

固态发酵生产菜籽肽及其清除自由基能力的研究

何 荣, 鞠兴荣*, 袁 建, 王立峰

(南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省粮油品质控制及深加工技术重点实验室, 江苏 南京 210003)

摘 要: 以菜籽粕为原料, 氮溶解指数、氨基酸态氮、肽含量、蛋白酶活力为评价指标, 研究枯草芽孢杆菌固态发酵生产菜籽肽的动态效果, 探讨菜籽肽清除自由基的能力。结果显示, 随着发酵时间的延长, 蛋白酶活力、氮溶解指数和多肽含量呈先升高后降低趋势, 在发酵中期(3d)达到最大值, 分别为1840U/ml、70%和7.5mg/ml; 菜籽肽清除自由基的能力与菜籽肽的浓度呈正相关, 7.5mg/ml的菜籽肽对DPPH·、超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除率分别为88.5%、71.2%和83.1%; 凝胶过滤色谱分析结果表明, 随着发酵的进行, 产生了许多小分子质量菜籽肽, 并且分子量越小的菜籽肽清除自由基的能力越强。

关键词: 固态发酵; 菜籽肽; 清除自由基能力

Production by Solid-state Fermentation and Free Radical Scavenging Activities Rapeseed Peptides

HE Rong, JU Xing-rong*, YUAN Jian, WANG Li-feng

(College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Key Laboratory of Grain and Oils Quality Control and Deep-Utilizing Technology of Jiangsu Province, Nanjing 210003, China)

Abstract: In the solid-state fermentation process of rapeseed meal by *Bacillus subtilis* 10160, nitrogen solubility index, amino acid nitrogen, protease activity and peptide content in fermentation liquid were measured at intervals of 0.5 h, and antioxidant activities of produced peptides were evaluated by various assays, including DPPH radical scavenging, superoxide anion radical scavenging and hydroxyl radical scavenging. Results showed that protease activity, nitrogen solubility index and peptide content all exhibited a tendency to first increase and then decrease as prolonging of fermentation time and reached peak values at mid-fermentation (3d), which were 1840 U/ml, 70% and 7.5 mg/ml respectively. A positive correlation was found between free radical-scavenging activities and concentration of rapeseed peptides, and the scavenging rates against DPPH radicals, superoxide anion radicals and hydroxyl radicals were 88.5%, 71.2% and 83.1%, respectively at concentration of 7.5 mg/ml. Gel filtration chromatographic analysis showed that a lot of low molecular weight peptides were produced at mid-fermentation. Peptides of lower molecular weight had stronger free radical-scavenging activities.

Key words: solid-state fermentation; rapeseed peptide; free radical scavenging activity

中图分类号: Q514.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0259-04

菜籽蛋白水解物中存在具有抗氧化性的活性肽, 这类活性肽能抑制机体内自由基的大量积累, 具有清除自由基、延缓机体衰老、调节机体免疫等生理功能^[1-2], 其纯化后可以作为食品添加剂和保健食品因子, 开发成具有多种保健功能的新型食品, 具有广泛的应用前景。

枯草芽孢杆菌具有丰富的蛋白酶系, 广泛地应用于酱油、纳豆、大豆肽和细菌蛋白酶的生产^[3-5]。用该菌

发酵菜籽粕生产菜籽活性肽, 一方面可以降低生产成本, 节省大量昂贵的生物酶制剂; 另一方面能有效降解菜籽粕中的有毒物质^[6], 达到人和动物的食用标准。为此, 本实验探讨枯草芽孢杆菌固态发酵生产菜籽肽的动态效果, 并观察由此生产的菜籽肽清除自由基的作用, 为开发利用低成本、高溶解性和抗氧化性的菜籽肽打下了良好基础。

收稿日期: 2009-05-15

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z331); 江苏省六大人才高峰项目(2006-2009)

作者简介: 何荣(1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物蛋白资源的开发和利用。E-mail: ronghe.nufe@163.com

* 通讯作者: 鞠兴荣(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品资源综合利用。E-mail: xingrongju@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株 *Bacillus.Subtilis* 10160 等产蛋白酶菌种由中国工业微生物菌种保藏中心提供; 菜籽粕以 canola 菜籽为原料, 通过浸提脱油制得, 粗蛋白含量 42.52%, 换算系数为 6.25, 水分 8.39%。

牛血清白蛋白, 细胞色素、钴胺酰胺(VB₁₂)、Gly-Gly-Tyr-Arg、2,2-二苯基-1-苦味肼基自由基(DPPH·) Sigma 公司; 2-脱氧-D-核糖(Alfa Aesar)、抗超氧阴离子自由基试剂盒 南京建成生物有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

立式电热压力蒸汽灭菌锅 上海中安医疗器械厂; 超净工作台 苏净集团安泰公司; PHS-3C 型精密数显 pH 计 上海精密科学仪器厂; GL-20B 型高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; PQX 型多段可编程培养箱 宁波东南仪器有限公司; 722N 紫外可见分光光度计 上海精密科学仪器厂; AKTA 蛋白质纯化仪 通用电气公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基

斜面培养基: 牛肉膏 0.3g、蛋白胨 1.0g、NaCl 0.5g、营养琼脂 2.0g、100ml 自来水, pH7.2~7.4; 种子培养基: 牛肉膏 0.3g、蛋白胨 1.0g、NaCl 0.5g、100ml 自来水, pH7.2~7.4; 发酵培养基: 菜籽粕、葡萄糖、KH₂PO₄、蒸馏水, pH7.0。

1.3.2 发酵剂的制备

从活化后的菌种保藏斜面中, 挑取两环枯草芽孢杆菌接种于种子培养基中, 8 层纱布封口, 35℃, 120r/min, 摇床培养 24h, 使菌体浓度达到 10⁸ 个/ml。按 3 × 10⁷ 个/ml 的接种量将液体种子接入已灭菌的无菌水中, 无菌水中事先加入了葡萄糖(0.3%, m/V)和 KH₂PO₄(0.5%, m/V), 调 pH7.0, 即得发酵剂。

1.3.3 固态发酵

将菜籽粕粉碎至粒径大小为 500 μm, 灭菌, 按固液比 1:2 的比例加入发酵剂, 调发酵温度为 30℃, 环境湿度为 90%, 定时搅拌通风, 每隔 0.5d 取样, 按固液比 1:15 的比例加蒸馏水溶解发酵培养基, 搅拌 30min, 2~4℃, 10000 × g 条件下离心 15min; 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤上清液, 除去不溶物和细菌, 得到发酵处理液, 备用。

1.3.4 氮溶解指数的测定

按照文献[7]所述方法进行测定。

1.3.5 氨基酸态氮的测定

按照文献[8]所述方法进行测定。

1.3.6 多肽含量测定

参照文献[9]所述方法, 取一定量处理液, 加入等体积 10% 的三氯乙酸(TCA), 静置 30min, 2~4℃, 5000 × g 条件下离心 15min, 取 2ml 上清液, 加 8ml 双缩脲试剂, 25℃下静置 30min, 测 A_{540nm} 值, 通过 Gly-Gly-Tyr-Arg 肽标准曲线, 得出处理液中的肽含量。

1.3.7 发酵处理液中蛋白酶活力的测定

以酪蛋白(2%)为底物, 按国标 SB/T10317—1999, 采用 Folin-酚法测定。40℃下, 以每分钟 1ml 酶溶液水解酪蛋白产生 1 μg 的 TCA 可溶酪氨酸的酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.3.8 菜籽肽清除自由基能力的测定

1.3.8.1 DPPH·清除能力的检测

采用 DPPH·氧化法测定^[10]。在洁净试管中加入不同发酵时间的样品处理液 ml, 再加入 2ml 0.1mmol/L 的 DPPH·无水乙醇溶液, 混匀, 室温下避光静置 30min 后, 测 A_{517nm} 值, 按公式(1)计算发酵处理液清除 DPPH·的能力。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100 \quad (1)$$

式中: A₀ 为 DPPH·无水乙醇溶液(空白对照)的吸光度; A_i 为 DPPH·无水乙醇溶液 + 样品的吸光度; A_j 为无水乙醇 + 样品的吸光度。

1.3.8.2 清除超氧阴离子自由基能力的测定

清除超氧自由基能力的测定依据试剂盒说明书。在反应系统中, 每升发酵液在 37℃反应 40min 所抑制的超氧阴离子自由基相当于 1mg 的 VC 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位。

1.3.8.3 清除羟基自由基能力的测定

采用脱氧核糖氧化法测定^[11], 在 10ml 试管中依次加入 0.1ml 样品溶液, 0.4ml KH₂PO₄-NaOH 缓冲液(50mmol/L, pH7.4), 0.1ml EDTA 溶液(1mmol/L), 0.1ml 过氧化氢溶液(10mmol/L), 0.1ml VC(2mmol/L), 0.1ml 的脱氧核糖溶液(60mmol/L), 0.1ml FeCl₃(1mmol/L), 各管最终体积 1.0ml, 混合后置于 37℃恒温水浴中反应 1h, 取出加入 1.0ml 20%(m/V)三氯乙酸(TCA)溶液, 再加入 1.0ml 1.0% 的硫代巴比妥酸(TBA)溶液, 混匀, 100℃沸水浴反应 15min, 取出冰水浴冷却后, 测 A_{532nm}(如有浑浊, 需离心或用正丁醇萃取后再测 A_{532nm})按公式(2)计算发酵处理液清除羟基自由基能力。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - \frac{A_s - A_e}{A_0}) \times 100 \quad (2)$$

式中: A_s 为样品的吸光度; A_e 为样品空白(不加脱

氧核糖)的吸光度; A_0 为试剂空白(不加样品)的吸光度。

1.3.9 菜籽多肽分子量分布的测定

采用凝胶过滤色谱法测定。色谱条件: Superose 12 10/300 GL(10mm × 300mm)柱; 流动相 50mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.0, 0.15mol/L NaCl; 流速 0.5ml/min; 进样体积 500 μ l; 检测波长 215nm。分子量标品为牛血清白蛋白(分子量 M_w 67000D)、细胞色素 (M_w 12700D)、钴胺酰胺(VB₁₂, M_w 1355D)、Gly-Gly-Tyr-Arg(M_w 451.48D)。处理液稀释 5 倍后测量。

1.3.10 不同分子量蛋白肽浓度的测定

收集不同保留体积蛋白肽后按福林-酚(lowry)法测定其蛋白肽含量^[12]。

2 结果与分析

2.1 菜籽粕发酵生产菜籽肽动态研究

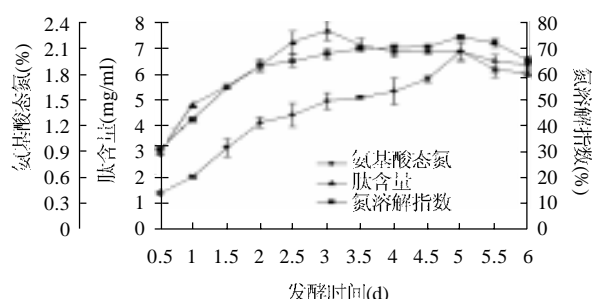


图1 不同发酵时间处理液中的多肽、氨基酸态氮和水溶性氮含量
Fig.1 Contents of polypeptide and amino acid nitrogen and nitrogen solubility index in fermentation liquid at different fermentation time

为研究枯草芽孢杆菌固态发酵生产菜籽肽的发酵效率, 测定了不同时间发酵处理液中的多肽、氨基酸态氮和水溶性蛋白含量(用氮溶解指数表示), 结果如图1所示。在发酵前期(0.5~3d), 处理液中多肽含量随着发酵时间的延长显著上升, 并在第3天达到最高值(7.5mg/ml), 之后逐渐降低; 而氨基酸态氮和氮溶解指数的变化在发酵前5d都呈现出递增趋势, 到第5.5天开始下降, 其中在发酵后期(3~5d)氮溶解指数变化不大, 而氨基酸态氮则持续增加。这说明在发酵过程中枯草芽孢杆菌产生的蛋白酶先将菜籽蛋白水解成菜籽肽, 随着时间的延续, 发酵深度加强, 将部分菜籽蛋白和菜籽肽水解成了游离的氨基酸, 发酵后期(5d以后), 由于微生物生长繁殖利用了菜籽粕中的氮源, 从而导致上述3个指标又有所下降。从固态发酵生产菜籽肽的角度看, 发酵时间为3d是最合适的。

2.2 发酵菌株产蛋白酶动态研究

对不同时间发酵产蛋白酶活力的研究可以看出(图2), 随着发酵时间的延长枯草芽孢杆菌产蛋白酶的酶活

力逐渐增大, 第3.5天达到最大值1840U/ml, 之后随之减小。原因可能是由于发酵后期菌体进入衰亡期或者是发酵体系的理化条件(如pH值、C/N)发生了不利于菌株生长繁殖的变化, 导致其代谢能力减弱, 所分泌的蛋白酶量相应减少。

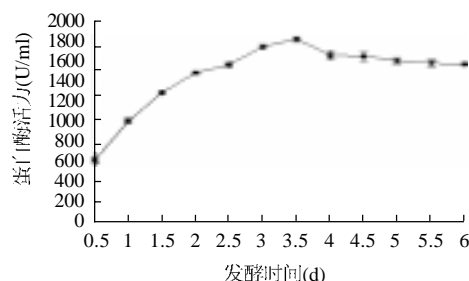


图2 不同发酵时间处理液中的蛋白酶活力
Fig.2 Protease activity in fermentation liquid at different fermentation times

2.3 发酵产菜籽肽清除自由基能力动态研究

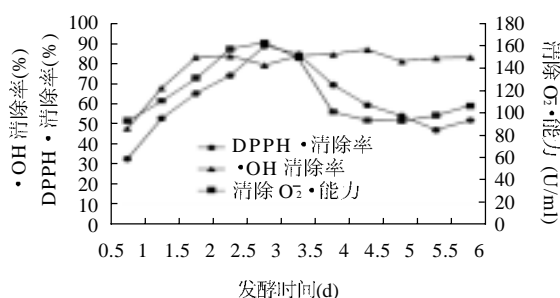


图3 不同发酵时间处理液中菜籽肽清除自由基的能力
Fig.3 Free radical-scavenging activities of rapeseed peptides produced at different fermentation times

图3给出了不同发酵时间处理液中菜籽肽清除自由基的能力结果。通过比较菜籽肽对不同自由基的清除能力, 可以看出, 随着发酵时间的增加, 处理液中菜籽肽的浓度发生变化(图1), 对DPPH·和O₂·⁻的清除能力呈先增加后减少趋势, 在第2.5天达到最大值(此时菜籽肽浓度为7.5mg/ml), 分别为88.5%和71.2%(活力为0.163U/ml); 而对·OH的清除率自第1.5天达到最大值83.1%后一直保持不变, 可能因为羟基自由基是化学性质非常活泼的一种活性氧分子, 能同时与菜籽肽和菜籽蛋白发生反应^[2]。以上分析表明, 菜籽肽具有较强的自由基清除能力, 并且与菜籽肽的浓度呈正相关。

2.4 不同发酵时间处理液中菜籽蛋白肽的分子量分布

为了解发酵过程菜籽肽分子量大小的变化情况, 利用凝胶过滤色谱对不同时间发酵处理液中的菜籽蛋白肽分子量分布进行研究。从图4可以看出, 发酵1d后, 处理液中以大分子量的蛋白肽为主, 小分子量多肽很少, 随着发酵的进行(3d), 水溶性氮逐渐升高(峰分而

积增大),大分子量的长链肽逐步被酶解,含量降低,发酵液中主要为短链肽($M_w 180 \sim 3000D$),到第5天时,由于水解深度的加强和微生物的利用,使小分子量的菜籽肽和氨基酸大量减少。同时研究不同峰值分子量蛋白肽清除自由基的能力(表1),可以看出,相同浓度时,蛋白肽的分子量越小,对DPPH·的清除能力越强,分子量180D的菜籽肽在浓度26.9 $\mu g/ml$ 时对DPPH·、·OH清除率和抗 $O_2^{\cdot-}$ 能力达到14.60%、26.08%和36.85U/L,这也说明小分子量的菜籽肽可能具有更高的抗氧化性。

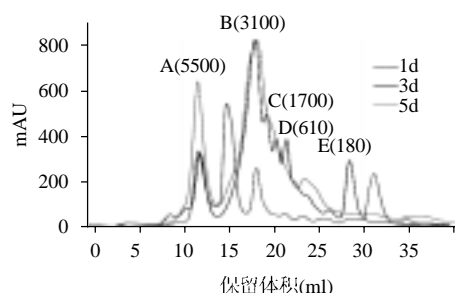


图4 不同发酵时间处理液中菜籽肽的分子量分布

Fig.4 Molecular weight distribution of rapeseed peptide in fermentation liquid at different fermentation time

表1 不同分子量菜籽肽清除DPPH·的能力

Table 1 Free radical scavenging activities of rapeseed peptides of different molecular weight

出峰编号	A	B	C	D	E
蛋白肽浓度($\mu g/ml$) *	94.1	166.4	86.9	52.9	26.9
DPPH·清除率(%)	16.23	32.05	19.68	19.68	14.60
·OH清除率(%)	30.80	25.09	31.05	26.27	26.08
抗 $O_2^{\cdot-}$ 能力(U/L)	26.57	37.07	29.25	28.50	36.85

注:*.收集出峰体积后按福林-酚法测定蛋白肽含量^[12]。

3 结论

本研究利用枯草芽孢杆菌固态发酵所产的蛋白酶,水解菜籽粕中蛋白质,制备具有清除自由基能力的菜籽肽。上述分析结果可以得出以下结论:

枯草芽孢杆菌发酵菜籽粕提高了菜籽粕中菜籽蛋白的溶解性,发酵得到的菜籽肽具有较强的清除自由基的能力,该能力与菜籽肽的浓度呈正相关,菜籽肽浓度为7.5mg/ml时对DPPH·、 $O_2^{\cdot-}$ 和·OH的清除率分别为88.5%、71.2%和83.1%,并且分子量越小的菜籽肽对DPPH·的清除能力越强,分子量180D的菜籽肽在浓度26.9 $\mu g/ml$ 时,DPPH·、·OH清除率和抗 $O_2^{\cdot-}$ 能力达到14.60%、26.08%和36.85U/L。同时,从固态发酵生产菜籽活性肽的角度看,发酵时间为3d是最合适的。

参考文献:

- [1] 薛照辉,吴谋成,罗祖友,等.菜籽肽清除自由基作用的研究[J].食品工业科技,2005,21(10):71-75.
- [2] CUMBY N, ZHONG Y, NACZK M, et al. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 144-148.
- [3] MOKTAN B, SAHA J, SARKAR P K. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema[J]. Food Research International, 2008, 41(6): 1-8.
- [4] SHIEH C J, THI L A P, SHIH I L. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 43(1): 85-91.
- [5] 李然,邢介帅,韩立英,等.枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶突变株的筛选及其拮抗作用[J].应用与环境生物学报,2008,14(2):231-234.
- [6] 董绪燕,胡小加,江木兰,等.采用枯草芽孢杆菌发酵菜籽饼粕生产溶栓酶条件的优化[J].中国油料作物学报,2008,30(2):239-241.
- [7] GB/T 5511—1985 粮食、油料检验粗蛋白质测定法[S].
- [8] 大连轻工业学院.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994:234-235.
- [9] 鲁伟,任国谱,宋俊梅.蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J].食品科学,2005,26(7):169-171.
- [10] TEPE B, SOKMEN M, AKPULAT H A, et al. *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey[J]. Food Chemistry, 2005, 92(1): 89-92.
- [11] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C, ARUOMA O I. The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals[J]. Anal Biochem, 1987, 165: 215-219.
- [12] 郭勇.现代生化技术[M].广州:华南理工大学出版社,1996.