

酶法制备元蘑蛋白肽及其分级组分 抗氧化活性研究

Preparation and antioxidant activity of protein peptides by
enzymatic from *Hohenbuehelia serotina*

栗铭鸿¹ 姜伊悦¹ 张小勇² 崔福顺^{1,2}

LI Ming-hong¹ JIANG Yi-yue¹ ZHANG Xiao-yong² CUI Fu-shun^{1,2}

(1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学食品研究中心, 吉林 延吉 133002)

(1. Agricultural College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China;

2. Food Research Center of Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China)

摘要: 研究风味蛋白酶制备元蘑蛋白肽的工艺条件, 并分析蛋白肽分级组分氨基酸组成、红外结构及体外抗氧化活性。以水解度和 DPPH· 清除率为指标, 在单因素试验基础上通过响应面法优化元蘑蛋白肽酶解条件; 将元蘑蛋白肽按分子量大小分级为 P₁ (<3.5 kDa)、P₂ (3.5~10.0 kDa) 及 P₃ (>10.0 kDa); 分析 3 个组分氨基酸组成、红外光谱特征; 分析 DPPH·、ATBS⁺·、·OH 等清除作用以及体外模拟胃肠消化作用。结果表明: 风味蛋白酶制备元蘑蛋白肽的最佳条件为 pH 7.6、酶解时间 3.0 h、酶解温度 42 ℃; 3 个组分中总氨基酸含量最高以及综合抗氧化效果最好的为大分子量的 P₃ 组分 (P<0.05); 3 个组分红外光谱峰形基本一致; 通过体外模拟胃肠后 3 个组分活性基本没有变化。通过风味蛋白酶酶解并分级可以制得氨基酸含量丰富、性能稳定并具有较好抗氧化作用的元蘑蛋白肽; 元蘑蛋白肽分子量越大, 抗氧化效果越好。

关键词: 元蘑; 蛋白质; 氨基酸; 蛋白肽; 结构; 抗氧化

Abstract: To prepare protein peptides from *Hohenbuehelia serotina* by enzymatic method, the composition of amino acids, structure and biological activity of protein peptide were analyzed. Proteolytic enzymes were selected with hydrolysis degree and DPPH scavenging rate to optimize the enzymatic hydrolysis conditions by response surface methodology. The protein peptides from *Hohenbuehelia serotina* was classified to P₁ (<3.5 kDa), P₂ (3.5~10.0 kDa) and P₃ (>10.0 kDa), which were analyzed to get the

amino acid composition and infrared spectral signature. The antioxidant activity was evaluated by using DPPH, ABTS, OH reduction capacity of free radicals scavenging activity and in vitro simulation of gastrointestinal digestion was also studied. The best hydrolysis conditions as follows: pH 7.6, the reaction time 3.0 h and temperature 42 ℃. The protein peptide P₃ (P<0.05) had the highest content of total amino acids and the best antioxidant effect. The infrared spectrum peaks of the three components were similar. The activity of the three components did not changed after simulated gastrointestinal digestion. The protein peptides of *Hohenbuehelia serotina* prepared by enzymatic method are abundant of amino acid, good stability and antioxidant activity. The higher the molecular weight of peptide, the better its antioxidant effect is.

Keywords: *Hohenbuehelia serotina*; protein; amino acid; protein peptides; structure; antioxidant

中国食用菌资源丰富, 是食用菌生产大国, 产量占世界首位; 总产值在国内种植业中居第 6 位。食用菌含有丰富的蛋白质, 可与肉、蛋以及豆类相媲美。肽类是介于蛋白质与氨基酸之间的一种生化物质, 分子量比蛋白质小, 更易被胃肠吸收而具有更多生物活性。食用菌源蛋白肽类的制备、理化性质及其免疫调节、抗氧化等功能活性已成为当前研究热点^[1-4]; 并已应用到功能保健食品以及医药等领域^[5-6]。研究^[7-8]也证实, 肽类的功能活性依赖于其分子量大小、氨基酸组成及氨基酸排列顺序等。

元蘑是中国东北著名食用菌之一, 味道鲜美, 营养丰富。元蘑中含有蛋白质、维生素、氨基酸等营养物质; 还含有酚类、多糖等活性成分; 具有抗氧化、抗癌、抗辐射等功效作用^[9]。目前国内外对元蘑的研究主要集中在元蘑

基金项目: 吉林省教育厅项目 (编号: 吉教科合字[2013]第 8 号)

作者简介: 栗铭鸿, 女, 延边大学在读硕士研究生。

通信作者: 崔福顺 (1966—), 女, 延边大学副教授, 硕士。

E-mail: 1441782215@qq.com

收稿日期: 2019-08-08

多糖的提取、结构以及生物活性^[10-12],而对元蘑蛋白的研究鲜见报道。

课题组^[13]前期研究发现元蘑中含有多种生物活性成分,具有很好的抗氧化作用。试验拟以元蘑为原料,研究风味蛋白酶酶解制备元蘑蛋白肽工艺条件,并分析蛋白肽分级组分的氨基酸组成、红外特征及其体外抗氧化活性,为高值化元蘑蛋白产品的开发及综合利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

元蘑:购于吉林延吉;

风味蛋白酶:酶活 1:30 000,北京索莱宝科技有限公司;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、过硫酸钾、丁基羟基茴香醚(BHA):分析纯,美国 Sigma 公司;

β -巯基乙醇:纯度 $\geq 99.0\%$,卡迈舒(上海)生物科技有限公司;

其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

离心机:TDZ5-WS 型,湘仪离心机仪器有限公司;

氨基酸自动分析仪:L-8900 型,日本日立集团;

傅里叶红外光谱仪:IRTracer-100 型,日本岛津有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 蛋白质水解度 DH 测定 参照文献^[14]。

1.3.2 元蘑蛋白质提取液制备 准确称取脱脂元蘑,以料液比 1:80 (g/mL)利用 0.07 mol/L NaOH 超声提取 40 min,提取温度 50 °C,超声功率 250 W;过滤后滤液用盐酸调至 pH 4.0,4 000 r/min 离心 20 min;沉淀用蒸馏水复溶制得元蘑蛋白溶液,作为后续元蘑蛋白肽制备原液^[15]。

1.3.3 酶解制备元蘑蛋白肽单因素试验 在预试验基础上选择风味蛋白酶为水解用酶。以水解度和 DPPH·清除率为指标进行单因素考察。

(1) 温度对元蘑蛋白酶解效果的影响:固定 pH 7.0、风味蛋白酶添加量 5 000 U/g 以及酶解时间 4.0 h,考察温度分别为 40,45,50,55,60 °C 条件下的酶解效果。

(2) pH 值对元蘑蛋白酶解效果的影响:固定酶解温度 50 °C、风味蛋白酶添加量 5 000 U/g 以及酶解时间 4.0 h,考察 pH 7.0,7.5,8.0,8.5,9.0 条件下的酶解效果。

(3) 酶解时间对元蘑蛋白酶解效果的影响:固定酶解温度 50 °C、pH 7.0 以及风味蛋白酶添加量 5 000 U/g,考察酶解时间分别为 2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 h 条件下的酶解效果。

(4) 加酶量对元蘑蛋白酶解效果的影响:固定酶解温度 50 °C、pH 7.0 以及酶解时间 4.0 h,考察风味蛋白酶添加量分别为 3 000,4 000,5 000,6 000,7 000 U/g 条件下的酶解效果。

1.3.4 响应面优化酶解制备元蘑蛋白肽工艺 在单因素试验的基础上,以 DPPH·清除率为响应值,选择影响相对较大的因素,采用 Box-Behnken 进行响应面试验设计,优化酶解制备元蘑蛋白肽工艺条件。

1.3.5 元蘑蛋白肽分级 将元蘑酶解制得的酶解液在 3.5,10.0 kDa 透析袋中透析,收集 3 个组分,标记为 P₁(<3.5 kDa)、P₂(3.5~10.0 kDa)及 P₃(>10.0 kDa),分别冷冻干燥,制得元蘑蛋白肽 3 个分级组分。

1.3.6 氨基酸组成分析 称取样品置于水解管,加入 6 mol/L HCl 溶液,真空封口,110 °C 水解 24 h 后定容;取 1 mL 在 100 °C 水浴蒸干,加 2.5 mL 0.02 mol/L HCl 溶解后进样测定。

1.3.7 傅里叶红外光谱分析 称取样品 2 mg,以质量比 1:100 加入溴化钾混合研磨压片。红外光谱采集分析软件为 LabSolutions IR,扫描 50 次,分辨率 0.25 cm⁻¹,信噪比 60 000:1,波数范围 4 500~450 cm⁻¹。

1.3.8 抗氧化活性测定 DPPH·清除能力、ABTS⁺·清除能力、·OH 清除能力和相对还原能力的测定参照文献^[13]^[11-12]。利用模糊数学的隶属函数值法进行抗氧化综合评价^[16]。

1.3.9 模拟人工胃肠液对蛋白肽的影响 将元蘑蛋白肽配成 0.05 mg/mL 溶液,煮沸 2 min,冷却后用 1 mol/L 的盐酸溶液调至 pH 2.0,加入胃蛋白酶(占底物质量的 4%),37 °C 恒温反应 1 h;用 0.9 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液将 pH 值调至 5.3,再用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至 7.0,加入胰蛋白酶(占底物质量的 4%),37 °C 恒温反应 2.0 h,10 min 沸水浴终止反应,冷却后取上清液,测定其 DPPH·清除率并代入式(1)计算活性保留率^[17-19]。

$$B = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

B——活性保留率,%;

A₁——不同条件处理后样品的清除率,%;

A₀——蛋白肽原液的清除率,%。

1.3.10 数据处理 采用 SPSS 20.0 软件进行方差分析并进行 LSD 多重比较分析;红外光谱图采用 Origin 6.1 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 元蘑蛋白酶解响应面优化

在单因素试验结果基础上,固定加酶量 6 000 U/g,选择 pH、酶解时间和酶解温度 3 个因素,采用 Box-Behnken 进行三因素三水平响应面试验设计,编码及水平

见表 1, 试验设计与结果见表 2。

采用 Design-Expert 10 软件对数据进行回归拟合, 得到模型方程:

$$Y = 26.898 - 1.464A + 0.488B - 1.157C + 0.445AB - 0.114AC + 1.376BC - 1.946A^2 - 2.427B^2 - 1.176C^2. \quad (2)$$

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of RSM analysis

水平	A pH	B 酶解时间/h	C 酶解温度/℃
-1	7.0	2.0	40
0	8.0	3.0	45
1	9.0	4.0	50

表 2 试验设计与结果

Table 2 The experimental design and results

序号	A	B	C	清除率/%
1	-1	-1	0	23.94
2	1	1	0	22.00
3	-1	0	-1	25.75
4	0	1	-1	24.70
5	1	-1	0	20.73
6	0	-1	1	19.15
7	1	0	1	21.58
8	0	1	1	23.47
9	-1	1	0	23.44
10	0	-1	-1	25.88
11	0	0	0	26.26
12	0	0	0	26.31
13	1	0	-1	22.45
14	0	0	0	27.60
15	-1	0	1	25.33
16	0	0	0	27.60
17	0	0	0	26.72

由表 3 可知, 建立的二项多项模型极显著; 失拟项不显著; 相关系数 $R^2 = 0.911$, 说明此模型可以很好地拟合试验结果。显著性表明, 一次项 A 极显著, C 显著, B 不显著; 二次项 A^2 和 B^2 极显著, C^2 不显著; 交互项 BC 显著, AB 和 AC 不显著。表明响应值的变化较复杂, 各个试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系; 影响的大小顺序依次为 $A > C > B$ 。

图 1 为 3 个因素影响 DPPH· 清除能力的响应面和等值线图。通过软件分析得到的最佳酶解条件为 pH 7.60, 酶解时间 2.90 h, 酶解温度 42.39 °C, DPPH· 清除率理论值可达 27.45%。为了验证上述最佳条件, 同时考虑操作可行性, 选择酶解条件为: pH 7.6, 酶解时间

表 3 统计分析结果

Table 3 Regression analysis and results

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P>F	备注
模型	89.582	9	9.954	7.952	0.006	极显著
A	17.072	1	17.072	13.638	0.008	极显著
B	1.908	1	1.908	1.524	0.257	
C	10.702	1	10.702	8.550	0.022	显著
AB	0.791	1	0.791	0.632	0.453	
AC	0.052	1	0.052	0.041	0.844	
BC	7.578	1	7.578	6.054	0.043	显著
A^2	15.945	1	15.945	12.738	0.009	极显著
B^2	24.799	1	24.799	19.811	0.003	极显著
C^2	5.821	1	5.821	4.650	0.068	
残差	8.762	7	1.252			
失拟误差	6.978	3	2.326	5.216	0.072	不显著
纯误差	1.784	4	0.446			
总和	98.345	16				

3.0 h, 酶解温度 42 °C, 验证实验 ($n = 3$) 得到的 DPPH· 清除率为 26.85%, 与理论值基本吻合。

2.2 氨基酸组成分析

由表 4 可以看出, 元蘑蛋白肽 3 个组分中均含有 16 种氨基酸, 其中含有 7 种必需氨基酸(色氨酸未测); 都不含有半胱氨酸。同时, 3 个组分中谷氨酸、脯氨酸和天冬氨酸相对丰富, 这些氨基酸参与蛋白质的代谢过程, 有助脑部发育以及增强肝脏功能、降低血压等。与 FAO 推荐标准相比, 组分 P_3 中苯丙氨酸和苏氨酸含量高于 FAO 推荐标准; 缬氨酸、亮氨酸和赖氨酸含量与之相当, 这些氨基酸具有改善记忆力和预防脂肪肝的作用^[20]。葛晓鸣等^[7]研究发现酶解肽的分子量大小不同时氨基酸组成也不同, 抗氧化能力也不同。由表 4 还可以看出, 元蘑蛋白肽 3 个组分中组分 P_3 的总氨基酸和必需氨基酸含量最高, 显著高于 ($P < 0.05$) 组分 P_1 和组分 P_2 。因此, 可以推测 3 个组分的抗氧化作用也会存在差异。

2.3 红外光谱分析

由图 2 可看出, P_1 、 P_2 和 P_3 的峰形和出峰位置基本一致, 说明三者具有同样的官能团; 3414 cm^{-1} 处的极强吸收峰可能是 N—H 伸缩振动峰, 属伯胺的特征吸收; 2929 cm^{-1} 处的吸收峰可能是 CH_2 非对称性伸缩振动, 属于酰胺 B 带; 2368 cm^{-1} 可能是三键和累积二键伸缩振动的吸收峰; 1637 cm^{-1} 处的强吸收峰可能是酰胺 I 带 ($\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动) 的 β 折叠, 酰胺 I 带特征峰由多肽骨架的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动在特定的氢键环境下引起的, 其对二级结构变化十分敏感, 是描述蛋白质二级结构的最主要峰^[21]; 1404 cm^{-1} 处的吸收峰可能是 C—N 伸缩振动峰, 属酰胺 III 带; 1249 cm^{-1} 处的吸收峰可能属于蛋白质红外

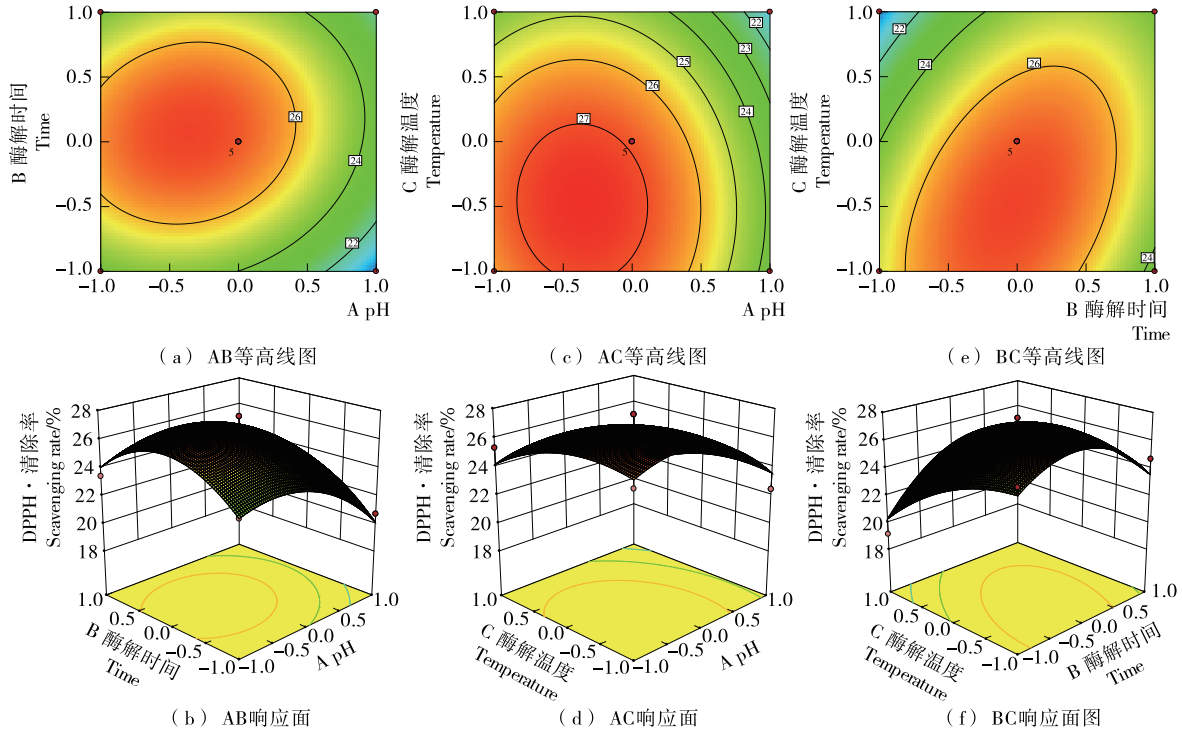


图1 响应面及等值线图

Figure 1 Response surface and contour map

表4 氨基酸组成[†]

Table 4 The composition of amino acid

氨基酸	mg/100 mg			FAO 推荐标准
	P ₁	P ₂	P ₃	
天冬氨酸	3.610 ^b	2.770 ^c	9.384 ^a	2.8
苏氨酸	2.062 ^c	2.405 ^b	4.430 ^a	
丝氨酸	1.964 ^c	2.095 ^b	4.348 ^a	
谷氨酸	5.324 ^c	6.005 ^b	10.529 ^a	
甘氨酸	1.680 ^c	1.755 ^b	3.523 ^a	
丙氨酸	2.188 ^c	2.200 ^b	3.864 ^a	
半胱氨酸	—	—	—	
缬氨酸	2.672 ^b	2.599 ^c	3.668 ^a	
甲硫氨酸	0.690 ^b	0.746 ^b	1.380 ^a	
异亮氨酸	1.754 ^b	1.558 ^c	2.320 ^a	
亮氨酸	2.501 ^b	2.115 ^c	3.279 ^a	
酪氨酸	2.092 ^b	1.862 ^c	3.776 ^a	
苯丙氨酸	2.251 ^b	1.631 ^c	3.128 ^a	
赖氨酸	2.257 ^b	1.818 ^c	3.865 ^a	
组氨酸	0.999 ^b	0.805 ^b	1.784 ^a	
精氨酸	1.187 ^b	1.187 ^b	2.232 ^a	
脯氨酸	8.575 ^b	8.129 ^b	10.208 ^a	
必需氨基酸含量	14.187 ^b	12.872 ^b	22.070 ^a	
总氨基酸含量	41.806 ^b	39.680 ^b	71.718 ^a	

[†] 同行字母不同表示差异显著(P<0.05)。

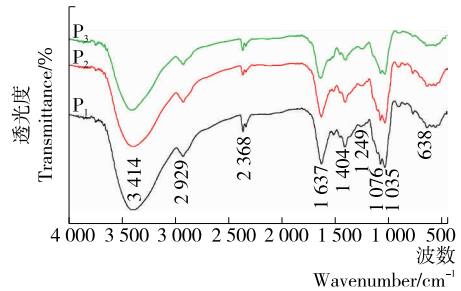


图2 红外光谱图

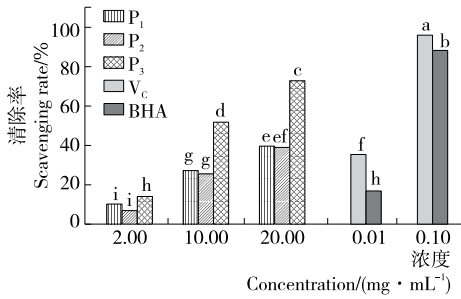
Figure 2 FTIR spectra of protein peptide

光谱的酰胺Ⅲ带的β折叠;1 035,1 076 cm⁻¹处的强吸收峰可能是C—N伸缩振动峰,属脂酰胺的特征吸收;638 cm⁻¹处的吸收峰可能是N—H伸缩振动峰。

2.4 抗氧化活性

2.4.1 DPPH·清除作用 如图3所示,随着浓度的增加,3个组分元蘑蛋白肽DPPH·清除能力均随之增大,浓度与清除率呈正相关;3个组分中P₃清除能力(72.95%)显著高于(P<0.05)组分P₁和组分P₂。刘敏等^[22]研究发现鲢鱼肽经超滤分成的3个组分中分子量大的组分DPPH·清除能力最好,与试验相似。

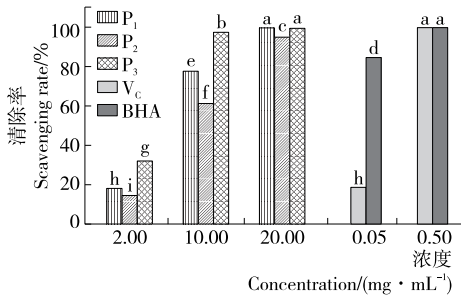
2.4.2 ABTS⁺·清除作用 如图4所示,随着浓度的增加,3个组分清除率均随之增大,浓度与清除率呈正相关;3个组分之间组分P₃对ABTS⁺·清除能力最高(P<0.05);其次为组分P₁,组分P₂最低;当浓度为10 mg/mL



字母不同表示不同样品之间差异显著 (P<0.05)

图 3 DPPH·清除能力

Figure 3 DPPH· scavenging ability of protein peptide



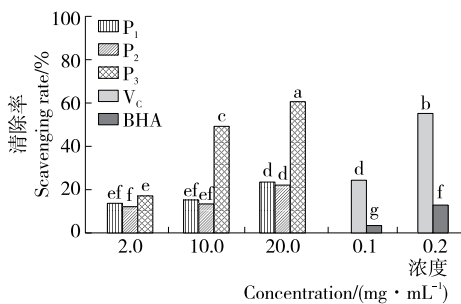
字母不同表示不同样品之间差异显著 (P<0.05)

图 4 ABTS⁺·清除能力

Figure 4 ABTS⁺· scavenging ability of protein peptide

时,组分 P₃ 的清除率最高 (97.82%)。申彩红等^[23]发现海参寡肽中小分子量 (0.13~2.00 kDa) 具有较好的 ABTS⁺·清除能力;与试验结果不同,可能是蛋白来源不同,所用蛋白酶种类也不同,产生的多肽氨基酸序列不同,功能作用亦有差异。

2.4.3 ·OH 清除作用 如图 5 所示,随着浓度的增加,3 个组分·OH 清除率也增大;浓度与清除率也呈正相关;3 个组分之间组分 P₃ 的清除率显著高于 (P<0.05) 组分 P₂ 和组分 P₁。当浓度为 20 mg/mL 时,组分 P₃ 的清除率最高 (60.99%)。张会翠等^[24]发现花生肽 3 个组分中大分子量组分对·OH 清除效果最差,与试验结果不同。说明不同来源蛋白肽分子量大小对·OH 清除作用不同。

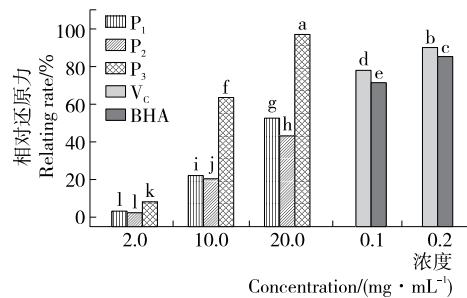


字母不同表示不同样品之间差异显著 (P<0.05)

图 5 ·OH 清除能力

Figure 5 ·OH scavenging ability of protein peptide

2.4.4 元蘑蛋白肽的相对还原能力 如图 6 所示,随着浓度的增加,3 个组分相对还原能力也增加,呈明显的量效关系。3 个组分中 P₃ 的相对还原能力显著高于 (P<0.05) 组分 P₂ 和组分 P₁;组分 P₂ 的还原力最差。当浓度为 20 mg/mL 时,P₃ 组分相对还原能力达到 97.55%。张会翠等^[24]发现花生肽 3 个组分中低分子量具有较好的还原能力,与试验结果不同。Aderonke 等^[25]研究表明,同种物质经不同种类蛋白酶作用后,由于酶解位点不同,所得到的多肽氨基酸序列不同,产生同样分子量大小的多肽片段显现出不同的抗氧化效果。



字母不同表示不同样品之间差异显著 (P<0.05)

图 6 相对还原能力

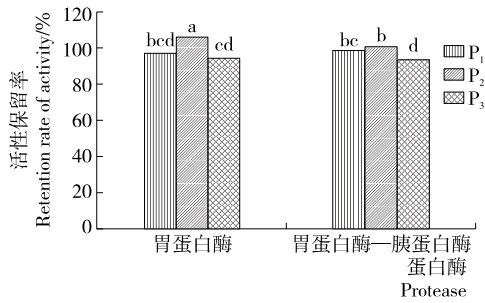
Figure 6 Relative reduction capacity of protein peptide

2.4.5 综合抗氧化能力 利用隶属函数对不同分子量元蘑多肽抗氧化能力进行综合评价。以 DPPH·、ABTS⁺·、·OH 和相对还原力 4 个指标为依据,计算各指标的隶属函数值。经计算不同分子量元蘑多肽隶属函数值的平均值从大到小依次为组分 P₃ (0.70)>P₁ (0.43)>P₂ (0.19),说明不同分子量元蘑多肽中组分 P₃ 的综合抗氧化能力最好;其次为组分 P₁;组分 P₂ 最差。

生物活性物质的抗氧化能力与疏水性氨基酸和芳香性氨基酸具有较强的相关性。试验中不同分子量元蘑多肽的疏水性氨基酸和芳香性氨基酸含量较高;3 个组分中组分 P₃ 的含量显著高于 (P<0.05) 组分 P₁ 和组分 P₂,也印证了组分 P₃ 具有最强的抗氧化能力,其次为组分 P₁,组分 P₂ 最差,与综合抗氧化能力顺序相符。但这一结论与其他学者^[7,24,26]研究结果小分子肽具有比大分子肽抗氧化活性更好的结论不同。造成这一结果的原因,可能是元蘑中所含有的蛋白质经风味蛋白酶水解并透析分级后的组成不同;也有可能是分级组分中氨基酸含量的差异;还可能是有其他活性成分在起作用。有待于进一步分离纯化,并进行功能活性验证。

2.5 模拟人工胃肠液对元蘑蛋白肽稳定性的影响

图 7 为模拟胃肠道消化对 3 个组分元蘑蛋白肽稳定性的影响。经过 1 h 的胃蛋白酶作用后组分 P₁ 和组分 P₃ 的活性保留率保持在 90% 以上;组分 P₂ 的活性保留率达到了 106%。说明经过胃蛋白酶作用后,其抗氧化能力反而增强,可能在胃蛋白酶作用下,组分 P₂ 得到进一步酶解,



字母不同表示不同组分之间差异显著($P < 0.05$)

图7 元蘑蛋白肽活性保留率

Figure 7 Activity retention rate of protein peptide

产生更多具有抗氧化活性的多肽。胃蛋白酶作用后,再利用胰蛋白酶模拟肠道作用 2 h,发现组分 P₁和组分 P₃的活性仍可保留在 90%以上;而组分 P₂的活性保留率也在 100%以上,说明胰蛋白酶将组分 P₁和组分 P₃进一步地酶解,抗氧化肽进而分解成其他功能肽,抗氧化活性减弱。经过模拟胃肠环境发现元蘑蛋白肽活性基本没有影响,并且可以增强组分 P₂的抗氧化能力,稳定性很好。张晶^[17]通过模拟胃肠道对菜籽抗氧化肽发现,经过胃蛋白酶作用后抗氧化活性增强,但经胰蛋白酶作用后活性有一定程度上的减弱,活性下降至 80%。

3 结论

利用风味蛋白酶对元蘑进行酶解制备元蘑蛋白肽,在固定酶用量为 6 000 U/g 条件下得到最佳酶解工艺为 pH 7.6、酶解时间 3.0 h、酶解温度 42 °C,该条件下酶解液对 DPPH·清除率为 26.85%。对元蘑蛋白肽进一步分级得到的 3 个组分 P₁(< 3.5 kDa)、P₂(3.5~10.0 kDa)和 P₃(> 10.0 kDa)中均含有多种氨基酸;分子量最大的组分 P₃含有最多的总氨基酸和必需氨基酸;综合抗氧化结果也表明 3 个组分中大分子量的组分 P₃效果最好;清除效果与浓度呈正相关。同时还得出元蘑蛋白多肽分子量不同,氨基酸组成以及抗氧化能力也不同;分子量越大,含有疏水性氨基酸和芳香性氨基酸越多,抗氧化效果越好。红外光谱图结果表明,3 个组分峰形和出峰位置基本一致,说明具有相同的官能团,二级结构稳定。模拟胃肠道消化结果表明,胃消化和肠消化作用对 3 个组分活性基本无影响。综上可以得出,元蘑蛋白中大分子量的蛋白肽氨基酸种类丰富,稳定性好,并具有很好的抗氧化作用,可以作为营养成分应用到食品加工中。而且食用菌来源不同以及蛋白肽分子量的大小时功能活性也呈现出不同的规律。

体外的功效作用并不能完全代表元蘑蛋白肽体内的生物活性。下一步将继续对体内相关活性展开深入研究,为元蘑高附加值产品的开发提供理论参考。

参考文献

[1] 魏君慧,薛媛,冯莉,等.杏鲍菇分离蛋白和清蛋白的理化

- 性质及功能分析[J].食品科学,2018,39(18):54-60.
- [2] KIMATU Benard Muinde, ZHAO Li-yan, BIAO Yuan, et al. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions[J]. Food Chemistry, 2017, 230(3): 58-67.
- [3] 杨雅轩,田勇,唐宇,等.食用菌功能活性蛋白通过 TLRs 信号通路的免疫调节作用研究进展[J].食品科学,2017,38(19):278-284.
- [4] 冯墨.食用菌蛋白与酶解多肽的制备及抗氧化活性的研究[D].广州:暨南大学,2018:2.
- [5] 樊蕊,徐美虹,王军波,等.生物活性肽在保健/功能食品中的应用[C]//陈君石.营养健康新观察(第四十九期):肽营养与健康.北京:中国疾病预防控制中心达能营养中心,2018:19-25.
- [6] TOLDRÁ Fidel, REIG Milagro, ARISTOY M-Concepción, et al. Generation of bioactive peptides during food processing[J]. Food Chemistry, 2018, 267: 395-404.
- [7] 葛晓鸣,顾伟,徐永健.海马水解蛋白的氨基酸组成与抗能力的关系[J].核农学报,2019,33(2):322-329.
- [8] 许旻,乔琨,路海霞.海洋多肽功能活性与氨基酸组成的研究进展[J].渔业研究,2017,39(6):502-508.
- [9] 栗铭鸿,金铁,李官浩,等.元蘑醇提物不同极性部位有效成分含量及清除自由基活性[J].食品科技,2016,41(10):184-189.
- [10] 杨立红,刘林德,姜华,等.野生元蘑多糖的分离鉴定及其清除氧自由基作用[J].食品科学,2007,28(11):81-85.
- [11] LI Xiao-yu, WANG Lu, WANG Zhen-yu. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Hohenbuehelia serotina* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98(5): 59-66.
- [12] LI Xiao-yu, WANG Lu. Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 83(15): 270-276.
- [13] 王禄禄.元蘑不同极性溶剂提取物抗氧化活性及麦角甾醇提取纯化研究[D].延吉:延边大学,2017.
- [14] 于慧,李明艳,张典,等.响应面法优化裙带菜蛋白酶解工艺及酶解液抗氧化活性[J].食品科学,2017,38(6):96-103.
- [15] 姜伊悦,张小勇,崔泰花,等.元蘑蛋白的超声辅助提取及结构分析[J].食品科技,2018,44(8):228-234.
- [16] 王彩霞,买玉花,贺晓光.模糊数学评价结合响应面法优化红枣脆片真空干燥工艺[J].食品工业科技,2018,39(21):164-171.
- [17] 张晶.菜籽抗氧化肽的制备、抗氧化机理及其稳定性研究[D].南京:南京财经大学,2016:41.
- [18] 封易成,牟德华.体外模拟胃肠消化过程中山楂的活性成分及抗氧化性规律[J].食品科学,2018,39(7):139-145.
- [19] 王肖莉,薛淑静,周明,等.基于主成分分析的白灵菇预煮液酶解研究[J].食品与机械,2015,31(4):35-37.

(下转第 190 页)

解法不仅可以有效提高酸枣可溶物提取率和总糖含量,还可以显著提高其抗氧化能力,因此超声辅助酶解提取可以作为一种高效的酸枣汁提取方法。后续将进行体内试验以进一步验证不同方法提取酸枣汁的抗氧化能力。

参考文献

- [1] 徐蕊,李祥,王慧,等. 酸枣浓缩汁抗氧化和血脂调控的功能评价[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 192-197.
- [2] 杨冲,李宪松,刘孟军. 酸枣的营养成分及开发利用研究进展[J]. 北方园艺, 2017, 41(5): 184-188.
- [3] 毛丽衡. 酸枣果醋酿造工艺及其成分分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2013: 1-14.
- [4] 赵爱玲,薛晓芳,王永康,等. 枣和酸枣果实糖酸组分及含量特征分析[J]. 塔里木大学学报, 2016, 28(3): 29-36.
- [5] 翟宇鑫,陈军,李俦,等. ICP-AES法测定南酸枣及其提取物中矿物元素含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(4): 1 052-1 055.
- [6] GUO Sheng, TANG Yu-ping, DUAN Ji-nao, et al. Two new terpenoids from fruits of *Ziziphus jujuba*[J]. Chinese Chemical Letters, 2009, 20(2): 197-200.
- [7] FENG Cui-jiao, WANG Bi-ni, ZHAO Ai-qing, et al. Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 238-245.
- [8] YUE Yuan, WU Shuang-chan, LI Zhi-ke. Wild jujube polysaccharides protect against experimental inflammatory bowel disease by enabling enhanced intestinal barrier function[J]. Food & Function, 2015, 6(8): 2 568-2 577.
- [9] 武光路,王爱军. 酸枣汁饮料——一种新型的东方食品[J]. 食品工业科技, 1999, 20(6): 12-12.
- [10] 卫拯友,党永,吴富强,等. 酸枣醋饮料工艺研究[J]. 陕西农业科学, 2010, 56(1): 31-34.
- [11] 杨宜非. 野酸枣果酒酿造工艺研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014: 1-3.
- [12] 孙巍,刘学铭. 酶在果汁加工中的应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 148-151.
- [13] 张宝善,陈锦屏,李强,等. 红枣汁的提取方法[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(12): 67-71.
- [14] 聂小伟. 红枣粉加工工艺的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2011: 10-39.
- [15] 姬晨. 红枣浓缩汁加工关键技术研究及品质评价[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015: 12-21.
- [16] 张文杰. 和田玉枣、花生固体蛋白饮料加工工艺研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2009: 16-37.
- [17] 王翠连. 木枣钙果复合饮料研制及抗氧化性研究[D]. 太原: 山西大学, 2018: 8-14.
- [18] 张露,刘鹏飞,涂宗财,等. 香榧不同部位提取物的抗氧化和酶抑制活性比较分析[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 78-83.
- [19] 林婷婷,房雷雷,张亚新,等. 响应面法优化酸枣仁多糖的脱色工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 198-202, 208.
- [20] MA Yi-long, ZHU Dan-ye, THAKUR Kiran, et al. Antioxidant and antibacterial evaluation of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 92-101.
- [21] JIAO Li-juan, YAN Chen-pu, ZHANG Kun-sheng, et al. Comprehensive determination of nine polyphenols in polygoni avicularis herba with a new HPLC-DAD method and their correlation with the antioxidant activities [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12(3): 1 593-1 600.
- [22] 罗磊,张冰洁,马丽苹,等. 金银花叶黄酮体外抗氧化能力及对 H₂O₂ 诱导 RAW264.7 巨噬细胞损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 139-145.
- [23] 何佳,张宏森,张海宁,等. 果浆酶和果胶酶对猕猴桃出汁率的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 76-79.
- [24] 贾东升,李荣乔,谢晓亮,等. 响应面法优化果胶酶澄清酸枣汁工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(10): 91-95.
- [25] 印建钢. 红枣浓缩清汁生产工艺的探讨[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(9): 90-93.
- [26] 杜琨. 陕北野生酸枣果醋的生产工艺研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(9): 87-89.
- [27] 杜琨. 陕北野生酸枣果醋的生产工艺研究[D]. 厦门: 华侨大学, 2015: 42-43.
- [28] 张会翠,唐琳,杨庆利,等. 超滤法分离花生肽及其抗氧化活性的研究[J]. 花生学报, 2012, 41(1): 1-5.
- [29] OLAGUNJU A I, OMOBA O S, ENUIJUGH A V N, et al. Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 97(7): 269-278.
- [30] 郑晓吉,许程剑,牛博楠,等. 新疆阿魏菇抗氧化肽分离纯化及抗氧化性质[J]. 食品与生物技术学报, 2015(5): 524-529.

(上接第 181 页)

- [20] 吴莹莹,鲍大鹏,王瑞娟,等. 6 种市售工厂化栽培金针菇的氨基酸组成及蛋白质营养评价[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 263-268.
- [21] GUERRERO P, KERRY J P, DE L C K. FTIR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111(6): 598-605.
- [22] 刘敏,孟艳丽,董士远,等. 鲢鱼肽美拉德反应产物超滤组分的抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(6): 219-223.
- [23] 申彩红. 海参肽的酶法制备及其抗氧化、抗疲劳活性研

- 究[D]. 厦门: 华侨大学, 2015: 42-43.
- [24] 张会翠,唐琳,杨庆利,等. 超滤法分离花生肽及其抗氧化活性的研究[J]. 花生学报, 2012, 41(1): 1-5.
- [25] OLAGUNJU A I, OMOBA O S, ENUIJUGH A V N, et al. Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 97(7): 269-278.
- [26] 郑晓吉,许程剑,牛博楠,等. 新疆阿魏菇抗氧化肽分离纯化及抗氧化性质[J]. 食品与生物技术学报, 2015(5): 524-529.