

酶解法制茶渣多肽及其抗氧化性能研究

黄晓辉, 王颖, 林辉

宁德师范学院化学与材料学院, 福建 宁德

Email: pauperxh@sina.com

收稿日期: 2020年8月26日; 录用日期: 2020年9月11日; 发布日期: 2020年9月18日

摘要

以茶渣粗蛋白为原料, 使用酶法水解制茶渣多肽。制备茶渣多肽的最优工艺为: 采用碱性复合酶(碱性果胶酶:高碱性纤维素酶 = 1:1)、加酶量1600 U/g、粗蛋白水溶液的质量分数为0.8%、水解温度55°C、pH为10、水解时间1 h。对茶渣多肽进行抗氧化性能研究结果表明: 茶渣多肽对羟基自由基具有清除作用, 清除率高达77.46%, 茶渣多肽对DPPH·具有清除作用, 茶渣多肽对DPPH·的抑制率达82%。

关键词

茶渣多肽, 酶水解法, 抗氧化性能

Study on Antioxidant Properties and Extraction Technology of Tea-Leaf Peptides by Enzymatic Hydrolysis

Xiaohui Huang, Ying Wang, Hui Lin

Chemical and Material College, Ningde Normal College, Ningde Fujian

Email: pauperxh@sina.com

Received: Aug. 26th, 2020; accepted: Sep. 11th, 2020; published: Sep. 18th, 2020

Abstract

The polypeptides from the tea-leaf are hydrolyzed by enzymatic hydrolysis. The results show that the optimal process for the preparation of tea-leaf peptides: using alkaline composite enzyme (alkaline pectinase:high alkaline cellulase = 1:1), enzyme quantity 1600 u/g, the ratio of crude protein of aqueous solution 0.8%, hydrolysis temperature 55°C, pH 10, the time 1 h. The antioxidant activity of tea-leaf peptides showed that tea-leaf peptides had scavenging effect on hydroxyl radi-

cal with a high scavenging rate of 77.46%, tea-leaf peptides had scavenging effect on DPPH· and the inhibitory rate of tea-leaf peptides on DPPH· was up to 82%.

Keywords

Tea-Leaf, Enzymatic Hydrolysis, Antioxidant Properties

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着茶叶及其衍生产品消费市场的扩大,生产过程和消费后留下的茶渣不仅成为了企业的负担,也对环境造成了污染,因此对茶渣进行更深层次的研究不仅有利于发挥茶渣的经济价值,而且对改善人民生活环境提高人民的生活水平都有重要意义。

茶渣多肽是茶渣蛋白水解的产物,与茶渣蛋白相比,茶渣多肽更易于吸收和利用并且具有一定的抗氧化性。可作为天然抗氧化剂替代传统的化学合成的抗氧化剂应用于食品工业、化妆品工业以及医药工业等[1] [2] [3]。现阶段茶渣中具有抗氧化活性的多肽的研究较少[4] [5] [6],主要是由于大规模生产过程存在工艺复杂问题,而且长时间的提取容易造成多肽的变性失活等[7] [8] [9]。相较而言,酶解法的制备条件相对温和,制备过程较为安全,制备成本低,因而成为当下抗氧化肽制备的普遍方法。

本次实验是以探究酶解法制茶渣多肽,并研究其抗氧化性能。

2. 实验部分

2.1. 实验药品和仪器

无水乙醇,氢氧化钠,丙酮(AR,西陇化工股份有限公司);磷酸二氢钾,磷酸氢二钠,(AR,国药集团化学试剂有限公司);盐酸(AR,上海三鹰化学试剂有限公司);邻二氮菲,氯化钠,氯化钾(AR,天津市福晨化学试剂);KQ-250DE型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;UV-2100型双光束紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;RE-52A型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;GF06型多功能粉碎机,上海霸辉工具有限公司。

2.2. 茶渣多肽的提取工艺流程

茶渣多肽样液的制备流程如图1所示。

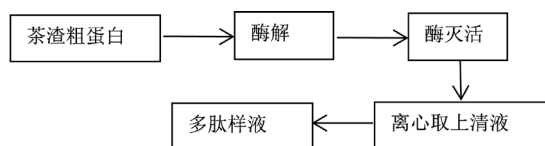


Figure 1. Preparation process of polypeptide from tea residue [3]

图1. 茶渣多肽的制备工艺流程[3]

2.3. 酶的筛选

探究不同种类的酶对茶叶蛋白质水解的影响。实验过程中,控制加酶量为1000 U/g,粗蛋白水溶液

的质量分数为 0.5%，pH 值为 7，水解温度 45℃，水解 1 h，测吸光度。

2.4. 单因素试验

按照 2.2 工艺流程考察了加酶量、水解温度、pH 值、粗蛋白水溶液的质量分数和水解时间五种因素对多肽提取率的影响。

2.5. 正交试验法

在单因素的基础上，选择其中的 4 个主要影响因素，采用 L9(3⁴)表，进行正交试验，以茶渣中多肽对羟自由基的清除率为总指标，优化茶渣多肽的提取工艺。

2.6. 茶渣多肽的抗氧化活性

茶渣多肽的抗氧化性可通过对多肽对羟自由基和 DPPH·(二苯代苦味肼基自由基)的清除能力进行表示[10][11]。

2.7. 茶渣多肽的抗氧化活性

2.7.1. 茶渣多肽对羟自由基的清除试验

采用邻二氮菲法[10]测定多肽对羟自由基的清除率。并按公式 1 计算茶渣多肽对羟基自由基(·OH)的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{空白}} - A_{\text{损伤}}} \times 100 \quad (1)$$

2.7.2. 茶渣多肽对 DPPH·自由基的清除试验

准确称取 0.0197 g DPPH·，用无水乙醇定容于 250 mL 容量瓶，得到浓度为 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH·标准溶液。分别取 0、2、4、6、8、10 mL 标准溶液，用无水乙醇定容至 10 mL。在波长为 516 nm 波长处测定上述标准溶液的吸光度，制作标准曲线。另取一比色管加入 0.4 mL 0.166 mg/mL 的乙醇溶液，2 mL DPPH·溶液做对比，混合均匀后反应 30 min [12]，用无水乙醇定容至 10 mL，测定 516 nm 波长下吸光值的变化。按照公式 2 计算抗氧化物质的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{[\text{DPPH}\cdot]_t}{[\text{DPPH}\cdot]_{t=0}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中： $[\text{DPPH}\cdot]_{t=0}$ —0 时刻体系中 DPPH·的浓度， $[\text{DPPH}\cdot]_t$ —t 时刻体系中 DPPH·的浓度。

3. 结果与分析

3.1. 酶的筛选结果

探究果胶酶、纤维素酶、中性复合酶(果胶酶:纤维素酶 = 1:1)、碱性果胶酶、高碱性纤维素酶、碱性复合酶(果胶酶:纤维素酶 = 1:1)对茶渣蛋白制备多肽含量的影响，其中碱性复合酶(果胶酶:纤维素酶 = 1:1)水解的多肽对羟自由基的清除率最高。

不同比例的碱性复合酶水解蛋白质产生的茶渣多肽对羟基自由基的清除率不同。其中碱性果胶酶与高碱性纤维素酶的比例为 1:1 时的碱性复合酶水解产生的多肽对羟基自由基的清除能力最强。因此可以认为碱性复合酶(果胶酶:纤维素酶 = 1:1)为最适的酶的比例的选择。

3.2. 加酶量的选择

由图 2 可以发现,随着加酶量的增加茶渣多肽对羟基自由基的清除能力逐渐提高最后趋于平缓。试验中,加酶量为 1200 U/g、1600 U/g、2000 U/g 时,清除率相差不大,考虑节约药品,因此可认为加酶量为 1200 U/g 即为最适加酶量。

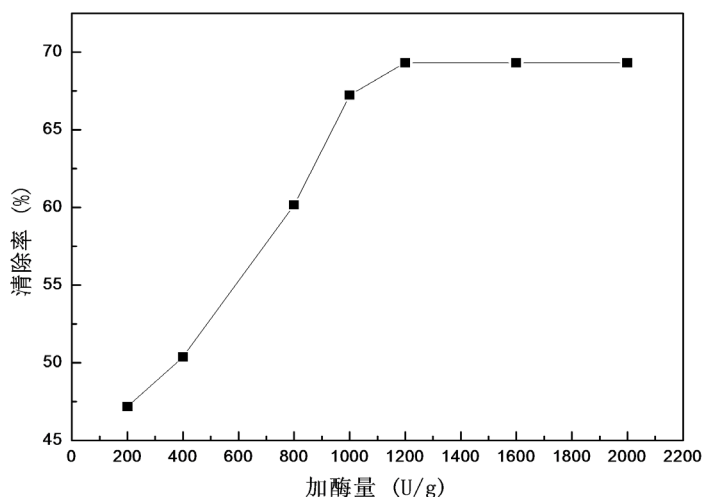


Figure 2. Effect of enzyme amount on hydroxyl radical scavenging ability
图 2. 加酶量对羟基自由基清除能力的影响

3.3. 水解温度的选择

由图 3 可以看出,在 35°C 到 55°C 温度之间,随着温度的升高多肽对羟基自由基的清除率升高。在超过 55°C 以后,随着温度的上升清除率急速下降。这是由于温度较低时,酶活性会随着温度上升而增强,当温度超过一定范围时,会使酶活性下降,较高的温度也会引起蛋白水解,此外高温会使多肽变性失活 [5]。可以确定水解最佳温度为 55°C。

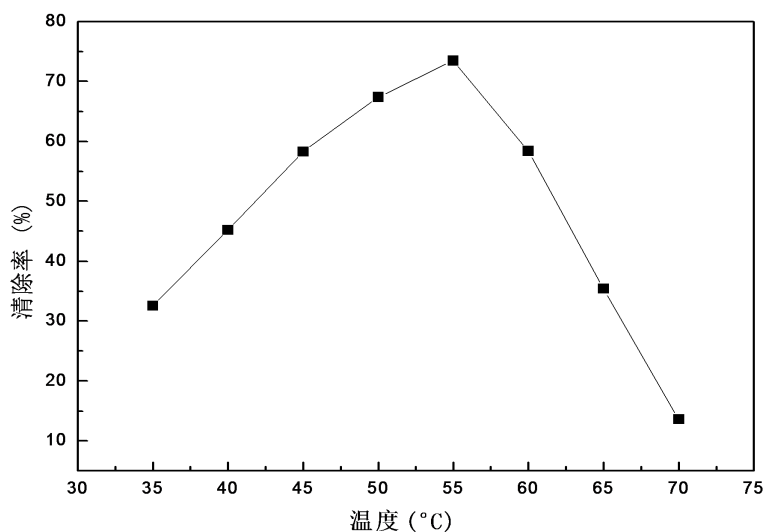


Figure 3. Effect of hydrolysis temperature on hydroxyl radical scavenging ability
图 3. 水解温度对羟基自由基清除能力的影响

3.4. pH 值的选择结果与分析

由图 4 可以看出, 茶渣多肽对羟基自由基的清除能力随 pH 增加先增强后减弱。当 pH 值为 10 时, 多肽的清除能力为 76.70%, 较为突出。因此, 试验确定碱性复合酶最佳水解 pH 值为 10。

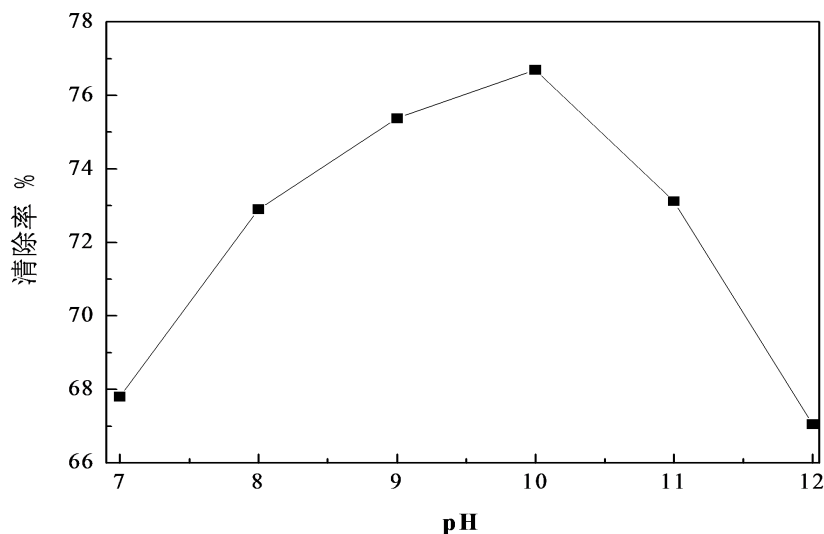


Figure 4. Effect of pH on hydroxyl radical scavenging ability

图 4. pH 对羟基自由基清除能力的影响

3.5. 粗蛋白溶液质量分数的选择结果与分析

由图 5 可知, 实验中随着粗蛋白液质量分数增加, 清除率变化较小。说明蛋白液质量分数对羟基自由基的清除影响较小。当质量分数为 0.8% 时, 多肽对羟基自由基的清除率相对较高, 因此可以确定粗蛋白液的质量分数为 0.8% 时即是最佳选择。

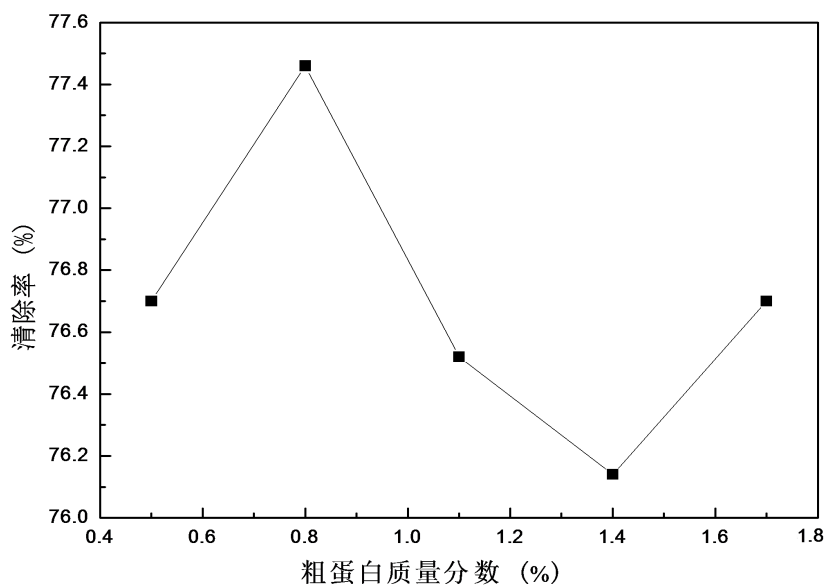


Figure 5. Effect of crude protein mass fraction on hydroxyl radical scavenging ability

图 5. 粗蛋白质量分数对羟基自由基清除能力的影响

3.6. 水解时间的选择

由图 6 可知, 随着酶水解时间的增长, 多肽的清除能力先增强再减弱。随着时间的增长, 酶解程度加深, 因此水解产生的多肽对羟基自由基的清除能力先上升, 当时间进一步延长, 其对羟自由基清除能力下降。在水解时间为 1 h 时, 清除率达 77.46% 即为最佳酶解时间。

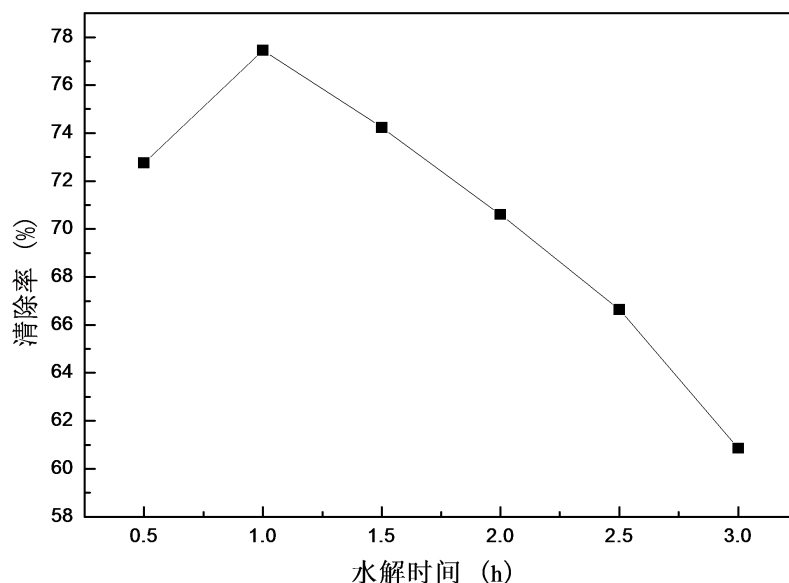


Figure 6. Effect of hydrolysis time on hydroxyl radical scavenging ability

图 6. 水解时间对羟基自由基清除能力的影响

3.7. 正交试验

综合单因素试验的结果对酶法制茶渣多肽的工艺进行优化。因素水平如表 1 所示, 按照表进行 4 因素 3 水平的正交实验。实验结果如表 2 所示。

Table 1. Orthogonal table of experimental factors $L_9(3^4)$

表 1. 实验因素水平正交表 $L_9(3^4)$

水平	因素			
	A 加酶量(U/g 粗蛋白)	B 水解温度(°C)	C pH	D 酶解时间(h)
1	1000	50	9	0.5
2	1200	55	10	1
3	1600	60	11	1.5

Table 2. The results of orthogonal test of enzymatic hydrolysis

表 2. 酶法水解正交试验结果

试验号	因素				清除率(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	70.83
2	1	2	2	2	72.54
3	1	3	3	3	67.05
4	2	1	2	3	72.73

Continued

5	2	2	3	1	70.64
6	2	3	1	2	69.89
7	3	1	3	2	72.16
8	3	2	1	3	74.62
9	3	3	2	1	70.45
K ₁	0.70	0.72	0.72	0.71	
K ₂	0.71	0.73	0.72	0.72	
K ₃	0.72	0.69	0.70	0.71	
k ₁	0.234	0.240	0.239	0.235	
k ₂	0.237	0.242	0.240	0.238	
k ₃	0.241	0.230	0.233	0.238	
极差 R	0.023	0.035	0.020	0.009	

从表 2 可知: 综合酶法水解制多肽的影响因素中, 各因素的影响次序为水解温度(°C) > 加酶量(U/g) > pH > 水解时间(h)。其中水解温度对清除率的影响较大。因此碱性复合酶(果胶酶:纤维素酶=1:1)水解蛋白质制茶渣多肽的最佳工艺参数如下: A₃B₂C₂D₂。即加酶量为 1600 U/g, 水解温度为 55°C, pH 为 10, 水解时间为 1 h。在此最佳工艺下进行验证实验, 得到的清除率为 77.51%, 比预测值 74.62%高。对比文献 [7]对羟基自由基的清除率 56.7%, 本实验获得的清除率是其 1.37 倍, 结果显示以 A₃B₂C₂D₂ 为条件的工艺是可行的。

3.8. 茶渣多肽抗氧化活性

3.8.1. 茶渣多肽对羟基自由基的清除能力

由图 7 可知, 茶渣多肽对羟基自由基的清除能力随着茶渣粗蛋白的浓度的升高而增强, 最后趋于平缓。在粗蛋白浓度为 0.8 mg/mL 时, 清除率最高, 达到 77.46%。

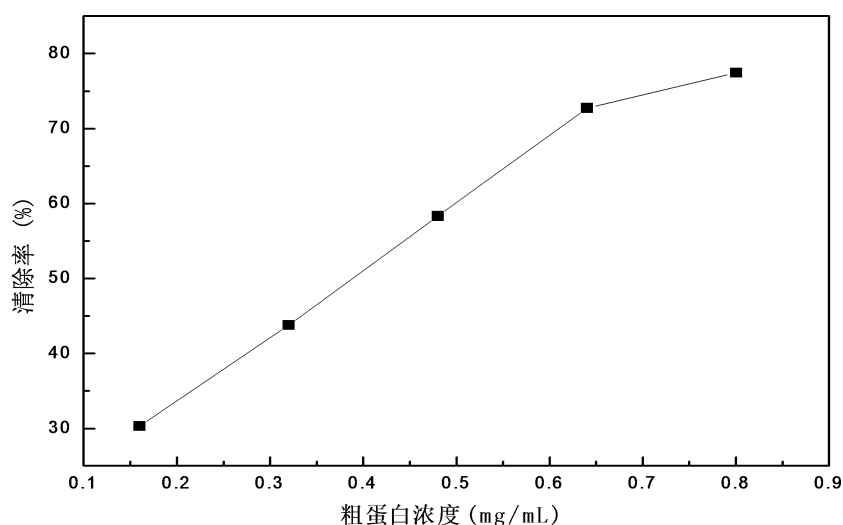


Figure 7. Effect of crude protein concentration on hydroxyl radical scavenging rate
图 7. 粗蛋白浓度对羟基自由基清除率的影响

3.8.2. 茶渣多肽对 DPPH· 自由基的清除试验

由图 8 可得, 茶渣多肽对 DPPH· 具有清除作用, 且随着粗蛋白浓度的升高, 茶渣多肽对 DPPH· 的抑制作用增强。在粗蛋白浓度为 0.8 mg/mL 时抑制率最强, 达到 82%。

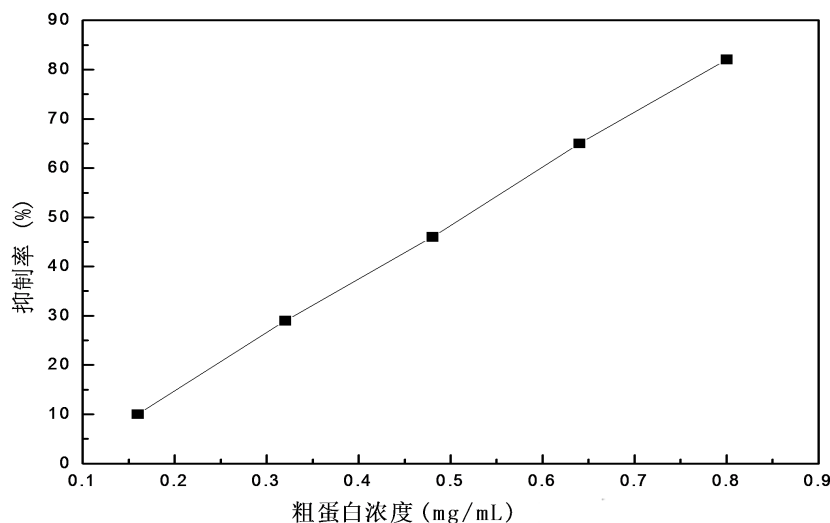


Figure 8. Inhibition of crude protein concentration on DPPH·
图 8. 粗蛋白浓度对 DPPH· 的抑制作用

4. 结论

通过碱液法对茶渣中进行提取可以得到粗蛋白粉。通过多种方法探究酶法水解茶渣蛋白制备茶渣多肽的工艺的实验过程。可以得出以下结论:

酶法水解茶渣蛋白制备茶渣多肽的最优工艺是: 粗蛋白水溶液的质量分数为 0.8%, 加酶量为 1600 U/g, 水解温度为 55°C, pH 为 10, 水解时间 1 h。

茶渣多肽对羟基自由基具有清除作用, 表现为随粗蛋白浓度的升高, 茶渣多肽对羟基自由基的清除作用增强。在粗蛋白浓度为 0.8 mg/mL 时, 清除率最高, 达到 77.46%。茶渣多肽对 DPPH· 具有清除作用, 表现为随着粗蛋白浓度的升高, 茶渣多肽对 DPPH· 的清除作用增强。当粗蛋白浓度为 0.8 mg/mL 时, 茶渣多肽对 DPPH· 的抑制率达 82%。

致 谢

感谢张飘婷同学在测试中提供的帮助, 感谢应少明教授在抗氧化活性测试中给予的指导。

基金项目

2016 年福建省高校中青年教师教育科研项目(科技扶贫产学研专项) (No. JZ160215), 2017 年宁德师范学院茶产业与文化研究所专项项目(No. 2017C016)的项目支持。

参考文献

- [1] 陆晨, 张士康, 王彬, 等. 碱提酸沉法提取茶叶蛋白质的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(6): 56-59.
- [2] 叶倩, 梁月荣, 陆建良, 等. 茶渣综合利用研究进展[J]. 茶叶, 2005, 31(3): 150-153.
- [3] 周绍迁. 茶渣蛋白的提取与应用研究[J]. 福建茶叶, 2013, 35(6): 26-30.
- [4] 张士康, 陆晨, 王彬, 等. 茶渣蛋白功能特性研究[J]. 中国茶叶加工, 2012(3): 31-34.

-
- [5] 罗红玉, 郁军, 岳鹏翔, 等. 茶渣多肽制备及其对羟自由基的清除能力[J]. 食品科学, 2011(14): 61-66.
- [6] 靳伟刚, 张洋, 罗璠琳, 等. 茶渣资源的开发与利用——茶叶蛋白肽的功能性研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(5): 52-58.
- [7] 李永富. 茶渣蛋白和茶渣多肽的制备及性质的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海师范大学, 2015.
- [8] 于长青, 赵学明, 姚琨, 等. 高产蛋白酶芽孢杆菌的选育及其在大豆活性肽制备中的应用[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(1): 34-37.
- [9] 杜林, 李亚娜. 生物活性肽的功能与制备研究进展[J]. 中国食物与营养, 2005(8): 18-21.
- [10] 邹小明, 谢骞, 朱立成, 等. 茶叶蛋白的提取工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2007(1): 169-171.
- [11] 王和才, 胡秋辉. DPPH 法测定紫红薯提取物清除自由基的能力[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1): 132-135.
- [12] 李春阳, 许时婴, 王璋. DPPH 法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 102-106.