

青刺果粕抗氧化肽的酶法制备工艺优化及体外抗氧化活性分析

王增丽¹, 付坚², 何同¹, 王雪峰^{1,3*}, 范江平^{1,3}, 黄艾祥¹

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 云南公安民警综合训练基地, 云南昆明 650222) (3. 云南省畜产品加工工程技术研究中心, 云南昆明 650201)

摘要: 青刺果为食药同源的云南特色木本油料作物, 其榨油后的副产物存在蛋白质利用率低的问题。实验以青刺果粕为原料获得具有抗氧化活性的蛋白酶解物, 对酶质量分数、酶解时间、料液比三个因素进行单因素实验和响应面优化分析, 确定碱性蛋白酶水解制备青刺果粕蛋白酶解物的工艺条件。结果表明, 最佳酶解工艺条件为: 酶质量分数 4.6%、酶解时间 4.6 h、料液比 1:31 (g/mL), 在此最优条件下酶解制备的抗氧化肽质量浓度为 0.9 mg/mL 时, 对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和羟基自由基的清除能力最高分别为 76.46%、94.22%、73.02%。此外, 青刺果抗氧化肽对细胞毒性实验结果表明, 该肽对 HepG 2 细胞的生长无毒性作用。综上, 该工艺条件下制备的青刺果抗氧化肽具有较好的抗氧化活性, 研究可为青刺果蛋白资源的开发利用提供参考依据。

关键词: 青刺果; 抗氧化肽; 酶解; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2024)12-49-56

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1215

Optimization of Enzymatic Preparation Process of Antioxidant Peptides from *Prinsepia utilis* Royle and Analysis of Their *in Vitro* Antioxidant Activities

WANG Zengli¹, FU Jian², HE Tong¹, WANG Xuefeng^{1,3*}, FAN Jiangping^{1,3}, HUANG Aixiang¹

(1.College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2.Yunnan Public Security Police Comprehensive Training Base, Kunming 650222, China)

(3.Yunnan Engineering Technology Research Center for Processing of Livestock Products, Kunming 650201, China)

Abstract: *Prinsepia utilis* Royle is a food and medicine homologous woody oil crop with Yunnan characteristics. The by-products after oil extraction have the problem of low protein utilization. In this experiment, *Prinsepia utilis* Royle meal was used as the raw material to produce protein hydrolysate with antioxidant activity. The single factor experiments and response surface optimization analysis were carried out on three factors, enzyme mass fraction, enzymatic hydrolysis time

引文格式:

王增丽,付坚,何同,等.青刺果粕抗氧化肽的酶法制备工艺优化及体外抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2024,40(12):49-56.

WANG Zengli, FU Jian, HE Tong, et al. Optimization of enzymatic preparation process of antioxidant peptides from *Prinsepia utilis* Royle and analysis of their *in vitro* antioxidant activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 49-56.

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (31960462); 云南省基础研究计划面上项目 (2019FB052); 云南省农业联合专项重点项目 (202101BD070001-013); 云南省科学技术协会青年科技人才托举工程项目

作者简介: 王增丽 (1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1991608624@qq.com; 共同第一作者: 付坚 (1978-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 分子生物学, E-mail: fugien@aliyun.com

通讯作者: 王雪峰 (1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品蛋白质资源利用与乳品科学, E-mail: 364135728@qq.com

and solid-liquid ratio, to determine the enzymatic hydrolysis process conditions for the preparation of protease hydrolysate from *Prinsepia utilis* Royle meal by alkaline protease. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis conditions were: enzyme mass fraction, 4.6%; enzymatic hydrolysis time, 4.6 h; solid-liquid ratio, 1:31 g/mL. Under the optimal conditions, when the mass concentration of antioxidant peptide prepared by enzymatic hydrolysis was 0.9 mg/mL, the scavenging capacities for DPPH free radical, ABTS⁺ free radical and hydroxyl free radical were 76.46%, 94.22% and 73.02%, respectively. In addition, the results of cytotoxicity experiments showed that the peptide had no toxic effect on the growth of HepG 2 cells. Taken together, the antioxidant peptide prepared through this process had good antioxidant activity. This study can provide a reference for the development and utilization of *Prinsepia utilis* Royle protein resource.

Key words: *Prinsepia utilis* Royle; antioxidant peptides; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity

青刺果 (*Prinsepia utilis* Royle) 是蔷薇科一种多年生灌木扁核木, 又名青刺尖、打油果, 主要分布于云南、贵州、四川等海拔在 1 800~3 200 m 的冷寒地区^[1]。据不完全统计, 云南丽江青刺果籽年产量约 1 000 t, 青刺果籽油年产量约 200 余 t, 其中有 5 家企业已开发出青刺果软胶囊、青刺果茶饮品等产品^[2]。青刺果富含酚类、脂肪、蛋白等多种营养物质, 具有调节内分泌^[3]、抗氧化^[4]、降血糖^[5]和降血脂^[6]等作用, 其蛋白含量尤为丰富, 高达 46.97%^[7]。目前, 对青刺果的开发利用主要集中在油脂上, 其副产物—青刺果粕大多被用来当做饲料喂养牲畜或者直接丢弃, 造成蛋白资源的浪费。高凡丁等^[8]研究发现, 青刺果粕中的蛋白质含量约为 24.6%。因此, 如何高效利用青刺果粕提取抗氧化肽对提高青刺果蛋白资源利用率具有重要意义。

常见生物活性肽的制备方法有微生物发酵法、分离提取法和酶解法等^[9]。其中, 酶解法因酶解条件温和易控制、制备的肽具有稳定的生物活性而被广泛用于生物活性肽的提取^[10]。酶解法提取所用蛋白酶主要有胰蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶等。如 Li 等^[11]利用碱性蛋白酶水解牦牛皮蛋白和 Cai 等^[12]利用碱性蛋白酶水解草鱼皮蛋白均制备出具有较强抗氧化能力的抗氧化肽; 张靖等^[13]通过酶解法从羊骨中提取抗氧化肽的工艺研究中发现, 相比其他蛋白酶, 碱性蛋白酶所提取的多肽 C 端具有大分子疏水性氨基酸, 提取的多肽表现出高抗氧化活性。

因此本实验以青刺果粕为原料, 采用碱性蛋白酶通过酶解法对青刺果粕进行酶解制备抗氧化肽, 并对酶解工艺条件进行优化及抗氧化肽的抗氧化活性进行分析。此外, 还对青刺果抗氧化肽的细胞毒性进行了研究。预期提高青刺果蛋白资源的开发利用, 为青刺果抗氧化肽的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验材料及试剂

青刺果, 购自香格里拉碧罗雪山生物科技有限公司; 碱性蛋白酶 (酶活力 500 U/mg)、DPPH、ABTS, 购自上海源叶生物科技有限公司; 氢氧化钠、盐酸, 购自天津市凤船化学试剂科技有限公司; PBS 缓冲液, 购自赛默飞世尔科技有限公司; 其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

STARTER3100 pH 计, 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; EPED-ESL-10 纯水器, 南京易普易达科技发展有限公司; TGL20M 高速冷冻离心机, 北京兴伟业仪器有限公司; SCIENTZ-18N 真空冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司; UV-1800CP 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; HWS24 电热恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; Multiskan Go 酶标仪, Thermo Scientific; 恒温磁力搅拌器, 上海梅颖溥仪器仪表制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 青刺果蛋白的提取

取青刺果 1 000 g, 于 45 °C 恒温干燥箱中恒温干燥 4 h, 榨油机预热, 将干燥好的青刺果于榨油机中压榨得到青刺果粕并粉碎备用。

青刺果粕蛋白的提取参照孙显惠等^[14]的方法, 稍作修改。取青刺果粕粉于烧杯中, 与去离子水混合后用 1.0 mol/L 的 NaOH 调节混合液 pH 值至 9.0, 于室温下磁力搅拌提取 1 h 后过滤, 滤液于 4 °C 离心 (4 000 r/min) 25 min, 取上清液用 1.0 mol/L 的 HCl 将 pH 值调至 4.5, 室温下静置 2 h 后再次离心

15 min, 沉淀用去离子水溶解并调节 pH 值至中性, 冷冻干燥后得到青刺果粕蛋白。

1.2.2 青刺果抗氧化肽的制备

青刺果抗氧化肽的制备工艺参照于丽颖^[15]的方法稍作修改。青刺果粕蛋白与去离子水混合后水浴至沸腾, 取出冷却至室温, 用 1.0 mol/L NaOH 调节 pH 值至 8.0, 加入碱性蛋白酶, 在水浴锅中于 50 °C 恒温酶解, 并保持混合液的 pH 值恒定为 8.0, 酶解完成后将混合液在 95 °C 下灭酶 15 min, 待冷却后于 4 000 r/min 离心 20 min, 上清液真空冷冻干燥后得到青刺果抗氧化肽。

1.2.3 酶解液中总蛋白质含量的测定

蛋白含量的测定参照和丽等^[16]的方法, 取青刺果粕酶解上清液和质量分数 0.01% 的考马斯亮蓝染液以 1:5 (V/V) 混合; 同时用蒸馏水代替酶解上清液作空白对照。混合液于室温下静置 5 min 后在 595 nm 波长下测定吸光值; 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品绘制蛋白含量的标准曲线, 所得蛋白质标准曲线方程为: $y=0.635 5x+0.002 4$ ($R^2=0.992 2$), 通过样品吸光值计算样品总蛋白含量 (V_1)。

1.2.4 水解度 (DH) 的测定

水解度采用 OPA 方法^[17]进行测定, 将酶解液与 OPA 试剂以 1:40 (V/V) 的体积比混匀, 25 °C 孵化 8 min 后于酶标仪测定 340 nm 波长下的吸光度。以谷胱甘肽 (GSH) 作为标准品绘制肽含量的标准曲线, 所得肽含量标准曲线方程为: $y=0.002 4x+0.186 5$ ($R^2=0.994 5$), 根据标准曲线求样品中的肽含量 (V_2)。水解度按公式 (1) 计算:

$$B = \frac{V_2}{V_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B ——水解度 (DH), %;

V_1 ——样品蛋白质含量, mg/mL;

V_2 ——样品肽含量, mg/mL。

1.2.5 单因素实验设计

根据预实验结果分析, 酶质量分数、料液比、酶解时间三个因素对青刺果抗氧化肽的 DPPH 抗氧化活性影响均较大, 因此本实验主要考察酶质量分数 (2.5%、3.5%、4.5%、5.5%、6.5%)、料液比 (1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL)、酶解时间 (2.5、3.5、4.5、5.5、6.5 h) 3 个因素对青刺果抗氧化肽水解度及抗氧化活性的影响。

1.2.6 响应面实验设计

在单因素实验的基础上, 以酶质量分数 (A)、酶解时间 (B)、料液比 (C) 为自变量, 以青刺果抗氧化肽 DPPH 自由基清除率为响应值, 利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行三因素三水平的响应面实验。各因素水平及编码见表 1。

表 1 响应面实验因素水平表

Table 1 Response surface test factor level

水平	因素		
	A 酶质量分数/%	B 酶解时间/h	C 料液比 (g/mL)
-1	3.5	3.5	1:20
0	4.5	4.5	1:30
1	5.5	5.5	1:40

1.2.7 体外抗氧化活性的测定

1.2.7.1 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除率参照 Angelo 等^[18]的方法测定。将 100 μ L 不同质量浓度的青刺果抗氧化肽溶液加入到 100 μ L 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液中。同样, 通过向 100 μ L 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液中加入 100 μ L 去离子水, 平行制备空白实验组; 对照组以乙醇代替 DPPH 溶液。同时, 用不同浓度的抗坏血酸制备阳性对照。将上述溶液温育 10 min, 使用设定在 515 nm 的酶标仪测定其吸光度 (OD), 清除率按公式 (2) 进行计算:

$$R_1 = \frac{A_b - (A_s - A_c)}{A_b} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R_1 ——DPPH 自由基清除率, %;

A_s ——样品组吸光度;

A_b ——空白组吸光度;

A_c ——对照组吸光度。

1.2.7.2 ABTS⁺自由基清除能力的测定

ABTS⁺自由基清除能力的测定参照杨宗美等^[19]的方法, 稍作修改。将 25 μ L 不同质量浓度的样品溶液和 190 μ L ABTS⁺工作液混匀, 避光温育 5 min 后在 734 nm 波长处测定吸光度 (OD), 对照组以去离子水代替 ABTS⁺溶液, 空白组以去离子水替代样品溶液, 以 Vc 作对照, 清除率按公式 (3) 计算:

$$R_2 = \frac{A_b - (A_s - A_c)}{A_b} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

R_2 ——ABTS⁺自由基清除率, %;

A_s ——样品组吸光度;

A_b ——空白组吸光度;

A_c ——对照组吸光度。

1.2.7.3 羟基自由基清除能力的测定

羟基自由基清除能力的测定参照徐弦等^[20]的方法,稍作修改。取样品溶液、过氧化氢溶液(6 mmol/L)和硫酸亚铁溶液(6 mmol/L)按1:1:1(V/V/V)的体积依次加入到10 mL试管中,充分振荡,避光静置30 min后加入同体积的水杨酸醇溶液(6 mmol/L),振荡混匀后25℃下静置10 min于酶标仪在510 nm波长处测定吸光度(OD),空白组以去离子水代替样品溶液,对照组以蒸馏水代替水杨酸醇溶液,以Vc作对照,清除率按公式(4)计算:

$$R_3 = \frac{A_b + A_c - A_s}{A_b} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

R_3 ——羟基自由基清除率, %;

A_s ——样品组吸光度;

A_b ——空白组吸光度;

A_c ——对照组吸光度。

1.2.8 青刺果抗氧化肽对HepG 2细胞的毒性测定

参考吉正梅等^[21]的方法,稍作修改。将HepG 2细胞培养至对数生长期,加入质量分数为0.25%的胰蛋白酶消化后向其中加入含胎牛血清的DMEM培养基混合均匀获得单细胞悬液,然后接种于96孔板(每孔细胞密度为 5×10^4 个)在37℃培养箱中培养12 h,药物处理组分别加入1、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL的青刺果抗氧化肽溶液。同时以不加药物为对照组,以不接种细胞为空白组。每孔加入20 μ L的MTT溶液(5 mg/mL)避光反应4 h后吸出溶液并加入150 μ L DMSO振荡10 min,于酶标仪在570 nm波长处测定吸光度(OD)。细胞存活率按公式(5)计算:

$$R_4 = \frac{OD_s - OD_b}{OD_c - OD_b} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

R_4 ——细胞存活率, %;

OD_s ——样品处理组吸光度;

OD_b ——空白组吸光度;

OD_c ——对照组吸光度。

1.3 数据分析

本文所有实验均重复三次,利用IBM SPSS

Statistics 23、Design-Expert 8.0.6对数据进行统计学分析,用GraphPad Prism 8进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 酶质量分数对水解度及DPPH自由基清除率的影响

水解度为制备多肽的首要评价指标,在高水平的水解度下多肽含量也会增加^[22]。在蛋白酶的作用下,蛋白质会产生不同分子量的肽片段,而肽段分子量越小越容易被人体吸收,其生物活性也越高^[23]。由图1可知,水解度和DPPH自由基清除率随着酶质量分数增加均呈现先增加后减少的趋势。当酶质量分数为4.5%时,其水解度和DPPH自由基清除率达到最大,分别为6.45%、60.36%。可能该酶质量分数下酶与底物的接触的面积最大,水解更加充分,产生了大量的小分子肽,增加了其抗氧化活性^[24]。当酶质量分数过低时,酶不足以与底物反应,导致反应不充分,分解的肽含量较低;当酶质量分数过高时,会抑制酶解中间产物转化为酶解终产物,意味着酶解产物的活性会下降^[25],因此,综合考虑选择最适酶质量分数为4.5%。

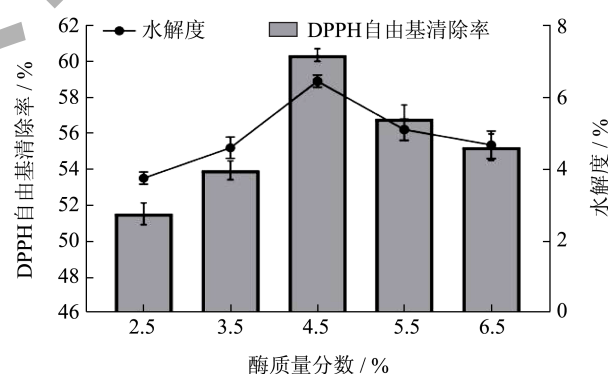


图1 酶质量分数对水解度及DPPH自由基清除率的影响

Fig.1 Effect of enzyme mass fraction on degree of hydrolysis and DPPH free radical scavenging rate

2.1.2 酶解时间对水解度及DPPH自由基清除率的影响

酶解时间不同,获得的酶解产物在结构上和肽链的长度上存在差异,从而使肽的生物活性发生变化。由图2可知,当酶解时间为4.5 h时,水解度和DPPH自由基清除率达到最大,分别为13.37%、58.34%,少于或多于4.5 h,水解度和清除率均出现降低的现象。其可能得原因是,酶解时间越长,得

到的具有抗氧化活性的肽类物质就越多,当酶解时间过度,部分抗氧化肽进一步会被水解生成不具有抗氧化活性的短肽或游离氨基酸,其活性也随之降低^[26]。因此,综合考虑选择最适酶解时间为4.5 h。

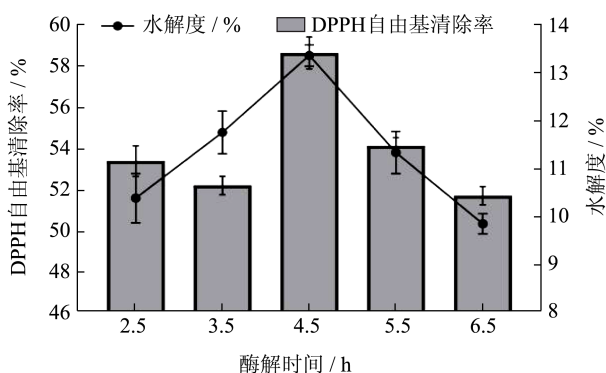


图2 酶解时间对水解度及 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 Effect of enzymatic time on degree of hydrolysis and DPPPH free radical scavenging rate

2.1.3 料液比对水解度及DPPH自由基清除率的影响

由图3可知,料液比在1:10~1:50(g/mL)范围内,水解度和DPPH自由基清除活性呈现先上升后下降的趋势,这可能是因为在一定的水分含量范围内底物浓度的增加提高了酶与底物结合的几率,从而加速酶解反应进程^[27],而当水分含量达到饱和时,继续增加溶剂会导致底物浓度变低,减少了酶与底物接触几率,从而抑制酶解反应的进行^[28]。在料液比1:30(g/mL)时,水解度和DPPH自由基清除率均达到最大值,分别为20.88%、61.03%。因此,综合考虑选择最适料液比为1:30(g/mL)。

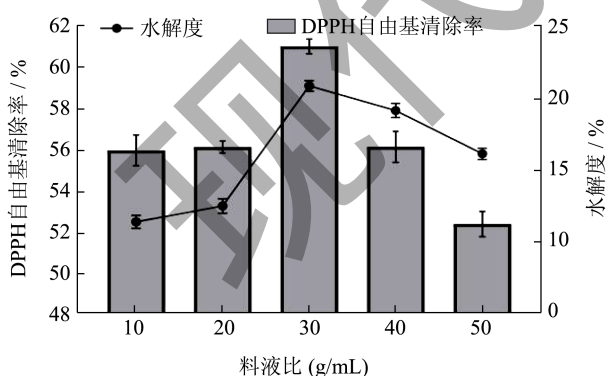


图3 料液比对水解度及 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 Effect of solid liquid ratio on degree of hydrolysis and DPPPH free radical scavenging rate

2.2 响应面优化酶解制备工艺

2.2.1 响应面试验设计及结果分析

利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面实验设

计,结果见表2,并对实验数据进行方差分析(表3)得到其回归方程为: $Y=59.59+0.86A+0.71B+0.72C+1.15AB+1.55AC-1.14BC-4.79A^2-4.14B^2-5.85C^2$ 。该模型 $P<0.01$, 具有极高的显著性,且失拟项 $P=0.5638>0.05$, $R^2_{Adj}=0.9357$, 说明该模型的拟合度较好、可信度高,能够对青刺果抗氧化肽的酶解工艺进行较好的分析和预测。 F 值可以反映各因素的影响程度, F 值越大影响越明显,由表3可知 $F(A)=3.74$, $F(B)=2.56$, $F(C)=2.62$, 因此各因素对青刺果酶解物 DPPH 自由基清除率的主次顺序为: A (酶质量分数) > C (料液比) > B (酶解时间)。

表2 响应面实验设计方案及结果

Table 2 Experimental design with response variable for response surface analysis

试验号	A 酶质量分数/%	B 酶解时间/h	C 料液比 (g/mL)	DPPH 自由基清除率/%
1	5.5	4.5	1:20	48.23
2	3.5	4.5	1:20	48.46
3	4.5	3.5	1:20	47.32
4	4.5	4.5	1:30	60.13
5	3.5	3.5	1:30	50.41
6	4.5	4.5	1:30	59.46
7	4.5	3.5	1:40	51.27
8	5.5	3.5	1:30	48.67
9	4.5	5.5	1:40	49.61
10	3.5	5.5	1:30	50.34
11	3.5	4.5	1:40	46.56
12	4.5	4.5	1:30	57.46
13	4.5	4.5	1:30	59.87
14	4.5	4.5	1:30	61.03
15	5.5	5.5	1:30	53.21
16	5.5	4.5	1:40	52.54
17	4.5	5.5	1:20	50.21

2.2.2 各因素交互作用分析

应用 Design-Expert 8.0.6 绘制三维立体图及等高线图,可以直观地反映各因素对 DPPH 自由基清除率的影响。各因素对酶解物 DPPH 自由基清除率的响应面图及等高线图见图4。三维立体图越平缓,说明因素之间影响不显著,反之说明具有显著差异。等高线图轮廓的形状越接近椭圆,则交互作用越

强，轮廓线沿自变量所在的轴的变化越大，则此变量相较另一变量对 DPPH 自由基清除率的影响程度越大^[29]。由图可看出，酶质量分数 (A)、酶解时间 (B)、料液比 (C) 三者两两交互作用的响应面坡度变化较陡，而等高线图近似圆形，说明三者对 DPPH 自由基清除率有显著影响，但两两交互作用不明显。

表 3 回归模型方差分析表

Table 3 Variance analysis of the developed quadratic regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	382.93	9	42.55	26.86	<0.000 1	**
A	5.92	1	5.92	3.74	0.094 5	
B	4.06	1	4.06	2.56	0.153 4	
C	4.15	1	4.15	2.62	0.149 7	
AB	5.31	1	5.31	3.35	0.109 7	
AC	9.64	1	9.64	6.09	0.043 0	*
BC	5.18	1	5.18	3.27	0.113 6	
A ²	96.76	1	96.76	61.08	0.000 1	**
B ²	72.12	1	72.12	45.53	<0.000 3	**
C ²	144.03	1	144.03	90.93	<0.000 1	**
残差	11.09	7	1.58			
失拟项	4.09	3	1.36	0.78	0.563 8	
纯误差	7.00	4	1.75			
总和	394.02	16				
$R^2=0.971 9$		$R^2_{Adj}=0.935 7$				

注 * 表示影响显著 ($P<0.05$); ** 表示影响极显著 ($P<0.01$)。

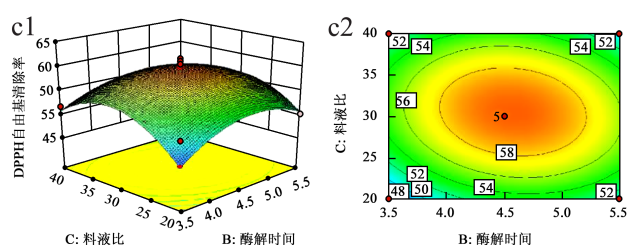
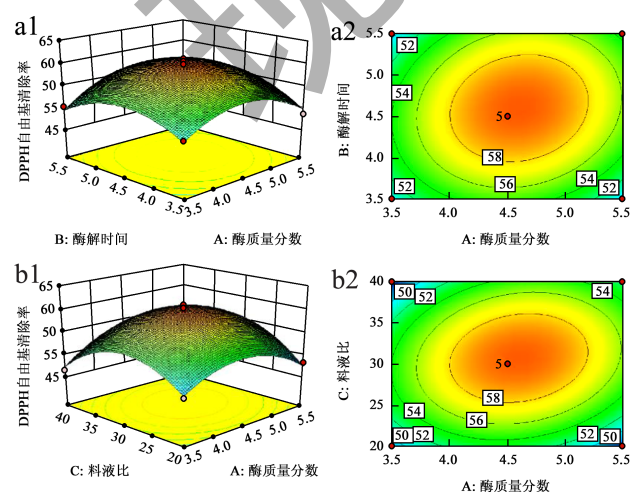


图 4 各因素交互作用对 DPPH 自由基清除率影响的响应面及等高线图

Fig.4 Response surface and contour plots of the effect of the interaction of various factors on the scavenging rate of DPPH radicals

2.2.3 最佳条件的确定及回归模型的验证

经 Design-Expert 8.0.5.0 软件分析可得最佳工艺条件如表 4 所示。酶质量分数 (A) 为 4.61%、酶解时间 (B) 为 4.59 h、料液比 (C) 为 1:30.68 (g/mL)，DPPH 自由基清除率为 59.69%。考虑到可操作性实践和设备条件，将最佳酶解条件调整为：酶质量分数 (A) 4.6%、酶解时间 (B) 4.6 h、料液比 (C) 1:31 (g/mL)，并进行三次平行实验验证，得到 DPPH 自由基清除率为 58.34%，与预测值之间相差 5% 以内，表明由响应面优化工艺得到的最佳酶解条件较为可靠。

表 4 最佳条件的确定和回归模型的验证

Table 4 Determination of optimal conditions and validation of regression models

因素	最优选择	实验验证
酶质量分数/%	4.61	4.6
酶解时间/h	4.59	4.6
料液比(g/mL)	1:30.68	1:31
DPPH 自由基清除率/%	59.69	58.34

2.3 青刺果粕抗氧化肽的体外抗氧化活性分析

2.3.1 DPPH 自由基清除能力

由图 5 可知，随着青刺果抗氧化肽质量浓度的增加，DPPH 清除活性也随之增加，在质量浓度为 0.9 mg/mL 时 DPPH 清除率达到最大为 76.46%。根据从植物中提取抗氧化肽对 DPPH 自由基的清除能力来看，大豆乳清蛋白肽清除率为 62.30%^[30]，草菇抗氧化肽的 DPPH 自由基清除率为 69.85%^[31]，鹰嘴豆抗氧化肽的清除率为 43.71%^[32]，对比结合本实验的青刺果抗氧化肽的 DPPH 自由基清除率，可以说明其具有较好的抗氧化活性。

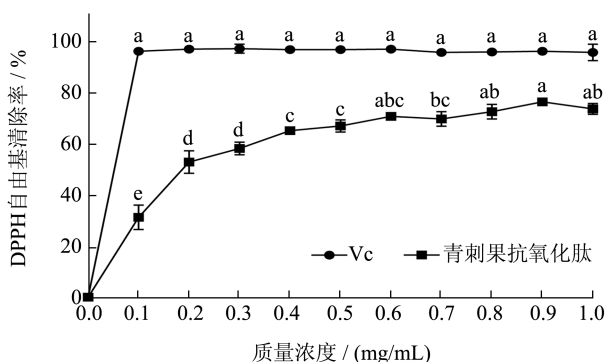


图5 不同质量浓度下青刺果抗氧化肽的 DPPH 自由基清除能力

Fig.5 DPPH radical scavenging ability of antioxidant peptides of *Prinsepia utilis* Royle at different mass concentrations

注：图中不同小写字母表示组间存在显著性差异， $P < 0.05$ 。下图同。

2.3.2 ABTS⁺自由基清除能力

由图6可知，与Vc相比，青刺果抗氧化肽对ABTS⁺自由基有较好的清除能力，其清除能力随肽质量浓度的增加而增加，在青刺果抗氧化肽质量浓度为0.9 mg/mL时，对ABTS⁺的清除率相接近于Vc，达到94.22%，之后便趋于稳定。王惠敏等^[33]在亚麻籽粕抗氧化肽的制备研究中，在最佳酶解工艺条件下制备的酶解产物的ABTS⁺自由基清除率为88.11%。由此可以说明本研究所制备的酶解物具有较好的ABTS⁺自由基清除能力。

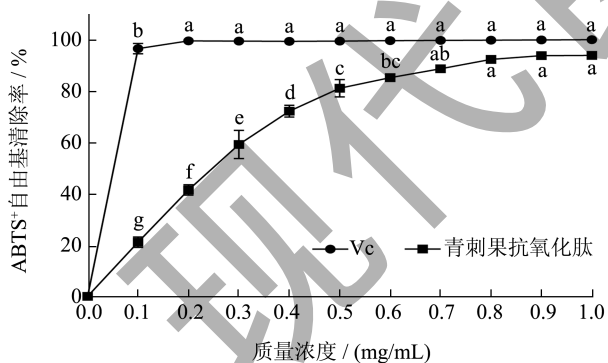


图6 不同质量浓度下青刺果抗氧化肽的 ABTS⁺ 自由基清除能力

Fig.6 ABTS⁺ radical scavenging ability of antioxidant peptides of *Prinsepia utilis* Royle at different mass concentrations

2.3.3 羟基自由基清除能力

羟基自由基是一种具有较强氧化能力，对人体能产生极大伤害的自由基，清除羟基自由基能力可以反应样品抗氧化活性的强弱^[34]。如图7所示，Vc和青刺果抗氧化肽在0.1~0.5 mg/mL质量浓度范围

内对羟基自由基清除率明显上升 ($P < 0.05$)。当质量浓度超过0.5 mg/mL后Vc对羟基自由基的清除率接近100%，而青刺果抗氧化肽在质量浓度超过0.5 mg/mL时对羟基自由基的清除率无明显变化，质量浓度为0.8 mg/mL时，羟基自由基的清除率最大为75.07%。宁芯等^[34]在苜蓿蛋白酶解物抗氧化活性的研究中，当酶解物的浓度达到15 mg/mL时，羟基自由基的清除率才高达40.11%。由此可见，该研究在最佳酶解工艺条件下制备的酶解物具有较好的抗氧化活性。

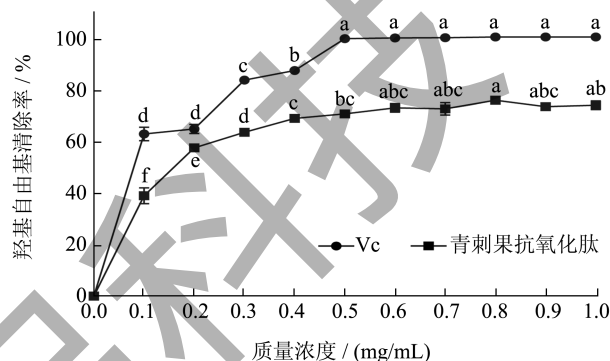


图7 不同质量浓度下青刺果抗氧化肽的羟基自由基清除能力
Fig.7 Hydroxyl radical scavenging ability of antioxidant peptides of *Prinsepia utilis* Royle at different mass concentrations

2.4 青刺果抗氧化肽对HepG 2细胞的抑制作用

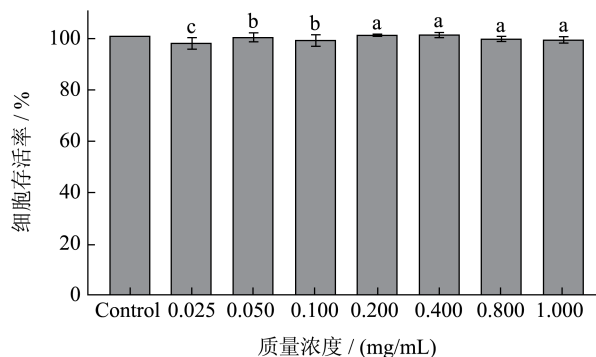


图8 青刺果抗氧化肽的细胞毒性实验结果

Fig.8 Results of cytotoxicity experiments of antioxidant peptides of *Prinsepia utilis* Royle

MTT 比色法是一种非常经典的检测细胞存活和生长的方法，该方法已广泛用于生物活性因子的活性检测、药物筛选和细胞毒性试验等^[35]。青刺果粕抗氧化肽在不同质量浓度下对 HepG 2 细胞活性的影响如图8所示，随着青刺果粕抗氧化肽质量浓度的增加，对 HepG 2 细胞存活率影响不大，HepG 2 细胞经样品处理 24 h 后，细胞存活率仍在 90% 以上。

说明青刺果粕抗氧化肽在质量浓度 ≤ 1 mg/mL时对细胞的生长无毒性作用。

3 结论

本研究通过响应面法优化青刺果抗氧化肽酶解物的最佳工艺条件为：酶质量分数4.6%、酶解温度60℃、料液比1:31(g/mL)，在此酶解条件下DPPH自由基清除率达58.34%。并对青刺果抗氧化肽的抗氧化活性进行了研究，结果表明，其对DPPH自由基、ABTS⁺自由基和羟基自由基的清除能力最高分别为76.46%、94.22%和73.02%；此外，还对青刺果抗氧化肽的毒性进行分析，MTT实验结果表明青刺果抗氧化肽在质量浓度 ≤ 1 mg/mL时对细胞的生长无毒性作用。综上所述，通过酶解法制备的青刺果抗氧化肽具有较好的抗氧化活性和无细胞毒性作用，为青刺果粕抗氧化肽的开发利用提供了参考价值。

参考文献

- [1] 和琼姬,和加卫,王宇萍,等.青刺果研究概述[J].中国农学通报,2016,32(7):74-78.
- [2] 鲁丽梅,和泽伟.丽江发展高原特色青刺果产业现状及对策[J].绿色科技,2017,5:73-75.
- [3] 张瑞琳.抗氧化青刺果果实蛋白应用生物化学作用特性与青刺果油制品的研究[D].上海:上海海洋大学,2018.
- [4] CHAUHAN K, TRIPATHI Y C, VARSHNEY V K. *Princepia utilis* Royle: A review on its traditional uses, phytochemistry, and biological activities [J]. *Phytochemistry Letters*, 2023, 55: 44-55.
- [5] 夏海梅,何鹏飞,李艳萍,等.青刺果生物活性及应用研究概况[J].云南中医中药杂志,2018,39(12):86-87.
- [6] 张璇.青刺果酚类物质组成及其生物活性研究[D].昆明:昆明理工大学,2019.
- [7] 朱薪,康山明,张天雄,等.青刺果抗菌肽组分的分离及其稳定性分析[J].中国油脂,2024,49(2):42-46.
- [8] 高凡丁,张成庭,蔡圣宝.青刺果种子和油粕中的营养成分对比及酚类物质组成和抗氧化活性分析[J].食品与发酵工业,2019,45(2):151-158.
- [9] 陈丽娜,温宇旗,韩国庆,等.生物活性肽制备工艺的研究进展[J].农产品加工,2018,17:57-62.
- [10] 马建伟.羊肚菌蛋白抗氧化肽的制备及抗运动疲劳活性研究[J].中国酿造,2023,42(9):163-169.
- [11] LI L, ZHANG P X, HAN P C, et al. Process of the preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of yak hide protein [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(24): 188-196.
- [12] CAI L Y, WU X S, ZHANG Y H, et al. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 16(3): 234-242.
- [13] 张靖,苏琳,陈晓雨,等.羊骨抗氧化肽酶解法制备和响应面工艺优化[J].食品与生物技术学报,2021,40(3):18-27.
- [14] 孙显慧,卜令娜,张爱英,等.豆渣蛋白的提取及在韧性饼干中的应用研究[J].粮食与食品工业,2022,29(2):20-24.
- [15] 于丽颖.花生抗氧化肽的制备、分离纯化及其缓解小鼠疲劳活性研究[D].长春:吉林农业大学,2021.
- [16] 和丽,熊海涛,王雪峰,等.响应面法优化复合酶法制备青刺果抗菌肽的工艺研究[J].中国油脂,2021,46(6):33-37.
- [17] VASQUEZVILLANUEVA R, MARINA M L, GARCIA M C, et al. Revalorization of a peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) byproduct: extraction and characterization of ACE-inhibitory peptides from peach stones-Science Direct [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 137-146.
- [18] ANGELO A F B, KARIME C M, JAMES T T, et al. Antioxidant activity of aqueous extracts of roasted bean seeds of *Coffea canephora* Rubiaceae [J]. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 2022, 9(2): 63-68.
- [19] 杨宗美,王飞,李媛,等.酚类化合物体外自由基清除能力的研究[J].广东化工,2022,49(13):40-43.
- [20] 徐弦,安兆祥,李晓明,等.柑橘皮蛋白质提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2021,42(16):154-162.
- [21] 吉正梅,张晓春,彭钰迪,等.鸭胚源抗氧化肽TD12对HepG2细胞氧化应激损伤的保护作用[J].食品与发酵工业,2021,47(18):141-148.
- [22] 祝超智,温耀涵,许龙,等.牛血红蛋白肽的酶解工艺优化及其亚铁螯合物结构、稳定性研究[J].食品工业科技,2024,45(8):75-87.
- [23] 胡武瑶,黄晶,黄莹,等.基于主要成分分析不同大米肽的品质与综合评价[J].食品工业,2023,44(1):289-295.
- [24] ZHANG J, LI G, DANG Y, et al. Study on the antioxidant activity of peptide isolated from porcine plasma during *in vitro* digestion [J]. *Food Bioscience*, 2021, 42(2):101069.
- [25] 王惠敏,李茜,蔡甜甜,等.亚麻籽粕抗氧化肽制备工艺的响应面法优化[J].食品工业科技,2018,39(3):220-225.
- [26] 邵志芳,皇甫洁,刘文颖,等.基于乳清蛋白粉水解产物抗氧化活性优化酶解工艺[J].食品工业科技,2020,41(18):143-149,156.
- [27] 张杨,胡磊,汪少芸,等.响应面法优化酶解法制备蒲公英籽蛋白抗氧化肽工艺[J].食品工业科技,2016,37(5):258-262.
- [28] 游庆红,陈梅琳,赵增东,等.响应面法优化酶解草菇蛋白制备抗氧化肽工艺[J].食品研究与开发,2022,43(4):149-157.
- [29] 邓放明,李罗明,尹华,等.碎鲜辣椒发酵制品发酵用乳酸菌的选育与接种发酵试验[J].食品科学,2005,26(3):83-86.
- [30] 林彦君,刘杨静,曲肖凤,等.酶解大豆乳清蛋白制备抗氧化肽及其体外抗氧化活性评价[J].食品工业科技,2023,44(20):230-238.
- [31] 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.
- [32] 梁雪荣.鹰嘴豆抗氧化肽的分离纯化、结构鉴定及复合饮料的研制[D].石河子:石河子大学,2023.
- [33] 王惠敏,李茜,蔡甜甜,等.亚麻籽粕抗氧化肽制备工艺的响应面法优化[J].食品工业科技,2018,39(3):220-225.
- [34] 宁芯,罗志辉,墨紫梅,等.响应面法优化莜麦蛋白的酶解工艺及酶解物抗氧化活性的研究[J].粮食与饲料工业,2019,6:25-29.
- [35] 高阳.CDC20和RRM1基因在人结肠直肠癌辐射敏感性调控中的作用[D].合肥:中国科学技术大学,2021.