L NaOH调节溶液pH(木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶2709和Alcalase蛋白酶的pH分别为6.5、6.5、7.0、8.0、10、10),加入6 000 U/g的蛋白酶,45℃酶解5 h,每隔0.5 h取10 mL酶解液,沸水浴灭酶10 min,8 000 r/min离心10 min,收集上清液备用。

#### 1.2.3 多肽产率测定

取0.5 mL上清液加入到Amicon Ultra-0.5超滤离心管(截留相对分子质量1万Da滤芯)以8 000 r/min离心30 min,取透过液与酶解液采用考马斯亮蓝法测定多肽与蛋白质浓度<sup>[12]</sup>。按下式计算多肽产率。

$$\text{多肽产率} = \frac{M_p}{M_t} \times 100\%$$

式中: $M_p$ 为透过液中多肽质量,mg; $M_t$ 为酶解液中蛋白质质量,mg。

#### 1.2.4 水解度测定

修改Adler-Nissen<sup>[13]</sup>方法,上清液适当稀释后,取0.125 mL稀释液于试管中,随后加入1 mL、pH 8.2磷酸缓冲液和1 mL、体积分数0.1%的TNBS,铝箔遮光,在水浴锅中50℃振荡60 min。最后用2 mL、0.1 mol/L的盐酸进行终止反应,室温静置30 min。以0~2 mmol/L的L-亮氨酸制作标准曲线,在波长340 nm处测定吸光度<sup>[14]</sup>。按下式计

算蛋白水解度。

$$\text{水解度} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

式中： $h$  为 1 g 酶解物被裂解所含的肽键量，mmol/g； $h_{\text{tot}}$  为每克原料蛋白质总的肽键量，mmol/g，芝麻蛋白的  $h_{\text{tot}}$  取 8 mmol/g。

### 1.2.5 DPPH 自由基清除能力测定

取 0.5 mL 上清液加入 Amicon Ultra-0.5 超滤离心管(截留相对分子量 1 万 Da 滤芯)以 8 000 r/min 离心 30 min, 将透过液中多肽质量浓度稀释至 3 mg/mL, 取稀释液 100  $\mu$ L 加入到 96 孔酶标板中, 随后加入 100  $\mu$ L  $2 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH 乙醇溶液, 振荡 30 s, 室温避光反应 30 min, 在波长 517 nm 处测定吸光度  $A_1$ , 以同样的方法同时测定 100  $\mu$ L 样品与 100  $\mu$ L 乙醇混合后的吸光度  $A_0$  [15]。按下式计算 DPPH 自由基清除率( $D_1$ )。

$$D_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

### 1.2.6 ABTS 自由基清除能力测定

取 5 mL、7.4 mmol/L ABTS 溶液和 5 mL、2.6 mmol/L 过硫酸钾混合, 室温避光放置 16 h 制备 ABTS 溶液, 测定时在波长 734 nm 处用甲醇将 ABTS 溶液稀释至其吸光度为  $(0.70 \pm 0.02)$ 。取 25  $\mu$ L 3 mg/mL 多肽溶液加入到 96 孔酶标板中, 随后加入 200  $\mu$ L ABTS 溶液, 室温避光静置 6 min, 在波长 734 nm 处测定吸光度  $A_1$ , 测定 25  $\mu$ L 3 mg/mL 多肽溶液与 200  $\mu$ L 甲醇混合物的吸光度  $A_2$ , 25  $\mu$ L 甲醇与 2 mL ABTS 溶液混合物的吸光度  $A_0$  [16]。按下式计算 ABTS 自由基清除率( $A_1$ )。

$$A_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

### 1.2.7 FRAP 测定

取 50  $\mu$ L 3 mg/mL 多肽溶液加入到 96 孔酶标板中, 随后加入 150  $\mu$ L FRAP 工作液(由 pH 3.6、0.3 mol/L 醋酸盐缓冲液, 10 mmol/L TPTZ, 20 mmol/L  $\text{FeCl}_3$  溶液以 10:1:1 比例混合), 振荡 30 s, 避光 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 在波长 593 nm 处测定吸光度。另以 0~2 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  标准溶液代替样品作标准曲线。样品的总抗氧化能力以具有相同吸光度的  $\text{FeSO}_4$  的浓度表示, 单位为 mmol/L [17]。

### 1.2.8 数据处理

采用 SAS 9.3 进行单因素方差分析和 TOPSIS 算法排序(多肽产率、DPPH 自由基清除率、ABTS 自

由基清除率和 FRAP 值权重均为 1)。表中同一列中带有相同小写字母的样品间在 0.05 水平上无显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同蛋白酶酶解芝麻蛋白制备抗氧化肽能力(见图 1)

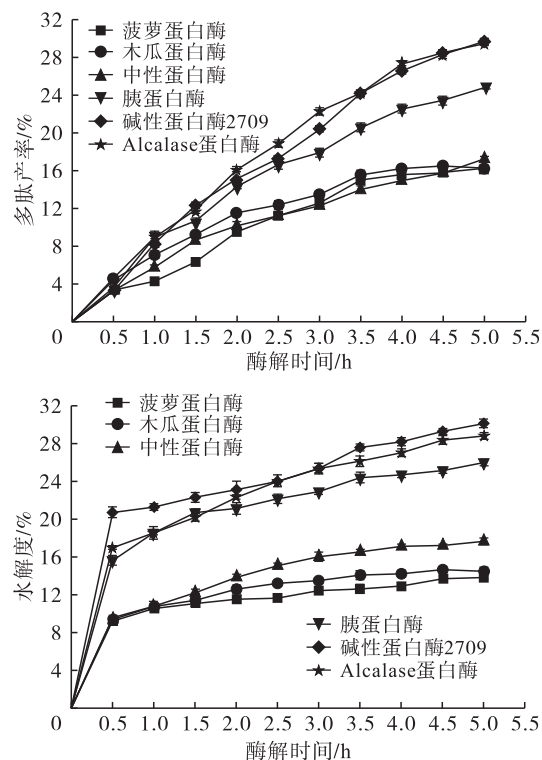


图 1 不同蛋白酶酶解芝麻蛋白的多肽产率与水解度

由图 1 可知, 不同蛋白酶酶解芝麻蛋白呈现不同的效果。菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶酶解芝麻蛋白能力较差, 水解度低, 多肽产率偏低, 而胰蛋白酶、碱性蛋白酶 2709、Alcalase 蛋白酶水解芝麻蛋白能力强, 水解度高, 多肽产率高, 酶解 5 h 后, 水解度在 25.99%~30.14% 之间, 多肽产率在 24.42%~29.70% 之间。这与蛋白酶作用位点及芝麻蛋白的自身组成有关, 菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶水解位点较专一, 菠萝蛋白酶水解位点在碱性氨基酸(如精氨酸)或芳香族氨基酸(如苯丙氨酸、酪氨酸)的羧基侧上的肽链; 木瓜蛋白酶水解位点在精氨酸和赖氨酸的羧基端、N-端酸性氨基酸或芳香族氨基酸; 而碱性蛋白酶 2709、Alcalase 蛋白酶、胰蛋白酶作用范围广 [7]。此外, 芝麻蛋白是碱溶性蛋白, 其等电点在 4.3~4.5 之间, 当溶液 pH 从 4.5 继续增加时, 芝麻蛋白自身负电荷增多, 在静电排斥作用下, 蛋白质分子伸展, 分子内部间隙增加 [18]。这些因素导致碱性蛋白酶和胰蛋白酶酶解效果好。

## 2.2 芝麻多肽抗氧化能力分析

(见表1)

## 2.2.1 芝麻多肽的 DPPH 自由基清除能力

表1 不同蛋白酶酶解芝麻蛋白制备的芝麻多肽的 DPPH 自由基清除率

酶解时间/h	DPPH 自由基清除率/%					
	菠萝蛋白酶	木瓜蛋白酶	中性蛋白酶	胰蛋白酶	碱性蛋白酶 2709	Alcalase 蛋白酶
0.5	7.64 ± 0.23 <sup>h</sup>	5.39 ± 0.35 <sup>g</sup>	4.96 ± 0.23 <sup>h</sup>	9.38 ± 0.13 <sup>h</sup>	8.71 ± 0.42 <sup>h</sup>	9.69 ± 0.34 <sup>h</sup>
1.0	9.81 ± 0.32 <sup>g</sup>	7.72 ± 0.31 <sup>f</sup>	10.19 ± 0.14 <sup>g</sup>	20.10 ± 0.15 <sup>g</sup>	18.99 ± 0.28 <sup>g</sup>	15.04 ± 0.52 <sup>g</sup>
1.5	15.37 ± 0.20 <sup>f</sup>	8.03 ± 0.44 <sup>ef</sup>	14.91 ± 0.05 <sup>f</sup>	25.92 ± 0.24 <sup>f</sup>	21.21 ± 0.26 <sup>f</sup>	22.57 ± 0.35 <sup>f</sup>
2.0	17.88 ± 0.36 <sup>d</sup>	7.56 ± 0.31 <sup>f</sup>	18.02 ± 0.11 <sup>c</sup>	37.54 ± 0.18 <sup>a</sup>	25.50 ± 0.50 <sup>e</sup>	27.45 ± 0.43 <sup>e</sup>
2.5	17.44 ± 0.21 <sup>e</sup>	8.67 ± 0.37 <sup>de</sup>	15.90 ± 0.07 <sup>e</sup>	33.21 ± 0.55 <sup>d</sup>	29.78 ± 0.14 <sup>cd</sup>	30.75 ± 0.38 <sup>a</sup>
3.0	18.04 ± 0.23 <sup>cd</sup>	9.39 ± 0.35 <sup>d</sup>	17.32 ± 0.09 <sup>d</sup>	34.31 ± 0.67 <sup>c</sup>	30.81 ± 0.36 <sup>b</sup>	30.98 ± 0.56 <sup>a</sup>
3.5	18.88 ± 0.25 <sup>b</sup>	10.40 ± 0.47 <sup>c</sup>	18.08 ± 0.25 <sup>c</sup>	35.54 ± 0.99 <sup>bc</sup>	29.63 ± 0.23 <sup>d</sup>	28.67 ± 0.31 <sup>d</sup>
4.0	18.44 ± 0.22 <sup>c</sup>	11.62 ± 0.19 <sup>b</sup>	17.60 ± 0.17 <sup>d</sup>	35.38 ± 0.25 <sup>b</sup>	30.08 ± 0.18 <sup>cd</sup>	29.43 ± 0.57 <sup>c</sup>
4.5	19.16 ± 0.17 <sup>b</sup>	12.56 ± 0.72 <sup>a</sup>	18.50 ± 0.21 <sup>b</sup>	37.80 ± 0.33 <sup>a</sup>	31.71 ± 0.26 <sup>a</sup>	30.30 ± 0.25 <sup>ab</sup>
5.0	19.60 ± 0.12 <sup>a</sup>	11.76 ± 0.83 <sup>ab</sup>	19.25 ± 0.12 <sup>a</sup>	32.21 ± 0.45 <sup>e</sup>	30.29 ± 0.19 <sup>c</sup>	29.62 ± 0.43 <sup>bc</sup>

注:酶解时间 0 h 蛋白溶液的 DPPH 自由基清除率为(0.02 ± 0.01)%。

由表1可知,6种蛋白酶酶解芝麻蛋白制备的芝麻多肽均有 DPPH 自由基清除能力,这表明芝麻多肽具有抗氧化活性,其中由胰蛋白酶酶解制备的芝麻多肽的 DPPH 清除能力最强,其次是碱性蛋白酶 2709、Alcalase 蛋白酶,其余3种蛋白酶制备的芝麻多肽 DPPH 自由基清除能力较弱。观察酶解时间与 DPPH 自由基清除率的关系发现:随着酶解时间从

0 h 延长到 2 h, DPPH 自由基清除率呈现显著上升趋势,但是继续延长酶解时间, DPPH 自由基清除率增加幅度减少,且有上下波动。这可能是酶解液中高活性的抗氧化肽被蛋白酶水解产生新的多肽,导致活性降低或增加,从而表现为总体 DPPH 自由基清除率下降或上升<sup>[7]</sup>。

## 2.2.2 芝麻多肽的 ABTS 自由基清除能力(见表2)

表2 不同蛋白酶酶解芝麻蛋白制备的芝麻多肽的 ABTS 自由基清除率

酶解时间/h	ABTS 自由基清除率/%					
	菠萝蛋白酶	木瓜蛋白酶	中性蛋白酶	胰蛋白酶	碱性蛋白酶 2709	Alcalase 蛋白酶
0.5	9.91 ± 0.32 <sup>e</sup>	7.96 ± 0.75 <sup>f</sup>	10.48 ± 0.35 <sup>g</sup>	13.49 ± 0.21 <sup>g</sup>	15.90 ± 0.28 <sup>g</sup>	13.99 ± 0.72 <sup>f</sup>
1.0	19.62 ± 0.71 <sup>d</sup>	12.46 ± 0.66 <sup>e</sup>	20.85 ± 0.40 <sup>f</sup>	24.98 ± 0.19 <sup>f</sup>	28.08 ± 0.49 <sup>f</sup>	29.10 ± 0.51 <sup>c</sup>
1.5	21.08 ± 0.42 <sup>abc</sup>	14.86 ± 0.49 <sup>c</sup>	21.65 ± 0.37 <sup>e</sup>	36.44 ± 0.21 <sup>e</sup>	38.34 ± 0.86 <sup>e</sup>	39.36 ± 0.62 <sup>d</sup>
2.0	20.13 ± 0.87 <sup>cd</sup>	13.61 ± 0.29 <sup>d</sup>	26.62 ± 0.47 <sup>a</sup>	43.37 ± 0.65 <sup>c</sup>	52.88 ± 1.48 <sup>a</sup>	49.40 ± 0.48 <sup>c</sup>
2.5	20.73 ± 0.23 <sup>bc</sup>	16.11 ± 0.74 <sup>ab</sup>	23.29 ± 0.41 <sup>d</sup>	46.41 ± 0.33 <sup>a</sup>	51.26 ± 0.65 <sup>bc</sup>	53.14 ± 0.91 <sup>a</sup>
3.0	21.12 ± 0.19 <sup>ab</sup>	15.95 ± 0.03 <sup>ab</sup>	26.21 ± 0.29 <sup>ab</sup>	46.55 ± 0.37 <sup>a</sup>	52.59 ± 0.72 <sup>ab</sup>	53.39 ± 0.64 <sup>a</sup>
3.5	21.08 ± 0.22 <sup>abc</sup>	16.58 ± 0.50 <sup>ab</sup>	25.62 ± 0.30 <sup>b</sup>	44.74 ± 0.22 <sup>b</sup>	51.42 ± 0.35 <sup>b</sup>	50.76 ± 0.8 <sup>b</sup>
4.0	20.49 ± 0.87 <sup>bcd</sup>	16.99 ± 0.47 <sup>a</sup>	24.68 ± 0.18 <sup>c</sup>	42.35 ± 0.33 <sup>d</sup>	51.56 ± 0.37 <sup>b</sup>	53.24 ± 0.41 <sup>a</sup>
4.5	21.47 ± 0.42 <sup>ab</sup>	16.37 ± 0.84 <sup>ab</sup>	26.19 ± 0.35 <sup>ab</sup>	44.08 ± 0.61 <sup>b</sup>	49.71 ± 0.78 <sup>d</sup>	51.03 ± 0.29 <sup>b</sup>
5.0	21.99 ± 0.27 <sup>a</sup>	15.49 ± 0.59 <sup>bc</sup>	24.31 ± 0.26 <sup>c</sup>	46.50 ± 0.48 <sup>a</sup>	50.06 ± 0.59 <sup>cd</sup>	49.37 ± 0.56 <sup>c</sup>

注:酶解时间 0 h 蛋白溶液的 ABTS 自由基清除率为(0.01 ± 0.01)%。

由表2可知,6种蛋白酶酶解芝麻蛋白制备的芝麻多肽具有 ABTS 自由基清除能力,这也显示芝麻多肽具有抗氧化能力,总体来看,由 Alcalase 蛋白酶制备的芝麻多肽 ABTS 自由基清除率最高,其次是碱性蛋白酶 2709 和胰蛋白酶。在酶解 3 h 内,芝麻多肽的 ABTS 自由基清除能力有显著提高,随后继续延长酶解时间,ABTS 自由基清除能力变化不

明显。

## 2.2.3 芝麻多肽的 FRAP 值(见表3)

由表3可知,芝麻多肽除具有清除自由基的能力,还具有一定的还原金属阳离子的能力。胰蛋白酶和碱性蛋白酶 2709 酶解制备的芝麻多肽具有最高的 FRAP 值,其次是 Alcalase 蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶。与 DPPH、ABTS 自

由基清除率类似,芝麻多肽的 FRAP 变化主要在酶解 3 h 以内,随后 FRAP 值基本保持稳定。

表 3 不同蛋白酶酶解芝麻蛋白制备的芝麻多肽的 FRAP 值

酶解时间/h	FRAP 值/(mmol/L)					
	菠萝蛋白酶	木瓜蛋白酶	中性蛋白酶	胰蛋白酶	碱性蛋白酶 2709	Alcalase 蛋白酶
0.5	0.12 ± 0.02 <sup>g</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>c</sup>
1.0	0.25 ± 0.01 <sup>f</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>d</sup>
1.5	0.35 ± 0.02 <sup>e</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>c</sup>
2.0	0.40 ± 0.02 <sup>cd</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.03 <sup>b</sup>
2.5	0.38 ± 0.01 <sup>de</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.01 <sup>a</sup>
3.0	0.45 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.23 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.40 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.59 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>a</sup>
3.5	0.42 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.60 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.01 <sup>a</sup>
4.0	0.44 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>a</sup>
4.5	0.45 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.03 <sup>a</sup>
5.0	0.46 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>a</sup>

注:酶解时间 0 h 蛋白溶液的 FRAP 值为(0.01 ± 0.01) mmol/L。

### 2.3 制备芝麻抗氧化肽的工具酶筛选

综上所述,6 种蛋白酶酶解芝麻蛋白制备的芝麻多肽具有抗氧化性。采用 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率和 FRAP 值对芝麻多肽抗氧化活性进行评价时,对于同一样品的 3 个指标一致性较

差,即高 DPPH 自由基清除率的样品,其 ABTS 自由基清除率与 FRAP 值并非也高。综合考虑芝麻抗氧化肽的产率和活性,采用 TOPSIS 算法对 6 种蛋白酶制备的多肽样品进行排序,结果见表 4。

表 4 不同蛋白酶酶解芝麻蛋白制备抗氧化肽表现的 TOPSIS 排序

样品	与最优向量距离	排序	样品	与最优向量距离	排序	样品	与最优向量距离	排序
J9	0.039 3	1	J4	0.137 9	21	P9	0.252 0	41
J10	0.045 2	2	T3	0.182 5	22	P8	0.254 8	42
A9	0.046 7	3	J3	0.186 8	23	P10	0.255 9	43
A10	0.051 7	4	A3	0.187 7	24	A2	0.256 0	44
J8	0.052 3	5	N10	0.191 4	25	N3	0.256 9	45
A8	0.053 8	6	N9	0.195 4	26	P7	0.263 3	46
T10	0.058 6	7	B10	0.196 3	27	B3	0.267 8	47
T9	0.060 7	8	B9	0.201 4	28	P6	0.276 6	48
J7	0.064 2	9	N8	0.204 1	29	P5	0.285 3	49
A7	0.069 4	10	N7	0.206 4	30	N2	0.292 4	50
A6	0.071 3	11	B8	0.207 6	31	P4	0.299 2	51
T8	0.071 4	12	B7	0.208 8	32	B2	0.307 1	52
T7	0.080 8	13	N6	0.217 8	33	P3	0.308 5	53
J6	0.083 8	14	B6	0.220 2	34	P2	0.326 5	54
A5	0.096 1	15	N4	0.226 9	35	T1	0.330 9	55
T6	0.098 1	16	N5	0.231 5	36	J1	0.332 1	56
J5	0.108 4	17	B5	0.234 7	37	A1	0.336 6	57
T5	0.110 6	18	B4	0.241 7	38	B1	0.349 3	58
T4	0.127 3	19	T2	0.242 1	39	N1	0.355 2	59
A4	0.128 0	20	J2	0.242 3	40	P1	0.358 4	60

注:样品标号中 B、P、N、T、J、A 分别代表菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶 2709、Alcalase 蛋白酶的酶解液,1~10 分别代表酶解 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 h。

由表 4 可知,由菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶 2709 和 Alcalase 蛋白酶酶解物的与最优向量距离总和分别为 2.434 9、

2.880 5、2.378、1.363、1.292 3、1.297 3,可知 6 种蛋白酶作为制备芝麻抗氧化肽工具酶的适宜性由高到低依次为碱性蛋白酶 2709、Alcalase 蛋白酶、胰蛋

白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶。

### 3 结论

采用常用的6种蛋白酶酶解芝麻蛋白制备芝麻抗氧化肽,通过测定多肽产率、水解度、DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率和 FRAP 值,利用 TOPSIS 对酶解液的多肽产率和抗氧化活性进行综合排序筛选出适宜制备芝麻抗氧化肽的工具酶。结果表明:6种蛋白酶酶解芝麻蛋白的能力存在明显差异,碱性蛋白酶 2709、Alcalase 蛋白酶、胰蛋白酶酶解芝麻蛋白能力强,酶解 5 h 后,水解度在 25.99% ~ 30.14% 之间,多肽产率在 24.42% ~ 29.70% 之间;6种蛋白酶制备的芝麻多肽虽均具有抗氧化活性,但抗氧化活性存在显著差异,碱性蛋白酶、Alcalase 蛋白酶、胰蛋白酶制备的芝麻抗氧化肽活性较强。此外,芝麻抗氧化肽的 ABTS 自由基清除能力高于 DPPH 自由基清除能力,抗氧化活性主要形成于酶解 3 h 以内,随后基本保持稳定;根据与最优向量距离总和,碱性蛋白酶 2709 最适宜用于制备芝麻抗氧化肽,随后依次为 Alcalase 蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶。

受时间所限,本文未研究不同蛋白酶复配酶解芝麻蛋白制备抗氧化肽的效果,以及酶解条件对芝麻抗氧化肽生成的影响,上述内容将在后续工作中进行研究。

### 参考文献:

- [1] 陶然,何东平,胡传荣,等. 超声波辅助提取芝麻蛋白的工艺研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(5):23-26.
- [2] 钱森和,葛言顺,赵世光,等. 超声波预处理芝麻粕制备芝麻多肽的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(11):105-108.
- [3] 隋晓,杜桂彩,赵爱云,等. 芝麻活性肽研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(2):193-197.
- [4] CHATTERJEE R, DEY T K, GHOSH M, et al. Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application [J]. Food Bioprod Process, 2015, 94:70-81.
- [5] 王振斌,裴娟娟,闫景坤,等. 超滤精制对芝麻蛋白水解液 ACE 抑制活性和抗氧化活性的影响[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(8):58-63.
- [6] 袁东振,张国治,赵丹,等. Alcalase 酶解芝麻蛋白制备 ACE 抑制肽的工艺研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(1):35-42.
- [7] 马海乐,刘斌,李树君,等. 酶法制备大米抗氧化肽的蛋白酶筛选[J]. 农业机械学报, 2010, 41(11):119-123.
- [8] 张迪,籍保平,周峰,等. 食品体外抗氧化能力评价方法探讨[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 30(1):20-25.
- [9] 赖爱华,潘宝骏,陈烈平. 福建省 8 县市新农合运行绩效 TOPSIS 法的 SAS 综合评价程序[J]. 海峡预防医学杂志, 2008, 14(3):74-77.
- [10] 宋宝娥,朱文茵,李晓明. 基于 TOPSIS 法的超市生鲜食品供应商选择模型研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(4):223-228.
- [11] 袁东振,张国治,黄纪念,等. 用亚临界芝麻粕制备芝麻蛋白的工艺研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2014, 35(6):49-55.
- [12] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 2 版. 北京:清华大学出版社, 2010:151-157.
- [13] ADLER - NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitro benzenesulfonic acid[J]. J Agric Food Chem, 1979, 27(6):1256-1262.
- [14] 李雪,罗永康,尤娟. 草鱼鱼肉蛋白酶解物抗氧化性及功能特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(1):94-99.
- [15] 林恋竹,赵谋明. 反应时间对 DPPH 法、ABTS 法评价抗氧化性结果的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(5):63-67.
- [16] 张乃珣,尹红力,刘冉,等. 茶黄素与真菌多糖联合清除 ABTS 自由基活性的比较[J]. 现代食品科技, 2017, 33(2):21-28,34.
- [17] 朱尚彬,聂少平,朱盼,等. 黑灵芝不同溶剂提取物抗氧化活性比较研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17):98-101.
- [18] INYANG U E, IDUH A O. Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate [J]. J Am Oil Chem Soc, 1996, 73(12):1663-1667.