

葛根蛋白酶解物大孔树脂吸附工艺优化 及其体外抗氧化活性研究

Optimization of macroporous resin adsorption process of
enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein and its antioxidant
activity in vitro by response surface method

岳奕含 严铭铭 邵 帅 丁奕元 江 婷

YUE Yihan YAN Mingming SHAO Shuai DING Yiyuan JIANG Ting

(长春中医药大学, 吉林 长春 130117)

(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130117, China)

摘要:目的:优化大孔树脂吸附葛根蛋白酶解物工艺及其抗氧化活性研究。方法:采用 Box-Behnken 响应面法确定大孔树脂吸附葛根蛋白酶解物最佳工艺。以维生素 C 为对照,测定最佳工艺下纯化前后葛根蛋白酶解物的抗氧化活性。结果:大孔树脂的最佳吸附—解吸工艺为上样液质量浓度 10.0 mg/mL,洗脱液流速 2.6 mL/min,洗脱液乙醇体积分数 74%,纯化后葛根蛋白酶解物含量提升至 37.19%。大孔树脂纯化后的葛根蛋白酶解物对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟自由基的清除率均强于吸附前的。结论:大孔树脂纯化后的葛根蛋白酶解物抗氧化效果良好,可以作为一种潜在的蛋白多肽应用于食品中。

关键词:葛根蛋白;酶解物;大孔树脂;抗氧化活性;吸附

Abstract: Objective: This study aims to optimize the adsorption of enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein by macroporous resin and maximize the antioxidant properties *in vitro*. Methods: The Box-Behnken response surface method was used to determine the optimization of adsorption of enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein. Using Vc as a control, the antioxidant activity of Kase was determined before and after purification under the optimal

purification process. Results: The optimal adsorption-desorption process of macroporous resin is: the mass concentration of the sample solution was 10.0 mg/mL, the flow rate of the eluent was 2.6 mL/min, and the volume fraction of ethanol in the eluent was 74%. After adsorption, the content of enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein increased to 37.19%. The scavenging rate of DPPH, ABTS⁺, and hydroxyl radicals of *Pueraria Mirifica* protease after adsorption was stronger than before adsorption. Conclusion: This study shows that enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein after adsorption of macroporous resin has good antioxidant effect, which can be used as a potential protein polypeptide in food, providing data reference for further research of enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein.

Keywords: *Pueraria* protein; enzymatic hydrolysis; macroporous resins; antioxidant activity; adsorption

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根,习称野葛,始载于《神农本草经》,具有生津止渴、升阳止泻等功效^[1]。葛根作为药食同源药品,在改善心血管功能^[2]、解酒保肝^[3]、抗氧化、保护神经、预防骨质疏松^[4]等方面具有良好的疗效。有研究^[5]表明,将植物蛋白酶解生成多种活性肽,能够提高其生物活性及蛋白质功能,且具有良好的抗氧化潜力。庞会娜等^[6]将葛根蛋白酶解,酶解后蛋白分子量降低,且体外抗氧化活性较酶解前显著提高。但由于蛋白质酶解产物多样(其中包括游离氨基酸、部分未水解蛋白质以及多肽),选择合适的纯化方法能够进一步评估蛋白酶解物结构及提高其生物活性^[7-8]。目前,蛋白多肽纯化方法主要包括超滤、凝胶色谱、大孔树脂纯化、离子交换色谱、反向高效液相色谱

基金项目:吉林省科技发展计划项目(编号:20210401111YY);吉林省发改委产业技术研究与开发项目(编号:2023C027-4);吉林省教育厅人文社科研究项目(编号:JJKH20211006SK)

作者简介:岳奕含,女,长春中医药大学在读硕士研究生。

通信作者:严铭铭(1968—),女,长春中医药大学教授,博士。

E-mail: yanmm595@126.com

邵帅(1979—),女,长春中医药大学副教授,博士。

E-mail: 36038612@qq.com

收稿日期:2023-05-22 **改回日期:**2023-10-25

谱、电渗析等^[9-11]。目前对葛根蛋白多肽的研究多限于提取工艺的优化,对其纯化工艺的研究尚未见报道。研究拟通过大孔树脂吸附脱去葛根蛋白酶解物中无机盐等杂质,提高葛根蛋白酶解物的纯度及抗氧化活性,为葛根蛋白多肽添加于食品中的开发与利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葛根蛋白:含量 9.35%,课题组前期研究产物;

碱性蛋白酶:200 U/mg,上海源叶生物科技有限公司;

无水乙醇:分析纯,无锡市晶科化工有限公司;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

FeCl_3 、 HCl 、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、 NaOH 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:分析纯,西陇科学股份有限公司;

牛血清蛋白、PBS(pH 7.4):北京索莱宝科技有限公司;

三氯乙酸(TCA):天津化学试剂有限公司;

大孔树脂(AB-8、D101、HPD-450、LX-8):厦门柏嘉生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外分光光度计:UV-1700 型,日本岛津(中国)有限公司;

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S 型,上海豫康科教仪器设备有限公司;

赛多利斯台式数显酸度计:PB-10 型,上海诺萱科学仪器有限公司;

低温离心机:5804R 型,美国贝克曼库尔特有限公司;

冷冻干燥机:DRC-2L 型,北崎国际贸易有限公司;

恒温水浴锅:HH-6 数显型,金坛市佳美仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 葛根蛋白酶解物制备 取适量葛根蛋白与蒸馏水配制成质量浓度为 2% 的底物溶液,加入酶底比为 2% 的碱性蛋白酶,在 55 ℃、pH 为 9 的条件下酶解 3 h,酶解结束后,立即于 100 ℃水浴灭酶 10 min,冷却至室温,将 pH 值调至中性,4 ℃、8 000 r/min 离心 15 min^[6]。

1.3.2 葛根蛋白多肽含量测定 采用福林酚法^[12],其标准曲线为 $y = 0.0006x + 0.0013$ ($R^2 = 0.9999$)。

1.3.3 大孔树脂筛选 选用 4 种不同极性的大孔树脂进行吸附—解吸试验。取预处理好的大孔吸附树脂各 1.0 g,分别加入到 150 mL 锥形瓶中,加入质量浓度为 3.0 mg/mL 的葛根蛋白酶解物溶液 50 mL,25 ℃下,

160 r/min 震摇 12 h,抽滤,取滤液,按式(1)计算葛根蛋白酶解物质量浓度与吸附率。取上述饱和的大孔树脂用蒸馏水洗至流出液澄清透明,加入 50 mL 95%乙醇,相同条件振摇 12 h,测定吸光度并按式(2)计算解吸率^[13-14]。

$$R_1 = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%, \quad (1)$$

$$R_2 = \frac{C_2}{C_0 - C_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R_1 ——吸附率,%;

R_2 ——解吸率,%;

C_0 ——吸附液中葛根蛋白酶解物质量浓度,mg/mL;

C_1 ——吸附后溶液葛根蛋白酶解物质量浓度,mg/mL;

C_2 ——解吸液中酶解物质量浓度,mg/mL。

1.3.4 单因素试验 称取预处理后的大孔树脂,湿法装柱,装柱约为柱体积的 3/4。固定葛根酶解物质量浓度为 10 mg/mL、上样液流速为 2 mL/min、上样液体积为 40 mL,吸附时间为 3 h,上柱、收集、测定,考察上样液质量浓度(5,10,15,20,25 mg/mL)、上样液流速(0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL/min)对吸附率的影响。固定洗脱液乙醇体积分数为 70%,上样液流速为 2.5 mL/min,洗脱液体积为 160 mL,考察洗脱液乙醇体积分数(0%,30%,50%,70%,90%)、洗脱液流速(1.5,2.0,2.5,3.0,3.5 mL/min)、洗脱液体积(40,80,120,160,200,240 mL)对解吸率的影响。

1.3.5 响应面试验优化 在单因素试验基础上,以上样液质量浓度、洗脱液流速以及洗脱液乙醇体积分数作为自变量,葛根蛋白酶解物解吸率作为响应值,使用 Design-Expert 8.0.6.1 软件进行 Box-Behnken 三因素三水平试验设计,优化葛根蛋白酶解物大孔树脂吸附工艺。

1.3.6 葛根蛋白酶解物的体外抗氧化活性

(1) DPPH 自由基清除能力测定:根据文献^[15]并修改。取 2 mL 质量分数为 0.004% 的 DPPH 溶液,加入 2 mL 不同梯度浓度的葛根蛋白酶解物溶液,涡旋混匀,避光反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度。以甲醇为样品对照组,蒸馏水为空白对照组,维生素 C 为阳性对照,按式(3)计算 DPPH 自由基清除率。

$$S_1 = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S_1 ——DPPH 自由基清除率,%;

A_0 ——空白对照组吸光度值;

A_1 ——样品对照组吸光度值;

A_2 ——样品吸光度值。

(2) 羟自由基清除能力测定:根据文献[16]并修改。将 2 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 PBS 缓冲溶液(pH 7.4)加入到 1 mL 浓度为 0.75 mmol/L 邻二氮菲溶液中,再加入 1 mL 不同梯度浓度的葛根酶解物溶液,涡旋混匀,加入 1 mL 0.75 mmol/L 硫酸亚铁溶液以及 0.75 mmol/L 硫酸亚铁溶液,混匀后反应 0.5 h (37 °C),测定 536 nm 处吸光度。将样品液替换为蒸馏水,测定空白对照组吸光度。将过氧化氢溶液替换为蒸馏水,测定样品对照组吸光度。以维生素 C 作为阳性对照,按式(4)计算 ABTS 自由基清除率。

$$S_2 = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

S_2 ——羟自由基清除率, %;

A_0 ——空白对照组吸光度值;

A_1 ——样品吸光度值;

A_2 ——样品对照组吸光度值。

(3) ABTS⁺自由基清除能力测定:根据文献[17]并修改。取 0.2 mL ABTS⁺工作液,用 pH 7.4 PBS 缓冲溶液稀释至 734 nm 处吸光度值为 0.7 ± 0.2 ,取稀释后的 ABTS⁺溶液 0.2 mL,加入 10 μ L 不同梯度浓度的葛根酶解物溶液,混匀,常温暗室反应 6 min,测定 734 nm 处吸光度。以 PBS 溶液为样品对照组,维生素 C 作为阳性对照,按式(5)计算 ABTS⁺自由基清除率。

$$S_3 = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

S_3 ——ABTS⁺自由基清除率, %;

A_0 ——样品对照组吸光度值;

A_1 ——样品吸光度值。

(4) 还原能力:根据文献[18]并修改。分别取不同梯度浓度的葛根蛋白酶解物溶液 2.5 mL,加入 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 2.5 mL,再加入 1% $K_3Fe(CN)_6$ 溶液 2.5 mL,反应 20 min (50 °C)后冷却至室温,加入 10% 三氯乙酸 2.5 mL,离心,取上清液 1 mL,加入 1 mL 蒸馏水以及 5 mL 0.1% 的 $FeCl_3$ 溶液,涡旋混匀,静置后测定 700 nm 处吸光度值。将 1% $K_3Fe(CN)_6$ 溶液替换为蒸馏水,测定吸光度值。蒸馏水作为空白组调零,维生素 C 作为阳性对照,按式(6)计算还原力。

$$A = A_1 - A_2, \quad (6)$$

式中:

A ——还原能力;

A_1 ——样品吸光度值;

A_2 ——样品对照组吸光度值。

1.3.7 数据统计与分析 每组试验均重复 3 次,利用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,Origin2019 软件绘制图表,Design-Expert 8.0.6.1 软件进行响应面设计实验设计及数据分析。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂型号筛选

由表 1 可知,不同型号大孔树脂对于葛根蛋白酶解物的静态吸附—解吸率不同,综合吸附率、解吸率来看,AB-8 大孔树脂的效果最好,可能是由于 AB-8 型大孔树脂极性较弱,具有网状结构及高比表面积,适合蛋白多肽的吸附纯化^[19]。故后续试验选用 AB-8 型大孔树脂。

表 1 各型号大孔树脂的静态吸附性能

Table 1 Static adsorption properties of each models

大孔树脂型号	解吸率/%	吸附率/%
AB-8 大孔树脂	79.20 $\pm$ 0.74	86.52 $\pm$ 0.96
D101 大孔树脂	55.67 $\pm$ 0.58	55.67 $\pm$ 0.58
HPD-450 大孔树脂	61.45 $\pm$ 1.03	43.58 $\pm$ 0.72
LX-8 大孔树脂	40.43 $\pm$ 0.52	35.65 $\pm$ 1.24

2.2 单因素试验

2.2.1 上样液质量浓度 由图 1 可知,大孔树脂的吸附率随葛根蛋白酶解物质量浓度的增大呈先增大后减小的趋势,当上样液质量浓度为 10.0 mg/mL 时,吸附率达到最大值 87.54%。继续增大葛根蛋白酶解物质量浓度,吸附率逐渐降低,可能是葛根蛋白酶解物质量浓度较低时,大孔树脂不能完全吸附,而质量浓度过高,则会超出大孔树脂的吸附量,并且葛根蛋白酶解液中的杂质成分也会竞争吸附位点,大孔树脂不能将其完全吸附^[20]。因此,最佳上样质量浓度确定为 10 mg/mL。

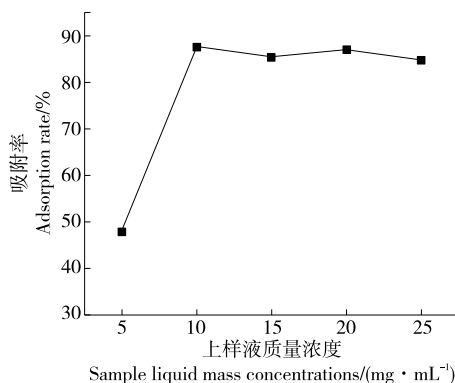


图 1 上样液质量浓度对大孔树脂吸附性能的影响
Figure 1 Effects of different sample liquid mass concentrations on the adsorption properties of macroporous resin

2.2.2 上样液流速 由图 2 可知,随着葛根蛋白酶解物上样液速度的加快,大孔树脂对葛根蛋白酶解物的吸附率先上升后下降的趋势,当上样液流速为 2.0 mL/min 时,吸附率达到最大值。当上样液流速 >2.0 mL/min 时,吸附率反而降低,可能是葛根蛋白酶解液在大孔树脂中需要一个吸附与扩散的过程,流速过大,酶解液还未充分吸附就被泄露,导致葛根蛋白酶解液浪费。因此,最佳上样液流速为 2 mL/min。

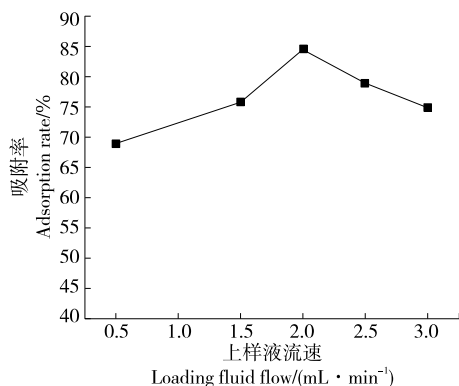


图 2 上样液流速对大孔树脂吸附性能的影响

Figure 2 Effects of loading fluid flow rate on adsorption performance of macroporous resin

2.2.3 洗脱液乙醇体积分数 由图 3 可知,随着洗脱液乙醇体积分数逐渐增大,大孔树脂对葛根蛋白酶解物的解吸率先增大后减小趋势,当洗脱液乙醇体积分数为 70% 时,解吸率达到最大值 82.55%,当洗脱液乙醇体积分数 $>70\%$ 时,解吸率则下降。这可能是乙醇体积分数会导致洗脱液的极性发生改变,进而影响了洗脱液对葛根蛋白酶解物的洗脱能力^[21]。因此,选择 50%, 70%, 90% 3 个水平进行后续研究。

2.2.4 洗脱液流速 由图 4 可知,随着洗脱液流速的增加,大孔树脂对葛根蛋白酶解物的吸附率先上升后下

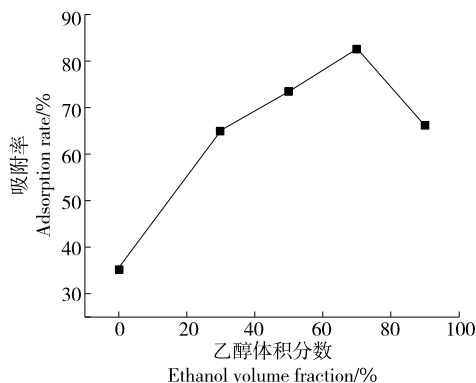


图 3 乙醇体积分数对大孔树脂解吸性能的影响

Figure 3 Effects of ethanol volume fraction on desorption performance of macroporous resin

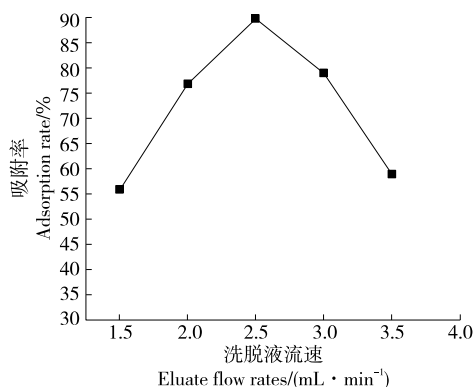


图 4 洗脱液流速对大孔树脂解吸性能的影响

Figure 4 Effects of different eluate flow rates on the desorption properties of macroporous resin

降的趋势,当洗脱液流速为 2.5 mL/min 时,解吸率达到最大值 89.75%。当洗脱液流速 >2.5 mL/min 时,解吸率开始下降,可能是洗脱流速过快,洗脱液不能与大孔树脂很好接触,葛根蛋白酶解物不能被有效洗脱^[22]。

2.2.5 洗脱液体积 由图 5 可知,随着洗脱液体积的上升,大孔树脂对葛根蛋白酶解物的解吸率先上升后趋于平缓的趋势,当洗脱液体积为 160 mL 时,解吸率达到最大值 84.50%。继续增大洗脱液体积,解吸率几乎不再变化,说明此时流出液中酶解物含量已经很少,大部分葛根蛋白酶解物已被洗脱下来,可能剩余部分葛根蛋白酶解物出现死吸附的情况,不能被继续洗脱。

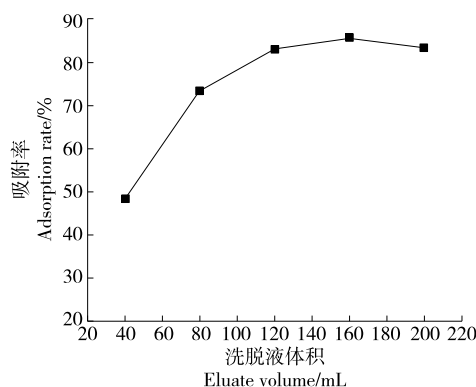


图 5 洗脱液体积对大孔树脂解吸性能的影响

Figure 5 Effects of eluate volume on desorption performance of macroporous resin

2.3 响应面试验优化

2.3.1 试验模型建立与方差分析 根据单因素试验结果,以上样液质量浓度、洗脱液流速和洗脱液乙醇体积分数为自变量,以解吸率为响应值,进行三因素三水平响应面分析。试验因素水平见表 2,试验设计及结果见表 3。利用 Design-Expert 软件进行线性方程拟合,拟合回归方程为:

表 2 响应面试验因素水平

Table 2 Factors and levels in response surface design

水平	A 上样液质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	B 洗脱液流速/ (mL · min ⁻¹)	C 洗脱液乙醇 体积分数/%
-1	5	2.0	50
0	10	2.5	70
1	15	3.0	90

表 3 响应面设计方案与结果

Table 3 Response surface design scheme and results

试验号	A	B	C	解吸率/%
1	1	0	1	83.5
2	0	0	0	87.3
3	-1	0	-1	81.3
4	0	0	0	88.4
5	1	-1	0	73.7
6	1	0	-1	75.6
7	-1	0	1	82.3
8	-1	-1	0	78.0
9	0	1	1	84.9
10	0	0	0	88.3
11	0	-1	1	82.5
12	0	-1	-1	80.1
13	0	1	-1	83.6
14	1	1	0	78.3
15	-1	1	0	79.4
16	0	0	0	88.5
17	0	0	0	88.3

$$Y = 88.02 - 1.24A + 1.49B + 1.58C + 0.80AB + 1.73AC - 0.27BC - 6.39A^2 - 4.28B^2 - 0.96C^2. \quad (7)$$

由表 4 可知,模型 $P < 0.01$,极显著;失拟项 $P = 0.105\ 3$,不显著; R^2 为 0.986 4,说明误差对实际结果影响较小,模型可靠,可以对葛根蛋白酶解物解吸率有准确的分析和预测。在该模型中,一次项 A、B、C,二次项 A^2 、 B^2 ,交互项 AC 对葛根蛋白酶解物解吸率影响极显著 ($P < 0.01$),二次项 C^2 对葛根蛋白酶解物解吸率影响显著 ($P < 0.05$)。根据 F 值可以判断出各水平对试验结果影响排序为 C(洗脱液乙醇体积分数) > B(洗脱液流速) > A(上样液质量浓度)。

2.3.2 响应面结果分析 由图 6 可知,随着上样液质量浓度与洗脱液乙醇体积分数的增加,解吸率呈先上升后下降的趋势,其曲面坡度较陡峭,等高线呈椭圆形,说明上样液质量浓度与洗脱液乙醇体积分数的交互作用对葛根酶解物的解吸率影响显著,与模型方差结果一致。上

表 4 回归方程方差分析结果[†]

Table 4 Results of variance analysis of regression equations

来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	336.59	9	37.40	56.54	<0.000 1	* *
A	12.25	1	12.25	18.52	0.003 6	* *
B	17.70	1	17.70	26.76	0.001 3	* *
C	19.85	1	19.85	30.00	0.000 9	* *
AB	2.56	1	2.56	3.87	0.089 9	
AC	11.90	1	11.90	17.99	0.003 8	* *
BC	0.30	1	0.30	0.46	0.520 6	
A ²	171.66	1	171.66	259.49	<0.000 1	* *
B ²	77.31	1	77.31	116.87	<0.000 1	* *
C ²	3.88	1	3.88	5.87	0.046 0	*
残差	4.63	7	0.66			
失拟项	3.48	3	1.16	4.04	0.105 3	—
纯误差	1.15	4	0.29			
总离差	341.22	16				

[†] * * 为差异极显著 ($P < 0.01$); * 为差异显著 ($P < 0.05$); $R^2 = 0.986\ 4$ 。

样液质量浓度与洗脱液流速交互作用的曲面坡度陡峭,但其等高线呈圆形,说明二者交互作用对结果影响不显著,与模型方差结果一致。洗脱液流速与洗脱液乙醇体积分数交互作用等高线呈椭圆形,但曲面坡度平缓,说明二者交互作用对结果影响不显著,与模型方差结果一致。

2.3.3 最佳吸附工艺结果分析与验证 通过对拟合模型进行分析,响应面优化大孔树脂吸附葛根酶解物的最佳工艺为上样液质量浓度 9.33 mg/mL,洗脱液流速 2.61 mL/min,洗脱液乙醇体积分数 74.44%,此工艺条件下预测葛根蛋白酶解物解吸率为 88.54%。考虑到后续验证实验的可操作性,将最佳工艺调整为上样液质量浓度 10 mg/mL,洗脱液流速 2.6 mL/min,洗脱液乙醇体积分数 74%。此时葛根蛋白酶解物的解吸率为 $(86.78 \pm 1.27)\%$,与预测值基本相同,且最佳工艺下葛根蛋白酶解物含量由 10.81% 增加至 37.19%,证明此工艺优化可行且效果较好。

2.4 葛根酶解物的体外抗氧化活性

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 由图 7 可知,当样品质量浓度为 0.1~3.2 mg/mL 时,样品对 DPPH 自由基清除能力随质量浓度的增大而增强,当样品质量浓度为 0.8 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率达 $(89.34 \pm 1.26)\%$,且趋于平稳。维生素 C、葛根蛋白酶解物吸附前后的 IC_{50} 值分别为 0.002,0.083,0.063 mg/mL, IC_{50} 值越小,证明其清除能力越强,抗氧化效果越好^[23],三者自由基清除能力由强到弱为维生素 C > 纯化后 > 纯化前。因此,经大孔树

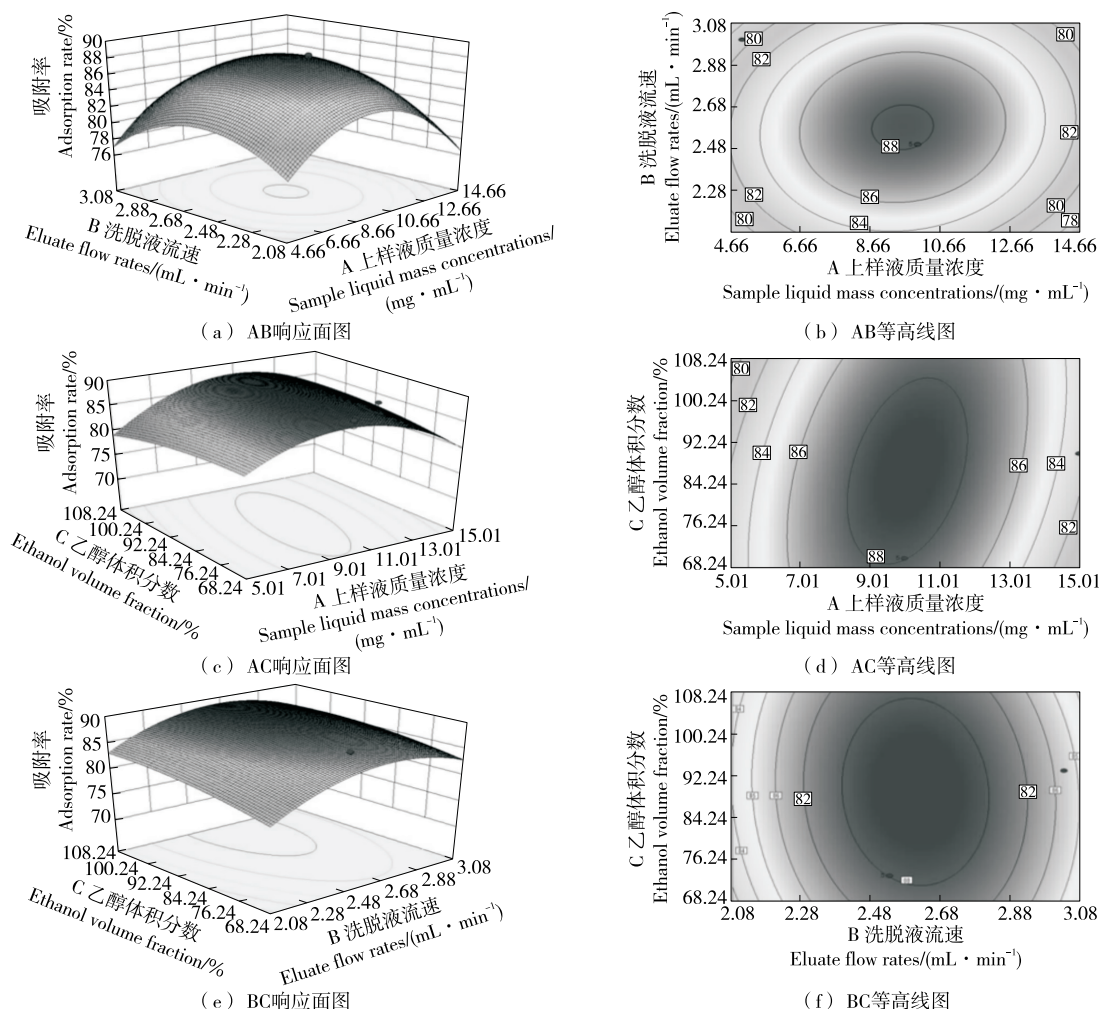


图 6 响应面与等高线分析图

Figure 6 Response surface and contour analysis diagram

脂纯化后,葛根蛋白多肽含量上升导致其体外抗氧化活性增强。

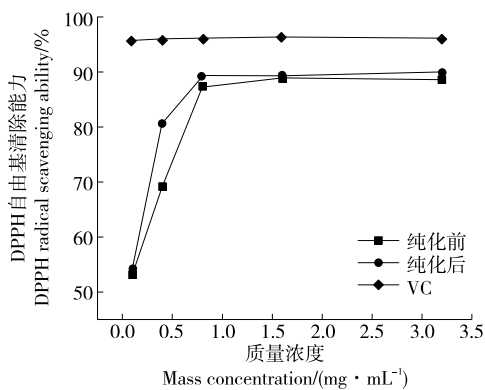


图 7 纯化前后葛根蛋白酶解物对 DPPH 自由基清除能力的影响

Figure 7 Effects of enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein on DPPH radical scavenging ability before and after purification

2.4.2 羟自由基清除能力 由图 8 可知,当样品质量浓度为 0.1~3.2 mg/mL 时,纯化前后的样品对羟自由基的

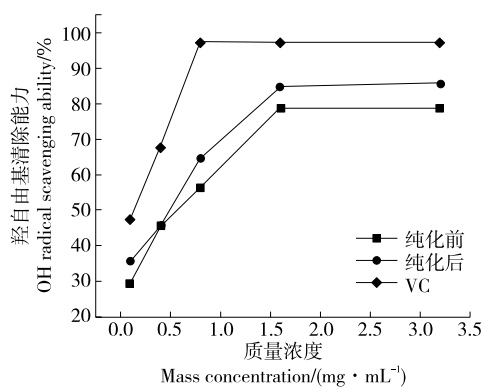


图 8 纯化前后葛根蛋白酶解物对羟自由基清除能力的影响

Figure 8 Effects of enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein on OH radical scavenging ability before and after purification

清除率均低于维生素 C 的,但经大孔树脂纯化后的葛根酶解物对羟自由基的清除率从 $(78.72 \pm 2.29)\%$ 增加到 $(85.74 \pm 2.24)\%$ 。维生素 C、纯化前后的 IC_{50} 值分别为 0.126, 0.423, 0.304 mg/mL, 三者对羟自由基清除能力排序为维生素 C > 纯化后 > 纯化前。因此,葛根酶解物经大孔树脂纯化后,其抗氧化活性增强,与吕凯波等^[24]的研究结论一致。

2.4.3 ABTS⁺ 自由基清除能力 由图 9 可知,葛根酶解物纯化前后对 ABTS⁺ 自由基清除能力随样品质量浓度的增加而增强,且纯化后对 ABTS⁺ 的清除率最高可达 $(93.14 \pm 2.38)\%$ 。维生素 C、纯化前后的 IC_{50} 值分别为 0.141, 0.642, 0.408 mg/mL, 三者对 ABTS 自由基清除能力大小排序为维生素 C > 纯化后 > 纯化前,其抗氧化能力结果与马萌等^[25]的一致。

2.4.4 还原能力 由图 10 可知,当样品质量浓度为 0.1~3.2 mg/mL 时,大孔树脂纯化前后的葛根酶解物呈现出

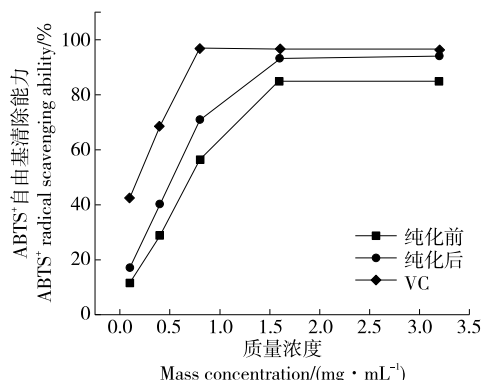


图 9 纯化前后葛根蛋白酶解物对 ABTS⁺ 自由基清除能力的影响

Figure 9 Effects of enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein on ABTS⁺ radical scavenging ability before and after purification

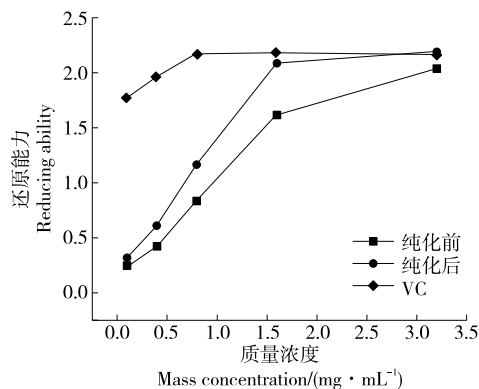


图 10 纯化前后葛根蛋白酶解物对还原能力影响

Figure 10 Effects of enzymatic hydrolysis of *Pueraria* protein on reducing ability before and after purification

不同的还原能力,随着质量浓度的增加,还原能力增加。当葛根蛋白酶解物质量浓度增加至 1.5 mg/mL 时,其还原能力基本与维生素 C 的持平,纯化后的葛根蛋白酶解物具有更强的还原能力。

3 结论

试验表明,AB-8 型大孔树脂为吸附葛根蛋白酶解物的最佳材料,大孔树脂吸附葛根蛋白酶解物的最佳工艺条件为上样液质量浓度 10.0 mg/mL,洗脱液流速 2.6 mL/min,洗脱液乙醇体积分数 74%。该条件下葛根蛋白酶解物含量以及抗氧化活性较吸附前明显提高,说明优化工艺可行。但将其作为一种有效的食源性抗氧化肽来源应用于保健食品中,需进行动物以及临床试验,以探究葛根蛋白酶解物的抗氧化活性机制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2020: 333-334.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's Republic of China: 1 st[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2020: 333-334.
- [2] 史晨旭, 杜佳蓉, 吴威, 等. 葛根化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2021, 23(12): 2 177-2 195.
SHI C X, DU J R, WU W, et al. Chemical constituents and pharmacological action of *Puerariae lobatae radix*: A review[J]. Modern Chinese Medicine, 2021, 23(12): 2 177-2 195.
- [3] 陈艳, 文佳玉, 谢晓芳, 等. 葛根的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床, 2021, 12(1): 53-60.
CHEN Y, WEN J Y, XIE X F, et al. Progress on the chemical composition and pharmacological effects of *Pueraria*[J]. Traditional Chinese Medicine and Clinical Practice, 2021, 12(1): 53-60.
- [4] 李树欣. 葛根的化学成分及药理作用的研究进展[J]. 辽宁化工, 2020, 49(11): 1 412-1 413, 1 417.
LI S X. Progress on the chemical composition and pharmacological effects of *Pueraria*[J]. Liaoning Chemical Industry, 2020, 49(11): 1 412-1 413, 1 417.
- [5] 江含秀, 曾芳, 鄢晓霞, 等. 不同品种苦荞蛋白的复合酶解及其多肽抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(9): 43-51.
JIANG H X, ZENG F, WU X X, et al. Double enzymatic hydrolysis of tartary buckwheat proteins of different varieties and the antioxidant activity of the polypeptides[J]. Food Research and Development, 2023, 44(9): 43-51.
- [6] 庞会娜, 董红影, 肖凤琴, 等. 响应面法优化葛根蛋白酶解工艺及其体外抗氧化特性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 197-204.
PANG H N, DONG H Y, XIAO F Q, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of *Pueraria* protein by response surface methodology and its antioxidant properties in vitro[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 197-204.

- [7] 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, 2022: 12.
- [8] 杨雅梦, 胥健萍, 刘婉月, 等. 植物多肽分离技术及功能研究进展[J]. 食品科技, 2021, 46(6): 194-200.
- YANG Y M, XU J P, LIU W Y, et al. Research progress of plant polypeptide separation technology and function [J]. Food Technology, 2021, 46(6): 194-200.
- [9] 张林松, 徐卫东, 石继伟, 等. 响应面法优化葛根蛋白的提取工艺[J]. 药学与临床研究, 2017, 25(3): 195-198.
- ZHANG S L, XU W D, SHI J W, et al. Optimizing the extraction process of Pueraria protein by response surface method [J]. Pharmacy and Clinical Research, 2017, 25(3): 195-198.
- [10] 王苗, 张红印, 范琳, 等. 葛根蛋白提取工艺及其体外抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(1): 73-79.
- WANG M, ZHANG H Y, FAN L, et al. Study on extraction technology of Pueraria lobata protein and its antioxidant activity in vitro[J]. Food Research and Development, 2021, 42(1): 73-79.
- [11] 唐婷范, 杨杰, 黄芳丽, 等. 不同产地葛根蛋白质提取工艺及其功能性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(9): 32-37.
- TANG T F, YANG J, HUANG F L, et al. Study of extraction technology and function of Pueraria lobata protein from different habitats[J]. Food Research and Development, 2020, 41(9): 32-37.
- [12] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. 福林酚试剂法测定蛋白质[J]. 食品与药品, 2011, 13(3): 147-151.
- LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein was measured by folio reagent method[J]. Food & Drugs, 2011, 13(3): 147-151.
- [13] 徐超, 张昊宇, 任红涛, 等. 艾草黄酮大孔吸附树脂纯化及抗氧化活性研究[J]. 河南农业大学学报, 2023, 57(3): 451-461.
- XU C, ZHANG H Y, REN H T, et al. Study on purification of flavonoids from Artemisia argyi with macroporous resin and their antioxidant activity[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2023, 57(3): 451-461.
- [14] 刘杰, 梁亚蓝, 李浩楠, 等. 玉米须中总黄酮的大孔树脂纯化工艺优化[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(3): 76-80.
- LIU J, LIANG Y L, LI H N, et al. Optimization of macroporous resin purification process for total flavonoids in corn silk [J]. Cereals & Oils, 2022, 35(3): 76-80.
- [15] ELZBIETA W, ALDONA K, RENATA Z W. Antioxidant activity and free radicals of roasted herbal materials[J]. Herba Polonica, 2017, 63(2): 34-41.
- [16] 夏雨, 卓倩婷, 徐雅因, 等. 美藤果蛋白的分级提取、理化性质鉴定及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(1): 193-198.
- XIA Y, ZHUO Q T, XU Y N, et al. Study on fractional extraction, physicochemical properties and antioxidant activity of sacha inchi protein[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(1): 193-198.
- [17] 徐丹萍, 蒲彪, 叶萌, 等. 藤椒冷榨油饼粕中多酚的纯化及体外抗氧化活性[J]. 西北农业学报, 2018, 27(11): 1 690-1 700.
- XU D P, PU B, YE M, et al. Study on extraction, purification and antioxidant activity of polyphenols in cold pressed oil residue of *Zanthoxylum armatum* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2018, 27(11): 1 690-1 700.
- [18] XU Z Q, WU C P, SUN D X, et al. Identification of post-digestion angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean protein isolate: Their production conditions and in silico molecular docking with ACE [J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128855.
- [19] 许英一, 吴红艳, 王宇, 等. 大孔树脂纯化苜蓿叶蛋白肽的工艺优化[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 167-171.
- XU Y Y, WU H Y, WANG Y, et al. Optimization on purification technology of alfalfa leaf protein peptide by macroporous adsorption resin[J]. Food & Machinery, 2019, 35(5): 167-171.
- [20] 辛科颖, 孙向明, 胡扬, 等. 响应面法优化大孔树脂纯化菟丝子总黄酮工艺[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(7): 530-538.
- XIN K Y, SUN X M, HU Y, et al. Optimization of purification process of total flavonoids from cuscute chinensis by macroporous resin by response surface methodology[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2022, 57(7): 530-538.
- [21] 刘辉, 张会生, 童火艳, 等. 酶解大豆蛋白抗氧化肽的分离纯化与鉴定[J]. 食品科学, 2022, 43(20): 191-197.
- LIU H, ZHANG H S, TONG H Y, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed soybean protein[J]. Food Science, 2022, 43(20): 191-197.
- [22] JOSHI I, JANAGARAJ K, NOORANI K P M, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020, 29: 101770.
- [23] 李晓洁, 刘金鑫, 李建华, 等. 大孔吸附树脂纯化茶多酚的工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 214-223.
- LI X J, LIU X H, LI J H, et al. Optimization of purification of tea polyphenols with macroporous adsorption resin and research of their antioxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 214-223.
- [24] 吕凯波, 龚乃超. 大孔树脂分离红花籽粕酶解产物制备抗氧化肽的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(6): 90-95.
- LU K B, GONG N C. Preparation of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysis of safflower seed meal by macroporous adsorption resin[J]. Food Research and Development, 2021, 42(6): 90-95.
- [25] 马萌, 陶婷, 马挺军. 大孔吸附树脂纯化苦荞多肽工艺研究[J]. 北京农学院学报, 2022, 37(3): 115-120.
- MA M, TAO T, MA T J. Purification of Tartary buckwheat polypeptide by macroporous adsorption resin[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2022, 37(3): 115-120.