



引用格式:许春平,姜宇,曾颖,等.不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和抗氧化性的影响[J].轻工学报,2017,32(6):56-62.

中图分类号:TS41⁺3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.007

文章编号:2096-1553(2017)06-0056-07

不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和抗氧化性的影响

Effects of different enzymolysis conditions on the protein hydrolysis degree and antioxidant activity of tobacco leaf

许春平¹,姜宇¹,曾颖¹,马扩彦²,谭兰兰³,申屠洪钊³,
曲利利¹,孟丹丹¹,戴亚²

XU Chun-ping¹, JIANG Yu¹, ZENG Ying¹, MA Kuo-yan², TAN Lan-lan³,
SHENTU Hong-qian³, QU Li-li¹, MENG Dan-dan¹, DAI Ya²

- 1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
 - 2. 四川中烟工业有限责任公司 技术研发中心,四川 成都 610060;
 - 3. 重庆中烟工业有限责任公司 技术研发中心,重庆 400060
1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Technology Center, China Tobacco Sichuan Industrial Co., Ltd., Chengdu 610060, China;
3. Technology Center, China Tobacco Chongqing Industrial Co., Ltd., Chongqing 400060, China

关键词:
废弃烟叶;烟叶蛋白多肽;酶解;抗氧化性;水解度;清除率

Key words:
discarded tobacco leaf;
tobacco leaf protein polypeptide;
enzymatic hydrolysis;
antioxidant activity;
hydrolysis degree;
clearance

摘要:采用碱溶酸沉法从大田废弃上部烟叶中提取蛋白质,分别使用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶对烟叶蛋白进行酶解,研究不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率的影响.结果表明:蛋白多肽水解度最优的酶解条件与蛋白多肽对 DPPH 清除率最高的酶解条件不同.以使用木瓜蛋白酶为例,烟叶蛋白水解度最优酶解条件为,酶解温度 50 ℃,酶解时间为 0.5 h,加酶量为底物的 3%,酶解 pH = 8; DPPH 清除率最优酶解条件为,酶解温度 40 ℃,酶解时间 2 h,加酶量为底物质量的 3%,pH = 7.这说明蛋白多肽的水解度高低与其抗氧化性并非正相关,蛋白多肽既可以作为美拉德反应的底物,也可以作为抗氧化剂,可针对不同的应用目的,选择相应的最优酶解条件.

收稿日期:2016-06-23;修回日期:2017-03-26

基金项目:国家自然科学基金联合基金项目(U1604176);重庆中烟合作项目(20151011)

作者简介:许春平(1977—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草工程.

通信作者:戴亚(1946—),男,江苏省盐城市人,四川中烟工业有限责任公司教授,主要研究方向为烟草化学.

Abstract: Tobacco leaf protein was extracted by alkali-solution and acid-isolation method from upper leaves in the field. The tobacco protein was hydrolyzed using trypsin, papain or protamex, respectively. The effect of different enzymolysis conditions on leaf protein hydrolysis degree and the DPPH clearance rate of tobacco leaf protein polypeptide were investigated. The results showed that the optimal enzymolysis conditions of protein peptide were different with those of the highest DPPH clearance rate of protein polypeptide. Using papain as an example, the optimal hydrolysis conditions for tobacco protein hydrolysis degree were enzymolysis temperature 50 °C, hydrolysis time 0.5 h, enzyme amount 3%, pH = 8. The optimal hydrolysis conditions for DPPH clearance rate were temperature 40 °C, enzymolysis time 2 h, enzyme amount 3%, pH = 7. This indicated that the degree of hydrolysis of protein polypeptide was not positively correlated with its antioxidant activity. Protein peptide can be used as substrate for Maillard reaction or antioxidant, and it may be chosen corresponding optimal enzymatic conditions for different purposes.

0 引言

我国烟叶产量大,但工业使用中对农业生产的烟叶要求较高.烟叶生产中打顶会产生部分废弃上部叶^[1],由于其成熟度不够、使用率较低,有时甚至废弃不用,大量废弃烟叶通常制成肥料或作焚烧处理^[2].事实上,烟叶中蛋白质含量非常丰富,有很高的营养价值和药用价值^[3],提取烟叶蛋白并合理利用,不仅能够减轻环境负担,还能创造一定的经济价值.将烟叶蛋白进行控制酶解,得到分子大小适宜且包含特定氨基酸序列的具有较高生物活性的多肽^[4],可进一步提高烟叶蛋白的使用价值.具有生物活性的多肽也有很高的使用价值,可以满足人体的营养需求,对人体的生理功能进行调节^[5].董二慧等^[6]研究低次烟叶中蛋白质的提取工艺,优化了提取缓冲溶液的浓度、液料比和 pH 值,得出烟叶中蛋白质的最高提取率为 10.96 mg/g.饶国华等^[7]以低次烟叶为材料,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计研究了烟叶蛋白最佳提取工艺,结果表明,磨浆工艺的最佳方案为:固液比($m(\text{烟叶}) : m(\text{水})$) 1 : 17;提取温度 60 °C;提取液 pH = 8.0;磨浆 2 次.林晓婕等^[8]采用不同的方法获得烟草色素蛋白复合物 TPP (tobacco pigments protein),并研究其抗紫外性能和机理,得出 pH = 4.5 沉降的 TPP 的酚类物质含量最高,

抗紫外活性也最强.但目前的研究结合酶解技术研究烟叶蛋白抗氧化性的成果很少.本文拟通过碱溶酸沉法从大田废弃上部烟叶中提取蛋白质,研究不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率的影响,以期为烟叶蛋白复合物的利用和生物活性的进一步研究提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料:上部废弃鲜烟叶(豫烟十号,采摘自许昌市襄城县).

试剂: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , H_3PO_4 , NaOH , 茚三酮, PBS 缓冲液 (pH = 8), 均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司产;DPPH,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司产;胰蛋白酶(250 U/mg),宝生物科技有限公司产;考马斯亮蓝 G-250,牛血清白蛋白,西安国安生物科技有限公司产.

仪器:TDZ5-WS 低速多管架自动平衡离心机,湘仪离心机仪器有限公司产;SJIA-10N 冷冻干燥机,宁波市双嘉仪器有限公司产;UV-17001C 紫外分光光度计,上海凤凰光学科仪有限公司产.

1.2 方法

1.2.1 原料的预处理 将从大田新采摘的上

部废弃鲜烟叶摊开放入烘箱中,105 ℃烘烤15 min 进行杀青处理^[9],40 ℃烘干24 h,打粉,备用。

1.2.2 烟叶蛋白的提取(碱溶酸沉法) 称取50 g 烟叶粉末,加入 pH = 8 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(500 mL)中;用机械搅拌器搅拌24 h,10 000 r/min,4 ℃离心10 min;取上清液,重复上述步骤1次,合并上清液,往上清液中逐滴加入体积分数为85%的 H_3PO_4 ,搅拌,将pH值调至3.0,放置8 h;以10 000 r/min,4 ℃离心10 min,取沉淀部分,冷冻干燥,得到烟叶蛋白,为后续实验备用^[10]。

1.2.3 蛋白质含量测定 用牛血清白蛋白绘制标准曲线.准确称取烟叶蛋白0.2 g,加水溶解,定容到1000 mL,取1 mL用考马斯亮蓝法^[11]测定吸光度.同法,通过标准曲线和稀释倍数计算蛋白质含量,计算公式为

$$\text{蛋白质含量} = (\text{蛋白质浓度} \times \text{稀释倍数} / 1000 \text{ mL}) / 200 \text{ mg}$$

1.2.4 不同酶解条件对蛋白质水解度的影响 蛋白质的酶解实验分为3组,分别为胰蛋白酶组、木瓜蛋白酶组、复合蛋白酶组,每组分别进行酶解单因素实验。

1) 温度对蛋白质水解度的影响实验.取60 mg烟叶蛋白,加入3 mL水溶解,调pH到每组不同酶的最适值(胰蛋白酶 pH = 10,木瓜蛋白酶 pH = 7,复合蛋白酶 pH = 7),预热5 min;对应加入质量分数3%的不同的酶,温度分别为30 ℃,40 ℃,50 ℃,60 ℃进行反应,酶解时间2 h。

2) 时间对蛋白质水解度的影响实验.将酶解温度设置为50 ℃,酶解时间分别为0.5 h,1 h,2 h,3 h,4 h,其他条件与上述相同。

3) 加酶量对蛋白质水解度的影响实验.将酶解温度设置为50 ℃,酶解时间2 h,加酶量(质量分数)分别调至为2%,3%,4%,5%,6%,其他条件与上述相同。

4) pH 值对蛋白质水解度的影响实验.将酶解温度设置为50 ℃,酶解时间2 h,加酶量3%.胰蛋白酶组 pH 值分别调至7,8,9,10,11,12;木瓜蛋白酶组 pH 值分别调至5,6,7,8,9;复合蛋白酶组 pH 值分别调至4,5,6,7,8,9.其他实验条件与上述相同。

1.2.5 完全水解的蛋白水解液的制备与水解度^[12]的测定 1) 完全水解的蛋白水解液的制备.取烟叶蛋白100 mg,放入40 mL耐压瓶中,加入5 mL的6 mol/L盐酸,拧紧瓶盖,110 ℃油浴中水解24 h;冷却,过滤,滤液旋转蒸发至蒸干,加蒸馏水50 mL左右,用1 mol/L NaOH中和至pH = 6,定容至100 mL。

2) 水解度的测定.实验组:茚三酮法测氨基酸浓度,取烟叶完全水解蛋白液0.2 mL,0.4 mL,0.6 mL,0.8 mL,1.0 mL于试管中,蒸馏水补至4.0 mL,加pH = 8缓冲溶液1.0 mL,茚三酮溶液1.0 mL,混匀,沸水浴加热15 min,冷却,用蒸馏水稀释至10 mL,570 nm处测定吸光度(水作参比).对照组:另取100 mg蛋白质,加水100 mL,振荡均匀后过滤,取相应体积的滤液,按上述方法测定吸光度。

取灭酶的水解液1 mL,稀释至50 mL,过滤,取滤液1 mL,加水至4 mL,按上述茚三酮法反应,570 nm处测定吸光度(水作参比).另取同种未水解烟叶蛋白溶液1 mL,按上述方法(茚三酮法)测定吸光度,并计算二者吸光度的差值.以相同体积样品的吸光度之差与烟叶蛋白的含量作工作曲线,取线性部分作标准曲线.然后根据烟叶蛋白水解液中蛋白质浓度与吸光度标准曲线计算得到蛋白质含量,按下式计算水解度:

$$DH = \frac{A}{1000 \times W} \times V_1 \times 50 \times 100\%$$

式中,A为计算得到蛋白质的含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),W为称样重/g, V_1 为水解液的总体积/mL。

1.2.6 不同酶解条件下酶解产物 DPPH 清除率^[13]的计算

对不同条件下的烟叶蛋白水解液稀释 50 倍,测定其 DPPH 清除能力.取 3 组试管,分别为实验组、对照组和空白组.实验组加 1 mL 烟叶蛋白水解液,3 mL DPPH 溶液,漩涡振荡器混匀,避光放置 30 min,以 50% 乙醇溶液调紫外分光光度计为零,于 517 nm 处测定其吸光度,记为 A_i ;对照组加入 1 mL 蒸馏水,3 mL DPPH 溶液,方法同上,测得吸光度记为 A_0 ;空白组加 1 mL 烟叶蛋白水解液,3 mL 50% 乙醇,方法同上,测得吸光度记为 A_j .以不同条件下的烟叶蛋白水解液为研究材料,设置一组实验,每组实验重复 3 次.烟叶蛋白水解液对 DPPH 清除率/% 的计算公式如下:

$$\text{DPPH 清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 废弃烟叶蛋白提取结果

按照实验 1.2.2 的方法从 50 g 烟叶粉末中提取出 4 g 蛋白质,烟叶蛋白质得率为 8%.由牛血清白蛋白标准液得到的标准曲线为 $y = 0.0075x + 0.9453$, $R^2 = 0.9932$.

取烟叶蛋白水解液中蛋白质含量与吸光度值作图即得图 1,标准曲线为 $y = 0.7313x - 0.0424$, $R^2 = 0.9952$.稀释后的样品平均吸光度为 1.4301,计算得到蛋白质浓度为 64.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,烟叶蛋白含量为 0.3232 mg/g.

2.2 不同酶解条件对烟叶蛋白水解度的影响

图 2 反映 3 种酶在不同实验条件下对烟叶蛋白水解度的影响.图 2a) 中,胰蛋白酶对烟叶蛋白的水解度随酶解温度的升高先增加后减少,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右达到最高值 34.40%;木瓜蛋白酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右达到最高值 41.72%;复合蛋白酶在 40 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 范围内对烟叶蛋白的水解变化不明显,从节约能源考虑,取 40 $^{\circ}\text{C}$ 为最适温度.图 2b) 中,随酶解时间的延长,3 种酶对烟叶

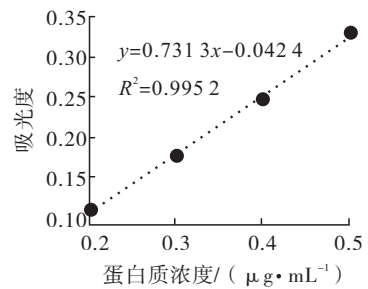


图 1 烟叶蛋白水解液中蛋白质浓度与吸光度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of protein concentration and absorbance in tobacco protein hydrolysate

蛋白质的水解度的影响都有所增大:胰蛋白酶组中烟叶蛋白的水解度在 2 h 以后几乎不变,故最适酶解时间为 2 h;木瓜蛋白酶组在酶解时间为 0.5 h 时,烟叶蛋白水解度已经达到较高的水平(39.65%);复合蛋白酶组烟叶蛋白的水解度在 3 h 后相对稳定在较高水平(43.99%),需要的反应时间比较长.从图 2c) 水解度趋势可以看出,最适加酶量分别为:胰蛋白酶为底物质量的 5%,木瓜蛋白酶为底物质量的 3%,复合蛋白酶为底物质量的 5%.从图 2d) 可以看出,胰蛋白酶的最适 pH 值为 10,木瓜蛋白酶的最适 pH 值为 8,复合蛋白酶的最适 pH 值为 7.

综上,在单因素实验的基础上进行测试,结果如下:胰蛋白酶,在酶解温度 50 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间 2 h,加酶量为底物质量的 5%,pH = 10 的条件下,烟叶蛋白水解度最高为 34.98%;木瓜蛋白酶,在酶解温度 50 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间 0.5 h,加酶量为底物质量的 3%,pH = 8 的条件下,烟叶蛋白水解度最高为 43.43%;复合蛋白酶,在酶解温度 40 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间 3 h,加酶量为底物质量的 5%,pH = 7 的条件下,烟叶蛋白水解度最高为 41.15%.

2.3 不同酶解条件下烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除能力的影响

图 3 为 3 种酶在不同实验条件下获得的烟

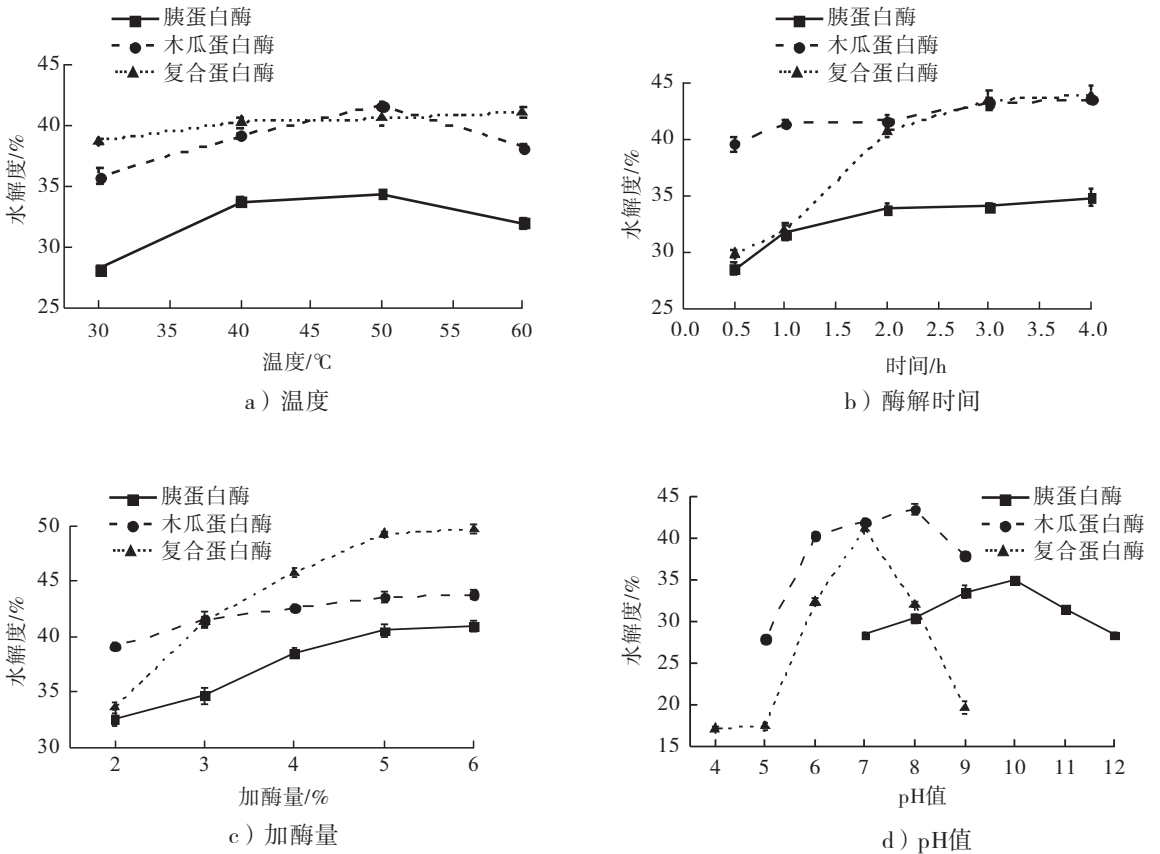


图2 不同酶解条件对烟叶蛋白水解度的影响

Fig.2 Effect of different enzymolysis conditions on hydrolysis degree of tobacco leaf protein

叶蛋白多肽对 DPPH 清除能力的影响. 由图 3a) 可知,胰蛋白酶组烟叶蛋白多肽对 DPPH 的清除能力很低;木瓜蛋白酶组烟叶蛋白多肽对 DPPH 的清除率在 40 °C 时达到最高值 43.51%,也就是说,其他条件不变时,温度为 40 °C 时木瓜蛋白酶对烟叶蛋白质的水解产物抗氧化性最佳;复合蛋白酶组在 50 °C 时达到最高值 28.55%. 从图 3b) 中可以看出,随着酶解时间的增加:胰蛋白酶组多肽对 DPPH 清除率差异仍不显著,且抗氧化性很低;木瓜蛋白酶组在 2 h 左右烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率最高,为 43.02%;复合蛋白酶组随时间增加抗氧化性先增加后减少,在酶解时间为 1 h 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率最高为 36.71%. 从图 3c) 中可以看出,胰蛋白酶组的烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率很低;木瓜蛋白酶组和复合

蛋白酶组在加酶量 > 3% 时烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率变化趋势相似,清除率分别为 43.30% 和 27.70%;从图 3d) 中可以看出,胰蛋白酶组的烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率很低,pH 值的变化对其影响不大;木瓜蛋白酶组在 pH = 7 时,清除率达到最高值为 44.87%;复合蛋白酶组在 pH 为 6 ~ 8 时,清除率变化不显著,pH = 8 时,清除率为 29.33%. 虽然木瓜蛋白酶和复合蛋白酶的酶活力不同,但是在高于 3% 的加酶量后对 DPPH 清除率变化不明显,说明在 3% 的加酶量下,酶活力不是影响烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率的主要因素^[14].

综上,在单因素实验基础上进行测试,结果如下:胰蛋白酶在酶解温度 30 °C,酶解时间 4 h,加酶量为底物质量的 2%,pH = 11 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率为 3.56%;木瓜蛋白

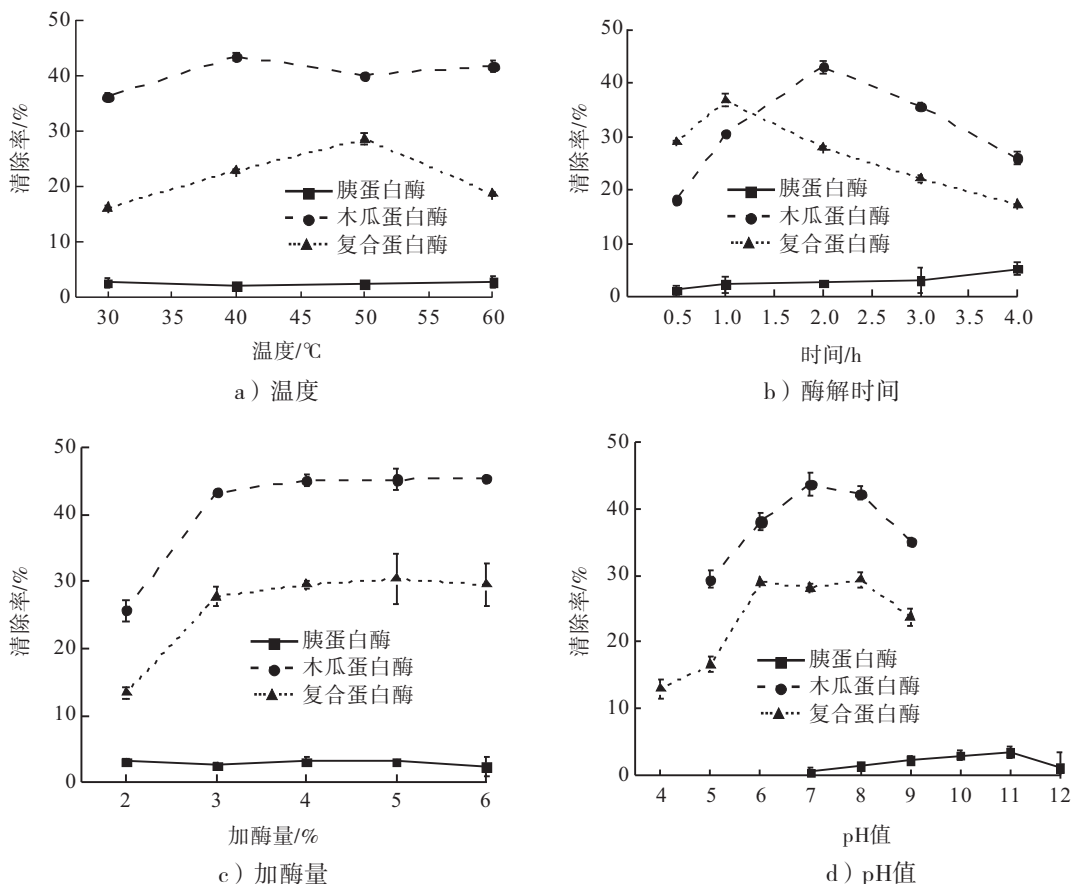


图3 不同酶解条件下获得的烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除能力的影响

Fig.3 Effect of scavenging ability of tobacco protein peptides to DPPH under different enzymolysis conditions

酶在酶解温度 40 °C, 酶解时间 2 h, 加酶量为底物质量的 3%, pH = 7 时, 烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率最高, 为 45.22%; 复合蛋白酶在酶解温度 50 °C, 酶解时间 1 h, 加酶量为底物质量的 3%, pH = 8 时, 烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率为 39.44%.

3 结论

本文采用碱溶酸沉法从大田废弃上部新鲜烟叶中提取蛋白质, 分别使用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶对烟叶蛋白进行酶解, 研究不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和不同条件下获得的烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率的影响, 得出以下结果:

1) 胰蛋白酶, 在酶解温度 50 °C, 酶解时间

2 h, 加酶量为底物质量的 5%, pH = 10 时, 烟叶蛋白水解度最高为 34.98%; 木瓜蛋白酶, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 0.5 h, 加酶量为底物质量的 3%, pH = 8 时, 烟叶蛋白水解度最高为 43.43%; 复合蛋白酶, 酶解温度 40 °C, 酶解时间 3 h, 加酶量为底物质量的 5%, pH = 7 时, 烟叶蛋白水解度最高为 41.15%.

2) 胰蛋白酶, 在酶解温度 30 °C, 酶解时间 4 h, 加酶量为底物质量的 2%, pH = 11 时, 烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率为 3.56%; 木瓜蛋白酶, 在酶解温度 40 °C, 酶解时间 2 h, 加酶量为底物质量的 3%, pH = 7 时, 烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率最高, 为 45.22%; 复合蛋白酶, 在酶解温度 50 °C, 酶解时间 1 h, 加酶量为底物质量的 3%, pH = 8 时, 烟叶蛋白多肽对 DPPH 清

除率为 39.44%.

这表明,蛋白多肽水解度最优的酶解条件与蛋白多肽对 DPPH 清除率最高的酶解条件不同,进而说明蛋白多肽的水解度高低与其抗氧化性并非正相关.蛋白多肽既可以作为美拉德反应的底物,也可以作为抗氧化剂,在具体实验中可以针对不同的应用目的,选择相应的最优酶解条件.该结果为烟叶蛋白的利用和烟叶蛋白多肽生物活性的进一步研究提供了理论依据.下一步的研究重点将是多肽的化学组成和抗氧化活性的机理.

参考文献:

[1] PAPENFUS H D. 运用打顶和控制腋芽技术调节烟叶可用性[J]. 烟草科技,1997(1):37.

[2] 李殿殿,李志能,林娟. 利用废弃烟叶栽培糙皮侧耳初探[J]. 食用菌学报,2011,18(4):9.

[3] 田少君,张磊. 烟叶叶蛋白的提取研究[J]. 食品科技,2005(5):15.

[4] 饶国华. 利用低次烟叶蛋白制备生物活性肽及烟用香精的研究[D]. 广州:华南理工大学,2006.

[5] 李建杰,叶磊,荣瑞芬. 生物活性肽的酶法制备及分离鉴定研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(2):195.

[6] 董二慧,谭红,何锦林,等. 响应曲面法优化低

次烟叶可溶性蛋白提取工艺[J]. 江苏农业科学,2013(2):235.

[7] 饶国华,赵谋明,林伟锋,等. 低次烟叶蛋白质提取工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005(11):67.

[8] 林晓婕,傅红,杨琳,等. 烟草色素蛋白复合物中多酚类物质对其抗紫外性能的影响[J]. 中国烟草科学,2011(2):57.

[9] 李跃平,徐兴阳,高福宏,等. 烤烟成熟鲜烟叶10种化学成分受海拔与叶位的影响研究[J]. 西南农业学报,2012,25(5):1620.

[10] 刘颖,付薇,宋丹丹,等. 限制性酶解米糠蛋白功能性质研究[J]. 食品工业,2016,37(3):141.

[11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem,1976,72:248.

[12] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定[J]. 中国油脂,2000,25(6):176.

[13] 勾明玥,刘梁,张春枝. 采用 DPPH 法测定 26 种植物的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2010,36(3):148.

[14] 赵谋明,董红竹,郑淋,等. 不同蛋白酶水解高温花生粕和低温花生粕及其水解产物抗氧化活性的对比研究[J]. 现代食品科技,2016,32(4):1.