

# 油用牡丹籽粕蛋白及其酶解产物的 功能性质研究

王敏<sup>1</sup>, 李聪<sup>1</sup>, 舒羽<sup>2</sup>, 李皓瑜<sup>1,3</sup>, 陈邦<sup>1</sup>, 申烨华<sup>1</sup>

(1. 西北大学合成与天然功能分子教育部重点实验室, 化学与材料科学学院, 西安 710127; 2. 西北大学食品科学与工程学院, 西安 710127; 3. 延安大学化学与化工学院, 陕西延安 716000)

**摘要:**研究了油用牡丹籽粕蛋白(PoSMP)及其碱性蛋白酶酶解产物(AHs)的相对分子质量分布、溶解度、变性温度及温度和pH对其抗氧化性的影响。结果表明:PoSMP的亚基主要分布在62、45、34 kDa和23 kDa处,且45、23 kDa条带对碱性蛋白酶具有良好的耐受性;pH为4.5和3.7时,PoSMP和AHs的溶解度最低,分别为 $(0.92 \pm 0.25)\%$ 、 $(8.90 \pm 0.32)\%$ ,在中性条件下均表现出良好的溶解性;两者的变性温度分别为67.82℃和84.70℃。此外,PoSMP在高温和pH为3.0~9.0时表现出良好的抗氧化性,AHs在高温和强碱性pH 11.0条件下也具有优异的抗氧化性。试验证明了PoSMP和AHs具有较好的溶解性及抗氧化稳定性,有望作为添加剂或功能成分应用于食品及保健品领域。

**关键词:**牡丹籽粕;蛋白;酶解产物;功能性质

中图分类号:TS253.9;TS229 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)05-0067-05

## Functional properties of oil peony seed meal protein and its enzymatic hydrolysate

WANG Min<sup>1</sup>, LI Cong<sup>1</sup>, SHU Yu<sup>2</sup>, LI Haoyu<sup>1,3</sup>, CHEN Bang<sup>1</sup>, SHEN Yehua<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecule Chemistry of Ministry of Education, College of Chemistry and Materials Science, Northwest University, Xi'an 710127, China; 2. College of Food Science and Engineering, Northwest University, Xi'an 710127, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China)

**Abstract:** The experimental study on the functional properties of relative molecular weight distribution, solubility, denaturation temperature and antioxidative properties affected by temperature and pH was carried out with oil peony seed meal protein (PoSMP) and its alcalase enzymatic hydrolysates (AHs). The results showed that the subunits of PoSMP were mainly distributed at 62, 45, 34 kDa and 23 kDa, and the 45, 23 kDa bands were well tolerated to alcalase. At pH 4.5 and 3.7, the solubilities of PoSMP and AHs were the lowest, which were  $(0.92 \pm 0.25)\%$  and  $(8.90 \pm 0.32)\%$  respectively. Both of them showed good solubility under neutral conditions. The denaturation temperatures of the two were 67.82℃ and 84.70℃, respectively. In addition, PoSMP exhibited good antioxidant activity at high temperature

and pH 3.0-9.0, and AHs also had excellent antioxidant activity at high temperature and a strong alkali pH 11.0. The results demonstrated that PoSMP and AHs had good solubility and antioxidant stability, which were expected to be used as a supplement or functional component in the fields of food and health products.

**Key words:** peony seed meal; protein; enzymatic hydrolysate; functional property

收稿日期:2019-11-10;修回日期:2020-01-15

基金项目:陕西省科技厅重点产业链项目(2018ZDXM-NY-087, 2019TSLNY03-02);国家重点研发计划(2019YFD1002400);陕西省林业厅2018年重大专项

作者简介:王敏(1994),女,在读硕士,研究方向为植物蛋白和多肽的功能与开发(E-mail)wm253340965@163.com。

通信作者:李聪,高级工程师(E-mail)licong@nwu.edu.cn;申烨华,教授(E-mail)yhshen@nwu.edu.cn。

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)属毛茛科、芍药属植物,具有重要的观赏、食用、药用价值,颇受人们的喜爱和研究者的关注。油用牡丹籽中油脂含量占20%以上,油中不饱和脂肪酸含量大于90%,并富含牡丹皂苷、牡丹醇、牡丹酚以及维生素E等天然活性成分,具有抗氧化、抗癌、保护视力、预防心血管疾病、延缓衰老等医疗保健以及护肤美容等功效<sup>[1]</sup>,被称为“液体黄金”。

油用牡丹籽粕作为榨油后的副产物含有丰富的营养物质,如蛋白质、多糖、多酚、黄酮等。其中,蛋白质含量占籽粕质量的20%~33%,是重要的天然植物蛋白来源<sup>[2]</sup>,也是制备活性多肽的优良来源。徐玥等<sup>[3]</sup>采用碱溶酸沉法制备牡丹籽蛋白,通过单因素试验和正交试验对牡丹籽蛋白提取工艺进行优化,结果表明牡丹籽蛋白提取率可达 $78.23\% \pm 0.04\%$ 。宋艳秋<sup>[4]</sup>对碱溶酸沉法制备的牡丹籽蛋白进行了理化性质和动物试验研究,结果表明牡丹籽蛋白具有较好的持水性、起泡性、乳化性和乳化稳定性,且能够满足大鼠在生长发育过程中对蛋白质和必需氨基酸的需求。颜辉等<sup>[5]</sup>比较了3种生物酶制备的牡丹籽蛋白酶解产物对血糖的抑制作用,结果表明,胰蛋白酶酶解产物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果最佳,抑制率可达22.21%。

本课题组前期采用碱溶酸提法制备了油用牡丹籽粕蛋白,并以水解度为指标对5种常用的蛋白酶进行筛选,其中碱性蛋白酶酶解产物的水解度和抗氧化活性最高,采用色谱和超滤技术相结合的方法对抗氧化多肽组分进行分离纯化,鉴定出5种新型的多肽序列,并研究了这5种新型抗氧化多肽的活性及结构关系<sup>[6]</sup>。对于油用牡丹籽粕蛋白和碱性蛋白酶酶解产物的溶解度、变性温度及温度和pH对其抗氧化性的影响鲜有报道。本文以油用牡丹籽粕为原料,对牡丹籽粕蛋白及其碱性蛋白酶酶解产物的相对分子质量分布、溶解度、变性温度及抗氧化稳定性等进行研究,以期对牡丹籽粕蛋白及其酶解产物的进一步开发和利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

油用牡丹籽(品种凤丹)去皮、经冷榨法制油后得油用牡丹籽饼(蛋白质含量20.2%),陕西兴森源生物科技有限公司(陕西咸阳)提供;碱性蛋白酶(20000 U/g)、牛血清白蛋白(98%),生物纯,优博生物有限公司;G-250、R-250考马斯亮蓝,上海蓝季科技发展有限公司;正己烷、95%乙醇、盐酸、氢

氧化钠,分析纯,西安三浦化学试剂。

#### 1.1.2 仪器与设备

JP-500C-8高速粉碎机,永康市久品工贸有限公司;ME204电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;PHS-3C pH计,上海精密科学仪器有限公司;UV-1780紫外可见分光光度计,日本岛津公司;Avanti J-26XP高速冷冻离心机,美国Beckman公司;Q1000差示扫描量热仪,美国TA公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 牡丹籽粕蛋白(PoSMP)提取工艺流程

油用牡丹籽饼→粉碎→按质量体积比1:5加入正己烷脱脂→牡丹籽粕粉→按质量体积比1:10加入蒸馏水混匀→1 mol/L NaOH调节pH至10.0→搅拌4 h→离心收集上清液→1 mol/L盐酸调pH为4.5→4℃静置2 h→离心收集沉淀→调节至中性→冷冻干燥,得PoSMP。试验用Bradford法测定冻干粉中蛋白质含量,首先以0~1.0 mg/mL的牛血清白蛋白绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.9196X + 0.0117$ ( $R^2 = 0.9992$ ),再根据曲线回归方程计算得PoSMP中蛋白质含量。根据以上方法得PoSMP的提取率为56.77%。

#### 1.2.2 酶解产物(AHs)的制备

按1:25(质量体积比)的比例将PoSMP溶解于去离子水中,置于85℃预热20 min。冷却后调节pH和温度到碱性蛋白酶最佳酶解条件(pH为9.0,温度为55℃),随后按照酶底比1:25加入碱性蛋白酶,酶解6 h。酶解反应期间用0.5 mol/L NaOH维持PoSMP酶解液的pH,记录耗碱量。采用pH-stat法<sup>[7]</sup>测定水解度。酶解结束后,溶液于100℃保温10 min使酶灭活。调节pH到中性,10000 r/min离心10 min,取上清液,冻干得AHs。采用Lowry法<sup>[8]</sup>测定AHs中多肽含量以计算多肽得率。多肽得率 = AHs中多肽质量/牡丹籽粕蛋白质量 × 100%。

#### 1.2.3 SDS-PAGE测定相对分子质量分布

采用SDS-PAGE法测定蛋白质相对分子质量分布,试验分为制胶、跑胶、显色、脱色4部分。制胶:采用20%的分离胶和5%的浓缩胶配制胶体。跑胶:将制备的PoSMP和AHs样品配成2 mg/mL的溶液,按照1:1比例加入上样缓冲液后于沸水浴加热5 min。冷却至室温,上样10  $\mu$ L,以80 mV电压跑至分离胶后增至120 mV电压至跑胶结束。显色:0.5 g考马斯亮蓝R-250加入45 mL水、45 mL乙醇及10 mL冰乙酸混合制成染色液,染色30 min。脱色:以水-乙醇-冰乙酸(体积比9:3:1)为脱色

液对胶进行脱色。脱色后胶体在凝胶图像处理系统进行图像采集。

#### 1.2.4 溶解度测定

以1:100(质量体积比)比例将PoSMP和AHs样品分别溶解在蒸馏水中,用1.0 mol/L HCl或者1.0 mol/L NaOH溶液调节pH为2.0~8.0。将样品于室温下静置30 min后于6 500 r/min离心20 min。以牛血清白蛋白为标准品,采用Bradford法测量上清液蛋白质含量(标准曲线回归方程为 $Y = 0.7647X - 0.0006$ ,  $R^2 = 0.9975$ ),以pH为横坐标、溶解度为纵坐标作图。

#### 1.2.5 变性温度测定

准确称量5~20 mg冻干样品于铝盘中置于差示扫描量热仪上,以5 °C/min的速率由25 °C升温至130 °C,以不加样品的铝盘为空白对照,测定PoSMP和AHs样品的DSC曲线。以温度为横坐标,热流量为纵坐标作图,根据曲线得样品的变性温度和焓值。

#### 1.2.6 抗氧化稳定性测定

##### 1.2.6.1 温度对PoSMP和AHs抗氧化性的影响

以蒸馏水为溶剂,制备质量浓度分别为0.25、0.5、1.0 mg/mL的样品溶液,随后将样品分别置于25、40、60、80 °C和100 °C的水浴中温育30 min,随后冷却至室温。采用ABTS自由基清除试验<sup>[9]</sup>评估温度对PoSMP和AHs抗氧化性的影响。

##### 1.2.6.2 pH对PoSMP和AHs抗氧化性的影响

用1 mol/L HCl(NaOH)将样品溶液pH分别调至3.0、5.0、7.0、9.0和11.0,25 °C下反应60 min后将溶液调回中性并将样品溶液最终定容,以配成质量浓度分别为0.25、0.5、1.0 mg/mL的PoSMP和AHs样品溶液。采用ABTS自由基清除试验<sup>[9]</sup>评估pH对PoSMP和AHs抗氧化性的影响。

#### 1.2.7 数据分析

所有测量均重复3次。所有结果均表示为3次重复的“平均值±标准差”。使用SPSS 19软件,通过方差分析处理数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶解蛋白

酶切反应是制备多肽溶液高效且环保的方法,被广泛使用。酶的种类决定酶切位点,对于某一种特定的蛋白质而言,选取不同的水解酶会产生不同片段大小氨基酸组成的多肽序列,从而产生具有不同性质和功能的酶解产物。本试验以PoSMP为底物,选择碱性蛋白酶进行酶切反应,以水解度考察酶切程度,结果如图1所示。由图1可知,经碱性蛋白酶酶解PoSMP的水解度呈现先上升后趋于平缓的

趋势。酶解前1 h水解度迅速上升,达到 $(10.74 \pm 0.25)\%$ ,1~6 h水解度变化缓慢,6 h时水解度最大,达到 $(15.74 \pm 0.51)\%$ ,这可能是因为碱性蛋白酶属于外切酶,刚开始加入酶时,酶活大,反应迅速。随着反应的进行,酶活不断下降,酶切位点也在不断减少,2 h后PoSMP溶液的水解度趋于平缓。此外,经过酶切反应获得的碱性蛋白酶酶解产物AHs多肽得率为73.25%。

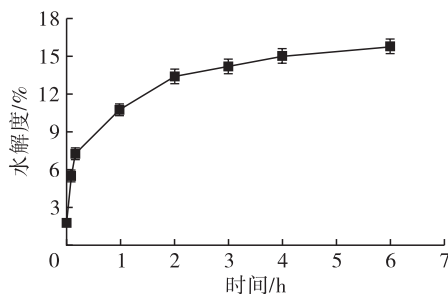
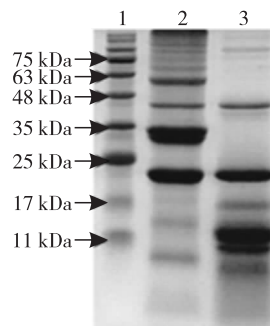


图1 牡丹籽粕蛋白的水解度随时间的变化曲线

### 2.2 蛋白质相对分子质量分布

为考察PoSMP和AHs的蛋白质相对分子质量分布,进行了SDS-PAGE试验,结果见图2。



注:1. Marker;2. PoSMP;3. AHs。

图2 PoSMP和AHs的相对分子质量分布

由图2可知,PoSMP的亚基主要分布在62、45、34 kDa以及23 kDa附近,AHs的蛋白条带则分布相对集中,含量较高的多肽片段集中在23、15 kDa和10 kDa,其中PoSMP和AHs中一些小肽类物质可能会随着电泳过程迁移出胶体。对泳道2、3列比较可知,碱性蛋白酶能够将PoSMP中62、34 kDa附近的蛋白条带水解为小于20 kDa的蛋白,酶解产物主要集中在10~15 kDa。但是碱性蛋白酶对45 kDa和23 kDa处蛋白条带均未表现出水解作用,说明这两处的蛋白条带对碱性蛋白酶具有较好的耐受性,对于其性质的研究需要进一步探讨。

### 2.3 PoSMP和AHs的溶解度

试验对PoSMP和AHs的溶解度进行了测定,结果如图3所示。由图3可知,PoSMP和AHs的溶解度在pH 2.0~8.0内均表现出先下降再上升后趋于

平缓的趋势。其中 PoSMP 在 pH 为 4.5 时的溶解度最低,为 $(0.92 \pm 0.25)\%$ ,在 pH 小于 3.0 和 pH 大于 6.0 条件下,溶解度均大于 60%,表现出良好的溶解性。PoSMP 在 pH 为 7.0 时溶解度为 $(71.83 \pm 3.28)\%$ ,高于米糠蛋白最大溶解度 64.30% (pH 为 7.0)<sup>[10]</sup>,该性质与不同蛋白样品的相对分子质量大小和结构有密切的关系。AHs 的溶解度在 pH 为 3.7 时最小,为 $(8.90 \pm 0.32)\%$ ,且 pH 大于 6.0 的环境中几乎可溶。AHs 在中性条件下的溶解度为 $(89.73 \pm 5.62)\%$ ,与相同条件下大米蛋白酶解产物的溶解度 $(85.8\%)$ 类似<sup>[11]</sup>。此外,当 pH 在 2.0~4.2 时,PoSMP 比 AHs 的溶解度高,而当 pH 大于 4.2 时,AHs 的溶解度高于 PoSMP,这与两者含有的亲/疏水性氨基酸含量密切相关。

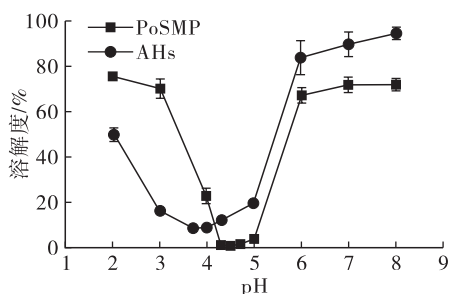


图3 PoSMP 和 AHs 的溶解度曲线

#### 2.4 PoSMP 和 AHs 的变性温度

蛋白质的功能活性是建立在其构象完整的基础上,在蛋白类食品加工过程中处理温度过高会导致蛋白的构象发生变化从而影响其活性,所以对蛋白类物质变性温度的研究具有重要意义。PoSMP 和 AHs 的变性温度曲线如图 4 所示。

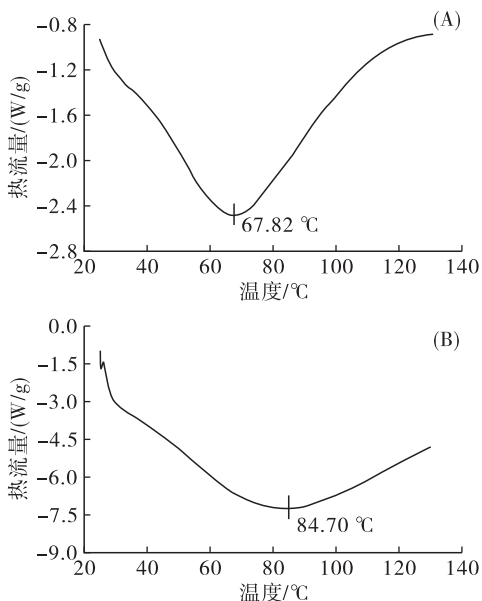


图4 PoSMP(A)和 AHs(B)的变性温度曲线

由图 4(A)可知,采用碱溶酸沉法制备的

PoSMP 在 25~130℃ 的升温过程中处于缓慢吸热状态,直到 67.82℃ 时出现最低吸热变性峰,且测定的焓值为 124.0 J/g。PoSMP 的变性温度接近燕麦麸皮蛋白(66.28℃)<sup>[12]</sup>,低于黑米蛋白的变性温度(87.35℃)<sup>[13]</sup>。由图 4(B)可知,AHs 的变性温度为 84.70℃,焓值为 185.3 J/g。与 PoSMP 相比,AHs 的变性温度和焓值都升高,焓值越大说明样品中含有的有序结构越多,且变性的程度越小。PoSMP 经过酶切后的产物(AHs)多为一级结构的小分子多肽片段,二维或者三维结构的蛋白分子占比较少,所以整个酶解体系受温度的影响较蛋白小。

#### 2.5 抗氧化稳定性

##### 2.5.1 温度、pH 对 PoSMP 抗氧化性的影响

ABTS 自由基清除能力是抗氧化性的重要指标之一,可以有效地阐明样品的抗氧化性受外界环境的影响。因此,试验选取 ABTS 自由基清除活性作为指标,考察了质量浓度 0.25、0.5、1.0 mg/mL 的 PoSMP 在不同温度和不同 pH 下的抗氧化性,结果见图 5。

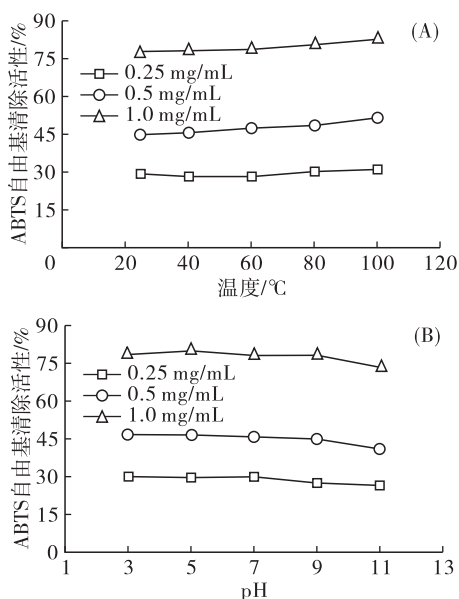


图5 温度(A)和 pH(B)对 PoSMP 抗氧化性的影响

由图 5(A)可知,在 3 种不同 PoSMP 质量浓度下,随着温度的升高,PoSMP 的 ABTS 自由基清除活性均表现出上升的趋势。温度高于 80℃ 时,PoSMP 的结构可能发生一定的改变。但是,根据自由基清除原理中的电子转移原理和氢原子转移原理可知,ABTS 自由基清除活性与蛋白质的三维及以上结构关联较小<sup>[14-15]</sup>。所以在高温环境下 ABTS 自由基清除活性仍会提高,质量浓度为 0.25、0.5、1.0 mg/mL 的 PoSMP 在 100℃ 时 ABTS 自由基清除活性分别为 $(31.09 \pm 1.05)\%$ 、 $(51.54 \pm 1.09)\%$ 、 $(82.87 \pm$

0.73)%。由图5(B)可知,PoSMP在pH小于9.0的环境下ABTS自由基清除活性几乎不发生变化,但是ABTS自由基清除活性在强碱性条件下具有下降的趋势,且质量浓度越高影响越大。pH为7.0和11.0时,1.0 mg/mL PoSMP样品的ABTS自由基清除活性分别为(78.27 ± 1.65)%和(73.54 ± 3.01)%。

### 2.5.2 温度、pH对AHs抗氧化性的影响

试验以ABTS自由基清除活性作为指标,考察了质量浓度0.25、0.5、1.0 mg/mL的AHs在不同温度、不同pH下的抗氧化性,结果见图6。

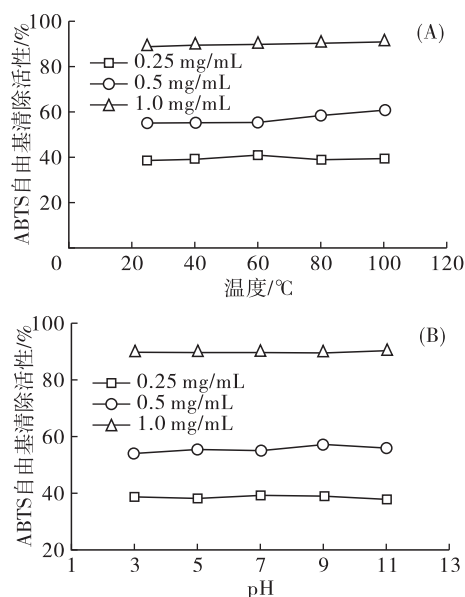


图6 温度(A)和pH(B)对AHs抗氧化性的影响

由图6(A)可知,在3个质量浓度下,随着温度的升高,AHs的ABTS自由基清除活性表现相同的趋势,该趋势与PoSMP随温度的变化相似。由图6(B)可知,pH为11.0时AHs在0.25 mg/mL质量浓度下的ABTS自由基清除活性((37.68 ± 0.65)%)较pH为7.0时((39.26 ± 0.90)%)几乎保持平衡,0.5 mg/mL和1.0 mg/mL时表现出相同的趋势。试验表明AHs具有良好的耐高温和耐酸碱的特性。

### 3 结论

本文研究了油用牡丹籽粕蛋白(PoSMP)及其碱性蛋白酶酶解产物(AHs)的相对分子质量分布以及功能特性。采用碱性蛋白酶对PoSMP酶解6h水解度达(15.74 ± 0.51)%。功能特性试验表明PoSMP和AHs样品在中性条件下溶解度可达(71.83 ± 3.28)%和(89.73 ± 5.62)%,且PoSMP的溶解度高于文献报道的米糠蛋白溶解度。PoSMP和AHs变性温度分别为67.82℃和84.70℃。此外,在质量浓度0.25、0.5、1.0 mg/mL时,PoSMP在高温和pH

为3.0~9.0范围显示较强的抗氧化性,AHs在高温及强碱性pH 11.0环境下对ABTS自由基清除活性几乎无影响。因此,从油用牡丹籽粕中制备的PoSMP和AHs在食品中具有潜在的应用,有望作为功能性成分或补充剂添加到特医食品、保健品等产品中。

### 参考文献:

- [1] 富丽莎,刘萍. 油用牡丹产业发展研究综述[J]. 林业经济,2017,39(11): 51-56.
- [2] GAO L L, LI Y Q, WANG Z S, et al. Physicochemical characteristics and functionality of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein[J]. Food Chem, 2018,240: 980-988.
- [3] 徐玥,张存芳,杨耿,等. 碱提酸沉法提取牡丹籽饼中蛋白质的研究[J]. 中国油脂,2019, 44(8): 28-40.
- [4] 宋艳秋. 牡丹籽蛋白的提取、功能特性及应用研究[D]. 长沙:长沙理工大学,2015.
- [5] 颜辉,蔡豪,贾俊强,等. 牡丹籽酶解制备降血糖肽工艺的响应面优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14): 167-170.
- [6] WANG M, LI C, LI H Y, et al. In vitro and in silico antioxidant activity of novel peptides prepared from *Paeonia Ostii* 'Feng Dan' hydrolysate[J]. Antioxidants, 2019, 8(10): 433-448.
- [7] 张慧娟,夏雪芬,刘静. 大米蛋白及其酶解产物的功能性质[J]. 中国食品学报,2015, 15(8): 63-70.
- [8] MILLER J S, SHEN J C, WESLEY R L, et al. Bioactive hydrogels made from step-growth derived PEG-peptide macromers [J]. Biomaterials,2010,31(13): 3736-3743.
- [9] 梁红敏,任继波,李彦奎,等. 改良的DPPH与ABTS自由基法评价不同葡萄籽油抗氧化能力[J]. 中国粮油学报,2018, 33(1): 85-91.
- [10] 孙靖辰. 超声处理提高米糠蛋白溶解性与乳化性的工艺研究[J]. 农产品加工,2019(7):34-42.
- [11] LUCA A, JONATHAN O, CHRISTOPHE S, et al. Characterisation of the physicochemical properties of intact and hydrolysed rice protein ingredients[J]. J Cereal Sci,2019(88): 16-23.
- [12] 张民,王婵,毕华,等. 裸燕麦麸皮蛋白的提取工艺及理化性质研究[J]. 现代食品科技,2012, 28(11): 1495-1499.
- [13] 高柳,向琴,李佳钊,等. 黑米蛋白的功能与结构性质[J]. 食品与发酵工业,2019, 45(4): 89-94.
- [14] 张晖,唐文婷,王立,等. 抗氧化肽的构效关系研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2013(7): 673-679.
- [15] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Learnings from quantitative structure-activity relationship(QSAR) studies with respect to food protein-derived bioactive peptides: a review [J]. RSC Adv,2016, 6(79): 75400-75413.