

超声改性对辣木籽蛋白体外消化特性的影响

巫艳慧, 唐诗琦, 杜秋函, 林莹, 符珍*

(广西大学轻工与食品工程学院 南宁 530004)

摘要 以辣木籽水溶蛋白(MOWP)为原料,采用体外模拟消化模型和体外抗氧化模型探究不同超声功率处理对其体外消化特性及氧化活性的影响。结果表明:在胃肠连续消化期间因超声作用,MOWP 消化率、水解度明显提高,随着超声功率的增加消化率先降低后上升,在超声功率 650 W 时,胃消化和胃肠连续消化的酶解液消化率分别达(68.52±1.70)%和(91.48±0.64)%;经过模拟胃消化和胃肠连续消化,蛋白质分子分解成分子质量更小的蛋白,两阶段内源荧光峰值波长发生变化,胃消化的峰值由 351 nm 红移至 353 nm,胃肠连续消化由 353 nm 红移后到达 355 nm;超声功率为 60%时,MOWP 经过胃消化和胃肠连续消化的 DPPH·清除能力最优,分别为(78.26±0.85)%和(44.23±0.98)%。MOWP-100 在胃肠连续消化阶段 ABTS 自由基清除率最高,为(91.87±0.19)%。结论:超声改性有助于提高 MOWP 的消化性能,经超声处理 MOWP 消化物质具有优良抗氧化活性,为 MOWP 引入食品并在人体中消化提供参考。

关键词 辣木籽水溶蛋白; 消化率; 抗氧化活性; 体外消化

文章编号 1009-7848(2023)02-0111-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.011

辣木(*Moringa oleifera*, MO)又称苜蓿树、鼓槌树、角树,是一种具有高利用价值、实用价值和营养价值的多年生植物,原产于印度北部和北欧的部分地区,现分布在亚洲、非洲、中美洲和南美洲,分布面积广泛^[1]。果实成熟期采摘的辣木果实,即辣木籽(*Moringa oleifera seeds*, MOS)。MOS 营养成分极其丰富,含有大量脂肪、蛋白质、多糖、矿物质元素和膳食纤维等,被誉为“植物钻石”^[2]。研究显示,摄入辣木籽粉可使糖尿病大鼠的肾功能参数显著增加和改善^[3],MOS 还具有的抗关节炎特性^[4]。多种研究指出辣木籽蛋白功能特性优于其它植物蛋白,辣木叶及种仁中蛋白质含量为牛奶的 4 倍^[5]。另外,辣木中含有多种人体必需的氨基酸,尤以赖氨酸和苏氨酸含量最高^[6]。辣木籽的市场开发主要用于榨油,而榨油后留下的辣木籽粕,粗蛋白含量达 50%以上^[7]。

超声波在溶液中传播主要是通过产生空化效应和机械效应等多重物理作用,对蛋白质构象产生较大影响且不会显著改变氨基酸排列顺序。据报道,超声波已广泛应用于大豆、玉米等的研究中,对其功能特性具有显著的提高作用^[8-11]。高强

度的超声处理可以通过改变蛋白的空间结构,如改变蛋白质二三级结构,来提高溶解度、吸水性等功能特性^[12-13]。近年来,许多科研人员对玉米蛋白、芸豆蛋白、玛咖蛋白等易获取的植物蛋白进行模拟人体胃肠消化研究,以酶解后的多肽作进一步分析,寻找具有高抗氧化能力的植物性多肽^[14-16]。许多研究表明,经过脱酰胺、糖基化等化学改性和热处理等物理改性对蛋白质结构的改变,会进一步影响酶解消化后多肽活性以及抗氧化能力^[17-18],为多种植物蛋白在创新食品和定向改性蛋白质食品中的应用提供理论依据。

本文探究经不同超声功率改性的辣木籽水溶蛋白(MOWP),对体外消化特性和消化产物抗氧化活性的影响,寻找适合的超声条件,以提高 MOWP 消化率、水解度和抗氧化性能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辣木籽,市售,粉碎后过 80 目过筛。

胃蛋白酶(1:3000, PS3)、胰蛋白酶(1:250, EC 3.4.4.4)、胰酶粉(1:4000)、胆汁盐、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(DPPH)、菲洛嗪、邻苯二甲酰(OPA),索莱宝科技有限公司;过硫酸钾、过氧化氢、氯化亚铁、 β -巯基乙醇,上海源叶生物科技有限公司;硫酸亚铁、水杨酸、四硼酸钠,广西南宁楚

收稿日期: 2022-02-13

基金项目: 广西省自然科学基金项目(2019GXNSFAA185014)

第一作者: 巫艳慧,女,硕士生

通信作者: 符珍 E-mail: fuzhen13@gxu.edu.cn

杰生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SHZ-88 水浴恒温振荡器,江苏金怡仪器科技有限公司;CR21N 高速冷冻离心机,Himac 公司;PHSJ-3F pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;722 可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 辣木籽水溶蛋白的制备 根据 Tang 等^[19]的方法制备,取适量辣木籽粉末加入正己烷脱脂 2 h,取辣木籽粉末晾干。脱脂辣木籽粉末中加入蒸馏水(1:25 g/mL),室温条件下进行磁力搅拌 2.5 h,然后将提取液在 8 000 r/min、4 ℃的条件下离心 25 min,取上清液备用。重复上述提取过程,合并两次上清液后加入 0.5 mol/L HCl 调节上清液 pH 值至 4.5 等电点沉淀。等电点沉淀后以上述相同条件离心,取蛋白质沉淀,再透析 36 h,冷冻干燥得到 MOWP 粉末。此方法得到的 MOWP,经 HPLC 检测,纯度为(93.84±1.32)%。

1.3.2 超声处理辣木籽水溶蛋白 采用 20 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)配制 1% MOWP 悬浮液,室温条件下磁力搅拌 2 h 后将烧杯置于冰水浴中。按照超声功率 0,130,260,390,520,650 W(总功率的 0%,20%,40%,60%,80%,100%)超声波细胞破,工作时间为 3 s,间歇时间 2 s,超声处理总时间 15 min^[20]。全程保持溶液低温。取出后透析 48 h,冷冻干燥,得到超声处理的 MOWP 样品。样品名称为 MOWP、MOWP-20、MOWP-40、MOWP-60、MOWP-80、MOWP-100。

1.3.3 模拟体外胃肠消化 根据刘艳美等^[21]的胃肠液消化方法并稍作修改。取未超声和超声处理后的 MOWP 样品溶于 0.9% NaCl 配置成 10 mg/mL 蛋白质溶液,常温条件下磁力搅拌分散 30 min,0.5 mol/L HCl 调节溶液 pH 值至 2.0,放置于 37 ℃水浴保温 30 min 待消化。将胃蛋白酶溶于 0.1 mol/L HCl 配制成为 20 mg/mL 胃液,调节 pH 值至 2.0,放置于 37 ℃水浴保温 30 min 待消化。以 $V_{\text{蛋白质溶液}}:V_{\text{胃液}}=50:1$ 在 37 ℃条件下水浴振荡酶解 2 h 模拟胃消化。消化结束后取 10 mL 胃酶解液放置沸水浴灭酶 10 min,剩余胃酶解液用于模拟胃肠连续消化。将灭酶的酶解液冷却后以

10 000 r/min 离心 30 min,取上清酶解液以作备用。

将剩余胃酶解液迅速调节 pH 值至 7.5,以 $V_{\text{蛋白质溶液}}:V_{\text{肠液}}=50:1$ 加入 37 ℃水浴保温的肠液(肠液:5 mg/mL 胰蛋白酶+5 mg/mL 胆汁盐+5 mg/mL 胰酶)中,37 ℃水浴振荡酶解 2 h 模拟肠消化。消化结束后肠酶解液放置沸水浴灭酶 10 min,冷却后混合酶解液以 10 000 r/min 离心 30 min,取上清酶解液以作备用。

1.3.4 模拟体外胃肠消化消化率的测定 取 1.3.3 节模拟胃肠连续消化的胃酶解液和胃-肠酶解液灭酶的上清液。采用凯氏定氮法测定上清液含氮量,以公式(1)计算样品消化率。

$$\text{消化率}(\%) = \frac{\text{上清液含氮量} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品中含氮量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.5 模拟体外胃肠消化水解度的测定 根据 Elena 等^[22]的水解度测定方法并稍作修改。取 200 μL 的未处理 MOWP 和超声处理 MOWP 的酶解液加入 3 mL OPA 混合试剂,摇匀避光静置 2 min,在波长 340 nm 处测定吸光值,未经水解样品吸光值为 A_1 ,水解样品吸光值 A_2 ,水解度(H)参照公示(2)计算。

$$H(\%) = \frac{1.8114 \times (A_2 - A_1) \times d}{C} \times 100 \quad (2)$$

式中, d ——原样品与酶解液稀释倍数; C ——蛋白质质量浓度,g/L。

OPA 混合试剂的配制方法如下:0.1 mol/L 四硼酸钠 25.0 mL 中加入 0.5 g SDS,再加入 1.0 mL 甲醇溶解的 40 mg OPA 和 100 μL 的 β -巯基乙醇,定容至 50 mL,摇匀即可。

1.3.6 消化产物 SDS-PAGE 的测定 取 1.00 mg 不同处理条件的 MOWP 加入 400 μL 尿素和 100 μL 5 倍样品缓冲液,煮沸 5 min 后 10 000 r/min 离心 5 min。采用 12%分离胶和 5%浓缩胶,Marker(标准蛋白)上样量为 5 μL ,样品上样量为 10 μL ,浓缩胶和分离胶电压分别为 80 V 和 120 V^[23]。电泳结束后取出凝胶片,考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 0.5 h,脱色至条带清晰后使用荧光成像系统对凝胶片图像采集成像。

1.3.7 消化产物内源荧光的测定 内源荧光扫描采用荧光分光光度计测定。将 MOWP 溶液(0.2

mg/mL) 溶解于 PBS 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.0) 中。激发波长为 290 nm, 发射波长范围为 300~500 nm^[24]。

1.3.8 消化产物 DPPH 自由基清除率的测定 DPPH 自由基清除率根据 DPPH 化合物与蛋白质中的自由基反应, 在波长 517 nm 处具有强烈的吸光值, 其测定参数如表 1 所示。

按照表 1 所示的参数测定, 其中采取 0.1 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇试剂溶液进行测定。混合对应试剂后在室温条件下避光反应 30 min, 于波长 517 nm 处测定对应吸光值, DPPH 自由基清除率计算参照公式见式(3)。

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = \left[1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right] \times 100 \quad (3)$$

1.3.9 消化产物 ABTS 自由基清除率的测定 将 7 mmol/L ABTS 和 2.45 mmol/L 过硫酸钾以体积比 1:1 的比例混合均匀, 黑暗条件下放置 16 h 得到 ABTS 混合液。采用去离子水稀释 ABTS 混合液直至 ABTS 混合液吸光值为 0.7±0.02 以作备用。取 0.5 mL 酶解液加入调节后的 ABTS 混合液, 混合均匀, 避光静置 10 min, 在波长 734 nm 处测定吸光值为 A_3 。取 0.5 mL 无水乙醇加入调节后的 ABTS 混合液, 混合均匀, 避光静置 10 min, 在波长 734 nm 处测定吸光值为 A_c ^[14]。ABTS 自由基清除率计算参照式(4)。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \frac{A_c - A_3}{A_c} \times 100 \quad (4)$$

1.3.10 消化产物羟自由基的测定 取 0.5 mL 酶解液加入 0.5 mL 6 mmol/L 的硫酸亚铁和 0.5 mL 0.01% 水杨酸, 混匀后 37 °C 条件下静置 30 min, 于波长 510 nm 处测定吸光值为 A_4 ; 去离子水代替水杨酸测定其吸光值为 A_x ; 去离子水代替酶解液测定其吸光值为 A_y ^[16]。羟自由基计算参照式(5)。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{A_4 - A_x}{A_y} \right] \times 100 \quad (5)$$

1.3.11 消化产物金属螯合力 Fe^{2+} 的测定 参考韩苗等^[26]的测定方法并略作修改。取 1.0 mL 酶解液加入 0.05 mL 2 mmol/L 的氯化亚铁和 0.1 mL 5 mmol/L 的非啰嗦, 混合均匀后室温静置 10 min, 在波长 562 nm 处测定吸光值 A_5 ; 采用去离子水代

表 1 DPPH 自由基清除率测定参数
Table 1 DPPH· determination parameters
of free radical scavenging rate

编号	酶解液/ mL	DPPH 试剂/mL	无水乙醇/ mL	吸光度
1	1	1	-	A_i
2	1	-	1	A_j
3	-	1	1	A_0

替酶解液测定吸光值 A_z 。金属螯合力 Fe^{2+} 计算参照式(6)。

$$\text{金属螯合率}(\%) = \frac{A_z - A_5}{A_z} \times 100 \quad (6)$$

1.4 数据处理

试验均重复测量 3 次, 数据以平均值±标准偏差表示。试验绘图与分析分别采用 Origin 9.1 对数据进行绘图, IBM SPSS Statistics 20 软件进行显著性分析。

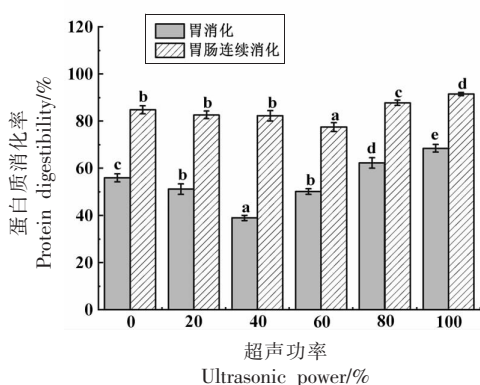
2 结果与讨论

2.1 超声功率对 MOWP 消化率的影响

图 1 显示超声处理对提高 MOWP 模拟体外胃肠消化的消化率作用。以胃酶解液和胃肠连续消化酶解液为基础, 分析发现高功率超声 ($P > 60\%$ 超声功率) 可显著 ($P < 0.05$) 提高 MOWP 在胃环境的消化率, MOWP-100 的消化率可达 (68.52 ± 1.70)%, 而 MOWP-40 低于未处理 MOWP, 其消化率 16.97%。胃肠连续消化的 MOWP 消化率也得到相似变化趋势, MOWP-100 的消化率最大为 (91.48 ± 0.64)%。龙佩^[18]在探究超声强度对 4 类谷物蛋白(小麦蛋白、荞麦蛋白、玉米蛋白和 大米蛋白)消化率的影响时也发现 400 W 左右的超声强度对谷物蛋白消化率具有极显著的提高作用。根据消化结果显示低功率超声作用并未呈现高消化率, 这可能是由于多肽链部分化学键重排后使多肽内部处于较稳定空间构象, 如 α -螺旋含量增加。随超声功率增大和肠液的进一步消化, α -螺旋含量随之降低, MOWP 分子粒径减小, 分子间趋于稳定但分子内部稳定性减弱使得 MOWP 消化率显著上升。

2.2 超声功率对 MOWP 水解度的影响

植物蛋白酶解后的水解度均为较低状态,大豆蛋白、糙米蛋白等多种蛋白的水解度均小于20%^[26-27],为提高蛋白质水解度,采用物理、化学等改性手段提高水解度。超声功率对 MOWP 水解度的影响如图2所示,MOWP-40在胃消化和胃肠连续消化水解度分别为(5.52±0.12)%和(29.30±0.15)%,均高于未处理 MOWP 和高功率处理的 MOWP,该情况与消化率变化趋势相反。当超声功率达100%时,胃消化和胃肠连续消化中水解度低于未处理 MOWP。



注:a~e 不同字母表示胃肠消化率±标准偏差在组间的显著性差异($P<0.05$)。

图1 不同超声功率对 MOWP 的胃肠消化率的影响

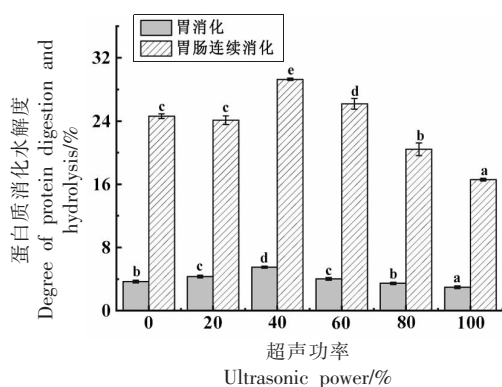
Fig.1 Effect of different ultrasonic power on gastrointestinal digestibility of MOWP

2.3 超声功率对 MOWP 消化产物亚基的影响

图3表示未酶解 MOWP 和超声处理后 MOWP 在胃肠消化后分子质量变化。经酶解处理后,蛋白质降解成分子质量更小的蛋白。经模拟胃消化水解后的酶解液主要由4 ku 和14~17 ku 亚基肽段组成,其中14~16 ku 亚基肽段含量较大;当超声功率小于40%时,亚基肽段分子质量主要为14 ku。经模拟胃肠连续消化水解后的酶解液主要由14~16 ku 亚基肽段组成,随超声强度增强,肽段分子质量变化趋势与胃消化相同。图3b和图3c两图对比分析还可知胃肠连续消化较胃消化亚基含量少,表明在消化后期可消化蛋白质分子已显著降低。

进一步分析 SDS-PAGE 图谱发现超声功率超过20%能改变 MOWP 分子结构,同时改变酶对蛋

白质分子作用肽链长度和分子质量,由于机械力和空化气泡产生的作用力不断改变化学键,将 MOWP 分子内部基团暴露,改变酶切位点,致使段肽链变为长肽链,则亚基分子质量增加。胃消化的 SDS-PAGE 图谱中还可发现经消化后酶解液含有两条亚基条带,可能是一条多肽链中含有部分二硫键,经 β -巯基乙醇分解后产生两条肽段,也有可能是胃消化直接产生两条具有显著分子质量差异的多肽片段;胃肠连续消化的 SDS-PAGE 图谱中仅有一条亚基条带,也证实胃肠酶连续消化后肽段不含二硫键。



注:a~e 不同字母表示胃肠消化水解度±标准偏差在组间的显著性差异($P<0.05$)。

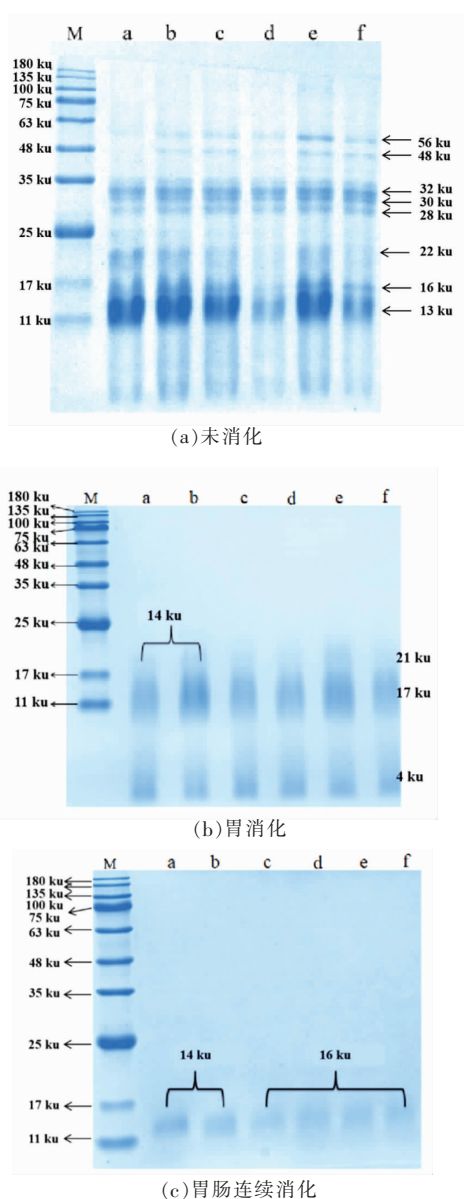
图2 不同超声功率对 MOWP 的水解度的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic power on gastrointestinal digestive hydrolysis degree of MOWP

白质分子作用肽链长度和分子质量,由于机械力和空化气泡产生的作用力不断改变化学键,将 MOWP 分子内部基团暴露,改变酶切位点,致使段肽链变为长肽链,则亚基分子质量增加。胃消化的 SDS-PAGE 图谱中还可发现经消化后酶解液含有两条亚基条带,可能是一条多肽链中含有部分二硫键,经 β -巯基乙醇分解后产生两条肽段,也有可能是胃消化直接产生两条具有显著分子质量差异的多肽片段;胃肠连续消化的 SDS-PAGE 图谱中仅有一条亚基条带,也证实胃肠酶连续消化后肽段不含二硫键。

2.4 超声功率对 MOWP 消化产物内源荧光的影响

经模拟胃消化和胃肠连续消化两阶段后,内源荧光峰值波长发生偏移,如图4所示,胃肠连续

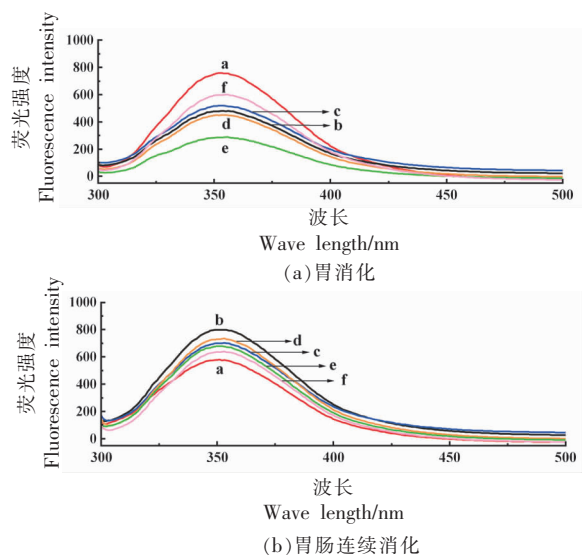


注:M. 标准分子量蛋白 Marker;a. 0%超声功率;b. 20%超声功率;c. 40%超声功率;d. 60%超声功率;e. 80%超声功率;f. 100%超声功率。

图 3 超声功率对 MOWP 的胃肠消化产物 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE pattern of gastrointestinal digestive products of MOWP by ultrasonic power

消化峰值波长大于胃消化峰值波长，并且两处消化阶段内源荧光最大峰值(λ_{max})均大于 330 nm, 以此推断经过胃消化的 MOWP 与连续消化的 MOWP 产生的肽段均处于极性环境中^[24], 连续消化极性作用强于胃消化的极性作用。在连续消化



注:a. 0%超声功率;b. 20%超声功率;c. 40%超声功率;d. 60%超声功率;e. 80%超声功率;f. 100%超声功率。

图 4 超声功率影响 MOWP 的胃肠消化产物内源荧光图谱
Fig.4 Ultrasonic power affects the fluorescence spectra of gastrointestinal digestive products of MOWP power

中, 超声预处理可改变荧光强度和峰值波长。其中经超声作用处理的 MOWP 经胃消化后消化产物内源荧光强度均降低, 经胃肠连续消化后消化产物内源荧光强度均增强; 超声功率大于 40% 时在两处消化中的荧光波长均发生红移, 胃消化的 λ_{max} 由 351 nm 红移至 353 nm, 胃肠连续消化由 353 nm (MOWP) 红移至 356 nm (MOWP-80) 处又降至 355 nm。

峰值波长红移原因可能分为两种: 1) 经超声处理的 MOWP 会改变非共价作用力, 多肽之间相连的化学键在声场冲击下不断断裂, 不同多肽之间重写排列又形成新的化学键, 依照化学键的改变多肽间末端氨基酸排列顺序也随之改变, 经过胃消化或胃肠连续消化作用后, 酶切作用生成不同分子质量亚基即峰值波长发生偏移; 2) 经超声处理的 MOWP 分子内部不断伸展, 超声强度增强伸展程度, 酶切位点暴露程度不同导致峰值波长发生偏移。

2.5 超声功率对 MOWP 消化产物抗氧化活性的影响

2.5.1 DPPH 自由基清除率

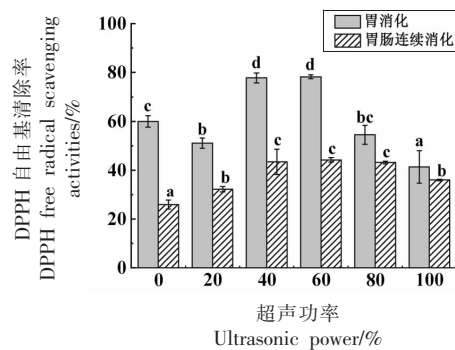
经超声处理的 MOWP 在胃消化和两步消化后的 DPPH 自由基清

除率与未处理样品相比具有显著性差异($P<0.05$)。如图5所示,经胃蛋白酶酶解后超声作用的MOWP清除能力显著增强,上升至 $(78.26\pm 0.85)\%$;然而,随着超声功率增强,在MOWP-100处降至 $(41.34\pm 6.66)\%$ 。在胃肠消化水解后DPPH自由基清除率相较胃消化显著降低,MOWP-60经酶解后虽降低至 $(44.23\pm 0.98)\%$,但优于未处理MOWP。

已有研究表明超声作用蛋白质可显著提高改性蛋白质酶解产物抗氧化活性^[25,27-28]。本文中40%~60%超声功率条件下的超声波机械和空化作用在最大程度延展分子内部化学键的同时暴露部分具有单电子和强电荷量的氨基酸,并且酶的作用位点根据超声强度而偏移,经胃蛋白酶消化后含有该类氨基酸的多肽游离于溶液中,与DPPH反应后暴露的单电子氨基酸与其相结合,DPPH自由基清除率增强。随着连续消化的进行,游离氨基酸增多,含有单电子和强电荷量氨基酸的多肽含量减少,自由基清除效果减弱。Santos等^[29]探究辣木籽水溶性凝固剂凝固血液效果中发现水提取完整辣木籽得到的凝固剂具有一定DPPH自由基清除能力,正是由于辣木籽中含有抗氧化性多肽,胃肠消化增强其抗氧化能力所致。

2.5.2 ABTS 自由基清除率 如图6所示,未处理MOWP与前期超声处理的MOWP在胃消化和胃肠连续消化中清除ABTS自由基能力呈现相反趋势,经胃消化酶解后清除ABTS自由基能力随超声功率呈现先减小后增大趋势,MOWP-40处降至最低为 $(6.45\pm 0.75)\%$;模拟胃肠连续消化后MOWP的清除ABTS自由基能力显著($P<0.05$)上升,MOWP-100的ABTS清除值升至 $(91.87\pm 0.19)\%$ 。

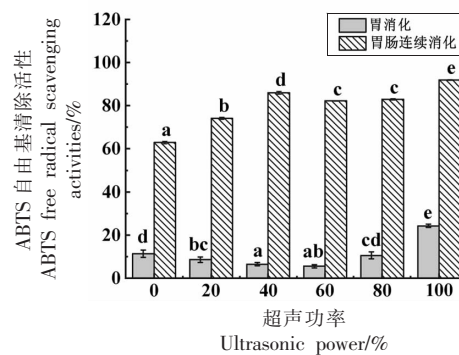
Zou等^[20]在研究中指出ABTS试剂是一种具有显色基团的化合物,该化合物极易与疏水基团或氨基酸结合。在先前的研究中^[19],MOWP经不同超声功率处理后表面疏水指数显著降低。结合ABTS试剂作用基团或氨基酸种类,提示在胃消化后大量小分子质量多肽暴露更多的亲水基团,ABTS自由基清除率降低。进入模拟小肠消化阶段,酶解作用增强,酶解程度增加,被包埋的疏水基团或者氨基酸逐渐分解、暴露,ABTS自由基清除率增大。



注:a-d不同字母表示DPPH自由基清除率±标准偏差在组间的显著性差异($P<0.05$)。

图5 超声功率对MOWP胃肠消化产物DPPH自由基清除活性的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic power on scavenging activities of DPPH free radical in gastrointestinal digestive products of MOWP



注:a~e不同字母表示ABTS自由基清除率±标准偏差在组间的显著性差异($P<0.05$)。

图6 超声功率对MOWP的胃肠消化产物ABTS自由基清除率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic power on scavenging activities of ABTS free radical in gastrointestinal digestive products of MOWP

2.5.3 羟自由基清除率 当前研究表明羟自由基在生物体内具有杀死红细胞、降解DNA、降解多糖化合物等多重恶性效应^[30]。图7所示,胃蛋白酶酶解与肠消化酶解对未处理MOWP影响较大,在胃蛋白酶酶解后羟自由基清除能力较强为 $(97.15\pm 0.93)\%$,继续模拟小肠酶解降低至 $(63.53\pm 0.50)\%$ 。经胃消化后,随着超声功率的增大,超声波作用显著降低($P<0.05$)MOWP的酶解多肽对羟自由基的消除能力;而进入胃肠连续消化,MOWP的酶解多肽对羟自由基的消除能力显著增强($P<$

0.05), MOWP-80 的清除值(96.53 ± 1.35)%。

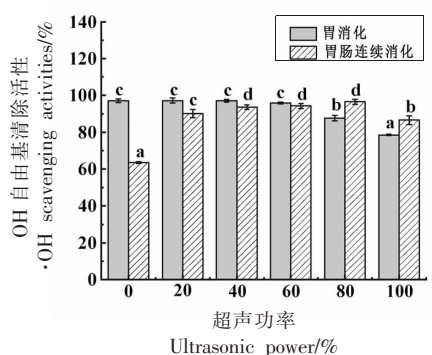
超声作用后,随功率增大(20%~80%),经胃肠连续酶解后的 MOWP 与羟自由基结合位点暴露程度增强,清除能力增加。超声功率为 60%时,胃消化酶解与肠消化酶解后的羟自由基清除率无显著变化,这可能是由于与羟自由基结合的位点在胃蛋白酶酶解后已完全暴露,多数含有结合位点的多肽与羟自由基结合,清除数值无明显变化。降低羟自由基含量对抗衰老具有积极意义,超声作用增强了人体消化 MOWP 的过程中对羟自由基清除效果。

2.5.4 Fe^{2+} 螯合力的影响 如图 8 所示,该图为前期不同超声功率处理对 MOWP 消化产物金属螯合力的影响。图中胃消化后 MOWP 的 Fe^{2+} 螯合能力均高于胃肠连续消化,并且不同功率的超声作用均使酶解后多肽的螯合力高于原蛋白。然而,进一步的研究发现模拟小肠深度酶解后 Fe^{2+} 螯合能力低于胃水解,最高值仅为(22.90 ± 1.06)%(MOWP-80),未处理 MOWP 降低至(2.54 ± 0.58)%。

根据 MOWP 消化率和水解度测定结果,胃蛋白酶水解后酶解液中含有少量完整蛋白质分子和大量多肽, Fe^{2+} 与蛋白质或多肽结合形成螯合物可降低自由基氧化速率并阻止 Fe^{2+} 进一步催化^[31-32]。含有胰蛋白酶的小肠液进一步分解蛋白质和多肽,切断多肽链中赖氨酸和精氨酸残基中侧链羧基,解离成更多游离氨基酸,对 Fe^{2+} 作用能力较小,螯合力降低。对比蛋白质和多肽对金属螯合能力,陈梦霏等^[33]在研究蛹虫草抗氧化活性时做出分析,发现多肽对金属离子螯合能力优于蛋白质,并随浓度增加而增强。本文中正是由于经胃水解产生大量多肽加强 Fe^{2+} 螯合能力,前期超声作用增加胃蛋白酶酶切位点,解离更多具有螯合能力的多肽,进一步增强 Fe^{2+} 螯合力。

3 结论

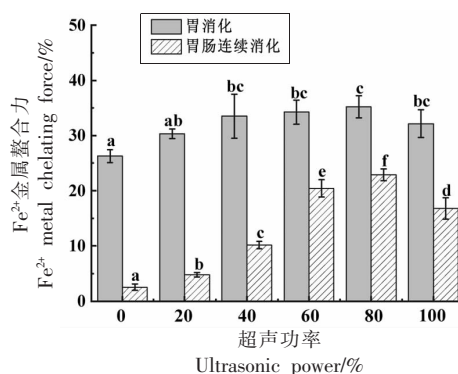
本研究表明 MOWP 经模拟胃肠消化的消化产物的消化率、水解度和荧光峰值波长随着超声功率的增强而增加。在模拟人体消化过程中,超声处理使 MOWP 增强分子内部延展,并改变化学键与分子间作用方式。超声处理的 MOWP 在胃消化阶段生成较多多肽,显著增强消化产物的 DPPH



注:a~d 不同字母表示羟自由基±标准偏差在组间的显著性差异($P < 0.05$)。

图 7 超声功率对 MOWP 的胃肠消化产物羟自由基清除率的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic power on scavenging activities of OH free radical in gastrointestinal digestive products of MOWP



注:a~f 不同字母表示 Fe^{2+} 螯合力±标准偏差在组间的显著性差异($P < 0.05$)。

图 8 超声功率对 MOWP 的胃肠消化产物 Fe^{2+} 螯合力的影响

Fig.8 Effect of ultrasonic power on Fe^{2+} chelating force in gastrointestinal digestive products of MOWP

自由基清除力和 Fe^{2+} 螯合力;模拟小肠进一步水解后生成较多游离氨基酸,则增强 ABTS 自由基清除力和羟自由基清除力。

参 考 文 献

- [1] TRIGO C, CASTELLÓ M L, ORTOLÁ M D, et al. *Moringa oleifera*: An unknown crop in developed countries with great potential for industry and adapted to climate change[J]. *Foods*, 2020, 10(1): 2-14.

- [2] 杜同同, 孙朋, 鄢庆祥, 等. 辣木籽的综合研究[J]. 大众科技, 2017, 19(12): 46-48.
DU T T, SUN P, YAN Q X, et al. Comprehensive study on *Moringa* seeds[J]. Popular Science and Technology, 2017, 19(12): 46-48.
- [3] AL-MALKI A L, EL R H A. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats[J]. BioMed Research International, 2015, 2015: 381040.
- [4] HAMZA A A. *Curcuma longa*, *Glycyrrhiza glabra* and *Moringa oleifera* ameliorate diclofenac-induced hepatotoxicity in rats[J]. American Journal of Pharmacology and Toxicology, 2007, 2(2): 80-88.
- [5] 郭如鑫, 王有琼, 张重权, 等. 辣木蛋白质与氨基酸组成分析及营养评价[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(2): 324-331.
GUO R X, WANG Y Q, ZHANG C Q, et al. Protein and amino acid composition analysis and nutritional evaluation of *Moringa oleifera*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2020, 35(2): 324-331.
- [6] 刘凤霞, 王苗苗, 赵有为, 等. 辣木中功能性成分提取及产品开发生的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 282-286.
LIU F X, WANG M M, ZHAO Y W, et al. Research progress on extraction of functional components from *Moringa oleifera* and product development [J]. Food Science, 2015, 36(19): 282-286.
- [7] JAIN A, SUBRAMANIAN R, MANOHAR B, et al. Preparation, characterization and functional properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate [J]. Springer India, 2019, 56(4): 2093-2104.
- [8] 朱建华, 杨晓泉, 邹文中, 等. 超声处理对大豆分离蛋白功能特性的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 56-59.
ZHU J H, YANG X Q, ZOU W Z, et al. The effect of ultrasonic treatment on the functional properties of soybean protein isolate [J]. Food Science, 2004, 25(7): 56-59.
- [9] 皮桂泉, 胡义泽, 乔佳琦, 等. 超声处理对蛋白结构和特性的影响[J]. 粮食与食品工业, 2020, 27(5): 36-37.
PI G Q, HU Y Z, QIAO J Q, et al. The effect of ultrasonic treatment on protein structure and characteristics[J]. Cereal and Food Industry, 2020, 27(5): 36-37.
- [10] 李杨, 田甜, 刘军, 等. 超声对大豆分离蛋白结构及乳化特性影响研究[J]. 食品工业, 2019, 40(1): 184-188.
LI Y, TIAN T, LIU J, et al. The effect of ultrasound on the structure and emulsification characteristics of soybean protein isolate [J]. Food Industry, 2019, 40(1): 184-188.
- [11] 沈玲玲. 超声预处理对植物蛋白生物利用度的影响及其机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
SHEN L L. The effect of ultrasonic pretreatment on the bioavailability of plant protein and its mechanism[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.
- [12] 戚亭, 陈雪忠, 刘志东, 等. 超声处理对南极磷虾蛋白功能特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(7): 174-180.
QI T, CHEN X Z, LIU Z D, et al. The effect of ultrasonic treatment on the functional properties of Antarctic krill protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(7): 174-180.
- [13] 望运滔, 王营娟, 田金凤, 等. 高强度超声对鹰嘴豆分离蛋白结构和功能特性的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(8): 9-14.
WANG Y T, WANG Y J, TIAN J F, et al. Effects of high-intensity ultrasound on the structure and functional properties of chickpea protein isolate [J]. Food and Machinery, 2020, 36(8): 9-14.
- [14] 吴丽英. 玛咖蛋白的提取纯化、理化性质及模拟体外消化研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
WU L Y. Study on the extraction, purification, physical and chemical properties and simulated *in vitro* digestion of maca protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.
- [15] 毛小雨. 体外模拟消化对芸豆蛋白结构特征及抗氧化活性的影响研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2020.
MAO X Y. Study on the effect of *in vitro* simulated digestion on the structural characteristics and antioxidant activity of kidney bean protein[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Land Reclamation University, 2020.
- [16] 张森. 玉米蛋白及其水解物模拟体外消化产物抗氧化活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
ZHANG M. Study on the antioxidant activity of corn protein and its hydrolysate simulated *in vitro* digestion products[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agriculture-

- al University, 2016.
- [17] 王治平. 菜籽分离蛋白糖接枝改性及其功能、结构和消化吸收特性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
WANG Z P. Study on graft modification of rapeseed protein isolate sugar and its function, structure and digestion and absorption characteristics [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016.
- [18] 龙佩. 超声波和脱酰胺改性对谷物蛋白体外消化率的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
LONG P. The effect of ultrasonic and deamidation modification on the *in vitro* digestibility of cereal protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [19] TANG S Q, DU Q H, FU Z. Ultrasonic treatment on physicochemical properties of water-soluble protein from *Moringa oleifera* seed[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 71: 105357.
- [20] ZOU Y, YANG H, LI P P, et al. Effect of different time of ultrasound treatment on physicochemical, thermal, and antioxidant properties of chicken plasma protein[J]. Poultry Science, 2019, 98(4): 1925-1933.
- [21] 刘艳美, 周学永, 付荣霞, 等. 谷物蛋白体外消化率测定方法的修正[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 68-73.
LIU Y M, ZHOU X Y, FU R X, et al. Modification of the method for determination of *in vitro* digestibility of cereal protein[J]. Food Science, 2020, 41(1): 68-73.
- [22] ELENA P, GUADALUPE P, ROSARIO G. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins[J]. Food Chemistry, 2004, 85(4): 641-648.
- [23] KIM T K, YONG H I, JEONG C H, et al. Technical functional properties of water- and salt-soluble proteins extracted from edible insects[J]. Food Science of Animal Resources, 2019, 39(4): 643-654.
- [24] LING B, OUYANG S, WANG S. Effect of radio frequency treatment on functional, structural and thermal behaviors of protein isolates in rice bran[J]. Food Chemistry, 2019, 289: 537-544.
- [25] 吴瑕, 江连洲, 王晰锐, 等. 超声波预处理对大豆蛋白酶水解物抗氧化活性的影响[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(10): 32-36.
WU X, JIANG L Z, WANG X R, et al. Effect of ultrasonic pretreatment on antioxidant activity of soybean protease hydrolysate[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(10): 32-36.
- [26] 韩苗, 颜纵横, 匡聪, 等. 超声波处理对蚕蛹蛋白理化性质及酶解产物抗氧化活性的影响[J]. 蚕业科学, 2016, 42(4): 711-716.
HAN M, YAN Z H, KUANG C, et al. Effects of ultrasonic treatment on the physicochemical properties of silkworm pupa protein and the antioxidant activity of enzymatic hydrolysates[J]. Sericulture Science, 2016, 42(4): 711-716.
- [27] LIU K L, ZHAO Y, CHEN F S, et al. Purification and identification of Se-containing antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of Se-enriched brown rice protein[J]. Food Chemistry, 2015, 187: 424-430.
- [28] 王萌. 多模式超声对乳清蛋白功能及其消化产物抗氧化性质的影响[D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
WANG M. The effect of multi-mode ultrasound on the function of whey protein and the antioxidant properties of its digestion products [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.
- [29] SANTOS A F S, ARGOLLO A C C, COELHO L C B B, et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds[J]. Water Research, 2005, 39(6): 975-980.
- [30] 教小磐, 刘云. 甜茶叶多糖的表征、体外抗氧化活性与体内毒性. 食品科学, 2020, 41(15): 201-207.
JIAO X P, LIU Y. Characterization, antioxidant activity *in vitro* and toxicity *in vivo* of polysaccharides from *Rubus suavissimus* S. Lee leaves[J]. Food Science, 2020, 41(15): 201-207.
- [31] 王军, 石莹莹, 李刚森, 等. 螯合性表面活性剂的性能及应用研究进展[J]. 中国洗涤用品工业, 2007(2): 42-45.
WANG J, SHI Y Y, LI G S, et al. Performance and application research progress of chelating surfactants[J]. China Detergent Industry, 2007(2): 42-45.
- [32] 金子纯. 核桃粕蛋白质组分的理化性质、抗氧化性质及 ACE 抑制率的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
JIN Z C. Study on the physicochemical properties, antioxidant properties and ACE inhibition rate of walnut meal protein components[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2017.
- [33] 陈梦霏, 周娟娟, 吴书建, 等. 模拟胃肠消化提高蛹虫草蛋白的体外抗氧化活性[J]. 现代食品科技,

2020, 36(2): 70–77.

CHEN M F, ZHOU J J, WU S J, et al. Simulating gastrointestinal digestion improves the *in vitro*

antioxidant activity of *Cordyceps militaris*[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 70–77.

Effect of Ultrasound Modification on *in Vitro* Digestion Characteristics of *Moringa oleifera* Seeds Water-solution Protein

Wu Yanhui, Tang Shiqi, Du Qiuhan, Lin Ying, Fu Zhen*

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004)

Abstract Different ultrasonic power treatment effects on *in vitro* digestibility and oxidation activity of *Moringa oleifera* seeds water soluble protein (MOWP) were explored by *in vitro* simulated digestion and antioxidant model. The results showed that during the continuous digestion of gastrointestinal tract, the digestibility and hydrolysis degree were increased obviously, and the digestion was decreased firstly with the increase of ultrasonic power. When the ultrasonic power was up to 650 W, the digestibility of gastric hydrolysate and gastrointestinal continuous digestive hydrolysate could reach up to (68.52±1.70)% and (91.48±0.64)%. After simulated stomach digestion and gastrointestinal continuous digestion, protein molecules were decomposed into proteins with smaller molecular mass, and the peak wave length of endogenous fluorescence changes in the two stages, the peak of stomach digestion was redshifted from 351 nm to 353 nm, and the continuous gastrointestinal digestion was redshifted from 353 nm to 355 nm. The ultrasonic power was 60%, the DPPH· clearance capacity of MOWP after stomach digestion and gastrointestinal continuous digestion was the best, which was (78.26±0.85)% and (44.23±0.98)%. MOWP-100 had the highest scavenging rates of ABTS free radical in stomach digestion and gastrointestinal continuous digestion stage, which were (91.87±0.19)%. Conclusion: Ultrasonic modification can help improve the digestion performance of MOWP. The ultrasonically digested MOWP has excellent antioxidant activity, which provides theoretical significance for the introduction of MOWP into food and digestion in the human body.

Keywords *Moringa oleifera* seeds water-solution protein; digestibility; antioxidant activity; *in vitro* digestion