

文章编号:1673-1689(2009)05-0627-06

苜蓿叶蛋白及其酶解物抗氧化活性的比较

谢正军, 金征宇*, 徐学明, 陈寒青

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 通过提取、酶解和超滤从苜蓿叶蛋白中分离得到相对分子质量不同的可溶性苜蓿叶蛋白及其酶解粗肽和精制肽, 研究了其氨基酸组成和相对分子质量分布, 并对其抗氧化活性进行了比较。结果表明: 虽然从苜蓿叶分离的各种蛋白质其氨基酸组成相近, 但相对分子质量大的可溶性苜蓿叶蛋白 SALPr 未发现抗氧化活性, 而酶解后的粗肽 CALPe 以及超滤后的精制肽 PALPe 均表现出较强的抗氧化活性, 并且存在剂量效应关系, 而且 PALPe 抗氧化活性强于 CALPe。这可能是由于 PALPe 中疏水性氨基酸和小分子肽的含量均高于 CALPe。

关键词: 苜蓿叶蛋白; 可溶性水解肽; 相对分子质量; 抗氧化活性

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Comparison of Antioxidant Activities of Alfalfa Leaf Protein and Its Hydrolysates

XIE Zheng-jun, JIN Zheng-yu*, XU Xue-ming, CHEN Han-qing

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, soluble alfalfa leaf protein and its hydrolysates were obtained by extraction, enzyme hydrolysis and ultrafiltration, then its molecular weight distribution, amino acids composition and antioxidant activities were studied. However, no antioxidant activity was detected in the soluble alfalfa leaf protein (SALPr). But antioxidant activity was found in the crude alfalfa leaf protein enzyme-hydrolyzed peptide (CALPe) and the purified alfalfa leaf protein enzyme-hydrolyzed peptide (PALPe). Among of them, PALPe exhibited stronger antioxidant activity than that of CALPe, the reasons may be resided on the concentrations of low molecular weight peptides and hydrophobic amino acids in PALPe were higher than that of CALPe.

Key words: alfalfa leaf protein, soluble leaf protein hydrolysates, molecular weight, antioxidant activity

近年来, 抗氧化物质以其相对分子质量小、易吸收、活性高等特点越来越受到人们的青睐, 其中

收稿日期: 2008-09-25

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重大项目(2006BAD05A01)。

作者简介: 谢正军(1964-), 男, 江苏扬州人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品资源开发研究。Email: fpcenter@jiangnan.edu.cn.

* 通讯作者: 金征宇(1960-), 男, 江苏扬州人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事碳水化合物研究与应用。Email: jinlab2008@yahoo.com

抗氧化肽更成为研究的热点之一^[1-4],多种食用蛋白酶解液中已分离出具有生物活性的抗氧化肽片段。这些片段从2个氨基酸残基到几十个氨基酸残基不等,具有抑制生物大分子过氧化或清除体内自由基的作用^[5]。据文献报道:许多氨基酸及其衍生物具抗氧化能力,如半胱氨酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸、亮氨酸和缬氨酸等。也发现一些含组氨酸、色氨酸和酪氨酸等功能短肽具有明显的抗氧化作用^[6]。

作者是以新鲜的苜蓿茎叶为原料,经压榨取汁、分离和浓缩干燥而制备的蛋白质浓缩物(alfalfa leaf protein concentration,简称ALPC)。苜蓿叶蛋白具有来源广泛、营养丰富、不含动物性胆固醇等特点。联合国粮农组织(FAO)认为苜蓿叶蛋白是一种高品质的食品,是具有开发价值的蛋白质资源。傅晓^[7]等对大鼠饲养试验结果表明:苜蓿叶蛋白可提高机体谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)的活力,并可降低氧化产物丙二醛(MDA)的浓度,增强机体抗氧化酶系统的功能。因此,苜蓿叶蛋白质是一种既有营养价值又能降低血脂的保健食品成分。

目前,国内外对苜蓿叶蛋白的研究与开发主要集中于提取工艺技术和营养功效上,而有关苜蓿叶蛋白抗氧化肽的研究尚未见文献报道。因此,作者以从苜蓿叶中提取的可溶性叶蛋白为底物,通过蛋白质酶解及一系列的分离纯化手段,获得了不同相对分子质量分布的蛋白酶解产物。并以还原型谷胱甘肽GSH和未酶解的可溶性苜蓿叶蛋白为对照,采用两种常用的体外抗氧化模型来评价它们的抗氧化活性,以期研究不同相对分子质量可溶性蛋白酶解物对抗氧化活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料 苜蓿叶:新疆大叶苜蓿,二茬草,分枝期,内蒙古农科院提供。

1.1.2 主要试剂和药品 碱性蛋白酶 Alcalase FG 2.4L;丹麦 Novozyme 酶制剂公司产品;DP-PH;Sigma 公司产品;还原型谷胱甘肽 GSH;美国 Sigma 公司产品;其它试剂均为分析纯或优级纯。

1.2 主要仪器与设备

超滤膜:截留相对分子质量 3000 D,上海亚东核级树脂有限公司产品;HH-2 恒温水浴锅;江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司产品;721 型可见分光光度计;上海第三分析仪器厂产品;TGL-IGC 高

速台式离心机:上海安亭科学仪器厂产品;800 型离心沉淀器:上海手术器械厂产品;XW-80 旋涡振荡器:上海医科大学仪器厂产品;氨基酸自动分析仪:美国安捷伦公司产品;SHG-C 型生物化学发光仪:上海检测技术所检测仪器厂产品。

1.3 方法

1.3.1 苜蓿叶蛋白及其酶解肽的制备

1)可溶性苜蓿叶蛋白的提取 称取粉碎后苜蓿叶 100 g,以 $m(\text{苜蓿叶}):m(\text{水})=1:7$ 配置→用 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 9.0→45 ℃ 超级恒温水浴浸泡提取 5 h→3 500 r/min 离心 30 min→取上清液→用 0.1 mol/L HCl 溶液调 pH 值至 4.0→静置 30 min→3 500 r/min 离心 30 min→沉淀→冷冻干燥→可溶性苜蓿叶蛋白 SALPr。

2)苜蓿叶蛋白的酶解 5 g/dL 苜蓿叶蛋白悬浮液→用 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 8.0→50 ℃ 超级恒温水浴溶解 30 min→加入 4.94×10^3 U/g(底物)的碱性蛋白酶 Alcalase FG 2.4 L,60 ℃ 下酶解 4 h(pH-stat 法使体系 pH 值稳定)→85 ℃/10 min 灭酶→3 500 r/min 离心 15 min→上清液→大孔吸附树脂脱盐→真空浓缩→冷冻干燥→苜蓿叶蛋白粗肽 CALPe。

3)苜蓿叶蛋白粗肽分离、脱盐与精制 在 0.30 MPa、20 ℃、料液质量浓度 35 g/L 下,选用截留相对分子质量为 3 000 的聚砜膜(PS 膜)进行超滤,收集滤过液,经真空浓缩、冷冻干燥得超滤初分离的苜蓿叶蛋白肽。将质量浓度为 50 mg/mL 的此产品以 0.5 BV/h 流速流经玻璃层析柱($D 2.6 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$)(在室温条件下),上样结束后,用去离子水以 1 BV/h 的流速洗涤层析柱,收集水洗脱液,每 15 mL 收集 1 管,测定水洗脱液的电导率,当电导率降至与去离子水相当时,用体积分数 75% 的乙醇以 1.5 mL/min 的流量流经层析柱,收集洗脱峰,真空浓缩蒸去乙醇,冷冻干燥得脱盐的精制苜蓿叶蛋白肽 PALPe。

1.3.2 氨基酸组成的测定 样品在 110 ℃、6 mol/L HCl 中水解 18 h,然后在美国安捷伦 1 100 型氨基酸自动分析仪上进行氨基酸测定。

1.3.3 苜蓿叶蛋白相对分子质量的测定 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE),分离胶质量浓度 12.5 g/dL,浓缩胶质量浓度 4 g/dL,考马斯亮蓝 R-250 法染色。胰蛋白酶抑制剂(20 100)、牛碳酸酐酶(31 000)、兔肌动蛋白(43 000)、牛血清白蛋白(66 200)和兔磷酸化酶 B(97 400)作相对分子质量标准,溴酚蓝为指示剂。

以标准蛋白质相对分子质量的对数与相对迁移率作标准曲线,根据苜蓿叶蛋白的相对迁移率从标准曲线上查出蛋白质的相对分子质量。

1.3.4 苜蓿叶蛋白酶解肽相对分子质量分布测定

采用 Waters 600 高效液相色谱(配 2487 紫外检测器和 M32 工作站)进行测定,色谱条件为:色谱柱:TSKgel2000 SWXL 300 mm×7.8 mm,流动相:V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸)=45:55:0.1,检测波长:220 nm,流量:0.5 mL/min,柱温:30 ℃。

1.3.5 还原能力的测定 用超纯水配制不同质量浓度(0~2.5 mg/mL)的可溶性苜蓿叶蛋白溶液、苜蓿叶蛋白肽溶液和还原型谷胱甘肽溶液,取 2.5 mL 于试管中,分别加入 1%铁氰化钾 $K_3Fe(CN)_6$ 2.5 mL,混合均匀,于 50 ℃水浴中反应 20 min。取出,再加入质量分数 10%三氯乙酸(TCA)2.5 mL,混合后以 3 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.5 mL,加入蒸馏水 2.5 mL、质量分数 0.1% $FeCl_3$ 0.5 mL,混合均匀,静置 10 min 后,用 721 分光光度计测定 700 nm 波长处的吸光值 A,所有测定值均为 3 次平均值。

1.3.6 对二苯代苦味酰自由基(DPPH·)清除能力的测定 各取 0.5 mL 样品溶液(质量浓度为 0~1.6 mg/mL),依次与 2.5 mL DPPH 溶液(25 μg/mL)室温避光反应 30 min,用 721 分光光度计测定 517 nm 波长处的吸光值,同时以甲醇作空白对照测定,所有测定值均为 3 次平均值,按下式计算 DPPH·抑制率。

$$DPPH\cdot\text{抑制率}(\%) = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS10.0 软件进行单因子方差分析,并用 LSD 进行多重比较。

2 结果与讨论

2.1 苜蓿叶蛋白及其酶解肽的氨基酸组成

可溶性苜蓿叶蛋白(SALPr)、苜蓿叶蛋白酶解粗肽(CALPe)和苜蓿叶蛋白酶解精制肽(PALPe)3 种产品氨基酸组成测定结果见表 1。由表 1 可知:苜蓿叶蛋白以及酶解肽中氨基酸种类齐全,比例较为平衡,与联合国粮农组织(FAO)推荐的成人氨基酸模式基本相符。并且含有多种抗氧化能力的氨基酸,其中包括组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸、亮氨酸和缬氨酸等。

由表 1 还可知,超滤后 PALPe 中除 Pro 含量略低外,其它疏水性氨基酸 Tyr、Val、Phe、Ile 及 Leu 的含量都比 CALPe 有所提高。表明这些疏水性氨基酸可能也会改变 PALPe 的生物活性。

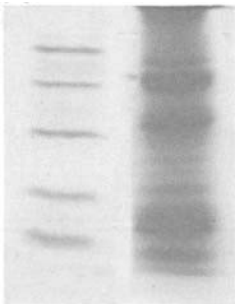
表 1 苜蓿叶蛋白及其酶解肽的氨基酸组成

Tab. 1 Amino acid composition of SALPr, CALPe and PALPe (g/hg)

氨基酸	SALPr	CALPe	PALPe
Asparatic acid	7.16	8.98	9.71
Serine	2.88	3.67	3.73
Glycine	3.80	4.81	3.97
Arginine	4.84	6.25	5.36
Tyrosine	3.26	4.14	4.55
Valine	4.56	5.76	6.25
Phenylalanine	4.27	5.39	5.88
Leucine	6.40	7.95	8.36
Proline	2.99	3.82	2.75
Glutamic acid	8.88	11.80	11.02
Histidine	2.02	2.61	3.67
Threonine	3.14	3.90	3.81
Alanine	4.36	5.51	6.25
Cysteine	1.09	1.53	1.44
Methionine	1.30	1.63	1.76
Isoleucine	3.89	4.94	5.19
Lysine	4.83	5.99	5.95
Tryptophan	2.13	2.88	2.82
总质量分数	71.80	91.56	92.47

2.2 可溶性苜蓿叶蛋白(SALPr)的相对分子质量

可溶性苜蓿叶蛋白 SALPr 的 SDS-PAGE 图谱如图 1 所示,标准蛋白相对分子质量和相对迁移率关系如图 2 所示。



(左:标准蛋白,右:SALPr)

图 1 可溶性苜蓿叶蛋白 SALPr 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of SALPr

从图 1 可以看出,作者所得到的可溶性苜蓿叶蛋白 SALPr 中蛋白质组成比较复杂。按标准曲线计算,其相对分子质量分布范围可以将它划分为 7 个区域:118 700~103 100、90 900~72 200、62 300~54 400、39 100~35 600、32 400~30 400、27 600~25 700 和 18 900~17 700。

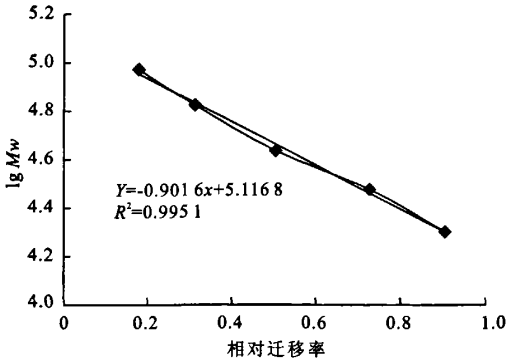


图 2 标准蛋白质相对分子质量和相对迁移率关系

Fig. 2 Curve of LogMr of standard protein and the R_f

2.3 超滤对苜蓿叶蛋白酶解肽相对分子质量分布的影响

目前文献报道的生物活性肽主要是小分子肽,相对分子质量大多在 3 000 以下。作者采用截留相对分子质量 3 000 的聚砜膜对苜蓿叶蛋白酶解肽(CALPe)进行初步分离纯化。

超滤前后苜蓿叶蛋白酶解肽相对分子质量分布见图 3、图 4 及表 2。从表 2 可知,超滤后苜蓿叶蛋白酶解精制肽 PALPe 中相对分子质量大于 3 000 的组分由 16.67% 减少至 1.69%,相对分子质量 1 000~500 的组分含量由 21.85% 提高到 27.91%,500~130 的组分含量由 21.64% 提高到 30.83%,130 以下的组分含量从 4.91% 提高到 7.61%,说明超滤能非常有效地除去料液中相对分子质量较大的组分,使小分子质量组分大大提高。

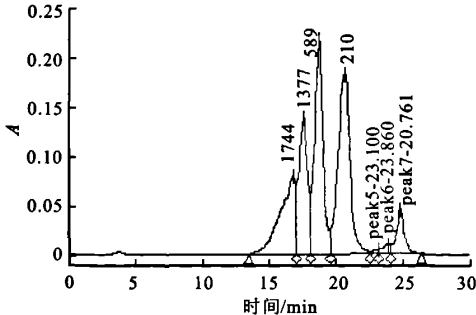


图 3 超滤前 CALPe 的相对分子质量分布

Fig. 3 Molecular weight distribution of CALPe before ultrafiltration

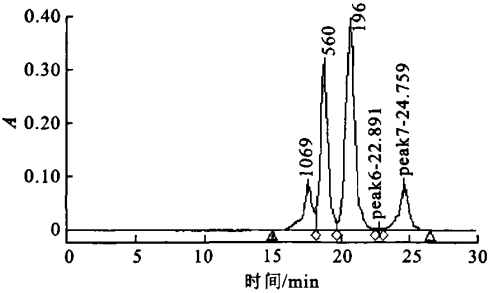


图 4 超滤后 PALPe 的相对分子质量分布

Fig. 4 Molecular weight distribution of PALPe after ultrafiltration

表 2 超滤对苜蓿叶蛋白酶解肽 (ALPe) 相对分子质量分布的影响

Tab. 2 Effect of ultrafiltration on the molecular weight distribution of ALPe

相对分子质量	超滤前 CALPe 比例/%	超滤后 PALPe 比例/%
>5 000	4.52	0.03
5 000~3 000	12.15	1.66
3 000~2 000	15.88	6.25
2 000~1 000	19.05	25.71
1 000~500	21.85	27.91
500~130	21.64	30.83
<130	4.91	7.61

2.4 不同酶解苜蓿叶蛋白肽相对分子质量分布对生物活性的影响

2.4.1 对还原能力的影响 还原力是表示抗氧化物质提供电子能力的重要指标,还原能力大的样品是良好的电子供体,可以通过提供电子使自由基变为稳定的物质,以中断自由基的连锁反应^[8]。许多研究已证实抗氧化活性同还原力之间呈现正相关。

通常认为样品在波长 700 nm 处的吸光值越大,其还原力越强。苜蓿叶蛋白及其酶解肽的还原能力见图 5。

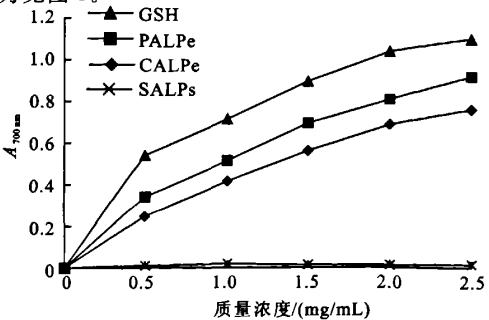


图 5 苜蓿叶蛋白及其酶解肽的还原力

Fig. 5 Reducing capacity of alfalfa leaf protein and its enzyme-hydrolyzed peptides

由图5可以看出,大分子的苜蓿叶蛋白基本没有还原能力,而酶解后的小分子肽的浓度与还原力之间呈较显著的量效关系,即苜蓿叶蛋白酶解肽的抗氧化作用随着质量浓度的提高而增强。超滤后的PALPe在各个质量浓度下的吸光值都比超滤前CALPe大,即抗氧化活性有所提高,但均低于GSH的还原能力。

2.4.2 对清除DPPH·能力的影响 大多数自由基反应活性较强而寿命短暂,DPPH·是为数不多的即使在室温条件下也能保持稳定的自由基,DPPH有1个单电子并且在517 nm处有强的吸收,其乙醇溶液呈深紫色,当自由基被不同程度清除时,DPPH在517 nm处的吸光度逐渐减小,视觉上其颜色从紫色逐渐褪至黄色。

从图6可以看出,苜蓿叶蛋白对DPPH·清除率都为零,而苜蓿叶蛋白酶解粗肽和精制肽以及GSH对DPPH·清除率均随浓度的增加而增大,即呈现一定的剂量效应,GSH对DPPH·清除率最高,PALPe次之,CALPe最低。当PALPe质量浓度增加到1.6 mg/mL时,DPPH·清除率可达到80%左右,与质量浓度为0.4 mg/mL GSH对DPPH·清除率相当,显示出较强的DPPH·清除能力。

出现上述实验结果的原因之一可能是超滤后PALPe的小分子组分含有较高比例的Tyr、Val、Phe、Ile、Leu等疏水性氨基酸,这与Hua-Ming Chen等选来自芽孢杆菌的蛋白酶水解大豆 β -球蛋白,分离出6个由5~16个氨基酸残基组成的抗氧化肽,它们的N-末端皆为疏水性氨基酸Val或Leu的研究结果相一致;原因之二可能归因于超滤后具有抗氧化活性的肽在PALPe中的质量浓度相对提高。这与Jang^[9]和Anne^[10]等通过超滤富集水

解物中的ACE抑制肽、陈季旺^[11]等通过超滤富集水解物中的类阿片拮抗活性肽、程云辉^[12]等通过酶解超滤等手段从麦胚蛋白中得到具有抗氧化活性的蛋白肽的研究结果相类似。

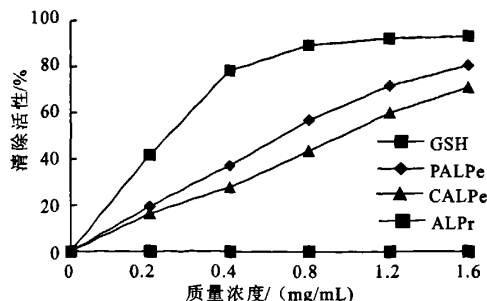


图6 苜蓿叶蛋白及其酶解产物对DPPH·的清除活性

Fig. 6 Scavenging activity of alfalfa leaf protein and its enzyme-hydrolyzed peptides

3 结 语

1) 苜蓿叶蛋白及其酶解后的肽中氨基酸种类齐全,比例平衡,且含有较高比例的疏水性氨基酸。

2) 可溶性苜蓿叶蛋白SALPr中蛋白质组成比较复杂,相对分子量分布在118 700~17 700的7个不同区域。而苜蓿叶蛋白酶解产物相对分子量基本在5 000以下,且超滤后PALPe中2 000以下小相对分子质量的组分以及疏水性氨基酸含量都比超滤前CALPe中高。

3) 虽然苜蓿叶蛋白及其酶解物和精制物氨基酸组成相近,但大分子的可溶性苜蓿叶蛋白SALPr未发现有抗氧化活性,而酶解后的粗肽CALPe以及超滤后的精制肽PALPe都具有较强的抗氧化活性。而且由于PALPe中疏水性氨基酸和小分子肽的含量均高于CALPe,故表现出更强的抗氧化活性。

参考文献(References):

- [1] Serbecic N, Beutelspacher S C. Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 320 (3): 465-475.
- [2] Bottino R, Balamurugan A N, Bertera S, et al. Preservation of human islet cell functional mass by anti-oxidative action of a novel SOD mimic compound[J]. *Diabetes*, 2002, 51(8): 2561-2567.
- [3] Shibata N, Tomita N. The anti-oxidative properties of alpha-tocopherol in gamma-irradiated UHMWPE with respect to fatigue and oxidation resistance[J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (29): 5755-5761.
- [4] SEOK Hyun Nam, SUN Phil Choi, MI Young Kang, et al. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars[J]. *Food Chemistry*, 2006, 94 (4): 613-620.
- [5] Hook V I H, Burton D, Yasothornsrikul S, et al. Proteolysis of Pro PTHrP(1-141) by "Prohormone Thiol Protease" at multibasic residues generates PTHrP-Related peptides: Implications for PTHrP peptide production in lung cancer cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 285: 932-938.
- [6] Muramoto K, Chen H M, Yamauchi F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide

- isolated from digests of a soybean protein[J]. Report of the Soy Protein Research Committee, 1996, 17:23-28.
- [7] 傅晓. 植物叶蛋白对抗脂质过氧化作用酶系统的影响[J]. 中国兽医科技. 2003, 11:49-50.
- FU Xiao. Effect of plant leaf protein on lipotropy peroxidase system of rats[J]. **Chinese Journal of Veterinary Science and Technology**, 2003, 11:49-50. (in Chinese)
- [8] Dorman H J D, Peltoketo A, Hiltunen R, et al. Characterization of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiaceae Herbs[J]. **Food Chemistry**, 2003, 83(2), 255-262.
- [9] Jang A, Lee M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from beef hydrolysates[J]. **Meat Science**, 2005, 69:653-661.
- [10] Anne P L, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory properties of whey pritein digists concen -tration and characterization of active peptides[J]. **Journal of Dairy Science**, 2000, 67:53-64.
- [11] 陈季旺, 孙庆杰, 姚惠源. 预分离米糠可溶性蛋白类阿片拮抗肽的超滤工艺[J]. 食品科技, 2003, 12:21-24.
- CHEN Ji-wang, SUN Qin-jie, YAO Hui-yuan. Preliminary isolation of opioid antagonist peptides from rice bran protein by ion-exchange chromatography[J]. **Food Science and Technology**, 2003, 12:21-24. (in Chinese)
- [12] Cheng Y H, Wang Z, Xu S Y. Antioxidant properties of wheat germ protein hydrolysates evaluated in vitro[J]. **Journal of Central South University of Science and Technology (English Edition)**, 2006, 13(2), 160-165.

(责任编辑:朱明)

《食品与生物技术学报》2010 年征稿征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为 CSCD 核心期刊、全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外 10 余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》,双月刊, A4(大 16K)开本, 144 页, 全年 6 期, 每册定价 15.00 元, 全年定价 90 元。邮发代号:28-79, 全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部