

小米多肽的制备及其抗氧化功能研究

刘剑利, 曹向宇*

(辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要: 采用碱性蛋白酶 Alcalase 水解小米蛋白, 以二苯代苦味肼基(DPPH)自由基清除率为指标, 通过单因素试验和正交试验确定小米多肽最佳制备条件, 用硝基四氮唑蓝(NBT)还原试验、脱氧核糖法检测其对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot OH$)的清除能力, 分光光度法测定小鼠红细胞溶血和肝线粒体 MDA 生成量。结果表明: 碱性蛋白酶 Alcalase 制备小米多肽的最佳酶解条件为 pH8.5、[E]/[S]5%、温度 40℃、时间 3.5h、对 DPPH 自由基、 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的清除率分别为 68.93%、40.06% 和 48.63%, 并具有明显抑制氧化溶血现象和 $\cdot OH$ 诱导线粒体氧化损伤的功能, 表明小米多肽具有较强的抗氧化功能。

关键词: 小米多肽; 制备; 抗氧化

Preparation and Antioxidation *in vitro* of Millet Peptides

LIU Jian-li, CAO Xiang-yu*

(Faculty of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: Millet peptides were prepared by means of alcalase hydrolysis, and the optimum enzymatic hydrolysis parameters were determined by single-factor test and orthogonal design. Then their scavenging activity to superoxide anion radical and hydroxyl radical were detected by nitroblue tetrazolium (NBT) test and deoxyribose method, and the extent of erythrocytalysis and the formation of malondialdehyde (MDA) in liver mitochondria were detected by spectrophotometric method. The results showed that the optimum preparation conditions for millet peptides are hydrolysis with 5% of concentration ratio of enzyme to substrate at pH 8.5 and 40℃ for 3.5 h. The scavenging activity of millet peptides to DPPH radical, superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) are 68.93%, 40.06% and 48.63%, respectively. Moreover, the millet peptides can effectively inhibit the hemolysis of red blood cells and the damage of mitochondria. Therefore, they have significant antioxidant.

Key words: millet peptides; preparation; antioxidation

中图分类号: Q514.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0064-04

随着自由基研究的不断深入, 氧化应激损伤和抗氧化保护作用的理论引起广泛关注, 活性氧自由基导致的氧化损伤被认为是引起衰老、细胞损伤、组织伤害和细胞癌变的原因之一。因此寻找高效、低毒的抗氧化剂已成为医学和食品科学研究的新趋势^[1], 抗氧化肽由于其重要功能和优越性而越来越受到人们的关注, 已成为国内外研究的热点^[2]。

小米是我国主要的粮食品种之一, 其种植和加工都有着悠久的历史。小米营养丰富, 其蛋白含量 9.28%, 是一种优质的植物蛋白资源^[3]。目前国内小米的应用主要还停留在初级加工阶段^[2], 产品附加值低, 并且国内外未见小米多肽的研究报道。为进一步扩大小米在食品

及药品领域的应用范围, 本研究在提取小米蛋白的基础上, 通过酶法制备小米多肽, 以清除 DPPH 自由基为指标, 确定最佳制备条件, 并对其抗氧化活性进行深入研究, 为小米多肽的大规模工业化生产提供理论依据和工艺参数, 为小米进一步深加工奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小米(朝阳新谷 5 号) 朝阳市农业高新技术研究所; SD 大鼠 中国医科大学实验动物中心。

碱性蛋白酶 Alcalase(2.4AU/g); 丙二醛(MDA)测定试剂盒 南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为国产

收稿日期: 2008-07-03

基金项目: 辽宁省科技厅科技攻关项目(2004205001)

作者简介: 刘剑利(1980-), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: jianlililiu@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 曹向宇(1980-), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: xiangyucuo@sohu.com

分析纯。

1.2 仪器与设备

PB-10 标准型 pH 计 德国 Sartorius 公司; SCR 20BC 型高速冷冻离心机 日本日立公司; 721 型分光光度计 中国上海第三分析仪器厂; HH-6 型数显恒温水浴锅 金坛市城东科辉仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 小米蛋白制备的工艺流程

小米 粉碎 过筛(20 目) 稀碱浸泡 3h(pH10) 胶体研磨 离心 20min(5000r/min) 取上清液 90% 硫酸铵沉淀 离心 20min(5000r/min) 沉淀 溶解沉淀 大孔树脂脱盐 冷冻干燥 小米蛋白

1.3.2 蛋白含量测定

蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法^[4]。

1.3.3 小米多肽最佳制备工艺研究

1.3.3.1 单因素试验

取小米蛋白制备 8% (W/V) 的悬浮液, 按不同 pH 值、酶与底物浓度比([E]/[S])、温度和时间进行酶解, 沸水浴 10min 灭酶, 离心 15min(3500r/min), 取上清液进行分析测定。在其他因素确定的条件下分别采用脱氧核糖法测定 pH 值、[E]/[S]、温度和酶解时间各单因素对小米多肽清除 DPPH 自由基的影响。

1.3.3.2 正交试验

在单因素试验的基础上, 确定正交试验各因素的水平, 以 DPPH 自由基的清除率为指标, 同时用 pH-stat 法测定水解度(DH)^[5], 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 确定小米多肽制备的最佳工艺参数。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案

Table 1 Experimental scheme of orthogonal test $L_9(3^4)$

水平	pH	[E]/[S] (%)	温度(°C)	时间(h)
1	8	4	40	2.5
2	8.5	5	45	3
3	9	6	50	3.5

1.3.4 体外抗氧化活性实验

按正交试验确定最佳制备条件制备小米多肽, 进行体外抗氧化活性实验。

1.3.4.1 抗自由基能力测定

清除 DPPH 自由基能力测定参照文献^[6]; 清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力测定采用 NBT 法^[7]; 清除 $\cdot OH$ 能力测定采用脱氧核糖法^[8]。

1.3.4.2 H_2O_2 诱导的红细胞氧化溶血实验^[9]

取 SD 大鼠, 眼球取血, 分离红细胞, 生理盐水洗涤三次后制成 0.5% 的悬液, 取红细胞悬液 1.0ml 于试管中, 加入小米多肽 20 μl , 用生理盐水定容至 1.25ml,

最后加入 0.25ml (200mmol/L) 的 H_2O_2 启动反应, 37 °C 温育 1h 后, 用 4.5ml 生理盐水稀释, 6000r/min 离心 5min, 取上清液, 测定 OD_{415nm} 。

1.3.4.3 影响肝脏线粒体 MDA 生成量的测定^[10]

制备大鼠肝脏线粒体, 取 1ml 肝脏线粒体悬浮液, 加入 0.4ml 不同浓度的小米多肽和 0.4ml 0.5mmol/L 的 $FeSO_4$ 、0.4ml 0.5mmol/L 的 VC 溶液, 对照组以等体积 PBS 代替小米多肽溶液, 混匀于 37 °C 温育 1h 后测 A_{532nm} 。

2 结果与分析

2.1 小米多肽制备单因素试验

2.1.1 pH 值对酶解反应的影响

酶与底物蛋白的结合与催化反应都有一个最适宜的 pH 值。在 [E]/[S] 为 5%, 温度为 50 °C, 水解时间 3h 条件下, 选择不同的 pH 值进行水解。由图 1 可知, 当 pH 值为 8.5 时, 酶解反应所得到的小米多肽对自由基的清除能力最强。

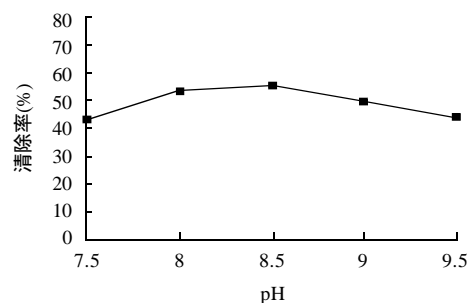


图 1 pH 值对小米多肽清除 DPPH 自由基活性的影响

Fig.1 DPPH radical scavenging activities of hydrolyzed millet protein at different pH values

2.1.2 [E]/[S] 对酶解反应的影响

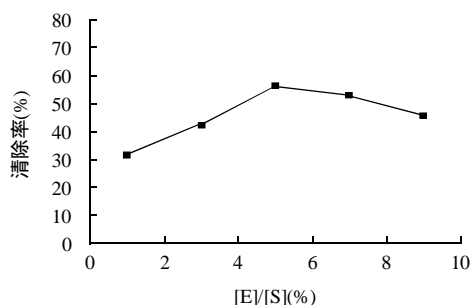


图 2 [E]/[S] 对小米多肽清除 DPPH 自由基活性的影响

Fig.2 DPPH radical scavenging activities of hydrolyzed millet protein at different concentration ratios of alkalase to substrate

小米多肽对 DPPH 自由基的清除能力取决于底物的水解度, 而底物的水解度随 [E]/[S] 的变化而变化。在 [E] 远小于 [S] 时, 一般认为酶反应速度正比于 [E], 故 [E]/[S]

影响小米多肽对 DPPH 自由基的清除率。图 2 是在 pH8.5、酶解温度 50 、水解 3h, 变化不同的 [E]/[S] 而得到的自由基清除率曲线。可以看出 [E]/[S] 为 5% 时, 小米多肽对 DPPH 自由基的清除率最高。

2.1.3 温度对酶解反应的影响

各种催化反应都有最适的温度。在 pH8.5、[E]/[S] 5% 及反应 3h 条件下考察不同的温度对酶解反应的影响。由图 3 可知, 温度为 35 时清除率开始上升, 40 达到较高水平, 45 以后开始下降, 故 45 为该酶解反应最适作用温度。

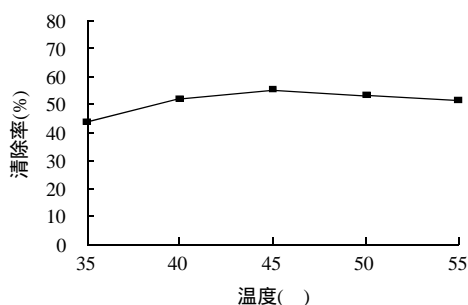


图3 温度对小米多肽清除 DPPH 自由基活性的影响

Fig.3 DPPH radical scavenging activities of hydrolyzed millet protein at different temperatures

2.1.4 时间对酶解反应的影响

时间影响酶的催化反应。随着反应时间的延长, 水解度逐渐增大, 小米多肽对自由基清除 DPPH 率也随之增大, 当底物的水解度超过了小米多肽清除 DPPH 自由基能力的最适水解度时, 小米多肽对自由基的清除率随之下降。从图 4 可以看出, 在 pH8.5、[E]/[S] 5%、温度 45 的条件下, 以水解 3h 效果最佳。

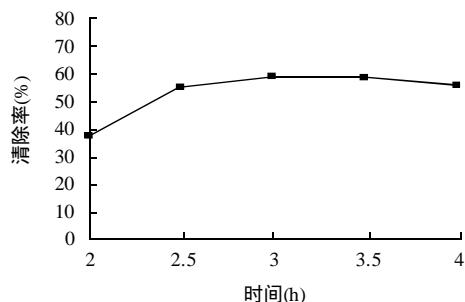


图4 时间对小米多肽清除 DPPH 自由基活性的影响

Fig.4 DPPH radical scavenging activities of hydrolyzed millet protein at different hydrolysis time

2.2 小米多肽最佳酶解工艺条件的确定

从表 2 可以看出, 就水解度而言, 极差值反映出影响水解度的各因素的排列顺序为 A>C>B>D, 最佳酶解条件为 A₃B₃C₂D₃, 即 pH9、[E]/[S] 6%、温度 45 、时间 3.5h、在此条件下水解度可达 31.39%; 对清除 DPPH

自由基能力而言, 极差值反映出影响自由基清除能力的各因素的排列顺序为 B>C>A>D, 最佳酶解条件为 A₂B₂C₁D₃, 即 pH8.5、[E]/[S] 5%、温度 40 、时间 3.5h, 在此条件下验证小米多肽对 DPPH 自由基的清除率为 68.93%。从表 2 还可以看出, 底物的水解度与小米多肽对 DPPH 自由基的清除能力间并不存在线性关系, 只有在特定的水解度时, 清除能力最强, 超过或者低于这个水解度, 清除能力下降。本实验目的是制备抗氧化肽, 故最佳制备条件为 A₂B₂C₁D₃, 即 pH8.5、[E]/[S]=5%、温度 40 、时间 3.5h。

表2 正交试验结果

Table 2 Results and range analysis of orthogonal test

试验号	A pH	B [E]/[S] (%)	C 温度(°C)	D 时间(h)	DH (%)	清除率(%)
1	8	4	40	2.5	20.62	47.52
2	8	5	45	3	27.81	51.63
3	8	6	50	3.5	29.45	53.04
4	8.5	4	40	3.5	23.61	48.68
5	8.5	5	50	2.5	21.68	58.89
6	8.5	6	45	3	18.62	57.34
7	9	4	50	3	25.91	46.90
8	9	5	40	3.5	27.78	60.22
9	9	6	45	2.5	31.36	48.71
DH	K ₁	25.96	23.38	22.34	24.55	
	K ₂	21.30	25.76	27.59	24.11	
	K ₃	28.35	26.48	25.68	26.95	
	R	7.05	3.10	5.25	2.83	
清除率	K ₁	50.73	47.70	55.03	51.71	
	K ₂	54.97	56.91	49.67	51.96	
	K ₃	51.94	53.03	52.54	53.98	
	R	4.24	9.21	5.35	2.27	

2.3 体外抗氧化活性实验

2.3.1 抗自由基能力测定

经测定小米多肽对 O₂· 和 ·OH 都有较好的清除效果, 对 O₂· 和 ·OH 的清除率分别为 40.06% 和 48.63%, 说明制备的小米多肽具有较高的清除 O₂· 和 ·OH 的能力, 并且在该条件下制备的小米多肽清除 ·OH 的能力更强。

2.3.2 小米多肽对 H₂O₂ 诱导的红细胞氧化溶血实验的抑制作用

表3 小米多肽对 H₂O₂ 诱导的红细胞氧化溶血的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 3 Effects of different concentrations of millet peptides on hemolysis of red blood cells induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	浓度(mg/ml)	A 值	抑制率(%)
对照	-	0.78 ± 0.03	-
	20	0.45 ± 0.03*	42.31
小米多肽	40	0.32 ± 0.01*	58.97
	80	0.20 ± 0.02*	74.36

注: *. 与对照组比较, 差异极显著(p<0.01)。下同。

红细胞中加入 H_2O_2 后, 红细胞膜氧化受损, 导致溶血现象。加入小米多肽后, 明显抑制了氧化溶血现象的发生, 实验结果见表 3。小米多肽对 H_2O_2 诱导的红细胞氧化溶血的抑制作用在 3 个浓度水平上(20、40、80mg/ml)均达到了显著水平($p < 0.01$), 且表现出一定的剂量 - 效应关系。说明在本实验条件下所制备的小米多肽能明显抑制溶血反应的发生, 有效保护红细胞结构的完整性。

2.3.3 小米多肽对肝脏线粒体 MDA 生成量的影响

表 4 小米多肽对肝脏线粒体 MDA 生成量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effects of different concentrations of millet peptides on formation of malondialdehyde (MDA) in mouse liver mitochondria ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度(mg/ml)	MDA (nmol/mg 蛋白)	MDA 生成抑制率(%)
对照	-	68.83 ± 5.62	-
小米多肽	20	$51.26 \pm 4.85^*$	25.53
	40	$43.71 \pm 9.66^*$	36.50
	80	$35.18 \pm 6.93^*$	44.89

在实验剂量下小米多肽均能抑制 Fe^{2+} -VC 诱导的肝脏线粒体脂质过氧化产物 MDA 的生成, 抑制作用随浓度的增加而增强, 高剂量下效果最明显。结果表明小米多肽对大鼠肝线粒体损伤具有保护作用(表 4)。

3 结 论

本研究以小米为原料制备具有较高抗氧化活性的小

米多肽, 结果表明, 以碱性蛋白酶 Alcacase 制备小米多肽的最佳酶解条件为 pH8.5、[E]/[S]5%、温度 40℃、时间 3.5 h, 制备的小米多肽对 DPPH 自由基、 $O_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot OH$ 的清除率分别为 68.93%、40.06% 和 48.63%, 能减少红细胞溶血, 减轻肝脏线粒体 MDA 生成量, 说明小米多肽具有较强的抗氧化功能。本研究为小米多肽的工业化生产提供理论依据和工艺参数, 从而为小米多肽更加广泛的应用于功能食品领域提供依据, 其体内抗氧化活性和抗氧化作用机理有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 程云辉, 王璋, 许时婴. 酶解麦胚蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 147-151.
- [2] 张昊, 任发政. 天然抗氧化肽的研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 443-447.
- [3] 张超, 张晖, 李冀新. 小米的营养以及应用研究进展[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(1): 51-55; 78.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 138-140.
- [5] 郭敏亮. 由豆粕制备大豆肽饮料[J]. 食品科学, 1992, 13(4): 1-3.
- [6] 曹伟, 卢珂, 陈卫军, 等. 不同种类蜂蜜抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 352-356.
- [7] 吕淑霞. 基础生物化学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 77-82.
- [8] 陈美珍, 余杰, 郭慧敏. 大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 43-46.
- [9] 王关林, 田兵, 方宏筠, 等. 芦荟抗氧化物质活性及对红细胞的保护作用[J]. 营养学报, 2002, 24(4): 380-383.
- [10] 朱艳华, 谭军. 玉米多肽对大鼠体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 463-465.