

蚕蛹抗氧化肽的制备及其体内外活性评价

陈嘉敏, 黄颂源, 梅甜甜, 董丽雯, 李圣雪, 岳文琪, 李柳颖, 吴海强, 余熙, 吴序栋*

(深圳大学医学部公共卫生学院, 广东深圳 518037)

摘要: 该研究在酶解法和响应面法的基础上通过增加响应面法中的响应值来优化碱性蛋白酶酶解蚕蛹蛋白的工艺, 以 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率作为水解肽评估指标筛选并找到了一条抗氧化活性较强的酶解工艺流程。最优酶为碱性蛋白酶, 最佳条件为 pH 值为 9.0、温度为 48 °C、底物质量分数为 4.1%、反应时间为 2 h、酶质量分数为 3.0%, 与现有的工艺流程相比较缩短且降低了反应的时间和温度, 且提升了体外抗氧化活性, 其体外抗氧化活性达到了 Vc 的 89.10%。在此基础上使用 D-半乳糖引起的氧化应激小鼠模型评价了该蚕蛹肽在体内的抗氧化活性, 低剂量组的蚕蛹肽即可使血清中 CK、SOD、T-AOC、GSH-PX 因子恢复至 0.31、105.44、3.51、308.36 U/mL 肝脏中 MDA、SOD 因子恢复至 0.71 nmol/mL、77.40 U/mL 均与模型组有显著差异 ($P < 0.05$)。综上通过双响应面法制备而得的蚕蛹肽不仅优化了工艺流程而且使得其抗氧化活性有所提升且在体内外均能发挥抗氧化活性, 为蚕蛹蛋白肽的开发利用提供了实验依据。

关键词: 蚕蛹多肽; 响应面; 氧化应激; 工艺条件; 抗氧化肽

文章编号: 1673-9078(2024)08-189-198

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.1040

Evaluation of Preparation, *in Vitro* and *in Vivo* Activity of Antioxidant Peptides from Silkworm Pupae

CHEN Jiamin, HUANG Songyuan, MEI Tiantian, DONG Liwen, LI Shengxue, YUE Wenqi, LI Liuying, WU Haiqiang, YU Xi, WU Xuli*

(School of Public Health, Shenzhen University, Shenzhen 518037, China)

Abstract: This study sought to optimize the process of the enzymatic hydrolysis of silkworm pupa protein by alkaline protease by increasing the response value in response surface method. DPPH and ABTS free radical scavenging rates were employed as the evaluation indices of hydrolyzed peptides. This allowed for the screening and identification of enzymatic hydrolysis processes exhibiting strong antioxidant activity. As a result, the optimal enzyme was identified as alkaline protease with pH value 9.0, a temperature of 48 °C, a substrate mass fraction of 4.1%, a reaction time of 2 h, and an enzyme mass fraction of 3.0%. Compared with the existing process, the reaction time and temperature were reduced, and the antioxidant activity *in vitro* was improved, reaching 89.10% of Vc. On this basis, the antioxidant activity of the silkworm pupa peptide

引文格式:

陈嘉敏,黄颂源,梅甜甜,等.蚕蛹抗氧化肽的制备及其体内外活性评价[J].现代食品科技,2024,40(8):189-198.

CHEN Jiamin, HUANG Songyuan, MEI Tiantian, et al. Evaluation of preparation, *in vitro* and *in vivo* activity of antioxidant peptides from silkworm pupae [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 189-198.

收稿日期: 2023-09-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32172311); 广东省自然科学基金项目项目 (2021A1515012413); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20220531102205012; GJHZ20210705141803010)

作者简介: 陈嘉敏 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: 1057908836@qq.com

通讯作者: 吴序栋 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养, E-mail: wxl@szu.edu.cn

in vivo was evaluated using an oxidative stress mouse model induced by D-galactose. The low-dose group of silkworm pupa peptide was able to restore the CK, SOD, T-AOC and GSH-PX factors in serum to 0.31, 105.44, 3.51 and 308.36 U/mL, respectively. In addition, the MDA and SOD factors in the liver were restored to 0.71 nmol/mL and 77.40 U/mL, respectively, which were significantly different from the model group ($P < 0.05$). In summary, silkworm pupa peptide prepared using the double response surface method optimized the process flow and improved the antioxidant activity, enhancing antioxidant activity both *in vitro* and *in vivo*. This provides an experimental basis for the development and utilization of silkworm pupa protein peptides.

Key words: silkworm polypeptide; response surface methodology; oxidative stress; process condition; antioxidant peptide

我国是世界上蚕桑生产第一大国，每年蚕茧产量高达 65 万 t，其中也会产生大量的蚕蛹作为生产过程中的副产物，蚕蛹中富含丰富的蛋白质、油脂等物质，对于这些物质的利用目前主要还集中在动物的饲料当中^[1]，但是其中所具有丰富的蛋白质是否也可以为人体所利用，近年来也有许多学者也在探究以蚕蛹蛋白作为原料通过不同的方法得到一些具有生物学活性的多肽。例如：沈圆圆等^[2]通过纳豆液态发酵技术制备得到一种具有抗炎作用的蚕蛹肽、Wu 等^[3]通过胃肠道蛋白酶解的方法分离纯化出一种具有血管紧张素-1 转化酶抑制作用的多肽、Luo 等^[4]通过运用胃蛋白酶和溴素处理之后获得了一种具有 DPP-IV 抑制作用的多肽。

氧化应激作为生物中最常见也无法避免的损害它与生物体的许多过程息息相关，其本质其实就是体内氧化物质与还原物质的比例失衡，氧化应激会诱发许多的疾病特别是与年龄相关的疾病^[5]包括慢阻肺^[6]、高血压^[7]、阿兹海默症^[8]等，因此如何减轻氧化应激对人体带来的损伤显得十分重要。

蚕蛹水解肽作为一种新开发的药物资源是否也具有抗氧化活性，目前已有研究表明相比中性蛋白酶木瓜蛋白酶水解蚕蛹蛋白后得到的蚕蛹肽抗氧化活性更好^[9]、卢楠等^[10]通过基于总还原能力的响应面实验探究了一条碱性蛋白酶酶解的工艺流程、学者李志永^[11]通过分离纯化获得了一种具有增强免疫功能的蚕蛹肽。在此基础上能否进一步优化蚕蛹蛋白水解肽的制备流程，进一步提升其抗氧化性能使其成为一种有效、安全的食源性功能多肽是值得深入研究的。

人体内自由基的产生与清除之间存在着微妙的平衡，一旦这种平衡被打破就有可能造成一系列的机体的损害，自由基的产生同时也会引起细胞内发生一系列氧化应激现象，因此基于 DPPH 和 ABTS

自由基清除效果的响应面实验可以更加有效的评估蚕蛹蛋白水解肽对于这一系列氧化应激损伤的缓解作用，并且通过双响应面的方式可以进一步优化已有的蚕蛹蛋白水解肽的制备工艺流程，本研究意在进一步优化蚕蛹蛋白水解抗氧化肽的制备工艺以及增强抗氧化活性，减轻生产过程中的能源消耗，增大产业效益且制备所得的蚕蛹肽也有望进一步开发其生物作用，例如抗衰老、预防老年痴呆等一系列老年疾病。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蚕蛹为实验室养殖得到的桑蚕蛹；碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、1,1-二苯基-2-苦肼基 (DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS)、硫酸铜、氢氧化钠、乙酸乙酯，购于上海麦克林生化科技有限公司；D-半乳糖购于默克；肌酸激酶 (CK)、过氧化物 (CAT)、过氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物歧化酶 (GSH-PX)、丙二醛 (MDA) 及总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒，均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物

Spf 级 Balb/c 小鼠，来源于广东省医学实验动物中心（许可证编号 SCXK(粤)2019-0035）饲养于深圳大学医学部实验动物中心（许可证号 SYXK(粤)2022-0302）。实验前适应性饲养一周。在试验期间小鼠被饲养于 25 °C，享受 12 h 光照和黑暗，自由进食和饮水的环境中。

1.3 仪器与设备

IKA KS3000i 气浴恒温摇床，艾卡（广州）仪器设备有限公司；Eppendorf Centrifuge 5424R、5810R

高速离心机, 艾本德(上海)国际贸易有限公司; OHAUS ST20 pH 计, 奥豪斯国际贸易(上海)有限公司; Bio Tek SYNERGY HTX 酶标仪, 美国 Bio Tek 公司; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TUS-200P 震荡型恒温金属浴, 上海一恒科学仪器有限公司; MS7-HI550-Pro 恒温磁力搅拌仪, 美国 SCILOGEX 公司。

1.4 方法

1.4.1 脱脂蚕蛹蛋白粉的制备

取一定量的蚕蛹清洗后置于 60 °C 烘干, 取 15 g 打成粉末后加入 100 mL 乙酸乙酯 55 °C 下搅拌 2 h 后静置 30 min 去除上层溶液, 重复数次, 直至上层清澈。将蚕蛹置于通风橱内静置使多余的乙酸乙酯挥发, 挥发后加入 100 mL 的纯净水用氢氧化钠调节 pH 值为 10.0, 在 55 °C 下搅拌提取 3 h 后 12 000 r/min 离心 5 min 取上清, 重复两次, 上清用盐酸调节 pH 值为 4.0, 置于 4 °C 冰箱沉淀 4 h 后 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清保留沉淀。沉淀尽快用 50 mL 纯净水复溶并用氢氧化钠调节 pH 值为 7.0, 冷冻干燥。

1.4.2 蚕蛹抗氧化多肽粉末的制备工艺

准确称取一定量的脱脂蚕蛹蛋白粉, 用双蒸水配制成实验所需质量分数的蚕蛹蛋白溶液, 用氢氧化钠或盐酸调节溶液至所需的 pH 值并置于震荡型恒温金属浴加热至设定温度后迅速加入称量好的蛋白酶进行酶解, 反应对应时间后取出沸水浴灭酶 10 min, 产物冷却后将酶解液的 pH 值调至 7.0 然后以 12 000 r/min 的转速离心 20 min, 取上清液后冷冻干燥。

1.4.3 最佳水解蛋白酶的筛选

表 1 不同蛋白酶最佳 pH 值

Table 1 The optimum pH value of different proteases

酶种类	最适 pH 值	最适温度/°C	酶解时间/h
碱性蛋白酶	9.0	50	4
中性蛋白酶	7.0	50	4
木瓜蛋白酶	6.0	55	4
菠萝蛋白酶	4.0	55	4

称取一定量的蛋白粉末用水配制成质量分数 2% (底物质量 / 总质量) 的溶液后加入质量分数 2% (酶质量 / 底物质量) 四种不同的蛋白酶 (碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶) 在最适 pH 值和温度 (如表 1) 下按 1.4.2 酶解, 结束

后取一定量的多肽粉末配制成 0.2 mg/mL 的多肽溶液测定 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率, 通过比较自由基清除率的高低选择酶解效果最佳的蛋白酶。

1.4.4 单因素实验

依次评价蚕蛹蛋白质量分数 (底物质量 / 总质量) (1%、3%、5%、7.5%)、蛋白酶质量分数 (酶质量 / 底物质量) (1%、1.5%、2%、3%)、反应温度 (40、45、50、55、60 °C)、体系 pH 值 (8.0、9.0、10.0、11.0) 以及酶解时间 (2、3、4、5、6 h) 对于蚕蛹蛋白水解肽产物抗氧化活性的影响, 抗氧化能力采用体外 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基清除能力 (未确认最佳条件时采用中间值)。

1.4.5 响应面优化

在单因素实验的基础上筛选出酶解时间、温度、底物质量分数、pH 值作为考察因素, 运用 Box-Behnken 设计 4 因素 3 水平实验, 以 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率进行双响应值进而确定蚕蛹抗氧化肽的最佳酶解工艺, 设计条件如表 2 所示。

表 2 响应面优化实验设计因素水平表

Table 2 Response surface optimization test factor level

水平	pH 值(A)	温度(B)/°C	底物质量分数(C)/%	反应时间(D)/h
1	8.0	40	1	2
0	9.0	50	3	4
-1	10.0	60	5	6

1.4.6 体外抗氧化活性的测定

DPPH 自由基清除率测定, 参照 Brand-Williams 等^[12]的方法, 样品组 A_1 (样品、DPPH)、样品对照组 A_2 (乙醇、样品)、对照组 A_3 (乙醇、DPPH), 每组 4 个复孔, 分别向 96 孔板中加入各组相应的试剂或样品各 100 μ L, 避光孵育后测 517 nm 处吸光度。计算 DPPH 自由基清除率 Y 。

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

式中:

A_1 ——样品在 517 nm 处的吸光度;

A_2 ——样品对照组在 517 nm 处的吸光度;

A_3 ——对照组在 517 nm 处的吸光度。

ABTS⁺ 自由基清除率测定, 参照 Li 等^[13]的方法测定。对照组 A_0 (PBS 和 ABTS 工作液), 实验组 A_1 (样品和 ABTS 工作液), 在 96 孔板中检测 ABTS 工作液加入 200 μ L 外其他试剂或样品均加入 50 μ L, 避光孵育后测 734 nm 处吸光度, 每组 4 个

复孔。计算 ABTS⁺ 自由基清除率 Y。

$$Y = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

A_0 ——对照组在 734 nm 处的吸光度;

A_1 ——实验组在 734 nm 处的吸光度。

1.4.7 动物分组及造模

参照 Sun 等^[14]的方法, 略有修改。40 只小鼠被随机分成 4 组, 分别为空白对照组、模型组、低剂量蚕蛹肽组、高剂量蚕蛹肽组, 每组各 10 只。除空白对照组外, 其余组小鼠每天皮下注射 100 mg/kg 的 D-半乳糖溶液 (使用生理盐水进行溶解), 在此基础上, 模型组每天灌胃生理盐水, 低剂量组每天灌胃 0.2 g/kg 的蚕蛹肽, 高剂量组每天灌胃 0.8 g/kg 的蚕蛹肽进行治疗。空白对照组每天皮下注射和灌胃等剂量的生理盐水。连续给药 4 周后眼眶取血并处死小鼠。

1.4.8 肝脏及血清生化指标检测

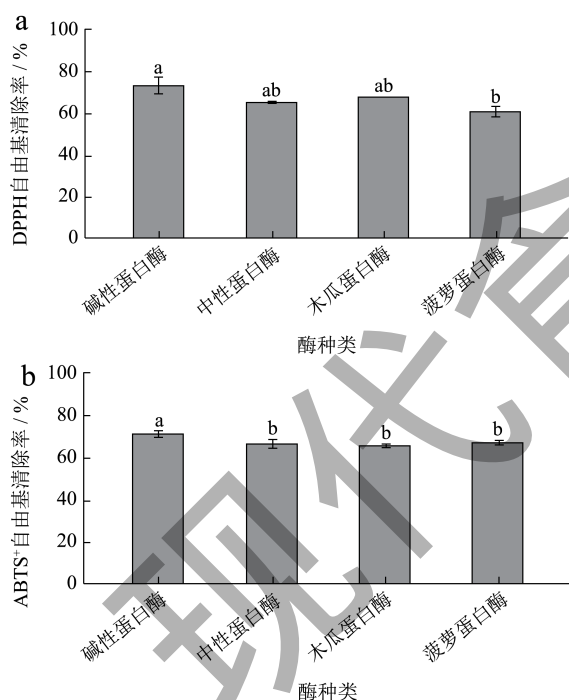


图 1 不同酶对水解肽 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率的影响

Fig.1 Effects of different enzymes on the clearance rate of hydrolyzed peptide DPPH and ABTS⁺

注: 不同的小写字母之间表示具有显著差异 ($P < 0.05$), 下图同。

小鼠饲养至第五周时眼球取血, 3 500 r/min 离心 20 min 后, 分离血清备用。处死小鼠后取部分肝脏组织, 用生理盐水制备成 10% 的组织匀浆后用肌酸激酶 (CK)、过氧化物酶 (CAT)、过氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物歧化酶 (GSH-PX)

及总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒检测其在肝脏组织及血清中的含量。

1.5 数据统计与分析

所有数据均平行三次, 运用 Prism 9、Design Expert 13 进行数据的处理和分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

使用不同的蛋白酶酶解同一底物的时候由于不同酶之间酶切位点的不同会导致酶解后得到的多肽的结构也不尽相同, 因此不同的蛋白酶水解后得到的蚕蛹肽的抗氧化活性也可能有所差异, 选取实验室中常用的四种蛋白酶即: 中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶。由图 1 可知碱性蛋白酶酶解得到的多肽 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率最高, 因此选用碱性蛋白酶作为最佳酶^[10]。

2.2 单因素实验结果与分析

2.2.1 最佳 pH 值的确定

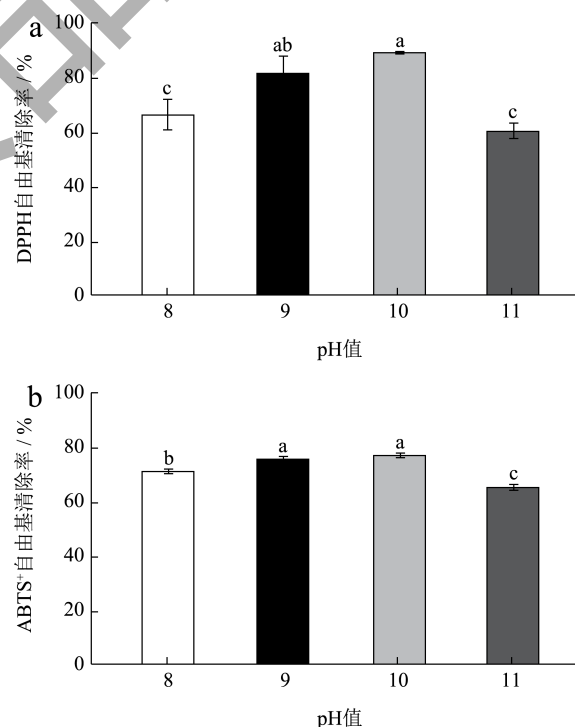


图 2 不同 pH 值对水解肽 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率的影响

Fig.2 Effects of different pH values on the clearance rate of hydrolyzed peptide DPPH and ABTS⁺

通过图 2 可以看出随着 pH 值的升高蚕蛹肽的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率也在逐渐升高, 在

pH 值为 10.0 的时候有最大值, 继续增大 pH 值时清除率降低。其原因是不同的 pH 值对于酶解过程有着相当大的影响, 不仅使酶的活性有所改变, 而且还会影响蛋白质在溶液中的分散情况, 不同 pH 值使得蛋白质在溶液中的分散程度不同、溶解不同因此在酶解过程的酶解程度也会有所区别, 进而影响酶解后得到的肽的抗氧化活性^[15], 因此选定最佳 pH 值为 10.0。

2.2.2 最佳底物质量分数的确定

通过图 3 可以发现当底物质量分数在 1.0% 至 5.0% 时酶解产物的抗氧化活性与质量分数成正相关, 当底物质量分数为 7.5% 的时候可能由于底物质量分数过高导致酶被过多的蛋白质所包围导致其活性位点被屏蔽因此使得蛋白质未被充分酶解导致生成的多肽抗氧化活性降低^[16]。因此最佳底物质量分数为 5%。

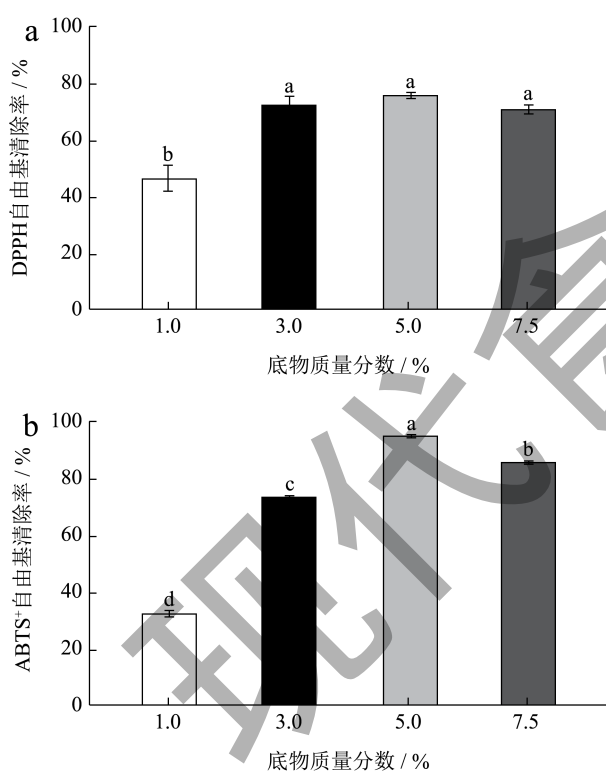


图 3 不同底物质量分数对水解肽 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率的影响

Fig.3 Effects of different substrate concentrations on the clearance rate of hydrolyzed peptide DPPH and ABTS⁺

2.2.3 最佳酶质量分数的确定

通过图 4 可以发现随着酶质量分数的增加蚕蛹水解肽的 ABTS⁺ 自由基清除率在质量分数为 3.0% 的时候达到了最大值, 而 DPPH 自由基清除率先是快速增加然后趋于平稳, 这可能是由于酶已经和底物结

合达到饱和因此再增加酶的量也不会对酶促反应有所帮助, 综上选择酶质量分数为 3.0% 为最佳条件。

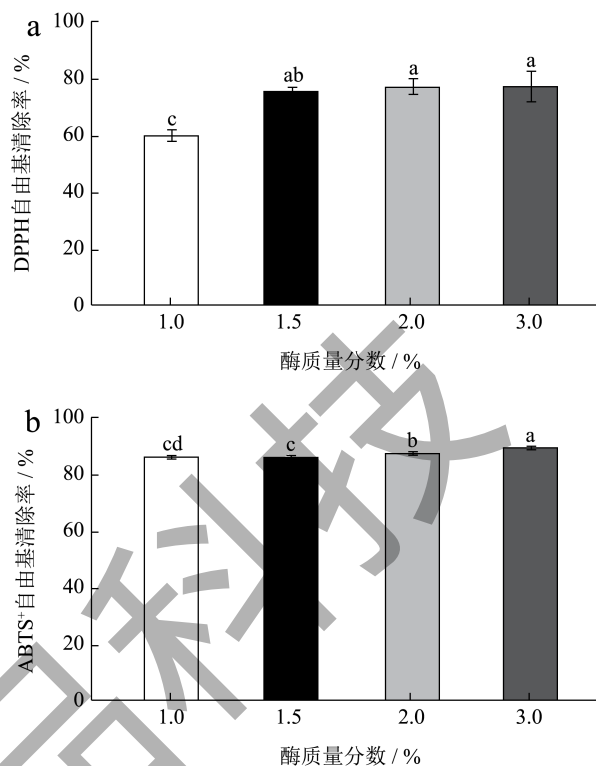


图 4 不同酶质量分数对水解肽 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率的影响

Fig.4 Effects of different enzyme concentrations on the clearance rate of hydrolyzed peptide DPPH and ABTS⁺

2.2.4 最佳温度的确定

由图 5 可知温度从 40 °C 升至 60 °C 时对于水解肽 DPPH 自由基清除率而言呈上升趋势并在 60 °C 时达到最大值, 温度的变化可能改变酶解过程中酶的活性, 温度过高则会使酶失活, 因此在温度达到 70 °C 时水解肽的 DPPH 自由基清除率发生下降究其原因可能是因为温度过高破坏了酶的结构导致酶失去活性导致水解不够彻底^[15]。ABTS⁺ 自由基清除率则没有呈现明显温度依赖性, 其原因可能是在酶解过程中活性结构反复出现又消失导致。综上选择最佳的反应温度为 55 °C。

2.2.5 最佳酶解时间的确定

由图 6 可知蚕蛹水解肽的 DPPH 自由基清除率随着时间的增加先增加后减少, 在酶解时间达到 4 h 的时候达到最大值。酶解时间过长会导致蛋白质被过分酶解成为氨基酸或一些短肽, 从而丧失了抗氧化的活性。ABTS⁺ 自由基清除率则是呈现一种先下降再上升的趋势, 其原因可能是因为酶切过程中产生了新的活性基团因此导致自由基清除率的

上升, 因此选择最佳酶解时间为 4 h。

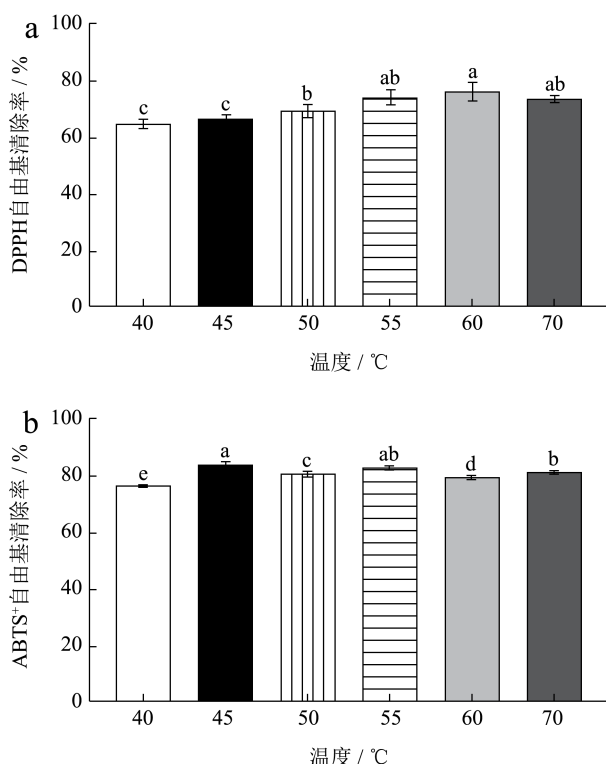


图 5 不同温度对水解肽 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率的影响

Fig.5 Effect of different temperature on the clearance rate of hydrolyzed peptide DPPH and ABTS⁺

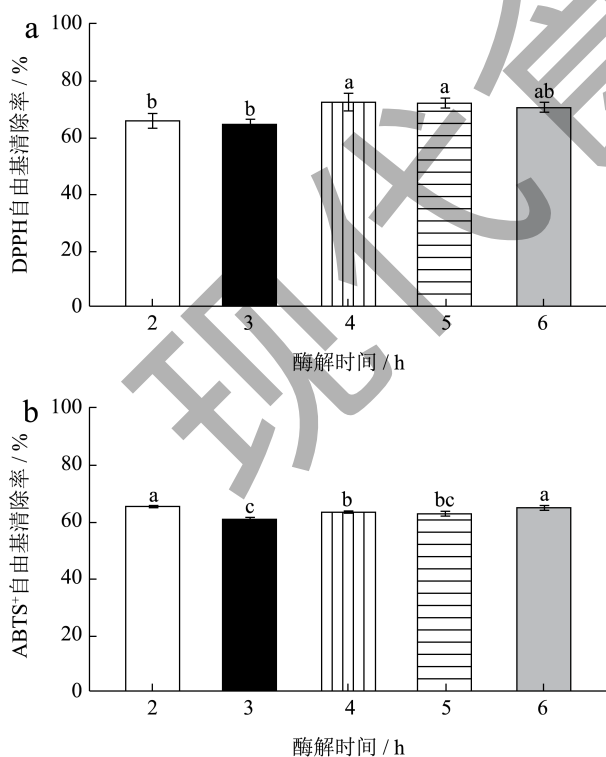


图 6 不同酶解时间对水解肽 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率

Fig.6 Effect of different enzymatic hydrolysis time on the clearance rate of hydrolyzed peptide DPPH and ABTS⁺

2.3 响应面分析

2.3.1 双响应面实验设计与结果

在单因素实验结果的基础上筛选了 pH 值 (A)、温度 (B)、底物质量分数 (C)、反应时间 (D) 作为考察的因素, 以 DPPH 自由基清除率和 ABTS⁺ 自由基清除率作为双响应值进行响应面实验的设计和实验结果如表 3 所示。

表 3 响应面实验设计与结果

Table 3 Response surface test design and results

序号	A: pH 值	B: 温度 / °C	C: 底物质量分数 / %	D: 时间 / h	DPPH 自由基清除率 / %	ABTS ⁺ 自由基清除率 / %
1	8.0	40	3.0	4	79.00	81.29
2	8.0	50	5.0	4	84.66	94.90
3	9.0	40	5.0	4	83.88	94.06
4	9.0	60	5.0	4	78.71	94.56
5	9.0	50	3.0	4	80.43	82.61
6	9.0	40	3.0	6	80.25	90.24
7	9.0	50	1.0	2	42.37	39.23
8	10.0	60	3.0	4	76.00	79.05
9	10.0	40	3.0	4	65.00	76.89
10	9.0	50	1.0	6	49.38	38.72
11	8.0	50	1.0	4	51.03	29.57
12	9.0	50	3.0	4	83.69	87.42
13	8.0	50	3.0	2	81.00	75.87
14	9.0	40	3.0	2	78.79	80.89
15	8.0	60	3.0	4	80.21	69.88
16	9.0	50	5.0	2	83.31	94.53
17	9.0	40	1.0	4	49.64	37.33
18	10.0	50	1.0	4	47.83	32.01
19	9.0	50	3.0	4	81.30	82.51
20	10.0	50	5.0	4	76.02	95.00
21	8.0	50	3.0	6	83.05	77.00
22	9.0	60	3.0	2	84.10	84.00
23	10.0	50	3.0	6	70.00	65.00
24	9.0	50	3.0	4	80.06	83.15
25	9.0	60	3.0	6	85.04	87.69
26	9.0	50	3.0	4	84.44	86.56
27	10.0	50	3.0	2	69.25	83.01
28	9.0	60	1.0	4	42.15	38.62
29	9.0	50	5.0	6	79.06	81.20

2.3.2 方差分析

通过 Design Expert 13 软件对响应面实验进行

方差分析如表 4、5 所示，并得到 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率的回归方程。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 0.8180 - 0.467A + 0.0075B + 0.1733C + 0.0092D + 0.0250AB - 0.0025AD - 0.0125AC + 0.0075BC + 0.0000BD - 0.0150CD - 0.0411A^2 - 0.0148B^2 - 0.01536C^2 - 0.0073D^2$$

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率} = 0.8460 + 0.0017A - 0.0042B + 0.2942C - 0.0033D + 0.0325AB - 0.0050AC - 0.0475AD - 0.0025BC - 0.0125BD + 0.0000CD - 0.0713A^2 - 0.0026B^2 - 0.1651C^2 - 0.0063D^2$$

表 4 DPPH 方差分析
Table 4 DPPH analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.5516	14	0.0394	25.0900	<0.0001	****
A	0.0261	1	0.0261	16.6400	0.0011	*
B	0.0007	1	0.0007	0.4298	0.5227	
C	0.3605	1	0.3605	229.5500	<0.0001	****
D	0.0010	1	0.0010	0.6420	0.4364	
AB	0.0025	1	0.0025	1.5900	0.2277	
AC	0.0006	1	0.0006	0.3979	0.5383	
AD	0.0000	1	0.0000	0.0159	0.9014	
BC	0.0002	1	0.0002	0.1433	0.7107	
BD	0.0000	1	0.0000	0.0000	1.0000	
CD	0.0009	1	0.0009	0.5730	0.4616	
A ²	0.0109	1	0.0109	6.9700	0.0194	*
B ²	0.0014	1	0.0014	0.9087	0.3566	
C ²	0.1530	1	0.1530	97.4200	<0.0001	****
D ²	0.0003	1	0.0003	0.2221	0.6447	
残差	0.0220	14	0.0016			
失拟项	0.0203	10	0.0020	4.8400	0.0712	不显著
净误差	0.0017	4	0.0004			
总离差	0.5736	28				

注：A=pH 值；B= 温度；C= 底物质量分数；D= 时间，下表同。

P 值用于检验回归模型是否有效的标准，通过表 4、表 5 可以得到不管是 DPPH 清除率还是 ABTS⁺ 清除率作为响应值，模型的 P 值均小于 0.0001，因此可以判断实验所用的模型差异十分显

著，且具有统计学意义。同时这两个模型的失拟项的 P 值均大于 0.05，因此可以得出该模型并未出现明显的失拟情况，再次证明模型的可用性和统计学意义。基于以上信息可以得出该模型可用于优化蚕蛹蛋白的酶解工艺以得到具有更好抗氧化活性的蚕蛹肽。在对回归方程进行分析可以发现对于蚕蛹肽的抗氧化活性而言底物质量分数的影响最为显著。

2.3.3 响应面及等高线分析

为了可以更加直观的反映出各个因素之间交互作用的强弱绘制出了等高线图和 3D 响应面图，通过图 7、图 8 可以看出对于 DPPH 自由基清除率而言 pH 值与温度、pH 值与时间、温度与时间之间的交互作用比较强，对于 ABTS⁺ 自由基清除率而言 pH 值与温度、pH 值与底物质量分数之间交互作用比较强。

表 5 ABTS 方差分析

Table 5 ABTS analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.25	14	0.0896	47.9500	<0.0001	****
A	0.0000	1	0.0000	0.0178	0.8956	
B	0.0002	1	0.0002	0.1116	0.7433	
C	1.0400	1	1.0400	556.0400	<0.0001	****
D	0.0001	1	0.0001	0.0714	0.7932	
AB	0.0042	1	0.0042	2.2600	0.1548	
AC	0.0001	1	0.0001	0.0535	0.8203	
AD	0.0090	1	0.0090	4.8300	0.0452	*
BC	0.0000	1	0.0000	0.0134	0.9095	
BD	0.0006	1	0.0006	0.3347	0.5721	
CD	0.0000	1	0.0000	0.0000	1.0000	
A ²	0.0330	1	0.0330	17.6700	0.0009	**
B ²	0.0000	1	0.0000	0.0232	0.8812	
C ²	0.1768	1	0.1768	94.6600	<0.0001	****
D ²	0.0003	1	0.0003	0.1393	0.7145	
残差	0.0261	14	0.0019			
失拟项	0.0242	10	0.0024	5.0500	0.0663	不显著
净误差	0.0019	4	0.0005			
总离差	1.2800	28				

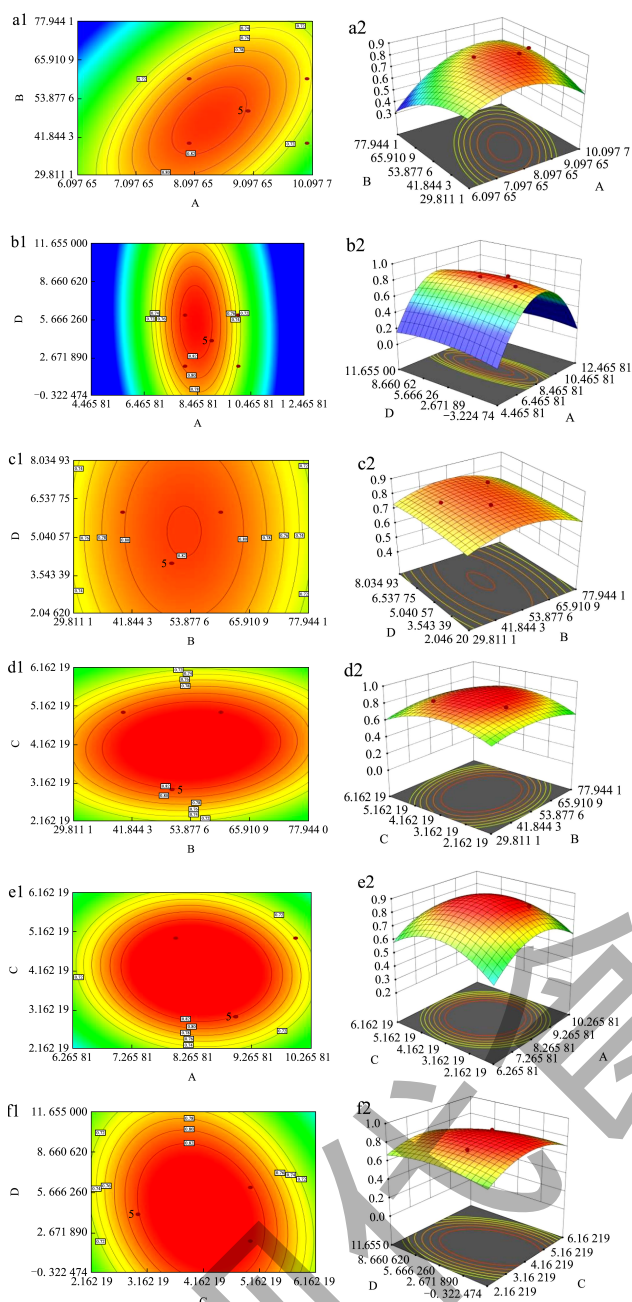


图 7 DPPH 自由基清除率自由基响应面及等高线

Fig.7 DPPH response surface and contour map

注:A 为 pH 值,B 为温度,C 为底物质量分数,D 为时间, 下图同。

2.3.4 工艺流程最优条件的确认

将 2.3.2 中得到的方程导数化后求极值 (最大值) 可以得到 pH 值 9.0、温度 48 °C、底物质量分数 4.1%、反应时间 2 h 此时的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率的预测值分别为 86.00% 和 96.00%，与卢楠等^[10]的研究相比，通过双响应的响应面分析得到的工艺流程有着相对明显的优势，反应时间从 2.45 h 缩短至 2 h，酶解温度从 50 °C 下降到 48 °C。

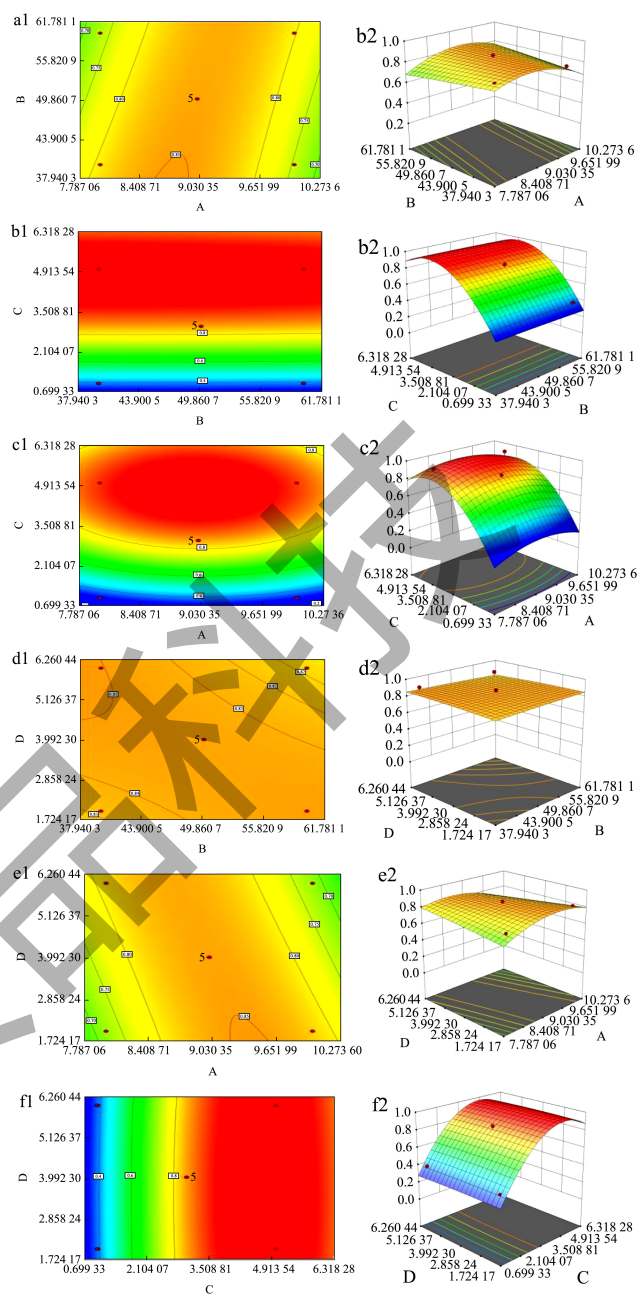


图 8 ABTS⁺ 清除率响应面及等高线图

Fig.8 ABTS⁺ response surface and contour map

2.4 蚕蛹肽体内外抗氧化活性鉴定

2.4.1 体外抗氧化活性检测与评价

通过对单因素实验结果进行分析发现 DPPH 自由基清除率可以更显著的反应蚕蛹肽抗氧化活性，因此选用此指标作为蚕蛹蛋白水解肽体外抗氧化活性检测的指标。如图 9 所示，使用该工艺流程制备而得的蚕蛹肽 DPPH 自由基清除率为 83.62% 与预测值 86.00% 的相对误差为 2.77%，这再次表明该模型可以较好的反应各因素与响应值之间的关系。同时与质量分数的 Vc (0.2 mg/mL) 比较发现用该方法制备的蚕蛹肽体外抗氧化活性可以达到维生素 C 的 89.10%。

表 6 蚕蛹肽对小鼠血清中抗氧化酶系的影响 (U/mL)

Table 6 Effect of silkworm chrysalis peptide on serum antioxidant enzyme system in mice

组别	CK	CAT	SOD	T-AOC	GSH-PX
空白	0.36 ± 0.08 ^b	1.28 ± 0.19 ^b	135.55 ± 11.25 ^a	3.44 ± 0.11 ^a	315.14 ± 15.55 ^a
模型	0.51 ± 0.04 ^a	0.88 ± 0.16 ^c	82.55 ± 10.02 ^c	2.68 ± 0.25 ^b	278.65 ± 14.87 ^b
低剂量	0.31 ± 0.06 ^c	1.11 ± 0.22 ^c	105.44 ± 9.82 ^b	3.51 ± 0.33 ^a	308.36 ± 16.17 ^a
高剂量	0.26 ± 0.05 ^c	2.35 ± 0.23 ^a	112.55 ± 12.12 ^a	3.65 ± 0.47 ^a	324.33 ± 15.65 ^a

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$); 下表同。

表 7 蚕蛹肽对小鼠肝脏中抗氧化酶系的影响

Table 7 Effect of silkworm chrysalis peptide on antioxidant enzyme system in mouse liver

组别	MDA/(nmol/mg)	CAT/(U/mg)	SOD/(U/mg)	T-AOC/(U/mg)	GSH-PX/(U/mg)
空白	1.16 ± 0.56 ^b	6.48 ± 0.89	75.35 ± 10.11 ^a	1.44 ± 0.21 ^a	315.14 ± 25.45
模型	1.50 ± 0.54 ^a	6.25 ± 0.69	57.55 ± 9.32 ^c	1.08 ± 0.14 ^b	305.65 ± 34.44
低剂量	0.71 ± 0.33 ^c	6.31 ± 1.20	77.40 ± 9.88 ^b	1.11 ± 0.13 ^b	308.36 ± 26.87
高剂量	0.66 ± 0.35 ^c	6.75 ± 0.83	78.65 ± 11.32 ^a	1.17 ± 0.17 ^b	324.33 ± 29.66

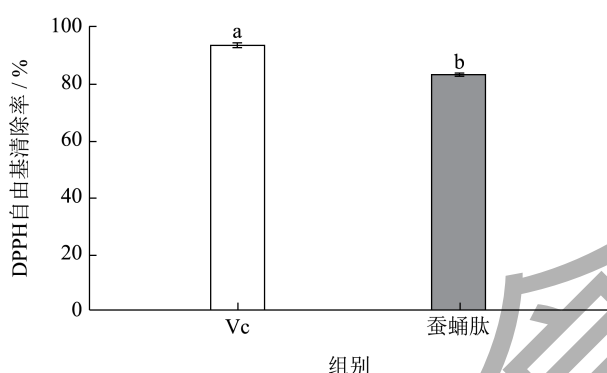


图 9 蚕蛹肽体外抗氧化活性比较

Fig.9 Comparison of antioxidant activity of silkworm pupa peptide *in vitro*

2.4.2 小鼠血清中抗氧化酶系的影响

由表 6 可以看出使用蚕蛹肽治疗的小鼠相较于模型组血清中的各项抗氧化酶系指标均得到改善, 血清 CK 的含量不论是在低剂量组还是高剂量组中均有显著的降低, 相比模型组分别降低了 39.22% 和 49.02%。CAT、SOD、T-AOC、GSH-PX 等指标高剂量组与模型组相比均有所上升且差异明显 ($P < 0.05$), 分别上升 167.04%、36.34%、36.19%、16.39%, 大部分指标都能恢复到与空白组的相同水平。因此可以得出蚕蛹蛋白水解肽对于 D-半乳糖所引起的氧化损伤有着一定的治疗作用。

2.4.3 小鼠肝脏中抗氧化酶系的影响

由表 7 可以看出模型组小鼠肝脏中 MDA、SOD 的指标与治疗组的小鼠之间均出现了显著的差异 ($P < 0.05$), 与模型组相比经过低剂量和高剂量

蚕蛹肽的治疗使 MDA 分别降低 52.67% 和 56.00%, 使 SOD 上升 34.49% 和 36.66%, MDA 含量的变化可以反应细胞膜上脂质过氧化的程度^[17], 因此可以得出蚕蛹肽具有恢复肝脏细胞脂质过氧化损伤的功效。与血清中 CAT、GSH-PX 的影响做比较发现蚕蛹肽并不会使正常指标发生改变。因此可以得出蚕蛹肽可以缓解由于 D-半乳糖引起的肝脏细胞的脂质过氧化损伤, 而不影响其他正常的生理功能, 推测其原因可能是蚕蛹肽可能通过竞争受体的方式发挥作用。

3 结论

本实验在基于响应面的实验基础上采用了以 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率为指标的双响应面法作为更客观的分析方法, 探讨了温度、反应时间、pH 值、底物质量分数对于碱性蛋白酶酶解蚕蛹蛋白后得到的抗氧化活性的影响, 得出了最佳的酶解条件为 pH 值 9.0、温度 48 °C、底物质量分数 4.1%、反应时间 2 h、酶质量分数 3.0% 与现有的研究相比优化了酶解时间和酶解温度。在体外验证实验中该法制备而得的蚕蛹肽 DPPH 自由基清除率达到了同质量浓度 Vc 的 89.10%, 接着评价了其在动物体内的抗氧化活性, 发现其具有明显的体内抗氧化活性, 血清以及肝脏抗氧化酶系在高剂量组的蚕蛹肽治疗下各异常指标均有显著改善 (与模型组相比 $P < 0.05$), 且在肝脏组织中蚕蛹肽对肝脏细胞脂质过氧化累积有着消除的作用。以上研究发现为进一步开发利用蚕蛹肽提供了实验依据。

参考文献

- [1] 李庆荣,廖森泰,杨琼,等.一种高抗菌活性的蚕蛹粉、鱼配合饲料添加剂及制备方法和应用:中国,CN11603495 6A [P].2023-05-02
- [2] 沈圆圆,于福田,秦雅莉,等.纳豆菌液态发酵制备蚕蛹肽的工艺优化及其抗炎活性研究[J].食品工业科技,2022, 43(3):162-71.
- [3] WU Q Y, JIA J Q, YAN H, et al. A novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein: Biochemical characterization and molecular docking study [J]. Peptides, 2015, 68: 17-24.
- [4] LUO F L, FU Y, MA L, et al. Exploration of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitory peptides from silkworm pupae (*Bombyx mori*) proteins based on *in silico* and *in vitro* assessments [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(12): 3862-3871.
- [5] FORMAN H J, ZHANG H Q. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2021, 20(8): 652-652.
- [6] GLAVIND J, HARTMANN S, CLEMMESSEN J, et al. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. 2. the presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta [J]. Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica, 1952, 30(1): 1-6.
- [7] TOUYZ R M, RIOS F J, ALVES-LOPES R, et al. Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension [J]. Canadian Journal of Cardiology, 2020, 36(5): 659-670.
- [8] ANSARI M A, SCHEFF S W. Oxidative stress in the progression of alzheimer disease in the frontal cortex [J]. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 2010, 69(2): 155-67.
- [9] 蔡沙,何建军,张国忠,等.蚕蛹蛋白酶解工艺及其水解产物抗氧化性[J].食品工业,2019,40(6):77-82.
- [10] 卢楠,廖鲜艳,翁新楚,等.蚕蛹抗氧化肽的制备及其体外抗氧化活性评价[J].上海大学学报(自然科学版),2013, 19(2): 215-20.
- [11] 李志永.蚕蛹蛋白免疫肽的分离纯化、结构鉴定及功能分析[D].镇江:江苏科技大学,2019.
- [12] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity [J]. Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 1995, 28(1): 25-30.
- [13] LI X, LIN J, GAO Y, et al. Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma cimicifugae* [J]. Chemistry Central Journal, 2012, 6(1): 140.
- [14] SUN K, YANG P, ZHAO R, et al. Matrine attenuates D-galactose-induced aging-related behavior in mice via inhibition of cellular senescence and oxidative stress [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7108604.
- [15] 刘云姣,张海燕,刘淑晗,等.响应面优化南极磷虾蛋白酶解工艺及蛋白肽组分分析[J].现代食品科技,2019,35(1): 144-151,280.
- [16] 林燕,陈计恋,胡小松,等.酶解核桃蛋白制备抗氧化肽的研究[J].食品工业科技,2011,32(4): 204-207,12.
- [17] AYALA A, MUNOZ M F, ARGUELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014, 2014: 360438.