

山桐子抗氧化多肽的制备及功能特性研究

豆磊¹, 王智勇¹, 杨文清¹, 陈耀兵¹, 阚建全², 罗凯¹

(1. 湖北民族大学生物与食品工程学院, 湖北恩施 445000; 2. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘要: 为了促进山桐子饼粕的开发利用, 以山桐子饼为原料提取蛋白, 并对其酶解制备山桐子多肽。以 DPPH 自由基清除率和多肽得率为指标, 结合多肽二级结构筛选最佳水解酶, 并采用单因素实验和响应面实验对山桐子多肽的制备工艺进行优化, 同时考察其体外抗氧化能力和功能特性。结果表明: 经复合蛋白酶酶解山桐子蛋白所得多肽具有更高的抗氧化活性和多肽得率, 且其 α -螺旋含量从酶解前的 38.23% 下降到 16.49%, β -折叠含量从 28.01% 下降到 17.81%; 山桐子多肽最优制备工艺条件为酶解时间 2.7 h、酶解温度 45.8 °C、pH 8、酶添加量 2.9%, 在该条件下 DPPH 自由基清除率和多肽得率分别达到 78.54% 和 20.04%; 制备的山桐子多肽具有良好的体外抗氧化活性, 其对 DPPH、ABTS⁺ 和羟自由基清除能力的 IC₅₀ 值分别为 0.462、0.583 mg/mL 和 3.626 mg/mL; pH、温度和离子强度与山桐子多肽的多种功能特性密切相关; 与山桐子蛋白相比, 山桐子多肽溶解度和起泡性显著升高, 而持水性和乳化性有所下降。综上, 以山桐子饼粕中提取的蛋白为原料, 可通过复合蛋白酶酶解制备抗氧化多肽。

关键词: 山桐子; 多肽; 抗氧化活性; 功能特性

中图分类号: TS201.2; TS209 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2025)08-0074-10

Preparation and functional characteristics of *Idesia polycarpa* Maxim. polypeptides with antioxidant activity

DOU Lei¹, WANG Zhiyong¹, YANG Wenqing¹, CHEN Yaobing¹,
KAN Jianquan², LUO Kai¹

(1. College of Biological and Food Engineering, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China;
2. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To promote the development and utilization of *Idesia polycarpa* Maxim. cake and meal, the protein was extracted from *Idesia polycarpa* Maxim. cake, and polypeptides were prepared from the protein through enzymatic hydrolysis. The optimal hydrolysis enzyme was screened based on the DPPH radical scavenging rate and polypeptides yield, with the secondary structure of the polypeptides also considered. Additionally, the preparation process was optimized using single factor experiment and response surface methodology. The antioxidant capacity *in vitro* and functional characteristics of the polypeptides were investigated. The results indicated that polypeptides obtained from *Idesia polycarpa* Maxim. protein through enzymatic hydrolysis with a complex protease exhibited higher antioxidant activity and polypeptides yield. The content of α -helix decreased from 38.23% before enzymatic hydrolysis to

收稿日期: 2024-05-15; 修回日期: 2025-04-18

基金项目: 湖北省科技厅自然科学基金项目(2023AFD080); 硒食品营养与健康智能技术湖北省工程研究中心开放基金项目(PT082301); 湖北民族大学 2024 年研究生教育创新项目(MYK2024074)

作者简介: 豆磊(1998), 男, 硕士研究生, 研究方向为山桐子蛋白、多糖等(E-mail) doulei0119@163.com。

通信作者: 罗凯, 教授, 博士(E-mail) luokai_79@163.com。

16.49%, while β -fold content decreased from 28.01% to 17.81%. The optimal conditions for the polypeptides preparation were obtained as follows: enzyme hydrolysis time 2.7 h, hydrolysis temperature 45.8 °C, pH 8, and enzyme dosage 2.9%. Under these conditions, the DPPH radical scavenging rate and polypeptides yield reached 78.54% and 20.04%, respectively. The

polypeptides showed good *in vitro* antioxidant activity, with IC_{50} values for DPPH, ABTS⁺ and hydroxyl radical scavenging capacities of 0.462, 0.583 mg/mL, and 3.626 mg/mL, respectively. The functional characteristics of the polypeptides were closely related to pH, temperature, and ionic strength. Compared with *Idesia polycarpa* Maxim. protein, the solubility and foaming properties of polypeptides were significantly enhanced, while water-holding and emulsifying properties were reduced. In conclusion, the protein derived from *Idesia polycarpa* Maxim. cake and meal as raw material, antioxidant polypeptides can be obtained by enzymatic hydrolysis using a complex protease.

Key words: *Idesia polycarpa* Maxim.; polypeptides; antioxidant activity; functional characteristics

山桐子 (*Idesia polycarpa* Maxim.) 为大风子科山桐子属木本油料植物, 其果实富含油脂、蛋白质、维生素等营养成分, 是一种重要的食用功能性水果^[1]。山桐子果肉含油量高达 43.6%, 且其油脂中富含亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸, 被誉为“树上油库”, 是新型植物油的优质来源^[2-3]。目前, 对山桐子的开发利用仅局限于油脂的加工与精炼, 对油料衍生副产物山桐子饼粕的利用相对不足。山桐子饼粕富含蛋白质^[4], 且其氨基酸种类齐全, 具有较高的营养价值^[5]。因此, 为避免资源浪费, 应加大对山桐子饼粕的开发, 提升其附加值^[6]。

山桐子饼粕因富含蛋白质而成为天然抗氧化多肽的优质来源。抗氧化多肽能够有效清除体内的自由基, 减缓细胞老化及衰退过程, 凭借其安全性和有效性成为天然食品添加剂和营养补充剂^[7]。酶解法作为一种常见的制备抗氧化多肽的绿色高效方法, 可以有效地将蛋白质水解为更易被人体吸收的小分子肽段。但目前还未有以山桐子饼粕为原料制备抗氧化多肽的研究。

本研究以山桐子饼为原料, 采用碱提酸沉法提取蛋白, 然后采用酶解法制备抗氧化多肽, 以多肽得率和 DPPH 自由基清除率为指标, 结合多肽二级结构含量确定最佳水解酶, 通过单因素实验和响应面实验对酶解工艺条件进行优化, 并对多肽的体外抗氧化能力和功能特性进行探究, 以期对山桐子油料副产物的利用和抗氧化多肽功能产品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

山桐子饼, 湖北恩施采摘山桐子, 经实验室榨油后获得; 碱性蛋白酶 (BR, 200 U/mg, 地衣芽孢杆菌 2709)、中性蛋白酶 (BR, 100 U/mg, 枯草杆菌)、复合蛋白酶 (BR, 120 U/mg, 主要由蛋白内切酶、外切酶和风味酶等组成)、胰蛋白酶 (BR, 1:250, 猪胰腺)、1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH)、2,2-联

氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、酒石酸钾钠, 上海源叶生物科技有限公司; 正己烷, 上海麦克林生化科技有限公司; 谷胱甘肽, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 五水合硫酸铜、氢氧化钠、水杨酸、30% 过氧化氢, 国药集团化学试剂有限公司; 三氯乙酸, 山东西亚化学工业有限公司; 硫酸亚铁, 天津市福晨化学试剂厂。

1.1.2 仪器与设备

YB-150 多功能粉碎机, 永康市速锋工贸有限公司; UV-8000H 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; HH-4A 恒温水浴锅, 常州国华仪器制造有限公司; ZNCL-GS 智能磁力搅拌器, 上海越众仪器设备有限公司; HZP-T502 pH 计, 福建华志电子科技有限公司; Nicolet iS5 傅里叶红外光谱 (FTIR) 仪, 上海善福电子科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 山桐子蛋白 (IP) 的提取

以山桐子饼为原料, 参考文献 [8] 采用碱提酸沉法制备山桐子蛋白。

1.2.2 山桐子多肽的制备

配制质量浓度 2 g/100 mL 的山桐子蛋白溶液, 于 90 °C 水浴锅中变性 10 min, 冷却后调节溶液 pH, 加入一定量蛋白酶, 在一定温度下酶解一定时间。酶解结束后置于 90 °C 水浴锅中灭酶 10 min, 冷却后于 6 500 r/min 离心 15 min 后取上清液 (酶解液), 将上清液冷冻干燥后得到山桐子多肽。

1.2.3 多肽得率的测定

参考文献 [9] 的方法, 采用双缩脲法测定多肽含量。吸取 2.5 mL 酶解液与同体积 10% 的三氯乙酸溶液混合, 静置 10 min 后于 6 500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 5% 的三氯乙酸溶液定容至 10 mL, 用移液管吸取 1 mL 溶液用 5% 的三氯乙酸稀释 10 倍后, 再取 6 mL 稀释液与 4 mL 双缩脲试剂混合, 静置 30 min 后于 540 nm 波长处测其吸光值, 代入以还原型谷胱甘肽为标准品绘制的标准曲线方程

($y = 0.1297x + 0.0002$, $R^2 = 0.997$, x 为还原型谷胱甘肽质量浓度, y 为吸光度) 中得到多肽质量浓度。按公式(1)计算多肽得率(y)。

$$y = \frac{C \times V \times N}{2.5 \times 1000 \times m} \quad (1)$$

式中: C 为多肽质量浓度, mg/mL; V 为酶解液体积, mL; N 为稀释倍数; m 为山桐子蛋白质质量, g。

1.2.4 FTIR 分析

参考 Xu 等^[10] 的方法进行 FTIR 分析。将山桐子多肽与溴化钾混合压片, 采用傅里叶红外光谱仪扫描压片谱带, 扫描范围为 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描次数为 64 次。使用 Omnic 软件解卷积, 并使用 PeakFit 软件进行平滑和二次推导。

1.2.5 体外抗氧化能力测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除率的测定

参考郭浩彬等^[11] 的方法测定 DPPH 自由基清除率。将山桐子多肽制成不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL)的样液。取 2 mL 样液与等体积 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液混合, 在室温下避光反应 30 min 后, 于 517 nm 处测定吸光值(A_1)。另外测定无水乙醇与 DPPH 混合溶液的吸光值(A_2)和无水乙醇与样液混合溶液的吸光值(A_3), 按公式(2)计算其 DPPH 自由基清除率(R)。以 V_c 的 DPPH 自由基清除率为对照。

$$R = \left(1 - \frac{A_1 - A_3}{A_2}\right) \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5.2 ABTS⁺ 自由基清除率的测定

参考 Rumpf 等^[12] 的方法测定 ABTS⁺ 自由基清除率。将山桐子多肽制成不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL)的样液。将 7 mmol/L 的 ABTS⁺ 溶液和 2.45 mmol/L 的 $K_2S_2O_8$ 溶液等体积混合, 在黑暗环境下静置 16 h 制备 ABTS⁺ 储备液, 再稀释至在 734 nm 处吸光值为 0.70 ± 0.02 。取 0.2 mL 样液, 加入 4 mL ABTS⁺ 稀释液于室温下反应 6 min, 在 734 nm 处测定吸光值(A_1), 另外测定 H_2O 代替多肽溶液的吸光值(A_2)以及 H_2O 代替 ABTS⁺ 溶液的吸光值(A_3), 按公式(2)计算 ABTS⁺ 自由基清除率。以 V_c 的 ABTS⁺ 自由基清除率为对照。

1.2.5.3 羟自由基清除率的测定

参考吴绍珍^[13] 的方法测定羟自由基清除率。将山桐子多肽制成不同质量浓度(1、2、3、4、5 mg/mL)的样液。取 0.5 mL 样液加入等体积 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液、9 mmol/L 的水杨酸溶液和 9 mmol/L 的 H_2O_2 溶液, 在 $37^\circ C$ 水浴反应 30 min, 于 6000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 在 510 nm 处测定吸光值

(A_1)。另外测定 H_2O 代替多肽溶液的吸光值(A_2)和 H_2O 代替 H_2O_2 溶液的吸光值(A_3), 按公式(2)计算羟自由基清除率。以 V_c 的羟自由基清除率为对照。

1.2.6 山桐子多肽功能特性的测定

1.2.6.1 溶解度

分别取 1 g 山桐子蛋白和多肽, 加 100 mL 纯水溶解, 分别调节溶液 pH 至一定值后, 于 6500 r/min 离心 10 min, 取上清液。分别采用考马斯亮蓝法和双缩脲法测定上清液和样品中的蛋白质和多肽含量, 按公式(3)计算溶解度(X)。

$$X = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (3)$$

式中: A 为上清液蛋白质或多肽含量; B 为样品蛋白质或多肽含量。

1.2.6.2 持水性

分别取 1 g 山桐子蛋白和多肽, 加 100 mL 纯水溶解, 调节溶液的 pH、温度及离子强度(采用 NaCl 调节, 以多肽或蛋白质质量计)后放置 30 min, 于 6000 r/min 离心 10 min, 去除上清液后称质量。按公式(4)计算持水性(W)。

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \quad (4)$$

式中: m_0 为样品质量; m_1 为吸水后样品 + 离心管质量; m_2 为样品 + 离心管质量。

1.2.6.3 乳化性(EAI)和乳化稳定性(ESI)

参考庞会娜^[14] 的方法测定 EAI 和 ESI。分别取 1 g 山桐子蛋白和多肽, 加 100 mL 纯水溶解, 调节其 pH、温度和离子强度后, 加入 5 mL 玉米油, 于 12000 r/min 均质 3 min, 再取 50 μ L 下层样液于 5 mL 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中混匀, 于 500 nm 处测定吸光值(A_0)。在室温中放置 10 min 后, 吸取 50 μ L 溶液, 测定吸光值(A_t)。分别按公式(5)、公式(6)计算 EAI 和 ESI。

$$I_{EA} = \frac{2.303 \times A_0 \times 2 \times d}{10000 \times \varphi \times c} \quad (5)$$

$$I_{ES} = \frac{A_0 \times 10}{A_0 - A_t} \quad (6)$$

式中: I_{EA} 为 EAI, m^2/g ; d 为稀释倍数; c 为样品质量浓度, g/mL; φ 为乳化液中油相比例; I_{ES} 为 ESI。

1.2.6.4 起泡性(FC)及泡沫稳定性(FS)

分别取 1 g 山桐子蛋白或多肽, 加 100 mL 纯水溶解, 调节其 pH、温度和离子强度后, 使用均质机于 12000 r/min 均质 3 min, 记录样品体积。30 min 后, 再次记录样品体积。按公式(7)、公式(8)计算

FC 和 FS。

$$F_c = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100\% \quad (7)$$

$$F_s = \frac{V_i}{V_1} \times 100\% \quad (8)$$

式中： F_c 为 FC； V_1 为搅打后样品体积； V_0 为样品初始体积； F_s 为 FS； V_i 为 30 min 后的样品体积。

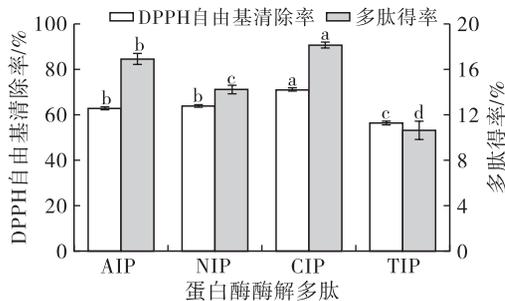
1.2.7 数据处理与分析

每组实验做 3 组平行，结果取平均值。采用 Origin 2022、Design - Expert 13 软件进行数据绘图和统计分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶种类对 DPPH 自由基清除率 and 多肽得率的影响

蛋白酶通过切割蛋白质中的肽键从而达到释放活性肽的目的。当酶与底物结合时，会使酶发挥活性，使其具有特定的活性位点^[15]。在酶解时间 3 h，酶添加量 3%（以山桐子蛋白质量计），蛋白酶最适 pH 和最适温度（复合蛋白酶和中性蛋白酶的最适 pH 均为 7，最适温度均为 45℃；碱性蛋白酶的最适 pH 为 10，最适温度为 45℃；胰蛋白酶的最适 pH 为 8，最适温度为 37℃）条件下，以山桐子蛋白（IP）为原料，分别制备碱性蛋白酶酶解多肽（AIP）、中性蛋白酶酶解多肽（NIP）、复合蛋白酶酶解多肽（CIP）、胰蛋白酶酶解多肽（TIP），考察蛋白酶种类对山桐子蛋白酶解液 DPPH 自由基清除率 and 多肽得率的影响，结果如图 1 所示。



注：同一指标不同字母表示具有显著差异 ($p < 0.05$)

Note: Different letters for the same index indicate significant differences ($p < 0.05$)

图 1 蛋白酶种类对 DPPH 自由基清除率 and 多肽得率的影响

Fig. 1 Effect of protease types on DPPH free radical scavenging rate and polypeptides yield

由图 1 可知，CIP 的 DPPH 自由基清除率达到 71.2%，显著高于 NIP、AIP 和 TIP，同时 CIP 的多肽得率达到 18.13%，同样也显著高于其他 3 种蛋白酶的多肽得率 ($p < 0.05$)。这是由于复合蛋白酶相比其他蛋白酶具有更广泛的酶切位点，对蛋白质水解得更加

彻底，产生了较多具有抗氧化活性的多肽，从而使其具有较好的抗氧化活性和较高的多肽得率。

2.2 蛋白酶种类对山桐子多肽红外光谱 and 二级结构的影响

通过 FTIR 对山桐子蛋白 and 多肽的结构进行表征，结果如图 2 所示。

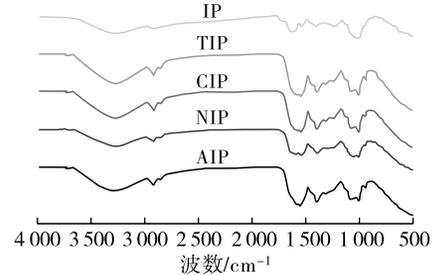


图 2 山桐子蛋白 and 多肽的 FTIR 图

Fig. 2 FTIR spectra of *Idesia polycarpa* Maxim. protein and polypeptides

由图 2 可知，山桐子蛋白存在多处明显吸收峰，其中在 3 269 cm^{-1} 处出现的宽峰归因于蛋白质的 N—H 和 O—H 的伸缩振动，主要与蛋白质主链上的氢键有关，氢键对维持蛋白质二级结构稳定性起着至关重要的作用^[16-17]。此外，C—H 伸缩振动可以反映蛋白质结构中的疏水区域，其在 2 800 ~ 3 000 cm^{-1} 处出现显著的吸收峰。酰胺 I 带代表蛋白质主链的 C=O 伸缩振动，在 1 631 cm^{-1} 处出现，是蛋白质典型的特征峰。酰胺 I 带对二级结构如 β -折叠、无规卷曲、 α -螺旋和 β -转角非常敏感。山桐子蛋白经酶解后，在 3 269 cm^{-1} 处的蛋白质特征峰出现小范围红移，这可能是因为酶解使蛋白质结构发生变化，造成氢键数量或强度发生变化，从而影响了 O—H 伸缩振动吸收峰的位置。

通过 PeakFit 软件对 FTIR 数据进行平滑处理和二次推导得到山桐子蛋白及多肽的二级结构含量，结果见表 1。

表 1 山桐子蛋白 and 多肽的二级结构含量

Table 1 Secondary structure content of *Idesia polycarpa* Maxim. protein and polypeptides

样品	β -折叠	无规卷曲	α -螺旋	β -转角
IP	28.01	15.20	38.23	18.56
AIP	17.60	15.02	16.55	50.81
NIP	23.58	14.53	30.98	30.89
CIP	17.81	14.97	16.49	50.74
TIP	31.54	16.71	32.57	19.19

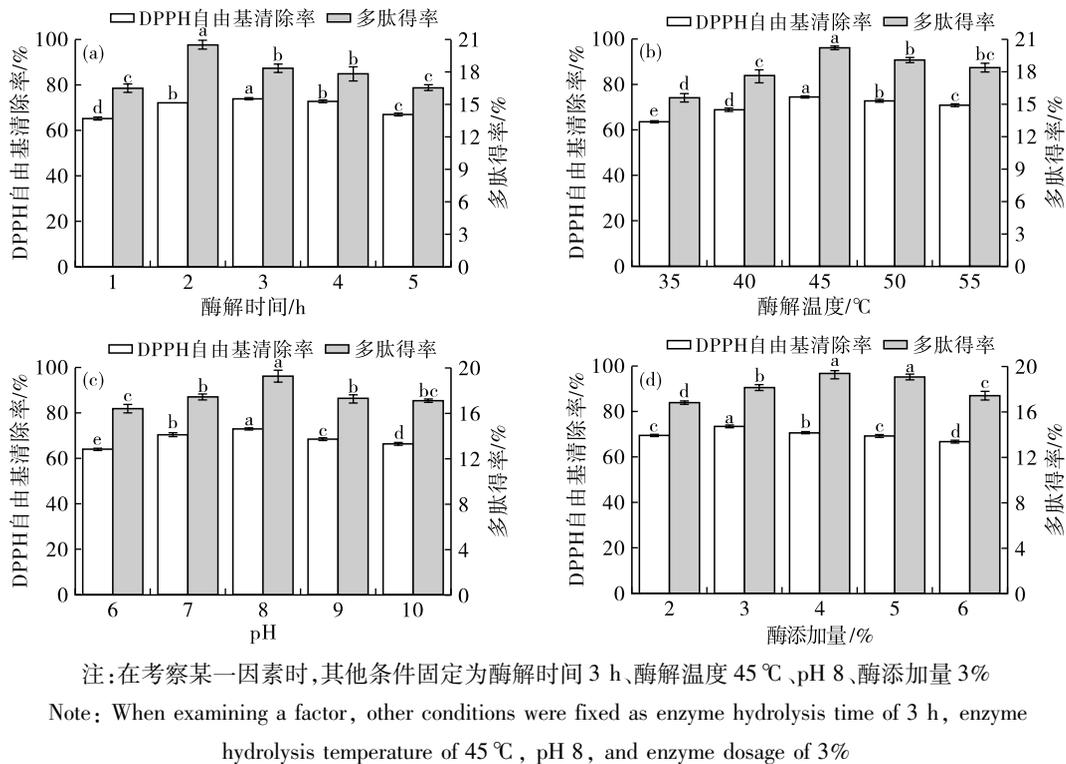
由表 1 可知，除 TIP 的 β -折叠外，山桐子多肽的 α -螺旋和 β -折叠含量均低于山桐子蛋白的，推测蛋白酶主要对 α -螺旋和 β -折叠结构进行水解，

使蛋白质构象部分展开,促使更多的无规则结构产生,使得水解后蛋白质有序结构逐渐转变为无序结构,暴露大量疏水性基团,抗氧化能力提高^[18]。相对于其他多肽,CIP的 α -螺旋含量最低,为16.49%, β -折叠也从原料的28.01%降至17.81%。复合蛋白酶由多种内切酶、外切酶和风味酶组成,能够同时从蛋白质内部肽链和外端肽链进行切割,导致对蛋

白质主链的氢键产生更大的破坏,暴露出更多的疏水性基团,从而影响 α -螺旋的稳定性及其抗氧化能力,这与2.1CIP的DPPH自由基清除能力最高相对应,因此选择复合蛋白酶来制备山桐子多肽。

2.3 山桐子多肽制备工艺的单因素实验

酶解时间、酶解温度、pH和酶添加量对山桐子多肽的DPPH自由基清除率 and 多肽得率的影响见图3。



注:在考察某一因素时,其他条件固定为酶解时间3 h、酶解温度45 °C、pH 8、酶添加量3%

Note: When examining a factor, other conditions were fixed as enzyme hydrolysis time of 3 h, enzyme hydrolysis temperature of 45 °C, pH 8, and enzyme dosage of 3%

图3 山桐子多肽制备工艺的单因素实验结果

Fig. 3 Results of single factor experiment on preparation process of *Idesia polycarpa* Maxim. polypeptides

由图3a可知,随着酶解时间的延长,DPPH自由基清除率 and 多肽得率均呈现先上升后下降的趋势,在酶解时间2 h时,多肽得率达到最大,在酶解时间3 h时DPPH自由基清除率达到最大。当酶解时间超过3 h时,DPPH自由基清除率 and 多肽得率都逐步降低,这是由于酶解时间过长,导致产物发生进一步水解,变为无活性的氨基酸,故不能与双缩脲试剂发生反应,同时较长的酶解时间还会导致多肽之间通过非共价键产生聚合,导致多肽得率降低^[19]。综合考虑,选择3 h为最佳酶解时间。

由图3b可知,随着酶解温度的升高,DPPH自由基清除率 and 多肽得率均呈现先上升后下降的趋势,在酶解温度45 °C时,DPPH自由基清除率 and 多肽得率均达到最大。当酶解温度超过45 °C时,DPPH自由基清除率 and 多肽得率均降低。温度过高会导致酶空间结构发生改变,导致酶活性降低甚至失活,进而影响蛋白质水解程度,使多肽得率和

DPPH自由基清除率降低。综合考虑,选择45 °C为最佳酶解温度。

由图3c可知,随着pH的增加,DPPH自由基清除率 and 多肽得率均呈现先上升后下降的趋势,在pH为8时DPPH自由基清除率 and 多肽得率均达到最大。pH会对酶与底物的结合以及催化作用产生直接影响。当pH超过8时,酶活性会逐渐降低,影响蛋白质水解程度,使多肽得率和DPPH自由基清除率降低。综合考虑,选择pH 8为最佳酶解pH。

由图3d可知,随着酶添加量的增加,DPPH自由基清除率 and 多肽得率均呈现先上升后下降的趋势,在酶添加量3%时,DPPH自由基清除率达到最大,在酶添加量4%时,多肽得率达到最大。当酶浓度逐渐增加时,酶解速率也同步增加,当酶与底物达到饱和时继续增加酶浓度,会导致肽链酶切位点处酶分子过饱和,使酶与酶之间产生竞争作用,从而影响酶解速率。此外,过高的酶浓度还会造成底物黏度过大,影响酶

与底物的流动^[20],最终造成酶解产物的抗氧化活性降低。综合考虑,选择3%为最佳酶添加量。

2.4 山桐子多肽制备工艺的响应面优化实验

2.4.1 响应面实验设计与结果

在单因素实验的基础上,以酶解时间(A)、酶解温度(B)、pH(C)和酶添加量(D)4个因素为自变量,以DPPH自由基清除率(Y_1)和多肽得率(Y_2)为响应值,根据Box-Behnken模块设计四因素三水平响应面实验,预测复合蛋白酶酶解山桐子蛋白制备多肽的最佳工艺。响应面实验因素与水平见表2,响应面实验设计与结果见表3。

表2 响应面实验因素与水平

水平	A 酶解时间/h	B 酶解温度/℃	C pH	D 酶添加量/%
-1	2	40	7	2
0	3	45	8	3
1	4	50	9	4

表3 响应面实验设计与结果

实验号	A	B	C	D	Y_1 /%	Y_2 /%
1	1	0	1	0	76.52	17.89
2	-1	0	-1	0	73.67	20.11
3	1	0	0	-1	76.33	18.32
4	0	0	0	0	78.82	19.96
5	0	-1	0	-1	71.65	17.54
6	-1	0	0	1	68.52	20.94
7	0	-1	0	1	69.87	18.23
8	-1	0	0	-1	73.69	20.07
9	1	-1	0	0	73.63	17.36
10	-1	1	0	0	73.21	20.21
11	1	0	0	1	74.64	18.07
12	-1	0	1	0	73.25	18.21
13	0	-1	-1	0	74.63	16.81
14	-1	-1	0	0	72.63	19.85
15	0	0	1	1	72.34	19.34
16	0	-1	1	0	73.88	17.63
17	1	1	0	0	75.66	18.28
18	0	0	-1	1	71.98	17.54
19	0	0	0	0	78.37	19.53
20	0	1	1	0	76.38	18.16
21	0	0	0	0	80.07	20.23
22	0	1	0	1	70.21	19.69
23	0	0	0	0	79.24	20.18
24	0	0	1	-1	75.62	17.44
25	0	0	0	0	79.12	19.63
26	0	0	-1	-1	74.69	17.23
27	0	1	-1	0	74.68	17.18
28	1	0	-1	0	75.64	16.58
29	0	1	0	-1	76.32	18.33

2.4.2 模型的建立与方差分析

对表3中的数据进行多元回归拟合,得到多元二次回归方程: $Y_1 = 79.1200 + 1.4500A + 0.8475B + 0.2250C - 1.7300D + 0.3625AB + 0.3250AC + 0.8700AD + 0.6125BC - 1.0800BD - 0.1425CD - 2.3700A^2 - 2.9500B^2 - 1.6400C^2 - 3.8100D^2$; $Y_2 = 19.9100 - 1.0700A + 0.3692B + 0.2683C + 0.4067D + 0.1400AB + 0.8025AC - 0.2800AD + 0.0400BC + 0.1675BD + 0.3975CD - 0.0922A^2 - 0.9197B^2 - 1.5600C^2 - 0.4859D^2$ 。该模型的方差分析如表4、表5所示。

表4 Y_1 方差分析

方差来源	平方和	自由度	方差	F	p
模型	221.21	14	15.80	25.37	<0.0001**
A	25.38	1	25.38	40.74	<0.0001**
B	8.62	1	8.62	13.84	0.0023**
C	0.61	1	0.61	0.98	0.3401
D	35.85	1	35.85	57.56	<0.0001**
AB	0.53	1	0.53	0.84	0.3738
AC	0.42	1	0.42	0.68	0.4240
AD	3.03	1	3.03	4.86	0.0447*
BC	1.50	1	1.50	2.41	0.1429
BD	4.69	1	4.69	7.53	0.0159*
CD	0.08	1	0.08	0.13	0.7234
A^2	36.53	1	36.53	58.66	<0.0001**
B^2	56.57	1	56.57	90.84	<0.0001**
C^2	17.38	1	17.38	27.91	0.0001**
D^2	94.38	1	94.38	151.54	<0.0001**
残差	8.72	14	0.62		
失拟项	7.15	10	0.72	1.82	0.2956
纯误差	1.57	4	0.39		
合计	229.93	28			

注: * 表示差异显著($p < 0.05$), ** 表示差异极显著($p < 0.01$)。下同

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

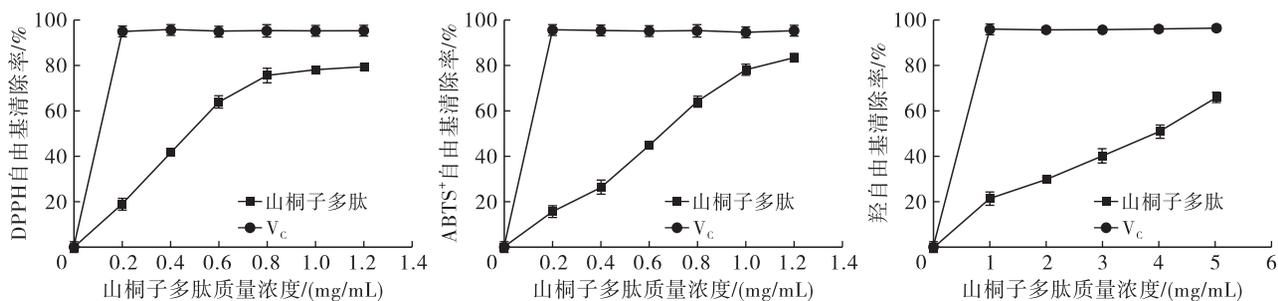
表5 Y_2 方差分析

方差来源	平方和	自由度	方差	F	p
模型	41.28	14	2.95	18.91	<0.0001**
A	13.85	1	13.85	88.81	<0.0001**
B	1.64	1	1.64	10.49	0.0059**
C	0.86	1	0.86	5.54	0.0337*
D	1.98	1	1.98	12.73	0.0031**
AB	0.08	1	0.08	0.50	0.4899
AC	2.58	1	2.58	16.52	0.0012**
AD	0.31	1	0.31	2.01	0.1780
BC	0.01	1	0.01	0.04	0.8424
BD	0.11	1	0.11	0.72	0.4105

续表 5

方差来源	平方和	自由度	方差	F	p
CD	0.63	1	0.63	4.05	0.063 7
A ²	0.06	1	0.06	0.35	0.561 7
B ²	5.49	1	5.49	35.19	<0.000 1**
C ²	15.85	1	15.85	101.69	<0.000 1**
D ²	1.53	1	1.53	9.82	0.007 3**
残差	2.18	14	0.16		
失拟项	1.78	10	0.18	1.78	0.304 1
纯误差	0.40	4	0.10		
合计	43.46	28			

由表4可知, Y_1 模型的 p 值小于0.01, 差异极显著, 失拟项的 p 值大于0.05, 差异不显著, 回归模型的决定系数(R^2)为0.962 1, 校正决定系数(R_{Adj}^2)为0.924 2, 表明该模型拟合程度较好且无其他因素显著影响, 能够准确可靠地预测各因素对山桐子多肽 DPPH 自由基清除率的影响。其中, 一次项 A、B、D 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对模型影响极显著, 4 个因素对 DPPH 自由基清除率的影响程度依次为酶添加量 > 酶解时间 > 酶解温度 > pH。

图4 山桐子多肽的 DPPH、ABTS⁺ 和羟自由基清除活性Fig. 4 DPPH, ABTS⁺ and hydroxyl radical scavenging activities of *Idesia polycarpa* Maxim. polypeptides

由图4可知, 山桐子多肽的体外抗氧化能力与其质量浓度呈正相关。当山桐子多肽质量浓度达到1.2 mg/mL时, 其对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率分别达到79.44%和83.28%; 当山桐子多肽质量浓度为5 mg/mL时, 其对羟自由基清除率达到65.53%: 表明山桐子多肽具有良好的抗氧化活性。但山桐子多肽对 DPPH、ABTS⁺ 和羟自由基的清除活性均低于 V_C 的。山桐子多肽对 DPPH、ABTS⁺ 和羟自由基清除能力的半抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为0.462、0.583 mg/mL 和 3.626 mg/mL, 低于一些已报道多肽的 IC₅₀ 值, 如: 通过双酶系统酶解芝麻蛋白所得的多肽, 其清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 5.689 mg/mL^[21]; 魔芋飞粉经碱性蛋白酶酶解得到的最优抗氧化多肽清除 DPPH 和羟自由基的 IC₅₀ 值分别为 2.82 mg/mL 和 9.03 mg/mL^[22]。

由表5可知, Y_2 模型的 p 值小于0.01, 差异极显著, 失拟项 p 值大于0.05, 差异不显著, R^2 为0.949 8, R_{Adj}^2 为0.899 6, 4 个因素对多肽得率的影响程度依次为酶解时间 > 酶添加量 > 酶解温度 > pH。

2.4.3 最优条件确定及验证

根据 DPPH 自由基清除率模型预测制备山桐子多肽的最优工艺条件为酶解时间 2.733 h、酶解温度 45.787 °C、pH 8.028、复合蛋白酶添加量 2.936%, 在此条件下 DPPH 自由基清除率和多肽得率理论值分别为 78.74% 和 20.18%。为便于操作, 调整工艺条件为酶解时间 2.7 h、酶解温度 45.8 °C、pH 8、复合蛋白酶添加量 2.9%, 在该条件下测得实际 DPPH 自由基清除率和多肽得率分别为 78.54% 和 20.04%。预测值和实际值相差不大, 表明该响应面模型具有可行性。

2.5 山桐子多肽的体外抗氧化能力

在上述最优条件下制备山桐子多肽, 测定其 DPPH、ABTS⁺ 和羟自由基清除率, 结果如图4所示。

2.6 山桐子多肽功能特性分析

2.6.1 溶解度

山桐子蛋白(IP)和 CIP 的溶解度如图5所示。

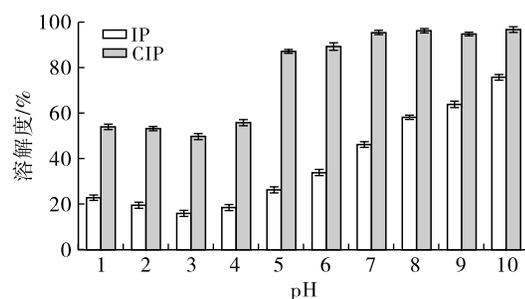


图5 IP 和 CIP 的溶解度

Fig. 5 Solubility of IP and CIP

由图5可知, 当 pH 为 3 时, IP 和 CIP 的溶解度均达到最低, 分别为 16.01% 和 49.90%。pH 刚偏离等电点 (pH 3~4) 时, IP 和 CIP 与氢离子之间的

相互作用力逐渐减弱,样品的溶解度迅速增加;当 pH 完全偏离等电点时,IP 和 CIP 的溶解度大幅度升高,此时样品分子与溶液中的离子相互作用,形成稳定的离子对或离子复合物,从而使溶解度达到一

个相对稳定的水平。

2.6.2 持水性

pH、温度和离子强度对 IP 和 CIP 持水性的影响如图 6 所示。

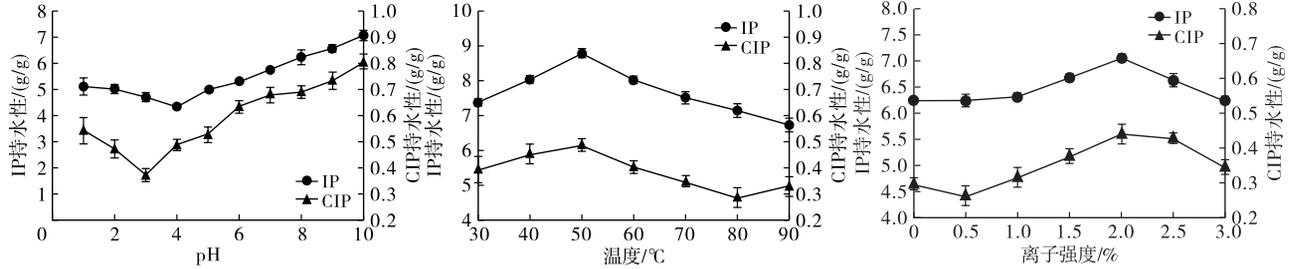


图 6 pH、温度和离子强度对 IP 和 CIP 持水性的影响

Fig. 6 Effect of pH, temperature and ionic strength on water holding property of IP and CIP

由图 6 可知,CIP 在不同 pH、温度和离子强度下的持水力显著低于 IP 的,分子质量较小的 CIP 具有较高的亲水性,溶解度相对较高,导致 CIP 持水能力下降。随着体系中 pH 的不断增加,IP 和 CIP 的持水性均呈现先下降后上升的趋势。当 pH 为 4 时,IP 的持水性最低,为 4.32 g/g,当 pH 为 3 时,CIP 的持水性最低,为 0.37 g/g。两者的持水性均在等电点附近达到最低。随着温度和离子强度的提高,IP 和 CIP 的持水性总体呈现先上升后下降的趋势。当温度为 50 °C 时,IP 和 CIP 的持水性均达到最

高,分别为 8.78 g/g 和 0.49 g/g,温度过高时,会导致蛋白质和多肽生成沉淀,减少了多肽与水分子的接触面积,导致其持水性降低。当离子强度为 2.0% 时,IP 和 CIP 的持水性均达到最高,分别为 7.05 g/g 和 0.44 g/g,当离子强度过高时,Na⁺/Cl⁻的水化作用和盐析效应,会与蛋白质和多肽的持水性降低。

2.6.3 乳化性及乳化稳定性

IP 和 CIP 在不同 pH、温度和离子强度下的乳化性和乳化稳定性如图 7 所示。

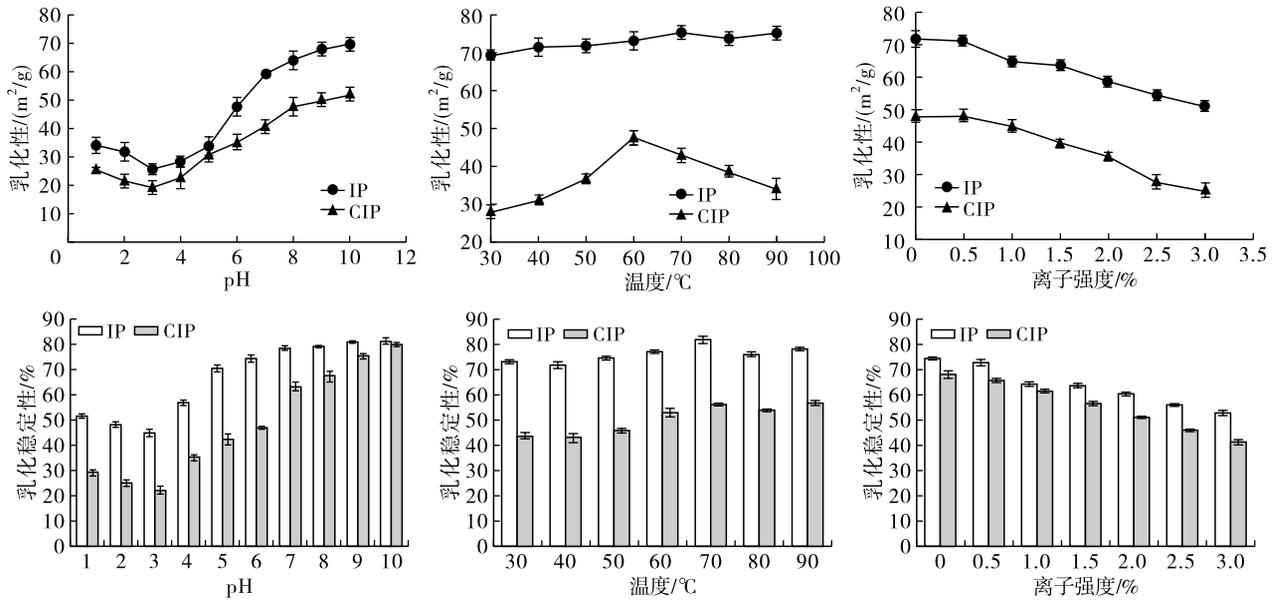


图 7 pH、温度和离子强度对 IP 和 CIP 乳化性及乳化稳定性的影响

Fig. 7 Effect of pH, temperature and ionic strength on emulsifying property and emulsion stability of IP and CIP

由图 7 可知,CIP 在不同 pH、温度和离子强度下的乳化性和乳化稳定性均显著低于 IP 的。CIP 主要由分子质量较小的肽段组成,导致体系中分子粒径、表面张力和黏度降低,从而影响乳化效果和乳化稳定性。IP、CIP 在 pH 为 3 时乳化性和乳化稳定

性均达到最低,分别为 25.64% 和 44.86%、19.16% 和 22.10%。该 pH 处于等电点附近,静电斥力最小,蛋白质和多肽更倾向于聚集并沉淀,导致吸附在油水界面的蛋白质量减少,难以形成均一的乳液,进而降低了乳液的稳定性^[23]。随着温度的逐渐升高,

IP 和 CIP 的乳化性和乳化稳定性总体呈现先上升后下降的趋势,适度加热处理可以提高体系的溶解度,有利于提高油滴在界面上的吸附能力,但当温度过高时,会导致界面上的蛋白质和多肽变性聚集和黏度降低,进而影响乳化效果和其稳定性。NaCl 浓度的增加会导致 IP 和 CIP 的乳化性和乳化稳定性降低。这是因为 NaCl 会影响蛋白质和多肽的电荷

分布,影响分子之间的吸引力和水合作用,导致其乳化性降低。此外,NaCl 还能通过水化作用消耗自由水,削弱蛋白质/多肽水化膜的稳定性,从而降低了蛋白质和多肽的乳化能力。

2.6.4 起泡性及起泡沫稳定性

pH、温度和离子强度对 IP 和 CIP 起泡性及泡沫稳定性的影响如图 8 所示。

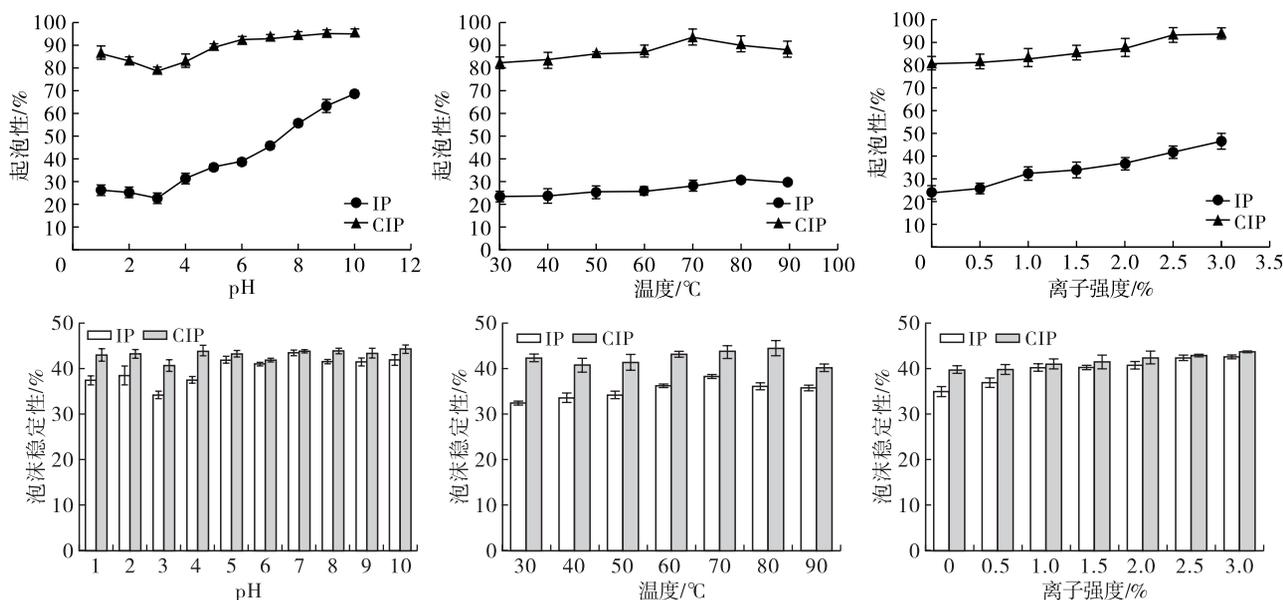


图 8 pH、温度和离子强度对 IP 和 CIP 起泡性及泡沫稳定性的影响

Fig. 8 Effect of pH, temperature and ionic strength on foaming property and foam stability of IP and CIP

由图 8 可知,CIP 在不同 pH、温度和离子强度下的起泡性及泡沫稳定性均显著高于 IP 的。IP、CIP 在 pH 为 3 时起泡性和泡沫稳定性均达到最低,分别为 22.66% 和 34.31%、78.63% 和 40.74%。该 pH 处于等电点附近,分子之间作用力和表面张力较小,导致形成的泡沫表面膜张力不够,进而影响蛋白质和多肽的起泡能力和泡沫稳定性。随着温度的逐渐升高,IP 和 CIP 的起泡性和泡沫稳定性均出现小范围上升,温度的升高会导致分子间流动性增加,进一步增强体系的溶解度。NaCl 浓度的增加会导致 IP 和 CIP 的起泡性和泡沫稳定性增强。这可能是由于 NaCl 通过静电屏蔽作用促进蛋白质/多肽的界面吸附,并通过 Na⁺ 桥接增强界面膜强度,从而提高了起泡性和泡沫稳定性。

3 结论

本研究以山桐子饼为原料提取蛋白,然后利用酶解法制备抗氧化多肽,以 DPPH 自由基清除率和多肽得率为指标,结合多肽二级结构筛选最佳蛋白酶,采用单因素实验和响应面实验对山桐子多肽的制备工艺进行优化,并对山桐子多肽的抗氧化活性与功能特性进行探究。结果表明:经复合蛋白酶酶

解后,所得山桐子多肽的 DPPH 自由基清除率和多肽得率均最高,且其 α -螺旋含量从酶解前的 38.23% 下降到 16.49%, β -折叠含量从 28.01% 下降到 17.81%;山桐子多肽的最优制备工艺条件为酶解时间 2.7 h、酶解温度 45.8 °C、pH 8、复合蛋白酶添加量 2.9%,在此条件下 DPPH 自由基清除率和多肽得率分别达到 78.54% 和 20.04%;山桐子多肽对 DPPH、ABTS⁺ 和羟自由基清除能力的 IC₅₀ 值分别为 0.462、0.583 mg/mL 和 3.626 mg/mL,具有良好的抗氧化活性;与山桐子蛋白相比,山桐子多肽溶解度和起泡性显著升高,而持水性和乳化性有所下降。本研究结果为山桐子多肽的后续开发及其在食品行业的应用提供一定的参考。

参考文献:

- [1] HUANG L, ZENG Y, LI F, et al. Polyphenolic compounds from *Idesia polycarpa* Maxim. fruits ameliorate non-alcoholic fatty liver disease by modulating lipid metabolism in oleic acid-induced HepG2 cells and high-fat diet-induced mice [J/OL]. *J Funct Foods*, 2023, 108: 105715 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105715>.
- [2] ZHANG X, LI W, YU G, et al. Evaluation of *Idesia*

- polycarpa Maxim fruits extract as a natural green corrosion inhibitor for copper in 0.5 M sulfuric acid solution [J/OL]. *J Mol Liq*, 2020, 318: 114080 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114080>.
- [3] 吴玲利, 邓雯方, 卢晓宇, 等. 山桐子开发利用研究进展[J]. *经济林研究*, 2023, 41(2): 242-252.
- [4] YANG W, ZHANG Z, CHEN Y, et al. Evaluation of the use of *Idesia polycarpa* Maxim protein coating to extend the shelf life of European sweet cherries [J/OL]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1283086 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1283086>.
- [5] SHI X, ZHANG Q, YANG J, et al. Simultaneous extraction of oil, protein and polysaccharide from *Idesia polycarpa* Maxim cake meal using ultrasound combined with three phase partitioning [J/OL]. *Ultrason Sonochem*, 2024, 110: 107043 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107043>.
- [6] 陈子茜, 陈耀兵, 黄秀芳, 等. 采收期对“鄂选2号”山桐子果实成分及脂肪酸组成变化影响[J]. *中国粮油学报*, 2023, 38(2): 96-103.
- [7] DENG W, CHEN Y, SUN X, et al. AODB: A comprehensive database for antioxidants including small molecules, peptides and proteins [J/OL]. *Food Chem*, 2023, 418: 135992 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135992>.
- [8] 杨文清, 罗凯, 陈耀兵. 山桐子蛋白提取工艺优化及功能特性研究[J]. *中国粮油学报*, 2024, 39(3): 89-97.
- [9] 王鲁黔. 山核桃仁中脂肪酸分析和多肽的制备及活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.
- [10] XU Y, YANG Y, MA C M, et al. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates [J/OL]. *Food Res Int*, 2023, 173: 113473 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113473>.
- [11] 郭浩彬, 张陆燕, 赵宇, 等. 藜麦水解蛋白肽制备及其抗氧化活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(21): 7073-7082.
- [12] RUMPF J, BURGER R, SCHULZE M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins [J/OL]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 233: 123470 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>.
- [13] 吴绍珍. 山核桃饼粕生物活性肽的制备与活性研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2022.
- [14] 庞会娜. 葛根抗氧化肽的提取分离及其对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [15] FENG L, WANG Y, YANG J, et al. Overview of the preparation method, structure and function, and application of natural peptides and polypeptides [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113493 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113493>.
- [16] BERMEJO-CRUZ M, OSORIO-RUIZ A, RODRÍGUEZ-CANTO W, et al. Antioxidant potential of protein hydrolysates from canola (*Brassica napus* L.) seeds [J/OL]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2023, 50: 102687 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102687>.
- [17] ZHANG X, HUANG Y, MA R, et al. Structural properties and antioxidant activities of soybean protein hydrolysates produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell envelope proteinase [J/OL]. *Food Chem*, 2023, 410: 135392 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135392>.
- [18] WANG Y Y, WANG C Y, WANG S T, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases [J/OL]. *Food Chem*, 2021, 345: 128765 [2024-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128765>.
- [19] 吴峰, 王常青, 石亚伟. 亚麻多肽制备及其抗氧化活性分析[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(23): 112-117.
- [20] 段帅, 吴晓彤. 油莎豆粕抗氧化肽的制备及其稳定性研究[J]. *中国粮油学报*, 2023, 38(1): 80-89.
- [21] LU X, ZHANG L, SUN Q, et al. Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame (*Sesamum indicum* L.) protein hydrolysate [J]. *Food Res Int*, 2019, 116: 707-716.
- [22] 姜莉, 徐怀德, 王莉, 等. 碱性蛋白酶酶解魔芋飞粉制备抗氧化多肽[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(5): 90-95.
- [23] 王海东. 五味子蛋白肽的制备和生物活性研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.