

具有抗氧化活性青稞酒糟蛋白酶解液对H₂O₂诱导HepG2细胞的保护作用

陈丽花¹, 陈少华¹, 荣玉芝¹, 冯声宝², 张叶挺³, 钟研威⁴, 江津津^{4*}

(1. 上海应用技术大学香料香精化妆品学部, 上海 201418) (2. 青海互助天佑德青稞酒股份有限公司, 青海海东 810500) (3. 上海崇明致富酿造有限公司, 上海 202158) (4. 广州城市职业学院食品科学与美食养生学院, 广东广州 510405)

摘要: 为实现青稞酒糟的高值化利用, 该研究在提取青稞酒糟蛋白基础上, 以 DPPH 自由基清除率和还原力为指标优化了青稞酒糟蛋白酶解液的制备工艺, 并对该酶解液的体外抗氧化活性和细胞保护作用进行了探究。结果表明: 青稞水酒糟和青稞白酒糟均含有丰富的蛋白质, 含量分别为 31.46 g/100 g 和 18.47 g/100 g; 超声纤维素酶法辅助碱提酸沉法对青稞水酒糟的蛋白提取率高达 76.10% (*m/m*), 白酒糟的为 29.88%; 碱性蛋白酶最适合用于青稞水酒糟蛋白的酶解, 其最佳酶解条件为: 料液比 1:60 (*m/V*), 超声时间 15 min, 酶添加量 3.7% (*m/m*) 及酶解时间 3.5 h, 此条件下制得的青稞水酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率高达 95.02%; 不同浓度的青稞水酒糟蛋白酶解液对 HepG2 细胞活力没有负面影响; 随着青稞水酒糟蛋白酶解液浓度的升高, 对经 H₂O₂ 诱导的细胞内 ROS 逐渐降低, 酶解液浓度为 5.0 mg/mL (*m/V*) 时可使受损细胞内的 ROS 比损伤组低约 50%。该研究成果可为青稞水酒糟蛋白酶解液的制备及其在保健食品、化妆品中的高值化利用提供参考。

关键词: 青稞酒糟; 蛋白酶解液; 抗氧化活性; 细胞活性

文章编号: 1673-9078 (2024) 03-28-38

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078. 2024. 3. 0330

H₂O₂-induced Protective Effects of the Antioxidant Protease Hydrolysate of Highland Barley Brewer's Spent Grains on HepG2 Cells

CHEN Lihua¹, CHEN Shaohua¹, RONG Yuzhi¹, FENG Shengbao², ZHANG Yeting³, ZHONG Yanwei⁴, JIANG Jinjin^{4*}

(1. Shanghai Institute of Technology, School of Perfume, Aroma & Cosmetics, Shanghai 201418, China) (2. Qinghai Huzhu Barley Wine Co. Ltd., Haidong 810500, China) (3. Shanghai Chongming Rich Brewing Co. Ltd., Shanghai 202158, China) (4. College of Food Science and Gourmet Health, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510405, China)

引文格式:

陈丽花, 陈少华, 荣玉芝, 等. 具有抗氧化活性青稞酒糟蛋白酶解液对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞的保护作用 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 28-38.

CHEN Lihua, CHEN Shaohua, RONG Yuzhi, et al. H₂O₂-induced protective effects of the antioxidant protease hydrolysate of highland barley brewer's spent grains on HepG2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 28-38.

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 上海市崇明区科委农业科技攻关项目 (CK2022-52); 广州市名师工作室 (2022MSGZS015); 广州市大学生创新创业训练计划项目 (2022CXCYJH013)

作者简介: 陈丽花 (1971-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物资源综合利用、食品发酵、风味分析及生物活性因子功能表征, E-mail: lhchen@sit.edu.cn

通讯作者: 江津津 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 455213049@qq.com

Abstract: To illustrate the high-value utilization of highland barley brewer's spent grains, the process used to prepare its protease hydrolysate was optimized based on protein extraction from highland barley brewer's spent grains using the DPPH free radical scavenging rate and reducing power as indicators. Thereafter, the in vitro antioxidant activity and cytoprotective effects of the hydrolysates were examined. The soluble and white highland barley brewer's spent grains were found to be rich in protein, with protein contents of 31.46 g/100 g and 18.47 g/100 g, respectively. Using the ultrasound/cellulase-assisted alkali extraction and acid precipitation method, the protein extraction rates from the soluble and white highland barley brewer's spent grains were 76.10% (*m/m*) and 29.88%, respectively. Alkaline protease was found to be most suitable for enzymatic hydrolysis of the proteins of soluble highland barley brewer's grains. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were as follows: solid to liquid ratio, 1:60 (*m/V*); ultrasonic treatment time, 15 min; enzyme dosage, 3.7% (*m/m*); and enzymatic hydrolysis time, 3.5 h. Under these conditions, the DPPH free radical scavenging rate of the protease hydrolysate of soluble highland barley brewer's spent grains reached 95.02%. Different concentrations of the protease hydrolysate of soluble highland barley brewer's spent grains did not exhibit negative effects on HepG2 cell viability. In addition, as the concentration of the protease hydrolysate of soluble highland barley brewer's spent grains increased, ROS in cells damaged by H₂O₂ gradually decreased. In fact, 5.0 mg/mL (*m/V*) of the protease hydrolysate reduced ROS in damaged cells by approximately 50%. In addition to serving as a reference, this study provides a theoretical basis for preparing the protease hydrolysate of soluble highland barley brewer's spent grains and illustrates its high-value utilization in healthy food and cosmetics.

Key words: highland barley brewer's spent grains; protease hydrolysate; antioxidant activity; cell viability

青稞是一种广泛种植于中国青藏高原地区的禾本科粮食作物^[1]。青稞米具有较高的营养价值和极高的保健功能,其营养成分具有“三高两低”的特点^[2],是青藏高原地区居民赖以生存的主粮,同时也是青藏高原藏区的传统特色饮品——被誉为“高原明珠、酒林奇葩”的青稞酒的酿造原料。青稞酒的酿造会产生大量的副产物——青稞酒糟。青稞酒糟中仍含有丰富的蛋白质、纤维素、淀粉、维生素等营养物质且酸度较高,极易腐败变质^[3]。青稞酒糟目前最广泛的应用途径仍是喂食牲畜或堆积农肥^[4],这不仅造成了资源的极大浪费,而且污染了环境。农业加工副产物处理不当造成的一系列环境污染问题是我国政府非常关注的热点问题^[5],而深入挖掘农业加工副产物的利用价值、对其高值化再利用是实现可持续的循环生物经济、改善环境污染的重要途径。

人体新陈代谢过程中会不断产生自由基,而过量的自由基会引起氧化应激和氧化损伤,从而导致机体出现炎症,甚至导致癌症、动脉粥样硬化等慢性疾病^[6]。因此,抗氧化策略是降低各种氧化应激性疾病风险的经济可行的方法。研究发现,合成活性肽类药物会产生某些不良反应,而世界卫生组织也大力强调要合理使用天然药物治疗流行疾病^[7]。因此,天然来源的生物活性肽越来越成为研究热点。

目前天然活性肽最常用的制备方法是酶法,鉴于酶的专一性,经不同酶酶解后产生的酶解液活性不同^[8]。近年来,超声波技术作为一种辅助提取技术也引起了广泛的兴趣^[9]。研究发现,超声波技术结合酶法可有效提高甘薯和羽扇豆蛋白酶解液的抗氧化活性^[10,11]。

关于青稞酒糟制备活性多肽的研究已有报道,但是未见以抗氧化活性为指标制备青稞酒糟蛋白酶解液并探究其对细胞活力及氧化应激损伤保护能力的报道。本文以青稞酒糟为原料,在提取青稞酒糟蛋白的基础上筛选合适的蛋白酶,优化了抗氧化活性青稞酒糟蛋白酶解液的制备工艺,并探究了其对于H₂O₂诱导HepG2细胞的保护作用。本研究不仅可为青稞酒糟在保健食品或化妆品中的高值化利用提供参考,还可以促进解决目前因青稞酒糟的低值化利用而造成的资源浪费问题和环境污染问题。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

材料与试剂:青稞水酒糟(青稞半固态酿制低度水酒的副产物)及青稞白酒糟(青稞固态酿造并蒸馏白酒后的副产物)均来源于青海互助天佑德青稞酒股份有限公司;氢氧化钠、盐酸、 $\rho=95\%$ 乙醇

等均为分析纯, 纤维素酶 (100 U/mg)、碱性蛋白酶 (200 U/mg)、中性蛋白酶 (100 U/mg)、复合蛋白酶 (1 000 U/mg)、风味蛋白酶 (5 000 U/mg)、胃蛋白酶 (3 000 U/mg), DPPH、铁氰化钾、三氯乙酸等均购于上海泰坦科技有限公司; CCK8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒, 购于上海皓元生物医药科技有限公司; 试验用水均为实验室自制去离子水配制。

仪器: HC-500A 铝合金三角架式粉碎机, 上海泰坦科技股份有限公司; TG16-WS 型台式高速冷冻离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; ATN-300 型全自动凯氏定氮仪, 上海洪纪仪器有限公司; SKF-6 型超声波清洗器 (500 W), 上海科导超声仪器有限公司; 101-1AB 型电热鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; FD-1B-50 台式真空冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司; WIGGENS WCL-180 CO₂ 培养箱, 普迈精医科技 (北京) 有限公司; Synergy HTX 多功能酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; MF52-LED 倒置显微镜, 广州市明美光电技术有限公司; Plus 多功能荧光酶标仪, 上海博竞生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原料预处理

将青稞水酒糟和青稞白酒糟分别置于 55 °C 烘箱中 48 h, 粉碎后过 40 目筛, 备用。

1.2.2 酒糟基本营养成分测定

根据国标的方法分别测定青稞水酒糟和青稞白酒糟的基本营养成分, 包括水分和灰分 (重量法)、脂肪 (索氏抽提法)、蛋白质 (凯氏定氮法)、纤维素 (介质过滤法)、淀粉 (酶水解法), 并以 g/100 g 干基表示。

1.2.3 青稞酒糟蛋白的提取

第一种方法 (碱提酸沉法): 分别在 100 g 的两种青稞酒糟中以 1:25 (*m/V*) 比例的加入蒸馏水, 混合均匀后调节溶液 pH 值至 11, 40 °C 恒温水浴锅中浸提 40 min; 之后将溶液在 4 000 r/min 下离心 20 min, 保留上清液; 将上清液的 pH 值调至 4, 静置一段时间, 使溶液与析出的物质充分分离, 在 4 000 r/min 下离心 20 min, 保留沉淀物; 沉淀物在冻干机中冷冻干燥 12 h, 得到青稞酒糟蛋白粉, 称重并计算蛋白质提取率^[12]。

$$E = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

E—蛋白质提取率, %;

A—提取的蛋白粉的质量, g;

B—100 g 酒糟中的蛋白质质量, g。

第二种方法 (超声波辅助碱提酸沉法): 分别在两种青稞酒糟中以 1:25 (*m/V*) 比例的加入蒸馏水后进行超声波预处理 15 min, 调节溶液 pH 值至 11 等其他步骤与第一种方法 (碱提酸沉法) 相同。

第三种方法 (超声波纤维素酶辅助碱提酸沉法): 在第二种方法的基础上加一步纤维素酶酶解。即: 超声预处理之前, 先加入纤维素酶和青稞酒糟比例为 5% (*m/m*) 的纤维素酶, 在 55 °C 恒温水浴酶解 2 h, 然后在 90 °C 加热 10 min 灭酶, 其他步骤与第二种方法 (超声波辅助碱提酸沉法) 相同。

1.2.4 青稞酒糟蛋白酶解液制备的单因素实验

以抗氧化活性为指标进行制备青稞酒糟蛋白酶解液的单因素实验, 包括:

(1) 最适作用酶: 碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶及胃蛋白酶;

(2) 最佳料液比 (青稞酒糟蛋白粉与蒸馏水的比例, g/mL): 1:30、1:40、1:50、1:60 及 1:70;

(3) 常温下超声处理的最佳时间: 0、5、10、15 及 20 min;

(4) 酶 (碱性蛋白酶, 最适作用 pH 值为 9) 的最添加量 (*m/m*): 1%、3%、5% 及 7%;

(5) 55 °C 下的最佳酶解时间: 2、3、4、5 及 6 h。

酶解完成后, 将酶解液在 90 °C 下加热 15 min 灭酶终止反应, 冷却至室温后以 4 000 r/min 离心 20 min。上清液在 -20 °C 下预冷冻 2 h 后冷冻干燥, 冻干粉于 -20 °C 保存、备用^[13,14]。

1.2.5 青稞酒糟蛋白酶解液制备工艺条件的响应面优化试验

在 1.2.4 的单因素实验基础上, 选取对酶解效果影响较大的因素碱性蛋白酶添加量 (*A*)、酶解时间 (*B*) 及料液比 (*C*) 为自变量, 以酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率为响应值, 采用响应面法设计中心组合试验优化青稞酒糟蛋白酶解液的制备工艺条件。试验因素水平安排如表 1 所示, 采用 Design-Expert 8.05 对数据进行统计分析。

表 1 响应面优化因素水平

Table 1 Level of response surface optimization factors

因素	因素水平		
	-1	0	1
A 加酶量/%	2	3	4
B 酶解时间/h	3	4	5
C 料液比/(g/mL)	1:50	1:60	1:70

1.3 青稞酒糟蛋白酶解液的抗氧化活性测定

1.3.1 对DPPH自由基清除能力的测定

参考文献的方法^[15]并稍作修改,即: $\varphi=95\%$ 乙醇配置成 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液,加入 2 mL 待测样品,混匀,置黑暗环境下保存 30 min,在 517 nm 处吸光度记为 A_1 ,2 mL $\varphi=95\%$ 乙醇溶液代替 DPPH 溶液与样品混合,517 nm 处的吸光度记为 A_2 ,2 mL $\varphi=95\%$ 乙醇代替待测样品加入将 2 mL DPPH 溶液,在 517 nm 处的吸光度记为 A_0 ,此为空白对照。DPPH 自由基清除率的计算公式如下:

$$R = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R —DPPH 自由基清除率, %。

1.3.2 对铁离子还原能力的测定

参考文献的方法^[16,17]并稍作修改。取 2 mL 蛋白酶解液,添加 2 mL 1% (m/V) 的铁氰化钾溶液和 2 mL 0.2 mol/L (pH 值 6.6) 磷酸盐缓冲液,充分混合后置 50 °C 水浴锅中孵育 20 min。水浴结束后加入 2 mL 10% (m/V) 的三氯乙酸,摇匀后取 2 mL 混合液到新容器中,加入 2 mL 蒸馏水和 0.4 mL 0.1% (m/V) 氯化铁于试管中,静置 10 min 后在 700 nm 处测定吸光值,即表示为蛋白酶解液的铁离子还原能力。

1.3.3 对细胞培养和细胞毒性试验

采用 CCK8 法测定青稞水酒糟蛋白酶解液的细胞毒性,主要实验方法参考文献^[18]并稍作修改。将复苏好的 HepG2 细胞弃去培养基后用 PBS 清洗一遍;加胰蛋白酶消化细胞,待细胞明显相互分离变圆,快速弃去胰蛋白酶,加入完全培养基,在体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中、饱和湿度条件下扩大培养。

取处于对数生长期且生长状态良好的 HepG2 细胞接种于 96 孔板,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中过夜培养,空余孔内加入 100 μ L 无菌 PBS;按照如下分组对细胞进行处理:空白组加入 200 μ L 细胞悬液,

实验组分别加入 100 μ L 不同质量浓度 (0.1、1.0 和 5.0 mg/mL) 的青稞水酒糟蛋白酶解液和 200 μ L 细胞悬液;孵育 24 h 后吸走上清液,每孔加入 10 μ L CCK8,37 °C 培养 1 h,采用酶标仪测定各孔 OD₄₅₀ 下的吸光值,即为细胞活力值。

1.3.4 对H₂O₂诱导的HepG2细胞中活性氧 (ROS) 水平的测定

根据 Ji 等^[19]的研究采用 DCFH-DA 荧光染料法并稍作修改来研究青稞水酒糟蛋白酶解液对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞中 ROS 水平的影响。取生长状态良好的 HepG2 细胞在 96 孔板上,每孔加入 200 μ L 细胞悬液在 37 °C 培养箱中培养 24 h,去除培养液后加入青稞水酒糟蛋白酶解液孵育 6 h。采用荧光酶标仪检测细胞内的活性氧水平。实验组设置如下:损伤组中加入 200 μ L 浓度为 200 μ mol/L 的 H₂O₂ 溶液;低浓度保护组中加入 100 μ L H₂O₂ 溶液和 100 μ L、0.1 mg/mL 的青稞水酒糟蛋白酶解液;中浓度保护组中加入 100 μ L H₂O₂ 溶液和 100 μ L、1.0 mg/mL 的青稞水酒糟蛋白酶解液;高浓度保护组中加入 100 μ L H₂O₂ 溶液和 100 μ L、5.0 mg/mL 的青稞水酒糟蛋白酶解液。

1.4 数据统计与分析

每组实验至少进行三次重复,并使用 Microsoft-Excel 2010 软件将数据表示为平均值 \pm 标准偏差 (SD);使用 SPSS 26 进行显著性分析,以 $P < 0.05$ 表示差异显著;选用 Origin 2018 软件进行绘图和数据处理。

2 结果与讨论

2.1 两种青稞酒糟的基本营养成分

青稞水酒糟和青稞白酒糟的基本营养成分如图 1 所示。图 1 表明,青稞水酒糟中的粗蛋白质含量高达 31.46 g/100 g,水分含量为 7.15 g/100 g,粗脂肪含量为 10.85 g/100 g,粗淀粉含量为 14.83 g/100 g,粗纤维含量为 20.49 g/100 g,灰分含量为 8.67 g/100 g;青稞白酒糟中的粗蛋白质含量为 18.47 g/100 g,纤维素含量为 40.03 g/100 g。很明显,青稞水酒糟和青稞白酒糟均富含蛋白质,且蛋白质含量均高于高粱酒糟 (16.3 g/100 g)^[20]和芝麻香型白酒糟 (13.5 g/100 g)^[21] ($P < 0.05$)。以上结果表明两种青稞酒糟,尤其是青稞水酒糟中含有丰富的蛋白质,值得进一步开发利用。

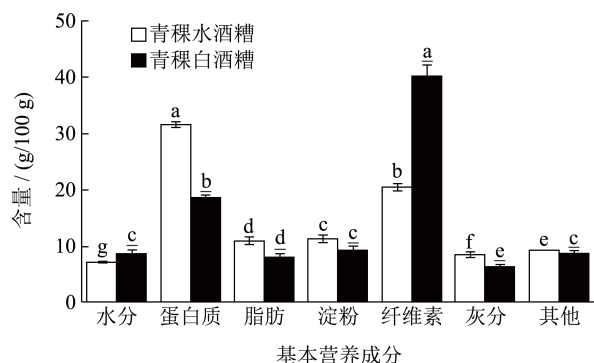


图1 青稞水酒糟和青稞白酒糟的营养成分

Fig.1 Nutritional components of water highland barley distiller's grains and white highland barley distiller's grains

2.2 不同提取方法对青稞酒糟蛋白提取率的影响

采用碱提酸沉法、超声辅助碱提酸沉法以及超声纤维素酶辅助碱提酸沉法三种方法分别对青稞水酒糟和青稞白酒糟中蛋白质进行提取,不同方法对青稞酒糟粗蛋白质提取率的影响见表2所示。

表2 不同方法对青稞酒糟粗蛋白质提取率的影响

Table 2 Effects of different methods on the extraction rate of crude protein from highland barley distiller's grains

提取方法	青稞水酒糟 /(% , m/m)	青稞白酒糟 /(% , m/m)
碱提酸沉法	60.02±0.29 ^a	10.98±0.32 ^a
超声辅助碱提酸沉法	68.68±0.56 ^b	18.95±0.09 ^b
超声纤维素酶辅助碱提酸沉法	76.10±0.42 ^c	29.88±0.63 ^c

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$)。

很明显, 经过超声预处理后, 青稞水酒糟与青稞白酒糟的提取率分别为 68.68%、18.95%。与未进行超声处理的相比, 两种青稞酒糟粗蛋白的提取率均有明显升高, 分别提高了 6.66%、7.97% ($P<0.05$)。这可能是因为在超声波增加了粒子之间的碰撞概率和剪切速率, 导致包裹蛋白质分子的成分破坏或不溶性大分子蛋白质分子间氢键的断裂, 从而提高了酒糟中可溶性蛋白质溶出及含量的增加^[22]。本成果与超声预处理能提高羊奶中可溶性蛋白浓度和桑籽蛋白提取率的研究结果一致^[23,24]。

与碱提酸沉法、超声辅助碱提酸沉法相比, 超声纤维素酶辅助碱提酸沉法对两种青稞酒糟蛋白的提取效率均最高, 其中比碱提酸沉法分别提高了 16.08% 和 8.90% ($P<0.05$), 除超声波的辅助破碎作用以外, 还可能是因为纤维素酶可以膨胀、软化和破坏原料的细胞壁结构, 提高蛋白质在水中的溶

解度, 从而提高了粗蛋白的得率。值得注意的是, 无论是哪种提取方法, 在相同提取条件下, 青稞水酒糟蛋白提取率一直远大于青稞白酒糟蛋白提取率。

2.3 抗氧化活性青稞酒糟蛋白酶解液制备的单因素试验

2.3.1 最佳作用酶的筛选

酶法是利用生物酶制剂对植物生物活性物质提取的一种有效且具有广阔前景的方法, 蛋白酶作用的特异性对酶解产物的抗氧化活性有重要影响。五种蛋白酶对青稞水酒糟与青稞白酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率和还原力的影响如图 2。

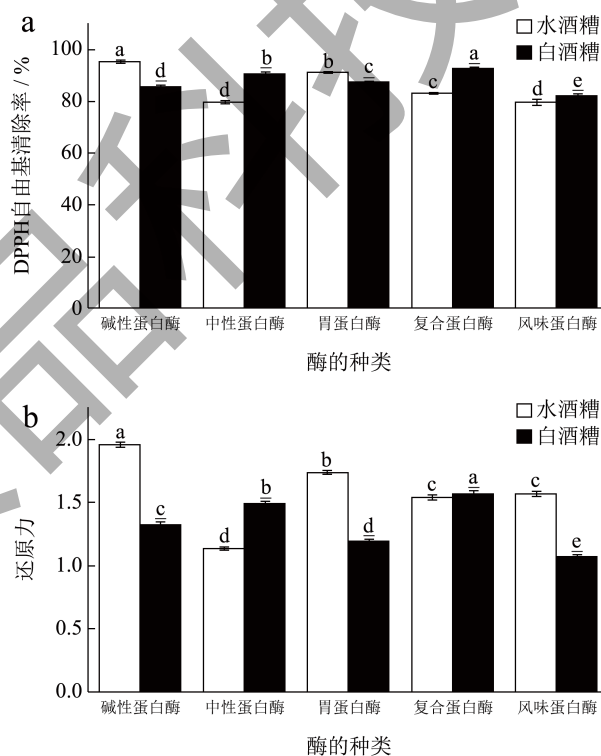


图2 蛋白酶种类对酶解液抗氧化活性的影响

Fig.2 The effect of protease types on the antioxidant activity of enzymatic hydrolysates

从图2可以看出, 由碱性蛋白酶酶解得到的青稞水酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率与还原力最高, 分别为 95.06% 和 1.96, 且明显高于其他蛋白酶的酶解效果 ($P<0.05$)。由复合蛋白酶酶解得到的青稞白酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率与还原力最高, 分别为 92.36% 和 1.57。两种青稞酒糟蛋白的最适作用酶不同, 这是由于酶对底物作用的专一性不同, 这与陈丹阳等^[25]对六种蛋白酶酶解蚕豆蛋白后发现不同蛋白酶酶解产物之间抗氧化活性具有差异的研究结果一致。因此, 选择碱性

蛋白酶和复合蛋白酶分别对青稞水酒糟和青稞白酒糟进行后续的酶解工艺优化以制备抗氧化活性更强的酶解产物。

2.3.2 最佳料液比的确定

料液比对青稞水酒糟和青稞白酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率和还原力的影响如图 3 所示。

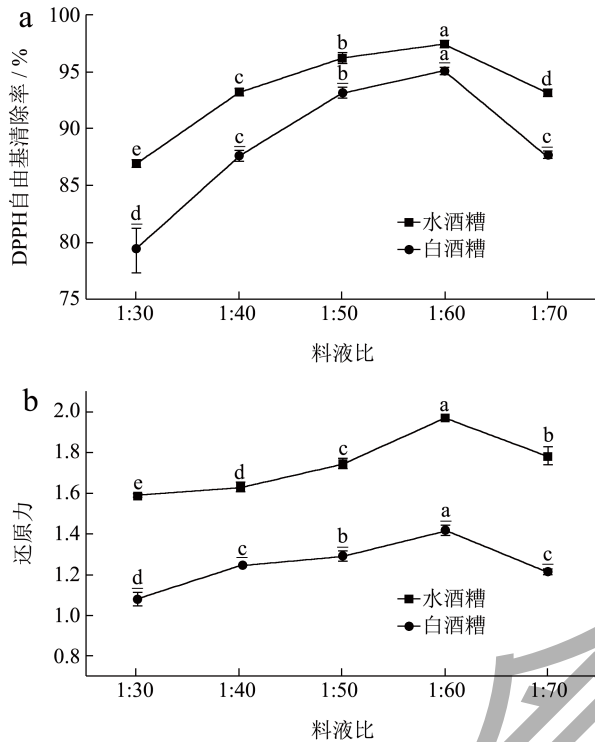


图 3 料液比对青稞酒糟酶解液抗氧化活性的影响

Fig.3 Effects of solid-liquid ratios on antioxidant activities of two distiller's grains hydrolysates

由图 3 可知, 料液比在 1:30~1:60 范围内时, 随着料液比的增加, 青稞水酒糟蛋白酶解液和青稞白酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率和还原力均呈现逐步增强的趋势; 当料液比达到 1:60 时, 两种酒糟蛋白酶解液的抗氧化活性均达到最高值, 其中 DPPH 自由基清除率分别为 95.53% 和 92.19%, 还原力分别为 1.92 和 1.38; 当料液比高于 1:60 后, 两种酒糟蛋白酶解液的抗氧化活性均开始下降。原因可能是: 当底物浓度过高时, 反应体系较浓稠, 影响了酶和底物的流动, 从而抑制了反应效率; 随着料液比的增大, 反应体系的浓度使酶与底物实现了充分接触, 从而提高了酶解效率; 当料液比过大时, 反应体系的浓度过稀, 使酶与底物的碰撞机会减少, 同时导致具有抗氧化活性产物浓度的下降而影响了体系的抗氧化活性。因此, 选取料液比为 1:60 作为两种酒糟蛋白酶解液制备的最适料液比。

2.3.3 最适酶添加量的确定

酶添加量对青稞水酒糟和青稞白酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率和还原力的影响如图 4 所示。

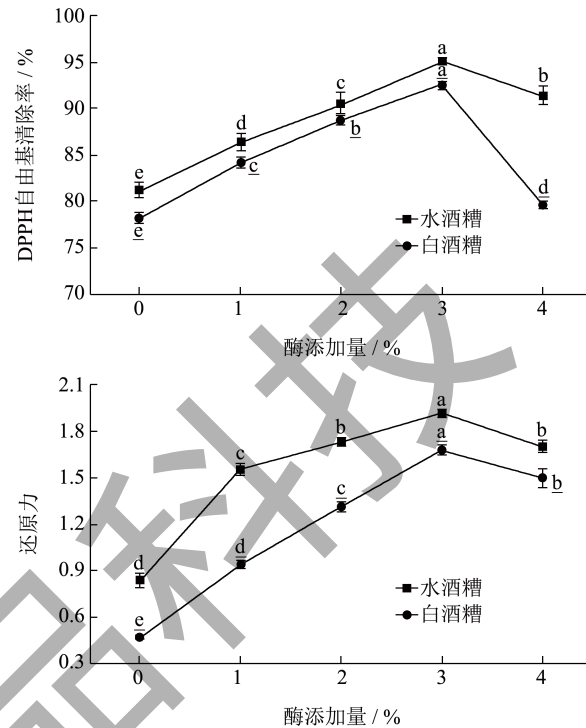


图 4 酶添加量对两种酒糟酶解液抗氧化活性的影响

Fig.4 Effects of enzyme dosage on antioxidant activity of two distiller's grains hydrolysates

从图 4 可以看出, 当加酶量在 0%~3% 的区间时, 两种酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率和还原力均随着酶的添加量增加呈逐步上升趋势; 当酶添加量为 3% 时, 两种酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率和还原力均达到最高值; 当酶添加量超过 3% 时以后, 两种酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率和还原力开始呈现下降趋势。这可能是因为尽管酶用量的增加可以提高酶与底物的结合效率, 在较短时间内就可以使蛋白质充分酶解, 从而提高酶解效果, 但是当酶添加量超过底物需求量时, 酶量的增加不仅不会继续提高酶解反应的效率, 反而可能促进酶解液中有抗氧化活性的多肽继续分解, 生成了活性较低的小分子肽或游离氨基酸, 从而影响了酶解液的抗氧化活性。因此, 选择酶添加量为 3% 作为两种酒糟蛋白酶解液制备的最适酶添加量。

2.3.4 最佳酶解时间的确定

酶解时间对青稞水酒糟和青稞白酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率和还原力的影响如图 5 所示。

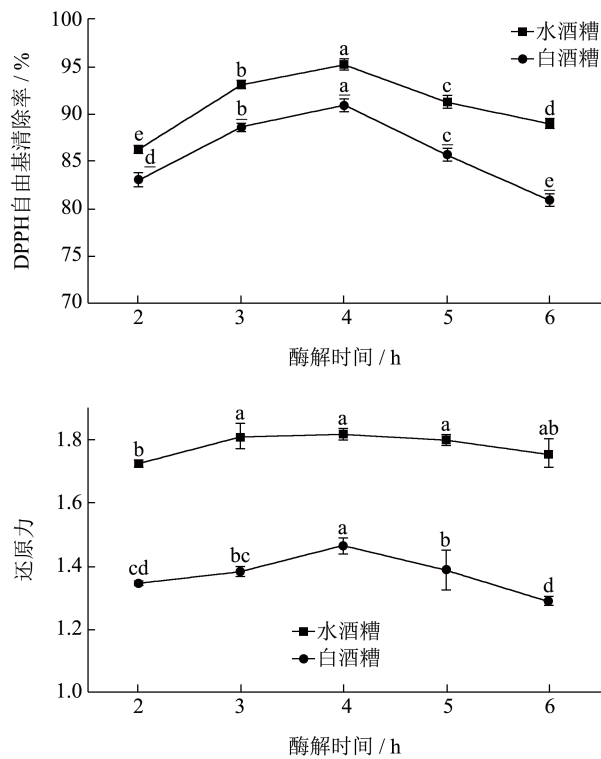


图5 酶解时间对两种酒糟蛋白酶解液抗氧化活性的影响

Fig.5 Effects of enzymolysis time on antioxidant activities of two distiller's grains hydrolysates

从图5可以看出,在2~4 h的酶解时间内,青稞水酒糟蛋白酶解液和青稞白酒糟蛋白酶解液的DPPH自由基清除率和还原力随反应时间的增加而不断提高;在酶解4 h时,两种青稞酒糟酶解产物的抗氧化活性均出现了最高值,DPPH自由基清除率分别为95.01%和88.82%,还原力分别为1.78和1.46。酶解时间超过4 h后,两种酒糟蛋白酶解液的抗氧化活性随反应时间的增加反而逐渐降低,这可能是因为随着酶解时间的增长,酶解过程所产生的抗氧化活性多肽的结构和片段大小进一步发生了变化而生成无抗氧化活性的小片段肽或游离氨基酸,使酶解产物的整体抗氧化活性随之降低。因此,选择酶解4 h作为两种酒糟蛋白酶解液制备的最适酶解时间。

2.3.5 最佳超声时间的确定

超声预处理时间对青稞水酒糟和青稞白酒糟的DPPH自由基清除率和还原力的影响如图6所示。

从图6可以看出,在超声时间0~15 min的范围内,两种酒糟蛋白酶解液的DPPH自由基清除率和还原力均随着超声时间的增加而增强;当超声预处理15 min时,两种酒糟蛋白酶解液的DPPH自由基清除率分别为94.86%和89.74%,还原力分别为1.84

和1.35;当超声预处理时间超过15 min后,两种酒糟蛋白酶解液的抗氧化活性开始降低。可能是因为随着超声时间的增长,超声的破碎作用导致酒糟蛋白发生更多的断裂,影响了后续参与酶解的碱性蛋白酶的作用位点,反而不能产生具有抗氧化活性的肽段进而影响了蛋白酶解液的DPPH自由基清除率和还原力。因此,选择超声预处理15 min作为两种酒糟蛋白酶解液制备的最适超声预处理时间。

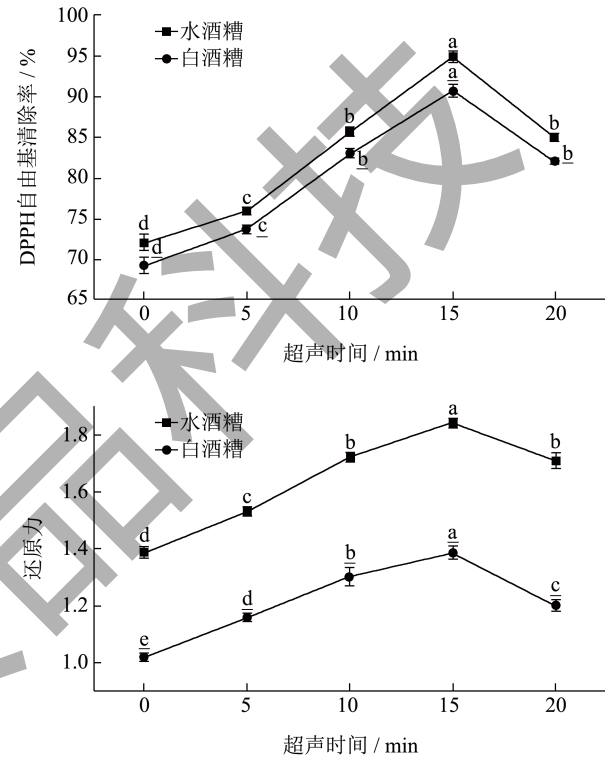


图6 超声时间对两种酒糟蛋白酶解液抗氧化活性的影响

Fig.6 Effects of ultrasonic time on antioxidant activity of two distiller's grains hydrolysates

上述单因素实验结果表明,在不同的单因素影响下,青稞水酒糟蛋白酶解液的DPPH清除率与还原力均高于青稞白酒糟蛋白酶解液,原因可能是经不同的酿酒微生物作用和酿造工艺处理后,已经使青稞水酒糟蛋白和青稞白酒蛋白的结构与原料青稞蛋白的相比发生了不同程度的改变,导致即使在同一种酶及相同的酶解条件下,青稞水酒糟蛋白和青稞白酒蛋白再酶解后,所得到的酶解液的抗氧化活性有了差异。同时,研究结果表明,青稞水酒糟中的蛋白质含量及提取率均明显高于青稞白酒糟。以上说明青稞水酒糟具有更高的利用价值,因此后续的研究仅针对青稞水酒糟蛋白的酶解。另外,鉴于前述研究中酶解产物的DPPH自由基清除率和还原力这两个表达抗氧化的指标呈现相同的趋势,因此

组合实验的响应研究仅以青稞水酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率作为评价酶解效果的主要考量指标。

2.4 具有抗氧化活性青稞水酒糟蛋白酶解液制备工艺条件的响应面优化实验

2.4.1 响应面试验结果与方差分析

根据传统响应面分析法和数据中心响应组合实验优化设计的基本原理进行响应面优化组合实验,以 DPPH 自由基清除率作为主要响应值,以料液比、酶添加量、酶解时间作为主要考察因素,共依次进行 17 组组合实验,对每组实验研究结果通过二次组合多元回归的方式优化组合,得到响应方程式。响应面的基本设计和计算结果如表 3。

表 3 DPPH 自由基清除率回归分析结果

Table 3 Regression analysis results of DPPH free radical scavenging

实验号	因素			R1: DPPH 自由基清除率/%
	A(碱性蛋白酶添加量)	B(酶解时间)	C(料液比)	
1	2	4	50	92.86
2	2	4	70	93.37
3	4	4	50	92.57
4	4	4	70	93.16
5	3	4	60	95.39
6	2	5	60	93.47
7	3	3	50	93.88
8	3	3	70	94.23
9	3	5	70	93.33
10	3	4	60	95.52
11	3	4	60	95.19
12	3	4	60	95.43
13	4	5	60	92.48
14	4	3	60	94.24
15	3	5	50	92.33
16	3	4	60	94.47
17	2	3	60	93.39

对表 3 中的试验数据进行回归拟合分析,得到青稞水酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除活性与各因素影响的二次方程为: $Y(\text{DPPH 自由基清除率}) = 34.50 + 8.41A + 5.30B + 1.26C - 0.46AB + 0.02 - 1.13A^2 - 0.68B^2 - 0.01C^2$ 。

2.4.2 回归模型的建立与检验

对上述回归模型的方差分析结果见表 4。

从表 4 中可以明显看出该回归模型的 F 值为 16.500 0, P 值为 0.000 6 ($P < 0.001$), 说明此模型是显著的, 失拟项不显著 ($F = 0.904 4 > 0.5$), 模型 R^2 的值为 0.960 0, 说明拟合的回归曲线符合实际情况^[26], 可以用此模型分析和预测青稞水酒糟蛋白酶解液的抗氧化活性。交互项 AB 、 BC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 的数值均大于 0.5, 表明这些相应项极显著或显著, 并且各因素对青稞水酒糟蛋白酶解液抗氧化活性的影响程度大小为: 加酶量 > 酶解时间 > 料液比。

表 4 Box-Behnken 实验设计和结果

Table 4 Box-Behnken design scheme and results

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P
Model	17.450 0	9	1.940 0	16.500 0	0.000 6
A	0.051 2	1	0.051 2	0.435 7	0.530 3
B	2.130 0	1	2.130 0	18.150 0	0.003 7
C	0.750 3	1	0.750 3	6.390 0	0.039 4
AB	0.846 4	1	0.846 4	7.200 0	0.031 4
AC	0.001 6	1	0.001 6	0.013 6	0.910 4
BC	0.105 6	1	0.105 6	0.898 9	0.374 6
A^2	5.360 0	1	5.360 0	45.650 0	0.000 3
B^2	1.930 0	1	1.930 0	16.390 0	0.004 9
C^2	4.920 0	1	4.920 0	41.890 0	0.000 3
残差	0.822 5	7	0.117 5		
失拟项	0.098 1	3	0.032 7	0.180 6	0.904 4
误差	0.724 4	4	0.181 1		

2.4.3 最佳条件优化及模型验证

各因素交互作用的响应面图如图 7 所示。

响应面图的斜率越大, 说明两个参数之间的交互作用对响应值的影响越显著; 等高线图越趋于椭圆, 交互作用越显著^[27]。从图 7 中的 3D 图可以看出, 每个图像均向下凹起且有一定斜率, 说明该模型存在最大值, 两个单因素之间交互作用明显; 等高线图可以看出酶添加量与料液比、酶解时间与料液比等高线更偏向于椭圆, 说明两个单因素之间具有较强的交互作用。

根据 Design Expert v 8.0.6 对模型进行优化可得最佳制备工艺条件为: 料液比 1:61.02, 酶添加量 3.73%、酶解时间 3.39 h, 理论 DPPH 自由基清除率为 94.82%。为便于实际操作, 我们将工艺条件调整为: 料液比 1:60, 酶添加量 3.7%, 酶解时间 3.5 h。

按照此条件进行验证实验, 得到青稞水酒糟蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率为 95.02%, 与预测值相差不大, 证明用响应面法优化青稞水酒糟蛋白酶解液抗氧化活性工艺是可行的, 该拟合模型适用于青稞水酒糟蛋白酶解液的制备。

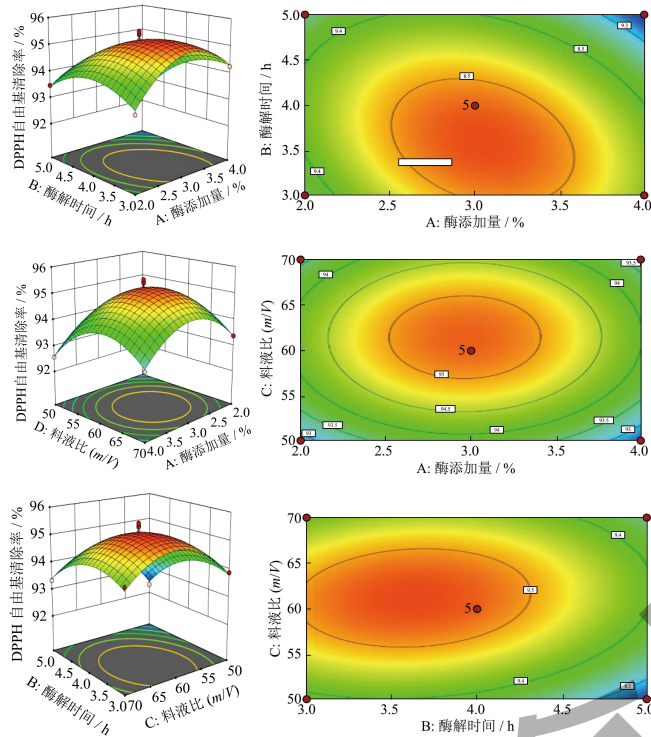


图 7 三因素对酶解青稞水酒糟蛋白质的 DPPH 自由基清除率三维响应面图

Fig.7 3D response surface diagram of DPPH free radical scavenging rate of proteins in hydrolyzed barley distiller's grains by three factors

2.5 青稞水酒糟蛋白酶解液对 HepG2 细胞的保护作用

活性氧 (ROS) 是细胞呼吸作用的产物, 在生理过程中起着重要作用。然而体内过量的 ROS 会对细胞大分子造成氧化损伤, 进而导致各种疾病的发生^[28]。随着年龄的增长, 人体内的抗氧化防御系统能力下降, 导致 ROS 不断积累, 从而损伤老年人的身体健康。一些研究发现外源性抗氧化剂的摄入有助于减少 ROS 损伤, 降低人类疾病的发病率^[29]。因此, 本研究拟进一步探究青稞水酒糟蛋白酶解液对 HepG2 细胞的毒性作用及其对氧化应激细胞的保护效果。

2.5.1 对 HepG2 细胞的细胞毒性作用

采用 CCK8 法分别测定了三个不同质量浓度的青稞水酒糟蛋白酶解液对 HepG2 细胞的细胞毒性作用, 结果如图 8 所示。

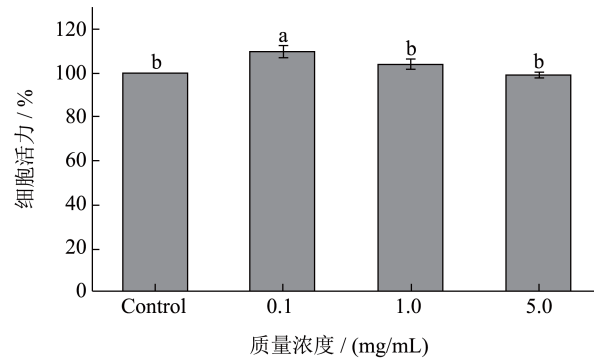


图 8 不同质量浓度蛋白酶解液对细胞活力的影响

Fig.8 Effect of protease hydrolysate with different mass concentration on cell viability

由图 8 可知, 空白对照组 (没有经过任何处理的细胞) 的细胞活力为 100%, 低质量浓度组 (0.1 mg/mL 酶解液) 与中质量浓度组 (1.0 mg/mL 酶解液) 的细胞活力值分别为 109% 和 104%, 说明这两个质量浓度的青稞水酒糟蛋白酶解液不仅对 HepG2 细胞活力没有损伤, 甚至还有一定的细胞活力促进作用; 而高质量浓度组 (5.0 mg/mL 酶解液) 的细胞活力值也高达 99%, 说明此质量浓度的青稞水酒糟蛋白酶解液依然对 HepG2 细胞几乎没有细胞毒性作用。Hu 等^[30]在对安康鱼肌肉蛋白水解物中的研究中发现, 100 μmol/L 浓度下的分离肽对 HepG2 细胞活力没有影响。本研究的结果说明所研究的三个质量浓度梯度的青稞水酒糟蛋白酶解液对 HepG2 细胞活力几乎没有损伤, 甚至具有一定的细胞活力保护作用。

2.5.2 对 H₂O₂ 氧化损伤的 HepG2 细胞中 ROS 水平的影响

为了探究青稞水酒糟蛋白酶解液的细胞抗氧化活性, 本研究根据 1.3.4 的方法对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞中 ROS 水平进行测定。用 H₂O₂ 对正常的 HepG2 细胞进行诱导损伤后添加不同质量浓度 (0.1、1.0、5.0 mg/mL) 的蛋白酶解液来检测受损细胞内的 ROS 变化, 检测结果如图 9 所示。

由图 9 可知, 空白对照组的 ROS 荧光强度值为 183, 而经过 H₂O₂ 损伤的细胞的荧光强度值为 890, 与对照组细胞相比, 损伤组细胞的 ROS 荧光强度升高近 5 倍。然而加入青稞水酒糟蛋白酶解液后, 损伤组细胞内的荧光强度明显减弱, 且随着质量浓度的增加呈现剂量依赖性的降低, 其中 5.0 mg/mL 的蛋白酶解液对 ROS 的清除作用最强, 其荧光强度为 498, 与损伤组相比, 其细胞内的 ROS 降低了近

50%。以上分析表明所制备的青稞水酒糟蛋白酶解液具有一定的保护 HepG2 细胞免受 H₂O₂ 损伤能力。

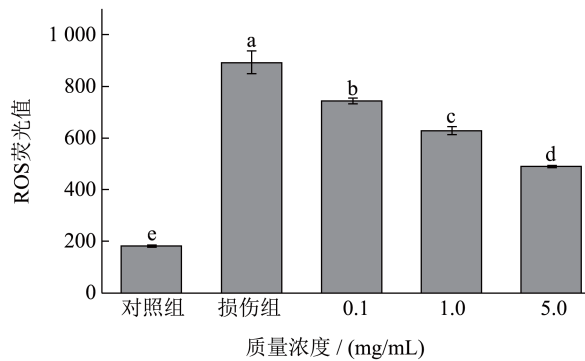


图9 不同质量浓度蛋白酶解液对 H₂O₂ 氧化损伤的 HepG2 细胞中 ROS 水平的影响

Fig.9 Effects of protease hydrolysate with different mass concentration on the levels of ROS in oxidative damaged HepG2 cells

3 结论

青稞水酒糟和青稞白酒糟的蛋白质含量分别为 31.46 g/100 g 和 18.47 g/100 g, 远高于一般的谷物, 具有较好的蛋白质再利用潜力。超声纤维酶碱提酸沉法可有效提取青稞酒糟蛋白, 其中对青稞水酒糟蛋白的提取率高达 76.10%, 对青稞白酒糟的提取率为 29.88%。碱性蛋白酶酶解青稞水酒糟蛋白酶解液的最佳条件为: 料液比 1:60、超声时间 15 min、酶添加量 3.7%、酶解时间 3.5 h, 在此条件下得到的青稞酒糟蛋白酶解液对 DPPH 自由基清除率为 95.02%。青稞水酒糟蛋白酶解液对 HepG2 细胞活力没有负面影响, 反而对 H₂O₂ 损伤 HepG2 细胞有一定的保护作用, 且效果呈一定的剂量依赖性。本研究制备的青稞酒糟蛋白酶解液是良好的天然抗氧化剂, 可进一步应用于保健食品或化妆品, 为实现青稞酒糟的高值化利用提供参考。

参考文献

- [1] 樊世萌,刘浩,欧阳敬禹,等.青稞酒糟中蛋白质的提取工艺[J].湖北农业科学,2022,61(18):169-172.
- [2] 冯金娜,殷西锋,李善文,等.青稞酒糟的高附加值利用及在具保健功能面膜中的应用[J].酿酒科技,2022,2:87-93.
- [3] 张佳丽,罗毅皓,孙万成,等.青稞酒糟脂溶性成分超临界 CO₂提取工艺优化及其组成分析[J].现代食品科技, 2023, 39(4):231-238.
- [4] 杨延玲,杨刚.米曲霉固态发酵青稞酒糟的研究[J].中国牛业科学,2021,47(6):51-55.
- [5] OZÓN B, COTABARREN J, VALICENTI T, et al. Chia expeller:

A promising source of antioxidant, antihypertensive and antithrombotic peptides produced by enzymatic hydrolysis with Alcalase and Flavourzyme [J]. Food Chemistry, 2022, 380: 132185.

- [6] WEN CHAOTING, ZHANG JIXIAN, FENG YUQIN, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from watermelon seed protein hydrolysates and their cytoprotective effects on H₂O₂-induced oxidative stress [J]. Food Chemistry, 2020, 327: 127059.
- [7] WANG LIYING, MA MENGTING, YU ZHIPENG, et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins [J]. Food Chemistry, 2021, 352: 129399.
- [8] ZHENG ZHAOJUN, LI JIAXIN, LI JINWEI, et al. Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 97: 105222.
- [9] OGEMDI F EZE, AFRODITI CHATZIFRAGKOU, DIMITRIS CHARALAMPOPOULOS. Properties of protein isolates extracted by ultrasonication from soybean residue (okara) [J]. Food Chemistry, 2021, 368: 130837.
- [10] ILDEPHONSE HABINSHUTI, MU TAIHUA, ZHANG MIAO. Ultrasound microwave-assisted enzymatic production and characterisation of antioxidant peptides from sweet potato protein [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 69: 105262.
- [11] GBEMISOLA J FADIMU, HARSHARN GILL, ASGAR FARAHNAKY, et al. Improving the enzymolysis efficiency of lupin protein by ultrasound pretreatment: Effect on antihypertensive, antidiabetic and antioxidant activities of the hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132457.
- [12] 吴丽雯,龙澜,袁名远,等.响应面优化富硒四季豆叶蛋白提取工艺及抗氧化活性研究[J].湖北民族大学学报(自然科学版),2022,40(4):391-399.
- [13] 吴慧琳,李苗云,朱瑶迪,等.酶解发酵肉制备抗氧化肽的工艺优化[J].现代食品科技,2020,36(7):173-183.
- [14] HU XIAO, LIU JING, LI JUN, et al. Preparation, purification, and identification of novel antioxidant peptides derived from *Gracilariaopsis lemaneiformis* protein hydrolysates [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 971419.
- [15] LI CHAO, PENG YAO, TANG WEI, et al. Antioxidant, anti-lipidemic, hypoglycemic and antiproliferative effects of phenolics from Cortex Mori Radicis [J]. Arabian Journal of Chemistry, 2022, 15(6): 103824.
- [16] 王耀冉,陈明杰,查磊,等.响应面法优化草菇抗氧化肽的酶法制备工艺[J].食品工业科技,2022,43(15):227-233.
- [17] CHEN LIHUA, LI DONGNA, ZHU CHUCHU, et al. Characterisation of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of golden melon seeds protein [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 56: 5904-5912.
- [18] ZHAO GUODONG, HU CAIBIAO, XUE YING. *In vitro*

- evaluation of chitosan-coated liposome containing both coenzyme Q10 and alpha-lipoic acid: Cytotoxicity, antioxidant activity, and antimicrobial activity [J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2018, 17(2): 258-262.
- [19] JI ZHONGWEI, MAO JIEQI, CHEN SHUGUANG, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activity of peptides from foxtail millet (*Setaria italica*) prolamins in HaCaT cells and RAW264.7 murine macrophages [J]. *Food Bioscience*, 2020, 36: 100636.
- [20] ANTONELA G GARZÓN, FLÁVIO F VERAS, ADRANO BRANDELLI, et al. Purification, identification and in silico studies of antioxidant, antidiabetogenic and antibacterial peptides obtained from sorghum spent grain hydrolysate [J]. *LWT*, 2022, 153: 112414.
- [21] PENGLIN, KONG XIAOYONG, WANG ZONGMIN, et al. Baijiu vinasse as a new source of bioactive peptides with antioxidant and anti-inflammatory activity [J]. *Food Chemistry*, 2021, 339: 128159.
- [22] NATCHAYA DUANG, WEERACHAI CHAI, CHITSIRI RACH, et al. Antimicrobial and functional properties of Duckweed (*Wolffia globosa*) protein and peptide extracts prepared by ultrasound-assisted extraction [J]. *Foods*, 2022, 11(15): 2348.
- [23] SUSHIL KOIRALA, WAI PRATHUMPAI, ANIL KUMAR ANAL. Effect of ultrasonication pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of caprine milk proteins and on antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptides thus produced [J]. *International Dairy Journal*, 2021, 118: 105026.
- [24] BIAN YURONG, LI WENJING, PAN LIANHAN, et al. Sweet-flavored peptides with biological activities from mulberry seed protein treated by multifrequency countercurrent ultrasonic technology [J]. *Food Chemistry*, 2022, 367: 130647.
- [25] 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.
- [26] 王爽, 刘雪松, 江波涛. 驴血蛋白酶解制备抗氧化肽工艺优化[J]. *生物学杂志*, 2023, 40(2): 109-114.
- [27] 薛雅茹, 陈紫红, 黄茂坤. 响应面法优化马鲛鱼内脏抗氧化肽泡腾片制备工艺及其质量评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(8): 244-251.
- [28] XUE HUI, WANG JUNJIE, XIE JIAYAN, et al. Isolation, purification, and structure identification of antioxidant peptides from embryonated eggs [J]. *Poultry Science*, 2019, 98(6): 2360-2370.
- [29] REN LIKUN, YANG YANG, MA CHUNMIN, et al. Identification and in silico analysis of novel antioxidant peptides in broken rice protein hydrolysate and its cytoprotective effect against H₂O₂-induced 2BS cell model [J]. *Food Research International*, 2022, 162: 112108.
- [30] HU XIAOMENG, WANG YUMEI, ZHAO YUQIN, et al. Antioxidant peptides from the protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle: purification, identification, and cytoprotective function on HepG2 cells damage by H₂O₂ [J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(3): 153.