

文章编号: 1673 1689(2011)01-0044-05

超滤法分离富集谷朊粉抗氧化活性肽

苏春燕, 朱科学*, 周惠明

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 为了研究谷朊粉酶解产物中发挥抗氧化活性的肽片段, 采用截留不同相对分子质量的超滤膜对谷朊粉酶解产物进行初步分离富集, 并通过测定各级多肽的亚铁离子螯合能力、对亚油酸的自氧化抑制能力以及对 ABTS 自由基的清除能力来评价其体外抗氧化能力。结果表明: 抗氧化能力由弱到强依次为: 大于 10 000 < 10 000 ~ 5 000 < 小于 5 000。对于相对分子质量在 5 000 以下的组分, 当质量浓度为 0.2、0.4 mg/mL 时, 亚铁离子螯合能力是超滤前样品的 2 倍左右; 对亚油酸自氧化的抑制能力在 36 h 后比其它相对分子质量片段的组分效果明显; 而当质量浓度为 4 mg/mL 时, TEAC 值达到 1.45 mmol/L Trolox; 并且由高效液相色谱法对其相对分子质量进行分析发现, 小分子肽占了绝大部分, 说明抗氧化肽主要集中在相对分子质量 2 000 以下。

关键词: 谷朊粉; 酶解产物; 超滤; 抗氧化活性; 相对分子质量

中图分类号: TS 211.43

文献标识码: A

Preparation and Enrichment Antioxidant Peptides from Wheat Gluten Hydrolysate using Ultrafiltration

SU Chun-yan, ZHU Ke-xue*, ZHOU Hu-ming

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

Abstract: In order to study the active fraction of wheat gluten hydrolysates (WGH), WGH was preliminary separated and purified by using different MWCO of the ultrafiltration membrane. Different antioxidant assays in vitro such as ferrous ion chelating activity, inhibition of linoleic acid emulsion peroxidation and 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activity, were employed to evaluate the antioxidant activities of the obtained wheat gluten hydrolysate. It was found that the antioxidant activity of the WGH can be arranged in the following order: over 10KD < 10KD ~ 5KD < below 5KD. For the fraction which molecular weight was below 5KD, when the concentration was set at 0.2 or 0.4 mg/mL, the ferrous ion chelating activity was about as twice as the sample which was not treated by ultrafiltration; in the linoleic acid system, a longer induction time made a significant decrease of lipid peroxidation, especially after 36h, gaps began to widen; and also when the concentration was set at 4mg/mL, the TEAC value was up to 1.45mmol/L Trolox. And it was found that small molecular weight peptides accounted for the most by the high performance liquid chromatography analysis of its molecular weight, it showed that antioxidant peptides

收稿日期: 2010-04-20

基金项目: 国家 863 计划项目 (2008AA10Z312)。

* 通信作者: 朱科学 (1978-), 男, 河南郑州人, 工学博士, 副教授, 主要从事方便食品及品质改良研究。

Email: kx.zhu@jiangnan.edu.cn

concentrated in the following 2KD.

Key words: gluten, hydrolysate, ultrafiltration, antioxidant activity, molecular weight

氧化反应会导致食品品质下降,如色、香、味和质地,抗氧化剂可以延缓食品贮藏期间的品质劣变,延长食品的货架期。然而,由于人们对合成抗氧化剂安全方面的忧虑日益增加,使得人们逐步开始关注天然抗氧化剂的开发和应用^[1]。研究表明,植物蛋白酶水解后会产生具有抗氧化功能的活性肽,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^[2],抗氧化肽以其相对分子质量小、易吸收、活性强等特点受到重视^[3],谷朊粉酶解产物已被证实具有抗氧化性^[4],但是酶解液中常含有未水解的蛋白质、酶等大分子物质,若能进一步分离纯化则有利于提高抗氧化活性。目前分离纯化的方法主要有凝胶层析和超滤等,凝胶层析法设备简单,操作方便,样品回收率高,但处理量少、耗时长,不适合工业化生产^[5]。而超滤法由于可以按膜的截留相对分子质量(MWCO)对物料进行分离,用于蛋白质制品的纯化具有工艺流程短、耗用化学试剂少等优点,所以是较有前途的方法^[6]。

为了更确切地了解谷朊粉酶解产物发挥抗氧化活性的片段及机理,作者采用超滤分离技术对其中所含的肽段进行分离富集,以期能为谷朊粉酶解物的应用提供理论依据。

1 材料与 方法

1.1 材料与试剂

谷朊粉:河南莲花味精有限公司产品;碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L:诺维信酶制剂公司产品;菲洛嗪(ferrozine)、Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)、ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) di-ammonium salt):色谱纯, Sigma 公司产品;亚油酸:安庆中创生物工程有限公司产品;其他试剂如硫酸亚铁、氢氧化钠、盐酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、乙醇、硫氰酸氨、高硫酸钾等,均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

小型切向流超滤装置:配有截留相对分子质量分别为10 000、5 000的改良聚醚砜复合膜,美国 Millipore 公司制造;HH-4 数显恒温水浴锅:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司制造;PHS-3C 型精密 pH 计:上海雷磁仪器厂制造;UV-2800 紫外-

可见分光光度计:上海 UNICO 仪器有限公司制造;PL203 分析天平:梅特勒托利多公司制造;超声波药品处理机:济宁金百特工程机械有限公司制造;冰箱:海尔电器制造;超低温冰箱:美国 Thermo 公司制造;冷冻离心机:日本日立公司制造;冷冻干燥机:德国 CHRIST 公司制造。

1.3 试验方法

1.3.1 谷朊粉基本成分分析 粗蛋白测定:微量凯氏定氮法(GB 5511-85);水分测定:105℃恒重法(GB 5597-85);灰分的测定:550℃灼烧法(GB 5505-85)。

1.3.2 谷朊粉的酶法水解工艺 底物质量浓度 2 g/dL,溶解介质为 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液,连续搅拌 20 min,然后放入超声波反应器中,在低频(25.1~25.5 KHz)作用下超声辅助酶解 30 min,温度为 50℃,酶解时 pH 调到 9.0,加入质量分数 1% 的碱性蛋白酶 Alcalase 进行酶解^[7],反应过程中用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液维持 pH 值在 9.0 左右(± 0.1),酶解结束时将 pH 调到 7.0,将烧杯置于沸水浴中加热 10 min 灭酶,冷却至室温,以 10 000 r/min 转速冷冻离心 30 min,取上清液冷冻干燥备用。

1.3.3 谷朊粉酶解产物的超滤工艺 将冷冻干燥的酶解产物用去离子水配成溶液,先用滤纸真空抽滤,再用孔径 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,最后采用截留相对分子质量为 10 000、5 000 的超滤膜,超滤时将 10 000 的超滤膜的透过液作为 5 000 超滤膜的起始液,收集浓缩和透过液,分别冷冻干燥。测定各相对分子质量段样品的抗氧化活性,以此来确定合适的截留相对分子质量的超滤膜。

1.3.4 抗氧化活性的测定

1) 螯合亚铁离子能力的测定:试验中先用微量凯氏定氮法测出样品的粗蛋白质量分数,然后配出蛋白质质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL 的溶液,用于测亚铁螯合率。

0.05 mL、2 mmol/L 的 FeCl_2 与 0.2 mL、5 mmol/L 的 ferrozine 混合后会产生一种物质,在 562 nm 处有强吸收。向其中添加 3 mL 稀释到一定浓度的样品,由于 Fe^{2+} 被螯合,溶液颜色发生变化,10 min 后在 562 nm 下读取吸光值。按以下公式计算:

螯合作用(%) = (1 - (样品溶液的吸光值/空白溶液的吸光值)) × 100%^[8]

2) 对亚油酸自氧化的抑制作用: 取 0.4 mg/mL 的样品溶液 0.5 mL, 加入 2.0 mL 亚油酸乳化液(2.5 mL 亚油酸溶于 100 mL 95% 的乙醇中), 与 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液 4.0 mL 在具塞试管中混匀, 混匀后于 60 °C 避光反应, 每隔 12 h 测试一次。取 50 μL 反应液, 依次加入 4 mL 75% 的乙醇, 50 μL 30% 的硫氰酸铵和 50 μL 20 mmol/L 氯化亚铁(溶于 3.5% HCl), 振荡混匀, 3 min 后在 500 nm 波长下测定吸光值^[9]。

3) ABTS+·自由基清除能力的测定: 按照 Kim 等^[10]的方法, 略有改动。

ABTS+·自由基的制备: 将 7 mmol/L ABTS 储备液和 2.45 mmol/L 高硫酸钾(最终浓度)混合, 在室温、避光的条件下静置过夜, 形成 ABTS+·自由基储备液。使用前用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释成工作液, 使其在 734 nm 处的吸光值为 0.70 ± 0.02。

绘制标准曲线: 配制一系列浓度的 Trolox 溶液(0~1.5 mmol/L)。40 μL 不同浓度的 Trolox 溶液与 4 mL ABTS+·工作液混合, 反应 6 min 后在 734 nm 读取吸光值, 以 Trolox 溶液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

ABTS+·自由基清除能力测定: 40 μL 消化液与 4 mL ABTS+·工作液混合, 反应 6 min 后在 734 nm 读取吸光值。ABTS+·自由基清除能力用 Trolox 等价抗氧化能力表示(TEAC, mmol/L)。

1.3.5 谷朊粉酶解产物相对分子质量分布

1) 高效液相色谱: Waters600(配 2487 紫外检测器和 M32 工作站); 色谱柱: TSKgel2000 SWXL 300 mm × 7.8 mm; 流动相: 乙腈、水和三氟乙酸体积比为 45:55:0.1; 检测 UV220 nm, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C。

2) 相对分子质量校正曲线所用标准品: 细胞色素 C(相对分子质量为 12 500), 杆菌酶(相对分子质量为 1450), 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(相对分子质量为 451), 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(相对分子质量为 189)

2 结果与讨论

2.1 超滤对谷朊粉酶解产物螯合亚铁离子能力的影响

过渡态金属如铁、铜是诱导多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的催化剂, 尤其是 Fe²⁺ 是最具有影响

力, 因此螯合 Fe²⁺ 能力与抗氧化有密切的关系。菲洛嗪能够与 Fe²⁺ 结合形成复合物, 在波长 562 nm 处具有强的吸收。如果酶解产物具有螯合 Fe²⁺ 作用, 则形成的紫色复合物就会减少, A_{562 nm} 就会减少, 因此反应物的 A_{562 nm} 较低, 表明酶解产物的螯合铁离子的能力较强^[11]。

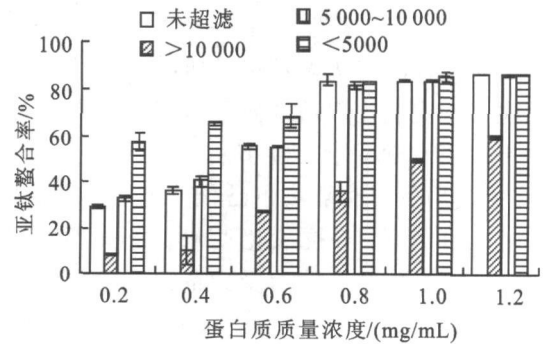


图1 超滤对酶解产物螯合亚铁离子能力的影响

Fig.1 Effect of ultrafiltration on ferrous ion chelating activity of wheat gluten hydrolysate

由图1可以看出, 不论是超滤前还是经过各种不同截留相对分子质量的超滤膜处理过的样液, 当其中蛋白质质量浓度在 0.2~1.2 mg/mL 范围内时, 亚铁离子螯合能力和浓度之间都呈现出良好的量效关系, 即随着质量浓度的增加, 亚铁离子螯合能力也随之增加。并且可以看出, 酶解产物的抗氧化性随着相对分子质量的变化而发生变化, 呈现出相对分子质量越小, 亚铁离子的螯合能力越强的趋势。当相对分子质量为大于 10 000 片段时, 亚铁离子螯合能力远远小于未经过超滤处理的样液, 而相对分子质量在 5 000~10 000 时亚铁离子螯合能力略大于未超滤处理的样液, 在相对分子质量小于 5 000 时, 螯合能力都比未超滤处理的样液大得多。小于 5 000 的肽段表现出很高的亚铁离子螯合能力, 当质量浓度为 0.2、0.4、0.6 mg/mL 时, 亚铁离子螯合能力是超滤前酶解产物的两倍, 即亚铁离子螯合能力有显著提高。当质量浓度增加时, 亚铁离子螯合能力的增长速度趋于平缓, 但当质量浓度在 0.8、1.0、1.2 mg/mL 时, 各个相对分子质量片段的肽都表现出很高的亚铁离子螯合能力, 都维持在 80% 以上。说明经过 5 000 超滤膜处理后酶解物的抗氧化活性得到很大的提高。

2.2 超滤对谷朊粉酶解产物抑制亚油酸自动氧化作用的影响

脂质过氧化物对生物体内蛋白质、膜结构的破坏会造成生物细胞的损伤。鉴于脂类的过氧化对人类的健康和寿命的影响极大, 研究谷朊粉酶解物防止脂质过氧化能力具有重要意义^[12]。亚油酸乳化体系是

用来检验抗氧化剂抗氧化作用最常用的方法,可部分反映谷朊粉酶解物防止脂质过氧化的能力。

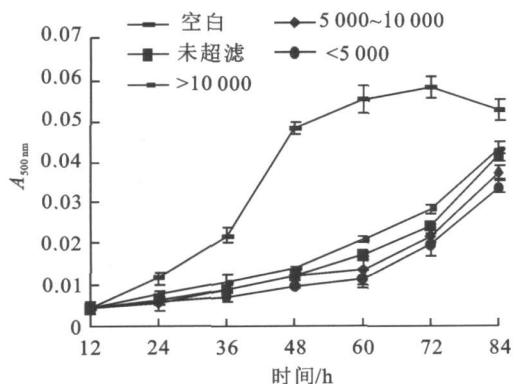


图 2 超滤对谷朊粉酶解产物对亚油酸氧化抑制作用的影响

Fig. 2 Effect of ultrafiltration on linoleic acid autoxidation inhibition of wheat gluten hydrolysate

从图 2 可以看出,各个相对分子质量片段的多肽在 500 nm 下的吸光值都比空白的小,随着时间的延长,各组吸光值均呈现上升趋势,其中空白样更明显,说明亚油酸自动氧化作用十分显著,而各相对分子质量片段多肽的吸光值虽然也有上升趋势,但上升的比较缓慢,说明亚油酸的自氧化作用受到了抑制。从图 2 中也可以看出,对谷朊粉酶解产物进行超滤处理得到的多肽对亚油酸的自氧化抑制作用与相对分子质量大小有一定的关系。在 24 h 内谷朊粉各相对分子质量片段多肽的吸光值和空白基本上是同步的,差别很小,24 h 后,吸光值之间的差值开始增大,表明谷朊粉各个相对分子质量片段的多肽对亚油酸的自氧化都有不同程度的抑制作用。总体来说,相对分子质量越小的多肽对亚油酸的自氧化抑制作用更强。相对分子质量在 10 000 以上的多肽组分对亚油酸的自氧化抑制作用小于未经过超滤处理的谷朊粉酶解物,5 000~10 000 的多肽对亚油酸的自氧化抑制作用稍强于未经过超滤处理的样品,相对分子质量在 5 000 以下的多肽对亚油酸自氧化的抑制能力最强。

2.3 超滤对谷朊粉酶解产物 ABTS 自由基清除能力的影响

脂质过氧化过程中会生成较多的自由基,因而会引发连锁反应,加速脂质的过氧化。抗氧化物质能够清除这些自由基,中断脂质过氧化的链反应,从而达到抗氧化的目的^[11]。ABTS+·是一种水溶性自由基,抗氧化剂对自由基清除能力的强弱在一定程度上反映了其抗氧化特点以及抗氧化能力的强弱。

由图 3 可知,当蛋白质质量浓度在 0.4 mg/mL

~4 mg/mL 范围内时,各个片段多肽的 ABTS 自由基清除能力都随着质量浓度的增加而增加。总体来说,谷朊粉酶解产物的各个相对分子质量片段都表现出很高的 ABTS 自由基清除能力,TEAC 值维持在 0.34~1.45 mmol/L Trolox 之间,而且发现谷朊粉酶解产物各组分清除 ABTS 自由基清除能力与相对分子质量大小密切相关,相对分子质量越低自由基清除能力越强,以质量浓度为 0.8 mg/mL 时为例,相对分子质量大于 10 000、5 000~10 000、小于 5 000 多肽的 TEAC 值分别是 0.66、0.69、0.73 mmol/L Trolox。相对分子质量小于 5 000 的 ABTS 自由基清除能力尤为突出,当蛋白质质量浓度为 4.0 mg/mL 时,小于 5 000 的肽段的 TEAC 值达到 1.45 mmol/L (以 Trolox 计),所以谷朊粉抗氧化肽的活性主要集中在低相对分子质量的范围内。这是因为抗氧化活性肽含有能与自由基反应的特殊基团即供氢基团,只有这些短肽的相对分子质量适中,供氢基团才能得到充分的暴露与自由基作用,表现出较强的抗氧化能力。

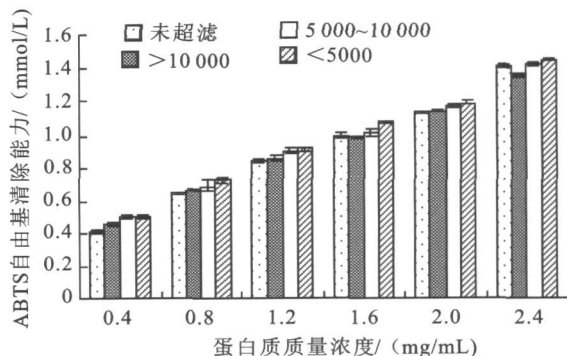


图 3 超滤对酶解产物整合亚铁离子能力的影响

Fig. 3 Effect of ultrafiltration on the ABTS radical scavenging activity of wheat gluten hydrolysate

2.4 超滤对谷朊粉酶解产物相对分子质量分布的影响

以上已经得出经过 5 000 超滤膜处理后的谷朊粉酶解物抗氧化活性最强,进一步对它的相对分子质量分析,以确认抗氧化活性与相对分子质量的关系,见图 4、5。

超滤膜超滤处理前后谷朊粉酶解产物中相对分子质量在 5 000 以上的组分由 7.8% 减少至 2.78%,相对分子质量在 2 000~5 000 的组分含量由 11.07% 减少至 6.41%,相对分子质量在 2 000 以下的组分含量由 81.12% 提高至 90.81%。说明超滤有效地去除了一些相对大分子质量的组分,再由以上抗氧化的研究发现 5 000 超滤膜处理后抗氧化活性明显增强,进一步说明相对分子质量越小抗氧化活性越强。

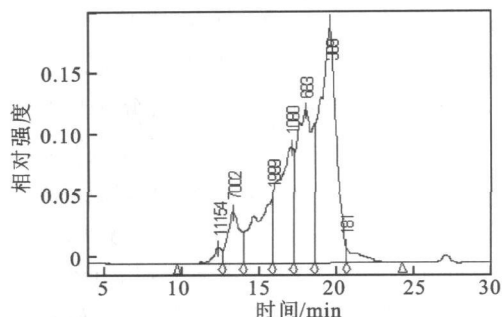


图 4 未经过超滤处理过的谷朊粉酶解物的高效液相分离图

Fig. 4 Chromatograms of wheat gluten hydrolysate separated by HPLC

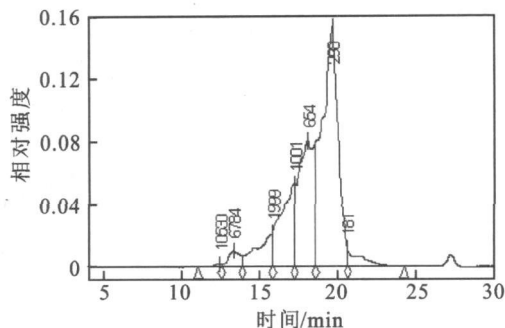


图 5 5KD 超滤膜处理后的谷朊粉酶解物的高效液相分离图

Fig. 5 Chromatograms of wheat gluten hydrolysate treated by ultrafiltration separated by HPLC

3 结 语

选用10 000、5 000两种超滤膜对谷朊粉酶解产物进行处理,超滤膜处理后谷朊粉酶解产物抗氧化活性得到提高,发现多肽的抗氧化性与相对分子质

量大小有一定的关系,一般相对分子质量越小抗氧化性越强,相对分子质量在5 000以下的组分在亚铁离子螯合能力、对亚油酸自氧化抑制作用以及对ABTS 自由基的清除能力方面都表现出最强的抗氧化能力,所以在后续研究可以选用低相对分子截留量的超滤膜对谷朊粉酶解产物进行分离富集。

参考文献(References):

- [1] 王金水,赵谋明,蒲首丞. 胰蛋白酶水解谷朊粉的酶解产物抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(10): 93- 96.
WANG Jing shui, ZHAO Mou ming, PU Shou cheng. Study on the antioxidative activity of the hydrolysate derived from vital Wheat Gluten by Trypsin[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2005, 26(10): 93- 96. (in Chinese)
- [2] 谢正军,金征宇,徐学明等. 苜蓿叶蛋白及其酶解物抗氧化活性的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 627- 631.
XIE Zheng jun, JIN Zheng yu, XU Xue ming, etc. Comparison of antioxidant activities of alfalfa leaf protein and its hydrolysates[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 627- 631. (in Chinese)
- [3] 李珂,卜尔红,杨秀华等. 骨蛋白酶解物的抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(6): 773- 776.
LI Ke, BO Er hong, YANG Xiu hua, etc. Study on anti oxidant enzymatic hydrolysis of bone protein[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(6): 773- 776. (in Chinese)
- [4] 肖香,钱静亚,崔凤杰,等. 碱性蛋白酶降解小麦面筋蛋白制备抗氧化产物的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(8): 38- 40.
XIAO Xiang, QIAN Jing ya, CUI Feng jie, etc. Technoogy optimization for alkaline protease hydrolysis of wheat gluten to produce the ant ioxidant activities[J]. **Food Research and Development**, 2009, 30(8): 38- 40. (in Chinese)
- [5] 任海伟,李志忠,王鸣刚等. 超滤对芸豆蛋白酶解物抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 212- 216.
REN Hai wei, LI Zhi zhong, WANG Ming gang, etc. Effect of ultrafiltration on antioxidant activity of kidney bean protein hydrolysates[J]. **Food Science**, 2009, 30(18): 212- 216. (in Chinese)
- [6] 孙月梅,李杨,江连洲. 超滤技术在抗氧化大豆肽制备中的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(02): 94- 96.
SU N Yue mei, LI Yang, JIANG Lian zhou. Study on ultra filtration technology of the preparation of soybean peptide[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2009, 30(02): 94- 96. (in Chinese)
- [7] 孔祥珍,周惠明,王洪燕. 碱性蛋白酶水解小麦面筋蛋白的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 9: 104- 105.
KONG Xiang zhen, ZHOU Hui ming, WANG Hong yan. Study on hydrolysis of wheat gluten by alcalase[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2009, 9: 104- 105. (in Chinese)
- [8] Zhu, K X, Zhou, H M, Qian, H F. Antioxidant and free radical scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase[J]. **Process Biochemistry**, 2006, 41, 1296- 1302.
- [9] Wu, H C, Chen, H M., Shiau, C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. **Food Research International**, 2003, 36, 949- 957.
- [10] Kim J S, Lee Y S. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/ glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time [J]. **Food Chemistry**, 2009, 116, 227- 232.
- [11] 郭晓娜,崔颖,张晖,等. 苦荞麦蛋白质酶解产物的抗氧化活性研究[J]. 粮食与饲料工业, 2009, 7: 18- 20.
GUO Xiao na, CUI Ying, ZHANG Hui, et al. Study on antioxidative activity of the hydrolysate Buckwheat protein hydrolysates[J]. **Cereal and Feed Industry**, 2009, 7: 18- 20. (in Chinese)
- [12] 吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学食品科学, 2003.