

桑叶蛋白抗氧化肽的酶法制备

孙崇臻^{1,2}, 汤新¹, 孙崇军³, 韩铎¹, 赖富饶², 邵鑫², 杨仕贵⁴, 吴希阳¹, 吴晖²

(1. 暨南大学食品科学与工程学院, 广东广州 510632)(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)
(3. 华南农业大学生命科学与技术学院, 广东广州 510642)(4. 广州荣鼎生物科技有限公司, 广东广州 510445)

摘要: 为了提高桑叶蛋白 MLP 的抗氧化活性, 用碱性蛋白酶 Alcalase、复合蛋白酶 Protamex、木瓜蛋白酶 Papain、风味蛋白酶 Flavourzyme、中性蛋白酶 Neutrase 及胰蛋白酶 Trypsin 等 6 种蛋白酶对 MLP 进行单酶酶解及双酶、三酶复合酶解, 并对酶解前后的化学组成、分子量分布、多肽得率、氨基酸组成、自由基清除能力、还原能力等进行对比分析。结果表明, MLP 主要由分子量大于 6.5 ku 的大分子肽及蛋白质组成, 酶解物则主要由分子量为 0.3~0.6 ku 的小肽及 0.6~6.5 ku 的多肽组成; 相较于过度酶解, 适度酶解能更好的改善 MLP 的抗氧化活性; 多肽得率与自由基清除能力显著正相关 ($r=0.916\sim 0.985$); 6 种蛋白酶中, 碱性蛋白酶、中性蛋白酶及复合蛋白酶的酶解物抗氧化活性显著优于 MLP 及其他三种蛋白酶解物; 中性蛋白酶单独酶解物的抗氧化活性显著优于双酶、三酶复合酶解物。对中性蛋白酶的酶解条件进行优化, 结果表明底物浓度为 20 mg/mL, E/S 为 1% (W/W), 用中性蛋白酶酶解 2 h 所得的酶解物(NH)的抗氧化活性最高, 后期研究中可选用中性蛋白酶制备桑叶蛋白抗氧化肽。NH 或许可以作为食品中较有潜力的抗氧化剂。

关键词: 桑叶; 蛋白质; 酶解物; 抗氧化; 分子量分布

文章编号: 1673-9078(2020)04-192-201

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.026

Enzymatic Preparation of Antioxidant Peptides of Mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) Leaf Protein

SUN Chong-zhen^{1,2}, TANG Xin¹, SUN Chong-jun³, HAN Duo¹, LAI Fu-rao², SHAO Xin², YANG Shi-gui⁴,
WU Xi-yang¹, WU Hui²

(1. Department of Food Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(2. School of Food science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(4. Guangzhou Rong Ding Biological Technology CO., Ltd., Guangzhou 510445, China)

Abstract: In order to improve antioxidant activity of mulberry leaf protein (MLP), Alcalase, Protamex, Papain, Flavourzyme, Neutrase, and Trypsin were used to hydrolyze MLP. Effects of different enzymes on the chemical composition, molecular weight distribution, peptide yield, amino acid composition, radical scavenging activity and reducing power were investigated. Results showed that mulberry leaf protein was mainly composed of the fractions above 6.5 ku, while MLP hydrolysates were rich in the fractions of 0.3~0.6 ku and 0.6~6.5 ku. Limited hydrolysis of MLP could lead to higher antioxidant activity than extensive enzymatic hydrolysis. The radical scavenging activities of MLP hydrolysates were significantly correlated with the peptide yield ($r=0.916\sim 0.985$). Hydrolysates prepared with neutrase, alcalase, and protamex showed significantly higher antioxidant activity than that of MLP and the other three hydrolysates. Meanwhile, the antioxidant activity of Neutrase hydrolysates was significantly better than the complex hydrolysates. Furthermore, the condition of an enzyme to substrate level of 1%

引文格式:

孙崇臻, 汤新, 孙崇军, 等. 桑叶蛋白抗氧化肽的酶法制备[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 192-201

SUN Chong-zhen, TANG Xin, SUN Chong-jun, et al. Enzymatic preparation of antioxidant peptides of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf protein [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 192-201

收稿日期: 2019-12-04

基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2019B020212004)

作者简介: 孙崇臻 (1987-), 女, 博士, 研究方向: 食品科学; 共同第一作者: 汤新: 男 (1994-), 硕士, 研究方向: 食品科学; 孙崇军 (1992-), 男, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学

通讯作者: 吴希阳 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学; 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全

(W/W), substrate concentration of 20 mg/mL and a hydrolysis time of 2 h was found to be the optimum conditions to obtain Neutrase hydrolysates (NH) with the highest antioxidant activity. In the further research, the antioxidant peptides of MLP will be prepared by Neutrase, and NH may be a promising antioxidant in food.

Key words: mulberry leaf; protein; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity; molecular weight

自由基作为高活性组分, 会引起食品的脂质氧化, 从而降低食品质量导致营养流失甚至产生食品腐败^[1]。自由基反应产生的活性氧, 在与人体健康相关的多种疾病中扮演重要角色^[2]。因此, 寻找可以显著抑制氧化反应并改善敏感食品产品营养价值的抗氧化剂, 对食品行业非常重要。近年来, 诸如蛋白质、蛋白质多肽等天然抗氧化剂, 由于具有分布广、活性高、毒性低等特点而被人们所重视^[3]。与蛋白质及游离氨基酸相比, 蛋白酶解物含有许多更容易被胃肠有效吸收的肽, 从而被看作适合人体营养的有效蛋白质资源^[4]。此外, 源于蛋白质的多肽及酶解物具有低致敏性及高活性, 相较于蛋白质更有益于人体健康^[2,3]。

通常, 生物活性肽及酶解物可以通过体外酶解反应制备。与其它方式相比较, 蛋白质的酶解反应条件更加温和、副作用少、提取率高, 所得的活性成分多^[5]。目前为止, 已从多种植物中制备出具有良好抗氧化活性的蛋白酶解物。如亚麻籽^[6]、苜蓿叶^[7]及米糠^[8]等。研究表明, 酶的专一性及酶解条件 (pH、E/S 及温度等) 能够显著影响活性肽的分子量分布, 二级结构及氨基酸组成的理化性质, 从而影响生物活性^[4]。因此, 选择合适的蛋白酶及酶解条件制备活性肽非常重要。

桑叶营养丰富、适口性好, 传统上常被用于养蚕及饲喂食草动物^[9]。在一些亚洲国家, 桑叶不仅被用作动物生产的潜在植物蛋白来源^[10], 也被用作中药制剂或者凉茶, 用于护肝或改善视力^[11]。如今, 桑叶已被用作功能性食品或者食品营养添加剂来生产桑叶面、汤、豆腐、酒、饮料、小吃等^[12,13]。由于桑叶具有广泛的食用价值, 桑叶的相关研究日益受到重视。桑叶中蛋白含量丰富, 约占干基重量的 17%~25%^[14,15]。前期研究表明, 桑叶蛋白尤其是清蛋白具有良好的抗氧化活性, 可以用作潜在的抗氧化剂^[16]。但是目前对桑叶蛋白酶解物的抗氧化活性研究十分有限^[17]。为了进一步改善桑叶蛋白的抗氧化活性, 提高其吸收性能及实际应用价值, 用 6 种蛋白酶(碱性蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶及胰蛋白酶)对桑叶清蛋白进行酶解, 探究了酶解条件对多肽得率、分子量分布、抗氧化活性等的影响, 以期选出最适合制备桑叶抗氧多肽的蛋白酶。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑叶 (广东桑-大 10), 广东省农业蚕业研究所提供; 碱性蛋白酶 (3.0 T, 3 AU/g)、风味蛋白酶 (500 LAPU/g、复合蛋白酶 (1.5 AU/g)、中性蛋白酶 (0.8 AU/g) 购自诺维信酶制剂公司 (丹麦); 胰蛋白酶 (250 U/mg) 及木瓜蛋白酶 (800 U/mg) 购自 Biotopped 公司 (中国北京); 还原型谷胱甘肽 (GSH) 购自广州齐云生物技术有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 及菲啰嗪购自 Sigma 公司 (美国)。其它试剂为分析纯, 购自阿拉丁公司 (中国上海)。

1.2 仪器与设备

membraPure A300 全自动氨基酸分析仪, 德国; PHS-3C 精密 pH 计, 上海; SCIENTZ-18N 冷冻干燥机, 宁波; HHS 电热恒温水浴锅, 上海; Legend micro 17 高速离心机, 美国 Thermo; SHZ-88A 往复式水浴恒温振荡器, 太仓; GZX-9140MBE 数显鼓风干燥箱, 上海; SCIENTZ-IIID 超声细胞粉碎仪, 宁波; U-3900 紫外可见分光光度计, 日本日立。

1.3 方法

1.3.1 桑叶蛋白的制备

桑叶清蛋白 MLP 的制备参照前期制备方法并经大孔树脂 DA-201 纯化^[16], 凯氏定氮测得 MLP 的蛋白质含量为 75.20%±1.24%。

1.3.2 酶活的测定

由于选用酶的单位并不统一, 为了统一单位, 对酶活进行测定。酶活的测定参考李艳红^[18]的方法。

1.3.3 桑叶蛋白的酶解

1.3.3.1 MLP 的单酶酶解

MLP 用蒸馏水溶解, 配制 1% (W/V) 的蛋白溶液。95 °C 加热 10 min, 去除 MLP 中蛋白酶抑制剂的活性。调节温度至酶的最适温度, 预热 10 min, 并用 0.5 M NaOH 调节蛋白溶液至所需 pH。在最适条件下酶解 MLP, 酶解条件如表 1 所示。酶解过程中, 前

20 min, 每 5 min 调节一次 pH, 25~245 min, 每 20 min 调节一次。结束后, 将酶解液于 95 °C 灭酶活 10 min 以终止反应。调回 pH 至中性, 8000 r/min 离心 10 min,

取上清, 用截留量为 100 u 的透析袋透析。之后冷冻干燥, 并于 -20 °C 保存备用。

表 1 六种蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 The optimal hydrolysis condition of six proteases

标号	酶	标注酶活	实测酶活/(10 ⁵ U/g)	最佳pH	最适T/°C	E/S
1	Alcalase	3 AU/g	56.80	8	55	60000
2	Protamex	1.5 AU/g	10.60	7	55	60000
3	papain	800 U/mg	0.28	7	55	60000
4	Flavorzyme	500 LAPU/g	0.81	7	50	60000
5	Neutrase	0.8 AU/g	6.76	7	45	60000
6	trypsin	250 U/mg	1.70	8	37	60000

1.3.3.2 MLP 的双酶或三酶复合酶解

表 2 桑叶蛋白的复合酶解

Table 2 Multiple enzymatic hydrolysis of mulberry leaf protein

标号	蛋白酶	pH	温度/°C	时间	E/S
Y1	Alcalase+Flavorzyme	8/7	55/50	0.5 h/2 h	60000
Y2	Alcalase+papain	8/7	55/55	0.5 h/2 h	60000
Y3	Alcalase+trypsin	8/8	55/37	0.5 h/2 h	60000
Y4	Neutrase+Flavorzyme	7/7	45/50	2 h/1 h	60000
Y5	Neutrase+papain	7/7	45/55	2 h/1 h	60000
Y6	Neutrase+trypsin	7/8	45/37	2 h/1 h	60000
Y7	Neutrase+Alcalase	7/8	45/55	2 h/0.5 h	60000
Y8	Neutrase+Protamex+Alcalase	7/7/8	45/55/55	1 h/1 h/0.5 h	60000

由于单一酶解存在酶解位点单一, 酶解不充分等缺陷, 为了对桑叶蛋白充分酶解, 以期得到抗氧化活性较好的酶解物, 对 6 种蛋白酶进行双酶或三酶复合酶解。酶解条件如表 2 所示。

1.3.4 桑叶蛋白酶解条件的优化

对 1.3.3 酶解得到酶解物进行抗氧化活性分析后, 选择综合性能较优的蛋白酶进行不同酶解时间下抗氧化活性的分析, 选择活性较高的酶对其酶解条件进一步优化。主要考察了加酶量 (1%、2%、3%、4%)、底物浓度 S (10、20、30、40 mg/mL) 及酶解时间 (1 h、2 h、4 h、6 h、8 h) 三个因素对抗氧化活性的影响。

1.3.5 酶解物基本化学成分分析

凯氏定氮法测定蛋白质含量; 总糖含量的测定参照方法^[19]; 总酚含量测定参照方法^[20]; 蛋白质得率计算为酶解物蛋白含量与酶解底物中蛋白含量的百分比。

1.3.6 水解度 (DH) 的测定

由于反应所用 pH 值均等于或大于 7.0, 所以采用 pH-stat 法测定水解度 DH^[21]。其中, 桑叶蛋白 $h_{tot}=8.16$ mmol/g。

1.3.7 可溶性肽得率 (YSP) 的测定

用福林酚法测定可溶性肽得率^[21]。取 2 mL 样品溶液与 2 mL 10% (W/V) 的三氯乙酸(TCA)混合均匀, 25 °C 静置 0.5 h。8000 r/min 离心 10 min 后, 取 0.5 mL 上清液与 2.5 mL 福林酚-A 试剂混匀, 30 °C 水浴 0.5 h。加入 1 mL 福林酚-B 试剂 (购自广州卵林) 后于 30 °C 继续水浴 0.5 h。650 nm 测定吸光值。以 0.5 mL 的 5% TCA 为空白对。用 GSH (0.0~2.0 g/L) 作标准曲线。根据标准曲线计算样品可溶性肽浓度 (T_S)。YSP 表示为 T_S 与 T_p 的百分比。T_p 表示底物中的蛋白浓度。

1.3.8 分子量测定

采用高效液相色谱系统 (Waters, 美国) 进行分子量的测定^[22]。取 1 mg/mL 的样品溶液, 用 0.22 μm 的滤膜过滤后进色谱柱 TSK gel 2000SWXL (300 mm×7.8 mm)。用乙腈/水/三氟乙酸(45/55/0.1, V/V/V) 作流动相, 检测波长 220 nm, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。用细胞色素 C (12.5 ku), 抑肽酶 (6.5 ku), 杆菌肽 (1.45 ku), 还原型谷胱甘肽 (307 u) 和乙氨酰氨-乙氨酰氨-乙氨酰氨 (MW 189 u) 作为相对分子质量校正标准。以标准品的 log Mw 及洗脱时间作标准曲线(y=-3.472x+30.005, R²=0.9917)。

1.3.9 抗氧化活性测定

1.3.9.1 自由基清除能力

将样品配制成 0.30 mg/mL 的溶液,进行自由基清除能力的测定。参照前期文献^[17]测定了 DPPH 及 ABTS 自由基清除能力;超氧阴离子自由基清除能力参照文献^[23]进行。

1.3.9.2 还原能力测定

将样品配制成 0.30 mg/mL 的溶液,参照文献^[22]进行还原能力测定。

1.3.10 统计分析及作图

使用 SPSS 17.0 软件,对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 结果表示为平均值±标准偏差 (SD)。采用 Duncan 多边检验进行差异显著性分析 ($p<0.05$)。用 Pearson 双尾相关性检验对数据进行相关性分析。用 Origin Pro 8.6 作图。

2 结果与分析

2.1 酶活测定结果

根据 L-酪氨酸不同浓度对应的吸光值作线性图, 得出线性方程 $y=0.0101x+0.0121$, $R^2=0.9996$ 。各酶的酶活测定结果如表 1 所示。其中 Alcalase 活性最高, Protamax 次之, 木瓜蛋白酶最差。与标注的酶活相比, 木瓜蛋白酶的实测酶活降低了约 26 倍, 这主要因为放置时间过长, 酶活降低。

2.2 单酶酶解产物的理化性分析

2.2.1 水解度 DH 及可溶性肽得率 YSP 测定

水解度可以通过影响肽的氨基酸组成及大小来控制肽的生物活性^[24]。6 种蛋白酶酶解过程中 DH 的变化如图 1a 所示。酶的种类及酶解时间是影响 DH 的主要因素。由图 1a 可知, 6 种蛋白酶中, 胰蛋白酶的酶解能力最差, 245 min 后 DH 仅为 11.9%。分析原因, 胰蛋白酶为特异性强的内切酶, 仅特异性断裂碱性氨基酸之间形成的肽键。其它蛋白酶的酶解速率在 45 min 内呈线性增长($R^2=0.967\sim 0.996$), 65~145 min 缓慢增长最终趋于平缓。MLP 最初水解时, 肽键迅速断裂, 产生大量的氨基氮, 从而导致 DH 迅速增加; 随着水解反应的进行, 肽键断裂速度降低, DH 保持稳定。TH 的低 DH 值, 主要归因于胰蛋白酶肽键断裂的特异性。6 种蛋白酶解物中, Protamax 酶解物 (PrH) 的 DH 最高, Neutralse 酶解物 (NH)、Alcalase 酶解物 (AH) 次之。Protamax、Neutralse 及 Alcalase 均为内切酶, 已被广泛用于水解蛋白制备生物活性肽^[24]。PrH、NH 及 AH 的较高的 DH 表明三种酶对桑叶蛋白具有较高

水解能力。由图 1 可知, PrH、AH 及 NH 的 DH 及 YSP 均高于木瓜蛋白酶解物 (PaH)、Flavorzyme 酶解物 (FH) 及胰蛋白酶解物 (TH)。与之不同, 尽管 PaH 与 FH 的水解度显著高于 TH, 但是对应 YSP 显著低于 TH ($p<0.05$)。因此, DH 与 YSP 之间并无显著正相关性。

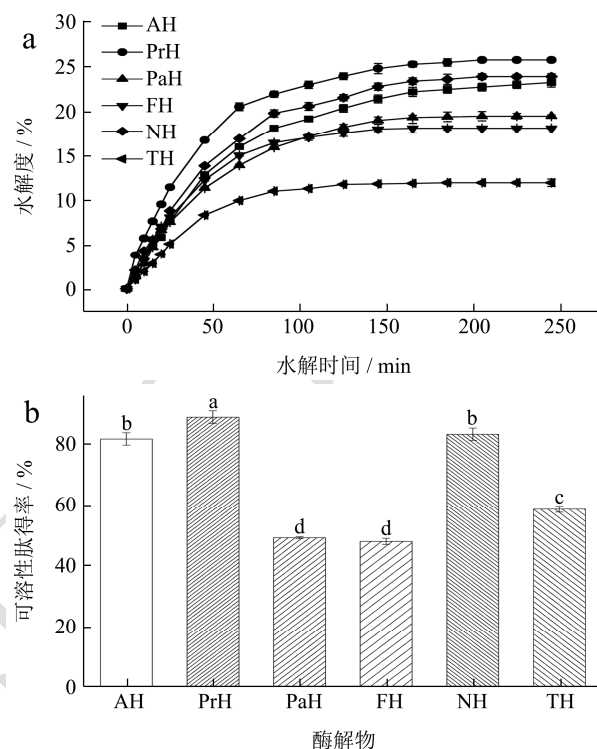


图1 桑叶蛋白6种酶解物的水解度 a 及可溶性肽得率 b

Fig.1 Hydrolysis degree and soluble peptide yield of mulberry leaf protein hydrolysates with different individual proteases

注: MLP: 桑叶蛋白; AH、PrH、PaH、FH、NH、TH 分别代表 MLP 碱性蛋白酶解物、复合蛋白酶解物、木瓜蛋白酶解物、风味蛋白酶解物、中性蛋白酶解物及胰蛋白酶解物。不同字母表示各数值之间存在显著性差异 ($p<0.05$)。

2.2.2 单酶酶解物的化学组成

对酶解物的化学成分进行测定, 结果如表 3 所示。所有酶解物的蛋白含量均高于 64%, TH 的最低。分析原因, Trypsin 为特异性内切酶, 仅断裂 Lys、Arg 等碱性氨基酸形成的肽键。AH、PrH 及 NH 的最高, 分别为 80.39%、79.55%、79.52%。这些值低于小麦胚芽球蛋白碱性酶解物的纯度^[21], 高于油菜籽粕胃蛋白酶解物^[25]。蛋白得率也能作为酶解效率的指标。由表 3 可知, 酶解物的蛋白得率均高于 50%, 表明多数蛋白质能被酶水解, 并转化为多肽产物; 此外, 蛋白含量与蛋白得率呈显著正相关 (表 4), 这与 Thamnarathip 等^[8]的结果一致。MLP 经过酶解后, 总糖含量及总酚显著增加。这主要是由于酶解过程中, 多酚及多糖发生降解, 生成小分子单糖及一些游离酚

酸。与此同时，未酶解桑叶蛋白中，一些酚类可与蛋白以共价或非共价形式结合，在酶解过程中，更多的酚类被释放出来，成为游离酚^[8]。

表3 单酶酶解物的化学成分及水解度

Table 3 The chemical composition and degree of hydrolysis of mulberry leaf protein hydrolysates

酶	样品 ¹	DH	蛋白含量/%	蛋白得率/%	总糖/(g/100 g)	总酚酸 ² /(g GAE/100 g)
--	MLP	--	75.20±1.24 ^b	--	4.04±0.31 ^d	2.09±0.05 ^c
Alcalase	AH	23.19±1.06 ^a	80.39±1.31 ^a	93.06±2.12 ^a	5.19±0.16 ^c	3.54±0.02 ^b ^a
Protamex	PrH	25.67±0.60 ^a	79.55±2.63 ^a	92.91±2.06 ^a	6.42±0.40 ^b	3.58±0.19 ^a
Papain	PaH	19.44±0.02 ^b	70.78±3.00 ^b	66.43±1.21 ^c	6.12±0.62 ^b	2.64±0.01 ^b
Flavourzyme	FH	18.08±0.19 ^b	74.73±2.69 ^b	77.47±1.56 ^b	5.08±0.39 ^c	2.68±0.11 ^b
Neutrase	NH	23.83±0.22 ^a	79.52±3.21 ^a	91.57±3.06 ^a	6.42±0.28 ^b	3.33±0.24 ^a
Trypsin	TH	11.93±0.42 ^c	64.79±2.31 ^c	50.62±2.02 ^d	8.03±0.47 ^a	3.83±0.12 ^a

注：1. MLP: 桑叶蛋白；AH、PrH、PaH、FH、NH、TH 分别代表 MLP 碱性蛋白酶解物、复合蛋白酶解物、木瓜蛋白酶解物、风味蛋白酶解物、中性蛋白酶解物及胰蛋白酶解物；2. TPC: 总酚含量；3. 4 h 时的水解度；ND 表示未检测到；同一列中不同字母表示各数值之间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

表4 各理化指标及抗氧化指标的相关性分析

Table 4 The correlation analysis of various physicochemical indexes and antioxidant indexes

名称	YSP	自由基清除能力			还原力	蛋白含量	蛋白得率	DH	总糖	总酚
		DPPH [·]	O ₂ ^{·-}	ABTS ^{·+}						
YSP	1	0.916**	0.985**	0.956**	0.81	0.572	0.59	0.528	0.127	0.81
DPPH [·]		1	0.944**	0.923**	0.965**	0.300	0.325	0.214	0.375	0.929**
O ₂ ^{·-}			1	0.957**	0.864*	0.578	0.599	0.522	0.147	0.811*
ABTS ^{·+}				1	0.882*	0.552	0.566	0.434	0.104	0.759
还原力					1	0.201	0.227	0.089	0.447	0.865*
蛋白含量						1	0.999**	0.939**	-0.649	0.01
蛋白得率							1	0.943**	-0.622	0.034
DH								1	-0.512	-0.015
总糖									1	0.584
总酚										1

注：YSP: 可溶性肽得率；DH: 4 h 时的水解度；**在 0.01 的水平上（双侧）显著相关；*在 0.05 水平上（双侧）显著相关。

2.2.3 单酶酶解产物分子量分布测定结果

表5 酶解物的分子量分布

Table 5 The molecular weights of mulberry leaf protein hydrolysates

样品	I(>35 ku)	II(6.5~35 ku)	III(0.5~6.5 ku)	IV (0.3~0.5 ku)	V(<0.3 ku)
MLP	25.27	20.82	36.50	15.11	2.3
AH	1.09	ND	58.93	31.16	8.82
PrH	1.56	ND	56.08	32.07	9.29
PaH	ND	ND	ND	84.50	15.50
FH	ND	ND	ND	94.61	5.35
NH	1.74	ND	59.08	26.88	12.30
TH	9.27	5.66	55.02	24.32	5.73

桑叶蛋白及其桑叶酶解物的分子量分布如表 5 所示。MLP 被分为 5 个部分：I(>35 ku)、II(6.5~35 ku)、III (0.5~6.5 ku)、IV (0.3~0.5 ku) 及 V (<0.3 ku)。水解后，组分 I 与组分 II 百分比显著降低；III 与 IV

的百分比显著增加，组分 V 略有增加。这表明酶解处理可以将大分子量的蛋白质分解为小分子量的多肽、寡肽及游离氨基酸。6 种酶解产物中，只有 TH 含有组分 I 与组分 II (14.90%)，表明胰蛋白酶处理不能完

全破坏 MLP 的蛋白结构。MLP 的组分 II 被其它五种酶彻底酶解, 组分 I-III 被木瓜蛋白酶及风味蛋白酶彻底降解。AH、PrH 及 NH 的分子量分布类似, 均含有丰富的多肽 (0.5~6.5 ku)。PaH 及 FH 则含有丰富的寡肽 (0.3~0.5 ku)。此结果表明, 不同的蛋白酶对 MLP 的降解能力不同。

2.2.4 单酶酶解物的氨基酸组成

MLP 经过不同蛋白酶水解后, 其氨基酸组成有所变化。除了 NH 及 TH 外, 其余样品的总氨基酸含量 TAA 均显著降低, 其中 FH 及 PaH 降低的最为显著。这主要是由于 MLP 经过酶解后, 产生了小分子的肽及游离氨基酸, 这些小分子物质在透析过程会被损失

掉, 从而使 TAA 降低。由表 5 可知, MLP 经过 Papain 及 Flavorzyme 酶解后, 大分子物质全被水解成小肽及游离氨基酸, 从而使其氨基酸损失较大, TAA 显著降低。Ao 等^[26]研究表明, 酪蛋白经过凝胶过滤后, 游离氨基酸被去除, 导致氨基酸含量显著降低 ($p<0.01$)。所有样品中, Glu 最为丰富, Asp 次之 (PaH 除外)。就疏水性氨基酸 (HAA) 而言, TH、NH、PrH 及 AH 含有较高含量的 Leu、Ala、Val 及 Phe, 其 HAA 含量显著高于 PaH 及 FH ($p<0.05$)。芳香族氨基酸 (AAA) 分析结果与之相似。酶解物中, NH、AH 及 PrH 的氨基酸分布相似。与其它酶解物相比, PaH 的 Met 及 Ala 含量较高, Tyr 及 Cys 的含量较低。

表 6 桑叶蛋白及其酶解产物的氨基酸组成

Table 6 Amino acid compositions of mulberry leaf protein hydrolysates

氨基酸	氨基酸含量/(g/kg 蛋白)						
	MLP	AH	PrH	NH	FH	PaH	TH
Asp	107.10±6.50 ^a	82.10±3.80 ^c	84.60±5.60 ^c	100.55±1.23 ^b	64.50±1.60 ^d	36.40±1.30 ^e	101.20±2.51 ^{ab}
Thr	58.90±1.51 ^a	42.10±1.10 ^b	43.10±1.70 ^b	49.90±2.35 ^{ab}	32.50±1.41 ^c	31.70±3.10 ^c	52.00±2.20 ^{ab}
Ser	55.00±2.11 ^a	37.70±4.20 ^b	39.00±1.60 ^b	45.90±1.54 ^b	29.60±0.60 ^c	36.40±2.20 ^b	48.60±3.10 ^{ab}
Glu	144.50±6.74 ^a	116.30±7.20 ^c	118.90±4.20 ^c	129.00±3.53 ^b	93.70±2.50 ^d	100.00±4.60 ^d	139.10±7.10 ^{ab}
Pro	50.20±0.54 ^a	40.30±1.50 ^{ab}	41.10±1.00 ^{ab}	46.70±0.91 ^a	30.40±0.80 ^b	28.90±1.10 ^b	48.20±4.00 ^a
Gly	63.40±3.01 ^a	50.60±3.10 ^{bc}	52.10±2.60 ^{bc}	54.10±3.51 ^{ab}	40.0±1.9 ^{cd}	29.70±1.50 ^d	60.20±2.20 ^a
Ala	58.70±2.32 ^a	48.00±1.20 ^c	49.40±3.60 ^{bc}	50.20±1.42 ^{bc}	35.10±1.30 ^d	62.90±4.30 ^a	53.60±4.20 ^{ab}
Val	30.70±1.34 ^a	36.30±1.62 ^a	32.90±1.70 ^a	38.00±4.01 ^a	29.40±1.60 ^a	11.70±0.50 ^b	34.70±2.20 ^a
Met	10.80±1.09 ^b	15.90±1.31 ^{ab}	16.80±1.10 ^{ab}	16.50±1.62 ^{ab}	12.60±1.20 ^b	22.50±1.61 ^a	12.20±0.60 ^b
Ile	31.30±2.50 ^a	38.20±2.30 ^a	36.50±1.60 ^a	38.10±1.98 ^a	34.10±2.10 ^a	37.80±1.81 ^a	37.70±3.60 ^a
Leu	63.90±4.01 ^a	69.20±5.61 ^a	67.40±4.20 ^a	65.30±3.65 ^a	51.80±3.10 ^b	47.00±1.70 ^b	67.60±5.30 ^a
Tyr	42.20±3.58 ^a	42.60±4.11 ^{ab}	42.80±2.60 ^{ab}	42.90±1.54 ^{ab}	35.00±1.81 ^b	16.00±1.00 ^c	50.50±4.60 ^a
Phe	33.40±1.01 ^{ab}	38.40±5.12 ^a	40.60±2.30 ^a	34.50±2.23 ^{ab}	26.70±1.31 ^b	34.80±2.61 ^{ab}	34.40±2.40 ^{ab}
Arg	38.90±1.69 ^a	31.80±1.61 ^{ab}	35.80±2.10 ^{ab}	39.30±3.22 ^a	25.10±1.80 ^b	9.40±1.10 ^c	39.4±2.6 ^a
Lys	16.80±1.43 ^a	12.90±1.23 ^a	15.20±1.70 ^a	16.40±1.22 ^a	9.80±0.60 ^a	14.10±1.60 ^a	15.10±1.30 ^a
His	35.00±2.50 ^a	31.40±1.90 ^a	32.80±2.30 ^a	37.50±2.57 ^a	21.10±3.11 ^b	21.50±1.30 ^b	32.40±2.50 ^a
Cys	18.70±1.81 ^a	8.40±0.61 ^b	10.10±1.30 ^b	15.30±1.51 ^a	7.10±0.70 ^b	4.20±0.50 ^c	11.80±1.60 ^b
HAA ¹	339.90±8.01 ^b	337.30±10.10 ^b	339.60±8.60 ^b	347.50±4.01 ^a	262.20±5.20 ^c	265.80±6.30 ^c	350.70±13.20 ^a
AAA ²	75.60±3.54 ^a	81.00±4.20 ^a	83.40±2.80 ^a	77.40±4.22 ^a	61.70±1.40 ^b	50.80±2.20 ^c	84.90±5.60 ^a
TAA ³	859.50±10.24 ^a	742.20±14.10 ^b	759.10±14.60 ^b	820.10±6.02 ^a	578.5±12.1 ^c	545.00±14.61 ^c	838.70±24.00 ^a

注: 1.疏水性氨基酸 (Ala、Val、Ile、Leu、Tyr、Phe、Pro、Met 及 Cys); 2.芳香族氨基酸 (Phe 及 Tyr); 3.总氨基酸。数据表示为均值±SD, 同一行中不同字母上标表示各数据之间存在显著性差异 ($p<0.05$)。AH、PrH、PaH、FH、NH 及 TH 分别对应碱性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶及胰蛋白酶酶解物。

2.3 桑叶蛋白及其单酶酶解产物的抗氧化活性

MLP 及其酶解产物的自由基清除能力如图 2 所示。所有样品的 DPPH 自由基清除能力显著高于 ABTS 及超氧阴离子自由基清除能力。除 PaH 及 FH 以外, 其余酶解物的自由基清除能力显著高于 MLP

($p<0.05$)。在 DPPH 自由基清除能力中, TH (89.6%)、PrH (89.8%)、NH (89.2%) 及 AH (88.8%) 的清除能力显著高于 FH (80.1%) 及 PaH (60.8%)。这与样品的 YSP 及总酚含量显著相关 (表 4, $p<0.01$)。Mw 分析结果表明 TH、PrH、AH 及 NH 含有较多的高分子量多肽 (0.5~6.5 ku); 这些多肽使其具有较高的表

面疏水性。同时, 酶解反应改善了 MLP 的溶解性, 酶解产物可以更容易的接触 DPPH 自由基。另一方面, 经过木瓜蛋白酶及风味蛋白酶酶解后, MLP 中高分子量多肽被水解为亲水性的小肽及游离氨基酸, 极性增加, 使其难以捕捉疏水性的 DPPH 自由基^[27]。因此, TH、PrH、AH 及 NH 较优的 DPPH 自由基清除能力与其高疏水性及在反应介质中良好的分散性之间的平衡有关^[22]。AH、PrH 及 NH 的超氧阴离子自由基清除能力显著高于 MLP、FH 及 PaH ($p < 0.05$), 这与其 YSP 及总酚含量显著相关($p < 0.05$)。与 DPPH 及 O_2^- 不同, NH (18.7%) 及 AH (18.2%) 的 ABTS⁺ 清除能力显著高于 PrH (15.8%) 及 TH (14.5%, $p < 0.05$)。FH 与 MLP 的 ABTS 自由基清除能力没有显著性差异。总之, 酶解物的自由基清除能力与多肽得率显著相关 ($p < 0.01$, r 为 0.916~0.985)。YSP 越高, 自由基清除能力越强。因此, 优化的 DH 及 YSP 可以改善 MLP 的自由基清除能力。这与 You 等^[27]的结论相似。

酸性氨基酸 (Asp、Glu) 与还原能力呈显著的正相关。表 6 表明, NH 及 TH 的 HAA 及酸性氨基酸含量显著高于其他酶解物中的含量。此外, 还原能力与酶解物的 TPC 含量显著相关 ($r=0.865$), 与多肽得率之间并无显著的相关性 ($p > 0.05$, $r=0.810$)。PaH 及 FH 的自由基清除能力、还原能力均低于 MLP。这表明 MLP 经过木瓜蛋白酶及风味蛋白酶水解后不仅不能够改善抗氧化活性, 而且会使其降低。此外, PaH 及 FH 的 DH 显著优于 TH, 但是其抗氧化活性显著低于 TH, 因此, 较高的 DH 并不意味着较高的抗氧化活性。

2.4 酶解时间对 AH、NH 及 PrH 抗氧化活性的影响

酶解时间显著影响抗氧化活性^[29]。根据四种酶解产物抗氧化活性分析结果, 得出 Alcalase、Neutrase 及 Protamax 是酶解 MLP 制备抗氧化肽的最为有效的酶。为了研究酶解时间对 AH、PrH 及 NH 抗氧化活性的影响, 对三种酶解物在不同时间段下的抗氧化活性进行了测定。结果表明, 2 h 内, 酶解物的抗氧化活性变化趋势最为丰富, 2 h 后随着酶解时间的延长, 抗氧化活性显著降低 (图 3, $p < 0.05$)。2 h 内, NH 的 DPPH 自由基清除能力高于 AH 及 PrH, 并于 2 h 达到最高 (92.42%)。ABTS 自由基清除结果 (图 3b) 表明, AH、PrH 及 NH 分别在 0.5 h (12.36%)、1 h (16.32%) 及 2 h (19.61%) 达到最大值。

NH 及 AH 的还原能力具有相似的变化趋势, 即在 1 h 内迅速降低, 之后 1 h 迅速升高 (图 3c)。此趋势与风味蛋白酶酶解醇溶蛋白还原能力变化趋势相似^[30]。与 AH 及 NH 相反, PrH 的还原能力在 3 h 内并无显著变化。结合 DPPH 及 ABTS 自由基清除能力测定结果可知, 酶解 3 h 后, NH、AH 及 PrH 的抗氧化活性随着酶解时间的延长不会升高反而降低。AH、PrH 及 NH 的抗氧化活性分别在 0.5 h、1 h 及 2 h 达到最大。其中, NH 的综合抗氧化性能最优。与过度酶解相比, MLP 适当酶解可以产生更好的抗氧化活性。

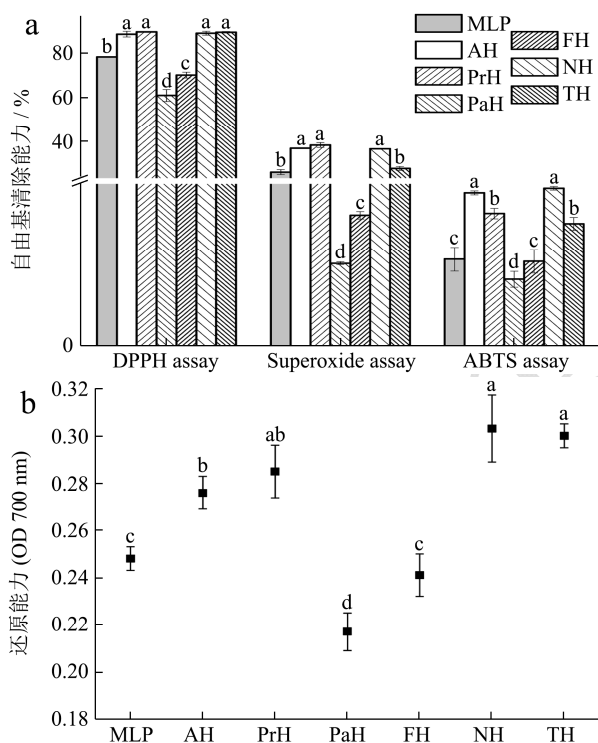
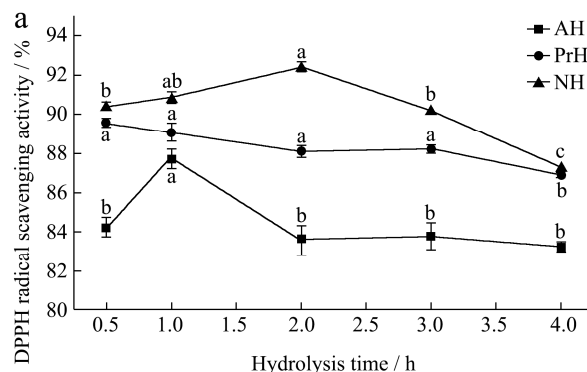


图2 桑叶蛋白及酶解产物的自由基清除能力(a)及还原能力(b)
Fig.2 Radical scavenging activity (a) and reducing power (b) of mulberry leaf protein and mulberry leaf protein hydrolysates (0.3 mg/mL)

注: 同一指标中不同字母表示各数值之间存在显著差异 ($p < 0.05$), 下同。

与自由基清除能力结果相似, AH、PrH、TH 及 NH 的还原能力显著优于 MLP ($p < 0.05$)。NH 与 TH 的还原能力最强 (0.303、0.300), PrH (0.285) 及 AH (0.276) 次之。Udenigwe 等^[28]发现疏水性氨基酸及



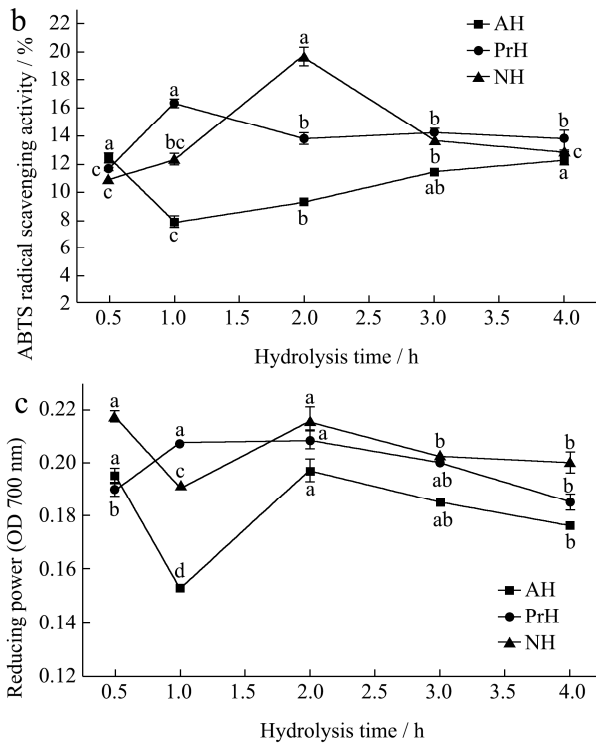


图3 AH,NH 及 PrH 在不同酶解时间下 DPPH 自由基清除能力(a)、ABTS 自由基清除能力(b) 及还原能力(c) (0.3 mg/mL)

Fig.3 The DPPH (a), ABTS radical quenching activity (b) and reducing power (c) of AH, NH and PrH at different hydrolysis time (0.3 mg/mL)

2.5 复合酶解物抗氧化活性测定结果

选择综合抗氧化活性较优的 Neutrase 及对时间变化比较敏感的 Alcalase 与其它蛋白酶进行复合酶解。结果如图 4 所示。NH* 的自由基清除能力显著优于 AH* 及其它复合酶解产物，其中 DPPH 自由基清除能力 (91.42%) 可以与 Vc (93.69%) 相媲美。NH* 的还原能力亦显著优于 AH* 及其他复合蛋白酶解物 (p < 0.05)。因此，选择 NH* 继续进行酶解条件优化。

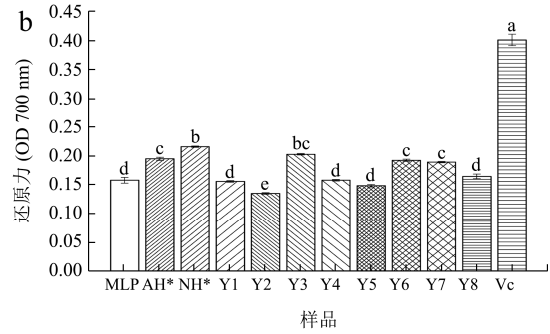
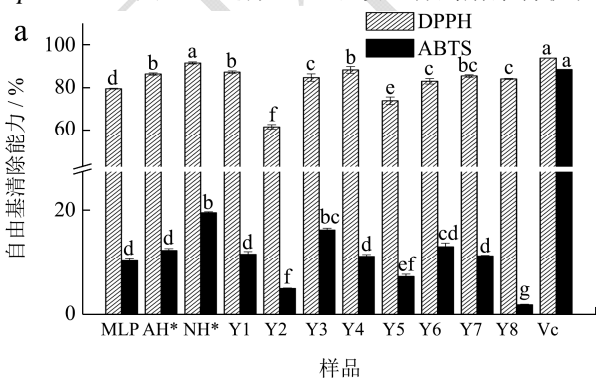


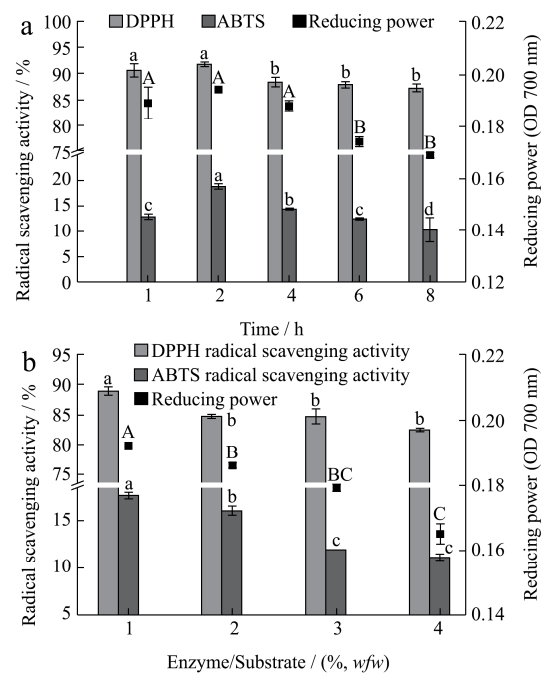
图4 双酶及三酶复合酶解物的自由基清除能力 (a) 及还原能力 (b) (0.3 mg/mL)

Fig.4 Radical quenching activity (a) and reducing power (b) of MLP hydrolysates with two or three enzymes (0.3 mg/mL)

注: AH*、NH* 分别对应碱性蛋白酶 0.5 h 酶解产物、中性蛋白酶 2 h 酶解产物; Y1-Y8 双酶及三酶复合酶解产物。

2.6 中性蛋白酶酶解 MLP 的条件优化

分析了底物浓度、E/S 及酶解时间对 NH 抗氧化活性的影响进行分析,结果如图 5 所示。酶解时间 2 h、E/S 为 1%、底物浓度为 20 mg/mL 时, NH 的自由基清除能力及还原能力最优。在此条件下,对 NH 进行酶解,并对酶解产物的抗氧化活性进行验证。结果证明,此复合优化条件下, NH 的还原能力自由基清除能力优于单因素条件的抗氧化活性。因此,确定 NH 的优化条件为: E/S 为 1%, 底物浓度 20 mg/mL, 酶解时间 2 h



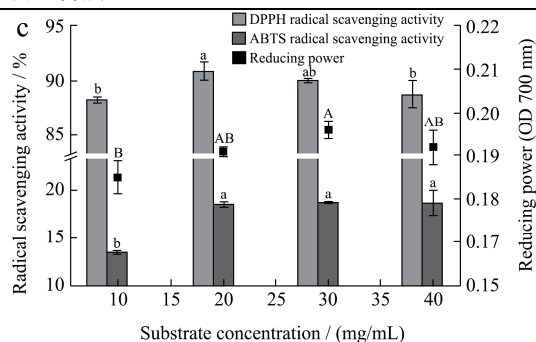


图5 酶解时间 (a)、加酶量 (b) 及底物浓度 (c) 对中性蛋白酶解物抗氧化活性的影响

Fig.5 Effects of substrate concentration (a), enzyme/substrate (b) and substrate concentration (c) on the antioxidant activity

3 结论

3.1 用 Neutrase、Alcalase、Protamax 等 6 种蛋白酶对桑叶蛋白进行单酶或复合酶解。结果表明, 用中性蛋白酶、碱性蛋白酶及复合蛋白酶能够更有效的制备具有抗氧化活性的桑叶蛋白酶解物, 同时, 三种酶解物的抗氧化活性显著高于桑叶蛋白。这三种酶解物的氨基酸组成及分子量分布相似。酶解物的抗氧化活性与 YSP 及多酚含量呈正相关。分子量与水解度之间并没有显著的相关性, 高 DH 不能保证高的抗氧化活性。此外, 与过度水解相比, MLP 的适度水解能够产生更好的抗氧化活性。

3.2 用 Neutrase 及 Alcalase 与其它单酶进行双酶、三酶的复合酶解, 中性蛋白酶单独酶解 2 h 的抗氧化活性显著优于复合酶解的效果, 对中性蛋白酶单独酶解条件进一步的优化, 结果表明, 酶解时间 2 h, E/S 为 1%, 底物浓度 20 mg/mL 所得酶解物的抗氧化活性最高。NH 或许可以作为食品中较有潜力的抗氧化剂。

参考文献

- [1] Kou X, Gao J, Xue Z, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2013, 50(2): 591-598
- [2] Yan Q J, Huang L H, Sun Q, et al. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases [J]. *Food Chemistry*, 2015, 179: 290-295
- [3] Pownall T L, Udenigwe C C, Aluko R E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(8): 4712-4718
- [4] Jin J, Ma H, Zhou C, et al. Effect of degree of hydrolysis on the bioavailability of corn gluten meal hydrolysates [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(12): 2501-2509
- [5] Feng Y X, Ruan G R, Jin F, et al. Purification, identification, and synthesis of five novel antioxidant peptides from Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) protein hydrolysates [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2018, 92: 40-46
- [6] Karamac M, Kosinska-Cagnazzo A, Kulczyk A. Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7)
- [7] Xie Z, Huang J, Xu X, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(2): 370-376
- [8] Thamnarathip P, Jangchud K, Jangchud A, et al. Extraction and characterisation of riceberry bran protein hydrolysate using enzymatic hydrolysis [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51(1): 194-202
- [9] Andallu B, Shankaran M, Ullagaddi R, et al. *In vitro* free radical scavenging and *in vivo* antioxidant potential of mulberry (*Morus indica* L.) leaves [J]. *Journal of Herbal Medicine*, 2014, 4(1): 10-17
- [10] Kandylis K, Hadjigeorgiou I, Harizanis P. The nutritive value of mulberry leaves (*Morus alba*) as a feed supplement for sheep [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2009, 41(1): 17-24
- [11] He X, Fang J, Ruan Y, et al. Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review [J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 899-910
- [12] Sánchez-Salcedo E M, Amoros A, Hernández F, et al. Physicochemical properties of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves, a new food supplement [J]. *Journal of Food Nutrition and Research*, 2017, 5: 253-261
- [13] Phoonan W, Deowanish S, Chavasiri W. Food attractant from mulberry leaf tea and its main volatile compounds for the biocontrol of *Lasioderma serricorne* F. (*Coleoptera: Anobiidae*) [J]. *Journal of Stored Products Research*, 2014, 59: 299-305
- [14] Zhang L L, Bai Y L, Shu S L, et al. Simultaneous quantitation of nucleosides, nucleobases, amino acids, and alkaloids in mulberry leaf by ultra high performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Separation Science*, 2014, 37

- (11): 1265-1275
- [15] 孙崇臻,武文佳,闵甜,等.不同制备方法桑叶蛋白功能性质的比较[J].现代食品科技,2015,31(12):242-249
SUN Chong-zhen, WU Wen-jia, MIN Tian, et al. Functional properties of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf proteins extracted by different methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(12): 242-249
- [16] Sun C, Wu W, Ma Y, et al. Physicochemical, functional properties, and antioxidant activities of protein fractions obtained from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf [J]. International Journal of Food Properties, 2018, 20: S3311-S3325
- [17] Sun C, Tang X, Ren Y, et al. Novel antioxidant peptides purified from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf protein hydrolysates with hemolysis inhibition ability and cellular antioxidant activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(27): 7650-7659
- [18] 李艳红.鹰嘴豆酶解物的制备及抗氧化肽的研究 [D].无锡:江南大学,2008
LI Yang-hong. Preparation of enzymatic hydrolysates and antioxidant peptides of chickpea [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008
- [19] Cuesta G, Suarez N, Bessio M I, et al. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method [J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 52(1): 69-73
- [20] Ma Y, Zhou M, Huang H. Changes of heat-treated soymilks in bioactive compounds and their antioxidant activities under *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. European Food Research and Technology, 2014, 239(4): 637-652
- [21] Wu W, Zhang M, Sun C, et al. Enzymatic preparation of immunomodulatory hydrolysates from defatted wheat germ (*Triticum Vulgare*) globulin [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(12): 2556-2566
- [22] Sun C, Wu W, Yin Z, et al. Effects of simulated gastrointestinal digestion on the physicochemical properties, erythrocyte haemolysis inhibitory ability and chemical antioxidant activity of mulberry leaf protein and its hydrolysates [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(2): 282-295
- [23] Bamdad F, Chen L. Antioxidant capacities of fractionated barley hordein hydrolysates in relation to peptide structures [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2013, 57(3): 493-503
- [24] Sila A, Bougatef A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 21: 10-26
- [25] Alashi A M, Blanchard C L, Mailer R J, et al. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2014, 146(Supplement C): 500-506
- [26] Ao J, Li B. Stability and antioxidative activities of casein peptide fractions during simulated gastrointestinal digestion *in vitro*: Charge properties of peptides affect digestive stability [J]. Food Research International, 2013, 52(1): 334-341
- [27] You L, Zhao 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
- [28] Udenigwe C C, Aluko R E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(5): 3148-3161
- [29] Li X, Shen S, Deng J, et al. Antioxidant activities and functional properties of tea seed protein hydrolysates (*Camellia oleifera* Abel.) influenced by the degree of enzymatic hydrolysis [J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23(6): 2075-2082
- [30] Bamdad F, Wu J, Chen L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein [J]. Journal of Cereal Science, 2011, 54(1): 20-28